

抗犬瘟热病毒荧光标记单抗的制备和初步鉴定

苏建青¹, 褚秀玲¹, 杨松涛², 夏成柱^{2*}, 岳妙妹³ (1. 聊城大学农学院, 山东聊城 252059; 2. 中国人民解放军军事医学科学院军事兽医研究所, 吉林长春 130062; 3. 长春理工大学生命科学技术学院, 吉林长春 130062)

摘要 [目的] 建立利用单克隆抗体检测犬瘟热病毒的直接免疫荧光诊断方法。[方法] 通过搅拌法, 用异硫氰酸荧光素标记 G 蛋白纯化的抗犬瘟热病毒单抗 CE3, 对荧光抗体进行纯化、鉴定, 并确定其最适工作浓度。对 61 份临床可疑犬瘟热病料进行直接免疫荧光检测。[结果] 吸收试验、阻断试验和特异性试验结果显示, 标记抗体具有高度的敏感性和特异性, 与犬细小病毒 (CPV)、犬副流感病毒 (CPIV)、犬腺病毒 (CAV)、狂犬病毒 (RV) 无交叉反应, 其最优化工作浓度为 1:80。对临床可疑犬瘟热病料的阳性检出率是 48%。[结论] 该研究建立的直接免疫荧光方法具有快速、特异和简便的优点, 对犬瘟热疾病的早期诊断具有重要意义。

关键词 犬瘟热病毒; 直接免疫荧光; 单克隆抗体

中图分类号 S852.65⁺5 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)08-03552-03

Preparation and Preliminary Identification of Fluorescein Labeled Monoclonal Antibody Against Canine Distemper Virus

SU Jian-qing et al (Agricultural School, Liaocheng University, Liaocheng, Shandong 252059)

Abstract [Objective] The study aimed to develop a direct immunofluorescence technique for the antigen detection of canine distemper using monoclonal antibody against canine distemper virus. [Method] By stirring method, the monoclonal antibody CE3 purified by protein G was labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC). After purification and identification, the optimal working concentration of the fluorescent antibody was determined. Subsequently, 61 samples collected from suspected dogs were detected by direct immunofluorescence assay. [Result] The absorption, blocking and specificity tests showed that the labeled antibody had high specificity and sensitivity, showing no cross reaction with canine parvovirus (CPV), canine parainfluenza virus (CPIV), rabies virus (RV) and canine adenovirus (CAV). Its optimal working concentration was 1:80. The positive rate of clinical suspected samples was 48%. [Conclusion] The direct immunofluorescence method developed in this study possesses such advantages as rapidness, specificity and convenience, having an important significance to early diagnosis of canine distemper disease.

Key words Canine distemper virus; Direct immunofluorescence assay; Monoclonal antibody

犬瘟热 (Canine Distemper, CD) 是由犬瘟热病毒 (Canine Distemper Virus, CDV) 引起的一种急性、高度接触性传染病^[1-2], 其感染性强, 流行范围广, 致死率高, 是危害犬类、毛皮经济动物、野生动物和部分海洋哺乳动物的重要疾病^[3]。CD 临床症状多样, 常继发或并发感染, 导致临床确诊困难^[4]。该病发病快、传播迅速, 对诊断方法的简便、快速要求高, 但目前常用的临床症状和流行病学诊断方法确诊晚, 常贻误最佳治疗时机^[5]。实验室诊断具有快速、准确和特异的优点, 可以在疾病的早期确诊, 提高疾病的治愈率。但目前常用的 PCR 方法对专业技术要求高, 病毒电镜观察方法又需要昂贵的仪器^[6]。而免疫荧光方法操作简便, 特异性高, 不仅可用于疾病早期的活体抹片诊断, 还可用于死后的组织切片诊断^[7-8]。单克隆抗体具有特异性高、纯度好和亲和力强的优点^[9]。鉴于此, 该研究拟利用抗犬瘟热的单抗标记免疫荧光来建立一种诊断犬瘟热的直接免疫荧光方法, 以期对犬瘟热疾病的早期诊断和致病机理研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒与细胞。犬瘟热病毒 (CDV)、狂犬病毒 (RV)、犬细小病毒 (CPV)、犬副流感病毒 (CPIV)、犬腺病毒 (CAV), 非洲绿猴肾细胞 (Vero)、犬肾细胞 (MDCK)、猫肾细胞 (F81), 犬瘟热病毒单克隆抗体 CE3 由军事医学科学院军事兽医研究所犬病研究中心提供。

1.1.2 试剂。异硫氰酸荧光素 (FITC)、伊文斯蓝 (Evans

Blue) 购自 Sigma 公司; 葡聚糖凝胶 G-25 (Sephadex G-25) 购自 Amersham 公司; 其他常规试剂为进口分装或国产分析纯试剂。

1.1.3 仪器。荧光显微镜 (OLYMPUS, 日本); 二氧化碳培养箱 (SANYO, 日本); -70 °C 低温冰箱 (海尔, 中国); UV2800H 紫外分光光度计 (美国); XDS-1B 倒置显微镜 (重庆光电仪器总公司); 90-3 型定时恒温双向磁力搅拌器 (上海亚荣生化仪器厂); 超净工作台 (苏净集团安泰公司); 其他仪器为国产普通小型仪器。

1.2 犬瘟热直接免疫荧光方法的建立

1.2.1 抗体的纯化和鉴定。选用 CE3 作为标记用单抗, 先用 50% 硫酸铵初步沉淀 BALB/c 小鼠腹水, 然后用 G 蛋白亲和层析柱进行纯化^[10], 并鉴定其纯度和效价, 纯化后的单抗用于 FITC 的标记。

1.2.2 荧光抗体的标记。采用搅拌法^[11]。将纯化的 CE3 单克隆抗体用 (0.5 mol/L) 碳酸盐缓冲液 pH 值 9.0~9.5 透析过夜。按每毫克抗体蛋白内加入 0.05 mg FITC 的量, 称取适量 FITC, 加入二甲基亚砜 (DMSO), 使终浓度为 1 mg FITC/ml DMSO; 将抗体放入 10 ml 小烧杯中, 在搅拌状态下, 按上述比例将 FITC-DMSO 溶液逐滴加入透析后的抗体溶液中, 滴加过程持续 10 min, 磁力搅拌器室温下搅拌 4 h。整个过程尽量避光操作, 将容器用黑纸包好。

1.2.3 荧光抗体的纯化。先用流水透析 30 min, 然后用 0.01 mol/L、pH 值 7.2 的 PBS 透析过夜, 再用 Sephadex G-25 柱除去游离荧光素, 用 0.02 mol/L、pH 值 7.2 的 PBS 作为洗脱液, 收集 PBS 洗脱第 1 个荧光素结合蛋白峰, 第 2 个荧光素峰为游离荧光素。

1.2.4 荧光抗体的鉴定。

基金项目 总后科技攻关资助项目 (06G138)。

作者简介 苏建青 (1972-), 男, 河北阳原县人, 博士, 讲师, 从事疾病诊断研究。* 通讯作者。

收稿日期 2008-12-19

1.2.4.1 结合比率 (F/P) 的测定。用紫外分光光度计测定收集的荧光抗体在 280 nm 和 495 nm 波长下的 OD 值, 根据公式 $F/P = (2.87 \times OD_{495}) / (OD_{280} - 0.35 \times OD_{495})$ 计算出比值, 评定荧光抗体的标记质量。

1.2.4.2 特异性鉴定。①特异性试验: 在 96 孔板上, 用 CDV、CPIV、RV、CPV 和 CAV 分别接种 Vero 细胞、F81 细胞和 MDCK 细胞, 做直接免疫荧光试验, 观察有无交叉反应, 检测其特异性。②吸收试验: 在荧光抗体中加入过量的 CDV 抗原, 37 °C 吸附 1 h, 用吸附后的荧光抗体进行直接免疫荧光试验, 镜检。③阻断试验: 在 CDV 细胞培养孔里滴加 CDV 高免血清原液及不同稀释倍数 (1:5、1:10、1:20、1:40) 的稀释液, 37 °C 作用 1 h, 经充分洗涤后, 再用 CDV 荧光抗体染色, 镜检。同时滴加 PBS 阻断作空白对照。

1.2.5 最适工作浓度的测定。用 PBS (含 0.01% 伊文斯蓝) 倍比稀释荧光抗体溶液 (1:10 ~ 1:1 000) 分别对 CDV 感染细胞和阴性对照细胞做染色。感染细胞出现清晰明亮的特异性荧光, 阴性对照无非特异荧光的最大稀释倍数, 即为该抗体的染色滴度 (效价) 或单位。实际染色应用时, 可取低于染色滴度 1 ~ 2 个稀释度的浓度作为最适工作浓度。

1.2.6 染色程序。

1.2.6.1 细胞染色程序。在 96 孔微量培养板中 10 倍系列稀释病毒样品, 之后加入单细胞悬液, 细胞密度为 5×10^4 个/孔, 同时设一排细胞对照 (即只加培养液的 Vero 细胞), 混匀后置 37 °C CO_2 培养箱中培养 72 h。弃培养液, 用 PBS 洗板 3 次, 每次 3 min, 晾干后加入 80% 冷丙酮室温固定 10 min 后, 弃丙酮, 同上洗板, 加入工作浓度为 1:100 的抗犬瘟热病毒荧光抗体 100 μ l/孔, 37 °C 孵育 50 min, PBS 洗板 3 次, 每次 5 min, 最后用三蒸水洗 1 min, 滴加 90% 缓冲甘油, 于荧光显微镜下观察结果。

1.2.6.2 涂片染色程序^[12]。①样品片制备。眼分泌物样品片的制备: 用食指和拇指翻开待检犬眼结膜, 无菌载玻片直接接触压, 或用湿润的灭菌棉签拭取两眼结膜的分泌物涂于载玻片。血液样品片的制备: 无菌采取待检犬静脉末端血, 直接涂片或分离淋巴细胞涂片。②染色程序。室温自然晾干涂片, 冷丙酮室温固定 10 min 后, 以 0.01 mol/L、pH 值 7.4 的 PBS 洗涤 3 次, 然后置室温自然干燥 10 min。将干燥后的样品片平置湿盒中, 滴加抗 CDV 荧光标记单克隆抗体, 覆盖于涂片材料上, 置于 37 °C 30 min, 取出后用 0.01 mol/L、pH 值 7.4 的 PBS 轻轻冲洗 3 次, 每次 5 min, 蒸馏水浸泡 1 min 脱盐, 吹干后滴加缓冲甘油, 封片, 镜检。

1.2.7 判定标准。用荧光显微镜观察, 阴性对照应呈橘红色荧光或无特异性苹果绿荧光, 阳性对照呈明显的特异性苹果绿荧光。在测定待检样品时, 每次试验同时设阳性和阴性对照, 用荧光显微镜观察 20 个视野, 待检样品细胞中有特异性苹果绿荧光簇为 10 个以下时记 “+”, 为 10 ~ 50 个时记 “++”, 为 50 ~ 80 个时记 “+++”, 80 个以上时记 “#”; 视野中没有特异性苹果绿荧光时, 记 “-”。

1.3 犬瘟热临床病料的采集和检验 采集临床疑似 CD 病犬的分泌物, 如眼结膜分泌物、鼻腔分泌物、阴道分泌物和尿液; 血液 (抗凝血); 有神经症状的采集脑脊髓液; 对于病死犬

或解剖犬, 采集扁桃体、脾脏、肺门淋巴结、肝、肺、肾、脑等内脏器官, 共计 61 份。将采集的病料直接涂片或印片, 部分血液分离淋巴细胞后涂片, 进行直接免疫荧光检测。

2 结果与分析

2.1 犬瘟热直接免疫荧光诊断方法的建立

2.1.1 荧光抗体的制备及鉴定。

2.1.1.1 F/P 的测定。荧光素 (F) 和抗体蛋白 (P) 的比值反映荧光抗体的特异性染色质量。 F/P 值越高, 说明抗体分子上结合的荧光素越多, 标记抗体的灵敏度就高, 但 F/P 过高会增加荧光素标记抗体的负电荷, 从而增加与组织细胞的非特异性吸附。经测定, 荧光素标记抗体的光密度值 OD_{280} 和 OD_{495} 分别为 0.892 和 0.517, 计算得荧光抗体的 F/P 为 2.51。

2.1.1.2 特异性鉴定。①特异性试验: 以 CDV、CPV、RV、CPIV 和 CAV 接种相应的细胞 48 h 后, 经荧光染色, CDV 样品呈强绿色荧光, 其他病毒样品均未发现特异性荧光。②吸收试验: 在荧光抗体中加入过量的 CDV 抗原, 然后以此染抗原标本, 无特异性荧光出现。③阻断试验: CDV 高免血清原液及 1:5、1:10 倍稀释液均能完全阻断 CDV 与荧光抗体产生特异性荧光, 1:20 倍稀释液有部分阻断作用, 而 1:40 倍稀释液则完全没有阻断作用, 即镜检有荧光出现, PBS 也同样没有阻断作用, 说明所制备的荧光抗体具有特异性。

2.1.2 CDV 荧光抗体最适工作浓度的测定。由表 1 可见, CDV 荧光标记抗体在 1:40 时, 特异性苹果绿荧光最强, 但非特异性荧光较强; 1:80 稀释时, 特异性苹果绿荧光很强, 且阴性对照无非特异荧光出现 (图 1); 1:160 稀释时, 特异性苹果绿荧光较弱。因此, 对荧光素标记抗 CDV 单克隆抗体以 1:80 稀释为宜。

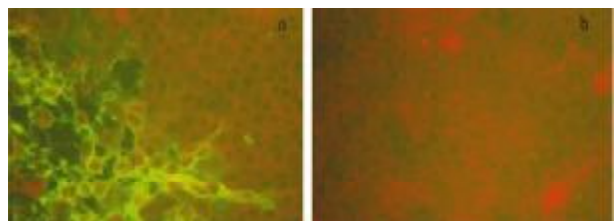
表 1 CDV 荧光抗体最适工作浓度的测定

Table 1 Determination of optimal concentration of fluorescent antibody

样本 Sample	稀释度 Diluted ratio					
	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
正常细胞 Normal cells	++	+	-	-	-	-
CDV 感染细胞 CDV infected cells	#	#	+++	++	+	-

注: “#、+++、++、+”表示荧光亮度由强到弱; “-”表示无荧光。

Note: “#、+++、++、+” represents brightness of fluorescence from high to low; “-” represents no fluorescence.



注: a. CDV 感染的 Vero 细胞; b. 未感染的 Vero 细胞。

Note: a. CDV infected Vero cells; b. Infection-free Vero cells.

图 1 1:80 稀释的 C3E 单抗与 Vero 细胞的免疫荧光反应 (200 \times)

Fig. 1 FAT of 1:80 dilution CE3 McAb and Vero cells

2.2 临床病料检测 通过对 61 份可疑 CD 病料进行直接免疫荧光检测, 共检出 29 份阳性病料。直接免疫荧光的阳性

率是48%。

3 讨论

荧光抗体技术是目前国际公认的诊断CD较好的方法。1956年,Coffin等建立了诊断CD的荧光抗体技术,可以特异、敏感、快速地检出和定位CD抗原。在国内,袁书智等^[13]和付少才等^[14]的研究均证明了这种方法的可行性。该研究采用抗犬瘟热病毒的单克隆抗体建立检测CDV的直接免疫荧光方法,进一步提高了该技术检测CD的敏感性、特异性和临床实用性。

免疫荧光技术的检出率受待检样品的影响较大。结膜和生殖道印片、尿液中的上皮细胞、皮肤和胃的穿刺样品、来自于气管灌洗液中的细胞、血涂片和脑脊髓液等样品都可作为病原学诊断的样品。杨百亮等运用建立的间接免疫荧光法检测21只犬瘟热自然感染犬的眼分泌物、鼻汁、粪便和血涂片,其检出率分别为21%、14%、15%和76%^[15]。血液中CDV主要存在于白细胞,而白细胞数量有限。采用淋巴细胞分离液分离淋巴细胞涂片,每张涂片上的白细胞数量相对增多,含杂质较少,降低了非特异性荧光,可以提高阳性检出率。袁书智等采用直接免疫荧光方法检测人工感染犬白细胞中CDV抗原,阳性率为94%^[13]。直接免疫荧光主要用于急性病例的早期诊断,因为超过3周的病例,在上皮细胞中检测不到病毒,而且亚急性或慢性病犬由于产生中和抗体,通常难以查出阳性细胞,但该方法比检查包涵体更有意义。

免疫荧光检测具有操作简便、快速(检测工作能够在2h内完成)、直观性强等特点,是动物传染病快速确诊常用的方法。该试验建立的犬瘟热直接免疫荧光诊断方法,能对CD急性病畜及时确诊,进而进行有效的隔离和治疗,可避免疾

病的进一步传播和最佳治疗时机的贻误,达到早诊断、早隔离和早治疗的目的。

参考文献

- [1] BEINEKE A,PUFF C,SEEHUSEN F,et al. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper[J]. Vet Immunol Immunopathol,2009,127(1/2):1-18.
- [2] 王讯,赵玲.犬瘟热神经病理学研究进展及可能的治疗措施[J].安徽农业科学,2007,35(24):7500-7501.
- [3] DEEM S L,SPELMAN L H,YATES R A,et al. Canine distemper in terrestrial carnivores: A review[J]. J Zoo Wildl Med,2000,31(4):441-451.
- [4] 黄国君,岳华,杨发龙,等. SYBR Green I 荧光定量 RT-PCR 检测犬瘟热病毒方法的建立及应用[J]. 中国预防兽医学报,2008,30(6):450-454.
- [5] 赵长城,李福宝,钟志刚. 50例犬瘟热病例的诊疗报告[J]. 中国动物检疫,2007,24(1):38-40.
- [6] SAITO T B,ALFIERI A A,WOSLACKI S R,et al. Detection of canine distemper virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in the urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis[J]. Res Vet Sci,2006,80:116-119.
- [7] 黄秋琳,许翔,江淑芳. 直接免疫荧光法对多种呼吸道病毒检测的临床意义[J]. 检验医学与临床,2008,5(3):135-136.
- [8] 严家新,祝玉桃,李承平,等. 抗狂犬病毒核蛋白荧光标记抗体的制备和初步鉴定[J]. 中国人畜共患病杂志,2000,16(5):59-62.
- [9] 金伯泉. 细胞和分子免疫学实验技术[M]. 北京:科学出版社,2001:36-37.
- [10] Amersham Pharmacia Biotech. Antibody purification handbook[M]. Uppsala:Amersham Pharmacia Biotech,2002:55.
- [11] 何昭阳,胡桂学,王春风. 动物免疫学实验技术[M]. 吉林:吉林科学技术出版社,2005:81-96.
- [12] JOZWIK A,FRYMUS T. Comparison of the immunofluorescence assay with RT-PCR and nested PCR in the diagnosis of canine distemper[J]. Vet Res Com,2005,29:347-359.
- [13] 袁书智,夏咸柱. 犬瘟热荧光抗体技术的应用研究[J]. 中国兽医学报,1994,14(2):146-149.
- [14] 付少才,尚太成,余洪涛,等. 美国免疫荧光试剂盒在我院的临床应用[C]. 全国第七次小动物疾病学术讨论会论文集,2002:181-110.
- [15] 杨百亮,张娟娟,段县平,等. 荧光抗体技术诊断犬瘟热的研究[J]. 中国动物检疫,2004,21(5):23-25.
- [6] 曲鲁江,吴桂琴,李显耀,等. 采用微卫星DNA标记分析部分地方鸡种保种场的保种效果[J]. 遗传学报,2004,31(6):591-595.
- [7] 刘望夷. 肉用鸡肌肉中肌苷酸含量的比较[J]. 中国农业科学,1980(4):79-83.
- [8] 李慧芳,屠云洁,汤青萍,等. 6个中国重点保护地方鹅品种的遗传多样性[J]. 四川农业大学学报,2005,23(4):466-469.
- [9] 黄胜海,李慧芳,陈宽维,等. 5个白鹅群体的遗传结构和进化分析[J]. 畜牧与兽医,2006,38(6):20-22.
- [10] 孟安明,齐顺章,宫桂芬. 四个控针产生的家禽DNA指纹图谱[J]. 生物化学与生物物理进展,1993,20(2):139-142.
- [11] 屠云洁,陈宽维,汤青萍,等. 利用微卫星标记分析我国13个地方灰羽鹅品种的遗传多样性[J]. 生物多样性,2006,14(2):152-158.
- [12] 张军,龚道清,张红,等. 利用微卫星标记分析溧阳鸡的群体遗传变异[J]. 中国家禽学报,2004,8(1):114-117.
- [13] BOLSTEIN D,WHITE R L,SKOLNICK M,et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism[J]. Am J Hum Genet,1980,32:314-331.
- [14] NEI M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals[J]. Genetics,1978,89:583-590.
- [15] 薛高波,张文彤,田晓燕,等. SAS.2 统计应用教程[M]. 北京:北京希望电子出版社,2004.
- [16] BARKER K K,VAN DREUMEL A A,PALMER N. The alimentary system [C]//JUBB K V F,KENNEDY P C,PALMER N. Pathology of domestic animals. San Diego:Academic Press,1994:163-172.
- [17] 王昕,耿社民,朱育红. 微卫星标记在畜禽育种中的应用[J]. 黄牛杂志,2002,28(1):39-42.
- [18] 张于光,李迪强,肖启明,等. 微卫星技术技术在动物遗传多样性研究中的应用[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版,2001,27(5):410-414.
- [19] 何大乾,孙国荣,沈洪民,等. 肉鹅消化器官生长发育规律初探[J]. 上海农业学报,2005,21(3):59-63.

(上接第3541页)