

研究报告

基于猪德尔塔冠状病毒重组核衣壳蛋白的 ELISA
抗体检测方法的建立与评价

杨浩 方六荣* 董楠 刘静 钱瑾 刘寒 王荡 肖少波

(华中农业大学动物医学院 农业微生物学国家重点实验室 湖北 武汉 430070)

摘要:【目的】猪德尔塔冠状病毒(Porcine deltacoronavirus, PDCoV)是近年来新发现的一种猪肠道冠状病毒,2014 年首次暴发于美国,随后亚洲多个国家也相继报道,对养猪业构成了巨大威胁。以大肠杆菌表达纯化的 PDCoV 重组核衣壳(N)蛋白为包被抗原,建立检测 PDCoV 抗体的间接 ELISA 方法,为 PDCoV 的血清抗体检测和流行病学调查提供工具。【方法】以 PDCoV CHN-HN-2014 株的基因组 RNA 为模板,通过 RT-PCR 扩增 PDCoV 核衣壳蛋白(N)基因的全长 cDNA,将其插入原核表达载体 pET-30a 中,构建原核表达质粒 pET30a-N,转化大肠杆菌 Rosetta(DE3),经异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG)诱导表达,以纯化的重组 N 蛋白为包被抗原,建立 PDCoV N-ELISA 抗体检测方法,评估其特异性、敏感性、稳定性,并用于临床血清的检测。【结果】SDS-PAGE 电泳检测证实表达的重组 N 蛋白主要以可溶性形式存在,Western blotting 证实表达的重组蛋白具有反应活性。用纯化的重组蛋白建立的 N-ELISA 具有良好的特异性、敏感性、稳定性。与中和试验同时检测 148 份免疫猪血清和 102 份临床血清,两种方法的阳性符合率为 88.99%,阴性符合率为 92.90%,总符合率为 91.20%。用建立的 ELISA 方法检测 267 份临床血清, PDCoV 抗体阳性血清的比率为 66.67%。【结论】建立的猪德尔塔冠状病毒 N-ELISA 抗体检测方法,与中和试验的符合率高,可用于 PDCoV 血清抗体检测和流行病学调查。

关键词: 猪德尔塔冠状病毒,核衣壳蛋白,间接 ELISA,中和试验

Foundation item: Key Technologies Research & Development Program of China (No. 2015BAD12B02); National Key Research & Development Program of China (No. 2016YFD0500103)

***Corresponding author:** Tel: 86-27-87286884; E-mail: fanglr@mail.hzau.edu.cn

Received: July 08, 2017; **Accepted:** November 02, 2017; **Published online** (www.cnki.net): November 09, 2017

基金项目: 国家科技支撑计划项目(No. 2015BAD12B02); 国家重点研发计划项目(No. 2016YFD0500103)

***通讯作者:** Tel: 86-27-87286884; E-mail: fanglr@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2017-07-08; **接受日期:** 2017-11-02; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2017-11-09

Development and evaluation of an indirect ELISA based on recombinant nucleocapsid protein for detecting antibodies against porcine deltacoronavirus

YANG Hao FANG Liu-Rong* DONG Nan LIU Jing QIAN Jin LIU Han
WANG Dang XIAO Shao-Bo

(State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

Abstract: [Objective] Porcine deltacoronavirus (PDCoV) is an emerging swine enteropathogenic coronavirus. PDCoV outbreak was first reported in the United States swine in 2014, and has subsequently been reported in many Asian countries. Nowadays, PDCoV has been becoming a great threat to swine industry worldwide. Using the recombinant nucleocapsid (N) protein expressed in *E. coli* Rosetta(DE3) as the coated antigen to establish an indirect ELISA for the detection of PDCoV antibody, providing a useful tool for antibody detection and epidemiology surveillance of PDCoV. [Methods] The full-length cDNA of PDCoV N gene was amplified by RT-PCR based on the PDCoV strain CHN-HN-2014. The RT-PCR production was inserted into prokaryotic expressing vector pET-30a to generate a recombinant plasmid pET30a-N. Then pET30a-N was transformed into *E. coli* Rosetta(DE3) and induced by Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG). The expressed N protein was purified and used as coated antigen to develop an indirect ELISA for detecting antibodies against PDCoV. After the specificity, sensibility, and repeatability of the developed ELISA method were evaluated, this method was used to test clinical serum samples. [Results] SDS-PAGE and Western blotting analysis showed that the N protein was efficiently expressed in supernatant and was specific reactions with antiserum against PDCoV. The established N-ELISA was highly specific, sensitive and repeatable. A total of 148 serum samples collected from pigs with a known immunization history and 102 serum samples collected from pigs with unknown PDCoV status were detected using both N-ELISA and neutralization test. The results showed that the positive agreement rate was 88.99%, the negative agreement rate was 92.90%, and overall coincidence rate was 91.20%. The positive rate of 267 clinical serum samples examined by N-ELISA was 66.67%. [Conclusion] The established ELISA method can be used as a tool for antibody detection and epidemiology surveillance of PDCoV.

Keywords: Porcine deltacoronavirus, Nucleocapsid protein, Indirect ELISA, Neutralizing test

猪德尔塔冠状病毒(Porcine deltacoronavirus, PDCoV)是近年来新发现的一种猪肠道冠状病毒^[1], 可以感染不同日龄和品种的猪, 主要引起哺乳仔猪发病, 以腹泻、呕吐、脱水为主要特征, 临床症状与猪传染性胃肠炎病毒(Transmissible gastroenteritis virus, TGEV)和猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)引起的仔猪腹泻极为相似。PDCoV 于 2012 年由 Woo 等从畜禽交易市场采集的猪直肠拭子中首次检测到, 但他们没有进行病毒分离, 也未对其致病性作深入研究^[1]。2014 年 2 月, 美国研究者从发生腹泻但 TGEV、PEDV、猪轮状

病毒(Porcine rotavirus, PoRV)为阴性的猪场检测到 PDCoV^[2-4], 提示 PDCoV 可能对猪具有致病性并引起仔猪腹泻。目前美国至少有 20 个州检测到 PDCoV 感染, 说明 PDCoV 在美国广泛流行^[5-6]。韩国、中国、泰国、老挝、越南、加拿大等国家也相继报道了 PDCoV 的发生或流行^[7-13], 说明 PDCoV 的流行范围在逐渐扩大, 其对养猪业的危害也日益凸现。

PDCoV 属于冠状病毒科, 是有囊膜的单股正链 RNA 病毒, 基因组全长约 25.4 kb, 编码 15 个成熟的非结构蛋白、4 个结构蛋白和 3 个辅助蛋白^[14-15]。

结构蛋白依次为表面纤突蛋白(S)、小膜蛋白(E)、膜蛋白(M)、核衣壳(N)蛋白,其中N蛋白是PDCoV病毒粒子含量最丰富的蛋白,具有很强的免疫原性,PDCoV感染猪后针对N蛋白的抗体产生时间早、持续时间长、抗体水平高,并且在不同PDCoV毒株中N蛋白的保守性高^[16-17],因此,N蛋白是建立PDCoV血清学诊断方法的首选靶蛋白。本研究以原核表达、纯化的PDCoV N蛋白为包被抗原,建立了检测PDCoV抗体的ELISA方法,并与中和试验进行了比较。

1 材料与方法

1.1 病毒、细菌与质粒

PDCoV CHN-HN-2014株由本实验室从临床发病猪中分离^[18];大肠杆菌DH5 α 和Rosetta(DE3)、原核表达载体pET-30a均由本实验室保存。

1.2 血清

猪瘟病毒(CSFV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)、猪圆环病毒2型(PCV2)、伪狂犬病病毒(PRV)、TGEV、PEDV、PoRV、PDCoV阳性血清、PDCoV阴性血清以及PDCoV CHN-HN-2014株灭活疫苗免疫后不同时间采集的血清均由本实验室制备,临床血清样品采自湖北、河南、河北地区的部分猪场。

1.3 主要试剂和仪器

RNA反转录试剂、限制性内切酶、*Taq* DNA聚合酶、T4 DNA连接酶、DNA凝胶上样缓冲液、DNA Marker等均购自宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa);RNA提取试剂盒为OMEGA公司产品;琼脂糖凝胶回收试剂盒为TIANGEN公司产品;羊抗猪酶标二抗购自Santa Cruz公司;酶标板购自深圳金灿华实业有限公司。化学发光成像系统、凝胶成像系统、PCR仪,Bio-Rad公司;酶标仪,BioTek公司。

1.4 引物设计

根据PDCoV CHN-HN-2014株的N基因序列,利用Primer 5.0软件设计扩增N基因全长cDNA的特异性引物。上游引物F: 5'-CGCGGATCCATGGC

CGCACCAGTAGTC-3' (下划线为*Bam*H I酶切位点);下游引物R: 5'-GTGCTCGAGTCGCTGCTGATTCCTGCTT-3' (下划线为*Xho* I酶切位点)。PCR反应体系: 5 \times Buffer 10 μ L, dNTPs (1.5 mmol/L) 4 μ L, Primer STAR HS DNA Polymerase (2.5 U/ μ L) 0.5 μ L, 上游引物F (10 μ mol/L) 1 μ L, 下游引物R (10 μ mol/L) 1 μ L, cDNA 1 μ L, DEPC H₂O 32.5 μ L。PCR反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 98 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 共35个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.5 PDCoV N基因的扩增与原核表达质粒的构建

利用RNA提取试剂盒提取病毒总RNA,反转录成cDNA后作为模板,利用设计的特异性引物通过PCR扩增PDCoV N基因。回收的PCR产物用*Bam*H I和*Xho* I双酶切后插入pET-30a的相应位点,构建重组表达质粒。重组表达质粒经*Bam*H I和*Xho* I双酶切鉴定。

1.6 PDCoV N蛋白的原核表达、纯化与鉴定

将构建的重组表达质粒转化大肠杆菌Rosetta(DE3)感受态细胞,37 $^{\circ}$ C、200 r/min振荡培养至 $0.4 \leq OD_{600} \leq 1.0$ 后,加入终浓度为0.8 mmol/L的IPTG在16 $^{\circ}$ C诱导表达。分别在诱导后16、24 h取样,用于SDS-PAGE电泳检测。证实PDCoV N蛋白获得表达后,进一步扩大培养转化菌,在16 $^{\circ}$ C诱导24 h,收集菌体,用灭菌水重悬。将装有样品的离心管置于冰水混合物中,进行超声波破碎,超声波每作用15 s停15 s,持续约3 min,直至菌液变清亮。4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min离心10 min,分别取上清和沉淀进行SDS-PAGE电泳检测,以确定重组蛋白的表达形式。重组蛋白的纯化按照His标签镍柱亲和纯化方法进行,纯化的N蛋白经SDS-PAGE电泳后转印到PVDF膜上,用PDCoV阳性血清作为一抗,HRP标记的羊抗猪IgG作为二抗进行Western blotting检测。

1.7 PDCoV N-ELISA 抗体检测方法的建立

1.7.1 最佳抗原包被浓度和血清稀释倍数的确定:将纯化的PDCoV N蛋白连续倍比稀释至终浓度依次为5.00、2.50、1.25、0.63、0.32、0.16 μ g/mL,

PDCoV 标准阴、阳性血清从 1:20 倍比稀释至 1:640, 采用方阵滴定法进行 ELISA 检测, 以阳性血清 $OD_{630} \geq 1.0$ 且有最大 P/N 值时的包被蛋白浓度和血清稀释度作为最佳抗原包被浓度和最佳血清稀释倍数。

1.7.2 最佳包被条件的确定: 按确定的最佳包被浓度将抗原稀释后滴加到酶标板中, 分别按以下 5 种不同的条件进行包被: 4 °C 过夜、37 °C 2 h、37 °C 3 h、37 °C 2 h 后 4 °C 过夜、37 °C 3 h 后 4 °C 过夜, 然后按间接 ELISA 程序进行测定。

1.7.3 最佳包被液和包被时间的确定: 以最适抗原包被浓度和包被条件包被酶标板, 分别以 0.5% BSA 的 PBST、1% BSA 的 PBST、2% BSA 的 PBST、4% BSA 的 PBST、1% 海藻糖的 PBST、2% 海藻糖的 PBST、5% 脱脂奶粉的 PBST 和 10% 脱脂奶粉的 PBST 于 37 °C 封闭 1 h, 进行间接 ELISA 测定。随后以确定的封闭液分别封闭 30、60、90、120 min 后, 进行间接 ELISA 测定。

1.7.4 血清最佳稀释液和最佳作用时间的确定: 分别以 0.5% BSA 的 PBST、1% BSA 的 PBST、2% BSA 的 PBST 和 PBST 作为血清稀释液, 进行间接 ELISA 测定, 以确定最佳的血清稀释液。然后以确定的血清稀释液稀释血清, 在 37 °C 分别作用 15、30、45、60、90、120 min 后进行间接 ELISA 测定。

1.7.5 酶标二抗最佳稀释度和作用时间的确定: 将酶标二抗分别作 1:2 000、1:4 000、1:8 000、1:10 000 和 1:12 000 稀释后进行间接 ELISA 检测。以确定的稀释度稀释二抗, 加入二抗后于 37 °C 分别孵育 30、60、90、120 min, 显色后测定 OD_{630} 。

1.7.6 底物反应时间的确定: 按确定的条件进行间接 ELISA, 加入底物后分别显色 5、10、15、30 min 后测定 OD_{630} 。

1.7.7 判定标准的确定: 用建立的 ELISA 方法检测 141 份 PDCoV 中和抗体为阴性的血清样品, 计算样品 S/P 值[S/P 值=(检测样品 OD_{630} -阴性对照 OD_{630})/(阳性对照 OD_{630} -阴性对照 OD_{630})]的平均值(\bar{x})和标准差(SD)。确定 ELISA 的判定标准为: 当

S/P 值 $\geq \bar{x} + 3SD$ 时判定为阳性, 当 S/P 值 $\leq \bar{x} + 2SD$ 时判定为阴性, S/P 值在 $\bar{x} + 3SD$ 与 $\bar{x} + 2SD$ 之间时为可疑, 需要重新检测, 再次检测时 S/P 值 $\geq \bar{x} + 2SD$ 判为阳性, S/P 值 $< \bar{x} + 2SD$ 判为阴性。

1.8 特异性试验

用建立的 ELISA 方法检测 CSFV、PRRSV、PCV2、PRV、PEDV、TGEV、PoRV 的特异性阳性血清, 同时设立 PDCoV 阳性、阴性血清对照, 确定方法的特异性。

1.9 重复性试验

取同一批包被的 3 块酶标板, 同时检测 14 份血清, 根据检测得到的 S/P 值计算变异系数, 确定所建立的 ELISA 方法的批内重复性。取 3 批抗原包被的酶标板各一块, 同时检测 14 份血清, 根据检测得到的 S/P 值计算变异系数, 确定所建立 ELISA 方法的批间重复性。

1.10 稳定性试验

将包被 PDCoV N 蛋白的 ELISA 板封闭后 37 °C 放置 3、7 d 和 4 °C 放置 30、150 d 后分别检测标准阳性血清和标准阴性血清, 评价 N-ELISA 检测方法的稳定性。

1.11 符合率试验

为了确定所建立 N-ELISA 方法的准确性与可靠性, 用建立的 ELISA 方法和中和试验同时检测 148 份 PDCoV CHN-HN-2014 株灭活疫苗免疫仔猪的血清和 102 份临床血清, 并对检测结果进行比较分析。在中和试验检测中, 当抗体效价小于 1:4 时判为阴性, 大于等于 1:4 时判为阳性。

1.12 临床血清样品的检测

使用建立的 PDCoV N-ELISA 抗体检测方法, 对来自湖北、河北、河南的 267 份临床血清进行检测, 统计相关数据。

2 结果与分析

2.1 PDCoV N 基因重组表达质粒的构建

以 PDCoV CHN-HN-2014 株的基因组 RNA 为模板, 通过 RT-PCR 扩增获得大小约 1 000 bp 的片

段,与预期结果一致。回收目的片段,经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后插入原核表达载体 pET-30a 中,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,小量提取质粒,经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切,获得大小约 1 000 bp 的目的条带和 5 400 bp 的载体条带,说明 N 基因已插入 pET-30a 载体中。测序证实无碱基突变、插入或缺失,说明重组质粒构建成功,将其命名为 pET30a-N。

2.2 PDCoV N 蛋白的表达、纯化与 Western blotting 分析

将重组质粒 pET30a-N 转化 Rosetta(DE3)重组菌,经 IPTG 诱导后表达,离心后取全菌及经超声波破碎后的上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE 检测,表达的重组 N 蛋白主要以可溶性形式存在于上清中,大小约 45 kD(图 1),与预期一致。将表达的蛋白用 His 标签镍柱纯化,经 SDS-PAGE 电泳后转移到 PVDF 膜上进行 Western blotting 检测。如图 2 所示,SDS-PAGE 显示获得的蛋白纯度较高,经检测蛋白浓度为 0.2 mg/mL; Western blotting 检测仅在大小约 45 kD 处出现特异性条带,说明表达的蛋白能与 PDCoV 阳性血清发生特异性反应,具有良好的反应原性。

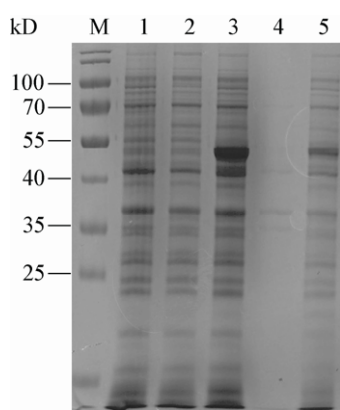


图 1 重组 N 蛋白的可溶性表达

Figure 1 Soluble recombinant N protein expressed in supernatant

注: M: 蛋白 Marker; 1: 重组质粒 pET30a-N 未诱导; 2: pET-30a 16 °C 诱导 16 h; 3: pET30a-N 16 °C 诱导 24 h; 4: 沉淀; 5: 上清。

Note: M: Protein Marker; 1: pET30a-N non-induced (16 °C); 2: pET-30a induced for 16 h (16 °C); 3: pET30a-N induced for 24 h (16 °C); 4: Cracked precipitation; 5: Cracked supernatant.

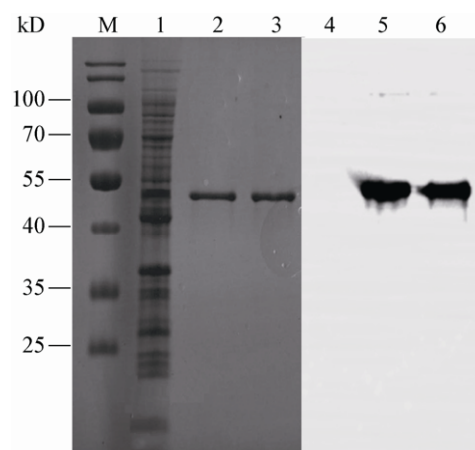


图 2 纯化 N 蛋白的 SDS-PAGE 检测和 Western blotting 分析

Figure 2 SDS-PAGE and Western blotting analysis of purified N protein

注: M: 蛋白 Marker; 1、4: pET-30a 16 °C 诱导 24 h; 2、3、5、6: 纯化的 N 蛋白。

Note: M: Protein Marker; 1, 4: pET-30a induced for 24 h at 16 °C; 2, 3, 5, 6: Purified N protein.

2.3 PDCoV N-ELISA 方法的建立

2.3.1 最适反应条件: 方阵滴定法的检测结果显示,当包被蛋白浓度为 1.25 μ g/mL、血清稀释倍数为 1:80 时,阳性血清 OD_{630} 为 1.242,阴性血清 OD_{630} 为 0.109, P/N 值最大,因此确定 N 蛋白的最佳包被浓度为 1.25 μ g/mL,血清最佳稀释倍数为 1:80。根据阴、阳性血清的检测结果,确定抗原包被条件为: 4 °C 过夜; 最适封闭液为 0.5% BSA 的 PBST,封闭时间为 60 min; 最佳血清稀释液为 0.5% BSA 的 PBST,反应时间为 30 min; 酶标二抗最佳稀释度为 1:6 000,最佳反应时间为 60 min; 底物最佳反应时间为 5 min。

2.3.2 判定标准: 利用 N-ELISA 抗体检测方法检测了 141 份 PDCoV 中和抗体为阴性的血清样品,计算 S/P 值的平均值 \bar{x} = 0.103, SD = 0.036,确定建立的 ELISA 检测方法的判定标准为: 当 S/P 值 \geq 0.211 时判定为阳性,当 S/P 值 \leq 0.175 时判定为阴性, S/P 值在 0.175 与 0.211 之间时为可疑,如再次检测时 S/P 值 \geq 0.175 时判为阳性, S/P 值 $<$ 0.175 时判为阴性。

2.3.3 N-ELISA 的特异性: 利用建立的 N-ELISA

方法检测 CSFV、PRRSV、PCV2、PRV、PEDV、TGEV、PoRV 的特异性阳性血清, 结果均为阴性, 而对 PDCoV 阳性血清的检测结果为阳性(表 1), 说明建立的 N-ELISA 方法具有良好的特异性。

2.3.4 N-ELISA 的重复性: 用同一批次包被的不同 ELISA 板和不同批次包被的 ELISA 板同时对 14 份血清进行检测的结果显示, 批内重复性试验的变异系数在 1.22%–7.46%之间, 批间重复的变异系数在 0.93%–9.63%之间(表 2), 均低于 10%, 说明所建立的 ELISA 方法具有良好的批内重复性和批间重复性。

2.3.5 N-ELISA 的稳定性: 将包被的酶标板于 37 °C 和 4 °C 保存一定时间后对同一 PDCoV 阴性血清和阳性血清进行检测, 结果在 37 °C 保存 3 d、4 °C 保存 30 d、4 °C 保存 150 d 的 ELISA 板检测结

表 1 PDCoV N-ELISA 特异性试验结果
Table 1 The results of PDCoV N-ELISA specificity test

| 血清 Sera | OD ₆₃₀ | S/P | 结果 Results |
|-----------|-------------------|-------|------------|
| CSFV | 0.149 | 0.040 | — |
| PRRSV | 0.133 | 0.024 | — |
| PCV2 | 0.151 | 0.042 | — |
| PRV | 0.128 | 0.019 | — |
| PEDV | 0.151 | 0.042 | — |
| TGEV | 0.152 | 0.043 | — |
| PRoV | 0.142 | 0.033 | — |
| PDCoV (+) | 1.113 | | |
| PDCoV (—) | 0.109 | | |

果无显著差异(表 3), 说明所建立的 N-ELISA 方法稳定性良好。

2.3.6 N-ELISA 与中和试验的符合率: 用建立的 PDCoV N-ELISA 方法与中和试验同时检测 250 份血清, 其中 148 份为 PDCoV CHN-HN-2014 株灭活疫苗免疫仔猪后不同时间的血清, 102 份为临床猪

表 2 重复性试验结果
Table 2 The results of repeatability tests

| 血清编号 Serum No. | 批内重复性 Intra-batch repeatability | | 批间重复性 Inter-batch repeatability | |
|-----------------------------------|---------------------------------|--------|---------------------------------|--------|
| | 平均值±标准差 | 变异系数 | 平均值±标准差 | 变异系数 |
| | $\bar{x} \pm SD$ | CV (%) | $\bar{x} \pm SD$ | CV (%) |
| 标准阳性血清 Standard positive serum | 0.978±0.020 | | 1.144±0.067 | |
| 标准阴性血清 Standard negative serum | 0.100±0.003 | | 0.103±0.011 | |
| 1 | 0.903±0.019 | 2.11 | 1.012±0.018 | 1.71 |
| 2 | 0.884±0.011 | 1.22 | 1.069±0.024 | 1.45 |
| 3 | 0.661±0.011 | 1.59 | 0.731±0.043 | 2.00 |
| 4 | 0.931±0.049 | 5.21 | 1.053±0.022 | 0.93 |
| 5 | 0.973±0.055 | 5.69 | 1.164±0.058 | 4.93 |
| 6 | 0.696±0.011 | 1.51 | 0.664±0.054 | 3.94 |
| 7 | 0.719±0.035 | 4.89 | 0.655±0.048 | 5.01 |
| 8 | 0.577±0.038 | 6.61 | 0.459±0.006 | 1.19 |
| 9 | 0.893±0.037 | 4.11 | 0.718±0.039 | 1.78 |
| 10 | 0.432±0.032 | 7.46 | 0.362±0.022 | 3.97 |
| 11 | 1.149±0.053 | 4.65 | 1.054±0.032 | 2.99 |
| 12 | 0.860±0.029 | 3.43 | 1.047±0.039 | 3.19 |
| 13 | 0.583±0.031 | 5.24 | 0.701±0.070 | 9.63 |
| 14 | 0.816±0.010 | 1.23 | 0.979±0.039 | 3.60 |

表 3 稳定性试验结果

Table 3 The results of stability test

| 保存条件 Condition | 血清样品 Serum samples | $OD_{630\pm S}$ |
|-------------------|-----------------------|-----------------|
| 37 °C, 0 d | + | 1.115±0.039 |
| | - | 0.102±0.011 |
| 37 °C, 3 d | + | 1.235±0.032 |
| | - | 0.124±0.013 |
| 37 °C, 7 d | + | 1.006±0.020 |
| | - | 0.098±0.011 |
| 4 °C, 30 d | + | 1.115±0.018 |
| | - | 0.116±0.012 |
| 4 °C, 150 d | + | 1.089±0.017 |
| | - | 0.108±0.011 |

注: +: PDCoV 阳性血清; -: PDCoV 阴性血清。

Note: +: PDCoV positive serum; -: PDCoV negative serum.

血清。结果两种方法检测的阴性符合率为 92.90%, 阳性符合率为 88.99%, 总符合率为 91.20% (表 4)。同时也发现建立的 N-ELISA 可以检测到中和抗体为 1:4 的血清, 说明建立的 N-ELISA 具有较好的敏感性。

2.3.7 N-ELISA 抗体检测方法的初步应用: 用建立的 ELISA 检测方法, 对来自湖北、河南、河北 3 个省的 14 个猪场 267 份临床血清样品进行检测, 阳性猪场达 85.71%, 阳性率为 66.67% (表 5)。其中 7 个猪场样品阳性率高达 91.67%–100%, 可见 PDCoV 在湖北、河南、河北 3 个省均呈地方性流行。

表 4 N-ELISA 与中和试验的符合性检测结果

Table 4 Detection results of serum samples by the indirect N-ELISA and serum neutralizing test (SNT)

| | | N-ELISA 检测结果 Results of N-ELISA | | 符合率 Coincidence rate (%) |
|----------------------------|----------|-------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| | | 阳性样品数 Number of positive samples | 阴性样品数 Number of negative samples | |
| 中和试验检测结果 Results of SNT | <1:4 | 141 | 10 | 92.90 |
| | 1:4–1:8 | 17 | 13 | 76.47 |
| | 1:8–1:16 | 37 | 29 | 78.38 |
| | >1:16 | 55 | 55 | 100 |

表 5 临床猪血清样品 ELISA 检测结果

Table 5 ELISA results of clinical porcine serum samples

| 地区 Sources | 采集时间 Collected dates | 样品数量 Number of samples | 阴性样品数 Number of negative samples | 阳性样品数 Number of positive samples | 阳性率 Positive rate (%) | 猪日龄 Age in days |
|-----------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|--------------------|
| 湖北黄石 Huangshi, Hubei | 2015.12 | 23 | 23 | 0 | 0 | — |
| 湖北鄂州 Ezhou, Hubei | 2016.04 | 14 | 0 | 14 | 100 | 35 日龄 |
| 湖北荆州 Jingzhou, Hubei | 2016.05 | 10 | 0 | 10 | 100 | 母猪 |
| 湖北黄石 Huangshi, Hubei | 2016.05 | 20 | 1 | 19 | 95.00 | — |
| 湖北黄冈 Huanggang, Hubei | 2016.05 | 28 | 0 | 28 | 100 | 育肥猪 |
| 湖北咸宁 Xianning, Hubei | 2016.05 | 15 | 14 | 1 | 6.67 | 21 日龄 |
| 湖北武汉 Wuhan, Hubei | 2016.07 | 19 | 0 | 19 | 100 | — |
| 湖北咸宁 Xianning, Hubei | 2016.10 | 6 | 6 | 0 | 0 | 1–21 日龄 |
| 湖北鄂州 Ezhou, Hubei | 2016.11 | 24 | 2 | 22 | 91.67 | 1–21 日龄 |
| 湖北鄂州 Ezhou, Hubei | 2016.11 | 12 | 11 | 1 | 8.33 | 1–21 日龄 |
| 湖北武汉 Wuhan, Hubei | 2016.11 | 17 | 16 | 1 | 5.88 | 1–21 日龄 |
| 河南郑州 Zhengzhou, Henan | 2017.04 | 25 | 6 | 19 | 76.00 | 1–21 日龄 |
| 河南新乡 Xinxiang, Henan | 2017.04 | 22 | 1 | 21 | 95.45 | 1–21 日龄 |
| 河北衡水 Hengshui, Hebei | 2017.03 | 32 | 9 | 23 | 71.88 | 1–21 日龄 |
| 总计 Total | | 267 | 89 | 178 | 66.67 | |

3 结论与讨论

自 2010 年底 PEDV 变异株引起仔猪腹泻发生以来, 仔猪腹泻成为严重危害养猪业的常见疫病, 给我国养猪业造成了巨大的经济损失^[19]。2014 年以来在美国出现的 PDCoV, 使仔猪腹泻的疫情更加复杂。作为一种新发疫病, 目前对 PDCoV 的病原学、流行病学、致病与免疫机理等知之甚少, 也缺少疫苗和诊断技术等防控产品^[17,20]。加快 PDCoV 的基础研究和防控产品开发, 将有助于仔猪腹泻疫情的控制。

在 2014 年美国发生 PDCoV 后, 国内多个实验室对 PDCoV 在中国大陆的流行情况进行了病原学调查, 证实 PDCoV 在我国湖北、江苏、广东等十多个省市的猪场中存在, 部分地区的病原阳性率高达 33.71%^[9-11,18,21-22], 提示 PDCoV 已成为威胁我国养猪业的重要疫病。全基因组序列分析发现, 我国大陆流行的 PDCoV 与 2012 年我国香港地区检测到的 PDCoV HUK15-155 株以及 2014 年美国分离毒株具有较高的相似性^[9-11]。人工感染试验证实国内分离毒株 CHN-HN-2014 对 5 日龄和 21 日龄仔猪均具有较强的致病性^[18]。

中和试验是检测 PDCoV 抗体常用的方法, 也是最经典的检测抗体方法, 能直接反映病毒感染后或疫苗免疫后所诱导的保护性抗体的水平。但由于中和试验的条件要求高、耗时长, 不适合大量血清样品的检测和基层生产单位使用。因此, 建立一种快速简便的间接 ELISA 抗体检测方法有助于 PDCoV 的流行病学调查与监测。本研究以原核表达的 PDCoV N 蛋白为包被抗原, 建立了检测 PDCoV 抗体的 ELISA 方法, 并与中和试验进行了比较, 通过对 250 份血清样品的检测, 证实所建立的 ELISA 方法与中和试验在检测阴性血清和中和抗体水平高的血清时的符合率很高。在特异性方面, 建立的 PDCoV N-ELISA 同 PEDV、TGEV、PoRV 等几种引起仔猪腹泻病毒的阳性血清均没有交叉反应, 证明其具有较好的特异性。最近, 我国广东地区又发现一种可能来源于蝙蝠的猪阿尔法冠状病毒

(SeACoV)^[23-24]。由于目前缺少针对这种新出现 SeACoV 的单因子阳性血清, PDCoV N-ELISA 是否与 SeACoV 存在交叉反应有待进一步研究。另外, 我们在表达重组核衣壳蛋白时, 采用了低温诱导 (16 °C), 使表达的重组蛋白呈可溶性, 避免了对包涵体表达蛋白的复性过程, 更好地保证重组蛋白的反应原性以及不同批次表达蛋白的稳定性。

本研究采用建立的 ELISA 方法检测了来自湖北、河南、河北 3 个省 14 个规模化猪场的 267 份临床血清样品, 猪场阳性率为 85.71% (12/14), 血清样品阳性率为 66.67% (178/267)。分析发现之所以总阳性率高, 主要是因为部分猪场的血清阳性率达到 90% 以上, 甚至 100%; 另一个可能的原因是所有 267 份血清样品均采自发生腹泻的猪场, 这一结果也说明部分猪场的腹泻是由 PDCoV 感染所致。采集的 267 份临床血清样品来源于不同年龄阶段的猪, 检测结果发现来源于 21 日龄以内仔猪、育肥猪和母猪的血清均可检测到 PDCoV ELISA 抗体, 并且最高阳性率均可达 90% 以上, 说明 PDCoV 可以感染不同生长阶段的猪。虽然临床上 PDCoV 引起的腹泻主要发生在 21 日龄以内仔猪, 但抗体检测结果表明不同生长阶段猪都有可能被 PDCoV 感染。因此, 在临床上除了要断奶前仔猪的预防措施外, 对其它日龄的猪同样要做好综合防控措施, 以防止其作为传染源导致 21 日龄以内仔猪感染发病。

参考文献

- [1] Woo PCY, Lau SKP, Lam CSF, et al. Discovery of seven novel mammalian and avian coronaviruses in the genus Deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of Gammacoronavirus and Deltacoronavirus[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(7): 3995-4008
- [2] Wang LY, Byrum B, Zhang Y. Detection and genetic characterization of deltacoronavirus in pigs, Ohio, USA, 2014[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2014, 20(7): 1227-1230
- [3] Li GW, Chen Q, Harmon KM, et al. Full-length genome sequence of porcine deltacoronavirus strain USA/IA/2014/8734[J]. *Genome Announcements*, 2014, 2(2): e00278-14
- [4] Marthaler D, Jiang Y, Collins J, et al. Complete genome sequence of strain SDCV/USA/Illinois121/2014, a porcine deltacoronavirus

- from the United States[J]. *Genome Announcements*, 2014, 2(2): e00218-14
- [5] Wang LY, Byrum B, Zhang Y. Porcine coronavirus HKU15 detected in 9 US states, 2014[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2014, 20(9): 1594-1595
- [6] Sinha A, Gauger P, Zhang JQ, et al. PCR-based retrospective evaluation of diagnostic samples for emergence of porcine deltacoronavirus in US swine[J]. *Veterinary Microbiology*, 2015, 179(3/4): 296-298
- [7] Lee S, Lee C. Complete genome characterization of Korean porcine deltacoronavirus strain KOR/KNU14-04/2014[J]. *Genome Announcements*, 2014, 2(6): e01191-14
- [8] Lee JH, Chung HC, Nguyen VG, et al. Detection and phylogenetic analysis of porcine deltacoronavirus in Korean swine farms, 2015[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2016, 63(3): 248-252
- [9] Dong N, Fang LR, Zeng SL, et al. Porcine deltacoronavirus in mainland China[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2015, 21(12): 2254-2255
- [10] Song D, Zhou X, Peng Q, et al. Newly emerged porcine Deltacoronavirus associated with diarrhea in swine in China: identification, prevalence and full-length genome sequence analysis[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2015, 62(6): 575-580
- [11] Wang YW, Yue H, Fang WH, et al. Complete genome sequence of porcine deltacoronavirus strain CH/Sichuan/S27/2012 from mainland China[J]. *Genome Announcements*, 2015, 3(5): e00945-15
- [12] Madapong A, Saeng-Chuto K, Lorsirigool A, et al. Complete genome sequence of porcine deltacoronavirus isolated in Thailand in 2015[J]. *Genome Announcements*, 2016, 4(3): e00408-16
- [13] Janetanakit T, Lumyai M, Bunpong N, et al. Porcine deltacoronavirus, Thailand, 2015[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2016, 22(4): 757-759
- [14] Fang PX, Fang LR, Liu XR, et al. Identification and subcellular localization of porcine deltacoronavirus accessory protein NS6[J]. *Virology*, 2016, 499: 170-177
- [15] Fang PX, Fang LR, Hong YY, et al. Discovery of a novel accessory protein NS7a encoded by porcine deltacoronavirus[J]. *Journal of General Virology*, 2017, 98(2): 173-178
- [16] Jung K, Hu H, Saif LJ. Porcine deltacoronavirus infection: etiology, cell culture for virus isolation and propagation, molecular epidemiology and pathogenesis[J]. *Virus Research*, 2016, 226: 50-59
- [17] Zhang JQ. Porcine deltacoronavirus: overview of infection dynamics, diagnostic methods, prevalence and genetic evolution[J]. *Virus Research*, 2016, 226: 71-84
- [18] Dong N, Fang LR, Yang H, et al. Isolation, genomic characterization, and pathogenicity of a Chinese porcine deltacoronavirus strain CHN-HN-2014[J]. *Veterinary Microbiology*, 2016, 196: 98-106
- [19] Wang D, Fang LR, Xiao SB. Porcine epidemic diarrhea in China[J]. *Virus Research*, 2016, 226: 7-13
- [20] Jang G, Lee KK, Kim SH, et al. Prevalence, complete genome sequencing and phylogenetic analysis of porcine deltacoronavirus in South Korea, 2014-2016[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2017, 64(5): 1364-1370
- [21] Zhai SL, Wei WK, Li XP, et al. Occurrence and sequence analysis of porcine deltacoronaviruses in southern China[J]. *Virology Journal*, 2016, 13: 136
- [22] Mai K, Feng J, Chen G, et al. The detection and phylogenetic analysis of porcine deltacoronavirus from Guangdong province in southern China[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2017. DOI: 10.1111/tbed.12644
- [23] Gong L, Li J, Zhou QF, et al. A new bat-HKU2-like coronavirus in swine, China, 2017[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2017, 23(9): 1607-1609
- [24] Pan YF, Tian XY, Qin P, et al. Discovery of a novel swine enteric alphacoronavirus (SeACoV) in southern China[J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 211: 15-21