

抗鸭副粘病毒单克隆抗体的制备及其特性鉴定

程晓霞^{1,2}, 朱小丽^{1,2}, 陈少莺^{1,2}, 王 劭^{1,2}, 陈仕龙^{1,2}, 林锋强^{1,2}, 李兆龙^{1,2}

(1 福建省农业科学院 畜牧兽医研究所, 福建 福州 350013; 2 福建省畜禽疫病防治工程技术研究中心, 福建 福州 350013)

【摘要】【目的】制备抗鸭副粘病毒(DPMV)的单克隆抗体,为鸭副粘病毒病免疫学诊断方法的建立奠定基础。**【方法】**采用差速和蔗糖不连续密度梯度离心法提纯 DPMV,免疫 BALB/c 小鼠,取脾细胞与骨髓瘤细胞株 SP2/0 融合,采用间接 ELISA、间接免疫荧光试验(IFA)和血凝抑制(HI)试验等方法筛选阳性杂交瘤细胞株,并测定其生物学特性。**【结果】**筛选到 7 株能稳定分泌抗 DPMV 单克隆抗体的杂交瘤细胞株,分别命名为 J28、F4、B3、E39、E41、A12 和 A30。这 7 株单克隆抗体都具有 ELISA 和 IFA 特性,其中 J28 和 F4 还具有 HI 和中和特性。免疫球蛋白亚类测定结果显示,J28 和 F4 均为 IgG1,其他 5 株均为 IgM。相加 ELISA 试验结果显示,单抗 B3、J28 与 F4、A30 与 E39/E41/A12 分别识别 3 个不同的抗原位点。特异性测定结果显示,7 株单克隆抗体与雏番鸭细小病毒(MPV)、鹅细小病毒(GPV)、鸭肝炎病毒(DHV)、番鸭呼肠孤病毒(MDRV)及正常细胞均无交叉反应。**【结论】**筛选出了 7 株具有 ELISA、IFA 等特性且分泌抗 DPMV 单克隆抗体的杂交瘤细胞株,并明确了各株单克隆抗体的特性,为鸭副粘病毒病的免疫治疗和临床诊断奠定了基础。

【关键词】 鸭源副粘病毒;单克隆抗体;ELISA;IFA;HI

【中图分类号】 S858.32

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2011)02-0054-05

Preparation and characterization of monoclonal antibodies against duck paramyxovirus infection

CHENG Xiao-xia^{1,2}, ZHU Xiao-li^{1,2}, CHEN Shao-ying^{1,2}, WANG Shao^{1,2},
CHEN Shi-long^{1,2}, LIN Feng-qiang^{1,2}, LI Zhao-long^{1,2}

(1 Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350013, China;

2 Fujian Animal Diseases Control Technology Development Center, Fuzhou, Fujian 350013, China)

Abstract: **【Objective】** The paper was to obtain monoclonal antibodies against duck paramyxovirus for further application to clinic test. **【Method】** Duck paramyxovirus was propagated in chicken embryo and purified by differential centrifugation and discontinuous sucrose density gradient centrifugation. The spleen cells of Balb/c mice immunized with purified viral antigen were fused with SP2/0 myeloma cells. Hybridoma cell lines secreting monoclonal antibodies against duck paramyxovirus were screened by using indirect ELISA, IFA and HI. The specificities of these monoclonal antibodies were determined by immunoglobulin G subclass and ELISA. **【Result】** Seven monoclonal antibodies against duck paramyxovirus were obtained using hybridoma technique. They were designated as J28, F4, B3, E39, E41, A12 and A30. These McAbs all had ELISA and IFA activity, and two of them J28 and F4 had HI and neutralizing activity. The isotyping analysis showed that both J28 and F4 belonged to IgG1, and others belonged to IgM. It was found by ELISA additivity test that the seven McAbs recognized three different antigenic sites, in which, the epitopes of J28 and F4, E39, E41, A12 and A30 were very close, respectively, and the epitope of B3 was solely. Result of

* [收稿日期] 2010-06-16

[基金项目] 福建省农业科学院动物传染病创新团队资助项目(STIF-Y02)

[作者简介] 程晓霞(1972—),女,福建福州人,助理研究员,主要从事动物传染病免疫学研究。E-mail:cxjljy@126.com

[通信作者] 陈少莺(1962—),女,福建长乐人,研究员,主要从事动物传染病病原与防治研究。E-mail:chensy58@163.com

specificity test indicated that all these monoclonal antibodies were specific to duck paramyxovirus (DPMV), and did not react with Muscovy duck parvovirus (MPV), Goose parvovirus (GPV), Duck hepatitis virus (DHV), and Muscovy duck reovirus (MDRV). 【Conclusion】 The DPMV McAbs were successfully prepared, which could provide a good foundation for further research on the immune therapy and clinical diagnosis.

Key words: duck paramyxovirus; monoclonal antibody; ELISA; IFA; HI

鸭副粘病毒病是近年新出现的一种鸭病毒性传染病,其病原为血清 I 型禽副粘病毒,属于副粘病毒科、副粘病毒亚科、腮腺炎病毒属,病毒粒子直径为 100~200 nm,有囊膜,呈圆形、椭圆形、球拍形、杆状等多种形态,表面具有密集纤突。禽副粘病毒感染鸟类的宿主范围很广,目前可自然或人工感染该病毒的鸟类多达 256 种^[1-4]。以往的研究表明,水禽对致病性 I 型禽副粘病毒 (APMV-I) 具有极强的抵抗力,即使感染也很少表现或不表现临床症状^[5],仅表现为健康带毒,极少有自然感染引发大批发病与死亡的报道^[6]。但 1998 年以来,在我国水禽饲养密集和水陆禽混养的地区,先后发现了鹅副粘病毒病^[7-10]和鸭副粘病毒病^[11-12],给水禽养殖业造成一定的经济损失。制备抗鸭副粘病毒 (DPMV) 的特异性单克隆抗体,可为禽副粘病毒抗原性分析及建立快速免疫诊断方法奠定基础。本研究利用杂交瘤技术筛选到能稳定分泌抗 DPMV 单克隆抗体的杂交瘤细胞株,并对单克隆抗体的特性进行了鉴定,现将结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 病毒、试验动物和细胞 DPMV LG 株、番鸭细小病毒 (MPV)、鹅细小病毒 (GPV)、鸭肝炎病毒 (DHV)、番鸭呼肠孤病毒 (MDRV) 及骨髓瘤细胞株 SP2/0,均由福建省农业科学院畜牧兽医研究所动物病毒研究室保存;9 日龄 SPF 鸡胚,购自大北农福州有限公司;番鸭胚,购自福州山区番鸭场;8~10 周龄 Balb/c 小鼠,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司;鸡胚成纤维细胞 (CEF) 和番鸭胚成纤维细胞 (MDEF),按常规方法制备。

1.1.2 主要试剂 聚乙二醇 (PEG4000),改良 Eagle 培养基 (DMEM),次黄嘌呤、氨基喋呤、胸腺嘧啶核苷酸培养基 (HAT),次黄嘌呤、胸腺嘧啶核苷酸培养基 (HT),羊抗鼠 Ig-HRP,兔抗羊 IgG-HRP,单克隆抗体亚级份检测试剂盒,均购自 Sigma 公司;羊抗鼠 IgG-FITC,购自博士德生物工程有限公司;

新生牛血清,购自杭州四季青生物材料有限公司;弗氏完全佐剂和不完全佐剂,购自 Gibco 公司。

1.2 病毒的增殖和纯化

将 DPMV LG 株经尿囊腔接种 9 日龄 SPF 鸡胚,每枚 0.1 mL,37 ℃ 孵育,每日照胚 2 次,弃去 24 h 内的死胚,胚胎濒死时将其置 4 ℃ 冰箱 4 h 以上,收获胚液,5 000 r/min 离心 30 min,取上清液于 35 000 r/min 离心 80 min,弃上清液,用少量 pH 7.2、0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液重悬沉淀物,即得粗提抗原,用于 ELISA 包被。取粗提抗原平铺于 PBS 配制的 150~550 g/L 不连续蔗糖密度梯度上,27 000 r/min 离心 150 min,收集病毒条带,重悬于 PBS 中,30 000 r/min 离心 90 min,洗脱蔗糖,将沉淀重悬于少许 PBS 中即得纯化病毒抗原。Commassia R-250 法测定蛋白含量后置 -70 ℃ 冰箱保存,供免疫 Balb/c 小鼠用。

1.3 病毒感染细胞板的制备及间接免疫荧光试验 (IFA)

按文献[13]方法进行,当 DPMV LG 株在单层 96 孔鸡胚成纤维细胞上病变达 30% 时,用甲醇固定,即为 IFA 试验用抗原。检测时添加杂交瘤细胞培养上清液为第一抗体,第二抗体为羊抗鼠 IgG-FITC。将试验结果于倒置荧光显微镜 (OLYMPUS 型) 下观察。

1.4 间接 ELISA 试验

参照文献[14]的方法进行。将粗提抗原按照预先测定的最佳包被量 (20 μg/mL,每孔 50 μL) 包被聚苯乙烯平底微孔板 (Costar 产品),4 ℃ 过夜,洗涤并封闭后,加第一抗体 (杂交瘤细胞培养上清液),于 37 ℃ 孵育 1 h,洗涤后加第二抗体 (羊抗鼠 Ig-HRP),于 37 ℃ 孵育 1 h,洗涤后加底物联苯二胺 (OPD) 显色,2 mol/L H₂SO₄ 终止反应,置酶标仪 (ELX800uv 型) 上测定 490 nm 处吸光度 (OD₄₉₀)。

1.5 血凝抑制 (HI) 试验

操作程序按世界动物卫生组织 (OIE) 标准进行。

1.6 Balb/c 小鼠的免疫

对 Balb/c 小鼠进行长程免疫和短程免疫。长

程免疫用纯化病毒抗原免疫 8 周龄雌性 Balb/c 小鼠,共免疫 3 次,每次间隔 2 周,第 1 次免疫抗原加等量弗氏完全佐剂,后 2 次免疫抗原加等量弗氏不完全佐剂,免疫剂量均为 $100 \mu\text{g}/\text{只}$,免疫途径为颈背部多点皮下注射。当血清 HI 抗体效价达 2^{10} 以上时,于融合前 3 d 进行加强免疫,即直接在腹腔注射抗原, $100 \mu\text{g}/\text{只}$ 。短程免疫于融合前 3 d 用纯化的病毒抗原对 8 周龄雌性 Balb/c 小鼠直接脾脏免疫,免疫剂量为 $100 \mu\text{g}/\text{只}$ 。

1.7 细胞融合及阳性杂交瘤细胞的筛选、克隆

无菌条件下取免疫小鼠脾细胞,与对数生长期的骨髓瘤细胞株 SP2/0 按细胞数为 5:1 比例混合,参照文献[15]的方法进行细胞融合。用 HAT 选择杂交瘤细胞,10 d 后以间接 ELISA 法检测细胞培养的上清液,从检出的阳性孔中,选取 OD_{490} 值高、生长旺盛、形态好且不与正常细胞反应的阳性细胞孔,经有限稀释法克隆 3 次,直至克隆孔阳性率达 100%。克隆过程中,各阶段细胞同时扩大培养并冻存。

1.8 单克隆抗体的制备及特性鉴定

1.8.1 单克隆抗体的制备 按照文献[14]的方法制备腹水。即选用 8~10 周龄 Balb/c 小鼠腹腔注射 0.2 mL 液体石蜡,10 d 后每只小鼠腹腔注射杂交瘤细胞悬液 0.3 mL(约 5×10^5 个细胞),待小鼠腹部明显膨大时,收集腹水, $2\ 000 \text{ r}/\text{min}$ 离心 10 min,取上清液即为单克隆抗体,分装后于 $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存,并分别测定其 ELISA、IFA、HI 和中和试验(NT)等特性。

1.8.2 单克隆抗体效价的测定 将杂交瘤细胞培养上清液和腹水分别进行 2 倍和 10 倍系列稀释后,分别按 1.3 和 1.4 方法测定 IFA 和 ELISA 效价;将杂交瘤细胞培养上清液及腹水都以 2 倍系列稀释,测定单克隆抗体 HI 效价,方法同 1.5。

1.8.3 亚类和中和活性的测定 (1)亚类。按照单克隆抗体亚级份检测试剂盒介绍的方法进行。

(2)中和活性。采用固定病毒稀释抗体法,将腹水用 Hank's 分别按 1:4,1:8,1:16,1:32,1:64 和 1:128 体积比稀释,与等体积 200 TCID_{50} DPMV 充分混合,置 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 作用 1 h 后,接种单层 96 孔鸡胚成纤维细胞板,0.1 mL/孔,每稀释度接种 4 孔,置 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 条件下培养,观察 4~6 d,同时设病毒、阴性腹水和正常细胞对照,按 Karber 法计算中和效价[16]。

1.8.4 相加 ELISA 试验 参照文献[17]方法进行,用粗提的 DPMV 抗原包被酶标板,将待测单克

隆抗体两两配对进行位点相加 ELISA 试验。根据公式 $AI = [2A_{1+2}/(A_1 + A_2) - 1] \times 100\%$,对结果进行判断。式中: A_{1+2} 为 2 种单克隆抗体相加进行 ELISA 测定的 OD_{490} 值, A_1 和 A_2 分别为 2 种单克隆抗体单独进行 ELISA 时测定的 OD_{490} 值。若 $AI < 50\%$,则 2 种单克隆抗体识别同一抗原表位;若 $AI > 50\%$,则 2 种单克隆抗体识别不同的抗原表位。

1.8.5 特异性和稳定性的测定 (1)特异性。应用间接 ELISA 检测单克隆抗体 (1:100)与 DPMV、MPV、GPV、DHV、MDRV 抗原包被时的 OD_{490} 值,同时以免疫鼠血清为阳性血清对照,以骨髓瘤细胞株 SP2/0 培养上清液作为阴性对照。

(2)稳定性。将单克隆抗体杂交瘤细胞分别冻存 3 和 6 个月后复苏,并在体外连续培养 2 个月,用间接 ELISA 法检测细胞上清液的效价。

2 结果与分析

2.1 抗 DPMV 单克隆抗体杂交瘤细胞株的筛选与建立

本研究结果显示,长程和短程免疫获得的脾细胞融合率均达到 95%,取阳性孔经 3 次克隆和扩大培养后,共获得 A12、E41、B3、E39、A30、J28、F4 等 7 株形态好、生长旺盛、能稳定分泌单克隆抗体,且不与正常鸡胚尿囊液交叉反应的强阳性细胞株,其中单克隆抗体 F4 和 J28 是长程免疫获得的,其他 5 株单克隆抗体均是短程免疫获得的。

2.2 抗 DPMV 单克隆抗体的特性分析

2.2.1 效价 由表 1 可知,所筛选的 7 株单克隆抗体都具有 ELISA 和 IFA 特性,其中 J28 和 F4 2 株单克隆抗体还具有 HI 和 NT 特性。

由表 2 可见,7 株单克隆抗体的细胞培养上清液和腹水的 ELISA 效价分别为 $1 \times 2^7 \sim 1 \times 2^8$ 和 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$;IFA 效价分别为 $1 \times 2^4 \sim 1 \times 2^5$ 和 1×10^3 ;J28 和 F4 单克隆抗体的细胞培养上清液和腹水的 HI 效价分别为 2^9 和 2^{16} 。

A30 单克隆抗体的 IFA 结果见图 1。图 1 显示,A30 单克隆抗体与感染 DPMV 的 CEF 反应,阳性细胞呈现亮绿色荧光,而正常 CEF 为阴性。

2.2.2 亚类和中和活性 由表 1、表 2 可见,单克隆抗体 J28 和 F4 的亚类均为 IgG1,中和效价分别为 1:71 和 1:40;其余 5 株单克隆抗体的亚类均为 IgM,不具有中和活性。

2.2.3 相加 ELISA 试验结果 按每种单克隆抗体各自的饱和量进行相加 ELISA 试验,结果(表 3)显

示,J28 和 F4 分别与其余 5 株单抗两两交互相加,及 B3 分别与其余 6 株单抗两两交互相加的 AI 值均大于 50%;J28 与 F4 及 A30 与 E39、E41、A12 两

两交互相加的 AI 值均小于 50%。结果提示,单克隆抗体 B3,J28 与 F4,A30 与 E39、E41、A12 分别识别 3 个不同的抗原位点。

表 1 7 株抗 DPMV 单克隆抗体的特性

Table 1 Immunologic characteristics of McAbs

项目 Item	单克隆抗体 McAb						
	A12	E41	B3	E39	A30	J28	F4
ELISA	+	+	+	+	+	+	+
IFA	+	+	+	+	+	+	+
HI	-	-	-	-	-	+	+
NT	-	-	-	-	-	+	+
亚类 Subclass	IgM	IgM	IgM	IgM	IgM	IgG1	IgG1

表 2 7 株抗 DPMV 单克隆抗体杂交瘤细胞培养上清液及腹水的效价

Table 2 Titers of the McAbs in hybridoma culture supernatants and ascites

单克隆抗体 McAb	ELISA		IFA		HI		NT	
	TC	AF	TC	AF	TC	AF	TC	AF
A12	2 ⁷	10 ⁴	2 ⁴	10 ³	0	0	ND	0
A30	2 ⁷	10 ⁴	2 ⁴	10 ³	0	0	ND	0
B3	2 ⁷	10 ⁴	2 ⁴	10 ³	0	0	ND	0
E39	2 ⁷	10 ⁴	2 ⁴	10 ³	0	0	ND	0
E41	2 ⁷	10 ⁴	2 ⁴	10 ³	0	0	ND	0
J28	2 ⁸	10 ⁵	2 ⁵	10 ³	2 ⁹	2 ¹⁶	ND	71
F4	2 ⁸	10 ⁵	2 ⁵	10 ³	2 ⁹	2 ¹⁶	ND	40

注: TC. 细胞培养上清液;AF. 腹水;ND. 表示未检测。

Note: TC. Supernatant; AF. Ascitic fluid; ND. No detection.

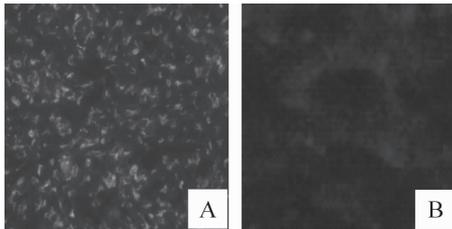


图 1 单克隆抗体 A30 的 IFA 结果(×200)

A. 感染 DPMV 的 CEF; B. 正常 CEF

Fig. 1 IFA results of McAb A30(×200)

A. DPMV-infected CEF; B. Normal CEF

2.2.4 特异性和稳定性 ELISA 检测结果显示,7 株单克隆抗体与 DPMV 包被抗原呈强阳性反应, OD_{490} 值与阳性对照相近,而与 MPV、GPV、DHV、MDRV 及正常细胞包被抗原均呈阴性反应, OD_{490} 值与阴性对照值相近。杂交瘤细胞在液氮中分别冻存 3 和 6 个月取出复苏,并在体外连续培养 2 个月,7 株抗 DPMV 单克隆抗体的杂交瘤细胞株均能稳定分泌抗体,细胞生长良好,且上清液 ELISA 抗体效价无明显变化。表明 7 株单克隆抗体均具有良好的特异性,且细胞株抗体分泌性能稳定。

表 3 7 株抗 DPMV 单克隆抗体相加 ELISA 的 AI 值

Table 3 AI of McAbs additivity test

单克隆抗体 McAb	J28	F4	B3	E39	E41	A12	A30	%
J28	0	17	73	58	60	79	80	
F4	28	0	81	69	58	60	67	
B3	92	89	0	74	72	80	66	
E39	79	75	63	0	35	43	46	
E41	68	67	60	23	0	37	28	
A12	95	79	69	25	21	0	25	
A30	72	65	55	30	16	12	0	

3 讨论

本研究以纯化的 DPMV LG 株为抗原,经细胞融合和筛选,获得 7 株能稳定分泌抗 DPMV 单克隆抗体的杂交瘤细胞株。本研究测定结果表明,这 7

株单克隆抗体具有 ELISA、IFA 特性,其中 J28 和 F4 还具有 HI 和 NT 特性;不与 MPV、GPV、DHV、MDRV 等发生交叉反应,具有良好的特异性,为今后研究禽副粘病毒提供了试验材料。

在单克隆抗体的制备过程中,本试验进行了多

次杂交融合,早期采用差速离心获得的病毒免疫 Balb/c 小鼠,进行融合,结果发现假阳性率高,未获得稳定特异性细胞株;随后采用差速和蔗糖不连续密度梯度离心法提纯的 DPMV 免疫 Balb/c 小鼠,免疫程序分为长程免疫和短程免疫,其融合结果是:长程免疫融合率 100%,但假阳性率高,多数阳性孔与粗提病毒抗原及正常细胞均发生反应,未获得特异性细胞株,因此改用 HI 筛选,结果只筛选到 2 株单克隆抗体(J28 和 F4);短程免疫融合率达 95%,其阳性率高,假阳性率低,筛选到 5 株单克隆抗体(A12、E41、B3、E39 和 A30),其亚类均属于 IgM。这些结果从某种意义上提示,用粗提抗原免疫 Balb/c 小鼠难以获得能稳定分泌抗 DPMV 的杂交瘤细胞株,若想筛选出具有 HI 特性和中和活性的单克隆抗体则需用长程免疫;若想筛选出亚类为 IgM 单克隆抗体,则需用短程免疫。因此,筛选杂交瘤细胞株时,可依据单克隆抗体用途选择合适的抗原纯化方法和免疫程序。

临床上快速诊断鸭副粘病毒病是有效预防该病的关键,目前国内诊断鸭副粘病毒病的方法有病毒分离鉴定、RT-PCR 和血清学鉴定等,但是这些方法由于费时费力而不适于临床快速检测,而抗 DPMV 单克隆抗体的成功制备,为该病免疫诊断试剂盒的研制奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Kontrimavichus L M, Akulov A V. Experimental new castle disease in goslings [J]. *Vet Bull*, 1974, 44(1): 28.
- [2] Kosovac A, Veselinovic S. Biological properties of a new castle disease virus isolated from geese [J]. *Poult Abstract*, 1988, 14(1): 28.
- [3] Alimadi M A, Tanyi J. The susceptibility of domestic waterfowls of new castle disease virus(NDV) and their role in its spread [J]. *Acta Vet Acad Sci Hung*, 1982, 30(1/3): 31-43.
- [4] Nerome K, Shibata M, Kobayashi S, et al. Immunological and genomic analyses of two serotypes of avian paramyxovirus isolated from wild duck in Japan [J]. *J Virol*, 1984, 50(2): 649-653.
- [5] Alexander D J. *Disease of poultry* [M]. Iowa, USA: Iowa State University Press, 1997: 541-569.
- [6] Higgins D A. Nine disease outbreaks associated with myxoviruses among ducks in HongKong [J]. *Trop Anim Health Prod*, 1971, 3: 232-240.
- [7] 王永坤, 田慧芳, 周继宏, 等. 鹅副粘病毒病的研究 [J]. *江苏农学院学报*, 1998, 19(1): 59-62.
Wang Y K, Tian H F, Zhou J H, et al. A primary study on the goose paramyxovirus infections [J]. *Journal of Jiangsu Agricultural College*, 1998, 19(1): 59-62. (in Chinese)
- [8] 周元宝. 鹅副粘病毒病的诊治 [J]. *浙江畜牧兽医*, 2000(2): 37.
Zhou Y B. Diagnose and treatment on the goose paramyxovirus infections [J]. *Zhejiang Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2000(2): 37. (in Chinese)
- [9] 张全成, 贝怀国, 王昌斌, 等. 鹅副粘病毒病的诊断与防治 [J]. *中国兽医科技*, 2000, 30(12): 43-44.
Zhang Q C, Bei H G, Wang C B, et al. Diagnose and treatment on the goose paramyxovirus infections [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, 2000, 30(12): 43-44. (in Chinese)
- [10] 刘禄, 梁蔚华, 韦平, 等. 鹅副粘病毒病的诊断与病原研究 [J]. *广西畜牧兽医*, 2002, 18(4): 5-7.
Liu L, Liang W H, Wei P, et al. The Study on the pathogeny and diagnose of goose paramyxovirus infections [J]. *Guangxi Journal of Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2002, 18(4): 5-7. (in Chinese)
- [11] 张训海, 朱鸿飞, 陈溥言, 等. 鸭副粘病毒强毒株的分离和鉴定 [J]. *中国动物检疫*, 2001, 18(10): 24-26.
Zhang X H, Zhu H F, Chen F Y, et al. Isolation and identification of high pathogenic duck paramyxovirus [J]. *China Journal of Animal Quarantine*, 2001, 18(10): 24-26. (in Chinese)
- [12] 陈少莺, 胡奇林, 陈仕龙, 等. 鸭副粘病毒的分离与初步鉴定 [J]. *中国预防兽医学报*, 2004, 26(2): 118-120.
Chen S Y, Hu Q L, Chen S L, et al. Isolation and identification of duck paramyxovirus [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2004, 26(2): 118-120. (in Chinese)
- [13] 程由铨, 李怡英, 吴平, 等. 伪狂犬病毒单克隆抗体的特性与应用 [J]. *病毒学报*, 1992, 8(2): 162-167.
Cheng Y Q, Li Y Y, Wu P, et al. Characterization and application of monoclonal antibodies (McAb) to pseudorabies virus (PRV) [J]. *Chinese Journal of Virology*, 1992, 8(2): 162-167. (in Chinese)
- [14] 程晓霞, 陈少莺, 胡奇林, 等. 鉴别伪狂犬病病毒强、弱毒株单克隆抗体的制备 [J]. *福建农业学报*, 2003, 20(2): 87-90, 200.
Cheng X X, Chen S Y, Hu Q L, et al. Preparation of the monoclonal antibodies discriminating virulent and attenuated-strains of psudorabbies virus (PRV) [J]. *Fujian Journal of Agricultural Science*, 2003, 20(2): 87-90, 200. (in Chinese)
- [15] 林天龙, 陈强, 龚晖, 等. 欧洲鳗免疫球蛋白单克隆抗体的制备与特性 [J]. *水产学报*, 2001, 25(6): 532-537.
Lin T L, Chen Q, Gong H, et al. Production and characterization of monoclonal antibodies against *Anguilla anguilla* IgM [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2001, 25(6): 532-537. (in Chinese)
- [16] Dvorak M. Increasing the effectiveness of feed mixtures for the early weaning of piglets with the addition of fats or growth stimulators [J]. *Vet Medicine*, 1984, 29(3): 151-162.
- [17] Nabuurs M J, Vander E J. Clinical signs and performance of pigs treated with different doses of carbadox, cyadox and olaquinox [J]. *Vet Medicine*, 1990, 37(1): 68-76.