

文章编号: 1001-411X(2001)01-0074-04

Mab-ELISA 对 IBV 毒株定性检测方法的建立与应用

王林川, 黄爱芳, 游 洪

(华南农业大学动物医学系, 广东 广州 510642)

摘要: 针对禽传染性支气管炎病毒 (IBV) 血清型众多、临床检测不易的难题, 用我国自己研制的 2 株 IBV 单克隆抗体, 通过多种方法的比较与鉴定, 建立起适用于定性检测 IBV 的包被鼠源 IBV 单抗的 Mab-ELISA 方法, 其操作程序是: 包被鼠源 IBV 单抗—被检病毒—鸡抗 IBV 高免血清—兔抗鸡 IgG (AGP 效价 1:32)—羊抗兔 IgG—HRP; 用本方法对国内 46 个 IBV 分离株及 NDV、AIV-H9N2、PPMV-1 等的检测, 表明其具有较好的特异性和敏感性。

关键词: 禽传染性支气管炎病毒; 单克隆抗体; 酶联免疫吸附测定法

中图分类号: S855.3

文献标识码: A

禽传染性支气管炎 (IB) 是由禽传染性支气管炎病毒引起的一种急性、高度接触性的传染病。主要侵害鸡的呼吸系统、泌尿生殖系统和消化系统, 使病鸡出现呼吸困难、肾脏病变、产蛋下降及蛋品质降低等症候。IB 还可使鸡的增重和饲料报酬降低; 作为病因之一参与混合感染引起鸡的气囊炎, 从而使肉鸡在加工过程中废弃率增高; 另外, 幼雌鸡感染会引起输卵管永久性退化, 这对蛋种鸡场而言则更是灾难。

传染性支气管炎首先于 1931 年报道于美国^[1], 1936 年确定本病病原为病毒, 之后命名为传染性支气管炎病毒 (IBV)^[2], 现已证实为冠状病毒科的一种病毒。50 年代以前, 首先由美国鉴定有包括马萨诸塞的几个血清型。在英国, 直至 80 年代才由 Cook 等^[3,4] 报道在免疫过鸡群仍有 IB 的暴发, 并发现从这些暴发鸡群中分离出来的毒株存在有不同于疫苗株的血清型。现在已报道的血清型已达 20 多种, 变异株则不断被鉴定出。

而国内目前的报道已见有呼吸道及肾病变、减蛋型、腺胃型 IB 的临床描述, 实验室分型手段已有多种, 如鸡胚中和实验和鸡胚气管环中和实验、S1 基因 RT-PCR/RFLP 分型等。其中中和实验操作繁琐, 耗费时间, 其他方法都在不断完善之中以达到简洁实用的目的。本文拟建立简易、快捷、经济及特异性好的单克隆抗体酶标检测法, 并用此法对所收集国内 IBV 病毒株进行检测, 以便为 IB 的诊断和合理防

治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

(1) ELISA 板: 进口; ELISA 检测仪: BioRAD 455 型。

(2) 鸡抗 IBV 高免血清、兔抗鸡 IgG: 自制。

(3) 单克隆抗体: 鼠抗 IBV 单抗腹水 B1C11, B4D2 (南京农业大学动物医学院陈溥言教授赠送)。

(4) 酶标抗体: 羊抗鼠 IgG-HRP, 羊抗兔 IgG-HRP。从华美公司广州分公司购买, 工作浓度 1:1 000。

(5) 被检抗原: 国内 46 株 IBV 分离株, IBV 标准毒株 M41, H120, H52, Gray; P4 (PPMV-1)、S10 (A/Chicken/9801/Guangdong H9N2)、NDV (La Sota)。均为华南农业大学动物医学系禽病室保存。

(6) 溶液: A. 包被液, B. 洗涤液, C. 保温液, D. 底物溶液, E. 终止液。均按常规方法配制。

1.2 包被病毒的 Mab-ELISA 检测 IBV

(1) 基本操作步骤: a. 抗原包被。用包被液对被检抗原进行一定比例稀释后, 包被反应板, 每孔 100 μ L, 置 4 $^{\circ}$ C 过夜。b. 洗涤。用洗涤液洗涤 2 次, 每次 2 min, 在吸水纸上拍干。c. 加单克隆抗体。用保温液对单抗进行一定比例稀释后, 每孔 100 μ L, 置 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。d. 洗涤 3 次, 方法同 b。e. 加酶标抗体。用保温液对酶标抗体作 1:1 000 倍稀释, 加入反应板, 每孔 100 μ L, 置 37 $^{\circ}$ C, 孵育 1 h。f. 洗涤 3 次, 方法同 b。g. 加底物溶液。每孔 100 μ L, 置室温暗盒

收稿日期: 2000-04-10

作者简介: 王林川 (1965-), 男, 副教授, 博士。

基金项目: 国家自然科学基金重大项目 (39893290-2B)

©1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

内显色 20 min. h. 加终止液. 每孔 50 μ L, 静置 5 min. i. 用 ELISA 检测仪测定结果.

(2) 单抗合适浓度的选择: (a) 抗原. 对 IBV-Sen, IBV-QX, H120 分别做 1 :100 倍稀释. (b) 单抗. 对 B1C11, B4D2 分别做 1 :1 000, 1 :2 000, 1 :4 000, 1 :6 000 倍稀释.

(3) 包被抗原合适浓度的选择: (a) 抗原. 对 IBV-Sen, H52 分别做 1 :50, 1 :100, 1 :200, 1 :400 倍稀释. (b) 单抗. 对 B1C11, B4D2 分别做 1 :4 000 倍稀释.

(4) 对所收集抗原的定性检测: (a) 抗原. 收集的 40 株 IBV 分离株及 NDV、S10、P4 (PPMV-I) 分别做 1 :100 倍稀释. (b) 单抗. 对 B1C11、B4D2 分别做 1 :4 000 倍稀释.

(5) 包被鸡抗 IBV 高免血清的 Mab-ELISA 检测 IBV (用 0.04 g/mL 牛血清白蛋白封闭): 操作程序.

包被鸡抗 IBV 高免血清—被检病毒—单抗—羊抗鼠 Ig G-HPR.

(6) 包被鼠源 IBV 单抗的 Mab-ELISA 检测 IBV (用 0.04 g/mL 牛血清白蛋白封闭): 操作程序. 包被鼠源 IBV 单抗—被检病毒—鸡抗 IBV 高免血清—兔抗鸡 IgG (AGP 效价 1 :32)—羊抗兔 Ig G—HPR.

2 结果与讨论

2.1 包被病毒的 Mab-ELISA 检测 IBV

(1) 单抗合适浓度的选择: 本试验以同期测定的最低值 (B4D2 1 :4 000 浓度时对 H120 株) 的数值为参照. 由表 1 可知选用 1 :4 000 稀释度的单抗较好.

(2) 抗原合适浓度的选择: 本试验以同期测定的最低值 (B4D2 对 IBV-Sen 株 1 :400 浓度时) 的数值为参照. 由表 2 可知选用 1 :100 稀释度的抗原比较理想.

表 1 不同 IBV 单抗浓度时 Mab ELISA 检测的 P/ N 值
Tab. 1 The result of Mab-ELISA using IBV monoclonal antibody of different concentration

毒株 isolates	B1C11				B4D2			
	1 :1 000	1 :2 000	1 :4 000	1 :6 000	1 :1 000	1 :2 000	1 :4 000	1 :6 000
H120	1.07	1.22	1.07	1.07	1.11	1.00	1.00	1.04
IBV-Sen	1.87	1.93	2.07	2.87	1.74	1.59	1.70	1.46
IBV-QX	1.74	1.76	1.48	1.74	1.39	1.30	1.30	1.17

表 2 不同 IBV 抗原浓度时 Mab ELISA 检测的 P/ N 值
Tab. 2 The result of Mab-ELISA using IBV antigen of different concentration

单抗 Mab	IBV-Sen				H52			
	1 :50	1 :100	1 :200	1 :400	1 :50	1 :100	1 :200	1 :400
B1C11	1.06	1.18	1.10	1.01	1.13	1.03	1.13	1.15
B4D2	1.06	1.04	1.04	1.00	1.07	1.07	1.10	1.12

表 3 不同 IBV 毒株尿囊液 Mab ELISA 检测的 P/ N 值
Tab. 3 The result of Mab-ELISA for different IBV isolates

毒株 isolates	B1C11	B4D2	毒株 isolates	B1C11	B4D2	毒株 isolates	B1C11	B4D2	毒株 isolates	B1C11	B4D2
M41	1.08	0.043	HY—1	1.19	1.150	BJ01	1.29	1.080	JX1	0.94	0.850
Gray	1.23	1.230	HY—2	1.38	1.290	BJ04	0.92	0.860	JX2	0.96	0.860
H52	1.79	0.065	HY—5	1.46	1.310	HN2	1.19	1.250	JX3	0.79	0.900
H120	1.35	0.061	HY—6	1.06	0.900	HN4	1.48	1.170	HB2	1.19	0.810
HN1	1.63	1.250	HY—7	1.02	0.960	JS1	1.17	0.880	JL1	1.52	1.230
HN2	1.40	1.330	HY—25	0.83	0.830	JS3	0.90	0.900	TJ1	1.02	0.770
HN3	1.33	1.310	HY—28	0.92	0.050	JS4	1.17	0.049	HY21	1.27	1.350
LN1	1.10	0.960	HY—A	0.96	0.042	SC1	1.08	0.038	HY35	1.17	1.130
D41	1.50	1.190	HY—WJ	1.31	0.055	NM2	1.15	0.053	Ma5	1.44	1.400
JS3	1.63	1.190	Dan	1.00	0.046	SX1	1.25	0.055	TF	1.46	1.420
HB1	1.17	1.000	GD5	1.23	0.058	SC2	1.02	0.053	NDV	1.17	1.000
SD1	1.38	1.060	GD6	1.04	0.045	GD3	1.23	0.055	S10	1.56	1.210
ZJ1	1.63	1.330	BJ	1.29	0.061	ZJ2	1.25	1.190	P4	1.40	1.440

(3) 对所收集病毒的检测: 对各病毒尿囊液做 1:100 稀释并用于抗原包被, 单抗做 1:4 000 稀释, 羊抗鼠酶标抗体做 1:1 000 稀释. 本试验以同期测定的 NDV (B4D2) 为阴性对照 (N 值为 1.00) (表 3).

2.2 包被鸡抗 IBV 高免血清的 Mab-ELISA 检测 IBV 用高免血清包被 (做 1:50 和 1:10 两种稀释度),

抗原做 1:50 倍稀释, 单抗做 1:2 000 倍稀释, 羊抗鼠酶标做 1:1 000 倍稀释. 本试验以同期测定的 NDV (B4D2 1:50 稀释液) 为阴性对照 (N 值为 1.00), 结果见表 4.

2.3 包被鼠源 IBV 单抗的 Mab-ELISA 检测 IBV 用 B1C11 (1:50 稀释) 包被, 抗原用原液, 鸡抗

表 4 不同 IBV 毒株用包被鸡抗 IBV 高免血清的 Mab-ELISA 法检测的 P/N 值

Tab. 4 The result of Mab-ELISA having plates coated with IBV positive serum of chicken for different IBV isolates

毒株 isolates	血清(1:10)		血清(1:50)		毒株 isolates	血清(1:10)		血清(1:50)	
	serum		serum			serum		serum	
	B1C11	B4D2	B1C11	B4D2		B1C11	B4D2	B1C11	B4D2
M41	1.56	1.34	1.22	1.12	JX3	1.63	1.29	1.10	1.00
Gray	1.90	1.54	1.41	1.05	JL1	1.71	1.29	1.17	1.05
H52	1.71	1.51	1.51	1.17	TJ1	1.34	1.54	1.12	1.15
H120	1.85	1.51	1.51	1.22	Xian	1.88	1.56	1.22	1.10
HN1	1.90	1.71	1.27	1.24	HY21	1.88	1.88	1.24	1.07
HN2	1.78	1.41	1.63	1.15	HY35	1.76	1.46	1.17	1.10
HN3	1.63	1.39	1.22	1.05	BJ01	1.39	1.54	1.10	1.22
LN1	1.41	1.20	1.22	1.07	BJ04	1.59	1.29	1.12	1.02
D41	1.59	1.49	1.37	1.34	HN2	1.56	1.41	1.17	1.15
JS3	1.61	1.29	1.29	1.07	HN4	1.64	1.46	1.27	1.07
HB1	1.78	1.46	1.34	1.17	JS1	1.29	1.54	1.05	1.20
SD1	1.68	1.39	1.29	1.15	JS3	1.63	1.37	1.20	1.05
Sen	1.49	1.51	1.41	1.24	JS4	1.37	1.39	1.12	1.39
Dan	1.80	1.39	1.37	1.20	SC1	1.78	1.29	1.10	1.07
IB-QX	1.66	1.56	1.37	1.10	NM2	1.37	1.37	1.02	1.07
H120	1.32	1.12	1.15	1.15	SX1	1.49	1.27	1.20	1.02
HY-1	1.49	1.54	1.24	1.27	SC2	1.32	1.12	0.98	0.98
HY-2	1.76	1.56	1.46	1.10	GD3	1.39	1.20	1.07	1.10
HY-5	1.61	1.29	1.29	1.05	ZJ1	1.12	1.27	1.05	1.15
HY-6	1.49	1.17	1.15	1.05	ZJ2	1.24	1.17	1.10	1.00
HY-7	1.61	1.71	1.34	1.24	BJ	1.20	1.12	1.17	0.95
HY-25	1.61	1.39	1.34	1.07	TF	1.24	1.24	1.12	1.00
HY-28	1.54	1.32	1.17	1.05	Ma5	1.15	1.22	1.12	1.24
HY-A	1.37	1.17	1.07	1.02	CE	1.22	1.12	1.22	1.02
HY-WJ	1.51	1.49	1.15	1.22	P4	1.27	1.34	1.15	1.02
GD6	1.73	1.39	1.37	1.12	NDV	1.24	1.10	1.07	1.00
GD5	1.51	1.29	1.24	1.15	S10	1.66	1.29	1.12	1.20
HB2	1.37	1.27	1.41	1.17	无病毒	1.29	1.05	1.17	1.00
JX1	1.46	1.49	1.29	1.15	无单抗	1.24	1.15	1.02	0.98
JX2	1.88	1.44	1.34	1.10	无病抗	1.17	1.15	1.07	1.12

IBV 高免血清做 1 :10 倍稀释, 兔抗鸡 IgG 做 1 :100 倍稀释, 羊抗兔 IgG-HRP 做 1 :800 倍稀释. 本试验以同期测定的 NDV 为阴性对照(N 值为 1.00), 结果见表 5.

表 5 不同 IBV 毒株用包被鼠源 IBV 单抗 Mab-ELISA 法检测的 P/N 值

Tab. 5 The result of Mab-ELISA having plates coated with IBV positive murine serum for different IBV isolates			
毒株 isolates	BIC11	毒株 isolates	BIC11
M 41	1. 02	HY-7	1. 31
Gray	1. 48	HY-25	1. 14
H52	1. 58	HY-28	1. 04
H120	1. 56	HY-A	1. 09
HN1	1. 86	HY-WJ	1. 23
HN2	1. 26	GD6	1. 19
HN3	1. 41	GD5	1. 14
LN1	1. 32	HB2	1. 27
D41	0. 35 ¹⁾	JX1	1. 21
JS3	0. 76 ¹⁾	JX2	1. 23
HB1	1. 43	JX3	1. 36
SD1	1. 48	JL1	1. 31
Sen	1. 18	TJ1	1. 17
Dan	1. 28	Xian	1. 17
IB-QX	1. 42	HY21	1. 27
H120	1. 44	HY35	1. 13
HY-1	1. 17	BJ01	1. 26
HY-2	1. 40	BJ04	1. 39
HY-5	1. 33	HN2	1. 52
HY-6	1. 39	HN4	1. 49
		JS1	1. 21
		JS3	1. 33
		JS4	1. 42
		SC1	1. 41
		NM2	1. 67
		SX1	1. 53
		SC2	1. 43
		GD3	1. 63
		ZJ1	2. 40
		ZJ2	1. 52
		BJ	1. 22
		TF	1. 38
		Ma5	1. 22
		CE	1. 06
		P4	1. 00
		NDV	1. 00
		S10	0. 94
		无病毒	1. 00
		无病抗	0. 91

1) 操作时未加兔抗鸡 IgG 高免血清

3 小结

3.1 包被鼠源 IBV 单抗的 Mab-ELISA 检测 IBV 方法, 其操作程序是: 包被鼠源 IBV 单抗—被检病毒—鸡抗 IBV 高免血清—兔抗鸡 IgG (AGP 效价 1 :32)—羊抗兔 Ig G—HRP; 在将 P4、S10、NDV 均作为阴性反应时可使 IBV 各毒株均出现较强阳性反应. 这说明本方法具有较好的特异性和敏感性, 可用于对 IBV 毒株的定性检测.

3.2 IBV 各毒株的检测值普遍不高并参差不齐, 这可能是有抗原浓度问题及各毒株与单抗、鸡抗 IBV 高免血清的血清型适合性有差异等原因; 也初步说明本试验所用 2 株单抗不是针对所有 IBV 毒株都有较大结合力的单抗.

参考文献:

[1] SCHALK A F, HAWN M C. An apparently new respiratory disease of baby chicks [J] . J Am Vet Med Assoc, 1931, 78: 413—422.

[2] BEACH J R, SCHALM O W. A filterable virus distinct from that of laryngotracheitis the cause of a respiratory disease of chicks [J] . Poultry Science, 1936, 15: 199—206.

[3] COOK J K A. The classification of new serotypes of infectious bronchitis isolated from poultry flocks in Britain between 1981 and 1983 [J] . Avian Pathology, 1984, 13: 733—741.

[4] COOK J K A, HUGGINS M B. Newly isolated serotypes of infectious bronchitis virus; their role in disease [J] . Avian Pathology, 1986, 15: 129—138.

Mab-ELISA for Identification of Avian Infectious
Bronchitis Virus and Its Application

WANG Lin-chuan, HUANG Ai-fang, YOU Hong
(Dept. of Veterinary Medicine, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: This study established an identification procedure for the avian infectious bronchitis virus, Mab-ELISA, with two strains of IBV monoclonal antibody made by an institution in China. The procedure was: coating IBV Mab (murine)-test sample (virus)-IBV positive serum from chicken—anti-chicken IgG from rabbit (AGP titres 1 :32)—sheep anti-rabbit IgG-HRP. The check using 46 IBV isolates from China with NDV, AIV-H9N2 and PPMV-I suggested that this IBV Mab-ELISA method had relatively good specificity and sensitivity.

Key words: avian infectious bronchitis virus; monoclonal antibody; ELISA

【责任编辑 柴 焰】