

禽流感血凝素基因的原核表达及其在 H9 亚型诊断中的应用

Expression of Hemagglutinin of Avian Influenza Virus (AIV) and its Application in Diagnosis of AIV H9 Subtype

张瑞华, 金梅林*, 王贵华, 喻正军, 赵思婷, 李红超, 谭亚娣, 陈焕春

ZHANG Rui-Hua, JIN Mei-Lin*, WANG Gui-Hua, YU Zheng-Jun, ZHAO Si-Ting, LI Hong-Chao, TAN Ya-Di and CHEN Huan-Chun

华中农业大学动物医学院动物病毒室, 武汉 430070

Lab of Animal virus, College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan, 430070, China

摘 要 根据 H9N2 亚型禽流感病毒血凝素基因序列设计并合成引物, 从本室分离并保存的 H9N2 亚型禽流感病毒中扩增了预计约 1683bp 的血凝素基因, 将此扩增产物克隆进 pMD18-T 载体, 限制性酶切及序列测定后, 进一步将其亚克隆到 pGEX-KG 中, 与 GST 蛋白融合表达。SDS-PAGE 和 Western 印迹表明缺失信号肽后的 HA 基因在大肠杆菌中获得了表达, 表达产物具有免疫学活性, 融合蛋白的分子量约为 90kD, 位于包涵体中。包涵体经变性、复性处理, 利用复性产物作为抗原包被酶标板建立了检测 H9 亚型禽流感抗体 ELISA 方法。结果表明应用 HA 重组蛋白作为诊断 H9 亚型禽流感抗原具有特异性强、敏感性高、重复性好的特点, 可用于 H9 亚型禽流感抗体的检测。

关键词 禽流感病毒, 血凝素基因, 原核表达, ELISA

中图分类号 Q786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2005)02-0315-05

Abstract In order to differently diagnose avian influenza virus (AIV) subtypes, the HA gene of AIV H9 subtype was cloned, expressed and utilized in an enzyme-linked immunoad sorbent assay (ELISA). HA gene (1683bp) of H9N2 AIV was amplified by RT-PCR from a strain of field isolated H9N2 AIV, and its identity was confirmed by sequencing. The HA gene was subcloned into prokaryotic expression vector pGEX-KG with its secretion signal sequence removed. The expressed HA-GST fusion protein in *E. coli* BL21 was characterized by SDS-PAGE and western blotting analysis as a 90kD protein with immunogenicity. The fusion protein was present primarily in inclusion bodies and was purified via denaturation and renaturation. The HA-GST fusion protein was used to establish an indirect ELISA for the detection of antibodies to H9 subtypes of AIV. The assay has 91.57% specificity to H9 AIV, 92.31% sensitivity and excellent reduplication. It could be used to differently detect antibodies to H9 AIV.

Key words avian Influenza virus, hemagglutinin (HA) gene, prokaryotic expression, ELISA

禽流感(AI)是由 A 型流感病毒引起的一种严重危害禽类健康的急性传染病^[1]。该病自 1878 年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(AIV)引起的 AI 暴发^[2-4], 其中 H9 亚型禽流感最早报道于 1966

年^[5]。20 世纪 90 年代开始, H9 亚型 AIV 已在亚洲鸡群广泛流行^[6], 给养禽业带来沉重的打击, 也造成无法估量的经济损失, 尤其是 H9N2 亚型 AIV, 它不仅流行于全世界, 而且可以感染人类^[7-8]。同时还是引起 1997 年香港流感事件的

Received: September 9, 2004; Accepted: November 11, 2004.

* Corresponding author. Tel: 86-27-87282608; E-mail: hzauvet@public.wh.hb.cn

H5N1 亚型 AIV 的内部基因的供体^[4]。因此,开展对 H9 亚型禽流感病毒的研究,对养禽业和公共卫生都有重大意义。

禽流感病毒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,编码至少 10 种病毒蛋白,其中片段 4 编码血凝素(HA)糖蛋白,它为病毒最重要的表面抗原,具有亚型特异性,同时可以诱导特异性抗体的产生^[9]。因此,利用 HA 蛋白有望建立一种诊断禽流感亚型的方法。A 型流感病毒亚型众多,易变。目前,已经发现了 15 种 H 亚型和 9 种 N 亚型,且各亚型之间无血清学交叉反应。从而导致该病的诊断和治疗非常困难。因此,迫切需要一种较为理想的禽流感亚型诊断方法。本研究利用禽流感 H9 亚型 HA 蛋白作为诊断抗原建立了诊断禽流感亚型的 ELISA 检测方法。该方法快速、灵敏、准确、简便,可以直接定位到亚型,目前,国内尚无相关报道。该方法的建立对进出口检验检疫,禽流感的防制具有十分重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒与菌种:鸭源 H9N2 亚型禽流感病毒由本室分离并保存,经国家流感中心鉴定为 H9N2 亚型。*E. coli* DH5 α 、*E. coli* BL21 由本室保存提供。

1.1.2 质粒及相关试剂:pMD18-T 载体购自宝生物工程公司。pGEX-KG 由本室保存。OMEGA Biotek RNA-Solv Reagent、TaKaRa One-step RNA PCR Kit(AMV)、Taq 聚合酶以及相关限制酶均购自宝生物工程公司。UNIQ-10 柱式离心式 DNA 凝胶回收试剂盒购自上海生工生物工程公司。

1.1.3 血清和酶标抗体:鸡马立克氏病、鸡新城疫、鸡副流感、鸡传染性支气管炎、鸡传染性喉气管炎、H5、H7、H9 亚型禽流感、鸡传染性法式囊、鸡腺病毒 I 型、鸡腺病毒 III 型标准阳性血清、标准阴性血清购自北京实验动物中心。辣根过氧化物酶标记羊抗鸡 IgG 购于华美生物公司。AIV 抗体检测试剂盒购自美国 IDEXX 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物:据 GenBank 收录的 H9N2 亚型禽流感病毒 A/Chicken/Shandong/2/99 分离株血凝素基因序列设计并合成引物 HAP1、HAP2、HAP3、HAP4。其中 HAP1、HAP2 用于扩增从 ATG 到 TAA 一个完整阅读框架的 HA 基因、HAP3、HAP4 用于扩增缺失 HA 蛋白信号肽序列的 HA 基因。引物由上海生工生物工程公司合成,其序列为:

HAP1:5'CGC GGA TCC ATG GAA ACA ATA TCA CT 引入 BamH I 的酶切位点

HAP2:5'CGC GAG CTC TTA TAT ACA AAT GTT GC 引入 Sac I 的酶切位点

HAP3:5'GCG GAT CCG ATA AAA TCT GCA TCG GC 引入 BamH I 的酶切位点

HAP4:5'CGG AAG CTT TTA TAT ACA AAT GTT GC 引入 Hind III 的酶切位点

1.2.2 HA 基因的扩增和克隆:参照 OMEGA Biotek RNA-

Solv Reagent 说明书提取的病毒基因组 RNA,用来做模板。引物: HAP1、HAP2。参照 TaKaRa One-step RNA PCR Kit(AMV)说明书进行 HA 基因的 RT-PCR 扩增。PCR 产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测进行鉴定。鉴定后的 PCR 产物连入 pMD18-T 载体,经 BamH I + Sac I 双酶切鉴定含有正确插入片段的重组质粒进行测序,阳性重组克隆子命名为 pMD-HA。

1.2.3 HA 基因的亚克隆及缺失修饰:引物: HAP3、HAP4。模板: pMD-HA。常规 PCR 方法扩增缺失掉 HA 蛋白信号肽的 HA 基因。经 BamH I + Hind III 双酶切及序列测定的方法筛选阳性重组克隆子,并命名为 pMD-HAM。

1.2.4 重组表达质粒的构建:用 BamH I + Hind III 双酶切 pMD-HAM 和表达载体质粒 pGEX-KG,回收 HAM 片段和表达载体质粒,T4 DNA 连接酶 16℃ 连接过夜,连接产物转化 *E. coli* DH5 α ,经 BamH I + Hind III 双酶切鉴定,获得含目的片段的阳性重组子命名为 pGEX-HAM。

1.2.5 转化菌的诱导表达与表达产物的检测:转化菌的诱导表达与包涵体的提取按 pGEX 表达系统操作手册进行。表达产物的 SDS-PAGE 和 Western blot 均按文献[10]进行。包涵体的溶解复性及蛋白浓度的测定按文献[11]进行。

1.2.6 ELISA 检测方法:间接 ELISA 最佳反应条件的选择:通过方阵滴定来决定抗原最佳包被浓度和血清最佳稀释度。抗原从 1:10、1:20 稀释到 1:1280,分别加到酶标板的 1 至 8 行。血清从 1:10、1:20 稀释到 1:320。阳性血清按其稀释度加到第 1 至 6 列,阴性血清按其稀释度加到第 7 至 12 列。按间接 ELISA 方法进行,测定 OD₆₃₀ 值。以阳性 OD_{630nm} 值/阴性 OD_{630nm} 值(P/N 值)最大的孔所对应的抗原包被浓度和血清稀释度为最佳抗原包被浓度和血清稀释度。

结果判定标准的确定:将临床送检的经 HI 检测为阴性的 57 份鸡血清,进行 ELISA 检测均为阴性,计算该 57 份血清的平均值 \bar{x} ,标准差 SD ,阴阳界限计算公式 $\bar{x} + 2SD$ 。

重复性试验:用相同批次和不同批次的酶标板对不同抗体水平的血清样品(其中 5 份阳性血清,3 份阴性血清)进行批内和批间重复性测定,按照参考文献[12]进行。计算批内和批间的吸收变异系数。

分析特异性试验:分别检测鸡新城疫、鸡马立克氏病、鸡传染性支气管炎、鸡传染性喉气管炎、鸡传染性法式囊、鸡腺病毒 I 型、鸡腺病毒 III 型、鸡副流感阳性血清及 H5、H7、H9 标准阳性血清。

诊断特异性、敏感性与符合率试验:选择用国内常用的检测方法,即血凝抑制试验(HI)与本研究建立的 ELISA 诊断方法相比较来确定该 ELISA 诊断方法的诊断特异性、敏感性与符合率。

间接 ELISA 与进口 ELISA 试剂盒的对比试验:进口 ELISA 试剂盒按进口试剂盒说明书操作,与 HA-ELISA 对 16 份 SPF 鸡血清、10 份 H9 亚型 AIV 攻毒鸡血清及临床送检的 75 份鸡血清,共 101 份血清进行检测。

间接 ELISA 的应用:用此 ELISA 方法对深圳、湖北安陆、

湖北新洲,湖北武汉等地区的 420 份送检血清进行检测。

2 结果

2.1 HA 基因的扩增和克隆

One Step RT-PCR 扩增产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析表明:扩增出一条约 1683bp 大小的特异性片段,与预期的结果相符(图 1)。RT-PCR 扩增产物经回收纯化后与 pMD18-T 载体连接,转化 *E. coli* DH5 α 。经 *Bam*H I + *Sac* I 双酶切鉴定,获得了约 1683bp 和 2700bp 左右的两条带,与预期的结果相符。序列测定结果显示:HA 基因序列为 1683bp 涵盖了从 ATG 到 TAA 一个完整阅读框架,与 GenBank 收录的其他禽流感 H9N2 亚型分离株同源性在 82% ~ 99%。与 A/Chicken/Shandong/2/99 的同源性最高,为 99%,与 A/turkey/California/189/66 同源性最低,为 82%。与同一亚型内 HA 的同源性一般在 80% ~ 100%^[13] 的研究结果相符。

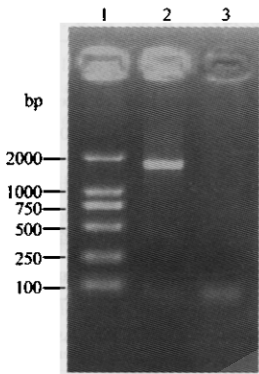


图 1 AIV RT-PCR 扩增 HA 结果

Fig.1 RT-PCR product of AIV strain HA gene

1:DL2000 marker; 2: RT-PCR product; 3:negative control.

2.2 HA 基因的亚克隆及缺失修饰

以 pMD-HA 为模板,特异性引物 HAP3、HAP4,进行常规 PCR。PCR 扩增产物结果显示:扩增出一条约 1600bp 大小的特异性片段,与预期的结果相符。PCR 扩增产物经回收纯化后与 pMD18-T 载体连接,转化 *E. coli* DH5 α ,经 *Bam*H I + *Hind*III 双酶切对重组质粒进行鉴定,结果显示获得了 1600bp 和 2700bp 左右的两条带,与预期结果相符。

2.3 重组原核表达质粒的构建

用 *Bam*H I + *Hind*III 双酶切阳性重组子,获得了 1600bp 和 5000bp 左右的两条带(图 2),说明缺失了 HA 蛋白信号肽的 HA 基因插入了原核表达载体 pGEX-KG 中相应的位置。

2.4 表达产物的 SDS-PAGE 和 Western blot 结果

SDS-PAGE 胶结果显示:含 pGEX-HAM 的重组质粒的 *E. coli* BL21 在约 90kD 处有明显的表达带,是 HA 蛋白与 GST 蛋白融合表达的产物,HA 蛋白约 63kD,与 GST 的 26kD 融合后约为 90kD。而含 pGEX-KG 的 *E. coli* BL21 的对照在约 26kD 有明显的表达带,相当于 GST 蛋白的分子量。以上结果说明目的基因获得了表达(图 3)。Western blot 结果表明:90kD 的蛋白带与抗阳性 H9 亚型 AIV 的阳性血清发生了特

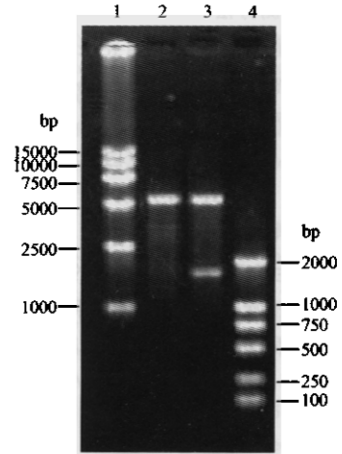


图 2 重组表达质粒的酶切结果

Fig.2 Identification of recombinant expression plasmid

1:DL15000 marker; 2:pGEX-KG; 3:pGEX-HAM/*Bam*H I + *Hind*III; 4:DL2000 marker.

异性的免疫反应,证实表达产物具有很好的抗原性(图 4)。

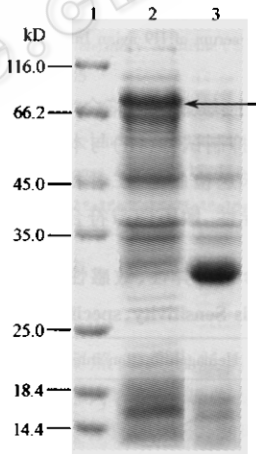


图 3 原核表达载体 pGEX-HAM 诱导表达产物的 SDS-PAGE 检测

Fig.3 SDS-PAGE analysis of the expressed products by pGEX-HAM

1:protein marker;2:pGEX-HAM;3:pGEX-KG.



图 4 表达产物的 Western blot 检测

Fig.4 Western blot analysis of the expressed proteins

1:negative control;2:proteins expressed by pGEX-HAM.

2.5 ELISA 检测方法

2.5.1 ELISA 最适条件及阴阳界限的确定: 方阵滴定表明, 抗原最佳包被浓度为 1:80, 即 0.8 mg/孔, 血清最佳稀释度为 1:80。计算得平均值 \bar{x} 等于 0.197, SD 等于 0.077, 求得阴阳界限为 0.351。结果判定: 以空白孔调零, 在酶标仪上测各孔 OD_{630} 值, $OD_{630} \geq 0.351$ 判为阳性, 疑为禽流感病毒感染; $OD_{630} < 0.351$ 判为阴性。

2.5.2 重复性试验: 取相同批次的 5 块包被抗原的酶标板 (批内) 和不同批次的 5 块包被抗原的酶标板 (批间) 检测 8 份抗体水平不同的血清样品 (5 份阳性血清和 3 份阴性血

清), 结果显示批内重复的吸收变异系数在 4.5% ~ 7.3% 之间。批间重复的吸收变异系数在 4.7% ~ 9.6% 之间, 说明该诊断方法具有良好的重复性。

2.5.3 分析特异性试验: 检测鸡马立克氏病、鸡腺病毒 I 型、鸡腺病毒 III 型、鸡副流感、鸡传染性支气管炎、鸡传染性喉气管炎、鸡新城疫、鸡传染性法氏囊这 8 种疫病的阳性血清及 H5、H7 亚型禽流感标准阳性血清均无交叉反应。检测 H9 亚型禽流感标准阳性血清结果为阳性, 标准阴性血清结果为阴性, 表明该方法的分析特异性良好。结果见表 1。

表 1 分析特异性试验
Table 1 The result of specificity test

Serum		Standard positive serum											
Serial number		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
OD_{630}		0.049	0.089	0.118	0.103	0.130	0.201	0.230	0.149	0.301	0.242	1.097	0.196

Note: 1: positive serum of Marek's disease (MD); 2: positive serum of I fowl adenovirus (FAV); 3: positive serum of III fowl adenovirus (FAV); 4: positive serum of avian Parainfluenza; 5: positive serum of infectious bronchitis (IB); 6: positive serum of infectious laryngotracheitis (ILT); 7: positive serum of Newcastle disease (ND); 8: positive serum of infectious bursal disease (IBD); 9: positive serum of H5 avian Influenza; 10: positive serum of H7 avian Influenza; 11: positive serum of H9 avian Influenza; 12: negative serum.

2.5.4 诊断特异性、敏感性与符合率试验: 选择用国内常用的检测方法: 血凝抑制试验 (HI) 与本研究建立的 ELISA 诊断方法同步检测临床送检血清, 二者相比较来确定该 ELISA 诊断方法的诊断特异性、敏感性与符合率。结果见表 2。

表 2 诊断特异性、敏感性与符合率试验
Table 2 Diagnosis Sensitivity, specificity and coincidence test

Type of test		Hemagglutination inhibition test (HI)		Total
		+	-	
ELISA	+	239	6	245
	-	22	72	94
Total		261	78	339

此结果显示: 诊断特异性为 91.57%, 诊断敏感性为 92.31%, 符合率为 91.74%。说明该方法具有良好的诊断特异性、敏感性与符合率。

2.5.5 间接 ELISA 与进口试剂盒的对比试验: 进口试剂盒检测 16 份 SPF 鸡血清均为阴性, 10 份 H9 亚型 AIV 攻毒鸡血清均为阳性, 间接 ELISA 诊断方法对此血清样品进行检测, 试验结果均一致。送检的 75 份鸡血清经进口 ELISA 检测阳性率为 65% (49/75), 间接 ELISA 进行同步检测, 试验结果一致。

2.5.6 临床送检血清的间接 ELISA 检测结果: 临床检测结果见表 3。

试验结果显示, 利用禽流感病毒 HA 基因表达抗原, 建立的 ELISA 检测方法可以快速、准确地检测 H9 亚型禽流感。

表 3 临床检测结果

Table 3 The clinical detection of AI sera antibody

Source of serum	Total number	Positive number	Positive rate/%
Shenzhen of Guangdong province	90	38	42.2
Wuhan of Hupeh province	52	37	71.2
Anlu of Hupeh province	185	155	83.8
Xinzhou of Hupeh province	93	35	37.6
Total number	420	265	63.1

3 讨论

本研究采用两种原核表达载体: pET-28a 载体和 pGEX-KG 载体表达 HA 蛋白, 均没有获得表达。根据 HA 蛋白所含的 4 个结构域: 信号肽 (前导序列)、胞浆域、跨膜域和胞外域, 利用基因工程手段将 HA 基因的信号肽缺失掉, 进一步采用 pET-28a 载体和 pGEX-KG 载体表达缺失信号肽的 HA 基因, 结果表明: 不同表达系统中 HA 表达水平相差很大, pET-28a/B121 中没有得到表达, pGEX-KG/B121 中获得较高表达, 说明所选的载体系统会影响 HA 基因的表达而且信号肽在表达中起到了负面作用。本研究建立的间接 ELISA 的基础是诊断抗原具有有良好的抗原性, 但形成了包涵体的 HA 蛋白是没有其天然抗原性的, 因此包涵体的溶解、复性是关键点。

采用血凝素 (HA) 蛋白作为包被抗原建立了检测 H9 亚型的禽流感抗体的间接 ELISA 方法其特异性好, 与 H5、H7 亚型禽流感标准阳性血清没有交叉反应, 同时与鸡马立克氏病、鸡新城疫、鸡副流感、鸡传染性支气管炎、鸡传染性喉气管炎、鸡传染性法式囊、鸡腺病毒 I 型、鸡腺病毒 III 型等 8 种

疫病的标准阳性血清呈阴性反应。为了考核该间接 ELISA 的敏感性,用 101 份鸡血清的检测方法与进口试剂盒检测结果比较,表明 2 种方法的阳性符合率、阴性符合率及总符合率均为 100%。通过对试验样品的检测应用表明,该方法可用于临床实践中。

血凝素是位于病毒囊膜表面的一种蛋白质,具有亚型特异性,还可以诱导特异性抗体的产生。因此利用 HA 蛋白作为包被抗原,可以直接鉴定到亚型,省时、省力、节约资源。另外,我们研制的间接 ELISA 方法操作简便、特异性强、结果判定方便直观、快速、准确。适用于禽流感的免疫抗体检测、现地疫病普查及口岸检疫等领域。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Cheng J(程坚), Liu HQ(刘红旗), Peng DX(彭大新) *et al.* Analysis of hemagglutinin genes of two avian influenza virus(H9N2) isolates. *Chinese Journal of Virology* (病毒学报), 2002, **18**(3):285-287
- [2] Chen BL(陈伯伦), Zhang ZJ(张泽纪), Chen WB(陈伟斌) *et al.* The research of avian influenza virus: I isolation and preliminary serological identification of avian influenza virus-type A from chickens. *Chinese Journal of Veterinary Medicine* (中国兽医杂志), 1994, **22**(10):3-5
- [3] Calnek BW, John BH, Beare CW *et al.* Disease of Poultry, 10th ed. Iowa: Iowa State University Press, 1997, pp.583-605
- [4] Guan Y, Shortridge 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 Sci USA*, 1999, **96**(16):9363-9367
- [5] Homme PJ, Easterday BC. Response of pheasants, ducks, and geese to influenza A-turkey-Wisconsin-1966 virus. *Avian Diseases*, 1970, **14**(2):285-290
- [6] Alexander DJ. Proceeding of the fourth international symposium on avian influenza. Athens, GA: United States Animal Health Association, 1997, pp.9-13
- [7] Guo YJ, Krauss S, Senne DA *et al.* Characterization of the pathogenicity of members of the newly established H9N2 influenza virus lineages in Asia. *Virology*, 2000, **267**(2):279-288
- [8] Peiris M, Yuen KY, Leung CW *et al.* Human infection with influenza H9N2. *Lancet*, 1999 **354**(9182):916-917
- [9] Gan MH(甘孟侯). Avian Influenza. Beijing: Beijing Agricultural University Press(北京农业大学出版社), 1995
- [10] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- [11] Marshak DR, Kadonaga JT, Burgess RR *et al.* Strategies for Protein Purification and Characterizations: A Laboratory Course Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996
- [12] Li HY(李海燕), Yu KZ(于康震), Xin XG(辛晓光) *et al.* Development and validation of indirect enzyme-linked immunosorbent assay test kit for detecting anti-influenza virus antibodies. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine* (中国预防兽医学报), 2000, **22**(3):182-185
- [13] Nobusawa E, Aoyama T, Kato H. Coparison of complete amino acid sequence and receptor-binding properties among 13 serotypes of hemagglutinin of influenza A virus. *Virology*, 1991, **182**:475-485