

坦布苏病毒 NS1 蛋白的表达及 ELISA 检测方法的建立

提金凤^{1,2}, 李志杰², 李秀丽¹, 张敏敏¹, 张媛媛¹, 刁有祥^{1*}

(1. 山东农业大学 动物科技学院, 泰安 271018; 2. 山东畜牧兽医职业学院, 潍坊 261061)

摘要: 为了建立坦布苏病毒(TMUV)感染鸭群的抗体检测方法,以 TMUV NS1 的原核表达蛋白质作为包被抗原,建立了间接 ELISA 方法,并对该方法进行了检测条件的优化。将 TMUV NS1 全基因序列克隆至 pET-28a (+),利用 BL21(DE3)表达 NS1 蛋白,纯化后其质量浓度为 $4.16 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。通过方阵试验,确定了 NS1 蛋白的最佳包被质量浓度是 $100 \text{ ng} \cdot \text{孔}^{-1}$,检测血清的最佳稀释倍数为 40 倍。随后对检测条件进行了优化,优化后的结果:抗原的最佳包被条件是 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 作用过夜;酶标二抗的最佳工作条件是稀释 5 000 倍, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 作用 1 h;阴阳血清的临界值为 0.278。一系列试验验证了该检测方法具有很强的特异性、敏感性、重复性。对采集自山东各地的 80 份血清样品进行检测,其检测结果显示,该方法与经典的鸡胚中和试验检测结果的符合率为 93.5% 以上,且比传统的中和试验更敏感。对 TMUV 感染鸭群的血清进行检测,描述了 TMUV 感染后鸭群抗体水平的消长规律,为该病的防治提供重要的理论依据。以 NS1 蛋白为包被抗原的间接 ELISA 方法的建立为临床上 TMUV 的感染提供了一种新的抗体检测方法,尤其是在 TMUV 早期感染的检测方面有着更为广泛的应用前景。

关键词: 鸭坦布苏病毒; NS1 蛋白; 间接 ELISA; 检测方法

中图分类号: S858.325.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2016)05-0970-08

Expression of NS1 Protein of Tembusu Virus and Development of Indirect ELISA Assay

TI Jin-feng^{1,2}, LI Zhi-jie², LI Xiu-li¹, ZHANG Min-min¹, ZHANG Yuan-yuan¹, DIAO You-xiang^{1*}

(1. *Animal Science Institute, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China*; 2. *Shandong Vocational Animal Science and Veterinary College, Weifang 261061, China*)

Abstract: In order to establish a detection method about the antibodies to Tembusu virus (TMUV), TMUV NS1 prokaryotic expression protein was used as a coating antigen and an indirect ELISA method was established and optimized. TMUV NS1 gene sequence was cloned into pET-28a (+) and the recombinant expression vector PET-28-NS1 was developed. pET-28-NS1 was transformed into BL21 (DE3) and the fusion protein NS1 was successfully expressed. The NS1 protein was purified with different concentrations of urea and the concentration of NS1 protein was $4.16 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. According to phalanx test, the coating concentration of NS1 protein was $100 \text{ ng} \cdot \text{cell}^{-1}$ and the detected serum was diluted by 40 times. The detection conditions were optimized and the optimized conditions were as follows. The best incubation condition was overnight at $4 \text{ }^\circ\text{C}$; the secondary antibody was diluted by 5 000 times and incubated for 1 h at $37 \text{ }^\circ\text{C}$; the critical value of serum was 0.278. It was verified by a series of tests that the ELISA method based on NS1 protein had a higher specificity, sensitivity and reproducibility. Eighty serum samples collected from Shandong province were detected. The coincidence was above 93.5% between the results

收稿日期: 2015-10-20

基金项目: 国家自然科学基金(31272583; 31472199); 国家水禽产业技术体系项目(CARS-43-10); 山东省科技发展计划项目(2014GNC111023)

作者简介: 提金凤(1977-), 女, 山东莱州人, 讲师, 硕士, 主要从事动物病毒学, Tel: 0538-8249851, E-mail: cora865@126.com

* 通信作者: 刁有祥, Tel: 0538-8249851, E-mail: yxdiao@163.com

of ELISA and conventional neutralization test. Serums in ducks infected with TMUV were detected by the ELISA assay and dynamic changes of antibody levels were described. Prevention and control measures of this disease can be developed according to antibody characteristics. A new method for detecting antibodies to TMUV is developed and will provide wide use in the early detection of TMUV.

Key words: duck Tembusu virus; NS1 protein; indirect ELISA; detection methods

坦布苏病毒(Tembusu virus, TMUV)感染是近年来新出现的一种以水禽感染为主的病毒性传染病,产蛋鸭感染后主要表现为产蛋率下降,出血性卵巢炎;雏鸭感染后主要表现为扭脖、瘫痪等神经症状,死亡率较高^[1-2]。该病毒于 1955 年最早从蚊子体内分离得到,属于黄病毒科、黄病毒属中的那他耶病毒群^[3-5]。黄病毒属中的大多数病毒属于人畜共患,如登革热病毒、流行性乙型脑炎病毒、黄热病毒、西尼罗病毒等,每年都会引起数百万的人群感染或死亡,严重威胁着全世界人们的生命健康^[6]。

目前,针对 TMUV 感染的一些检测方法也已经陆续建立,如套式 PCR 检测方法^[7]、荧光定量 PCR^[8]、地高辛探针检测法^[9]、阻断 ELISA^[10]、间接 ELISA(E 蛋白为基础)^[11]等。PCR 方法主要是对病原进行检测,不能检测抗体;目前建立的阻断 ELISA 和间接 ELISA 检测方法,都是以 E 蛋白为包被抗原的检测方法,由于 E 蛋白是结构蛋白,以它为基础的检测方法不能区分活毒感染和灭活苗免疫产生的抗体^[12]。而 NS1 蛋白是 TMUV 的一种非结构蛋白,非结构蛋白只有在活毒感染宿主细胞时才会出现,且该蛋白质具有非常重要的生物学功能,能刺激机体产生非中和性的保护性抗体。因此以该蛋白质为基础建立的 ELISA 检测方法可以区分活毒感染和灭活苗免疫,在生产实践将会有更广泛的临床应用,发挥更重要的作用。

本研究成功表达了 TMUV NS1 原核蛋白,并以此为基础建立了敏感性、特异性及稳定性均很强的间接 ELISA 检测方法,为 TMUV 早期感染及活病毒感染的检测提供了方便敏感的检测方法,为进一步研究 NS1 蛋白的功能奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 病毒及血清

鸭坦布苏病毒 SDSG 株病毒由山东农业大学禽病研究所分离保存;新城疫(ND)、低致病性禽流感病毒(H9)、1 型鸭肝炎病毒(DHV-1)、3 型鸭肝炎病

毒(DHV-3)、鸭瘟病毒(DPV)等的阳性血清均来自山东农业大学禽病研究所;血清样品从山东潍坊、泰安、菏泽等地的鸭场采集。

1.2 试剂

HRP 标记的羊抗鸭酶标二抗,购自 KPL 公司;TMB 底物显色液,购自北京天根生物科技有限公司;IPTG,购自索莱宝生物科技有限公司;Random Premier、Taq DNA 聚合酶、pMD18-T 试剂盒、质粒快速提取试剂盒、DNA 凝胶纯化试剂盒等购自大连宝生物工程有限公司;Trizol 试剂、反转录酶 MLV、RNA 酶抑制剂、ddH₂O 等均购自北京全式金生物技术有限公司。其他试剂均为分析纯。

1.3 仪器

台式冷冻高速离心机(Beckman Coulter)、普通 PCR 仪(Applied Biosystems 2720)、凝胶成像系统(BIORAD)、电泳仪(北京市六一仪器厂)。

1.4 NS1 全基因原核重组表达载体的构建及鉴定

根据 GenBank 中 TMUV NS1 的全基因序列(登录号:KJ740748.1)设计引物,引物序列如下,NS1F:5'-CGGAATTCGACACGGGGTGCTCAATC-3',(下划线为 EcoR I 酶切位点);NS1R:5'-CCCAAGCTTAGCCATGACCTTTGATTGA-3',(下划线为 Hind III 酶切位点)。引物由上海生物工程有限公司合成。以 TMUV SDSG 株的 cDNA 为模板,扩增 NS1 全基因序列。NS1 基因的 PCR 产物回收后与原核表达载体 PET-28a(+)分别进行双酶切,回收后进行连接,构建 NS1 基因的原核重组表达载体 pET-28-NS1,并对构建的表达载体进行双酶切及测序鉴定。

1.5 NS1 重组蛋白质的诱导表达、纯化及鉴定

将鉴定为阳性的原核重组表达载体 pET-28-NS1 及空载体 pET-28a(+)同时转化至 BL21(DE3)表达菌中,挑取菌落,在 LB(Amp⁺)中培养过夜。5 mL LB(Amp⁺)中加入 1.0% 的新鲜菌液,37 °C 继续培养至 OD_{600 nm} 为 0.6~0.8,加入终浓度为 1 mmol·L⁻¹ 的 IPTG,诱导 1~6 h,然后进行

SDS-PAGE 电泳。SDS-PAGE 电泳参照分子克隆(第二版)进行。

1.6 融合蛋白质的制备和纯化

按照“1.5”所述的方法,诱导 100 mL 菌液(含 pET-28-NS1)。冰浴条件下超声波裂解菌液,12 000 r·min⁻¹×10 min 离心,取离心后的上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳。蛋白质沉淀采用梯度尿素法(1、3、5 mol·L⁻¹的尿素溶液)进行洗涤纯化,每次 12 000 r·min⁻¹×5 min 离心。纯化的蛋白质进行 SDS-PAGE 电泳,然后采用 BSA 蛋白含量测定试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司)测定纯化后蛋白质的浓度。

1.7 间接 ELISA 检测方法的建立

1.7.1 抗原最佳包被浓度和最佳血清稀释度的确定 采用方阵滴定法,在 96 孔 ELISA 板中,将纯化后的 NS1 蛋白用 0.05 mol·L⁻¹碳酸盐缓冲液(pH9.6)稀释至 400 μg·100 μL⁻¹,然后进行横向倍比稀释至 25 μg·100 μL⁻¹,每孔加入 100 μL,4℃包被过夜。然后加入倍比稀释的抗 TMUV 鸭阳性血清和阴性血清(纵向稀释),从 1:5 稀释至 1:1 280,100 μL·孔⁻¹,37℃作用 1.0 h。PBST 洗涤 3 次后加入羊抗鼠酶标二抗(1:5 000 稀释),50 μL·孔⁻¹,37℃作用 1.0 h。PBST 洗涤 3 次后加入 TMB 显色液,100 μL·孔⁻¹,37℃闭光显色 15 min,加入 2 mol·L⁻¹ H₂SO₄ 终止反应,50 μL·孔⁻¹,酶标仪测定 OD_{450 nm}。阳性血清与阴性血清 OD_{450 nm} 比值(P/N 值)最大时即为最佳抗原的包被浓度和血清稀释度。

1.7.2 抗原最佳包被条件的确定 以最佳抗原浓度包被 ELISA 板,分别采用 37℃作用 2 h,4℃作用过夜,37℃作用 2 h 后 4℃过夜,三种条件进行孵育,其他条件不变。按照“1.7.1”中所述的步骤测定抗原的最佳包被条件。

1.7.3 最佳封闭条件的确定 封闭液分别采用 5%的脱脂乳,4%的小牛血清;封闭时间分别采用 37℃作用 2 h,4℃作用过夜,37℃作用 2 h 后 4℃作用过夜。其他条件不变,按照“1.7.1”中所述的步骤确定最佳封闭液和最佳封闭时间。

1.7.4 酶标二抗最佳工作条件的确定 对酶标二抗进行稀释,选择最佳的稀释倍数;酶标二抗作用的时间分别采用 37℃1 h,37℃2 h,4℃作用过夜。其他条件不变,按照“1.7.1”中所述的步骤确定酶标

二抗的最佳稀释倍数和最佳作用时间。

1.7.5 间接 ELISA 临界值的确定 采用本研究中建立的 ELISA 检测方法,对采集的 20 份 TMUV 阴性血清样品进行检测,每份样品检测 3 遍,计算样品的 OD_{450 nm} 值和标准差,阳性样品的临界值=阴性 OD_{450 nm} 平均值+3×标准差,当样品 OD_{450 nm} 值大于此值则判为阳性。

1.7.6 特异性鉴定 采用本研究中建立的 ELISA 检测方法,对新城疫(ND)、H9 亚型禽流感(H9)、1 型鸭肝炎病毒(DHV-1)、3 型鸭肝炎病毒(DHV-3)、鸭瘟病毒(DPV)等的阳性血清进行检测,以确定该检测方法的特异性。

1.7.7 敏感性鉴定 将 TMUV 的阳性血清按 1:5~1:1 280 进行倍比稀释,采用本研究中建立的 ELISA 方法进行检测,以确定可以检测的血清最大稀释倍数,从而确定该方法的敏感性。

1.7.8 重复性鉴定 在同一块酶标板中检测 10 份血清样品,每份样品重复 3 孔,计算同一份血清样品的板内变异系数(CV%),以确定检测样品的板内重复性。

采用 3 块不同时间段包被的酶标板,对 10 份血清样品进行检测,计算同一份血清样品的板间变异系数(CV%),以确定检测样品的板间重复性。

1.8 临床样品的检测

从山东潍坊、泰安等地免疫过 TMUV 弱毒苗的种鸭场采集 120 份血清样品进行检测,同时与中和试验进行比较,从而确定该检测方法对临床样品的检测效率。

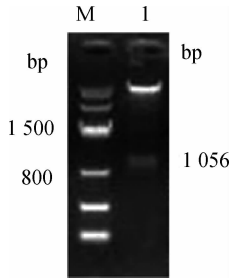
1.9 攻毒后雏鸭体内抗体水平的消长规律检测

对 20 日龄雏鸭攻毒 TMUV,分别采集攻毒后 1、3、5、7、9、11、13、15、17、21 d 的鸭血清,采用本研究建立的 ELISA 方法进行抗体检测,对攻毒后鸭体内 TMUV 抗体水平的消长规律进行鉴定。

2 结果

2.1 NS1 基因原核重组表达载体的鉴定

将重组质粒 pET-28-NS1 进行双酶切鉴定,酶切产物进行 0.8%的琼脂糖电泳鉴定,结果出现大小为 1 056 bp 的特异性条带(图 1)。重组质粒测序结果显示,其序列与 GenBank 上 TMUV NS1 序列的相似性为 100%。

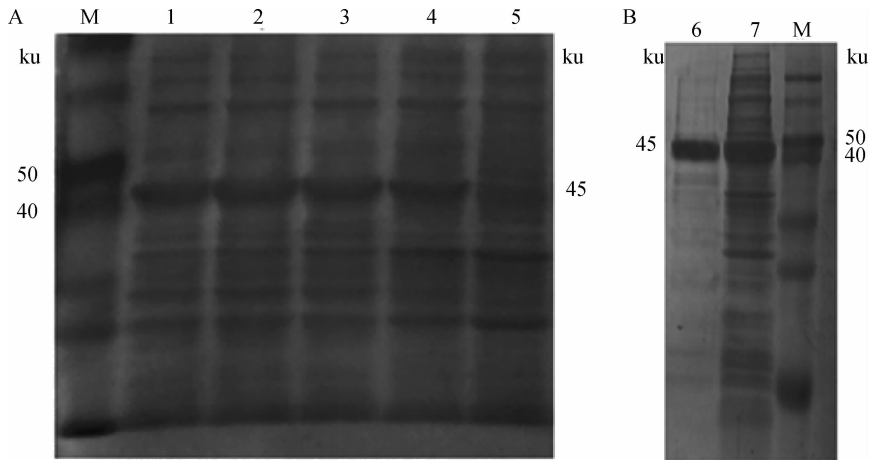


M. Marker 5000 相对分子质量标准;2. 重组质粒 pET-28-NS1 双酶切

M. Marker 5000;2. Double digestion of recombinant plasmid pET-28-NS1

图 1 重组质粒 pET-28-NS1 双酶切鉴定

Fig. 1 The identification of double enzyme digestion of pET-28-NS1



M. 蛋白质相对分子质量标准;1~4. 含 pET-28-NS1 的 BL21(DE3) 分别诱导 3、4、5、6 h;5. 含 pET-28-NS1 的 BL21 (DE3) 未经 IPTG 诱导;6. 纯化后的 NS1 蛋白;7. 含 pET-28-NS1 的 BL21 经 IPTG 诱导

M. Protein marker;1-4. BL21(DE3) containing pET-28-NS1 with inducing of IPTG for 3, 4, 5, 6 h;5. BL21 (DE3) containing pET-28-NS1 without inducing of IPTG;6. The purified NS1 protein;7. BL21 (DE3) containing pET-28-NS1 with inducing of IPTG

图 2 NS1 蛋白的原核表达及纯化后的 SDS-PAGE 鉴定

Fig. 2 Identification of SDS-PAGE of NS1 protein prokaryotic expression and purification

2.3 抗原最佳包被浓度和血清最佳稀释倍数的确定

采用方阵滴度法,将纯化后的 NS1 蛋白倍比稀释后包被 ELISA 板,阳性血清和阴性血清倍比稀释后进行检测。结果显示,阳性血清与阴性血清 OD_{450 nm} 比值最高为 9.44, NS1 蛋白的质量浓度为 100 ng · 孔⁻¹, 阳性血清的最佳稀释倍数为 40 倍。

2.4 抗原最佳包被条件的确定

采用最佳抗原包被浓度,在不同条件下进行包被,4 °C 作用过夜包被时,P/N(阳性血清与阴性血清的 OD_{450 nm} 比值)最大,且背景值最低。

2.5 酶标二抗最佳工作条件的确定

酶标二抗进行倍比稀释,待稀释倍数为 5 000

2.2 NS1 重组蛋白的表达及纯化

将原核重组表达载体 pET-28-NS1 及空载体 pET-28a 同时转化至大肠杆菌 BL21(DE3)中,终浓度为 1 mmol · L⁻¹ IPTG 分别诱导 1~6 h 后, SDS-PAGE 电泳结果显示,IPTG 诱导 5 h 后的蛋白质表达量最高,NS1 蛋白大小为 45 ku 左右(图 2)。超声波裂解菌液,将菌液上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE 电泳,结果显示,表达的蛋白质在沉淀中,以包涵体的形式存在。将超声波裂解后的菌液沉淀用不同浓度的尿素进行洗涤,最终获得纯度较高的表达蛋白质(图 2)。纯化后的 NS1 蛋白的质量浓度为 4.16 μg · μL⁻¹。

倍时,P/N 最大;采用不同的二抗作用温度和时间,37 °C 作用 1 h 时的 P/N 最大,且背景值最小。

2.6 间接 ELISA 临界值的确定

采用本研究建立的间接 ELISA 检测方法对 20 份鸭阴性血清进行检测,阴性血清 OD_{450 nm} 的平均值为 0.137,标准差为 0.047,根据公式临界值=阴性 OD_{450 nm} 平均值 + 3 × 标准差,阴阳性血清的临界值为 0.278。

2.7 特异性试验

采用本研究建立的间接 ELISA 检测方法对新城疫 (ND)、H9 亚型禽流感 (H9)、鸭肝炎病毒 (DHV)、鸭瘟病毒 (DPV) 等的阳性血清进行检测,

其 OD_{450 nm} 均小于临界值 0.278, 因此该检测方法具有良好的特异性。

2.8 敏感性试验

采用本研究建立的间接 ELISA 检测方法, 将阳性血清进行一系列倍比稀释, 待阳性血清稀释至 1:500 倍时, 其检测的 OD_{450 nm} 依然大于临界值。因此该检测方法具有较强的敏感性。

2.9 重复性试验

用同一块包被好的 ELISA 板检测 10 份不同的血清样品, 每份样品重复 3 次, 其样品的板内变异系数为 0.68%~1.321%; 用 3 块不同批次包被的 ELISA 板检测 10 份血清, 每份样品重复 3 次, 其检测结果的板间变异系数为 0.53%~2.413%, 变异系数均小于 5%。因此, 该检测方法具有非常好的

重复性。

2.10 临床样品的检测

对采集自山东各地区免疫过 TMUV 弱疫苗的鸭血清样品进行检测, 分别采用本研究建立的 ELISA 方法和经典的鸡胚中和试验, 其检测结果见表 1。结果显示, 中和试验检测为阳性的样品(中和滴度 SNT \geq 5), ELISA 检测结果也为阳性, 两种方法检测的阳性样品的符合率为 93.5% 以上, 而且, 本研究建立的 ELISA 检测方法比传统的中和试验更敏感。在 112 份中和试验检测为阳性的样品中, 有的血清样品中和滴度较低, 但 ELISA 检测的效价相对较高。但两种方法对血清样品阳性率的检测结果是一致的(表 2)。

表 1 两种检测方法对临床样品检测的比较

Table 1 Comparison of two detection assays for the detection of 120 clinical samples

方法 Detection assay	样品总数 Total sample	检测的阳性样品 Positive sample	检测的阳性率/% Positive rate
中和试验 Neutralization test	120	112	93.5
ELISA	120	115	95.8

表 2 两种检测方法对临床样品检测的比较(部分样品)

Table 2 Comparison of two detection assays for the detection of clinical samples(some samples)

样品 Sample	中和试验(滴度)	ELISA	
	Neutralization test (Titer)	滴度 Titer	OD _{450 nm}
1	5.84	80	1.27
2	10.2	40	1.43
3	17.8	80	0.84
4	6.9	40	1.16
5	11.5	160	0.72
6	6.31	80	0.78
7	20	160	0.64
8	7.0	40	0.98
9	5.2	40	0.88
10	8.3	80	1.05

2.11 免疫后雏鸭体内抗体水平的消长规律检测

对 20 日龄樱桃谷鸭攻毒 TMUV, 分别间隔 2 d 采集攻毒后的鸭血清, 采用本研究建立的 ELISA 方法进行抗体检测, 检测结果如图 3 所示。鸭群在攻毒后第 5 天抗体水平开始转阳, 之后抗体水平持续升高, 攻毒后 15 d 达到最高, 之后抗体滴度开始下降。该检测结果展示的抗体消长规律与孙晓燕(X.

Y. Sun) 等通过中和试验检测的 TMUV 感染鸭群的抗体消长水平是一致的^[13], 而且该方法能更早检测到鸭群抗体转阳。这与临床上鸭群感染 TMUV 后出现的抗体变化规律基本是一致的。因此, 该方法可以用于临床上 TMUV 感染鸭群或免疫鸭群血清抗体水平的检测, 为临床上更好地预防和控制该病制定合理的免疫措施和防控措施。

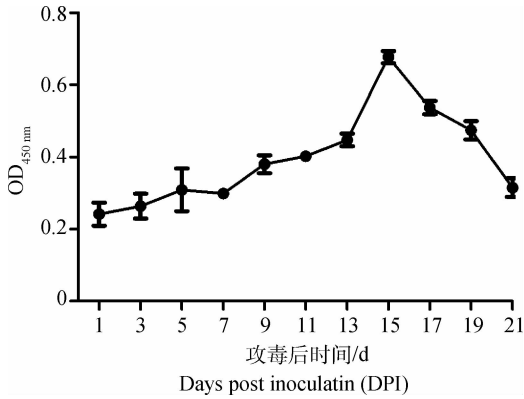


图 3 20 日龄桃谷鸭攻毒 TMUV 后抗体水平的检测

Fig. 3 Detection of antibodies to TMUV in ducks after inoculation at 20 dpi

3 讨论

坦布苏病毒属于黄病毒属中的蚊媒类病毒,蚊蝇在该病毒的传播中发挥着重要的媒介作用^[1]。自从 2010 年该传染病在我国东南部鸭场出现以来,该病毒在较短的时间内迅速传播到全国绝大多数的养鸭地区,给我国的养鸭业造成了严重的经济损失^[14]。坦布苏病毒基因组全长为 10 990 kb,包含一个开放阅读框,编码一个多聚蛋白,包括 3 种结构蛋白(C、prM、E)和 7 种非结构蛋白(NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B、NS5)^[14]。其中 NS1 蛋白是一种与膜功能密切相关的糖蛋白,包含多个 T 细胞和 B 细胞表位,参与病毒感染的免疫应答反应,能刺激机体产生非中和性的保护性抗体,在机体的免疫应答反应中发挥着极为重要的作用^[16-18]。尤其重要的是,NS1 蛋白不会产生病毒的抗体依赖性感染增强作用,这就意味着该蛋白质在疫苗的制备、蛋白质功能的研究及检测方法的建立等方面将发挥重要的作用^[19]。

目前,对于 TMUV 感染的检测方法有多种,其中 ELISA 方法具有操作简单、快速,可同时检测大量样品的优点,在临床检测中可广泛应用。多数检测黄病毒的商品化 ELISA 试剂盒采用灭活的全病毒作为抗原,但全病毒的纯化难度大,成本高,而且容易出现与其他黄病毒的交叉反应^[20]。TMUV 的纯化同样也面临着这样的问题,而且该病毒的病毒滴度下降较快。因此,以该病毒的结构或非结构蛋白为抗原来建立检测方法就有更广泛的应用价值。本研究以 NS1 蛋白为包被抗原,建立了检测 TMUV 活毒感染的间接 ELISA 检测方法,并且对

该方法进行了系列优化。目前,我国尚无该抗体检测的商品化 ELISA 试剂盒。

本研究通过原核表达系统成功表达了 TMUV NS1 蛋白,并利用不同浓度的尿素溶液对表达的蛋白进行纯化。若包被抗原的纯度不高,会严重影响到检测方法的敏感性、特异性和重复性。纯化后的 NS1 蛋白含量及纯度均很高,为 ELISA 检测方法的成功建立奠定了基础。NS1 蛋白是 TMUV 的一种非结构蛋白,只有在活毒感染机体时才会产生,并且该蛋白质是在病毒复制早期出现的^[21]。因此,以 NS1 蛋白为包被抗原的 ELISA 检测方法可用于 TMUV 早期感染的诊断。

ELISA 检测方法的特异性和敏感性与抗原的包被浓度、待测血清的稀释倍数也有密切的关系。若抗原包被浓度过高,抗原蛋白质分子之间频繁的相互作用容易造成蛋白质分子的多层化,使包被抗原在洗涤时容易被洗掉,导致检测结果出现非特异性;若浓度太低,载体表面吸附的抗原量不够,同样也可能出现假阴性,从而影响 ELISA 检测结果的敏感性^[22]。本研究通过方阵试验筛选出了抗原的最佳包被剂量,NS1 蛋白的最佳包被量为 100 ng·孔⁻¹。该抗原的包被量适中,符合抗原的包被要求。而谢星星等^[23]建立的 ELISA 检测方法,其 NS1 蛋白的包被剂量为 192 ng 左右,包被剂量是本研究中 NS1 蛋白包被剂量的二倍,这也表明本研究中表达的 NS1 蛋白纯度及活性更强,建立的检测方法的敏感性、特异性和稳定性更强。

同时,本研究对建立的 ELISA 检测方法的其他条件,如抗原的包被时间和温度、二抗的作用条件、敏感性、特异性和重复性等也分别进行了优化和鉴定。通过优化抗原的包被条件及二抗的作用条件,成功解决了鸭血清检测时背景值较高的缺陷。该检测方法具有良好的特异性,与 TMUV 的阳性血清反应敏感,而与新城疫(ND)、H9 亚型禽流感(H9)、鸭肝炎病毒(DHV)、鸭瘟病毒(DPV)等的阳性血清无任何交叉反应。该方法的敏感性很高,阳性血清稀释至 1:500 倍时,其检测结果依然大于临界值。该方法的重复性很强,板间和板内的变异系数均小于 5%。

应用该检测方法对临床上 120 份鸭血清样品进行检测,并且与血清中和试验进行比对,结果显示该检测方法具有更高的阳性检出率。通过检测接种 TMUV 后的 20 日龄桃谷鸭体内抗体水平的消长

规律,为临床上 TMUV 免疫及防治程序的合理制定提供了理论依据。而且本研究建立的 ELISA 检测方法能更早得检测到鸭群抗体转阳的时间,这可能是由于 NS1 蛋白是病毒感染早期产生的蛋白质,因此其抗体在 TMUV 感染后也能较早检测到,这在 TMUV 早期感染的检测及诊断中有着重要的意义,这也为更好地预防和控制该病提供更加有效检测手段^[12]。而且 NS1 蛋白是 TMUV 一种非结构蛋白,因此可以对实际生产中的 TMUV 野毒或活毒感染的水禽进行检测,从而确定水禽的活毒感染情况,而以 E 蛋白为包被抗原的 ELISA 方法却不能区分活毒或灭活苗的免疫^[12]。

因此,本研究建立的以 NS1 蛋白为基础的间接 ELISA 检测方法将在临床检测中发挥着重要的作用,为更好地检测和防控该病提供了一种敏感性、特异性和重复性强,操作简单,检测成本较低的方法。

4 结 论

作者建立了以 TMUV 非结构蛋白 NS1 为包被抗原的间接 ELISA 检测方法,该方法具有良好的特异性、稳定性和重复性。通过临床应用,该方法比中和试验敏感性更高,且操作简单、省时省力、检测成本较低;而且可以应用于临床上 TMUV 感染或免疫鸭群血清中抗体水平的检测,为临床上更好地预防和控制该病的发生提供了重要的检测手段及理论依据。

参考文献 (References):

- [1] CAO Z, ZHANG C, LIU Y, et al. Tembusu virus in ducks, China[J]. *Emerg Infect Dis*, 2011, 17(10): 1873-1875.
- [2] SU J, LI S, HU X, et al. Duck egg-drop syndrome caused by BYD virus, a new Tembusu-related flavivirus[J]. *PLoS One*, 2011, 6(3): e18106.
- [3] BOWEN E T, SIMPSON D I, PLATT G S, et al. Arbovirus infections in Sarawak, October 1968-February 1970; human serological studies in a land Dyak village [J]. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1975, 69(2): 182-186.
- [4] KARABATSOS N. Supplement to international catalogue of arboviruses including certain other viruses of vertebrates[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 1978, 27(2 Pt 2 Suppl): 372-440.
- [5] OLSON J G, KSIAZEK T G, GUBLER D J, et al. A survey for arboviral antibodies in sera of humans and animals in Lombok, Republic of Indonesia[J]. *Ann Trop Med Parasitol*, 1983, 77(2): 131-137.
- [6] LI S, LI X, ZHANG L, et al. Duck Tembusu virus exhibits neurovirulence in BALB/c mice[J]. *Virology*, 2013, 456: 260.
- [7] 颜丕熙, 李国新, 吴晓刚, 等. 应用套式 RT-PCR 快速检测鸭坦布苏病毒[J]. *中国动物传染病学报*, 2011, 19(3): 34-37.
- YAN P X, LI G X, WU X G, et al. Rapid identification of duck Tembusu virus by the nested RT-PCR[J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2011, 19(3): 34-37. (in Chinese)
- [8] 于春梅, 刁有祥, 唐 熠, 等. 坦布苏病毒荧光定量 RT-PCR 方法的建立[J]. *中国农业科学*, 2012, 45(21): 4492-4500.
- YU C M, DIAO Y X, TANG Y, et al. Fluorescence quantitative RT-PCR assay for detection of Tembusu virus[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, 45(21): 4492-4500. (in Chinese)
- [9] 高绪慧, 刁有祥, 唐 熠, 等. 探针检测鸭黄病毒的地高辛标记 DNA 的制备与应用[J]. *中国兽医学报*, 2012, 32(4): 525-528.
- GAO X H, DIAO Y X, TANG Y, et al. Preparation of digoxigenin-labeled DNA probe for detection of duck flavivirus and its application[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2012, 32(4): 525-528. (in Chinese)
- [10] LI X, LI G, TENG Q, et al. Development of a blocking ELISA for detection of serum neutralizing antibodies against newly emerged duck Tembusu virus [J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e53026.
- [11] 姬希文, 闫雨萍, 颜丕熙, 等. 鸭坦布苏病毒抗体间接 ELISA 检测方法的建立[J]. *中国预防兽医学报*, 2011, 33(8): 630-634.
- JI X W, YAN L P, YAN P X, et al. Establishment of an indirect ELISA for detection of antibody against duck Tembusu virus[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2011, 33(8): 630-634. (in Chinese)
- [12] SHU P Y, CHEN L K, CHANG S F, et al. Dengue NS1-specific antibody responses: isotype distribution and serotyping in patients with Dengue fever and Dengue hemorrhagic fever[J]. *J Med Virol*, 2000, 62(2): 224-232.
- [13] SUN X Y, DIAO Y X, WANG J, et al. Tembusu virus

- infection in Cherry Valley ducks: the effect of age at infection[J]. *Vet Microbiol*, 2014, 168(1): 16-24.
- [14] YAN P, ZHAO Y, ZHANG X, et al. An infectious disease of ducks caused by a newly emerged Tembusu virus strain in mainland China[J]. *Virology*, 2011, 417(1): 1-8.
- [15] YUN T, YE W, NI Z, et al. Identification and molecular characterization of a novel flavivirus isolated from Pekin ducklings in China[J]. *Vet Microbiol*, 2012, 157(3-4): 311-319.
- [16] LINDENBACH B D, RICE C M. trans-Complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication[J]. *J Virol*, 1997, 71(12): 9608-9617.
- [17] SCHLESINGER J J. Flavivirus nonstructural protein NS1: complementary surprises[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(50): 18879-18880.
- [18] TAFUKU S, MIYATA T, TADANO M, et al. Japanese encephalitis virus structural and nonstructural proteins expressed in *Escherichia coli* induce protective immunity in mice[J]. *Microbes Infect*, 2012, 14(2): 169-176.
- [19] HUA R H, LIU L K, CHEN Z S, et al. Comprehensive mapping antigenic epitopes of NS1 protein of Japanese encephalitis virus with monoclonal antibodies[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e67553.
- [20] 靳宇田. 鸭坦布苏病毒 JS2010 株的分离鉴定及间接 ELISA 检测方法的建立[D]. 安徽: 安徽农业大学, 2013.
- JIN Y T. Isolation and identification of duck Tembusu virus JS2010 strain and Establishment of indirect ELISA to detect antibodies against duck Tembusu virus[D]. Anhui: Anhui Agricultural University, 2013. (in Chinese)
- [21] PACCA C C, SEVETINO A A, MONDINI A, et al. RNA interference inhibits yellow fever virus replication *in vitro* and *in vivo* [J]. *Virus Genes*, 2009, 38(2): 224-231.
- [22] 张文文. 猪 TTV2ORF1 基因的原核表达以及间接 ELISA 检测方法的建立[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- ZHANG W W. Prokaryotic expression of open reading frame 1 gene of torque teno virus 2 and development of an indirect ELISA diagnostic method[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012. (in Chinese)
- [23] 谢星星, 李祥瑞, 李 银, 等. 检测坦布苏病毒病抗体 NS1-ELISA 方法的建立与初步应用[J]. 浙江农业学报, 2014, 26(1): 135-140.
- XIE X X, LI X R, LI Y, et al. Establishment of an NS1-ELISA for detection of antibody against Tembusu virus and initial application[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2014, 26(1): 135-140. (in Chinese)
- (编辑 白永平)