



H-1 细小病毒抗体 ELISA 检测方法的建立与应用

付 瑞,李 晓 波,王 淑 菁,王 吉,卫 礼,巩 薇,岳 秉 飞,贺 争 鸣

(中国食品药品检定研究院,北京 100050)

【摘要】 目的 建立 H-1 细小病毒抗体的 ELISA 检测方法,并进行初步应用。方法 采用大鼠神经胶质瘤细胞 C6 培养大鼠 H-1 细小病毒,制备包被抗原,采用纯化后抗原建立该病毒的 ELISA 检测方法;将建立的方法与国外同类试剂盒进行比对,考察该方法的特异性和灵敏度。同时,应用该方法对 35 份大鼠血清进行检测。结果 所建立的方法可检测出稀释 1280 倍的阳性血清;与犬细小病毒、小鼠微小病毒和猪细小病毒阳性血清均无交叉反应;与大鼠细小 KRV 病毒有交叉反应;对 35 份大鼠血清进行检测,结果均为阴性,与国外同类试剂盒结果一致。结论 所建立的 H-1 细小病毒 ELISA 检测方法具有良好的种属特异性和灵敏度,可用于大鼠血清中 H-1 细小病毒抗体检测。

【关键词】 H-1 细小病毒;ELISA;抗体检测

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 03-0075-06

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2016. 03. 015

Establishment and application of ELISA method for H-1 parvovirus

FU Rui, LI Xiao-bo, WANG Shu-jing, WANG Ji, WEI Li, GONG Wei, YUE Bing-fei, HE Zheng-ming

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

【Abstract】 Objective To establish ELISA method for H-1 parvovirus, and to apply it in detection. **Method** Cultured the H-1 parvovirus in rat glioma cell line C6, prepared the viral antigen for coating. Used the purified viral antigen to establish the ELISA method, and compared the ELISA method with the ELISA kit from XpressBio company. Then applied the ELISA method in detection of 35 rat serums. **Results** The positive serum which be diluted to 1280 can be detected by the ELISA method, there have not cross reaction with positive serum of CPV, MVM and PPV, but there has cross reaction with KRV. 35 pieces of rat serums were detected by the ELISA method, they were all negative, the results were consistent with the kit from XpressBio company. **Conclusions** The sensitivity and species specificity of the ELISA method for H-1 parvovirus were suitable, the method can be used in detection of H-1 parvovirus in rat serum.

【Key words】 H-1 parvovirus; ELISA; Detection of antibody

大鼠细小病毒(Rat parvovirus, RPV)是对实验大鼠危害最为严重的病毒之一。成年大鼠感染多无临床症状,免疫抑制等因素可激发本病。RPV还可污染肿瘤移植物和细胞系,对实验研究产生严重

干扰^[1]。Toolan^[2]从经大鼠传代的人肿瘤细胞系(HEP-1)分离到第2株大鼠细小病毒,通常称为H-1细小病毒,又称Toolan病毒。H-1细小病毒属于细小病毒科,其天然宿主为大鼠,病毒粒子直径为

【基金项目】 国家科技支撑计划“实验用动物病原分子生物学快速检测新技术研究与应用”(2015BAI07B02)。

【作者简介】 付瑞(1978-),男,副研究员,研究方向:实验动物病毒学,Email: furui78@126.com。

【通讯作者】 贺争鸣(1957-),男,研究员,研究方向:实验动物微生物学,Email: zhengminghe57@163.com。

20 ~ 25 nm, 为无囊膜单链 DNA 病毒, 其核酸约为 5100 nt^[3]。

我国实验动物国家标准(GB 14922. 2-2011)规定大鼠细小病毒 KRV 和 H-1 株为 SPF 实验大鼠病毒的必检项目。本研究采用可传代的大鼠神经胶质瘤细胞 C6 培养 H-1 细小病毒^[4], 从而建立了 H-1 细小病毒抗体的 ELISA 检测方法。

1 材料和方法

1.1 毒株和细胞

H-1 细小病毒购自美国标准培养物保存中心(ATCC, VR-356), 大鼠神经胶质瘤细胞 C6 中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.2 其它试剂及样品

商品化 H-1 ELISA 抗体检测试剂盒购自美国 XpressBio 公司; 猪细小病毒、小鼠微小病毒和犬细小病毒阴阳对照血清均为科室制备保存; 山羊抗大鼠 IgG-HRP、山羊抗小鼠 IgG-HRP、山羊抗猪 IgG-HRP 和山羊抗犬 IgG-HRP 均购自 KPL 公司; DMEM 培养基和胎牛血清购自 Gibco 公司; 35 份清洁级与 SPF 级大鼠血清样本来自北京地区实验动物监督检查收集样品。

1.3 病毒培养

将 C6 细胞按照 6×10^4 个/mL 的浓度接种于细胞培养瓶, 采用含 5% 胎牛血清的 DMEM 培养及培养 6 h 后将 H-1 病毒液以 0.02 MOI 的比例加入培养瓶中。置含有 5% 二氧化碳的 37℃ 培养箱中培养 36 h, 待细胞长满单层后, 弃去瓶中培养液, 加入等体积的含 2% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 继续培养 36 h, 完全病变的病毒冻存于 -70℃ 保存。

1.4 病毒滴定

将 C6 细胞按照 6×10^4 个/mL 的浓度接种于 96 孔细胞培养板, 培养 6 h 后将 H-1 病毒液以 10^{-1} ~ 10^{-11} 作系列倍比稀释, 依次加入培养有 C6 细胞的 96 孔细胞培养板(1 ~ 11 列), 每个稀释度接种 1 列(8 孔), 第 12 列不加病毒, 作为细胞对照。置含有 5% 二氧化碳的 37℃ 培养箱中观察 10 d, 记录结果。

1.5 抗原的制备及纯化

正常抗原: C6 细胞按照 6×10^4 个/mL 的浓度接种于细胞培养瓶, 待长满单层后, 用 10% ATV 常规法消化, PBS 洗涤, 1000 r/min 离心 10 min, 沉淀溶于适量 PBS 冻融 3 次后, 超声破碎, 10000 r/min

离心 30 min, 取上清, 测定蛋白含量。分装后作为正常抗原冻存于 -70℃ 备用。

特异抗原: 收获 H-1 病毒, 于 4℃, 10000 r/min 离心 1 h, 取上清于 4℃, 40000 r/min 离心 3 h, 收集沉淀于适量 PBS 中。超声破碎后, 再经 20% 蔗糖离心, 采用紫外分光光度法测定抗原蛋白含量。分装后作为正常抗原冻存于 -70℃ 备用。

1.6 毒种的 PCR 鉴定

常规方法提取病毒 DNA, 进行 PCR 扩增, 琼脂糖电泳后应能观察到 183 bp 的可见目的条带。PCR 产物送测序, 测序结果与 NCBI 核酸数据库比对。

1.7 判断标准的确定

依据实验动物国家标准选择 OD₄₉₀ 来读取吸光度。在阴、阳对照血清成立的情况下, 待检血清特异抗原孔 A 值 ≥ 0.2 、待检血清特异抗原孔 A 值/阴性对照特异抗原孔 A 值(P/N 值) ≥ 2.1 , 判为阳性。

1.8 正常抗原与特异抗原、酶结合物最佳工作浓度的确定

将阳性血清、阴性血清、包被抗原、HRP 标记的山羊抗大鼠 IgG 进行系列倍比稀释, 根据方阵滴定法确定试验的最适工作条件。

1.9 精密性测定

取阴性血清与阳性血清各一份, 1:40 稀释后, 各用一块纯化后 H-1 细小病毒包被的 96 孔板测定。得到的结果分别计算平均值及标准差, 计算板内变异系数(CV)。

1.10 特异性测定

用已建立的 ELISA 法和 XpressBio 公司检测试剂盒分别检测大鼠细小 KRV 病毒、小鼠微小病毒(MVM)、犬细小病毒(CPV)和猪细小病毒(PPV)阴、阳性血清, 同时设 H-1 病毒标准阴、阳性血清对照。

1.11 重复性测定

取纯化后 H-1 抗原包被的 96 孔板, 分别对 20 份血清(其中阴性血清 15 份, 阳性血清 5 份)重复测定三次, 计算结果的符合率。

1.12 稳定性测定

用纯化后 H-1 抗原包被 96 孔 ELISA 板 11 块, 其中一块保存于 4℃, 其余 10 块置于 37℃, 分别于第 1-10 天每天取出一块放 4℃ 保存, 同时检测同一批 15 份阴性血清和 5 份阳性血清。

1.13 敏感性测定

将 H-1 阳性对照血清 1:40 至 1:2560 系列稀释后,用所建立的 ELISA 方法检测,以确定所建立方法的敏感性。

1.14 与商品化试剂盒的比较

用购自 XpressBio 公司的 Toolan's H-1 Virus Rat 检测试剂盒与本研究所建立的 ELISA 方法同时检测 20 份大鼠血清(其中 15 份阴性血清,5 份阳性血清),对所建立的 ELISA 检测方法进行验证。

1.15 H-1ELISA 抗体检测方法的应用

用所建立的方法检测来自北京地区实验动物监督检验的 35 份大鼠血清。

2 结果

2.1 病毒培养结果

病毒经 C6 细胞培养 72 h 后完全病变,正常细胞对照与病变细胞结果见图 1 与图 2。



图 1 正常 C6 细胞培养 72 h 后
Fig.1 C6 cell was cultured 72 h

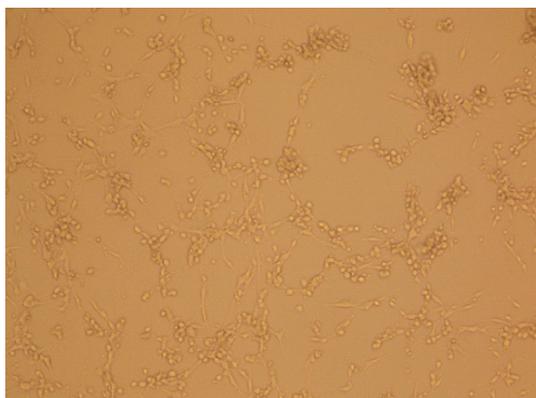


图 2 H-1 培养 72 h 后
Fig.2 H-1 virus was cultured 72 h

2.2 病毒滴定结果

采用 C6 细胞 96 孔细胞病变法对 H-1 细小病毒进行滴定,重复测定二次滴定结果按照 Karber 法计

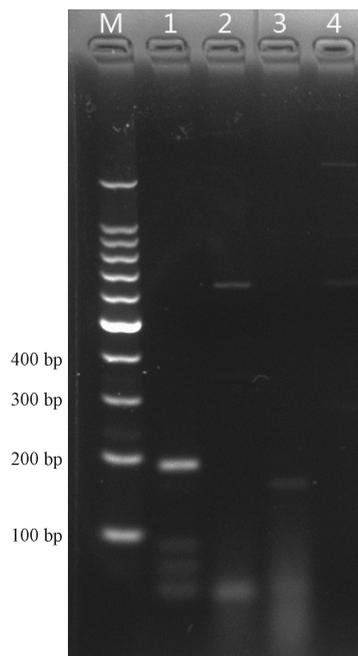
算。(Karber 法是计算病毒感染力的一种方法,其公式为: $LgTCID_{50} = L-d(S-0.5)$ 其中:L = 最高稀释度的对数;d = 稀释对数之间的差;s = 阳性孔比率总和),H-1 细小病毒滴度为 $6.5 LgTCID_{50}/0.1 mL$ 。

2.3 抗原的制备和纯化

分别制备和纯化 C6 细胞和 H-1 细小病毒作为正常抗原和特异抗原,采用分光光度法测定正常抗原和特异抗原的浓度,其中 C6 细胞正常抗原浓度为 $0.509 mg/mL$;H-1 细小病毒特异抗原浓度为 $6.597 mg/mL$ 。

2.4 毒种的 PCR 鉴定

用建立的 PCR 方法分别扩增 H-1、KRV、小鼠微小病毒(MVM)、猪细小病毒(PPV),结果显示,在以 H-1 为模板时出现 183 bp 的单一目的条带,以 KRV、小鼠微小病毒(MVM)、猪细小病毒(PPV)为模板时无目的条带出现(图 3)。



注:M:100 bp marker;1:H-1 病毒;2:KRV 病毒;
3:小鼠微小病毒;4:猪细小病毒。

图 3 H-1 细小病毒株 PCR 特异性结果

Note:M:100 bp marker;1:H-1; 2:KRV; 3:MVM; 4:PPV.

Fig.3 Specificity of H-1 Virus PCR

以 H-1 DNA 为模板,能扩增到 183 bp 的可见目的条带,PCR 产物送生工测序,测序结果与 NCBI 核酸数据库比对,与 H-1 细小病毒同源性达到 97%。

2.5 最佳工作条件确定

采用棋盘滴定法确定 H-1 细小病毒 ELISA 方法中正常抗原、特异抗原及 HRP 标记山羊抗大鼠

IgG 最佳工作浓度,其中正常抗原工作浓度为 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$,特异抗原工作浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,HRP 标记山羊抗大鼠 IgG 工作稀释度为 1:10000。

2.6 精密性测定

取阴性血清与阳性血清各一份,1:40 稀释后,各用一块纯化后 H-1 细小病毒包被的 96 孔板测定。得到的结果分别计算平均值及标准差,计算板内变异系数(CV),经计算,阴性血清与阳性血清 CV 值均小于 15% (表 1)。

表 1 H-1 细小病毒 ELISA 方法精密性检测

Tab.1 The precision of ELISA method for H-1 parvovirus

	阴性血清 (Negative serum)	阳性血清 (Positive serum)
平均值 (Mean)	0.0738	1.826
标准差 (standard deviation)	0.0074	0.201
$X \pm 2SD$	0.0738 ± 0.0074	1.826 ± 0.201
板内变异系数 (Coefficient of variation)	10.04%	11.0%

2.7 特异性测定

用已建立的 ELISA 法和 XpressBio 公司的 H-1 检测试剂盒分别检测大鼠细小 KRV 病毒、小鼠微小病毒 (MVM)、犬细小病毒 (CPV) 和猪细小病毒 (PPV) 阴、阳性血清,同时设 H-1 病毒标准阴、阳性血清对照。结果显示 H-1 细小病毒和 KRV 病毒阳性血清检测为阳性,其余病毒阴性及阳性血清检测均为阴性,所建立的 H-1 细小病毒 ELISA 方法有良好的种属特异性(表 2)。

表 2 H-1 细小病毒 ELISA 方法特异性试验结果

Tab.2 The specificity of ELISA method for H-1 parvovirus

阴、阳对照血清 (Negative and positive control serum)	H-1MVMCPVPPV						KRV			
	N/C	P/C	N/C	P/C	N/C	P/C	N/C	P/C	N/C	P/C
正抗 OD ₄₉₀ (C6 antigen)	0.076	0.069	0.039	0.023	0.041	0.052	0.057	0.043	0.052	0.009
特抗 OD ₄₉₀ (Viral antigen)	0.106	1.768	0.051	0.067	0.049	0.074	0.069	0.097	0.093	0.897

表 3 H-1 细小病毒 ELISA 方法重复性检测

Tab.3 Repeatability of ELISA method for H-1 parvovirus

	阴性血清 (Negative serum)			阳性血清 (Positive serum)		
	1	2	3	1	2	3
血清份数 (Serums numbers)	15	15	15	5	5	5
符合份数 (Coincidence numbers)	15	15	15	5	5	5
百分率 (%) (percentage)	100	100	100	100	100	100

2.8 检测方法重复性测定

将 15 份阴性血清和 5 份阳性血清 1:40 稀释后,重复测定三次,经计算分析三次测定的总符合率为 100%。三次测定阴性血清与阳性血清各自的符合率见表 3。

2.9 检测方法稳定性测定

37℃ 放置 0~10 d 的 H-1 细小病毒包被 11 块抗原包被板,同时检测阳性血清 5 份,阴性血清 15 份。比较检测结果的 P/N 值(表 4)。其中阴性血清 P/N 值均小于 2.1,阳性血清 P/N 值均大于 2.1,符合判断标准。

2.10 检测方法敏感性测定

用所建立的 ELISA 方法检测经倍比稀释的阳性血清,以确定该方法的敏感性(表 5)。经检测,阳性血清进行 1280 倍稀释后 P/N 值仍大于 2.1,该方法敏感性为 1:1280。

2.11 与商品化试剂盒的比较

用所建立的 H-1 细小病毒 ELISA 检测方法 with XpressBio 公司的 H-1 ELISA 检测试剂盒同时对 15 份阴性血清和 5 份阳性血清进行检测,检测结果显示所建立的方法与商品化试剂盒的符合率为 100% (表 6)。

2.12 H-1 细小病毒 ELISA 检测方法的初步应用

采用建立的 H-1 细小病毒 ELISA 检测方法检测 XpressBio 公司 H-1 试剂盒检测为阴性的大鼠血清 35 份,经检测均为阴性。

表 4 H-1 细小病毒 ELISA 方法稳定性检测
Tab. 4 Stability of ELISA method for H-1 parvovirus

血清编号 (Numbers of serum)	37℃ 放置时间(d) (The period of 37℃)										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0.89	0.73	0.91	1.01	0.66	0.82	0.96	0.59	0.77	0.41	0.55
2	0.73	0.74	0.88	0.81	0.56	0.65	0.91	0.59	0.83	0.48	0.64
3	0.83	0.74	0.96	0.78	0.60	0.72	0.99	0.64	0.97	0.46	0.59
4	0.69	0.62	0.75	0.49	0.50	0.48	0.72	0.47	0.84	0.42	0.62
5	1.07	0.99	1.21	1.15	0.78	0.97	1.22	0.83	1.27	0.61	0.78
6	1.20	1.08	1.33	1.36	0.84	1.12	1.38	0.77	1.33	0.71	0.88
7	0.93	0.74	1.21	1.02	0.62	0.74	1.06	0.55	0.89	0.54	0.69
8	0.46	0.67	0.61	0.69	0.34	0.47	0.71	0.47	0.50	0.35	0.34
9	0.86	0.73	0.97	0.85	0.71	0.93	0.91	0.67	0.86	0.47	0.60
10	0.84	0.66	0.94	1.02	0.66	0.83	1.09	0.72	0.84	0.42	0.58
11	0.96	0.71	1.12	1.05	0.81	1.03	1.18	0.76	0.96	0.46	0.69
12	0.79	0.70	1.03	0.81	0.61	0.77	1.32	0.68	0.79	0.45	0.64
13	1.24	1.01	1.48	1.34	0.91	1.18	1.65	1.05	1.24	0.65	0.92
14	1.17	1.07	1.60	1.28	0.94	1.15	1.51	0.94	1.17	0.69	0.99
15	0.97	0.96	1.12	1.23	0.71	0.99	1.10	0.66	0.97	0.62	0.69
16	21.79	20.30	20.39	16.57	13.17	14.26	19.37	13.78	20.80	13.88	12.59
17	22.19	19.08	20.18	16.05	13.44	14.03	19.31	12.45	18.66	13.40	12.42
18	18.43	18.82	18.93	15.78	13.40	14.05	21.88	12.70	13.14	12.27	11.92
19	16.33	20.84	19.25	15.81	12.17	13.96	21.10	12.49	10.79	12.24	11.80
20	20.46	19.16	18.48	15.70	14.88	13.04	21.57	12.30	7.30	11.97	12.07

表 5 H-1 细小病毒 ELISA 方法敏感性测定
Tab. 5 Sensitivity of ELISA method for H-1 parvovirus

	阳性血清稀释度(Dilution of positive serum)						
	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560
OD 值 (OD value)	1.973	1.666	1.231	1.135	0.958	0.438	0.149
P/N 值 (P/N value)	28.19	23.80	17.59	16.21	13.69	6.00	1.66

表 6 两种 ELISA 检测试剂结果比较
Tab. 6 Comparison of two kinds of ELISA methods

样品编号 (Number of samples)	预期结果 (Predict results)	H-1 细小病毒 ELISA 方法 (ELISA for H-1 parvovirus)			XpressBio 公司 ELISA 方法 (ELISA of XpressBio company)		
		OD 值 (OD value)	P/N 值 (P/N value)	检测结果 (results)	OD 值 (OD value)	P/N 值 (P/N value)	检测结果 (results)
1	阴性	0.110	1.57	阴性	0.148	1.40	阴性
2	阴性	0.079	1.13	阴性	0.136	1.28	阴性
3	阴性	0.053	0.76	阴性	0.126	1.19	阴性
4	阴性	0.070	1.00	阴性	0.142	1.34	阴性
5	阴性	0.067	0.96	阴性	0.144	1.36	阴性
6	阴性	0.057	0.81	阴性	0.122	1.15	阴性
7	阴性	0.076	1.09	阴性	0.122	1.15	阴性
8	阴性	0.077	1.10	阴性	0.113	1.07	阴性
9	阴性	0.080	1.14	阴性	0.093	0.88	阴性
10	阴性	0.053	0.76	阴性	0.117	1.10	阴性
11	阴性	0.053	0.76	阴性	0.136	1.28	阴性
12	阴性	0.052	0.74	阴性	0.116	1.09	阴性
13	阴性	0.059	0.84	阴性	0.092	0.87	阴性
14	阴性	0.048	0.69	阴性	0.111	1.05	阴性
15	阴性	0.050	0.71	阴性	0.119	1.12	阴性
16	阳性	1.525	16.94	阳性	1.456	19.95	阳性
17	阳性	1.553	17.26	阳性	1.306	17.89	阳性
18	阳性	1.290	14.33	阳性	0.920	12.60	阳性
19	阳性	1.143	12.70	阳性	0.755	10.34	阳性
20	阳性	1.432	15.91	阳性	0.511	7.00	阳性

3 讨论

GB/T 14926. 31 - 2001 中建议采用大鼠胚胎原代细胞(primary rat embryo cells, RE)培养 H-1 病毒。用 RE 细胞培养 H-1 病毒,费时、费力、易污染,并需要使用大量怀孕大鼠,在给 H-1 病毒的培养带来了诸多困难的同时也不符合动物福利的原则。刘先菊等^[4]报导可通过大鼠神经胶质瘤细胞 C6 可传代培养 H-1 细小病毒,为该病毒的大规模培养与制备提供了基础。

本研究首次建立了通过传代细胞培养 H-1 细小病毒的 ELISA 检测方法。采用大鼠脑胶质瘤细胞 C6 对 H-1 细小病毒进行培养,得到病毒滴度为 6.5LgTCID₅₀/0.1 mL 的病毒。该病毒经 PCR 方法验证为 H-1 细小病毒,与 NCBI 的序列进行比对,符合率为 97%。通过对获得的病毒进行超速离心和蔗糖梯度密度离心进行纯化,得到纯化的 H-1 细小病毒抗原,抗原浓度为 6.597 mg/mL。用该抗原作为包被抗原,建立 H-1 细小病毒的全病毒 ELISA 抗体检测方法。通过对方法的敏感性、稳定性、重复性、特异性和精确性进行验证,确定该方法可检测出大于 1:1280 稀释的阳性血清,37℃ 放置 10 d 不影响其检测效果。所建立的检测方法 with XpressBio 公司的 H-1 检测试剂盒均与犬细小病毒、猪细小病毒和小鼠细小病毒阳性血清间无交叉反

应,但两种方法均与大鼠细小病毒 KRV 有交叉反应,经 NCBI 比对, H-1 细小病毒与大鼠细小病毒 KRV 的序列同源性达到 90%,其中两种病毒非结构蛋白 NS-1 同源性为 99%,非结构蛋白 NS-2 同源性为 98%,结构蛋白 VP-1 同源性为 81%,结构蛋白 VP-2 同源性为 78%,通过序列比对说明 H-1 细小病毒和 KRV 细小病毒之间具有交叉抗原,需要针对两种病毒结构蛋白的差异分别建立检测方法来进行区分,有待进一步研究。

本方法的建立,可有效补充国家标准中 H-1 细小病毒检测方法,并可代替国外同类试剂盒对大鼠血清中 H-1 细小病毒抗体进行检测。

参考文献:

- [1] 田克恭. 实验动物病毒性疾病[M]. 北京: 农业出版社. 1992: 126 - 132.
- [2] 田克恭, 贺争鸣, 刘群, 等. 实验动物疫病学[M]. 北京: 中国农业出版社. 2014: 205.
- [3] Karsten Geletneký, Andreas D. Hartkopf, Robert Krempien, *et al.* Therapeutic implications of the enhanced short and long-term cytotoxicity of radiation treatment followed by oncolytic parvovirus H-1 infection in high-grade glioma cells [J]. *Bioengineered Bugs*, 2010, 1: 429 - 433.
- [4] 刘先菊, 佟巍, 张丽芳, 等. 大鼠细小病毒 H-1 株培养方法的建立[J]. *中国实验动物学报*, 2011, 19: 495 - 498.

[修回日期]2015 - 11 - 08