

# 诺如病毒衣壳蛋白多克隆抗体的制备及效价分析

武娟<sup>1</sup>, 赵玉然<sup>2</sup>, 唐庆娟<sup>1,\*</sup>, 王静凤<sup>1</sup>, 王玉明<sup>1</sup>, 李兆杰<sup>1</sup>, 薛勇<sup>1</sup>, 薛长湖<sup>1</sup>

(1.中国海洋大学食品科学与工程学院, 食品科学与人类健康实验室, 山东 青岛 266003;

2.山东省出入境检验检疫局食品与农产品检测机构, 山东 青岛 266003)

**摘要:** 将大肠杆菌表达的GII-4型诺如病毒(Norovirus, NV)衣壳蛋白免疫新西兰大白兔, 制备多克隆抗体; 收集抗血清, 酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测其效价, 并对经聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)验证为阳性的NV感染样品进行检测, 比较两种检测方法的差异性。以原核表达的诺如病毒衣壳蛋白作为抗原制备的NV特异性多克隆抗体具有良好的免疫反应性, 抗体效价为1:10 000, 可以用于免疫学检测。

**关键词:** 诺如病毒; 衣壳蛋白; 原核表达; 抗血清

## Preparation and Titer Analysis of Polyclonal Antibody against Norovirus Capsid Protein

WU Juan<sup>1</sup>, ZHAO Yu-ran<sup>2</sup>, TANG Qing-juan<sup>1,\*</sup>, WANG Jing-feng<sup>1</sup>, WANG Yu-ming<sup>1</sup>, LI Zhao-jie<sup>1</sup>, XUE Yong<sup>1</sup>, XUE Chang-hu<sup>1</sup>

(1. Laboratory of Food Science and Human Health, College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Food and Agricultural Products Testing Agency (FATA), Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** New Zealand rabbits were immunized with the recombinant norovirus (NV) capsid protein expressed in *E. coli* to prepare polyclonal antibody. The antiserum was collected and evaluated by ELISA method, and a comparative evaluation with PCR was carried out by using both methods to detect NV-positive samples identified by PCR. The antiserum had a good immunoreactivity at a dilution of 1:10 000, suggesting its availability for immunological experiments. Compared with PCR, the ELISA method was more simple and rapid. Although the sensitivity of ELISA was worse than that of PCR, this problem was able to be meliorated by purified virus. This study establishes the basis for a rapid and economical norovirus enzyme-linked immunosorbent assay kit.

**Key words:** norovirus; capsid protein; prokaryotic expression system; polyclonal antibody

中图分类号: TS254.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2014)11-0105-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201411021

诺如病毒(Norovirus, NV)是目前最为常见的食源性病毒之一, 是一种单链RNA病毒。流行病学调查提示牡蛎等双壳贝类是诺如病毒最主要的食物性传播载体<sup>[1]</sup>。到目前为止, 全世界范围内已报道了数十起食用诺如病毒污染的牡蛎导致的流行性腹泻爆发事件, 严重影响了牡蛎的食品安全性<sup>[2-7]</sup>。近年来, 不少国家要求进口的冻贝产品不得携带诺如病毒。我国的贝类产量居世界首位, 建立适用于大规模贝类中诺如病毒快速检测的新方法意义重大。

目前, 逆转录-聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)技术是国内检测诺

如病毒最主要的手段<sup>[8]</sup>。但是该技术对仪器设备和检测者的技能均有较高要求, 在基层单位很难推广, 而且所需时间较长, 难以满足贝类产品现场快速检测的要求。另外一种常用方法是酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)。国内外研究者利用基因工程方法获得多种基因型的诺如病毒衣壳蛋白或合成肽, 联合免疫动物后获得特异性免疫血清, 建立了商品化的酶联免疫检测试剂盒<sup>[9-11]</sup>。由于该方法成本较高, 导致试剂盒价格昂贵, 不适合在价格相对低廉的贝类产品检测中推广。本实验室在前期工作中利用大肠杆菌系统原核表达了GII-4型诺如病毒衣壳蛋白, 表达和纯化的

收稿日期: 2013-06-03

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31071525); 山东省“泰山学者”建设工程专项;

教育部“长江学者和创新团队发展计划”项目(IRT1188); 国家自然科学基金青年科学基金项目(31101281)

作者简介: 武娟(1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品安全与营养。E-mail: 932837429@qq.com

\*通信作者: 唐庆娟(1971—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为食品营养与分子营养学。E-mail: tangqingjuan@ouc.edu.cn

流程相对简单且操作容易,成本较低<sup>[12]</sup>。本研究拟利用原核表达的诺如病毒重组衣壳蛋白免疫新西兰大白兔,制备多克隆抗体,在此基础上建立相应的ELISA检测方法,为实现水产品中诺如病毒的快速检测目标提供一定参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

诺如病毒衣壳蛋白由本实验室通过大肠杆菌表达NV G II-4型衣壳蛋白基因获得<sup>[12]</sup>。非细菌性腹泻病人粪便样品由青岛市儿童医院提供。

弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂 美国Sigma公司; TMB底物 加拿大Bio Basic公司; HRP-羊抗兔IgG 北京博奥森生物技术有限公司; 吐温-20 青岛碧海生物试剂有限公司; 其他化学试剂均购自上海Sangon公司。

### 1.2 仪器与设备

岛津UV2550紫外分光光度计 日本岛津公司; Beckman Allegra 64R高速冷冻离心机 美国Beckman公司; 96孔12道可拆聚苯乙烯酶标板 青岛碧海生物试剂有限公司; CliniBio 128C酶标仪 奥地利ASYS-Hitech有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 动物免疫与NV抗血清的制备

将原核表达的诺如病毒衣壳蛋白,免疫新西兰大白兔。采用背部4点注射免疫,第1次每只注射2 mg/mL抗原,免疫原与等量的弗氏完全佐剂混合乳化; 2、3、4次免疫每只注射1 mg/mL抗原,用弗氏不完全佐剂乳化注射家兔; 第5次直接注射蛋白溶液1 mg/mL。每次免疫相隔14 d。第5次免疫前,耳静脉采血,间接ELISA方法测定效价。第5次免疫后7 d,颈动脉放血,分离血清, -20℃冻存。

#### 1.3.2 诺如病毒抗血清效价的ELISA检测

将诺如病毒衣壳蛋白溶液透析24 h之后真空冻干24 h,称质量后溶于5 mg/mL碳酸盐缓冲溶液(carbonate buffer solution, CBS)中用作包被抗原。包被抗原和抗体最佳浓度的测定用抗原包被96孔板,按方阵滴定法测定包被抗原和抗血清反应的最佳工作浓度,测定OD<sub>450 nm</sub>值。根据曲线图,选择OD<sub>450 nm</sub>值在1.0左右的抗原包被物浓度和酶标抗体的稀释度为最适工作浓度。

ELISA操作参照文献<sup>[12]</sup>步骤如下: 1) NV衣壳蛋白稀释至20 μg/mL包被96孔板, 4℃过夜,洗板; 2) 封闭液(1×PBST, 0.5%牛血清白蛋白)封闭, 37℃作用1 h,洗板; 3) NV抗血清用pH 7.4、0.01 mol/L的磷酸盐缓冲溶液(phosphat buffered saline, PBS)

按1:1 000、1:2 000、1:4 000、1:6 000、1:8 000、1:10 000、1:12 000、1:14 000的比例稀释后,加入待测样品孔,空白孔加pH 7.4、0.01 mol/L的PBS缓冲液,阴性对照孔加免疫前采集的兔血清, 37℃作用1 h,洗板; 4) 加入3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)底物溶液显色,测定OD<sub>450 nm</sub>值,通过Excel软件作图并计算各种稀释度下的P/N值,以P/N值大于2.0者为阳性, P/N值接近2.0的抗血清稀释度为该抗体效价。

$$P/N = \frac{\text{抗血清OD}_{450\text{ nm}} - \text{空白OD}_{450\text{ nm}}}{\text{正常OD}_{450\text{ nm}} - \text{空白OD}_{450\text{ nm}}}$$

#### 1.3.3 诺如病毒ELISA法与PCR法的比较

取经RT-PCR方法(采用引物P289/290<sup>[13]</sup>)验证为诺如病毒G II型阳性的粪便样品4份,其中3株为诺如病毒G II-4型, 1株为诺如病毒G II-3型,阴性样品2份,作为包被蛋白进行包被,用诺如病毒抗血清对其进行ELISA检测。本实验采用4个对照组,对照组1与对照组2为2份阴性样品包被抗原,对照组3与对照组4为2份阳性样品包被抗原,对照组1与对照组3添加阴性血清,对照组2与对照组4添加阳性血清,血清均按照1:1 000进行稀释,空白组添加PBS。通过每个对照组之间的反应,验证抗血清对阳性样品的检测能力。

## 2 结果与分析

### 2.1 抗血清效价的ELISA检测结果

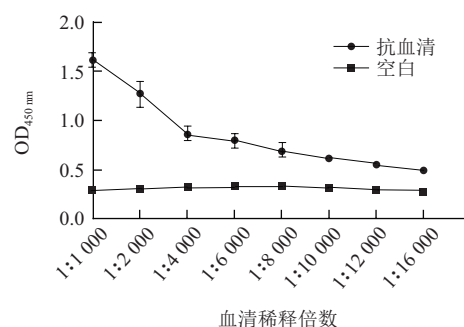


图1 抗血清效价的测定

Fig.1 Determination of antiserum titer

用间接ELISA方法测得抗血清效价,如图1所示,所制备的兔抗NV衣壳蛋白效价可达到1:10 000,可以满足免疫检测的要求。

### 2.2 ELISA法与PCR法对诺如病毒检测的结果比较

通过4个对照组的抗原抗体反应,测定OD<sub>450 nm</sub>,并计算各种对照组条件下的P/N值,结果见表1,只有阳性样品与阳性血清反应结果出现阳性,其余为阴性。在所检测的粪便样品中,4份经PCR检测为NV G II型阳性

的粪便样品中, 仅1份样品可通过ELISA方法检测为阳性样品, P/N为2.0。而其余3份经PCR验证为NV阳性的粪便样品, P/N均小于2.0, 检测结果为阴性。这说明本实验所得的抗血清特异性比较好, 其检测范围亦较窄。因此, 在此抗体基础上的ELISA方法检测实际粪便样品时, 其检出率较PCR方法低。

**表1 ELISA法与PCR法对诺如病毒4个对照组P/N检测结果的比较**  
**Table 1 Comparison of P/N results of four control groups detected by ELISA and PCR**

样品	阴性样品1	阴性样品2	GII-4阳性样品1	GII-4阳性样品2	GII-4阳性样品3	GII-3阳性样品
阴性血清	0.94/-	1.11/-	1.02/-	1.15/-	0.98/-	1.07/-
阳性血清	1.21/-	1.26/-	2.00/+	1.74/-	1.82/-	1.59/-

注: +, 阳性; -, 阴性。

通过ELISA检测方法方法与PCR检测方法初步比较, 可以看出ELISA检测方法对实际粪便样品的检出率较PCR方法低, 这与Jiang等<sup>[9]</sup>通过VLPs制备的诺如病毒单抗对实际粪便样品的检测率非常低的报道相一致。推测其中原因可能是由于粪便样品中杂蛋白的干扰, 或病毒浓度过低所致, 且NV变异性强, 一种遗传组型抗体不能识别其他组型抗原, 对自身遗传组型抗原的识别也因衣壳蛋白的差异性受到限制, 且检出率相对较低。同时, 由于PCR检测NV病毒时, 病毒是经过提纯的, 相对浓度要远远高于实际粪便样品。PCR检测结果与NV特异探针杂交结果的比较以及PCR阳性与被检者感染NV的一致性都显示用RT-PCR方法具有很高的灵敏度<sup>[13]</sup>, 因此不能简单地将PCR检测方法方法与ELISA检测方法进行比较。因此本实验结果提示, 用ELISA法检测水产品中诺如病毒时, 首先需要对病毒进行浓缩提纯。

### 3 讨论

NV GII-4型是我国诺如病毒主要流行株之一<sup>[14-15]</sup>, 但目前还没有关于NV GII-4型抗血清的报道。1992年, Jiang等<sup>[9]</sup>用重组杆状病毒表达了NV衣壳蛋白(rNV), rNV在昆虫细胞中自动组装成病毒样颗粒(virus like particals, VLPs), 此方法可以大量获得与病毒形态和抗原性相似的VLPs。但根据2000年Yoda等<sup>[16]</sup>对NV衣壳蛋白抗原表位的研究表明, NV衣壳蛋白的保守区域位于N末端, 在VLPs中比较保守的N端被包裹在内, 而变易比较大的C端暴露在外, 因此免疫动物产生的抗体也是主要针对病毒衣壳蛋白C端抗原, 这样就限制了抗体识别其他型病毒的能力, 而原核表达的可融性的衣壳蛋白, N端和C端的抗原表位均很好的暴露, 免疫动物得到的抗体可以识别衣壳蛋白的各区域, 因此通过原核表达NV衣壳蛋白而获得的多克隆抗体将具有更广泛的检测范围。2001—2003年Yoda等<sup>[10-11]</sup>又通过原核表达的衣壳蛋白制备了单克隆

抗体, 发现GII衣壳蛋白制备的单抗其抗原表位可以很好的识别G I、G II型的NV衣壳蛋白N端40个氨基酸, 它们的抗原表位来自于N末端暴露在外的氨基酸(QQNIIDPWIMN)肽。更加表明原核表达的NV衣壳蛋白具有不可替代的优越性。本实验室采用Yoda等<sup>[10-11]</sup>提出的诺如病毒原核表达系统表达诺如病毒衣壳蛋白, 制备多抗。通过DNAtools的分析, 不存在终止密码子突变, 该衣壳蛋白基因能够完整的被翻译。在该蛋白质序列中存在Yoda等<sup>[10-12]</sup>提出的N末端11个保守氨基酸(QQNIIDPWIMN), 该11个保守氨基酸位于诺如病毒衣壳蛋白抗原表位, 以此蛋白免疫动物获得的抗血清, 理论上比通过VLPs免疫获得的抗血清具有更广的检测范围。

由于多抗的制备具有抗原制备快, 耗时短, 操作安全, 成本低廉, 制备难度低的特点, 在此基础上开发试剂盒有经济适用的优点, 对于大量、低廉水产品(如牡蛎)的检测有着单抗不可代替的优越性<sup>[12]</sup>。在我国, 针对诺如病毒食品检测方面的应用, 制备NV多抗还未见报道。本实验采用间接ELISA方法, 方法的优点是只要变换包被抗原就可利用同一酶标抗抗体建立检测相应抗体的方法。多抗相对于单抗, 更容易捕捉抗原, 因为含有抗不同表位的抗体, 此外通过大肠杆菌表达的衣壳蛋白抗原表位又全部展露在外, 以此制备的多克隆抗体相对于VLPs将具有更广泛的识别范围, 在一定程度上可以减少试剂盒制备过程中需要表达病毒株的基因组型<sup>[12]</sup>。因此, 本实验制备了NV衣壳蛋白的多抗, 以期能获得成本低廉且检测范围广的高效酶联免疫检测试剂盒。通过将大肠杆菌表达的诺如病毒衣壳蛋白免疫新西兰大白兔, 获得诺如病毒抗血清, 并通过间接ELISA方法对抗血清效价进行检测, 结果表明, 该抗血清效价可达到1:10 000, 能够满足免疫检测的要求。目前所用ELISA检测间接法一般标本用量为5~10 μL, 在检测孔中作10~20倍稀释, 之所以作高比例的稀释, 主要是受间接法固有的缺点限制, 因为如果血清浓度过高, 血清中存在的大量免疫球蛋白对酶标板的非特异吸附会造成阴性标本本底很高, 无法对实验结果有效判断。在ELISA检测中, 用样品稀释液调整反应成分的浓度, 调节适宜的OD值范围, 为免疫反应提供适宜的环境, 降低非特异吸附, 抑制非特异反应等, 提高特异性反应和检测的灵敏度, 提高免疫学检测技术的可行性, 以获得正确的结果。因此, ELISA检测方法的条件优化及方法学评价是至关重要的。

本实验通过ELISA检测方法方法与PCR检测方法初步比较, 得出ELISA检测方法对实际粪便样品的检出率较PCR方法低, 提示ELISA法检测水产品中诺如病毒时, 需对病毒进行浓缩提纯。吴斌等<sup>[17]</sup>通过用荧光定量PCR法和



ELISA法检测贝类中的诺如病毒,得出这两种方法都可以用于快速检测诺如病毒,但ELISA法更适于检测诺如病毒含量低的样品。然而由于诺如病毒的基因型的多样性和复杂性,设计出具有特异性和广泛适用性的引物已成为RT-PCR检测的关键。各国实验室大多是以ORF1编码病毒RNA多聚酶上的保守区段为靶序列来设计引物,但这种方法不具有绝对优势,研究者们致力于寻找检测能力较好的引物。对诺如病毒的PCR扩增,首先要提取诺如病毒的RNA, RNA非常不稳定,暴露在空气中很容易降解,粪便样品中的蛋白质、脂肪、金属离子等都是能够抑制反转录酶和DNA聚合酶活性的物质,因此在进行RT-PCR之前有必要对病毒核酸进行高效率的提取纯化。虽然PCR检测方法灵敏度高、特异性好,但是该方法并不适合大量产品短时间内的检测,仍然需要繁琐的实验操作与成本较高的测序过程,因此建立NV的ELISA检测试剂盒还是有其必要性的。

由于NV病毒具有较强的变异性,同一遗传组型不同病毒株在衣壳蛋白区域可能存在较大差异,在实际检测过程中抗体病毒株型与实际传播的病毒株型也可能存在较大的差距,因此后期本实验难以找到合适的粪便样品以进行抗血清特异性的进一步研究,这就增加了诺如病毒检测的难度<sup>[16]</sup>。虽然原核表达的衣壳蛋白制备的抗血清理论上检测范围较VLPs制备的抗血清检测范围广,但是诺如病毒多抗检测试剂盒的研制还需要针对我国流行的GG II 3、GG II 1和GG II 7型病毒衣壳蛋白多抗的获得,以及对抗体交叉反应、特异性和灵敏度的进一步检测。本实验室还将在以后的工作中不断完善该检测方法。

#### 参考文献:

- [1] KOOPMANS M, DUIZER E. Foodborne viruses: an emerging problem[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 90(1): 23-41.
- [2] LEES D. Viruses and bivalve shellfish[J]. International Journal of Food Microbiology, 2000, 59(1/2): 81-116.
- [3] 秦彦珉, 廖玉学, 刘刚, 等. 一起诺如病毒感染性腹泻爆发的流行病学调查[J]. 热带医学杂志, 2009, 9(8): 967-969.
- [4] 孙灵英, 张立军, 刘军涛. 一起诺如病毒胃肠炎爆发疫情的调查[J]. 浙江预防医学, 2010, 22(11): 39-40.
- [5] 黄竹林, 王晓之, 刘如春, 等. 长沙市诺如病毒感染性腹泻爆发疫情调查分析[J]. 中国热带医学, 2007, 7(9): 1638-1639.
- [6] 吴疆, 高志勇, 刘桂荣, 等. 北京地区诺如病毒感染的流行病学调查[J]. 中华流行病学杂志, 2007, 28(7): 667-670.
- [7] BRUGGINK L, MARSHALL J. The relationship between health care and nonhealth care norovirus outbreak settings and norovirus genotype in Victoria, Australia, 2002—2005[J]. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 2011, 44(4): 241-322.
- [8] 周晓红, 李晖, 杨杏芬. 食品中诺如病毒RT-PCR检测技术研究进展[J]. 国外医学: 卫生学分册, 2009, 36(4): 234-238.
- [9] JIANG X, WANG Min, GRAHAM D Y, et al. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein[J]. Journal of Virology, 1992, 66(11): 6527-6532.
- [10] YODA T, TERANO Y, SUZUKI Y, et al. Characterization of Norwalk virus G I specific monoclonal antibodies generated against *Escherichia coli* expressed capsid protein and the reactivity of two broadly reactive monoclonal antibodies generated against G II capsid towards G I recombinant fragments[J]. BMC Microbiology, 2001, 1: 24.
- [11] YODA T, SUZUKI Y, TERANO Y. Precise characterization of norovirus (Norwalk-like virus)-specific monoclonal antibodies with broad reactivity[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(6): 2367-2371.
- [12] 赵玉然, 薛长湖, 王静凤, 等. 诺如病毒衣壳蛋白原核表达的研究[J]. 中国海洋大学学报, 2007, 37(增刊2): 77-80.
- [13] JIANG Xi, HUANG P W, ZHONG W M, et al. Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR[J]. Journal of Virological Methods, 1999, 83: 145-154.
- [14] SIEBENGA J J, LEMEY P, POND S L K, et al. Phylodynamic reconstruction reveals Norovirus GII.4 epidemic expansions and their molecular determinants[J]. PLoS Pathogens, 2010, 6(5): 1-13.
- [15] ZHENG D P, WIDDOWSON M A, GLASS R I, et al. Molecular epidemiology of genogroup II-genotype 4 noroviruses in the United States between 1994 and 2006[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2010, 48(1): 168-177.
- [16] YODA T, TERANO Y, SHIMADA A. Expression of recombinant Norwalk-like virus capsid proteins using a bacterial system and the development of its immunologic detection[J]. Journal of Medical Virology, 2000, 60: 475-481.
- [17] 吴斌, 裴铁君, 王刚, 等. 贝类中诺如病毒ELISA与荧光定量PCR检测技术的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(12): 2623-2624.