

赤羽病 ELISA 检测方法的建立及试剂盒的研制

王玉瑾¹ 吴雯娟² 张 婷² 吴绍精² 陈 勇² 仲建忠² 詹爱军^{2*}

1. 江苏省新沂市畜牧兽医站, 江苏新沂 221400; 2. 广东省深圳市检验检疫科学研究院, 广东深圳 518010

摘要 为了提高赤羽病的检测速度与效率, 建立双抗夹心 ELISA 检测方法并进行试剂盒的研制。试验用纯化的 AKV 免疫 BALB/c 小鼠, 细胞融合后用 ELISA 方法筛选出 3 株分泌抗 AKV 特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞(1D1、1B12 和 2G1), 各杂交瘤细胞株均可以稳定地分泌特异性单克隆抗体, 且其单克隆抗体亚型测定的结果均为 IgG1、轻链均为 κ 链。建立 DAS-ELISA 检测方法, 确定抗 AKV 单克隆抗体 1B12 株的最佳包被浓度为 $4 \mu\text{g}/\text{mL}$, 多克隆抗体最佳稀释比为 $1:500$, 二抗最佳工作浓度为 $1:5000$, 阴性/阳性结果判定临界值为 0.238, 具有较好的特异性, 检测极限为 10^{-4} 。表明该方法及试剂盒具有较强的实用价值。

关键词 赤羽病; 阿卡斑病毒; 单克隆抗体; DAS-ELISA; 试剂盒

赤羽病是由布尼病毒属辛波病毒群的阿卡斑病毒(AKV)引起的牛、绵羊、山羊和其它多种野生动物的以流产、早产、死产、畸形产以及先天性关节弯曲一积水性无脑综合征(AH 综合征)为特征的病毒性传染病。此病可给畜牧业造成巨大经济损失, 是国际动物贸易中检疫的重点疫病之一^[1]。20 世纪 30 年代, 该病最早在澳大利亚暴发, 随后在日本、美国、韩国、沙特阿拉伯、苏丹等地区也分离到该病毒^[2-3]。该病在我国很多地区都有发生, 是目前对我国养牛业和养羊业危害较为严重的疫病之一, 也是我国从国外进口牛、羊时必须检测的 7 种疫病之一。因此, 研究并制备高特异性、可与相关病毒相区分的快速检测方法是 AKV 检疫中亟待解决的问题。

目前 AKV 的血清学诊断方法有补体结合试验(CF)、间接荧光抗体法(IFNT)^[4]、血凝抑制试验(HI)^[1]、琼脂扩散试验(AGDP)^[5]、微量血清中和试验(VN)^[6]和 ELISA^[7-8]。最常用的方法是 VN 和 ELISA, 应用间接 ELISA 可快速且准确地进行血清群定群(SG-ELISA)和血清型定型(ST-ELISA)。现已有用 PCR 和基因芯片方法进行病原检测的报道^[9]。AKV 核蛋白 N 上存在抗原表位,

具有群特异性, 可刺激机体产生抗体, 因此, 可通过检测核蛋白抗体来诊断此病。由于核衣壳蛋白是 AKV 与辛波群中的其他成员的共同的群抗原, 而中和试验具有很高的特异性, 不出现交叉反应。因此, 在确诊时应将 ELISA 试验与中和试验联合应用于此病血清抗体的检测。ELISA 方法是一种敏感性高、特异性强、重复性好的检测方法, 可检测到样品中微量的特异性抗原或抗体。随着单克隆抗体技术的发展, 许多细胞因子的检测都有通过 ELISA 方法检测的趋势^[10-12]。

国内尚无商品化的赤羽病病毒快速诊断试剂盒, 只能提供以常规检测方法为主的试剂。本研究将纯化的赤羽病病毒作为免疫原, 通过常规杂交瘤技术, 制备了亲和性强、特异性好的小鼠抗赤羽病病毒单克隆抗体, 建立了 DAS-ELISA 快速检测方法, 并进行了试剂盒的研制。

1 材料与方 法

1.1 病毒、细胞株和试验动物

蓝舌病病毒(BTV, 血清 1、3、5、8、10、11、12、17 和 22 型)、家畜流行性出血性疾病病毒(EHDV, 血

收稿日期: 2013-09-30

基金项目: “十二五”国家科技支撑项目(2012BAK17B08)

* 通讯作者

王玉瑾, 女, 1968 年生, 本科, 高级兽医师。

清 1、2、3、5 和 6 型)、水泡性口炎病毒(VSV, 新泽西型)、AKV、小反刍兽疫病毒(PPRV)和口蹄疫病毒(FMDV)亚洲 I 型等灭活抗原和 BHK-21 细胞株及 SP2/0 骨髓瘤细胞株, 均由深圳出入境检验检疫局动植物检验检疫技术中心动检实验室保存。6 周龄 SPF BALB/c 小鼠购于中山大学实验动物中心。

1.2 主要试剂及试剂盒

IMDM 培养基、RPMI-1640 培养基、HAT 和 HT 选择性培养基、新生胎牛血清(FBS)、100×双抗(青霉素+链霉素)及胰酶均为 Gibco 公司产品; PEG-4000、弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂、HRP 标记的羊抗鼠 IgG、HRP 标记的兔抗羊 IgG、矿物油(无菌)均为 Sigma 公司产品; 生物素标记的羊抗鼠 IgG、生物素标记的兔抗羊 IgG 及藻红蛋白标记的链霉亲和素均为 KPL 公司产品; 蛋白 A/G 抗体纯化试剂盒为 Pierce 公司产品; 鼠源单克隆抗体亚型鉴定试剂盒为 HyCult biotechnology 公司产品; BSA 粉剂(V 片段)和 OVA 粉剂均为 Roche 公司产品。

1.3 主要仪器

无菌细胞培养瓶、96 孔细胞培养板、24 孔细胞培养板及 6 孔细胞培养板为 Corning 公司产品; 高亲和力 ELISA 板(96 孔)、一次性无菌移液管(5、10 和 25 mL)及细胞冻存管(2.0 mL)为德国 Greiner 公司产品; 细胞冻存盒(25 孔)和程序降温盒(18 孔)为 Nalgene 公司产品; 超速离心管(5.2 和 38.5 mL)为 Beckman 公司产品; 100-XP 超速离心机、64R 高速离心机及 DU-800 核酸蛋白分析仪为 Beckman 公司产品; 371 CO₂ 培养箱为 ThermoShier 公司产品; 994 全自动倒置显微镜为 Thermo(Forma)公司产品; Axio Observer Z1 全自动倒置显微镜为 ZEISS 公司产品; ELX-50 ELISA 洗板机为 Biotek 公司产品; MACS-AHV SPF 鼠饲养独立供气笼为 Alt-design 公司产品; KRYO550-16 程序降温与冷冻仪和 MVE815P-190F 液氮冻存仪为 PLANT 公司产品。

1.4 病毒感染力试验

病毒感染力试验, 即 50% 组织细胞感染量(TCID₅₀)的测定。赤羽病病毒的感染力通过测定病毒感染 BHK-21 细胞的 TCID₅₀ 的方法进行测定, 试验操作及结果计算按《动物病毒学》^[13] 中所介绍方法进行。

1.5 分泌抗 AKV 特异性单克隆抗体(McAb)杂交瘤细胞株的建立

1) 动物免疫。6 周龄 SPF BALB/c 小鼠 5 只, 用纯化的 AKV 免疫, 每隔 14 d 免疫 1 次, 共免疫 3 次; 注射剂量均为 100 μg/只。首次免疫加等体积弗氏完全佐剂乳化, 二次免疫和三次免疫加等体积弗氏不完全佐剂乳化。三次免疫后 15 d, 尾静脉采血分离血清检测抗体滴度。取抗体效价比较高的小鼠, 通过尾静脉注射同样的抗原(纯化的病毒)强化免疫 1 次, 剂量为 100 μg/只, 3 d 后即可用于分离脾细胞。

2) 阳性杂交瘤细胞株的筛选及 McAb 的制备。将免疫鼠脾细胞和 SP2/0 骨髓瘤细胞融合, 经选择培养基培养, 筛选出阳性杂交瘤细胞株, 扩大培养后制备腹水, 离心取上清, -80 °C 保存备用。

1.6 检测方法的建立

按常规间接 ELISA 操作步骤^[14], 运用方阵试验, 确定抗原最佳包被浓度、待检抗体最佳工作浓度及结果判定标准; 同时设立空白对照及 SP2/0 上清对照。

1.7 单克隆抗体的鉴定

1) 杂交瘤细胞株分泌抗体稳定性的评价。将筛选到的杂交瘤细胞株连续传代并进行 3 次冻存-复苏, 每次复苏后, 进行 1 次亚克隆, 并从亚克隆板上随机挑取 50 个单克隆孔, 用间接 ELISA(AKV-ELISA)检测, 通过计算阳性率来评价杂交瘤细胞株分泌抗体的稳定性。

2) 抗 AKV 单克隆抗体特异性的鉴定。用所筛选到的分泌抗 AKV 单克隆抗体的杂交瘤细胞上清与 AKV、BTV、EHDV、VSV、PPRV、FMDV 及 BHK 细胞包被的 ELISA 板反应, 鉴定单克隆抗体的特异性。

3) 单克隆抗体亚型的鉴定。取培养上清, 按照鼠源单克隆抗体亚型鉴定试剂盒说明书进行鉴定。

1.8 赤羽病 DAS-ELISA 检测方法的建立及试剂盒的研制

1) 最佳单克隆抗体及多克隆抗体浓度的确定。用包被缓冲液(pH9.6 碳酸盐缓冲液)将杂交瘤细胞株 1B12 分泌的抗 AKV 单克隆抗体稀释至浓度为 0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 和 16.0 μg/mL, 加入 1:1 000 稀释的 AKV 阳性样品、阴性样品(BHK-21)及不同浓度的多克隆抗体(1:250、

1 : 500、1 : 1 000 和 1 : 2 000), 终止反应后, 检测 OD₄₅₀ 值。

2) 最佳二抗工作浓度的确定。用 DAS-ELISA 检测相应的标准阳性样品(1 : 10 稀释)和阴性样品(1 : 10 稀释), 分别使用 1 : 3 000、1 : 4 000、1 : 5 000、1 : 6 000、1 : 7 000 及 1 : 8 000 稀释(生产商推荐工作浓度为 1 : 3 000~8 000)的 HRP 标记的兔抗羊 IgG 检测。通过比较阳性样品和阴性样品 OD₄₅₀ 背景值的大小及阳性样品与阴性样品 OD₄₅₀ 值的比值(P/N), 确定最佳二抗工作浓度。

3) DAS-ELISA 试剂盒结果判定标准的确定。用建立的 AKV DAS-ELISA 方法检测 30 份阴性样品, 测定 OD₄₅₀ 值, 计算平均值(X)和标准差(SD), 以“X+3SD”作为阳性和阴性结果判定的临界值。

4) DAS-ELISA 试剂盒特异性的评价。用 AKV DAS-ELISA 分别检测 BTV(血清 1、3、5、8、10、11、12、17 及 22 型)、EHDV(血清 1、2、3、5 及 6 型)、AKV、VSV、PPRV、FMDV 阳性样品和 BHK 细胞样品各 10 份, 评价 DAS-ELISA 方法的特异性。

5) DAS-ELISA 试剂盒检测极限的确定。将 AKV 样品进行系列稀释(10⁻¹ ~ 10⁻⁸), 用 DAS-ELISA 进行检测。

2 结果与分析

2.1 病毒感染力测定结果

将 AKA 病毒作系列稀释(10⁻¹ ~ 10⁻¹⁰), 接种至 BHK-21 细胞, 在 72 h 时记录细胞产生病变孔数, 根据 Reed-Muench 法计算出 AKV TCID₅₀ 为 10^{-5.65}/0.1 mL。

2.2 分泌抗 AKV 单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立

用 AKV 和 BHK 细胞对融合细胞生长上清液进行筛选, 并对筛选到的阳性细胞进行 2 次亚克隆, 最终建立 3 株可以分泌抗 AKV 特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 分别标记为 1D1、1B12 和 2G1。

2.3 间接 ELISA 方法的建立

通过方阵试验, 可以确定建立间接 ELISA 方法时, AKV 抗原最佳包被浓度为 2.5 μg/mL。用建立的 AKV-ELISA 检测 20 份阴性样品, 对 20 份样品检测结果(OD₄₅₀ 值)进行分析, 得到临界值为

0.238。

2.4 单克隆抗体的鉴定结果

1) 杂交瘤细胞分泌抗体的稳定性。经特异性检测, 亚克隆阳性率均在 90% 以上, 表明所有杂交瘤细胞均可以稳定地分泌特异性单克隆抗体。

2) 抗 AKV 单克隆抗体的特异性鉴定。对筛选到的 3 株分泌抗 AKV 单克隆抗体的杂交瘤细胞(1D1、1B12 和 2G1)进行特异性鉴定, 结果表明 3 株杂交瘤细胞分泌的抗 AKV 单克隆抗体与 AKV 包被的 ELISA 板反应时呈强阳性, 与其他病毒(或细胞)包被的 ELISA 板反应时均呈阴性, 见表 1。由此可见, 3 株杂交瘤细胞分泌的抗 AKV 单克隆抗体可与 AKV 特异性结合, 与其他病毒(或细胞)包被的 ELISA 板无交叉反应。

表 1 抗 AKV 单克隆抗体(上清)特异性鉴定

ELISA 板包被抗原	1D1	1B12	2G1
AKV	1.962±0.078	1.853±0.106	1.794±0.089
BTV-1	0.197±0.029	0.207±0.038	0.204±0.016
BTV-3	0.194±0.032	0.215±0.026	0.208±0.028
BTV-5	0.236±0.022	0.218±0.019	0.215±0.034
EHDV-1	0.229±0.026	0.345±0.024	0.208±0.023
EHDV-2	0.273±0.025	0.293±0.016	0.226±0.027
VSV	0.225±0.036	0.213±0.023	0.206±0.018
PPRV	0.202±0.024	0.274±0.022	0.385±0.029
FMDV	0.218±0.025	0.199±0.031	0.220±0.035
BHK	0.186±0.019	0.216±0.027	0.209±0.021

注: 表中各数据是 5 份单克隆抗体(上清)的“平均 OD₄₅₀ 值 ± 标准差”。

3) 单克隆抗体亚型的鉴定。利用鼠源单克隆抗体亚型鉴定试剂盒对 3 株抗 AKV 单克隆抗体进行亚型鉴定, 结果表明 3 株抗 AKV 单克隆抗体(1D1、1B12 和 2G1)亚型均为 IgG1, 轻链均为 κ 链, 见图 1。

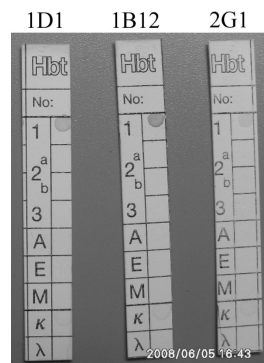


图 1 3 株抗 AKV 单克隆抗体的亚型鉴定

2.5 DAS-ELISA 检测方法的建立及试剂盒研制结果

通过方阵试验,确定建立 ELISA 时,分泌抗 AKV 单克隆抗体的杂交瘤细胞株 1B12 的最佳包被浓度为

1)单克隆抗体和多克隆抗体最佳浓度的确定。4 μg/mL,多克隆抗体最佳稀释比为 1 : 500,见表 2。

表 2 抗 AKV 单克隆抗体和多克隆抗体最佳浓度测定结果

多克隆抗体浓度		单克隆抗体包被浓度/(μg/mL)					
		16.0	8.0	4.0	2.0	1.0	0.5
1 : 250	阳性	1.903	1.621	1.193	0.816	0.523	0.302
	阴性	0.360	0.315	0.263	0.217	0.213	0.200
	P/N	6.53	5.59	4.92	4.22	2.92	1.51
1 : 500	阳性	1.892	1.505	1.102	0.682	0.411	0.289
	阴性	0.258	0.226	0.201	0.196	0.192	0.188
	P/N	7.33	6.66	5.48	3.48	2.14	1.54
1 : 1 000	阳性	1.356	0.855	0.587	0.394	0.236	0.215
	阴性	0.228	0.216	0.201	0.170	0.173	0.168
	P/N	5.95	3.96	2.92	2.32	1.36	1.28
1 : 2 000	阳性	0.826	0.769	0.377	0.268	0.230	0.196
	阴性	0.206	0.188	0.171	0.163	0.159	0.155
	P/N	4.01	4.09	2.20	1.64	1.45	1.26

2)最佳二抗工作浓度的确定。用 DAS-ELISA 检测相应的阳性样品和阴性样品,结果表明二抗最佳工作浓度为 1 : 5 000。

3)DAS-ELISA 试剂盒结果判定标准的确定。用 AKV DAS-ELISA 检测 30 份阴性样品,结果表明 DAS-ELISA 阳性和阴性结果判定的临界值为 0.238。

4)DAS-ELISA 试剂盒特异性评价。对 AKV

DAS-ELISA 进行特异性试验,结果表明 DAS-ELISA 检测 AKV 阳性样品时结果均为阳性,检测其他样品时结果均为阴性,AKV DAS-ELISA 试剂盒具有良好的特异性。

5)DAS-ELISA 试剂盒的检测极限。将 AKV 样品进行系列稀释,用 DAS-ELISA 进行检测,结果表明 AKV DAS-ELISA 试剂盒检测极限为 10^{-4} ,见表 3。

表 3 DAS-ELISA 检测极限

ELISA 类型	阳性样品(病毒)稀释倍数							
	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8
DAS-ELISA	2.891	1.594	0.858	0.386	0.192	0.175	0.166	0.170

注:AKV TCID₅₀为 $10^{-5.65}$ /0.1mL。

3 讨论

赤羽病是以吸血昆虫为传播媒介的感染牛、山羊和绵羊的重要传染病。目前,赤羽病的检测主要依靠病毒分离鉴定、病毒中和试验、琼脂扩散试验等传统检测方法^[1],存在操作不便、费时费力、不能满足大量样品的快速检测等问题。因此,急需开发具有特异、敏感、快速、方便等特性并能实现高通量检测的方法。

单克隆抗体是重要的免疫学工具,具有较好的特异性和敏感性,已被人们广泛应用于诊断、预防等领域^[16]。在建立病原学诊断方法中,单克隆抗体的特异性直接决定着所建立诊断方法的特异性。由于杂交瘤细胞在传代、冻存和复苏过程中有可能会造

成染色体丢失(或存在能导致杂交瘤细胞分泌单克隆抗体稳定性降低的其他原因),在评价杂交瘤细胞分泌抗体的稳定性方面,笔者认为最好是将传代复苏后的细胞进行亚克隆,在亚克隆板中随机选出一定数量的单克隆孔,用 ELISA 检测每个孔分泌抗体的情况,通过亚克隆细胞的阳性率来评价杂交瘤细胞分泌抗体的稳定性。

双抗体夹心 ELISA 方法是最常用的免疫学检测方法之一,已经在临床检测方面得到了广泛的应用。本研究中,笔者用自行制备的单克隆抗体作为包被抗体,建立了检测 AKV 夹心 ELISA 检测方法;选用单克隆抗体作为包被抗体包被 ELISA 板,来捕获样品中的抗原;用相应多抗作为夹心抗体,是比较理想的方案。笔者也曾用多抗作为包被抗体,

发现会影响第二抗体与抗原的反应,在一定程度上降低了检测方法的敏感性。由于目前仍没有相应的商品化检测试剂盒,因此,本研究中建立的 ESLIA 检测方法可以作为检测 AKV 的参考方法。

本研究用 AKV 免疫 BALB/c 小鼠,经细胞融合和双重 ELISA 筛选,获得了分泌抗 AKV 单克隆抗体的杂交瘤细胞株,且所制备的单克隆抗体均具有良好的特异性。建立 AKV DAS-ELISA 检测方法和研制试剂盒,实现 AKV 的快速高通量检测,具有较强的实用价值,能为检疫工作节省大量的人力、物力,大大地降低检疫成本。

参 考 文 献

[1] 范晴,周晓黎,孙洪正,等. 赤羽病研究进展[J]. 预防兽医学进展,2007,28(12):58-62.

[2] OGAWA Y, FUKUTOMI T, SUGIURA K, et al. Comparison of akabane virus isolated from sentinel cattle in Japan [J]. Vet Microbio, 2007, 124(1-2):16-24.

[3] BRENNER J. Akabane viral encephalitis in calves [J]. Vet Rec, 2007, 161(18):636.

[4] 李少英,冉多良,尹训南,等. 赤羽病病毒间接荧光抗体快速检测方法的初步研究[J]. 动物医学进展, 2005, 26(11):78-80.

[5] 刘焕章,李树清,陈建康,等. 赤羽病琼脂免疫扩散试验诊断方法的研究[J]. 中国预防兽医学报, 2000, 22(4):299-301.

[6] 刘焕章,李树清,吴东来,等. 赤羽病微量病毒中和试验诊断方法

的研究[J]. 中国预防兽医学报, 2001, 23(1):53-55.

[7] 李健,李树清,王巧全,等. 赤羽病间接 ELISA 检测方法的建立和标化[J]. 中国预防兽医学报, 2003, 25(6):483-486.

[8] 花群义,杨云庆,董俊,等. 赤羽病病毒 N 基因硫氧还蛋白融合表达载体的构建与表达[J]. 中国兽医科技, 2003, 33(10):7-14.

[9] 李健,陈沁,杨燕青,等. 赤羽病病毒 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 畜牧与兽医, 2004, 36(4):26-27.

[10] 李志中,秦立廷,王喜军,等. 抗鸡 γ -干扰素单克隆抗体的制备及定量 ELISA 方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(11):891-895.

[11] 于圣青,刘秀梵. 单克隆抗体夹心 ELISA 试验检测鸡新城疫病毒抗原的研究[J]. 江苏农学院学报, 1990, 11(2):41-45.

[12] 卢建红,焦新安,刘秀梵,等. 快速检测鸡新城疫病毒的聚乙二醇单克隆抗体夹心 ELISA 试验的建立和应用[J]. 中国兽医科技, 1994, 24(2):3-4.

[13] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 北京:科学出版社, 1997:30-37.

[14] 朱立平,陈学清. 免疫学常用实验方法[M]. 北京:人民军医出版社, 2000:342-358.

[15] AFSHAR A, DULAC G C, WRIGHT P F, et al. Application of indirect ELISA for detection of bovine antibodies against vesicular stomatitis viruses [J]. J Vet Diagn Invest, 1993, 5(1):26-32.

[16] 张宁. 猪流行性乙型脑炎双抗夹心 ELISA 方法的建立与试剂盒的制备[D]. 长春:吉林大学, 2011:31.

(责任编辑:郭会田)

美国玉米及豆粕巨量出口凸显全球饲料需求强劲

10月24日,分析师及交易商称,美国农业部(USDA)周四公布的周度出口销售报告显示,巨量的玉米及豆粕出口销售凸显全球饲料需求依然强劲。

“玉米及豆粕销售异常巨大,当然有助于全球饲料需求……这是重点”,花旗集团(Citigroup)期货分析师 Sterling Smith 表示。USDA 于周四早些时候公布了10月3日止当周的出口销售数据,美国政府在10月前3周的大部分时间内关停,导致 USDA 停发该数据。USDA 定于下周四公布10月10日、10月17日和10月24日止当周3周的出口数据。

USDA 公布,10月3日止当周,美国 2013/14 年度玉米净出口销售 134.14 万 t,高于预估的 65.00 万~85.00 万 t。其中 42.81 万 t 销往未知目的地,23.06 万 t 销往中国。日本、哥伦比亚、墨西哥亦占据较大份额。

2013/14 年度豆粕净出口销售为 85.01 万 t,其中 38.30 万 t 销往未知目的地。豆粕 2013/14 市场年度始于10月1日。市场预估豆粕净出口销售仅为 15.00 万~25.00 万 t。

USDA 称,2012/13 年度豆粕销售共计 971.23 万 t,较 2011—2012 年度增长 14%。

10月3日止当周,2013/14 年度大豆净出口销售 92.98 万 t,其中 24.23 万 t 销往中国,12.24 万 t 销往未知目的地。

来源:国际畜牧网