

基于 N 蛋白小反刍兽疫病毒单克隆抗体的制备及阻断 ELISA 方法的建立

孟卫芹¹,董 帅²,陈金龙³,唐 娜¹,石竞楠⁴,郭 璐¹,宋晶晶¹,王金良^{1*} (1.山东省滨州畜牧兽医研究院,山东 滨州 256600;2.河北工程大学 生命科学与食品工程学院,河北 邯郸 056000;3.石河子大学 动物科技学院,新疆 石河子 832003;4.内蒙古民族大学 生命科学与食品学院,内蒙古 通辽 028043)

摘要:为建立一种小反刍兽疫病毒(PPRV)抗体的快速检测方法,本研究将 pET-32a-N 重组质粒转化至 *E.coli* BL21 (DE3)感受态细胞中,经 IPTG 诱导表达、纯化获得重组蛋白并免疫 BALB/c 小鼠,制备了抗 PPRV-N 蛋白的单克隆抗体并进行 HRP 标记,通过优化反应条件建立了 PPRV 阻断 ELISA 抗体检测方法。经评价该方法与 PIV、GTPV、ORFV 的阳性血清均无交叉反应;最低能检出 1 : 160 稀释的阳性血清;批内和批间变异系数(C_v)均小于 10%;通过对 180 份临床血清样品进行检测,该方法与竞争 ELISA 试剂盒的符合率为 96%。表明建立的阻断 ELISA 方法具有良好的特异性、敏感性与可重复性,可用于 PPRV 抗体的检测,为 PPRV 疫苗的免疫效果评估及疫病防控提供了技术支持。

关键词:小反刍兽疫;N 蛋白;单克隆抗体;阻断 ELISA

中图分类号:S852.65 文献标志码:A 文章编号:1005-4545(2024)05-0935-05

DOI:10.16303/j.cnki.1005-4545.2024.05.09

Preparation of monoclonal antibody against peste des petits ruminants virus based on N protein and establishment of a blocking ELISA for detection of antibodies

MENG Weiqin¹, DONG Shuai², CHEN Jinlong³, TANG Na¹, SHI Jingnan⁴, GUO Lu¹, SONG Jingjing¹, WANG Jinliang^{1*} (1. *Shandong Binzhou Animal Science & Veterinary Medicine Academy, Binzhou, Shandong 256600, China*; 2. *College of Life Science and Food Engineering, Hebei University of Engineering, Handan, Hebei 056000, China*; 3. *College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000, China*; 4. *College of Science and Food Engineering, Inner Mongolia Minzu University, Tongliao, Inner Mongolia 028000, China*)

Abstract: To establish a rapid antibody detection method for peste des petits ruminants virus (PPRV), in this study, pET-32a-N recombinant plasmid was transformed into *E.coli* BL21 (DE3) competent cells. The recombinant protein was obtained by IPTG-induced expression and purification, which was used to immunized BALB/c mouse. The monoclonal antibodies against PPRV-N proteins were prepared and HRP-labeled, a PPRV blocking ELISA antibody detection method was established by optimizing the reaction conditions. The method was evaluated to have no cross-reactivity with the positive serum of PIV, GTPV, and ORFV; the lowest positive serum could be detected at a dilution of 1 : 160; the intra- and inter-batch coefficients of variation (C_v) were less than 10%; and the compliance rate between the method and competitive ELISA kit was 96% by testing 180 clinical serum samples. The results showed that the blocking ELISA has good specificity, sensitivity, and reproducibility, and can be used for the detection of PPRV antibodies, which can provide technical support for the evaluation of the immunization effect of PPRV vaccine and the prevention and control of epidemics.

收稿日期:2023-08-15

基金项目:山东省羊产业技术体系岗位专家资助项目(SDAIT-10-06)

作者简介:孟卫芹(1985-),女,助理研究员,硕士。

* 通信作者, E-mail: wjl478@163.com

Keywords: peste des petits ruminants; N protein; monoclonal antibody; blocking ELISA

* Corresponding author, E-mail: wjl478@163.com

小反刍兽疫(peste des petits ruminants, PPR)简称羊瘟,是由小反刍兽疫病毒(PPR virus, PPRV)感染家养(山羊、绵羊)和野生(水牛、羚羊等)小反刍动物引起的一种急性烈性接触性传染病^[1-2]。感染后主要以口炎、发热和腹泻为主,以高发病率和病死率为特征,被世界动物卫生组织(World Organization for Animal Health, WOAH)列为必须上报的重大动物传染病^[3]。PPR于1942年首次在非洲科特迪瓦发现,2007年首次传入我国西藏的阿里地区,被迅速控制扑灭;2013年底再次传入我国,并在湖南、山东、辽宁、吉林、内蒙古等多个省份暴发^[4-5]。疫情的暴发给养羊业带来了巨大的经济损失,对全球相关行业的健康发展产生严重威胁,因而在我国被列为一类动物疫病^[6],是国家动物疫病的重点防控对象。

目前对PPR尚无有效的治疗方法,主要靠免疫、监测、扑杀、移动控制等综合防控措施。PPRV疫苗株主要有PPRV-Nigeria75/1、PPRV-Sungri/96、Clone 9株等,可用于防控羊群感染PPRV,均有一定的免疫效果^[7-8]。然而在养殖过程中免疫群体的抗体水平参差不齐,疫苗免疫效果欠佳或免疫失败而导致羊群有感染PPRV的潜在风险^[9]。因此,建立一种PPRV抗体快速检测方法对于PPRV的疫苗免疫效果评估及有效防控具有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 细胞、重组质粒、血清及实验动物

小鼠骨髓瘤细胞SP2/0、*E. coli* BL21(DE3)感受态细胞、携带PPRV N基因的重组质粒(pET-32a-N)、PPRV阴性血清、羊副流感病毒(PIV)、山羊痘病毒(GTPV)、羊口疮病毒(ORFV)和PPRV阳性血清由山东省滨州畜牧兽医研究院兽医生物技术重点实验室保存;PPR活疫苗(Clone9株)购自天康生物股份有限公司;180份临床血清样品为山东滨州及周边地区羊场送检保存;6~8周龄SPF级BALB/c小鼠由济南朋悦实验动物繁育有限公司提供。

1.2 主要试剂

辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠IgG购自北京博奥龙免疫技术有限公司;DMEM培养基购自Gibco公司;弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、

HAT和HT购自Sigma公司;PageRuler™预染蛋白分子量标准购自Thermo Fisher Scientific公司;PPR竞争ELISA抗体检测试剂盒购自兰州兽研生物科技有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.3 重组蛋白的表达与鉴定

将重组质粒pET-32a-N转化至*E. coli* BL21(DE3)感受态细胞,挑取单菌落接种于含氨苄青霉素的LB培养基中,并用IPTG进行诱导表达。离心收集菌体,沉淀用磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L PBS, pH7.4)重悬并超声破碎,离心收集上清经Ni柱纯化得到重组N蛋白,并进行SDS-PAGE分析及Western blot鉴定。

1.4 N蛋白单克隆抗体的制备及鉴定

用纯化的N蛋白与弗氏完全佐剂等体积乳化,以100 μg/只剂量对6~8周龄的BALB/c雌性小鼠进行多点皮下注射,之后每2周用不完全弗氏佐剂乳化的N蛋白进行加强免疫。第3次免疫后2周,采用间接ELISA方法检测小鼠血清抗体滴度,并选择血清滴度高的小鼠进行冲击免疫。3 d后取冲击免疫小鼠脾细胞与SP2/0骨髓瘤细胞进行融合,采用间接ELISA和IFA筛选阳性杂交瘤细胞。通过有限稀释法对阳性杂交瘤细胞孔进行3次亚克隆,直至阳性率达100%,再对阳性孔杂交瘤细胞株进行扩大培养,并制备腹水型单抗。腹水用正辛酸-饱和硫酸铵法进行纯化,使用IFA和间接ELISA方法对制备的单克隆抗体进行鉴定,参照文献^[10]中戊二醛交联改良二步法对单克隆抗体进行HRP标记。

1.5 阻断ELISA检测方法的建立

1.5.1 反应条件的优化

采用棋盘法,将纯化的N蛋白配制成0.1、0.5、1、10 mg/L系列质量浓度,按100 μL/孔包被在酶标板上,4℃过夜包被,用含10%小牛血清的PBS在37℃下封闭1~2 h;将阴性对照、阳性对照按50 μL/孔加入对应酶标孔,37℃温育30 min,用PBST洗涤3次,再将HRP标记的单抗按1:5 000,1:10 000,1:20 000,1:40 000倍比稀释,按50 μL/孔加入酶标板,37℃温育30 min,用PBST洗涤3次;进一步利用棋盘法对样品稀释倍数(按1:1,1:2,1:4,1:8)、底物显色时间(5、10、15、20 min)等条件进行优化,根据阴性对照 D_{450} 值1.0~1.5、阳性对照 D_{450} 值(P)和阴性对照 D_{450} 值(N)的比值即P/N值筛选出阻断ELISA方法的最

佳反应条件。

1.5.2 临界值的确定

根据 WOAHA 推荐的 PPRV 抗体竞争 ELISA 检测方法筛选出 40 份 PPRV 阴性血清,用上述优化的阻断 ELISA 方法进行检测,按如下公式计算抑制率 PI, $PI = [(阴性对照血清 D_{450} - 被检血清 D_{450}) / 阴性对照血清 D_{450}] \times 100\%$,并计算 PI 平均值(\bar{x})和标准差(s),根据参考文献[11]中的方法(临界值= $\bar{x} + 3s$),得出阻断 ELISA 方法的临界值。

1.5.3 特异性试验

选取 PIV、GTPV、ORFV、PPRV 阳性血清及 PPRV 阴性血清,用优化的阻断 ELISA 方法进行检测,每份血清样本均做 3 个重复,以评价该方法的特异性。

1.5.4 敏感性试验

将 PPRV 抗体阳性对照进行 2 倍倍比稀释(1:10~1:640),分别用建立的阻断 ELISA 方法和兰州兽研生物科技有限公司的竞争 ELISA 试剂盒进行检测,比较两者的敏感性。

1.5.5 重复性试验

用同一批次包被的酶标板和不同批次包被的酶标板分别检测 6 份血清样品,每份样品做 3 个重复,计算其变异系数(C_v)以评价该方法的批内和批间重复性。

1.5.6 临床样品的检测

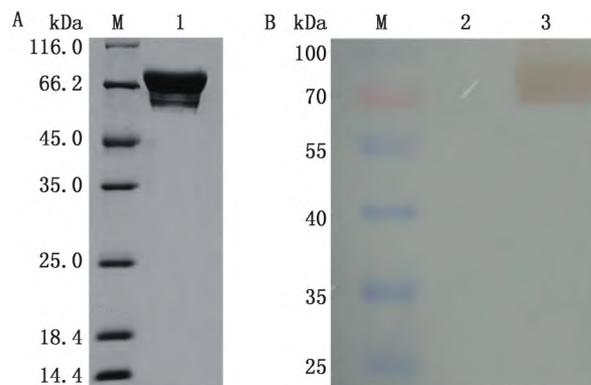
采用优化的阻断 ELISA 方法和 PPR 竞争 ELISA 抗体检测试剂盒分别对 180 份临床血清样品进行检测,比较两者的检测结果,并计算 2 种方法的符合率。

2 结果

2.1 N 蛋白的表达与鉴定结果

重组 N 蛋白经 Ni 柱纯化后进行 SDS-PAGE 分

析(图 1A),在相对分子质量为 79 kDa 处可见单一条带,与预期相符,纯度较高;Western blot 分析结果(图 1B)显示纯化后的 N 蛋白与 PPRV 阳性血清具有良好的抗原反应性。



注:M. 蛋白分子量标准;1. 纯化后的 PPRV N 蛋白;2. pET-32a 空载体对照;3. PPRV N 蛋白。

图 1 PPRV 重组 N 蛋白的 SDS-PAGE 分析(A)及 Western blot 鉴定(B)

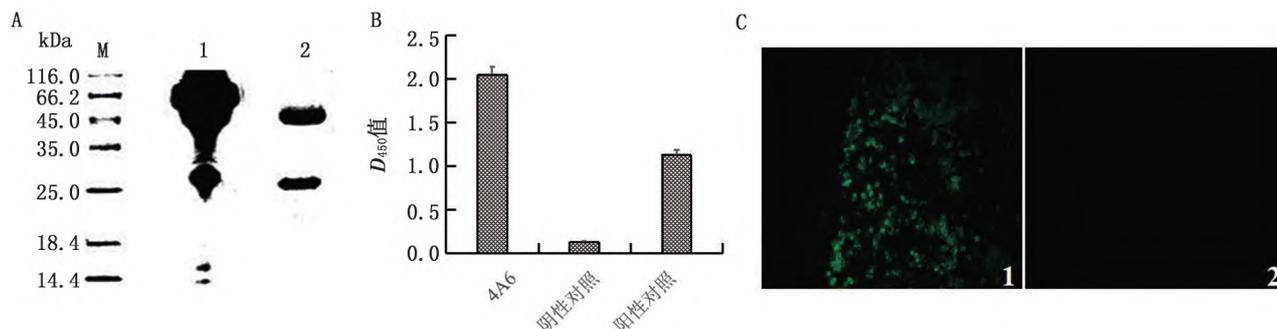
2.2 单克隆抗体的制备与鉴定

用间接 ELISA 和 IFA 鉴定杂交瘤细胞上清,经过 3 次亚克隆最终筛选出 1 株抗 N 蛋白的单克隆抗体 4A6。其纯化后的 SDS-PAGE 结果(图 2A)显示 4A6 具有 55 kDa 重链和 25 kDa 轻链 2 条明显的条带;间接 ELISA 结果(图 2B)显示 4A6 与 N 蛋白具有良好的反应性;IFA 结果(图 2C)显示该单克隆抗体与 PPRV 具有良好的反应性。

2.3 阻断 ELISA 方法的建立

2.3.1 反应条件的优化

根据阴性对照 D_{450} 值为 1.0~1.5、P/N 值最小确定蛋白的包被条件,优化后的反应条件见表 1。



注:A. 单克隆抗体的纯化(M. 蛋白分子量标准;1. 纯化前 4A6;2. 纯化后 4A6);B. 间接 ELISA 鉴定;C. IFA 鉴定(1. 感染 PPRV 的 Vero 细胞;2. 未感染 PPRV 的 Vero 细胞;×40)。

图 2 单克隆抗体的纯化及鉴定

表1 阻断 ELISA 方法反应条件优化结果

项目	蛋白包被	封闭液	血清	酶标单抗	显色
最佳质量浓度	1.0 mg/L	10% BSA	1:4	1:20 000	—
反应条件	4 °C/16 h	37 °C/1 h	37 °C/30 min	37 °C/30 min	37 °C/15 min

2.3.2 阻断 ELISA 临界值的确定结果

按照优化的阻断 ELISA 方法对筛出的 40 份 PPRV 阴性血清进行检测,测得平均抑制率为 9.3%,标准方差为 0.11,计算得阴阳性临界值为 42.3%。当被检血清的抑制率 $PI \geq 42.3\%$ 时,判定为阳性;当被检血清的抑制率 $PI < 42.3\%$ 时,判定为阴性。

2.3.3 特异性试验结果

用建立的阻断 ELISA 方法对 PIV、GTPV、ORFV 抗体阳性血清进行检测,抑制率均小于 42.3%(图 3),表明该方法具有良好的特异性。

2.3.4 敏感性试验结果

将 PPRV 抗体阳性血清倍比稀释后,应用建立的阻断 ELISA 方法和竞争 ELISA 试剂盒同时检

测。表 2 结果显示,2 种方法的灵敏度一致,最低均能检测到按 1:160 稀释的 PPRV 抗体阳性血清,表明建立的阻断 ELISA 方法的敏感性较高。

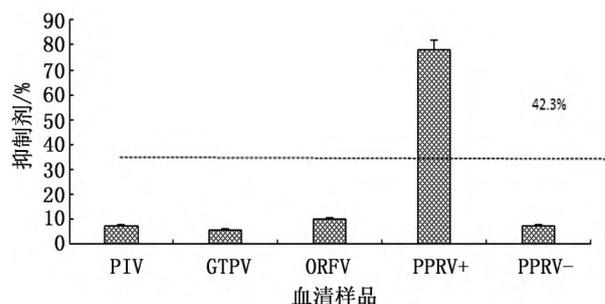


图3 特异性试验结果

表2 敏感性试验结果

阳性对照	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
阻断 ELISA	+	+	+	+	+	-	-
竞争 ELISA	+	+	+	+	+	-	-

2.3.5 重复性试验结果

结果显示,批内与批间重复性试验变异系数分

别为 2.763%~9.378%、3.077%~9.693%,均低于 10%(表 3),说明该方法的重复性较好。

表3 重复性试验结果(n=6)

样品编号	批内变异系数		变异系数/%	批间变异系数		变异系数/%
	平均值	标准差		平均值	标准差	
1	0.348	0.022	6.302	0.356	0.024	6.712
2	0.468	0.043	9.378	0.463	0.045	9.634
3	0.801	0.063	7.848	0.841	0.026	3.077
4	0.396	0.027	6.837	0.385	0.037	9.693
5	1.005	0.028	2.763	1.134	0.071	6.306
6	0.798	0.049	6.239	0.837	0.033	3.948

2.3.6 临床样品检测结果

用本研究建立的阻断 ELISA 方法与竞争 ELISA 试剂盒同时对 180 份临床羊血清样品进行抗体水平检测。从表 4 中看出,2 种方法的阳性符合率为 94%,阴性符合率为 100%,总符合率为 96%。

表4 阻断 ELISA 方法与竞争 ELISA 检测结果 份

检测方法	阻断 ELISA		
	阳性	阴性	总数
竞争 ELISA	阳性	7	119
	阴性	61	61
	总数	112	68

3 讨论

我国是养羊大国,切实做好 PPR 防控工作,对于养羊业持续健康发展具有重大意义。疫病在控制和消灭过程中的有效免疫和快速灵敏的检测技术尤为重要,且 PPRV 在感染或疫苗接种后产生的抗体水平持续时间较长^[8],因而对疫苗免疫水平进行监测和血清流行病学进行调查,有助于 PPR 的防控和根除^[12]。PPRV 抗体检测方法主要有病毒中和实验(VNT)、血凝抑制实验(HI)、对流免疫电泳试验(CIE)、酶标免疫吸附试验(ELISA)、SPR 生物传感器、胶体金及时间分辨荧光免疫^[7,13]检测方法等,其中竞争 ELISA 检测方法已经成为 WOA 规定的标准检测方法。而阻断 ELISA 和竞争 ELISA 方法相似,都是利用单克隆抗体与待检血清抗体竞争同一抗原表位的原理进行检测,与间接 ELISA 方法相比具有更高的特异性^[14]。邢作志等^[15]应用上述 3 种检测方法检测 PPRV 的免疫抗体进行对比,竞争 ELISA 和间接 ELISA 方法的操作相对比较复杂,且用时较多,而阻断 ELISA 方法操作简单,且准确度和重复性均高于其他 2 种方法。

PPRV 基因组为单股负链 RNA 病毒,可编码 6 种结构蛋白和 2 种非结构蛋白。N 蛋白作为主要的结构蛋白包被病毒分子形成核衣壳,在 PPRV 中含量最丰富、保守性最强、抗原性最稳定^[16],在病毒感染的动物血清中针对 N 蛋白的抗体占主导地位,在诊断试剂研发中研究的也最为深入^[17]。本研究原核表达了 PPRV-N 蛋白,Western blot 鉴定结果表明该蛋白具有良好的反应原性,用其免疫小鼠后筛选出 1 株针对 PPRV-N 蛋白的单克隆抗体 4A6,利用 HRP 标记 4A6 建立了一种 PPRV 阻断 ELISA 抗体检测方法。该方法与 PIV、GTPV、ORFV 的阳性血清均无交叉反应;与兰州兽研生物科技有限公司试剂盒的敏感性一致;临床样品检测总符合率为 96%。表明该方法特异性强、敏感、准确,与竞争 ELISA 相比大大节约了检测时间,可用于大规模临床样本的快速检测,为 PPRV 的疫苗免疫效果评估及疫病防控提供了一种有效、便捷的方法。

参考文献:

[1] AZIZ U L, RAHMAN, WENSMAN et al. Peste des petits ruminants in wild ungulates [J]. Trop Anim

Health Prod, 2018, 50(8): 1818-1817.

- [2] 周岩岩,李玲霞,吴锦艳,等.小反刍兽疫病毒 N 蛋白的原核表达及其多克隆抗体的制备[J].中国兽医学报,2019,49(10):1277-1282.
- [3] 李园丽,李林,樊晓旭等.小反刍兽疫检测技术研究进展[J].中国兽医杂志,2018,54(12):76-80.
- [4] 陈曦,占松鹤,洪功飞等.2017-2019 年安徽省小反刍兽疫监测[J].中国动物检疫,2020,37(8):5-7.
- [5] 石岩,翁善钢.小反刍兽疫的流行、诊断与防控[J].中国畜牧兽医,2013(4):231-234.
- [6] WANG J, WANG M, WANG S, et al. Peste des petits ruminants virus in Heilongjiang Province, China, 2014 [J]. Emerg Infect Dis, 2015, 21(4): 677-680.
- [7] 孙瑶,艾军,姜平.小反刍兽疫检测方法研究进展[J].中兽医医药杂志,2019,38(5):25-29.
- [8] SARAVANAN P, SEN A, BALAMURUGAN V, et al. Comparative efficacy of peste des petits ruminants (PPR) vaccines [J]. Biologicals, 2010, 38(4): 479-485.
- [9] 田凯鸽.规模化羊场口蹄疫和小反刍兽疫疫苗免疫抗体监测与免疫程序优化[D].陕西杨凌:西北农林科技大学,2019.
- [10] 董春娜,张蕾,李静,等.基于非洲猪瘟病毒特异性单克隆抗体建立的阻断 ELISA 方法[J].中国兽医杂志,2023,59(3):36-40.
- [11] 田占云,崔川,李明珠等.A 型塞内卡病毒 VP2 蛋白单抗制备及阻断 ELISA 方法的建立[J].中国兽医学报,2023,43(5):872-879.
- [12] SINGH R P. Control strategies for peste des petits ruminants in small ruminants of India [J]. Rev Sci Tech, 2011, 30(3): 879-887.
- [13] 孙雨,宋晓晖,董浩,等.小反刍兽疫病毒双抗原夹心时间分辨荧光免疫测定方法的建立[J].动物医学进展,2019,40(4):1-8.
- [14] 袁雪涛,王芳蕊,石瑜,等.双抗体阻断 ELISA 检测小反刍兽疫病毒抗体的方法建立[J].中国动物传染病学报,2023,31(1):61-65.
- [15] 邢作志,张雁.小反刍兽疫竞争、间接和阻断 ELISA 免疫抗体检测方法的对比和应用[J].国外畜牧学(猪与禽),2020,40(5):74-77.
- [16] YANG B, XUE Q, GUO J, et al. Autophagy induction by the pathogen receptor NECTIN4 and sustained autophagy contribute to peste des petits ruminants virus infectivity [J]. Autophagy, 2020, 16(5): 1-20.
- [17] 孙雨,赵柏林,王晓英等.小反刍兽疫病毒 N 蛋白原核表达与间接 ELISA 检测方法的建立[J].动物医学进展,2017,38(1):6-10.