

一种基于猪流行性腹泻病毒 S1 蛋白的单域抗体的阻断 ELISA 方法及其评价

马志倩^{1*}, 白鸽^{2*}, 王天宇¹, 李志伟¹, 李洋¹, 肖书奇¹, 李爽¹

1 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100

2 渭南市动物疫病预防控制中心, 陕西 渭南 714000

马志倩, 白鸽, 王天宇, 等. 一种基于猪流行性腹泻病毒 S1 蛋白的单域抗体的阻断 ELISA 方法及其评价. 生物工程学报, 2021, 37(9): 3221-3230.

Ma ZQ, Bai G, Wang TY, et al. Development of a blocking ELISA based on a single-domain antibody target the S1 protein of porcine epidemic diarrhea virus. Chin J Biotech, 2021, 37(9): 3221-3230.

摘要: 文中旨在利用猪流行性腹泻病毒 (Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) S1 蛋白生物素化纳米抗体建立一种阻断酶联免疫吸附试验 (Blocking enzyme-linked immunosorbent assay, bELISA) 方法, 用于检测猪体内 PEDV 抗体水平及疫苗免疫效果的评估。对 PEDV S1 蛋白的特异性单域抗体 (Single-domain antibodies, sdAb) sdAb3 基因进行扩增, 并在 3'端融合 Avitag 序列, 构建至原核表达载体 pET21b, 进行 sdAb3-Avitag 蛋白诱导表达纯化。对纯化的 sdAb3-Avitag 融合蛋白进行生物素标记并鉴定其活性。以 PEDV 重组 S1 蛋白为抗原, 通过对各反应条件进行摸索与优化, 建立一种可靠灵敏的 bELISA 方法应用于血清样品检测, 并与商品化试剂盒检测进行比价。成功构建重组载体 pET21b-sdAb3-Avitag 并诱导表达出 sdAb3-Avitag 蛋白。体外生物素标记的 sdAb3 (sdAb3-Biotin) 具有良好的活性。所构建的 bELISA 方法中, 最适参数为: S1 蛋白的包被浓度 200 ng/孔; 血清稀释比例 1:2, 血清孵育时间 2 h; sdAb3-Biotin 稀释比 1:8 000, 孵育时间 30 min; 酶标抗体稀释比例 1:5 000, 反应时间 30 min。所建立的方法与猪传染性胃肠炎病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒等主要猪源病毒的阳性血清均无交叉反应, 具有良好的特异性和重复性。利用建立的 bELISA 方法对临床 54 份猪血清样品进行检测, 结果显示, 该方法与商品化试剂盒检测结果具有 92.56% 的总体符合率。文中建立了一种省时可靠的 bELISA 方法, 可用于 PEDV 的临床监测和疫苗免疫效果评估。

关键词: 猪流行性腹泻病毒, 生物素化单域抗体, 阻断 ELISA, S1 蛋白

Received: December 11, 2020; **Accepted:** March 25, 2021

Supported by: National Key Research and Development Program of China (No. 2017YFD0500605), Key Research and Development Program of Shaanxi Province (No. 2019NY-076), the Youth Innovation Team of Shaanxi Universities and the Science and Technology Extension Project in Northwest A&F University (No. TGZX2020-24).

Corresponding author: Shuang Li. Tel: +86-29-87091117; E-mail: lishuang2006001@126.com

*These authors contributed equally to this study.

国家重点研发计划项目 (No. 2017YFD0500605), 陕西省重点研发计划项目 (No. 2019NY-076), 陕西高校青年创新团队项目, 西北农林科技大学试验示范站科技创新与成果转化项目 (No. TGZX2020-24) 资助。

Development of a blocking ELISA based on a single-domain antibody target the S1 protein of porcine epidemic diarrhea virus

Zhiqian Ma^{1*}, Ge Bai^{2*}, Tianyu Wang¹, Zhiwei Li¹, Yang Li¹, Shuqi Xiao¹, and Shuang Li¹

¹ College of Veterinary Medicine, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling 712100, Shaanxi, China

² Weinan Animal Disease Control Center, Weinan 714000, Shaanxi, China

Abstract: The aim of this study was to develop a blocking enzyme-linked immunosorbent assay (bELISA) based on a biotinylated nanobody target the S1 protein of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) for detecting the anti-PEDV antibodies and evaluating the immune effect of the vaccine. The gene encoding the single-domain antibody sdAb3 target the PEDV S1 protein was amplified and the Avitag sequence was fused at its 3'-end. The PCR product was cloned into the expression vector pET-21b for expression and purification of the sdAb3-Avitag protein. The purified sdAb3-Avitag fusion protein was biotinylated and its activity was determined. Using the recombinant S1 protein as a coating antigen, a bELISA was established and optimized. Serum samples were tested in parallel by the bELISA and a commercial kit. The recombinant vector pET21b-sdAb3-Avitag was constructed to express the tagged sdAb3. After induction for expression, the biotin-labeled sdAb3 (sdAb3-Biotin) with high purity and good activity was obtained. For the optimized bELISA, the coating concentration of the S1 protein was 200 ng/well, the serum dilution was 1:2 and incubated for 2 h, the dilution ratio of the biotinylated sdAb3 was 1:8 000 and incubated for 30 min, the dilution of the enzyme-labeled antibody was 1:5 000 and incubated for 30 min. The bELISA had no cross reaction with the sera of major porcine viruses including transmissible gastroenteritis virus, porcine reproductive and respiratory syndrome virus and showed good specificity and reproducibility. For a total of 54 porcine serum samples tested, the overall compliance rate of the bELISA with a commercial kit was 92.56%. This study developed a rapid and reliable bELISA method, which can be used for serosurveillance and vaccine evaluation for PEDV.

Keywords: porcine epidemic diarrhea virus, biotinylated single-domain antibody, blocking ELISA, S1 protein

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) 引起的一种严重的肠道疾病, 主要表现为仔猪出现呕吐、脱水、水样腹泻和高死亡率^[1-2]。PEDV S 蛋白是一类位于病毒表面的糖蛋白, 在入侵宿主细胞、病毒毒力和诱导中和抗体等方面发挥重要作用, 根据功能不同可将 S 蛋白分为 S1 和 S2^[3]。在感染 PEDV 的猪体内, 由于 S 蛋白具有较强的抗原性, 血清中针对 S 蛋白的抗体比 N 蛋白的抗体持续时间更长^[4]。因此, S 蛋白是建立诊断方法和研发疫苗的靶蛋白。

由于引起猪腹泻的病原能够诱发猪产生相似的临床症状, 因此根据临床症状无法准确诊断 PED, 只能借助实验室诊断技术^[5-6]。目前, 已有多种方法用于 PEDV 的检测, 主要分为两大类:

病原学检测 (核酸和病毒蛋白) 和血清学检测。血清学检测方法通常包括间接免疫荧光、病毒中和试验和酶联免疫吸附试验 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 这些方法已被广泛用于检测粪便和血清中的 PEDV 抗体^[7-9]。ELISA 由于其灵敏度、简便性和安全性等优势而被广泛应用。检测 PEDV 抗体常用 ELISA 方法包括间接 ELISA、竞争 ELISA 和阻断 ELISA, 且后两种方法具有更强的特异性^[9-10]。

抗体是 ELISA 的核心试剂, 它决定了 ELISA 方法检测的灵敏性和特异性, 目前大多数 ELISA 试剂盒使用多克隆抗体或者单克隆抗体作为监测试剂, 但这些抗体生产工艺烦琐、价格昂贵和储存困难^[9,11-12]。因此, 迫切需要开发易于生产且生产成本低廉的抗体用于 ELISA 方法的建立。与常规

抗体不同, 纳米抗体, 又称单域抗体, 是来自骆驼科动物或者软骨鱼类的重链抗体, 仅有一个重链可变区结构域, 分子量小, 只有约 15 kDa^[13]。纳米抗体具有良好的热稳定性、构象稳定性和良好的溶解性, 且易在多种表达系统进行生产^[14]。基于这些优势, 纳米抗体受到越来越多的关注, 有望被用于生物诊断和疫病治疗中^[15-16]。2019 年, Sheng 等将新城疫病毒 (Newcastle disease virus, NDV) 的纳米抗体与辣根过氧化物酶 (Horseshoe peroxidase, HRP) 融合表达, 建立了一种竞争 ELISA 用于临床 NDV 抗体的检测^[17]。Du 等利用生物素化单域抗体建立了一种阻断 ELISA 检测猪流感病毒 (Swine influenza virus, SIV) 抗体^[18]。Ma 等利用 PEDV N 蛋白纳米抗体建立了一种快速检测 PEDV 抗体的 bELISA 方法^[19]。Ji 等将 NDV 的纳米抗体以铁蛋白融合的纳米抗体 (Fenobody) 和纳米抗体融合的报告基因 (RANbody) 的形式呈现, 开发了用于检测不同样品中 NDV 的夹心 ELISA^[20]。目前尚无 PEDV S1 蛋白特异性单域抗体及其在 ELISA 方法建立中的应用报道。本课题组前期利用噬菌体展示技术筛选出针对 PEDV S1 蛋白的单域抗体 sdAb3, 本研究对 sdAb3 进行体外生物素标记, 并利用生物素标记的 sdAb3 建立一种检测 PEDV 抗体的 bELISA 方法, 以期对 PED 监测和免疫效果评估提供一个可靠方法。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

单域抗体 sdAb3 是由本课题组前期利用噬菌体展示技术筛选的针对 PEDV S1 蛋白的单域抗体, 基因大小为 339 bp。pET21b 载体和 pCANTAB-5E-sdAb3 质粒由本实验室保存, 大肠杆菌 *E. coli* Trans5 α 克隆菌株、*E. coli* BL21(DE3) 菌株和 Ni-NTA Agarose 购自 TransGen Biotech, 生物素连接试剂盒购自广州易锦生物技术有限公司, HRP 标记的链霉亲和素购自美国 Thermo

Fisher Scientific 公司, PEDV 抗体检测试剂盒购自加拿大 Biovet 公司。

1.2 引物设计与合成

为了构建重组单域抗体 sdAb3 的表达载体, 根据 sdAb3 基因序列设计引物, 在 5'端引入 *Bam*H I 酶切位点, 3'端引入 Avitag 短肽序列和 *Hind* III 限制性内切酶位点, 由西安擎科泽西生物科技有限责任公司负责引物的合成, 序列如下 (斜体字分别为限制性内切酶位点 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点, 下划线处为 Avitag 标签): pET21b-sdAb3-Avitag-F: FCGGGATCCGCAGGT CCAACTGCAGGAG; pET21b-sdAb3-Avitag-R: CCCAAGCTTTTCGTGCCATTCGATTTTCTGAG CTTCGAAATATCGTTCAGACCTGAGGAGACG GTGACCTGGGTCC。

1.3 重组单域抗体 sdAb3 原核表达载体的构建

以 pCANTAB-5E-sdAb3 质粒为模板, 进行 sdAb3 基因片段的扩增, 利用相应的酶切位点将其连入原核表达载体 pET21b 中, 得到 pET21b-sdAb3-Avitag 质粒, 测序正确后, 用于下一步试验。

1.4 重组单域抗体 sdAb3 的表达与纯化

将 pET21b-sdAb3-Avitag 质粒转化至 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞中, 挑取阳性克隆菌, 接种于 LB 培养基中, 于 37 °C 恒温摇床中 200 r/min 振荡培养过夜, 按照 1:100 的比例接种于大的摇瓶中, 培养至对数期, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 进行诱导表达, 诱导 5 h 后收菌。取 1 mL 诱导后菌液于 1.5 mL 离心管中, 12 000 \times g 离心 1 min 收取菌液沉淀, 加入 100 μ L 2 \times 上样缓冲液, 重悬菌体, 置于沸水中煮 10 min, 12 000 \times g 离心 10 min, 取上清进行 SDS-PAGE 分析。对诱导后的菌体进行超声破碎, 138 kW 超声 3 s, 暂停 3 s, 共超声 40 min, 4 °C 12 000 \times g 离心 10 min, 收集上清, 沉淀用 8 mol/L 尿素溶解, 分别对上清和溶解的沉淀进行 SDS-PAGE 分析, 进行 sdAb3-Avitag

蛋白的可溶性分析。按照 Ni-NTA 蛋白纯化试剂盒说明书进行重组蛋白 sdAb3-Avitag 的纯化。

1.5 SdAb3-Avitag 融合蛋白的生物素标记

将纯化的 sdAb3-Avitag 融合蛋白透析至 10 mmol/L Tris (pH 8.0) 的缓冲液中,测定蛋白浓度后对纳米抗体进行生物素标记,具体操作如下: Buffer A 8.3 μ L, Buffer B 8.3 μ L, sdAb3-Avitag 50 μ g, BirA 酶 0.84 μ L, ddH₂O 34.3 μ L, 混匀后置于 30 $^{\circ}$ C 恒温条件下反应 30 min, 反应完成后加入等体积的丙三醇, 混匀后分装, 命名为 sdAb3-Biotin, 放置 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.6 SdAb3-Biotin 活性分析

利用间接 ELISA 方法和 Western blotting 方法鉴定 sdAb3-Biotin 的生物学活性。间接 ELISA 方法: (1) 抗原包被。将截短的 PEDV S1 蛋白 (Asp, aa22-Pro, aa505) 和 PEDV N 蛋白分别包被于酶标板, 100 ng/孔, 置于 4 $^{\circ}$ C 包被过夜。(2) 封闭酶标板。将包被液弃去, 用 PBST 洗板 4 次, 200 μ L/孔加入 1% BSA, 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中封闭 1 h。(3) 加样。弃去封闭液, 用 PBST 洗板 4 次, 将 sdAb3-Biotin 分别按 1:100、1:1 000、1:2 000、1:4 000 和 1:8 000 进行稀释, 100 μ L/孔加入酶标板中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。(4) 孵育酶标抗体。弃去 sdAb3-Biotin, 用 PBST 洗板 4 次, 以 1:5 000 的比例稀释链霉亲和素-HRP 抗体, 100 μ L/孔加入酶标板中, 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中孵育 1 h。(5) 显色。弃掉酶标二抗, 用 PBST 洗涤 4 次, 100 μ L/孔加入新鲜配制的 TMB 显色底物, 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中避光孵育 15 min。(6) 终止。50 μ L/孔加入 3 mol/L H₂SO₄ 终止显色反应, 测定 OD₄₅₀。

Western blotting 方法: 将 PEDV S1 重组蛋白进行 SDS-PAGE 后转印至 PVDF 膜上, 转印后的 PVDF 膜置于 5% 脱脂奶粉中, 25 $^{\circ}$ C 孵育 2 h; 随后, 将 PVDF 膜置于用 1% BSA 按 1:2 500 稀释的 sdAb3-Biotin 中, 25 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; 用 PBST 洗涤后, 对 PVDF 膜进行孵育于酶标二抗 (按照

1:5 000 的链霉亲和素-HRP), 25 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; 弃去酶标二抗, 用 PBST 洗涤后曝光, 用凝胶成像系统拍照记录。

1.7 抗原包被量与 sdAb3-Biotin 稀释比例

利用棋盘法确定最适抗原包被量与 sdAb3-Biotin 稀释比例, 操作流程如步骤 1.6, 包被不同量的 PEDV S1 蛋白, 分别为 25 ng/孔、50 ng/孔、100 ng/孔和 200 ng/孔, sdAb3-Biotin 的稀释比例为: 1:500、1:1 000、1:2 000、1:4 000、1:6 000、1:8 000 和 1:10 000, 确定出最适抗原包被量和 sdAb3-Biotin 的稀释比例。

1.8 最适血清稀释比例

采用最适抗原包被量进行包被且封闭后进行 bELISA: 对酶标板进行封闭, 弃去封闭液, 用 PBST 洗涤后, 将 PEDV 阴阳性血清分别按照 1:1、1:5、1:10、1:20、1:40 和 1:80 进行稀释后, 100 μ L/孔加入酶标板中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 90 min, 用 PBST 洗涤 4 次, 加入最适比例稀释的 sdAb3-Biotin, 用 PBST 洗涤后, 加入酶标二抗后进行显色, 计算各稀释比例阻断率。阻断率 $PI=(1-\text{阳性血清 } OD_{450}/\text{阴性血清 } OD_{450})\times 100\%$, 选取阻断率最高的稀释比例作为最适血清稀释比例。

1.9 最适血清孵育时间

采用最适包被抗原和最适血清稀释比例条件下, 按照步骤 1.8 进行 bELISA, 不同之处将血清分别孵育 30 min、60 min、90 min 和 120 min, 计算各组的阻断率, 选取阻断率最高的组作为血清最适孵育时间。

1.10 SdAb3-Biotin 最适孵育时间

采用上述筛选条件进行 SdAb3-Biotin 的最适孵育时间摸索, 将最适稀释比例的 SdAb3-Biotin 分别孵育 30 min、60 min、90 min 和 120 min, 计算各组的阻断率, 阻断率最高的作为 sdAb3-Biotin 最适孵育时间。

1.11 最适链霉亲和素-HRP 最佳孵育时间

按照上述已确定的条件进行链霉亲和素-HRP 的最适孵育时间的筛选, 将链霉亲和素-HRP 按照 1:5 000 稀释后, 分别孵育 30 min、60 min、90 min 和 120 min, 计算各组的阻断率, 阻断率最高的孵育时间为链霉亲和素-HRP 最适孵育时间。

1.12 bELISA 临界值的确定

对 90 份 PEDV 阴性血清按照上述确定的各项最适条件进行 bELISA, 计算 90 份阴性血清的阻断率, 按照阻断率确定 bELISA 的临界值: 临界值 A=阴性血清平均 PI 值+2×标准差 (s); 临界值 B=阴性血清平均 PI 值+3×标准差 (s), 计算出临界值 A 与临界值 B, 若样品阻断率 $PI \geq$ 临界值 B, 则判定样品为 PEDV 抗体阳性; 若临界值 $A < PI <$ 临界值 B, 则判定为 PEDV 抗体可疑, 需要对样品进行复检; 若复检结果仍为可疑, 则判定样品为 PEDV 抗体阴性; 若 $PI \leq$ 临界值 A, 则判定样品为 PEDV 抗体阴性。

1.13 重复性试验

为验证 bELISA 方法的重复性, 选取不同人员在不同时间按照上述 bELISA 操作流程对 7 份猪血清进行 4 次测试, 每个样品进行 3 个重复孔,

对检测样品的阻断率进行统计分析来评估 bELISA 方法的重复性。

1.14 特异性试验

为验证 bELISA 方法的特异性, 利用建立的 bELISA 方法对实验室保存的其他病原的阳性血清进行检测, 包括 TGEV、PRRSV、PCV、PRV、PPV 和 JEV 的阳性血清, 计算检测样品的阻断率来评估 bELISA 方法的特异性。

1.15 符合率试验

利用建立的 bELISA 方法和商品化 PEDV 抗体检测试剂盒分别对 54 份血清样品进行检测, 计算两者的符合率。

2 结果与分析

2.1 重组单域抗体 sdAb3 的表达与纯化

将构建的 pET21b-sdAb3-Avitag 转化至 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞, 利用终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 进行诱导表达, 结果如图 1A 所示, 与预期结果一致, 在约 15 kDa 处可见目的蛋白。此外, sdAb3-Avitag 重组蛋白以包涵体的形式存在 (图 1B)。用 Ni-NTA 进行纯化后, 得到纯度较高的 sdAb3-Avitag 重组蛋白 (图 1C)。

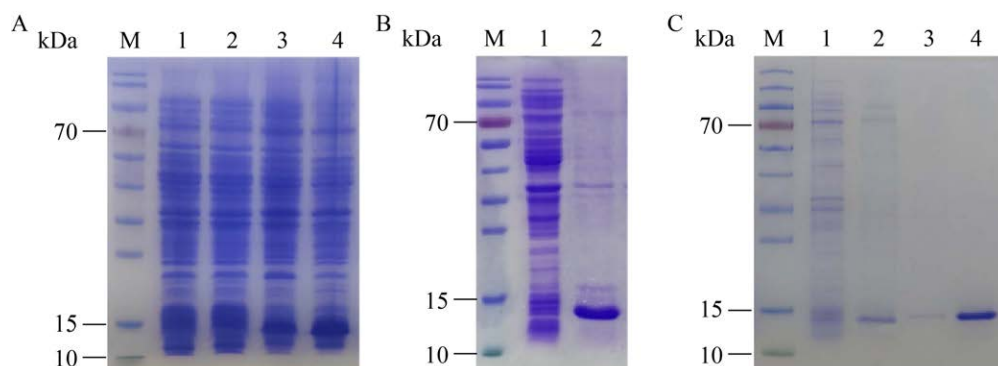


图 1 SdAb3-Avitag 重组蛋白的表达与纯化

Fig. 1 Expression and purification of sdAb3-Avitag recombinant protein. SDS-PAGE showing the expression (A), solubility (B), and purity (C) of the sdAb3-Avitag recombinant protein.

2.2 SdAb3-Biotin 活性分析

利用间接 ELISA 和 Western blotting 对 sdAb3 生物素标记效果进行了验证。Western blotting 结果显示, sdAb3-Biotin 能够特异性地检测到 S1 重组蛋白 (图 2A), 间接 ELISA 结果显示, 当 sdAb3-Biotin 稀释到 1:8 000 仍能够与 S1 蛋白进行良好的反应 (图 2B), 以上表明 sdAb3-Biotin 具有良好的活性。

2.3 抗原包被量与 sdAb3-Biotin 稀释比例

通过棋盘滴定法进行间接 ELISA, 结果表明当 S1 蛋白包被量为 200 ng/孔、sdAb3-Biotin 稀释比例为 1:8 000 时, OD_{450} 约为 1.0, 故将此抗原包被量和 sdAb3-Biotin 抗体稀释比例作为最适包被量和抗体稀释比例 (图 3)。

2.4 最适血清稀释比例

将阴阳性对照血清分别按照 1:2、1:5、1:10、1:20、1:40 和 1:80 的比例进行稀释后用 bELISA 进行检测, 结果显示, 血清在 1:2 稀释的情况下具有最高的阻断率 (图 4A), 故血清最适稀释比例为 1:2。

2.5 最适血清孵育时间

基于上述最适条件进行 bELISA, 摸索最适血清孵育时间, 结果显示, 血清孵育 120 min 时具

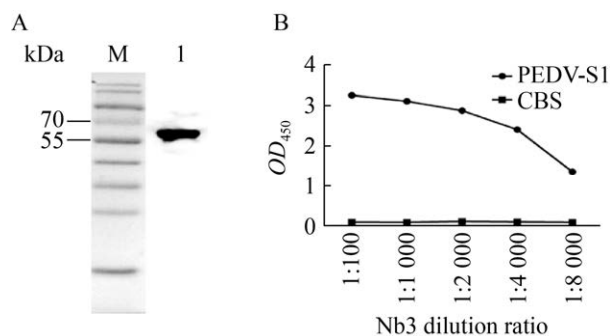


图 2 SdAb3-Biotin 活性分析

Fig. 2 Activity of the sdAb3-Biotin. (A) The PEDV S1 protein was detected with the sdAb3-Biotin by Western-blotting. (B) PEDV S1 protein was detected by the sdAb3-Biotin using indirect ELISA.

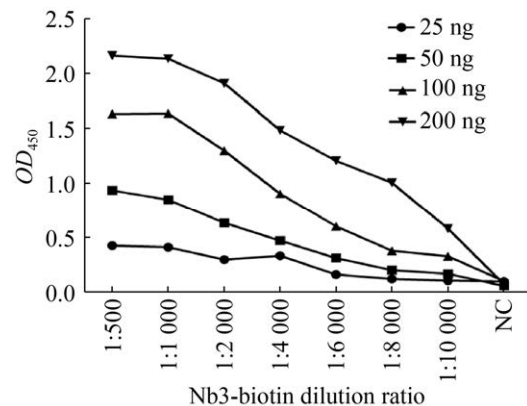


图 3 优化 S1 蛋白包被量和最适 sdAb3-Biotin 稀释比例

Fig. 3 Optimization of the S1 coating quantity and the dilution ratio of sdAb3-Biotin.

有最高的阻断率 (图 4B), 故将此作为最适血清孵育时间。

2.6 SdAb3-Biotin 最适孵育时间

基于上述最适条件进行 bELISA, 摸索最适 sdAb3-Biotin 孵育时间, 结果显示, 孵育时间为 30 min 时具有最高的阻断率 (图 4C), 故将此作为最适 sdAb3-Biotin 孵育时间。

2.7 酶标二抗最适孵育时间

基于上述最适条件进行 bELISA 摸索, 最适链霉亲和素-HRP 的孵育时间, 结果显示, 链霉亲和素-HRP 按照 1:5 000 稀释, 孵育时间为 30 min 时具有最高的阻断率 (图 4D), 故将此作为酶标二抗最适孵育时间。

2.8 bELISA 的临界值

对 90 份已知阴性血清进行了 bELISA 检测, 90 份阴性血清的平均 PI 为 7.67%, 标准差 (s) 为 8.98%, 因此, 当样品的 $PI \geq 35\%$, 则判定样品为 PEDV 抗体阳性; 若 $26\% < PI < 35\%$, 则判定为 PEDV 抗体可疑, 需要进行重新检测, 若重新检测结果仍为可疑, 则判定为 PEDV 抗体阴性; 若样品 $PI \leq 26\%$, 则判定为 PEDV 抗体阴性 (图 5)。

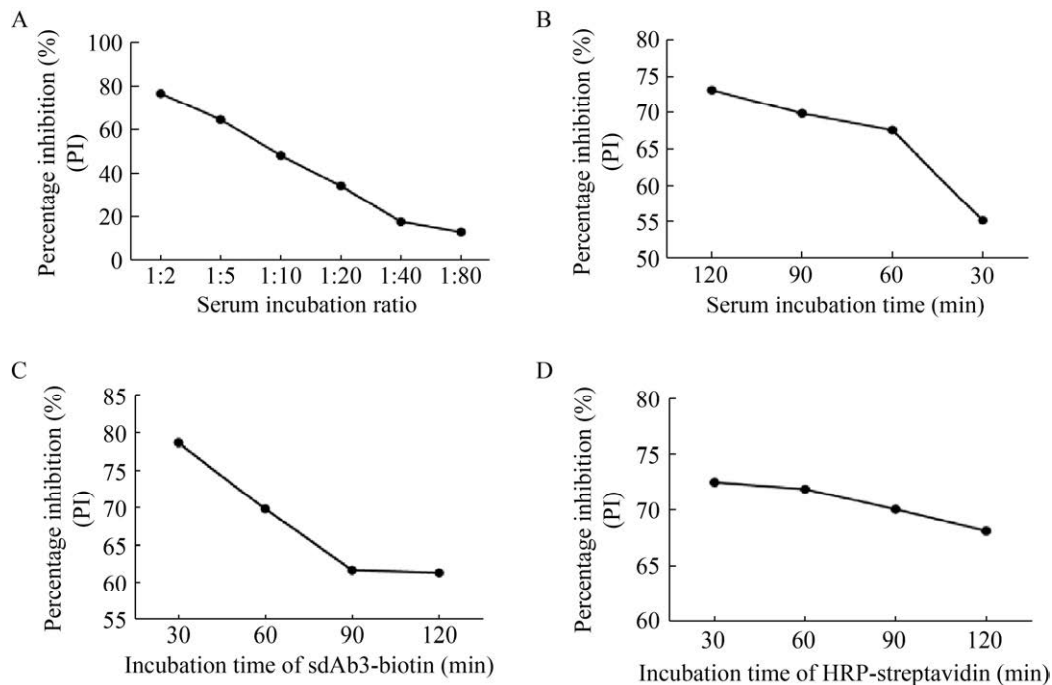


图 4 bELISA 最佳条件

Fig. 4 Screening of optimal conditions for bELISA. (A) The serum dilution ratio. (B) The serum incubation time. (C) The sdAb3-Biotin incubation time. (D) The incubation time of streptavidin-HRP on the performance of bELISA.

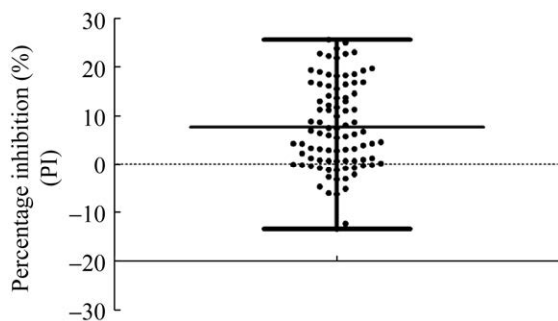


图 5 bELISA 的临界值

Fig. 5 The cut-off value of the bELISA.

2.9 bELISA 的重复性

为验证 bELISA 方法的重复性, 选取不同人员在不同时间按照上述 bELISA 操作流程, 对 7 份猪血清进行 4 次测试, 每个样品进行 3 个重复孔, 结果表明, 在 4 次重复试验中, 不同人员检测同一份血清样品的阴阳性结果一致 (图 6), 且 CV% 均在 10% 以下, 表明该 bELISA 方法具有良好的重复性。

2.10 bELISA 特异性

利用建立的 bELISA 方法对 TGEV、PRRSV、PCV、PRV、PPV 和 JEV 阳性血清进行检测, 结果表明, 除 PEDV 阳性对照血清, 其余病原阳性均不与 S1 蛋白进行结合, 从而不能阻断 sdAb3-Biotin 与 S1 蛋白结合。结果表明该 bELISA 方法表现出良好的特异性 (图 7)。

2.11 bELISA 与商品化试剂盒符合率

应用商品化试剂盒和本研究建立的 bELISA 分别对 54 份临床猪血清进行检测, 经计算, 二者的总体符合率可达 92.59% (表 1)。

3 讨论

由于变异毒株的高流行性, PED 已成为威胁世界养猪业的最重要的疫病之一, 早期快速的诊断对防控 PEDV 的传播非常重要^[21]。S 蛋白是 PEDV 的主要抗原之一, 且含有多个抗原表位,

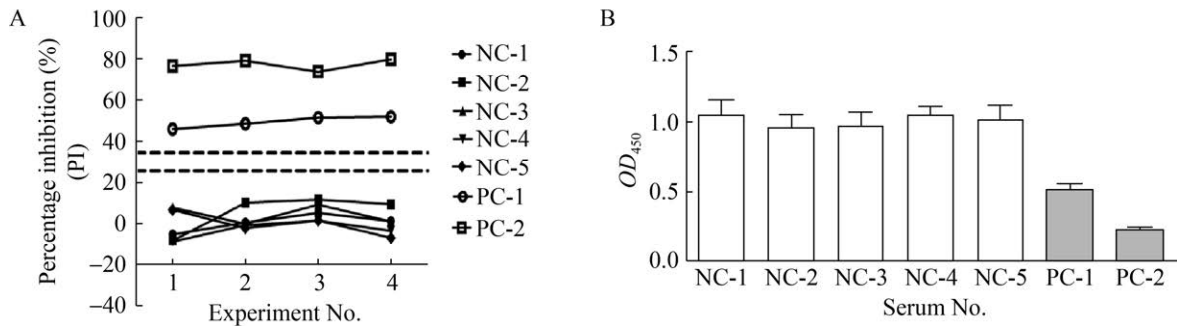


图 6 bELISA 的重复性

Fig. 6 Reproducibility of the bELISA.

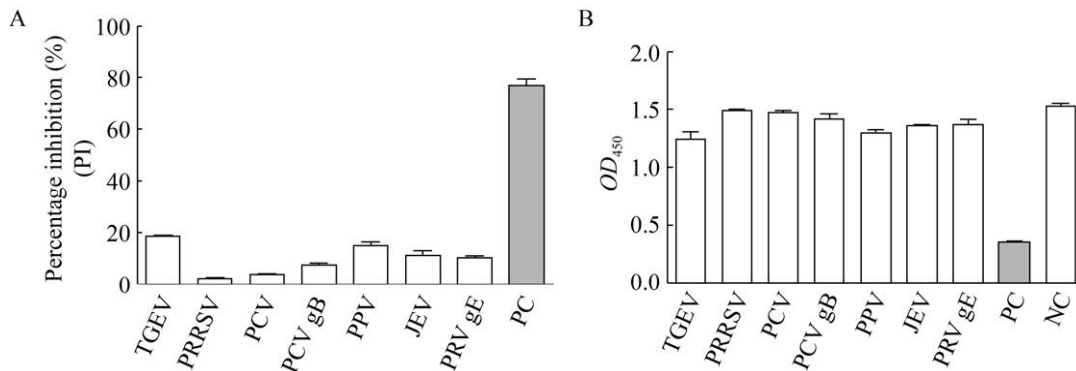


图 7 bELISA 的特异性

Fig. 7 Specificity of the bELISA.

表 1 bELISA 与商品试剂盒的符合率评价

Table 1 The compliance rate between the bELISA and a commercial ELISA kit

| Methods and determination indexes | Blocking ELISA | | | Coincidence rate (%) |
|-----------------------------------|------------------------|------------------------|-------|----------------------|
| | Positive serum numbers | Negative serum numbers | Total | |
| Commercialization ELISA | Positive serum numbers | 16 | 18 | 88.89 |
| | Negative serum numbers | 2 | 36 | 94.44 |
| | Total | 18 | 54 | 92.59 |

是进行 PEDV 遗传变异分析和建立 ELISA 方法的主要靶蛋白^[22]。抗体在间接 ELISA、竞争 ELISA 和阻断 ELISA 等不同形式的 ELISA 检测方法中起着重要的作用。由于这些方法都是基于 PEDV 特异性单克隆抗体或多克隆抗体，因此制备、纯化和标记抗体的过程复杂且昂贵^[23]。然而，纳米抗体的出现克服了这些问题，与传统的抗体相比，

纳米抗体可在传统的原核表达系统和酵母表达系统中进行大量的表达。笔者课题组前期报道的基于 PEDV N 蛋白纳米抗体建立的 bELISA 方法^[19]和本研究基于 S1 蛋白纳米抗体建立的 bELISA 与商品化试剂盒的符合率分别是 94% 和 92.56%，这可能与他们检测 PEDV 感染后不同时间段的抗体以及抗原的保守性有关。PEDV 感染早期时，猪

体内首先会产生大量针对 N 蛋白的抗体, 而针对 S 蛋白的抗体持续时间长于 N 蛋白^[5,24]。此外, 几种基于不同病毒纳米抗体建立的 ELISA 方法已被用于病毒血清学检测, 包括 NDV 和 SIV。

生物素-链霉亲和素体系是一种非常有效的生物反应扩增体系, 一个链霉亲和素可以特异性结合 4 个生物素分子, 起到放大信号的作用, 从而提高反应的灵敏度^[25]。生物素-链霉亲和素体系由于其高特异性和强亲和力, 已被广泛应用于各种物质的检测。此外, 生物素的分子量只有 244.31 Da, 是 HRP 分子量的 1/160^[26]。因此, 用生物素标记蛋白时, 蛋白的生物活性基本不受影响。考虑到纳米抗体的分子量小, 生物素标记可以最大限度地保留其结构和功能。以生物素化的 sdAb5 为基础, 建立了一种特异性、敏感性和重现性良好的检测猪血清中 SIV 抗体的 ELISA 方法。考虑到纳米体在诊断开发中的应用日益增多, 本研究以 S1 蛋白的特异性单域抗体 sdAb3 为基础建立了一种具有良好的特异性、灵敏度、重复性和低成本的 bELISA 方法, 其中, sdAb3 可通过原核表达系统进行大量表达, 从而能够大幅度降低检测成本, 有望用于临床实践中。

总之, 本研究通过对 PEDV S1 蛋白的特异性单域抗体 sdAb3 进行生物素化标记, 以生物素化 sdAb3 为基础建立了 bELISA 方法并对临床 54 份样品进行检测, 检测结果与商品化试剂盒检测结果符合率为 92.56%。该 bELISA 方法具有良好的特异性、灵敏性与重复性, 具有省时、低成本的优势, 在生产实践中具有较高的应用价值。本研究为间接诊断 PEDV 的感染和监测猪群中 PEDV 疫苗免疫水平提供了一种新的方法。

REFERENCES

- [1] Sun RQ, Cai RJ, Chen YQ, et al. Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China. *Emerg Infect Dis*, 2012, 18(1): 161-163.
- [2] Ge FF, Yang DQ, Li X, et al. Novel method for isolation of porcine epidemic diarrhea virus with the use of suspension vero cells and immunogenicity analysis. *J Clin Microbiol*, 2021, 59(2): e02156-20.
- [3] Li DL, Feng H, Liu YC, et al. Molecular evolution of porcine epidemic diarrhea virus and porcine deltacoronavirus strains in Central China. *Res Vet Sci*, 2018, 120: 63-69.
- [4] Lin HX, Zhou H, Gao L, et al. Development and application of an indirect ELISA for the detection of antibodies to porcine epidemic diarrhea virus based on a recombinant spike protein. *BMC Vet Res*, 2018, 14(1): 243.
- [5] Chae C, Kim O, Choi C, et al. Prevalence of porcine epidemic diarrhoea virus and transmissible gastroenteritis virus infection in Korean pigs. *Vet Rec*, 2000, 147(21): 606-608.
- [6] Wood EN. Transmissible gastroenteritis and epidemic diarrhoea of pigs. *Br Vet J*, 1979, 135(4): 305-314.
- [7] Diel DG, Lawson S, Okda F, et al. Porcine epidemic diarrhea virus: an overview of current virological and serological diagnostic methods. *Virus Res*, 2016, 226: 60-70.
- [8] Liu GP, Jiang YH, Opriessnig T, et al. Detection and differentiation of five diarrhea related pig viruses utilizing a multiplex PCR assay. *J Virol Methods*, 2019, 263: 32-37.
- [9] Okda F, Liu XD, Singrey A, et al. Development of an indirect ELISA, blocking ELISA, fluorescent microsphere immunoassay and fluorescent focus neutralization assay for serologic evaluation of exposure to North American strains of porcine epidemic diarrhea virus. *BMC Vet Res*, 2015, 11: 180.
- [10] Fan JH, Zuo YZ, Shen XQ, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the monitoring and surveillance of antibodies to porcine epidemic diarrhea virus based on a recombinant membrane protein. *J Virol Methods*, 2015, 225: 90-94.
- [11] 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 Vet Diagn Invest*, 1995, 7(1): 60-64.
- [12] Fan BC, Sun J, Zhu L, et al. Development of a novel double antibody sandwich quantitative

- enzyme-linked immunosorbent assay for detection of porcine epidemic diarrhea virus antigen. *Front Vet Sci*, 2020, 7: 540248.
- [13] Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*, 1993, 363(6428): 446-448.
- [14] Che T, English J, Krumm BE, et al. Nanobody-enabled monitoring of kappa opioid receptor states. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1145.
- [15] Lu QZ, Li XX, Zhao JK, et al. Nanobody-horseradish peroxidase and -EGFP fusions as reagents to detect porcine parvovirus in the immunoassays. *J Nanobiotechnol*, 2020, 18(1): 7.
- [16] Demine S, Ribeiro RG, Thevenet J, et al. A nanobody-based nuclear imaging tracer targeting dipeptidyl peptidase 6 to determine the mass of human beta cell grafts in mice. *Diabetologia*, 2020, 63(4): 825-836.
- [17] Sheng YM, Wang K, Lu QZ, et al. Nanobody-horseradish peroxidase fusion protein as an ultrasensitive probe to detect antibodies against Newcastle disease virus in the immunoassay. *J Nanobiotechnol*, 2019, 17(1): 35.
- [18] Du TF, Zhu G, WuXP, et al. Biotinylated single-domain antibody-based blocking elisa for detection of antibodies against swine influenza virus. *Int J Nanomedicine*, 2019, 14: 9337-9349.
- [19] Ma ZQ, Wang TY, Li ZW, et al. A novel biotinylated nanobody-based blocking ELISA for the rapid and sensitive clinical detection of porcine epidemic diarrhea virus. *J Nanobiotechnol*, 2019, 17(1): 96.
- [20] Ji PP, Zhu JH, Li XX, et al. Fenobody and RANbody-based sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to detect Newcastle disease virus. *J Nanobiotechnol*, 2020, 18(1): 44.
- [21] Shan Y, Liu Y, Liu Z, et al. Development and application of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant S1 for serological testing of porcine epidemic diarrhea virus. *Can J Microbiol*, 2019, 65(5): 343-352.
- [22] Liu JB, Cong GY, Shi HY, et al. Neutralizing monoclonal antibody fails to recognize porcine epidemic diarrhea virus with two regions deleted in spike protein. *Veterin Microbiol*, 2020, 251: 108917.
- [23] Gerber PF, Lelli D, Zhang JP, et al. Diagnostic evaluation of assays for detection of antibodies against porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in pigs exposed to different PEDV strains. *Prev Vet Med*, 2016, 135: 87-94.
- [24] Knuchel M, Ackermann M, Müller HK, et al. An ELISA for detection of antibodies against porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) based on the specific solubility of the viral surface glycoprotein. *Veterin Microbiol*, 1992, 32(2): 117-134.
- [25] Gong X, Zhu M, Li GH, et al. Specific determination of influenza H7N2 virus based on biotinylated single-domain antibody from a phage-displayed library. *Anal Biochem*, 2016, 500: 66-72.
- [26] Diamandis EP, Christopoulos TK. The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology. *Clin Chem*, 1991, 37(5): 625-636.

(本文责编 陈宏宇)