

邵颖, 肖福泉, 王丽丽, 等. 血清 4 型禽腺病毒 POCT 荧光微球免疫层析检测方法的建立[J]. 江苏农业学报, 2022, 38(5): 1298-1305.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2022.05.017

血清 4 型禽腺病毒 POCT 荧光微球免疫层析检测方法的建立

邵颖^{1,2}, 肖福泉^{1,2}, 王丽丽^{1,2}, 龚柳菲^{1,2}, 宋祥军^{1,2}, 涂健^{1,2}, 祁克宗^{1,2}

(1. 兽医病理生物学与疫病防控安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230036; 2. 安徽省动物性食品质量与生物安全工程实验室, 安徽 合肥 230036)

摘要: 为了迅速且便利地判定血清 4 型禽腺病毒(FAdV-4), 设计引物进行扩增, 构建重组载体, 原核表达的融合蛋白乳化后动物免疫得到多克隆抗体, 用 Western Blot 检测, 最后建立即时检验(POCT)荧光微球免疫层析试纸条, 并进行初步应用。用 POCT 荧光微球免疫层析试纸条检测不同浓度的 FAdV-4 病毒液及临床阳性样本, 结果表明, 用 POCT 荧光微球免疫层析试纸条 15 min 可以检测出结果, 且检测出阳性, 与临床诊断结果相符。建立的 POCT 荧光微球免疫层析检测 FAdV-4 的方法, 特异性良好, 操作简单且便于携带, 检测效率高, 有利于基层兽医临床检测。

关键词: FAdV-4; hexon 基因; 原核表达; 多克隆抗体; 荧光微球免疫层析

中图分类号: S858.326.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2022)05-1298-08

Establishment of POCT fluorescent microsphere immunochromatography method for detection of fowl adenovirus type 4

SHAO Ying^{1,2}, XIAO Fu-quan^{1,2}, WANG Li-li^{1,2}, GONG Liu-fei^{1,2}, SONG Xiang-jun^{1,2}, TU Jian^{1,2}, QI Ke-zong^{1,2}

(1. Anhui Key Laboratory of Veterinary Pathobiology and Disease Control, Hefei 230036, China; 2. Anhui Province Animal Food Quality and Biosafety Engineering Laboratory, Hefei 230036, China)

Abstract: To quickly and conveniently determine fowl adenovirus serotype 4 (FAdV-4), primers were designed for amplification, and the recombinant vector was constructed. After the fusion protein was emulsified, the polyclonal antibody was obtained by animal immunization. Western blot was used to detect, and point-of-care testing (POCT) fluorescent microsphere immunochromatographic strip was established and preliminary applied. The POCT fluorescent microsphere immunochromatographic strip was used to detect different contents of FAdV-4 and clinical positive sample. The results could be detected by poa fluorescent microsphere immunochromatographic strip for 15 minutes, and the positive results were consistent with the clinical diagnostic results. The POCT fluorescence immunochromatography assay has good specificity, simple operation and portability, high detection efficiency, so it is conducive to clinical detection of primary veterinarians.

Key words: FAdV-4; hexon; prokaryotic expression; polyclonal antibody; fluorescent microsphere immunochromatography

收稿日期: 2021-10-26

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31972642); 安徽省高校协同创新项目(GXXT-2019-035); 安徽省大学生创新创业训练计划项目(202110364043、202110364027)

作者简介: 邵颖(1989-), 女, 安徽亳州人, 博士研究生, 主要从事动物疫病防控研究, (E-mail) shaoying@ahau.edu.cn

通讯作者: 祁克宗, (E-mail) qkz@ahau.edu.cn

禽腺病毒对养禽业有很大的隐患, 许多家禽品

种,如鸡、鸭、鹅等都会被感染。血清 4 型禽腺病毒 (Fowl adenovirus serotype 4, FAdV-4) 属于感染最为严重的 I 群禽腺病毒,不仅可以经口、经粪水平传播,而且还可以通过种蛋垂直传播^[1]。FAdV-4 感染后主要以禽的心包积液和包涵体肝炎为病理特征,在世界各地都有发生。FAdV-4 侵害 3~5 周龄肉鸡和蛋雏鸡,感染率高达 90% 以上,死亡率可高达 80%^[2-3]。FAdV-4 是养殖业中致病的主要流行株,一直以来给中国家禽养殖业造成了严重的经济损失^[4-5]。

目前常用的检测 FAdV-4 的方法有 PCR、间接 ELISA 与 IFA 等。这些方法大都来自实验室,要求较高的专业技术,操作过程繁琐且检测仪器昂贵,对于大规模的临床检测来说费时费力^[6]。荧光免疫层析因快捷简单、价格低廉、灵敏度高等优势而广泛应用于病原检测、食品安全检测、环境检测等方面^[7]。即时检验 (Point-of-care testing, POCT) 是设备小、移动方便、操作简单、出结果时间短、即时即地检测的检测方式^[8]。荧光微球免疫层析技术检测病毒时有较高的效率和灵敏度,可以定量检测,而且没有较高的技术要求。该技术在农业上可以运用于微生物鉴定、霉菌毒素残留测定、药物残留鉴定、动物疾病诊断、食品质量检测等^[9]。

本研究用制备的鼠源多克隆抗体偶联荧光微球,用兔源多克隆抗体作为检测线 (Test line, T 线),山羊抗鼠 IgG 抗体为质控线 (Control line, C 线)^[10],以 FAdV-4 具有特异性的抗原决定簇 Hexon 蛋白制备多克隆抗体,建立 FAdV-4 荧光微球免疫层析试纸条检测方法,并验证该试纸条的特异性和灵敏性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验样品 原核表达载体 pGEX-6p-1、pET-32a、FAdV-4 基因组 DNA、FAdV-4 病毒液 (滴度 $1 \text{ ml } 1 \times 10^{7.52} \text{ TCID}_{50}$), FAdV-4 阳性临床样本、禽白血病 (ALV) 阳性临床样本,均由安徽农业大学动物科技学院兽医病理生物学与疫病防控实验室保存。

1.1.2 试验动物 7 只 BALB/c 小鼠、2 只 2 kg 左右的新西兰雌兔。

1.1.3 主要试剂 洗脱液 I: 120.00 g 尿素、1 ml tritan100、2.92 g 氯化钠、0.05 g EDTA,加入磷酸盐

缓冲液 (Phosphate-buffered saline, PBS) 至体积为 1 L。洗脱液 II: 120 g 尿素、1 ml tritan100,加入 PBS 至体积为 1 L。Premix Taq[®] Version 2.0 (Loading dye mix)、5×Protein SDS PAGE Loading Buffer、2×Power Taq PCR MasterMix 均购自诺唯赞生物科技有限公司, DH5 α chemically competent cell、Cat no. 11802ES 购自北京全式金生物公司, SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、PAGE 凝胶快速制备试剂盒购自上海雅酶生物科技有限公司, 弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂购自上海碧云天生物科技有限公司, HRP 标记的山羊抗兔 IgG 和 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 购自合肥艾格博斯生物科技有限公司, 荧光微球购自美国 Bangs Laboratories, Inc 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 引物的合成 参考 GenBank (登录号 MN781665) 的 FAdV-4 hexon 基因碱基序列, 设计 1 对特异性引物 hexon-F/hexon-R, 以实验保存的 FAdV-4 基因组 DNA 为模板, 扩增目的基因片段。用实验室保存的线性化载体 pET-32a 及 pGEX-6p, 分别设计载体引物 pET-32a-hexon-F/pET-32a-hexon-R 和 pGEX-6p-1-hexon-F/pGEX-6p-1-hexon-R, 由生物工程 (上海) 股份有限公司合成 (表 1)。

表 1 本研究使用的引物

Table 1 The primers used in this study

引物名称	序列 (5'→3')
hexon-F	GACATGGGGTCGACCTATTTTC
hexon-R	ACTGATGGCGGGACATCA
pET-32a-hexon-F	ATGGCTGATATCGGATCCGACATGGGGTCGACCTATTTTC
pET-32a-hexon-R	TCGACGGAGCTCGAATTCAGTGTATGGCGG-GACATCA
pGEX-6p-1-hexon-F	TCCCGGGTCGACTCGAGGACATGGGGTCGACCTATTTTC
pGEX-6p-1-hexon-R	TCAGTCACGATGCGGGCCGCACTGTATGGCGGACATCA

下划线部分为与线性化载体两末端对应的完全一致的同源臂序列。

1.2.2 重组质粒标准品 以实验室保存的 FAdV-4 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增目的片段 (729 bp)。PCR 反应程序: 95 °C 预变性 15 min; 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 复性 2 min, 共 32 个循环; 72 °C 延伸 10 min。将重组产物进行凝胶回收, 经过纯化后, 与保存的线性化载体利用 PCR 进行连接。转化于感受态细胞上, 构建重组质粒。提取阳性质粒,

进行测序,将结果进行比对。将阳性标准品于 -20°C 保存,作为后续试验的阳性模板。

1.2.3 扩增产物诱导表达条件确立 将 His-hexon 蛋白和 GST-hexon 蛋白分别接种于 LB 培养基,用异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)诱导蛋白质表达,IPTG 终浓度设为 0.25 mmol/L 及 0.50 mmol/L,诱导温度分别设为 16°C 、 28°C 及 37°C 。诱导蛋白质表达后,10 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,用磷酸盐缓冲液(Phosphate-buffered saline, PBS)重悬沉淀。采用超声波细胞破碎仪破碎蛋白质沉淀,收集蛋白质上清液与包涵体沉淀,经 12% 聚丙烯酰胺凝胶(Polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)电泳后,确定融合蛋白质的表达条件。

1.2.4 扩增产物溶解纯化条件的确立 先用 PBS 重悬包涵体沉淀,离心 10 min,弃上清液。分别用洗脱液 I、洗脱液 II 和 8 mol/L 尿素重悬 His-hexon 蛋白沉淀,混匀,冰上静置 10 min,10 000 r/min 离心 10 min,收集上清液。分别用洗脱液 I、洗脱液 II、6 mol/L 尿素重悬 GST-hexon 蛋白沉淀,混匀,冰上静置 10 min,10 000 r/min 离心 10 min,收集上清液。分别取经处理后的 His-hexon 蛋白和 GST-hexon 蛋白上清液,SDS-PAGE 验证,确定融合蛋白的溶解条件。

1.2.5 动物免疫及抗体效价的测定 用 BCA 试剂盒测定 His-hexon 蛋白和 GST-hexon 蛋白的浓度。用 PBS 稀释重组抗原,首次免疫动物时,抗原溶液与弗氏完全佐剂等量混合制成乳剂后免疫动物,之后免疫时,抗原溶液与弗氏不完全佐剂等量混合,振荡使之完全融合。具体的免疫过程:取已经乳化好的 His-hexon 蛋白,皮下分多点注射 7 只 BALB/c 小鼠。2 周、4 周、6 周后以相同方法再各免疫 1 次,最后一次免疫后 4 d 摘除小鼠眼球取血。取 GST-hexon 蛋白注射新西兰大白兔 2 只,每隔 7 d 进行一次免疫,最后一次免疫后 4 d 采集心脏血液。收集血清,经过洗涤、封闭,加入不同浓度的多克隆抗血清,孵育 1 h。加入待测血清,加入用封闭液按 1:5 000 稀释的 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 抗体,孵育 1 h,避光,用 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, TMB)显色,终止后用酶标仪测定波长 450 nm 处的吸光值,计算分析 P/N 值(阳性血清与阴性血清 OD 值之比)确定融合蛋白最佳包被浓度,根据最佳包被浓度测定抗体效价。用相同的方法测定兔源多克隆抗体效价。

1.2.6 hexon 基因的多克隆抗体 Western Blot 鉴定

GST-hexon 蛋白进行 12% SDS-PAGE 电泳,将蛋白质转印到 PVDF 膜上,封闭后 4°C 过夜。以稀释 100 倍的鼠源多克隆抗体为一抗,稀释 5 000 倍的 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 为二抗,润洗后,加 ECL 显色液避光显色。His-hexon 经 12% SDS-PAGE 电泳转印到 PVDF 膜,过夜孵育,以稀释 100 倍的兔源多克隆抗体为一抗,稀释 5 000 倍的 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 为二抗,加 ECL 显色液,避光显色。拍照分析。

1.3 FAdV-4 POCT 荧光微球免疫层析方法的建立

1.3.1 POCT 试纸条包被微球液最适 pH 的确定

将标准品用 PBS 2 倍梯度稀释,空白对照为 PBS。FAdV-4 病毒液的每个样品分别用 pH 值为 6.2、6.6、7.2 偶联鼠源多克隆抗体组装的试纸条检测,在电脑上读出数值。

1.3.2 POCT 试纸条包划线浓度的确定 将标准品用 PBS 2 倍梯度稀释,空白对照为 PBS。将 FAdV-4 病毒液的每个样品分别用划线稀释液稀释至 1 g/L、2 g/L、3 g/L 组装的试纸条检测,读出数值。

1.3.3 敏感性试验 在最适 pH 下稀释 5 倍微球稀释液,利用三维喷点平台将稀释好的抗体标记微球溶液喷涂到 5 mm 的玻璃纤维膜与最佳划线浓度制备好的 PVC 板。分别取 FAdV-4 病毒液(分别稀释 101、102、103、104 倍)、禽白病临床阳性样本及样本稀释液加入加样孔,用本研究建立的 POCT 荧光微球免疫层析方法进行检测,15 min 后进行读数,保存数据。

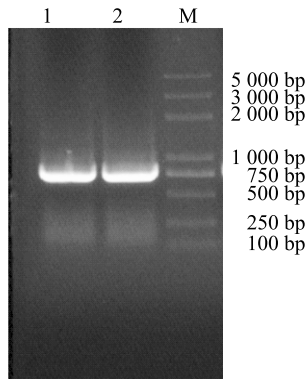
1.4 临床样品的检测

将实验室保存的 7 份禽腺病毒样本分别进行 PCR 检测与 POCT 荧光微球免疫层析检测,对比检测结果。

2 结果与分析

2.1 pET-32a-hexon 及 pGEX-6p-1-hexon 载体的构建

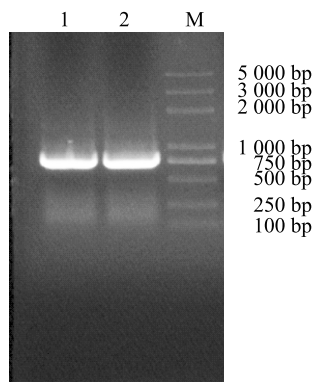
PCR 产物与载体 pET-32a 用同源重组方法连接,转化后提取质粒。进行 PCR 验证,结果如图 1 所示,PCR 目的片段大小在 729 bp 左右,与预期相符,测序正确。PCR 产物与载体 pGEX-6p-1 经同源重组方法连接,转化后提取质粒,进行 PCR 验证,结果如图 2 所示,PCR 目的片段与预期相符,测序正确。



M: 核酸大小标准; 1、2: PCR 产物。

图 1 pET-32a-hexon 载体验证

Fig.1 Identification of pET-32a-hexon



M: 核酸大小标准; 1、2: PCR 产物。

图 2 pGEX-6p-1-hexon 载体验证

Fig.2 Identification of pGEX-6p-1-hexon

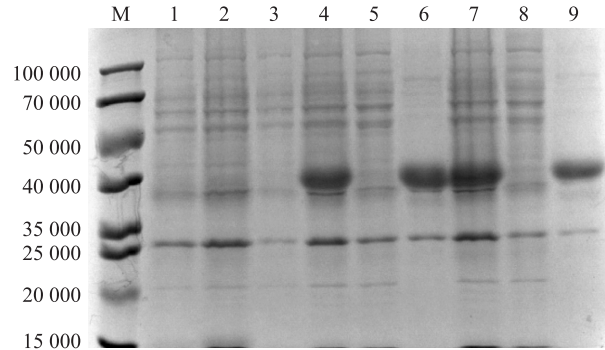
2.2 产物诱导表达温度及 IPTG 浓度的确定

His-hexon 蛋白在不同浓度 IPTG、不同温度下诱导表达。SDS-PAGE 电泳检测结果表明, His-hexon 蛋白在包涵体中表达, 在蛋白质相对分子质量 4.3×10^4 左右出现目的条带, 第 5 孔融合蛋白目的条带明显 (图 3)。因此在 16 °C、IPTG 浓度 0.25 mmol/L 条件下诱导表达 His-hexon 融合蛋白最佳。

GST-hexon 蛋白在不同浓度 IPTG、不同温度下诱导表达。SDS-PAGE 电泳检测结果显示, GST-hexon 蛋白在包涵体中表达, 在蛋白质相对分子质量 5.2×10^4 左右出现目的条带, 第 9 孔融合蛋白目的条带明显且杂蛋白质最少。所以在 37 °C、IPTG 浓度 0.50 mmol/L 条件下诱导表达 GST-hexon 融合蛋白最佳 (图 4)。

2.3 融合蛋白的溶解纯化条件优化

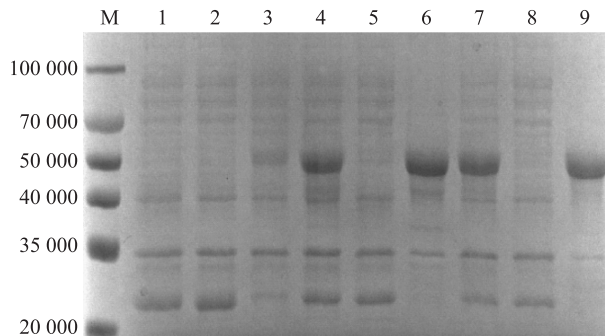
His-hexon 蛋白在大肠杆菌中以包涵体形式存



M 为蛋白质相对分子质量标准, 1、2 分别为 16 °C 诱导温度下空载未诱导、空载诱导, 3 为 16 °C 诱导温度下菌液未诱导, 4~6 分别为 16 °C 诱导温度、IPTG 浓度 0.25 mmol/L 下的菌液、上清液、包涵体, 7~9 分别为 16 °C 诱导温度、IPTG 浓度 0.50 mmol/L 下的菌液、上清液、包涵体。

图 3 His-hexon 蛋白在大肠杆菌中的诱导表达

Fig.3 Induced expression of His-hexon protein in *Escherichia coli*



M 为蛋白质相对分子质量标准, 1、2 分别为 16 °C 诱导温度下空载未诱导、空载诱导; 3 为 16 °C 诱导温度下菌液未诱导, 4~6 分别为 16 °C 诱导温度、IPTG 浓度 0.50 mmol/L 下的菌液、上清液、包涵体, 7~9 分别为 37 °C 诱导温度、IPTG 浓度 0.50 mmol/L 下的菌液、上清液、包涵体。

图 4 GST-hexon 蛋白在大肠杆菌中的诱导表达

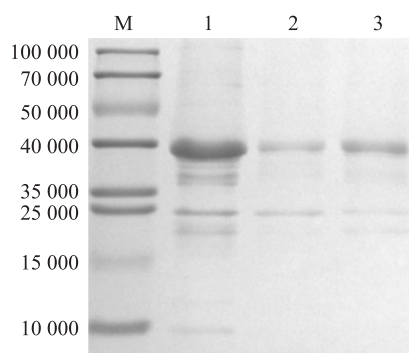
Fig.4 Induced expression of GST-hexon protein in *E. coli*

在。对重悬沉淀混合后溶解纯化的 His-hexon 蛋白进行 SDS-PAGE 分析, 从图 5 可看出, 8 mol/L 尿素能充分溶解 His-hexon 蛋白且目的蛋白浓度较高。

对经洗脱液、尿素洗脱下来的 GST-hexon 蛋白进行 SDS-PAGE 分析, 从图 6 可看出, 6 mol/L 尿素能充分溶解 GST-hexon 蛋白且目的蛋白浓度较高。

2.4 Hexon 基因的多克隆抗体效价测定

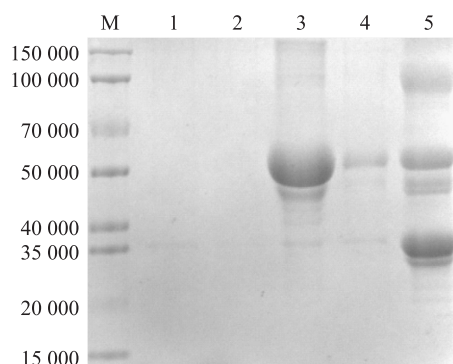
采用间接 ELISA 方法测定最后一次免疫后小鼠血清。在 1:800 包被抗原稀释倍数下, P/N 值普遍高于 1:400 与 1:1600 包被浓度下的 P/N 值,



M:蛋白质相对分子质量标准;1:洗脱液 I;2:洗脱液 II;3:8 mol/L 尿素。

图 5 His-hexon 蛋白的溶解纯化

Fig.5 Purification results of His-hexon protein



M:蛋白质相对分子质量标准;1:洗脱液 I;2:洗液 II;3:6 mol/L 尿素;4:8 mol/L 尿素;5:细菌菌液。

图 6 GST-hexon 蛋白的溶解纯化

Fig.6 Purification results of GST-hexon protein

并且在抗原稀释到 1 : 800、血清稀释到 1 : 100 时 P/N 值达到最高,所以在 1 : 800 稀释度下包被效果最佳。在包被浓度 1 : 800 下进行抗体效价测定,再用间接 ELISA 方法测定抗体效价,取 $P/N \geq 2.1$ 的血清稀释度为小鼠血清效价,结果(表 2)显示小鼠血清效价为 1 : 819 200。

用间接 ELISA 方法检测最后一次免疫后新西兰大白兔的血清,在包被浓度 1 : 800 时 P/N 值普遍高于 1 : 400 与 1 : 1 600 包被浓度下的 P/N 值,且在抗原稀释到 1 : 800、血清稀释到 1 : 800 时 P/N 值达到最高,所以在 1 : 800 稀释度下包被效果最佳。在包被浓度 1 : 800 时进行抗体效价测定,再用间接 ELISA 方法测定抗体效价,取 $P/N \geq 2.1$ 的血清稀释度为兔血清效价,结果(表 3)显示,1 号兔的血清效价为 1 : 512 00、2 号兔血清效价为 1 : 102 400。

表 2 鼠源抗体效价的间接 ELISA 测定结果

Table 2 Results of indirect ELISA for mouse-derived antibody titer

血清稀释度	阳性对照(P) OD 值	阴性对照(N) OD 值	P/N 值
1 : 400	2.879 45	0.049 20	58.525 40
1 : 800	2.302 50	0.044 60	51.625 50
1 : 1 600	1.975 50	0.046 75	42.256 60
1 : 3 200	1.896 75	0.047 65	39.805 80
1 : 6 400	1.884 55	0.047 75	39.467 00
1 : 12 800	1.810 30	0.046 95	38.558 00
1 : 25 600	1.609 70	0.046 75	34.432 00
1 : 51 200	1.301 90	0.045 00	28.931 10
1 : 102 400	0.923 30	0.044 40	20.795 00
1 : 204 800	0.546 65	0.041 80	13.077 70
1 : 409 600	0.391 85	0.040 50	9.675 30
1 : 819 200	0.236 50	0.048 55	4.871 30
1 : 1 638 400	0.089 71	0.047 73	1.879 50

2.5 多克隆抗体 Western Blot 鉴定

将 GST-hexon 蛋白进行 Western Blot 鉴定,结果(图 7)显示第 2 孔在 5.2×10^4 左右出现与预期蛋白质大小相同的条带。将 His-hexon 融合蛋白进行 Western Blot 鉴定,结果(图 8)显示第 2 孔在 4.3×10^4 左右出现与预期蛋白质大小相同的条带。

2.6 POCT 试纸条包被微球液最适 pH 的优化及划线浓度的确定

用 FAdV-4 病毒液作为标准品鉴定试纸条包被微球液最适 pH。采用荧光读数仪读取 T 线(检测线)和 C 线(质控线)的荧光强度,并计算 T/C 值。 T/C 值越大说明特异性越好,如表 4 所示,该鼠源多克隆抗体荧光包被微球液在 pH 为 6.6 时效果最好。

2.7 POCT 试纸条划线质量浓度的优化

用 FAdV-4 病毒液作为标准品,比较试纸条包被微球液最适的兔源多克隆抗体 T 线划线质量浓度。用荧光读数仪读取的 T 线和 C 线荧光强度,并计算 T/C 值。 T/C 值越大说明特异性越好,如表 5 所示,兔源多克隆抗体 T 线划线质量浓度在 3 g/L 时效果最好。

2.8 POCT 荧光微球免疫层析检测的敏感性

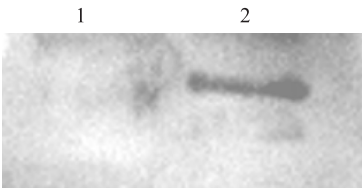
用 POCT 试纸条检测实验室保存的临床样本,分别检测了 3 组 PBS 稀释液、3 组 ALV 阳性组织研磨液、3 组 FAdV-4 阳性组织研磨液与 5 组 FAdV-4 病毒液。结果(表 6)显示 ALV 阳性组织研磨液为

阴性,FAdV-4 阳性组织稀释液为阳性。FAdV-4 病毒液的稀释度 1×10^3 时为阳性,稀释度 1×10^4 时为阴性,禽白血病阳性组织液为阴性。检测病毒液最低病毒滴度为 1 ml $1\times 10^{4.52}$ TCID₅₀。

表 3 兔源抗体效价的间接 ELISA 测定结果

Table 3 Indirect ELISA results of rabbit-derived antibody titer

血清稀释度	1 号阳性对照 (P)OD 值	2 号阳性对照 (P)OD 值	阴性对照 (N)OD 值	1 号 P/N	2 号 P/N
1 : 400	2.181	3.124	0.220	9.898	14.177
1 : 800	2.107	2.997	0.175	12.029	17.109
1 : 1 600	2.256	3.096	0.222	10.128	13.896
1 : 3 200	1.772	2.412	0.211	8.381	11.406
1 : 6 400	0.956	2.377	0.247	3.859	9.594
1 : 12 800	0.513	0.955	0.145	3.523	6.560
1 : 25 600	0.276	0.497	0.115	2.385	4.299
1 : 51 200	0.157	0.246	0.054	2.905	4.561
1 : 102 400	0.101	0.253	0.123	0.824	2.060
1 : 204 800	0.121	0.207	0.118	1.026	1.758



1:pGEX-6p-1 空载菌液;2:GST-hexon 蛋白。

图 7 鼠源多克隆抗体 Western Blot 鉴定

Fig.7 Identification of mouse polyclonal antibody by Western blot



1:pET-32a 空载菌液;2:pET-32a-hexon。

图 8 兔源多克隆抗体 Western Blot 鉴定

Fig.8 Identification of rabbit polyclonal antibody by Western blot

表 4 不同包被微球液 pH 下 POCT 试纸条荧光强度峰值

Table 4 Fluorescence intensity peak of POCT strips at different pH of the encapsulated microsphere solution

荧光包被微球液 pH	项目	病毒原液	1 : 2 稀释液	1 : 4 稀释液
6.2	T 峰峰值	8 715 705	8 794 620	8 632 545
	C 峰峰值	9 123 596	9 182 890	8 615 931
	T 峰峰值/C 峰峰值比值(T/C)	0.955	0.957	1.001
6.6	T 峰峰值	8 667 829	8 727 252	8 660 602
	C 峰峰值	8 999 764	9 166 007	8 629 288
	T 峰峰值/C 峰峰值比值(T/C)	0.963	0.952	1.003
7.2	T 峰峰值	8 755 787	8 842 652	8 604 735
	C 峰峰值	9 444 888	9 957 783	9 539 587
	T 峰峰值/C 峰峰值比值(T/C)	0.927	0.888	0.902

2.9 POCT 荧光微球免疫层析检测方法初步应用

取实验室保存的 7 份禽腺病毒样本用 POCT 荧光微球免疫层析试纸条检测。POCT 荧光微球免疫

层析试纸条 15 min 检测出结果。检测结果如图 9 所示,检测出 2 份阳性,与 PCR 检测结果和临床诊断结果相符。

表 5 不同兔源抗体质量浓度下 POCT 试纸条荧光峰值

Table 5 Fluorescence intensity peak of POCT strips at different mass concentrations of rabbit antibodies

兔源多克隆 抗体划线液 质量浓度 (g/L)	项目	病毒原液	1:2 稀释液
1	T 峰峰值	45 588 377	12 966 472
	C 峰峰值	3 862 393	3 241 405
	T 峰峰值/C 峰峰值比 值(T/C)	11.803	4.000
2	T 峰峰值	16 220 163	17 670 871
	C 峰峰值	704 471	1 412 826
	T 峰峰值/C 峰峰值比 值(T/C)	23.024	12.507
3	T 峰峰值	34 802 503	17 977 915
	C 峰峰值	476 965	285 522
	T 峰峰值/C 峰峰值比 值(T/C)	72.966	62.965

表 6 POCT 试纸条检测临床组织样本的荧光强度峰值之比

Table 6 Ratio of peak fluorescence intensity of clinical tissue samples detected by POCT strips

样本	组别	T 峰峰值	C 峰峰值	T/C
PBS	1	377 956	30 149 138	0.012
	2	208 578	22 285 452	0.009
	3	115 515	11 820 762	0.009
ALV 阳性组织研磨液	1	220 072	14 422 626	0.015
	2	364 741	25 108 976	0.014
	3	3 136 061	151 091 622	0.020
FAdV-4 阳性组织研磨液	1	47 694 401	22 926 551	2.080
	2	29 879 862	34 459 176	0.867
	3	60 495 457	74 233 434	0.814
FAdV-4 病毒液	1	34 802 503	476 965	72.966
	2	16 220 163	704 471	23.024
	3	17 670 871	1 412 826	12.507
	4	12 966 472	3 241 405	4.000
	5	45 739 457	287 767 952	0.158

5 组 FAdV-4 病毒液中,1 为原液(滴度为 $1 \text{ ml} \times 10^{7.52} \text{ TCID}_{50}$),2~5 分别为 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 倍稀释液。

3 讨论

禽腺病毒属于禽腺病毒属,是 DNA 病毒^[11-13]。禽腺病毒有 12 种血清型(FAdV-1~FAdV-7、FAdV-

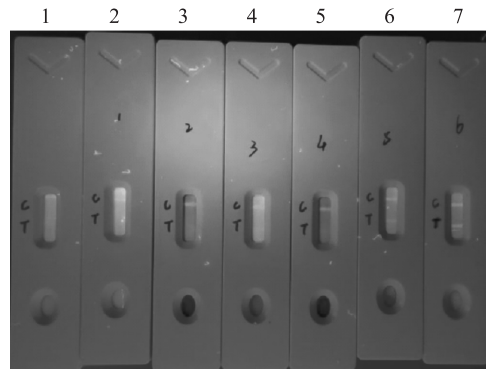


图 9 POCT 荧光微球免疫层析试纸条检测结果图

Fig.9 Detection results of POCT fluorescent microsphere immuno-chromatographic test strip

8a、FAdV-8b、FAdV-9~FAdV-11)^[14]。FAdV-4 和 FAdV-8b 两种血清型最常见,FAdV-4 型在中国养禽业中发生更加普遍,引起了广泛重视^[15]。血清 4 型禽腺病毒会引起鸡的包涵体肝炎、心包积水综合征、产蛋下降综合征等临床症状,发病率和死亡率都很高^[16]。目前对于血清 4 型禽腺病毒最常见的检测法有琼脂试验检测法、中和试验检测法、ELISA 检测法、免疫荧光技术检测法等,这些检测方法都能有效地检测病毒,具有良好的特异性^[17],但是操作专业性强,需要在实验室条件下进行,对于养殖场工作者来说是比较困难的。因此建立操作要求低且适用于大部分养殖场和基层兽医临床的检测方法十分必要。

本研究针对血清 4 型禽腺病毒特异性抗原的多克隆抗体,建立了一种检测血清 4 型禽腺病毒的 POCT 荧光微球免疫层析试纸条检测方法。生产 POCT 荧光微球免疫层析试纸条的关键技术在于抗体的制备,用特异性高的抗体制备的试纸条特异性和灵敏性也更高^[18]。利用同源重组技术将目的基因与载体连接,转化为 His-hexon 和 GST-hexon,作为免疫原,制备高效价的多克隆抗体,用间接 ELISA 和 Western Blotting 方法鉴定。本试验用的是多克隆抗体,利用 ProteinA/G-Sepharose FF 亲和层析柱快速提取多抗中的 IgG,大大提高了试纸条的特异性,捕获到了抗原的存在,但灵敏度还有待进一步提高^[19]。

影响试纸条特异性与灵敏性的因素还有一些化学药剂造成的非特异性结合、包被液和稀释液的浓度、包被液的 pH 等。不同样本稀释液检测的结果

会有一定的差异,一般会选择 PBS。在试纸条组装过程中,要避免操作台不被病原等可控因素影响,组装时尽可能不触碰到结合垫与 NC 膜,避免出现误差^[20]。本试纸条最大的优点是不需要昂贵的仪器,定性检测的时候只需要紫外灯光照射便可观察结果,既快速又简单^[21],可以在 15 min 内产生结果,适合于现场快速检测。但还需要进一步完善和优化生产过程,以适应不断变化的检测需求。

荧光微球制备过程简单且受外界环境的干扰较小,稳定性更好,利用检测仪就能实现基本定量,同时 POCT 技术已是很多病毒检测项目的研究热点^[22]。本试验将二者相结合,建立了血清 4 型禽腺病毒的 POCT 荧光微球免疫层析检测方法,为基层兽医临床诊断提供了一种新的快速检测方法。

参考文献:

- [1] 魏 熠. 禽腺病毒病的诊断与防控[J]. 国外畜牧学(猪与禽), 2020, 40(2): 20-21.
- [2] KOMATSU T, KUBO T, KITOU R, et al. Inclusion body hepatitis caused by *Aviadenovirus* in a tropical screech owl (*Megascops choliba*) [J]. The Journal of Veterinary Medical Science, 2020, 82(9): 1341-1345.
- [3] DINESH M, NARESH J, ASHOK K T, et al. Characterization of fowl adenoviruses associated with hydropericardium syndrome and inclusion body hepatitis in broiler chickens [J]. VirusDisease, 2014, 25(1): 114-119.
- [4] RASHID F, XIE Z, ZHANG L, et al. Genetic characterization of fowl aviadenovirus 4 isolates from Guangxi, China, during 2017-2019 [J]. Poultry Science, 2020, 99(9): 4166-4173.
- [5] YAPENG S, QIANG W, YUNCHAO L, et al. Unravelling the receptor binding property of egg drop syndrome virus (EDSV) from the crystal structure of EDSV fiber head [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 139: 587-595.
- [6] GYZ L K, SÁNDOR K, BALÁZS H, et al. Molecular typing of fowl adenoviruses, isolated in Hungary recently, reveals high diversity [J]. Veterinary Microbiology, 2013, 167(3/4): 357-363.
- [7] YU J, SU J, ZHANG J, et al. CdTe/CdS quantum dot-labeled fluorescent immunochromatography test strips for rapid detection of *Escherichia coli* O157 : H7 [J]. Rsc Advances, 2017, 7(29): 17819-17823.
- [8] NARDO F D, ANFOSSI L, GIOVANNOLI C, et al. A fluorescent immunochromatographic strip test using Quantum Dots for fumonisins detection [J]. Talanta, 2016, 150(12): 463-468.
- [9] 赵继勋. 当前鸡疫病流行现状及分析 [J]. 北方牧业, 2016(9): 22-23.
- [10] JONATHAN C, CARL L, ROGIER H, et al. Respiratory tract infections (RTIs) in primary care: narrative review of C reactive protein (CRP) point-of-care testing (POCT) and antibacterial use in patients who present with symptoms of RTI [J]. BMJ Open Respiratory Research, 2020, 7(1): 445-454.
- [11] 王 静. 禽腺病毒 I 群单抗表位鉴定及 ELISA 抗体检测方法的建立 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2020.
- [12] 陈俊红, 何 宇, 祁宇晨, 等. 肉鸽圆环病毒、腺病毒及疱疹病毒 I 型混合感染的多重 PCR 检测 [J]. 江苏农业科学, 2021, 49(22): 167-171.
- [13] 史荣华, 周 扬, 颜彩霞, 等. 1 例蛋鸡腺病毒感染的诊断及对 SPF 鸡的致病性 [J]. 江苏农业科学, 2020, 48(6): 156-159.
- [14] SILAEN O S M, MURTINI S, PAMUNGKAS J, et al. Isolation and molecular characterization of fowl aviadenovirus associated with inclusion body hepatitis from poultry in Banten and West Java, Indonesia [J]. Veterinary World, 2020, 13(9): 30-32.
- [15] 蒋 韬. 免疫层析技术在口蹄疫 POCT 中的应用研究 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2012.
- [16] 陈伟生, 张森洁, 王志刚. 加强我国动物疫病预防控制体系建设的对策建议 [J]. 中国科学院院刊, 2020, 35(11): 1384-1389.
- [17] DEL V F P, CAMBA S I, UMALI D V, et al. Research Note: Molecular and pathologic characterization of avian adenovirus isolated from the oviducts of laying hens in eastern Japan [J]. Poultry Science, 2020, 99(5): 2459-2468.
- [18] 杜成亮, 李如才. 动物疫病检测工作的现状分析及应对措施探讨 [J]. 国外畜牧学(猪与禽), 2017, 37(4): 57-58.
- [19] SHUBHAGATA D, KATHLEEN F, SUBIR S, et al. A novel pathogenic aviadenovirus from red-bellied parrots (*Poicephalus rufiventris*) unveils deep recombination events among avian host lineages [J]. Virology, 2017, 502(2): 188-197.
- [20] 张启龙, 孙 丹, 韦海涛, 等. I 群禽腺病毒 4 型 IgG 抗体间接 ELISA 检测方法的建立 [J]. 中国兽药杂志, 2019, 53(8): 1-7.
- [21] GANG L, GUANLIU Y, YUJUAN N, et al. Airborne transmission of a serotype 4 fowl adenovirus in chickens [J]. Viruses, 2019, 11(3): 262.
- [22] 黄德滨, 黄亚兰, 王 森, 等. 荧光定量免疫层析技术在诊断上的应用 [J]. 热带医学杂志, 2018, 18(10): 1390-1393.

(责任编辑:张震林)