

禽流感病毒 H9N2 血凝素基因和神经氨酸酶因 在大肠杆菌中的表达

张烨¹ 于在江¹ 辛丽¹ 陈永坤¹ 唐启慧² 陈禹保³ 陈清轩² 舒跃龙^{1*}

(1. 中国疾病预防控制中心 病毒病所国家流感中心 北京 100052)
(2. 北京标凯科技有限公司 北京 100094)
(3. 北京中亚国瑞生物经济研究所 北京 102206)

摘要: 克隆、表达和鉴定禽流感病毒 H9N2 HA、NA 基因序列, 为制备抗体和基因工程疫苗打下基础。在成功克隆禽流感病毒 H9N2 全长 HA、NA 基因并测序的基础上, 将部分基因序列克隆到表达载体 pET32a (+) 上, 全基因序列克隆到表达载体 pGEX4T-1 上, 构建了重组表达质粒 pET32a (+)/HA (截短)、pET32a (+)/NA (截短)、pGEX4T-1/HA、pGEX4T-1/NA, 转化大肠杆菌 BL21/rosetta, IPTG 诱导表达, 利用 Ni²⁺ 亲和层析柱和 GSTrap 4B 亲和层析柱对重组蛋白进行纯化, 并用 Western Blotting 和 ELISA 方法检测其抗原性。结果重组蛋白在大肠杆菌中可以高效表达, SDS-PAGE 显示其相对分子质量与预计大小一致。ELISA 和 Western Blotting 实验证实, 重组蛋白具有良好的抗原性。本研究成功克隆和表达了禽流感病毒 H9N2 HA、NA 基因序列。为禽流感病毒 H9N2 诊断试剂和疫苗的开发等进一步的研究奠定了基础。

关键词: 禽流感病毒 H9N2, 血凝素, 神经氨酸酶, 克隆表达

Expression of the Hemagglutinin and Neuramidinase Gene of Influenza A Virus H9N2 in *E. coli*

ZHANG Ye¹ YU Zai-Jiang¹ XIN Li¹ CHEN Yong-Kun¹ TANG Qi-Hui²
CHEN Yu-Bao³ CHEN Qing-Xuan² SHU Yue-Long^{1*}

(1. Department of Influenza, National Institute of Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China)
(2. Beijing Biokit Science and Technology Limited Company, Beijing 100094, China)
(3. SinoGreen Institute for BioEconomy, Beijing 102206, China)

Abstract: To clone, express and characterize the HA and NA Protein of avian influenza A virus H9N2. On the basis of successful clone the full length HA and NA gene and sequence analysis of avian influenza A virus H9N2, we were ligated part of the gene into pET32a (+) and full of the gene into pGEX4T-1. An expression vector pET32a (+)/HA (cut), pET32a (+)/NA (cut), pGEX4T-1/HA, pGEX4T-1/NA were constructed and expressed in *E. coli* BL21/rosetta induced by IPTG. Recombinant

protein was purified through affinity chromatography column. Western Blotting and ELISA were used to determine the antigenic of the recombinant protein. The recombinant capsid gene can be overexpressed in *E. coli*. SDS-PAGE result showed that the gene could express product as same as we expect. ELISA and Western Blotting result showed that the recombinant protein has good antigenic. The HA and NA protein of avian influenza virus H9N2 has been successful cloned and expressed, which could be useful for developing diagnose reagents or vaccine of H9N2.

Keywords: Avian influenza virus H9N2, Hemagglutinin, Neuramidinase, Clone and express

禽流感(Avian influenza, AI)又名欧洲鸡瘟、真性鸡瘟,是由正黏病毒科 A 型流感病毒引起的一种禽类感染或/和疾病综合症^[1]。是现代化养禽业难以对付的重要禽类呼吸道传染病之一。我国《中华人民共和国动物防疫法》和世界动物卫生组织(OIE)规定该病为 A 类烈性传染病^[2]。自 1878 年在意大利鸡群首次爆发以来,世界各地都相继有各种亚型的禽流感病毒引起 AI 的流行。H9 亚型禽流感最早报道于 1966 年^[3], 20 世纪 90 年代开始, H9 亚型禽流感病毒(Avian influenzavirus, AIV)已在亚洲鸡群广泛流行^[4]。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^[5-6],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。

1999 年中国广东省和香港发生了 H9N2 亚型的 AIV 感染人事件,随后相继在猪、人体内分离出这一亚型的 AIV^[7-8],说明流感病毒(Influenza virus, IV)已突破了种间屏障^[9]。目前的研究表明: H9N2 亚型的 AIV 是引起 1997 年香港 H5N1 亚型 AIV 的内部基因的供体^[10]。从已有的报道分析,禽流感病毒 H9N2 亚型已成为中国当前的主型。因此,开展对 H9 亚型 AIV 的研究具有重要的公共卫生意义。

血凝素(Hemagglutinin, HA)蛋白是病毒表面的主要糖蛋白之一,属于主要的保护性抗原,它不仅可诱导特异性中和抗体产生,而且还可以刺激机体产生细胞毒性淋巴细胞(CTL)反应。另外,HA 在病毒吸附、穿膜以及决定病毒的宿主特异性和致病力方面均起着关键作用^[11-12]。NA 基因编码的神经氨酸酶(Neuramidinase, NA)蛋白是体液免疫的靶抗原,可诱导机体产生特异性抗体,抗体具有免疫保护作用^[13-14]。

本研究根据 HA、NA 蛋白亚型特异性的特点,利用大肠杆菌表达系统成功表达了 H9N2 病毒 HA、NA 蛋白,并对重组蛋白抗原性进行了初步评价,为

血清流行病学调查及诊断试剂的开发打下了良好的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

禽流感病毒 H9N2 由中国疾病预防控制中心病毒病所国家流感中心分离培养;大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 、*E. coli* BL21、*E. coli* Rosetta、DNA marker 为北京标凯科技有限公司产品; pET32a (+)和 pGEX4T-1 载体为 Novagen 公司产品; pMD20-T 载体、蛋白 marker 为 TaKaRa 公司产品;限制性内切酶、T4 DNA 连接酶为 NEB 公司产品; DNA Polymerase、Reverse Transcriptase 为 TaKaRa 公司产品; DNA 凝胶回收试剂盒、质粒 DNA 小量抽提试剂盒、RNA 抽提试剂盒为北京标凯科技有限公司产品; Ni-NTA-gro 为 QIAGEN 公司产品; GSTrap 4B 亲和层析柱为 GE 公司产品;其他试剂为分析纯产品。

1.2 方法

1.2.1 禽流感病毒 H9N2 全基因组提取以及 HA、NA 基因的克隆:病毒基因组的提取按病毒 RNA 提取试剂盒说明书进行操作。根据 GenBank 中禽流感病毒 H9N2 基因序列,设计出针对 H9N2 HA 和 NA 大片段的引物。以提取的病毒 RNA 为模板,在逆转录酶的作用下逆转录 HA 和 NA 基因。操作步骤为:模板与引物 70°C 保温 10 min 后迅速在冰上急冷 3 min, 瞬离再加入已混合好的 Buffer、dNTPs Mixture、RNase Inhibitor、Reverse Transcriptase 和 RNase free Water, 42°C 保温 1 h。再设计引物,以逆转录出的 1st-Strand 为模板 PCR 扩增 DNA,反应条件为: 95°C 5 min; 93°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 2 min, 30 个循环; 72°C 10 min。PCR 结束后,经 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定阳性的片段用 1%琼脂糖凝胶电泳分离,用胶回收试剂盒回收纯化后克隆至 pMD20-T 载体,转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α ,

PCR 鉴定, 阳性质粒送北京标凯科技有限公司进行序列测定。引物序列为: H9-up: 5'-GCAGATAAAATCTGCAT-3'; H9-down: 5'-TTATATACAAATGTGTCATCTG-3'; N9-up: 5'-CCGACCCATCGAACAAAT-3'; N9-down: 5'-TTATATAGGCATGAAATTGATATTC-3'。

1.2.2 HA、NA 蛋白抗原片段表达质粒的构建: (1) 重组表达质粒 pET32a (+)/HA (截短)、pET32a (+)/NA (截短)的构建: 根据 HA、NA 蛋白基因阳性重组质粒的测序结果, 设计引物(pET-H9-up: 5'-GAGAGATCCGCAGATAAAATCTGCAT-3'; pET-H9-down: 5'-GAGACTCGAGTATTTTCTGTCTTTCTAG-3'; pET-N9-up: 5'-GAGAGAATTCACCGACCCATCGAACAAAT-3'; pET-N9-down: 5'-GAGACTCGAGCCTGTGTATGCAGGTTTTTCCTTC-3'), 以禽流感病毒 H9N2 蛋白基因阳性重组质粒(pMD20- T-HA/NA)为模板进行 PCR 扩增, 反应条件为: 95°C 5 min; 93°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 2 min, 30 个循环; 72°C 10 min。PCR 扩增出尾部截短 150 bp 两端带有酶切位点和保护碱基的 HA 和 NA 基因序列。经 1%琼脂糖凝胶电泳分离, 胶回收纯化后双酶切, 与用同两种酶双酶切的 pET32a (+)载体连接、转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 、挑单克隆扩大培养, PCR 鉴定出阳性克隆。重组质粒 pET32a (+)/HA(截短)、pET32a (+)/NA(截短)PCR 阳性克隆送北京标凯科技有限公司测序。

(2) 重组表达质粒 pGEX4T-1/HA、pGEX4T-1/NA 的构建: 根据 HA 蛋白基因阳性重组质粒的测序结果, 设计引物 (GXT-H9-up: 5'-GAGAGGATCCGCAGATAAAATCTGCAT-3'; GXT-H9-down: 5'-GAGACTCGAGTTATATACAAATGTTGCATCTG-3'; GXT-N9-up: 5'-GAGAGAATTCACCGACCCATCGAACAAAT-3'; GXT-N9-down: 5'-GAGACTCGAGTTATATAGGCATGAAATTGATATTC-3'), 以禽流感病毒 H9N2 蛋白基因阳性重组质粒(pMD20- T-HA)为模板进行 PCR 扩增, 反应条件为 95°C 5 min; 93°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 2 min, 30 个循环; 72°C 10 min。PCR 扩增出全长 HA 基因序列。经 1%琼脂糖凝胶电泳分离, 胶回收纯化后双酶切, 与用同两种酶双酶切的 pGEX4T-1 载体连接、转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 、挑单克隆扩大培养, PCR 鉴定出阳性克隆。重组质粒 pGEX4T-1/HA、pGEX4T-1/NA PCR 阳性克隆送北京标凯科技有限公司测序。

1.2.3 HA、NA 蛋白抗原片段的表达: 阳性 pET32a (+)/HA (截短)、pET32a (+)/NA(截短)质粒转化 *E. coli* BL21 Star, 阳性 pGEX4T-1/HA、pGEX4T-1/NA 质粒转化 *E. coli* Rosetta, 挑单克隆, 接种入 5 mL 含相应抗生素的 LB 培养基中, 37°C、250 r/min 振荡过夜。次日将 5 mL 培养液转接入 500 mL 含相应抗生素的 LB 培养基中, 37°C 振荡培养至吸光度 $A_{600} = 0.6$ 时, 加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 诱导 3 h, 离心收集菌体, 并用 PBS 洗 1 次, -40°C 冻融 2 次, 用 1/10 体积的 PBST (PBS, 0.5% Triton-X100, pH 7.4)悬浮菌体, 加 PMSF 至终浓度为 1 mmol/L, 180 Hz 超声破碎细菌, 4°C、12000 r/min 离 30 min, 分别收集沉淀和上清, SDS-PAGE 显示蛋白位于沉淀中(也即包涵体表达)。

1.2.4 表达产物的纯化: (1) pET32a (+)/HA (截短)、pET32a (+)/NA (截短)重组质粒表达产物的纯化: 用 Ni-NTA agarose 按 QIAGEN 手册方法纯化包涵体, PBS 透析复性。(2) pGEX4T-1/NA 重组质粒表达产物的纯化: 超声破碎后的沉淀溶于尿素中, 用 PBS 梯度稀释使其复性, 上 GSTrap 4B 亲和层析柱, 按 GE 手册方法纯化蛋白。

1.2.5 纯化产物免疫学活性的鉴定: (1) ELISA 检测: 以梯度稀释的表达重组蛋白抗原铺板, 梯度稀释的兔抗禽流感病毒 H9N2 血清作为一抗, HRP 标记的羊抗兔 IgG 为二抗, 进行 ELISA 检测, 并设空白对照和免疫前小鼠血清为阴性对照, 待测样本 OD 值大于阴性对照 OD 值 2 倍以上为阳性。(2) Western blotting 印迹检测: 以重组蛋白为抗原, 兔抗禽流感病毒 H5N1 血清作为一抗, HRP 标记的羊抗兔 IgG 为二抗, 进行 Western blotting 印迹检测, 并设未诱导的 BL21/rosetta 为阴性对照。

2 结果

2.1 H9N2 病毒全基因组提取以及 HA、NA 基因的克隆

病毒 RNA 模板经逆转录及 PCR 扩增后, 琼脂糖电泳显示分别得到 1700 bp 和 1400 bp 左右的条带(图 1), 此条带与 T 载体连接转化后得到多个阳性克隆, 测序结果分析, 此两条基因序列是 H9N2 病毒的血凝素和神经氨酸酶基因。

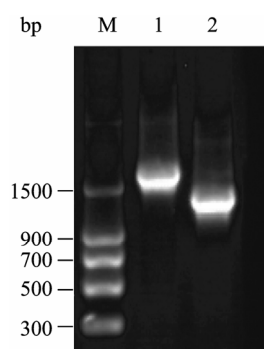


图1 HA 和 NA 基因的 PCR 扩增图

Fig. 1 PCR for HA and NA

注: M: DNA marker; 1: HA 基因 PCR 结果; 2: NA 基因 PCR 结果.

Note: M: DNA marker; 1: PCR for HA gene; 2: PCR for NA gene.

2.2 HA、NA 蛋白抗原片段表达质粒的构建

PCR 产物经1%琼脂糖凝胶电泳分离, 胶回收纯化后, 上下游酶切位点双酶切, 同时也用同样的酶处理 pET32a (+)载体和 pGEX4T-1载体, 连接, 转化大肠杆菌 *E. coli* DH5 α , 小量抽提质粒后进行双酶切和 PCR 鉴定, 电泳都显示出正确大小的条带(图2和图3), 测序结果也正确, 表明目的基因已经成功亚克隆到 pET32a (+)载体和 pGEX4T-1载体上。

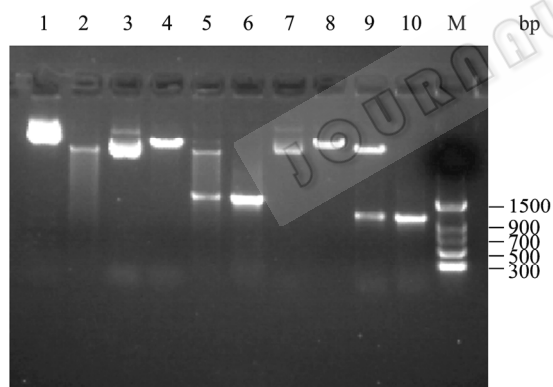


图2 重组表达质粒 pET32a (+)/HA(截短)、pET32a (+)/NA(截短)的酶切及 PCR 鉴定

Fig. 2 Enzyme digestion analysis of recombinant plasmid pET32a (+)/HA (Cut), pET32a (+)/NA (Cut)

注: 1: pET32a (+); 2: pET32a (+) *Bam*H I 单酶切; 3: pET32a (+)/HA(截短); 4: pET32a (+)/HA(截短) *Bam*H I 单酶切; 5: pET32a (+)/HA(截短) *Bam*H I/*Not* I 双酶切; 6: HA(截短)片段 PCR 产物; 7: pET32a (+)/NA(截短); 8: pET32a (+)/NA(截短) *Eco*R I 单酶切; 9: pET32a (+)/NA(截短) *Eco*R I/*Xho* I 双酶切; 10: NA(截短)片段 PCR 产物; M: DNA marker.

Note: 1: pET32a (+); 2: pET32a (+) digested with *Bam*H I; 3: pET32a (+)/HA (Cut); 4: pET32a (+)/HA (Cut) digested with *Bam*H I; 5: pET32a (+)/HA (Cut) digested with *Bam*H I and *Not* I; 6: PCR for HA (Cut); 7: pET32a (+)/NA (Cut); 8: pET32a (+)/NA (Cut) digested with *Eco*R I; 9: pET32a (+)/NA (Cut) digested with *Eco*R I and *Xho* I; 10: PCR for NA (Cut); M: DNA marker.

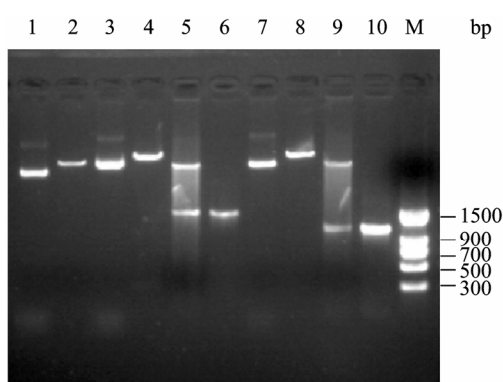


图3 重组表达质粒 pGEX4T-1/HA、pGEX4T-1/NA 的酶切及 PCR 鉴定

Fig. 3 Enzyme digestion analysis of recombinant plasmid pGEX4T-1/NA

注: 1: pGEX4T-1; 2: pGEX4T-1 *Bam*H I 单酶切; 3: pGEX4T-1/HA; 4: pGEX4T-1/HA *Bam*H I 单酶切; 5: pGEX4T-1/HA *Bam*H I/*Xho* I 双酶切; 6: HA 片段 PCR 产物; 7: DNA marker; 8: pGEX4T-1/NA; 9: pGEX4T-1/NA *Eco*R I 单酶切; 10: pGEX4T-1/NA *Eco*R I/*Xho* I 双酶切; 11: NA 片段 PCR 产物.

Note: 1: pGEX4T-1; 2: pGEX4T-1 digested with *Bam*H I; 3: pGEX4T-1/HA; 4: pGEX4T-1/HA digested with *Bam*H I; 5: pGEX4T-1/HA digested with *Bam*H I and *Xho* I; 6: PCR for HA; 7: DNA marker; 8: pGEX4T-1/NA; 9: pGEX4T-1/NA digested with *Eco*R I; 10: pGEX4T-1/NA digested with *Eco*R I and *Xho* I; 11: PCR for NA.

2.3 HA、NA 蛋白抗原片段的表达

质粒转化表达菌 *E. coli* BL21/rosetta, 经 1 mmol/L IPTG 诱导 3 h 后, SDS-PAGE 电泳检测, 可见特异性表达带, 分子量与预期大小相同。可溶性分析显示此蛋白为包涵体形式表达。

2.4 表达产物的纯化

2.4.1 pET32a (+)/HA(截短)、pET32a (+)/NA(截短)重组质粒表达产物的纯化: 用 Ni-NTA agarose 亲和层析柱纯化包涵体, 在 8 mol/L 尿素(pH 4.5)洗脱时 Bradford 试剂有强烈的颜色变化, 经 SDS-PAGE 检测, 表明目的蛋白得到纯化, 其中表达蛋白纯度占总蛋白的 90%以上, 浓度约为 3 g/L (图 4 和图 5)。纯化后的蛋白经 PBS 透析复性后保存。

2.4.2 pGEX4T-1/HA、pGEX4T-1/NA 重组质粒表达产物的纯化: 超声破碎后的沉淀溶于尿素中, 用 PBS 梯度稀释使其复性, 上 GSTrap 4B 亲和层析柱, 在 10 mmol/L 还原型谷胱甘肽洗脱时 Bradford 试剂有强烈的颜色变化, 经 SDS-PAGE 检测, 表明目的蛋白得到纯化, 其中表达蛋白纯度占总蛋白的 90%以上, 浓度为约 3 g/L。

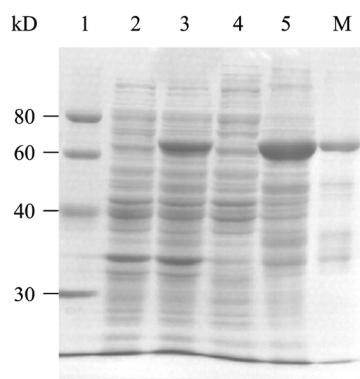


图 4 HA 重组蛋白的表达和纯化

Fig. 4 Expression and purification of HA

注: M: 蛋白质 marker; 1: 未经 IPTG 诱导的 BL21; 2: IPTG 诱导后的 BL21; 3: 超声破菌后上清; 4: IPTG 诱导后的不可溶蛋白; 5: 纯化后的蛋白。

Note: M: Protein marker; 1: BL21 before IPTG induction; 2: BL21 after IPTG induction; 3: Ultrasonic supernatant after IPTG induction; 4: Crude extract of infusibility protein; 5: Purified recombinant protein.

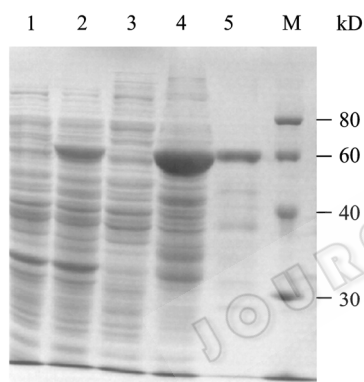


图 5 NA 重组蛋白的表达和纯化

Fig. 5 Expression and purification of NA

注: M: 蛋白质 marker; 1: 未经 IPTG 诱导的 BL21; 2: IPTG 诱导后的 BL21; 3: 超声破菌后上清; 4: IPTG 诱导后的不可溶蛋白; 5: 纯化后的蛋白。

Note: M: Protein marker; 1: BL21 before IPTG induction; 2: BL21 after IPTG induction; 3: Ultrasonic supernatant after IPTG induction; 4: Crude extract of infusibility protein; 5: Purified recombinant protein.

2.5 纯化产物免疫学活性的鉴定

2.5.1 ELISA: 检测结果显示: 重组蛋白与兔抗禽流感病毒 H9N2 血清有阳性反应, 提示表达的重组蛋白与病毒自身蛋白有相似的免疫原性(数值略)。

2.5.2 Western blotting: 结果显示重组蛋白与兔抗禽流感病毒 H9N2 血清反应有特异性条带产生, 分子量大小与预计一致(图 6 和图 7)。

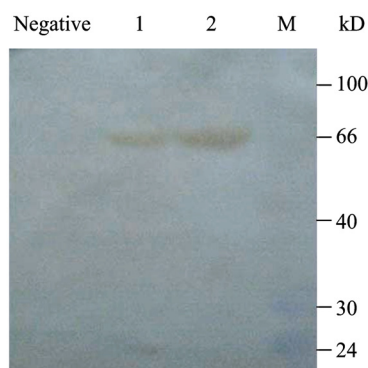


图 6 重组蛋白与兔抗禽流感病毒 H9N2 血清的 Western blotting 分析(截短)

Fig. 6 Western blotting analysis recombinant protein and avian influenza virus H9N2 antiserum (Cut)

注: Negative: BL21; M: 预染蛋白 marker; 1: NA 重组蛋白; 2: HA 重组蛋白。

Note: Negative control: BL21; M: Prestained protein marker; 1: Recombinant protein NA; 2: Recombinant protein HA.

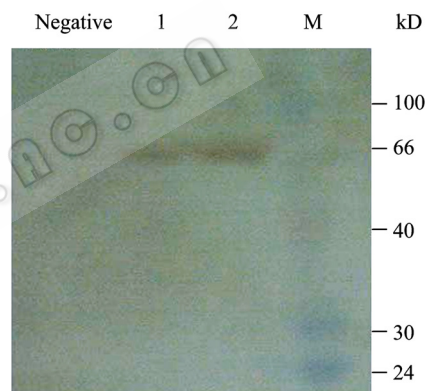


图 7 重组蛋白与兔抗禽流感病毒 H9N2 血清的 Western blotting 分析(全长)

Fig. 7 Western blotting analysis recombinant protein and avian influenza virus H9N2 antiserum (Full length)

注: Negative: Rosetta; M: 预染蛋白 marker; 1: HA 重组蛋白; 2: NA 重组蛋白。

Note: Negative control: Rosetta; M: Prestained protein marker; 1: Recombinant protein HA; 2: Recombinant protein NA.

3 讨论

禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV)属于正粘病毒科流感病毒属, 病毒基因组为分节段单股负链 RNA 病毒, 基因组大约为 13.6 kb, 由大小不等的 8 个基因片段组成。编码 PB2、PB1、PB3 聚合酶、血凝素(HA)、神经氨酸酶(NA)、核蛋白(NP)、基质蛋白 M1 和离子通道蛋白 M2、非结构蛋白 NS1、NS2 共 10 种不同的基因产物^[15]。SIV 的 RNA 片段 4 和片段 6 分别编码血凝素 HA 和神经氨酸酶 NA, 它们是流感病毒亚型分类的依据。目前已发现的流

感病毒 HA 亚型 16 个, NA 亚型有 9 个^[16-17]。A 型流感病毒亚型众多易变, 且各亚型之间无血清学交叉反应。

研究表明, H9N2 亚型 AIVHA 基因是病毒表面主要糖蛋白之一, 以三聚体形式存在于囊膜表面, HA 是 IV 感染宿主细胞的先决条件, 在病毒吸附、穿膜以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 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淋巴细胞(CTL)反应。大肠杆菌表达系统不能识别和加工真核基因的信号肽片段, 故笔者选择了去掉信号肽的 HA 基因进行表达。HA 分为重链 HA1 与轻链 HA2 区; HA1 区与宿主细胞表面的受体唾液酸结合, HA2 区与宿主细胞表面发生膜融合从而使 IV 进入宿主细胞。所以, 对 HA 蛋白的研究对防制 IV 侵入宿主细胞有重要的作用^[18-19]。

神经氨酸酶(NA)是镶嵌在 A 型流感病毒双层类脂膜上的表面糖蛋白之一, 具有糖苷外切酶活性, 介导病毒对敏感细胞的侵染及协助子代病毒粒子的成熟和释放, 与病毒的宿主嗜性及毒力有关。研究表明, NA 作为一种重要的病毒表面抗原, 具有免疫原性, 该重组蛋白免疫动物后能诱导机体产生特异的抗体, 其诱导产生的抗体虽然不能完全抵御强毒攻击, 但可降低机体内的病毒复制水平, 减轻临床症状。用 NA 蛋白成分辅以全病毒灭活疫苗免疫机体后可相应地提高 HA 及 NA 抗体效价, 并可在一定程度上增强对异源毒株攻击的保护性。目前, NA 蛋白在诱导免疫力方面的作用, 特别是在交叉保护性方面的功能已成为研究的热点^[20-21]。

禽流感病毒的流行范围遍及全球且目前尚无有效地预防措施, 因此, 禽病毒基因工程疫苗和快速诊断试剂的研制有着广阔的前景。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, 其他还有病毒中和、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。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。

本研究应用原核表达系统具有成本低, 操作简单, 生产周期短, 适于大规模生产, 并且表达的蛋白易于纯化等优点^[22]。利用基因工程手段将 HA、NA 基因的信号肽缺失掉, 采用两种原核表达载体: pET32a (+)载体和 pGEX4T-1 载体表达缺失信号肽的 HA 和 NA 基因, 结果表明: 不同表达系统中蛋白表达水平相差大, pET32a (+)/BL21 中没有得到表达, pGEX4T-1/rosetta 中获得较高表达, 说明所选择的载体系统会影响蛋白基因的表达。pET32a (+)/BL21 体系不表达, 推测可能是因其尾部序列与头部序列会形成复杂的二级结构, 阻碍蛋白翻译的起始, 故决定分别切去头部和尾部约 150 bp 序列试表达, 因此基因为结构蛋白, 一般 7 个氨基酸即可形成一个抗原决定簇, 故切去头部或尾部小段片段不会影响免疫活性, 结果截短头部还是未表达, 截短尾部获得了高效表达, 说明主要还是尾部序列影响表达。采用 pGEX4T-1 载体表达缺失信号肽的 HA 和 NA 基因, 结果 HA 和 NA 都获得了高效表达。

免疫学鉴定确定其具有较好的免疫反应性, 后续的试验将利用此重组蛋白进行单克隆抗体和免疫学快速检测试剂的研制, 本工作作为研制开发相关的诊断试剂和基因工程疫苗打下了基础。

致谢: 对“人禽流感阻断技术研究课题组”全体人员致以诚挚的感谢, 感谢他们对本文做出的无私奉献!

参考文献

- [1] Christensen JP, Detz HH, Bisgaard M. Phenotypic and genotypic characters of isolates of *Pasteurella multocida* obtained from backyard poultry and from two outbreaks of avian cholera in avifauna in Denmark. *Avian Pathol*, 1998(27): 373-381.
- [2] Berman SM, Hirsh DC. Partial characterization of plasmids from *Pasteurella multocida* isolated from turkeys. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 1978(14): 348-352.
- [3] Homme PJ, Easterday BC. Response of pheasants, ducks and geese to influenza A turkey Wisconsin 1996 virns. *Avian Diseases*, 1970, 14(2): 285-290.
- [4] Alexander DJ. Proceeding of the Fourth International Symposium on Avian Influenza. Athens, GA: United

- States Animal Health Association, 1997: 9–13.
- [5] 张瑞华, 金梅林, 王贵华, 等. 禽流感血凝素基因的原核表达及其 H9 亚型诊断中的作用. 生物工程学报, 2005, **21**(2): 315–319.
- [6] Guan Y, Short ridge KF, Krauss S, *et al.* Molecular characterization of H9N2 influenza viruses: were they the donors of the “internal” genes of H5N1 viruses in Hong Kong. *Proc Natl Acad Virol USA*, 1999, **96**(16): 9363–9367.
- [7] Guo YJ. Characterization of the pathogenicity of members of the newly established H9N2 Influenza virus lineage in ASIA. *Virology*, 2000(267): 279–288.
- [8] 连晓雯, 杜惠芬, 李克生, 等. 抗 H5N1 型禽流感病毒单克隆抗体的制备与鉴定. 甘肃农业大学学报, 2007, **42**(2): 26–29.
- [9] 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(293): 393–396.
- [10] Berman SM, Hirsh DC. Partial characterization of plasmids from *Pasteurella multocida* isolated from turkeys. *Antimicroblal Agents Chemotherapy*, 1978(14): 348–352.
- [11] 甘孟侯. 禽流感. 北京: 中国农业出版社, 1995: 15–62.
- [12] Imanaka T, Tsunekawa H, Aiba S. Phenotypic stability of trpoperon recombinant plasmids in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol*, 1980, **118**(1): 253–261.
- [13] Ron AM, Fouchier, Vincent M, *et al.* Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *Journal of Virology*, 2005, **79**(5): 2814–2822.
- [14] 宋建领, 张富强, 王金萍, 等. H5N1 亚型禽流感病毒神经氨酸酶基因的克隆与表达. 中国病毒学, 2006, **21**(1): 43–46.
- [15] Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, *et al.* Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev*, 1992(56): 152–179.
- [16] Pereira HG, Tumova B, Law VG. Animal influenza A virus. *World Health Organization*, 1965(32): 855–860.
- [17] 殷震, 刘景华. 动物病毒学. 北京: 科学出版社, 1997: 704–735.
- [18] 曹康, 张卫东, 李虹, 等. 流感病毒血凝素基因 HA1 区的克隆及其真核表达载体的构建. 中国人兽共患病杂志, 2005, **21**(1): 11–13.
- [19] CLAAS EC, Osterhaus AD, Van beek R, *et al.* Human influenza H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet*, 1998, **35**(1): 472–477.
- [20] Annie Mak, Ronak Rahmanian, Victor Lei, *et al.* Longitudinal analysis of genotype distribution of influenza A virus from 2003 to 2005. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006, **44**(10): 3583–3588.
- [21] 王全英, 乔传玲, 张洪波, 等. H5N1 亚型禽流感病毒 NA 基因在重组禽痘病毒中的表达及其产物的免疫原性. 中国兽医科学, 2007, **37**(4): 312–315.
- [22] 郑其升, 刘华雷, 张晓勇, 等. H9N2 亚型 AIV HA 基因的原核表达及间接 ELISA 方法的建立. 中国病毒学, 2005, **20**(3): 293–297.

稿件书写规范

高校教改纵横栏目简介及撰稿要求

“高校教改纵横”栏目, 原“高等院校教学”, 是中国微生物学会主办的科技期刊中唯一的教学类栏目, 也是中国自然科学核心期刊中为数不多的教学栏目。该栏目专为微生物学及其相关学科领域高校教师开辟, 一方面为高校微生物学学科的教师提供一个发表论文的平台, 同时微生物关联学科的一部分确实优秀的论文也可以在此发表, 是微生物学及相关领域教学研究、交流、提高的园地。

本栏目的文章有别于其它实验类研究报告, 特色非常鲜明。要求作者来自教学第一线, 撰写的稿件内容必须要有新意、要实用, 不是泛泛地叙述教学设计与过程, 而是确实有感而发, 是教学工作中的创新体会, 或者在教学中碰到的值得商榷的、可以与同行讨论的有价值的论题。在内容选材上应该有鲜明的特点和针对性, 做到主题明确、重点突出、层次分明、语言流畅。教师的教学思路应与时俱进, 注意将国内外新的科技成果和教学理念贯穿到教学之中, 只有这样才能真正起到教与学的互动, 促进高校生物学教学的发展, 更多更好地培养出国家需要的高科技创新人才。这也是本栏目的目的所在。

同时, 为了给全国生物学领域的教学工作者提供一个更广阔更高层次的交流平台, 本栏目还开辟了“名师名课”版块, 原“名师讲堂”。邀约相关生命科学领域, 如微生物学、分子生物学、生物医学、传染病学、环境科学等的教学名师、知名科学家就教学和学生培养发表观点, 推荐在教学改革、教学研究、引进先进教学手段或模式以及学生能力培养等方面有突出成绩的优秀论文, 为高校教师以及硕士、博士研究生导师提供一个可资交流和学习的平台, 促进高校教学和人才培养水平的提高。

欢迎投稿! 欢迎对本栏目多提宝贵意见!