

检测禽流感病毒抗体的重组核蛋白 间接 ELISA 方法的建立

吴仁蔚, 胡思顺, 肖运才, 李自力, 石德时, 毕丁仁*
(华中农业大学动物医学院微生物与免疫学研究室, 武汉 430070)

摘要: 以大肠杆菌系统表达的 H9N2 亚型禽流感病毒(AIV)核蛋白(NP)为抗原,建立了禽流感间接酶联免疫吸附试验抗体检测技术(NP-ELISA)。对 263 份待检血清(包括临床收集的 243 份血清和 20 份 H9N2 亚型 AIV 免疫鸡阳性血清)进行检测, NP-ELISA 与琼脂免疫扩散试验(AGP)的总符合率为 83.3%, 与血凝抑制试验(HI)的总符合率为 92%。特异性试验表明, NP-ELISA 方法可以检测 H5、H7 和 H9 亚型 AIV 特异性抗体, 检测为阳性的血清样品能够被阳性鸡胚尿囊液阻断。敏感性试验证实, NP-ELISA 最早可以检测鸡感染后 7 d 的血清样品, 并于感染后 10 d 确定 100% 血清阳性, 而 AGP 检测直到首免后 21~28 d 才出现部分血清阳性, HI 检测直到 10~14 d 才出现部分血清阳性, 并且 NP-ELISA 要比 HI 敏感 4~40 倍。试验证明, NP-ELISA 是检测 AIV 血清型特异性抗体的一种特异、敏感、快速、经济的血清学检测技术。

关键词: 禽流感病毒; 重组核蛋白; NP-ELISA; 抗体检测

中图分类号: S854.4⁺3; S852.65⁺9.5

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2006)10-1067-06

Development of Indirect Enzyme-linked Immunosorbent Assay with Nucleoprotein as Antigen for Detecting Antibodies against Avian Influenza Virus

WU Ren-wei, HU Si-shun, XIAO Yun-cai, LI Zi-li, SHI De-shi, BI Ding-ren*
(Laboratory of Animal Microbiology and Immunology,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting antibodies against avian influenza virus (AIV) was developed by using expressed full length nucleoprotein (NP) of H9N2 AIV in *E. coli*. 263 chicken serum samples (including 243 clinical serum samples and 20 positive serum samples from H9N2 AIV vaccinated chicks) were detected by NP-ELISA, agar gel precipitin test (AGP), and hemagglutination inhibition (HI). The results showed that the coincidence ratio between NP-ELISA and AGP or HI was 83.3% and 92% respectively. The specific assay suggested that NP-ELISA was able to detect H5, H7 and H9 subtype antibodies to AIV, and the serum samples which were confirmed positive by NP-ELISA could be blocked by positive chicken-embryo allantoic fluid. The sensitive analysis demonstrated that NP-ELISA can detect specific antibody in the 7th day after AIV infection in chicks, and all sera were positive in the 10th day. However, serum samples were still negative at the 21st day post inoculation (PI) by AGP test, and HI tests began to detect low levels of antibodies at the 10th day PI. The sensitivity of NP-ELISA was 4-40 times higher than that of HI. The present study confirmed that the NP-ELISA was a rapid, sensitive, economic and specific method for type-serologically detection

收稿日期: 2005-12-05

基金项目: 湖北省科技厅重点项目(20002P0805)

作者简介: 吴仁蔚(1977-), 女, 辽宁人, 博士生, 主要从事动物病毒分子生物学与免疫学研究。E-mail: wurenwei@webmail.hzau.edu.cn

* 通讯作者: 毕丁仁, Tel: 027-87280566; E-mail: bidingren@mail.hzau.edu.cn

of AIV infection in chickens.

Key words: avian influenza virus; recombinant nucleoprotein; NP-ELISA; detecting antibody

禽流感是由 A 型流感病毒引起的禽类烈性传染病,其病原称为禽流感病毒(avian influenza virus, AIV)。禽流感在各种禽类中的流行有多种形式,可见亚临床症状、轻度上呼吸道感染和急性致死性等。目前我国已分离到的禽流感病毒有 H4、H5、H7、H9 和 H14 等亚型^[1]。通过禽流感流行病学调查发现中等毒力以下毒株在我国广泛存在,其中 H9 亚型禽流感病毒是影响我国养禽业的主要病毒亚型。

由于禽流感的特殊卫生学意义,禽流感的防制直接关系到养禽业的持续、健康发展和人民的身体健康。禽流感的早期快速诊断和血清学抗体检测是目前最重要的监测方法,对预防禽流感具有重要意义。目前,用于诊断禽流感的血清学方法已有多种,如琼脂扩散试验(A GP)^[3]、血凝抑制试验(HI)^[4]、酶联免疫吸附试验(ELISA)^[5,6]等。但其中 A GP 观察结果需要 24~72 h,且敏感性较差,易出现假阴性。HI 方法不能检测异种亚型禽流感抗体,且红细胞需要新鲜制备。而 ELISA 方法具有特异、敏感、快速等特点,因此受到广泛关注,但利用全病毒作抗原建立的检测诊断方法必须先将病毒浓缩提纯,这就使得全病毒抗原制备过程复杂,并且有散毒的危险,不宜于推广。因此,需要一种安全、特异、敏感、快捷、经济的血清学检测技术来确定禽流感型抗原性的诊断,监测禽流感的流行并作出预报。

本试验利用禽流感病毒核蛋白(NP)高度保守,具有型特异性的特点,在成功以大肠杆菌系统表达我国流行毒株 H9N2 亚型禽流感病毒 NP 完整编码区的基础上^[7],探讨和建立了以全长 NP 蛋白为抗原的间接 NP-ELISA 禽流感病毒抗体检测技术,以期为预防和控制禽流感奠定基础。

1 材料与方法

1.1 毒株、抗原及血清

H9N2 亚型 AIV 由本实验室分离并保存^[8]。大肠杆菌 BL21(DE3) codon plus 为本实验室保存,含 H9N2 亚型禽流感病毒 NP 基因完整编码片段的原核表达质粒 p KG-NP 由本实验室胡思顺博士构建并保存^[7]。禽流感标准琼脂扩散抗原和 H5 及 H7 亚型血凝分型抗原购自中国农业科学院哈尔滨

兽医研究所。禽流感病毒 H5、H7、H9 亚型标准阳性血清和鸡新城疫(ND)、鸡马立克氏病(MD)、鸡传染性支气管炎(IB)、鸡传染性法氏囊病(IBD)标准阳性血清购自中国兽医药品监察所。辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鸡 IgG 购自 SBA 公司。

1.2 待检样品

用 H9N2 亚型 AIV 免疫 5 周龄来航鸡,免疫 2 次,每次间隔 2 周。免疫鸡血清和自湖北、河南、安徽等地区养鸡场采集的未知血清(部分为 2004 年暴发禽流感时血清样品)作为待检血清样品。

1.3 阴性血清的制备

孵化 1 日龄来航鸡(其母代为 AIV 阴性),挑选 50 只隔离饲养至 30 d,制备血清,用血凝抑制试验(HI)^[2]和琼脂扩散试验(A GP)^[1]检测血清中是否含 AIV 抗体。结果判定时以 HI 效价 2^4 为阳性,HI 效价 $< 2^3$ 为阴性,HI 效价等于 2^3 为可疑。结果 50 份血清 HI 效价均 $< 2^1$,在 A GP 试验中所有血清都未产生沉淀线,说明这 50 份血清为 AI 阴性血清。

1.4 NP-ELISA 方法的建立

1.4.1 NP-ELISA 抗原准备 H9N2 亚型禽流感病毒 NP 基因完整编码区大肠杆菌表达产物的提取及纯化参考文献[7]进行,作为 NP-ELISA 建立的抗原。

1.4.2 NP-ELISA 操作程序 纯化的 NP 抗原用包被液按一定浓度(待定)稀释包被,每孔 100 μ L,置 4 $^{\circ}$ C 过夜,每孔加 200 μ L 洗涤液,洗涤 4 次,每次间隔 3 min;每孔加 100 μ L 保温液,置 37 $^{\circ}$ C 1 h,同上洗涤 4 次;加用保温液稀释的待检鸡血清,每孔 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 30 min,同上洗涤 4 次,于 37 $^{\circ}$ C 作用 30 min 后,加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鸡 IgG,反应 30 min,利用四甲基联苯二胺(TMB)进行显色后,于波长 450 nm 处测定 OD 值。

1.4.3 NP-ELISA 最佳反应条件的确定 抗原和待检血清最佳工作浓度的确定采用方阵滴定,抗原(2 mg/mL)自 10 倍稀释的起始浓度倍比稀释(2 \times)后分别包被聚乙烯微量反应板,阴阳性血清分别自 10 倍倍比稀释,从 1:10、1:20、1:40 直到 1:1280。以方阵滴定中 OD 值下降最快且阳性 OD_{450nm}/阴性 OD_{450nm}值(P/N 值) > 2.1 时所对应的

抗原包被浓度和血清稀释度为最佳抗原包被浓度和血清最佳稀释倍数。

1.4.4 NP-ELISA 判定标准的确定 将上述 HI 和 A GP 检测确定为阴性的 50 份血清在最佳工作条件下进行间接 NP-ELISA 测定,以确定 NP-ELISA 阴阳性判定的临界值。

1.5 比较试验

分别用 NP-ELISA、A GP 和 HI 对 243 份临床待检血清和免疫鸡的阳性血清进行检测,并对试验结果进行统计学比较。

1.6 特异性试验

1.6.1 阻断试验 将经 NP-ELISA 检测为阳性的血清与等体积 H9N2 亚型 AIV 感染鸡胚尿囊液混合,37 作用 45min,进行检测,观察 OD 值变化,同时设不做任何处理的阳性血清和正常尿囊液处理的阳性血清对照。

1.6.2 对不同亚型及其它疫病血清的检测 在相同条件下用 NP 包被抗原对 H5、H7、H9 亚型标准阳性血清和 ND、MD、IB、IBD 标准阳性血清进行 NP-ELISA 检测。

1.7 重复性试验

用同一批次包被板(批内),和不同批次包被板(批间)在不同试验日检测血清,每个样品重复检测 3 次。

1.8 NP-ELISA 敏感性检测

H9N2 亚型 AIV 免疫 AIV 阴性 5 周龄来航鸡,免疫 2 次,每次间隔 2 周。分别于首免后第 4、7、10、14、21、28、35 和 42 天采集免疫鸡血清,分别进行 NP-ELISA、A GP 和 HI 试验检测,确定血清中特异性抗体在不同检测方法的阳转情况。同时,从临床送检血清中随机抽取 10 份血清,进行 HI 和 NP-ELISA 效价的测定,直接判定这两种检测方法的敏感性。

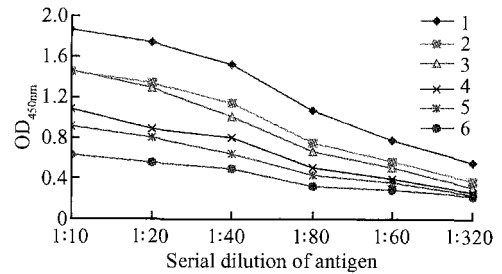
2 结果

2.1 NP-ELISA 最佳反应条件的确定

纯化的融合蛋白倍比稀释包被酶标板,经方阵滴定确定最佳抗原稀释度为 1:40,包被浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (图 1),血清最佳稀释度为 1:80(图 2),此时阴阳性血清的 OD 值相差最大,P/N 值均大于 2.1。

2.2 间接 NP-ELISA 判定标准的确定

50 份阴性血清中,OD 值最小的为 0.117,最大

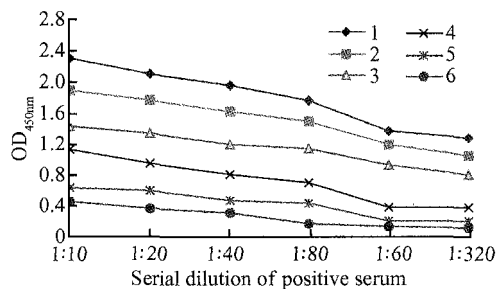


曲线 1~6 依次为血清做 1:20、1:40、1:80、1:160、1:320、1:640 倍稀释

Curves 1-6 mean that the dilution of sera is 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, and 1:640 respectively

图 1 NP 抗原包被浓度的确定

Fig. 1 The identification of optimal NP antigen concentration



曲线 1~6 依次为 NP 抗原做 1:10、1:20、1:40、1:80、1:160、1:320 倍稀释

Curves 1-6 express that the dilution of NP antigen is 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, and 1:320 respectively

图 2 检测血清最佳稀释度的确定

Fig. 2 The identification of the optimal dilution of sera

的为 0.239,大部分 AIV 阴性血清 OD 值集中在 0.135~0.190,经统计学处理,求得 $OD_{450\text{nm}}$ 平均值 $\bar{x} = 0.163$; 标准差 (Standard Difference) $SD = 0.031$; 确定阴阳性临界值为 $\bar{x} + 3SD = 0.256$,即待测样品的 $OD_{450\text{nm}}$ 值大于 0.256 则为阳性,小于或等于 0.256 则为阴性。

2.3 比较试验

分别用 NP-ELISA、A GP 和 HI 对 243 份临床待检血清和免疫鸡首免后 42 d 时采集的阳性血清进行检测,结果如表 1 所示,NP-ELISA 与各亚型 HI 的总符合率为 92%,其中 16 份 NP-ELISA 检测为阳性而 HI 检测为阴性。NP-ELISA 与 A GP 的总符合率为 83.3%,其中 44 份 NP-ELISA 检测为阳性而 A GP 检测为阴性,本试验建立的 NP-ELISA

的阳性检出率最高,达到 97.7%,而后依次为 HI (93.2%)和 AGP(81.4%)。

表 1 NP-ELISA 和 AGP、HI 对血清样品检测的比较

Table 1 Comparative detection of serum samples by NP-ELISA, AGP and HI

	数量 Numbers	HI	NP-ELISA	AGP
免疫鸡血清 Sera from chickens inoculated	20	20/0 ^a	20/0	20/0
待检血清 Examined sera	243	226/17	237/6	194/49
总数 Total	263	246(238)/17(4) ^b	257/6	214(214)/49(5)
阳性率/ % Positive ratio		93.2	97.7	81.4
与 NP-ELISA 的符合率/ % Coincidence ratio with NP-ELISA		92.0	/	83.3

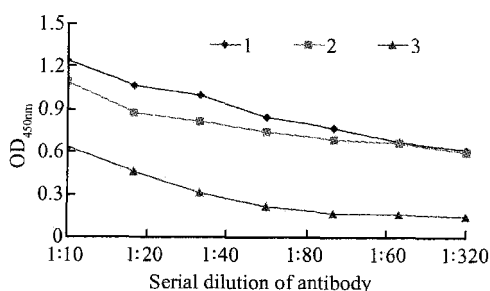
20/0^a. 阳性份数/ 阴性份数; ^b. 括号中的数值表示 HI 或 AGP 与 NP-ELISA 检测均为阳性或均为阴性的样品数

20/0^a. Number of positive sera samples/ Number of negative sera samples;

^b. The number in the bracket means positive or negative sera numbers in accord with NP-ELISA

2.4 特异性试验

阻断试验显示经 AIV 感染的鸡胚尿囊液处理的阳性血清 OD 值明显降低,而经健康鸡胚尿囊液处理阳性血清,OD 值没有明显变化(图 3)。ND、MD、IB、IBD 标准阳性血清与 NP 反应结果均为阴性,说明建立的 NP-ELISA 与异种病原血清不存在交叉反应,而 NP-ELISA 与 H5、H7 和 H9 亚型标准阳性血清呈明显的特异性阳性反应,说明表明 NP-ELISA 具有较好的型特异性抗体检测能力。



曲线 1. 阳性血清对照; 曲线 2. 阴性尿囊液处理的阳性血清; 曲线 3. 感染性尿囊液处理的阳性血清

Curve 1. Positive serum of avian influenza; Curve 2. Positive serum treated with negative allantoic fluid; Curve 3. Positive serum treated with infectious allantoic fluid

图 3 NP-ELISA 特异性阻断试验

Fig. 3 Specific block test of NP-ELISA

2.5 重复性试验

对 10 份临床随机抽取的待检血清做重复性检测,结果发现,批内变异系数为 0.49%~5.23%,批间变异系数为 0.18%~6.2%,变异系数均小于 7%。说明 NP 抗原稳定性较好,建立的 NP-ELISA 方法重复性良好。

2.6 敏感性试验

分别于首免后第 4、7、10、14、21、28、35 和 42 天采集免疫鸡血清,分别进行 NP-ELISA、AGP 和 HI 试验检测,确定三种检测方法的敏感性。从表 2 中可以看出,最先检测到阳性抗体的是 NP-ELISA,于首免后第 7 天在 20 只免疫鸡中就有 14 只检测到血清阳转,于首免后第 10 天 100%血清阳转,而 HI 检测确定于首免后 28 d 免疫鸡血清 100%发生阳转。AGP 试验检测于首免后第 21 天才出现少量血清阳转(3/20),二免后 21 d(首免后 35 d)确定 100%血清阳转。说明 NP-ELISA 能够较早地检测出特异性 AIV 抗体,其敏感性均优于 HI 和 AGP。

表 2 NP-ELISA、HI 和 AGP 检测免疫鸡血清的敏感性试验
Table 2 The sensitive comparison of NP-ELISA, HI and AGP detecting serum samples from chicken inoculated with AIV

DPI ^a /d	NP-ELISA	HI ^b	AGP
4	0/20 ^c	0/20	0/20
7	14/20	0/20	0/20
10	20/20	9/20	0/20
14	20/20	14/20	0/20
21	20/20	19/20	3/20
28	20/20	20/20	11/20
35	20/20	20/20	20/20
42	20/20	20/20	20/20

DPI. 免疫后时间; ^b. HI 值大于或等于 1/4 认为定为阳性; ^c. 阳性数/ 总数

DPI. Days post inoculation; ^b HI titers 1/4 be considered positive; ^c. Positive numbers/ total numbers

为了进一步确定 NP-ELISA 在临床中的敏感性,对随机挑取的 10 份临床阳性血清分别进行 HI 和 NP-ELISA 效价的测定。从表 3 中可以看出,

NP-ELISA 要比 HI 敏感 4~40 倍,说明 NP-ELISA 在临床检测中的敏感性更高。

表 3 NP-ELISA、HI 检测临床送检血清的敏感性

Table 3 The sensitive comparison of NP-ELISA and HI in detecting clinical serum samples

	临床送检血清样品 Serum Samples									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
HI	1 64	1 32	1 1 024	1 32	1 256	1 32	1 256	1 64	1 128	1 32
NP-ELISA ^a	1 1 280	1 256	1 5 120	1 256	1 5 120	1 1 280	1 2 560	1 256	1 512	1 512
NP-ELISA/ HI	20	8	5	8	20	40	10	4	4	16

a. NP-ELISA 中阳性血清 OD/ 阴性血清 OD 大于或等于 2.1 的最大稀释倍数

a. The highest dilution that OD value of positive serum/ OD value of negative serum ≥ 2.1 in NP-ELISA

3 讨论

血清学抗体检测方法目前仍是禽流感最重要的监测方法,在成熟的快速诊断方法出现以前,可以首先采用型特异性抗体检测方法对血清样品进行初步筛选,以提高检测效率,对 ELISA 检测为阴性的样本不必进一步检测;对筛选出的阳性样品再进行 HI 检测,以确定亚型。

1970 年 Beard 等^[3]首次将 A GP 用于禽流感抗体的检测,此法虽然简单易行,但是敏感性较差,易出现假阴性。随后,Shafer 等^[6]和李海燕等^[9]分别以杆状病毒感染昆虫细胞表达 AIV 核蛋白建立了 rNP-ELISA 诊断技术,能够较好的地检测各亚型禽流感,但该方法抗原制备复杂,成本较高而不易于推广。Fatunmbi 等^[10]在研究广谱检测禽流感的血清学诊断技术时,发现 H9N2 亚型 AIV 裂解抗原是最理想的抗原供体,最早可以检测到感染后 4d 的特异性抗体。目前我国主要存在 H9N2 亚型 AIV 的流行^[2],我们在获得大肠杆菌表达 H9N2 亚型 AIV NP 完整编码区的基础上,在国内首次成功地建立了以全长 NP 蛋白为抗原的检测 AIV 抗体的间接 NP-ELISA 方法。该方法抗原获得简单,经济,具有良好的应用价值。

建立的 NP-ELISA 与 A GP 的总符合率为 83.3%,其中 44 份 NP-ELISA 检测为阳性而 A GP 检测为阴性,与各亚型 HI 的总符合率为 92%,其中 16 份 NP-ELISA 检测为阳性而 HI 检测为阴性。特异性试验证实,该方法与 ND、MD、IB 和 IB D 标准阳性血清没有交叉反应,用 NP-ELISA 检出的阳性血清也可以被 AIV 阻断。说明制备的 NP 抗原具有较好的免疫学活性,所建立的 NP-ELISA 具有很高的特异性。由于 HI 检测方法在 AIV 感染的

哺乳动物中表现出较低的特异性和敏感性^[11],其应用受到极大的限制,而针对 NP 蛋白的抗体可以较高滴度存在于人、猪、雪貂、马、鸡、鸭等血清中,以这种针对 NP 蛋白抗原建立的抗体检测技术成为一种极好的补充^[11]。本试验建立的 NP-ELISA 可与 H5、H7 和 H9 亚型禽流感标准阳性血清反应,可以有效检测 AIV 型特异性抗体,展示了巨大应用前景。

1974 年 Jennings 等^[12]首先用 ELISA 对注射流感病毒所产生的抗体消长规律进行了检测,认为 ELISA 的敏感性远高于 HI 反应。Synder 等^[13]对 ELISA、A GP、HI 检测 AIV 抗体进行了比较研究,发现 A GP 和 ELISA 一样均能检测型特异性抗原(抗体),但敏感性远低于 ELISA,HI 适用于亚型的检测,其敏感性也不如 ELISA。本研究也对所建立的 NP-ELISA 检测 AIV 抗体的敏感性进行了探讨,分别与 HI、A GP 进行了比较性研究。结果证实, NP-ELISA 明显比 A GP、HI 敏感,最早可以检测 AIV 感染后 7 d 血清中的特异性抗体。对临床感染或免疫鸡群检测敏感性比 HI 敏感 4~40 倍,而这一点也在 2.3 结果中也被进一步证实。在共 263 份的血清样品中 NP-ELISA 的阳性检出率最高,达到 97.7%,明显高于 A GP 和 HI 检出阳性率。

4 结论

此次建立的 NP-ELISA 克服了 A GP 反应时间长、敏感性低等缺点,弥补了 HI 只能检测亚型特异性抗体的不足。该方法操作简便、快速、敏感性和特异性高、结果判定直观,是发展禽流感血清学型特异性抗体监测的一种实用、有前途的方法,为禽流感的流行病学调查和预防控制奠定了基础。

参考文献:

- [1] 唐秀英, 田国斌, 赵传删. 中国禽流感流行株的分离鉴定[J]. 中国畜禽传染病, 1998, 20: 1~5.
- [2] 于康震, 付朝阳, 崔尚金, 等. 我国禽流感防制研究进展[J]. 中国兽医学报, 2001, 21: 103~106.
- [3] Beard C W. Avian influenza antibody detection by immunodiffusion [J]. Avian Diseases, 1970, 14: 337~341.
- [4] Zhou E M, Chan M, Heckert R A, *et al.* Evaluation of a competitive ELISA for detection of antibodies against avian influenza virus nucleoprotein[J]. Avian Diseases, 1998, 42: 517~522.
- [5] Lu H. A longitudinal study of a novel dot-enzyme-linked immunosorbent assay for detection of avian influenza virus [J]. Avian Diseases, 2003, 47: 361~369.
- [6] Shafer A L, Katz J B, Eernisse K A. Development and validation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of type A influenza antibodies in avian sera[J]. Avian Diseases, 1998, 42: 28~34.
- [7] 胡思顺. 禽流感病毒(AIV) HB株(H9N2)和鸡毒霉形体(MG) HS株主要抗原性基因的克隆与表达研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2005.
- [8] 肖运才, 李自力, 胡思顺, 等. 禽流感病毒夹心ELISA快速检测方法的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2004, 35(5): 536~541.
- [9] 李海燕, 于康震, 辛晓光, 等. 禽流感病毒重组核蛋白ELISA诊断技术的研究[J]. 中国预防兽医学报, 2000, 22(3): 182~185.
- [10] Fatunmbi O O, Newman J A, Sivanandan V, *et al.* A broad-spectrum avian influenza subtype antigen for indirect enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Avian Diseases, 1989, 33: 264~269.
- [11] De Boer G F, Back W, Osterhaus A D M E. An ELISA for detection of antibodies against influenza A nucleoprotein in humans and various animal species [J]. Arch Virol, 1990, 115: 47~61.
- [12] Jennings R, Brand C M, McLaren C, *et al.* The immune response of hamsters to purified hemagglutinins and whole influenza virus vaccines following live influenza virus infection [J]. Med Microbiol Immunol (Berl), 1974, 160: 295~309.
- [13] Synder D B, Marquardt W W, Yancey F S, *et al.* An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody against avian influenza virus [J]. Avian Diseases, 1985, 29: 136~144.