

宋莎莎, 王洪利, 朱光, 等. 鸭坦布苏病毒 E 蛋白多克隆抗体的制备及抗体 ELISA 检测方法的建立 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (2): 84-90.
SONG S S, WANG H L, ZHU G, et al. Preparation of duck Tembusu virus E protein polyclonal antibodies and establishment of an antibody ELISA detection method [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (2): 84-90.

鸭坦布苏病毒 E 蛋白多克隆抗体的制备及抗体 ELISA 检测方法的建立

宋莎莎, 王洪利, 朱光, 迟灵芝, 李佳暖, 李晓晗, 李婧*

(山东畜牧兽医职业学院, 山东 潍坊 261061)

摘要: 旨在制备鸭坦布苏病毒 (DTMUV) E 蛋白多克隆抗体并建立抗体检测方法。克隆 DTMUV E 基因, 构建重组质粒 pET-32a-E 并进行原核表达, 对表达蛋白提纯后免疫家兔, 制备兔抗 DTMUV E 蛋白多克隆抗体。以原核表达的 E 蛋白作为包被抗原, 建立了检测抗体的间接 ELISA 方法。结果: DTMUV E 蛋白在大肠杆菌中成功表达, 且具有良好的免疫原性, 制备的兔源抗 DTMUV E 蛋白多克隆抗体能够与 DTMUV 发生良好特异性反应, 建立的抗体间接 ELISA 检测方法具有高敏感性、特异性和重复性。提示: 制备的 DTMUV 多克隆抗体和建立的抗体间接 ELISA 检测方法为 DTMUV 的深入研究提供了技术支撑。

关键词: 鸭坦布苏病毒; E 蛋白; 原核表达; 多克隆抗体; 间接 ELISA

中图分类号: S855.3 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)02-0084-07

Preparation of duck Tembusu virus E protein polyclonal antibodies and establishment of an antibody ELISA detection method

SONG Shasha, WANG Hongli, ZHU Guang, CHI Lingzhi, LI Jianuan, LI Xiaohan, LI Jing*

(Shandong Vocational Animal Science and Veterinary College, Weifang 261061, China)

Abstract: This study aimed to prepare polyclonal antibodies against the E protein of duck Tembusu virus (DTMUV) and to establish an antibody detection method. The DTMUV E gene was cloned, and a recombinant plasmid, pET-32a-E, was constructed for expressing the protein in prokaryotic cells. The purified expressed protein was used to immunize rabbits, resulting in the production of rabbit polyclonal antibodies against DTMUV E protein. And an indirect ELISA method was developed using the prokaryotically expressed E protein as the coating antigen to detect the presence of antibodies. The results demonstrated successful expression of the DTMUV E gene in *Escherichia coli*, showing good immunogenicity. The generated rabbit polyclonal antibodies showed a strong reaction with DTMUV, indicating their effectiveness. The established indirect ELISA antibody detection method exhibited high sensitivity, specificity, and reproducibility. The prepared DTMUV polyclonal antibodies and the established indirect ELISA antibody detection method in the present study contributed to the advancement of DTMUV research, serving as valuable technical support.

Keywords: duck Tembusu virus; E protein; prokaryotic expression; polyclonal antibodies; indirect ELISA

鸭坦布苏病毒 (duck Tembusu virus, DTMUV) 作为一种严重威胁鸭健康的病毒, 其高感染率和严重的致病性给养鸭业造成严重的威胁和较大的经济损失。据报道, DTMUV 对鸭的感染率高达 80%, 一旦感染, 将导致蛋鸭产蛋率急剧下降, 雏鸭生长受阻甚

至死亡, 恢复生产性能需要较长时间, 并且难以恢复到感染前的产蛋水平^[1]。2010 年中国首次报道 DTMUV 感染病例。该病毒除了对养鸭业的直接影响外, 也威胁着公共卫生安全^[2-4]。因此, 加强对 DTMUV 的研究显得尤为迫切。

DTMUV 属于黄病毒科中的一个成员^[5], 病毒粒子为球形, 直径在 30~50 nm 之间, 表面包裹着一层囊膜。DTMUV 的基因组中包含了 10 个编码病毒蛋白的基因^[6-7], 其中位于病毒表面的重要蛋白是 E 蛋白, 其分子质量约为 54 kDa^[8-9]。E 蛋白作用广泛, 与病毒的宿主范围、毒力、免疫保护力、组织嗜性等都有很大的关系^[10]。另外, 由于 E 蛋白本身有许多

收稿日期: 2024-02-27; 修回日期: 2024-12-03

基金项目: 潍坊市科技发展计划项目 (2021GX035, 2023GX047, 2024GX040); 潍坊市科技惠民项目 (2020KJHM23); 中药组方调配技术在肉鸡绿色养殖中的应用项目 (2021TSGC1921)

第一作者: 宋莎莎, 女, 硕士研究生, 讲师

*通信作者: 李婧, 本科, 副教授, 研究方向为预防兽医学, E-mail: sdmxlj@163.com。

保护性抗原表位,可产生中和抗体,发生保护性免疫应答^[11]。疫苗研究通常选择E蛋白作为DTMUV的主要目标蛋白。因此,深入研究DTMUV E蛋白功能,有助于揭示病毒的感染机制和生物学特征。

本研究拟通过对之前分离的1株DTMUV的E基因进行克隆并在原核系统中进行表达,使用纯化的重组蛋白对家兔进行免疫,制备用于检测DTMUV的抗E蛋白多克隆抗体,并建立针对重组E蛋白的间接ELISA检测方法,旨在为研究DTMUV感染过程中的作用机制提供物质基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

试验家兔从南京青龙山动物繁殖场购买。DTMUV毒株,本实验室前期分离到的病毒株DTMUV-2022-WF;羊抗鼠IgG-Alexa Fluor 488购自碧云天生物技术;Western blot所用HRP标记山羊抗小鼠IgG2a(H+L)抗体购自KPL公司;pET-32a载体购自北京百奥莱博科技有限公司;DMEM细胞培养基、2×DMEM培养基、胎牛血清(FBS)及双抗(100 μg/mL链霉素和100 IU/mL青霉素)均购自于GIBCO公司;细胞消化用0.05%胰酶(Trypsin)购自于Sigma公司;RIPA细胞裂解缓冲液购自Solarbio公司;总RNA提取试剂盒、带有gDNA擦除剂的HiScript[®] II Q RT SuperMix PCR反转录试剂盒购自南京诺唯赞公司;封闭用山羊血清购自上海碧云天生物技术公司;封闭式脱脂奶粉从光明牛奶有限公司购买;小剂量质粒纯化试剂盒和W-TMB显色液试剂盒均从生工生物工程(上海)股份有限公司购买;2×Taq Master Mix、DL2000 Marker、DL15000 Marker均购自上海碧云天生物技术有限公司;T4 DNA连接酶试剂盒购自翌圣生物;限制性内切酶EcoR I和Xho I购自宝生物工程(大连)有限公司;ELISA 96孔酶标板购自Thermo公司;ELISA包被液、TMB显色液、终止液购自默沙克生物;10×PBST、5%牛血清白蛋白(BSA)封闭液购自北京索莱宝生物科技有限公司;其余试剂为国产分析纯。BL21(DE3)和DH5α感受态细胞从重庆擎科生物科技有限公司购买。BHK-21细胞由本实验室保存。

1.2 引物的设计与合成

利用GenBank中参考株DTMUV-SD2010(登录号:MN649260)的核苷酸序列,在Primer 5.0软件中设计了专门针对DTMUV E基因的引物,并在引物序列上添加了相应的酶切位点。具体引物序列如下:引物F:5'-CCGGAATTCGAGTGAATGCTGTTGAGTG-3',其中划线部分为EcoR I酶切位点;引物R:5'-

CCGCTCGAGACATGCCTTGAGTAATCCA-3',其中划线部分为Xho I酶切位点。目的片段为1 353 bp。引物由重庆擎科生物技术有限公司合成。

1.3 E基因的克隆及载体的构建

据病毒RNA提取试剂盒说明书从DTMUV-2022-WF毒株中提取总RNA,并通过5×All-In-One RT Master Mix反转录试剂盒反转录得到cDNA。反转录反应体系(总体积20 μL):4×AccuRT Reaction Mix 2 μL,总RNA 6 μL,5×AccuRT Reaction Stopper 2 μL,5×All-In-One RT Master Mix 4 μL,DEPC水6 μL。反转录条件:25℃,10 min;42℃,15 min;85℃,5 min。反转录得到的cDNA产物作为模板直接用于PCR扩增,预期扩增片段大小为1 353 bp。PCR扩增体系(总体积25 μL):PCR Mix 12.5 μL,cDNA 2.5 μL,上下游引物各1 μL,ddH₂O 8 μL。PCR扩增条件:95℃,5 min预变性;95℃变性30 s,53℃退火30 s,72℃延伸45 s,共进行32个循环;最后在72℃条件下延伸10 min结束。通过琼脂糖凝胶电泳对PCR产物进行鉴定。

纯化回收阳性PCR产物,将纯化后的产物经过EcoR I和Xho I双酶切,酶切片段与载体pET-32a连接,并转化至BL21(DE3)感受态细胞中。在37℃的培养箱中培养14~18 h,挑选单个菌落,接种于LB液体培养基中继续震荡培养16 h。待培养完成,提取质粒,同时对质粒进行EcoR I和Xho I酶切鉴定。完成鉴定后,将阳性质粒命名为pET-CZ-E,送至重庆擎科生物科技有限公司测序。

1.4 重组E蛋白的诱导表达与SDS-PAGE鉴定

重组菌经过鉴定后,培养至光密度(OD)值为0.4~0.9,以1 mmol/L IPTG诱导DTMUV重组E蛋白表达,并连续培养8~10 h。培养结束后,进行离心操作。离心后重悬菌体沉淀,使用Western blot技术来确认蛋白质的表达情况。同时,剩余的菌液离心5 min,用Tris-HCl缓冲液重悬。将样品在冰浴超声条件下裂解,并在4℃,13 000 r/min的条件下离心10 min,取上清液(40 μL)供后续分析使用。使用尿素将沉淀溶解,产生包涵体样品进行SDS-PAGE检测。用蛋白切胶的方法纯化E蛋白,并且使用SDS-PAGE来评估纯化效果^[12]。

1.5 重组E蛋白兔源多克隆抗体的制备

选用家兔,待家兔适应环境后,开始制备能够产生特定E蛋白抗体的兔源多克隆抗体。首先,将重组E蛋白与弗氏完全佐剂按照1:1的比例混合乳化作为抗原,采用皮下注射的方式给2只6~8周的雌性家兔进行免疫。隔离14 d后,将重组E蛋白与弗氏不完全佐剂按照1:1的比例混匀,再次通过皮下

注射对家兔进行二免。隔离 14 d 后, 进行三免, 方法同二免。三免后 1 周进行四免, 方法同二免。四免后 1 周, 通过耳静脉采血的方式收集血清。

1.6 Western blot 试验鉴定

将 BHK21 细胞接种到 24 孔板中, 待细胞密度达到 80% 左右时, 接种 DTMUV-2022-WF, 同时设立空白对照组。感染后 48~72 h 及时观察细胞, 待出现细胞病变时, 收集细胞样本, RIPA 缓冲液裂解细胞。通过 SDS-PAGE 技术检测样品, 将跑完的蛋白胶于 330 mA 恒定电流条件下, 用湿转法转印 2~3 h 至 PVDF 膜上。待转印完成后, 用镊子小心取出 PVDF 膜并于 10% 的脱脂乳中封闭, 室温条件下封闭 1.5 h。封闭完成后, 弃去封闭液, 使用 PBST 溶液间隔 10 min 洗涤 PVDF 膜 5 次, 然后将制备的 E 蛋白多克隆抗体以 1:1 000 稀释作为一抗, 置于 4 ℃ 摇床孵育过夜。过夜后取出 PVDF 膜并使用 PBST 间隔 10 min 洗涤 PVDF 膜 5 次, 加入适量 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG2a (H+L) 抗体作为二抗 (以 5% 的脱脂乳稀释), 37 ℃ 培养箱内孵育 1 h。使用 PBST 间隔 10 min 洗涤 PVDF 膜 5 次, 加入 ECL 化学发光液, 避光条件下在化学发光成像系统仪下进行曝光操作。

1.7 间接免疫荧光试验 (IFA) 鉴定

用 DTMUV-2022-WF 感染 BHK-21 细胞, 以未感染 DTMUV 的细胞作为对照, 培养 36 h 后, 每个细胞孔以 4% 多聚甲醛在室温下固定 20 min, 用 PBS (pH = 7.2) 洗涤 3 次, 每次清洗持续 5 min; 用 0.1% 的 Triton 100 作用 20 min; 洗涤后每孔加入含有 2% BSA 的 PBS 200 μ L, 于 37 ℃ 封闭 2 h, 洗涤后每孔加入按 1:300 稀释的 E 蛋白多克隆抗体, 于 4 ℃ 条件下孵育过夜。接下来用无菌 PBS 清洗 3 次, 每次 5 min; 避光加入 1:1 000 稀释的 IgG-Alexa Fluor 488 作为二抗, 室温条件下孵育 1 h; 最后在避光条件下, 用无菌 PBS 清洗 3 次, 将细胞板置于荧光显微镜下观察, 拍照并保存。

1.8 间接 ELISA 方法的建立

1.8.1 抗原最佳包被浓度及最佳血清稀释度的确定

采用棋盘方阵滴定法, 在 96 孔 ELISA 酶标板上, 将纯化后的重组 E 蛋白用 0.05 mol \cdot L⁻¹、pH 为 9.6 的碳酸盐缓冲液按 16、8、4、2、1 和 0.5 μ g \cdot mL⁻¹ 进行倍比稀释, 每孔 100 μ L 包被酶标板, 4 ℃ 包被过夜。然后弃去孔内液体, 用 PBST 洗涤 3 次后, 加入含有 0.2% 明胶的 PBST, 37 ℃ 封闭 1 h。阴性与阳性血清分别按照 1:50、1:100、1:200 和 1:400 进行倍比稀释, 37 ℃ 作用 1 h 后, 用 PBST 洗涤 3 次, 加入 1:5 000 稀释的羊抗鸭酶标二抗, 37 ℃ 作用 1 h, 用 PBST 洗涤 3 次后拍干。每孔加入 100 μ L

的 TMB 显色液, 避光显色 15 min 后, 每孔加入 2 mol \cdot L⁻¹ H₂SO₄ 终止反应, 用酶标仪测定 OD_{450 nm} 值, 当阳性血清与阴性血清 OD_{450 nm} 比值 (P/N 值) 最大时, 其对应的即为抗原最佳包被浓度与最佳血清稀释度。

1.8.2 酶标二抗最佳工作浓度的确定

采用 1.8.1 试验中获得的最佳抗原包被浓度和最佳血清稀释度, 将 HRP 标记的羊抗鸭二抗依次从 1:2 000 开始进行倍比稀释, 最大稀释倍数为 1:64 000, 其余条件一致。测定 OD_{450 nm} 值后, 计算并确定酶标二抗的最佳工作浓度。

1.8.3 酶标二抗最佳工作时间的确定

采用上述试验中获得的最佳抗原包被浓度、最佳血清稀释浓度和最佳酶标二抗稀释浓度, 将酶标二抗作用时间分别控制在 30、45、60 和 90 min, 其余条件保持一致。测定 OD_{450 nm} 值后, 计算并确定酶标二抗的最佳工作时间。

1.8.4 间接 ELISA 方法对阴性和阳性临界值的确定

采用上述建立的间接 ELISA 方法, 对收集到的山东省各地共 40 份肉鸭 DTMUV 阴性血清进行检测。每份样品重复检测 3 孔, 测定 OD_{450 nm} 值并计算样本的平均值 (\bar{X}) 和标准差 (SD)。根据统计学原理, 样本的 OD_{450 nm} > 阴性样本 OD_{450 nm} 均值 (\bar{X}) + 2SD (标准差) 时, 能够在 99.5% 水平上判定为阳性。

1.8.5 特异性试验

用建立的间接 ELISA 方法分别检测新城疫 (ND)、H9 亚型禽流感 (H9)、鸭肝炎 3 型 (DVH-3)、鸭瘟 (DP) 等阳性血清, 验证本试验建立的间接 ELISA 方法是否对鸭其他病阳性血清有交叉反应性。

1.8.6 敏感性试验

将抗 DTMUV 阳性血清从 1:100 开始进行倍比稀释, 最大稀释倍数为 1:6 400, 其余条件不变按上述试验步骤进行, 验证该方法可以检测到的血清最大稀释倍数, 从而确定该方法的敏感性。

1.8.7 重复性试验

为了评估板内重复性, 在同一酶标板上, 对 10 份血清样品 (阴性血清与阳性血清各 5 份) 进行了检测, 每份样品均重复了 6 孔, 分别计算了每份血清样品的板内变异系数 (CV)。此外, 为了确定板间重复性, 使用 3 块在不同时间段包被的酶标板, 对相同的 10 份血清样品进行了检测, 分别计算了每份血清样品的板间 CV。

1.8.8 间接 ELISA 方法的临床应用

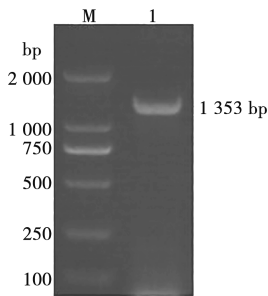
用建立的间接 ELISA 方法检测本试验室所采集

的山东各地区免疫过鸭坦布苏病毒病 (DTMUV) 弱疫苗的鸭血清样品 200 份及正常未感染的肉鸭血清样品 50 份, 计算阴阳性检出率。

2 结果与分析

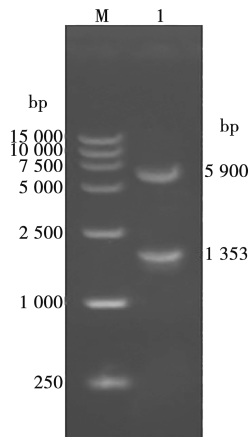
2.1 E 基因的克隆及载体构建

E 基因的 PCR 扩增结果如图 1 所示, 可见 1 条约 1 353 bp 的目的条带, 与预期结果一致。将 DTMUV E 基因连接到 pET-32a 载体后, 使用限制性内切酶 *EcoR* I/*Xho* I 双酶切, 获得了 1 条约 5 900 bp 的载体片段和 1 条约 1 353 bp 的目的条带 (见图 2), 结果与预期大小相符, 说明重组质粒 pET-CZ-E 构建成功。



M. DL2000 Marker; 1. DTMUV。

图 1 DTMUV E 基因的 PCR 扩增



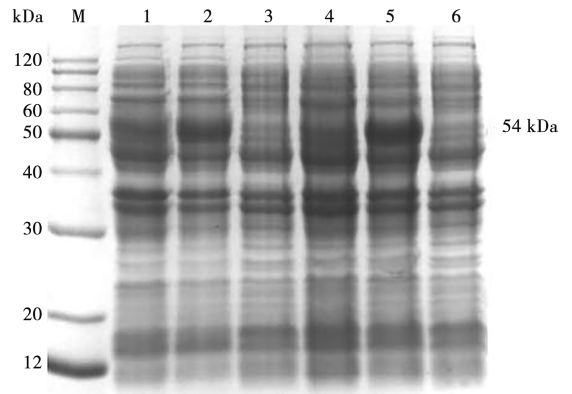
M. DL15000 Marker; 1. pET-CZ-E。

图 2 重组表达载体 pET-CZ-E 的酶切鉴定

2.2 重组 E 蛋白的表达形式鉴定

将重组质粒 pET-CZ-E 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中经过 1 mmol/L IPTG 诱导后, 通过 SDS-PAGE 鉴定。结果显示 (见图 3), 与未诱导相比, 重组质粒 pET-CZ-E 在大小约 54 kDa 处出现了目的蛋白, 与预期结果一致。诱导菌裂解后沉淀中存在重组融合蛋白, 同时上清液中也检测到少量诱导表

达的融合蛋白。重组蛋白 DTMUV E 成功表达。

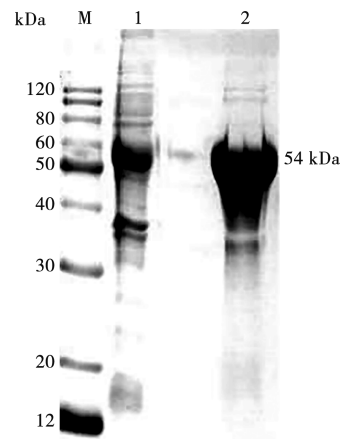


M. Marker; 1. 诱导菌裂解后上清液; 2. 重组质粒 pET-CZ-E 诱导; 3. 重组质粒 pET-CZ-E 未诱导; 4. pET32a 空载体未诱导; 5. 诱导菌裂解后沉淀; 6. pET32a 空载体诱导。

图 3 重组 E 蛋白的 SDS-PAGE 分析

2.3 重组蛋白的纯化与免疫

将含有 pET32a (+) -E/BL21 的培养物接种到添加了 1% 双抗的 LB 液体培养基中, 以扩大培养规模。经过 8~10 h 的诱导表达后, 离心将菌体沉淀收集, 然后使用超声波破碎技术对细胞进行裂解。随后, 提取包涵体样品, 将纯化的重组蛋白进行 SDS-PAGE 验证, 纯化效果良好 (见图 4)。通过 BCA 法测定, 确定目的蛋白的浓度为 3.023 g/L。用重组蛋白免疫家兔, 采集耳静脉血样, 并收集血清备用。



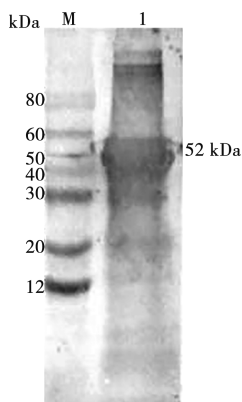
M. Marker; 1. 未纯化的包涵体蛋白; 2. 纯化后的重组 E 蛋白。

图 4 SDS-PAGE 对纯化后 E 蛋白的分析

2.4 重组 E 蛋白多克隆抗体的 Western blot 检测

将 DTMUV 感染 BHK21 细胞, 收样后经 Western blot 鉴定, 得到了 1 条与预期结果一致的目的条带 (约 52 kDa) (见图 5), 表明制备的 E 多克隆抗体能

够识别 E 蛋白。



M. Marker; 1. 诱导 pET-CZ-E 表达的蛋白。

图 5 Western blot 鉴定多克隆抗体对 DTMUV 感染细胞 E 蛋白的识别

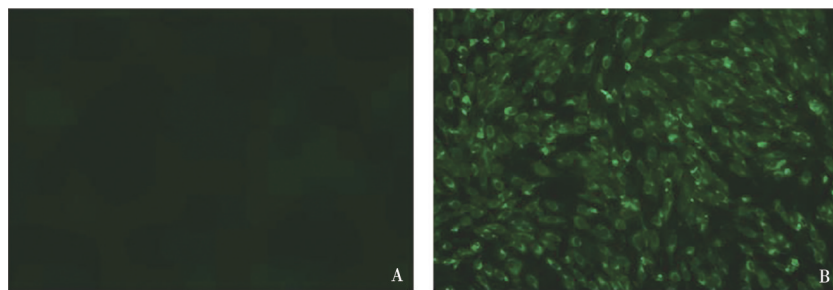
2.5 多克隆抗体的 IFA 检测

DTMUV 感染 BHK21 细胞 72 h 后，使用 IFA 方法进行检测。结果显示，特异性绿色荧光信号显著，而未接受病毒感染的对照组则无荧光信号，如图 6 所示。结果表明，制备的兔源抗 E 蛋白多克隆抗体能成功检测 DTMUV 的 E 蛋白，且特异性较好。

2.6 间接 ELISA 检测方法的建立

2.6.1 抗原最佳包被浓度及最佳血清稀释度的确定

方阵滴定结果显示，当血清的稀释浓度为 1 : 200，每孔抗原包被量为 0.1 μg 时（表 1），阳性血清的 $OD_{450\text{ nm}}$ 值可达到 1.065，与之对应的阴性血清孔 $OD_{450\text{ nm}}$ 值为 0.194，阳性血清与阴性血清的 $OD_{450\text{ nm}}$ 比值最大 (P/N=5.489)。由此得出，最佳的血清稀释度为 1 : 200，抗原的最佳包被量为 0.1 μg/孔。



A. 对照组; B. DTMUV 感染组。

图 6 重组 E 蛋白的 IFA 检测

表 1 方阵滴定法测定抗原最佳包被浓度及最佳血清稀释度

血清稀释度	指标	抗原浓度/ (μg · mL ⁻¹)					
		16	8	4	2	1	0.5
1 : 50	阳性血清 $OD_{450\text{ nm}}$ 值	1.745	1.779	1.682	1.761	1.495	1.148
	阴性血清 $OD_{450\text{ nm}}$ 值	0.462	0.366	0.441	0.401	0.433	0.418
	P/N	3.777	4.861	3.814	4.392	3.453	2.746
1 : 100	阳性血清 $OD_{450\text{ nm}}$ 值	1.404	1.523	1.425	1.322	1.167	1.022
	阴性血清 $OD_{450\text{ nm}}$ 值	0.311	0.295	0.321	0.315	0.334	0.296
	P/N	4.514	5.163	4.439	4.197	3.494	3.453
1 : 200	阳性血清 $OD_{450\text{ nm}}$ 值	1.496	1.337	1.224	1.142	1.065	0.658
	阴性血清 $OD_{450\text{ nm}}$ 值	0.302	0.255	0.247	0.241	0.194	0.221
	P/N	4.954	5.243	4.955	4.739	5.489	2.977
1 : 400	阳性血清 $OD_{450\text{ nm}}$ 值	0.995	0.912	0.862	0.818	0.712	0.518
	阴性血清 $OD_{450\text{ nm}}$ 值	0.201	0.179	0.164	0.157	0.159	0.137
	P/N	4.950	5.095	5.256	5.210	4.478	3.781

2.6.2 酶标二抗最佳工作浓度的确定

结果显示，当酶标二抗羊抗鸭以 1 : 16 000 稀释

时，阳性值更接近于 1 且 P/N=4.503 为最大。因此，将 1 : 16 000 确定为酶标二抗的最佳工作浓度（表 2）。

表2 酶标二抗最佳工作浓度测定

指标	二抗稀释倍数					
	1 : 2 000	1 : 4 000	1 : 8 000	1 : 16 000	1 : 32 000	1 : 64 000
阳性血清 $OD_{450\text{ nm}}$ 值	3.355	2.836	1.977	1.279	0.792	0.482
阴性血清 $OD_{450\text{ nm}}$ 值	0.964	0.651	0.467	0.284	0.177	0.117
P/N	3.480	4.356	4.233	4.503	4.475	4.120

2.6.3 酶标二抗最佳工作时间的确定

结果显示,将羊抗鸭酶标二抗以 1 : 16 000 稀释后,作用 45 min 时阳性血清与阴性血清的 $OD_{450\text{ nm}}$ 值比值最大。因此,将 45 min 确定为酶标二抗的最佳工作时间。

2.6.4 间接 ELISA 方法对阴性和阳性临界值的确定

对 40 份 DTMOV 阴性血清进行间接 ELISA 检测。结果显示,平均值为 0.197,标准差为 0.129,可计算出试验临界值为 0.455,即待测样品的 $OD_{450\text{ nm}}$ 值 ≥ 0.455 时为阳性, $OD_{450\text{ nm}}$ 值 < 0.455 为阴性。

2.6.5 特异性试验

采用建立的间接 ELISA 方法分别检测 ND、H9、DVH-3、DP 等阳性血清,结果显示,所有阳性血清

$OD_{450\text{ nm}}$ 值均小于临界值 0.455 (表 3)。

表3 间接 ELISA 特异性试验检测

指标	ND	H9	DVH-3	DP
$OD_{450\text{ nm}}$ 值	0.122	0.085	0.211	0.097

2.6.6 敏感性试验

采用上述试验所得最佳条件进行包被,将抗 DTMOV 阳性血清从 1 : 100 开始进行倍比稀释,最大稀释倍数为 1 : 6 400,其余按最适反应条件进行间接 ELISA。结果显示,1 : 800 稀释时,其 $OD_{450\text{ nm}}$ 值仍然大于 0.455 (表 4)。因此,该 ELISA 方法的检测敏感性大于 1 : 800。

表4 间接 ELISA 敏感性试验结果

指标	血清稀释倍数						
	1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 800	1 : 1 600	1 : 3 200	1 : 6 400
阳性 $OD_{450\text{ nm}}$ 值	0.885	0.821	0.718	0.482	0.367	0.274	0.181
阴性 $OD_{450\text{ nm}}$ 值	0.171	0.135	0.111	0.092	0.087	0.079	0.076

2.6.7 重复性试验

板内重复性试验:将 10 份抗 DTMOV 血清(其中阳性血清与阴性血清各 5 份)用同一批包被的酶标板检测,重复 6 孔,计算标准偏差和平均值。结果显示,试验中 CV 最大为 6.2%,最小为 1.1%。

板间重复性试验:不同时间内包板,分别进行 3 次试验,检测上述 10 份血清,每孔同样做 6 个平行孔,计算标准偏差和平均值。结果显示,批间 CV 最大为 9.7%,最小为 2.8%。

2.6.8 间接 ELISA 方法的临床应用

用建立的间接 ELISA 方法分别检测本实验室所采集的山东各地区免疫过 DTMOV 弱毒疫苗的鸭血清样品 200 份及正常未感染的肉鸭血清样品 50 份。结果显示,免疫过 DTMOV 弱毒疫苗的鸭血清中共测得阳性样本 192 份,阳性率为 96%;正常未感染的肉鸭血清样品则全部检测为阴性,阴性率为 100%。

3 讨论

DTMOV 自 2010 年首次在中国发现以来,该病给我国水禽养殖业带来了巨大的冲击,给养殖户造成了严重的经济损失^[13]。当前针对 DTMOV 的研究亟待加强,特别是在探究其致病机理、跨物种传播机制以及疫苗研制方面尚需突破。针对 DTMOV 的研究可以从多个层面展开,包括病毒的传播途径、致病机制、免疫学特性以及疫苗研发等方面^[14-16]。通过深入了解 DTMOV 的生物学特性和致病机制,有望为制定更有效的防控策略提供科学依据,从而减轻其对养殖业的危害,保障养殖业的健康发展。同时,加强监测和防控 DTMOV 感染的工作也是维护公共卫生安全的重要举措,有助于减少疾病对人类健康造成的潜在风险。因此,深入研究 DTMOV 并加强相应的防控工作对促进养殖业的可持续发展具有重要作用。

E 蛋白作为 DTMOV 的囊膜蛋白,在病毒感染过程中扮演着至关重要的角色^[17]。E 蛋白的结构域 I

作为特异性抗原表位具有中和活性,对病毒的中和及清除至关重要;结构域Ⅱ在病毒入侵宿主细胞的过程中发挥着重要作用,参与了介导病毒与宿主细胞的膜融合。当病毒侵入细胞后,其外膜蛋白会与宿主细胞膜上的受体结合,随后通过结构域Ⅱ介导的膜融合机制,将病毒基因组释放到宿主细胞内部,从而激发机体产生抗体应对感染;结构域Ⅲ作为DTMUV产生抗体的主要靶点,能够引发机体产生特异性免疫反应,有助于清除感染病毒^[18]。基于对E蛋白功能的深入了解,可以为疫苗研制提供重要的理论依据,同时也有助于揭示DTMUV感染机制和病理生物学特征,为制定精准防控策略提供重要参考。本研究制备的E蛋白多克隆抗体,经Western blot和IFA试验鉴定,可以与DTMUV发生良好的特异性反应,对于更好地了解该病毒的感染机制,研发有效疫苗以及保护水禽养殖业具有重要意义。

目前,对于DTMUV感染有多种检测方法,其中ELISA方法因其操作简便、快速高通量而在临床检测中广受欢迎。然而,大部分用于检测抗DTMUV抗体的商业化ELISA试剂盒采用的是灭活的全病毒作为包被抗原。这种方法虽然有效,但全病毒的纯化过程既复杂又昂贵,而且存在与其他黄病毒发生交叉反应的风险^[19]。同样,对于DTMUV来说,纯化也面临类似的挑战,其病毒滴度大幅下降。因此,以DTMUV的结构蛋白或非结构蛋白为抗原建立检测方法,将具有更广泛的实用价值。本研究采用重组E蛋白作为抗原,成功构建了检测抗DTMUV抗体的间接ELISA方法。试验结果显示,该方法展现出了较高的敏感性,即使在血清稀释至1:800的情况下,仍为阳性。同时,其特异性较强,不会与其他病毒或细菌的阳性血清发生交叉反应。在重复性方面,该方法也表现优异,无论是批间还是批内检测,CV均低于10%。这一研究成果为DTMUV的诊断、血清检测以及流行病学调查提供了坚实的基础。

综上,本研究成功利用原核表达系统表达了DTMUV E蛋白,并制备了针对DTMUV E蛋白的兔源多克隆抗体,建立了一种基于重组E蛋白的间接ELISA抗体检测方法,该方法具有高敏感性、特异性和重复性,为鸭坦布苏病的诊断、血清学检测以及流行病学调查提供了可靠的工具,有利于养殖业的可持续发展。

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] 李敏,王鸿志,杨晶,等.鸭坦布苏病毒感染研究进展[J].养禽与禽病防治,2018(8):2-6.
- [3] 黄健,庄育彬,黄秀玉,等.鸭坦布苏病毒病研究进展[J].福建畜牧兽医,2016,38(1):14-17.
- [4] 刘志刚,孙青松,姚蓉,等.鸭坦布苏病毒研究进展[J].中国动物传染病学报,2013(1):81-86.
- [5] 曲哲会,张喜文,齐志颖,等.鸭坦布苏病毒E蛋白的原核表达与反应原性分析[J].黑龙江畜牧兽医,2022(23):67-71.
- [6] TANG Y, DIAO Y, GAO X, et al. Analysis of the complete genome of Tembusu virus, a flavivirus isolated from ducks in China [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2012, 59 (4): 336-343.
- [7] 林霄,贺煜,程安春,等.鸭坦布苏病毒NS3蛋白的原核表达及其多克隆抗体的制备[J].四川农业大学学报,2020,38(5):619-623.
- [8] 李宁,相海琴,刘立涛,等.鸭坦布苏病毒病研究进展[J].水禽世界,2013(2):41-45.
- [9] BAI X, LV R, LIU C, et al. Molecular characterization of a duck Tembusu virus from China [J]. *Virus Genes*, 2013, 47 (3): 478-482.
- [10] ZHU K, HUANG J, JIA R, et al. Identification and molecular characterization of a novel duck Tembusu virus isolate from Southwest China [J]. *Arch Virol*, 2015, 160 (11): 2781-2790.
- [11] 寇甜甜,丁天兵.黄病毒属病毒E蛋白结构和功能研究进展[J].微生物学免疫学进展,2014(3):49-53.
- [12] 杨笑笑,杨兴森,刘亚林,等.日本脑炎病毒prM蛋白单克隆抗体的制备及其抗原表位的鉴定[J/OL].南京农业大学学报,2025. <https://link.cnki.net/urlid/32.1148.S.20240924.1759.002>.
- [13] SHAO Z W, LI C, ZHANG Q, et al. Duck tembusu virus and its envelope protein induce programmed cell death [J]. *Virus Genes*, 2015, 51 (1): 39-44.
- [14] LIU D, XIAO X, ZHOU P, et al. Glycosylation on envelope glycoprotein of duck Tembusu virus affects virus replication *in vitro* and contributes to the neurovirulence and pathogenicity *in vivo* [J]. *Virulence*, 2021, 12 (1): 2400-2414.
- [15] 邱新文.鸭坦布苏病毒病研究进展[J].山东畜牧兽医,2023,44(5):78-80.
- [16] 郝桂英,陈玲,殷蓓蓓,等.鸭坦布苏病毒病的研究进展[J].中国畜禽种业,2023,19(1):7-12.
- [17] LI L, ZHANG Y, DONG J, et al. The truncated Eprotein of DTMUV provide protection in young ducks [J]. *Vet Microbiol*, 2020, 240: 108508.
- [18] LI C, LIU J, SHAO Z W, et al. Epitope identification and application for diagnosis of duck Tembusu virus infections in ducks [J]. *Viruses*, 2016, 8 (11): 306.
- [19] ZHOU Q, BI Z, YIN D, et al. Development and application of an indirect ELISA for the serological detection of duck Tembusu virus infection based on the NS1 protein antigen [J]. *Arch Virol*, 2020, 165 (3): 709-714.