

卢春霞, 刘长彬, 万鹏程, 等. 绵羊 ovPAG7 间接竞争酶联适配体检测方法的建立与应用[J]. 江苏农业学报, 2022, 38(3): 730-738.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2022.03.019

绵羊 ovPAG7 间接竞争酶联适配体检测方法的建立与应用

卢春霞^{1,2}, 刘长彬², 万鹏程², 郭延华², 陈霞³, 李红敏³, 卢守亮²

(1. 长江师范学院现代农业与生物工程学院, 重庆 408100; 2. 新疆农垦科学院省部共建绵羊遗传改良与健康养殖国家重点实验室, 新疆 石河子 832000; 3. 新疆农垦科学院分析测试中心, 新疆 石河子 832000)

摘要: 为建立一种简便、经济、无创的应用于绵羊早期妊娠诊断的快速检测技术, 以绵羊妊娠相关糖蛋白 7 (Ovine pregnancy-associated glycoproteins-7, ovPAG7) 核酸适配体为分子识别探针, 建立一种间接竞争酶联适配体 (Indirect competitive enzyme-linked aptamer assay, ic-ELAA) 检测 ovPAG7 的新方法, 并对 ovPAG7 包被质量浓度、包被缓冲液、封闭条件、适配体浓度、链霉亲和素-辣根过氧化物酶 (SA-HRP) 稀释比例等检测条件进行优化, 将建立的方法应用于人工授精后 28 d 的中国美利奴羊血清检测, 检测结果与妊娠相关糖蛋白-酶联免疫吸附测定 (PAG-ELISA) 商业化试剂盒和 B 超检测法进行比较。结果显示, 在 ovPAG7 包被质量浓度为 2.0 μg/ml、包被缓冲液为 50 mmol/L 碳酸盐缓冲液 (pH 9.6)、1.0% 牛血清白蛋白封闭 2 h、适配体浓度为 40 nmol/L、SA-HRP 稀释比例为 1:40 000 (体积比)、室温下竞争反应时间为 40 min 等优化条件下, ovPAG7 在缓冲液体系和血清体系中质量浓度的线性范围均为 0.1~50.0 ng/ml ($R^2 > 0.994$), 半数抑制质量浓度 (IC_{50}) 分别为 1.40 ng/ml 和 2.11 ng/ml, 检测限分别为 0.11 ng/ml 和 0.19 ng/ml。ovPAG7 在空白样品中加标回收率为 96.4%~106.8%, 相对标准偏差小于 6.0%。妊娠诊断结果显示, ic-ELAA 法的诊断敏感性、特异性和准确率分别为 96.0%、83.3% 和 91.2%, 与 B 超检测结果一致性较高 (Kappa 值 = 0.810)。

关键词: 妊娠相关糖蛋白; 适配体; 早期妊娠诊断; 绵羊

中图分类号: S826.3⁺5 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2022)03-0730-09

Establishment and application of indirect competitive enzyme-linked aptamer assay for ovPAG7 in sheeps

LU Chun-xia^{1,2}, LIU Chang-bin², WAN Peng-cheng², GUO Yan-hua², CHEN Xia³, LI Hong-min³, LU Shou-liang²

(1. School of Advanced Agriculture and Bioengineering, Yangtze Normal University, Chongqing 408100, China; 2. State Key Laboratory of Sheep Genetic Improvement and Healthy Breeding, Xinjiang Academy of Agriculture and Reclamation Science, Shihezi 832000, China; 3. Analysis and Testing Center of Xinjiang Academy of Agriculture and Reclamation Science, Shihezi 832000, China)

Abstract: The aim of the experiment was to establish a rapid and new detection technique that can be applied simply, economically and noninvasively in diagnosis of sheeps in early period of pregnancy. An indirect competitive enzyme-linked

收稿日期: 2021-07-25

基金项目: 新疆生产建设兵团科技创新人才计划项目 (2020CB022);
重庆市自然科学基金面上项目 (cstc2020jcyj-msxmX0080);
国家重点实验室优秀中青年人才培养引导计划专项
(SKLSGIH2017A02)

作者简介: 卢春霞 (1978-), 女, 河南商丘人, 博士, 教授, 主要从事快速检测技术研究。(E-mail) shzlcx2002@163.com

通讯作者: 刘长彬, (E-mail) xlchangbin@163.com

aptamer assay (ic-ELAA) was developed using ovine pregnancy-associated glycoproteins-7 (ovPAG7) nucleic acid aptamer as molecular probe for the detection of ovPAG7. Several detecting conditions including mass concentration of coated ovPAG7, coating buffer, blocking conditions, concentration of aptamer and dilution ratio of streptavidin-horseradish peroxidase (SA-HRP) were optimized. Subsequently, the serum samples from Chinese Merino ewes

28 days after insemination were analyzed by applying the ic-ELAA method proposed. The test results were compared with ultrasound B detection method and PAG-ELISA (pregnancy associated glycoproteins-enzyme linked immunosorbent assay) kit. The results demonstrated that, the optimized conditions were 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mass concentration of coated ovPAG7, 50 mmol/L carbonate with pH 9.6 as coating buffer, blocking the wells with 1.0% bovine serum albumin for 2 h, the aptamer concentration was 40 nmol/L, the dilution ratio (in volume) of SA-HRP was 1 : 40 000, the competitive reaction time at room temperature was 40 min. Under the optimal conditions, the linear range of mass concentration of ovPAG7 in both buffer system and serum system was 0.1–50.0 ng/ml ($R^2 > 0.994$), with median inhibition concentration (IC_{50}) of 1.40 ng/ml and 2.11 ng/ml respectively, and the limit of detection were 0.11 ng/ml and 0.19 ng/ml respectively. The recovery rate of ovPAG7 in blank samples was between 96.4% and 106.8%, and the relative standard deviations were all less than 6.0%. Results of pregnancy diagnosis showed that, the diagnostic sensitivity, specificity and accuracy of ic-ELAA method were 96.0%, 83.3% and 91.2% respectively, which showed high consistency with detection results by ultrasound B method ($Kappa = 0.810$).

Key words: pregnancy associated glycoprotein; aptamer; early pregnancy diagnosis; sheep

近些年,中国养羊业发展迅速,截至2017年,中国绵羊存栏量 1.64079×10^8 只,山羊存栏量 1.38238×10^8 只,羊肉总产量 4.711×10^6 t^[1],养殖模式也由传统的农户分散饲养向规模化和产业化转型。众所周知,在规模化养殖中,提高繁殖效率是提高养殖经济效益的关键环节。若能在配种后对母羊准确及时地进行早期妊娠诊断,尽早区分已孕和未孕母羊,及时地对未孕母羊采取复配措施,不仅有利于减少空胎率和空胎时间、提高母羊的繁殖效率,也有助于进行分群饲养管理,降低饲养成本。

目前,B超检测法是母羊妊娠诊断最常用的方法^[2-3]。但此法有一定缺陷:(1)一般配种后45~60 d才能探测出比较准确的结果,无法实现早期妊娠诊断;(2)需要专业的仪器操作人员,无法在基层推广应用;(3)效率低,孕检时需要组织3~4个劳动力固定羊,耗时费力。由于B超妊娠诊断法不易在基层推广应用,造成基层羊场在配种后基本不实施孕检,致使母羊空怀时间延长,繁殖率降低,增加了非繁殖期饲养管理时间及饲养成本。因此,急需开发一种与规模化、产业化养殖技术相匹配的早孕快速检测技术,以满足母羊早期孕检需要,促进人工输精、胚胎移植等繁殖技术的协同发展,提高母羊繁殖效率。

妊娠相关糖蛋白(Pregnancy-associated glycoproteins, PAGs)是偶蹄动物胎盘滋养层细胞合成和分泌的一类糖蛋白,属于天冬氨酸蛋白酶家族^[4]。迄今,研究者们已用RT-PCR技术从绵羊胎盘组织中筛选出11个绵羊PAG(ovPAG)cDNA转录本^[5-7]。ovPAG在绵羊整个妊娠期的表达和分泌呈现时空特异性,例如ovPAG1、ovPAG5、ovPAG7、ovPAG10、ovPAG11在妊娠16~17 d开始表达,而ovPAG3、

ovPAG6、ovPAG8、ovPAG9则在妊娠中后期表达^[7-8]。PAG对维持妊娠发挥了一定作用,绵羊从妊娠后第3周直到产羔时在母体外周血中均可检测到ovPAG,其浓度在妊娠第60 d达到第1个高峰,随后持续下降,在妊娠90 d再次升高直到分娩^[9]。所以ovPAG可作为生物标志物用于母羊早期妊娠诊断^[10-11]。但国内关于ovPAG的研究报道较少,也无针对ovPAG的商业化检测试剂盒,虽然有使用牛PAG-酶联免疫吸附剂测定(ELISA)检测ovPAG的报道^[10,12-13],但检测结果存在分歧,且牛PAG-ELISA试剂盒售价过高,限制了其在国内大规模推广应用。

基于此,本研究以前期筛选的ovPAG7核酸适配体作为分子识别探针,代替抗体建立一种间接竞争酶联适配体(Indirect competitive enzyme-linked aptamer assay, ic-ELAA)检测血清中ovPAG7的分析方法,旨在实现绵羊配种后约4周即可进行早期妊娠诊断,降低检测成本,满足基层牧场养殖生产需要。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

ovPAG7、bPAG9、bPAG4重组蛋白质由本团队前期通过真核表达系统制备^[13-14]。牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)、TMB(3,3',5,5'-四甲基联苯胺)显色试剂盒、链霉亲和素-辣根过氧化物酶(SA-HRP, 500 U/ml)、Tween-20、胎牛血清、96-well酶标板等购自生工生物工程(上海)股份有限公司,孕酮(P4)购自北京世纪奥科生物技术有限公司,NaCl、KCl、 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 CaCl_2 、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 等常规分析纯试剂购自国药集团化学试剂有限公司(上海),PAG-ELISA试剂盒购自北京爱德士元亨生物科技有限公司。

ovPAG7 适配体由本团队前期筛选获得^[15],由生工生物工程(上海)股份有限公司合成和纯化。生物素化适配体(bio-apt)序列为5'-TTGAAGTGA-CATCATCATTCAGCGTAGGGTTTGGCACTGGGCC-TGGCATAGCAGGT-biotin-3'。

1.2 仪器与设备

Thermo Scientific™ Varioskan Flash 全波长扫描式多功能读数仪(美国赛默飞世尔科技公司),Tringa Linear Vet 便携式兽用B超仪(意大利百胜集团荷兰公司),5MX 96孔板混匀仪(美国赛洛捷克公司),SK-1快速混匀器(江苏正基仪器有限公司),

424R台式冷冻离心机(德国艾本德股份公司),Milli-Q Reference超纯水系统。

1.3 方法

1.3.1 间接竞争酶联适配体检测 ovPAG7 间接竞争酶联适配体检测 ovPAG7 的原理如图1所示,包被于酶标板上的固相 ovPAG7 与样品中 ovPAG7 竞争结合生物素化适配体,通过生物素-链霉亲和素作用,与加入的 SA-HRP 特异性结合。HRP 催化 TMB 显色,样品中 ovPAG7 浓度与反应溶液颜色深度、吸光度成反比,通过显色反应和测定 450 nm 处的吸光度实现对靶标的定性或定量检测。

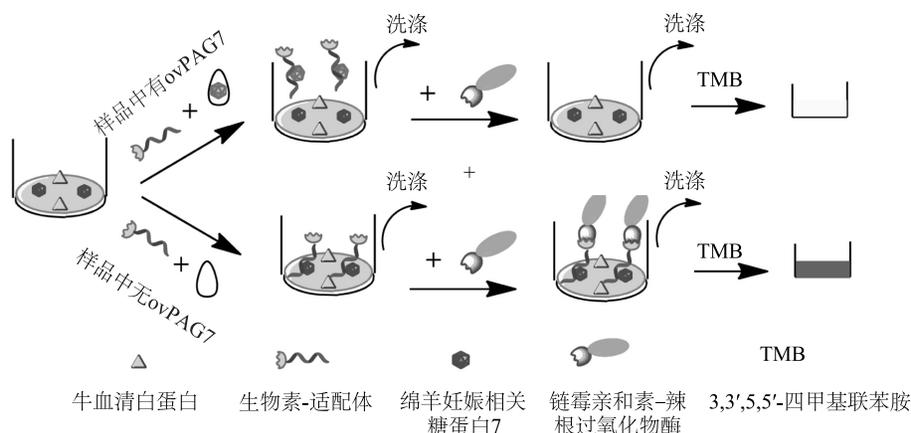


图1 间接竞争酶联适配体(ic-ELAA)检测 ovPAG7 原理

Fig.1 Schematic representation of indirect competitive enzyme-linked aptamer assay (ic-ELAA) for the detection of ovPAG7

具体操作参考本团队前期研究结果^[16]和相关文献中的方法^[17]并稍作修改:将 ovPAG7 用合适的包被液稀释至一定浓度,每孔加入 200 μ l ovPAG7 溶液,4 $^{\circ}$ C 包被过夜,用 200 μ l PBST 缓冲液(10 mmol/L PBS, pH 7.4, 0.05% Tween-20)洗涤3~5次,拍干。加入 200 μ l 一定浓度的 BSA 封闭液,室温封闭若干小时,用 PBST 洗涤、拍干。加入 100 μ l ovPAG7 或待测样品以及 100 μ l 生物素化适配体,室温孵育,用 PBST 洗涤、拍干。加入 200 μ l SA-HRP 溶液,室温孵育 10 min,用 PBST 洗涤、拍干。加入 100 μ l TMB 底物显色液,反应 10 min。加入 100 μ l 终止液终止反应,采用全波长扫描式多功能读数仪测定 450 nm 处的吸光度。

1.3.2 检测条件优化 采用方阵滴定法确定 ovPAG7 包被浓度(0.5~8.0 μ g/ml)和生物素适配体浓度(5~60 nmol/L)。采用单因素试验优化包被溶液[10 mmol/L PBS, pH 7.4; 50 mmol/L 碳酸盐缓冲液(CB), pH 9.6; 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0]、BSA 封

闭液含量(0.1%~2.0%)和封闭时间(1~8 h)、SA-HRP 稀释比例(1:10 000~1:100 000, v/v)、竞争结合时间(10~120 min)。反应体系选用 ovPAG7 适配体筛选缓冲液(BB): 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.15 g Na₂HPO₄, 0.2 g KH₂PO₄, 0.1 g CaCl₂, 0.1 g MgCl₂·6H₂O, pH 7.4。每个试验重复 3 次。除包被温度条件为-4 $^{\circ}$ C 外,其余试验均在室温下操作。

1.3.3 检测性能评价 竞争抑制曲线:在优化条件下,分别用 BB 缓冲液和阴性血清将 ovPAG7 稀释成 0 ng/ml、0.01 ng/ml、0.05 ng/ml、0.10 ng/ml、0.50 ng/ml、1.00 ng/ml、5.00 ng/ml、10.00 ng/ml、50.00 ng/ml、100.00 ng/ml、500.00 ng/ml、1 000.00 ng/ml 的工作标准溶液,同时设置空白对照,采用方法 1.3.1 进行检测,每个试验重复 5 次。以 ovPAG7 各质量浓度的对数值为横坐标,各质量浓度对应的 A_i(各质量浓度 ovPAG7 对应的 450 nm 下的吸光度)/A₀(ovPAG7 质量浓度为 0 时 450 nm 处的吸光度)为纵

坐标,绘制竞争抑制曲线,求线性方程、相关系数和线性范围,根据公式(1)计算抑制率和半数抑制质量浓度(IC_{50} ,即 $A_i/A_0 = 50\%$ 时所对应的 ovPAG7 质量浓度)。

$$\frac{A_i}{A_0} = a + b \lg \rho_{\text{ovPAG7}} \quad (1)$$

其中, A_i 为不同质量浓度 ovPAG7 对应的 450 nm 处的吸光度, A_0 为 ovPAG7 质量浓度为 0 时测定的 450 nm 处的吸光度, b 为斜率, a 为截距, ρ_{ovPAG7} 为 ovPAG7 的质量浓度。

检测限:参考国家标准(GB/T 33411-2016)中的方法^[18],取 10 份空白样品(无 ovPAG7 的 BB 缓冲液和阴性血清体系),按照方法 1.3.1 步骤进行测定,求出吸光度的平均值(\bar{x}_0)和标准偏差(s),计算 $\bar{x}_0 - 2s$ (竞争抑制法),以此数值在标准曲线上算出对应的 ovPAG7 质量浓度,即为检测限(Limit of detection, LOD)。

特异性:参照方法 1.3.1 分别测定 ovPAG7、bPAG9、bPAG4、BSA、孕酮(P4)的抑制曲线,计算 IC_{50} 和交叉反应率(CR), $CR = IC_{50}(\text{ovPAG7})/IC_{50}(\text{各抑制物}) \times 100\%$ ^[19],以评估该方法的特异性。

加标回收率:采用空白加标回收试验考察 ic-ELAA 的准确性与精密度。取阴性血清,在线性范围内分别添加低、中、高 3 种质量浓度水平的 ovPAG7,使 ovPAG7 终质量浓度分别为 1 ng/ml、5 ng/ml、20 ng/ml。按照方法 1.3.1 检测,通过标准抑制曲线计算样品中 ovPAG7 浓度,并计算加标回收率和相对标准偏差(RSD)。每个添加水平设 5 个重复。

1.3.4 ic-ELAA 在绵羊早孕诊断中的应用 样品采集及检测:选择人工授精(Artificial insemination, AI)后 28 d 的中国美利奴母羊 80 只,颈静脉无菌采集血液 3~5 ml,室温下放置约 1~2 h,血清自动析出后收集血清。以 ovPAG7(5 ng/ml)溶液为阳性对照,用 BB 缓冲液作为空白对照,以胎羊血清作为阴性对照,采用方法 1.3.1 的步骤进行检测。血清样品同时采用牛 PAG-ELISA 商业化试剂盒进行检测。

超声波检测:在 AI 后 60 d 以超声波检测作为金标方法确诊羊的怀孕状态。

结果判断:检测结果采用临界值(Cut-off, CO)判定为阳性或阴性。有研究者发现^[20-21],未孕母羊的 PAG 质量浓度常小于 1 ng/ml,所以 PAG 的临界值常定为 1 ng/ml, $cut-off \geq 1 \text{ ng/ml}$ 为阳性, $cut-off < 1 \text{ ng/ml}$ 为阴性。检测结果若与超声波检测结果不

一致,则以超声波检测结果为准。最后统计阳性、假阳性、阴性和假阴性结果,根据行业标准(SN/T 2435-2010《出入境动物检疫诊断试剂盒质量评价规程》)评价诊断敏感性、诊断特异性^[22]。

1.3.5 数据处理与统计分析 试验数据用平均值±标准偏差方式表示,采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)方法分析试验数据,显著性水准为 $\alpha = 0.05$ 。用 Kappa 值分析本方法及 PAG-ELISA 试剂盒与 B 超检测结果的一致性。Kappa 值为 0.4~0.5,表明一致性一般;Kappa 值为 0.5~0.6,表明一致性较好;Kappa 值大于 0.6,表明一致性很高;Kappa 值为 1,表示完全一致^[23]。

2 结果与分析

2.1 间接竞争酶联适配体检测条件的优化

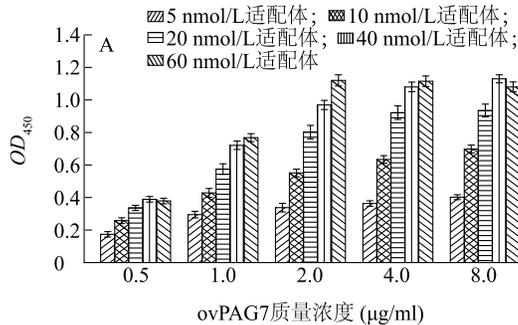
2.1.1 包被条件优化 采用方阵滴定法确定最佳 ovPAG7 包被质量浓度及适配体工作浓度,在包被缓冲液为 50 mmol/L CB(pH 9.6)、用 1% BSA 封闭 4 h、SA-HRP 稀释比例为 1:20 000(体积比)、ovPAG7 与适配体反应时间为 60 min 等试验条件下测定 OD_{450} ,以 OD_{450} 为 1.0 左右时对应的 ovPAG7 包被质量浓度和适配体浓度为最佳工作条件^[24]。结果如图 2A 所示,当 ovPAG7 质量浓度为 2.0 $\mu\text{g/ml}$ 、适配体浓度为 40 nmol/L 时,吸光度接近 1.0。为获得较高的抑制率和灵敏度,选择 ovPAG7 包被质量浓度为 2.0 $\mu\text{g/ml}$ 、适配体浓度为 40 nmol/L。

在固定试验条件下(ovPAG7 包被质量浓度为 2.0 $\mu\text{g/ml}$ 、适配体浓度为 40 nmol/L、1% BSA 封闭 4 h、SA-HRP 稀释体积比为 1:20 000、室温结合时间为 60 min),考察不同包被溶液对 ovPAG7 的包被效果,选择吸光度较大的包被缓冲液。结果如图 2B 所示,CB 包被缓冲液试验组吸光度显著高于 Tris-HCl 和 PBS 试验组($P < 0.05$),故选择 50 mmol/L CB 作为包被缓冲液。

2.1.2 封闭条件优化 以最佳包被条件包被 ovPAG7,采用 BSA 封闭后直接加入 SA-HRP(1:20 000,体积比),观察 BSA 封闭液含量和封闭时间对 SA-HRP 非特异性吸附的影响。吸光度越小,表明 SA-HRP 非特异性吸附越少,封闭效果越好。结果(图 3)显示,当 BSA 封闭液含量低于 0.5% 时,封闭不完全,随着 BSA 液含量的增加,吸光度逐渐下降,说明 SA-HRP 非特异性吸附效果降低。另外,非特异性吸附效果随着封闭时间的延长而降低,当封

闭时间超过 2 h 后,吸光度无明显变化。综合以上

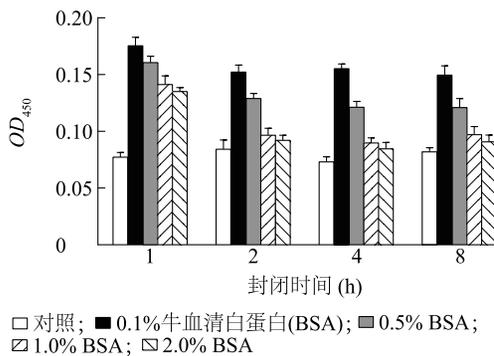
分析,选择 1.0% BSA 封闭 2 h。



不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图2 间接竞争酶联适配体检测的包被条件的优化

Fig.2 Optimization of the coating condition of indirect competitive enzyme-linked aptamer assay (ic-ELAA) for the detection



□ 对照; ■ 0.1%牛血清白蛋白(BSA); ▒ 0.5% BSA;
▨ 1.0% BSA; ▩ 2.0% BSA

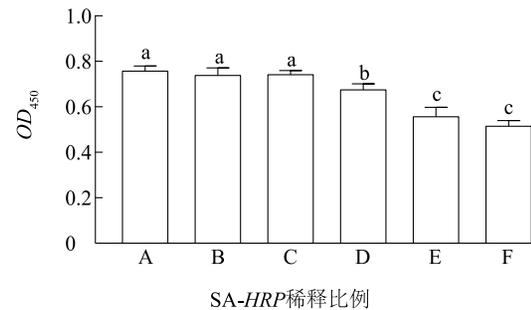
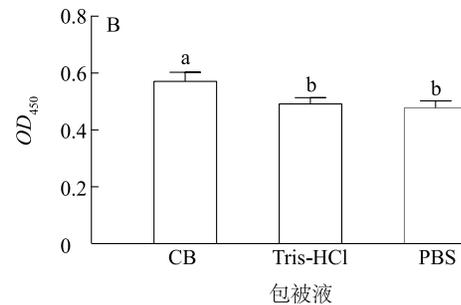
图3 不同封闭条件对链霉亲和素-辣根过氧化物酶 (SA-HRP) 非特异性吸附的影响

Fig.3 Influence of different blocking conditions on non-specific adsorption of streptavidin-horseradish peroxidase (SA-HRP)

2.1.3 SA-HRP 稀释比例 固定以上优化的试验条件,将 SA-HRP 用 BB 缓冲液以 1 : 10 000、1 : 20 000、1 : 40 000、1 : 60 000、1 : 80 000 和 1 : 100 000 体积比稀释,测定 OD_{450} 。结果如图 4 所示,SA-HRP 稀释比例为 1 : 10 000~1 : 40 000 时,吸光度变化不显著 ($P > 0.05$),随着稀释比例的进一步增大,吸光度显著降低 ($P < 0.05$)。故后续试验选择 SA-HRP 稀释比例为 1 : 40 000。

2.1.4 竞争反应时间 固定以上试验条件,采用 ic-ELAA 测定固相-ovPAG7 和样品中 ovPAG7 (50 ng/ml) 与适配体竞争反应时间对抑制率的影响。结果(图 5)显示,抑制率随着竞争结合时间的延长而增大,超过 40 min 后抑制率无明显变化 ($P > 0.05$)。故选择竞争结合时间为 40 min。

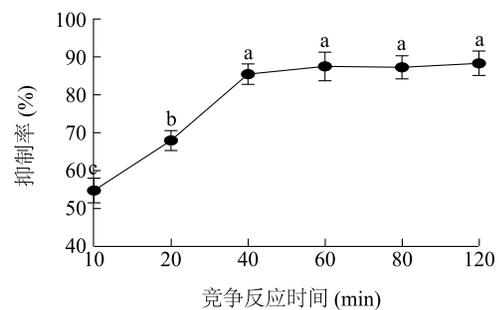
综上所述,ic-ELAA 的最佳工作条件为:



A: 1 : 10 000; B: 1 : 20 000; C: 1 : 40 000; D: 1 : 60 000; E: 1 : 80 000; F: 1 : 100 000。相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$),不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图4 链霉亲和素-辣根过氧化物酶 (SA-HRP) 稀释比例条件的优化

Fig.4 Optimization of the dilution ratio of streptavidin-horseradish peroxidase (SA-HRP)



不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

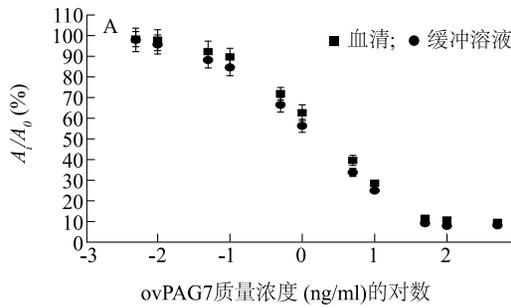
图5 竞争反应时间对抑制率的影响

Fig.5 Effect of competitive reaction time on inhibition rate

ovOAG7 包被质量浓度 2.0 $\mu\text{g/ml}$, 适配体浓度为 40 nmol/L, 包被缓冲液为 50 mmol/L CB 缓冲液 (pH 9.6), 1.0% BSA 封闭 2 h, SA-HRP 稀释比例为 1 : 40 000 (体积比), 竞争反应时间为 40 min。

2.2 ELAA 方法学评估

2.2.1 竞争抑制曲线 在优化条件下,将系列浓度的 ovPAG7 分别在 BB 缓冲液和阴性血清样品体系中竞争反应。图 6 为 ovPAG7 在 2 种反应体系中的竞争抑制曲线,通过回归方程计算可知,在缓冲体系和血清体系中,ovPAG7 在 0.1~50.0 ng/ml 质量浓度范

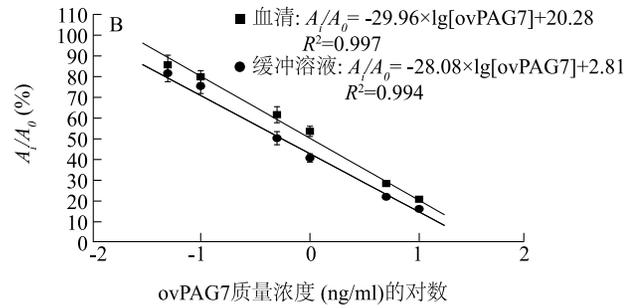


A_i 为各竞争浓度 ovPAG7 对应的吸光度, A_0 为 ovPAG7 浓度为 0 时测定的吸光度。

图 6 ovPAG7 在阴性血清和缓冲溶液中的竞争抑制曲线 (A) 及标准曲线 (B)

Fig.6 Competitive inhibition curves (A) and calibration curves (B) for ovPAG7 in negative serum and buffer

围内具有良好线性 ($R^2 > 0.994$), IC_{50} 分别为 1.40 ng/ml 和 2.11 ng/ml, 检测限分别为 0.11 ng/ml 和 0.19 ng/ml。结果表明,本方法检测限低、线性范围宽。血清基质中的 IC_{50} 和检测限稍高于缓冲液体系,原因可能是血清基质对 ic-ELAA 检测有一定影响。



2.2.2 ic-ELAA 的特异性 为评估 ic-ELAA 的特异性,选择血清中的相关激素、蛋白质及结构类似物为抑制物,采用方法 1.3.1 中的步骤测定各抑制物的抑制曲线,计算 IC_{50} 和交叉反应率。结果见图 7,可见适配体与 BSA 和 P4 基本无交叉反应,与牛妊娠相关糖蛋白 (bPAG9 和 bPAG4) 具有一定交叉反应,交叉反应率分别为 22.0% 和 19.4%,这可能与牛羊 PAG 氨基酸序列同源性较高、蛋白质含有一些相似的抗原表位有关^[4]。

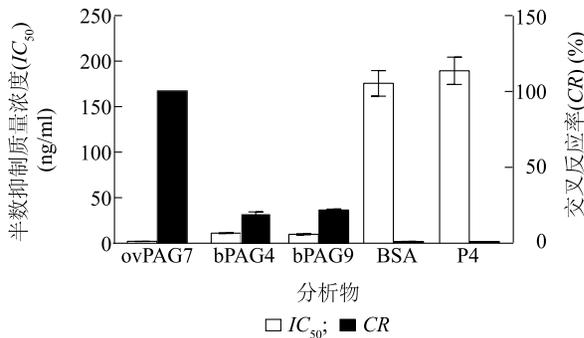


图 7 ic-ELAA 特异性分析

Fig.7 Specificity analysis of indirect competitive enzyme-linked aptamer assay (ic-ELAA)

2.2.3 ic-ELAA 的加标回收率 采用建立的 ic-ELAA 对阴性血清进行添加回收试验,进一步评价该方法的准确性和精密度。如表 1 所示,ovPAG7 添

加回收率为 96.4%~106.8%, 相对标准偏差 (RSD) 为 4.02%~5.28%, 说明本方法具有高的准确性和精密度。

表 1 血清中 ovPAG7 加标回收率及相对标准偏差 (n=5)

Table 1 Recovery rates and relative standard deviations of ovPAG7 in the serum by the developed method (n=5)

添加量 (ng/ml)	检测值 (ng/ml)	回收率 (%)	相对标准偏差 (%)
1	0.964±0.038 8	96.4±3.88	4.02
5	5.341±0.282 0	106.8±5.64	5.28
20	20.830±0.968 0	104.2±4.84	4.65

2.3 ic-ELAA 的在绵羊早孕检测中的应用

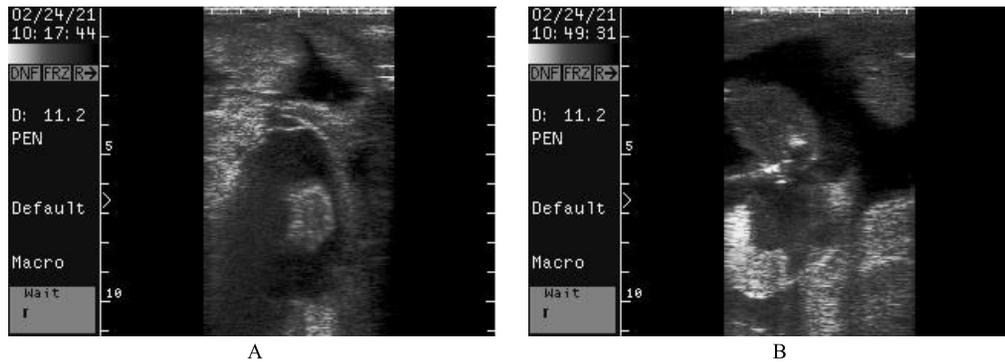
为验证 ic-ELAA 的实际应用效果,采集 80 份母羊血清,按照方法 1.3.1 进行检测后按照方法 1.3.4 进行结果判定,并与 B 超检测结果比较,结果如表 2 和图 8 所示。从表 2 中可以看出,本方法共检测出 53 只妊娠绵羊 (阳性), 27 只空怀绵羊 (阴性), 出现 5 个假阳性, 2 个假阴性, 诊断敏感性为 96.0%, 诊断特异性为 83.3%, 诊断准确率为 91.2%, 与商品化试剂盒的诊断准确率结果相比差异不显著 ($P > 0.05$)。实际应用结果表明,本方法与 B 超诊断结果符合率较高, Kappa 值为 0.810, 大于 0.6, 表明具有较高的一致性。

表2 ic-ELAA与PAG-ELISA试剂盒和B超检测绵羊妊娠结果比较

Table 2 Comparison of indirect competitive enzyme-linked aptamer assay (ic-ELAA), pregnancy associated glycoproteins-enzyme linked immunosorbent assay (PAG-ELISA) test kit and B-scan ultrasonography for early pregnancy diagnosis in sheep

方法	妊娠羊数量(只)	未妊娠羊数量(只)	假阳性数量(只)	假阴性数量(只)	敏感性(%)	特异性(%)	准确率(%)	Kappa值
本方法	53	27	5	2	96.0a(48/50)	83.3a(25/30)	91.2a(73/80)	0.810
PAG-ELISA	52	28	4	2	96.0a(48/50)	86.7a(26/30)	92.5a(74/80)	0.837
B超	50	30	-	-	-	-	-	-

敏感性=真阳性/(真阳性+假阴性) \times 100%,特异性=真阴性/(真阴性+假阳性) \times 100%,准确率=(真阳性+真阴性)/样品总数 \times 100%。同列相同字母表示差异不显著($P>0.05$)。



A:绵羊1;B:绵羊2。

图8 人工授精后60d的2只妊娠绵羊B超检查结果

Fig.8 Images of two pregnant ewes by B-scan ultrasonography inspection at 60 days after artificial insemination

3 讨论

在ic-ELAA分析方法的建立中,优化反应条件对提高其检测性能至关重要。如果ovPAG7包被浓度过小,可能会导致高非特异性吸附;如果包被浓度过大,则导致蛋白质与基板材料的结合较弱,在洗板过程中易被洗掉,浓度过高还有可能影响检测灵敏度^[17,24]。另外,酶标板上多余位点的封闭也较为关键,若封闭不完全,SA-HRP和生物素化的适配体均会与聚苯乙烯板发生非特异性结合,造成较高的背景值,降低检测灵敏度^[25]。除此以外,选择合适的包被缓冲液可提高包被原的包被效果^[16-17,24],一般来说,缓冲液pH大于包被蛋白质的等位点(pI),以保持其活性。在ic-ELAA分析中,SA-HRP是ic-ELAA显色反应的关键因素,如果SA-HRP浓度过低,显色反应不充分;SA-HRP浓度过高易引起非特异性吸附。因此,本试验对多种检测条件进行优化,在优化条件下,建立的ic-ELAA获得了低的检测限和高的准确性。

目前,ovPAG测定方法包括放射免疫分析法(Radioimmunoassay,RIA)和酶联免疫吸附测定法(En-

zyme linked immunosorbent assay, ELISA)^[10-11,26-29]。在早期,人们大都采用异源RIA测定母羊血液中ovPAGs浓度^[11,20,30]。如Karen等^[20]采用异源RIA检测母羊配种后22d外周血中ovPAG浓度,妊娠诊断敏感性和特异性分别达到93.5%和100.0%。但ovPAG浓度与品种、妊娠天数、胎次、样品来源等有一定关系^[9,11,30],因此诊断准确性受多种因素影响。Barbato等^[30]采用异源RIA检测母羊配种后18d、24d、26d、28d、30d和50d的血液样品,发现怀双胞胎的妊娠母羊PAG水平高于怀单胎的妊娠母羊,个体差异较大。除了血液样品,RIA也用于乳样检测,但是乳样的妊娠确诊天数(28d)多于血浆样品(20d);另外,与血浆样品不同,乳样中PAG浓度与多胎或单胎无明确相关性^[11]。

RIA虽然具有较高的诊断灵敏度和特异性,但由于受到辐射因素的限制,RIA没有得到大规模推广应用。鉴于PAG蛋白含有一些相似的抗原表位,可用于跨种免疫检测^[31]。人们尝试使用牛PAG-ELISA试剂盒检测ovPAG,以对绵羊进行早期妊娠诊断^[12-13]。如Rovanil等^[32]使用商业化牛PAG-ELISA试剂盒(IDEXX)检测绵羊血清中PAG,与超

声波检测法相比较,PAG-ELISA 诊断敏感性和特异性分别为 93.5%和 98.9%,不同于 RIA 方法,该试剂盒则需在妊娠 33 d 后才能获得高的诊断准确率(96.1%),结果的差异可能与两种检测方法所测 PAG 不同亚型有关。Chaves 等^[12]同样采用 PAG-ELISA 商业化试剂盒(IDEXX)检测妊娠和空怀绵羊血清,获得高敏感性(100%)、高特异性(93.75%~97.56%)和高准确率(98.46%)。但 Shahin 等^[10]却获得不一致的研究结果,他们分别采用山羊 PAG-ELISA、绵羊 PAG-ELISA 和牛 PA-ELISA 检测妊娠山羊血清中 PAG,结果显示,山羊和绵羊 PAG-ELISA 的检测结果相似,而牛 PAG-ELISA 的检测敏感性却显著降低。

本研究用建立的 ic-ELAA 方法检测配种后 28 d 的绵羊血清,获得的检测结果与 PAG-ELISA 方法基本一致。本方法的妊娠诊断结果出现假阴性现象,可能与个体差异有关。有人研究发现,在母羊妊娠早期,PAG 平均质量浓度为(4.3±1.4) ng/ml,个别妊娠母羊的 PAG 质量浓度低于临界值(1 ng/ml),导致了假阴性结果^[20]。也可能由于部分样品发生了溶血,释放的血红蛋白具有过氧化物酶活性,导致非特异性显色,造成假阴性现象^[33]。诊断结果中出现假阳性现象,推测与适配体特异性有关,由于血清基质较为复杂,适配体可能结合了血清中某种类似靶标的未知物,产生了抑制效应,造成假阳性结果。在本研究中,PAG-ELISA 诊断特异性和准确率低于部分研究结果^[12-13],也可能与部分样品溶血有关,导致了假阳性现象,具体原因有待进一步研究。

4 结论

本研究以 ovPAG7 适配体为识别分子,代替抗体建立了一种间接竞争 ELAA 分析方法,在优化条件下,该方法具有低的检测限(0.11 ng/ml)、高的准确性(加标回收率 96.4%~106.8%)和精密度($RSD < 6.0\%$)。将建立的 ovPAG7-ELAA 检测方法应用于血清学检测,绵羊妊娠诊断准确率达到 91.2%,与 PAG-ELISA 试剂盒和超声波检测技术比较,具有简便、经济等优点,为绵羊早期妊娠诊断提供了一种无创快速检测新技术,具有一定应用前景。

参考文献:

[1] 中国畜牧兽医年鉴编辑委员会.中国畜牧兽医年鉴[M].北

京:中国农业出版社,2018.

- [2] JONES A K, GATELY R E, MCFADDEN K K, et al. Transabdominalultrasound for detection of pregnancy, fetal and placental landmarks, and fetal age before day 45 of gestation in the sheep [J]. *Theriogenology*, 2016, 85: 939-945.
- [3] 陈童,罗永明,董红,等. B超在母羊早期妊娠和繁殖疾病诊断中的应用[J]. *黑龙江动物繁殖*, 2021, 29(1): 43-46.
- [4] XIE S, LOW R C, NAGEL R J, et al. Identification of the major pregnancy-specific antigens of cattleand sheep asinactive members of the aspartic proteinase family [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 10247-10251.
- [5] XIE S, GREEN J, BIXBY J B, et al. The diversity and evolutionary relationships of the pregnancy-associated glycoproteins, an aspartic proteinase subfamily consisting of many trophoblast-expressed genes [J]. *Proc Nati Acad Sci USA*, 1997, 94: 12809-12816.
- [6] EL AMIRI B, REMY B, DE SOUSA N M, et al. Isolation and characterization of eight pregnancy-associated glycoproteins present at high levels in the ovine placenta between day 60 and day 100 of gestation [J]. *Reprod Nutr Dev*, 2004, 44: 169-181.
- [7] GARBAYO J M, SERRANO B, LOPEZ-GATIUS F. Identification of novel pregnancy associated glycoproteins (PAG) expressed by the peri-implantation conceptus of domestic ruminants [J]. *Anim Reprod Sci*, 2008, 103: 120-134.
- [8] GREEN J A, XIE S, QUAN X, et al. Pregnancy-associated bovine and ovine glycoproteins exhibit spatially and temporally distinct expression patterns during pregnancy [J]. *Biolo Reprod*, 2000, 62: 1624-1631.
- [9] RANILLA M J, SULON J, CARRO M D, et al. Plasmatic profiles of pregnancy-associated glycoprotein and progesterone levels during gestation in Churra and Merino sheep [J]. *Theriogenology*, 1994, 42: 537-545.
- [10] SHAHIN M, FRIEDRICH M, GAULY M, et al. Pregnancy-associated glycoprotein (PAG) pattern and pregnancy detection in Boer goats using an ELISA with different antisera [J]. *Small Ruminant Res*, 2013, 113: 141-144.
- [11] EL AMIRI B, COGNIÉ Y, SULON J, et al. Pregnancy-associated glycoprotein concentrations inplasma and milk samples for early pregnancy diagnosis in Lacaune dairy sheep [J]. *Res Vet Sci*, 2015, 99: 30-36.
- [12] CHAVES C M S, COSTA R L D, DUARTE K M R, et al. Visual ELISA for detection of pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) in ewe serum [J]. *Theriogenology*, 2017, 97: 78-82.
- [13] 刘长彬,石国庆,卢春霞. 牛妊娠相关糖蛋白 9 (bPAG9) 的真核表达及纯化 [J]. *新疆农业科学*, 2019, 56(8): 1552-1559.
- [14] LIU C B, LU C X, SHI G Q. Selection, identification and application of DNA aptamers againstbovine pregnancy-associated glycoproteins 4 [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2020, 412: 4235-4243.
- [15] LU C X, LIU C B, ZHOU Q, et al. Selecting specific aptamers that bind to ovine pregnancy-associated glycoprotein 7 using real

- serum sample assisted FluMag-SELEX to develop magnetic microparticle-based colorimetric aptasensor[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2022, 1191: 339291.
- [16] 唐宗贵,刘长彬,罗小玲,等. 间接竞争酶联适配体检测食品中土霉素[J]. *分析测试学报*, 2015, 34(5): 458-462.
- [17] 王 赛,魏 潇,刘佳惠,等. 降低酶联核酸适配体分析方法中非特异性吸附的分析研究[J]. *北京化工大学学报*, 2017, 44(2): 36-41.
- [18] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 酶联免疫分析试剂盒通则: GB/T 33411-2016 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [19] JEON M, PAENG I R. Quantitative detection of tetracycline residues in honey by a simple sensitive immunoassay[J]. *Anal Chimica Acta*, 2008, 626: 180-185.
- [20] KAREN A, BECKERS J F, SULON J, et al. Early pregnancy diagnosis in sheep by progesterone and pregnancy-associated glycoprotein tests[J]. *Theriogenology*, 2003, 59: 1941-1948.
- [21] GONZALEZ F, SULON J, GARBAYO J M, et al. Early pregnancy diagnosis in goats by determination of pregnancy-associated glycoprotein concentrations in plasma samples[J]. *Theriogenology*, 1999, 52:717-725.
- [22] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 出入境动物检疫诊断试剂盒质量评价规程: SN/T 2435-2010 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [23] MARTIN S W, MEEK A, WILLEBERG P. Measurement of disease frequency and production[M]. 1st ed. Ames: Iowa State Univ Press, 1987.
- [24] WANG S, YONG W, LIU J H, et al. Development of an indirect competitive assay-based aptasensor for highly sensitive detection of tetracycline residue in honey[J]. *Biosens Bioelectron*, 2014, 57: 192-198.
- [25] ZHANG D W, SUN C J, ZHANG F T, et al. An electrochemical aptasensor based on enzyme linked aptamer assay[J]. *Biosens Bioelectron*, 2012, 31: 363-368.
- [26] 吕丽兰,张 娅,邹承武,等. 基于特异性对硫磷单克隆抗体的间接竞争酶联免疫吸附分析方法建立[J]. *南方农业学报*, 2020, 51(5): 1193-1200.
- [27] 崔 银,李 明,杜道林. 邻苯二甲酸酯类化合物免疫检测技术研究进展[J]. *江苏农业科学*, 2020, 48(4): 33-40.
- [28] 黄 陈,于生兰,徐加兵,等. 黄芪甲苷免疫亲和色谱介质的制备及应用[J]. *江苏农业科学*, 2020, 48(3): 218-221.
- [29] 江地科,尹清清,项明源,等. 检测猪瘟病毒胶体金和量子点试纸条的初步研制[J]. *江苏农业学报*, 2020, 36(1): 116-121.
- [30] BARBATO O, SOUSA N M, DEBENEDETTI A, et al. Validation of a new pregnancy-associated glycoprotein radioimmunoassay method for the detection of early pregnancy in ewes[J]. *Theriogenology*, 2009, 72(7): 993-1000.
- [31] SZAFRANSKA B, PANASIEWICZ G, MAJEWSKA M. Biodiversity of multiple pregnancy-associated glycoprotein (PAG) family: gene cloning and chorionic protein purification in domestic and wild eutherians (Placentalia)-a review[J]. *Reprod Nutr Dev*, 2006, 46: 481-502.
- [32] ROVANIL M T, CEZAR A S, RIGO M L, et al. Evaluation of a bovine pregnancy-associated glycoprotein enzyme-linked immunosorbent assay kit for serological diagnosis of pregnancy in sheep[J]. *Ciencia Rural*, 2016, 46: 362-367.
- [33] 王菲菲. 溶血对 ELISA 与化学发光免疫检测 HIV 抗体的影响[J]. *医药论坛杂志*, 2019, 40(9): 98-100.

(责任编辑:张震林)