

# 一种检测乙型脑炎病毒抗体阻断 ELISA 的建立及其初步应用

江 雅, 牛季琛, 倪 慧, 韦冬妹, 周国栋, 曹瑞兵\*

(南京农业大学动物医学院, 南京 210095)

**摘 要:** 流行性乙型脑炎是由日本脑炎病毒(JEV)引起的蚊媒传播人畜共患传染病, 严重危害人类和猪、马等动物的健康。为建立检测多种动物血清中 JEV 抗体的 ELISA, 应用重组囊膜蛋白和辣根过氧化物酶标记的 JEV 单克隆抗体建立了检测 JEV 抗体的阻断 ELISA。结果显示: 通过对 100 份 JEV 抗体阴性猪血清的检测结果进行统计学分析, 确定阻断 ELISA 的判定标准: 阻断率( $PI$ ) $\geq 34\%$ 时判定为阳性,  $PI \leq 25\%$ 时判定为阴性,  $25\% < PI < 34\%$ 时判定为可疑。该阻断 ELISA 与其他常见猪病毒病抗体阳性血清无交叉反应; 批内和批间重复试验的变异系数均小于 5%; 与商品化 ELISA 试剂盒的对比检测表明, 敏感性为 98.5%、特异性为 94.3%, 两者的符合率为 97.2%。应用该阻断 ELISA 对临床收集的猪、牛和羊共 515 份血清样品进行检测, JEV 抗体阳性检出率分别为 74.5%、13.3%和 9.2%, 抽样的血清中和试验结果与阻断 ELISA 检测结果的符合率为 100%(9/9)。本研究成功建立了可适用于猪、牛和羊临床血清 JEV 抗体检测的阻断 ELISA 方法。

**关键词:** 日本脑炎病毒; 囊膜蛋白; 酶标单抗; 阻断 ELISA

中图分类号: S852.659.6

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2018)09-1961-08

## Development and Preliminary Application of a Blocking ELISA for Detection of Japanese Encephalitis Virus Antibody

JIANG Ya, NIU Ji-chen, NI Hui, WEI Dong-mei, ZHOU Guo-dong, CAO Rui-bing\*

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** Japanese encephalitis is a mosquito transmitted zoonosis caused by Japanese encephalitis virus (JEV) that seriously harms the health of human and animals, such as pigs and horses. In order to establish a specific method for detection the JEV antibody in various animal serum, a blocking ELISA method was established using recombinant ED $\text{III}$  protein and horseradish peroxidase (HRP) conjugated JEV specific Monoclonal antibody 1B10. Results were as follows: The percentage of interruption rate ( $PI$ ) of 100 JEV antibody negative serum samples were statistically analyzed, the cut-off of blocking ELISA was determined as the sample presenting a calculated  $PI \geq 34\%$  were considered positive; while samples with a calculated  $PI \leq 25\%$  were rated negative; and those presenting  $PI$  between 25% and 34% were considered inconclusive. No cross-reaction with antibody positive serum against PCV2, PRV, CSFV, FMDV and PRRSV was observed in the test. And the intra- and inter-assay variation were less than 5%. Compared with the commercialization JEV antibody detection ELISA kit, the agreement rates of the new established blocking ELISA was 97.2%. The specificity and sensitivity of the blocking ELISA were 98.5% and 94.3%, respectively. The blocking ELISA was used to test against 515 serum samples col-

收稿日期: 2018-04-08

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(201203082); 国家自然科学基金面上项目(31772756)

作者简介: 江 雅(1993-), 女, 安徽滁州人, 硕士生, 主要从事动物传染病预防与诊断研究, E-mail: 2015107042@njau.edu.cn

\* 通信作者: 曹瑞兵, 教授, 主要从事动物疫病诊断与免疫研究, E-mail: crb@njau.edu.cn

lected from swine, cattle and sheep, among which 74.5%, 13.3% and 9.2% of samples were JEV specific antibody-positive. The detection results of randomly selected swine, cattle and sheep by the serum neutralization test were agree with blocking ELISA. As a result, a blocking ELISA was successfully established for detecting JEV antibody of swine, cattle and sheep in the present study.

**Key words:** Japanese encephalitis virus; envelope protein; HRP-labeled MAb; blocking ELISA

流行性乙型脑炎(epidemic encephalitis B),又称日本乙型脑炎,简称乙脑,是由日本脑炎病毒(Japanese encephalitis virus, JEV)引起的一种自然疫源性人畜共患传染病<sup>[1]</sup>。该病是一种蚊媒传播的中枢神经系统性传染病,主要分布于亚洲地区和西太平洋沿岸<sup>[2-3]</sup>。

JEV 是黄病毒科黄病毒属成员,基因组长约 10 970 nt,编码一个多聚蛋白的开放阅读框(ORF),多聚蛋白裂解后形成 3 种结构蛋白(C、prM 和 E)和 7 种非结构蛋白(NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B 和 NS5)<sup>[4]</sup>。囊膜蛋白(envelope protein, E 蛋白)是 JEV 最主要的结构蛋白和免疫原性蛋白,在介导病毒的吸附、融合,决定病毒的血凝活性、细胞嗜性、病毒毒力及诱导宿主保护性免疫反应方面起重要作用<sup>[5]</sup>。E 蛋白膜外区含 3 个结构域,其中结构域 III(ED III)呈免疫球蛋白样结构,是 JEV 结合受体的主要部位,具有良好的免疫原性<sup>[6]</sup>。

自然界中的多种动物和人类均可以感染 JEV,其中猪是 JEV 最重要的扩增宿主,在 JEV 的流行中起到了重要的作用<sup>[7]</sup>。除此之外,畜禽以及野生动物也会对 JEV 的流行和传播产生一定的影响<sup>[8]</sup>。因此,对于 JEV 抗体水平的监测有利于及时掌控 JEV 的感染及流行情况,常用的 JEV 血清抗体检测方法主要有血清中和试验(SNT)、间接免疫荧光试验(IFA)、血凝抑制试验(HI)和酶联免疫吸附试验(ELISA)。比较而言<sup>[9]</sup>,ELISA 具有操作简便、快速、易批量化等优点,更适合于大规模 JE 流行病学调查以及临床推广应用,ELISA 现已成为多种动物检测 JEV 抗体的首选方法<sup>[8]</sup>。到目前为止,国内外已建立多种关于不同动物及人类血清 JEV 抗体检测的 ELISA,但是关于检测乙脑抗体的阻断 ELISA 却未有报道<sup>[10-11]</sup>。由于阻断 ELISA 具有特异性强、适用性广的特点,其在西尼罗河病毒(WNV)等黄病毒抗体的检测中已经得到了广泛的应用<sup>[12]</sup>。

临床上关于不同动物血清中 JEV 抗体的检测主要是以间接 ELISA 为主,市场上已经存在多种商

品化间接 ELISA 试剂盒,但是尚无可以同时应用于检测不同动物 JEV 抗体的阻断 ELISA 试剂盒。为了开发可以应用于检测不同种类动物 JEV 抗体的阻断 ELISA,本研究建立了以重组 JEV ED III 蛋白作为包被抗原、HRP 标记的 JEV 单抗作为检测抗体的阻断 ELISA,并初步应用该方法对临床猪、牛和羊血清进行了流行病学调查。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞、质粒、血清及主要试剂

分泌抗 JEV ED III 蛋白单克隆抗体(1B10、1C4 和 6F10)的杂交瘤细胞株和 pET-28a-JEV-ED III 原核表达质粒由本实验室制备及保存;JEV 抗体标准阴、阳性血清由本实验室保存,猪圆环病毒 2 型(PCV2)抗体阳性血清、猪伪狂犬病病毒(PRV)抗体阳性血清、猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)抗体阳性血清、猪瘟疫病毒(CSFV)抗体阳性血清和口蹄疫病毒(FMDV)抗体阳性血清均为商品化试剂盒中的阳性对照。

预染蛋白质 Marker、RPMI 1640、Gibco 胎牛血清均购自 Invitrogen 公司;HRP 标记羊抗猪 IgG 购自 Abcam 公司;TMB 显色液购自湖州英创公司;MAb Trap™ Kit 购自 GE Healthcare 公司;其他化学试剂均为国产分析纯。

### 1.2 JEV ED III 蛋白和 JEV 单克隆抗体的制备

1.2.1 重组 JEV ED III 蛋白的制备 将 pET-28a-JEV-ED III 质粒转化 BL-21 大肠杆菌,挑取单菌落,37 °C 培养,IPTG 诱导表达 6 h 后,超声裂解菌体,以 8 mol · L<sup>-1</sup> 尿素溶解包涵体后经 Ni 柱纯化即为纯化后的 ED III 蛋白。纯化好的 ED III 蛋白经 SDS-PAGE 鉴定和蛋白定量仪测定浓度后,保存于 -20 °C 备用。

1.2.2 JEV 单克隆抗体的制备及标记 应用本实验室制备并保存的 3 株分泌抗 JEV ED III 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株(1B10、1C4 和 6F10)参照文献<sup>[13]</sup>制备腹水单抗。采用 MAb Trap™ Kit 纯化单抗,经间接 ELISA 测定其效价后进行 Western

blot 鉴定,再将 3 株单抗送金斯瑞生物技术有限公司进行 HRP 标记。

### 1.3 阻断 ELISA 酶标单抗的筛选

1.3.1 酶标 JEV 单抗的 ELISA 相加试验 参照文献[14]所述方法,先确定合适的 JEV EDⅢ重组蛋白包被浓度,再以直接 ELISA 测定 3 株 HRP 标记的 JEV EDⅢ蛋白单抗饱和时的最大稀释度。保持 JEV EDⅢ蛋白包被浓度不变,然后将各株单抗两两以各自饱和时的最大稀释度加入同一个包被有 EDⅢ蛋白抗原的检测孔内,从而测定抗体的结合水平。为了定量评定相加试验的测试结果,依据下列算式计算相加指数  $A. I.$ 。

$$A. I. = \frac{A_{1+2} - \frac{A_1 + A_2}{2}}{A_1 + A_2 - \frac{A_1 + A_2}{2}} \times 100\% = \left( \frac{2A_{1+2}}{A_1 + A_2} - 1 \right) \times 100\%$$

其中, $A_1$ 、 $A_2$ 和  $A_{1+2}$ 分别表示单独的第一种单抗、单独的第二种单抗和两种抗体混合时的  $OD_{450\text{ nm}}$  值。若两种单抗结合相同的表位, $A_{1+2}$ 将会接近于平均值, $A. I.$ 将会接近于 0。相反,若两种单抗结合不同的表位, $A_{1+2}$ 将会接近于加和, $A. I.$ 将会接近于 100%。 $A. I. \geq 50\%$ 表明 2 株单抗识别不同的表位。

1.3.2 酶标 JEV 单抗的阻断 ELISA 试验 以商品化 JEV 抗体检测 ELISA 试剂盒从临床送检血清中随机筛选出 15 份 JEV 抗体阳性猪血清和 15 份 JEV 抗体阴性猪血清,以 3 株 HRP 标记的 JEV 单抗进行阻断 ELISA 对比检测,按照公式计算阻断率:阻断率( $PI$ )=(1-被检血清  $OD_{450\text{ nm}}$  值/阴性血清  $OD_{450\text{ nm}}$ ) $\times 100\%$ ,根据阴、阳性猪血清的阻断率分析比较 3 株单抗的检测效果。

### 1.4 阻断 ELISA 反应条件的优化

按棋盘法将 JEV EDⅢ重组蛋白及选定的酶标单抗分别系列稀释后做方阵滴定,每个稀释度重复一次,取其平均值,计算各组阴、阳性血清的阻断率,选择阴性血清  $OD_{450\text{ nm}}$  接近 1 且阳性血清阻断率最高的反应条件作为最佳反应条件;将 JEV 抗体阳性血清和 JEV 抗体阴性血清以 1:1、1:4、1:50、1:100 进行稀释,分别加入 5%脱脂乳、2%BSA 和 5%BSA 封闭的 ELISA 板中,根据阻断率选择合适的血清稀释度以及封闭液;将 JEV 抗体阳性血清和 JEV 抗体阴性血清按最佳稀释度在 37℃ 分别作用

0.5、1、1.5 和 2 h,根据阻断率选择合适的血清作用时间;将酶标单抗按确定好的稀释倍数加入 ELISA 板后,37℃ 分别作用 0.5、1 和 1.5 h,根据阻断率结果选择合适的酶标单抗作用时间。

### 1.5 阻断 ELISA 临界值的确定

取经实验室建立的检测 JEV 抗体间接 ELISA 及商品化 ELISA 试剂盒同时测定为 JEV 抗体阴性的猪血清样品 100 份,按已优化反应条件的 JEV 抗体阻断 ELISA 检测各血清样品的阻断率,计算出平均阻断率( $\bar{x}$ )和标准差( $s$ ),分析结果并判定阻断率临界值。

### 1.6 阻断 ELISA 的交叉反应性试验

以阻断 ELISA 对 PCV2 抗体阳性血清、PRV 抗体阳性血清、CSFV 抗体阳性血清、PRRSV 抗体阳性血清以及 FMDV 抗体阳性血清进行检测,同时设置标准 JEV 抗体阴、阳性猪血清对照,根据检测结果判定本方法的交叉反应性。

### 1.7 阻断 ELISA 的重复性试验

同一批次包被处理的阻断 ELISA 板中,随机取出 1 块,选取 6 份不同阻断率的血清样品,每个样品设置 3 个重复,在同一条件下进行阻断 ELISA 检测,计算各血清检测结果的批内变异系数。3 个不同批次的阻断 ELISA 板中,各随机取出 1 块,在同一条件下对 6 份血清进行阻断 ELISA 检测,计算各血清检测结果的批间变异系数。

### 1.8 阻断 ELISA 与商品化 ELISA 试剂盒的对比

用本试验建立的阻断 ELISA 与商品化猪乙型脑炎抗体 ELISA 检测试剂盒(武汉科前生物制品有限公司,批号 171210)对比检测 285 份临床猪血清样品,依据检测结果计算本方法的敏感性、特异性以及与商品化试剂盒的检测符合率。

### 1.9 临床血清样品的检测

以本试验建立的阻断 ELISA 对 2017 年 8—11 月来自安徽、江苏、山东等 5 省份猪场送检的共 275 份临床猪血清,以及本实验室收集的来自江苏省东台、溧水、姜堰等 9 地区共 120 份牛血清样品、120 份羊血清样品进行阻断 ELISA 检测,根据阻断率临界值对检测结果进行阴阳性判定。

### 1.10 阻断 ELISA 与血清中和试验的比较

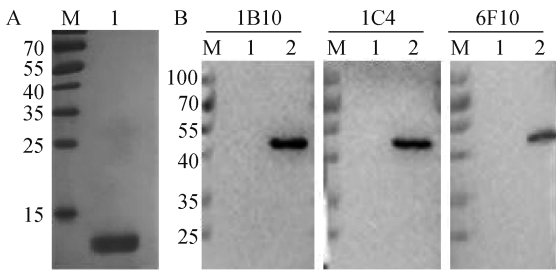
从“1.9”中选取 9 份猪、牛和羊的血清样品,经 56℃ 灭活 30 min 和 0.22  $\mu\text{m}$  无菌过滤后,按 1:10、1:20、1:40、1:80、1:160 和 1:320 做倍比稀释进行蚀斑减少血清中和试验(PRNT),同时设

置病毒对照孔( $100 \text{ PFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ )和正常细胞对照孔以及标准 JEV 抗体阴、阳性血清对照组。当对照组和对照孔均成立时,计算出相对病毒对照孔蚀斑数减少 50% 时对应的血清稀释度,作为该血清的中和抗体效价,以血清中和抗体效价  $\geq 1:10$  判定为 JEV 抗体阳性<sup>[15]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 JEV EDⅢ 重组蛋白及 JEV 单克隆抗体的制备与鉴定

将纯化的 JEV EDⅢ 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,结果显示有 1 条约 14 ku 的蛋白质带(图 1A),与 EDⅢ 蛋白理论大小一致。由 JEV EDⅢ 蛋白单抗 1B10、1C4 和 6F10 的 Western blot 结果显示(图 1B),3 株单抗均可特异性识别 JEV E 蛋白(53 ku),且与 C6/36 细胞样品无反应。



M. 蛋白质相对分子质量标准; A1. 纯化的 JEV EDⅢ 蛋白; B1. C6/36 细胞裂解物; B2. JEV 感染的 C6/36 细胞裂解物  
M. Protein marker; A1. Purified JEV EDⅢ protein; B1. C6/36 cell lysates; B2. C6/36 cell lysates infected with JEV  
图 1 JEV EDⅢ 重组蛋白的 SDS-PAGE(A) 及 JEV 单抗的 Western blot(B) 结果

Fig. 1 SDS-PAGE of the recombinant JEV EDⅢ protein (A) and Western blot of JEV MAb(B)

### 2.2 阻断 ELISA 酶标单抗的筛选

2.2.1 酶标 JEV 单抗的 ELISA 相加试验 由直接 ELISA 测定 3 株 HRP 标记单抗的结果可知,当 JEV EDⅢ 蛋白的包被浓度为  $0.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时,HRP-1B10、HRP-1C4 和 HRP-6F10 单抗饱和时的最大稀释度依次为  $1:6400$ 、 $1:6400$  和  $1:3200$ 。进一步以 3 株单抗进行直接 ELISA 相加试验,结果如表 1 所示,HRP-1B10 单抗和 HRP-1C4 单抗的 A. I. 为 83.0%,HRP-1B10 单抗和 HRP-6F10 单抗的 A. I. 为 80.8%,HRP-1C4 单抗和 HRP-6F10 单抗的 A. I. 为 90.1%,均高于 50%。因此,这 3 株单抗所识别的抗原表位两两存在相加

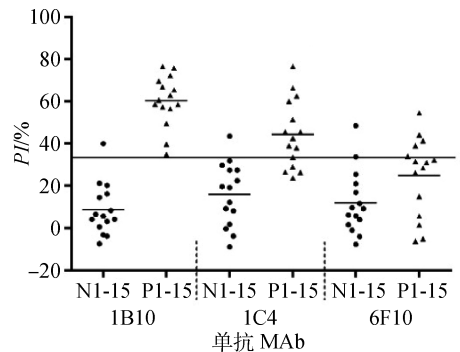
效应,即 3 株单抗各自针对不同的表位。

表 1 3 株 JEV EDⅢ 单抗的相加 ELISA 结果(A. I.)

Table 1 Result of three JEV EDⅢ MAbs additivity ELISA (A. I.) %

	1B10	1C4	6F10
1B10	—	—	—
1C4	83.0	—	—
6F10	80.8	90.1	—

2.2.2 酶标 JEV 单抗的阻断 ELISA 试验 分别以 3 株酶标 JEV 单抗作为检测抗体对 JEV 抗体阴、阳性猪血清进行阻断 ELISA 检测,结果如图 2 所示,HRP-1B10 单抗建立的阻断 ELISA 对 15 份阳性血清的检测最为敏感,HRP-1C4 单抗次之,HRP-6F10 单抗相对较差。相比而言,HRP-1B10 单抗作为检测抗体时建立的阻断 ELISA 敏感性和特异性均优于 HRP-1C4 单抗与 HRP-6F10 单抗,且阴、阳性血清平均阻断率之间的差异最显著。



N1-15. 阴性血清 1~15; P1-15. 阳性血清 1~15  
N1-15. Negative serum 1-15. P1-15. Positive serum 1-15  
图 2 HRP 标记 JEV 单抗的筛选

Fig. 2 Selection of HRP conjugated JEV MAB

### 2.3 阻断 ELISA 反应条件的确定

通过对各步骤反应条件进行筛选,当 JEV EDⅢ 蛋白包被浓度为  $0.05 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  且 HRP-1B10 的稀释度为  $1:2000$  ( $0.36 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 时阴性血清 OD<sub>450 nm</sub> 达到 1、阳性血清的阻断率达到最高为 74.6%(表 2)。由其他条件的优化结果可知,以 2% BSA 作为封闭液、以 1:1 稀释待检血清样品在 37 °C 孵育 1.5 h、酶标单抗在 37 °C 孵育 0.5 h 时对应的每组阻断率均最高,因此选择以上条件作为建立检测 JEV 抗体阻断 ELISA 的条件。

表 2 最佳抗原包被浓度和酶标单抗稀释度的选择

Table 2 Determination of optimal concentration of antigen and dilution of HRP-MAb

抗原包被浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ Coating concentration of antigen		酶标单抗稀释浓度 Dilution of HRP-MAb			
		1 : 1 000	1 : 2 000	1 : 4 000	1 : 8 000
0.2	P/N	0.722/1.928	0.557/1.711	0.490/1.391	0.376/1.042
	PI/%	62.6	67.4	64.8	64.0
0.1	P/N	0.604/1.678	0.436/1.476	0.385/1.204	0.291/0.898
	PI/%	64.0	70.5	68.1	67.6
0.05	P/N	0.429/1.416	0.278/1.098	0.231/0.842	0.171/0.570
	PI/%	69.7	74.6	72.5	70.1
0.025	P/N	0.359/0.953	0.204/0.748	0.164/0.536	0.115/0.343
	PI/%	62.3	72.7	69.5	66.5

## 2.4 阻断 ELISA 临界值的确定

利用阻断 ELISA 对 100 份 JEV 抗体阴性猪血清检测数据计算可得阻断率平均值  $\bar{x}$  为 9.3%，标准差  $s$  为 8.1%。根据公式  $\bar{x} + 2s = 25\%$ ， $\bar{x} + 3s = 34\%$ ，确定本方法的判定标准： $PI \geq 34\%$  判为阳性； $PI \leq 25\%$  时判为阴性； $25\% < PI < 34\%$  时判为可疑，需再次复检一次，若仍是  $PI < 34\%$  判为阴性。

## 2.5 阻断 ELISA 的交叉反应性试验

以 JEV 抗体阴、阳性血清为对照，用阻断 ELISA 对常见猪病毒病抗体阳性血清进行检测，结果如图 3 所示，除 JEV 抗体阳性血清为阳性反应外，其他几种猪病毒病阳性血清均为阴性反应，证明该阻断 ELISA 方法可特异性检测 JEV 抗体，与其他几种猪病毒病阳性血清无交叉反应。

## 2.6 阻断 ELISA 的重复性试验

选取 6 份不同阻断率的猪血清样品进行阻断 ELISA，根据试验结果可知(表 3)，6 份猪血清在批内重复性试验的变异系数为 0.70%~2.51%，批间重复性试验的变异系数为 2.48%~4.92%，均小于 5%，证明该阻断 ELISA 检测方法具有良好的重复性。

## 2.7 阻断 ELISA 与商品化 ELISA 试剂盒的对比

用商品化 ELISA 试剂盒与本研究建立的阻断 ELISA 同时对 285 份临床猪血清样品进行检测，结果经统计分析可知(表 4)，用阻断 ELISA 检测有 197 份血清样品为阳性，其中商品化 ELISA 试剂盒检测为 JEV 抗体阳性的有 194 份，表明本方法的相对敏感性为 98.5%；用阻断 ELISA 检测有 88 份血

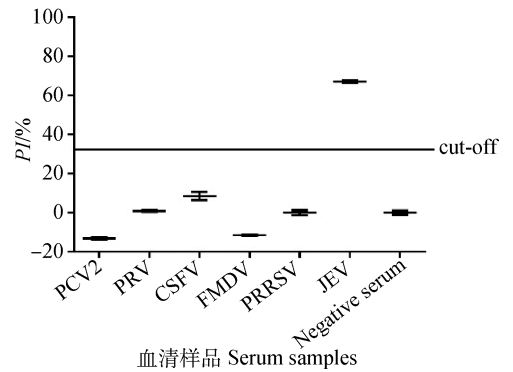


图 3 阻断 ELISA 的交叉反应性试验

Fig. 3 The results of the cross-reactivity test by blocking ELISA

清样品为阴性，其中商品化 ELISA 试剂盒检测为 JEV 抗体阴性的有 83 份，表明本方法的相对特异性为 94.3%；阻断 ELISA 与商品化试剂盒检测结果符合率为 97.2%。

## 2.8 临床血清样品的检测

采用本研究建立的阻断 ELISA 对 275 份临床猪血清和 240 份临床牛、羊血清进行 JEV 抗体的检测，结果如表 5 所示，275 份猪血清中，81 份商品猪血清 JEV 抗体阳性检出率为 55.6%，194 份种猪血清 JEV 抗体阳性检出率为 82.5%，总检出率为 74.5%。120 份牛血清样品中 JEV 抗体阳性检出率为 13.3%，120 份羊血清样品中 JEV 抗体阳性检出率为 9.2%，表明临床猪、牛和羊血清中均存在不同水平的 JEV 抗体，其中种猪血清样品的 JEV 抗体阳性率最高。

表 3 阻断 ELISA 方法批内和批间重复性试验

Table 3 The results of intra- and inter- repeatability test by blocking ELISA

血清编号 Serum No.	批内重复 (PI%) Repeat in the same batch				变异 系数 CV	批间重复 (PI%) Repeat in the different batch				变异 系数 CV
	重复 1 Repeat 1	重复 2 Repeat 2	重复 3 Repeat 3	平均值 Mean value		重复 1 Repeat 1	重复 2 Repeat 2	重复 3 Repeat 3	平均值 Mean value	
	1	11.32	11.08	11.40		11.26	0.70	11.34	11.26	
2	36.59	35.47	39.30	37.12	2.51	34.27	37.12	37.92	36.43	2.48
3	41.94	39.70	39.94	40.53	1.43	41.78	40.53	47.03	43.12	3.77
4	54.98	53.38	59.06	55.80	2.47	48.26	55.80	59.40	54.49	4.92
5	56.26	57.38	61.62	58.42	2.28	56.26	58.42	62.39	59.02	2.48
6	64.41	64.89	60.02	63.11	2.01	57.38	63.11	63.16	61.22	2.56

表 4 阻断 ELISA 与商品化试剂盒检测结果的比较

Table 4 Comparison of the results of JEV antibody detection by blocking-ELISA and commercialization Kit

方法及判定指标 Method and determination index	商品化试剂盒 Commercialization ELISA			符合率/% Coincidence rate
	阳性血清数 Positive serum numbers	阴性血清数 Negative serum numbers	总数 Total	
阻断 ELISA 阳性血清数 Positive serum numbers	194	3	197	98.5
Blocking ELISA 阴性血清数 Negative serum numbers	5	83	88	94.3
总数 Total	199	86	285	97.2

表 5 猪、牛和羊的 JEV 抗体阻断 ELISA 检测结果

Table 5 Results of JEV antibodies detection of swine, cattle and sheep serum by blocking ELISA

动物物种 Animal species	总数 Total	阳性血清数 Positive serum numbers	阳性率/% Positive rate
猪 Swine	81	45	55.6
商品猪 Commercial swine			
种猪 Breeding swine	194	160	82.5
牛 Cattle	120	16	13.3
羊 Sheep	120	11	9.2

## 2.9 阻断 ELISA 与血清中和试验的比较

由 PRNT 结果可知,每组的正常细胞对照孔均无空斑形成,JEV 抗体阳性血清组的中和抗体效价为 1:320,阴性血清组的中和抗体效价小于 1:10。将 9 份血清的阻断率及中和抗体效价汇总如表 6 所示,经阻断 ELISA 判定为 JEV 抗体阳性的血清对 JEV 产生 50% 蚀斑抑制时对应的中和抗体效价在 1:80~1:320 之间;判定为 JEV 抗体阴性的血清对 JEV 无显著的蚀斑抑制作用,中和抗体效价均小于 1:10。结果表明,9 份临床血清样品的阻断 ELISA 检测结果和血清中和试验检测结果一致。

## 3 讨论

本研究以 3 株 JEV 单抗作为基础,进行了阻断 ELISA 检测抗体筛选。由相加 ELISA 试验结果可知,3 株 JEV 单抗所识别的 JEV EDⅢ 蛋白上的抗原表位是不同的。分析 3 株酶标 JEV 单抗分别作为检测抗体建立的阻断 ELISA 检测结果可知,它们对 30 份 JEV 抗体阴阳性血清的敏感性和特异性存在一定差异,尤其是对 JEV 抗体阳性血清的阻断效果差异显著,表明临床猪血清样品中针对这 3 株单抗识别的抗原表位所产生的抗体水平是不同的。自

表 6 临床动物血清样品的 JEV 中和试验结果

Table 6 Results of JEV neutralization test of clinical animal serum samples

血清样品及编号 Serum samples & No.	阻断 ELISA		血清中和
	阻断率/% Blocking ELISA PI		抗体效价 Serum neutralization antibody titer
猪 Pig	1	76.7	1 : 160
	2	63.5	1 : 160
	3	-2.3	<1 : 10
牛 Cattle	4	45.0	1 : 80
	5	60.8	1 : 160
	6	19.6	<1 : 10
羊 Sheep	7	60.4	1 : 320
	8	56.4	1 : 80
	9	0.4	<1 : 10
阳性血清 Positive serum	70.8		1 : 320
阴性血清 Negative serum	0.9		<1 : 10

然状态下病毒感染机体时,一方面由于病毒蛋白上存在众多表位,因此依据各表位的抗原性不同而有优势表位和非优势表位之分,机体会优先产生针对优势抗原表位的抗体;另一方面由于病毒存在不同的基因型或是不同的毒株,因此会导致抗原表位的变异现象,抗原表位在不同病毒上的保守程度是不同的,通常针对保守表位的抗体适用性更加广泛<sup>[16]</sup>。结合试验结果,本研究选择了对 JEV 抗体阴性猪血清阻断效果最佳的 HRP-1B10 单抗作为建立 JEV 抗体阻断 ELISA 的检测抗体。

相比大多商品化 ELISA 试剂盒采用 JEV 全病毒作为包被抗原而会产生相对较高的实验成本及假阳性结果,本研究使用原核系统表达的重组 JEV EDⅢ蛋白作为包被抗原,既操作简单、容易大量制备,也降低了实验成本<sup>[17]</sup>。同时,本研究选用经过筛选的 JEV 单抗 HRP-1B10 作为阻断 ELISA 的检测抗体,一方面,特异性的 JEV 酶标单抗与血清中 JEV 抗体竞争结合抗原蛋白,从而减少非特异性反应的发生,提高检测的准确性;另一方面,以特异性的 JEV 酶标单抗作为检测抗体,还可以不受动物种属的限制,避免了为每种动物血清都配备相应的二抗,从而简化操作步骤,为同时检测多种动物血清 JEV 抗体提供了可能<sup>[18]</sup>。在此基础上,通过对阻断 ELISA 反应条件的优化,保证了对 JEV 抗体阳性血清检测的灵敏性与特异性。与国产商品化 ELISA 试

剂盒的对比试验中,两者的符合率为 97.2%,表明本研究建立的阻断 ELISA 具有良好应用前景。

运用阻断 ELISA 对来自 5 个省份的 275 份临床猪血清样品和来自江苏地区的 120 份牛血清样品及 120 份羊血清样品进行 JEV 抗体水平的检测,发现经过常规 JE 疫苗免疫的种猪群中 JEV 抗体阳性率在 82.5%左右,虽然不同省份的猪场疫苗免疫效果存在一定差异,但依旧使种猪群体产生了较高的 JEV 抗体水平,说明了疫苗免疫对于种猪群预防 JEV 的感染是十分重要的;商品猪群中 JEV 抗体阳性率为 55.6%,其中部分来自于仔猪群的待检血清出现较高的阳性率可能是由于母源抗体的存在而导致的,而保育和育肥猪群中母源抗体已经逐渐消减,因此出现较高的抗体水平则提示可能存在一定的 JEV 野毒感染<sup>[19-21]</sup>;临床的牛、羊血清中 JEV 抗体阳性检出率分别为 13.3%和 9.2%,表明牛、羊中也存在 JEV 感染的情况<sup>[22-23]</sup>。为了进一步评价该阻断 ELISA 对临床动物血清 JEV 抗体检测中的可靠性,选取了 9 份血清样品进行血清中和试验验证,发现两者的符合率为 100%,表明本研究建立的阻断 ELISA 能够适用于同时对大量的猪、牛和羊临床待检血清中 JEV 抗体的检测。该阻断 ELISA 不仅为 JE 流行病学调查、免疫监测和疫病诊断提供了一种新的检测方法,也为多种动物 JEV 抗体检测阻断 ELISA 试剂盒的研制奠定了基础。

## 4 结 论

成功建立了适用于猪、牛和羊血清中 JEV 抗体检测的阻断 ELISA,相比于常规的 ELISA 检测方法具有明显的优势。

## 参考文献 (References):

- [1] 陈溥言. 兽医传染病学[M]. 5 版. 北京:中国农业出版社, 2006.  
CHEN P Y. Veterinary lemmology[M]. 5th ed. Beijing:China Agriculture Press, 2006. (in Chinese)
- [2] MORITA K. Molecular epidemiology of Japanese encephalitis in East Asia[J]. *Vaccine*, 2009, 27(50): 7131-7132.
- [3] WANG H Y, TAKASAKI T, FU S H, et al. Molecular epidemiological analysis of Japanese encephalitis virus in China[J]. *J Gen Virol*, 2007, 88(3):885-894.
- [4] CHAMBERS T J, HAHN C S, GALLER R, et al. Flavivirus genome organization, expression, and rep-

- lication[J]. *Annu Rev Microbiol*, 1990, 44:649-688.
- [5] YE Q, XU Y P, ZHANG Y, et al. Genotype-specific neutralization determinants in envelope protein: implications for the improvement of Japanese encephalitis vaccine[J]. *J Gen Virol*, 2015, 96(8):2165-2175.
- [6] LUCA V C, ABIMANSOUR J, NELSON C A, et al. Crystal structure of the Japanese encephalitis virus envelope protein [J]. *J Virol*, 2012, 86(4):2337-2346.
- [7] TURTLE L, SOLOMON T. Japanese encephalitis - the prospects for new treatments[J]. *Nat Rev Neurol*, 2018, 14(5):298-313.
- [8] CSANK T, DRZEWNIOKOVÁ P, KORYTÁR L, et al. A serosurvey of flavivirus infection in horses and birds in slovakia[J]. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2018, 18(4):206-213.
- [9] PIYASENA T B H, SETOH Y X, HOBSON-PEETERS J, et al. Differential diagnosis of flavivirus infections in horses using viral envelope protein domain III antigens in enzyme-linked immunosorbent assay[J]. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2017, 17(12):825-835.
- [10] GALULA J U, CHANG G J J, CHUANG S T, et al. Establishment of an algorithm using prM/E- and NS1-specific IgM antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assays in diagnosis of Japanese encephalitis virus and west nile virus infections in humans[J]. *J Clin Microbiol*, 2016, 54(2):412-422.
- [11] 祖立闯,王金良,管宇,等. 流行性乙型脑炎病毒 E 蛋白的截短表达与间接 ELISA 诊断方法的建立[J]. *中国预防兽医学报*, 2010, 32(3):200-204, 231.
- ZU L C, WANG J L, GUAN Y, et al. Development of an indirect ELISA for detecting antibodies to japanese encephalitis virus using recombinant truncated glycoprotein E expressed in *E. coli* [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2010, 32(3):200-204, 231. (in Chinese)
- [12] HIROTA J, SHIMOJI Y, SHIMIZU S. New sensitive competitive enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody against nonstructural protein 1 of west nile virus NY99[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2012, 19(2):277-283.
- [13] 倪慧,王钰,毛岩,等. 日本脑炎病毒囊膜蛋白单克隆抗体的制备及特性分析[J]. *畜牧与兽医*, 2016, 48(7):1-9.
- NI H, WANG Y, MAO Y, et al. Preparation and characterization of monoclonal antibodies against envelope protein of Japanese encephalitis virus[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2016, 48(7):1-9. (in Chinese)
- [14] FRIGUET B, DJAVADI-OHANIAN L, PAGES J, et al. A convenient enzyme-linked immunosorbent assay for testing whether monoclonal antibodies recognize the same antigenic site. Application to hybridomas specific for the  $\beta_2$ -subunit of *Escherichia coli* tryptophan synthase[J]. *J Immunol Methods*, 1983, 60(3):351-358.
- [15] HOMBACH J, SOLOMON T, KURANE I, et al. Report on a WHO consultation on immunological endpoints for evaluation of new Japanese encephalitis vaccines, WHO, Geneva, 2-3 September, 2004[J]. *Vaccine*, 2005, 23(45):5205-5211.
- [16] KEDL R M, KAPPLER J M, MARRACK P. Epitope dominance, competition and T cell affinity maturation[J]. *Curr Opin Immunol*, 2003, 15(1):120-127.
- [17] 马淑娟,熊益权,张琼花,等. 三种 ELISA 试剂盒检测猪流行性乙型脑炎病毒血清 IgG 抗体比较[J]. *中国人兽共患病学报*, 2015, 31(5):423-426.
- MA S J, XIONG Y Q, ZHANG Q H, et al. Comparison of three commercial ELISA kits for detection of antibodies against Japanese encephalitis virus in swine sera[J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2015, 31(5):423-426. (in Chinese)
- [18] MAO L, LI W L, ZHOU T C, et al. Development of a blocking ELISA for Caprine parainfluenza virus type 3[J]. *J Virol Methods*, 2017, 250:59-65.
- [19] CHAI C X, WANG Q, CAO S J, et al. Serological and molecular epidemiology of Japanese encephalitis virus infections in swine herds in China, 2006-2012[J]. *J Vet Sci*, 2018, 19(1):151-155.
- [20] RICKLIN M E, GARCÍA-NICOLÍS O, BRECHBUHL D, et al. Vector-free transmission and persistence of Japanese encephalitis virus in pigs[J]. *Nat Commun*, 2016, 7:10832.
- [21] MANSFIELD K L, HERNÁNDEZ-TRIANA L M, BANYARD A C, et al. Japanese encephalitis virus infection, diagnosis and control in domestic animals[J]. *Vet Microbiol*, 2017, 201:85-92.
- [22] HUBÁLEK Z, RUDOLF I, NOWOTNY N. Arboviruses pathogenic for domestic and wild animals[J]. *Adv Virus Res*, 2014, 89:201-275.
- [23] CHOWDHURY S, KHAN S U, CRAMERI G, et al. Serological evidence of henipavirus exposure in cattle, goats and pigs in Bangladesh[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2014, 8(11):e3302.