

新城疫病毒 HN 蛋白在水稻中的表达及半定量快速检测抗体方法的建立

张申立^{1,2}, 许倩茹⁴, 杨继飞³, 李青梅³, 孙亚宁³, 李雪洋^{1,2}, 王雅楠⁵, 牛香香^{1,2}, 屈小天^{1,2}, 陈金炫^{1,2}, 张二芹^{1,2}, 张改平^{1,2,3}

- 1 河南农业大学 国家动物免疫学国际联合研究中心, 河南 郑州 450046
- 2 河南农业大学 动物医学院, 河南 郑州 450046
- 3 河南省农业科学院 动物免疫学重点实验室, 河南 郑州 450002
- 4 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100
- 5 吉林大学 动物医学院, 吉林 长春 130062

张申立, 许倩茹, 杨继飞, 李青梅, 孙亚宁, 李雪洋, 王雅楠, 牛香香, 屈小天, 陈金炫, 张二芹, 张改平. 新城疫病毒 HN 蛋白在水稻中的表达及半定量快速检测抗体方法的建立. 生物工程学报, 2022, 38(5): 1981-1993.

ZHANG SL, XU QR, YANG JF, LI QM, SUN YN, LI XY, WANG YN, NIU XX, QU XT, CHEN JX, ZHANG EQ, ZHANG GP. Expression of NDV HN protein in rice and development of a semi-quantitative rapid method for detection of antibodies. Chin J Biotech, 2022, 38(5): 1981-1993.

摘要: 本研究旨在利用水稻胚乳生物反应器表达新城疫病毒 (Newcastle disease virus, NDV) HN 蛋白, 建立一种 NDV 抗体半定量、快速免疫层析检测方法。通过 *Mly* I 和 *Xho* I 双酶切重组质粒 pUC57-HN, *Nae* I 和 *Xho* I 双酶切包含有启动子、信号肽和终止子的 pMP3 中间载体, 分别回收 HN 和 pMP3 片段并进行连接, 构成重组质粒 pMP3-HN1。然后利用 *Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切 pMP3-HN1 和植物载体 pCAMBIA1300, 将 HN1 基因成功连接到 pCAMBIA1300 上, 采用电转化方法将重组质粒 pCAMBIA1300-HN1 导入根癌农杆菌 EHA105。通过农杆菌介导法将 pCAMBIA1300-HN1 转入水稻愈伤组织。经过暗培养、愈伤筛选、分化、生根和移栽, 4 个月后获得转基因水稻种子。经 PCR 鉴定, HN 基因已插入到水稻基因组中。SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定结果表明, 水稻胚乳成功表达了 HN 蛋白, 且该蛋白通过 SP 阳离子层析和凝胶过滤层析, 其纯度达到 90% 以上。根据国家制定的新城疫血凝抑制 (hemagglutination inhibition, HI) 试验诊断技术标准 ($HI \geq 4\log_2$, 检测的抗体为阳性), 利用胶体金标记 HN 蛋白, 通过双抗夹心法制备 NDV

Received: August 20, 2021; **Accepted:** November 18, 2021; **Published online:** December 8, 2021

Supported by: The Major Project to Breed New Genetically Modified Organisms, China (2016ZX08001006-10); University Level Project of Henan Agricultural University, China (30601543)

Corresponding authors: ZHANG Erqin. Tel: +86-371-56990151; E-mail: zhangerqin76@163.com

ZHANG Gaiping. E-mail: zhanggaiping2003@163.com

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项 (2016ZX08001006-10); 河南农业大学校级项目 (30601543)

抗体半定量快速检测试纸。结果显示：试纸与其他病毒的阳性血清无交叉反应，且试纸对新城疫标准阳性血清的敏感性可达到 1 : 102 400。根据 308 份临床血清的检测结果，NDV 抗体试纸与 HI 试验的符合率为 97.08%，Kappa 值为 0.942。综上所述，获得了高纯度水稻胚乳表达的重组 HN 蛋白，并研制了一种简单、快速、灵敏度高、特异性强的半定量免疫层析试纸。该试纸能够初步应用于新城疫疫苗的免疫评价。

关键词：新城疫；HN 蛋白；胶体金；半定量试纸条

Expression of NDV HN protein in rice and development of a semi-quantitative rapid method for detection of antibodies

ZHANG Shenli^{1,2}, XU Qianru⁴, YANG Jifei³, LI Qingmei³, SUN Yaning³, LI Xueyang^{1,2}, WANG Yanan⁵, NIU Xiangxiang^{1,2}, QU Xiaotian^{1,2}, CHEN Jinxuan^{1,2}, ZHANG Erqin^{1,2}, ZHANG Gaiping^{1,2,3}

1 International Joint Research Center of National Animal Immunology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, Henan, China

2 College of Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, Henan, China

3 Key Laboratory of Animal Immunology, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, Henan, China

4 College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

5 College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, Jilin, China

Abstract: The aim of this study was to develop a semi-quantitative immunochromatographic method for rapid detection of Newcastle disease virus (NDV) antibodies by expressing HN protein in rice endosperm bioreactor. The recombinant plasmid pUC57-HN was digested by *Mly* I and *Xho* I to retrieve the HN gene, while the intermediate vector pMP3 containing promoter, signal peptide and terminator was digested by *Nae* I and *Xho* I. The HN gene and the linearized pMP3 were purified and ligated to form a recombinant plasmid pMP3-HN1. Subsequently, pMP3-HN1 and plant vector pCAMBIA1300 were digested by *Eco*R I and *Hind* III, and the HN1 gene was cloned into pCAMBIA1300. The recombinant plasmid pCAMBIA1300-HN1 was introduced into *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 by electrotransformation, and the pCAMBIA1300-HN1 was transferred into rice callus by agrobacterium-mediated method. After dark culture, callus screening, differentiation, rooting and transplanting, transgenic rice seeds were obtained 4 months later. PCR identified that the HN gene has been inserted into the rice genome. SDS-PAGE and Western blotting indicated that the HN protein was successfully expressed in the positive rice endosperm. The purity of the HN protein was more than 90% by SP cation exchange chromatography and gel filtration chromatography. According to the national standards for the diagnostic techniques of Newcastle disease HI test ($HI \geq 4 \log_2$, positive antibody reaction), a colloidal gold labeled purified HN protein was used to prepare a semi-quantitative test strip by double-antibody sandwich method for rapid detection of NDV antibody. The results showed that the test strip did not cross-react with positive sera against other viruses, and the sensitivity of the test strip reached 1:102 400 for standard positive sera of Newcastle disease. Testing of a total of 308 clinical

sera showed that the compliance rate of the test strip with HI test was 97.08%, and the Kappa value was 0.942. In conclusion, high purity recombinant HN protein was obtained from rice endosperm, and a simple, rapid, highly sensitive and highly specific semi-quantitative immunochromatographic strip was developed. The test strip could be used for immune evaluation of the Newcastle disease vaccine.

Keywords: Newcastle disease; HN protein; colloidal gold; semi-quantitative test strip

新城疫^[1-4]是由新城疫病毒引起禽类的一种急性、致死性、高传染性的动物传染病。其主要特征为呼吸困难、神经紊乱、黏膜和浆膜出血、死亡率高^[5], 同时也感染多种鸟类^[6-9]。牧翔禽病研究院统计数据显示: 2021年8月份新城疫的发病率为2.92%, 该病对养禽业的发展具有重要影响。新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)^[10]属于副粘病毒科、副粘病毒亚科的禽腮腺炎病毒属。病毒为单股负链RNA病毒, NDV的基因组为不分节段, 大小约15 kb, 依次编码6种结构蛋白: 核衣壳蛋白(NP)、磷蛋白(P)、基质蛋白(M)、融合蛋白(F)、血凝素-神经氨酸酶蛋白(HN)和大分子蛋白(L)。其中HN糖蛋白产生的抗体能够完全中和NDV。HN蛋白作为靶抗原, 已在多种系统中表达, 有的验证了其免疫保护效果^[11-13]。由于传统上药用蛋白的商业化生产依赖于细菌和酵母发酵或哺乳动物细胞生产, 然而这些表达系统的生产成本、可扩展性、安全性和蛋白活性等限制促使人们研究替代平台。分子农业生物制药的发展, 将植物的分子农业作为生产复杂药用蛋白的一个有前途的平台。基于植物的重组蛋白生产平台比传统表达系统具有显著优势, 其中包括无动物病原体、生产成本低、易储存、蛋白活性高以及可扩展性^[14-15]。

疫苗是预防和控制禽类新城疫流行的重要手段^[16-17]。为了监测疫苗接种鸡群产生的免疫保护反应, 最常用的抗体检测方法^[17-21]有血凝抑制试验(hemagglutination inhibition test, HI)、酶

联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、荧光抗体技术(immunofluorescence technique, IFA)和琼脂凝胶免疫扩散试验(agar gel immunodiffusion, AGID), 这些方法具有较高的特异性和准确性。然而它们需要熟练的专业技术人员或常用的仪器设备, 限制了这些方法的大面积推广应用。因此需要一种简单而快速的方法来监控鸡群新城疫抗体免疫保护水平, 胶体金免疫层析试纸能满足这些需求^[22]。在过去的几十年中, 胶体金试纸已广泛用于各种领域, 如非法药物残留的检测、食品的检测和人类与动物疾病的诊断^[23-25]。本研究基于国家新城疫诊断技术标准, 利用水稻胚乳反应器表达重组HN蛋白, 以胶体金标记重组HN蛋白制备半定量检测新城疫病毒抗体的试纸, 用来评估新城疫疫苗的免疫保护能力。

1 材料与方法

1.1 试验材料

Protein G柱、阳离子SP填料和75 μg凝胶过滤纯化柱购自GE公司; *Mly* I、*Xho* I、*Nae* I、*Eco*R I和*Hind* III内切酶购自NEB公司; pUC57-HN由南京金斯瑞生物科技有限公司合成; 载体pMP3和植物表达载体pCAMBIA1300、EHA105农杆菌感受态和TP309水稻种子由武汉禾元生物科技股份有限公司提供; 兔抗鸡抗体、新城疫A-VII灭活疫苗阳性血清、LaSota新城疫灭活疫苗阳性血清、H5N1亚型禽流感病毒和H9N2亚型禽流感病

毒标准阳性血清保存于国家动物免疫学国际联合研究中心; HN 单克隆抗体、传染性法氏囊和日立克标准阳性血清由河南省农业科学院动物免疫学重点实验室提供。308 份鸡临床血清采自许昌某鸡场, 通过商品灭活疫苗制备免疫鸡。

1.2 重组 pMP3-HN 和 pCAMBIA1300-HN1 载体的构建

Mly I 和 *Xho* I 双酶切重组质粒 pUC57-HN, 同时用 *Nae* I 和 *Xho* I 酶切 pMP3 中间载体, 分别回收 HN 和 pMP3 片段, 用 T4 DNA 连接酶连接 HN 与 pMP3, 转化 DH5 α 菌, 挑白斑菌落, 液体培养, 提取重组质粒 pMP3-HN, 用 *Eco*R I 和 *Hind* III 酶切和测序鉴定, 并回收 HN1 (包括启动子、信号肽、HN 和终止子) 片段。用同样的体系酶切 pCAMBIA1300, 连接 HN1 与 pCAMBIA1300, 转化 DH5 α 菌, 提取重组质粒 pCAMBIA1300-HN, 用 *Eco*R I 和 *Hind* III 酶切和测序鉴定。最后用电击法将重组质粒 pCAMBIA1300-HN 转化到 EHA105 农杆菌中。

1.3 HN 基因水稻遗传转化

水稻遗传转化方法概述^[26-29]: 挑选饱满的 TP309 水稻种子, 经过消毒、无菌水冲洗 3-5 次, 在滤纸上干燥后, 铺在 N6 培养基上生长, 8 d 后用镊子取在胚乳处生长的愈伤组织, 用根癌农杆菌 EHA105 侵染愈伤组织, 然后在 N6 培养基上暗培养 3 d, 用无菌水洗 3-5 次, 每次 5 min, 然后用含 500 μ g/mL 头孢霉素的无菌水洗 3-5 次, 每次 5 min, 在滤纸上干燥后, 铺在含 50 μ g/mL 潮霉素的 N6 培养基上培养 30 d, 筛选的新愈伤组织转到 MS 培养基上进行分化, 30 d 后分化的苗转到 MS 生根培养基上生根。

1.4 阳性植株的筛选

取每株水稻叶片, 利用十六烷基三甲基溴化铵 (hexadecyl trimethyl ammonium bromide, CTAB) 法提取叶片组织 DNA, 进行 PCR 鉴

定, 引物如表 1 所示。PCR 反应体系 (25 μ L): 10 \times rTaq 聚合酶缓冲液 2.5 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 0.5 μ L, rTaq 聚合酶 0.2 μ L, HN-F 0.5 μ L, HN-R 0.5 μ L, 植物 DNA 1.8 μ L, H₂O 19 μ L。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 10 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 54 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。最后将筛选的阳性植株种植到大田中, 4 个月后收获种子。

1.5 重组 HN 蛋白鉴定

每个植株的种子脱壳、切成半粒, 胚乳部分留下做种用, 剩下部分磨成粉末, 加入提取液 30 mmol/L Tris-HCl pH 8.5, 室温下溶解 1 h, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 用 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定重组 HN 蛋白。操作过程如下: 蛋白样品和 5 \times SDS-PAGE 上样缓冲液以 4:1 的比例加入 EP 管中, 并在水浴锅中 100 $^{\circ}$ C 煮沸 10 min。离心后取 30 μ L 样品上样, 120 V 电压电泳 1.5 h, 电泳结束后, 其中一块蛋白胶用考马斯亮蓝染色; 另一块蛋白胶块转移至聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 上, 用 Bio-Rad 转膜仪转膜, 15 V 电压转膜 1.5 h 后, PVDF 膜放入 5% 脱脂奶中 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h, 加入 HN 鼠单抗 (5% 脱脂奶 1:1 000), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 孵育结束后用 PBST 溶液洗膜 3 次, 每次 5 min。然后加入辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的羊抗鼠二抗 (5% 脱脂奶 1:1 000), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 然后用 PBST 溶液洗膜 3 次, 每次 5 min。最后加入 ECL 显色液, 用凝胶成像系统 (Vilber Lourmat, 法国) 进行显色。

表 1 HN 基因引物序列

Table 1 HN gene primer sequence

Prime name	Sequence (5'→3')
HN-F	CACATCCATCATTATCCATCCACC
HN-R	GAAGTTGAGGTGCTCCTGGTAG

1.6 重组 HN 蛋白的纯化

取 HN 水稻种子粉末,按照 1:6 (*W/V*) 的比例加入 PB 缓冲液 (25 mmol/L PB, pH 5.7), 室温下溶解 1 h,离心取上清 (HN 蛋白提取物)。利用 AKTA 蛋白纯化仪 (AKTA pure 25 M1, 美国 GE), 将 HN 提取物上样至带有 PB 缓冲液的 SP 纯化柱中,并用洗脱液 (25 mmol/L PB、1 mol/L NaCl, pH 5.7) 分步洗脱 HN 蛋白。富集的 HN 蛋白上样至 75 μ g 凝胶过滤纯化柱纯化,浓缩 HN 蛋白,用 SDS-PAGE 鉴定纯度,送至上海生工进行质谱分析。

1.7 HN 蛋白的鼠单抗腹水的制备与纯化

复苏冻存的杂交瘤细胞,加入含有 10%胎牛血清的 1640 培养基进行培养,待细胞长满后,用 PBS 缓冲液重悬于 15 mL 离心管中,1 000 r/min 离心 10 min,弃上清,用 1 mL PBS 缓冲液重悬细胞,将其注射到打过石蜡的 BALB/c 小鼠腹腔内,每只注射 500 μ L,每隔 2 d 观察一次,选腹部明显隆起的小鼠,抽取腹水 (动物试验获得河南农业科学院动物免疫学重点实验室伦理审查委员会批准,批准文号:LLSC410107)。4 $^{\circ}$ C、4 000 r/min 离心 10 min,取上清,用 HiTrap protein G HP 亲和柱纯化 HN 单抗,最后用 SDS-PAGE 鉴定单抗纯度。

1.8 半定量免疫层析试纸制备

1.8.1 胶体金的制备

利用柠檬酸三钠还原法制备胶体金^[22]。取 100 mL 超纯水加到 500 mL 烧杯中,加 1 mL 10 g/L 氯金酸,加热煮沸,然后迅速加入 1.6 mL 10 g/L 柠檬酸三钠,持续煮沸。当溶液变成透明的紫红色溶液时,停止加热。室温冷却后用 0.1 mol/L K_2CO_3 溶液调至 pH 8.8,室温避光保存,最后利用紫外分光光度计测量胶体金粒径。

1.8.2 金标记 HN 蛋白量及胶体金标记蛋白

HN 蛋白用纯水倍比稀释 5 个浓度梯度,分别为 0.700、0.350、0.175、0.085 和 0.043 mg/mL。

每孔各加入 125 μ L 胶体金溶液和 125 μ L 10% NaCl 溶液,混合后静置 10 min,选择胶体金颜色始终为紫红色的为 HN 蛋白最佳标记量。金标记 HN 蛋白量确定后,取 1 支 2 mL 无菌 EP 管,加入 HN 蛋白溶液,其次加入 1 mL 胶体金溶液混匀,室温放置 30 min,然后加入 5%酪蛋白封闭 10 min,4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 20 min,弃上清,沉淀中加入 100 μ L 2%的 BSA 重悬,即为金标 HN 蛋白溶液。

1.8.3 检测线和质控线的制作

根据国家新城疫 HI 诊断技术标准^[21],HI 效价 $\geq 4\log_2$,判为 HI 试验阳性;HI 效价 $\leq 3\log_2$ 时,判为 HI 试验阴性;依据这个标准制备半定量抗体检测试纸。用三维喷膜仪在硝酸纤维素 (NC) 膜上进行检测线和质控线的点样,质控线 (control 线, C 线) 单抗浓度设为 0.16 mg/L,检测线 (test 线, T 线) 兔抗鸡多抗浓度分别设为 1.17、2.34 和 4.68 mg/mL,2 条平行线间隔 0.5 cm。最后将 NC 膜放到 42 $^{\circ}$ C 干燥箱中干燥 2 h,室温保存于密封袋。

1.8.4 金标记 HN 蛋白结合垫、样品垫和吸水垫制备

玻璃纤维膜裁成规格为 300 mm \times 7 mm 长条,金标 HN 蛋白用单向喷点仪喷至玻璃纤维膜上,56 $^{\circ}$ C 烘干后保存。样品垫裁成规格为 300 mm \times 15 mm 的长条,在缓冲液 (0.01 mol/L PBS、0.1% Triton X-100、0.03%叠氮钠) 中充分浸泡,56 $^{\circ}$ C 干燥保存。吸水垫裁成规格为 40 mm \times 300 mm 的长条,密封保存。

1.8.5 半定量试纸的组装

取一个塑料支撑板,喷有 C 线和 T 线的 NC 膜粘在支撑板中间。其次金标记 HN 蛋白的玻璃纤维膜粘在 NC 膜下边,二者上边缘交叠约 1–2 mm,然后在最下方贴样品垫,同样,下边缘交叠约 1–2 mm。吸水纸粘在 NC 膜的上边并交叠 1–2 mm,最后组装试纸用切割机切成

2.79 mm×60.00 mm 的试纸条。

1.8.6 试纸检测方法与结果判定

被检血清样品 1:100 倍稀释,加入到试纸检测样品孔中,5-10 min 内观察结果。当 HI 抗体效价 $\geq 4\log_2$, 试纸 C 线与 T 线都显示深红色,说明抗体效价达到了保护抗体水平;当 HI 抗体效价 $\leq 3\log_2$, 试纸仅 C 线显色,表明检测的抗体为阴性;如果只有 T 线显色或者 T 线和 C 线均不显色,则判试纸无效。

1.9 半定量试纸的特异性、灵敏性、重复性和稳定性检测

为了检测半定量试纸的特异性,用 NDV A-VII 型、NDV LaSota 株、禽流感 (AI) H5N1 亚型、禽流感 (AI) H9N2 亚型、传染性法氏囊 (IBD) 和马立克 (MD) 标准阳性血清以及 SPF 鸡阴性血清进行检测,并利用 TSR3000 读条仪 (BioDot, 美国) 检测试纸条样品相对光密度值 (ROD)。取 HI 效价为 $10\log_2$ 的阳性血清,从 1:100 依次倍比稀释至 1:204 800,混匀后各取 100 μ L 进行试纸检测,检测试纸的灵敏性。分别用批号为 20210307、20210524、20210720

的试纸检测 10 份相同的临床血清,观察其检测结果 (每次检测重复 3 次)。试纸室温保存 5 个月,每隔 1 个月对试纸的外观、特异性、灵敏性进行检测,以确定该试纸的保质期 (每次试验重复 3 次)。

1.10 半定量试纸和 HI 试验检测临床血清

从许昌某鸡场采的 308 份临床血清,用稀释液按照 1:100 稀释后进行检测,同时将临床血清作 HI 试验,最后利用 kappa 统计方法^[30]判断半定量试纸与 HI 试验的符合率。

2 结果与分析

2.1 重组载体的鉴定

双酶切重组质粒 pUC57-HN, HN 的大小为 1 563 bp (图 1A); 载体 pMP3 与 HN 连接、转化大肠杆菌 DH5 α , 经酶切鉴定 HN1 的大小为 3 048 bp (包括植物启动子、信号肽和终止子) (图 1B), 测序鉴定 HN1 基因序列正确。载体 pCAMBIA1300 与 HN1 连接、转化 DH5 α 菌,经酶切和测序鉴定,与预期大小一致 (图 1C)。

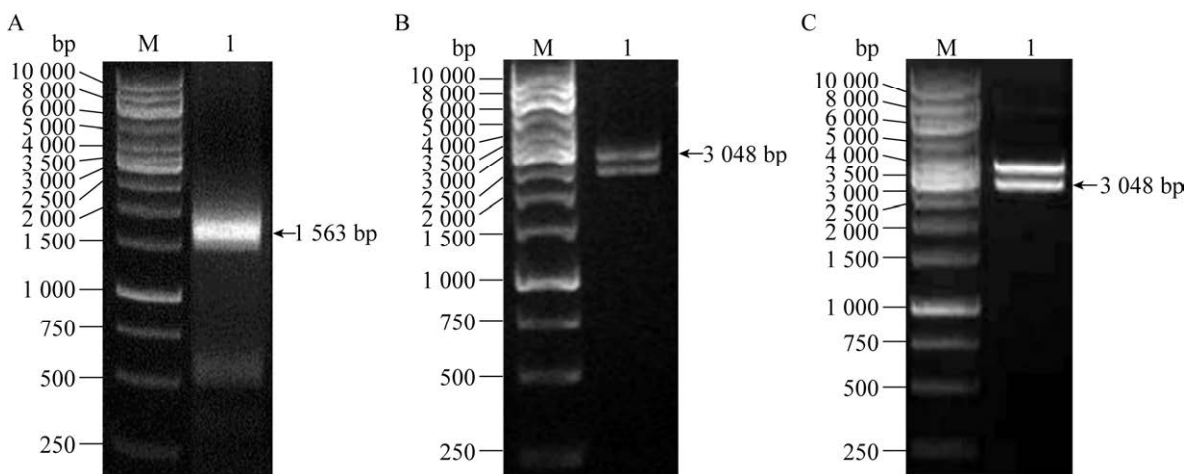


图 1 重组载体鉴定

Figure 1 Identification of recombinant vector. (A) Identification of recombinant plasmid pUC57-HN by digestion. (B) Identification of recombinant plasmid pMP3-HN by digestion. (C) Identification of recombinant plasmid pCAMBIA1300-HN by digestion. M: GeneRuler 1 kb DNA marker; I: HN1 gene.

2.2 阳性植株的筛选以及 HN 蛋白表达鉴定

CTAB 法提取植物 DNA, 经 PCR 鉴定, 150 株水稻中筛选出 67 株阳性植株, HN 扩增大小为 593 bp, 图 2A 为部分植株鉴定结果。挑选 5 株水稻种子经 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定, HN 蛋白大小为 57 kDa (图 2B、2C)。然后将 SDS-PAGE 目的胶块送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行质谱鉴定, 质谱结果显示: 覆盖了 77% 的 HN 氨基酸序列 (用绿色氨基酸序列表示) (图 2D)。以上结果表明:

HN 蛋白在水稻胚乳中成功表达。

2.3 水稻胚乳中 HN 蛋白的纯化

HN 蛋白粗提液经过 SP 阳离子和 75 μ g 凝胶过滤纯化后, 经 SDS-PAGE 鉴定, 蛋白纯度达到 90% 以上 (图 3)。

2.4 HN 蛋白的小鼠单克隆抗体腹水纯化

小鼠腹水用 HiTrap protein G HP 亲和柱纯化, 经 SDS-PAGE 鉴定, 结果 (图 4) 显示抗体的重链与轻链大小分别为 50 kDa 和 25 kDa, 纯度在 90% 以上。

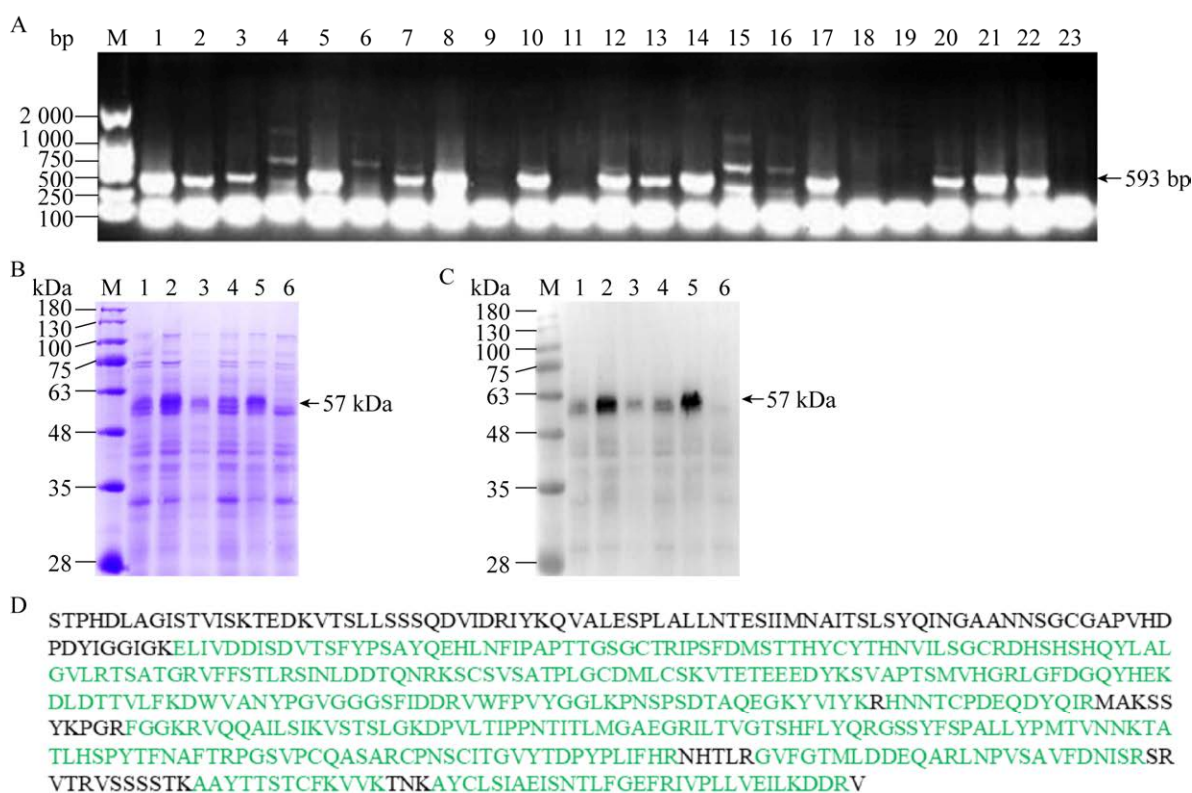


图 2 阳性植株和重组蛋白的鉴定

Figure 2 Identification of positive plants and recombinant proteins. (A) Identification of HN gene by PCR amplification. M: DL2000 DNA marker; 1, 2, 3, 5, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 17, 20, 21: identification of positive plants; 4, 6, 9, 11, 15, 16, 18, 19: negative plants; 22: positive control; 23: negative control. (B) Identification of HN protein by SDS-PAGE. M: protein marker; 1–5: identification of HN protein in different seeds; 6: TP309 seeds. (C) Identification of HN protein by Western blotting. M: protein marker; 1–5: identification of HN protein in different seeds; 6: TP309 seeds. (D) Identification of HN amino acid sequence by mass spectrometry. Results of the mass spectrometry covering 77% of the HN protein sequence (green sequence).

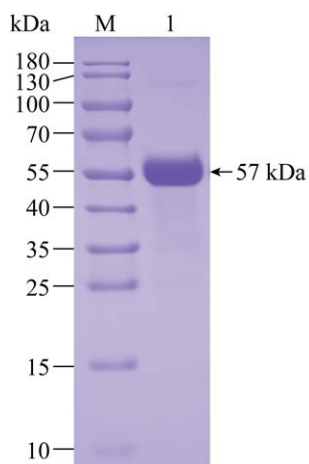


图3 纯化的HN蛋白鉴定

Figure 3 Identification of purified HN protein. M: protein marker; 1: purified HN protein.

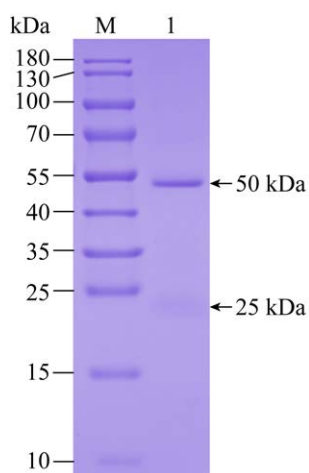


图4 纯化的单抗鉴定

Figure 4 Identification of purified monoclonal antibodies. M: protein marker; 1: purified monoclonal antibody.

2.5 胶体金颗粒的鉴定及金标HN蛋白量检测

利用柠檬酸三钠还原氯金酸制备胶体金颗粒。紫外可见分光光度计扫描最大吸收峰为 525 nm, 胶体金颗粒平均粒径约为 24 nm (图 5)。胶体金标记 HN 蛋白量为 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胶体金溶液。

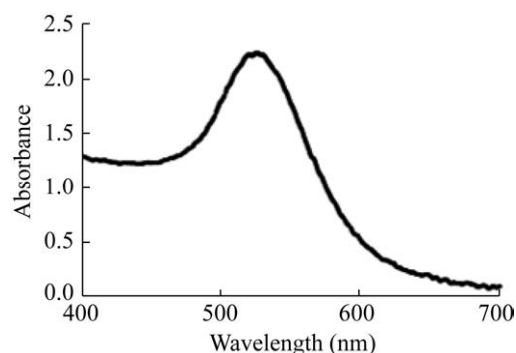


图5 胶体金的吸光值

Figure 5 Light absorption value of colloidal gold.

2.6 半定量试纸的组装

根据新城疫 HI 诊断技术标准, 制备半定量抗体检测试纸。C 线的单抗浓度为 0.16 mg/L, T 线的多抗浓度为 2.34 mg/mL, 最后将样品垫、结合垫、NC 膜以及吸水垫组装成试纸, 切成 2.79 mm \times 60 mm 的试纸条, 室温保存备用。

2.7 试纸条的特异性

半定量试纸用不同阳性血清和阴性血清检测后, 结果只有 NDV A-VII型和 NDV LaSota 株与试纸反应显示阳性; 而与其他血清反应均为阴性 (图 6A)。TSR3000 仪器检测试纸, 结果左峰为 NDV A-VII、NDV LaSota、H5N1、H9N2、IBD 和 MD 阳性血清以及 SPF 鸡阴性血清质控线的扫描峰, 而右峰为 NDV A-VII型和 NDV LaSota 株阳性血清检测线扫描峰 (图 6B), 说明试纸具有高度特异性, 只与 NDV 的阳性血清反应, 与其他血清不反应。

2.8 试纸条的灵敏性

取 HI 效价为 $10\log_2$ 的 NDV 血清 (图 7A), 将血清从 1:100 依次倍比稀释至 1:204 800, 结果显示血清稀释到 1:102 400 时仍能检测到 (图 7B), 说明试纸条的灵敏度比较高。

2.9 试纸重复性试验

分别用批号为 20210307、20210507、20210707 的试纸检测 10 份相同的已知 NDV 临

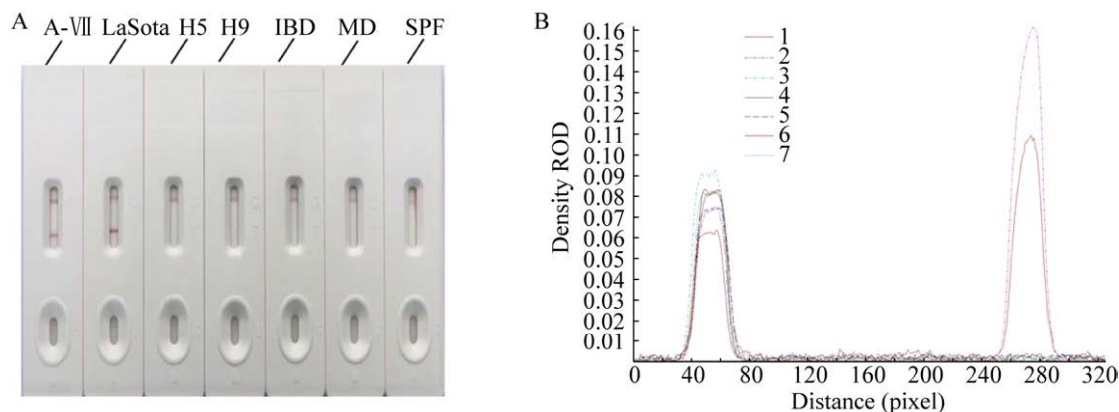


图 6 试纸特异性检测

Figure 6 The specificity of test strip. (A) Results of different criteria positive serum by test strip. (B) Relative optical density values of different serum samples. 1-7: NDV A-VII positive serum, NDV LaSota positive serum, AIV H5 positive serum, AIV H9 positive serum, IBDV positive serum, MDV positive serum and SPF serum.

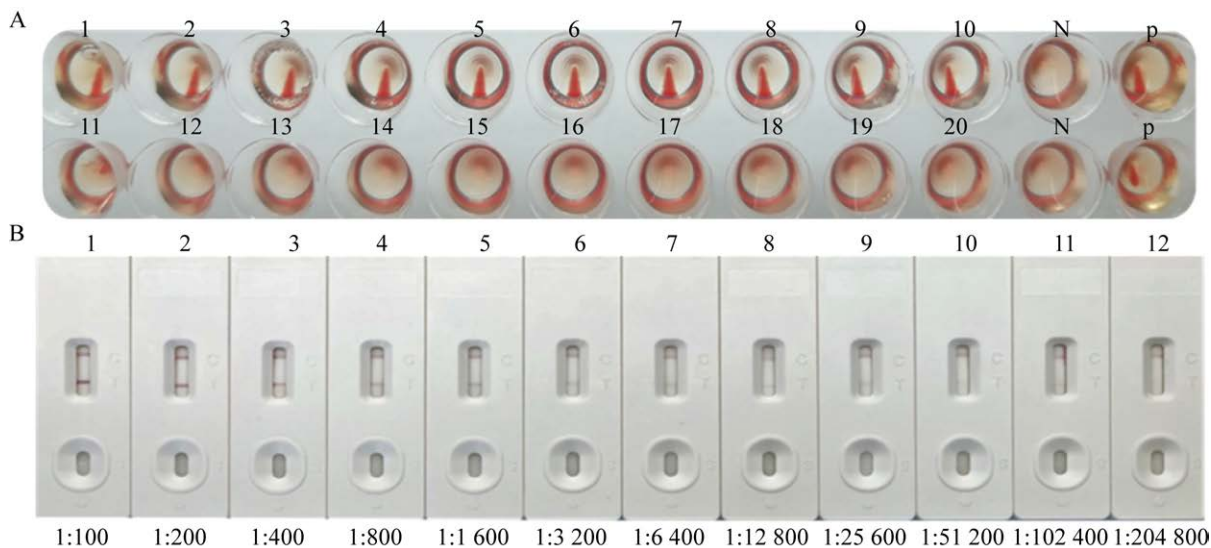


图 7 试纸条灵敏性检测

Figure 7 Sensitivity of the test strip. (A) Antibody titer of NDV by HI test. 1-20: The serum was diluted from 2^1 to 2^{20} ; N: negative control; P: positive control. (B) Antibody titer by test strip. 1-12: the serum was diluted from 1:100 to 1:204 800.

床血清，重复 3 次，结果 3 个批次的试纸检测结果相同，说明试纸的重复性良好。

2.10 试纸稳定性试验

检测 0-5 个月试纸，其外观保存良好，试纸特异性不变，试纸的检测标准阳性血清的极

限是 1 : 102 400。说明试纸具有良好的稳定性 (表 2)。

2.11 半定量试纸与 HI 试验结果比较

用试纸和 HI 试验检测 308 份临床血清，结果试纸条检出阳性血清 151 份，检出率为

49.03%。HI 试验检出阳性血清 148 份，检出率为 48.05%，二者符合率为 97.08%，kappa 值为 0.942 (表 3)。kappa 值介于 0.75–1.0 之间，说明半定量试纸条与 HI 试验二者的符合率较高。

3 讨论

新城疫病毒 (NDV) 可感染多种禽类和野生鸟类，具有极高的发病率、死亡率和快速的传播能力，ND 对全球的畜牧行业具有重大的经济损失^[31]。基因 VII 型是目前造成禽类和野鸟暴发 ND 的主要基因型，该病毒亚型具有高度流动性，目前基因 VII 型毒株的地理分布和宿主范围在不断扩大，应当加强防范措施。常用的 ND 灭活疫苗和减毒疫苗主要是基因型 I 和 II，其与目前临床毒株的核苷酸距离为 18.3%–26.6%，因此需要高剂量的传统 ND 全病毒疫苗免疫种群获得相应保护，但是显著增加了疫苗的生产成本^[32]。

分子医药农业的发展使蛋白表达系统多元化，目前已有多种蛋白在植物系统中表达^[33]。例如，Yang 等^[34]在水稻中成功表达 NDV F 蛋白，免疫小鼠体内产生了特异性抗体，表明植物源新城疫病毒 F 蛋白具有作为候选疫苗的潜

力。He 等^[35]在水稻中成功表达 OsrHSA，试验证明 OsrHSA 在生化特性、蛋白结构和功能方面与 pHSA 相当。Wu 等^[36]首次报道 IBDV VP2 蛋白在水稻中高效表达，口服免疫鸡后产生了高滴度中和抗体，可以保护鸡免受 IBDV 强毒株的感染。利用转基因植物作为生物反应器生产病原体抗原有许多优点。首先，该系统生产成本低，疫苗生产简单，易于扩大规模生产。其次，蛋白活性高，因为植物能正确的折叠和修饰外源蛋白。第三，安全性高，培养植物的培养基不需要任何动物源性补充物。第四，植物对胃肠道的酶消化具有抗性，口服给药方法简单。因此转基因植物为开发安全、廉价的动物或人用蛋白提供了一种新的策略^[36]。水稻的优点：自花授粉、生产成本低和表达的蛋白活性高等^[35]。本试验利用水稻胚乳表达 HN 蛋白，通过 PCR 检测水稻基因组 DNA，筛选到 67 株阳性植株，表明 HN 基因已插入到水稻的基因组中，经 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定，HN 蛋白已在水稻中表达。重组 HN 蛋白经过 SP 阳离子和 75 pg 凝胶分子筛纯化后，纯度达到 90%以上。该试验以胶体金标记 HN 蛋白，利用 HN 单克隆抗体和兔抗鸡多抗的双抗夹心法制备免

表 2 试纸条的稳定性试验

Table 2 The stability of the test strip

Date (month)	0	1	2	3	4	5
Positive serum titer	1:102 400	1:102 400	1:102 400	1:102 400	1:102 400	1:102 400
Negative serum	–	–	–	–	–	–

1:102 400: maximum limit of NDV positive serum detection. –: negative serum.

表 3 试纸条与 HI 检测结果比较

Table 3 Comparison of the test strip with HI

Hemagglutination inhibition test	Immunochromatographic strip		Total	Kappa value
	Positive	Negative		
Positive	145	3	148	0.942
Negative	6	154	160	
Total	151	157	308	

疫层析试纸, 这些使试纸检测的特异性和灵敏性不受到宿主蛋白质和其他因素的影响。

一般情况下, 试纸只用于定性分析。为了使试纸具有更高的临床鉴别价值与灵敏度, 在 HI 检测基础上对新城疫抗体检测试纸进行了升级。结果显示, 试纸条与其他血清无交叉反应, 血清稀释到 1:102 400 时仍能检测到。李希友等^[37]利用胶体金标记纯化的新城疫全病毒, 制备半定量检测新城疫病毒抗体试纸, 没有检测试纸的最高灵敏度; 张展英和贾清^[38-39]利用胶体金标记鼠抗鸡 IgG Fc 单抗, 兔抗鼠 IgG 作为质控线, 以大肠杆菌 (pGEX-HN) 表达的 HN 蛋白作为检测线, 试纸的灵敏度分别为 1:256 和 1:512。用 3 个不同批号的试纸检测 10 份相同的已知 NDV 临床血清, 结果 3 个批次的试纸检测结果相同, 说明试纸的重复性良好。检测 0-5 个月试纸, 其外观保存良好, 试纸特异性不变, 试纸检测标准阳性血清的极限是 1:102 400, 说明试纸具有良好的稳定性。利用试纸和 HI 试验分别检测 308 份临床血清, 二者符合率为 97.08%, kappa 值为 0.942。以上结果表明该试纸可作为 HI 试验的替代方法, 以评估临床新城疫疫苗的免疫保护效果。

综上所述, 本研究在水稻胚乳中成功表达了 HN 蛋白, 通过 SP 阳离子和 75 pg 凝胶过滤纯化, 使 HN 蛋白纯度达到 90% 以上。以胶体金标记 HN 蛋白, 制备的半定量抗体检测试纸具有较高的特异性、灵敏性、重复性和稳定性。以上结果表明半定量抗体检测试纸可以作为一种临床血清的检测方法, 为临床大规模监测新城疫疫苗免疫效果提供了一种新的策略。

REFERENCES

- [1] 崔治中. 我国家禽新城疫流行现状. 中国家禽, 2002, 24(4): 4-6.
Cui ZZ. Epidemic status of poultry Newcastle disease in China. *China Poult*, 2002, 24(4): 4-6 (in Chinese).
- [2] 王新华, 逮艳云, 张二芹, 等. 鸡病类症鉴别诊断彩色图谱. 北京: 中国农业出版社, 2009: 50-54.
Wang XH, Lu YY, Zhang EQ, et al. *Color Map for Differential Diagnosis of Chicken Diseases*. Beijing: China Agriculture Press, 2009: 50-54 (in Chinese).
- [3] 秦卓明, 徐怀英, 刘玉山, 等. 疫苗免疫压力下新城疫病毒的动态演化. 中国兽药杂志, 2013, 47(2): 1-6.
Qin ZM, Xu HY, Liu YS, et al. Evolutionary dynamics of Newcastle disease virus under the pressure of vaccination in China. *Chin J Vet Drug*, 2013, 47(2): 1-6 (in Chinese).
- [4] 薛聪, 王建忠, 尹仁福, 等. 新城疫流行病学性特点及鹅新城疫防控策略. 中国兽医大会暨中国兽医发展论坛, 2015: 191-200.
Xue C, Wang JZ, Yin RF, et al. Epidemiological characteristics of Newcastle disease and prevention and control strategies of Newcastle disease in geese. *Chin Vet Con and Chin Vet Devlo Forum*, 2015: 191-200 (in Chinese).
- [5] Mariappan AK, Munusamy P, Kumar D, et al. Pathological and molecular investigation of velogenic viscerotropic Newcastle disease outbreak in a vaccinated chicken flocks. *Virus disease*, 2018, 29(2): 180-191.
- [6] Rehmani SF, Wajid A, Bibi T, et al. Presence of virulent Newcastle disease virus in vaccinated chickens in farms in Pakistan. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(5): 1715-1718.
- [7] Samour J. Newcastle disease in captive falcons in the Middle East: a review of clinical and pathologic findings. *J Avian Med Surg*, 2014, 28(1): 1-5.
- [8] Susta L, Segovia D, Olivier TL, et al. Newcastle disease virus infection in quail. *Vet Pathol*, 2018, 55(5): 682-692.
- [9] Alamian A, Pourbakhsh SA, Shoushtari A, et al. Seroprevalence investigation of Newcastle disease in rural poultries of the northern provinces (golestan, gilán, and mazandaran) of Iran. *Arch Razi Inst*, 2019, 74(4): 365-373.
- [10] Du J, Xia J, Li S, et al. Evolutionary dynamics and transmission patterns of Newcastle disease virus in China through Bayesian phylogeographical analysis. *PLoS One*, 2020, 15(9): e0239809.
- [11] 李太元, 殷震, 金宁一, 等. 新城疫病毒 F₄₈E₈ 株 HN 基因在杆状病毒系统中表达. 中国生物制品学杂志, 2002, 15(6): 334-336.
Li TY, Yin Z, Jin NY, et al. Expression of HN gene of

- Newcastle disease virus (NDV) strain F₄₈E₈ in baculovirus. *Chin J Biol*, 2002, 15(6): 334-336 (in Chinese).
- [12] 刘铀, 毕英佐, 曹永长. 新城疫病毒 HN 基因克隆及其在大肠杆菌中的表达. *西南农业大学学报(自然科学版)*, 2004, 26(6): 785-788.
Liu Y, Bi YZ, Cao YC. Cloning of HN gene of Newcastle disease virus and its expression in *E. coli*. *J Southwest Agric Univ (Nat Sci Ed)*, 2004, 26(6): 785-788 (in Chinese).
- [13] Lee YJ, Sung HW, Choi JG, et al. Protection of chickens from Newcastle disease with a recombinant baculovirus subunit vaccine expressing the fusion and hemagglutinin-neuraminidase proteins. *J Vet Sci*, 2008, 9(3): 301-308.
- [14] Xu J, Ge X, Dolan MC. Towards high-yield production of pharmaceutical proteins with plant cell suspension cultures. *Biotechnol Adv*, 2011, 29(3): 278-299.
- [15] Kolotilin I, Topp E, Cox E, et al. Plant-based solutions for veterinary immunotherapeutics and prophylactics. *Vet Res*, 2014, 45: 117.
- [16] 刘秀梵, 胡顺林. 新城疫病毒的进化及其新型疫苗的研制. *中国兽药杂志*, 2010, 44(1): 12-18.
Liu XF, Hu SL. Evolution of Newcastle disease virus and the development of novel vaccines. *Chin J Vet Drug*, 2010, 44(1): 12-18 (in Chinese).
- [17] Afonso CL, Miller PJ. Newcastle disease: progress and gaps in the development of vaccines and diagnostic tools. *Dev Biol (Basel)*, 2013, 135: 95-106.
- [18] Foltise R, Halvorson DA, Sivanandan V. A dot immunoblotting assay (dot blot ELISA) for early detection of Newcastle disease antibodies in chickens. *Avian Dis*, 1998, 42(1): 14-19.
- [19] Cattoli G, Susta L, Terregino C, et al. Newcastle disease: a review of field recognition and current methods of laboratory detection. *J Vet Diagn Invest*, 2011, 23(4): 637-656.
- [20] Bello MB, Yusoff K, Ideris A, et al. Diagnostic and vaccination approaches for Newcastle disease virus in poultry: the current and emerging perspectives. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 7278459.
- [21] 国家市场监督管理总局&国家标准化管理委员会. 新城疫诊断技术. 北京: 中国标准出版社, 2020.
The State Administration for Market Regulation & Standardization Administration. *Diagnostic Techniques for Newcastle Disease*. Beijing: Standards Press of China, 2020 (in Chinese).
- [22] 张改平. 免疫层析试纸快速检测技术. 郑州: 河南科学技术出版社, 2015.
Zhang GP. *Immunochromatographic Lateral Flow Strip Test*. Zhengzhou: Henan Science and Technology Press, 2015 (in Chinese).
- [23] Li QM, Wang L, Sun YN, et al. Evaluation of an immunochromatographic strip for detection of avian *Avulavirus 1* (Newcastle disease virus). *J Vet Diagn Invest*, 2019, 31(3): 475-480.
- [24] Sun YN, Yang JF, Yang SZ, et al. Development of an immunochromatographic lateral flow strip for the simultaneous detection of aminoglycoside residues in milk. *RSC Adv*, 2018, 8(17): 9580-9586.
- [25] Na G, Hu X, Yang J, et al. Colloidal gold-based immunochromatographic strip assay for the rapid detection of bacitracin zinc in milk. *Food Chem*, 2020, 327: 126879.
- [26] 许倩茹, 张二芹, 郭军庆, 等. 新城疫病毒 F 蛋白在水稻中的表达及检测. *畜牧兽医学报*, 2017, 48(6): 1167-1172.
Xu QR, Zhang EQ, Guo JQ, et al. Expression and detection of NDV-F protein in rice endosperm. *Chin J Animal Vet Sci*, 2017, 48(6): 1167-1172 (in Chinese).
- [27] 申雪静, 张二芹, 许倩茹, 等. 狂犬病病毒 G 蛋白在水稻中的表达及遗传稳定性鉴定. *农业生物技术学报*, 2019, 27(2): 204-211.
Shen XJ, Zhang EQ, Xu QR, et al. Expression of rabies virus G protein in rice (*Oryza sativa*) and identification of its genetic stability. *J Agric Biotechnol*, 2019, 27(2): 204-211 (in Chinese).
- [28] Ma FS, Zhang EQ, Li QM, et al. A plant-produced recombinant fusion protein-based Newcastle disease subunit vaccine and rapid differential diagnosis platform. *Vaccines*, 2020, 8(1): 122.
- [29] 赵翔玥, 张二芹, 许倩茹, 等. 禽流感病毒 H9N2 亚型 HA 蛋白在水稻胚乳中的稳定、高效表达及活性鉴定. *华北农学报*, 2020, 35(4): 230-238.
Zhao XY, Zhang EQ, Xu QR, et al. Stable and efficient expression of HA protein of avian influenza virus H9N2 subtype in rice endosperm and identification of activity. *Acta Agric Boreali-Sin*, 2020, 35(4): 230-238 (in Chinese).
- [30] 王军. Kappa 系数在一致性评价中的应用研究[D]. 成都: 四川大学, 2006.
Wang J. *The application of kappa in assessing agreement*[D]. Chengdu: Sichuan University, 2006 (in Chinese).
- [31] Liu H, De Almeida RS, Gil P, et al. Can genotype mismatch really affect the level of protection conferred

- by Newcastle disease vaccines against heterologous virulent strains? *Vaccine*, 2018, 36(27): 3917-3925.
- [32] Dimitrov KM, Ferreira HL, Pantin-Jackwood MJ, et al. Pathogenicity and transmission of virulent Newcastle disease virus from the 2018–2019 California outbreak and related viruses in young and adult chickens. *Virology*, 2019, 531: 203-218.
- [33] Holtz BR, Berquist BR, Bennett LD, et al. Commercial-scale biotherapeutics manufacturing facility for plant-made pharmaceuticals. *Plant Biotechnol J*, 2015, 13(8): 1180-1190.
- [34] Yang ZQ, Liu QQ, Pan ZM, et al. Expression of the fusion glycoprotein of Newcastle disease virus in transgenic rice and its immunogenicity in mice. *Vaccine*, 2007, 25(4): 591-598.
- [35] He Y, Ning T, Xie T, et al. Large-scale production of functional human serum albumin from transgenic rice seeds. *PNAS*, 2011, 108(47): 19078-19083.
- [36] Wu J, Yu L, Li L, et al. Oral immunization with transgenic rice seeds expressing VP₂ protein of infectious bursal disease virus induces protective immune responses in chickens. *Plant Biotechnol J*, 2007, 5(5): 570-578.
- [37] 李希友, 田夫林, 张秀娥, 等. 半定量检测新城疫抗体胶体金试纸条的研制. *畜牧兽医学报*, 2006, 37(12): 1373-1377.
- Li XY, Tian FL, Zhang XE, et al. Preparation of colloidal gold strip for semi-quantitative test of antibody against Newcastle disease virus. *Acta Vet et Zootechnica Sin*, 2006, 37(12): 1373-1377 (in Chinese).
- [38] 张展英. 鸡新城疫抗体免疫胶体金速测试纸条的研制及初步应用[D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
- Zhang ZY. Development of a lateral-flow strip for rapid detecting serum antibodies against Newcastle disease virus in chicken and its preliminary application[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2008 (in Chinese).
- [39] 贾清. 鸡新城疫抗体检测试纸条的研制及初步应用[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.
- Jia Q. Development and preliminary application of detection strips for Newcastle disease virus specific antibody in chicken[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2010 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)