

四川农业大学
硕士学位论文

同时识别 1 和 3 型鸭甲肝病毒的单抗及胶体金
试纸条研究

杨 旸

指导教师 程安春 教授

汪铭书 教授

学科专业 预防兽医学

研究方向 禽病学

2016 年 6 月

中文摘要

鸭甲型肝炎病毒 (DHAV) 可引起雏鸭发生急性、高度致死性传染病。主要感染 3 周龄以下的雏鸭, 其中 1 周龄以内的雏鸭死亡率高达 95%, 主要特征病变为患病鸭的肝脏肿大和出血。本试验开展了 DHAV 病毒单克隆抗体及胶体金试纸条制备和快速诊断等研究, 结果如下:

1. DHAV 单克隆抗体的制备及初步鉴定

用血清 1 型鸭甲型肝炎病毒 (DHAV-1) X 株病毒尿囊液接种鸭胚, 收集 24-72h 死亡的鸭胚尿囊液, 将含 DHAV-1 病毒的尿囊液与等量的氯仿混合, 抽提 3 次, 除去脂类以及一些杂蛋白, 然后在 40000 r/min 离心 2 h, 用 PBS 重悬病毒并使病毒蛋白含量为 0.5 mg/mL, 作为制备单克隆抗体的抗原免疫 6 周龄的 BALB/c 雌性小鼠。取免疫后小鼠的脾细胞与 SP2/0 小鼠骨髓瘤进行了细胞融合、筛选, 再用有限稀释法对杂交瘤细胞进行 3 次亚克隆, 最终得到 5 株可以稳定分泌特异性抗体的阳性杂交瘤细胞, 分别命名为 1 #、2 #、3 #、4 #和 5 #杂交瘤细胞株。经鉴定, 1 #单克隆抗体类型属于 IgM, 2#单克隆抗体类型属于 IgG1, 3#单克隆抗体类型属于 IgG2b, 4 #和 5 #单克隆抗体类型属于 IgG2a。纯化后单抗腹水的效价均在 2×10^5 以上; 5 株杂交瘤细胞株稳定性均较好, 经过体外传代以及细胞冻存复苏仍能稳定分泌抗体。5 株单克隆抗体的相对亲和常数都在 10^9 数量级以上, 具有较好的抗原结合能力, 其中 3 #单克隆抗体的亲和力更高。

2. 胶体金试纸条的研制及应用

用纯化的 2 #单克隆抗体进行胶体金标记制备成金标抗体, 经过试验条件的优化, 确定了胶体金与抗原的最佳标记量为 $34 \mu\text{g/mL}$, 最佳标记的 pH 值确定 $0.1 \text{ mol/L K}_2\text{CO}_3$ 加入量为 $12 \mu\text{L/mL}$; 将纯化的兔抗 DHAV-1 多抗包被于 NC 膜的 T 线上作为检测线, 羊抗鼠 IgG 包被于 NC 膜的 C 线上作为对照线, 制成双抗体夹心法检测 DHAV 的胶体金免疫层析试纸条。对胶体金试纸条 T 线和 C 线浓度的优化, 确定检测线上的兔抗 DHAV-1 多抗的最佳标记量为 1 mg/mL , 对照线上羊抗鼠 IgG 最佳标记量为 1 mg/mL 。在特异性试验中, 检测 4 株 DHAV-1 和 6 株 DHAV-3 呈阳性反应, 对鸭常见的其它致病病原 (鸭瘟病毒、鸭大肠杆菌、鸭坦布苏病毒、鸭沙门氏菌、鸭疫里默氏杆菌等) 检测均为阴性; 对 DHAV-1 最低检出量为 $0.9 \mu\text{g}$, DHAV-3 最低检出量为 $1.8 \mu\text{g}$ 。试纸条在 4°C 、室温和 37°C 至少可以保存 3 个月; 批间和批内试纸条对样品检测的重复性较好。本试验制备的试纸条与 RT-PCR 同时检测临床样本的阳性符合率为 96.5% (111/115), 阴性符合率为 97.9% (46/47)。该胶体金试纸条具有较好灵敏度、特异性、重复性和稳定性。

关键词: 鸭甲型肝炎病毒; 单克隆抗体; 胶体金; 抗原检测

Abstract

Duck viral hepatitis is a kind of highly contagious and acute infectious disease that was caused by duck hepatitis virus A. And this disease mainly infected young ducklings under 3 weeks and led liver swell and bleed, which caused economic loss to duck industry for its high mortality and infection rate. In this article, we obtained and purified monoclonal antibodies based on DHAV-1. Besides, we conjugated monoclonal antibodies to colloidal gold and developed an immunochromatographic strip assay to detect DHAV. There are two parts in this research.

1. DHAV monoclonal antibody preparation and preliminary identification

We inoculated duck embryo allantoic fluid with DHAV-1 X in the duck embryos. And embryos dead within 24-72 h were collected, we obtain allantoic fluid after they were placed at 4°C overnight. Purifying DHAV-1 antigen with three steps: Centrifugating allantoic fluid, Mixing allantoic fluid with chloroform, Ultracentrifugating allantoic fluid. We used PBS to dissolve the precipitation that contained DHAV-1 antigen content is 0.5mg/mL. and then used this purified virus to immune after BALB/c female mice of 6 weeks old. Then splenocytes from the immunized mice were fused with SP2/0, then the the hybridoma cells were harvested by limited dilution through three times of cloning. End up with five strains can stable, secretion specificity hybridoma, and respectively named 1 #, 2 #, 3 #, 4#, 5 #; 1 # monoclonal antibody was IgM, 2 # monoclonal antibody was IgG1, 3 # belongs was IgG2b monoclonal antibody, 4, 5 # belongs to IgG2a monoclonal antibody. The ascites titer of McAbs that purified is more than 2×10^5 . The purified McAbs showed strong reactivity only with the DHAV, confirmed that the newly developed McAbs does not show any cross-reactivity. After passaged in vitro and cells cryopreserved recovery that remain stable can secrete antibody; affinity constant of strains of monoclonal antibodies are orders of magnitude more than 10^9 , that has a good ability of the antigen. by comparing the five strains of monoclonal antibody affinity constant value, can get 3 # monoclonal antibody affinity is higher.

2. The development and application of immunochromatographic strip

We developed an immunochromatographic strip test based on 2 # monoclonal antibodies. In this assay, monoclonal antibodies were conjugated to colloidal gold, and on the nitrocellulose membrane, test line were coated with rabbit anti-DHAV-1 polyclonal antibodies and control line was coated with goat anti-mouse IgG. What's more, we obtain the optimal pH

and amount of monoclonal antibodies. The optimal pH was that 12ul 0.1mol/L K_2CO_3 should be added to 1mL colloidal gold solution, and the optimal amount was that 34ug monoclonal antibodies should be added into 1mL colloidal gold solution. Besides, the optimal concentration of rabbit anti-DHAV-1 polyclonal antibodies on test line and goat anti-mouse IgG on control line were 1mg/mL and 1mg/mL. The specificity analysis of ICS indicated that ICS can detect the four strains of DHAV-1 and six strains of DHAV-3, and the results of the detection of other duck pathogenic agents(Duck enteritis virus, Duck Tembusu virus, Escherichia coli, Salmonella, Riemerella anatipestifer and so on) were negative. And the detection limit were 0.9 μ g of DHAV-1 and 1.8 μ g of DHAV-3. The stability analysis of ICS suggested that strips can be stored in the 4 $^{\circ}C$ and 37 $^{\circ}C$ and at room temperature at least 3 months. Repeatability analysis indicated that the repeatability of strips was good. In terms of the detection of clinical samples, the positive and negative coincidence rate between ICS and RT-PCR were 96.5%(111/115) and 97.9%(46/47). The sensitivity, specificity, repeatability and stability were reliable.

Keywords: DHAV; monoclonal antibodies; colloidal gold; detection of antigen;

常用英文缩写词汇

英文缩写	英文全称	中文全称
AA	Amino Acid	氨基酸
bp	Base Pair	碱基对
BSA	Bovine Serum Albumin	牛血清白蛋白
DHV	Duck Hepatitis Virus	鸭肝炎病毒
DPV	Duck Plague Virus	鸭瘟病毒
DAB	Diaminobenzidine	二氨基联苯胺
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
d	day	天
ddH ₂ O	Double-distilled water	双蒸水
E.coli	Escherichia coli	大肠杆菌
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	酶联免疫吸附试验
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
FCA	Freund's Complete Adjuvant	弗氏完全佐剂
FICA	Freund's Adjuvant Incomplete	弗氏不完全佐剂
HAT	Hypoxantin Aminopterin Thymidin	次黄嘌呤、氨基蝶呤、胸腺嘧啶
HT	Hypoxantin Thymidin	次黄嘌呤、胸腺嘧啶
HRP	Horse Radish Peroxidase	辣根过氧(化)物酶
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactoside	异丙基-β-D 硫代半乳糖苷
kDa	kilo Da	千道尔顿
Kana	Kanamycin	卡那霉素
L	liter	升
m mol/L	milimole per liter	毫摩尔每升
McAb	Monoclonal Antibody	单克隆抗体
NC	nitrocellulose	硝酸纤维膜
OD	Optical Density	光密度
ORF	Open Reading Frame	开放阅读框
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应

PEG	Polyethylene Glycol	聚乙二醇
PBS	Phosphate Buffered Saline Solution	磷酸盐缓冲液
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
RA	Riemerella anatipestifer	鸭疫里默氏杆菌
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute-1640	RPMI-1640 培养基
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate	十二烷基硫酸钠
SP2/0	SP2/0-Ag14	BALB/c 小鼠骨髓瘤细胞
SE	Salmonella	沙门氏菌
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin	N,N,N',N'-四甲基二乙胺

目 录

中文摘要.....	I
ABSTRACT	II
常用英文缩写词汇.....	IV
文献综述.....	1
1. 鸭病毒性肝炎研究进展概况	1
1.1 引言.....	1
1.2 鸭病毒性肝炎的历史与分布.....	1
1.3 鸭肝炎病毒的病原学.....	2
1.4 流行病学.....	2
1.5 临床症状和病理变化.....	2
1.6 DHAV 分子生物学.....	3
1.7 鸭肝炎病毒的诊断.....	3
1.7.1 根据临床症状进行初步诊断.....	3
1.7.2 分子生物学诊断.....	4
1.7.3 血清学诊断.....	4
2. 单克隆抗体技术	6
3. 胶体金的研究概况及应用	7
4. 选题目的和意义	8
第一章 鸭甲型肝炎病毒单克隆抗体的制备及鉴定	9
1. 材料	9
1.1 细胞、菌株与毒株.....	9
1.2 试验动物.....	9
1.3 试剂、材料.....	9
1.4 主要试剂的配制.....	9
1.4.1 细胞培养试剂.....	9
1.4.2 ELISA 相关试剂的配制.....	10

1.4.3 SDS-PAGE 电泳相关溶液	10
1.5 仪器设备	10
2. 试验方法	11
2.1 DHAV-1 单克隆抗体的制备	11
2.1.1 DHAV-1 抗原的制备及纯化	11
2.1.2 免疫方法	12
2.1.3 检测 DHAV-1 抗体间接 ELISA 方法的建立	12
2.1.4 SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞的培养	13
2.1.5 饲养层细胞、免疫小鼠脾细胞的制备	14
2.1.6 细胞融合	15
2.1.7 杂交瘤细胞的筛选及亚克隆	15
2.1.8 杂交瘤细胞的传代、冻存及复苏	16
2.1.9 单克隆抗体的大量制备	16
2.1.10 单克隆抗体的纯化	16
2.2 单克隆抗体特性鉴定	17
2.2.1 单克隆抗体亚型的鉴定	17
2.2.2 单克隆抗体特异性鉴定	17
2.2.3 杂交瘤细胞稳定性测定	18
2.2.4 各株单抗 ELISA 效价测定	18
2.2.5 单抗识别抗原位点的相加试验分析	18
2.2.6 单抗亲和常数的测定	19
3. 结果	19
3.1 基于 DHAV-1 全病毒的间接 ELISA 方法的构建	19
3.1.1 最佳抗原包被浓度和血清稀释度的条件优化	19
3.1.2 最佳酶标抗体浓度	20
3.1.3 最佳封闭液、封闭时间的优化	20
3.1.4 包被条件的确定	20
3.1.5 显色时间的确定	21
3.1.6 血清孵育时间的确定	21
3.1.7 二抗孵育时间的确定	21

3.1.8 临界值的确定	22
3.2 脾细胞、饲养细胞及 SP2/0 细胞	22
3.3 细胞融合	23
3.4 腹水单抗的制备和纯化	23
3.5 抗体亚类鉴定	24
3.6 细胞培养上清及腹水效价的测定	24
3.7 杂交瘤细胞株的稳定性	24
3.8 特异性	25
3.9 单抗亲和常数的测定	26
3.10 单抗抗原表位的初步鉴定	26
4. 讨论	27
4.1 病毒纯化	27
4.2 细胞融合及筛选	27
4.3 单抗特性	28
第二章 检测 1 和 3 型鸭甲肝病毒胶体金试纸条的研制	29
1. 材料	29
1.1 毒株与菌株	29
1.2 试剂、材料	29
1.3 主要试剂的配置	29
1.4 仪器设备	29
2. 试验方法	30
2.1 玻璃器皿的清洁	30
2.2 胶体金颗粒质量鉴定	30
2.2.1 肉眼观测	30
2.2.2 紫外扫描鉴定	30
2.3 待标记抗体的处理	30
2.4 金标单克隆抗体的制备和纯化	30
2.4.1 最适标记 K_2CO_3 的量	30
2.4.2 单克隆抗体最适稳定量	31

2.4.3 单克隆抗体的胶体金标记.....	32
2.4.4 金标单克隆抗体的纯化.....	32
2.5 试纸条最佳试验条件的优化.....	32
2.5.1 纯化的兔抗 DHAV-1 IgG 的包被浓度的确定.....	32
2.5.2 羊抗鼠 IgG 的包被浓度的确定.....	32
2.5.3 胶体金标记的单克隆抗体的稀释度的确定.....	33
2.5.4 试纸条组成材料的选择.....	33
2.6 胶体金试纸的组装.....	33
2.7 检测程序与结果判定.....	34
2.7.1 鸭胚尿囊液或者菌体培养液的处理.....	34
2.7.2 样品的处理.....	34
2.7.3 样品检测的结果判定.....	34
2.8 胶体金试纸条的检测.....	35
2.8.1 胶体金试纸条的灵敏性试验.....	35
2.8.2 胶体金试纸条的特异性试验.....	35
2.8.3 胶体金试纸条的重复性试验.....	35
2.8.4 胶体金试纸条的保存期试验.....	35
2.8.5 临床样品的检测.....	35
3. 结果.....	36
3.1 胶体金溶液质量鉴定.....	36
3.2 胶体金标记抗 DHAV-1 单抗复合物的鉴定.....	36
3.3 金标抗体的优化.....	37
3.3.1 胶体金最佳标记 K_2CO_3 的量的确定.....	37
3.3.2 胶体金最佳标记蛋白量.....	37
3.4 试纸条的优化.....	38
3.4.1 C 线浓度的优化.....	38
3.4.2 金标抗体浓度的优化.....	38
3.4.3 T 线浓度优化.....	39
3.4.4 NC 膜的选择.....	39
3.4.5 玻璃纤维素膜的选择.....	39

3.4.6 样品垫的选择	40
3.4.7 NC 膜封闭时间的确定	40
3.5 胶体金试纸条的检测	40
3.5.1 重复性	40
3.5.2 特异性	40
3.5.3 稳定性	41
3.5.4 灵敏度	42
3.5.5 临床样本的检测	43
4.讨论	44
4.1 胶体金试纸条的优化	45
4.1.1 抗体的选择	45
4.1.2 NC 膜的优化	45
4.1.3 金标的优化	46
4.2 胶体金试纸条性能的检测	46
4.3 临床样本的检测	47
结 论	49
参考文献	50
致 谢	56

文献综述

1. 鸭病毒性肝炎研究进展概况

1.1 引言

鸭病毒性肝炎 (Duck viral hepatitis, DVH), 俗称“背脖病”, 是由鸭肝炎病毒 (Duck hepatitis virus) 引起的幼龄雏鸭的一种急性、高度致死性传染病。该病主要感染3周龄以下的雏鸭, 1周龄以内的雏鸭感染后死亡率达到95%, 该病的主要特征是潜伏期短、发病急、传播迅速、死亡率高, 死亡鸭头部向后仰, 呈角弓反张, 病变特征为鸭肝脏肿大、出血^[1-3]。

1.2 鸭病毒性肝炎的历史与分布

鸭病毒性肝炎最先是 1945 年在美国发现, 主要感染 1 周龄以内的北京雏鸭, 肝脏出血, 很快死亡, 在 1950 年 Levine 等用鸡胚第一次分离到该病毒, 证实是小 RNA 病毒, 并命名为鸭肝炎病毒^[4]。1957 年, Macpherson 和 Avery 在加拿大分离出 DHV 病毒^[5]。随后世界各养鸭国家如法国、英国、印度、德国、日本、苏联、中国等许多国家陆续报道了鸭肝炎病毒的发生^[3]。

鸭肝炎病毒曾经分为 3 个血清型, 分别是 DHV-1、DHV-2 和 DHV-3, 其中 DHV-1 引起的鸭肝炎病毒呈世界性分布, 而 DHV-2、DHV-3 分别报道于英国和美国, 3 个血清型之间有明显的差异, 无交叉中和作用^[3]。DHV 还有部分毒株, 与 DHV-1 仅有部分血清学相关性, 1992 年 Sandhu^[6]等用鸡胚中和试验证实了 I 型 DHV 的变异株 I a 型 DHV 的存在。2007 年, 通过交叉中和试验和基因同源性分析, 在韩国^[7]和我国台湾地区^[8]分别报道了与 DHV-1 感染的临床症状和病理学变化一致且发病率和死亡率远远高于 DHV-2、3 的新型 DHV。郑献进^[8]等从北京、广西两地分离到两株新的变异毒株, 称之为 I v 型 DHV, 其基因组序列测定同韩国型的毒株的同源性最高。

在我国, 黄均建等 (1963) 首次报道了鸭病毒性肝炎在上海的流行, 王平等 (1980)^[9]在北京地区分离到鸭肝炎病毒, 郭玉璞等 (1984)^[10]利用间接荧光抗体试验对分离到的血清型进行初步鉴定, 确定我国流行的鸭肝炎病毒为 1 型。此后, 北京、广东、四川、深圳、江苏等全国各地陆续有鸭肝炎病毒 1 型的报道。近年来发现鹅出血性肝炎临床病例中分离到鸭肝炎病毒 1 型^[11]。

1.3 鸭肝炎病毒的病原学

根据基因组特征和抗原中和试验将鸭甲型肝炎病毒分为 3 个基因型或血清型, 即鸭甲型肝炎病毒基因 1 型 (DHAV-1)、2 型 (DHAV-2)、3 型 (DHAV-3), DHAV-1 型即对应传统的 DHV-1, 我国台湾新分离到的毒株称为 DHAV-2, 我国和韩国新分离到的新型毒株称为 DHAV-3。其中 DHAV-1 与 DHAV-2 不产生交叉保护作用, 与 DHAV-3 有部分交叉中和反应^[1, 7, 8, 12-14]。根据国际病毒分类委员会 (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) 发表的病毒分类报告显示, DHAV 属于小 RNA 病毒科 (Picornavirida)、禽肝病毒属 (Avihepatovirus) 的成员 (<http://ictvonline.org/index.asp>)。原 DHV-2、3 属于禽星状病毒科星状病毒属^[15]。

DHAV 病毒颗粒的直径约为 20-40 nm, 呈球形或类球形, 病毒核衣壳呈二十面体对称, 无囊膜结构, 单股 RNA^[16]。DHAV 病毒具有很强的生命力, 对环境的抵抗力很强, 对乙醚、氯仿、胰酶、硫酸铵等有机溶剂等都有抵抗力, 可以耐受 pH3.0 的酸性环境, 一定浓度的 NaCl、Na₂SO₄、MgCl₂ 或者 MgSO₄ 可防止病毒失活^[17]; 同时具有一定的热稳定性, 一般情况下, 50℃加热 1 h 后不受影响, 56℃、60 min 病毒仍能存活, 60℃加热 30 min 可以将病毒完全灭活。在自然环境条件下, DHAV 可在污染的未清洗的孵化器中至少存活 10 周, 在阴凉潮湿的粪便中至少可以存活 37 d。病料在 4℃冰箱里可以存活 2 年以上, 在-20℃冰箱里则可达到 9 年以上^[3, 16]。DHAV 对一些常用的消毒剂也有一定的抵抗作用, 在 22 g/L 的次氯酸钙中 2 h、20 g/L 的氢氧化钠中 2 h、2 mol/L 的福尔马林中 2 h 均可以使病毒完全灭活^[18]。

1.4 流行病学

本病潜伏期一般为 1-4 d, 病程较短, 死亡率高, 成年鸭有抵抗力, 感染病毒后一般不出现明显的临床症状, 对其产蛋率也不产生影响, 但可以排毒。最近发现该病可在自然条件下感染鸽和鹅^[11, 19]。病鸭和带毒鸭为传染源, 通过消化道、呼吸道感染, 不经垂直感染鸭^[3]。本病无季节性, 春季多发, 饲养管理不良, 鸭舍内湿度过高, 密度过大, 卫生条件差, 维生素和矿物质缺乏, 均可促使本病发生^[20]。

1.5 临床症状和病理变化

本病潜伏期短, 发病急, 发病初期表现为精神沉郁、食欲废绝、脚软站立不稳, 翅下垂、行动迟缓, 眼半闭呈昏睡状, 强行驱赶则行走, 有的病鸭出现绿色液状稀粪, 发病后期出现神经症状, 死亡时角弓反张^[21]。雏鸭肉眼可见肝脏肿大, 表面有不等的出血点和出血斑, 脾肿和肾脏肿胀, 充血, 对死亡 1-2 d 的病鸭进行组织学诊断, 病变主要

是肝炎，间隙支气管肺炎，脾炎^[6]。

1.6 DHAV 分子生物学

DHAV 的全基因组由 7690 个核苷酸组成(不包括 3' 末端的 poly (A) 尾巴结构)，含有编码 2249 个氨基酸的多聚蛋白的单一开放阅读框，其基因组结构具有典型的小 RNA 病毒基因组的特征，即：5' 非编码区-L-VP0(VP4 和 VP2)-VP3-VP1-2A-2B-2C-3A-3B-3C-3D-3' 非编码区^[22]。DHAV 的 5' 非编码区 (UTR) 由 625 个核苷酸组成，在翻译起始和 RNA 的合成中具有重要的作用^[23]。在 5' UTR 具有典型内部核糖体进入位点 (IRES) 元件，位于 360-620 nt，由 260 个碱基组成，具有内部起始下游蛋白的翻译的功能，SL1、SL2 和 IIIe 区是维持 IRES 启动内部翻译起始功能的关键性结构域^[24]，并且不受真核起始因子 eIF4F 活动的影响^[25]。DHAV 的 3' UTR 可以形成 5 个发夹结构，参与病毒的复制^[26]。此外，有研究表明小 RNA 病毒的 3' 末端具有可变长度的 poly (A) 尾巴结构，与病毒 mRNA 的翻译和 RNA 的复制有关^[27]。DHAV 的 3 个结构蛋白 VP0、VP3 和 VP1 位于衣壳的表面，都存在潜在的免疫原性，但是优势 B 细胞抗原表位主要存在于 VP1 和 VP3 蛋白，并且都含有 2 种潜在的优势 B 细胞抗原表位，VP3 和 VP1 可以作为 DHAV 基因工程疫苗的候选免疫原^[28]。Wen 等 (2013)^[29]研究表明 DHAV-1 的 VP1 蛋白的亲水性、抗原性都很高，最高位于编码 B 抗原位点的 131-136 和 209-218 aa。此外，有研究表明，VP1 蛋白的 C 端有三个高变区 (158-160、180-193、205-219)，但是没有引起 DHAV-1 毒力的变化^[30]。DHAV-1 的 VP3 与人双埃可病毒 (HpeV) 一样，N 末端富含碱性氨基酸，长度约为 22aa，含有主要的抗原决定簇，能够诱导机体免疫反应^[26]。DHAV 的 3C 蛋白与其他小 RNA 病毒一样，3C 蛋白是一种蛋白酶^[26]。3D 蛋白是高度保守的结构域，是一种 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RdRp)，在病毒复制中参与病毒 RNA 的合成^[22]，此外 3D 蛋白有 B 细胞表位和 T 细胞表位，因此有很好的免疫原性，可以刺激宿主的免疫反应^[31]。

1.7 鸭肝炎病毒的诊断

1.7.1 根据临床症状进行初步诊断

DHAV 具有典型的临床症状和病理变化，发病急、感染初期精神不济、食欲不振、继而出现运动失调的神经症状，死亡时角弓反张。剖检发现肝脏肿胀，质地变脆、有出血点和出血斑等特征可以对鸭病毒性肝炎进行初步诊断。传统的诊断方法虽然有效，但是操作过程繁琐、费用多、确诊需要花费的时间长。

1.7.2 分子生物学诊断

1.7.2.1 逆转录环介导等温扩增 (RT-LAMP)

RT-LAMP 是一种新型的核酸扩增和检测技术, 在具有链置换活性的 DNA 聚合酶作用下, 能特异性的识别靶位序列上 6 个位点的 4 条引物, 在 60-65℃ 等温条件下, 进行不到 1 h 核酸扩增, 其扩增效率可以达到 10^9 拷贝, 广泛用于病毒检测^[32]。Limin Yang 等 (2012)^[33]采用 RT-LAMP 方法, 针对 DHAV-1 病毒的 3C 基因设计了 4 对引物, 具有特异性强, 灵敏度高, 最低能检测出 2×10^{-1} pg DHAV-1 的总 RNA 模板, 是常规 RT-PCR 的 100 倍, 对临床样本检测的符合率均为 100%。Song 等 (2012)^[34]对 DHAV-1 高度保守的 3D 基因序列设计引物, 应用 RT-LAMP 方法检测感染 DHAV-1 病毒的鸭的尿囊液和肝脏样品, 具有高灵敏度, 并且检测出与其他禽类病毒和细菌病原体无交叉反应。Li 等 (2013)^[35]等建立的 RT-LAMP 方法对 DHAV-C (即 DHAV-3) 的 3D 基因设计引物, 最低检测量为 0.3 pg, 样品的阳性检出率比 RT-PCR 高。

1.7.2.2 RT-PCR

RT-PCR 是一种体外扩增特异性基因片段的技术, 在检测疾病方面有广阔的应用前景, Kim 等 (2007)^[36]建立的一步法 RT-PCR 检测 DHAV-1, 根据编码 DHAV-1 的 RNA 依赖性 RNA 聚合酶的 3D 基因设计引物, 扩增出 467 bp 的特异性目的条带, 可以检测出 10 ELD₅₀/0.1 mL 的 DHAV-1, 用 DHAV-1 接种后 3 d 内死亡的鸭胚和鸡胚的肝脏和尿囊液可检测出 DHAV-1。黄显明等 (2008)^[37]选取 DHAV-1 A66 毒株的 RNA 聚合酶基因序列, 设计合成了 2 对引物, 建立逆转录套式 PCR 方法, 扩增出 304 bp 的单一一条带, 敏感性和特异性有了很大提高, 通过反转录套式 PCR 的两次扩增, 套式 PCR 检测灵敏度是普通 PCR 的 10^5 倍, 避免了 DHAV-1 检测中的假阴性问题, 可以应用到临床诊断、病料检测和流行病学调查。Yang M 等 (2008)^[38]采用的实时荧光定量 RT-PCR 方法可以检测到大约 10 个拷贝的病毒基因组, 特异性强, 敏感性更高, 但是荧光 PCR 方法成本较高。Kim 等 (2008)^[39]建立了检测 DHAV-1 和韩国型 DHV 的多重 RT-PCR 诊断方法, RNA 最低检出量分别为 1000 拷贝和 100 pg。程安春等 (2009)^[40]建立的逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 在检测 DHV-1 的 RNA 的灵敏度达到 3 pg/10 μ L。

1.7.3 血清学诊断

1.7.3.1 中和试验

中和试验是诊断 DHAV 的经典方法, 自从 Levine 等 (1965)^[4]首次将中和试验应用到 DHAV-1 的检测后, 各国学者均采用此方法在鸡胚、鸭胚和细胞上进行中和试验, 如 Hwang 等 (1965)^[41]建立了一种准确性高、重复性好的 DHAV-1 中和试验, 对中和试验中的孵育、温度、病毒量等的最佳条件进行了研究, 研究发现血清被灭活的最佳条

件是 56℃、30 min，并且血清和病毒的混合液在 37℃，水浴 40 min 后接种 8 日龄鸡胚，具有灵敏度高、特异性强、重复性好等优点；Kaleta 等（1988）^[42]用北京鸭胚肾细胞培养的减毒 DHV 进行了微量中和试验。由于中和试验操作繁琐、所需时间较长等，不能用于快速诊断。

1.7.3.2 凝集试验

罗函禄等（1990）^[43]应用“氯仿去脂-冻融交替处理-PEG 反透析-DEAE₃₂ 纤维素谱法”在获得纯化的 DHAV-1 的基础上成功建立了检测 DHAV-1 抗体的间接血凝抑制试验（IHA），该法测定已知阳性样本检测率为 100%。汪铭书等（1996）^[44]应用基于葡萄球菌 A 蛋白协同凝集试验（SPA-CoA）检测 DHAV-1，对患病雏鸭肝脏的检出率为 100%，提纯抗原的最低检出量为 0.4 mg/mL，具有较高的敏感度和特异性。凝集试验虽然不需要特殊仪器，但对 DHAV 抗原提纯困难，存在非特异性凝血因子的影响，而且检测的敏感性不够高。

1.7.3.3 ELISA 方法

陈溥言等（1989）^[45]制备了 DHAV-1 单克隆抗体，并用单克隆抗体建立了 ELISA 夹心法检测 DHAV-1。Zhao 等（1991）^[46]等通过中和试验、琼脂扩散试验、ELISA 方法对 DHAV-1 抗体进行检测，阳性检出率分别为 18.8%、68.8%和 68.8%。杨萍萍等（2004）^[47]以氯仿去脂、0.22 μm 孔径滤膜过滤、凝胶柱浓缩层析方法纯化得到的病毒作为包被抗原，并制备鸡抗 DHAV-1 的高免血清，成功建立了检测 DHAV-1 血清抗体的间接 ELISA 方法。Liu 等（2010）^[48]用重组的 VP1 蛋白为抗原建立检测 DHAV-1 抗体的 ELISA 方法，与中和试验相比，该 VP1-ELISA 具有较高的特异性和灵敏度，与蛋白印迹的一致性达到 86%。Shen 等（2015）^[49]基于鸭肝炎病毒重组 VP3 蛋白构建的间接 ELISA 方法，可以同时检测 DHAV-1 和 DHAV-3 抗体，与全病毒构建的间接 ELISA 方法相比符合率达到 96%。酶联免疫吸附试验具有敏感度高、特异性强、操作简单等优点，但是在纯化抗原方面存在一定的困难，而且需要数小时才能得出结果，在临床使用中受到限制。

1.7.3.4 胶体金技术

程安春等（1994）^[50]采用胶体金标记羊抗兔 IgG 建立检测 DHAV-1 的免疫电镜，在电镜中观察到大量的单个存在的 20-40 nm 的呈球形的病毒粒子，与直接电镜比较，该方法结果清晰，大大提高了检测率，胶体金技术具有简便、快速、灵敏、直观等特点，但对设备要求很高，很难用在临床诊断。张小飞等（1997）^[51]首次建立了检测 DHAV-1 的斑点免疫金渗滤法（DIGFA），对纯化的 DHAV-1 的最小检测量为 4.12 ng/点，敏感性是抗原斑点试验（AST）的 2 倍。DIGFA 法对 DHAV-1 鸡胚尿囊液检出率为 100%，对 36 份临床样本检测阳性率分别为 83.3%，是一种微量、敏感、特异、快速、简便的检测方法。

1.7.3.5 琼脂扩散试验

孙泉云等（1998）^[52]等用氯仿处理待检病料，建立检测 DHAV-1 抗原的琼脂免疫扩

散试验。张济培等（2002）^[53]应用琼脂扩散试验对DHAV-1抗原和抗体进行了检测，阳性检出率为80%，并且检测的琼脂配置最佳方案是pH 7.2，NaCl为80 g/L，最理想的抗原是病雏鸭肝脏浓缩物。琼脂扩散试验方法虽然简单易行，不需要特殊仪器，但DHAV-1抗原提纯困难，抗原不纯，将会产生非特异性沉淀条带，而且试验灵敏度不高，不易大范围推广应用。

2. 单克隆抗体技术

1975年，德国的Kohler和英国的Milstein（1992）^[54]在细胞融合技术的基础上首次成功的制备了能够永久分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。单克隆抗体是用经抗原免疫的小鼠脾淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合，经培养，筛选和克隆化，建立既能分泌针对特定抗原的抗体，又能无限增殖的杂交瘤细胞系。

单克隆抗体技术自问世以来，已经在许多领域研究中得到广泛的应用，在兽医学领域也发挥了很重要的作用。建立在病毒方面，单抗在病毒结构的分析、中和表位的鉴定、免疫学诊断以及抗病毒治疗方面得到了广泛的应用。Weiland E等（1990）^[55]用猪瘟病毒（CSFV）的单克隆抗体结合猪瘟病毒的融合蛋白，确定CSFV主要的保护性抗原蛋白。金山等（1997）^[56]用具有中和活性的抗鸡传染性法氏囊单克隆抗体M12和D291治疗自然发病鸡，治愈率93%-94%。Zhang等（2006）^[57]用禽流感单抗作为捕获抗体，HRP标记的兔多抗作为检测抗体，建立了双抗体夹心ELISA方法。仇铮等（2009）^[58]通过分段表达对鹅细小非结构蛋白NS1单克隆抗体的抗原位点进行定位，鉴定出3个抗原表位区。Upadhyay C等（2009）^[59]将重组的禽流感病毒NP蛋白表达纯化后与NP特异性单克隆抗体HB65建立竞争ELISA方法，用于检测鸭、鹅以及野鸟血清。

单克隆抗体在鸭肝炎病毒中也发挥了重要的作用。陈溥言等（1989）^[45]制备了DHAV-1单克隆抗体，并用单克隆抗体建立了ELISA夹心法检测DHAV-1。Zhang等（2014）^[60]成功筛选出4株能稳定分泌抗鸭肝炎病毒VP1蛋白的杂交瘤细胞株。Wu X等（2015）^[61]用抗DHAV-1 VP1蛋白的单克隆抗体进行VP1蛋白B细胞抗原表位的鉴定，确定了VP1蛋白特定的B细胞抗原表位LPAPTS被单抗中和。Zhang等（2015）^[62]通过对制备的DHAV-1 VP1单抗的抗原表位的鉴定，单抗识别的抗原表位是DHAV-1 VP1的⁷⁵GILT⁸⁰，该抗原表位在DHAV中高度保守，可以用于免疫诊断。单克隆抗体的特异性好，在DHAV的诊断方面使得胶体金试纸条的优点更为突出，用胶体金标记单克隆抗体检测鸭肝炎病毒的试纸条，不仅在临床上可以更加快速、准确的检测鸭肝炎病毒，而且还为实验室中的应用提供了一种更为简便的途径。

3. 胶体金的研究概况及应用

免疫胶体金试纸条 (immunochromatographic strip . ICS) 技术是一种新型的固相免疫标记技术, 1971 年首次由 Faulk 和 Taylor 将胶体金与抗体结合检测沙门氏菌, 由此引入免疫化学^[63], 具有简便、特异、快速等优点, 已经成为现在动物疫病检测中实用的检测技术之一^[64]。胶体金主要是由氯金酸在还原剂如白磷、鞣酸、抗坏血酸等的作用下, 聚合成特定大小的金颗粒, 并由于静电作用形成一种稳定的胶体状态。该方法的原理是以硝酸纤维素膜为载体, 利用了微孔膜的毛细管的作用, 待检样品将会沿着硝酸纤维素膜向前移动, 当待检样品移动到已经固定的抗体或者抗原区域时, 通过抗原抗体结合, 并利用胶体金呈现红色反应, 从而达到特异性的免疫诊断。该方法主要由 NC 膜、样品垫、金标垫、吸收垫、底板这五个部分组成。胶体金技术有很多种, 目前应用较多的主要有斑点免疫金渗滤法 (Dot-immunogold filtration assay, DIGFA) 和胶体金免疫层析法 (colloidal gold immunochromatography, GICA) ^[65, 66]。

近年来, 胶体金技术在各领域得到了日益广泛的应用, 如病毒、寄生虫、细菌等方面均有报道, 已经成为研究的热点。程安春等 (1997) ^[67]首次报道建立了检测提纯的鸡减蛋综合征病毒 (EDSV) 抗原的银加染胶体金探针的方法, 结果表明病毒抗原的最低检测量为 0.11719 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 运用该方法对人工感染的 50 只带毒鸡的样本进行检测, 卵巢、输卵管峡部、咽喉部、软壳蛋样本的阳性率均为 100%, 粪便阳性率为 92%。Kameyama K 等 (2006) ^[68]用胶体金标记单克隆抗体, 建立了检测牛病毒性腹泻病毒 (BVDV) 抗原的胶体金免疫层析试纸条。沈婵娟等 (2010) ^[69]首次建立了检测血液样品中鸭瘟抗体的免疫胶体金试纸条, 该方法能够特异性的检测到鸭瘟抗体, 对 DHV、RA、DPV、MPV、E.coli 的检测结果均为阴性, 将血清样品倍比稀释, 在稀释度为 1:128 时, 检测的结果仍为阳性。夏兴霞等 (2010) ^[70]应用大肠杆菌 O157: H7 单克隆抗体制备了胶体金免疫层析检测试纸条, 敏感度为 10^6 CFU/mL, 可以在 10 min 内得出检测结果。Lin 等 (2011) ^[71]研制了一种快速、特异性检测亚洲 1 型 FMDV 的胶体金诊断试纸条, 与间接凝集试验一致性达到 98.7%。Zhang 等 (2011) ^[72]将胶体金试纸条用于快速检测黄曲霉毒素 B₁。此外, 胶体金在生物检测^[73]、水产品^[74]、动物进出口检疫^[75]、有机磷农药检测^[76]等领域也得到了广泛的应用。胶体金技术既可以检测抗原, 又能检测抗体, 操作简单, 不需要特殊仪器, 在 10 min 内就可快速检测结果, 具有快速、准确、特异性强、灵敏度高、重复性好、易于判断等优点, 从而显示出了胶体金技术在检测方面具有广阔的应用前景。目前还未有研究报道是关于鸭甲型肝炎病毒试纸条的研究。

4. 选题目的和意义

目前，检测 DHAV 抗原的方法有很多种，如病毒中和试验、ELISA、RT-PCR、免疫电镜等，这些方法都具有不可替代的优势，但也有自身的不足的地方，如操作麻烦、试验所需时间长、不能用于快速诊断、灵敏度和特异性差等缺点，在生产实际中有很大的限制。而胶体金试纸条作为新的检测技术，具有快速、特异性强、灵敏度高、操作简单、肉眼判断结果、试验结果容易保存、不需要任何试验仪器和设备、被污染的机会大大降低、易标准化等优点，具有其他方法不可比拟的优势。

目前我国养鸭生产中均有 DHAV-1 和 DHAV-3 的发生和流行，寻找 DHAV-1 和 DHAV-3 的共同抗体一直是学界没有很好解决的难题。本试验试图研制既能识别 DHAV-1、也能识别 DHAV-3 的单克隆抗体，为生产上不漏检 DHAV-1 或 DHAV-3 提供广谱的、特异性强、灵敏度高、简便、快速的胶体金检测技术（试纸条），具有重要意义。

第一章 鸭甲型肝炎病毒单克隆抗体的制备及鉴定

1. 材料

1.1 细胞、菌株与毒株

SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞，购自中国科学院细胞库；

鸭甲型肝炎病毒 1 型 (DHAV-1) (GenBank 登录号: JQ316452.1)、鸭病毒性肠炎 (DPV CHv 株)、鸭大肠杆菌 (E.coli, 保藏号: CVCC83003)、鸭沙门氏菌 (SE, 保藏号: CMCC50083)、鸭甲型肝炎病毒 3 型 (DHAV-3 QL 株)、鸭疫里默氏杆菌 (RA CH-1 株)、鸭乙肝病毒 (DHBV)、鸭坦布苏有病毒 (DTMUV)、小鹅瘟 (GPV): 由四川农业大学禽病防治研究中心保存提供。

1.2 试验动物

6-8 周龄和 10-12 周龄 SPF BALB/c 雌性小鼠: 购买于成都达硕实验动物有限公司;
10 日龄鸭胚: 购买于四川农业大学农场。

1.3 试剂、材料

HAT 培养基添加剂 (50×)、HT 培养基添加剂 (50×)、二甲基亚砷 (DMSO)、聚乙二醇 (PEG 1450)、弗氏不完全佐剂、弗氏完全佐剂、8-杂氮鸟嘌呤 (8-AG) 均为 Sigma 公司产品;

胎牛血清 (FBS)、RPMI 1640 培养基为 Gibco 公司产品;

牛血清白蛋白 (BSA) 为 BIOSHARP 公司产品;

鼠单克隆抗体 Ig 类亚类鉴定酶标二抗套装为北京博奥龙免疫技术有限公司;

一次性细胞瓶、细胞培养板 (6 孔、12 孔、24 孔、48 孔、96 孔)、ELISA 酶标板购自美国 Corning 公司;

NaCl、KH₂PO₄、KCl、Na₂HPO₄·12H₂O、H₂SO₄、SDS、Tris、无水乙醇、氯仿等常见化学试剂购自万科。

1.4 主要试剂的配制

1.4.1 细胞培养试剂

(1)RPMI 1640 细胞培养液: 10.4 g RPMI 1640, NaHCO₃ 1.5 g, 葡萄糖 2.5 g, 丙酮酸钠

- 0.11 g 溶于 1L 超纯水中，搅拌溶解，过滤除菌，-20℃ 保存。
- (2)PBS (0.01 mol/L PH7.4): 800 mL 超纯水中溶解 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 3.58 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.24 g KH_2PO_4 , 定容至 1L, 分装, 灭菌保存备用。
- (3)细胞冻存液: RPMI 1640:FBS:DMSO=5:4:1, 过滤除菌, 4℃ 避光保存。

1.4.2 ELISA 相关试剂的配制

- (1)包被液 (0.05 mol/L pH 9.6 碳酸盐缓冲液): Na_2CO_3 1.59 g, NaHCO_3 2.93 g, 加 800 mL 水溶解, 定容至 1000 mL, 过滤, 4℃ 保存。
- (2)洗涤缓冲液 (PBS-T): 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 3.58 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.24 g KH_2PO_4 , 加水溶解, 定容至 1000 mL 加 0.5% Tween-20 混匀, 4℃ 保存。
- (3)封闭液: 1 g 牛血清白蛋白(BSA), 加洗涤缓冲液至 100 mL。
- (4)抗体稀释液: BSA 0.1 g, 加洗涤缓冲液至 100 mL。
- (5)终止液 (2 mol/L H_2SO_4): 在 178.3 mL dd H_2O 中逐滴加入 21.7 mL 浓 H_2SO_4 。

1.4.3 SDS-PAGE 电泳相关溶液

- (1)30%丙烯酰胺: 称取丙烯酰胺 290 g, N,N'-亚甲叉双丙烯酰胺 10 g 于 1000 mL 烧杯中, 向烧杯中加入 800mL 的 dd H_2O , 搅拌溶解, 定容至 1000 mL, 4℃ 避光保存备用。
- (2)10%AP: 称取 1 g AP 溶解于 10 mL 超纯水中, 4℃ 避光保存备用。
- (3)10%SDS: 10 g SDS 加入 80 mL dd H_2O 中, 加热搅拌溶解, 定容至 100 mL。
- (4)1M Tris-HCl (PH6.8): 称取 121.1 g Tris 置于 1L 烧杯中, 加入约 800 mL 的 dd H_2O , 搅拌溶解, 浓盐酸调节 PH 为 6.8, 定容至 1000 mL, 室温保存备用。
- (5)1.5M Tris-HCl (PH8.8): 称取 181.7g Tris 置于 1 L 烧杯中, 加入约 800 mL 的 dd H_2O , 搅拌溶解, 浓盐酸调节 PH 为 8.8, 定容至 1000 mL, 室温保存备用。
- (6)5×Tris-Glycine 电泳缓冲液: 称取 Tris 15.1 g, 甘氨酸 94 g, SDS 5 g 溶解定容至 1000 mL, 室温保存备用。
- (7)5×样品缓冲液: 60 mmol/L Tris-HCl (PH6.8), 25%甘油, 2%SDS, 14.4 mmol/L β -巯基乙醇, 0.1%溴酚蓝。
- (8)考马斯亮蓝染色液: 10 mL 冰乙酸, 45 mL 甲醇, 45 mL dd H_2O , 0.25 g 考马斯亮蓝 R-250, 混匀。

1.5 仪器设备

微量加样枪 (10 μL 、200 μL 和 1 mL, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司);

恒温水浴锅 (HH 型, 常州澳华仪器有限公司);
超纯水仪 (WaterPro, 美国 Labconco 公司);
全自动高压灭菌锅 (MLS-3750, SANYO 公司);
普通离心机 (1-15, 德国 Sigma 公司);
核酸蛋白检测仪 (SmartSpec 3000, 美国 Bio-rad 公司);
凝胶成相系统 (GelDoc 3000, 美国 Bio-rad 公司);
冰箱 (4°C, 海尔公司);
冰柜 (-20°C, 海尔公司);
倒置荧光显微镜 (TE2000-U, 日本 Nikon 公司);
制冰机 (N35S, 意大利 Icematic 公司);
二氧化碳培养箱 (3951Reach-In, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司);
酶标仪 (MODEL 680, 美国 Bio-rad 公司)。

2. 试验方法

2.1 DHAV-1 单克隆抗体的制备

2.1.1 DHAV-1 抗原的制备及纯化

2.1.1.1 DHAV-1 抗原的制备

- (1)将实验室保存的 DHAV-1 X 菌株(JQ316452.1)病毒液用生理盐水做适当稀释,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤;
- (2)通过尿囊腔接种于 10 日龄的鸭胚,0.1 mL/枚;同时 5 枚为对照组接种生理盐水,37°C 条件下孵育,弃去接种 24 h 内死亡鸭胚,以后每天照蛋 2 次,观察 3-5 d;
- (3)收集接种后 36-72 h 死亡并且病变明显的鸭胚尿囊液,冻存于-20°C 备用。

2.1.1.2 DHAV-1 病毒的纯化

- (1)大量收集接种 36 h 后死亡鸭胚的尿囊液,将尿囊液反复冻融 3 次后,于 4°C,6000 r/min 离心 15 min,弃去沉淀,取上清;
- (2)在上清液中加入等量氯仿强烈振摇 20 min,于 4°C,6000 r/min 离心 20 min,取上清液;
- (3)重复上述操作 3 次;
- (4)4°C 40000 r/min 离心 2 h,收获沉淀并溶于少量 0.01 mol/L pH7.4 的磷酸盐缓冲液悬液中,将沉淀物悬浮;
- (5)用紫外分光光度计测定其在 260 nm 和 280 nm 处光密度,按照公式测定纯化抗原浓度,分装,-20°C 保存备用。公式如下:

蛋白浓度 (mg/mL) = (1.45 × OD_{280nm} - 0.74 × OD_{260nm}) × 稀释倍数

2.1.2 免疫方法

以纯化后的 DHAV-1 病毒为免疫原, 免疫 6-8 周龄的 BALB/c 雌性小鼠。首免按照每只小鼠 DHAV-1 病毒 100 μg 的剂量与弗氏完全佐剂等体积混合并充分乳化, 背部皮下多点注射。两周后, 用弗氏不完全佐剂处理同一剂量抗原进行背部皮下多点注射。间隔两周后用同样的方法进行第三次免疫。第三次免疫后 10 d 从小鼠尾静脉采血, 放入 37℃ 恒温箱中静置 2 h, 4℃ 过夜, 之后 5000 r/min 离心 10 min 用以分离血清。采用间接 ELISA 方法检测血清抗体效价, 根据检测结果决定用于融合的时机, ELISA 效价在 1:10⁴ 以上时可用于融合。细胞融合前 3 d, 腹腔注射无佐剂抗原 50 μg/只进行加强免疫。3 d 后, 将 SP2/0 骨髓瘤细胞与小鼠脾细胞进行无菌融合。(见表 1)

表 1 DHAV-1 抗原小鼠免疫程序

Table 1 The mice immune program of DHAV-1 antigens

时间	抗原	剂量	接种的方法	备注
1d	DHAV-1 抗原+弗氏完全佐剂	0.4 mL/只 (100 μg 纯化 DHAV-1 病毒)	背部皮下多点注射	
14d	DHAV-1 抗原+弗氏不完全佐剂	0.4 mL/只 (100 μg 纯化 DHAV-1 病毒)	背部皮下多点注射	
28d	DHAV-1 抗原+弗氏不完全佐剂	0.4 mL/只 (100 μg 纯化 DHAV-1 病毒)	背部皮下多点注射	10d 后从小鼠尾静脉采血检测抗体效价
38d	无佐剂的抗原	0.1 mL/只 (50 μg 纯化 DHAV-1 病毒)	腹腔注射	

2.1.3 检测 DHAV-1 抗体间接 ELISA 方法的建立

参照文献^[46], 按照常规间接 ELISA 操作步骤, 采用方阵滴定试验确定抗原最佳包被浓度、血清最佳工作浓度, 作用时间等条件, 具体操作步骤如下并见表 2:

- (1)包被: 纯化 DHAV-1 病毒用 0.05 mol/L pH 9.6 碳酸盐缓冲液稀释, 100 μL/孔, 加入酶标板, 4℃ 包被过夜;
- (2)洗涤: 弃去包被液, 拍干, 用 300 μL 的 PBS-T 缓冲液洗涤 4 次, 每次 5 min;
- (3)封闭: 每孔加入 200 μL 最佳封闭液进行, 37℃ 温箱中孵育 1 h;
- (4)洗涤: 同 (2)
- (5)一抗: 将免疫小鼠血清用 PBS 稀释, 阴、阳血清分别作倍比稀释, 置 37℃ 恒温箱作

- 用一定时间;
- (6)洗涤: 同(2);
- (7)酶标二抗: 每孔加入 100 μL 用 PBS 稀释 HRP 标记羊抗鼠 IgG, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h, 洗涤液洗涤 4 次;
- (8)显色: 每孔加入 100 μL TMB 显色液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 显色;
- (9)终止: 每孔加入 50 μL 终止液 (2 mol/L H_2SO_4) 终止反应;
- (10)酶标仪以双波长形式读取 $\text{OD}_{450}-\text{OD}_{630}$ 值。

结果判定: 试验孔的 $\text{OD}_{450}-\text{OD}_{630}$ 值记为 P, 阴性对照孔的 $\text{OD}_{450}-\text{OD}_{630}$ 值记为 N, 计算 P/N 值, 若 P/N 值 ≥ 2.1 为阳性, 反之为阴性。

表 2 间接 ELISA 试验条件的优化
Table 2 Optimization of the indirect ELISA

优化的内容	优化条件
抗原包被浓度	纯化的 DHAV-1 X 株病毒包被量按照 1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400、1:12800 进行倍比稀释, 即为 1500 ng、750 ng、375 ng、187.5 ng、93.75 ng、46.88 ng、23.44 ng、11.72 ng。
一抗稀释度	按照 1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200 进行倍比稀释
酶标抗体稀释度	按照 1:1000、1:2000、1:3000、1:4000、1:5000、1:6000、1:7000、1:8000 进行稀释
封闭液	5%BSA、1%BSA、5%脱脂奶粉、1%脱脂奶粉、5%明胶、1%明胶
封闭时间	30 min、60 min、90 min、120 min
病毒包被条件	直接 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜; 37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h, 再 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; 37 $^{\circ}\text{C}$ 4 h, 再 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜
血清孵育时间	30 min、60 min、90 min、120 min
二抗孵育时间	30 min、60 min、90 min、120 min
显色时间	5 min、10 min、15 min、20 min、25 min、30 min

2.1.4 SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞的培养

融合前 1-2 周, 将冻存的 SP2/0 骨髓瘤细胞复苏, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养, 待细胞稳定后, 在细胞传代时按照 2% 的比例加入 HAT 原液, 混匀, 48 h 后观察细胞的

生长状况。若骨髓瘤细胞全部萎缩、死亡则表明细胞对 HAT 敏感；若出现骨髓瘤细胞的回复突变，则需用 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 8-杂氮鸟嘌呤 (8-AG) 将 SP2/0 骨髓瘤细胞连续传代 3 次，以保持次黄嘌呤磷酸核糖转化酶(HGPRT)缺陷型。用含 20%胎牛血清的完全 RPMI 1640 培养基培养，取对数期生长状态良好，细胞大小均匀的细胞进行融合。将细胞轻轻吹匀，收集至 50 mL 离心管内，800 r/min 离心 10 min，弃去上清。用 RPMI 1640 基础培养液悬起，相同条件离心洗涤一次，再弃去上清，用 RPMI 1640 基础培养液悬起，备用。骨髓瘤细胞在融合前应处于对数生长阶段，浓度达到 $1-2 \times 10^5$ 个/mL。

2.1.5 饲养层细胞、免疫小鼠脾细胞的制备

饲养细胞制备

- (1)取 10-12 周龄以上未免疫的 BALB/c 小鼠，拉颈处死，流动清水冲洗，将小鼠浸泡于 75%酒精中 5-10 min 进行消毒，将消毒后的小鼠置于超净工作台上；
- (2)用 75%酒精消毒，腹部朝上，用镊子提起小鼠腹部皮肤，用灭菌剪刀剪开腹部皮肤，由两边向背部进行皮肤的钝性分离，使腹膜暴露；
- (3)用镊子提起腹膜，取约 5 mL 预先在 37°C 预热的培养液注射到小鼠腹腔内，小心按摩小鼠腹部约 3 min，抽出，重复操作几次。置于 10 mL 离心管内，1500 r/min，弃去液体用适量培养液重悬，进行活细胞计数后，调整至细胞数为 $2-3 \times 10^5$ 个/mL；
- (4)100 μL /孔加入 96 孔细胞板中培养；
- (5)细胞于 37°C、5% CO_2 培养箱中培养过夜，次日观察无污染即可使用。

免疫小鼠脾细胞的制备

- (1)选取已经加强免疫的 BALB/c 小鼠，摘除小鼠眼球采血，收集血液，分离血清作为阳性血清备用；
- (2)脱颈致死后，将小鼠浸泡于 75%的酒精溶液中浸泡 3-5 min 进行消毒，然后将小鼠放置于超净工作台上；
- (3)用 75%酒精消毒，腹部朝上，用镊子提起小鼠腹部皮肤，用灭菌剪刀剪开腹部皮肤，由两边向背部进行皮肤的钝性分离，使腹膜暴露；
- (4)用另一把剪刀和镊子，在脾脏近处用镊子提起腹膜，轻轻剪开腹膜，不要剪到任何脏器，防止污染；
- (5)用眼科镊子将脾脏轻轻取出，并除去其表面的脂肪组织和结缔组织，放在盛有 10 mL 基础 RPMI 1640 培养液的平皿内冲洗；
- (6)用吸取 RPMI 1640 培养液的无菌注射器从脾脏的一端缓慢注入，反复冲洗，挤压出脾细胞；
- (7)然后吸取混有脾细胞的培养液于离心管中，加 10 mL RPMI 1640 基础培养液，1000 r/min 离心 10 min，弃上清，沉淀用 10 mL RPMI 1640 基础培养液重悬，进行细胞计

数，达到 $2-3 \times 10^6$ 个/mL。37℃ 备用。

2.1.6 细胞融合

- (1)将制备好的 SP2/0 骨髓瘤细胞和免疫脾细胞按 1: 5 的比例混匀，放入 50 mL 离心管中，1800 r/min 离心 5 min，小心弃去上清液体，用无菌滤纸条尽量吸干细胞沉淀上方液体；
- (2)超净台台面上轻柔旋转敲打管壁和管底，使细胞松散、均匀；
- (3)将离心管放置于 37℃ 水浴中，在 60 s-90 s 间缓慢匀速逐滴加入已经 37℃ 预热处理好的 PEG 1450 1 mL，边加边轻柔转动离心管，加完以后巴氏管轻柔搅匀细胞团块，勿吹打。在 37℃ 水浴锅中静置 90 s；
- (4)加入预热无血清 RPMI 1640 培养液终止融合作用，在第 1 min 内缓慢加入 37℃ 预热的 RPMI 1640 液 1 mL，边滴加边摇动，轻轻混匀。第 2 min 内再缓慢加入 37℃ 预热的 RPMI 1640 液 2 mL，边滴加边摇动，轻轻混匀。第 3 min 内再缓慢加入 37℃ 预热的 RPMI 1640 液 5 mL，边滴加边摇动，轻轻混匀。第 4 min 开始匀速补加 RPMI 1640 至 40 mL；
- (5)旋紧离心管盖，水平转动混匀细胞悬液，静置 2 min，800 r/min 离心 5 min，小心弃去上清液体，用手掌轻轻拍打管壁及底部，使离心沉淀的细胞松散并混合均匀，细胞沉淀用 37℃ 预热的 RPMI 1640 培养基 40 mL 清洗一次，离心弃上清；
- (6)用含 20% 胎牛血清的 HAT 选择培养液重悬细胞沉淀，加入到含有饲养细胞的 96 孔细胞板中，100 μ L/孔，置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中进行培养。

2.1.7 杂交瘤细胞的筛选及亚克隆

2.1.7.1 杂交瘤细胞的筛选

融合后的杂交瘤细胞培养一周后用 HAT 选择培养液进行半换液，以后再隔 3 d 进行全换液一次，然后采用间接 ELISA 方法用纯化的 DHAV-1 病毒按照 2.1.3 试验步骤进行阳性克隆的筛选。

2.1.7.2 杂交瘤细胞的筛选及亚克隆

采用有限稀释法进行亚克隆，试验步骤如下：

- (1)按照 2.1.5 试验步骤制备饲养细胞；
- (2)将阳性孔内杂交瘤细胞轻轻吹下，适当稀释后对悬浮细胞计数；
- (3)用 HT 培养液将细胞稀释成 100 个/mL、20 个/mL、10 个/mL，将细胞培养液加入含饲养细胞的培养板中，100 μ L/孔；
- (4)将培养板置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养，倒置显微镜下观察并记录细胞克隆生长孔情况，选择只有一个集落生长的阳性孔进行亚克隆，对其进行 3-4 次亚克隆试验；

(5)将能稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株进行扩大培养。

2.1.8 杂交瘤细胞的传代、冻存及复苏

杂交瘤细胞株的传代

每天观察细胞的生长状态 2 次，打开瓶盖，弃去细胞培养液，加入已经灭菌好的 PBS 缓冲液，洗涤杂交瘤细胞 3 次，加入新鲜的 RPMI 1640 完全培养液，将细胞轻轻吹下来，调整到合适的细胞浓度后，分装到新的培养瓶中，再补充培养液，置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

杂交瘤细胞的冻存

经检测的阳性的杂交瘤细胞孔需尽快扩大培养并冻存，冻存时挑选对数期生长的细胞，用 PBS 洗涤 3 次后 1500 r/min 离心 5 min，弃上清，沉淀用细胞冻存液悬浮细胞，将悬浮细胞分装于冻存管中，1 mL/管，细胞密度不低于 $1-2 \times 10^6$ /mL，4℃放置 20 min，用洗脱棉包裹后放入-80℃过夜后，移入液氮罐中长期保存。

杂交瘤细胞的复苏

从液氮罐中取出一支冻存管后，快速放入已经调节成 37℃的水浴中，不断摇动使其快速融化。将融化的细胞悬液加到 10 mL 的离心管中，加入含 20%胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养液至 10 mL，1000 r/min 离心 10 min，弃上清，用 HT 培养基重悬后加到细胞瓶中培养。

2.1.9 单克隆抗体的大量制备

取 10-12 周龄左右 BALB/c 雌性小鼠预先用弗氏不完全佐剂致敏，0.5 mL/只，5 d 后腹腔注入杂交瘤细胞 0.5 mL/只 (2.0×10^6 个/mL)，7-10 d 后，当小鼠腹部显著增大时，消毒腹部皮肤，用注射器抽取小鼠腹水，将腹水置 37℃ 2h，随后置 4℃过夜。次日将收集到的腹水以 3000 r/min，离心 15 min，收集上清液，即为含有所需单克隆抗体的腹水。-20℃保存备用。每隔 2 d 可以抽取腹水 1 次，可以反复抽取小鼠腹水多次，一共可以取腹水 1-5 mL。

2.1.10 单克隆抗体的纯化

采用辛酸-硫酸铵沉淀法：

- (1)取 5 mL 腹水与 10 mL 0.06 mol/L pH4.8 的醋酸盐缓冲液，混匀；
- (2)室温下用电磁搅拌器边搅拌边逐滴加入 33μL/mL 的正辛酸，滴加完后，室温继续搅拌 30 min 左右，4℃静置 2h，使其充分沉淀；
- (3)4℃ 12000r/min 离心 30 min，弃去沉淀；
- (4)取上清用滤纸过滤 2 次，向滤液中加入 1/10 体积的 0.01mol/L pH7.4 的 PBS，用 2 mol/L

的 NaOH 调节 PH 值为 7.4;

- (5)冰浴下向液体中缓慢滴加入饱和硫酸铵溶液,使其终浓度达到 50%,不断搅拌 30 min, 4℃静置 1 h;
- (6)4℃ 10000r/min 离心 30 min, 弃上清液;
- (7)沉淀用适量 0.1 mol/L pH7.4 的 PBS 溶解;
- (8)将溶解液装入透析袋中, 4℃下用 0.1 mol/L pH7.4 的 PBS 透析, 每 6 h 换液一次, 直至 BaCl₂ 检测透析液无沉淀为止。进一步用 rProtein A/G Beads 分离纯化粗提的单抗腹水, 纯化后, 采用 SDS-PAGE 检测抗体纯化效果。

2.2 单克隆抗体特性鉴定

2.2.1 单克隆抗体亚型的鉴定

根据抗体亚型鉴定说明书, 采用间接 ELISA 方法进行单抗 Ig 亚型的检测, 操作步骤如下:

- (1)将单克隆抗体特异结合的纯化的 DHAV-1 病毒用 0.05 mol/L pH 9.6 碳酸盐缓冲液包被酶标微孔板, 100 μL/孔, 置 4℃放置 12 h, 随后用洗板机 PBS-T 洗 4 次;
- (2)将待测杂交瘤细胞培养上清每种加一排共计 6 孔, 每孔 100μL, 置 37℃温育 30 min, 而后同样是用洗板机 PBS-T 洗 5 次;
- (3)将 6 种酶标记物每种加 1 孔, 100 μL/孔, 置 37℃温育 30 min 后继续用洗板机 PBS-T 洗 5 次;
- (4)显色: 每孔加入 100 μL TMB 显色液, 37℃显色;
- (5)终止: 每孔加入 50 μL 终止液 (2mol/L H₂SO₄) 终止反应;
- (6)酶标仪以双波长形式读取 OD₄₅₀-OD₆₃₀ 值。OD 值最高孔所对应的酶标二抗为杂交瘤细胞的单抗亚型。

2.2.2 单克隆抗体特异性鉴定

采用间接 ELISA 方法:

- (1)常见鸭致病病菌: 在 37℃, 180 r/min 恒定条件下, 对鸭疫里默氏杆菌、沙门氏菌、大肠杆菌进行增殖培养 24 h 后, 超声破碎, 离心 10 min, 并取各菌株对应上清液包被酶标板; 将鸭致病病毒: 鸭病毒性肝炎、鸭病毒性肠炎、鸭乙肝、鸭坦布苏、小鹅瘟的病毒液包被酶标板; 用 PBS 作空白对照。4℃孵育 12 h, 随后用 PBS-T 洗 4 次;
- (2)用封闭液封闭 ELISA 板 2 h, PBS-T 洗 4 次;
- (3)加入杂交瘤细胞株的培养上清液为一抗, 同时用 SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞上清液为阴性对照;

- (4)酶标二抗：每孔加入 100 μL 用 PBS 稀释 HRP 标记羊抗鼠 IgG，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h，洗涤液洗涤 4 次；
- (5)显色：每孔加入 100 μL TMB 显色液，37 $^{\circ}\text{C}$ 显色；
- (6)终止：每孔加入 50 μL 终止液（2 mol/L H_2SO_4 ）终止反应；
- (7)酶标仪读取各孔 $\text{OD}_{450-630\text{nm}}$ 值。试验孔的 $\text{OD}_{450-630\text{nm}}$ 值记为 P，阴性对照的 $\text{OD}_{450-630\text{nm}}$ 值记为 N，计算 P/N 值，若 P/N 值 ≥ 2.1 判为阳性，反之判为阴性。

2.2.3 杂交瘤细胞稳定性测定

对 5 株杂交瘤细胞株进行连续的传代培养，分别取其第 1 代、第 5 代、第 10 代细胞培养的上清和经过反复冻存复苏 1 个月后的细胞培养上清按照 2.1.3 间接 ELISA 试验步骤进行检测，测定其效价，用 SP2/0 细胞上清为阴性对照，对杂交瘤细胞进行抗体分泌稳定性的检测。

2.2.4 各株单抗 ELISA 效价测定

应用间接 ELISA 方法，对 5 株杂交瘤细胞的培养上清液以及腹水中 McAbs 的效价的测定。用纯化的 DHAV-1 病毒包被酶标板，4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜；封闭，37 $^{\circ}\text{C}$ 2h；将待测的 5 株杂交瘤细胞培养上清、腹水倍比稀释，同时用 SP2/0 细胞培养上清和阴性腹水平行稀释作为阴性对照，其它步骤同本章 2.1.3 方法进行间接 ELISA 试验，测定各孔 OD 值。判定：试验孔的 $\text{OD}_{450-630\text{nm}}$ 值记为 P，阴性对照的 $\text{OD}_{450-630\text{nm}}$ 值记为 N，计算 P/N 值，若 P/N 值 ≥ 2.1 为阳性，反之为阴性，重复 3 次，计算平均值。

2.2.5 单抗识别抗原位点的相加试验分析

(1)根据单抗效价选取适宜稀释倍数；

(2)相加试验：

将纯化的 DHAV-1 病毒包被酶标板，4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜；一抗分别加入稀释好的 McAb 和按照最适比例稀释好的等比例混合后的 2 株纯化的 McAb，100 μL /孔；洗涤 4 次；再加入 HRP-羊抗鼠 IgG 孵育，洗涤；加底物显色，终止反应，酶标仪读取 $\text{OD}_{450-630\text{nm}}$ 值，设立 1 次重复。

结果按如下公式分别计算 2 种单克隆抗体两两叠加后的 AI 值： $\text{AI}=[2 \times (\text{A}_1+\text{A}_2) \div (\text{A}_1+\text{A}_2)-1] \times 100\%$ 。式中 A_1 和 A_2 为两个 McAb 单独所测的 OD 值， A_1+A_2 为两个 McAb 相加所测的 OD 值。如果 $\text{AI} < 10\%$ ，则两种单抗针对抗原表位相近；如果 $10\% < \text{AI} < 50\%$ ，则可认为两种单抗识别的抗原表位存在一定差异；如果 $\text{AI} > 50\%$ ，则识别不同抗原表位，具有相加效应，并且 AI 越大，其抗原识别位点重叠的可能性就越小。

2.2.6 单抗亲和常数的测定

纯化后的 DHAV-1 病毒包被酶标板过夜, 将待检单抗进行倍比稀释, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, 方法同本章 2.1.3 间接 ELISA 法的试验步骤, 读取最终 OD_{450-630nm} 值。根据曲线中 50% OD_{450-630nm} 值所对应的抗体稀释倍数计算 Kaff, 计算公式: $Kaff \approx 150000 \times A / [Ag]$, 亲和常数的单位 Kaff 为 L/mol, 其中 A 为曲线平台二分之一 OD 值所对应的抗体稀释倍数, [Ag] 为抗体浓度。

3. 结果

3.1 基于 DHAV-1 全病毒的间接 ELISA 方法的构建

3.1.1 最佳抗原包被浓度和血清稀释度的条件优化

纯化的 DHAV-1 X 株病毒包被量按照 1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400、1:12800 进行倍比稀释, 即为 1500 ng、750 ng、375 ng、187.5 ng、93.75 ng、46.88 ng、23.44 ng、11.72 ng。每个抗原的稀释度设置 2 个重复结果, 取其平均值, 取其 P/N 值最大的为最佳优化条件。从表 3 试验结果可知, 最佳优化的抗原包被稀释度为 1: 800, 即纯化的 DHAV-1 病毒包被量为 187.5 ng/孔; 血清的最佳稀释浓度为 1: 800。

表 3 抗原包被浓度和血清稀释度选择

Table 3 Optimal antigen coating concentration and serum dilution

血清稀 释度	抗原稀释度							
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800
1:100+	1.389	1.32	1.252	1.23	1.204	1.129	0.982	0.551
1:100-	0.622	0.5	0.303	0.163	0.14	0.148	0.142	0.132
P/N	2.233	2.64	4.132	7.546	8.6	7.628	6.915	4.174
1:200+	1.147	1.002	0.851	0.813	0.719	0.659	0.571	0.337
1:200-	0.393	0.236	0.127	0.099	0.078	0.074	0.086	0.05
P/N	2.919	4.246	6.701	8.212	9.218	8.905	6.640	6.74
1:400+	0.887	0.74	0.598	0.583	0.584	0.51	0.42	0.186
1:400-	0.215	0.137	0.088	0.053	0.051	0.054	0.059	0.04
P/N	4.126	5.401	6.795	11	11.451	9.444	7.119	4.65
1:800+	0.716	0.657	0.585	0.566	0.486	0.491	0.472	0.155
1:800-	0.1	0.068	0.048	0.033	0.029	0.037	0.038	0.03
P/N	7.16	9.662	12.188	17.152	16.759	13.270	12.421	5.167
1:1600+	0.427	0.387	0.407	0.408	0.373	0.309	0.245	0.185
1:1600-	0.056	0.052	0.037	0.037	0.029	0.031	0.03	0.031
P/N	7.625	7.442	11	11.027	12.862	9.968	8.167	5.968
1:3200+	0.299	0.259	0.266	0.219	0.205	0.153	0.121	0.115
1:3200-	0.053	0.042	0.033	0.029	0.025	0.026	0.025	0.02
P/N	5.642	6.167	8.061	7.552	8.2	5.885	4.84	5.75

3.1.2 最佳酶标抗体浓度

根据确定的 DHAV-1 X 株病毒的最佳包被浓度和血清最佳稀释度后，然后测定酶标二抗最佳稀释度，每个浓度同样设置 2 个重复，取其平均值，37℃ 孵育 1 h，选取 P/N 值最大者为最佳二抗稀释度，即为 1:5000（见表 4）。

表 4 酶标抗体工作浓度优化
Table 4 Working concentration of Goat-anti-mouse HRP-IgG

酶标抗体 稀释度	1:1000	1:2000	1:3000	1:4000	1:5000	1:6000	1:7000	1:8000
阳性	1.1205	1.2075	1.059	1.0575	0.928	0.6545	0.396	0.314
阴性	0.304	0.2755	0.2175	0.2035	0.169	0.131	0.142	0.1125
P/N	3.686	4.383	4.869	5.197	5.491	4.996	2.789	2.791

3.1.3 最佳封闭液、封闭时间的优化

根据之前优化好的条件对封闭液和封闭时间进行优化，每个设置 2 个重复，均于 37℃ 封闭，根据表 5、表 6 试验结果所示，选择 P/N 值最大者作为最佳封闭液，即最佳封闭液为 1% BSA，最佳封闭时间为 2 h。

表 5 最佳封闭液选择
Table 5 Optimal blocking buffer option

封闭液	5%BSA	1%BSA	5%脱脂奶粉	1%脱脂奶粉	5%明胶	1%明胶
阳性	0.729	0.726	0.347	0.382	0.721	0.671
阴性	0.113	0.105	0.103	0.089	0.114	0.12
P/N	6.451	6.914	3.369	4.292	6.325	5.592

表 6 封闭时间选择
Table 6 Optimal blocking time option

封闭时间	120 min	90 min	60 min	30 min
阳性	1.556	1.552	1.543	1.543
阴性	0.127	0.124	0.127	0.139
P/N	12.612	12.584	12.182	11.098

3.1.4 包被条件的确定

抗原在 37℃ 孵育 1 h、4 h 和直接 4℃ 包被过夜进行了优化，每个设置了 2 个重复，取其平均值，选取 P/N 值最大的为最佳包被条件，即为直接 4℃ 包被过夜（见表 7）。

表 7 包被条件的优化

Table 7 Optimal coating condition option

包被条件	直接 4℃ 包被过夜	37℃ 1 h, 再 4℃ 过夜	37℃ 4 h, 再 4℃ 过夜
阳性	1.178	1.2055	1.347
阴性	0.12	0.201	0.266
P/N	9.817	5.998	5.064

3.1.5 显色时间的确定

根据优化好的条件,对显色时间进行优化,每个设置 2 个重复,均于 37℃ 显色,选择 P/N 值最大的作为最佳优化条件,即最佳显色时间为 10 min (见表 8)。

表 8 显色时间优化

Table 8 Optimal chromogenic time option

显色时间	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min
阳性	1.156	1.350	1.249	1.028	0.748	0.438
阴性	0.152	0.167	0.177	0.157	0.145	0.132
P/N	7.627	8.105	7.054	6.548	5.159	3.327

3.1.6 血清孵育时间的确定

根据优化好的条件,对一抗血清孵育时间进行优化,每个设置 2 个重复,均于 37℃ 孵育,选择 P/N 值最大的作为最佳优化条件,即最佳一抗血清孵育时间为 30 min (见表 9)。

表 9 血清孵育时间的确定

Table 9 Optimal incubating time of serum option

孵育时间	30 min	60 min	90 min	120 min
阳性	1.366	1.303	1.339	1.324
阴性	0.092	0.137	0.164	0.177
P/N	14.843	9.5	8.156	7.495

3.1.7 二抗孵育时间的确定

根据优化好的条件,对酶标二抗孵育时间进行优化,每个设置 2 个重复,均于 37℃ 孵育,选择 P/N 值最大的作为最佳酶标二抗优化条件,即最佳酶标二抗孵育时间为 60 min (见表 10)。

表 10 二抗孵育时间的优化

Table 10 Optimal incubating time of Goat-anti-mouse HRP-IgG option

孵育时间	30 min	60 min	90 min	120 min
阳性	1.2318	1.3536	1.3534	1.4148
阴性	0.1036	0.106	0.1382	0.1582
P/N	11.88996	12.76981	9.793054	8.94311

3.1.8 临界值的确定

按照优化的所有条件，对 15 份小鼠阴性血清进行检测，测定血清 OD 值，取平均值+3×SD 作为阳性临界值，计算得到平均数为 0.231，标准方差为 0.051273，临界值为 0.385（见表 11）。

表 11 15 份阴性血清

Table 11 The OD_{450nm} of 15 negative serums

0.227	0.1864	0.1888	0.2018	0.2128	0.1902	0.3162	0.2418
0.238	0.2034	0.182	0.2072	0.2044	0.3454	0.3196	

3.2 脾细胞、饲养细胞及 SP2/0 细胞

如图 1 结果所示，脾细胞呈圆形，较小，与 SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞的形态相似，不易区分。小鼠腹腔饲养细胞在过夜培养后呈梭形，若梭形细胞数量越多，则说明饲养细胞的状态越好，为融合的细胞生长提供的条件也越好。

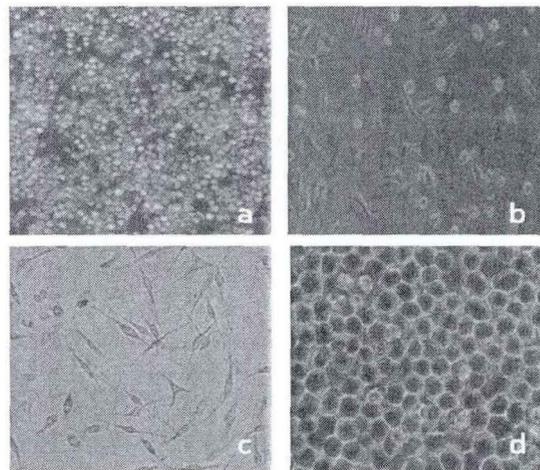


图 1 脾细胞、SP2/0 细胞及饲养细胞形态

a.脾细胞； b.培养24 h后的饲养细胞； c.培养7 d后的饲养细胞； d.SP2/0小鼠骨髓瘤细胞

Fig.1 The spleen cell, SP2/0 cell and feeder cell

a. The spleen cell; b. The feeder cell were cultivated after 24h. c. The feeder cells were cultivated after 7d. d. SP2/0 myeloma cells

3.3 细胞融合

杂交瘤细胞融合后第3 d可见克隆细胞集团，大部分的培养孔中生长的克隆细胞集团数多于2个，随着时间推移克隆细胞集团数量继续增多，7 d进行半换液，2 d后利用构建的间接ELISA方法初检阳性孔。经过3次亚克隆以后，最终得到5株能够稳定分泌特异性抗体的McAbs，分别命名为1#、2#、3#、4#和5#杂交瘤细胞株（见图2）

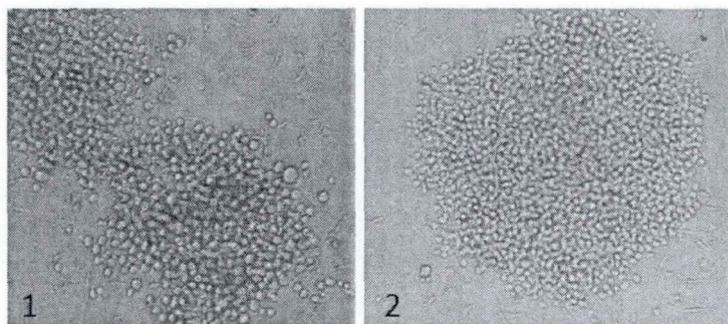


图2 融合后的杂交瘤细胞

1 为培养5 d后的杂交瘤细胞；2 为培养9 d后的杂交瘤细胞

Fig.2 Observation of fusion hybridoma cells

1 is the hybridoma cells were cultivated after 5 d. 2 is the hybridoma cells were cultivated after 9 d

3.4 腹水单抗的制备和纯化

5株杂交瘤细胞的腹水经辛酸-硫酸铵粗提和 rProtein A/G Beads 过柱纯化后，经 SDS-PAGE 结果分析如图3所示。

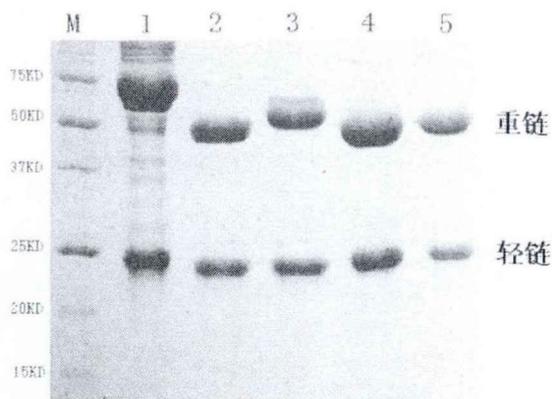


图3 纯化腹水的 SDS-PAGE 分析

M: 蛋白Marker; 1-5 分别表示 1#、2#、3#、4#、5#纯化腹水

Fig.3 SDS-PAGE analysis of purified ascites

M:protein marker. From 1 to 5 are 1#, 2#, 3#, 4#, 5# of purified ascites.

3.5 抗体亚类鉴定

对 5 株 McAbs 亚型鉴定结果见表 12。1 # McAbs 类型属于 Ig M, 2 # McAbs 类型属于 IgG1, 3 # McAbs 类型属于 IgG2b, 4 #、5 # McAbs 类型属于 IgG2a (见表 12)。

表 12 单克隆抗体的亚型鉴定
Table 12 Identification subtype of monoclonal antibodies

	1#	2#	3#	4#	5#
IgM	0.75	0.054	0.049	0.046	0.041
IgG1	0.07	0.438	0.063	0.067	0.065
IgG2a	0.087	0.088	0.077	0.346	0.337
IgG2b	0.074	0.062	0.677	0.066	0.065
IgG3	0.07	0.062	0.056	0.059	0.082
IgA	0.063	0.056	0.053	0.084	0.064

3.6 细胞培养上清及腹水效价的测定

将杂交瘤细胞上清及腹水作倍比稀释, 采用间接 ELISA 法检测其 OD 值, 确定其效价。结果表明 5 株杂交瘤细胞培养上清的 McAbs 效价在 1:320-1:10240 之间; 纯化后腹水 McAbs 的效价均在 2×10^5 以上 (见表 13)。

表 13 细胞培养上清及腹水 McAbs 的效价检测结果
Table 13 The titer of cell culture supernatant and ascites McAbs

McAb	杂交瘤细胞培养上清效价	纯化后的腹水效价
1 #	1:640	1:204800
2 #	1:1280	1:819200
3 #	1:10240	1:1638400
4 #	1:320	1:819200
5 #	1:640	1:204800

3.7 杂交瘤细胞株的稳定性

对细胞上清进行连续传代和冻存后, 对抗 DHAV-1 病毒的 5 株杂交瘤细胞株进行了细胞培养上清的检测, 如表 14 所示, 细胞培养上清的 $OD_{450-630nm}$ 值无明显差异, 表明 5 株杂交瘤细胞株具有稳定分泌抗体的能力。

表 14 杂交瘤细胞传代和冻存后稳定性测定

Table 14 Stability of hybridoma cell after the cells passage and freeze

	第 1 代细胞培养上清		第 5 代细胞培养上清		第 10 代细胞培养上清		冻存 1 个月后复苏细胞上清	
	OD ₄₅₀₋₆₃₀	P/N						
1 #	0.749	14.687	0.719	8.3605	0.799	13.097	0.801	13.35
2 #	1.127	22.098	1.007	11.709	1.058	17.344	1.134	18.9
3 #	1.177	23.078	0.984	11.442	1.178	19.311	1.216	20.267
4 #	0.93	18.235	0.792	9.209	0.869	14.246	1.095	18.25
5 #	0.973	19.078	0.714	8.302	0.667	10.934	1.055	17.583

3.8 特异性

采用间接 ELISA 检测杂交瘤细胞株细胞上清及纯化腹水结果显示：不与鸭瘟病毒、鸭坦布苏病毒、鸭乙肝病毒、小鹅瘟病毒、鸭大肠杆菌、鸭沙门氏菌、鸭疫里默氏杆菌发生特异性反应，5 株杂交瘤细胞与 DHAV-3 能够发生交叉反应。试验表明，本试验制备的 5 株 McAbs 对 DHAV-1 和 DHAV-3 具有较强的特异性（见表 15）。

表 15 单抗特异性反应间接 ELISA 鉴定结果

Table 15 The result of specificity of McAbs by indirect ELISA

	DHAV-1	DHAV-3	DPV	DHBV	DTMUV	GPV	E.coli	SE	RA	阴性对照	阳性对照
1#	0.709	0.352	0.053	0.092	0.131	0.056	0.047	0.051	0.067	0.066	1.167
2#	1.108	0.442	0.057	0.111	0.104	0.066	0.053	0.054	0.052		
3#	1.271	0.839	0.057	0.046	0.093	0.054	0.078	0.073	0.072		
4#	0.872	0.418	0.13	0.047	0.107	0.093	0.061	0.058	0.059		
5#	0.846	0.361	0.083	0.069	0.122	0.066	0.043	0.04	0.045		

3.9 单抗亲和常数的测定

经曲线回归拟合抗体浓度与 OD₄₅₀ 的曲线模型，得出 50% OD_{450-630nm} 对应的抗体浓度，根据亲和常数计算公式计算，本试验结果得到 1# 亲和常数=6.03 × 10⁹ L/mol；2# 亲和常数=2.4 × 10¹⁰ L/mol；3# 亲和常数=3.8 × 10¹⁰ L/mol；4# 亲和常数=1.4 × 10¹⁰ L/mol；5# 亲和常数=1.5 × 10¹⁰ L/mol，结果表明 5 株单克隆抗体的相对亲和常数都在 10⁹ 数量级以上，具有较好的抗原结合能力，通过比较 5 株单克隆抗体亲和常数值的大小，可以得出 3# 单克隆抗体的亲和力更高（见图 4）

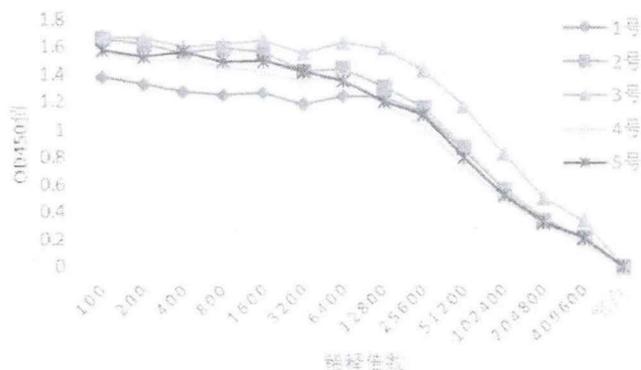


图 4 不同抗体浓度下 OD₄₅₀₋₆₃₀ 值
Fig.4 OD₄₅₀₋₆₃₀ Value of different antibody concentrations

3.10 单抗抗原表位的初步鉴定

经相加 ELISA 法计算出 5 种 McAbs 的 AI 值，试验结果表明，4# 杂交瘤细胞与 5# 杂交瘤细胞 AI < 10%，表示两株 McAbs 针对抗原表位相近；其余的杂交瘤细胞 10% < AI < 50%，表明被测两株 McAbs 识别的抗原结合位点有差异抗原表位（结果见表 16）

表 16 抗原表位初步鉴定结果
Table 16 Identification of antigen epitopes

	1#	2#	3#	4#	5#
1#	0.789	31.59%	40.28%	22.87%	33.75%
2#	1.289	1.171	21.07%	16.59%	26.11%
3#	1.378	1.420	1.17567	23.56%	22.90%
4#	1.152	1.315	1.397	1.086	0.24%
5#	1.22	1.391	1.357	1.063	1.03533

黑体字表示每种单抗的 OD₄₅₀₋₆₃₀ 实际测定；黑体字下面表示每两株单抗共同孵育的 OD₄₅₀₋₆₃₀ 实际测定；黑体字上面表示每两株单抗的 AI 值

Boldface is each actual measurement of McAbs. Under the boldface is actual measurement of every two McAbs common incubation. Above the boldface is the AI of every two McAbs

4. 讨论

4.1 病毒纯化

DHAV 病毒的颗粒直径为 20-40 nm, 呈球形或类球形, 病毒核衣壳呈二十面体对称, 衣壳上有 32 个壳粒, 无囊膜结构, 包浆内增殖^[16]。DHAV-1 病毒纯化比较困难, 但是病毒的纯化对于制备单克隆抗体和胶体金试纸条都是试验成败的关键因素。由于该病毒没有囊膜, 对环境的抵抗力很强, 对氯仿不敏感, 本试验根据文献^[77]中的报道的纯化 DHAV-1 病毒的方法, 将尿囊液反复冻融 3 次, 去除一些脂类物质和杂蛋白, 6000 r/min 离心 15 min, 氯仿抽提 3 次, 40000 r/min 离心 2 h, 纯化后得到的病毒进行单克隆抗体的制备, 因此本试验结果表明, 采用此方法纯化的 DHAV-1 病毒能够进行动物的免疫, 成功进行了单克隆抗体的制备。

4.2 细胞融合及筛选

本试验采用小鼠血清效价达到 $1:10^4$ 以上的 BALB/c 小鼠进行细胞融合, 在做细胞融合的时候, 融合率受很多因素的影响: 1. 血清效价: 细胞融合前小鼠血清效价不高导致阳性克隆少甚至没有; 2. 融合的时候 SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞的状态: 选择对数生长期的细胞, 此时细胞的形态、活力等均有利于细胞融合及筛选, SP2/0 骨髓瘤细胞是次黄嘌呤磷酸核糖转化酶(HGPRT)缺陷型的骨髓瘤细胞, 长期培养的骨髓瘤细胞系可能会产生突变细胞, 因此融合的骨髓瘤细胞必须确保有无回复突变, 必要时可以用 8-杂氮鸟嘌呤对细胞进行再诱导; 3. 饲养层细胞: 它并不是培养杂交瘤细胞所必须的, 但是它可以在很大程度上可以提高细胞的存活率, 加快细胞的生长速度, 为杂交瘤细胞提供必要的生存条件, 吞噬死亡细胞及细胞碎片, 但是饲养层细胞数量过大, 消耗大量的营养物质, 不利于杂交瘤细胞生长, 因此饲养层细胞的浓度建议为 $2-3 \times 10^5$ 个/mL; 4. 细胞融合: 融合的过程也是决定融合率高的重要因素, 在融合的过程中一定要注意加入融合剂的时间, 时间过长或者过短对融合都有一定的影响, 融合过程中动作一定要轻, 本试验主要选择的是 PEG 1450, PEG 1450 它的融合效率虽然没有 PEG 4000 好, 但是它对细胞的损害程度比较小, 本试验结果表明, 应用 PEG1450 细胞总体融合率较好; 5. 抗原纯度: 抗原纯度较低, 在细胞融合时得到的阳性杂交瘤细胞的数量较少, 在后续筛选的时候工作量较大, 本试验由于鸭甲型肝炎病毒纯化较困难, 得到的病毒量较少, 在筛选的时候得到的阳性孔较少, 给试验带来了一定的困难。

在进行杂交瘤细胞的培养时, 要注意观察细胞的状态, 及时进行亚克隆, 以免阳性克隆丢失。因此本试验用构建好的间接 ELISA 方法进行亚型克隆的筛选, 通过有限稀

释法第3次亚克隆后阳性细胞率为100%，表明筛选出来的5株杂交瘤细胞是单克隆，分别命名为1#、2#、3#、4#和5#。一定要注意在融合和筛选的各个环节必须要保证细胞不能污染，在亚克隆时注意随时冻存细胞，不然就会造成前功尽弃。在筛选的时候，要考虑所制备的单克隆抗体的用途，在本试验中所制备的单克隆抗体主要用于之后胶体金试纸条的标记，来检测鸭甲型肝炎病毒，因此，在筛选的时候，所筛出来的抗体必须能跟全病毒反应。

4.3 单抗特性

一般情况下，动物免疫应答反应首先产生亚型为IgM型抗体，在之后的二次应答反应和加强反应时产生IgG型抗体，IgG型抗体在抗体介导的防御机理中占主要位置，在实际应用中IgG抗体的应用较广。对本试验所获得的抗体进行了抗体亚型的鉴定，有利于我们更多的去了解抗体的特性。不同的抗体亚型由于它的性质不同，其纯化方法以及应用都有一定的差异^[78]。本试验对筛选出来的5株抗体亚型鉴定表明，1# McAbs类型属于IgM，2# McAbs类型属于IgG1，3# McAbs类型属于IgG2b，4#和5# McAbs类型属于IgG2a。本试验中IgM抗体的产生可能与小鼠免疫系统对免疫原的应答不同有关，IgG抗体的获得为后续做胶体金试纸条准备好了材料。将各株杂交瘤细胞注入已用弗氏不完全佐剂致敏的BALB/c小鼠体内，待小鼠腹部明显变大，抽取腹水，采用辛酸-硫酸铵粗提和rProtein A/G过柱纯化，纯化结果如本章图3结果所示，包括一条重链和一条轻链，纯化后的单克隆抗体的效价均在 2×10^5 以上，与纯化前的效价无差异。在制备腹水的时候，要注意细胞的注射量和注射部位，注射量过多容易形成实体瘤或者小鼠还未产生腹水就死亡，注射量太少或者接种的细胞的状态不好将不容易产生腹水。用间接ELISA方法检测均能检测到传代至10代和冻存1个月后复苏的细胞上清呈阳性结果，表明杂交瘤细胞性能稳定。在特异性试验中，5株单抗均与DHAV-1和DHAV-3呈阳性反应，对鸭常见的其它致病病原（鸭瘟病毒、鸭大肠杆菌、鸭乙肝病毒、鸭坦布苏病毒、鸭沙门氏菌、鸭疫里默氏杆菌等）检测均为阴性，进一步证实DHAV-1和DHAV-3之间存在抗原交叉^[7]，Zhang等（2013）^[62, 79]用DHAV-1全病毒免疫小鼠制备的单克隆抗体4F8同时能识别DHAV-1 VP1抗原表位⁷⁵GEIILT⁸⁰和DHAV-3 VP1抗原表位⁷⁵GEVILT⁸⁰。本试验制备的单抗可以识别DHAV-1和DHAV-3相同的抗原表位。

第二章 检测 1 和 3 型鸭甲肝病毒胶体金试纸条的研制

1. 材料

1.1 毒株与菌株

DHAV-1 毒株 (BZB 株、CD1231 株、DY0903 株和 X 株), DHAV-3 毒株 (CZ160312 株、QL 株、QL13 株、MY02 株、YA151006 株和 SD151227 株), 鸭瘟病毒 (DPV CHv 株), 鸭大肠杆菌 (*E.coli*, 保藏号: CVCC83003), 肠炎沙门氏菌 (SE, 保藏号: CMCC50083), 鸭疫里默氏杆菌 (RACH-1 株), 鸭坦布苏有病毒 (DTMUV)、小鹅瘟 (GPV): 由四川农业大学禽病防治研究中心保存提供。

1.2 试剂、材料

兔抗DHAV-1血清, 由四川农业大学禽病防治研究中心保存提供;

玻璃纤维素膜 (MA0280、GL0194)、样品垫 (GL-b03和GL-b04)、吸收垫 (H5072)、白色塑料卡 (A-9)、底板 (DB-6)、NC膜 (Sartorius CN140, Sartorius CN95, vivid 170 和Millipore 135)、衔接胶带、20nm胶体金溶液均购自上海杰一生物技术有限公司;

玻璃纤维素膜 (CB-0801、SB06、VL78), 均购买于上海金标生物科技有限公司;

海藻糖, 购自于上海瑞永生物科技有限公司;

BSA, 购自上海艾信生物科技有限公司;

1.3 主要试剂的配置

(1)金标抗体重悬液: 1 g BSA, 10 g 蔗糖, 5 g 海藻糖, 0.05 g 酪蛋白, 0.1 g 叠氮化钠, 1 g PEG 20000 用 0.01mol/L 的 pH8.0 PBS 缓冲液 100 mL 溶解, 分装, -20℃ 储存备用;

(2)10% NaCl: NaCl 1 g, 加入 10 mL 超纯水, 分装 4℃ 保存备用;

(3)10% BSA: 称取 1 g BSA, 加入超纯水 10 mL, 分装, -20℃ 保存备用;

(4)0.1mol/L K_2CO_3 : 称取 K_2CO_3 1.38 g, 溶解于 100 mL 超纯水中, 分装, 4℃ 保存备用。

(5)NC 膜封闭液 1%BSA: 1 g BSA 溶解于 10 mL PBS 中, 分装, -20℃ 保存备用;

1.4 仪器设备

三维平面点膜喷金仪 (HM3030, 上海金标生物科技有限公司);

压壳机 (YK725, 上海金标生物科技有限公司);
微电脑自动斩切机 (上海金标生物科技有限公司);
JB-5 定时双向数显恒温磁力搅拌器 (江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司);

2. 试验方法

2.1 玻璃器皿的清洁

制备胶体金试纸条所需要的所有玻璃器皿需要泡酸处理 (重铬酸钾 1000 g, 加入浓硫酸 2500 mL, 加蒸馏水至 10000 mL), 浸泡过夜, 然后取出, 再用自来水清洗干净, 用蒸馏水冲洗 4-6 次, 在烘箱中干燥, 然后进行硅化处理, 干燥备用。

2.2 胶体金颗粒质量鉴定

2.2.1 肉眼观测

取出在上海杰一生物技术有限公司购买的制备好的 20 nm 的胶体金溶液, 用肉眼观察, 判定胶体金溶液的质量。质量较好的胶体金溶液肉眼观察清亮透明, 无浑浊沉淀、漂浮物。

2.2.2 紫外扫描鉴定

将胶体金溶液在 400-660 nm 条件下进行紫外光谱扫描, 观察胶体金颗粒的波峰位置, 对胶体金溶液的质量进行鉴定。

2.3 待标记抗体的处理

采用透析除盐的方法对抗体蛋白进行处理

将待标记的抗体蛋白溶液放置于透析袋中, 置于 0.01 mol/L、pH7.4 的 PBS 溶液中 4℃ 透析过夜, 每隔 4 h 更换透析液。4℃, 10000 r/min 离心 30 min, 去除抗体溶液中的不溶物以及蛋白沉淀, 取上清液, 再测定蛋白含量, 分装, -20℃ 保存备用。

2.4 金标单克隆抗体的制备和纯化

2.4.1 最适标记 K_2CO_3 的量

根据资料显示, 单克隆抗体的最佳 pH 为 8.2, 但是自己按照要求也进行了优化。根据表 17 试验步骤, 取 250 μ L 胶体金溶液加入各管中, 向上述各管中加入不同浓度的 0.1

mol/L K_2CO_3 溶液量, 混匀, 静置 10 min, 将之前透析好的单克隆抗体用 0.01 mol/L pH7.4 的 PBS 液稀释到 2 mg/mL 依次加入各管中, 混匀, 静置 10 min, 静止后加入 25 μ L 的 NaCl 溶液混匀, 静止 2 h。观察结果, 以颜色保持红色不变的时候所对应 0.1 mol/L K_2CO_3 的添加量为最适标记单克隆抗体所加入的 0.1 mol/L K_2CO_3 的量。

表 17: 胶体金标记单克隆抗体 K_2CO_3 的量测定
Table 17 The amount of the colloidal gold-labeled K_2CO_3

	空白	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
胶体金 (μ L)	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
单克隆抗体 (μ L)	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
0.1mol/L K_2CO_3 (μ L)	0	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5
PBS (μ L)	10	5	4.5	4	3.5	3	2.5	2	1.5	1	0.5	0
NaCl (μ L)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25

2.4.2 单克隆抗体最适稳定量

取 250 μ L 胶体金溶液加入各管中, 向上述各管中加入已调节至最佳 PH 值的 0.1 mol/L K_2CO_3 溶液量, 混匀, 静置 10 min, 将之前透析好的单克隆抗体按照表的步骤, 用 0.01mol/L pH7.4 的 PBS 液稀释成每管浓度分别为 0 μ g/mL, 4 μ g/mL, 8 μ g/mL, 12 μ g/mL, 16 μ g/mL, 20 μ g/mL, 24 μ g/mL, 28 μ g/mL, 32 μ g/mL, 36 μ g/mL, 40 μ g/mL, 依次加入各管中, 混匀, 静置 10 min, 静止后加入 25 μ L 的 10% NaCl 溶液混匀, 按照表 18 试验步骤的顺序进行, 静止 2 h 以上。观察胶体金溶液颜色的变化的结果, 以胶体金溶液颜色保持红色不变的最低单克隆抗体加入量为单克隆抗体的最适稳定量, 在试验操作中, 常在最适稳定量的基础上再加上 10%-20%作为胶体金标记单克隆抗体的实际蛋白用量。

表 18 胶体金标记单克隆抗体最低标记量的测定
Table 18 Optimal appropriate the amount of colloidal gold labeled monoclonal antibody

	空白	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
胶体金 (μ L)	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
0.1mol/L K_2CO_3 (μ L)	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
单克隆抗体 (μ g)	0	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
NaCl (μ L)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25

2.4.3 单克隆抗体的胶体金标记

根据 2.4.1 和 2.4.2 试验优化出来的最适标记的单克隆抗体稳定量和最适标记单抗所加入的 0.1 mol/L K_2CO_3 溶液量，进行单克隆抗体的标记。

- (1)根据标记的总的胶体金溶液的量，计算出所需要标记的 2 #单克隆抗体的量；
- (2)取 50 mL 小烧杯，加入 20 mL 胶体金溶液，用 0.1 mol/L K_2CO_3 按照 2.4.1 优化的用量将胶体金溶液的 PH 值调节至最适 PH 值，然后将小烧杯放置于磁力搅拌器上进行搅拌，混匀；
- (3)在搅拌的条件下，用 200 μ L 移液器逐滴加入已经纯化透析好的单克隆抗体，继续搅拌混匀，室温静置 30 min；
- (4)在搅拌条件下，加入 10% BSA 至终浓度为 1%，再继续搅拌 10 min，室温静置 15 min，4 $^{\circ}$ C 保存备用。

2.4.4 金标单克隆抗体的纯化

- (1)将标记好的金标单克隆抗体 4 $^{\circ}$ C，2000 r/min，离心 15 min，收集上清，弃沉淀；
- (2)将上清液以 9000 r/min，4 $^{\circ}$ C 离心 20 min，弃去上清，注意轻轻吸取上清，避免沉淀重悬；
- (3)将沉淀用胶体金重悬液稀释至原体积，9000 r/min，4 $^{\circ}$ C 离心 20 min，弃去上清；
- (4)重复上步操作 1-2 次；
- (5)离心后的金标沉淀溶解于一定量的金标抗体重悬液中，4 $^{\circ}$ C 密封保存；
- (6)将标记好的金标抗体溶液做紫外光谱扫描观察，鉴定是否标记上。

2.5 试纸条最佳试验条件的优化

2.5.1 纯化的兔抗 DHAV-1 IgG 的包被浓度的确定

按照第一章 2.1.10 进行抗体的纯化，将纯化的兔抗 DHAV-1 多抗用 0.01 mol/L 的 PBS 缓冲液稀释成 0.6 mg/mL，0.8 mg/mL，1.0 mg/mL，1.2 mg/mL，1.4 mg/mL，1.6 mg/mL，包被于 NC 膜上，形成 T 线。将制备好的试纸条在其他条件不变的情况下，观察试验结果，确定达到试纸条敏感度要求的最低兔抗 DHAV-1 多抗的稀释度，即为多抗的最适包被浓度。

2.5.2 羊抗鼠 IgG 的包被浓度的确定

将羊抗鼠 IgG 用 0.01 mol/L PBS 缓冲液稀释成羊抗鼠 IgG 浓度为 0.2 mg/mL，0.6 mg/mL，1.0 mg/mL，1.4 mg/mL，1.8 mg/mL，2.0 mg/mL，包被于 NC 膜上，形成 C 线。

将制备好的试纸条在其他条件不变的情况下，观察显色结果，确定达到试纸条敏感度要求的最适羊抗鼠 IgG 的稀释度，即为所需的羊抗鼠 IgG 的最适包被浓度。

2.5.3 胶体金标记的单克隆抗体的稀释度的确定

将胶体金标记好的单克隆抗体每 mL 分别加入 100 μ L，150 μ L，200 μ L，250 μ L，300 μ L，350 μ L，400 μ L，450 μ L 金标抗体重悬液，分别滴加在相同大小的玻璃纤维素膜上。将制备好的试纸条在其他条件不变的情况下，观察试验结果，确定达到试纸条敏感度要求所需要的最低金标抗体重悬液的量，即为胶体金标记的单克隆抗体的最适稀释度。

2.5.4 试纸条组成材料的选择

2.5.4.1 NC 膜的选择

NC 膜主要有 Sartorius CN140，Sartorius CN95，vivid 170 和 Millipore 135 这 4 种型号，用其分别包被 T、C 线，干燥、封闭后进行组装，待检样品完全层析过 NC 膜后进行结果的观察，比较不同膜的显色情况，选择流速在 5-10 min 的硝酸纤维素膜。

2.5.4.2 玻璃纤维素膜的选择

将已经制备好的金标抗体分别标记在 CB 0801、SB 06、VL 78、MA 0280、GL 0194 这 5 种不同型号的玻璃纤维素膜上，37 $^{\circ}$ C 温箱干燥烘干后，按照 2.6 试验步骤组装试纸条，比较这 5 种不同的玻璃纤维素膜上金标抗体的释放情况。

2.5.4.3 样品垫的选择

样品垫主要有 GL-03 和 GL-04 两个货号，将阴性、阳性鸭胚尿囊液滴加在样品垫上，按照 2.6 试验步骤组装胶体金试纸条，比较两种样品垫的释放情况，选择最佳的样品垫。

2.5.4.4 NC 膜封闭时间的确定

为了降低对硝酸纤维素膜（NC 膜）的非特异性吸附，采用 1% BSA 对 NC 进行封闭，NC 膜上的 T 线包被兔抗 DHAV-1 多抗和 C 线包被羊抗鼠 IgG 后，干燥，用 1% BSA 分别在 37 $^{\circ}$ C 条件下孵育 0 min，30 min，60 min，120 min，干燥，按照 2.6 试验步骤将制备好的试纸在其他条件不变的情况下进行组装，观察显色结果，从而确定 NC 膜的封闭时间。

2.6 胶体金试纸的组装

试纸条由样品垫、金标垫、NC 膜、吸水垫、底板 5 个部分组成，按照试纸条的常规方法进行组装^[69,80]，具体步骤如下：

- (1)将纯化后的兔抗DHAV-1多抗和羊抗鼠IgG分别用0.01 mol/L的PBS缓冲液按照2.5.1和2.5.2 试验步骤稀释成最佳包被浓度，分别包被于NC膜上，形成检测线（T线）和质控线（C线），置37℃干燥过夜后，4℃密封保存备用；
- (2)将已经标记好的2#单克隆抗体用金标复溶液稀释成最适浓度，滴加于玻璃纤维素膜上，37℃干燥过夜，制备成金标垫；
- (3)按照图5所示，分别将NC膜、样品垫、金标垫、吸收垫干燥后依次粘在底板上，组装成检测试纸条，再将其装入塑料盒中，密封包装，加入干燥剂，4℃密封保存备用。

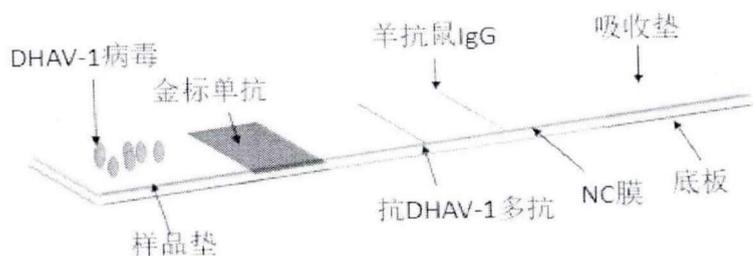


图5 胶体金试纸条组装示意图

Fig.5 The assembly diagram of colloidal gold test strip

2.7 检测程序与结果判定

2.7.1 鸭胚尿囊液或者菌体培养液的处理

参照文献^[81]将待检的液体样品进行裂解处理：向待检样品液中加入等体积的裂解液（0.01 mol/L PH7.4 PBS 溶液含 2% Triton X-100）作用 5 min，剧烈振荡，4℃ 8000 r/min 离心 5 min，收集上清液用于检测。

2.7.2 样品的处理

无菌采集鸭病料后，剪碎，放入盛有约 500 μL 生理盐水的灭菌 EP 管中，反复冻融 3 次，将 EP 管在漩涡振荡器上剧烈振荡 1-3 min 后，向液体中加入等体积的裂解液（0.01 mol/L PH7.4 PBS 溶液含 2% Triton X-100）作用 5 min，剧烈振荡，4℃ 8000 r/min 离心 5 min，收集上清液用于检测。

2.7.3 样品检测的结果判定

取 100 μL 样品滴加到样品垫上，5-10 min 内观察显色结果，结果判定：如果 T 线和 C 线均显示出清晰的红色条带则表示检测结果为阳性，样品中 DHAV 病毒含量越高，T 线显色就越深；如果只有 C 线显示出红色条带则表示检测结果为阴性；如果 C 线没显

示出红色条带表示试验失败，需重新进行检测。

2.8 胶体金试纸条的检测

2.8.1 胶体金试纸条的灵敏性试验

将处理好的含有 DHAV-1 和 DHAV-3 的鸭胚尿囊液进行浓度的测定，按照 2.6 组装的胶体金试纸条的检测方法，将含毒鸭胚尿囊液按照 1:1、1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64 等倍比稀释后，每个胶体金试纸条加入 100 μ L 的样品，10 min 后观察显色情况，确定该试纸条的最低检测浓度。

2.8.2 胶体金试纸条的特异性试验

按照 2.6 组装的胶体金试纸条的检测方法，将所制备好的胶体金试纸条分别检测正常的鸭胚尿囊液、DHAV-1 病毒的鸭胚尿囊液、DHAV-3 病毒的鸭胚尿囊液、鸭瘟病毒、小鹅瘟病毒、鸭坦布苏病毒、鸭疫的菌体培养液、沙门氏菌的菌体培养液和大肠杆菌的菌体培养液，观察显色结果，判定该胶体金试纸条的特异性。

2.8.3 胶体金试纸条的重复性试验

按照 2.6 组装的胶体金试纸条的检测方法，分别同时检测含有 DHAV-1 病毒的尿囊液、含有 DHAV-3 病毒的尿囊液，以及阴性鸭胚尿囊液，用 3 个不同批次的胶体金试纸条进行检测，每个批次用阴性、阳性鸭胚尿囊液各重复检测 3 次，观察显色结果，确定其重复性。

2.8.4 胶体金试纸条的保存期试验

按照 2.6 组装的胶体金试纸条的检测方法，将胶体金试纸条干燥密封后，分别保存于 4 $^{\circ}$ C、室温和 37 $^{\circ}$ C，每隔一个月，分别用阴性鸭胚尿囊液和含 DHAV 的阳性鸭胚尿囊液进行检测，观察显色结果，确定其试纸条的稳定性。

2.8.5 临床样品的检测

分别用制备好的胶体金试纸条与本实验室构建的 RT-PCR 方法^[82]同时对养殖场送检的 162 份疑似样品按照 2.7.2 方法处理后，进行胶体金试纸条和 RT-PCR 的检测，比较两者的符合率。

3. 结果

3.1 胶体金溶液质量鉴定

20 nm 胶体金溶液颜色为红色，溶液均匀透明。紫外光谱扫描，在 520 nm 左右为最大吸收值，符合试验要求（如图 6 所示）。

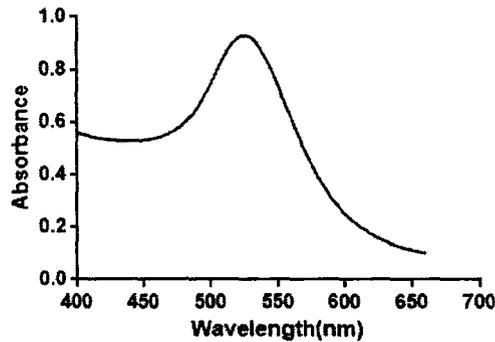


图 6.胶体金溶液紫外光谱扫描

Fig.6 UV-vis spectroscopy of naked colloidal gold

3.2 胶体金标记抗 DHAV-1 单抗复合物的鉴定

胶体金颗粒标记 DHAV-1 单抗后，将胶体金-单抗复合物在 400-660 nm 范围内进行紫外光谱的扫描，与未标记的胶体金颗粒相比，它的最大吸收峰向右移动 4 nm，由此可以说明单抗被成功标记上了，使得直径增加（见图 7）。

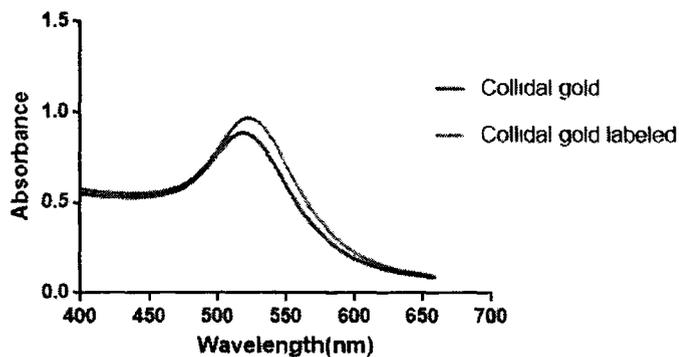


图 7 胶体金紫外光谱扫描

Fig.7 UV-vis spectroscopy of naked colloidal gold and colloidal gold-labeled IgG. The red shift in the maximum absorption peak illustrated that anti-DHAV-1IgG was successful labeled.

3.3 金标抗体的优化

3.3.1 胶体金最佳标记 K_2CO_3 的量的确定

2# 纯化腹水进行胶体金的标记，每 mL 胶体金溶液分别加入不同浓度的 0.1 mol/L K_2CO_3 溶液，T 线包被兔抗 DHAV-1，C 线包被羊抗鼠 IgG，按照 2.4.1 试验步骤，保持红色稳定不变的最低量为佳标记 K_2CO_3 的量，确定 7 号为最佳 K_2CO_3 的标记量，即 0.1 mol/L K_2CO_3 加入量为 12 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 。（见图 8）

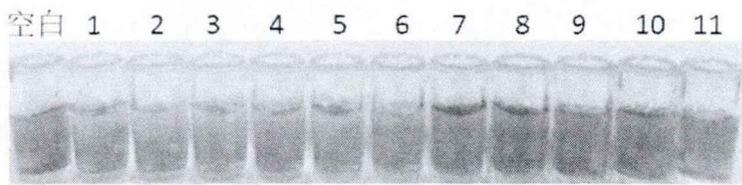


图 8 胶体金试纸条最佳标记 K_2CO_3 的量

空白表示胶体金溶液；1-11 分别表示 0.1mol/L K_2CO_3 的量为 0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、6 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、12 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、14 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、16 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、18 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 和 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$

Fig.8 Optimal of the colloidal gold-labeled K_2CO_3 concentration

Blank is naked colloidal gold. The amount of 0.1mol/L K_2CO_3 from 1 to 11 are 0 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 4 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 6 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 8 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 12 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 14 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 16 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 18 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

3.3.2 胶体金最佳标记蛋白量

将胶体金溶液对 2# 纯化腹水进行标记后，如图 9 结果所示，发现 2# 纯化腹水的标记量在 5 号时颜色呈灰色，单克隆抗体的标记量在第 6 和 7 号颜色呈红色不变，但是离心后部分不能复溶，因此单克隆抗体浓度在第 8 号时为最佳蛋白标记量，即最佳标记量为 28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在这个量的基础上加上 20%，此时 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 为单克隆抗体的最佳标记量。

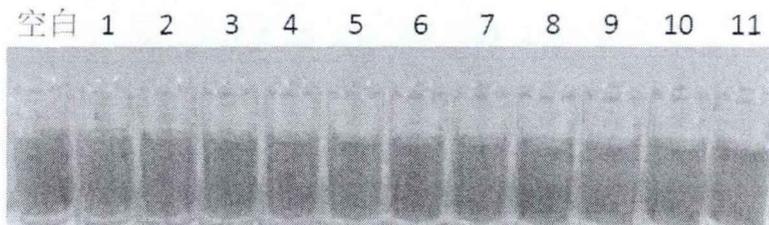


图 9 胶体金最佳标记蛋白量

空白表示胶体金溶液；1-11 分别表示金标单克隆抗体浓度分别为 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、36 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Fig.9 Optimal of the colloidal gold-labeled IgG concentration

Blank is naked colloidal gold. The concentration of monoclonal antibody from 1 to 11 are 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 24 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 28 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 36 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

3.4 试纸条的优化

3.4.1 C 线浓度的优化

C 线用 0.2 mg/mL、0.6 mg/mL、1.0 mg/mL、1.4 mg/mL、1.8 mg/mL、2.0 mg/mL 羊抗鼠 IgG 进行包被，结果显示 2 号（即 0.6mg/mL 羊抗鼠 IgG）显色颜色较浅，不易观察试验结果，因此 3 号为最佳包被量，即羊抗鼠 IgG 浓度为 1.0 mg/mL（见图 10）。

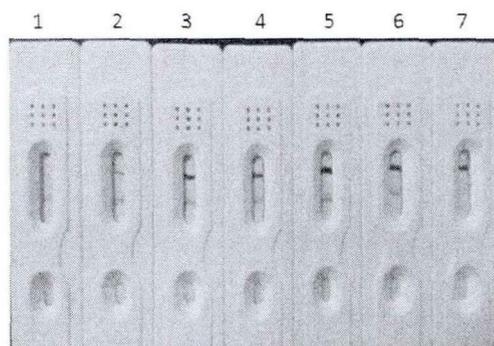


图 10 胶体金试纸条 C 线浓度的优化

1-6 分别表示羊抗鼠 IgG 浓度为 0.2 mg/mL、0.6 mg/mL、1.0 mg/mL、1.4 mg/mL、1.8 mg/mL、2.0 mg/mL；
7 表示阴性

Fig.10 Optimal of the colloidal gold strip line C concentration

The concentration of goat anti-mouse IgG From 1 to 6 are 0.2 mg/mL, 0.6 mg/mL, 1.0 mg/mL, 1.4 mg/mL, 1.8 mg/mL, 2.0 mg/mL. 7 is negative

3.4.2 金标抗体浓度的优化

1 mL 胶体金溶液中加入 34 μ g 的 2# 纯化腹水进行标记，离心后用胶体金复溶液进行重悬，当每 mL 标记液添加金溶胶复溶液 0.4 mL，显色较浅，即 8 号显色略浅，则在 7 号时，为最佳复溶液添加量，即最佳复溶液为每毫升标记后加入 400 μ L 胶体金复溶液（见图 11）。

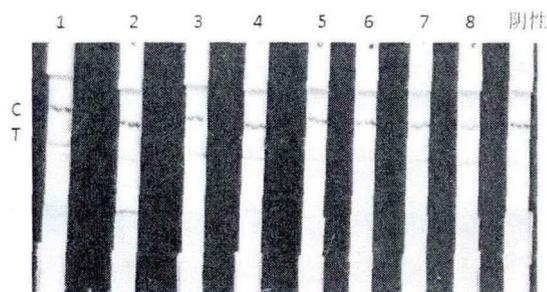


图 11 胶体金试纸条金标抗体浓度的优化

1-8 分别表示加入金溶胶复溶液为 100 μ L、150 μ L、200 μ L、250 μ L、300 μ L、350 μ L、400 μ L 和
450 μ L

Fig.11 Optimal of colloidal gold labeled antibody concentration

The concentration of colloidal gold solution from 1 to 8 are 100 μ L, 150 μ L, 200 μ L, 250 μ L, 300 μ L, 350 μ L, 400 μ L, 450 μ L.

3.4.3 T 线浓度优化

T 线分别用 0.6 mg/mL, 0.8 mg/mL, 1.0 mg/mL, 1.2 mg/mL, 1.4 mg/mL, 1.6 mg/mL 的纯化的兔多抗进行包被, 结果显示 2 号 (即 0.8 mg/mL) 显色颜色较浅, 不易观察结果, 因此 T 线上兔抗 DHAV-1 多抗浓度为 3 号 (即 1.0 mg/mL) 为最佳包被量 (见图 12)

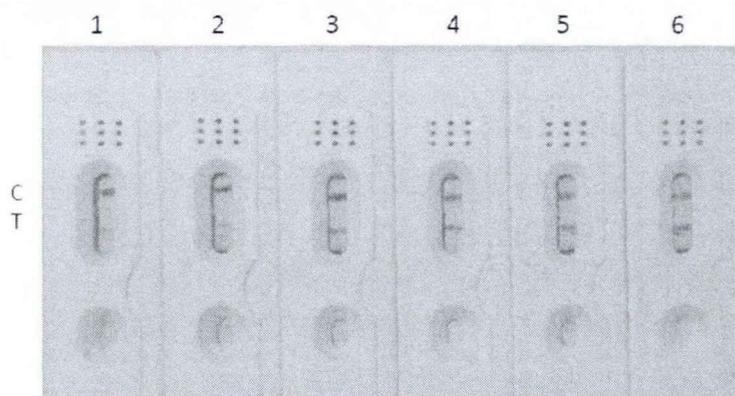


图 12 胶体金试纸条 T 线浓度的优化

1-6 号分别表示 T 线多抗浓度为 0.6 mg/mL、0.8 mg/mL、1.0 mg/mL、1.2 mg/mL、1.4 mg/mL 和 1.6 mg/mL。

Fig.12 Optimal of the colloidal gold strip line T concentration

The concentration of polyclonal antibody from 1 to 6 are 0.6 mg/mL, 0.8 mg/mL, 1.0 mg/mL, 1.2 mg/mL, 1.4 mg/mL, 1.6 mg/mL.

3.4.4 NC 膜的选择

试验结果由表 19 可知, Sartorius CN140 和 Millipore 135 显色均较快, 在 10 min 左右均可显色, 但是 Sartorius CN140 显色后背景不干净, 有层析不完全的现象, 通过综合比较这 4 种膜, Millipore 135 更符合试纸条设计要求。

表 19 不同 NC 膜比较结果

Table 19 Different NC membrane comparison results

NC 膜	Sartorius CN140	Sartorius CN95	vivid 170	Millipore 135
显色时间	8-10 min (适中)	15-20 min (慢)	20-30 min (慢)	5-10 min (适中)
显色背景	不干净	不干净	干净	干净

3.4.5 玻璃纤维素膜的选择

CB0801、SB06、VL78 以及 GL0194 上的金标抗体释放不完全, 有很多金标抗体残留在膜上, CB0801 上的金标抗体释放速度极慢, MA0208 上释放完全, 故选择 MA0208 作为结合释放垫。

3.4.6 样品垫的选择

购买的胶体金套装中 GL-03 和 GL-04 样品垫不需要做任何处理，直接用于检测，检测结果显示，样品垫 GL-03 样品在垫上流动速度较慢，样品大量被样品垫直接吸收，不利于样品与金标抗体结合，造成样品的浪费，故选择 GL-04。

3.4.7 NC 膜封闭时间的确定

取出封闭 0 min, 30 min, 60 min, 120 min 试纸条后进行干燥，观察试纸条的显色结果，试验结果表明，封闭 0 min 和 30 min 试纸条拖带比较严重，封闭 60 min 和 120 min 效果均较好，无明显差异，因此选择 60 min 为 NC 膜最佳封闭时间

3.5 胶体金试纸条的检测

3.5.1 重复性

用 3 个不同批次的胶体金试纸条分别检测 DHAV-1、DHAV-3 感染鸭胚尿囊液以及阴性鸭胚尿囊液，每个批次重复检测 3 次，显色结果如图 13 所示，均无明显的差异，试验结果表明该试纸条具有良好的重复性。

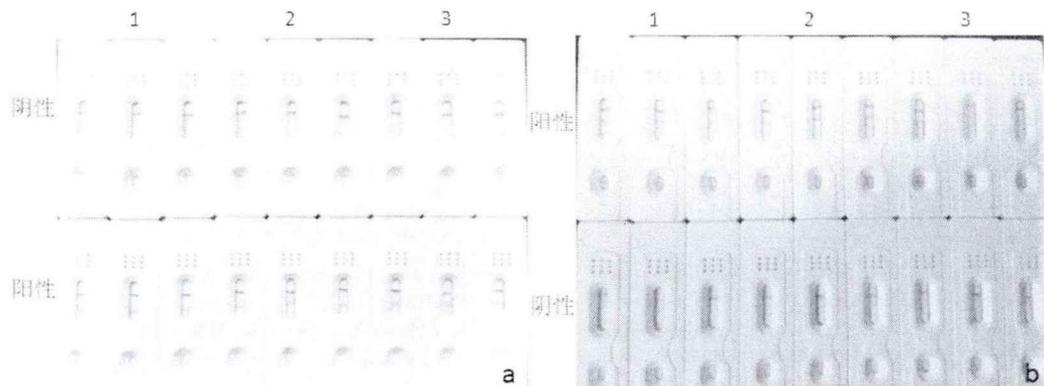


图 13.胶体金试纸条重复性试验

1、2 和 3 分别表示第 1 批次、第 2 批次和第 3 批次；a 表示检测 DHAV-1 的重复性试验；b 表示检测 DHAV-3 的重复性试验

Fig.13 The repeatability of colloidal gold strip

From 1 to 3 are three different batches of strips. a is the repeatability of DHAV-1. b is the repeatability of DHAV-3

3.5.2 特异性

应用制备的胶体金试纸条对不同的水禽病病原进行检测，结果如图 14 所示，对鸭胚尿囊液、鸭瘟病毒、鸭坦布苏病毒、小鹅瘟病毒，肠炎沙门氏菌、RA 和 E.coli 的检测结果呈阴性，该试纸条具有良好的特异性

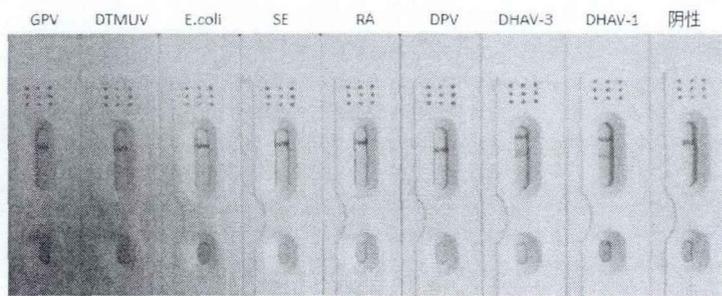


图 14.胶体金试纸条特异性试验

Fig.14 The colloidal gold strip for testing different waterfowl pathogen

应用制备的胶体金试纸条对 DHAV-1 和 DHAV-3 进行检测，结果如图 15 所示，其中 4 株 DHAV-1 (BZB 株、CD1231 株、DY0903 株和 X 株) 检测结果呈阳性，6 株 DHAV-3 (CZ160312 株、QL 株、QL13 株、MY02 株、YA151006 株和 SD151227) 检测结果呈阳性。

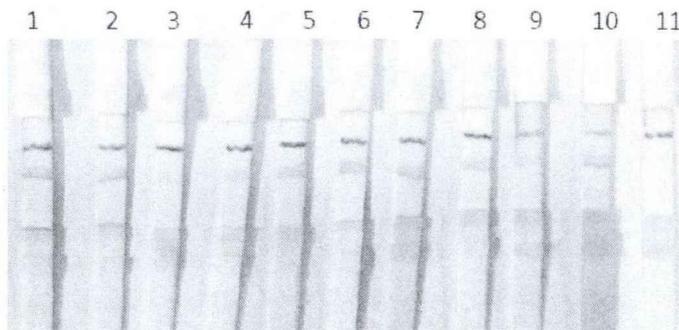


图 15. 胶体金试纸条对 DHAV-1 和 DHAV-3 进行检测

1-5、7 分别表示 DHAV-3 毒株 (CZ160312 株、QL 株、QL13 株、MY02 株、YA151006 株、SD151227 株)；6、8-10 分别表示 DHAV-1 毒株 (BZB 株、CD1231 株、DY0903 株、X 株)；11 表示阴性对照

Fig.15 The colloidal gold strip for testing DHAV-1 and DHAV-3

1 to 5 and 7 are DHAV-3 (CZ160312 strain, QL strain, QL13 strain, MY02 strain, YA151006 strain, SD151227 strain respectively). 6 and 8 to 10 are DHAV-1 (BZB strain, CD1231 strain, DY0903 strain, X strain respectively). 11 is negative control

3.5.3 稳定性

将胶体金试纸条密封保存于 37℃、室温和 4℃，每隔一个月后进行检测，结果表明三个不同储存条件保存三个月后阴性、阳性检测效果均较好，因此试纸条在 37℃、室温和 4℃ 三种不同的条件下至少可以保存 3 个月，其稳定性均较好（见图 16）

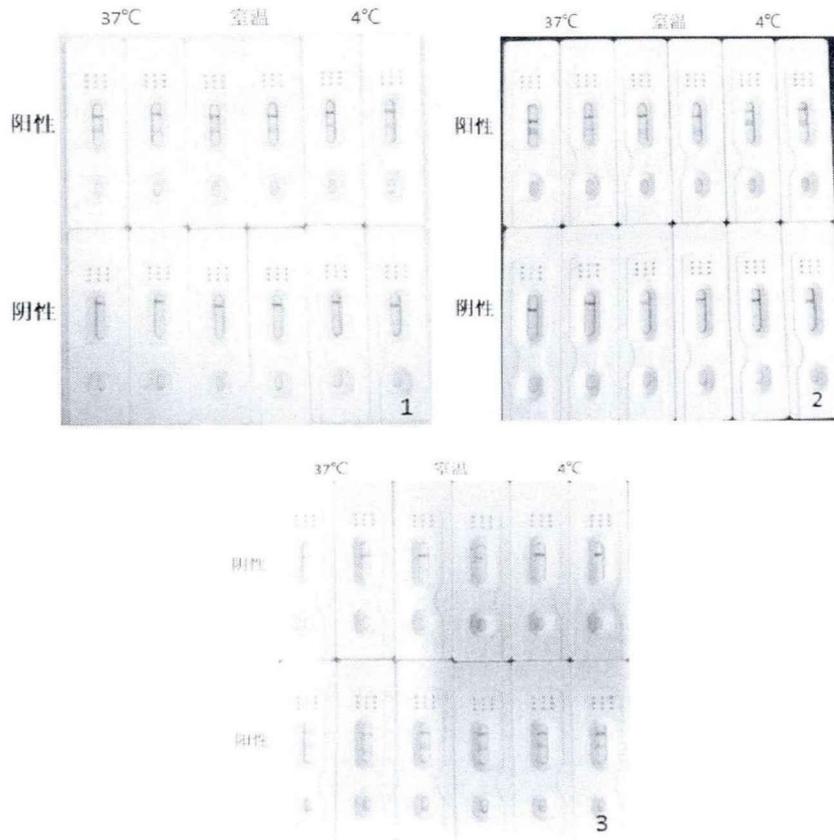


图 16 胶体金试纸条稳定性试验结果

1: 保存 1 个月; 2: 保存 2 个月; 3: 保存 3 个月

Fig.16 The stability of the colloidal gold strip

1 is save a month. 2 is keep 2 month. 3 is keep 3 month

3.5.4 灵敏度

通过 BCA 检测 DIIAV-1 病毒蛋白的含量为 0.6 mg mL^{-1} ，每个试纸条的添加量为 $100 \mu\text{L}$ ，因此按照 1:1、1:2、1:4、1:8、1:16 等进行倍比稀释，在 7 号（即 1:64）的稀释度时条带较浅，在 8 号（即 1:128）稀释度时，只有 C 线显色，T 线不显色，因此，该试纸条的灵敏度为 1:64，即 $0.9 \mu\text{g}$ （见图 17）。

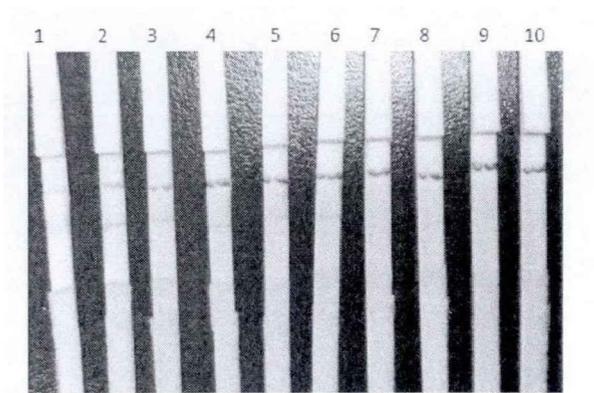


图 17 DHAV-1 病毒灵敏度试验结果

1-9 分别表示病毒蛋白含量为 1:1 (60 μg)、1:2 (30 μg)、1:4 (15 μg)、1:8 (7.5 μg)、1:16 (3.6 μg)、1:32 (1.8 μg)、1:64 (0.9 μg)、1:128 (0.45 μg) 和 1:256 (0.23 μg)；10 表示阴性

Fig.17 The experimental results of the sensitivity of DHAV-1

The concentration of protein from 1 to 9 are 1:1 (60 μg), 1:2 (30 μg), 1:4 (15 μg), 1:8 (7.5 μg), 1:16 (3.6 μg), 1:32 (1.8 μg), 1:64 (0.9 μg), 1:128 (0.45 μg), 1:256 (0.23 μg)

通过 BCA 法检测 DHAV-3 病毒蛋白的含量为 0.3 mg mL，每个试纸条的添加量为 100 μL ，因此按照 1:1、1:2、1:4、1:8、1:16 等进行倍比稀释，在 5 号（即 1:16）的稀释度时条带较浅，在 6 号（即 1:32）稀释度时，只有 C 线显色，T 线不显色，因此，该试纸条的灵敏度为 1:16，即 1.8 μg （见图 18）

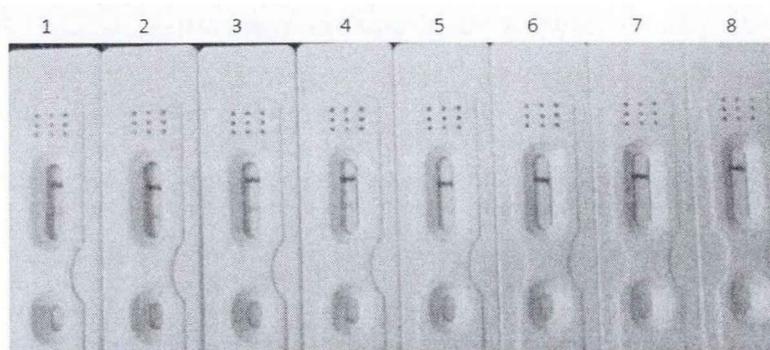


图 18 DHAV-3 病毒灵敏度试验结果

1-7 分别表示病毒蛋白含量为 1:1 (30 μg)、1:2 (15 μg)、1:4 (7.5 μg)、1:8 (3.6 μg)、1:16 (1.8 μg)、1:32 (0.9 μg)、1:64 (0.45 μg)；8 表示阴性

Fig.18 The experimental results of the sensitivity of DHAV-3

The concentration of protein from 1 to 7 are 1:1 (30 μg), 1:2 (15 μg), 1:4 (7.5 μg), 1:8 (3.6 μg), 1:16 (1.8 μg), 1:32 (0.9 μg), 1:64 (0.45 μg)

3.5.5 临床样本的检测

对养殖场送检病料的 162 份样品进行试纸条的检测，并对其进行 RT-PCR 的检测，通过比较试验结果如表 20 所示，在 RT-PCR 中检测出的 115 个阳性样本中，胶体金试纸条检测出 111 个阳性；在 RT-PCR 检测出的 47 个阴性样本中，胶体金试纸条检测出 1 个阳性，46 个阴性。因此本试验制备的试纸条与 RT-PCR 相比阳性符合率为 96.5%。

(111/115), 阴性符合率为 97.9% (46/47)。

表 20 试纸条检测临床样本的结果
Table 20 Detection of clinical samples

		试纸条检测		RT-PCR		符合率	
		阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
总	162	112	50	115	47		
肝脏	144	110	34	114	30		
粪便	3	1	2	0	3	96.5% (111/115)	97.9% (46/47)
脾	10	1	9	1	9		
肾脏	5	0	5	0	5		

4. 讨论

目前检测 DHAV 的方法有很多种, 主要是根据临床诊断和病理学诊断、病毒中和试验^[42]、ELISA^[49]、RT-PCR^[39]、免疫电镜^[50]等, 其操作程序复杂, 用时较长, 给试验带来了许多不便, 从本试验的胶体金检测方法来看, 肉眼可以观察试验结果, 操作简便, 缩短了检测的时间, 不需要特殊试验仪器设备, 具有广泛的应用价值。

胶体金免疫层析技术 (ICS, immunochromatographic strip) 常见的有以下 3 种方法:

(1) 双抗体夹心法: 常用于抗原样品的检测, 用针对某一个抗原表位的单抗进行胶体金的标记, 用另一抗体包被于检测线上形成 T 线, 如检测人绒毛膜促性腺激素的早孕检测试纸条^[83]; (2) 双抗原夹心法: 常用于血清中抗体的检测, 用抗原进行胶体金的标记, 用另一抗原包被于检测线上形成 T 线, 如鸭肠炎病毒抗体的检测^[69]; (3) 间接法: 常用于血清中抗体的检测, 用 SPA 进行胶体金的标记, 用抗原包被于检测线上形成 T 线, 如猪圆环病毒 2 型抗体的检测^[84]。

本试验采用双抗体夹心法检测 DHAV-1, 用胶体金标记 DHAV-1 单克隆抗体, 将纯化的兔抗 DHAV-1 的多抗包被于 T 线上形成检测线, 羊抗鼠 IgG 包被于 C 线形成对照线, 当检测的样品中含有 DHAV-1 时, 抗原与胶体金-单抗结合物中的抗 DHAV-1 单抗结合形成“鸭甲型肝炎病毒-金标 DHAV-1 单抗”, 在层析过程中, 与包被于 T 线上兔抗 DHAV-1 多抗发生特异性结合, 形成“DHAV-1 多抗-鸭甲型肝炎病毒-金标 DHAV-1 单抗”, 在 T 线上呈现出红色的条带, 没有与 DHAV-1 病毒结合的胶体金单克隆抗体继续向前层析, 达到 C 线处时, 胶体金颗粒上的单克隆抗体与 C 线处包被的羊抗鼠 IgG 发生特异性结合, 在 C 线处也呈现出红色的条带; 如果样品中不含有 DHAV 病毒或者 DHAV-1 病毒含量低于 0.9 μg 或者 DHAV-3 病毒含量低于 1.8 μg , 则只有 C 线出现红色条带, T 线不产生红色反应。

胶体金是一种富含负电荷的疏水溶液，可以与多种生物大分子结合形成稳定的复合物。制备胶体金主要是用柠檬酸三钠还原法^[85]，在胶体金试纸条的制备过程中，需要注意容器是否干净，配制的所有溶液必须用超纯水，它对胶体金试验结果有很大的影响，是试验成功的前提，容器不干净容易造成胶体金颗粒的聚沉，因此容器必须进行泡酸处理。

4.1 胶体金试纸条的优化

4.1.1 抗体的选择

本试验应用的是双抗体夹心法试纸条，C线上包被羊抗鼠 IgG，金标垫上的抗体和T线上的抗体分别用1#、2#、3#、4#、5#单克隆抗体以及兔抗 DHAV-1 多抗进行配对试验，结果显示，2#单抗用于金标抗体，兔抗 DHAV-1 多抗包被于T线时，显色效果较好，背景干净。因此，最终确定2#单克隆抗体为金标抗体，T线上包被抗 DHAV-1 多抗，C线上包被羊抗鼠 IgG。

4.1.2 NC 膜的优化

蛋白与 NC 膜结合主要包括疏水作用、氢键、静电作用力等，NC 膜的孔径、C 线和 T 线上的生物原料、缓冲液和封闭液的配方、点样环境等对膜与蛋白的结合有很大的影响。

NC 膜的选择主要考虑膜的孔径和蛋白的吸附能力，NC 膜的孔径越大，蛋白与 NC 膜的结合力就越低，层析速度就越快；NC 膜的孔径越小，层析速度也越小，金标复合物通过 T 线的时间就越长，反应就越充分^[86]，但是在减慢层析速度的同时，也会增加非特异性结合的机会，造成假阳性。本试验通过对 Sartorius CN140，Sartorius CN95，vivid 170 和 Millipore 135 这 4 种膜比较发现 Sartorius CN140 和 Millipore 135 显色均较快，在 10 min 左右均可显色，但是 Sartorius CN140 显色后背景不干净，有层析不完全的现象。本试验中采用 0.01 mol/L PH7.4 的 PBS 缓冲液，1% BSA 对 NC 膜进行封闭处理，封闭抗体上未结合的位点^[87]。

如果 NC 膜上结合的蛋白量太少，那么检测结果中显色较弱，而且检测灵敏度较低；如果蛋白不能牢固的吸附于 NC 膜上，那么在蛋白吸附于 NC 膜之前就会发生扩散或者流过的检测物和表面活性剂溶液可能将吸附于 NC 膜上的蛋白洗掉，从而使检测线较宽、显色较弱，或者显色不清晰，影响试验结果的观察；如果 NC 膜上结合的蛋白太多，造成原料的浪费。同时在对 NC 膜点膜时，要注意环境的湿度，最佳湿度一般在 45%-65%，湿度过低容易出现散点，湿度过高，容易引起 T 线、C 线变宽扩散^[86, 87]。本试验在试纸条的研制方面，环境湿度较难控制，只能更多的对 T 线和 C 线上包被的兔抗 DHAV-1

多抗和羊抗鼠 IgG 进行优化, 确定 T 线上兔抗 DHAV-1 多抗的包被浓度为 1 mg/mL, C 线羊抗鼠 IgG 的包被浓度为 1 mg/mL。

4.1.3 金标的优化

玻璃纤维素膜在胶体金试纸条的研制中也有重要的作用: 一方面是对金标抗体的固定; 另一方面是对金标抗体的释放。本试验通过对玻璃纤维素膜材料的选择, 结果显示, 使用 CB 0801、SB 06、VL 78 以及 GL 0194 作金标结合垫时, 金标抗体释放不完全, 有很多金标抗体残留在膜上, 而且 CB0801 上的金标抗体释放速度极慢, MA0208 上释放完全, 速度适中, 故选择 MA 0208 作为结合释放垫。

胶体金对溶液的标记是由于胶体金溶液在碱性条件下带负电荷, 蛋白质在等电点稍高的位点带正电荷, 两者之间的电荷吸附能力是最强的, 最容易形成稳定的胶体金复溶液。金标垫上胶体金溶液与被标记的单克隆抗体之间的用量比例、溶液 pH 值等对标记结果有很大的影响, 需要找到最佳标记量和最佳标记 PH: (1) 对标记 PH 的调节: 在调节溶液 PH 值时, 溶液中的胶体金颗粒容易吸附于 PH 计的电极上面使其堵塞, 对 PH 计有损害, 因此不能使用 PH 计测定胶体金溶液的 PH 值, 本试验按照表 17, 采用的是不同量的 0.1 mol/L K_2CO_3 对其进行 PH 的优化, 选择颜色为红色稳定不变的最低 K_2CO_3 加入量为胶体金标记单克隆抗体的最佳 PH, 从而确定 K_2CO_3 的用量为 12 μ L/mL; (2) 对最佳单抗标记量的确定: 本试验按照表 18, 采用优化 PH 的相同方法, 选择颜色为红色稳定不变的最低单克隆抗体加入量, 在此基础上加上 10%-20% 为最佳标记蛋白量, 确定单抗的最佳标记量为 34 μ g/mL。同时对胶体金复溶液进行了工艺的优化, 胶体金重悬液中加入叠氮钠作为防腐剂, 有利于胶体金试纸条的长久保存; 蔗糖、PEG 等对金标抗体起到保护和稳定的作用; 0.05% 水解酪蛋白可以降低非特异性反应。

4.2 胶体金试纸条性能的检测

本试验通过对胶体金试纸条灵敏度、特异性、稳定性、重复性进行检测, 胶体金试纸条在室温、4 $^{\circ}$ C 以及 37 $^{\circ}$ C 至少可以保存 3 个月, 检测结果无明显差异; 批间和批内试纸条对样品检测的重复性均较好; 对 DHAV-1 病毒蛋白最低检出量为 0.9 μ g; 对 DHAV-3 病毒蛋白最低检出量为 1.8 μ g; 在特异性试验中, 检测 4 株 DHAV-1 和 6 株 DHAV-3 呈阳性反应, 对鸭常见的其它致病病原 (如鸭瘟病毒、鸭大肠杆菌、鸭坦布苏病毒、鸭沙门氏菌、鸭疫里默氏杆菌等) 检测均为阴性。本试验可以同时检测 DHAV-1 和 DHAV-3 病毒可能由于本试验制备的单抗识别的抗原表位是 DHAV-1 和 DHAV-3 相同的抗原表位, 兔抗 DHAV-1 多抗血清也可同时识别 DHAV-1 和 DHAV-3 型, 如果检测样本中含有 DHAV-1 病毒或者 DHAV-3 病毒, 将会与金标垫上的单抗结合, 结合的复合物向前流动,

与 T 线上包被的多抗反应, 呈现出红色。根据已有的研究结果显示, DHAV-1 和 DHAV-3 有部分交叉^[7], 杨发龙等 (2014)^[88]用 DHAV-3 VP1 重组蛋白作为包被抗原构建的检测 DHAV-3 抗体的 ELISA 方法, 与 DHAV-1 阳性血清有交叉反应, 存在相同的抗原表位, 用 GenBank 通过对 DHAV-1 VP1 和 DHAV-3 VP1 的核苷酸相似性进行分析, 表明核苷酸序列相似性为 67.8%-72%, 氨基酸序列相似性为 67.6%-77.7%, 两者相似性较高; Shen 等 (2015)^[49]用 DHAV-1 VP3 重组蛋白作为包被抗原构建的检测 DHAV-1 抗体的间接 ELISA 方法, 同时可以检测出 DHAV-1 和 DHAV-3 血清, 表明 DHAV-1 和 DHAV-3 有交叉反应, 存在相同的抗原表位, 同时 VP3 相对保守, 通过 BLAST 序列分析表明 DHAV-1 和 DHAV-3 VP3 序列相似性为 79%-80%, 高于两基因之间 VP1 的相似性

(70.51%-72.81%)。Ma 等 (2015)^[89]用 ClustalW 序列对位排列软件对 VP1 蛋白序列进行分析, DHAV-1 和 DHAV-3 VP1 的序列相似性为 76%, 该试验发现 DHAV-1 和 DHAV-3 的 VP1 蛋白的变异区主要位于 138-146 和 C 端 (178-199 和 212-219)。Zhang 等 (2015)^[62]用 DHAV-1 全病毒粒子免疫 BALB/c 小鼠制备的单抗 4F8 既可以识别 DHAV-1 VP1 蛋白上保守线性表位 ⁷⁵GEIILT⁸⁰, 又可以识别 DHAV-3 VP1 蛋白上保守线性表位 75GEVILT80, 进行序列比对发现 DHAV-1 和 DHAV-3 的 VP1 蛋白在 75-80 为氨基酸均非常保守。DHAV 的 3 个结构蛋白 VP0、VP3 和 VP1 位于衣壳的表面, 都存在潜在的免疫原性, 但是优势抗原表位主要存在于 VP1 和 VP3 蛋白, 是病毒的主要抗原决定区, 能够起到诱导机体产生中和抗体的作用^[28, 49], 因此本试验构建的单克隆抗体是用 DHAV-1 全病毒进行 BALB/c 小鼠免疫的, 是能识别 DHAV-1 病毒的, 由于 DHAV-1 的主要抗原表位存在于 VP1 和 VP3, DHAV-1 病毒和 DHAV-3 病毒的 VP1 和 VP3 序列的相似性较高, 本试验构建的单抗识别的抗原表位可能是 DHAV-1 和 DHAV-3 相同的抗原表位, 因此制备的胶体金试纸条在进行检测时, 既能检测出 DHAV-1, 又能检测出 DHAV-3, 具体识别 DHAV-1 和 DHAV-3 哪一个相同的抗原表位尚需开展进一步的工作。

4.3 临床样本的检测

本试验研制的胶体金检测方法与 RT-PCR^[82]在检测临床样本时相比较, 试纸条与 RT-PCR 相比阳性符合率为 96.5%(111/115), 阴性符合率为 97.9%(46/47), 虽然 RT-PCR 检测出的阳性率略高于胶体金试纸条, 但相差很小。RT-PCR 的阳性率较高, 主要原因:

(1) RT-PCR 技术比胶体金试纸条的灵敏度更高, 临床样本中 DHAV-1 或者 DHAV-3 病毒的含量较少, 还未达到胶体金试纸条的检测限度, 试纸条不能检测出来; (2) 胶体金试纸条中的胶体金颗粒的直径小, NC 膜为快速层析膜, 导致速度太快, 还未与 T 线、C 线牢固结合就已经流出; (3) 由于试纸条需要长期保存, 在胶体金复溶液中加入稳定

剂 PEG, 它对试纸条的灵敏度有一定的影响。此外, 本试纸条检测出的粪便呈阳性结果, 可能由于临床样本中成分复杂, 造成假阳性的现象。从这两种方法比较而言, RT-PCR 操作繁琐, 需要特殊的试验仪器, 而试纸条不需要专门的仪器设备, 易于操作, 可以长期保存, 并且 5-10min 就可以观察到试验结果, 为临床快速诊断和基层单位的现场应用提供了一种简单、快速的诊断方法。

结 论

1. 研制成功 5 株 DHAV 单克隆抗体

将 DHAV 抗原免疫 Balb/c 雌性小鼠, 通过细胞融合和有限稀释法成功筛选到 5 株可以稳定分泌抗 DHAV 病毒的单克隆抗体, 其相对亲和常数都在 10^9 数量级以上, 具有较好的抗原结合能力。5 株杂交瘤细胞传 10 代、冻存 1 个月仍可稳定分泌单抗。

2. 建立了能够特异检测 DHAV-1 和 DHAV-3 胶体金试纸条

建立的胶体金试纸条可特异检测 DHAV-1 和 DHAV-3, 对鸭的常见致病病原 (鸭瘟病毒、鸭大肠杆菌、鸭坦布苏病毒、鸭沙门氏菌、鸭疫里默氏杆菌等) 检测均为阴性, DHAV-1 病毒蛋白最低检出量为 $0.9 \mu\text{g}$, DHAV-3 病毒蛋白最低检出量为 $1.8 \mu\text{g}$ 。试纸条在 4°C 、室温和 37°C 至少可以保存 3 个月; 批间和批内试纸条对样品检测的重复性较好。本试验制备的试纸条与 RT-PCR 同时检测临床样本的阳性符合率为 96.5% (111/115), 阴性符合率为 97.9% (46/47)。其敏感性、特异性、稳定性、重复性均较好, 有良好现场使用前景。

参考文献

- [1] Ding C, Zhang D. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 [J]. *Virology*, 2007, 361(1): 9-17.
- [2] 何庆雄, 程安春, 汪铭书. I 型鸭病毒性肝炎诊断方法研究进展 [J]. *中国预防兽医学报*, 2009, 08: 664-666.
- [3] David E.Swayne. *Diseases of poultry*, 13th Edition [M]. 2013.
- [4] Levine P, Fabricant J. A hitherto-undescribed virus disease of ducks in North America [J]. *Cornell Veterinarian*, 1950, 40: 71-86.
- [5] Macpherson L W, Avery R J. Duck virus hepatitis in Canada [J]. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 1957, 21(2): 26-31.
- [6] Sandhu T S, Calnek B W, L. Z. Pathologic and serologic characterization of a variant of duck hepatitis type I virus [J]. *Avian diseases*, 1992, 36: 932-936.
- [7] Kim M C, Kwon Y K, Joh S J, et al. Recent Korean isolates of duck hepatitis virus reveal the presence of a new geno- and serotype when compared to duck hepatitis virus type 1 type strains [J]. *Archives of Virology*, 2007, 152(11): 2059-2072.
- [8] Tseng C H, Tsai H J. Molecular characterization of a new serotype of duck hepatitis virus [J]. *Virus research*, 2007, 126(1-2): 19-31.
- [9] 王平, 潘文石, 胡寿文, 等. 北京小鸭病毒性肝炎的研究—(一) 诊断和防治 [J]. *北京大学学报 (自然科学版)*, 1980, 1: 55-72.
- [10] 郭玉璞, 潘文石. 北京鸭病毒性肝炎血清型的初步鉴定 [J]. *中国兽医杂志*, 1984, 10(11): 2-3.
- [11] Liu M, Fanyi M, Li X J, et al. Goose haemorrhagic hepatitis caused by a new subtype duck hepatitis type 1 virus [J]. *Veterinary microbiology*, 2011, 152:280-283.
- [12] Fu Y, Pan M, Wang X, et al. Molecular detection and typing of duck hepatitis A virus directly from clinical specimens [J]. *Veterinary microbiology*, 2008, 131(3-4): 247-257.
- [13] Xu Q, Zhang R, Chen L, et al. Complete genome sequence of a duck hepatitis a virus type 3 identified in eastern China [J]. *Journal of virology*, 2012, 86(24): 13848.
- [14] Wen H, Han L, Zhang X, et al. Duck hepatitis A virus (DHAV) genotype definition: Comment on the article by Cha et al [J]. *Veterinary microbiology*, 2014, 170(3-4): 462-464.
- [15] Todd D, Smyth V J, Ball N W, et al. Identification of chicken enterovirus-like viruses, duck hepatitis virus type 2 and duck hepatitis virus type 3 as astroviruses [J]. *Avian pathology*, 2009, 38(1): 21-30.
- [16] 刘兆宇, 程安春. 雏鸭病毒性肝炎的研究进展 [J]. *中国家禽*, 2002, 10: 9-12.
- [17] Davis D. Temperature and pH stability of duck hepatitis virus [J]. *Avian pathology*, 1987, 16(1): 21-30.
- [18] 范卫国, 杜佳慧, 曹瑞兵, 等. I 型鸭肝炎病毒概述 [J]. *动物医学进展*, 2009, 30(11): 110-114.

- [19] Shaohua S, Hongmei C, Zhen C, et al. Complete genome sequence of a duck hepatitis A virus 1 isolated from a pigeon in China [J]. *Genome announcements*. 2013, 1(4): e00451-13.
- [20] 陈溥言主编. 兽医传染病学 (第六版) [M]. 中国农业出版社, 2015.
- [21] 辛朝安. 禽病学 [M]. 中国农业出版社, 2003.
- [22] Cao Q D, Cheng A C, Wang M S. Complete Nucleotide Sequence of 3D Gene from Duck Hepatitis A Virus Strain H Isolated in China [J]. *Advanced Materials Research*. 2013, 647: 403-407.
- [23] Pan M, Yang X, Zhou L, et al. Duck Hepatitis A virus possesses a distinct type IV internal ribosome entry site element of picornavirus [J]. *Journal of virology*. 2012, 86(2): 1129-1144.
- [24] 赵伟, 李传峰, 陈宗艳, 等. I型鸭肝炎病毒内部核糖体进入位点的结构与功能研究 [J]. *中国预防兽医学报*. 2011, 33(1): 1-5.
- [25] Liu G, Yanguéz E, Chen Z, et al. The duck hepatitis virus 5'-UTR possesses HCV-like IRES activity that is independent of eIF4F complex and modulated by downstream coding sequences [J]. *Virology journal*. 2011, 8(1): 147.
- [26] Tseng C H, Knowles N J, Tsai H J. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 indicates that it should be assigned to a new genus [J]. *Virus research*. 2007, 123(2): 190-203.
- [27] Kempf B J, Kelly M M, Springer C L, et al. Structural features of a picornavirus polymerase involved in the polyadenylation of viral RNA [J]. *Journal of virology*. 2013, 87(10): 5629-5644.
- [28] 李传峰, 陈宗艳, 刘光清. 鸭甲型肝炎病毒衣壳蛋白 B 细胞抗原表位和密码子偏爱性的分析 [J]. *中国兽医科学*. 2012, 42(11): 1112-1120.
- [29] Wen X J, Cheng A C, Wang M S. Sequence analysis and B cell epitope prediction of duck hepatitis A virus 1 VP1 gene [J]. *Advanced Materials Research*. 2013, 647: 214-219.
- [30] Gao J, Chen J, Si X, et al. Genetic variation of the VP1 gene of the virulent duck hepatitis A virus type 1 (DHAV-1) isolates in Shandong province of China [J]. *Virologica Sinica*. 2012, 27(4): 248-253.
- [31] Cao Q D, Cheng A C, Wang M S. Bioinformatic analysis of the 3D polyprotein from duck hepatitis A virus strain H isolated in China [J]. *Advanced Materials Research*. 2013, 647: 396-402.
- [32] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Research*. 2000, 28(12): E63.
- [33] Yang L, Li J, Bi Y, et al. Development and application of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of Duck hepatitis A virus type 1 [J]. *Virus genes*. 2012, 45(3): 585-589.
- [34] Song C, Wan H, Yu S, et al. Rapid detection of duck hepatitis virus type-1 by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification [J]. *Journal of virological methods*. 2012, 182(1-2): 76-81.
- [35] Li C, Chen Z, Meng C, et al. Rapid detection of duck hepatitis A virus genotype C using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification [J]. *Journal of virological methods*. 2014, 196:

- 193-198.
- [36] Kim M C, Kwon Y K, Joh S J, et al. Development of one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction to detect duck hepatitis virus type 1 [J]. *Avian Diseases*, 2007, 51(2): 540-545.
- [37] 黄显明, 张小飞, 李春芬, 等. I 型鸭肝炎病毒逆转录套式 PCR 检测方法的建立 [J]. *中国兽医科学*, 2008, 38(1): 25-28.
- [38] Yang M, Cheng A, Wang M, et al. Development and application of a one-step real-time Taqman RT-PCR assay for detection of Duck hepatitis virus type1 [J]. *Journal of virological methods*. 2008, 153(1): 55-60.
- [39] Kim M C, Kwon Y K, Joh S J, et al. Differential diagnosis between type-specific duck hepatitis virus type 1 (DHV-1) and recent Korean DHV-1-like isolates using a multiplex polymerase chain reaction [J]. *Avian pathology*, 2008, 37(2): 171-177.
- [40] Anchun C, Mingshu W, Hongyi X, et al. Development and application of a reverse transcriptase polymerase chain reaction to detect Chinese isolates of duck hepatitis virus type 1 [J]. *Journal of microbiological methods*, 2009, 76: 1-5.
- [41] Hwang J. Duck hepatitis virus in duck embryo fibroblast cultures [J]. *Avian Diseases*, 1965, 9(2): 285-290.
- [42] Kaleta E F. Duck viral hepatitis type 1 vaccination: monitoring of the immune response with a microneutralisation test in Pekin duck embryo kidney cell cultures [J]. *Avian pathology*, 1988, 17(2): 325-332.
- [43] 罗函禄, 范文明, 张菊英, 等. 间接血凝试验检测鸭病毒性肝炎抗原和抗体的研究 [J]. *中国家禽*, 1990, 3: 28-29.
- [44] 汪铭书, 程安春, 陈孝跃. 应用葡萄球菌 A 蛋白协同凝集试验快速检测鸭肝炎病毒的研究 [J]. *中国兽医科技*, 1996, 26(6): 3-5.
- [45] 陈溥言. 应用酶联免疫吸附试验检测雏鸭肝炎病毒抗原 [J]. *畜牧与兽医*, 1989, 21(5): 200-201.
- [46] Zhao X L, Phillips R M, Li G D, et al. Studies on the detection of antibody to duck hepatitis virus by enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Avian Diseases*, 1991, 35(4): 778-782.
- [47] 杨萍萍, 宋敏训, 艾武, 等. 间接 ELISA 检测鸭病毒性肝炎抗体的研究 [J]. *中国动物检疫*, 2004, 21(1): 18-20.
- [48] Liu M, Zhang T, Zhang Y, et al. Development and evaluation of a VP1-ELISA for detection of antibodies to duck hepatitis type 1 virus [J]. *Journal of virological methods*, 2010, 169(1): 66-69.
- [49] Shen Y, Cheng A, Wang M, et al. Development of an indirect ELISA method based on the VP3 protein of duck hepatitis A virus type 1 (DHAV-1) for dual detection of DHAV-1 and DHAV-3 antibodies [J]. *Journal of Virological Methods*, 2015, 225: 30-34.
- [50] 程安春, 汪铭书, 廖德惠, 等. 应用胶体金免疫电镜技术检测鸭肝炎病毒 [J]. *中国兽医杂志*.

1994, 20(6): 3-4.

- [51] 张小飞, 陈毓川, 刘庆年, 等. 斑点免疫金渗滤法检测鸭肝炎病毒的研究 [J]. 安徽农业科学, 1997, 25(4): 373-376.
- [52] 孙泉云, 刘红, 李劲松. 琼脂免疫扩散试验检测鸭病毒性肝炎抗原 [J]. 中国兽医杂志, 1998, 24(3): 22-23.
- [53] 张济培, 冼琼珍, 黎雄亮, 等. 鸭肝炎 I 型琼脂扩散试验的研究 [J]. 佛山科学技术学院学报: 自然科学版, 2002, 20(3): 74-77.
- [54] Kohler G, Milstein C, . Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity [J]. Nature, 1992, 24(5517): 495-497.
- [55] Weiland E , Stark R , Haas B , et al. Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer [J]. Journal of virology, 1990, 64(8): 3563-3569.
- [56] 金山, 倪龙根, 王永坤. 抗鸡传染性法氏囊病病毒型特异性单克隆抗体的临床治疗试验 [J]. 中国畜禽传染病, 1997, 06: 58-59.
- [57] Anding Z, Meilin J, Fan Fang L, et al. Development and evaluation of a DAS-ELISA for rapid detection of avian influenza viruses [J]. Avian Diseases, 2006, 50(3): 325-330.
- [58] 仇铮, 于天飞, 李俚, 等. 抗鹅细小病毒 NS1 蛋白单克隆抗体的制备及对应抗原表位区的分析 [J]. 中国兽医科学, 2009, 8: 696-701.
- [59] Upadhyay C, Ammayappan A, Vakharia V N. Detection of NP, N3 and N7 antibodies to avian influenza virus by indirect ELISA using yeast-expressed antigens [J]. Virology journal, 2009, 6(1): 177-182.
- [60] Zhang T, Li X, Wu X, et al. Characterization of monoclonal antibodies against duck hepatitis type 1 virus VP1 protein [J]. Journal of Virological Methods, 2014, 208: 166-170.
- [61] Wu X, Li X, Zhang Q, et al. Identification of a Conserved B-Cell Epitope on Duck Hepatitis A Type 1 Virus VP1 Protein [J]. PLoS One, 2015, 10(2): e0118041.
- [62] Zhang R, Zhou G, Xin Y, et al. Identification of a conserved neutralizing linear B-cell epitope in the VP1 proteins of duck hepatitis A virus type 1 and 3 [J]. Veterinary Microbiology, 2015, 180(3-4): 196-204.
- [63] Faulk W P, Taylor G M. Communication to the editors : An immunocolloid method for the electron microscope [J]. Immunochemistry, 1971, 8(8): 1081-1083.
- [64] Paek S H, Lee S H, Cho J H, et al. Development of rapid one-step immunochromatographic assay [J]. Methods, 2000, 22(1): 53-60.
- [65] 王东勇, 张松乐. 免疫胶体金技术在快速诊断中的应用 [J]. 中国卫生检验杂志, 2003, 13(3): 391-392.
- [66] 李永勤, 杨瑞馥. 以膜为固相载体的免疫胶体金快速试验 [J]. 微生物学免疫学进展, 2003, 31(1):

74-78.

- [67] 程安春, 汪铭书, 廖德惠, 等. 银加强胶体金探针检测鸡减蛋综合征病毒的研究 [J]. 中国兽医杂志, 1997, 23(7): 9-11.
- [68] Kameyama K, Sakoda Y, Tamai K, et al. Development of an immunochromatographic test kit for rapid detection of bovine viral diarrhea virus antigen [J]. *Journal of virological methods*, 2006, 138(1): 140-146.
- [69] Chanjuan S, Anchun C, Mingshu W, et al. Development and evaluation of an immunochromatographic strip test based on the recombinant UL51 protein for detecting antibody against duck enteritis virus [J]. *Virology journal*, 2010, 7(1): 268.
- [70] 夏兴霞, 王永山, 孟祥升, 等. 大肠杆菌 O157 : H7 单克隆抗体胶体金免疫层析检测试纸条的研制 [J]. 中国动物传染病学报, 2010, 18(4): 47-53.
- [71] Lin T, Shao J, Du J, et al. Development of a serotype colloidal gold strip using monoclonal antibody for rapid detection type Asia1 foot-and-mouth disease [J]. *Virology Journal*, 2011, 8: 418.
- [72] Zhang D, Li P, Yang Y, et al. A high selective immunochromatographic assay for rapid detection of aflatoxin B1 [J]. *Talanta*, 2011, 85(1): 736-742.
- [73] Liu X, Xiang J J, Tang Y, et al. Colloidal gold nanoparticle probe-based immunochromatographic assay for the rapid detection of chromium ions in water and serum samples [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2012, 745(10): 99-105.
- [74] Zhou Y, Pan F G, Li Y S, et al. Colloidal gold probe-based immunochromatographic assay for the rapid detection of brevetoxins in fishery product samples [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 24(8): 2744-2747.
- [75] Lo C, Chin L T, Chu C S, et al. Rapid Immune Colloidal Gold Strip for Cetacean Meat Restraining Illegal Trade and Consumption: Implications for Conservation and Public Health [J]. *PloS one*, 2013, 8(3): e60704.
- [76] Kim Y A, Lee E-H, Kim K-O, et al. Competitive immunochromatographic assay for the detection of the organophosphorus pesticide chlorpyrifos [J]. *Analytica chimica acta*, 2011, 693(1): 106-113.
- [77] 陈海军, 程安春, 汪铭书, 等. 鸭病毒性肝炎的病原分离和鉴定 [J]. 中国家禽, 2007, 29(12): 9-12.
- [78] Ey P L, Prowse S J, Jenkin C R. Isolation of pure IgG 1 , IgG 2a and IgG 2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-Sepharose [J]. *Immunochemistry*, 1978, 15(7): 429-436.
- [79] 张瑞华. 鸭甲肝病毒 1 型和 3 型 VP1 蛋白中和性线性抗原表位的精确定位 [D]; 山东农业大学, 2013.
- [80] Tsuda Y, Sakoda Y, Sakabe S, et al. Development of an immunochromatographic kit for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection [J]. *Microbiology and immunology*, 2007, 51(9):

903-907.

- [81] 沈婵娟. 鸭瘟病毒 UL51 基因部分特性及其基因工程蛋白应用的研究 [D]; 四川农业大学, 2010.
- [82] Wen X J, Cheng A C, Wang M S, et al. Detection, differentiation, and VP1 sequencing of duck hepatitis A virus type 1 and type 3 by a 1-step duplex reverse-transcription PCR assay [J]. *Poultry Science*, 2014, 93: 2184-2192.
- [83] 刘煜凯, 陈伟明, 马以秀, 等. 免疫层析法作早孕快速诊断测定 [J]. *中华医学检验杂志*, 1995, 6: 364-367.
- [84] 范晓娟, 李刚, 史利军, 等. 检测猪圆环病毒 2 型抗体 SPA 胶体金免疫层析方法的建立 [J]. *中国畜牧兽医*, 2009, 07: 158-161.
- [85] Frens G. Controlled nucleation for regulation of particle-size in monodisperse gold suspensions [J]. *Nature*, 1973, 241(105): 20-22.
- [86] Jones K. Troubleshooting Protein Binding in Nitrocellulose Membranes, Part 1: Principles [J]. *IVD Technology*, 1999, 2: 32-41.
- [87] Kolosova A Y, Sibanda L, Dumoulin F, et al. Lateral-flow colloidal gold-based immunoassay for the rapid detection of deoxynivalenol with two indicator ranges [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2008, 616(2): 235-244.
- [88] 杨发龙, 张焕容, 程方明, 等. 基于基因 C 型鸭甲肝病毒 VP1 重组蛋白的鸭甲肝病毒抗体 ELISA 检测方法的建立 [J]. *畜牧兽医学报*, 2014, 07: 1148-1153.
- [89] Ma X, Sheng Z, Huang B, et al. Molecular Evolution and Genetic Analysis of the Major Capsid Protein VP1 of Duck Hepatitis A Viruses: Implications for Antigenic Stability [J]. *Plos One*, 2015, 10(7): e0132982.

致 谢

时光飞逝，三年的研究生生活即将结束，这三年使我学到很多。在这三年时光的磨砺，毕业论文终于写完，回顾这三年的时光，有苦有笑有泪，在这段经历中，我得到了老师、师兄师姐、师弟师妹以及同届的关怀和帮助，我要向他们表达我最真诚的谢意。

首先，深深感谢我的导师程安春教授和汪铭书教授，两位老师为人谦和，和蔼可亲。从论文题目确定、搜集资料和论文撰写都给予了极大的关心和帮助，在百忙之中抽出时间认真批改我的论文，给我提出了许多宝贵意见。在试验遇到挫折，会耐心的指导我，让我不再迷茫，重新找回信心。两位老师严谨的治学之风和对事业的追求将激励我的一生，对我的关心和教诲我将永远铭记，借此机会，我向程安春老师和汪铭书老师致以深深地谢意，谢谢两位老师！

我还要衷心感谢四川农业大学禽病中心的各位老师：朱德康老师、贾仁勇老师、陈孝跃老师、刘马峰老师、刘菲老师、陈舜老师、吴英老师、杨乔老师、孙昆峰老师以及黄杵睿老师等老师，正是因为有了他们严格、无私的教导，使我在三年的研究生学习过程中各方面能力得到提高。此外，还要特别感谢张沙秋、刘悸斌、文兴建、胡溪霞、何阳、张欣、刘超越、欧旭敏等各位师兄师姐；张煜、江一帆、何玲、杨晓尧、张雨薇、张怡泽等各位师弟师妹。还要特别感谢我们这届对我的帮助、关心与支持的各位小伙伴：黄霞、胡琴、曹靖雨、魏玲、赵雄艳、景艳春、孙迪等。还要特别感谢卿莉对我试验、生活方面的帮助，我才能按时完成试验，跟大家一起顺利毕业，非常谢谢！

感谢我的宿舍小伙伴们在我身后默默地支持，谢谢你们！

最后要特别感谢我的家人在我求学道路上的关爱、支持和理解。在我遇到困难的时候鼓励我、开导我，给予我正能量，才能让我顺利完成学业。谢谢你们！