

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.03.03

DNA 免疫技术制备 H10 亚型禽流感病毒 HA 蛋白单因子血清的研究

高鑫鑫, 郭晶*, 薛睿, 赵聪慧, 李旭勇*

(聊城大学农学院, 山东聊城 252000)

[收稿日期] 2020-01-03 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 03-0015-06 [中图分类号] S852.5

[摘要] 为优化 H10 亚型禽流感病毒快速检测方法, 按照鸡偏嗜性密码子将 A/Jiangxi/IPB13/2013 (H10N8) 的血凝素 (HA) 基因序列优化后人工合成, 克隆至真核表达载体 pCAGGs。将重组质粒双酶切后测序证明该质粒构建成功。用 200 μ g 的表达载体免疫 6 周龄 SPF 鸡, 分别在第一次免疫后的第 30 天和第 60 天用相同剂量实施第二次和第三次免疫, 末次免疫后的第 10 天心脏采血, 分离血清, 制备单因子血清。间接免疫荧光试验和 western blot 试验证明 HA 蛋白成功表达, 单因子血清制备成功。血凝抑制试验结果表明抗体效价 ≥ 128 , 单因子血清特异性强, 与其他亚型禽流感病毒无交叉反应。该研究为 H10 亚型流感病毒快速鉴定和研究奠定了基础。

[关键词] 禽流感病毒; H10 亚型; 单因子血清; DNA 免疫

Study on Preparation of Hemagglutinin Mono-specific Serum Against H10 Subtype Avian Influenza Viruses by DNA Immunization

GAO Xin-xin, GUO Jing*, XUE Rui, ZHAO Cong-hui, LI Xu-yong*

(College of Agricultural, Liaocheng University, Liaocheng, Shandong 252000, China)

Corresponding authors: GUO Jing, E-mail: guojing2360846@163.com; LI Xu-yong, E-mail: xylicaas@163.com

Abstract: Due to detect H10 subtype avian influenza viruses (AIVs), the HA gene of A/Jiangxi/IPB13/2013 (H10N8) was synthesized and optimized, and cloned into the mammalian expression vector pCAGGs. The recombinant plasmids were confirmed with double restriction enzyme digestion and DNA sequencing. Then 6-week-old specific pathogen free chickens were immunized with 200 μ g HA plasmid three times at a 30-day interval, respectively. Then the sera were collected at 10 days after the third immunization. Both the results of the indirect immunofluorescence and western blot indicated that the HA genes of recombinant plasmids

基金项目: 国家自然科学基金(31702262, 31702261); 山东省自然科学基金(ZR2017BC057, ZR2017BC048); 聊城大学实验技术研究基金资助(26322170257, 26322170260)

作者简介: 高鑫鑫, 硕士, 从事动物流感病毒致病机制研究。

通讯作者: 郭晶, E-mail: guojing2360846@163.com; 李旭勇, E-mail: xylicaas@163.com

were successfully expressed, and the HA protein can bind to the antibody in the hemagglutinin – specific polyclonal antibody prepared. Antibody titers detected by hemagglutination inhibition test were greater than 128, and the antisera did not cross – react with AIV of other subtypes and newcastle disease virus, suggesting high sensitivity and specificity of antisera. To conclude, the hemagglutinin – specific polyclonal antibody against H10 subtype AIVs was prepared successfully, and it will contribute to identify H10 subtype AIVs quickly and accurately.

Key words: avian influenza virus; H10 subtype; hemagglutinin – specific polyclonal antibody; DNA immunization

A 型流感病毒为单股负链 RNA 病毒,根据血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)不同,可将流感病毒分为不同的亚型(H1~H18 和 N1~N11)。禽类作为流感病毒的混合器,除了从蝙蝠体内分离的 H17N10 和 H18N11 两种新型流感病毒^[1-2],其他所有亚型的流感病毒均可在禽类中分离得到。2013 年我国江西省出现了全球首例人感染 H10N8 亚型流感病毒事件^[3],研究表明引起人感染的 H10N8 流感病毒(A/Jiangxi – Donghu/346/2013)为一株三源重组病毒,HA 基因来自 H10N3 病毒,NA 基因来自 H10N8 病毒,6 个内部基因来自 H9N2 病毒。同样是在江西省,Ma 等^[4]在 2013 – 2014 年的活禽市场的鸡体内共分离得到 124 株 H10N8 和 H10N6 禽流感病毒(Avian influenza viruses, AIVs),遗传演化分析表明 H10N8 AIVs 与致死的人源流感病毒(A/Jiangxi – Donghu/346/2013)高度相似,证明家禽市场中鸡体内的流感病毒可能是人源病毒株的来源。Deng 等^[5]对 2009 – 2013 年在活禽市场分离出的 8 株 H10N8 AIVs 的研究表明,该亚型病毒对家禽无致病力,但可同时结合人源受体($\alpha 2, 6$ – SA)和禽源受体($\alpha 2, 3$ – SA),且有 4 株病毒可引起小鼠体重下降约 12.7% ~ 22.5%。正是因为被感染动物的临床症状较温和,H10 亚型 AIVs 常被人们所忽视,对其研究较少。为了有效监测并消灭 H10 亚型 AIVs,保障生物安全和公共健康,建立 H10 AIVs 的快速检测方法具有重要的公共卫生学意义。

流感病毒亚型众多,对不同亚型流感病毒的快速检测一直是研究的热点。流感病毒检测技术有酶联免疫吸附法、荧光定量 PCR、普通 PCR、血凝试验和血凝抑制试验等。由于血凝抑制试验灵敏度

高、特异性强、易于操作、价格低廉等特点,常作为流感病毒鉴定和检测的首选试验技术。目前,国内用于 H10 亚型 AIVs 鉴定的抗体大多是全病毒制备的血清,由于其含有较多的抗体成分和非特异性物质,进行流感病毒亚型鉴定时会出现交叉反应,造成假阳性,影响结果的准确性,为流感病毒亚型的鉴定带来干扰。基于 DNA 免疫技术的单因子血清是将流感病毒某一种或某几种蛋白克隆到真核表达载体后免疫动物而获得单因子血清,本研究将 H10N8 AIVs 的 HA 基因经鸡偏嗜密码子优化后克隆至真核表达载体 pCAGGs,免疫 6 周龄的 SPF 鸡,从而获得针对 H10 亚型血凝素的单因子血清,为 H10 亚型 AIVs 的快速鉴定和病毒抗原性精准分析奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、细胞、毒株和实验动物 根据 GenBank 中的 A/Jiangxi/IPB13/2013 (H10N8) (KJ406543.1) HA 基因序列进行鸡偏嗜密码子优化后^[6],目的基因由上海捷瑞生物工程有限公司合成。感受态细胞购自北京全式金生物有限公司;pCAGGs 载体由聊城大学农学院畜禽疫病防控技术创新团队保存;293T 细胞购自中国科学院细胞库。SPF 鸡购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.2 主要试剂 Ex Taq DNA 聚合酶、DL2000 DNA Marker 和 DL5000 DNA Marker 均购自宝生物工程(大连)有限公司。T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I 均购自 New England Biolabs 公司。胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒以及纯化试剂盒购自 OMEGA 公司。脂质体 Lipofectamine 3000 购自 Invitrogen 公司。DMEM 和胎牛血清均购自 GIBCO 公司。细胞裂解液购自 Thermo Scientific 公

司,SDS - PAGE 蛋白上样缓冲液(2 ×)购自上海碧云天生物技术有限公司。FITC 标记的兔抗鸡荧光抗体购自 Thermo Scientific 公司,辣根过氧化物酶标记的山羊抗鸡抗体购自 KPL 公司。

1.3 表达质粒的构建及鉴定 用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I 分别对公司合成的目的基因、空载体质粒 pCAGGs 进行双酶切处理,用 T4 连接酶将载体和目的基因连接后转化到感受态细胞中,挑取阳性菌落、扩大培养、提取质粒后,用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切获得目的基因并测序。测序结果正确,将阳性质粒命名为 pCAGGs - H10,转化至感受态细胞扩大培养,大量制备重组质粒。

1.4 H10 亚型禽流感病毒 HA 蛋白单因子血清的制备 取 6 只 6 周龄 SPF 鸡,将已鉴定的表达质粒 pCAGGs - H10 以每次 200 μg/只的剂量对其肌肉注射,该区域进行电刺激,加强鸡的应激反应。一免后第 30 天以相同剂量进行第二次免疫,二免后第 30 天以相同剂量进行第三次免疫,三免后的第 10 天心脏采血,分离血清,制备单因子血清。

1.5 H10N8 AIVs 血凝素蛋白与单因子血清的相互作用

1.5.1 间接免疫荧光试验鉴定单因子血清 将表达质粒 pCAGGs - H10 转染至 293T 细胞,转染 48 h 后固定细胞,用单因子血清作为一抗孵育后,加入带有 FITC 标记的兔抗鸡的二抗,放于荧光显微镜下观察目的蛋白的表达。

1.5.2 western blot 检测单因子血清 表达质粒 pCAGGs - H10 转染至 293T 细胞,48 h 后离心收集细胞,根据细胞数量加入适量的细胞裂解液,反复吹散细胞,在 4 ℃ 孵育 30 min,加入等量的 2 × 蛋白上样缓冲液,沸水中煮 10 min。SDS - PAGE 跑胶、转膜后,用脱脂乳封闭膜,PBST 洗膜后用 H10 单因子血清做为 一抗孵育,PBST 洗膜后用辣根过氧化物酶标记的山羊抗鸡二抗孵育,Odyssey 仪器扫描,鉴定单因子血清效果。

1.6 H10 亚型单因子血清的效价评估及特异性试验

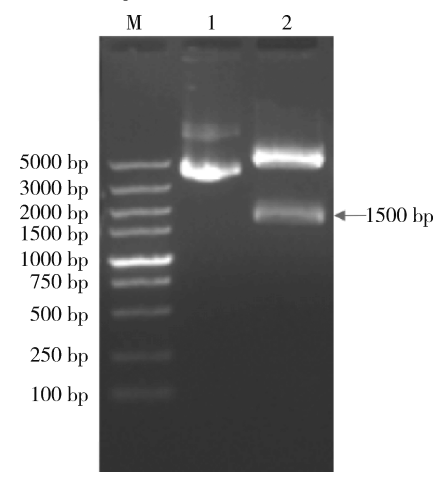
1.6.1 遗传演化分析 在 NCBI 的流感数据库中下载 2012 - 2015 年 H10 亚型 AIVs 的 HA 序列后,

与 A/Jiangxi/IPB13/2013(H10N8)的 HA 序列与进行遗传演化分析。

1.6.2 血凝抑制试验 以实验室分离的流感病毒 A/Duck/Shandong/203/2017 (H1N1)、A/Chicken/Shandong/10/2018 (H3N2)、A/Chicken/Shandong/423/2016 (H4N6)、A/Chicken /Jiangxi/683/2016 (H5N1)、A/Chicken/Shandong/1831/2016 (H6N2)、A/Goose/Shandong/3/2019 (H9N2)、A/Chicken/Shandong/146/2018 (H10N6)、A/Chicken/Shandong/23/2017 (H10N8)和新城疫病毒 NDV/Chicken/Shandong/2008/2017 为抗原,与制备的 H10 单因子血清和实验室保存的 H5、H9 单因子血清进行血凝抑制试验,同时以 PBS 作为对照,检验 H10 亚型单因子血清的特异性和交叉反应原性。

2 结果与分析

2.1 表达质粒的构建及酶切鉴定 将表达质粒 pCAGGs - H10 用限制性内切酶 *EcoR* I + *Xho* I 于 37 ℃ 酶切 2 h 后,得到 1700 bp 的 HA 基因片段(图 1),将该片段收回测序,测序结果正确,表明表达质粒构建成功。



M:DNA 分子质量标准;1:表达质粒 pCAGGs - H10;
2:表达质粒 pCAGGs - H10 的双酶切片段

M: DL5000 DNA Marker; 1: Recombinant plasmid pCAGGs - H10;
2: Restriction enzyme digestion of recombinant plasmid pCAGGs - H10

图 1 表达质粒 pCAGGs - H10 的酶切鉴定

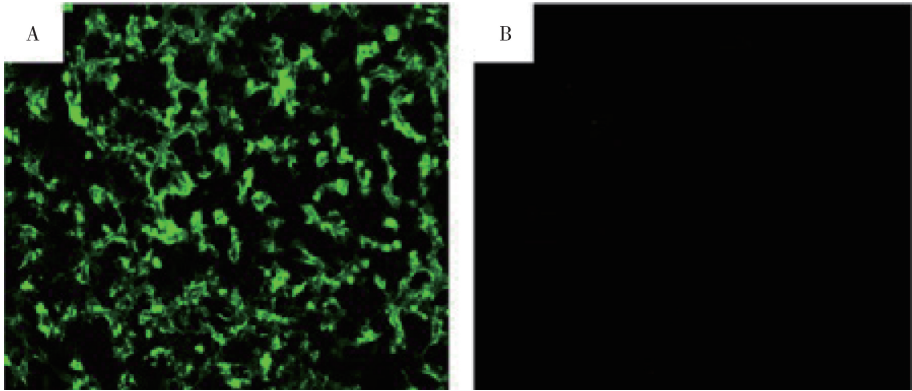
Fig 1 Identification of enzyme digestion of recombinant plasmids pCAGGs - H10

2.2 HA 蛋白与单因子血清的相互作用

2.2.1 间接免疫荧光试验结果 荧光显微镜检测发现,转染 pCAGGs – H10 的 293T 细胞产生特异性绿色荧光,转染空载体的 293T 细胞检测不到荧光(图 2),表明真核重组表达质粒能够表达 H10N8

AIVs 的血凝素蛋白,并且该目的蛋白与制备的单因子血清相互作用。

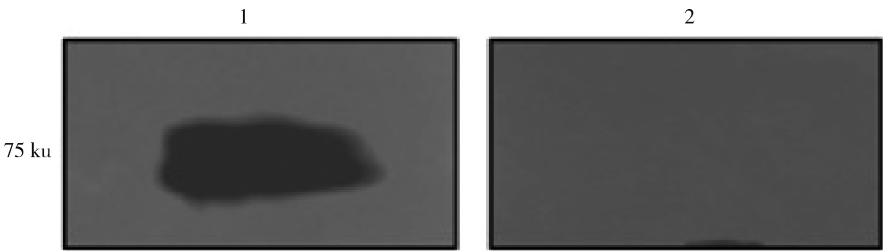
2.2.2 western blot 检测结果 检测发现血凝素蛋白在 75 ku 处表达(图 3),该蛋白与单因子血清相互作用,表明单因子血清制备成功。



A:表达质粒 pCAGGs – H10 转染至 293T 细胞;B:空载体 pCAGGs 转染至 293T 细胞
A: Transfected pCAGGs – H10 into 293T;B: Transfected pCAGGs into 293T

图 2 间接免疫荧光检测单因子血清

Fig 2 Indirect immunofluorescence assay of Hemagglutinin Mono – specific Serum



1:表达质粒 pCAGGs – H10 转染至 293T 细胞;2:空载体 pCAGGs 转染至 293T 细胞
1: Transfected pCAGGs – H10 into 293T;2: Transfected pCAGGs into 293T

图 3 制备的单因子血清的 western blot 检测

Fig 3 Detection of hemagglutinin mono – specificserum by western blot

2.3 H10 亚型 HA 单因子血清的特异性试验

2.3.1 遗传演化分析 H10 亚型 AIVs 的 HA 基因主要分为欧亚谱系和北美谱系。应用 MAGE. 7 软件对克隆的 A/Jiangxi/IPB13/2013 (H10N8) 的 HA 序列进行比对,绘制基因进化树。图 4 结果显示,克隆的 A/Jiangxi/IPB13/2013 (H10N8) 的 HA 序列属于欧亚谱系,并且该克隆株的 HA 序列与我

国流行株高度同源。

2.3.2 血凝抑制试验结果 实验室分离的多株流感病毒和新城疫病毒 NDV/Chicken/Shandong/2008/2017 作为抗原,与制备的 H10 单因子血清进行血凝抑制试验,结果只有 A/Chicken/Shandong/146/2018 (H10N6)、A/Chicken/Shandong/23/2017 (H10N8) 与 H10 单因子血清发生血凝抑制反应,抗

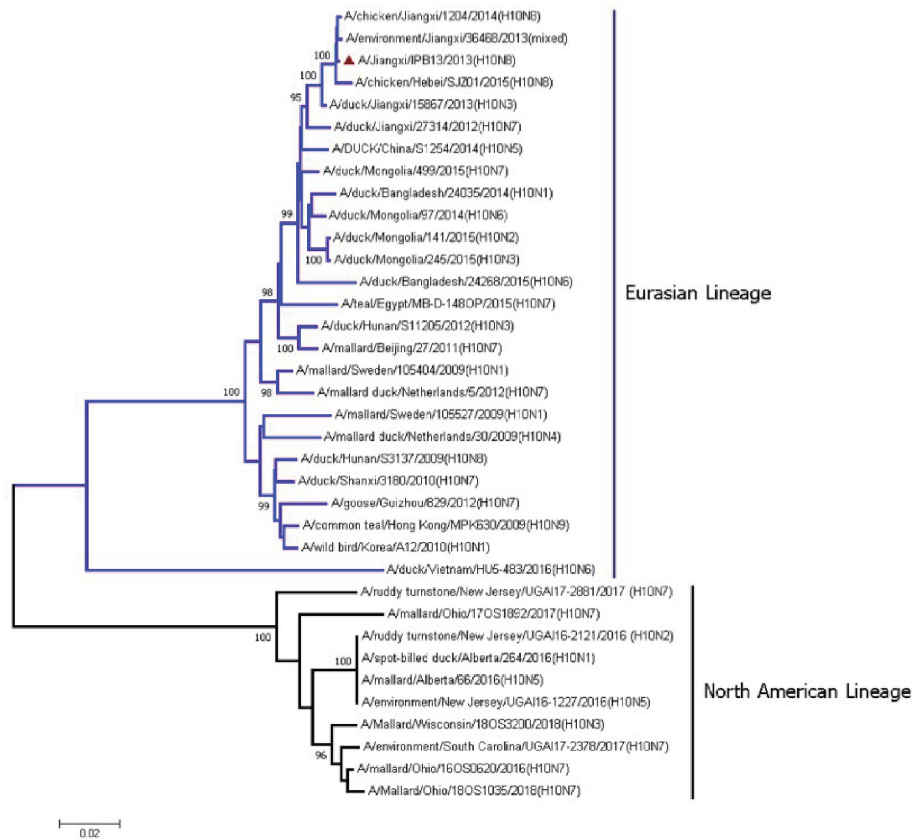


图 4 HA 基因的进化树分析

Fig 4 Phylogenetic analysis of HA genes

体效价分别为 256、128,表明制备的 H10 亚型单因子血清与其他亚型 AIVs 无交叉反应,针对目前我国国内流行的 H10 亚型 AIVs 具有良好的特异性和敏感性。

3 讨论与结论

近年来,禽流感的流行与暴发给养禽业的发展和公共卫生安全造成了严重危害。2013 年我国江西省出现了 H10N8 亚型流感病毒感染人并造成死亡的事件,使得该亚型流感病毒引起各界广泛关注。H10N8 亚型 AIVs 最早由 Zhang 等^[7]分离于 2007 年我国洞庭湖水域,该病毒对哺乳动物小鼠无致病力,但在小鼠体内传代后获得致病力,并且 PB2 – E627K、M1 – M192V 等多个氨基酸位点突变。研究表明,H10 亚型 AIVs 除了鸡、鸭等家禽中,在野生水禽也能检出^[7-9],提示我们 H10 亚型低致病性 AIVs 在自然界中分布较广。野鸟携带的

表 1 H10 单因子血清与其他亚型 AIVs 和新城疫病毒抗原的血凝抑制试验

Tab 1 The HI test of H10 subtype antisera with antigens of other AIV subtypes and NDV

抗原 Antigen	血清抗体效价 HI titer of antisera			
	H5	H9	H10	PBS
H1N1	0	0	0	0
H3N2	0	0	0	0
H4N6	0	0	0	0
H5N1	256	0	0	0
H6N2	0	0	0	0
H7N9	0	0	0	0
H9N2	0	64	0	0
H10N6	0	0	256	0
H10N8	0	0	128	0
NDV	0	0	0	0

病毒可能与家禽携带的病毒同时感染同一宿主,增大了不同毒株间发生基因重排乃至产生危害性更大的重组病毒的可能性^[8],正如感染人并致死的 A/Jiangxi – Donghu/346/2013(H10N8) 三源重组病毒株。因此,应该加强对 H10 亚型 AIVs 的监测力度,预警该亚型病毒在自然界中的持续进化将会对生物安全和公共健康造成持续的潜在威胁。

本试验将经鸡偏嗜密码子优化后的 A/Jiangxi/IPB13/2013(H10N8) 流感病毒的 HA 基因克隆到 pCAGGs 载体,免疫 SPF 鸡后获得单因子血清。间接荧光免疫试验和 western blot 试验结果表明,制备的 H10 亚型单因子血清可与 HA 蛋白相互作用,并且单因子血清的特异性试验结果显示该单因子血清只能与 H10 亚型的 HA 蛋白相互作用,与其他亚型 AIVs 以及其他种类病毒无相互作用,从而获得特异性强、敏感性好、无交叉反应的 H10 亚型单因子血清。这与传统通过免疫灭活全病毒或直接免疫活病毒以获取抗某种亚型血清的方式相比更具安全性,并且避免了使用全病毒免疫的血清进行 HI 试验时,NA 抗体会非特异性地干扰 HA,从而导致非特异性血凝抑制现象的问题。目前,有关 H10N8 的遗传进化分析的报道较少,不断检测分析 H10 亚型 AIV 在自然界中的分布及进化情况在 H10 亚型 AIV 于自然界中分布较广、重组病毒株能够感染人并致死的背景下,该 H10 亚型单因子血清的成功制备为 H10 亚型 AIVs 的检测提供了有力支持。

参考文献:

- [1] Tong S X, Zhu X Y, Li Y, *et al.* New world bats harbor diverse influenza A viruses [J]. *Plos Pathog*, 2013, 9(10): e1003657.
- [2] Wu Y, Wu Y, Tefsen B, *et al.* Bat – derived influenza – like

viruses H17N10 and H18N11 [J]. *Trends Microbiol*, 2014, 22: 183 – 191.

- [3] Chen H, Yuan H, Gao R, *et al.* Clinical and epidemiological characteristics of a fatal case of avian influenza A H10N8 virus infection: A descriptive study [J]. *Lancet*, 2014, 383 (9918): 714 – 721.
- [4] Ma C, Lam T Y, Chai Y, *et al.* Emergence and evolution of H10 subtype influenza viruses in poultry in China [J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(7): 3534 – 3541.
- [5] Deng G, Shi J, Wang J, *et al.* Genetics, receptor binding, and virulence in mice of H10N8 influenza viruses isolated from ducks and chickens in live poultry markets in China [J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(12): 6506 – 6510.
- [6] 姜永萍, 张洪波, 李呈军, 等. 密码子的鸡体偏嗜性优化增强 H5 亚型禽流感 HA 基因的表达水平和免疫原性 [J]. *免疫学杂志*, 2005, 21(5): 377 – 381.
- Jiang Y P, Zhang H B, Li C J, *et al.* Increased expression and immunogenicity of optimized H5 subtype avian influenza HA gene containing chicken bias codons [J]. *Journal of Immunology*, 2005, 21(5): 377 – 381.
- [7] Zhang H, Xu B, Chen Q, *et al.* Characterization of an H10N8 influenza virus isolated from Dongting lake wetland [J]. *Virology Journal*, 2011, 8(1): 1 – 9.
- [8] Deng G, Tan D, Shi J, *et al.* Complex reassortment of multiple subtypes of avian influenza viruses in domestic ducks at the Dongting Lake region of China. [J]. *Journal of Virology*, 2013, 87(17): 9452 – 9462.
- [9] 王德丽, 慈彦鹏, 崔艳芳, 等. 一株 H10N7 亚型禽流感病毒的分离鉴定及生物学特性研究 [J]. *中国预防兽医学报*, 2015, 37(1): 6 – 9.
- Wang D L, Ci Y P, Cui Y F *et al.* Biological characteristic of an H10N7 avian influenza virus isolated from Wood Sandpiper in Qinhuangdao in 2013 [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2015, 37(1): 6 – 9.

(编辑:李文平)