



华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

硕士学位论文

MASTER'S DEGREE DISSERTATION

犬副流感病毒单克隆抗体的制备及其胶体金检测技术的建立

Preparation of monoclonal antibodies against Canine Parainfluenza Virus and establishment of colloidal gold detection technology

研究生: 毛静
CANDIDATE: MAO JING

学 号: 2021302120217
STUDENT NO.:

学位类别: 兽医硕士
DEGREE TYPE: MASTER OF PROFESSIONAL
DEGREE IN VETERINARY MEDICINE

导 师: 张安定 教授
SUPERVISOR: PROFESSOR ZHANG ANDING
中国 武汉

WUHAN, CHINA

二〇二三年六月

JUNE, 2023

华中农业大学硕士学位论文

犬副流感病毒单克隆抗体的制备及其胶体金检测技术的建立

Preparation of monoclonal antibodies against Canine Parainfluenza Virus and establishment of colloidal gold detection technology

研究生：毛静

学号：2021302120217

指导教师：张安定 教授

专业：兽医

研究方向：预防兽医

获得学位名称：兽医硕士

获得学位时间：2023年6月

华中农业大学动物科学技术学院、动物医学院

二〇二三年六月

目 录

1 文献综述.....	1
1.1 犬副流感概述.....	1
1.2 CPIV 病原学特性	1
1.3 CPIV 主要蛋白及功能介绍	2
1.4 犬副流感流行病学.....	2
1.5 临床症状和病理变化.....	3
1.6 犬副流感病毒诊断方法.....	3
1.6.1 病原分离.....	3
1.6.2 免疫荧光检测.....	4
1.6.3 血凝和血凝抑制实验.....	4
1.6.4 酶联免疫吸附试验.....	4
1.6.5 RT-PCR 和 RT-qPCR.....	4
1.7 胶体金免疫层析技术.....	5
1.7.1 胶体金免疫层析技术及原理.....	5
1.7.2 胶体金免疫层析技术的分类.....	6
1.7.3 胶体金免疫层析技术在病毒疾病中的诊断应用	8
1.8 预防和控制.....	8
2 研究目的与意义	10
3 材料与方法.....	11
3.1 实验材料.....	11
3.1.1 实验动物、毒种及细胞.....	11
3.1.2 引物设计	11
3.1.3 主要仪器与试剂.....	12
3.1.4 培养基配置.....	13
3.1.5 Western Blot 相关试剂.....	13
3.1.6 核酸胶相关试剂.....	15
3.1.7 ELISA 相关试剂	15
3.1.8 试纸条主要试剂配制.....	15
3.2 试验方法.....	16
3.2.1 免疫方案制定.....	16
3.2.2 细胞复苏及培养.....	16
3.2.3 病毒含量测定.....	17
3.2.4 病毒扩增及浓缩.....	17
3.2.5 建立间接 ELISA 检测方法	17

3.2.6	间接 ELISA 试验与中和试验检测免疫小鼠抗体水平	18
3.2.7	SP2/0 骨髓瘤细胞的制备	19
3.2.8	免疫脾细胞的制备	19
3.2.9	饲养细胞的制备	20
3.2.10	细胞融合	20
3.2.11	阳性细胞的亚克隆	21
3.2.12	杂交瘤细胞的冻存与复苏	22
3.2.13	杂交瘤细胞染色体数目鉴定	22
3.2.14	单克隆抗体亚类鉴定	22
3.2.15	杂交瘤细胞株分泌抗体的反应性分析	23
3.2.16	杂交瘤细胞株分泌抗体的特异性分析	23
3.2.17	杂交瘤细胞上清抗体效价测定	24
3.2.18	单抗靶标抗原鉴定	24
3.2.19	腹水的制备	32
3.2.20	腹水效价的测定	32
3.2.21	腹水的纯化	33
3.2.22	纯化后单克隆抗体的检验	34
3.2.23	基于单克隆抗体的 CPIV 胶体金检测方法的建立	34
4	结果与分析	38
4.1	CPIV 单克隆抗体的制备	38
4.1.1	犬副流感病毒的 TCID ₅₀ 的测定及病毒扩增、浓缩	38
4.1.2	间接 ELISA 检测方法的建立	39
4.1.3	病毒感染后间接 ELISA 与细胞中和实验测定免疫鼠血清抗体水平	40
4.1.4	细胞融合后阳性杂交瘤细胞的筛选与亚克隆	42
4.1.5	杂交瘤细胞染色体数目鉴定	42
4.1.6	阳性单克隆抗体亚类鉴定	43
4.1.7	单克隆抗体反应性验证	43
4.1.8	单克隆抗体反应特异性验证	44
4.1.9	单克隆抗体杂交瘤细胞上清抗体效价测定	45
4.1.10	测定单克隆抗体 4E3 的中和抗体效价	45
4.1.11	单克隆抗体靶标抗原鉴定	47
4.2	双抗体夹心胶体金试纸条检测方法的建立	48
4.2.1	单克隆抗体腹水效价测定	48
4.2.2	腹水纯化	49
4.2.3	胶体金纳米粒子的鉴定	50
4.2.4	1B12 和 4E3 分别作为金标记抗体与检测抗体的选择	50
4.2.5	胶体金溶液最佳标记 pH 的确定	51

4.2.6 单克隆抗体最佳标记量的确定.....	52
4.2.7 胶体金标记单克隆抗体 4E3 鉴定结果	53
4.2.8 最佳反应时间的确定.....	54
4.2.9 试纸条敏感性检验.....	55
4.2.10 试纸条特异性检验.....	55
4.2.11 试纸条稳定性检测	56
4.2.12 本研究建立胶体金试纸条与商业化同类产品比较结果	56
4.2.13 临床样品符合率检测.....	57
5 讨论.....	59
5.1 CPIV 单克隆抗体的制备	59
5.2 胶体金检测方法的建立.....	60
6 结论.....	61
参考文献.....	62

摘要

犬副流感病毒 (Canine Parainfluenza Virus, CPIV) 是犬传染性呼吸道疾病的主要病原之一, 感染犬后常出现呼吸道症状, 如发热、流涕、咳嗽等, 危害犬类健康。该病症状与感染犬瘟热病毒 (Canine Distemper Virus, CDV) 的犬的临床症状相似, 难以直接鉴别诊断, 因此建立一种快速、简便、准确的检测方法至关重要。

通过试验验证发现目前市场上已有的 CPIV 检测试纸条存在灵敏度偏低的问题, 以及该病目前并没有特异性疗法, 因此本研究同时筛选中和抗体及检测抗体, 以期为 CPIV 的临床治疗、监测以及流行病学调查提供参考, 对犬呼吸道疾病的防控提供帮助。本研究主要结果如下:

1. 以 PEG6000 浓缩的 CPIV 病毒液作为免疫原对 BALB/c 小鼠进行免疫。三次免疫后中和效价达到 $1:10^4$ 后即进行细胞融合。以 CPIV 病毒液为包被抗原, 通过间接 ELISA 方法对融合后筛选阳性克隆细胞, 通过三次亚克隆, 成功筛选到 3 株阳性杂交瘤细胞, 分别以 1B12、4E3 和 5F3 为名。通过 ELISA 实验, 发现 3 株单克隆抗体均可分泌针对 CPIV 的特异性抗体, 与 CAV-2、CDV、CPV 无明显交叉反应, 特异性良好; 通过对单克隆抗体进行亚类鉴定, 发现 1B12、5F3 重链为 IgG1, 4E3 重链为 IgG2a, 3 株单克隆抗体轻链均为 Kappa。通过 Western-Blot 分析, 发现 4E3 为 CPIV 的 F 蛋白的抗体, 1B12 和 5F3 为 HN 蛋白的抗体。通过病毒感染细胞的中和试验发现 4E3 抗体具有中和作用。

2. 利用 BALB/c 小鼠制备腹水, 通过 ELISA 试验发现 1B12 所产腹水效价为 1×10^5 , 4E3 为 1×10^6 , 5F3 为 1×10^4 。间接免疫荧光实验证明 3 株单克隆抗体能与 CPIV 反应。选取腹水抗体效价较高的 4E3 和 1B12 经辛酸-硫酸铵法和 Protein G 柱纯化, 获得的两株单抗重链、轻链条带清晰, 纯度达 95% 以上, 浓度分别为 2.3 mg/mL 和 1.3 mg/mL。

3. 以 4E3 为胶体金标记抗体, 1B12 为检测抗体, 确定反应最优条件, 建立双抗体夹心检测抗原胶体金试纸条方法。本研究建立的试纸条检测体系, 最低检测限度为 $10^{1.67}$ TCID₅₀/mL, 敏感性良好。仅与 CPIV 反应, 与 CAV-2、CDV、CPV 等无明显交叉反应, 特异性良好。试纸条放置于 37°C 60 d, C 线、T 线条带

强度一致，稳定性良好。分别用本研究制备的试纸条和商品化 C 抗原检测试纸条进行同类产品比较，检测 $10^{4.67}$ TCID₅₀/mL 的 CPIV 病毒液，本试纸条显色清晰，稀释至 1:1000 可见检测线，最低检测限度为 $10^{1.67}$ TCID₅₀/mL，商品化试纸条显色较浅，稀释至 1:100 可见检测线，稀释 1000 倍时未见明显检测线，说明本研究建立的检测试纸条其灵敏度比商品化试纸条高约 10 倍。采集 46 份临床样品分别用本试纸条与 RT-PCR 同时检测，试纸条检测率比 RT-PCR 低，符合率达 97.8%。

本研究以 CPIV 为免疫原，成功研制了 3 株单克隆抗体，分别是针对病毒 F 蛋白（4E3）和 N 蛋白（1B12、5F3）的，其中针对 F 的单抗 4E3 对 CPIV 感染细胞具有中和作用。以 4E3 为胶体金标记抗体，1B12 为检测抗体建立了检测 CPIV 双抗体夹心胶体金检测试纸条，该试纸条与 CAV-2、CDV、CPV 等无明显交叉反应，特异性好，同时和商品化试剂盒检测倍比稀释的 CPIV 时，其灵敏度高约 10 倍，与 RT-PCR 同时检测采集的 46 份临床样品时，试纸条检测率比 RT-PCR 低，总体符合率达到 97.8%。

关键词：犬呼吸道传染病；犬副流感病毒；单克隆抗体；胶体金检测试纸条

Abstract

Canine Parainfluenza Virus (CPIV) is one of the main pathogens of infectious respiratory diseases in dogs. Respiratory symptoms such as fever, runny nose, and cough are common after CPIV infection in dogs, which are harmful to the health of dogs. The symptoms of this disease are similar to those of dogs infected with Canine Distemper Virus (CDV), and it is difficult to directly differentiate the disease. Therefore, it is essential to establish a rapid, simple and accurate detection method.

It was found that the sensitivity of CPIV test strips on the market was low, and there was no specific treatment for the disease at present. Therefore, this study screened neutralizing antibodies and detection antibodies at the same time, in order to provide reference for clinical treatment, monitoring and epidemiological investigation of CPIV, and to provide help for the prevention and control of canine respiratory disease. The main findings of this study are as follows:

1. BALB/c mice were immunized with PEG6000 concentrated CPIV virus solution as immunogen. Cell fusion was performed as soon as the neutralization titer reached $1:10^4$ after three immunizations. Using CPIV as coating antigen, the fusion cells were screened by indirect ELISA. Three positive hybridomas, named 1B12, 4E3 and 5F3, were successfully selected through three subcloning. The monoclonal antibodies secreted by the above three hybridoma cells were identified. All three hybridoma cells could secrete specific antibodies against CPIV. The secreted monoclonal antibodies were IgG1 for heavy chain 1B12 and 5F3, IgG2a for heavy chain 4E3, and Kappa for light chain of hybridoma cells. By Western-Blot analysis, 4E3 was found to be an antibody to the CPIV F protein, and 1B12 and 5F3 were found to be antibodies to the HN protein. The 4E3 antibody was found to be neutralizing by neutralization assays in virus-infected cells.

2. The titer of ascites produced by hybridoma cell line 1B12 was 1×10^5 , 4E3 was 1×10^6 , and 5F3 was 1×10^4 . Indirect immunofluorescence assay showed that the ascites of the 3 strains could only react with CPIV, and had no obvious cross-reaction with CAV-2, CDV and CPV. Two monoclonal antibodies (4E3 and 1B12) with high

ascites titer were purified by octanoic acid-ammonium sulfate method and Protein G column. The heavy chain and light chain bands of the two monoclonal antibodies were clear, the purity was more than 95%, and the concentrations were 2.3 mg/mL and 1.3 mg/mL respectively.

3. Using 4E3 as the labeled antibody and 1B12 as the detection antibody, the optimal reaction conditions were determined, and the double-antibody sandwich colloidal gold test strip method for antigen detection was established. The minimum detection limit of the test strip detection system established in this study was $10^{1.67}$ TCID₅₀/mL, and the sensitivity was good. It reacted only with CPIV, and there was no obvious cross-reaction with CAV-2, CDV, CPV, etc. When the test strip was placed at 37°C for 60 days, the intensity of C line and T line was consistent and the stability was good. The test strip prepared in this study and the commercial CPIV antigen detection test strip were compared with similar products. The CPIV virus solution of $10^{4.67}$ TCID₅₀/mL was detected. The test strip showed clear color, and the detection line could be seen when diluted to 1:1280, and the minimum detection limit was $10^{1.67}$ TCID₅₀/mL. The commercial test strip showed light color, and the detection line was visible when diluted to 1:100, but no obvious detection line was found when diluted to 1000 times, indicating that the sensitivity of the test strip established in this study was about 10 times higher than that of the commercial test strip. 46 clinical samples were detected by this test strip and RT-PCR simultaneously, and the coincidence rate was 97.8%.

Keywords: Canine Respiratory Infectious Disease; Canine Parainfluenza Virus; Monoclonal antibody; Colloidal gold detection test strip

缩略词表 (Abbreviation Table)

缩写 Abbreviations	英文名称 English Name	中文名称 Chinese Name
CPIV	Canine Parainfluenza Virus	犬副流感病毒
CPV	Canine parvovirus	犬细小病毒
CAV	Canine adenovirus	犬腺病毒
CDV	Canine distemper virus	犬瘟热病毒
AP	Ammonium persulfate	过硫酸铵
BSA	albumin from bovine serum	牛血清白蛋白
ddH ₂ O	Deionized water	去离子水
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砜
DTT	DL-Dithiothreitol	二硫苏糖醇
ELISA	Enzyme-Linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附实验
g	Gram	克
h	Hour	小时
HAT	Hypoxantin-aminopterin-thymidin	次黄嘌呤-氨基喋呤-胸腺嘧啶脱氧核苷
HT	Hypoxantin-thymidin	次黄嘌呤-胸腺嘧啶脱氧核苷
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
IPTG	Isopropylthiogalactoside	异丙基硫代半乳糖苷
Kan	Kanamycin	卡那霉素
KDa	Kilodalton	千道尔顿
LA	Luria Bertani Agar	LA 固体培养基
LB	Luria Bertani	LB 培养基
McAb	Monoclonal antibody	单克隆抗体
min	Minute	分钟
mL	Milliliter	毫升
OD	Optical density	光密度
PAGE	PoLyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸盐缓冲液
PEG	Polyethylene glycol	聚乙二醇
r/min	Rotation per minute	每分钟转速
SDS	Sodium dodecylsulphate	十二烷基磺酸钠
TEMED	Tetramethyl ethylenediamine	四甲基乙二胺
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine	3,3',5,5'-四甲基联苯胺
μL μg	Microliter Microgram	微升 微克

1 文献综述

1.1 犬副流感概述

犬传染性呼吸道疾病复合体 (Canine Infectious Respiratory Disease Complex, CIRDC) 是一种涉及多种病毒和细菌的全球流行综合征 (Leroith et al 2012)。波德特氏支气管杆菌 (Bronchobacillus Burdett, Bb)、犬腺病毒 2 型 (Canine adenovirus type 2, CAV-2)、犬疱疹病毒 (Canine Herpesvirus, CHV)、CDV 和 CPIV 是 CIRDC 的主要病原 (Decaro et al 2016, Matsuu et al 2020), 渐渐地, 犬冠状病毒 (Canine Coronavirus, CCoV)、犬流感病毒 (Canine Influenza Virus, CIV)、犬细小病毒 (Canine Parvovirus, CPV) 从患病犬中被分离出来, 划分在 CIRDC 的主要病原中 (Scott-Garrard et al 2018, Charoenkul et al 2021)。

犬副流感病遍布世界各地, 传染性极强, 尤其是犬舍和犬养殖基地。感染犬表现为咳嗽、流鼻涕、发热等, 与感染 CDV 后的犬的症状极为相似, 难以直接鉴别, 病情严重时还可以导致犬死亡。

1.2 CPIV 病原学特性

CPIV 为不分节段的单股负链 RNA 病毒, 在病毒学分类中, CPIV 病毒为副粘病毒科、正腮腺炎病毒属成员 (Binn LN et.al 1967, Charoenkul et al 2021)。CPIV 的病毒粒子形状多样, 脂质包膜是从被感染细胞的质膜上获得的核衣壳芽 (Karron RA et al 2007), 正常情况下呈圆球形, 但囊膜破裂时则会失去自身形状。融合蛋白 (Fusion Protein, F) 和血凝素 - 神经氨酸酶蛋白 (Hemagglutinin-Neuraminidase Protein, HN) 分布在病毒囊膜表面 (孙明等 2016)。核衣壳呈螺旋式对称, 直径约 12 nm~17 nm (Randall 1987, Ellisl 2011)。由于 CPIV 为囊膜病毒, 所以对脂溶剂较敏感。CPIV 在高温环境下不稳定, 容易失活; 在超低温环境下可保存数月, 且仍具病毒活性。CPIV 在酸碱环境下极不稳定, 中性条件则可以保持它的活性 (Yuan P et al 2008)。除此之外, CPIV 还具有血凝活性, 临床上常使用鸡红细胞进行毒价检测等实验 (吴凡 2006, 岑浩 2007)。

1.3 CPIV 主要蛋白及功能介绍

CPIV 的遗传物质是单股负链 RNA, 其基因组长度为 15246 nt (齐宾宾 2015), 由 7 个基因从 3'-5' 按不变顺序排列: N-P-M-F-SH-HN-L (高菽蔓等 2016), 两端分别为 3' 前导序列以及 5' 尾随序列。与其他哺乳动物 PIV 相比, CPIV 的一个独特的区别是在 F 和 NH 基因之间存在一个独有的 SH 基因 (Karron et al 2007)。从图 1-1 可看出, CPIV 基因组按 3'-5' 顺序编码以下 7 个蛋白组成 (刘腾飞 2010)。



图 1-1 CPIV 基因结构

Fig.1-1 The basic structure of CPIV

CPIV 的主要蛋白为核衣壳蛋白 (Nucleocapsid Protein, NP)、HN 蛋白、F 蛋白。

NP 蛋白通常被叫作 N 蛋白, 由 510 个氨基酸构成, 蛋白包裹 CPIV 基因组形成 RNP, 其 N 端紧连病毒基因组, C 端周围结构与病毒样颗粒 (VLP) 的形成有关 (Schmitt et al 2010)。由于氨基酸的梯度转录, 所以在基因组中 NP 表达量最高, 诱导机体产生的特异性抗体含量更高, 在检测抗原及抗体水平中应用更多。

HN 蛋白与病毒附着细胞有关。有学者发现, 以四聚体形式存在的 HN 蛋白出现在宿主细胞胞膜, 病毒之所以能吸附在胞膜上是由于 HN 蛋白与唾液酸受体结合后可以发挥神经氨酸酶活性 (Elks et al 2004)。除此之外, HN 蛋白作为 CPIV 的主要抗原之一, 也可以诱导产生抗体 (Ruch-Gallie et al 2016)。

融合蛋白 F 介导病毒囊膜和宿主细胞膜的融合, 可以促进病毒入侵细胞 (Li Z 2013, Bose et al 2014)。具有蛋白活性的 F 蛋白的形成原因是 F0 被蛋白酶水解后形成 F1 和 F2。有学者证明 F 蛋白是诱导中和抗体产生是主要抗原 (杨敬 1996), 可以更好地中和病毒, 也是学者们研究诊断制剂主要的靶标抗原 (李超 2019)。

1.4 犬副流感流行病学

CPIV 传染性很强, 流行范围极广, 遍布世界各地。CPIV 感染宿主除了犬以外还有貉、狐狸、老虎等。2004 年孙贺延等人采集多地区未接种犬类疫苗的老虎血清进行 CPIV 抗体检测, 发现其抗 CPIV 的阳性率高达 65.79% (孙贺延等

2004)。2007年闫喜军等人采集多地的未接种疫苗的犬血清、貉血清以及狐狸血清对其进行流行病学调查，结果显示几种犬科动物中均存在犬副流感病毒 H 抗体（闫喜军等 2007）。据报道 54 只患病犬中有一半的病犬分离到 CPIV，总体血清抗体阳性率在 30% 以上。目前对 CPIV 的流行病学调查显示，CPIV 在临床上常常与其他病原混合感染，例如 CAV、CDV 以及其他细菌。犬感染 CPIV 后一周左右开始排毒，病毒粒子一般通过呼吸道传染健康犬，并且感染 CPIV 后犬体内的中和抗体水平在一个月内达到高峰。

除了以上那些已经确定的 CPIV 感染物种之外，Durchfeld 及 Davidson 等人的研究发现了 CPIV 还可以实现在狼、雪貂和啮齿类动物中的跨物种传播 (Davidson et al 1991, Durchfeld et al 1992)。

目前 CPIV 常见的易感细胞有 VERO、MDBK、MDCK 等，Chen 等用 VERO 细胞扩增 CPIV 病毒毒价高达 8×10^8 PFU/mL (Chen et al 2018)。

1.5 临床症状和病理变化

不存在其他病原感染的情况下，犬感染 CPIV 后引起的呼吸道症状程度并不严重 (Fenner et al 2014)，表现为发热、食欲大退、流鼻涕等症状，与流感症状相似，病犬疲软无力。当 CPIV 与其他呼吸道病原共同感染时，症状加重，甚至持续 10 d 左右 (Reagan and Sykes 2020)，严重者引起死亡；幼犬感染 CPIV 后可能导致神经症状（刘兆宇和张磊 2014），如后肢麻痹，不能正常行走。

病犬呼吸道器官病变明显，症状为常见的发热、流涕等。有学者对病犬组织进行剖检，发现大量中性粒细胞和淋巴细胞聚集在气管、支气管粘膜处 (Binn II et al 1967)。感染 CPIV 后，病犬会出现不同程度脑软化、脑炎、脑水肿等神经症状，部分免疫力低下的犬还可能出现间质性肺炎 (Evermann et al 1980, Baumgartner et al 1982, Jacobs et al 2005)。

1.6 犬副流感病毒诊断方法

1.6.1 病原分离

犬出现呼吸道症状后，采集犬的鼻咽拭子或病死犬解剖后的呼吸道组织，使

用 MDCK 或 VERO 等易感细胞进行病原分离,保持其培养环境为中性 (Timani et al 2008, Ravid et al 2010)。通常情况下,传代 5 次以内若未出现病变,则认为该病料不含 CPIV;在观察到 CPIV 在细胞上产生细胞融合和变圆、脱落等病变后,应用荧光定量、血凝和血凝抑制、电镜观察等实验检测是否为 CPIV。若病料中存在其他病毒,如 CAV、CPV 等,则需进行空斑纯化 CPIV,直至得到单克隆。刘畅、李长垒等采用此方法分别分离到了 CPIV-BJO 1 株和 CPIV-CC 株,并用多种方法对病毒进行鉴定(李长垒 2014,刘畅 2019)。病原分离及鉴定所需时间较长,并需要严格的无菌操作技术。

1.6.2 免疫荧光检测

对病死犬进行剖检,采集 CPIV 可能出现的组织,如扁桃体、淋巴结、肺等器官,进行切片固定,利用特异性荧光抗体判定切片是否为 CPIV 阳性。但该方法操作较繁琐,且病理切片质量对结果影响较大(杨亚萍 2022)。

1.6.3 血凝和血凝抑制实验

由于 CPIV 具有血凝活性,因此可用血凝和血凝抑制实验来检测体内特异性抗体水平,但该方法对红细胞的要求较高,且稳定性不好(杨亚萍 2022)。

1.6.4 酶联免疫吸附试验

酶联免疫吸附试验 (ELISA),利用血清学原理,可以应用于 CPIV 检测。宋彩玲建立竞争 ELISA 检测血清中的 CPIV 抗体。该方法以 CPIV 为抗原,以 CPIV 单克隆抗体为竞争抗体,检测重复性、特异性均良好(宋彩玲 2015)。ELISA 检测灵敏度高,但操作过程复杂、需要时间长、对操作要求严格。

1.6.5 RT-PCR 和 RT-qPCR

对病死犬解剖并采集 CPIV 常出现的呼吸道组织,提取 RNA 后反转录扩增,通过特异性引物对 cDNA 进行扩增,若核酸电泳结果条带大小与预期相符且序列比对正确,则判定 CPIV 阳性(于浩 2006,王凤雪 2007,高晓宇 2010,康泰 2013)。

部分健康犬携带 CPIV 但未出现症状，所以仅用该技术并不能完全说明问题。要将临床症状和实验室诊断技术结合起来，这样的判读结果才准确（余春 2001）。但解剖病料、提取 RNA 及反转录各个过程较为烦琐，且易污染，耗时较长。

实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-Time PCR, qPCR) 获得 cDNA 的方式与 RT-PCR 相同，但该方法灵敏性、特异性远远高于普通 PCR，且可以通过多通道同时检测多种多种病原，目前已被广泛应用于病原的诊断方面。目前利用核酸提取试剂盒可以完成核酸提取工作，省时省力，但是存在成本高昂，无法大批量应用于临床检测。

1.7 胶体金免疫层析技术

1.7.1 胶体金免疫层析技术及原理

二十世纪末，胶体金作为一种逐渐兴起的体外诊断技术。目前胶体金免疫层析技术已经成功的应用于多种生物样品中分析物的快速检测，特别是许多疾病的特异性抗原和抗体 (Koczula et al 2016)。与 PCR、ELISA 等检测方法相比，胶体金免疫层析技术具有快速、低成本和易于使用等优点。这些特性使得该检测方法非常适合于未经培训的人员进行现场检测，成为在人类健康、兽医、食品安全和环境研究方面的常用诊断工具 (Siu et al 2016)。目前，胶体金免疫层析技术被报道用于多种动物病毒感染的检测 (Yang et al 2010)。

胶体金免疫层析技术是用胶体金标记的抗原或抗体作为示踪剂，以硝酸纤维素膜为载体，将用胶体金标记的抗原或抗体在检测线处与特异性的抗体或抗原结合，之后可以在硝酸纤维素膜捕获处形成肉眼可见的颜色 (Raesisossadati et al 2016)。如图 1-2 所示，胶体金检测试纸条主要由图中 5 部分组成（章先等 2019, Ngom B et al 2010），技术成熟，操作简单，可以在短时间内看到结果（陈晓峰 2004），且检测的准确度高，在抗原诊断和抗体检测方面具有很大的发展前景。

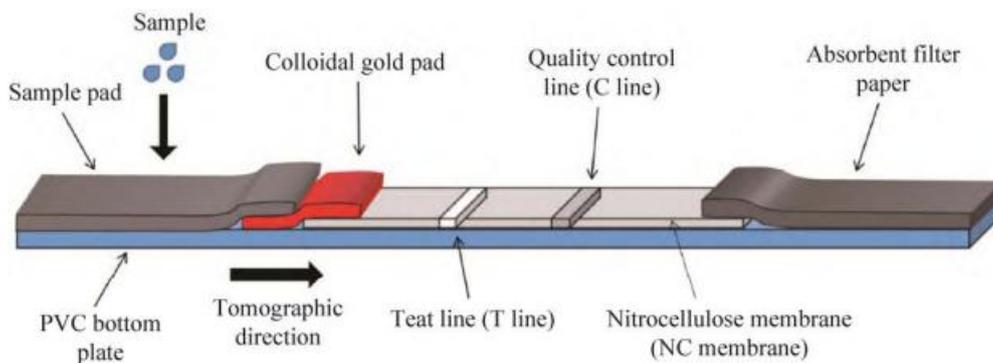


图 1-胶体金检测试纸条结构组成 (董旭旭 2022)

Fig.1-2 Colloidal gold test strip structure composition (Dong Xuxu 2022)

1.7.2 胶体金免疫层析技术的分类

胶体金免疫层析技术与 ELISA 技术一样，分为三类：竞争法、间接法和夹心法。

间接法 (张玲等 2007) 适用于血清中抗体水平的检测，以此判定机体内是否存在该病原的特异性抗体，达到检测病原的目的。它的原理是胶体金标记物为抗体，相当于 ELISA 中的 HRP 标记的二抗，抗原则包被于 T 线处。待检样品中的抗体则可与金标抗体及抗原发生特异性反应从而显色。

夹心法 (Mahmoudi T et al 2019) 又称双抗体夹心法，主要用于检测蛋白分子量大的物质，如细菌和病毒粒子。该方法需要两个不同位点的特异性抗体，一个与金标探针偶联，另一个包被于 T 线。检测时会形成双抗体夹心结构，该方法准确性更高，更加可靠。

竞争法 (Mahmoudi T et al 2019) 适用于检测小分子物质，通过一个抗体与抗原结合进而实现另一个抗体无法与抗原结合的竞争效果，需要注意的是竞争抗体应采用一个不饱和量，其检测结果与其他两种方法相反，若为阳性，则 C 线正常，T 线不显色；若为阴性，则 C 线、T 线均显色。

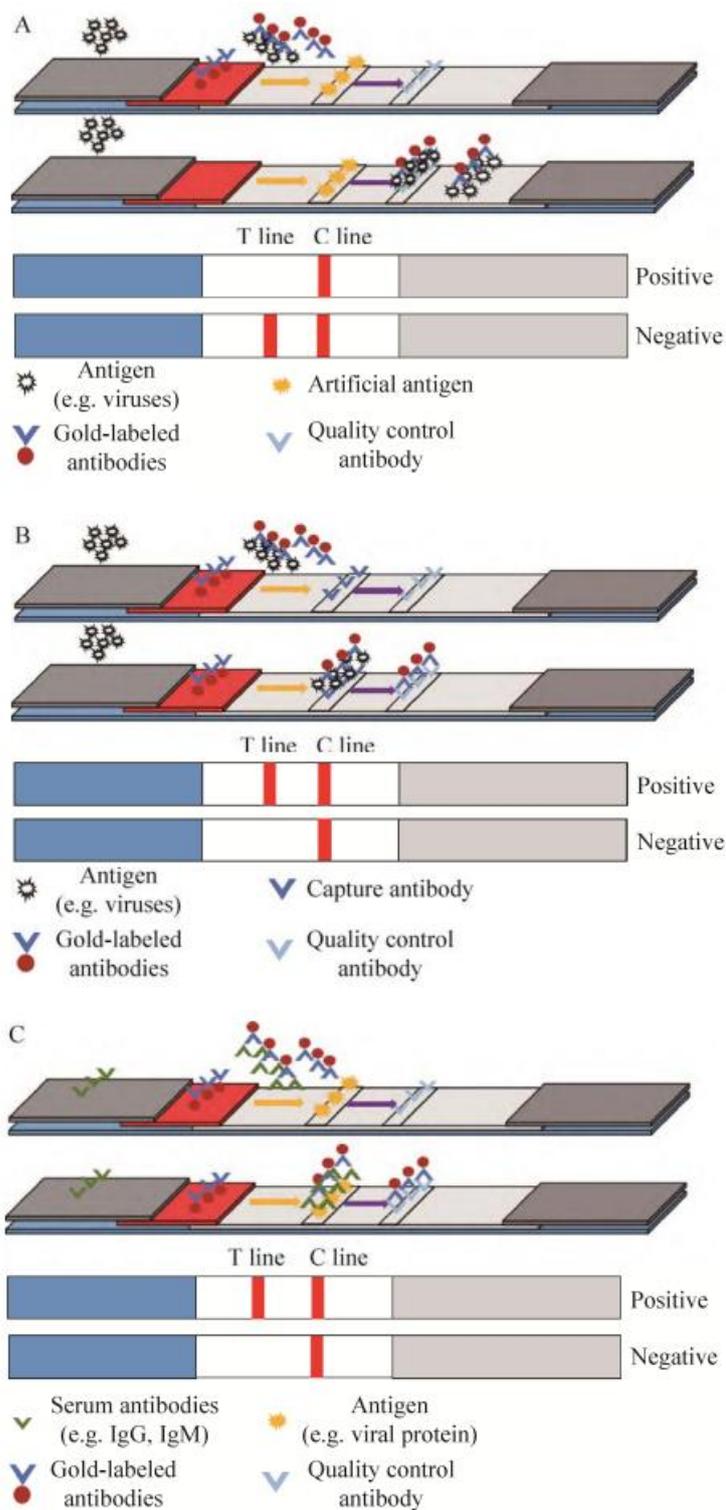


图 1-3 胶体金检测测试纸条的原理（董旭旭 2022）

A:竞争法; B:夹心法; C:间接法

Figure 1-3 Principle of colloidal gold detection test strip

(A) Competitive detection. (B) Sandwich method detection. (C) Indirect detection (Dong

Xuxu 2022)

1.7.3 胶体金免疫层析技术在病毒疾病中的诊断应用

赵少若等以犬轮状病毒 (Canine RotaVirus, CRV) 为免疫原, 制备了 4 株阳性单克隆抗体, 基于单克隆抗体建立的胶体金检测试纸条, 检测 47 份临床样品符合率 93.6%, 检测 CAV、CDV、CPV、CCoV 均为阴性, 准确性及特异性均良好 (赵少若等 2022)。王莹等研制的可用于检测猫细小病毒 (Feline Parvovirus, FPV) 的胶体金免疫层析试纸在 513 份临床血清样品检测中, 与 PCR 检测的总符合率高达 96%, 并且与猫杯状病毒 (Feline Calicivirus, FCV)、猫疱疹病毒 (Feline Herpesvirus, FHV) 无交叉反应, 表明其敏感性和特异性良好, 可用于 FPV 的临床快速检测 (王莹等 2021)。杨凯越建立的 CPV 胶体金试纸条, 可应用于患病犬的临床快速检测, 用试纸条和 PCR 技术分别检测了 30 份犬的临床样品, 检测符合率为 93.3% (杨凯越 2020)。贾宇旻等人以制备的猪流行性腹泻病毒 (Porcine Epidemic Diarrhea Virus, PEDV) 单克隆抗体为基础, 建立的双抗体夹心胶体金检测试纸条, 最低检测线为 7.8×10^3 TCID₅₀/mL, 敏感性、稳定性、特异性均较高, 与 RT-PCR 同时检测 115 份临床样品符合率为 93% (贾宇旻等 2019)。邵雨制备了可以检测 H9 亚型的胶体金试纸条和禽类鸡毒支原体抗体检测的胶体金试纸条, H9 的检测结果与 HI 试验对比符合率为较高, 在禽类鸡毒支原体抗体检测中, 与 SPA 检测对比符合率同样较高, 特异性强 (邵雨 2019)。房超等人以单克隆抗体建立的检测犬瘟热病毒的抗体胶体金试纸条, 特异性及反应性良好 (房超等 2011)。余春明等人以浓缩的 FCV 免疫 BALB/c 小鼠, 成功获得 5 株阳性单克隆细胞并制备了诊断 FCV 的胶体金快速诊断试纸条, 该方法的敏感性、特异性、稳定性均较好, 并与 RT-PCR 的检测结果符合率在 90% 以上, 对病原诊断具有广泛的应用价值 (余春明等 2023)。

1.8 预防和控制

CPIV 作为犬呼吸道传染病的病原之一, 主要通过呼吸道途径传播给其他健康易感宿主, 对病犬采取有效隔离措施是较为有效的防止传播方式 (刘腾飞 2010, 温彪 2012)。日常饲养犬时, 尽量减少长途运输, 更换环境, 过度拥挤等情况, 降低犬的发病率 (余春等 2001, 陈龙如 2004)。目前我国市面上并没有根治 CPIV

的特效药，临床上常用抗生素、补充体液等方式对病犬进行对症治疗，日常饲养可在日粮中添加保健品来增强犬的免疫能力。

当前预防犬发病使用最多的是弱毒疫苗（焦库华等 2009），犬按照正常免疫程序免疫后，机体产生的中和抗体最多可以在体内保持 2 年，使犬免受 CPIV 的感染（Mouzin DE et al 2004）。CPIV-XN934 和 CPIV-XN4 分别是我国分离的一株犬副流感病毒强毒株和弱毒株，弱毒株适用的扩毒细胞为 VERO 和 MDCK，病毒扩增滴度较高，可作为免疫原制备弱毒疫苗。中国人民解放军第四军医大学动物研究中心李六金等人以犬瘟热、病毒性肠炎、肝炎、喉气管炎、副流感和狂犬病为抗原研制的犬五联疫苗已经应用于临床（李六金等 1996）。

2 研究目的与意义

CPIV 常在犬舍或流浪犬基地流行 (Piewbang C 2017), 传染性强, 危害范围广, 给养殖业带来了严重损失, 目前市场预防犬传染病的疫苗多为联苗, 并不能完全控制 CPIV 的再感染 (Charoenkul et al 2021, Erles K et al 2004)。胶体金试纸条具有操作简单、快捷、低廉的优点, 适用于 CPIV 的临床筛查, 以尽早控制病情、减少损失。

当前国内针对 CPIV 的检测技术主要是 RT-qPCR、RT-PCR、ELISA 以及胶体金试纸条。其中 RT-PCR 是宠物医院常用的检测技术, 而目前国内检测 CPIV 的胶体金试纸条研发并不多, 且具备国家正式批号的试纸条较少。因此本研究基于新的单克隆抗体建立胶体金检测病原试纸条, 选取其中 2 株腹水进行胶体金检测方法的建立, 通过特异性、灵敏性以及临床样品检测证明了该胶体金试纸条可应用于临床检测, 为 CPIV 的临床诊断提供候补的检测产品; 同时筛选了中和抗体, 为后续研发治疗制剂提供材料。

3 材料与amp;方法

3.1 实验材料

3.1.1 实验动物、毒种及细胞

本试验中使用的小鼠均为 SPF 级 4~6 周龄 BALB/c 雌性小鼠,购自华中农业大学实验动物中心。

MDCK 细胞、CPIV、CAV、CDV、CPV 均由本实验室保存。

SP2/0 骨髓瘤细胞,中国典型培养物保藏中心提供,本实验室保存。

佐剂(免疫佐剂、腹水制备佐剂)均购自北京博奥龙免疫技术有限公司,货号分别为 KX0210041、KX0210048-10。

3.1.2 引物设计

本研究利用 Primer Premier 5.0 生物软件设计引物,引物由北京擎科生物科技有限公司合成。引物序列见表 3-1。

表 3--1 本研究所用的 PCR 引物

Table 3-1 PCR primers used in this study

成份 Components	体积 Volume (μL)
CPIV-F-F	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGAAGGCAAATAAAAATG
CPIV-F-R	GGTGACTGCCCCACCTCCTAATACTTGTAGTCG
CPIV-H-F	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGTATGAGAGTTTAATA
CPIV-H-R	GTGACTGCCCCACCTCCGGATAGTGTCACCTGACG
CPIV-N-F	GTGACTGCCCCACCTCCGGATGTCATCCGTGCTTAAAG
CPIV-N-R	CTGGGTGATCTTGACATCGGAGGTGGGGGCAGTCACC
pET-28a-R	CATGGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAAC
pET-28a-F	GGAGGTGGGGGCAGTCACCATCATC
pET-28a-JD-F	GATGTCGGCGATATAGGCGCC
pET-28a-JD-R	GGGTTTTTTGCTGAAAGGAGG

3.1.3 主要仪器与试剂

表 3-2 本研究所用的主要试剂、耗材与仪器设备

Table 3-2 Main reagents, consumables and Instruments used in this study

仪器设备 Equipment	购买公司 Purchase company
EDC-810 型 PCR 仪	北京东胜创新生物科技股份有限公司
DYH-III 电泳仪、核酸水平电泳槽	北京六一仪器厂
SCW-CZ-650 型洁净工作台	苏州宏瑞净化科技有限公司
XW-80A 微型涡旋混合仪	上海沪西分析仪器厂有限公司
DK-S22 型恒温水浴锅	上海精宏试验设备有限公司
BD-BGC1 蓝光切胶仪	无锡博弗瑞德生物科技有限公司
5810 型台式高速大容量离心机	德国 Eppendorf 公司
二氧化碳细胞培养箱	SANYO MCO-AC
光学显微镜	OLYMPUS CKX31
4°C、-20°C、-80°C 冰箱	海尔公司
立式高压蒸汽灭菌锅	上海博讯实业有限责任公司
紫外-可见分光光度计	U-2910, Hitachi
电子天平	上海科学精密仪器有限公司精平仪器厂
酶标仪	上海赛默飞世尔有限公司
照胶仪	上海能科技有限公司
化学发光成像系统	以色列 DNR 公司
琼脂糖	Biosharp
Triton-X-100	Sigma-aldrich
Westernblot ECL 显色液	Bio-rad 公司
BSA	BioFroxx
EasyTaq DNA PoLymerase	北京全式金生物技术有限公司
In-Fusion HD Enzyme Premix	宝生物工程（大连）有限公司
PrimeSTAR HS DNA PoLymerase	南京诺唯赞生物科技股份有限公司

3.1.4 培养基配置

LB 液体培养基：5.0 g/L 酵母粉，10 g/L 胰蛋白胨，10 g/L 氯化钠溶于 1 L 单蒸水中，高压灭菌后常温保存。

LA 固体培养基：5.0 g/L 酵母粉，10 g/L 胰蛋白胨，10 g/L 氯化钠，15 g/L 琼脂粉于 1 L 水中，高压灭菌后常温保存。

RPMI-1640 基础培养基、双抗（青-链霉素）购于美国 Thermo 公司。HAT 添加剂（50×）、HT 添加剂（50×）、50%PEG 购于美国 Sigma 公司。胎牛血清购于 GBICO 公司。

RPMI-1640 完全培养基：RPMI-1640 基础培养基 79 mL，胎牛血清 20 mL，双抗 1 mL。

HAT 培养基：RPMI-1640 基础培养基 77 mL，胎牛血清 20 mL，双抗 1 mL，HAT（50×）2 mL。

HT 培养基：RPMI-1640 基础培养基 77 mL，胎牛血清 20 mL，双抗 1 mL，HT（50×）2 mL。

50%PEG: 用灭菌的 EP 管分装成 1 mL 每支，4℃保存，融合当天取一支于恒温水浴锅中温于至 37℃备用。

胎牛血清：-80℃保存的血清放在 4℃溶解后，56℃水浴灭活半小时后，上下颠倒混匀，4℃保存。

3.1.5 Western Blot 相关试剂

BSA (Bovine Serum Albumin) 购自 BioSharp 公司。HIS 标签抗体及 HRP 羊抗鼠二抗，均购自 Southern Biotechnology 生物公司。溴酚蓝、DTT 粉剂、粉剂、甘氨酸（美国 MP 公司）、丙三醇、吐温-20、冰醋酸、无水乙醇、浓盐酸购自国药集团化学试剂有限公司。蛋白质 Marker 购自 ThermoFisher 公司。

30% 聚丙烯酰胺溶液：称量 290 g 聚丙烯酰胺，10 g N,N-亚甲基双丙烯酰胺于 1 L 烧杯中，加入单蒸水 600 mL，充分搅拌溶解，转移至容量瓶定容 1 L，用 0.22 μm 滤膜过滤，于棕色瓶中 4℃避光保存。

10% 过硫酸铵溶液：称量 1.0 g 过硫酸铵粉末，加入 10 mL 单蒸水后搅拌溶

解，于棕色瓶中 4℃ 避光保存。

1.5 M Tris (pH 8.8) 溶液：称量 182 g Tris-Base，溶于 800 mL 单蒸水中，搅拌溶解均匀，用浓 HCl 调 pH 值至 8.8，转移到容量瓶定容 1 L，用 0.22 μm 滤膜过滤后，于 4℃ 保存。

1 M Tris (pH 6.8) 溶液：称量 121 g Tris-Base 溶于 800 mL 单蒸水中，搅拌溶解均匀，用浓 HCl 调 pH 值至 6.8，转移到容量瓶定容 1 L，用 0.22 μm 滤膜过滤后，于 4℃ 保存。

5×SDS Loading buffer：称量 SDS 1.0 g、溴酚蓝 0.01 g，加入 1 M Tris-HCl (pH6.8) 2.5 mL，甘油 5 mL，定容 10 mL，室温保存，备用。

10% DTT：称量 1.0 g DTT 粉剂，溶于 10 mL 单蒸水中，分装到 1.5 mL EP 管中，-20℃ 冻存，备用。

SDS-PAGE 凝胶配方：10% SDS-PAGE 分离胶 (5 mL)：按照 Takara 公司 SDS-PAGE 凝胶配制方法，加入单蒸水 1.9 mL，30%聚丙烯酰胺溶液 1.7 mL，1.5M Tris-HCl (pH8.8) 1.3mL，10% SDS 溶液 0.05 mL，10%过硫酸铵溶液 0.05 mL 及 TEMED 0.002 mL，充分混合。

5% SDS-PAGE 浓缩胶 (2 mL)：加入单蒸水 1.4 mL，30%聚丙烯酰胺溶液 0.33 mL，1.0 M Tris-HCl (pH6.8) 0.25 mL，10% SDS 溶液 0.02 mL，10%过硫酸铵溶液 0.02 mL 及 TEMED 2 μL，充分混合。

SDS-PAGE 电泳缓冲液：现用现配，称量 1.5 g Tris-Base，7.2 g 的甘氨酸，0.5 g 的 SDS，溶于 500 mL 单蒸水中，搅拌溶解待用。

Western Blot 转膜缓冲溶液：称取甘氨酸 14.4 g 及 Tris-base 3.0 g，加入约 600 mL 的 ddH₂O，充分溶解后，定容至 800 mL，加入 200 mL 甲醇，现配现用。

10×TBST 缓冲液：称取 NaCl 88.0 g 及 Tris-base 24.2 g，加入 800 mL ddH₂O，充分溶解后，加入 5 mL Tween-20 及 10 mL 浓盐酸充分混匀，定容至 1 L，4℃ 保存。

1×TBST：使用 ddH₂O 稀释 10×TBST，加入 0.1 M 或 1 M 的 HCL 调节 pH 至 7.6，定容至 1 L，再加入 0.5 mL Tween-20，4℃ 保存。

Western Blot 封闭液：称取 2 g BSA、5 g 脱脂奶粉溶解于 100 mL TBST 中，-20℃ 保存。

3.1.6 核酸胶相关试剂

50×TAE 缓冲液:称取 242 g Tris 和 37.2 g 二水合 EDTA 二钠溶解于 800 mL 单蒸水中,加 57.1 mL 冰乙酸,充分溶解混匀,定容至 1 L,室温保存,用时稀释至 1×TAE 溶液。

1.0%琼脂糖凝胶:称取 1.0 g 琼脂糖于 100 mL 1×TAE 缓冲液中,加热融化,待溶液冷却至 60℃左右加入 5 μL Goldview 贮存液。

3.1.7 ELISA 相关试剂

包被液(0.05 mol/L pH 9.6 碳酸盐缓冲液):称取 Na_2CO_3 1.59 g, NaHCO_3 2.93 g, 加超纯水定容至 1 L, 调 PH 至 9.6。

磷酸盐缓冲液 (0.01 mol/L, pH 7.4): 称取 NaCl 8.0 g, $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9 g, KCl 0.2 g, KH_2PO_4 0.2 g, 加超纯水定容至 1 L。

洗涤液 (0.05%PBST): 吸取 0.5 mL Tween-20, 加入到 1 L 0.01 mol/L pH7.4 PBS 缓冲液中, 充分混匀, 室温保存。

封闭液: 称取 1 g BSA, 2.5 g 脱脂乳, 加入到 50 mL 的 PBST 洗涤液中, 涡旋混匀, 现配现用。

抗体稀释液 (2%BSA): 称取 1 g BSA, 溶于 50 mL 的 PBST 洗涤液中, 涡旋混匀, 现配现用。

终止液: 2 mol/L H_2SO_4 。

3.1.8 试纸条主要试剂配制

金标保存液: 0.2 mol/L 硼酸盐缓冲液, pH 值 9.0: 称取硼酸 12.366 g、加入到 900 mL 超纯水中溶解, 待完全溶解后, 混匀, 用 5 mol/L NaOH 调 pH 值至 9.0, 再加入超纯水定容至 1 L。

金标垫和样品垫处理液: 称取 20 g BSA、0.2 g NaN_3 、5 g PVP K30、1 g PEG-20000 加入到 900 mL 的 PBS (0.01 mol/L, pH 值 7.2) 溶液中, 充分溶解, 再加入 Tween-20 0.5 mL, 混匀后用 PBS (0.01 mol/L, pH 值 7.2) 溶液定容至 1 L。

3.2 试验方法

3.2.1 免疫方案制定

以浓缩后的 CPIIV 病毒液作为免疫原，佐剂选用博奥龙快速水佐剂，试验动物为 6 周龄的 BALB/c 磁性小鼠。将快速佐剂与免疫原等体积混合后，按 100 μL /只的抗原量通过肌肉注射 6 周龄的 BALB/c 小鼠 3 只，每隔 14 d 免疫一次。免疫三次后对血清效价最高的小鼠进行三次腹腔冲击免疫，每次 50 μL ，每次间隔 1 d。最后一次冲击免疫后 1 d 进行细胞融合。免疫程序如下（表 3-3）：

表 3-3 小鼠免疫程序

Table 3-3 Immunization Schedule for Mice

免疫次数	免疫剂量 (μL)	免疫佐剂	免疫时间 (D)	免疫途径
首免	100	快速佐剂	0	肌肉注射
二免	100	快速佐剂	14	肌肉注射
三免	100	快速佐剂	28	肌肉注射
冲击免疫	50	-	36	腹腔注射
冲击免疫	50	-	38	腹腔注射
冲击免疫	50	-	40	腹腔注射

3.2.2 细胞复苏及培养

从液氮罐中取出冻存细胞后立即放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅，迅速摇晃至冻存液完全融化。室温 2000 r/min 离心 5 min 弃去上清，用完全培养基重悬细胞于细胞瓶中，置于恒温培养箱中培养，6 h~8 h 后换液。

当细胞长至单层时，对细胞进行传代。首先，弃掉培养基，用胰酶洗 2 遍，加入 1 mL 胰酶，置于恒温培养箱中消化细胞，至细胞瓶直立时细胞可以从瓶壁分散滑落为准，加入适量培养基中和胰酶，保留适量比例细胞，补加完全培养基 (T25 为 5 mL, T75 为 15 mL)，置于恒温培养箱中培养。

3.2.3 病毒含量测定

96孔细胞培养板接种 MDCK 细胞至细胞生长至单层时,将完全培养基换成 2%FBS 的维持培养基,将病毒液以 10 倍比稀释 8 个稀释度,接种至细胞中,每个稀释度接种 8 个孔,每孔接种 100 μ L,设置两列无病毒液的空白细胞对照。将细胞板置于恒温培养箱中培养,每日观察,直至细胞不再出现病变为止,按照 Reed-Muench 方法计算病毒 TCID₅₀。

3.2.4 病毒扩增及浓缩

MDCK 细胞生长至单层时,弃掉培养基,换成 2%FBS 的培养基,按照 1% 的比例接种 CPIV 病毒液,于培养箱培养,每日观察病变情况,直至 80%~90% 的细胞变圆、脱落、核碎裂,将细胞及上清一起收集,于 -80℃ 反复冻融 3 次,将收集的病毒液在 4℃、8000 r/min 离心 30 min,去除细胞碎片,收集上清即为病毒液。

按终浓度 3% (m/V) 加入氯化钠,终浓度 8% (m/V) 加入 PEG6000,反复摇匀,4℃ 过夜静置,沉淀病毒粒子,4℃ 条件下 18000 r/min 离心 1 h,弃掉上清,用少量 PBS 重悬沉淀,过夜溶解,-80℃ 分装冻存待用。

3.2.5 建立间接 ELISA 检测方法

将超速离心纯化的 CPIV 病毒以及 MDCK 细胞蛋白分别在碳酸盐包被缓冲液中稀释成不同浓度,进行抗原包被浓度的摸索,具体步骤如下:

(1) 设置不同梯度的抗原包被量,病毒以 1:50、1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400 进行包被;细胞以 1:10、1:20、1:40、1:80、1:160、1:320、1:640、1:1280 进行包被,100 μ L/孔,4℃ 包被过夜;

(2) 弃去(1)中板子内的包被液,用 PBST 清洗板子 3 次,200 μ L/孔,吸水纸拍干,以 5% 脱脂乳和 2% BSA 进行封闭,100 μ L/孔,37℃ 温育 1 h;

(3) 弃去(2)中的封闭液,用 PBST 清洗板子 3 次,200 μ L/孔,吸水纸拍干,-20℃ 保存备用或即用;

(4) 将采集的小鼠阳性血清用 2% BSA 以 1:1000、1:2000、1:4000、1:8000、

1:16000、1:32000、1:64000、1:12800 的稀释度进行稀释，100 μL /孔，37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h；

(5) 将(4)中的一抗弃去，用 PBST 清洗板子 3 次，200 μL /孔，吸水纸拍干，加入 1:10000 稀释的 HRP 标记的 IgG 酶标羊抗鼠二抗，100 μL /孔，37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 45 min；

(6) 弃去(5)中的二抗，PBST 清洗板子 3 次，吸水纸拍干，加入配制好的 TMB 显色液，100 μL /孔，37 $^{\circ}\text{C}$ 显色孵育 15 min；

(7) 显色结束后，以 2 mol/L H_2SO_4 终止反应，每孔 50 μL /孔，测定 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值，进行数据分析确定抗原最佳工作浓度；

(8) 以(7)中摸索好的抗原包被浓度，包被 15 块~20 块 ELISA 板，于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存，用于后续血清抗体效价检测及杂交瘤细胞筛选。

3.2.6 间接 ELISA 试验与中和试验检测免疫小鼠抗体水平

小鼠第三次免疫后 7 d 尾尖采血，分离血清。

间接 ELISA 试验具体步骤：

(1) 将 3.2.5 中包被好的抗原板从-20 $^{\circ}\text{C}$ 取出解冻，将免疫鼠血清从 1:1000 依次 2 倍比稀释至 1:8192000，并做空白鼠血清 1:100 阴性对照，100 μL /孔，并置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h；

(2) 弃上清，用 PBST 清洗 3 次，吸水纸拍干，加入 1:10000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠二抗，100 μL /孔，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 45 min；

(3) 弃去二抗，用 PBST 清洗板子 3 次，吸水纸拍干，加入配置好的 TMB 显色液，100 μL /孔，37 $^{\circ}\text{C}$ 显色孵育 15 min；

(4) 显色结束后，以 2 mol/L H_2SO_4 终止反应，测定 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值。

中和试验具体步骤如下：

(1) 将 MDCK 细胞铺一块 96 孔板，100 μL /孔；

(2) 将采集的小鼠血清依次按 1:100、1:1000、1:10000、1:100000 进行十倍比稀释，稀释液为含 2% FBS、1% 青-链霉素的 DMEM；将 CPIV 原毒按 100 $\text{TCID}_{50}/0.1 \text{ mL}$ 进行稀释，将 50 μL 稀释的病毒液与 50 μL 不同稀释度的血清等比例混匀，对照组设置为：空白细胞对照（100 μL 培养基）、病毒对照（50 μL

病毒液+50 μL 培养基)、空白血清对照 (50 μL 未免疫鼠血清 1:100 稀释+50 μL 病毒液)、免疫鼠血清对照 (50 μL 1:100 免疫鼠血清+50 μL 培养基), 每组设置 3 个重复, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1h, 将各个稀释度的血清与病毒混合液分别加入细胞板, 100 μL /孔;

(3) 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中, 每隔 24 h 于细胞显微镜下观察病变情况, 判定终点为 72 h;

(4) 如果抗体水平大于 1:10000, 则进行冲击免疫, 准备细胞融合。

3.2.7 SP2/0 骨髓瘤细胞的制备

(1) 将实验室冻存的 SP2/0 骨髓瘤细胞从液氮罐中取出, 复苏于 T25 细胞瓶中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。待细胞长满单层后弃掉培养基, 用 RPMI-1640 基础培养基将细胞轻轻吹下, 2000 r/min 离心 5 min, 弃上清, RPMI-1640 基础培养基重复洗一遍, 最后用 1.5 mL RPMI-1640 基础培养基重悬细胞, 分三点注射 BALB/c 小鼠背部皮下, 每点 500 μL , 约 10~14 d 可见小鼠背部形成明显肿瘤;

(2) 小鼠摘眼球放血后用颈椎脱臼法处死, 75%酒精浸泡 5 min, 消毒皮毛。小鼠固定于解剖盘中, 无菌状态下将肿瘤块剪下置于匀浆器中, 加入 3 mL RPMI-1640 基本培养基充分研磨, 再补加 RPMI-1640 基本培养基至 10 mL, 静置 2 min, 吸取上层的细胞悬液于 15 mL 离心管备用; 该步骤重复两次;

(3) 将细胞悬液以 1000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 用 12 mL RPMI-1640 基础培养基重悬细胞。在 2 个 15 mL 离心管中先加入 6 mL 小鼠淋巴细胞分离液, 将等量 SP2/0 骨髓瘤细胞悬液轻轻地加在分离液之上, 500 g/min 离心 20 min, 吸取位于分界面致密的白色细胞层, 取得的细胞用 RPMI-1640 基本培养基洗 2 遍, 将所得细胞用 RPMI-1640 完全培养基重悬, 于细胞瓶中培养扩大, 直至细胞数量达到 1×10^8 个。

3.2.8 免疫脾细胞的制备

(1) 将进行了 3 次冲击免疫的小鼠摘眼球放血后用颈椎脱臼法处死 (收集血清为阳性血清), 75%酒精浸泡 5 min, 消毒皮毛;

(2) 无菌状态下将小鼠固定于解剖板上，后肢交叉固定，用无菌镊子夹住下腹部皮肤，剪一小口，撕开皮肤露出腹膜，换一套镊子和剪刀，剪开腹膜，暴露出脾脏，再换一套剪刀镊子，用镊子夹住脾脏，用剪刀去掉粘连的脂肪组织，剪破脾脏外膜；

(3) 将脾脏置于 10 mm 细胞平皿中，加 3 mL~5 mL RPMI-1640 基本培养基，止血钳拔出 5 mL 注射器内芯，用白色端挤压出脾脏细胞，之后用适量 RPMI-1640 基本培养基将脾细胞重悬，再将脾细胞悬液通过 200 目的细胞筛，除掉脂肪或组织块。

将收集的细胞悬液 1000 r/min 离心 10 min，弃上清，该步骤重复 2 次，用 RPMI-1640 基础培养基重悬细胞，计数后放 37℃、5%CO₂ 培养箱备用。

3.2.9 饲养细胞的制备

(1) 取一只未免疫的 BALB/c 鼠，摘眼球放血后颈椎脱臼法处死，收集血清为阴性血清，于 -20℃ 保存备用；

(2) 75%酒精中浸泡 5 min，皮毛消毒。无菌状态下将小鼠固定于解剖板上，后肢交叉固定，用无菌镊子夹住下腹部皮肤，剪一小口，撕开皮肤露出腹膜，换一套镊子和剪刀，剪开腹膜，暴露出脾脏，再换一套剪刀镊子，用镊子夹住脾脏，用剪刀去掉粘连的脂肪组织，剥离脾脏，置于匀浆器中。加入 3 mL RPMI-1640 基本培养基充分研磨，再补加 RPMI-1640 基本培养基至 10 mL，静置 2 min，吸取上层的细胞悬液于 15 mL 离心管备用；该步骤重复两次；

(3) 1000 r/min 离心 10 min 后弃上清，RPMI-1640 基本培养基清洗两遍，之后用 RPMI-1640 完全培养基重悬，以 40%左右的细胞密度铺 5 块 96 孔细胞培养板，100 μL/孔，置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中待用。

3.2.10 细胞融合

(1) 将 SP2/0 骨髓瘤细胞与免疫脾细胞以 1:5 的比例在 50 mL 离心管中混匀，1000 r/min 离心 10 min，弃去上清，用灭菌滤纸吸干离心管侧壁液体，轻轻弹击离心管管底，使细胞沉淀略加松动，以细胞将要顺管壁下流为准；

(2) 将该离心管正置于 38℃ 恒温水浴锅中，保证管底完全浸入水中，在

1 min 内缓慢滴入 1 mL 预温至 38°C 的 50% PEG, 边加边轻轻用吸管搅拌。加完后继续搅拌 1 min, 然后静置 45 s;

(3) 缓慢加入 38°C 预热的 RPMI-1640 基本培养基 40 mL。具体方案为: 第 1 min 缓慢加入 1 mL, 第 2 min 缓慢加入 1 mL, 第 3~5 min 缓慢加入 3 mL, 最后缓慢加入 35 mL 培养基, 整个过程 20 min 左右。加培养基时需缓慢加入, 并不断轻轻地搅拌; 将融合后的细胞悬液正置于 37°C、5%CO₂ 培养箱放置 10 min, 室温 1000 r/min 离心 10 min 后弃掉上清, 用 HAT 培养基重悬融合细胞, 用 1 mL 枪头均匀滴加入 5 块已经铺过饲养细胞的 96 孔细胞培养板中, 约 100 μ L/孔, 置于 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养;

(4) 次日观察细胞有无污染, 8 d~10 d 时将 HAT 培养基更换为 HT 培养基。待融合细胞集落长至培养孔 1/3 时, 即可通过间接 ELISA 对细胞上清进行抗体检测, 选取 P/N 值高、P 值高的克隆孔进行亚克隆。

3.2.11 阳性细胞的亚克隆

采用有限稀释法对经 ELISA 筛选后的阳性杂交瘤细胞进行亚克隆, 具体操作流程如下:

将初筛阳性的细胞孔内的培养基小心弃去, 向孔中加入 200 μ L 的 RPMI-1640 完全培养基, 用移液器将孔内的细胞轻轻吹散, 按照一定比例进行稀释, 吸取 10 μ L 于细胞计数板上, 在显微镜下对细胞进行观察计数, 计算出细胞的密度, 采用有限稀释法对杂交瘤细胞悬液进行逐步稀释, 使最终细胞密度为 1000 个/mL, 吸取 100 μ L 稀释好的细胞悬液加入 10 mL RPMI-1640 完全培养基中, 充分混匀后, 均匀滴加到 96 孔细胞培养板中, 使每孔的细胞密度控制在 1 个/孔, 置于 37°C、5% CO₂ 细胞培养箱中进行培养。5 d 后在显微镜下观察亚克隆的杂交瘤细胞的生长状况, 将只含有单克隆的细胞孔做好标记, 待细胞板中细胞密度铺满 50% 时, 以 3.2.10 中的筛选方法对单克隆细胞孔筛选, 将第一次亚克隆阳性的细胞进行第二次亚克隆, 直至亚克隆的细胞阳性率达到 100%, 即可筛选出稳定分泌抗体的单克隆细胞。在每次亚克隆的同时将每次筛选为阳性的杂交瘤细胞进行扩大培养、冻存, 以防止亚克隆过程中细胞的丢失及其他意外情况的出现。

3.2.12 杂交瘤细胞的冻存与复苏

细胞冻存：将经过多次亚克隆已经建立好细胞系的杂交瘤细胞进行扩大培养，将生长状态良好且处于对数生长期的细胞进行冻存。首先用 RPMI-1640 完全培养基将细胞板中的杂交瘤细胞轻轻吹下，1000 r/min 离心 5 min，弃去培养基。用提前配置的含 10% DMSO 的细胞冻存液，将细胞沉淀进行重悬，分装于冻存管，置于冻存盒，-80℃保存过夜。次日即可将细胞转移至液氮罐中进行保存。

细胞复苏：取出液氮中冻存的杂交瘤细胞，在 37℃水浴锅中快速晃动直至冻存液完全融化，1000 r/min 离心 5 min，弃去冻存液，用 RPMI-1640 完全培养基将细胞沉淀完全重悬，转移至细胞板中，置于 37℃、5%CO₂ 细胞培养箱中培养。24 h 后细胞大部分贴壁后进行换液，并每日观察复苏后的细胞生长状态。

3.2.13 杂交瘤细胞染色体数目鉴定

采用秋水仙素法进行胞核学检验，取对数生长期的细胞，加入培养基体积 1/10 的 0.005 M 秋水仙素到培养瓶中，继续培养 4 h~5 h，150 g 离心 5 min，去除上清。将细胞重悬于 7 ml 低渗 0.075% KCl 溶液中，37℃温育 15 min。加入 1~2 ml 新鲜配制的固定液（甲醇：冰醋酸=3:1）到低渗后的溶液中，轻轻混匀，150 g 离心 5 min，去上清。加入 7 ml 的新鲜固定液混匀室温下固定 15 min，150 g 离心 5 min，去除上清。再加入 7 ml 的固定液，混匀室温下固定 15 min，150 g 离心 5 min，去除上清。加入一定量的固定液，轻轻混匀，制成悬液，滴在一张干燥、洁净的载玻片上，轻轻吹散，火焰固定，自然干燥；用吉姆萨染液染 10 min~15 min，流水冲洗，风干后镜检。显微镜下寻找分散良好，染色适中的分裂相，油镜下观察，计染色体数。

3.2.14 单克隆抗体亚类鉴定

取杂交瘤细胞上清，使用 SBA Clonotyping System-HRP 试剂盒（SouthernBiotech）进行亚类鉴定。具体操作如下：

（1）将先前已经包被好的抗原板从-20℃取出解冻，将 100 μL 杂交瘤上清添加到每个孔中，并置于 37℃作用 1 h；

(2) 弃上清, 用 PBST 清洗 3 次, 吸水纸拍干, 加入 1:500 稀释的 HRP 标记的检测抗体, 包括 Ig screening antibody、IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgA、Kappa、Lambda, 每孔 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 45 min;

(3) 弃去检测抗体, 用 PBST 清洗板子 3 次, 吸水纸拍干, 加入配置好的 TMB 显色液, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 显色孵育 15 min;

(4) 显色结束后, 以 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 测定 OD_{450nm} 值。

3.2.15 杂交瘤细胞株分泌抗体的反应性分析

利用间接免疫荧光试验对杂交瘤细胞培养上清进行反应性与特异性分析, 具体步骤如下:

(1) 将 MDCK 细胞提前铺于二十四孔细胞板, 待细胞长至单层, 接种 CPIV 病毒液;

(2) 待病毒入侵细胞后, 弃去孔里培养基, PBS 清洗 3 次, 加入 4% 的多聚甲醛, 200 μ L/孔, 室温固定 25 min;

(3) 弃去 (2) 中的固定液, PBS 清洗 3 遍, 加入 0.2% 的 Triton-100 \times , 200 μ L/孔, 室温透化 20 min;

(4) 弃去 (3) 中的透化液, PBS 清洗 3 遍, 加入 10% 的山羊血清进行封闭, 200 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h;

(5) 弃去 (4) 中的封闭液, PBS 清洗 3 遍, 分别加入杂交瘤细胞上清、免疫鼠血清、空白鼠血清、SP2/0 细胞上清以及 PBS, 200 μ L/孔, 4 $^{\circ}$ C 过夜;

(6) 弃去 (5) 中的一抗, PBS 清洗 3 遍, 避光加入 1:250 稀释的 FITC 488 羊抗鼠二抗, 200 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 作用 1 h;

(7) 弃去 (6) 中的二抗, PBS 清洗 5 遍, 避光加入 1:3000 稀释的 DAPI, 200 μ L/孔, 4 $^{\circ}$ C 染色 10 min;

(8) 弃去 (7) 中的 DAPI, 向细胞孔加入 PBS, 200 μ L/孔, 置于荧光显微镜下观察结果。

3.2.16 杂交瘤细胞株分泌抗体的特异性分析

(1) 将实验室保存的 CPIV、CAV-2、CDV、CPV 病毒液以 1:10 进行包被,

100 μL /孔，4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜；

(2) 弃去 (1) 中板子内的包被液，用 PBST 清洗板子 3 次，200 μL /孔，吸水纸拍干，以 5% 脱脂乳和 2% BSA 进行封闭，100 μL /孔，37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h；

(3) 弃去 (2) 中的封闭液，用 PBST 清洗板子 3 次，200 μL /孔，吸水纸拍干，-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用或即用；

(4) 将 3 株阳性杂交瘤细胞培养上清以 1:10 的稀释度进行稀释，100 μL /孔，37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h；

(5) 将 (4) 中的一抗弃去，用 PBST 清洗板子 3 次，200 μL /孔，吸水纸拍干，加入 1:10000 稀释的 HRP 标记的 IgG 酶标羊抗鼠二抗，100 μL /孔，37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 45 min；

(6) 弃去 (5) 中的二抗，PBST 清洗板子 3 次，吸水纸拍干，加入配制好的 TMB 显色液，100 μL /孔，37 $^{\circ}\text{C}$ 显色孵育 15 min；

(7) 显色结束后，以 2 mol/L H_2SO_4 终止反应，每孔 50 μL /孔，测定 OD_{450nm} 值。

3.2.17 杂交瘤细胞上清抗体效价测定

用间接 ELISA 方法检测杂交瘤细胞培养上清抗体效价，操作程序为：将先前包被的 ELISA 板解冻，3 株杂交瘤细胞培养上清作为一抗，从 1:100 开始依次 2 倍比稀释至 1:6400，以 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗。同时 SP2/0 骨髓瘤细胞上清液作为阴性对照，检测单抗培养上清的最大效价。

将中和抗体 4E3 的杂交瘤细胞上清从 1:50、1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600 稀释，与 100 TCID₅₀/0.1mL 的 CPIV 病毒液混合接种于长满单层的 MDCK 细胞，同时做好病毒对照、空白细胞对照、SP2/0 培养上清对照，判定终点为 72 h。

3.2.18 单抗靶标抗原鉴定

3.2.18.1 病毒 RNA 的提取

200 μL CPIV 病毒液中加入 500 μL Trizol，涡旋混匀后于冰上裂解 15 min。

向其中加入 200 μL 氯仿，涡旋 15 s 于冰上静置 10 min，于 4 $^{\circ}\text{C}$ 12000 r/min 离心 15 min，吸取 600 μL 上清于另一个无 RNA 酶的 1.5 mL EP 管中，向其中加入 600 μL 异丙醇，轻轻混匀，冰上静置 10 min，于 4 $^{\circ}\text{C}$ 12000 r/min 离心 10 min，小心弃去上清，加入 1 mL 无水乙醇轻轻重悬沉淀，于 4 $^{\circ}\text{C}$ 12000 r/min 离心 10 min，重复一次后将液体吸净并置于超净台中风干 5 min，最后加入 20 μL DEPC 水溶解。

3.2.18.2 RNA 反转录及基因扩增

使用美国普罗麦格生物公司的 RQ1 RNase-Free DNase 除去样品中 RNA 溶液中基因组 DNA，去 DNA 体系见表 3-4:

表 3-4 去 DNA 反应体系

Table 3-4 The Reaction system for DNA removal

成份 Components	体积 Volume (μL)
RNA	< 2 μg
RNase-Free DNase	7
10 \times Buffer	3
DEPC 水	up to 30 μL

37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h 后，加入 5 μL Stop Solution, 65 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min 终止反应;

使用美国普洛麦格生物公司的 M-MLV Reverse Transcriptase 对样品 RNA 进行反转录，反转录体系见表 3-5。

表 3-5 反转录预反应体系

Table 3-5 Retrotranscriptional preresponse system

成份 Components	体积 Volume (μL)
RNA	< 2 μg
特异性引物 (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$)	1
DEPC 水	up to 15 μL

70 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5min，冰浴 2min，再加入其他体系，进行反转录;

表 3-6 反转录反应体系

Table 3-6 The Reaction system for RT-PCR

成份 Components	体积 Volume (μL)
上一步反应液	15
M-MLV RT	1
M-MLV 5 \times Reaction Buffer	4
Recombinant RNase Inhibitor	0.5
dNTP (2.5 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$)	4
DEPC 水	up to 25 μL
RNA	<2 μg
RNase-Free DNase	7
10 \times Buffer	3
DEPC 水	up to 30 μL

37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 min, 42 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h, 72 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 min, 得到反转录产物 (cDNA)。

3.2.18.3 CPIV-H、F、N 抗原目的基因的扩增

通过 SnapGene 设计特异性引物后, 分别用 CPIV-F-F、CPIV-F-R、CPIV-H-F、CPIV-H-R、CPIV-N-F、CPIV-N-R、pET-28a-F、pET-28a-R 进行扩增 CPIV-H、F、N 基因及 pET-28a 载体的扩增。使用扩增体系及反应条件如表 3-7 所示:

表 3-7 片段扩增反应体系

Table 3-7 Fragment amplification reaction system

成份 Components	体积 Volume (μL)
cDNA	<100ng
酶	1
特异性上下游引物	各 2
dNTP	1
Buffer	10
MgSO ₄	1
ddH ₂ O	up to 50 μL

扩增条件如表 3-8:

表 3-8 片段扩增反应条件

Table 3-8 The reaction conditions of PCR amplification of the target fragment

Temperature	Time	Cycles
95°C	5min	
95°C	10sec	} 32
60°C	10sec	
72°C	15sec/kb	
72°C	5min	
25°C	1min	

3. 2. 18. 4 扩增片段胶回收

- (1) 快速切下含目的 DNA 片段的凝胶，并尽量去除多余的凝胶，
- (2) 称取凝胶块的重量，并转移至 2 mL 离心管中。加入 1~3 倍凝胶体积 Buffer GDP, 55°C 水浴至凝胶块完全溶解；
- (3) 短暂离心收集管壁上的液滴。将 HiPure DNA Mini Column 套在 2 mL 离心管中。把 700 μ L 溶胶液转移至柱子中。12000 r/min 离心 30 s；
- (4) 倒弃滤液，把柱子套回 2 mL 离心管中。加入 300 μ L Buffer GDP 至柱子中。静置 1 min。12000 r/min 离心 30 s；
- (5) 倒弃滤液，把柱子套回 2 mL 离心管中。加入 600 μ L Buffer DW2（已用无水乙醇稀释）至柱子中。12000 r/min 离心 30 s；
- (6) 重复（5）一次，12000 r/min 离心 2 min；
- (7) 把柱子套在 1.5 mL 离心管中，加入 20 μ L ddH₂O（预热至 55°C）至柱子膜中央。放置 2 min。12000 r/min 离心 1 min。

3. 2. 18. 5 目的片段与载体融合转化

利用融合 PCR 技术，将 CPIV-N、CPIV-F、CPIV-H 三个片段构建至线性化的 pET-28a 载体上。融合 PCR 的原理是采用具有互补末端的引物，扩增出有重叠链的 PCR 产物，再通过融合酶的作用，将两个具有重叠链的不同 PCR 产物片段连接起来，若是目的片段与质粒载体片段融合成完整的质粒，其产物可直接转化到 DH5 α 感受态细胞中。重叠 PCR 的反应体系中 DNA 片段与载体片段的摩

尔比 3:1~10:1, 插入片段添加量不超过 200 ng, 如表 3-9 所示, 反应条件如表 3-10 所示:

表 3-9 重叠体系

Table 3-9 The first step reaction system of overlap PCR

成份	体积
Components	Volume (μL)
片段	200ng
载体	20ng
酶	4
ddH ₂ O	up to 20

反应体系如表 3-10 所示:

表 3-10 重叠 PCR 的反应条件

Table 3-10 The first step reaction condition of overlap PCR

Temperature	Time
37°C	15min
50°C	8min
52°C	8min
54°C	8min
58°C	8min
60°C	8min
25°C	1min

3.2.18.6 CaCl₂处理法制备感受态

(1) 菌种复苏: 取-80°C保存的 DH5 α 菌种划线接种于 LA 平皿上, 做好标记, 于 37°C温箱培养过夜。挑取单菌落接种于 1 mL LB 液体培养基中, 置于 37°C摇床中, 200 r/min 震荡培养 10 h;

(2) 菌液扩大培养: 次日将活化的菌液按 1:1000 转接到 50 mL LB 培养基中, 置于 37°C摇床, 160 r/min 震荡培养 4 h;

(3) 当 OD_{600nm}≈0.5 时, 取出培养物, 冰上静置 30 min;

(4) 4°C条件下, 5000 r/min 离心 10 min, 在无菌超净台中弃去上清, 收集菌体, 将管倒置于干滤纸上 1 min, 吸干残留的培养液, 加入 25~30 mL 预冷的 0.1 mol/L CaCl₂ 重悬菌体, 冰浴 15 min;

(5) 4°C条件下, 5000 r/min 离心 10 min, 超净台中弃去上清, 收集菌体, 加入 1 mL 预冷的含有 15%甘油的 0.1 mol/L CaCl₂, 轻轻吹散, 重悬菌体, 冰浴 10 min;

(6) 取感受态细胞悬 100 μL 每管分装于 1.5 mL 预冷的灭菌离心管中, 保存于-80°C冰箱中。

3.2.18.7 融合产物的转化

融合 PCR 结束后取 10 μL 产物直接转化至 DH5α 感受态细胞中。转化步骤如下:

(1) 取出在-80°C冰箱中保存的感受态细胞, 置于冰上解冻;

(2) 待感受态细胞解冻后, 无菌环境下取 10 μL 融合 PCR 产物加入装有感受态细胞的离心管中, 轻轻吹打, 冰上静置 30 min;

(3) 静置结束后, 将感受态在 42°C水浴锅中热激 90 s, 热激结束后将离心管迅速置于冰上冷却 2 min, 每管加 1 mL LB 培养基, 置于 37°C摇床, 160 r/min 复苏 1 h;

(4) 将复苏后的菌液取 200 μL 或者 5000 r/min 离心 5 min 后弃去培养基至仅剩 200 μL, 涂布含有四环素的 LA 琼脂平皿中。待平皿表面无明显液滴后, 将平皿倒置于 37°C恒温培养箱中培养过夜。

3.2.18.8 质粒转化子的 PCR 鉴定

在无菌环境下挑取转化子到含菌体, 无菌取出 3 μL 到外开的 PCR 管中用作鉴定 PCR 的模板, 其余的补上 1 mL 对应抗性的 LB 培养基, 置于 37°C恒温振荡器中摇菌。使用引物 pET-28a-JD-F、pET-28a-JD-R 进行 PCR 扩增鉴定。反应体系如表 3-11 所示, 反应条件如表 3-12 所示。

表 3-11 鉴定 PCR 反应体系

Table 3-11 The reaction system of identification PCR

System composition	Reagent dosage
10×Easy Taq Buffer	2.5μL
dNTP Mixture (2.5 mmol/L each)	1μL
Forward Primer (10 μmol/L)	1.5μL
Reverse Primer (10 μmol/L)	1.5μL
Template	2μL
Easy Taq DNA PoLymerase (5U /μL)	0.5μL
ddH2O	up to 25μL

表 3-12 鉴定 PCR 的反应条件

Table 3-12 The reaction conditions of identification PCR

Temperature	Time	Cycles
98°C	10min	} 32
95°C	30sec	
59°C	30sec	
72°C	30sec/kb	
72°C	10min	
25°C	1min	

若鉴定的转化子疑似正确，则将对应的内开离心管中的菌液取出 200 μL 送测序。

3.2.18.9 质粒提取

将鉴定正确的单菌落转接，过夜摇菌提取质粒

(1) 柱平衡步骤：向吸附柱 CP3 中（吸附柱放入收集管中）加入 500 μL 的平衡液 BL，12,000 r/min 离心 1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中；

(2) 取 1 mL~5 mL 过夜培养的菌液，加入离心管中，常温离心 12000 r/min 离心 1 min，尽量吸除上清（菌液较多时可以通过多次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中）；

(3) 向留有菌体沉淀的离心管中加入 250 μL 溶液 P1, 使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌沉淀注意如果有未彻底混匀的菌块, 会影响裂解, 导致提取量和纯度偏低;

(4) 向离心管中加入 250 μL 溶液 P2, 温和地上下翻转 6~8 次使菌体充分裂解;

(5) 向离心管中加入 350 μL 溶液 P3 立即温和地上下翻转 6~8 次, 充分混匀, 此时将出现白色絮状沉淀。12000 r/min 离心 10 min;

(6) 将上一步收集的上清液用移液器转移到吸附柱 CP3 中(吸附柱放入收集管中), 尽量不要吸出沉淀。12000 r/min 离心 30 s, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱 CP3 放入收集管中;

(7) 向吸附柱 CP3 中加入 600 μL 含无水乙醇的漂洗液 PW, 12000 r/min 离心 30s, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱 CP3 放入收集管中;

(8) 重复操作步骤 8;

(9) 将吸附柱 CP3 放入收集管中, 12000 r/min 离心 2 min, 目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除。然后将吸附柱 CP3 开盖, 置于室温放置数分钟, 以彻底晾干残余的漂洗液;

(10) 将吸附柱 CP3 置于个干净的离心管中, 向吸附膜的中间部位滴加 100 μL 洗脱缓冲液 EB, 室温放置 2 min, 12000 r/min 离心 2 min, 将质粒溶液收集到离心管中。

3.2.18.10 Western Blot 验证

将上述提取的质粒转化至 Rosetta 感受态中, 次日挑取单菌落摇菌并扩大菌液体积进行蛋白表达。表达后的各抗原菌液超声破碎后, 收集上清与各杂交瘤细胞株上清进行 Western Blot 验证, 方法如下:

(1) 取重组 pET-28a-CPIV-N、pET-28a-CPIV-F、pET-28a-CPIV-H 蛋白各 80 μL , 每管中加入 20 μL 5 \times SDS Loding Bufer, 将充分混匀后的样品在沸水水中煮沸 15 min, 之后再加 10 μL 10%DTT, 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 12000 r/min 离心 2 min。将处理好的样品加入提前组装好的凝胶加样孔中, 样品量为 10 μL /孔, 进行 SDS-PAGE 电泳, 先 80 V 电泳 30 min, 后调至 120 V 电泳 1 h, 结束电泳, 关闭

电源；

(2) 将玻璃板上的凝胶小心剥离，参照剥离凝胶的大小，裁剪相同大小的 NC 膜和滤纸，裁剪完后用缓冲液将 NC 膜和滤纸进行充分浸润，取出夹子，按照蛋白胶在负极，NC 膜在正极的规则，将滤纸凝胶 NC 膜组装成三明治的结构，组装完后进行挤压以防气泡而导致实验不成功。将组装好的结构浸润在缓冲液中，打开电源开关，调整电压为 100V，时间为 1 h。实验结束后，将 NC 膜浸润于 5%BSA 中孵育 1 h。一抗选用阳性杂交瘤上清，对照组为 SP2/0 细胞上清，室温孵育 1 h，反应结束后，将 NC 膜浸没于盛有 TBST 的容器中于摇床进行振荡洗涤，洗涤 5 次，每次 3 min，选用 HRP 标记的 IgG 抗体，按 1:5000 进行稀释，恒温振荡孵育 1 h。反应结束后，将 NC 膜浸没于盛有 TBST 的容器中于摇床进行振荡洗涤，洗涤 5 次，每次 3 min 完成后，轻轻拭干 NC 膜上残留液体，将其置于超灵敏化学发光成像系统内，将配制好的化学发光底物显色液均匀涂布于 NC 膜表面，然后对其进行拍照保存。

3.2.19 腹水的制备

选取健康状况良好的 8~10 周龄雌性 BALB/c 小鼠，将腹水制备佐剂以 0.5 mL/只的量进行腹腔注射；10 d 后，将计数好的杂交瘤细胞注射入小鼠腹腔（ 1×10^5 个/只），注意小鼠腹部变化，待小鼠腹部膨大（大约 10 d）后，采集腹水，1000 r/min 离心 10 min（离心红细胞及其他杂质），吸取离心后上清（避免吸到油脂）12000 r/min 离心 10 min，吸取上清，加入石英砂后在旋转混合仪上过夜孵育进行除脂，12000 r/min 离心 10 min，吸取上清， -80°C 保存备用。

3.2.20 腹水效价的测定

用间接 ELISA 方法检测小鼠腹水抗体效价，操作程序为：以浓缩的 CPIV 作为包被抗原，将小鼠腹水作为一抗，从 1:100 开始依次 10 倍比稀释至 1:10⁹，以 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗。同时 SP2/0 骨髓瘤细胞上清液作为阴性对照，检测单抗腹水的最大效价。效价达 10⁵ 以上进行纯化。

3.2.21 腹水的纯化

3.2.21.1 辛酸-硫酸铵法初步纯化

- (1) 采集的腹水加入 4 倍体积的乙酸钠缓冲溶液 (pH4.8);
- (2) 室温条件下, 逐滴加入辛酸并搅拌 (每毫升腹水加入 33 μ L 辛酸), 加入时注意, 待前一滴完全溶解后再加入另一滴。加入辛酸后搅拌 30 min, 4 $^{\circ}$ C 静置 2 h 以上使其充分沉淀;
- (3) 在 4 $^{\circ}$ C 条件下, 12000 r/min 离心 30 min, 吸取上清;
- (4) 上清液用 0.22 μ m 滤膜过滤进行过滤, 加入 0.1 倍体积的 10 \times PBS (0.1 mol pH7.4), 用 2 M NaOH 调 pH 值至 7.4。上述混合液中加入等体积的饱和硫酸铵溶液, 在冰上操作, 逐滴缓慢加入并搅拌 30 min;
- (5) 静置 2 h, 在 4 $^{\circ}$ C 条件, 12000 r/min 离心 30 min, 弃上清。用 100 mM Tris 盐酸缓冲溶液重悬沉淀, 用 50~100 倍体积的缓冲液透析, 4 $^{\circ}$ C 透析过夜, 每隔 12 h 换液一次;
- (6) 4 $^{\circ}$ C 条件下, 12000 r/min 离心 30 min, 吸取上清。

3.2.21.2 Protein G 柱再次纯化

- (1) 结合缓冲液流过柱子, 在流液状态下装柱子;
- (2) 5 倍柱体积的结合缓冲液平衡柱子, 1 mL/min.;
- (3) 按照 5 mg~10 mg/mL 柱子的载量来准备样品, 调节样品的流速至 1 mL/min, 样品自循环排气;
- (4) 打开上样阀, 开始上样, 循环上样 30 min~60 min, 样品冰浴;
- (5) 用 5 倍柱体积的结合缓冲液洗涤柱子, 1 mL/min。收集峰值时流出的杂蛋白;
- (6) 用 5 倍柱体积的洗脱缓冲液进行洗脱, 1 mL/min, 峰值时流出液用含 60 μ L 中和缓冲液的 EP 管接收。每支 1 mL 左右;
- (7) 洗脱完毕, 立即用 10 倍柱体积的结合缓冲液平衡柱子, 再用 20%的乙醇浸泡, 4 $^{\circ}$ C 过夜保存。

3.2.22 纯化后单克隆抗体的检验

使用蛋白含量测定试剂盒按照说明书测定纯化后单抗的蛋白含量。采用 SDS-PAGE 检验纯化后单抗的纯度：每株单抗分别取 40 μL 样品，加入 10 μL 5 \times SDS-PAGE Loading Buffer，混匀后煮沸 10 min，冰浴 5 min，5000 r/min 离心 5 min。将处理后蛋白样品点样 10 μL 于蛋白胶孔，并点样 5 μL 蛋白 Marker 于相邻孔道，上层浓缩胶于 80V 电压下电泳 30 min，而后调整电压到 120 V，于分离胶电泳 60 min。待电泳结束，小心剥离凝胶，加入考马斯亮蓝 R-250 染色液(完全浸没凝胶)，置于摇床上染色 1 h。染色结束后，将考马斯亮蓝 R-250 染色液回收，将凝胶浸泡在考马斯亮蓝脱色液中，置于摇床上，每隔 30 min 换一次脱色液直至脱色完全。最后将凝胶放于凝胶成像系统观察并照相保存结果。

将蛋白含量较高纯度较好的单抗混合后进行透析脱盐。透析后单抗分装保存备用。

3.2.23 基于单克隆抗体的 CPIV 胶体金检测方法的建立

3.2.23.1 胶体金纳米粒子制备

取 100 mL 超纯水中加入预先配制的 1.0 mL 1% 氯金酸溶液，于磁力加热搅拌器上加热至沸腾，迅速向其中加入 1% 柠檬酸三钠溶液（现配现用）1.2 mL，并充分混匀，继续加热沸腾 10 min。冷却至室温后，加入超纯水定容至 100 mL。冷却至室温后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。用肉眼观察法、紫外-可见光分光光度计扫描法对胶体金颗粒进行鉴定。

3.2.23.2 金标抗体和检测抗体的选择

将克隆号 4E3 和 1B12 的单克隆抗体分别作为金标记抗体和检测抗体按常规条件制备试纸条，用 CPIV 病毒液进行检测，观察不同克隆号单克隆抗体分别作为金标记抗体和检测抗体的检测结果。

3.2.23.3 最佳金标 pH 摸索

- (1) 取 5 mL EP 管，每管加入 3 mL 胶体金溶液；
- (2) 分别加入体积为 0、3、15、27、39、51 μL 的 0.2 M K_2CO_3 溶液；
- (3) 分别加入 90 μg 单克隆抗体 4E3，颠倒混匀，室温静置 30 min，使用紫外-可见分光光度计进行扫描，选取出现最大吸收峰时对应的胶体金 pH 值为最佳标记 pH 值。该 pH 值对应的 0.2 M K_2CO_3 溶液添加体积为最佳添加体积。

3.2.23.4 最佳标记蛋白量摸索

- (1) 取 5 mL EP 管，每管加入 2 mL 胶体金溶液；
- (2) 用 0.2 M K_2CO_3 溶液调节胶体金 pH 为最佳标记 pH 值；
- (3) 分别加入 1 mg/mL 不同体积的单克隆抗体使之浓度为 0、2、4、6、8、10、12、14、16 μg 单抗/mL 胶体金，颠倒混匀，室温静置 15 min；
- (4) 每管再加入 200 μL 10% NaCl 溶液，混匀并室温下静置 15 min；
- (5) 眼观胶体金溶液颜色变化并使用紫外-可见分光光度计进行扫描，依据胶体金溶液由蓝变红时的单克隆抗体量再加 20%，并选取出现最大吸收峰时对应的抗体量，即为抗犬副流感病毒单克隆抗体的最佳标记量；

表 3-13 单克隆抗体最佳标记量的确定

Table 3-13 Determination of optimal labeling amount of monoclonal antibody

编号 项目	1	2	3	4	5	6	7	8	9
胶体金体积 (mL)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
单抗用量 (μL)	0	4	8	12	16	20	24	28	32
10%NaCl 用量 (mL)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

3.2.23.5 金标抗犬副流感病毒单克隆抗体的制备

将胶体金溶液用 0.2 M 碳酸钾溶液调至最佳 pH 值，混匀 20 min~30 min。将单克隆抗体按最佳标记量加入到胶体金溶液中，混匀 30 min。加入 BSA 至终浓度为 1%，搅拌 30 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 8500 r/min 离心 40 min，收集沉淀。加入金标保

存液复溶至原体积，再以 4°C 9000 r/min 离心 40 min，收集沉淀。沉淀用 1/10 初始胶体金体积的金标保存液重悬，即为金标记抗体。使用紫外-可见光分光光度计在 400 nm~600 nm 范围内进行扫描，测定最大吸收波长和吸光值，获得胶体金标记抗体的吸收光谱。当单克隆抗体结合到胶体金颗粒表面后，会使得胶体金颗粒增大，扫描图谱的最大吸收峰发生红移，吸收峰峰宽增加，吸收 OD 值变大。即证明单克隆抗体成功标记到胶体金颗粒表面。

3.2.23.6 试纸条的组装与制备：

(1) 处理金标垫和样品垫，配制金标垫和样品垫处理液，完全浸泡裁剪好垫子 30 min，于 37°C 烘箱中过夜干燥；

(2) 将金标抗 CPIV 单抗涂布于金标垫处理液处理过的金标垫上，干燥 3~7 h；

(3) 试纸条划线，将 1B12、4E3 和羊抗鼠抗体稀释成合适浓度，上样清洗后的 BIODOT 划线机，修改机器参数，检测线设置 $y=19.5$ mm，质控线设置 $y=14.5$ mm，两线间隔 5 mm，划线完成后于 37°C 烘箱烘干 20 min；

(4) 组装试纸条，将样品垫、金标垫、NC 膜、吸水纸依次裁剪为合适宽度，并依次粘贴到 PVC 底板上，每个原件重叠 1 mm 左右，保证样本液体流动。试纸条切条，使用切条机，将系统参数中试纸条宽度设置为 4 mm；

(5) 试纸条组装，将切割好的试纸条按照正确方向装于塑料卡套中，用于进行下一步实验。

3.2.23.7 反应时间优化

制备试纸条，金标探针添加量为最佳添加体积。用所制备的试纸条检测同一个阳性样品，点样后观察 10 min、15 min、20 min、25 min，选择 T 线、C 线条带强度趋于稳定的最佳时间点为反应终点。

3.2.23.8 试纸条敏感性检验

用 PBS 溶液稀释病毒含量为 $10^{4.67}$ TCID₅₀/mL 的 CPIV 病毒液样品，按 1:5、1:10、1:20、1:40、1:80、1:160、1:2560 进行倍比稀释，每个样品取 100 μ L 用同

一批试纸条进行检测，判定试纸条的最低检测限。

3.2.23.9 试纸条特异性检验

用同一批试纸条，分别检测犬常见病毒 CPV、CDV、CPIV、CAV-2、PBS 以及他们的混合物和阴性临床样品，检测胶体金试纸条特异性。

3.2.23.10 试纸条稳定性检验

试纸条于 37°C 保存，进行加速老化试验。分别在 0 d、10 d、20 d、30 d、40 d、50 d、60 d 用制备的试纸条检测同一份阳性和阴性样品，进行试纸条稳定性分析。

3.2.23.11 商品化同类产品比较试验

将病毒含量为 $10^{4.67}$ TCID₅₀/mL 的 CPIV 病毒液阳性样品进行 1:5、1:10、1:100、1:1000、1:2000、1:4000 稀释。购买具有国家正式批准文号的市面上某犬副流感病毒胶体金检测试纸条，与自研胶体金试纸条同时检测倍比稀释后的样品，比较检测结果。

3.2.23.12 临床样品符合率检测

采集 46 份犬的眼、鼻拭子，样本大多无明显症状，个别有泪痕、鼻涕症状。用自研试纸条检测 46 份犬眼、鼻分泌物拭子，记录样品检测结果，与 RT-PCR 检测结果进行比较，计算符合率。

表 3-14 临床样品符合率检测

Table 3-14 Coincidence detection of clinical samples

		比对方法		总计
		阳性	阴性	
诊断	阳性	a (真阳性)	b (假阳性)	a+b
试验	阴性	c (假阴性)	d (真阴性)	c+d
	总计	a+c	b+d	a+b+c+d

4 结果与分析

4.1 CPIV 单克隆抗体的制备

4.1.1 犬副流感病毒的 TCID₅₀ 的测定及病毒扩增、浓缩

事先将 MDCK 细胞铺进 96 孔细胞培养板，当细胞长至 80% 时接种 1:10 依次十倍比稀释直至 1:10⁸ 的 CPIV 病毒液，并设置未接毒的空白细胞对照。每日观察细胞病变情况直到细胞不再出现病变时，观察每个稀释度的细胞病变孔数，根据 Reed-Muench 法测得 CPIV 原液 TCID₅₀ 为 10^{4.67}/mL。

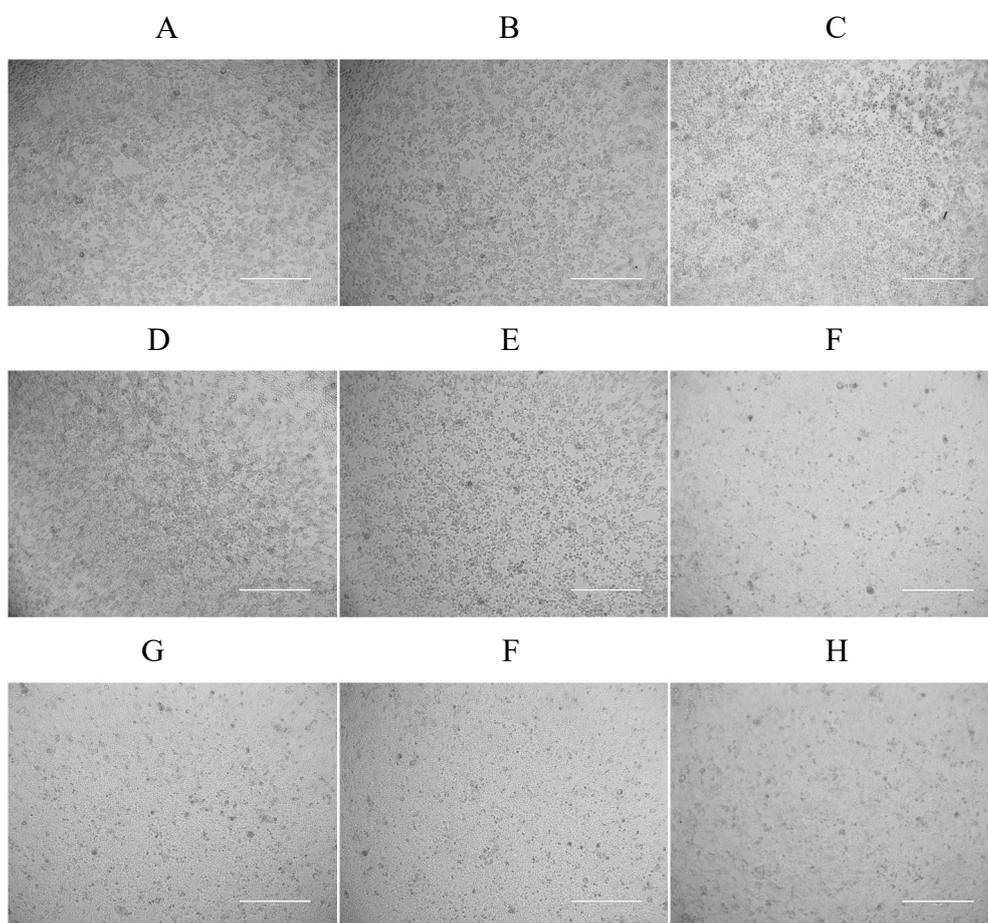


图 4-1 CPIV 接种 MDCK 后的 TCID₅₀ 测定

A~G: 分别接种 1:10、1:10²、1:10³、1:10⁴、1:10⁵、1:10⁶、1:10⁷、1:10⁸ 稀释的 CPIV 的 MDCK 细胞 H: MDCK 细胞

Fig.4-1 TCID₅₀ determination of CPIV after inoculation with MDCK

MDCK cells were seeded 1:10, 1:10², 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵, 1:10⁶, 1:10⁷, and 1:10⁸ diluted with CPIV H:MDCK cells

4.1.2 间接 ELISA 检测方法的建立

为了确定融合后阳性杂交瘤细胞的抗原筛选条件,利用 CPIV 超离病毒液建立间接 ELISA 方法。第三次免疫后进行尾尖采血, CPIV 浓缩病毒液最佳包被浓度,以 CPIV 超离病毒液为正向筛选, MDCK 细胞为 CPIV 的感染细胞,故选择 MDCK 细胞裂解液为负向筛选。 $P/N=(\text{CPIV 超离病毒液 OD}/\text{MDCK 细胞裂解液 OD})$,取 P/N 值最大所对应的蛋白浓度作为后续测定效价的抗原包被浓度。根据表 4-1 可以看出, CPIV 超离病毒液稀释度在 1:200、MDCK 细胞裂解液稀释度在 1:20 时, P/N 值最高,故 CPIV 超离病毒液包被浓度为 1:200, MDCK 细胞裂解液包被浓度为 1:20 作为间接 ELISA 最佳工作条件。

表 4-1 抗原最佳工作浓度方阵滴定结果

Table 4-1 The results of square matrix titration of optimal working concentration

血清稀释度		1:2×10 ³	1:4×10 ³	1:8×10 ³	1:16×10 ³	1:32×10 ³	1:64×10 ³	1:128×10 ³	1:256×10 ³	空白血清
	CPIV	2.86	2.911	2.872	2.492	1.797	1.075	0.63	0.38	0.113
1:100	MDCK	1.33	0.87	0.547	0.328	0.198	0.136	0.107	0.097	0.088
	P/N	2.150	3.346	5.250	7.598	8.076	7.904	5.888	3.918	-
	CPIV	2.871	2.918	2.79	2.436	1.687	1.042	0.601	0.365	0.099
1:200	MDCK	1.284	0.791	0.534	0.293	0.186	0.135	0.103	0.08	0.095
	P/N	2.236	3.689	5.225	8.314	9.070	7.719	5.835	4.563	-
	CPIV	2.857	2.815	2.591	2.053	1.375	0.826	0.477	0.27	0.082
1:400	MDCK	1.043	0.68	0.424	0.26	0.164	0.112	0.09	0.076	0.086
	P/N	2.739	4.140	6.111	7.896	8.384	7.375	5.300	3.553	-
	CPIV	2.703	2.441	1.973	1.409	0.895	0.508	0.287	0.177	0.074
1:800	MDCK	0.889	0.594	0.383	0.241	0.151	0.114	0.083	0.069	0.097
	P/N	3.040	4.109	5.151	5.846	5.927	4.456	3.458	2.565	-
	CPIV	2.081	1.725	1.315	0.877	0.552	0.308	0.187	0.122	0.067
1:1600	MDCK	0.6	0.398	0.268	0.181	0.13	0.105	0.08	0.068	0.162
	P/N	3.468	4.334	4.907	4.845	4.246	2.933	2.338	1.794	-

4.1.3 病毒感染后间接 ELISA 与细胞中和实验测定免疫鼠血清抗体水平

通过间接 ELISA 与中和试验同时检测小鼠血清抗体水平，从图 4-2 可以看出，3 只小鼠中 1 号鼠血清抗体效价最高，为 1:10240；因此检测 1 号小鼠的血清中和抗体水平，对照组均成立的情况下，免疫鼠血清中和抗体水平达到 1:10000 可以进行细胞融合。

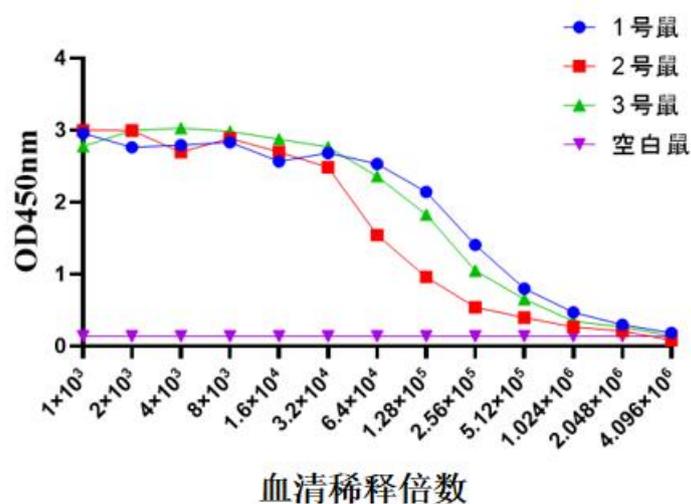


图 4-2 间接 ELISA 试验测定免疫鼠血清抗体水平

Fig.4-2 Serum antibody levels were measured by indirect ELISA

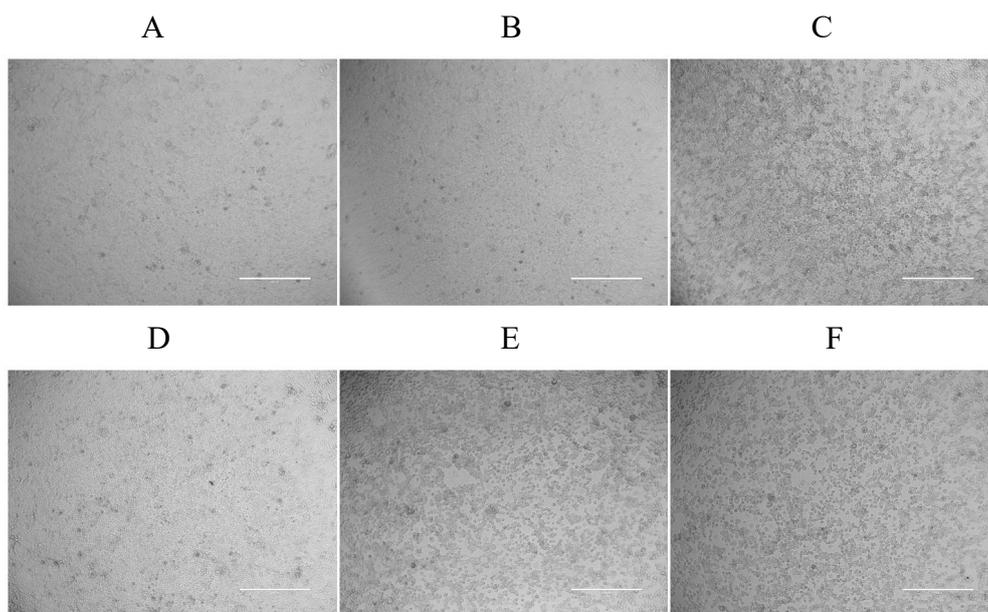


图 4-3 病毒感染后细胞中和实验测定免疫鼠血清中和抗体水平

A~C: 分别接种 1:1000、1:10000、1:100000 稀释的免疫鼠血清与 CPIV 的 MDCK 细胞
 D: MDCK 细胞 E: 接种 CPIV 的 MDCK 细胞 F: 接种 CPIV 与空白鼠血清的 MDCK 细胞

Fig. 4-3 The level of antibody in serum of immunized mice was detected by cell neutralization test after virus infection

A~C: MDCK cells were inoculated with 1:1000, 1:1000 and 1:10000 diluted serum of immunized mice and CPIV respectively D: MDCK cells E: MDCK cells inoculated with CPIV F: MDCK cells inoculated with CPIV and blank mouse serum

4.1.4 细胞融合后阳性杂交瘤细胞的筛选与亚克隆

免疫脾细胞和 SP2/0 骨髓瘤细胞进行细胞融合后 10 d, 于显微镜下观察杂交瘤细胞生长情况。若细胞状态良好, 且未融合的脾细胞和瘤细胞已经凋亡, 则可以更换 HT 培养基。换液后 1 d, 对有杂交瘤细胞生长的细胞孔计数。待杂交瘤细胞长至 1/4 培养孔面积时对其筛选, 同时统计细胞融合率和阳性率。结果表明 86% 的细胞孔内有杂交瘤细胞生长; 对有杂交瘤细胞的细胞孔进行检测, 阳性检出率为 1%, 用有限稀释法对阳性杂交瘤细胞亚克隆、扩大及冻存, 经过三轮亚克隆后成功筛选出 3 株, 分别命名为 1B12、4E3、5F3。

表 4-2 细胞融合后阳性单克隆细胞筛选结果

Table 4-2 Screening results of positive monoclonal cells after cells fusion

细胞板	融合孔数 (个)	融合率 (%)	阳性孔数 (个)	阳性率 (%)
1	83	86	70	84
2	89	92	74	83
3	80	83	63	79
4	79	82	58	73
5	85	88	65	76
6	90	98	83	92

4.1.5 杂交瘤细胞染色体数目鉴定

对数生长期的杂交瘤细胞经秋水仙素处理, 吉姆萨染液进行染色, 置于显微镜下仔细观察染色体数目。结果见图 4-4, 杂交瘤细胞染色体数目分别为 1B12: 76 ± 5 条, 4E3 为 84 ± 5 条, 5F3 为 66 ± 5 条。而单一 SP2/0 骨髓瘤细胞染色体数目为 62 条, 脾细胞的染色体数目为 40 条。筛选到的杂交瘤细胞染色体数介于骨髓瘤细胞和脾细胞融合染色体数之间, 说明所得的杂交瘤细胞是骨髓瘤细胞和脾细胞的融合产物。

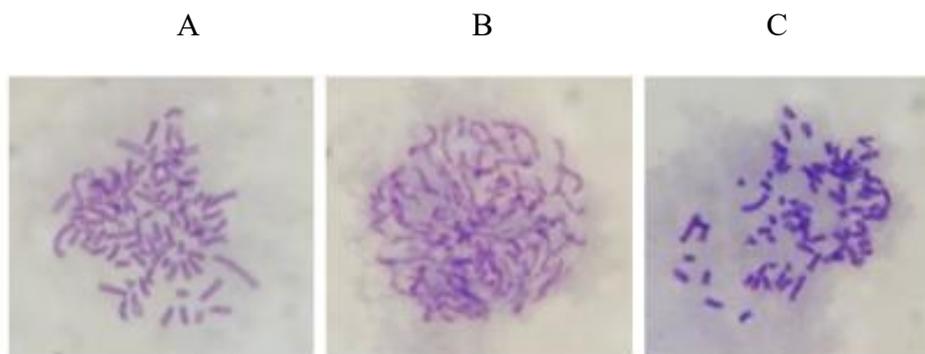


图 4-4 杂交瘤细胞染色体数目鉴定

A:1B12 B:4E3 C:5F3

Fig.4-4 Identification of chromosome number in hybridoma cells

A:1B12 B:4E3 C:5F3

4.1.6 阳性单克隆抗体亚类鉴定

使用亚类鉴定试剂盒对筛选到的 3 株阳性杂交瘤细胞进行鉴定，结果见表：1B12、5F3 重链为 IgG1，4E3 重链为 IgG2a；3 株杂交瘤细胞轻链均为 Kappa。

表 4-3 3 株阳性单克隆细胞的亚类鉴定结果

Table 4-3 Subclass identification results of three positive monoclonal cells

	IgA	IgM	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	Kappa	Lambda	Ig
1B12	0.156	0.157	2.766	0.164	0.166	0.186	0.577	0.127	2.608
4E3	0.242	0.203	0.45	2.756	0.187	0.143	0.877	0.213	2.417
5F3	0.156	0.138	2.811	0.21	0.129	0.186	0.57	0.125	2.613

4.1.7 单克隆抗体反应性验证

采用间接免疫荧光法，一抗分别用 3 株单克隆抗体培养上清，同时用免疫鼠血清作为阳性对照，空白鼠血清作为阴性对照，PBS 作为二抗对照，通过荧光二抗观察单克隆抗体与感染 CPIV 的 MDCK 细胞反应性。从图 4-5 可以看出，免疫鼠血清阳性对照与 3 株单抗均能与 CPIV 反应，板孔内出现特异性绿色荧光，空白鼠血清对照与 PBS 对照组则无特异性绿色荧光出现，说明制备的 3 株单抗与 CPIV 有较好的反应性。

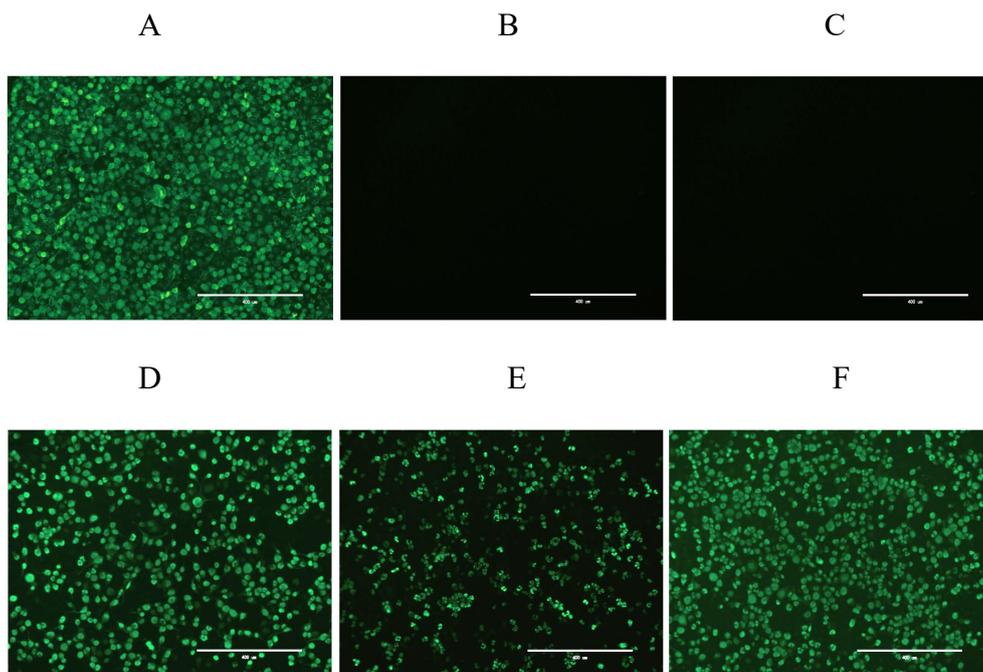


图 4-5 间接免疫荧光试验验证 3 株单克隆抗体对感染 CPIV 的 MDCK 细胞反应性

A:免疫鼠血清 B:空白鼠血清 C: PBS D:1B12 E:4E3 F:5F3

Fig.4-5 Indirect immunofluorescence assay was used to verify the reactivity of three monoclonal antibodies against CPIV-infected MDCK cells

A:Immune mouse serum B:Blank rat serum C: PBS D:1B12 E:4E3 F:5F3

4.1.8 单克隆抗体反应特异性验证

将实验室保存的 CPIV、CAV、CDV、CPV 分别包被酶标板，以 3 株单克隆抗体上清作为一抗进行常规 ELISA 试验。结果如表 4-4 所示，3 株单抗与 CPIV 的 OD_{450nm} 读值分别为 2.455、2.877、2.497，与 CAV、CDV、CPV 的 OD_{450nm} 读值均在 0.5 以下，说明筛选到的 3 株单抗特异性均良好。

表 4-4 间接 ELISA 试验验证 3 株单克隆抗体的特异性

Table 4-4 Indirect ELISA was used to verify the specificity of the three monoclonal antibodies

单抗名称	1B12	4E3	5F3
CPIV	2.455	2.877	2.497
CAV	0.332	0.303	0.215
CDV	0.289	0.329	0.193
CPV	0.225	0.259	0.414

4.1.9 单克隆抗体杂交瘤细胞上清抗体效价测定

将 3 株单抗的细胞培养上清从 1:100 开始 2 倍比稀释至 1:6400，应用间接 ELISA 进行效价测定。结果见图 4-6，1B12 与 4E3 细胞上清效价为 1:3200，5F3 为 1:1600。说明 3 株杂交瘤细胞生产特异性抗体能力较强。

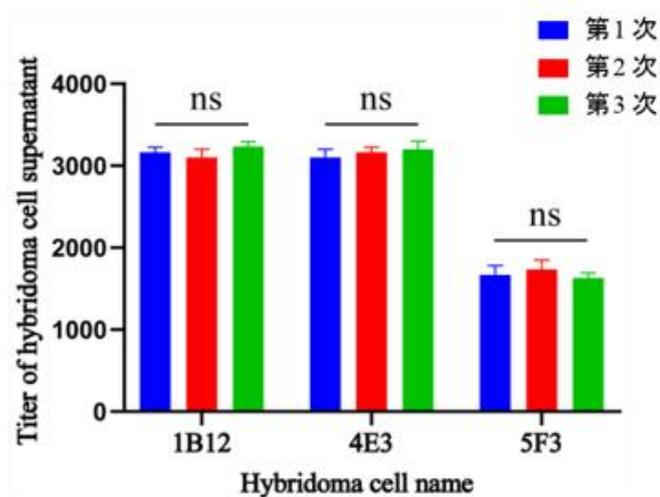


图 4-6 间接 ELISA 测定单克隆抗体杂交瘤细胞培养上清抗体效价

Fig.4-6 Indirect ELISA was used to determine the antibody titer of hybridoma cell culture supernatant

4.1.10 测定单克隆抗体 4E3 的中和抗体效价

将中和抗体 4E3 的杂交瘤细胞上清从 1:50、1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600 稀释，与 100 TCID₅₀/0.1mL 的 CPIV 病毒液混合接种于长满单层的 MDCK 细胞，同时做好病毒对照、空白细胞对照、SP2/0 培养上清对照，72 h 观察最终

结果。如图 4-7 所示，当杂交瘤细胞株 4E3 的细胞培养上清稀释至 1:400 时，4E3 可以完全中和 CPIV，当 4E3 的细胞培养上清稀释至 1:800 时，4E3 的中和抗体可以中和 30%~50% 的 CPIV。

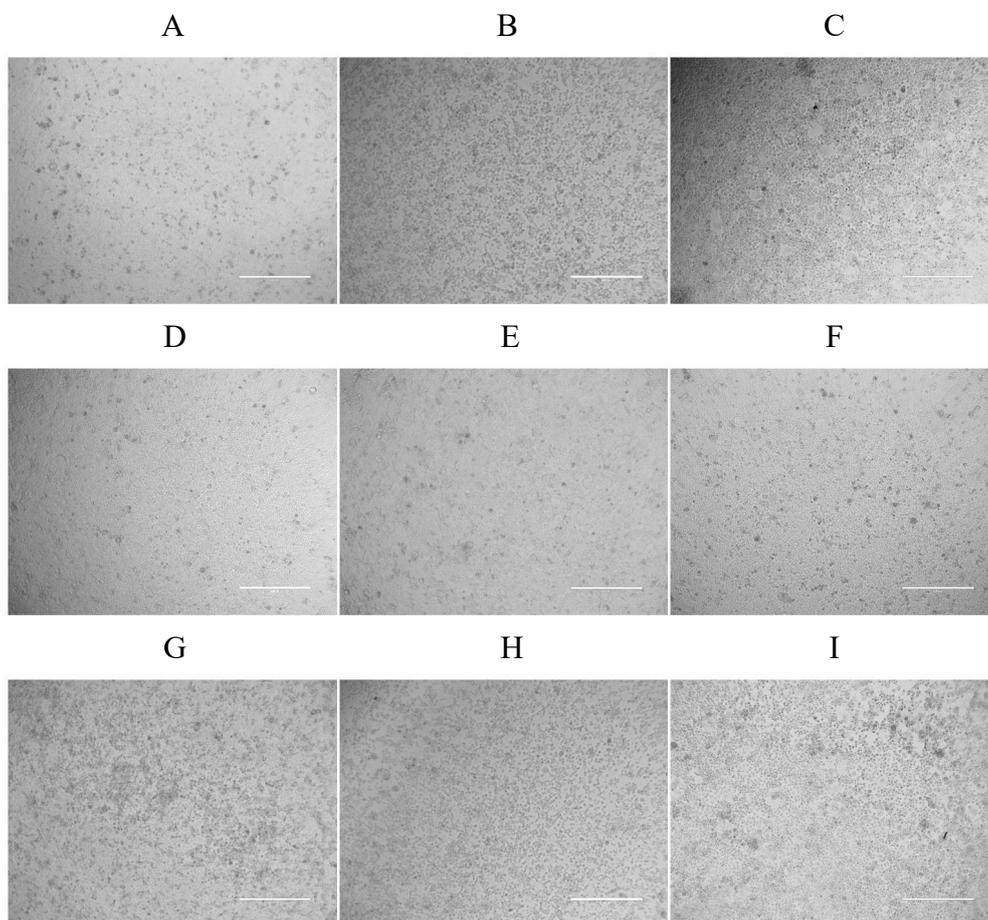


图 4-7 通过病毒感染后的细胞中和试验测定 4E3 的中和抗体效价

A: MDCK 细胞 B: 接种 CPIV 的 MDCK 细胞 C: 接种 CPIV 与 SP2/0 的 MDCK 细胞
D~I: 分别接种 1:50、1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600 稀释的 4E3 细胞培养上清与 CPIV 的 MDCK 细胞

Fig.4-7 Neutralizing antibody titers against 4E3 were determined by cell neutralization assay after virus infection

A: MDCK cells B: MDCK cells inoculated with CPIV C: MDCK cells inoculated with CPIV and SP2/0 D~I: MDCK cells inoculated with 4E3 cell culture supernatant diluted 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 and 1:1600 with CPIV, respectively

4.1.11 单克隆抗体靶标抗原鉴定

4.1.11.1 质粒构建

以 CPIV 病毒液反转后的 cDNA 为模板设计 HN、NP、F 三个基因对应的特异性引物，进行片段扩增，分别于 1524 bp、1077 bp、1590 bp 出现目的条带；之后分别与实验室保存的原核表达载体 pET-28a 进行融合转化，挑菌鉴定结果显示三个质粒序列正确，均构建成功。结果见图 4-8：

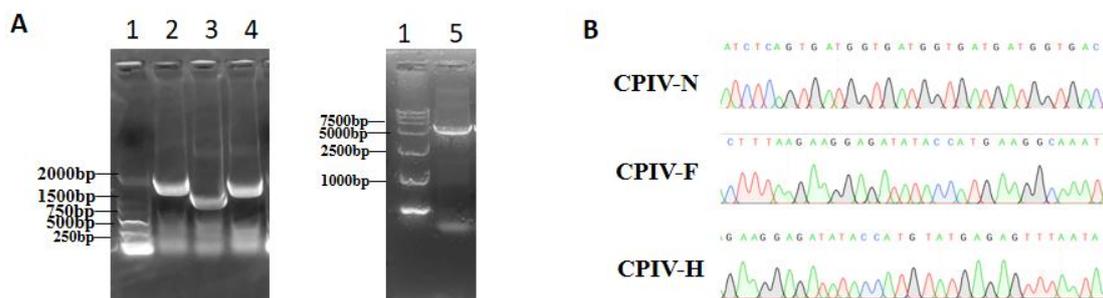


图 4-8 NP、F、HN 片段的扩增、pET-28a 载体的线性化及重组质粒测序结果

A: 基因、载体扩增结果 B: 重组质粒测序结果

1: Marker 2: CPIV-NP 3: CPIV-F 4: CPIV-HN 5: 线性化 pET-28a

Fig.4-8 Amplification of NP,F and HN fragments, linearization of pET-28a vector and sequencing of recombinant plasmids were performed

A:Results of gene and vector amplification B:Sequencing results of recombinant plasmids

1: Marker 2: CPIV-NP 3: CPIV-F 4: CPIV-HN 5:Linearization pET-28a

4.1.11.2 单克隆抗体的靶标抗原检测结果

将构建成功的质粒转入 Rosetta 感受态后进行蛋白表达.如图 4-9 所示，Western blot 试验表明，杂交瘤细胞株 1B12 和 5F3 分泌的单抗特异性识别重组 N 蛋白，分子量大小为 56KDa；4E3 为中和抗体，特异识别重组 F 蛋白，分子量大小为 38KDa。

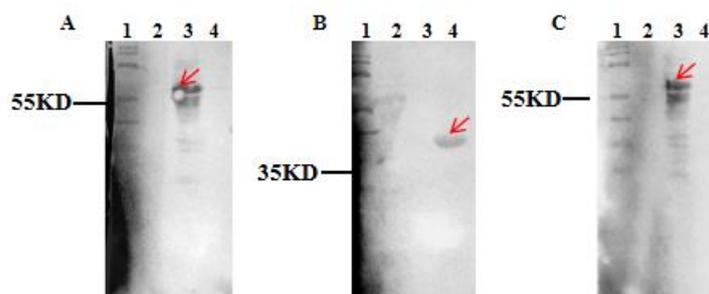


图 4-9 Western Blot 验证 3 株单克隆抗体针对 CPIV 靶标抗原结果

A:1B12 B:4E3 C:5F3 1:Marker 2:pET-28a-CPIV-H 3:pET-28a-CPIV-N
4:pET-28a-CPIV-F

Fig.4-9 The results of three monoclonal antibodies against CPIV target antigen were verified by Western Blot

A:1B12 B:4E3 C:5F3 1:Marker 2:pET-28a-CPIV-H 3:pET-28a-CPIV-N
4:pET-28a-CPIV-F

4.2 双抗体夹心胶体金试纸条检测方法的建立

4.2.1 单克隆抗体腹水效价测定

将 3 株单抗的腹水从 $1:10^2$ 稀释至 $1:10^8$ ，应用间接 ELISA 进行效价测定。结果见图 4-10，3 株单抗的效价在 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ 之间，其中 1B12 所产腹水效价为 1×10^5 ，4E3 为 1×10^6 ，5F3 为 1×10^4 。说明 3 株杂交瘤细胞生产特异性抗体能力较强。选取效价达 10^5 之上的腹水进行纯化。

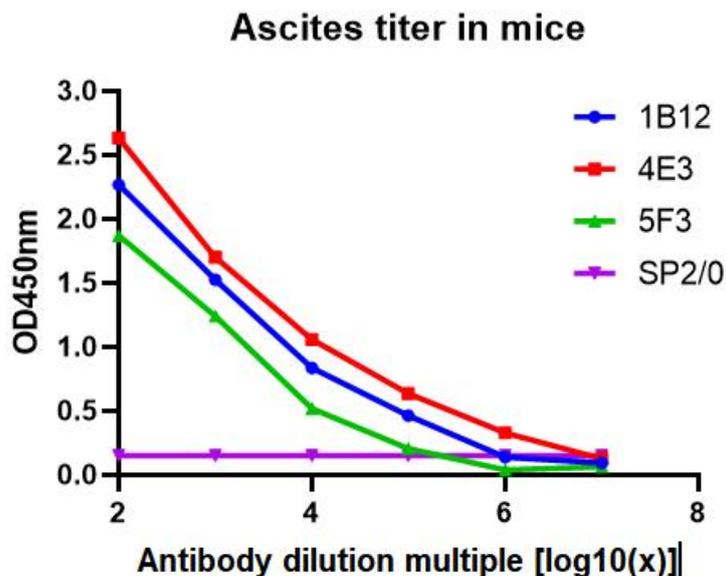


图 4-10 间接 ELISA 测定 3 株单克隆抗体的腹水效价

Fig.4-10 Indirect ELISA was used to determine the ascites titer of 3 monoclonal antibodies

4.2.2 腹水纯化

选取辛酸硫酸铵粗纯后抗体效价高的 2 株抗体 1B12 和 4E3 用 Protein G 柱进行再次纯化，纯化后抗体用 SDS-PAGE 鉴定，结果如图 4-11 所示，2 株单抗均在 55 KDa 左右出现重链，25 KDa 左右出现轻链，纯度达 95%以上。经蛋白含量测定试剂盒测定，1B12 单抗浓度为 1.28 mg/mL、4E3 单抗浓度为 2.27 mg/mL。

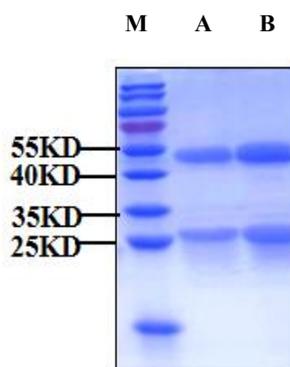


图 4-11 通过 Protein G 柱再纯化腹水结果

M: Marker A:1B12 B:4E3

Fig.4-11 Results of repurification of ascitic fluid by Protein G column

M: Marker A:1B12 B:4E3

4.2.3 胶体金纳米粒子的鉴定

通过柠檬酸钠还原法制备的胶体金溶液，肉眼观察澄清透明，呈紫红色，无漂浮物和沉淀。通过紫外-可见分光光度计对胶体金进行扫描，扫描图谱为单波峰，倒钟形，波峰较窄，最大吸收峰波长为522 nm，说明胶体金溶液质量较好。

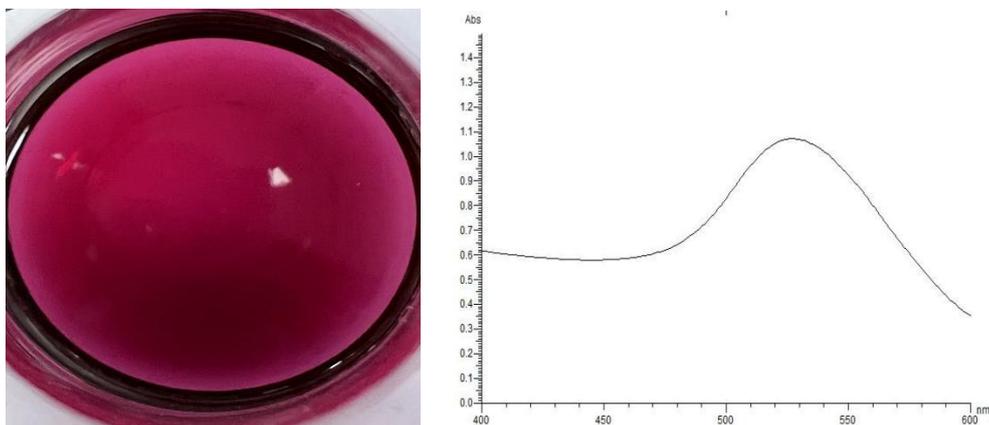


图 4-12 胶体金纳米粒子眼观和紫外吸收光谱图

Fig.4-12 Uv absorption spectra of colloidal gold nanoparticles and gold labeled probes

4.2.4 1B12 和 4E3 分别作为金标记抗体与检测抗体的选择

4E3作为金标记抗体，1B12作为检测抗体，检测CPIV ($10^{4.67}$ TCID₅₀/mL) 敏感性至1:1000，特异性良好，显色清晰明艳。1B12作为金标记抗体在样品垫与T线中间的胶体金垫处固定，4E3作为检测抗体于T线处固定，检测CPIV ($10^{4.67}$ TCID₅₀/mL)，敏感性虽至1:1000，但1:100和1:1000稀释度显色没有4E3作为金标记抗体在样品垫与T线中间的胶体金垫处固定，1B12作为检测抗体于T线处固定时体清晰明艳。为保证试纸条读取结果的准确性，本试纸条选择4E3作为金标记抗体在样品垫与T线中间的胶体金垫处固定，1B12作为检测抗体于T线处固定。

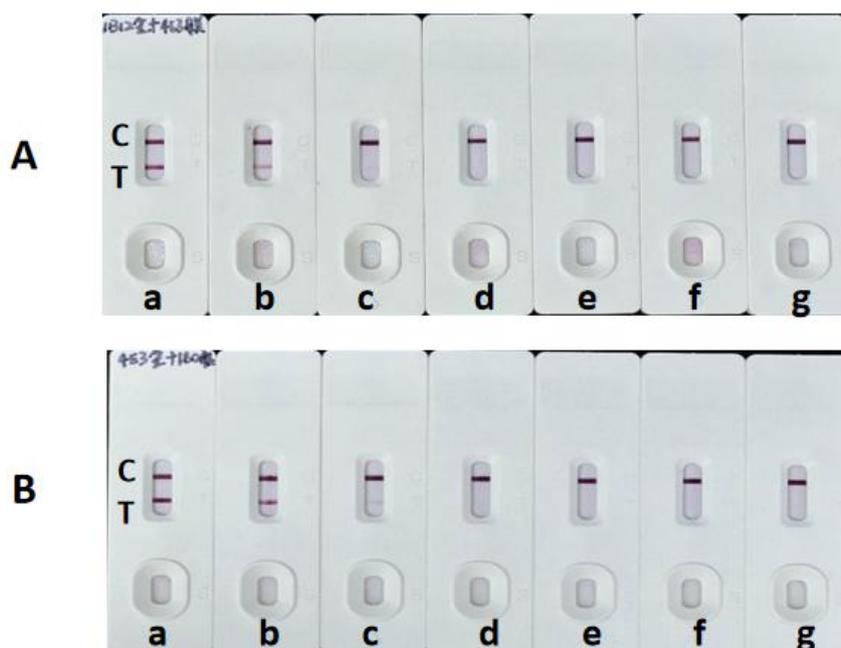


图 4-13 金标记抗体与检测抗体选择结果图

A: 1B12 为金标记抗体在胶体金垫固定, 4E3 为检测抗体在 T 线固定 B: 4E3 为金标记抗体, 1B12 为检测抗体

a:1:100 b:1:1000 c:1:10000 d:1:100000 e:1:1000000 f:10000000 g: 阴性对照

Fig.4-13 Uv absorption spectra of colloidal gold nanoparticles and gold labeled probes

A:1B12 is the gold-labeled antibody and 4E3 is the detection antibody B:4E3 is the gold-labeled antibody and 1B12 is the detection antibody

a:1:100 b:1:1000 c:1:10000 d:1:100000 e:1:1000000 f:10000000 g: Negative

Control

4.2.5 胶体金溶液最佳标记 pH 的确定

当每毫升胶体金溶液 K_2CO_3 添加量为 $1 \mu L$ 时, 扫描图谱波峰明显较矮, 说明有聚沉现象, 当每毫升胶体金溶液 K_2CO_3 添加量为 5、9、13、17 μL 时, 紫外可见光扫描最大吸收峰无明显差别, 但 K_2CO_3 添加量为 9 μL 时出现最大吸收峰, 即最佳标记 pH 值时, 每毫升胶体金溶液 K_2CO_3 添加量为 9 μL 。

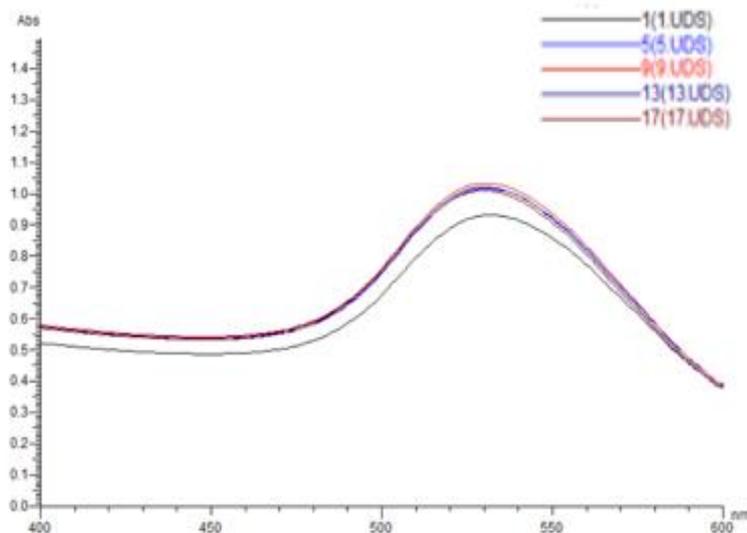


图 4-14 胶体金溶液最佳 pH 的确定

Fig.4-14 Determination of the optimal pH of colloidal gold solution

4.2.6 单克隆抗体最佳标记量的确定

为确定与金标探针偶联的最佳抗体量，pH 固定为最佳值，将 4E3 抗体以不同浓度进行添加，如图 4-15 所示，当每毫升胶体金溶液抗体添加量为 2 和 4 μg 时，眼观颜色变紫、明显聚沉，当抗体添加量为 6 μg 时偏蓝紫色，当抗体添加量为 8 μg 之后均为正常红色，因此眼观最佳标记量加 20%，最佳标记量为每毫升胶体金溶液抗体添加量为 9.6 μg ，即最佳标记量为每毫升胶体金溶液抗体添加量约为 10 μg 。紫外可见光分光光度计扫描抗体添加量为 6~16 μg 时的图谱显示，抗体添加量为 6 μg 时最高吸收峰值最小，10、12、14 和 16 μg 时吸收峰值差别很小，眼观不易分辨，数值上当抗体添加量为 10 μg 时位于最高吸收峰，与眼观结果一致。

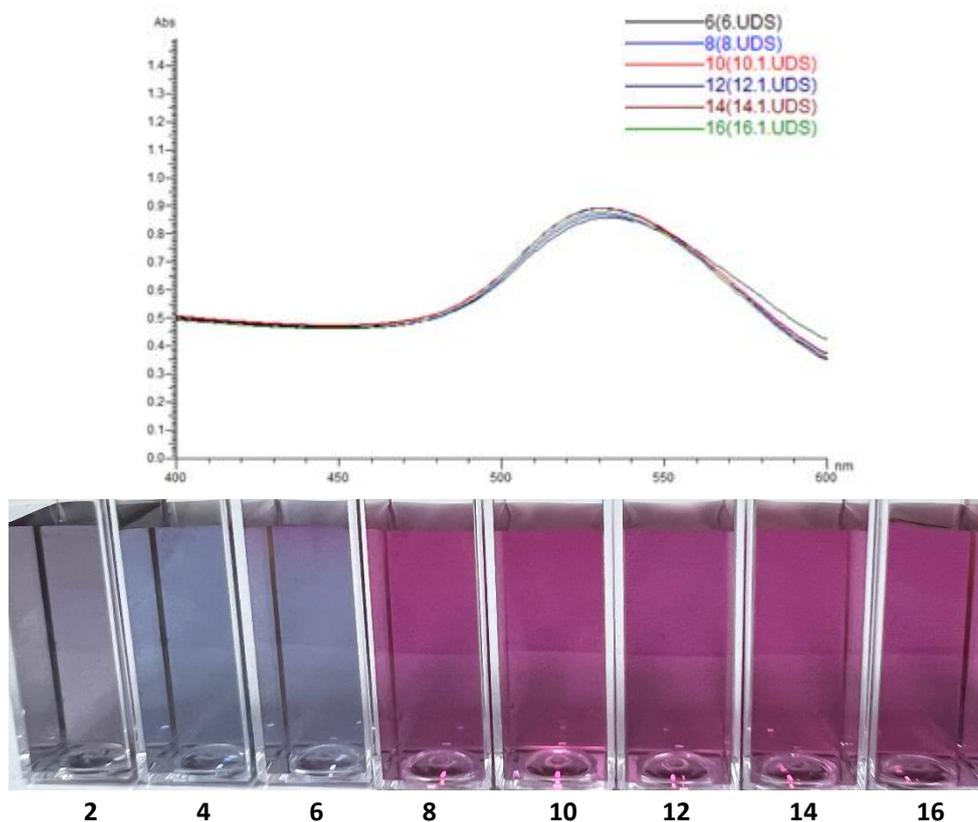


图 4-15 单克隆抗体 4E3 最佳金标记量的确定

Fig.4-15 Determination of the optimal amount of gold labeling for monoclonal antibody 4E3

4. 2. 7 胶体金标记单克隆抗体 4E3 鉴定结果

从图 4-16 可看出，胶体金标记抗体扫描图谱为单波峰、倒钟形，最大吸收峰出现在波长 531 nm 处。与胶体金纳米粒子溶液相比，胶体金标记抗体的最大吸收峰发生红移，吸收峰峰宽增加，吸收 OD 值变大。即证明单克隆抗体成功标记到胶体金纳米粒子表面。

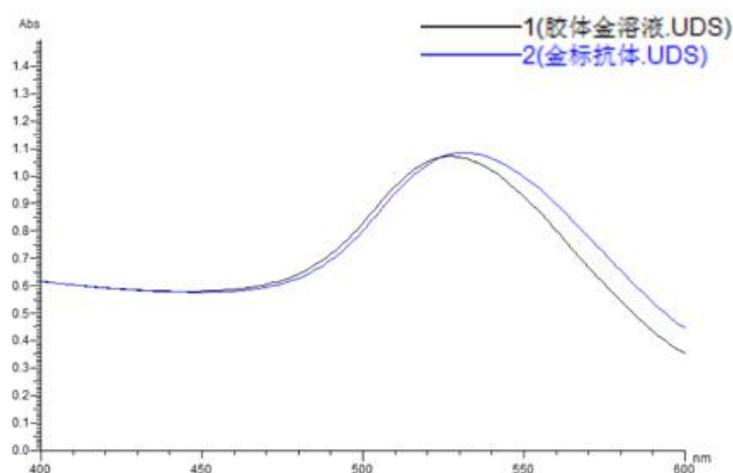


图 4-16 金标记抗体 4E3 标记结果鉴定结果图

Fig.4-16 Figure of the identification results of the gold labeled antibody 4E3 labeling

4. 2. 8 最佳反应时间的确定

为了确定完成试纸条检测的最佳反应时间,用同一份 CPIV 病毒液进行检测,反应时间分别为 10 min、15 min、20 min、25 min,反应结果如图 4-17 所示,反应 15 min 以后,检测结果趋于稳定,因此判定反应时间为 15 min 是反应的最短时间。

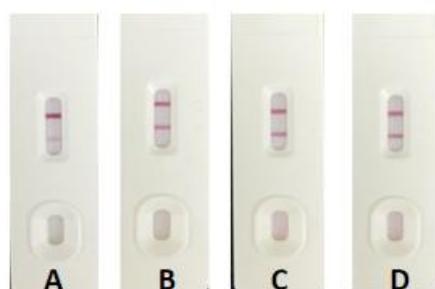


图 4-17 本研究胶体金试纸条最佳反应时间的确定

A: 10min B: 15min C: 20min D: 25min

Fig.4-17 Determination of the optimal reaction time of colloidal gold dipstick strips in this study

A: 10 min B: 15 min C: 20 min D: 25 min

4.2.9 试纸条敏感性检验

将病毒含量为 $10^{4.67}$ TCID₅₀/mL 的 CPIV 病毒液用 PBS (pH7.4) 按 1:5、1:10、1:100、1:1000、1:10000 进行稀释，用稀释液 PBS 作为阴性对照，用试纸条检测，如图 4-18 所示，将病毒液稀释至 1:1000 时试纸条 T 线仍有微弱反应，因此判定病毒液稀释度为 1:1000、对应的病毒含量约为 $10^{1.67}$ TCID₅₀/mL 时为该试纸条的最低检测限。试纸条敏感性良好。

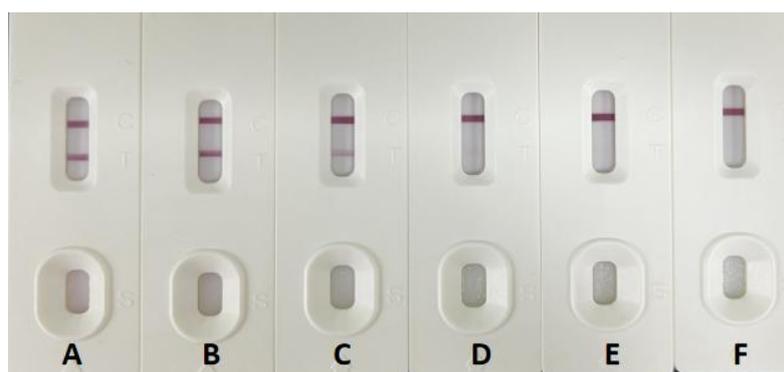


图 4-18 本研究胶体金试纸条敏感性检测

a:1:5 b:1:10 c:1:100 d:1:1000 e:1:100000 f: 阴性对照

Fig.4-18 the sensitivity of colloidal gold test strip was detected in this study

a:1:5 b:1:10 c:1:100 d:1:1000 e:1:100000 f: Negative Control

4.2.10 试纸条特异性检验

同一批试纸条分别检测 CPIV、CPV、CDV、CAV-2、MDCK 细胞裂解液及阴性犬眼鼻分泌物样品，如图 4-19 所示，该试纸条仅与 CPIV 反应，与其他犬源传染病病原无交叉反应，特异性良好。

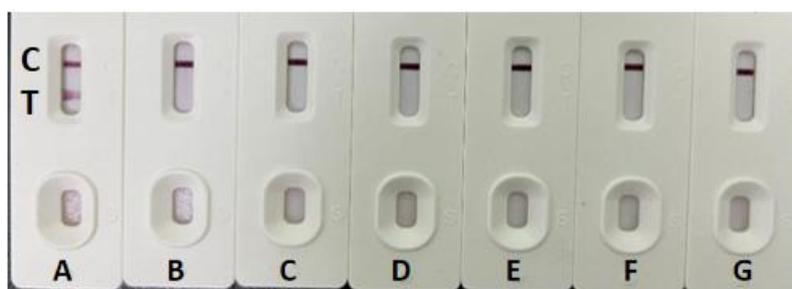


图 4-19 本研究胶体金试纸条特异性检测

A: CPIV B: CPV C: CDV D: CAV-2 E: MDCK F: 阴性临床样品 G: 阴性对照

Fig.4-19 Specificity detection of dipstick strips in this study

**A: CPIV B: CPV C: CDV D: CAV-2 E: MDCK F: Negative clinical samples
G: Negative Control**

4.2.11 试纸条稳定性检测

将放置于 37°C 0 d、10 d、20 d、30 d、40 d、50 d、60 d 的试纸条检测 CPIV，结果如图 4-20，60 d 时的试纸条检测线信号与 0 d 无明显差异，试纸条于 37°C 保存 2 个月相当于常温保存 2 年，说明本研究建立的检测 CPIV 胶体金试纸条稳定性较好。

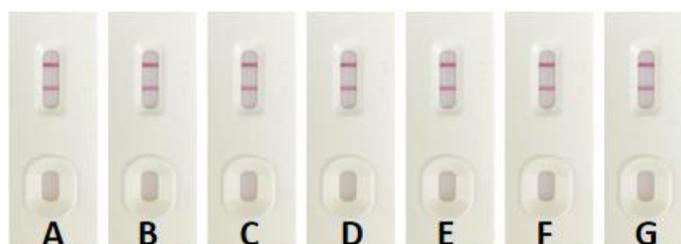


图 4-20 本研究胶体金试纸条稳定性检测

A:0 d B:10 d C:20 d D:30 d E:40 d F:50 d G:60 d

Fig.4-20 the stability of colloidal gold test strip was detected in this study

A:0 d B:10 d C:20 d D:30 d E:40 d F:50 d G:60 d

4.2.12 本研究建立胶体金试纸条与商业化同类产品比较结果

官网购买某品牌（具有国家正式注册文号）的 CPIV 胶体金检测试纸条，检测病毒含量为 $10^{4.67}$ TCID₅₀/mL 的 CPIV 病毒液，本研究建立的试纸条在稀释度为 1:5~1:100 时，检测线清晰直观，呈紫红色；稀释至 1:1000 仍可见检测线，检测限约为 $10^{1.67}$ TCID₅₀/mL，而商品化试纸条显色微弱，稀释至 1:100 可见检测线，检测限约为 $10^{2.67}$ TCID₅₀/mL。说明本研究建立的试纸条敏感性高于商品化试纸条约 10 倍，即检测效果由于商品化试纸条。

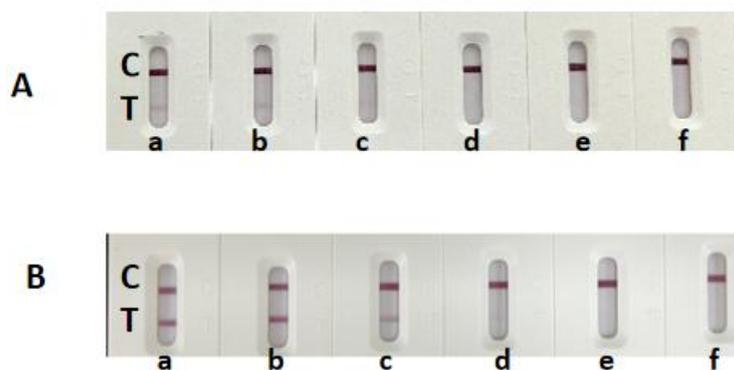


图 4-21 本研究建立胶体金试纸条与商业化产品检测 CPIV 效果比较

A 商业化试纸条 B 本研究试纸条

a:1:5 b:1:10 c:1:100 d:1:1000 e:1:100000 f: 阴性对照

Fig.4-21 The colloidal gold test strip was established to compare with commercial products in the detection of CPIV in this study

(A) commercial products; (B) Strips of this paper

a:1:5 b:1:10 c:1:100 d:1:1000 e:1:100000 f:Negative Control

4. 2. 13 临床样品符合率检测

采集 46 份犬的眼鼻分泌物拭子，每份样品一分为二，一部分提取 RNA 后进行反转录，用 RT-PCR 方法进行检测，另一部分用本研究建立的试纸条检测。结果如表 4-6 所示，本研究试纸条检测出阳性 1 份，可疑阳性样品 1 份，阴性为 44 份；从图 4-22 可以看出，RT-PCR 检测方法检测弱阳性 2 份，分别为 5 号和 10 号，阴性 44 份。试纸条检测的阳性样品检测结果与 PCR 方法一致，试纸条检测可疑阳性样品，PCR 方法检测结果为阳性。本研究建立的检测方法与 RT-PCR 相比总符合率为 97.8%。

表 4-6 利用本研究试纸条与 RT-PCR 分别检测临床样品结果

Table 4-6 The test strip and RT-PCR were used to detect the results of clinical samples

		RT-PCR		总计	总符合率
		阳性	阴性		
自研 试纸条	阳性	1	0	1	-
	阴性	1	44	45	-
	总计	2	44	46	97.8%
	灵敏度	50%	-	-	-
	特异度	-	100%	-	-

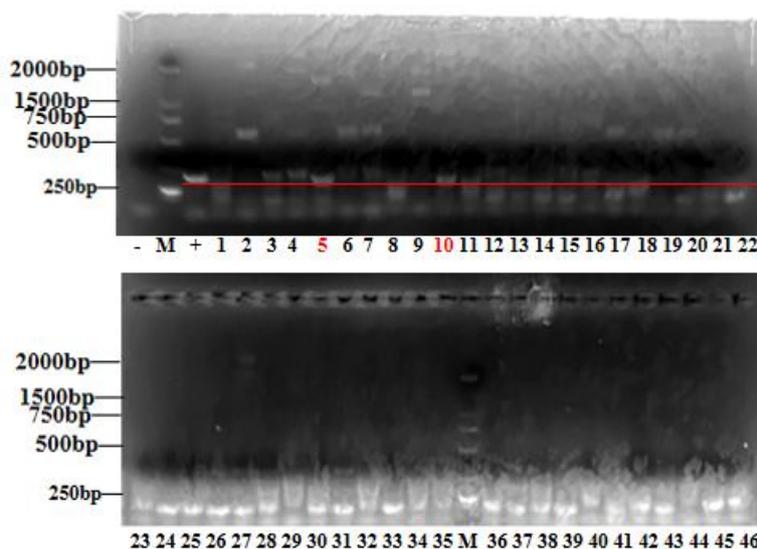


图 4-22 46 份临床样品 RT-PCR 检测结果

-: 阴性对照 +: 阳性对照 M: Marker 1~46: 46 份临床样品

Fig.4-22 Results of RT-PCR assay of clinical samples

-:Negative Control +:Positive Control 1~46:1~46 clinical samples

5 讨论

犬副流感病毒作为犬呼吸道传染病的主要病原 (Mitchel et al 2015, Sykes et al 2014), 常与其他病原混合感染, 严重危害犬的健康 (Day et al 2020)。2016 年, Decaro 等人调查了在急性感染 CIRDC 的犬、暴露于 CIRD 的犬和 CIRD 康复犬中 CPIV 的阳性率为 20.5%、4.5%和 2.6% (Decaro et al 2016), 这表明 CPIV 在有 CIRDC 症状的犬和无症状犬中都很常见 (Erles et al 2004, Schulz et al 2014)。多项研究证实 CPIV 是犬呼吸道疾病的主要病原 (Monteiro et al 2016, Maboni et al 2019)。CPIV 在国内流行范围广泛, 犬类携带率高, 易与其他病毒和细菌混合感染, 导致犬类出现严重的呼吸道症状, 并且由于感染症状极为相似, 不易与其他病原辨别 (Emery et al 1976, Kontor et al 1981, Hess et al 2011, Wilson et al 2014)。因此建立一种快速可靠、价格低廉的检测技术尤为重要。

5.1 CPIV 单克隆抗体的制备

若要提高单克隆抗体的阳性率, 免疫原的选择十分重要。本实验以 CPIV 为免疫原, 通过 PEG6000 将病毒液浓缩 50 倍, 提高了免疫原的浓度。除此之外, 佐剂的选择也至关重要, 本试验采用了博奥龙快速水佐剂, 该佐剂的注射方式为肌肉注射, 应用该佐剂对小鼠免疫 3 次后, 中和抗体效价已达到融合水平。

SP2/0 骨髓瘤细胞是另一个影响细胞融合率的关键因素。瘤细胞的状态, 如生长速度、折光性、是否较圆等对细胞融合的影响很大。瘤细胞和脾细胞最适于细胞融合的比例为 1:3~1:5。饲养细胞的密度也非常关键, 一般控制在 40%~50% 左右, 饲养细胞密度过小, 则无法刺激杂交瘤细胞生长, 密度过大, 则会过度消耗培养基中的营养。细胞融合的过程需要在 37℃ 进行, 融合时滴加 PEG 的速度尤为关键, 巴氏吸管更好控制滴加速度, 并且边滴加边搅拌, 使瘤细胞和脾细胞充分融合。细胞融合后对杂交瘤细胞及时检测筛选, 避免细胞密度过大, 造成阳性杂交瘤细胞丢失。在对杂交瘤细胞筛选时, 筛选抗原的纯度和浓度要高。本研究采用超高速离心的 CPIV 病毒浓缩液作为包被抗原用来筛选, 一定程度上提高了病毒浓度, 但超离过程病毒损失较大, 且本研究并未对病毒进行纯化。同时用 CPIV 的扩增细胞 MDCK 裂解液作为负向筛选, 极大程度上减少了假阳性孔。制

备腹水时，要选择合适的细胞量，一般在 1×10^5 个细胞左右，细胞量过大容易使小鼠形成实体瘤，过小则杂交瘤细胞分泌抗体能力不足。

5.2 胶体金检测方法的建立

本研究建立了检测 CPIV-N、CPIV-F 蛋白的双抗体夹心胶体金试纸条，并且 15 min 内出现清晰可见的检测线。本实验以 4E3 与胶体金偶联作为金标探针，1B12 包被于 T 线处，羊抗鼠二抗包被于质控线上作为反应的质控，组成双抗体夹心检测 CPIV 的胶体金免疫层析试纸条。结果表明，检测 CPIV 的双抗体夹心试纸条与犬源病毒 CDV、CAV-2、CPV、CcoV 均无交叉反应，特异性良好；试纸条最低检测限为 $10^{1.67}$ TCID₅₀/mL，灵敏性较高。用该试纸条检测了 46 份疑似犬呼吸道疾病的眼鼻拭子，阳性率为 2.2%，阴性率为 97.8%；RT-PCR 检测阳性率为 4.3%，阴性率为 95.7%，试纸条与 RT-PCR 方法总符合率为 97.8%，但由于阳性样本量较少，一份弱阳性样品试纸条检测为可疑阳性结果，而 RT-PCR 检测为弱阳性结果，虽然检测结果有一定的对应性，但可以看出试纸条敏感性应低于 RT-PCR 方法，并且需搜集更多阳性样本评估试纸条对临床样品的敏感性。目前少量临床样品检测结果表明试纸条检测结果准确性较高，可以用于大规模的临床初步检测，对可疑样品再通过 RT-PCR 或 RT-qPCR 进行进一步检测。CPIV 在国内流行范围广泛，犬类携带率高，易与其他病毒和细菌混合感染，导致犬类出现严重的呼吸道症状，并且由于感染症状极为相似，不易与其他病原辨别。所以本研究根据实际需求，通过研制针对 CPIV 的单克隆抗体，并以 1B12 和 4E3 两株单克隆抗体建立了检测 CPIV 抗原的胶体金检测方法，为犬的副流感病毒病临床诊断提供了可靠的检测方法。

6 结论

1 本研究利用单克隆抗体技术,成功制备了3株抗CPIV的单克隆抗体,分别命名为1B12、4E3、5F3,其中4E3为中和抗体。

2.本研究以1B12和4E3单克隆抗体为基础建立了检测CPIV的双抗体夹心胶体金试纸条检测方法,该试纸条特异性、灵敏性、重复性均较好,与PCR相比,该试纸条符合率为97.8%;与商品化的CPIV抗原检测试纸条相比,该试纸条灵敏度更高。

参考文献

1. 岑皓. 犬副流感病毒的分离及单克隆抗体的制备 [硕士学位论文]. 扬州: 扬州大学, 2009.
2. 陈龙如, 胡贵荣. 犬副流感的治疗. 四川畜牧兽医, 2004, 31(6): 50-50.
3. 陈小锋, 刘曙照. 胶体金标记免疫分析及其在小分子化合物快速检测中的应用. 药物生物技术, 2004, (04):278-280.
4. 房超, 张泉, 易海华等. 检测犬瘟热病毒的单克隆抗体胶体金试纸条的制备. 中国动物传染病学报, 2011,19(02):26-30.
5. 高菽蔓, 靳红亮, 马嫫, 等. 副流感病毒 5 型的分子生物学 研究进展. 中国动物传染病学报, 2016, 24(2): 80-86.
6. 贾宇旻, 徐飞, 边洪芬. 猪流行性腹泻病毒单克隆抗体的制备及胶体金免疫层析检测方法的建立. 中国预防兽医学报, 2019,41(09):924-928.
7. 焦库华, 岑皓, 张小荣. 犬副流感病毒单克隆抗体的研制及其特性鉴定.中国预防兽医学报, 2009, 31(12):985-987.
8. 金昌德, 李六金. 犬副流感流行毒株的分离与鉴定.第四军医大学学报. 2000, 21: 719-721.
9. 李六金, 金昌德, 娄清林. 狂犬病、犬肠炎、犬瘟热、犬腺病毒、犬副流感五联弱毒冻干疫苗的研究. 中国兽医科技, 1996, 26(1):5-8.
10. 李长磊. 犬副流感病毒的分离鉴定及结构蛋白基因的克隆与序列分析 [D 硕士学位论文]. 吉林:吉林农业大学, 2013.
11. 刘畅. 犬副流感病毒的分离鉴定与生物学特性研究 [硕士学位论文]. 长春: 吉林农业大学, 2019.
12. 刘腾飞. 犬副流感病毒的检测和 NP 基因的克隆.表达及其重组蛋白的免疫学活性的研究 [硕士学位论文]. 新疆: 新疆农业大学, 2010.
13. 刘兆宇, 张磊. 犬副流感病毒感染的流行与诊断. 养殖 技术顾问, 2014(3): 170-171.
14. 齐宾宾, 宋彩玲, 陈小微. 犬副流感病毒分子克隆的构建及全基因组序列分析. 动物医学进展, 2015 (10): 10-15.
15. 秦海斌, 温海. 应用新型 LAMP 检测技术诊断犬副流感病毒感染. 中国工作

- 犬业, 2016.18-19.
16. 邵雨. H9 亚型禽流感病毒和鸡毒支原体抗体检测胶体金试纸条的研制与初步应用 [硕士学位论文]. 武汉: 华中农业大学, 2019.
 17. 孙贺廷, 夏咸柱, 高玉伟, 贺文琦, 王立刚, 刘丹, 黄耕. 虎血清中犬副流感病毒的抗体流行病学调查研究. 畜牧与兽医, 2004. 4-6.
 18. 孙明, 刘巧荣, 秦亚嫒, 等. 犬副流感病毒的分离鉴定及 部分基因序列分析. 中国比较医学杂志, 2016, 26(2): 77-82.
 19. 温彪, 刘成功, 孙林. 犬副流感的诊治. 畜牧兽医杂志, 2012, 31(1):108-109.
 20. 吴凡, 贺争鸣, 邢瑞昌. 猴副流感病毒(SV5)研究进展. 实验动物科学与管理, 2006, 23: 54-56.
 21. 杨敬. 犬副流感病毒. 中国动物检疫, 1996(1): 35-37.
 22. 杨凯越. 犬细小病毒胶体金试纸条的研制及初步应用. [硕士学位论文]. 北京: 中国农业科学院, 2020.
 23. 杨亚萍. 犬副流感病毒快速检测方法的建立. [硕士学位论文]. 武汉: 华中农业大学, 2022.
 24. 余春, 刘慧芬, 刘国华, 温彪, 罗秉昆. 犬副流感的诊治. 中国兽医科技, 2001, 8: 34-35.
 25. 余春. 犬副流感的诊治. 中国兽医科技, 2001, 31(8):34-35.
 26. 余春明, 郑雪莹, 范君文等. 犬瘟热、犬细小病毒胶体金二联检测卡研制. 中国动物检疫, 2023,40(01):128-133.
 27. 张玲, 白斑综合征病毒 (WSSV) 胶体金免疫半定量快速检测试纸条的研制与应用. [硕士学位论文]. 青岛: 中国海洋大学, 2007.
 28. 章先, 付子贤, 周一钊. 赭曲霉毒素 A 和玉米赤霉烯酮-二联胶体金免疫层析试纸条的制备及应用. 微生物学通报, 2019, 46(5): 1235-1245.
 29. 赵少若, 黄甜, 郝丽影. 犬轮状病毒单克隆抗体制备及胶体金试纸条检测方法的建立. 中国畜牧兽医, 2022,49(11):4429-4437.
 30. Baumgartner WK, Krakowka S, Koestner A. Acute encephalitis and hydrocephalus in dogs caused by canine parainfluenza virus. *Vet Pathol*, 1982, 19:79- 92.
 31. Binn LN, Eddy GA, Lazar EC. Viruses recovered from laboratory dogs with

- respiratory disease. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1967, 126:140-145.
32. Bose S, Song AS, Jardetzky TS, Lamb RA. Fusion activation through attachment protein stalk domains indicates a conserved core mechanism of paramyxovirus entry into cells. *Journal of virology*, 2014, 88: 3925-3941.
 33. Charoenkul K, Nasamran C, Janetanakit T, Chaiyawong S, Bunpamong N, Boonyapisitsopa S, Tangwangvivat R, Amonsin A. Molecular detection and whole genome characterization of Canine Parainfluenza type 5 in Thailand. *Scientific Reports*, 2021, 11: 3866.
 34. Chen Z. Parainfluenza virus 5-vectored vaccines against human and animal infectious diseases. *Rev Med Virol*, 2018, 28: 1965.
 35. Collins PL. Parainfluenza viruses. In: Knipe DM, Howley PM. *Fields virology* Vol. Philadelphia: lip-pincott, Williams & Wilkins, 2007;1497–1526.
 36. Damian M, Morales E, Salas G, Trigo FJ. Immunohistochemical Detection of Antigens of Distemper, Adenovirus and Parainfluenza Viruses in Domestic Dogs with Pneumonia. *Journal of Comparative Pathology*, 2005, 133: 289-293.
 37. Davidson WR, Appel MJ, Doster GL, Baker OE, Brown JF. Diseases and parasites of red foxes, gray foxes, and coyotes from commercial sources selling to fox-chasing enclosures. *Journal of Wildlife Diseases*, 1992, 28: 581-589.
 38. Day MJ, Carey S, Clercx C, Kohn B, Marsillo F, Thiry E, Freyburger L, Schulz B, Walker DJ. Aetiology of Canine Infectious Respiratory Disease Complex and Prevalence of its Pathogens in Europe. *Comp Pathol*. 2020 ;176:86-108.
 39. Decaro N, Mari V, Larocca V. Molecular surveillance of traditional and emerging pathogens associated with canine infectious respiratory disease. *Vet Microbiol*, 2016, 192: 21–25.
 40. Didcock, L, Young, D. F, Goodbourn, S.&Randall, R. E. The V protein of simian virus 5 inhibits interferon signalling by targeting STAT1 for proteasome-mediated degradation. *J Virol* .1999b, 73: 9928-9933
 41. Durchfeld B, Baumgartner W, Krakowka S. Intranasal infection of ferrets (*Mustela putorius furo*) with canine parainfluenza virus. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 1991, 38: 505-512.

42. Elks J, Anseeuw E, Gow S. Seroepidemiology of respiratory (group 2) canine coronavirus, canine parainfluenza virus, and Bordetella bronchiseptica infections in urban dogs in a humane shelter and in rural dogs in small communities. *The Canadian Veterinary Journal*. 2011, 52(8): 861-868.
43. Ellis J, Anseeuw E, Gow S. Seroepidemiology of respiratory (group 2) canine coronavirus, canine parainfluenza virus, and Bordetella bronchiseptica infections in urban dogs in a humane shelter and in rural dogs in small communities. *Cannie Vet*, 2011, 52(8): 861-868.
44. Erles, K. Dubovi, EJ. Brooks, HW. Brownlie, J. Longitudinal study of viruses associated with canine infectious respiratory disease. *J Clin. Microbiol.* 2004, 42, 4524–4529.
45. Evermann JF, Lincoln JD, Mckieman AJ. Isolation of a paramyxovirus from the cerebrospinal fluid of a dog with posterior paresis. *J Am Vet Med Assoc*, 1980, 177: 1132-1134.
46. Greene, CE. Nonrespiratory Paramyxovirus Infections of Dogs. *In Infectious Disease of the Dog and Cat*, 4th ed. Elsevier/Saunders: St. Louis, MO, USA, 2012; Chapter 7, p66.
47. He B, Paterson, RG, Stock, N. Recovery of paramyxovirus simian virus 5 with a V protein Lacking the conserved cysteine-rich domain: the multifunctional V protein blocks both interferon induction and interferon signaling. *Virology*. 2002, 303: 15-32.
48. He, B, Lamb, RA. The V proteins of simian virus 5 and other paramyxoviruses inhibit induction of interferon. *Virology*. 2002, 303:33-46.
49. Jacobs AA, Theelen RP, Jaspers R. Protection of dogs for 13 months against Bordetella bronchiseptica and canine parainfluenza virus with a modified live vaccine. *Vet Rec*, 2005, 2;157(1):19-23.
50. Karron RA, Collins PL. Parainfluenza viruses. *Fields virology*. 2007;1497–1526.
51. Koczula K, Gallotta AA. Lateral flow assays. *Essays Biochem*. 2016; 60:111–120.
52. LeRoith T, Pineyro P, Vieson MD (2012) A review of the pathology and treatment of canine respiratory infections. *Veterinary Medicine: Research and*

- Reports, 3,25-39.
53. Li Z, Gabbard JD, Mooney A. Efficacy of parainfluenza virus 5 mutants expressing hemagglutinin from H5N1 influenza A virus in mice. *J Virol*, 2013, 87(17): 9604–9609.
 54. Maboni, G. Seguel, M. Lorton, A. Berghaus, R. Sanchez, S. Canine infectious respiratory disease: New insights into the etiology and epidemiology of associated pathogens. *Plos ONE* 2019, 14, e0215817.
 55. Mahmoudi T, Guardia MDL, ShirdeL B. Recent advancements in structural improvements of Lateral flow assays towards point-of-care testing. *Trac Trends Anal Chem*, 2019, 116: 13-30.
 56. Matsuu A, Yabuki M, Aoki E. Molecular detection of canine respiratory pathogens between 2017 and 2018 in Japan. *J Vet Med Sci*, 2020, 82(6): 690–694.
 57. Mitchell JA. Cardwell JM. Leach H. Walker CA. Le Poder S. Decaro N. Rusvai M. Egberink H. Rottier P. Fernandez M. European surveillance of emerging pathogens associated with canine infectious respiratory disease. *Vet. Microbiol.* 2017, 212, 31–38.
 58. Mitchell, JA. Brownlie, J. The challenges in developing effective canine infectious respiratory disease vaccines. *JPharm. Pharmacol.* 2015, 67, 372–381.
 59. Monteiro FL. Cargnelutti JF. Martins M. Anziliero D. Erhardt MM. Weiblen R. Flores EF. Detection of respiratory viruses in shelter dogs maintained under varying environmental conditions. *Braz. J. Microbiol.* 2016, 47, 876–881.
 60. Ngom B, Guo YC, Wang XL. Development and application of Lateral flow test strip technology for detection of infectious agents and chemical contaminants: a review. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 397: 1113-1135.
 61. Phan SI, Chen Z, Xu P. A respiratory syncytial virus (RSV) vaccine based on parainfluenzavirus 5 (PIVS). *Vaccine*.2014, 32: 3050-3057.
 62. Piewbang C, Rungsipipat A, Poovorawan Y. Development and application of multiplex PCR assays for detection of virus-induced respiratory disease complex in dogs. *J Vet Med Sci*, 2017, 78(12): 1847–1854.
 63. Raeisossadati MJ, Danesh NM, Borna F. Lateral flow based immunobiosensors

- for detection of food contaminants. *Biosens Bioelectron*, 2016, 86: 235-246.
64. Randal RE, Young DF, Goswami KK. Isolation and characterization of monoclonal antibodies to simian virus 5 and their use in revealing antigenic differences between human, canine and simian isolates. *Gen Virol*, 1987, 68 (Pt 11): 2769-2780.
65. Ravid D, Leser GP, Lamb RA. A role for caveolin 1 in assembly and budding of the paramyxovirus parainfluenza virus 5. *Virol*, 2010, 84(19): 9749-9759.
66. Reagan KL, Sykes JE. Canine infectious respiratory disease. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 2020, 50: 405-418.
67. Ruch-Gallie R, Moroff S, Lappin MR. Adenovirus 2, Bordetella bronchiseptica, and Parainfluenza Molecular Diagnostic Assay Results in Puppies After vaccination with Modified Live Vaccines. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2016, 30(1):164-166.
68. Schmitt AP, Leser GP, Waning DL, Lamb RA. Requirements for budding of paramyxovirus simian virus 5 virus-Like particles. *Hiol*, 2002, 76: 3952-3964.
69. Schulz BS, Kurz S, Weber K, Balzer HJ, Hartmann K. Detection of respiratory viruses and Bordetella bronchiseptica in dogs with acute respiratory tract infections. *Vet* 2014, 201, 365–369.
70. Siu L, Tsai Y, Lin J, Chen T, Fung C, Chang F. Development of a Colloidal Gold-Based Immunochromatographic Strip for Rapid Detection of Klebsiella pneumoniae Serotypes K1 and K2. *Clin. Microbiol*. 2016; 54: 3018–3021.
71. Sykes, JE. Canine viral respiratory infections. *In Canine and Feline Infectious Diseases*, 2014; Chapter 17; p 170–181.
72. Timani K A, Sun D, Sun M. A single amino acid residue change in the P protein of parainfluenza virus 5 elevates viral gene expression. *Virol*, 2008, 82(18):9123-9133.
73. Yang S, Yang J, Zhang G, Wang X, Qiao S, Zhao D, Zhi Y, Li X, Xing G, Luo J. Development of an immunochromatographic strip for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus serotype O—ScienceDirect. *Virol. Methods*.2010;165:139–144.

74. Yuan P, Leser GP, Demeler B. Domain architecture and oligomerization properties of the paramyxovirus PIV 5 hemagglutinin-neuraminidase (HN) protein. *Virology*, 2008, 378(2):282-291.
75. Zhang L. Development of a semiquantitative immunochromatographic test strip (SIT-strip) to detect white spot syndrome virus, 2016.