

单抗直接Dot-EL ISA 检测禽脑脊髓炎病毒抗原

杨建民* 秦卓明 赵继勋 苏敬良

(中国农业大学动物医学院, 北京 100094)

摘要 本研究在已制备的A EV 单抗基础上建立了检测A EV 抗原的直接Dot-EL ISA 方法。该方法对A EV 最低检出量为 $8.03 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。人工感染 1 日龄 SPF 鸡, 取临床发病鸡(6~ 13 日龄)相应病料, 各病料样本病原阳性检出率分别为: 脑 98%, 胰 94%, 十二指肠 80%, 腺胃 85%。对 100 份临床自然发病鸡病料检测, 阳性检出率为 90%。对 10 份A EV 病原分离阳性样品检测阳性率为 100%。

关键词 禽脑脊髓炎病毒抗原; 单抗直接Dot-EL ISA; 抗原检测

中图分类号 S855.3; S858.3

Establishment of Direct Dot-EL ISA Based on McAb for Detection of AEV Antigen

Yang Jianmin Qin Zhuoming Zhao Jixun Su Jingliang

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract The procedure of direct Dot-EL ISA has been successfully established for detection of AEV antigen, and the detection limits of the AEV was $8.03 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The one-day-old SPF chickens were infected with AEV (VR and Shandong isolates) by the way of brains and subcutaneous injection in neck, and the pathological tissues and organs infected were collected when they are 6~ 13-day-old. It was shown that the positive rates of AEV antigen in brain, pancreas, duodenum, gland-stomach are 98%, 94%, 80%, 85% respectively. These organs are the major targets infected by AEV. One hundred samples collected from field infected chickens having clinical sign were detected, and the positive rate of AEV was 90%.

Key words AEV antigen; monoclonal antibody; direct dot-EL ISA; antigen detection

禽脑脊髓炎的特异性诊断一直是该病研究中的重点研究方向之一。在AEV的诊断中病原分离是最好的确诊方法之一,但比较费时、费力。目前多采用免疫学方法如:免疫荧光(FA)和酶联免疫吸附法(ELISA)直接检测抗原^[1]。这些方法中,为了避免非特异性反应,使用了提纯或吸附的抗血清。单克隆抗体技术特异性强,被认为是鉴定病毒因子的可靠方法,已用于多种病毒感染的诊断。据报道,国外用AEV单克隆抗体(VR9-1株),建立了免疫组化、间接免疫荧光和免疫过氧化物酶染色、抗生物素蛋白-生物素-过氧化物酶染色方法检测AEV抗原,并用于AEV的定量研究^[2],而国内相关报道较少。本研究在制备AEV单克隆抗体的基础上^[3],建立了检测AEV抗原的直接Dot-EL ISA方法,并对其进行了初步应用。

收稿日期: 2001-09-03

山东省青年基金资助项目(28370440)

* 杨建民, 博士生, 研究方向为动物分子病毒学, 北京圆明园西路2号



1 材料与方法

1.1 材料

A EV V anRoekel(鸡胚适应株), A EV 山东分离株, A EV 阳性抗原及试验所用的参考病毒为新城疫病毒(NDV)、减蛋综合症病毒(EDSV-76)、鸡马立克病病毒(MDV)、传染性支气管炎病毒(BV_{H120})、传染性法氏囊病病毒(BDV)、鸡传染性喉气管炎病病毒(LTV), SPF 鸡由中国农业大学实验动物所提供; SPF 种蛋及待检鸡脑组织病料由山东家禽所提供。A EV ELISA 抗体检测试剂盒, 美国 DEXX 公司生产, 由中国农业大学实验动物所提供; Dot-ELISA 底物溶液: 0.05 mol·L⁻¹ pH7.2 Tris-HCl 缓冲液 100 mL + DAB 40 mg + 30% H₂O₂ 50 μL。进口醋酸纤维素薄膜(NC膜), 购自同正生物公司, 国产醋酸纤维素薄膜(NC膜), 浙江黄岩四青生化材料厂生产。HRP, 购自中山生物公司。

1.2 单抗直接Dot-ELISA 操作程序

NC膜处理, (将NC膜浸入含0.3% H₂O₂的PBS中10 min, 洗涤3次, 每次3 min), 点样, 点样的NC膜的封闭, 加酶标单抗, 加底物溶液(将NC膜浸入新鲜配制的底物溶液中, 显色10 min, 37℃), 终止显色(将NC膜置蒸馏水中3 min), 自然干燥, 观察结果。判定标准: 与阴性对照相同不呈斑点者为阴性(-); 以斑点深棕色, 背景白色, 对比度清楚为强阳性(#); 斑点浅棕色, 对比度清晰为(++); 介于两者之间的为(+++); 斑点较弱或点内不均质的棕色点为(+). 以呈现“+”最高稀释倍数为被检抗原效价。每次检测样本时, 均设A EV 阳性对照与阴性鸡脑组织对照。

1.3 酶标单克隆抗体的制备

采用辛酸硫酸胺法提纯腹水^[4], 参照郭春祥的改良过碘酸钠法 HRP 标记。测定其 OD_{280nm}, OD_{403nm}。按如下公式计算标记率、酶标记物中的 HRP 量([HRP])、酶标记物中的 IgG 量([IgG])与克分子比: 标记率 = OD_{403nm}/OD_{280nm}, [HRP] (mg/mL) = 0.4 × OD_{403nm}, [IgG] (mg/mL) = (OD_{280nm} - 0.3 × OD_{403nm}) × 0.62, HRP 与 IgG 克分子比 = $\frac{[HRP] \times 160\,000}{[IgG] \times 40\,000}$, 式中 160 000 为 IgG 分子量, 40 000 为 HRP 分子量。

1.4 实验条件的确定

1.4.1 底物最适 pH 值 按方阵法测定^[3]。

1.4.2 抗原包被浓度, 酶标单抗浓度确定 确定抗原包被浓度, 酶标单抗浓度 2 倍倍比系列稀释 A EV 纯化抗原(1 2¹, 1 2², 1 2³, ..., 1 2¹⁴) 酶标单抗作 1 20, 1 40, 1 80, 1 160, 1 320, 1 640 系列稀释, 设 CEF 阴性对照, 按照单抗直接 Dot-ELISA 法程序(1.2 项)进行。

1.4.3 最佳试验条件确定 进口膜与国产膜比较 将进口 NC 膜(北方同正生物技术发展公司经销)与国产 NC 膜进行同样预处理后以工作浓度的酶标单抗点样按 1.2 操作, 比较结果。

封闭液种类选择(阴性血清供试) 供试封闭液分别用 0.01 mol·L⁻¹ pH7.2 PBS (NaCl 浓度为 0.145 mol·L⁻¹) 和包被液配制的 10% 小牛血清、5% 小牛血清、6% 卵清蛋白(体积分数 0.1%、0.1%、1% 和 2%、4% 明胶和 0.1% BSA。其中 6% 卵清蛋白是使用 SPF 鸡蛋(未受精蛋)的卵清按体积比加入配制液后摇匀, 并以 3 000 r·min⁻¹ 离心 30 min 后的上清液。点样等操作过程按 1.2 所述进行。

封闭时间及洗涤次数、时间选择确定 按 1.2 所述比较封闭 30 min 和 1 h, 封闭后的不同

洗涤次数以及其他步骤的洗涤次数和时间不同对最终试验结果的影响。除测试内容外,其他操作均按1.2所述进行。

酶标单抗作用时间、作用温度确定 分别以30, 60和120 min为单抗作用时间单位,分别于室温、37℃条件下显色效果观察比较。

底物显色时间、显色温度确定 分别以5, 10, 15, 20, 30 min为底物显色时间单位,分别于室温、37℃条件下观察比较显色效果。

1.4.4 特异性试验

阻断试验 按照1.2所述进行,将NC膜剪成适当大小,分成A、B 2组(每组2片),分别点样阳性抗原、阴性抗原;每组其中一片加阳性鸡血清,另一片加SPF鸡阴性血清,37℃作用30 min;再将其一同在酶标单抗溶液中感作,加底物溶液显色,终止显色,自然干燥。重复1次。

交叉试验 分别以NDV(Lasota系疫苗株)、EDS-76病毒、MDV、BV、BDV、LTV、AEV抗原点样,按1.2程序进行检测是否有交叉反应。

1.4.5 敏感性试验(最低检出量确定) 按 10^{-1} ~ 10^{-14} 倍比稀释AEV阳性抗原(蛋白含量 $1.029\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)和阴性抗原,按1.2程序进行确定最低检出量)。

1.4.6 重复性试验 按单抗直接Dot-ELISA操作程序重复1.4.5试验3次。比较每次试验检出及结果的重复性。

1.5 样本处理及检测

AEV(VR株及AEV山东株)脑内接种1日龄SPF雏鸡,每只0.1 mL($1\ 000\text{ EID}_{50}\cdot\text{mL}^{-1}$),隔离盒中饲养。观察记录发病情况。待鸡出现临床AE典型症状,采血处死。取脑、胰、十二指肠和腺胃,分别常规研磨、离心,冻融处理。采用单抗直接Dot-ELISA检测人工感染SPF鸡不同脏器组织带毒情况,计算检出率;取田间表现出AE典型临床症状发病鸡脑,称重后,用玻璃匀浆器研磨,按1:4加入无菌PBS缓冲液,冻融3次,超声波处理, $3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心30 min,取水相,采用单抗直接Dot-ELISA对其进行检测。

2 结果与分析

2.1 酶标记物分析

按改良过碘酸钠法制备HRP-IgG后,测定 OD_{280} 、 OD_{403} ,计算结果表明:标记率= $0.601/1.132\times 100\%=53.09\%$, $[\text{HRP}]=0.40\times 0.601=0.240(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$, $[\text{IgG}]=\frac{1.132-0.3\times 0.601}{0.62}=0.590\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,HRP与IgG克分子比= $\frac{0.240}{0.590}\times 4=1.627$ 。

2.2 单抗直接法Dot-ELISA检测AEV实验条件的确定

2.2.1 底物溶液的最适pH值选择 底物溶液 $\text{pH}<6.4$ 和 $\text{pH}>8.4$ 时规定显色时间内斑点不能形成。结果表明:底物溶液最适pH值为7.2~8.0。

2.2.2 抗原、酶标单抗最适工作浓度的测定 试验结果表明,可测得AEV抗原的最佳点样稀释度为1:26,即16.08 ng/dot,酶标抗体在1:2 000时可检测效价高,但斑点与背景的对比如差,酶标抗体在1:5 000时对比度清晰但斑点形成的颜色比1:4 000的浅,用可检测效价低,酶标羊鼠IgG最适工作浓度为1:4 000。

2.2.3 封闭条件测定 根据阳性斑点不减色时背景色度的深浅判定封闭及洗涤效果,结果表明用包被液配制的封闭液效果明显好于用 $0.01\text{ mol}\cdot\text{mL}^{-1}\text{ pH}7.2$ PBS液配制。通过此试验可以看出为了达到既节省时间而又不影响反应效果的目的,可将封闭液和洗涤方式调整为:

40 min 封闭后做 3 min 一次洗涤; 其他步骤洗涤均为每次 2 min, 共 3 次。

2.2.4 酶标单抗作用时间、作用温度、底物显色时间、显色温度确定 根据阳性斑点不减色时背景色度的深浅判定效果, 结果表明酶标单抗作用温度和时间以 37、60 min 为最佳, 底物显色温度和时间以室温、15 min 为最佳。

2.2.5 进口 NC 膜与国产 NC 膜的比较 试验结果表明二者没有差别, 而且国产 NC 膜价格较为低廉, 故选用国产 NC 膜进行以后的试验。

2.3 单抗直接 Dot-EL ISA 检测 AEV 抗原的特异性试验

表 1 单抗直接 Dot-EL ISA 检测 AEV 抗原的阻断试验结果

2.3.1 阳性阻断试验 试验结果表明: 阳性鸡抗 AEV 血清能阻断阳性反应, 无可见斑点形成(表 1)。

阻断血清	AEV 阳性抗原	阴性抗原
阳性鸡抗 AEV 血清	-	-
SPF 鸡阴性血清	+	-

2.3.2 交叉反应试验 结果见表 2。

表 2 直接 Dot-EL ISA 检测 AEV 抗原的交叉反应试验结果

抗原	阳性抗原	NDV	BDV	MDV	EDS-76	LTV	BV	阴性对照
判定结果	+	-	-	-	-	-	-	-

2.4 单抗直接 Dot-EL ISA 检测 AEV 抗原的敏感性试验

3 次重复试验纯化病毒的可检测效价为 10^7 。对照均无可见斑点形成。AEV 最低检出量为 8.03 mL。

2.5 单抗直接 Dot-EL ISA 检测 AEV 抗原的重复性试验

分别取阴阳性抗原按 2 倍比稀释 $2^1 \sim 2^{14}$, 按间接 Dot-EL ISA 操作程序进行, 同时点 3 片 NC 膜, 再分别按同样的步骤重复, 结果表明每次重复, 抗原可检测效价相同, 都为 2^7 , 说明本直接 Dot-EL ISA 检测 AEV 抗原具有良好的重复性, 保证了试验结果的可靠性和准确性。

2.6 单抗直接 Dot-EL ISA 检测 AEV 临床样本

2.6.1 人工感染 SPF 鸡 AEV 样本的检测 经人工感染 AEV 后, 在脑、胰腺、十二指肠、腺胃均可检测到病原(表 3)。

表 3 人工感染 SPF 鸡 AEV 样本的检测结果

%

样 品	VR 株			分离株			对照		
	阳性	可疑	阴性	阳性	可疑	阴性	阳性	可疑	阴性
脑	98	0	0	98	0	0	0	0	100
胰腺	94	4	0	94	4	0	0	0	100
十二指肠	80	2	0	80	2	0	0	0	100
腺胃	85	2	0	85	2	0	0	0	100

2.6.2 自然感染样本的检测 将 100 份取自疑似 AE 临床发病鸡的脑组织常规处理样品, 按上述 1.2 检测, 结果: AE 阳性率为 90% 其中包括曾进行 AE 病原分离阳性的 10 份脑组织病料, 该 10 份脑组织病料阳性率为 100%。

3 讨论

经交叉试验、阻断试验、敏感性试验、重复性试验,证明本法能检测较低含量的抗原成分,且特性高,重复性好。对人工感染SPF鸡的组织样品用本法检测,以及对病原分离确认为AEV阳性和表现疑似AE临床症状发病鸡病料检测,证明本法能够用于AE临床病料的特异检测。

Dot-ELISA方法的优点在于快速、简便,既保留了常规ELISA的敏感性高、特异性强等优点,又克服了其繁琐的程序,结果直观可用肉眼直接观察,也可定量单一抗原或抗血清滴度。单克隆抗体以其特异性强、均质性好、重复性好、效价高、成本低,并可大量生产之优点,能够克服多抗在敏感性和特异性方面存在的某些弊端,可用于病原微生物的诊断,进而实现血清学诊断技术的标准化和商品化——制备诊断试剂盒。由于本方法所用病料极少,操作过程无特殊仪器,操作简单,因此易于基层工作人员掌握。标准程序及各种试剂标准浓度建立后,可研制诊断盒,便于推广应用。

参 考 文 献

- 1 殷震,刘景华主编 动物病毒学(第2版). 北京:科学出版社,1997. 468~ 516
- 2 Tannock G A, Shafren D R. A vian encephalomyelitis: a review. *A vian Pathology*. 1994, 23(4): 603~ 620
- 3 杨建民 秦卓明,苏敬良,等 禽脑脊髓炎病毒单克隆抗体的制备及鉴定 *畜牧兽医学报*,2003,(6)
- 4 Heddy Zola 单克隆抗体技术手册 周宗安等译 南京:南京大学出版社,1990