

## 鸭瘟病毒 gB 蛋白 N 端主要抗原域的表达及间接 ELISA 检测

潘华奇<sup>1,2</sup>, 曹瑞兵<sup>1\*</sup>, 刘磊<sup>2</sup>, 孙海亮<sup>1,2</sup>, 姬向波<sup>1</sup>, 陈勇军<sup>1</sup>, 陈溥言<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 南京 210095)

(<sup>2</sup> 甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070)

**摘要:** 在分析鸭瘟病毒 gB 蛋白抗原性的基础上, 设计一对引物克隆 gB 蛋白 N 端抗原性较好的抗原域编码基因。将克隆的基因定向插入 pET-32a 的 *EcoR* I 和 *Hind* III 之间, 构建了 gB 蛋白主要抗原域原核表达载体 pET-gB1。将 pET-gB1 质粒转化 BL (21) 宿主菌后, 对培养和表达条件进行了优化, 实现了 DPV gB 蛋白主要抗原域的高效表达。免疫印迹试验表明获得的表达产物具有良好的反应原性。应用 His-Bind 亲和层析柱纯化重组 DPV gB 蛋白, 以纯化的重组 gB1 蛋白作为检测抗原, 初步建立了检测鸭瘟病毒抗体的 igB1-ELISA。结果表明, 抗原的最佳包被浓度为 6.5 μg/mL, 血清的最佳稀释度为 1:80, 阳性标准初步定为: 待检血清  $OD_{490} > 0.4$ , 且待检血清  $OD_{490}$ /阴性血清  $OD_{490} > 2$ 。应用 igB1-ELISA 对鸭血清样品进行检测, 结果表明 igB1-ELISA 与全病毒包被的 iDPV-ELISA 符合率达到 95.6%。

**关键词:** 鸭瘟病毒; gB 蛋白; 原核表达; 抗原域; 间接 ELISA

**中图分类号:** Q93, Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008) 01-0098-05

鸭瘟病毒(Duck plague virus, DPV)又名鸭肠炎病毒(Duck enteritis virus, DEV), 为鸭瘟的病原。1923 年荷兰学者首次分离到该病毒<sup>[1]</sup>, 我国于 1957 年首次发现, 其高发病率和死亡率目前已给养鸭业造成了巨大的经济损失<sup>[2]</sup>。近年来养鸭大量增多, 鸭瘟疫情给养鸭业造成不小的威胁。因此迫切需要建立有效可靠的监测手段, 以便能及时正确地了解鸭群的健康状态和免疫抗体水平, 但国内外涉及鸭瘟诊断方法的研究多集中于对病毒抗原的检测<sup>[3-5]</sup>, 能用于实践的抗体监测方法报道较少。经典的血清中和试验是一种准确的方法, 但其耗时长(约 1~2 周), 费力, 不适于大批量血清样品的检测。

糖蛋白 B(gB)是 $\alpha$ -疱疹病毒囊膜蛋白中最保守的一种。 $\alpha$ -疱疹病毒中, gB 在病毒结合到细胞膜后与质膜的融合及在病毒的释放中起重要作用。在 HSV-1 感染的初期, 最先出现的是抗 gB 抗体, 因此我们建立了检测鸭瘟病毒 gB 抗体的

ELISA 方法, 其特异性强, 敏感性高, 可用于鸭群的流行病学调查和免疫抗体监测, 利于提高防疫水平。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 病毒、菌株和质粒:** DPV 疫苗株由本实验室保存。表达载体 pET32a, 大肠杆菌(*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 、BL21(DE3))由本实验室保存。

**1.1.2 血清:** 鸭瘟阳性血清、鸭瘟阴性血清、鸭肝炎阳性血清、鸭肝炎阴性血清、鸭流感阳性血清(H9N2)、鸭流感阴性血清为本组保存, 700 份鸭血清来自山东、江苏省各鸭场。羊抗鸭 HRP-IgG(H+L)为 KPL 公司产品。

**1.1.3 主要试剂和仪器:** 限制性内切酶 *Hind* III 和 *EcoR* I, *rTaq* DNA 聚合酶, DNA Marker, T4 DNA 连接酶、核酸凝胶回收试剂盒均购自大连 TaKaRa 公司。His·Bind Purification Kit 为

\*通讯作者。Tel: +86-25-84396028; Fax: +86-25-84396335; E-mail: crb@njau.edu.cn

作者简介: 潘华奇(1982-), 男, 甘肃武山人, 硕士研究生, 从事分子病毒学研究。E-mail: phq629@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-05-11; 修回日期: 2007-10-17

Novagen 公司产品, OPD(邻苯二胺)、琼脂糖、IPTG 和 DAB 显色试剂盒购自上海 Sangon 公司, 其它试剂均为分析纯。PE-4800 型 PCR 扩增仪为 Perkin-Applied Biosystems 产品, V16-夹心式垂直电泳槽为上海精益有机玻璃制品仪器厂产品, ZW-11 型多用途水平转移槽和 WLx800 型通用微量酶联免疫检测仪为 Bio-Tek Instruments Inc. 产品。

## 1.2 引物的设计与合成

根据本人克隆获得的 DPV 的 gB 基因序列 (GenBank 登陆号: EF554401), 应用 SignalP 3.0 分析 gB 的信号肽, DNASTAR 软件分析 gB 蛋白的抗原性, 用 Primer 5.0 软件设计一对引物, 目标扩增 DPV gB 蛋白 N 端去除信号肽的主要抗原域编码基因。引物如下: 上游引物为 5'-TCTGAATTC AATGCAACT GATAGGCCGC-3' 其 5' 端设计有 *EcoR* I 位点(下划线部分)下游引物为 5'-TCCAAGCTTTTAATTCCG CGAGCGCAAGTA-3' 其 5' 端设计有终止密码子(黑体)和 *Hind* III 位点(下划线部分)。引物由上海 Invitrogen 公司合成。

## 1.3 重组表达载体 pET-gB1 的构建和鉴定

**1.3.1 病毒 DNA 的提取:** 病毒 DNA 的提取按常规的方法进行。

**1.3.2 gB1 基因的获取:** 以提取的病毒 DNA 为模板, 用 gB1 特异性引物进行扩增, 反应体系: 10×PCR Buffer 5μL、25 mM MgCl<sub>2</sub> 3μL、2.5mM dNTP Mixture 4μL、上、引物 P1、P2 各 1μL (50 pmol)、*rTaq* DNA Polymerase 0.5μL、模板 4μL, ddH<sub>2</sub>O 33.5μL。反应条件: 94℃ 4min; 94℃ 30s, 53℃ 45s, 72℃ 1min, 35 个循环; 72℃ 10min。反应结束后取 5μL PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶进行电泳分析。分析正确后, 其余 PCR 产物用琼脂糖凝胶试剂盒回收, 按说明书操作。

**1.3.3 重组表达载体 pET-gB1 的构建和鉴定:** 将回收的 PCR 产物与载体 pET32a 分别用 *Hind* III 和 *EcoR* I 双酶切, 回收纯化, 用 T4 DNA 连接酶于 16℃ 连接过夜, 将连接产物转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞。提取质粒, 做酶切鉴定, 选取阳性质粒, 进一步测序确证(上海 Invitrogen 公司), 获得重组质粒 pET-gB1。

## 1.4 诱导表达和产物的纯化

将已构建的含 pET-gB1 的 BL21 菌液按 1:100 的比例加入含有 Amp(50μg/ml)的 LB 培养基中, 37℃

振荡培养至 OD 值 0.4~0.6, 加入 IPTG 至终浓度 1.0mmol/L, 37℃继续振荡培养 5h, 同时设 pET32a/BL21 的诱导对照, 各取出 1mL, 12000g 离心 30s, 弃上清, 沉淀重悬于 80μL 1×SDS-PAGE 凝胶上样缓冲液中, 100℃变性 5min, 进行 SDS-PAGE 电泳。同时表达产物经 SDS-PAGE 分析后, 转移至 NC 膜上进行 Western blot 分析。

将裂解后获得包涵体溶于 8mol/L 尿素中, 并在体外进行复性处理, 最后获得的蛋白溶于 2mol/L 尿素中, 将该蛋白混合物利用 His-Bind Purification Kit 进行纯化, 纯化的具体方法按说明书进行。

## 1.5 igB1-ELISA 方阵滴定和检测方法的初步建立

参照文献<sup>[6]</sup>介绍方法进行 igB1-ELISA 方阵滴定。选取某一 P/N (阳性血清 OD 值/阴性血清 OD 值) 最大且 P 在 1.0 左右的抗原和血清稀释度, 确定抗原最佳包被浓度和抗体适宜稀释倍数。

## 1.6 igB1-ELISA 的特异性试验

将鸭瘟阳性血清、鸭瘟阴性血清、鸭肝炎阳性血清、鸭肝炎阴性血清、鸭流感阳性血清、鸭流感阴性血清从 1:20 开始做倍比稀释, 每个样品设 3 个重复, 按常规方法利用 igB1-ELISA 进行检测, 取平均值比较结果。

## 1.7 igB1-ELISA 重复性和抗原保存期试验

用同一批抗原对已知鸭瘟阴阳性血清, 另取 3 份待检测血清, 在其他条件不变的情况下, 应用本法进行检测, 每样品重复 4 个孔, 根据 OD 值判定批内重复; 用不同批次制备的抗原对已知鸭瘟阴阳性血清, 另取 3 份待检测血清, 在其他条件不变的情况下, 应用本法进行检测, 每样品重复 4 个孔, 根据 OD 值判定不同批次制备的抗原建立间接 ELISA 的可重复性; 将制备重组 gB1 抗原的存放于 4℃, 每隔 1 月取出与鸭瘟阳性血清做间接 ELISA 试验, 以确定 gB1 抗原的保存期。

## 1.8 igB1-ELISA 与 iDPV-ELISA 比较

将 700 份待检鸭血清样品分别用本研究建立的 igB1-ELISA 和全病毒包被的 iDPV-ELISA 进行检测, 对检测结果作比较分析。

# 2 结果

## 2.1 目的片段的获得和 PCR 鉴定

以提取的病毒 DNA 为模板, 经过 PCR 扩增获得了与预期大小相符的 690bp 左右的目的片段(图略)。将该片段克隆至 pET32a 载体中, 提取质粒后, 以 *Hind* III 和 *EcoR* I 双酶切鉴定, 1%琼脂糖凝胶电

泳结果显示酶切片段的大小与预期结果一致。测序结果证实目的片段大小及阅读框均正确。

## 2.2 目的基因在大肠杆菌中的表达和 Western blot 检测

阳性重组质粒在大肠杆菌中被诱导后, 于 3h 取样, 进行 SDS-PAGE 分析, 发现重组菌在约 42.4kDa 处出现目的融合蛋白, 而对照菌在 42.4kDa 附近未出现蛋白条带 (图 1-A), 表明目的蛋白获得表达。表达产物经 SDS-PAGE 分析后, 转移至 NC 膜上进行 Western blot, 结果显示: 表达产物能被 DPV 阳性血清所识别, 而对照没有发应条带, 证明表达产物具有免疫反应性(图 1-B)。

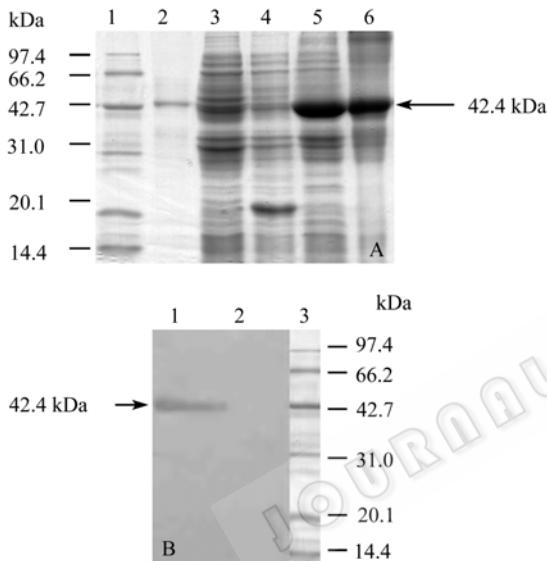


图1 SDS-PAGE分析(A)和免疫印迹分析(B)

Fig. 1 SDS-PAGE Analysis(A) and Western blot (B) of the expressed product. A: 1. Protein marker; 2. Purification of pET-gB1 fusion protein by His-Bind; 3. pET32a/BL21; 4. pET32a/BL21 induced by IPTG; 5. pET-gB1/BL21 induced by IPTG; 6. Precipitate of the lysate (Inclusion body). B: 1.pET-gB1/BL21 (fusing protein); 2. pET32a / BL21; 3. Protein marker.

## 2.3 ELISA 方阵滴定结果

将抗原稀释成 130 $\mu$ g/mL, 从 1:10 开始倍比稀释后包被聚苯乙烯微量反应板, 阴、阳性血清从 1:10 开始倍比稀释, 按 ELISA 程序进行方阵滴定。

选择阳性孔  $OD_{490}$  在 1.0 左右, 阴性孔小于 0.3 确定最佳包被浓度为 6.5 $\mu$ g/mL, 血清的最佳稀释倍数为 1:80, 酶标二抗的最佳工作稀释度为 1:2000。用 igB1-ELISA 去检测 iDPV-ELISA 检测为阳性和阴性样品的各 40 份, 阳性标准初步定为:  $OD_{\text{待检血清}} > 0.4$  且  $OD_{\text{标准阳性血清}} / OD_{\text{标准阴性血清}} > 2$ (表 1)。

## 2.4 igB1-ELISA 的特异性试验结果

利用 igB1-ELISA 检测鸭瘟阳性血清、鸭瘟阴性血清、鸭肝炎阳性血清、鸭肝炎阴性血清、鸭流感阳性血清、鸭流感阴性血清。只有鸭瘟阳性血清样品  $OD_{490}$  值与鸭瘟阴性血清样品  $OD_{490}$  值的比值远大于 2, 其余样品的  $OD_{490}$  值与鸭瘟阴性血清样品  $OD_{490}$  值的比值均小于 2。因此, 本研究建立的 igB1-ELISA 具有较好的特异性。

## 2.5 igB1-ELISA 重复性及抗原保存期试验结果

批内重复试验结果显示, 5 份血清  $OD_{490}$  值的变异系数均值为 4.104%。这说明同一样品在同一批试验中变异程度很小, 具有良好的重复性, 表明重组 gB1 蛋白具有较好的稳定性; 对 5 份抗体水平不同的血清样品进行批间重复试验, 统计学分析表明, 不同批次抗原对同一份血清反应的  $OD_{490}$  值及 P/N 值影响不大( $P > 0.05$ )。这一结果再次证明了本方法重复性良好, gB1 抗原的制备工艺是稳定的; 经检验, 保存 1 个月与 6 个月的反应板上同一份血清的  $OD_{490}$  值变化不大, 且该血清的阴性或阳性检测结果不变, 说明用重组蛋白包被的反应板至少存放 6 个月而不会对样品检测造成影响。

表1 间接ELISA方阵滴定结果

Table 1 result of the indirect ELISA phalanx titrimetry

Ag diluted Time (X)	Positive serum dilution						Negative serum dilution					Blank control
	20	40	80	160	640	1280	20	40	80	160	640	
10	2.322	1.971	1.394	0.867	0.575	0.381	0.577	0.421	0.302	0.243	0.21	0.113
20	2.02	1.711	1.282	0.782	0.435	0.287	0.489	0.3	0.21	0.172	0.173	0.089
40	1.731	1.429	1.005	0.566	0.398	0.232	0.326	0.261	0.169	0.15	0.149	0.078
80	1.586	1.294	0.895	0.464	0.302	0.198	0.36	0.213	0.166	0.145	0.132	0.082
160	1.462	1.119	0.746	0.413	0.219	0.153	0.246	0.199	0.161	0.156	0.125	0.071
320	1.257	0.987	0.597	0.286	0.203	0.164	0.2	0.165	0.152	0.148	0.116	0.074
640	1.171	0.761	0.455	0.255	0.249	0.187	0.154	0.158	0.142	0.144	0.127	0.075
1280	0.963	0.594	0.39	0.207	0.186	0.159	0.138	0.147	0.145	0.137	0.108	0.0692

The first antibody samples added in line 1 to 6 were different dilutions of standard positive serum of DPV, the 7 to 11 line were different dilutions of standard negative serum of DPV and the 12 line was blank control.

## 2.6 igB1-ELISA 与 iDPV-ELISA 比较试验结果

分别用本研究建立的 igB1-ELISA 和前人已建立的 iDPV-ELISA 对 700 份待检血清进行了检测。结果均为阳性的样品有 604 份, 均为阴性的样品有 46 份, 应用 iDPV-ELISA 检测为阳性, 而 igB1-ELISA 检测为阴性的样品有 11 份, 应用 iDPV-ELISA 检测为阴性, 而 igB1-ELISA 检测为阳性的样品有 39 份。igB1-ELISA 检测结果的阳性率为 91.9%, iDPV-ELISA 试剂盒检测结果的阳性率 87.9%。本研究制备的 igB1-ELISA 试剂盒与 iDPV-ELISA 试剂盒的检测符合率为 95.6%。

## 3 讨论

本试验研究了将重组 DPV gB 蛋白作为 ELISA 诊断抗原的可行性。试验在成功表达 DPV gB 蛋白主要抗原域基础上, 以纯化蛋白作为包被抗原初步建立了检测鸭瘟抗体的间接 ELISA 方法, 确定了最佳抗原包被浓度为 6.5 $\mu$ g/mL, 抗体最佳稀释倍数为 1:80。阳性标准初步定为: 待检血清  $OD_{490} > 0.4$ , 且待检血清  $OD_{490}$ /阴性血清  $OD_{490} > 2$ 。应用本研究建立的 igB-ELISA 与 iDPV-ELISA 试剂盒对 700 份待检血清进行了对比实验, 结果两种试剂盒的检测符合率为 95.6%。表明本研究建立的检测鸭瘟抗体的 igB-ELISA 可应用于鸭子的鸭瘟抗体检测。

研究表明, 在疱疹病毒中糖蛋白 B(gB)是一种最重要的囊膜蛋白, 能诱导宿主产生高水平的体液免疫和细胞免疫, 它由一个很大的膜外区、跨膜区、细胞质区组成<sup>[7-9]</sup>。研究 HSV-1 gB 发现, 在 gB 蛋白 N 端存在着丰富的中和抗体表位, 尤其 gB 蛋白的高中和活性抗体表位均位于其 1~298 氨基酸序列间的 D1a、D1b、D2a 和 D2b 位点上<sup>[10,11]</sup>, 所以用重组 DPV gB 蛋白检测到的抗体可能代表了鸭体保护性抗体水平的高低, 可望用于 gB 的保护性抗体水平检测。

众所周知, 当前我国禽群中普遍存在大肠杆菌抗体, 而原核表达的重组蛋白即使纯化后也不可避免的含有大肠杆菌的菌体蛋白, 能与鸭血清中的大肠杆菌抗体发生非特异性反应。在试验中, 我们直接煮沸裂解诱导表达重组蛋白的菌体进行 SDS-PAGE, 将 DPV 阳性血清用经超声波破碎的大肠杆菌吸附后作为 Western blot 分析的一抗。从 western blot 的结果来看, 经吸附后的血清只与大肠杆菌中的重组蛋白反应, 产生一条特异性条带, 说明用破碎的大肠杆菌做抗原吸附待检血清中大肠

杆菌抗体的方法是可行的。

在本实验中建立的间接 ELISA 方法虽然不能区分野毒感染和疫苗免疫产生的抗体, 但是可以用于鸭群疫苗正常免疫之后抗体水平高低的监测, 也可以根据抗体水平是否整齐来判断鸡群是否有野毒感染, 这对于制定合理的免疫程序是十分必要的。

病毒分离鉴定和病毒中和试验虽然准确性高, 但存在实验周期长, 操作繁琐和不适于大批样品检测的缺点。ELISA 技术由于具有敏感、特异、快速和易于标准化等特点, 结合半自动化检测设备, 特别适合于大批动物群体检测和基层单位检疫需要。虽然我国已有学者开展了 DPV 检测方法的建立工作, 但以往建立的间接 ELISA 方法使用全病毒细胞培养物作为包被抗原。由于受病毒培养和纯化等方面的技术限制, 全病毒抗原纯度有限, 稳定性差, 难以标准化, 从而影响 ELISA 检测结果的特异性、敏感性和准确性。目前, 国内还没有切实可行的检测 DPV 的诊断试剂, 给 DPV 的防治带来许多不便。为此, 本研究采用融合蛋白原核表达策略, 成功表达和鉴定了 DPV gB 的 N 端主要抗原域片段, 并用纯化的融合蛋白为包被抗原初步建立了有应用价值的间接 ELISA 诊断方法, 为进一步研制检测 DPV 的间接 ELISA 试剂盒奠定基础。

## 参 考 文 献

- [1] Saif Y M. 禽病学. 高福, 苏敬良译. 北京: 中国农业出版社, 1999, 857.
- [2] 甘孟侯. 中国禽病学. 北京: 中国农业出版社. 1997, 109-119
- [3] 郑福英, 刁有祥, 杨杰华, 等. 间接 ELISA 检测新型鸭瘟病毒抗体. 中国预防兽医学报 (*Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*), 2004, 26(3): 226-230.
- [4] 程安春, 汪铭书, 廖德惠, 等. 酶联免疫吸附试验检测鸭瘟抗体的研究和应用. 四川农业大学学报 (*Journal of Agricultural University*), 1997, 15(3): 379-384.
- [5] 黄忠, 黄引贤, 杜伟贤, 等. 应用 ELISA 检测鸭瘟抗体. 中国畜禽传染病 (现改为中国预防兽医学报 *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*), 1998, 20(2): 100-101
- [6] 梁成珠, 曹瑞兵, 魏建超, 等. 马动脉炎病毒 GL 蛋白主要抗原域的表达及间接 ELISA 的初步建立. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 46(3): 436-440.
- [7] Li Y H, van Drunen Littel-van den Hurk S, Babiuk L A, et al. Characterization of cell-binding properties of bovine herpesvirus 1 glycoproteins B, C, and D: Identification of a dual cell binding function of gB. *J Virol*, 1995, 69(8):

- 4758–4768.
- [8] Hutchings D L, van Drunen Little-van den Hurk S, Babiuk LA. Lymphocyte proliferative responses to separated bovine herpesvirus 1 proteins in immune cattle. *J Virol*, 1990, 64: 5114–5122.
- [9] Pellett P E, Kousoulas K G, Pereira L, *et al.* Anatomy of the herpes simplex virus 1 strain F glycoprotein B gene: primary sequence and predicted protein structure of the wild type and of monoclonal antibody resistant mutants. *J Virol*, 1985; 53 (1): 243–251.
- [10] Lenore P, Mir Ali, Konstantin K, *et al.* Domain structure of herpes simplex virus 1 glycoprotein B: Neutralizing epitopes map in regions of continuous and discontinuous residues. *Virology*, 1989, 172(1): 11–24.
- [11] Pescador L S, Paz P, Navarro D, *et al.* Epitopes of herpes simplex virus type 1 glycoprotein B that bind type-common neutralizing antibodies elicit type-specific antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Infect Dis*. 1992, 166(3): 623–627.

## Prokaryotic expression of N-terminal antigenic domain of duck plague virus gB protein and the establishment of putative indirect ELISA assay

Huaqi Pan<sup>1,2</sup>, Ruibing Cao<sup>1\*</sup>, Lei Liu<sup>2</sup>, Hailiang Sun<sup>1,2</sup>, Xiangbo Ji<sup>1</sup>,  
Yongjun Chen<sup>1</sup>, Puyan Chen<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Disease Diagnosis and Immunology, Nanjing Agricultural University, Ministry of Agriculture, Nanjing 210095, China)  
(<sup>2</sup>College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** Based on the antigenic analysis of duck plague virus (DPV) gB protein, we designed a pair of primers to amplify the gene fragment encoding high antigenic domain of DPV N-terminal gB protein from the DPV genome. The cloned gene was digested with *EcoR* I and *Hind* III and then inserted into pET32a vector to obtain the recombinant pET-gB1 plasmid. The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21, and expressed in very high level after induced with IPTG. The expressed product was analyzed by SDS-PAGE and Western blotting. The result indicated that the fusion protein (pET-gB1) existed as inclusion body, which was about 42.4kDa and showed specific immunoreactivity with anti-DPV sera. The recombinant gB1 protein was purified with His-Bind resin protein purification procedure. Then an indirect ELISA was established to detect antibody against DPV with the purified gB1 protein as the coating antigen. The result showed that the optimal concentration of coated antigen was 6.5µg/mL and the optimal dilution of serum was 1 : 80. The positive criterion of this ELISA assay was  $OD_{\text{the tested serum}} > 0.4$  and  $OD_{\text{the tested serum}}/OD_{\text{the negative serum}} > 2.0$ . The ELISA was done on 700 sera that were preserved in Shandong, Jiangsu Provinces, and were detected by igB1-ELISA and iDPV-ELISA with duck plague virus as the coating antigen respectively. The agreement ratio between the two methods was 95.6 %.

**Keywords:** duck plague virus; glycoprotein B; prokaryotic expression; antigenic domain; indirect ELISA

\*Corresponding author. Tel: +86-25-84396028; Fax: +86-25-84396335; E-mail: crb@njau.edu.cn  
Received: 11 May 2007/Revised: 17 October 2007