

## 酵素連結免疫吸附法檢測口蹄疫抗原之研發

陳姿菡<sup>1,2\*</sup>、林有良<sup>1</sup>、李 璠<sup>1,2</sup>、黃淑敏<sup>1,2</sup>、石佳霓<sup>1</sup>、黃金城<sup>1</sup>、蔡向榮<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>行政院農業委員會家畜衛生試驗所

<sup>2</sup>國立臺灣大學獸醫專業學院

<sup>3</sup>國立臺灣大學人畜共通傳染病研究中心

**摘要** 本研究目的主要研發間接型三明治酵素連結免疫吸附法檢測豬口蹄疫病毒抗原。本研究係利用口蹄疫重組結構蛋白及不活化病毒分別產製的單株抗體及多株抗體，並分別以蕁荳過氧化酶及生物素標示，以建立二種酵素連結免疫吸附法。結果顯示於空白樣品試驗組中所使用的單株抗體與多株抗體不會產生交叉反應，且能有效捕捉陽性樣品中的抗原。以口蹄疫七種血清型不活化抗原標準品檢測發現陽性分析特異性高。另以口蹄疫病毒 O 型陽性抗原標準品進行 10 倍序列稀釋後測試評估 RT-PCR、商品化免疫色層分析測試片及酵素連結免疫吸附法，其分析敏感性分別為  $10^6$  倍、 $10^3$  倍及  $10^3$  倍，且不會與豬水疱病病毒產生非特異性反應。

**關鍵詞：**口蹄疫病毒、豬水疱病病毒、酵素連結免疫吸附法、免疫色層分析測試片、抗原檢測、反轉錄聚合酶鏈反應

### 緒言

口蹄疫 (Foot-and-Mouth Disease ; FMD) 及豬水疱病 (Swine Vesicular Disease ; SVD) 為豬隻高度傳染之病毒性疾病。FMD 病毒是正股 RNA 病毒，在 *Picornaviridae* 科之成員中隸屬於 *Aphthovirus* 屬，為小的無封套病毒，含有 8.5 kbp 基因可轉譯出 12 個結構與非結構蛋白 (NSP)。本病毒含有 7 種血清型，包括 O、A、C、Asia 1、SAT 1、SAT 2 和 SAT 3 等分佈在全世界，此疾病在臨床上無法與豬水疱病 (SVD)、豬水疱性口炎 (VS) 及豬水泡疹 (VE) 等有效區別診斷。而 SVD 病毒歸類於人類 *Coxsackievirus* B5 (CVB5) 之豬型變異株，隸屬於 *Picornaviridae* 家族中之腸病毒 (*Enterovirus*) 屬，而抗原性相當接近於 CVB5，至今仍為單一血清型 [21,22]。

近幾年來，針對豬隻疾病及水疱性疾病之試驗研

究，已應用於牛、豬、羊等動物的抗原檢測方法不勝枚舉，如 ELISA [1,5,8,13,19]、EITB (Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay) [2]、RT-PCR [1,10,13,18,19]、RT-PCR-ELISA [13]、Real-time RT-PCR [15,17]、生物晶片 (Microarray-based) [12]、免疫色層分析測試片 (Chromatographic pen-side strip strip test; Lateral flow devices (LFD) ; Lateral flow assay (LFA) [3,6,11,14,16,20]、RT-LAMP (Reverse transcription -Loop-mediated isothermal amplification) [4]、Piezo electric immunobiosensor [7] 及 Multiplexed luminex [9] 等方法。

然依據世界動物衛生組織 (Office International Des Epizooties ; OIE) 2009 年口蹄疫-陸生動物診斷試驗及疫苗手冊 (Manual of diagnostic tests and

\*抽印本索取作者  
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

vaccines for terrestrial animals) 建議鑑定病原的方法有病毒分離 (Virus isolation)、ELISA、RT-PCR、免疫色層分析測試片、補體結合試驗 (Complement fixation test; CF) 等, 其中ELISA試驗是多數實驗室常使用的檢測方法, 由於敏感性及特異性高而不受pro-或anti-complementary factors之影響, 故已成為補體結合試驗的替代方法[21]。

本試驗為了建立一套具準確及敏感性的測試方法, 主要利用原核表現系統生產口蹄疫結構重組蛋白, 從而分別建構此重組蛋白及不活化病毒的單株抗體及多株抗體, 建立口蹄疫抗原檢測ELISA方法, 並實際應用於送檢病例之檢測, 期能快速有效地區別口蹄疫及豬水疱病等二種水泡性疾。

## 材料及方法

### 量產口蹄疫病毒 O 血清型結構重組蛋白的誘導表現及純化

以口蹄疫表現質體量產重組蛋白質, 經膠片電泳分析 (SDS-PAGE assay) 確認預期的分子量大小, 進而量產及利用低壓層析儀 (LC) 以親和性色層分析法純化重組蛋白。

### 重組蛋白質之功能性試驗

以西方墨點轉漬分析法 (Western blot assay) 確定功能性蛋白質與抗體之作用。

### 蛋白質濃度測定

利用分光光度儀建立標準蛋白BSA曲線, 以推算未知樣品蛋白質濃度, 進而取適當濃度製備單株抗體。

### 蔗糖梯度濃縮口蹄疫及豬水疱病不活化病毒液 (O/TAW/97, O/TAW/99, SVDV) 之製備

將口蹄疫及豬水疱病等病毒之各約 $10^{6.5}$  TCID<sub>50</sub> / 50 $\mu$ L細胞培養BEI不活化病毒液以蔗糖預鑄梯度之超高速區帶離心法進行純化濃縮製成。

### 單株及多株抗體之製備

將口蹄疫病毒結構重組蛋白及不活化病毒分別接種於實驗動物小白鼠及兔子, 小白鼠以間隔四週免疫接種3~4次, 進行篩選株化抗體, 以間接型ELISA測定抗體力價, 繼而增殖量產、IgG純化、濃度測定及

Isotyping等, 待收集之單株及多株抗體以備檢測口蹄疫及豬水疱病抗原。

### 口蹄疫七種血清型不活化抗原陽性標準品

購自英國口蹄疫參考實驗室 (The Institute for Animal Health, Pirbright, United Kingdom), 包括 O、A、C、Asia 1、SAT 1、SAT 2、SAT 3 等陽性標準品。

### 反轉錄聚合酶鏈反應 (Reverse transcription polymerase chain reaction; RT-PCR)

以OIE公佈之特異性引子增幅O型口蹄疫病毒標準抗原, 利用反轉錄聚合酶鏈反應, 經Denaturation, Annealing, Extension等步驟, 以循環該三步驟進行樣品中的病毒核酸 (Nucleic acid) 增幅反應。

### 免疫色層分析測試片 (Chromatographic strip)

商品化產品 (SVANODIP® FMDV-Ag test, Sweden), 主要檢測拭子及組織樣品中的口蹄疫抗原。

### 建立 HRP 及 Biotin streptavidin 系統之酵素連結免疫吸附法 (ELISA)

以HRP及Biotin streptavidin結合系統分別與單株或多株抗體進行結合作為試驗報告者 (Reporter), 方法則依照產品 (Innova Biosciences, Cambridge, UK) 建議之說明書完成。續以建立口蹄疫七種血清型之抗原檢測差異性分析, 及建立FMDV及SVDV抗原之檢測標準曲線及最適化條件, 以作為進一步檢測各種陽性試驗樣品 (23支水泡液、13支咽喉拭子及3支濃縮不活化病毒液等) 進行抗原檢測分析時之依據。

### 比較試驗

分別以ELISA方法及商品化免疫色層分析測試片診斷試劑比較二種疾病之抗原檢測分析敏感性與分析特異性, 並建立水泡性疾不活化抗原檢測之區別診斷分析。

## 結果

### 量產融合蛋白質的誘導表現及純化

經RT-PCR增幅約132 bp之產物，以pET原核表現系統量產FMDV-SP結構重組蛋白如預期為25 KDa，該批之重組蛋白質濃度約為10 mg/mL。

### 重組蛋白質之功能性試驗

利用西方墨點轉漬分析法（Western blot assay），以重組蛋白與FMDV豬抗血清之多株抗體進行測試呈陽性反應。

### 單株及多株抗體之製備

以實驗動物小鼠及兔子分別製備O型FMDV（O/TAW/97）-IgG單株抗體及多株抗體，最高稀釋倍數分別為8,000及16,000倍。

### 反轉錄聚合酶鏈反應（Reverse transcription polymerase chain reaction; RT-PCR）

以OIE之特異性引子增幅O型口蹄疫病毒標準抗原，利用反轉錄聚合酶鏈反應，於Agarose膠片上呈現大小約328 bp之產物。

### 建立 HRP 及 Biotin streptavidin 鍵結體之間接型三明治酵素連結免疫吸附法（Sandwich ELISA）

利用HRP及Biotin streptavidin結合檢測系統應用於Sandwich ELISA之研發，自標準曲線及最適化條件分析發現二種系統皆有檢測FMDV（O/TAW/97, O/TAW/99）及SVDV抗原等能力（圖1），結果顯示於空白樣品試驗組中證實本方法所使用的單株抗體（Capture antibody）不會與多株抗體（Reporter antibody）產生交叉反應，且能有效捕捉樣品中的抗原。以口蹄疫病毒七種血清型不活化抗原陽性標準品，經不同的系列稀釋試驗發現陽性分析特異性高，反之，陰性為低，亦即表示陽性控制組之OD值呈倍數相關變化，然各種陰性控制組於不同的稀釋濃度之間無顯著的倍數相關（圖2及圖3）。以陽性試驗樣品進行HRP-ELISA抗原檢測之初步結果顯示以分界值Cut off value ( $OD_{450nm}$ )  $\geq 0.25$ 為陽性，0.1-0.24為疑陽性， $< 0.1$ 為陰性之判定標準，於23支水泡液樣品顯示HRP-ELISA與RT-PCR及免疫色層分析測試片之符合率均為100%，皆呈陽性反應。若Cut off value ( $OD_{450nm}$ )  $< 0.11$ 為陰性，則HRP-ELISA與

RT-PCR及免疫色層分析測試片之符合率為96%。若Cut off value ( $OD_{450nm}$ )  $< 0.12$ 為陰性，則HRP-ELISA與RT-PCR及免疫色層分析測試片之符合率為91%。13支咽喉液之ELISA檢測結果與RT-PCR之符合率為100%，皆呈陽性反應，然ELISA檢測結果與免疫色層分析測試片之符合率為0%，因為免疫色層分析測試片測試後全無訊號，皆呈陰性反應。

### 比較試驗

另以口蹄疫病毒O型標準陽性抗原評估RT-PCR、商品化免疫色層分析測試片及HRP-ELISA方法之分析敏感性分別可達 $10^6$ 倍、 $10^3$ 倍及 $10^3$ 倍，且以使用口蹄疫結構重組蛋白及不活化病毒所製備的單株抗體建構的ELISA方法，不會與豬水疱病毒產生非特異性反應，可有效區別口蹄疫病毒及豬水疱病毒。

## 討論

為了建立一套具敏感性及特異性的FMDV抗原檢測方法，本試驗主要研發間接型三明治酵素連結免疫吸附法（Sandwich ELISA），並與RT-PCR及商品化免疫色層分析測試片等方法進行比較。試驗樣品取自口蹄疫病毒七種血清型不活化抗原陽性標準品，及蔗糖梯度濃縮口蹄疫及豬水疱病不活化病毒液建立最適化條件之基質，且選擇RT-PCR方法確認陽性反應之水泡液及咽喉液樣品當作待測樣品，分別評估抗體標示HRP或Biotin之Sandwich ELISA檢測樣品中抗原檢出之能力，經最適化試驗結果二者皆可有效檢出口蹄疫病毒七種血清型。

試驗研發的ELISA方法係使用口蹄疫結構重組蛋白及不活化病毒以產製單株抗體及多株抗體當作捕捉抗原的檢測者（detector）。依據2009年Ferris及Oem等學者的研究報告指出免疫色層分析測試片（LFD或LFA）之診斷敏感性為84-87.3%診斷特異性可達98.8-99%，而Ag-ELISA之診斷敏感性為85-87.7%診斷特異性可達99.9-100% [6,14]，由此結果顯示二類方法之診斷能力相當。然以口蹄疫病毒O血清型樣品比較ELISA與免疫色層分析測試片之分析敏感性結果皆約達 $10^3$ 倍，而RT-PCR則可達

$10^{-6}$  倍，因此 RT-PCR 之敏感性高於 ELISA 1000 倍，故本研究結果類似於報告描述 RT-PCR (oligoprobing) ELISA 及 Dot hybridization assay 顯示其敏感性分別高於 Sandwich ELISA 1000 及 10 倍 [13]。

本 ELISA 具有廣泛辨認口蹄疫病毒七種血清型之檢測能力 (圖 2 及圖 3)，為了證實此一結果，故以商品化免疫色層分析測試片發現與 ELISA 相同皆可檢測該病毒之七種血清型樣品，然結果顯示 SAT 1 及 SAT 2 之訊號較弱 (圖 4)，如同先前報告發現常於 LFD 發現 SAT 2 反應較弱，可能與單株抗體的結合能力有關 [6]。另確定本 ELISA 方法可有效區別診斷且不會與豬水疱病病毒產生非特異性反應。

從免疫色層分析測試片分析咽喉液之檢測結果發現皆呈陰性反應，如同商品化試劑說明書所述該測試片指針對急性期發病的未破或新鮮已破的水泡液及上皮最為適當，若非水泡液如血液、血清、牛奶及咽喉

液等皆不適用以此測試片檢測，故初步推測可能因水泡液及咽喉液中抗原濃度差異所致，或者如同報告中推測可能在這些樣品之病毒量不足 [6]，同樣於咽喉液試驗結果皆為陰性。因此理想的比較方法宜採用 RT-PCR 作為金標準，若是水泡液樣品或許可參考免疫色層分析測試片的結果。故未來我們可利用這些單株及多株抗體，針對新收集而保存於 1XMEM 或 PBS 中的樣品進行檢測，作為進一步探討 ELISA 之確效 (Validation) 試驗及研發免疫色層分析測試片的參考。

總之，藉比較各種試驗研究方法，如免疫色層分析測試片及 ELISA、RT-PCR 等方法，建立快速且有效區別診斷口蹄疫及豬水疱病等水泡性疾病的方法，除有助於第一時間內採取防疫重要措施，遏止疫病蔓延以及降低養豬業者的經濟損失，達成疫病防治之終極目標外，未來尚可朝向「產學合作」及「商品化」的目標邁進。

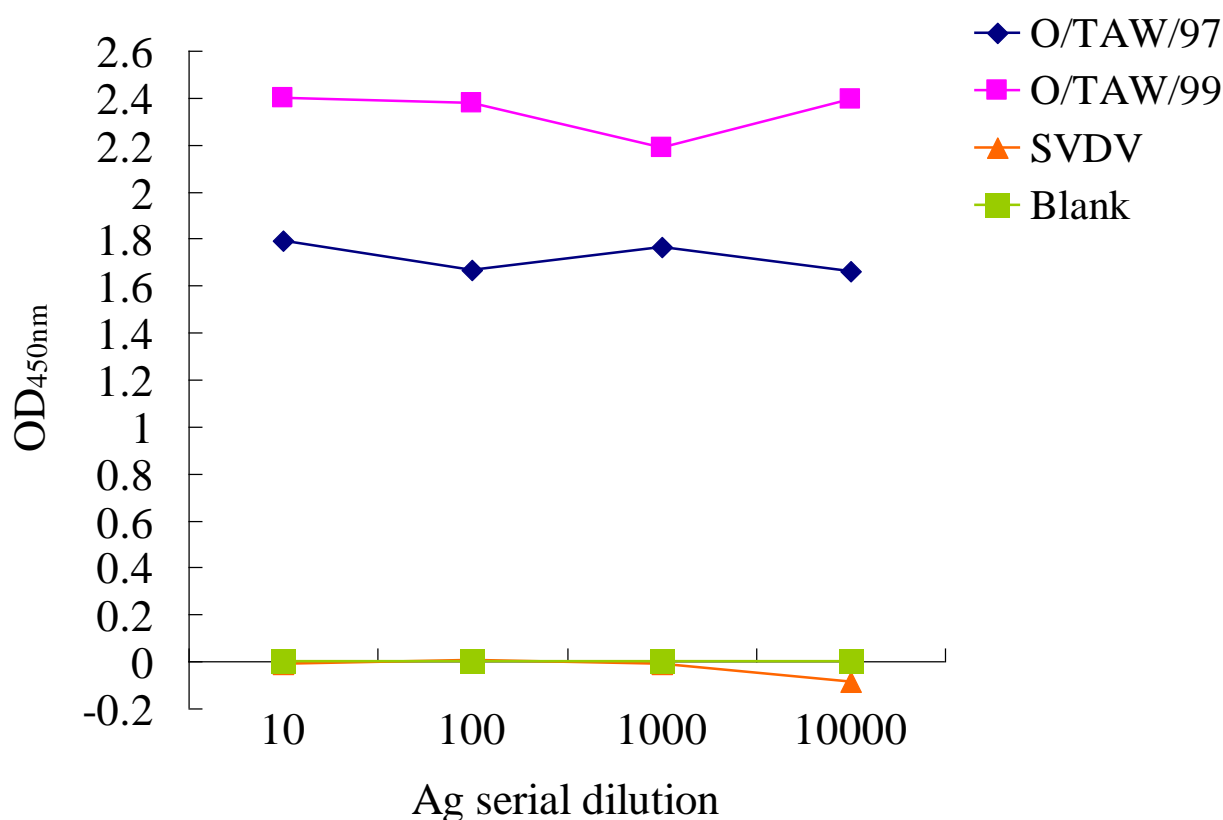


圖 1、標示 Biotin 之酵素連結免疫吸附法 (ELISA) 最適化條件之建立，以口蹄疫不活化病毒液所製作的單株抗體，檢測蔗糖梯度濃縮口蹄疫 (O/TAW/97、O/TAW/99) 及豬水疱病 (SVDV) 不活化病毒液和 Blank (唯加入緩衝液之空白控制組)。

酵素連結免疫吸附法檢測口蹄疫抗原之研發

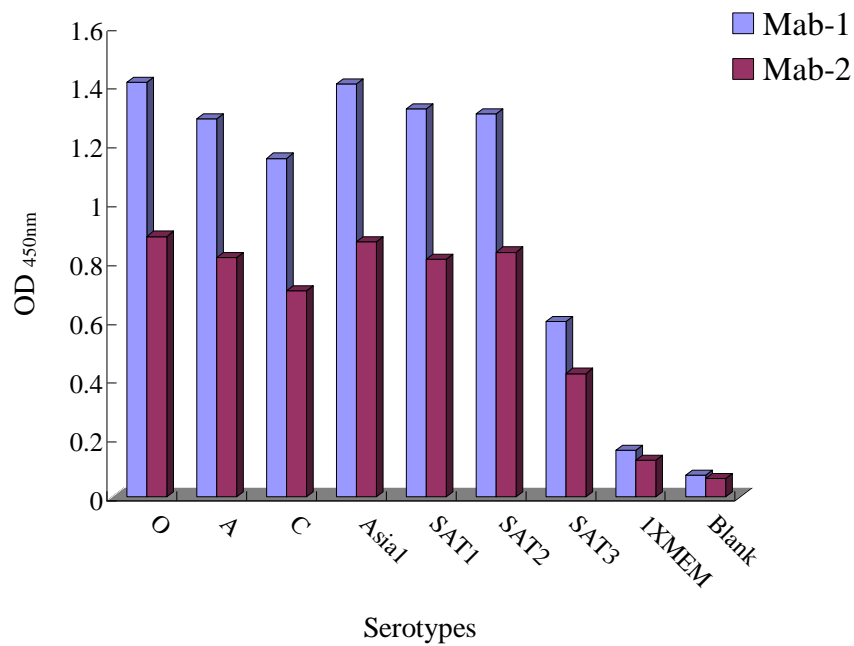


圖 2、標示 Biotin 之酵素連結免疫吸附法 (ELISA) 最適化條件之建立，以口蹄疫重組結構蛋白 (Mab-1) 及不活化病毒 (Mab-2) 所製作的單株抗體，檢測口蹄疫病毒七種血清型陽性標準品 (FMDV-serotype O、A、C、Asia 1、SAT 1、SAT 2 及 SAT 3) 不活化抗原及 1XMEM (細胞培養液) 和 Blank。

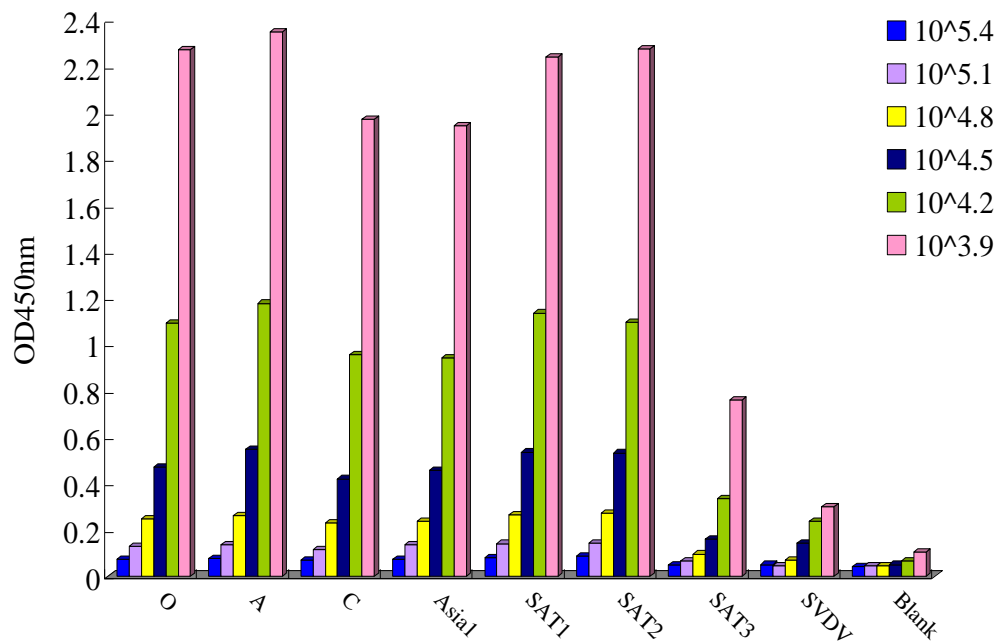


圖 3、標示 HRP 之酵素連結免疫吸附法 (ELISA) 最適化條件之建立，以口蹄疫病毒與抗體結合率之不同稀釋倍數 ( $10^{-3.9}$ ~ $10^{-5.4}$ )，檢測口蹄疫病毒七種血清型陽性標準品 (FMDV-type O、A、C、Asia1、SAT 1、SAT 2 及 SAT 3) 不活化抗原及豬水疱病不活化病毒液 (SVDV) 和 Blank。

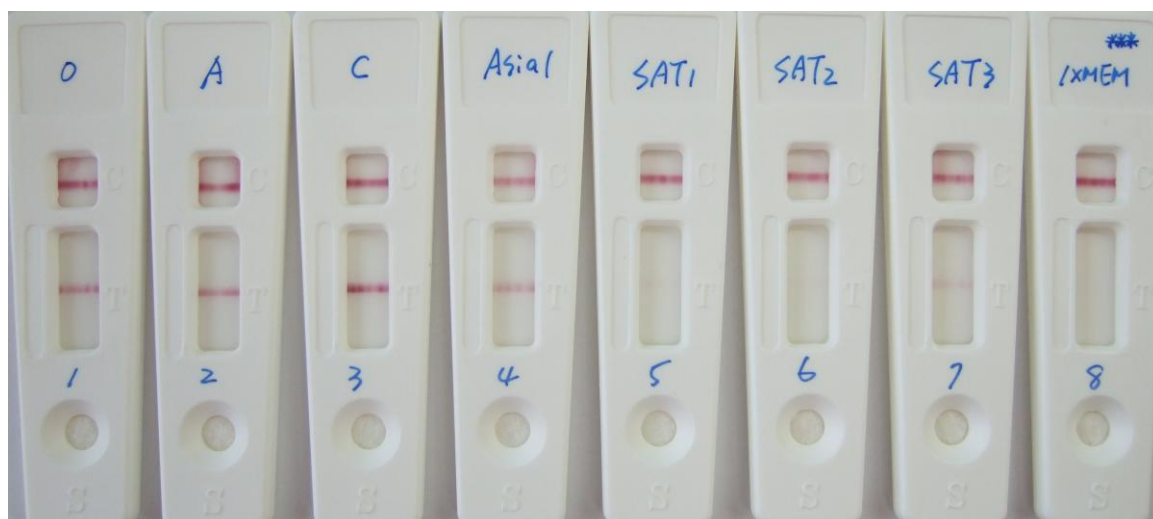


圖 4、以商品化免疫層分析測試片檢測口蹄疫病毒七種血清型陽性標準品（FMDV-type O、A、C、Asia 1、SAT 1、SAT 2 及 SAT 3）不活化抗原及 1XMEM。

## 參考文獻

1. Barlic-Maganja D, Grom J, Toplak I, Hostnik P. Detection of foot and mouth disease virus by RT-PCR and microplate hybridization assay using inactivated viral antigens. *Vet Res Commun*, 28(2):149-58, 2004.
2. Bergmann IE, Malirat V. Performance of a rapid enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay for detection of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. *Bol Centr Panam Fiebre Aftosa*, 61: 40-44, 1995.
3. Brüning A, Bellamy K, Talbot D, Anderson J. A rapid chromatographic strip test for the pen-side diagnosis of rinderpest virus. *J Virol Methods*, 81:143-154, 1999.
4. Dukes JP, King DP, Alexandersen S. Novel reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of foot-and-mouth disease virus. *Arch Virol*, 151(6):1093-1106, 2006.
5. Ferris NP, Abrescia NG, Stuart DI, Jackson T, Burman A, King DP, Paton DJ. Utility of recombinant integrin alpha v beta6 as a capture reagent in immunoassays for the diagnosis of foot-and-mouth disease. *J Virol Methods*, 127(1): 69-79, 2005.
6. Ferris NP, Nordengrahn A, Hutchings GH, Reid SM, King DP, Ebert K, Paton DJ, Kristersson T, Brocchi E, Grazioli S, Merza M. Development and laboratory validation of a lateral flow device for the detection of foot-and-mouth disease virus in clinical samples. *J Virol Methods*, 155(1):10-17, 2009.
7. Gajendragad MR, Kamath KN, Anil PY, Prabhudas K, Natarajan C. Development and standardization of a piezo electric immunobiosensor for foot and mouth disease virus typing. *Vet Microbiol*, 78(4):319-330, 2001.
8. Kweon CH, Kwon BJ, Kim IJ, Lee SY, Ko YJ. Development of monoclonal antibody-linked ELISA for sero-diagnosis of vesicular stomatitis virus (VSV-IN) using baculovirus expressed glycoprotein. *J Virol Methods*, 130(1-2):7-14, 2005.
9. Lenhoff RJ, Naraghi-Arani P, Thissen JB, Olivas J, Carillo AC, Chinn C, Rasmussen M, Messenger SM, Suer LD, Smith SM, Tammero LF, Vitalis EA, Slezak TR, Hullinger PJ, Hindson BJ, Hietala SK, Crossley BM, McBride MT. Multiplexed molecular assay for rapid exclusion of foot-and-mouth disease. *J Virol Methods*, 153(1):61-69, 2008.
10. Lomakina NF, Fallacara F, Pacciarini M, Amadori M, Lomakin AI, Timina AM, Shcherbakova LO, Drygin VV. Application of universal primers for identification of foot-and-mouth disease virus and swine

- vesicular disease virus by PCR and PCR-ELISA. *Arch Virol*, 149(6):1155-1170, 2004.
11. Lyoo YS, Kleiboeker SB, Jang KY, Shin NK, Kang JM, Kim CH, Lee SJ, Sur JH. A simple and rapid chromatographic strip test for detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Vet Diagn Invest*, 17:469-473, 2005.
  12. Martin V, Perales C, Abia D, Ortiz AR, Domingo E, Briones C. Microarray-based identification of antigenic variants of foot-and-mouth disease virus: a bioinformatics quality assessment. *BMC Genomics*, 18(7):117, 2006.
  13. Mohapatra JK, Sanyal A, Hemadri D, Tosh C, Palani G, Rasool TJ, Bandyopadhyay SK. Development and comparison of genome detection assays for the diagnosis of foot-and-mouth disease suspected clinical samples. *J Virol Methods*, 137(1):14-20, 2006.
  14. Oem JK, Ferris NP, Lee KN, Joo YS, Hyun BH, Park JH. Simple and rapid lateral-flow assay for the detection of foot-and-mouth disease virus. *Clin Vaccine Immunol*, 16(11):1660-1664, 2009.
  15. Rasmussen TB, Uttenthal A, de Stricker K, Belak S, Storgaard T. Development of a novel quantitative real-time RT-PCR assay for the simultaneous detection of all serotypes of foot-and-mouth disease virus. *Arch Virol*, 148(10):2005-2021. 2003.
  16. Reid SM, Ferris NP, Bruning A, Hutching GH, Kowalska Z, Akerblom L. Development of a rapid chromatographic strip test for the pen-side detection of foot-and-mouth disease virus antigen. *J Virol Methods*, 96:189-202. 2001.
  17. Shaw AE, Reid SM, King DP, Hutchings GH, Ferris NP. Enhanced laboratory diagnosis of foot and mouth disease by real-time polymerase chain reaction. *Rev Sci Tech*, 23(3):1003-1009. 2004.
  18. Suryanarayana V, Madanamohan B, Bist P, Natarajan C, Tratschin JD. Serotyping of foot-and-mouth disease virus by antigen capture reverse transcriptase/polymerase chain reaction. *J Virol Methods*, 80(1):45-52. 1999.
  19. Suryanarayana VV, Viswanathan S, Ratish G, Bist P, Prabhudas K, Gajendragad MR, Natarajan C. E. coli expressed proteins as diagnostic reagents for typing of foot-and-mouth disease virus. *Arch Virol*, 144(9):1701-1712. 1999.
  20. Wilsmore AJ, Davidson I. Clearview rapid test compared with other methods to diagnose chlamydial infection. *Vet Rec*, 128:503-504. 1991.
  21. World Organization for Animal Health (OIE). Chapter 2.1.5. Foot and mouth disease. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 6th Edition. OIE, Paris, France, 2009.
  22. World Organization for Animal Health (OIE). Chapter 2.8.9. Swine vesicular disease. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 6th Edition. OIE, Paris, France, 2008.

## Development of ELISA for Detecting the Antigens of Foot-and-Mouth Disease

Tsu-Han Chen<sup>1,2\*</sup>, Yeou-Liang Lin<sup>1</sup>, Fan Lee<sup>1,2</sup>, Sue Min Huang<sup>1,2</sup>,  
Chia-Ni Shih<sup>1</sup>, Chin-Cheng Huang<sup>1</sup>, Hsiang-Jung Tsai<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

<sup>2</sup>Graduate Institute of Veterinary Medicine, School of Veterinary Medicine, National Taiwan University

<sup>3</sup>Zoonoses Research Center, School of Veterinary Medicine, National Taiwan University

**Abstract** Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (Sandwich ELISA) was developed to detect antigens of foot-and-mouth disease virus (FMDV). Anti-FMDV monoclonal and polyclonal antibodies were derived from either recombinant FMDV proteins or whole inactivated FMDV. The antibodies were labeled either with horseradish peroxidase or biotin and were incorporated into an ELISA test platform for antigen detection. Our preliminary results indicated that antibodies were able to capture the antigens in samples with FMDV and showed a clear distinction, and without cross reaction between monoclonal and polyclonal antibody sets. The specificity of the ELISA test for seven serotypes of inactivated FMDV was high. The sensitivities of RT-PCR, commercial available chromatographic strips and our ELISA were  $10^{-6}$ ,  $10^{-3}$  and  $10^{-3}$ , respectively. The results indicated that ELISA screening could detect FMDV antigens in the test samples and did not cross-react with swine vesicular disease virus (SVDV) antigens.

**Keywords:** *Foot-and-mouth disease virus (FMDV), Swine vesicular disease virus (SVDV), Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Chromatographic strip, Antigen detection, Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)*