

邝燕齐, 莫梅君, 何红玲, 等. 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 Yanqi, MO Meijun, HE Hongling, et al. 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.

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

邝燕齐¹, 莫梅君¹, 何红玲¹, 周金柱², 周如月¹, 郭霄峰¹
(1 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642; 2 江苏省农业科学院 兽医研究所, 江苏 南京 210014)

摘要:【目的】制备猪流行性腹泻病毒 (PEDV) N 蛋白单克隆抗体, 并建立检测 PEDV 的间接免疫荧光试验方法。【方法】以重组表达的 PEDV N 蛋白为免疫原, 免疫 8 周龄雌性 BALB/c 小鼠, 分离高抗体效价小鼠的脾细胞, 与 SP2/0 细胞融合。筛选分泌抗 PEDV N 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株。在已经感染 PEDV 的 Vero 细胞中, 以抗 PEDV N 蛋白的单克隆抗体为一抗, FITC-羊抗鼠 IgG 为二抗, 建立 PEDV 的间接免疫荧光检测方法。【结果】制备的杂交瘤细胞株可以稳定分泌抗 PEDV N 蛋白抗体, 细胞上清液的 ELISA 抗体效价在 1:3 200 以上, 而诱导的小鼠腹水抗体效价在 1:1 000 000 以上。将单克隆抗体应用在间接免疫荧光试验时, 最适条件为-20 ℃ 80%(φ)丙酮溶液中固定 30 min; 一抗用 PBS 缓冲液按体积比 1:1 000 稀释, 4 ℃ 条件下过夜孵育; 二抗用 PBS 缓冲液按体积比 1:100 稀释, 37 ℃ 条件下孵育 1 h。以建立的间接免疫荧光试验方法检测细胞中的猪传染性胃肠炎病毒 (TGEV)、猪瘟病毒 (CSFV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV)、猪伪狂犬病毒 (PPRV)、猪肠道 α 冠状病毒 (PEAV)、猪轮状病毒 (PoRV) 和 PEDV, 只有 PEDV 显示阳性, 其他病毒均为阴性。【结论】制备了抗 PEDV N 蛋白单克隆抗体, 以该抗体为一抗建立检测 PEDV 的间接免疫荧光试验方法具有良好的特异性, 为 PEDV 的实验室检测及 PEDV 在培养细胞中的定位和动态分布提供了有效的手段。

关键词: 猪流行性腹泻病毒; N 蛋白; 单克隆抗体; 间接免疫荧光试验
中图分类号: S852.65 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2020)05-0027-09

Preparation of monoclonal antibody against N protein of porcine epidemic diarrhea virus and establishment of indirect immuno-fluorescence assay

KUANG Yanqi¹, MO Meijun¹, HE Hongling¹, ZHOU Jinzhu², ZHOU Ruyue¹, GUO Xiaofeng¹
(1 College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;
2 Institute of Veterinary Research, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: 【Objective】To prepare monoclonal antibodies against porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) N protein, and develop an indirect immuno-fluorescence assay method used for detecting PEDV. 【Method】The expressed recombinantly PEDV N protein was used as an immunogen and 8-week-old female BALB/c mice were immunized. Then their spleen cells with high antibody titer were isolated and fused with SP2/0 cells. The hybridoma cell lines secreting monoclonal antibodies against PEDV N protein were screened. In Vero cells

收稿日期: 2020-02-26 网络首发时间: 2020-07-14 11:37:23
网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20200714.0927.002.html>
作者简介: 邝燕齐 (1994—), 女, 硕士研究生, E-mail: 1321897547@qq.com; 通信作者: 郭霄峰 (1963—), 男, 教授, 博士, E-mail: xfguo@scau.edu.cn
基金项目: 广东省产学研重点项目 (2014B090901046)

infected with PEDV, monoclonal antibody of anti-PEDV N protein was used as the primary antibody and FITC-goat-anti-mouse IgG was used as the secondary antibody to develop indirect immuno-fluorescence assay method used for detecting PEDV. 【Result】 The prepared hybridoma cell lines could stably secrete anti-PEDV N protein antibodies, ELISA antibody titer in cell supernatant was above 1 : 3 200, and in mouse ascites above 1 : 1 000 000. While monoclonal antibodies were applied in established indirect immuno-fluorescence assay, the optimal conditions were that cells were fixed with 80% (v) acetone at -20 °C for 30 min; The primary antibody was diluted 1 000 times by PBS buffer solution and incubated at 4 °C overnight; The secondary antibody was diluted 100 times by PBS buffer solution and incubated at 37 °C for 1 h. Transmissible gastroenteritis virus (TGEV), classical swine fever virus (CSFV), porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), porcine reproductive virus (PRV), porcine enteric α corone virus (PEAV), porcine rotavirus (PoRV) and PEDV were detected by established indirect immuno-fluorescence assay method, only PEDV showed positive, all the else viruses showed negative. 【Conclusion】 An anti-PEDV N protein monoclonal antibody is prepared, and the indirect immuno-fluorescence assay method used for detecting PEDV is established with high specificity. It provides an effective method for laboratory detection of PEDV and for localization and dynamic distribution of PEDV in infected cells.

Key words: porcine epidmic diarrhea virus; N protein; monoclonal antibody; indirect immunofluorescence assay

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) 引起的一种高度接触性猪肠道传染疾病。PEDV 主要引起 10 日龄以内的仔猪发病, 典型的症状为水样腹泻、脱水、呕吐等。自 1971 年英国首次报道 PED 后, 该病已在世界各地流行^[1-4]。2011 年以来, 我国多个地区暴发了 PEDV 变异毒株引起的 PED^[5-8], 新生仔猪发病率和死亡率高达 90% 以上, 给我国养猪业造成了巨大损失^[9-10]。

PEDV 是有囊膜的单股正链 RNA 病毒, 属于冠状病毒科 α 冠状病毒属的成员, 主要结构蛋白包括纤突 (Spike, S) 蛋白、膜 (Membrane, M) 蛋白、包膜 (Envelope, E) 蛋白和核衣壳 (Nucleocapsid, N) 蛋白^[11]。每种蛋白都在病毒的繁殖中发挥重要作用。N 蛋白高度保守, 在病毒的结构蛋白中所占比例最大^[12-13], 也是病毒复制过程中表达量最大的一种碱性结构蛋白, 对诱导细胞免疫至关重要。与 S 蛋白一样, N 蛋白也是早期准确检测 PEDV 感染的靶蛋白^[14-15]。N 蛋白还是一种重要的抗原, 在病毒感染机体的早期刺激机体产生体液免疫, 诱导机体产生大量抗 N 蛋白抗体, 普遍用于针对 PEDV 的血清学检测。

本研究基于 N 蛋白的特点, 以原核表达的方法制备重组 N 蛋白, 制备抗 N 蛋白单克隆抗体, 并使用该抗体建立 PEDV 间接免疫荧光试验的抗体检测方法, 为 PEDV 的实验室检测及 PEDV 在感染细胞中的定位和动态分布研究提供有效手段。

1 材料与方法

1.1 菌种、毒株、细胞系

原核表达载体 pET-32a(+), PEDV(CH/GDZH02/1401, 简称 ZH02), 猪传染性胃肠炎病毒 (Transmissible gastroenteritis virus, TGEV)、猪伪狂犬病毒 (Porcine pseudorabies virus, PPRV)、猪瘟病毒 (Classical swine fever virus, CSFV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒 (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)、Vero 细胞、PEDV 抗体均由华南农业大学兽医学院微生物学与免疫学教研室保存。SP2/0 骨髓瘤细胞、猪肠道 α 冠状病毒 (Porcine enteric α corone virus, PEAV)、猪轮状病毒 (Porcine rotavirus, PoRV) 分别由华南农业大学琚春梅博士、马静云教授和江苏农业科学院兽医研究所何孔旺研究员惠赠。

1.2 主要试剂

50 $\times$ HAT(次黄嘌呤-氨甲喋呤-胸腺嘧啶核苷)、HT(次黄嘌呤-胸腺嘧啶核苷)、弗氏佐剂和弗氏不完全佐剂均为 Sigma 公司产品。HRP-羊抗鼠 IgG 为碧云天公司产品。FITC-羊抗鼠 IgG 为博奥森公司产品。

1.3 试验动物

SPF BALB/c 6~8 周龄雌性小鼠购自南方医科大学实验动物中心。

1.4 PEDV N 蛋白重组质粒的构建、表达与鉴定

根据 ZH02 毒株 (GenBank 注册号为 KR

153326) 基因组序列, 设计 1 对引物: PEDV-N-F: 5'-CGGCATATGATGGCTTCTGTCAAGTTTCA-3', PEDV-N-R: 5'-CCGCTCGAGATTTCCTGTGTCGAAGATCTC-3'。提取病毒 RNA, 以 PEDV-N-F 和 PEDV-N-R 为引物通过 RT-PCR 扩增 N 基因, 与 pET-32(a) 连接, 构建 PEDV N 基因重组表达质粒, 命名为 pET-N。将构建的重组表达载体转化大肠埃希菌 Transetta(DE3) 进行 N 蛋白的表达和纯化, 随后将纯化好的蛋白进行 Western blot 鉴定。

1.5 动物免疫

6 只 8 周龄雌性 BALB/c 小鼠饲养于华南农业大学动物实验中心。300 μg 的 PEDV N 蛋白与等体积 (500 μL) 弗氏完全佐剂一起乳化制备免疫原, 皮下注射小鼠。一次免疫后第 15 天和第 29 天, 用等体积 (500 μL) 弗氏不完全佐剂乳化 300 μg 抗原分别进行二次免疫和三次免疫。三次免疫后第 10 天检测小鼠抗 N 蛋白抗体效价, 当抗体效价达到 1:100 000 后, 于融合前 3 d 腹腔注射非乳化抗原 150 μg 加强免疫一次。

1.6 抗体滴度的测定

在 96 孔酶标反应板中, 每孔加入 100 μL 纯化后的 N 蛋白 (ρ 为 8 μg/mL), 37 °C 条件下温育 1 h, 然后 4 °C 条件下过夜。弃去包被液, 用 PBST 缓冲液洗涤 3 次。每孔加入 100 μL 封闭液, 37 °C 恒温箱中封闭 2 h。弃去封闭液, 用 PBST 缓冲液洗涤 3 次, 加入用 PBS 缓冲液倍比稀释的血清或细胞上清液, 置于 37 °C 条件下温育 70 min。弃去孵育液, 用 PBST 缓冲液洗涤 3 次, 加入 100 μL HRP-羊抗鼠 IgG (用 PBS 缓冲液按体积比 1:10 000 稀释) 的二抗, 置于 37 °C 条件下温育 40 min。弃去孵育液, 用 PBST 缓冲液洗涤 3 次, 加入 100 μL TMB 底物, 37 °C 恒温箱避光显色 5~10 min, 加入 50 μL 终止液终止反应, 用酶标仪测定 $D_{450\text{ nm}}$, 计算抗体滴度。

1.7 杂交瘤细胞的筛选

以聚乙二醇 (PEG)1450 为融合剂将获得的阳性小鼠脾细胞和 SP2/0 骨髓瘤细胞融合, 融合后第 10 天按照 “1.6” 的方法检测细胞上清液, 筛选抗体呈阳性细胞孔。之后对阳性孔中的杂交瘤细胞进行亚克隆, 每亚克隆 1 次需要对细胞上清液进行 ELISA 检测, 直到获得单个杂交瘤细胞株。亚克隆成功后, 将杂交瘤细胞株置于液氮中保存。

1.8 单克隆抗体的制备、检测和鉴定

1.8.1 制备 取生长状态良好、抗体分泌能力强的杂交瘤细胞株通过体内诱生法制备腹水。将弗氏不完全佐剂按每只 500 μL 的剂量腹腔注射雌性

BALB/c 小鼠, 致敏 7 d 备用。从细胞培养瓶中吹下杂交瘤细胞, 调整细胞数至 $1\times10^6/\text{mL}$, 用 1640 培养液洗涤 2~3 次后腹腔注射经弗氏不完全佐剂致敏的小鼠。10~15 d 后, 小鼠腹部明显膨大时抽取腹水, 经 4 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液, ELISA 测定抗体效价后分装冻存于 -80 °C。

1.8.2 单克隆抗体的特异性检测 为验证获得的单克隆抗体的特异性, 以 TGEV、PPRV、CSFV、PRRSV 为抗原包被酶标板, 进行间接 ELISA 检测。

1.8.3 单克隆抗体的 Western blot 鉴定 将表达的 N 蛋白经 SDS-PAGE 电泳后转移到 PVDF 膜上, 再将膜放入 50 g/L 脱脂牛乳溶液中封闭, 置于 37 °C 条件下孵育 2 h; 使用 PBST 缓冲液洗涤 4 次, 将制备的腹水用 PBS 缓冲液按体积比 1:5 000 稀释作为一抗, 置于 4 °C 条件下过夜孵育; 使用 PBST 缓冲液洗涤 4 次, HRP-羊抗鼠 IgG 用 PBS 缓冲液按体积比 1:5 000 稀释后作为二抗, 置于 37 °C 条件下中孵育 1 h; 使用 PBST 缓冲液洗涤 4 次, 加入 DAB 显色。

1.9 间接免疫荧光试验

1.9.1 试验方法的建立 待 96 孔板的 Vero 细胞长成单层后, 接种 PEDV。20 h 后, 弃培养液, 每孔加入 150 μL 预冷的 80%(ρ) 丙酮溶液, -20 °C 条件下固定 30 min。随后每孔用灭菌的 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 再于每孔加入 50 μL 用 PBS 缓冲液稀释的一抗 N 蛋白单克隆抗体 (N 蛋白单克隆抗体与 PBS 缓冲液的体积比为 1:200), 37 °C 条件下孵育 2 h。用灭菌的 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 每孔加入 50 μL 用 PBS 缓冲液稀释的二抗 FITC-羊抗鼠 IgG (FITC-羊抗鼠 IgG 与 PBS 缓冲液的体积比为 1:100), 在 37 °C 条件下孵育 1 h。用灭菌的 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 最后每孔加入 100 μL 灭菌的 PBS 缓冲液, 置于荧光倒置显微镜下观察。

1.9.2 试验方法的优化 本试验主要对一抗工作浓度、二抗工作浓度和孵育时间进行了优化。一抗工作浓度: 分别按体积比 1:100、1:200、1:500、1:1 000、1:2 000 稀释; 二抗工作浓度: 分别按体积比 1:100、1:200、1:500、1:800 稀释; 一抗孵育时间: 4 °C 条件下过夜孵育、37 °C 条件下孵育 2 h。镜检观察结果。

1.9.3 特异性试验 在长成单层的 Vero 细胞中分别接种 CSFV、PRRSV、TGEV、PPRV、PEAV、PoRV 和 PEDV, 同时设立不接病毒的正常细胞为对照。接种 24 h 后, 用 “1.12” 建立的间接免疫荧

光方法进行检测。

1.9.4 无一抗对照试验 用 PBS 缓冲液替代一抗进行间接免疫荧光试验, 观察二抗是否有特异性反应, 同时设立阳性对照。

1.9.5 重复性试验 取同批次和不同批次的 Vero 细胞接种病毒, 按“1.9.2”建立的间接免疫荧光方法进行试验, 检测本方法是否具有重复性。

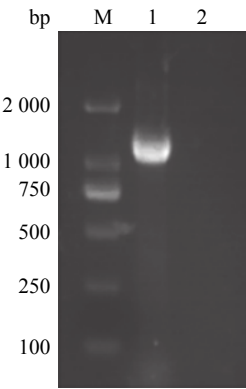
1.9.6 样品自发光对照试验 将未接种病毒的细胞板和接种病毒的细胞板弃去培养基后, 每孔加入 100 μ L 灭菌的 PBS 缓冲液, 然后置于荧光显微镜下观察是否存在自发荧光现象, 同时设阳性对照。

1.9.7 敏感性试验 将 PEDV 病毒液用不完全培养基 DMEM 按照 10 倍倍比梯度 (1:10、1:100、1:1 000、1:10 000、1:100 000、1:1 000 000) 进行稀释, 按照“1.9.2”建立的间接免疫荧光试验方法进行试验, 以出现明显荧光的最大稀释倍数的病毒稀释度作为检测的最高灵敏度。

2 结果与分析

2.1 PEDV N 蛋白重组质粒的构建

以提取的 PEDV 核酸为模板, 通过 RT-PCR 扩增 N 基因, 再插入 pET 质粒的多克隆位点, 构建表达重组质粒 pET-N。再以该重组子菌液为模板, 用 PEDV-N-F、PEDV-N-R 为引物进行 RT-PCR 扩增。结果显示, 扩增片段为 1 400 bp 左右, 与预期结果一致 (图 1)。



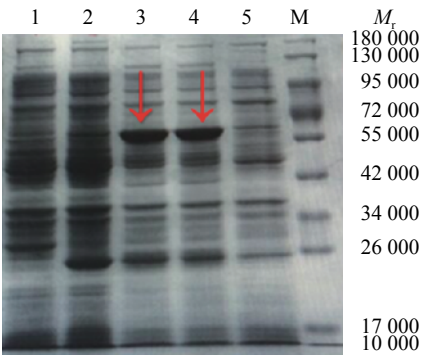
M: DL 2000 DNA marker; 1: N 基因的 PCR 产物; 2: 阴性对照
M: DNA marker; 1: PCR products of N gene; 2: Negative control

图 1 N 基因的 PCR 扩增
Fig. 1 PCR amplification of N gene

2.2 PEDV N 蛋白的表达、纯化与鉴定

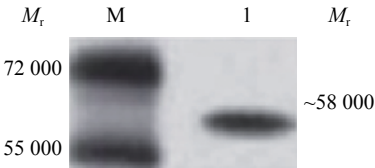
重组质粒 pET-N 转化进表达宿主菌 Transetta (DE3), 经 IPTG 诱导后进行 SDS-PAGE 分析, 重组子 pET-N 表达产物中出现相对分子质量为 58 000 的特异目的蛋白条带, 与预期大小相符。空载体宿

主菌表达产物无特异性条带出现, 未经诱导的重组子表达产物中出现微弱的特异性条带 (图 2)。纯化的 N 蛋白转膜后, 以抗 PEDV 的抗体染色, 发现相对分子质量为 58 000 的特异性条带 (图 3)。



Mr: 相对分子质量; M: 蛋白 marker; 1: 空载体宿主菌诱导产物; 2、5: 未诱导的含 PET-N 宿主菌株; 3、4: pET-N 诱导产物
Mr: Relative molecular mass; M: Protein marker; 1: Induction products of empty vector host bacteria; 2, 5: Uninduced host bacteria strain with PET-N; 3, 4: pET-N induced products

图 2 PET-N 表达产物的 SDS-PAGE
Fig. 2 SDS-PAGE of expressed product PET-N



Mr: 相对分子质量; M: 蛋白预染 marker; 1: 纯化 N 蛋白
Mr: Relative molecular mass; M: Protein pre-staining marker; 1: Purified N protein

图 3 纯化 N 蛋白的 Western blot 检测

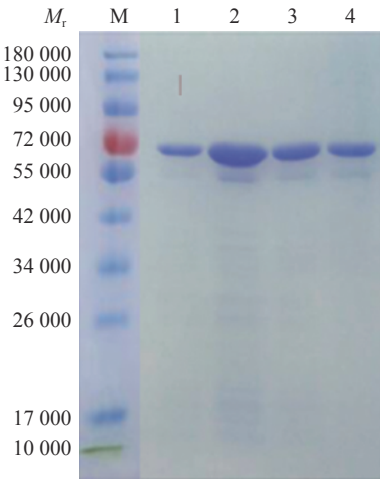
Fig. 3 Western blot detection of purified N protein

pET-N 重组子在优化条件下诱导表达后, 目的蛋白经重力流 Ni 柱层析纯化, 收集不同浓度咪唑洗脱的蛋白液, 用透析膜脱盐处理后进行 SDS-PAGE, 用考马斯亮蓝染色, 脱色液脱色。结果 (图 4) 显示, 纯化的蛋白相对分子质量约 58 000, 且目的蛋白纯度较高, 根据结果选用 300 mmol/L 咪唑洗脱的蛋白, 用 BCA 试剂盒测定蛋白质量浓度为 450 μ g/mL。

2.3 抗体效价

小鼠经 3 次免疫后, 用间接 ELISA 测定各组小鼠的抗体效价, 其中 2~5 号小鼠的抗体水平较低, 1 号、6 号小鼠的抗体水平较高, 且 6 号小鼠的 ELISA 结果较为稳定, 结果见图 5。后续试验选用 6 号小鼠进行。

经过 2 次亚克隆, 获得 1 株分泌特异性单抗的杂交瘤细胞, 命名为 13。收集杂交瘤细胞上清液, 用 PBS 缓冲液倍比稀释, 用间接 ELISA 检测杂交瘤细胞上清液效价。将杂交瘤细胞上清液稀释 3 200 倍后仍为阳性, 结果见图 6。

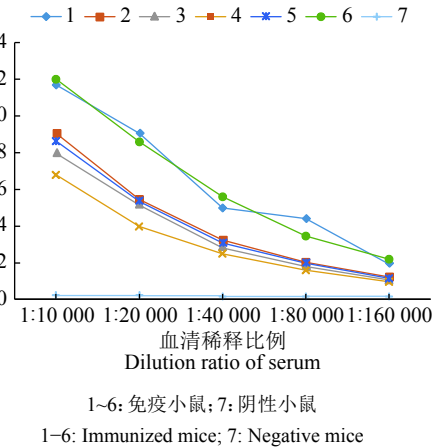


M_r : 相对分子质量; M: 蛋白 marker; 1: 300 mmol·L⁻¹ 咪唑洗脱的蛋白液; 2: 500 mmol·L⁻¹ 咪唑洗脱的蛋白液; 3、4: 400 mmol·L⁻¹ 咪唑洗脱的蛋白液

M_r : Relative molecular mass; M: Protein marker; 1: 300 mmol·L⁻¹ imidazole eluted protein solution; 2: 500 mmol·L⁻¹ imidazole eluted protein solution; 3, 4: 400 mmol·L⁻¹ imidazole eluted protein solution

图4 经不同浓度咪唑洗脱的纯化产物的 SDS-PAGE

Fig. 4 SDS-PAGE of purified product eluted by different concentrations of imidazole



1~6: 免疫小鼠; 7: 阴性小鼠

1~6: Immunized mice; 7: Negative mice

图5 重组 PEDV N 蛋白免疫小鼠血清中的抗体效价

Fig. 5 Antibody titer in serum of mice immunized with recombinant PEDV N protein

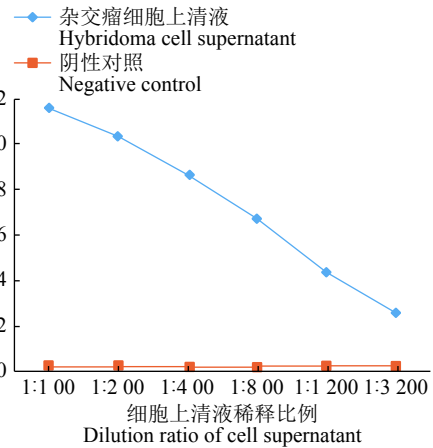


图6 杂交瘤细胞上清液的抗体效价

Fig. 6 Antibody titer of hybridoma cell supernatant

将杂交瘤细胞 13 接种小鼠腹腔制备单克隆抗体。抽取腹水并测定其抗体效价, 制备的 PEDV N 蛋白单克隆抗体用 PBS 缓冲液经过 1 024 000 倍稀释后仍为阳性, 证明该单抗抗体水平较高, 结果见图 7。

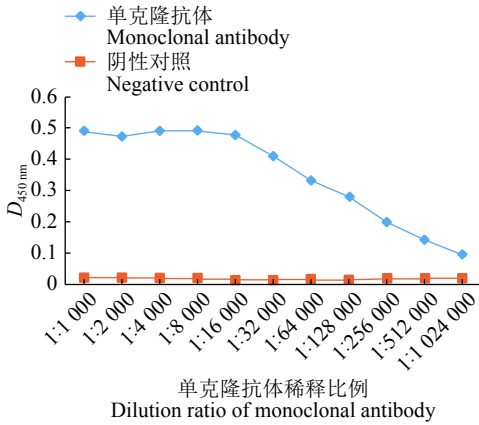


图7 小鼠腹水中单克隆抗体效价

Fig. 7 Monoclonal antibody titer in mouse ascites

2.4 特异性检测和 Western blot 鉴定结果

单克隆抗体的特异性检测结果见表 1。以 TGEV、PPRV、CSFV、PRRSV 和 PEDV 为抗原包被 8 μg/mL 的纯化 N 蛋白, 将腹水用 PBS 缓冲液按体积比 1:10 000 稀释作为一抗, 采用间接 ELISA 法进行检测, 结果显示, 包被不同稀释比例的 TGEV、PPRV、CSFV、PRRSV 均呈阴性反应, 只有 PEDV 呈阳性, 各稀释比例下的 $D_{450\text{ nm}}$ 稳定。

将纯化的 N 蛋白转到 PVDF 膜后, 用脱脂牛乳溶液在 37 °C 条件下封闭 3 h, 将收集并处理好的小鼠腹水用 PBS 缓冲液按照体积比 1:5 000 稀释作为一抗, 4 °C 条件下过夜孵育, HRP-羊抗鼠 IgG 用 PBS 缓冲液按体积比 1:5 000 稀释作为二抗, 37 °C 孵育 1 h。进行 Western blot 分析, 在相对分子质量为 58 000 处有明显的特异性条带, 结果见图 8。

2.5 最适工价浓度

N 蛋白单克隆抗体最适工作浓度结果见图 9。在已接种 PEDV 的细胞培养板中, 加入用 PBS 缓冲液倍比稀释的 N 蛋白单克隆抗体、用 PBS 缓冲液按体积比 1:100 稀释的 FITC-羊抗鼠 IgG, 同时设阴性及空白对照, 然后在荧光显微镜下观察。结果显示, 阴性血清及空白对照均无肉眼可见的特异性荧光, N 蛋白单克隆抗体在稀释比例为 1:1 000 时荧光斑点最清晰。

在已接种 PEDV 的细胞培养板中加入用 PBS 缓冲液倍比稀释的 FITC-羊抗鼠 IgG 和用

表 1 间接 ELISA 法检测不同稀释比例病毒的抗体特异性

Table 1 Detection of antibody specificity of viruses with different dilution ratios by indirect ELISA

病毒名称 ¹⁾ Virus name	<i>D</i> _{450 nm}							
	1 : 1	1 : 100	1 : 1 000	1 : 3 000	1 : 5 000	1 : 10 000	1 : 50 000	1 : 100 000
TGEV	0.022	0.019	0.026	0.021	0.022	0.018	0.024	0.026
PRV	0.020	0.020	0.023	0.023	0.026	0.022	0.023	0.021
CSFV	0.018	0.017	0.019	0.020	0.017	0.021	0.020	0.016
PRRSV	0.018	0.020	0.023	0.021	0.017	0.020	0.022	0.018
PEDV	0.489	0.474	0.492	0.491	0.479	0.472	0.468	0.492

1)TGEV、PPRV、CSFV、PRRSV、PEDV 分别代表猪传染性胃肠炎病毒、猪伪狂犬病毒、猪瘟病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪流行性腹泻病毒

1) TGEV, PPRV, CSFV, PRRSV and PEDV N indicate transmissible gastroenteritis virus, classical swine fever virus, porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine epidemic diarrhea virus

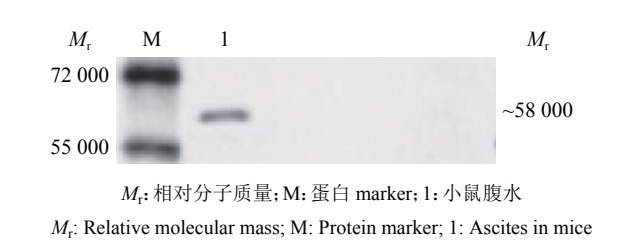


图 8 单克隆抗体与 PEDV N 蛋白反应的 Western blot 鉴定

Fig. 8 Western blot identification of monoclonal antibodies reacting with PEDV N protein

PBS 缓冲液按体积比 1:1 000 稀释的 N 蛋白单抗, 同时设样本自发荧光对照及阴性对照, 在荧光显微镜下观察。结果显示, 样品自发荧光对照及阴性对照均无肉眼可见的特异性荧光, 而 FITC-羊抗鼠 IgG 的稀释度在 1:100 时荧光斑点最清晰 (图 10)。

2.6 N 蛋白单克隆抗体孵育时间

N 蛋白单克隆抗体 4 ℃ 条件下过夜孵育和 37 ℃ 条件下孵育 2 h, 均能观察到亮度无明显差别的绿色荧光 (图 11)。

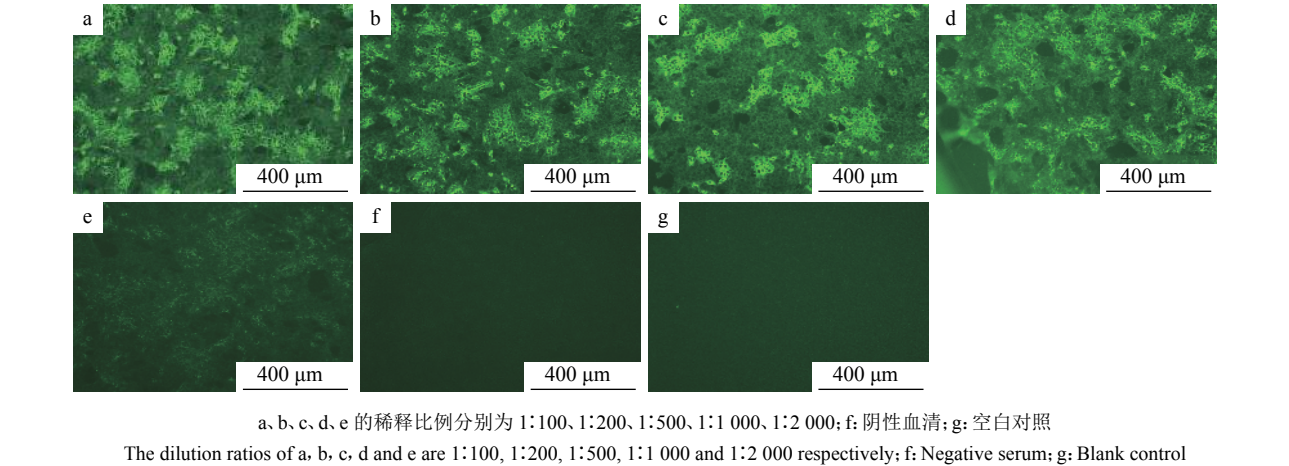


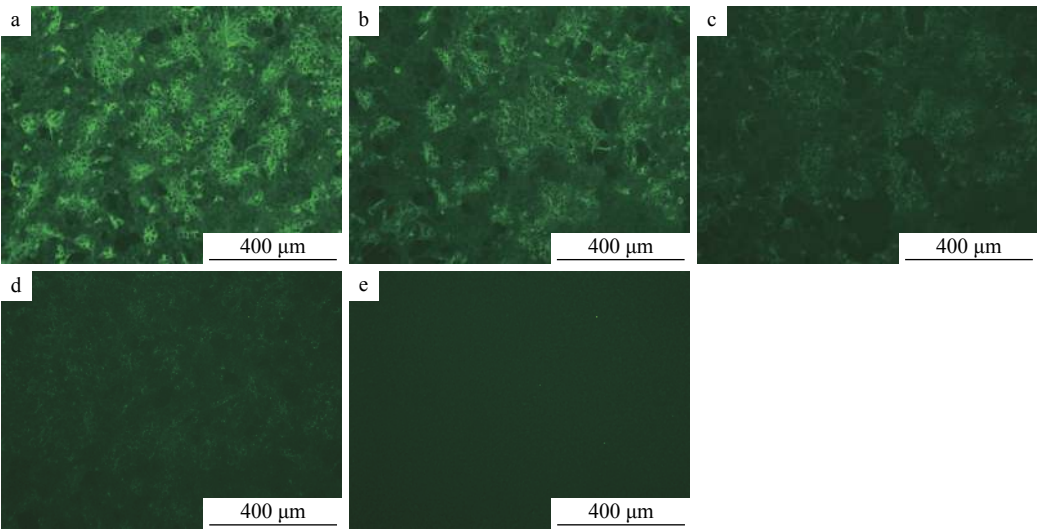
图 9 不同稀释度 N 蛋白单克隆抗体的间接免疫荧光试验结果

Fig. 9 Indirect immuno-fluorescence assay results of N protein monoclonal antibodies at different dilution ratios

2.7 间接免疫荧光试验结果

2.7.1 特异性试验 在已接种 TGEV、CSFV、PRRSV、PRV、PEAV、PoRV、PEDV 的细胞培养板中, 加入 1:1 000 稀释的 PEDV N 蛋白单抗、1:100 稀释的 FITC-羊抗鼠-IgG, 同时设立

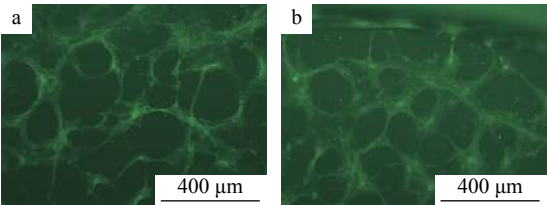
PEDV 阳性对照和正常细胞的阴性对照, 然后置于荧光显微镜和激光共聚焦显微镜下观察。结果表明, 除接种 PEDV 的细胞有明显的特异性荧光显色外, 接种 TGEV、CSFV、PRRSV、PRV、PEAV、PoRV 的细胞均无特异性荧光, 说明建立的



a、b、c、d 的稀释比例分别为 1:100、1:200、1:500、1:800; e: 自发光样品
The dilution ratios of a, b, c and d are 1:100, 1:200, 1:500 and 1:800; e: Self-illuminated sample

图 10 不同稀释度 FITC-羊抗鼠 IgG 的间接免疫荧光试验结果

Fig. 10 Indirect immuno-fluorescence assay results of FITC-goat anti-mouse IgG at different dilution ratios



a: 4 ℃ 条件下过夜孵育; b: 37 ℃ 条件下孵育 2 h
a: Incubation at 4 ℃ overnight; b: Incubation at 37 ℃ for 2 h

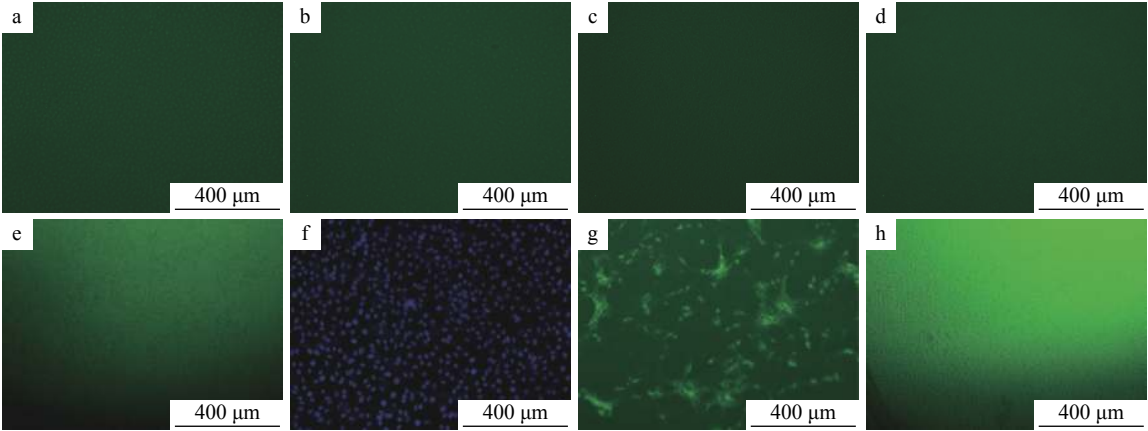
图 11 N 蛋白单克隆抗体孵育时间的确定

Fig. 11 Determination of incubation time of N protein monoclonal antibody

PEDV 间接免疫荧光检测方法具有较强的特异性 (图 12)。

2.7.2 重复性试验 取同批次(图 13a、13b)和不同批次(图 13c)的 Vero 细胞接种病毒, 采用间接免疫荧光法进行试验, 结果显示荧光强度一致, 说明重复性好。

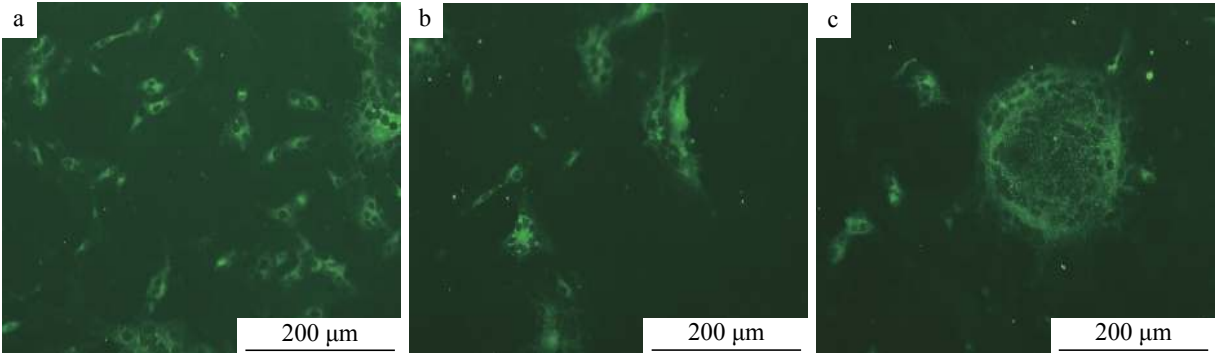
2.7.3 敏感性试验 在已接种不同稀释度 PEDV 病毒液的细胞培养板中, 加入用 PBS 缓冲液按体积比 1:1 000 稀释的 PEDV N 蛋白单克隆抗体、用 PBS 缓冲液按体积比 1:100 稀释的 FITC-羊抗鼠 IgG, 同时设正常细胞为空白对照, 然后置荧光显微镜下观察, 结果表明, 将 PEDV 病毒液稀释到 100 000, 在荧光显微镜下仍可观察到典型的特异性绿色荧光 (图 14)。



a: 猪瘟病毒; b: 猪繁殖与呼吸综合征病毒; c: 猪伪狂犬病毒; d: 猪传染性胃肠炎病毒; e: 猪肠道 α 冠状病毒; f: 猪轮状病毒; g: 阳性对照; h: 阴性对照
a: Classical swine fever virus; b: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus; c: Porcine pseudorabies virus; d: Transmissible gastroenteritis virus; e: Porcine enteric α corone virus; f: Porcine rotavirus; g: Positive control; h: Negative control

图 12 间接免疫荧光特异性试验结果

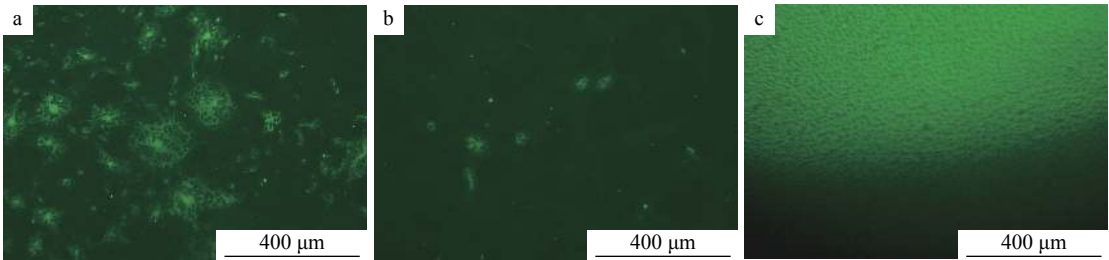
Fig. 12 Specific test results of indirect immuno-fluorescence assay



a, b: 同批次 Vero 细胞; c: 与 a、b 不同批次 Vero 细胞
a, b: The same batch Vero cells; c: Different batch Vero cells with a and b

图 13 间接免疫荧光试验重复性试验结果

Fig. 13 Repeatability test results of indirect immuno-fluorescence assay



a: PEDV 病毒液用不完全培养基 DMEM 按 1:10 稀释; b: PEDV 病毒液用不完全培养基 DMEM 按 1:100 000 稀释; c: 空白对照

a: PEDV virus solution is diluted by incomplete medium DMEM at 1:10; b: PEDV virus solution is diluted by incomplete medium DMEM at 1:100 000; c: Blank control

图 14 间接免疫荧光试验敏感性试验结果

Fig. 14 Sensitivity test results of indirect immuno-fluorescence assay

3 讨论与结论

我国养殖业中 PEDV 感染十分普遍^[16], 3~10 日龄的仔猪最为易感, 病死率为 80%~100%^[17], 给我国养猪业造成严重损失^[9-10]。在临床症状和病理变化上, 除与猪传染性胃肠炎十分相似外, PED 还与 PEAV、PoRV、致病性大肠埃希菌引起的病征相似。因此, 建立一种 PED 的实验室诊断方法具有重要实践意义。

本研究利用原核表达系统表达 PEDV N 蛋白。相比其他表达系统, 原核表达系统具有操作简单、价格便宜、表达量大等优点。在单克隆抗体的制备过程中, 蛋白的纯度要求高, 本研究利用 PET-32a(+) 载体上自带的 HIS 标签与 Ni 柱反应, 经考马斯亮蓝染色证明获得了高纯度的目的蛋白, 用此蛋白作为免疫原免疫小鼠, 小鼠的效价达到 1:80 000 以上, 证明该目的蛋白具有很好的免疫原性。

PEAV、PoRV、TGEV 感染猪只后, 临床症状与 PEDV 相似, 并且 TGEV、PoRV 接种 Vero 细胞后产生的细胞病变和 PEDV 也相似; 因此, 仅仅依靠临床症状和细胞病变难以鉴别诊断。本研究建立的

免疫荧光试验检测方法经过特异性试验的验证, 除了与 PEDV 有特异性反应可以观察到明显的绿色荧光外, 与其他的病原没有交叉反应。

综上所述, 本研究利用大肠埃希菌原核表达系统成功构建 PET-N 重组质粒, 表达了 PEDV N 蛋白, 制备了 PEDV N 单克隆抗体, 并利用此抗体建立了检测 PEDV 的间接免疫荧光试验方法, 为 PEDV 的流行病学调查、临床诊断和疫情控制提供了技术支撑。

参考文献:

[1] MESQUITA J R, HAKZE-VAN D H R, ALMEIDA A, et al. Outbreak of porcine epidemic diarrhea virus in Portugal, 2015[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2015, 62(6): 586-588.

[2] CHEN Q, LI G, STASKO J, et al. Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea viruses associated with the 2013 disease outbreak among swine in the United States[J]. *J Clin Microbiol*, 2014, 52(1): 234-243.

[3] SUN J, LI Q, SHAO C, et al. Isolation and characterization of Chinese porcine epidemic diarrhea virus with novel mutations and deletions in the S gene[J]. *Vet Microbiol*, 2018, 221: 81-89.

[4] LARA-ROMERO R, GOMEZ-NUNEZ L, CERRITENO-SANCHEZ J L, et al. Molecular characterization of the spike gene of the porcine epidemic diarrhea virus in Mexico, 2013-2016[J]. *Virus Genes*, 2018, 54(2): 215-224.

[5] ZHAO X, LI Z, ZENG X, et al. Sequence analysis of the spike gene of porcine epidemic diarrhea virus isolated from South China during 2011-2015[J]. *J Vet Sci*, 2017, 18(2): 237-243.

[6] LI W, LI H, LIU Y, et al. New variants of porcine epidemic diarrhea virus, China, 2011[J]. *Emerg Infect Dis*, 2012, 18(8): 1350-1353.

[7] VAN DIEP N, SUEYOSHI M, NORIMINE J, et al. Molecular characterization of US-like and Asian non-S INDEL strains of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) that circulated in Japan during 2013-2016 and PEDVs collected from recurrent outbreaks[J]. *BMC Vet Res*, 2018, 14: 96. doi: 10.1186/s12917-018-1409-0.

[8] 莫炜钰, 罗均, 莫梅君, 等. 两株猪流行性腹泻野毒的确诊及N基因的分析[J]. *中国兽医杂志*, 2016, 52(9): 10-12.

[9] JUNG K, ANNAMALAI T, LU Z, et al. Comparative pathogenesis of US porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) strain PC21A in conventional 9-day-old nursing piglets vs 26-day-old weaned pigs[J]. *Vet Microbiol*, 2015, 178(1/2): 31-40.

[10] LI Z L, ZHU L, MA J Y, et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) field strains in south China[J]. *Virus Genes*, 2012, 45(1): 181-185.

[11] 孙东波, 冯力, 时洪艳, 等. 猪流行性腹泻病毒分子生物学研究进展[J]. *动物医学进展*, 2006, 27(10): 11-14.

[12] KOCHERHANS R, BRIDGEN A, ACKERMANN M, et al. Completion of the porcine epidemic diarrhoea coronavirus (PEDV) genome sequence[J]. *Virus Genes*, 2001, 23(2): 137-144.

[13] DANIELY Y, BOROWIEC J A. Formation of a complex between nucleolin and replication protein A after cell stress prevents initiation of DNA replication[J]. *J Cell Biol*, 2000, 149(4): 799-810.

[14] 石达, 吕茂杰, 陈建飞, 等. 猪流行性腹泻病毒蛋白对Vero E6核蛋白B23.1的影响[J]. *中国兽医杂志*, 2012, 48(4): 21-23.

[15] 石达. 猪流行性腹泻病毒核衣壳蛋白亚细胞定位信号的鉴定[D]. 哈尔滨: 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 2012.

[16] CHEN X, ZHANG X X, LI C, et al. Epidemiology of porcine epidemic diarrhea virus among Chinese pig populations: A meta-analysis[J]. *Microb Pathog*, 2019, 129: 43-49.

[17] SUN R Q, CAI R J, CHEN Y Q, et al. Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China[J]. *Emerg Infect Dis*, 2012, 18(1): 161-163.

【责任编辑 李庆玲】

欢迎订阅 2021 年《华南农业大学学报》

《华南农业大学学报》是华南农业大学主办的综合性农业科学学术刊物。本刊主要报道农业各学科的科研学术论文、综述等，涵盖动物科学、兽医学、农学、园艺学、土壤肥料、植物保护、生物学、林业科学、农业工程和食品科学等学科。本刊附英文目次和英文摘要。读者对象主要是农业院校师生、农业科研人员和有关部门的专业技术人员。

本刊为《中文核心期刊要目总览》综合性农业科学核心期刊，《中国科学引文数据库 (CSCD)》、《中国科技论文统计源（中国科技核心期刊）》及《中国学术期刊综合评价数据库》等来源期刊，并排列在中国科学引文数据库被引频次最高的中国科技期刊 500 名以内；为《CNKI》《万方数据库》《中国生物学文摘》《化学文摘》《EBSCO》《Scopus》《CABI》《剑桥科学文摘》《动物学记录》《食品科技文摘》《文摘杂志》《日本科学技术振兴机构数据库》等国内外 40 多家数据库（文摘）收录。

双月刊，逢单月上旬出版，A4 幅面。定价 15.00 元/册，全年 90.00 元。自办发行，参加全国非邮发报刊联合征订发行，非邮发代号：6573。国内外公开发行，欢迎订阅！

订阅款邮汇至：300381 天津市卫津南路李七庄邮局 9801 信箱，全国非邮发报刊联合征订服务部。

《华南农业大学学报》编辑部