

# AIV NP 基因在噬菌体表面的展示及间接 ELISA 方法的建立

王新卫<sup>1,2,3</sup>, 毕英佐<sup>1\*</sup>, 何宏轩<sup>2\*</sup>, 王宪文<sup>1</sup>, 詹爱军<sup>1</sup>, 马静云<sup>1</sup>

(1. 华南农业大学动物科学学院, 广州 510642; 2. 中国科学院动物研究所, 北京 100101; 3. 河南农业大学牧医工程学院, 郑州 450002)

**摘要:** 利用 DNA 重组技术, 将禽流感病毒(AIV)核蛋白基因片段克隆重组于溶菌酶缺陷噬菌体 T4-z1, 获得重组噬菌体 T4-z1-NP。经 SDS-PAGE 和 Western blot 检测证实, AIV 核蛋白成功地在 T4 噬菌体表面展示。以 T4-z1-NP 为抗原建立了检测禽流感抗体的酶联免疫吸附试验(T4-NP-ELISA)方法。其与琼脂免疫扩散试验(AGP)的相对灵敏度为 100%, 特异性为 87.62%, T4-NP-ELISA 的检测准确率为 91.43%。T4-NP-ELISA 可检测 H5、H7 和 H9 亚型 AIV 特异性抗体, 而 IBD、IB、MD、ND、EDS 的阳性血清检测结果则为阴性。敏感性试验证实, 当阳性血清以 1:640 倍稀释时仍能检测到流感病毒抗体, 说明该方法比较敏感。对 192 份血样的检测显示, T4-NP-ELISA 与 IDDEX ELISA 符合率为 96.8%。这表明 T4-NP-ELISA 可检测 AIV 抗体, 也为检测与诊断 AI 提供了一种技术选择。

**关键词:** 禽流感病毒; 核蛋白; T4 噬菌体; 展示; T4-NP-ELISA

中图分类号: S852.659.5:Q78

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2008)11-1537-07

## Display of NP Gene of AIV on the Surface of Bacteriophage T4 and Development of Indirect ELISA on the Basis of the Expressed NP Protein

WANG Xin-wei<sup>1,2,3</sup>, BI Ying-zuo<sup>1\*</sup>, HE Hong-xuan<sup>2\*</sup>,

WANG Xian-wen<sup>1</sup>, ZHAN Ai-jun<sup>1</sup>, MA Jing-yun<sup>1</sup>

(1. College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 3. College of Animal Husbandry and Veterinary, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** A 1320 bp fragment of NP gene of avian influenza virus (AIV) was cloned and integrated into the genome of T4-z1 phage with SOG-deleted and lysozyme-defected by homologous recombination. The recombinant phage was named as T4-z1-NP. The results of SDS-PAGE and Western blot showed that nucleoprotein of AIV was successfully displayed on the surface of the T4-z1-NP. Based on the purified T4-z1-NP, an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (T4-NP-ELISA) was developed for detection of antibodies against AIV. Its sensitivity relative to AGP was 100% but the specificity was 87.62%. The detection accuracy rate of T4-NP-ELISA was 91.43%. It could detect antibodies to H5, H7 and H9 subtype AIV, but has no significant reaction to positive serum of IBD, IB, MD, ND and EDS. The sensitive test confirmed that when the positive serum of AI was diluted to 1:640, the OD<sub>450</sub> value was still positive, which suggested it had better sensitivity. The accordance rate between T4-NP-ELISA and commercial IDDEX

收稿日期: 2007-12-03

基金项目: 广东省科技攻关计划资助项目(A20403)资助

作者简介: 王新卫(1971-), 男, 河南泌阳人, 兽医学博士, 主要从事动物传染病学研究, Tel: 010-64807256, E-mail: xinweicliff@yahoo.com.cn

\* 通讯作者: 毕英佐, 教授, Tel: 020-85280283, E-mail: yzbi@scau.edu.cn; 何宏轩, 研究员, Tel: 010-64807118, E-mail: hehx@ioz.ac.cn

ELISA was 96.8%, when 192 serum samples were detected with them. These results indicated that T4NP-ELISA could not only detect antibody to AIV, but also provide an alternative technique for diagnosis and control of AI.

**Key words:** avian influenza virus; nucleoprotein; bacteriophage T4; display; T4NP-ELISA

禽流感(Avian influenza, AI)是A型流感病毒引起的一种禽类(家禽和野禽)的感染和/或疾病综合征<sup>[1]</sup>。该病严重危害养殖业,也威胁人类健康<sup>[2]</sup>。A型禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV)具有8个基因片段,编码10种蛋白,其中核蛋白(Nucleoprotein, NP)高度保守,在AIV各亚型间的同源性达90%以上,是主要的型特异性抗原<sup>[3-7]</sup>,常常作为临床检测AI的诊断试剂<sup>[8-9]</sup>,在实际临床诊断中具有重要意义。

近年来,已经建立了许多检测流感的方法,如病毒分离、中和试验、HA、HI、NA、NI、AGP、RT-PCR和序列分析<sup>[10]</sup>。RT-PCR和序列分析主要用于疫源追踪、毒型鉴定和毒株的遗传学分析。间接血凝试验、琼脂扩散试验、中和试验和病毒分离较为常用,然而都存在一定缺点,中和试验和病毒分离费时费力;间接血凝存在亚型的限制;而AGP的敏感性低。以上方法在使用活病毒时,存在散毒的危险,尤其是在检测高致病性毒株时。而且流感病毒存在多种亚型,在对禽类(野鸟、禽)动物进行流感检测时,以上方法仍然存在困难。而基于NP的群特异性检测方法(ELISA)适于大批样品的血清学调查,其作为抗原建立的ELISA方法在流感检测中被证实是可行的<sup>[11-13]</sup>。而且基因表达技术的逐渐成熟为其实用性奠定了基础,选择合适的表达系统表达NP,获得纯度高的NP抗原已在实际中得到应用<sup>[3,14-15]</sup>。但利用重组噬菌体展示技术生产的核蛋白做抗原检测流感抗体的ELISA技术国内外还未见报道。为此,本研究利用基因工程的方法表达H9N2亚型禽流感病毒的核蛋白基因,在此基础上初步建立了检测禽类血清中A型流感病毒抗体水平的间接ELISA方法,为流感的监测以及早期预警提供一种技术上的选择。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种和质粒

含有AIV NP基因的NP-T重组质粒、pR整合质粒、大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ 、E2、BL-21 (DE3)由华南农业大学动物科学学院基因工程实验

室保存。

### 1.2 病毒和抗体

溶菌酶缺陷型噬菌体(T4z1)和野生型T4噬菌体由美国马里兰州立大学任兆均惠赠;AIV广东分离株(GD/5/01)由华南农业大学动物科学学院基因工程实验室分离鉴定。酶标记兔抗鸡IgY购自Promega公司。IBDV、IBV、MDV、NDV、EDSV感染血清、A型禽流感阳性血清(包括H5、H9、H7亚型流感病毒抗血清)、SPF鸡血清购自哈尔滨兽医研究所;43份流感阳性血清、97份阴性血清由广东省兽医防治站提供。

### 1.3 主要试剂

工具酶及试剂:Ex Taq DNA聚合酶、EcoRiv、T4DNA连接酶、溶菌酶和DNA片段快速纯化回收试剂盒均购自中国大连宝生物(TaKaRa)公司。预染蛋白质标准购自深圳百奥生物技术有限公司。其余试剂均为分析纯。

### 1.4 AIV NP基因的PCR扩增

参照GenBank AIV NP基因序列(AY950257)设计1对引物,用于扩增删除其C末端部分序列、1320 bp的NP基因片段,并分别在5'端加EcoRiv位点(划线部):NP1、NP2分别为5'-CAAGAAT-TCTATGATAACAATAGAGAGA-3'和5'-TG-GAATTCTCAATTGTCACTACTCCT-3'。扩增条件:95℃预变性3 min;94℃45 s,55℃45 s,72℃1.5 min,30个循环;72℃延伸10 min。扩增产物-20℃保存备用。

### 1.5 重组载体pR-NP的构建

用酚-氯仿抽提PCR产物,EcoRiv酶切消化,同法消化pR质粒,用琼脂糖凝胶电泳回收NP基因片段和pR载体片段,在T4DNA连接酶作用下连接后转化DH5 $\alpha$ 感受态细胞。PCR方法筛选阳性重组菌。另用pR质粒上的一段序列作为上游引物(pSOG-UP:5'-GAATCATATGGCTAGTCTCG-CGG-3')与NP基因下游引物进行PCR扩增,选择插入方向正确的克隆,提取重组质粒用EcoRiv进行酶切鉴定。取PCR及酶切鉴定正确的克隆送交上海博亚生物工程公司测序。重组整合质粒命名为

pR-NP。

### 1.6 T4 重组噬菌体的构建

T4-z1 噬菌体的 SOC 基因及溶菌酶 (*e*) 基因部分序列缺失, 穿梭质粒 pR-NP 中含有缺失的序列, 用 T4-z1 噬菌体感染含有 pR-NP 质粒的重组菌时, NP 基因与上述序列经同源重组整合到噬菌体基因组中。首先以 pR-NP 质粒转化 *E. coli* E2 菌, 重组 E2 菌用 SC 培养基培养至 OD<sub>600</sub> 0.3~0.4 后, 用 T4-z1 噬菌体感染, 取细菌裂解液 10 μL 点样于不含溶菌酶的 SC 培养皿上 37 °C 过夜。用灭菌牙签蘸取噬菌斑接种于 SC 顶层琼脂, 37 °C 过夜培养。刮取噬菌斑生长良好的顶层琼脂, 浸泡于磷酸盐缓冲液中 24 h 以上。以上述重组噬菌体浸出液为模板进行 PCR 检测, 重组噬菌体命名为 T4-z1-NP, 参照噬菌体的制备方法进行扩大培养、纯化<sup>[16]</sup>。

### 1.7 重组噬菌体的 PAGE 和 Western blot 检测

浓缩纯化的重组噬菌体于 -80 和 37 °C 冻融 3 次后, SDS-PAGE 检测; 然后将之转移至硝酸纤维素 (NC) 膜, 用含 3% BSA 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5) 封闭过夜, 分别用 AIV 阳性血清和 HRP 标记的兔抗鸡 IgY 分别作用 2 h, 充分洗涤后, 用 DAB 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 显色。

### 1.8 间接 ELISA 检测方法的建立

1.8.1 最佳工作条件的选择 按常规方法确定抗原最佳包被量、血清最佳稀释倍数、酶标二抗的最佳工作浓度和阴阳性临界值, 建立检测 AIV 抗体的间接 ELISA。将重组抗原用包被液稀释至最佳工作浓度后包被酶标板, 100 μL/孔, 37 °C 放置 4 h 后置 4 °C 过夜。甩去包被液, 用 PBST 洗涤 3 次, 每次 2~3 min。然后加入封闭液, 200 μL/孔, 37 °C 封闭 1 h。甩去封闭液, 洗涤同上, 用 PBS 液将血清稀释至最佳稀释度, 加入血清, 100 μL/孔, 每份样品设 2 个重复, 37 °C 作用 1 h, 洗涤同上, 加入酶标兔抗鸡 IgG, 100 μL/孔, 37 °C 作用 1 h, 洗涤同上。然后加入底物溶液, 37 °C 避光作用 10~15 min, 加入终止液, 50 μL/孔, 终止反应, 立即于酶标仪上读取 450 nm 处的吸光值 (OD<sub>450</sub>)。同时设阳性对照、阴性对照及空白对照。

1.8.2 敏感性试验 按常规方法进行, 将阳性血清作 1:40、1:80、1:160、1:320、1:640、1:1280、1:2560 稀释; 按已建立的 ELISA 方法进行检测, 确定该方法的敏感性。

1.8.3 特异性试验 按常规方法进行 ELISA 交叉

试验和特异性阻断试验, 从而确定其特异性。对于阻断性试验, 以其 (N-P)/N = (未阻断孔 OD 值 - 阻断孔 OD 值) / 未阻断孔 OD 值来判断其效果。

1.8.4 灵敏度和特异性指标的检验 取 AGP 琼脂扩散试验检测阳性的 43 份血清和阴性的 97 份血清, 用本研究建立的间接 ELISA 方法进行检测, 阴性血清中检出为阴性的检出率为特异性, 阳性血清中检出为阳性的检测率为相对灵敏度。琼脂扩散试验和 ELISA 两种方法检测结果均为阳性和阴性的样品总数占总检样品的比例为检测的准确率。

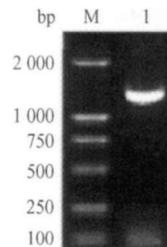
### 1.9 T4-NP-ELISA 的初步应用

取来自广东、河南等地 3 个不同鸡群的 192 份血清样品, 用建立的 T4-NP-ELISA 检测, 与商品化的 IDDEX ELISA 试剂盒进行比较, 确定其临床应用价值。

## 2 结果

### 2.1 NP 基因的 PCR 扩增与 pR-NP 重组载体的构建

PCR 产物用 1% 琼脂糖电泳检测, 获得了约 1320 bp 的特异性扩增条带 (图 1), 与预期结果相符。以 NP1/NP2 和 pSOG-UP/NP2 引物分别进行 PCR 筛选, 获得大小约 1320 和 1600 bp 的特异性扩增条带。提取重组质粒用 *EcoR* IV 酶消化, 获得大小分别为 5100 bp 的载体条带和 1320 bp 的目的条带 (图 2), 结合序列测定结果, 读码框正确的 NP 基因成功克隆至 pR 载体。



M. DL2000 DNA 相对分子质量标准; 1 NP 的 PCR 产物 (约 1320 bp)

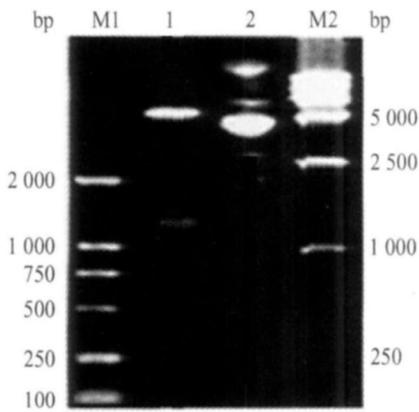
M. DL2000 DNA marker; 1 PCR product of NP gene (about 1320 bp)

图 1 NP 基因的 PCR 结果

Fig 1 PCR product of NP gene

### 2.2 重组 NP 基因噬菌体的获得

重组噬菌体恢复溶菌酶活性, 可在不含溶菌酶的 SC 培养基上增殖并形成噬菌斑, 以噬菌斑作为

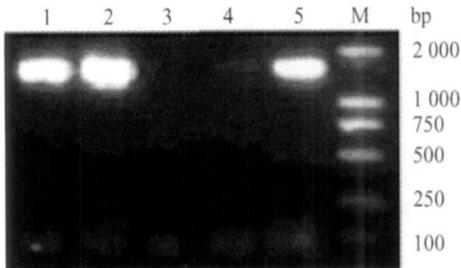


M1 DL2000 DNA 相对分子质量标准; 1 *EcoR* I 酶切产物; 2 重组 pR 质粒对照; M2 DL15000 DNA 相对分子质量标准  
M1 DL2000 DNA marker; 1 Digested by *EcoR* I; 2 Recombinant plasmid pR; M2 DL15000 DNA marker

图 2 重组质粒 pR-NP 的酶切鉴定

Fig 2 Restriction analysis of pR-NP recombinant plasmid

模板,用 pSOG-UP/ NP2 引物进行 PCR 筛选,获得约 1 600 bp 的特异条带(图 3),表明 NP 基因已按正确方向重组至噬菌体基因组。扩大培养并纯化,获得重组噬菌体的浓度为 1.28 mg/mL。



1~5 重组噬菌体 PCR 产物,获得 3 个(1、2、5)含有 NP 基因片段的阳性克隆; M. DL2000 DNA 相对分子质量标准

1-5 PCR products of recombinant phages, 3 positive clones containing NP gene segment were obtained; M DL2000 DNA marker

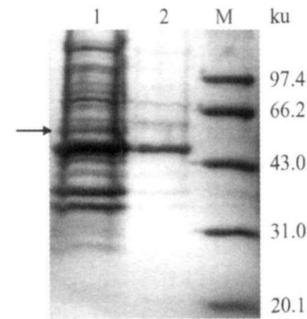
图 3 重组噬菌体 T4-z1-NP 的 PCR 筛选

Fig 3 PCR screening of recombinant phage T4-z1-NP

### 2.3 重组噬菌体 T4-z1-NP 的 SDS-PAGE 与 Western blot 检测

T4-z1-NP 感染宿主菌 E2, 扩增后,以 12% 的 SDS-PAGE 检测重组噬菌体表面展示的蛋白,结果如图 4 所示,融合蛋白大小约 58 ku。然后将其转移至 NC 膜上进行 Western blot,重组 SOG-NP 蛋白

可与 AIV 阳性血清发生特异性结合反应,产生相对分子质量约 58 ku 的特异条带(图 5),进一步表明 NP 基因已在 T4 噬菌体表面成功展示。

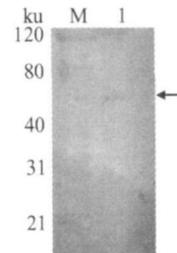


M. 蛋白质相对分子质量标准; 1. 噬菌体 T4-z1-NP, 箭头所示为目的条带; 2. 普通噬菌体

M. Protein marker; 1. Phage T4-z1-NP, interest protein was displayed; 2. Normal T4 phage

图 4 重组噬菌体 T4-z1-NP 的 SDS-PAGE 检测

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of T4-z1-NP



M. 蛋白质相对分子质量标准; 1. 重组噬菌体 T4-z1-NP

M. Protein marker; 1. Recombinant phage T4-z1-NP

图 5 重组噬菌体 T4-z1-NP 的 Western blot 检测

Fig. 5 Western blot analysis of phage T4-z1-NP

### 2.4 检测流感抗体的间接 T4-NP-ELISA 的最佳工作条件的选择

2.4.1 抗原最佳包被浓度和血清最佳稀释度的确定 分别将抗原和标准阳性、阴性血清作系列稀释,进行棋盘滴定试验。当抗原 1:400 倍稀释、血清 1:160 倍稀释时, P/N 值最大,且阴性血清非特异性反应较小。综合考虑,确定抗原的最佳稀释度为 1:400,血清最佳稀释倍数为 1:160,此时抗原的包被浓度为 3.2 μg/mL。

2.4.2 酶标二抗最佳工作浓度的确定 将酶标二抗作不同倍数的稀释,其它均为最适条件,进行 ELISA 试验,确定二抗的最佳工作浓度,当二抗作 1:3000 以上稀释时, OD<sub>450</sub> 值下降幅度明显,确定酶标二抗的最佳工作浓度为 1:3000 倍稀释。

## 2.5 ELISA 阴、阳性临界值的确定

用已建立的间接 ELISA 方法检测 22 份 SPF 鸡血清, 计算 22 份 SPF 鸡血清 OD<sub>450</sub> 值的平均值 ( $\bar{x}$ ) 为 0.152, 标准差 ( $s$ ) 为 0.040,  $\bar{x} + 3s$  为 0.272, OD<sub>450</sub>  $\geq$  0.272 判为阳性, OD<sub>450</sub> < 0.272 判为阴性。

## 2.6 ELISA 试验的敏感性

将阳性血清作系列稀释, 用已建立的 ELISA 方法检测, 测定其 OD<sub>450</sub> 值。结果表明, 当阳性血清 1:640 倍稀释时, OD<sub>450</sub> 值为 0.398, 仍能检测到流感病毒的抗体, 说明该方法敏感性较强。

## 2.7 ELISA 特异性试验

2.7.1 ELISA 交叉试验 结果显示, 阳性对照血清的 OD<sub>450</sub> 值为 0.629, 而与 IBV、IB、MD、ND、EDS 的 OD<sub>450</sub> 值均在 0.272 以下, 根据本试验建立的判定标准, 均为阴性, 表明重组核蛋白不与 IBDV、

IBV、MDV、NDV、EDSV 感染的血清反应, 只与 A 型禽流感阳性血清反应(包括 H5、H9、H7 亚型流感病毒抗血清), 说明该方法具有较好的特异性。

2.7.2 ELISA 特异性阻断试验 阻断试验表明, 经 AI 感染性尿囊液处理后的阳性血清的 OD<sub>450</sub> 值有明显的降低, 几乎降低 50% 以上。其  $(N-P)/N = (\text{未阻断孔 OD 值} - \text{阻断孔 OD 值}) / \text{未阻断孔 OD 值}$  几乎都大于 0.5。大于 1:160 稀释的血清基本上完全阻断,  $(N-P)/N$  在 0.7 以上, 表明该方法具有较好的特异性。

2.7.3 相对灵敏度试验结果 对 AGP 检测阳性的 43 份血清, 阴性的 97 份血清, T4-NP-ELISA 检测的结果如表 1 所示, 其相对灵敏度为 100%, 而特异性为 87.62%。ELISA 方法的检测准确率为 91.43%。这表明所建立方法具有较高的灵敏性。

表 1 ELISA 对 AGP 法的相对敏感性的特异性试验

Table 1 Sensitivity of T4-NP-ELISA relative to AGP

AGP 样品数 AGP samples	ELISA 检测结果 ELISA results			
	阳性 Positive	阴性 Negative	检出率/ % Detection ratio	
			阳性 Positive	阴性 Negative
43 份阳性 43 positive samples	43	0	100	-
97 份阴性 97 negative samples	12	85	-	87.62

## 2.8 T4-NP-ELISA 与商品化试剂盒比较

T4-NP-ELISA 和商品化试剂盒 IDDEX ELISA 对 192 份血样的检测结果见表 2, 阳性检出率分别为 41.7% 和 42.7%, T4-NP-ELISA 略低于

商品化试剂盒, 二者的符合率为 96.8%。这表明建立的 NP-ELISA 可作为家禽或者野鸟流感大规模临床检测的一种技术选择。

表 2 T4-NP-ELISA 与商品化试剂盒比较

Table 2 Comparison between T4-NP-ELISA and IDDEX ELISA

样品 Samples	阳性检出率 Positive detection ratio		
	T4-NP-ELISA	商品试剂盒	符合率/ % Accord rate
		IDDEX ELISA	
鸡群 1 No. 1 chicken flock	29/65	30/65	96.7
鸡群 2 No. 2 chicken flock	32/82	31/82	103.2
鸡群 3 No. 3 chicken flock	19/45	21/45	90.5
平均阳性率/ % Mean positive rate	41.7	42.7	96.8

## 3 讨论

T4 噬菌体表面展示系统是近来发展起来的新型生物技术, 该展示系统由其重组载体、噬菌体阳性

选择载体组成。构建能够在 SOC 位点展示外源蛋白的重组噬菌体, 必须通过缺失溶菌酶基因的噬菌体阳性选择载体与携带有外源基因和溶菌酶基因重组质粒发生同源重组而将其整合入 T4 噬菌体基因

组中,从而将外源蛋白展示于 T4 噬菌体的表面<sup>[17-19]</sup>。基于此原理的该系统具有 3 种展示方式, HOC、SOC 位点展示与 HOC 和 SOC 位点双展示。其中 SOC 位点展示较成熟,在其 C 末端插入的外源基因的片段大,可展示较大的多肽和蛋白质,应用范围更广,而且已经有多个病原微生物的功能蛋白被展示,表达的蛋白具有很好的生物学活性<sup>[19]</sup>。但未见利用此位点展示流感病毒核蛋白的报道。本研究利用 PCR 技术首次成功地构建了表达流感病毒核蛋白的重组噬菌体,通过 SDS-PAGE 与免疫印迹检测证实其表达的融合蛋白具有特异的免疫学反应性(图 4、5)。笔者利用此重组噬菌体作为诊断抗原建立了检测 AIV 抗体的 ELISA 方法,为进一步利用 T4 噬菌体展示系统开展新型诊断试剂以及基因工程疫苗的研究奠定了基础。

流感病毒的核蛋白结构高度保守,可诱导动物产生抗体,刺激动物机体产生细胞免疫,在抗原性上具有重要意义。Harley 等在痘病毒中表达了 A/Shearwater/Australia/72 株 NP 蛋白,发现抗重组 NP 蛋白的兔血清可用于检测 A 型流感病毒,并可区分 A、B 型流感病毒<sup>[4]</sup>。而 De Boer 等利用抗 NP 的单克隆抗体建立了双夹心 ELISA,检测人、马、鸡、猪、海豹、雪貂、鼠等血清中的 AIV 抗体,结果表明 NP-ELISA 可用于动物流感的检测,而 HI 适用于流感病毒的血清学分型<sup>[11]</sup>,进一步证实了 Harley 的推论。后来,Shafer 等利用在昆虫细胞表达的 NP 生产抗核蛋白单抗,建立了竞争 ELISA,检测禽类血清,比 AGP 方法更敏感、特异,表明该方法有可能代替 AGP 用于禽类 A 型流感病毒血清的检测<sup>[12]</sup>。本研究以噬菌体展示的 NP 蛋白建立了 ELISA,初步结果表明较 AGP 敏感、特异,可用于禽类血清抗体的检测。这些研究为流感的诊断提供了更多的选择。

此外,笔者以表达 NP 蛋白的重组噬菌体作为 ELISA 的诊断抗原建立检测 AIV 抗体的 ELISA 方法,具有其独特的优点:(1)外源蛋白展示于噬菌体的球状头部表面,能充分接触抗体,提高了 ELISA 的灵敏性;(2)T4 噬菌体 SOC 位点展示的融合蛋白拷贝数高,达到 960 拷贝,增加了抗原蛋白的免疫原性;(3)T4 噬菌体本身是病毒粒子,相对分子质量较大,表达的蛋白处于其表面与噬菌体一起以溶液形式存在,利于包被;(4)表达于其表面的蛋白易保持其天然构象,具有良好的生物活性,且成分

较为单一,大大降低了 ELISA 方法的非特异性;(5)与全病毒作为诊断抗原相比,不必担心散毒危险,具有高度的生物安全性;(6)诊断抗原易于生产,价格低廉,易于推广应用。该法与琼脂扩散检测相比,其相对灵敏度为 100%,而特异性为 87.62%。检测的准确率为 91.43%。其敏感性较琼脂扩散试验高,与相关研究的结果一致<sup>[8,12]</sup>。结果表明,以噬菌体展示的 NP 作为抗原建立的 ELISA 方法能特异、有效地监测 AIV 抗体。具有较高的特异性和敏感性。但由于本方法未做田间试验,对于在野外监测流感抗体,还需做进一步的标准化工作。

#### 参考文献:

- [1] SAIF Y M. 禽病学 [M]. 苏敬良,高福,译.第 11 版.北京:中国农业出版社,2005:147-177.
- [2] SUAREZ D L. Evolution of avian influenza viruses [J]. *Veterinary Microbiology*, 2000, 74(1-2): 15-27.
- [3] 吴仁蔚,胡思顺,肖运才,等.检测禽流感病毒抗体的重组核蛋白间接 ELISA 方法的建立[J]. *畜牧兽医学报*, 2006, 37(10): 1067-1072.
- [4] EPSTEIN S L, KONG W P, MISPLON J A, et al. Protection against multiple influenza A subtypes by vaccination with highly conserved nucleoprotein [J]. *Vaccine*, 2005, 23(46-47): 5404-5410.
- [5] ALTSTEIN A D, GITELMAN A K, SMIRNOV Y A, et al. Immunization with influenza A NP-expressing vaccinia virus recombinant protects mice against experimental infection with human and avian influenza viruses [J]. *Archives of Virology*, 2006, 151(5): 921-931.
- [6] BREATHNACH C C, CLARK H J, CLARK R C, et al. Immunization with recombinant modified vaccinia Ankara (rMVA) constructs encoding the HA or NP gene protects ponies from equine influenza virus challenge [J]. *Vaccine*, 2006, 24(8): 1180-1190.
- [7] SAHA S, YOSHIDA S, OHBA K, et al. A fused gene of nucleoprotein (NP) and Herpes simplex virus genes (VP22) induces highly protective immunity against different subtypes of influenza virus [J]. *Virology*, 2006, 354(1): 48-57.
- [8] STARICK E, WERNER O, SCHIRRMAYER H, et al. Establishment of a competitive ELISA (cELISA) system for the detection of influenza A virus nucleoprotein antibodies and its application to field sera from different species [J]. *Journal of Veterinary Medicine*,

- 2006, 53(8): 370-375.
- [ 9 ] ZHANG A, JIN M, LIU F, et al. Development and evaluation of a DAS-ELISA for rapid detection of avian influenza viruses[J]. *Avian Diseases*, 2006, 50 (3): 325-330.
- [ 10 ] WEBSTER R, COX N, STHR K. WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance [ M ]. 2002: 19-64.
- [ 11 ] DE BOER G F, BACK W, OSTERHAUS A D. An ELISA for detection of antibodies against influenza A nucleoprotein in humans and various animal species [ J ]. *Arch Virol*, 1990, 115( +2 ): 47-61.
- [ 12 ] 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 Dis*, 1998, 42 (1): 28-34.
- [ 13 ] 于康震, 付朝阳, 刑大昌, 等. 高致病力禽流感的流行与防制研究进展 [ J ]. *中国预防兽医学报*, 2001, 23 (5): 393-396.
- [ 14 ] HARLEY V R, MATHER K A, POWER B E, et al. Characterization of an avian influenza virus nucleoprotein expressed in *E. coli* and in insect cells [ J ]. *Arch Virol*, 1990, 113(3-4): 267-277.
- [ 15 ] BROWN D W, KAWAOKA Y, WEBSTER R G, et al. Assessment of retrovirus-expressed nucleoprotein as a vaccine against lethal influenza virus infections of chickens [ J ]. *Avian Dis*, 1992, 36(3): 515-520.
- [ 16 ] JIN D Y, LI M F. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [ M ]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 1999: 133-135.
- [ 17 ] REN Z J, LOWIS G K, WINGFIELD P L, et al. Phage display of intact domains at high copy number: A system based on SOC, the small outer capsid protein of bacteriophage T4 [ J ]. *Protein Science*, 1996, 5: 1 833-1 843.
- [ 18 ] REN Z J, BAUMANN R G, BLACK L W. Cloning of linear DNAs in vivo by over expressed T4 DNA ligase: Construction of a T4 phage hoc gene display vector [ J ]. *Gene*, 1997, 195: 303-311.
- [ 19 ] 刘 铀, 毕英佐, 曹永长. 新城疫病毒 F 基因重组噬菌体的构建及其免疫原性 [ J ]. *中国农业科学*, 2005, 38 (6): 1 270-1 274.

## 动物疫情快递

### 德国发生低致病性禽流感

2008 年 10 月 17 日, 德国向 OIE 通报了低致病性禽流感疫情。疫情始于 2008 年 10 月 2 日, 于 10 月 9 日确诊。此次疫情是临床发病, 病原是 H5N3 亚型禽流感病毒, 依靠实验室检测(高级)作出诊断。Friedrich-Loeffler 研究所(国家实验室)的 Real-time PCR 结果为阳性。疫区位于萨克森州 Leipzig 的动物园和一个养殖场, 易感动物是禽, 动物园有易感禽 248 只, 病例 4 例(1 只鹅和 3 只鸭), 未出现死亡, 销毁 4 只; 养殖场(毒株神经氨酸酶仍未确定)有易感禽 106 只, 病例 106 例, 未出现死亡, 全部销毁, 没有活禽的流通。感染来源尚不清楚。德国采取的控制措施有控制野生动物、国内限制移运、筛查、区域化、染疫场区消毒和改良的扑杀, 并且禁止免疫, 未对动物进行治疗。这是德国首次发生低致病性禽流感。

### 斯洛文尼亚发生炭疽

2008 年 10 月 17 日, 斯洛文尼亚向 OIE 通报了炭疽疫情。疫情始于 2008 年 10 月 9 日, 于 10 月 13 日得到确诊。病原是炭疽杆菌, 此次疫情是临床病例, 根据怀疑、临床症状和实验室检测作出诊断, 国家兽医研究所(国家实验室)的细菌学检查结果为阳性。疫区位于占采列市 Loce pri Poljcanah 的养殖场, 易感动物是牛, 有易感牛 22 头, 病例 2 例。感染来源尚不清楚。斯洛文尼亚采取的控制措施有国内限制移运、筛查、紧急免疫、染疫场区消毒, 未禁止免疫, 未对动物进行治疗。斯洛文尼亚上一次发生炭疽是 2001 年。

(摘译自 OIE 网站)