

密级:

论文编号:



中国农业科学院

学位论文

马血清淀粉样蛋白 A 抗原检测方法的建立与初步应用

硕 士 研 究 生: 李帅杰

学 号: 82101205496

指 导 教 师: 胡哲 副研究员

申 请 学 位 类 别: 兽医硕士

领 域: 兽医

培 养 单 位: 哈尔滨兽医研究所
研究生院

2023 年 6 月

Secrecy:

No.

Chinese Academy of Agricultural Sciences Thesis

Establishment and Preliminary Application of Detection Method for Equine Serum Amyloid A Antigen

Candidate: LI Shuaijie

Student ID:82101205496

Supervisor: Associate Prof. Hu Zhe

**Degree Type: Master of Professional Degree in
Veterinary Medicine**

Major: Veterinary Medicine

**Institution: Harbin Veterinary Research Institute
Graduate School**

June 2023

摘 要

血清淀粉样蛋白 A (Serum Amyloid A, SAA) 是大部分哺乳动物体内最主要的急性期蛋白, 被认为是早期判断一些疾病的和炎症发生的敏感指标。当机体受到病毒、细菌、寄生虫感染、损伤等刺激后, 体内 SAA 浓度会在短时间内迅速升高, 该规律同样适用于马属动物。在临床症状出现之前, SAA 可以对疫病做出早期检测, 遵循“早发现、早隔离”的原则, 阻止疫病的传播, 可以区分病毒和细菌感染, 为马属动物第一时间给药提供方向。目前, 马的疫病较多, 大多数疫病是非典型临床症状, 病因排查困难, 容易导致检测项目多, 费用多和时间长问题, 这可能造成临床指导不及时, 增加疫病传播风险, 而 SAA 一项检测就可以及时判断马属动物健康水平。除此之外, 我国市场上还没有检测马 SAA 的试剂盒。基于以上背景, 本研究建立了检测马血清中 SAA 浓度的双抗体夹心 ELISA 定量方法。

本研究从患病马血液中提取总 RNA, 经过反转录成 cDNA, 利用设计好的引物以 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 得到 SAA 目的片段; 将目的片段构建到原核表达载体上, 进行原核表达, 经过蛋白纯化, 获得 SAA 重组蛋白; 将 SAA 重组蛋白作为免疫原, 对 BALB/C 小鼠进行免疫, 当 4 次免疫之后, 小鼠血清中抗体效价达到 10^6 后, 进行细胞融合实验; 筛选出 5 株单克隆抗体, 通过效价检测, 效价相对较高的是单克隆抗体 3H5 和 6F1; 经过配对筛选, 确定单克隆抗体 6F1 作为包被抗体, 单克隆抗体 3H5 作为检测抗体, 经过条件优化, 确定包被抗体浓度为 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、检测抗体浓度为 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、封闭液为 5% BSA、待检样品孵育时间为 60 min、检测抗体孵育时间 30 min、TMB 底物显色温度和时间分别是 37°C 和 15 min, 建立了双抗体夹心 ELISA 方法; 最后, 将双抗体夹心 ELISA 方法应用于马流感病毒和马流产沙门氏菌感染的样品以及临床样品检测。

建立双抗体夹心 ELISA 方法的标准曲线范围在 0.01875-0.59 mg/L 之间, 相关系数 R^2 是 0.9998, 最低检测浓度为 0.01875 mg/L; 批间和批内重复性的 CV 值都小于 4%; 与血液中胆红素、甘油三酯等无交叉反应; 与国外试剂盒检测结果的阴阳性符合率为 100%, 表明该方法具有较好的特异性, 敏感性、准确性和稳定性。相比于国外试剂盒, 双抗体夹心 ELISA 方法的标准曲线范围更广, 这也意味着该方法用于检测血清中 SAA 浓度的范围也较广。通过检测病毒和细菌感染的样品, 提出 SAA 可以区分病毒和细菌感染, 在感染早期阶段, 病毒感染时 SAA 浓度一般在 20-541 mg/L 之间, 细菌感染时 SAA 浓度一般在 600 mg/L 以上; 检测 248 份临床血清样品, 其中有 52 份是 SAA 浓度异常的血清, 而这 52 份血清所对应的马属动物常规疫病检测核酸阳性占比 77%。

综上所述, 本研究建立的双抗体夹心 ELISA 定量方法, 可以准确的检测出马血清中 SAA 的浓度, 已经在马流感病毒和马流产沙门氏菌感染的样品及临床样品中得到应用。

关键词: 血清淀粉样蛋白 A, 疫病, 双抗体夹心 ELISA

Abstract

Serum amyloid A (SAA) is the most important acute phase protein in most mammals, and is considered to be the early detection of the sensitive index of some diseases and inflammation. When the body is stimulated by virus, bacteria, parasite infection, injury and other stimuli, the concentration of SAA in the body will rise rapidly in a short time, and this regular is also applicable to equine animals. Some diseases that have no clinical symptoms are detected early by SAA, which follows the principle of "early detection, early isolation" to prevent the spread of diseases. SAA is used to identify viral and bacterial infections and provide directions for the first time to administer drugs in equine animals. At present, there are a lot of equine diseases, most of which are atypical clinical symptoms and difficult to find the cause, which leads to a lot of detection items and costs a lot of money and time, which may lead to the delay in clinical guidance and increase the risk of disease transmission. The concentration of SAA in the serum can determine the health level of equine animals in time. In addition, there is no kit to test equine SAA on the Chinese market. Based on the above background, a double antibody sandwich ELISA method is established to detect the concentration of SAA in equine serum.

In this study, the total RNA was extracted from the blood of infected horses, which was reversely transcribed into cDNA. The designed primers were used to perform PCR amplification with cDNA as template, and the target SAA fragment was obtained. The target fragment was constructed into the prokaryotic expression vector for prokaryotic expression. After protein purification, SAA recombinant protein was obtained. SAA recombinant protein was used as immunogen to immunize BALB/C mice. After 4 times of immunization, the antibody titer in the serum of mice reached 10^6 , and cell fusion experiment was performed. Five strains of monoclonal antibody were screened, and the antibody titers of 3H5 and 6F1 were relatively high. After pairing screening, monoclonal antibody 6F1 was determined as the coated antibody and monoclonal antibody 3H5 as the detection antibody. The coated antibody concentration was determined to be 1 $\mu\text{g/mL}$, the detection antibody concentration to be 1 $\mu\text{g/mL}$, the blocking solution to be 5% BSA, the incubation time of the sample to be tested to be 60 min, the incubation time of the detection antibody to be tested to be 30 min, and the color development temperature and time of the TMB substrate were 37°C and 15 min respectively. A double-antibody sandwich ELISA method was established. Finally, the double antibody sandwich ELISA method was applied to detect the variation of SAA concentration in equine influenza virus and Salmonella equine abortive infection samples and clinical samples.

The standard curve of the double-antibody sandwich ELISA method ranged from 0.01875-0.59 mg/L, the correlation coefficient R^2 was 0.9998, and the lowest detection concentration was 0.01875 mg/L. The CV values of inter-assay and intra-assay repeatability were less than 4%. There is no cross reaction with bilirubin and triglyceride in blood. The positive and negative coincidence rate with foreign kit was 100%. It is suggested that this method has good specificity, sensitivity, accuracy and stability. Compared with foreign kits, the double-antibody sandwich ELISA method has a wider range of standard curves, which

results in a wider range of SAA concentration in serum. By detecting the samples of virus and bacterial infection, it is suggested that SAA can distinguish virus and bacterial infection. In the early stage of infection, the concentration of SAA is generally between 20-541 mg/L in viral infection, and above 600 mg/L in bacterial infection. Among 248 clinical serum samples, 52 were found to have abnormal SAA concentration, and 77% of them were found to be positive for nucleic acid of equine routine disease detection.

In summary, the established quantitative method of double-antibody sandwich ELISA can accurately detect the concentration of SAA in equine serum. It has been applied in equine influenza virus and equine abortive salmonella infection samples and clinical samples.

Keywords: Serum amyloid A, Diseases, Double-antibody sandwich ELISA

目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 急性期反应.....	1
1.2 SAA 的概述.....	2
1.2.1 SAA 的简介及发现历程.....	2
1.2.2 SAA 的结构与合成.....	2
1.2.3 SAA 的生物学功能.....	4
1.3 在临床马匹中 SAA 浓度变化情况	4
1.3.1 在健康马匹中 SAA 浓度变化情况.....	4
1.3.2 在运动马匹中 SAA 浓度变化情况.....	5
1.3.3 在感染性和非感染性疾病的马匹中 SAA 浓度变化情况	5
1.3.4 在关节疾病的马匹中 SAA 浓度变化情况	6
1.3.5 在生殖障碍疾病的马匹中 SAA 浓度变化情况	7
1.3.6 在外科疾病的马匹中 SAA 浓度变化情况	8
1.4 SAA 定量分析方法的研究进展	8
1.4.1 酶联免疫吸附试验(ELISA).....	8
1.4.2 胶体金免疫层析法.....	9
1.4.3 免疫比浊法.....	9
1.4.4 化学发光法.....	9
1.5 研究目的、意义和内容.....	10
1.5.1 研究目的和意义.....	10
1.5.2 研究内容	10
第二章 马 SAA 蛋白单克隆抗体的制备	11
2.1 材料.....	11
2.1.1 细胞、质粒、血液及实验动物.....	11
2.1.2 主要试剂.....	11
2.1.3 主要仪器设备.....	12
2.1.4 主要溶液.....	12
2.2 实验方法.....	13
2.2.1 马 SAA 引物的设计.....	13
2.2.2 总 RNA 的提取及马 SAA 基因的扩增	13
2.2.3 马 SAA 基因的克隆及鉴定.....	14
2.2.4 马 SAA 重组蛋白的表达及纯化.....	15
2.2.5 马 SAA 重组蛋白的鉴定分析.....	16
2.2.6 动物免疫.....	16

2.2.7 杂交瘤细胞融合	17
2.2.8 阳性杂交瘤细胞的筛选与亚克隆	17
2.2.9 马 SAA 单克隆抗体亚型鉴定	18
2.2.10 马 SAA 单克隆抗体的腹水制备、纯化及效价测定	18
2.2.11 马 SAA 单克隆抗体的 Western blot 鉴定	18
2.2.12 马 SAA 单克隆抗体的特异性鉴定	19
2.3 实验结果	19
2.3.1 马 SAA 基因的扩增及原核表达质粒的构建	19
2.3.2 马 SAA 重组蛋白的体外表达、纯化及鉴定	20
2.3.3 马 SAA 单克隆抗体的筛选及 Western blot 鉴定	22
2.3.4 马 SAA 单克隆抗体亚型鉴定	22
2.3.5 马 SAA 单克隆抗体的纯化及效价测定	22
2.3.6 马 SAA 单克隆抗体的特异性验证	23
2.4 小结	23
第三章 马 SAA 双抗体夹心 ELISA 的建立	25
3.1 材料	25
3.1.1 血清	25
3.1.2 主要试剂	25
3.1.3 主要仪器	25
3.2 实验方法	25
3.2.1 单克隆抗体的 HRP 标记	25
3.2.2 包被抗体和检测抗体的筛选配对及最佳浓度的确定	26
3.2.3 最佳封闭液的确定	26
3.2.4 最佳样品孵育时间的确定	26
3.2.5 最佳检测抗体作用时间的确定	26
3.2.6 最佳底物显色温度及时间的确定	26
3.2.7 最佳样品稀释液的确定	27
3.2.8 标准曲线的建立	27
3.2.9 样品稀释度的确定	27
3.2.10 特异性试验	27
3.2.11 重复性试验	27
3.2.12 马 SAA 双抗体夹心 ELISA 与国外试剂盒标准曲线范围 和检测血清中 SAA 浓度范围的比较	27
3.2.13 马 SAA 双抗体夹心 ELISA 方法与国外试剂盒检测结果 的符合率	27
3.3 实验结果	28
3.3.1 包被抗体和检测抗体的筛选配对及最佳浓度的确定	28
3.3.2 最佳封闭液的确定	29

3.3.3 最佳样品孵育时间的确定.....	29
3.3.4 最佳检测抗体作用时间的确定.....	30
3.3.5 最佳底物显色温度和时间的确定.....	30
3.3.6 最佳样品稀释液的确定.....	31
3.3.7 标准曲线的建立.....	31
3.3.8 样品稀释度的确定.....	32
3.3.9 特异性试验结果.....	33
3.3.10 重复性试验结果.....	33
3.3.11 马 SAA 双抗体夹心 ELISA 与国外试剂盒标准曲线范围 和检测血清中 SAA 浓度范围的比较.....	33
3.3.12 马 SAA 双抗体夹心 ELISA 方法与国外试剂盒检测结果 的符合率.....	34
3.4 小结.....	35
第四章 马 SAA 双抗体夹心 ELISA 方法的应用.....	36
4.1 材料.....	36
4.1.1 临床血清样品.....	36
4.1.2 主要试剂和仪器.....	36
4.2 实验方法.....	36
4.2.1 在马匹内区分细菌和病毒感染的 SAA 浓度值.....	36
4.2.2 马 SAA 双抗体夹心 ELISA 方法在马流感病毒感染的马匹中 的初步应用.....	36
4.2.3 马 SAA 双抗体夹心 ELISA 方法在马流产沙门氏菌感染的 驴中的初步应用.....	36
4.2.4 马 SAA 双抗体夹心 ELISA 方法在临床样品中的应用...37	
4.3 实验结果.....	37
4.3.1 区分细菌和病毒感染的 SAA 浓度值.....	37
4.3.2 马 SAA 双抗体夹心 ELISA 方法在马流感病毒感染的马匹中 的初步应用.....	37
4.3.3 马 SAA 双抗体夹心 ELISA 方法在马流产沙门氏菌感染的 驴中的初步应用.....	38
4.3.4 马 SAA 双抗体夹心 ELISA 方法在临床样品中的应用...39	
4.4 小结.....	40
第五章 全文讨论.....	41
第六章 结论.....	44
参考文献.....	45

主要符号对照表

英文缩写	英文全称	中文名称
APR	acute phase response	急性期反应
APP	Acute phase protein	急性期蛋白
CRP	C-reactive protein	C-反应蛋白
CFU	Colony forming units	菌落形成单位
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
EIV	Equine Influenza Virus	马流感病毒
EAV	Equine arteritis virus	马动脉炎病毒
EHV-1/4	Equine Herpes Virus type-1/4	1/4 型马疱疹病毒
ERBV	equine rhinitis B virus	马乙型鼻病毒
HP	haptoglobin	结合珠蛋白
SAA	Serum amyloid A	血清淀粉样蛋白 A

第一章 绪论

急性期蛋白是由急性期反应产生的一类蛋白，是一些疾病和炎症反应的敏感指标。马血清淀粉样蛋白 A (Serum Amyloid A, SAA) 是急性期蛋白的一种，在大部分哺乳动物中都能合成，当受到致炎因子刺激后，机体就会分泌 IL-6 等促炎细胞因子，促使肝脏合成 SAA。本章对 SAA 的简介、结构、生物学功能、不同临床情况下马匹内 SAA 浓度变化情况、SAA 定量分析方法的研究进展逐一综述，以明确研究目的和意义，完善研究内容。

1.1 急性期反应

急性期反应 (Acute Phase Response, APR) 是一种由各种类型的组织损伤 (包括炎症、感染、创伤等) 诱导的早期、非特异性全身反应 (YOO et al., 2003)。APR 涉及许多的生理反应，比如发热、激素变化、代谢改变等。APR 过程中会产生许多的蛋白质，称之为急性期反应蛋白 (Acute Phase Protein, APP) (KUSHNER, 1982; CRAY et al., 2009)。

APP 种类繁多，根据 APP 合成的诱导因子可分为 I 型 APP 和 II 型 APP，I 型 APP 主要是由 IL-1 α 、IL-1 β 、TNF- α 、TNF- β 等细胞因子诱导合成，比如 SAA、C-反应蛋白 (CRP)、结合珠蛋白 (HP) 等，II 型 APP 主要是由 IL-6、白血病抑制因子 (LIF)、心脏营养素-1 (CT-1) 等细胞因子诱导合成，比如纤维蛋白原、血红素结合蛋白、血浆铜蓝蛋白等；根据急性期蛋白在急性期反应中的含量变化，又可将其分为正急性期蛋白和负急性期蛋白，正急性期蛋白有 SAA、CRP 等，负急性期蛋白有白蛋白、转铁蛋白等 (BAUMANN et al., 1994; TRAUTWEIN et al., 1994)。

APP 具有以下特征，(1) 从炎症发生到可在血液中检测到 APP 升高能在短时间内完成。(2) APP 半衰期比较短，当炎症反应消失后，APP 在血液中迅速降解。(3) 健康动物中，血液中的 APP 含量比较低。如图 1-1 所示，这些特征使得 APP 特别适合于疾病的早期诊断和预后监测。

在不同物种中测量 APP 是一项挑战，因为 APP 是物种特有的，在一个物种中具有急性期特性的一些蛋白质在另一个物种中可能没有。在不同物种中，APP 的分布也有所差异，比如犬主要的 APP 是 CRP，次要的 APP 有 HP 和 α_1 -酸性糖蛋白质 (AGP)；猫主要的 APP 是 SAA，次要的 APP 有 HP 和 AGP (CERON et al., 2005)；马主要的 APP 是 SAA (LONG et al., 2020)，次要的 APP 则是 HP。这些主要的 APP 被认为是疾病的早期诊断和预后监测最敏感的指标。

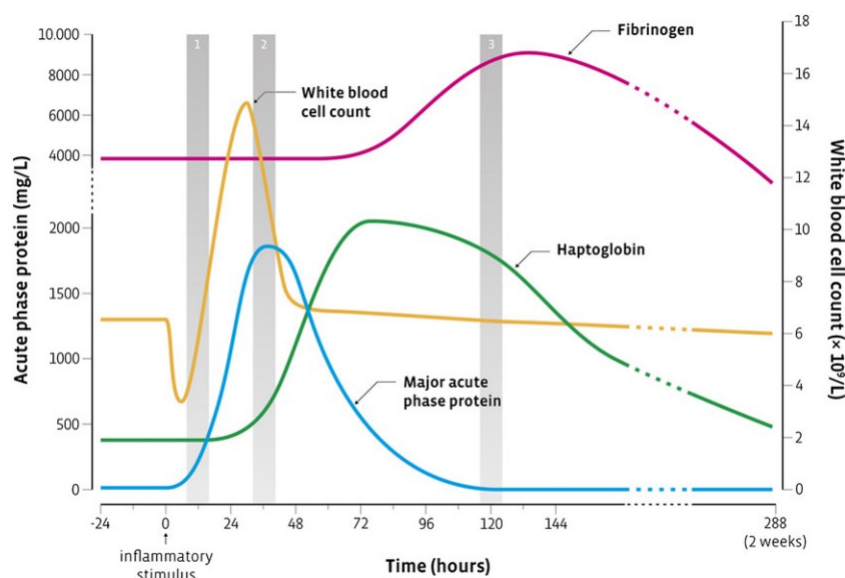


图 1-1 不同 APP 在伴侣动物中的反应动力学 (KJELGAARD-HANSEN et al., 2011)

Fig.1-1 Kinetics of different APPs in companion animals

1.2 SAA 的概述

1.2.1 SAA 的简介及发现历程

SAA 是在 APR 中产生的, 能作为感染性疾病和非感染性疾病指标的一种血清蛋白, 正常情况下血液中的 SAA 含量极少, 当机体受到细菌、病毒、支原体、衣原体等抗原刺激或者组织损伤后, 由肝脏细胞合成分泌大量的 SAA 进入血液, 在 5-6 h 内迅速升高 (NUNOKAWA et al., 1993; JACOBSEN et al., 2006), 24-48 h 内可达到初始浓度的 1000 倍 (COUTINHO DA SILVA et al., 2013)。同时, SAA 半衰期短, 当机体抗原清除后, SAA 则能在 12 h 内迅速降至正常水平 (JACOBSEN et al., 2006)。因此, SAA 可作为反映机体感染和炎症程度及其控制情况的敏感指标。

在 1972 年, Levin 等人在继发性淀粉样沉积物中首次分离得了一个完整的 76 个氨基酸序列的蛋白质, 后来被命名为淀粉样蛋白 A (LEVIN et al., 1972)。在 1974-1987 年, 针对淀粉样蛋白 A 制备的抗体鉴定出一种有 104 个氨基酸大小的血清蛋白, 被证明是淀粉样蛋白 A 的前体, 后来又因为该蛋白是一种血清蛋白, 所以被命名为血清淀粉样蛋白 A (HUSBY et al., 1974; LINKE et al., 1975; MEEK et al., 1986; PRELLI et al., 1987)。

1.2.2 SAA 的结构与合成

SAA 是一种 9-11 千道尔顿的载脂蛋白 (HUSEBEKK et al., 1986), 尽管 SAA 蛋白很小, 其序列的多态性也已被分类, 但其三维结构一直难以模拟, 模拟 SAA 三维结构的主要障碍是其水溶性很差, 尽管疏水性残基在 SAA 的序列中并不显著, 但 SAA 与肝细胞中产生的高密度脂蛋白 (HDL) 结合成复合物, 导致水溶性很差。在 1986 年, Turnell 等人提出了 SAA 具有 2 个 α -螺旋

和 1 个 β -折叠的结构模型 (TURNELL et al., 1986)。Meeker 和 Sack 等人利用 SAA 与葡萄球菌核酸酶形成可溶性的融合蛋白, 在圆二色谱仪中只观察到 α -螺旋结构 (MEEKER et al., 1998)。在 2014 年, Lu 等人通过多波长反常散射测定 SAA 的单体结构为 2.2 Å, 正如 Meeker 和 Sack 等人所预料的那样, SAA 的单体结构由 4 个 α -螺旋和一个相对无结构的 C 端结构域组成 (LU et al., 2014), 如图 1-2 所示。

SAA 主要在肝脏中合成, 当致炎因子 (病毒、细菌、寄生虫感染、切割、内源性毒性物质、免疫异常等) 对机体造成组织损伤后, 会导致白细胞 (中性粒细胞、巨噬细胞) 和基质细胞 (成纤维细胞) 的激活, 被激活的白细胞和基质细胞会分泌促炎细胞因子 (IL-6、IL-1、TNF- α 等), 这些细胞因子会作用于肝脏, 使肝脏合成 SAA 蛋白, 合成的 SAA 在循环系统的作用下进入血液, 如图 1-3 所示。在马体内, 已经发现了 SAA 在肝外合成的部位, 主要在与外界环境接触的器官 (如胃肠道、乳腺和气道) 的内皮细胞和上皮细胞中合成 (HULTEN et al., 1999; JACOBSEN et al., 2006), 它通过乳腺上皮细胞分泌到初乳中, 但也通过关节软骨细胞和子宫内膜分泌到滑液中, 这表明 SAA 可能参与了局部免疫的形成。

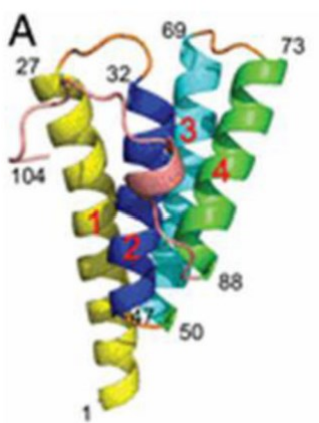


图 1-2 SAA 的三维单体结构 (LU et al., 2014)

4 个 α -螺旋位点分别是 1-27 氨基酸、32-47 氨基酸、50-69 氨基酸、73-88 氨基酸; C 端结构位点是 89-104 氨基酸

Fig.1-2 Monomeric three-dimensional structure of SAA

4 α -helices 1 (aa 1-27), 2 (aa 32-47), 3 (aa 50-69), 4 (aa 73-88) and C-terminal tail (aa 89-104)

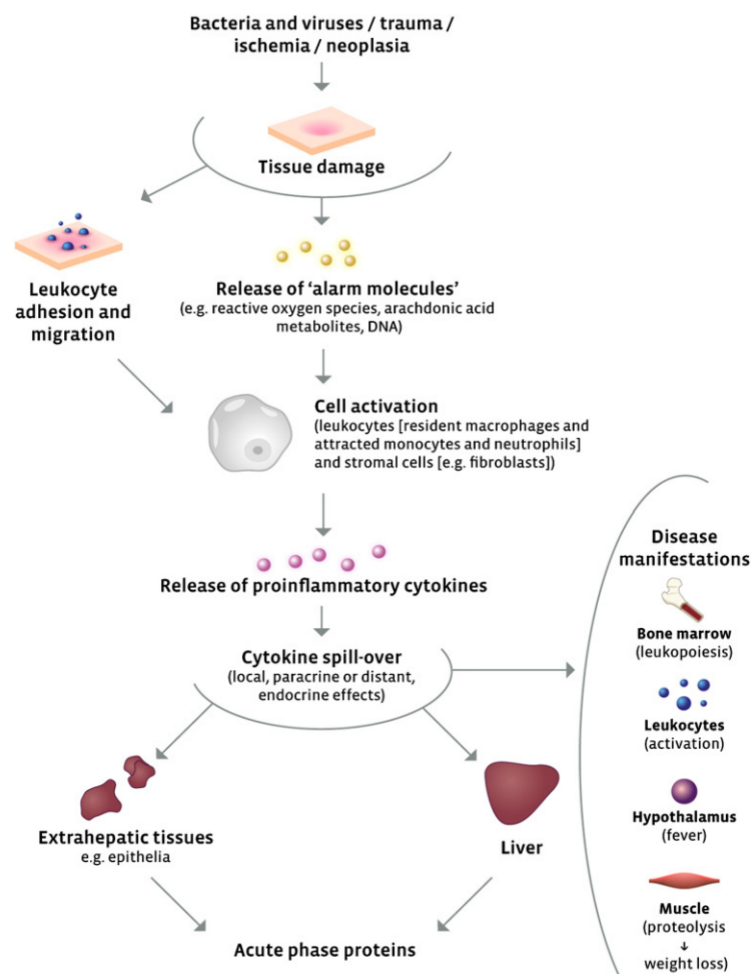


图 1-3 SAA 蛋白的合成过程 (KJELGAARD-HANSEN et al., 2011)

Fig.1-3 Overview of the SAA protein formation

1.2.3 SAA 的生物学功能

目前为止, SAA 的全部作用尚不完全清楚, 根据研究表明, SAA 具有以下生物学功能 (BADOLATO et al., 2000; CONNOLLY et al., 2012; YE et al., 2015): (1) 有助于抑制淋巴细胞增殖, 血小板聚集和吞噬作用。(2) 有助于刺激单核细胞和中性粒细胞等免疫细胞的迁移。(3) 参与前列腺素合成和金属蛋白酶激活。(4) 对多种细胞因子的表达具有调节作用, 比如单核细胞趋化蛋白-1, IL-6 和 TNF- α 等。(5) 当组织发生损伤时, 参与诱导细胞外基质降解酶的表达, 有利于组织损伤的修复。(6) SAA 可以通过刺激内皮细胞增殖和刺激毛细管样结构的形成, 从而促进体内新血管的形成。

1.3 在临床马匹中 SAA 浓度变化情况

1.3.1 在健康马匹中 SAA 浓度变化情况

据报道,健康马匹血液中的SAA浓度一般在0到20 mg/L之间(WITKOWSKA-PILASZEWICZ et al., 2019)。SAA浓度与个体存在一定的关系,不同健康状况的马匹中,其体内SAA浓度不同。也有报道称在2-10岁的马匹中,SAA浓度与年龄呈微弱的正相关关系(LECLERE et al., 2015)。

健康母马怀孕期间SAA的浓度也有变化。妊娠母马在分娩前4个月内,SAA浓度在正常范围内并保持稳定,但从分娩前1周至产驹后1个月内SAA浓度会升高,这有可能是胎儿移位过程中造成的组织损伤所致(NUNOKAWA et al., 1993)。SAA浓度在母马产后12 h (0.7-305 mg/L)和36 h (0-1615 mg/L)显著的升高,在产后60 h内SAA浓度恢复到基线水平(COUTINHO DA SILVA et al., 2013)。但是,也有研究报道称经过人工授精或者正常怀孕的母马在产后其SAA浓度没有变化(CANISSO et al., 2014; TUPPITS et al., 2014)。以上情况说明了母马产后其SAA浓度的变化不同很可能是由个体差异导致的。

1.3.2 在运动马匹中 SAA 浓度变化情况

经过长距离(120公里和160公里)耐力骑行、剧烈训练和比赛后,马体内会出现运动诱发的急性期反应(APR)(CYWINSKA et al., 2012; CYWINSKA et al., 2013; TURLO et al., 2015)。在长距离耐力骑行的马中,由运动诱发的APR的特征是SAA显著增加,但HP和CRP浓度没有明显增加(CYWINSKA et al., 2012)。通过兽医检查,完成长距离骑行的马中,其体内的SAA浓度增加了10倍以上(TUPPITS et al., 2014),而在中等距离骑行或者对没有训练经验的马进行剧烈训练后,测量到SAA浓度增加了2-4倍(CYWINSKA et al., 2010)。比赛后的马匹其体内SAA浓度大约增加了7倍,并在2天内恢复到基线浓度(TURLO et al., 2015)。在所有关于马匹运动后其体内SAA浓度变化的研究中,与报道的患有急性炎症性疾病的马匹体内SAA浓度相比,马匹运动后其体内SAA的最高浓度仍然相对较低。在参加比赛的马匹中,提前对比SAA浓度可能有助于评估一般健康和训练状况。值得注意的是,在长距离耐力骑行的马匹中,比赛开始前其体内的SAA浓度如果超过1 mg/L时,则无法完成比赛(CYWINSKA et al., 2010)。然而,在这项研究中,样本量很小,仍需要更多的数据来确定不能完成比赛的马匹体内SAA浓度适当的临界值。

有骨骼损伤的马匹在比赛结束3-4天后,SAA的浓度有明显的升高,SAA浓度变化比白细胞计数更能反映炎症状况(TURLO et al., 2015)。健康马匹在比赛结束后,其体内的SAA浓度会增加2倍(VALLE et al., 2015),在连续抽样的个体中,没有检测到SAA浓度与马匹的不良表现具有相关性的关系(BACK et al., 2015)。训练期间的SAA监测可能成为评估马匹一般健康状况的有用指标,有助于评估它们在赛道上的表现。

1.3.3 在感染性和非感染性疾病的马匹中 SAA 浓度变化情况

在临床应用中,SAA浓度的升高可能有助于感染性疾病的早期发现(BARR et al., 2022; THURSTON et al., 2022),但仍需结合详细的病史、体格检查、血液学和其他辅助诊断试验的综合判断。出现疾病的马匹绝大多数都会导致SAA浓度升高,虽然SAA浓度的升高是非特异性的,不能指示特定的疾病,但对于疾病治疗及疾病恢复期的监测具有重要作用,一般对于感染性和非感染性疾病的区分,有研究学者提出100 mg/L的分界值(STONEHAM et al., 2001)。

在非感染性疾病中的胃肠道疾病,如小肠结肠炎、结肠炎、脓肿和腹膜炎等也被证明会产生 SAA 浓度升高的现象 (VANDENPLAS et al., 2005; DONDI et al., 2015)。在一项涉及 718 匹马的大型研究中,指出入院时测量的 SAA 浓度可能是一个有用的预后指标,患有炎症性疾病(肠炎、结肠炎或腹膜炎)且 SAA 浓度超过 50 mg/L 的马比其他马的预后情况更差 (VANDENPLAS et al., 2005)。在局部炎症过程中,血液中 SAA 浓度的重要性不大,当马匹出现角膜炎的时候,因为眼睛周围存在血眼屏障,其血液中的 SAA 浓度并没有升高 (LABELLE et al., 2011)。

在病毒感染的马匹中,其体内的 SAA 浓度会升高,然而并不是呈 1000 倍的趋势急剧升高。在马冠状病毒 (ECoV) 感染实验中, SAA 已被证明能反映马的临床状态,在感染后的 2-7 天,从 2 匹马中检测到超过 100 mg/L 的 SAA 浓度,并且这 2 匹马出现了双相发热和厌食的临床症状,相比之下,第 3 匹马没有表现出任何的临床症状,没有炎症的发生,体内 SAA 浓度没有发生任何变化 (NEMOTO et al., 2014)。同样,从自然感染马流感病毒 (EIV) 的马匹中发现,在临床症状出现后的前 48 h 内, SAA 浓度增加到 100 mg/L 以上,同时指出, SAA 浓度与临床严重程度有关,在无并发症的病例中, SAA 浓度在 11-22 天内可以恢复到基线水平 (HULTEN et al., 1999)。除此之外,在早期的研究报道称,马流感病毒感染马匹后,其体内的 SAA 浓度水平会升高到 450mg/L 左右 (HULTEN et al., 1999)。在马疱疹病毒 (EHV-1) 感染实验中, SAA 浓度的变化模式与感染马流感病毒的相似,感染 48 h 后 SAA 浓度超过 100 mg/L,直肠温度升高,感染约 10 天后可以恢复正常浓度 (NUNOKAWA et al., 1993)。在感染了 EIV、EAV、EHV-1、EHV-4 和 ERBV 的马匹实验中,利用荧光定量 PCR 检测病毒的载量,发现 SAA 浓度的升高与感染的病毒载量没有关系 (BACK et al., 2015)。

测量血液中 SAA 浓度主要被认为有助于区分以较高的 SAA 浓度为标志的细菌感染性疾病和与其他病原体有关的炎症,包括病毒感染和非感染性疾病(过敏反应)。在细菌感染的马匹中,其体内的 SAA 水平会呈 1000 倍的趋势急剧升高;在普通哮喘病呼吸道疾病的马匹中,其 SAA 浓度是健康马匹的 3.5 倍 (BULLONE et al., 2015);此研究表明, SAA 浓度有助于区分细菌感染的呼吸道疾病和其他具有相似临床症状的呼吸道疾病。也有报道称 SAA 浓度可以作为感染性疾病早期发现的指标。脓毒血症、脓毒性关节炎和细菌性肺炎会在马驹体内产生高浓度的 SAA (HULTEN et al., 2002; HALTMAYER et al., 2017),而且脓毒血症是新生马驹死亡的重要原因,其症状是非特异性的,且症状复杂、不明显,导致早期诊断困难,但早期治疗对该病尤其重要。所以, SAA 可以作为一些感染性疾病早期检测的指标,用于解决临床无法及时发现并治疗的问题。

对于人体内细菌感染和病毒感染,有研究报道提出 SAA 200mg/L 的临界值,当 SAA 浓度低于 200mg/L 范围时可能预示着病毒感染,而当 SAA 浓度超过 200mg/L 时往往预示着细菌感染 (SASAKI et al., 2002)。对于区分细菌感染和病毒感染在马体内的 SAA 病毒临界值具体数据目前还没详细的报道,在马体内根据 SAA 浓度区分病毒和细菌感染也应该适用。

1.3.4 在关节疾病的马匹中 SAA 浓度变化情况

对于关节感染,如果治疗延迟或不当可能会对马匹的运动造成毁灭性的打击。由创伤性伤口导致的化脓性关节炎在马中很常见,如未及时彻底清除感染,炎症就会朝着恶性的方向发展,甚至会危及生命。早期诊断是迅速消除感染和炎症的关键 (SANCHEZ TERAN et al., 2012;

SANCHEZ-TERAN et al., 2016; ROBINSON et al., 2017), 可以避免疾病朝着恶性化方向的发生。关节疾病的诊断一般是基于临床症状和滑液分析(蛋白总量和有核细胞总数), 这些方法无法对关节疾病做出准确的早期诊断, 而且也不能明确区分急性非化脓性炎症和感染。SAA 浓度在关节液中能被检测和定量(JACOBSEN et al., 2006), 而且 SAA 浓度不受反复关节硬化、关节内给药和关节镜下灌洗的影响(JACOBSEN et al., 2006)。因此, 关节液中 SAA 浓度的升高会成为关节疾病早期诊断的指标。也有相关研究发现, 在健康的马匹中, 血液和关节液中的 SAA 浓度一般都低于 1 mg/L(SANCHEZ TERAN et al., 2012), SAA 浓度升高也可以被认为是区分感染性和非感染性滑膜内病变的有用指标, 并提出脓毒性关节炎的临界值为 60.7 mg/L(ROBINSON et al., 2017)。在一项实验诱导的马匹感染性关节炎的研究中发现, 感染 24 h 后, 血液中的 SAA 浓度会升高, 感染 36 h 后, 关节滑液中的 SAA 浓度才会升高; 在实验的感染性关节炎中, 血液中的 SAA 浓度升高时间要早于关节滑液中的 SAA 浓度升高时间, 除此之外, 血液中的 SAA 浓度(111.9 ± 116.3 mg/L)也要高于关节滑液中的 SAA 浓度(27.3 ± 40.1 mg/L)(LUDWIG et al., 2016)。在对关节滑膜损伤的马匹治疗过程中, 持续测量其 SAA 浓度, 可以发现 SAA 浓度在不断的下降(JACOBSEN et al., 2016), 说明 SAA 在关节疾病中可以作为早期诊断的标志, 也可以用于关节治疗康复期的监测。

最近的研究也表明, SAA 在马关节炎的发病机制中起着关键作用。SAA 是关节软骨细胞产生基质金属蛋白酶的有效诱导剂, 参与软骨细胞外基质的降解。同时, SAA 也被证明可以降低软骨源性视黄酸敏感蛋白的表达, 该蛋白参与了维持关节软骨的完整性(TURLO et al., 2015; JACOBSEN et al., 2016)。因此, SAA 可能参与了软骨细胞代谢的改变, 与关节疾病有潜在的相关性。

1.3.5 在生殖障碍疾病的马匹中 SAA 浓度变化情况

雌性马属动物生殖障碍疾病很常见, 并习惯性导致不育, 其中一个主要原因就是出现子宫性疾病。评估子宫健康的常用方法包括临床检查、细胞学、细菌学和组织病理学。然而, 在综合使用所有方法之后, 检测结果也存在不确定性(EL-BAHR et al., 2016; SIKORA et al., 2016)。在患子宫积脓的阿拉伯母马体内, SAA 浓度已被证明显著升高(11.36 - 22.90 mg/L), 并被认为是与心肌钙蛋白 I 和促炎细胞因子一起作为子宫积脓的有用生物标志物(EL-BAHR et al., 2016)。在子宫内灌注大肠杆菌诱发的实验性子宫内膜炎中, SAA 浓度的变化因病原体的剂量而异, 高剂量的大肠杆菌(10^9 CFU)使血液和子宫内膜 SAA 浓度增加 10-100 倍, 而低剂量的大肠杆菌(10^5 CFU)仅引起子宫内膜反应, 表现为注射 3 h 后子宫内膜组织的 SAA mRNA 表达增加(CHRISTOFFERSEN et al., 2010; CHRISTOFFERSEN et al., 2012)。然而, SAA 浓度变化未能作为自然发生的亚临床子宫内膜炎的标志。也有报道称, 发生在怀孕的前 40 天感染性和非感染性子宫内膜炎症是早期胚胎死亡(EED)最常见的原因, 在 EED 母马中, SAA 浓度增加了 20 倍以上(KRAKOWSKI et al., 2011)。

胎盘炎是导致母马生殖障碍的另外一个疾病。在胎盘炎的动物实验模型中, SAA 浓度迅速升高并保持在较高水平直到流产。通过宫颈内接种马链球菌实验诱导的胎盘炎中, 在 2-4 天内, 动物体内 SAA 浓度增加 100 倍, 流产发生在 5-25 天之内(CANISSO et al., 2014), 且 SAA 浓度上

升和外阴分泌物是第一个临床信号。而在自然发生的胎盘炎中,发病通常更隐蔽,阴道分泌物通常不是第一个临床症状。考虑到在胎盘和胎儿受到不可逆转的损害之前进行诊断和治疗,SAA 可能在任何临床表现之前就已经增加了。因此,SAA 可以作为胎盘炎早期检测的标志物。有研究发现,在胎儿和胎盘组织中存在感染或炎症时,胎儿血液中的 SAA 浓度明显较高,甚至达到 10.5-40 mg/L (EROL et al., 2016)。因此,测量 SAA 浓度可能有助于发现患有胎盘炎和流产风险的母马。此外,在患有胎盘炎的母马中使用抗生素和抗炎药物成功地阻止了 SAA 的升高 (COUTINHO DA SILVA et al., 2013),因此 SAA 浓度也可能有助于监测治疗情况。

1.3.6 在外科疾病的马匹中 SAA 浓度变化情况

手术会引发 APR,血液中 SAA 浓度也会跟着变化。马匹在全身麻醉下进行小手术后,在没有手术后感染的情况下,预计 SAA 浓度在 100-400 mg/L 之间,在手术后第 3 天左右达到峰值,如果手术后 SAA 浓度持续升高,可能暗示着马体发生了手术后感染 (WESTERMAN et al., 2015)。已经研究的手术包括胫跗关节镜检查 and 软骨碎片清除术,喉成形术和脑室切除术 (术后第 2 天达到 50-150 mg/L,第 7 天恢复正常浓度),颈动脉外剥和屈肌腱分离术 (术后第 2 天达到 100-400 mg/L,7-14 天恢复正常浓度 (JACOBSEN et al., 2009),以及各种择期手术,包括小气道和整形外科手术 (术后 24 h 达到 16.4 mg/L) (POLLOCK et al., 2005)。

SAA 浓度的测定在应对急性腹痛时可能是有用的。有人通过评估临床状况和血液检测建立了模型以区分马炎性绞痛 (小肠结肠炎和腹膜炎) 和外科手术绞痛 (DANIEL et al., 2016; PIHL et al., 2016)。临床表现为嗜睡,直肠温度大于 38°C,胃反流在 5-10 L。除胃反流 5-10 L 为负预测因子外,其余各变量均为炎性绞痛的正向预测因子。该模型正确区分炎性绞痛和外科手术绞痛的能力为 86%。模型参数还包括白细胞计数、红细胞压积、总血浆蛋白、乳酸、SAA、结合珠蛋白和纤维蛋白原浓度。后来,临床血液检测模型得到改进,在考虑 SAA 的情况下,最终区分炎性绞痛和外科绞痛的能力达到 90%。因为炎性绞痛症状可能进展得非常快,其腹腔中的 SAA 浓度要比其他原因绞痛的马增加得更快 (PIHL et al., 2015)。因此,检测 SAA 的浓度可以提高该模型区别炎性绞痛和外科手术绞痛的能力。在马出现创伤时,从血清和伤口流出的液体中分别检测出的 SAA 浓度差异较大 (BUNDGAARD et al., 2016),测量 SAA 浓度,对有伤口的马匹,其临床管理作用并没有文献报道,如果考虑伤口感染的情况,连续监测 SAA 的浓度变化可能有助于伤口的恢复。

1.4 SAA 定量分析方法的研究进展

1.4.1 酶联免疫吸附试验 (ELISA)

ELISA 现在被广泛应用于临床诊断行业,也是临床最常用的诊断方法之一。根据工作原理不同,一般 ELISA 分为间接 ELISA (i-ELISA),竞争 ELISA (C-ELISA) 和双抗体夹心 ELISA (AC-ELISA)。i-ELISA 是通过包被抗原,检测血清中的抗体;C-ELISA 一般是包被具有竞争活性的抗体,将酶标抗原和待检血清一起孵育加入 ELISA 板中,检测血清中是否存在抗体;AC-ELISA 是通过包被抗体捕获抗原,酶标的检测抗体也同样识别抗原,形成抗体-抗原-抗体复合物,达到检

测抗原的目的。从工作原理上看, AC-ELISA 是符合检测 SAA 蛋白的一种方法。早在 1995 年, M Satoh 等人建立了 ELISA 去检测马体内的 SAA 蛋白含量 (SATO et al., 1995)。Tsu-Lan Wu 等人也建立了一个 ELISA 用于检测马 SAA 蛋白, 敏感性达到 0.12mg/L (WU et al., 2007)。后来, 人们使用 ELISA 检测血清中的 SAA (MA et al., 2014; POMORSKA-MOL et al., 2022)。T Kajikawa 等人建立了 ELISA 用于研究猫犬 SAA 的交叉反应性 (KAJIKAWA et al., 1996)。A Wada 等人建立了用于检测人体内 SAA 蛋白的 ELISA (WADA et al., 1998)。使用商品化的 ELISA 试剂盒去检测 SAA 也比较普遍 (BRACONI et al., 2018; CROOKENDEN et al., 2023), 目前, 市场上也有商品化的试剂盒用于马 SAA 蛋白的检测, 比如 abcam 公司的 ab205087-Horse SAA ELISA Kit 试剂盒, 但是货期比较长, 价格昂贵。

1.4.2 胶体金免疫层析法

胶体金免疫层析法作为受人青睐的临床诊断方法之一, 具有特异性强, 敏感性高, 反应时间短, 肉眼可看结果和现场应用等特点, 已经在许多领域得到了广泛的应用, 而且胶体金相比于 ELISA, 更适合广大基层检验人员操作以及大批量检测的使用, 更能得到人们的认可。宋英林等人利用 SAA 蛋白建立了胶体金免疫层析试纸条, 该方法的最低检测限度为 0.16 $\mu\text{g/mL}$ (宋英林 et al., 2016)。在 2020 年, 贺沁等人建立了 SAA 和 CRP 蛋白免疫层析联合检测的方法, 实现了“一卡双检”的目标 (贺沁 et al., 2020)。Marc Oertly 等人利用胶体金检测马血清中的 SAA (OERTLY et al., 2021), Sheri S W Birmingham 等人使用商品化的胶体金对马体内的 SAA 进行定量 (BIRMINGHAM et al., 2019)。

1.4.3 免疫比浊法

免疫比浊法出现的比较早, 大致原理也是利用抗原抗体的结合, 在促聚剂的作用下, 析出形成微粒、出现浊度, 根据反应液的浊度和标准品的浊度比较, 从而计算出抗原的含量。免疫比浊法有免疫透射比浊法, 免疫散射比浊法和免疫乳胶比浊法, 但是由于免疫比浊法需要昂贵的仪器和比较差的敏感性, 该方法在临床中并未得到广泛的应用。在 2015 年, 姜剑巍等人建立了乳胶增强免疫散射比浊法检测 SAA 蛋白, 并进行评估, 可用于临床患者血清标本的检测, 且敏感性达到 3.53 mg/L, 3 min 即可完成检测 (姜剑巍 et al., 2015)。目前, 市场上也有检测 SAA 的免疫比浊法的试剂盒, 如上海奥普生物医药有限公司研发的血清淀粉样蛋白 A 检测试剂盒 (乳胶增强免疫比浊法), 用于人 SAA 蛋白的检测, 具有较好的准确性和稳定性。

1.4.4 化学发光法

化学发光是某种物质分子吸收化学能产生的光辐射。化学发光凭借着高灵敏、低背景、检测时间短和线性范围广等特点, 近年来已经广泛应用于临床诊断领域。周齐洋等人基于生物素-链霉亲和素信号放大系统建立了 SAA 的化学发光免疫检测技术, 线性范围在 5-800 ng/mL 之间, 最低检测限度是 3 ng/mL (周齐洋 et al., 2019)。高欣欣等人以裸磁珠偶联 SAA 单克隆抗体, 吖啶酯

作为发光标记物建立了检测 SAA 的化学发光技术,具有较高的敏感性和良好的重复性(高欣欣 et al., 2022)。

1.5 研究目的、意义和内容

1.5.1 研究目的和意义

SAA 是急性期反应期间产生的一种蛋白, SAA 的产生要早于临床症状的出现,因此, SAA 不仅可以作为反应机体感染和炎症程度及其控制情况的敏感指标,也可以用于疾病的早期检测。针对个体而言, SAA 可以区分细菌感染和病毒感染,可以第一时间为动物给药提供方向;根据动物体内的 SAA 水平,也能反映动物机体康复的情况,为动物的康复情况提供判断的依据。针对于群体而言,在临床症状出现之前,能对疾病做出早期检测,一直以来都是动物养殖业的目标,完全落实“早发现,早隔离”的政策,对动物的群体防疫至关重要。由此可见, SAA 蛋白在临床应用中显得尤为重要。目前,国内马属动物养殖业在不断扩大,马传染性疾病增多,检测项目也随着增多,所花费的时间和检测费用随之增加,并且大多数疫病是非典型临床症状,病因排查困难,对临床治疗指导意义不及时,而 SAA 可以判断动物健康状况,区分细菌和病毒感染, SAA 一项检测就可以及时判断动物健康水平并指导临床的用药方向。相对于国内,国外对马 SAA 的研究比较多,试剂盒已经上市,供养殖户使用,我国市场上没有检测马 SAA 的试剂盒,无法满足行业的需求。

本研究针对 SAA 蛋白制备了单克隆抗体,利用单克隆抗体建立了双抗体夹心 ELISA 定量方法,明确方法的检测范围、准确性、稳定性、特异性,找到马 SAA 浓度提示动物疫病感染的规律,摸索出 SAA 浓度测定最快速、有效的方案,以及更好为临床疫病诊断和治疗提供有效的、科学的数据支持,实现对动物群体疫病健康水平的高通量检测和个体疫病的快速判定,为疫病防控争取时间和第一时间给药方向提供依据,最大限度地减少疫病带来的经济损失。

1.5.2 研究内容

本研究建立了一种特异、稳定、高效、准确检测马 SAA 蛋白的双抗体夹心 ELISA 的定量方法,具体由以下几部分内容展开:

(1)马 SAA 蛋白单克隆抗体的制备:目的基因的扩增和克隆,重组蛋白的表达纯化与鉴定,单克隆抗体的制备,筛选,鉴定,效价检测和特异性验证。

(2)建立检测马 SAA 的 ELISA 定量方法:配对筛选出包被抗体和检测抗体、反应条件优化,最后对方法进行敏感性、特异性、重复性、准确性验证。

(3)马 SAA ELISA 定量方法的初步应用:检测病毒和细菌感染的血清,找出区分病毒和细菌感染的 SAA 浓度临界值,检测马流感病毒和马流产沙门氏菌感染的马血清中的 SAA 浓度,摸索出马流感病毒和马流产沙门氏菌感染的马体内 SAA 浓度变化规律,检测 248 份临床血清样品,结合常见马病的病原检测,判断 SAA 是否具有临床指导意义。

第二章 马 SAA 蛋白单克隆抗体的制备

设计马 SAA 扩增引物，利用 PCR 技术，以从患病马匹全血中提取的 RNA 经过反转录成的 cDNA 为模板，扩增出马 SAA 基因。把扩增得到的 SAA 基因，利用同源臂重组技术，构建到原核表达载体上，形成 PET-32a-cSAA 和 PGEX-6P-1-cSAA 重组质粒。把 PET-32a-cSAA 和 PGEX-6P-1-cSAA 重组质粒转化到 BL21（DE3）中，进行 SAA 蛋白的原核表达，纯化获得含有 His 和 GST 标签的 SAA 蛋白。将 His 标签的 SAA 蛋白作为免疫原，制备单克隆抗体，将 GST 标签的 SAA 蛋白作为筛选抗原，最终获得 5 株单克隆抗体，并进行亚型、效价的测定和特异性鉴定。

2.1 材料

2.1.1 细胞、质粒、血液及实验动物

骨髓瘤细胞 SP2/0、PGEX-6P-1、PET-32a(+)原核表达载体均由本实验室保存，患病马血液来源于临床送检样品，BALB/C 小鼠提供于哈尔滨兽医研究所动物实验中心。

2.1.2 主要试剂

制备马 SAA 蛋白单克隆抗体所需要的试剂详见表 2-1

表 2-1 主要试剂

Table 2-1 The reagents used in this research

试剂	公司
Simple P 总 RNA 提取试剂盒	杭州博日科技有限公司
pClone007 Versatile Simple Vector Kit、琼脂糖	北京擎科生物有限公司
胶回收试剂盒、DNA 小提试剂盒、蛋白变性预制胶	南京诺维赞生物有限公司
细胞计数板	深圳亨睿生物科技有限公司
反转录试剂盒	Takara
QuickBlue 快速染胶液、TMB 显色液	北京博奥龙免疫技术有限公司
His-Tag 蛋白纯化磁珠试剂盒	北京索莱宝生物有限公司
GST 标签蛋白纯化试剂盒	上海碧云天生物有限公司
KOD 高保真酶	TOYOBO
Horse SAA ELISA Kit	Abcam
DH5α、BL21(DE3)感受态细胞	北京睿博兴科生物有限公司
His 抗体、GST 抗体	Sigma
HT、HAT、PEG 融合剂、弗氏完全/不完全佐剂	Sigma
Tween-20、1640 培养基、红外标记羊抗鼠二抗	Sigma
NC 膜	Millipore

表 2-1 (续)

试剂	公司
ELISA 板子	Costar
HRP 标记羊抗鼠二抗	KPL
SBA Clonotyping System-HRP	Southern Biotech
Protein G Focurose 4FF	武汉汇研生物有限公司
Protein L 4FF Chromatography Column	上海翊圣生物科技有限公司
胎牛血清(FBS)	Ausbian
脱脂乳	北京金钡生物科技有限公司
青霉素-链霉素 (PS)	北京博奥龙免疫技术有限公司
L-谷氨酰胺	北京博奥龙免疫技术有限公司

2.1.3 主要仪器设备

制备马 SAA 蛋白单克隆抗体所需要的仪器设备详见表 2-2

表 2-2 主要仪器

Table 2-2 The instruments used in this research

仪器	公司
超纯水仪 (GENPURE PRO)	美国 Thermo 公司
台式离心机 (5424)、移液器	德国 Eppendorf 公司
PCR 仪(Sure Cycler 8800)	美国 Agilent Technologies 公司
核酸电泳仪	美国 Major Science 公司
Odyssey 凝胶成像分析系统	美国 LI-COR 公司
生物安全柜	Heal Force
超声裂解仪	上海启前电子科技有限公司
高速离心机 (CR21GII)	日本 Hi TACHI 公司
蛋白电泳仪	美国 BIO-RAD 公司
快速湿转膜仪	南京金斯瑞生物有限公司
恒温振荡器	美国 CRYSTAL SYSTEMS 公司
细胞培养箱	Heal Force
细胞计数仪	深圳亨睿生物科技有限公司
台式 pH 计 (S210-B)	瑞士 METTLER TOLEDO 公司
酶标仪 (ELx800)	Bio Tek

2.1.4 主要溶液

PBS 缓冲液: 把 137 mM 的 NaCl、2.7 mM 的 KCl、2 mM 的 KH_2PO_4 、10 mM 的 Na_2HPO_4 溶

于 1 L 的蒸馏水中, PH 值调到 7.4。

PBST 洗涤液: 将 800 μ L 的 Tween-20 加入到 1 L 的 PBS 溶液中。

TBS 缓冲液: 将 0.02 M 的 Tris-Hcl 和 0.15 M 的 Nacl 溶于 1 L 的蒸馏水中。

TBST 洗涤液: 将 500 μ L 的 Tween-20 加入到 1 L 的 TBS 溶液中。

HT 培养基: 将 20% 的 FBS、1% 的 PS、1% 的 L-谷氨酰胺、HT 加入到 1640 培养液中。

HAT 培养基: 将 20% 的 FBS、1% 的 PS、1% 的 L-谷氨酰胺、HAT 加入到 1640 培养液中。

LB 培养基: 将 1% 的 Tryptone、0.5% 的 Yeast Extract、1% 的 Nacl 加入到蒸馏水中, 高压灭菌。

5%脱脂乳: 称取 5 g 脱脂乳干粉, 溶于 100 mL PBS 缓冲液中。

磁珠法纯化 His 标签蛋白的 Binding Buffer: 将 0.456 g 的 NaH_2PO_4 、2.299 g 的 Na_2HPO_4 、29.95 g 的 Nacl、3.404 g 的 Imidazole 溶于 1 L 蒸馏水中, PH 值调到 7.4; Washing Buffer: 将 0.456 g 的 NaH_2PO_4 、2.299 g 的 Na_2HPO_4 、29.95 g 的 Nacl、6.808 g 的 Imidazole 溶于 1L 蒸馏水中, PH 值调到 7.4; Elution Buffer: 将 0.456 g 的 NaH_2PO_4 、2.299 g 的 Na_2HPO_4 、29.25 g 的 Nacl、34.04 g 的 Imidazole 溶于 1 L 蒸馏水中, PH 值调到 7.4。

亲和层析纯化 GST 标签蛋白的 Elution Buffer: 50 mM Tris、150 mM NaCl、10 mM GSH, PH 值调至 8.0。

IPTG 诱导剂: 将 1.2 g IPTG 充分溶于 50 mL 灭菌水中, 用 0.22 μ m 滤器过滤除菌。

抗体纯化 Binding Buffer: 将 7.6024 g 的 Na_3PO_4 用蒸馏水溶解, 用 Hcl/NaOH 调至 PH=7.0, 最后定容至 1 L; Elution Buffer: 将 2.2521 g Gly 用蒸馏水溶解, 用 Hcl/NaOH 调至 PH=2.7, 最后定容至 300 mL; Tris-HCl: 将 1.211 g Tris Base 用蒸馏水溶解, 用 Hcl/NaOH 调至 PH=9.0, 最后定容至 10 mL。

2.2 实验方法

2.2.1 马 SAA 引物的设计

从 NCBI 上下载马的 SAA 基因序列, 利用软件 Primer 5 进行引物的设计, 在吉林库美生物有限公司对引物进行合成。马 SAA 及其分段突变体的引物设计如表 2-3 所示。

2.2.2 总 RNA 的提取及马 SAA 基因的扩增

根据 Simply P 总 RNA 提取试剂盒出产商家提供的操作步骤, 从外周血单核巨噬细胞、肝组织、马血浆及患病马血液中提取总 RNA, 根据反转录试剂盒商家提供的操作步骤, 把 RNA 反转录成 cDNA, 以 cDNA 为模板, 利用 eqSAA-7F、eqSAA-438R、eqSAA-28IF 和 eqSAA-416IR 进行巢式 PCR 扩增, 获得 SAA 基因序列, 如示意图 2-1 所示。第一轮扩增体系为: 10 μ L 2 $\times$ PCR buffer for KOD FX Neo、4 μ L 2 mM dNTPs、0.4 μ L KOD FX Neo、2 μ L cDNA、上下游引物各 1 μ L、1.6 μ L H_2O 。第一轮扩增条件为: 预变性温度 98 $^{\circ}\text{C}$ 、预变性时间 30 s, 变性温度 98 $^{\circ}\text{C}$ 、变性时间 10 s, 退火温度 58 $^{\circ}\text{C}$ 、退火时间 30 s, 延伸温度 68 $^{\circ}\text{C}$ 、延伸时间 30 s, 25 个循环; 终延伸温度 68 $^{\circ}\text{C}$ 、

终延伸时间 10 min。第二轮扩增以第一轮扩增产物为模板，扩增体系同上，扩增条件是退火温度是 60℃，其他同上。通过 DNA 胶回收试剂盒，对在 1%的核酸琼脂糖凝胶中目的片段进行回收。最后，利用 pClone007 Versatile Simple Vector Kit 将回收的 DNA 片段克隆到 T 载体上，送到吉林库美生物有限公司测序。

表 2-3 引物序列

Table 2-3 Primers sequences

引物名称	引物序列 (5'-3')	目的片段大小	引物用途
eqSAA-7F	TGCTCACTGGAAGTCAGCACCA	432bp	扩增 SAA 的外 片段
eqSAA-438R	CTGAGAGCAGAGTGAAGAGGAAGC		
eqSAA-28IF	ATGAAGCTGTTCACAGGCCTCGTCT	387bp	扩增 SAA 的内 片段
eqSAA-414IR	TCAGTACTTGTCAGGCAGGCCAT		
eqSAA-F1	ATCGGATCCGAATTCTATTTTCATGCGCGT	252bp	构建 PET-32a- cSAA 重组质粒
eqSAA-R1	TGCGGCCGCAAGCTTTTAATATTTATCCGG		
PET-32a-F	AAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCAC	5900bp	
PET-32a-R	GAATTCGGATCCGATATCAGCCATGGCCTT		
eqSAA-F2	GGATCCCCGGAATTCTATTTTCATGCGCGT	252bp	构建 PGEX-6P- 1-cSAA 重组质 粒
eqSAA-R2	GCCGCTCGAGTCGACTTAATATTTATCCGG		
PGEX-6p-1-F	GTCGACTCGAGCGGCCGCATCGTGA CTGAC	4984bp	
PGEX-6p-1-R	GAATTCGGGGATCCCAGGGGCCCTGGAA		

2.2.3 马 SAA 基因的克隆及鉴定

将马 SAA 基因的编码序列在华大基因公司进行密码子优化，通过 DNASTAR Lasergene Protean 软件对 SAA 蛋白的抗原表位进行分析，保留抗原指数高的 SAA 基因序列 (cSAA)，如示意图 2-1 绿框内所示，利用同源臂重组技术，将 cSAA 基因插入到 PET-32a(+) 和 PGEX-6p-1 原核表达载体上。SAA-F1、SAA-R1 和 SAA-F2、SAA-R2 分别以 cSAA 为模板进行扩增，PET-32a-F、PET-32a-R 和 PGEX-6p-1-F、PGEX-6p-1-R 分别以 PET-32a(+)、PGEX-6p-1 为模板进行扩增。使用 infusion 酶将 cSAA 连接到 PET-32a 和 PGEX-6p-1，构建成 PET-32a-cSAA 和 PGEX-6p-1-cSAA 重组质粒。

然后将 PET-32a-cSAA 和 PGEX-6p-1-cSAA 转化到 DH5 α 感受态细胞中，经过培养，挑取单个菌落于 5 mL LB 的试管中，37℃震荡培养 12 h，抽取 2 mL 菌液送到吉林库美生物公司测序。使用 DNA 小提试剂盒从测序正确的菌液中提取质粒，-20℃保存。

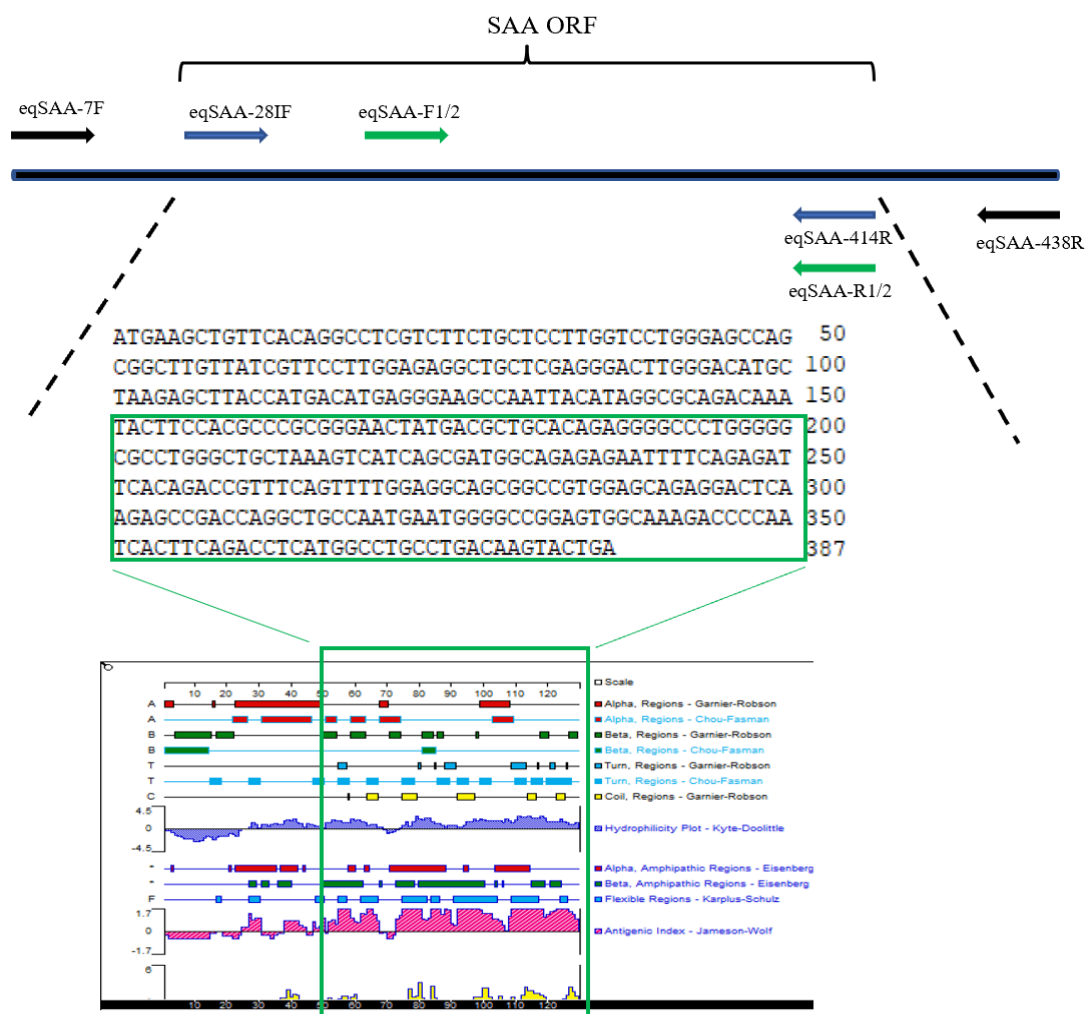


图 2-1 马 SAA 基因扩增及抗原表位分析示意图

Fig. 2-1 Schematic diagram of amplification of equine SAA and epitope analysis

2.2.4 马 SAA 重组蛋白的表达及纯化

将重组质粒 PET-32a-cSAA 和 PGEX-6p-1-cSAA 分别转化到 BL21 (DE3) 感受态细胞中, 进行原核表达。分别挑取单菌落于含有 5 mL 的氨苄抗性的 LB 试管中, 在 37°C 温箱振荡培养 14 h, 然后各取 100 μ L 接种于含有 10 mL 氨苄抗性的 LB 试管中(接种比例为 1: 100), 在 37°C 温箱振荡培养 2.5 h, 测 OD 值为 0.9 时, 充分混匀后取 5 mL 菌液到新的试管中并加入 2.5 μ L 的 1 M IPTG, 不加 IPTG 的作为空白对照。分别在 16°C、25°C 和 37°C 振荡培养箱中诱导 6 h。取 4 mL 菌液, 8000 rpm 离心 2 min, 弃掉上清, 沉淀用 1.5 mL 的 PBS 重悬, 在超声破碎仪的作用下对细菌进行裂解。将超声后的菌液 8000 rpm 离心 10 min, 分离上清和沉淀, 然后沉淀用 1.5 mL PBS 重悬, 分别各取 100 μ L 上清和沉淀, 然后加入 25 μ L 5xLoading Buffer, 在 98°C 煮样 10 min, 之后进行 SDS-PAGE 蛋白电泳, 最后用 Quick Blue 快速染胶液染色 30 min, 用蒸馏水脱色 15 min 分析蛋白表达情况。

使用 His-Tag 蛋白纯化磁珠试剂盒纯化 PET-32a-cSAA 重组蛋白, 大致操作如下:

(1) 将磁珠产品置于漩涡振荡器上充分混匀, 用移液器取 4 mL 磁珠悬液于 15 mL 离心管中, 进行磁性分离, 弃上清液, 从磁性分离器上取下离心管。

(2) 加入 4 mL Binding Buffer 到上述装有磁珠的离心管中, 上下翻转离心管数次, 让磁珠重悬; 进行磁性分离, 移去上清液, 重复洗涤 3 次。

(3) 用 40 mL Binding Buffer 重悬约 2 g 湿重的菌体, 进行超声裂解之后, 即为目标粗蛋白样品, 加入到装有预处理磁珠的离心管中。

(4) 将离心管置于旋转混合仪上, 4°C 旋转混合 1 h。

(5) 将离心管置于磁性分离器上进行磁性分离, 移出上清液至新的离心管中以备后续检测。

(6) 加入 10 mL Washing Buffer 到装有磁珠的离心管中, 轻轻翻转离心管数次, 使磁珠重新悬浮, 磁性分离, 移出清洗液到新的离心管中, 以备取样检测, 重复此步骤 5 次。

(7) 最后加入 Elution Buffer 对目的蛋白进行洗脱。

使用 GST 标签蛋白纯化试剂盒对 PGEX-6p-1-cSAA 重组蛋白进行纯化, 大致步骤如下:

(1) 取 2 mL 混合均匀的 BeyoGold™ GST-tag Purification Resin 于亲和层析空管柱中, 利用重力, 使保护液自然流下, 之后加入 5 mL PBS 自然流下, 重复 2 次。

(2) 40 mL PBS 重悬约 2 g 的菌体, 进行超声裂解, 获得粗蛋白样品, 8000 rpm 离心 10 min, 保留上清。

(3) 将上述处理好的凝胶加入到蛋白上清液中, 放到旋转混合仪上, 4°C 翻转 1 h。

(4) 打开亲和层析柱底部, 使液体自然流出, 之后加入 10 mL PBS 洗涤, 洗涤 6 次。

(5) 加入洗脱缓冲液对目的蛋白进行洗脱。

纯化得到的 PET-32a-cSAA 和 PGEX-6p-1-cSAA 重组蛋白使用分光光度计对其定量, 分装保存于 -80°C。

2.2.5 马 SAA 重组蛋白的鉴定分析

将纯化得到的重组蛋白进行 Western blot 分析和 Horse SAA ELISA Kit 验证, 以确保表达的重组蛋白的准确性。

Western blot 过程如下: 先将蛋白样品跑 SDS-PAGE 电泳, 利用快速转膜仪将蛋白胶转入 NC 膜上, 将 NC 膜放入 5% 的脱脂乳封闭 1 h, TBST 洗 3 次, 10 min/次, 共洗 30 min, 洗涤后加入用 5% 脱脂乳 1: 5000 稀释的 His 和 GST 抗体中, 室温孵育 2 h, 洗涤同上, 然后再加入到用 5% 脱脂乳 1: 10 000 稀释的红外线标记的羊抗鼠二抗中, 室温避光孵育 1 h, 洗涤同上, 最后将膜放置于 odyssey 红外扫描仪中扫描。

Horse SAA ELISA Kit 检测 SAA 重组蛋白完全按照产家提供的说明书操作。

2.2.6 动物免疫

计划对 BALB/C 小鼠进行五次免疫, 第一次免疫先将弗氏完全佐剂与 50 µg PET-32a-cSAA 重组蛋白体积比 1: 1 进行乳化, 背部多点注射到 6 周龄的 BALB/C 小鼠中; 21 天后进行第二次免疫, 将弗氏不完全佐剂与 50 µg PET-32a-cSAA 重组蛋白体积比 1: 1 进行乳化, 腹腔注射到小鼠

中；第 42 天和 56 天分别进行第三次、第四次免疫，免疫原和免疫方式均同第二次免疫；第 70 天对小鼠的血清进行效价检测在 10^6 以上，进行第五次免疫，直接腹腔注射 $50\text{ }\mu\text{g}$ PET-32a-cSAA 重组蛋白，4 天后取出脾组织，做细胞融合实验。

2.2.7 杂交瘤细胞融合

利用融合剂将预先培养好的 SP2/0 细胞与脾细胞相结合，具体步骤如下：

(1) 眼球采血：采出的血放入到 37°C 温箱中（易析出血清）析出血清做后续试验的阳性血清。把小鼠放到酒精中浸泡。

(2) 打开生物安全柜，固定小鼠。

(3) 分别抽 10 mL 1640 培养基溶液于两个平皿中。

(4) 左手持镊，右手持剪刀，分两步，先剪开小鼠腹部的上皮，此时在我们的右侧能看到肿大的脾脏，然后剪开腹膜，准确剪掉完整脾脏。

(5) 把脾脏放入到含有 1640 培养基溶液的平皿中，剪去脾脏表面的多余组织，抽取 1 mL 1640 培养基溶液进行冲洗。

(6) 把干净的脾脏放入到另一个含有 1640 培养基溶液的平皿中，取出 20 mL 和 1 mL 注射器，拔下 20 mL 注射器的针头，抽取平皿中的 10 mL 1640 培养基溶液，把 1 mL 的针头插入到 20 mL 的注射器上，然后插入到脾脏中，打出 1640 培养基溶液，把脾细胞冲出来，反复多次，直到脾脏泛白。

(7) 取出细胞筛网，把含有脾细胞的 1640 培养基溶液过滤到 50 mL 的离心管中。

(8) 从培养箱中取出培养好的 SP2/0，倒掉上清培养液，用 1640 培养基溶液吹打，使 SP2/0 重悬。

(9) 细胞计数：取 $20\text{ }\mu\text{L}$ 细胞液于细胞计数板中。脾细胞 10 倍稀释计数会更准确。

(10) SP2/0 和脾细胞按照 1: 8（细胞数目）的比例混合。按照比例，把 SP2/0 加入到脾细胞中， 1000 rpm ，离心 4 min 。

(11) 在离心期间，取出预热的大烧杯和融合剂，离心结束后，倒掉上清，把有细胞团的离心管底部放入到左手掌中，拍打，使细胞离壁悬浮。

(12) 左手把含有细胞团的离心管底部浸泡到大烧杯的温水中，右手持枪抽取 1 mL 融合剂， 1 min 内加到细胞中，边加边摇。加完后静止 90 s ，使融合剂起作用。

(13) 终止融合：向离心管中加入 1640 培养基溶液，第 1 min 加 1 mL 1640 培养基溶液，第 2 min 加 4 mL 1640 培养基溶液，第 3 min 加 5 mL 1640 培养基溶液，最后向离心管中补加 1640 培养基溶液到 40 mL ， 1000 rpm ，离心 4 min 。

(14) 离心结束后取出离心管，倒掉上清，用手拍匀细胞，向细胞里加 40 mL 的 1640 培养基溶液重悬，离心同上。

(15) 离心结束后取出离心管，倒掉上清，用 3 mL HAT 培养基重悬细胞，分别加入 3 管 40 mL HAT 培养基中，最后每孔加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ 的培养基于 5 个 96 孔板中，放入细胞培养箱进行培养。

2.2.8 阳性杂交瘤细胞的筛选与亚克隆

细胞融合一周之后,需要对阳性杂交瘤细胞进行筛选,筛选的方法是间接 ELISA,一般步骤如下:

(1) 包被 1 $\mu\text{g/mL}$ 含有 GST 标签的 cSAA 蛋白于 ELISA 板中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被 12 h, 之后弃掉包被液, 每孔加入 200 μL PBST 洗涤, 洗涤 3 次, 每次振荡洗涤 2 min, 最后弃干洗涤液。

(2) 每孔加入 100 μL 的一抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h, 洗涤同上。

(3) 每孔加入 100 μL 的 1:10 000 稀释的抗鼠二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光作用 30 min, 洗涤同上。

(4) 每孔加入 100 μL 的 TMB 显色液, 室温避光作用 10 min, 然后每孔加入 50 μL 终止液进行终止。

(5) 在酶标仪上读取 OD₄₅₀ 值。

最后用移液枪轻微吹打筛选到的阳性细胞孔, 使里面的细胞重悬, 进行细胞计数, 利用终点稀释法对阳性细胞团进行亚克隆, 直到出现单个细胞团。

2.2.9 马 SAA 单克隆抗体亚型鉴定

使用 SBA Clonotyping System-HRP (Southern Biotech) 试剂盒, 对单克隆抗体进行亚型鉴定, 严格按照产家提供的说明书操作。

2.2.10 马 SAA 单克隆抗体的腹水制备、纯化及效价测定

先向小鼠腹腔注射 0.5 mL 弗氏不完全佐剂, 7 天后向小鼠腹腔注射约 10^6 的杂交瘤细胞, 从注射完杂交瘤细胞的第 5 天开始, 每天都去观察小鼠腹腔情况, 最后使用注射器抽取腹水。

使用 Protein G Focurose 4FF 和 Protein L 4FF Chromatography Column 分别纯化 IgG、IgM 型抗体, 大致步骤如下:

(1) 先将腹水稀释 (20 mL Binding Buffer+4 mL 腹水), 0.22 μm 滤头过滤到 50 ml 离心管中。

(2) 10 mL Binding Buffer 平衡纯化柱。要缓慢, 一滴一滴往下流。

(3) 将 24 mL 稀释的样品用注射器加入到纯化柱中, 流速要慢, 一滴一滴往下流, 流出的液体用离心管接住。

(4) 重复步骤 3。

(5) 用 15 mL Binding Buffer 注射器加入到纯化柱中, 洗杂。

(6) 用 Elution Buffer 洗脱抗体。一般洗脱 7 管, 第 1、2 管洗脱 500 μL , 第 3-7 管洗脱 1 mL。在洗脱之前要先向 1、2EP 管中加入 60 μL Tris-HCl, PH=9, 3-7 管加 120 μL Tris-HCl, PH=9。

使用间接 ELISA 对纯化得到的抗体进行效价检测, 具体步骤详见 2.2.8。

2.2.11 马 SAA 单克隆抗体的 Western blot 鉴定

将纯化得到的马 SAA 单克隆抗体进行 Western blot 验证, 具体步骤详见 2.2.5。

2.2.12 马 SAA 单克隆抗体的特异性鉴定

通过包被重组 SAA 蛋白、马流产沙门氏菌的鞭毛蛋白 FljB、马动脉炎病毒的 N 蛋白及 IL-1 β 蛋白于 ELISA 板中, 根据 2.2.8 的步骤, 来验证制备的马 SAA 单克隆抗体的特异性。

2.3 实验结果

2.3.1 马 SAA 基因的扩增及原核表达质粒的构建

根据设计好的引物 eqSAA-7F、eqSAA-438R、eqSAA-28IF 和 eqSAA-416IR, 以反转录好的 cDNA 为模板, 进行巢式 PCR, 最后扩增出 387 bp 的目的片段, 如图 2-2 所示。经过抗原分析, 删除了 N 段的前 50 个氨基酸, 如图 2-1 所示。PET-32a(+) 载体和 cSAA 扩增结果如 2-3 的 A 图所示, PGEX-6P-1 载体和 cSAA 扩增结果如 2-3 的 B 图所示。经过 infusion 酶连接, 菌液测序正确后, 命名为 PET-32a-cSAA 和 PGEX-6P-1-cSAA 重组质粒。

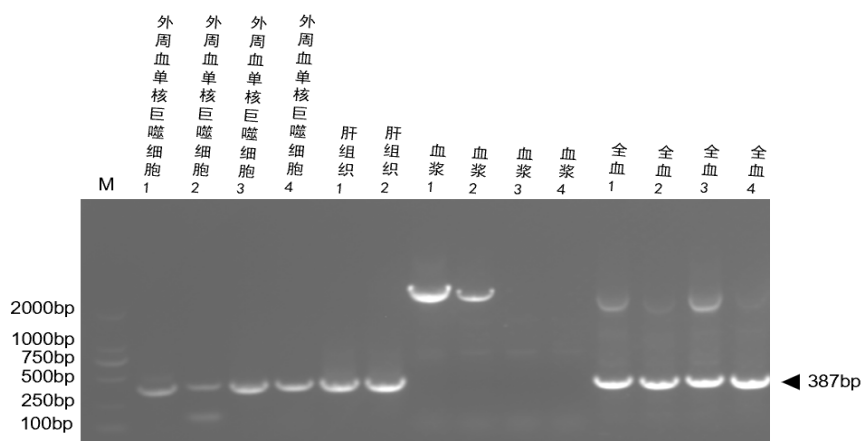


图 2-2 马 SAA 基因的扩增

Fig. 2-2 Amplification of equine SAA

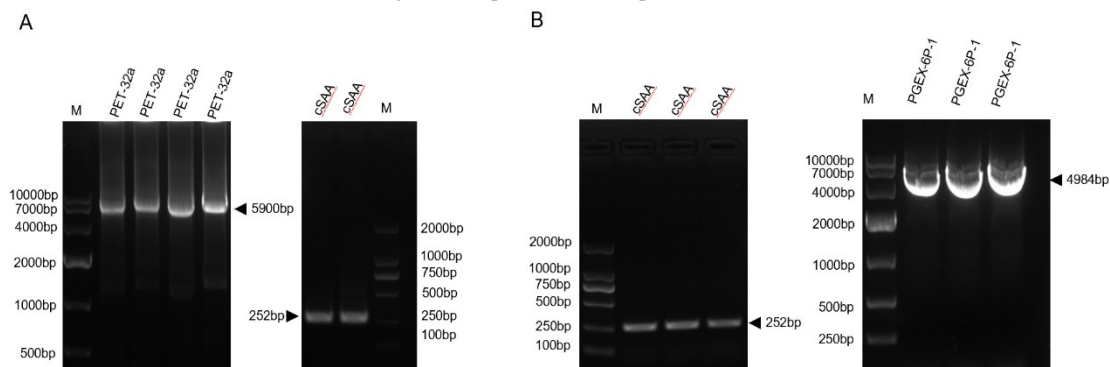


图 2-3 质粒的构建

Fig. 2-3 Plasmid construction

A 代表 PET-32a 载体和 cSAA 基因的扩增; B 代表 PGEX-6P-1 载体和 cSAA 基因的扩增。

A represents the amplification of PET-32a vector and cSAA gene, B represents the amplification of PGEX-6P-1 vector and cSAA gene.

2.3.2 马 SAA 重组蛋白的体外表达、纯化及鉴定

根据 2.2.4 表达的步骤, 表达 28 KDa 大小的 PET-32a-cSAA 和 35 KDa 大小的 PGEX-6P-1-cSAA 重组蛋白。两种重组蛋白均是可溶性表达, 其中 PET-32a-cSAA 在 37°C 表达最佳, 如 2-4 的 A 图所示; PGEX-6P-1-cSAA 在 37°C 表达最佳, 但是考虑到在该温度下, 包涵体表达过高, 所以选择 PGEX-6P-1-cSAA 重组蛋白在 25°C 表达, 如 2-4 的 B 图所示。

依据上述的蛋白表达条件, 对重组蛋白进行大量的表达, 之后使用蛋白纯化试剂盒对蛋白进行纯化, 获得目的蛋白, 如图 2-5 所示, 具体步骤详见 2.2.4。

对于纯化得到的蛋白, 用 Western blot 和商品化的试剂盒进行验证, 证实重组蛋白成功的表达, 并且可以与国外试剂盒中的抗体反应, 结果如图 2-6 所示。

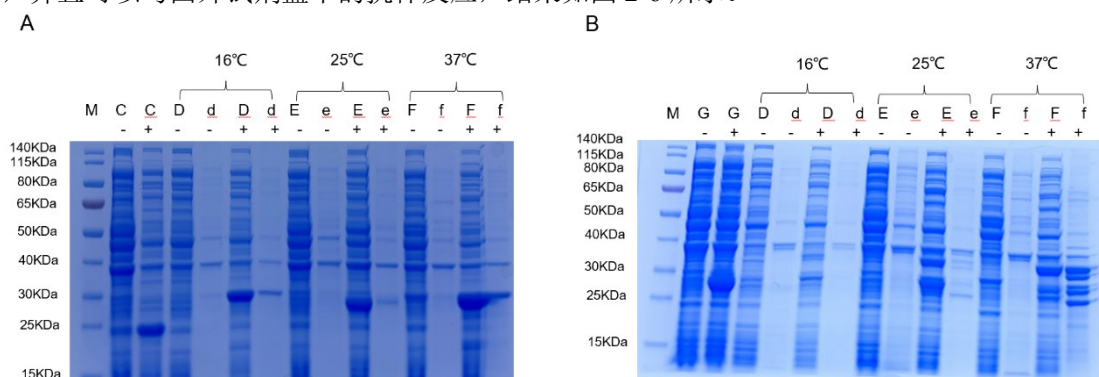


图 2-4 马 SAA 重组蛋白的表达

Fig. 2-4 Expression of equine SAA recombinant protein

A 代表 PET-32a-cSAA 重组蛋白的表达; B 代表 PGEX-6P-1-cSAA 重组蛋白的表达; C 代表 PET-32a 空载体; G 代表 PGEX-6P-1 空载体; D 代表蛋白在 16°C 表达的上清; d 代表蛋白在 16°C 表达的沉淀; E 代表蛋白在 25°C 表达的上清; e 代表蛋白在 25°C 表达的沉淀; F 代表蛋白在 37°C 表达的上清; f 代表蛋白在 37°C 表达的沉淀; + 代表加了 IPTG; - 代表不加 IPTG。

A represents the expression of PET-32a-cSAA recombinant protein, B represents the expression of PGEX-6P-1-cSAA recombinant protein, C represents PET-32a vector, G represents PGEX-6P-1 vector, D represents the supernatant of the protein expressed at 16°C, d represents the precipitate of the protein expressed at 16°C, E represents the supernatant of the protein expressed at 25°C, e represents the precipitate of the protein expressed at 25°C, F represents the supernatant of the protein expressed at 37°C, f represents the precipitate of the protein expressed at 37°C, + represents the addition of IPTG, - represents no IPTG.

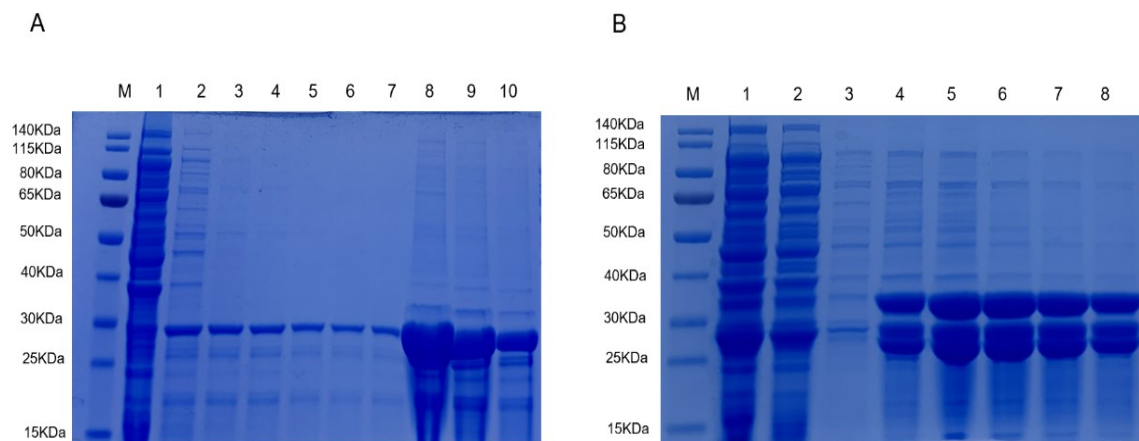


图 2-5 马 SAA 重组蛋白的纯化

Fig. 2-5 Purification of equine SAA recombinant protein

A 代表 PET-32a-cSAA 重组蛋白的纯化，1 代表 PET-32a-cSAA 蛋白的流穿液；2-7 代表 PET-32a-cSAA 蛋白洗涤液；8-10 代表 PET-32a-cSAA 蛋白洗脱液。

B 代表 PGEX-6P-1-cSAA 重组蛋白的表达，1 代表 PGEX-6P-1-cSAA 蛋白的流穿液；2-3 代表 PGEX-6P-1-cSAA 蛋白的洗涤液；4-8 代表 PGEX-6P-1-cSAA 蛋白的洗脱液。

A represents the Purification of PET-32a-cSAA recombinant protein, 1 represents the bacterial fluid of PET-32a-cSAA, 2-7 represents the washing of PET-32a-cSAA, 8-10 represents the purified protein of PET-32a-cSAA.

B represents the Purification of PGEX-6P-1-cSAA recombinant protein, 1 represents the bacterial fluid of PGEX-6P-1-cSAA, 2-3 represents the washing of PGEX-6P-1-cSAA, 4-8 represents the purified protein of PGEX-6P-1-cSAA.

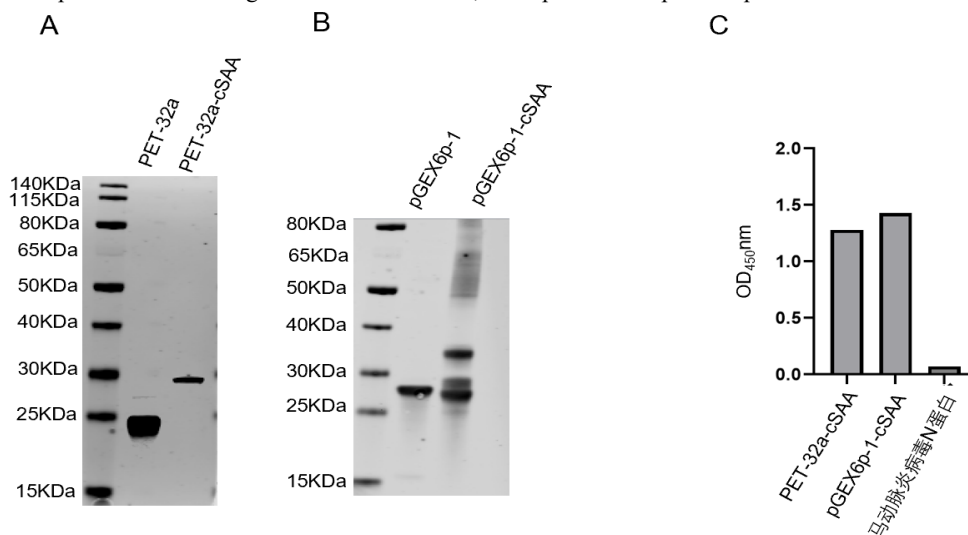


图 2-6 马 SAA 重组蛋白鉴定

Fig. 2-6 Identification of equine SAA recombinant protein

A 代表 PET-32a-cSAA 重组蛋白的 Western blot 鉴定；B 代表 PGEX-6P-1-cSAA 重组蛋白的 Western blot 鉴定；C 代表 Horse SAA ELISA Kit 鉴定两种重组蛋白。

A represents Western blot identification of PET-32a-cSAA recombinant protein, B represents Western blot identification of PGEX-6P-1-cSAA recombinant protein, C represents Horse SAA ELISA Kit identification of PET-32a-cSAA and PGEX-6P-1-cSAA recombinant protein.

2.3.3 马 SAA 单克隆抗体的筛选及 Western blot 鉴定

细胞融合实验一周后，按照 2.2.8 步骤进行单克隆抗体的筛选，一共筛选到 5 株单克隆抗体，之后再根据 2.2.5 步骤，对单克隆抗体进行 Western blot 鉴定，结果如图 2-7 所示。

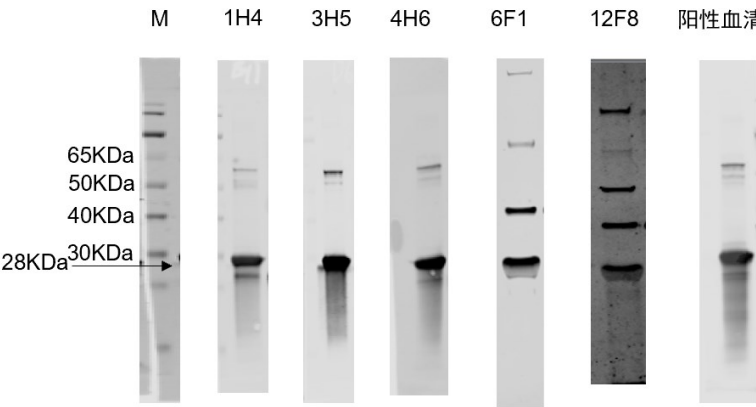


图 2-7 马 SAA 单克隆抗体的 Western blot 鉴定

Fig. 2-7 Western blot identification of monoclonal antibody to Equine SAA

2.3.4 马 SAA 单克隆抗体亚型鉴定

根据抗体亚型鉴定试剂盒，对上述 5 株抗体进行亚型鉴定，其中 1H4、3H5 和 4H6 抗体为 IgG1 型，6F1 和 12F8 抗体为 IgM 型，结果如表 2-4 所示。

表 2-4 5 株单克隆抗体亚型的鉴定

Table 2-4 Identification of 5 monoclonal antibody subtypes

单克隆抗体名称	亚型
1H4	IgG1
3H5	IgG1
4H6	IgG1
6F1	IgM
12F8	IgM

2.3.5 马 SAA 单克隆抗体的纯化及效价测定

分别纯化上述 5 株单克隆抗体，具体纯化步骤详见 2.2.10。将纯化得到的抗体用分光光度计定量到 1 mg/mL，之后用间接 ELISA 进行检测，如 2-8 的 A 图所示，3H5 和 6F1 抗体的 OD₄₅₀ 值高于另外 3 株抗体，最后通过 2 倍梯度稀释 3H5 和 6F1 抗体，检测这 2 株抗体的效价，如 2-8 的 B 图所示，3H5 抗体的效价为 2048，6F1 抗体的效价为 512。

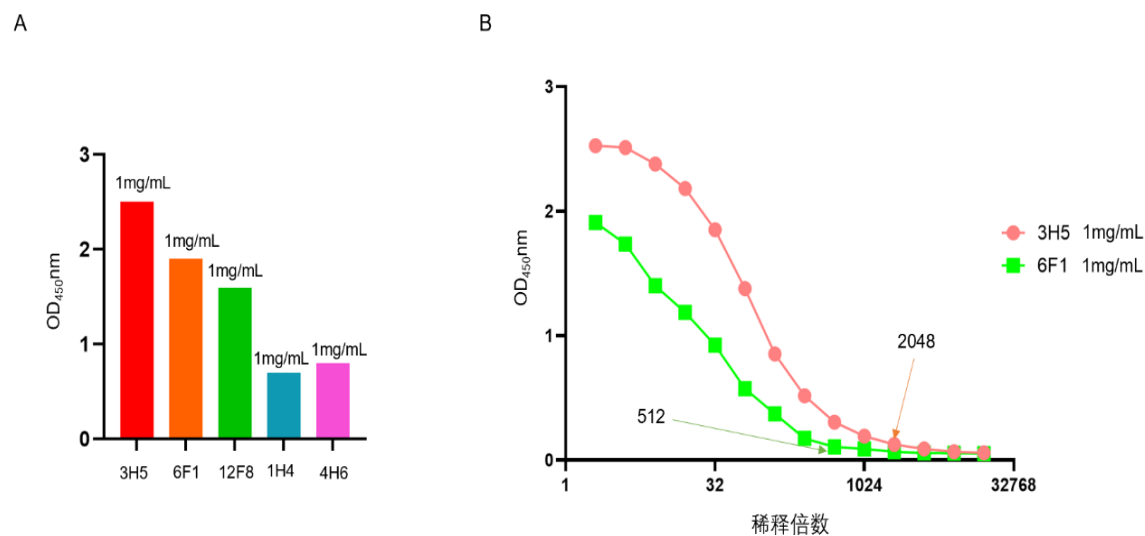


图 2-8 3H5 和 6F1 抗体效价的测定

Fig. 2-8 Determination of titers of monoclonal antibody 3H5 and 6F1

2.3.6 马 SAA 单克隆抗体的特异性验证

通过间接 ELISA 验证, 如图 2-9 所示, 5 株单克隆抗体只与 SAA 反应, 与 FljB、N、IL-1 β 均不反应, 说明这 5 株单克隆抗体特异性良好。

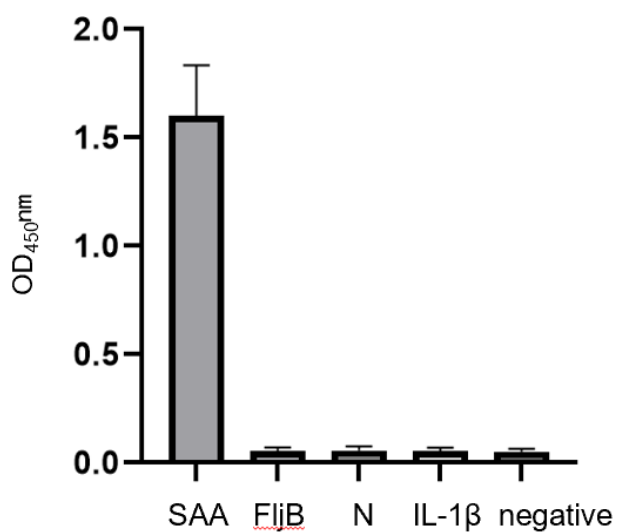


图 2-9 5 株抗体的特异性验证

Fig.2-9 Specificity of 5 strains of monoclonal antibodies

2.4 小结

(1) 成功构建了 PET-32a-cSAA 和 PGEX-6P-1-cSAA 原核表达质粒, 并通过原核表达, 纯化得到重组蛋白。

(2) 利用 cSAA 重组蛋白免疫小鼠制备单克隆抗体, 共获得 5 株马 SAA 特异性单克隆抗体。

- (3) 单克隆抗体 1H4、3H5、4H6 亚型为 IgG1，单克隆抗体 6F1、12F8 亚型为 IgM。
- (4) 单克隆抗体 3H5 和 6F1 的抗体效价要高于另外 3 株抗体。

第三章 马 SAA 双抗体夹心 ELISA 的建立

通过对单克隆抗体 3H5 和 6F1 进行配对，确定包被抗体为 6F1，检测抗体为 3H5，建立双抗体夹心 ELISA，之后通过条件优化，确定包被抗体浓度为 1 μg/mL、检测抗体浓度为 1 μg/mL、封闭液为 5%BSA、待检样品孵育时间为 60 min、检测抗体孵育时间 30 min、TMB 底物显色温度和时间分别是 37℃和 15 min、样品稀释液为 2%的 BSA、样品稀释度为 100 倍稀释。最后对建立的马 SAA 双抗体夹心 ELISA 方法进行特异性、重复性验证，并且对标准曲线和检测血清中 SAA 浓度的范围，以及检测结果的符合率与国外试剂盒进行了比较。

3.1 材料

3.1.1 血清

含有 SAA 蛋白的马血清来源于本实验保存的血清库。

3.1.2 主要试剂

国外试剂盒、脱脂乳、TMB 显色液参照表 2-1，其他试剂见表 3-1。

表 3-1 主要试剂

Table 3-1 The reagents used in this research

试剂	公司
HRP Conjugation Kit	Abcam
BSA	北京索莱宝生物公司
胎牛血清	北京依珊汇通科技有限公司
商品化封闭液	湖州英创生物科技有限公司
胆红素	成都瑞芬思德丹生物公司
甘油三酯	北京瑞达恒辉科技有限公司
胆固醇	国药集团化学试剂有限公司
血浆蛋白	北京华夏远洋科技有限公司

3.1.3 主要仪器

所需要的仪器参照表 2-2。

3.2 实验方法

3.2.1 单克隆抗体的 HRP 标记

使用 HRP Conjugation Kit 试剂盒对 3H5 和 6F1 单克隆抗体进行 HRP 标记, 严格按照产家提供的说明书操作。

3.2.2 包被抗体和检测抗体的筛选配对及最佳浓度的确定

本研究需要建立一个检测抗原的双抗体夹心的 ELISA 方法, 包被抗体和检测抗体的筛选配对也就显得十分的重要。使用效价比较高的 3H5 和 6F1 抗体, 建立双抗体夹心 ELISA。根据一般的双抗体夹心的 ELISA 方法, 对包被抗体和检测抗体进行配对, 具体步骤如下:

(1) 包被 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 包被抗体于 ELISA 板中, 4°C 包被 12 h, 之后弃掉包被液, 每孔加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ PBST 洗涤, 洗涤 3 次, 每次振荡洗涤 2 min, 最后弃掉洗涤液。

(2) 每孔加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 的待检样品, 37°C 作用 1 h, 洗涤同上。

(3) 每孔加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 的 1:1000 稀释的 HRP 标记的检测抗体, 37°C 避光作用 30 min, 洗涤同上。

(4) 每孔加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 的 TMB 显色液, 室温避光作用 10 min, 然后每孔加入 $50\text{ }\mu\text{L}$ 终止液进行终止。

(5) 在酶标仪上读取 OD_{450} 值。

确定包被抗体和检测抗体之后, 采取方阵滴定的方式, 确定包被抗体和检测抗体最佳的浓度条件, 包被抗体和检测抗体均倍比稀释, 通过阳性和阴性样品的 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 比值 (P/N), 判断出各个抗体的最佳稀释度。

3.2.3 最佳封闭液的确定

参照 3.2.2 确定的步骤, 封闭液分别用 5% 脱脂乳、5% BSA、10% 的胎牛血清和商品化封闭液, 通过 P/N 值来确定最佳封闭液。

3.2.4 最佳样品孵育时间的确定

在上述条件确定的情况下, 参照 3.2.2 步骤, 样品孵育时间分别改为 30 min、45 min、60 min、75 min 和 90 min, 通过 P/N 值来确定最佳的样品孵育时间。

3.2.5 最佳检测抗体作用时间的确定

在上述条件确定的情况下, 参考 3.2.2 步骤, 检测抗体作用时间分别改为 20 min、30 min、45 min、60 min、75 min 和 90 min, 通过 P/N 值来确定最佳的检测抗体时间。

3.2.6 最佳底物显色温度及时间的确定

在上述条件确定的情况下, 参考 3.2.2 步骤, 底物显色温度分别为 25°C 和 37°C , 作用时间分别为 5 min、10 min、15 min 和 20 min, 通过 P/N 值来确定最佳的底物显色温度和作用时间。

3.2.7 最佳样品稀释液的确定

在上述条件确定的情况下,使用样品稀释液 PBS、2% BSA、商品化稀释液和 Horse SAA ELISA Kit 国外试剂盒中的稀释液分别倍比稀释马 SAA 阳性血清,参考 3.2.2 步骤来确定最佳的样品稀释液。

3.2.8 标准曲线的建立

首先,利用 Horse SAA ELISA Kit 国外试剂盒对马血清中的 SAA 进行定量。在上述条件确定的情况下,参考 3.2.2 步骤,通过 2 倍梯度稀释已知 SAA 浓度的马血清,参照 Horse SAA ELISA Kit 国外试剂盒中的标准曲线,建立了四参数拟合曲线。

3.2.9 样品稀释度的确定

根据建立的马 SAA 双抗体夹心 ELISA 检测方法,接下来对样品稀释度进行了探索,通过 10 倍、50 倍、100 倍和 200 倍稀释马 SAA 阳性血清,检测得到的 SAA 浓度于国外试剂盒进行比较,通过 CV%值的大小来确定最终的样品稀释度。

3.2.10 特异性试验

根据建立的双抗体夹心 ELISA 检测方法对胆红素、甘油三脂、胆固醇、血浆蛋白、IL-1 β 及 SAA 进行检测,验证该方法的特异性。

3.2.11 重复性试验

取出 5 列同一批次包被的 ELISA 板子和 5 列不同批次包被的 ELISA 板子,按照已近建立的双抗体夹心 ELISA 方法,检测阴阳性血清和空白对照。通过计算平均值 (M)、标准差 (SD) 和变异系数 (CV),来验证该方法批内和批间的重复性。

3.2.12 马 SAA 双抗体夹心 ELISA 与国外试剂盒标准曲线范围和检测血清中 SAA 浓度范围的比较

根据建立好的标准曲线,比较双抗体夹心 ELISA 和国外试剂盒标准曲线的范围。把 OD_{450nm} 值代入标准曲线中,计算得到 SAA 浓度值,再乘以相对应的稀释倍数,获得血清中 SAA 的浓度值,从而对双抗体夹心 ELISA 和国外试剂盒检测血清中 SAA 浓度范围进行比较。

3.2.13 马 SAA 双抗体夹心 ELISA 方法与国外试剂盒检测结果的符合率

利用马 SAA 双抗体夹心 ELISA 方法和国外试剂盒检测 88 份血清,比较这两种方法检测结

果的符合率。

3.3 实验结果

3.3.1 包被抗体和检测抗体的筛选配对及最佳浓度的确定

通过对 5 株抗体的效价检测，如 2-8 的 A 图所示，选择效价较高的 3H5 和 6F1 抗体进行后续实验。包被抗体 3H5，检测抗体 6F1 和包被抗体 6F1，检测抗体 3H5 配对分析，当包被抗体为 6F1，检测抗体为 3H5 时，能较好的区分阴阳性血清，如图 3-1 所示，包被抗体确定为 6F1，检测抗体确定为 3H5。

包被抗体 6F1 和检测抗体 3H5 分别进行 1: 250、1: 500、1: 1000、1: 2000、1: 4000 和 1: 8000 倍稀释，根据 3.2.2 步骤，检测 SAA 阴阳性血清。P/N 值最大时的包被抗体 6F1 为 1: 1000 倍稀释（1 μg/mL），检测抗体 3H5 为 1: 500 倍稀释（2 μg/mL），如表 3-2 所示。考虑检测抗体 3H5 的经济成本，最终将 3H5 改为 1: 1000 倍稀释（1 μg/mL）。

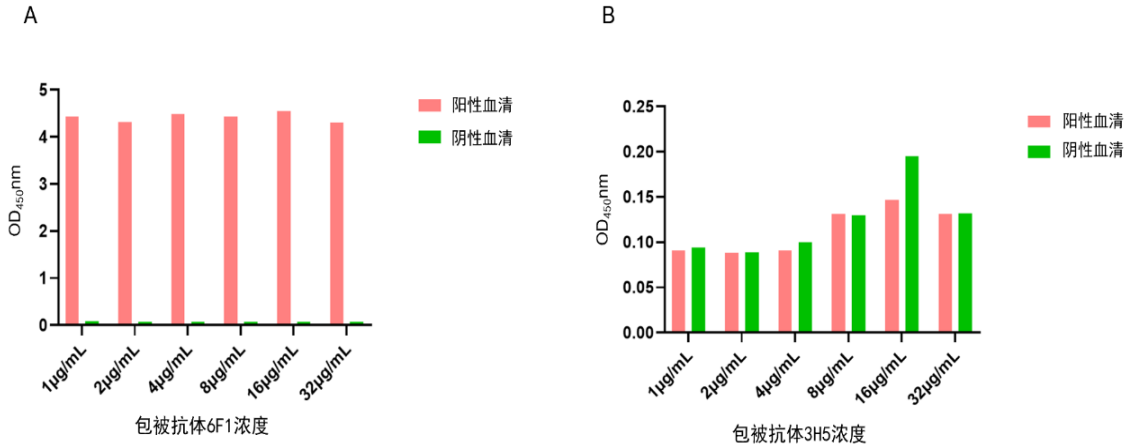


图 3-1 抗体的筛选配对

Fig. 3-1 Screening and pairing of antibodies

A 代表包被抗体为 6F1，检测抗体为 3H5；B 代表包被抗体为 3H5，检测抗体为 6F1

A represents the coated antibody is 6F1 and the detection antibody is 3H5, B represents the coated antibody is 3H5 and the detection antibody is 6F1.

表 3-2 包被抗体和检测抗体最佳稀释度的确定

Table 3-2 Determination of the optimum dilution of coated antibody and detected antibody

P/N		检测抗体 3H5					
		1: 250	1: 500	1: 1000	1: 2000	1: 4000	1: 8000
包被抗体 6F1	1: 250	75.23729	79.63462	54.60784	33.72549	17.80392	9.375
	1: 500	70.11475	78.84314	55.5625	41.53846	19.86047	10.58696
	1: 1000	67.80303	84.25	58.4	29.92857	18.88636	10.13333
	1: 2000	74.34426	83.14	48.12963	26.98276	16.14	9.354167
	1: 4000	63.4	67.42373	44.50877	35.2	13.71429	7.525424

表 3-2 (续)

P/N		检测抗体 3H5					
		1: 250	1: 500	1: 1000	1: 2000	1: 4000	1: 8000
包被抗体 6F1	1: 8000	68.27273	75.5	59.55814	39.8	20.575	10.48936

3.3.2 最佳封闭液的确定

经过 5%脱脂乳、5%BSA、10%胎牛血清、商品化封闭液实验结果的比较,发现 5%BSA 的 P/N 值比较高,最终选择了 5%的 BSA 作为最佳的封闭液,如图 3-2 所示。

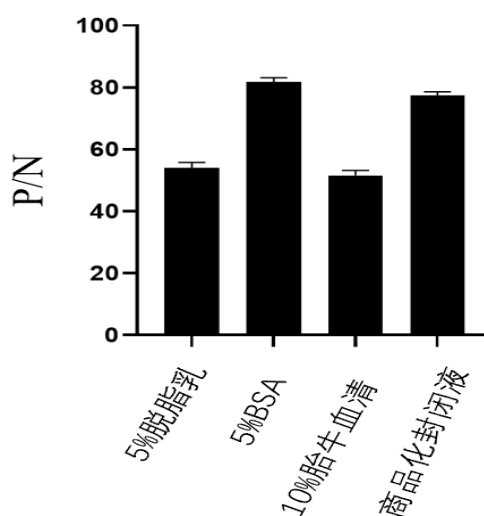


图 3-2 封闭液的确定

Fig. 3-2 Determination of blocking solution

3.3.3 最佳样品孵育时间的确定

经过样品孵育 30 min、45 min、60 min、75 min、90 min 实验结果的比较,发现样品孵育时间为 60 min、75 min、90 min 时, P/N 值比较高,为了节约时间,最终选择 60 min 作为样品孵育的最佳时间,如图 3-3 所示。

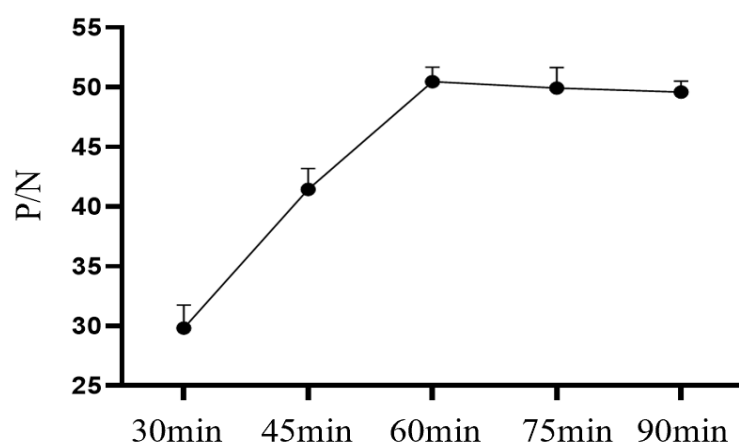


图 3-3 样品孵育时间的确定

Fig. 3-3 Determination of sample acting time

3.3.4 最佳检测抗体作用时间的确定

经过检测抗体作用 20 min、30 min、45 min、60 min、75 min、90 min 实验结果的比较,发现检测抗体作用时间是 30 min 时, P/N 值最大, 最终确定最佳检测抗体作用时间是 30 min, 如图 3-4 所示。

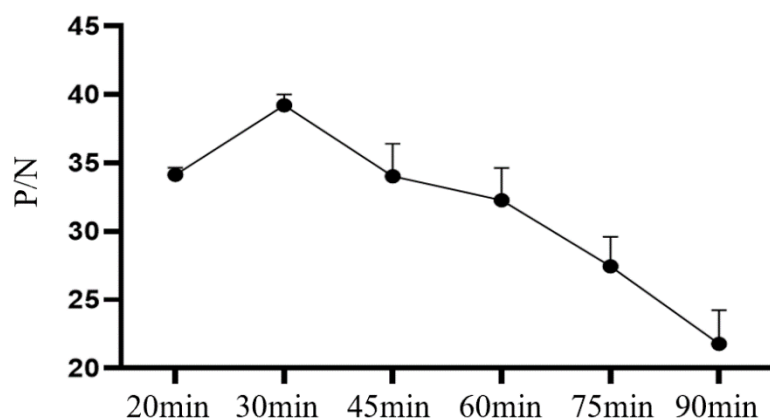


图 3-4 检测抗体作用时间的确定

Fig. 3-4 Determination of detected antibody acting time

3.3.5 最佳底物显色温度和时间的确定

经过底物在室温、37℃显色和显色时间 5 min、10 min、15 min、20 min 实验结果的比较,发现在 37℃显色时的 P/N 值在各个时间段都要高于室温,当底物在 37℃显色时,显色时间在 15 min、20 min 的 P/N 值较高,为了节约时间,显色时间选择了 15 min, 最终确定最佳底物显色温度为 37℃, 最佳显色时间是 15 min, 如图 3-5 所示。

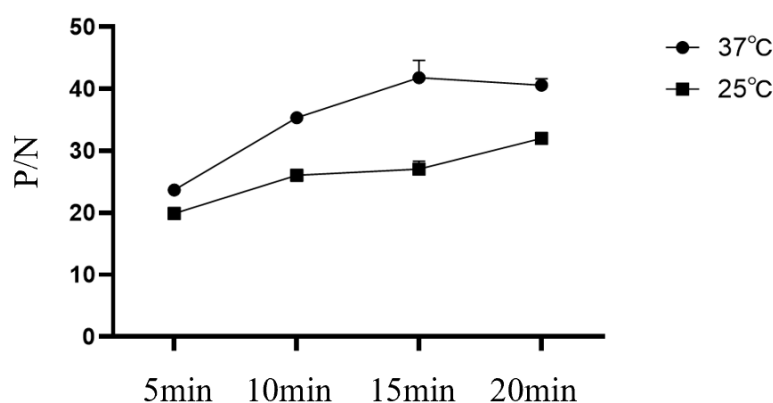


图 3-5 底物显色温度和时间的确定

Fig. 3-5 Determination of substrate color temperature and time

3.3.6 最佳样品稀释液的确定

经过倍比稀释检测马 SAA 血清，相比于其它稀释液，只有稀释液是 2% 的 BSA 时，不同梯度稀释的血清 OD_{450nm} 值下降程度更低，最佳样品稀释液就定为 2% 的 BSA，如表 3-3 所示。

表 3-3 最佳样品稀释液的确定

Table 3-3 Determination of the best sample diluent

稀释液种类 血清稀释倍数	PBS	2%BSA	商品化稀释液	国外试剂盒中的稀释液
16	4.506	4.422	4.464	4.433
32	4.298	4.246	4.233	4.263
64	4.541	4.398	4.318	4.37
128	4.373	4.314	4.149	4.247
256	4.561	4.369	3.172	2.935
512	3.956	3.839	1.59	1.001
1024	1.169	2.39	0.667	0.223
2048	0.169	1.161	0.259	0.083
4096	0.05	0.42	0.129	0.065

3.3.7 标准曲线的建立

利用建立的双抗体夹心 ELISA，以 2 倍梯度稀释已知 SAA 浓度的马血清为标准品进行检测，发现血清中 SAA 浓度在 0.01875-0.59 mg/L 范围内，可以建立四参数拟合曲线，如 3-6 的 A 图所示，与国外试剂盒的标准曲线 3-6 的 B 图很相似。

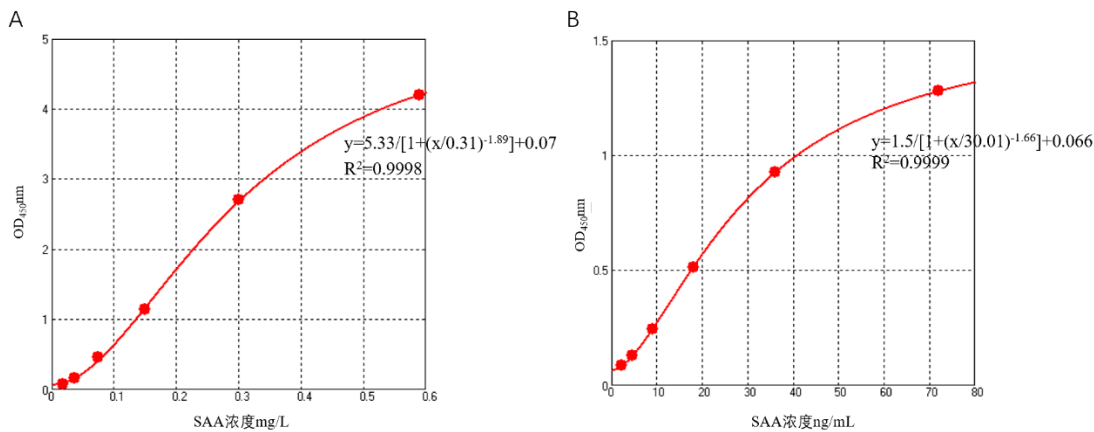


图 3-6 标准曲线的建立

Fig. 3-6 The establishment of a standard curve

A 代表双抗体夹心 ELISA 的标准曲线；B 代表国外试剂盒的标准曲线。

A represents the standard curve of the double antibody sandwich ELISA, B represents the standard curve of the foreign kit.

3.3.8 样品稀释度的确定

根据建立的双抗体夹心 ELISA 方法，通过检测得到的不同稀释度的马 SAA 血清浓度值与国外试剂盒检测结果比较，当样品 100 倍稀释时，CV 值最小，浓度值与国外试剂盒检测的结果最为接近，最终样品稀释度定为 100 倍稀释，结果如表 3-4 所示。

表 3-4 样品稀释度的确定

Table 3-4 Determination of sample dilution

稀释倍数 样品编号	10 (CV%)	50 (CV%)	100 (CV%)	200 (CV%)
1	63.27	13.18	4.36	29.10
2	97.05	27.11	4.77	38.64
3	60.16	22.39	8.43	6.31
4	62.39	17.27	7.30	31.43
5	63.73	16.41	5.39	24.10
6	71.56	28.28	10.97	13.17
7	62.23	12.86	2.89	31.93
8	62.69	14.33	5.79	13.13
9	51.84	3.27	9.18	27.65
10	64.64	14.84	7.03	25.38
11	86.77	24.25	5.54	19.28
12	82.98	27.48	5.21	23.35

3.3.9 特异性试验结果

特异性试验结果表明,建立的双抗体夹心 ELISA 方法只与 SAA 蛋白反应,无其它交叉反应,如图 3-7 所示。

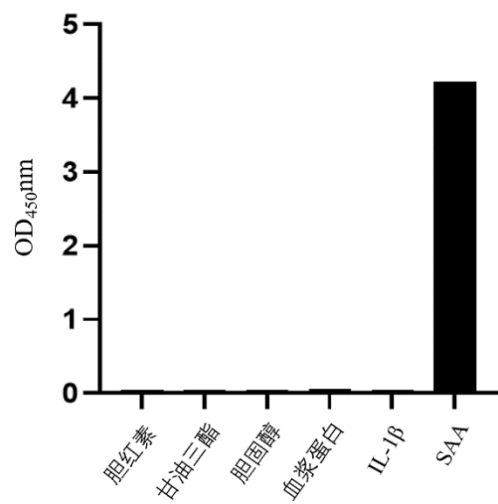


图 3-7 双抗体夹心 ELISA 特异性鉴定

Fig. 3-7 The specificity test of double antibody sandwich ELISA

3.3.10 重复性试验结果

取出 5 列同一批次包被的 ELISA 板子,按照已近建立的双抗体夹心 ELISA 方法,检测阴阳性血清和空白对照来验证该方法批内重复性。试验结果表明,该方法的批内变异系数均小于 3%,具有较好的批内重复性,如表 3-5 所示。

取出 5 列不同批次包被的 ELISA 板子,按照已近建立的双抗体夹心 ELISA 方法,检测阴阳性血清和空白对照来验证该方法批间的重复性。试验结果表明,该方法的批间变异系数均小于 4%,具有较好的批间重复性,如表 3-5 所示。

表 3-5 批内和批间重复性试验

Table 3-5 The result of inter-assay and intra-assay repeatability				
样品类型	批内重复性		批间重复性	
	M±SD	CV (%)	M±SD	CV (%)
阳性血清	3.298±0.0566	1.7	3.342±0.0708	2.1
阴性血清	0.0484±0.0011	2.4	0.0492±0.0019	3.9
空白对照	0.0424±0.0011	2.7	0.0432±0.0013	3.0

3.3.11 马 SAA 双抗体夹心 ELISA 与国外试剂盒标准曲线范围和检测血清中 SAA 浓度范围的比较

马 SAA 双抗体夹心 ELISA 标准曲线的范围是 0.01875-0.59 mg/L，国外试剂盒标准曲线的范围是 0.00225-0.072 mg/L，如 3-8 的 A 图所示。通过标准曲线计算血清中 SAA 的浓度，马 SAA 双抗体夹心 ELISA 可以检测到血清中 1.875-59 mg/L 的 SAA 蛋白，国外试剂盒可以检测到血清中 0.45-14.4 mg/L 的 SAA 蛋白，如 3-8 的 B 图所示。很明显，马 SAA 双抗体夹心 ELISA 相比于国外试剂盒，检测血清中 SAA 浓度的范围更大。

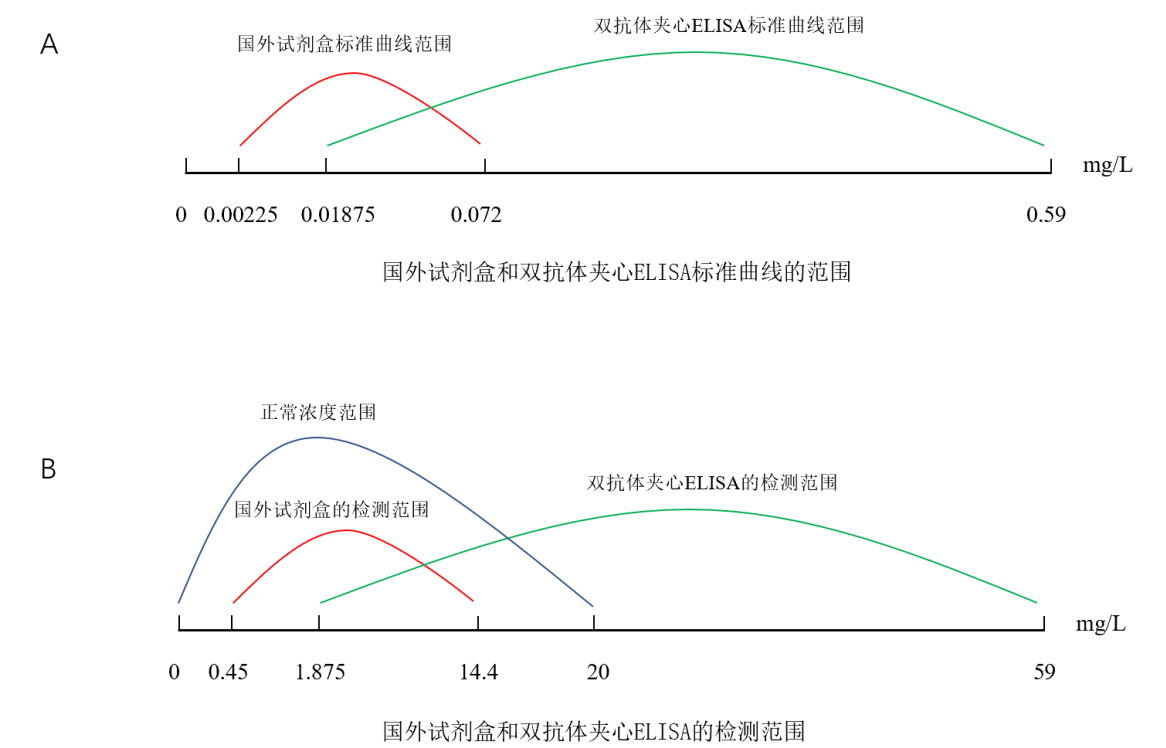


图 3-8 双抗体夹心 ELISA 与国外试剂盒标准曲线范围和血清中 SAA 检测范围的比较

Fig. 3-8 Comparison of standard curve range and serum SAA detection range between double antibody sandwich ELISA and foreign kit

3.3.12 马 SAA 双抗体夹心 ELISA 方法与国外试剂盒检测结果的符合率

通过检测 88 份马血清，马 SAA 双抗体夹心 ELISA 方法与国外试剂盒检测结果的阴阳性符合率为 100%，如表 3-6 所示。

表 3-6 双抗体夹心 ELISA 与国外试剂盒检测结果的符合率结果

Table 3-6 The coincidence rate of double antibody sandwich ELISA and foreign kit

		国外试剂盒	
		阳	阴
双抗体夹心 ELISA	阳	38	0
	阴	0	50

3.4 小结

- (1) 成功建立了马 SAA 双抗体夹心 ELISA 方法，用于 SAA 蛋白的定量检测。
- (2) 该方法具有较好的特异性、稳定性、准确性。
- (3) 马 SAA 双抗体夹心 ELISA 方法对于血清中 SAA 的检测范围要比国外试剂盒的检测范围广。

第四章 马 SAA 双抗体夹心 ELISA 方法的应用

本章主要是对马 SAA 双抗体夹心 ELISA 方法进行应用,通过检测病毒和细菌感染的血清样品,得出了 SAA 可以区分病毒和细菌感染,细菌感染 SAA 浓度一般在 600 mg/L 以上,病毒感染 SAA 浓度一般在 541 mg/L 以下。使用马 SAA 双抗体夹心 ELISA 方法检测马流感病毒和马流产沙门氏菌感染的马匹体内 SAA 浓度,找出 SAA 浓度的变化规律并分析 SAA 浓度变化与病原存在的关系。最后,也对临床样品进行了检测评价,为更好的服务于农场做准备。

4.1 材料

4.1.1 临床血清样品

马流感病毒和马流产沙门氏菌感染的马驴血清来源于哈尔滨农场,248 份临床血清样品来源于甘肃某马场。

4.1.2 主要试剂和仪器

主要试剂详见表 2-1 和表 3-1,主要仪器详见表 2-2。

4.2 实验方法

4.2.1 在马匹内区分细菌和病毒感染的 SAA 浓度值

把细菌和病毒感染的血清样品进行 100 倍、200 倍、400 倍、800 倍、1000 倍稀释,根据 OD_{450nm} 值的变化规律,找出能区分细菌和病毒感染的最佳稀释倍数,确定能区分细菌和病毒感染的稀释倍数后,把 OD_{450nm} 值代入标准曲线计算出 SAA 浓度,找出可以区分细菌和病毒感染的 SAA 浓度值。

4.2.2 马 SAA 双抗体夹心 ELISA 方法在马流感病毒感染的马匹中的初步应用

在早期的研究报告表明,马流感病毒感染马匹后,其体内的 SAA 浓度就会明显升高。通过本实验的马流感病毒荧光定量 RT-PCR 检测方法,找到 4 匹感染流感病毒的马,然后使用建立的马 SAA 双抗体夹心 ELISA 方法和国外试剂盒,对这 4 匹马体内的 SAA 浓度进行检测,找到 SAA 浓度的变化规律。

4.2.3 马 SAA 双抗体夹心 ELISA 方法在马流产沙门氏菌感染的驴中的初步应用

在一家农户的农场中,发生了一头怀孕母驴流产的事件,经过实验室检测,确诊是由马流产

沙门氏菌导致的流产，随后把厂区进行杀菌消毒，将其它驴进行隔离饲养。利用建立的马 SAA 双抗体夹心 ELISA 方法，从隔离饲养中选取 4 头没有临床表现的驴，进行 SAA 浓度的检测，找到 SAA 浓度的变化规律。

4.2.4 马 SAA 双抗体夹心 ELISA 方法在临床样品中的应用

利用马 SAA 双抗体夹心 ELISA 方法对天鸿马场的送检样品进行 SAA 浓度定量分析，将 SAA 检测结果与国外试剂盒检测的结果进行比较，并对 SAA 浓度异常的血清进行了病原的检测。

4.3 实验结果

4.3.1 区分细菌和病毒感染的 SAA 浓度值

通过不同稀释度稀释病毒和细菌感染的马血清，发现在稀释度为 1000 时，病毒感染的马血清的 OD_{450nm} 值全部小于 4，细菌感染的马血清的 OD_{450nm} 值全部大于 4，如 4-1 的 A 图所示。把 1000 倍稀释作为区分细菌和病毒感染的稀释度，将细菌和病毒感染的马血清 1000 倍稀释得到的 OD_{450nm} 代入标准曲线，得到马血清中的 SAA 浓度值，病毒感染的马血清中的 SAA 浓度最大值是 541 mg/L，细菌感染的马血清中的 SAA 浓度初步几乎都在 600 mg/L 以上，如图 4-1 的 B 图所示。根据以上的数据可以推测，对于早期疫病感染的动物而言，细菌感染时，SAA 浓度一般在 600 mg/L 以上，病毒感染时，SAA 浓度一般在 20-541 mg/L 之间。

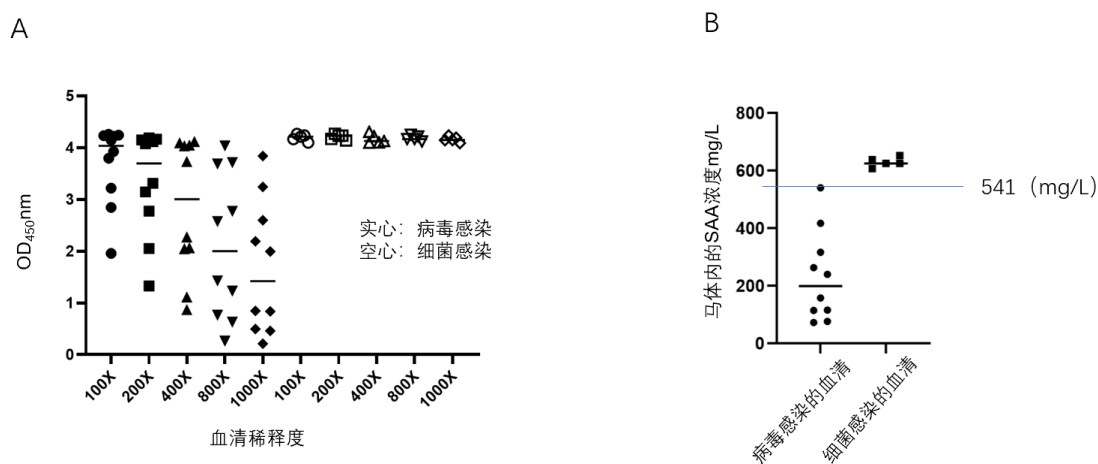


图 4-1 SAA 区分细菌和病毒感染

Fig. 4-1 SAA identifies bacterial and viral infections

A 是区分病毒和细菌感染的稀释倍数的确定；B 是区分病毒和细菌感染的 SAA 浓度的确定。

A represents the dilution to identify viral and bacterial infections, B represents the SAA concentration to identify viral and bacterial infections.

4.3.2 马 SAA 双抗体夹心 ELISA 方法在马流感病毒感染的马匹中的初步应用

马 SAA 双抗体夹心 ELISA 方法检测结果显示, 马流感病毒感染会导致马匹体内 SAA 浓度会升高。在早期的研究报告称, 马匹感染流感病毒后会引引起 SAA 浓度升高, 最高可以升到 450 mg/L 左右。使用建立的双抗体夹心 ELISA 方法去检测已经通过荧光定量 RT-PCR 确诊马流感病毒的 4 匹马血清中的 SAA 浓度。从图 4-2 可以看出, 1 和 3 号马马流感病毒检测结果与 SAA 浓度变化基本一致, 当马流感病毒存在, SAA 浓度就会升高, 当马流感病毒消除后, SAA 浓度就会迅速下降, 恢复正常水平, 虽然 2 号马马流感病毒检测结果与 SAA 浓度变化也和 1、3 号马一样, 但是 2 号马的 SAA 浓度明显超出了马流感病毒感染的范围, 4 号马不仅是 SAA 浓度超出了马流感病毒感染的范围, 而且当马流感病毒消除后, 其体内的 SAA 浓度依然处于升高水平。因此, 也只有 1 和 3 号马只有马流感病毒感染。马流感病毒感染马匹后, SAA 浓度会快速升高, 达到顶点, 而不是呈缓慢升高趋势, SAA 浓度异常的持续期一般在感染后能达到 6-9 天左右, SAA 浓度的升高与下降能较好的指示马流感病毒的存在和消除, 如图 4-2 中 1 和 3 号马所示。

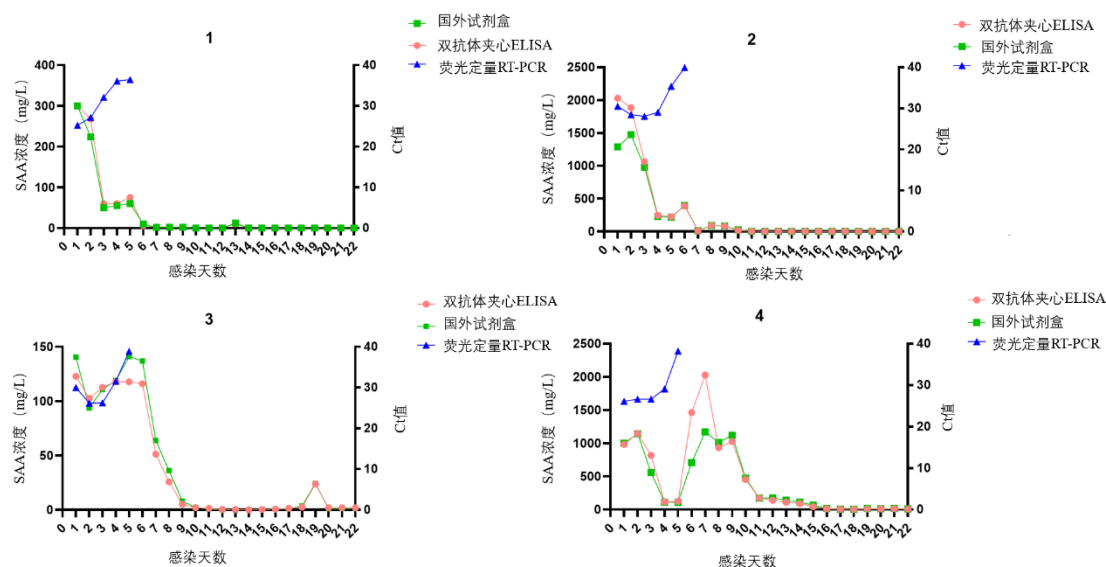


图 4-2 马流感病毒感染马匹后其体内 SAA 浓度变化情况

Fig. 4-2 The changes of SAA concentration in horses infected with equine influenza virus

4.3.3 马 SAA 双抗体夹心 ELISA 方法在马流产沙门氏菌感染的驴中的初步应用

把怀孕母驴发生流产那天当成第 0 天, 随后对其它没有临床表现的驴进行 SAA 浓度检测, 监测 SAA 浓度的升高变化。如图 4-3 所示, 4 头驴在第 0 天的时候, SAA 浓度都没有升高, 处于正常水平, 在第 1 天的时候, SAA 浓度突然急速升高到 600 mg/L 以上; 1 号驴体内 SAA 的高浓度水平持续到 8 天, 第 9 天之后 SAA 浓度开始下降, 恢复正常水平, 在第 22、23 天分离出马流产沙门氏菌; 2 号驴体内 SAA 的高浓度水平持续到第 3 天, 第 4 天 SAA 浓度开始下降, 但是第 9 天 SAA 浓度开始升高, 第 11、12 天达到顶峰, 之后 SAA 浓度就开始逐步下降, 恢复正常水平, 在第 18、22 天分离出马流产沙门氏菌; 3 号驴体内 SAA 的高浓度水平持续到第 4 天, 第 5 天后 SAA 浓度开始下降, 虽然第 6、10、20 天 SAA 浓度上升最大, 但是都没有达到顶点, 第 23 天 SAA 浓度恢复正常水平, 在第 19、20、22、23 天分离出马流产沙门氏菌; 4 号驴体内 SAA 的高浓度水平持续到第 3 天, 第 4 天 SAA 浓度开始下降, 逐步恢复正常水平, 在第 19、20、21、

23 天分离出马流产沙门氏菌。从结果来看，这 4 头驴体内 SAA 浓度升高是由马流产沙门氏菌感染导致的。

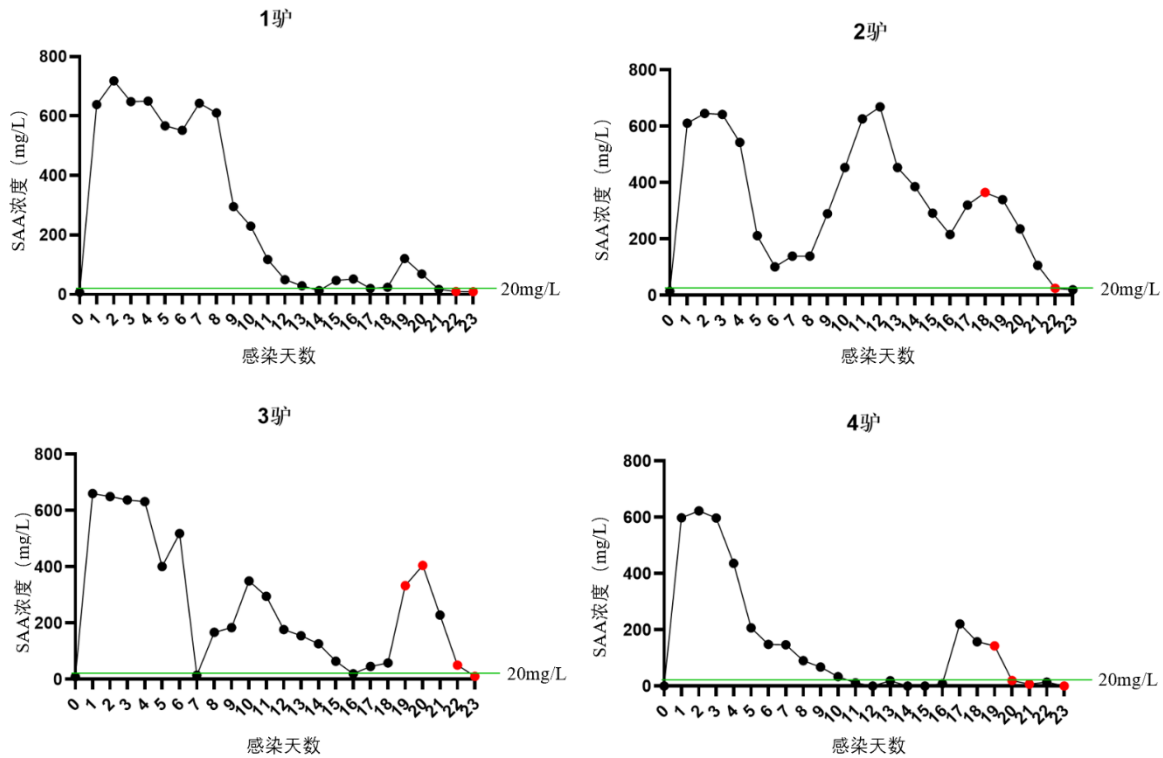


图 4-3 马流产沙门氏菌感染驴后其体内 SAA 浓度变化情况

Fig. 4-3 The changes of SAA concentration in donkeys infected with Salmonella abortus equi

红色实心圆代表驴的阴道拭子马流产沙门氏菌分离为阳性。

The red solid circle suggests that Salmonella abortus equi was isolated from a vaginal swab of the donkey.

4.3.4 马 SAA 双抗体夹心 ELISA 方法在临床样品中的应用

通过对 248 份临床样品的检测，双抗体夹心 ELISA 检测的结果与国外试剂盒检测的结果一致，SAA 浓度正常的血清有 196 份，SAA 浓度异常的血清有 52 份，如表 4-1 所示。通过对 52 匹 SAA 浓度异常的马属动物进行病原检测，其中有 40 匹是马疱疹病毒和马梨形虫核酸阳性，12 匹没有检测到常规的病原，如图 4-4 所示。

表 4-1 双抗夹心 ELISA 和国外试剂盒的临床样品的检测

Table 4-1 Detection of clinical samples of double-antibody sandwich ELISA and foreign kit

		国外试剂盒	
		SAA 浓度正常（份数）	SAA 浓度异常（份数）
双抗体夹心 ELISA	SAA 浓度正常（份数）	196	0
	SAA 浓度异常（份数）	0	52

52匹马属动物常规病原的检测

■ 马疱疹病毒和马梨形虫（40匹） ■ 无病原（12匹）

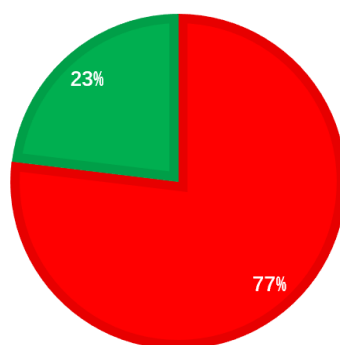


图 4-4 52 匹马属动物常规病原的检测

Fig. 4-4 Detection of common pathogens in 52 equine animals

4.4 小结

（1）找到了区分细菌和病毒感染的样品稀释倍数为 1000，在疫病早期感染时期，细菌感染 SAA 浓度一般在 600 mg/L 以上，病毒感染 SAA 浓度一般在 541 mg/L 以下。

（2）马流感病毒和马流产沙门氏菌感染会导致马属动物体内的 SAA 浓度升高。

（3）在临床样品检测中，SAA 浓度升高与病原检测的符合率高达 77%。

第五章 全文讨论

目前,主要的 APP 已经被证明可以作为机体感染和发生炎症的敏感指标 (MURATA et al., 2004; PALTRINIERI, 2008)。传统的炎症标志物 WBC 计数和纤维蛋白原具有一定的局限性, APP 的测定对感染的诊断优于 WBC 计数 (杨海波, 1992), 比如儿童的白细胞数变化大, 有些个体白细胞基数偏低和患病高龄中白细胞不能相应升高; 血浆中的纤维蛋白原是一种常用但次要的 APP, 可受炎症以外的因素影响, 这些都是 APP 要由优于传统的炎症标志物的原因。APP 中的 SAA 蛋白, 大部分哺乳动物都会在体内合成, 广泛应用于感染性疾病、炎症、肿瘤等方面的研究。SAA 蛋白是马体内的主要 APP, 目前在马匹中也得到了广泛的应用, 提出 SAA 可以作为疾病检测的早期指标, “早发现, 早隔离”, 为群体防疫做出保障; 可以区分病毒和细菌感染, 为患病动物的第一时间给药提供方向; 也可以在康复期预后监测, 评价康复期的情况, 及时发现可能存在的继发感染。

检测抗原的免疫学方法有很多, 比如双抗体夹心 ELISA、胶体金免疫层析、免疫比浊、化学发光等, 最终, 我们选择了建立双抗体夹心 ELISA, 用于 SAA 蛋白的定量检测。ELISA 方法虽然不能进行现场检测, 对环境稍微有点要求, 但是该方法技术简单、具有高通量检测的特点, 依然是实验室临床检测使用最广、最常规的检测方法之一。目前, 对于 SAA 蛋白的检测方法, ELISA 方法颇多, 已经建立了检测人、猫、犬、马体内 SAA 蛋白含量的 ELISA 方法 (KAJIKAWA et al., 1996; WADA et al., 1998; WU et al., 2007), 而且, abcam 公司上市了一款专门检测马体内 SAA 蛋白含量的试剂盒 ab205087-Horse SAA ELISA Kit。胶体金免疫层析方法凭借着高特异性、敏感性、时效性, 操作简单方便, 可以应用于临床的现场检测, 是临床诊断应用比较广的一项诊断技术。目前, 对于 SAA 蛋白的检测, 已有胶体金免疫层析的研究 (宋英林 et al., 2016; OERTLY et al., 2021), 但是胶体金适合对样品进行定性分析, 定量分析具有一定的困难。免疫比浊法也可以用于 SAA 蛋白的检测 (姜剑巍 et al., 2015), 但是该方法过于久远, 敏感性也不好, 在临床诊断中并未得到广泛的应用。化学发光法虽然检测时间短、敏感性高、检测范围宽、可以自动化等, 但该方法本底信号较高、仪器昂贵且故障率高、试剂稳定性差, 依然无法达到实验室常规的临床检测方法的要求。综合考虑, 建立一个双抗体夹心 ELISA 方法, 用于检测马体内的 SAA 蛋白是一个不错的选择。

经过细胞融合技术, 筛选到了 5 株单克隆抗体, 经过效价的比较, 发现 3H5 和 6F1 的效价水平是高于另外 3 株单克隆抗体, 如 2-8 的 A 图所示, 所以, 就选择了 3H5 和 6F1 这 2 株抗体去建立双抗体夹心 ELISA。建立的双抗体夹心 ELISA 方法, 具有较好的特异性, 重复性、准确性, 而且对血清中 SAA 蛋白的检测范围更大。对于建立一个可以进行定量分析的 ELISA, 关键在于标准曲线的建立, 在双抗体夹心 ELISA 方法中, 之所以使用 SAA 阳性血清作为标准品建立标准曲线, 是因为重组蛋白并不能满足作为标准品建立标准曲线的要求, 测得血清中 SAA 浓度与实际浓度相差甚远。使用 SAA 阳性血清作为标准品建立的标准曲线, 与国外试剂盒中的标准曲线十分的相似, 可以满足对血清中 SAA 蛋白定量检测的要求。从 3-8 的 A 图可知, 双抗体夹心 ELISA 的标准曲线范围要远远大于国外试剂盒中的标准曲线范围。标准曲线范围大, 那就说明该方法检测血清中 SAA 蛋白浓度范围也大, 正如 3-8 的 B 图所展示的那样, 国外试剂盒只能对血

清中 SAA 浓度正常的进行检测,而双抗体夹心 ELISA 不仅可以对血清中 SAA 浓度正常的进行检测,也可以对那些血清中 SAA 浓度超过正常值的进行检测。相比于国外试剂盒,双抗体夹心 ELISA 具有以下优势:(1)双抗体夹心 ELISA 的标准曲线要比国外试剂盒的标准曲线范围大。(2)如果血清中 SAA 浓度在 14.4-20 mg/L 正常范围内,国外试剂盒就不能直接检测到,给检测者一种血清中 SAA 浓度超标的感觉,需要进一步稀释去验证血清中 SAA 浓度是否超标,而双抗体夹心 ELISA 就可以直接检测到,一步到位。(3)如果血清中 SAA 浓度在 20-59 mg/L 异常范围内,国外试剂盒也是没法检测到,只能通过 2 倍、4 倍、8 倍甚至更多的稀释度去探索,才能检测出血清中 SAA 蛋白浓度,而双抗体夹心 ELISA 同样可以一步到位,检测出血清中 SAA 浓度。

通过对病毒和细菌感染的血清进行检测,找到区分病毒和细菌感染的稀释度和 SAA 浓度值。从 4-1 的 A 图可知,当样品 1000 倍稀释时,病毒感染的血清 OD_{450nm} 值都小于 4,细菌感染的血清 OD_{450nm} 值都大于 4,也就是说,样品 1000 倍稀释,就是区分病毒和细菌感染的稀释度。当样品 1000 倍稀释后,检测到一份病毒感染 SAA 浓度最高的一份血清, SAA 浓度是 541 mg/L,细菌感染血清中的 SAA 浓度基本上都在 600 mg/L 以上,如 4-1 的 B 图所示。为了能帮助养殖业准确的区分病毒和细菌感染,提供精准的给药方向,更好的为农户服务,把 SAA 浓度 600 mg/L 以上的,推测为细菌感染, SAA 浓度在 20-541 mg/L 之间,推测为病毒感染,而 SAA 浓度在 541-600mg/L 之间的,需要结合常规的疫病临床检测,判断是病毒还是细菌感染。

从图 4-2 的检测结果来看,当有马流感病毒感染机体时,在感染早期阶段,1 和 3 号马的 SAA 浓度值符合文献报道的流感病毒感染马的 SAA 浓度值,而 2 和 4 号马的 SAA 浓度值就不太符合流感病毒感染马的 SAA 浓度值,再结合马流感病毒的检测,发现当流感病毒在马的鼻拭子中检测不到后 1 和 3 号马的 SAA 浓度不再持续升高,恢复正常水平,而 2 和 4 号马体内的 SAA 浓度依然维持在高浓度,没有恢复正常水平。根据马体内的 SAA 浓度与已经报道的马流感病毒感染造成的 SAA 升高的浓度差异,再结合马流感病毒荧光定量 RT-PCR 的检测结果,推断 1 和 3 号马只存在马流感病毒的感染,而 2 和 4 号马不仅存在马流感病毒感染,还可能存在细菌感染。

从图 4-3 的检测结果来看,当马流产沙门氏菌感染机体时,在感染早期阶段,4 头驴的 SAA 浓度都达到 600 mg/L 以上,这和我们定义细菌感染时 SAA 浓度的临界值一致,更能确定了 SAA 浓度在 600 mg/L 以上是细菌感染的推测。而且,从驴的阴道拭子进行马流产沙门氏菌分离,结果为阳性,说明因为对怀孕母驴感染的马流产沙门氏菌发现不及时,造成马流产沙门氏菌在农场传播,这 4 头驴受到马流产沙门氏菌的感染。但是细菌分离阳性结果要远远晚于 SAA 浓度的升高,说明马流产沙门氏菌的排毒是晚于 SAA 浓度升高的。如果检测 SAA 浓度,就可以早期发现马流产沙门氏菌感染,在未排毒期进行隔离,及时给抗菌药物,可以最大程度的避免马流产沙门氏菌的传播,为农户减少经济损失。

无论是马流感病毒感染还是马流产沙门氏菌在感染机体后,其 SAA 浓度水平并不是一成不变的,一般呈现波形变化,先急剧升高达到最大值,然后开始下降,最后达到正常水平。因此,检测 SAA 浓度的时间也是十分重要的,如果要区分病毒和细菌感染,最好在感染的早期检测,因为随着时间的延长, SAA 浓度在体内是下降的趋势,后期检测细菌感染的血清中 SAA 浓度可能是小于 600 mg/L,落在病毒感染范围内,误认为是病毒感染。

对于临床样品的检测,双抗体夹心 ELISA 方法检测的 SAA 结果与国外试剂盒检测的 SAA 结

果一致,符合率达到 100%,之所以会出现这么高的符合率是因为在正常情况下 SAA 浓度的水平很低,浓度几乎是 0 mg/L,一旦受到疫病感染,就会以 100 倍,甚至 1000 倍的速度急速升高,SAA 的浓度远远超过正常值 20mg/L,两种检测方法均能容易的区分 SAA 浓度正常值和异常值,在 52 匹 SAA 浓度异常的马属动物中,检测到病原的有 40 匹,符合率高达 77%,正是病原导致了 SAA 浓度的升高,然而有 12 匹马属动物没有检测到常规的病原,很可能这 12 匹马属动物处于隐性感染阶段,无法检测到病原,但是,SAA 浓度已经在开始升高。

结合以前的研究报道和我们的研究成果,SAA 确实是疾病早期的敏感指标,可以用于一些疾病感染的早期检测,对疫病的防控十分重要;SAA 可以区分病毒和细菌感染,可以很好的为临床动物第一时间给药提供方向。

第六章 结论

(1) 建立了检测马血清中 SAA 蛋白浓度的双抗体夹心 ELISA 定量方法, 敏感性范围是 0.01875-0.59 mg/L; 该方法具有良好的特异性、重复性和准确性, 对血清中 SAA 蛋白浓度的检测范围为 1.875-59 mg/L, 优于国际同类产品。

(2) 对样品采用 100 倍稀释, 然后 2 倍倍比梯度稀释进行检测可对 SAA 定量分析; 对样品采用 1000 倍稀释, 直接检测时, 可初步判定样品中 SAA 的浓度对应的疫病范围。

(3) 找到了马 SAA 浓度在疫病感染早期阶段对疫病的提示范围, 病毒感染时 SAA 浓度一般在 20-541 mg/L, 细菌感染时一般高于 600 mg/L, 为临床动物第一时间给药提供方向。

(4) 双抗体夹心 ELISA 定量方法检测临床样品, 与国外试剂盒相比, SAA 浓度正常和异常样品数量的符合率均为 100%。

参考文献

- 高欣欣, 马梦男, 刘春龙, 王梦凡, 2022. 基于裸磁珠体系检测血清淀粉样蛋白 A 浓度方法的建立与效果评估. 生物技术进展, 12(02): 281-287. DOI: 10.19586/j.2095-2341.2021.0095.
- 贺沁, 周春峰, 王云龙, 明亮, 李玉林, 曹继宗, 2020. 血清淀粉样蛋白 A、C 反应蛋白荧光免疫层析联合检测方法的建立. 中国免疫学杂志, 36(02): 198-202.
- 姜剑巍, 杨宇, 应春妹, 2015. 乳胶增强免疫散射比浊法检测血清淀粉样蛋白 A 的应用评价. 检验医学, 30(01): 49-52.
- 宋英林, 赵玉环, 褚春旭, 张司晨, 张晓, 2016. 人血清淀粉样蛋白 A1 原核表达及胶体金检测方法的建立. 长春理工大学学报(自然科学版), 39(06): 134-137.
- 杨海波, 1992. C-反应蛋白测定对感染的诊断优于白细胞计数. 上海医学检验杂志, (03): 183.
- 周齐洋, 黄建荣, 陈祥, 王春新, 2019. 血清淀粉样蛋白 A 化学发光免疫检测技术开发. 生物学杂志, 36(04): 85-88.
- BACK H, PENELL J, PRINGLE J, ISAKSSON M, RONEUS N, TREIBERG BERNDTSSON L, STAHL K, 2015. A longitudinal study of poor performance and subclinical respiratory viral activity in Standardbred trotters. Vet Rec Open, 2(1): e000107. DOI: 10.1136/vetreco-2014-000107.
- BADOLATO R, WANG J M, STORNELLO S L, PONZI A N, DUSE M, MUSSO T, 2000. Serum amyloid A is an activator of PMN antimicrobial functions: induction of degranulation, phagocytosis, and enhancement of anti-Candida activity. J Leukoc Biol, 67(3): 381-386. DOI: 10.1002/jlb.67.3.381.
- BARR B, NIEMAN N M, 2022. Serum amyloid A as an aid in diagnosing sepsis in equine neonates. Equine Vet J, 54(5): 922-926. DOI: 10.1111/evj.13540.
- BAUMANN H, GAULDIE J, 1994. The acute phase response. Immunol Today, 15(2): 74-80. DOI: 1016/0167-5699(94)90137-6.
- BIRMINGHAM S S W, MASON R M, 2019. The Effect of Sedation, Oral Examination, and Odontoplasty on Systemic Inflammation as Measured by Serum Amyloid A in the Adult Performance Horse. J Vet Dent, 36(3): 198-201. DOI: 10.1177/0898756419893577.
- BRACONI D, GIUSTARINI D, MARZOCCHI B, PERUZZI L, MARGOLICCI M, ROSSI R, BERNARDINI G, MILLUCCI L, GALLAGHER J A, LE QUAN SANG K H, IMRICH R, ROVENSKY J, AL-SBOU M, RANGANATH L R, SANTUCCIA, 2018. Inflammatory and oxidative stress biomarkers in alkaptonuria: data from the DevelopAKUre project. Osteoarthritis Cartilage, 26(8): 1078-1086. DOI: 10.1016/j.joca.2018.05.017.
- BULLONE M, DE LAGARDE M, VARGAS A, LAVOIE J P, 2015. Serum Surfactant Protein D and Haptoglobin as Potential Biomarkers for Inflammatory Airway Disease in Horses. J Vet Intern Med, 29(6): 1707-1711. DOI: 10.1111/jvim.13602.
- BUNDGAARD L, BENDIXEN E, SORENSEN M A, HARMAN V M, BEYNON R J, PETERSEN L J, JACOBSEN S, 2016. A selected reaction monitoring-based analysis of acute phase proteins in interstitial fluids from experimental equine wounds healing by secondary intention. Wound Repair

- Regen, 24(3): 525-532. DOI: 10.1111/wrr.12425.
- CANISSO I F, BALL B A, CRAY C, WILLIAMS N M, SCOGGIN K E, DAVOLLI G M, SQUIRES E L, TROEDSSON M H, 2014. Serum amyloid A and haptoglobin concentrations are increased in plasma of mares with ascending placentitis in the absence of changes in peripheral leukocyte counts or fibrinogen concentration. *Am J Reprod Immunol*, 72(4): 376-385. DOI: 10.1111/aji.12278.
- CERON J J, ECKERSALL P D, MARTYNEZ-SUBIELA S, 2005. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet Clin Pathol*, 34(2): 85-99. DOI: 10.1111/j.1939-165x.2005.tb00019.x.
- CHRISTOFFERSEN M, BAAGOE C D, JACOBSEN S, BOJESSEN A M, PETERSEN M R, LEHN-JENSEN H, 2010. Evaluation of the systemic acute phase response and endometrial gene expression of serum amyloid A and pro- and anti-inflammatory cytokines in mares with experimentally induced endometritis. *Vet Immunol Immunopathol*, 138(1-2): 95-105. DOI: 10.1016/j.vetimm.2010.07.011.
- CHRISTOFFERSEN M, WOODWARD E, BOJESSEN A M, JACOBSEN S, PETERSEN M R, TROEDSSON M H, LEHN-JENSEN H, 2012. Inflammatory responses to induced infectious endometritis in mares resistant or susceptible to persistent endometritis. *BMC Vet Res*, 841. DOI: 10.1186/1746-6148-8-41.
- CONNOLLY M, MULLAN R H, MCCORMICK J, MATTHEWS C, SULLIVAN O, KENNEDY A, FITZGERALD O, POOLE A R, BRESNIHAN B, VEALE D J, FEARON U, 2012. Acute-phase serum amyloid A regulates tumor necrosis factor alpha and matrix turnover and predicts disease progression in patients with inflammatory arthritis before and after biologic therapy. *Arthritis Rheum*, 64(4): 1035-1045. DOI: 10.1002/art.33455.
- COUTINHO DA SILVA M A, CANISSO I F, MACPHERSON M L, JOHNSON A E, DIVERS T J, 2013. Serum amyloid A concentration in healthy periparturient mares and mares with ascending placentitis. *Equine Vet J*, 45(5): 619-624. DOI: 10.1111/evj.12034.
- CRAY C, ZAIAS J, ALTMAN N H, 2009. Acute phase response in animals: a review. *Comparative Medicine*, 59(6): 517-526.
- CROOKENDEN M A, BURKE C R, MITCHELL M D, PHYN C V C, ROCHE J R, HEISER A, 2023. Effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the inflammatory response of bovine endometrial epithelial cells in vitro. *J Dairy Sci*, DOI: 10.3168/jds.2021-21742.
- CYWINSKA A, GORECKA R, SZARSKA E, WITKOWSKI L, DZIEKAN P, SCHOLLENBERGER A, 2010. Serum amyloid A level as a potential indicator of the status of endurance horses. *Equine Vet J Suppl*, (38): 23-27. DOI: 10.1111/j.2042-3306.2010.00280.x.
- CYWINSKA A, SZARSKA E, GORECKA R, WITKOWSKI L, HECOLD M, BEREZNOWSKI A, SCHOLLENBERGER A, WINNICKA A, 2012. Acute phase protein concentrations after limited distance and long distance endurance rides in horses. *Res Vet Sci*, 93(3): 1402-1406. DOI: 10.1016/j.rvsc.2012.02.008.
- CYWINSKA A, WITKOWSKI L, SZARSKA E, SCHOLLENBERGER A, WINNICKA A, 2013. Serum

- amyloid A (SAA) concentration after training sessions in Arabian race and endurance horses. *BMC Vet Res*, 991. DOI: 10.1186/1746-6148-9-91.
- DANIEL A J, LEISE B S, BURGESS B A, MORLEY P S, CLONINGER M, HASSEL D M, 2016. Concentrations of serum amyloid A and plasma fibrinogen in horses undergoing emergency abdominal surgery. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*, 26(3): 344-351. DOI: 10.1111/vec.12365.
- DONDI F, LUKACS R M, GENTILINI F, RINNOVATI R, SPADARI A, ROMAGNOLI N, 2015. Serum amyloid A, haptoglobin, and ferritin in horses with colic: Association with common clinicopathological variables and short-term outcome. *Vet J*, 205(1): 50-55. DOI: 10.1016/j.tvjl.2015.03.015.
- EL-BAHR S M, EL-DEEB W M, 2016. Acute-phase proteins, oxidative stress biomarkers, proinflammatory cytokines, and cardiac troponin in Arabian mares affected with pyometra. *Theriogenology*, 86(4): 1132-1136. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2016.04.002.
- EROLE, JACKSON C, HOROHOV D, LOCKE S, SMITH J, CARTER C, 2016. Elevated serum amyloid A levels in cases of aborted equine fetuses due to fetal and placental infections. *Theriogenology*, 86(4): 971-975. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2016.03.021.
- HALTMAYER E, SCHWENDENWEIN I, LICKA T F, 2017. Course of serum amyloid A (SAA) plasma concentrations in horses undergoing surgery for injuries penetrating synovial structures, an observational clinical study. *BMC Vet Res*, 13(1): 137. DOI: 10.1186/s12917-017-1057-9.
- HULTEN C, DEMMERS S, 2002. Serum amyloid A (SAA) as an aid in the management of infectious disease in the foal: comparison with total leucocyte count, neutrophil count and fibrinogen. *Equine Vet J*, 34(7): 693-698. DOI: 10.2746/042516402776250360.
- HULTEN C, SANDGREN B, SKIOLDEBRAND E, KLINGEBORN B, MARHAUG G, FORSBERG M, 1999. The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as an inflammatory marker in equine influenza virus infection. *Acta Vet Scand*, 40(4): 323-333. DOI: 10.1186/BF03547012.
- HULTEN C, TULAMO R M, SUOMINEN M M, BURVALL K, MARHAUG G, FORSBERG M, 1999. A non-competitive chemiluminescence enzyme immunoassay for the equine acute phase protein serum amyloid A (SAA) -- a clinically useful inflammatory marker in the horse. *Vet Immunol Immunopathol*, 68(2-4): 267-281. DOI: 10.1016/s0165-2427(99)00027-6.
- HUSBY G, NATVIG J B, 1974. A serum component related to nonimmunoglobulin amyloid protein AS, a possible precursor of the fibrils. *J Clin Invest*, 53(4): 1054-1061. DOI: 10.1172/JCI107642.
- HUSEBEKK A, HUSBY G, SLETTEN K, MARHAUG G, NORDSTOGA K, 1986. Characterization of amyloid protein AA and its serum precursor SAA in the horse. *Scand J Immunol*, 23(6): 703-709. DOI: 10.1111/j.1365-3083.1986.tb02007.x.
- JACOBSEN S, KJELGAARD-HANSEN M, HAGBARD PETERSEN H, JENSEN A L, 2006. Evaluation of a commercially available human serum amyloid A (SAA) turbidometric immunoassay for determination of equine SAA concentrations. *Vet J*, 172(2): 315-319. DOI: 10.1016/j.tvjl.2005.04.021.

- JACOBSEN S, LADEFOGED S, BERG L C, 2016. Production of serum amyloid A in equine articular chondrocytes and fibroblast-like synoviocytes treated with proinflammatory cytokines and its effects on the two cell types in culture. *Am J Vet Res*, 77(1): 50-58. DOI: 10.2460/ajvr.77.1.50.
- JACOBSEN S, NIELSEN J V, KJELGAARD-HANSEN M, TOELBOELL T, FJELDBORG J, HALLING-THOMSEN M, MARTINUSSEN T, THOEFNER M B, 2009. Acute phase response to surgery of varying intensity in horses: a preliminary study. *Vet Surg*, 38(6): 762-769. DOI: 10.1111/j.1532-950X.2009.00564.x.
- JACOBSEN S, NIEWOLD T A, HALLING-THOMSEN M, NANNI S, OLSEN E, LINDEGAARD C, ANDERSEN P H, 2006. Serum amyloid A isoforms in serum and synovial fluid in horses with lipopolysaccharide-induced arthritis. *Vet Immunol Immunopathol*, 110(3-4): 325-330. DOI: 10.1016/j.vetimm.2005.10.012.
- KAJIKAWA T, FURUTA A, ONISHI T, SUGII S, 1996. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of feline serum amyloid A protein by use of immunological cross-reactivity of polyclonal anti-canine serum amyloid A protein antibody. *J Vet Med Sci*, 58(11): 1141-1143. DOI: 10.1292/jvms.58.11_1141.
- KJELGAARD-HANSEN M, JACOBSEN S, 2011. Assay validation and diagnostic applications of major acute-phase protein testing in companion animals. *Clin Lab Med*, 31(1): 51-70. DOI: 10.1016/j.cll.2010.10.002.
- KRAKOWSKI L, KRAWCZYK C H, KOSTRO K, STEFANIAK T, NOVOTNY F, OBARA J, 2011. Serum levels of acute phase proteins: SAA, Hp and progesterone (P4) in mares with early embryonic death. *Reprod Domest Anim*, 46(4): 624-629. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2010.01715.x.
- KUSHNER I, 1982. The phenomenon of the acute phase response. *Ann N Y Acad Sci*, 389:39-48. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1982.tb22124.x.
- LABELLE A L, HAMOR R E, MACNEILL A L, LASCOLA K M, BREAUX C B, TOLAR E L, 2011. Effects of ophthalmic disease on concentrations of plasma fibrinogen and serum amyloid A in the horse. *Equine Vet J*, 43(4): 460-465. DOI: 10.1111/j.2042-3306.2010.00305.x.
- LECLERE M, LAVOIE-LAMOUREUX A, LAVOIE J P, 2015. Acute phase proteins in racehorses with inflammatory airway disease. *J Vet Intern Med*, 29(3): 940-945. DOI: 10.1111/jvim.12587.
- LEVIN M, FRANKLIN E C, FRANGIONE B, PRAS M, 1972. The amino acid sequence of a major nonimmunoglobulin component of some amyloid fibrils. *J Clin Invest*, 51(10): 2773-2776. DOI: 10.1172/JCI107098.
- LINKE R P, SIPE J D, POLLOCK P S, IGNACZAK T F, GLENNER G G, 1975. Isolation of a low-molecular-weight serum component antigenically related to an amyloid fibril protein of unknown origin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 72(4): 1473-1476. DOI: 10.1073/pnas.72.4.1473.
- LONG A, NOLEN-WALSTON R, 2020. Equine Inflammatory Markers in the Twenty-First Century: A Focus on Serum Amyloid A. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 36(1): 147-160. DOI: 10.1016/j.cveq.2019.12.005.

- LU J, YU Y, ZHU I, CHENG Y, SUN P D, 2014. Structural mechanism of serum amyloid A-mediated inflammatory amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111(14): 5189-5194. DOI: 10.1073/pnas.1322357111.
- LUDWIG E K, BRANDON WIESE R, GRAHAM M R, TYLER A J, SETTLAGE J M, WERRE S R, PETERSSON-WOLFE C S, KANEVSKY-MULLARKY I, DAHLGREN L A, 2016. Serum and Synovial Fluid Serum Amyloid A Response in Equine Models of Synovitis and Septic Arthritis. *Vet Surg*, 45(7): 859-867. DOI: 10.1111/vsu.12531.
- MA K L, ZHANG Y, LIU J, WU Y, HU Z B, RUAN X Z, LIU B C, 2014. Establishment of an inflamed animal model of diabetic nephropathy. *Int J Biol Sci*, 10(2): 149-159. DOI: 10.7150/ijbs.7875.
- MEEK R L, HOFFMAN J S, BENDITT E P, 1986. Amyloidogenesis. One serum amyloid A isotype is selectively removed from the circulation. *J Exp Med*, 163(3): 499-510. DOI: 10.1084/jem.163.3.499.
- MEEKER A K, SACK G H, JR., 1998. A fusion protein between serum amyloid A and staphylococcal nuclease--synthesis, purification, and structural studies. *Proteins*, 30(4): 381-387.
- MURATA H, SHIMADA N, YOSHIOKA M, 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet J*, 168(1): 28-40. DOI: 10.1016/S1090-0233(03)00119-9.
- NEMOTO M, OUE Y, MORITA Y, KANNO T, KINOSHITA Y, NIWA H, UENO T, KATAYAMA Y, BANNAI H, TSUJIMURA K, YAMANAKA T, KONDO T, 2014. Experimental inoculation of equine coronavirus into Japanese draft horses. *Arch Virol*, 159(12): 3329-3334. DOI: 10.1007/s00705-014-2205-1.
- NUNOKAWA Y, FUJINAGA T, TAIRA T, OKUMURA M, YAMASHITA K, TSUNODA N, HAGIO M, 1993. Evaluation of serum amyloid A protein as an acute-phase reactive protein in horses. *J Vet Med Sci*, 55(6): 1011-1016. DOI: 10.1292/jvms.55.1011.
- OERTLY M, GERBER V, ANHOLD H, CHAN D S, PUSTERLA N, 2021. The Accuracy of Serum Amyloid A in Determining Early Inflammation in Horses After Long-Distance Transportation by Air. *J Equine Vet Sci*, 97: 103337. DOI: 10.1016/j.jevs.2020.103337.
- PALTRINIERI S, 2008. The feline acute phase reaction. *Vet J*, 177(1): 26-35. DOI: 10.1016/j.tvjl.2007.06.005.
- PIHL T H, SCHEEPERS E, SANZ M, GODDARD A, PAGE P, TOFT N, ANDERSEN P H, JACOBSEN S, 2015. Influence of disease process and duration on acute phase proteins in serum and peritoneal fluid of horses with colic. *J Vet Intern Med*, 29(2): 651-658. DOI: 10.1111/jvim.12542.
- PIHL T H, SCHEEPERS E, SANZ M, GODDARD A, PAGE P, TOFT N, KJELGAARD-HANSEN M, ANDERSEN P H, JACOBSEN S, 2016. Acute-phase proteins as diagnostic markers in horses with colic. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*, 26(5): 664-674. DOI: 10.1111/vec.12504.
- POLLOCK P J, PRENDERGAST M, SCHUMACHER J, BELLENGER C R, 2005. Effects of surgery on the acute phase response in clinically normal and diseased horses. *Vet Rec*, 156(17): 538-542. DOI: 10.1136/vr.156.17.538.
- POMORSKA-MOL M, LIBERA K, LARSKA M, KRZYSIAK M K, 2022. Acute-phase protein

- concentrations in serum of clinically healthy and diseased European bison (*Bison bonasus*) - preliminary study. *BMC Vet Res*, 18(1): 28. DOI: 10.1186/s12917-021-03133-z.
- PRELLI F, PRAS M, FRANGIONE B, 1987. Degradation and deposition of amyloid AA fibrils are tissue specific. *Biochemistry*, 26(25): 8251-8256. DOI: 10.1021/bi00399a035.
- ROBINSON C S, SINGER E R, PIVIANI M, RUBIO-MARTINEZ L M, 2017. Are serum amyloid A or D-lactate useful to diagnose synovial contamination or sepsis in horses? *Vet Rec*, 181(16): 425. DOI: 10.1136/vr.104386.
- SANCHEZ-TERAN A F, BRACAMONTE J L, HENDRICK S, BURGUESS H J, DUKE-NOVAKOVSKI T, SCHOTT M, HOFF B, RUBIO-MARTINEZ L M, 2016. Effect of Arthroscopic Lavage on Systemic and Synovial Fluid Serum Amyloid A in Healthy Horses. *Vet Surg*, 45(2): 223-230. DOI: 10.1111/vsu.12439.
- SANCHEZ TERAN A F, RUBIO-MARTINEZ L M, VILLARINO N F, SANZ M G, 2012. Effects of repeated intra-articular administration of amikacin on serum amyloid A, total protein and nucleated cell count in synovial fluid from healthy horses. *Equine Vet J Suppl*, (43): 12-16. DOI: 10.1111/j.2042-3306.2012.00637.x.
- SASAKI K, FUJITA I, HAMASAKI Y, MIYAZAKI S, 2002. Differentiating between bacterial and viral infection by measuring both C-reactive protein and 2'-5'-oligoadenylate synthetase as inflammatory markers. *J Infect Chemother*, 8(1): 76-80. DOI: 10.1007/s101560200010.
- SATOH M, FUJINAGA T, OKUMURA M, HAGIO M, 1995. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for quantitative measurement of serum amyloid A protein in horses. *Am J Vet Res*, 56(10): 1286-1291.
- SIKORA M, KROL J, NOWAK M, STEFANIAK T, AUBERTSSON G, KOZDROWSKI R, 2016. The usefulness of uterine lavage and acute phase protein levels as a diagnostic tool for subclinical endometritis in Icelandic mares. *Acta Vet Scand*, 58(1): 50. DOI: 10.1186/s13028-016-0233-4.
- STONEHAM S J, PALMER L, CASH R, ROSSDALE P D, 2001. Measurement of serum amyloid A in the neonatal foal using a latex agglutination immunoturbidimetric assay: determination of the normal range, variation with age and response to disease. *Equine Vet J*, 33(6): 599-603. DOI: 10.2746/042516401776563472.
- THURSTON C C, STEFANOVSKI D, MACKINNON M C, CHAPMAN H S, RICHARDSON D W, LEVINE D G, 2022. Serum amyloid A and fibrinogen as markers for early detection of surgical site infection associated with internal fixation in the horse. *Front Vet Sci*, 9: 960865. DOI: 10.3389/fvets.2022.960865.
- TRAUTWEIN C, BÖKER K, MANNS M, 1994. Hepatocyte and immune system: acute phase reaction as a contribution to early defence mechanisms. *Gut*, 35(9): 1163-1166. DOI: 10.1136/gut.35.9.1163.
- TUPPITS U, ORRO T, EINARSSON S, KASK K, KAVAK A, 2014. Influence of the uterine inflammatory response after insemination with frozen-thawed semen on serum concentrations of acute phase proteins in mares. *Anim Reprod Sci*, 146(3-4): 182-186. DOI:

- 10.1016/j.anireprosci.2014.02.007.
- TURLO A, CYWINSKA A, CZOPOWICZ M, WITKOWSKI L, NIEDZWIEDZ A, SLOWIKOWSKA M, BOROWICZ H, JASKIEWICZ A, WINNICKA A, 2015. The Effect of Different Types of Musculoskeletal Injuries on Blood Concentration of Serum Amyloid A in Thoroughbred Racehorses. *PLoS One*, 10(10): e0140673. DOI: 10.1371/journal.pone.0140673.
- TURLO A, CYWINSKA A, CZOPOWICZ M, WITKOWSKI L, SZARSKA E, WINNICKA A, 2015. Post-exercise dynamics of serum amyloid A blood concentration in thoroughbred horses classified as injured and non-injured after the race. *Res Vet Sci*, 100: 223-225. DOI: 10.1016/j.rvsc.2015.04.008.
- TURNELL W, SARRA R, GLOVER I D, BAUM J O, CASPI D, BALTZ M L, PEPYS M B, 1986. Secondary structure prediction of human SAA1. Presumptive identification of calcium and lipid binding sites. *Mol Biol Med*, 3(5): 387-407.
- VALLE E, ZANATTA R, ODETTI P, TRAVERSO N, FURFARO A, BERGERO D, BADINO P, GIRARDI C, MINISCALCO B, BERGAGNA S, TARANTOLA M, INTORRE L, ODORE R, 2015. Effects of competition on acute phase proteins and lymphocyte subpopulations - oxidative stress markers in eventing horses. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, 99(5): 856-863. DOI: 10.1111/jpn.12289.
- VANDENPLAS M L, MOORE J N, BARTON M H, ROUSSEL A J, COHEN N D, 2005. Concentrations of serum amyloid A and lipopolysaccharide-binding protein in horses with colic. *Am J Vet Res*, 66(9): 1509-1516. DOI: 10.2460/ajvr.2005.66.1509.
- WADA A, YAMADA T, ITOH Y, ITOH K, 1998. [Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for human serum amyloid A (SAA) and application to clearance study]. *Rinsho Byori*, 46(12): 1252-1257.
- WESTERMAN T L, TORNQUIST S J, FOSTER C M, POULSEN K P, 2015. Evaluation of serum amyloid A and haptoglobin concentrations as prognostic indicators for horses with inflammatory disease examined at a tertiary care hospital. *Am J Vet Res*, 76(10): 882-888. DOI: 10.2460/ajvr.76.10.882.
- WITKOWSKA-PILASZEWICZ OD, ZMIGRODZKA M, WINNICKA A, MISKIEWICZ A, STRZELEC K, CYWINSKA A, 2019. Serum amyloid A in equine health and disease. *Equine Vet J*, 51(3): 293-298. DOI: 10.1111/evj.13062.
- WU T L, TSAI I C, CHANG P Y, TSAO K C, SUN C F, WU L L, WU J T, 2007. Establishment of an in-house ELISA and the reference range for serum amyloid A (SAA): complementarity between SAA and C-reactive protein as markers of inflammation. *Clin Chim Acta*, 376(1-2): 72-76. DOI: 10.1016/j.cca.2006.07.012.
- YE R D, SUN L, 2015. Emerging functions of serum amyloid A in inflammation. *J Leukoc Biol*, 98(6): 923-929. DOI: 10.1189/jlb.3VMR0315-080R.
- YOO J Y, DESIDERIO S, 2003. Innate and acquired immunity intersect in a global view of the acute-phase response. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(3): 1157-1162. DOI: 10.1073/pnas.0336385100.