

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.12.02

# 表达 H5N1 亚型禽流感 HA、NA、M1 基因的重组杆状病毒的鉴定

李晶梅<sup>1</sup>, 陈鲁杰<sup>1</sup>, 王焕君<sup>1</sup>, 李改<sup>2</sup>, 朱薇<sup>1</sup>, 张飞雁<sup>1</sup>, 石宝兰<sup>1</sup>, 漆世华<sup>1</sup>, 谢红玲<sup>1</sup>

(1. 国药集团动物保健股份有限公司, 武汉 430075; 2. 诺华生物科技(武汉)有限责任公司, 武汉 430075)

[收稿日期] 2021-06-22 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2021) 12-0009-05 [中图分类号] S852.65

**[摘要]** 为证实插入了禽流感 HA、NA 和 M1 基因的重组杆状病毒(VLP01 株)能表达 HA、NA 和 M1 蛋白并自行组装成具有禽流感形态的病毒样颗粒,对 VLP01 株的细胞培养上清进行离心纯化或透析处理,获得的表达产物用电镜、Western Blot、ELISA 进行鉴定。电镜观察表达产物,可见禽流感病毒样颗粒;以 Western Blot 方法用 HA、NA 和 M1 抗体分别检测表达产物,可见特异性条带;以 NA 多抗为捕获抗体、HA 单抗为检测抗体建立双抗体夹心 ELISA 方法检测表达产物,结果为阳性,说明表达产物为同时含有 HA 蛋白和 NA 蛋白的病毒样颗粒。结果显示,VLP01 株能够表达 HA、NA 和 M1 蛋白,并自行组装成禽流感病毒样颗粒分泌到细胞培养上清中。

**[关键词]** 重组杆状病毒;禽流感病毒样颗粒;电镜;Western Blot;ELISA

## Identification of Recombinant Baculoviruses Expressing HA, NA, M1 Genes of H5N1 Avian Influenza Virus

LI Jing - mei<sup>1</sup>, CHEN Lu - jie<sup>1</sup>, WANG Huan - jun<sup>1</sup>, LI Gai<sup>2</sup>, ZHU Wei<sup>1</sup>,  
ZHANG Fei - yan<sup>1</sup>, SHI Bao - Lan<sup>1</sup>, QI Shi - hua<sup>1</sup>, XIE Hong - ling<sup>1\*</sup>

(1. Sinopharm Animal Health Corporation Ltd., Wuhan 430075, China; 2. Nova Biologiques (Wuhan) Co. Ltd., Wuhan, 430075, China)

Corresponding author: XIE Hong - ling, E - mail: 13419546263@163.com

**Abstract:** The aim of the work was to confirm the recombinant baculovirus (VLP01 strain) inserted three genes of avian influenza (HA, NA and M1) can express those proteins and self-assemble into virus-like particles with avian influenza morphology. The products of VLP01 were purified by centrifugation or dialysis, the expression product was identified by electron microscopy, Western Blot and ELISA. The avian influenza virus-like particles were observed with electron microscope. The antibodies against the protein HA, NA and M1 respectively, reacted with the products of VLP01 was stained at specific location, the same as the HA, NA and M1 protein. A double antibody sandwich ELISA method was established using NA polyclonal antibody as the capture antibody and HA

作者简介: 李晶梅, 硕士, 从事兽用生物制品方面的研究。

通讯作者: 谢红玲。E-mail: 13419546263@163.com

monoclonal antibody as the detection antibody to detect the products of VLP01, the result was positive, indicating that the expressed products were virus-like particles containing both HA and NA proteins. It is concluded that VLP01 could express protein HA, protein NA and protein M1, and self-assemble into avian influenza virus-like particles to be secreted into the cell culture supernatant.

**Key words:** recombinant baculovirus; avian influenza virus-like particles; electron microscope; Western Blot; ELISA

禽流感(Avian influenza, AI)是由 A 型流感病毒引起的一种禽类传染病,其中的 H5N1 亚型禽流感是危害最大的禽类疫病之一。疫苗能有效防控该疫病,现阶段主要应用的是鸡胚工艺或细胞培养工艺制备 H5N1 亚型禽流感病毒,进而生产全病毒灭活疫苗。全病毒灭活疫苗需在生物安全三级的生产车间生产,生产成本较高,因此广大研究者一直在探寻新型疫苗研发方向<sup>[1]</sup>。

昆虫杆状病毒表达系统是一种能够高效表达外源基因的真核表达载体系统<sup>[2]</sup>。昆虫杆状病毒不感染脊椎动物,无生物安全隐患;基因组较大可容纳大片段外源基因;能对表达的蛋白进行加工修饰,使表达的蛋白保存原有的生物活性<sup>[3]</sup>。有研究表明该系统表达流感病毒的 HA、NA、M1 蛋白可自我包装成形态类似于禽流感病毒的病毒样颗粒(Virus-like particles, VLPs)<sup>[4]</sup>。VLPs 具有较好的免疫原性,有开发成为疫苗产品的可能。

为研究基于该系统构建的含有 H5N1 亚型禽流感 HA、NA、M1 基因的重组杆状病毒(简称“VLP01 株”),其表达产物是 VLPs,还是游离的 HA、NA、M1 等蛋白,对表达产物进行了血凝、电镜、Western Blot、ELISA 鉴定,以确定其性质。

## 1 材料和方法

1.1 毒种、细胞 VLP01 株毒种由诺华生物科技(武汉)有限责任公司提供,国药集团动物保健股份有限公司扩繁并保存; Sf9 细胞由国药集团动物保健股份有限公司扩繁并保存。

1.2 主要试剂 H5N1 HA 重组蛋白、H5N1 NA 重组蛋白、H7N9 M1 重组蛋白, Sino Biological 公司产品; 禽流感病毒 H5 亚型血凝抑制试验(Re-6)抗原(简称“H5 禽流感病毒”), 哈尔滨国生生物科技

股份有限公司产品; HA 单抗, 由国药集团动物保健股份有限公司研制; NA 多抗, abcam 公司产品; M1 单抗, santa cruz biotechnology 公司产品; HRP 羊抗鼠 IgG 和 HRP 羊抗兔 IgG, KPL 公司产品; DAB 显色试剂盒, 武汉博士德公司产品; TMB 显色液, 湖州英创生物科技有限公司产品; 蛋白 Marker, Thermo Scientific 公司产品。

1.3 主要设备耗材 超速离心机, Beckman 公司, 水平转子 sw41Ti, 角转子 TyPe0ToTi; 20 mL 超滤浓缩离心管, 50000MWC0, Vivaspin 公司产品。

1.4 制备表达产物 毒种接种 Sf9 细胞, 27 °C 培养 4 d, 3000 r/min 20 min 离心收获上清即为表达产物。

1.5 超速离心纯化表达产物 角转子离心表达产物, 4 °C 28000 r/min 2 h。弃去上清, 沉淀中加入 PBS, 震荡悬浮后过夜, 制成均匀混悬液。配制蔗糖密度梯度离心溶液, 蔗糖密度分别为 20%、60%, 水平转子离心混悬液, 4 °C 28000 r/min 3 h。吸取目的条带即为纯化产物。

1.6 血凝效价检测 检测表达产物、角转子离心上清、混悬液、纯化产物的血凝效价, 血凝检测的方法参照《中华人民共和国兽药典 2015 版第三部》附录 27<sup>[5]</sup>。

1.7 电镜检测 纯化产物以超滤浓缩离心管脱糖, 加至铜网上, 2% 磷钨酸染色液负染, 透射电镜观察 VLPs 的形态。

1.8 Western Blot 检测 纯化前表达产物、纯化后表达产物、H5 禽流感病毒(对照)和 H5N1 HA 重组蛋白(HA 蛋白标准品)经 10% SDS-PAGE 电泳后电转至 NC 膜, 用 HA 单抗作为一抗、HRP 羊抗鼠 IgG 作为二抗、DAB 染色液显色, 鉴定 HA 蛋白。同法用 NA 多抗鉴定 NA 蛋白, 用 M1 单抗鉴定 M1 蛋白。

**1.9 ELISA 检测** 用 NA 兔多抗作为包被抗体、HA 鼠单抗作为检测抗体建立双抗夹心 ELISA 方法,并以此方法检测表达产物。包被捕获抗体:加入 NA 多抗,200 ng/孔,100 μL/孔,2~8 °C 孵育过夜,PBST 洗板。封闭:加入含 5% 脱脂乳的 PBS,250 μL/孔,37 °C 封闭 2 h,PBST 洗板。加样:在酶标板相应孔中加入适当稀释的表达产物、H5 禽流感病毒和 HA 蛋白、NA 蛋白,100 μL/孔,3 个重复,37 °C 孵育 1 h,PBST 洗板。加检测抗体:加入 HA 单抗,500 ng/孔,100 μL/孔,37 °C 孵育 1 h,PBST 洗板。加酶标二抗:加入 HRP 羊抗鼠 IgG 工作液,100 μL/孔,37 °C 孵育 1 h,PBST 洗板。加显色液:加入 TMB 显色液,100 μL/孔,室温反应 10 min。加终止液:加 2 mol/L 硫酸,50 μL/孔,在酶标仪上读取 OD<sub>450nm</sub> 的值。PBS 各孔 OD<sub>450nm</sub> 值的平均数 + 3 倍标准差为阴阳性判定的临界值,OD<sub>450nm</sub> ≥ 临界值,判为阳性;OD<sub>450nm</sub> < 临界值判为阴性。

**2 结果与分析**

**2.1 血凝效价检测** 表达产物、角转子离心上清、混悬液、纯化后表达产物的血凝效价和体积见表 1。超速离心后有血凝活性的物质在沉淀中而不在上清中。

**表 1 被检样品血凝效价和体积**

**Tab 1 HA titer and volume of the samples**

样品名称	血凝效价/log2	体积/mL
表达产物	7	23
角转子离心上清	0	23
混悬液	9	4
纯化后表达产物	11	0.6

**2.2 电镜检测** 如图 1 所示,电镜下可见禽流感病毒形态特点的 VLPs,呈圆形或椭圆形,直径约 100 nm,外周有环形的冠状刺突。

**2.3 Western Blot 检测** 用 HA、NA、M1 抗体分别检测纯化前表达产物、纯化后表达产物、H5 禽流感病毒及 HA、NA、M1 蛋白标准品。

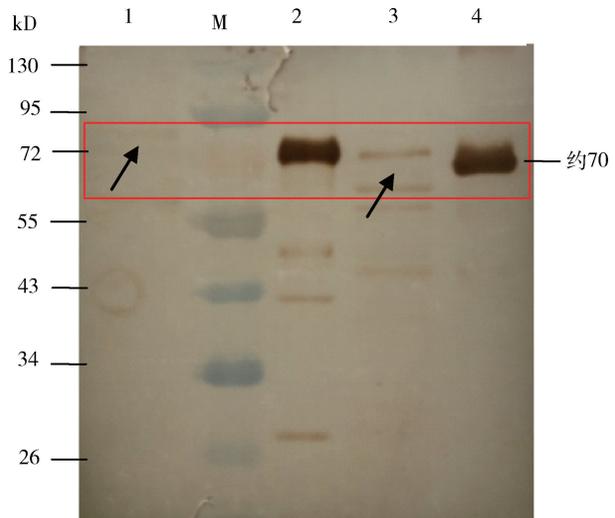
**2.3.1 HA 抗体检测** HA 蛋白 纯化前后的表达产物、H5 禽流感病毒、HA 蛋白标准品在 70 kD

左右有目的条带,见图 2。H5 禽流感病毒 HA 蛋白的条带弱,可能因为甲醛灭活导致抗原表位被部分破坏,未被 HA 抗体全部识别。表达产物、H5 禽流感病毒、HA 蛋白标准品的 HA 蛋白的分子量有差异,可能因为表达的系统不一样,表达产物是昆虫杆状病毒系统表达的,HA 蛋白标准品是原核表达系统表达的,而 H5 禽流感病毒是鸡胚扩繁制备的。



**图 1 纯化后样品电镜照片**

**Fig 1 Observation of the purified sample by electron microscopy**

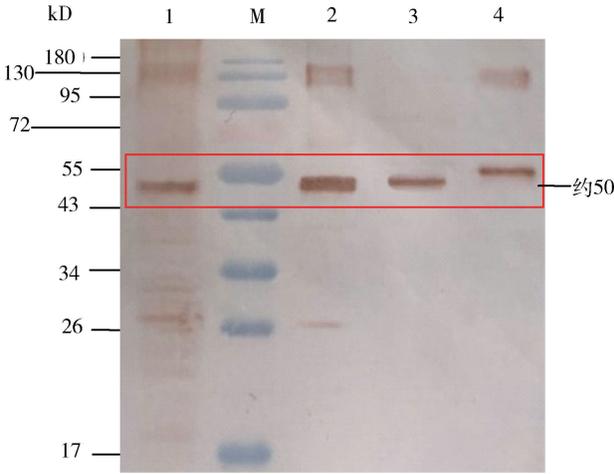


1: H5 禽流感病毒; M: Marker; 2: 纯化后的表达产物; 3: 纯化前的表达产物; 4: HA 蛋白标准品  
1: H5 AIV; M: Marker; 2: Purified products; 3: Unpurified products; 4: HA protein

**图 2 Western Blot 检测 HA 蛋白**

**Fig 2 Detection of HA protein by Western Blot**

2.3.2 NA 抗体检测 NA 蛋白 纯化前后的表达产物、H5 禽流感病毒、NA 蛋白标准品在 50 kD 左右有目的条带,见图 3。



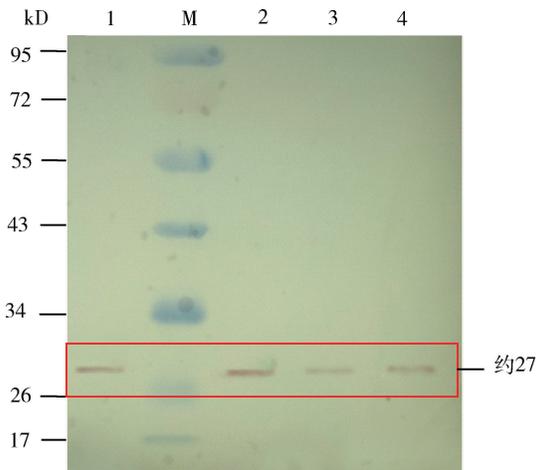
1: 纯化前的表达产物; M: Marker; 2: 纯化后的表达产物;  
3: NA 蛋白标准品; 4: H5 禽流感病毒

1: Unpurified products; M: Marker; 2: Purified products;  
3: NA protein; 4: H5 AIV

图 3 Western Blot 检测 NA 蛋白

Fig 3 Detection of NA protein by Western Blot

2.3.3 M1 抗体检测 M1 蛋白 纯化前后的表达产物、H5 禽流感病毒、M1 蛋白标准品在 27 kD 左右有目的条带,见图 4。



1: H5 禽流感病毒; M: Marker; 2: 纯化后的表达产物;

3: 纯化前的表达产物; 4: M1 蛋白标准品

1: H5 AIV; M: Marker; 2: Purified products;

3: Unpurified products; 4: M1 protein

图 4 Western Blot 检测 M1 蛋白

Fig 4 Detection of M1 protein by Western Blot

2.4 ELISA 检测 预实验研究显示,表达产物中有影响 ELISA 检测结果准确性的物质,所以样品需经透析处理。ELISA 方法检测表达产物、H5 禽流感病毒和 HA 蛋白、NA 蛋白,OD<sub>450nm</sub> 值见表 1,经计算样品阴阳性判定标准为 0.164。结果显示,不同批的表达产物为阳性,H5 禽流感病毒和 HA 蛋白、NA 蛋白均为阴性。结果说明,表达产物为同时含有禽流感 HA、NA 蛋白的 VLPs。H5 禽流感病毒的 ELISA 检测结果为阴性,结合 2.3.1 的结果,分析原因可能是甲醛灭活的 H5 禽流感病毒无法被 HA 单抗有效识别。

表 2 ELISA 检测表达产物

Tab 2 Detection of the products by ELISA

被检样品	稀释倍数	OD <sub>450nm</sub> 值				阳性孔数 / 总孔数
		孔 1	孔 2	孔 3	平均数	
表达产物批次 1	原倍	1.213	1.459	1.345	1.339	3/3
	10 倍	0.390	0.404	0.552	0.449	3/3
	100 倍	0.162	0.155	0.200	0.172	1/3
表达产物批次 2	原倍	1.532	1.442	1.238	1.404	3/3
	10 倍	0.543	0.409	0.443	0.465	3/3
	100 倍	0.322	0.189	0.172	0.228	3/3
表达产物批次 3	原倍	1.346	1.441	1.203	1.330	3/3
	10 倍	0.356	0.459	0.372	0.396	3/3
	100 倍	0.166	0.123	0.154	0.148	1/3
HA 蛋白	10 倍	0.112	0.109	0.154	0.125	0/3
	100 倍	0.120	0.098	0.107	0.108	0/3
NA 蛋白	10 倍	0.130	0.125	0.144	0.133	0/3
	100 倍	0.102	0.116	0.123	0.114	0/3
H5 禽流感病毒	原倍	0.120	0.123	0.102	0.115	0/3
	10 倍	0.103	0.115	0.114	0.111	0/3
	100 倍	0.097	0.106	0.113	0.105	0/3
纯化后表达产物	10 倍	0.823	0.765	0.940	0.843	3/3
		0.110	0.090	0.101	0.100	0/3
PBS	/	0.134	0.142	0.111	0.129	0/3
		0.117	0.095	0.099	0.104	0/3

### 3 讨论与结论

昆虫细胞的小规模和大规模培养都相对容易,因此,昆虫杆状病毒表达系统成为了最广泛的应用

于重组蛋白的常规生产系统之一<sup>[6]</sup>。昆虫细胞可以折叠、修饰、运输和组装新合成的多肽,产生高度真实的可溶性最终产物<sup>[6]</sup>,因此,将其作为疫苗的抗原生产系统在工艺和抗原性方面均满足要求。

VLP01 株是基于昆虫杆状病毒表达系统构建的含有 H5N1 亚型禽流感 HA、NA、M1 基因的重组杆状病毒,以禽流感疫苗研发为目的。为确认 VLP01 株表达产物是禽流感 VLPs,对表达产物进行了鉴定。角转子超速离心后有血凝活性的物质在沉淀中不在上清中,说明有血凝活性的物质是可被超离沉淀的、沉降系数 700 ~ 800 s 的禽流感 VLPs,而非沉降系数小于 20 s、不能被超离沉淀的 HA 蛋白。禽流感病毒形态上为不规则球形,100 nm 左右,包膜上有两种糖蛋白,即血凝素和神经氨酸酶,这两类蛋白突出病毒体外,长度约为 10 ~ 14 nm,直径 6 ~ 8 nm,被称作刺突<sup>[7]</sup>。电镜观察本研究纯化后的表达产物,可见上述大小的病毒样颗粒及表面的环形冠状刺突,说明表达产物具有禽流感病毒的形态特点,是禽流感 VLPs。HA、NA、M1 抗体以 Western Blot 方法检测蔗糖密度梯度方法离心纯化的表达产物,可见特异性条带,说明纯化后的表达产物是同时含有 HA、NA、M1 蛋白的禽流感 VLPs。NA 多抗、HA 单抗的夹心 ELISA 检测表达产物为阳性,说明表达产物并非游离的 HA 蛋白、NA 蛋白,而是同时含有 HA 蛋白、NA 蛋白 VLPs。

血凝、电镜、Western Blot、ELISA 鉴定均说明 VLP01 株表达产物是形态结构类似禽流感病毒的禽流感 VLPs 而非游离的 HA、NA 等蛋白。开展的其他研究显示,基于 VLP01 株的禽流感 VLPs 疫苗在靶动物上一次免疫能够产生不低于 6log<sub>2</sub> 的血凝抑制抗体,并可抵御相同分支的 H5N1 禽流感病毒的攻击,不发病、不排毒,即禽流感 VLPs 具有禽流

感病毒相似的免疫原性。综上,昆虫杆状病毒表达系统构建的重组杆状病毒载体禽流感疫苗有被开发成为新型禽流感疫苗产品的可能。

#### 参考文献:

- [1] 高晓艺,王传彬,石玉祥,等. 禽流感病毒样颗粒疫苗研究进展[J]. 病毒学报, 2018, 34(6): 920-928.  
Gao X Y, Wang C B, Shi Y X, *et al.* Research progress on virus-like particle vaccine of avian influenza [J]. Chinese Journal of Virology, 2018, 34(6): 920-928.
- [2] 李晶梅,靖志强,秦红刚,等. 昆虫杆状病毒表达系统生产流感疫苗的研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2012, 46(12): 67-70.  
Li J M, Jing Z Q, Qin H G, *et al.* Progress of influenza virus like particles vaccine based on baculovirus expression vector system[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2012, 46(12): 67-70.
- [3] Possee R D. Baculoviruses as expression vectors [J]. Current Opinion in Biotechnology, 1997, 8(5): 569-572.
- [4] Pushko P, Tumpey T M, Bu F, *et al.* Influenza virus-like particles comprised of the HA, NA, and M1 proteins of H9N2 influenza virus induce protective immune responses in BALB/c mice[J]. Vaccine, 2005, 50: 5751-5759.
- [5] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2015 年版第三部[S]. 北京: 中国农业出版社, 2016.  
Chinese Veterinary Pharmacopoeia Committee. Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 2015 edition, the third Volume[S]. Beijing: China Agriculture Press, 2016.
- [6] Kost T A, Condreay J P, Jarvis D L. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells[J]. Nature Biotechnology, 2005, 23(5): 567-575.
- [7] Swayne D E, Boulianne M, Logue C M, *et al.* Diseases of poultry[M]. 14th Ed. Wiley-Blackwell, 2020.

(编辑:李文平)