

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2024.03.01

血清 1 型马立克氏病病毒单克隆抗体的制备及其特异性鉴定

苏佳, 赵炜, 翟天舒, 白洪旭, 刘伟洁, 薛麒, 薛青红, 陈晓春*

(中国兽医药品监察所(农业农村部兽药评审中心), 北京 100081)

[收稿日期] 2023-10-24 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2024) 03-0001-09 [中图分类号] S859.79

[摘要] 为制备血清 1 型马立克氏病病毒(Marek's disease virus, MDV)单克隆抗体,以超速离心浓缩的血清 1 型 MDV CVI988/Rispens 毒株免疫 BALB/c 小鼠,应用杂交瘤技术制备单克隆抗体。通过亚克隆、间接 ELISA 和间接免疫荧光(Indirect immunofluorescence assay, IFA)筛选,获得 3 株分泌特异性抗血清 1 型 MDV 单克隆抗体的杂交瘤细胞系,分别命名为 4D9、1C5 和 1F10,并对其进行特异性分析。间接 ELISA 结果显示,4D9、1C5 和 1F10 制备的腹水 ELISA 效价分别达 5.1×10^4 、 8.2×10^5 、 4.1×10^5 ,可用于后续建立 ELISA 检测方法;IFA 结果显示,4D9、1C5 和 1F10 制备的腹水与不同血清 1 型 MDV 毒株具有良好的反应性,效价可分别达 1:12800、1:25600 和 1:12800,与血清 3 型 MDV 毒株和其他常见禽源病毒均没有交叉反应,特异性良好;亚型检测结果显示,4D9 抗体为 IgG2a/ κ 型,1C5 抗体为 IgG2b/ κ 型,1F10 抗体为 IgG1/ κ 型;应用 1C5 建立的 IFA 方法能检出至少 5PFU CVI988/Rispens 毒株感染,适用于血清 1 型 MDV 的检测。综上,制备的单克隆抗体可用于血清 1 型 MDV 的检测,为 MDV 致病机制研究及诊断试剂研发提供基础。

[关键词] 马立克氏病病毒;单克隆抗体;鉴定

Preparation and Specificity Identification of Monoclonal Antibody against Serotype 1 Marek's Disease Virus

SU Jia, ZHAO Wei, ZHAI Tian-shu, BAI Hong-xu, LIU Wei-jie, XUE Qi,

XUE Qing-hong, CHEN Xiao-chun*

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

Corresponding author: CHEN Xiao-chun, E-mail: chunxiao1981@126.com

Abstract: To prepare the monoclonal antibody (McAb) of serotype 1 Marek's disease virus, BALB/c mice were immunized with the serotype 1 MDV CVI988/Rispens strain concentrated by ultracentrifugation, and McAbs were prepared by hybridoma technique. By subcloning, indirect ELISA and indirect immunofluorescence assay (IFA)

基金项目: 中国兽医药品监察所兽药行业公益性重点专项“禽源制品外源病毒检验新方法 & 标准物质的研究”(GY202105)

作者简介: 苏佳,助理研究员,从事兽用生物制品检验及相关研究工作。

通讯作者: 陈晓春。E-mail: chunxiao1981@126.com

identification, three positive McAb cell lines were obtained and named as 4D9, 1C5 and 1F10, respectively. Then, the specificity of the obtained McAbs was analyzed. The ELISA titers of 4D9, 1C5 and 1F10 reached 5.1×10^4 , 8.2×10^5 and 4.1×10^5 , indicating that all of the three could be used to establish ELISA detection methods; IFA results showed that the ascites prepared by 4D9, 1C5 and 1F10 had good reactivity with different serotype 1 MDV strains with the titers of 1:12800, 1:25600 and 1:12800, respectively, and all of the three have no cross-reactivity with serotype 3 MDV strains and other common avian-derived viruses; The subtype test of the three above McAbs indicated that 4D9 was IgG2a/ κ subtype, 1C5 was IgG2b/ κ subtype and 1F10 was IgG1/ κ subtype. The IFA method established with 1C5 could detect more than 5 PFU CVI988/Rispens, confirming that this method is suitable for the detection of serotype 1 MDV. In summary, the McAbs obtained in this study can be used for the detection of serotype 1 MDV and provide the basis for further researches on MDV pathogenicity and the development of diagnostic reagents.

Key words: Marek's disease virus; monoclonal antibody; identification

马立克氏病(Marek's disease, MD)是由鸡马立克氏病病毒(Marek's disease virus, MDV)感染鸡后引起的一种免疫抑制性疾病,发病鸡只的皮肤、肌肉、虹膜、神经、内脏器官和性腺发生单核细胞浸润、形成T淋巴细胞增生性肿瘤,影响鸡的生长发育及产蛋性能^[1,2]。自1907年MDV发现以来,已扩散至世界各地,MDV主要的天然宿主是鸡,一旦感染后可终身带毒并可不断向外界排毒,严重危害全球养禽业的健康发展^[3,4]。如:2015年,我国广西玉林某规模约5000只肉用乌鸡的养殖场暴发MD继发大肠杆菌病,发病率约10%、死亡率约8%^[5];超强毒和特超强毒感染没有免疫的鸡群能导致鸡群3月内全部死亡^[6]。

MDV是疱疹病毒目(*Herpesvirales*) α 疱疹病毒亚科(*Alphaherpesvirinae*)马立克病毒属(*Mardivirus*)的一员(<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>),MDV基因组为线性双股DNA,大小约160~180kb,根据病毒的血清学反应,可以分为三个血清型:致瘤性较强的血清1型MDV,又名禽疱疹病毒2型(*Gallid herpesvirus type 2*, GaHV-2);非致瘤性的血清2型MDV,又名禽疱疹病毒3型(*Gallid herpesvirus type 3*, GaHV-3)和火鸡疱疹病毒(*Meleagrid herpesvirus 1*, MeHV-1),即血清3型MDV。三种血清型之间具有50~80%的同源性^[7,8],目前各血清型间的分子生物学鉴别诊断方法报道较多,

如普通PCR^[9]、实时荧光定量PCR^[10,11]、环介导等温扩增(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术^[12]等,但相关免疫学鉴别诊断技术报道较少。

MDV单克隆抗体的制备,可为研究其致病机制及开发诊断试剂提供重要基础物质^[13]。我们前期通过将血清1型MDV和血清3型MDV gE蛋白各自保守区分别作为免疫原制备单克隆抗体,所得单克隆抗体具有良好的ELISA反应特性,但不可用于间接免疫荧光试验,严重限制了其使用范围(研究成果未发表)。这可能是由于体外表达蛋白无法真实还原病毒蛋白结构,导致其作为免疫原制备的单抗与病毒粒子反应性较差。宋利娜等以纯化的MDV免疫小鼠,通过免疫过氧化物酶单层细胞试验和Western-blot筛选,获得一株分泌强阳性抗MDV单克隆抗体的杂交瘤细胞株,但未对单抗的特异性进行鉴定^[14]。基于此,我们尝试以浓缩的血清1型MDV作为免疫原,通过亚克隆、间接ELISA和IFA筛选,以期获得灵敏度高、特异性强、交叉反应少的血清1型MDV单克隆抗体,为后续研究其致病机制、开发免疫学诊断试剂提供基础。

1 材料

1.1 细胞与动物 9~10日龄SPF鸡胚购于北京勃林格殷格翰维通生物技术有限公司;6~8周龄BALB/c雌性小白鼠、经产昆明鼠购于北京维通利

华实验动物技术有限公司;SP2/0 骨髓瘤细胞由中国检验检疫科学研究院动物检验与检疫研究所提供。

1.2 病毒 血清 1 型 MDV 疫苗株 CVI988/Rispens 株、814 株和 CVTR 株均购自疫苗生产厂家;血清 1 型 MDV 野毒株 AV1553 株和 Md5 株,血清 3 型 MDV 火鸡疱疹病毒(Herpesvirus of turkey, HVT)FC126 株、禽网状内皮组织增生症病毒(Avian reticuloendothelial virus, REV)T 株、禽白血病病毒(Avian leukemia virus, ALV) - A(RAV - 1 株)和 ALV - B(RAV - 2 株)、鸡新城疫病毒(NDV)La Sota 株、鸡传染性法氏囊病毒(Infectious bursal disease virus, IBDV)B87 株、禽腺病毒 I 群(Avian adenovirus group I, Fadv - I)YR36 株,均由中国兽医药品监察所保存。

1.3 试剂 HAT 选择培养基、HT 选择培养基、融合剂聚乙二醇(Polyethylene glycol, PEG)和 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 购于 Sigma 公司;HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 购于全式金生物技术有限公司;新生牛血清(New - born calf serum, NBS)和胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)购于 PAN 公司;M199、DMEM 和胰酶购于 Gibco 公司;QuickAntibody - Mouse5 W(5 周标准鼠单抗/多抗制备佐剂)、腹水专用佐剂、单抗亚类鉴定试剂盒购于北京博奥龙免疫技术有限公司;MDV 特异性血清由中国兽医药品监察所保存;SDS - PAGE 电泳缓冲液、HRP 标记的兔抗鸡 IgG 和转膜液购于北京索莱宝科技有限公司;BCA 蛋白定量试剂盒购于 Thermo Fisher Scientific 公司。

PBST 洗液:将 500 μ L 吐温 - 20 加入到 1,000 mL PBS 中,混匀备用。

2 方法

2.1 鸡胚成纤维细胞(Chick embryo fibroblast, CEF)的制备 参照现行《中国兽药典》^[15]附录进行制备。取 9 ~ 10 日龄 SPF 鸡胚,表面喷洒酒精消毒后放入生物安全柜内,无菌取出鸡胚,放入平皿中,PBS 冲洗胚体后去除头、四肢和内脏;将处理好的胚体转移至小烧杯内,PBS 冲洗 3 次,将胚体剪

成约 2 ~ 3 mm³小块后转移到含组织研磨球的三角瓶内,再用 PBS 冲洗至组织块基本不含红细胞,加入不含 EDTA 的 0.25% 胰酶盖过组织块,封口后放入 37 $^{\circ}$ C 水浴锅消化 10 ~ 15 min,期间轻轻晃动一次,以保证消化充分;弃掉胰酶,加适量的含 5% NBS 的 M199 营养液终止胰酶消化反应,轻摇三角瓶使组织与研磨球充分碰撞,细胞充分释放、分散,适当沉淀组织块后,将上清细胞分散液倒入带有 12 层纱布漏斗及烧杯内过滤,重复 3 ~ 5 次至细胞分散完毕;细胞计数,调整细胞悬液的浓度为 1.0 ~ 2.0 $\times 10^6$ 个/mL,分瓶或铺细胞板;置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。

2.2 CVI988/Rispens 免疫原的制备及鉴定 将 CVI988/Rispens 接种已长成良好单层的 CEF 细胞,每日观察细胞病变(Cytopathic effect, CPE),在 80% 细胞出现 CPE 时,收获细胞,于室温和 -80 $^{\circ}$ C 间反复冻融 3 次,8000 r/min 离心 10 min 去除细胞沉淀,取上清进行超速离心,30000 r/min 离心 3 h,用 PBS 重悬沉淀,获得浓缩的 CVI988/Rispens 抗原,采用 SDS - PAGE 和 Western - blot 鉴定浓缩结果,通过 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。SDS - PAGE 和 Western - blot 鉴定:将浓缩及未浓缩 CVI988/Rispens 制备样品后,取等体积样品进行 SDS - PAGE 电泳,然后进行考马斯亮蓝染色鉴定,同时将 SDS - PAGE 电泳分离的蛋白转到 NC 膜上,通过封闭、一抗(MDV 特异性血清)孵育、二抗(HRP 标记的兔抗鸡 IgG)孵育及底物反应进行 Western - blot 鉴定。

2.3 单克隆抗体制备

2.3.1 免疫小鼠 取浓缩的 CVI988/Rispens 抗原适当稀释后与 QuickAntibody - Mouse5 W 快速免疫佐剂按体积 1:1 比例混合后,在 6 ~ 8 周龄 BALB/c 雌性小鼠后腿小腿肌肉注射进行第 1 次免疫,每只小鼠免疫 100 μ L(含抗原 5 μ g)。21 d 后,同样的免疫剂量与免疫途径进行第 2 次免疫。二次免疫后第 14 天,将小鼠断尾采血,用间接 ELISA 和 IFA 方法检测血清抗体效价,同时采集未免疫小鼠血清作为阴性对照,若免疫小鼠血清间接 ELISA 效价达

到 1:10000, IFA 效价达到 1:1000, 则按照第 1 次免疫的剂量与免疫途径进行加强免疫, 加强免疫后 3 天进行融合。

2.3.2 细胞融合和筛选 细胞融合前一天, 取 1 只 BALB/c 雌性小白鼠, 摘眼球采血, 作为阴性血清对照, 脱颈处死后取其腹腔巨噬细胞制作饲养层细胞, 铺 96 孔细胞板后置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中备用。加强免疫 3 天后, 将小鼠摘眼球采血, 脱颈处死后, 无菌取其脾细胞, 将脾细胞与 SP 2/0 细胞以 5:1 ~ 10:1 的比例均匀混合, 使用 50% PEG 溶液诱导细胞融合, 添加 HAT 培养基终止细胞融合, 将融合后的细胞添加到已铺满单层的饲养层细胞中, 继续培养。待融合细胞生长至 20% ~ 50% 时, 通过间接 ELISA 和 IFA 方法筛选阳性杂交瘤细胞株, 采用有限稀释法对阳性杂交瘤细胞株进行亚克隆, 至少亚克隆三次, 直至所有亚克隆细胞孔抗体均为阳性, 扩大培养后于液氮中保存。对筛选出的阳性杂交瘤细胞株分别进行亚型鉴定、细胞稳定性检测、支原体检验和外源病毒检验。

2.3.3 腹水的制备 杂交瘤细胞株经鉴定合格后, 制备小鼠腹水。取经产昆明小鼠 10 只, 每只腹腔注射腹水专用佐剂 400 μL, 15 d 后腹腔注射杂交瘤细胞, 每只小鼠 $8 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ /500 μL, 7 ~ 10 d 后观察小鼠状态, 待小鼠腹部明显膨大、行动不便时, 抽取小鼠腹水, 3000 r/min 离心 10 min, 取上清, -70 °C 保存。间隔 2 ~ 3 d, 若腹水再次产生, 可再次采集。

2.4 单克隆抗体的特异性检测 用制备的腹水, 对接种了血清 1 型 MDV (CVI988/Rispens 株、814 株、CVTR 株、AV1553 株和 Md5 株)、血清 3 型 MDV HVT FC126 株和其他常见禽源病毒的带毒细胞进行 IFA 检测, 观察是否出现特异性荧光, 以确定该单抗的特异性。

2.5 间接 ELISA 方法的建立 包被: 使用 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液 (pH 9.6) 稀释浓缩的 CVI988/Rispens 抗原, 加入 96 孔酶标板, 100 μL/孔, 4 °C 过夜包被; 封闭: PBST 洗涤 3 次, 每次 3 min, 加入 5% 脱脂乳封闭液, 200 μL/孔, 37 °C 封闭 2 h; 一抗孵

育: PBST 洗涤 3 次, 每次 3 min, 将腹水进行适宜稀释后加入, 100 μL/孔, 37 °C 孵育 1 h; 二抗孵育: PBST 洗涤 3 次, 每次 3 min, 加入 1:10000 稀释的 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG, 100 μL/孔, 37 °C 孵育 1 h; 显色: PBST 洗涤 3 次, 每次 3 min, 加入 TMB 底物溶液, 100 μL/孔, 室温避光反应 15 min, 用 2 mol/L H₂SO₄ 终止液终止反应, 50 μL/孔, 酶标仪读取 OD_{450nm} 值。与阴性对照 OD_{450nm} 值比值大于 2.1 判为阳性。

2.6 IFA 方法的建立

2.6.1 IFA 试验程序 固定: 弃去细胞板中培养基, 加入冷丙酮, 50 μL/孔, 4 °C 固定 20 min, 弃去丙酮, 自然晾干; 一抗孵育: PBS 洗板 3 次, 每次 3 min, 甩干, 加入用 PBS 适当稀释的一抗, 100 μL/孔, 37 °C 孵育; 二抗孵育: PBS 洗板 3 次, 每次 3 min, 甩干, 加入用 PBS 适当稀释的 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗, 100 μL/孔, 37 °C 孵育; 观察: PBS 洗板 3 次, 每次 3 min, 甩干, 在倒置荧光显微镜下用蓝色激发光 (波长 490 nm) 观察, 被感染细胞呈现绿色荧光, 有完整细胞形态, 未感染细胞不着色, 视野发暗。

2.6.2 IFA 试验最适工作条件的确定 取 1C5 株单抗腹水进行 IFA 方法的条件优化。将一抗血清 1 型 MDV 单克隆抗体稀释至工作浓度为 1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200 和 1:6400, 将二抗 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 稀释至工作浓度为 1:100、1:200 和 1:400, 二者进行棋盘式组合, 按照 2.6.1 操作程序进行 IFA 试验, 以出现荧光信号的最大稀释倍数作为一抗和二抗的最佳工作浓度; 将一抗反应时间设定为 30 min、45 min 和 60 min, 将二抗反应时间设定为 30 min、45 min 和 60 min, 二者进行棋盘式组合, 以上述确定的抗体最佳工作浓度, 分别进行 IFA 试验, 以呈现荧光强度最高, 且背景值最低的反应时间, 作为一抗、二抗最适作用时间。

2.7 各禽源病毒带毒细胞的制备 MDV: 将病毒液用含 2% NBS 的 M199 培养液稀释至适宜浓度后, 接种单层的 CEF 96 孔细胞板, 100 μL/孔, 置

37℃、5% CO₂的培养箱中培养 3~5 d;REV、NDV:将病毒用含 2% NBS 的 M199 培养液稀释成 100 TCID₅₀/100 μL,接种已长成单层的 CEF 96 孔细胞板,100 μL/孔,置 37℃、5% CO₂的培养箱中培养 5 天;ALV、IBDV:将病毒用含 2% FBS 的 DMEM 培养液稀释成 100 TCID₅₀/100 μL,接种已长成单层的 DF-1 96 孔细胞板,100 μL/孔,置 37℃、5% CO₂的培养箱中培养 6 天;Fadv-I:将病毒用含 2% FBS 的 DMEM 培养液稀释成 100 TCID₅₀/100 μL,接种已长成单层的 LMH 96 孔细胞板,100 μL/孔,置 37℃、5% CO₂的培养箱中培养 5 天。

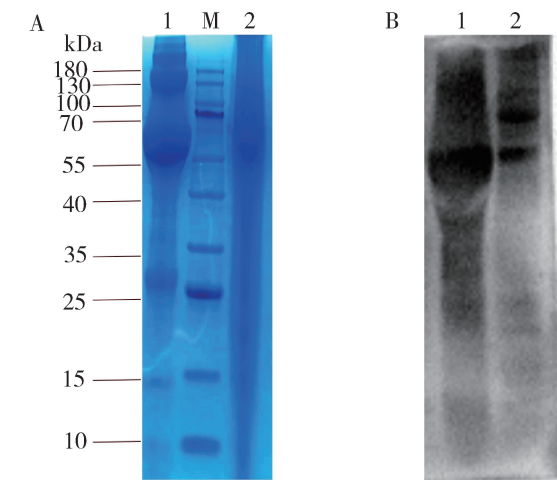
2.8 人工添加试验 为研究是否可鉴别检测出血清 3 型 MDV 中污染的血清 1 型 MDV 毒株,及最小检出限度。取血清 3 型 MDV HVT FC-126 株,用含 2% NBS 的 M199 培养基稀释为 25 PFU/50 μL,然后加入等体积分别含有 100 PFU、50 PFU、25 PFU、10 PFU、5 PFU 和 1 PFU 的 CVI988/Rispens 毒株,混合后全部接种至生长至良好单层的 CEF,同时设定未添加 CVI988/Rispens 的 HVT FC-126 株单感染对照组,采用上述建立的 IFA 方法进行荧光染色,确定该方法最小检出限。

3 结果与分析

3.1 CVI988/Rispens 免疫原的制备及鉴定 将浓缩前后的 CVI988/Rispens 病毒液分别等体积上样,进行 SDS-PAGE 和 Western-blot 鉴定。SDS-PAGE 结果显示(图 1A),与超速离心前样品相比,超速离心后样品蛋白条带更粗,可见经超速离心,病毒抗原得到有效浓缩。Western-blot 鉴定结果显示(图 1B),浓缩及未浓缩的 CVI988/Rispens 抗原均可被 MDV 特异性血清识别。进一步,通过 BCA 蛋白定量试剂盒测定浓缩后的蛋白浓度,为 9.1 mg/mL。

3.2 杂交瘤细胞的筛选 细胞融合成功后经过 3 次亚克隆,利用间接 ELISA 和 IFA 方法对杂交瘤细胞培养上清进行检测,共筛选出 3 株阳性杂交瘤细胞株,分别命名为 4D9、1C5 和 1F10。

3.3 杂交瘤细胞株的鉴定结果 纯净性结果表明,4D9、1C5 及 1F10 3 株杂交瘤细胞株均无支原体生长,无外源病毒污染,纯净性良好;用单克隆抗体



1: 浓缩的 CVI988/Rispens; M: 蛋白质分子质量标准;
2: 未浓缩的 CVI988/Rispens。
1: Concentrated CVI988/Rispens antigens; M: Protein molecular quality standard; 2: Non-concentrated CVI988/Rispens antigens.
A: CVI988/Rispens 的 SDS-PAGE 鉴定;
B: CVI988/Rispens 的 Western-blot 鉴定。
A: SDS-PAGE analysis of CVI988/Rispens;
B: Western-blot analysis of CVI988/Rispens.

图 1 CVI988/Rispens 的鉴定
Fig 1 Identification of CVI988/Rispens

亚类鉴定试剂盒分别进行抗体亚型测定,结果显示,4D9 抗体为 IgG2a/κ 型,1C5 抗体为 IgG2b/κ 型、1F10 抗体为 IgG1/κ 型;分别连续培养 10 代,各代次培养上清 ELISA 效价均在 1:20~1:40,稳定性好。
3.4 腹水间接 ELISA 效价的测定 将 3 株阳性杂交瘤细胞株制备的腹水分别进行 2 倍系列稀释,从 1:200 系列稀释至 1:1639600,使用间接 ELISA 方法测定各稀释度的腹水效价。结果表明(图 2)1C5 效价最高,为 8.2×10^5 ,其次是 1F10,效价为 4.1×10^5 ,4D9 效价最低,效价为 5.1×10^4 。
3.5 腹水 IFA 效价测定 将 3 株阳性杂交瘤细胞株制备的腹水分别进行 1:800、1:1600、1:3200、1:6400、1:12800、1:25600、1:51200 和 1:102400 稀释,对 CVI988/Rispens 感染的 CEF 细胞板进行 IFA 检测,结果表明,4D9、1C5 及 1F10 单抗腹水分别稀释至 1:12800、1:25600、1:12800 时,细胞仍可见明亮的特异性绿色荧光(图 3),判定 3 株单抗腹水效价分别为 1:12800、1:25600、1:12800。

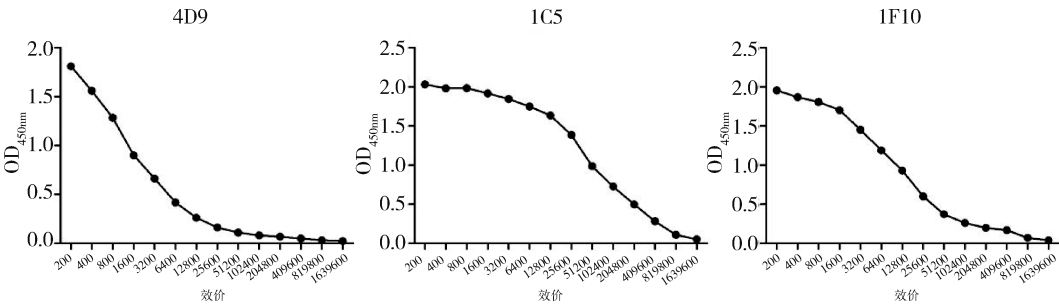


图 2 单克隆抗体 ELISA 效价测定

Fig 2 ELISA titer determination of monoclonal antibodies

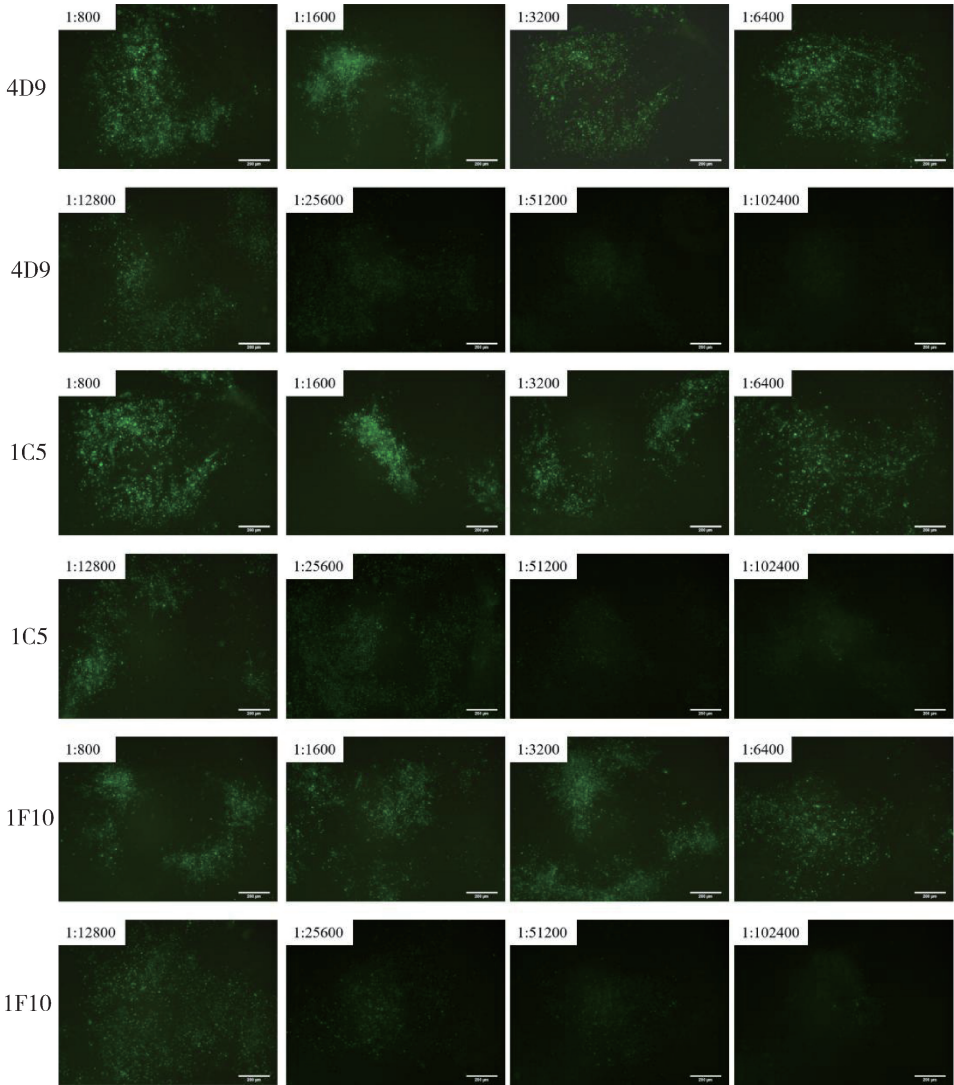


图 3 单抗 4D9、1C5 及 1F10 腹水效价测定结果

Fig 3 Determination of IFA titer of 4D9, 1C5 and 1F10 ascites

3.6 IFA 方法的条件优化 取 1C5 株单抗腹水进行 IFA 方法的条件优化,经优化,确定 IFA 最适反应条件为:一抗 1:1600 稀释,作用时间 60 min;二抗 1:200 稀释,作用时间 60 min。

3.7 单抗特异性鉴定 将 3 个单克隆抗体分别作为一抗,对分别接种了血清 1 型 MDV 和血清 3 型 MDV 的带毒 CEF 细胞进行 IFA 检测,同时设立未接毒阴性细胞对照。结果显示(图4),3 株单克隆

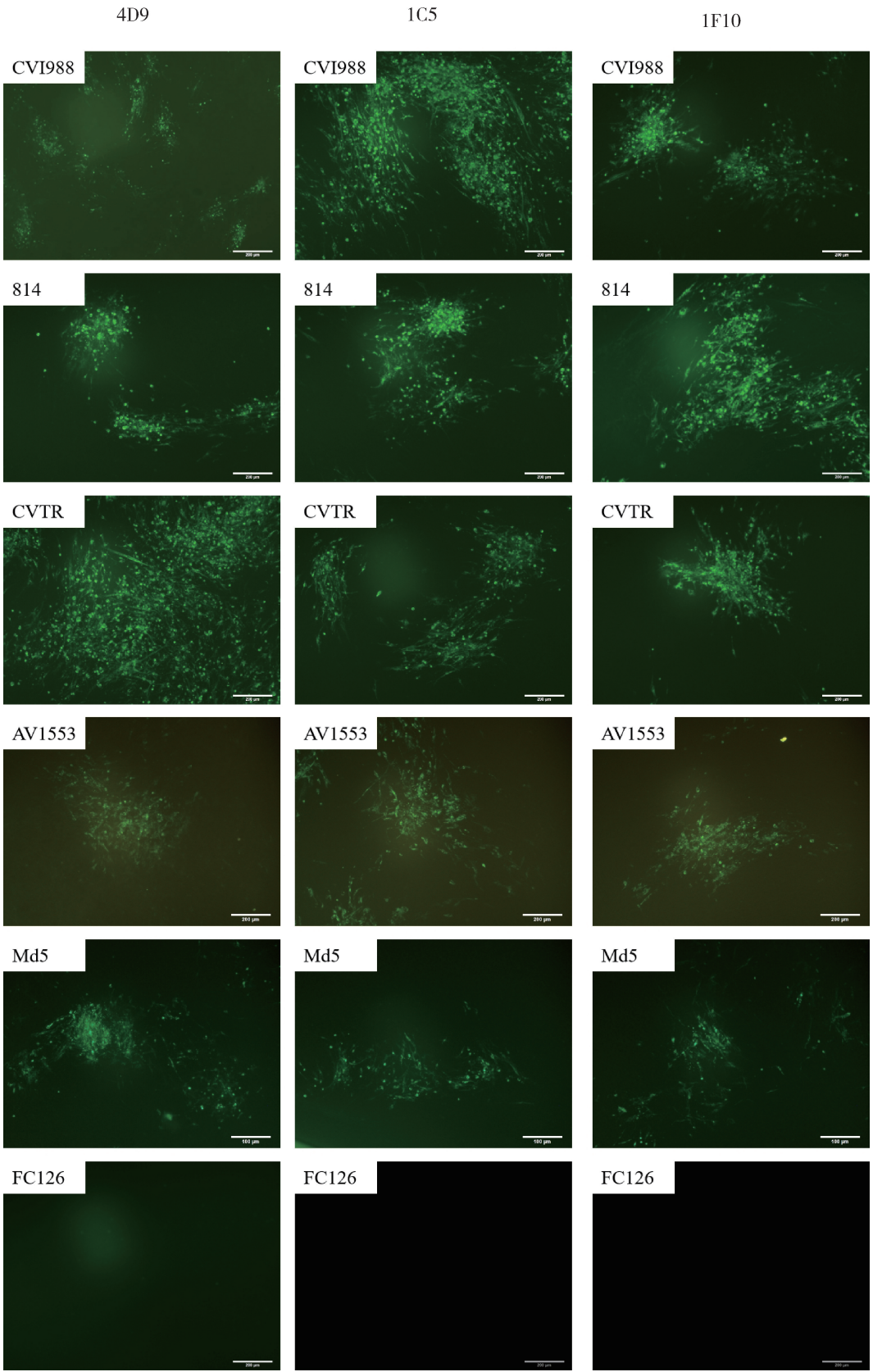


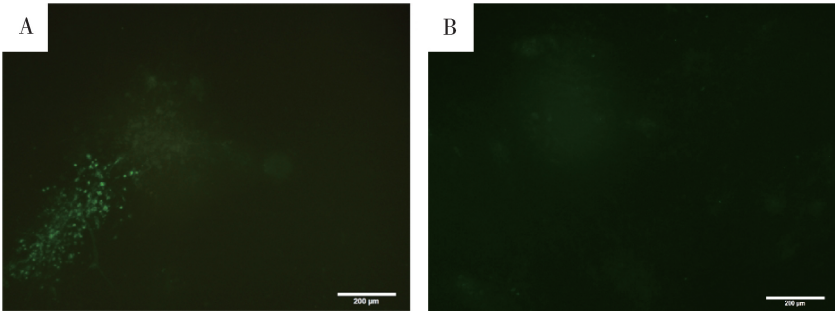
图 4 单克隆抗体特异性检测

Fig 4 Specificity test of the monoclonal antibodies

抗体除可特异性识别血清 1 型 MDV 疫苗株 CVI988/Rispens 株、814 株和 CVTR 株感染的细胞外,还可以识别血清 1 型 MDV 野毒株 AV1553 株和 Md5 株感染的细胞,而与血清 3 型 MDV FC126 毒株感染的细胞不反应。此外,对接种了 REV (T 株)、ALV (RAV - 1 株和 RAV - 2 株)、NDV (La Sota 株)、IBDV (B87 株)、Fadv - I (YR36 株) 的带毒

细胞进行 IFA 检测,均未检测到特异性荧光。综上所述,说明所制备的 3 个单克隆抗体特异性良好,可用于血清 1 型 MDV 毒株的检测。

3.8 人工添加试验 结果表明,采用 1C5 株单抗腹水作为一抗建立的 IFA 方法,可鉴别检测出 HVT FC - 126 株中人工添加的 CVI988/Rispens,最低检出量为 5 PFU (图 5)。



A:5 PFU 添加组 1C5 单抗染色;B:HVT FC126 单感染对照组 1C5 单抗染色。

A:Stained with 1C5 Mab in 5 PFU artificially added group;B:Stained with 1C5 Mab in the HVT FC126 single infection control group.

图 5 HVT FC - 126 株中人工添加血清 1 型 MDV 的 IFA 检测

Fig 5 IFA detection of artificially added serotype 1 MDV in HVT FC - 126

4 讨论与结论

MDV 的检测方法大致可分为免疫学和分子生物学技术。本课题组已建立特异性好,灵敏度高,重复性好的血清 1 型 MDV 和血清 3 型 MDV 实时荧光定量 PCR 检测方法,可分别用于禽用生物制品中外源性血清 1 型 MDV、血清 3 型 MDV 毒株核酸的检测^[16]。抗体是免疫学检测方法的核心材料,因此,本研究通过将浓缩的血清 1 型 MDV 病毒粒子免疫小鼠,应用杂交瘤技术制备单克隆抗体,以期建立血清 1 型 MDV 免疫学检测技术提供物质基础。

浓缩的血清 1 型 MDV CVI988/Rispens 毒株不可避免的还含有 CEF 杂蛋白,其免疫 BALB/c 小鼠,在刺激机体产生大量针对 CVI988/Rispens 毒株特异性 B 细胞的同时,还会产生很多针对 CEF 抗原成分的 B 细胞,增加了筛选阳性杂交瘤细胞株的难度,因此需要选用适宜的筛选方法。鉴于 ELISA 方法的高灵敏度,可以避免因培养细胞上清所含抗

体浓度不足导致检测不到、阳性克隆细胞株丢失,我们选择间接 ELISA 方法初步筛选融合后的细胞,对于初步获得的阳性克隆细胞株,再进行 IFA 筛选,以排除假阳性。此外,为减少 CEF 杂蛋白的干扰,在间接 ELISA 筛选中同时分别包被 CVI988/Rispens 抗原和 CEF 裂解液,在 IFA 筛选中设置空白未接种 CVI988/Rispens 的细胞对照,进行平行筛选,与 CVI988/Rispens 反应呈阳性而对 CEF 空白组反应呈阴性者为阳性克隆细胞株。总之,通过间接 ELISA 和 IFA 筛选方法的结合,还有平行筛选的设立,既最大程度避免了阳性克隆细胞株的遗漏,又排除了 CEF 杂蛋白的干扰,为筛选得到特异性良好的血清 1 型 MDV 单克隆细胞株奠定了基础。

将筛选得到的 4D9、1C5 和 1F10 三株阳性杂交瘤细胞株,分别制备腹水,经检测 ELISA 效价分别为 5.1×10^4 、 8.2×10^5 、 4.1×10^5 ,可为后续建立血清 1 型 MDV 相关 ELISA 检测方法提供物质基础;经检测,IFA 效价分别为 1:12800、1:25600、1:12800,特

异性鉴定结果显示三株单抗均可特异性识别血清 1 型 MDV 疫苗株和野毒株,而与血清 3 型 MDV 及其他常见禽源病毒不存在交叉反应。进一步,选择 IFA 效价最高的 1C5 单抗腹水进行 IFA 方法的条件优化,建立了检测血清 1 型 MDV 毒株的 IFA 方法,人工添加试验显示该方法能检出血清 3 型 MDV 中至少 5 PFU 血清 1 型 MDV CVI988/Rispens 毒株感染,为血清 1 型 MDV 的检测提供了良好的技术基础。

参考文献:

- [1] Cui N, Su S, Sun P, *et al.* Isolation and pathogenic analysis of virulent Marek's disease virus field strain in China [J]. Poultry Science, 2016, 95(7): 1521–1528.
- [2] Wang H, Li W, Zheng S J, *et al.* Advances on innate immune evasion by avian immunosuppressive viruses [J]. Frontiers in Immunology, 2022, 13: 901913.
- [3] Ghalyanchilangeroudi A, Hosseini H, Nazarpak H H, *et al.* Molecular characterization and phylogenetic analysis of Marek's disease virus in Iran [J]. Avian Diseases, 2022, 66(3):1–5.
- [4] Yilmaz A, Turan N, Bayraktar E, *et al.* Molecular characterisation and phylogenetic analysis of Marek's disease virus in Turkish layer chickens [J]. British Poultry Science, 2020, 61(5): 523–530.
- [5] 焦鹏涛, 陈果, 吴科敏, 等. 乌鸡暴发马立克氏病继发感染大肠杆菌的诊治 [J]. 中国家禽, 2015, 37(22): 68–69.
- Jiao P T, Chen G, Wu K M, *et al.* Diagnosis and treatment of Marek's disease with E. coli secondary infection in black chickens [J]. China Poultry, 2015, 37(22): 68–69. (in Chinese)
- [6] 苏帅. 鸡马立克氏病防控技术研究进展 [J]. 山东畜牧兽医, 2023, 44(1): 77–85.
- Su S. Research progress in the prevention and control technology of chicken Marek's disease [J]. Shandong Animal Science and Veterinary Medicine, 2023, 44(1): 77–85. (in Chinese)
- [7] Woñiakowski G, Samorek – Salamonowicz A E, Woñiakowski G, *et al.* Molecular evolution of Marek's disease virus (MDV) field strains in a 40 – year time period [J]. Avian Diseases, 2014, 58(4): 550–7.
- [8] Deng Q, Shi M, Li Q, *et al.* Analysis of the evolution and transmission dynamics of the field MDV in China during the years 1995–2020, indicating the emergence of a unique cluster with

the molecular characteristics of vv + MDV that has become endemic in southern China [J]. Transboundary And Emerging Diseases, 2021, 68(6): 3574–3587.

- [9] Becker Y, Asher Y, Tabor E, *et al.* Polymerase chain reaction for differentiation between pathogenic and non – pathogenic serotype 1 Marek's disease viruses (MDV) and vaccine viruses of MDV – serotypes 2 and 3 [J]. Journal of Virological Methods, 1992, 40(3):307–22.
- [10] Baigent S J, Nair V K, Le Galludec H. Real – time PCR for differential quantification of CVI988 vaccine virus and virulent strains of Marek's disease virus [J]. Journal of Virological Methods, 2016, 233:23–36.
- [11] Wu S, Ding T, Shao H, *et al.* A quadruplex real – time PCR assay combined with a conventional PCR for the differential detection of Marek's disease virus vaccines and field strains [J]. Frontiers in Veterinary Science, 2023, 10:1161441.
- [12] Woñiakowski G, Samorek – Salamonowicz E, Kozdrún W. Comparison of loop – mediated isothermal amplification and PCR for the detection and differentiation of Marek's disease virus serotypes 1, 2, and 3 [J]. Avian Diseases, 2013, 57(2 Suppl):539–43.
- [13] Haq K, Schat K A, Sharif S. Immunity to Marek's disease: Where are we now? [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2013, 41(3): 439–446.
- [14] 宋利娜, 滕蔓, 郑鹿平, 等. 马立克氏病病毒单克隆抗体的制备 [J]. 中国兽医科学, 2018, 48(09): 1102–1108.
- Song L N, Teng M, Zheng L P, *et al.* Development of monoclonal antibodies against Marek's disease virus [J]. Chinese Veterinary Science, 2018, 48(09): 1102–1108.
- [15] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2020 年版三部 [S]. Chinese Veterinary Pharmacopoeia Commission. The Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China (2020 III Volume) [S].
- [16] 苏佳, 赵炜, 刘丹, 等. 外源性马立克氏病病毒荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. 中国农业科学, 2023, 56(20): 4125–4136.
- Su J, Zhao W, Liu D, *et al.* Establishment of real – time PCR method for detection of extraneous Marek's disease virus [J]. Scientia Agricultural Sinica, 2023, 56(20): 4125–4136.