检测禽霍乱抗体间接 ELISA法的建立

梁 荣 赵建坤 李健强
(西北农业大学动物医学系,陕西杨凌 712100)

摘 要 以方阵滴定法选择出最适 ELISA反应条件,用系列稀释法测定 21份血清样品的禽霍乱抗体 ELISA效价(ET),并与相应血清样品 1∶200倍稀释的 P/N值配对,作线性回归分析,得到回归方程 $y=219.673a-183.570$($r=0.944$)和标准曲线,从而建立起快速定量测定禽霍乱抗体的间接 ELISA方法——阳阴比值 ELISA效价法(P/N-ET法)。利用该法,血清样品只需作 1∶200倍稀释,测定其 P/N值,通过回归方程(或标准曲线)即可求得 ET.

关键词 间接 ELISA, P/N-ET法,禽霍乱抗体
中图分类号 S854.43, S852.53

禽霍乱(Fowl Cholera, FC)是由多杀性巴氏杆菌引起的一种侵害禽类,以出血性败血症表现为主的接触性传染病。目前检测禽霍乱抗体水平的血清学方法主要有间接血凝试验、全血平板凝集试验、琼脂扩散试验等[1~3],但均存在着灵敏度不高或不稳定等局限性。间接 ELISA法灵敏度高,但作定量测定时待检血清需作系列稀释,操作繁琐。柴忠林等[4]用兔抗鸡 IgG酶结合物建立了一种快速定量测定禽霍乱抗体的间接 ELISA法,证明该法具有快速、简便、灵敏等优点。

本研究采用抗鸡 Ig轻链单抗酶结合物[5],以多杀性巴氏杆菌强毒株 C_{48-1}荚膜抗原包被酶标板测定 21份血清样品不同稀释度的 P/N值,建立起快速定量测定禽霍乱抗体水平的间接 ELISA法——阳阴比值 ELISA效价法(P/N-ET法)。

1 材料与方法

1.1 材料

多杀性巴氏杆菌强毒株 C_{48-1},购自中监所;1B7酶结合物为抗鸡免疫球蛋白轻链单抗辣根过氧化物酶结合物,工作浓度 1∶1 500,西北农业大学病毒病研究室研制;禽霍乱阳性血清、新城疫阳性血清、传染性法氏囊病阳性血清,购自中监所,均为鸡源;SPF鸡血清、鸡减蛋综合征阳性血清,由扬州大学董国雄老师惠赠;待检血清样品,1~8#采自陕西绛帐一养鸡户,亚发父母代鸡,159日龄,于 120日龄注射过禽霍乱蜂胶灭活苗;9~21#采自杨凌一养鸡户,海兰商品代蛋鸡,135日龄,于 90日龄注射过禽霍乱蜂胶灭活苗;ELISA试验所需材料试剂,常规法配制。

1.2 方法

1.2.1 禽霍乱抗原制备 ①荚膜多糖抗原制备:C_{48-1}强毒株接入含 50 g·L⁻¹绵羊血的

收稿日期 1997-12-25
课题来源 西北农业大学青年科学基金资助项目
作者简介 梁荣,女,1966年生,讲师,硕士
?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://w

马丁琼脂斜面培养基, 37℃培养 36 h,用 3 mL灭菌生理盐水刮洗,收集菌液, 56℃水浴 30 min, 8 000 r/min离心 30 min,取上清液即为荚膜多糖抗原。② 菌体抗原制备: 用上法制取菌液, -30~ 37℃反复冻融 7次,超声波进一步裂解即可。

1.2.2　间接 ELISA操作程序　以 0.05 mol·L^{-1} pH9.6碳酸盐缓冲液稀释抗原,包被酶标板, 50μL/孔, 4℃过夜;用 PBST洗涤 5 min×3;每孔加封阻液(含 30 mL·L^{-1}马血清的 PBST) 50μL, 37℃封阻 30 min,同上洗涤;加一定稀释度的待检血清 50μL/孔, 37℃反应 1 h,同上洗涤;加 1B7酶结合物 50μL/孔, 37℃作用 30 min,同上洗涤;加底物 50μL/孔, 37℃显色 10 min;每孔加 50μL 2 mol·L^{-1} H_2SO_4终止反应,酶联免疫检测仪上测定 490 nm的 OD值,计算 P/N值,以 P/N值≥ 2.0判为阳性, P/N < 2.0时判为阴性。

$$P/N值 = \frac{待检样品的\ OD值 - 空白对照\ OD值}{阴性对照的\ OD值 - 空白对照\ OD值}$$

1.2.3　ELISA最适条件的选择　① 抗原种类及抗原包被量的选择: 将荚膜抗原和菌体抗原分别作 1∶2, 1∶5, 1∶10稀释,与 1∶400禽霍乱阳性血清和 1∶400 SPF鸡血清进行 ELISA试验,以 P/N值为指标,选择合适的抗原和包被量。② 底物显色时间的选择: 以荚膜抗原包被酶标板,禽霍乱阳性血清和 SPF鸡血清进行 1∶400稀释,底物显色时间分别为 5, 10, 20 min,以 P/N值为指标,选择合适的显色时间。③ 血清稀释度的选择: 以 1∶10荚膜抗原包被酶标板,将禽霍乱阳性血清和 SPF鸡血清从 1∶50倍起稀释至 1∶1 600,做 ELISA试验,以 P/N值为指标,选择合适的血清稀释度。

1.2.4　P/N-ET法的建立　在最适条件下做 ELISA试验。21份血清样品均作 5个稀释度 1∶50, 1∶100, 1∶200, 1∶400, 1∶800,每个稀释度重复 4孔,测定各稀释度的 P/N值。以 P/N值为纵坐标,稀释倍数 Z的自然对数(lnZ)为横坐标,做直线回归分析,建立回归方程 $y_1 = a + bx_1$.令 $y_1 = 2$,通过方程算出 x_1,即 lnZ,反对数得 ET.以各血清 1∶200的 P/N值为横坐标, ET值为纵坐标,作点图。经直线回归分析建立回归方程 $y_2 = a + bx_2$,从而建立起 P/N-ET法。

1.2.5　特异性检验和重复性检验　分别将 ND、IBD、EDS-76, FC阳性血清做 1∶200倍稀释,在最适条件下做 ELISA试验,进行特异性检验。在 2周内取 5个样品,重复 4次试验,做重复性检验。

1.2.6　禽霍乱间接血凝试验　采用微量凝集法进行[3]。

2　结　果

2.1　ELISA最适条件的选择

2.1.1　抗原种类及抗原包被量的选择　结果见表 1.

表 1　抗原种类和抗原包被量的选择

血　清	荚膜抗原			菌体抗原		
	1∶2	1∶5	1∶10	1∶2	1∶5	1∶10
FC阳性血清	1.970± 0.080	1.580± 0.020	1.560± 0.040	1.320± 0.170	1.250± 0.180	1.240± 0.140
SPF鸡血清	0.270± 0.030	0.160± 0.020	0.140± 0.020	0.320± 0.080	0.180± 0.070	0.150± 0.030
P/N值	7.296	9.875	11.143	4.125	6.944	8.266

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://w

从表 1可看出,以 1∶10倍稀释时荚膜抗原 P/N值最高。故选 1∶10荚膜抗原做包被用抗原。

2.1.2 底物显色时间的选择 显色时间为 5, 10, 20 min时, P/N值分别 8.000, 10.154, 8.444,故选 10 min作为底物显色时间。

2.1.3 血清稀释度的选择 结果见表 2.

表 2 血清稀释度的选择

血 清	1∶50	1∶100	1∶200	1∶400	1∶800	1∶1 600
FC阳性血清	2.130± 0.100	2.120± 0.050	1.720± 0.080	1.560± 0.040	0.620± 0.020	0.220± 0.010
SPF鸡血清	0.420± 0.030	0.310± 0.020	0.160± 0.010	0.140± 0.020	0.140± 0.010	0.130± 0.020
P/N值	5.071	6.839	10.750	11.143	4.429	1.692

结果表明,阳性血清 1∶200, 1∶400稀释时 P/N值均很高,二者差异不显著,故选择 1∶200血清稀释度作为待检血清最适稀释度。

2.2 P/N–ET法的建立

测定了 21份血清样品。各份样品不同稀释度的 P/N值及经线性回归后所得各样品 ET值见表 3.

表 3 21份血清样品不同稀释度的 P/N值及 ET值

样品号	稀释度 Z(– lnZ)					ET值
	1∶50 (3.921)	1∶100 (4.605)	1∶200 (5.298)	1∶400 (5.991)	1∶800 (6.685)	
1	4.667	3.067	2.667	1.533	1.067	323.240
2	7.333	5.933	3.067	1.667	1.600	466.379
3	5.000	3.200	1.800	1.667	1.133	303.621
4	4.333	3.200	2.133	1.467	1.067	289.639
5	6.267	4.000	2.733	2.000	1.733	465.131
6	6.467	4.200	2.533	1.933	1.467	422.331
7	5.267	3.400	2.467	2.133	1.333	342.300
8	6.267	4.533	2.667	1.867	1.400	424.243
9	5.091	1.909	1.545	1.364	1.000	230.816
10	5.273	4.273	3.182	1.909	1.727	508.232
11	2.182	1.364	1.091	1.000	0.909	38.475
12	2.273	1.909	1.364	0.727	0.636	76.277
13	3.727	2.455	1.364	0.818	0.364	162.183
14	2.909	1.727	1.273	0.909	0.727	103.950
15	1.545	1.182	0.909	0.818	0.545	14.22
16	2.273	1.909	1.727	1.364	1.091	91.312
17	6.182	2.727	1.909	1.273	0.909	282.874
18	2.727	2.182	1.364	1.091	0.909	72.115
19	2.636	2.182	1.909	1.545	1.182	262.076
20	3.182	2.818	1.909	1.636	1.364	259.748
21	2.818	2.182	1.545	1.364	1.182	146.912

以 21份血清样品 1∶200倍稀释时 P/N值为横坐标, ET值为纵坐标,进行直线回归分析,得回归方程 $y = 219.673x - 183.570$($r = 0.944$),所得标准曲线见图 1.

2.3 特异性检验

用 ND, IBD, EDS-76和 FC阳性血清在相同条件下进行 ELISA试验, P/N值分别为

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://w

0. 750, 1. 667, 1. 500为阴性,而 FC阳性血清为 10. 430,说明纯化的荚膜抗原特异性较强,无交叉反应。

2. 4　重复性检验

结果见表 4.

表 4　重复性检验结果

样　品	P/N值				标准差	平均值	变异系数(%)
	第 1次	第 2次	第 3次	第 4次			
1	11. 500	11. 833	11. 667	12. 583	0. 478	11. 896	4. 0
2	2. 417	2. 500	2. 250	2. 083	0. 185	2. 313	8. 0
3	3. 000	2. 833	3. 250	3. 250	0. 204	3. 083	6. 6
4	5. 250	5. 000	5. 167	5. 583	0. 245	5. 25	4. 7
5	4. 417	4. 500	4. 583	4. 833	0. 180	4. 583	3. 9

结果显示,5个样品相对变异系数在 3. 9% ~ 8. 0% ,说明该法重复性很好。

2. 5　与间接血凝试验比较

任意取 8份待检血清测定其血凝价,并与各样品所测 ET值进行比较,结果见表 5.

表 5　8份待检血清间接血凝价($1/x$)与 ET值比较

待检血清	1	2	3	4	5	6	7	8
间接血凝价	64	64	32	64	16	32	8	8
ET值	323. 24	466. 38	303. 62	422. 33	230. 82	289. 64	72. 12	76. 28
ET值/血凝价	5. 05	7. 29	9. 49	6. 60	14. 43	9. 05	9. 02	9. 54

由表 5可见,所建立的 ELISA法灵敏度比常规间接血凝试验高 5. 05~ 14. 43倍(平均为 8. 82倍)。

3　小结与讨论

本研究以禽霍乱 C_{48-1}荚膜多糖抗原作包被抗原,将 21份血清样品经系列稀释测定 ET值,并与相应血清 1∶200倍稀释所测的 P/N值配对,经线性回归分析,得到回归方程 $y = 219.673x - 183.570$ ($r = 0.944$),建立起快速定量测定禽霍乱抗体的方法——阳阴比值 ELISA效价法(P/N-ET法)。利用该法,待检血清只需作 1∶200倍稀释,在最适条件下测其 P/N值,通过线性方程或标准曲线即可求得 ET值。与间接 ELISA系列稀释法相比,具有快速、简便、材料消耗少等优点。比间接血凝试验灵敏度提高 8. 82倍,并且有特异性强、重复性好等优点。如能与计算机结合,即可实现操作的规程化和自动化,有利于临床大批量快

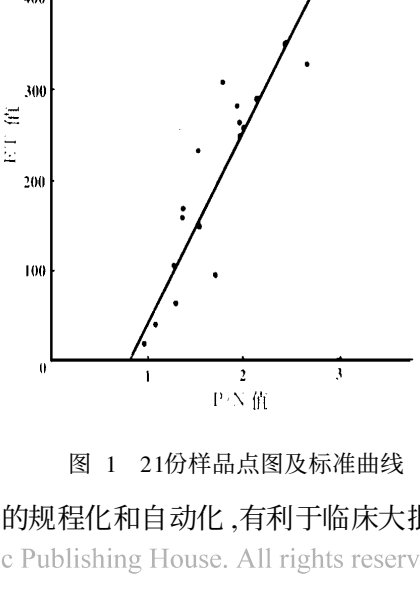

图 1　21份样品点图及标准曲线

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://w

速检测。关于 ET值与保护率的关系,阳性与阴性的判定标准,有待今后进一步实验确定。

参 考 文 献

1 [美]B. W.卡尔尼主编;高福等主译.禽病学(第 9版).北京:农业出版社,1991
2 刘永德.禽霍乱全血平板凝集抗原的研制.中国畜禽传染病,1989(1):51~53
3 曹澍译等主编.兽医微生物学与免疫学技术.北京:北京农业大学出版社,1992
4 柴忠林.一种快速定量测定鸡霍乱抗体的方法——阳阴比值 ELISA滴度法的建立.动物检疫,1988(2):4~6
5 梁 荣,冯 斌,李健强.分泌抗鸡 1g单抗杂交瘤细胞系的建立与单抗生物学特性鉴定.中国兽医学报,1997(2):140~144

Establishment of Indirect ELISA for Detecting Fowl Cholera Antibody

Liang Rong Zhao Jiankun Li Jianqiang

(*Department of Veterinary Science, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi* 712100)

Abstract Using the method of chessboard titration to choose the proper reaction condition, after a series of dilution, 21 samples of chicken serum were detected for their fowl cholera (FC) antibody ELISA titer (ET). Paired with ET and the P/N value of 1∶200 dilution and after linear regression analysis, a linear equation $y = 219.673x - 183.570$ ($r = 0.944$) and a standard diagram of curves were got. Thus an indirect ELISA which could rapidly and quatitatively detect FC antibody–P/N–ET method was established, with which the ET could be canculated out with regression equation only if the serum samples were diluted at 1∶200 and P/N value determined.

Key words indirect ELISA, P/N–ET, fowl cholera antibody

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://w