

鸭坦布苏病毒 E 蛋白特异性抗原表位鉴定及 Epitope-ELISA 血清学诊断方法建立

李晨曦, 白小飞, 邵周伍林, 张青山, 刘 明, 张 云*

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室, 哈尔滨 150001)

摘 要: 旨在建立鸭坦布苏病毒(DTMUV)的特异性血清学诊断方法。本研究以纯化的单克隆抗体 1A5 为固相筛选分子, 利用噬菌体展示技术鉴定 DTMUV 囊膜(E)蛋白的特异性抗原表位, 并利用 DNASTar 分析抗原表位序列在 DTMUV 中保守性和与其他黄病毒的 E 蛋白相应位点的氨基酸序列相似性。结果成功筛选到 DTMUV E 蛋白的一个线性抗原表位_{87 YAEYI₉₁}, 该抗原表位在 DTMUV 中具有高度的保守性, 无氨基酸位点差异, 而与其他黄病毒 E 蛋白相应位点的氨基酸序列不具有相似性。Dot-Blotting 结果表明表位_{87 YAEYI₉₁}与 DTMUV 阳性血清具有良好的亲和性, 而与 JEV、DENV、WNV 等黄病毒阳性血清间不出现交叉反应, 可见抗原表位_{87 YAEYI₉₁}为 DTMUV 所特有的抗原表位。利用 DTMUV 特异性抗原表位_{87 YAEYI₉₁}建立 Epitope-ELISA 血清学诊断方法并对 126 份鸭血清样品进行检测, 以中和试验作为标准进行比较, 结果显示 Epitope-ELISA 检测方法的相对特异性为 100%, 相对敏感度为 96%, 并且 Epitope-ELISA 与其他黄病毒血清间不出现交叉反应性, 表明本研究建立的 Epitope-ELISA 检测方法是一种特异的、灵敏的 ELISA 血清学诊断方法。

关键词: 鸭坦布苏病毒; 抗原表位; 交叉反应性; Epitope-ELISA

中图分类号: S852.659.6

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2017)10-1958-11

Unique Antigenic Epitope Identification of Duck Tembusu Virus Envelope Protein and Development of Epitope-ELISA

LI Chen-xi, BAI Xiao-fei, SHAOZHOU Wu-lin, ZHANG Qing-shan, LIU Ming, ZHANG Yun*

(State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China)

Abstract: In this study, a unique antigenic epitope _{87 YAEYI₉₁} on E protein of duck Tembusu virus (DTMUV) was identified by phage display technology with purified monoclonal antibodies (MAb) 1A5 against DTMUV E protein. To determine whether the _{87 YAEYI₉₁} sequence is conserved among the E proteins of flaviviruses, we aligned the E protein amino acid sequences of flaviviruses. The results revealed that YAEYI was highly conservative in DTMUV strain, but the epitope sequence wasn't conserved among the corresponding amino acid sequence of the E protein in other strains of flavivirus. Dot blotting assay showed that epitope _{87 YAEYI₉₁} had a good affinity with positive sera to DTMUV, and there was not cross-reacting with JEV-, DENV-, WNV-positive sera, suggesting that _{87 YAEYI₉₁} was DTMUV unique epitope. An Epitope-ELISA assay was established by using unique epitope (_{87 YAEYI₉₁}) fused protein and used to test duck serum samples which were also detected by the Neutralization Test as the standard method. According

收稿日期: 2017-05-02

基金项目: 十三五重点研发项目(2016YFD0500100); 国家自然科学基金面上项目(31670153); 中国农业科学院协同创新项目(CAAS-XTCX2016011-04-9)

作者简介: 李晨曦(1992-), 男, 黑龙江双鸭山人, 硕士生, 主要从事水禽病毒病的研究

* 通信作者: 张 云, 副研究员, 硕士生导师, E-mail: yunzhang01@126.com

to results, the specificity of this test was 100%. The sensitivity of this epitope-based peptide serologic test for DTMUV infection was 96%. So, Epitope-ELISA was a specific method for detecting antibodies against DTMUV.

Key words: duck Tembusu virus; epitope; cross-reacting; Epitope-ELISA

鸭坦布苏病毒病是由鸭坦布苏病毒(duck Tembusu virus, DTMUV)引起的一种以蛋鸭产蛋量骤然下降为特征的一种急性传染病,该病于 2010 年在我国江浙地区首次暴发,并迅速传播蔓延,给我国鸭养殖业造成了巨大的经济损失^[1-2]。DTMUV 属于黄病毒科黄病毒属,为单股正链 RNA 病毒,病毒基因组大小为 10 990 nt,含 5'-UTR、3'-UTR 及中间一个开放的阅读框,不含 Ploy A 尾巴,病毒基因组共编码 3 种结构蛋白:C 蛋白、M 前体蛋白 PrM、E 蛋白,七种非结构蛋白:NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B、NS5^[3-5]。黄病毒中 E 蛋白是病毒的主要结构蛋白,位于病毒颗粒的表面,是引起宿主抗感染免疫的主要保护性抗原,其表面存在大量的抗原决定簇,具有良好的免疫原性与反应原性,能够诱导宿主产生中和抗体^[6-7]。

由于传播迅速,DTMUV 的监测和疾病诊断越来越被学者们所重视^[8-9]。DTMUV 与登革热病毒(DENV)、日本乙型脑炎病毒(JEV)、西尼罗河病毒(WNV)等黄病毒属同科同属病毒,而黄病毒 E 蛋白间又有一定的相似性,因此黄病毒属各个病毒阳性血清间具有一定的交叉反应性,这为疾病的血清学诊断造成了一定困难^[10]。因此,本研究利用噬菌体展示技术筛选 DTMUV E 蛋白抗原表位,并利用特异性抗原表位建立 Epitope-ELISA 血清学诊断方法,为该病的快速检测和临床上抗体水平的评估提供技术手段。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

单克隆抗体(MAb)1A5 由本实验室制备保存;鸭坦布苏病毒(DTMUV)、鸭瘟病毒(DEV)、番鸭细小病毒(MDPV)、I 型鸭肝炎病毒(DHV)阳性血清均由本实验室保存;登革热病毒(DENV)、日本乙型脑炎病毒(JEV)、西尼罗河病毒(WNV)等阳性血清由华荣虹与祁贤博士提供。pGEX-6P-1 质粒、感受态大肠杆菌 DH5 α 及感受态细胞 BL21(DE3)均购自宝生物(TaKaRa)公司。

1.2 主要试剂

噬菌体随机 12 肽库及限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I 购自 New England Bio labs 公司;T4 连接酶购自 TaKaRa 公司;质粒小量试剂盒购自 Axygen 公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的鼠抗 M13IgG、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG、HRP 标记的羊抗鸭 IgG、HRP 标记的羊抗兔 IgG、HRP 标记的羊抗人 IgG 均购自 KPL 公司;蛋白质相对分子质量 Marker 购自 MBI 公司;DAB 显色液购自北京中杉金桥公司;TMB 显色液购自武汉博士德公司;Immobilized Protein G Column 购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.3 抗原表位鉴定

1.3.1 单克隆抗体的纯化 本实验室以原核表达的 DTMUV TA 株的囊膜(E)蛋白免疫小鼠,成功制备了一株单克隆抗体(MAb)1A5^[11-12]。利用 Protein G 亲和层析柱对 MAb 1A5 进行纯化,纯化步骤参考相关文献^[13-16]。取 500 μ L 单克隆抗体 1A5,10 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 去除杂质,取上清,用 5 倍体积的 Binding Buffer(PBS, pH 7.2)进行稀释,将单抗稀释液经过 Protein G 亲和层析柱进行纯化,上样流速为 1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。然后用 10 mL Binding Buffer 再次清洗柱子除去杂质。用 5 mL Elution Buffer(PBS, 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Gly, pH 2.5)洗脱结合在亲和层析柱上的抗体,流速 0.5 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,收集洗脱液,每 1 mL 加入 100 μ L Neutralization Buffer(PBS, 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris, pH 8.5)进行中和。纯化后的单克隆抗体用紫外分光光度计测其浓度并取 10 μ L 抗体加入 2 μ L β 巯基乙醇室温孵育 5 min,进行 SDS-PAGE 分析。

1.3.2 生物淘选 以纯化的单克隆抗体 1A5 为固相载体分子对噬菌体随机 12 肽库进行淘选,淘选步骤参考文献^[14-17]。将纯化的 MAb 1A5 以 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度包被 ELISA 板,每孔 100 μ L,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,以 BSA 作为阴性对照。第二日,弃去包被液,用封闭缓冲液(0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaHCO_3 , pH 8.6,5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ BSA, 0.02% NaN_3)37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h,以 0.1% 的 TBST 洗 6 次。加入噬菌体肽库,室温轻

柔振荡 1 h,使噬菌体与抗体结合。再次洗涤 6 次后,每孔加入 100 μL 0.2 mol \cdot L⁻¹ Glycine-HCl (pH 2.7) 洗脱,将洗脱液转至 1.5 mL 离心管,加入 15 μL 1 mol \cdot L⁻¹ Tris-HCl (pH 9) 中和至中性。取 1 μL 中和液测定噬菌体滴度,其余扩增纯化并进行下一轮筛选。共对噬菌体淘选 4 轮,并且在第 2~4 轮淘选过程中将包被的抗体浓度分别降低至 50、10 与 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, Tween-20 的浓度提高到 0.5%。第四轮淘选后,挑取单个噬菌斑进行增殖,筛选阳性噬菌斑克隆。

1.3.3 噬菌斑阳性克隆的筛选 将 MA5 1A5 (100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 包被 ELISA 板上,每孔 100 μL , 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。第二天加满封闭缓冲液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h。甩干封闭缓冲液,加入 1×10^6 pfu 噬菌斑克隆,以原始的噬菌体文库为阴性对照,室温温和作用 1 h。TBST(0.5% Tween-20)洗涤 6 次,加入 1:5 000 倍稀释的 HRP 标记的鼠抗 M13 IgG,每孔 200 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。洗涤 6 次,每孔加入 100 μL TMB 底物溶液,避光室温作用 20 min,加入 2 mol \cdot L⁻¹

H₂SO₄ 终止反应。测定 450 nm 吸光值。ELISA 检测结果阳性者进行测序。

1.3.4 模拟表位分析 阳性噬菌斑克隆测序成功后,对噬菌体所展示的 12 肽序列进行相似性比较分析,根据 12 肽中各个氨基酸出现的频率及位置关系确定出模拟表位的氨基酸序列,再对模拟表位与 DTMUV E 蛋白氨基酸序列进行同源性比较,初步确定 DTMUV E 蛋白上的抗原表位氨基酸序列。

1.3.5 序列合成及重组质粒构建 人工合成筛选到的抗原表位的寡核苷酸序列,并用 C 端与 N 端逐个氨基酸缩短的方法,设计合成相应多肽的寡核苷酸序列。寡核苷酸序列见表 1。在互补的两条寡核苷酸链中,正义链 5' 端引入 *Xho* I 酶切位点,反义链 5' 端引入 *Eco*R I 酶切位点。寡核苷酸链由吉林省库美生物科技有限公司合成。两条互补的寡核苷酸链,退火后可形成双链的 DNA,可直接与 *Eco*R I 和 *Xho* I 酶切处理的 pGEX-6P-1 载体连接,得到重组质粒送吉林省库美生物科技有限公司进行测序验证。

表 1 寡核苷酸序列和其对应的短肽序列

Table 1 The oligo nucleotide sequence of designed short peptide expressions

引物 Primers	序列(5'→3') Sequence	截断肽 Truncated peptide
1A5-1-F	AATTCTACGCTGAATACATAC	YAEYI
1A5-1-R	TCGAGTATGTATTCAGCGTAG	
1A5-2-F	AATTCGCTGAATACATAC	AEYI
1A5-2-R	TCGAGTATGTATTCAGCG	
1A5-3-F	AATTCTACGCTGAATACC	YAEY
1A5-3-R	TCGAGGTATTCAGCGTAG	

1.3.6 质粒诱导表达及 Western blot 分析 将测序正确的重组质粒进行诱导表达,表达后的样品经 SDS-PAGE 电泳后,电转移到纤维硝酸素(NC)膜上;用 5% 脱脂乳(PBS)4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜,PBS 洗 3 遍,每遍 5 min;以 1:1 000 倍稀释的单抗 1A5 作为一抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,PBST(0.1% Tween-20)洗 3 遍,每遍 5 min;然后 1:2 000 倍稀释的 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 作为二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,PBST(0.1% Tween-20)洗 3 遍,每遍 5 min;DAB 显色,观察结果。

1.3.7 抗原表位同源性分析 从 GenBank 上选取具有代表性的黄病毒属病毒株,如表 2,利用 DNASTar Lasergene Program (DNASTAR Inc,

Madison, WI, USA) 对 DTMUV 与黄病毒属 DENV、JEV、WNV 的 E 蛋白进行序列比对,以分析筛选到的 DTMUV E 蛋白的线性抗原表位在黄病毒中的同源性。

1.3.8 抗原表位交叉反应性分析 利用 Dot-Blotting 分析筛选到的 DTMUV E 蛋白的线性抗原表位在 DTMUV、JEV、DENV、WNV 阳性血清间的交叉反应性。方法:将融合表达的肽段,取 5 μL 点于 NC 膜上,室温干燥 30 min;用 5% 脱脂乳(PBS)37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h,PBS 洗 3 遍,每遍 5 min;将 DTMUV(鸭源)、JEV(兔源)、DENV(人源)、WNV(兔源)阳性血清 1:10 倍稀释,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,PBS 洗 3 遍,每遍 5 min;将 HRP 标记的羊抗人 IgG、羊

表 2 黄病毒毒株相关资料

Table 2 Flaviviruses strains used in the sequence analysis in this study

病毒名 Virus name	毒株名 Strain name	GenBank 登陆号 GenBank No.	分离信息 Isolation information	
			地点 Site	年份 Years
DTMUV	TA	JQ289550.1	China	2010
DTMUV	DK/TH/CU-1	KR061333.1	Thailand	2013
DTMUV	GDHD2014-3	KT159713.1	China	2014
DENV-1	HNRG24827	KC692511.1	Argentina	2010
DENV-2	DENV-2/Pk/Swat-02	KJ701507.1	Pakistan	2013
DENV-3	D83-144	KJ737430.1	Thailand	1983
DENV-4	EHI310A129SY10	JX024758.1	Singapore	2010
WNV	USA	AY646354.1	USA	2002
WNV	FtC-3699	KR868734.1	USA	2012
JEV	HEN0701	FJ495189.1	China	2007
JEV	CC27-S6	AY303797.1	Taiwan, China	2003

抗鸭 IgG、羊抗兔 IgG 二抗进行 1 : 250 倍稀释, 37 °C 孵育 1 h, PBS 洗 3 遍, 每遍 5 min; DAB 显色。

1.4 Epitope-ELISA 诊断方法的建立

1.4.1 抗原蛋白和血清最佳稀释度的确定 用矩阵滴定法^[18-19]对抗原表位融合蛋白的最佳包被浓度及 DTMUV 阳性血清最佳反应浓度进行确定。将抗原表位融合蛋白以 1 : 10 开始进行 10 倍梯度稀释, 包被 ELISA 板上, 每孔加 100 μ L 的包被液, 4 °C 孵育过夜。将 DTMUV 阳性与阴性血清以 1 : 20 开始进行 2 倍梯度稀释, 每孔加入 100 μ L, 37 °C 孵育 1 h。以 1 : 1 500 倍稀释的 HRP 标记的羊抗鸭 IgG 进行二抗的孵育, 每孔 100 μ L, 37 °C 孵育 1 h。其他步骤按照 ELISA 程序进行。最后 TMB 底物显色液, 每孔加 50 μ L, 在 37 °C 避光温育显色 10 min, 以 2 mol \cdot L⁻¹ H₂SO₄ 终止液中中止显色, 酶标仪 450 nm 读取 OD 值。判定标准: 选取阳性血清 (P)/阴性血清值 (N) > 2.1, 且阳性 OD_{450 nm} 值为接近 1.0 左右的抗原表位蛋白包被浓度和血清的最大稀释倍数为蛋白质和血清的最佳工作浓度。

1.4.2 封闭液的选择 确定抗原表位蛋白与血清最佳工作浓度之后, 再分别以 5% 聚乙烯醇、5% 脱脂乳、1% BSA、1% 明胶、2% 卵清蛋白作为封闭液。计算 P/N 值, 选 P/N 最大值为最佳封闭液进行后续试验。

1.4.3 待检血清反应时间的确定 在确定抗原表位蛋白和血清的最佳工作浓度、最佳封闭液后, 将血清孵育时间分别定为 37 °C 45 min、37 °C 60

min、37 °C 75 min、37 °C 90 min, 比较不同孵育时间的 P/N 值, 取 P/N 最大值为血清最佳反应时间。

1.4.4 酶标二抗最佳反应时间的确定 根据上述反应条件, 加入二抗后, 孵育时间分别为 37 °C 45 min、37 °C 60 min、37 °C 75 min、37 °C 90 min, 比较各组的 P/N 值, 取 P/N 的最大值时为二抗最佳反应时间。

1.4.5 阴阳性临界值的确定 根据试验确立的 ELISA 最佳反应条件, 对 25 份鸭 DTMUV 阴性血清样品进行检测, 根据结果计算阴性样品的 OD_{450 nm} 平均值 (\bar{x}) 和标准差 (s), 确定阴阳性标准的临界值, 阴阳性临界值 = 阴性样品 $\bar{x} + 3s$ 。

1.4.6 特异性试验 用已经建立的鸭 DTMUV 血清 Epitope-ELISA 检测方法对 I 型鸭肝炎病毒 (DHV-I)、鸭病毒性肠炎病毒 (DEV)、番鸭细小病毒 (MDPV) 阳性血清进行检测, 分析其交叉反应性。

1.4.7 重复性试验 批内重复性试验: 用同一批次包被的 ELISA 板, 检测 6 份不同 DTMUV 血清, 进行批内 6 次重复试验, 用统计学分析其结果, 以检验其批内重复性。

批间重复性试验: 用不同批次包被的 ELISA 板, 加入 6 份 DTMUV 血清, 进行批内 6 次重复试验, 其结果用统计学分析, 以检验其批间重复性。

1.4.8 敏感性试验 以血清中和试验 (serum neutralization tests, SN) 作为标准对 126 份鸭血清样品进行检测^[18]。用建立的 Epitope-ELISA 对上述 126 份鸭血清进行检测, 以血清中和试验作为标准, 根据检测结果计算其特异性与敏感性。

2 结果

2.1 抗原表位鉴定结果

2.1.1 单克隆抗体纯化 经 Immobilized Protein G Column 纯化后的单克隆抗体 1A5, 利用 β 巯基乙醇打断二硫键并通过 SDS-PAGE 进行分析, 结果显示分别在 55 与 26 ku 处出现单一的重链和轻链条带(图 1), 说明抗体纯化成功, 利用紫外分光光度计测得纯化后抗体质量浓度为 $1.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

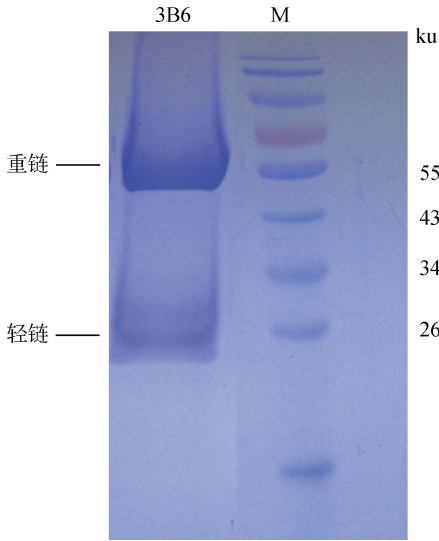


图 1 纯化抗体 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of purified MAb

表 3 噬菌体克隆展示的 12 肽序列及其同源性分析

Table 3 Peptides sequences of phage clones and their consensus sequences

噬菌体克隆 Phage clones	序列 Sequence														
C1	S	R	N	L	S	Y	A	E	Y	I	Q	I			
C2				G	N	Y	S	E	Y	I	V	G	K	L	V
C3				S	S	Y	H	N	Y	I	Q	F	R	N	T
C4				S	S	Y	T	A	Y	I	M	A	R	G	Q
C5	N	S	M	S	E	Y	I	N	Y	I	L	T			
C6				V	D	Y	S	T	Y	I	S	R	L	T	S
C7		N	F	M	N	Y	A	E	Y	V	Q	K	K		
C8				V	D	Y	S	T	Y	I	S	R	L	T	S
C9		T	V	H	S	Y	E	E	Y	I	V	Q	K	K	
C10			V	S	P	Y	A	E	Y	T	A	R	R		
C11				W	D	Y	N	L	Y	I	K	Y	V	A	R
C12				V	D	Y	A	L	Y	I	S	R	L	T	S
Consensus						Y	A	E	Y	I					
Virus TA	84		K	A	T	Y	A	E	Y	I	C	K	K	D	97

2.1.2 噬菌斑阳性克隆筛选结果 通过 ELISA 反应, 最终筛选到与单克隆抗体 1A5 呈现特异性反应的 12 个阳性克隆, 见图 2。

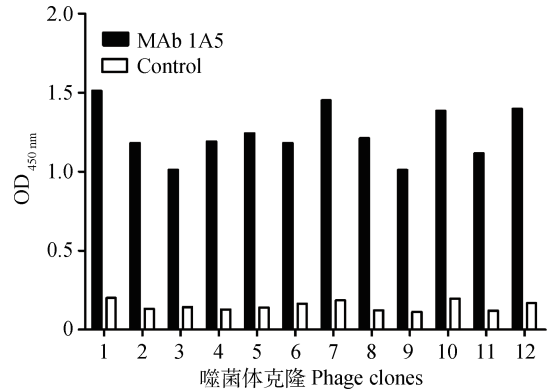
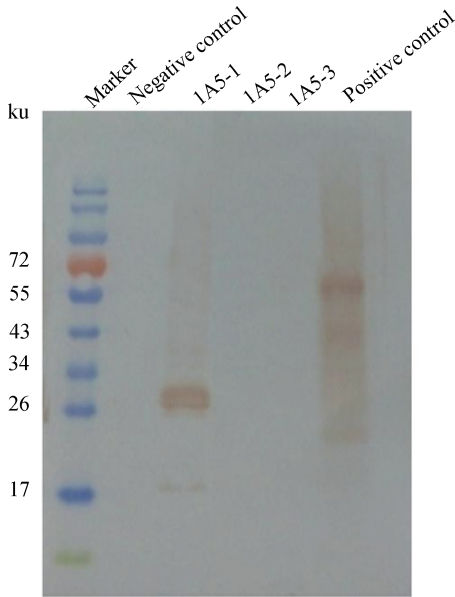


图 2 噬菌体克隆与 MAb 结合的 ELISA 检测结果

Fig. 2 Detection of combination between phage and MAb by ELISA

2.1.3 阳性噬菌体克隆测序及相似性分析 通过分析阳性噬菌体表面所展示的各个氨基酸出现频率及位置关系, 最终确定一个模拟表位序列为 YAEYI, 将该序列与 DTMUV E 蛋白氨基酸序列进行比对分析, 发现模拟表位序列与 E 蛋白 87-YAEYI-92 序列一致(表 3)。

2.1.4 融合多肽的 Western blot 分析 将人工合成的寡核苷酸链退火后,直接与酶切的 pGEX-6P-1 质粒相连,得到的阳性重组质粒进行诱导表达并进行 Western blot 分析,结果表明,表达的融合蛋白 GST-1A5-1 可与 MAb 1A5 发生特异性反应,说明单抗 1A5 所针对的抗原表位核心氨基酸短肽序列为 YAEYI,见图 3。



Negative control. GST protein; 1A5-1. GST-YAEYI; 1A5-2. GST-AEYI; 1A5-3. GST-YAEY; Positive control. E protein

图 3 短肽融合蛋白与单抗的 Western blot 分析
Fig. 3 Western blot analysis of the reactivity of short peptide-fused protein

2.1.5 抗原表位同源性分析 利用 DNASTar,将筛选到的线性抗原表位 YAEYI 与 DENV、JEV、WNV 的 E 蛋白序列进行比较,结果显示 DTMUV E 蛋白抗原表位 YAEYI 的氨基酸序列在 DTMUV 中具有高度的保守性,无氨基酸位点差异,而与其他几种黄病毒则不具有同源性,表明抗原表位 YAEYI 为 DTMUV 所特有的抗原表位,见图 4。

2.1.6 抗原表位交叉反应性分析 通过 Dot-Blotting 结果发现抗原表位 YAEYI 与 DTMUV 阳性血清均具有良好的亲和性,且在其他黄病毒阳性血清间不具有交叉反应性,表明抗原表位 YAEYI 是 DTMUV 所特有的抗原表位,见图 5。

2.2 Epitope-ELISA 诊断方法建立

2.2.1 抗原表位融合蛋白最佳包被浓度和血清最佳稀释度的确定 通过矩阵法对血清与抗原表位融合蛋白进行倍比稀释,确定了血清的最佳稀释倍数和抗原表位融合蛋白的最佳包被浓度。检测结果见表 4,当抗原表位蛋白浓度 1 : 100 稀释至 $6.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,血清样品进行 1 : 80 稀释时,此时 P/N 值最大,为 8.48,因此 $6.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 为表位蛋白最佳包被浓度,1 : 80 为血清最佳稀释倍数。

2.2.2 最佳封闭液选择 分别以 5% 聚乙烯醇、5% 脱脂乳、1% BSA、1% 明胶、2% 卵清蛋白作为封闭液对 ELISA 板进行封闭,血清样品进行检测,如表 5,结果显示当封闭液为 1% BSA 时,P/N 值(为 7.8)最大,因此所建立的 Epitope-ELISA 检测方法中最佳封闭液为 1% BSA。

DTMUV	TA	75	PTMGEAHNP	KATYAEYI	CKKDFVDR	99
DTMUV	DK/TH/CU-1	75	-----	-----	-----	99
DTMUV	GDHD2014-3	75	-----	-----	-----	99
DENV-1	HNRG24827	75	--Q--	TLVEEQD-NFV	-RRT----	99
DENV-2	Pk/Swat-02	75	--Q--	PSLNEEQDKRFV	--HSM---	99
DENV-3	D83-144	75	--Q--	IL-EEQDQN-V	--HTY---	99
DENV-4	EHI310A129SY10	75	--Q--	PYLKEEQDQQ--	--RR-V---	99
WNV	USA	75	-----	D---DPAFV	-RQGV---	99
WNV	FtC-3699	75	-----	D-RADPAFV	-RQGV---	99
JEV	HEN0701	75	--T----	E-RADSS-V	--QG-T--	99
JEV	CC27-S6	75	--T----	E-RADSS-V	--QG-T--	99

图 4 黄病毒属病毒之间同源序列比较
Fig. 4 Homologous sequence comparison of flaviviruses

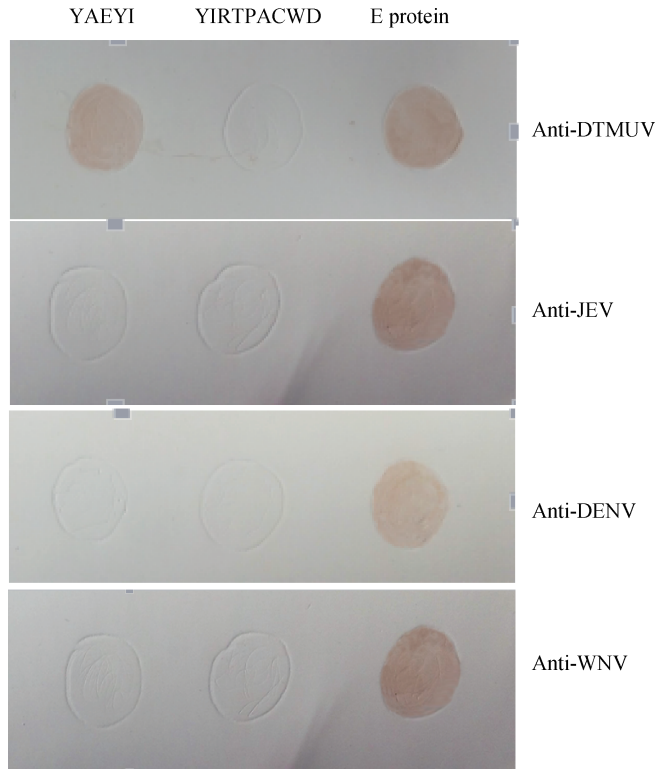


图5 抗原表位与黄病毒阳性血清交叉反应性分析

Fig. 5 The cross-reactivity of the epitopes to the Japanese encephalitis virus (JEV), dengue virus (DENV), West Nile virus (WNV)

表4 抗原蛋白和血清最佳稀释度的确定 ($OD_{450\text{ nm}}$)Table 4 The optimum antigen protein coating concentration and the best dilution of the serum ($OD_{450\text{ nm}}$)

血清稀释浓度 Sera dilution		抗原表位蛋白包被浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ Coating concentration of antigen protein				
		64	6.4	0.64	0.064	0.0064
1:20	+	1.518±0.025	1.239±0.024	0.859±0.022	0.669±0.035	0.558±0.035
	-	0.243±0.025	0.204±0.011	0.176±0.012	0.153±0.08	0.152±0.011
1:40	+	1.232±0.053	1.028±0.049	0.606±0.017	0.543±0.044	0.405±0.026
	-	0.211±0.020	0.163±0.012	0.112±0.025	0.112±0.020	0.092±0.018
1:80	+	1.051±0.076	0.882±0.045	0.572±0.044	0.499±0.021	0.323±0.022
	-	0.154±0.027	0.104±0.017	0.093±0.017	0.074±0.016	0.068±0.011
1:160	+	0.633±0.058	0.521±0.014	0.433±0.018	0.343±0.040	0.240±0.210
	-	0.119±0.006	0.079±0.016	0.067±0.014	0.060±0.011	0.054±0.012

表5 最佳封闭液的确定

Table 5 The optimal blocking agent

指标 Parameter	封闭液 Blocking agent				
	5%聚乙烯醇 5% polyvinyl alcohol	5%脱脂乳 5% skimmed milk	1%牛血清白蛋白 1% BSA	1%明胶 1% gelatin	2%卵清蛋白 2% ovalbumin
阳性平均值(P)	0.838	0.831	0.803	0.805	0.828
阴性平均值(N)	0.148	0.134	0.103	0.112	0.124
P/N	5.66	6.20	7.80	7.19	6.68

2.2.3 血清最佳反应时间确定 在确定抗原表位蛋白和血清的最佳工作浓度、最佳封闭液后,将血清孵育时间分别定为 37 °C 45 min、37 °C 60 min、37 °C 75 min、37 °C 90 min,结果见表 6,当反应时间为 1 h 时,P/N 值最大,为 7.327。据此,确定血清最佳反应时间为 1 h。

表 6 血清最佳反应时间确定

Table 6 The optimal reaction time of serum

指标 Parameter	血清作用时间/min Reaction time of serum			
	45	60	75	90
阳性平均值(P)	0.716	0.828	0.832	0.896
阴性平均值(N)	0.109	0.113	0.128	0.131
P/N	6.569	7.327	6.500	6.840

2.2.4 二抗最佳反应时间的确定 根据以上反应条件,加入二抗后,孵育时间分别为 37 °C 45 min、37 °C 60 min、37 °C 75 min、37 °C 90 min,结果见表 7,当二抗作用时间为 1 h 时,P/N 值为 7.643,

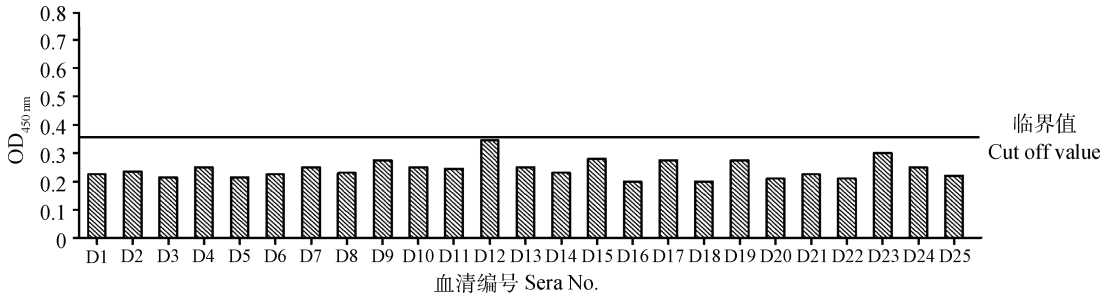


图 6 DTUV 特异性抗原表位与鸭阴性血清 ELISA 反应

Fig. 6 ELISA reactivities of DTUV synthetic peptide with negative serum samples

2.2.6 特异性试验结果 用已经建立的特异性抗原表位 ELISA 检测方法对 DHV- I 、DEV、MDPV 阳性血清以及 DENV、JEV、WNV 黄病毒阳性血清检测。结果见图 7,DTUV 阳性血清检测结果为阳性,其他病毒阳性血清检测结果均为阴性,OD 值小于 0.375。说明本研究建立的 ELISA 检测方法与其他病毒阳性血清没有交叉反应,特异性比较好。

2.2.7 批内、批间重复性试验结果 根据统计学分析结果,见表 8,批内重复性试验变异系数小于 9%,批间重复性试验变异系数均小于 11%,说明本实验室建立的 Epitope-ELISA 诊断方法重复性良好。

2.2.8 敏感性试验 用建立的 Epitope-ELISA 检测方法与血清中和试验(SN)标准检测方法对 126 份鸭血清样品进行检测,见表 9,血清中和试验

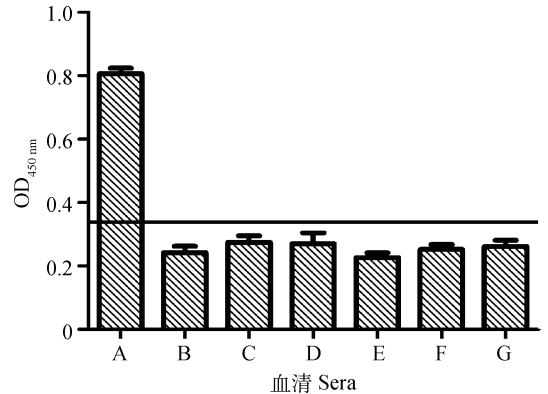
高于其他二抗反应时间的检测结果,据此确定二抗最佳作用时间为 1 h。

表 7 酶标二抗最佳反应时间的确定

Table 7 The optimal reaction time of enzyme labeled antibody

指标 Parameter	二抗作用时间/min			
	Reaction time of enzyme labeled antibody			
	45	60	75	90
阳性平均值(P)	0.768	0.879	0.969	1.027
阴性平均值(N)	0.104	0.115	0.138	0.149
P/N	7.385	7.643	7.022	6.893

2.2.5 阴阳性临界值确定 根据以上试验确立的 ELISA 最佳反应条件,对 25 份鸭 DTUV 阴性血清样品进行检测,见图 6,根据结果计算阴性样品的 OD_{450 nm} 的 \bar{x} 和 s ,阴阳性临界值 = $0.235 + 3 \times 0.0465$ 。最终得出阴阳性临界值为 0.375。检测结果 ≥ 0.375 即为阳性,检测结果 < 0.375 即为阴性。



A. DTUV 阳性血清;B. DHV- I 阳性血清;C. DEV 阳性血清;D. MDPV 阳性血清;E. DENV 阳性血清;F. JEV 阳性血清;G. WNV 阳性血清

A. DTUV positive sera;B. DHV- I positive sera;C. DEV positive sera;D. MDPV positive sera;E. DENV positive sera;F. JEV positive sera;G. WNV positive sera

图 7 特异性试验
Fig. 7 The specificity experiment result

分别检测出 101 份鸭阳性血清(P)与 25 份鸭阴性血清(N), Epitope-ELISA 方法分别检测到 97 份鸭阳性血清(P)与 29 份鸭阴性血清(N), 两种检测方法一致的结果共有 97 份鸭阳性血清与 25 份鸭阴性血

清, 以血清中和试验作为标准, 则计算得到 Epitope-ELISA 检测结果的相对特异性为 100%, 相对敏感度为 96%。

表 8 批内、批间重复性试验结果

Table 8 Intra and inter-assay of ELISA

样品序号 Sample No.	批内试验 Intra-assay		批间试验 Inter-assay	
	$\bar{x} \pm s$	变异系数/% CV	$\bar{x} \pm s$	变异系数/% CV
1	0.435±0.026	5.89	0.421±0.035	8.31
2	0.669±0.054	8.07	0.712±0.063	8.85
3	0.792±0.061	7.70	0.832±0.087	10.46
4	0.518±0.035	6.76	0.526±0.052	9.89
5	0.156±0.012	7.69	0.155±0.017	10.97
6	0.177±0.009	5.08	0.182±0.015	8.24

表 9 血清中和试验与 Epitope-ELISA 血清检测结果对比试验

Table 9 The result of SN tests and Epitope-ELISA for detection of DTMUV-related sera

检测方法 Detection method	SN(P)	SN(N)	总计 Total
Epitope-ELISA(P)	97	0	97
Epitope-ELISA(N)	4	25	29
总计 Total	101	25	126

3 讨论

鸭坦布苏病毒属于黄病毒科黄病毒属, 黄病毒属各种病毒 E 蛋白间的相似性较高, 因此黄病毒属各个病毒血清间存在一定的交叉反应性, 利用 DTMUV E 蛋白建立的 E-ELISA (E-Protein-Based-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 血清学诊断方法以及利用纯化的灭活病毒作为抗原建立的 ELISA 血清学诊断方法均存在黄病毒阳性血清的交叉反应问题, 这为鸭坦布苏病毒病的诊断造成了一定困难^[20-22]。本试验利用噬菌体展示技术成功筛选到一个 DTMUV E 蛋白特异性抗原表位 YAEYI, 并利用表位建立了 Epitope-ELISA 诊断方法。Epitope-ELISA 诊断方法是一种特异性的检测方法, 该方法仅对 DTMUV 阳性血清具有反应性, 而对鸭其他种类传染病病原的阳性血清以及

DENV、JEV、WNV 等阳性血清不具有反应性。

本研究优化完善了 Epitope-ELISA 反应条件, 通过矩阵滴定法最终确定抗原表位融合蛋白的最佳包被浓度为 $6.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 血清的最佳稀释度数为 1:80。为达到最佳的封闭效果本研究以 1% BSA 作为封闭液, 最大限度减小了非特异性的结合。利用建立的 Epitope-ELISA 检测方法对 25 份鸭阴性血清进行检测, 根据检测结果最终确定阴阳性临界值为 0.375。特异性试验表明, DEV、DHAV、MDPV、DENV、JEV 和 WNV 阳性血清检测值均为阴性, 说明该种检测方法值仅针对于 DTMUV 血清的检测。Epitope-ELISA 检测方法的批内变异系数为 5.08%~8.07%, 批间变异系数为 8.24%~10.97%, 变异系数都小于 11%, 说明同一样品在同批次和不同批次的 ELISA 板的检测结果差异不大, 该方法具有良好的重复性。用建立的 Epitope-ELISA 检测方法和血清中和试验对 126 份鸭血清样品进行检测, 以中和试验为标准确定出 101 份鸭阳性血清样品, 25 份鸭阴性血清样品, 分别在利用 Epitope-ELISA 检测方法对这 101 份鸭阳性血清样品进行检测, 结果确定 97 份阳性, 25 份阴性, 则相对特异性为 100%, 而利用 Epitope-ELISA 检测方法对 25 份鸭阴性血清进行检测, 结果也均为阴性, 则其相对敏感度为 96%。

但是本试验建立的 Epitope-ELISA 检测方法所检测到的阳性样品的 OD 值均偏低, 在亲和力和还有待进一步优化提高。

4 结 论

成功鉴定到一个 DTMUV E 蛋白特异性的抗原表位 YAEYI, 并利用该表位建立了 Epitope-ELISA 血清学诊断方法, 该方法特异性好、无交叉反应性, 可用于 DTMUV 的临床诊断和抗体水平的评价。

参考文献 (References):

[1] 滕巧泐, 颜丕熙, 张旭, 等. 一种新的黄病毒导致蛋鸭产蛋下降及死亡[J]. 中国动物传染病学报, 2010, 18(6): 1-4.

TENG Q Y, YAN P X, ZHANG X, et al. A novel flavivirus causing duck egg drops and death[J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2010, 18(6): 1-4. (in Chinese)

[2] SU J L, LI S, HU X D, et al. Duck Egg-Drop syndrome caused by BYD virus, a new Tembusu-Related flavivirus[J]. *PLoS One*, 2011, 6(3): e18106.

[3] LIU M, LIU C G, LI G, et al. Complete genomic sequence of duck flavivirus from China[J]. *J Virol*, 2012, 86(6): 3398-3399.

[4] BAI X F, LV R, LIU C G, et al. Molecular characterization of a duck Tembusu virus from China [J]. *Virus Genes*, 2013, 47(3): 478-482.

[5] LIU M, CHEN S Y, CHEN Y H, et al. Adapted Tembusu-Like virus in chickens and geese in China [J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(8): 2807-2809.

[6] LI Y M, YE J, CAO S B, et al. Withdrawn: immunization with pseudotype baculovirus expressing envelope protein of Japanese encephalitis virus elicits protective immunity in mice [J]. *J Gene Med*, 2009, 11(2): 150-159.

[7] CRILL W D, CHANG G J J. Localization and characterization of flavivirus envelope glycoprotein cross-reactive epitopes [J]. *J Virol*, 2004, 78(24): 13975-13986.

[8] 刘洋, 王传彬, 霍斯琪, 等. 中国部分地区鸭、鹅携带四种病毒状况的调查与分析[J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(8): 1610-1617.

LIU Y, WANG C B, HUO S Q, et al. Epidemiologic investigation of four viruses carried by ducks and geese in China[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2016, 47(8): 1610-1617. (in Chinese)

[9] 提金凤, 李志杰, 李秀丽, 等. 坦布苏病毒 NS1 蛋白的表达及 ELISA 检测方法的建立[J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(5): 970-977.

TI J F, LI Z J, LI X L, et al. Expression of NS1 protein of Tembusu virus and development of indirect ELISA assay [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2016, 47(5): 970-977. (in Chinese)

[10] LINDENBACH B D, RICE C M. Molecular biology of flaviviruses[J]. *Adv Virus Res*, 2003, 59: 23-61.

[11] BAI X F, SHAOZHOU W L, ZHANF Q S, et al. Characterization of monoclonal antibodies against duck Tembusuvirus E protein; an antigen-capture ELISA for the detection of Tembusu virus infection [J]. *Arch Virol*, 2015, 160(3): 757-764.

[12] 白小飞, 刘洪玉, 陈玉环, 等. 抗鸭坦布苏病毒 E 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定[J]. 中国兽医科学, 2014, 44(8): 833-837.

BAI X F, LIU H Y, CHEN Y H, et al. Preparation and identification of monoclonal antibodies against E protein of duck Tembusu virus[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2014, 44(8): 833-837. (in Chinese)

[13] 徐颖, 蒋玉平, 马泓冰, 等. 亲和层析法纯化小鼠腹水来源的单克隆抗体的实验研究[J]. 中国血液流变学杂志, 2007, 17(3): 372-374.

XU Y, JIANG Y P, MA H B, et al. Studies on purification monoclonal antibody from mouse ascites by using affinity chromatography [J]. *Chinese Journal of Hemorheology*, 2007, 17(3): 372-374. (in Chinese)

[14] WU X Y, LI X J, ZHANG Q S, et al. Identification of a conserved B-cell epitope on duck hepatitis A type 1 virus VP1 protein [J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0118041.

[15] LI C X, LIU H Y, LI J Z, et al. A conserved epitope mapped with a monoclonal antibody against the VP3 protein of goose parvovirus by using peptide screening and phage display approaches[J]. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0147361.

[16] LI C X, BAI X F, MENG R Z, et al. Identification of a new broadly cross-reactive epitope within domain III of the duck Tembusu virus E protein[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 36288.

[17] 马丽敏, 李琳, 胡乐鹏, 等. 日本乙型脑炎病毒 E 抗原表位的筛选[J]. 中国预防兽医学报, 2012, 34(1): 60-63.

MA L M, LI L, HU L P, et al. Screening and identification of epitope in glycoprotein E of Japanese encephalitis virus [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2012, 34(1): 60-63. (in Chinese)

[18] 姬希文, 闫丽萍, 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)
- [19] CHEN X W, SONG C L, LIU Y, et al. Development of an ELISA Based on Fusion VP2₃₃₂₋₄₅₂ antigen for detecting antibodies against aleutian mink disease virus[J]. *J Clin Microbiol*, 2016, 54(2): 439-442.
- [20] YIN X C, LV R, CHEN X D, et al. Detection of specific antibodies against tembusu virus in ducks by use of an E protein-based enzyme-linked immunosorbent assay[J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(7): 2400-2402.
- [21] LUO Y Y, FENG J J, ZHOU J M, et al. Identification of a novel infection-enhancing epitope on dengue prM using a dengue cross-reacting monoclonal antibody [J]. *BMC Microbiol*, 2013, 13: 194.
- [22] GUPTA A K, BHATTACHARYA S, LAD V J, et al. Monoclonal antibody to Japanese encephalitis virus cross-reacting with histones present in the cell nuclei[J]. *Acta Virol*, 1992, 36(4): 401-411.

(编辑 白永平)