H_9N_2 亚型 AIV HA 基因的原核表达及间接 ELISA 方法的建立

郑其升[1]，刘华雷[1]，张晓勇[1]，周 斌[1]，曹瑞兵[1]，任雪枫[1]，李 鹏[1,2]，陈溥言[1**]

(1. 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，江苏南京 210095；2. 河北省畜牧兽医站，河北保定 071000)

Prokaryotic Expression and the Establishment of a Putative Indirect ELISA Assay for the HA Gene of Avian Influenza Virus H_9N_2 subtype

ZHENG Qi-sheng[1], LIU Hua-lei[1], ZHANG Xiao-yong[1], ZHOU Bin[1], CAO Rui-bing[1], REN Xue-feng[1], LI Peng[1,2], CHEN Pu-yan[1**]

(1. *Key Laboratory of Animal Disease Diagnosis and Immunology, Nanjing Agricultural University, Nanjing* 210095, *China*; 2. *Animal Husandry and Veterinary Station of Hebei Province, Baoding* 071000, *China*)

Abstract: The complete *HA* gene of AIV H9N2 subtype was amplified with PCR method using a pair of specific primers designed according to the relevant nucleotide sequence from GenBank. The PCR product was successively cloned into pMD18-T and pET-32a (+) to get a prokaryotic expression vector pET-HA. The target gene was successfully expressed in the *E. coli* BL21(DE3) host cell in inclusion body when induced with IPTG. The expression was optimized with proper inducing conditions of 0.7 mmol/L IPTG and 3 hours induction. The highest expression of the target protein was up to 30.8% of the total bacterial proteins. Western-blot analysis proved that the recombinant protein had good immunoreactivity against H9 subtype AIV antibody. The indirect ELISA method for the detection of H9 subtype AIV antibody in chicken serum was established after the optional working circumstance for the ELISA assay (antigen concentration: 4μg/mL; serum dilution: 1:80) was tried out with chessboard titration. The positive criterion of this ELISA method is $OD_{待检血清} > 0.5$ and $OD_{标准阳性血清} > 1.0$; $OD_{标准阴性血清} < 0.1$。

Key words: Avian Influenza Virus (AIV) H_9N_2 subtype; *HA* gene; Prokaryotic expression; Indirect ELISA

摘要：根据 GenBank 公开发表的禽流感病毒(Avian Influenza Virus, AIV) H9N2 亚型血凝素基因(*HA*)序列设计引物，用 PCR 方法从重组质粒 pUC-*HA* 中扩增 H9N2 亚型禽流感病毒去除信号肽的血凝素基因，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-*HA*。阳性质粒转化宿主菌 BL21(DE3)，经 IPTG 诱导，*HA* 基因获得表达，经定位分析，目的蛋白以包涵体的形式存在于大肠杆菌中。通过改变 IPTG 的浓度和诱导时间，确定了表达 *HA* 基因的最佳诱导条件：IPTG 终浓度为 0.7mmol/L，诱导时间为 3 h。Western-blot 分析表明，重组蛋白能与 H9N2 亚型 AIV 阳性血清发生特异性反应。以纯化后表达产物作为诊断抗原包被酶标板建立了检测 H9 亚型 AIV 抗体的间接 ELISA 方法。结果表明，抗原的最佳包被浓度为 25μg/mL，血清的最佳稀释度为 1∶80，阳性标准初步定为：$OD_{待检血清} > 0.5$ 且 $OD_{标准阳性血清} > 1.0$；$OD_{标准阴性血清} < 0.1$。

关键词：禽流感病毒 H9N2 亚型、血凝素基因、原核表达、间接 ELISA

中图分类号：S852.65 **文献标识码**：A **文章编号**：1003-5125(2005)03-0293-05

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

收稿日期：2004-11-23，修回日期：2005-02-01

作者简介：郑其升(1979-)男，博士研究生，主要从事畜禽传染病诊断与防治方面的研究。

** 通讯作者：陈溥言(1942-)男，教授，从事分子病毒学及免疫学方面的研究。

Corresponding authr. Tel: 025-84396028, E-mail: aid@njau.edu.cn

© 1995-2006 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

地区公约动物传染病名单[1]。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试验。国外已对检测禽流感抗体的ELISA方法进行了不少研究[2]。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,其抗原来自于经纯化、浓缩的完整的病毒。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,且存在感染人和容易散毒的危险性。与采用完整的病毒粒子相比,利用大肠杆菌表达的重组蛋白作为诊断试剂没有感染性、成本低廉,基因工程菌可以进行大量发酵培养,可以进行大规模的工业化生产,利用重组血凝素做抗原检测流感抗体的ELISA技术国内还未见报道[3]。本试验利用基因工程的方法表达H9N2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免疫鸡群血清中H9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 材料与方法

1.1 材料

重组质粒pUC-*HA*为本室刘华雷博士构建,该质粒系将AIV H9N2亚型完整血凝素基因克隆到pUC19质粒中;*E. coli* DH5α、BL21(DE3)、原核表达载体pET-32a(+)为本组保存;H5、H7、H9亚型AIV阳性血清由哈尔滨兽医研究所研制,抗鸡IgY的二抗购自promega公司。胶回收试剂盒购自上海华舜生物技术公司;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*Bam*HⅠ、*Hind*Ⅲ和T_4DNA连接酶、rTaqDNA聚合酶等工具酶以及pMD18-T载体均购自大连宝生物工程有限公司;其余试剂均为分析纯。

1.2 引物设计

参照GenBank公布的AIV H9N2亚型*HA*基因的核苷酸序列,自行设计并由大连宝生物工程有限公司合成。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*HⅠ和*Hind*Ⅲ位点(引物中划线部分):

上游引物 P1:5′-GAGGATCCATGGAGGCGTTAGTGC-3′

下游引物 P2:5′-TAAAGCTTGGCGATGGCACATCTGCAT-3′

1.3 目的片段的扩增及表达载体的构建

利用引物P1、P2,以质粒pUC-*HA*为模板,扩增目的基因*HA*。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-*HA*并送交大连宝生物工程有限公司进行序列测定。从pMD-*HA*中用*Bam*HⅠ、*Hind*Ⅲ酶切获得*HA*片段,克隆入pET-32a(+),用*Bam*HⅠ、*Hind*Ⅲ双酶切鉴定,阳性克隆命名为*pET-HA*。

1.4 重组蛋白表达最佳诱导条件的确定

对筛选出阳性重组质粒的细菌培养物于37 ℃振荡培养,至A_{600}值0.5时分别加入1.0、0.8、0.7、0.5、0.4、0.3、0.1mmol/L IPTG于30 ℃下诱导表达3h,随后取1.0mL菌液煮沸裂解进行SDS-PAGE;在10mL培养物中加入IPTG至最佳诱导浓度,于30 ℃振荡培养,取不同时间段(诱导表达1、2、3、4h)的表达产物各1.0mL进行SDS-PAGE电泳。

1.5 血清的吸附

将转化pET-32a(+)空载体的大肠杆菌BL21(DE3)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后10 000r/min,4 ℃离心10min取上清备用。

1.6 表达产物的纯化和分析

按照His·Bind Purification Kit说明书进行,表达产物的纯化,按文献[4]介绍的Western-blot方法分析表达产物。

1.7 间接ELISA检测方法的建立

按[5]介绍方法进行。根据间接ELISA方阵结果确定抗原、抗体的最适稀释度,初步建立了检测H9亚型AIV抗体的间接ELISA方法。

将表达蛋白用抗原包被液稀释到25μg/mL,将H5亚型、H7亚型、H9亚型AIV阳性血清和SPF鸡血清做1∶20开始做倍比稀释,同时设空白对照,按常规方法做间接ELISA,OPD显色,重复3次,取平均值比较结果。

2 结果

2.1 目的基因的扩增和克隆质粒pMD-HA的酶切鉴定

琼脂糖电泳结果显示有一条相对分子质量在1 700bp左右(1723bp)的目的条带,与预期结果相符;重组质粒pMD-*HA*用*Bam*HⅠ、*Hind*Ⅲ酶切,得到1 723 bp的片段(图未显示)。

© 1995-2006 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

2.2 重组表达载体双酶切鉴定

双酶切产物电泳后(图 1),在紫外光灯下出现一大一小两个片段,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。

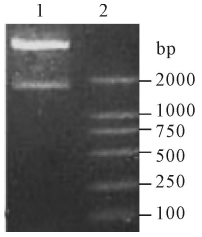

图 1 重组质粒 pET-*HA* 的鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant plasmid pET-*HA*

1, Recombinant plasmid pET-*HA* digested by *Bam*H Ⅰand *Hind*Ⅲ; 2, DNA molecular weight marker (DL2000)

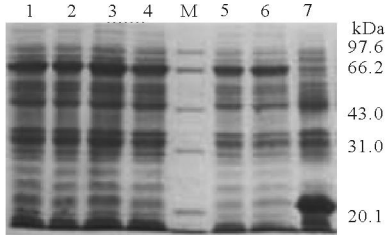

图 2 IPTG 诱导最佳浓度的电泳确定

Fig. 2 Optional induction concentration of IPTG determined by SDS-PAGE

1-6, Induced respectively with 1.0、0.8、0.7、0.5、0.4、0.3mmol/L of IPTG concentration; 7, pET-32a(+)/BL21 induced with IPTG; M, MW protein marker.

2.3 IPTG 诱导表达最佳浓度的确定

由图 2 可以看出,在 Novagen 公司推荐的 IPTG 终浓度(1.0mmol/L)下,表达量与以 0.7 mmol/L 诱导没有明显的变化。出于成本考虑,选择以 0.7mmol/L 的 IPTG 终浓度诱导即可获得较多的重组蛋白。电泳结果(图 3)显示:在加入 IPTG 之前,目的蛋白没有表达,经 IPTG 诱导 1h 后,即可见到有明显的重组蛋白质的表达;诱导 3h 后,重组蛋白的量明显高于诱导 1h 和 2h ;诱导 4h 后,表达产量几乎没有增加。因此,综合考虑诱导表达量的高低和所花费的时间,故确定 3h 为 IPTG 的最佳诱导时间。

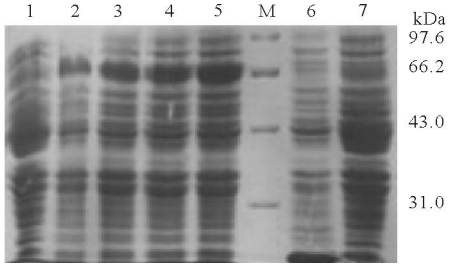

图 3 IPTG 最佳诱导时间的确定

Fig. 3 Time course of expression induced with IPTG

1-5, expression products of 0, 1, 2, 3, 4, h induced with IPTG, respectively; M, MW protein marker; 6, pET-32a(+)/BL21 induced with IPTG; 7, BL21 induced with IPTG.

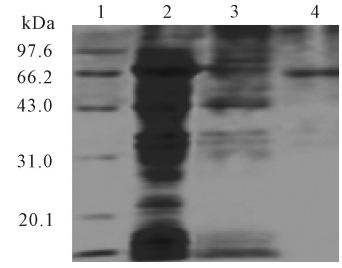

图 4 表达产物的可溶性分析

Fig. 4 Analysis of the solubility of the expressed product by SDS-PAGE

1, MW protein marker; 2, pET-HA/BL21 induced with IPTG; 3, pET-HA(supernant); 4, pET-HA (inclusion body).

2.4 表达产物的可溶性分析

SDS-PAGE 结果表明:菌体经超声波破碎、离心后,上清中仅有少许目的条带,而沉淀在约 70 kDa 处出现一条明显的特异性蛋白条带(图 4),表明表达产物大部分以包涵体形式存在。

2.5 Western-blot 结果

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 H9 亚型 AIV 特异性鸡抗血清呈现阳性反应(图 5),且无非特异性条带出现,证明表达产物抗原性较好。

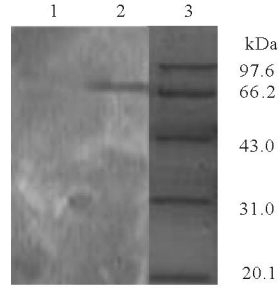

图 5 表达产物的免疫印迹分析

Fig. 5 Analysis of the expressed product by Western-blot

1. Negative control; 2. pET-HA/BL21 fusion protein Analysis by Western-blot; 3. MW protein marker.

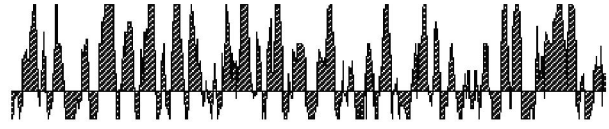

图 6 表达产物的抗原指数分析

Fig. 6 Antigencity index analysis of the recombinant protein with DNAstar

2.6 表达产物的抗原指数分析

利用计算机软件 DNAstar 对 *HA* 基因编码蛋白进行抗原指数分析,结果如图 6 所示,表达蛋白的抗原指数比较高。

© 1995-2006 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

2.7 ELISA方阵滴定结果

将抗原稀释成6.0 μg/uL,从1∶10开始倍比稀释后包被聚苯乙烯微量反应板,阴、阳性血清从1∶10开始倍比稀释,按ELISA程序进行方阵滴定。阳性标准初步定为:$OD_{待检血清} > 0.5$ 且 $OD_{标准阳性血清} > 1.0$; $OD_{标准阴性血清} < 0.1$。选择阳性孔 OD_{490nm} 在1.0左右,阴性孔小于0.1的确定抗原抗体最佳反应比例,抗原的最适包被浓度定为25.0 μg/mL、血清最适稀释度为1∶80。

表1 间接ELISA方阵滴定结果

Table 1 Result of the indirect ELISA checkboard titration

	1	2	3	4	5	6	7	8	SD
A	2.468	2.001	2.050	2.103	2.551	2.457	2.334	2.239	1∶20
B	1.771	1.329	1.321	1.296	1.462	1.675	1.504	1.572	1∶40
C	0.990	0.757	0.740	0.721	1.146	1.096	0.919	0.965	1∶80
D	0.863	0.387	0.395	0.394	0.855	0.730	0.552	0.585	1∶160
E	0.371	0.221	0.297	0.290	0.393	0.387	0.304	0.291	1∶320
F	0.233	0.166	0.202	0.236	0.249	0.219	0.180	0.170	1∶6 400
G	0.167	0.132	0.146	0.158	0.147	0.166	0.105	0.106	1∶1 280
H	0.118	0.087	0.108	0.092	0.116	0.108	0.078	0.012	1∶2 560
I	0.081	0.057							
AD	1∶10	1∶20	1∶40	1∶80	1∶160	1∶320	1∶640	1∶1 280	

Note: The plate holes from A1 to H8 are positive phalanx titrimetry, I1 is negative contrast, I2 is blank contrast; AD and SD indicate the diluting measure of the antigen and serum respectively

2.8 间接ELISA特异性检测结果

由表2可以看出,重组蛋白抗原不但可以明显的区分H9亚型AIV阳性血清和SPF鸡血清,而且可以区分H9亚型AIV阳性血清与H5、H7亚型AIV的阳性血清。在血清做1∶640倍稀释时,H9亚型AIV阳性血清和SPF鸡血清、H5、H7亚型AIV的阳性血清的 OD_{490} 之比还大于10(1.199/0.058、1.199/0.116、1.199/0.098),这表明此重组抗原不仅可以检测鸡血清中H9亚型AIV抗体水平的高低,而且可以作为AIV诊断区分亚型的抗原。

表2 重组蛋白与常见亚型禽流感病毒阳性血清反应的ELISA结果

Table2 Result for the recombinant protein reacts with positive serum of other subtype AIV

SD	1∶20	1∶40	1∶80	1∶160	1∶320	1∶640	1∶1 280	1∶2 560
A	1.477	1.497	1.402	1.371	1.312	1.199	0.928	0.812
B	0.112	0.095	0.086	0.103	0.123	0.116	0.086	0.075
C	0.110	0.097	0.088	0.109	0.116	0.098	0.086	0.079
D	0.087	0.067	0.067	0.058	0.059	0.058	0.058	0.053
E	0.054							

Note: The plate holes from A to C are H9, H5 and H7 subtype positive serum of AIV diluted from1:20 to 1:2560; hole D is negative control; hole E is blank contrast; SD indicates the diluting measure of the serum

3 讨论

我国自1994年在广东省首次发生 H_9N_2 亚型禽流感以来,陆续在其它各省区有该病发生的报道,对我国的养禽业造成了严重损失,综合防制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。本试验研究了将重组H9N2亚型AIV HA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,确定了禽流感抗体间接ELISA检测法的最佳工作条件,为检测H9亚型AIV抗体的间接ELISA方法的建立奠定了基础。

研究表明,HA大约有550个氨基酸,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,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诱生保护性免疫的主要抗原,它不仅可以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 HA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HA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。本实验重组蛋白主要用于抗体水平的检测,因此,重组蛋白与H9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,再经电转移转印到NC膜上后,已经处于变性状态,仍然具有与H9亚型AIV抗血清反应的能力,这表明该重组蛋白表现了很强的反应原性。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

© 1995-2006 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

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,我们直接煮沸裂解诱导表达重组蛋白的菌体进行 SDS-PAGE,将 AIV 阳性血清用经超声波破碎的大肠杆菌吸附后作为 Western-blotting 分析的一抗。从 western-blot 的结果来看,经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做抗原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。

在本实验中建立的间接 ELISA 方法虽然不能区分野毒感染和疫苗免疫产生的抗体,但是可以用于鸡群疫苗正常免疫之后抗体水平高低的监测,也可以根据抗体水平是否整齐来判断鸡群是否有野毒感染,这对于制定合理的免疫程序是十分必要的。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 HA 蛋白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[M]. 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[J]. 中国兽医科技, 1998, 28 (9):41-42.

[4] 金冬雁,黎孟枫. 分子克隆实验指南 [M]. 第二版, 北京:科学出版社. 1989. 49～56, 845～848, 876～887.

[5] 巴德山. 现代免疫学实验技术[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版, 1998.

[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[J]. 微生物学报, 2003, 43 (6):722-727.

[7] Shafer Y. Development and validation of a competitive enzyme-linked assay to detect antibodies in avian sera [J]. Avian Diseases, 1998, 42:282-234.

© 1995-2006 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.