

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2023.06.02

禽流感病毒 NP 蛋白单克隆抗体的制备与鉴定

黄小洁, 薛 麒, 张 兵, 邓 永, 侯力丹, 吴华伟, 薛青红, 杨承槐, 刘 丹*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2022-11-23 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2023) 06-0010-07 [中图分类号] S852.65

[摘 要] 为获得禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV) NP 蛋白的单克隆抗体, 将构建的重组表达质粒 pET-30a-NP 转化 BL21 细胞, 经 IPTG 诱导表达、纯化后作为免疫原, 免疫 8 周龄 Balb/c 雌性小鼠, 并按常规方法制备杂交瘤细胞。通过 ELISA 方法、Western-blot 方法进行筛选, 获得 3 株杂交瘤细胞株, 命名为 3A6、2H12、5F7, 并进行了培养特性、分泌抗体活性、分泌抗体亚类的鉴定。结果显示: 3 株细胞株连续传 10 代均稳定分泌单克隆抗体, 分泌的单克隆抗体亚型均为 IgG2b, 轻链类型均为 Kappa。制备并纯化了以上 3 株单克隆抗体, 浓度分别为 2.9、2.5、2.8 mg/mL, 纯度不低于 90%。West-blot 检测, 单抗与 H7 血凝抑制试验抗原、H5 血凝抑制试验抗原、H9N2 病毒能发生特异性反应, 说明单抗具有广谱性, 且与 IBDV、REV、IBV、MDV、ALV、AE、ILT、NDV、EDSV 等均无特异性条带出现, 说明特异性良好。本研究制备的 3 株针对禽流感 NP 蛋白的单抗, 具有较好的特异性、保守性和广谱性, 为下一步开展 AIV 诊断试剂如 IFA 检测试剂盒、ELISA 检测试剂盒等的研制奠定了物质基础。

[关键词] 禽流感病毒; NP 蛋白; 单克隆抗体; 制备; 鉴定

Preparation and Identification of Monoclonal Antibody against NP Protein of Avian Influenza Virus

HUANG Xiao-jie, XUE Qi, ZHANG Bing, DENG Yong, HOU Li-dan,

WU Hua-wei, XUE Qing-hong, YANG Cheng-huai, LIU Dan*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: LIU Dan, E-mail: liudan813@163.com

Abstract: In order to obtain the monoclonal antibody against NP protein of Avian influenza virus (AIV), the recombinant expression plasmid pET30a-NP was transformed into BL21 cells. The recombinant plasmid pET30a-NP was induced by IPTG, purified and used as immunogen to immunize 8-week-old female Balb/c mice, and hybridoma cells were prepared by conventional methods. Three hybridoma cell lines, named 3A6, 2H12 and 5F7, were obtained by ELISA, Western-blot and IFA method. Their culture characteristics, antibody

基金项目: 兽药行业公益性重点专项(GY202105)

作者简介: 黄小洁, 高级兽医师, 从事兽用生物制品的检验和研究工作。

通讯作者: 刘 丹。E-mail: liudan813@163.com

secreting activity and subclass were identified. The results showed that the three cell lines stably secreted monoclonal antibodies for 10 passages, and the subtype of secreted monoclonal antibodies was IgG2b, light chain type was Kappa. The three strains of monoclonal antibody mouse ascites was prepared and purified, which concentration were 2.9, 2.5, 2.8 mg/mL separately, the purity were not less than 90%, The monoclonal antibody could react specifically with H7 hemagglutination inhibition test antigen, H5 hemagglutination inhibition test antigen, H9N2 virus, which indicated that the monoclonal antibody had broad spectrum. The monoclonal antibody had no specific bands with IBDV, REV, IBV, MDV, ALV, AE, ILT, NDV, EDSV, which indicated that the specificity was good. The three monoclonal antibodies against NP protein of AIV prepared in this study had good specificity, conservatism and broad - spectrum. This study layed a material foundation for the development of AIV diagnostic reagents such as IFA test kit, ELISA test kit in the next step.

Key words: Avian influenza; NP protein; monoclonal antibody; preparation; identification

禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV)属于正黏病毒科 A 型流感病毒属,基因组由 8 个单股负链 RNA 组成,每一条 RNA 都以不同的核糖核酸蛋白复合物形式存在。分别编码聚合酶(PB1、PB2 和 PA)、血凝素(HA)、核蛋白(NP)、神经氨酸酶(NA)和基质蛋白(M1 和 M2)等 8 种结构蛋白,以及 NS1、NS2、M42 和 NSP3 等非结构蛋白^[1-3]。AIV 亚型众多,变异速度快,根据其表面糖蛋白 HA 和 NA 抗原性的差异,分为 18 个 HA 亚型(H1 ~ H18)和 11 个 NA 亚型(N1 ~ N11)^[4-5]。其中 H5N1、H7N9 和 H9N2 等能够感染人类,具有重要的公共卫生学意义^[6-8]。H9N2 亚型禽流感于 1966 年首次从患温和呼吸道病的火鸡中分离到,1998 年在我国发生,因该病毒毒力较弱而常被忽视,导致该亚型禽流感在世界范围内迅速流行,给世界养禽业造成了巨大经济损失^[9-10]。

AIV 宿主范围广,容易发生变异和重组,使得检测比较困难。常规检测方法有病毒分离鉴定、血清学方法和分子生物学方法等^[11-13]。AIV 是《中国兽药典》规定必须检测的外源病毒之一,通过鸡胚接种,以鸡胚死亡或尿囊液具有 HA 特性作为判定依据进行初步鉴定;也可用针对 AIV 的单抗,用免疫荧光染色作为病毒的初步鉴定。单克隆抗体技术已广泛应用于 AIV 的抗原变异分析和检测方法的建立,利用抗 H9N2 亚型 AIV HA 单克隆抗体已鉴定了 AIV 逃逸突变毒株的关键氨基酸^[14-15]。

通过 AIV 序列分析,发现血凝素(HA 蛋白)及神经氨酸酶(NA 蛋白)在各个亚型中均有较大差异,只有其核蛋白(NP)在 H1 ~ H18 及 N1 ~ N11 各个亚型及重组病毒中高度保守。本研究旨在采用原核表达系统表达并纯化 NP 蛋白,并结合杂交瘤技术制备特异性单克隆抗体,为 AIV 检测方法研究和致病机制研究提供物质基础。

1 材料与方法

1.1 细胞、毒株、重组质粒、实验动物 MDCK 细胞、AIV/BJ15 株,均由中国兽医药品监察所保存;pET30a - NP 重组质粒,由中国兽医药品监察所构建及鉴定;8 周龄 Balb/c 雌性小鼠,购自北京勃林格殷格翰生物技术有限公司。

1.2 主要试剂 表达菌株 BL21 购自北京全式金公司;SDS - PAGE 凝胶制备试剂盒购自上海百赛生物技术有限公司;Protein Marker、羊抗鼠 IgG - HRP、一抗稀释液、膜封闭液、HRP 抗体稀释液、增强型 DAB 显色试剂盒、TBST 购自索莱宝生物科技有限公司;禽流感 H7 亚型血凝抑制试验抗原、禽流感 H9 亚型血凝抑制试验抗原为青岛生物工程有限公司产品;HAT、FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 为 Sigma 公司产品;Quick Antibody - Mouse 3 W 佐剂为北京博奥龙免疫技术有限公司产品。

1.3 重组质粒 pET30a - NP 的诱导表达 将重组质粒 pET30a - NP 转化至 BL21 感受态细胞,接种于 LB(Amp⁺)液体培养液,37 °C 培养过夜,获得种

子菌。将培养物转接培养至 $OD = 0.6 \sim 0.8$, 加入 IPTG (0.5 mmol/L) 诱导, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 2 h。取 1 mL 诱导的菌液, 12000 r/min 离心 1 min, 弃上清, 沉淀用 50 μL 10 mmol/L Tris - HCl (pH8.0) 溶液吹散, 加入与缓冲液等体积的 $2 \times$ loading buffer, $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 煮 5 min, SDS - PAGE 电泳检测。

1.4 NP 重组蛋白的可溶性分析 接 1 μL 活化的菌液加到 5 mL LB (Amp⁺) 液体培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。将培养的菌液转接到 250 mL LB (Amp⁺) 液体培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养至 $OD = 0.6 \sim 0.8$, IPTG (0.5 mmol/L) $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ 诱导过夜。8000 r/min 离心 6 min, 弃上清。菌体用 30 mL 10 mmol/L Tris - HCl (pH 8.0) 溶液吹散, 超声波破碎 (500 W, 180 次, 每次 5 s, 间隔 5 s)。取 100 μL 超声后的菌悬液, 12000 r/min, 离心 10 min, 取 50 μL 上清至另一 EP 管, 上清去除干净后沉淀用 50 μL 10 mmol/L Tris - HCl 溶液吹散。SDS - PAGE 电泳检测。

1.5 NP 重组蛋白的纯化 向 250 mL 菌液所得超声沉淀中, 加入 20 mL 10 mmol/L Tris 溶解, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10000 r/min 离心 15 min, 洗涤沉淀两次。先加入 500 μL 10 mmol/L Tris 吹匀沉淀, 再加 20 mL 2 mmol/L 尿素 + 10 mL 10 mmol/L Tris 混匀, 10000 r/min 离心 15 min, 收集上清, 洗涤沉淀两次。先加入 500 μL 10 mmol/L Tris 吹匀沉淀, 再加 5 ~ 10 mL 8 mmol/L 尿素 + 10 mL 10 mmol/L Tris + 0.5 g NaCl, 混匀, 超声 2 ~ 3 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10000 r/min 离心 10 min, 收集上清, 向沉淀中加入 20 mL 10 mmol/L Tris 溶解, 取出 80 μL 进行 SDS - PAGE 考染检测。

1.6 动物免疫 将纯化后的 NP 蛋白与 Quick Antibody - Mouse 3 W 佐剂等体积混匀作为免疫原, 通过背部皮下多点注射免疫小鼠, 每只小鼠接种 30 μg 。共进行 3 次免疫, 每次免疫接种间隔 2 周。第 3 次免疫 1 周后采血, 分离血清检测抗体效价, 第 3 次免疫后 2 周腹腔注射 30 μg 免疫原加强免疫 1 次。

1.7 NP 重组蛋白间接 ELISA 方法的建立 利用方阵滴定法进行 ELISA 试验, 确定 NP 抗原最佳包被浓度与血清最佳稀释度。重组蛋白 NP 纯化后浓

度为 0.5 mg/mL, 用包被液对其进行 1:100、1:200、1:400、1:800 及 1:1600 倍稀释, 以确定最佳抗原稀释度; 同时, 将小鼠阳性血清进行倍比稀释, 以免免疫小鼠血清作为阴性对照。按照 $P/N = \text{阳性血清 } OD_{450\text{ nm}} / \text{阴性血清 } OD_{450\text{ nm}}$ 值, 求出 P/N 值。以阳性对照 $OD_{450\text{ nm}}$ 读值最接近于 1.0, 且 P/N 大于 2.1 的抗原和血清稀释度作为最佳工作浓度。

1.8 细胞融合 无菌条件下取免疫小鼠的脾细胞, 用无血清培养基洗 3 次, 计数并重悬于 20 mL 培养液中, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置备用。取处于对数生长期的小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0, 用无血清培养基洗 3 次, 计数并重悬, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^7 / \text{mL}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置备用。将脾细胞和 SP2/0 细胞按 5:1 混合, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1000 r/min 离心 10 min。轻轻去掉上清, 并把细胞沉淀打散, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中, 在 1 min 内边混合边逐滴加入 1 mL 50% PEG, 继续混合, 在 2 min 内加入 2 mL 预热的 DMEM, 4 min 内边混合边加入另外 8 mL 含 10% FBS 的 DMEM。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1000 r/min 离心 10 min。加入含 10% FBS 的 DMEM 轻轻混匀, 铺板, 0.15 mL/孔, 每孔 1×10^5 个细胞。加入 0.05 mL HAT, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养。10 d 后收集杂交瘤细胞上清采用间接 ELISA 方法进行检测。

1.9 间接 ELISA 鉴定单克隆抗体特异性 用纯化的 NP 蛋白与 His 蛋白分别包被酶标板, 100 μL /孔, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 包被酶标板过夜, 用洗液洗涤 3 次。封闭液 (2% 脱脂奶粉) 封闭, 200 μL /孔, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 后用洗液洗涤 3 次。加入一抗 (细胞培养上清)、阴性对照 (SP2/0 培养上清)、空白对照 (PBS)、阳性对照 (阳性血清 PBS 稀释 1000 倍), 均为 100 μL /孔, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 后用洗液洗涤 3 次。加入 PBS 稀释 20000 倍的二抗, 100 μL /孔, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 取出后用洗液洗涤 3 次。加入显色液 100 μL /孔, 显色时间为 10 min 左右。每孔加入 50 μL 终止液终止。双波长 (450 nm、630 nm) 测吸光值, 记录保存数据。

1.10 杂交瘤细胞的鉴定

1.10.1 类及亚类的鉴定 用包被液稀释“亚类包被抗体”, 终浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 μL /孔, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜,

后用洗液洗涤 3 次。封闭液封闭, 200 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, 后用洗液洗涤 3 次。加入一抗(细胞培养上清)、阴性对照(SP2/0 培养上清)均为 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 后用洗液洗涤 3 次。用 PBS 稀释各型亚类二抗, 100 μ L/孔, 分别加入适当的孔中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 取出后用洗液洗涤 3 次。加入显色液 100 μ L/孔, 显色时间为 10 min 左右。每孔加入 50 μ L 终止液终止。双波长(450 nm、630 nm)测吸光值, 记录保存数据。

1.10.2 Western-blot 检测单克隆抗体特异性 将灭活后的 AIV/BJ15 株、AIV H5 亚型血凝抑制试验抗原、AIV H7 亚型血凝抑制试验抗原经处理后, 进行 SDS-PAGE 电泳分离, 并转至 PVDF 膜上; 封闭液 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜, TBST 洗涤 3 次后, 用适当稀释的杂交瘤细胞上清室温孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次, 用 1:10000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 二抗室温孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次, 用增强型 DAB 显色试剂盒进行显色。将 IBDV、REV、IBV、MDV、ALV、AE、ILT、NDV、EDSV 等常见的禽类病毒经处理后, 用 Western-blot 方法进行检测, 评价单抗的特异性。

1.10.3 IFA 鉴定单克隆抗体 MDCK 细胞置于 48 孔板进行培养, 待细胞长至 80% 左右时, 接种 AIV/BJ15 病毒, 培养 48 h, 进行 IFA 试验。以阳性孔杂交瘤细胞培养上清作为一抗, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; 以 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 作为二抗, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; 洗涤后在荧光显微镜下观察结果。

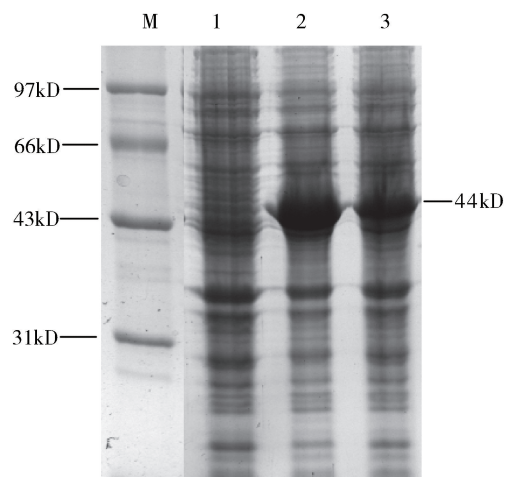
1.11 单克隆抗体腹水的制备 小鼠腹腔注射液体石蜡致敏, 每只 0.5 mL, 7 d 后经腹腔注射阳性杂交瘤细胞, 将杂交瘤细胞浓度调整为 2×10^6 /mL, 每只小鼠注射 0.5 mL。7~10 d 后待小鼠腹腔膨大时无菌收取腹水, 4 $^{\circ}$ C 12000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 即获得单克隆抗体。

1.12 单克隆抗体的纯化与鉴定 将收集的腹水以 10000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 取上清, 用小型过滤器过滤后放置于冰上。用预冷的 20 mmol/L PB、

3 mol/L NaCl pH7.4 溶液平衡 5 mL 的 HiTrap MabSelect 亲和纯化亲和柱 10 个柱体积。用预冷的 20 mmol/L PB、3 mol/L NaCl pH7.4 溶液将样品稀释 5 倍后上柱结合。上样完毕用预冷的 20 mmol/L PB、3 mol/L NaCl pH7.4 溶液平衡 2.5 mL 的 HiTrap MabSelect 亲和纯化亲和柱 10 个柱体积。用 200 mL 甘氨酸缓冲液, pH3.0 溶液洗脱, 收集完毕, 立即加入 300 μ L 调节溶液, 轻轻混匀即可。将收集的组分用 SDS-PAGE 电泳检测进行纯度检测。采用紫外分光光度计测定纯化后的单克隆抗体浓度。

2 结果与分析

2.1 pET30a-NP 的诱导表达 取 1 mL 诱导表达的菌液进行 SDS-PAGE, 结果在 44 kD 处可见表达条带, 符合预期大小(图 1)。



M: 蛋白分子质量标准; 1: 未诱导对照(BL21); 2-3: IPTG 诱导(BL21)

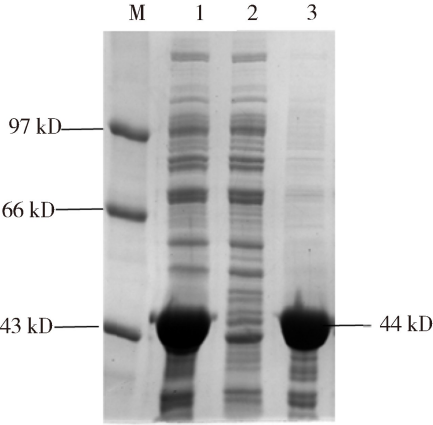
M: Protein molecular weight Marker; 1: No induced control (BL21);
2-3: IPTG induced (BL21)

图 1 pET30a-NP 诱导表达

Fig 1 The induced expression of pET30a-NP

2.2 重组蛋白的可溶性分析 超声裂解诱导后的菌液, 将菌液上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE 电泳, 结果显示, pET30a-NP 蛋白主要出现在沉淀中, 提示该蛋白在包涵体中表达(图 2)。

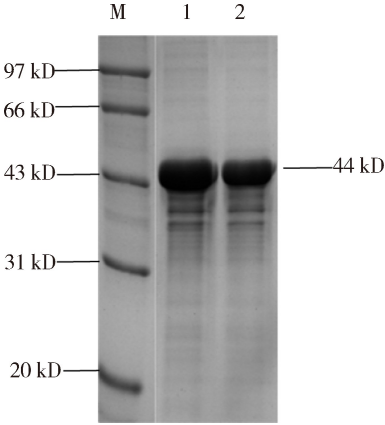
2.3 蛋白纯化结果 将表达蛋白纯化后进行 SDS-PAGE 电泳检测, 结果显示获得纯度较高的 pET30a-NP 重组蛋白, 浓度为 1.8 mg/mL(图 3), 可以用于动物免疫。



M:蛋白分子质量标准;1.:超声后全菌;
2:超声后上清;3:超声后沉淀
M:Protein molecular weight Marker;1:Total bacteria after ultrasound;
2:Ultrasound supernatant;3:Precipitation after ultrasound

图2 pET30a-NP 重组蛋白可溶性分析

Fig 2 Soluble analysis of pET30a-NP recombinant protein



M:蛋白分子质量标准;1. 纯化蛋白稀释 5 倍 2:纯化蛋白稀释 10 倍
M:Protein molecular weight Marker;1:5 fold dilution of
purified protein;2:10 fold dilution of purified protein;

图3 pET30a-NP 重组蛋白的纯化

Fig 3 Purificaiton of pET30a-NP recombinant protein

2.4 杂交瘤细胞筛选 当杂交瘤细胞铺满孔底面积的 1/5 时,将培养上清用间接 ELISA 法在 NP 蛋白和 His 蛋白包被板上进行 ELISA 抗体检测,在至少进行了 3 次筛选后,将 3 次筛选均显示阳性的细胞株进行亚克隆及扩大培养定株。共筛选出 3 株 ELISA 阳性杂交瘤细胞株,分别命名为 3A6、2H12、5F7(表 1)。

表 1 杂交瘤细胞株的 ELISA 分析

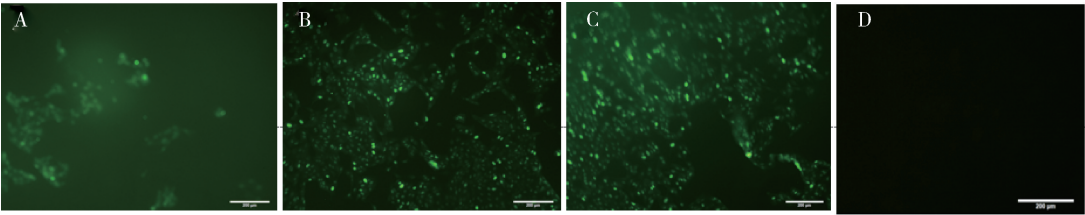
Tab 1 ELISA analysis of hybridoma cell lines		
样品	针对 NP 蛋白的 OD 值	针对 His 蛋白包被 OD 值
3A6	1.033	0.117
2H12	1.025	0.109
5F7	0.991	0.114

2.5 杂交瘤细胞的类及亚类的鉴定 用 ELISA 方法对三株杂交瘤细胞进行鉴定,结果显示 3A6、2H12、5F7 重链类型均为 IgG2b,轻链类型均为 Kappa(表 2)。

表 2 ELISA 法测定单克隆抗体类及亚类

Tab 2 Detection of subclasses of McAbs by ELISA								
样品	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgA	IgM	Kappa	Lambda
3A6	0.050	0.031	0.576	0.051	0.059	0.042	0.555	0.056
2H12	0.043	0.047	0.559	0.049	0.041	0.050	0.435	0.062
5F7	0.058	0.039	0.555	0.062	0.055	0.048	0.441	0.061

2.6 IFA 鉴定单克隆抗体 制备的 3 株单抗均可与 AIV H9N2 株感染的 MDCK 细胞发生反应,产生绿色荧光,而对照组均未见绿色荧光(图 4)。结果表明,制备的 3 株单抗均能识别并结合 AIV 的某些蛋白。



A:3A6 样品;B:2H12 样品;C:5F7 样品;D:对照
A:3A6 sample; B: 2H12 sample; C: 5F7 sample; D: Control

图4 IFA 鉴定单克隆抗体特异性

Fig 4 IFA identification of monoclonal antibody specificity

2.7 腹水纯化结果 将 3A6、2H12、5F7 三株杂交瘤细胞株扩大培养后接种小鼠制备腹水。采用 HiTrap MabSelect 亲和纯化方法对采集的腹水进行纯化,获得纯度不低于 90% 的单克隆抗体(图 5)。

2.8 腹水单抗浓度测定 采用紫外分光光度计检测抗体浓度,3A6、2H12、5F7 单抗浓度分别为 2.9、2.5、2.8 mg/mL。

2.9 Western - blot 检测 三株单抗与 H7 血凝抑制试验抗原、H5 血凝抑制试验抗原、H9N2 病毒在 56 kD 处发生特异性反应(图 6),与 IBDV、REV、IBV、MDV、ALV、AE、ILT、NDV、EDSV 等均无特异性条带出现,说明特异性良好。

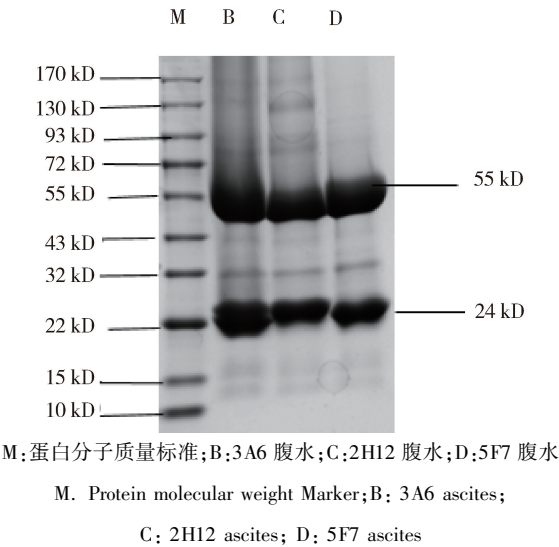


图 5 腹水纯化结果

Fig 5 Results of ascites purification

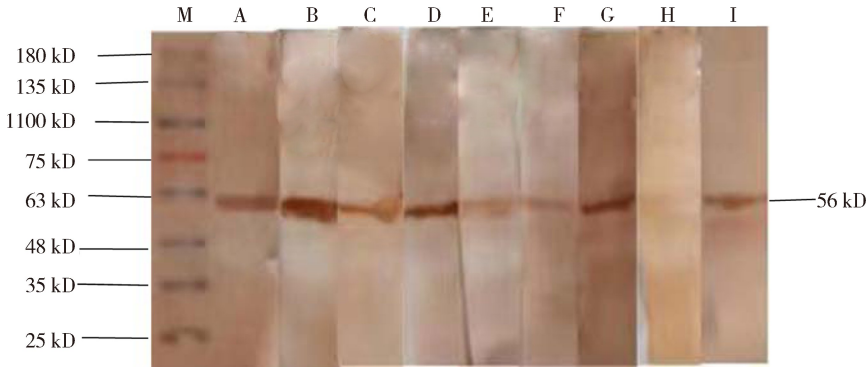


图 6 单抗与各亚型 AIV Western - blot 检测结果

Fig 6 Western - blot detection results of monoclonal antibody and influenza viruses of various subtypes

3 讨论

禽流感被我国列为一类传染病,其病毒具有变异性强、传播速度快、死亡率高等特点,严重威胁养殖业的发展和人类生命安全。对禽流感疫情防控的原则是早发现、早隔离、早诊断、早控制,因此建立有效的检测方法尤为重要。AIV 为囊膜病毒,其

HA 和 NA 蛋白在病毒感染和免疫识别过程中发挥重要作用,是流感疫苗和快速检测的主要靶标。Dong 等利用细胞融合法筛选了 12 株针对 HA 基因中和表位的单克隆抗体,并建立了一种检测 AIV - H7 抗体的竞争 ELISA 方法,与经典的血凝抑制试验方法的符合率为 97.52%,可用于鸡、鸭、鹅、鹌鹑

和鸽的 AIV H7 抗体的诊断^[11]。Li 等利用灭活纯化的 H7N9 AIV 作为免疫原制备了单克隆抗体,并以单克隆抗体作为检测抗体研制了检测 H7 AIV 的免疫层析试纸条,为 AIV 的快速早期检测提供了一种有效的方法^[16]。单克隆抗体技术在病毒的基因、蛋白的结构和功能研究,诊断和检测中发挥了重要作用,开展相关单克隆抗体研制十分必要。

本研究对 AIV NP 基因序列进行综合性二级分析及抗原性分析,选择亲水性好且抗原性较好的 157–498aa 区域进行后期抗原制备。利用大肠杆菌表达的纯化 AIV NP 蛋白,按常规方法免疫小鼠,采用 ELISA 方法、Western blot 方法和间接免疫荧光方法筛选出 3 株杂交瘤细胞株,ELISA 方法筛选时,选用表达 NP 蛋白和标签蛋白 His 作为包被抗原,进行多次筛选。和 ELISA 方法比较,IFA 方法直接与感染病毒进行反应,能更大可能识别 AIV NP 蛋白的天然抗原表位,从而避免采用表达的蛋白可能存在的交叉反应现象,检测时间更短,结果更直观可靠。对于筛选用于 FA 或 IFA 的单克隆抗体而言,直接采用 IFA 方法可以快速筛选出符合目的要求的杂交瘤细胞。本研究制备的单抗与 NDV、IBDV 等禽常见病毒均无交叉反应,为下一步开展 AIV 诊断试剂如 IFA 检测试剂盒、ELISA 检测试剂盒等的研制奠定了物质基础。

参考文献:

- [1] Yu Y N, Zheng Y, Hao S S, *et al.* The molecular evolutionary characteristics of new isolated H9N2 AIV from East China and the function of vimentin on virus replication in MDCK cells[J]. J Virol, 2020, 17(1):78.
- [2] Tang W T, Li X Y, Tang L, *et al.* Characterization of the low – pathogenic H7N7 avian influenza virus in Shanghai, China[J]. Poult Sci, 2021,100(2): 565–574.
- [3] Zowalaty M E, Bustin S A, Hussein M I, *et al.* Avian influenza: virology, diagnosis and surveillance [J]. Future Microbiol, 2013, 8(9): 1209–1227.
- [4] Spackman E. A brief introduction to avian influenza virus[J]. Methods Mol Biol, 2020, 2123: 83–92.
- [5] Wang Y X, Li J X, Liu P, *et al.* Progress in research of avian influenza virus and human monoclonal antibody and vaccines against H7 N9 virus [J]. Chinese Journal of Epidemiology, 2021, 42(9): 1700–1708.
- [6] Harder TC, Buda S, Hengel H, *et al.* Poultry food products – a source of avian influenza virus transmission to humans[J]. Clin Microbiol Infect, 2016, 22(2): 141–146.
- [7] Li Y T, Linster M, Mendenhall I H, *et al.* Avian influenza viruses in humans: lessons from past outbreaks [J]. Br Med Bull, 2019, 132(1): 81–95.
- [8] Zhang Z J, Li R, Jiang L F, *et al.* The complexity of human infected AIV H5N6 isolated from China [J]. BMC Infect Dis, 2016, 16(1): 600.
- [9] Ferenczi M, Beckmann, Klaassen M. Rainfall driven and wild – bird mediated avian influenza virus outbreaks in Australian poultry [J]. BMC Vet Res, 2021, 17(1):306.
- [10] Velkers F C, Blokhuis S J, Kroeze E J, *et al.* The role of rodents in avian influenza outbreaks in poultry farms: a review[J]. Vet Q, 2017, 37(1):182–194.
- [11] Dong J, Fan J Q, Wang Y Y, *et al.* Development and evaluation of a C – ELISA for rapid detection of antibody to AIV – H7[J]. Anal Biochem, 2019, 572:52–57.
- [12] Zowalaty M E, Chander Y, Redig P T, *et al.* Selective isolation of Avian influenza virus (AIV) from cloacal samples containing AIV and Newcastle disease virus[J]. J Vet Diagn Invest, 2011, 23(2): 330–332.
- [13] Lee J, Cho A Y, Ko H H, *et al.* Evaluation of insulated isothermal PCR devices for the detection of avian influenza virus [J]. J Virol Methods, 2021, 292:114126.
- [14] Wan Z, Ye J, Xu L, *et al.* Antigenic mapping of the hemagglutinin of an H9N2 Avian influenza virus reveals novel critical amino acid positions in antigenic sites[J]. J Virol, 2014, 88(7): 3898–3901.
- [15] Zhu Y, Yang D, Ren Q, *et al.* Identification and characterization of a novel antigenic epitope in the hemagglutinin of the escape mutants of H9N2 avian influenza viruses [J]. Vet Microbiol, 2015, 178(1/2):144–149.
- [16] Li G, Wang X, Li Q, *et al.* Development of an immunochromatographic strip for rapid detection of H7 subtype avian influenza viruses[J]. J Virol, 2021, 18(1): 68.

(编辑:李文平)