

基于N蛋白单克隆抗体的小反刍兽疫病毒抗体检测胶体金试纸条的研制

董帅^{1,2}, 孟卫芹², 莫玲², 陈金龙³, 石竞楠⁴, 杨哲¹, 李通⁵, 徐倩倩², 沈志强², 刘建钊^{1*}, 王金良^{2*}

- 1 河北工程大学生命科学与食品工程学院, 河北 邯郸 056038
- 2 山东省滨州畜牧兽医研究院, 山东 滨州 256600
- 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 028000
- 5 青岛农业大学动物医学院, 山东 青岛 266109

董帅, 孟卫芹, 莫玲, 陈金龙, 石竞楠, 杨哲, 李通, 徐倩倩, 沈志强, 刘建钊, 王金良. 基于N蛋白单克隆抗体的小反刍兽疫病毒抗体检测胶体金试纸条的研制[J]. 生物工程学报, 2023, 39(12): 4915-4926.

DONG Shuai, MENG Weiqin, MO Ling, CHEN Jinlong, SHI Jingnan, YANG Zhe, LI Tong, XU Qianqian, SHEN Zhiqiang, LIU Jianchao, WANG Jinliang. Preparation of colloidal gold test strips for the detection of antibodies to peste des petits ruminants based on monoclonal antibodies to N protein[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(12): 4915-4926.

摘要: 本研究旨在建立一种简便、快捷、可直观检测小反刍兽疫病毒(peste des petits ruminants virus, PPRV)抗体的检测方法。将pET-32a-N重组质粒转化至大肠杆菌(*Escherichia coli*) Rosetta(DE3)感受态细胞中进行诱导表达,以纯化的PPRV N蛋白免疫8周龄BALB/c小鼠,取其脾细胞与SP2/0骨髓瘤细胞进行融合,间接酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assays, ELISA)筛选及亚克隆,获得了抗PPRV N蛋白的单克隆抗体。将PPRV N蛋白分别作为金标抗原及检测线(T线)包被抗原、单克隆抗体作为质控线(C线)包被抗体,组装成检测PPRV N蛋白抗体的胶体金免疫层析试纸条。结果显示:成功获得1株能稳定分泌抗N蛋白抗体的杂交瘤细胞株,命名为1F1;间接ELISA检测1F1腹水效价为1:128 000;亚类鉴定结果为IgG1,轻链为kappa链。Western blotting结果显示,1F1能与PPRV N蛋白特异性结合;间接免疫荧光(indirect immunofluorescent assay, IFA)结果显示,制备的单克隆抗体能够识别PPRV;建立的试纸条能够特异性地检测PPRV抗体,以不同批次的试纸条重复检测,结果无差异。根据122份临床血清的检测结果,PPRV抗体试纸条与ELISA试验的符合率为97.6%。本研究建立的试纸条检测方法具有良好的特异性、重复性和敏感性,可用于PPRV抗体的快速检测。
关键词: 小反刍兽疫病毒; N蛋白; 单克隆抗体; 胶体金; 抗体检测

资助项目: 山东省羊产业技术体系岗位专家项目(SDAIT-10-07)

This work was supported by the Shandong Provincial Sheep Industry Technology System Project (SDAIT-10-07).

*Corresponding authors. E-mail: WANG Jinliang, wjl478@163.com; LIU Jianchao, ljch0826@126.com

Received: 2023-04-23; Accepted: 2023-06-07; Published online: 2023-06-26

Preparation of colloidal gold test strips for the detection of antibodies to peste des petits ruminants based on monoclonal antibodies to N protein

DONG Shuai^{1,2}, MENG Weiqin², MO Ling², CHEN Jinlong³, SHI Jingnan⁴, YANG Zhe¹, LI Tong⁵, XU Qianqian², SHEN Zhiqiang², LIU Jianchai^{1*}, WANG Jinliang^{2*}

1 College of Life Science and Food Engineering, Hebei University of Engineering, Handan 056038, Hebei, China

2 Shandong Binzhou Animal Science & Veterinary Medicine Academy, Binzhou 256600, Shandong, China

3 College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832003, Xinjiang, China

4 College of Life Sciences and Food Engineering, Inner Mongolia Minzu University, Tongliao 028000, Inner Mongolia, China

5 College of Veterinary Medicine, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong, China

Abstract: A simple, fast, and visual method for detecting antibodies against peste des petits ruminants virus (PPRV) using colloidal gold strips was developed. In this study, the pET-32a-N was transformed into *Escherichia coli* Rosetta (DE3) for expression. Hybridoma cell lines were generated by fusing SP2/0 myeloma cells with splenocytes from immunized mice with the expressed and purified N protein of PPRV. The PPRV N protein was labeled with colloidal gold particles as the gold-labeled antigen. The N protein served as the gold standard antigen and as the test (T) line-coated antigen, while the monoclonal antibody served as the quality control (C) line-coated antibody to assemble the colloidal gold immunochromatographic test strips for detecting antibodies against the N protein of PPRV. Hybridoma cell line designated as 1F1 was able to stably secrete the monoclonal antibody against the N protein of PPRV. The titer of 1F1 monoclonal antibody in ascites was 1:128 000 determined by indirect enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), and the immunoglobulin subtype of the monoclonal antibody was IgG1, with kappa chain. The obtained monoclonal antibody was able to specifically recognize the N protein of PPRV, as shown by Western blotting and indirect immunofluorescent assay (IFA). The developed colloidal gold test strip method was able to detect PPRV antibodies specifically, and there was no difference between different batches of the test strips. Testing of a total of 122 clinical sera showed that the compliance rate of the test strip with ELISA test was 97.6%. The test strip assay developed in this study has good specificity, reproducibility, and sensitivity, and it can be used for the rapid detection of PPRV antibodies.

Keywords: peste des petits ruminants virus; N protein; monoclonal antibody; colloidal gold; antibody detection

小反刍兽疫(peste des petits ruminants, PPR)是由小反刍兽疫病毒(peste des petits ruminants virus, PPRV)引起的一种家养和野生小反刍动物的病毒性疾病^[1]。PPRV 属于副黏病毒科的

麻疹病毒属, 具有线性负链 RNA 基因组, 编码 6 种结构蛋白, 包括核衣壳蛋白(nucleocapsid, N)、磷蛋白(phosphoprotein, P)、融合蛋白(fusion, F)、基质蛋白(matrix, M)、血凝素蛋白

(hemagglutinin, H)、大蛋白(large, L)和 2 个非结构蛋白(C 和 V)^[2]。N 蛋白是 PPRV 感染细胞中含量最多且高度保守的病毒蛋白,是麻疹病毒中重要的病毒蛋白,在 PPRV 复制和转录中起关键作用^[3]。由于其抗原的稳定性以及物种特异性和交叉反应性,该蛋白是麻疹病毒的诊断候选蛋白^[4]。根据融合蛋白和核衣壳蛋白基因的部分序列分析,将 PPRV 划分为 I 型、II 型、III 型和 IV 型 4 个不同的遗传谱系^[5]。

PPR 主要临床表现为发热、口炎、腹泻和肺炎,被世界动物卫生组织(World Organization for Animal Health, WOA)列为须报告的动物疫病,我国将其列为一类动物疫病。该病严重危害养羊产业的健康发展,对畜牧业造成巨大的经济损失。因此,粮农组织和 WOA 联合推出了 PPR 全球控制和消除战略计划,用以控制和消除 PPR^[6]。目前根除 PPR 主要依赖于大规模疫苗接种,使用最广泛的 PPR 疫苗是在细胞培养物中连续传代 75 次减毒后获得的 Nigeria 75/1^[7]。尽管使用 Nigeria 75/1 弱毒疫苗进行免疫,可以使动物获得 1 年以上的免疫力^[8],但因免疫程序不合理等因素,时常导致免疫失败,使得羊群有发生 PPR 潜在风险。因此,建立一种快速的 PPR 抗体检测方法对于我国 PPR 有效防控具有重要意义。

PPR 实验室常规检测方法包括病毒中和试验(virus neutralization test, VNT)^[9]、琼脂凝胶免疫扩散试验(agar gel immunodiffusion, AGID)^[10]、免疫荧光抗体试验(fluorescent antibody test, FAT)^[11]、逆转录重组酶聚合酶扩增(reverse transcription recombinase polymerase amplification, RT-RPA)^[12]、逆转录环介导等温扩增(reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP)^[13]、酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent

assays, ELISA)^[14]、PCR^[15]、化学发光免疫分析法(chemiluminescent immunoassay, CLIA)^[16]、胶体金免疫层析技术(gold immunochromatographic assay, GICA)和量子点免疫层析法(quantum dots lateral flow immunoassay, QD-LFMA)^[17]。在 PPR 抗体检测方法中, VNT 为检测的金标准,也是 WOA 认可的国际贸易诊断方法,但对实验人员的操作要求较高,且费时费力,不适合大量样本检测^[18]。WOA 推荐竞争性 ELISA (competitive ELISA, c-ELISA)作为接种疫苗效果的评估方法,但其操作步骤繁琐,不适合用于现场快速检测^[19]。CLIA 具有灵敏度高、特异性强、操作方便等优点,广泛用于疫病检测技术的开发,但该方法需要专业的检测人员以及特定的仪器设备,限制了其在生产一线的应用^[16]。QD-LFMA 荧光独特、激发光谱范围广且荧光强度高,虽然可实现大规模样品普查,但试剂成本相对较高^[17]。GICA 既快速又简单,不需要熟练的技术人员或特殊设备,检测结果易判定。鉴于此,本研究以 PPRV N 蛋白制备的单克隆抗体作为质控线包被抗体,以原核表达的 PPRV N 蛋白作为金标抗原和检测线包被抗原,制备 PPRV 检测抗体试纸条方法,旨在能够快速检测且适用于基层检测,为 PPRV 抗体的即时检测提供新方法。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 细胞、重组质粒、血清及实验动物

小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0、非洲绿猴肾细胞 Vero、绵羊睾丸细胞、大肠杆菌(*Escherichia coli*) Rosetta(DE3)感受态细胞、携带 N 基因的重组质粒(pET-32a-N)、A 型口蹄疫病毒(foot and mouth disease virus serotype A, FMDV-A)阳性

血清、O型口蹄疫病毒(foot and mouth disease virus serotype O, FMDV-O)阳性血清、山羊痘病毒(goatpox virus, GTPV)及阳性血清、羊口疮病毒(orf virus, ORFV)和布鲁氏菌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; 胎牛血清购自 Cegrogen 公司; 6-8 周龄无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级 BALB/c 小鼠由济南朋悦实验动物繁育有限公司提供; 122 份临床血清采集于山东省滨州市周边羊场。所用实验动物均严格按照实验动物福利伦理审查指南进行, 并经山东绿都生物科技有限公司实验动物伦理委员会批准(批准号: 2022001005)。

1.1.2 主要试剂

针对 His 标签的单克隆抗体(4E6)和辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗鼠 IgG 购自北京博奥龙免疫技术有限公司; Ni NTA Beads 6FF 购自天地人和生物科技有限公司; DMEM 培养基购自 Gibco 公司; 弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、氯金酸、次黄嘌呤-氨基蝶呤胸苷(hypoxanthine-aminopterin thymidine, HAT)和次黄嘌呤-胸腺苷(hypoxanthine-thymidine, HT)购自 Sigma 公司; 单克隆抗体亚型鉴定试剂盒、异丙基硫代- β -半乳糖苷(isopropylthio- β -galactoside, IPTG)和 PageRuler™ 预染蛋白分子量标准购自 Thermo Fisher Scientific 公司; PPR 抗体 ELISA 检测试剂盒购自山东绿都生物科技有限公司; 玻璃纤维、NC 膜和胶体金卡套购自上海杰一生物技术有限公司; 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)购自 Amresco 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 重组蛋白的表达和鉴定

将重组质粒 pET-32a-N 转化 *E. coli* Rosetta(DE3)

感受态细胞, 挑取单克隆接种于 10 mL 含氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37 °C 过夜培养。取 2 mL 培养后的菌液转接至 200 mL 含氨苄青霉素 LB 液体培养基, 37 °C 振荡培养至对数生长期, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 37 °C 诱导表达 5 h, 离心收集菌体。沉淀用碳酸盐缓冲液(0.01 mol/L, pH 7.4)重悬并超声裂解, 离心取上清经镍离子亲和层析柱纯化得到重组 N 蛋白, 并进行 SDS-PAGE 分析及 Western blotting 鉴定。

1.3 动物免疫

用磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L, pH 7.4)调整纯化的 PPRV N 蛋白浓度为 1 mg/mL 并过滤除菌。初次免疫 150 μ g/只, 加等体积弗氏完全佐剂乳化, 颈背部皮下多点注射 BALB/c 小鼠。初次免疫后隔 2 周进行加强免疫, 蛋白溶液加等体积弗氏不完全佐剂乳化, 免疫剂量与途径同初次免疫。第 3 次免疫与第 2 次相同。在第 3 次免疫后 1 周通过小鼠眼眶采血, 以 PPRV N 蛋白为包被抗原的间接 ELISA 方法检测免疫小鼠血清效价。选择抗体效价较高的小鼠按 100 μ g/只进行冲击免疫。

1.4 PPRV N 蛋白单克隆抗体制备

将免疫小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 按 1:10 比例置于 50 mL 离心管中混匀, 2 000 r/min 离心 10 min, 将细胞混合物置于 37 °C 水浴中, 60 s 内缓慢滴入预温至 37 °C 50% 的聚乙二醇 1 mL, 边加边用吸管轻轻搅拌, 静置 30 s 后缓慢加入 10 mL 37 °C 预热的 DMEM 基础培养基, 2 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 用含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基(含 HAT)重悬至每毫升 1.2×10^6 个细胞, 于 37 °C 水浴锅中静置 10 min, 以总体积为 200 μ L/孔平铺于含有饲养细胞的 96 孔板中, 37 °C、5% CO₂ 温箱中培

养。融合后第 3、6、9 天用含 HAT 的 DMEM 培养基进行换液,第 14 天用含 HT 的 DMEM 培养基进行换液,待培养基略变黄时取 100 μL 上清,以 PPRV N 蛋白包被的酶标板用间接 ELISA 方法对杂交瘤细胞上清进行筛选,将筛选阳性孔的杂交瘤细胞通过有限稀释法纯化至 100%阳性。扩大培养阳性杂交瘤细胞经细胞计数后(1.0×10^6 – 2.0×10^6)腹腔注射 10 周龄经产雌性 BLAB/c 小鼠,制备腹水型单克隆抗体。

1.5 单克隆抗体的鉴定

1.5.1 单抗的纯化及亚类的鉴定

制备的腹水离心去除沉淀收集上清。采用辛酸-硫酸铵方法纯化腹水^[20], SDS-PAGE 分析纯度。按照 Thermo Fisher Scientific 公司 Rapid ELISA Mouse mAb Isotyping Kit 说明书对单克隆抗体的亚类进行鉴定。

1.5.2 Western blotting 鉴定

以 PPRV N 蛋白和含空质粒的菌体蛋白进行 SDS-PAGE,电泳结束后转印至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜,5%脱脂乳封闭 1 h,将膜浸泡于含 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 单克隆抗体(1F1)的 TBST 溶液中,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次;将膜浸泡于含 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HRP 标记的羊抗鼠 IgG 的 TBST 溶液中 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次后, DAB 显色进行 Western blotting 鉴定。

1.5.3 IFA 鉴定单克隆抗体特异性

用 PPR 疫苗毒感染 Vero 细胞,依据参考文献[21-22]建立 GTPV、ORFV 感染绵羊睾丸细胞的方法,待细胞出现病变后,用 4%组织固定液室温固定 15 min, PBS 润洗 3 次;0.2% Triton X-100 室温通透 5 min, PBS 润洗 3 次;用 1% BSA 封闭 60 min 后加入鉴定为阳性的杂交瘤细胞上清室温孵育 60 min, PBS 润洗 3 次;加入 1:100 稀释的羊抗鼠 IgG-FITC 室温避光孵育 40 min, PBS 润洗 3 次;置于荧光显微镜下观

察。同时设置不接毒 Vero 细胞作为对照。

1.6 胶体金试纸条的制备

1.6.1 胶体金制备

采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金溶液^[23]。将 1 mL 1.0%氯金酸加入到 99 mL 超纯水中,煮沸 3 min。煮沸好的溶液中加入 1.6 mL 1.0%柠檬酸三钠溶液,持续加热 5 min,直到颜色变成深红色,不再变化。胶体金溶液冷却至室温,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.6.2 金标记探针的制备和纯化

将 400 μL 的 0.2 mol/L K_2CO_3 加入到 50 mL 胶体金溶液中调节 pH,室温搅拌 30 min,然后加入 700 μL 的 1 mg/mL PPRV N 蛋白溶液室温搅拌 45 min,加入 10% BSA 至终浓度为 1%,继续搅拌 45 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 2 h。然后将胶体金溶液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 000 r/min 离心 15 min;抽吸上清,丢弃沉淀。将上清液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,在沉淀中加入 5 mL 胶体金复溶液作为金标记抗原置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中保存备用。

1.6.3 样品垫处理

将玻璃纤维膜浸泡于样品垫处理液(0.01 mol/L PBS、0.5% PVP、0.5% Tween-20、2% PEG20000 和 1% BSA)中 30 min,平放于洁净的玻璃平板上,37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜干燥,4–30 $^{\circ}\text{C}$ 密封保存备用。

1.6.4 试纸条的组装

用三维喷膜仪将 PPRV N 蛋白与 1F1 单克隆抗体分别喷洒于硝酸纤维素膜上(nitrocellulose membrane, NC 膜),分别做检测线与质控线。金标 PPRV N 蛋白用单向喷点仪喷至玻璃纤维膜上。按照常规纸条组装方法,优化好条件,干燥密封后室温保存备用。

1.6.5 胶体金试纸条检测方法及其结果判定

将 75 μL 血清样品滴加在加样孔上,10 min 后观察结果。若 T 线和 C 线均显色则检测抗体

为阳性；T 线不显色，C 线显色检测抗体阴性；C 线和 T 线不显色判定为无效检测。

1.7 试纸条性能评价

用建立的试纸条方法检测 FMDV-A、FMDV-O、GTPV、布鲁氏菌阳性血清，用 PPRV 阳性血清作对照以此检测其特异性。

将 PPRV 阳性血清按照 1:10、1:20、1:40、1:80、1:160、1:320、1:640、1:1 280 和 1:2 560 系列稀释，加样量均为 75 μ L，分别用本试纸条进行检测，评判试纸条的检测敏感性。

取 15 份 PPRV 临床血清样品，用不同批次的试纸条和同批次的试纸条检测每份血清样品，每份样品平行做 3 个重复，确定试纸条的批间和批内重复性。

1.8 符合性试验

分别用本研究制备的试纸条与商品化 ELISA 试剂盒对 122 份临床血清样品进行检测，比较两者的符合率。

2 结果与分析

2.1 PPRV N 蛋白单克隆抗体制备

2.1.1 PPRV N 蛋白的纯化和鉴定

SDS-PAGE 和 Western blotting 分析显示，PPRV N 蛋白具有良好的反应性和特异性，大小约 79 kDa，与预期相符(图 1)。

2.1.2 阳性杂交瘤细胞筛选

使用间接 ELISA 对所培养的杂交瘤细胞上清液进行检测，有限稀释法对阳性杂交瘤细胞亚克隆至阳性率达 100%，最终获得了 1 株稳定分泌抗 PPRV N 蛋白的杂交瘤细胞株，命名为 1F1。

2.1.3 PPRV N 蛋白单克隆抗体 1F1 的纯化

经辛酸-硫酸铵方法纯化腹水，磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L, pH 7.4)透析 24 h 后 SDS-PAGE 检测，结果显示，单克隆抗体裂解为 55 kDa 左右的重链和 25 kDa 左右的轻链，杂蛋白去除较好(图 2)。

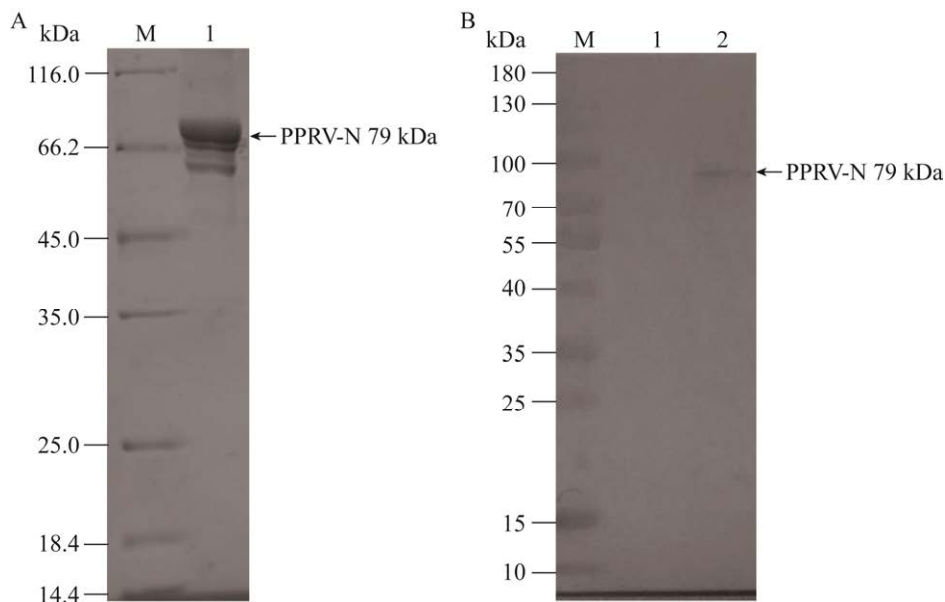


图 1 PPRV N 蛋白 SDS-PAGE 及 Western blotting 鉴定分析

Figure 1 PPRV N protein SDS-PAGE and Western blotting identification analysis. A: Purification of PPRV N protein. M: Protein molecular weight standard; 1: Purified PPRV N protein. B: PPRV N protein Western blotting identification. M: Protein molecular weight standard; 1: pET-32a empty vector; 2: PPRV N protein.

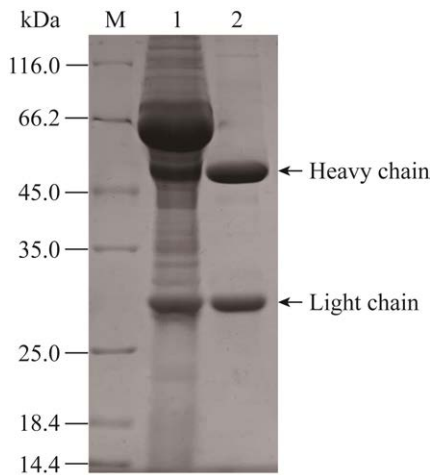


图 2 PPRV N 蛋白单克隆抗体腹水纯化的 SDS-PAGE 鉴定

Figure 2 PPRV N protein monoclonal antibody purified in ascites SDS-PAGE identification chart. M: Protein molecular weight marker; 1: Monoclonal antibody 1F1 ascites without purification; 2: Purified monoclonal antibody 1F1 ascites.

2.1.4 单克隆抗体亚型鉴定及抗体效价检测

利用小鼠单克隆抗体亚型鉴定试剂盒对单克隆抗体的亚型进行鉴定,结果显示,1F1 重链为 IgG1,轻链均为 κ 链(表 1)。间接 ELISA 检测 1F1 抗体效价为 1:128 000。

2.1.5 Western blotting 鉴定

应用 Western blotting 试验检测 1F1 和 PPRV N 蛋白的反应性,结果显示,1F1 能特异性识别 PPRV N 蛋白,在约 79 kDa 处出现特异条带(图 3),并不与含空质粒表达的菌体蛋白发生反应。

2.1.6 间接免疫荧光鉴定

用 PPRV、GTPV、ORFV 分别接种细胞,经固定、封闭后,以纯化的腹水型单抗按 1:1 000

稀释后作一抗, FITC 标记的羊抗鼠 IgG 作二抗进行 IFA 鉴定。结果显示,制备的单克隆抗体只与 PPRV 发生反应,发出特异性的荧光,而 GPTV、ORFV 和正常 Vero 细胞与 1F1 不发生反应,无荧光(图 4)。

2.2 胶体金试纸条制备

2.2.1 试纸条的特异性

本研究制备的试纸条检测 FMDV-A、FMDV-O、GTPV 和布鲁氏菌阳性血清,结果显示,均为阴性(图 5)。

2.2.2 试纸条的敏感性

用建立的试纸条检测倍比稀释的 PPRV 阳性血清,稀释至 1:1 280 时为阳性,稀释至 1:2 560 时 T 线未显色判定为阴性(图 6),ELISA 抗体检测试剂盒检测稀释至 1:1 280 时为阴性(表 2),与 ELISA 结果相比,说明本研究制备的试纸条的敏感性优于商品化 ELISA 试剂盒。

2.2.3 试纸条的重复性

用不同批次的试纸条检测 15 份 PPRV 临床血清,进行批内及批间重复试验,检测结果无差异,表明建立的试纸条有良好的重复性。

2.2.4 试纸条与 ELISA 的符合率

用本研究制备的试纸条与 ELISA 试剂盒对 64 份绵羊血清和 58 份山羊血清进行检测。结果表明,市售 ELISA 试剂盒检出 118 份阳性血清、4 份阴性血清,阳性率 96.7%;本研究制备的胶体金试纸条检出阳性血清 121 份,1 份阴性血清,阳性率 99.1%,两者符合率 97.6%(表 3)。对胶体金试纸条和 ELISA 检测结果不相符的 3 份血清用 IFA 进行复核,结果均为阳性。

表 1 单克隆抗体亚型鉴定

Table 1 Subtype identification of monoclonal antibody 1F1

Cell strain	OD_{450}							
	M	G1	G2a	G2b	G3	A	κ	λ
1F1	0.027	0.864	0.023	0.015	0.018	0.019	0.430	0.023

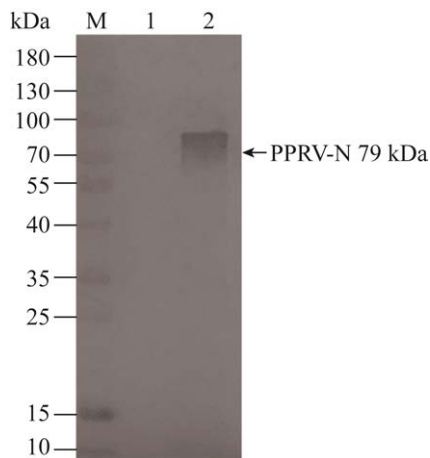


图3 单克隆抗体的 Western blotting 鉴定

Figure 3 Western blotting analysis of monoclonal antibody 1F1. M: Protein molecular weight standard; 1: pET-32a empty vector; 2: Monoclonal antibody 1F1.

3 讨论与结论

PPR 无特效药物治疗, 疫苗接种是在流行国家控制和根除 PPR 的关键。目前, 商品化疫苗可有效预防 PPR。我国对于 PPR 实行强制免疫使 PPR 流行得到了全面控制, 但因免疫操作不当, 导致疫苗免疫失败, 使得羊只具有感染 PPRV 并在不同地区零星发病的风险。鉴于此, 研制一种快速准确、可视化且适合现场血清学抗体检测方法对于 PPR 的诊断防治及疫苗免疫效果评价具有重要意义。

PPRV N 蛋白抗原性强, 且较为保守, 在病毒感染动物的血清中针对 N 蛋白的抗体占主导地位, 常作为诊断抗原的研究的靶基因^[19,24-25]。

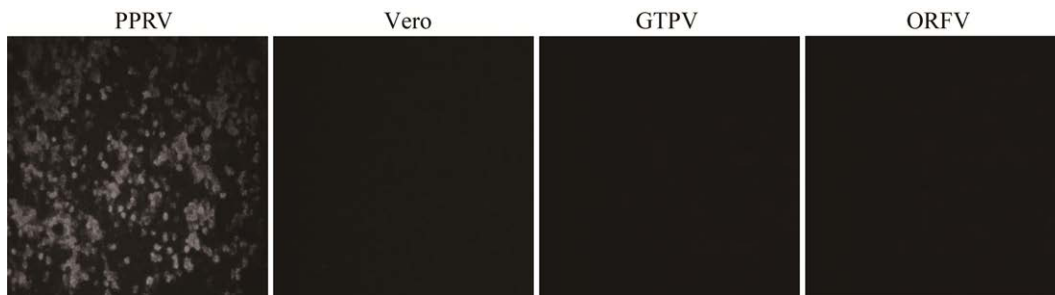


图4 间接免疫荧光鉴定单克隆抗体特异性(200×)

Figure 4 Identification of monoclonal antibody specificity by indirect immunofluorescence (200×).

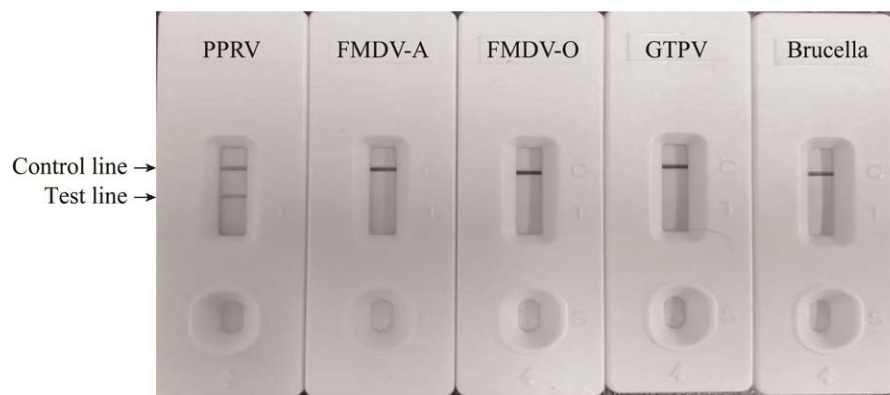


图5 试纸条特异性检测

Figure 5 The specificity of test strip.



图 6 试纸条敏感性检测
Figure 6 Sensitivity of the test strip.

表 2 ELISA 检测倍比稀释阳性血清

Table 2 ELISA for multiply diluted positive sera

Positive serum dilution	Positive serum OD_{450}	Blocking rate (%)	Negative control	Positive control
1:10	0.093	71.6		
1:20	0.106	68.2		
1:40	0.100	70.0	0.328	0.054
1:80	0.138	58.6		
1:160	0.097	70.9		
1:320	0.131	60.7		
1:640	0.104	68.7	0.338	0.078
1:1 280	0.223	33.0		
1:2 560	0.409	-23.0		

OD_{PC} : Mean of positive controls; OD_{NC} : Mean of negative controls; Blocking rate (%) = $(1 - OD_{PC}/OD_{NC}) \times 100\%$; Blocking rate $\leq 50\%$, judged as negative; Blocking rate $> 50\%$, judged as positive.

表 3 试纸条与 ELISA 检测结果比较

Table 3 Comparison of the test strip with ELISA

Sample source	Number	Positive by colloidal gold test	Positive by ELISA
Sheep sera	64	64.0	63.0
Goat sera	58	57.0	55.0
Positive rate (%)		99.1	96.7
Agreement (%)		97.6	

目前, 基于 N 蛋白建立的抗体检测方法主要为 ELISA, 袁雪涛等利用重组 N 蛋白建立了 PPRV 阻断 ELISA^[26], Balamurugan 等基于 N 蛋白建立了竞争 ELISA^[27], 孙雨等使用不同表达载体表达 N 蛋白建立了双抗原夹心 ELISA^[28], 冯向辉等在昆虫细胞中表达 N 蛋白建立了间接 ELISA^[29]。上述 ELISA 检测方法证实了 N 蛋白作为检测方法靶蛋白的可行性, 但该方法也有一定局限性如需要多个操作步骤、假阳性高、需要昂贵的专用仪器且需要在专业的实验室进行限制其生产应用。胶体金免疫层析技术具备简单、快速、无需检测设备优势, 已广泛用于病毒^[30]、细菌^[31]、兽药残留^[32]和食品安全^[33]等领域的快速检测中, 受到基层检测人员的青睐。因此, 本研究原核表达了 PPRV N 蛋白并制备了抗 PPRV N 蛋白的单克隆抗体, 建立了检测 PPRV 抗体的试纸条方法。结果表明, 本研究制备的试纸条对 PPRV 阳性血清有高度特异性, 与 FMDV-A、FMDV-O、GTPV、布鲁氏菌阳性血清无交叉反应。将 PPRV 阳性血清稀释至 1:1 280 时, 检测结果仍为阳性, 而商品化 PPRV 抗体 ELISA 试剂盒检测稀释至 1:1 280

时阻断率小于 50%判定结果为阴性,说明本研究制备的胶体金试纸条灵敏度高于商品化 ELISA 试剂盒。

本研究利用原核表达的 PPRV N 重组蛋白免疫 BALB/c 小鼠,经细胞融合、筛选、鉴定,制备了抗 PPRV N 蛋白的单克隆抗体,以 PPRV N 蛋白为基础建立了胶体金抗体检测试纸条,该试纸条敏感性高于商品化 ELISA 试剂盒,具有特异性高和重复性好的优点,可用于 PPRV 的流行病学调查和抗体监测。

REFERENCES

- [1] SCHULZ C, FAST C, WERNERY U, KINNE J, JOSEPH S, SCHLOTTAU K, JENCKEL M, HÖPER D, PATTERIL NAG, SYRIAC G, HOFFMANN B, BEER M. Camelids and cattle are dead-end hosts for peste-des-petits-ruminants virus[J]. *Viruses*, 2019, 11(12): 1133.
- [2] DALAN BAILEY, ASHLEY BANYARD, PRADYOT DASH, TOM BARRETT. Full genome sequence of peste des petits ruminants virus, a member of the *Morbillivirus* genus[J]. *Virus Research*, 2005, 110(1/2): 119-124.
- [3] PARIDA S, MUNIRAJU M, MAHAPATRA M, MUTHUCHELVAN D, BUCZKOWSKI H, BANYARD AC. Peste des petits ruminants[J]. *Veterinary Microbiology*, 2015, 181(1/2): 90-106.
- [4] MANTIP S, SIGISMEAU A, SHAMAKI D, WOMA TY, KWIA TEK O, LIBEAU G, FAROUGOU S, BATAILLE A. Molecular epidemiology of peste des petits ruminants virus in Nigeria: an update[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2022, 69(3): 1634-1640.
- [5] MUNIRAJU M, MUNIR M, PARTHIBAN AR, BANYARD AC, BAO JY, WANG ZL, AYEBAZIBWE C, AYELET G, EL HARRAK M, MAHAPATRA M, LIBEAU G, BATTEN C, PARIDA S. Molecular evolution of peste des petits ruminants virus[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2014, 20(12): 2023-2033.
- [6] LEGNARDI M, RAIZMAN E, BELTRAN-ALCRUDO D, CINARDI G, ROBINSON T, FALZON LC, DJOMGANG HK, OKORI E, PARIDA S, NJEUMI F, BENFIELD CTO. Peste des petits ruminants in central and eastern Asia/west Eurasia: epidemiological situation and status of control and eradication activities after the first phase of the PPR global eradication programme (2017–2021)[J]. *Animals*, 2022, 12(16): 2030.
- [7] ELOIFLIN RJ, BOYER M, KWIA TEK O, GUENDOUZ S, LOIRE E, SERVAN de ALMEIDA R, LIBEAU G, BATAILLE A. Evolution of attenuation and risk of reversal in peste des petits ruminants vaccine strain Nigeria 75/1[J]. *Viruses*, 2019, 11(8): 724.
- [8] AMANOVA Z, ZHUGUNISSOV K, BARAKBAYEV K, KONDYBAEVA Z, SAMETOVA Z, SHAYAKHMETOV Y, KAISSENOV D, DZHEKEBEKOV K, ZHUNUSHOV A, ABDURAIMOV Y, ZAKARYA K, BULATOV Y. Duration of protective immunity in sheep vaccinated with a combined vaccine against peste des petits ruminants and sheep pox[J]. *Vaccines*, 2021, 9(8): 912.
- [9] HU QQ, CHEN WY, HUANG KH, BARON MD, BU ZG. Rescue of recombinant peste des petits ruminants virus: creation of a GFP-expressing virus and application in rapid virus neutralization test[J]. *Veterinary Research*, 2012, 43(1): 1-8.
- [10] OSMAN NA, A/RAHMAN ME, ALI AS, FADOL MA. Rapid detection of peste des petits ruminants (PPR) virus antigen in Sudan by agar gel precipitation (AGPT) and haemagglutination (HA) Tests[J]. *Tropical Animal Health and Production*, 2008, 40(5): 363-368.
- [11] SUMPTION KJ, ARADOM G, LIBEAU G, WILSMORE AJ. Detection of peste des petits ruminants virus antigen in conjunctival smears of goats by indirect immunofluorescence[J]. *Veterinary Record*, 1998, 142(16): 421-424.
- [12] YANG Y, QIN XD, SONG YM, ZHANG W, HU GW, DOU YX, LI YM, ZHANG ZD. Development of real-time and lateral flow strip reverse transcription recombinase polymerase amplification assays for rapid detection of peste des petits ruminants virus[J]. *Virology Journal*, 2017, 14(1): 1-10.
- [13] MAHAPATRA, HOWSON, FOWLER, BATTEN, FLANNERY, SELVARAJ, PARIDA. Rapid detection of peste des petits ruminants virus (PPRV) nucleic acid using a novel low-cost reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for future use in nascent PPR eradication programme[J]. *Viruses*, 2019, 11(8): 699.

- [14] SINGH RP, SREENIVASA BP, DHAR P, SHAH LC, BANDYOPADHYAY SK. Development of a monoclonal antibody based competitive-ELISA for detection and titration of antibodies to peste des petits ruminants (PPR) virus[J]. *Veterinary Microbiology*, 2004, 98(1): 3-15.
- [15] MAHAPATRA M, NETOMM, KHUNTI A, NJEUMI F, PARIDA S. Development and evaluation of a nested PCR for improved diagnosis and genetic analysis of peste des petits ruminants virus (PPRV) for future use in nascent PPR eradication programme[J]. *Animals*, 2021, 11(11): 3170.
- [16] 钱榜, 刘振东, 赵印, PRAJAPATI Meera, 李彦敏, 孙跃峰, 窦永喜. 小反刍兽疫病毒 H 蛋白抗体化学发光免疫分析检测方法的建立[J]. *生物技术通报*, 2023, 39(4): 10-18.
- QIAN B, LIU ZD, ZHAO Y, PRAJAPATI Meera, LI YM, SUN YF, DOU YX. Establishment of chemiluminescence immunoassay for detection of peste des petits ruminants virus H protein antibodies[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2023, 39(4): 10-18 (in Chinese).
- [17] CHENG S, SUN J, YANG JX, LV JQ, WU F, LIN YX, LIAO LS, YE YY, CAO CF, FANG LR, HUA QY. A new immunoassay of serum antibodies against peste des petits ruminants virus using quantum dots and a lateral-flow test strip[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2017, 409(1): 133-141.
- [18] DHINAKAR RAJ G, NACHIMUTHU K, MAHALINGA NAINAR A. A simplified objective method for quantification of peste des petits ruminants virus or neutralizing antibody[J]. *Journal of Virological Methods*, 2000, 89(1/2): 89-95.
- [19] 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.
- XING ZZ, ZHANG Y. Comparison and application of competitive, indirect and blocking ELISA for detection of immune antibodies against Pest des petits ruminants[J]. *Pigs and Poultry*, 2020, 40(5): 74-77 (in Chinese).
- [20] SAEED AFUH, LING SM, YUAN J, WANG SH. The preparation and identification of a monoclonal antibody against domoic acid and establishment of detection by indirect competitive ELISA[J]. *Toxins*, 2017, 9(8): 250.
- [21] 唐娜, 刘吉山, 王玉茂, 王金良, 张倩, 谢金文, 曲光刚, 沈志强. 一株羊口疮病毒分离株的生物学特性研究[J]. *动物医学进展*, 2014, 35(6): 49-53.
- TANG N, LIU JS, WANG YM, WANG JL, ZHANG Q, XIE JW, QU GG, SHEN ZQ. Study on biological characteristics of an orf virus isolate[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2014, 35(6): 49-53 (in Chinese).
- [22] 唐娜, 孙翠平, 王文秀, 张倩, 苗立中, 管宇, 沈志强. 山羊痘病毒 AV41 株在 3 种原代细胞上的培养特性比较[J]. *动物医学进展*, 2012, 33(11): 41-44.
- TANG N, SUN CP, WANG WX, ZHANG Q, MIAO LZ, GUAN Y, SHEN ZQ. Comparative analysis of goatpox virus AV41 strain cultured in three different primary cells[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2012, 33(11): 41-44 (in Chinese).
- [23] GENG R, SUN YN, LI R, YANG JF, MA HF, QIAO ZX, LU QX, QIAO SL, ZHANG GP. Development of a p72 trimer-based colloidal gold strip for detection of antibodies against African swine fever virus[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2022, 106(7): 2703-2714.
- [24] BASAGOUDANAVAR SH, HOSAMANI M, MUTHUCHELVAN D, SINGH RP, SANTHAMANI R, SREENIVASA BP, SARAVANAN P, PANDEY AB, SINGH RK, VENKATARAMANAN R. Baculovirus expression and purification of peste-des-petits-ruminants virus nucleocapsid protein and its application in diagnostic assay[J]. *Biologicals*, 2018, 55: 38-42.
- [25] BALAMURUGAN V, VARGHESE B, SOWJANYAKUMARI S, VINOD KUMAR K, MUTHUCHELVAN D, NAGALINGAM M, ROY P. Avidin-biotin recombinant antigen capture ELISA for the detection of peste des petits ruminants virus in the clinical specimens of sheep and goats[J]. *Journal of Virological Methods*, 2021, 291: 114103.
- [26] 袁雪涛, 王芳蕊, 石瑜, 杨爱华. 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.
- YUAN XT, WANG FR, SHI Y, YANG AH. Development of a double antibody blocking ELISA for detecting PPRV antibodies[J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2023, 31(1): 61-65 (in Chinese).
- [27] BALAMURUGAN V, VARGHESE B, SOWJANYAKUMARI S, VINOD KUMAR K, MUTHUCHELVAN D, NAGALINGAM M, HEMADRI D, ROY P, SHOME BR. Avidin-biotin recombinant nucleoprotein competitive ELISA for the detection of peste des petits ruminants virus antibodies in sheep and goats[J]. *Journal of Virological Methods*,

2021, 295: 114213.

- [28] 孙雨, 宋晓晖, 肖颖, 李秀梅, 吕园园, 王睿男, 蒋菲, 孙航, 杨林, 王传彬. 基于不同重组小反刍兽疫病毒 N 蛋白建立的双抗原 S-ELISA 抗体检测方法的比较研究 [J]. 中国兽医科学, 2019, 49(12): 1484-1491.
SUN Y, SONG XH, XIAO Y, LI XM, (LÜ/LV/LU/LYU) YY, WANG RN, JIANG F, SUN H, YANG L, WANG CB. A comparative study on double-antigen S-ELISA for the detections of antibodies based on different recombinant N protein of peste des petits ruminants virus[J]. Chinese Veterinary Science, 2019, 49(12): 1484-1491 (in Chinese).
- [29] 冯向辉, 陈三民, 孔汉金, 杨璐, 申屠芬琴, 田新生, 张丽, 孙明, 陈西钊. 小反刍兽疫病毒重组 N 蛋白抗原制备及间接 ELISA 检测方法的建立[J]. 畜牧与兽医, 2017, 49(12): 75-79.
FENG XH, CHEN SM, KONG HJ, YANG L, SHENTU FQ, TIAN XS, ZHANG L, SUN M, CHEN XZ. Preparation of peste des petits ruminants virus (PPRV) nucleocapsid protein and establishment of an indirect ELISA for detecting the serum antibody against PPRV[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2017, 49(12): 75-79 (in Chinese).
- [30] 董旭旭, 孙威, 曹攀, 刘晓丹. 胶体金免疫层析试纸条技术在病毒检测领域的应用研究现状[J]. 生物工程学报, 2022, 38(9): 3243-3254.
DONG XX, SUN W, CAO P, LIU XD. Colloidal gold immunochromatographic test strip for virus detection: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(9): 3243-3254 (in Chinese).
- [31] HAN WL, CHEN ZC, NIU PF, REN XM, DING C, YU SQ. Development of a colloidal gold immunochromatographic strip for rapid detection of *Riemerella anatipestifer* in ducks[J]. Poultry Science, 2020, 99(10): 4741-4749.
- [32] NA GQ, HU XF, YANG JF, SUN YN, KWEE S, TANG L, XING GX, XING YR, ZHANG GP. A rapid colloidal gold-based immunochromatographic strip assay for monitoring nitroxynil in milk[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020, 100(5): 1860-1866.
- [33] WANG P, XU XX, LIU LQ, SONG SS, KUANG H, XU CL, WU XL. A colloidal gold immunochromatography for the detection of flumioxazin residues in fruits[J]. Journal of Food Science, 2022, 87(10): 4538-4547.

(本文责编 郝丽芳)