

# 禽流感病毒 H5HA、H7HA、H9HA 亚型血凝素基因在毕赤酵母中的表达 Expression of AIV subtype H5HA、H7HA and H9HA Hemagglutinin Gene in *Pichia pastoris*

徐一鸣<sup>1</sup>, 金宁一<sup>1\*</sup>, 夏志平<sup>1</sup>, 马鸣潇<sup>1</sup>, 鲁会军<sup>1</sup>, 韩松<sup>1</sup>, 金扩世<sup>1</sup>, 梁国栋<sup>2</sup>

XU Yi-Ming<sup>1</sup>, JIN Ning-Yi<sup>1\*</sup>, XIA Zhi-Ping<sup>1</sup>, MA Ming-Xiao<sup>1</sup>, LU Hui-Jun<sup>1</sup>, HAN Song<sup>1</sup>, JIN Kuo-Shi<sup>1</sup> and LIANG Guo-Dong<sup>2</sup>

1 军事医学科学院军事兽医研究所全军基因工程重点实验室, 长春 130062

2 中国疾病预防控制中心病毒预防控制所, 北京 100052

1 The Key Genetic Engineering Lab of PLA Academy of Military Medical Sciences, Changchun 130062, China

2 Viral Prevention & Control Station of National Disease Prevention & Control Center, Beijing 100052, China

**摘 要** 利用毕赤酵母表达系统进行了禽流感病毒 H5HA、H7HA 及 H9HA 亚型血凝素基因的真核表达研究。首先将 H5HA、H7HA 及 H9HA 基因片段分别插入酵母分泌型表达载体 pPIC9K 中, 获得重组质粒 pPIC9K-H5HA、pPIC9K-H7HA 和 pPIC9K-H9HA, 再将所获重组质粒分别经 *Sac* I、*Bgl* II 及 *Sal* I 线性化后, 电转化 GS115 感受态细胞, 以插入/替换的方式进行重组, 并经 MD 平板与 MM 平板筛选, 及 PCR 鉴定, 得到重组酵母工程菌 GS115/pPIC9K-H5HA、GS115/pPIC9K-H7HA 及 GS115/pPIC9K-H9HA, 用甲醇诱导分泌表达目标蛋白。经 SDS-PAGE 和 Western-blotting 检测, 结果表明, H5HA、H7HA 及 H9HA 蛋白在毕赤酵母中均获得表达。酵母表达了上述目的蛋白, 可直接进行抗原检测, 并可用于抗体检测试剂盒及亚单位疫苗制备的辅助研究。

**关键词** 禽流感病毒, 血凝素基因, 毕赤酵母, 表达

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2006)02-0231-06

**Abstract** The expression of the hemagglutinins of Avian influenza virus H5 H7 and H9 subtypes was studied in this article by *Pichia pastoris*, one of the eukaryotic expression systems. Three reconstructed expression plasmids and engineering strains, named pPIC9K-H5HA, pPIC9K-H7HA, pPIC9K-H9HA and GS115/pPIC9K-H5HA, GS115/pPIC9K-H7HA, GS115/pPIC9K-H9HA respectively, were obtained. The reconstructed yeast engineering strains were identified by MD and MM plate selecting and PCR. The induced interest proteins were examined by SDS-PAGE and Western-blotting, the results showed that the interest genes were expressed exactly. And this will be helpful in the future study of antigen detection and antibody detection kit, as well in the subunit vaccines developing.

**Key words** AIV, HA, *Pichia pastoris*, expression

禽流感(Avian Influenza)是由 A 型流感病毒引起的一种急性高度接触性传染病, 是世界性流行病。

鸡对该病毒有较高的易感性。1997 年在香港首次发生人<sup>[1,2]</sup>感染禽流感(H5N1)<sup>[3]</sup>, 并具有比以往的

Received: August 10, 2005; Accepted: December 20, 2005.

This work was supported by a grant from the Projective Topic of National Tackle Key Problems in Science and Technology (No. 30070722).

\* Corresponding author. Tel: 86-431-6985925; E-mail: ningyij@yahoo.com.cn

“十五”国家科技攻关计划课题资助项目(No. 30070722)

流感较高的病死率。2005年我国爆发的禽流感(H5N1)已造成3人死亡及无法估计的经济损失。专家预测下次全球范围内的流感大流行极有可能起源于亚洲地区<sup>[4]</sup>。该病已被OIE定为A类传染病并被列入国际生物武器公约动物传染病名单和反生物恐怖主要内容之一,并被我国农业部《家禽家畜防疫条例》列为甲类监测传染病。因此,禽流感的防治工作迫在眉睫并具有重大意义。

禽流感病毒是属正粘病毒群,核酸型属于RNA。目前发现的禽流感病毒都属于A型流感病毒。根据禽流感血凝素(Hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(Neuraminidase, NA)的不同可分为HA亚型15个,NA亚型9个。这些抗原又以不同的组合,产生极其多样的毒株。病毒变异主要集中在病毒的血凝素和神经氨酸酶两种表面结构蛋白上,HA是病毒变异、毒力和宿主特异性的主要决定因素,也是诱导体液免疫最主要的保护性抗原<sup>[5]</sup>。H5HA、H7HA、H9HA三个亚型的禽流感病毒均已在人体内分离到,且有很高的致病性,甚至导致了感染者的死亡。由于这三段基因编码的聚合酶蛋白特异性好,亚型间无交叉保护,故多亚型的同步检测可实现快速定型,以便及时正确的免疫,具有重要的临床、流行病学及经济意义。基于以上考虑,本研究利用毕赤酵母系统表达了H5HA、H7HA、H9HA基因,可提供具有生物活性的抗原蛋白用于抗体的检测,并为禽流感病毒的抗原检测研究奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与质粒

毕赤酵母表达载体pPIC9K及毕赤酵母菌株GS115由本实验室保存。质粒pUCm-H5HA、pMD18-H7HA、pMD18-H9HA由本实验室合成并保存。

### 1.2 工具酶与生化试剂

各种限制酶、T4 DNA连接酶、牛小肠碱性磷酸酶(CIAP)、大肠杆菌DNA聚合酶I大片段(Klenow)、Taq酶、DNA Marker DL2000、 $\lambda$ -EcoT14 I digest均购自TaKaRa公司和Promega公司。碱性磷酸酶标记的羊抗鸡IgG抗体、BCIP、NBT、TEMED、巯基乙醇、等均为Promega公司和Sigma公司产品;H5HA、H7HA及H9HA标准血清购自哈尔滨兽医研究所;Pepton无游离氨基酸酵母含氮碱基YNB、Biotin、D-Sorbitol为上海生工公司产品;RNase、低分子量蛋白质Marker、琼脂糖、胰蛋白酶、酵母提取物均为华美生物工程公司产品。其余试剂均为分

析纯或生化试剂。所用引物由上海生工公司合成。

### 1.3 重组酵母表达质粒的构建

质粒pPIC9K-H5HA的构建:pUCM-TH5HA质粒由BamHI、EcoRV双酶切,经补平后回收得到目的片段;pPIC9K质粒由EcoRI线性化,两端分别补平、去磷后回收,将以上回收产物经T4连接酶连接后即获得目的质粒pPIC9K-H5HA。

质粒pPIC9K-H7HA的构建:pMD18-TH7HA质粒由SalI酶切,补平后再经EcoRI酶切,回收得到目的片段;pPIC9K质粒由SnaBI、EcoRI双酶切,去磷后回收,将以上回收产物经T4连接酶连接后即获得目的质粒pPIC9K-H7HA。

质粒pPIC9K-H9HA的构建:pMD18-TH9HA质粒由BamHI、HindIII双酶切,经补平后回收得到目的片段;pPIC9K质粒由EcoRI线性化,两端分别补平、去磷后回收,将以上回收产物经T4连接酶连接后即获得目的质粒pPIC9K-H9HA。

### 1.4 重组表达质粒转化酵母菌感受态细胞(电击法)

取80 $\mu$ L酵母菌感受态细胞分别与5~20 $\mu$ g经SacI、BglII及SalI线性化的重组表达质粒和空载体质粒混合,用加样器将样品滴加于0.2cm电转杯两电极间,冰浴5min,用ECM830电转仪于电压1500V,电容25 $\mu$ F,电阻200 $\Omega$ 条件下电转化。电击后,立即加入1mL 1mol/L冰浴冷山梨醇,混匀,取200~600 $\mu$ L菌液涂布于MD选择平板上,30 $^{\circ}$ C孵育2~3d,直至出现菌落。

### 1.5 酵母转化子营养表型筛选

将转化后的待检酵母菌,用无菌牙签同时接种于MD和MM平板上,28~30 $^{\circ}$ C培养2~4d,观察菌落的大小,挑选在MD平板上生长迅速而在MM平板上生长缓慢或不生长的酵母菌进行进一步PCR扩增鉴定。

### 1.6 酵母基因组DNA的提取(玻璃珠法)

挑取单菌落至5mL YPD液体培养基中,28~30 $^{\circ}$ C培养16h以上,12000r/min离心1min,收集沉淀,5mL ddH<sub>2</sub>O悬浮,离心,弃上清,用200 $\mu$ L Breaking buffer悬浮沉淀,加入约200 $\mu$ L 0.5mm玻璃珠和200 $\mu$ L饱和酚,振荡3min,然后12000r/min离心3min,取上清,用2.5倍体积的无水乙醇沉淀DNA,用400 $\mu$ L TE(PH8.0)溶解沉淀,加入4 $\mu$ L RNase(10mg/mL),37 $^{\circ}$ C消化25min,用等体积的氯仿:异戊醇抽提1次,将上清液400 $\mu$ L加入10 $\mu$ L 10mol/L NH<sub>4</sub>AC和1mL冰浴的无水乙醇沉淀,12000r/min离

心 10min,用 70%乙醇洗涤沉淀,吹干后用 20 $\mu$ L TE 溶解备用。

### 1.7 转化子的 PCR 鉴定

按前述酵母基因组的提取方法(玻璃珠法)提取基因组 DNA 作为模板,然后使用酵母载体上通用引物进行 PCR 反应:

通用引物:P1:5'-TACTATTGCCAGCATTGCTGC-3';P2:5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'

扩增条件为:96 $^{\circ}$ C 预先变性 300s 后,然后按 94 $^{\circ}$ C 60s,55 $^{\circ}$ C 60s,72 $^{\circ}$ C 120s 扩增 30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min,扩增后,取样进行 1%琼脂糖凝胶电泳,根据扩增片段大小对比,判断酵母染色体 DNA 中是否有 H5HA、H7HA 及 H9HA 目的基因片段的插入。

### 1.8 酵母工程菌株的甲醇诱导分泌表达

接种单个阳性菌株或甘油菌(-20 $^{\circ}$ C 保存)于 100mL YPD 培养基中,28~30 $^{\circ}$ C,250r/min 振荡培养约 16~18h,离心收菌,用 100mL BMGY 培养基重悬,28~30 $^{\circ}$ C,250r/min 摇瓶培养,使  $OD_{600}$  达到 2~6(约 16~18h),离心收取菌体,沉淀用 1/5 或 1/10 体积的 BMMY 培养基重悬,28~30 $^{\circ}$ C,250 r/min 继续振荡培养 2~6d,并于诱导表达起始后,每隔 24h 补加甲醇至总体积的 0.5%~1.0%,每隔 24h 取出 1mL 样品用于测试表达量。

### 1.9 目的蛋白的初步纯化

将酵母工程菌 GS115/pPIC9K-M-Np 按优化的表达条件进行诱导表达,培养液 4 $^{\circ}$ C 10000r/min 离心 10min,取上清液。培养上清首先分别用 10%、20%、30%饱和度的  $(NH_4)_2SO_4$  进行浓缩,浓缩产物进行 Dot-ELISA 检测,选出不使目的蛋白发生沉淀的最大硫酸铵饱和度,然后再用 55%、65%、75%和 85%饱和度的  $(NH_4)_2SO_4$  沉淀,4 $^{\circ}$ C 过夜,10000r/min 离心 10min,浓缩产物进行 Dot-ELISA 检测,选出能使目的蛋白发生沉淀的最小硫酸铵饱和度。

### 1.10 外源基因表达产物的 SDS-PAGE 分析

将工程酵母菌在 BMMY 培养基中培养一定时间后,离心将培养基上清用硫酸铵沉淀法初步纯化后,用 2 倍 Loading buffer 与初步纯化后的蛋白等量混合一起进行 SDS-PAGE,分析目的蛋白的表达。

### 1.11 蛋白印迹(Western blotting)检测

将 SDS-PAGE 的电泳产物转移至硝酸纤维素膜上,用 5%的脱脂乳封闭。分别用 H5HA、H7HA 和 H9HA 的标准血清抗体作为一抗,以碱性磷酸酶标记的羊抗鸡 IgG 作为二抗,经 BCIP/NBT 配制成底物

显色液显色,观察特异性条带。

### 1.12 表达条件的优化

根据毕赤酵母诱导表达时的特点,通过不同的溶解氧(95%、85%、75%、65%、55%)、培养时间(2d、3d、4d、5d)、甲醇浓度(0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%)、转瓶转数(100、150、200、250)和 pH 值(3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0)来优化表达条件。

注:溶解氧可粗略用(摇瓶容积-培养液体积)/摇瓶容积的比值来表示。

### 1.13 间接酶联免疫吸附试验(间接 ELISA)

依据中华人民共和国国家标准(GB/T18936-2003)《高致病性禽流感诊断技术》中间接酶联免疫吸附试验方法,对所表达抗原进行测定。过程如下:除 A1、B1、C1 和 D1 孔不加样品,留做空白调零,pPIC9K 空载体表达产物和 H5HA、H7HA 和 H9HA 标准抗原分别作为阴性对照和阳性对照外,其余孔取 1:400 稀释的被检蛋白(即将初步纯化后的 H5HA、H7HA 和 H9HA 抗原蛋白进行 400 倍稀释进行检测),每孔 100 $\mu$ L 包被板,将加样位置做好记录。倒掉孔内包被液,用 PBS 洗 3 次。相应加入 H5HA、H7HA 和 H9HA 标准血清,将反应板盖好盖子后置 37 $^{\circ}$ C 环境下作用 30min。倒掉孔内液体,在吸水纸上空干,每孔加满洗液,静置 1~2min 后倒掉,空干,再重复洗 2 次。除 A1、B1、C1 和 D1 孔外,其他每孔加碱性磷酸酶标记的抗鸡二抗 100 $\mu$ L,盖好盖子后置 37 $^{\circ}$ C 环境下作用 30min。用上述同样的方法再洗涤 3 次,加入底物使用液(碱性磷酸酶缓冲液中加入 BCIP/NBT 混合液),每孔 90 $\mu$ L,置室温避光显色 2~3min,加入中止液(浓硫酸 11.1mL + 蒸馏水 88.9mL),每孔 90 $\mu$ L,使其终止反应。用酶标仪测定每个孔在 490nm 波长的光密度值(即  $OD_{490}$  值), $OD \geq 0.2$  者判定为阳性, $0.18 \leq OD < 0.2$  需重复测试 1 次,若仍在此范围则判为阳性, $OD < 0.18$  者判定为阴性。

### 1.14 目的蛋白含量测定

1.14.1 目的蛋白绝对含量测定:采用分光光度法,分别测定样品在  $OD_{260}$ 、 $OD_{280}$  下的紫外吸收值,然后根据公式[蛋白浓度(mg/mL) =  $1.45 \times OD_{280} - 0.74 \times OD_{260}$ ]计算蛋白含量。

1.14.2 目的蛋白相对含量测定:分别取 30 $\mu$ L H5HA、H7HA 和 H9HA 初步纯化的抗原进行 SDS-PAGE。经考马斯亮蓝 R250 染色,脱色干燥后,用 CS-9000 型薄层扫描仪(日本岛津)测定其 560nm 波长下的吸收值,测定表达蛋白的相对含量。

## 2 结果

### 2.1 重组质粒的鉴定

**2.1.1 重组质粒 pPIC9K-H5HA 的鉴定:** 重组质粒 pPIC9K-H5HA 经 *Kpn* I 单酶切后, 正向连接出现 8800、1600、612 三条带, 反向连接出现 8300、2100、612 三条带; 经 *Sac* I 单酶切后, 正向连接出现 9000、2000 两条带, 反向连接出现 9500、1500 两条带; 经 *Sal* I、*Not* I 单酶切后线性化。鉴定结果见图 1。

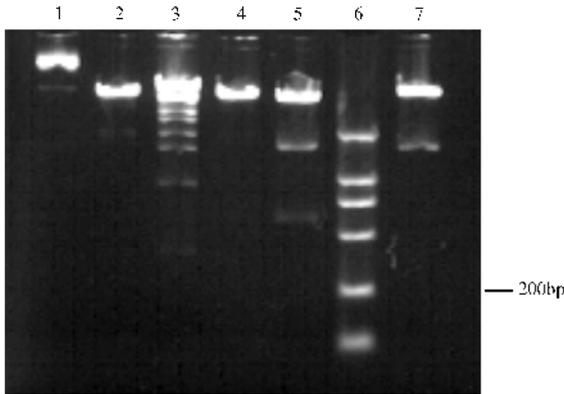


图 1 重组质粒 pPIC9K-H5HA 酶切鉴定图谱

Fig.1 Enzyme digestion profile of recombinant plasmid pPIC9K-H5HA

1: Plasmid pPIC9K-H5HA; 2: *Sal* I; 3: DNA marker  $\lambda$ EcoT 14; 4: *Not* I; 5: *Kpn* I; 6: DNA marker DL2000; 7: *Sac* I.

**2.1.2 重组质粒 pPIC9K-H7HA 的鉴定:** 重组质粒 pPIC9K-H7HA 经 *Bam* H I 单酶切后, 出现 9070、1930 两条带; 经 *Bgl* II 单酶切后出现 8600、2403 两条带。鉴定结果见图 2。

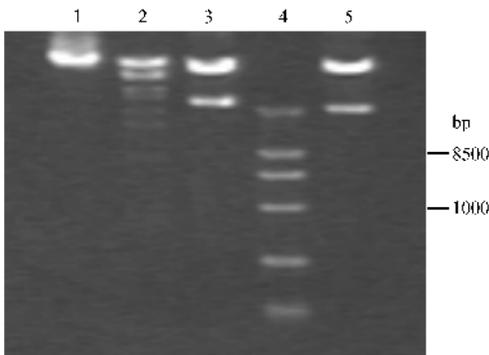


图 2 重组质粒 pPIC9K-H7HA 酶切鉴定图谱

Fig.2 Enzyme digestion profile of recombinant plasmid pPIC9K-H7HA

1: plasmid pPIC9K-H7HA; 2: DNA Marker  $\lambda$ EcoT 14; 3: *Bgl* II; 4: DNA Marker DL2000; 5: *Bam*H I.

**2.1.3 重组质粒 pPIC9K-H9HA 的鉴定:** 重组质粒 pPIC9K-H9HA 经 *Xba* I 单酶切后, 正向连接出现

8500、2310、220 三条带; 反向连接出现 10000、820、220 三条带。目的质粒经 *Sac* I 单酶切后线性化。鉴定结果见图 3。

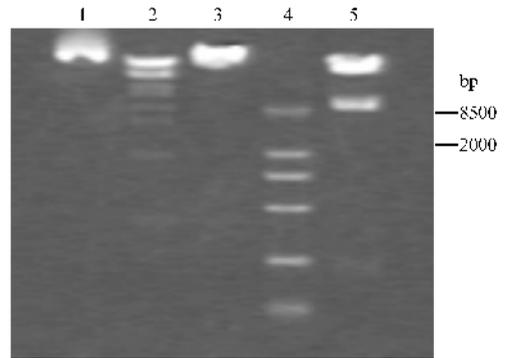


图 3 重组质粒 pPIC9K-H9HA 酶切鉴定图谱

Fig.3 Enzyme digestion profile of recombinant plasmid pPIC9K-H9HA

1: plasmid pPIC9K-H9HA; 2: DNA marker  $\lambda$ EcoT 14; 3: *Sac* I; 4: DNA marker DL2000; 5: *Xba* I.

### 2.2 酵母转化子的 PCR 鉴定

由通用引物 PCR 扩增结果可见, GS115/pPIC9K-H5HA 转化子扩增出 1.9kb 大小的带, 正好与目的基因 H5HA 加分泌信号(1.70kb + 198bp)的大小相当; GS115/pPIC9K-H7HA 转化子扩增出 1.9kb 大小的带, 正好与目的基因 H7HA 加分泌信号(1.68kb + 198bp)的大小相当; GS115/pPIC9K-H9HA 转化子扩增出 1.9kb 大小的带, 正好与目的基因 H9HA 加分泌信号(1.7kb + 198bp)的大小相当。证明我们的各目的基因已整合入酵母基因组中。鉴定结果见图 4。

### 2.3 表达产物的 SDS-PAGE 分析

将经筛选的转化子分别接种 BMGY 和 BMMY 培养基诱导表达后, 表达上清用 70% 硫酸铵沉淀, 取沉淀溶于原 1/10 体积的 PBS(pH7.4)中, 取样进行 SDS-PAGE, 从其结果可以看出, GS115/pPIC9K-H5HA 转化子诱导产物在 62.0kD 处出现与预计大小相符条带; GS115/pPIC9K-H7HA 转化子诱导产物在 61.8kD 处出现与预计大小相符条带; GS115/pPIC9K-H9HA 转化子诱导产物在 62.0kD 处出现与预计大小相符条带。鉴定结果见图 5(a~c)。

### 2.4 表达条件的优化

用培养上清的 ELISA 检测  $OD_{492}$  值和溶解氧、培养时间、甲醇浓度、转瓶转数和 pH 值的关系来优化表达条件。最终确定目标蛋白最佳表达条件是大于 80% 的溶解氧、1% 甲醇诱导、培养 4d、摇瓶转速大于 200r/min、培养基 pH 值为 6.0。在最佳表达条件

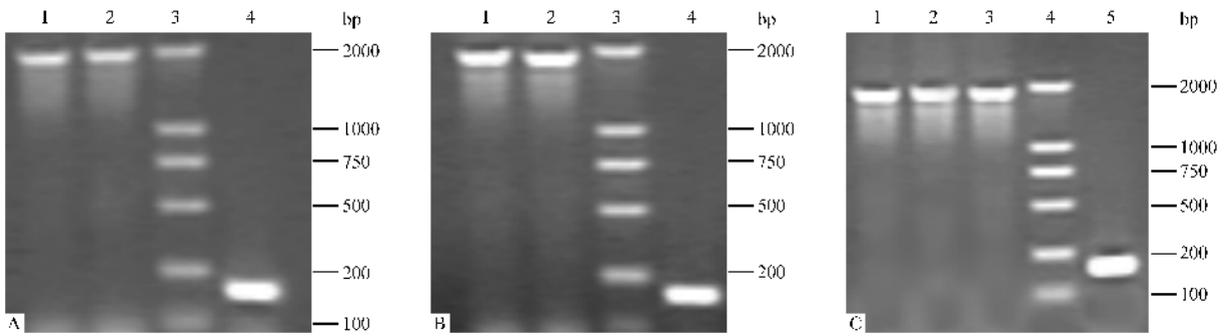


图4 H5HA、H7HA、H9HA 重组转化子 PCR 鉴定图

Fig. 4 PCR Identification of yeast recombinants of H5HA, H7HA and H9HA

A : 1, 2 : GS115/pPIC9K-H5HA ; 3 : DNA Marker DL2000 ; 4 : GS115/pPIC9K ; B : 1, 2 : GS115/pPIC9K-H7HA ; 3 : DNA Marker DL2000 ; 4 : GS115/pPIC9K ; C : 1-3 : GS115/pPIC9K-H9HA ; 4 : DNA Marker DL2000 ; 5 : GS115/pPIC9K.

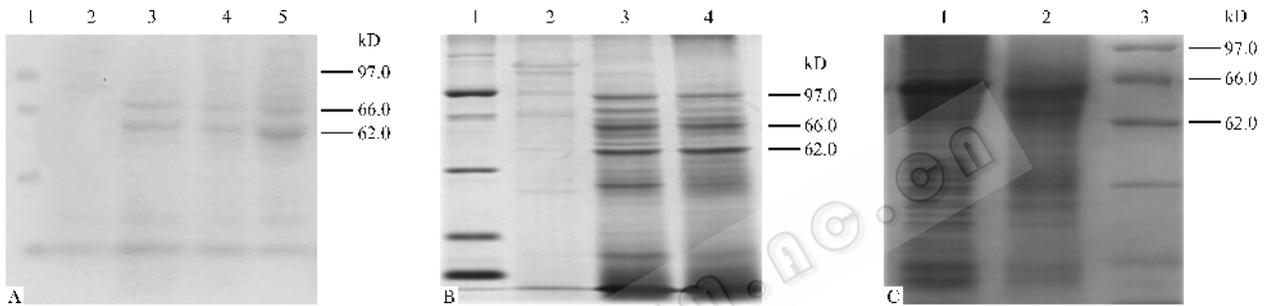


图5 H5HA、H7HA、H9HA 酵母转化子表达上清 SDS-PAGE 分析图

Fig. 5 SDS-PAGE of the expressed H5HA, H7HA, H9HA from cultural supernatant of GS115/pPIC9K-H5HA, GS115/pPIC9K-H7HA and GS115/pPIC9K-H9HA

A : 1 : Marker ; 2 : GS115/pPIC9K ; 3-10 : GS115/pPIC9K-H5HA ; B : 1 : Marker ; 2 : GS115/pPIC9K ; 3-4 : GS115/pPIC9K-H7HA ; C : 1 : GS115/pPIC9K-H9HA ; 2 : GS115/pPIC9K ; 3 : Marker.

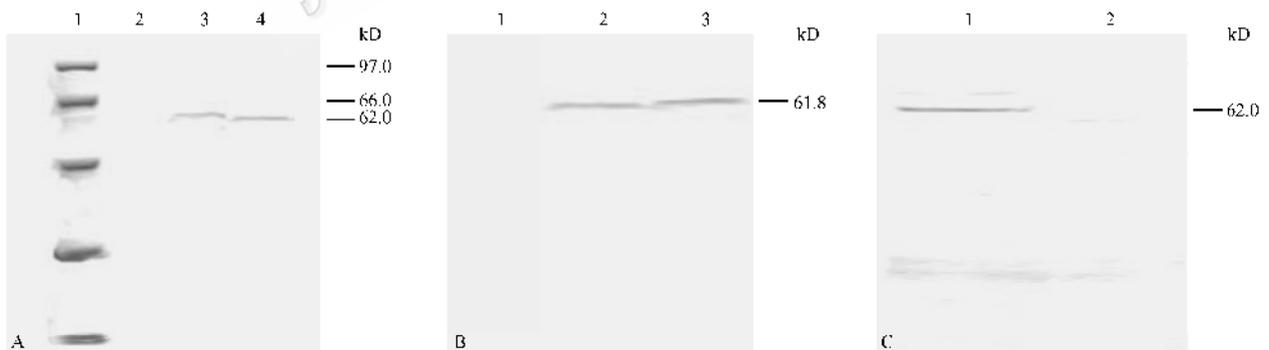


图6 酵母转化子表达产物的 Western blot 分析图

Fig. 6 Western blot for products of GS115/pPIC9K-H5HA, GS115/pPIC9K-H7HA and GS115/pPIC9K-H9HA

A : 1 : Marker ; 2 : GS115/pPIC9K ; 3, 4 : GS115/pPIC9K-H5HA ; B : 1 : GS115/pPIC9K ; 2, 3 : GS115/pPIC9K-H7HA ; C : 1 : GS115/pPIC9K-H9HA ; 2 : GS115/pPIC9K.

下,目的蛋白产量可提高 1.8~2.5 倍以上。

## 2.5 目的蛋白含量测定结果

SDS-PAGE 分析后,利用薄层扫描于 560nm 分别测定各目的蛋白在菌体总蛋白中的相对含量,得到如下结果:H5HA、H7HA 及 H9HA 目的蛋白分别占

菌体总蛋白的 18%、18.5% 和 17%,即每升菌液可表达目的蛋白分别约为 47.9mg、51.5mg 和 44.5mg。

## 2.6 表达产物的蛋白印迹(Western blot)检测

对诱导表达产物进行蛋白印迹分析。SDS-PAGE 电泳、转膜后,分别与一抗和二抗反应。显色

结果表明,表达的产物具有特异性,分别能与抗 AIV H5HA、H7HA 及 H9HA 标准血清抗体发生特异反应,所出带位置大约在 62kD 处,与目标蛋白大小相当,说明目标蛋白均获得完好表达。鉴定结果见图 6(A~B)。

## 2.7 间接 ELISA 实验结果

经 ELISA 检测,GS115/pPIC9K-H5HA、GS115/pPIC9K-H7HA 及 GS115/pPIC9K-H9HA 表达产物测定值  $OD_{490} \geq 0.2$ ,可判定为阳性;GS115/pPIC9K 表达产物测定值  $OD_{490} < 0.18$ ,可判定为阴性。证明所制备抗原蛋白具良好生物活性,分别能特异地中和 H9HA、H9HA 及 H9HA 抗体(表 1)。

表 1 间接 ELISA 实验结果  
Table 1 experimental result of ELISA

Detected sample	$OD_{490}$		
PBS	0.05	0.06	0.08
GS115/pPIC9K	0.10	0.13	0.11
GS115/pPIC9K-H5HA	1.58	1.62	1.44
GS115/pPIC9K-H7HA	1.67	1.72	1.53
GS115/pPIC9K-H9HA	1.38	1.46	1.41

## 3 讨论

毕赤酵母为甲醇营养型酵母,该表达系统使用的乙醇氧化酶基因(AOX1)启动子为强诱导启动子,在  $P_{AOX1}$  启动子控制下的外源基因表达水平高且便于调控,重组株可按需要在诱导前高密度生长,加入甲醇诱导后能高水平表达。毕赤酵母分泌型表达的优点是简化了后续纯化过程,并且伴随分泌表达进程能进行蛋白质的正确加工、二硫键的重建、蛋白质的正确折叠、糖基化修饰等,产生具有天然生物活性的蛋白产物,无需复性。此外,它还具有营养要求低、表达量高、操作简便、细胞生长速度快、非致病性、安全性等特点,并能大规模发酵生产。本研究采用酵母分泌型表达载体 pPIC9K 构建的酵母工程菌 GS115/pPIC9K-H5HA、GS115/pPIC9K-H7HA 和 GS115/pPIC9K-H9HA 经甲醇诱导后,分别可表达分子量为 62.0kD、61.8kD 和 62.0kD 的目的蛋白,与预计大小相符。在大于 80% 的溶解氧、1% 甲醇诱导、培养 96h、摇瓶转速大于 200r/min、培养基 pH 值为 6.0 的条件下,表达量分别达到 47.9mg/L、51.5mg/L 和 44.5mg/L。既能为 AIV 抗体检测提供具有生物活性的抗原蛋白,又可实现工业化大规模生产,体现出较好的前景。

随着生物学技术的迅速发展和国际市场的需要,诊断和检测技术需要更加敏感、快速且特异性强。传统 AIV 诊断方法主要有病毒分离培养和血清学诊断(如琼脂扩散实验、间接血凝抑制实验及病毒中和实验),但这些方法操作烦琐、诊断时间长、结果重复性不好,因此人们正在努力研制一种广泛使用的、特异性强、敏感性高的 ELISA 检测方法来鉴别诊断禽流感。1993 年 Kodihalli 等<sup>[6]</sup>建立了双抗夹心-ELISA(DAS-ELISA)。ELISA 已成为 AIV 流行病学普查及早期快速诊断的最有效和最实用的方法,也是当前应用最广泛的一种免疫测定方法。目前由于 AIV 全病毒作为包被抗原建立的 ELISA 方法存在生物安全性问题,应用 AIV 型特异性蛋白及其单抗建立 ELISA 方法成为了研究的热点。本实验选用禽流感病毒高度保守且具有高致病性的 A 型禽流感病毒 H5、H7 和 H9 亚型基因,并利用廉价且产量高的毕赤酵母表达系统制备了大量的 H5HA、H7HA 和 H9HA 蛋白,利用所获抗原蛋白研制 ELISA 试剂盒可快速准确地同时检测出高发、高致病性的所有 H5HA、H7HA 及 H9HA 亚型 AIV,捕捉面广且针对性强。不但有着重要的临床、流行病学和经济意义而且具有重要的公共卫生意义及实用价值。另外,至今国内外至今未见报导利用毕赤酵母系统表达高致病性禽流感病毒亚型基因,故本研究为研制禽流感病毒亚型 ELISA 诊断试剂盒打下坚实的基础。

## REFERENCES(参考文献)

- [1] Guan Y, Shortridge KF, Krauss S *et al.* Molecular characterization of H9N2 influenza viruses: were they the donors of the "interal" genes of H5N1 viruses in Hong Kong. *Proc. Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**(16): 9363-9367
- [2] Subbarao K, Katz J *et al.* Avian influenza viruses infecting humans. *Cell Mol Life Sci*, 2000, **57**(12): 1770-1784
- [3] Subbarao K, Klimov A, Katz J *et al.* Characterization of an avian influenza A(H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science*, 1998, **279**(5349): 393-396
- [4] Kdahl K, Penttinen P, Temhag A, Linde A, *et al.* Avian influenza—next global infection threat from Asia. *Lakartidningen*, 2004, **10**(8): 683-685.
- [5] Webster RG, Rott R. Influenza virus A pathogenicity: the pivotal role of haemagglutinin. *Cell*, 1987, **50**(5): 665-666
- [6] Kodihalli S, Sivanandan V, Nagaraja KV *et al.* Antigen-capture enzyme immunoassay for detection of avian influenza virus in turkeys. *AM J Vet Res*, 1993, **54**(9): 1385-1390