

3 种处理方法检测禽流感卵黄 HI 抗体的比较

朱 雁¹, 陈燕眉¹, 陈英军²

(1. 江苏省铜山县兽医院, 江苏 铜山 221007; 2. 江苏省铜山县禽病门诊部, 江苏 铜山 221009)

摘要: 将同一份卵黄分别采用氯仿、8% 枸橼酸钠和生理盐水处理, 在相同条件下进行禽流感卵黄 HI 试验, 并与其相对应的血清 HI 试验进行对比。结果发现氯仿处理法所测得的结果和相应血清差异最小, 且重复性好, 但繁琐、费时; 枸橼酸钠法次之, 但简便易行, 费时少, 更适合基层应用; 生理盐水处理法所得结果误差较大, 一般不宜采用。

关键词: 禽流感; 卵黄; HI 抗体; 氯仿; 8% 枸橼酸钠; 生理盐水

中图分类号: S858.3 **文献标识码:** B **文章编号:** 0529-5130(2007)12-0063-02

目前利用卵黄 HI 试验代替血清检测产蛋鸡群禽流感 (AI) 抗体已得到了广泛应用, 且方法有多种。为选择较为理想的方法, 本文将同一份卵黄分别采用不同处理方法, 在相同条件下进行 HI 试验, 并与其相对应的血清 HI 抗体进行对比, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

禽流感抗原: 由江苏省畜牧兽医总站检测中心提供, 血凝价 1:512。

供试卵黄及血清: 采自商品代蛋鸡及蛋种鸡, 共 100 份。在收集鸡蛋的同时, 翅静脉采集与之相对应的血液, 分离血清, 对应编号。

试剂: 0.75% 新鲜鸡红细胞悬液, 现用现做; 氯仿 (三氯甲烷), 南京化学试剂厂生产; 8% 枸橼酸钠, 自配。

其他用品: 96 孔 V 型微量板; 50 μ L 定量移液器; 微型振荡器。

1.2 3 种处理法及比较

氯仿处理法: 1 mL 卵黄加入 1 mL 生理盐水, 混合后加入 2 mL 氯仿, 强力振荡, 静置 1 h, 然后 1 500 r/min 离心 10 min, 1 min 内分为三层, 吸取上清液备用。

8% 枸橼酸钠处理法: 1 mL 卵黄加入 1 mL 8% 枸橼酸钠, 静置 10 min, 卵黄液呈中度浑浊。

生理盐水处理法: 1 mL 卵黄加入 1 mL 生理盐水, 混合后备用, 卵黄液浑浊。

将同一编号的 3 种方法处理的卵黄液和对应血清, 在相同条件下, 分别于同一块微量板上进行 HI 试验, 对试验结果进行统计分析, 并比较结果出现的快慢及红细胞沉积图像的清晰度。然后, 再抽取 3 份同一编号的样品, 进行重复试验, 比较各种方法的可重复性。

2 结果与分析

2.1 3 种处理方法的卵黄及对应血清 HI 试验结果

从表 1 中可以看出, 氯仿处理法所测得结果的平均值低于对应血清 1 个滴度以内, 差异不显著 ($P > 0.05$), 样本内各测定值之间的变异程度接近于对应血清。8% 枸橼酸钠处理法所测得的结果平均值高于对应血清 1 个滴度左右, 虽有显著差异 ($P < 0.05$, $P > 0.01$), 但却表现出明显的相关关系, 样本内各测定值之间的变异程度也接近于对应血清。生理盐水处理法所测得的结果高于对应血清 2 个滴度左右, 差异极显著 ($P < 0.01$), 样本内各测定值之间的变异程度也较大, 有时可相差几个滴度。

表 1 3 种卵黄处理液及对应血清 HI 试验结果 (以 log₂ 表示)

品 种	项 目	氯仿	枸橼酸钠	生理盐水	对应血清
商品代蛋鸡	$\bar{x} \pm SD$	8.1 \pm 0.73	10.1 \pm 0.88	11.0 \pm 0.24	8.7 \pm 0.74
	C. V/%	9.0	8.7	11.27	8.3
蛋种鸡	$\bar{x} \pm SD$	6.9 \pm 0.82	8.1 \pm 0.98	8.7 \pm 1.24	7.3 \pm 0.82
	C. V/%	11.9	12.1	14.3	11.2

注: 商品代蛋鸡最近一次 120 日龄 H5 灭活苗免疫, 0.6 mL/只, 160 龄采样; 蛋种鸡最近一次 130 日龄 H5 灭活苗免疫, 0.6 mL/只, 168 日龄采样。

2.2 3 种处理方法的卵黄及对应血清 HI 试验出现结果的快慢

在条件相同的情况下, 无显著差异。通常与气温有关, 一

般夏季约 20 ~ 25 min; 冬季约 30 ~ 35 min。

2.3 HI 试验红细胞沉积图像的清晰度

氯仿处理法红细胞沉积图像清晰可见, 和对应血清基本相同, 易于判定; 8% 枸橼酸钠处理法次之, 但尚不影响结果判定; 生理盐水处理法红细胞沉积图像有时模糊不清或出现跳孔

收稿日期: 2007-03-19

作者简介: 朱雁 (1965-), 男, 高级兽医师, 学士。

巢式 RT-PCR 在猪传染性胃肠炎病毒检测中的应用

母文华¹, 郭 闯², 周志农³, 贺宽军⁴

(1. 内蒙古民族大学, 内蒙古 通辽 028000;

2. 内蒙古民族大学生命科学院, 内蒙古 通辽 028000;

3. 浙江省湖州市远东园艺有限公司, 浙江 湖州 313000;

4. 内蒙古民族大学职业技术学院, 内蒙古 通辽 028000)

摘要: 建立对猪传染性胃肠炎病毒 (TGEV) 的巢式 RT-PCR (RT-nested PCR) 检测方法, 为该病的诊断和流行病学调查提供更为可靠和敏感的手段。根据 GenBank 中收录的 TGEV, 纤突蛋白 S 基因的核酸序列设计了 2 对引物, 以 mRNA 为模板, 通过 RT-PCR、RT-nested PCR 方法, 在优化 RT-PCR 反应条件的基础上, 建立了快速检测 TGEV 的 RT-nested PCR 诊断方法。试验结果成功扩增出长度为 886 bp 和 690 bp 的 TGEV 目的片段, 但未扩增出猪传染性腹泻病毒 (PEDV) 片段。表明 RT-nested PCR 方法可用于检测猪传染性胃肠炎病毒, 而且此法简单省时、灵敏性高。

关键词: 猪传染性胃肠炎病毒; RT-PCR; RT-nested PCR; S 基因

中图分类号: S858.285.3

文献标识码: B

文章编号: 0529-5130(2007)12-0064-03

猪传染性胃肠炎 (TGE) 是一种以严重腹泻、呕吐和脱水为临床特征的高度接触性传染病, 属于国际动物卫生组织 (OIE) 法典 B 类疫病中必检的猪传染病, 在世界各国都有不同程度的流行。由于传染性胃肠炎和流行性腹泻 (PED) 的临床表现、病理变化、流行病学等方面都非常相似, 给临床诊断带来了一定的困难。所以寻找一种灵敏、可靠、快速检测猪传染性胃肠炎的方法就显得至关重要。目前检测 TGEV 的方法主要有中和试验、免疫荧光抗体试验、酶联免疫吸附试验和电泳技术, 这些方法对于检测 TGEV 和防制 TGE 起到了重要作用, 但也存在特异性不强、灵敏性差、耗时长等缺点, 且难以有效区分 TGEV 感染还是 PEDV 感染。RT-PCR 方法因其特异、灵

敏、快速和可直接检测临床样品等优点, 已成为检测 TGEV 和 PEDV 的一种有效的新方法^[3]。试验旨在通过优化巢式 RT-PCR (RT-nested PCR) 方法, 建立了快速、灵敏的 TGEV 的分子生物学检测方法, 为该病与猪流行性腹泻的正确诊断和流行病学研究提供更为敏感和可靠的手段。

1 材料与方法

1.1 毒株与试剂

试验用 TGEV 和 PEDV 乳猪的小肠组织毒, 由笔者实验室保存。Trizol 试剂、反转录酶、Rnase 抑制剂、dNTP 均购于 Gibco 公司。Taq DNA 聚合酶为宝生物公司产品。限制性内切酶、DNA Marker 为 MBI 公司产品。

1.2 RNA 的提取

病料组织充分冻融 3 次, 取组织样品 0.2 g 加 1 mL PBS 稀

收稿日期: 2007-02-12; 修回日期: 2007-10-17

作者简介: 母文华 (1966-), 男, 副研究员。

沉积现象, 容易造成判断错误, 特别是对于抗体滴度较低的样品, 误差较大。

2.4 3 种处理方法的卵黄 HI 重复试验结果

重复试验结果 (表 2) 表明: 氯仿处理法测得的结果稳定可靠, 重复性好, 8% 枸橼酸钠处理法次之, 生理盐水处理法重复性相对较差。

表 2 HI 重复试验结果 (以 log₂ 表示)

序 号	氯仿处理法	8% 枸橼酸钠处理法	生理盐水处理法
10	9, 9, 9	10, 10, 10	11, 12, 11
30	8, 8, 8	9, 9, 9	11, 9, 10
60	6, 6, 6	7, 6, 7	8, 7, 8

3 小结与讨论

综合以上结果可以得出, 经过氯仿或枸橼酸钠处理的卵黄

可以代替血清检测产蛋鸡群的 AI 抗体, 前者的准确度虽然高于后者, 但繁琐、费时, 而后者简便易行, 费时少, 更适合基层应用; 生理盐水处理法所得结果误差较大, 一般不宜采用。

HI 试验的原理是通过抗体和抗原发生特异性的结合, 从而抑制了抗原凝集红细胞的作用。氯仿能够溶解卵黄中的脂肪, 用它处理的卵黄经离心后分为 3 层, 最下层淡黄色, 为氯仿层; 中间层为凝固的脂肪层; 最上层澄清透明, 为提纯的卵黄抗体溶液, 和血清相似, 所以 HI 试验结果最接近对应血清。8% 枸橼酸钠能够破坏卵黄中脂肪的结构, 使脂肪变性, 有利于抗体成分的析出, 但溶液比较浑浊, 从而使抗体和抗原的结合出现一定的误差。生理盐水处理卵黄只起到单纯的稀释作用, 溶液浑浊, 因而除抗体和抗原发生特异性结合以外, 卵黄颗粒也可能和抗原发生非异性结合使结果的误差增大。以上可能是导致 3 种方法 HI 试验结果出现差异的原因。