

杨利, 张浩明, 乔绪稳, 等. 基于双特异纳米抗体 FMDV 血凝检测方法的建立[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(3): 514-521.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2024.03.014

基于双特异纳米抗体 FMDV 血凝检测方法的建立

杨利^{1,2}, 张浩明^{1,2}, 乔绪稳^{1,2}, 陈瑾^{1,2}, 郑其升^{1,2}, 程海卫^{1,2}

(1.江苏省农业科学院动物免疫工程研究所/国家兽用生物制品工程技术研究中心/江苏省食品质量与安全重点实验室, 江苏南京 210014; 2.兽用生物制品<泰州>国泰技术创新中心, 江苏泰州 225300)

摘要: 本研究利用基因工程方法将抗口蹄疫病毒(FMDV)纳米抗体 Nb205 和抗鸡醛化红细胞(cRBC)纳米抗体 NbRBC48 的基因片段连接, 构建双特异纳米抗体 Nb205-48, 其相对分子质量为 3.5×10^4 , 能同时与 FMDV 和 cRBC 反应。利用 Nb205-48 成功建立了可用于 FMDV 抗原检测的血凝方法, 该方法检测灵敏度为 $1 \mu\text{g/ml}$, 与其他病毒无交叉反应, 且批内和批间重复性好。分别采用血凝法和夹心 ELISA 方法对 3 批次 FMDV 抗原进行了检测, 二者检测结果基本吻合。本研究建立了基于双特异纳米抗体 Nb205-48 的血凝检测方法, 该方法具有较好的灵敏度、特异性和重复性, 且简便、快捷、成本低, 其检测结果与传统的 FMDV 定量检测方法的检测结果相关性好, 为检测口蹄疫疫苗生产过程中 FMDV 抗原的含量提供了新方法。

关键词: 口蹄疫病毒; 双特异性纳米抗体; 血凝检测法

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2024)03-0514-08

Establishment of haemagglutination detection method for quantification of foot and mouth disease virus based on bispecific nanobodies

YANG Li^{1,2}, ZHANG Hao-ming^{1,2}, QIAO Xu-wen^{1,2}, CHEN Jin^{1,2}, ZHENG Qi-sheng^{1,2}, CHENG Hai-wei^{1,2}

(1. Institute of Veterinary Immunology & Engineering, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/National Research Center of Engineering and Technology for Veterinary Biologicals/Jiangsu Key Laboratory for Food Quality and Safety, Nanjing 210014, China; 2. GuoTai (Taizhou) Center of Technology Innovation for Veterinary Biologicals, Taizhou 225300, China)

Abstract: In this study, the gene fragments of the nanobody Nb205 against foot-and-mouth disease virus (FMDV) and the nanobody NbRBC48 against chicken aldehyde red blood cell (cRBC) were connected by genetic engineering method to construct the bispecific nanobody Nb205-48. Its relative molecular weight was 3.5×10^4 , and it could react with FMDV and cRBC simultaneously. A new hemagglutination method for the detection of FMDV antigen was established successfully by using Nb205-48. The detection sensitivity of this method was $1 \mu\text{g/ml}$, and it had no cross-reaction with other viruses. In addition, the intra-batch and inter-batch repeatability was good. Three batches of FMDV antigen were detected by hemagglutination method and sandwich ELISA method, and the results were similar. In this study, a novel hemagglutination method based on

bispecific nanobody Nb205-48 was established. The method had good sensitivity, specificity and repeatability, and was simple, fast and low cost. The detection results were well correlated with the results of traditional FMDV quantitative detection methods. The method constructed in this study provides a new method for detecting the content of FMDV antigen in the production of foot-and-mouth disease vaccine.

Key words: foot and mouth disease virus; bispecific nanobodies; haemagglutination detection method

收稿日期: 2023-05-05

基金项目: “十四五”重点研发专项(2022YFD1800800); 国家自然科学基金项目(32102690); 江苏省农业自主创新基金项目[CX(21)3135]

作者简介: 杨利(1985-), 女, 重庆人, 硕士, 助理研究员, 主要从事食品安全、动物疫病检测及诊断研究。(E-mail) yangli411041@126.com

通讯作者: 程海卫, (E-mail) chw5673@126.com

口蹄疫(Foot-and-mouth disease,FMD)是由口蹄疫病毒(Foot-and-mouth disease virus,FMDV)引起的人畜共患病。该病毒可以通过消化道、呼吸道等途径在 70 多种偶蹄动物(猪、牛、羊等)间快速传播,造成巨大经济损失^[1]。世界动物卫生组织将其列为 A 类传染病之首。

疫苗接种是防控该病最有效的措施,免疫动物抵御 FMDV 的能力与疫苗的质量密切相关。依据《中华人民共和国兽药典》,FMDV 疫苗质量控制的首要指标是疫苗中有效抗原含量。FMDV 疫苗中有效抗原含量测定的方法主要包括双抗体夹心酶联免疫法(Enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)^[2-3]、蔗糖密度梯度离心法(Sucrose density gradient ltracentrifugation,SDG)^[4]以及高效液相色谱法(High-performance liquid chromatography,HPLC)^[5]等。但此类方法操作繁琐、成本较高,且对实验室硬件条件以及操作人员经验均有较高要求,因此不适用于一般实验室。血凝方法因为操作简便、对设备和工作人员要求低等优点被广泛应用于基层实验室^[6-8],由于 FMDV 没有血凝性,无法使用血凝方法进行检测。近年来有文献报道,利用双功能分子或双特异抗体可以实现红细胞的交联和凝集,并成功建立可用于检测人体免疫缺陷病毒 1 型(HIV-1)^[9]、乙肝病毒表面抗原(HBsAg)^[10]和猪圆环病毒(PCV2)^[11]的血凝方法。本研究拟利用抗 FMDV 和抗醛化鸡红细胞(Chicken red blood cells,cRBCs)的纳米抗体构建一种新型双特异纳米抗体(Bispecific nanobody)Nb205-48,建立一种可

用于检测 FMDV 抗原的血凝方法,并对该方法的灵敏度、特异性和重复性进行鉴定,为口蹄疫疫苗生产过程中 FMDV 抗原含量的检测提供新的思路和参考。

1 材料与方法

1.1 材料

灭活 O 型 FMDV 抗原由中国农业科学院兰州兽医研究所提供,3 批次灭活 O 型 FMDV 抗原(FMDV-1、FMDV-2 和 FMDV-3,3 批次独立生产)由内蒙古金宇集团提供,猪圆环病毒 2 型(Porcine circovirus type 2,PCV2)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus,PRRSV)、猪伪狂犬病毒(Pseudorabies virus,PRV)和猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus,PEDV)均由江苏省农业科学院动物免疫工程研究所保存;载体 pET32a 和 pMD18-T、大肠杆菌 DH5α 和 BL21 购自 Novagen 公司;Anti-his 鼠单抗及 HRP 羊抗鼠 IgG(H+L)购自武汉博士德生物工程有限公司;限制性内切酶及 PCR 相关试剂均购自 TaKaRa 公司;HisTrap HP 亲和层析柱购自 Life Science 公司;口蹄疫 O 型抗体液相阻断 ELISA 检测试剂盒购自中国农业科学院兰州兽医研究所。cRBCs 由江苏省农业科学院动物免疫工程研究所制备;抗 FMDV 纳米抗体 Nb205^[12]和抗 cRBCs 纳米抗体 NbRBC48^[11]均由江苏省农业科学院动物免疫工程研究所筛选获得。本研究所涉及到的 PCR 引物见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Sequences of primers

引物名称	引物序列(5'→3')
NbFMDV-l	CATATGGATGATGATGATGATGAG(有下划线的为 <i>Nde</i> I 酶切位点)
NbFMDV-r	GACCCCAGCTCCAAAGCTCCCAAGCTCCCAACGGTCACTTGGGT
NbRBC-l	AGCTTTGGAGCTGGGGTCTTCGCTGTGCTGGACTCTGGGGGAGGC
NbRBC-r	GCGGCCGCTGAGGAGACGGT(有下划线的为 <i>Not</i> I 酶切位点)

1.2 双特异纳米抗体 Nb205-48 表达载体的构建

1.2.1 NbFMDV-linker-NbRBC 基因片段的扩增 通过连接肽将抗 FMDV 纳米抗体的基因片段 Nb205 和抗 cRBCs 纳米抗体的基因片段 NbRBC48 连接,扩增出 NbFMDV-linker-NbRBC 基因片段^[11]。具体操作如下:以 Nb205 基因序列为模板,以 NbFMDV-l

(含酶切位点 *Nde* I)和 NbFMDV-r(含部分连接肽序列)为引物,通过 PCR 扩增出 NbFMDV-linker;以 NbRBC48 基因片段为模板,以 NbRBC-l(含部分连接肽序列)和 NbRBC-r(含酶切位点 *Not* I)为引物,通过 PCR 扩增出 linker-NbRBC。以 NbFMDV-l 和 NbRBC-r 为引物,采用重叠延伸 PCR(Splicing over-

lap extension PCR, SOEPCR) 将 *NbFMDV*-linker 和 linker-*NbRBC* 组装成 *NbFMDV*-linker-*NbRBC*。所有 PCR 产物均采用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 利用 DNA 凝胶回收试剂盒回收目的片段后连接 pMD18-T 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α , 将菌落 PCR 鉴定为阳性的单克隆送至上海生工生物有限公司进行测序分析。将测序正确的扩增片段记为 *NbFMDV*-linker-*NbRBC*。

1.2.2 pET32a-*Nb205-48* 表达载体的构建 采用 *Nde* I 和 *Not* I 对 *NbFMDV*-linker-*NbRBC* 和载体 pET32a 进行双酶切, 酶切产物经琼脂糖凝胶电泳后利用 DNA 凝胶回收试剂盒回收目的片段。将回收的目的片段和载体 pET32a 利用 T4 连接酶连接后转化大肠杆菌 BL21。随机挑选单克隆, 进行菌落 PCR 鉴定和双酶切鉴定, 将鉴定为阳性克隆送上海生工生物有限公司进行测序分析。将测序正确的克隆记为 pET32a-*Nb205-48*。

1.3 *Nb205-48* 的表达与纯化

将 pET32a-*Nb205-48* 转化的大肠杆菌 BL21 接种到含终质量浓度为 100 $\mu\text{g/ml}$ 氨苄西林的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床上培养。待菌液 OD_{600} 为 0.6~0.8 时, 添加终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 16 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床上诱导表达过夜。8 000 g 离心 20 min 收集菌体, PBS (pH 7.2) 重悬菌体后进行高压破碎。将细菌破碎液 12 000 g 离心 20 min, 收集上清液。采用 HisTrap HP 对上清液进行亲和纯化。采用 SDS-PAGE 和 Western Blotting 鉴定表达产物及纯化的 *Nb205-48*。

1.4 间接 ELISA 鉴定 *Nb205-48* 的反应原性

用碳酸盐缓冲液 (CBS) 将新鲜的鸡红细胞稀释至每 1 ml 2×10^5 个, 加到 96 孔酶标板中 37 $^{\circ}\text{C}$ 包被 2 h, 弃上清液后加入 0.5% 戊二醛室温固定 10 min, 弃去固定液后加入含 3% 过氧化氢的甲醇溶液室温 1 h (淬灭内源性过氧化物酶), PBST 洗涤后用 1% 明胶-PBST 封闭酶标板, PBST 洗涤后备用。用 CBS 将 FMDV 稀释至 1 $\mu\text{g/ml}$ 后加到 96 孔酶标板中 37 $^{\circ}\text{C}$ 包被 2 h, PBST 洗涤后用 1% 明胶-PBST 封闭酶标板, PBST 洗涤后备用。用 PBST 将 *Nb205-48* 稀释到 1 $\mu\text{g/ml}$ 后加入到上述制备好的酶标板中, 另用 *Nb205*、*NbRBC48* 和 PBS 分别代替 *Nb205-48* 作为对照, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。PBST 洗涤后向上述酶标板中加入 1:2 000 稀释的 Anti-his 鼠单抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。

PBST 洗涤后向上述酶标板中加入 1:10 000 稀释的 HRP-羊抗鼠 IgG (H+L), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。PBST 洗涤后向上述酶标板中加入 TMB 显色液, 室温显色 10 min。用 2 mol/L 硫酸终止反应后, 酶标仪上读取 450 nm 处吸光值。

1.5 基于 *Nb205-48* 的血凝方法的建立

1.5.1 *Nb205-48* 工作质量浓度的确定 预先在血凝板上每孔加入 25 μl FMDV (10 $\mu\text{g/ml}$) 和 25 μl cRBCs (每 1 ml 2×10^5 个细胞)。用 PBS 将 *Nb205-48* 稀释至 32.00 $\mu\text{g/ml}$ 、16.00 $\mu\text{g/ml}$ 、8.00 $\mu\text{g/ml}$ 、4.00 $\mu\text{g/ml}$ 、2.00 $\mu\text{g/ml}$ 、1.00 $\mu\text{g/ml}$ 、0.50 $\mu\text{g/ml}$ 和 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 。取 25 μl 稀释后的 *Nb205-48* 加入到上述血凝板中, 并用 PBS 代替 *Nb205-48* 作为对照, 轻轻振荡混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min, 观察血凝结果。引起 cRBCs 完全血凝时 *Nb205-48* 的最低质量浓度为 *Nb205-48* 的工作质量浓度。

1.5.2 灵敏度测定 用 PBS 将 FMDV 抗原稀释至 8.00 $\mu\text{g/ml}$ 、4.00 $\mu\text{g/ml}$ 、2.00 $\mu\text{g/ml}$ 、1.00 $\mu\text{g/ml}$ 、0.50 $\mu\text{g/ml}$ 和 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 。取 25 μl 稀释后的 FMDV 加入到血凝板中, 再向每孔中加入 25 μl cRBCs 和 25 μl *Nb205-48*, 用 PBS 代替 FMDV 作为对照, 轻轻振荡混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min, 观察血凝结果。能引起 cRBCs 完全凝集时抗原最低质量浓度为该方法的检测灵敏度。

1.5.3 特异性试验 在血凝板中加入 25 μl FMDV、PCV2、PRRSV、PRV、PEDV 和 PBS, 再向每孔中加入 25 μl cRBCs 和 25 μl *Nb205-48*, 轻轻振荡混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min, 观察血凝结果, 验证该方法的特异性。

1.5.4 批内和批间重复性试验 用 PBS 将 FMDV 抗原稀释至 16.00 $\mu\text{g/ml}$ 、8.00 $\mu\text{g/ml}$ 、4.00 $\mu\text{g/ml}$ 、2.00 $\mu\text{g/ml}$ 、1.00 $\mu\text{g/ml}$ 、0.50 $\mu\text{g/ml}$ 和 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 。用同一批 *Nb205-48* 工作液对每个稀释度的 FMDV 重复检测 3 次, 验证该方法的批内可重复性。用 3 批次 *Nb205-48* 工作液对每个稀释度的 FMDV 重复检测 3 次, 验证该方法的批间可重复性。

1.6 血凝法与夹心 ELISA 方法检测结果的比较

将 3 批次灭活 O 型 FMDV 抗原 (FMDV-1, FMDV-2, FMDV-3) 梯度稀释后分别采用本研究建立的基于 *Nb205-48* 的血凝方法和夹心 ELISA 方法进行检测, 对比分析 2 种方法检测结果的相关性。夹心 ELISA 方法具体操作如下: (1) 将灭活 O 型 FMDV

抗原用 PBS 稀释至 $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ 后,2 倍梯度稀释成 5 个梯度,作为标准品;将样品 FMDV-1,FMDV-2,FMEV-3 抗原 2 倍梯度稀释。(2)取出口蹄疫 O 型抗体液相阻断 ELISA 检测试剂盒中的已包被口蹄疫 O 型兔抗的 ELISA 板,以每孔 $50\text{ }\mu\text{l}$ 向上述板中分别加入梯度稀释后的标准品和样品,以加入 PBS 代替标准品的孔为空白对照; $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温育 60 min 。(3)PBST 洗板 5 次后,以每孔 $50\text{ }\mu\text{l}$ 向 ELISA 板中加入口蹄疫 O 型豚鼠抗体工作液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min 。(4)PBST 洗板 5 次后,以每孔 $50\text{ }\mu\text{l}$ 向 ELISA 板中加入兔抗豚鼠 IgG-HRP 工作液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min 。(5)PBST 洗板 5 次后,将 TMB 底物 A 溶液和 B 溶液等体积混合后以每孔 $50\text{ }\mu\text{l}$ 加入到 ELISA 板中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温育 15 min 。(6)每孔加入 $50\text{ }\mu\text{l}$ 终止液终止反应,在酶标仪上读取 OD_{450} 值。以 FMDV 抗原质量浓度为横坐标, OD_{450} 值为纵坐标绘制标准曲线,根据样品 OD_{450} 值计算出样品中 FMDV 抗原的含量。

2 结果与分析

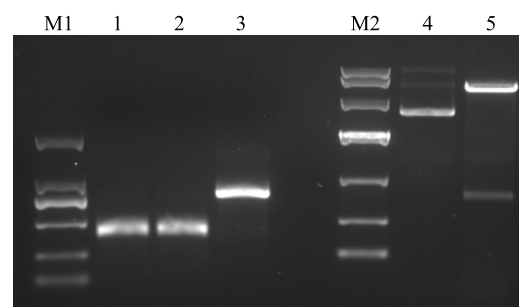
2.1 Nb205-48 的构建、表达及鉴定

将 Nb205 和 NbRBC48 基因采用连接肽连接,成功构建表达 Nb205-48 的重组菌 pET32a-Nb205-48 (图 1)。重组菌 pET32a-Nb205-48 经 IPTG 诱导表达和镍柱亲和纯化最终获得双功能纳米抗体 Nb205-48。SDS-PAGE 和 Western Blotting 鉴定结果显示,Nb205-48 可在大肠杆菌中表达,其表达的蛋白质相对分子质量为 3.5×10^4 (图 2),符合预期。采用间接 ELISA 对 Nb205-48 与 FMDV 和 cRBCs 的反应性能进行检测,结果显示 Nb205-48 可以同时与 FMDV 及 cRBCs 反应,且反应性能与 Nb205 和 NbRBC48 无明显差异 (图 3)。

2.2 血凝方法的建立

2.2.1 Nb205-48 工作质量浓度的确定 将梯度稀释后的 Nb205-48 加入含 FMDV 和 cRBCs 的血凝板中进行血凝试验,确定其工作质量浓度。结果显示,当 Nb205-48 质量浓度高于 $2\text{ }\mu\text{g/ml}$ 时 cRBCs 完全凝集,当 Nb205-48 低于 $2\text{ }\mu\text{g/ml}$ 时 cRBCs 部分凝集或不凝集,表明 Nb205-48 最佳工作质量浓度为 $2\text{ }\mu\text{g/ml}$ (图 4)。

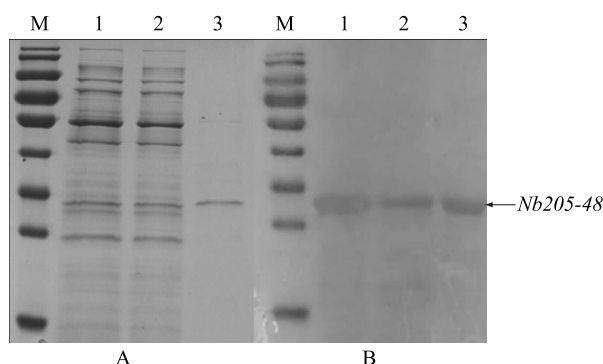
2.2.2 灵敏度 将 FMDV 梯度稀释后进行血凝试验,测定该方法的灵敏度。结果显示,当 FMDV 质量浓度高于 $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ 时, cRBCs 完全凝集,低于 1



泳道 M1:DL2 000 DNA marker;1:Nb205 基因片段;2:NbRBC48 基因片段;3:Nb205-48 基因片段;M2:DL 10 000 DNA marker,条带碱基数从上至下依次为:10 000 bp、7 000 bp、4 000 bp、2 000 bp、1 000 bp、500 bp 以及 250 bp;4:未经酶切处理的重组质粒 pET32a-Nb205-48;5:双酶切重组质粒 pET32a-Nb205-48 后的产物。

图 1 重组质粒 pET32a-Nb205-48 的鉴定

Fig.1 Identification of the recombinant plasmid pET32a-Nb205-48



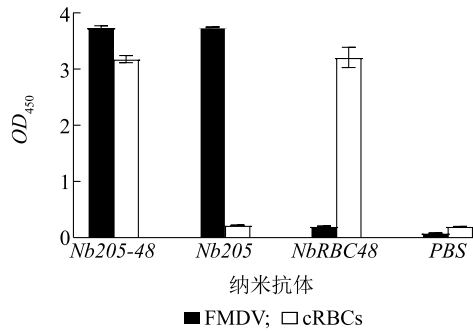
M:蛋白质 Marker,条带相对分子质量由上到下依次为 1.7×10^5 、 1.3×10^5 、 1.0×10^5 、 7.0×10^4 、 5.5×10^4 、 4.0×10^4 、 3.5×10^4 、 2.5×10^4 、 1.5×10^4 ;1:诱导后的转化的大肠杆菌;2:转化的大肠杆菌破碎后的上清液;3:亲和纯化后的 Nb205-48。

图 2 Nb205-48 的 SDS-PAGE (A) 及 Western Blotting (B) 鉴定结果

Fig.2 SDS-PAGE (A) and Western blotting (B) analysis of Nb205-48

$\mu\text{g/ml}$ 时 cRBCs 不凝集。说明能引起 cRBCs 完全凝集时 FMDV 的最低质量浓度为 $1\text{ }\mu\text{g/ml}$,因此该方法的检测灵敏度为 $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ (图 5)。

2.2.3 特异性 将 FMDV、PCV2、PRRSV、PRV 和 PEDV 分别加入血凝板中进行血凝试验。结果显示仅 FMDV 能凝集 cRBCs,其他病毒不能凝集 cRBCs (图 6),表明本方法具有较好的特异性。



FMDV: 猪口蹄疫病毒; cRBCs: 鸡醛化红细胞。

图3 ELISA 鉴定 Nb205-48 的反应性

Fig.3 Reactivity identification of Nb205-48 by ELISA

2.2.4 批内与批间重复性 采用同一批 Nb205-48 工作液对 FMDV 进行 3 次重复检测, 其检测灵敏度均为 1 $\mu\text{g/ml}$ (图 7A); 采用不同批 Nb205-48 工作液对 FMDV 进行重复检测, 其检测灵敏度均为 1 $\mu\text{g/ml}$ (图 7B), 表明该方法具有较好的可重复性。

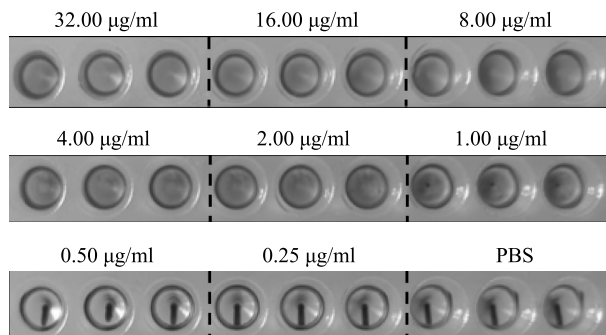


图4 Nb205-48 最佳工作质量浓度

Fig.4 The optimum mass concentration of Nb205-48

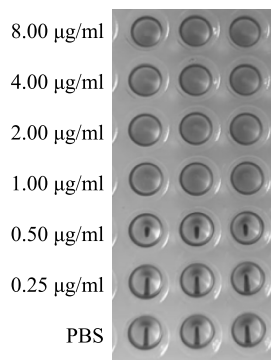
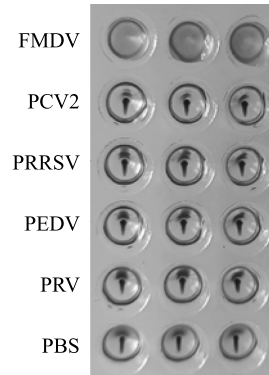


图5 灵敏度检测结果

Fig.5 Sensitivity determination results



FMDV: 口蹄疫病毒; PRRSV: 猪繁殖与呼吸综合征病毒; PCV2: 猪圆环病毒 2 型; PRV: 猪伪狂犬病毒; PEDV: 猪流行性腹泻病毒。

图6 特异性测定结果

Fig.6 Specificity determination results

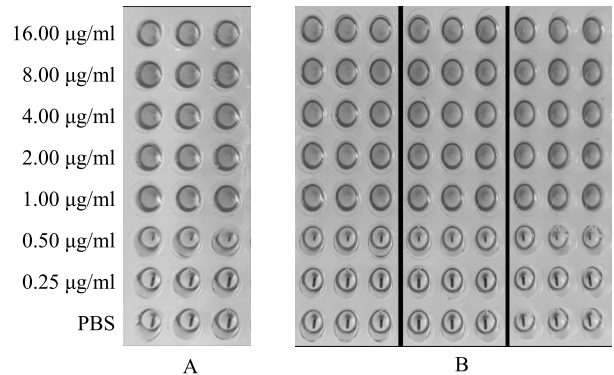


图7 批内(A)和批间(B)重复性测定结果

Fig.7 Repeatability determination results of intra-assay (A) and inter-assay (B)

2.3 血凝法与夹心 ELISA 方法检测结果比较

将 3 批次灭活 O 型 FMDV 抗原 (FMDV-1、FMDV-2、FMDV-3) 梯度稀释后分别采用本研究建立的血凝法和夹心 ELISA 方法进行检测。图 8 为夹心 ELISA 的标准曲线, 该曲线的 $R^2 = 0.9977 > 0.995$, 表明夹心 ELISA 检测结果准确。表 2 为夹心 ELISA 检测 3 批次抗原在不同稀释倍数下的结果, 数据显示 3 批次抗原的质量浓度分别约为 32 $\mu\text{g/ml}$ 、34 $\mu\text{g/ml}$ 、33 $\mu\text{g/ml}$ 。图 9 为血凝法检测 3 批次口蹄疫抗原的结果, 可见 FMDV-1、FMDV-2、FMDV-3 在稀释倍数 ≤ 32 倍时出现血凝现象, 稀释倍数为 64 倍时不出现血凝现象, 可判定 FMDV-1、FMDV-2、FMDV-3 的质量浓度均 $\geq 32 \mu\text{g/ml}$, 这与夹心 ELISA 结果基本相符, 表明血凝法的检测结果与夹心 ELISA 方法的检测结果相关性好。

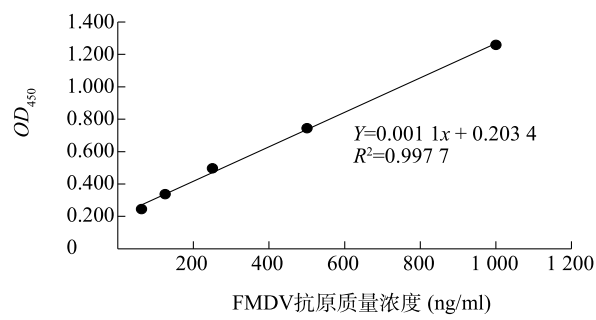


图 8 夹心 ELISA 方法的标准曲线
Fig.8 The standard curve of sandwich ELISA

表 2 夹心 ELISA 方法检测 3 批次 FMDV 的结果
Table 2 The results of three batches of FMDV detected by sandwich ELISA

稀释倍数	FMDV-1		FMDV-2		FMDV-3	
	OD ₄₅₀	检测值(μg/ml)	OD ₄₅₀	检测值(μg/ml)	OD ₄₅₀	检测值(μg/ml)
32	1.303	32.0	1.378	34.1	1.329	32.7
64	0.764	32.6	0.789	34.1	0.773	33.1
128	0.482	32.4	0.500	34.5	0.486	32.9

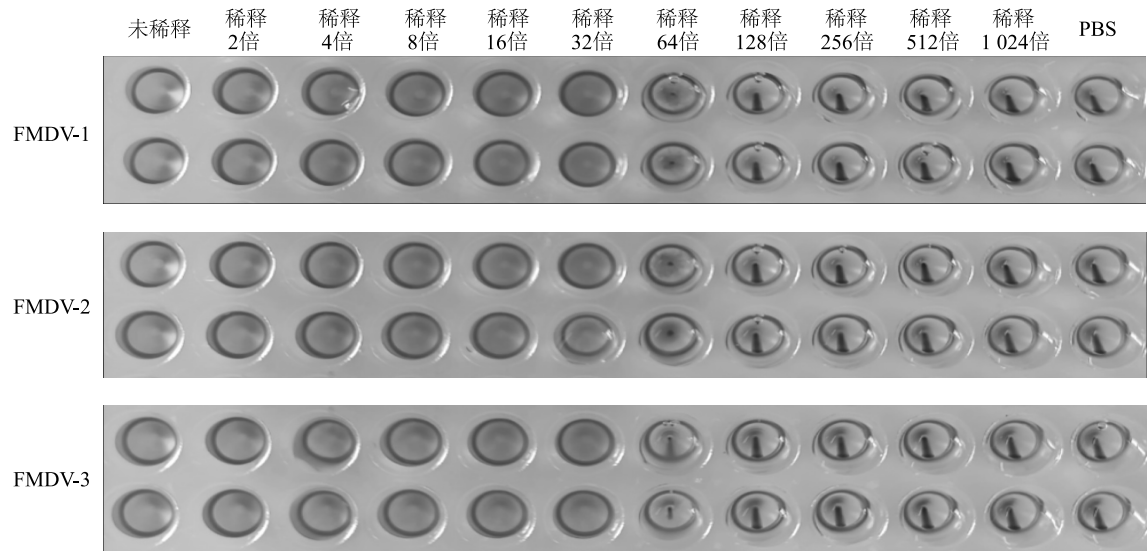


图 9 血凝法检测 3 批次 FMDV 的结果
Fig.9 The results of three batches of FMDV detected by hemagglutination method

取代 SDG。但该方法对样品的纯度要求较高,上机前需先对样品进行蔗糖密度梯度离心纯化。ELISA^[3,17-20]虽然操作简单、通量高、检测时长短,但仍存在依赖高精度设备和有经验操作人员等缺点。血凝方法是一种基层兽医工作人员在畜禽疾病诊断

3 讨论

口蹄疫对畜牧养殖业危害巨大,计划免疫口蹄疫疫苗一直是防控该病的有效措施。疫苗中 FMDV 的含量决定了该疫苗的质量和免疫效力,因此 FMDV 含量的测定对于该病的防控至关重要。

蔗糖密度梯度离心法(SDG)作为金标准是口蹄疫疫苗中 FMDV 抗原定量最广泛使用的方法^[13],但该方法存在操作过程繁琐,耗时耗力,通量低,重复性不佳等缺点^[14]。为了提高定量结果的准确性和可重复性,高效液相色谱(HPLC)^[15-16]被引入后已

中广泛应用的快速检测方法^[21],该技术具有受干扰因素(如环境温度、红细胞质量、操作人员技术水平)影响小、操作简便、耗时短、肉眼即可判读检测结果等优点,一直被用于具有血凝活性病毒(如流感病毒)的检测^[22]。随着双功能分子的出现,血凝

方法也被用于检测无血凝性的病毒(如 HIV、HBsAg、PCV2)。这种双功能分子一般由抗红细胞抗体和抗原分子或抗红细胞抗体和抗体两部分通过化学交联或重组表达获得^[23]。传统双功能分子中的抗体一般为单链抗体,但是单链抗体相对分子质量大,在表达时容易聚沉且产量低。纳米抗体是目前已知的具有完整功能的最小抗原结合片段,因其相对分子质量小、热稳定性强、易可溶性表达等优点被广泛应用于疾病治疗和诊断试剂的研究^[24]。

4 结 论

本研究将抗 FMDV 和 cRBC 的纳米抗体融合表达构建了双特异纳米抗体 Nb205-48。SDS-PAGE 及 Western Blotting 结果显示 Nb205-48 能在大肠杆菌中可溶性表达,间接 ELISA 结果显示 Nb205-48 与 FMDV 和 cRBC 均有较好的反应性能。基于 Nb205-48 的双特异性,本研究建立了用于 FMDV 检测的血凝方法。通过试验确定了该方法的灵敏度为 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$,特异介导 FMDV 凝集 cRBC,与其他病毒无交叉反应,且批内和批间重复性好。分别采用本研究建立的血凝法和夹心 ELISA 方法对 3 批次 O 型 FMDV 抗原进行检测,二者的检测结果基本吻合,表明该血凝法有用于检测 FMDV 含量的潜力。由于方法的局限性,本研究建立的血凝法灵敏度为 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$,不如夹心 ELISA 方法(0.06 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。但该方法的检测时间只有 15 min,远远低于夹心 ELISA 方法(2 h 15 min)等传统的 FMDV 检测方法,可实现 FMDV 的快速高通量检测。后续的研究工作中,我们还可以通过优化融合表达方式和筛选亲和力更高的纳米抗体去提高该方法灵敏度。

综上所述,本研究通过构建双特异纳米抗体,建立了可用于 FMDV 抗原检测的血凝方法,该方法灵敏度高、特异性强、重复性好,检测结果与传统检测方法的检测结果相关性好,操作简便,成本低,耗时短,为检测口蹄疫疫苗生产过程中 FMDV 抗原的含量提供了新方法。

参考文献:

- [1] DIAZ-SAN-SEGUNDO F, MEDINA G N, STENFELDT C, et al. Foot-and-mouth disease vaccines [J]. Veterinary Microbiology, 2017, 206: 102-112.
- [2] 李 乐, 苗海生, 信爱国, 等. ELISA 用于口蹄疫病毒 146S 抗原快速定量的研究[J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(4): 314-317.
- [3] FENG X, MA J W, SUN S Q, et al. Quantitative detection of the foot-and-mouth disease virus serotype o 146s antigen for vaccine production using a double-antibody sandwich ELISA and nonlinear standard curves[J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0149569.
- [4] 刘玉梅, 刘 飞, 孙艳琪, 等. 蔗糖密度梯度法定量口蹄疫完整病毒粒子(146S)的特异性研究[J]. 中国兽药杂志, 2012, 46(11): 6-8.
- [5] 宋艳民, 杨延丽, 苏志国, 等. 高效体积排阻色谱法定量检测口蹄疫疫苗中 146S 的疫苗预处理方法[J]. 生物工程学报, 2019, 35(8): 1441-1452.
- [6] WAMBURA P N, MZULA A. A novel rapid direct haemagglutination-inhibition assay for measurements of humoral immune response against non-haemagglutinating Fowlpox virus strains in vaccinated chickens[J]. Heliyon, 2017, 3(10): e00428.
- [7] KIRBY F D, MARTIN H T, OSTLER D C. An indirect haemagglutination test for the detection and assay of antibody to infectious bovine rhinotracheitis virus [J]. Veterinary Record, 1974, 94(16): 361-362.
- [8] HITZLER W E, RUNKEL S, et al. Prevalence of human parvovirus B19 in blood donors as determined by a haemagglutination assay and verified by the polymerase chain reaction[J]. Vox Sanguinis, 2002, 82(1): 18-23.
- [9] HABIB I, SMOLAREK D, HATTAB C, et al. V(H)H (nanobody) directed against human glycophorin A: a tool for autologous red cell agglutination assays [J]. Analytical Biochemistry, 2013, 438(1): 82-89.
- [10] CHEN Y P, QIAO Y Y, ZHAO X H, et al. Rapid detection of hepatitis b virus surface antigen by an agglutination assay mediated by a bispecific diabody against both human erythrocytes and hepatitis B virus surface antigen[J]. Clinical & Vaccine Immunology, 2007, 14(6): 720-725.
- [11] CHENG H, YANG L, CAI Z, et al. Development of haemagglutination assay for titration of porcine circovirus type 2[J]. Analytical Biochemistry, 2020, 598: 113706.
- [12] CHENG H, CHEN J, CAI Z, et al. Development of GEM-PANANOTRAP for purification of foot-and-mouth disease virus[J]. Vaccine, 2019, 37(24): 3205-3213.
- [13] KIM A-Y, PARK S Y, PARK S H, et al. Validation of pretreatment methods for the in-process quantification of foot-and-mouth disease vaccine antigens[J]. Vaccines, 2021, 9(11): 1361.
- [14] SONG Y, YANG Y, LIN X, et al. On-line separation and quantification of virus antigens of different serotypes in multivalent vaccines by capillary zone electrophoresis: a case study for quality control of foot-and-mouth disease virus vaccines[J]. Journal of Chromatography A, 2021, 1637: 461834.
- [15] KIM M H, YUN S J, KIM Y H, et al. Evaluation of quality control methods for foot-and-mouth disease vaccines by high-performance liquid chromatography[J]. Pathogens, 2020, 9(3): 194.
- [16] KIM A Y, PARK S Y, PARK S H, et al. Comparison of high-performance liquid chromatography with sucrose density gradient ultracentrifugation for the quantification of foot-and-mouth disease vaccine antigens[J]. Vaccines (Basel), 2022, 10(5): 667.
- [17] HARMSSEN M M, FIJTEN H P, WESTRA D F, et al. Effect of

- thiomersal on dissociation of intact (146S) foot-and-mouth disease virions into 12S particles as assessed by novel ELISAs specific for either 146S or 12S particles[J]. *Vaccine*, 2011, 29(15): 2682-2690.
- [18] 卢清侠,李 伟,金前跃,等. 鹅星状病毒刺突蛋白单克隆抗体的制备与鉴定[J]. *江苏农业科学*, 2022, 50(22): 159-165.
- [19] 刘建欣,刘 蕾,郭珊珊,等. 副溶血性弧菌外膜蛋白 BamA 重组表达及其免疫原性分析[J]. *江苏农业科学*, 2022, 50(15): 43-50.
- [20] 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.
- [21] GOPINATH S C B, KUMAR P K R. Aptamers that bind to the hemagglutinin of the recent pandemic influenza virus H1N1 and efficiently inhibit agglutination[J]. *Acta Biomaterialia*, 2013, 9(11): 8932-8941.
- [22] KILLIAN M L. Hemagglutination assay for influenza virus[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2020, 2123: 3-10.
- [23] KRISHNAMURTHY A, JIMENO A. Bispecific antibodies for cancer therapy: a review[J]. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 2018, 185: 122-134.
- [24] LIU M, LI L, JIN D, et al. Nanobody-A versatile tool for cancer diagnosis and therapeutics[J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2021, 13(4): e1697.

(责任编辑:成纾寒)