畜牧兽医学报 2014,45(7):1148-1153
Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica
doi:10.11843/j.issn.0366-6964.2014.07.017

基于基因C型鸭甲肝病毒VP1重组蛋白的鸭甲肝病毒抗体ELISA检测方法的建立

杨发龙[1,2],张焕容[1,2*],程方明[1],岳　华[1,2],汤　承[1,2]
(1.西南民族大学生命科学与技术学院,成都 610041;2.动物医学四川省高等学校重点实验室,成都 610041)

摘　要:以纯化的基因C型鸭甲肝病毒(DHAV-C) VP1重组蛋白作为包被抗原,建立检测DHAV-C抗体的间接ELISA方法。结果表明,试验的最佳条件:用pH9.6、0.05 mol·L^{-1}的碳酸盐缓冲液将包被抗原稀释成5 μg·mL^{-1},4 ℃包被过夜,抗体稀释度为1∶100,HRP酶标羊抗鸭IgG稀释度为1∶5 000,封闭液为含10%脱脂乳的0.01 mol·L^{-1} PBS,37 ℃封闭2 h,血清稀释液为含1% BSA的PBS,抗体反应时间为60 min,酶标羊抗鸭IgG反应时间为30 min,底物作用时间为15 min,临界值为$OD_{450\ nm}$≥0.474。该方法重复性好,批内变异系数为2.03%~2.95%,批间变异系数为3.28%~7.38%,与鸭圆环病毒(DUCV)、鸭乙型肝炎病毒(DHBV)、鸭瘟病毒(DPV)、新城疫病毒(NDV)、禽流感病毒(AIV)、鸭抗大肠杆菌、鸭抗金黄色葡萄球菌、鸭抗沙门菌、鸭抗禽多杀性巴氏杆菌以及鸭疫里默杆菌阳性血清无交叉反应,而与基因A型鸭甲肝病毒(DHAV-A)阳性血清有交叉反应,表明该方法可以作为检测DHAV-C和DHAV-A抗体的通用ELISA方法。与中和试验相比,阳性血清检测符合率为80%,阴性血清检测符合率为100%。初步临床应用表明:该方法可用于雏鸭母源抗体和免疫后抗体消长的检测。本研究基于DHAV-C VP1重组蛋白建立的间接ELISA方法可用于基因A型和C型鸭甲型肝炎的血清流行病学调查和抗体检测。

关键词:基因C型鸭甲肝病毒;VP1蛋白;间接ELISA;抗体检测
中图分类号:S855.3;S852.659.6　　**文献标志码**:A　　**文章编号**:0366-6964(2014)07-1148-06

Development of an Indirect ELISA for Detecting Antibodies against Genotype A and C Duck Hepatitis A Virus Based on Recombinant VP1 Protein

YANG Fa-long[1,2], ZHANG Huan-rong[1,2*], CHENG Fang-ming[1], YUE Hua[1,2], TANG Cheng[1,2]
(1. *College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu* 610041, *China*; 2. *Key Laboratory of Sichuan Institutes of Higher Learning, Chengdu* 610041, *China*)

Abstract: The aim of this study was to establish an indirect ELISA to rapidly detect antibody of genotype C duck hepatitis A virus (DHAV-C). An indirect ELISA based on DHAV-C VP1 recombinant protein as coating antigen was established for rapid detection of DHAV antibody. The reaction conditions were optimized, including 5 μg·mL^{-1} VP1 recombinant protein as coating antigen, 1:100 dilution of testing serum and 1:5000 dilution of HRP conjugated goat anti-duck IgG with cut-off value 0.474 ($OD_{450\ nm}$). The pH 9.6, 0.05 mol·L^{-1} bicarbonate buffer was used as coating antigen dilution buffer, the sealing buffer was 0.01 mol·L^{-1} PBS buffer containing 10% skimmed milk, and the dilution buffer was PBS buffer containing 1% BSA. The coating condition was at 4 ℃ for a whole night, antibody reacted with coating antigen for 60 min, HRP conjugated

收稿日期:2013-10-18
基金项目:国家高技术研究发展计划(2012AA101304);西南民族大学研究生学位点建设项目(2014XWD-S0906);四川省教育厅创新团队项目(13TD0057)
作者简介:杨发龙(1976-),男,青海大通人,博士,副教授,主要从事兽医微生物与免疫学研究
* **通信作者**:张焕容,E-mail:zhrong05@163.com

goat anti-duck IgG incubated for 30 min and substrate reaction time was 15 min. The specific test showed that there were no cross reactions with positive sera against duck circovirus, duck plaque virus, duck hepatitis B virus, Newcastle disease virus, avian influenza virus, duck *E. coli*, duck *Staphylococcus aureus*, duck *Salmonella anatis*, duck *Pasteurella multocida* and *Riemerella anatipestifer*. However, DHAV-A antibody showed cross reaction with DHAV-C VP1 recombinant protein. The inter- and intra-assay demonstrated that the co-efficient variations were 2.03%-2.95% and 3.28%-7.38%, respectively. Compared with neutralization test, the detection coincidences of positive and negative sera were 80% and 100%, respectively. This method had been successfully used to detect maternal antibody and the growth and decline of immune antibody. The results revealed that the indirect ELISA could be used for sero-epidemiological survey and antibody detection of duck hepatitis A disease caused by DHAV-A or DHAV-C.

Key words: genotype C duck hepatitis A virus (DHAV-C); recombinant VP1 protein; indirect ELISA; antibody detection

鸭病毒性肝炎（duck viral hepatitis，DVH）是由鸭肝炎病毒（duck hepatitis virus，DHV）引起雏鸭的一种以肝肿大和出血为主要病理变化的急性、高度接触性和致死性的传染病。DVH 以发病急、传播迅速、病死率高为特征。自发现以来，在全世界养鸭地区广泛分布，是危害养鸭业最为严重的传染病之一[1-3]。DHV 有 3 种血清型，分别为血清Ⅰ型 DHV（duck hepatitis virus type 1，DHV-1），血清Ⅱ型 DHV（duck hepatitis virus type 2，DHV-2），血清Ⅲ型 DHV（duck hepatitis virus type 3，DHV-3），3 种血清型 DHV 之间无血清学交叉反应。其中临床上最常见的 DHV-1，又称鸭甲肝病毒（duck hepatitis A virus，DHAV），为小 RNA 病毒，DHV-2 和 DHV-3 为星状病毒科成员。根据基因组成差异，DHAV 分为 3 种基因型，王丽艳等称之为基因 A 型、B 型和 C 型，分别对应传统血清Ⅰ型 DHAV，“台湾新型”和“韩国新型”DHAV[4-8]。目前在中国大陆主要流行基因 A 型和 C 型 DHAV。

DHAV-C 仅具有 1 个大的开放阅读框（ORF），长度为 6 756 bp，编码 1 个含 2 251 个氨基酸的多聚蛋白。在蛋白翻译过程中多聚蛋白被蛋白酶水解，其中 P1 区蛋白水解为 VP0、VP3 和 VP1 三种衣壳蛋白[9]。3 个基因型 DHAV 的基因组长度差异主要是由 *VP*1 基因以及 5′ 和 3′ UTR 的长度变异引起。DHAV-C *VP*1 基因全长 720 bp，编码 240 个氨基酸。*VP*1 基因作为小 RNA 病毒的主要抗原基因，其编码的蛋白能诱导机体产生保护性中和抗体，并且有识别相应受体的作用[10]。

本研究利用纯化的 DHAV-C VP1 重组蛋白作为包被抗原建立检测 DHAV 抗体的间接 ELISA 方法，为 DHAV 抗体的快速检测与血清流行病学调查提供基本方法。

1　材料与方法

1.1　质粒与菌株

DHAV-C *VP*1 基因原核表达载体 PET-32a(＋)-VP1 由西南民族大学动物医学实验室构建并保存[7]，原核表达工程菌 Rosetta (DE3) 购自 Biomed 公司。

1.2　血清

DHAV-C、DHAV-A、鸭瘟病毒（DPV）、新城疫病毒（NDV）、禽流感病毒（AIV）、鸭抗大肠杆菌、鸭抗金黄色葡萄球菌、鸭抗沙门菌、鸭抗禽多杀性巴氏杆菌、鸭疫里默杆菌阳性血清以及 SPF 鸭阴性血清均由西南民族大学动物医学实验室制备保存；鸭乙型肝炎病毒（DHBV）和鸭圆环病毒（DUCV）阳性血清由四川农业大学贾仁勇教授馈赠。

1.3　主要试剂

HRP 标记的羊抗鸭 IgG 购自 KPL 公司；TMB 购自 Thermo 公司；Tween-20 购自 Sigma 公司；酶标板购自 Corning costar 公司；BSA 购自 Biotopped 公司，BCA 蛋白定量试剂盒购自上海生工生物工程公司。

1.4　DHAV-C VP1 重组蛋白的纯化及特异性

按 HisTrap™ HP 亲和层析柱说明书对 DHAV-C VP1 重组蛋白纯化和复性，SDS-PAGE 检测纯度，按 BCA 蛋白定量试剂盒说明书测定纯化蛋白浓度，与兔抗 DHAV-C 血清和正常兔血清

Western blot 检测纯化的 DHAV-C VP1 重组蛋白的特异性。

1.5 间接 ELISA 抗原最佳包被浓度和最佳血清稀释度的选择

采用方阵法，用 pH9.6、0.05 mol·L^{-1}碳酸盐包被缓冲液将纯化的重组蛋白按 20、10、5 和 2.5 μg·mL^{-1}稀释后包被酶标板，100 μL·孔$^{-1}$，4 ℃过夜；洗涤后，用含 10%或 5%脱脂乳的 0.01 mol·L^{-1} PBS 100 μL·孔$^{-1}$ 37 ℃封闭 2 h；洗涤后，用含 0.05%Tween-20 的 0.01 mol·L^{-1} PBS 溶液(PBST)将阳性和阴性血清分别稀释 1∶100、1∶200、1∶300、1∶400，37 ℃孵育 1 h。洗涤后加入 HRP 标记的羊抗鸭 IgG (1∶5 000)，100 μL·孔$^{-1}$，37 ℃孵育 0.5 h；洗涤后加入底物 TMB 显色，室温避光孵育 15 min；加入 2 mol·L^{-1} H_2SO_4 终止，测定 $OD_{450\ nm}$值。根据 P/N 值确定最佳抗原包被浓度和血清最佳稀释度。

1.6 酶标二抗最佳稀释度的选择

应用已确定的最适抗原包被浓度和血清最佳稀释度来确定酶标二抗的最佳稀释度，将 HRP 标记的羊抗鸭 IgG 按 1∶1 000、1∶2 000、1∶3 000、1∶4 000、1∶5 000 和 1∶10 000 稀释，根据 P/N 值确定酶标二抗的最佳稀释度。

1.7 酶标二抗反应时间的优化

按照优化好的酶标二抗稀释度，酶标二抗 37 ℃孵育时间分别为 30、45、60、75 min，按以上 ELISA 程序，根据 P/N 值确定酶标二抗的最佳反应时间。

1.8 临界值的确定

按照最佳的 ELISA 工作条件，对 30 份不含 DHAV-C 抗体的鸭血清进行间接 ELISA 测定，测定 $OD_{450\ nm}$值，计算血清 $OD_{450\ nm}$平均值($\bar{x}$)和标准差(s)，确定阴阳性临界值($\bar{x}\pm 3s$)。

1.9 间接 ELISA 重复性试验

1.9.1 批内重复 同一批 2 块酶标板检测 DHAV-C 阳性和阴性血清各 1 份，每份血清各 3 个重复检测，计算批内变异系数。

1.9.2 批间重复 2 批次各 1 块酶标板检测 DHAV-C 阳性和阴性血清各 1 份，每份血清各 3 个重复检测，计算批间变异系数。

1.10 间接 ELISA 特异性试验

用建立的间接 ELISA 方法检测 DUCV、DHBV、DHAV-A、NDV、AIV、DPV、鸭抗大肠杆菌、鸭抗金黄色葡萄球菌、鸭抗沙门菌、鸭抗禽多杀性巴氏杆菌、鸭疫里默杆菌和 DHAV-C 的阳性血清，以验证建立的间接 ELISA 方法是否与其他病原鸭源阳性血清发生交叉反应。

1.11 敏感性试验

ELISA 检测 1∶100～1∶12 800 倍比稀释的 DHAV-C 阳性血清，确定该方法的敏感性。

1.12 与中和试验方法比较

采用中和试验方法对建立的间接 ELISA 方法检测的 15 份阳性血清和 15 份阴性血清进行检测，比较 2 种方法的符合率。

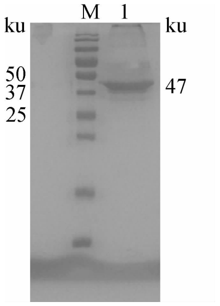
1.13 初步临床应用

免疫Ⅰ型 DHV 弱毒苗种鸭所产种蛋孵出的雏鸭分别在 2、5、8、11 和 14 日龄采血分离血清，用建立的间接 ELISA 测定母源抗体的消长情况；对 3 日龄雏鸭免疫Ⅰ型 DHV 弱毒苗后，采集免疫后 3、7、10 和 15 d 的血清，间接 ELISA 测定免疫后抗体的消长情况。对免疫 7 d 雏鸭攻毒，采集攻毒后 3、5 和 7 d 血清，间接 ELISA 测定攻毒后抗体消长情况。

2 结 果

2.1 纯化的 DHAV-C VP1 重组蛋白及其特异性

SDS-PAGE 显示 HisTrap™ HP 柱纯化的 VP1 蛋白只有 1 条 47 ku 左右的目的条带，如图 1。BCA 测定的蛋白浓度为 283 μg·mL^{-1}。DHAV-C VP1 蛋白能与兔抗 DHAV-C 血清特异性结合(图 2)。



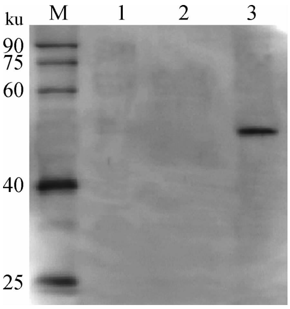
M. 蛋白质相对分子质量标准；1. 纯化的 VP1 重组蛋白
M. Protein marker；1. Purified recombinant VP1

图 1 纯化的 VP1 重组蛋白

Fig. 1 Purified VP1 recombinant protein

2.2 ELSIA 反应条件的确定

方阵试验结果显示，当抗原包被浓度为 5 μg·mL^{-1}，血清稀释度为 1∶100 时，$OD_{450\ nm}$值在 1.0 左右，且 P/N 值较高。因此，抗原包被浓度为 5 μg·mL^{-1}，血清稀释倍数为 100 倍。最适浓度抗原



M. EasySee Western 分子质量标准;1. pET32a(+)空载菌体;2. 健康兔血清;3. 纯化的重组 VP1 蛋白

M. EasySee Western marker; 1. No-recombinant pET32a (+) vector; 2. Sera from healthy rabbit; 3. Purified VP1 recombinant protein

图 2　VP1 重组蛋白的 Western blot 鉴定

Fig. 2　Western blot analysis of recombinant protein VP1

和血清与不同稀释度酶标二抗 ELISA 检测结果表明,酶标二抗最佳稀释度为 1∶5 000。最佳包被抗原浓度、血清稀释度和酶标二抗浓度优化酶标二抗的孵育时间为 30 min。

采用优化的间接 ELISA 最佳条件对 30 份鸭阴性血清进行 ELISA 检测,根据检测结果计算出 $OD_{450\ nm}$平均值为 0.321,标准方差(s)为 0.051,根据公式:阴阳性临界值=阴性血清 $OD_{450\ nm}$平均值+3×s,得出 0.474 为阴阳性血清检测临界值,即 $OD_{450\ nm} \geq 0.474$ 者判为阳性,$OD_{450\ nm} < 0.474$ 者判为阴性。

2.3　重复性

批内重复性试验结果显示,变异系数最大为 2.95%,最小为 2.03%,表明同一批酶标板具有很好的重复性。2 批包被板重复性试验结果显示,变异系数最大为 7.37%,最小为 3.28%,均未超过最大变异系数 10%,不同批次包被板具有很好的重复性。

2.4　特异性

间接 ELISA 检测 DUCV、DHBV、DHAV-A、NDV、AIV、DPV、鸭抗大肠杆菌、鸭抗金黄色葡萄球菌、鸭抗沙门菌、鸭抗禽多杀性巴氏杆菌、鸭疫里默杆菌和 DHAV-C 的阳性血清 $OD_{450\ nm}$ 分别为 0.356、0.375、0.828、0.443、0.312、0.302、0.334、0.342、0.333、0.317、0.234 和 1.307,除 DHAV 外,其他阳性血清的 $OD_{450\ nm}$ 值均小于临界值,而 DHAV-A 值为 0.828,表明建立的 DHAV-C 间接 ELISA 与 DHAV-A 阳性血清有交叉反应,该 ELISA 方法可作为检测 DHAV-C 与 DHAV-A 血清的通用方法。

2.5　敏感性

阳性血清稀释到 1∶6 400 倍时,$OD_{450\ nm}$ 为 0.489,检测仍为阳性,而阳性血清稀释为 1∶12 800 倍时,$OD_{450\ nm} < 0.474$,检测为阴性。

2.6　与中和试验方法比较结果

间接 ELISA 鉴定为 DHAV-C 阳性的血清 15 份,经中和试验鉴定为阳性 12 份,2 种方法检测阳性样本的符合率为 80%;间接 ELISA 检测阴性血清 15 份,经中和试验检测均为阴性,2 种方法检测阴性样本的符合率为 100%。

2.7　间接 ELISA 检测母源抗体和免疫抗体结果

间接 ELISA 检测结果表明,2 日龄时雏鸭母源抗体滴液较高,$OD_{450\ nm}$达到 1.583,随着雏鸭日龄的增加,母源抗体滴液逐渐降低,在 8 日龄时达到临界值,10 日龄以后母源抗体消失,如图 3。间接 ELISA 测定免疫雏鸭的抗体消长,结果表明:免疫后 3 d 开始产生抗体,7 d 时达到最大为 1.021,15 d 时抗体仍在临界值以上,如图 4。免疫 7 d 后攻毒,随时间的增加,抗体效价逐渐降低,如图 5。

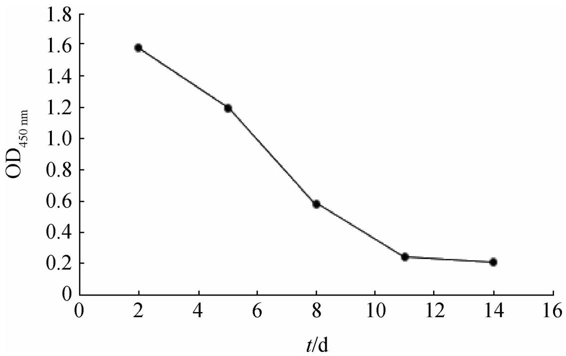


图 3　雏鸭母源抗体消长规律

Fig. 3　Growth and decline of maternal antibody in ducklings

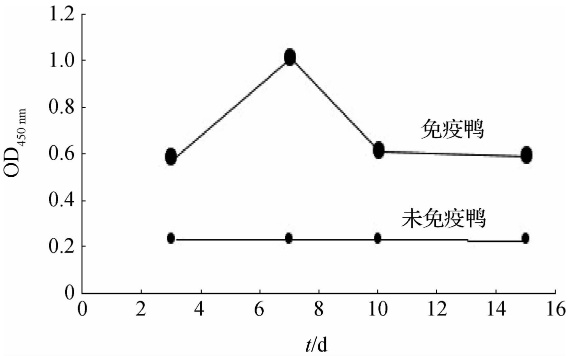


图 4　雏鸭免疫后抗体的消长规律

Fig. 4　Growth and decline of antibody in immunized ducklings

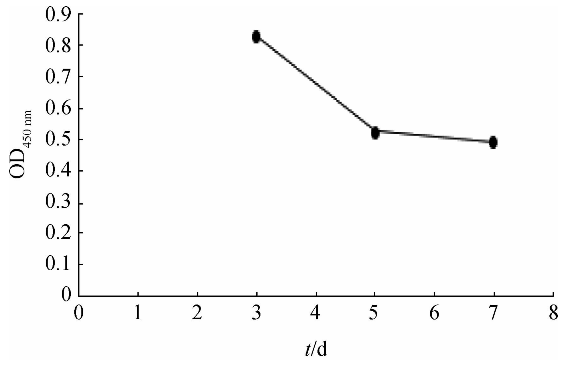


图5 免疫7 d后攻毒的抗体消长情况

Fig. 5 Growth and decline of antibody in challenged ducklings

3 讨 论

DVH是危害养鸭业最为严重的传染病之一，国内众多学者对DVH的检测诊断方法进行了研究，苏敬良等用病毒的分离来鉴定DHV[11]，病毒分离技术要求高，鉴定时间长；杨萍萍等用纯化的DHV病毒作为包被抗原建立的间接ELISA[12]，该方法中纯化DHV的设备超速冷冻离心机昂贵，操作复杂，包被抗原的制备较困难；程安春等建立了RT-PCR检测DHV[13]，该方法中需要特殊设备PCR仪，操作技术要求较高。DHAV-C是近年中国流行的1种DHV变异株，最关键的是针对DHAV-C的检测目前只停留在病毒的分离鉴定和RT-PCR方面[14]。ELISA方法具有特异性强、敏感性高和操作简单快速等优点，但对包被抗原的纯度要求较高。本研究利用构建好的DHAV-C *VP*1基因原核表达载体pET-32a(+)-VP1[7]，经诱导表达VP1重组蛋白，采用亲和层析来纯化VP1蛋白显著提高了蛋白的纯度，它作为ELISA的包被抗原特异性好。

VP1蛋白作为小RNA病毒的主要免疫原性蛋白，能诱导机体产生中和抗体。DHAV-C *VP*1基因与GenBank登录的DHAV-A、DHAV-B *VP*1基因核苷酸序列和氨基酸相似性分析表明：DHAV-C *VP*1基因与DHAV-A *VP*1基因之间的核苷酸序列相似性为67.8%～72.0%，氨基酸序列的相似性为67.6%～77.7%；DHAV-C *VP*1基因与DHAV-B *VP*1基因之间的核苷酸序列相似性为71.4%～74.0%，氨基酸序列相似性为71.2%～80.5%。3种基因型的DHAV *VP*1基因的核苷酸和氨基酸相似性较高，运用VP1重组蛋白作为包被抗原建立抗体检测的间接ELISA，可能会产生交叉反应。本研究试验结果证明：运用DHAV-C VP1重组蛋白作为包被抗原建立的间接ELISA与DHAV-A阳性血清有交叉反应，因此本研究建立的间接ELISA方法可作为不同基因型DHAV抗体的检测方法。

ELISA方法中降低ELISA非特异性至关重要。本研究对封闭液和血清稀释液等都进行了筛选。本研究先用1%的BSA作为封闭液，结果背景值高，经试验，含10%脱脂奶的封闭液37 ℃封闭2 h效果最好。初步临床应用表明：DHAV-C VP1重组蛋白作为包被抗原建立的抗体检测ELISA方法可以用于雏鸭母源抗体、免疫后抗体消长规律和攻毒后抗体消长规律的检测。基于DHAV-C VP1重组蛋白的DHAV-C和DHAV-A抗体检测ELISA的建立为DHV疫苗免疫后抗体水平监测、血清流行病学调查等提供了快速的方法。

4 结 论

以纯化的基因C型鸭甲肝病毒(DHAV-C) VP1重组蛋白作为包被抗原，建立检测DHAV-C抗体的间接ELISA方法。ELISA最佳条件：用pH 9.6、0.05 mol·L^{-1}的碳酸盐缓冲液将包被抗原稀释成5 μg·mL^{-1}，4 ℃包被过夜，抗体稀释度为1∶100，HRP酶标羊抗鸭IgG稀释度为1∶5 000，封闭液为含10%脱脂乳的0.01 mol·L^{-1} PBS，37 ℃封闭2 h，血清稀释液为含1% BSA的PBS，抗体反应时间为60 min，酶标羊抗鸭IgG反应时间为30 min，底物作用时间为15 min，临界值为$OD_{450\ nm}$≥0.474。该方法重复性好，特异性高，与基因A型鸭甲肝病毒(DHAV-A)阳性血清有交叉反应，可用于基因A型和C型鸭甲型肝炎的血清流行病学调查和抗体检测。

参考文献：

[1] DING C，ZHANG D. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 [J]. *Virology*，2007，361(1)：9-17.

[2] 范书才，李　虹，袁率珍，等. 新型鸭肝炎病毒的分离鉴定[J]. 中国预防兽医学报，2009，31(10)：770-775.

[3] TSENG C H，TSAI H J. Molecular characterization of a new serotype of duck hepatitis virus [J]. *Virus Res*，2007，126(1-2)：19-31.

[4] JIN X，ZHANG W，ZHANG W，et al. Identification

and molecular analysis of the highly pathogenic duck hepatitis virus type 1 in Hubei province of China[J]. *Res Vet Sci*, 2008, 85(3): 595-598.

[5] WANG L, PAN M, FU Y, et al. Classification of duck hepatitis virus into three genotypes based on molecular evolutionary analysis [J]. *Virus Genes*, 2008, 37(1): 52-59.

[6] KIM M C, KWON Y K, JOH S J, et al. 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 [J]. *Arch Virol*, 2007, 152(11): 2059-2072.

[7] 皮晋魁，聂培婷，黄秋雪，等. 基因 C 型鸭甲肝病毒 VP1 基因的克隆及原核表达[J]. 中国预防兽医学报，2012，34(9)：740-742.

[8] 何庆雄，程安春，汪铭书. Ⅰ型鸭病毒性肝炎诊断方法研究进展[J]. 中国预防兽医学报，2009，31(8)：664-666.

[9] TSENG C H, KNOWLES N J, TSAI H J. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 indicates that it should be assigned to a new genus [J]. *Virus Res*, 2007, 123(2): 190-203.

[10] LIU J, WANG F, NI Z, et al. Genetic diversity of the VP1 gene of duck hepatitis virus type I (DHV-I) isolates from southeast China is related to isolate attenuation[J]. *Virus Res*, 2008, 137(1): 137-141.

[11] 苏敬良，黄　瑜，贺荣莲，等. 新型鸭肝炎病毒的分离及初步鉴定[J]. 中国兽医科技，2002，32(1)：15-16.

[12] 杨萍萍，宋敏训，艾　武，等. 间接 ELISA 检测鸭病毒性肝炎抗体的研究[J]. 中国动物检疫，2004，21(1)：18-20.

[13] 程安春，汪铭书，信洪一，等. Ⅰ型鸭病毒性肝炎病毒 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医科学，2007，37(1)：38-42.

[14] HUANG Q, YUE H, ZHANG B, et al. Development of a real-time quantitative PCR for detecting duck hepatitis a virus genotype C [J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 51(10): 3318-3323.

（编辑　白永平）