



分类号 S858.31

学号 S20162260

山西農業大學

全日制硕士学位论文

鸡细胞外脂肪酸结合蛋白单克隆抗体的制备
及双抗夹心ELISA检测方法的初步建立

姓名：翟晶晶

指导教师：田文霞 教授

学科专业：预防兽医学

培养单位：动物科技学院

中国·山西·太谷

二〇一九年五月

Shanxi Agricultural University

Full-time Master Degree Dissertation

**Development of monoclonal antibody against
extracellular fatty acid binding protein in chicken and
establishment of double-antibody sandwich method**

Name: Jing-jing Zhai

Supervisor: Professor. Wen-xia Tian

Subject Major: Preventive Veterinary medicine

**Training Institute: College of Animal Science and
Veterinary Medicine**

Taigu Shanxi China

May, 2019

学位论文原创性声明

本人郑重声明：所提交的学位论文，是在导师指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文研究做出过重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。

本人完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

作者签名（亲笔）：翟晶晶 2019 年 5 月 28 日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定。即学位论文的知识产权属山西农业大学；同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的原件、复印件和电子版；允许论文被查阅和借阅；本人授权山西农业大学可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

作者签名（亲笔）：翟晶晶 2019 年 5 月 28 日

导师签名（亲笔）：田文霞 2019 年 5 月 28 日

基金项目

国家重点研发计划（2016YFD0500800）

山西省回国留学人员科研资助项目（2017-073）

晋中市重点科技创新平台（P171002-3）

山西省科技攻关项目（20130311027-3）

国家自然科学基金（31072179）

目 录

摘 要.....	1
前 言.....	2
1 FABPs 的研究进展.....	2
1.1 A-FABP	2
1.2 B-FABP	2
1.3 Ex-FABP	2
1.4 H-FABP	3
1.5 L-FABP	3
2 单克隆抗体的研究进展.....	3
2.1 杂交瘤技术的发展.....	3
2.2 单克隆抗体技术的进展.....	4
3 研究目的与意义.....	5
第一章 鸡细胞外脂肪酸结合蛋白单克隆抗体的制备.....	6
1 材料.....	6
1.1 主要仪器设备及耗材.....	6
1.2 主要试剂.....	6
1.3 实验动物.....	8
2 试验方法.....	8
2.1 重组蛋白 Ex-FABP 的表达与纯化.....	8
2.2 BALB/C 小鼠免疫程序.....	9
2.2 SP2/0 骨髓瘤细胞的复苏及培养.....	9
2.3 饲养细胞的制备.....	9
2.4 免疫脾细胞的准备.....	9
2.5 融合分装.....	10
2.6 筛选.....	10
2.6.1 初次检测.....	10
2.6.2 杂交瘤细胞克隆化及扩增.....	11
2.7 细胞冻存.....	11
2.8 抗体亚类的鉴定.....	11
2.9 腹水的制备.....	11

3 结果.....	12
3.1 抗原的制备.....	12
3.2 融合前测效价结果.....	13
3.3 融合筛选结果.....	13
3.4 抗体亚类鉴定结果.....	13
3.5 腹水检测效价结果.....	14
第二章 Ex-FABP 双抗夹心试剂盒方法的初步建立.....	15
1 材料.....	15
1.1 主要仪器设备及耗材.....	15
2 方法.....	15
2.1 腹水的纯化及辣根过氧化物酶的标记.....	15
2.2 双抗体夹心 ELISA 流程.....	16
2.3 组合反应选择合适的单抗及酶标抗体.....	16
2.4 确定包被时间.....	16
2.5 封闭液的选择.....	17
2.6 确定抗体及辣根过氧化物酶标记的抗体的工作浓度.....	17
2.7 确定样品稀释倍数试验.....	18
2.8 确定底物显色液时间的试验.....	18
2.9 临床样品的检查.....	19
3 结果.....	19
3.1 腹水纯化的结果.....	19
3.2 组合反应选择合适的单抗及酶标抗体结果.....	19
3.3 包被时间的确定.....	20
3.4 封闭液的选择.....	20
3.5 抗体及辣根过氧化物酶标记的抗体的工作浓度的结果.....	21
3.6 样品稀释结果.....	23
3.7 底物显色液反应时间的确定.....	24
3.8 临床样品检测结果.....	24
第三章 用 Western Blot 方法鉴定重组 Ex-FABP 攻毒的血清样品.....	33
1 实验材料.....	33
1.1 主要仪器设备及耗材.....	33
1.2 主要试剂.....	33

2 实验方法	34
2.1 SDS-PAGE 分析 TD 动物模型注射 Ex-FABP 动物试验血清样品	34
2.2 Western Blot 分析 TD 动物模型注射 Ex-FABP 动物试验血清样品	34
3 结果	35
3.1 SDS-PAGE 血清试验结果	35
3.2 Western Blot 血清试验结果	37
讨论	39
结论	40
参考文献	41
Abstract	46
致谢	48

鸡细胞外脂肪酸结合蛋白单克隆抗体的制备及 双抗夹心 ELISA 检测方法的初步建立

摘要

胫骨软骨发育不良 (Tibial Dyschondroplasia, TD) 对家禽的影响是全球养禽业都会面临的一个问题, 目前还没有检测该病的成熟技术。课题组前期在研究 TD 时通过基因芯片技术, 发现在 TD 早期时细胞外脂肪酸蛋白 (Ex-FABP) 基因有差异性表达, 因此制备 Ex-FABP 单克隆抗体及建立 Ex-FABP 检测方法为早期诊断 TD 奠定基础。

将重组蛋白 Ex-FABP 纯化, 作为免疫原, 免疫 6 周龄 SPF 级 BALB / C 小鼠, 每两周一次, 三次免疫后用建立的间接 ELISA 测效价, 选取效价最高的进行加强免疫, 准备 SP2/0 骨髓瘤细胞融合。取重组蛋白 EX-FABP 和 GSTA3 包被, 通过间接 ELISA 方法筛选杂交瘤细胞, 挑选数值较高的阳性孔进行亚克隆, 获得 5 株杂交瘤细胞株, 命名为 5B7、4E4、5D12、1H6 和 4B2, 腹水效价高达 $1:10^{11}$, 亚类鉴定均为 IgG₁。

将 5 株单克隆抗体包被酶标板, 辣根过氧化物酶标记的单克隆抗体为酶标抗体, 用于建双抗夹心 ELISA 方法。经过试验, 确定 4E4 作为包被抗体, 辣根过氧化物酶标记的 5D12 为酶标抗体; 包被单抗 4E4 的稀释倍数为 1:2 000, 4℃ 过夜; 用 10% 马血清的白板稀释液, 37℃ 作用 2 h; 血清样品上样量 50 μL, 37℃ 30 min; 酶标抗体 5D12 稀释倍数为 1:2 000, 37℃ 30 min; 底物显色液反应时间为 15 min。用该方法检测 1688 份临床样品, 初步显示出双抗夹心 ELISA 方法的良好效果。

将实验室 TD 动物模型注射重组蛋白 Ex-FABP 动物试验血清样品进行 Western Blot 试验, 设置 SPF 血清样品作为对照。根据成像结果与建好的双抗夹心 ELISA 结果对比分析, Western Blot 检测结果显示血清中 Ex-FABP 的条带含量与其双抗夹心 ELISA 方法检出的数值符合。表明双抗夹心 ELISA 方法可用于实验室检测血清中的 Ex-FABP。

课题组前期研究发现 TD 早期 Ex-FABP 基因有显著的上调表达, 为了更好地研究 Ex-FABP 在 TD 发生过程中的作用, 制备重组蛋白 Ex-FABP 的单克隆抗体并建立了双抗夹心 ELISA 方法, 用来快速、特异、灵敏的检测 Ex-FABP, 为后期更好的研究 Ex-FABP 奠定基础。

关键词: 细胞外脂肪酸蛋白 (Ex-FABP); 单克隆抗体; 双抗夹心 ELISA 方法; Western Blot

前言

1 FABPs 的研究进展

脂肪酸结合蛋白 (FABPs) 是一种小的胞质蛋白, 主要分布在无脊椎动物和脊椎动物中^[1], 它结合长链脂肪酸, 然后将它们转移到适当的细胞内位点, 如氧化线粒体或内质网中, 实现疏水性配体如脂肪酸的摄取和细胞内转运^[2]。尽管长链脂肪酸在细胞上有许多功能^[3], 但在无脊椎动物物种的功能仍然不是很清楚^[4]。自 1972 年第一次报道 FABP 报告以来, 已经鉴定了许多类型的 FABP, 它们的名称取决于第一次分离鉴定的组织, 如心脏型^[5]、肝脏型^[6]及肾脏型^[7]等。由于 FABPs 被认为参与多种炎症和代谢信号传导途径^[8], 对于脑和其他组织中的能量产生和相关信号传导至关重要, 据此推测 FABPs 在代谢疾病的发病机制中起重要作用^[9-12]。FABPs 可能控制细胞质中游离脂肪酸及其代谢物^[13], 防止其细胞毒性^[14]; FABPs 调节脂肪酸与核受体的相互作用^[15]; FABPs 螯合或去除细胞毒性物质^[16]; FABPs 捕获或清除 ROS^[17]。

1.1 A-FABP

A-FABP 主要存在于脂肪组织和巨噬细胞中^[18], 与其他家族成员一样, 相对分子量为 15 kDa, 促进细胞之间脂肪酸的转运^[19]。A-FABP 可作为动态过程中的生物标志物^[20]。据证实在 II 型糖尿病患者血清中 A-FABP 浓度与非酒精性脂肪肝脂肪变性之间发现 II 型糖尿病患者中 A-FABP 浓度更高。Lamounier-Zepter 等人还表明, 脂肪细胞释放的 A-FABP 会直接影响 Ca^{2+} 抑制依赖性心肌细胞痉挛。心包脂肪中的 A-FABP 浓度升高或局部表达升高可能是导致心功能不全和肥胖人群的心脏功能障碍的原因之一^[21]。

1.2 B-FABP

B-FABP 主要存生在神经胶质细胞中, 如胶质母细胞瘤细胞和星形细胞肿瘤细胞^[22]。Mita 等^[23]表明 B-FABP 参与胶质母细胞瘤细胞的迁移。在星形细胞瘤中, B-FABP 的表达与肿瘤侵袭和复发的部位相关。控制细胞中的 B-FABP 表达可能有助于对抗这些肿瘤。B-FABP 浓度的增加与神经退行性疾病和中枢神经系统肿瘤有关。鼠脑脂肪酸结合蛋白由在放射状神经胶质细胞和未成熟星形胶质细胞中表达的 B-FABP 进行基因编码调节发育^[24]。B-FABP 在大脑发育过程中的放射状神经胶质细胞中有高表达。据研究 B-FABP 与神经退行性疾病和其他认知功能障碍有关^[25]。

1.3 Ex-FABP

Ex-FABP 细胞外脂肪酸结合蛋白，是一种相对分子量大小为 21kDa 的脂质运载蛋白，在软骨、肌肉和心脏发育期间以及在粒细胞中表达^[26]。通过增加 Ex-FABP 来抑制在软骨细胞和成肌细胞培养物中炎症因子引起的炎症^[27]。Ex-FABP 在软骨发育不良和关节炎中大量表达，在发病鸡的关节软骨区域检测到大量 Ex-FABP，但是成人关节软骨内没有 Ex-FABP 的表达。有研究表明，Ex-FABP 表达可能是急性期反应的一部分，不一定与炎症有关。研究表明^[28]LPS 和其他炎症因子增强了几种蛋白质的表达，包括 Ex-FABP，在分化晚期的生长板软骨细胞和成肌细胞中被激活产生表达。正如报道所言^[29]，在正常对照鸡的软骨中，Ex-FABP 仅限于肥大软骨细胞的区域表达。

1.4 H-FABP

H-FABP 主要用于诊断心肌梗塞，以及部分肾脏病变。H-FABP 分布广，在心脏，骨骼肌和乳腺中检测到，其中组织和骨骼肌的表达量低于心肌细胞^[30]。这些组织都以脂肪酸作为主要能量来源。

1.5 L-FABP

肝脏脂肪酸结合蛋白 (L-FABP)，也称为脂肪酸结合蛋白 1 (FABP1)，相对分子量大小为 14kDa，存在于肝、肠、肾小管和胃细胞的细胞质中，是肝脏脂质代谢的关键调节剂^[31]。L-FABP 以高亲和力结合疏水性分子，包括可能具有肾毒性的游离脂肪酸，胆汁酸和胆红素，并且主要在肝细胞中参与其代谢^[32]。已知 L-FABP 含有具有抗氧化功能的氨基酸。研究表明肝损伤患者的血浆中 L-FABP 表达水平升高^[33]。肾脏病变产生的尿液中 L-FABP 增加，通过 Western 印迹证明，L-FABP 进入尿液是急性肾损伤的敏感和特异性指标。通过检验证明了 L-FABP 可作为抗氧化应激的有效内源性细胞保护剂的假设。通过转染并克隆表达 L-FABP 基因肝细胞，与对照相比该细胞降低细胞内 ROS 水平，该发现暗示 L-FABP 在氧化应激中具有重要作用^[34]。L-FABP 很可能是一种有效的内源性抗氧化剂，因为它具有高亲和力和结合长链脂肪酸氧化产物的能力。

2 单克隆抗体的研究进展

2.1 杂交瘤技术的发展

自从 1975 年报道^[35]通过细胞融合方法获得单克隆抗体，自此在免疫学及生物医学领域已发了一场的革命^[36]。单克隆抗体的优点在生物^[37]、医学领域^[38]广泛展现出来，用于诊断试剂、生物治疗以及作为亲和层析的配体^[39]。据报道，经美国 FDA 批准使用的单抗产品已达数千种^[40]，还有几百种实验中的单抗产品^[41]，其中应用较多的是单抗诊断

试剂盒及单抗药物^[42]。一次细胞融合试验获得特定抗体的几率为千万分之一^[43]，为提高成功几率，选择合适的抗原^[44]及佐剂进行免疫且加强免疫^[45]，经证实三次免疫后的抗体水平较高^[46]。杂交瘤技术的重要环节是细胞融合^[47]，融合时间的选择为加免后的3天^[48]或7~8天^[49]，大部分选择第一种方案，因为该期间的脾淋巴细胞更易于融合^[50]；融合试验常用的PEG分子量有2000^[51]和1500的^[52]，PEG正常选购自Sigma公司，而且不同批号的PEG融合效果有差异^[53]；影响融合效果和饲养细胞有关^[54]，目前饲养细胞的来源有小鼠腹腔巨噬细胞和脾淋巴细胞，巨噬细胞有吞噬死亡细胞的能力^[55]，但是一只小鼠的腹腔巨噬细胞获得的数量不可控^[56]，制备过程中要注意不能刺破腹腔器官易引起污染^[57]，相对而言，脾淋巴细胞在细胞数量上比较合适^[58]，也能提供细胞生长所需的能量^[59]。影响融合效果的另一因素和骨髓瘤细胞有关，骨髓瘤细胞大多数实验室都有保存^[60]，准备融合试验前复苏SP2/0细胞，用含8-AG培养基进行筛选选择培养^[61]，或者将复苏的细胞进行免疫小鼠，重新获得骨髓瘤细胞^[62]，这两种操作增强细胞活性而且去除细胞返祖^[63]。融合试验后选择杂交瘤细胞进行亚克隆的时间，由于该期间杂交瘤细胞生长快速^[64]，细胞间的竞争激烈，克隆时有丢失特定抗体的可能^[65]，克隆时间早特定抗体细胞形状不稳定^[66]，且数量少，需时刻注意杂交瘤细胞的生长情况。为了获得稳定分泌的单克隆抗体，需进行3-5次克隆^[67]，每次进行克隆的杂交瘤细胞需要冻存多管^[68]，以防特定抗体的丢失^[69]。单抗提纯方法讲究简易高效^[70]，经过验证IgM提纯方法为聚乙二醇沉淀，IgG提纯方法为辛酸-硫酸铵沉淀^[71]。在1997年产生了世界上第一株高质量稳定的兔单克隆抗体的融合细胞株^[72]，被命名为240E-W，其亲和力及特异性比鼠单克隆抗体更好^[73]。

2.2 单克隆抗体技术的进展

自从1986年第一个单克隆抗体Orthoclone OKT3被批准使用^[74]，随后的几十年，单抗的应用如雨后春笋慢慢崛起。首先应用的是鼠源性抗体^[75]，由于其鼠源性的问题，在临床治疗中起到的效果一般^[76]。上世纪80年代出现了嵌合单克隆抗体，通过改进后鼠源成分仅为人基因序列的5%，嵌合抗体已高度人源化^[77]。第一个人鼠嵌合抗体rituxan用于治疗非何杰氏恶性淋巴瘤^[78]。1985年，Smith G P利用噬菌体抗体库技术获得人源性抗体，操作简便但抗体的多样性受限^[79]。1994年核糖体展示技术出现，该技术在体外将基因型与表型联系在一起可以获得特异性和亲和力高得抗体，但是操作繁琐，库容量受限^[80]。转基因小鼠制备全人抗体技术改善了鼠源性，但由于转基因小鼠的基因片段小，在抗体应答时略显不足^[81]。小分子单克隆抗体，该类单抗由于相对分子质量小，没有免疫原性，只有通过大分子物质进行偶联，获得人工抗原进行免疫进

而产生抗体^[82]。单克隆抗体在传染病和内分泌性疾病等诊断方面应用较广，由于其特异性强和易于标准化^[83]。纳米抗体可融且高度稳定，通过连接造影剂进行疾病诊断，可以口服调节免疫功能，还可以用于治疗肿瘤。近 20 年，抗肿瘤抗体药物是研究热点，虽然投入成本高，耗时长，但该方法依旧是治疗癌症最成功的方法之一^[84]。

3 研究目的与意义

家禽育种工作的快速发展，鸡的生长速度和饲料转化率等性能得到了大幅度的提高，同时也带来了许多问题。其中 TD 主要引起家禽胫骨软骨脆弱或骨折，采食减少，生长缓慢，给养禽业带来巨大损失。单克隆抗体技术已广泛于众多领域，作为标准化诊断试剂和免疫治疗试剂研发的主要技术手段。因此本研究将重组蛋白 Ex-FABP 作为免疫原免疫 6 周龄 SPF 级 BALB/C 小鼠，准备 SP2/0 骨髓瘤进行细胞融合试验，将阳性杂交瘤细胞进行亚克隆，获得杂交瘤细胞株并鉴定亚类。将获得的单克隆抗体进行辣根过氧化物酶的标记，初步建立双抗夹心 ELISA 方法检测血清中 Ex-FABP。通过 Western Blot 试验鉴定血清中 Ex-FABP，比较成像条带的大小与 ELISA 数值的相关性。用从湖北和山西各地收集的血清样品验证双抗夹心 ELISA 检测效果，这将为临床上检测 EX-FABP 提供较为快捷便利的技术方法，为后期更好的研究 Ex-FABP 奠定基础。

第一章 鸡细胞外脂肪酸结合蛋白单克隆抗体的制备

1 材料

1.1 主要仪器设备及耗材

二氧化碳培养箱：产品型号 ICO 150med, MEMMERT;

倒置显微镜：产品型号 XD-202, 江南;

电子分析天平：产品型号 Y9600, 上海精密科仪表有限公司;

台式冷冻离心机：产品型号 CT15RE, 日本日立;

高速冷冻离心机：产品型号 Eppendorf 5810R, 德国 Eppendorf;

细胞培养板：购自 Costar 公司;

摇床：产品型号 SK-O180-E, 北京大龙;

电热恒温培养箱：产品型号 DNP-9162, 上海精宏;

微量移液器：购自 eppendorf 公司;

多功能酶标仪：产品型号 Spark 10M, TECAN;

超微量分光光度计：产品型号 DS-11, 美国-Denovix;

高压细胞破碎机：产品型号 AH-1500, 加拿大-AT;

小型垂直电泳槽：产品型号 552BR131382, 美国 BIO-RAD;

凝胶成像系统：产品型号 GelDoc XR+, 美国 BIO-RAD。

1.2 主要试剂

本试验中的弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、50 倍 HAT 储存液、50 倍 HT 储存液、HRP-羊抗鼠 IgG 酶标二抗、IgG 抗体亚类试剂盒、PEG1500、淋巴细胞分离液等购自 SIGMA 公司; HyClone RPMI 1640 培养基、青霉素链霉素双抗溶液和马血清购自海克隆公司; 胎牛血清购自北京博奥龙公司; TMB Peroxidase Substrate Kit 购自 KPL 公司; 0.22 μm 、0.45 μm 过滤器购自 Millex; 重组蛋白 Ex-FABP 为本实验室保存; 其余分析纯化学试剂购自国药集团化学试剂有限公司和上海沪试实验室器材股份有限公司。

本试验中使用的试剂及配制方法为:

①包被液: pH 9.6 碳酸盐缓冲液

Na₂CO₂ 1.59 g

NaHCO₃ 2.93 g

蒸馏水定容至 1000 mL

②PBS: pH 7.4 0.01 M

NaCl 8.0 g

KH₂PO₄ 2.93 g

蒸馏水定容至 1000 mL

③洗涤液: PBST pH 7.4

NaCl 8.0 g

KH₂PO₄ 2.93 g

Tween-20 0.5 mL

蒸馏水定容至 1000 mL

④CB 缓冲液: 0.05 M

Na₂CO₂ 3.18 g

NaHCO₃ 5.88 g

超纯定容至 2000 mL

⑤PB 缓冲液: 20 MM pH 7.4

Na₂HPO₄ ·12 H₂O 7.16 g

Na₂HPO₄ 2.84 g

NaH₂PO₄ 3.12 g

NaH₂PO₄ 2 H₂O 4.01 g

超纯水 2000 mL

⑥考马斯亮蓝溶液:

考马斯亮蓝 R250 1 g

异丙醇 250 mL

配好的溶液混匀后过滤。

⑦脱色液:

乙醇 50 mL

冰醋酸 1000 ml

⑧10×SDS 缓冲液:

SDS 100 g

蒸馏水定容至 1000 mL

⑨饱和硫酸铵溶液：pH 7.2

(NH₄)₂SO₄ 900 g

双蒸水定容至 1000 mL

水浴加热溶解后趁热用滤纸过滤，用 25%氨水调 pH。

1.3 实验动物

本试验中使用的 6-8 周龄雌性 SPF 级 BALB/C 小鼠和昆明鼠由华中农业大学实验动物中心提供。

2 试验方法

2.0 重组蛋白 Ex-FABP 的表达与纯化

将实验室构建的重组大肠杆菌，接种到添加有 Kana 的 LB 固体培养皿中，37℃ 培养 12~14 h。次日挑取培养皿内的单菌落，转入含有 Kana 的 LB 液体培养基中，置于摇床培养 14 h。随后按 1:100 的体积比把菌液转到 LB 培养液中，同等条件培养 3 h，期间测 OD 值，数值为 0.4~0.7 时，加入 IPTG，按一定的比例加入 IPTG，诱导培养 21 h。接着在 4℃ 离心机离心洗菌，获得菌体。先将菌体用 0.22 μm 的滤器过滤，然后用高压细胞破碎机进行菌体破碎，循环破碎至菌体澄清透亮即可。获得的液体进行离心取分离的上清，课题组前期摸索已知蛋白存在于上清，收集上清，采用亲和层析法纯化蛋白，组装柱平衡，缓慢上蛋白样品，按梯度加入洗脱液，收集洗脱下来的目的蛋白。将目的蛋白 Ex-FABP 加入灭菌 1.5 mL 离心管，备用。准备聚丙烯酰胺凝胶电泳试验分析目的蛋白 Ex-FABP。提前拿出梳子、1.0 的长玻璃板、跑胶架、密封条和电泳槽用蒸馏水洗净，自然干燥后组装玻璃板，加满蒸馏水检漏。先配制 12% 分离胶，加入蒸馏水进行液封，直至出现一条明显的分界线时配制 5% 浓缩胶，立即平直迅速插入梳子，室温静置待凝胶后准备加样。取出装有目的蛋白 Ex-FABP 的灭菌 1.5 mL 离心管，加入蛋白上样缓冲液，振荡混匀，顺离后煮样 10 min。取 20 μL 进行上样，恒压 100V 电泳 1.5 h，当溴酚蓝快跑至蛋白电泳凝胶底面时，关掉电泳仪。取出蛋白电泳凝胶，用切胶板切掉多余的蛋白电泳凝胶，放入装有考马斯亮蓝溶液的染胶盒中在摇床上进行染色 2 h，回收考马斯亮蓝染色液，蒸馏水冲洗蛋白电泳凝胶，然后再加入脱色液，置于摇床上慢速度脱色，期间间隔几小时换脱色液，脱色过夜。换掉脱色液，用蒸馏水冲洗几遍，将蛋白

电泳凝胶置于 GelDoc XR+凝胶成像系统, 通过 Image Lab 软件对蛋白电泳凝胶样品进行全自动图像采集, 然后进行分析。

2.1 BALB/C 小鼠免疫程序

重组鸡 EX-FABP 纯化蛋白用 0.01 M pH 7.4 的 PBS 作适当稀释, 与弗氏完全佐剂等体积混合后, 充分乳化, 按 100 μg /只 (0.2 mL/只) 的抗原量经背部皮下多点注射 6 周龄 BALB/c 雌性小鼠 3 只; 两周后, 再经背部皮下多点注射用弗氏不完全佐剂处理的同一剂量抗原, 以后每隔两周重复免疫一次, 均经背部皮下多点注射, 免疫剂量不变。第三次免疫后的第 7 天进行小鼠尾静脉采血测抗体效价, 采用间接 ELISA 法, 合格后加强免疫抗原量为 200 μg /只, 3~4 天后取其脾脏进行融合。

2.2 SP2/0 骨髓瘤细胞的复苏及培养

提前准备水浴锅温度调至 37 $^{\circ}\text{C}$, 配好含 20%胎牛血清、1%双抗的 HyClone RPMI 1640 的完全培养基。迅速取出液氮罐内的 SP2/0 骨髓瘤细胞冻存管, 用止血钳夹住冻存管在预热好的水浴锅中速溶, 在超净工作台内无菌操作, 将冻存管内细胞悬液移至 15 mL 无菌离心管, 加入基础培养基 RPMI 1640 10 mL, 离心 1 000 rpm, 10 min。离心结束后取出离心管倒去基础培养基, 加入完全培养基吹匀, 进行培养并传代, 冻存数批以备, 复苏后的骨髓瘤细胞选用在对数生长期进行融合。

2.3 饲养细胞的制备

融合前一天取未经免疫的 SPF BALB/c 小鼠 1 只, 用摘眼球法采血, 分离阴性血清, 然后拉颈致死, 随后浸泡于 75%酒精小盆 3~5 min 后, 固定在泡沫板上, 用灭菌剪刀和镊子无菌操作在腹部剪开一个小口, 钝性分离暴露腹部皮肤且不伤及腹膜, 然后用镊子提起腹膜, 用 10 mL 注射器吸取约 10 mL 含 20%胎牛血清 HAT 培养基注入小鼠腹腔中, 用左手拇指和食指隔着酒精棉轻揉腹腔几分钟, 再用留置在鼠腹膜上的注射器吸出含饲养细胞的培养液, 反复几次, 进行细胞计数, 然后调整 HAT 培养基。用 Eppendorf 12 道微量移液器, 吸 100 μL 含均匀细胞数量的 HAT 培养基移入 96 孔细胞培养板, 做好标记放入 5%CO₂ 培养箱中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。

2.4 免疫脾细胞的准备

取一只加强免疫的 BALB/c 小鼠, 摘眼球采血, 分离阳性血清冻存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用, 颈

椎脱臼处死小鼠浸泡在 75%酒精 3~5 min, 移入超净工作台, 用灭菌镊子提起腹部皮肤, 再小心剪开腹部皮肤和腹膜, 取出脾脏至于平皿中, 加入少量 1640 完全培养基漂洗 2~3 次, 并仔细去除脾脏周围的结缔组织, 然后放入另一含有少量 HyClone RPMI 1640 完全培养基的研磨器内, 用研磨器轻轻将脾细胞压出尽量减少对脾细胞的损伤, 用 5 mL 移液器移出上清至 50 mL 灭菌离心管, 1 000 rpm 离心 10 min, 用基础培养基重悬细胞, 最后用台盼蓝进行细胞计数。

2.5 融合分装

将脾细胞和 SP2/0 细胞按 5:1 的比例加入到 50 mL 离心管中, 1 200 rpm, 离心 5 min, 倾弃上清液, 并用手掌轻击管底, 使细胞松散并混合均匀呈泥状, 然后在 37°C 水浴中边转动边加入 50%PEG-1500 1 mL, 在 45 s 内加完, 再用 5 mL 吸管在 90 s 内加入 20~30 mL 预热的 HyClone RPMI 1640 培养基, 室温静置 10 min 后, 1 500 rpm 离心 5 min, 倾弃上清液, 加入少量含 20%胎牛血清 HAT 培养基, 轻轻吹吸数次, 使细胞团块分散, 然后加入 80~100 mL 含 20%胎牛血清 HAT 培养基, 按 96 孔板 0.1~0.15 mL/孔进行分装, 放于 37°C 5%CO₂ 培养箱中进行培养。

2.6 筛选

2.6.1 初次检测

在融合后的第 4 天观察细胞状态, 一周左右半换液, 换含 20%胎牛血清的 HAT 培养基, 当杂交瘤细胞长至孔底 1/3~1/2 时, 用建立的间接 ELISA 方法检测融合细胞上清液中抗体, 根据融合时获得的阴阳性血清进行方阵实验。在筛选前通过方阵确定测抗体效价的间接 ELISA 的最佳抗原和二抗的工作浓度。Ex-FABP 为检测抗原, 包被工作浓度为由上至下由 1:100 开始每孔 100 μ L, 倍比 8 行, 4°C 过夜, 拍干酶标板, 在每孔加入 200 μ L 的 0.5%BSA, 置于 37°C 封闭 2 h, 取出酶标板用 PBST 洗 4 遍, 分别加入阳性血清和阴性血清, 每孔 100 μ L, 置于 37°C, 反应 30 min, 用 PBST 洗 4 遍, 加入商品鼠二抗试剂从左至右由 1:250 开始每孔 100 μ L, 倍比 6 列, 置于 37°C, 反应 30 min, 用 PBST 洗 4 遍, 每孔加入 100 μ L 的 TMB 底物显色液, 在室温反应 15 min, 加入终止液, 然后测定 OD₄₅₀ 读值。初次检测时用纯化的 Ex-FABP 和同样载体表达的 GSTA3 抗原同时包被酶标板按最佳稀释度包被酶标板, 用两种不同的抗原包被酶标板进行鉴别检测, 以区分针对 Ex-FABP 和同样载体的蛋白, 避免产生假阳性孔的问题。检测每个杂

交瘤孔上清液，初检阴性孔予以淘汰，阳性孔及可疑阳性孔进行二次检测。

2.6.2 杂交瘤细胞克隆化及扩增

将筛选获得的阳性的杂交瘤细胞孔用微量移液器吹起细胞集落，混匀后移入 48 孔细胞板扩增培养。待 48 孔细胞板长满后，吹起细胞集落在 96 孔细胞板以有限稀释法进行克隆化，随即在每孔加入准备好的 100 μL 饲养细胞，做好标记置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中进行培养，并将剩余的 48 孔细胞进行扩大培养冻存。观察细胞状态进行筛选、克隆化，经 3~4 次的克隆化且逐步将含 20%胎牛血清 HT 培养基更换为含 20%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基，对克隆化的细胞进行检查，均为阳性的即可确定为获得分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

2.7 细胞冻存

冻存获得的分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。将长势及形态良好的细胞用移液枪轻轻的吹起细胞集落，移至离心管，1 000 r/min，离心 10 min，配置细胞冻存液含 90%胎牛血清和 10% DMSO，用细胞冻存液重悬细胞，分装到细胞冻存管中，做好标记，先将细胞冻存盒置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱后转至-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱，最后保存置于液氮罐。

2.8 抗体亚类的鉴定

采用 SIGMA 抗体亚类鉴定试剂盒，将试剂盒内的 6 个亚类(IgA、IgM、IgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG₃)分别按每孔 100 μL (1:1 000 用 0.01 M PBS, pH 7.4 稀释) 进行包被，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ ，静置 1 h。弃包被液加入洗涤液进行洗涤，洗板三次，加入待检细胞上清 100 μL ，室温放置 1 h，重复洗板 3 次，拍干净液体，然后加入鼠二抗 100 μL (1:6 000 用 0.01 M PBS, pH 7.4 稀释)，室温放置 30 min 反应，重复洗板 3 次。拍干净液体。加入底物显色液 KPL 100 μL ，避光反应 10~15 min，加入 50 μL 终止液终止反应，然后放入 Spark 10M 酶标仪，选择 OD₄₅₀ 进行读值，保存数据。

2.9 腹水的制备

提前 1 周准备好 6-8 周龄雌性的 Balb/C 小鼠，每只腹腔注射 0.5 mL 液体石蜡。待细胞板孔内的细胞长满，用移液枪轻轻吹起细胞集落，1 000 r/min，离心 10 min。每只

小鼠接种 0.5 mL 细胞悬液，每天观察小鼠状态，待小鼠腹部隆起如乒乓球大小时，准备收腹水。第一次收集腹水在超净工作台进行，用酒精棉对小鼠的下腹部进行消毒，用 10 mL 注射器针头刺入下腹部，收集腹水，1 000 r/min 离心 10 min，上清就是腹水，放入-20℃冻存，下部的沉淀是腹水细胞，通过淋巴细胞分离液进行腹水细胞的分离，分离的腹水细胞用细胞冻存液分装标记放入液氮罐冻存。待小鼠腹部再次隆起继续收腹水，一般一只小鼠可收集 2~4 次腹水。将所有腹水收集完毕后，取出部分腹水按照建立好的间接 ELISA 测其效价，将 5 个腹水从 1:100 开始，每孔 100 μ L 由上至下倍比稀释 16 个孔，将收集的阴性血清作为阴性对照，倍比稀释，酶标仪读数，当 P/N 值大于 2.1 时的稀释倍数，可认为是腹水的效价。

3 结果

3.1 抗原的制备

重组蛋白 Ex-FABP 纯化后，用超微量分光光度计检测含量结果：0.94 mg/mL。

通过 SDS-PAGE 分析诱导纯化后的重组蛋白 Ex-FABP，获得与预期相符的目的条带，蛋白大小为 24 kDa 左右，说明成功表达重组蛋白，图 1 如下：

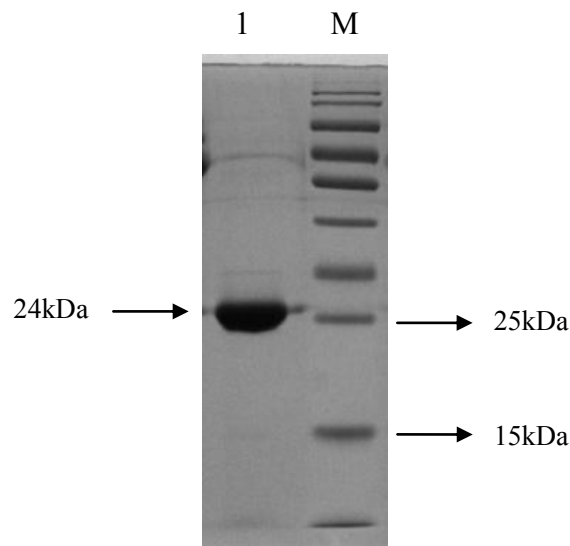


图 1 纯化重组蛋白 Ex-FABP 的 SDS-PAGE 鉴定

M: 蛋白分子量标准品；1: 纯化重组蛋白 Ex-FABP

Fig 1 Identification of SDS-PAGE of purified protein Ex-FABP

M:Protein marker; 1: purified protein of Ex-FABP

3.2 融合前测效价结果

ELISA 方法检测抗体水平,检测抗原包被浓度为1:3 200,鼠二抗工作浓度为1:1 000,结果见表 1 显示 3 号小鼠效价为 1:25 600 高于其他 2 只小鼠,选择 3 号小鼠进行细胞融合。

表 1 测抗体效价结果
Table 1 Detection of antibody titers

1 号 Number 1		2 号 Number 2		3 号 Number 3		阴性对照 Negative control	
1.311	0.957	1.421	1.091	1.572	1.083	0.050	0.049
1.358	0.742	1.434	0.925	1.493	0.963	0.053	0.044
1.415	0.578	1.372	0.745	1.408	0.700	0.0554	0.046
1.428	0.448	1.395	0.555	1.431	0.548	0.047	0.045
1.346	0.323	1.360	0.375	1.361	0.386	0.051	0.050
1.253	0.266	1.280	0.272	1.409	0.261	0.059	0.052
1.120	0.212	1.184	0.173	1.227	0.164	0.048	0.050
1.045	0.245	1.045	0.124	1.044	0.147	0.048	0.048

3.3 融合筛选结果

融合的杂交瘤细胞经过 2 次筛选,融合率在 95% 以上,在五块细胞板中,每块挑选 3 个最高值进行有限稀释法克隆细胞,经过 3~4 次亚克隆,筛选均为阳性的可定株。

3.4 抗体亚类鉴定结果

五株单克隆抗体细胞株 5B7、4E4、5D12、1H6 和 4B2 亚类鉴定其中 IgG₁ 的数值明显高于其它亚类,因此鉴定结果均为 IgG₁,结果见表 2。

表 2 亚类鉴定结果

Table 2 Subclass identification results

细胞株 Cell line	Ig _M	Ig _A	IgG _{2α}	IgG ₁	IgG _{2b}	IgG ₃
5B7	0.170	0.097	0.158	0.598	0.129	0.093
4E4	0.141	0.076	0.145	0.589	0.108	0.075
5D12	0.102	0.0622	0.088	0.603	0.086	0.063
1H6	0.489	0.087	0.207	0.600	0.140	0.088
4B2	0.092	0.059	0.091	0.523	0.078	0.068

3.5 腹水检测效价结果

根据表格可知 4E4 细胞株较其他几株细胞耐稀释，腹水效价高达 $1:10^{11}$ ，见表 3。

表 3 腹水检测结果

Table 3 Results of ascites test

5D12		4E4		5B7		1H6		4B2		阴性对照血清 Negative control serum	
1.842	0.950	1.517	1.457	1.762	0.531	1.572	0.691	2.005	0.508	0.083	0.096
1.725	0.656	1.438	1.086	1.574	0.308	1.495	0.420	1.854	0.303	0.083	0.111
1.623	0.445	1.459	0.924	1.563	0.207	1.593	0.282	1.773	0.206	0.078	0.084
1.589	0.298	1.521	0.705	1.470	0.151	1.498	0.195	1.775	0.138	0.092	0.090
1.588	0.200	1.489	0.479	1.313	0.117	1.455	0.124	1.597	0.110	0.076	0.086
1.571	0.146	1.506	0.325	1.173	0.099	1.335	0.116	1.270	0.103	0.076	0.074
1.424	0.113	1.546	0.227	0.941	0.089	1.115	0.101	0.935	0.091	0.080	0.082
1.207	0.108	1.506	0.180	0.707	0.094	0.830	0.097	0.768	0.083	0.090	0.075

第二章 Ex-FABP 双抗夹心试剂盒方法的初步建立

1 材料

1.1 主要仪器设备及耗材

烧杯、醋酸钠、辛酸、饱和硫酸铵、Tris-HCl 缓冲液、辣根过氧化物酶、pH 计、透析袋、封口夹、磁力搅拌器、转子，辣根过氧化物酶购自 SIGMA 公司；酶标板购自深圳市金灿华实业有限公司；双圈定性滤纸购自杭州沃华滤纸有限公司；牛血清白蛋白(组分 V)购自武汉科瑞生物技术有限公司；马血清购自 HyClone 公司；通蔚双抗夹心 ELISA 试剂盒；血清稀释液购自山东济南百迪泰生物有限公司；湖北荆州血清样品、山西忻州血清样品及实验室动物实验的血清样品。

2 方法

2.1 腹水的纯化及辣根过氧化物酶的标记

腹水分别取 3mL 腹水置于烧杯中，加入 4 倍体积的醋酸钠 (pH 4.8)，在磁力搅拌器下搅拌均匀，随后缓慢加入辛酸（按照每毫升腹水加入 25 μ L 辛酸）搅拌 30 min，然后 5000 rpm 离心 10 min，留下上清，吸取上清用滤纸过滤，然后调其 pH 为 7.2，接着加入 pH 7.2 的饱和硫酸铵，沉淀 30 min，然后在 12 000rpm 离心 30 min，留下离心管内的沉淀，根据沉淀的大小吸取适量 Tris-HCl 重悬沉淀，封闭好透析袋，放置于 10mmol Tris 缓冲液内，置于 4 $^{\circ}$ C 透析，每日更换缓冲液 3 次，待透析两天后收抗体，用超微量分光光度计检测浓度分装小管，放入 -20 $^{\circ}$ C 冻存备用。

分别取 5 mg 辣根过氧化物酶溶于 5 mL 超纯水变为棕红色反应，加 0.5 mL NaIO₄ 反应溶液呈现草绿色，在 4 $^{\circ}$ C 作用 30 min，加入 0.16 mol/L 乙二醇 0.5 mL 终止反应，室温避光反应 30 min。然后加入纯化好的腹水抗体 1 mL，分装入透析袋，封好口，置于 CB 缓冲液中，放于 4 $^{\circ}$ C 透析过夜。第二天取出透析袋，吸出液体，加入 NaBH₄ 0.2 mL，在 4 $^{\circ}$ C 反应 2 h，然后加入等体积的 pH 7.2 的饱和硫酸铵，在 4 $^{\circ}$ C 反应 30 min，随后吸取

液体移入离心管 12 000 rpm 离心 10 min，弃掉上清，配置 20 MM pH 7.4 的 PB 溶液，根据沉淀大小，吸取适量 PB 溶液重悬沉淀，将悬液移入透析袋封闭好，置于 PB 溶液环境下透析过夜。第二天吸出液体，分装标记好，放入 -20℃ 冻存备用。

2.2 双抗体夹心 ELISA 流程

(1) 包被工作浓度的单抗每孔 100 μL ，置于 4℃ 包被过夜，取出酶标板加入 PBST 洗涤液洗板 5 次拍干。

(2) 封闭液封闭酶标板封闭酶标板，37℃ 封闭 2 h，取出酶标板加入 PBST 洗涤液洗板 5 次拍干。

(3) 每孔加入血清样品，设立阴性对照，每孔 100 μL ，放入 37℃ 反应 30 min，取出酶标板加入 PBST 洗涤液洗板 5 次拍干。

(4) 每孔加入工作浓度的酶标抗体 100 μL ，37℃ 反应 30 min，取出酶标板加入 PBST 洗涤液洗板 5 次拍干。

(5) 取出反应板，每孔加入 KPL 底物反应显色液 100 μL ，避光室温反应 10~15 min。

(6) 加入终止液 50 μL 终止反应，立即放入酶标仪 OD₄₅₀ 读数。

2.3 组合反应选择合适的单抗及酶标抗体

取出纯化的 5 株腹水抗体和 5 管酶标抗体，用超微量分光光度计测其浓度，从上往下包被 5 株腹水抗体 5 列每孔 100 μL 置于 4℃ 过夜，加入 PBST 洗涤液洗板 5 次拍干。用含 0.5% BSA 的 PBS 溶液封闭酶标板，37℃ 封闭 2 h，取出酶标板加入 PBST 洗涤液洗板 5 次拍干。加入重组蛋白 Ex-FABP，每孔加入饱和浓度 100 μL ，设置相应的阴性对照孔 100 μL /孔，37℃ 反应 30 min，加入 PBST 洗涤液洗板 5 次拍干。从左往右分别加入参照商品推荐的二抗浓度 100 μL 加入酶标板孔，37℃ 反应 30 min，加入 PBST 洗涤液洗板 5 次拍干。每孔加入 KPL 底物反应显色液 100 μL ，避光室温反应 10~15 min。加入 50 μL 终止液终止反应，放入酶标仪 450 nm 测定 OD 值。根据 OD 值选出比较合适的单抗和辣根过氧化物酶标记的抗体反应组合，继续优化条件。

2.4 确定包被时间

将选出的单抗和酶标抗体反应组合，选择饱和溶度包被，分别置于 4℃ 过夜和 37℃ 2 h，加入 PBST 洗涤液洗板 5 次拍干。用含 0.5% BSA 的 PBS 溶液封闭酶标板，37℃ 封

闭 2 h, 取出酶标板加入 PBST 洗涤液洗板 5 次拍干。加入重组蛋白 Ex-FABP, 每孔加入饱和浓度 100 μL , 设置相应的阴性对照孔 100 μL /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min, 加入 PBST 洗涤液洗板 5 次拍干。从左往右分别加入参照商品推荐的二抗浓度 100 μL 加入酶标板孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min, 加入 PBST 洗涤液洗板 5 次拍干。每孔加入 KPL 底物反应显色液 100 μL , 避光室温反应 10~15min。加入 50 μL 终止液终止反应, 放入酶标仪 450nm 测定 OD 值。根据 P/N 值选出比较合适的包被时间, 继续优化条件。

2.5 封闭液的选择

将选出的单抗和酶标抗体反应组合, 选择饱和溶度包被, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 加入 PBST 洗涤液洗板 5 次拍干。分别加入含 0.5% BSA 的 PBS 溶液、含 10% 马血清的 PBS 缓冲液和含 10% 马血清的白板稀释液(保密配方), 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h, 取出酶标板加入 PBST 洗涤液洗板 5 次拍干。加入重组蛋白 Ex-FABP, 每孔加入饱和浓度 100 μL , 设置相应的阴性对照孔 100 μL /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min, 加入 PBST 洗涤液洗板 5 次拍干。从左往右分别加入参照商品推荐的二抗浓度 100 μL 加入酶标板孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min, 加入 PBST 洗涤液洗板 5 次拍干。每孔加入 KPL 底物反应显色液 100 μL , 避光室温反应 10~15 min。加入 50 μL 终止液终止反应, 放入酶标仪 450 nm 测定 OD 值。根据 P/N 值选出比较合适的封闭液, 继续优化条件。

2.6 确定抗体及辣根过氧化物酶标记的抗体的工作浓度

将选出的单抗和酶标抗体反应组合分别进行方阵试验, 流程如下:

(1) 用包被液稀释单抗从上往下 1:500 开始每孔 100 μL 倍比稀释一行, 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜, 取出酶标板加入 PBST 洗涤液洗板 5 次拍干。

(2) 用含 10% 马血清的白板稀释液封闭酶标板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h, 取出酶标板加入 PBST 洗涤液洗板 5 次拍干。

(3) 加入饱和工作浓度的重组蛋白 Ex-FABP 100 μL , 设立阴性对照, 每孔加入 100 μL 的 PBS 缓冲液, 放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min, 取出酶标板加入 PBST 洗涤液洗板 5 次拍干。

(4) 从左往右分别加入辣根过氧化物酶标记的抗体 1:500 倍开始倍比稀释 6 行, 稀释液采用的 PBS 缓冲液, 每孔 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min, 取出酶标板加入 PBST 洗涤液洗板 5 次拍干。

(5) 取出反应板, 每孔加入 KPL 底物反应显色液 100 μL , 避光室温反应 10~15 min。

(6) 加入终止液 50 μL 终止反应，立即放入酶标仪 OD_{450} 读数。

(7) 根据 P/N 值选出比较合适的抗体及辣根过氧化物酶标记的抗体的工作浓度，继续优化条件。

2.7 确定样品稀释倍数试验

(1) 包被工作浓度的单抗每孔 100 μL ，置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜，取出酶标板加入 PBST 洗涤液洗板 5 次拍干。

(2) 用含 10% 马血清的白板稀释液封闭酶标板，37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h，取出酶标板加入 PBST 洗涤液洗板 5 次拍干。

(3) 将血清样品根据文献及相关试剂盒的说明书，依次按照 50 μL 血清原液、2 倍样品稀释液稀释、5 倍样品稀释液稀释及 1:500 倍样品稀释液稀释。样品稀释液分别为：通蔚试剂盒的样品稀释液、济南百迪泰血清稀释液和含 0.5% BSA 的 PBS 缓冲液进行稀释血清样品。设立阴性对照，每孔加入 100 μL 的对照血清，放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min，取出酶标板加入 PBST 洗涤液洗板 5 次拍干。

(4) 分别加入工作浓度的酶标抗体每孔 100 μL ，37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min，取出酶标板加入 PBST 洗涤液洗板 5 次拍干。

(5) 取出反应板，每孔加入 KPL 底物反应显色液 100 μL ，避光室温反应 10~15 min。

(6) 加入终止液 50 μL 终止反应，立即放入酶标仪 OD_{450} 读数。

(7) 根据 P/N 值选出比较合适的样品稀释倍数，继续优化条件。

2.8 确定底物显色液时间的试验

(1) 包被工作浓度的单抗每孔 100 μL ，置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜，取出酶标板加入 PBST 洗涤液洗板 5 次拍干。

(2) 用含 10% 马血清的白板稀释液封闭酶标板，37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h，取出酶标板加入 PBST 洗涤液洗板 5 次拍干。

(3) 加入血清样品每孔 100 μL 。设立阴性对照，每孔加入 100 μL 的对照血清，放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min，取出酶标板加入 PBST 洗涤液洗板 5 次拍干。

(4) 分别加入工作浓度的酶标抗体每孔 100 μL ，37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min，取出酶标板加入 PBST 洗涤液洗板 5 次拍干。

(5) 取出反应板，每孔加入 KPL 底物反应显色液 100 μL ，避光室温反应时间分别为

10 min、13 min、15 min、17 min、25 min。

(6) 加入终止液 50 μL 终止反应，立即放入酶标仪 OD_{450} 读数。

(7) 根据 P/N 值选出比较合适的底物显色液反应时间。

2.9 临床样品的检查

将从湖北荆州、山西忻州及实验室 TD 动物模型注射 EX-FABP 动物试验血清样品及其他动物实验采集的血清共 1688 份，用建好的双抗体夹心 ELISA 进行检测。

3 结果

3.1 腹水纯化的结果

经超微量分光光度计检测，5B7 浓度为 5.531mg/mL、4E4 浓度为 9.452mg/mL、5D12 浓度为 8.864mg/mL、1H6 浓度为 1.740mg/mL 和 4B2 浓度为 2.400mg/mL。

3.2 组合反应选择合适的单抗及酶标抗体结果

将单抗和酶标抗体通过不同的组合，观察其不同的效果，根据 P/N 值选择 4E4 作为包被抗体，酶标抗体选择 HRP-5D12 和 HRP-1H6，结果见表 4:

表 4 组合试验结果

Table 4 Combined test results

单抗 酶标二抗		5B7	4E4	5D12	1H6	4B2
HRP-5B7 (1:2500)	P值	0.1577	0.2012	0.077	0.1103	0.0719
	N值	0.0417	0.0467	0.0429	0.0407	0.0409
	P/N值	3.782	4.308	1.794	2.710	1.758
HRP-4E4 (1:2500)	P值	0.1753	0.2296	0.082	0.1176	0.0688
	N值	0.0425	0.0498	0.0444	0.0421	0.0431
	P/N值	4.125	4.610	1.845	2.793	1.596
HRP-5D12 (1:2500)	P值	0.3051	0.3881	0.110	0.1868	0.1138
	N值	0.0439	0.0502	0.0496	0.0441	0.0458
	P/N值	6.950	7.731	2.216	4.236	2.485
HRP-1H6 (1:2500)	P值	0.3586	0.5233	0.1228	0.24	0.127
	N值	0.0504	0.0579	0.0486	0.0637	0.0721
	P/N值	7.115	9.038	2.527	3.768	1.761
HRP-4B2 (1:2500)	P值	0.1427	0.1747	0.0746	0.1094	0.0758
	N值	0.0612	0.0629	0.0623	0.068	0.0729
	P/N值	2.332	2.777	1.200	1.609	1.040

3.3 包被时间的确定

通过包被饱和和工作浓度的抗体,分别设置4℃包被过夜和37℃包被2 h,结果显示4℃过夜的 P/N 值较高,见表 5,因此选择4℃包被过夜。

表 5 包被时间的结果

Table 5 Result of coating time

封闭温度及时间 Closed temperature and time	4℃ 过夜 4 degrees overnight	37℃ 2 h 37 degrees 2 hours
P值	1.901	1.763
N值	0.225	0.355
P/N值	8.449	4.966

3.4 封闭液的选择

通过包被饱和和工作浓度的抗体,置于4℃过夜,分别加入含0.5%BSA的PBS溶液、

含 10%马血清的 PBS 缓冲液和含 10%马血清的白板稀释液(保密配方), 37℃封闭 2h, 由表可见选择含 10%马血清的白板稀释液进行封闭酶标板时将对照数值降低, 结果见表 6。

表 6 不同封闭液的反应结果

Table 6 Reaction results of different blocking solutions

	0.5%BSA 0.5%BSA	10%马血清PBS稀释液 10% horse serum PBS dilution	10%马血清二倍白稀释液 10% horse serum double white dilution
P	0.6185	0.8326	1.1489
N	0.3914	0.4239	0.0815
P/N值	1.580	1.964	14.097

3.5 抗体及辣根过氧化物酶标记的抗体的工作浓度的结果

由于最终样品为血清, 因为动物试验血清数量的原因, 先用重组蛋白作为样品通过方阵试验, 见表 7, 根据计算 P/N 值, 确定一个大概范围的单抗和辣根过氧化物酶标记抗体的工作浓度, 通过比较 P/N 值, 舍去包被抗体为 4E4, 辣根过氧化物酶标记抗体为 1H6 的组合, 根据这个浓度, 再进行一个小梯度的方阵, 步骤同上。进行方阵试验发现当样品为血清时, 方阵的数值出现波浪式的高低变化, 通过重复 2 次该实验, 发现问题一致, 通过实验发现用 PBS 缓冲液进行稀释不可行, 改用二抗保护剂(保密配方)进行稀释辣根过氧化物酶标记的抗体, 结果显示消除了非特异性的现象, 最终根据重组蛋白和血清样品滴定方阵的结果选择单抗的稀释浓度为 9.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 辣根过氧化物酶标记的抗体稀释倍数为 1:2 000, 见表 8。

表 7 重组蛋白方阵滴定结果

Table 7 Result of recombinant protein square array titration

		1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000
19 μ g/mL	P 值	1.798	1.217	0.629	0.362	0.214	0.128
	N 值	0.382	0.265	0.250	0.143	0.108	0.090
	P/N 值	4.705	4.589	2.516	2.541	1.979	1.420
9.5 μ g/mL	P 值	2.086	1.261	0.722	0.416	0.278	0.174
	N 值	0.478	0.340	0.229	0.166	0.116	0.097
	P/N 值	4.365	3.703	3.149	2.502	2.392	1.799
4.75 μ g/mL	P 值	1.710	1.247	0.692	0.419	0.228	0.139
	N 值	0.386	0.251	0.184	0.124	0.089	0.082
	P/N 值	4.429	4.964	3.766	3.392	2.552	1.702
2.375 μ g/mL	P 值	1.334	0.892	0.520	0.398	0.225	0.130
	N 值	0.469	0.263	0.184	0.150	0.089	0.081
	P/N 值	2.842	3.396	2.830	2.655	2.543	1.610
1.19 μ g/mL	P 值	0.897	0.545	0.332	0.232	0.158	0.123
	N 值	0.412	0.264	0.193	0.197	0.095	0.078
	P/N 值	2.174	2.066	1.725	1.177	1.660	1.579
0.593 μ g/mL	P 值	0.683	0.402	0.257	0.175	0.111	0.086
	N 值	0.452	0.317	0.202	0.129	0.100	0.078
	P/N 值	1.511	1.268	1.272	1.357	1.116	1.102
0.300 μ g/mL	P 值	0.661	0.389	0.235	0.172	0.114	0.081
	N 值	0.484	0.306	0.214	0.141	0.093	0.080
	P/N 值	1.365	1.272	1.099	1.217	1.226	1.007
0.149 μ g/mL	P 值	0.882	0.416	0.352	0.248	0.145	0.126
	N 值	0.651	0.377	0.250	0.200	0.146	0.083
	P/N 值	1.355	1.104	1.407	1.245	0.990	1.509

表 8 血清样品方阵滴定结果

Table 8 The results of square array titration of serum samples

		1:1600	1:2000	1:2400
5.278 $\mu\text{g}/\text{mL}$	P值	0.6514	0.3914	0.3189
	N值	0.1008	0.0679	0.066
	P/N值	6.462	5.764	4.832
4.523 $\mu\text{g}/\text{mL}$	P值	0.5753	0.3972	0.3338
	N值	0.0847	0.0937	0.057
	P/N值	6.792	4.239	5.856
3.958 $\mu\text{g}/\text{mL}$	P值	0.4396	0.2959	0.2894
	N值	0.1015	0.0443	0.0345
	P/N值	4.331	6.679	8.388
3.516 $\mu\text{g}/\text{mL}$	P值	0.2972	0.2248	0.1753
	N值	0.0552	0.0483	0.0479
	P/N值	5.384	4.654	3.660
3.167 $\mu\text{g}/\text{mL}$	P值	0.4353	0.3498	0.3
	N值	0.0845	0.0427	0.0601
	P/N值	5.151	8.192	4.992

3.6 样品稀释结果

将单抗 1:2 000 包被酶标板，置于 4℃ 过夜；用含 10% 马血清的白板稀释液进行封闭酶标板，37℃ 封闭 2 h；将血清样品根据文献及相关试剂盒的说明书，依次按照 50 μL 血清原液、2 倍样品稀释液稀释、5 倍样品稀释液稀释、10 倍样品稀释液稀释及 1:500 倍样品稀释液稀释。样品稀释液分别为：通蔚试剂盒的样品稀释液、济南百迪泰血清稀释液和含 0.5% BSA 的 PBS 缓冲液进行稀释血清样品。结果利用实验室注射 Ex-FABP 重组蛋白收取的血清稀释实验可知，当血清样品为 50 μL 血清原液时 P/N 值最高，因此样品上样量为 50 μL 。

表 9 血清样品条件的确定

Table 9 Determination of serum sample conditions

P/N值 P/N value	0.5% BSA	齐鲁稀释液 Qilu diluent	通蔚稀释液 Tongwei diluent	50 μ L血清、 50 μ L serum	5倍稀释 5 times dilution	10倍稀释 10 times dilution	500倍稀释 500 times dilution
P值	0.0317	0.0119	0.4632	0.5886	0.1322	2.7614	0.0851
N值	0.0119	0.0393	0.1312	0.0536	0.0636	3.2195	0.0743
P/N值	2.664	0.303	3.530	10.981	2.079	0.858	1.145

3.7 底物显色液反应时间的确定

根据上面优化好的条件，操作双抗夹心 ELISA 试验，优化底物显色液反应时间，分别设为 10 min、13 min、15 min 和 17 min，见表可知最佳反应时间为 15min，见表 10。

表 10 底物显色液反应时间的确定

Table 10 Determination of Reaction Time of Substrate Chromogenic Solution

	10 min	13 min	15 min	17 min
P值	0.4825	0.538	0.5708	0.5894
N值	0.2333	0.2607	0.2667	0.2763
P/N值	2.068	2.064	2.140	2.133

3.8 临床样品检测结果

根据初步建好的双抗夹心 ELISA 方法检测来自湖北荆州、山西忻州以及实验室动物试验采集的血清，共 1688 份。根据 OD 值发现其中湖北荆州某种鸡场检出率为 19%，其他鸡场检出率为 2.3%；山西忻州鸡场检出率为 33.5%，其中忻州的血清样品中含有 439 份猪血清，其检出率为 21.7%，部分表格如下。

表 11 湖北鸡血清样品检测结果

Table 11 The detection results of Hubei Chicken serum samples

样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value
1	0.162	9	0.107	17	0.087	25	0.152	25	0.117	41	0.112
2	0.119	10	0.067	18	0.102	26	0.314	26	0.683	42	0.089
3	0.123	11	0.085	19	0.192	27	0.123	27	0.073	43	0.088
4	0.107	12	0.155	20	0.134	28	0.159	28	0.136	44	0.166
5	0.044	13	0.062	21	0.140	29	0.109	29	0.137	45	0.086
6	0.103	14	0.117	22	0.093	30	0.105	30	0.050	46	0.091
7	0.059	15	0.132	23	0.123	31	0.089	31	0.068	47	0.081
8	0.160	16	0.056	24	0.061	32	0.051	32	0.047	48	0.061

表 12 湖北鸡血清样品检测结果

Table 12 The detection results of Hubei Chicken serum samples

样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value
1	0.069	9	0.090	17	0.091	25	0.077	81	0.071	41	0.101
2	0.068	10	0.120	18	0.111	26	0.114	82	0.108	42	0.060
3	0.130	11	0.122	19	0.078	27	0.326	83	0.094	43	0.092
4	0.119	12	0.158	20	0.100	28	0.140	84	0.077	44	0.094
5	0.072	13	0.153	21	0.127	29	0.146	85	0.070	45	0.053
6	0.125	14	0.075	22	0.104	30	0.097	86	0.128	46	0.082
7	0.119	15	0.133	23	0.148	31	0.219	87	0.085	47	0.052
8	0.053	16	0.162	24	0.096	32	0.124	88	0.111	48	0.910

表 13 湖北鸡血清样品检测结果

Table 13 The detection results of Hubei Chicken serum samples

样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value
1	3.777	9	0.253	17	0.055	25	0.349	81	0.327	41	0.041
2	3.562	10	0.129	18	0.200	26	0.165	82	0.117	42	0.054
3	0.198	11	0.066	19	0.046	27	1.166	83	0.019	43	0.144
4	0.291	12	0.037	20	0.080	28	0.430	84	0.055	44	0.001
5	1.186	13	0.096	21	0.081	29	0.855	85	0.247	45	0.392
6	2.037	14	0.135	22	0.064	30	0.094	86	0.141	46	0.590
7	0.192	15	0.160	23	0.066	31	0.082	87	0.206	47	0.404
8	0.555	16	0.135	24	0.079	32	0.355	88	0.636	48	0.273

表 14 湖北鸡血清样品检测结果

Table 14 The detection results of Hubei Chicken serum samples

样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value
1	0.137	9	0.224	17	0.104	25	0.072	33	0.035	41	0.040
2	0.019	10	0.371	18	0.035	26	0.059	34	0.153	42	0.041
3	0.013	11	0.220	19	1.895	27	0.079	35	0.020	43	0.085
4	1.340	12	0.143	20	0.164	28	0.142	36	0.204	44	0.081
5	0.078	13	0.154	21	0.094	29	0.098	37	1.585	45	0.040
6	0.286	14	0.134	22	0.079	30	0.117	38	0.039	46	0.013
7	0.013	15	0.031	23	0.026	31	0.024	39	0.039	47	0.009
8	0.052	16	0.226	24	0.069	32	0.113	40	0.011	48	0.002

表 15 湖北鸡血清样品检测结果

Table 15 The detection results of Hubei Chicken serum samples

样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value
1	0.062	9	0.004	17	0.024	25	0.466	33	0.056	41	0.031
2	0.018	10	0.014	18	0.055	26	0.035	34	0.035	42	0.034
3	0.058	11	0.033	19	0.016	27	0.080	35	0.065	43	0.059
4	0.043	12	0.042	20	1.715	28	0.029	36	0.047	44	0.007
5	0.046	13	0.160	21	0.112	29	0.030	37	0.118	45	0.076
6	0.081	14	2.419	22	1.291	30	2.866	38	0.088	46	0.131
7	0.030	15	0.017	23	0.054	31	0.001	39	0.037	47	0.078
8	0.140	16	0.198	24	1.052	32	0.043	40	0.093	48	0.097

表 16 湖北鸡血清样品检测结果

Table 16 The detection results of Hubei Chicken serum samples

样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value
1	0.109	9	0.078	17	0.052	25	0.122	81	0.043	41	0.138
2	0.015	10	0.089	18	0.093	26	0.051	82	0.043	42	0.084
3	0.018	11	0.067	19	0.052	27	0.215	83	0.003	43	0.011
4	0.027	12	0.108	20	0.053	28	0.064	84	0.048	44	0.085
5	0.016	13	0.049	21	0.030	29	0.058	85	0.171	45	0.019
6	3.621	14	0.421	22	0.052	30	0.044	86	0.071	46	0.081
7	0.038	15	0.067	23	0.017	31	0.106	87	0.047	47	0.077
8	0.066	16	0.126	24	0.065	32	0.028	88	0.049	48	0.020

表 17 湖北鸡血清样品检测结果

Table 17 The detection results of Hubei Chicken serum samples

样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value
1	0.603	9	0.616	17	0.698	25	0.712	33	0.956	41	1.716
2	0.429	10	2.274	18	0.067	26	0.521	34	0.141	42	0.926
3	0.201	11	0.411	19	0.247	27	0.126	35	0.260	43	0.203
4	0.559	12	0.380	20	0.082	28	0.176	36	0.262	44	0.136
5	0.342	13	0.280	21	0.289	29	0.209	37	0.267	45	0.379
6	0.369	14	0.774	22	0.292	30	0.219	38	0.213	46	0.369
7	0.438	15	0.586	23	0.204	31	0.243	39	0.148	47	0.285
8	0.344	16	0.284	24	0.274	32	0.229	40	0.544	48	0.228

表 18 山西鸡血清样品检测结果

Table 18 The detection results of Shanxi Chicken serum samples

样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value
1	1.430	9	0.884	17	1.102	25	2.543	81	1.484	41	2.227
2	0.322	10	0.228	18	0.312	26	0.314	82	1.803	42	0.254
3	0.713	11	0.541	19	0.282	27	0.423	83	0.267	43	0.461
4	0.304	12	0.302	20	0.170	28	0.273	84	0.167	44	1.868
5	0.409	13	0.902	21	0.585	29	0.661	85	0.504	45	0.877
6	0.365	14	0.631	22	0.769	30	0.675	86	0.554	46	0.837
7	0.325	15	0.662	23	0.649	31	0.499	87	0.753	47	0.638
8	0.422	16	1.138	24	0.950	32	0.623	88	0.629	48	0.708

表 19 西鸡血清样品检测结果

Table 19 The detection results of Shanxi Chicken serum samples

样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value
1	0.347	9	0.475	17	0.268	25	0.558	81	0.296	41	0.554
2	0.264	10	0.338	18	0.400	26	0.213	82	0.234	42	0.228
3	0.392	11	0.647	19	0.410	27	0.199	83	0.254	43	0.277
4	0.300	12	0.289	20	0.319	28	1.203	84	0.252	44	3.694
5	0.326	13	0.911	21	0.223	29	0.298	85	0.301	45	0.213
6	0.296	14	0.402	22	0.449	30	0.284	86	0.304	46	0.403
7	0.392	15	0.347	23	0.260	31	0.286	87	0.289	47	0.129
8	0.356	16	0.458	24	0.757	32	0.295	88	0.396	48	0.352

表 20 山西鸡血清样品检测结果

Table 20 The detection results of Shanxi Chicken serum samples

样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value
1	0.333	9	0.454	17	0.345	25	0.313	33	0.550	41	0.598
2	0.634	10	0.393	18	0.877	26	0.242	34	0.238	42	0.240
3	0.371	11	0.266	19	0.640	27	0.228	35	0.340	43	0.243
4	0.223	12	0.634	20	0.619	28	0.310	36	0.844	44	0.397
5	0.284	13	0.270	21	0.376	29	1.472	37	0.524	45	0.460
6	0.468	14	0.593	22	1.284	30	0.334	38	0.221	46	0.434
7	0.618	15	0.241	23	0.219	31	0.762	39	0.175	47	0.562
8	0.299	16	0.300	24	0.573	32	1.179	40	0.251	48	0.507

表 21 山西鸡血清样品检测结果

Table 21 The detection results of Shanxi Chicken serum samples

样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value
1	0.700	9	0.419	17	0.530	25	0.202	81	0.372	41	0.412
2	2.874	10	0.441	18	0.407	26	0.179	82	0.197	42	0.297
3	0.283	11	0.208	19	0.359	27	0.400	83	0.465	43	0.238
4	0.848	12	0.325	20	0.690	28	0.187	84	0.169	44	0.546
5	0.367	13	0.371	17	0.440	25	0.306	85	0.265	41	0.378
6	0.341	14	0.309	18	1.043	26	0.348	86	0.169	42	0.533
7	0.483	15	0.572	19	0.610	27	0.279	87	0.247	43	0.156
8	1.008	16	0.437	20	0.244	28	0.237	88	0.293	44	0.277

表 22 山西鸡血清样品检测结果

Table 22 The detection results of Shanxi Chicken serum samples

样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value
1	0.309	9	0.335	17	0.092	25	0.998	33	0.127	41	0.235
2	0.126	10	0.206	18	0.111	26	0.245	34	0.204	42	0.123
3	0.178	11	0.156	19	0.155	27	0.297	35	2.560	43	0.143
4	0.177	12	0.244	20	0.264	28	0.100	36	0.118	44	0.793
5	0.106	13	0.454	21	0.089	29	0.124	37	0.150	45	0.265
6	0.167	14	0.257	22	0.189	30	0.164	38	0.240	46	0.181
7	0.146	15	0.268	23	0.144	31	0.157	39	0.292	47	0.449
8	0.193	16	0.257	24	0.170	32	0.201	40	0.174	48	0.499

表 23 山西猪血清样品检测结果

Table 23 The detection results of Shanxi Pig serum samples

样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value
49	0.259	9	0.147	17	0.229	25	0.279	81	0.043	41	0.065
1	0.209	10	0.290	18	0.266	26	0.162	82	0.100	42	0.188
2	0.202	11	0.130	19	0.115	27	0.137	83	0.108	43	0.130
3	0.137	12	0.117	20	0.063	28	0.306	84	0.127	44	0.124
4	0.153	13	0.171	21	0.125	29	0.099	85	0.167	45	0.186
5	0.204	14	1.131	22	0.549	30	0.288	86	0.081	46	0.074
6	0.243	15	0.098	23	0.062	31	0.126	87	0.510	47	0.418
7	0.317	16	0.502	24	0.184	32	0.104	88	0.226	48	0.447

表 24 山西猪血清样品检测结果

Table 24 The detection results of Shanxi Pig serum samples

样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value
1	0.309	9	0.506	17	0.186	25	0.524	33	0.106	41	0.148
2	0.255	10	0.191	18	0.116	26	0.233	34	0.136	42	0.427
3	0.143	11	0.205	19	0.170	27	0.148	35	0.171	43	0.168
4	0.229	12	0.192	20	0.181	28	0.176	36	0.149	44	0.140
5	1.572	13	0.496	21	0.259	29	0.329	37	0.406	45	0.154
6	0.258	14	0.168	22	0.331	30	0.530	38	0.114	46	0.667
7	0.744	15	0.253	23	0.575	31	0.281	39	0.147	47	0.163
8	0.127	16	0.283	24	0.178	32	0.412	40	0.213	48	0.161

表 25 山西猪血清样品检测结果

Table 25 The detection results of Shanxi Pig serum samples

样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value
1	0.228	9	0.381	17	0.211	25	0.283	81	0.262	41	0.562
2	0.156	10	0.128	18	0.167	26	0.134	82	0.156	42	0.227
3	0.406	11	0.408	19	0.143	27	0.593	83	0.130	43	0.211
4	0.356	12	0.151	20	0.239	28	0.180	84	0.245	44	0.239
5	0.194	13	0.128	21	0.091	29	0.248	85	0.351	45	0.606
6	0.195	14	0.119	22	0.170	30	0.238	86	0.144	46	0.450
7	0.303	15	0.161	23	0.194	31	0.149	87	0.165	47	0.325
8	0.316	16	0.136	24	0.200	32	0.204	88	0.147	48	0.673

表 26 山西猪血清样品检测结果

Table 26 The detection results of Shanxi Pig serum samples

样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value
1	0.295	9	0.187	17	0.151	25	0.164	33	0.165	41	1.523
2	0.339	10	0.107	18	0.074	26	0.415	34	0.171	42	0.162
3	0.315	11	0.158	19	0.147	27	0.107	35	0.139	43	0.142
4	0.873	12	0.173	20	0.400	28	0.447	36	0.109	44	0.523
5	0.177	13	0.196	21	0.195	29	0.234	37	0.087	45	0.221
6	0.166	14	0.171	22	0.140	30	0.131	38	0.086	46	0.114
7	0.063	15	0.632	23	0.106	31	0.222	39	0.505	47	0.482
8	0.302	16	0.160	24	0.141	32	0.123	40	0.265	48	0.501

表 27 山西猪血清样品检测结果

Table 27 The detection results of Shanxi Pig serum samples

样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value	样品号 Sample number	OD值 OD value
1	0.171	9	0.364	17	0.175	25	0.112	81	0.293	41	0.226
2	0.085	10	0.248	18	0.202	26	0.283	82	0.343	42	0.446
3	0.099	11	0.090	19	0.605	27	0.351	83	0.224	43	0.596
4	0.130	12	0.160	20	0.207	28	0.362	84	0.179	44	0.187
5	0.119	13	0.172	21	0.464	29	0.092	85	0.582	45	0.160
6	0.404	14	0.210	22	0.134	30	0.131	86	0.176	46	0.165
7	0.372	15	0.132	23	0.164	31	0.131	87	0.191	47	0.188
8	1.149	16	0.200	24	0.119	32	0.138	88	0.162	48	0.261

第三章 用 Western Blot 方法鉴定重组 Ex-FABP 攻毒的血清样品

1 材料

1.1 主要仪器设备及耗材

小型垂直电泳槽：产品型号 552BR131382，美国 BIO-RAD；

凝胶成像系统：产品型号 GelDoc XR+，美国 BIO-RAD；

GE AI600 超灵敏多功能生物分子成像仪：产品型号 AI600，美国 GE；

多孔恒温水浴锅产品型号：DK-8D，上海跃进医疗器械。

1.2 主要试剂

本实验中的超敏型 ECL 化学发光试剂盒等购自 Biodragon 公司；APS、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5×)、Tris-HCL 缓冲液 (1 mol/L, pH 6.8)、Tris-HCL 缓冲液 (1.5 mol/L, pH 8.8)、Acr-Bis(30%)、Glycine 购自 LEAGENE 公司；预染蛋白 Marker 26616 购自 Thermo 公司；NC 膜购自 Amersham 公司；考马斯亮蓝 R250 购自国药集团试剂有限公司；实验室保存的 TD 模型动物实验注射 Ex-FABP 血清。

本实验中使用的试剂及配制方法为：

① 转膜缓冲液：

甘氨酸	2.9 g
Tris	5.8 g
SDS	0.37 g
甲醇	200 mL
蒸馏水定容至 1 000 mL	

② TBS 缓冲液：

NaCl	8.8 g
1mol/LTris-Hcl (pH 7.5)	10 mL
蒸馏水定容至 1 000 mL	

③ TBST 缓冲液:

20% Tween 1.65 mL

TBS 700 mL

④ 封闭液: 含 0.5% 脱脂奶粉的 TBS 缓冲液;

⑤ 超敏 ECL 化学发光液: A 液和 B 液按照 1: 1 的比列混匀, 现配现用。

⑥ 丽春红染色液: 取出丽春红原液, 根据厂家指导稀释倍数, 用蒸馏水 1:500 倍稀释使用。

2 方法

2.1 SDS-PAGE 分析 TD 动物模型注射 Ex-FABP 动物试验血清样品

SDS-PAGE 试验步骤同上, 因为样品为血清, 同前面 Ex-FABP 蛋白样品上样量的步骤做完发现血清中的一些大分子量和丰度的蛋白影响^[85-87], 导致上半段的条带呈云雾状的团块, 为此将血清样品进行稀释继续试验。将血清样品^[88-89]分别采取不稀释以及用 PBS 缓冲液两倍和三倍稀释。血清原液的点样量分别为 1 μ L、3 μ L、10 μ L 和 20 μ L; 两倍稀释的血清点样量分别为 2 μ L、3 μ L、5 μ L 和 10 μ L; 三倍稀释的血清点样量分别为 1 μ L、3 μ L、5 μ L 和 10 μ L。跑胶条件分别设为 90 V 恒压, 约 3.5 h; 电压 80 V, 40 min, 调为 120 V 跑至蛋白凝胶底端; 电压 60 V, 40 min, 调为 100 V 跑至蛋白凝胶底端。其余步骤同上根据固定好的条件将 TD 动物模型注射 Ex-FABP 动物试验血清样品全部上样, 将血清电泳凝胶置于 GelDoc XR+凝胶成像系统, 通过 Image Lab 软件对血清电泳凝胶样品进行全自动图像采集, 然后进行分析。

2.2 Western Blot 分析 TD 动物模型注射 Ex-FABP 动物试验血清样品

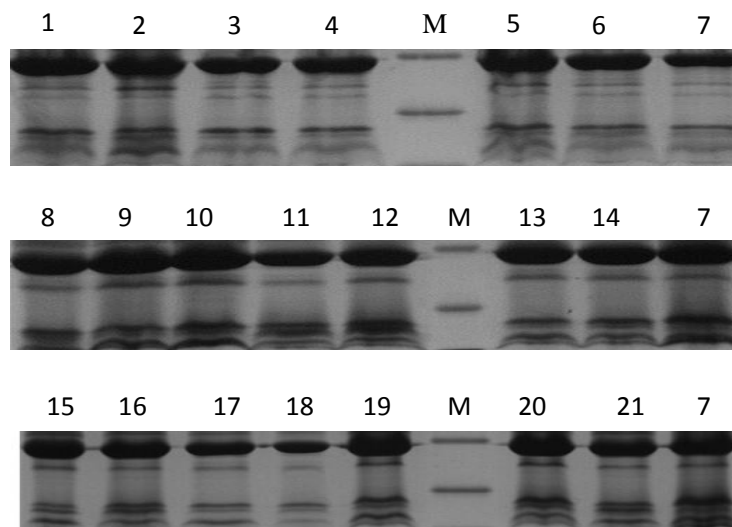
制备两块蛋白凝胶同时进行 SDS-PAGE 试验, 用切胶板小心起出蛋白凝胶, 切除多余的凝胶, 一块立即放入盛有考马斯亮蓝 R250 的染胶盒内, 进行染色和脱色。另一块蛋白凝胶仍需切掉浓缩胶再放入转膜缓冲液中, 用根据凝胶大小裁剪 Whatman 滤纸和硝酸纤维素膜, 裁剪好的 Whatman 滤纸也放入转膜缓冲液中浸泡。取出转印装置, 从负极开始: 海绵垫、滤纸、蛋白凝胶、硝酸纤维素膜、滤纸及海绵垫, 最后合起夹子, 转入电泳槽内, 每一层之间不要有气泡, 手法需轻柔。采用湿法转膜^[90], 根据蛋白 Ex-FABP 蛋白大小摸索条件, 条件分别为: 电压 120 V, 45 min; 电压 80 V, 1.5 h; 电

压 65 V, 1 h; 电压 60 V, 1 h; 恒流 200 MA, 1 h 等。转膜电泳期间提前配置好转膜缓冲液、TBS 缓冲液和 TBST 缓冲液, 封闭液为含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液, 以及丽春红染色液。转膜结束后, 取出硝酸纤维素膜, 均匀的点上丽春红染色液, 染色几分钟后, 若有条带显示, 立即用蒸馏水洗去丽春红染色液, 将硝酸纤维素膜放入装有混匀的 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液, 将封闭盒置于摇床上, 室温封闭 2 h。弃掉封闭液, 用 TBST 缓冲液洗膜 5 次, 每次 3 min。加入 1:1 000 倍稀释的辣根过氧化物酶标记的 5D12, 置于 4°C 过夜。取出硝酸纤维素膜, 用 TBST 缓冲液进行多次洗膜。取出超敏型 ECL 化学发光试剂溶液 I 和溶液 II 按 1: 1 混匀, 用镊子小心取出硝酸纤维素膜, 下缘接触吸水纸, 去除 TBST 缓冲液, 将其均匀覆盖于 ECL 化学发光试剂混合液, 然后置于 GE AI600 超灵敏多功能生物分子成像仪暗格内, 自动曝光拍摄成像。根据固定好的条件将 TD 动物模型注射 Ex-FABP 动物试验血清样品全部上样, 将 SPF 血清设为对照进行分析。

3 结果

3.1 SDS-PAGE 血清试验结果

通过对血清进行梯度稀释, 每个梯度选取不一样的上样量进行 SDS-PAGE 试验, 再改变蛋白凝胶电泳的条件, 获得比较高质量的蛋白凝胶电泳图片。根据结果最终血清进行两倍稀释, 上样量为 10 μ L, 蛋白凝胶电泳的条件确定为: 电压 80 V, 40 min, 调为 100 V 跑至蛋白凝胶底端, 血清的 SDS-PAGE 凝胶成像图仍可见一些大分子量和丰度的蛋白, 但条带清晰可见, 如图 2。



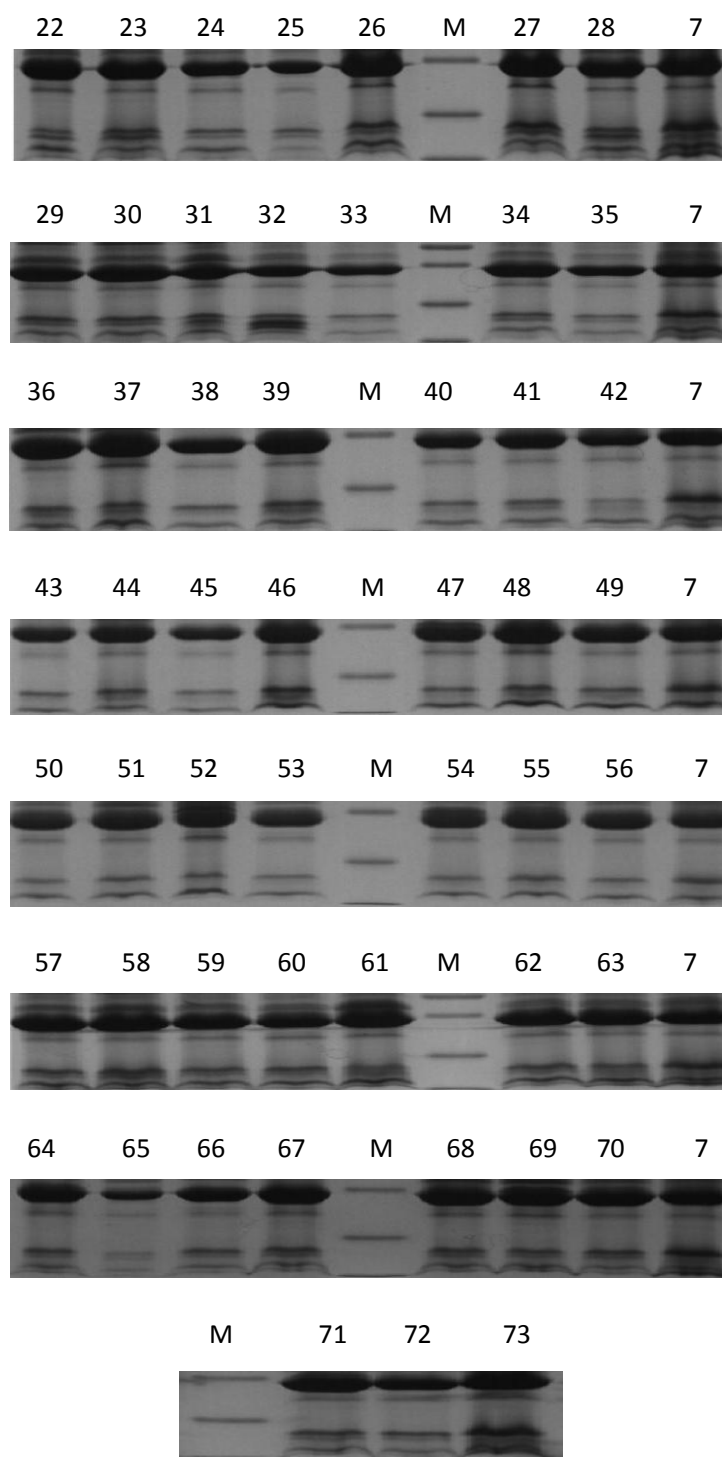


图 2 血清的 SDS-PAGE 鉴定

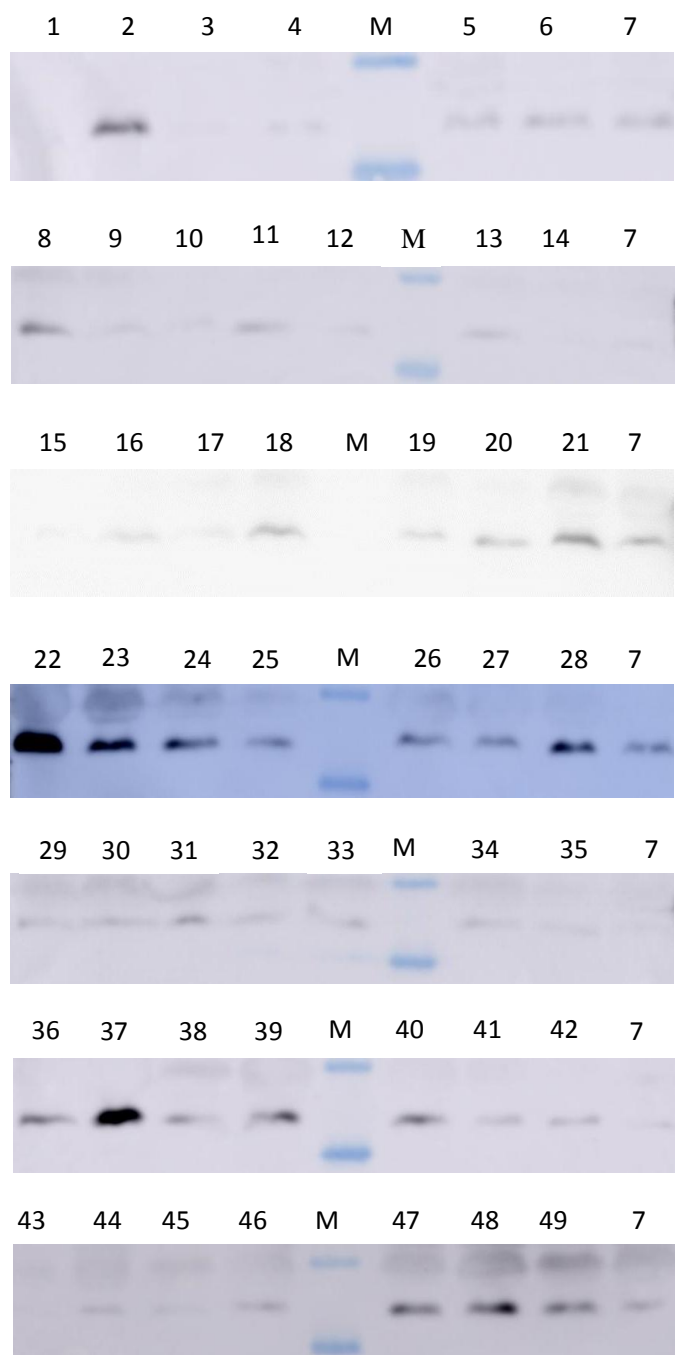
M: 蛋白分子量标准品; 1-73: 动物试验血清样品; 7: SPF 血清样品

Fig 2 Identification of SDS-PAGE of serum

M: Protein marker; 1-73: Animal test serum sample; 7: SPF serum sample

3.2 Western Blot 血清试验结果

采用不同条件进行湿法转膜，根据成像结果，选择电压 60 V，1 h 为最佳转膜条件。通过将实验室 TD 动物模型注射 Ex-FABP 动物试验血清样品上样进行 Western Blot，其成像结果与建好的双抗夹心 ELISA 结果对比分析，发现结果一致，见图 3。



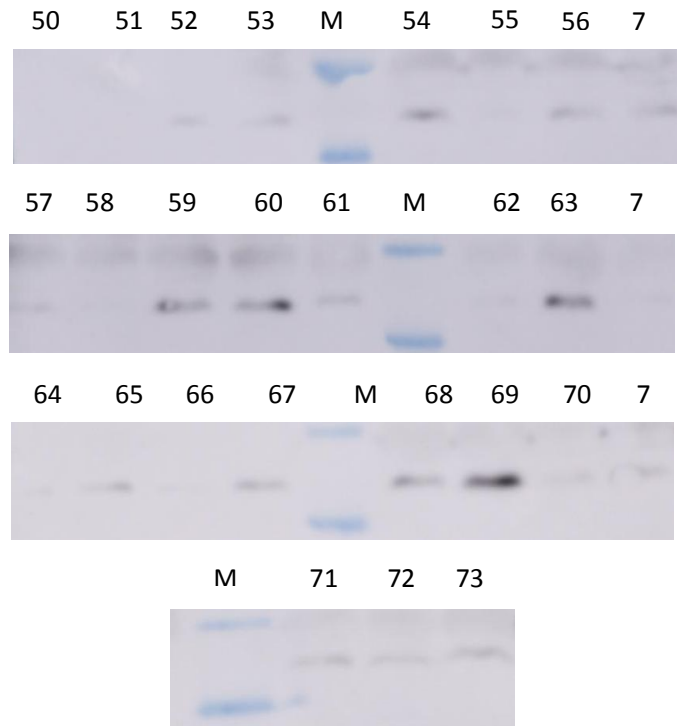


图 3 血清的 Western Blot 鉴定

M: 蛋白分子量标准品; 1-73: 动物试验血清样品; 7: SPF 血清样品

Fig 3 Identification of Western Blot of serum

M: Protein marker; 1-73: Animal test serum sample; 8: SPF serum sample

讨论

在制备单克隆抗体进行细胞培养的时候，需要时刻注意的问题就是污染，这个问题让大部分的工作人员很头疼。由于从细胞融合到成功建株至少需要4个月^[91]，因此需要定期每天观察细胞生长状态，细胞板经常拿进拿出会引起污染^[92]。为警惕这种情况的发生，需要经常对实验室进行灭菌消毒，紫外照射等，预防霉菌、细菌和支原体等污染源^[93]。如若发现细胞板有污染的存在，少数孔可及时用10M NaOH进行封闭，若污染数量较多，及时丢掉污染的细胞板^[94]。为防止污染的发生平时多观察细胞状态及细胞培养箱的使用状况，培养基是否混浊变色，尽量做到现配现用^[95]。在杂交瘤细胞建株时骨髓瘤细胞也起到很重要的作用，因此需要对骨髓瘤细胞提前进行筛选以及避免细胞返祖的可能。融合试验需提前做好饲养细胞，置于细胞培养箱过夜，用之前观察细胞形态避免污染的可能。在融合试验操作过程中要做到有条不紊，提前熟悉试验过程，操作时注意无菌，融合过程手法轻柔注意搅拌节奏，提高融合的几率。

基于实验室前期的研究过程中 Ex-FABP 基因在 TD 病程中有差异性表达，因此通过制备 Ex-FABP 单克隆抗体并利用该抗体进行检测。该研究选择免疫原时为提高一定的融合率，在试验时选择蛋白加 His 标签^[96]。本研究用的是原核表达蛋白，可能造成某些抗原表位的缺失，为了提高成功率，筛选了5株单克隆抗体进行试验^[97]。在建方法期间发现，P/N 值作为调试条件的选择标准，不光是数值越高越好，选择数值相对比较低的阴性值设为条件效果更好。大部分 Western Blot 试验样品都为蛋白质，由于血清样品量较少，本研究参照^[98-100]方法，Western Blot 一抗直接以酶标抗体进行孵育，试验成像结果呈现出特异性条带。Ex-FABP 双抗夹心 ELISA 方法操作简单，耗时短，且灵敏度高，而且也便于基层人员操作，方便及时进行检测，因此 Ex-FABP 双抗夹心试剂盒是很有前景的。通过对湖北省和山西省鸡收集的血清检测结果分析可知，山西省的血清检测结果整体高于湖北省血清样品结果，这可能与饲养水平、养殖条件以及养殖环境有关。国内关于 Ex-FABP 蛋白的单克隆抗体的报道较少，本研究将为后续研究 Ex-FABP 提供一些参考。

结 论

1. 将重组蛋白 Ex-FABP 作免疫原，制备单克隆抗体，共获得 5 株杂交瘤细胞株，命名为 5B7、4E4、5D12、1H6 和 4B2，其中 4E4 腹水效价高达 $1:10^{11}$ 。
2. 利用获得的 5 株单克隆抗体分别进行辣根过氧化物酶标记，通过两者的组合试验，取其效果较好组合的建立双抗夹心 ELISA 方法，用该方法检测湖北和山西部分地区的血清样品，其结果显示建立的 Ex-FABP 双抗夹心 ELISA 方法效果良好。
3. 将实验室 TD 动物模型注射 Ex-FABP 动物试验收集的血清样品上样进行 Western Blot，将其结果与试剂盒检测结果分析，其检测抗原效果良好。

参考文献

- [1] Wang G, Gong Y, Anderson J, et al. Antioxidative function of L-FABP in L-FABP stably transfected Chang liver cells [J]. *Hepatology*, 2010, 42(4): 871-879.
- [2] Funaoka H, Kanda T, Fujii H. Intestinal fatty acid-binding protein (I-FABP) as a new biomarker for intestinal diseases[J]. *Rinsho byori. The Japanese journal of clinical pathology*, 2010, 58(2): 162-168.
- [3] Bodelier AGL, Pierik MJ, Lenaerts K, et al. Plasma intestinal fatty acid-binding protein fails to predict endoscopic disease activity in inflammatory bowel disease patients[J]. *European journal of gastroenterology & hepatology*, 2016, 28(7).
- [4] Xian-E P, Yun-Li W, Yi-Bing Z, et al. Association of a Human FABP1 Gene Promoter Region Polymorphism with Altered Serum Triglyceride Levels[J]. *PLOS ONE*, 2015, 10(10): e0139417-.
- [5] Li J, Henry E, Wang L, et al. Comparative Study of the Fatty Acid Binding Process of a New FABP from *Cherax quadricarinatus* by Fluorescence Intensity, Lifetime and Anisotropy[J]. *PLOS ONE*, 2012, 7(12): e51079.
- [6] Luxon BA, Weisiger RA. Sex differences in intracellular fatty acid transport: role of cytoplasmic binding proteins[J]. *American Journal of Physiology*, 1993, 265(1): 831-41.
- [7] Cermelli S, Zerega B, Carlevaro M, et al. Extracellular fatty acid binding protein (Ex-FABP) modulation by inflammatory agents: “physiological” acute phase response in endochondral bone formation[J]. *European Journal of Cell Biology*, 2000, 79(3): 155-164.
- [8] Gentili C, Tutolo G, Zerega B, et al. Acute phase lipocalin Ex-FABP is involved in heart development and cell survival[J]. *J Cell Physiol*, 2005, 202(3): 683-689.
- [9] Choromańska B, Myśliwiec P, Dadan J, et al. The clinical significance of fatty acid binding proteins[J]. *Postępy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej*, 2011, 65(846636): 759-763.
- [10] Van Veldhoven P P. Biochemistry and genetics of inherited disorders of peroxisomal fatty acid metabolism[J]. *J Lipid Res*, 2010, 51(10): 2863-2895.
- [11] Shioda N, Yamamoto Y, Watanabe M, et al. Heart-type fatty acid binding protein regulates dopamine D2 receptor function in mouse brain[J]. *J Neurosci*, 2010, 30(8): 3146-3155.
- [12] Madsen P, Rasmussen HH, Leffers H, et al. Molecular Cloning and Expression of a Novel Keratinocyte Protein (Psoriasis-associated fatty acid-binding protein [PA-FABP]) that Is Highly Up-Regulated in Psoriatic Skin and that Shares Similarity to Fatty Acid-Binding Proteins.[J] *Journal of Investigative Dermatology*, 1992, 99(3): 299-305.
- [13] Takao Tanaka, Ko-ichiSohmiya, YasushiKitaura, et al. Clinical Evaluation of Point-of-Care-Testing of Heart-Type Fatty Acid-Binding Protein (H-FABP) for the Diagnosis of Acute Myocardial Infarction[J]. *Journal of Immunoassay*, 2006, 27(3): 14.
- [14] Mikolajczak SA, Jacobs-Lorena V, Mackellar DC, et al. L-FABP is a critical host factor for successful malaria liver stage development[J]. *International Journal for Parasitology*, 2007, 37(5): 483-489.
- [15] Mitidiero, Lu í Felipe Tsuyoshi, Simões, et al. L-FABP and I-FABP expression in newborn rats changes inversely in the model of necrotizing enterocolitis[J]. *ACTA CIRURGICA BRASILEIRA*. 2014, 29.543-549.
- [16] Ohlsson G, Moreira JM, Gromov P, et al. Loss of expression of the adipocyte-type fatty acid-binding protein (A-FABP) is associated with progression of human urothelial carcinomas[J]. *Molecular & Cellular Proteomics Mcp*, 2005, 4(4): 570.

- [17] Liu RZ, Li X, Godbout R. A novel fatty acid-binding protein (FABP) gene resulting from tandem gene duplication in mammals: transcription in rat retina and testis[J]. *Genomics*, 2008, 92(6): 0-445.
- [18] Weisiger RA. Cytosolic fatty acid binding proteins catalyze two distinct steps in intracellular transport of their ligands[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2002, 239(1-2): 35-43.
- [19] Owada Y, Suzuki I, Noda T, et al. Analysis on the phenotype of E-FABP-gene knockout mice[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2002, 239(1-2): 83-86.
- [20] Godbout R, Bisgrove DA, Shkolny D, et al. Correlation of B-FABP and GFAP expression in malignant glioma[J]. *Oncogene*, 1998, 16(15): 1955-1962.
- [21] Bachorzewska-Gajewska H, Poniatowski B, Dobrzycki S. NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin) and L-FABP after percutaneous coronary interventions due to unstable angina in patients with normal serum creatinine[J]. *Advances in Medical Sciences*, 2009, 54(2): 221-224.
- [22] Kurz K, Giannitsis E, Becker M, et al. Comparison of the new high sensitive cardiac troponin T with myoglobin, h-FABP and cTnT for early identification of myocardial necrosis in the acute coronary syndrome[J]. *Clinical Research in Cardiology*, 2011, 100(3): 209-215.
- [23] Gao N, Qu X, Yan J, et al. L-FABP T94A decreased fatty acid uptake and altered hepatic triglyceride and cholesterol accumulation in Chang liver cells stably transfected with L-FABP[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2010, 345(1-2): 207-214.
- [24] Garénaux A, Houle S, Folch B, et al. Avian lipocalin expression in chickens following *Escherichia coli* infection and inhibition of avian pathogenic *Escherichia coli* growth by Ex-FABP[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2013, 152(1-2): 156-167.
- [25] Descalzi Cancedda F, Dozin B, Zerega B, et al. Extracellular fatty acid binding protein(ex-FABP) is a stress protein expressed during chondrocyte and myoblast differentiation[J]. *Osteoarthritis Cartilage, Suppl A*, 2001: 118-122.
- [26] Gentili C, Cermelli S, Tacchetti C, et al. Expression of the extracellular fatty acid binding protein (Ex-FABP) during muscle fiber formation in vivo and in vitro[J]. *Exp Cell Res*, 1998, 242(2): 410-418.
- [27] Di Marco E, Sessarego N, Zerega B, et al. Inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis by ExFABP gene targeting[J]. *J. Cell Physiol*, 2003, 196(3): 464-473.
- [28] Vergnes L, Chin R, Young SG, et al. Heart-type fatty acid-binding protein is essential for efficient brown adipose tissue fatty acid oxidation and cold tolerance[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(1): 380-390.
- [29] Murphy EJ. L-FABP and I-FABP expression increase NBD-stearate uptake and cytoplasmic diffusion in L cells.[J]. *Am J Physiol*, 1998, 275(2 Pt 1): G244.
- [30] Binas B, Han XX, Erol E, et al. A null mutation in H-FABP only partially inhibits skeletal muscle fatty acid metabolism[J]. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 2003, 285(3): E481-E489.
- [31] Giannoni P, Dozin B, Zambotti A, et al. Differentiation-dependent activation of the extracellular fatty acid binding protein (Ex-FABP) gene during chondrogenesis[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2004, 198(1): 144-154.
- [32] Cronk DR, Houseworth TP, Cuadrado DG, et al. Intestinal Fatty Acid Binding Protein (I-FABP) for the Detection of Strangulated Mechanical Small Bowel Obstruction[J]. *Current Surgery*, 2006, 63(5): 322-325.
- [33] Okamoto F, Sohmiya K, Ohkaru Y, et al. Human Heart-Type Cytoplasmic Fatty Acid-Binding Protein (H-FABP) for the Diagnosis of Acute Myocardial Infarction. Clinical Evaluation of H-FABP in

- Comparison with Myoglobin and Creatine Kinase Isoenzyme MB[J]. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2000, 38(3): 231---238.
- [34] Oyama Y, Takeda T, Hama H, et al. Evidence for megalin-mediated proximal tubular uptake of L-FABP, a carrier of potentially nephrotoxic molecules[J]. *Laboratory Investigation*, 2005, 85(4): 522-531.
- [35] 刘菁, 毛新民, 李琳琳, 等. 小分子单克隆抗体的制备与敲除技术研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(19): 3737-3741.
- [36] 高明燕, 胡茂志, 孙林, 等. H4 亚型禽流感病毒血凝素蛋白单克隆抗体的制备[J]. *中国动物检疫*, 2007,24(12): 21-23.
- [37] 谢青梅, 徐维加, 陈俊伟, 等. H5 亚型禽流感病毒血凝素蛋白单克隆抗体的制备及鉴定[J]. *华南农业大学学报*, 2007, 28(4): 117-118.
- [38] 王桂芹. H7 亚型禽流感病毒单克隆抗体的制备及 ELISA 诊断方法的建立[D]. 东北农业大学, 2006.
- [39] 刘晓燕. H7 亚型禽流感病毒单克隆抗体的制备及胶体金免疫层析试纸条的研制[D]. 2014.
- [40] 刘瀛, 汤仁仙, 付琳琳, 等. McAb 制备及其表达系统的研究进展[J]. *医学综述*, 2013, 19(1): 26-29.
- [41] 张蕾, 马凡舒, 闫喜军, 等. 单克隆抗体制备的关键因素[J]. *特产研究*, 2015, 37(1): 69-71.
- [42] 焦秋伟, 孟利, 孙欢欢. 单克隆抗体制备的研究进展与展望[J]. *内江科技*, 2016, 37(6): 107-107.
- [43] 孟凡华. 动物细胞克隆技术研究进展及应用[J]. *水产学杂志*, 2001, 14(2): 75-78.
- [44] 郭亚军. 基于单克隆抗体的肿瘤免疫疗法研究进展[J]. *生物工程学报*, 2015, 31(6).
- [45] 陈伯权, 吴美芙, 叶群瑞. 几种部分纯化单克隆抗体方法的比较[J]. *病毒学报*, 1990(2): 122-126.
- [46] 陆彦, 王金洛, 徐福洲, 等. 抗氨苄青霉素单克隆抗体的制备及初步鉴定[J]. *动物医学进展*, 2005, 26(2): 67-70.
- [47] 王谦. 抗链霉素单克隆抗体制备与 ELISA 方法的建立[D]. 中国农业大学, 2003.
- [48] 陈晨, 曹红, 陈福勇. 抗禽白血病 p27 抗原单克隆抗体的制备与鉴定[J]. *中国预防兽医学报*, 2005, 27(4).
- [49] 黄红亮, 陈焕春, 覃雅丽, 等. 抗伪狂犬病病毒 gG 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定[J]. *中国兽医学报*, 2004, 24(3).
- [50] 陈美玲, 陈焕春, 黄红亮, 等. 抗猪圆环病毒 II 型 ORF2 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定[J]. *中国兽医学报*, 2005, 25(6).
- [51] 曹军平, 闫桂玲, 刘秀梵, 等. 两种简易高效的单克隆抗体提纯方法[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 1995(2):52-54.
- [52] 卢炳州, 曹伟军, 郑海学, 等. 纳米抗体应用的研究进展[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2016, 32(3): 414-417.
- [53] 范俊青. 禽白血病病毒 (ALV) 的分离与鉴定及针对 A、B 亚群 ALV gp85 囊膜蛋白单克隆抗体的研制[D]. 扬州大学, 2012.
- [54] 谢华丽, 邵华斌, 杨峻, 等. 禽白血病病毒 p27 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定[J]. *动物医学进展*, 2013(12): 34-37.
- [55] 王绪. 禽白血病病毒 p27 抗原的单克隆抗体制备及双抗体夹心 ELISA 检测方法建立[D]. 扬州大学, 2011.
- [56] 孙佳善. 禽流感、新城疫和犬瘟热病毒单克隆抗体筛选策略比较及应用研究[D]. 2016.
- [57] 孔晶, 吴艳涛, 刘文博, 等. 禽流感病毒单克隆抗体的研制及初步应用[J]. *中国动物检疫*, 2004, 21(10): 20-22.

- [59] 刘芳芳, 金梅林, 张安定, 等. 禽流感病毒核蛋白单克隆抗体的制备及部分特性鉴定[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2006, 22(5): 648-649.
- [60] 王铮, 王铁成, 冯娜, 等. 犬瘟热病毒单克隆抗体的制备及其生物学特性鉴定[J]. 动物医学进展, 2014(3): 73-77.
- [61] 林树柱, 李万波, 刘先菊, 等. 乌鳢血清免疫球蛋白 IgM 的分离纯化及其兔抗血清的制备[J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17(11).
- [62] 张燕红, 路荣, 刘国英, 等. 细胞免疫组化法筛选口蹄疫病毒单克隆抗体的研究[J]. 兽医导刊, 2017(5): 75-76.
- [63] Spieker-Polet H, Sethupathi P, Yam PC, et al. Rabbit monoclonal antibodies: generating a fusion partner to produce rabbit-rabbit hybridomas[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995, 92(20): 9348-9352.
- [64] 张琳琳. 杂交瘤技术制备单克隆抗体研究进展[J]. 生物学教学, 2016, 41(8): 2-4.
- [65] 王冰. 针对 gG 基因的牛传染性鼻气管炎病毒新型检测方法建立和应用[D]. 华中农业大学, 2011.
- [66] 张晶, 付洁, 宋海峰. 真核表达系统的抗体库技术研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2014, 30(8): 878-880.
- [67] 谭雯雯. 猪 β -防御素 2 多克隆和单克隆抗体的制备及应用[D]. 华中农业大学, 2010.
- [68] 元永平. 猪圆环病毒 II 型 Cap 蛋白单克隆抗体的制备和鉴定[D]. 西北农林科技大学, 2008.
- [69] 李希友. 鸡新城疫单克隆抗体制备及免疫胶体金诊断试纸条的研制[D]. 山东农业大学, 2006.
- [70] 陈冰. 鸭疫里默氏杆菌单克隆抗体的制备及快速检测方法的建立[D]. 扬州大学, 2011.
- [71] 郑鑫, 朱世成, 李家奎, 等. 猪生长激素单克隆抗体的制备及其特性[J]. 中国兽医学报, 2005, 25(3):293-294.
- [72] 丘惠深, 王在时, 方国安. 猪瘟单克隆抗体诊断试剂的研究[J]. 中国预防兽医学报, 1991(6): 20-26.
- [73] 俞太尉, 丘惠深. 猪细小病毒单克隆抗体的研制及初步应用的研究[J]. 中国预防兽医学报, 1993(1): 55-57.
- [74] 唐亚华, 黄红林. 单克隆抗体的研究进展[J]. 生物技术世界, 015(3): 96-96.
- [75] 潘艳, 张昕. 单克隆抗体技术的研究进展[J]. 吉林工商学院学报, 2014, 30(5): 88-90.
- [76] 李壮林, 姚雪静. 单克隆抗体药物研究进展[J]. 药物生物技术, 2014(5): 456-461.
- [77] 冯丽亚, 李扬, 孙文正, 等. 单克隆抗体药物研究新进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2016, 32(3): 418-422.
- [78] 王雄, 荣钊, 蒙海超, 等. 抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体的制备及 ELISA 检测试剂盒的研制[J]. 饲料研究, 2010(11).
- [79] 孔君, 刘箐, 韩跃武, 等. 单克隆抗体制备技术的最新进展及应用前景[J]. 免疫学杂志, 2011(2): 170-173.
- [80] 朱学泰, 谢漆, 马瑞君. 单克隆抗体制备技术研究进展[J]. 甘肃科技, 2005, 21(3): 108-109.
- [81] James K, Bell GT. Human monoclonal antibody production: Current status and future prospects[J]. Journal of Immunological Methods, 1987, 100(1-2): 5-40.
- [82] Batra J, Rathore AS. Glycosylation of monoclonal antibody products: Current status and future prospects[J]. Biotechnology Progress, 2016, 32(5).
- [83] 冯丽亚, 李扬, 孙文正, 等. 单克隆抗体药物研究新进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2016, 32(3): 418-422.
- [84] 张敏, 李佳, 俞德超. 单克隆抗体药物在肿瘤治疗中的研究进展[J]. 实用肿瘤杂志, 2015(6):

495-500.

- [85] 赵敏, 张庭瑛, 周为民, 等. HCoV-NL63 N 蛋白不同片段的表达纯化及血清学检测应用分析[J]. 病毒学报, 2011(3): 244-249.
- [86] 王艳红, 庞训雷, 苗蓓, 等. 不同血清学亚型 Hp 感染对无症状体检者血清胃功能的影响[J]. 江苏医药, 2017, 43(22): 1615-1618.
- [87] 韦传宝, 陈炯, 郑红英, 等. 几种血清学技术在浙贝母花叶病毒(Thunberg fritillary mosaic virus) 检测中的应用[J]. 科技通报, 2006, 22(4): 506-509.
- [88] 李真慧, 吴秉毅, 蒋玲, 等. 检测血清 ATG 浓度 ELISA 方法的建立[J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(2): 374-376.
- [89] 张婷, 史晋绒, 赵田田, 等. 四种鱼的血清、体表黏液 SDS-PAGE 分析[J]. 四川动物, 2015, 34(6): 880-884.
- [90] 李泽卿, 田勇泉, 肖健云, 等. EB 病毒特异性 DNA 酶的纯化制备[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2000, 6(1): 28-31.
- [91] 杨燕飞. MBV、SRV、SIV 血清抗体调查及间接 ELISA 检测方法的初步建立[D]. 2016.
- [92] 王桂芹. H7 亚型禽流感病毒单克隆抗体的制备及 ELISA 诊断方法的建立[D]. 东北农业大学, 2006.
- [93] 吕芳. 含五元杂环磺胺类药物单克隆抗体的制备及初步应用[D]. 扬州大学, 2008.
- [94] 冯誉龄, 刘晔, 张守峰, 等. 动物狂犬病中和性抗体竞争 ELISA 检测试剂盒的研制[J]. 军事医学, 2010, 34(2): 175-178.
- [95] 窦勇, 宁喜斌. 副溶血弧菌间接 ELISA 快速检测法的建立[J]. 食品工业科技, 2007(6).
- [96] 王帅兵. 克伦特罗单克隆抗体制备和残留 ELISA 检测方法及其试剂盒研究[D]. 华中农业大学, 2005.
- [97] 段霞, 黄欣, 黄岭芳, 等. 双抗夹心 ELISA 方法检测食品中单核细胞增生李斯特氏菌[J]. 食品科学, 2010, 31(24): 272-276.
- [98] 余平良, 杨汉春, 刘平黄, 等. 猪瘟 ELISA 试剂盒组装条件的研究[J]. 中国兽医杂志, 2002(1): 44-45.
- [99] 刘业方. 艾滋病脾肾阳虚证蛋白组学标志物验证研究[D]. 2016.
- [100] 舒发明. 艾滋病热毒蕴结证蛋白组学标志物验证研究[D]. 2016.

Development of monoclonal antibody against extracellular fatty acid binding protein in chicken and establishment of double-antibody sandwich method

Abstract

The impact of tibial dyschondroplasia (Tibial dyschondroplasia, TD) on poultry is a problem for poultry farming worldwide. There is no mature technology to detect the disease. In the early research of TD, the experimental group found that the extracellular fatty acid protein (Ex-FABP) gene was differentially expressed in the early stage of TD by gene chip technology.

Therefore, the preparation of Ex-FABP monoclonal antibody was further studied. The recombinant protein Ex-FABP was purified as the immune pathogen, immunized 6 weeks old SPF BALB/C mice every two weeks. After three immunizations, the indirect ELISA was used to measure the titer, and the highest titer was selected for booster immunization. Prepare SP2/0 myeloma cell fusion.

Using recombinant protein Ex-FABP and GSTA3 packets, the hybridoma cells were screened by indirect Elisa method, the positive holes with higher values were selected for sub-cloning, and 5 strains of hybridoma cell lines were obtained, named 5B7, 4E4, 5D12, 1h6 and 4b2, and the ascites potency was up to $1 : 10^{11}$, and the subcategory identification is IgG₁.

Five monoclonal antibodies were coated on the plate, and the horseradish peroxidase-labeled monoclonal antibody was an enzyme-labeled antibody. After testing, it was determined that 4E4 as the package was antibody, and the 5D12 labeled by horseradish peroxidase as secondary antibodies. McAb was diluted for 1:2000 and placed overnight at 4 °C; With whiteboard diluent containing 10% horse Serum, 37 °C action 2h; Take 50μL of serum sample and put it at 37 °C for 30 min; and the enzyme-labeled antibody was diluted for 1:2000, placed at 37 °C for 30 min; Peroxidase Substrate reaction time is 15min. 1688 clinical samples were tested by our ELISA method. The results showed that the double-antibody sandwich ELISA method had excellent specificity. The laboratory TD animal model was injected with the recombinant protein Ex-FABP animal test serum sample for Western Blot, and the SPF serum sample was set as a negative control. According to the comparison between the imaging results and the established

double-antibody sandwich ELISA results, the results of Western Blot showed that the band content of Ex-FABP in serum was consistent with the value of the double-antibody sandwich ELISA method. These results indicate that the double-antibody sandwich ELISA method can be used to detect EX-FABP in serum in the laboratory.

The previous study of the research team found that the early Ex-FABP gene in TD has significant up-regulated expression. In order to better study the role of Ex-FABP in TD, a monoclonal antibody against recombinant protein Ex-FABP was prepared and a double-antibody sandwich ELISA was established. The method is used to detect Ex-FABP quickly, specifically and sensitively, which lays a foundation for a better study of Ex-FABP in the later stage.

Key words: preparation of monoclonal antibody; preliminary establishment of double-antibody sandwich ELISA method; Western Blot serum identification

致 谢

本研究及学位论文是在我的导师田文霞教授和宁官保副教授的悉心指导下完成的。课题的选择到项目的顺利完成，两位老师都给予了很多帮助，他们对科研的态度和治学精神一直感染着我。这篇论文的实验细节和数据，都离不开两位的细心指导，在此致以诚挚的谢意和崇高的敬意。

试验顺利的进行与完成，离不开各位老师、同学的帮助，为以后的学习及工作夯实基础，在这里我要向诸位老师表示深深的感谢。感谢在华中农业大学单抗实验室的师兄但汉并、董俊、张弛、马磊，师姐范俊青、王园园、贾慧琴、李盼盼，以及师弟师妹们在试验中给予的帮助。

研究生生活是我最为充实的日子，期间学到了很多，感谢我的父母对我的支持和鼓励，因为你们是我坚强后盾，我才能安心的学习并顺利完成实验，谢谢你们！

最后，向所有在学习、生活及论文完成过程中关心帮助过我的老师、同学和亲朋好友，衷心地道声：谢谢！

翟晶晶

2019年5月