

# 人脑心肌炎病毒免疫球蛋白 M 捕获酶联免疫吸附试验的建立及初步应用<sup>\*</sup>

张海霞<sup>1</sup>, 冯若飞<sup>1,2</sup>, 王 丹<sup>2</sup>, 徐 雷<sup>2</sup>, 谢晶莹<sup>2</sup>, 李向茸<sup>1</sup>, 马忠仁<sup>1△</sup> (1. 甘肃省动物细胞工程技术研究中心, 兰州 730030; 2. 西北民族大学生物工程与技术国家民委重点实验室, 兰州 730030)

**【摘要】 目的** 建立脑心肌炎病毒(EMCV) 免疫球蛋白 M(IgM)捕获酶联免疫吸附试验(ELISA)检测方法, 用于感染 EMCV 血清学早期诊断。**方法** 用抗人 IgM( $\mu$  链)单抗进行包被, 辣根过氧化物酶(HRP)标记的 EMCV 为酶标抗原, 初步建立 EMCV IgM 捕获 ELISA; 对建立的方法进行条件优化及特异性、精密性、稳定性等验证。**结果** 建立的 EMCV IgM 捕获 ELISA 检测方法抗体包被浓度为 1  $\mu\text{g/mL}$ , EMCV-HRP 工作浓度和反应时间分别为 1 : 400 和 45 min, 封闭液为 10% 马血清时该法检测效果可达最佳, 3 批试剂批内及批间变异系数均小于 5%, 且特异性、精密性及稳定性较好。**结论** 建立的 EMCV IgM 捕获 ELISA 法特异、精密且稳定, 可用于人感染 EMCV 的早期检查, 为 EMCV 的诊断奠定基础。

**【关键词】** 脑心肌炎病毒; 免疫球蛋白 M; 酶联免疫吸附试验; 初步应用

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2015. 15. 001 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)15-2139-03

**Establishment and preliminary application of EMCV IgM capture ELISA method<sup>\*</sup>** ZHANG Hai-xia<sup>1</sup>, FENG Ruofei<sup>1,2</sup>, WANG Dan<sup>2</sup>, XU Lei<sup>2</sup>, XIE Jing-ying<sup>2</sup>, LI Xiang-rong<sup>1</sup>, MA Zhong-ren<sup>1△</sup> (1. Gansu Engineering Research Center for Animal Cells, Lanzhou, Gansu 730030, China; 2. Key Bio-Engineering and Technology Laboratory of Northwest University for Nationalities, Lanzhou, Gansu 730030, China)

**【Abstract】 Objective** To establish the encephalomyocarditis virus(EMCV) immunoglobulin M(IgM) captured enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) detection method for the application in early serological diagnosis of EMCV infection. **Methods** Anti-human( $\mu$  chain) monoclonal antibody was used to conduct the coating and the horse radish peroxidase(HRP) labelled EMCV served as the enzyme labeled antigen, the EMCV IgM capture ELISA method was preliminarily established; The established method was performed the conditional optimization and verification of the specificity, precision and stability. **Results** The antibody coating concentration in the established EMCV IgM captured ELISA method was 1  $\mu\text{g/mL}$ , the EMCV-HRP work concentration and reaction times were 1 : 400 and 45 min respectively. When the blocking solution was 10% horse serum, this method achieved the best effect. The intra-assay and inter-assay coefficients of variation in 3 batches of reagents were less than 5%, and the specificity, precision and stability were better. **Conclusion** The established EMCV IgM capture ELISA method is specific, precise and stable, can be used for the detection of early human EMCV infection and lays the foundation for the EMCV diagnosis.

**【Key words】** EMCV; IgM; ELISA; preliminary application

脑心肌炎病毒(EMCV)是微 RNA 病毒科, 心病毒属的唯一成员, 根据分离来源的不同, 有时也称哥伦比亚-SK(Columbia-SK)、小鼠脑脊髓炎病毒(MEV)、门哥(Mengo)病毒<sup>[1-2]</sup>。1945 年在美国佛罗里达州, 从一只患急性致死性心肌炎的黑猩猩体内, 首次分离到 EMCV, 1958 年在巴拿马首次证明导致猪死亡的病原体是 EMCV<sup>[3-7]</sup>。随后陆续有报道, EMCV 在世界上很多国家爆发和流行<sup>[8-9]</sup>。EMCV 和其他部分小 RNA 病毒有着类似的组装结构和抗逆的理化特性, 病毒粒子呈圆形状, 直径为 20~30 nm, 无囊膜裸露的核衣壳, 病毒粒子的衣壳为对称结构的二十面体, 衣壳内含一单股正链 RNA, 3' 端有 poly(A) 尾, 5' 端没有帽子结构, 该衣壳在 CsCl 中的浮密度为 1.33~1.34 g/cm<sup>3</sup>。本病毒在 56  $^{\circ}\text{C}$  1 h 能灭活, 但对氯仿、乙醚、乙醇等脂溶剂有很强的抵抗力。哺乳动物中以猪对 EMCV 的敏感性最强, 感染后多出现致死性心肌炎和心肌周围炎

等, 处于妊娠期的母猪大多出现死胎、弱胎、流产、木乃伊胎等繁殖性障碍, 其他的表象中, 健康猪多呈隐性感染<sup>[10-13]</sup>。据有关报道, 猪脑心肌炎发病高的地区, 人感染 EMCV 也较高<sup>[14]</sup>。灵长类动物中主要以人类为主, 人类被 EMCV 感染后, 大多出现头痛、发热、精神萎靡、身体僵硬、呕吐等主要症状, 有学者从患者和其他正常人群血清中检测到 EMCV 抗体, 并从患脑膜炎和脑炎的儿童体内分离到 EMCV, 说明 EMCV 可感染人类并可造成较为严重的损伤, 这就要求在临床中务必做到早诊断、早预防<sup>[15]</sup>。然而, 现有针对 EMCV IgM 的检测只有中和试验等一些传统方法, 不仅耗时、费用高, 而且结果准确度不高, 难以满足现代快速、准确、成本低的诊断要求。因此, 建立一种快速准确检测 EMCV IgM 抗体的方法在 EMCV 早期诊断中尤为重要。利用抗人  $\mu$  链抗体捕获 EMCV IgM, 可以达到早期血清学检测、免疫分析、抗原抗体相互作用检测等各种

<sup>\*</sup> 基金项目: 国家自然科学基金项目(31160033、31460665); 教育部“长江学者和创新团队发展计划”项目(IRT13091)。

作者简介: 张海霞, 女, 助教, 硕士, 主要从事分子病毒学方面的研究。  $\triangle$  通讯作者, E-mail: mazhongren@xbmu.edu.cn。

试验目的,为 EMCV 的早期诊断和流行病学调查奠定基础。

## 1 材料与方法

**1.1 材料来源** EMCV(VR-129 株,ATCC)抗原由西北民族大学生物工程与技术国家民委重点实验室提供。

**1.2 试剂** 抗人 IgM( $\mu$  链)单抗购自美国 Sigma 公司;辣根过氧化物酶(HRP)购自华美生物工程公司;

**1.3 EMCV 标酶** 通过改良过碘酸法,将 HRP 标记于灭活的 EMCV,之后将标记混合物经硫酸铵盐析,NaAC-HAC 中透析,柱层析(Sephrose-4FF),收集峰 1,即为酶标记抗原(EMCV-HRP),经间接 ELISA 测定效价后,加入 50% 的丙三醇,分装置于  $-20^{\circ}\text{C}$  冻存<sup>[16-17]</sup>。

**1.4 人 EMCV IgM 捕获 ELISA 的建立及条件优化**

**1.4.1 方法的建立** 用 0.05 mol/L 的碳酸盐缓冲液(CB)(pH9.6) 1:20 000 稀释抗人 IgM( $\mu$  链)单抗至 2.50  $\mu\text{g/mL}$ ,100 微升/孔包被聚苯乙烯微量滴定板,4  $^{\circ}\text{C}$  过夜;PBST[0.01 mol/L PBS(pH7.4),0.05% (v/v) 吐温-20]洗涤 1 次,100 微升/孔封闭液室温封闭过夜;甩尽、拍干后真空密封,4  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。检测时,加入 100 微升/孔待检血清,37  $^{\circ}\text{C}$  温育 1 h;磷酸盐吐温缓冲液(PBST)洗涤 5 次,拍干后每孔加入 100  $\mu\text{L}$  1:800 稀释的 EMCV-HRP,37  $^{\circ}\text{C}$  温育 1 h;PBST 洗涤 5 次并拍干,每孔加入 50  $\mu\text{L}$  显色液 A[磷酸-柠檬酸缓冲液(pH 5.0),0.1% (v/v)  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%)]和 50  $\mu\text{L}$  显色液 B[柠檬酸-乙酸钠缓冲液(pH2.0),0.25 g/L 四甲基联苯胺(TMB)-HCl,10% (v/v) 丙三醇],37  $^{\circ}\text{C}$  温育 15 min,终止,读取 450 和 630 nm 波长处样本吸光度(A)。计算每块板上阴性对照检测孔的平均值及标准差,并以此结果进行 Cut-off 值计算。具体为  $\text{Cut-off}_1 = \bar{x} + 2s$ ,  $\text{Cut-off}_2 = \bar{x} \times 2$ ;阳性:  $A > \text{Cut-off}_2$ ;阴性:  $A < \text{Cut-off}_1$ ;可疑:  $\text{Cut-off}_1 < A < \text{Cut-off}_2$ 。

**1.4.2 阴阳性对照的确定** 参考上述初步建立的 EMCV IgM 捕获 ELISA 操作步骤,筛选出 EMCV IgM 阳性血清,阴性血清;选取 A 值最高的阳性 3 份混合,选取 A 值最低阴性的 3 份混合,并 56  $^{\circ}\text{C}$  灭活 30 min 后分别用 0.22  $\mu\text{m}$  的膜过滤,无菌分装,置  $-80^{\circ}\text{C}$  保存备用。

**1.4.3 条件优化** (1)最佳包被浓度的确定。将抗人 IgM( $\mu$  链)单抗分别稀释至 8、4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.062 5  $\mu\text{g/mL}$  进行包被,其余步骤参照 1.4.1,根据结果确定最佳的包被浓度。(2)最佳 EMCV-HRP 浓度的确定。EMCV-HRP 的工作浓度分别为 1:50、1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600,其余步骤参照 1.4.1,根据结果确定最佳的 EMCV-HRP 浓度。(3)最佳酶标抗原反应时间的确定。加入的酶标抗原反应时间分别为 15、30、45、60、75 min,其余步骤参照 1.4.1,根据结果确定最佳酶标抗原反应时间。(4)最佳底物显色的时间。加入底物显色时间分别为 10、15、20、25、30、35 min,其余步骤参照 1.4.1,根据结果确定最佳底物显色时间。(5)最佳封闭液的选择。封闭液分别选用 PBST、10% 马血清、10% 牛血清、1% 卵清蛋白、2% 蛋白胨、5% 脱脂奶粉,其余步骤参照 1.4.1,根据结果确定最佳封闭液。

**1.5 精密性试验** 选择 1 份  $A_{450\text{ nm}}/A_{630\text{ nm}}$  值在 1.1 左右的阴性对照血清进行精密性验证。抽取同一批试剂的 5 块包被板,每板抽取 1 条,每条抽取 2 孔共 10 孔,进行批内精密性试验;抽取连续 3 批试剂按批内精密性试验抽样,共 30 孔,进行批间精密性试验,计算变异系数(CV),分析批内和批间精密性。

**1.6 特异性试验** 用上述方法分别检测乙型肝炎病毒

(HBV)、戊型肝炎病毒(HEV)抗体、乙型脑炎病毒(JEV) IgM 抗体及阴性对照,其余步骤参照 1.4.1,确定该方法的特异性。

**1.7 稳定性试验** 将上述包被板及试剂随机分成两部分,分别置 4、37  $^{\circ}\text{C}$  各保存 6 d,分别检测 7 个弱阳性样本(A 值在 0.2 左右样本),其余步骤参照 1.4.1,验证试剂的稳定性。

## 2 结果

**2.1 EMCV IgM 捕获 ELISA 方法的最佳条件** 最佳条件确定均以阳性血清 A 值作为 P 值,阴性对照 A 值作为 N 值,分别计算 P/N。然后以考察条件作横坐标,P/N 作纵坐标绘制折线图。

**2.1.1 最佳包被浓度** 随着包被浓度增加,P/N 先升高后下降,在 0.5~1  $\mu\text{g}$  达到峰值,一般选择最优条件为峰值左右,且稀释度不宜过大,所以最佳的抗人 IgM 包被浓度为 1  $\mu\text{g/mL}$ 。见图 1。

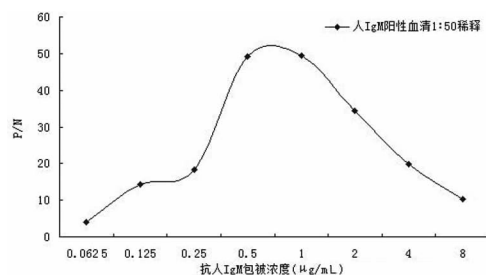


图 1 抗人 IgM 包被浓度的确定结果(P/N)

**2.1.2 最佳 EMCV-HRP 工作浓度** 每个 IgM 阳性血清稀释度条件下,P/N 值都随着 EMCV-HRP 稀释的增加而先升高后下降,而在 1:400 浓度时的 P/N 均最大,所以 EMCV-HRP 的最佳工作浓度为 1:400。见图 2。

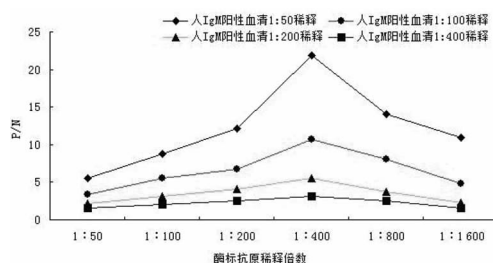


图 2 酶标 EMCV 工作浓度(P/N)

**2.1.3 最佳 EMCV-HRP 反应时间** 随着 EMCV-HRP 反应时间的增加,P/N 先升高后下降,而在反应时间为 45 min 时,P/N 最高,所以 EMCV-HRP 的最佳反应时间为 45 min。见图 3。

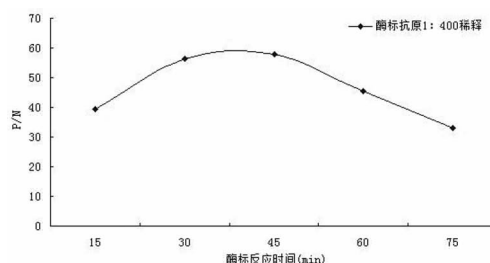


图 3 酶标抗原反应时间确定结果(P/N)

**2.1.4 最佳底物显色时间** 随着显色液反应时间的增加,P/N 先升高后下降,在显色时间为 25 min 时,P/N 最高,所以显色液的最佳反应时间为 25 min。见图 4。

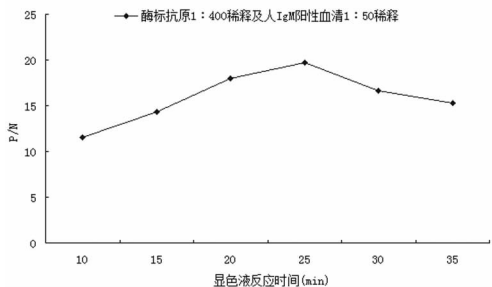


图 4 最佳显色反应时间确定结果(P/N)

2.1.5 最佳封闭液的确定 在不同封闭液下,10%马血清封闭时,P/N 最大,因此 10%马血清封闭液为最适。见图 5。

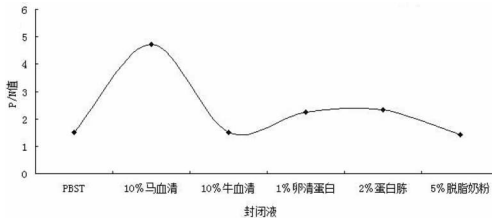


图 5 封闭液确定(P/N)

2.2 精密性试验 3 批试剂的批内及批间 CV 均小于 5%,表明建立的方法精密性较好。见表 1。

表 1 方法的精密性验证

| 批次   | $\bar{x}(A_{450\text{ nm}}/A_{630\text{ nm}})$ | $s(A_{450\text{ nm}}/A_{630\text{ nm}})$ | CV(%) |
|------|------------------------------------------------|------------------------------------------|-------|
| 01 批 | 1.085                                          | 0.053                                    | 4.91  |
| 02 批 | 1.007                                          | 0.040                                    | 3.97  |
| 03 批 | 1.011                                          | 0.022                                    | 2.18  |
| 批间   | 1.034                                          | 0.036                                    | 3.48  |

2.3 特异性试验 本方法只能检出 EMCV IgM 抗体,其他均为阴性,表明该法特异性较好。见图 6。

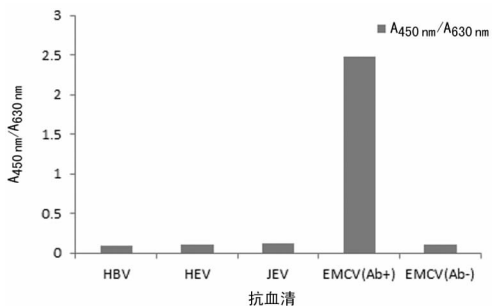


图 6 特异性验证

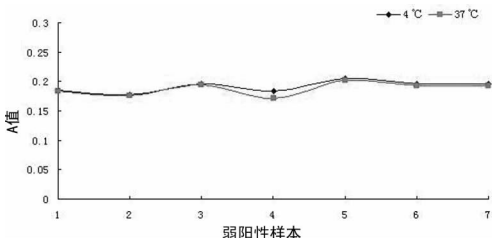


图 7 热加速稳定性

2.4 稳定性试验 热加速降解实验试剂与 4 °C 存放 6 d 的试剂相比,检测的 7 个弱阳性样本,存放于 37 °C 的检测值略低于 4 °C,但变化相差不大,表明稳定性良好。见图 7。

3 讨论

本研究成功建立了 EMCV IgM 捕获 ELISA 方法:将抗人 IgM( $\mu$  链)单抗稀释至 1  $\mu\text{g/mL}$ ,以 100 微升/孔加入 96 孔聚苯乙烯微量滴定板,4 °C 过夜;PBST 洗涤 1 次,并轻轻拍干,用 10%马血清封闭液室温封闭过夜;甩干后,加入 100 微升/孔待检样本,37 °C 反应 1 h;PBST 洗涤 5 次拍干后,加入 100 微升/孔 1:400 的 EMCV-HRP,37 °C 反应 45 min,洗涤 5 次后拍干,加入底物显色 25 min,终止,读取 450 和 630 nm 波长处样本 A 值。

对上述优化的 EMCV IgM 捕获 ELISA 方法进行验证,结果显示:批内及批间 CV 均小于 5%,精密性良好;只能特异性地检出 EMCV IgM 抗体;包被板和试剂具有良好的热稳定性。说明该 EMCV IgM 捕获 ELISA 方法的精密性、特异性及稳定性均较好。

IgM 是人的免疫球蛋白之一,在感染过程中 IgM 首先出现,但持续时间不长,是近期感染的标志。本研究首次成功建立的 EMCV IgM 捕获 ELISA 法,较其他 ELISA 而言,检测样本时不需要稀释,且不受类风湿因子的影响,有很高的特异性,不产生假阳性,其准确性较高。且较间接 ELISA 及双抗原夹心 ELISA,该法更能准确地应用于 EMCV 感染早期的快速诊断,从而确定 EMCV 早期感染情况。总之,该法为 EMCV 早期感染的检测提供了新的手段,也为 EMCV 抗体监测、流行病学调查提供了更有利的工具。

参考文献

[1] Van Regenmortel MHV,Fauquet CM,Bishop DHL,et al. Virus taxonomy:classification and nomenclature of viruses,seventh report of the International committee on taxonomy of viruses[J]. Virus Res,2002,83(1/2):221-222.

[2] Blinkova O,Kapoor A,Victoria J,et al. Cardioviruses are genetically diverse and cause common enteric infections in South Asian children[J]. J Virol,2009,83(9):4631-4641.

[3] Helwig FC,Schmidt CH. A filter-passing agent producing interstitial myocarditis in anthropoid apes and small animals[J]. Science,1945,102(2637):31-33.

[4] Oberste MS,Gotuzzo E,Blair P,et al. Human febrile illness caused by encephalomyocarditis virus infection,Peru [J]. Emerg Infect Dis,2009,15(4):640-646.

[5] Garkavenko O,Muzina M,Muzina Z,et al. Monitoring for potentially zoonotic viruses in New Zealand pigs[J]. J Med Virol,2004,72(2):338-344.

[6] Kume K,Sawata A,Nakase Y. Relationship between protective activity and antigen structure of Haemophilus paragallinarum serotypes 1 and 2 [J]. Am J Vet Res, 1980,41(1):97-100.

[7] Murnane TG,Craighead JE,Mondragon H,et al. Fatal disease of swine due to encephalomyocarditis virus[J]. Science,1960, 131(3399):498-499.

[8] Knowles NJ,Dickinson ND,Wilsden G,et al. Molecular analysis of encephalomyocarditis viruses isolated from pigs and rodents in Italy[J]. Virus Res,1998,(下转第 2144 页)

生免疫反应,产生炎性介质,如肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )、白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、IL-L、干扰素(IFN)- $\alpha/\beta$ 、形成细胞(KC)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)等,进而刺激核转录因子  $\kappa$ B 抵御病原菌的侵袭<sup>[8-9]</sup>。

本研究结果显示,与同年龄健康儿童相比,肺炎链球菌感染患者出现了较高水平的白细胞计数、中性粒细胞比值、单核细胞比值及 CRP 水平,众所周知,中性粒细胞是宿主抵御细菌感染时重要的一线免疫细胞效应因子,在病原菌侵袭患者早期发挥重要作用,而单核/巨噬细胞系统对病原菌的清除也起重要作用,提示婴幼儿患者受到肺炎链球菌侵袭后也可在一定程度上激发天然免疫反应,抵御病原菌的侵袭;而 CRP 作为急性时相反应蛋白,在炎性反应中具有积极作用,提示患者对病原菌具有非特异性抵抗力。

尽管肺炎链球菌感染在儿童患者中普遍存在,抗生素耐药乃至交叉耐药现象的不断加重使得肺炎链球菌感染的治疗面临越来越严峻的问题,利用有效的疫苗进行预防为解决肺炎链球菌感染刻不容缓的手段。虽然目前已经有商品化的多糖疫苗及结合疫苗,然而其保护效果均不理想。因此,保护效果更好,针对人群更广的肺炎链球菌疫苗研发可能成为降低人群中肺炎链球菌携带率及其在人群中传播的最终措施<sup>[10-11]</sup>。

## 参考文献

- [1] O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, et al. Burden of disease caused by streptococcus pneumoniae in children younger than 5 years: global estimates [J]. Lancet, 2009, 374 (9693):893-902.
- [2] Zhao H, Kang CI, Rouse MS, et al. The role of IL-17 in the association between pneumococcal pneumonia and allergic sensitization [J]. Int J Microbiol, 2011, 9 (16): 709509.
- [3] 姚开虎,王立波,赵根明,等. 四家儿童医院住院肺炎病例 (上接第 2141 页)  
57(1):53-62.
- [9] Wells SK, Gutter AE, Soike KF, et al. Encephalomyocarditis virus; epizootic in a zoological collection[J]. Zoo Wild Med, 1989, 20(3):291-296.
- [10] Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, et al. Virus taxonomy, classification and nomenclature of viruses sixth report of the international committee on taxonomy of viruses[J]. Springer Berlin, 1995, 12(10):329-336.
- [11] Papaioannou N, Billinis C, Psychas V, et al. Pathogenesis of encephalomyocarditis virus (EMCV) infection in piglets during the viraemia phase: a histopathological, immunohistochemical and virological study[J]. J Comp Pathol, 2003, 129(3):161-168.
- [12] Koenen F, De Clercq K, Lefebvre J, et al. Reproductive failure in sows following experimental infection with a Belgian EMCV isolate[J]. Vet Microbiol, 1994, 39(1):

肺炎链球菌分离株的耐药性监测[J]. 中国当代儿科杂志, 2008, 10(3):275-279.

- [4] 黄勇, 万根平, 周珍文, 等. 儿童呼吸道感染肺炎链球菌耐药性及 pbp2B 与 TEM 基因的研究[J]. 中国当代儿科杂志, 2009, 11(8):623-626.
- [5] Novak R, Henriques B, Charpentier E, et al. Emergence of vancomycin tolerance in *Streptococcus pneumoniae* [J]. Nature, 1999, 399(16):590-593.
- [6] Shapiro ED, Berg AT, Austrian R, et al. The protective efficacy of polyvalent pneumococcal polysaccharide vaccine[J]. N Engl J Med, 1991, 325(21):1453-1460.
- [7] Davis KM, Nakamura S, Weiser JN. Nod 2 sensing of lysozyme-digested peptidoglycan promotes macrophage recruitment and clearance of *S. pneumoniae* colonization in mice[J]. J Clin Invest, 2011, 121(9):3666-3676.
- [8] Zhang Z, Clarke T, Weiser J, et al. Cellular effectors mediating Th17-dependent clearance of pneumococcal colonization in mice[J]. J Clin Invest, 2009, 119(7):1899-1909.
- [9] Kimberly MD, Shigeki N, Jeffrey NW. Nod 2 sensing of lysozyme-digested peptidoglycan promotes macrophage recruitment and clearance of *S. Pneumoniae* colonization in mice[J]. J Clin Invest, 2011, 121(9):3666-3676.
- [10] Cui Y, Zhang X, Gong Y, et al. Immunization with DnaJ (hsp40) could elicit protection against nasopharyngeal colonization and invasive infection caused by different strains of *Streptococcus pneumoniae* [J]. Vaccine, 2011, 29 (9):1736-1744.
- [11] Michael R. *Streptococcus pneumoniae*: epidemiology and patterns of resistance [J]. Am J Med, 2004, 117(3):3-15.

(收稿日期:2015-02-28 修回日期:2015-04-15)

111-116.

- [13] Maurice H, Nielen M, Brocchi E, et al. The occurrence of encephalomyocarditis virus (EMCV) in European pigs from 1990 to 2001 [J]. Epidemiol Infect, 2005, 133(3): 547-557.
- [14] Kirkland PD, Gleeson AB, Hawkes RA, et al. Human infection with encephalomyocarditis virus in New South Wales [J]. Med J Aust, 1989, 151(3):176-178.
- [15] Gajdusek DC. Encephalomyocarditis virus infection in childhood [J]. Pediatrics, 1955, 16(6):902-906.
- [16] 王宪文, 王新卫. 兽医生物制品制备技术 [M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2007:59.
- [17] 董艳娇, 黄金海, 王晶钰, 等. 猪脑心肌炎病毒抗体间接 Elisa 方法的建立及应用 [J]. 中国动物检疫, 2008, 25(7): 30-33.

(收稿日期:2015-02-25 修回日期:2015-03-15)