

## 猪流行性腹泻病毒 S 蛋白主要抗原表位区的原核表达及间接 ELISA 检测方法的建立

华耀 王玮 李郁 孙裴 魏建忠\*

(安徽农业大学动物科技学院 安徽 合肥 230036)

**摘要:**【目的】建立一种快速、特异、敏感的检测血清中猪流行性腹泻病毒(PEDV)抗体的方法。

【方法】利用生物学软件对 PEDV S 蛋白进行抗原位点分析,选择 S 蛋白的主要抗原表位区进行原核表达。采用 SDS-PAGE 和 Western-blot 对重组蛋白进行鉴定及抗原性分析。用纯化的重组蛋白作为包被抗原,经过条件优化、特异性和重复性试验,建立一种针对血清中 PEDV 抗体的间接 ELISA 检测方法。【结果】表达了重组 S 蛋白,重组的 S 蛋白能与 PEDV 阳性血清发生特异性反应,并建立一种基于重组 S 蛋白的间接 ELISA 检测方法。组内及组间变异系数均小于 10%,重复性较好。建立的间接 ELISA 检测方法分别与商品化 PEDV 抗体检测试剂盒和 Western-blot 鉴定结果相比,两者符合率分别为 86.67%和 88.89%。【结论】建立的间接 ELISA 方法可以用于 PEDV 抗体的检测。

**关键词:**猪流行性腹泻病毒, S 基因, 原核表达, 间接 ELISA

## Prokaryotic expression of the structural protein S of porcine epidemic diarrhea virus and establishment of an indirect ELISA for an detection of antibody against porcine epidemic diarrhea

HUA Yao WANG Wei LI Yu SUN Pei WEI Jian-Zhong\*

(School of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China)

**Abstract:** [Objective] To develop a rapid, specific and sensitive method for detecting the serum antibodies against porcine epidemic diarrhea virus (PEDV). [Methods] The major S protein antigenic region were expressed after analyzing the site antigenic of PEDV S protein by bioinformatics softwares and the recombinant protein was detected by SDS-PAGE and Western-blot. Furthermore, indirect ELISA was developed by using the recombinant protein as coating antigen and though optimizing conditions, specificity and reproducibility tests. [Results] The recombinant protein was expressed successfully, the recombinant S protein could react with PEDV positive serum specifically, and the indirect ELISA method for serum antibodies against PEDV was developed successfully. Both the intro-batch and inter-batch variation coefficient were lower than 10%. The developed indirect ELISA method compared with commercialization of PEDV antibody detection kit and Western-blot, the

\*Corresponding author: E-mail: wjz@ahau.edu.cn

Received: May 07, 2015; Accepted: July 16, 2015; Published online (www.cnki.net): September 09, 2015

\*通讯作者: E-mail: wjz@ahau.edu.cn

收稿日期: 2015-05-07; 接受日期: 2015-07-16; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-09-09

coincidence rate was 86.67% and 88.89% respectively. **[Conclusion]** The established indirect ELISA could be used for detecting PEDV antibodies.

**Keywords:** Porcine epidemic diarrhea virus, S gene, Prokaryotic expression, Indirect ELISA

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)引起的一种以腹泻、呕吐、脱水和哺乳仔猪高致死率为主要特征的高度接触性肠道传染病<sup>[1]</sup>。该病在 1971 年首次报道于荷兰,随后许多国家也相继出现<sup>[2]</sup>,1976 年我国也证实该病的存在。近几年,我国 PED 的发病率、死亡率均呈上升趋势,尤其是自 2010 年 10 月以来, PED 在我国广泛流行并呈现新的特点<sup>[3]</sup>。感染 PEDV 后,哺乳仔猪死亡率达 80%–100%,而繁殖母猪和公猪则很少表现出临床症状。病毒的变异可能是引起 PED 大规模暴发的原因,这些给该病的防治带来了新的挑战。建立快速、可靠的 PEDV 抗体检测方法,进行 PED 流行病学的监测以及猪群免疫过 PED 疫苗后抗体水平的检测,对于该病的预防具有重要意义。

PEDV 属于套式病毒目(Nidovirales)冠状病毒科 (Coronaviridae) 甲型冠状病毒属 (Alphacoronavirus), 其主要包括 4 种结构蛋白,即:纤突蛋白(S, 180–220 kD)、膜蛋白(M, 27–32 kD)、核衣壳蛋白(N, 55–58 kD)和小膜蛋白(E, 8.8 kD),其中 S 蛋白是由 S 基因编码的位于病毒粒子表面的纤突糖蛋白,具有高度免疫原性和反应原性,是诱导机体产生中和抗体和提供免疫保护作用的主要结构蛋白<sup>[4-5]</sup>。Cruz 等<sup>[6]</sup>利用噬菌体随机肽库鉴定了 PEDV S 蛋白的一个模拟表位,第 1 368–1 374 位氨基酸;孙东波等<sup>[7]</sup>鉴定出 PEDV S 蛋白 5 个线性抗原表位即 S1P1 (第 248–280 位氨基酸)、S1P2 (第 442–499 位氨基酸)、S1P3 (第 697–742 位氨基酸)、SS5 (第 748–755 位氨基酸)和 SS6 (第 764–771 位氨基酸)。本研究拟从 PEDV 中扩增出编码 S 蛋白主要抗原位点的 S 基因片段,重组至表达载体 pET-32a(+)中,并进行诱导表达、纯化与鉴定,以表达的 S 蛋白为包被抗原建立间接 ELISA 检测方法,

为 PEDV 抗体检测试剂盒的研发和应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、载体与血清

大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、BL21(DE3)菌株、pET-32a 载体、PEDV 阴性血清和阳性血清,猪瘟病毒(CSFV)、猪圆环病毒 2 型(PCV2)、猪繁殖与呼吸综合症病毒(PRRSV)、猪伪狂犬病毒(PRV)、口蹄疫病毒(FMDV)和猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)阳性血清均由安徽农业大学动物传染病实验室保存提供;待检血清来自安徽地区部分猪场。

### 1.2 主要试剂和耗材

T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶、pMD18-T 载体、限制性内切酶 *Xho* I、*Eco*R I 和 DNA Marker 购自大连宝生物工程有限公司;羊抗猪 IgG-HRP 购自北京索莱宝科技有限公司;RNA 提取试剂盒购自美国 OMEGA 公司;酶标板购自美国 Costar 公司;商品化 PEDV 抗体检测试剂盒购自加拿大 Biovet 公司(TRM-556)。

### 1.3 引物的合成

根据 GenBank 上登录的 PEDV CV777 株 S 基因全基因序列,利用 DNASTar 软件分析其抗原位点,选择编码亲水性较强、抗原指数较高且表面可及性好的区域。利用 Primer 6.0 引物设计软件,设计一对特异性引物。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

上游引物 P1: 5'-GCGGAATTCTTCTTGCTGTTTACCTCCTA-3'

下游引物 P2: 5'-GCGCTCGAGTGGTTTAGGC GTGCCAGTAAT-3'

下划线分别为限制性内切酶 *Eco*R I、*Xho* I 的酶切位点。

### 1.4 克隆载体和表达载体的构建及鉴定

利用 RNA 提取试剂盒提取 PEDV 总 RNA,以

RNA 为模板,用 RT-PCR 扩增 S 基因片段。将 PCR 胶回收产物用 *EcoR* I 和 *Xho* I 进行双酶切。酶切产物回收纯化后,将其克隆入载体 pET-32a(+)中以构建重组质粒。重组质粒经双酶切和测序分析鉴定后,阳性重组质粒被命名为 pET-32a(+)-S。

### 1.5 重组 pET-32a-S 融合蛋白的诱导表达及蛋白的纯化检测

将鉴定正确的 pET-32a(+)-S 重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,摸索最佳条件诱导表达,超声波裂解后分别收集上清及沉淀进行 SDS-PAGE 分析,鉴定目的蛋白的表达形式。

收集超声后的沉淀,包涵体蛋白按照参考文献[8]进行复性。蛋白复性后与 His-Ni-resin 室温摇床结合 2 h,按照参考文献[9]纯化蛋白,收集的样品进行 SDS-PAGE 分析。

### 1.6 重组蛋白的 Western-blot 分析

纯化的重组蛋白经 SDS-PAGE 后,转印到硝酸纤维素膜上,5%脱脂奶粉 4 °C 封闭过夜,加入 PEDV 阳性血清(1:100 稀释) 37 °C 作用 1 h,再加入羊抗猪 IgG 辣根过氧化物酶(HRP)标记抗体(1:1 000 稀释) 37 °C 作用 1 h,PBST 洗涤 3 次,每次 10 min,在二氨基联苯胺(DAB)缓冲溶液中显色 10 min。

### 1.7 S 蛋白间接 ELISA 方法的建立

**1.7.1 最佳抗原包被浓度和血清稀释度的确定:**按照方阵滴定法确定最佳抗原包被浓度和血清稀释度。以 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液将纯化抗原做 6 个包被梯度,分别稀释至终浓度为:16、8、4、2、1、0.5 mg/L,4 °C 过夜包被酶标板。PEDV 阴性和阳性血清按 1:20、1:40、1:80、1:160、1:320 倍稀释后进行方阵试验,每个稀释度 2 个重复,取其平均值,计算每个条件下  $D_{450,P}/D_{450,N}$  值。选择阳性血清  $D_{450}$  值接近 1.0,  $D_{450,P}/D_{450,N}$  值最大的反应组合作为间接 ELISA 的最佳反应条件。

**1.7.2 封闭液种类的确定:**确定的最佳抗原浓度包被酶标板,分别以 50 g/L 脱脂乳、10 g/L 明胶、5% 胎牛血清、10%胎牛血清、10 g/L BSA 和 20 g/L BSA 的封闭液 37 °C 封闭 2 h,按间接 ELISA 操作程序

测定。

**1.7.3 血清最佳作用时间的选择:**加入一抗后,分别在 37 °C 作用 30、60、90 min 后进行间接 ELISA 测定。

**1.7.4 二抗浓度的筛选:**以最适抗原包被浓度、封闭液、最佳 PEDV 阴、阳性血清稀释度分步加入反应后,羊抗猪 IgG-HRP 分别做 1:1 000、1:1 500、1:2 000、1:2 500 稀释,然后按常规间接 ELISA 程序测定。

**1.7.5 二抗作用时间的选择:**按最佳条件进行包被、封闭、加样,加入二抗后 37 °C 分别孵育 45、60、90 min,通过间接 ELISA 测定  $D_{450,P}$  和  $D_{450,N}$  的值,比较  $D_{450,P}/D_{450,N}$  值以选择最适二抗作用时间。

**1.7.6 显色时间的确定:**按照已筛选条件进行间接 ELISA 试验,最后加入 TMB 后分别显色 5、10、15 min 后测定其  $D_{450,P}$  和  $D_{450,N}$  的值。

**1.7.7 ELISA 临界值的确定:**用建立的间接 ELISA 方法检测 40 份 PEDV 抗体阴性血清,在最佳反应条件下进行间接 ELISA 试验。计算平均值  $\bar{x}$  和标准差  $s$ ,根据统计学原理,以  $D_{450} < \bar{x} + 2s$  作为阴性判定标准,  $D_{450} \geq \bar{x} + 3s$  作为阳性判定标准,介于两者之间者则判为可疑。

### 1.8 特异性试验

用建立的间接 ELISA 方法检测 PCV2、PRV、PRRSV、CSFV、FMDV、TGEV 阳性血清,同时设置 PEDV 标准阳、阴性血清对照,验证该检测方法的特异性。

### 1.9 重复性实验

随机选取 4 份 PEDV 抗体水平不同的血清样品,使用同批次的酶标板,每份血清样本平行做 4 个重复,用以检测批内重复性;使用 4 个不同批次的酶标板检测 4 份不同抗体水平的血清,用以检测批间重复性。

### 1.10 对比试验

取临床采集的安徽省合肥、马鞍山地区疫苗免疫后成年母猪和宣城、六安地区疑似 PED 发病的哺乳和保育仔猪的血清样品共 105 份,用建立的间接

ELISA 方法和进口的 PEDV 抗体检测试剂盒同时测定血清样品的  $D_{450}$  值, 可疑样品重复检测一次, 若仍为可疑, 即判为阳性<sup>[10-11]</sup>。比较检测结果, 计算二者符合率、特异性和敏感性[符合率=(阳性结果相同样本数+阴性结果相同的样本数)/总样本数; 敏感性=阳性结果相同样本数/商品化试剂盒检测出阳性样本数; 特异性=阴性结果相同样本数/商品化试剂盒检测出阴性样本数]。

用建立的间接 ELISA 方法检测临床采集的 63 份疫苗免疫后成年母猪血清样品, 并采用 Western-blot 鉴定血清样品抗体阴阳性。比较检测结果, 计算二者符合率、特异性和敏感性。

## 2 结果与分析

### 2.1 S 基因的扩增

利用 DNASTar 软件分析后, 选取亲水性较强、抗原指数较高且表面可及性高的蛋白区域, 最终选取 S 蛋白的 383–630 aa 区域进行表达(图 1)。以 PEDV 的 RNA 为模板, 利用设计的引物 P1、P2, 通过 RT-PCR 扩增得到约 760 bp 的目的片段, 与预期扩增目的条带大小一致(图 2)。

### 2.2 重组质粒的鉴定

重组质粒经 PCR 鉴定后得到的条带与目的片

段大小相符。重组质粒经 *EcoR* I 单酶切及 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切后, 单酶切后可见到约 6 660 bp 的重组片段, 双酶切后可见约 760 bp 的目的条带和约 5 900 bp 的质粒条带(图 3)。证实重组质粒 pET-32a-S 构建成功。

### 2.3 重组蛋白的诱导表达及纯化

以最佳的诱导条件诱导表达后经 SDS-PAGE 检测分析, 在预期的 45 kD 处出现目的蛋白条带, 目的蛋白主要以包涵体形式存在。重组蛋白经过镍柱纯化后进行 SDS-PAGE 分析, 结果显示, 目的蛋白得到了较好的纯化(图 4)。

### 2.4 重组蛋白的 Western-blot 分析

将纯化表达的重组 S 蛋白经 Western-blot 分析, 在 45 kD 处可见明显的条带, 而阴性对照则无特异性条带, 表明表达的重组 S 蛋白能够与 PEDV 阳性血清发生特异性结合, 具有良好的反应原性(图 5)。

### 2.5 间接 ELISA 检测方法的建立

**2.5.1 最佳抗原包被浓度和血清稀释度的确定:** 方阵滴定法结果显示(表 1), 当重组 S 蛋白的包被质量浓度为 8 mg/L, 血清稀释度为 1:40 时, 阳性血清  $D_{450}$  值接近 1.0, 且 P/N 的值最大。因此, 确定 8 mg/L 蛋白包被浓度为最佳浓度, 血清最佳稀释度为 1:40。

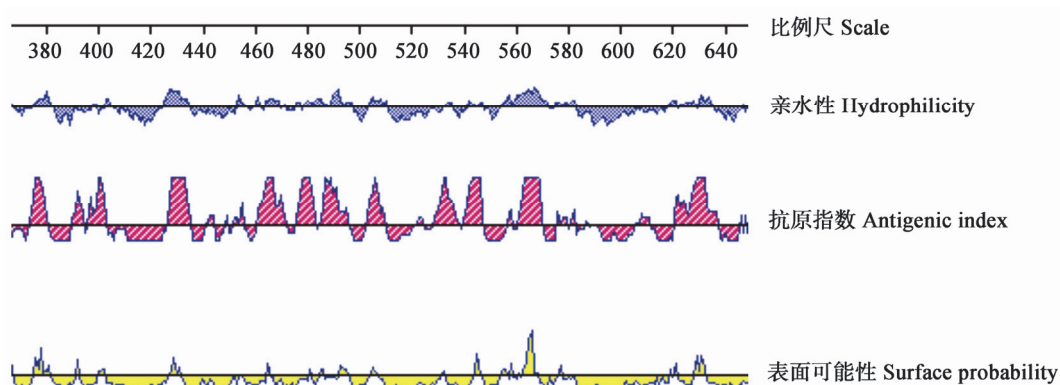


图 1 S 蛋白抗原位点亲水性、抗原指数、表面可能性的分析

Figure 1 Analysis of hydrophilicity, antigenic index, and surface probability of S protein antigenic region

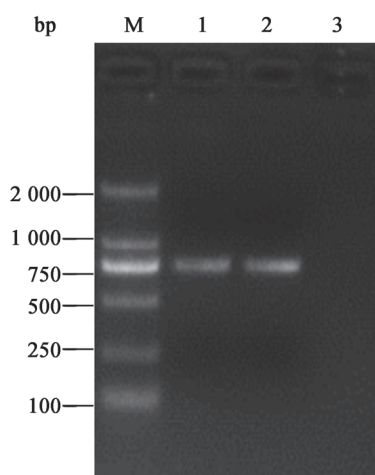


图2 PEDV S 基因 PCR 扩增结果

**Figure 2 The result of PCR amplification of PEDV S gene**

注: M: DNA 分子量标准; 1-2: S 基因的 PCR 产物; 3: 阴性对照.

Note: M: DL2000 DNA marker; 1-2: PCR-amplified S gene; 3: Negative control.

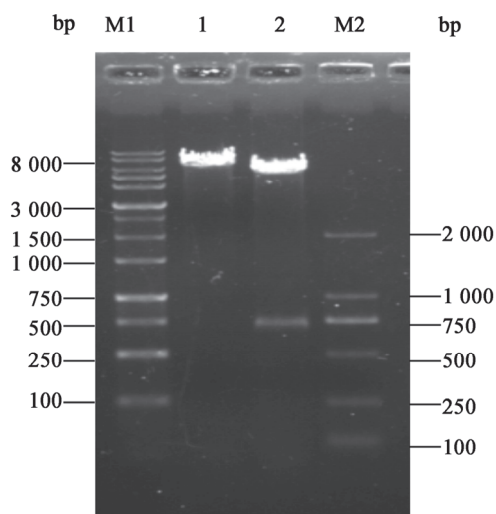


图3 重组质粒的酶切鉴定

**Figure 3 Restrictive digestion of recombinant plasmid**

注: M1、M2: DNA 分子量标准; 1: 重组质粒单酶切产物; 2: 重组质粒双酶切产物.

Note: M1: DL10000 DNA marker; M2: DL2000 marker; 1: Products from recombination plasmid digested by *EcoR* I or *Xho* I; 2: Products from recombination plasmid digested by *EcoR* I and *Xho* I.

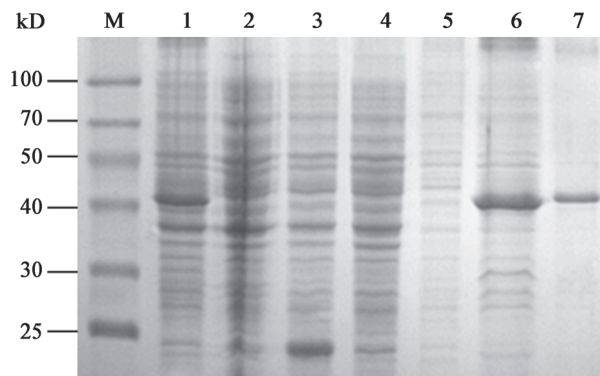


图4 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

**Figure 4 SDS-PAGE analysis of the expressed protein**

注: M: 蛋白质分子量标准; 1: 诱导后重组菌的表达产物; 2: 诱导前重组菌的表达产物; 3: 诱导后的 pET-32a(+)空白载体; 4: 未诱导的 pET-32a(+)空白载体; 5: 超声上清; 6: 超声沉淀; 7: 纯化后重组蛋白.

Note: M: Protein molecular weight marker; 1: Express products from the induced recombinant bacteria; 2: Express products the recombinant bacteria without induction; 3: Induced pET-32a(+); 4: pET-32a (+)without induction; 5: Supernatant after ultrasonic disruption; 6: Pellets after ultrasonic disruption; 7: Purified recombinant protein.

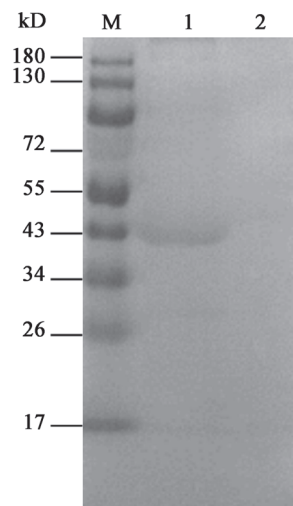


图5 重组蛋白的 Western-blot 鉴定

**Figure 5 Western-blot analysis of recombinant protein**

注: M: 蛋白质分子量标准; 1: 纯化后重组蛋白; 2: 阴性对照.

Note: M: Protein molecular weight marker; 1: Purified recombinant protein; 2: Negative control.

**2.5.2 封闭液种类的确定:** 表 2 结果显示, 以 2% BSA 作为封闭液时  $D_{450,P}/D_{450,N}$  值最大。因此确定 2% BSA 为最佳的封闭液。

**2.5.3 血清最佳作用时间的确定:** 表 3 结果显示, 当血清作用 30 min 时,  $D_{450,P}/D_{450,N}$  值最大。因此最佳的血清作用时间是 30 min。

**2.5.4 二抗作用浓度和作用时间的筛选:** 按照已筛

选条件进行常规间接 ELISA 操作, 表 4 和 5 的结果显示, 二抗以 1:1 500 稀释, 37 °C 作用 45 min 时  $D_{450,P}/D_{450,N}$  值最大, 因此二抗的最佳作用浓度 1:1 500, 最佳作用时间是 45 min。

**2.5.5 底物最佳显色时间的选择:** 表 6 结果显示, TMB 显色时间为 10 min 时, 其  $D_{450,P}/D_{450,N}$  值最大。因此最佳的显色时间是 10 min。

表 1 最佳抗原包被浓度和血清稀释度的确定						
Table 1 Determination of the coating concentration of antigen and serum dilution						
抗原包被浓度 Coating concentration of antigen (mg/L)	指标 Indexes	血清稀释度 Serum dilutions				
		1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
16	$D_{450,P}$	1.444	0.768	0.633	0.453	0.362
	$D_{450,N}$	0.419	0.244	0.251	0.199	0.164
	$D_{450,P}/D_{450,N}$	3.446	3.148	2.522	2.276	2.207
8	$D_{450,P}$	1.604	1.070	0.652	0.496	0.354
	$D_{450,N}$	0.535	0.262	0.275	0.244	0.153
	$D_{450,P}/D_{450,N}$	2.998	4.084	2.371	2.033	2.314
4	$D_{450,P}$	1.650	0.928	0.667	0.477	0.351
	$D_{450,N}$	0.661	0.312	0.268	0.315	0.254
	$D_{450,P}/D_{450,N}$	3.096	3.211	2.546	2.092	1.574
2	$D_{450,P}$	1.678	1.057	0.749	0.490	0.360
	$D_{450,N}$	0.661	0.312	0.268	0.315	0.254
	$D_{450,P}/D_{450,N}$	2.539	3.388	2.795	1.556	1.417
1	$D_{450,P}$	1.494	0.987	0.698	0.479	0.369
	$D_{450,N}$	0.569	0.315	0.306	0.220	0.182
	$D_{450,P}/D_{450,N}$	2.636	3.133	2.281	2.177	2.027
0.5	$D_{450,P}$	1.479	0.914	0.614	0.499	0.387
	$D_{450,N}$	0.551	0.301	0.290	0.201	0.167
	$D_{450,P}/D_{450,N}$	2.684	3.037	2.117	2.483	2.317

表 2 封闭液的确定						
Table 2 Determination of optional blocking solution						
指标 Index	封闭液种类 Blocking solutions					
	1% BSA	2% BSA	5% FBS	10% FBS	5%脱脂奶粉 5% Skimmed milk powder	1%明胶 1% Gelatin
$D_{450,P}$	0.702	1.130	1.216	0.926	0.204	0.216
$D_{450,N}$	0.170	0.163	0.244	0.185	0.123	0.163
$D_{450,P}/D_{450,N}$	4.129	6.933	4.984	5.005	1.659	1.325

表 3 血清最佳作用时间的确定  
Table 3 Determination of serum incubation time

指标 Index	血清作用时间 Serum reaction time (min)		
	30	60	90
$D_{450,P}$	0.987	0.869	1.031
$D_{450,N}$	0.198	0.235	0.243
$D_{450,P}/D_{450,N}$	4.985	3.698	4.247

表 4 二抗浓度的选择  
Table 4 Determination of goat-anti-swine-HRP dilution

二抗稀释倍数 Goat-anti-swine-HRP dilution	指标 Indexes		
	$D_{450,P}$	$D_{450,N}$	$D_{450,P}/D_{450,N}$
1:1 000	1.491	0.313	4.764
1:1 500	1.189	0.224	5.308
1:2 000	0.874	0.201	4.348
1:2 500	0.426	0.147	2.898
1:3 000	0.641	0.144	4.451
1:3 500	0.492	0.132	3.727
1:4 000	0.414	0.126	3.286
1:5 000	0.375	0.117	3.205

表 5 二抗作用时间的确定  
Table 5 Determination of different goat-anti-swine-HRP reaction time

指标 Index	二抗作用时间 Reaction time of goat-anti-swine-HRP (min)		
	45	60	90
$D_{450,P}$	1.047	0.819	1.031
$D_{450,N}$	0.207	0.213	0.237
$D_{450,P}/D_{450,N}$	5.058	3.845	4.350

表 6 显色时间的选择  
Table 6 Determination of substrate reaction time

指标 Index	显色时间 Reaction time of substrate (min)		
	5	10	15
$D_{450nm,P}$	0.874	1.082	1.213
$D_{450nm,N}$	0.203	0.243	0.310
$D_{450nm,P}/D_{450nm,N}$	4.305	4.453	3.913

**2.5.6 临界值的确定：**选取 40 份阴性血清，按照优化的间接 ELISA 方法进行检测，将得到的  $D_{450}$  值数据进行统计学处理，计算平均值  $\bar{x}=0.208$ ，标准差  $s=0.056\ 3$ ， $\bar{x}+2s=0.321$ ， $\bar{x}+3s=0.377$ 。因此血清样品的  $D_{450}$  值 $<0.321$  判为阴性， $D_{450}$  值 $\geq 0.377$  判为阳性， $0.321\leq D_{450}<0.377$  为可疑。

## 2.6 特异性实验

利用重组 S 蛋白建立的间接 ELISA 检测方法检测 PCV2、PRV、PRRSV、CSFV、FMDV、TGEV 阳性血清，结果均为阴性，PEDV 阴阳性血清对照均成立(表 7)。结果说明建立的间接 ELISA 检测方法具有较高的特异性。

## 2.7 重复性实验

用同一批包被的酶标板，检测 4 份血清，每个样品 4 个重复，结果显示批内重复实验变异系数均小于 10% (表 8)，表明批内重复性较好；用 4 批不同批次包被的酶标板，检测 4 份血清，结果显示批间重复试验变异系数均小于 10% (表 9)，表明批间重复性较好。

## 2.8 对比试验

用所建立的间接 ELISA 方法与商品化的 ELISA 抗体检测盒同时检测临床采集的 105 份猪血清，两者符合率为 86.67%，敏感性为 89.83%，特异性为 82.62% (表 10)。

表 7 特异性试验结果  
Table 7 Result of the specificity test

血清 Serum	PCV2	PRV	PRRSV	CSFV	FMDV	TGEV	PEDV(+)	PEDV(-)
$D_{450}$	0.070	0.130	0.075	0.076	0.264	0.107	0.872	0.185
结果 Result	-	-	-	-	-	-	+	-



表 8 批内重复试验结果 Table 8 Result of the intro-batch duplicability test							
血清编号 Serum No.	各重复孔的 $D_{450}$ Duplicability's $D_{450}$				平均值 $\bar{x}$	标准差 $s$	变异系数 $CV(\%)$
	1st	2nd	3rd	4th			
1	1.095	1.165	1.086	1.165	1.128	0.037	3.28
2	1.139	1.028	1.117	1.017	1.075	0.053	4.93
3	0.814	0.772	0.826	0.798	0.803	0.020	2.49
4	1.215	1.198	1.304	1.241	1.240	0.040	3.23

表 9 批间重复试验结果 Table 9 Result of the inter-batch duplicability test							
血清编号 Serum No.	各批次的 $D_{450}$ 值 $D_{450}$ Values of different batch				平均值 $\bar{x}$	标准差 $s$	变异系数 $CV(\%)$
	1st	2nd	3rd	4th			
1	1.130	0.990	1.090	1.022	1.058	0.055	5.20
2	1.075	1.041	0.977	0.966	1.022	0.038	3.72
3	0.803	0.713	0.710	0.822	0.762	0.051	6.69
4	1.102	0.981	1.068	0.995	1.037	0.050	4.82

表 10 间接 ELISA 和商品化试剂盒检测结果比较 Table 10 The result of ELISA compared with commercial kit			
检测方法 Detecting methods	建立的间接 ELISA 方法 The developed indirect ELISA		
	阳性样本数 Positive sample counts	阴性样本数 Negative sample counts	符合率 Coincidence rates (%)
	阳性样本数 Positive sample counts	53	6
商品化试剂盒 Commercial ELISA kit	阴性样本数 Negative sample counts	8	38
			86.67

表 11 间接 ELISA 和 Western-blot 鉴定结果比较 Table 11 The result of ELISA compared with Western-blot			
检测方法 Detecting methods	建立的间接 ELISA 方法 The developed indirect ELISA		
	阳性样本数 Positive sample counts	阴性样本数 Negative sample counts	符合率 Coincidence rates (%)
	阳性样本数 Positive sample counts	46	5
Western-blot	阴性样本数 Negative sample counts	2	10
			88.89



利用建立的间接 ELISA 方法检测 63 份临床采集的血清样品并用 Western blot 进行鉴定, 两者符合率为 88.89%, 敏感性为 90.20%, 特异性为 83.33% (表 11)。

### 3 讨论

目前已经报道的用于检测 PEDV 抗体的 ELISA 方法都是检测机体产生的 IgG 抗体。虽然针对 PEDV 等消化道病原体主要以黏膜免疫为主, 产生的是分泌型 IgA<sup>[12]</sup>, 但由于 IgA 主要存在于肠道分泌液和初乳中, 在血清中的含量很少, 因此很难进行检测。而机体在受到 PEDV 抗原刺激后, 体内既能产生 IgG, 也能产生 IgA, 两者有很好的正相关性, 且 IgG 在血清中含量也高, 所以通过检测血清中 IgG 抗体水平能间接反映出机体的免疫效果。

目前已建立的 ELISA 检测方法包被的抗原多为纯化的全病毒<sup>[13-15]</sup>, 但 PEDV 培养难度大, 病毒产量低, 一定程度上限制了检测抗原的大量制备<sup>[16]</sup>, 使细胞毒临床应用价值低, 而本研究采用基因工程重组蛋白作为抗原则降低了抗原的制备难度, 增加了产量, PEDV S 蛋白是病毒主要的结构蛋白, 可诱导机体产生中和抗体, 且产生的抗体水平持续时间长, 因此 S 蛋白可作为可靠的检测抗原。邓祖丽颖<sup>[17]</sup>将河南流行毒株部分 S 基因扩增并表达纯化, 建立了 PEDV 抗 S 蛋白间接 ELISA 方法。由于 S 基因全长 4 152 bp, 编码 1 383 个氨基酸残基, 完整的 S 基因扩增和表达的难度大, 本研究表达的 S 蛋白主要抗原位点位于 S 蛋白的 350–630 aa, 这与 Chang 等<sup>[18]</sup>鉴定的抗原表位(499–638 aa)和孙东波<sup>[7]</sup>鉴定的线性抗原表位 S1P2 (442–499 aa)相一致。

本研究重组 S 蛋白虽然是以包涵体的形式存在, 但经过包涵体的溶解和复性后, S 蛋白恢复了其天然构象, 以复性的重组 S 蛋白作为抗原, 可以增加检测的特异性和敏感性。再通过优化各种检测条件, 建立了特异性、重复性、灵敏度较好的间接 ELISA 方法, 从而进行 PEDV 的诊断及疫苗免疫效力评价。通过与加拿大 Biovet 公司生产的 PEDV 抗体 ELISA 检测试剂盒平行检测 105 份血清样本进行

比较, 本研究建立的 ELISA 方法检测结果与商品化试剂盒符合率为 86.67%, 敏感性为 89.83%, 特异性为 82.62%。造成这一现象的主要原因可能是两种方法所用的抗原不同, 商品化试剂盒采用重组 N 蛋白作为抗原, 而本研究采用重组 S 蛋白作为抗原。PEDV S 基因有一定的变异性<sup>[19]</sup>, 本研究原核表达流行毒株的 S 蛋白, 以此重组蛋白为基础建立的间接 ELISA 检测方法, 可增加对变异毒株产生抗体的检出率, 增加检测方法的敏感性和特异性, 减少假阴性的出现。综上所述, 本研究建立的基于 PEDV S 蛋白的间接 ELISA 方法, 具有良好的重复性、特异性、敏感性, 并可能在临床上成为检测猪群中 PEDV 抗体水平及监测 PED 流行情况的有效方法。

### 参考文献

- [1] Pensaert MB, de Bouck P. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine[J]. Archives of Virology, 1978, 58(3): 243-247
- [2] Straw BE. Diseases of Swine[M]. 8th Edition. Translated by Zhao DM, Zhang ZQ, Shen JZ. Beijing: China Agricultural University Press, 2000: 181-187 (in Chinese)  
斯特劳 BE. 猪病学[M]. 第8版. 赵德明, 张仲秋, 沈建忠, 译. 北京: 中国农业大学出版社, 2000: 181-187
- [3] Sun RQ, Cai RJ, Chen YQ, et al. Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China[J]. Emerging Infectious Diseases, 2012, 18(1): 161-163
- [4] Knipe DM, Hoeley PM, Griffin DE, et al. Fields Virology[M]. 4th Edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001
- [5] Kang TJ, Seo JE, Kim DH, et al. Cloning and sequence analysis of the Korean strain of spike gene of porcine epidemic diarrhea virus and expression of its neutralizing epitope in plants[J]. Protein Expression and Purification, 2005, 41(2): 378-383
- [6] Cruz DJM, Shin HJ. Application of a focus formation assay for detection and titration of porcine epidemic diarrhea virus[J]. Journal of Virological Methods, 2007, 145(1): 56-61
- [7] Sun DB, Lang HW, Shi HY, et al. Screening and identification of B cell antigenic epitopes of porcine epidemic diarrhea virus spike glycoprotein by phage display[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2007, 34(9): 971-977 (in Chinese)  
孙东波, 朗洪武, 时洪艳, 等. PEDV S 蛋白 B 细胞抗原表位的筛选和鉴定[J]. 生物化学与生物物理进展, 2007, 34(9): 971-977
- [8] Huang XH, Xin W, Wei JZ, et al. Prokaryotic expression of transferrin-binding protein A gene from *Haemophilus parasuis* and immunological analysis of the recombinant protein[J]. Chinese Veterinary Science, 2012, 42(10): 1053-1057 (in Chinese)  
黄晓慧, 辛伟, 魏建忠, 等. 副猪嗜血杆菌转铁结合蛋白 A 基因的原核表达与鉴定[J]. 中国兽医学, 2012, 42(10): 1053-1057
- [9] Wang HN, Qi YF, Zhu T, et al. Prokaryotic expressing of *pdhA* gene from *Mycobacterium tuberculosis* and immunogenicity analysis of the expressed product[J]. Chinese Veterinary Science, 2011, 41(7): 697-700 (in Chinese)

- 王华南, 亓英芳, 朱婷, 等. 结核分枝杆菌 *pdhA* 基因的原核表达及其免疫原性分析[J]. 中国兽医科学, 2011, 41(7): 697-700
- [10] Chen J, Wang XM, Yang PP, et al. Development and application of a Chinese porcine epidemic diarrhea virus variant S protein-based indirect ELISA for antibody detection[J]. Chinese Journal Veterinary Science, 2014, 34(10): 1568-1572 (in Chinese)
- 陈静, 王晓梦, 杨盼盼, 等. 基于 PEDV 中国变异株 S 蛋白的间接 ELISA 抗体检测方法[J]. 中国兽医学报, 2014, 34(10): 1568-1572
- [11] Wang JL, Zu LC, Tang N, et al. Development of PPA-ELISA for detecting antibodies to porcine epidemic diarrhea virus using recombinant truncated glycoprotein N expressed in *E. coli*[J]. Chinese Journal Veterinary Science, 2013, 33(6): 801-807 (in Chinese)
- 王金良, 祖立闯, 唐娜, 等. 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
- [12] Hathaway LJ, Kraehenbuhl JP. The role of M cells in mucosal immunity[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2000, 57(2): 323-332
- [13] Chen R, Luo Q, Li SG, et al. Indirect Dot-ELISA for the detection of antibodies against porcine epidemic diarrhea virus[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 1997, 23(8): 10-13 (in Chinese)
- 陈茹, 罗琼, 李树根, 等. 间接法 Dot-ELISA 检测猪流行腹泻抗体的研究[J]. 中国兽医杂志, 1997, 23(8): 10-13
- [14] Kweon CH, Kwon BJ, Kang YB, et al. Cell adaptation of KPEDV-9 and serological survey on porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) infection in Korea[J]. Korean Journal of Veterinary Research, 1994, 34(2): 321-326
- [15] Carvajal A, Lanza I, Diego R, et al. Evaluation of a blocking ELISA using monoclonal antibodies for the detection of porcine epidemic diarrhea virus and its antibodies[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 1995, 7(1): 60-64
- [16] Kim O, Chae C. In situ hybridization for the detection and localization of porcine epidemic diarrhea virus in the intestinal tissues from naturally infected piglets[J]. Veterinary Pathology, 2000, 37(1): 62-67
- [17] Dengzu LY. Prokaryotic expression of PEDV S protein and development of indirect ELISA for detection of its antibody[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2013, 42(8): 119-123 (in Chinese)
- 邓祖丽颖. 基于 S 蛋白检测猪流行性腹泻抗体间接 ELISA 方法的建立[J]. 河南农业科学, 2013, 42(8): 119-123
- [18] Chang SH, Bae JL, Kang TJ, et al. Identification of the epitope region capable of inducing neutralizing antibodies against the porcine epidemic diarrhea virus[J]. Molecules and Cells, 2002, 14(2): 295-299
- [19] Chen JF, Liu XZ, Shi D, et al. Detection and molecular diversity of spike gene of porcine epidemic diarrhea virus in China[J]. Viruses, 2013, 5(10): 2601-2613