

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.08.02

4 型禽腺病毒抗体间接 hexon-ELISA 检测方法的建立

朱庆贺¹, 张鹏宇¹, 崔红玉², 王观悦¹, 王爽¹, 陈曦¹, 刘力威¹, 史同瑞^{1*}

(1. 黑龙江省兽医科学研究所, 黑龙江齐齐哈尔 161006;

2. 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禽传染病研究室, 哈尔滨 150000)

[收稿日期] 2017-12-27 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 08-0007-05 [中图分类号] S852.65

[摘要] 以 4 型禽腺病毒(FAdV-4)的 DNA 为模板, 扩增其六邻体(hexon)部分基因并进行重组表达, 以重组 hexon 蛋白为包被抗原, 优化 ELISA 检测条件, 建立了 FAdV-4 的 ELISA 抗体检测方法。该方法对 FAdV-4 阳性血清检测为阳性, 对于其他鸡常见病毒, 如禽流感病毒 5、7、9 型, 新城疫病毒以及鸡传染性支气管炎病毒阳性血清检测均为阴性; 与 PCR 方法的阳性符合率为 83.3%。试验表明, 建立的以重组 hexon 蛋白为包被抗原检测 FAdV-4 血清抗体的 ELISA 方法可以用于检测 FAdV-4 的感染及相关流行病学调查。

[关键词] 4 型禽腺病毒; hexon 蛋白; 原核表达; 间接 ELISA

Establishment of an Indirect hexon-ELISA Method for the Detection of Antibodies against Fowl Avianadenovirus Serotype 4

ZHU Qing-he¹, ZHANG Peng-yu¹, CUI Hong-yu², WANG Guan-yue¹, WANG Shuang¹,
CHEN Xi¹, LIU Li-wei¹, SHI Tong-ru^{1*}

(1. Heilongjiang Institute of Veterinary Science, Qiqihar, Heilongjiang 161006, China; 2. Division of Avian Infectious Diseases, State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150000, China)

Corresponding author: SHI Tong-ru, E-mail: systr@sina.com

Abstract: FAdV-4 DNA as templates was used to amplify the hexon gene, and the recombinant hexon protein was expressed. With the recombinant hexon protein as the detection antigen, an indirect ELISA was established by optimizing the ELISA detection conditions. FAdV-4 antibodies reacted with the hexon protein significantly, no cross-reactivity occurred between the hexon protein and antibodies against other chicken viruses, such as avian influenza virus (AIV-5, AIV-7, AIV-9), newcastle disease virus (NDV), and infection bronchitis virus (IBV). The positive coincidence rate with PCR method was 83.3%. It showed that the developed ELISA could be used for the diagnosis of FAdV-4 infection and investigation of related epidemiological.

Key words: FAdV-4; hexon protein; prokaryotic; indirect ELISA

基金项目: 黑龙江省应用技术与开发计划(sczzn2017-2)

作者简介: 朱庆贺, 助理研究员, 硕士, 从事兽药及兽用生物制品研究。

通讯作者: 史同瑞。E-mail: systr@sina.com

4 型禽腺病毒(Fowl Avianadenovirus serotype 4, FAdV-4)属于 I 群禽腺病毒,能够引起鸡心包积水综合征^[1]。该病最早在巴基斯坦的安卡拉首先被报道,因此又称安卡拉病^[2-3]。近几年来,我国多个省份相继出现爆发,给养鸡业造成了严重的经济损失^[4-6]。由于发病时鸡出现明显的心包积液症状^[7-8],因此该病的临床诊断主要以剖检为主,实验室诊断主要以病毒分离、PCR 检测为主,也有利用琼脂扩散进行检测的报道^[9-10]。不过以上诊断方法都存在一定的缺点,例如,病毒分离难度大,PCR 方法批量检测样品工作量大,而琼脂扩散试验灵敏度较差等。因此有必要建立一种高效省时且灵敏度高的检测方法,能更好的对该病进行血清学检测以及血清抗体监测。

腺病毒粒子中的六邻体(hexon)是主要的衣壳蛋白,全长约 2811 bp,带有主要的属和亚属特异性抗原决定簇及次要的种特异性抗原决定簇。研究表明,hexon 中几个比较大的抗原表位区都位于前段和中段,这一区域恰好位于病毒的表面,暴露性好,后段虽然也有较好的抗原性,但暴露性较差^[11]。因此在试验中截短表达了 hexon 蛋白的前、中段进行原核表达,并应用于 ELISA 方法的建立。

1 材料与方法

1.1 血清及临床样品 病鸡心脏、肝脏组织样品、血清样品均收集自黑龙江省齐齐哈尔市甘南县肉鸡养殖场。FAdV-4 阳性鸡血清由哈尔滨兽医研究所禽传染病研究室惠赠,禽流感 5、7、9 型(Avian Influenza Virus, AIV-5、AIV-7、AIV-9)阳性鸡血清、新城疫(Newcastle Disease Virus, NDV)阳性鸡血清、传染性支气管炎(Infection Bronchitis Virus, IBV)阳性鸡血清由黑龙江省兽医科学研究所病毒研究室惠赠。FAdV-4 阴性血清为 SPF 雏鸡血清,SPF 鸡胚购自哈尔滨维科生物技术开发公司。

1.2 主要实验试剂 pET-28a 载体购自大连宝生物工程有限公司,Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶 *EcoR I/Xho I*、T4 连接酶、DNA Marker 购自 TaKaRa 公司;HRP 标记兔抗鸡 IgG 购自北京百奥莱博科技

有限公司;增强型 HRP-DAB 底物显色试剂盒、可溶性 TMB 底物显色液购自天根生物科技有限公司;PVDF 膜购自密理博中国有限公司。

1.3 hexon 蛋白克隆、表达及纯化 利用已发表的 Kr-yeoju 株 hexon 序列(登录号:HQ709228.1)设计引物,并添加 *EcoR I/Xho I* 为酶切位点。引物序列为: F: 5'-GGAATTCACCCACCCGAAATGTCA-CGAC-3'; R: 5'-CCGCTCGAGGGCGGTGTGTG-TGTAGAG-3',扩增长度为 1032 bp 基因片段,连接 pET-28a 载体,命名为 pET-28a-hexon,测序正确的质粒转化至 *Escherichia coli* BL21 (DE3)。0.8 mmol/L IPTG 37 °C 条件下 6 h 诱导重组菌,同时设立未诱导阴性对照。离心收集菌体进行超声破碎,12% SDS-PAGE 电泳分析表达蛋白并切胶纯化。

1.4 Western blot 分析 纯化的蛋白经 SDS-PAGE 电泳后半干转印至 PVDF 膜,以 1:100 稀释的 FAdV-4 鸡阳性血清以及 FAdV-4 鸡阴性血清为一抗,以 1:5000 稀释的兔抗鸡 IgG-HRP 为二抗,进行 Western blot 分析。

1.5 间接 ELISA 方法的建立

1.5.1 间接 ELISA 反应条件的优化 以 37 °C 1 h、37 °C 2 h 和 4 °C 过夜三种不同条件包被纯化的 FAdV-4 重组 hexon 蛋白,确定最佳包被条件;利用方阵滴定法对 FAdV-4 重组 hexon 蛋白的工作浓度和 FAdV-4 鸡阳性血清的稀释浓度进行了确定。以不同浓度脱脂乳封闭,确定最佳的封闭液浓度以及封闭时间。确定血清和 HRP 标记二抗最佳工作时间,确定底物作用时间。判定标准为:阳性血清(Positive serum, P)与阴性血清(Negative serum, N) OD_{450nm} 的 P/N 值高且 P 值 ≈ 1 为原则将所选条件确定为 ELISA 反应的最佳反应条件。

1.5.2 间接 ELISA 判定标准的确定 按照优化后的 ELISA 方法对已确定为 FAdV-4 阴性的 20 份血清进行检测(阴性血清按照 1:100 稀释),计算阴性样品的 OD_{450nm} 的平均值(\bar{x})和标准差(s),结果进行统计学分析,确定临界值。

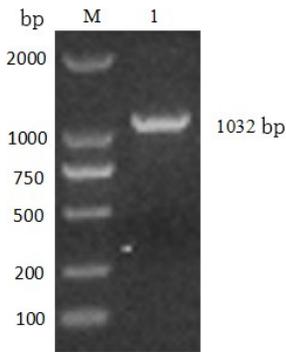
1.5.3 特异性实验 在相同条件下对其他鸡几种常见病毒,如 AIV-5、AIV-7、AIV-9、NDV、IBV 阳性血清进行检测,同时设 FAdV-4 阴、阳性血清对照。

1.5.4 临床血清样本的检测 于黑龙江省齐齐哈尔市甘南县肉鸡养殖场采集并保存的 21 份临床血清样本通过建立的 ELISA 方法进行检测。

1.5.5 符合率试验 21 份临床血清样对应的组织样品提取基因组后进行 PCR 检测,检测结果与 ELISA 检测结果比较分析。

2 结果

2.1 hexon 基因扩增结果 在出现心包积液症状的鸡肝脏组织中扩增 hexon 基因,经 1% 琼脂糖核酸电泳分析,结果显示,扩增基因大小约为 1032 bp (图 1)。扩增基因连接载体后测序,结果显示为 FAdV-4 基因。



M: DL2000 DNA Marker; 1: hexon 截短基因
M: DL2000 DNA Marker; 1: hexon-truncated gene

图 1 hexon 截短基因扩增结果

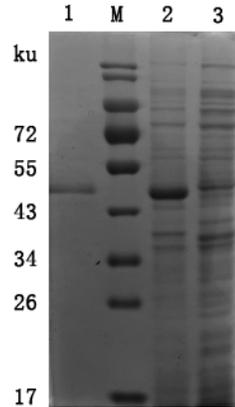
Fig 1 PCR amplification of hexon gene

2.2 hexon 蛋白的表达与纯化 IPTG 诱导后,表达产物经 SDS-PAGE 分析,表达蛋白约为 46 ku (图 2)。

2.3 重组 hexon 蛋白 Western blot 验证 纯化蛋白进行 Western blot 鉴定,结果显示纯化的 hexon 蛋白能够与 FAdV-4 阳性血清结合,而与阴性血清无反应 (图 3)。

2.4 间接 ELISA 的建立及反应条件的确定 按照常规 ELISA 方法建立检测抗 FAdV-4 血清抗体的

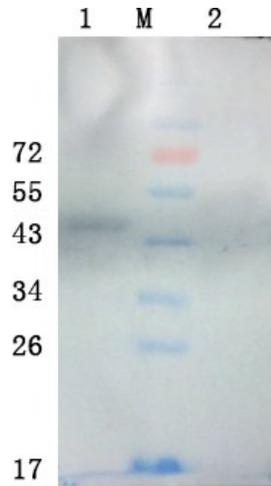
间接 ELISA,对各反应条件进行了筛选和优化,结果如表 1 所示。



M: Protein Marker; 1: 纯化蛋白; 2: 诱导表达重组 hexon 蛋白细菌; 3: 未诱导表达细菌对照
M: Protein Marker; 1: The purification of recombinant hexon protein; 2: Lysed hexon-containing bacterial inclusion bodies; 3: Non-induced crude bacterial lysate from bacteria containing hexon plasmid

图 2 SDS-PAGE 分析

Fig 2 SDS-PAGE analysis



M: Protein Marker; 1: 纯化 hexon 重组蛋白; 2: 阴性血清对照
M: Protein Marker; 1: The purification of recombinant hexon protein; 2: Negative serum control

图 3 Western blot 鉴定结果

Fig 3 Western blot analysis

表 1 间接 ELISA 检测方法反应条件优化结果

Tab 1 The optimized conditions of indirect ELISA

筛选条件 Filter condition	重组 hexon 蛋白 hexon protein	封闭液 Blocking solution	待检血清 Sample	兔抗鸡-HRP Rabbit Anti-Chicken Antibody-HRP	显色底物 Chromogenic substrate
最佳稀释浓度 Optimized dilutions	1 ug/mL	5%脱脂乳	1 : 100	1 : 5000	/
反应条件 Reaction condition	4℃/12 h	37℃/1 h	37℃/1 h	1 h	15 min

"/" 显色底物为商品化购买不需要稀释,直接加入至 ELISA 板中即可

2.5 间接 ELISA 判定标准 采取未感染 FAdV-4 的鸡血清,经间接 ELISA 方法进行检测,计算最终平均 OD_{450nm} 值(\bar{x})为 0.163,标准差(s)为 0.024,按照公式:阴阳临界值= $\bar{x}+3s$,临界值为 0.236。即当样品的 OD_{450nm} 值大于或等于 0.236 为阳性,OD_{450nm} 小于 0.236 为阴性(图 4)。

2.6 特异性试验 利用建立的间接 ELISA 方法对 FAdV-4、NDV、AIV-5、AIV-7、AIV-9、IBV 阳性血清进行检测,同时设阴性对照(Negative Control, NC),结果表明:重组 hexon 蛋白与 FAdV-4 阳性血清特异性结合,与 NDV、AIV-5、AIV-7、AIV-9、IBV 阳性血清均没有交叉反应(图 5)

2.7 符合率试验 采用建立的间接 ELISA 检测方法,检测临床中 21 份鸡血清样品,其中 15 份为 FAdV-4 抗体阳性,而 PCR 结果显示 18 份样品呈阳性,两种方法阳性符合率为 83.33%。结果表明,建立的 ELISA 方法和 PCR 方法符合率较好,可用于临床鸡血清样品的抗体检测。

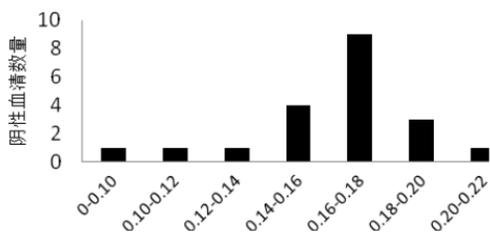


图 4 阴性样品结果分布图

Fig 4 Negative samples normal distribution diagram

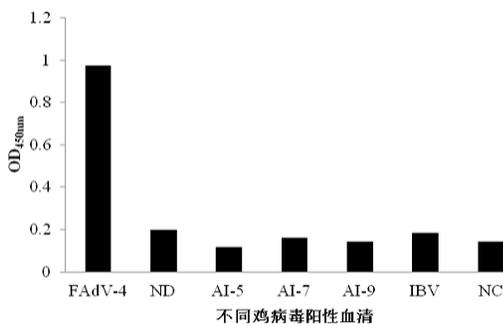


图 5 ELISA 特异性试验

Fig 5 Specific Detection of ELISA

表 2 ELISA 检测方法与 PCR 方法一致性检测结果

Tab 2 Comparison of concordance between ELISA and PCR Test for detection of FAdV-4

检测方法 Detection method	阳性样本数 Positive	阴性样本数 Negative	总样本数 Total	阳性样本符合率 Concordance
ELISA	15	6	21	83.33
PCR	18	3	21	

3 讨论与小结

多数学者以 I 群禽腺病毒代表株 CELO 株 hexon 蛋白作为包被抗原^[12],由于不同血清型 hexon

蛋白推导的氨基酸同源性差异较大,同源性的差异很可能会影响重组蛋白的抗原性。鉴于此,建立了以 FAdV-4 的基因组为 DNA 模板扩增并表达的

hexon 蛋白为包被抗原的 ELISA 检测方法,对于 FAdV-4 的血清学鉴定可能更有针对性,更适于临床出现心包积液症状病鸡的血清学诊断,但两种蛋白包被抗原对于 FAdV-4 的检测灵敏性是否具有差异仍需进一步研究验证。

目前,FAdV-4 的实验室诊断仍然以 PCR 为主,ELISA 方法的建立为该病的诊断提供了血清学方法。除作为诊断手段,ELISA 也可以作为监测抗体效价的有效方法,黑龙江省兽医科学研究所兽药研究室在进行鸡心包积水综合征卵黄抗体的制备过程中血清抗体监测就是由建立的 ELISA 方法完成,抗体含量检测准确,相比较琼脂扩散方法灵敏度高,效果更好。

参考文献:

- [1] 塞弗. 禽病学[M]. 苏敬良,高福,索勋,主译. 北京:中国农业出版社,2012.
Y M Saif. Diseases of poultry[M]. Su J L,Gao F,Suo X,translated. 12ed. Beijing:China Agriculture Press,2012.
- [2] Njum A D,Sabri M A,Iabal Z. Hydropericarditis syndrome in broiler chickens in Pakistan[J]. Veterinary Record,1989,124(10):247-248.
- [3] 程小果,王慧,程宁,等. 鸡心包积水综合征疫苗研究进展[J]. 动物医学进展,2016,3(11):97-101.
Chen X G,Wang H,Cheng N,et al. Progress on porcine hemagglutinating encephalomyelitis[J]. Progress in Veterinary Medical,2016,3(11):97-101.
- [4] Xia J,Yao K C,Liu Y Y,et al. Isolation and molecular characterization of prevalent fowl adenovirus strains in southwestern China during 2015-2016 for the development of a control strategy[J]. Emerg Microbes Infect,2017,6(11):e103.
- [5] 何秀苗,张科,秦爱建,等. 群禽腺病毒江苏分离株(FAdV-1JS)的分离鉴定[J]. 中国预防兽医学报,2005,27(1):44-47.
He X M,Zhang K,Qin A J,et al. Identification of an isolate of fowl adenovirus group I virus[J]. Chinese Journal of Prevention Veterinary Medicine,2005,27(1):44-47.
- [6] 张坦,郑杰,张发明,等. 鸡包涵体肝炎山西株的分离鉴定[J]. 中国畜牧兽医,2013,40(4):194-197.
Zhang T,Zhen J,Zhang F M,et al. Isolation and identification of isolation and identification body hepatitis virus in Shanxi [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine,2013,40(4):194-197.
- [7] 国纪奎,刁有祥,薛聪,等. I 群禽腺病毒山东株的分离鉴定及 hexon 基因的克隆分析[J]. 中国兽医学报,2012,32(12):1773-1777.
Guo J L,Diao Y X,Xue C,et al. Isolation and identification of inclusion body hepatitis and hexon gene cloning and analysis[J]. China J Sci,2012,32(12):1773-1777.
- [8] Zhao J,Zhong Q,Zhao Y,et al. Pathogenicity and complete genome characterization of fowl adenovirus associated with hydropericardium hepatitis syndrome differs with the corresponding region of other fowl adenoviruses [J]. Veterinary Microbiology,2001,78(1):1-11.
- [9] 袁万哲,李玉保,王建昌,等. 鸡心包积-肝炎综合征的初步研究[J]. 中国兽医科学,2016,46(2):157-160.
Yuan W Z,Li Y B,Wang J C,et al. Preliminary studies on chicken pericardial effusion and hepatitis syndrome [J]. Chinese Veterinary Science,2016,46(2):157-160.
- [10] Li P H,Zheng P P,Zhang T F,et al. Fowl adenovirus serotype 4: epidemiology, pathogenesis, diagnostic detection, and vaccine strategies[J]. Poult Sci,2017,97(8):2630-2640.
- [11] 文艳玲,谢芝勋,黄琦,等. 禽腺病毒 1 型和 4 型六邻体蛋白抗原表位和密码子偏爱性分析[J]. 动物医学进展,2007,28(11):17-20.
Wen Y L,Xie Z X,Huang Q,et al. Analysis of antigen epitope and codon preference for hexon protein of avian adenovirus serotypes[J]. Progress in Veterinary Medicine,2007,28(11):17-20.
- [12] 罗思思,谢芝勋,刘加波,等. I 群腺病毒抗体间接 hexon-ELISA 检测方法的建立[J]. 中国兽医科学,2012,42(7):701-707.
Luo S S,Xie Z X,Liu J B,et al. Establishment of an indirect hexo-ELISA for the detection of antibodies against fowl adenovirus group [J]. Chinese Veterinary Science,2012,42(7):701-707.

(编辑:李文平)