

## 鸭病毒性肝炎病毒 VP1 基因表达及其抗体检测 ELISA 方法的建立

马秀丽<sup>1,2</sup>, 宋敏训<sup>2</sup>, 于可响<sup>2</sup>, 廖明<sup>1\*</sup>, 辛朝安<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 华南农业大学兽医学院, 农业部养禽与禽病防治重点实验室, 广州 510642)

(<sup>2</sup> 山东省农科院家禽研究所, 山东省禽病诊断与免疫重点实验室, 济南 250023)

**摘要:** 【目的】研究 DHV VP1 基因在大肠杆菌中的表达, 并以纯化的重组蛋白为抗原建立鸭病毒性肝炎抗体检测 ELISA 方法。【方法】采用 RT-PCR 技术, 扩增 VP1 基因, 与 pMD18-T 载体进行连接, 构建 DHV VP1 基因克隆重组质粒。然后定向插入到 pET-32a (+) 表达载体, 筛选原核表达载体 pET-32a-VP1, 进行 IPTG 诱导表达分析。以纯化的重组蛋白为抗原建立间接 ELISA 方法并初步应用于临床。【结果】DHV VP1 基因可在大肠杆菌中稳定、高效地表达。Western blot 检测表明, 表达的重组蛋白能与鸭肝炎阳性血清发生特异性反应。确定间接 ELISA 方法的抗原最佳包被浓度为 5 μg/孔, 血清最佳稀释度为 1:100, 临界值为  $OD_{450}$  值 0.302, 建立的 ELISA 方法具有较好的敏感性、特异性和重复性。通过对 80 份血清样品的检测表明, 该方法与中和试验的符合率为 97.5%, 初步临床应用结果表明该方法可用于雏鸭母源抗体和免疫后抗体的消长变化的检测。【结论】以大肠杆菌表达的 DHV VP1 重组蛋白为抗原建立的间接 ELISA 方法可用于鸭病毒性肝炎抗体的检测。

**关键词:** 鸭肝炎病毒; VP1 基因; 表达; ELISA; 抗体; 检测

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 08-1110-05

鸭病毒性肝炎是一种传播迅速、高度致死性的传染病, 该病可由 3 种不同类型的病毒引起, 分别是 1、2 和 3 型鸭肝炎病毒 (DHV)。其中 1 型鸭肝炎呈世界性分布, 而 2 型和 3 型鸭肝炎仅见于英国和美国等国家<sup>[1]</sup>。DHV 属小 RNA 病毒科, 尚未定病毒属, 其基因组为单股正链 RNA (+ssRNA), 全长为 7707~7713 bp, 基因组含一个大的开放阅读框 (ORF), 编码一条由 2249 个氨基酸组成的多聚蛋白, 经翻译后加工成为各种功能蛋白<sup>[2]</sup>。DHV 结构蛋白编码区 (P1 区) 编码病毒特异性结构蛋白 VP0 (VP2 和 VP4 的前体)、VP3 和 VP1。P2 区和 P3 区编码病毒的功能性 (参与病毒复制) 非结构蛋白, P2 区包含 2A、

2B 和 2C 基因, P3 区包含 3A、3B、3C 和 3D 基因<sup>[3,4]</sup>。VP1 由 238 个氨基酸组成, 其分子量为 26.6 kDa。在小 RNA 病毒中 VP1 蛋白 (外壳蛋白) 作为主要的宿主保护蛋白, 编码主要的抗原位点并具有主要的型特异性中和位点<sup>[5]</sup>。

本研究将扩增的鸭肝炎病毒 VP1 基因定向克隆到原核表达载体 pET-32a (+) 中, 得到重组表达质粒, 利用 IPTG 诱导在大肠杆菌进行融合表达, 并确定目的蛋白有良好的反应原性。在此基础上以纯化的重组蛋白建立了相应的抗体检测 ELISA 方法并初步用于临床, 从而为鸭病毒性肝炎的快速血清学诊断奠定了一定的基础。

基金项目: 广东省科技计划项目 (2006A20301001); 广东省农业厅动物防疫专项经费 [粤农 2006(264)]; 山东省自然科学基金项目 (Z2006D06)

\*通讯作者。E-mail: mliao@scau.edu.cn

作者简介: 马秀丽 (1978-), 女, 山东省广饶县人, 助理研究员, 在读博士, 从事家禽病原与分子生物学研究。E-mail: maxiuli1978@163.com

收稿日期: 2008-02-18; 修回日期: 2008-05-08

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 病毒、菌种和质粒：**鸭病毒性肝炎毒株 ( Duck hepatitis virus , DHV , YZ )、鸭瘟毒株 ( Duck plague virus , DPV , SD )、宿主菌：大肠杆菌 ( *Escherichia coli* , *E.coli* ) BL-21(DE3)和 DH5 $\alpha$ 、质粒 pET-32a(+) 等均由山东家禽所禽病诊断与免疫重点实验室保存。

**1.1.2 主要试剂：**M-MLV 反转录酶、ExTaq DNA 聚合酶、RNase 抑制剂、Trizol Reagent 试剂、pMD18-T 载体等购自大连宝生物工程公司；HiTrap Chelating HP(1 mL) rprotein FF 亲和层析试剂盒购于安玛西亚公司；HRP-羊抗鼠 IgG , HRP-羊抗鸭 IgG 均购自 Bio-Rad 公司；DHV 阳性、阴性血清由本实验室制备及保存。

### 1.2 DHV VP1 基因扩增及表达载体的构建

根据 GenBank 中已登录的 VP1 基因序列，自行设计一对引物 ( 5'-GAATTCGGTGATTCCAACCAGT TG-3' ; 5'-GCGGCCGCTTCAATTCCAGATTG-3' )。以病毒 RNA 为模板，RT-PCR 扩增目的基因 VP1。将 PCR 产物连接至 pMD18-T 载体，酶切鉴定为阳性的克隆命名为 pMD-VP1，并送上海生物工程有限公司进行序列测定。用 *EcoR* /*Not* 酶切重组质粒 pMD-VP1，获得 VP1 基因，克隆入 pET-32a(+)载体，用 *EcoR* /*Not* 酶切鉴定，阳性克隆命名为 pET-32a-VP1，并送上海生物工程有限公司测序。

### 1.3 VP1 基因的诱导表达和分析

将阳性工程菌于 37 $^{\circ}$ C 培养，待  $A_{600}$  值达到 0.4~0.6 时，加入 Isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside (IPTG)至终浓度为 0.8 mmol/L，进行诱导表达。收集诱导后不同时间表达的菌体，于冰浴上进行超声破碎，4 $^{\circ}$ C 15000 $\times$ g 离心 10 min，取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳，并对表达产物进行 Western blot 分析。

### 1.4 重组蛋白的纯化

**1.4.1 亲和层析试剂盒方法：**按 HiTrap Chelating HP(1 mL)亲和层析柱说明书方法进行包涵体纯化和复性，SDS-PAGE 进行纯度鉴定。

**1.4.2 KCL 显色法：**参照 Hon 等<sup>[6]</sup>的方法，将电泳后的凝胶浸入 250 mmol/L 的 KCL 溶液中显色 5~10 min，切下目的蛋白条带，PBS 洗涤后捣细，冻融，离心，取上清作纯度鉴定。

**1.4.3 咪唑-Zn 反染：**参照 Carlos 等<sup>[7]</sup>的方法，将电泳后的凝胶浸入 0.2 mol/L 咪唑溶液中，在脱色摇床

上缓慢振荡 10 min，吸出咪唑溶液后，加入 0.2 mol/L ZnCl<sub>2</sub> 显色不超过 1 min，目的蛋白回收方法同 KCl 显色法。

### 1.5 间接 ELISA 最佳工作浓度及临界值的确定

用包被缓冲液将 VP1 重组蛋白进行倍比稀释，包被 ELISA 反应板，100  $\mu$ L/孔；DHV 阳性血清和阴性血清经大肠杆菌裂解液处理后分别作 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 等系列稀释；进行间接 ELISA 测定，确定抗原和血清的最佳工作浓度。在最佳工作条件下，对收集的 20 份无 DHV 抗体鸭血清进行间接 ELISA 测定，确定阴阳性临界值 ( $\bar{X} \pm 3SD$ )。

### 1.6 间接 ELISA 的特异性、敏感性和重复性试验

应用 VP1 蛋白建立的间接 ELISA 方法分别对 DPV、GPV、EDS<sub>76</sub>V、NDV、AIV 等阳性血清及 DHV 阴性血清进行交叉反应性测定；将 DHV 阳性血清分别与等体积的 DHV-YZ 病毒液 (  $10^{5.1}$  TCID<sub>50</sub>/0.2 mL ) 和 DPV-SD 病毒液 (  $10^{5.6}$  TCID<sub>50</sub>/0.2 mL ) 混合，室温作用 30 min，处理后的血清与未作任何处理的血清分别按最佳反应条件进行阻抑试验测定。将 10 份 DHV 阳性血清分别从 1:2 开始倍比稀释，进行 ELISA 检测，同时用病毒中和试验 ( VN ) 对其终点滴度进行测定，比较两种方法的敏感性。用两次包被的酶标板，分别检测 5 份 DHV 阳性血清和 5 份阴性血清，每个样品重复检测 5 次，测定其变异系数 CV% (  $CV=SD/X \times 100\%$  ,  $SD$  : 标准差 ,  $X$  : 算术平均值 )。

### 1.7 ELISA 方法与中和试验 VN 的对比

临床应用检验的样品为试验样品 10 份和送检样品 70 份。应用间接 ELISA 方法和血清中和试验 ( VN ) 同时检测上述样品，比较两种方法的符合率。

### 1.8 间接 ELISA 方法的初步应用

将免疫产蛋鸭所孵出的雏鸭分别在 3、5、7、10 和 14 日龄时采血，分离血清，间接 ELISA 测定，分析母源抗体的消长情况。对雏鸭进行弱毒苗免疫，采集免疫后 3、5、7、14、21 和 28 d 血清，间接 ELISA 测定，分析免疫后抗体的消长情况；同时对免疫后 3、5、7、14 d 的雏鸭进行攻毒试验，检测抗体的保护情况。

## 2 结果

### 2.1 DHV VP1 基因的克隆与鉴定

RT-PCR 扩增得到 714 bp 的目的片段，重组质粒 pMD-VP1 经 *EcoR* /*Not* 酶切鉴定和测序结果均正确。

2.2 表达产物的分析

重组表达质粒 pET-32a-VP1 鉴定正确后，转化 BL21；经 IPTG 诱导后的表达产物在不同时间取样进行 SDS-PAGE 鉴定，结果可见有明显的重组蛋白表达，以诱导 3 h 时表达量最大，重组蛋白以不溶性包涵体形式存在于菌体中；表达的重组蛋白纯化后只有一条 47 kDa 的目的蛋白条带（见图 1），表明亲和层析、KCl 显色和咪唑-Zn 反染 3 种方法均能获得较纯的目的蛋白。Western blot 分析发现，该重组蛋白能与抗鸭肝炎阳性血清进行反应，具有良好的免疫学活性(图 2)。

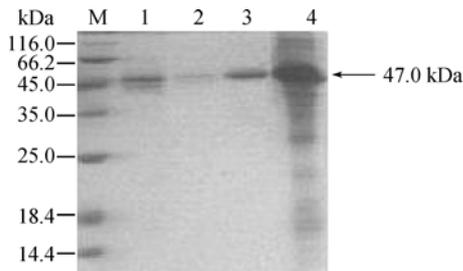


图 1 重组蛋白的纯化

Fig. 1 Purification of recombinant protein. M Protein Marker; 1. Imidazole-Zinc; 2. affinity chromatography; 3. KCL; 4. non-purification.

2.3 间接 ELISA 最佳工作浓度及临界值的确定

间接 ELISA 方阵试验结果（表 1）表明，VP1

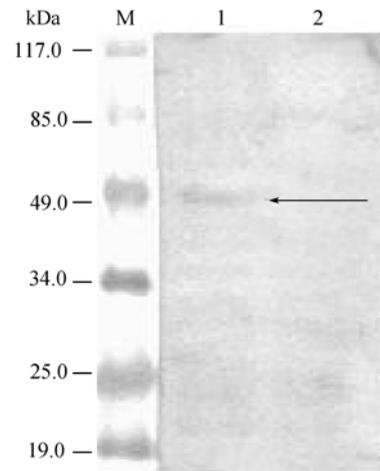


图 2 Western blot 鉴定

Fig. 2 Western blot of VP1. M Prestained protein Marker; 1. Induced expression protein; 2. Vector control.

重组蛋白包被量为 5 μg/孔，血清作 1:100 稀释时，OD<sub>450</sub> 为 1.0 左右，且 P/N 值较高，此时非特异性反应较低，故我们确定抗原的最佳包被量为 5 μg/孔，血清最佳稀释倍数为 1:100。以最佳工作条件检测 20 份阴性血清样品，其平均数和标准差分别为  $\bar{X}=0.236$ 、 $SD=0.022$ ， $\bar{X} \pm 3SD=0.302$ ，因此确定 0.302 作为间接 ELISA 的阴阳性临界值，即 OD<sub>450</sub> 值大于或等于 0.302 者判为阳性，否则判为阴性。

表 1 抗原和血清最佳工作浓度的确定(OD<sub>450</sub> 值)

Table 1 ELISA for detecting the optimum work concentration of antigen and serum

| Serum dilution |   | Concentration of VP1 antigen/(μg/well) |       |       |        |              |              |       |       |       |       |       |       |
|----------------|---|--|-------|-------|--------|--------------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                |   | 20                                     | 10    | 5     | 2.5    | 1.25         | 0.625        |       |       |       |       |       |       |
| 1:25           | P | 1.554                                  | 1.525 | 1.479 | 1.468  | 1.342        | 1.326        | 1.297 | 1.309 | 1.246 | 1.238 | 1.056 | 1.079 |
|                | N | 0.334                                  | 0.342 | 0.321 | 0.318  | 0.303        | 0.298        | 0.279 | 0.264 | 0.26  | 0.256 | 0.259 | 0.244 |
| 1:50           | P | 1.462                                  | 1.478 | 1.395 | 1.386  | 1.279        | 1.254        | 1.202 | 1.218 | 1.108 | 1.125 | 0.876 | 0.864 |
|                | N | 0.282                                  | 0.278 | 0.272 | 0.275  | 0.283        | 0.286        | 0.281 | 0.267 | 0.252 | 0.254 | 0.242 | 0.249 |
| 1:100          | P | 1.228                                  | 1.245 | 1.13  | 1.136  | <u>1.043</u> | <u>1.059</u> | 0.916 | 0.924 | 0.878 | 0.892 | 0.682 | 0.676 |
|                | N | 0.249                                  | 0.245 | 0.236 | 0.233  | 0.224        | 0.228        | 0.214 | 0.225 | 0.212 | 0.218 | 0.208 | 0.214 |
| 1:200          | P | 1.102                                  | 1.108 | 0.914 | 0.908  | 0.864        | 0.867        | 0.642 | 0.665 | 0.598 | 0.582 | 0.447 | 0.428 |
|                | N | 0.215                                  | 0.213 | 0.205 | 0.217  | 0.201        | 0.215        | 0.209 | 0.204 | 0.208 | 0.203 | 0.206 | 0.202 |
| 1:400          | P | 0.824                                  | 0.836 | 0.765 | 0.772  | 0.646        | 0.641        | 0.438 | 0.424 | 0.392 | 0.389 | 0.313 | 0.315 |
|                | N | 0.201                                  | 0.203 | 0.204 | 0.202  | 0.198        | 0.203        | 0.196 | 0.199 | 0.201 | 0.197 | 0.196 | 0.199 |
| 1:800          | P | 0.692                                  | 0.694 | 0.578 | 0.584  | 0.482        | 0.495        | 0.354 | 0.348 | 0.324 | 0.316 | 0.294 | 0.308 |
|                | N | 0.206                                  | 0.198 | 0.202 | 0.199  | 0.208        | 0.204        | 0.196 | 0.198 | 0.199 | 0.198 | 0.194 | 0.197 |
| Serum dilution |   | P/N Ratio                              |       |       |        |              |              |       |       |       |       |       |       |
|                |   | 20 μg                                  | 10 μg | 5 μg  | 2.5 μg | 1.25 μg      | 0.625 μg     |       |       |       |       |       |       |
| 1:25           |   | 4.65                                   | 4.46  | 4.61  | 4.62   | 4.43         | 4.45         | 4.65  | 4.96  | 4.79  | 4.84  | 4.08  | 4.42  |
|                |   | 5.18                                   | 5.32  | 5.13  | 5.04   | 4.52         | 4.38         | 4.28  | 4.56  | 4.4   | 4.43  | 3.62  | 3.47  |
| 1:100          |   | 4.93                                   | 5.08  | 4.79  | 4.88   | <u>4.66</u>  | <u>4.64</u>  | 4.28  | 4.11  | 4.14  | 4.09  | 3.28  | 3.16  |
|                |   | 5.13                                   | 5.20  | 4.46  | 4.18   | 4.3          | 4.03         | 3.07  | 3.26  | 2.88  | 2.87  | 2.17  | 2.12  |
| 1:400          |   | 4.1                                    | 4.12  | 3.75  | 3.82   | 3.26         | 3.16         | 2.23  | 2.13  | 1.95  | 1.97  | 1.6   | 1.58  |
|                |   | 3.36                                   | 3.5   | 2.86  | 2.93   | 2.32         | 2.43         | 1.81  | 1.76  | 1.63  | 1.6   | 1.52  | 1.56  |

P: positive serum N: negative serum

## 2.4 间接 ELISA 的特异性、敏感性和重复性试验

利用 DHV VP1 重组蛋白建立的间接 ELISA 方法检测 DPV、GPV、EDS<sub>76</sub>V、NDV、AIV 等阳性血清, 结果均为阴性, 表明该方法与上述病毒无交叉反应; 阻抑试验结果表明 DHV 阳性血清只能被 DHV 特异性阻抑, 而不能被 DPV 阻抑。

敏感性试验结果表明, 间接 ELISA 方法的敏感性要明显高于中和试验(表 2), 二者的相关系数为 0.96。

用 2 次包被的酶标板检测 5 份 DHV 阳性血清和 5 份 DHV 阴性血清, 每份样品重复检测 5 次, 计算其变异系数 CV%。结果表明变异系数最大为 5.16%, 最小为 1.0%, 表明该方法具有较好的重复性。

表 2 敏感性试验  
Table 2 Sensitivity test

| Method | 1     | 2      | 3     | 4      | 5      | 6      | 7    | 8     | 9      | 10     |
|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|------|-------|--------|--------|
| VN     | 90.51 | 137.19 | 168.9 | 294.07 | 388.02 | 111.43 | 48.5 | 78.79 | 337.79 | 147.03 |
| ELISA  | 256   | 512    | 512   | 1024   | 1024   | 512    | 128  | 256   | 1024   | 512    |

## 2.5 ELISA 方法与中和试验的比较

用建立的 ELISA 方法与中和试验两种方法共同检测 80 份血清, 其中 ELISA 方法检出阳性血清为 30 份, 阳性检出率为 37.5%, 中和试验检出阳性血清 28 份, 阳性检出率为 35.0%, 两种方法的符合率为 97.5% (表 3)。

表 3 ELISA 与中和试验比较  
Table 3 Comparison of ELISA with VN

| Method                  | ELISA | VN    |
|-------------------------|-------|-------|
| Samples total           | 80    | 80    |
| No. of positive sera    | 30    | 28    |
| Positive detection rate | 37.5% | 35.0% |
| No. of co-positive sera | 28    |       |
| No. of co-negative sera | 50    |       |
| Rate of coincidence     | 97.5% |       |

## 2.6 间接 ELISA 方法的初步应用

间接 ELISA 检测结果显示, 3 d 龄雏鸭的母源抗体水平较高, 随着日龄的增加, 母源抗体逐渐降低, 至 7 d 龄时母源抗体水平接近临界水平, 10 d 龄时母源抗体消失, ELISA 检测均为阴性(图 3)。用建立的间接 ELISA 方法对免疫后不同时间段的血清样品进行检测, 结果表明, 雏鸭免疫后 3 d 便产生抗体,  $OD_{450}$  值为 0.629, 雏鸭攻毒致死率为 1/5; 5 d 时抗体水平达到最高,  $OD_{450}$  值为 1.109; 7 d 时抗体稍有下

降, 为 0.994, 14 d 时仍能保持较高的抗体水平,  $OD_{450}$  值为 0.792, 7 d、14 d 时的抗体水平仍能保护 DHV 强毒的攻击; 28 d 时抗体水平下降幅度较大,  $OD_{450}$  值为 0.412 (图 4), 由于此时的小鸭偏大, 所以攻毒雏鸭未见死亡。

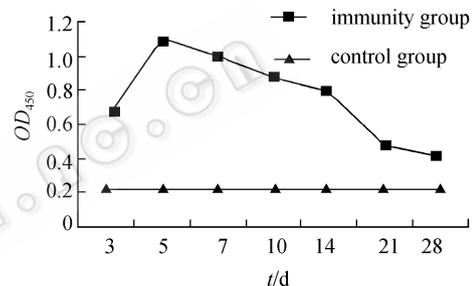


图 4 雏鸭免疫后抗体的消长

Fig. 4 Growth and decline of antibody in immunizing ducklings.

## 3 讨论

长期以来鸭肝炎的检测一直依赖于传统的病毒分离和中和试验<sup>[8]</sup>, 该方法费时费力, 不适于批量样品的检测。基于全病毒建立的 ELISA 方法因 DHV 纯化比较困难而限制了该方法的推广应用。而本研究中利用大肠杆菌表达的 VP1 重组蛋白作为抗原建立的间接 ELISA 方法具有较好的敏感性, 较中和试验的敏感性高出 2 倍以上。交叉试验和阻抑试验结果表明该方法具有较强的特异性, 对多份样品的重复检测结果表明该方法有较好的可重复性。通过对 80 份血清样品的检测, 结果表明 ELISA 方法与中和试验的符合率高达 97.5%。但 ELISA 方法与中和试验方法尚存在一定的出入, 其中 2 份血清中和试验的检测结果为阴性, 而 ELISA 检测结果为阳性。分析发现, 这 2 份血清的 ELISA  $OD_{450}$  值分别为 0.328 和 0.334, 比较接近临界值, 依据 ELISA 的判定标准会将这 2 份血

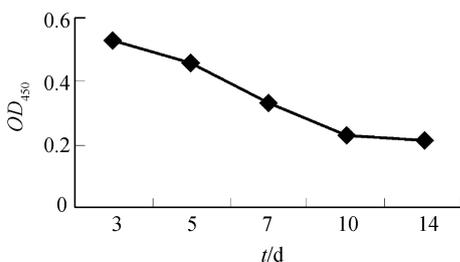


图 3 雏鸭母源抗体的消长

Fig. 3 Growth and decline of maternal antibody.

清判为阳性,但因 ELISA 方法的敏感性较高,所以接近临界值的结果容易出现误判,还需通过其它方法作进一步验证。因此,ELISA 方法的临界值尚需通过更多样品的检测来加以完善。初步临床应用表明,以 DHV VP1 重组蛋白作为抗原建立的 ELISA 方法可用于雏鸭母源抗体和免疫后抗体消长情况的检测。

利用大肠杆菌表达的 VP1 蛋白作为包被抗原检测鸭病毒性肝炎血清时,存在宿主蛋白干扰的问题,即鸭血清中存在的大肠杆菌抗体有可能与表达蛋白中残存的宿主蛋白发生交叉反应而影响检测结果<sup>[9]</sup>。因此,为避免纯化的表达蛋白与鸭血清中的大肠杆菌抗体发生非特异性反应,我们将待检血清经大肠杆菌裂解液吸附后进行间接 ELISA 反应。结果表明,该方法可降低 ELISA 方法的非特异性反应。因此,以大肠杆菌表达的 VP1 蛋白作为抗原建立的间接 ELISA 方法有望实现鸭病毒性肝炎抗体的快速检测。

### 参 考 文 献

- [1] Saif YM. 禽病学. 高福, 苏敬良, 索勋, 译. 第 11 版. 北京: 中国农业出版社, 2004.
- [2] Kim MC, Kwon YK, Joh SJ, et al. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 reveals a novel lineage close to the genus *Parechovirus* in the family. *Picornaviridae*. *Journal of General Virology*, 2006, 87(Pt11): 3307–3316.
- [3] Tseng CH, Nick JK, Tsai HJ, et al. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 indicates that it should be assigned to a new genus. *Virus Research*, 2007, 123(2): 190–203.
- [4] Ding CY, Zhang DB. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1. *Virology*, 2007, 361(1): 9–17.
- [5] Muir P, Kammerer U, Korn K, et al. Molecular typing of enteroviruses: current status, future requirements. *Clin Microbiol Rev*, 1998, 11(1): 202–227.
- [6] Hon WC, Griffith M, Chong P, et al. Extraction and isolation of antifreeze proteins from winter rye (*Xecake create L.*) leaves. *Plant Physiol*, 1994, 104(3): 971–980.
- [7] Carlos FP, Eugenio H, Angela S, et al. Double staining of coomassie blue-stained polyacrylamide gels by imidazole-sodium dodecyl sulfate-zinc reverse staining: sensitive detection of coomassie blue-undetected proteins. *Analytical Biochemistry*, 1995, 224(1): 263–269.
- [8] 司兴奎, 辛朝安, 陈建红, 等. 鸭肝炎的研究进展, 中国兽医科技(*Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*), 2001, 31(2): 40–41.
- [9] Guzman LM, Belin D, Carson MJ, et al. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol*, 1995, 177(14): 4121–4130.

## Expression of VP1 gene and ELISA detection of antibodies against duck hepatitis virus

Xiuli Ma<sup>1,2</sup>, Minxun Song<sup>2</sup>, Kexiang Yu<sup>2</sup>, Ming Liao<sup>1\*</sup>, Chao'an Xin<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(<sup>2</sup>Shandong Academy of Agricultural Sciences, Ji'nan 250023, China)

**Abstract:** [objective] We developed an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) by the recombinant VP1 protein of duck hepatitis virus (DHV) expressed in *Escherichia coli* to detect antibodies against DHV. [Methods] The VP1 gene of DHV was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and cloned into pMD18-T and pET-32a vectors to get a prokaryotic expression vector pET-32a-VP1. DHV VP1 gene was expressed and analyzed. A method of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed and studied. [Results] We obtained the recombinant plasmid pET-32a-VP1 with correct sequence and orientation. DHV VP1 gene was expressed in *E. coli* BL21(DE3) at a high level and had good immunoreactivity by SDS-PAGE and western blot. The optimum working concentration of antigen was 5.0 µg in 100 µL per well, the working concentration of serum samples was 1–100 dilution and the critical value was  $OD_{450} = 0.302$  for the ELISA assay. The rate of coincidence of ELISA and virus neutralization test (VN) was 97.5% by detecting 80 serum samples. The method was specific, sensitive and could be applied for antibody detection of maternal antibody and the rule of antibody growth and decline in immunizing ducklings. [Conclusion] The ELISA method developed by the purified recombinant protein could be used to detect antibodies against DHV.

**Keywords:** duck hepatitis virus; VP1; expression; enzyme-linked immunosorbent assay; antibody; detecting

Supported by the Program for Science Technology Research of Guangdong Province (2006A20301001), the Special-purpose Fund for Animal Prevention of Guangdong agriculture department [2006(264)] and the Natural Science Foundation of Shandong Province (Z2006D06)

\*Corresponding author. E-mail: mliao@scau.edu.cn

Received: 18 February 2008/ Revised: 8 May 2008