

鸡传染性支气管炎病毒抗体胶体金免疫层析试纸条的研制*

王悦欣¹, 舒黎辉², 杨雨琦¹, 王亚荣¹, 吴平¹, 寇启明¹, 孙琦¹, 乐涛¹

(1. 重庆师范大学 生命科学学院, 重庆 401331; 2. 重庆市农业机械化技术推广总站, 重庆 401147)

摘要:【目的】建立一种快速、灵敏的胶体金免疫层析法(Colloidal-gold immunochromatography assay),用以检测禽类早期感染鸡传染性支气管炎病毒(Infectious bronchitis virus, IBV)和监测 IBV 疫苗接种免疫水平。【方法】将重组 IBV 核衣壳(Nucleocapsid, N)蛋白包被在试纸条检测线,羊抗兔 IgG 包被在试纸条控制线,用胶体金-兔抗鸡 IgG 偶联物作为示踪剂,检测血清中 IBV 抗体。【结果】制备所得的胶体金免疫层析试纸条与 IBV 抗体阳性血清反应呈阳性,与鸡新城疫病毒抗体阳性血清、鸡传染性法氏囊病毒抗体阳性血清、鸡毒霉形体抗体阳性血清和 SPF 标准鸡血清未发生交叉反应;当 IBV 抗体阳性血清以 1:35 比例稀释后,依然可以用该试纸条检出;该试纸条在 60 d 的保存期内重复性良好;以从不同养殖场采集到的鸡血清样本作为测试对象,比较该试纸条和进口 ELISA 试剂盒的检测结果,两者符合率为 97.44%。【结论】成功制备了检测耗时短、检测限低、特异性强、稳定性好的 IBV 抗体检测胶体金免疫层析试纸条,为鸡传染性支气管炎的早期诊断以及免疫监测提供了简便高效的技术方法。

关键词:免疫层析;鸡传染性支气管炎;抗体;冠状病毒

中图分类号:Q939.91

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2021)05-0122-07

鸡传染性支气管炎(Infectious bronchitis, IB)是 20 世纪 30 年代在美国分离得到的鸡传染性支气管炎病毒(Infectious bronchitis virus, IBV)引发的一种传播迅速、传染能力强的禽类疾病^[1-2]。IBV 广泛分布于全球各地,以感染鸡(*Gallus gallus domesticus*)的呼吸道粘膜为主,继而引发大肠杆菌(*Escherichia coli*)、支原体等微生物感染。IBV 感染范围不仅限于上呼吸道,也可涉及前列腺、肾脏、肠和输卵管^[3],从而导致鸡对于饲料的利用率降低、生长减缓,使雏鸡死亡率上升,还影响蛋鸡的整体健康状况,并使蛋鸡产蛋量下降、鸡蛋品质变差。目前,IB 已成为了造成家禽养殖业经济损失的主要原因^[4]。

IBV 是一种有包膜的冠状病毒,属于冠状病毒亚科(Coronavirus),它只有 1 个正链 RNA 基因组在宿主细胞细胞质中复制^[5]。IBV 的血清型种类较多,截至目前已分离出 30 余种,且新的血清型还在持续出现^[6],这加大了 IB 的诊断与防治难度。IBV 的结构蛋白主要有 3 种,分别为膜(Membrane)蛋白、纤突(Spike, S)蛋白与核衣壳(Nucleocapsid, N)蛋白^[7]。在病毒蛋白中, N 蛋白所占比例可达 40%,主要功能为参与病毒的复制、包裹病毒核酸、参与机体免疫识别等,在早期机体免疫过程中起到关键作用^[8]。在 IBV 进化过程中, N 蛋白相较于 S 蛋白更为保守,因此,可以将 N 蛋白作为 IBV 检测的捕获抗原。

目前,酶联免疫吸附试验(ELISA)、血凝及血凝抑制试验(HA-HI)、反转录多聚酶链式反应(RT-PCR)是检测病毒的常用方法^[9],但上述方法需要较长的检测时间、专业的检测人员以及特殊的检测设备。因此,无论是在常规现场实践中还是在流行病学监测中,都迫切需要一种快速而简单的检测 IBV 早期感染和监测 IBV 疫苗免疫效果的方法。随着科技的进步,胶体金免疫层析法(Colloidal gold immunochromatography assay, GICA)的出现为病毒的快速检测开辟了新道路,仅需 10 min 左右就能得到无需仪器即可观察到的结果。与其他检测技术相比, GICA 的检测过程更加简单、快速,并且成本更低。为此,本研究选取 IBV 的 N 蛋白进行重组表达,将该蛋白作为检测线(T 线),制成了一种快速检测血清中 IBV 抗体的胶体金免疫层析试纸条(后简称胶体金试纸条),并将该试纸条与进口 ELISA 试剂盒的 IBV 检测结果进行了对比,以为 IBV 检测提供更加高效便捷的方法。

* 收稿日期:2020-12-21 修回日期:2021-01-12 网络出版时间:2021-09-13 11:19

资助项目:国家自然科学基金(No. 31671939);重庆市科学技术委员会技术创新与应用示范项目(No. cstc2018jscx-msybX0201);重庆市高校创新研究群体项目(No. CXQT20031)

第一作者简介:王悦欣,女,研究方向为微生物学, E-mail:1127667023@qq.com;通信作者:乐涛,男,教授,博士, E-mail:letao@cqnu.edu.cn

网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20210910.1747.012.html

1 材料与方法

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器为:长沙湘智离心机仪器有限公司生产的 GL21M 型高速冷冻离心机、太仓市华美生化仪器厂生产的 QHZ-98A 型台式全温摇床、General Electric 公司生产的 AKTA prime plus 型蛋白纯化仪、苏州净化设备有限公司生产的 SW-CJ-ZD 型超净工作台、南京先欧仪器制造有限公司生产的 XO-1200D 型超声细胞破碎仪、南京思普金生物科技有限公司生产的 Pyxis 蛋白凝胶快速处理系统、日本日立公司生产的 UH5300 型紫外分光光度计以及上海捷宁生物有限公司生产的台式喷金仪、连续划膜仪和试纸条切割机。

1.2 材料及主要试剂

重组工程菌 Pet-30a-N 由笔者所在实验室构建,感受态细胞大肠杆菌 BL21(DE3)由上海生物工程有限公司提供,兔抗鸡 IgG 和羊抗兔 IgG 由洛阳佰奥通生物有限公司提供,水合四氯金酸和牛血清蛋白由 Sigma 公司提供,进口 ELISA 试剂盒由上海酶联生物科技有限公司提供,硝酸纤维素膜、底板、样品垫和吸水垫由上海捷宁生物有限公司提供,IBV 阳性血清、鸡传染性法氏囊病毒阳性血清、鸡新城疫病毒阳性血清、鸡毒霉形体阳性血清和 SPF 标准鸡血清由中国兽医药品监察所提供。此外,从重庆市綦江区石角镇、石壕镇等不同禽类养殖场获得 50 份供试鸡血清样品,其中 IBV 阳性血清 40 份、IBV 阴性血清 10 份。

1.3 IBV 重组 N 蛋白的制备

1.3.1 N 蛋白的表达与鉴定 将 Pet-30a-N 质粒转化到 BL21(DE3)感受态细胞,再将后者涂布到含 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的硫酸卡那霉素的培养基上,37 °C 恒温培养箱中倒置培养 24 h。从 LB 固体培养基中选取单克隆菌落,接种到 4~6 mL 含 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 硫酸卡那霉素的 LB 液体培养基中,37 °C 摇菌培养 12 h,当菌液 OD_{600} 值在 0.5~0.8 内时,加入终浓度为 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)溶液,然后将它们置于 15 °C 和 37 °C 以诱导表达。通过 SDS-PAGE 鉴定 N 蛋白表达结果。

1.3.2 N 蛋白的纯化 在 4 °C 的条件下进行 N 蛋白纯化,将 BL21(DE3)全菌用含 $300 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠、pH 为 8.0 的 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris、 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Imidazole、质量分数为 1% 的 Triton X-100、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PMSF 以及 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT 的溶液进行超声波裂解,与此同时将 Ni-IDA 亲和层析柱用含 $300 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠、pH 为 8.0 的 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris 和 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Imidazole 的缓冲液进行平衡,再将 N 蛋白用不同浓度的咪唑平衡缓冲液进行洗脱,通过 SDS-PAGE 分析检测每个洗脱组分,收集经 Ni-IDA 亲和层析纯化后纯度和浓度相对较高的组分,将收集到的组分放到含有质量分数为 10% 的 Glycerol 且 pH 为 7.4 的 1×PBS 中进行透析,透析结束用孔径为 $0.22 \mu\text{m}$ 的针头式过滤器过滤,用 SDS-PAGE 鉴定蛋白纯化的效果,然后通过 Western blot 分析纯化后的蛋白免疫活性。

1.4 胶体金溶液的制备

成功制备胶体金的关键之一在于制备过程中所用锥形瓶的洁净程度,因此在制备胶体金之前,需要对烧金过程中所用的玻璃器皿进行严格清洗。先将所用玻璃器皿用王水充分浸泡,然后再用一级水润洗至少 5 次,最后用超纯水冲洗干净,烘干备用。制备胶体金时采用柠檬酸三钠作为还原剂,而还原剂可以使四氯金酸溶液在加热条件下发生聚合,还原剂的加入量、加入时间等因素可以使四氯金酸聚合形成不同大小金颗粒^[10]。首先将水合四氯金酸粉末配制成质量分数为 1% 的四氯金酸溶液,4 °C 避光保存。在锥形瓶中放入搅拌子,然后用移液枪吸取 1 mL 上述四氯金酸溶液,再补充 99 mL 一级水,开始加热搅拌混匀。5 min 左右停止搅拌溶液,观察溶液冒出的气泡;当溶液接近沸腾时开始搅拌并快速加入质量分数为 1% 的柠檬酸三钠溶液。持续加热搅拌溶液并继续观察,数十秒到 1 min 左右溶液开始变黑;当溶液沸腾后停止加热但仍持续搅拌,3 min 左右溶液变红,此时停止搅拌。将上述溶液冷却至室温后,加一级水补至 100 mL,4 °C 保存备用。

1.5 胶体金-抗鸡 IgG 偶联物的制备和纯化

取 $70 \mu\text{L}$ $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸钾溶液将 10.0 mL 胶体金溶液的 pH 调至最佳标记 pH,再加入最适标记量即 $90 \mu\text{L}$ 的 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 兔抗鸡 IgG,放入搅拌子持续搅拌 30 min;最后加入 2.5 mL 质量浓度为 5% 的牛血清蛋白溶液,匀速搅拌 30 min;将金标抗体复合物于 4 °C 冰箱中放置 2 h 后,等量装于多个离心管中以 $2\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,弃去底部沉淀;上清液继续以 $9\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 40 min,如此离心、复溶沉淀两次;最后用 1.0 mL 标记洗涤液重悬沉淀,将此纯化后的金标抗体于置于 4 °C 冰箱内保存。

1.6 胶体金试纸条的组装

IBV 抗体检测胶体金试纸条以 PVC 板作为底板,上面依次粘贴有样品垫、缀合垫、NC 膜和吸水垫,且各部分之间保持 1~2 mm 的重叠。样品垫和缀合垫用含有质量分数为 0.5% 的 PVPK30、质量分数为 0.5% 的 Tween-20、质量分数为 0.1% 的 PEG-20000、质量分数为 2% 的牛血清蛋白、质量分数为 0.02% 的 proclin300 且 pH 为 7.4 的 1×PBS 的封闭液处理,并在 37 °C 干燥过夜。在 NC 膜上用划膜仪以 $1 \mu\text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ 的划线量将 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 IBV 重组 N 蛋白划为 T 线,将 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的羊抗兔 IgG 蛋白划为控制线(C 线),并在 37 °C 下干燥 2 h。将胶体金标记的兔抗鸡 IgG 以 $0.3 \text{ mL} \cdot \text{cm}^{-1}$ 的喷金量负载到处理后的缀合垫上,烘干。最后将吸水垫、NC 膜、处理后的缀合垫、处理后的样品垫按顺序粘贴到 PVC 底板上,最后用试纸条切条机将组装好的 PVC 底板切割成 3.5 mm 的宽度。

1.7 IBV 抗体检测结果的判定

将待检的血清用 pH 为 7.4 的 1×PBS 稀释 20 倍,移液枪吸取 40 μL 稀释后的血清到样品垫上,待样品层析 10~20 min 后,察看试纸条的显色情况。若待检血清里含有 IBV 抗体,则试纸条 NC 膜上 T 线和 C 线均出现肉眼可见的红色条带,结果显示为阳性;若待检血清里不含 IBV 抗体,则只有 C 线出现肉眼可见的红色条带,结果显示为阴性;一旦 C 线不出现肉眼可见的红色条带,则该试纸条失效。试纸条的具体检测原理及过程见图 1。

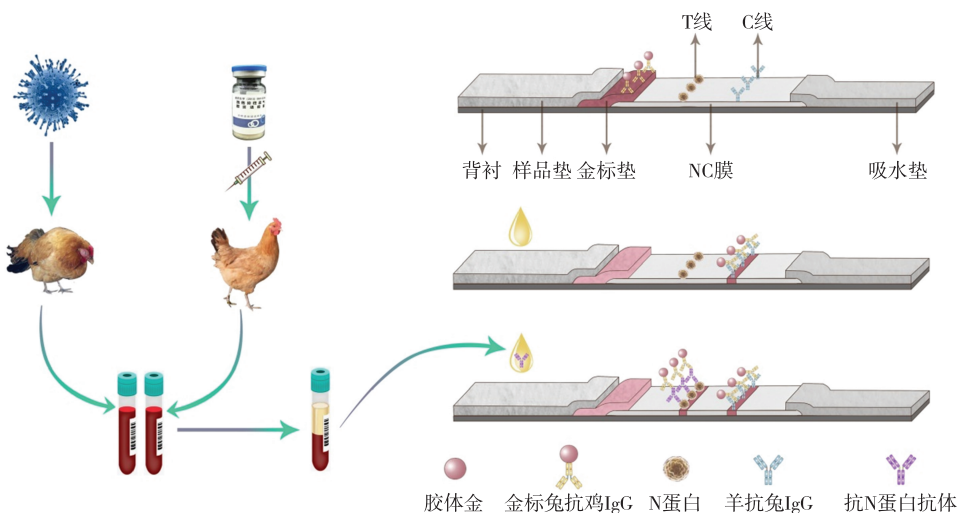


图 1 试纸条检测原理及流程

Fig. 1 Principle and flow of test strip detection

1.8 胶体金试纸条的性能评价

1.8.1 特异性评价 分别将 IBV 抗体阳性血清、鸡毒霉形体抗体阳性血清、鸡传染性法氏囊病毒抗体阳性血清、鸡新城疫病毒抗体阳性血清和 SPF 标准鸡血清进行胶体金试纸条检测,观察检测结果,并判定试纸条的特异性。

1.8.2 灵敏度评价 用生理盐水将 IBV 抗体阳性血清进行梯度稀释,用移液枪取各个稀释梯度的血清 40 μL 到胶体金试纸条样品垫上,10 min 后察看层析情况,将试纸条能检测出的最大稀释倍数作为试纸条的检测灵敏度。

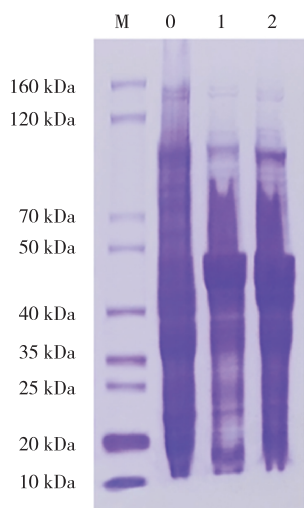
1.8.3 稳定性测试 将 3 组不同时间制备的 IBV 抗体检测胶体金试纸条进行组内、组间稳定性测试,将试纸条置于 4、25 和 37 °C 环境下 60 d,在此期间每隔 7 d 对阴性血清和阳性血清进行检测,观察检测结果。

2 结果与分析

2.1 IBV 重组 N 蛋白的制备情况

2.1.1 N 蛋白表达情况的鉴定 通过 SDS-PAGE 分析重组工程菌的 N 蛋白表达情况,如图 2 所示,可以看到在相对分子质量为 45 kDa 处出现明显条带,这与实验预期的 N 蛋白相对分子质量大小一致。

2.1.2 N 蛋白的纯化情况 从图 3 可以看出,用 $300 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 咪唑的平衡缓冲液进行洗脱时,N 蛋白的纯度相对较高。收集 N 蛋白纯度、浓度相对较高的 7~10 泳道所对应的样品,经透析后用孔径为 0.22 μm 的针头式过滤器过滤,进行 Western blot 分析,结果见图 4。可以看到 IBV 抗体与重组 N 蛋白可以发生特异性反应,在对分子质量为 45 kDa 处有 1 条明显的条带,这表明 IBV 重组 N 蛋白具有良好的免疫学活性。

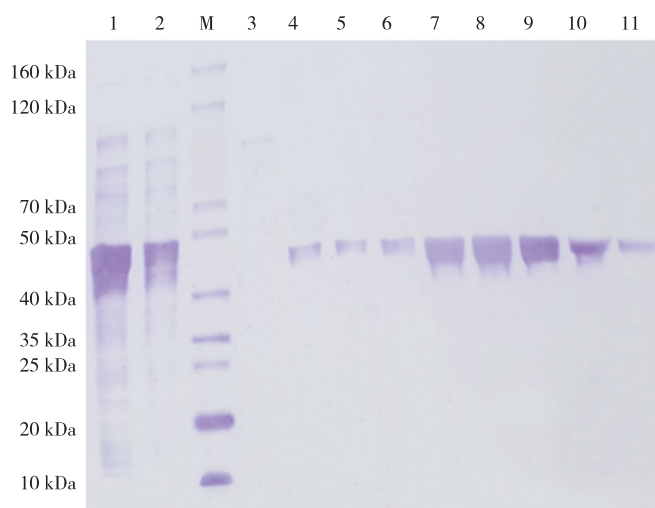


注:M为SDS-PAGE蛋白质Marker,0为对照(不加IPTG),1~2为均加入终浓度为 $0.2\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的IPTG并分别在 15°C 诱导16 h和 37°C 诱导16 h后的N蛋白表达情况

图2 SDS-PAGE分析N蛋白在

BL21(DE3)中表达情况

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of nucleocapsid protein expression in BL21(DE3)



注:M为SDS-PAGE蛋白质Marker,1为全菌破碎离心后上清液,2为上清液同Ni-IDA孵育后流出液,3为 $50\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Imidazole的洗脱组分,4~5为 $100\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Imidazole的洗脱组分,6~11为 $300\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Imidazole的洗脱组分

图3 SDS-PAGE分析N蛋白上清纯化结果

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of nucleocapsid protein supernatant purification results

2.2 胶体金质量鉴定结果

制成的胶体金溶液呈澄清的酒红色,在自然光下为透明状液体(图5)。由紫外可见分光光度计测定该溶液的吸光度,发现在 520 nm 处出现峰值(图6)。

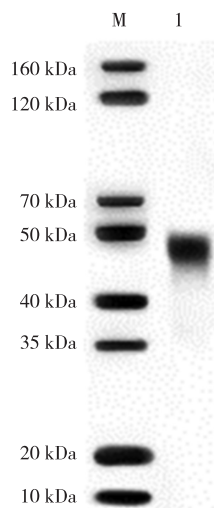


图4 重组N蛋白Western Blot分析

Fig. 4 Western Blot analysis of recombinant N protein



图5 本研究制成的胶体金溶液

Fig. 5 Colloidal gold solution in the study

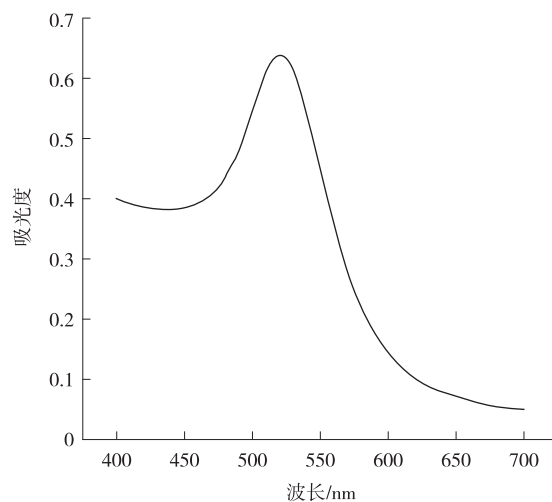
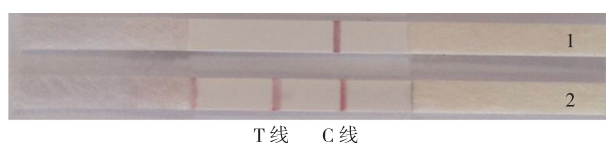


图6 胶体金紫外可见吸收光谱

Fig. 6 The UV-Vis absorption spectrum of colloidal gold

2.3 IBV 抗体检测结果

在胶体金试纸条检测时,阳性样本的T线和C线均出现条带,而阴性血清样本中由于没有IBV抗体则只有C线出现条带,该检测结果可以直接通过肉眼观察到(图7),检测时间不超过10 min。



注:1为IBV阴性血清,2为IBV阳性血清

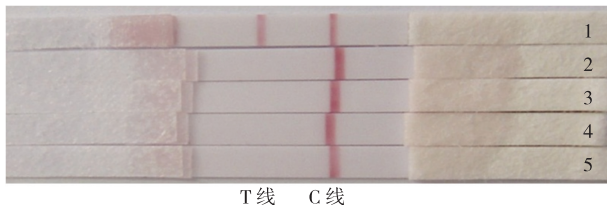
图7 试纸条对阴性血清和阳性血清检测结果

Fig. 7 Test strip test results for negative serum and positive serum

2.4 胶体金试纸条的性能评价结果

2.4.1 特异性评价结果 图 8 显示:检测 IBV 抗体阳性血清的胶体金试纸条,出现两条红色条带,检测结果呈阳性;而该试纸条在检测其他 3 类常见禽类疾病病毒以及 SPF 标准鸡血清时均只有 C 线显色,检测结果呈阴性。由此可见,该胶体金试纸条具有较好的特异性。

2.4.2 灵敏度评价结果 将 IBV 抗体阳性血清进行梯度稀释,结果显示:当稀释到 1:35 时,T 线仍然可以显色,表明制备的试纸条灵敏度良好(图 9)。

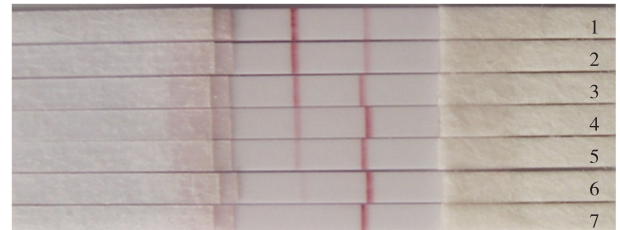


T 线 C 线

注:1~5 分别为鸡传染性支气管炎病毒抗体阳性血清、鸡毒霉形体抗体阳性血清、鸡传染性法式囊病毒抗体阳性血清、新城疫病毒抗体阳性血清和 SPF 血清

图 8 试纸条特异性试验结果

Fig. 8 Test strip specificity test results



T 线 C 线

注:1~7 对应的阳性血清稀释度分别为 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30 和 1:35

图 9 试纸条灵敏度试验结果

Fig. 9 Sensitivity test results of test strips

2.4.3 稳定性评价结果 将置于 4, 25 和 37 °C 保存的 3 个不同时间段制作的胶体金试纸条用 IBV 抗体阳性血清和阴性血清进行检测,每个相同时间段制作的试纸条设置 3 组重复。结果显示:在 60 d 保存期内,所有检测阳性血清的试纸条均能清晰显示 T 线和 C 线,检测阴性血清的试纸条均只显示 C 线,表明该试纸条有良好的重复性和稳定性。

2.5 与进口 ELISA 试剂盒检测结果的比较

以从不同养殖场采集到的鸡血清样本作为测试对象,比较本研究制备的 IBV 抗体检测胶体金试纸条和进口 ELISA 试剂盒的检测结果。由表 1 可知,两种方法的阳性样本检出率十分接近,二者符合率为 38/39 ≈ 97.44%。

表 1 血清样品检测结果与 ELISA 试剂盒比较

Tab. 1 Comparison of serum sample test results with ELISA kit

检测方法	阳性样品数/个	阴性样品数/个	合计/个	阳性样本检出率/%
胶体金试纸条	38	12	50	76
ELISA 试剂盒	39	11	50	78

3 讨论

目前在大部分饲养家禽的场所中均有 IBV 的存在,该病毒能在家禽之间迅速传播,并通过呼吸道和粪便排出,在外界环境中可存活 56 d^[11]。肉鸡在感染 IBV 后对饲料的利用率将会下降且生长也会减缓,蛋鸡在感染 IBV 后会则会影响所产鸡蛋的品质数量^[12]。IB 已被认为是危害中国禽类养殖业的一类主要传染病^[13]。养殖场需要采取严格的生物安全性措施,并通过给家禽接种疫苗等方法来提高禽类对 IBV 毒株的抵抗力。由于 IBV 是单链 RNA 病毒,具有较强的变异能力,因此新的 IBV 毒株正不断出现^[14-15],使疫苗的免疫防控效果受到影响^[16-17]。家禽养殖场的抗体监测是针对养殖场流行病学分析及疾病防控最重要的一项参考指标,有关抗体监测结果可为免疫效果评估、免疫程序确定、健康检测、疫病辅助诊断、疫苗质量评价、高效疫苗选择等提供科学依据,对疫病防控意义重大。因此,建立一种快速而简单的检测方法来对禽类受到 IBV 感染或人工疫苗免疫诱导而产生的 IBV 抗体进行现场监测十分必要。

IBV 病毒核衣壳主要由 N 蛋白和病毒 RNA 环绕而成。N 蛋白是一种比较保守的结构蛋白,在不同的毒株之间表现出高度的同一性^[18],在病毒的结构蛋白中所占比例也最大,且在早期感染 IBV 时禽类机体内就能迅速分泌产生大量抗 N 蛋白的抗体。因此,本研究利用原核表达的重组 N 蛋白作为胶体金试纸条的 T 线,检测血清

样本中的 IBV 抗体。经鉴定,本研究得到的纯化重组 N 蛋白具备良好的抗原性,作为包被抗原,在免疫层析过程中,胶体金试纸条检测结果理想,特异性良好。将该试纸条和进口 ELISA 试剂盒的检测结果加以比较,发现两者检测结果的符合率达到 97.44%。而新城疫病毒抗体阳性血清、鸡传染性法式囊病毒抗体阳性血清、鸡毒霉形体抗体阳性血清和 SPF 标准鸡血清用该试纸条进行检测时,结果均未出现假阳性,且无交叉反应。因此,本研究采用 GICA 检测免疫鸡血清中的 IBV 抗体具有良好的特异性和灵敏度。虽然 ELISA 作为常用的抗体效价监测方法有着结果可信度高且检测过程简单易行的优点,但检测时间通常较长,而且操作时需要专业的实验操作人员。相比之下,本研究制备的胶体金试纸条在监测鸡血清中的 IBV 抗体时,不仅具有较高的特异性和较低的检测限,而且易于操作,也不需要专业的设备以及专业技术人员,非常适合现场快速检测。此外,本研究中采用的主要抗原是重组 N 蛋白,因此在生物安全性方面也高于其他血清学方法。鉴于 IBV 属于冠状病毒亚科,因此本研究的相关方法对当下快速检测新型冠状病毒(SARS-CoV-2)感染方法的建立也具有一定的参考价值。总之,本研究制备的 IBV 抗体检测胶体金试纸条非常适用于现场快速检测 IBV 抗体,为养殖户检测禽类感染 IBV 以及监测 IBV 疫苗接种免疫水平提供了简便有效方法,并有助于未来家禽养殖业的发展。

参考文献:

- [1] SCHALK A F, HAWN M C. An apparently new respiratory disease of baby chicks[J]. Journal of the American Veterinary Medical Association, 1931, 78: 413-422.
- [2] SJAACK De WIT J J, COOK J K, Van Der HEIJDEN H M, et al. Infectious bronchitis virus variants; a review of the history, current situation and control measures[J]. Avian Pathology, 2011, 40(3): 223-235.
- [3] REN G C, LIU F, HUANG M R, et al. Pathogenicity of a QX-like avian infectious bronchitis virus isolated in China[J]. Poultry Science, 2019, 99(1): 111-118.
- [4] CAVANAGH D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus[J]. Veterinary Research, 2007, 38(2): 281-297.
- [5] ENJUANES L, ALMAZAN F, SOLA I, et al. Biochemical aspects of coronavirus replication[J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2006, 581: 13-24.
- [6] JACKWOOD M W, HILT D A, WILLIAMS S M, et al. Molecular and serologic characterization, pathogenicity, and protection studies with infectious bronchitis virus field isolates from California[J]. Avian Diseases, 2007, 51(2): 527-533.
- [7] XU L W, REN M T, SHENG J, et al. Genetic and biological characteristics of four novel recombinant avian infectious bronchitis viruses isolated in China[J]. Virus Research, 2019, 263: 87-97.
- [8] 李敏, 李俐睿, 岳建国, 等. 鸡传染性支气管炎病毒重组 N 蛋白克隆表达与免疫原性检测[J]. 四川畜牧兽医, 2017, 44(4): 24-27.
LI M, LI L R, YUE J G, et al. Cloning expression and immunogenicity detection of recombinant N protein of infectious bronchitis virus[J]. Sichuan Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2017, 44(4): 24-27.
- [9] 庄金秋, 阮震, 张颖, 等. 鸡传染性支气管炎病毒实验室检测方法研究进展[J]. 家禽科学, 2018(7): 50-58.
ZHUANG J Q, RUAN Z, ZHANG Y, et al. Research progress in laboratory detection methods of avian infectious bronchitis virus[J]. Poultry Science, 2018(7): 50-58.
- [10] 刘颖沙, 李建科, 张琳, 等. 胶体金制备技术的改进与优化[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(11): 110-114.
LIU Y S, LI J K, ZHANG L, et al. Improvement and optimization of the preparation technology of colloidal gold[J]. Food and Fermentation Industries, 2015, 41(11): 110-114.
- [11] AMMAYAPPAN A, UPADHYAY C, GELB J, et al. Complete genomic sequence analysis of infectious bronchitis virus Ark DPI strain and its evolution by recombination[EB/OL]. (2008-12-22) [2020-12-21]. <https://link.springer.com/article/10.1186/1743-422X-5-157>.
- [12] KHATABY K, FELLAHI S, LOUTFI C, et al. Avian infectious bronchitis virus in Africa; a review[J]. The Veterinary Quarterly, 2016, 36(2): 71-75.
- [13] 赵伟伟, 柴书霞. 鸡传染性支气管炎病毒的分离与鉴定[J]. 养殖与饲料, 2019(1): 37-38.
ZHAO W W, CHAI S X. Isolation and identification of chicken infectious bronchitis virus[J]. Cultivation and Feed, 2019(1): 37-38.
- [14] JACKWOOD M W. Review of infectious bronchitis virus around the world[J]. Avian Diseases, 2012, 56(4): 634-641.
- [15] ROHAIM M A, NAGGAR R F E, ABDELSABOUR M A, et al. Evolutionary analysis of infectious bronchitis virus reveals marked genetic diversity and recombination events[J]. Genes, 2020, 11(6): 605.
- [16] JORDAN B. Vaccination against infectious bronchitis virus; a continuous challenge[J]. Veterinary Microbiology, 2017, 206: 137-

143.

[17] HUANG Y P, WANG C H. Development of attenuated vaccines from Taiwanese infectious bronchitis virus strains[J]. Vaccine, 2006, 24(6): 785-791.

[18] 周景明, 耿玥, 马文利, 等. 抗传染性支气管炎病毒 N 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定[J]. 郑州大学学报(理学版), 2018, 50(4): 75-79.

ZHOU J M, GENG Y, MA W L, et al. Preparation and identification of monoclonal antibodies against the N protein of infectious bronchitis virus[J]. Journal of Zhengzhou University (Natural Science Edition), 2018, 50(4): 75-79.

Development of Colloidal Gold Immunochromatographic Test Strip for Avian Infectious Bronchitis Virus Antibody

WANG Yuexin¹, SHU Lihui², YANG Yuqi¹, WANG Yarong¹,

Wu Ping¹, KOU Qiming¹, SUN Qi¹, LE Tao¹

(1. College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331;

2. Chongqing Agricultural Mechanization Technology Extension Station, Chongqing 401147, China)

Abstract: [Purposes] To establish a fast and sensitive colloidal-gold immunochromatography assay, in order to detect early infection of poultry with Infectious bronchitis virus (IBV), and to monitor the level of IBV vaccination. [Methods] Coating the recombinant IBV nucleocapsid protein on the test strip detection line, goat anti-rabbit IgG was coated on the control line. The colloidal gold-rabbit anti-chicken IgG conjugate was used as a tracer to detect IBV antibodies in the serum. [Findings] The prepared colloidal gold immunochromatographic test strips reacted positively with IBV antibody positive serum, with chicken Newcastle disease virus antibody positive serum, chicken infectious bursal disease virus antibody positive serum, Mycoplasma gallisepticum antibody positive serum, SPF serum has no cross-reaction. When the IBV antibody-positive serum is diluted at a ratio of 1 : 35, it can still be detected with this test strip. The test strips have good repeatability during the 60-day storage period. Taking chicken serum samples collected from different farms as the test object, comparing the test results of the test strip and the imported ELISA kit, the coincidence rate of the two was 97.44%. [Conclusions] Successfully prepared colloidal gold immunochromatographic test strips for IBV antibody detection with short detection time, low detection limit, strong specificity and good stability, it provides a simple and efficient technical method for the early diagnosis and immune monitoring of infectious bronchitis in chickens.

Keywords: immunochromatography; avian infectious bronchitis; antibody; coronavirus

(责任编辑 方 兴)