

申慧芳,申惠敏,贾秀珍,等. H5N1高致病性禽流感病毒HA基因在昆虫细胞中的表达及免疫原性[J]. 江苏农业科学,2014,42(7):24-27.

H5N1高致病性禽流感病毒HA基因 在昆虫细胞中的表达及免疫原性

申慧芳¹, 申惠敏², 贾秀珍³, 张青峰¹

(1. 遵义医学院珠海校区,广东珠海 519041; 2. 山西省长治市畜牧兽医局,山西长治 046000;
3. 山西省长治市城区农林委员会,山西长治 046000)

摘要:用昆虫杆状病毒表达系统表达了高致病性禽流感 H5N1 HA 蛋白,经 SDS - PAGE 和 Western blot 检测,HA 蛋白表达分子量约为 70 ku;将 HA 蛋白制成油乳液,免疫 BALB/c 小鼠,免疫 3 次后,收集血清,以血凝抑制试验(HI)和血清 IgG 抗体酶联免疫吸附试验(ELISA)评估体液免疫,酶联免疫斑点试验(ELISPOT)评估细胞免疫。试验结果表明:重组 HA 蛋白组和全病毒灭活疫苗组免疫小鼠后,血清中和抗体效价及 ELISA IgG 效价均显著高于 PBS 组,重组 HA 蛋白组和全病毒灭活疫苗组之间差异不显著。ELISPOT 试验数据显示,重组 HA 蛋白组和全病毒灭活疫苗组小鼠脾单个核细胞分泌 IFN - γ 和 IL - 4 细胞数量显著高于 PBS 组,而重组 HA 蛋白组和全病毒灭活疫苗组之间差异不显著。用昆虫杆状病毒表达系统表达 H5N1 HA 蛋白制成油乳液能诱导体液免疫和细胞免疫,能为预防高致病性禽流感 H5N1 候选疫苗的筛选提供依据。

关键词:H5N1 高致病性禽流感;Sf9 昆虫细胞;HA 蛋白;免疫反应

中图分类号:S855.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002 - 1302(2014)07 - 0024 - 04

禽流感(avian influenza)是由禽流感病毒(avian influenza virus, AIV)引起的一种禽类传染病,其中高致病性禽流感(high pathogenic avian influenza, HPAI)H5N1 亚型更是养禽业

的一大灾难性疾病,不仅给养禽业带来了巨大的经济损失;同时,它正在突破种间屏障,引起人类感染,从病禽直接感染人类病死率高达 60%^[1],给公共卫生带来威胁。可通过减少禽对禽的传播以及禽对人类的传播,并进行有效的免疫来保护养禽业的健康发展^[2]。预防 H5N1 高致病性禽流感的传统疫苗是由鸡胚生产的。然而这种方法生产疫苗存在很大的风险,如由于病毒致死鸡胚而影响疫苗生产^[3]。另外,高致病性禽流感的疫苗生产和处理需要生物安全三级实验室^[4]。因此,寻找一种可以替代传统疫苗而又高效安全的疫苗就成

收稿日期:2014 - 03 - 14

基金项目:国家自然科学基金(编号:31360212);广东省深圳市科技研发资金基础研究计划(编号:JC2011105201028A)。

作者简介:申慧芳(1976—),女,山西长治人,博士,副教授,主要从事食品安全生物学研究。E - mail:hethershen@gmail.com。

[23]王凯,朱教君,于立忠,等. 遮阴对黄波罗幼苗的光合特性及光能利用效率的影响[J]. 植物生态学报,2009,33(5):1003 - 1012.

[24]缴丽莉,路丙社,周如久,等. 遮光对青榨槭光合速率及叶绿素荧光参数的影响[J]. 园艺学报,2007,34(1):173 - 178.

[25]肖凯,谷俊涛,邹定辉,等. 杂种小麦及其亲本光合碳同化特性的研究[J]. 作物学报,1999,25(3):381 - 388.

[26]张光飞,欧阳志勤,苏文华. 生境光强对云南金钱槭幼苗生长及光合速率的影响[J]. 湖北农业科学,2009,48(11):2780 - 2782.

[27]蔡艳飞,李世峰,解玮佳,等. 不同光照环境对‘薇安’铁线莲光合特性的影响[J]. 园艺学报,2011,38(7):1377 - 1384.

[28]吴根良,孙瑶,沈国正,等. 不同光照条件下大花蕙兰净光合速率和叶绿素荧光参数的日变化[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版,2009,35(6):607 - 612.

[29]金鑫,胡万良,丁磊,等. 遮阴对红松幼苗生长及光合特性的影响[J]. 东北林业大学学报,2009,37(9):12 - 13,47.

[30]毕焕改,王美玲,姜振升,等. 亚适温弱光对黄瓜幼苗光合酶活性和基因表达的影响[J]. 应用生态学报,2011,22(11):2894 - 2900.

[31]董明辉,惠锋,顾俊荣,等. 灌浆期不同光强对水稻不同粒位籽粒品质的影响[J]. 中国生态农业学报,2013,21(2):164 - 170.

[32]于莎,王友华,周治国,等. 花铃期遮阴对棉花氮素代谢的影

响及其机制[J]. 作物学报,2011,37(10):1879 - 1887.

[33]王庆美,侯夫云,汪宝卿,等. 遮阴处理对紫甘薯块根品质的影响[J]. 中国农业科学,2011,44(1):192 - 200.

[34]战吉成,黄卫东,王志龙,等. 葡萄幼苗对弱光环境的形态和生长反应[J]. 中国农学通报,2002,18(2):1 - 2,17.

[35]张福漫,马国成. 日光温室不同季节的生态环境对黄瓜光合作用的影响[J]. 华北农学报,1995,10(1):70 - 75.

[36]Willits D H. Predicting yield responses to different greenhouse CO₂ enrichment schemes:cucumbers and tomatoes[J]. Agricultural and Forest Meteorology,1989,44(3/4):275 - 293.

[37]童平,杨世民,马均,等. 不同水稻品种在不同光照条件下的光合特性及干物质积累[J]. 应用生态学报,2008,19(3):505 - 511.

[38]孔云,王绍辉,马承伟,等. 轻度遮光对温室油桃结果枝光合碳同化物积累和分配的影响[J]. 农业工程学报,2007,23(3):169 - 173.

[39]莫伟平,周琳耀,张静逸,等. 遮荫和环剥对荔枝枝梢生长和光合生理的影响[J]. 园艺学报,2013,40(1):117 - 124.

[40]安翠香,张玉鑫,杨世梅,等. 遮阴对甜瓜果实蔗糖积累及其代谢酶活性的影响[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2011,39(9):167 - 173.

了当务之急。

血凝素蛋白(hemagglutinin, HA)是禽流感病毒最重要的结构蛋白,在病毒吸附、穿膜及决定病毒的宿主特异性和致病力方面均起着关键的作用^[5]。HA蛋白也是AIV诱导保护性免疫的主要抗原,它刺激机体所产生的抗体可以中和病毒、抵抗感染^[6-7]。因此,HA蛋白成为发展亚单位疫苗的首选^[8]。当流感疫情发生时,只要分离到流行毒株,进行HA基因测序就可以进行序列合成并表达蛋白,这种方式周期短、产量高,将在流疫情高发时代替传统疫苗进行快速有效地控制病症的流行。

本试验选用Bac-to-Bac昆虫杆状病毒表达系统进行重组HA蛋白表达,用表达的HA蛋白和H5N1禽流感全病毒灭活疫苗进行体液免疫和细胞免疫评估,为今后研制快速、高效、安全的H5N1禽流感疫苗提供有效的依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株与质粒 *E. coli* DH5 α 菌种(笔者所在实验室保存);*E. coli* DH10Bac菌种、pFastbacDual质粒、Sf9昆虫细胞、Cellfectin II Reagent购自Invitrogen公司;pMD-18 T载体、Taq DNA聚合酶、T₄ DNA连接酶、限制性内切酶均购自TaKaRa公司;sf900 II SFM、Grace's Insect Cell Culture Medium购自GIBCO公司;质粒提取试剂盒购自天根生物工程公司;DNA胶回收试剂盒、预染蛋白质Marker购自Fermentas公司;显影液定影液购自碧云天生物技术研究所;ECL显色液、DAB显色液均购自BBI公司;H5N1高致病性禽流感高免血清购自广东温氏研究院;HRP标记的兔抗鸡IgG购自KPL公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.1.2 试验动物 6周龄BALB/c小鼠(体质量16~18 g/只)购自中山大学实验动物中心。

1.1.3 阳性对照疫苗 本研究免疫组用的阳性对照为肇庆大华农生物药品有限公司生产的重组禽流感病毒灭活疫苗H5N1亚型,Re-5,兽药生字(2006)190022098;证书编号:(2007)兽药GMP证字178号。

1.2 试验方法

1.2.1 HA基因的获得 参照GenBank中注册的禽流感病毒A/goose/GD/96(H5N1)毒株(序列号HA:NC_007362.1),将HA基因送去Invitrogen公司进行核苷酸序列合成。根据合成的序列设计用以扩增HA基因的特异性引物,其中上游引物H5N1-HA-F:5'-CGCGATCCGATGGAGAAAATAGTGC-3'(含BamH I酶切位点);下游引物H5N1-HA-R:5'-CCGGTCTGACTTAAATGCAAATTCCTG-3'(含Sal I酶切位点)。PCR扩增体系为50 μ L,其中5 \times PCR buffer 10 μ L, dNTP(各2.5 mmol/L)4 μ L,模板1 μ L,引物各1 μ L, Taq酶0.5 μ L,灭菌双蒸水补至50 μ L。纯化的PCR产物经BamH I和Sal I双酶切,连接至经相同限制性内切酶酶切的质粒pFastbacDual,转化DH5 α 感受态细胞。酶切鉴定后,筛选出重组质粒pFastbacDual-HA。将阳性重组质粒pFastbacDual-HA转化DH10Bac感受态细胞,通过蓝白斑筛选和PCR鉴定后,抽提重组杆粒rBacmid-HA,PCR鉴定时使用的通用序列参照Bac-to-Bac杆状病毒表达系统使用

手册。所有引物均由上海生物工程有限公司合成。

1.2.2 重组蛋白HA的表达 重组的rBacmid-HA通过Cellfectin II reagent转染进昆虫细胞Sf9。将Sf9细胞置于含有10% FBS(胎牛血清)的Grace昆虫细胞培养基,28 $^{\circ}$ C孵育。当6孔板中每孔细胞浓度为 1×10^6 个/mL时,让其吸附1 h。将1 μ g rBacmid-HA(Bacmid空杆粒作为阴性对照)溶于100 μ L不完全培养基中(不含血清或双抗的Grace培养基);将5 μ L Cellfectin溶于100 μ L不完全培养基;两者混合均匀在室温孵育15~45 min后加入Sf9细胞,28 $^{\circ}$ C孵育5 h,弃去转染培养基,加入新鲜培养基。当细胞出现明显病变后(第1代约需4 d),收集含病毒的培养上清,即为第一代重组病毒,记为P₁。P₁代病毒种子液量少、效价低,用P₁继续感染Sf9细胞产生效价高的P₂种子液。P₂代病毒液感染细胞后,收集感染72 h后的细胞培养上清直接用于后续检测。细胞用PBS(磷酸盐缓冲液)洗3次,经3次反复冻融后超声破碎,然后在4 $^{\circ}$ C、12 000 g条件下离心10 min,取上清,用12% SDS-PAGE(十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺)胶进行蛋白电泳检测。

1.2.3 表达产物的鉴定 将SDS-PAGE电泳中得到的蛋白用半干法转至PVDF(聚偏二氟乙烯)膜上,含3% BSA(牛血清白蛋白)封闭;1:1 000的H5N1禽流感高免血清作为一抗,1:5 000的HRP标记的兔抗鸡IgG作为二抗,用ECL进行显色。

1.2.4 间接免疫荧光试验(IFA) 通过间接免疫荧光试验观察重组蛋白在Sf9细胞的表达及定位。在6孔板中以 1×10^6 个/mL的浓度接种Sf9细胞,贴壁2 h后,接种约0.5个MOI(病毒感染复数)的重组杆状病毒上清。感染48 h后,用PBS清洗细胞3次;用4%多聚甲醛固定细胞15 min, PBS清洗细胞3次;用预冷的100%甲醇(4 $^{\circ}$ C)处理10 min, PBS清洗3次;3% BSA室温封闭1 h, PBS清洗3次;以H5亚型免疫阳性血清为一抗(1:200),37 $^{\circ}$ C孵育1 h, PBS清洗细胞3次;用1:1 000倍稀释的FITC(异硫氰酸荧光素)标记的荧光二抗,37 $^{\circ}$ C避光孵育1 h, PBS清洗细胞3次;置于荧光显微镜下拍照。

1.2.5 油乳液疫苗的制备 将定量后的细胞破碎液与油乳剂按2:1体积混合,高速匀浆,获得的油乳剂疫苗4 $^{\circ}$ C保存备用。

1.2.6 动物分组与免疫试验 选取体质量16~18 g的6周龄BALB/c雌性小鼠随机分成3组,分别为重组HA蛋白组、H5N1禽流感灭活疫苗组和PBS组(阴性对照),每组10只。采用颈部皮下多点注射,从6周龄开始进行免疫,此后每间隔14 d加强免疫1次,共免疫3次,每次免疫剂量为10 μ g/只,以HA蛋白含量为标准。3次免疫后,每组随机取5只试验小鼠,眼球取血,室温下分离血清,用HI和ELISA方法检测H5N1抗体水平。每个试验组随机取3只小鼠,取脾脏,用淋巴细胞分离液分离脾淋巴细胞,进行酶联免疫斑点试验(ELISPOT),检测分泌IFN- γ 与IL-4细胞因子的细胞数量。

1.2.7 血凝抑制试验(HI试验) 参照《国家流感中心标准操作规程》中的“流感/禽流感病毒血凝抑制试验(HI)操作细则”进行操作。

1.2.8 间接酶联免疫吸附试验(ELISA)检测IgG抗体 采用棋盘法确定最佳的抗原包被浓度、血清稀释度。用

100 μL/孔包被 96 孔板,用 1% BSA 封闭,加入用 0.1% BSA 稀释的待检血清于上述已包被的反应孔中,充分洗涤后,加入 1:10 000 的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体,在酶标仪上读取 450 nm 下的吸光度($D_{450\text{ nm}}$)。

1.2.9 酶联免疫吸附斑点试验 按达科为生物公司“酶联免疫吸附斑点试验操作细则”进行操作,将 ELISPOT 板斑点计数,并将重组 HA 蛋白组、全病毒灭活疫苗组及 PBS 组分别作数据间的 *t* 检验,进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 HA 基因的克隆

以合成的 A/duck/Guangdong/22/2002 (H5N1) 禽流感 HA 基因为模板,进行 PCR 扩增,将 HA 的 PCR 产物和 pFastBacDual 经 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切后,回收并连接,连接产物转化 DH5α 感受态细胞,经琼脂糖凝胶电泳检测及测序,获得扩增产物大小为 1 707 bp,与预计扩增片段长度相符合(图 1),表明已筛选出重组质粒 pFastBacDual-HA。

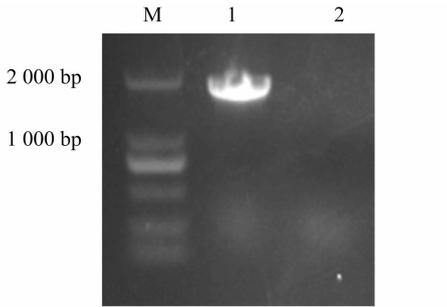


图1 PCR 扩增HA 基因

2.2 重组杆粒构建

将重组质粒 pFastBacDual-HA 转化到 DH10Bac 中,通过庆大霉素、卡那霉素、四环素 3 种抗性和 Blue-Gal 蓝白斑筛选得到阳性单菌落克隆,提取杆粒 rBacmid-HA,用特异性引物 M13 通过 PCR 鉴定重组杆状病毒,与预期结果一致(图 2)。

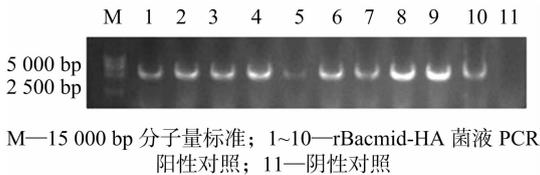


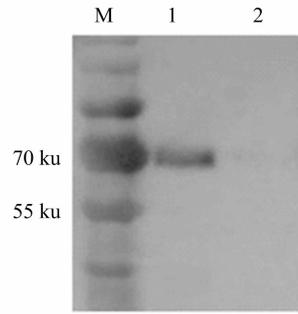
图2 PCR 鉴定重组杆状病毒DNA

2.3 Western blot 鉴定重组 HA 蛋白的表达

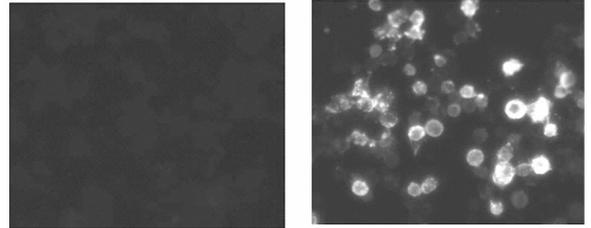
将 rBacmid-HA 病毒种子液以 1 倍感染复数 (MOI = 1) 接种 Sf9 昆虫细胞,收集 72 h 后的细胞培养上清,超声破碎,进行 Western blot 分析,一抗为 H5N1 亚型禽流感高免血清,二抗为 HRP 标记的兔抗鸡 IgG,以野生杆状病毒表达蛋白作为对照。如图 3 所示,出现分子量约 70 ku 的单一多肽,证明重组杆状病毒表达了 HA 蛋白。在昆虫细胞中,重组 HA 蛋白没有裂解为 HA1 和 HA2 亚基。

2.4 间接免疫荧光结果

重组杆状病毒感染 Sf9 细胞 48 h 后进行 IFA,从而鉴定及定位重组 HA 蛋白的表达,结果显示,重组蛋白高效表达于细胞表面(图 4)。



M—蛋白质分子量标准; 1—HA 蛋白; 2—阴性对照
图3 Western blot检测重组HA 蛋白的表达



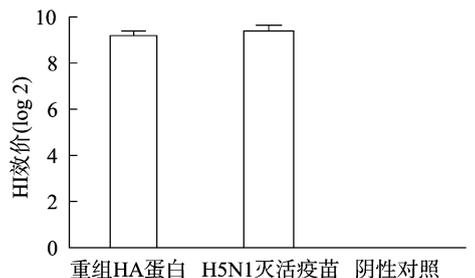
A. 野毒株感染的Sf9细胞 B.重组杆状病毒感染的Sf9细胞

图4 重组HA 蛋白IFA检测结果

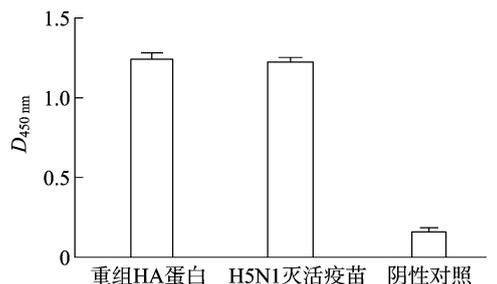
2.5 体液免疫

2.5.1 免疫 BALB/c 小鼠血清中 HI 效价 用重组的 HA 蛋白油乳液、全病毒灭活疫苗和 PBS 免疫 BALB/c 小鼠,检测 3 免后小鼠血清中 HI 效价。结果显示,免疫重组 HA 蛋白组和全病毒灭活疫苗组显著高于 PBS 对照组,而重组 HA 蛋白组和全病毒灭活疫苗组差异不显著(图 5-A)。

2.5.2 免疫 BALB/c 小鼠血清中 IgG 抗体水平检测 用间接 ELISA 检测 BALB/c 小鼠血清中 IgG 抗体,结果显示,重组 HA 蛋白组与全病毒灭活疫苗组 IgG 抗体均有升高,两者显著高于 PBS 组($P < 0.05$),重组 HA 蛋白组与全病毒灭活疫苗组差异不显著(图 5-B)。



A. 血清中的抗体检测



B. 血清IgG抗体检测

图5 小鼠体液免疫检测

2.6 免疫小鼠脾淋巴细胞中分泌细胞因子 IFN- γ 和 IL-4 检测

用大肠杆菌 BL21 表达的 HA 蛋白作抗原,刺激 3 次免疫后小鼠脾淋巴细胞,通过 ELISPOT 技术对产生的细胞因子 IFN- γ 和 IL-4 进行检测。结果显示,重组 HA 蛋白组和全病毒灭活疫苗组脾淋巴细胞经刺激后分泌细胞因子 IFN- γ 和 IL-4 的细胞数量均显著高于 PBS 组 ($P < 0.05$),但重组 HA 蛋白组和全病毒灭活疫苗组之间差异不显著 (图 6)。

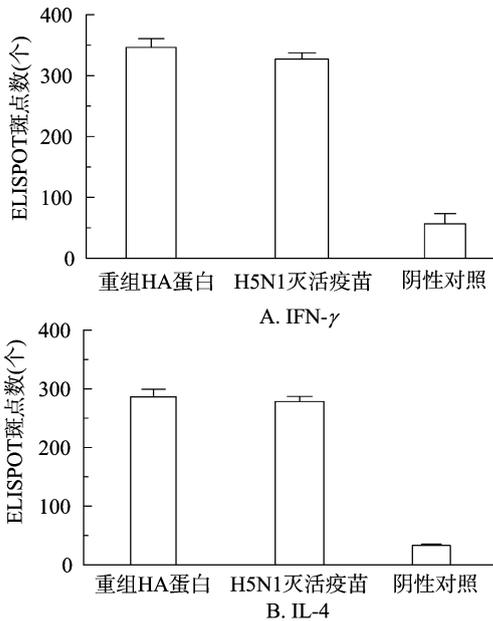


图6 ELISPOT 检测脾淋巴细胞分泌细胞因子IFN- γ 和 IL-4

3 结论与讨论

H5N1 型高致病性禽流感病毒在世界范围内分布广、危害性大,不仅造成了养禽业的巨大损失,也影响到人类健康和人类安全。目前,尚无特效药物用于临床治疗,接种疫苗是预防和控制该病发生的主要手段和途径。传统疫苗用鸡胚生产,生产周期长、生物安全性要求高,无法应对流感病毒的大范围流行。本研究用昆虫杆状病毒表达系统生产的重组 HA 蛋白,表达效率高、周期短、生物安全性好。HI 试验结果显示:重组 HA 蛋白与全病毒灭活疫苗免疫产生的效价相一致,HI 效价的高低与攻毒免疫保护有直接的相关^[9-15],HI 效价越高对禽流感病毒感染的保护效果越好,保护的时间越长;ELISA 结果表明:重组 HA 蛋白的 IgG 抗体与全病毒灭活疫苗之间无显著差别;ELISPOT 试验结果表明:重组 HA 蛋白组可诱导产生强烈的细胞免疫应答,有利于机体对感染病毒和细胞的直接杀伤,从而快速清除机体内的病毒。

本试验从通过获得 H5N1 HA 基因序列到转染昆虫细胞,进行 HA 蛋白高效表达 (分子量约 70 ku),以及感染细胞裂解,制备油乳液,全部过程只用了约 30 d;通过 BALB/c 小鼠免疫,刺激机体产生较强的体液免疫和细胞免疫反应,为禽流感基因工程亚单位疫苗的研发奠定了基础。

参考文献:

- [1] Uyeki T M. Global epidemiology of human infections with highly pathogenic avian influenza A (H5N1) viruses[J]. *Respirology*, 2008, 13 (Suppl 1): S2 - S9.
- [2] Cornelissen L A H M, de Vries R P, de Boer - Luijtz E A, et al. A single immunization with soluble recombinant trimeric hemagglutinin protects chickens against highly pathogenic avian influenza virus H5N1[J]. *PLoS One*, 2010, 5: e10645.
- [3] Qiao C L, Yu K Z, Jiang Y P, et al. Protection of chickens against highly lethal H5N1 and H7N1 avian influenza viruses with a recombinant fowlpox virus co-expressing H5 haemagglutinin and N1 neuraminidase genes[J]. *Avian Pathology*, 2003, 32 (1): 25 - 31.
- [4] Webby R J, Perez D R, Coleman J S, et al. Responsiveness to a pandemic alert; use of reverse genetics for rapid development of influenza vaccines[J]. *Lancet*, 2004, 363 (9415): 1099 - 1103.
- [5] 金元昌, 李景鹏, 张 龙, 等. 禽流感病毒分子生物学研究进展[J]. *动物医学进展*, 2003, 24 (1): 12 - 15.
- [6] Athmaram T N, Saraswat S, Santhosh S R, et al. Yeast expressed recombinant hemagglutinin protein of novel H1N1 elicits neutralising antibodies in rabbits and mice[J]. *Virology Journal*, 2011, 8: 524.
- [7] 南文龙, 金宁一, 鲁会军, 等. H5N1 亚型禽流感病毒血凝素 Th 和 B 细胞表位预测及抗原性分析[J]. *中国免疫学杂志*, 2009, 25 (7): 630 - 633, 637.
- [8] Russell C J, Webster R G. The genesis of a pandemic influenza virus[J]. *Cell*, 2005, 123 (3): 368 - 371.
- [9] Tang X C, Lu H R, Ross T M. Hemagglutinin displayed baculovirus protects against highly pathogenic influenza[J]. *Vaccine*, 2010, 28 (42): 6821 - 6831.
- [10] Skountzou I, Quan F S, Jacob J, et al. Transcutaneous immunization with inactivated influenza virus induces protective immune responses[J]. *Vaccine*, 2006, 24 (35/36): 6110 - 6119.
- [11] Treanor J J, Schiff G M, Couch R B, et al. Dose-related safety and immunogenicity of a trivalent baculovirus-expressed influenza-virus hemagglutinin vaccine in elderly adults[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2006, 193 (9): 1223 - 1228.
- [12] Lin W Y, Fan H Y, Cheng X L, et al. A baculovirus dual expression system-based vaccine confers complete protection against lethal challenge with H9N2 avian influenza virus in mice[J]. *Virology Journal*, 2011, 8: 273.
- [13] Treanor J J, Wilkinson B E, Maseoud F, et al. Safety and immunogenicity of a recombinant hemagglutinin vaccine for H5 influenza in humans[J]. *Vaccine*, 2001, 19 (13/14): 1732 - 1737.
- [14] Yang D G, Chung Y C, Lai Y K, et al. Avian influenza virus hemagglutinin display on baculovirus envelope; cytoplasmic domain affects virus properties and vaccine potential[J]. *Molecular Therapy*, 2007, 15 (5): 989 - 996.
- [15] Cox M M, Patriarca P A, Treanor J. FluBlok, a recombinant hemagglutinin influenza vaccine[J]. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 2008, 2 (6): 211 - 219.