

# H5N1 亚型禽流感病毒血凝素基因的原核表达及间接 ELISA 方法的初步建立

郑其升<sup>1</sup> 张晓勇<sup>1</sup> 刘华雷<sup>1</sup> 李 鹏<sup>1,2</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>河北省畜牧兽医总站 保定 071000)

**摘 要** 根据 GenBank 公布的 H5N1 亚型禽流感病毒(AIV)血凝素(HA)基因序列设计引物,用 PCR 方法扩增 H5N1 亚型禽流感病毒 HA1 基因,将该片段定向插入到原核表达载体 pET-32a(+)中,构建原核表达载体 pET-HA1。阳性质粒转化宿主菌 BL21(DE3),经 IPTG 诱导,HA1 基因获得表达,重组蛋白以包涵体的形式存在。通过改变 IPTG 的浓度和诱导时间,确定了表达 HA1 基因的最佳诱导条件: IPTG 终浓度为 0.8mmol/L,诱导时间为 3h。Western blot 分析表明表达产物具有良好的免疫学活性。以纯化的表达产物作为诊断抗原建立了检测 H5 亚型 AIV 抗体的 iHA-ELISA 方法。结果表明,抗原的最佳包被浓度为 4 $\mu$ g/mL,血清的最佳稀释度为 1:200,阳性标准初步定为:  $OD_{待检血清} > 0.5$ ,且  $OD_{待检血清} / OD_{阴性血清} > 2$ 。

**关键词** H5N1 亚型禽流感病毒,血凝素基因,原核表达,iHA-ELISA

**中图分类号** Q78 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(2005)01-0058-04

禽流感(Avian Influenza, AI)是由 A 型流感病毒引起的一种禽类疾病综合征,严重危害畜牧业发展和人类健康,该病以引起禽类的呼吸系统以及全身性败血症为特征。多年来在世界上许多国家和地区都发生过此病,造成巨大的经济损失,被国际兽疫局确定为 A 类烈性传染病,并被列入国际生物武器公约动物传染病名单<sup>[1]</sup>。近年来,随着血清学实验技术的发展,有几项技术常用于禽流感的监测和诊断,如用血凝抑制(HI)试验检测抗血凝素(HA)的抗体,用琼脂免疫扩散(AGP)试验检测抗核蛋白的抗体,其它还有病毒中和、补体结合、神经氨酸酶抑制和单辐射溶血等方法。国外已对检测禽流感抗体的 ELISA 方法进行了不少研究<sup>[2]</sup>。我国对禽流感的研究起步较晚,虽然已先后建立了 AGP、HI 和 RT-PCR 等检测技术,但其抗原来自于经纯化、浓缩的完整病毒,获得该抗原存在的问题是:完整病毒不易生产、纯化、成本较高,且存在感染性和容易散毒,在应用中存在局限性。利用重组血凝素做抗原检测禽流感 HA 抗体的 ELISA 技术国内还未见报道<sup>[3]</sup>。本试验利用基因工程的方法表达 H5N1 亚型禽流感病毒的血凝素基因,在此基础上初步建立了检测鸡群血清中 H5 亚型 AIV 抗体水平的间接 ELISA 方

法,为 AIV 新型 ELISA 抗体诊断试剂盒的研制奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒、菌株和血清** 重组质粒 pMD-HA 为本组博士生刘华雷构建,该质粒系将编码 H5N1 亚型 AIV 完整的血凝素基因克隆到 pMD18-T 载体中;大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$ 、BL21(DE3)原核表达载体 pET-32a(+)为本组保存;H3、H5、H7、H9 亚型 AIV 阳性血清由哈尔滨兽医研究所研制;SPF 鸡血清 40 份,由江苏省农业科学院提供;免疫鸡群血清 156 份,系用 H5 亚型禽流感病毒灭活疫苗(哈尔滨兽医研究所研制)肌肉注射免疫 SPF 鸡两次,采血后获得的血清;临床未免疫鸡血清 586 份,由山东、江苏、安徽、浙江等地养殖场提供;抗鸡 IgY 的二抗购自 Promega 公司;禽流感 H5 诊断抗原由哈尔滨兽医研究所生产。

**1.1.2 试剂** 胶回收试剂盒购自上海华舜生物技术有限公司;DAB 显色试剂盒购自南京生工生物工程有限公司;His·Bind® Purification Kit 为 Novagen 公司产品;限制性内切酶 BamH I、Hind III 和 T4 DNA 连接

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

作者简介 郑其升(1979-)男,山东人,硕士研究生,主要从事畜禽传染病诊断与防治研究。

收稿日期 2004-05-18,修回日期 2004-07-27

酶、*rTaq* DNA 聚合酶等工具酶及 pMD18-T 载体均购自 TaKaRa 公司,其余试剂均为分析纯。

## 1.2 原核表达载体的构建

引物设计参照已公布的 H5N1 亚型 AIV HA 基因的核苷酸序列( GenBank 登录号 AY522332 ),并由 TaKaRa 公司合成。为了便于基因的克隆及构建表达载体等后续工作,在上、下游引物 5'端分别加入 *Bam*H I 和 *Hind* III 位点(引物中划线部分):上游引物 P1: 5'-GAGGATCCATGGAGAGAATAGTGC-3' (含 *Bam*H I 位点);下游引物 P2: 5'-TAAAGCTTGGCAATGCAAATTCTGCAT-3' (含 *Hind* III 位点)。

利用引物 P1、P2,以质粒 pMD-HA 为模板,扩增目的基因 HA1。将 PCR 产物克隆到 pMD18-T 载体中,酶切鉴定为阳性的克隆命名为 pMD-HA1 并送交大连宝生物工程有限公司进行序列测定。从 pMD-HA1 中用 *Bam*H I、*Hind* III 酶切获得 HA1 片段,克隆入 pET-32a(+)用 *Bam*H I、*Hind* III 双酶切鉴定,阳性克隆命名为 pET-HA1。

## 1.3 重组蛋白表达最佳诱导条件的确定

将鉴定为阳性的 pET-HA1/BL21 细菌培养至  $OD_{600}$  达到 0.4 ~ 0.5 时分别用终浓度为 1.0、0.8、0.7、0.5、0.4、0.3、0.1 mmol/L 的 IPTG 于 30℃ 下诱导表达 3h,取出 1mL 诱导后的细菌,12000r/min 离心 30s,弃上清,沉淀重悬于 100 $\mu$ L 1 $\times$  SDS-PAGE 凝胶电泳上样缓冲液中,100℃ 变性 5min,进行 SDS-PAGE 分析,在 10mL 培养物中加入 IPTG 至最佳诱导浓度,30℃ 振荡培养,取不同时间段(诱导表达 1、2、3、4、5h)的表达产物各 1mL 处理后进行 SDS-PAGE 分析。

## 1.4 表达产物的纯化

按照 His·Bind<sup>®</sup> Purification Kit 说明书的方法进行操作。

## 1.5 表达产物 Western blot 分析

首先对血清进行吸附。将大肠杆菌 BL21 在液体 LB 中振荡培养过夜,收集菌体超声波裂解,裂解液用来吸附鸡血清中大肠杆菌抗体。将裂解液与血清按 1:5 混合,37℃ 作用 30 ~ 45min,4℃ 10000r/min 离心 10min,取上清备用。

参考文献 [4] 介绍的方法进行 Western blot。

## 1.6 iHA-ELISA 方阵测定和 iHA-ELISA 检测方法的初步建立

iHA-ELISA 方阵测定参照文献 [5] 介绍的方法进行。根据 iHA-ELISA 方阵结果确定抗原、抗体的最适稀释度,蛋白抗原每孔包被 0.4 $\mu$ g,待检血清、

阳性血清、阴性血清作 1:200 稀释,初步建立了检测 H5 亚型 AIV 抗体的间接 ELISA 方法。

## 1.7 iHA-ELISA 方法的特异性试验

将 H5 亚型、H3 亚型、H7 亚型、H9 亚型 AIV 阳性血清和 SPF 鸡血清从 1:20 开始做倍比稀释,按常规方法利用 iHA-ELISA 进行检测,OPD 显色,重复 3 次,取平均值比较结果。

## 1.8 iHA-ELISA 与 HI 方法的比较试验

用 iHA-ELISA 和 HI 试验方法分别对 40 份 SPF 鸡血清、20 份 H5N1 亚型 AIV 标准阳性血清、156 份免疫鸡血清、586 份临床未免疫血清进行检测,比较结果。HI 试验采用农业部标准(NY/SY166-2000)H5 亚型的禽流感 HI 试验的方法,用配好的鸡红细胞悬液检测待检血清中 H5 亚型禽流感的抗体。

# 2 结果

## 2.1 重组表达载体双酶切鉴定

双酶切产物电泳后,得到一大一小两个片段,其中小片段与目的基因片段大小一致,表明重组质粒已构建成功。

## 2.2 表达产物的可溶性分析

试验证明,IPTG 终浓度为 0.8mmol/L,诱导 3h 为最佳诱导条件,SDS-PAGE 分析表明,菌体经超声波破碎、离心后,上清中仅有少许目的条带,而沉淀在 55kD 处出现一条明显的特异性蛋白条带(图 1),表明表达产物大部分以包涵体形式存在。

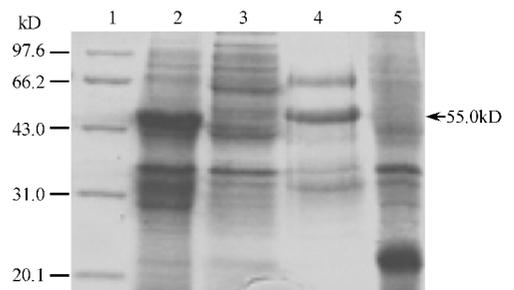


图 1 表达产物的可溶性分析

Fig.1 Solubility analysis of the expressed product by SDS-PAGE

1. Middle MW protein marker; 2. pET-HA1/BL21 induced with IPTG; 3. pET-HA1 (supernatant); 4. pET-HA1 (inclusion body); 5. pET-32a(+)BL21 induced with IPTG.

## 2.3 Western blot

对未经纯化的表达产物进行 Western blot 分析,结果与经 *E. coli* 吸附的 H5 亚型 AIV 特异性鸡抗血清呈现阳性反应(图 2),且无非特异性条带出现,证明表达产物抗原性较好。

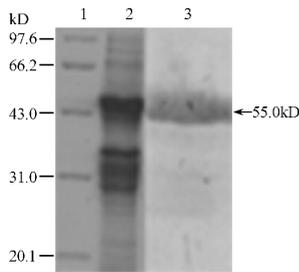


图2 表达产物的免疫印迹分析

Fig.2 Analysis of the expressed product by Western blot

1. Middle MW protein marker ;2. pET-HA1 fusion protein analysis by SDS-PAGE ;3. pET-HA1 fusion protein analysis by Western blot.

## 2.4 iHA-ELISA 方阵滴定结果

将抗原稀释成  $6.0\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 从 1 :10 开始倍比稀释后包被酶标板, 阴、阳性血清从 1 :10 开始倍比稀释, 按 ELISA 程序进行方阵滴定。将抗原稀释度定为 1 :1280 ~ 1 :2560, 血清稀释度定为 1 :200 (数据未显示), 阳性标准初步定为:  $OD_{\text{待检血清}} > 0.5$ , 且  $OD_{\text{待检血清}}/OD_{\text{阴性血清}} > 2.0$ 。为以后试验方便, 因此将抗原的最适包被浓度定为  $4.0\mu\text{g}/\text{mL}$ , 血清最适稀释度为 1 :200。

## 2.5 iHA-ELISA 特异性试验结果

利用 iHA-ELISA 检测 H3、H5、H7、H9 亚型禽流感病毒标准阳性血清, 结果显示该方法能够明显区分禽流感病毒血清亚型。H5 亚型禽流感病毒的阳性血清与 SPF 鸡血清的  $OD$  值之比远大于 2, 而其余 3 个亚型的阳性血清与 SPF 鸡血清的  $OD$  值之比小于 2。

## 2.6 iHA-ELISA 与 HI 方法的比较试验结果

如表 1 所示, 分别用这两种方法对 40 份 SPF 鸡血清进行检测, 结果均为阴性; 对 25 份 H5 亚型 AIV 阳性血清进行检测, 结果均为阳性; 156 份免疫鸡血清中有 130 份用 iHA-ELISA、HI 检测结果均为阳性, 另有 24 份血清用 iHA-ELISA 检测结果为阳性, 而用 HI 检测结果为阴性; 586 份临床未免疫

表 1 iHA-ELISA 与 HI 方法的比较试验结果

Table 1 The comparative detection of serum samples by iHA-ELISA and HI

Serum sample	Sample number	iHA-ELISA	HI
SPF chicken serum	40	0*	0
H5N1 subtype AIV positive serum	25	25	25
AIV-immunized chicken serum	156	149	130
Clinical non-immunized chicken serum	586	10	6
Total	807	159	116

\* Numbers showed were positive samples.

鸡血清中有 576 份血清用 iHA-ELISA、HI 检测结果均为阴性, 另有 5 份血清用 iHA-ELISA 检测结果为阳性, 而用 HI 检测结果为阴性; 总之对 782 份鸡血清进行检测, iHA-ELISA 与 HI 的符合率为 97.1% (774/807)。

## 3 讨论

我国自 1994 年在广东省首次发生 H9N2 亚型禽流感以来, 陆续在其它各省区有该病发生的报道, 给我国的养禽业造成了严重危害, 综合防控措施是目前进行禽流感预防和控制的最有效手段。ELISA 方法是检测禽流感病毒血清抗体的一种特异、敏感、快速的血清学诊断技术。本试验研究了重组 H5N1 亚型 AIV HA1 蛋白作为 ELISA 诊断抗原的可行性。试验从重组蛋白的表达、反应原性鉴定、蛋白的提取纯化到作为抗原包被进行 ELISA 反应, 确定了 iHA-ELISA 的最佳工作条件, 为检测 H5 亚型 AIV 抗体的间接 ELISA 方法的建立奠定了基础。

研究表明, HA 是构成病毒囊膜纤突的主要成分之一, 以三聚体形式存在于病毒囊膜表面, 在病毒吸附、穿膜及决定病毒的宿主特异性和致病力方面均起着相当关键的作用, HA 是 AIV 诱生保护性免疫的主要抗原, 它不仅诱导特异性中和抗体的产生, 而且还可以刺激机体产生细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 反应。所以, 用重组 AIV HA1 蛋白检测到的抗体代表了鸡体保护性抗体水平的高低。

重组 HA1 蛋白以包涵体的形式表达, 包涵体主要由重组蛋白构成, 这给目的蛋白纯化提供了方便。重组蛋白主要用于抗体水平的检测, 因此, 重组蛋白与 H5 亚型 AIV 抗血清的反应能力好坏就成为重组蛋白是否具有应用前景的重要依据。在 Western blot 中, 重组蛋白经过 SDS-PAGE, 再电转移转印到 NC 膜上后, 已经处于变性状态, 仍然具有与 H5 亚型 AIV 抗血清反应的能力, 这表明该重组蛋白具有很强的反应原性。众所周知, 当前我国鸡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, 能与鸡血清中的大肠杆菌抗体发生非特异性反应。在试验中, 我们直接处理表达重组蛋白的菌体进行 SDS-PAGE, 将 AIV 阳性血清用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, 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吸附待检血清中大肠杆菌抗体的方法是可行

的,这也为减少 ELISA 反应的非特异性提供了一条新思路。

在 iHA-ELISA 与 HI 方法的比较试验中,iHA-ELISA 对免疫鸡群 AIV 抗体阳性检出率和对未免疫鸡群 AIV 抗体阴性检出率均高于传统 HI 方法,证明了该方法具有较高的灵敏性和特异性。ELISA 方法检测 AIV 抗体与其他血清学诊断方法相比有许多优点:ELISA 方法速度快,对实验要求不高,不需要无菌操作,可以自动化操作,在短时间内可以检测大量样品,适于实验室血清学诊断、海关检疫及大规模疫病普查。此外,ELISA 检测法比较灵敏,而且结果也较为可靠。因此,利用基因工程方法表达的重组 HA1 蛋白作为诊断抗原建立的间接 ELISA 方法可望用于 AIV 的保护性抗体水平检测。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] 甘孟侯. 禽流感. 第二版. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [ 2 ] Zhou E M, Chan M, Heckert R G. Evaluation of a competitive ELISA for detection of antibodies against avian influenza virus nucleoprotein. *J Avian Diseases*, 1998, **42**: 517 - 522.
- [ 3 ] 薛景山. 禽流感实验室诊断方法. 中国兽医科技, 1998, **28** (9): 41 - 42.
- [ 4 ] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1996.
- [ 5 ] 巴德山. 现代免疫学实验技术. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998, 158 - 162.
- [ 6 ] 贾立军, 彭大新, 张艳梅, 等. H5 亚型禽流感重组鸡痘病毒活载体疫苗的构建及其遗传稳定性与免疫效力. 微生物学报, 2003, **43** (6): 722 - 727.
- [ 7 ] 张永国, 刘湘涛, 韩雪清, 等. 猪水泡病病毒 VP1 基因抗原区的原核表达. 微生物学报, 2003, **43** (6): 342 - 346.
- [ 8 ] Shafer Y. Development and validation of a competitive enzyme-linked antibodies in avian sera. *J Avian Diseases*, 1998, **42**: 282 - 234.

## The prokaryotic expression and the establishment of the putative indirect ELISA assay for the HA gene for Avian influenza virus ( AIV ) H5N1 subtype

ZHENG Qi-sheng<sup>1</sup> ZHANG Xiao-yong<sup>1</sup> LIU Hua-lei<sup>1</sup> LI Peng<sup>1, 2</sup> CHEN Pu-yan<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> Key Laboratory of Animal Disease Diagnosis and Immunology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

(<sup>2</sup> Animalhusband and Veterinary Station of HeBei Province, BaoDing 071000, China)

**Abstract**: Using a pair of specific primers designed according to the relevant nucleotide sequence from GenBank, The HA1 gene of H5N1 subtype AIV was amplified with PCR method. The PCR product was cloned into pET-32a(+) to get a prokaryotic recombinant plasmid pET-HA1. The target gene was successfully expressed in the host cell BL21( DE3 ) when induced with IPTG. The expression was optimized with proper inducing conditions of 0.8mmol/L IPTG and 3 hours induction. The highest expression of the target protein added up to 32.7% of the total bacterial protein. Western blot analysis proved the recombinant protein has good reactive ability against H5N1 subtype AIV positive serum. The optional working circumstances for the iHA-ELISA assay( antigenicity concentration : 4 $\mu$ g/mL, serum dilution : 1:200 ) was tried out with chess titration. The positive criterion of this ELISA assay is  $OD_{\text{the tested serum}} > 0.5$  and  $OD_{\text{the tested serum}} / OD_{\text{the negative serum}} > 2.0$ .

**Key words**: H5N1 subtype Avian Influenza Virus( AIV ), HA gene, Prokaryotic expression, iHA-ELISA

\* Corresponding author. Tel: 86-25-84396028; Fax: 86-25-84396335; E-mail: aid@njau.edu.cn

Received date: 05-18-2004

## 《病毒学报》欢迎您投稿和订阅

《病毒学报》是病毒学专业学术期刊,创刊于 1985 年,是中国科技核心期刊。主管单位是中国科学技术协会,主办单位是中国微生物学会,承办单位是中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所。

为了缩短论文的发表周期,提高科技成果交流的时效性,经过科技部批准,《病毒学报》由季刊变更注册为双月刊,从 2005 年起,每逢单月 25 日出版,每期定价为 20 元。刊登人与动物病毒、植物病毒、昆虫病毒、噬菌体、类病毒、朊病毒以及新病毒等的基础理论研究和应用研究的新成果、新进展。栏目有论著、简报、综述、信息等。所刊出的论文中,论著占 80%,其它为研究简报、综述等。

欢迎广大作者踊跃投稿!欢迎图书馆藏机构、科研和教学单位、生物技术公司以及从事病毒学、免疫学、生物学的广大读者积极订阅!

投稿及订阅咨询: Tel. 010-63536460 / 63560259; E-mail: bdx@chinajournal.net.cn

通讯地址: 100052 北京市宣武区迎新街 100 号 《病毒学报》编辑部

订阅: 全国各地邮局 邮局代号 82-227