



分类号 S855.3

学号 2017107075

南京农业大学

硕士学位论文

H5、H7 和 H9 亚型 AIV 三重荧光定量 RT-PCR 方法与 H7  
cELISA 方法建立及 H5 亚型 HA 蛋白单抗制备

李源

指导教师 闫丽萍 副教授

学科门类 农学

一级学科 兽医学

二级学科 预防兽医学

研究方向 动物病毒学与免疫学

答辩日期 二〇二〇年九月

**Establishment of Triple Real-time Fluorescence Quantitative  
RT-PCR Assay for AIV H5, H7 and H9 Subtypes and cELISA  
Assay for H7 Subtype and Preparation of Monoclonal Antibody  
against HA Protein of H5 Subtype**

**By**

**LI YUAN**

**A Thesis**

**Presented to Nanjing Agricultural University  
in Partial Fulfillment of the Requirements**

**for the Degree of**

**Master of Agronomy**

**in**

**Preventive Veterinary Medicine**

**Supervised by**

**Associate Professor YAN LI PING**

**Nanjing Agricultural University  
Nanjing, China**

**September 2020**

本研究由国家重点研发计划项目（2016YFD0501600）资  
助

**This study was supported by National Key R&D  
Program of China (No. 2016YFD0501600)**

# 目 录

第一篇 文献综述 .....	1
第一章 禽流感病毒的研究进展 .....	1
1 禽流感概述 .....	1
2 禽流感病毒病原学 .....	1
3 禽流感病毒流行病学 .....	5
4 禽流感病毒的诊断技术 .....	7
5 禽流感病毒单克隆抗体研究进展 .....	12
参考文献 .....	14
第二篇 研究内容 .....	23
第二章 AIV H5、H7 和 H9 亚型三重荧光定量 RT-PCR 方法的建立 .....	23
1 材料与方法 .....	24
2 结果 .....	31
3 讨论 .....	39
4 本章小结 .....	40
参考文献 .....	41
第三章 H7 亚型禽流感病毒 cELISA 抗体检测方法的建立 .....	43
1 材料与方法 .....	44
2 结果 .....	48
3 讨论 .....	54
4 本章小结 .....	55
参考文献 .....	56
第四章 H5 亚型禽流感病毒 HA 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定 ..	59
1 材料与方法 .....	60
2 结果 .....	70
3 讨论 .....	75
4 本章小结 .....	76
参考文献 .....	77
全文总结 .....	79
附录 I .....	81
附录 II .....	83
附录 III .....	85

# H5、H7 和 H9 亚型 AIV 三重荧光定量 RT-PCR 方法与 H7 cELISA 方法建立及 H5 亚型 HA 蛋白单抗制备

## 摘要

禽流感是一种急性、高度接触性的传染病，其病原禽流感病毒（Avian influenza virus, AIV）属于正黏病毒科 A 型流感病毒属。禽流感病毒具有多种亚型，亚型之间无交叉保护性，且抗原变异频繁，以 H5 和 H7 亚型为代表的高致病性 AIV 传播快，危害大，每次暴发都造成巨大的社会和经济损失，H9 亚型低致病性 AIV 全球流行最为广泛，持续为其他亚型 AIV 提供内部基因，严重降低家禽生产效率，影响养禽业的可持续发展；AIV 感染宿主广泛，包括多种家禽、留鸟、迁徙候鸟和部分哺乳动物，通过长期进化，部分 H5、H7 和 H9 亚型毒株已经成功跨越种间屏障导致人类感染，对人类生命健康构成严重威胁。为实现对禽流感的有效监测和防控，需要依赖快速、准确的诊断技术。当前，以实时荧光定量 RT-PCR 为代表的核酸诊断技术，具有快速、敏感和准确的特点，成为 AIV 鉴定分型和流行病学监测的重要工具。而以 ELISA 为代表的血清学检测技术因操作简便、敏感特异、速度快且高通量，有力推动了禽流感早期诊断和免疫抗体水平监测的高效开展。本研究针对 H5、H7 和 H9 亚型 AIV，建立了三重荧光定量 RT-PCR 方法并进行试剂盒的组装，建立了 H7 亚型 AIV 竞争 ELISA（cELISA）抗体检测方法，并制备了 H5 亚型 AIV 血凝素蛋白（HA）单克隆抗体，为有效防控这三种亚型禽流感提供了有力工具，具体研究如下：

### 1. AIV H5、H7 和 H9 亚型三重荧光定量 RT-PCR 方法的建立

本研究通过对 Genbank 报道的所有 H5、H7 和 H9 亚型 AIV 的 HA 基因序列进行比对分析，设计并合成特异性探针和引物，调整优化反应体系和反应程序后建立了鉴别 H5、H7 和 H9 亚型 AIV 的三重荧光定量 RT-PCR 方法，扩增时间约 70 min。该法对 H5、H7 和 H9 亚型 AIV 滴度的最低检出限分别为  $10^3$ 、 $10^2$  和  $10^2$  EID<sub>50</sub>/100  $\mu$ L，对于 H5 亚型 AIV 滴度在  $10^7$ - $10^3$  EID<sub>50</sub>/100  $\mu$ L 范围内呈线性关系，而对于 H7 和 H9 亚型 AIV 滴度定量线性范围在  $10^6$ - $10^2$  EID<sub>50</sub>/100  $\mu$ L 之间。该方法仅对 H5、H7 和 H9 亚型 AIV 呈现特异性扩增曲线，不与其他亚型 AIV 和其他禽类病毒产生交叉反应，无假阳性现象。该方法的组内和组间重复性试验变异系数均小于 4%，显示出良好的稳定性。经过共感染模型分析，证明该方法可以精确检测不同病毒滴度的 H5、H7 和 H9 亚型 AIV 混合感染。根据本研究所建立的方法对试剂盒进行组装，临床样本的效

力实验分析显示,该试剂盒与病毒分离鉴定方法高度符合。综上所述,该方法具有高通量、快捷、准确和灵敏等优点,为 H5、H7 和 H9 亚型 AIV 的临床早期快速鉴别诊断提供了新型工具。

## 2. H7 亚型禽流感病毒 cELISA 抗体检测方法的建立

用蔗糖密度梯度离心法纯化的 H7 灭活全病毒作为包被抗原,抗 H7 亚型 AIV 血凝素蛋白单克隆抗体纯化腹水作为竞争抗体,建立了 H7 亚型 AIV cELISA 抗体检测方法。本方法首先优化明确了最佳反应模式,当包被抗原浓度为  $4\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ,竞争单抗浓度为  $0.625\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ,待检血清稀释倍数为 1:5 时,阳性单因子血清抑制率达到峰值。然后通过 ROC 曲线分析界定了该方法的检测临界值,鸡、鸭和孔雀血清检测抑制率临界值分别确定为 30.11%、26.85%和 45.66%。最后性能评估试验结果显示,该方法能特异性检测血清样本中的 H7 抗体,与其他亚型 AIV 和常见禽类病毒阳性血清无交叉反应;以血凝抑制试验(HI)作为对照,该检测方法对阳性鸡、鸭和孔雀血清最低检测限度分别达到  $2^0$ 、 $2^1$  和  $2^{-1}$  HI 滴度;用建立的方法与 HI 试验平行检测 400 份临床血清样本,其中鸡血清 115 份,鸭血清 145 份和孔雀血清 140 份,相对于 HI 试验的检测符合率分别达到 100%、98.6%和 99.3%。以上结果表明本研究建立的 H7 抗体快速检测方法特异性强、灵敏度高、便于大批量检测且与 HI 试验高度相关,对 H7 亚型 AIV 的血清学诊断和疫苗免疫效果监测与评价具有实用价值。

## 3. H5 亚型禽流感病毒 HA 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定

用纯化的重组蛋白 pColdI-H5-HA1 免疫 Balb/c 雌性小鼠,取高血清抗体效价小鼠的脾细胞与生长对数期的 sp2/0 细胞进行细胞融合,用间接 ELISA 法筛选阳性杂交瘤细胞后,经 4 轮有限稀释法亚克隆,最终获得 2 株杂交瘤细胞株,依次命名为 11H4 和 12G4,均能稳定分泌抗 H5-HA1 蛋白单抗,抗体亚类均为 IgG1,轻链均为  $\kappa$  链。间接 ELISA 法检测 2 株单抗细胞培养上清的抗体效价,分别达到 1:10000 和 1:10;Western blot 分析表明 2 株单抗能与纯化的 H5-HA1 重组蛋白发生特异性反应;IFA 分析表明均能与 H5 亚型 AIV 感染的 MDCK 细胞发生特异性反应,而与其他亚型 AIV 感染的 MDCK 细胞不发生交叉反应。综上所述,以上两株 H5 单抗有望应用于 H5 亚型 AIV 诊断方法的研究。

**关键词:** 禽流感病毒;实时荧光定量 RT-PCR; cELISA; 单克隆抗体

# **ESTABLISHMENT OF TRIPLE REAL-TIME FLUORESCENCE QUANTITATIVE RT-PCR ASSAY FOR AIV H5, H7 AND H9 SUBTYPES AND cELISA ASSAY FOR H7 SUBTYPE AND PREPARATION OF MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST HA PROTEIN OF H5 SUBTYPE**

## **ABSTRACT**

Avian influenza is an acute, highly contagious infectious disease caused by the avian influenza virus (AIV) in the genus of influenza viruses belonging to the *Orthomyxoviridae* family. AIVs can be classified as multiple subtypes accompanied by frequent antigenic variations, with no cross-protection between different subtypes. Highly pathogenic AIV represented by H5 and H7 subtypes spread quickly and their outbreaks impose huge damage to social economy. As the most widespread low pathogenic AIV is in the world, the H9 subtype continues to provide internal genes for other subtypes of AIV, which seriously endangers the production efficiency of poultry. Through long-term evolution, H5, H7, and H9 subtypes AIV acquire the ability to directly infect people across the interspecies barrier, which seriously threatens human life and health. In order to achieve effective monitoring and prevention of avian influenza, it is necessary to apply fast and accurate diagnostic techniques. Currently, the real-time fluorescent quantitative RT-PCR assay is fast, sensitive, and accurate, rendering it an important tool for AIV identification, subtyping and epidemiological surveillance. And the ELISA assay is easy to operate, highly sensitive, specific and fast with high-throughput, which promotes avian influenza early diagnosis and monitoring of antibody levels after immunization. In this study, a one-step triple real-time fluorescence quantitative RT-PCR detection method was constructed for detection of H5, H7, and H9 subtypes AIV. Besides, the H7 subtype AIV competition ELISA antibody detection assay was established; finally, monoclonal antibodies (McAbs) against H5 subtype AIV were successfully prepared by using lymphocyte hybridoma technology. The specific research is as follows:

- 1. Development of one-step triple real-time fluorescent quantitative RT-PCR rapid detection assay for H5, H7 and H9 AIVs**

In this study, by comparing and analyzing the HA gene sequences of all H5, H7, and H9 subtypes AIV retrieved from Genbank, we designed and synthesized specific probes and primer pairs. After adjusting and optimizing the reaction system and reaction procedures, we established the one-step triple real-time quantitative RT-PCR assay for differential detection of H5, H7 and H9 subtype AIVs within 70 minutes. The minimum detection limits of this assay for H5, H7 and H9 subtype AIV titers were  $10^3$ ,  $10^2$  and  $10^2$  EID<sub>50</sub>/100  $\mu$ L, respectively. For H5 subtype, the viral titers were linear in the range of  $10^7$ - $10^3$  EID<sub>50</sub>/100  $\mu$ L; For H7 and H9 subtypes, the viral titers were within a linear range of quantification between  $10^6$ - $10^2$  EID<sub>50</sub>/100  $\mu$ L. This assay only showed specific amplification curves for H5, H7, and H9 subtypes AIV without false positive results with other subtypes AIV and a variety of other avian viruses. The variation coefficients of intra- and inter-assay repeatability tests of this method fell less than 4%, showing good repeatability. It was proved that the assay could accurately detect mixed infections of H5, H7, and H9 subtype avian influenza viruses with different virus titers in the co-infection model. After analyzing the efficacy test results of clinical swab samples, the coincidence rate of this assay with virus isolation and identification was extremely high. In summary, this assay owns the advantages of high throughput, rapidity, accuracy and sensitivity, thus providing a new tool for the rapid clinical early differential diagnosis of H5, H7 and H9 subtype AIV.

## **2. Development of a cELISA antibody detection assay for H7 subtype AIV**

With H7 inactivated whole virus particles purified by sucrose density gradient centrifugation as the coating antigen, and a purified McAb against HA protein of H7 subtype AIV as competitive antibody, a cELISA antibody detection assay for H7 subtype AIV was established. The optimal reaction conditions were optimized and determined at the beginning. When the antigen coating concentration was 4  $\mu$ g/mL, the concentration of the McAb was 0.625  $\mu$ g/mL, and the dilution ratio of the test serum was 1:5, the positive monospecific serum inhibition rate reached its peak. The ROC curve analysis was used to define the detection thresholds of the method. The cut-off values of the chicken, duck and peacock serum detection inhibition rates were determined to be 30.11%, 26.85% and 45.66%, respectively. The performance evaluation test results showed that the assay could specifically detect anti-H7 antibodies in serum samples with no cross-reaction with other subtypes of AIV and common avian respiratory virus positive sera; With the hemagglutination inhibition test (HI) as a control, the minimum detection limits for chicken,

duck and peacock positive serum reached  $2^0$ ,  $2^1$  and  $2^{-1}$  HI titers respectively; a total of 400 clinical serum samples for chicken, duck and peacock were tested in parallel by using the established assay and HI test. Compared to the HI test, the compliance rates reached 100%, 98.6%, and 99.3%, respectively. The above results showed that the H7 antibody rapid detection assay established in this study was highly specific, extremely sensitive, convenient for large-scale detection, and highly correlated with the HI test with practical value for the serological diagnosis of H7 subtype AIV and the monitoring and evaluation of vaccine immunization efficacy.

### **3. Preparation and Identification of Monoclonal Antibody against HA Protein of H5 Subtype AIV**

In this study, the purified prokaryotic expressed recombinant protein pColdI-H5-HA1 were used as immunogen to immunize Balb/c female mice, and splenocytes from mice with high serum antibody titers and sp2/0 cells in logarithmic growth phase were used for cell fusion. HAT selection culture was used to screen positive hybridomas. After the cells were subcloned by four rounds of limiting dilution, two monoclonal antibody hybridoma cell lines capable of stably secreting anti-H5-HA1 protein antibodies were obtained, named 11H4 and 12G4 in sequence. The McAbs 11H4 and 12G4 belonged to IgG1 subclass and the light chains were  $\kappa$  chains. The antibody titers of the two McAb cellular supernatants tested by the indirect ELISA method reached 1: 10,000 and 1:10, respectively. Western blot analysis showed that the two McAbs could specifically react with purified H5-HA1 recombinant protein; IFA analysis showed that 11H4 and 12G4 could specifically react with MDCK cells infected with H5 subtype AIV virus, but did not cross-react with MDCK cells infected with other subtype AIV. In summary, the above two McAbs 11H4 and 12G4 are expected to be useful in the establishment of early diagnostic methods for H5 subtype AIV.

**KEY WORDS:** avian influenza virus; real-time fluorescent quantitative RT-PCR; cELISA; monoclonal antibody

## 缩略语中英文对照

英文缩写	英文名称	中文名称
AGID	Agar gel immunodiffusion	琼脂凝胶免疫扩散试验
AI	Avian influenza	禽流感
AIV	Avian influenza virus	禽流感病毒
ALV-J	Avian leukosis virus-J subgroup	禽白血病病毒
bp	Base pair	碱基对
EID <sub>50</sub>	Fifty-percent chicken embryo infective dose	半数鸡胚感染量
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
FITC	Fluorescein isothiocyanate	异硫氰酸荧光素
HA	Hemagglutinin	血凝素
HI	Hemagglutination inhibition	血凝抑制试验
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
IBV	Infectious bronchitis virus	鸡传染性支气管炎病毒
IBDV	Infectious bursal disease virus	鸡传染性法氏囊病毒
IFA	Indirect immunofluorescence assay	免疫荧光技术
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification	环介导等温核酸扩增技术
M	Matrix protein	基质蛋白
McAb	Monoclonal antibody	单克隆抗体
NA	Neuraminidase	神经氨酸酶
NASBA	Nucleic acid sequence-based amplification	依赖核酸序列扩增技术
NS	Nonstructural protein	非结构蛋白
NDV	Newcastle disease virus	新城疫病毒
OD	Optical density	光密度
PA	Polymerase acidic subunit	聚合酶酸性蛋白
PB1	Polymerase basic 1 subunit	聚合酶碱性蛋白 1
PB2	Polymerase basic 2 subunit	聚合酶碱性蛋白 2
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
RT-PCR	Reverse transcription-polymerase chain reaction	反转录聚合酶链式反应
SPF	Specific pathogen free	无特定病原体
VNT	Virus neutralization test	病毒中和试验

## 本研究的目的与意义

我国是世界第一养禽大国，家禽种类和数量繁多、饲养密度高、模式多样，同时携带大量 AIV 的野生禽类每年进行大规模移动迁徙，共同促进了不同亚型和谱系 AIV 在易感禽类间的相互传播和基因交流，因而 AIV 基因型和抗原性变异迅速，致病性和传播能力随之变化，最终导致宿主范围产生变化，加之人口流动的活跃、生活范围的扩大和生产贸易的频繁往来，进一步增加了 AIV 由禽类向人传播的机率。多种因素下导致禽流感的复杂流行局势和公共卫生安全所面临的压力，目前对我国影响巨大的主要包括 H5、H7 和 H9 亚型禽流感，结合我国针对禽流感所采取的免疫预防策略，这对三种亚型禽流感的监测提出了更高的要求，早期快速诊断和血清学监测成为前沿阵地。

首先，本研究借助实验室已有工作平台，根据 H5、H7 和 H9 亚型 AIV 的 HA 靶基因保守序列，分别设计并合成探针和引物对，建立了在一个反应体系中快速检测 H5、H7 和 H9 亚型 AIV 的三重荧光定量 RT-PCR 方法并组装试剂盒。其次，本研究基于实验室已有的 H7 亚型 AIV 血凝素蛋白单抗和纯化的 H7 亚型灭活全病毒，研制出了 H7 亚型 AIV cELISA 抗体检测方法，用于测定不同种属动物血清中的 H7 抗体滴度。最后，本研究通过 B 淋巴细胞杂交瘤技术，制备了针对 H5 亚型禽流感病毒 HA 蛋白的单克隆抗体。

本研究中开发的三重荧光定量 RT-PCR 方法为 H5、H7 和 H9 三种重要亚型 AIV 的实验室鉴别诊断提供了一种有效、快速、高通量的新型技术手段，为临床上三种亚型的混合感染率监测提供了便利。单克隆抗体凭借其高特异性和专一性等优势在禽流感的诊断和治疗等领域正在发挥日益重要的作用，本研究基于 H7 单抗建立的 cELISA 方法操作简便，检测速度快，对于基层单位大批量血清样本 H7 抗体水平的检测具有推广应用价值；此外，本研究成功制备的 H5 亚型禽流感病毒 HA1 蛋白单克隆抗体为 H5 亚型 AIV 血凝素蛋白的空间结构和抗原表位鉴定提供了良好的工具，为 H5 亚型 AIV 的特异性诊断及鉴定奠定了基础，同时对 H5 亚型 AIV 抗原变异、致病性变化及宿主范围改变的研究具有重要意义。

# 第一篇 文献综述

## 第一章 禽流感病毒的研究进展

### 1 禽流感概述

禽流感 (Avian influenza, AI) 是禽流行性感冒的简称, 是由禽流感病毒 (Avian influenza virus, AIV) 引起的主要感染禽类的一种急性、高度传染性的疾病, 本病一旦暴发传播迅速, 常呈流行性 or 大流行。高致病性禽流感又被称作真性鸡瘟、欧洲鸡瘟。

### 2 禽流感病毒病原学

#### 2.1 病毒粒子形态、组成结构与理化特性

禽流感病毒在分类上属于正黏病毒科流感病毒属中的甲型流感病毒, 临床分离到的病毒粒子呈丝状, 经多次传代后呈球形, 直径 80-120nm<sup>[1]</sup>。AIV 病毒粒子在结构上划分为三层, 最外层由一层脂质囊膜包裹, 表面镶嵌两种辐射状密集排列的糖蛋白纤突血凝素和神经氨酸酶, 以及非糖基化的质子通道蛋白 M2; 囊膜下层为基质蛋白 M1 层; 最内层为核糖核蛋白复合体, 由病毒 RNA 片段、聚合酶蛋白以及核蛋白组成。AIV 病毒粒子相对分子质量约为  $2.5 \times 10^8$ , 蔗糖溶液浮密度为  $1.19 \text{g/cm}^3$ , 非丝状 AIV 病毒粒子沉降系数大小为 700-800S, 由 70% 蛋白质, 20% 脂类, 5%-8% 碳水化合物和 1% RNA 等化学物质组成, 不耐热, 对干燥、日光、紫外线照射、脂溶剂、甲醛和氧化剂等敏感<sup>[2, 3]</sup>。

#### 2.2 基因组与主要功能蛋白

AIV 属于单股负链 RNA 病毒, 其基因组由 8 个独立的病毒 RNA (viral RNA, vRNA) 片段 (PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M 和 NS) 组成, 全长 13.6kb, 单个基因片段长度在 736-2396bp 之间, 编码至少 17 种病毒功能蛋白<sup>[4]</sup>。根据 AIV 囊膜表面血凝素 (hemagglutinin, HA) 和神经氨酸酶 (neuraminidase, NA) 的差异, AIV 可被划分为 16 种 HA 亚型和 9 种 NA 亚型<sup>[5]</sup>。依据 AIV 不同毒株致病性和毒力的差异, AIV 可被划分为高致病性禽流感病毒 (HPAIV) 和低致病性禽流感病毒 (LPAIV) 两类。按照历史和地理位置的分布以及病毒基因的进化关系, AIV 又可以被分为欧亚和北美两大基因谱系<sup>[6]</sup>。

### 2.2.1 血凝素

HA 蛋白是 AIV 粒子表面最主要的成分,形态为棒状三聚体分子,结构上分为球状的头部以及纤维状的茎部,HA 头部主要由 HA1 分子构成,是高变区,茎部由 HA2 及部分 HA1 分子构成,相对保守。HA 蛋白在细胞核糖体内合成后以 HA0 前体蛋白形式存在,在内质网分子伴侣作用下形成三聚体,经糖基化和乙酰化等翻译后修饰并切除信号肽后,由高尔基体运输到细胞表面,在病毒出芽释放后 HA0 前体在裂解位点被蛋白酶切割为 HA1 和 HA2 亚基,通过二硫键相连,是 AIV 感染细胞的先决条件。HA 对蛋白酶裂解的敏感性直接由 HA 蛋白裂解位点的氨基酸序列和结构所决定,后者因而成为直接影响 AIV 宿主特异性和致病性的关键因素<sup>[7,8]</sup>。HA 蛋白的首要功能是识别与结合宿主细胞表面糖蛋白或糖脂分子末端的唾液酸受体,其受体结合位点位于 HA 分子的头部,该特性是 AIV 跨宿主传播能力的重要因素<sup>[9]</sup>。HA 蛋白的第二个主要功能是在酸性条件下借助 HA2 亚基的桥梁作用诱导膜融合<sup>[9]</sup>。此外,HA 蛋白是 AIV 的主要保护性抗原蛋白,会诱导宿主产生强烈的免疫反应,导致中和抗体的产生<sup>[10]</sup>。

### 2.2.2 聚合酶 (polymerase)

AIV 的 RNA 依赖性 RNA 聚合酶是一个致密复合体,由三类蛋白组成,即聚合酶碱性蛋白 2 (PB2)、聚合酶碱性蛋白 1 (PB1) 和聚合酶酸性蛋白 (PA),在核糖体中合成之后,PB2 蛋白可独立从细胞浆进入细胞核,而 PB1 和 PA 蛋白则需形成二聚体后才能进入细胞核,最终在细胞核组装成完整的复合体。RNA 聚合酶复合体调控 AIV 基因组的复制和转录过程<sup>[11]</sup>。

PB2 蛋白由 AIV 基因组 vRNA 1 片段编码,全长 759 个氨基酸,PB2 蛋白通过与宿主 mRNA 前体分子的帽子结构结合,促进产生病毒 vRNA 转录所需的 5'帽子结构的寡核苷酸引物,对 AIV 的转录起始发挥重要作用<sup>[12]</sup>。此外,PB2 蛋白还是 AIV 致病性和传播能力的重要决定因子<sup>[13]</sup>。

PB1 蛋白是 RNA 聚合酶复合体的核心,由 AIV 基因组 vRNA 2 片段编码,全长 757 个氨基酸,通过羧基端与 PB2 蛋白结合,氨基端和 PA 蛋白结合<sup>[14]</sup>。PB1 蛋白通过与病毒 RNA 的末端结合,以起始基因组的转录和复制<sup>[15]</sup>。

PA 蛋白由 AIV 基因组的 vRNA 3 片段编码,全长 716 个氨基酸,在 AIV 的复制和转录中发挥重要作用,PA 蛋白的氨基端结构域具有核酸内切酶活性,是聚合酶复合体切割宿主 mRNA 前体 5'帽子结构的功能部位,其羧基端的突变可导致聚合酶失去转录活性<sup>[16,17]</sup>。

### 2.2.3 神经氨酸酶

NA 蛋白是 AIV 粒子表面的第二种糖蛋白, 结构为四聚体, 其每个单体由一个球状的头部、一个茎区、一个疏水跨膜区和一段短而保守的氨基端胞质区组成<sup>[18]</sup>。其主要功能为在病毒感染靶细胞时, 识别细胞表面 AIV 受体末端的唾液酸残基, 促进病毒侵入细胞; 在病毒感染后期, 切割宿主细胞表面以及新生病毒粒子表面的唾液酸, 促进病毒粒子的出芽、释放和扩散, 防止出现聚集<sup>[19, 20]</sup>。保持 HA 和 NA 活性的平衡对 AIV 致病性至关重要, 不仅需要良好的 HA 活性确保病毒的吸附, 同时又需要相应的 NA 活性以保证子代病毒的释放。NA 蛋白也具有抗原性, 但 NA 蛋白的抗体不能中和病毒感染, 对病毒复制有一定程度的抑制作用<sup>[21]</sup>。

### 2.2.4 核蛋白 (nucleoprotein, NP)

核蛋白是 AIV 的主要结构蛋白, 全长 498 个氨基酸, 在结构上由头部结构域、主体结构域和尾部结构域共同组成<sup>[22]</sup>。其中 NP 蛋白的头部和主体结构域构成 RNA 结合槽, 暴露于蛋白表面, 含大量保守的碱性氨基酸, 对 RNA 具有很强的结合力。其尾部结构域插入相邻 NP 蛋白分子的主体结构域形成环状结构, 最终形成首尾相连的寡聚体结构<sup>[23]</sup>。RNA 依赖性 RNA 聚合酶的 3 个亚基 PB2、PB1、PA 与 NP 蛋白以及 RNA 共同构成核糖核蛋白 (vRNP) 复合体, 在病毒包装和复制过程中发挥关键作用。核蛋白还决定宿主的特异性, 并参与 AIV 复制过程中的多个阶段。NP 蛋白抗原结构稳定, 高度保守, 具有型和种属特异性, 在不同亚型间具有交叉反应活性, 是通用疫苗设计的潜在靶点<sup>[24]</sup>。

### 2.2.5 基质蛋白 (matrix protein, M)

基质蛋白由 AIV 基因组的 vRNA7 编码, 有两个开放阅读框, 分别翻译 M1 和 M2 蛋白。基质蛋白 M1 位于病毒粒子囊膜下, 是含量最丰富的病毒结构蛋白, 全长 252 个氨基酸, 单体呈棒状结构, 由 2 个球状的螺旋结构域组成, 具有多聚化特性<sup>[25]</sup>。M1 蛋白主要功能为调节 vRNP 复合体输出细胞核的过程, 以及在抑制病毒基因组转录以及病毒出芽过程中发挥核心作用<sup>[26]</sup>。M2 蛋白是 AIV 粒子表面除 HA 和 NA 以外的第 3 种囊膜蛋白, 全长 97 个氨基酸, 由羧基端的胞质尾区、中间的跨膜区和氨基端的胞外区 (M2e) 组成, 结构为同源四聚体<sup>[27]</sup>。M2e 在 AIV 进化过程中非常稳定, 具有广谱交叉保护作用, 成为广谱疫苗的重要研究方向。M2 蛋白的质子通道活性对维持病毒内部的酸性环境和病毒的有效复制起调节作用, 且 M2 蛋白在病毒粒子的包装和出芽过程中发挥重要作用<sup>[28]</sup>。

## 2.2.6 非结构蛋白 (nonstructural protein, NS)

非结构蛋白由 AIV 基因组的 vRNA8 编码, 分为 NS1 和 NS2 两种蛋白。NS1 蛋白全长 217-237 个氨基酸, 由氨基端 RNA 结合区域和羧基端效应结构域组成, 结构为二聚体<sup>[29]</sup>。NS1 蛋白具有核定位信号和核输出信号, 在细胞核与细胞质之间转运。NS1 蛋白的主要功能为拮抗宿主天然免疫应答, 抑制干扰素的产生, 且与 AIV 的毒力和宿主特异性相关<sup>[30]</sup>。非结构蛋白 NS2 全长 121 个氨基酸, 其主要功能为在病毒复制后期, 通过与 M1 蛋白的协同作用介导 vRNP 复合体从细胞核输出到细胞质, 故又被称为核输出蛋白 NEP<sup>[31]</sup>。

## 2.3 禽流感病毒进化与变异

### 2.3.1 病毒基因组变异

AIV 在长期进化过程中不断产生变异, 其变异方式有两种, 即基因突变和基因重组。由于 AIV 的 RNA 依赖性 RNA 聚合酶缺乏 5'-3' 核酸外切酶活性, 不具有自我校正功能, 因此在病毒复制过程中极易发生基因突变, 基因突变率约为  $4.1 \times 10^{-3}/(\text{位点} \cdot \text{年})$ <sup>[32]</sup>。AIV 的高突变率特征使得其在遗传性、抗原性、致病性、受体结合特性、耐药性以及跨宿主传播能力等方面发生复杂变异。此外, AIV 的基因组由 8 条独立单股负链 RNA 组成, 当不同亚型 AIV 感染同一宿主细胞时, 则容易发生病毒间基因片段的交换而产生新病毒, 此即基因重组, 在 AIV 流行过程中非常频繁和复杂, 是其持续进化和变异的主要驱动力<sup>[33]</sup>。大量研究揭示了不同亚型 AIV 在野鸟、水禽和家禽间不断发生基因重组, 自然界不断出现危害动物及人类健康的新基因型。

### 2.3.2 病毒抗原性变异

在感染宿主免疫系统的选择压力下, AIV 的抗原变异十分频繁, 根据其抗原性变异的程度不同可以分为两类, 即抗原漂移 (antigenic drift) 和抗原转变 (antigenic shift)。HA 蛋白和 NA 蛋白是 AIV 的主要表面抗原, HA 蛋白感染宿主细胞后诱导产生中和抗体, 而 NA 蛋白诱导产生的抗体具有一定的免疫保护作用。抗原漂移是指在病毒复制过程中, HA 和 NA 蛋白抗原位点氨基酸产生的点突变逐渐累积, 导致抗原性发生变异<sup>[34]</sup>。研究发现, H5N1 亚型 AIV 的 HA 基因在进化上形成多达 10 个不同分支, 不同分支之间抗原性差异明显, 2.1 分支 H5N1 亚型 AIV 的抗原漂移由几个位于 HA 蛋白受体结合位点附近的氨基酸所决定<sup>[35]</sup>。抗原转变为 HA 或 NA 蛋白的主要抗原变化, 是指 AIV 之间发生基因重组之后获得不同亚型的 HA 或 NA 基因, 从而产生抗原性发生根本改变的基因重组病毒, 无法被以往流行 AIV 抗体所中和, 从而引发大流行<sup>[36]</sup>。

### 2.3.3 病毒受体结合特性变异

AIV 感染宿主的第一步是其囊膜表面 HA 糖蛋白与宿主细胞表面的唾液酸受体结合, AIV 优先识别并结合唾液酸 $\alpha$ 2,3-半乳糖苷受体(“禽型”受体), 这一过程与 HA1 蛋白 RBS 区的氨基酸位点密切相关, RBS 区的单点突变即可改变 AIV 的受体结合特性, 由唾液酸 $\alpha$ 2,3-半乳糖苷受体转变为唾液酸 $\alpha$ 2,6-半乳糖苷受体(“人型”受体), 而 HA 蛋白获得与唾液酸 $\alpha$ 2,6-半乳糖苷受体结合的能力是 AIV 适应人类宿主的关键步骤<sup>[37]</sup>。目前出现的突破种间屏障感染人的 H5N1、H7N9 亚型禽流感病毒均携带与受体结合特异性相关的位点突变, 从而提高其与唾液酸 $\alpha$ 2,6-半乳糖苷受体的亲和力<sup>[38]</sup>。

## 3 禽流感病毒流行病学

### 3.1 禽流感病毒的传播

AIV 的天然储存宿主为野生水禽, 呈隐性感染, 无临床症状表现, 但会持续性向外排毒, 带毒野生水禽的大规模迁徙无疑扩大了 AIV 的传播范围。AIV 主要在禽鸟中传播, 有时会引起多种哺乳动物和人感染和发病。其传染源分为活体传染源和非活体传染源, 前者主要是 AIV 感染的禽鸟, 后者包括 AIV 感染的禽鸟的排泄物和相关禽产品, 以及这些物品污染的物体。AIV 主要通过水平传播, 主要模式为以气溶胶为媒介的空气传播和以摄入为主的粪-口传播, 感染潜伏期从数小时到数天不等, 最长可达 21d。

### 3.2 禽流感病毒的流行概况

禽流感病毒自发现以来, 就对家禽及野禽的生产和健康产生巨大影响, 严重威胁人类公共卫生安全, 成为世界各国动物疫病防控的重中之重。禽流感的历史记载可一直追溯到 1878 年, 当时 Perroncito 在意大利首次报道了高致病性禽流感, 当时称之为鸡瘟, 引起家禽很高的群体死亡率<sup>[39]</sup>。截至目前为止, 从禽类体内已监测到 16 种 HA 亚型 AIV, 其中以 H5、H7 和 H9 亚型造成的负面影响最甚。

#### 3.2.1 H5 亚型的流行概况

全球首例 H5N1 亚型高致病性禽流感疫情于 1959 年在苏格兰暴发, 我国于 1996 年在广东省首次暴发 H5N1 (Gs/Gd/96) 高致病性禽流感疫情, 随即 1997 年中国香港养鸡场暴发 H5N1 亚型流感疫情, 死亡率惊人, 经济损失惨重, 同时首次出现人感染 H5N1 病例, 共造成 18 人感染, 6 人死亡<sup>[40, 41]</sup>。2001 年后, 在中国香港家禽和野鸟中又多次分离到 H5N1 亚型 AIV, 其 HA 基因仍来源于 Gs/Gd/96 类似病毒, 但内部基因已呈现多样性。2003 年, Z 基因型 H5N1 亚型 AIV 引爆泰国、马来西亚等东南亚多国

[42]。2005 年 4 月,我国青海湖超过 6000 只野生候鸟因感染 H5N1 亚型 AIV 规模性死亡。据 WHO 统计,全球已有 17 个国家共确诊感染 H5N1 亚型 AIV 人数达 861 人,其中 455 例死亡,死亡率超 50%;中国已确诊 53 例 H5N1 亚型 AIV 感染患者,其中 31 例死亡,死亡率约为 60%。随着时间的推移,H5N1 亚型 AIV 的 HA 基因已产生不同程度的地区性变异,并不断演化出新分支[43]。H5N2 亚型 AIV 首先于 1983 年在美国宾夕法尼亚州暴发疫情,其后又在 1994 年墨西哥、1997 年意大利、1999 年比利时、2004 年美国、2006 和 2011 年南非、2012 年中国台北等地多次引发疫情[44]。H5N3 亚型 AIV 曾于 1961 年在南非引发燕鸥疫情[45]。H5N5 亚型 AIV 于 2008 年在中国活禽市场首次分离到,并于 2016 年欧洲多国暴发疫情。H5N6 亚型 AIV 于 1975 年首次从美国绿头鸭体内分离到,于 2014 年中国湖南省长沙市出现首例人感染病例,同年在中国四川省出现人死亡病例,该年暴发的多次疫情为养禽业带来巨大的经济损失,目前 H5N6 亚型 AIV 主要存在于中国、老挝及朝鲜[46,47]。H5N8 亚型 AIV 于 1983 年首次爱尔兰暴发疫情,后于 2014 年在韩国暴发疫情,H5N8 亚型 AIV 通过野鸟的迁徙来进行传播,目前已经扩散到全球 40 多个国家,其中欧洲疫情最为严重[47]。

### 3.2.2 H7 亚型的流行概况

早在 1894 年意大利北部就暴发了一次 H7 亚型高致病性禽流感,1877-1935 年间在意大利呈地方流行,并迅速在欧洲范围内扩散。1902 年意大利最先报道发现的鸡瘟后经证实为 H7N7 亚型 AIV[48]。1927 年先后在荷兰和德国发生 H7N7 和 H7N1 亚型禽流感疫情。自 1959 年从人体内首次分离到 H7N7 亚型 AIV,随后陆续有 H7 亚型 AIV 感染人病例。1963 年英国暴发 H7N3 疫情后,从 1976-1985 年分别在澳大利亚、英国和德国等国暴发四次 H7N7 亚型禽流感疫情。澳大利亚于 1992 年暴发 H7N3 亚型禽流感疫情后,澳大利亚和巴基斯坦于 1994 年又一次暴发 H7N3 疫情。1997 年在澳大利亚暴发严重的 H7N4 亚型禽流感疫情。1999-2000 年在意大利暴发 H7N1 亚型禽流感疫情,经济损失惨重。2003 年荷兰暴发大规模的 H7N7 亚型禽流感疫情,并波及周边的比利时和德国,首次报道人感染 H7N7 亚型 AIV 致死病例,经研究表明分离毒株与 $\alpha 2,6$  半乳糖苷唾液酸受体的亲和力增强,与人流感病毒相似[49]。2004 年在加拿大暴发 H7N3 亚型禽流感疫情,从两人体内分离到 H7N3 亚型 AIV。2005 年在朝鲜养鸡场暴发 H7N7 亚型禽流感疫情。2006-2012 年期间又在意大利、加拿大、墨西哥、荷兰、英国、德国、丹麦、挪威、韩国、日本等多国暴发 H7N1、H7N2、H7N3、H7N6、H7N7、H7N8 和 H7N9 等多种亚型禽流感疫情[50,51]。2013 年中国出现全球首例人感染新型重配 H7N9 亚型 AIV 死亡病例,随后在 2013-2017 年我国先后暴发五波 H7N9 禽流感疫情,大量 H7N9 毒株携带哺乳动物适应性位点突变以及耐药位点突变,2017 年第五波

疫情中的 H7N9 分离株的 HA 裂解位点更是插入多个碱性氨基酸，提示该病毒已发生变异，成为高致病性禽流感病毒，严重危害公共卫生安全<sup>[52,53]</sup>。到目前为止，H7 亚型 AIV 遍布全球，其对家禽业和公众健康的危害程度不言而喻。

### 3.2.3 H9 亚型的流行概况

H9 亚型 AIV 作为全球流行最为广泛的 LPAIV 之一，其对家禽生产的影响日益严重，逐渐成为国际关注焦点。自 1966 年从美国威斯康星州火鸡体内首次分离到 H9N2 亚型 AIV 以来，该亚型已经蔓延到世界范围，导致家禽生产性能降低，危害养禽业的健康发展<sup>[54]</sup>。1994 年在中国境内广东省首次分离到 H9N2 亚型 AIV，经过数十年的遗传演化，H9 亚型 AIV 已经成为我国流行的主要禽流感病毒亚型<sup>[55]</sup>。H9N2 亚型 AIV 不仅在家禽和野禽中广泛流行，甚至可以突破物种间屏障直接感染哺乳动物和人，早在 1998 年我国广东省就首次报道了 H9N2 亚型 AIV 感染人病例<sup>[56]</sup>。此外，H9N2 亚型禽流感病毒常为新型重配病毒提供内部基因，研究表明 1997 年报道的感染人的 H5N1 亚型 HPAIV 和 2013 年报道的感染人的 H7N9 亚型和 H10N8 亚型 AIV 其部分内部基因均由 H9N2 亚型 AIV 提供，其公共卫生意义不容忽视<sup>[57]</sup>。

## 4 禽流感病毒的诊断技术

### 4.1 临床及病理诊断

禽流感特征性临床症状表现为冠髯发绀、出血，头颈部肿大，流泪流涕，呼吸困难，衰竭死亡，部分病例会出现明显的共济失调等神经症状；临床病理变化特点为脚胫鳞片及多处皮肤出血，皮下水肿，眼结膜出血，消化道（从口腔至泄殖腔）黏膜出血、坏死、溃疡，腺胃乳头出血；组织病理变化特点为水肿、充血、出血和血管周围淋巴细胞性管套形成，主要表现在心肌、肺、肾、脾、脑和胸腺等器官。但禽流感的临床症状和病理变化受多种因素影响变异较大，且难以与其他有类似症状的传染病区分，无法做出准确诊断，确诊禽流感需要利用实验室诊断技术。

### 4.2 病原学诊断

病毒分离与鉴定目前仍是禽流感的一种高敏感性和实用的标准诊断方法，经鸡胚培养分离到有血凝性的病毒后，通过血凝-血凝抑制试验（HA-HI）及 RT-PCR 确定亚型并测序，根据序列分析及鸡胚死亡时间初步判定是否为高致病性毒株。但该方法在应用时也有一定的限制因素：操作程序繁琐，耗时费力，生物安全要求高，不利于大规模临床检测的推广应用。

## 4.3 免疫学诊断

### 4.3.1 血凝试验 (hemagglutination, HA) 和血凝抑制试验 (hemagglutination inhibition, HI)

目前, 应用最为广泛的免疫学诊断方法依然是血凝-血凝抑制试验, 其既是 WHO 进行全球流感监测推荐采用的方法, 也是我国目前针对 AI 感染和免疫的主要检测依据。AIV 囊膜表面的血凝素 HA 能凝集多种动物的红细胞, 这种凝集特性能被含特异抗体的血清抑制。HI 试验具备较高的敏感性和特异性, 适用于 AIV 的鉴定和血清中 AIV 抗体滴度的测定。但需要注意检测前需要先去血清中非特异性的凝集因素, 同时需要对抗原进行标准化。此外, HI 试验对操作人员专业素养要求高, 试验周期长, 结果判定主观性较强。

### 4.3.2 琼脂凝胶免疫扩散试验 (agar gel immunodiffusion, AGID)

1970 年, Beard 首次建立了用于禽流感抗原检测的 AGID, 根据免疫沉淀原理, 当可溶性抗原和抗体以适当比例在半固体琼脂凝胶相遇后在电解质参与下会产生一条白色沉淀线, 该方法用于检测 AIV 的共同抗原核蛋白或基质蛋白。该法操作简便、特异性较高, 但是敏感性较低, 不能区分感染与免疫。

### 4.3.3 病毒中和试验 (virus neutralization test, VNT)

病毒中和试验, 是指在体外适宜条件下混合孵育病毒与特异性抗体, 使之充分发生反应, 再将混合物接种到敏感的宿主体或细胞内, 用于测定残存病毒感染力的一种方法。该方法是一种经典的血清学检测技术, 敏感性和特异性良好, 同时可以测定动物体内中和抗体含量, 但由于操作较繁琐、耗时, 且因为操作感染性病毒对实验室生物安全级别要求高, 使得该方法无法应用于临床快速诊断。

### 4.3.4 免疫荧光技术 (indirect immunofluorescence assay, IFA)

免疫荧光技术, 是指根据抗原与抗体的特异结合特性, 先用荧光素标记已知的抗原或抗体, 将制成的荧光抗原或抗体作为探针, 检测组织或细胞内的相应抗体或抗原, 其优点包括敏感性高、特异性强和速度快等。2006 年 Dirk Dereg 等利用微球免疫法将重组 NP 蛋白结合于 Luminex 聚苯乙烯微球上, 用于检测 AIV 抗体, 检测灵敏度和特异性分别可达 99.3% 和 93.1%<sup>[58]</sup>。免疫荧光技术依赖于荧光显微镜, 不利于基层推广。

### 4.3.5 免疫层析分析技术

胶体金免疫层析技术, 以硝酸纤维素膜为固相载体, 借助毛细作用样品溶液在膜

上向前泳动,层析过程中胶体金颗粒标记物与样品溶液中待测物形成络合物,相应的配体捕获该络合物而富集显色,通过眼观膜上是否有显色带进行快速检测。该方法凭借操作简便快捷、检测结果直观的优势,适用于现场快速检测,为家禽病毒性传染病的快速诊断提供了新思路。2008年 Cui S J 等开发了用于检测 H5 亚型 AIV 抗体的胶体金试纸条,与 HI 试验相比较其灵敏度和特异性分别达到 88.8%和 97.6%<sup>[59]</sup>。2009年张殊慧等开发并组装了 H9 亚型 AIV 免疫层析快速检测试剂盒,具有高度特异性,灵敏度比血凝试验高出至少 4 倍以上,检测可在 10min 内完成,适用于 H9 亚型 AIV 的现场实时快速检测及鉴别诊断<sup>[60]</sup>。2019年吴峰等通过杂交瘤技术制备得到 H7 亚型 AIV 单抗并用荧光微球标记,基于双抗体夹心免疫层析法用于对 H7 亚型 AIV 的检测,检测灵敏度高,检出限为 0.125 HAU,适用于现场快速检测<sup>[61]</sup>。

#### 4.3.4 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

1971年瑞典学者 Engvall 和 Perlmann 首次报道了关于 ELISA 技术的使用,后于 1974年 Jennings 等首先探索 ELISA 方法对流感病毒免疫后抗体产生规律进行检测,目前已经广泛应用于食品药物残留和添加剂检测、重金属污染、生物毒素和人畜疾病检测等诸多领域。ELISA 检测技术,具体是指将待检抗体或抗原和酶标抗原或抗体按照不同步骤与结合于固相载体表面的抗原或抗体反应,形成抗原抗体复合物,通过洗涤去除免疫复合物以外的杂质,最终使结合于固相载体上的酶量与受检物质的量成正比,添加酶反应底物发生显色反应后,通过酶标仪进行定量测定的诊断方法。ELISA 既可以检测抗体又可以检测抗原,操作快速简便,适用于大批量病毒样品和血清的初筛,其具有灵敏性、特异性高、重复性好、检测速度快和易于标准化等优势,是目前进行 AI 流行病学调查和免疫抗体监测,评价疫苗免疫效力最有效和实用的方法。ELISA 检测技术主要类型有间接法、双抗体夹心法、竞争法等。

间接法 ELISA 是利用酶标记二级抗体用于检测与固相载体包被抗原特异结合的待检抗体,优点在于灵活度高,缺点在于交互反应几率高。2016年 Y. T. Redda 等利用原核表达重组 H5-HA1 蛋白作为包被抗原建立了 H5 亚型 AIV 间接 ELISA 抗体检测方法,与 HI 试验相比其检测灵敏度达 89.04%,特异性达 95.95%<sup>[62]</sup>。2017年王洋等通过离子交换层析纯化的跨膜区置换的 H7 亚型流感病毒重组 HA 蛋白建立了 H7 抗体间接 ELISA 检测法,可以精准区分 H7N9 亚型 AIV 阳性和阴性血清,检测结果与 HI 试验呈强相关性<sup>[63]</sup>。2017年仇薇等利用 H9 亚型 AIV 血凝素蛋白的头部球状区作为包被抗原,建立了灵敏特异的 H9 亚型 AIV 抗体检测间接 ELISA 方法,与 HI 试验高度相关,可进行大量样品的相对定量分析<sup>[64]</sup>。

双抗体夹心法 ELISA (DAS-ELISA),是指将已知捕获抗体连接于固相载体,待

测抗原与之结合后再与酶标抗抗体结合的方法,适用于检测具有两个及以上表位的抗原。2018年 Pose 等从 H5 亚型 AIV 单克隆抗体中筛选捕获抗体和检测抗体建立了双抗体夹心 ELISA 法,用于定量检测 H5N1 亚型流感体外嵌合 HA 蛋白<sup>[65]</sup>。2019年 Chen 等通过制备并筛选 H7 亚型 AIV 单克隆抗体,建立了双抗体夹心 ELISA 法,用于检测 H7 亚型重组 HA 蛋白和 H7 亚型 AIV,此法适用于检测目前流行的 H7N9 亚型毒株和抗原漂移型 H7 亚型病毒,表现出良好的敏感性和特异性<sup>[66]</sup>。2019年 Fan Ming 等制备了针对 H9N2 亚型 AIV 血凝素蛋白的单克隆抗体,分别将 4D10 和 5G2 作为捕获抗体和检测抗体,建立了双抗体夹心 ELISA,其检测灵敏度和特异性分别达到 98.90% 和 98.10%<sup>[67]</sup>。

斑点 ELISA 是基于硝酸纤维素膜为固相载体建立的 ELISA 检测方法,底物经酶催化反应后产生有色沉淀,使白色固相膜出现有色斑点,其优点是结果易观察判定,适用于基层现场检测,缺点为操作繁琐。2010年 Fang He 等利用一对广谱的 H5 亚型单克隆抗体 6B8 和 4C2,建立了一种 H5 亚型禽流感病毒 DOT-ELISA 通用检测法,该法检测灵敏度达到 0.5 血凝单位<sup>[68]</sup>。

竞争法 ELISA (cELISA) 是指用单克隆抗体与待测血清同时竞争固相载体包被抗原,单克隆抗体可直接进行酶标或间接用酶标抗抗体放大信号,加底物观察显色,显色强度与待检血清抗体滴度成反比,其优点为灵敏度更高,特异性更强,检测周期短。2008年李雪平等采用纯化后的灭活 H5 亚型 AIV 病毒粒子作为包被抗原,辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的 HA 蛋白单抗作为竞争检测抗体,建立了 cELISA 方法用于检测 H5 亚型 AIV 抗体,比 HI 试验敏感 2 倍以上<sup>[69]</sup>。2013年 Ana Moreno 等以纯化灭活 H5 亚型 AIV 作为包被抗原,一株广谱 H5 亚型单抗 5D8 为竞争单抗建立了竞争法 ELISA,可用于不同物种血清抗体的检测<sup>[70]</sup>。2019年范俊青等利用 H7 亚型 AIV 标准抗原进行包被,以 HRP 标记的 H7 亚型 AIV 单克隆抗体作为竞争抗体,建立了 H7 亚型 AIV cELISA 抗体检测方法,与 HI 试验相比血清检测符合率达 99.30%<sup>[71]</sup>。

## 4.4 分子生物学诊断

### 4.4.1 逆转录-聚合酶链式反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)

逆转录-聚合酶链式反应技术从基因水平检测 AIV,具备高度的敏感性和特异性,显著缩短 AIV 的检测周期,应用 RT-PCR 方法对 AIV 进行诊断的报道很多,根据原理和技术特点的差异可以分为常规 RT-PCR、巢式 RT-PCR 和多重 PCR 等。2013年谭丹等建立了 H6 亚型 AIV 一步法 RT-PCR 检测方法,尿囊液和拭子样品的检测极限均为  $10^{2.5}$  EID<sub>50</sub>/mL,同时利用该方法与病毒分离鉴定法进行临床样品检测,两者检测结果一致,结果表明该方法检测结果可靠,适于临床样品的实验室诊断<sup>[72]</sup>。2003年刘泽

文等选择 AIV 的 NP 基因设计合成一对通用外引物和内引物, 建立并优化了检测所有亚型 AIV 核酸的逆转录套式 PCR 法, 试验结果证明该法高度敏感且特异, 最低检测量为 0.2 pg 的 AIV 核酸, 适用于规模化鸡场 AIV 检测<sup>[73]</sup>。2006 年耿士忠等根据 AIV 的 NP 和 HA 基因序列, 分别设计了 1 对鉴定 A 型 AIV 的通用引物和 2 对用以区分 H5 和 H9 亚型 AIV 的特异性引物, 成功建立了多重 RT-PCR 快速检测方法。分别与病毒分离及琼脂凝胶免疫扩散试验作平行对比, 两者符合率为 100%, 灵敏度为  $10^2$  ELD<sub>50</sub><sup>[74]</sup>。

#### 4.4.2 体外等温核酸扩增技术

体外等温核酸扩增技术主要分为两类, 即依赖核酸序列扩增技术 (nucleic acid sequence-based amplification, NASBA) 和环介导等温核酸扩增技术 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP)。

NASBA 快速等温核酸扩增技术, 以 RNA 作为模板, 是应用于 RNA 扩增、检测及测序的有效工具。NASBA 技术方便快捷, 节省时间, 拥有比 RT-PCR 更高的扩增效率, 并适用于高通量筛查。2005 年刘乐庭等建立的 NASBA 技术可用于检测所有亚型的 AIV, 并能区分 H5 及 H7 亚型, 与其他病毒病原体无交叉反应<sup>[75]</sup>。Lamhoujeb S 等又在该技术基础上发展出实时 NASBA (real-time NAS-BS) 技术, 进一步提高了检测的灵敏度和特异性。

环介导等温扩增技术是一种恒温、连续并基于酶反应的新型核酸扩增技术, 由日本学者 Notomi T 等于 2000 年发明设计, 该技术具有灵敏度高 (比常规 RT-PCR 高 100 倍)、特异性强、等温高效、反应迅速和操作简便快捷等优点, 因而逐渐在病毒检测领域得到应用。2005 年 Poon LL 等报道的 LAMP 方法适用于检测 H1-H13 亚型流感病毒, 与临床诊断检测符合率为 100%<sup>[76]</sup>。2008 年候佳蕾等报道建立了一种基于 LAMP 的 H5 亚型 AIV 诊断方法, 结果表明该方法灵敏度高、特异性好且反应在 1.5 h 内即可完成<sup>[77]</sup>。2014 年 Bao H 等报道建立了针对 H7N9 亚型 AIV 快速有效的 LAMP 检测方法<sup>[78]</sup>。

#### 4.4.3 基因芯片诊断技术

基因芯片技术, 是指在硅片等芯片载体上将大量基因探针分子按照固定的排列模式进行固定, 然后与标记的样品分子进行杂交, 通过检测每个基因探针分子的杂交信号强度从而获取样品分子的序列和数量信息。基因芯片技术具有高通量、快速全自动分析、多参数同步分析、高精确度和精密度分析的特点, 在病毒的快速诊断领域应用前景广阔。2005 年王秀荣等建立了一种可靠的检测 H5、H7 和 H9 亚型的 AIV 快速

DNA 芯片检测技术<sup>[79]</sup>。2006 年 Townsend M B 等根据流感病毒的特点设计和合成芯片用于快速鉴别 A 型流感病毒的 H1N1、H3N2 和 H5N1 等亚型<sup>[80]</sup>。2009 年甲型 H1N1 流感暴发后, KANG X 等建立了基因芯片检测方法, 用于鉴别 2009 甲型 H1N1、季节性 H1N1、H3N2、H5N1 等亚型流感病毒<sup>[81]</sup>。

#### 4.4.4 实时荧光定量 RT-PCR

实时荧光定量 RT-PCR 技术由美国 Applied Biosystems 公司于 1996 年推出, 其是指在 PCR 反应体系中添加荧光集团, 整个 PCR 进程通过荧光信号累积进行实时监测, 以实现未知模板进行定量分析的方法。其具有操作简便快捷、高效客观、灵敏准确特异等特点, 并能有效防止检测过程交叉污染, 避免 PCR 产物的气溶胶污染, 确保结果的可靠性和重复性, 对于 AIV 的鉴定和分型发挥重要作用。该技术常用的检测模式有两种, 即 SYBR Green 荧光染料法和 TaqMan 探针法。

荧光染料法, 其检测原理为利用 SYBR Green 荧光染料能结合双链 DNA 小沟部位的特性对 DNA 进行相对定量分析。2008 年马莉等建立了针对 H5 亚型 AIV 的 SYBR Green I 定量 RT-PCR 快速检测法, 实验结果证明该方法特异性好, 灵敏度高, 适用于 H5 亚型 AIV 的筛检及流行病学调查<sup>[82]</sup>。2009 年张坤等建立了用于检测 H5 亚型 AIV 的 SYBR Green I 荧光定量 RT-PCR 检测方法, 检测灵敏度可达到 4.6 copies/ $\mu\text{L}$ , 成本低, 特异性强<sup>[83]</sup>。2013 年徐守振等建立了针对 H9 亚型 AIV 的 SYBR Green I 荧光定量 RT-PCR 检测方法, 该方法检测下限可达 74.3 copies/ $\mu\text{L}$ , 且特异性好、重复性佳<sup>[84]</sup>。

TaqMan 探针绝对定量法的主要原理是设计一段能与扩增片段内部相同或互补的核酸探针, 探针两端分别标记荧光基团和荧光淬灭基团, 探针在完好时由于发生荧光共振能量转移 (FRET) 不会发出荧光, 而在 PCR 扩增过程中当 Taq 酶在延伸链遇到探针时, 其 5'-3' 外切酶活性发挥功能将探针水解为单个碱基, 单个碱基间距离较远而无法发生 FRET, 从而检测到荧光信号。2017 年张慧蓉等根据欧亚谱系 H7N9 亚型 AIV 的 HA 和 NA 基因序列保守区分别设计特异性引物和 TaqMan 探针, 通过反应条件优化, 最终成功建立了 H7N9 亚型 AIV 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法, H7 和 N9 基因的最低检测限度分别为 100 copies/ $\mu\text{L}$  和 101 copies/ $\mu\text{L}$ <sup>[85]</sup>。2019 年王楷成等通过筛选最适 M 基因扩增引物和探针, 建立了一种能够检测各亚型 AIV 的通用实时荧光定量 RT-PCR 检测方法, 该方法检测耗时短、特异性好, 检测下限达  $10^{-4}$  ng/ $\mu\text{L}$ , 与传统的 RT-PCR 方法相比阳性检出符合率达 100%<sup>[86]</sup>。

## 5 禽流感病毒单克隆抗体研究进展

1957 年, 生物学家伯内特首次提出克隆选择学说, 为单克隆抗体技术提供了理论

依据；1975年，Kohler和Milstein成功创立B淋巴细胞杂交瘤技术，该项技术的问世是抗体生产的重大技术革命，使单克隆抗体的体外定向制备成为现实。杂交瘤技术制备单克隆抗体的基本原理是向小鼠体内多次注射特定抗原以刺激诱发免疫反应，分离免疫小鼠脾脏获取B淋巴细胞，将其与小鼠骨髓瘤细胞融合，经选择性培养筛选后形成在体外长期存活并稳定分泌所需特异性抗体的杂交瘤细胞株，鉴定后通过克隆化获得来源于单个杂交瘤细胞的单克隆系，最后经体内诱生或体外培养大量制备单克隆抗体。

单克隆抗体 (monoclonal antibody, McAb)，是指由同一种抗原决定簇的B淋巴细胞克隆所产生的均一性抗体。由于McAb特异性佳，效价高，性质高度均一，易于大量生产，单抗技术已深入医学、农业、食品、环境等众多领域，在生命科学研究、环境与食品监测、疾病免疫诊断、预防及临床治疗等方面取得了巨大效益，具有极为重要的理论研究价值和实用价值<sup>[87]</sup>。当前，单克隆抗体技术在禽流感快速诊断方法领域具有广阔的应用前景。2019年Qian Xiao等利用抗禽流感病毒NP蛋白和H5及H7亚型禽流感病毒HA蛋白的单抗，研制了一种新型的高通量蛋白芯片诊断方法，用于快速检测不同种属动物体内的禽流感抗体，且能鉴别H5和H7亚型AIV抗体，与IDEXX商品化ELISA试剂盒以及HI试验符合率高，对AIV的血清学诊断和流行病学调查以及疫苗接种效率的监测具有重要价值<sup>[88]</sup>。2020年Fan Yang等基于制备的两株针对H7N9亚型AIV的特异性单抗，开发了胶体金免疫层析试纸条，用于快速检测H7N9亚型AIV，检测下限为2HAU或 $10^{2.55}$ TCID<sub>50</sub><sup>[89]</sup>。2020年Huijuan Wang等制备了5株抗H7N9亚型AIV血凝素蛋白的鼠源单抗，筛选捕获和检测抗体建立了DAS-ELISA方法用于检测H7亚型AIV和定量其HA蛋白含量，检测下限为0.45 ng mL<sup>-1</sup>HA蛋白或1-2HAU/50 μL<sup>[90]</sup>。

## 参考文献

- [1] Noda T, Sagara H, Yen A, Takada A, Kida H, Cheng R H, Kawaoka Y. Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles [J]. *Nature*, 2006, 439(7075): 490-492.
- [2] Frommhamgen L H, Knight C A, Freeman N K. The ribonucleic acid, lipid, and polysaccharide constituents of influenza virus preparations [J]. *Virology*, 1959, 8(2): 176-197.
- [3] Compans R W, Meier-Ewert H, Palese P. Assembly of lipid-containing viruses [J]. *J Supramol Struct*, 1974, 2(2-4): 496-511.
- [4] Cheung T K, Poon L L. Biology of influenza a virus [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2007, 1102: 1-25.
- [5] Scholtissek C. Molecular evolution of influenza viruses [J]. *Virus Genes*, 1995, 11(2-3): 209-215.
- [6] Chen J M, Sun Y X, Chen J W, Liu S, Yu J M, Shen C J, Sun X D, Peng D. Panorama phylogenetic diversity and distribution of type A influenza viruses based on their six internal gene sequences [J]. *Virol J*, 2009, 6: 137.
- [7] Lazarowitz S G, Choppin P W. Enhancement of the infectivity of influenza A and B viruses by proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide [J]. *Virology*, 1975, 68(2): 440-454.
- [8] Klenk H D, Rott R, Orlich M, Blodorn J. Activation of influenza A viruses by trypsin treatment [J]. *Virology*, 1975, 68(2): 426-439.
- [9] Skehel J J, Wiley D C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin [J]. *Annu Rev Biochem*, 2000, 69: 531-569.
- [10] Wiley D C, Skehel J J. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus [J]. *Annu Rev Biochem*, 1987, 56: 365-394.
- [11] Arranz R, Coloma R, Chichon F J, Conesa J J, Carrascosa J L, Valpuesta J M, Ortin J, Martin-Benito J. The structure of native influenza virion ribonucleoproteins [J]. *Science*, 2012, 338(6114): 1634-1637.
- [12] Blaas D, Patzelt E, Kuechler E. Identification of the cap binding protein of influenza virus [J]. *Nucleic Acids Res*, 1982, 10(15): 4803-4812.
- [13] Rolling T, Koerner I, Zimmermann P, Holz K, Haller O, Staeheli P, Kochs G. Adaptive mutations resulting in enhanced polymerase activity contribute to high virulence of influenza A virus in mice [J]. *J Virol*, 2009, 83(13): 6673-6680.
- [14] Sugiyama K, Obayashi E, Kawaguchi A, Suzuki Y, Tame J R, Nagata K, Park S Y. Structural insight into the essential PB1-PB2 subunit contact of the influenza virus RNA polymerase [J]. *EMBO J*, 2009, 28(12): 1803-1811.
- [15] Gonzalez S, Ortin J. Characterization of influenza virus PB1 protein binding to viral RNA: two

- separate regions of the protein contribute to the interaction domain [J]. *J Virol*, 1999, 73(1): 631-637.
- [16] Li M L, Rao P, Krug R M. The active sites of the influenza cap-dependent endonuclease are on different polymerase subunits [J]. *EMBO J*, 2001, 20(8): 2078-2086.
- [17] Nieto A, de la Luna S, Barcena J, Portela A, Ortin J. Complex structure of the nuclear translocation signal of influenza virus polymerase PA subunit [J]. *J Gen Virol*, 1994, 75( Pt 1): 29-36.
- [18] Blundell T, Sibanda B L, Pearl L. Three-dimensional structure, specificity and catalytic mechanism of renin [J]. *Nature*, 1983, 304(5923): 273-275.
- [19] Palese P, Tobita K, Ueda M, Compans R W. Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase [J]. *Virology*, 1974, 61(2): 397-410.
- [20] Suzuki T, Takahashi T, Guo C T, Hidari K I, Miyamoto D, Goto H, Kawaoka Y, Suzuki Y. Sialidase activity of influenza A virus in an endocytic pathway enhances viral replication [J]. *J Virol*, 2005, 79(18): 11705-11715.
- [21] Schulman J L, Khakpour M, Kilbourne E D. Protective effects of specific immunity to viral neuraminidase on influenza virus infection of mice [J]. *J Virol*, 1968, 2(8): 778-786.
- [22] Ye Q, Krug R M, Tao Y J. The mechanism by which influenza A virus nucleoprotein forms oligomers and binds RNA [J]. *Nature*, 2006, 444(7122): 1078-1082.
- [23] Chan W H, Ng A K, Robb N C, Lam M K, Chan P K, Au S W, Wang J H, Fodor E, Shaw P C. Functional analysis of the influenza virus H5N1 nucleoprotein tail loop reveals amino acids that are crucial for oligomerization and ribonucleoprotein activities [J]. *J Virol*, 2010, 84(14): 7337-7345.
- [24] Yewdell J W, Bennink J R, Smith G L, Moss B. Influenza A virus nucleoprotein is a major target antigen for cross-reactive anti-influenza A virus cytotoxic T lymphocytes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985, 82(6): 1785-1789.
- [25] Rossman J S, Lamb R A. Influenza virus assembly and budding [J]. *Virology*, 2011, 411(2): 229-236.
- [26] Boulo S, Akarsu H, Ruigrok R W, Baudin F. Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes [J]. *Virus Res*, 2007, 124(1-2): 12-21.
- [27] Lamb R A, Choppin P W. Identification of a second protein (M2) encoded by RNA segment 7 of influenza virus [J]. *Virology*, 1981, 112(2): 729-737.
- [28] Takeda M, Pekosz A, Shuck K, Pinto L H, Lamb R A. Influenza a virus M2 ion channel activity is essential for efficient replication in tissue culture [J]. *J Virol*, 2002, 76(3): 1391-1399.
- [29] Melen K, Kinnunen L, Fagerlund R, Ikonen N, Twu K Y, Krug R M, Julkunen I. Nuclear and nucleolar targeting of influenza A virus NS1 protein: striking differences between different virus

- subtypes [J]. *J Virol*, 2007, 81(11): 5995-6006.
- [30] Garcia-Sastre A, Egorov A, Matassov D, Brandt S, Levy D E, Durbin J E, Palese P, Muster T. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems [J]. *Virology*, 1998, 252(2): 324-330.
- [31] Richardson J C, Akkina R K. NS2 protein of influenza virus is found in purified virus and phosphorylated in infected cells [J]. *Arch Virol*, 1991, 116(1-4): 69-80.
- [32] Saitou N, Nei M. Polymorphism and evolution of influenza A virus genes [J]. *Mol Biol Evol*, 1986, 3(1): 57-74.
- [33] 于康震, 崔尚金, 付朝阳, 唐秀英. 禽流感与养禽业发展和人类健康 [J]. *中国预防兽医学报*, 2000, 22(04): 73-76.
- Yu K Z, Cui S J, Fu C Y, Tang X Y. Avian influenza for poultry industry development and human health [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2000, 22(04): 73-76 (in Chinese).
- [34] Both G W, Sleight M J, Cox N J, Kendal A P. Antigenic drift in influenza virus H3 hemagglutinin from 1968 to 1980: multiple evolutionary pathways and sequential amino acid changes at key antigenic sites [J]. *J Virol*, 1983, 48(1): 52-60.
- [35] Koel B F, van der Vliet S, Burke D F, Bestebroer T M, Bharoto E E, Yasa I W, Herliana I, Laksono B M, Xu K, Skepner E, Russell C A, Rimmelzwaan G F, Perez D R, Osterhaus A D, Smith D J, Prajitno T Y, Fouchier R A. Antigenic variation of clade 2.1 H5N1 virus is determined by a few amino acid substitutions immediately adjacent to the receptor binding site [J]. *mBio*, 2014, 5(3): e01070-14.
- [36] Webster R G, Govorkova E A. Continuing challenges in influenza [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2014, 1323(1): 115-139.
- [37] Rogers G N, Paulson J C. Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin [J]. *Virology*, 1983, 127(2): 361-373.
- [38] Imai M, Kawaoka Y. The role of receptor binding specificity in interspecies transmission of influenza viruses [J]. *Curr Opin Virol*, 2012, 2(2): 160-167.
- [39] Lycett S J, Duchatel F, Digard P. A brief history of bird flu [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2019, 374(1775): 20180257.
- [40] Kim S M, Kim Y I, Pascua P N, Choi Y K. Avian Influenza A Viruses: Evolution and Zoonotic Infection [J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2016, 37(4): 501-511.
- [41] Vijaykrishna D, Bahl J, Riley S, Duan L, Zhang J X, Chen H, Peiris J S, Smith G J, Guan Y. Evolutionary dynamics and emergence of panzootic H5N1 influenza viruses [J]. *PLoS Pathog*, 2008,

- 4(9): e1000161.
- [42] Li K S, Guan Y, Wang J, Smith G J, Xu K M, Duan L, Rahardjo A P, Puthavathana P, Buranathai C, Nguyen T D, Estoepangestie A T, Chaisingh A, Auewarakul P, Long H T, Hanh N T, Webby R J, Poon L L, Chen H, Shortridge K F, Yuen K Y, Webster R G, Peiris J S. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia [J]. *Nature*, 2004, 430(6996): 209-213.
- [43] Guan Y, Smith G J. The emergence and diversification of panzootic H5N1 influenza viruses [J]. *Virus Res*, 2013, 178(1): 35-43.
- [44] Lupiani B, Reddy S M. The history of avian influenza [J]. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2009, 32(4): 311-323.
- [45] Becker W B. The isolation and classification of Tern virus: influenza A-Tern South Africa--1961 [J]. *J Hyg (Lond)*, 1966, 64(3): 309-320.
- [46] Du Y, Chen M, Yang J, Jia Y, Han S, Holmes E C, Cui J. Molecular Evolution and Emergence of H5N6 Avian Influenza Virus in Central China [J]. *J Virol*, 2017, 91(12): e00143-17.
- [47] Nunez I A, Ross T M. A review of H5Nx avian influenza viruses [J]. *Ther Adv Vaccines Immunother*, 2019, 7: 2515135518821625.
- [48] Capua I, Alexander D J. Avian influenza: recent developments [J]. *Avian Pathol*, 2004, 33(4): 393-404.
- [49] Fouchier R A, Schneeberger P M, Rozendaal F W, Broekman J M, Kemink S A, Munster V, Kuiken T, Rimmelzwaan G F, Schutten M, Van Doornum G J, Koch G, Bosman A, Koopmans M, Osterhaus A D. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(5): 1356-1361.
- [50] Abdelwhab E M, Veits J, Mettenleiter T C. Prevalence and control of H7 avian influenza viruses in birds and humans [J]. *Epidemiol Infect*, 2014, 142(5): 896-920.
- [51] 朱闻斐, 高荣保, 王大燕, 杨磊, 朱云, 舒跃龙. H7 亚型禽流感病毒概述 [J]. *病毒学报*, 2013, 29(03): 245-249.
- Zhu W P, Gao R B, Wang D Y, Yang L, Zhu Y, Shu Y L. A review of H7 subtype avian influenza virus [J]. *Chinese Journal of Virology*, 2013, 29(03): 245-249 (in Chinese with English abstract).
- [52] Liu D, Shi W, Shi Y, Wang D, Xiao H, Li W, Bi Y, Wu Y, Li X, Yan J, Liu W, Zhao G, Yang W, Wang Y, Ma J, Shu Y, Lei F, Gao G F. Origin and diversity of novel avian influenza A H7N9 viruses causing human infection: phylogenetic, structural, and coalescent analyses [J]. *Lancet*, 2013, 381(9881): 1926-1932.
- [53] Wang X, Jiang H, Wu P, Uyeki T M, Feng L, Lai S, Wang L, Huo X, Xu K, Chen E, Wang X, He J,

- Kang M, Zhang R, Zhang J, Wu J, Hu S, Zhang H, Liu X, Fu W, Ou J, Wu S, Qin Y, Zhang Z, Shi Y, Zhang J, Artois J, Fang V J, Zhu H, Guan Y, Gilbert M, Horby P W, Leung G M, Gao G F, Cowling B J, Yu H. Epidemiology of avian influenza A H7N9 virus in human beings across five epidemics in mainland China, 2013-17: an epidemiological study of laboratory-confirmed case series [J]. *Lancet Infect Dis*, 2017, 17(8): 822-832.
- [54] Homme P J, Easterday B C. Avian influenza virus infections. I. Characteristics of influenza A-turkey-Wisconsin-1966 virus [J]. *Avian Dis*, 1970, 14(1): 66-74.
- [55] Sun Y, Liu J. H9N2 influenza virus in China: a cause of concern [J]. *Protein Cell*, 2015, 6(1): 18-25.
- [56] Peacock T H P, James J, Sealy J E, Iqbal M. A Global Perspective on H9N2 Avian Influenza Virus [J]. *Viruses*, 2019, 11(7): 620.
- [57] Gu M, Xu L, Wang X, Liu X. Current situation of H9N2 subtype avian influenza in China [J]. *Vet Res*, 2017, 48(1): 49.
- [58] Deregt D, Furukawa-Stoffer T L, Tokaryk K L, Pasick J, Hughes K M, Hooper-McGrevy K, Baxi S, Baxi M K. A microsphere immunoassay for detection of antibodies to avian influenza virus [J]. *J Virol Methods*, 2006, 137(1): 88-94.
- [59] Cui S, Chen C, Tong G. A simple and rapid immunochromatographic strip test for monitoring antibodies to H5 subtype Avian Influenza Virus [J]. *J Virol Methods*, 2008, 152(1-2): 102-105.
- [60] 彭伏虎, 张殊慧, 王政, 宋念华, 方羽, 张文通, 张展英, 毕丁仁. H9 亚型禽流感病毒免疫层析快速检测试剂盒的研制及应用 [J]. *中国兽医学报*, 2009, 29(05): 584-587+593.
- Peng F H, Zhang S H, Wang Z, Song N H, Fang Y, Zhang W T, Zhang Z Y, Bi D R. Development and evaluation of an immunochromatographic test kit for rapid detection of H9 subtype avian influenza virus [J]. *Chin J Vet Sci*, 2009, 29(05): 584-587+593 (in Chinese with English abstract).
- [61] 吴峰, 卢奕良, 吕琦, 毛茅, 岑瑜, 马岚. 禽流感病毒 H7 亚型快速检测方法建立及应用 [J]. *云南大学学报(自然科学版)*, 2019, 41(S1): 103-107.
- Wu F, Lu Y L, Lyu Q, Mao M, Cen Y, Ma L. Establishment and application of a rapid detection method for avian influenza virus H7 subtype [J]. *Journal of Yunnan University*, 2019, 41(S1): 103-107 (in Chinese with English abstract).
- [62] Redda Y T, Venkatesh G, Kalaiyarasu S, Bhatia S, Kumar D S, Nagarajan S, Pillai A, Tripathi S, Kulkarni D D, Dubey S C. Expression and purification of recombinant H5HA1 protein of H5N1 avian influenza virus in *E. coli* and its application in indirect ELISA [J]. *J Immunoassay Immunochem*, 2016, 37(4): 346-358.
- [63] 王洋, 吴芷慧, 薛春宜, 曹永长. 应用跨膜区置换的血凝素蛋白建立 H7N9 禽流感病毒抗体间接 ELISA 检测方法 [J]. *微生物学通报*, 2017, 44(12): 2812-2821.

- Wang Y, Wu Z H, Xue C Y, Cao Y C. Establishment of an indirect ELISA for detecting H7N9 subtype avian influenza virus antibodies applied with hemagglutinin containing a replaced transmembrane domain [J]. *Microbiology China*, 2017, 44(12): 2812-2821 (in Chinese with English abstract).
- [64] 仇薇, 侯力丹, 宋洁, 张爽, 李芸, 李晶, 孙蕾, 范文辉, 刘文军. 一种更灵敏的特异性检测 H9 亚型禽流感抗体的间接 ELISA 方法的建立 [J]. *生物工程学报*, 2017, 33(08): 1253-1264.
- Zhang W, Hou L D, Song J, Zhang S, Li Y, Li J, Sun L, Fan W H, Liu W J. Establishment of a high sensitive indirect ELISA for detecting specific antibodies against H9 subtype avian influenza virus [J]. *Chin J Biotech*, 2017, 33(08): 1253-1264 (in Chinese with English abstract).
- [65] Pose A G, Rodriguez E R, Pineiro M J, Montesino R, Sanchez O, Toledo J R. Quantitative ELISA sandwich for a new vaccine against avian influenza virus H5N1 [J]. *J Immunol Methods*, 2018, 459: 70-75.
- [66] Chen L, Ruan F, Sun Y, Chen H, Liu M, Zhou J, Qin K. Establishment of sandwich ELISA for detecting the H7 subtype influenza A virus [J]. *J Med Virol*, 2019, 91(6): 1168-1171.
- [67] Ming F, Cheng Y, Ren C, Suolang S, Zhou H. Development of a DAS-ELISA for detection of H9N2 avian influenza virus [J]. *J Virol Methods*, 2019, 263: 38-43.
- [68] He F, Soejoedono R D, Murtini S, Goutama M, Kwang J. Complementary monoclonal antibody-based dot ELISA for universal detection of H5 avian influenza virus [J]. *BMC Microbiol*, 2010, 10: 330.
- [69] 李雪平, 邓国华, 高玉伟, 唐艳玲, 艾嘉亮, 葛叶, 陈化兰. 检测流感病毒 H5 亚型抗体竞争 ELISA 方法的建立及初步应用 [J]. *中国预防兽医学报*, 2008, 30(09): 716-720.
- Li X P, Deng G H, Gao Y W, Tang Y L, Ai J L, Ge Y, Chen H L. Establishment of a rapid competitive ELISA for detecting antibodies against influenza A virus H5 subtype [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2008, 30(09): 716-720 (in Chinese with English abstract).
- [70] Moreno A, Lelli D, Brocchi E, Sozzi E, Vinco L J, Grilli G, Cordioli P. Monoclonal antibody-based ELISA for detection of antibodies against H5 avian influenza viruses [J]. *J Virol Methods*, 2013, 187(2): 424-430.
- [71] 范俊青, 魏燕鸣, 邹忠, 李冉, 孙小美, 金梅林. 禽流感病毒 H7 亚型竞争 ELISA 抗体检测方法的建立 [J]. *养殖与饲料*, 2019, (01): 32-36.
- Fan J Q, Wei Y M, Zou Z, Li R, Sun X M, Jin M L. Development and evaluation of a C-ELISA for rapid detection of antibody to AIV- H7 [J]. *Husbandry and Feed*, 2019, (01): 32-36 (in Chinese).
- [72] 谭丹, 邓国华, 施建忠, 刘道新, 陈化兰. H6 亚型禽流感病毒一步法 RT-PCR 检测方法的建立 [J]. *中国预防兽医学报*, 2013, 35(02): 142-145.
- Tan D, Deng G H, Shi J Z, Liu D X, Chen H L. Development of one step RT-PCR technique for

- detection of H6 subtype avian influenza virus [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2013, 35(02): 142-145 (in Chinese with English abstract).
- [73] 刘泽文, 徐涤平, 杨峻, 邵华斌, 段正赢, 山口成夫. 应用逆转录套式 PCR 检测禽流感病毒核酸研究 [J]. 湖北农业科学, 2003, (04): 90-92.
- Liu Z W, Xu D P, Yang J, Shao H B, Duan Z Y, Shankou C F. Study on detection of avian influenza virus nucleic acid by reverse transcription nested PCR [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2003, (04): 90-92 (in Chinese).
- [74] 耿士忠, 曾显营, 潘志明, 黄金林, 焦新安, 刘秀梵. 禽流感病毒 H5 和 H9 亚型多重 RT-PCR 快速检测方法的建立 [J]. 中国兽医学报, 2006, 26(02): 160-161.
- Geng S Z, Zeng X Y, Pan Z M, Huang J L, Jiao X A, Liu X F. Multiplex RT-PCR for detection of different subtype (H5 and H9) of avian influenza virus [J]. Chin J Vet Sci, 2006, 26(02): 160-161 (in Chinese with English abstract).
- [75] 刘乐庭, 刘爽, 封燕芸, 陈建国, 于常海. NASBA——一种新型禽流感病毒检测方法 [J]. 中国生物工程杂志, 2005, 25(11): 96-99.
- Liu L T, Liu S, Feng Y Y, Chen J G, Yu C H. NASBA---A New method to detect avian influenza virus [J]. China Biotechnology, 2005, 25(11): 96-99 (in Chinese with English abstract).
- [76] Poon L L, Leung C S, Chan K H, Lee J H, Yuen K Y, Guan Y, Peiris J S. Detection of human influenza A viruses by loop-mediated isothermal amplification [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(1): 427-430.
- [77] 侯佳蕾, 罗开健, 樊惠英, 焦培荣, 亓文宝, 曹伟胜, 廖明, 任涛. H5 亚型禽流感病毒 RT-LAMP 快速检测方法的建立 [J]. 中国兽医科学, 2008, 38(12): 1070-1074.
- Hou J L, Luo K J, Fan H Y, Jiao P R, Qi W B, Cao W S, Liao M, Ren T. Establishment of rapid reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification for detection of H5 subtype avian influenza virus [J]. Chinese Veterinary Science, 2008, 38(12): 1070-1074 (in Chinese with English abstract).
- [78] Bao H, Zhao Y, Wang Y, Xu X, Shi J, Zeng X, Wang X, Chen H. Development of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method for the rapid detection of subtype H7N9 avian influenza virus [J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 525064.
- [79] 王秀荣, 邓国华, 于康震, 石锐, 刘丽玲, 乔传玲, 陈化兰, 孔宪刚. 在 DNA 芯片平台上探测 AIV 不同亚型 cDNA [J]. 中国农业科学, 2005, 38(02): 394-398.
- Wang X R, Deng G H, Yu K Z, Shi R, Liu L L, Qiao C L, Chen H L, Kong X G. Detection of cDNA of avian influenza virus by DNA microarray [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2005, 38(02): 394-398 (in Chinese with English abstract).
- [80] Townsend M B, Dawson E D, Mehlmann M, Smagala J A, Dankbar D M, Moore C L, Smith C B,

- Cox N J, Kuchta R D, Rowlen K L. Experimental evaluation of the FluChip diagnostic microarray for influenza virus surveillance [J]. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(8): 2863-2871.
- [81] Kang X, Li Y, Sun H, Wu W, Liu H, Lin F, Qing C, Chang G, Zhu Q, Chen W, Yang Y. Subtype identification of the novel A H1N1 and other human influenza A viruses using an oligonucleotide microarray [J]. *Arch Virol*, 2010, 155(1): 55-61.
- [82] 马莉, 汤承, 李明义, 岳华, 张彬, 张兆敏. SYBR Green I 定量 RT-PCR 快速检测 H5 亚型禽流感病毒方法的建立 [J]. *中国家禽*, 2008, 30(20): 18-21.
- Ma L, Tang C, Li M Y, Yue H, Zhang B, Zhang Z M. Establishment of SYBR Green I real-time RT-PCR for rapid diagnosis of H5 subtype avian influenza virus [J]. *China Poultry*, 2008, 30(20): 18-21 (in Chinese with English abstract).
- [83] 张坤, 李刚, 贾凤芹. H5N1 禽流感病毒微磁粒捕捉系统和 SYBR Green I 荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立 [J]. *中国兽医学报*, 2009, 29(09): 1144-1148.
- Zhang K, Li G, Jia F Q. Development of magnetic bead capture system and SYBR Green I real time RT-PCR technique for detection of avian influenza A (H5N1) virus [J]. *Chin J Vet Sci*, 2009, 29(09): 1144-1148 (in Chinese with English abstract).
- [84] 徐守振, 尹燕博. H9 亚型禽流感病毒 SYBR Green I 荧光定量 RT-PCR 法检测方法的建立 [J]. *青岛农业大学学报(自然科学版)*, 2013, 30(03): 195-199.
- Xu S Z, Yi Y B. Establishment of SYBR Green I real-time RT-PCR detecting H9 avian influenza virus [J]. *Journal of Qingdao Agricultural University (Natural Science)*, 2013, 30(03): 195-199 (in Chinese with English abstract).
- [85] 张慧蓉, 秦桂平, 李蓉, 于观留, 刘纪园, 韦良孟, 柴同杰. H7N9 亚型 AIV 荧光定量 RT-PCR 技术建立及在活禽市场的应用 [J]. *中国兽医学报*, 2017, 37(01): 78-82+96.
- Zhang H R, Qin G P, Li R, Yu G L, Liu J Y, Wei L M, Chai T J. Establishment of real-time RT-PCR for detection of H7N9 subtype AIV and its application in live poultry markets [J]. *Chin J Vet Sci*, 2017, 37(01): 78-82+96 (in Chinese with English abstract).
- [86] 王楷成, 王素春, 朱琳, 仲焕香, 黄保续. 禽流感病毒实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立 [J]. *中国动物检疫*, 2019, 36(04): 64-69.
- Wang K C, Wang S C, Zhu L, Zhong H X, Huang B X. Establishment of real-time RT-PCR for detection of avian influenza virus [J]. *Chinese Animal Quarantine*, 2019, 36(04): 64-69 (in Chinese with English abstract).
- [87] 袁华平, 关锋, 李桂梅. 流感病毒及其单克隆抗体的研究进展 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2013, 23(18): 3618-3619+3622.
- Yuan H P, Guan F, Li G M. Research progress of influenza virus and its monoclonal antibody production

- [J]. *Chin J Health Lab Tec*, 2013, 23(18): 3618-3619+3622 (in Chinese with English abstract).
- [88] Xiao Q, Bi Z, Yao L, Lei J, Yan Y, Zhou J, Yan L. Novel protein microarray for the detection of avian influenza virus antibodies and simultaneous distinction of antibodies against H5 and H7 subtypes [J]. *Avian Pathol*, 2019, 48(6): 528-536.
- [89] Yang F, Xiao Y, Chen B, Wang L, Liu F, Yao H, Wu N, Wu H. Development of a colloidal gold-based immunochromatographic strip test using two monoclonal antibodies to detect H7N9 avian influenza virus [J]. *Virus Genes*, 2020, 56(3): 396-400.
- [90] Wang H, Zhou J, Wang D, Huang B, Tan W. Development and optimized pairing of mouse monoclonal antibodies for detecting hemagglutinin in novel H7 subtype influenza viruses [J]. *Sci China Life Sci*, 2020, 63(2): 279-289.

## 第二篇 研究内容

### 第二章 AIV H5、H7 和 H9 亚型三重荧光定量 RT-PCR 方法的建立

**摘要：**禽流感是由正黏病毒科 A 型流感病毒引起的禽类烈性传染病，其中 H5、H7 和 H9 亚型 AIV 是危害我国养禽业的三类主要病毒亚型。荧光定量 RT-PCR 技术（Real-time RT-PCR）作为一种新型的分子核酸检测技术具有高度敏感性和特异性，并可极大缩短禽流感病毒的检出时间，能在数小时内检出痕量病原。本研究借助实验室已有工作平台，根据 Genbank 中公开发表的 H5、H7 和 H9 亚型 HA 基因序列，分析筛选出特异的保守片段，设计并合成特异性探针和引物，通过系统优化反应体系和反应程序，初步建立了一种可以单管同时检测并区分 H5、H7 和 H9 亚型 AIV 的三重荧光定量 RT-PCR 快速检测方法，扩增时间控制在约 70 min。用背景清楚的 H1-H13 亚型 AIV 和其它禽类病原评价该方法，该方法除对 H5、H7 和 H9 亚型 AIV 检测结果为阳性外，其他检测结果均为阴性，表现出了良好的特异性；在敏感性试验中，通过分别检测 10 倍系列稀释的 H5、H7 和 H9 亚型标准毒株，确定其最低检测滴度分别可达到  $10^3$ 、 $10^2$  和  $10^2$  EID<sub>50</sub>/100  $\mu$ L；重复性测定显示，检测 Ct 值的组内和组间变异系数分别为 0.18%-3.22% 和 0.82%-3.35%。在共感染模型试验中，可以精确检测不同病毒滴度的 H5、H7 和 H9 亚型 AIV 混合感染。经过分析 204 份临床样本的检测结果，该方法与病毒分离鉴定法的符合度高。本研究所建立的新型一步法三重荧光定量 RT-PCR 快速检测方法为 H5、H7 和 H9 亚型 AIV 的临床诊断和流行病学调查提供了一种快速高效的定量检测工具。

**关键词：**禽流感；H5 亚型；H7 亚型；H9 亚型；实时荧光定量 RT-PCR

禽流感作为长期威胁国际社会的人畜共患传染病，受到全球学者的广泛关注和持续监测<sup>[1]</sup>。其中高致病性禽流感是侵害家禽的主要烈性传染病，其病原主要集中于 H5 和 H7 亚型 AIV，突然暴发且传播快，发病率和病死率高达 100%，严重危害养禽业安全，经济损失巨大<sup>[2-4]</sup>。低致病性禽流感中的 H9 亚型禽流感因其在世界范围内分布广泛，导致隐形感染家禽生产性能下降和免疫抑制而备受关注。此外，H5、H7 和 H9 亚型 AIV 均已突破种间屏障获得直接感染哺乳动物的能力，导致人类出现角膜炎、急性呼吸窘迫综合征、多器官功能衰竭甚至死亡，对于人类公共卫生安全构成巨大的潜在威胁<sup>[5-8]</sup>。因此，加强对这三种亚型禽流感病毒的检测防控，已成为世界各国防疫的

重中之重。

目前,实验室诊断是确诊禽流感的唯一有效途径。长期以来病毒分离试验是 OIE 推荐的禽流感病毒经典鉴定方法,其灵敏度高,试验设备要求低,但检测周期长,操作繁琐,时效性差,不利于快速检测。目前分子生物学检测技术由于其具有敏感性高、特异性强、检测对象为核酸等特点被广泛应用于 AIV 诊断中,其中实时荧光定量聚合酶链式反应是一种基于 PCR 技术通过荧光信号累积完成实时监测 PCR 扩增过程的新方法,其扩增迅速,通过标准曲线精准定量核酸起始拷贝数,无需常规 PCR 后处理过程、交叉污染机率小且适合于多重高通量方法的研发<sup>[9-14]</sup>。

为了进一步优化现有的实时荧光定量 RT-PCR 快速检测方法,本研究开发了一种可同时诊断 H5、H7 和 H9 亚型 AIV 的三重荧光定量 RT-PCR 检测方法。该方法操作简便,特异性和灵敏度高,快速准确,为 H5、H7 和 H9 亚型 AIV 的临床样品快速筛检和长期流行病学监测提供了新的技术手段。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 主要仪器设备

实时荧光定量 PCR 仪购自 Roche 公司;移液器、PCR 仪、常温离心机和 4 °C 低温离心机购自 Eppendorf 公司;超低温冰箱、生物安全柜、恒温生化培养箱和 Nanodrop 超微量分光光度计购自 Thermo Scientific 公司;纯水系统购自 Millipore 公司。

### 1.2 主要生物试剂

病毒 RNA 抽提试剂盒购自 Omega 公司;一步法荧光定量 RT-PCR 试剂盒、反转录试剂盒 Hiscript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit、Phonta Max Super-Fidelity DNA 高保真聚合酶与 2×taq plus master mix 购自 Vazyme 公司;质粒小提试剂盒购自天根生化科技有限公司;胶回收试剂盒购自 Axygen 公司;pMD18-T 克隆载体质粒购自 TaKaRa 公司;β-丙内酯购自南京梅林学海生物科技有限公司。

### 1.3 病毒与鸡胚

H1-H8, H10-H13 亚型禽流感病毒(其中 H5 与 H7 亚型毒株是以 A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) (简称 PR8) 六个基因片段作为骨架构建的低致病力毒株, H5 亚型毒株的 HA 和 NA 基因片段来源于 A/chicken/Jiangsu/k0101/2010 (H5N1), H7 亚型毒株的 HA 和 NA 基因片段来源于 A/duck/Zhejiang/12/2011 (H7N3))、禽传染性支气管炎病毒(avian infectious bronchitis virus, IBV) 和禽传染性法氏囊病病毒(infectious bursal disease virus, IBDV) 均由农业部病毒学重点实验室分离并保存; H9 亚型毒株

(A/chicken/Zhejiang/A2013/2017 (H9N2))、新城疫病毒 (Newcastle disease virus, NDV-LASOTA) 和 J 亚群禽白血病病毒 (avian leukosis virus-J subgroup, ALV-J) 由本实验室保存, 毒株信息详见附录; 9-11 日龄的无特定病原体 (SPF) 鸡胚购自乾元浩生物股份有限公司南京生物药厂。

#### 1.4 引物及探针设计

根据 H5、H7 和 H9 三种亚型禽流感病毒血凝素 (HA) 编码基因 HA 基因进行引物设计。参照 Genbank 中公开发表的 H5、H7 和 H9 亚型禽流感病毒的 HA 基因序列, 通过基因比对并分析确定保守核苷酸区域, 分别设计特异性引物及 TaqMan 探针。其中 H5 亚型禽流感病毒 HA 基因的特异探针在其 5' 端携带 Cy5 荧光报告基团, 3' 端携带 BHQ2 荧光淬灭基团; H7 亚型禽流感病毒 HA 基因的特异探针在其 5' 端携带 JOE 荧光报告基团, 3' 端携带 BHQ1 荧光淬灭基团; H9 亚型禽流感病毒 HA 基因的特异探针在其 5' 端携带 FAM 荧光报告基团, 3' 端携带 BHQ1 荧光淬灭基团。引物及探针序列见表 2-1, 以下引物与探针均由上海生工生物工程有限公司合成:

表 2-1 引物及探针序列

Table 2-1 Sequences for primer pairs and probes

Name	Sequence (5'-3')	Site	Length
H9 probe	FAM-CATGGAGACAATTCGGAACGG -BHQ1	1458	
H9-F	CAGAACAAGAAGGCAGCAA	1641	157
H9-R	AATGTGATGACCARTGCATGG	1442	
H7 probe	JOE-ACTAAGCAGCGGCTACAAAGAT-BHQ1	1548	
H7-F	CCATTRCAATGGCTAGAAG	1627	105
H7-R	AATAGAATACAGATWGACCCAGT	1522	
H5 probe	Cy5-TTCTTGTTTAAATTCTCTATTCT-BHQ2	1283	
H5-F	GTACCACCATAGCAATGAGCAG	1104	210
H5-R	AGTCCAGACATCTAGGAATCCGT	1314	

#### 1.5 H5、H7 和 H9 标准毒株鸡胚半数感染量 (EID<sub>50</sub>) 滴定

取 H5、H7 和 H9 标准病毒尿囊液进行连续 10 倍稀释, 取 10<sup>-1</sup>-10<sup>-11</sup> 的 11 个稀释度分别接种 9-11 日龄 SPF 鸡胚, 每个稀释度接种 4 枚鸡胚, 每枚鸡胚 0.1 mL。接种后的鸡胚置于 37 °C 孵育 48 h, 24 h 以内的死胚为非特异性死亡, 废弃不计。收获存活至 48 h 的鸡胚尿囊液, 测定其血凝效价 (HA), 血凝阳性 (血凝效价 > 2<sup>4</sup>) 判定为感染, 根据 Reed-Muench 法计算出病毒的滴度, 单位为 EID<sub>50</sub>/100 μL。

#### 1.6 病毒基因组 RNA 提取

取适量鸡胚尿囊液, 12,000×g 离心 5 min, 吸取上清 200 μL, 置于无 RNA 酶离

心管中；在取出的上清中加入 1 mL RNA-Solv（使用前每毫升 RNA-Solv 添加 20 微升  $\beta$ -巯基乙醇），让两者混合均匀，静置 5 min；吸取 200  $\mu$ L 氯仿到上述混合液，充分混匀，静置 10 min，4  $^{\circ}$ C，12,000 $\times$ g 离心 15 min；离心后上清移入新离心管，加等量 70%乙醇，充分混匀；将 HiBind<sup>®</sup> RNA Mini Column 放入 2 mL 收集管中，每次转移 700  $\mu$ L 混合液至 HiBind<sup>®</sup> RNA Mini Column 中，10,000 $\times$ g 离心 1 min，弃除废液；加入 250  $\mu$ L RNA Wash Buffer I，10,000 $\times$ g 离心 1 min，弃除废液；在 HiBind<sup>®</sup> RNA Mini Column 膜中央滴加 75  $\mu$ L DNase I 消化混合液（73.5  $\mu$ L DNase I 消化液+1.5  $\mu$ L DNase I），室温下静置 15 min 后加入 250  $\mu$ L RNA Wash Buffer I，室温下静置 2 min 后，10,000 $\times$ g 离心 1 min，弃除废液；加入 500  $\mu$ L RNA Wash Buffer II，10,000 $\times$ g 离心 1 min，弃除废液，重复该步骤两次；将 HiBind<sup>®</sup> RNA Mini Column 放回 2 mL 收集管中，12,000 $\times$ g 离心 2 min 至柱基质完全干燥；将 HiBind<sup>®</sup> RNA Mini Column 放入到新 1.5 mL 离心管中，加入 45-75  $\mu$ L DEPC 水，室温下静置 1 min，12,000 $\times$ g 离心 2 min 洗脱 RNA；获得的 RNA 产物测浓度后于 -80  $^{\circ}$ C 保存。

### 1.7 三重荧光定量 RT-PCR 反应体系及程序的优化

三重荧光定量 RT-PCR 反应体系为 20.0  $\mu$ L，其中 2 $\times$ one step Q probe mix 10.0  $\mu$ L，One step Q probe enzyme mix 1.0  $\mu$ L，模板 RNA 用量为 2.0  $\mu$ L，详见表 2-2。反应参数为：55  $^{\circ}$ C 逆转录 15 min；95  $^{\circ}$ C 预变性 30 s；95  $^{\circ}$ C 变性 10 s，54  $^{\circ}$ C 扩增 30 s，共进行 40 个循环，详见表 2-3。选择标定 EID<sub>50</sub> 的 H5、H7 和 H9 毒株标准 RNA 作为模板，根据 MODDE 12.1 (Umetrics, Sweden) 软件推荐优选面心立方设计 (CCF) 作为响应面模型，设计优化实验 17 个（见表 2-4），对三重荧光定量 RT-PCR 各探针用量、各引物浓度及反应参数（退火温度）进行优化，探针浓度范围设定为 0.05-0.2  $\mu$ M，引物浓度范围设定为 0.1-0.4  $\mu$ M，退火温度范围设定为 54-60  $^{\circ}$ C，以筛选出三重荧光定量 RT-PCR 反应体系的最佳反应模式。

表 2-2 三重荧光定量 RT-PCR 反应体系

Table 2-2 Reaction system for one-step triplex real time RT-PCR

Reagents	volume
RNase free ddH <sub>2</sub> O	To 20 $\mu$ L
2 $\times$ one step Q probe mix	10 $\mu$ L
one step Q probe enzyme mix	1 $\mu$ L
gene specific primer forward	0.4 $\mu$ L
gene specific primer reverse	0.4 $\mu$ L
Taqman probe	0.2 $\mu$ L
template RNA	2 $\mu$ L

表 2-3 三重荧光定量 RT-PCR 反应程序

Stage	Stage description	cycle	temperature	time
Stage 1	Reverse transcription	1 cycle	55 °C	15 min
Stage 2	Initial denaturation	1 cycle	95 °C	30 s
Stage 3	denaturation	40 cycles	95 °C	10 s
	annealing and extension		54 °C	30 s

表 2-4 三重荧光定量 RT-PCR 体系优化实验设计表

Table 2-4 Design experiments for triplex real time RT-PCR system optimization

Exp No	primer concentration (μM)	probe concentration (μM)	Temperature (°C)
1	0.1	0.05	54
2	0.4	0.05	54
3	0.1	0.2	54
4	0.4	0.2	54
5	0.1	0.05	60
6	0.4	0.05	60
7	0.1	0.2	60
8	0.4	0.2	60
9	0.1	0.125	57
10	0.4	0.125	57
11	0.25	0.05	57
12	0.25	0.2	57
13	0.25	0.125	54
14	0.25	0.125	60
15	0.25	0.125	57
16	0.25	0.125	57
17	0.25	0.125	57

## 1.8 敏感性试验

分别以 10 倍连续梯度稀释的标定 EID<sub>50</sub> 的 H5、H7 和 H9 标准毒株基因组 RNA 为模板, 根据优化后的反应体系和程序进行三重荧光定量 RT-PCR 扩增, 每个反应设置 3 个重复, 同时设置阳性和阴性对照, 分别以 H5、H7 和 H9 毒株标准 RNA 起始 EID<sub>50</sub> 的对数作 X 轴, Ct 值作为 Y 轴绘制标准曲线, 通过标准曲线对未知样品进行定量, 并得出反应的扩增效率和标准曲线的斜率及相关性系数。同时以单重荧光定量 RT-PCR 作为参比方法, 用同样稀释的相同模板来检测其灵敏度。

## 1.9 特异性试验

以 H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13 亚型 AIV、IBV、NDV、IBDV 和 ALV-J 病毒 RNA 为模板, 每个反应设置 3 个重复, 同时设置阳

性和阴性对照以最佳反应条件进行三重荧光定量 RT-PCR 方法检测，检验所建立方法的特异性。

### 1.10 组内和组间重复性试验

将标定的 H5、H7 和 H9 亚型毒株作 10 倍比稀释后，分别选择高、中和低 EID<sub>50</sub> 滴度，提取基因组 RNA 作为模板，每个梯度做 3 个重复同时按照最优反应条件进行组内重复性检测；由不同操作者隔天进行组间重复性检测。依据检测结果计算 Ct 值的平均值，标准差（SD）和变异系数（CV），综合评价其稳定性。

### 1.11 共感染模型的建立

将标定 EID<sub>50</sub> 的 H5、H7 和 H9 亚型禽流感病毒 RNA 按比例混合后分别得到二重和三重感染模型样品，每个反应设置 3 个重复，同时设置阳性和阴性对照，以最优反应条件进行三重荧光定量 RT-PCR 方法检测，以考察所建立方法对于 H5、H7 和 H9 亚型混合感染的检测能力。

### 1.12 试剂盒的组装

#### 1.12.1 质粒标准品的制备

分别以实验室保存的 H5-HA、H7-HA 和 H9-HA 基因序列保守区阳性质粒为模板，进行 H5、H7 和 H9-HA 基因片段扩增，所用引物见表 2-5，扩增的各段基因片段切胶纯化，通过融合 PCR 的方法获得融合基因全长片段，将 3 段基因按照 H5-HA，H7-HA 和 H9-HA 基因的顺序进行融合。首先将 H5-HA 和 H7-HA 基因片段融合，融合程序为：高保真酶缓冲液 25  $\mu$ L，高保真酶 1  $\mu$ L，dNTP 1  $\mu$ L，H5-HA 基因（100 ng）1  $\mu$ L，H7-HA 基因（100 ng）1  $\mu$ L，灭菌水 21  $\mu$ L，总体积为 50  $\mu$ L，反应程序为：95  $^{\circ}$ C 预变性 30 s，95  $^{\circ}$ C 变性 15 s，54  $^{\circ}$ C 退火 15 s，72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min，扩增 20 个循环，72  $^{\circ}$ C 总延伸 5 min。获得的 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定，鉴定正确者作为模板按照下列程序进行扩增：高保真酶缓冲液 25  $\mu$ L，高保真酶 1  $\mu$ L，dNTP 1  $\mu$ L，PCR 产物 2  $\mu$ L，通用载体 H5 UP-F2 2  $\mu$ L，通用载体 H5 DOWN-F1757 2  $\mu$ L，灭菌水 17  $\mu$ L，总体积为 50  $\mu$ L，反应程序为：95  $^{\circ}$ C 预变性 30 s，95  $^{\circ}$ C 变性 15 s，54  $^{\circ}$ C 退火 15 s，72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min，扩增 30 个循环，72  $^{\circ}$ C 总延伸 5 min。切胶回收获得 H5-HA 和 H7-HA 基因融合产物。最后将融合产物和 H9-HA 基因片段继续按照如上所述条件进行融合，最终获得包含 H5、H7 和 H9 亚型 AIV HA 基因序列保守区的融合产物，将纯化 PCR 产物连接至 pMD18-T 载体上，然后转化宿主菌 *E.coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞并进行培养。选择阳性克隆菌株经过测序分析鉴定后，提取质粒 DNA 并测定浓度，计算确定该质

粒中目的基因片段的拷贝数，并作为质粒标准品母液。

表 2-5 融合 PCR 引物

Table 2-5 Primers for fusion PCR

Primer name	Primer sequence (5' to 3')
H5 UP-F2	GTACCACCATAGCAATGAGCAG
H5 DOWN-F1757	CAATGAAACCCGCTATAGCACTTAACTACAACCTGAACTCAC
H7 UP-1049-1069	GTGAGTTCAGGTTGTAGTTAAGTGCTATAGCGGGTTTCATTG
H7 DOWN-1695-1675	GCTATGGCCCCGAATAGTCCTAATAGTGCACCGCATGTTTCC
H9 UP-1047-1067	GGAAACATGCGGTGCACTATTAGGACTATTCGGGGCCATAGC
H9 DOWN-1653-1674	CCAGAAAYAAGAAGGCAGCAAAC

### 1.12.2 病毒标准品的制备

取 H5、H7 和 H9 标准毒株尿囊液，用无菌 PBS 进行 1000 倍稀释，每枚 SPF 鸡胚尿囊腔接种 0.1 mL，蜡封后，将鸡胚置于 37 °C 生化培养箱孵育，每 12 h 进行一次照胚观察，弃 24 h 内的死亡胚，将 24-72 h 内死亡和 72 h 后仍存活鸡胚放 4 °C 过夜，之后无菌收集尿囊液。逐胚测定鸡胚尿囊液的 HA 效价，收获 HA 效价不低于 1: 64 的鸡胚尿囊液，混合后测定 HA 效价并按照 1.5 方法滴定鸡胚半数感染量。

保留部分灭活前尿囊液用于核酸提取，其余按 1:3000 (v/v) 的比例，向收获的鸡胚尿囊液中缓慢加入  $\beta$ -丙内酯溶液，充分混合均匀，置 4 °C 摇床振摇灭活 48 h。病毒灭活完全后，测定 HA 效价，然后接种于 9-11 日龄 SPF 鸡胚，每枚鸡胚尿囊腔接种 0.1 mL，于 37 °C 孵育 48 h 后检测鸡胚尿囊液中病毒的血凝效价；如 HA 试验呈阴性，再盲传一代，如果仍为阴性，则判定灭活完全，否则为检验不合格。

按照 1.6 方法分别提取灭活前与灭活后尿囊液的基因组 RNA，为验证所制备 H5、H7 和 H9 病毒标准品的亚型，用诺唯赞反转录试剂盒进行反转录，具体步骤参照相关说明书进行。在无 RNA 酶的 PCR 管中配置第一步反应体系（表 2-6），体系配置完成后，瞬时离心 30 s，使产物混匀，65 °C 加热 5 min，冰浴 2 min。

表 2-6 RNA 模板的预变性反应体系

Table 2-6 Pre-denaturing reaction system of RNA template

Reagents	Volume
RNase free ddH <sub>2</sub> O	to 8 $\mu$ L
Oligo (dT)23VN (50 $\mu$ M)	1 $\mu$ L
Total RNA	1 pg-5 $\mu$ g

预变性结束后，配制表 2-7 所示的反应体系，吹打混匀后瞬时离心 30 s，然后立即进行反转录程序。程序设置为：25 °C 5 min；50 °C 45 min；85 °C 2 min。

以反转录获得的 cDNA 作为模板，利用表 2-8 的 HA 鉴定引物，依照表 2-9 的反应体系进行 PCR 鉴定。反应程序为：95 °C 预变性 5 min；95 °C 变性 30 s，56-58 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 30 s，以上过程可设置 30-35 个循环；最后 72 °C 延伸 10 min。用 1%琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行鉴定，PCR 鉴定正确的病毒标准品置于-80 °C 保存备用。

表 2-7 第一链 cDNA 的反应体系

Table 2-7 Reaction system of first strand cDNA

Reagents	Volume
The reaction mixture in table 2-5	8 $\mu$ L
2 $\times$ RT Mix	10 $\mu$ L
HiScript II Enzyme Mix	2 $\mu$ L

表 2-8 AIV 鉴定引物

Table 2-8 The primers for identification of AIV

Primer name	Primer sequence	Primer size	Amplified fragment size
H5-F	ACACATGCYCARGACATACT	20 bp	545 bp
H5-R	CTYTGRITTYAGTGTGATGT	20 bp	
H7-F	CCATTRCAATGGCTAGAAG	19 bp	105 bp
H7-R	AATAGAATACAGATWGACCCAGT	23 bp	
H9-F	CAGAACAAGAAGGCAGCAA	20 bp	157 bp
H9-R	AATGTGATGACCARTGCATGG	19 bp	

表 2-9 AIV 鉴定 PCR 体系

Table 2-9 The PCR reaction system for identification of AIV

Reagents	Volume
2 $\times$ taq plus master mix	10 $\mu$ L
Sense primer	1 $\mu$ L
Anti-sense primer	1 $\mu$ L
template	1 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	7 $\mu$ L

### 1.12.3 试剂盒组成及操作说明

试剂盒由 AIV-H5-H7-H9-反应液、RNA 酶混合液、AIV-H5-H7-H9-阳性对照和 AIV-H5-H7-H9-阴性对照四部分组成，置于-40 °C 避光保存。其中 AIV-H5-H7-H9-反应液由 2×one step Q probe mix、RNase free ddH<sub>2</sub>O、H5、H7 和 H9 特异性引物和探针组成；RNA 酶混合液为 one step Q probe enzyme mix；AIV-H5-H7-H9-阳性对照为 1.12.1 制备质粒标准品；AIV-H5-H7-H9-阴性对照为 DEPC 水。

具体操作方法为：在避光条件下，根据待检样品、阴性以及阳性对照数量，按比例（AIV-H5-H7-H9-反应液 17μL+RNA 酶混合液 1μL）取相应量的试剂，加入离心管中充分混匀成 PCR-Mix，瞬时离心后分装至每个反应管，吸取已处理的样本 RNA、阴性对照、阳性对照各 2μL 加入到对应反应管中，盖好盖子后放入荧光定量 PCR 仪，选择检测通道（Cy5 通道检测 H5，VIC 通道检测 H7，FAM 通道检测 H9）并按照表 2-3 设置反应程序后进行扩增反应。

### 1.13 试剂盒的初步应用

临床采集拭子样品来自于多个大型养殖场和散户，每份拭子样品一分为二，采用两种方法分别进行检测，一种是病毒分离鉴定，另一种是组装的三重荧光定量 RT-PCR 试剂盒检测。国家禽流感专业实验室进行病毒分离，接种 9-11 日龄鸡胚，收集 24h 之后的死胚及培养满 72h 鸡胚尿囊液，经过血凝试验鉴定为阳性后，通过 RT-PCR 鉴定 AIV 亚型。同时，灭活的拭子样本，分别提取核酸，利用组装的三重荧光定量 RT-PCR 试剂盒进行平行检测，分析评价所建立试剂盒相对于病毒分离鉴定方法的整体特异性、敏感性和符合率。

## 2 结果

### 2.1 反应条件的优化结果

通过等高线图和反应曲面图模型分析，三重荧光定量 RT-PCR 最佳反应体系为 20.0 μL，其中 2×one step Q probe mix 10.0 μL，One step Q probe enzyme mix 1.0 μL，模板 RNA 用量为 2.0 μL，引物 H5-F、H5-R、H9-F 和 H9-R 各 0.4 μL（0.2 μM），H7-F 和 H7-R 各 0.6 μL（0.3 μM），H5 和 H7 探针各 0.1 μL（0.05 μM），H9 探针各 0.2 μL（0.1 μM），DEPC 水补足 20.0 μL。最佳反应程序为：55 °C 逆转录 15 min；95 °C 预变性 30 s；95 °C 变性 10 s，54 °C 扩增 30 s，反应 40 个循环。此时获得 Ct 值最小且荧光强度最大，实验结果如图 2-1 所示。（Ct 值 < 30 且扩增曲线良好判定为阳性；Ct 值处于 30-40 之间需重新检测，无扩增曲线或 Ct 值 > 36 判定为阴性，Ct 值仍处于

30-36 之间且扩增曲线良好判定为弱阳性)

## 2.2 标准曲线绘制

分别以 10 倍倍比稀释的 H5、H7 和 H9 标准毒株所对应 EID<sub>50</sub> 的对数作 X 轴, Ct 值作 Y 轴绘制标准曲线。结果如图 2-2 所示, 本研究建立方法的 H5 标准曲线方程为  $y=-3.26x+38.188$ , H7 标准曲线方程为  $y=-3.501x+35.8$ , H9 标准曲线方程为  $y=-3.617x+36.33$ , H5, H7 和 H9 扩增效率 (E) 分别为 1.03, 0.93 和 0.89, 且标准曲线的 R<sup>2</sup> 值分别为 0.9959, 0.9983 和 0.9931, 产物的 Ct 值与 EID<sub>50</sub> 滴度对数之间的线性关系良好。

## 2.3 敏感性试验结果

分别以 10 倍梯度稀释的标定 EID<sub>50</sub> 的 H5、H7 和 H9 毒株 RNA 为模板, 其中 H5 标准毒株的滴度测定为 10<sup>7</sup> EID<sub>50</sub>/100 μL, H7 和 H9 标准毒株的滴度测定为 10<sup>6</sup> EID<sub>50</sub>/100 μL。实验结果如表 2-10 所示, 该三重荧光定量 RT-PCR 方法的 H5 检测敏感性可达到 10<sup>3</sup> EID<sub>50</sub>/100 μL, H7 检测敏感性可达到 10<sup>2</sup> EID<sub>50</sub>/100 μL, H9 检测敏感性可达到 10<sup>2</sup> EID<sub>50</sub>/100 μL。对于参比方法单重荧光定量 RT-PCR 法, 其 H5 检测下限为 10<sup>2</sup> EID<sub>50</sub>/100 μL, H7 检测下限为 10<sup>1</sup> EID<sub>50</sub>/100 μL, H9 检测下限为 10<sup>1</sup> EID<sub>50</sub>/100 μL。

表 2-10 三重荧光定量 RT-PCR 的敏感性

Table 2-10 Sensitivity test for one step triplex real time RT-PCR

EID <sub>50</sub> /100 μL	Uniplex real-time RT-PCR Ct value (mean±SD)			Triplex real-time RT-PCR Ct value (mean±SD)		
	H5	H7	H9	H5	H7	H9
1.0×10 <sup>7</sup>	14.69±0.02	-	-	15.73±0.18	-	-
1.0×10 <sup>6</sup>	16.75±0.02	15.22±0.16	14.48±0.04	18.44±0.13	14.77±0.04	14.58±0.47
1.0×10 <sup>5</sup>	20.10±0.09	18.43±0.03	18.00±0.03	21.51±0.04	18.15±0.23	18.02±0.17
1.0×10 <sup>4</sup>	23.55±0.06	22.29±0.14	21.52±0.21	25.02±0.36	21.90±0.04	21.92±0.25
1.0×10 <sup>3</sup>	27.86±0.01	25.74±0.23	25.74±0.23	28.74±0.26	25.62±0.04	26.23±0.04
1.0×10 <sup>2</sup>	32.32±0.24	30.67±0.08	30.95±0.33	-	28.54±0.54	28.56±0.13
1.0×10 <sup>1</sup>	-	34.53±0.67	34.75±0.11	-	-	-

注: 对于三重荧光定量 RT-PCR 方法, Ct 值≤30 判定为阳性; 对于单重荧光定量 RT-PCR 方法, Ct 值≤36 判定为阳性

Note: Ct ≤ 30 was considered positive by uniplex real-time RT-PCR assay; Ct ≤ 36 was considered positive by uniplex real-time RT-PCR assay

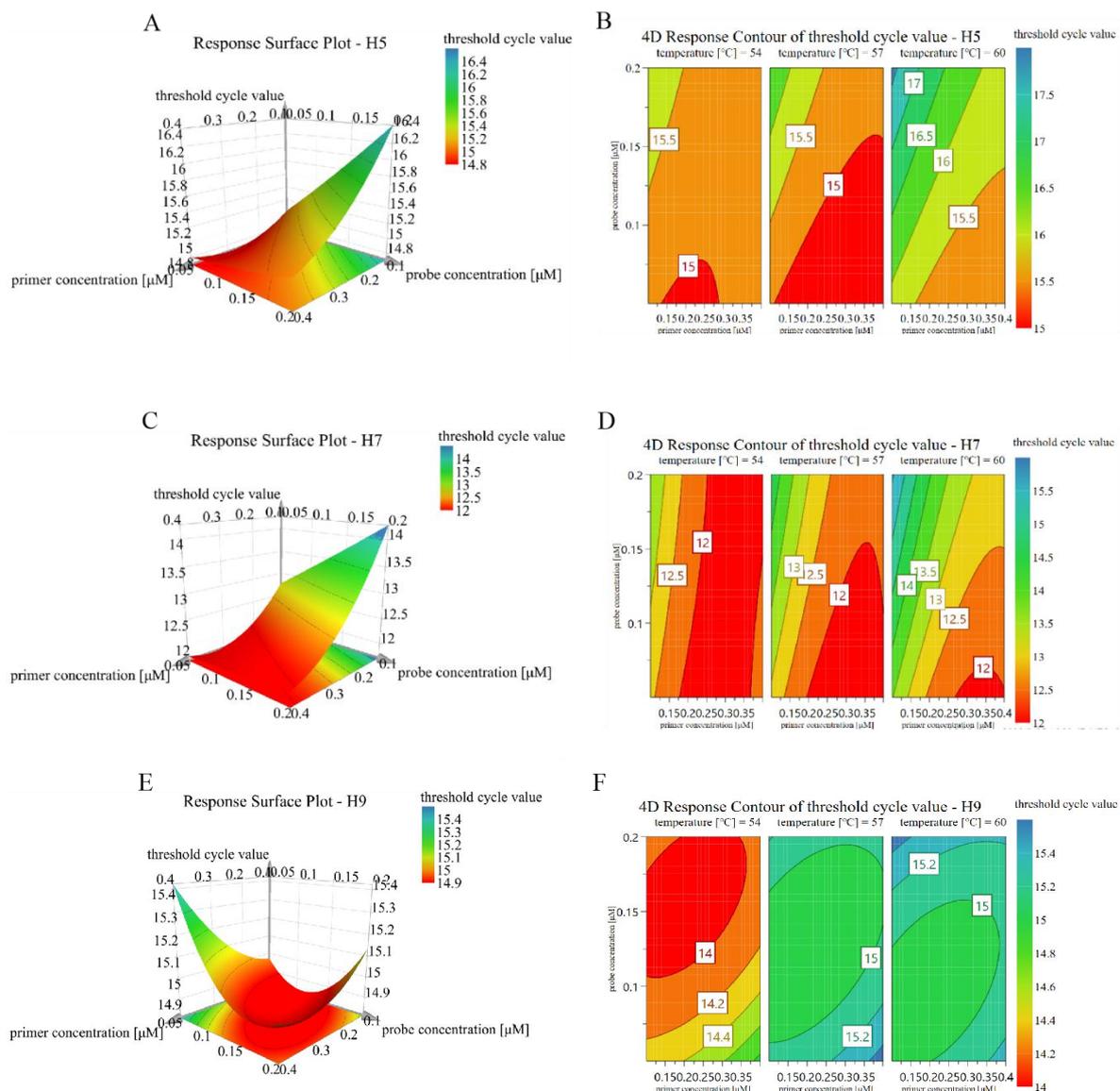


图 2-1 H5、H7 和 H9 反应条件（引物浓度、探针浓度和退火温度）优化等高线和反应曲面图

Fig. 2-1 Response surface plots and 4D response contour plots for reaction conditions optimization

(primer concentration, probe concentration and temperature)

注：A：H5 反应曲面图；B：H5 等高线图；C：H7 反应曲面图

D：H7 等高线图；E：H9 反应曲面图；F：H9 等高线图

Note: A: Response surface plot for H5; B: 4D response contour plot for H5; C: Response surface plots for H7;

D: 4D response contour plot for H7; E: Response surface plot for H9; F: 4D response contour plot for H9

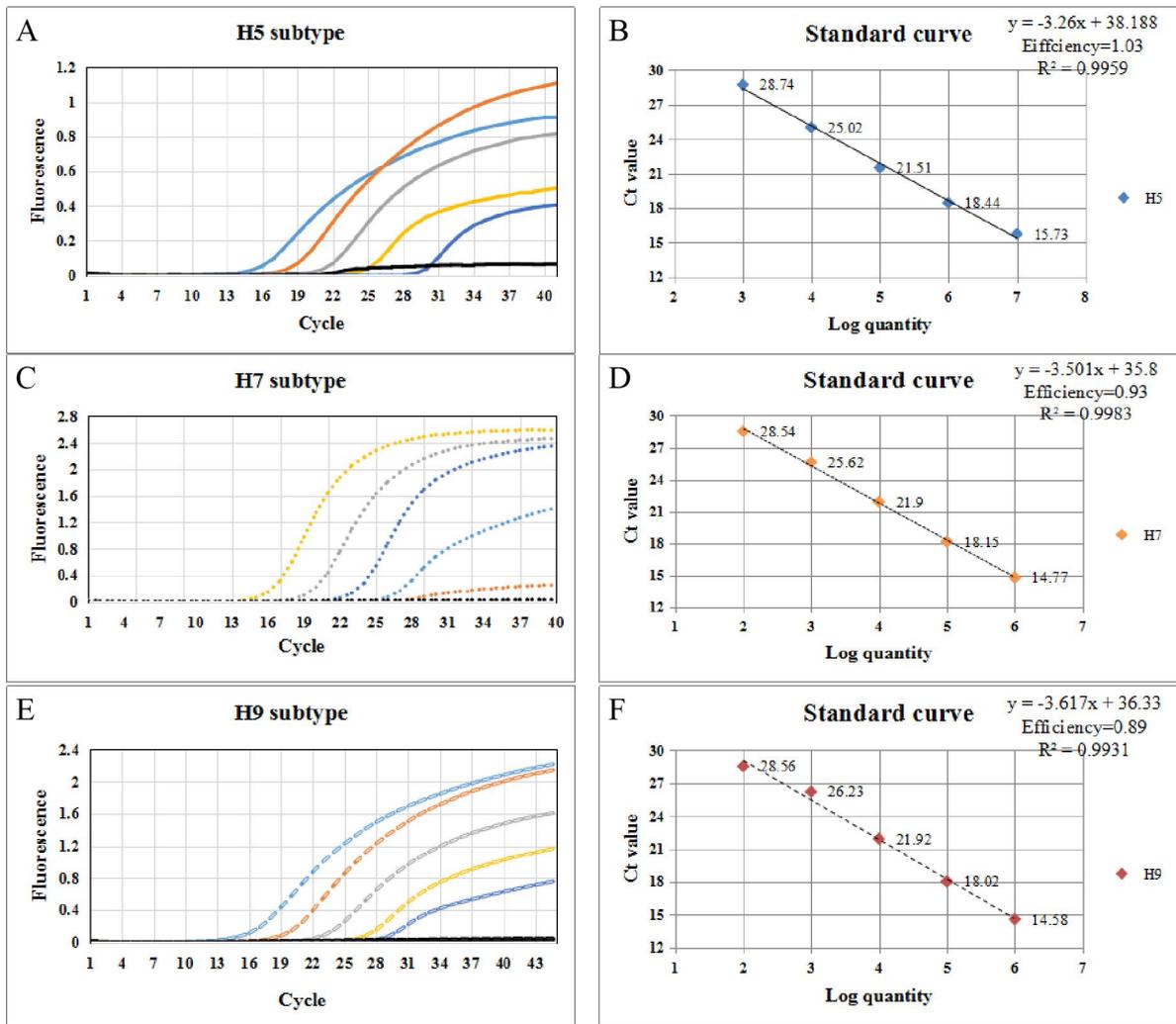


图 2-2 三重荧光定量 RT-PCR 标准曲线的建立

Fig. 2-2 Establishment of one step triplex real-time fluorescent quantitative RT-PCR Standard Curve

注：A：H5 扩增曲线；B：H5 标准曲线的建立；C：H7 扩增曲线；D：H7 标准曲线的建立；E：H9 扩增曲线；F：H9 标准曲线的建立

Note: A: Amplification plot for H5; B: Standard plot for H5; C: Amplification plot for H7; D: Standard curve for H7; E: Amplification plot for H9; F: Standard curve for H9

## 2.4 特异性试验结果

分别以 H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13 亚型 AIV、IBV、NDV、IBDV 和 ALV-J 病毒 RNA 为模板，进行三重荧光定量 RT-PCR 方法检测。结果如图 2-3 所示，本研究所使用的 Taqman 探针能特异性地检测 H5、H7 和 H9 亚型 AIV，出现特异性荧光曲线，其他亚型 AIV 以及传染性支气管炎病毒、传染性法氏囊病毒、新城疫病毒和 J 亚群禽白血病毒均不产生非特异性扩增，说明本方法特异性良好。

## 2.5 重复性试验结果

利用所建立的三重荧光定量 RT-PCR 方法进行组内和组间重复性检测，实验结果如表 2-11 所示，组内（0.18%-3.22%）及组间（0.82%-3.35%）变异系数均小于 4%，表明该三重荧光定量 RT-PCR 方法组内与组间重复性良好，可以满足临床检测的要求。

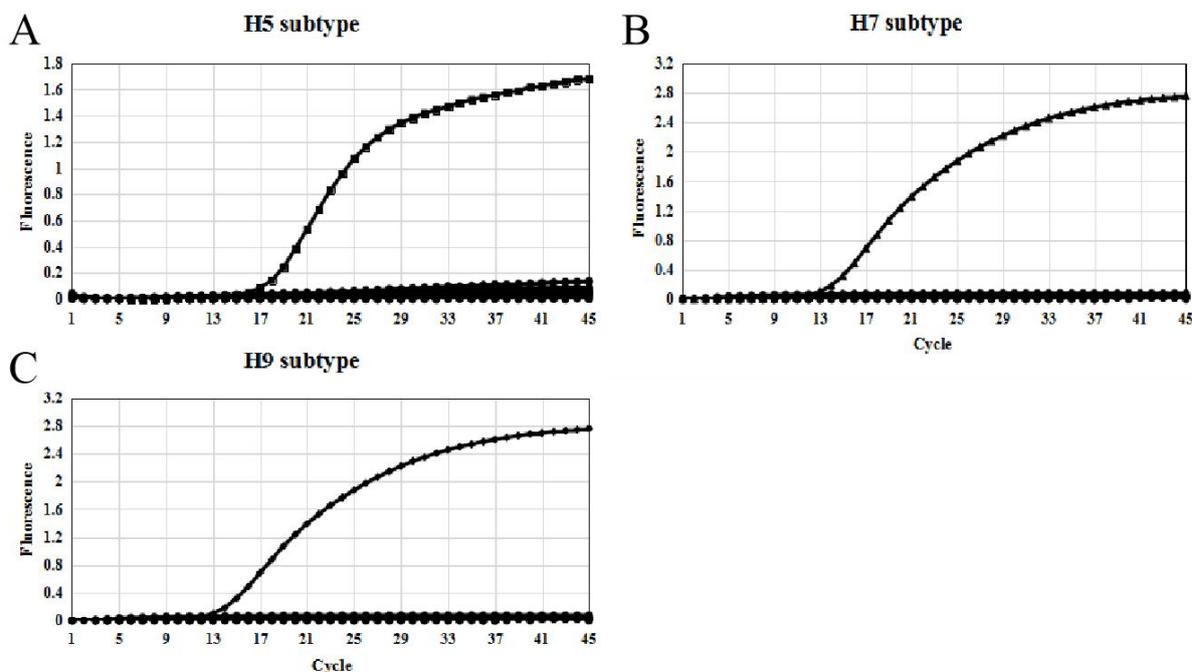


图 2-3 三重荧光定量 RT-PCR 的特异性

Fig. 2-3 Specificity test for one step triplex real time RT-PCR

注：A：H5 检测特异性；B：H7 检测特异性；C：H9 检测特异性

Note: A: Specificity for H5; B: Specificity for H7; C: Specificity for H9

表 2-11 三重荧光定量 RT-PCR 的重复性

Table 2-11 Reproducibility test for one step triplex real time RT-PCR

Virus subtype	EID <sub>50</sub> /100 μL	Intra-assay			Inter-assay		
		Mean Ct	SD	CV (%)	Mean Ct	SD	CV (%)
H5	1.0×10 <sup>7</sup>	15.73	0.18	1.14%	15.93	0.33	2.07%
	1.0×10 <sup>5</sup>	21.51	0.04	0.19%	21.36	0.21	0.99%
	1.0×10 <sup>3</sup>	28.74	0.54	1.88%	28.30	0.62	2.20%
H7	1.0×10 <sup>6</sup>	14.77	0.04	0.27%	14.50	0.32	2.19%
	1.0×10 <sup>4</sup>	21.90	0.04	0.18%	21.77	0.18	0.84%
	1.0×10 <sup>2</sup>	28.54	0.54	1.89%	28.38	0.23	0.82%
H9	1.0×10 <sup>6</sup>	14.58	0.47	3.22%	14.56	0.49	3.35%
	1.0×10 <sup>4</sup>	21.92	0.25	1.14%	21.57	0.49	2.27%
	1.0×10 <sup>2</sup>	28.56	0.13	0.46%	28.80	0.33	1.15%

## 2.6 共感染模型检测结果

实验结果如表 2-12 所示, 该三重荧光定量 RT-PCR 方法可以精确检测不同病毒滴度组合的 H5、H7 和 H9 亚型禽流感病毒二重和三重混合感染, 这对于揭示临床多种亚型共感染导致的协同致病作用具有重要意义。

表 2-12 三重荧光定量 RT-PCR 共感染模型的建立

Table 2-12 Co-infection models for one step triplex real time RT-PCR

Co-infection proportion	EID <sub>50</sub> /100 μL			Co-infection one-step triplex real time RT-PCR Ct value (mean±SD)		
	H5	H7	H9	H5	H7	H9
H5:H7:H9=10:1:1	1.0×10 <sup>4</sup>	1.0×10 <sup>3</sup>	1.0×10 <sup>3</sup>	23.16±0.28	26.41±0.63	25.21±0.05
H5:H7:H9=10:1:10	1.0×10 <sup>4</sup>	1.0×10 <sup>3</sup>	1.0×10 <sup>4</sup>	22.88±0.57	27.18±0.01	21.45±0.09
H5:H7:H9=10:10:1	1.0×10 <sup>4</sup>	1.0×10 <sup>4</sup>	1.0×10 <sup>3</sup>	23.13±0.17	22.20±0.07	25.68±0.18
H5:H7:H9=1:1:10	1.0×10 <sup>4</sup>	1.0×10 <sup>4</sup>	1.0×10 <sup>5</sup>	21.96±0.13	21.08±0.20	17.76±0.19
H5:H7:H9=1:10:1	1.0×10 <sup>4</sup>	1.0×10 <sup>5</sup>	1.0×10 <sup>4</sup>	22.21±0.09	17.97±0.11	22.05±0.20
H5:H7 =1:1	1.0×10 <sup>3</sup>	1.0×10 <sup>3</sup>	-	26.69±0.26	26.64±0.10	-
H5:H7 =10:1	1.0×10 <sup>4</sup>	1.0×10 <sup>3</sup>	-	23.63±0.50	26.67±0.11	-
H5:H7 =100:1	1.0×10 <sup>5</sup>	1.0×10 <sup>3</sup>	-	21.53±0.27	26.92±0.30	-
H5:H9 =1:1	1.0×10 <sup>4</sup>	-	1.0×10 <sup>4</sup>	22.71±0.07	-	21.33±0.08
H5:H9 =10:1	1.0×10 <sup>4</sup>	-	1.0×10 <sup>3</sup>	25.32±0.30	-	27.22±0.84
H5:H9 =100:1	1.0×10 <sup>5</sup>	-	1.0×10 <sup>3</sup>	21.67±0.10	-	28.44±0.21
H7:H9 =1:1	-	1.0×10 <sup>3</sup>	1.0×10 <sup>3</sup>	-	26.52±0.11	26.14±0.18
H7:H9 =10:1	-	1.0×10 <sup>4</sup>	1.0×10 <sup>3</sup>	-	22.98±0.10	26.82±0.69
H7:H9 =100:1	-	1.0×10 <sup>6</sup>	1.0×10 <sup>4</sup>	-	15.10±0.25	20.54±0.13

## 2.7 质粒标准品的制备

经测序证实重组质粒插入融合基因片段与目的基因序列完全一致, 表明重组质粒

构建成功。提取质粒标准品母液，通过 NanoDrop 测定浓度后计算拷贝数，依次 10 倍比稀释，建立质粒标准品，质粒标准品浓度为 0.05 ng/ $\mu$ L-0.5 ng/ $\mu$ L，拷贝数介于  $10^7/\mu$ L- $10^8/\mu$ L 之间。

## 2.8 病毒标准品的制备

H5 标准毒株灭活前毒价为  $10^{6.45}$  EID<sub>50</sub>/100  $\mu$ L，H7 标准毒株灭活前毒价为  $10^{6.17}$  EID<sub>50</sub>/100  $\mu$ L，H9 标准毒株灭活前毒价为  $10^{8.33}$  EID<sub>50</sub>/100  $\mu$ L。

取 H5、H7 和 H9 标准毒株灭活后尿囊液，经尿囊腔接种 9-11 日龄 SPF 鸡胚，37 °C 孵育 48 h 后收集所有鸡胚尿囊液，测定血凝价，全部为阴性；将收获的尿囊液以上述相同方法进行盲传，取传代鸡胚的尿囊液进行 HA 试验，全部为阴性，灭活检验合格。经 PCR 验证（如图 2-4 所示），所制备的 H5、H7 和 H9 病毒标准品亚型鉴定结果均正确。

H5 标准毒株灭活前血凝效价为  $2^7$ ，灭活后血凝效价为  $2^7$ ；H7 标准毒株灭活前血凝效价为  $2^6$ ，灭活后血凝效价为  $2^6$ ；H9 标准毒株灭活前血凝效价为  $2^{11}$ ，灭活后血凝效价为  $2^{11}$ 。

H5 标准毒株灭活前核酸拷贝数为  $7.9 \times 10^6/\mu$ L 尿囊液，灭活后核酸拷贝数为  $5 \times 10^5/\mu$ L 尿囊液；H7 标准毒株尿囊液灭活前核酸拷贝数为  $2.5 \times 10^6/\mu$ L 尿囊液，灭活后核酸拷贝数为  $5 \times 10^4/\mu$ L 尿囊液；H9 标准毒株尿囊液灭活前核酸拷贝数为  $1.3 \times 10^8/\mu$ L 尿囊液，灭活后核酸拷贝数为  $1.6 \times 10^6/\mu$ L 尿囊液。

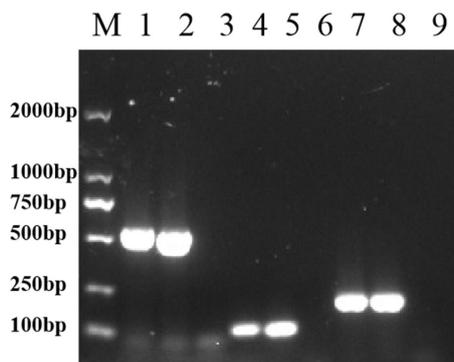


图 2-4 H5、H7 和 H9 病毒标准品 PCR 验证

Fig. 2-4 PCR for confirmation of H5、H7 and H9 standard virus strain

注：M：DL2000 marker；1：H5 病毒标准品；2：H5 亚型阳性对照；3：H5 亚型阴性对照；4：H7 病毒标准品  
5：H7 亚型阳性对照；6：H7 亚型阴性对照；7：H9 病毒标准品；8：H9 亚型阳性对照；9：H9 亚型阴性对照

Note: M: DL2000 marker; 1: H5 standard virus strain; 2: H5 positive control; 3: H5 negative control; 4: H7 standard virus strain; 5: H7 positive control; 6: H7 negative control; 7: H9 standard virus strain; 8: H9 positive control; 9: H9 negative control

## 2.9 试剂盒的组装

试剂盒具体组成试剂名称、规格预装量和主要成分如表 2-13 所示，置于-40 °C 避光保存。

表 2-13 三重荧光定量 RT-PCR 试剂盒组分

Table 2-13 The content of triplex real time RT-PCR kit

试剂名称	规格与装量	主要成分
AIV-H5-H7-H9-反应液	1200 μL/管	引物、探针、2×one step Q probe mix、RNase free ddH <sub>2</sub> O
RNA 酶混合液	50 μL/管	one step Q probe enzyme mix
AIV-H5-H7-H9-阳性对照	100 μL/管	含 H5, H7 和 H9 亚型禽流感病毒 HA 基因保守区序列的质粒
AIV-H5-H7-H9-阴性对照	100 μL/管	DEPC 水

## 2.10 试剂盒的初步应用

实验结果如表 2-14 所示，在对 204 份临床样本检测中，三重荧光定量 RT-PCR 试剂盒共检测出了 23 份（11.27%）H5 亚型 AIV 阳性样品，1 份（0.49%）H7 亚型 AIV 阳性样品和 51 份（25%）H9 亚型 AIV 阳性样品，其中 2 份（0.98%）为 H5 和 H9 亚型 AIV 混合感染；病毒分离鉴定法检测出了 24 份（11.76%）H5 亚型 AIV 阳性样品，1 份（0.49%）H7 亚型 AIV 阳性样品和 51 份（25%）H9 亚型 AIV 阳性样品，其中 2 份（0.98%）为 H5 和 H9 亚型 AIV 混合感染。如表 2-15 所示，与病毒分离鉴定法相比，三重荧光定量 RT-PCR 试剂盒对 H5 亚型 AIV 的检测敏感性为 95.83%，检测特异性为 100%，检测符合率为 99.51%；H7 和 H9 亚型 AIV 的检测敏感性、特异性和符合率均为 100%；H5、H7 和 H9 亚型 AIV 的总体检测敏感性达 98.68%，总体检测特异性达 100%，总体检测符合率达 99.51%。

表 2-14 三重荧光定量 RT-PCR 试剂盒临床实验结果

Table 2-14 clinical performance test results of one step triplex real time RT-PCR kit

Virus subtype	One-step triplex RRT-PCR assay	Virus isolation
	positive ratio	positive ratio
H5	23/204 (11.27%)	24/204 (11.76%)
H7	1/204 (0.49%)	1/204 (0.49%)
H9	51/204 (25%)	51/204 (25%)
H5, H7	0/204 (0%)	0/204 (0%)
H5, H9	2/204 (0.98%)	2/204 (0.98%)
H7, H9	0/204 (0%)	0/204 (0%)
H5, H7, H9	0/204 (0%)	0/204 (0%)

表 2-15 三重荧光定量 RT-PCR 与病毒分离鉴定法比较

Table 2-15 Comparison of one step triplex real time RT-PCR and virus isolation

Target	Sensitivity (TP/(TP+FN)) <sup>a</sup>	Specificity (TN/(TN+FP)) <sup>b</sup>	Accuracy ((TP+TN)/Total) <sup>c</sup>
AIV	98.68% (75/76)	100% (128/128)	99.51% (203/204)
H5	95.83% (23/24)	100% (180/180)	99.51% (203/204)
H7	100% (1/1)	100% (203/203)	100% (204/204)
H9	100% (51/51)	100% (153/153)	100% (204/204)

注: <sup>a</sup>TP, 阳性; FN, 假阴性; 灵敏度=(TP/(TP+FN))×100%; <sup>b</sup>TN, 阴性; FP, 假阳性; 特异性=(TN/(TN+FP))×100%;  
<sup>c</sup>Total, 总样本数; 符合率=((TP+TN)/Total)×100%

Note: <sup>a</sup>TP, true positive; FN, false negative; Sensitivity=(TP/ (TP+FN))×100%; <sup>b</sup>TN, true negative; FP, false positive;  
 Specificity=(TN/ (TN+FP))×100%; <sup>c</sup>Total, total sample size; Accuracy=((TP+TN)/Total)×100%

### 3 讨论

禽流感是由禽流感病毒引起的急性、高度接触性人畜共患传染病, 其中 H5、H7 和 H9 亚型禽流感的每次暴发流行使世界养禽业受到极大重创, 而且截至目前 H5、H7 和 H9 亚型 AIV 均有造成人类直接感染甚至死亡病例, 因此加强对这三种亚型禽流感的监测与防控事关动物源性食品安全和人类社会公共卫生安全, 而精准快速的高通量检测和鉴别诊断是有效防控三种亚型禽流感的前提和基础<sup>[1, 15-18]</sup>。

禽流感病原学检测分为经典的病毒分离试验和分子生物学快速诊断方法。病毒分离试验虽然准确可靠, 但确诊花费时间长, 实验操作对生物安全要求高且繁琐, 无法满足早期快速诊断的需求。分子诊断技术以核酸为检测对象, 有效避免出现病毒扩散, 且快速、准确、灵敏, 因而更受青睐<sup>[19-21]</sup>。

在分子诊断技术中, 实时荧光定量聚合酶链式反应 (PCR) 相较于传统 PCR 技术, 兼具引物和探针的双重特异性, 同时拥有光谱分析技术的高敏感性, 在全封闭条件下实现对 PCR 产物的定量检测, 易于标准化, 有效避免由污染引起的假阳性, 应用前景广阔<sup>[13, 14, 22]</sup>。该技术根据检测模板的不同又可分为两类, 相较于两步法实时荧光定量 PCR, 一步法实时荧光定量 RT-PCR 直接利用 RNA 作为模板进行检测, 反转录和 PCR 扩增过程在同一体系内完成, 进一步降低交叉污染率, 避免多步操作引入的试验误差, 显著缩短检测周期, 提高了检测的效率和准确性<sup>[23, 24]</sup>。根据其工作原理, 一步法实时荧光定量 RT-PCR 可以通过使用不同激发与发射光谱的荧光素标记探针实现单管多检的高通量检测目的<sup>[25]</sup>。本研究使用瑞士 Roche 公司 LightCycler 96 型号的实时荧光定量 PCR 扩增仪, 一次可同时完成对 96 份样品 H5、H7 和 H9 亚型 AIV 感染的

定量测定,检测结果可在扩增 70 min 后获得,无需常规 PCR 的后期电泳鉴定,既简化了操作步骤,快速简便,又实现了大规模和高通量检测,节约成本。但与单重荧光定量 RT-PCR 相比,多重荧光定量 RT-PCR 的反应体系受多种因素影响,从根本上需解决不同  $T_m$  值和浓度引物和探针之间的相互干扰问题<sup>[26]</sup>。因此本实验在设计引物与探针时,通过预实验筛选出引物与探针间干扰最小、扩增条件相近和扩增效率最高的组合,同时优化反应体系中引物、探针的浓度和退火温度等,从而提升单管多检的敏感性与特异性。

应用本研究所建立的方法,对 H1-H13 亚型 AIV 以及 NDV、IBV 和 IBDV 等常见禽病病毒进行检测,可特异性检测出 H5、H7 或 H9 亚型 AIV,出现特异性扩增曲线,其他病原检测结果均为阴性,无任何扩增曲线,特异性达 100%。将 H5、H7 和 H9 亚型 AIV 进行 10 倍倍比稀释后,利用本研究建立的方法进行敏感性检测,结果显示,该方法检测下限分别为  $10^3$ 、 $10^2$  和  $10^2$  EID<sub>50</sub>/100  $\mu$ L,相较于单重实时荧光定量 RT-PCR 方法整体检测灵敏度降低 10 倍。组内和组间重复性试验结果显示,Ct 值的变异系数均在 4% 以下,重复性高。根据本实验建立方法所组装的三重实时荧光定量 RT-PCR 试剂盒在临床样本检测中与病毒分离鉴定标准方法表现出高符合率。

有大量研究表明,在家禽和野禽中存在多种亚型禽流感病毒共感染现象,这是因为禽流感病毒基因组具有分节段特性,极易因感染同一宿主而导致不同亚型 AIV 之间进行基因重组产生新基因型,未知重组病毒的传播将对无免疫动物和人群构成潜在的重大威胁,因此对于在全世界广泛流行的 H5、H7 和 H9 亚型禽流感病毒在家禽和野禽中的共感染状况开展长期监测至关重要<sup>[27]</sup>。本研究所建立的方法在共感染模型检测中表现优异,可以精准检测出相同或不同病毒滴度组合的 H5、H7 和 H9 亚型禽流感病毒二重和三重混合感染,为这三种亚型禽流感的混合感染筛查提供了有力工具。

综上所述,本研究建立的一步法检测 H5、H7 和 H9 亚型禽流感病毒三重荧光定量 RT-PCR 检测方法检测范围宽、特异灵敏、操作简便,结果直观,可提高检测效率,降低实验成本,具有良好的应用前景。

## 4 本章小结

本章研究通过系统设计和优化特异性引物和探针,成功建立了在一个反应体系中鉴别 H5、H7 和 H9 亚型 AIV 的三重荧光定量 RT-PCR 方法并组装试剂盒。应用该试剂盒和病毒分离鉴定法对临床样品进行平行检测后证实,该方法具有单管封闭操作防污染、操作简便、可实时监控、准确快速、灵敏度高、特异性强等优点,可为 H5、H7 和 H9 亚型 AIV 的快速鉴别检测及流行病学调查提供有效的技术手段。

## 参考文献

- [1] 王秀荣, 陈化兰. 禽流感与公共卫生 [J]. 基础医学与临床, 2005, 25(12): 1079-1083.  
Wang X R, Chen H L. Avian influenza and public health [J]. Basic&Clinical Medicine, 2005, 25(12): 1079-1083 (in Chinese with English abstract).
- [2] 周森. H5 亚型高致病性禽流感病毒的全球传播与进化 [J]. 中国农学通报, 2019, 35(02): 104-110.  
Zhou S. Global dissemination and evolution of H5 highly pathogenic avian influenza virus [J]. ChineseAgricultural Science Bulletin, 2019, 35(02): 104-110 (in Chinese with English abstract).
- [3] Alexander D J, Brown I H. History of highly pathogenic avian influenza [J]. Rev Sci Tech, 2009, 28(1): 19-38.
- [4] Sutton T C. The Pandemic Threat of Emerging H5 and H7 Avian Influenza Viruses [J]. Viruses, 2018, 10(9): 461.
- [5] Gu M, Xu L, Wang X, Liu X. Current situation of H9N2 subtype avian influenza in China [J]. Vet Res, 2017, 48(1): 49.
- [6] Peacock T H P, James J, Sealy J E, Iqbal M. A Global Perspective on H9N2 Avian Influenza Virus [J]. Viruses, 2019, 11(7): 620.
- [7] Pusch E A, Suarez D L. The Multifaceted Zoonotic Risk of H9N2 Avian Influenza [J]. Vet Sci, 2018, 5(4): 82.
- [8] Sun Y, Liu J. H9N2 influenza virus in China: a cause of concern [J]. Protein Cell, 2015, 6(1): 18-25.
- [9] Pasick J. Advances in the molecular based techniques for the diagnosis and characterization of avian influenza virus infections [J]. Transbound Emerg Dis, 2008, 55(8): 329-338.
- [10] Landry M L. Diagnostic tests for influenza infection [J]. Curr Opin Pediatr, 2011, 23(1): 91-97.
- [11] Wang R, Taubenberger J K. Methods for molecular surveillance of influenza [J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2010, 8(5): 517-527.
- [12] Mahony J B, Petrich A, Smieja M. Molecular diagnosis of respiratory virus infections [J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 2011, 48(5-6): 217-249.
- [13] Mackay I M. Real-time PCR in the microbiology laboratory [J]. Clin Microbiol Infect, 2004, 10(3): 190-212.
- [14] Mackay I M, Arden K E, Nitsche A. Real-time PCR in virology [J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(6): 1292-1305.
- [15] Capua I, Alexander D J. Avian influenza: recent developments [J]. Avian Pathol, 2004, 33(4): 393-404.

- [16] Chmielewski R, Swayne D E. Avian influenza: public health and food safety concerns [J]. *Annu Rev Food Sci Technol*, 2011, 2: 37-57.
- [17] Kim S M, Kim Y I, Pascua P N, Choi Y K. Avian Influenza A Viruses: Evolution and Zoonotic Infection [J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2016, 37(4): 501-511.
- [18] 于康震, 崔尚金, 付朝阳, 唐秀英. 禽流感与养禽业发展和人类健康 [J]. *中国预防兽医学报*, 2000,22(04): 73-76.
- Yu K Z, Cui S J, Fu C Y, Tang X Y. Avian influenza for poultry industry development and human health [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2000, 22(04): 73-76 (in Chinese).
- [19] Procop G W. Molecular diagnostics for the detection and characterization of microbial pathogens [J]. *Clin Infect Dis*, 2007, 45 Suppl 2: S99-S111.
- [20] Krishna N K, Cunnion K M. Role of molecular diagnostics in the management of infectious disease emergencies [J]. *Med Clin North Am*, 2012, 96(6): 1067-1078.
- [21] Kumar S, Henrickson K J. Update on influenza diagnostics: lessons from the novel H1N1 influenza A pandemic [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2012, 25(2): 344-361.
- [22] Okamatsu M, Hiono T, Kida H, Sakoda Y. Recent developments in the diagnosis of avian influenza [J]. *Vet J*, 2016, 215: 82-86.
- [23] Laamiri N, Aouini R, Marnissi B, Ghram A, Hmila I. A multiplex real-time RT-PCR for simultaneous detection of four most common avian respiratory viruses [J]. *Virology*, 2018, 515: 29-37.
- [24] Stefanska I, Dzieciatkowski T, Brydak L B, Romanowska M. Application of three duplex real-time PCR assays for simultaneous detection of human seasonal and avian influenza viruses [J]. *Arch Virol*, 2013, 158(8): 1743-1753.
- [25] Gunson R N, Bennett S, Maclean A, Carman W F. Using multiplex real time PCR in order to streamline a routine diagnostic service [J]. *J Clin Virol*, 2008, 43(4): 372-375.
- [26] Wang W, Ren P, Mardi S, Hou L, Tsai C, Chan K H, Cheng P, Sheng J, Buchy P, Sun B, Toyoda T, Lim W, Peiris J S, Zhou P, Deubel V. Design of multiplexed detection assays for identification of avian influenza A virus subtypes pathogenic to humans by SmartCycler real-time reverse transcription-PCR [J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(1): 86-92.
- [27] Yu X, Jin T, Cui Y, Pu X, Li J, Xu J, Liu G, Jia H, Liu D, Song S, Yu Y, Xie L, Huang R, Ding H, Kou Y, Zhou Y, Wang Y, Xu X, Yin Y, Wang J, Guo C, Yang X, Hu L, Wu X, Wang H, Liu J, Zhao G, Zhou J, Pan J, Gao G F, Yang R, Wang J. Influenza H7N9 and H9N2 viruses: coexistence in poultry linked to human H7N9 infection and genome characteristics [J]. *J Virol*, 2014, 88(6): 3423-3431.

### 第三章 H7 亚型禽流感病毒 cELISA 抗体检测方法的建立

**摘要：**自 2017 年中国暴发 H7N9 亚型禽流感疫情后，我国采取重组禽流感病毒（H5+H7）三价灭活疫苗防控策略，为养殖家禽持续提供免疫保护力。当前，研发一种快速高效的 H7 亚型 AIV 抗体检测方法以实现免疫鸡群 H7 抗体水平的及时监测和疫苗免疫效果的正确评估极为迫切，对 H7 亚型禽流感防控显得尤为重要。本研究旨在开发一种新型的 H7 亚型 AIV cELISA 抗体检测方法，以纯化的 H7 全病毒颗粒作为包被抗原，筛选出与 H7 阳性血清共同竞争结合包被抗原的单克隆抗体作为竞争抗体，用于测定不同易感宿主血清中的 H7 抗体水平。在该检测方法中，最适抗原包被浓度为 4  $\mu\text{g/mL}$ ，竞争单抗最适浓度为 0.625  $\mu\text{g/mL}$ ，待检血清最佳稀释倍数为 1:5，检测时间控制在 2 h 以内。鸡、鸭和孔雀血清 H7 抗体检测抑制率临界值分别确定为 30.11%、26.85%和 45.66%。除 H7 以外其他亚型 AIV 和其他常见禽类病毒（IBV、NDV、IBDV 和 ALV）阳性血清用于特异性检测，结果表明该检测方法具有型和亚型特异性。以血凝抑制（HI）试验作为参考标准，确定该检测方法鸡、鸭和孔雀血清检测灵敏度分别达到  $2^0$ 、 $2^1$  和  $2^{-1}$  HI 滴度。利用该 cELISA 方法共检测 400 份临床血清样本（115 份鸡血清、145 份鸭血清、140 份孔雀血清），并与 HI 试验进行符合率比较，鸡、鸭和孔雀血清的检测符合率分别为 100%（115/115）、98.6%（143/145）和 99.3%（139/140）。综上所述，该 cELISA 方法是一种灵敏、特异的 H7 亚型 AIV 抗体快速检测方法，对 H7 亚型 AIV 的血清学诊断和免疫效力监测具有重要价值。

**关键词：**禽流感；H7 亚型；cELISA；抗体检测

禽流感是一种由 A 型流感病毒引起的人畜共患传染病综合征，被世界动物卫生组织（OIE）和我国列为 A 类动物疫病，其病原频繁变异，感染宿主多样，目前已在全球 60 多个国家和地区流行蔓延，人类社会、经济和公共卫生安全面临巨大挑战<sup>[1]</sup>。在进入二十一世纪后，H7 亚型 AIV 引发多次大规模的暴发流行，其中 2003 年荷兰暴发的 H7N7 亚型禽流感疫情波及多国，导致三千万家禽被扑杀，并有 89 人确诊感染；2013-2017 年期间在我国大面积暴发的五波 H7N9 亚型禽流感疫情共导致 1398 人感染发病，其中 560 人死亡，H7 亚型禽流感对全球公共健康和家禽产业造成的风险日益增大，更加凸显了对 H7 亚型禽流感防控的重要意义<sup>[2-6]</sup>。

免疫接种是提高易感动物抵抗力的关键措施，目前我国对高致病性禽流感实行强制免疫，因此需要建立相应的早期快速血清学检测手段跟踪监测和评估临床免疫状态，确保免疫抗体水平合格率达标，为我国 H7 亚型禽流感预防和控制提供充分保障

[7-9]。传统的血凝抑制试验因检测周期长,无法满足现实检疫的需求;琼脂凝胶免疫扩散试验因其检测抗原为核蛋白或基质蛋白,因此无法用于鉴定亚型。酶联免疫吸附试验(ELISA)凭借其敏感性高、特异性强、快速省时且便于大批量检测的优点尤其适用于禽流感的抗体监测及流行病学调查,其中 cELISA 充分发挥了单克隆抗体针对单一抗原表位的优势,使得抗体检测更为特异和稳定,并能实现对抗体滴度的定量测定[10-13]。

在本研究中,我们以纯化后的灭活全病毒作为检测抗原,利用一株本实验室制备的 H7 亚型 AIV 单克隆抗体作为竞争抗体,建立了 H7 亚型 AIV cELISA 抗体检测方法,用于评价不同易感宿主免疫后血清样本中的 H7 保护性抗体水平,初步临床试验表明其可批量稳定检测血清样本,方便快捷,特异敏感,与 HI 试验符合率高。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒、细胞、鸡胚与实验动物

所用 H7 亚型病毒株是以 A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) (简称 PR8) 六个基因片段作为骨架构建的低致病力毒株,其 HA 和 NA 基因片段来源于 A/duck/Zhejiang/12/2011 (H7N3); H7 单克隆抗体细胞株由本实验室保存; 9-11 日龄无特定病原体 (SPF) 鸡胚购自乾元浩生物股份有限公司南京生物药厂; SPF 鸡 (3 月龄) 购自浙江神农牧业股份有限公司; Balb/c 小鼠 (10-12 周龄) 购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司。

### 1.2 单因子阳性鸡血清

H1-H14 亚型 AIV, IBV, NDV, IBDV 和 ALV-J 共 17 种单因子阳性鸡血清均由农业部重点动物病毒学实验室制备并保存,血清详细信息见附录。

### 1.3 主要生物试剂

辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG (HRP-YKS) 购自美国 KPL 公司; RPMI-1640 购自 HyClone 公司; 弗氏不完全佐剂购自 Sigma 公司; 青链霉素 (100 $\times$ )、胎牛血清购自 Gibco 公司; HiTrap protein A HP 预装色谱柱购自 GE 公司。

主要溶液配置:

- 1) 包被液: 1.59 g 碳酸钠, 2.93 g 碳酸氢钠, 去离子水加至 1 L, 调节 pH 至 9.6;
- 2) 5%脱脂奶 PBS 溶液: 称取 5 g 脱脂奶, 溶解于 100 mL 1 $\times$ PBS 溶液;
- 3) 洗涤缓冲液: 0.2 g 磷酸二氢钾, 2.9 g 十二水合磷酸氢二钠, 8.0 g 氯化钠, 0.2 g 氯化钾, 0.5 mL 吐温-20, 去离子水加至 1 L;
- 4) 底物显色 A 液: 13.6 g 醋酸钠, 1.6 g 柠檬酸, 0.3 mL 30%双氧水, 去离子水加至

500 mL;

5) 底物显色 B 液: 0.2 g 乙二胺四乙酸二钠, 0.95 g 柠檬酸, 50 mL 甘油, 取 0.15 g 四甲基联苯胺溶于 3 mL DMSO 中, 去离子水加至 500 mL。

### 1.4 主要仪器设备

超低温冰箱、摇床和恒温培养箱购自 Thermo 公司; 移液器、常温离心机、4 °C 低温离心机购自 Eppendorf 公司; 超速离心机购自 Beckman 公司; CO<sub>2</sub> 细胞培养箱购自 Thermo 公司; 多功能酶标仪购自 Tecan 公司。

### 1.5 原理示意图

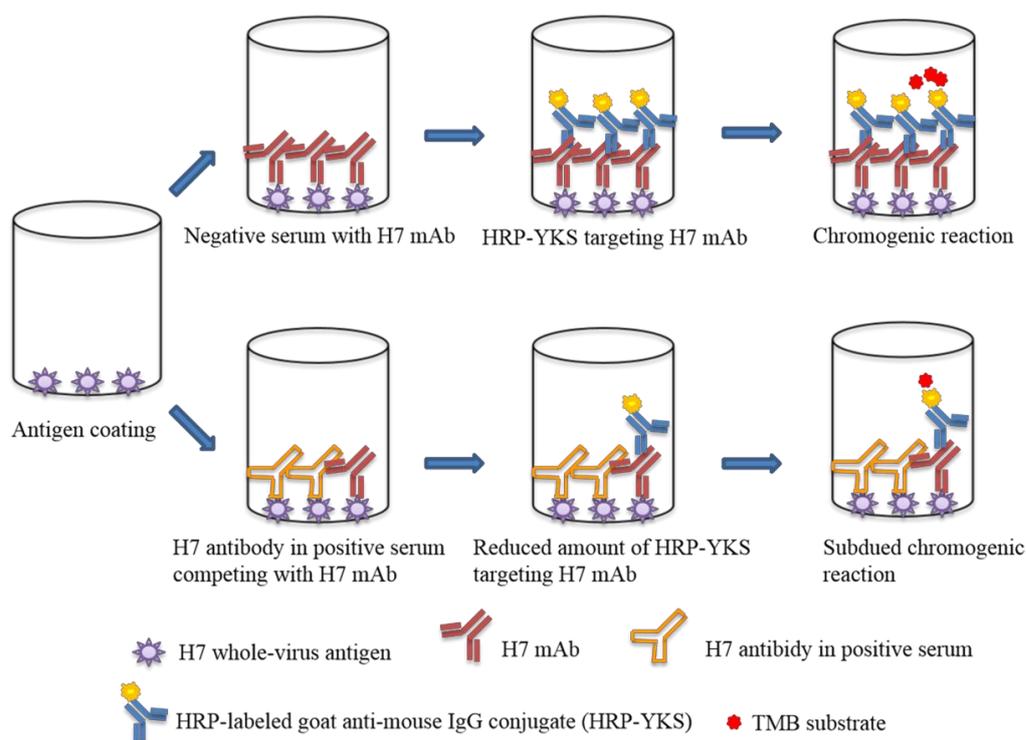


图 3-1 H7 竞争法 ELISA 原理示意图

Fig. 3-1 Schematic illustration of H7 competitive ELISA

### 1.6 H7 全病毒纯化

H7 重组病毒用 pH=7.4 的无菌 PBS 按照 1:1,000 比例稀释, 每枚 9-11 d SPF 鸡胚尿囊腔接种 100 μL, 接种后 72 h 测定所有鸡胚 HA 滴度, 测定符合要求后收集感染鸡胚尿囊液, 混匀后再测 HA 滴度, 经β-丙内酯处理灭活后, 将灭活的病毒尿囊液用四层纱布的漏斗过滤。以 3,000 rpm 高速离心 30 min, 获取上清, 再以 12,000 rpm 高速离心 45 min, 获取上清。将所得上清加至 38 mL 的超速离心管 31,000 rpm 超速离心 2 h, 弃掉上清; 然后迅速将管子至于冰上, 每管沉淀添加 0.5mL PBS 溶液过夜冰浴

浸润溶解，次日收集溶解沉淀。在 38 mL 的透明超速离心管中从离心管底部依次加入等体积的 60%、45%、30%、15% 的蔗糖溶液，加完蔗糖后，用记号笔标记分层处，然后加入经 PBS 溶解的病毒溶液，160,000 g 超速离心 2 h。超离后使离心机自然降速，取出离心管置于冰上，收取纯化病毒。蔗糖密度梯度离心后收集的纯化病毒用 PBS 溶液适度稀释后 31,000 rpm 超速离心 2 h，去除蔗糖，用 PBS 重悬溶解，测定蛋白含量，分装保存于 -70 °C，用作包被抗原。

### 1.7 H7 亚型禽流感病毒单克隆抗体腹水的纯化

取 10-12 周龄雌性 Balb/c 小鼠每只腹腔注射 0.5 mL 弗氏不完全佐剂致敏 10-14 d，期间复苏 H7 单抗细胞株并测定其细胞上清 ELISA 抗体效价，用基础培养基将扩大培养细胞稀释，注射量为  $1 \times 10^6$ /只- $5 \times 10^6$ /只，接种细胞约 7 d 后当小鼠腹部明显膨大时用注射器吸取腹水，所收集腹水在 4 °C 条件下 1,500 rpm 离心 20 min，吸取上层澄清腹水，保存于 -20 °C。

收集腹水通过辛酸-硫酸铵法进行初步纯化。腹水在 4 °C 条件下 12,000 rpm 离心 15 min，吸取腹水上清后用滤纸过滤去除脂质和颗粒沉淀，滤液经 4 倍体积的 60 mM 醋酸缓冲液 (pH 值 4.0) 稀释后，用 1 M NaOH 调 pH 值至 4.5，逐滴滴加辛酸 (终浓度为 25  $\mu$ L/mL)，室温下搅拌 30 min，然后 4 °C 静置 2 h 以上，使其充分沉淀。在 4 °C 条件下 12,000 rpm 离心 30 min 后收集上清，上清液用普通滤纸过滤 1 次，加入 1/10 体积的 10 $\times$ PBS，用 1 M NaOH 溶液调 pH 值至 7.4，4 °C 冰浴条件下边搅拌边缓慢加硫酸铵 (每毫升上述混合液加 0.277 g 固体硫酸铵)，小量多次慢慢溶入，并不时搅拌。硫酸铵全部加入后，于 4 °C 搅拌 30 min 后，继续静置过夜，次日在 4 °C 条件下 13,000 rpm 离心 30 min，弃上清，短暂离心后将沉淀溶解于 1.5 mL 结合缓冲液中用于后续亲和层析。

初步纯化的腹水经过 HiTrap protein A HP 预装色谱柱进行亲和层析纯化。每个收集管 (收集 1 mL 洗脱缓冲液) 中预先加入 60 至 200  $\mu$ L pH 值为 9.0 的 1 M Tris-HCl 溶液。除掉塞子，将色谱柱连接到注射器，用结合缓冲液填充注射器，避免将空气引入色谱柱。卸下色谱柱出口处的卡扣端，用 10 倍柱体积的结合缓冲液 (20 mM 磷酸钠溶液) 洗涤色谱柱，1 mL 和 5 mL 色谱柱流速分别为 1 mL/min 或 5 mL/min。用注射器将待纯化样品通过色谱柱，用 5 至 10 倍柱体积的结合缓冲液洗涤，直到流出物中没有物质为止。最后用 2 至 5 倍柱体积的洗脱缓冲液 (0.1 M 柠檬酸，pH 值 3.0-6.0) 洗脱。

## 1.8 检测条件的优化

### 1.8.1 最适抗原包被浓度、竞争单抗浓度和血清稀释倍数的确定

使用方阵滴定试验摸索包被抗原和竞争单抗的最适稀释滴度。将包被抗原分别稀释至浓度为 2  $\mu\text{g/mL}$ 、4  $\mu\text{g/mL}$ 、6  $\mu\text{g/mL}$ 、8  $\mu\text{g/mL}$ ，每孔包被 100  $\mu\text{L}$ 。将浓度为 2  $\text{mg/mL}$  的 H7 单抗纯化腹水分别稀释至 0.3125、0.625 和 1.25  $\mu\text{g/mL}$ 。按照竞争 ELISA 的常规步骤，以 H7 单因子阳性血清抑制率最高，同时阴性血清抑制率最低点所对应的抗原包被浓度和单抗浓度即为最适抗原包被浓度和竞争单抗浓度。确定最适抗原包被浓度和竞争单抗浓度后，将 H7 单因子阳性血清依次 1:5、1:10、1:20、1:40、1:80 倍比稀释，以 H7 单因子阳性血清抑制率最高，同时阴性血清抑制率最低点所对应的血清稀释倍数即为最适血清稀释倍数。

### 1.8.2 检测临界值的确定

通过 HI 试验选取阳性与阴性鸡、鸭和孔雀血清样本，用建立的 cELISA 检测方法分别对 40 份 H7 抗体阳性鸡血清和 75 份阴性鸡血清、105 份 H7 抗体阳性鸭血清和 40 份阴性鸭血清、100 份 H7 抗体阳性孔雀血清和 40 份阴性孔雀血清进行检测，对鸡、鸭和孔雀阳性和阴性血清样本的抑制率 (PI) 进行统计分析，根据受试者工作特征 (ROC) 曲线分析结果，以确定鸡、鸭和孔雀血清的检测临界值。

## 1.9 特异性试验

分别将 AIV, NDV, IBV, IBDV 和 ALV 的单因子阳性鸡血清按照最佳稀释倍数稀释，设置阳性和阴性对照，用建立的检测方法对上述血清依次进行检测，根据检测结果来评估所建立 H7 亚型禽流感病毒 cELISA 抗体检测方法的特异性。

### 1.10 敏感性试验

选取已知 H7 抗体阳性和阴性鸡、鸭和孔雀血清，连续两倍倍比稀释，设置阳性和阴性对照，稀释后的血清分别用 HI 试验以及建立的 cELISA 方法检测，将 HI 滴度在  $2^4$ - $2^8$  之间的血清用于 cELISA 方法检测并计算出相对应的抑制率，用上述确定的检测临界值判定结果，比较两种方法的敏感性差异。

### 1.11 重复性试验

#### 1.11.1 批内重复性试验

用同一批次纯化抗原包被的 96 孔酶标板，检测 H7 抗体阳性鸡血清 3 份和阴性鸡血清 2 份，并设置阳性和阴性对照，重复检测两次，每次重复 3 孔，分别计算每份血

清样品的抑制率，计算同一样本 PI 值的变异系数，以检验该检测方法批内检测样本的重复性。

### 1.11.2 批间重复性试验

用不同批次纯化抗原包被的 96 孔酶标板，检测上述 3 份 H7 抗体阳性鸡血清和 2 份阴性鸡血清，设置阳性和阴性对照，进行两次重复试验，每次重复 3 孔，分别计算每份血清样品的抑制率，计算同一样本 PI 值的变异系数，以检验该检测方法批间检测样本的重复性。

## 1.12 临床应用

随机选取 400 份临床鸡、鸭和孔雀临床血清样品，分别用建立的 cELISA 检测方法和 HI 试验进行平行检测，根据各种血清的检测临界值进行判定，比较该 cELISA 检测方法与 HI 试验的敏感性、特异性和符合率。阴性样品中的阴性检出率即为特异性，阳性样品的阳性检出率即为相对敏感性。两种方法检测结果一致的样本数占总体样本的比例即为两者的符合率。

## 2 结果

### 2.1 检测条件的优化

#### 2.1.1 抗原包被浓度、竞争单抗浓度和血清稀释倍数的选择

取 H7 单因子阳性鸡血清，方阵滴定结果显示，当抗原包被浓度为 4  $\mu\text{g/mL}$ ，H7 单抗纯化腹水稀释至 0.625  $\mu\text{g/mL}$  时，阳性标准血清的  $\text{OD}_{450\text{nm}}$  值达到最低点，抑制率达到最高点，因此确定最适抗原包被浓度为 4  $\mu\text{g/mL}$ ，竞争抗体最适浓度为 0.625  $\mu\text{g/mL}$ ；当血清稀释倍数为 1:5 时，阳性标准血清抑制率最高且与阴性标准血清抑制率差距最大，因此确定血清最佳稀释倍数为 1:5，具体结果见图 3-2。

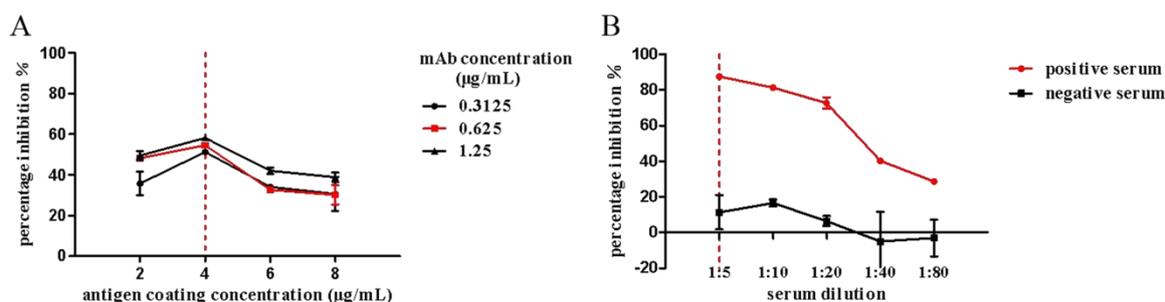


图 3-2 检测工作条件的优化

Fig. 3-2 Optimization of test working conditions

注：（A）包被抗原和竞争抗体最佳浓度的确定（B）血清最佳稀释倍数的确定

Note: (A) Determination of the optimal concentration for coating antigen and H7 mAb. (B) Determination of the optimal serum dilution ratio

### 2.1.2 检测临界值的确定

鸡、鸭和孔雀阳性和阴性血清样品的检测结果如图 3-3, 根据 ROC 曲线分析结果, 当鸡血清检测临界值为 30.11%, 鸭血清检测临界值为 26.85%, 孔雀血清检测临界值为 45.66%时, 此时诊断特异性和灵敏度同时达到最高。

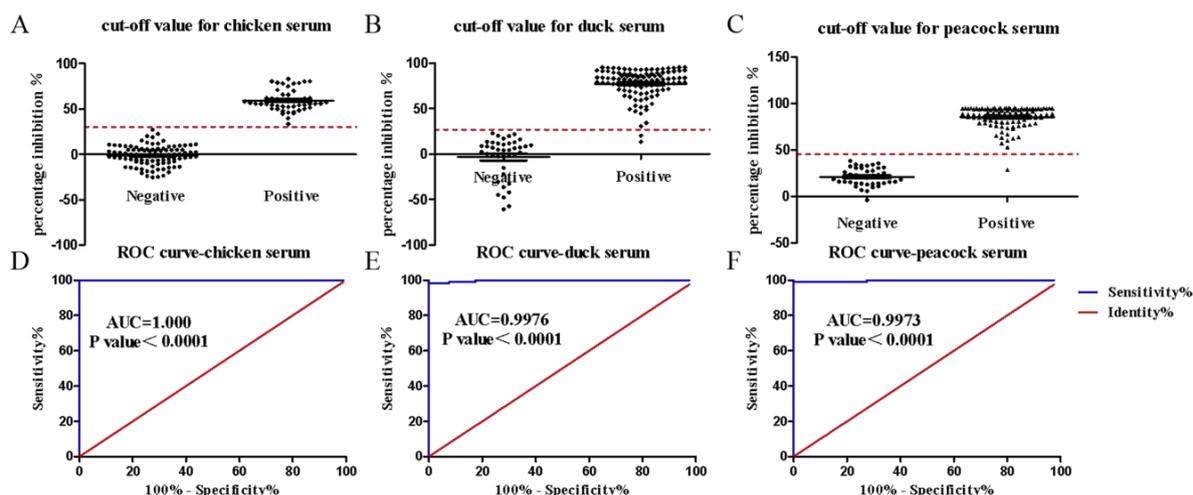


图 3-3 鸡、鸭和孔雀血清 H7 抗体检测临界抑制率的确定

Fig. 3-3 The cut-off inhibition rate for detection of H7 antibodies in chicken, duck and peacock serum

注: 图中每个实心圆点代表一份血清样本, 水平虚线代表检测临界值。A: 鸡血清临界值; B: 鸭血清临界值; C: 孔雀血清临界值; D: 鸡血清 ROC 曲线; E: 鸭血清 ROC 曲线; F: 孔雀血清 ROC 曲线

Note: Each dot represents one serum sample. The horizontal dotted lines indicate the cut off value. A: the cut-off inhibition rate for chicken serum; B: the cut-off inhibition rate for duck serum; C: the cut-off inhibition rate for peacock serum; D: ROC curve for chicken serum; E: ROC curve for duck serum; F: ROC curve for peacock serum

### 2.2 优化后的具体实验步骤

- 1) 抗原包被: 用包被液将纯化全病毒抗原稀释至终浓度为  $4 \mu\text{g/mL}$ , 于  $4^\circ\text{C}$  条件下包被 96 孔酶标板过夜, 每孔孵育  $100 \mu\text{L}$ , 次日弃包被液, 每孔添加  $200 \mu\text{L}$  PBST 洗涤液, 每次洗涤 5 min, 共洗涤 5 次。
- 2) 封闭: 每孔孵育  $200 \mu\text{L}$  5%脱脂奶 PBS 溶液, 于  $37^\circ\text{C}$  封闭 1 h, 洗涤同上。
- 3) 血清样本及竞争单抗混合孵育: 将待检血清样本按照 1:2.5 比例稀释, H7 单抗纯化腹水稀释至  $1.25 \mu\text{g/mL}$ , 然后将按比例稀释后的血清样本以及 H7 单抗纯化腹

水等体积混匀，同时设置浓度为 0.625  $\mu\text{g/mL}$  的 H7 单抗纯化腹水作为空白对照，每孔孵育 100  $\mu\text{L}$ ，于 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h，洗涤同上。

- 4) 酶标抗体孵育：以山羊抗小鼠 IgG (HRP-YKS) 作为二抗，按照 1:5,000 比例稀释，每孔孵育 100  $\mu\text{L}$ ，于 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min，洗涤同上。
- 5) 化学发光显色：每孔加入 100  $\mu\text{L}$  A 液与 B 液的等体积混合底物显色液，室温下避光显色反应 5 min，继续添加 50  $\mu\text{L}$  的 2 M 浓  $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止反应。
- 6) 读值计算：用酶标仪测定各个加样孔 OD<sub>450nm</sub> 值，定义血清样本与 H7 单抗纯化腹水等体积混合加样孔读值为 OD<sub>serum</sub>，H7 单抗纯化腹水空白对照孔读值为 OD<sub>mAb</sub>，根据酶标仪测定结果计算血清抑制率 (PI%)，计算公式为  $\text{PI}\% = ((\text{OD}_{\text{mAb}} - \text{OD}_{\text{serum}}) / \text{OD}_{\text{mAb}}) \times 100\%$ 。
- 7) 结果判定：鸡血清的判定标准：PI% > 30.11% 为 H7 抗体检测阳性，PI%  $\leq$  30.11% 为 H7 抗体检测阴性；鸭血清的判定标准：PI% > 26.85% 为 H7 抗体检测阳性，PI%  $\leq$  26.85% 为 H7 抗体检测阴性；孔雀血清的判定标准：PI% > 45.66% 为 H7 抗体检测阳性，PI%  $\leq$  45.66% 为 H7 抗体检测阴性。

## 2.3 特异性实验

所建立的 cELISA 方法检测结果显示 (如图 3-4)，只有 H7 亚型 AIV 单因子阳性鸡血清的抑制率高于检测临界值判定为阳性，而其他 HA 亚型 AIV 和其他常见禽类病毒单因子阳性鸡血清的抑制率均明显低于临界值，结果均为阴性，说明该检测方法与其他 HA 亚型 AIV 和其他常见禽类病毒单因子阳性鸡血清均无血清学交叉反应。以上结果表明，所建立的 H7 亚型 AIV cELISA 抗体检测方法具有良好的特异性，可用于血清中 H7 亚型 AIV 抗体检测。

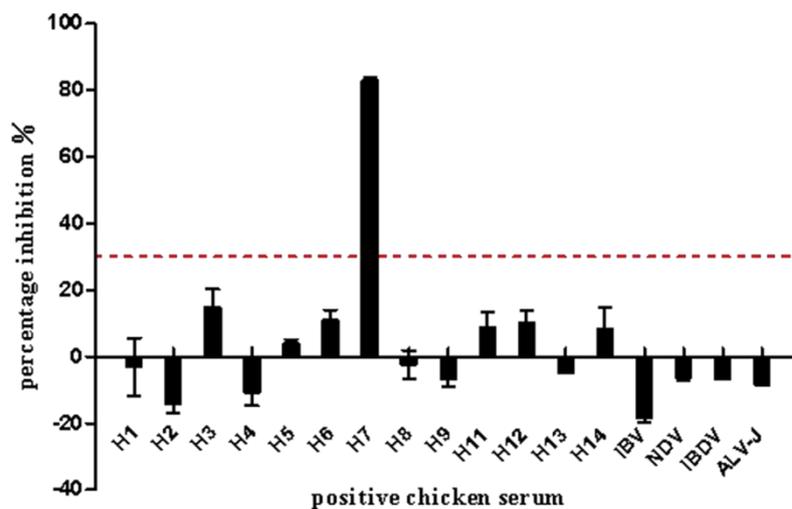


图 3-4 特异性试验结果

Fig. 3-4 Specificity test results of the H7 competitive ELISA assay

注：图中水平虚线代表检测临界值

Note: The horizontal dotted lines indicate the cut off value of chicken serum

## 2.4 敏感性实验

将不同 HI 效价的 H7 阳性鸡、鸭血清和阴性对照血清从 2 倍开始连续倍比稀释，用 HI 试验和所建立的 cELISA 方法两种方法分别检测血清效价，结果如图 3-5，鸡血清检测最低限度达到  $2^0$  HI 滴度，鸭血清检测灵敏度达到  $2^1$  HI 滴度，孔雀血清检测灵敏度达到  $2^{-1}$  HI 滴度，比传统的 HI 试验至少要敏感 8 倍以上。以上结果表明，所建立的 H7 亚型 AIV cELISA 抗体检测方法具有良好的敏感性，适用于检测血清中 H7 亚型 AIV 抗体。

此外，通过对所建立的 cELISA 方法和 HI 试验进行相关性分析，结果如图 3-5，鸡血清检测皮尔逊相关系数  $r$  为 0.9883 ( $P$  值  $< 0.0001$ )，鸭血清检测皮尔逊相关系数  $r$  为 0.9918 ( $P$  值  $< 0.0001$ )，孔雀血清检测皮尔逊相关系数  $r$  为 0.9413，当  $0.7 \leq |r| < 1$  时表示两个随机变量之间高度相关，以上结果表明相同血清样本的抑制率与 HI 滴度之间高度相关，进而说明抑制率对于 HI 滴度具有指示作用。

## 2.5 重复性实验

批内和批间重复试验结果显示：用相同批次纯化抗原包被的 96 孔酶标板检测相同编号的阳性和阴性血清样本，其 PI 值经统计学分析，批内变异系数介于 0.19%-6.17%之间，均低于 10%；用不同批次纯化抗原包被的 96 孔酶标板检测相同编

号的阳性和阴性血清样本, 其 PI 值经统计学分析, 批间变异系数介于 2.94%-15.15%, 均低于 20%, 以上结果说明建立的 H7 亚型 AIV cELISA 抗体检测方法重复性良好(见表 3-2)。

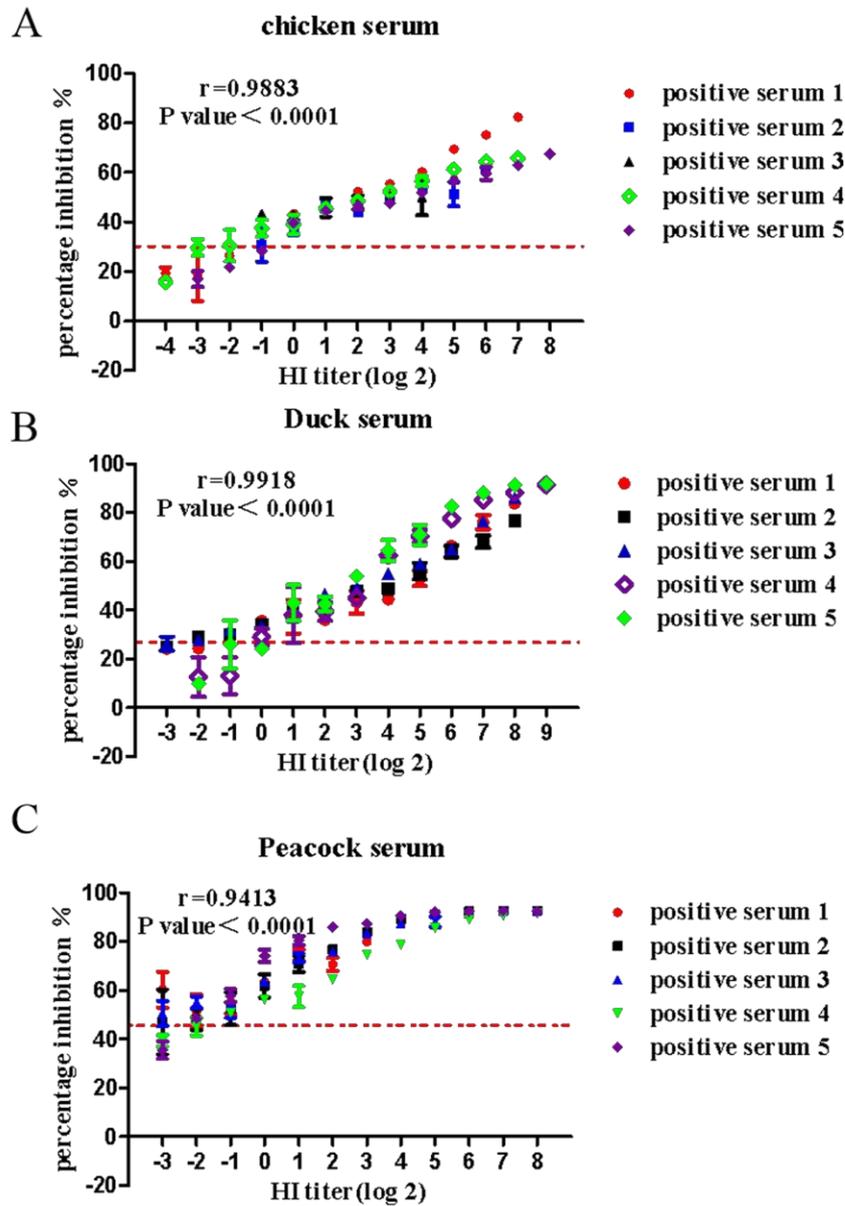


图 3-5 敏感性试验结果

Fig. 3-5 Sensitivity test results of the H7 competitive ELISA assay

注: 图中水平虚线代表检测临界值, r 代表皮尔逊相关系数

Note: The horizontal dotted lines indicate the cut off value, r represents Pearson correlation coefficient

表 3-2 批内与批间重复性试验

Table 3-2 *Intra-* and *Inter-assay* repeatability of the H7 competitive ELISA assay

Species	Serum samples	HI titer	Inhibition percentage					
			<i>Intra-assay</i>			<i>Inter-assay</i>		
			Mean (%)	SD	CV (%)	Mean (%)	SD	CV (%)
Chicken	Positive serum 1	2 <sup>6</sup>	77.30	0.014	1.92	76.34	0.052	6.91
	Positive serum 2	2 <sup>8</sup>	78.34	0.003	0.35	70.07	0.095	13.62
	Positive serum 3	2 <sup>9</sup>	81.50	0.005	0.67	85.76	0.049	5.74
	Negative serum 1	-	29.01	0.002	0.82	29.76	0.013	4.43
	Negative serum 2	-	14.89	0.009	6.17	19.50	0.027	14.04
Duck	Positive serum 1	2 <sup>10</sup>	89.69	0.011	1.22	84.20	0.064	7.56
	Positive serum 2	2 <sup>10</sup>	88.75	0.007	0.81	81.50	0.091	11.12
	Positive serum 3	2 <sup>10</sup>	86.72	0.017	1.91	81.73	0.059	7.18
	Negative serum 1	-	13.00	0.002	1.57	13.21	0.004	2.94
	Negative serum 2	-	22.39	0.007	3.27	20.61	0.031	15.15
Peacock	Positive serum 1	2 <sup>9</sup>	85.46	0.014	1.69	80.66	0.056	6.96
	Positive serum 2	2 <sup>9</sup>	85.07	0.024	2.85	89.63	0.054	6.07
	Positive serum 3	2 <sup>9</sup>	93.99	0.002	0.19	90.13	0.045	4.95
	Negative serum 1	-	15.94	0.001	0.20	15.66	0.014	8.74
	Negative serum 2	-	11.12	0.002	1.66	11.87	0.013	11.04

## 2.6 临床实验

用所建立的 H7 亚型 AIV cELISA 抗体检测方法 with HI 试验同时检测 400 份临床鸡、鸭和孔雀临床血清样品, 根据试验结果(见表 3-3)可知, 鸡血清的诊断敏感性为 100%, 诊断特异性为 100%, 符合率为 100%; 鸭血清的诊断敏感性为 98.1%, 诊断特异性为 100%, 符合率为 98.6%; 孔雀血清的诊断敏感性为 99%, 诊断特异性为 100%, 符合率为 99.3%。以上结果表明所建立的 H7 亚型 AIV cELISA 抗体检测方法 with 血凝抑制试验的符合率较高, 由此也证实了该方法在检测不同物种血清中 H7 亚型禽流感病毒抗体的可靠性。

表 3-3 H7 cELISA 与 HI 试验比较临床试验

Table 3-3 Comparison of the H7 competitive ELISA and HI test for clinical samples detection

Target	chicken serum		duck serum		peacock serum	
	H7 competitive assay	HI test	H7 competitive assay	HI test	H7 competitive assay	HI test
Positive	40	40	103	105	99	100
Negative	75	75	42	40	41	40
Positive rates	34.8%	34.8%	71.0%	72.4%	70.7%	71.4%
Sensitivity <sup>a</sup> (TP/(TP+FN))	100%		98.1%		99%	
Specificity <sup>b</sup> (TN/(TN+FP))	100%		100%		100%	
Accuracy <sup>c</sup> (TP+TN)/Total	100%		98.6%		99.3%	

注: <sup>a</sup>TP, 阳性; FN, 假阴性; 灵敏度= TP/(TP + FN)×100%。<sup>b</sup>TN, 阴性; FP, 假阳性; 特异性= TN/(TN + FP) ×100%;  
<sup>c</sup>Total, 总样本数; 符合率=((TP + TN)/Total)×100%

Note: <sup>a</sup>TP, true positive; FN, false negative; Sensitivity=(TP/ (TP+FN))×100%; <sup>b</sup>TN, true negative; FP, false positive;  
Specificity=(TN/ (TN+FP))×100%; <sup>c</sup>Total, total sample size; Accuracy=((TP+TN)/Total)×100%

### 3 讨论

禽流感是持续危害世界养禽业的毁灭性疫病和具有重要公共卫生意义的人畜共患病, 其病原 AIV 分属于甲型流感病毒, 感染宿主多样, 极易发生变异且血清型众多, 因此需要及时开展针对 AIV 的诊断研究, 以防止禽流感大范围流行, 最大限度降低其对动物和人类造成的威胁与伤害<sup>[2, 3, 14]</sup>。

AIV 根据其表面糖蛋白血凝素和神经氨酸酶的抗原性质可分为 16 个 HA 和 9 个 NA 亚型, 其中 H7 亚型 AIV 在世界许多地区的家禽和野禽身上均得到分离, 且不乏为高致病力毒株, 突然暴发且死亡率高, 对养禽业危害严重, 同时已发现部分 H7 毒株突破种间屏障直接感染哺乳动物和人类, 导致严重的呼吸道疾病甚至死亡, 使其成为在人群中潜在暴发流行的重要亚型之一, 对人类公共卫生造成严重威胁<sup>[15-17]</sup>。目前, 我国针对 H7 亚型禽流感采取免疫预防为主的防控策略, 因此对于养殖家禽的长期血清学监测显得尤为重要, 通过精准掌握和分析免疫鸡群 H7 抗体滴度的动态数据, 为后期免疫预防方案的实时调整提供重要指导<sup>[18]</sup>。

现阶段, HI 试验仍是临床上滴定禽流感病毒血清抗体的金标准, 但 HI 试验对操作者专业素养要求高且工作量大, 不利于开展大规模抗体水平监测。与 HI 试验相比,

ELISA 技术具有灵敏、快速、高效、操作简便、高通量等优点,并且待检血清无需进行预处理,因此更加适合实验室和田间批量样本抗体水平的监测,从而及时高效反应疫苗的免疫效果,为 H7 亚型禽流感的有效防控赢得宝贵时间<sup>[19,20]</sup>。

McAbs 凭借其高度特异、均质,易于体外大量制备等优势在病原微生物抗原抗体的检测中一直发挥积极作用<sup>[21]</sup>。基于单克隆抗体的 cELISA 方法可用于多种动物血清抗体检测,其特异性和敏感性高,成本低,操作简便,耗时短,在动物源性病毒的血清学诊断领域应用前景广阔<sup>[22]</sup>。cELISA 抗体检测方法成功建立的关键是选择高特异性和高亲和力的单克隆抗体,且该单抗针对诱导产生中和抗体的优势抗原表位。本研究对本实验室制备的多株 H7 单克隆抗体进行了实验筛选,其中一株抗 H7 亚型禽流感病毒 HA1 蛋白的特异性 McAb 与 H7 亚型 AIV 单因子阳性血清间具有良好的竞争效果,故将此株单抗用于开发 cELISA 抗体检测方法。首先,本研究分别运用两种方法对单抗腹水进行两步法纯化以获得高纯度的抗体,第一步利用辛酸-硫酸铵法将腹水中的非 IgG 蛋白杂质沉淀去除,第二步采用具有高度选择性的 protein A 亲和色谱法浓缩洗脱目的单克隆抗体<sup>[23-25]</sup>。此外,为保证该方法的特异性,我们采用蔗糖密度梯度离心法纯化 H7 亚型 AIV 并以此作为包被抗原,同时选择含 5%脱脂乳的 PBS 溶液作为封闭液和稀释液,从而显著消除非特异性结合反应。将该竞争法 ELISA 用于检测 H7 亚型外其余亚型 AIV、IBV、IBDV、NDV-LaSota 和 ALV-J 的单因子阳性血清时,均无交叉反应性。与间接 ELISA 相比,cELISA 由于引入抑制率来评价抗体水平的高低,将阳性和阴性之间的差距扩大,从而使得检测的敏感性大幅度提高,本研究所建立的方法鸡血清 H7 抗体的最低检测线可达到  $2^0$  HI 滴度,鸭血清的最低检测线达到  $2^1$  HI 滴度,孔雀血清的最低检测线达到  $2^{-1}$  HI 滴度相比 HI 试验更为灵敏,也明显优于范俊青等此前建立的 H7 亚型 cELISA 抗体检测方法<sup>[22]</sup>。使用同一批次包被的酶标板和不同批次包被的酶标板进行重复性试验,结果表明批内变异系数均小于 10%,批间变异系数均小于 20%,该方法具有良好的重复性和稳定性。而且,不同物种血清临床样本检测结果与 HI 试验符合率高,一次可实现对 96 份样品同时检测,检测时间可控制在 2 h 以内,高效快捷。

总之,该竞争法 ELISA 为免疫后血清 H7 抗体的大规模普查提供了一种有效的工具,对 H7 亚型禽流感暴发流行的有效防控具有重要的现实意义。

## 4 本章小结

本章研究以灭活的 H7 亚型纯化病毒作为包被抗原,H7 亚型禽流感病毒 HA1 蛋白特异性单抗为竞争抗体,建立了适用于不同种属动物血清中 H7 亚型 AIV 抗体快速定量检测的 cELISA 方法。实验结果表明该方法特异性与稳定性良好,敏感性高于经

典的血凝抑制试验, 临床样本检测与血凝抑制试验符合率高, 同时该方法操作简便快捷, 可为免疫鸡群的 H7 抗体水平监测提供依据。

## 参考文献

- [1] 刘智婷, 李伟强, 王霞, 何婉婷, 张友, 王文清, 陈祖贤, 赵冰兵, 廖明, 焦培荣. 当前全球禽流感流行状况与流行特点分析 [J]. 中国家禽, 2017, 39(24): 1-4.  
Liu Z T, Li W Q, Wang X, He W T, Zhang Y, Wang W Q, Chen Z X, Zhao B B, Liao M, Jiao P R. Analysis of the current global epidemic situation and characteristics of avian influenza [J]. China Poultry, 2017, 39(24): 1-4 (in Chinese).
- [2] Kaye D, Pringle C R. Avian influenza viruses and their implication for human health [J]. Clin Infect Dis, 2005, 40(1): 108-112.
- [3] Capua I, Alexander D J. Avian influenza: recent developments [J]. Avian Pathol, 2004, 33(4): 393-404.
- [4] Naguib M M, Verhagen J H, Mostafa A, Wille M, Li R, Graaf A, Jarhult J D, Ellstrom P, Zohari S, Lundkvist A, Olsen B. Global patterns of avian influenza A (H7): virus evolution and zoonotic threats [J]. FEMS Microbiol Rev, 2019, 43(6): 608-621.
- [5] Sutton T C. The Pandemic Threat of Emerging H5 and H7 Avian Influenza Viruses [J]. Viruses, 2018, 10(9): 461.
- [6] 杨正时, 卢洪洲, 潘孝彰. 人感染 H7 亚型禽流感事件 [J]. 中国微生态学杂志, 2014, 26(09): 1100-1106+1115.  
Yang Z S, Lu H Z, Pan X Z. Human infection of subtype H7 avian influenza [J]. Chinese Journal of Microecology, 2014, 26(09): 1100-1106+1115 (in Chinese with English abstract).
- [7] Chen H. Avian influenza vaccination: the experience in China [J]. Rev Sci Tech, 2009, 28(1): 267-274.
- [8] Capua I, Schmitz A, Jestin V, Koch G, Marangon S. Vaccination as a tool to combat introductions of notifiable avian influenza viruses in Europe, 2000 to 2006 [J]. Rev Sci Tech, 2009, 28(1): 245-259.
- [9] Domenech J, Dauphin G, Rushton J, McGrane J, Lubroth J, Tripodi A, Gilbert J, Sims L D. Experiences with vaccination in countries endemically infected with highly pathogenic avian influenza: the Food and Agriculture Organization perspective [J]. Rev Sci Tech, 2009, 28(1): 293-305.
- [10] Katz J M, Hancock K, Xu X. Serologic assays for influenza surveillance, diagnosis and vaccine evaluation [J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2011, 9(6): 669-683.

- [11] Okamatsu M, Hiono T, Kida H, Sakoda Y. Recent developments in the diagnosis of avian influenza [J]. *Vet J*, 2016, 215: 82-86.
- [12] Charlton B, Crossley B, Hietala S. Conventional and future diagnostics for avian influenza [J]. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2009, 32(4): 341-350.
- [13] Petric M, Comanor L, Petti C A. Role of the laboratory in diagnosis of influenza during seasonal epidemics and potential pandemics [J]. *J Infect Dis*, 2006, 194 Suppl 2: S98-110.
- [14] Scholtissek C. Molecular evolution of influenza viruses [J]. *Virus Genes*, 1995, 11(2-3): 209-215.
- [15] Belser J A, Bridges C B, Katz J M, Tumpey T M. Past, present, and possible future human infection with influenza virus A subtype H7 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15(6): 859-865.
- [16] Wille M, Holmes E C. The Ecology and Evolution of Influenza Viruses [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2020, 10(7): a038489.
- [17] 王承民, 王婧, 罗静, 谢立, 丁华, 刘社兰, 刘晓冬, 陈余, 贾亚雄, 何宏轩. H7 亚型禽流感病毒与禽类和人类的关系 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2013, 40(05): 416-424.
- Wang C M, Wang J, Luo J, Xie L, Ding H, Liu D L, Liu X D, Chen Y, Jia Y X, He H X. Relationship between H7 subtype avian influenza virus and birds or humans [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2013, 40(05): 416-424 (in Chinese).
- [18] 马守敏. 我国 H5、H7 亚型禽流感流行现状与防控策略 [J]. *畜禽业*, 2018, 29(07): 136+138.
- Ma S M. Epidemic status and prevention and control strategies of H5 and H7 avian influenza in China [J]. *Livestock And Poultry Industry*, 2018, 29(07): 136+138 (in Chinese).
- [19] 韩庆功, 崔艳红, 张智勇. ELISA 技术在禽流感诊断研究中的应用 [J]. *生物技术通报*, 2008, (06): 73-77.
- Han Q G, Cui Y H, Zhang Z Y. Application of ELISA to the diagnosis of avian influenza [J]. *Biotexhnology Bulletin*, 2008, (06): 73-77 (in Chinese with English abstract).
- [20] 周赛赛, 罗润波, 陈建春, 格桑卓玛, 索朗斯珠. 基于 ELISA 技术检测流感病毒的研究进展 [J]. *中国家禽*, 2019, 41(17): 45-49.
- Zhou S S, Luo R B, Chen J C, Gesang Z M, Suolang S Z. Research progress of influenza virus detection based on ELISA technology [J]. *China Poultry*, 2019, 41(17): 45-49 (in Chinese with English abstract).
- [21] 袁华平, 关锋, 李桂梅. 流感病毒及其单克隆抗体的研究进展 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2013, 23(18): 3618-3619+3622.
- Yuan H P, Guan F, Li G M. Research progress of influenza virus and its monoclonal antibody production [J]. *Chin J Health Lab Tec*, 2013, 23(18): 3618-3619+3622 (in Chinese with English abstract).
- [22] 范俊青, 魏燕鸣, 邹忠, 李冉, 孙小美, 金梅林. 禽流感病毒 H7 亚型竞争 ELISA 抗体检测方法

- 的建立 [J]. 养殖与饲料, 2019, (01): 32-36.
- Fan J Q, Wei Y M, Zou Z, Li R, Sun X M, Jin M L. Development and evaluation of a C-ELISA for rapid detection of antibody to AIV- H7 [J]. Husbandry and Feed, 2019, (01): 32-36 (in Chinese).
- [23] 柳萌, 周亚丽, 劳兴珍, 郑珩. 色谱法纯化抗体研究进展 [J]. 药物生物技术, 2012, 19(02): 173-176.
- Liu M, Zhou Y L, Lao X Z, Zheng Y. Progress in study on purification of antibody by chromatography [J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2012, 19(02): 173-176 (in Chinese with English abstract).
- [24] 汪立法. 单克隆抗体纯化技术研究进展 [J]. 黑龙江科技信息, 2016, (24): 151.
- Wang L F. Research progress of monoclonal antibody purification technology [J]. Heilongjiang Science and Technology Information, 2016, (24): 151 (in Chinese).
- [25] 单李深. 抗体分离纯化技术研究进展 [J]. 山东化工, 2016, 45(11): 59-60+62.
- Shan L S. Recent advances in the separation and purification of antibodies [J]. Shandong Chemical Industry, 2016, 45(11): 59-60+62 (in Chinese with English abstract).

## 第四章 H5 亚型禽流感病毒 HA 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定

**摘要:** 本研究用纯化的重组融合蛋白 pColdI-H5-HA1 作免疫原, 免疫 6-8 周龄 Balb/c 雌性小鼠, 用间接 ELISA 方法选取血清抗体滴度高的小鼠脾脏用于细胞融合, 并检测融合细胞培养上清以筛选阳性杂交瘤细胞株。经过多次克隆化培养, 最终获得 2 株能稳定分泌抗 H5 亚型禽流感病毒 HA1 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 命名为 11H4 和 12G4。间接 ELISA 法测得杂交瘤细胞培养上清的抗体效价分别为 1:10000、和 1:10; 2 株单抗都是 IgG1 亚类, 轻链均为  $\kappa$  链。Western blot 分析表明 2 株单抗均能与纯化的 H5-HA1 重组融合蛋白发生特异性反应; 间接免疫荧光 (IFA) 分析表明 2 株单抗均能与 H5 亚型禽流感病毒感染的 MDCK 细胞发生特异性反应。特异性试验表明 3 株单抗能够特异性地识别所有的 H5 亚型 AIV, 而不与其他亚型发生交叉反应。以上结果表明, 本研究制备的两株 H5 单抗具有良好的型特异性, 为 H5 亚型 AIV 诊断方法的开发及开展 HA 蛋白表位的研究奠定了基础。

**关键词:** 禽流感病毒; H5; 单克隆抗体; HA1; 特异性

禽流感是由禽流感病毒引起的一种广泛流行的急性呼吸道传染病, 长期困扰和制约世界养禽业发展, 并不断破坏全球社会生活秩序和公共卫生安全, 其中又以 H5 亚型最为严重<sup>[1]</sup>。自 1996 年 H5N1 亚型 AIV 在我国广东省被首次分离到, 其已经迅速传播蔓延至亚洲、欧洲和非洲等数十个国家和地区, 多国养禽业遭受重创; 此外, H5N1 亚型 AIV 可跨物种传播导致人类感染, 感染死亡率超过 50%<sup>[2, 3]</sup>。近年来 H5 亚型禽流感疫情已由局部地区暴发转变为全球大面积分布的趋势, 且暴发亚型和分支呈现多样性, 除 H5N1 亚型外, H5N2、H5N6 和 H5N8 等亚型均有见报道。在我国 H5N6 和 H5N1 亚型是近年来流行的主要血清型, clade 2.3.4.4 为优势分支, 一旦暴发病死亡率极高, 人类感染病例也时有报道, 研究表明 H5 亚型禽流感其进化变异速率不断加快, 因此需要加强对 H5 亚型禽流感诊断技术和流行特点的研究, 为科学防控提供技术支撑<sup>[4]</sup>。

单克隆抗体因其具备特异性强、亲和力高、均一性好、效价高和来源方便等优势, 因此可用作病原或血清学诊断试剂, 目前在禽流感检测中已成为有力的诊断工具<sup>[5]</sup>。禽流感病毒基因组编码多种抗原蛋白, 包含大量抗原决定簇, 其中 HA 蛋白是禽流感病毒粒子表面的主要抗原蛋白, 与禽流感病毒的抗原性和致病性密切相关, 是宿主获得性免疫系统识别的主要对象, 诱导中和抗体产生。HA 蛋白中决定抗原变异的关键

氨基酸位点都位于 HA1 部分，且都暴露于分子表面<sup>[6]</sup>。因此，本研究以重组融合蛋白 pColdI-H5-HA1 为免疫原，利用杂交瘤技术制备针对 H5 亚型禽流感病毒 HA1 蛋白的单克隆抗体，旨在为 H5 亚型禽流感病毒的检测和快速诊断方法的建立奠定物质基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒载体、菌株与毒株

原核表达载体 pColdI；克隆宿主菌 *E.coil* DH5 $\alpha$ 和表达宿主菌 *E.coil* BL21 (DE3) 均由本实验室保存。H1-H8, H10-H13 亚型 AIV 均由农业部病毒学重点实验室分离并保存（其中 H5 与 H7 亚型毒株是以 A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)（简称 PR8）六个基因片段作为骨架构建的低致病力毒株，H5 亚型毒株的 HA 和 NA 基因片段来源于 A/chicken/Jiangsu/k0101/2010 (H5N1)，H7 亚型毒株的 HA 和 NA 基因片段来源于 A/duck/Zhejiang/12/2011 (H7N3)；H9 亚型毒株（A/chicken/Zhejiang/A2013/2017 (H9N2)）由本实验室保存，毒株信息见附录）。

### 1.2 细胞、鸡胚与实验动物

小鼠骨髓瘤细胞（sp2/0）和犬肾细胞（MDCK）均保存于本实验室；9-11 日龄 SPF 鸡胚购自乾元浩生物股份有限公司南京生物药厂；6-8 周龄的 Balb/c 雌性小鼠购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司。

### 1.3 生物试剂

RPMI-1640 和 DMEM 培养基购自 Hyclone 公司；胎牛血清 Gibco 购自 Life Technologies 公司产品；胎牛血清 BI 购自 Biological Industries；胰酶购自美国 AMRESCO 公司；弗氏完全佐剂，弗氏不完全佐剂，HAT（50 $\times$ ）、PEG2000 和 DMSO 均购自 Sigma 公司；Trizol 购自诺唯赞公司；DNA Marker, 蛋白预染 Marker 和 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司；限制性内切酶购自 NEB 公司；Ni 填料购自 QIAGEN 公司；HRP-YKS 和 FITC-YKS 购自 KPL 公司；质粒提取试剂盒购自天根生化科技有限公司；凝胶回收试剂盒购自 Axygen 公司；克隆抗体亚型鉴定试剂盒购自北京博奥龙免疫技术公司。

### 1.4 仪器设备

移液器，常温离心机，4 $^{\circ}$ C 低温离心机购自 Eppendorf 公司；倒置荧光显微镜购自 Olympus 公司；CO<sub>2</sub> 细胞培养箱，摇床，细胞计数仪购自 Thermo 公司；多功能酶标仪购自 Tecan 公司。

## 1.5 免疫原的制备

### 1.5.1 核酸提取与反转录

取实验室保存的以 PR8 内部基因片段为骨架构建的 H5 亚型低致病力重组病毒尿囊液，经血凝试验验证和病毒核酸鉴定后用于病毒 RNA 的提取。

用 Trizol 法提取 H5 亚型禽流感病毒 RNA。具体步骤如下：取适量鸡胚尿囊液，以 12,000 rpm 转速离心 5 min，取 500  $\mu$ L 上清转移至无 RNA 酶离心管。向转移的上清中加入 700  $\mu$ L Trizol，两者混合均匀后静置 10 min。向上述混合液中加入 200  $\mu$ L 氯仿，混匀，4  $^{\circ}$ C 静置 10 min 后，于 4  $^{\circ}$ C 条件下以 12,000 rpm 转速离心 15 min。离心后立即转移上清并添加等量异丙醇，混匀，4  $^{\circ}$ C 静置 15 min 后，于 4  $^{\circ}$ C 条件下以 12,000 rpm 转速离心 10 min。弃去上清，用体积为 1 mL 的 75%乙醇洗涤沉淀，不重悬，以 12,000 rpm 转速离心 5 min。弃去上清，待离心管内无残余液体后，加入 20  $\mu$ L DEPC 水，震荡混匀，测定浓度后随即进行反转录，剩余 RNA 置于 -80  $^{\circ}$ C 保存。

以提取的 RNA 为模板进行反转录。反转录的反应体系按照表 4-1 中进行配置。反转录程序为：50  $^{\circ}$ C 15 min；85  $^{\circ}$ C 5 s。反应结束后，产物放于 -40  $^{\circ}$ C 保存。

表 4-1 反转录反应体系

Reagents	Volume
5 $\times$ HiScript II qRT SuperMix	4 $\mu$ L
Template RNA	Total RNA: 1 pg-1 $\mu$ g
RNase free ddH <sub>2</sub> O	to 20 $\mu$ L

### 1.5.2 目的基因的扩增

利用 Primer Premier 5.0 软件，参照原核表达载体 pColdI 序列，依据 H5 亚型禽流感毒株去掉前端信号肽的 HA1 基因序列设计挑选特异性引物对（表 4-2）。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

表 4-2 引物序列

Table 4-2 Primer sequences

Primer names	Primer sequence (5'-3')	Restriction enzymes
pColdI-H5-HA1 F	CATATGGAGCTCGGTACCCTCGAGGATCAGATTGTCATTGGTTACC	<i>XhoI</i>
pColdI-H5-HA1 R	CTGCAGGTCGACAAGCTTGAATTCTTTCTTCTTCTTTCTTTAGAGGA	<i>Hind III</i>

注：字体倾斜碱基代表酶切位点。

以反转录产物 cDNA 为模板，用高保真酶（诺唯赞公司）扩增 H5-HA1 目的基因片段。反应体系（50  $\mu\text{L}$ ）如下表 4-3，反应程序如下表 4-4 所示：

表 4-3 PCR 反应体系

Table 4-3 PCR reaction system

Reagents	Volume
Premix Taq (LA Taq Version 2.0 plus dye)	25 $\mu\text{L}$
pColdI-H5-HA1 F	2 $\mu\text{L}$
pColdI-H5-HA1 R	2 $\mu\text{L}$
cDNA	1 $\mu\text{L}$
ddH <sub>2</sub> O	20 $\mu\text{L}$

表 4-4 PCR 反应程序

Table 4-4 PCR reaction procedures

Stage description	Temperature	Time	Cycle
Initial denaturation	95 °C	5 min	1 cycle
Denaturation	95 °C	15 s	
Annealing	54 °C	30 s	35 cycles
Extension	72 °C	2 min	
Extension	72 °C	10 min	1 cycle

扩增后所得 PCR 产物，经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后，用凝胶回收试剂盒回收目的大小片段，测定纯化目的基因片段的浓度后，用于构建原核重组表达载体。

### 1.5.3 酶切、连接与转化

取本实验室保存的 pColdI 质粒载体菌种，在氨苄抗性（Amp<sup>+</sup>）的固体 LB 培养基上划线，于 37 °C 静置培养过夜；挑取单个菌落置于 4 mL 的 LB 液体培养基（Amp<sup>+</sup>）中，于 37 °C 摇床过夜震荡培养。用天根生化科技有限公司的质粒小提试剂盒提取质粒，具体步骤如下：用 500  $\mu\text{L}$  体积平衡液 BL 平衡吸附柱，离心后弃去收集管中的液

体并放回吸附柱。取过夜培养 4 mL 菌液，以 12,000 rpm 转速离心 5 min 后弃去上清。用 250  $\mu$ L 体积 P1 溶液彻底悬浮菌体沉淀，再添加 250  $\mu$ L 体积 P2 溶液，温和翻转 6-8 次以充分裂解菌液。然后再加入 350  $\mu$ L 体积 P3 溶液，立即温和混匀，出现白色絮状沉淀后以 12,000 rpm 转速离心 10 min。将离心后的上清转移至平衡后吸附柱，每次转移 700  $\mu$ L 体积，以 12,000 rpm 转速离心 1 min，弃去废液。转移完成后向吸附柱加入 600  $\mu$ L 体积漂洗液 PW，以 12,000 rpm 转速离心 1 min，弃去废液，重复一次此步骤后将吸附柱放回收集管，以 12,000 rpm 转速空离 2 min。取吸附柱置于新离心管中，滴加 20  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 于吸附柱膜中央，静置 5 min 后以 12,000 rpm 转速离心 3 min。测定质粒浓度，并标记好质粒名称，浓度以及日期。暂放于 4 °C 备用或存放于 -40 °C 长期保存。

取回收纯化的 H5-HA1 基因片段和质粒空载体 pColdI，分别用限制性内切酶进行双酶切，于 37 °C 条件下水浴 30 min。清洁回收酶切产物，回收产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定，用 clonexpressII one step cloning kit 连接质粒空载体和目的基因片段，酶切和连接反应体系如表 4-5 和 4-6 所示。

表 4-5 酶切体系

Reagents	Volume
pColdI	1 $\mu$ g
<i>XhoI</i>	1 $\mu$ L
<i>HindIII</i>	1 $\mu$ L
10 x cutsmart buffer	5 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	to 50 $\mu$ L

按下表体系于冰上操作，添加完试剂后混合均匀，短暂离心后 37 °C 恒温水浴 30 min，立即取出连接体系，冰浴 3 min。

表 4-6 连接体系

Reagents	Volume
5 CE II Buffer	4 $\mu$ L
Exnase <sup>®</sup> II	2 $\mu$ L
Target gene (H5-HA1)	50-200 ng
Vector (pColdI)	10-200 ng
ddH <sub>2</sub> O	to 20 $\mu$ L

全程无菌条件下用  $\text{CaCl}_2$  处理法制备感受态细胞。具体制备步骤如下，将 *E.coli* DH5 $\alpha$  和 *E.coli* BL21 菌种于无抗性 LB 固体培养基上划线，过夜活化培养，挑取单一菌落置于 4 mL 无抗性 LB 液体培养基中，于 37 °C 摇床过夜培养。将上述菌液按 1:100 的比例接种到无抗性 LB 液体培养基中，37 °C 摇床扩大培养，生长至对数期后分装至预冷的 50 mL 离心管，冰浴 20 min。于 4 °C 条件下以 4,000 rpm 转速离心后弃去上清，加入 25 mL 预冷的浓度为 0.1 M 的  $\text{CaCl}_2$  溶液悬浮菌体，冰浴 30 min。于 4 °C 条件下以 4,000 rpm 转速离心 10 min，弃去上清，加入 5 mL 预冷的含 20% 甘油的  $\text{CaCl}_2$  溶液悬浮菌体，分装后于 -80 °C 条件下保存。

取出感受态细胞 *E.coli* DH5 $\alpha$  置于冰上融化，将连接产物轻轻吹打加入 50  $\mu\text{L}$  体积的感受态细胞中，混匀后冰浴 30 min，然后于 42 °C 水浴热激 90 s，再迅速冰浴 3 min。接着加入 600  $\mu\text{L}$  体积的无抗性 LB 液体培养基中，于 37 °C 摇床培养 45 min 后，4,000 rpm 离心 5 min，弃去上清，重悬菌体，在氨苄抗性的 LB 固体培养基上均匀涂布重悬菌液，倒置于 37 °C 恒温培养箱中静置培养。

#### 1.5.4 重组原核表达载体的鉴定

重组原核表达载体通过菌液 PCR 进行鉴定。在无菌条件下挑取过夜转化 LB 平板上的单菌落，加入 600  $\mu\text{L}$  体积氨苄抗性的 LB 液体培养基，37 °C 摇床培养 2 h 至云雾状。取 1  $\mu\text{L}$  体积的菌液作为 PCR 模板（剩余暂放 4 °C 保存），20  $\mu\text{L}$  反应体系如下（表 4-7）：

表 4-7 菌液 PCR 反应体系

Reagents	Volume
2 x taq plus master mix	10 $\mu\text{L}$
pColdI-H5-HA1 F	1 $\mu\text{L}$
pColdI-H5-HA1 R	1 $\mu\text{L}$
bacterial suspension	1 $\mu\text{L}$
ddH <sub>2</sub> O	7 $\mu\text{L}$

反应程序如下表 4-8 所示：

表 4-8 菌液 PCR 反应程序

Stage description	Temperature	Time	Cycle
Initial denaturation	95 °C	5 min	1 Cycles
Denaturation	95 °C	30 s	
Annealing	54 °C	30 s	35 Cycles
Extension	72 °C	2 min	
Extension	72 °C	10 min	1 Cycles

通过 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定菌液 PCR 产物, 取样鉴定为阳性克隆的菌液送南京擎科公司测序, 测序结果用 DNAMAN 软件进行比对分析。

### 1.5.5 重组蛋白的诱导表达与纯化

将鉴定正确的重组阳性菌, 提取质粒, 按照 2.1.3 的方法转化至 *E. coli*. BL21 感受态细胞中, 挑取过夜转化 LB 平板上的阳性单菌落进行活化。将活化的菌液按 1:100 的比例接种至 LB 液体培养基中, 于 37 °C 摇床震荡培养, 转速为 220 rpm, 当菌液处于对数生长期时 (OD<sub>600</sub> 约为 0.6-0.8), 取出 1 mL 体积的菌液作诱导前对照, 剩余菌液添加工作浓度为 1 mM 的 IPTG 诱导剂。在 37 °C 摇床诱导 4 h 后, 以 11,000 rpm 转速离心 10 min 后弃去上清。

将菌体重悬, 菌体按湿重 1 mg/mL 的比例添加 PH=7.4 的 PBS 溶液, 于冰上超声破碎, 超声破碎程序为功率 150 W, 超声 3 s, 间隔 6 s, 液体均质透明后停止超声, 4 °C 条件下以 11,000 rpm 转速离心 15 min, 分离上清与沉淀, 弃去上清, 沉淀保留用于包涵体纯化。在变性条件下, 利用 QIAGEN 公司的 Ni-NTA 填料纯化重组蛋白, 纯化操作如下, 分别配制 Buffer A, Buffer B, Buffer C 和 Buffer D, 配方见附录。称重包涵体沉淀, 按照每克湿重加 5 mL Buffer A 的比例加入 Buffer A, 轻轻涡旋, 当溶液呈半透明状态, 即完成包涵体裂解。以 11,000 rpm 转速离心 15 min, 弃去沉淀, 用 0.45 μm 的滤器过滤上清。将 Ni 填料和裂解上清按 1:4 的比例混合, 室温震荡孵育 1 h 左右。将亲和层析柱柱垂直悬空固定好, 并将孵育后的混合液加入柱子中静置, 待填料全部沉于柱底, 打开底盖并收集流出液。Buffer B 清洗填料, 收集流出液并测浓度, 洗脱液浓度低于 0.1 mg/mL 时进行下一步操作。用 Buffer C 清洗, 收集液体, 洗脱液浓度低于 0.1 mg/mL 时进行下一步操作。用 Buffer D 洗脱蛋白, 每次洗脱 0.5 mL, 收集洗脱液, 同时测定洗脱液中的蛋白含量, 当蛋白浓度低于 0.1 mg/mL, 停止收集洗脱液。纯化蛋白取样进行验证, 其余纯化蛋白放 -80 °C 保存备用。

### 1.5.6 重组蛋白的验证

通过 SDS-PAGE 和 Western blot 实验验证重组蛋白纯化效果。配制 10%分离胶和 5%浓缩胶，取纯化蛋白及诱导前后对照样品，加入适量 4×loading buffer 混匀，于沸水中煮沸 10 min 充分变性蛋白。以 11,000 rpm 转速离心 10 min，取样 10 μL 加入 SDS-PAGE 电泳胶加样孔，通过电泳进行蛋白分离。蛋白胶分别用于考马斯亮兰染色，或半干法转印至硝酸纤维素（NC）膜。转膜完成后，将 NC 膜置于 5%的脱脂奶 PBS 溶液中，于 37 °C 摇床封闭 30 min。用 PBST 洗涤 5 次后，于 37 °C 摇床孵育 H5 单克隆抗体 1 h。用 PBST 洗涤 5 次后用 HRP-YKS 孵育 30 min。用 PBST 再次洗涤 5 次后在 NC 膜上滴加化学发光液 A 和 B（等体积混合），用多功能成像仪曝光显色。

### 1.6 动物免疫

取 50 μg 纯化的 H5-HA1 重组蛋白与等体积的弗氏完全佐剂充分混合，用乳化仪乳化均匀后，背部皮下多点注射免疫多只 6 周龄雌性 Balb/c 小鼠；在一免后第 15 d，将 50 μg 纯化的 H5-HA1 重组蛋白与等体积的弗氏不完全佐剂乳化形成的混合物，进行背部皮下多点注射免疫；在一免后第 30 d，将 50 μg 纯化的 H5-HA1 重组蛋白与等体积的弗氏不完全佐剂乳化形成的混合物，通过腹腔注射免疫，一周后免疫小鼠断尾采集血清，以纯化的 H5-HA1 重组蛋白包被 96 孔酶标板，用间接 ELISA 方法检测分析鼠血清效价，待血清效价达到  $10^5$ ，对小鼠进行加强免疫；直接将 100 μg 纯化的 H5-HA1 重组蛋白，腹腔注射免疫该只 6 周龄雌性 Balb/c 小鼠，免疫 3 d 后，进行细胞融合。

### 1.7 细胞融合

#### 1.7.1 饲养层细胞的制备

细胞融合前一天，挑选一只生长状态优良的雌性 Balb/c 小鼠，通过摘除眼球收集血液至 1.5 mL EP 离心管中，收集的血液在 37 °C 温箱放置 0.5-1 h 后，4,000 rpm 离心 10 min，小心分离得到血清分装后 -40 °C 保存，ELISA 和 HI 检测中可作为阴性对照血清。小鼠摘除眼球后脱颈椎致死，断颈椎时尽量减少对腹腔的压迫，将小鼠浸泡于 75% 酒精中 10 min，然后用手提住小鼠尾巴，上下于酒精中涮洗数次，置于超净台无菌平皿中。使用无菌剪镊从后腹剪开皮肤，沿两侧剪开皮肤，暴露腹部且不损伤腹膜。使用酒精棉球擦拭腹膜后，使用 10 mL 注射器吸取 6-8 mL 的 1640 不完全培养基注入腹腔，注射时用镊子提起腹膜，避免针头刺穿肠管等腹腔脏器。用棉球轻轻按摩腹部 1 min，吸出腹腔注入的培养基。将吸出的内含巨噬细胞的培养基转移至离心管中，放入水平离心机 800-1,000 r/min 离心 5-10 min，弃去上清，若腹腔血管损伤，沉淀中可

见有红细胞。用 5 mL 培养基悬浮细胞沉淀，根据细胞计数结果，补加培养基和胎牛血清，使细胞浓度达  $2 \times 10^5/\text{mL}$ 。将上述细胞悬液加入 96 孔细胞培养板，每孔添加 0.1 mL，放入充满 5%  $\text{CO}_2$  的  $37^\circ\text{C}$  恒温培养箱中培养 24 h。细胞生长形态应呈多形性，且贴壁紧密，检查并确定无细胞污染状况。

### 1.7.2 小鼠骨髓瘤细胞的准备

在细胞融合前 3 周，复苏实验室冻存的小鼠骨髓瘤细胞，取出 sp2/0 骨髓瘤细胞后迅速置于  $37^\circ\text{C}$  水浴，并轻轻晃动细胞冻存管，使细胞快速溶解，待细胞溶解后，将冻存管中的细胞转入离心管中，放入水平离心机以 800 rpm 转速离心 5 min，在无菌条件下弃去上清，使用 5 mL 体积的含 10% 胎牛血清的 1640 培养基吹起细胞沉淀，置于  $25\text{ cm}^2$  细胞培养瓶中，将细胞瓶置于充满 5%  $\text{CO}_2$  的  $37^\circ\text{C}$  恒温培养箱中静置培养。细胞融合时，细胞需生长状态良好且处于生长对数期，细胞密度达到 70%-80%。

### 1.7.3 细胞融合

细胞融合前将 PEG 溶液、1640 不完全培养基和  $1 \times \text{HAT}$  选择培养基等提前于  $37^\circ\text{C}$  恒温培养箱预热，同时准备  $37^\circ\text{C}$  温水。进行细胞融合时，将生长状态为对数生长期且细胞密度达到 80% 左右的 sp2/0 细胞吹起收集到 50 mL 无菌离心管中备用。取经加强免疫的雌性 Balb/c 小鼠，通过摘除眼球收集血液，经处理得到阳性对照血清，然后脱颈椎致死，在 75% 酒精中浸泡 10 min。将上述小鼠置于无菌平皿，使之仰躺，使用无菌镊子提起胸部中央的皮肤后，用无菌剪刀沿体中线向腹部剪开皮肤，同时防止剪破腹膜，接着剪开体左侧上下肢皮肤，分离左腹部的皮肤与腹膜，使脾脏所在部位暴露于视野下；使用无菌镊子提起腹下部中央的腹膜，无菌剪刀沿体中线向胸部剪开腹膜切勿剪破肠壁或剪开胸腔，完全打开左腹腔，使脾脏暴露于视野之中；此时换用另一副无菌剪刀和镊子，无菌镊子小心提起脾脏游离端，剪刀将脾脏自周围结缔组织中分离出来；将整个脾脏置于灭菌平皿中，用 1640 不完全培养基洗涤几次，弃尽液体。将洗涤后的脾脏放入研磨器中，加入 3 mL 1640 培养基研磨，待研磨充分之后补加到 5-10 mL，转移至 50 mL 无菌离心管中。研磨后得到的脾细胞以 1,500 rpm 转速离心 5 min，以去除结缔组织。将准备好的 sp2/0 细胞转移到离心管中同样以 1,500 rpm 转速离心 5 min，按此步骤清洗两遍后弃去上清，用预热的 1640 不完全培养基重悬细胞，通过台盼蓝染色进行细胞计数。细胞计数完成后，将骨髓瘤细胞 (sp2/0) 与脾细胞按照 1:10 的比例混合，轻轻旋转离心管混匀，以 1,000 rpm 转速水平离心 10 min，弃去上清，用指尖轻轻弹动管底以使细胞松动，将离心管置于  $37^\circ\text{C}$  水浴中。用 1 mL 注射器吸取 1 mL 已预热至  $37^\circ\text{C}$  的 PEG 溶液，沿离心管壁缓缓注入融合剂，1 min 内

加完, 同时在 37 °C 温水中不断旋转离心管促使细胞混合物与聚乙二醇相互作用, 刺激融合, 加完后再静置 1 min。静置 1 min 后沿管壁加入已预热至 37 °C 的 1640 不完全培养基以终止细胞融合, 同时不断转动离心管, 要求在第 1 min 的前 30 s 内加 1 mL, 后 30 s 内加 3 mL, 在第 2 min 内加完 11 mL, 最后加至总体积 30 mL。900 rpm 水平离心 5 min, 吸弃上清, 沿管壁加入 30 mL 1640 不完全培养基, 此时不悬浮细胞, 再次离心、弃上清, 以尽可能地去掉残留的 PEG。沿管壁加入 5 mL 已预热至 37 °C 的含 10%胎牛血清的 1×HAT 选择培养基, 轻轻吹打悬浮细胞。补加预热的含 10%胎牛血清的 1×HAT 选择培养基至 40-50 mL, 轻轻混匀后以 100 μL/孔接种至 5 块 96 孔细胞培养板中, 置于充满 5% CO<sub>2</sub> 的 37 °C 细胞恒温培养箱中培养。5 d 后补充添加新鲜的 HAT 培养基, 7-10 d 当细胞长至孔底约 3/10 时, 检测细胞上清抗体。

## 1.8 阳性杂交瘤细胞的筛选

### 1.8.1 间接 ELISA 筛选法的建立

将纯化的 H5-HA1 重组蛋白作为包被抗原, 用于建立间接 ELISA 法筛选阳性杂交瘤细胞。用包被液将 H5-HA1 重组蛋白依次稀释至 8、4、2、1、0.5 和 0.25 μg/mL, 每孔添加 100 μL, 置于 4 °C 包被过夜; 用 PBST 洗涤 5 次, 每次洗涤 5 min, 拍干后用 5%脱脂奶封闭, 每孔添加 200 μL, 于 37 °C 作用 2 h; 用 PBST 洗涤 5 次, 每次洗涤 5 min, 拍干。每孔添加 100 μL 用 PBS 倍比稀释的小鼠阳性和阴性血清, 稀释倍数为 1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400, 并设立 sp2/0 细胞上清和空白孔作为对照, 于 37 °C 作用 1 h; 同样用 PBST 洗涤 5 次, 每次洗 5 min, 拍干。用 5%脱脂奶按照 1:5,000 的比例稀释 HRP-YKS, 每孔添加 100 μL, 于 37 °C 作用 45 min; 孵育结束后 PBST 洗涤 5 次并拍干, 避光每孔添加 100 μL TMB 显色液, 避光显色 5 min 后每孔继续添加 50 μL 的终止液终止显色, 多功能酶标仪用于测量每孔 OD<sub>450</sub> 值的大小。根据 OD<sub>450</sub> 值计算 P/N 值, P 作为阳性值, N 作为阴性值, 选择 OD<sub>450</sub> 值在 1.0 左右, 且 P/N 值最大的抗原和血清浓度作为最适工作浓度, 杂交瘤细胞培养上清判定为阳性的标准为 P/N 值≥2.1。

### 1.8.2 间接 ELISA 筛选杂交瘤细胞

观察融合后的细胞生长情况, 当细胞克隆长至孔底面积 1/2 时, 取细胞培养上清用间接 ELISA 方法检测, 并设立 sp2/0 细胞上清作阴性对照, 小鼠阳性血清作阳性对照。间隔 2 d 再次检测, 2 次检测结果均为阳性且 OD<sub>450</sub> 值高的融合细胞进行下一步克隆。

## 1.9 杂交瘤细胞的克隆化

有限稀释法实现对杂交瘤细胞的克隆。使用含 10% FBS 的 RPMI-1640 完全培养基制备饲养层细胞，在充满 5% CO<sub>2</sub> 的 37 °C 饱和湿度恒温培养箱中静置培养 24 h。待细胞形态稳定且不存在污染，将检测结果显示为阳性的杂交瘤细胞集落用 RPMI-1640 吹起悬浮，取细胞悬液经台盼蓝染色后进行细胞计数，使用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养基将阳性克隆孔的杂交瘤细胞依次 10 倍倍比稀释至每毫升 10-12 个细胞，将 50 mL 稀释好的细胞悬液，每孔 0.1 mL 添加到 5 块铺有饲养细胞层的 96 孔细胞培养板中，置于充满 5% CO<sub>2</sub> 的 37 °C 饱和湿度恒温培养箱中进行培养，并将每次克隆化剩余的阳性克隆孔细胞进行扩大培养并冻存。一周后观察细胞生长情况，当细胞长至孔底 1/3 时，用间接 ELISA 法对细胞上清进行 2 次检测。对检测结果为阳性的单集落克隆继续亚克隆，经过 3-5 次克隆化，直到所克隆化细胞孔检测阳性率达到 100%，则可确定获得稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株，需及时进行扩大培养和冻存。细胞冻存具体步骤如下，弃去细胞上清后将细胞集落用 RPMI-1640 培养基吹下，以 800 rpm 转速水平离心 5 min，用配置的冻存液(培养基:血清:DMSO=6:3:1)重悬细胞，每个细胞冻存管分装体积为 1 mL，置于细胞冻存盒中经程序降温后转移至 -80 °C 冰箱，12 h 后取出放于液氮冻存。

## 1.10 单克隆抗体的鉴定

### 1.10.1 间接 ELISA 抗体效价测定

将最终获得的杂交瘤细胞株进行连续传代培养、液氮冻存与复苏试验，用间接 ELISA 方法检测杂交瘤细胞培养上清液中的抗体效价，上清从 1:10 开始连续倍比稀释至 1:10<sup>10</sup>，每个稀释度设置三个重复。同时将 sp2/0 细胞培养上清和小鼠阳性血清分别作为阴性和阳性对照。检测结果为阳性的细胞上清最高稀释度确定为单抗细胞株对应的抗体效价。

### 1.10.2 单克隆抗体亚型鉴定

按照单克隆抗体亚型鉴定试剂盒使用说明书鉴定单克隆抗体亚型。具体步骤如下，纯化 H5-HA1 重组蛋白包被 96 孔酶标板，每株单抗细胞培养上清加 16 孔，每孔添加 100 μL，置于 37 °C 孵育 30 min。弃去上清后用 PBST 洗涤 5 遍，每遍 5 min，拍干。然后将 8 种酶标记物 (IgG、IgG2a、IgG2b、IgGM、IgG3、IgA、λ 链、κ 链) 每种各加 2 孔，每孔 100 μL，共 16 孔，37 °C 反应 30 min，PBST 洗涤 5 遍，每遍 5 min，拍干。添加 TMB 显色液，37 °C 避光显色 20 min 后继续加入 2 M 浓硫酸终止反应，读取 OD<sub>450</sub> 值判定单克隆抗体的亚型。

### 1.10.3 Western blot 试验

取 10  $\mu\text{L}$  纯化的 H5-HA1 重组蛋白, 加入适量 4 $\times$ loading buffer 混匀, 沸水浴持续 10 min 使其充分变性, 以 12,000 rpm 转速离心 10 min。配制 10%蛋白分离胶和 5%浓缩胶, 经 SDS-PAGE 蛋白电泳分离蛋白, 而后转印至硝酸纤维素 (NC) 膜。在 37 $^{\circ}\text{C}$  摇床用 5%脱脂奶封闭 30 min, 用 PBST 洗涤 5 次后, 孵育杂交瘤细胞的上清原液, 在 37 $^{\circ}\text{C}$  摇床作用 1 h。PBST 洗涤 5 次后孵育二级抗体 HRP-YKS, 在 37 $^{\circ}\text{C}$  摇床作用 30 min。PBST 再次洗涤 5 次后, 加入等体积混合的 ECL 化学发光液 A 与 B, 经多功能成像仪曝光显色。

### 1.10.4 间接免疫荧光试验

MDCK 细胞经胰酶消化铺于 96 孔细胞培养板生长, 待细胞密度达到 60-80%时, 按 1:1,000 比例用无菌 PBS 稀释 H1-H13 亚型 AIV 毒株, 然后接种单层的 MDCK 细胞, 同时设立未接毒 MDCK 细胞作空白对照, 于 37 $^{\circ}\text{C}$  感作 1 h, 弃去病毒液; 添加含 2%胎牛血清的 DMEM 继续于 37 $^{\circ}\text{C}$  培养, 期间观察留意细胞病变, 48 h 后弃细胞上清, 用无菌 PBS 洗涤 5 次, 每次历时 5 min, 拍干; 加入固定液 (甲醇: 丙酮= 1: 1), 在 -20 $^{\circ}\text{C}$  条件下作用 20 min, 用 PBS 洗涤 5 次, 每次 5 min, 然后拍干; 在 H1-H13 病毒感染的细胞孔中分别都加入 200  $\mu\text{L}$  杂交瘤细胞培养上清作为一抗, 同时将 NP 蛋白单抗和小鼠的阳性血清作为阳性对照, sp2/0 细胞上清当作阴性对照, 于 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h 后, 用 PBS 洗涤 5 遍, 每次历时 5 min; 用 5%的脱脂奶对异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的山羊抗鼠 IgG 进行 400 倍稀释以此作为二抗, 于 37 $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 1 h 后, 用 PBS 洗涤 5 遍, 每次历时 5 min, 然后拍干; 避光条件下在 96 孔细胞培养板每孔内加入 100  $\mu\text{L}$  体积的 PBS, 在倒置荧光显微镜下观察并记录结果。

## 2 结果

### 2.1 免疫原的制备

#### 2.1.1 重组载体的鉴定

以抽提的 H5N1 毒株的基因组 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板, 用设计合成的 H5N1-HA1 基因序列特异性引物成功扩增到目的基因片段, 并将该目的片段进行胶回收后克隆到 pColdI 原核表达载体上, 经菌液 PCR 和测序结果比对验证, pColdI-H5-HA1 重组载体成功构建, 如图 4-1 所示。

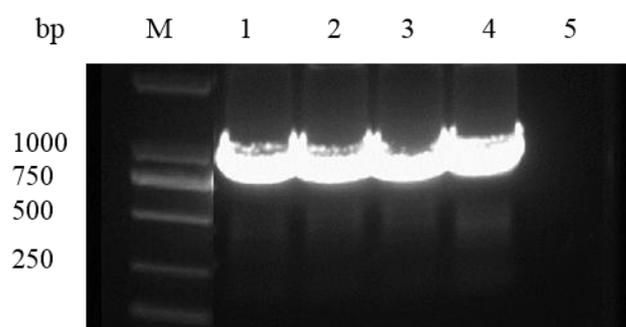


图 4-1 pColdI-H5-HA1 重组载体菌液 PCR 鉴定

Fig. 4-1 The identification of pColdI-H5-HA1 recombinant vector by PCR

注：M：DL2000 marker；1-4：不同菌落；5：阴性对照

Note: M: DL2000 marker; 1-4: the different colonies; 5: negative control

### 2.1.2 重组蛋白的鉴定

将重组载体转化至表达宿主菌内，经 IPTG 成功诱导表达后，用 Ni-NTA 对携带 His 标签的重组蛋白进行纯化，并验证重组蛋白的表达和纯化。SDS-PAGE 结果显示 1 mM IPTG 诱导后的菌体以及纯化蛋白在 38 kDa 处出现蛋白条带，与预期蛋白大小相符（图 4-2），western blot 结果表明纯化蛋白与相应的单克隆抗体发生特异性结合反应，在 38 kDa 处出现特异性目的条带（图 4-2），与预期相符，且阴性对照成立。故以上结果表明重组蛋白被成功诱导表达和纯化。

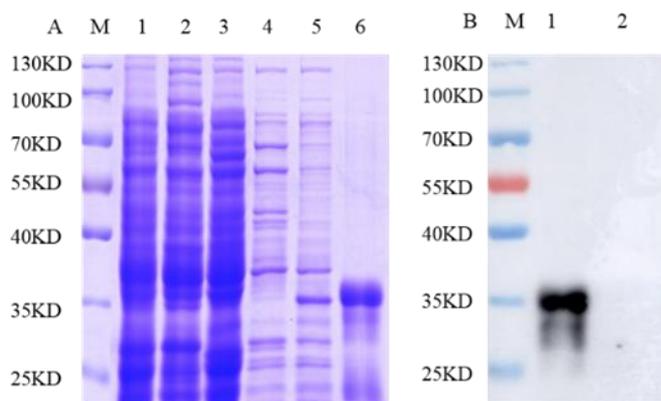


图 4-2 pColdI-H5-HA1 重组蛋白的诱导表达及纯化

Fig. 4-2 Induced expression and purification of pColdI-H5-HA1 recombinant protein

注：(A) M：蛋白 Marker；1：pColdI 空载体诱导前；2：pColdI 空载体诱导后；3：pColdI-H5-HA1 重组载体诱导前；4：pColdI-H5-HA1 重组载体诱导上清；5：PcoldI-H5-HA1 重组载体诱导沉淀；6：pColdI-H5-HA1 纯化蛋白 (B)

M：蛋白 Marker；1：pColdI-H5-HA1 纯化蛋白；2：pColdI 空载体诱导后

Note: (A) M: Protein marker; 1: noninduced *E. coli* transformed with pColdI; 2: induced *E. coli* transformed with pColdI; 3: noninduced *E. coli* transformed with pColdI-H5-HA1; 4: induced *E. coli* transformed with pColdI-H5-HA1 in supernatant; 5: induced *E. coli* transformed with pColdI-H5-HA1 in pellet; 6: purified pColdI-H5-HA1 protein

(B) M: Protein marker; 1: purified pColdI-H5-HA1 protein; 2: induced *E. coli* transformed with pColdI

## 2.2 单克隆抗体的制备

### 2.2.1 间接 ELISA 检测方法的建立

分别包被不同质量浓度的纯化 H5-HA1 重组蛋白，用方阵滴定法检测不同稀释度的阳性和阴性小鼠血清，根据 P/N 值确定最佳的抗原包被浓度及小鼠血清稀释度，结果表明，最佳的纯化病毒的最佳包被浓度为  $2 \mu\text{g/mL}$ ，阳性和阴性小鼠血清最佳稀释度为 1:800，二抗最佳稀释度为 1:5,000。

### 2.2.2 免疫小鼠血清效价测定

第三次免疫 7 d 后，Balb/c 小鼠断尾采血，离心分离血清，利用间接 ELISA 方法测定小鼠血清效价，结果显示，3 只免疫小鼠的血清效价均达到  $10^5$  以上，选择其中效价最高的小鼠用于细胞融合。

### 2.2.3 杂交瘤细胞株的筛选

经过细胞融合，采用间接 ELISA 法检测细胞培养上清液，将筛选得到的阳性杂交瘤细胞用有限稀释法经过 4 次亚克隆，同时用间接 ELISA 法检测，最后获得 2 株稳定分泌抗 H5 亚型禽流感病毒 HA1 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株，分别命名为 11H4

和 12G4 细胞株。

## 2.3 单克隆抗体的鉴定

### 2.3.1 单克隆抗体亚类鉴定与效价测定

通过间接 ELISA 方法，对两株杂交瘤细胞上清进行效价测定。结果如表 2-10 所示，11H4 细胞上清效价为  $1:10^4$ ，12G4 细胞上清效价为  $1:10$ 。

用鼠源单克隆抗体的亚型鉴定试剂盒对 11H4 和 12G4 单抗细胞株进行亚类鉴定，结果如表 4-9 所示，11H4 和 12G4 的重链均属于 IgG1 亚类，其轻链均为 $\kappa$ 链。

表 4-9 杂交瘤细胞培养上清抗体效价和亚型鉴定

Table 4-9 Supernatant antibody titer and subtype identification of hybrid tumor cells

McAbs	ELISA Titers of supernatant	Isotype	Light chain
11H4	$1:10^4$	IgG1	Kappa
12G4	$1:10^1$	IgG1	Kappa

### 2.3.2 杂交瘤细胞稳定性检测

分别在液氮冷冻保存第 3 和第 6 个月复苏杂交瘤细胞株，经连续多次传代后用间接 ELISA 方法检测细胞上清液中的 H5 单克隆抗体效价，结果显示，两株单抗细胞生长状态良好，其上清抗体效价略有下降但持续分泌抗体，说明两株 H5 单克隆抗体细胞株的抗体分泌能力稳定性良好。

### 2.3.3 Western-blot 检测

将诱导表达并纯化的 pColdI-H5-HA1 重组蛋白进行 SDS-PAGE 电泳，转膜后孵育两株单克隆抗体培养上清验证其反应性。结果显示（图 4-3），11H4 和 12G4 都与 H5-HA1 重组蛋白发生特异性反应，在 38 kDa 处出现目的条带，而空载体诱导表达蛋白作为阴性对照未出现条带，说明 2 株单抗都可以特异性识别 H5-HA1 蛋白。

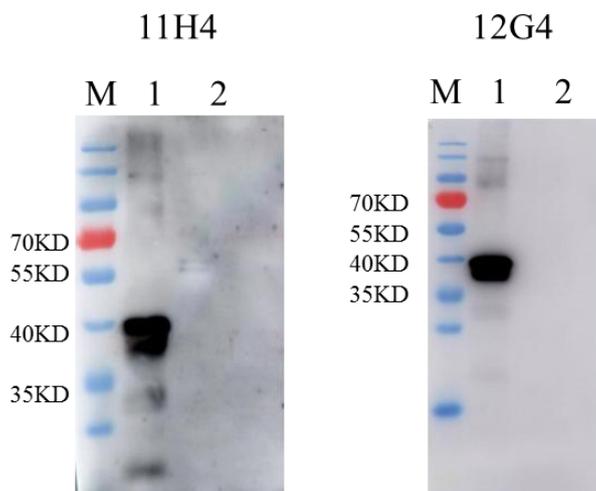


图 4-3 单克隆抗体与 pColdI-H5-HA1 蛋白反应的 Western blot 检测结果

Fig. 4-3 Reactivity of monoclonal antibodies with recombinant pColdI-H5-HA1 protein detected by western blot

注：M：蛋白 marker；1：pColdI-H5-HA1 重组蛋白；2：阴性对照

Note: M: Protein marker; 1: recombinant pColdI-H5-HA1 protein; 2: negative control

#### 2.3.4 间接免疫荧光检测

用 H1-H13 亚型禽流感病毒感染 MDCK 细胞，未接毒的 MDCK 作为阴性对照，分别将 2 株单克隆细胞培养上清用于 IFA 试验，通过倒置荧光显微镜观察荧光。结果如图 4-4 所示，在阳性小鼠血清与商品化 NP 单抗阳性对照成立，sp2/0 细胞上清阴性对照成立的前提下，2 株单克隆抗体只与 H5 亚型 AIV 感染的 MDCK 细胞发生特异性结合反应，可观察到明亮的绿色荧光，与其他亚型 AIV 感染以及未感染的 MDCK 细胞均不发生反应，未见绿色荧光，证明两株 H5 单克隆抗体特异性良好，能够特异识别 MDCK 细胞内感染 H5 亚型禽流感病毒的 HA 蛋白。

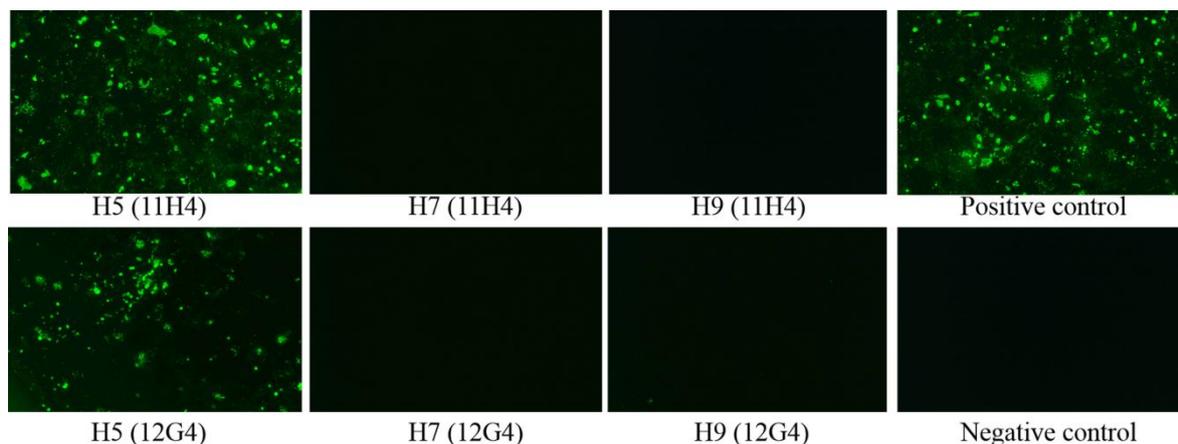


图 4-4 单抗 11H4 和 12G4 与不同亚型禽流感病毒感染 MDCK 细胞反应的 IFA 检测结果

Fig. 4-4 Reactivity of McAb 11H4 and 12G4 with different subtypes of AIV infected MDCK cells by IFA

注：单抗 11H4 和 12G4 与其他亚型禽流感病毒感染 MDCK 细胞反应的数据未展示

Note: Data for McAb 11H4 and 12G4 with other subtypes of AIV infected MDCK cells were not shown

### 3 讨论

由禽流感病毒感染引起的禽流行性感冒，是首个实施全球检测的人畜共患传染病。自 1878 年意大利报告发生禽流感以来，高致病性 H5 亚型禽流感的肆虐流行不仅严重制约世界养禽业的稳定可持续发展和动物相关产品的进出口贸易，而且不断危及个人健康和国际社会公共卫生安全，因此，控制和预防 H5 亚型 AIV 的感染和传播对世界经济、社会意义重大<sup>[7-9]</sup>。

1975 年 Kohler 和 Milstein 首创淋巴细胞杂交瘤技术制备单克隆抗体，此后该技术推广至生命科学各个领域<sup>[10]</sup>。单克隆抗体具有特异性高、亲和力强、理化性质均一、效价高、制备成本低和应用范围广等诸多优点，在病毒学诊断技术领域有重要应用价值<sup>[5, 11, 12]</sup>。本研究旨在制备针对 H5 亚型 AIV 特异性的单抗，为 H5 亚型禽流感病毒的快速特异诊断和预防治疗奠定基础。

HA 蛋白作为 AIV 的主要毒力因子和保护性抗原，刺激感染宿主产生中和抗体发挥中和病毒感染的作用；在病毒感染过程中 HA 蛋白识别并结合细胞受体，介导病毒与细胞膜融合；HA 蛋白裂解为 HA1 与 HA2 亚基是 AIV 感染细胞的必要条件，与 AIV 致病性密切相关，因此制备 HA 蛋白的单克隆抗体，对于禽流感病毒的抗原差异研究、抗原结构解析、诊断、预防和治疗领域具有重要意义<sup>[13-15]</sup>。

本研究共筛选到两株特异性抗 H5 亚型禽流感病毒 HA1 蛋白 McAbs，并对其生

物学特性进行了鉴定。首先，两株单抗均为 IgG1 亚型，IgG 抗体是再次体液免疫应答产生的主要抗体，亲和力高，具有重要的免疫效应，有研究表明 IgG1 在体内、外均能较好地中和病毒颗粒<sup>[16]</sup>。其次，根据 Western blot 和间接免疫荧光实验检测结果，2 株单抗既可与纯化的 H5-HA1 重组蛋白发生特异反应，又可特异结合 H5 亚型 AIV 感染 MDCK 细胞时形成的天然 HA 蛋白，如 H5N1 和 H5N6，具有 H5 亚型特异性和 H5 亚型内广谱性。同时 2 株单抗都不与其他亚型 AIV 发生交叉反应，这意味着这两株单抗只针对 H5 亚型 AIV 特异性的抗原表位，因此可以作为 H5 亚型禽流感病毒的诊断工具。此外，单克隆抗体作为研究抗原表位的重要工具，在未来我们需要进一步研究这两株单克隆抗体所识别的抗原表位，确定单抗所针对的表位在抗原结构中的位点。

#### 4 本章小结

本章研究成功制备了两株能够稳定分泌抗 H5-HA1 蛋白单克隆抗体的细胞株，分别命名为 11H4 和 12G4。根据间接 ELISA 方法，两株单克隆抗体上清效价分别测定为 1:10000 和 1:10；Western-blot 实验结果表明这两株单克隆抗体均与纯化的重组 H5-HA1 蛋白发生特异性反应；间接免疫荧光结果表明这两株单克隆抗体均与 H5 亚型禽流感病毒发生特异性反应。

## 参考文献

- [1] 刘智婷, 李伟强, 王霞, 何婉婷, 张友, 王文清, 陈祖贤, 赵冰兵, 廖明, 焦培荣. 当前全球禽流感流行状况与流行特点分析 [J]. 中国家禽, 2017, 39(24): 1-4.
- Liu Z T, Li W Q, Wang X, He W T, Zhang Y, Wang W Q, Chen Z X, Zhao B B, Liao M, Jiao P R. Analysis of the current global epidemic situation and characteristics of avian influenza [J]. China Poultry, 2017, 39(24): 1-4 (in Chinese).
- [2] 周森. H5 亚型高致病性禽流感病毒的全球传播与进化 [J]. 中国农学通报, 2019, 35(02): 104-110.
- Zhou S. Global dissemination and evolution of H5 highly pathogenic avian influenza virus [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2019, 35(02): 104-110 (in Chinese with English abstract).
- [3] Shortridge K F, Zhou N N, Guan Y, Gao P, Ito T, Kawaoka Y, Kodihalli S, Krauss S, Markwell D, Murti K G, Norwood M, Senne D, Sims L, Takada A, Webster R G. Characterization of avian H5N1 influenza viruses from poultry in Hong Kong [J]. Virology, 1998, 252(2): 331-342.
- [4] 关蕴, 刘智婷, 王霞, 何婉婷, 李伟强, 黎金荣, 陈祖贤, 赵冰兵, 曹文雁, 焦培荣. 近年我国 H5 亚型禽流感的流行情况和流行特点分析 [J]. 中国动物传染病学报, 1-9.
- Guan Y, Liu Z T, Wang X, He W T, Li W Q, Li J R, Chen Z X, Zhao B B, Cao W Y, Jiao P R. H5 avian influenza prevalence and epidemic characteristics in recent years in China [J]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases, 1-9 (in Chinese with English abstract).
- [5] 袁华平, 关锋, 李桂梅. 流感病毒及其单克隆抗体的研究进展 [J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(18): 3618-3619+3622.
- Yuan H P, Guan F, Li G M. Research progress of influenza virus and its monoclonal antibody production [J]. Chin J Health Lab Tec, 2013, 23(18): 3618-3619+3622 (in Chinese with English abstract).
- [6] Wu G, Yan S M. Mutation trend of hemagglutinin of influenza A virus: a review from a computational mutation viewpoint [J]. Acta Pharmacol Sin, 2006, 27(5): 513-526.
- [7] Chmielewski R, Swayne D E. Avian influenza: public health and food safety concerns [J]. Annu Rev Food Sci Technol, 2011, 2: 37-57.
- [8] Nunez I A, Ross T M. A review of H5Nx avian influenza viruses [J]. Ther Adv Vaccines Immunother, 2019, 7: 2515135518821625.
- [9] Sutton T C. The pandemic threat of emerging H5 and H7 avian influenza viruses [J]. Viruses, 2018, 10(9): 461.
- [10] 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(08): 2-5.
- Zhang L L. Research progress on preparation of monoclonal antibodies by hybridoma technology [J].

- Biology Education, 2016, 41(08): 2-5 (in Chinese).
- [11] He F, Soejoedono R D, Murtini S, Goutama M, Kwang J. Complementary monoclonal antibody-based dot ELISA for universal detection of H5 avian influenza virus [J]. BMC Microbiol, 2010, 10: 330.
- [12] Hanack K, Messerschmidt K, Listek M. Antibodies and Selection of Monoclonal Antibodies [J]. Adv Exp Med Biol, 2016, 917: 11-22.
- [13] Yao L, Chen Y, Wang X, Bi Z, Xiao Q, Lei J, Yan Y, Zhou J, Yan L. Identification of antigenic epitopes in the haemagglutinin protein of H7 avian influenza virus [J]. Avian Pathol, 2020, 49(1): 62-73.
- [14] Garten W, Klenk H D. Understanding influenza virus pathogenicity [J]. Trends Microbiol, 1999, 7(3): 99-100.
- [15] Li Y G, Chittaganpitch M, Waicharoen S, Kanai Y, Bai G R, Kameoka M, Takeda N, Ikuta K, Sawanpanyalert P. Characterization of H5N1 influenza viruses isolated from humans in vitro [J]. Virol J, 2010, 7: 112.
- [16] 陈雪晴, 祁贤, 焦永军. 甲型流感病毒广谱中和抗体研究进展 [J]. 江苏预防医学, 2017, 28(02): 169-172.
- Chen X Q, Qi X, Jiao Y J. Research progress of influenza A virus broad-spectrum neutralizing antibody [J]. Jiangsu J Prev Med, 2017, 28(02): 169-172 (in Chinese).

## 全文总结

1. 以 H5、H7 和 H9 亚型 AIV 的 HA 基因作为靶基因设计并优化特异性引物和荧光双标记 Taqman 探针组合，成功开发了三重荧光定量 RT-PCR 方法并组装试剂盒，一次闭管反应可同时鉴别诊断 H5、H7 和 H9 亚型 AIV 的单一及混合感染，有效避免假阳性结果，检测时间控制在约 70 min，通过开展对该方法的多角度评价，可知该方法具有高通量、快速准确、特异性和灵敏度高、稳定性强的优点，极大降低了时间和试剂成本，未来对于临床上 H5、H7 和 H9 亚型禽流感病毒的诊断具有应用价值。
2. 利用纯化后的灭活 H7 全病毒和抗 H7-HA 蛋白单克隆抗体，成功建立了一种 cELISA 方法用于测定不同种属易感动物血清的 H7 抗体水平，该方法操作简单，结果稳定可靠，特异性和灵敏度高，高效快速，对于临床上疫苗免疫效力评估具有重要价值。
3. 利用高纯度 H5-HA1 重组蛋白作为免疫原免疫小鼠，经适当免疫程序后获取脾细胞与骨髓瘤细胞进行细胞融合，最后筛选到 2 株能稳定分泌抗 H5-HA1 蛋白单抗的杂交瘤细胞株。2 株单抗均能与纯化的 H5-HA1 重组蛋白，及 H5 亚型 AIV 感染的 MDCK 细胞发生特异反应，不存在交叉反应，具有良好的亚型特异性，为 H5 亚型 AIV 的鉴别诊断与 HA 蛋白抗原决定簇的深入研究提供了物质基础。



## 附录 I

## 病毒株详细信息

## The information of virus strains

病毒名称 Virus	亚型 Subtype	HA 滴度 HA titer
AIV-H1N1 P2009	H1N1	2 <sup>9</sup>
AIV-H2N2 21103	H2N2	2 <sup>5</sup>
AIV-H3N8 11102	H3N8	2 <sup>8</sup>
AIV-H4N6 20411	H4N6	2 <sup>7</sup>
AIV-H5N1 060315	H5N1	2 <sup>5</sup>
AIV-H6N5 20411	H6N5	2 <sup>7</sup>
AIV-H7N3 201369	H7N3	2 <sup>7</sup>
AIV-H8N4 20413	H8N4	2 <sup>9</sup>
AIV-H9N2 201313	H9N2	2 <sup>9</sup>
AIV-H10N7 20410	H10N7	2 <sup>7</sup>
AIV-H11N9 21103	H11N9	2 <sup>9</sup>
AIV-H12N5 11103	H12N5	2 <sup>7</sup>
AIV-H13N6 11103	H13N6	2 <sup>6</sup>
NDV (Lasota)	NDV	2 <sup>9</sup>
IBV-J (F8)050309	IBV	-
IBDV-NB(F7)	IBDV	-
ALV-J	ALV-J	-

注：表中 H5 与 H7 毒株是以 A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) 六个基因片段作为骨架构建的低致病力毒株。

Note: The H5 and H7 strains in the table are low-pathogenic strains constructed with the six internal gene fragments of A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) as the backbone.



## 附录 II

## 单因子阳性血清

## Monospecific positive antiserum

免疫原 Immunogen	毒株 (亚型) Subtype	HI 效价 (2 <sup>x</sup> ) HI titer
P2009	H1	10
H2N2-21103	H2	10
H3N8	H3	8
H4N6-20411	H4	7
H5N1	H5	9
H6N5	H6	9
H7N3	H7	6
H8N4	H8	9
H9N2	H9	10
H11N9	H11	8
H12N5	H12	5
H13N6	H13	8
H14-A1131028	H14	10
NDV- ZJ2000 (F1)-00111	NDV	9
IBV-MLH	IBV	-
IBDV	IBDV	-
ALV-J	ALV-J	-



## 附录 III

### Ni-NTA 填料纯化所用试剂

#### Purification reagents for Ni-NTA

##### Buffer A (1 L)

100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13.8 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O (MW 137.99 g/mol)
10 mM Tris·Cl	1.2 g Tris base (MW 121.1 g/mol)
8M urea	480.5 g (MW 60.06 g/mol)
pH 调至 8.0	

##### Buffer B (1 L)

100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13.8 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O (MW 137.99 g/mol)
10 mM Tris·Cl	1.2 g Tris base (MW 121.1 g/mol)
8M urea	480.5 g (MW 60.06 g/mol)
pH 调至 6.3	

##### Buffer C (1 L)

100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13.8 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O (MW 137.99 g/mol)
10 mM Tris·Cl	1.2 g Tris base (MW 121.1 g/mol)
8M urea	480.5 g (MW 60.06 g/mol)
pH 调至 5.9	

##### Buffer D (1 L)

100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13.8 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O (MW 137.99 g/mol)
10 mM Tris·Cl	1.2 g Tris base (MW 121.1 g/mol)
8M urea	480.5 g (MW 60.06 g/mol)
pH 调至 4.5	