

猪流行性腹泻病毒抗体化学发光免疫分析法的建立及应用

刘士权^{1,2}, 叶鹏飞¹, 向国庆², 温肖会², 宋帅², 杨燕秋², 罗胜军^{2*}, 阮崇美^{1*}

1 安徽科技学院 动物科学学院 安徽省猪肉质量控制与提升工程研究中心, 安徽 滁州 233100

2 广东省农业科学院动物卫生研究所 广东省畜禽疫病防治研究重点实验室 农业农村部兽用药物与诊断技术广东科学观测实验站, 广东 广州 510640

刘士权, 叶鹏飞, 向国庆, 温肖会, 宋帅, 杨燕秋, 罗胜军, 阮崇美. 猪流行性腹泻病毒抗体化学发光免疫分析法的建立及应用[J]. 微生物学通报, 2026, 53(1): 536-549.

LIU Shiquan, YE Pengfei, XIANG Guoqing, WEN Xiaohui, SONG Shuai, YANG Yanqiu, LUO Shengjun, RUAN Chongmei. Establishment and application of a chemiluminescence immunoassay for antibodies against porcine epidemic diarrhea virus[J]. Microbiology China, 2026, 53(1): 536-549.

摘要: 【背景】猪流行性腹泻目前仍是中国乃至全球养猪业的主要疫病, 了解和掌握该疫病发病和流行状况对于该病的防控具有重要意义。【目的】以表达纯化的猪流行性腹泻病毒重组核衣壳蛋白为靶标抗原, 建立一种高特异性、高灵敏度、高通量及高自动化程度的猪流行性腹泻病毒抗体化学发光免疫分析法, 用于监测猪流行性腹泻病毒流行或感染状况。【方法】通过无缝克隆技术构建重组质粒并诱导表达出核衣壳蛋白, 与羧基磁珠进行偶联, 形成免疫磁珠复合物。通过优化各项反应条件, 建立猪流行性腹泻病毒抗体检测方法, 并对该方法的特异性、灵敏度、重复性及符合率进行验证。【结果】重组核衣壳蛋白为可溶性蛋白且具有良好的反应原性。建立的检测方法最优偶联 pH 值为 8.0、最优偶联蛋白量为 80 μg、最优封闭剂为 20 μL 的 10% 牛血清白蛋白、最优磁珠浓度为 0.25 mg/mL、最优样品稀释度为 10 倍、最优酶稀释度为 1:15 000、最优一抗孵育时间为 10 min、最优二抗孵育时间为 15 min、最优底物反应时间为 3 min。该方法灵敏度高于酶联免疫吸附试验, 并且与 11 种病原抗体阳性标准血清均无交叉反应。重复性试验中, 批内变异系数为 3.09%–8.80%, 批间变异系数为 4.87%–9.17%, 均 < 10%。符合率试验中, 阳性符合率为 93.4%、

资助项目: 广东省畜禽疫病防治研究重点实验室项目(2023B1212060040); 广东省农业科学院动物卫生研究所青年科技人才培养项目(PY2024010); 安徽科技学院引进和稳定人才项目(DKYJ202005)

This work was supported by the Program for Key Laboratory of Livestock Disease Prevention of Guangdong Province (2023B1212060040), the Young Science and Technology Talents Training Program, Institute of Animal Health, Guangdong Academy of Agricultural Sciences (PY2024010), and the Scientific Research Foundation of Anhui Science and Technology University for Talent Introduction (DKYJ202005).

*Corresponding authors. E-mail: LUO Shengjun, 422368881@qq.com; RUAN Chongmei, ruanchm@ahstu.edu.cn

Received: 2025-05-26; Accepted: 2025-07-14; Published online: 2025-08-26

阴性符合率为 99.2%、总符合率为 98.2%。【结论】本研究建立的猪流行性腹泻病毒抗体化学发光免疫分析法可用于临床样品中猪流行性腹泻病毒抗体的检测，以及猪流行性腹泻病毒流行状况的追踪了解，也为后续试剂盒开发提供了参考。

关键词：猪流行性腹泻病毒；重组质粒；核衣壳蛋白；化学发光；抗体

Establishment and application of a chemiluminescence immunoassay for antibodies against porcine epidemic diarrhea virus

LIU Shiquan^{1,2}, YE Pengfei¹, XIANG Guoqing², WEN Xiaohui², SONG Shuai², YANG Yanqiu², LUO Shengjun^{2*}, RUAN Chongmei^{1*}

1 Anhui Engineering Technology Research Center of Pork Quality Control and Enhance, College of Animal Science, Anhui Science and Technology University, Chuzhou 233100, Anhui, China

2 Guangdong Key Laboratory of Animal Disease Control, Guangdong Scientific Observation and Experiment Station of Veterinary Medicine and Diagnostic Technology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Animal Health, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, Guangdong, China

Abstract: [Background] Porcine epidemic diarrhea (PED) remains a major disease in the swine industry in China and the globe. Therefore, understanding and monitoring the incidence and epidemic situation of this disease is of great significance for its prevention and control. [Objective] To establish a highly specific, sensitive, high-throughput, and highly automated chemiluminescent immunoassay for antibodies against porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) using purified recombinant N protein of PEDV as the target antigen for monitoring PEDV epidemics or infections. [Methods] We constructed a recombinant plasmid by seamless cloning and induced the expression of N protein. The obtained protein was coupled with carboxy magnetic beads to form an immunomagnetic bead complex. After optimization of the reaction conditions, the PEDV antibody detection method was established. The specificity, sensitivity, reproducibility, and compliance rate of the established method were evaluated. [Results] The recombinant N protein was soluble and had good immunoreactivity. The optimal conditions for the established method were coupling pH 8.0, coupling protein amount of 80 μg , 20 μL 10% BSA as the blocking reagent, magnetic bead concentration of 0.25 mg/mL, sample dilution of 1:10, enzyme dilution of 1:15 000, incubation time of 10 min for the primary antibody, incubation time of 15 min for the secondary antibody, and substrate reaction time of 3 min. The established method showed higher sensitivity than ELISA and no cross-reactivity with 11 pathogen antibody-positive standard sera. The reproducibility test showed that the intra-batch and inter-batch coefficients of variation were 3.09%–8.80% and 4.87%–9.17%, respectively, which were both <10%. The compliance test showed a positive compliance rate of 93.4%, a negative compliance rate of 99.2%, and an overall compliance rate of 98.2%. [Conclusion] The chemiluminescent immunoassay established in this study can be used to detect PEDV antibodies in clinical samples, track and understand the epidemic situation of PEDV, and provide a reference for subsequent reagent kit development.

Keywords: porcine epidemic diarrhea virus; recombinant plasmid; N protein; chemiluminescence; antibody

猪流行性腹泻(porcine epidemic diarrhea, PED)是由猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)引起的一种高度传染性的猪胃肠道疾病^[1]。猪群在任何阶段都容易感染 PEDV, 乳猪的死亡率很高, 其临床症状表现为呕吐、水样腹泻、脱水^[2]。PEDV 在中国的流行率每年都在增加, 给畜牧业造成了相当大的经济损失^[3]。目前没有针对性的特效药和特效的治疗方法, 从而对 PEDV 的预防和控制提出了重大挑战^[4]。

PEDV 是一种线性 RNA 病毒, 具有囊膜结构, 基因组长约 28 kb, 包含 6 个开放阅读框。它们编码从 5'到 3'的复制酶多蛋白 1ab (pp1ab)、纤突蛋白(S 蛋白)、ORF3 蛋白、膜糖蛋白(M 蛋白)和核衣壳蛋白(N 蛋白)^[5]。PEDV 的 N 蛋白是该病毒的核心结构蛋白, 由 441 个氨基酸组成, 具有高度保守的 RNA 结合域, 主要负责包裹病毒基因组 RNA 形成核衣壳, 维持病毒遗传物质的稳定性, 并参与病毒组装与复制过程^[6]。研究表明, N 蛋白不仅通过与病毒聚合酶互作促进 RNA 转录, 还可通过抑制宿主 I 型干扰素信号通路[如阻断干扰素调节因子 3 (Interferon Regulatory Factor 3 IRF3)或 NF- κ B 激活]和调控细胞凋亡相关蛋白[如 B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell

lymphoma 2, Bcl-2)家族]来逃逸宿主免疫应答, 增强病毒致病性^[7]。在诊断领域, N 蛋白因保守性强且反应原性稳定, 被广泛用于 ELISA 抗体检测、RT-PCR 及 qPCR 靶标设计及胶体金试纸条开发, 但其与猪传染性胃肠炎病毒(transmissible gastroenteritis virus, TGEV)等冠状病毒的交叉反应仍需优化^[8]。PEDV 感染的猪只临床症状与 TGEV 相似, 所以确诊 PEDV 只能依靠实验室的检测方法^[9]。目前实验室常用的血清学诊断方法为 ELISA。该方法操作冗杂、检测周期较长, 并且只能定性分析不能定量检测。

化学发光免疫分析(chemiluminescence immunoassay, CLIA)是将特异性强的免疫反应与灵敏度高的化学反应相结合的一种检测方法, 其基本原理为: 磁珠与抗原结合形成免疫磁珠复合物, 加入待检抗体后形成免疫磁珠-抗体复合物, 洗去未结合的抗体后加入酶标二抗, 形成免疫磁珠-抗体-酶标二抗复合物, 洗去未结合的二抗后加入底物, 通过碱性磷酸酶分解底物产生光信号, 使用全自动化学发光免疫分析仪检测光信号强度(图 1)。相较于现有诊断方法, 该方法具有自动化程度高、特异性强、灵敏度高、检测范围广、高通量及操作简单等优点, 适用于大批量检测临床样本^[10]。

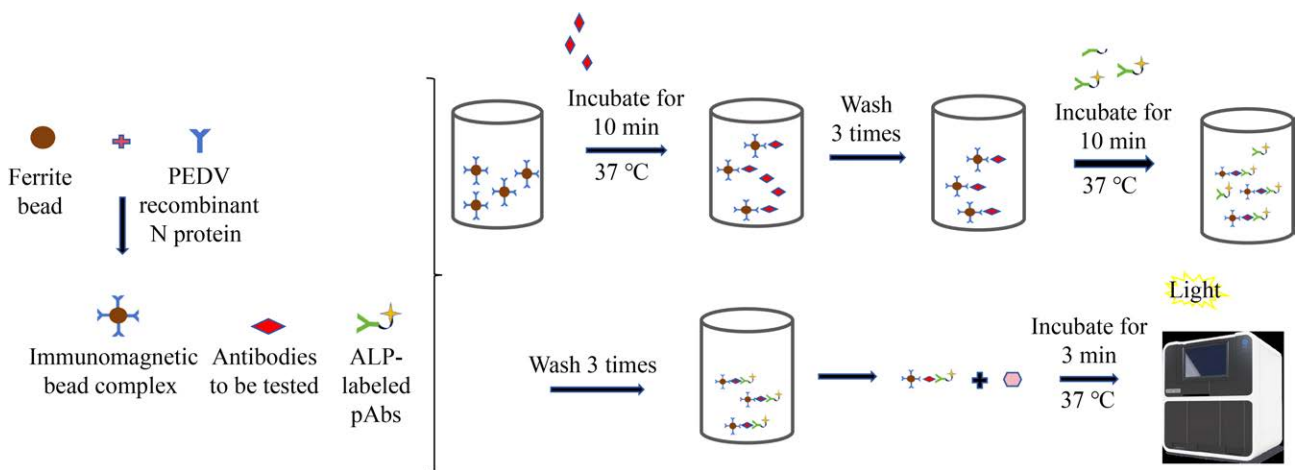


图 1 化学发光免疫分析法原理示意图

Figure 1 Schematic diagram of the principle of chemiluminescence immunoassay.

1 材料与方 法

1.1 样 品

PEDV 高免阳性血清、126 份背景清晰猪血清(阳性血清 31 份,阴性血清 95 份)及 489 份临床血清样品(广州市南沙区猪血清 63 份、广东省韶关市猪血清 136 份、广东省河源市猪血清 122 份)均由广东省农业科学院动物卫生研究所动物疫病诊断中心制备与保存; TGEV、猪德尔塔冠状病毒(porcine delta corona virus, PDCoV)、猪传染性胸膜肺炎(porcine contagious pleuropneumonia, PCP)、猪瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV)、猪支原体肺炎(mycoplasmal pneumonia of swine, MPS)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)、猪乙型脑炎病毒(Japanese encephalitis virus, JEV)、猪流感病毒(swine influenza virus, SIV)、猪细小病毒(porcine parvo virus, PPV)、猪链球菌(*Streptococcus suis*, SS)、猪圆环病毒 2 型(porcine circovirus type 2, PCV2)、抗体阳性标准血清均由广东省农业科学院动物卫生研究所制备与保存。猪传染性胃肠炎、猪流行性腹泻、猪轮状病毒(G5 型)三联活疫苗(弱毒化毒株+弱毒 CV777 株+NX 株), 哈尔滨维科生物技术有限公司。

1.2 培养基、主要试剂和仪器

PET-28a 甘油菌、PBST 缓冲液, 生工生物工程(上海)股份有限公司; LB 肉汤培养基, 广东环凯微生物科技有限公司。限制性快切酶 QuickCut™ *EcoR* I、限制性快切酶 QuickCut™ *Hind* III, 宝日医生物技术(北京)有限公司; E.Z.N.A.®Viral DNA/RNA Kit-Fast, Omega Bio-Tek 公司; HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper)、Green *Taq* Mix、DH5 α 感受态细胞、BL21 感受态细胞, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 猪流行性腹泻病毒 ELISA 试剂盒, 哈尔滨国生生物科技股份有限公司; 2-(N-吗啡啉)乙磺酸(2-morpholinoethanesulfonic acid, MES), 北京兰

杰柯科技有限公司; 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐[1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide, EDC], 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; N-羟基琥珀酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, NHS), 上海麦克林生化科技股份有限公司; 经济型长轴旋转混匀仪, 大龙兴创实验仪器(北京)股份公司; 羧基磁珠, JSR 公司; 化学发光底物, 兰州兽研生物科技有限公司; 兔抗猪 IgG-AP 抗体, GeneTex 公司。全自动化学发光免疫分析仪, 重庆科斯迈生物科技有限公司。

1.3 重组质粒构建

通过 GenBank 中 PEDV 核衣壳蛋白 N 基因序列(登录号: WLD18268.1)设计特异性引物 F (5'-TCGCGGATCCGAATTCATGGCTTCTGTCA GCTTCAGGA-3') (添加酶切位点 *EcoR* I)和 R (5'-GTGCGGCCGCAAGCTTTTAATTCCTGTA TCGAAGATCTCGTTGATAATTTCAAC-3') (添加酶切位点 *Hind* III), 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。使用 *EcoR* I 和 *Hind* III 对 PET-28a 进行双酶切, 使用 E.Z.N.A.®Viral DNA/RNA Kit-Fast 试剂盒提取疫苗弱毒 CV777 株的核酸, 使用 HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper)试剂盒反转录得到 cDNA 作为模板, 使用特异性引物扩增目的基因。PCR 反应条件: 94 °C 30 s; 98 °C 10 s, 58.8 °C 30 s, 72 °C 1 min, 34 个循环; 72 °C 2 min。PCR 反应体系: Green *Taq* Mix 25 μ L, cDNA 10 μ L, 上、下游引物(1 μ mol/L) 2.5 μ L, ddH₂O 10 μ L。通过无缝克隆技术构建出重组质粒, 反应结束后, 转入 DH5 α 感受态细胞。使用枪头挑取单菌落, 置于离心管中, 加入 2 mL Kan⁺的 LB 肉汤培养基, 37 °C、200 r/min 培养 12 h。使用特异性引物对重组质粒进行扩增, 将扩出 N 基因大小的重组质粒进行测序验证, 测序正确的重组质粒命名为 PET-28a-N。

1.4 抗原制备及重组 N 蛋白的 SDS-PAGE 分析

抗原制备: 提取测序正确的菌液中的质粒,

转入 BL21 感受态细胞。使用枪头挑取单菌落置于离心管中,加入适量 Kan⁺的 LB 肉汤培养基,37 °C 培养 12 h 后将菌液按 1% 接种量接种至 LB 肉汤培养基,37 °C 培养 3 h,加入 IPTG 诱导 8 h。诱导完成的菌液于 10 000×g 离心 1 min,按 1:4 的比例加入 PBS 缓冲液和 5×蛋白上样缓冲液,100 °C 加热 10 min。设置空载及未诱导对照,优化各项反应条件。

重组 N 蛋白的 SDS-PAGE 分析:诱导表达菌液 50 mL,10 000×g 离心 5 min 收集沉淀,加入裂解液进行超声破碎(工作 3 s,间歇 5 s,功率 50%,总工作时间 30 min),将上清液与沉淀制样,通过 SDS-PAGE 分析蛋白可溶性。

1.5 PET-28a-N 反应原性验证

使用高免 PEDV 阳性血清作为一抗,通过 Western blotting 鉴定验证重组 N 蛋白的反应原性。

1.6 化学发光免疫分析法的建立

本研究所建立方法为管式化学发光免疫分析法,分为抗原包被、试剂船组装、免疫复合物上样、样品上样、待检血清孵育、兔抗猪 IgG-AP 抗体孵育、底物反应、光信号检测 8 个步骤,试剂船的 3 个管中分别加入免疫磁珠复合物、酶标二抗和 PBST 缓冲液。

将反应条件设置为磁珠用量 25 μL,血清用量 10 μL,酶标二抗用量 100 μL,一抗孵育时间 15 min,二抗孵育时间 10 min,底物反应时间 5 min。检测样品发光值,采取控制变量法优化各项反应条件。

1.7 磁珠偶联抗原

将磁珠取出置于室温环境回温 30 min,使用 MES 偶联缓冲液将羧基磁珠分散均匀,磁性分离 2 min,弃掉管中液体,重复清洗 2 次。加入适量 MES 缓冲液重悬磁珠。加入 10 μL 浓度为 0.1 g/mL 的 EDC 和 NHS 溶液置于经济型长轴旋转混匀仪上活化 30 min。磁性分离,弃上清。清洗 3 次,加入 pH 8.0 的 MES 重悬磁珠,加入 10 μg 重组 N 蛋白,于经济型长轴旋转混匀仪上偶联 3 h 后加入适量封闭液于经济型长轴旋转混

匀仪上封闭 3 h。使用磁珠清洗液清洗磁珠 3 次,加入适量磁珠保存液,4 °C 保存。

1.8 最优偶联条件的确定

使用 pH 值为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 的 MES 缓冲液混匀磁珠,其他条件不变,以确定最优偶联 pH;选用上述最优 pH 的 MES 缓冲液混匀磁珠,分别加入 10、20、30、40、50、80、100 μg 蛋白进行偶联,其他条件不变,以确定最优偶联蛋白量;将 5% 脱脂奶粉、10% 脱脂奶粉、1% 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、5% BSA、10% BSA、5% 海藻糖、5% 明胶作为封闭剂,封闭 3 h,以确定最优封闭剂并在最优封闭剂的基础上优化封闭剂用量;向封闭完成的磁珠中分别加入适量磁珠保存液,使得磁珠浓度分别为 1.0、0.75、0.5、0.33、0.25、0.125 mg/mL,4 °C 保存,以确定最优磁珠浓度,通过全自动化学发光免疫分析仪检测阴、阳性血清发光值,以 P/N 最大值作为最优偶联条件。

1.9 最优反应条件的确定

分别设置 10、20、30、50、80、100 倍稀释及样品原液,以确定最优样品稀释度;设置样品用量为 10、20、30、40、50 μL 5 个梯度,以确定最优样品用量;将酶稀释液与兔抗猪 IgG-AP 按适当比例混合,使稀释度分别为 1:5 000、1:10 000、1:15 000、1:20 000、1:30 000、1:40 000,以确定最优酶稀释度;分别设置一抗孵育时间为 5、10、15、20 min,二抗孵育时间为 5、10、15、20、25 min,底物反应时间为 1、3、5、7、9 min,以确定最优反应时间,检测方法 & 最优条件选取原则同上。

1.10 标准品的确定及标准曲线的绘制

使用商品化 ELISA 试剂盒检测 1 份经 2 倍倍比稀释的高免 PEDV 阳性血清,以 S/P 值 0.35 对应 100 U 为基准,若此时高免 PEDV 阳性血清的稀释倍数为 128 倍,则当 256 倍稀释时为 50 U。以此类推选出 6 个标准品。以抗体含量值为横坐标,化学发光值为纵坐标,运用 MedCalc 软件进行数据分析,通过四参数曲线

拟合方法绘制标准曲线。

1.11 阴阳临界点的确定

在最优反应条件及标准曲线的基础上,以本研究所建立的方法检测 126 份猪血清,采用 MedCalc 软件绘制受试者工作特征曲线,并以约登指数最大值所对应的抗体含量值作为本研究的阴阳临界点。

1.12 特异性试验

用本研究建立的方法对 PCP、CSFV、MPS、PRRSV、JEV、SIV、PPV、SS、PCV2、TGEV、PDCoV 抗体阳性血清样品进行检测。以上述确定的阴阳临界点为标准,分析其特异性。

1.13 灵敏度对比试验

使用本研究所建立的方法及商品化 ELISA 试剂盒共同检测 3 份经 2 倍倍比稀释的高免 PEDV 阳性血清,分析本研究的灵敏度。

1.14 重复性及稳定性试验

批内重复性试验:使用同一批磁珠复合物检测 3 份阳性血清 3 份阴性血清,每个血清重复检测 12 次,计算变异系数。

批间重复性试验:使用 3 批磁珠复合物检测 3 份阳性血清 3 份阴性血清,每个血清重复检测 12 次,计算变异系数。

1.15 与商品化试剂盒对比

用本研究建立的 PEDV 抗体化学发光免疫方法与商品化 PEDV 抗体 ELISA 检测试剂盒同时检测 168 份临床样品,分析 2 种方法的符合率。并通过卡方检验分析 2 种检测方法的相关性。

1.16 临床血清检测

收集广州市南沙区猪血清 63 份、广东省韶关市猪血清 136 份、广东省河源市猪血清 122 份,以本研究所建立方法检测,计算检出率。

2 结果与分析

2.1 猪流行性腹泻病毒 N 基因扩增

以疫苗弱毒 CV777 株为模板反转录出 cDNA,使用特异性引物成功扩增出 PEDV N 基因大小的条带,结果如图 2 所示。

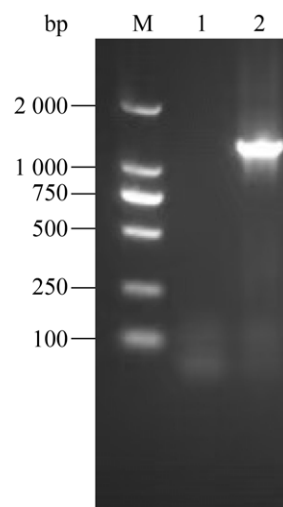


图 2 PEDV N 基因扩增 M:DL2000 DNA marker; 1: 阴性对照; 2: PEDV N 基因。

Figure 2 PEDV N gene amplification. M: DL2000 DNA marker; 1: Negative control; 2: PEDV N gene.

2.2 猪流行性腹泻病毒重组 N 蛋白的 SDS-PAGE 分析

诱导表达完成的菌液超声破碎,沉淀及上清液分别制样进行 SDS-PAGE,结果如图 3 所示,重组 N 蛋白以可溶性的形式大量表达。

2.3 Western blotting 鉴定结果

通过重组 N 蛋白与 PEDV 抗体阳性血清的 Western blotting 鉴定,证明重组 N 蛋白能与 PEDV 抗体阳性血清反应(图 4)。

2.4 最佳偶联条件

由图 5A 可知当偶联 pH 值为 8.0 时, P/N 值最大,因此最优偶联 pH 值为 8.0;由图 5B 可知当偶联蛋白量为 80 μg 蛋白进行偶联时, P/N 值最大,因此最优偶联蛋白量为 80 μg ;由图 5C 可知最优封闭剂种类为 10% BSA;由图 5D 可知当加入 20 μL 10% BSA 作为封闭剂时, P/N 值最大,因此封闭剂最优用量为 20 μL 10% BSA;由图 5E 可知当磁珠浓度为 0.25 mg/mL 时, P/N 值最大,因此最优磁珠浓度为 0.25 mg/mL。

2.5 最优反应条件

由图 6A 可知当样品稀释 10 倍时, P/N 值最大,因此最优样品稀释 10 倍。由图 6B 可知

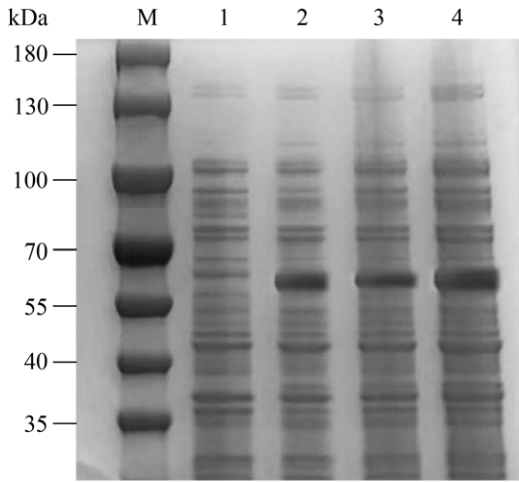


图 3 PEDV 重组 N 蛋白 SDS-PAGE 分析结果 M: 180 kDa 预染蛋白质 marker; 1: 未诱导的 PET-28a 空载菌液; 2: 诱导的 PET-28a-N 菌体; 3: 诱导的 PET-28a-N 菌体沉淀; 4: 诱导的 PET-28a-N 菌体上清。

Figure 3 Results of SDS-PAGE analysis of PEDV recombinant N protein. M: 180 kDa pre-stained protein marker; 1: Uninduced PET-28a empty bacterial fluid; 2: Induced PET-28a-N bacteriophage; 3: Induced PET-28a-N bacteriophage precipitation; 4: Induced PET-28a-N bacteriophage supernatant.

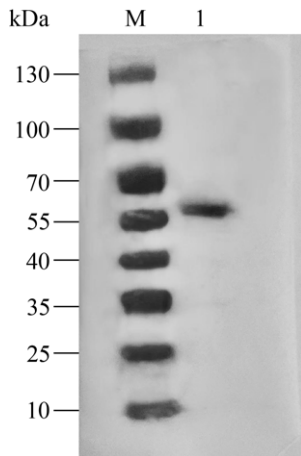


图 4 Western blotting 鉴定结果 M: 180 kDa 预染蛋白质 marker; 1: PEDV N 蛋白与阳性血清反应原性鉴定。

Figure 4 Western blotting identification results. M: 180 kDa pre-stained protein marker; 1: Identification of the reactivity of PEDV N protein with positive serum.

当样品用量为 20 μL 时, P/N 值最大, 因此最优样品用量为 20 μL 。由图 6C 可知当酶稀释度为 1:15 000 时, P/N 值最大, 因此最优酶稀释度为 1:15 000。由图 6D 可知一抗孵育时间为 10 min 时, P/N 值最大, 因此 10 min 为最优一抗孵育时间。由图 6E 可知二抗孵育时间为 15 min 时, P/N 值最大, 因此 15 min 为最优二抗孵育时间。由图 6F 可知底物反应时间为 3 min 时, P/N 值最大, 因此 3 min 为最优底物反应时间。

2.6 标准曲线

基于商品化 ELISA 抗体检测试剂盒检测 PEDV 阳性血清结果, 选出标准品 1-6, 分别将抗体含量值赋为 0 (标准品稀释液)、6.25 (1:256)、25 (1:64)、100 (1:16)、400 (1:4)、1 600 U (原液)。根据检测标准品 1-6 的含量值与发光值做四参数曲线拟合, 拟合曲线相关系数为 0.999 99, 最终定义此曲线为本方法的标准曲线(图 7)。

2.7 阴阳临界点

通过 126 份血清(其中阳性血清 31 份, 阴性血清 95 份)检测结果绘制受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC) (图 8), 结果显示, 约登指数最大值为 0.809 5, 对应的抗体含量值为 156.75 U。因此, 将本研究的判定标准定为抗体含量值 ≥ 156.75 U 为阳性, 抗体含量值 < 156.75 U 为阴性。

2.8 灵敏度比对结果

通过商品化 ELISA 试剂盒及本研究建立的方法共同检测 3 份不同地区经 2 倍倍比稀释的高免 PEDV 阳性血清(血清 1、血清 2、血清 3 分别来自广州市南沙区、广东省韶关市、广东省河源市), 分析本研究的灵敏度。结果显示(表 1)在血清 1 与血清 2 的检测试验中本研究所检测出的最大稀释度为 1:16, 而商品化 ELISA 试剂盒所检出的最大稀释度为 1:8, 在血清 3 的检测试验中本研究所检测出的最大稀释度为 1:8, 而商品化 ELISA 试剂盒所检出的最大稀释度为 1:4, 结果表明, 本方法灵敏度高于商品化 ELISA 试剂盒。

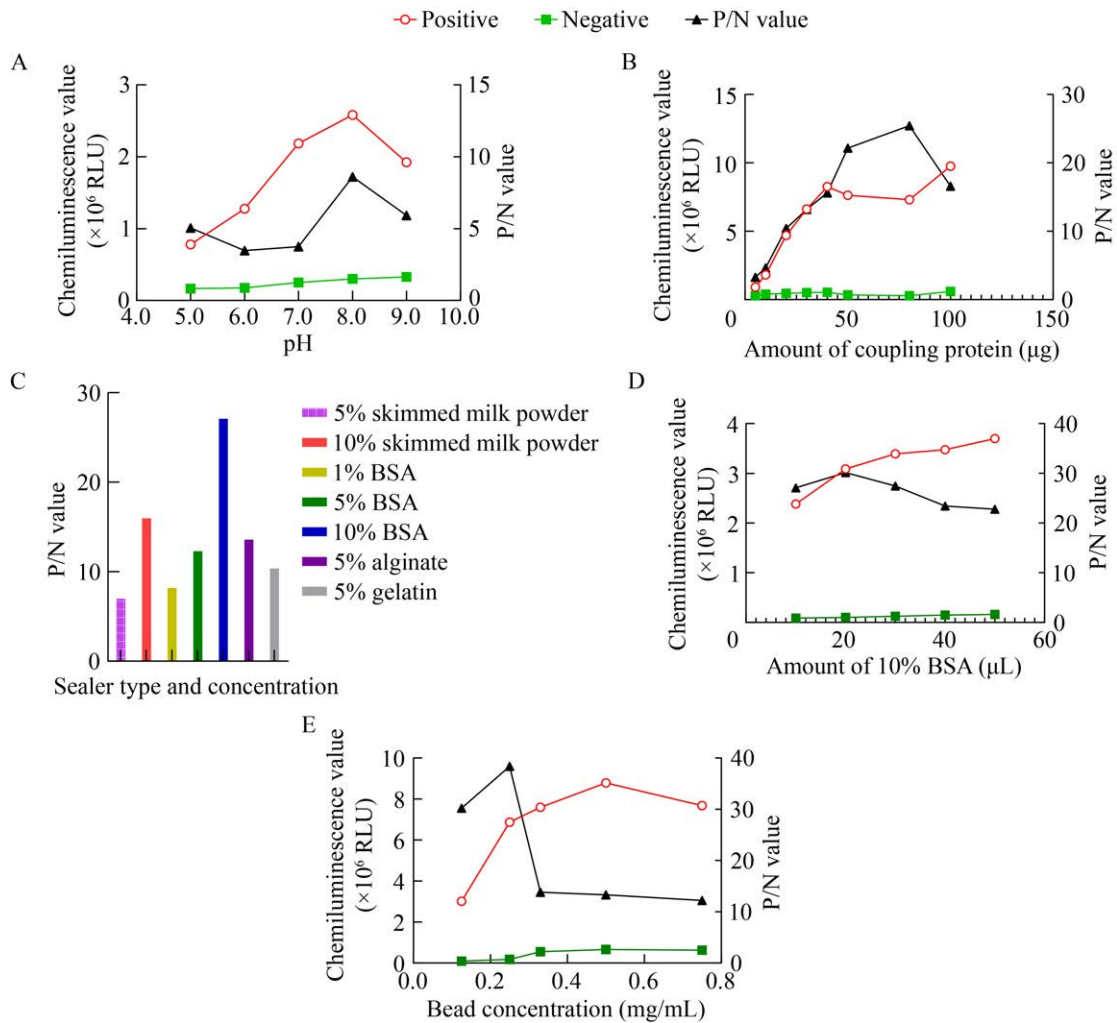


图 5 最优磁珠偶联条件的确定 A: 最优偶联 pH 的确定; B: 最优偶联蛋白量的确定; C: 最优封闭剂种类的确定; D: 封闭剂最优用量的确定; E: 最优磁珠浓度的确定。

Figure 5 Determination of optimal magnetic bead coupling conditions. A: Determination of the optimal coupling pH; B: Determination of the optimal amount of coupling protein; C: Determination of the optimal type of sealer; D: Determination of the optimal amount of sealer; E: Determination of the optimal magnetic bead concentration.

2.9 特异性试验结果

由表 2 可知,本研究建立的方法检测 PCP、CSFV、MPS、PRRSV、JEV、SIV、PPV、SS、PCV2、TGEV、PDCoV 抗体阳性血清,抗体含量值 <156.75 U,均为阴性,证明本方法与 11 种病原阳性血清具备良好的特异性。

2.10 重复性试验结果

通过批间、批内重复性实验验证本方法的稳定性,重复性试验结果表明批内变异系数为

3.09%–8.80%,批间变异系数为 4.87%–9.17% (表 3)。

2.11 与商品化试剂盒对比结果

在 168 份血清中 ELISA 检出阳性 44 份,本方法检测出 46 份阳性(表 4),阳性符合率为 93.4%、阴性符合率为 99.2%、总符合率为 98.2%。卡方检验结果为 $\chi^2=148.41 > 3.841$ (临界值),Phi 系数为 0.94,表明 2 种方法在血清抗体检测中表现出极强的相关性。

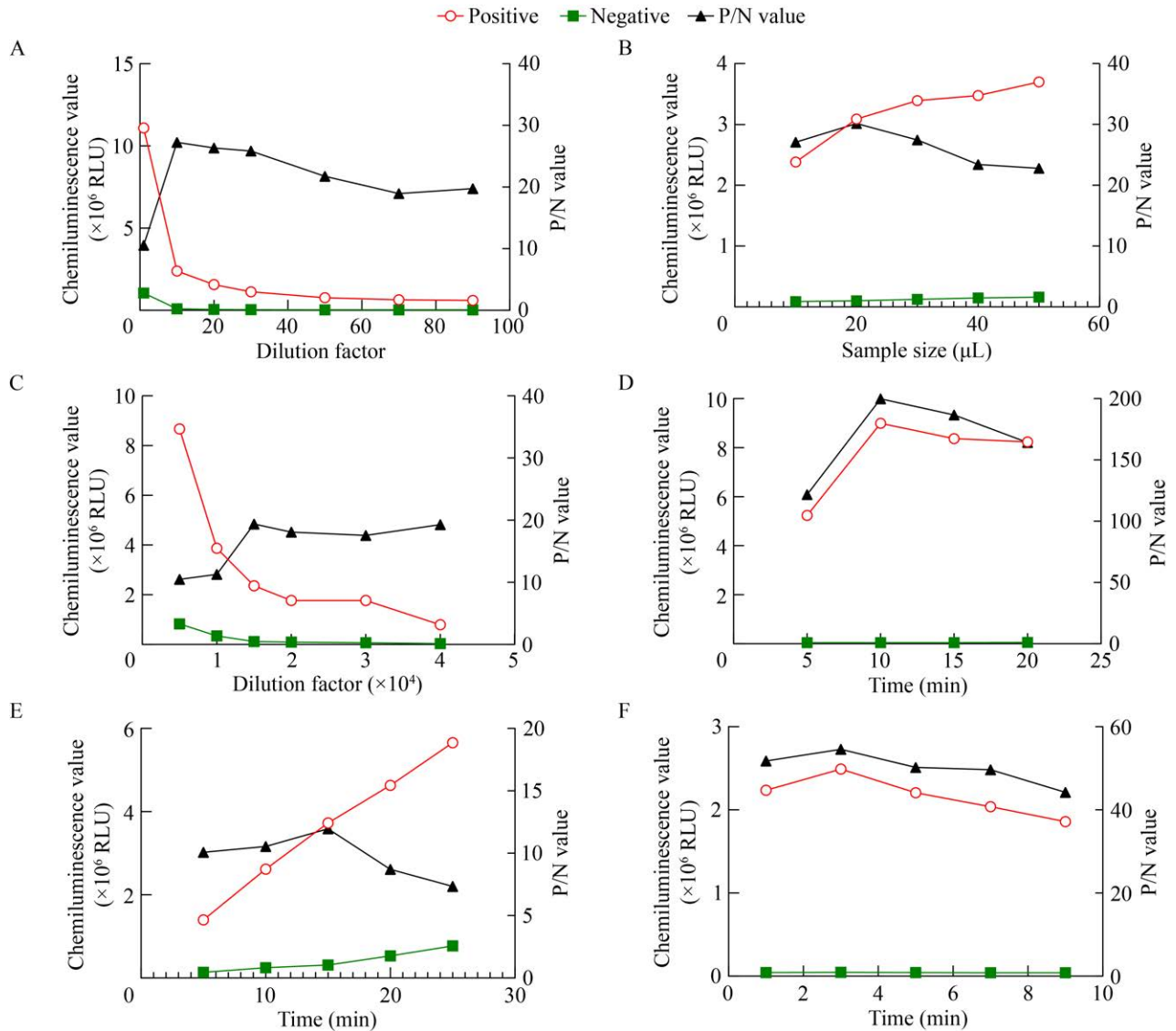


图6 最优反应条件的确定 A: 最优样品稀释度的确定; B: 最优样品用量的确定; C: 最优酶稀释度的确定; D: 最优一抗孵育时间的优化; E: 最优二抗孵育时间的确定; F: 最优底物反应时间的确定。

Figure 6 Determination of optimal reaction conditions. A: Determination of optimal sample dilution; B: Determination of optimal sample dosage; C: Determination of optimal enzyme dilution; D: Optimization of optimal primary antibody incubation time; E: Determination of optimal secondary antibody incubation time; F: Determination of optimal substrate reaction time.

2.12 临床血清检测结果

用本研究所建立的方法检测广州市南沙区猪血清 63 份检出阳性 61 份, 检出率为 96.8%; 广东省韶关市猪血清 136 份检出阳性 131 份, 检出率为 96.3%; 广东省河源市猪血清 122 份检出

阳性 118 份, 检出率为 96.7%。

3 讨论

PEDV 自 1971 年首次报道后已对全球养猪业造成巨大影响。PEDV 可感染所有年龄的猪,

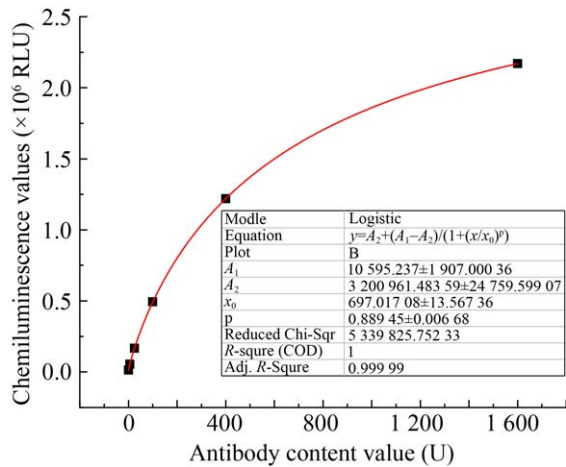


图 7 猪流行性腹泻病毒抗体化学发光免疫分析法标准曲线

Figure 7 Chemiluminescence immunoassay for antibodies against porcine epidemic diarrhea virus standard curve.

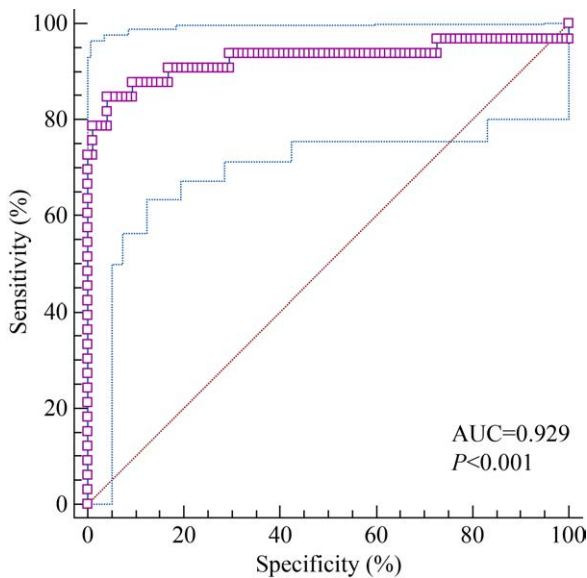


图 8 受试者工作特征曲线 曲线下面积(AUC)

含义为在所有可能的诊断阈值下, 该诊断方法能够将血清(阳性)正确判为阳性的可能性大于将血清(阴性)错误判为阳性的可能性的平均概率。

Figure 8 Receiver operating characteristic curve. The meaning of the area under the curve (AUC) is the average probability that, across all possible diagnostic thresholds, this diagnostic method can correctly identify serum (positive) as positive rather than incorrectly identify serum (negative) as positive.

成年猪的致病性较低^[11], 对新生仔猪致病力更强, 其特点是出现严重的水样腹泻、呕吐、脱水和高死亡率^[12]。

PED 的临床症状及流行病学与传染性胃肠炎无显著性差异, 所以只能借助实验室方法进行检测。目前实验室最常用的血清学诊断方法为 ELISA, 该方法操作相对简便, 可同时检测大量样本, 但不能定量分析、易出现交叉反应、耗时较长、检测效率低^[13]。CLIA 具有高自动化、高通量、线性范围广、可定量分析、检测时间短等优点, 适用于大规模的抗体水平调查, 能快速了解猪群的感染状况和免疫水平。

N 蛋白是 PEDV 的核心结构蛋白之一, 负责包裹病毒 RNA 形成核衣壳, 保护基因组并协助病毒组装与复制。该蛋白具有高度保守性和强反应原性, 感染后可诱导宿主产生特异性抗体(IgG/IgA), 虽非中和抗体的主要来源, 但作为重要的诊断标志物, 广泛应用于 ELISA 抗体检测及 RT-PCR 核酸检测^[14]。韩蓉等^[15]以 N 蛋白为抗原建立的猪流行性腹泻病毒抗体 ELISA 检测方法具有良好的敏感度、特异性及重复性。此外, N 蛋白在调节宿主天然免疫(如干扰素通路)中发挥重要作用, 其保守特性也使其成为亚单位疫苗的潜在靶点^[16]。同时, 在重组抗原表达中, 初期表达的 N 蛋白易以包涵体形式聚集, 丧失其天然构象与生物活性。为提升可溶性功能蛋白的产率, 常通过降低诱导温度与延长诱导时间来优化表达条件, 以调控蛋白合成速率、促进正确折叠, 从而显著增加可溶性目标蛋白的表达水平。

磁珠活化过程中, 首先要将磁珠回温 30 min 左右, 在分子层面上, 磁珠表面的功能性聚合物在低温储存时分子构型会发生变化, 活动受限, 结合能力降低。其次温度升高会增强磁珠的布朗运动, 使其更均匀地分布在溶液中, 使磁珠可以结合更多蛋白, 提高了磁珠利用率^[17]。在室温下, 温度平衡有利于蛋白恢复最佳活性, 减少结合团聚现象。

表 1 灵敏度试验结果

Table 1 Results of sensitivity test

Dilution factor	Serum 1				Serum 2				Serum 3			
	CLIA (U)	Result	ELISA (OD_{450})	Result	CLIA (U)	Result	ELISA (OD_{450})	Result	CLIA (U)	Result	ELISA (OD_{450})	Result
Concentrate	3 427.86	Positive	1.392	Positive	4 227.11	Positive	1.463	Positive	1 541.08	Positive	1.041	Positive
2	1 461.39	Positive	0.990	Positive	1 950.14	Positive	1.062	Positive	867.72	Positive	0.734	Positive
4	706.70	Positive	0.590	Positive	1 246.87	Positive	0.630	Positive	507.71	Positive	0.478	Positive
8	600.65	Positive	0.432	Positive	619.53	Positive	0.488	Positive	224.43	Positive	0.301	Negative
16	323.60	Positive	0.263	Negative	448.71	Positive	0.282	Negative	132.22	Negative	0.169	Negative

表 2 特异性试验结果

Table 2 Specificity test results

Item	Chemiluminescence values (RLU)	Content value (U)	Result
Porcine contagious pleuropneumonia (PCP)	65 498	26.63	Negative
Classical swine fever virus (CSFV)	106 084	47.90	Negative
Mycoplasmal pneumonia of swine (MPS)	62 625	25.16	Negative
Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, (PRRSV)	77 925	33.05	Negative
Japanese encephalitis virus (JEV)	91 104	39.95	Negative
Porcine parvo virus (PPV)	76 144	32.13	Negative
<i>Streptococcus suis</i> (SS)	81 049	34.68	Negative
Swine influenza virus (SIV)	92 813	40.85	Negative
Porcine circovirus type 2 (PCV2)	83 335	35.88	Negative
Transmissible gastroenteritis virus (TGEV)	134 651	63.34	Negative
Pporcine delta corona virus (PDCoV)	84 344	36.40	Negative
Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV)	1 164 423	859.62	Positive

表 3 重复性试验结果

Table 3 Repeatability test results

Item	Number	Intra-assay		Inter-assay	
		Mean±SD (U)	Coefficient of variation (CV) (%)	Mean±SD (U)	Coefficient of variation (CV) (%)
Positive sample	3	704.33±38.19	5.42	664.66±5.92	9.17
		191.40±5.92	3.09	225.46±16.23	7.20
		1 317.54±109.58	8.32	241.33±17.67	7.32
Negative sample	3	98.19±7.90	8.05	90.18±4.39	4.87
		87.25±6.78	7.87	82.07±5.95	7.25
		31.08±2.74	8.80	116.01±9.65	8.32

表 4 与商品化试剂盒对比

Table 4 Comparison with commercialized kits

Comparison test		CLIA		
		Positive	Negative	Consider
ELISA	Positive	43	1	44
	Negative	3	121	124
	Consider	46	122	168

磁珠偶联蛋白的基本原理主要基于化学反应和物理吸附机制。在活化过程中,磁珠表面的官能团被激活,形成能够与蛋白质中的特定基团发生共价结合的活性位点^[18]。本研究所采用的活化方法为通过 EDC 和 NHS 在微球表面形成活脂键,与蛋白的氨基发生反应,提高结合效率。另外,磁珠偶联蛋白过程中,pH 值是一个至关重要的参数,直接影响偶联效率和最终产品的性能。酸性条件下(pH 4.5–6.0),羧基磁珠表面的官能团被 EDC 活化形成活泼脂键,有利于活化过程,但增加了水解反应的可能性,随着 pH 值的降低,EDC 活化磁珠的效率会提高,但水解反应的速率也会加快。碱性条件下(pH 8.0–10.0)酰亚胺酯交联剂与伯胺反应形成脒键的效率最高,然而,随着 pH 的升高,副反应也会增加。对于本研究所使用的羧基磁珠,pH 值在 4.0–6.0 之间时,EDC 和 NHS 等活化试剂的效果最佳,能够高效地活化磁珠表面的羧基官能团。最优 pH 的确定还需考虑蛋白质的特性。不同蛋白质的等电点不同,在不同 pH

值的条件下电荷状态也会有所差异。因此,优先优化缓冲液的 pH 值,结果显示当 pH 值为 8.0 时,偶联效果最佳且无团聚现象。优化偶联蛋白量时,磁珠与蛋白偶联过程中出现了团聚现象,后将蛋白小量分批加入,避免了该现象的发生。偶联蛋白量较大时,将蛋白小量分批加入重悬后的磁珠中,可避免一个蛋白偶联多个磁珠而出现的团聚。

本研究所建立的化学发光免疫分析法具有极高的灵敏度,其原因为:CLIA 具有极低的背景信号,化学发光是待检测物自身反应产生的光信号,无需外部激发源,避免了光源散射、杂散光等背景噪声,显著提高信噪比。CLIA 在暗室中用光电倍增管检测光子,背景接近零。相较于比色法(吸光度检测)或荧光法(易受基质荧光干扰),背景干扰极小。通过碱性磷酸酶催化发生氧化反应,单个酶分子每分钟可产生数千至数百万个光子,发光反应可持续数分钟,通过积分测量总光量,进一步放大信号。高灵敏度的方法可检测超低浓度的分析物,显著降低方法的检出限和定量限,高灵敏度的方法可以降低漏检风险,减少假阴性,从而更精准地了解猪群免疫及感染状况。

本研究建立的 CLIA 方法与商品化 ELISA 试剂盒进行对比,阳性符合率为 93.4%、阴性符合率为 99.2%、总符合率为 98.2%,2 种方法在检测血清抗体检测中具有极强的相关性。本研

究基于高自动化的化学发光免疫分析法, 30 min 左右可完成检测, 大大增加了检测效率。自动化程度高可避免人为操作造成的误差, 增加结果的可信度。

4 结论

本研究通过无缝克隆技术构建重组质粒并诱导表达出 N 蛋白作为抗原, 以羧基磁珠为固相载体, 偶联 PEDV 重组 N 蛋白, 优化各项反应条件, 初步建立 PEDV 抗体化学发光免疫分析法, 并且具备良好的灵敏度、特异性及重复性, 可用于临床样品的大规模筛查, 为后续试剂盒开发提供了参考。

作者贡献声明

刘士权: 数据收集与监管、验证、数据管理、实验操作、撰写文章; 叶鹏飞: 数据分析、稿件润色修改; 向国庆: 方法论、方案设计; 温肖会: 提出概念、软件程序; 宋帅: 监督指导; 杨燕秋: 执行调研; 罗胜军: 项目管理、获取基金、提供材料、提供资源; 阮崇美: 审阅。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] 邝燕齐, 莫梅君, 何红玲, 周金柱, 周如月, 郭霄峰. PEDV N 蛋白单克隆抗体的制备及间接免疫荧光检测方法的建立[J]. 华南农业大学学报, 2020, 41(5): 27-35.
KUANG YQ, MO MJ, HE HL, ZHOU JZ, ZHOU RY, GUO XF. Preparation of monoclonal antibody against N protein of porcine epidemic diarrhea virus and establishment of indirect immuno-fluorescence assay[J]. Journal of South China Agricultural University, 2020, 41(5): 27-35 (in Chinese).
- [2] 李萍. PEDV S1 截短蛋白的单克隆抗体制备与间接 ELISA 方法的建立[D]. 武汉: 华中农业大学, 2023.
LI P. Preparation of monoclonal antibodies against PEDV S1 truncated protein and establishment of indirect elisa method[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2023 (in Chinese).
- [3] 王金良, 祖立闯, 唐娜, 李娇, 董炳梅, 魏凤, 韩文瑜, 沈志强. 猪流行性腹泻病毒 N 蛋白表达与 PPA-ELISA 抗体检测方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2013, 33(6): 801-807.
WANG JL, ZU LC, TANG N, LI J, DONG BM, WEI F, HAN WY, SHEN ZQ. Development of PPA-ELISA for detecting antibodies to porcine epidemic diarrhea virus using recombinant truncated glycoprotein N expressed in *E. coli*[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2013, 33(6): 801-807 (in Chinese).
- [4] XU XW, DU LP, FAN BC, SUN B, ZHOU JZ, GUO RL, YU ZY, SHI DY, HE KW, LI B. A flagellin-adjuvanted inactivated porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) vaccine provides enhanced immune protection against PEDV challenge in piglets[J]. Archives of Virology, 2020, 165(6): 1299-1309.
- [5] 张庆桥, 王一鹏, 魏艳秋, 米建华, 赵雪, 孙立旦, 宋勤叶. 猪流行性腹泻病毒 N 蛋白单克隆抗体的制备与鉴定[J]. 中国兽医杂志, 2019, 55(1): 31-35, 3.
ZHANG QQ, WANG YP, WEI YQ, MI JH, ZHAO X, SUN LD, SONG QY. Preparation and identification of monoclonal antibodies against N protein of porcine epidemic diarrhea virus[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2019, 55(1): 31-35, 3 (in Chinese).
- [6] 殷一凡. 猪流行性腹泻病毒 N 蛋白单克隆抗体的制备及其抗原模拟表位的筛选[D]. 南京: 南京农业大学, 2021.
YIN YF. Preparation of monoclonal antibody against porcine epidemic diarrhea virus N protein and screening of its epitopes[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2021 (in Chinese).
- [7] 冯力, 孙东波, 陈建飞, 时洪艳, 吴波平, 崔晓辰, 吕茂杰, 刘娣, 童光志. 猪流行性腹泻病毒 N 蛋白单克隆抗体的制备与鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(3): 190-193.
FENG L, SUN DB, CHEN JF, SHI HY, WU BP, CUI XC, LV MJ, LIU D, TONG GZ. Preparation and characterization of the monoclonal antibodies against nucleocapsid protein of PEDV[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2008, 30(3): 190-193 (in Chinese).
- [8] WANG K, HU ZQ, FAN MY, SHAO ZW, YU QN, LI XW. Development of an indirect ELISA to detect PEDV specific IgA antibody based on a PEDV epidemic strain[J]. BMC Veterinary Research, 2022, 18(1): 319.
- [9] LIN HX, ZHOU H, GAO L, LI B, HE KW, FAN HJ. Development and application of an indirect ELISA for the detection of antibodies to porcine epidemic diarrhea virus based on a recombinant spike protein[J]. BMC Veterinary Research, 2018, 14(1): 243.
- [10] 封莹洁, 张同锋, 罗娟, 尚佳静, 孟鸽, 于晓慧, 蒋文明, 刘华雷, 范春艳, 李阳. 化学发光免疫分析法简介及其在动物疫病检测中的研究进展[J]. 中国动物检疫, 2023, 40(12): 73-79.
FENG YJ, ZHANG TF, LUO J, SHANG JJ, MENG G, YU XH, JIANG WM, LIU HL, FAN CY, LI Y. Introduction to chemiluminescence immunoassay and its application in detection of animal diseases[J]. China Animal Health Inspection, 2023, 40(12): 73-79 (in Chinese).
- [11] 邓瑞德, 陈志雄, 胡泽奇, 李润成, 王亚, 蒋敏, 颜运秋, 龚自治, 董伟, 葛猛. 基于 PEDV IgA 间接 ELISA 方法对母猪产前血清与初乳中 IgA 相关性的研究[J]. 中国预防兽医学报, 2024, 46(12): 1245-1254.
DENG RD, CHEN ZX, HU ZQ, LI RC, WANG Y,

- JIANG M, YAN YQ, GONG ZY, DONG W, GE M. Study on the correlation between IgA in serum and colostrum of sows based on PEDV IgA indirect ELISA method[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2024, 46(12): 1245-1254 (in Chinese).
- [12] 黄海鑫. PDCoV 和 PEAV 诊断方法建立、遗传进化分析及其 N 蛋白作用机制研究[D]. 温州: 温州大学, 2021.
- HUANG HX. Establishment of PDCoV and PEAV diagnostic methods, genetic evolution analysis and the mechanism of N protein action[D]. Wenzhou: Wenzhou University, 2021 (in Chinese).
- [13] 蒋孟娟. 猪流行性腹泻病毒 N 蛋白和多肽间接 ELISA 抗体检测方法的建立[D]. 南京: 南京农业大学, 2021.
- JIANG MJ. Development of an indirect ELISA method for detecting porcine epidemic diarrhea virus N protein and polypeptide[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2021 (in Chinese).
- [14] 吴婕, 杜菁, 樊繁, 任金阳, 卢会鹏, 张力, 雷昕诺, 曹世诺, 吴植, 朱睿, 朱善元. 猪流行性腹泻病毒 N 蛋白原核表达及多克隆抗体制备[J]. 中国畜牧兽医, 2024, 51(10): 4522-4530.
- WU J, DU J, FAN F, REN JY, LU HP, ZHANG L, LEI XN, CAO SN, WU Z, ZHU R, ZHU SY. Prokaryotic expression of N protein of porcine epidemic diarrhea virus and preparation of polyclonal antibodies[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 51(10): 4522-4530 (in Chinese).
- [15] 韩蓉. 猪流行性腹泻病毒间接 ELISA 抗体检测方法的建立与应用及 Nsp2 蛋白单克隆抗体的制备[D]. 南京: 南京农业大学, 2013.
- HAN R. Development and primary application of indirect elisa method for detection of antibodies to porcine epidemic diarrhea virus and preparation of Nsp2Protein monoclonal antibodies[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2013 (in Chinese).
- [16] 张洋, 欧云文, 马春霞, 任绍科, 潘琴, 邓书明, 翟佳佳, 杨山山. 猪流行性腹泻疫苗研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2024, 51(11): 5004-5013.
- ZHANG Y, OU YW, MA CX, REN SK, PAN Q, DENG SM, ZHAI JJ, YANG SS. Research progress on porcine epidemic diarrhea vaccine[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 51(11): 5004-5013 (in Chinese).
- [17] 王刚, 马兵善, 范宗良, 杨蓉霞, 李绍勇. 布朗运动影响下方腔内纳米流体非稳态自然对流的数值研究[J]. 工程热物理学报, 2015, 36(8): 1780-1784.
- WANG G, MA BS, FAN ZL, YANG RX, LI SY. Numerical study of transient natural convection of nanofluid in a square cavity considering Brownian motion[J]. Journal of Engineering Thermophysics, 2015, 36(8): 1780-1784 (in Chinese).
- [18] HEFERMEHL AK, HENSEN SMM, VERSANTVOORT C, ROTHERMEL A, ŞAHIN U. Automated glycan-bead coupling for high throughput, highly reproducible anti-glycan antibody analysis[J]. SLAS Technology, 2024, 29(1): 100103.