

卵清蛋白多克隆抗体的制备及其双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立

李 妮 朱文勇 宋绍辉 钊鸿云 吴雅楠 赵蕊蕊 廖国阳

摘 要 **目的** 建立卵清蛋白(ovalbumin,OVA)双抗体夹心 ELISA 检测方法并进行验证,用于定量检测鸡胚流感疫苗中的 OVA 含量。**方法** 建立双抗体夹心酶联免疫法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA),对该方法的反应条件进行优化,确定定量范围及检测下限,并对重复性、特异性和准确度进行验证。**结果** 建立的方法最适包被抗体和酶标抗体浓度分别为 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 和 0.5 $\mu\text{g/ml}$,最适封闭液配方为 1% BSA + 1% 蔗糖。该方法的 cut-off 值为 0.134,线性范围为 0.313 – 20.000ng/ml,定量下限为 0.078ng/ml。重复性好,板内变异系数为 3.428% ~ 25.953%,板间变异系数为 5.375% ~ 27.614%。特异性好,准确度高,检测结果与试剂盒检测结果符合率为 91.43% ~ 102.96%。稳定性好,预包装的酶标板冻存于 -20 $^{\circ}\text{C}$,半年内检测样本变异系数为 1.976% ~ 14.409%。**结论** 建立了快速、简便、低成本的 OVA 定量检测方法,可用于鸡胚流感疫苗中 OVA 定量检测。

关键词 卵清蛋白 多克隆抗体 双抗体夹心 ELISA

中图分类号 R392.1

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2021.12.013

Preparation of Ovalbumin Polyclonal Antibody and Establishment of Double Antibody Sandwich ELISA. Li Ni, Zhu Wenyong, Song Shao-hui, et al. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Yunnan 650118, China

Abstract Objective To establish and verify a double antibody sandwich ELISA detection method for determination of ovalbumin in influenza vaccine. **Methods** A double antibody sandwich ELISA for ovalbumin was developed. The reaction conditions of this method were optimized, the quantitative range and the lower limit of detection were determined, and the repeatability, specificity and accuracy were verified. **Results** The optimal coating antibody and enzyme-labeled antibody concentrations of the established method were 2.5 $\mu\text{g/ml}$ and 0.5 $\mu\text{g/ml}$, respectively, and the 1% BSA and 1% sucrose was used as blocking reagent. The Cut-off value of this method is 0.134, the linear range and detection lower limit of the method were 0.313 – 20.000ng/ml and 0.078ng/ml respectively. The interplate and intraplate coefficient of variation were 3.428% – 25.953% and 5.375% – 27.614% respectively, indicating a reliable repeatability. The compliance rate between this method and the kit is 91.43% – 102.96%, revealing a high accuracy, and high specificity. The coefficient of variation of the sample tested by prepared plate was frozen and stored at -20 $^{\circ}\text{C}$ within half a year was between 1.976% and 14.409%, indicating a reliable stability. **Conclusion** The developed method showed lower cost and convenience, which might be used for quantitative detection of ovalbumin in chicken embryo influenza vaccine.

Key words Ovalbumin; Polyclonal antibody; Double antibody sandwich ELISA

甲型和乙型流感病毒引起的季节性流感每年在全球可造成(300 ~ 500)万例重症病例以及数千人死亡,警示我们开发流感病毒疫苗势在必行^[1,2]。接种疫苗是预防流感最有效的手段,且由于流行毒株每年可能发生不可预测的变化,流感疫苗需要每年进行接种^[3-8]。目前,美国食品和药品监督管理局(FDA)批准的流感疫苗主要有 3 类,即裂解灭活流感疫苗、重

组流感疫苗和减毒活疫苗^[9]。其中,季节性流感疫苗主要采用鸡胚进行生产,含有鸡胚来源的杂蛋白,所以鸡蛋过敏人群被禁止接种流感疫苗^[10]。卵清蛋白(ovalbumin,OVA)是鸡胚中含量最高的蛋白,具有强免疫原性,疫苗中卵清蛋白含量过高会导致不良反应并降低机体对疫苗的耐受性。最近的一项研究表明,大多数鸡蛋过敏患者也可以安全地接种含有少量 OVA 的流感疫苗^[11]。故降低疫苗中卵清蛋白含量是提高疫苗安全性和耐受性的关键因素。以往对卵清蛋白定量常采用 RPHA、单向免疫扩散(SRID)、常规免疫电泳和对流免疫电泳法,但这些方法操作繁琐,敏感度低,不适于准确定量^[12-14]。德国赛乐美诊

基金项目:中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2020-I2M-2-014)

作者单位:650000 昆明,中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所

通讯作者:廖国阳,电子信箱:liaogy@imbcams.com.cn

断有限公司研制的 OVA 定量检测试剂盒 Serazym® Ovalbumin 操作简便,敏感度高,是国内外主要采用的检测方法。但该试剂盒检测成本较高,不适于在生产工艺中推广应用。故研制一种操作简单、敏感度高、成本低廉的 OVA 定量检测试剂盒对于鸡胚流感疫苗生产是十分必要的。

本研究描述了一种定量检测 OVA 含量的双抗体夹心 ELISA 方法,该方法具有高度特异性及敏感度,且成本低廉,可应用于鸡胚流感疫苗生产中 OVA 含量的测定,为鸡胚流感疫苗研发中的质量控制提供了支持。

材料与方法

1. 主要材料及仪器设备:辣根过氧化物酶标记的兔抗卵清蛋白多克隆抗体(PA1-196-HRP)购自美国 Thermo Fisher 公司;鸡卵清蛋白参考品原料(A5503-1G)(纯度 $\geq 98\%$)购自美国 Sigma 公司,赛乐美卵清蛋白定量检测试剂盒 Serazym® Ovalbumin 购自德国赛乐美诊断有限公司;酶标仪购自美国 Bio-Rad 公司;隔水式恒温培养箱购自美国 Thermo Fisher 公司。

2. 实验动物:清洁级雌性新西兰大白兔,体质量为 2.5~3.0kg,购自昆明医科大学。

3. 参考品制备:购自美国 Sigma 的高纯度卵清蛋白参考品原料采用称重法配制成为 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 的储液,用购自德国赛乐美的卵清蛋白试剂盒对该参考品浓度进行验证后再分别稀释至 20、10、5、2.5、1.25、0.625、0.313ng/ml。

4. 兔多克隆抗体的纯化:采用 Protein G 亲和层析柱对兔抗 OVA 血清进行纯化,获得兔多抗 IgG。亲和层析操作由 AKTApurifier 层析系统实现,纯化过程中收集流出液和洗脱液样品,通过监控 280nm 波长处的吸收度(mAU)值来确定收集抗体的时间。对收集到的抗体采用间接 ELISA 方法测定效价,采用 SDS-PAGE 测定纯度,采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定浓度。

5. 双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立:按以下步骤进行双抗体夹心 ELISA 实验。捕获抗体 100 微升/孔包被酶标板,4℃ 孵育过夜;PBST 洗板 3 次并拍干,加入封闭液(含质量分数 1% BSA 的 PBS),250 微升/孔封闭酶标板,37℃ 孵育 2h;PBST 洗板 3 次并拍干,100 微升/孔加入抗原,37℃ 孵育 1h;PBST 洗板 3 次并拍干,100 微升/孔加入酶标抗体,37℃ 孵育 1h。显色:洗板 5 次并拍干,100 微升/孔加入 TMB 显色

液,37℃ 避光孵育 15min;加入终止液(2mol/L H_2SO_4),50 微升/孔,酶标仪检测 450nm 波长处 A 值。

6. 方法优化:(1)捕获抗体及酶标抗体浓度的确定:采用棋盘滴定法,将捕获抗体稀释至 4、3、2.5、2 $\mu\text{g/ml}$ 包被酶标板,以浓度为 20ng/ml 的标准品作为阳性对照,PBS 作为阴性对照,酶标抗体稀释至浓度为 0.5、0.25、0.125 $\mu\text{g/ml}$ 加入酶标板,每种条件做两个复孔,其余步骤同第 5 项。根据比较不同抗体浓度组合下,阳性对照检测结果(P)比阴性对照检测结果(N)的值(P/N)来确定最适抗体浓度。(2)封闭液确定:捕获抗体及酶标抗体均采用第 6 项确定的最适浓度,以浓度为 20ng/ml 的标准品作为阳性对照,PBS 作为阴性对照,分别用不同封闭液(未封闭、PBS 稀释的 1% BSA、2% BSA、1% BSA + 1% 蔗糖、2% BSA + 2% 蔗糖)于 37℃ 封闭 2h,每种条件做 2 个复孔,比较 P/N 值的大小选择最适封闭液配方。(3)判断标准的确定:采用优化后的体系检测 51 份阴性样本,计算 cut-off 值作为判断标准。

7. 方法的验证:(1)线性范围及敏感度验证:将卵清蛋白标准品分别稀释为 20、10、5、2.5、1.25、0.625、0.313、0.156、0.078、0.039、0.020、0.010ng/ml 进行检测,每个浓度设置 3 次重复。对标准品浓度及对应吸光度值进行直线回归分析,并计算相关系数 r^2 。根据“方法优化”项确定的 cut-off 值判断该体系的敏感度。(2)重复性验证:板内重复性实验:随机选取阴性和阳性样本各 5 份同时设置空白对照组和阴性对照组,每份样本做 3 个复孔,于同一块酶标板上检测,计算同一份样本板内的变异系数[CV(%)]。板间重复性实验:取 3 块酶标板,对上述进行板内重复性检验的样本进行检测,每份样本做 3 个复孔,计算同一份样本板间的变异系数。(3)特异性验证:用建立的方法分别对甲肝病毒、Vero 细胞上清液、流感病毒、新型冠状病毒、肺炎支原体、脱脂奶粉、0.01mol/L PBS、BSA、鸡蛋蛋清、鸭蛋蛋清、鹌鹑蛋蛋清、鸡胚培养流感病毒 H3N2 单价原液、鸡胚培养流感病毒 H3N2 尿囊收获液、Sigma 鸡卵清蛋白标准品、solarbio 鸡卵清蛋白标准品、赛乐美试剂盒卵清蛋白标准品(20ng/ml)等 16 份样本进行检测,根据“方法优化”项确定的 cut-off 值验证该方法的特异性。(4)准确度验证:随机选取 4 个批次的流感病毒裂解疫苗半成品用建立的方法和购自赛乐美的卵清蛋白检测试剂盒进行检测,比较建立的方法检测结果与试剂盒检测结果符合率,评价建立的方法检测样本的准

确性。(5)稳定性验证:从来自鸡胚流感裂解疫苗生产工艺的样本中选择强阳性样本、弱阳性样本和阴性样本各 3 份。用该方法预包被后于 -20℃ 冻存 1 周、1 个月、3 个月及 6 个月的酶标板对上述样本进行稳定性试验。

结 果

1. 兔抗 OVA 血清纯化验证结果:经 Protein G 层析柱亲和层析可有效分离血清中的杂蛋白(图 1 中 a~b 段),收集获得高纯度的 IgG 抗体(图 1 中 c~d 段)。对收集的抗体进行 SDS-PAGE 电泳,结果显示只有相对分子质量为 57.92kDa 和 35.44kDa 的重链、轻链各一条,表明亲和层析纯化后得到了纯度较高的兔抗 OVA 多抗(图 2)。间接 ELISA 方法测得多抗的效价为 1:64000,BCA 法测得蛋白浓度为 12.0mg/ml。

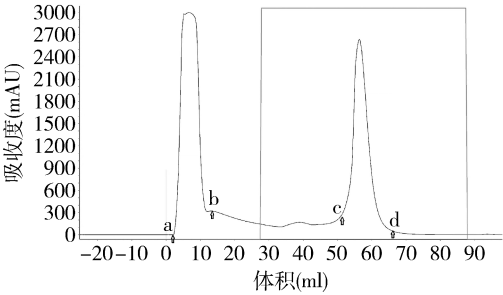


图 1 纯化兔抗 OVA 血清的亲和层析图谱
a~b. 流穿峰;c~d. 洗脱峰

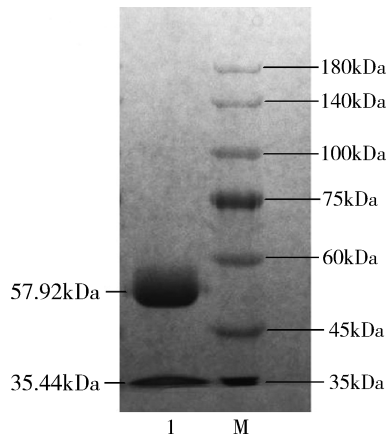


图 2 兔抗 OVA 血清亲和层析纯化后 SDS-PAGE 电泳图
1. 收集的洗脱液;M. 蛋白 marker

2. 方法优化的结果:(1)最适捕获抗体和酶标抗体浓度:当捕获抗体浓度为 2.5μg/ml,酶标抗体浓度为 0.5μg/ml,P/N 值最大,为 38.483。故选择捕获抗体及酶标抗体最适工作浓度分别为 2.5μg/ml 和 0.5μg/ml(表 1)。(2)最适封闭液:当用 1% BSA +

1% 蔗糖封闭时,P/N 值较大,为 45.526,故选择 1% BSA + 1% 蔗糖作为最适封闭液配方(表 2)。(3)判断标准的确定:51 份阴性样本检测结果平均值为 0.065,标准差为 0.023,在要求 99% (单侧)可信度条件下,采用以吸光度均值 + 3 倍标准差作为阳性判断值^[15]。计算得 cut-off 值为 0.134,故检测结果 >0.134 时判断为阳性,检测结果 ≤0.134 则判为阴性。

表 1 捕获抗体和酶标抗体工作浓度优化结果

酶标抗体浓度 (μg/ml)	包被抗体浓度 (μg/ml)	P	N	P/N
0.5	4.0	2.554	0.088	29.023
	3.0	2.393	0.071	33.704
	2.5	2.232	0.058	38.483
	2.0	1.812	0.048	37.750
0.25	4.0	2.056	0.068	30.235
	3.0	1.783	0.071	25.113
	2.5	1.411	0.049	28.796
	2.0	1.323	0.042	31.500
0.125	4.0	1.351	0.053	25.491
	3.0	1.169	0.046	25.413
	2.5	0.894	0.038	23.526
	2.0	0.835	0.036	23.194

P. 阳性对照 A 值;N. 阴性对照 A 值

表 2 封闭液优化结果

封闭条件	P	N	P/N
未封闭	0.100	0.017	5.882
1% BSA	0.847	0.033	25.667
1% BSA + 1% 蔗糖	0.865	0.019	45.526
2% BSA	0.764	0.026	29.385
2% BSA + 2% 蔗糖	0.762	0.024	31.750

P. 阳性对照 A 值;N. 阴性对照 A 值

3. 方法验证的结果:(1)线性范围及敏感度验证结果:5 次实验绘制标准曲线均表明,当卵清蛋白浓度为 20.000ng/ml 到 0.313ng/ml,A₄₅₀ 值与样品浓度呈良好的线性关系,且回归系数 r² 均大于 0.97,且重复性好(图 3)。并根据 cut-off 值确定该检测方法的检测下限为 0.078ng/ml。(2)重复性验证结果:板内最大 CV 值为 25.953%,最小为 3.428%;板间最大 CV 值为 27.614%,最小为 5.375%,表明该方法具有较高的重复性(表 3)。(3)特异性验证结果:对已知背景的 16 份样本进行检测,检出阳性样本 8 份,阴性样本 8 份,与已知背景相符,表明该方法具有较高的

特异性。(4)准确度验证结果:采用本方法与购自德国赛乐美的卵清蛋白试剂盒对 4 份 H1N1 流感疫苗半成品进行检测,结果表明,该方法检测结果与试剂盒检测结果符合率为 91.43% ~ 102.96%,二者比较差异无统计学意义,说明建立的检测方法具有较高的准确度(表 4)。稳定性验证结果:用冻存不同时间的预包被酶标板对上述样本进行检测,变异系数为 1.976% ~ 14.409%,表明该方法具有较高的稳定性(表 5)。

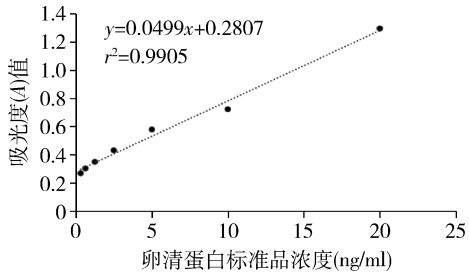


图 3 双抗体夹心 ELISA 定量 OVA 的标准曲线

表 3 板内及板间重复性验证

样本编号	板间重复性			板内重复性		
	平均值	标准差	CV (%)	平均值	标准差	CV (%)
1	0.065	0.0108	16.641	0.077	0.0172	22.378
2	0.077	0.0164	21.353	0.093	0.0240	25.953
3	0.071	0.0195	27.614	0.054	0.0098	18.346
4	0.065	0.0095	14.541	0.067	0.0090	13.460
5	1.581	0.1968	12.450	1.627	0.0558	3.428
6	1.854	0.1426	7.693	1.928	0.1669	8.654
7	1.702	0.0915	5.375	1.676	0.1152	6.872
8	1.314	0.1483	11.292	1.385	0.0976	7.045
9	0.599	0.1483	23.560	0.508	0.0474	9.322

表 4 准确度验证

样本编号	该方法检测 浓度 (ng/ml)	试剂盒检测 浓度 (ng/ml)	符合率 (%)
1	32.576	31.678	102.83
2	25.547	24.813	102.96
3	10.875	11.213	96.99
4	14.534	15.896	91.43

讨 论

疫苗是控制流感病毒感染传播最经济有效的手段,季节性流感疫苗主要采用鸡胚生产。研究表明, OVA 可导致炎性细胞侵入呼吸道,引起雌性 BALB/c 小鼠脂质过氧化从而引起 DNA 损伤,以及诱导细胞完整性损伤导致细胞功能障碍^[16,17]。故降低疫苗中

表 5 稳定性验证

样本编号	1 周	1 个月	3 个月	6 个月	平均值	标准差	CV (%)
1	2.758	2.704	2.640	2.656	2.690	0.053	1.976
2	2.045	2.124	1.989	2.145	2.076	0.072	3.473
3	1.468	1.464	1.349	1.320	1.400	0.077	5.489
4	0.585	0.542	0.498	0.512	0.534	0.038	7.205
5	0.768	0.730	0.687	0.705	0.723	0.035	4.856
6	0.471	0.438	0.456	0.442	0.452	0.015	3.315
7	0.065	0.058	0.072	0.062	0.071	0.010	14.409
8	0.051	0.049	0.050	0.045	0.049	0.003	5.395
9	0.072	0.066	0.065	0.068	0.065	0.006	8.793

1 ~ 3. 强阳性样本;4 ~ 6. 弱阳性样本;7 ~ 9. 阴性样本

OVA 含量对于提高疫苗的安全性和免疫原性至关重要。以往对卵清蛋白定量的方法具有操作繁琐、成本高昂、敏感度低等问题,与传统方法比较,利用双抗体夹心 ELISA 方法进行检测具有以下明显优势:(1)检测敏感度高,检测可达到纳克级别。(2)操作简便,预包被酶标板可在 - 20℃ 长期保存,单次检测操作可

在 3h 内完成。(3)价格低廉,可大大节约检测成本。故双抗体夹心 ELISA 检测方法可对鸡胚流感病毒疫苗及工艺阶段样品中 OVA 进行定量检测。
本研究通过制备兔抗 OVA 多克隆抗体,建立了一种快速、简便、低成本的双抗体夹心 ELISA 检测方法,并进行了验证。采用纯化后的多克隆抗体作为捕

获抗体,避免了血清中杂蛋白造成的交叉反应,有助于提高检测的敏感度和准确度。另外,直接采用带有辣根过氧化物酶标记的兔抗 OVA 多克隆抗体作为检测抗体,与采用酶标二抗比较,节约了操作时间,且避免了酶标二抗导致的交叉反应。对该方法的准确性、敏感度、重复性和特异性进行了验证,敏感度高,重复性好,特异性强,检测准确度不低于德国赛乐美卵清蛋白定量检测试剂盒,可用于鸡胚流感疫苗中卵清蛋白定量检测。但 ELISA 方法采用酶联免疫进行反应,特异性和敏感度有一定局限,而随着纳米材料在医学研究中的进一步应用,金纳米颗粒在提高 ELISA 分析的敏感度和特异性方面也展现出重要作用,笔者也希望通过引入金纳米颗粒或可开发出更高敏感度和特异性的卵清蛋白定量检测方法^[18]。

参考文献

- 1 Kalarikkal SM, Jaishankar GB. Influenza vaccine [M]. In: Statpearls. Treasure Island (FL) : StatPearls Publishing; February 16, 2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/s. webvpn. cams. cn/books/NBK537197/>
- 2 Sayedahmed EE, Elkashif A, Alhashimi M, *et al.* Adenoviral vector – based vaccine platforms for developing the next generation of influenza vaccines[J]. Vaccines (Basel) , 2020 , 8 (4) : 574
- 3 Dhakal S, Klein SL. Host factors impact vaccine efficacy: implications for seasonal and universal influenza vaccine programs[J]. J Vir-ol , 2019 , 93 (21) : e719 – e797
- 4 Chen R, Holmes EC. Avian influenza virus exhibits rapid evolutionary dynamics[J]. Mol Biol Evol , 2006 , 23 (12) : 2336 – 2341
- 5 Harding AT, Heaton NS. Efforts to improve the seasonal influenza vaccine[J]. Vaccines (Basel) , 2018 , 6 (2) : 19
- 6 Taubenberger JK, Morens DM. Influenza: the once and future pan-
demic[J]. Public Health Rep , 2010 , 125 (Suppl 3) : 16 – 26
- 7 Subbarao K, Joseph T. Scientific barriers to developing vaccines a-
gainst avian influenza viruses[J]. Nat Rev Immunol , 2007 , 7 (4) :

(上接第 28 页)

- 22 Li XJ,Zhong H,Bao WL,*et al.* Defective regulatory B - cell compartment in patients with immune thrombocytopenia[J]. Blood,2012,120 (16) :3318 - 3325
- 23 Lang GA,Johnson AM,Devera TS,*et al.* Reduction of CD1d expression in vivo minimally affects NKT - enhanced antibody production but boosts B - cell memory[J]. Int Immunol,2011,23 (4) : 251 - 260
- 24 王明镜,胡晓梅,丁晓庆,等. 气不摄血证免疫性血小板减少症患者细胞免疫功能变化及其临床意义[J]. 世界中医药,2018,13 (4) :822 - 825

- 267 – 278
- 8 Shapshak P, Chiappelli F, Somboonwit C, *et al.* The influenza pandemic of 2009: lessons and implications[J]. *Mol Diagn Ther*, 2011, 15(2): 63 – 81
- 9 Estrada LD, Schultz – Cherry S. Development of a universal influenza vaccine[J]. *J Immunol*, 2019, 202(2): 392 – 398
- 10 Trombetta CM, Marchi S, Manini I, *et al.* Challenges in the development of egg – independent vaccines for influenza[J]. *Exp Rev Vaccines*, 2019, 18(7): 737 – 750
- 11 Tozandehjani S, Kalmazari RN, Khodabandehloo M, *et al.* Safety of inactivated influenza vaccine in patients with egg allergy in kurdistan province, Iran[J]. *Iranian J Public Health*, 2019, 48(4): 758 – 763
- 12 田博, 施彤, 王晋, 等. 酶联法检测流感疫苗中卵清蛋白含量试剂盒的质量验证[J]. *中国生物制品学杂志*, 2006, 19(6): 647 – 648
- 13 黄楨祥编. 医学病毒学基础及实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1990
- 14 辛忠, 范宇红, 庄茂欣, 等. 流感疫苗中卵清蛋白检定方法精确度的探讨[J]. *生物技术*, 2004, 14(4): 34 – 35
- 15 丁军, 赵晓静, 虞楷锐, 等. 猪戊型肝炎病毒血清抗体间接 ELISA 检测方法的建立与应用[J]. *畜牧兽医学报*, 2018, 49(10): 2240 – 2248
- 16 Cui J, Xu F, Tang Z, *et al.* Bu – Shen – Yi – Qi formula ameliorates airway remodeling in murine chronic asthma by modulating airway inflammation and oxidative stress in the lung[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 112: 108694
- 17 Wafriy CI, Kamsani YS, Nor – Ashikin M, *et al.* Ovalbumin causes impairment of preimplantation embryonic growth in asthma – induced mice[J]. *J Reprod Immunol*, 2021, 143: 103240
- 18 Tabatabaei MS, Islam R, Ahmed M. Applications of gold nanoparticles in ELISA, PCR, and immuno – PCR assays: a review[J]. *Anal Chim Acta*, 2021, 1143: 250 – 266

(收稿日期: 2021-06-04)

(修回日期: 2021-08-03)

- 25 吴玉霞,黄志惠,袁忠.健脾益气摄血颗粒对脾气虚型慢性免疫性血小板减少症淋巴细胞亚群的影响[J].湖南中医药大学学报,2016,36(9):65-68
- 26 徐祖琼,朱学军,代兴斌.肿节风联合小剂量泼尼松治疗原发性免疫性血小板减少症的临床观察[J].川北医学院学报,2017,32(6):874-876,896
- 27 张旻昱,彭素娟,杨琳.凉血散血方对免疫性血小板减少症模型大鼠CD40L表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2013,33(11):32-35

(收稿日期:2021-06-30)

(修回日期:2021-07-19)