

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (4) :501 - 509; 4 April 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140413

鸭甲肝病毒 1 型和 3 型间接 ELISA 方法的建立与应用

张玉瑶^{1,2}, 马秀丽^{2*}, 黄兵², 李玉峰², 于可响², 李建亮¹, 刘存霞², 韩宏宇^{1,2},
崔言顺^{1*}

¹ 山东农业大学动物科技学院, 山东 泰安 271018

² 山东省农业科学院家禽研究所, 山东省家禽疫病诊断与免疫重点实验室, 山东 济南 250023

摘要: 【目的】研究鸭甲肝病毒 (Duck hepatitis A virus, DHAV) 1 型 VP3 和 3 型 VP1 串联基因在大肠杆菌中的表达, 并以纯化的重组蛋白为抗原建立鸭病毒性肝炎抗体检测的间接 ELISA 方法。【方法】设计 2 对特异性引物, 提取鸭甲肝病毒 1 型 (DHAV-1) 和 3 型 (DHAV-3) 的 RNA, 分别 RT-PCR 扩增得到 714bp 的 DHAV-1 VP3 和 720bp 的 DHAV-3 VP1 基因, 并克隆至 pMD18-T 载体中, 然后依次将 DHAV-1 VP3 和 DHAV-3 VP1 定向插入 pET-32a (+) 表达载体, 获得重组表达载体 pET-1VP3-3VP1, 进行 IPTG (Isopropyl-beta-D-1-thiogalactopyranoside) 诱导表达分析, 以纯化的重组蛋白为抗原建立间接 ELISA 方法并应用于临床。【结果】经 IPTG 诱导表达, 在大肠杆菌中可稳定、高效地表达 DHAV-1VP3-3VP1 蛋白。Western blot 检测结果表明, 表达的重组蛋白与 DHAV-1 和 DHAV-3 阳性血清均能发生特异性反应。确定间接 ELISA 方法的抗原最佳包被浓度为 1.0 μg/孔, 血清最佳稀释度为 1:200, 临界值为 OD_{650} 值 ≥ 0.38 , 建立的间接 ELISA 方法具有较好的敏感性、特异性和重复性。该方法与中和试验分别检测 DHAV-3 阳性血清, 两种方法的符合率各为 96.3% 和 96.7%; 初步临床应用结果表明该方法可用于雏鸭母源抗体和免疫后抗体的消长变化的检测。【结论】以大肠杆菌表达的 DHAV-1VP3-3VP1 重组蛋白建立的间接 ELISA 方法可用于 DHAV-1 和 DHAV-3 抗体的检测。

关键词: 鸭甲肝病毒 1 型, 鸭甲肝病毒 3 型, VP1 基因, VP3 基因, 表达

中图分类号: S852 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 04-0501-09

鸭病毒性肝炎是危害雏鸭的一种急性、高致死性传染病, 具有发病急、病程短、传播快、病死率高等特点, 主要侵害 3 周龄以内雏鸭, 严重威胁养鸭业的健康发展^[1]。其病原为鸭甲型肝炎病毒 (Duck hepatitis A virus, DHAV), 归属于小 RNA 病毒科的

禽肝炎病毒属^[2], 由于 DHAV 基因序列之间存在显著差异, 且不同型的 DHAV 间无交叉反应^[3-4], 又将 DHAV 分为 DHAV-1、DHAV-2 和 DHAV-3, 其分别对应基因 A 型 (血清 1 型)、基因 B 型 (台湾新型) 和基因 C 型 (韩国新型)^[5-6]。但三者引起的症状

基金项目: 山东省现代农业产业技术体系项目 (SDAIT-13-011-01); 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金 (BS2009YY019); 山东省农业科学院青年科研基金项目 (2014QNZ06); 国家自然科学基金面上项目 (31172355/C1806)

* 通信作者。崔言顺, E-mail: yscui@sdau.edu.cn; 马秀丽, maxiuli1978@163.com

作者简介: 张玉瑶 (1989 -), 女, 山东省沂水县人, 硕士研究生。E-mail: fangyangwazy@163.com

收稿日期: 2014-08-21; **修回日期:** 2014-12-01

和病变很相似。

近年来,随着养鸭业不断向产业化、集约化和规模化方向发展,血清学上不同于 DHAV-1 的报道逐渐增多^[7-8],DHAV-3 已在国内许多地区广泛流行,传统的鸭肝炎的主动免疫或被动免疫失败现象频繁发生,对鸭肝炎的防控提出了新的挑战^[9]。迄今为止,国内流行的主要为 DHAV-1 和 DHAV-3 毒株。除台湾外,内陆尚未见 DHAV-2 毒株的报道^[10]。疫苗免疫是该病的主要防控措施,但是目前只有 DHAV-1 疫苗已获得批准文号,DHAV-3 疫苗尚在研制过程中^[11]。鉴于当前 DHAV-1 和 DHAV-3 的危害日趋严重,多价苗的开发迫在眉睫。疫苗研制成功后,又面临如何对免疫抗体进行追踪监测?传统的血清中和试验周期长,费时费力,不利于批量样品的快速检测。利用大肠杆菌表达的 VP1 或 VP3 蛋白建立的间接 ELISA 方法只针对一个血清型的 DHAV,在用于多价疫苗评价时,需要分别进行 DHAV-1 和 DHAV-3 抗体的检测,操作繁琐,成本翻倍。而建立针对 DHAV-1 和 DHAV-3 型抗体 ELISA 检测方法可以解决上述问题。目前尚未见该方面的研究报道。

DHAV 基因组为单股正链 RNA (+ ssRNA),含一个大的开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF),编码一条由 2249 个氨基酸组成的多聚蛋白,经翻译后加工成为各种功能蛋白^[8]。ORF 编码的这个多聚蛋白在病毒包装过程中,裂解为 VP0 (VP2 和 VP4 的前体)、VP3、VP1 结构蛋白和 2A、2B、2C、3A、3B、3C、3D 非结构蛋白。在小 RNA 病毒中,VP1 和 VP3 基因编码主要的抗原位点并具有主要的型特异性中和位点,是决定病毒抗原性的主要成分,是目前研究的热点基因^[12-13]。因此,本研究将扩增的 DHAV-1 VP3 和 DHAV-3 VP1 基因克隆到 pET-32a (+) 原核

表达载体中,获得含 1 型和 3 型 DHAV 主要抗原基因的重组表达质粒。利用 IPTG 诱导表达,并对目的蛋白进行 Western blot 检测,确定其免疫反应性。然后以纯化的重组蛋白建立了相应的抗体 ELISA 检测方法,从而为 DHAV-1 和 DHAV-3 的快速血清学诊断奠定了一定的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒、菌株、载体:1 型鸭甲肝病毒毒株 (DHAV-1, CL)、3 型鸭甲肝病毒毒株 (DHAV-3, FX) 和 pET-32a (+) 原核表达载体由山东省农科院家禽研究所保存;pMD18-T-Vector、DH5 α 及 BL21 (DE3) 感受态细胞购自大连宝生物工程公司。

1.1.2 主要试剂和仪器:Trizol Reagent 试剂、RNA 酶抑制剂、M-MLV 反转录酶、ExTaq DNA 聚合酶、T4 DNA ligase、限制性内切酶等均购自大连宝生物工程有限公司;AxyPrep plasmid Miniprep kit、AxyPrep DNA Gel Extract kit 购自 AXYGEM 公司;ELISA 酶标板购自美国 Corning 公司;HRP 标记的羊抗鸡 IgG、羊抗鸭 IgG 购自美国 KPL 公司;DHAV-1 和 DHAV-3 阳性、阴性血清由本实验室制备及保存;其他常规试剂均为分析纯。低温高速离心机和 PCR 仪购自 Eppendorf 公司;电泳仪、电泳槽购自 Bio-RAD 公司;Thermo Scientific Wellwash Versa 洗板机购自 Thermo Fisher 公司。

1.2 DHAV-1 VP3 和 DHAV-3 VP1 基因扩增及表达载体的构建

参照 GenBank 已登录的鸭甲肝病毒 DHAV-1 VP3 基因和 DHAV-3 VP1 基因核苷酸序列,设计两对特异性引物 (表 1):

表 1. 引物

Table 1. Primers

Primer	Sequences (5'→3')	Size/bp	Restriction site
VP3-F	AAGGGATCCGAAAGAGAAAARCCACG	714	<i>Bam</i> H I
VP3-R	ATCGTCGACCTGATYATTGGTTGCCAT		<i>Sal</i> I
VP1-F	ATTGTCGACGGTGATTCCAATCAGCTTG	720	<i>Sal</i> I
VP1-R	AGTCTCGAGTTCAATYTCARATGGAG		<i>Xho</i> I

提取 DHAV-1 和 DHAV-3 病毒 RNA,利用 VP3-F/VP3-R 和 VP1-F/VP1-R 引物对分别扩增 DHAV-1

VP3 和 DHAV-3 VP1 基因。将回收的 PCR 产物,连接至 pMD18-T-Vector,分别经 *Bam*H I/*Sal*I 和 *Sal*I/

Xho I 双酶切鉴定正确的阳性重组子, 送上海生物工程技术有限公司测序。用 *Bam*H I/*Sal* I 双酶切重组质粒 PMD-1VP3 和原核表达载体 pET-32a (+), 16℃ 连接过夜, 转化 DH5 α 感受态细胞, 提取质粒, 经 *Bam*H I/*Sal* I 双酶切鉴定, 阳性重组质粒命名为 pET-1VP3。用 *Sal* I/*Xho* I 双酶切重组质粒 PMD-3VP1 和 pET-1VP3, 16℃ 连接过夜, 转化至 BL21 (DE3) 感受态细胞, 提取质粒 DNA, 用 *Bam*H I/*Xho* I 酶切法鉴定正确的阳性重组子, 送上海生物工程技术有限公司测序, 阳性克隆命名为 pET-1VP3-3VP1。

1.3 pET-1VP3-3VP1 的诱导表达、分析和纯化

将阳性工程菌于 37℃、200r/min 振荡培养至 OD_{600} 值达到 0.4 - 0.6, 加入 IPTG 至终浓度为 1.0 mmol/L, 37℃、200 r/min 进行诱导表达。收取诱导后不同时间的样品, 超声波破碎, 4℃ 13800 \times g 离心 10 min, 分别取上清和沉淀用于 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分析。然后进行 Western blot, 一抗分别用鸡抗 DHAV-1 和 DHAV-3 阳性血清, 二抗用辣根过氧化物酶 (horse radish peroxidase, HRP) 标记的羊抗鸡 IgG, DAB (3, 3'-diaminobenzidine, DAB) 显色。将破碎好的重组菌进行 SDS-PAGE, 电泳结束后取下凝胶, 先用双蒸水洗涤, 然后浸入 4℃ 预冷的 250 mmol/L 的 KCL 溶液中显色 5 - 10 min, 将目的蛋白条带切下, PBS 洗涤数次, 放入透析袋内, 进行电洗脱, 使目的蛋白游离出来, 然后用 pH7.4 PBS 透析^[14]。

1.4 间接 ELISA 最佳工作浓度及临界值的确定

经紫外分光光度法测定纯化的重组蛋白的浓度, 用纯化的蛋白做包被抗原。采用方阵滴定法, 确定抗原、抗体的最适稀释度。方阵滴定法具体步骤: 用包被缓冲液将纯化后的 DHAV-1VP3-3VP1 重组蛋白依次按 1:10、1:20、1:40 和 1:80 等系列稀释, 包被 ELISA 反应板, 100 μ L/孔; DHAV-1 和 DHAV-3 阳性血清和阴性血清分别作 1:50、1:100、1:200 和 1:400 等系列稀释, 二抗 HRP 标记的羊抗鸭 IgG, 四甲基联苯胺 (3, 3', 5, 5'-tetramethyl benadine, TMB) 底物显色, 氢氟酸终止液终止反应, 进行间接 ELISA 测定, 确定抗原和血清的最佳工作浓度。在最佳工作条件下, 将收集的 32 份 DHAV-1 和 DHAV-3 阴性鸭血清, 在最佳工作条件下进行间接 ELISA 测定, 确定阴阳性临界值 ($x \pm 3s$, s : 标准差,

x : 算术平均值)。

1.5 间接 ELISA 的特异性、敏感性和重复性试验

用 DHAV-1VP3-3VP1 重组蛋白制备的间接 ELISA 检测试剂盒分别检测鸭瘟、鸭呼肠孤病毒病、鸭新城疫、鸭流感、DHAV-1、DHAV-3 等阳性血清及阴性血清, 每样本 4 个重复, 进行交叉反应性测定; 利用实验室自制的 DHAV-1 和 DHAV-3 二价灭活疫苗免疫成鸭, 二次免疫后 20d 心脏采血, 制备 DHAV 二价阳性血清。将 DHAV 二价阳性血清分别与等体积的 DHAV-1 (200TCID₅₀/0.2 mL) 和 DHAV-3 (200TCID₅₀/0.2 mL) 以及鸭瘟病毒 (200TCID₅₀/0.2 mL) 混合, 室温作用 30 min, 将处理后的血清与未作任何处理的血清分别按最佳反应条件进行阻抑试验测定。将 DHAV-1 和 DHAV-3 阳性血清各 5 份分别从 1:2 开始倍比稀释, 其余条件按最佳反应条件进行 ELISA 检测, 分别用 DHAV-1 和 DHAV-3 病毒中和试验 (virus neutralization test, VN) 对其终点滴度进行测定。用两次包被的酶标板, 检测 5 份 DHAV-1 阳性血清、5 份 DHAV-3 阳性血清和 5 份阴性血清, 每个样品重复检测 5 次, 测定其变异系数 CV% (coefficient of variation, CV) ($CV = s/x \times 100\%$)。

1.6 间接 ELISA 滴度的测定

对实验室制备的 22 份 DHAV 二价阳性血清自 1:10 倍开始 2 倍倍比稀释后进行 ELISA 测定, 分别计算每份血清不同稀释度的 P/N 值。以 P/N 值为纵坐标, 相应稀释倍数对数 ($\lg x$) 为横坐标, 进行回归处理, 得线性方程 $y = bx + a$, 当 P/N = 2.1 时, 可认为测不出抗体, 此稀释倍数即为 ELISA 滴度 (ET, ELISA titer); 再将这 22 份样品的 ET 对数值 ($\lg ET$) 为纵坐标, 最佳血清稀释度的 P/N 值为横坐标, 进行直线回归分析, 求出直线方程 $y = bx + a$ 和相关系数 r , 该方程即为血清样品单一稀释度计算 ET 的标准直线方程, 即血清 ELISA 效价 ($\lg ET$) 与 P/N 值的关系为 $\lg ET = b(P/N) + a$ 。

1.7 间接 ELISA 方法与中和试验的对比

临床应用检验的样品为试验样品和送检样品, 其中与 DHAV-1 中和试验比较的血清 54 份, 与 DHAV-3 中和试验比较血清 62 份。将待检血清灭活处理后用稀释液从 1:2 开始作 2 倍倍比稀释, 分别与等量的病毒 (200EID₅₀/0.1 mL) 混合, 室温作用 30 min, 接种 11 d 鸭胚, 每个稀释度接种 5 枚鸭胚, 接种量为 0.2 mL/胚。同时应用间接 ELISA 方法检

测上述样品,比较两种方法的符合率。

1.8 间接 ELISA 方法的应用

对产蛋种鸭采用 DHAV-1 和 DHAV-3 二价灭活疫苗进行一次免疫,采集免疫后 7、10、14、21、28、35 和 42 d 的血清,进行间接 ELISA 测定,分析免疫后抗体的消长情况。将免疫过 DHAV-1 和 DHAV-3 二价灭活疫苗二次的产蛋鸭所孵出的雏鸭分别在 3、5、7、10 和 14 日龄时采血,分离血清,间接 ELISA 测定分析母源抗体的消长情况。

2 结果

2.1 重组表达载体 pET-1VP3-3VP1 的构建

RT-PCR 扩增获得 714bp 的 DHAV-1 VP3 和 720bp 的 DHAV-3 VP1 目的条带,分别克隆至 pMD18-T 载体,然后依次定向插入 pET-32a (+) 载体,得到重组表达质粒 pET-1VP3-3VP1。用 *Bam*H I 和 *Xho* I 进行双酶切鉴定,经琼脂糖凝胶电泳检测

出两条条带,分别在 5900bp 和 1434bp 左右,与预期大小相符;测序结果显示插入方向和阅读框架正确。

2.2 SDS-PAGE 及 Western blot 分析

对重组菌裂解产物进行 SDS-PAGE 分析,结果可见分子量 74.1kDa 的目的蛋白条带,与预期大小一致,以诱导后 5h 表达量最大,重组蛋白以不溶性包涵体形式存在于菌体中(图 1-A);表达的重组蛋白纯化后只有一条 74.1kDa 的蛋白条带(图 1-B),与直接用菌体进行 SDS-PAGE 出现的重组表达产物条带的质量大小一致,表明 KCL 显色结合电洗脱方法可获得较纯的目的蛋白。

Western blot 分析发现,该重组蛋白 DHAV-1VP3-3VP1 与鸡抗 DHAV-1 和 DHAV-3 阳性血清均能发生反应(图 2),表明重组蛋白具有良好的免疫反应性。表达的 DHAV-1VP3 重组蛋白与 DHAV-3 阳性血清无交叉反应(图略);表达的 DHAV-3VP1 重组蛋白与 DHAV-1 阳性血清也无交叉反应(图略)。

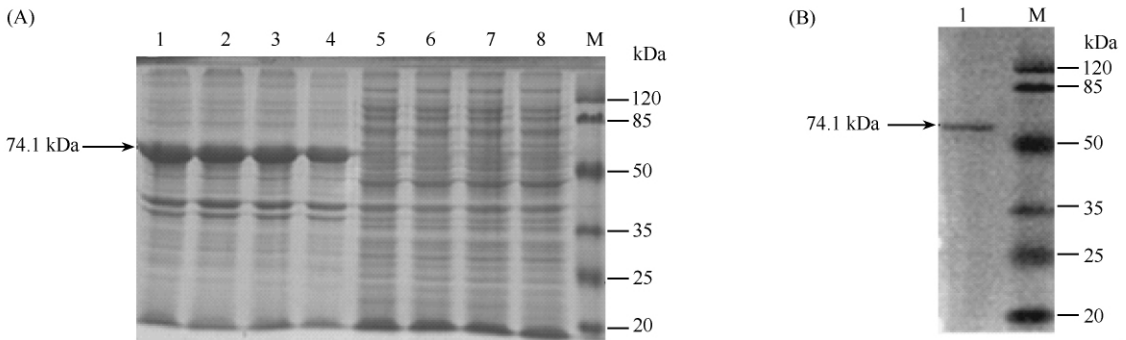


图 1. 不同诱导时间下蛋白表达量分析和重组蛋白的纯化

Figure 1. Protein expression analysis under different inducing times and purification of recombinant protein. A is Protein expression analysis under different inducing times. M, Protein Marker; lane 1 - 4, Sediment of pET-1VP3-3VP1 transformed BL21 (After induced 5h,4h,3h and 2h respectively); lane 5 - 8, Supernatant of pET-1VP3-3VP1 transformed BL21 (After induced 5h,4h,3h and 2h, respectively). B is purification of recombinant protein. Lane 1, Purified recombinant protein; M, Protein Marker.

2.3 检测 DHAV-1 和 DHAV-3 抗体的间接 ELISA 反应条件的确定

经紫外分光光度法测定纯化的重组蛋白的浓度为 0.4 mg/mL。间接 ELISA 方阵试验结果表明, DHAV-1VP3-3VP1 重组蛋白包被量为 10 μ g/mL,血清作 1:200 稀释时, OD_{650} 为 1.0 左右,且 P/N 值较高,非特异性较低(表 2)。故我们确定抗原的最佳包被量为 10 μ g/mL,血清最佳稀释倍数为 1:200。将收集的 32 份 DHAV-1 和 DHAV-3 阴性鸭血清,在最佳工作条件下进行间接 ELISA 测定。这些数据

经统计学处理,样品平均数和标准差分别为 $x = 0.329$ 、 $s = 0.017$ 、 $x \pm 3s = 0.38$,因此我们把 0.38 作为 DHAV 阴性血清的上限,得到间接 ELISA 判定标准,即待检样本阳性 OD_{650} 值与阴性 OD_{650} 值的比值 (P/N) 大于或等于 2.1 且 OD_{650} 值大于 0.38 者判为阳性,否则判为阴性(图 3)。

2.4 间接 ELISA 的特异性、敏感性和重复性试验

交叉试验结果显示鸭甲肝病毒 1 型、鸭甲肝病毒 3 型阳性血清均为阳性结果,其余均为阴性,表明该检测试剂盒与鸭瘟、鸭呼肠孤病毒病、鸭新城疫及

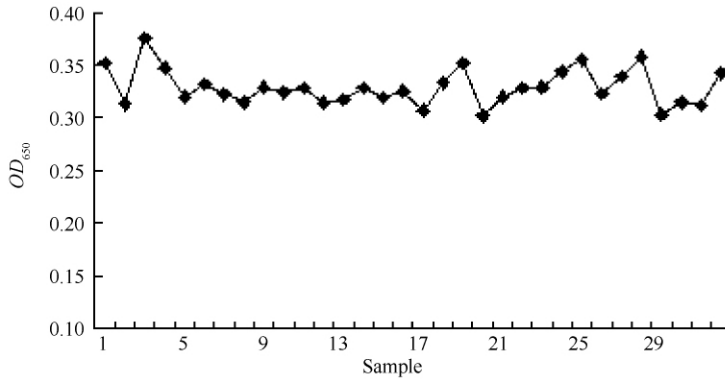


图 3. DHAV 阴性血清 OD_{650} 值分布图

Figure 3. ELISA for detecting 32 negative sera against DHAV.

表 3. 敏感性试验 (DHAV-1 和 DHAV-3 阳性血清)

Table 3. Sensitivity test
(Positive serum of DHAV-1 and DHAV-3)

Sample	Positive serum of DHAV-1		Positive serum of DHAV-3	
	ELISA	VN	ELISA	VN
1	256	59.7	256	54.7
2	512	102.4	512	121.4
3	512	124.6	256	46.8
4	1024	222.9	512	142.5
5	1024	181.0	512	131.8

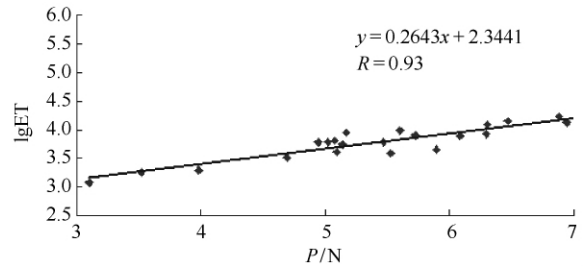


图 4. 回归直线方程的建立

Figure 4. Establishment of the regression equation.

表 4. ELISA 方法与中和试验比较

Table 4. Comparison of ELISA with VN

Method	Detection results of DHAV-1		Detection results of DHAV-3	
	ELISA	VN	ELISA	VN
Sample total	54	54	62	62
No. of positive sera	32	30	40	38
Positive detection rate	59.26%	55.56%	64.52%	61.29%
No. of co-positive sera	30		38	
No. of co-negative sera	22		21	
Rate of coincidence	96.30%		95.16%	

Coincidence detection rate = [(No. of co-positive sera + No. of co-negative sera) / Sample total] × 100%

2.7 间接 ELISA 方法的应用

间接 ELISA 检测结果显示, 3 日龄雏鸭的母源抗体水平较高, 随着日龄的增加, 母源抗体逐渐降低, 至 7 日龄时母源抗体水平已接近临界值, 10 日龄时母源抗体不能检出, ELISA 检测均为阴性 (图 5)。用建立的间接 ELISA 方法对灭活疫苗免疫后不同时间段的样品进行检测, 取其平均值进行分析, 结果表明, 产蛋种鸭免疫后 7 d 便产生抗体, OD_{650} 值为 0.702; 14 d 时抗体水平达到最高, OD_{650} 值为 1.224; 21 d 时仍能保持较高的抗体水平, OD_{650} 值为 1.178; 28 d 时抗体开始下降, 42 d 时抗体水平下降

幅度较大, OD_{650} 值为 0.424 (图 6)。

3 讨论

鉴于当前 DHAV-1 和 DHAV-3 对养鸭业造成的危害, 本试验在前期分别建立的 DHAV-1 间接 ELISA 方法和 DHAV-3 间接 ELISA 方法的基础上, 进行了两种血清型的主要抗原基因的串联表达。我们曾尝试 DHAV-1 VP1 和 DHAV-3 VP1 基因的串联表达, 未能成功, 推测可能与 DHAV-1 和 DHAV-3

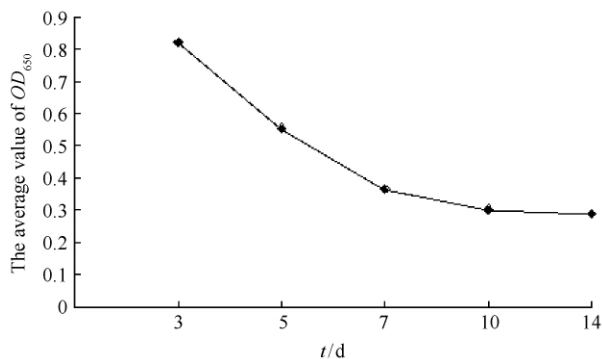


图 5. 雏鸭母源抗体消长规律

Figure 5. Growth and decline of maternal antibody in ducklings.

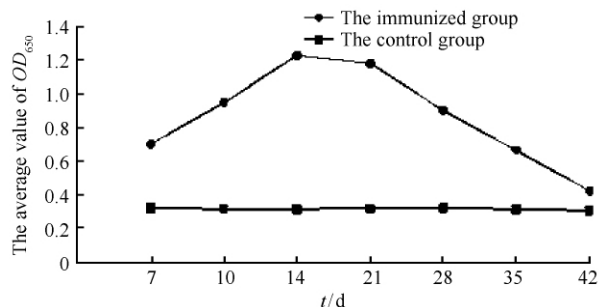


图 6. 灭活疫苗免疫后抗体消长规律

Figure 6. Growth and decline of antibody after immunized with inactivaed vaccine.

VP1 之间 ORF 序列相似 (约 70%) 有关。小 RNA 病毒的 VP1 和 VP3 作为病毒的衣壳蛋白, 位于病毒粒子表面, 是病毒的主要抗原基因, 能诱导动物产生中和抗体^[14], 因此, 我们选用了 DHAV-1 VP3 基因和 DHAV-3 VP1 基因进行原核表达。pET-32a (+) 表达系统操作简便、表达量高, 但表达产物大多以无生物学活性的包涵体形式存在^[15]。本研究中, 尽管我们反复优化了表达条件 (包括温度和 IPTG 浓度, 数据未显示), 构建的 DHAV-1VP3-3VP1 表达载体在大肠杆菌中的表达产物仍主要以包涵体的形式存在, 这可能与 DHAV-1VP3 中存在 4 个半胱氨酸残基, DHAV-3VP1 蛋白中存在 6 个半胱氨酸残基有关, 半胱氨酸残基之间容易形成二硫键, 增加了可溶性表达的难度^[12]。

表达的重组蛋白与 DHAV 阳性血清的反应性决定了该蛋白的应用价值, 通过 Western blot 分析, DHAV-1VP3-3VP1 重组蛋白经过变性处理后与 DHAV-1 和 DHAV-3 阳性血清均有很好的反应性, 表明该表达蛋白具有很强的抗原性。抗原的纯度和包被浓度直接影响试验的敏感性和特异性。研究表

明本试验采用 KCL 显色结合电洗脱方法进行重组蛋白纯化, 获得了纯度较高的目的蛋白。与亲和层析法相比, KCL 显色法结合电洗脱更适于表达量较高的蛋白, 大大简化了纯化程序, 操作简便、快速, 不仅解决了包涵体处理困难的问题, 而且可获得较高的回收率^[12]。以纯化 DHAV-1VP3-3VP1 蛋白包被 ELISA 板, 确定抗原的最佳包被量为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 血清的最佳工作浓度为 1:200 稀释时, ELISA 方法的特异性较高。试验用血清样品浓度在 ELISA 分析的线性范围内是获得准确而有重复性试验结果的重要保证。本研究建立了由血清样品单一稀释度计算 ET 的标准直线方程 $y = 0.2643x + 2.3441$, 可用于大批样品 ELISA 效价的检测。利用阴性血清取平均值, 再加 3 倍标准差的方法来确定 ELISA 结果的临界值, 结果准确可靠。通过对 32 份 DHAV 阴性鸭血清进行 ELISA 测定和统计学计算, 确定 $OD_{650} = 0.38$ 为 ELISA 方法的临界值。初步临床应用表明, 以 DHAV-1VP3-3VP1 重组蛋白建立的 ELISA 方法可用于雏鸭母源抗体的检测和免疫后抗体消长规律的检测。

鸭病毒性肝炎是肉鸭养殖过程中的重要疾病, 而 DHAV 抗体的快速检测方法一直是困扰养鸭业的难题之一。传统的鸡 (鸭) 胚中和试验, 费时费力, 基于全病毒建立的间接 ELISA 方法因 DHAV 纯化困难而发展受到了限制^[16-17]。尽管单独表达 DHAV-1 VP1 或 DHAV-1 VP3 以及 DHAV-3 VP1 重组蛋白建立的间接 ELISA 方法已有报道^[18], 但 DHAV-1 和 DHAV-3 间接 ELISA 方法的研究将为今后 DHAV 的混合感染监测及多价疫苗的使用提供技术支持, 通过一次反应完成 DHAV-1 和 DHAV-3 抗体的同时检测, 实现鸭病毒性肝炎的快速血清学诊断。

参考文献

- [1] Gao YD, Ling HL, Dong RE, Sun HX. Isolation, identification and pathogenic characteristics of duck hepatitis virus isolates. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2010, 2 (8) :37-39.
- [2] Tseng CH, Nick JK, Tsai HJ. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 indicates that it should be assigned to a new genus. *Virus Research*, 2007, 123 (2) :190-203.
- [3] Woolcock PR. Duck hepatitis virus type I: studies with inactivated vaccines in breederducks. *Avian Pathology*, 20

- (3) :509-522.
- [4] Todd D, Smyth VJ, Ball NW, Donnelly BM, Wylie M, Knowles NJ. Identification of chicken enterovirus-like viruses, duck hepatitis virus type 2 and duck hepatitis virus type 3 as astroviruses. *Avian Pathology*, 2009, 38 (1) :21-30.
- [5] Levine PP, Fabricant J. A hitherto-undescribed virus disease of ducks in North America. *The Cornell Vet Erinarian*, 1950, 40 (4) :71-86.
- [6] Kim MC, Kwon YK, Joh SJ, Kim SJ, Tolf C, Kim JH. Recent Korean isolates of duck hepatitis virus reveal the presence of a new geno- and serotype when compared to duck hepatitis virus type 1 type strains. *Archives of Virology*, 2007, 152 (11) :2059-2072.
- [7] Tseng CH, Tsai HJ. Molecular characterization of a new serotype of duck hepatitis virus. *Virus Research*, 2007, 126 (1) : 19-31.
- [8] Kim MC, Kwon YK, Joh SJ. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 reveals a novel lineage close to the genus *Parechovirus* in the family. *Picornaviridae*. *Journal of General Virology*, 2006, 87 (11) :3307-3316.
- [9] Su J, Huang Y, He R, Zhao J, Guo Y. Isolation and preliminary identification of a new duck hepatitis virus. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, 2002, 32 (1) :15-16. (in Chinese)
苏敬良, 黄瑜, 贺荣莲, 赵继勋, 郭玉璞. 新型鸭肝炎病毒的分离及初步鉴定. *中国兽医科技*, 2002, 32 (1) :15-16
- [10] Zhao L, Cui Y, Ren J, Li J, Huang B, Li Y, Ma X. Cloning and expression of VP1 gene of duck hepatitis virus genotype C and preparation of its polyclonal antibody. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2011, 23 (2) : 258-262. (in Chinese)
赵立娜, 崔言顺, 任建亭, 李建亮, 黄兵, 李玉峰, 马秀丽. 基因 C 型鸭肝炎病毒 VP1 基因的克隆表达及其多克隆抗体的制备. *浙江农业学报*, 2011, 23 (2) : 258-262.
- [11] Kim MC, Kim MJ, Kwon YK. Development of duck hepatitis A virus type 3 vaccine and its use to protect ducklings against infections. *Vaccine*, 2009, 27 (48) : 6688-6694.
- [12] Ma X, Song M, Yu K, Liao M, Xin C. Expression of VP1 gene and establishment of ELISA for detecting antibody against duck hepatitis virus. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48 (8) : 1110-1114. (in Chinese)
马秀丽, 宋敏训, 于可响, 廖明, 辛朝安. 鸭病毒性肝炎病毒 VP1 基因表达及其抗体检测 ELISA 方法的建立. *微生物学报*, 2008, 48 (8) : 1110-1114.
- [13] Ding CY, Zhang DB. Molecular analysis of duck hepatitis virus type I. *Journal of General Virology*, 2007, 361 (1) :9-17.
- [14] Le Gall-Reculé G, Jestin V, Chagnaud P, Blanchard P, Jestin A. Expression of muscovy duck parvovirus capsid proteins (VP2 and VP3) in a baculovirus expression system and demonstration of immunity induced by the recombinant proteins. *Journal of General Virology*, 1996, 77 (9) : 2159-2163.
- [15] Makrides S. Strategies for achieving high-level expression of gene in *Escherichia coli*. *Microbiological Review*, 1996, 60 (3) :512-538.
- [16] Huang C, Li J, Tang Y, Chen Y, Jin G. Detection of duck hepatitis virus serotype 1 by biosensor based on imaging ellipsometry. *Current Applied Physics*, 2011, 11 (3) : 353-357.
- [17] Yang P, Song M, Ai W, Ma X, Cui Y. Detection of Antibodies against duck hepatitis virus with indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Chinese Journal of Animal Quarantine*, 2004, 21 (1) : 18-20. (in Chinese)
杨萍萍, 宋敏训, 艾武, 马秀丽, 崔言顺. 间接 ELISA 检测鸭病毒性肝炎抗体的研究. *中国动物检疫*, 2004, 21 (1) : 18-20.
- [18] Liao J, Zhang X, Huang X, Mao H, Yin X, Liu D, Zhao W. Cloning and prokaryotic expression of VP3 gene of duck hepatitis virus type I. *Progress in Veterinary Medicine*, 2009, 30 (7) : 49-52. (in Chinese)
廖俊伟, 张小飞, 黄显明, 毛火于, 尹秀凤, 刘大伟, 赵魏忠. I 型鸭肝炎病毒 VP3 基因的克隆与原核表达. *动物医学进展*, 2009, 30 (7) : 49-52.

Indirect ELISA for simultaneous detection of antibodies against duck hepatitis A type 1 and 3 viruses

Yuyao Zhang^{1,2}, Xiuli Ma^{2*}, Bing Huang², Yufeng Li², Kexiang Yu², Jianliang Li¹, Cunxia Liu², Hongyu Han¹, Yanshun Cui^{1*}

¹ College of Animal Science & Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong Province, China

² Institute of Poultry Science, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250023, Shandong Province, China

Abstract: [Objective] To simultaneously detect antibodies against Duck hepatitis A type 1 (DHAV-1) and type 3 (DHAV-3) viruses, we developed an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with bacterially expressed recombinant viral protein as antigen in *Escherichia coli*. [Methods] We amplified the full-length VP3 gene of DHAV-1 and the full-length VP1 gene of DHAV-3 through reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and then cloned them into pET-32a expression vector, designated as pET-1VP3-3VP1. The fusion protein DHAV-1VP3-3VP1 expressed correctly and was subsequently used to develop an indirect ELISA assay. [Results] DHAV-1VP3-3VP1 fusion protein expressed in BL21 (DE3) cells following induction by Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG). The expressed protein was very antigenic and reactive to virus-specific antibodies in western blot assay. The optimal working concentration for coating antigen was 1.0 µg per well and the working concentration of serum samples was 1:200 dilution and the cut-off value that distinguished the positive from negative serum samples was $OD_{650} \geq 0.38$. [Conclusion] The ELISA method based on the prokaryotic expression of VP3 (DHAV-1) and VP1 proteins (DHAV-3) can be used effectively for the clinical detection antibodies against DHAV-1 and DHAV-3.

Keywords: Duck hepatitis A virus type 1, Duck hepatitis A virus type 3, VP1 gene, VP3 gene, expression

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Shandong Modern Agricultural Technology & Industry System (SDAIT-13-011-01), by the Province Young and Middle-Aged Scientists Research Awards Fund (BS2009YY019) and by the Youth Scientific Research Foundation of Shandong Academy of Agricultural Sciences (2014QNZ06)

* Corresponding author. E-mail: yscui@sdau.edu.cn, maxiuli1978@163.com

Received: 21 August 2014 / Revised: 1 December 2014