

万春和, 潘异哲, 傅秋玲, 等. 禽坦布苏病毒 NS1-ELISA 的初步建立 [J]. 福建农业学报, 2015, 30 (11): 1027-1031.

WAN C-H, PAN Y-Z, FU Q-L, et al. NS1-ELISA for Antibody Detection on Avian Tembusu Virus [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2015, 30 (11): 1027-1031.

禽坦布苏病毒 NS1-ELISA 的初步建立

万春和¹, 潘异哲^{1,2}, 傅秋玲¹, 陈 珍¹, 陈翠腾¹, 傅光华¹, 陈红梅¹,
程龙飞¹, 施少华¹, 黄 瑜^{1*}

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

2. 浙江省湖州市动物疫病与预防控制中心, 浙江 湖州 313000)

摘 要: 对禽坦布苏病毒非结构蛋白 NS1 基因进行原核表达, 并进行生物学活性鉴定。将表达成功具有生物学活性的重组蛋白经纯化后, 作为抗原包被 ELISA 平板, 通过条件优化, 建立检测禽坦布苏病毒血清学检测方法。结果表明, 表达的 NS1 重组蛋白大小约为 60 kD, 该蛋白经 Western blot 检测具有良好的生物学活性。将该重组蛋白纯化后包被 ELISA 板建立检测禽坦布苏病毒血清学间接 ELISA 方法, 该方法优化后的参数为 $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 包被 ELISA 板; 一抗 (鸭血清) 血清稀释度为 1:100; 酶标二抗为 1:3 000。本研究建立的方法特异性强, 批内和批间重复性较好。用建立的间接 ELISA 方法对坦布苏病毒灭活疫苗免疫鸭血清和自然感染鸭血清进行检测, 结果表明, 本研究建立的 NS1-ELISA 不能用于区分禽坦布苏自然感染和疫苗免疫血清的鉴别诊断。

关键词: 禽坦布苏病毒; 非结构蛋白 NS1; 表达; 间接 ELISA

中图分类号: S 852

文献标识码: A

NS1-ELISA for Antibody Detection on Avian Tembusu Virus

WAN Chun-he¹, PAN Yi-zhe^{1,2}, FU Qiu-ling¹, CHEN Zhen¹, CHEN Cui-teng¹, FU Guang-hua¹,

CHEN Hong-mei¹, CHENG Long-fei¹, SHI Shao-hua¹, HUANG Yu^{1*}

(1. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences/Fujian Animal Disease Control Technology Development Center, Fuzhou, Fujian 350013, China; 2. Zhejiang Huzhou Center for Animal Disease Control and Prevention, Huzhou, Zhejiang 313000, China)

Abstract: Nonstructural protein 1 (NS1) from the avian Tembusu virus were amplified and expressed in *E. coli* to establish ELISA procedures for the detection of antibodies in the virus. Biological activity of the expressed protein was analyzed by using SDS-PAGE and western blot. The results indicated that the recombinant NS1 with a molecular weight of 60 kD was expressed in high level with good biological activity. It was subsequently used to establish an indirect ELISA for the detection of antibodies in the virus. The optimized procedures included the uses of $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ recombination protein, 1:100 serum dilution, and the goat anti-duck IgG conjugate (1:3000). Although the NS1-ELISA showed desirable specificity and repeatability, it failed to effectively differentiate the inactivated Tembusu vaccine serum from the naturally infected serum. Thus, this method could not be applied as a diagnosis tool for Tembusu virus.

Key words: avian tembusu virus; nonstructural protein 1; expression; indirect ELISA

坦布苏病毒 (Tembusu virus) 属于黄病毒科 Flaviviridae 黄病毒属 *Flavivirus* 成员。坦布苏病毒感染禽类最早于 1999 年在马来西亚鸡群中发现,

但缺乏相关流行病学数据而未引起广泛的重视。2010 年春季以来, 我国南方多地种 (蛋) 鸭发生了以采食量迅速下降、产蛋率急剧下降、甚至停产

收稿日期: 2015-08-31 初稿; 2015-09-22 修改稿

作者简介: 万春和 (1982-), 男, 博士, 助理研究员, 主要从事水禽病原分子生物学研究

* 通讯作者: 黄瑜 (1965-), 男, 博士, 研究员, 主要从事畜禽传染病学研究 (E-mail: huangyu_815@163.com)

基金项目: 国家现代农业产业体系建设专项 (CARS-43); 福建省农业科学院青年人才创新基金项目 (2014QA-7); 福建省农业科学院畜牧兽医研究所基金项目 (MYQJ2014-3); 福建省农业科学院“青年科技英才百人计划”项目 (YC2015-12)

及出现不同程度死亡为特征的鸭群新发传染病。该病可感染多品种鸭群,不同地区、不同品种鸭群发病率高低不一。鸭感染该病的典型剖检病变主要见于卵巢,表现为卵巢发育不良,卵泡变性、出血或破裂^[1-5]。随后的研究发现,该病可感染蛋鸡、鹅和鸽子等禽类,建议将其命名为禽坦布苏病毒(Avian tembusu virus, ATMV)^[6-8]。此外,还从相关鸭场养殖人员体内检测到坦布苏病毒抗体^[9]。

坦布苏病毒基因组全长为 10 990 bp,编码完整的多聚蛋白(polyprotein)前体,可切割为 5'-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3'^[10-12]。囊膜蛋白 E 常被用来检测黄病毒属病毒的血清学抗体,研究发现 NS1 蛋白也可作为血清检测有效手段^[13]。本研究利用原核表达具有良好生物学活性的 NS1 重组蛋白,并以此为抗原建立禽坦布苏病毒的血清学诊断方法,为研究禽坦布苏病毒非结构蛋白 NS1 的结构与功能及建立禽坦布苏病毒诊断方法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 病毒株和高免血清

禽坦布苏病毒 WR 株及其高免血清由福建省农业科学院畜牧兽医研究所分离鉴定并保存。

1.2 试验试剂

EasyPure Viral DNA/RNA Kit、肠杆菌感受态细胞 DH5 α 和 BL21 均购自北京全式金生物技术有限公司。TaKaRa One Step RNA PCR Kit (AMV)、限制性内切酶 EcoR I 和 XhoI、T4 DNA 连接酶购自宝生物工程(大连)有限公司。HisPurTM Ni-NTA Purification Kit、常规和预染蛋白质标准购自 Thermo Fisher Scientific。Gel Extraction Kit 和 Plasmid Mini Kit I 购自广州飞扬生物工程有限公司。HRP 标记的羊抗鸭 IgG 购自 KPL 公司。96 孔酶标板购自 Corning COSTAR。ELISA 相关试剂和显色液等均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 非结构蛋白 NS1 的原核表达

1.3.1 引物设计 利用 OLIGO 7.37 引物设计软件设计原核表达引物,引物序列为:上游引物 NS1-F: 5'-CCGGAATTCGAGGCTTGGA-3'、下游引物 NS1-R: 5'-CCGCTCGAGGACCTTTGATTTTGAT-3',在上下游引物 5'-端分别引入 EcoR I、Xho I 酶切位点,预期扩增片段为 1 056 bp 左右,引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3.2 原核表达载体构建 根据参考文献 [1] 提取坦布苏病毒的核酸,用设计的特异性上下游引物,使用 TaKaRa One Step RNA PCR Kit (AMV) 进行扩增,反应体系参考 TaKaRa One Step RNA PCR Kit (AMV) 说明书配制。RT-PCR 扩增条件为:50℃ 30 min 进行 RT 反应,94℃ 预变性 5 min 后进入循环,94℃ 变性 1 min,53℃ 退火 35 s,72℃ 延伸 1 min,35 个循环结束后,72℃ 终延伸 10 min。反应结束后,将符合试验预期的目的条带经胶回收试剂盒切胶回收后克隆到 T 载体上,筛选出阳性重组质粒。将筛选出的阳性重组质粒和原核表达载体 pET32a 分别用 EcoR I、XhoI 进行双酶切,并对双酶切产物进行胶回收后用 T4 DNA 连接酶 16℃ 进行连接过夜,转化 DH5 α 感受态细胞后,筛选出的阳性重组质粒(pET32a-NS1)经序列测定为符合实验预期后备用。

1.3.3 非结构蛋白 NS1 原核表达及条件优化 将阳性重组质粒 pET32a-NS1 转化 BL21 大肠杆菌感受态细胞中,筛选出符合试验预期的阳性重组质粒进行诱导表达。将构建好的原核表达阳性重组质粒菌液 100 μ L 加入到 10 mL LB 培养基中震荡培养至 OD 值约为 0.5 时,加入 IPTG 至终浓度 0.25、0.50、0.75、1.00 mmol \cdot L⁻¹,于不同时间段(诱导表达 1、2、4、6 h)取表达产物 100 μ L,4 000 r \cdot min⁻¹ 离心 5 min 后加入 SDS-PAGE 电泳上样缓冲液,置于-80℃ 冻存。

1.3.4 表达蛋白的生物学活性鉴定 取优化后的最适条件诱导的菌液 50 mL,5 000 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min,收集菌体,用 10 mL PBS 重悬后置于冰浴进行超声波破碎,超声程序为 4 s 间隔 6 s,超声 99 次。待菌液变得清亮时,12 000 r \cdot min⁻¹ 离心 5 min,分别收集上清和沉淀,按照常规方法进行 SDS-PAGE 电泳和 western blot 鉴定。

1.3.5 目的蛋白的纯化 取优化后的最适条件诱导的菌液,经超声破碎后收集包涵体,对其按照常规方法复性后,按照 HisPur Ni-NTA Purification Kit 试剂盒说明书进行蛋白的纯化。将纯化后蛋白进行 SDS-PAGE 电泳鉴定结果,利用 Thermo Scientific NanoDrop 2000 微量紫外分光光度计测定纯化后的蛋白浓度。

1.4 ELISA 方法的初步建立

1.4.1 ELISA 条件的优化 将纯化的蛋白用碳酸盐包被液稀释后包被 ELISA 板,按常规 ELISA 条件优化的方法进行矩阵滴定优化各种反应条件,如

抗原包被浓度、一抗稀释度、最佳二抗作用浓度、最佳显色时间和最佳反应时间的优化，初步确定 ELISA 最佳工作浓度。

1.4.2 阴阳性值的判定 选取筛选出的 DTMOV 阴性血清 30 份，进行间接 ELISA 鉴定，每份血清重复 2 孔，计算其 $OD_{450\text{ nm}}$ 平均值及标准方差。阴阳性临界值 = (阴性样本 $OD_{450\text{ nm}}$ 平均值 + $2 \times$ 标准方差)。

1.4.3 特异性检测 用优化后的间接 ELISA 方法分别对鸭主要常见病原高免血清进行 ELISA 检测与分析。本研究使用的主要血清有：产蛋下降综合征病毒 (Egg drop syndrome virus, EDSV)、番鸭细小病毒 (Muscovy duck parvovirus, MDPV)、1 型鸭肝炎病毒 (duck hepatitis virus type 1, DHV-1)、鸭源禽流感病毒 (H5N1 和 H9N2)、禽 1 型副粘病毒 (avian paramyxovirus type 1, APMV-1)、番鸭呼肠孤病毒 (Muscovy duck reovirus, MDRV) 和鸭疫里默氏菌 (*Riemerella anatipestifer*, RA) 1 型和 2 型。阳性血清为 WR 株高免血清，阴性血清来自 SPF 鸭。

1.5 ELISA 方法的初步应用

1.5.1 自然感染鸭与灭活苗免疫鸭血清的检测

收集 9 份鸭坦布苏病毒灭活苗免疫的鸭血清和 15 份鸭坦布苏病毒自然感染鸭血清，经之前建立以纯化的病毒为包被原的间接 ELISA 检测为阳性的血清，用本研究建立的间接 ELISA 方法进行检测，并对两者的结果进行差异性分析，判定该重组蛋白能否用于自然感染与灭活苗免疫鸭血清的鉴别诊断。

1.5.2 临床样品的检测 用本研究检测间接 ELISA 对临床采集疑似坦布苏病毒感染的 68 份鸭血清进行 ELISA 检测，评价本研究建立的 NS1-ELISA 在临床检测上的应用。

2 结果与分析

2.1 表达条件的优化

对非结构蛋白 NS1 表达条件进行优化后，得到 IPTG $0.5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 表达 4 h 可获得最优表达，表达的蛋白经 SDS-PAGE 分析主要为包涵体形式存在，蛋白大小约 60 kD (图 1)，经 Western blot 分析发现，表达的蛋白可与鸭高免血清发生特异性免疫反应，表明表达的 NS1 蛋白具有良好的生物学活性 (图 2)。表达的蛋白经 HisPur™ Ni-NTA Purification Kit 纯化，经 SDS-PAGE 电泳检测可见均一的目的重组蛋白 (图 3)。

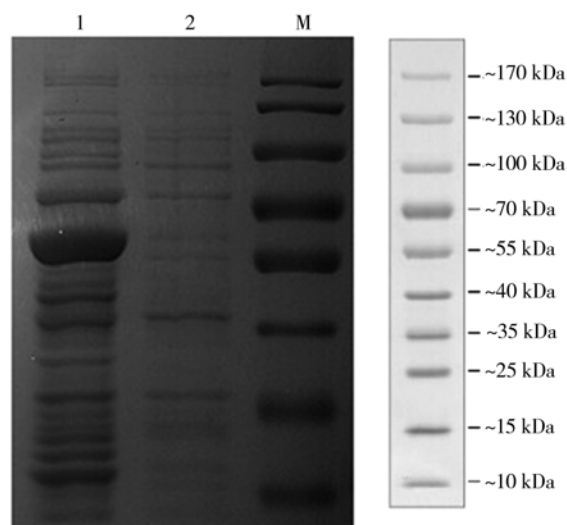


图 1 非结构蛋白 NS1 原核表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 Identification of NS1 from pET32a-NS1 plasmid by SDS-PAGE

注：1 为优化条件后的表达沉淀；2 为优化条件后的上清液；M 为蛋白分子量标准。

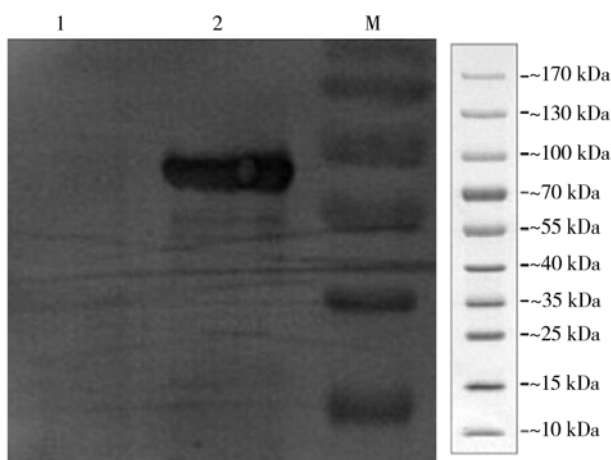


图 2 非结构蛋白 NS1 原核表达的 western blot 分析

Fig. 2 Detection of NS1 by western blot analysis

注：1 为阴性血清；2 为阳性血清；M 为蛋白分子量标准。

2.2 ELISA 条件的优化

经优化后的 ELISA 条件为，抗原包被质量浓度为 $2.5\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、一抗 (鸭血清) 最佳稀释度 1:100、酶标二抗 (HRP 标记的羊抗鸭 IgG) 最佳稀释度 1:3 000、作用时间为 90 min、 37°C 避光显色 5 min 时 P/N 值最大。

2.3 血清阴阳性判定

根据间接 ELISA 检测结果计算出 30 份阴性血清的 $OD_{450\text{ nm}}$ 平均值为 0.206，标准差 SD 为 0.056，

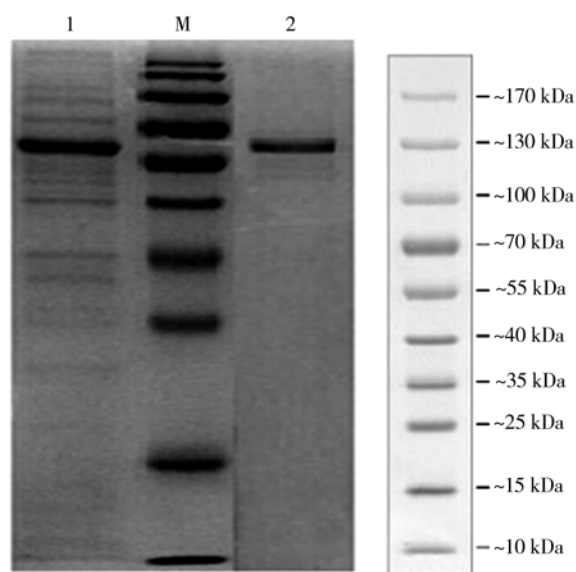


图 3 NS1 蛋白的纯化

Fig. 3 Purified recombinant NS1

注：1 为重组蛋白未纯化；2 为重组蛋白纯化；M 为蛋白分子量 Marker。

当样品 $OD_{450nm} \geq (\text{阴性血清 } OD_{450nm} + 2 \text{ 倍 SD})$ 时为阳性，反之为阴性，样品 $OD_{450nm} \geq 0.318$ 时判定为阳性， $OD_{450nm} < 0.318$ 时判为阴性（图 4）。

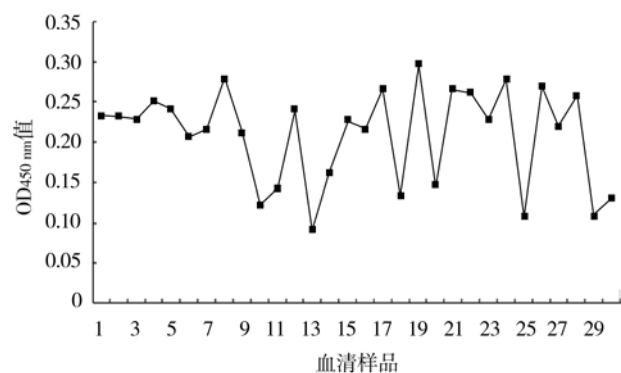


图 4 30 份临床阴性样品的检测

Fig. 4 Detection of 30 negative serum samples by indirect ELISA

2.4 特异性试验

用建立的间接 ELISA 方法对产蛋下降综合征病毒（Egg drop syndrome virus, EDSV）、番鸭细小病毒（Muscovy duck parvovirus, MDPV）、1 型鸭肝炎病毒（duck hepatitis virus type 1, DHV-1）、鸭源禽流感病毒（H5N1 和 H9N2）、禽 1 型副粘病毒（avian paramyxovirus type 1, APMV-1）、番鸭呼肠孤病毒（Muscovy duck reovirus, MDRV）和鸭疫里默氏菌（Riemerella

anatipestifer, RA）1 型和 2 型阳性血清（RA-1 和 RA-2）、鸭阴性血清（NC）和鸭源禽坦布苏病毒高免疫抗体（PC），测定其 OD_{450nm} 值，均小于阴阳性临界值 0.318，而阳性血清值为 1.081（图 5），表明本试验建立的间接 ELISA 方法具有较好的特异性。

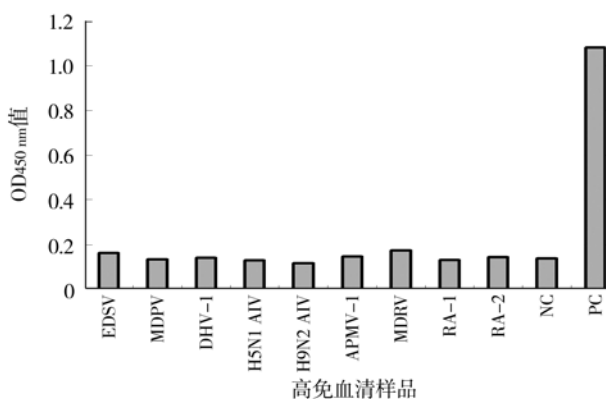


图 5 鸭常见病原高免疫血清 ELISA 检测

Fig. 5 Indirect ELISA on serum samples collected from common duck infectious diseases

2.5 ELISA 方法的应用

2.5.1 自然感染与疫苗免疫鸭血清的检测 24 份经以全病毒包被抗原建立的 ELISA 检测为阳性的鸭血清，经本研究建立的 ELISA 检测均为阳性，表明建立的 NS1-ELISA 方法不能用于区分鸭群坦布苏病毒自然感染和鸭群坦布苏病毒灭活疫苗自然免疫血清感染。

2.5.2 临床样品检测 用本试验建立的间接 ELISA 方法对临床采集的 68 份血清进行检测，结果显示阳性血清 49 份，阴性血清 19 份，阳性率为 72.1%。

3 讨论与结论

非结构蛋白 NS1 是黄病毒科黄病毒属病毒的一个较为保守的糖蛋白，推测其与病毒毒力相关。研究发现，黄病毒属病毒感染细胞后，其 NS1 蛋白或与细胞器相连，或分泌到细胞表面（选择性运输方式）或糖基化的方式释放到上清中等存在方式^[14]。

研究发现，登革热病毒（黄病毒科黄病毒属）的非结构蛋白 NS1 存在膜结合型和分泌型 2 种主要形式，是登革热病毒具有较强免疫原性的蛋白。该非结构蛋白 NS1 可在登革热病人刚开始发热直至临床期结束时都可以被检测，甚至在登革病毒 IgM 抗体尚不能被检出的情况下，非结构蛋白

NS1 抗体就能在血清、尿液和脑脊液中被检出, 已成为登革病毒早期感染的一种重要标志分子^[15-17]。关于坦布苏病毒血清学快速诊断方法已有报道^[18-19], 主要有全病毒抗原包被和表达 E 蛋白建立的 ELISA 方法和乳胶凝集方法进行血清学诊断的研究报道, 但关于坦布苏病毒是否有类似登革热病毒 NS1 蛋白的相关生物学功能还有待进一步明确。

本研究根据禽坦布苏病毒非结构蛋白 NS1 特征, 设计引物对其进行原核表达并进行生物学活性检测。结果表明, 所获得重组蛋白为包涵体, 并具有良好的生物学活性。建立的检测禽坦布苏病毒间接 ELISA 方法, 具有良好的特异性、敏感性和重复性, 可用于对禽坦布苏病毒血清学检测方法的有力补充。

综上所述, 本研究建立的 NS1-ELISA 方法可以作为检测禽坦布苏血清学感染的储备方法, 但该方法还不能用于对禽坦布苏病毒自然感染和灭活疫苗血清的鉴别诊断。

参考文献:

- [1] 万春和, 施少华, 程龙飞, 等. 一种引起种(蛋)鸭产蛋骤降新病毒的分离与初步鉴定 [J]. 福建农业学报, 2010, 25 (6): 663-666.
- [2] 曹贞贞, 张存, 黄瑜, 等. 鸭出血性卵巢炎的初步研究 [J]. 中国兽医杂志, 2010, 46 (12): 3-6.
- [3] 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.
- [4] CAO Z, ZHANG C, LIU Y, et al. Tembusu virus in ducks, China [J]. Emerg Infect Dis, 2011, 17 (10): 1873-1875.
- [5] 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.
- [6] 傅光华, 黄瑜, 施少华, 等. 鸡黄病毒的分离与初步鉴定 [J]. 福建畜牧兽医, 2011, 33 (3): 1-2.
- [7] 刘友生, 彭春香, 傅光华, 等. 2010-2011 年中国部分地区禽坦布苏病毒感染调查及分子变异分析 [J]. 中国动物传染病学报, 2012, 20 (1): 47-53.
- [8] LIU P, LU H, LI S, et al. Duck egg drop syndrome virus: an emerging Tembusu-related flavivirus in China [J]. Sci China Life Sci, 2013, 56 (8): 701-710.
- [9] TANG Y, GAO X, DIAO Y, et al. Tembusu virus in human, China [J]. Transbound Emerg Dis, 2013, 60 (3): 193-196.
- [10] LIU M, LIU C, LI G, et al. Complete genomic sequence of duck flavivirus from china [J]. J Virol, 2012, 86 (6): 3398-3399.
- [11] YUN T, ZHANG D, MA X, et al. Complete genome sequence of a novel flavivirus, duck tembusu virus, isolated from ducks and geese in china [J]. J Virol, 2012, 86 (6): 3406-3407.
- [12] WAN C, HUANG Y, FU G, et al. Complete genome sequence of avian tembusu-related virus strain WR isolated from White Kaiya ducks in Fujian, China [J]. J Virol, 2012, 86 (19): 10912.
- [13] CHAO D, LIU Y, SHEN W, et al. Comparison of E and NS1 antigens capture ELISA to detect dengue viral antigens from mosquitoes [J]. J Vector Borne Dis, 2015, 52 (2): 134-141.
- [14] 陈月, 任瑞文, 刘建伟. 登革病毒非结构蛋白 1 结构及功能研究进展 [J]. 病毒学报, 2014, (6): 88-93.
- [15] 傅强, 田疆, 方丹云, 等. 登革病毒 NS1 蛋白的原核表达及其在登革热快速诊断中的应用 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2012, 33 (3): 316-321.
- [16] RATHAKRISHNAN A, SEKARAN S. New development in the diagnosis of dengue infections [J]. Expert Opin Med Diagn, 2013, 7 (1): 99-112.
- [17] GELANEW T, POOLE-SMITH B, HUNSPERGER E. Development and characterization of mouse monoclonal antibodies against monomeric dengue virus non-structural glycoprotein 1 (NS1) [J]. J Virol Methods, 2015, 222: 214-223.
- [18] 傅秋玲, 陈珍, 施少华, 等. 鸭坦布苏病毒 E 蛋白包被抗原间接 ELISA 方法的建立 [J]. 福建农业学报, 2015, 30 (1): 1-5.
- [19] 万春和, 傅秋玲, 陈珍, 等. 乳胶凝集试验方法在检测鸭坦布苏病毒抗体中的应用 [J]. 福建农业学报, 2013, 28 (12): 1200-1203.

(责任编辑: 林海清)