

鸡传染性贫血病胶体金快速诊断试纸条的研制

——鸡传染性贫血血清抗体的制备、纯化及检测

孙素玲 (安徽科技学院, 安徽凤阳233100)

摘要 [目的] 为建立鸡传染性贫血病(CIA)诊断方法奠定基础。[方法] 对15周龄SPF鸡进行4次免疫后,制备鸡传染性贫血病血清抗体并对其进行纯化,测定抗原最佳包被浓度和血清的最佳稀释度,研究纯化后血清抗体的蛋白含量和效价。[结果] 阳性血清和阴性血清的最佳稀释度为1:100,病毒包被抗原最佳包被浓度为5 μg/ml。血清抗体蛋白含量为13.2 ng/ml,血清抗体效价为1:12 800。[结论] 该研究为制备CIA胶体金快速诊断试纸条奠定了基础。

关键词 鸡传染性贫血病;血清抗体;胶体金试纸条

中图分类号 S858.31 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)12-04980-02

Development of Colloidal Gold Rapid Diagnostic Stripe against Chicken Infectious Anaemia

SUN Su ling (Anhui Science and Technology University, Fengyang, Anhui 233100)

Abstract [Objective] The research aimed to lay the foundation for establishing the diagnostic method of chicken infectious anemia (CIA). [Method] After 15-week-old SPF chickens were immunized for 4 times, CIA serum antibodies were prepared and purified. The optimum coating concn. of antigen and the optimum dilution of serum were determined. And the protein content and titer of purified serum antibodies were studied. [Result] The optimum dilution of positive serum and negative serum was 1:100 and the optimum coating concn. for coating antigen by virus was 5 μg/ml. The protein content of serum antibodies were 13.2 ng/ml and the titer of serum antibodies were 1:12 800. [Conclusion] This research laid the foundation for preparing colloidal gold rapid diagnostic stripe against CIA.

Key words Chicken infectious anemia; Serum antibody; Colloidal gold rapid diagnostic stripe

鸡传染性贫血病(Chicken infectious anemia, CIA)是由鸡传染性贫血病病毒(Chicken infectious anemia virus, CIAV)引起的以再生障碍性贫血、淋巴器官组织萎缩、皮下和肌肉出血、泛血细胞减少为特征的疾病,是继鸡传染性法氏囊病之后的一种鸡的重要免疫抑制性传染病^[1]。目前世界许多养禽国家均有其流行或暴发的报道。我国山东、河南、广东、黑龙江等省(市)或地区也均有分离到CIAV的报道。CIA的发病率一般在20%~60%,高时可达100%,死亡率一般在5%~10%,严重时可达60%以上^[2]。雏鸡感染CIAV后发生的免疫抑制,一方面引起感染雏鸡对禽的其他疫苗的免疫应答机能降低,甚至丧失,使疫苗不能有效地防治其相应疾病;另一方面,致使感染雏鸡对其他某些禽病病原(如MDV、IBDV、NDV、REV等)的易感性提高^[3],合并感染可明显增强其相互的致病性,从而造成重大经济损失。因此,该病已纳入世界重要禽病研究的行列。快速准确的诊断是防制CIA发生和流行的重要前提保证。

国内外已建立的CIA诊断方法主要有病毒分离鉴定、血清学诊断[包括病毒中和试验(NV)、间接免疫荧光试验(IFA)、酶联免疫吸附试验(ELISA)]和生物技术方法诊断[包括PCR技术、核酸探针技术]等。

病毒分离虽然是诊断CIA的有效手段,其特异性强,但费时费力,不便推广使用;血清学方法比较费时、费力,容易延误该病的治疗;免疫荧光、ELISA等方法虽然具有微量、特异、快速、准确的优点,但需要比较完备的试验仪器和经验丰富的技术人员来操作和判断结果,检测一批样品整个流程需要2~4 h,对于基层兽医站或鸡场不适用;PCR及核酸探针的诊断更需要有特殊的仪器和药品,且技术含量高,很难在基层推广应用。因此,迫切需要建立一种简单、快速、灵敏、

廉价、适合于基层应用的CIA诊断方法。

免疫胶体金快速诊断技术是20世纪80年代在免疫胶体金标记技术基础上建立起来的一种新型独特的诊断技术。近年来,随着免疫层析快速诊断检测手段的不断提高和养殖业对疾病检测要求的不断提高,免疫胶体金快速诊断技术在动物疾病诊断中也得到初步应用^[4-9]。

该方法为CIA诊断提供了一种简单、快速、灵敏、廉价、适合于基层应用的新模式。CIA快速检测试纸条将具有广泛的应用价值,对CIA的有效控制具有非常重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂。CAV标准阳性及阴性血清,ZYMED公司产品;CAV毒株:Cux-1标准株,由哈尔滨兽医研究所提供;辣根过氧化物酶标记的兔抗鸡IgG,购自北京TIANGEN时代生物公司,使用时按说明书要求稀释;参照文献[10]配制封闭液、底物液、终止液、洗涤液、稀释液、饱和硫酸铵、各种缓冲液等。

1.1.2 仪器。722S分光光度计:上海精密仪器科学有限公司;L16G台式高速冷冻离心机:上海安亭科学仪器厂;DG5031型酶标仪:南京华东电子集团医疗装备有限公司。

1.1.3 实验用鸡。安徽科技学院畜牧科技园提供(经IFA方法检测CAV抗体为阴性)。

1.2 方法

1.2.1 鸡的免疫。4只15周龄SPF鸡,共免疫4次。于鸡颈部两侧皮下各注射免疫抗原油苗0.5 ml/只。每2周加强免疫1次,共3次,0.5 ml/只。7 d后静脉注射未加佐剂病毒抗原1.0 ml。1个月后心脏采血,分离血清,-20℃保存备用。

1.2.2 血清抗体的纯化(辛酸-饱和硫酸铵法)。取血清3 ml,加入0.06 ml/L pH值4.8的醋酸缓冲液6 ml,搅拌均匀,在室温下边搅拌边加入225 μl辛酸,搅拌30 min,4℃静置2 h以上。将血清溶液于4℃、800 r/min离心30 min,取上清,用2 ml/L NaOH调pH值至7.4。向上清液中边搅拌

基金项目 安徽省教育厅资助重点项目(KJ2008A32ZC)。

作者简介 孙素玲(1958-),女,安徽砀山人,副教授,从事畜禽流行病的研究。

收稿日期 2008-02-27

边加入等体积的饱和硫酸铵溶液。此时硫酸铵溶液终浓度为50%，搅拌30 min后，4℃静置2 h以上。8 000 r/min离心30 min，取沉淀，将沉淀溶于5 ml 0.01 mol/L pH值7.4的PBS中。向沉淀悬浮液中边搅拌边加入饱和硫酸铵溶液，使其终浓度为45%，搅拌30 min，4℃静置2 h以上。8 000 r/min离心30 min，取沉淀，将沉淀溶于2 ml 0.01 mol/L pH值7.4的PBS中。将沉淀悬浮液装入透析袋中，4℃用0.01 mol/L pH值7.4的PBS透析，8 h换液1次，透析2 d。灭菌过滤器过滤，4℃贮存。

1.2.3 血清抗体浓度的测定。用分光光度法测定纯化后的血清抗体蛋白含量，再稀释成1 mg/ml。

1.2.4 纯化后血清抗体效价的测定。

1.2.4.1 抗原最佳包被浓度和血清的最佳稀释度测定。用方阵法将病毒包被抗原按16.00、8.00、4.00、2.00、1.00、0.50、0.25 μg/ml稀释，阳性血清、阴性血清分别作1/50、1/100、1/200、1/400稀释，ELISA法测定各孔OD_{450 nm}，确定阳性血清、阴性血清最佳稀释度和病毒包被抗原最佳包被浓度。

1.2.4.2 血清抗体效价的测定。用包被缓冲液将CIA抗原稀释至最佳包被浓度后，100 μl/孔，37℃温育1 h，4℃过夜，倒出孔内液体，加入200 μl/孔洗涤液静置3 min，甩干，重复洗涤3次。加封闭液100 μl/孔，37℃温育1 h，倒出孔内液体，洗涤3次。将待测抗体等比稀释后按顺序加入，稀释比例分别为1/100、1/200、1/400、1/800、1/1 600、1/3 200、1/6 400、1/12 800，同时设阴性和阳性孔对照。100 μl/孔，37℃温育1 h，倒出孔内液体，洗涤3次。酶联抗体标记：用稀释液将辣根过氧化物酶联鸡IgG抗体稀释后100 μl/孔，37℃温育1 h，洗涤3次。加入新鲜配制的底物溶液100 μl/孔，避光静置10 min。终止液50 μl/孔。

用酶标仪测定450 nm处OD值，以阴性血清的吸光值为标准，吸光值大于或等于该值的2倍所对应血清抗体的稀释度为该血清的抗体效价。

3 结果与讨论

阳性血清、阴性血清最佳稀释度为1/100，病毒包被抗原最佳包被浓度为5 μg/ml。血清抗体蛋白含量13.2 ng/ml，血清抗体效价为1/12 800，见表1。

(上接第4964页)

种群中共同存在的现象，如中国的“洛阳春”、“鲁粉”，日本的“主基殿”、“七宝殿”和“户川寒”等。

2.2 用年代命名 为了纪念国家历史上有意义的年代，日本牡丹中出现用年代来给品种命名的情况，如“大正の夸”、“昭和の梦”等，这是中国牡丹中未曾出现过的情况。

2.3 用特定的词汇命名 中日牡丹的品种名称中出现过一些特定的词汇用来表示特定的含义，如中国牡丹中的“醉”则表示花色为粉红色或者花朵侧垂，“醉西施”为侧开的粉红色花；而日本牡丹中的“狮子”用来表示花朵直径大，如“八束狮子”、“新辉狮子”等，其中“八束狮子”的花径可达30 cm；再如“锦”字用来表示花瓣边缘有白色线，有“夺锦”、“日月锦”、“黑龙锦”等，即为红色或者墨紫色的花瓣边缘有一条明显的

表1 血清抗体效价测定结果

Table 1 The determination results of serum antibody titres

抗体稀释倍数 Antibody dilution	OD	抗体稀释倍数 Antibody dilution	OD
1/100	1.897	1/3 200	0.450
1/200	1.389	1/6 400	0.240
1/400	1.259	1/12 800	0.132
1/800	1.138	阴性 Negative control	0.065
1/1 600	0.837		

CIA血清抗体(一抗)的制备、纯化及效价检测是制备胶体金快速诊断试纸条的第1步，它的成功与否直接影响后面的实验结果。在操作过程中要将待检样品分为2份测定，以保证实验结果的准确性。底物使用液必须新鲜配制，尤其是H₂O₂应在临用前加入。采集制备血清时应注意避免溶血，因红细胞溶解时会释放含过氧化物酶活性的物质，影响显色效果。从冰箱中取出的试剂应待温度与室温平衡后使用。加样时应将所加物加在ELISA板孔的底部。温育的温度和时间应按规定，力求准确。

参考文献

- [1] 崔现兰,甘孟候.鸡传染性贫血病[J].中国兽医杂志,1993,19(7):46-48.
- [2] 刘桂云,王世敏,李棠.鸡传染性贫血因子的综述[C]//中国畜牧兽医学学会家畜传染病学分会第四届全国会员代表大会暨第七次学术研讨会论文集.上海:[s.n.],1997:425-430.
- [3] MCNAMEE PT, MCCULLAGH J, RODGERS J D, et al. Development of an experimental model of bacterial chondronecrosis with osteomyelitis in broilers following exposure to staphylococcus aureus by aerosol, and inoculation with chicken anemia and infectious bursal disease viruses[J]. Avian Pathol, 1999, 28:26-35.
- [4] 唐雨德.快速检测猪囊虫抗体的金免疫层析法的建立及应用[J].中国人畜共患病杂志,2003,19(5):72-79.
- [5] 孔繁德.斑点免疫金渗滤法检测猪温抗体的研究[J].中国动物检疫,2003(11):31-33.
- [6] 张长弓.口蹄疫抗体免疫金标快速检测试纸法的建立[J].福建畜牧兽医,2004(1):425.
- [7] 黄印尧.猪伪狂犬病抗体免疫金标快速检测试纸法[J].福建畜牧兽医,2004(3):8210.
- [8] 王中力.犬细小病毒免疫胶体金诊断技术的研究[J].中国预防兽医学报,2004,26(1):62.
- [9] 戴荣四,刘毅,胡仕凤,等.鸡新城疫免疫胶体金诊断技术的研究[J].湖南农业大学学报,2006,32(2):169-172.
- [10] 张明.磺胺甲恶唑胶体金免疫层析快速检测试纸条的研制[D].乌鲁木齐:新疆农业大学,2006.

白色纹线。

3 小结

我国为牡丹原产大国，但自从日本与欧美国家从中国大量引进牡丹后，不断培育出具有其特色的新品种，如日本的寒牡丹，法国的黄色系品种，其国际牡丹的舞台上占有的地位越来越重要。对此，应充分利用我国丰富的牡丹资源，培育出花色更丰富、抗病性更强、更有竞争力的新品种。较之国外牡丹，国内牡丹花期较短，影响其在园林中的观赏效果。可通过野生种质资源，培育出花期较长的品种，以增强国内牡丹的竞争力。

参考文献

- [1] 王莲英.中国牡丹品种图志[M].北京:中国林业出版社,1998:6-7,16.
- [2] 中国牡丹全书编纂委员会.中国牡丹大全[M].北京:中国科学技术出版社,2002.