

网络出版日期:2018-05-09
网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1220.S.20180509.1603.008.html

I 群禽腺病毒 Hexon 蛋白的原核表达及间接 ELISA 检测方法的建立与应用

张 曼,韩 飞,高 睿,何亚鹏

(杨凌职业技术学院 动物工程分院,陕西杨凌 712100)

摘 要 旨在原核表达 I 群禽腺病毒(Fowl adenovirus group I ,FAV I)的 Hexon 蛋白,并以 Hexon 蛋白为包被抗原建立血清的间接 ELISA 检测方法。将 FAV I 群 *Hexon* 基因克隆至原核表达载体 pET-28a(+)中进行重组 Hexon 蛋白的诱导表达,对表达产物进行纯化,并进行 Westernblot 鉴定;纯化后的 Hexon 蛋白作为包被抗原,优化反应条件,建立血清的间接 ELISA 检测方法,并进行特异性、灵敏性和重复性试验,最后对临床样品进行检测。结果表明,原核表达获得大小约为 37.4 ku 的重组 Hexon 蛋白;Westernblot 结果表明重组蛋白有良好的特异性和抗原反应性。FAV I 间接 ELISA 法优化反应条件为:抗原最佳包被质量浓度为 5.0 mg/L,封闭条件为 37 ℃作用 1 h,血清以 1 : 200 倍稀释作用 1 h,酶标二抗以 1 : 5 000 倍稀释作用 1 h,TMB 显色时间为 10 min。在该优化条件下,OD₄₅₀ ≥ 0.322 为阳性,反之为阴性;特异性试验结果表明,对鸡新城疫、禽流感、沙门菌、金黄色葡萄球菌、多杀性巴氏杆菌和大肠埃希菌阳性血清检测均为阴性;对阳性血清的敏感性可达 1 : 1 200,70 份阳性血清的阳性率为 97.1%;重复性试验结果表明,批内和批间 OD₄₅₀ 值的变异系数分别为 1.2%~3.5%和 5.1%~8.3%;用此方法对临床 279 份鸡血清样品检测的阳性率为 51.3%。表明建立的 ELISA 检测方法可用于 FAV I 抗体水平的检测。

关键词 I 群禽腺病毒;Hexon 蛋白;原核表达;间接 ELISA

中图分类号 S855.3 **文献标志码** A **文章编号** 1004-1389(2018)05-0634-07

禽腺病毒(Fowl adenovirus,FAV)是一种无囊膜的双链 DNA 病毒,可分为 I、II、III 3 群,I 群禽腺病毒(Fowl adenovirus group I ,FAV I)具有共同的群抗原^[1-2]。该群病毒代表株为鸡胚致死孤儿病毒(Chicken embro lethal orphan virus,CELOV)^[3]。近年来,由 FAV I 引起的包涵体肝炎、心包积液综合征和砂囊糜烂的感染呈上升趋势^[2,4-6]。特别是 2015 年 6 月以来,中国多个省份的鸡群爆发安卡拉病(Angrara disease),病原为 I 群 FAV 中 C 种 FAV-4 型,该病主要特征为突然倒地,出现呼吸道症状,甩鼻、呼吸加快,排黄色稀粪,有神经症状,两腿划空,剖检可见心包积液、肝脏肿大^[5-6]。该病主要发生于 3 周龄的肉鸡,发病后 1 周左右为死亡高峰期,死亡率可达 20%~80%,短时间内就给禽类养殖造成重大损失^[7]。此外,腺病毒既可经卵垂直传递,污染鸡胚,也可经排泄物水平传播,给防控带来巨大的困

难^[1]。对 FAV I 传统的实验室诊断方法如分离与鉴定、中和试验、琼脂糖凝胶免疫扩散试验等方法费时耗力,结果不够精确,PCR、LAMP 等对试剂和设备要求较高且不便对大量样品进行检测^[7-9],酶联免疫吸附试验(Enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)作为经典的、应用最广的血清学诊断方法,具有操作简便、特异性强、敏感性高和成本低廉等优点,可以为 I 群禽腺病毒疫苗免疫效果检测和未免疫鸡群的疾病诊断提供方法^[10]。

六邻体蛋白 Hexon 是 FAV I 的主要结构蛋白,位于 FAV I 的外壳,Hexon 蛋白含有主要的属和亚属特异性抗原决定簇和次要的种特异性抗原决定簇,可以作为诊断抗原^[3]。本研究分析 FAV I *Hexon* 基因编码蛋白的抗原指数和表面分布可能性,选择 Hexon 蛋白前段抗原性强且具有群特异性的 339 个氨基酸进行原核表达,制备

具有良好反应原性的抗原,对其进行大量诱导表达,将纯化复性后的重组 Hexon 蛋白作为包被抗原,经过条件优化,建立检测 FAV I 血清抗体的间接 ELISA 方法,以期对 I 群禽腺病毒疫苗免疫效果检测和未免疫鸡群的疾病诊断提供方法。

1 材料与方法

1.1 菌种、质粒、实验动物、血清

FAV I CELO 毒株(CVCC AV208)购自中国兽药监察所;pEASY-T1 Cloning Kit、感受态细胞 Trans5 α 为北京全式金生物技术有限公司产品;pET-28a(+)质粒为 Novagen 公司产品;原核表达 BL21(DE3)菌株为康为世纪生物公司产品;SPF 鸡(Specific pathogen free chicken)购自杨凌绿方生物科技有限公司;FAV I、鸡新城疫病毒、禽流感病毒、沙门菌、金黄色葡萄球菌、多杀性巴氏杆菌和大肠埃希菌阳性血清由杨凌职业技术学院动物工程分院畜禽传染病实验室采集,采用 ELISA 方法或免疫胶体金试纸条鉴定并保存;279 份鸡血清样品采自陕西省 4 个地区的规模化养鸡场。

1.2 主要试剂

2 $\times$ Es Taq MasterMix、DM2000 plus DNA marker、广谱蛋白 Marker 购于北京康为世纪生物科技有限公司;细菌基因组提取试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司;内切酶购于 Fermentas 公司;T₄ DNA 连接酶购于大连宝生物公司;预染蛋白 Marker Blue Plus II Protein Marker、ProteinIso Ni-NTA Resin 购于北京全式金生物技术有限公司;辣根过氧化物酶标记的兔抗鸡 IgG(Rabbit Anti-chicken IgG/HRP antibody)购于北京博奥森生物技术有限公司;酶标板购自 BEAVER 公司;TMB 储存液(2 mg/mL)由杨凌职业技术学院动物工程分院畜禽传染病实验室配制,现配现用;其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.3 Hexon 基因的扩增和表达载体构建

根据 GenBank 中收录的 FAV I (CELO Phelps 株,GenBank 登录号 U46933.1)Hexon 基因序列,利用 Primer 5.0 软件,设计引物,上游引物 HexonF-BamH I :5'-CGCGGATCCATGAC-TGCGCTTA-CTCCCGA-3'(下划线为 BamH I 酶切位点),HexonR-Xho I :5'-CCGCTCGAG-CGCCAGCATGTACTGGTAAC-3'(下划线为 Xho I 酶切位点),位置为 18 289~19 305 bp,扩

增长度为 1 017 bp,引物由 Invitrogen 公司合成。

以 FAV I 的 DNA 为模板,进行 PCR 扩增。切胶回收目的条带,连接 pEASY-T₁ Cloning 载体,获得 T₁-Hexon 阳性质粒,送华大基因(北京)测序。双酶切 T₁-Hexon 和 pET-28a(+)质粒,回收酶切产物,将目的基因 Hexon 连接到 pET-28a(+)载体中,PCR 选取阳性克隆,然后双酶切鉴定,并进行质粒测序,序列正确的质粒命名为 pET-Hexon。

1.4 Hexon 蛋白的原核表达

pET-Hexon 转化 BL21(DE3)感受态细胞,对诱导剂浓度(IPTG 终浓度 0~1.0 mmol/L)和诱导时间进行优化,收集并处理样品,然后进行 SDS-PAGE 分析。

1.5 Hexon 蛋白的纯化、复性

诱导培养 1 L 重组菌,收集菌体,裂解收集包涵体蛋白,按 ProteinIso Ni-NTA Resin 说明书操作纯化目的蛋白 Hexon。

配制透析液进行蛋白复性,透析液 A、B、C 均含有 20 mmol/L Tris-HCl,其他组分为:透析液 A(分别加入 6、4、2 和 1 mol/L 的尿素,调 pH 为 8.0)、透析液 B(0.6 mmol/L L-精氨酸, φ =10% 的甘油,2 mmol/L EDTA,0.5 mol/L,调 pH 为 8.0)和透析液 C(25 mmol/L NaCl,0.2 mol/L 尿素)。将纯化后的 Hexon 重组蛋白转入透析袋中,依照尿素浓度从高到低的顺序放入透析液 A 中,然后依次放入透析液 B、透析液 C 中,在 4 $^{\circ}$ C 环境中磁力搅拌透析复性,每个透析液中放置 10 h。测定复性后的 Hexon 重组蛋白的质量浓度,分装保存于一 20 $^{\circ}$ C。

1.6 重组蛋白的 Western blot 分析

对纯化后的 Hexon 蛋白进行 SDS-PAGE,转膜封闭后,用 1 : 500 倍稀释的一抗(鸡 FAV I 阳性血清)于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜后,用 1 : 10 000 倍稀释的二抗(HRP 标记的兔抗鸡 IgG 抗体)孵育 2 h 后,ECL 反应液孵育,暗室中压片曝光。

1.7 间接 ELISA 检测方法的建立与初步应用

1.7.1 间接 ELISA 方法 用 0.1 mol/L 碳酸盐缓冲液(pH 9.6)将纯化后的抗原稀释至所需质量浓度,以每孔 100 μ L 的包被量加入 96 孔 ELISA 板中,用保鲜膜封孔顶,置 4 $^{\circ}$ C 过夜;次日,用 PBST 洗液(pH 7.4)洗涤 3 次(每次 5 min)、拍干;加入封闭液(含 50 g/L 脱脂奶粉的 PBST),每孔 200 μ L,37 $^{\circ}$ C 1 h,弃去封闭液;加

入血清样品(用含 50 g/L 脱脂奶粉的 PBST 稀释),每孔 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 1 h,同样方法洗板、拍干;加酶标二抗(用含 50 g/L 脱脂奶粉的 PBST 稀释),每孔 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 1 h 后,同样方法洗板、拍干;每孔加入 100 μ L 的 TMB,避光孵育 15 min;每孔加入 3 mol/L 的浓硫酸 50 μ L 终止反应后,用酶标仪测定每孔的 OD₄₅₀ 值。

1.7.2 抗原、血清和酶标二抗最佳稀释度的确定

用纯化后的 Hexon 蛋白、血清以及酶标二抗进行正交试验,将抗原(Hexon 蛋白)分别稀释至质量浓度为 2.5、5.0 和 7.5 mg/L,每孔 100 μ L 包被至 ELISA 板中;阴阳性血清样品以 1 : 50、1 : 100、1 : 200 和 1 : 400 倍稀释;酶标二抗以 1 : 2 500、1 : 5 000 和 1 : 10 000 倍稀释;每孔设置 2 个重复取平均值,同时设立阴阳性和空白对照。进行 ELISA 检测,测定各孔 OD₄₅₀ 值后进行数据分析。取阳性样品 OD₄₅₀ 值(P 值)约为 1.0,阴性样品 OD₄₅₀ 值(N 值)在 0.1 左右,并且 P/N 值最大时,为最佳抗原包被量及血清和二抗稀释度。

1.7.3 作用时间的优化 以抗原、血清和酶标二抗最佳作用浓度为基础,优化抗原的最佳封闭时间(37 $^{\circ}$ C,1、1.5、2 h)、血清反应时间(37 $^{\circ}$ C,0.5、1、1.5 h)、酶标二抗最佳孵育时间(37 $^{\circ}$ C,0.5、1、1.5 h)以及最佳显色时间(37 $^{\circ}$ C,10、20、30 min)等条件,取阳性样品 OD₄₅₀ 值(P 值)约为 1.0,阴性样品 OD₄₅₀ 值(N 值)在 0.1 左右,并且 P/N 值最大时,为最佳作用时间。

1.7.4 阴/阳性标准临界值的确定 取 50 份阴性血清样品,用已建立的最佳反应条件进行间接 ELISA 方法检测。对检测结果进行分析,计算其平均值($\bar{x}$)和标准差(s),以“ $\bar{x}+3s$ ”为判定阴阳性的标准。

1.7.5 特异性试验 取鸡新城疫、禽流感、沙门菌、金黄色葡萄球菌、多杀性巴氏杆菌和大肠埃希菌阳性血清样品进行检测,统计分析结果。

1.7.6 敏感性试验 将 FAV I 阳性血清以 1 : 50、1 : 100、1 : 200、1 : 400、1 : 800、1 : 1 200、1 : 1 600 倍稀释,用建立的 ELISA 方法检测。在最优条件下,用建立的间接 ELISA 对 70 份 FAV I 阳性血清样品(经进口 ELISA 试剂盒检测为阳性)进行检测,统计分析阳性血清的检出率。

1.7.7 重复性试验 取 FAV I 阳性血清和阴性

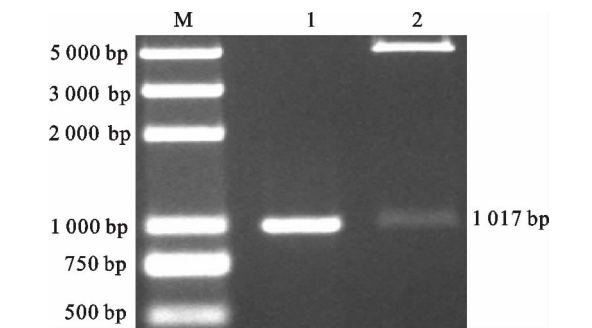
血清各 3 份,在同一条件下,用已建立的最佳间接 ELISA 检测方法进行检测,每份血清设置 4 个重复,根据每孔的 OD₄₅₀ 值,分析其批次内的可重复性。用 3 个批次纯化复性的 Hexon 蛋白包被酶标板检测 1 份阳性血清,根据每孔的 OD₄₅₀ 值,分析批次间的可重复性。

1.7.8 临床样品检测 用已建立的检测方法检测陕西省 4 个地区规模化养鸡场的 279 份鸡血清样品,评价该 ELISA 检测方法的检测效果。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增和重组质粒双酶切鉴定

PCR 扩增得到 1 017 bp 的目的基因 *Hexon*。将 *Hexon* 基因连接至 pET-28a(+),重组质粒 pET-*Hexon* 进行双酶切,获得预期的片段(图 1)。



M. DM2000 plus DNA marker;1. *Hexon* 基因扩增产物 Production of *Hexon* gene;;2. pET-*Hexon* 双酶切分析 Restriction enzyme analysis of recombinant r plasmid pET-*Hexon*

图 1 重组质粒酶切鉴定

Fig.1 Restriction analysis of recombinant plasmid

2.2 重组蛋白的原核表达与纯化

原核表达诱导剂 IPTG 浓度优化结果显示,当 IPTG 终浓度为 0.25~1.0 mmol/L 时,重组蛋白 Hexon 表达量一致,选择诱导剂 IPTG 浓度为 0.25~1.0 mmol/L 均可;全部采用终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导 5 h,重组蛋白 Hexon 可大量表达,而 pET-*Hexon* 未诱导,对照没有重组蛋白的表达。在最佳诱导条件下,分别取菌体超声裂解上清、菌体超声裂解沉淀进行 SDS-PAGE,结果显示 Hexon 重组蛋白主要以包涵体形式存在。包涵体蛋白经 ProteinIso Ni-NTA Resin 纯化并复性后均获得 37.4 ku 大小的 Hexon 重组蛋白(图 2)。

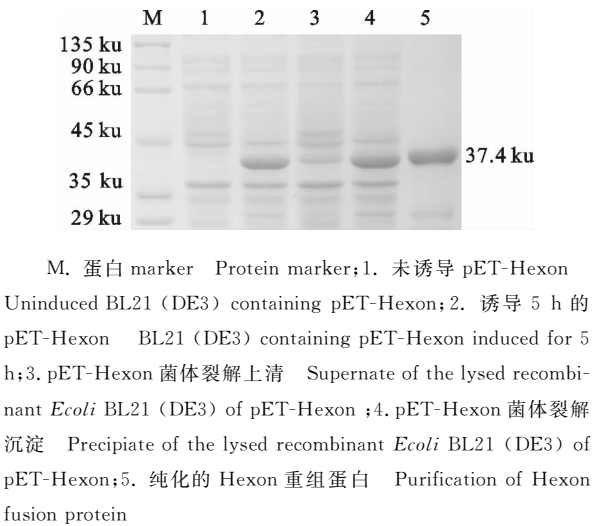


图 2 Hexon 重组蛋白 SDS-PAGE 分析
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of of Hexon fusion protein

2.3 重组蛋白的 Westernblot 分析

Westernblot 结果表明,Hexon 重组蛋白能与 FAV I 阳性血清发生特异性反应,出现大小为 37.4 ku 的条带,而与 SPF 鸡血清无特异性条带出现,无特异性反应(图 3)。

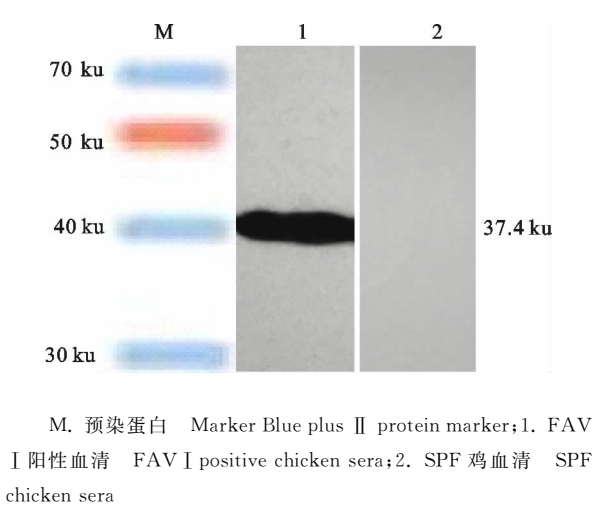


图 3 Hexon 重组蛋白的 Western blot 分析
Fig. 3 Western blot analysis of Hexon fusion protein

2.4 间接 ELISA 检测方法的建立

2.4.1 抗原包被量及血清和酶标二抗最佳稀释度的确定 多次正交试验结果显示,当抗原 Hex-on 重组蛋白的质量浓度为 5.0 mg/L,血清稀释度为 1 : 200,酶标二抗的稀释度为 1 : 5 000 时为最佳条件(表 1)。

表 1 抗原包被量、血清和酶标二抗工作浓度的确定 Table 1 Determination of optimal of antigen amount, serum and HRP-rabbit-anti-chicken IgG										
血清稀释度 Dilution of serum		酶标二抗不同稀释度时的 OD ₄₅₀ 值 OD ₄₅₀ values at different dilutions of HRP-rabbit-anti-chicken IgG								
		1 : 2 500			1 : 5 000			1 : 10 000		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C
1 : 50	阳性 Positive	1.481	2.186	1.955	1.381	1.250	1.519	0.772	0.694	0.795
	阴性 Negative	0.214	0.281	0.304	0.167	0.171	0.202	0.122	0.132	0.139
1 : 100	阳性 Positive	1.395	2.073	2.313	1.182	1.364	1.489	0.548	0.767	0.752
	阴性 Negative	0.207	0.276	0.291	0.144	0.169	0.197	0.104	0.121	0.126
1 : 200	阳性 Positive	0.844	1.085	1.248	0.825	1.043	1.213	0.483	0.667	0.627
	阴性 Negative	0.112	0.137	0.152	0.109	0.112	0.135	0.077	0.096	0.087
1 : 400	阳性 Positive	1.004	1.112	1.120	0.898	0.931	0.912	0.431	0.557	0.422
	阴性 Negative	0.122	0.142	0.141	0.110	0.117	0.126	0.081	0.115	0.098

注:A 代表抗原的质量浓度为 2.50 mg/L,B 代表抗原的质量浓度为 5.0 mg/L,C 代表抗原的质量浓度为 7.50 mg/L。
Notes: A. mass concentrations of antigen is 2.50 mg/L;B. mass concentrations of antigen is 5.0 mg/L; C. mass concentrations of antigen is 7.50 mg/L.

2.4.2 作用时间的优化 当抗原质量浓度为 5.0 mg/L,包被量为每孔 100 μL,封闭条件为 37 ℃作用 1 h,血清以 1 : 200 倍稀释 37 ℃作用 1 h,酶标二抗以 1 : 5 000 倍稀释 37 ℃作用 1 h,每孔 100 μL 的 TMB 37 ℃孵育 10 min 时效果最佳。

2.4.3 阴/阳性标准临界值的确定 用建立的间

接 ELISA 方法对 50 份阴性血清样品进行检测,测得该 50 份血清 OD₄₅₀ 值的平均值 $\bar{x}$ = 0.139,标准差 $s \approx 0.061$, $\bar{x} + 3s \approx 0.322$ 为判定阴阳性标准的临界值,即当 OD₄₅₀ 值 ≥ 0.322 时,判定 FAV I 抗体水平为阳性,当 OD₄₅₀ 值 < 0.322 时,判定 FAV I 抗体为阴性。

2.4.4 特异性试验 用建立的间接 ELISA 检测

鸡新城疫、禽流感、沙门菌、金黄色葡萄球菌、多杀性巴氏杆菌和大肠埃希菌阳性血清样品进行检测,结果 OD₄₅₀ 值均小于 0.3,为阴性,阴、阳性对照成立,表明检测方法特异性良好(表 2)。

2.4.5 敏感性试验 将 FAV I 阳性血清以 1 : 50、1 : 100、1 : 200、1 : 400、1 : 800、1 : 1 200、1 : 1 600 稀释,用建立的 ELISA 方法检测,结果当阳性血清以 1 : 50、1 : 100、1 : 200、1 : 400、1 : 800、1 : 1 200 稀释时,结果为阳性,当阳性血清以 1 : 1 600 稀释时,结果为阴性(表 3);并且用建立的间接 ELISA 对 70 份 FAV I 阳性血清样品(经进口 ELISA 试剂盒检测为阳性)进行检测,有 2 份未检出,检出阳性率为 97.1%,表明所建

立的检测方法敏感性良好。

表 2 特异性试验
Table 2 Specificity test

血清	Serum	OD ₄₅₀
禽流感病毒	AIV	0.201
鸡新城疫病毒	NDV	0.159
多杀性巴氏杆菌	<i>Pasteurella multocida</i>	0.168
沙门菌	<i>Salmonella</i> spp	0.127
金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.105
大肠埃希菌阳性	<i>Escherichia coli</i>	0.192
FAV I 阳性血清	Positive serum of FAV I	1.592
FAV I 阴性血清	Negative serum of FAV I	0.112

表 3 敏感性试验结果
Table 3 Result of sensitivity test

阳性血清稀释度 Dilution of positive serum	1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 800	1 : 1 200	1 : 1 600
OD ₄₅₀	1.885	1.503	1.127	0.961	0.754	0.416	0.207

2.4.6 重复性试验 在建立的最优条件下,检测 3 份阳性血清和 3 份阴性血清的 OD₄₅₀ 值,结果表明,OD₄₅₀ 值批内变异系数为 1.2%~3.5%;分别用 3 批次纯化复性的 Hexon 蛋白检测 1 份阳性血清和 1 份阴性血清,结果表明,OD₄₅₀ 值批间变异系数为 5.1%~8.3%。批内变异系数和批间

变异系数都较小,表明建立的检测方法具有良好的重复性。

2.4.7 临床样品检测 对采自不同地区规模化养鸡场的 279 份鸡血清样品进行 Hexon 蛋白抗体水平的检测。结果表明,143 份血清为阳性,阳性率为 51.3%(表 4)。

表 4 陕西省 4 个地区鸡血清 Hexon 抗体水平检测
Table 4 Detection of Hexon antibodies level of chicken serum in 4 regions of Shaanxi

地区 Region	样品数 Numbers of sample	阳性数 Numbers of positive sera	阳性率/% Positive rates
杨凌 Yangling	80	32	40.0
咸阳 Xianyang	72	41	56.9
宝鸡 Baoji	67	43	64.2
渭南 Weinan	60	27	45.0
总计 Total	279	143	51.3

3 讨论

近年来,由 FAV I 引起的包涵体肝炎、心包积液综合征和砂囊糜烂的感染呈上升趋势^[11-12]。特别是 2015 年 6 月以来,中国多数省份的鸡群爆发安卡拉病,发病率和病死率高,给禽鸡类养殖造成严重危害^[5,13]。因此建立灵敏度高、特异性强且能快速、安全、有效的检测鸡腺病毒血清抗体的 ELISA 检测方法至关重要。

本试验针对 FAV I 的 *Hexon* 基因进行分析,选取 Hexon 蛋白主要抗原区的序列,构建原核表达质粒 pET-*Hexon*,转化大肠埃希菌 BL21

(DE3)后,对其进行大量的诱导表达,经表达形式分析,该蛋白主要以包涵体形式存在。将纯化复性后的重组 Hexon 蛋白作为包被抗原,抗原质量浓度为 5.0 mg/L,包被量为每孔 100 μL,血清最佳稀释度为 1 : 200,二抗最佳稀释度为 1 : 5 000,建立间接 ELISA 抗体水平检测试验。试验结果显示,该检测方法具有较强的特异性,不能与鸡新城疫、禽流感、沙门菌、金黄色葡萄球菌、多杀性巴氏杆菌和大肠埃希菌阳性血清发生反应;批间和批内重复性试验结果可以看出,其变异系数小,重复性好;敏感性试验结果显示,该试验灵敏性强;并且本试验方法操作简单快速,成本

低,适合大量样品检测。对采自不同地区规模化养鸡场的 279 份鸡血清样品进行 Hexon 蛋白抗体水平的检测,检测结果显示 143 份血清为阳性,阳性率为 51.3%。在以后的临床检测应用中,可以对腺病毒疫苗免疫鸡群的免疫效果进行检测评估,也可以应用该方法对未免疫鸡群的感染情况进行调查。

在现在的养殖生产中“以防为主,防重于治”是防控疾病的基本原则,疫苗的免疫极为重要。因此,间接 ELISA 检测方法的建立为开展腺病毒疫苗免疫效果评估及未免疫鸡群疾病诊断提供技术支持,促进鸡包涵体肝炎和安卡拉等相关鸡病的有效防治。

参考文献 Reference:

[1] 罗思思,谢芝勋,刘加波,等. I 群禽腺病毒抗体间接 hexon-ELISA 检测方法的建立[J]. 中国兽医科学,2012(7):701-707.

LUO S S,XIE ZH X,LIU J B,*et al.* Establishment of an indirect hexon-elisa for the detection of antibodies against fowl adenovirus group I [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2012(7):701-707.

[2] MITTAL D,JINDAL N,TIWARI A K,*et al.* Characterization of fowl adenoviruses associated with hydropericardium syndrome and inclusion body hepatitis in broiler chickens [J]. *Virus Disease*, 2014,25(1):114-119.

[3] 罗思思,谢芝勋,刘加波,等. I 群禽腺病毒 Hexon 蛋白的截短表达与鉴定[J]. 基因组学与应用生物学,2011,30(5):550-555.

LUO S S,XIE ZH X,LIU J B,*et al.* Expression and identification of the truncated hexon protein of fowl adenovirus group I [J]. *Genomics & Applied Biology*, 2011,30(5):550-555.

[4] CHOI K S,KYE S J,KIM J Y,*et al.* Epidemiological investigation of outbreaks of fowl adenovirus infection in commercial chickens in Korea [J]. *Poultry Science*, 2012,91(10):2502-2506.

[5] LI H,WANG J,QIU L,*et al.* Fowl adenovirus species C serotype 4 is attributed to the emergence of hepatitis-hydropericardium syndrome in chickens in China [J]. *Infection Genetics & Evolution*, 2016,45:230-241.

[6] 罗 玲,赵 康,张 媛,等. 鸡心包积液综合征病原的分离与鉴定[J]. 中国家禽,2016,38(6):56-58.

LUO L,ZHAO K,ZHANG Y,*et al.* Isolation and identification of a fowl adenovirus serotype 4 strain from chickens with hydropericardium syndrome [J]. *China Poultry*, 2016,38(6):56-58.

[7] 李昕键,吴 彻,雷小亚,等. 鸡心包积液综合征病原的分离鉴定与进化分析[J]. 动物医学进展,2017(2):27-31.

LI X J,WU CH,LEI X Y,*et al.* Isolation,identification and evolution analysis of a fowl adenovirus serotype 4 strain from chickens with hydropericardium syndrome [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2017(2):27-31.

[8] 唐 熠,谢芝勋,熊文婕,等. I 群禽腺病毒环介导等温扩增检测方法的建立[J]. 中国兽医科学,2010(7):713-716.

TANG Y,XIE ZH X,XIONG W J,*et al.* Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for detection [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2010(7):713-716.

[9] 唐 熠,谢芝勋,熊文婕,等. PCR-RFLP 技术对 I 群禽腺病毒 12 个血清型毒株的分型鉴定[J]. 中国兽医科学,2009(10):886-889.

TANG Y,XIE ZH X,XIONG W J,*et al.* Identification of 12 serotypes of aviadenovirus group I by PCR-RFLP assay. [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2009(10):886-889.

[10] 韦 悠,谢芝勋,刘加波,等. 禽腺病毒 I 型抗体间接 ELISA 检测方法的建立[J]. 畜牧与兽医,2011,43(10):50-53.

WEI Y,XIE ZH X,LIU J B,*et al.* Establishment of indirect ELISA for detection of antibodies of fowl adenovirus group I [J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2011,43(10):50-53.

[11] 刘 东,刘红祥,于 静,等. I 亚群腺病毒在我国鸡群的流行病学调查[J]. 中国家禽,2015,37(15):70-73.

LIU D,LIU H X,YU J,*et al.* Epidemiological study of fowl adenovirus group I in China [J]. *China Poultry*, 2015,37(15):70-73.

[12] 罗思思,谢芝勋,刘加波,等. I 群禽腺病毒 100K 蛋白主要抗原区基因片段的表达及鉴定[J]. 西北农业学报,2012,21(5):22-25.

LUO S S,XIE ZH X,LIU J B,*et al.* Expression and identification of the major antigenic region fragment of 100K gene of fowl adenovirus group I [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2012,21(5):22-25.

[13] ZHANG T,JIN Q,DING P,*et al.* Molecular epidemiology of hydropericardium syndrome outbreak-associated serotype 4 fowl adenovirus isolates in central China [J]. *Virol-ogy Journal*, 2016(13):188.

Establishment and Application of Prokaryotic Expression of Hexon Protein of Fowl Adenovirus Group I and Indirect ELISA in *Escherichia coli*

ZHANG Man, HAN Fei, GAO Rui and HE Yapeng

(College of Animal Engineering, Yangling Vocational & Technical College, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract Using the Hexon protein as the antigen, prokaryotic expression of fowl adenovirus group I Hexon protein, the indirect ELISA detection method was established. FAV I serotype A *Hexon* gene was cloned into *Escherichia coli* expression vector pET-28a (+) to induce the expression of recombinant Hexon protein. Hexon protein was purified and tested by Western blot. Using the recombinant Hexon protein as the antigen; the indirect ELISA detection method was established to detect the level of FAV I antibody in serum. Specificity, sensitivity and reproducibility tests were carried out, and the clinical samples were tested. The recombinant protein with the size of 37.4 ku was obtained. Western blot showed that the purified Hexon protein had good specificity and antigen reactivity. The optimal reaction conditions were established as follows: the optimal mass concentrations of antigen was 5.0 mg/L, closed at 37 °C for 1 h; the serum dilution was 1 : 200, reacting 1 h; the second antibody dilution was 1 : 5 000, reacting 1 h; the TMB reacting time was 10 min. Criteria for determining the negative and positive results of serum samples were $OD_{450} \geq 0.322$ and $OD_{450} < 0.322$, respectively. Specificity tests showed that the results of newcastle disease, avian influenza, *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus*, *Pasteurella multocida*, *E. coli* positive sera were negative. The sensitivity of positive serum was up to 1 : 1 200. 70 positive sera were tested and the positive rate was 97.1%. The repeatability test showed that the coefficient of variation of OD_{450} between the same batch and different batch were 1.2%—3.5% and 5.1%—8.3%, respectively. The clinical 279 serum samples were tested by established system and the positive rate was 51.3%. The established method in this test could be used for clinical detection of serum antibody and epidemiological investigation of FAV I.

Key words Fowl adenovirus group I; Hexon protein; Prokaryotic expression; Indirect ELISA

Received 2017-04-20 **Returned** 2017-05-09

Foundation item Major Scientific and Technological Innovation of Xianyang in Shaanxi (No. 2016K01-43); Major Program for Science and Technology of Yangling (No. 2016-XY-16).

First author ZHANG Man, female, master, associate professor. Research area: poultry breeding and disease prevention and control. Email: 1647864117@qq.com.

(责任编辑: 顾玉兰 Responsible editor: GU Yulan)