

网络出版时间:2015-12-02 14:25

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2016.01.006

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20151202.1425.012.html>

H3N2 亚型 SIV 血凝蛋白单克隆抗体的制备

周云飞,朱春平,李 燕,常婧竹,崔保安,李新生

(河南农业大学 牧医工程学院,河南 郑州 450002)

【摘 要】 **【目的】**制备 H3N2 亚型猪流感病毒(SIV)的单克隆抗体,为 SIV 的鉴别诊断奠定基础。**【方法】**将 A/swine/Henan/1/2010(H3N2)猪流感病毒初步浓缩后,免疫 6 周龄的 BALB/c 小鼠,取小鼠脾细胞与瘤细胞 NS0 融合,采用间接 ELISA 方法筛选杂交瘤细胞,对杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体进行 Western blot 检验和抗原结合活性检测。**【结果】**经过 3 次有限稀释法克隆纯化,最终得到 1 株能稳定分泌单克隆抗体的阳性细胞株,命名为 1C10,经检测其腹水抗体效价为 1 : 51 200。单克隆抗体亚型鉴定结果表明,1C10 为 IgG1 亚型,轻链类型为 κ 链。Western blot 检测结果表明,这株单克隆抗体能与 H3N2 特异性结合,而且能特异性识别血凝素蛋白(HA),而不与 H1N1 亚型猪流感病毒、伪狂犬病毒、猪圆环病毒 2 型、猪细小病毒发生交叉反应。**【结论】**制备获得 1 株抗猪流感 H3N2 病毒 HA 蛋白的单克隆抗体,可用于猪流感病毒鉴别诊断方法的建立。

【关键词】 H3N2;猪流感病毒;单克隆抗体

【中图分类号】 S852.65⁺9.5

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2016)01-0031-06

Preparation of monoclonal antibody for H3N2 subtype swine influenza virus hemagglutinin protein

ZHOU Yun-fei,ZHU Chun-ping,LI Yan,CHANG Jing-zhu,

CUI Bao-an,LI Xin-sheng

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China)

Abstract: **【Objective】** To identify different swine influenza virus (SIV) and antibodies against SIV, monoclonal antibodies (Mabs) secreted by hybridoma cell lines against SIV H3 subtype were prepared. **【Method】** Concentrated swine influenza A/swine/Henan/1/2010(H3N2) viruses were injected subcutaneously or intraperitoneally into 6-week-old BALB/c mice with the rate of 0.2 mL per mouse according to the immunization protocol. For fusion, spleen cells and partner cells were washed, harvested, and mixed. Hybridomas cells were screened using indirect ELISA method. Then, the monoclonal antibodies from hybridomas were tested by Western blot. **【Result】** One candidate hybridoma named 1C10 was identified after clone and purification by limiting dilution for three times. The titre of ascitic fluids of 1C10 was up to 1 : 51 200. Monoclonal antibody 1C10 was IgG1 subtype and its light chain was kappa-type. Western blot showed that the MAb was specifically bounded to SIV H3N2 virus. 1C10 can be captured by hemagglutinin protein (HA) protein of SIV H3N2 in indirect ELISA and Western blot tests. There was no crossing reaction between 1C10, SIV H1N1 subtype, PRRSV, PCV2, and PPV. **【Conclusion】** The obtained monoclonal antibody

【收稿日期】 2014-04-04

【基金项目】 国家农业科技成果转化资金项目(2012GB2D000273);河南省科技成果转化计划项目(122201110027)

【作者简介】 周云飞(1989—),男,河南鹤壁人,在读硕士,主要从事畜禽疫病分子病原学及免疫学研究。

E-mail: english2005@163.com

【通信作者】 李新生(1968—),男,河南南阳人,副教授,博士,主要从事畜禽疫病分子病原学及免疫学研究。

E-mail: harmony69@163.com

1C10 could be a useful reagent for diagnosing SIV infection and analyzing the epitopes of HA protein of SIV H3N2 virus.

Key words: H3N2; swine influenza virus; monoclonal antibody

猪流感病毒(Swine influenza virus, SIV)是单股负链 RNA 病毒,属正黏病毒科 A 型流感病毒,可引起猪急性高度接触传染性呼吸道疾病。目前世界各地流行的 SIV 主要有 3 种血清型,即古典 H1N1、类禽 H1N1 和类人 H3N2^[1-2]。由于猪呼吸道上皮具有唾液酸 α -2,6 半乳糖苷(SA α -2,6-Gal)和唾液酸 α -2,3 半乳糖苷(SA α -2,3-Gal),是猪流感、禽流感和人流感病毒共同的易感宿主,也是流感病毒基因重组或重配的“混合器”和流感病毒新流行毒株的孵育器^[3-4]。因此对于猪流感病毒的研究不仅具有兽医学方面的意义,更具有人类公共卫生学意义^[5]。

近年来,张云^[6]在河南地区发现 1 株四源重组猪流感病毒,进一步证实猪是流感病毒发生基因重排的“混合器”,也证明猪群中的 SIV 日趋复杂,迫切需要建立有效的监测体系。基于此,本研究将 H3N2 猪流感病毒初步浓缩后,免疫 6 周龄的 BALB/c 小鼠,取小鼠脾细胞与瘤细胞 NS0 在 PEG2000 的诱导下进行细胞融合,并采用间接 ELISA 方法筛选杂交瘤细胞,再对杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体进行 Western blot 检验和抗原结合活性检测,最终制备得到了 1 株 H3N2 亚型 SIV 的单克隆抗体,可为 SIV 的鉴别诊断奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

6 周龄雌性 BALB/c 小鼠购自郑州大学动物中心;SPF 鸡胚购自北京梅里亚维通公司。

猪流感病毒 A/swine/Henan/1/2010 (H3N2)和 SW/HN/405/10(H1N1)及原核表达后复性的 A/swine/Henan/1/2010 株 HA 蛋白,均由河南农业大学河南省动物性食品安全重点实验室保存;猪伪狂犬病毒(PRV)、猪圆环病毒 2 型(PCV2)、猪细小病毒(PPV)和 NS0 细胞,均由河南农业大学河南省动物性食品安全重点实验室保存;MDCK 细胞由河南农业大学河南省动物性食品安全重点实验室保存。

弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、PEG2000、HAT 培养基、HT 培养基购自 Sigma 公司,DMEM 低糖培养基、胎牛血清购自 Hyclone, MILLIPORE 超滤管购自 Millipore 公司,单克隆抗体亚型鉴定试纸盒购自罗氏公司,羊抗鼠 IgG-HRP 标签二抗购

自康为世纪有限公司,羊抗鼠 IgG-FITC 标签二抗购自博奥森生物有限公司,底物 TMB 单组分显色液购自索莱宝公司。

1.2 方法

1.2.1 SIV 抗原的制备与浓缩 将 SIV A/swine/Henan/1/2010(H3N2)稀释后,接种 9~11 日龄的 SPF 鸡胚,72 h 后收取鸡胚尿囊液,测其血凝试验效价,取效价较高的尿囊液混合均匀,反复冻融 3 次后,4℃、8 000 r/min 离心 30 min,弃沉淀^[7],将上清液加入可截留分子质量为 100 ku 分子的 MILLIPORE 超滤管,4 000 g 离心 30 min,收集滤膜上方液体。采用病毒血凝试验测定浓缩后病毒效价,采用分光光度计测定病毒蛋白含量,于-30℃保存。

1.2.2 间接 ELISA 方法的初步建立 (1)包被抗原最佳质量浓度和阴、阳性对照血清最佳稀释倍数的确定。参考文献[8]中的方法建立间接 ELISA 方法。抗原的质量浓度分别为 35.4, 17.7, 8.9 和 4.4 μ g/mL,阳性血清分别稀释 800, 1 600, 3 200 和 6 400 倍,阴性血清稀释 800 倍作为阴性对照,试验结果用 OD₄₅₀ 值表示。OD₄₅₀ 值最接近 1.0 时,包被抗原的质量浓度为最佳质量浓度,阳性血清的稀释倍数为最佳稀释倍数,取阴性血清的最佳稀释倍数与阳性血清相同。

(2)阴阳性血清临界值的确定。取小鼠 SIV 阴性血清,在包被抗原最佳质量浓度和阴阳性对照血清最佳稀释倍数下进行间接 ELISA 试验,计算阴阳性血清临界值(阴阳性血清临界值=阴性样本 OD₄₅₀ 平均值+3×标准差)。

(3)结果判定。待测样品 OD₄₅₀ 值大于阴阳性血清临界值,并且 $P/N \geq 2.1$ (P =待测样品的 OD₄₅₀ 值; N =阴性血清 OD₄₅₀ 值的平均值)者判为阳性^[9]。

1.2.3 动物免疫 先将 10 只 BALB/c 小鼠断尾采集阴性血清,然后按照参考文献[10]的方法进行免疫,首免剂量 200 μ g/只,将 SIV 与等体积弗氏完全佐剂乳化后,皮下注射 6 周龄 BALB/c 小鼠;2 周后进行第 2 次免疫,剂量同上,将 SIV 与等体积弗氏不完全佐剂充分乳化后皮下注射;再 2 周后,第 3 次免疫,剂量同上。从第 3 次免疫起,每隔 7 d 断尾采血,制备阳性血清,用 1.2.2 节中建立的间接 ELISA 方法,测定小鼠血清抗体效价。

选取抗体效价最高的 3 只小鼠,在细胞融合前 3 d,腹腔注射浓缩病毒 400 μg/只加强免疫 1 次。融合前采血,血清稀释 1 600,3 200,6 400,12 800,25 600,51 200 和 102 400 倍,以 PBS 为空白对照,采用间接 ELISA 方法测定血清抗体水平,取抗体水平最高的小鼠脾细胞与瘤细胞进行融合。

1.2.4 细胞融合及阳性杂交瘤细胞的筛选与克隆培养 NS0 瘤细胞至对数生长期,收获免疫小鼠脾细胞,将脾细胞与 NS0 细胞按照 5∶1 至 2∶1 的数量比混合,然后在 PEG2000 诱导下进行细胞融合。融合后的细胞使用配制好的 HAT 选择培养基吹打均匀,加入到 10 块铺好饲养细胞的 96 孔板中,在 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 培养箱内培养。第 4 天和第 7 天使用 HAT 选择培养基半量换液,第 10 天和第 14 天,改用 HT 选择培养基半量换液,以后逐步改为完全 DMEM 培养基换液。待细胞融合 7~10 d 后,开始密切观察细胞生长情况,待杂交瘤细胞铺满 96 孔板孔底 1/8 以上时,取 96 孔板中的杂交瘤细胞上清液,用间接 ELISA 方法检测其单克隆抗体效价。第 1 次检测为阳性的孔,3 d 后再取上清检测第 2 次。第 2 次筛选结果仍为阳性的孔,取其中的杂交瘤细胞用有限稀释法连续克隆纯化 3 次。取第 3 次克隆纯化后的杂交瘤细胞定株的培养上清液,从 100 倍开始,连续倍比稀释,用间接 ELISA 法测定其效价。

1.2.5 腹水的制备 取 12 周龄以上雌性 BALB/c 小鼠,腹腔注射无菌石蜡油 0.5 mL/只,7 d 后腹腔注射杂交瘤细胞 1×10⁶ 只⁻¹,注射 7 d 后经常观察小鼠,待小鼠腹腔膨胀到一定程度时,无菌条件下收集腹水,1 500 r/min 离心 10 min,取上清液-70 ℃保存。将少量上清液用间接 ELISA 法测定单克隆抗体效价。取腹水上清从 100 倍开始,连续倍比稀释,用间接 ELISA 法测定其效价。

1.2.6 抗 HA 单克隆抗体亚型及其特异性鉴定按照单克隆抗体亚型鉴定试剂盒操作说明鉴定单克

隆亚型。分别用 H1N1 亚型猪流感病毒、猪圆环病毒 2 型(PCV2)、猪伪狂犬病毒(PRV)、猪细小病毒(PPV)及复性 HA 蛋白为抗原(均稀释至 8.9 μg/mL)包被 ELISA 板子,以 800 倍稀释的腹水作为一抗,测定与这株单克隆抗体的细胞上清液有无反应。以 H3N2 亚型猪流感病毒为阳性对照。

1.2.7 HA 抗体的 Western blot 分析 取浓缩的 H3N2 亚型猪流感病毒 40 μL,加入 10 μL 5×SDS-Loding buffer,沸水煮 10 min 并进行 SDS-PAGE 电泳后,转印到聚偏二氟乙烯膜(PVDF 膜),以腹水单抗作为一抗(1∶500),37 ℃作用 2 h,以羊抗鼠 IgG-HRP 为二抗,37 ℃作用 1 h,DAB 显色液作用 10 min,漂洗干净,然后观察^[11]。

1.2.8 抗 HA 单克隆抗体抗原结合活性检测 以 H3N2 亚型猪流感病毒感染 MDCK 细胞,当细胞出现明显病变时,利用间接免疫荧光试验的方法测定 HA 单克隆抗体的抗原结合活性,具体方法见参考文献[12]。

2 结果与分析

2.1 SIV 抗原的制备与浓缩

浓缩前混合病毒血凝效价为 2⁷,经 8 000 r/min 除杂质,再通过 MILLIPORE 超滤管除去小分子质量(分子质量<100 ku)的杂质蛋白后,滤膜上方病毒液体血凝效价为 2¹³,用分光光度计测量浓缩后的抗原质量浓度为 19.513 mg/mL,-30 ℃保存。

2.2 间接 ELISA 方法的初步建立

2.2.1 包被抗原最佳质量浓度和对照血清最佳稀释倍数的确定 由表 1 可知,当包被抗原质量浓度为 8.9 μg/mL,阳性血清稀释 1 600 倍时,其 OD₄₅₀ 值最接近 1.0,因此包被抗原最佳质量浓度为 8.9 μg/mL,阳性对照血清最佳稀释倍数为 1 600 倍。同时取 1 600 倍为阴性对照血清最佳稀释倍数。

表 1 间接 ELISA 方法中包被抗原最佳质量浓度和血清最佳稀释倍数的确定(OD₄₅₀)
Table 1 Identification of optimal antigen coating concentration and serum dilution(OD₄₅₀)

包被抗原质量浓度/ (μg·mL ⁻¹) Antigen dilution	血清稀释倍数 Serum dilution				
	800(+)	1 600(+)	3 200(+)	6 400(+)	800(-)
35.4	2.164	1.932	1.647	1.204	0.049
17.7	2.040	1.591	1.157	0.794	0.069
8.9	1.204	0.947	0.675	0.308	0.037
4.4	0.642	0.382	0.211	0.165	0.040

注:(+)表示阳性血清;(-)表示阴性血清。
Note:(+)means positive serum;(-)means negative serum.

2.2.2 阴阳性血清临界值的确定 在包被抗原最佳质量浓度和对照血清最佳稀释倍数下进行试验,结果 10 份阴性血清的 OD₄₅₀ 值分别为 0.049,0.046,0.057,0.057,0.047,0.058,0.047,0.050,0.046 和 0.045,其平均值为 0.050 2,标准差为 0.065 4,因此阴阳性血清临界值为 0.246。

2.3 动物免疫的抗体水平

按照免疫程序,最后得到 3 只高抗体水平的小

鼠。免疫后小鼠血清抗体水平的间接 ELISA 测定结果(OD₄₅₀)见表 2。由表 2 可知,在小鼠血清按 1:102 400 倍稀释时,3 只小鼠血清的 OD₄₅₀ 值(P)均大于阴阳性血清临界值 0.246,而阴性血清 OD₄₅₀ 值的平均值(N)为 0.050 2,计算其 P/N 值均大于 2.1。取 P/N 值最大的 3 号小鼠的脾细胞与瘤细胞进行融合。

表 2 免疫后小鼠血清抗体水平的间接 ELISA 测定结果(OD₄₅₀)
Table 2 Antibody levels in immune mice by indirect ELISA(OD₄₅₀)

小鼠编号 Mouse number	血清稀释度 Serum dilution							空白对照 Blank control
	1:1 600	1:3 200	1:6 400	1:12 800	1:25 600	1:51 200	1:102 400	
1	2.572	2.477	2.138	1.586	0.921	0.509	0.406	0.036
2	2.586	2.396	1.971	1.433	0.849	0.466	0.277	0.036
3	2.381	2.263	2.056	1.807	1.307	0.712	0.441	0.049

2.4 杂交瘤细胞的筛选

第 1 次筛选获得了 OD₄₅₀ 值大于阴阳性血清临界值且 P/N>2.1 的 8 株阳性杂交瘤细胞,根据其所在 96 孔板的位置分别命名为 1C10、4A11、4C6、4E5、5D4、6B3、8E5、9A9;经过 2 次筛选后,仅有 1C10 的单克隆抗体为阳性(表 3),将其有限稀释。同时,为了挽救其他可能存在的单克隆抗体,对其他

7 孔也进行了有限稀释,但仍然没有得到阳性孔。将命名为 1C10 的杂交瘤细胞经过 3 次亚克隆,得到 1 株能够稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

2.5 抗 HA 单克隆抗体效价的测定

使用间接 ELISA 方法测定杂交瘤细胞上清液抗 HA 单克隆抗体效价为 1:1 600,腹水单抗效价为 1:51 200。

表 3 分泌抗 HA 单克隆抗体的杂交瘤细胞的筛选
Table 3 Screening of hybridoma secreting anti-HA monoclonal antibodies

细胞株 Cell strain	第 1 次筛选(OD ₄₅₀) First screening	第 2 次筛选(OD ₄₅₀) Second screening	细胞株 Cell strain	第 1 次筛选(OD ₄₅₀) First screening	第 2 次筛选(OD ₄₅₀) Second screening
1C10	0.627	0.709	5D4	0.580	0.137
4A11	0.534	0.241	6B3	0.927	0.127
4C6	0.538	0.125	8E5	0.501	0.115
4E5	0.611	0.122	9A9	0.732	0.046

2.6 抗 HA 单克隆抗体亚型和特异性的鉴定

图 1 结果显示,1C10 为 IgG1 亚型,轻链类型为 κ 链。表 4 结果表明,1C10 株单克隆抗体与复性

HA 蛋白呈阳性反应(OD₄₅₀ 值>0.246),而与 H1N1 亚型猪流感病毒、PRV、PCV2、PPV 都不反应。

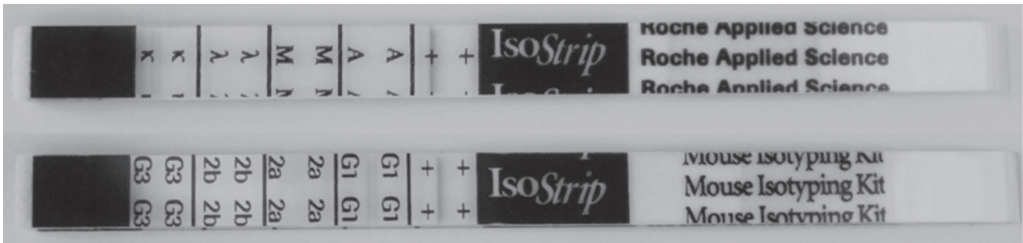


图 1 鼠源抗 HA 单克隆抗体亚型的鉴定结果
Fig. 1 Identification of murine monoclonal antibody subtypes

表 4 鼠源抗 HA 单克隆抗体的特异性鉴定
Table 4 Specific identification of murine monoclonal antibodies

抗原 Antigen	复性 HA 蛋白 Refolded HA protein	H1N1	PRV	PCV2	PPV	H3N2
OD ₄₅₀	0.447	0.035	0.069	0.039	0.041	1.129

2.7 抗 HA 单克隆抗体的 Western blot 检验

Western blot 检验结果(图 2)显示,1C10 株单克隆抗体在 62 ku 处出现特异性反应,与 HA 蛋白分子质量大小相符。结合表 4 中单抗与复性 HA 蛋白呈阳性反应的结果可知,1C10 株单克隆抗体可识别 H3N2 亚型猪流感病毒,并特异性识别 HA 蛋白^[13]。

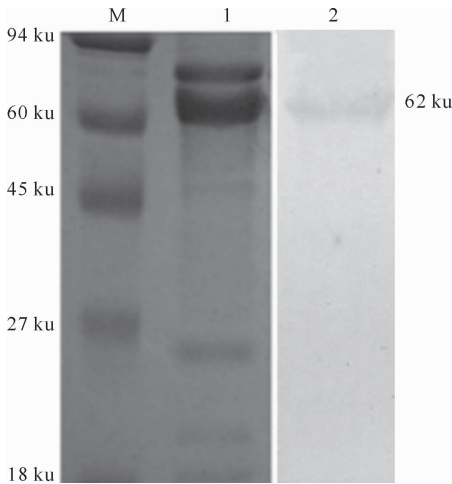


图 2 抗 HA 单克隆抗体的 Western blot 鉴定
M. 蛋白 Marker;1. H3N2 亚型猪流感病毒;
2. 单克隆抗体 1C10 的 Western blot 结果
Fig. 2 Western blot analysis of murine
anti-HA monoclonal antibody
M, SDS-PAGE protein molecular weight mark;
1. SDS-PAGE H3N2 virus;2. Western blot of 1C10

2.8 抗 HA 单克隆抗体的抗原活性

检测结果显示,阴性对照未接毒的 MDCK 细胞无荧光(图 3-A);接种 H3N2 亚型猪流感病毒的 MDCK 细胞出现病变,可以与 1C10 单克隆抗体特异性反应,出现明显荧光(图 3-B)。

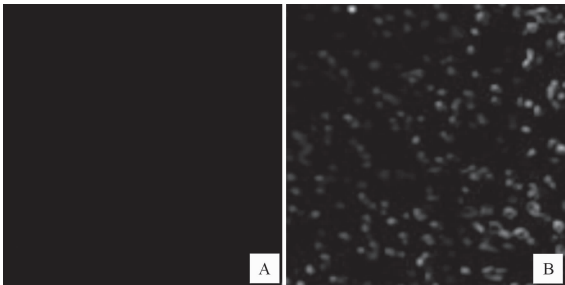


图 3 抗 HA 单克隆抗体抗原结合活性的检测(10×)
A. 正常 MDCK 细胞;B. 受到 H3N2 病毒感染的 MDCK 细胞

Fig. 3 Detection of antigen binding activity of
HA monoclonal antibody (10×)

A. Normal MDCK cells;B. MDCK cells infected with H3N2 virus

3 讨 论

抗原的制备与处理是单克隆抗体制备的第一步,通过鸡胚接种获得的 H3N2 亚型 SIV 中含有大量的尿囊液杂蛋白,用其诱导小鼠会产生大量的非特异性抗体,因而会增大单克隆抗体的筛选难度^[14]。本试验对收获的病毒尿囊液先 8 000 r/min 离心 30 min,再经过超滤管过滤,这样得到的 H3N2 亚型猪流感病毒去除了鸡胚尿囊液中的大部分杂蛋白,从而可以取得较好的免疫效果。本试验曾尝试使用超高速离心的方法来沉淀病毒,但是该方法对病毒的损耗较大,且超高速离心机操作复杂,因而并不实用。

用病毒免疫小鼠的方法制备单克隆抗体,与使用特定蛋白免疫小鼠的方法相比,其优点是可以一次制备针对多种蛋白的单克隆抗体,缺点是难以得到针对特定蛋白、特定位点的单克隆抗体。为了更加深入地研究 H3N2 亚型猪流感病毒的 HA 蛋白,使用原核表达的 HA 蛋白免疫小鼠,制备抗 HA 蛋白单克隆抗体将是下一步的工作。

本试验采用全病毒免疫动物,并以全病毒包被 ELISA 反应板来筛选单克隆阳性杂交瘤细胞株,目的是为了获得更为丰富的分泌抗猪流感病毒的杂交瘤细胞株。最终得到了 1 株针对 H3N2 猪流感病毒 HA 蛋白的单克隆抗体 1C10。这株抗猪流感 H3N2 病毒 HA 蛋白的单克隆抗体的制备,为 H3N2 亚型猪流感病毒快速准确检测方法的建立奠定了基础。

[参考文献]

[1] Ma W,Gramer M,Rosow K,et al. Isolation and genetic characterization of new reassortant H3N1 swine influenza virus from pigs in the Midwestern United States [J]. J Virol,2006,80:5092-5096.
[2] 陈敬贤. 2010—2011 年流感病毒流行状况回顾 [J]. 中华结核和呼吸杂志,2012,35(1):61-62.
Chen J X. Review of the 2010—2011 influenza [J]. Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases,2012,35(1):61-62. (in Chinese)
[3] 李海燕,于康震,杨焕良,等. 中国猪源 H5N1 和 H9N2 亚型流感病毒的分离鉴定 [J]. 中国预防兽医学报,2004,26(1):1-6.
Li H Y,Yu K Z,Yang H L,et al. Isolation and identification of Chinese swine H5N1 and H9N2 subtype of influenza virus [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine,2004,26(1):1-6. (in Chinese)
[4] 周伦江,王隆柏,俞玉鸿,等. 人源 H3N2 亚型猪流感重组病毒的分离鉴定及全基因序列分析 [J]. 中国预防兽医学报,2011,33(9):675-680.

- Zhou L J, Wang L B, Yu Y H, et al. Isolation and identification of human H3N2 subtype swine influenza viruses and sequence analysis of recombinant genome [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2011, 33(9): 675-680. (in Chinese)
- [5] Scotch M, Mei C. Phylogeography of swine influenza H3N2 in the United States; Translational public health for zoonotic disease surveillance [J]. Infection, Genetics & Evolution, 2013, 13(1): 224-229.
- [6] 张 云. 河南省 H1N2 亚型猪流感病毒分离株基因组演化特征和生物学特性研究 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2012.
- Zhang Y. Research and biological characteristics of Henan H1N2 subtype swine influenza virus isolate genomic evolution [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2012. (in Chinese)
- [7] 杨建民, 秦卓明. 禽脑脊髓炎病毒单克隆抗体的制备及鉴定 [J]. 畜牧兽医学报, 2003, 34(2): 191-194.
- Yang J M, Qin Z M. Preparation and characterization of avian encephalomyelitis virus monoclonal antibody [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2003, 34(2): 191-194. (in Chinese)
- [8] Crowther J R. The ELISA guidebook [M]. 2nd ed. USA: Humana Press, 2009: 79-111.
- [9] 陈 艳, 辛晓光, 杨焕良, 等. 猪流感抗体间接 ELISA 检测方法的建立 [J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(4): 308-311.
- Chen Y, Xin X G, Yang H L, et al. Swine flu establish an indirect ELISA detection method [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2007, 29(4): 308-311. (in Chinese)
- [10] 郭利敏, 乔传玲, 陈 艳, 等. 利用真核表达的猪流感病毒 NP 蛋白制备其特异性的单克隆抗体 [J]. 畜牧兽医学报, 2010, 32(6): 460-463.
- Guo L M, Qiao C L, Chen Y, et al. The use of eukaryotic expression swine influenza virus NP protein specificity monoclonal antibody preparation [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2010, 32(6): 460-463. (in Chinese)
- [11] 李慧昕, 刘胜旺, 韩宗玺, 等. 鸭肠炎病毒 VP5 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定 [J]. 中国兽医杂志, 2013, 29(1): 9-12.
- Li H X, Liu S W, Han Z X, et al. Preparation and characterization of duck enteritis virus VP5 protein monoclonal antibodies [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2013, 29(1): 9-12. (in Chinese)
- [12] 汪招雄, 何启盖, 黄红亮, 等. 抗伪狂犬病毒 Ea 株单克隆抗体的制备及鉴定 [J]. 华中农业大学学报, 2005, 24(3): 222-225.
- Wang Z X, He Q G, Huang H L, et al. Preparation and characterization of anti-pseudorabies virus Ea monoclonal antibodies [J]. Huazhong Agricultural University, 2005, 24(3): 222-225. (in Chinese)
- [13] 肖成蕊, 宋战昀, 杨立英, 等. H3N8 亚型马流感病毒单克隆抗体的制备及鉴定 [J]. 动物医学进展, 2011, 32(6): 1-4.
- Xiao C R, Song Z Y, Yang L Y, et al. Preparation and characterization of equine influenza virus subtype H3N8 monoclonal antibodies [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2011, 32(6): 1-4. (in Chinese)
- [14] 李引乾, 郝志明, 段清学, 等. 鸡胚尿囊液对小鼠免疫功能与抗应激作用的影响 [J]. 中国兽医科技, 2003, 33(11): 46-48.
- Li Y Q, Hao Z M, Duan Q X, et al. Allantoic fluid impact on immune function and anti-stress effects in mice [J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology, 2003, 33(11): 46-48. (in Chinese)