

DOI:10.13350/j.cjpb.240602

• 论著 •

三源重组 H9N2 亚型禽流感病毒 NA 蛋白原核表达及多克隆抗体制备*

梁志鹏¹, 刘静¹, 刘闰枢¹, 张新宇¹, 何杰珩¹, 陈高婕¹, 闫战飞¹, 池仕红¹, 袁生¹, 郭锦玥¹, 梁昭平², 黄淑坚¹, 温峰^{1*}

(1. 佛山科学技术学院生命科学与工程学院, 广东佛山 528225; 2. 华南农业大学兽医学院)

【摘要】 **目的** 利用原核表达系统表达华南地区分离的三源重组 H9N2 亚型禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV)的神经氨酸酶(NA)蛋白,并制备兔多克隆抗体。**方法** 将1株 H9N2 亚型 AIV 的 NA 基因克隆到 pET-32a 载体,构建 NA 原核表达质粒,并转化至 *E. coli* Rosetta(DE3)感受态细胞进行蛋白表达。优化 IPTG 浓度、诱导时间和温度,提高蛋白表达量。利用镍柱纯化重组 NA 蛋白,并免疫新西兰兔,制备兔抗 NA 蛋白多克隆抗体通过 Western blot 和间接免疫荧光试验(Indirect immunofluorescence assay, IFA)验证多克隆抗体的特异性。通过间接酶联免疫吸附试验(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定多克隆抗体的效价。**结果** 成功构建了 pET-32a-H9N2-NA 原核表达质粒;经 SDS-PAGE 和 Western blot 验证,表达的重组 NA 蛋白大小约 70 ku,符合预期;对诱导条件进行优化,确定 37 °C,终浓度为 1.2 mmol/L 的 IPTG,诱导时长 6 h 为最佳条件;制备的兔抗 NA 蛋白多克隆抗体的 Western blot 和 IFA 的结果显示,该多克隆抗体能和 H9N2 亚型 AIV 结合,特异性好;间接 ELISA 测得兔抗 NA 蛋白多克隆抗体的效价达到了 1 : 409 600。**结论** 本研究表达的 NA 蛋白,制备的兔抗 NA 蛋白多克隆抗体具有特异性,效价高,为 NA 蛋白的 ELISA 检测方法的建立和疫苗研制提供帮助。

【关键词】 禽流感病毒;H9N2 亚型;神经氨酸酶;原核表达;多克隆抗体

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2024)06-0625-06

[*Journal of Pathogen Biology*. 2024 Jun. ;19(6):625-630.]

Prokaryotic expression of NA protein of H9N2 subtype avian influenza virus and preparation of polyclonal antibody

LIANG Zhipeng¹, LIU Jing¹, LIU Yunzhi¹, ZHANG Xinyu¹, HE Jieheng¹, CHEN Gaojie¹, YAN Zhanfei¹, CHI Shihong¹, YUAN Sheng¹, GUO Jinyue¹, LIANG Zhaoping², HUANG Shujian¹, WEN Feng¹

(1. College of Life Science and Engineering, Foshan University, Foshan 528225, Guangdong, China; 2. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University)***

【Abstract】 **Objective** This study aimed to express the neuraminidase (NA) protein of a triple-reassortant H9N2 subtype avian influenza virus (AIV) isolated from South China using a prokaryotic expression system and to generate rabbit polyclonal antibodies. **Methods** The NA gene from an H9N2 AIV strain was cloned into the pET-32a vector to create an NA prokaryotic expression plasmid, which was then introduced into *E. coli* Rosetta (DE3) competent cells for protein expression. Optimization of IPTG concentration, induction time, and temperature was conducted to enhance protein expression. The recombinant NA protein was purified using a nickel column, and New Zealand rabbits were immunized to produce rabbit anti-NA protein polyclonal antibodies. The specificity of the polyclonal antibodies was confirmed through Western blot and Indirect Immunofluorescence Assay (IFA), while the titer of the polyclonal antibodies was evaluated using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). **Results** The construction of the pET-32a-H9N2-NA prokaryotic expression plasmid was successful. Analysis via SDS-PAGE and Western blot validated the expression of the recombinant NA protein, which exhibited the expected size of approximately 70 ku. Optimal induction conditions were determined to be 37 °C, a final IPTG concentration of 1.2 mmol/L, and an induction time of 6 hours. Western blot and IFA results of the generated rabbit anti-NA protein polyclonal antibodies demonstrated strong specificity in binding to the H9N2 AIV. The titer of the rabbit anti-NA protein polyclonal antibodies reached 1 : 409 600 as determined by indirect ELISA. **Con-**

* **【基金项目】** 广东省基础与应用基础研究基金 (No. 2022A1515012462, 2024A1515010836); 广东省教育厅科研项目 (No. 2022KTSCX124); 广东大学生科技创新培育专项资金资助项目 (No. pdjh2023b0547); 佛山科学技术学院学生学术基金项目 (No. xsjj202309kja01, xsjj202309zrb06)。

** **【通讯作者】** 温峰, E-mail: wenf@fosu.edu.cn

【作者简介】 梁志鹏(1999-), 男, 广东广州人, 在读硕士, 主要从事分子病毒学方面的研究。E-mail: 1097286571@qq.com

clusion The expressed NA protein and the resulting rabbit anti-NA protein polyclonal antibodies exhibited high specificity and titer, thus facilitating the establishment of an ELISA detection method for NA protein and contributing to vaccine development efforts.

【Keywords】 avian influenza virus; H9N2 subtype; neuraminidase; prokaryotic expression; polyclonal antibody

禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV)是正粘病毒科 A 型流感病毒属的一员,由编码 10 个核心蛋白,和数量可变的辅助蛋白的 8 个单股负链 RNA 片段包装而成^[1]。AIV 可分为高致病性禽流感病毒(Highly pathogenic avian influenza, HPAIV)和低致病性禽流感病毒(Low pathogenic avian influenza, LPAIV)。H9N2 亚型 AIV 最早分离于 1966 年美国威斯康星州^[2]。在 1992 年中国分离出第一个 H9N2 亚型 LPAIV 毒株^[3]。H9N2 亚型 LPAIV 感染不会在禽类中引起明显的临床症状或死亡,但会增加禽类对其他病原微生物的继发感染,而这些病原微生物可能延缓禽类生长和降低产蛋量,增加其死亡率,所以 H9N2 亚型 LPAIV 的流行常常导致重大的经济损失^[4-5]。在亚洲,H9N2 亚型 AIV 在家禽中的流行促进了各种新型禽流感病毒的出现和 H9 亚型禽流感病毒的进化^[6]。不仅如此,H9N2 亚型 AIV 可以将内部基因提供给其他亚型 AIV,如 H5N1、H5N6、H7N9 和 H10N8,增强它们在哺乳动物中的跨种传播能力和致病性^[7-10]。此外,H9N2 亚型流感病毒可以直接感染人^[11]。因此,防控 H9N2 亚型 AIV 至关重要。

神经氨酸酶(Neuraminidase, NA)是 AIV 的第二糖蛋白,占表面糖蛋白的 20%,其唾液酸酶活性能促进病毒粒子从感染细胞中释放^[12]。此外,NA 在 AIV 的感染过程中发挥重要作用,可促进病毒进入上皮细胞,并防止病毒聚集在宿主细胞表面^[13]。虽然 NA 会发生抗原漂移,但其抗原漂移的频率要低于 HA^[14]。因此,在禽流感的防控中,监控 AIV 的 NA 蛋白具有重要性。本研究对前期分离的 1 株三源重组 H9N2 亚型 AIV(由 G1、Y280 和 F98 系病毒重组)的 NA 基因进行克隆,构建含有 NA 基因的原核表达载体,转化到大肠埃希菌细胞中,诱导表达 NA 蛋白,并优化诱导表达的条件。将纯化的重组 NA 蛋白免疫新西兰兔,制备兔抗 NA 蛋白多克隆抗体,为建立 H9N2 亚型 AIV 血清鉴定方法提供参考。

材料与方 法

1 材料

1.1 毒株,细胞,载体及质粒 H9N2 亚型禽流感病毒株 A/chicken/Baise/0701/2019(H9N2)(简称 BS/19)^[15]、*E. coli* JM109 感受态细胞、*E. coli* Rosetta(DE3)和 pET-32a(+)载体均由实验室保存。

1.2 主要试剂 氨苄青霉素(AMP+)和 PVDF 转印膜均由实验室保存;SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5×)、HRP 标记山羊抗鼠 IgG(H+L)、HRP 标记山羊抗兔 IgG(H+L)、Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG(H+L)、超快速 DNA 连接试剂盒、His 标签蛋白纯化试剂盒(耐变性剂型)、弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂购于上海碧云天生物技术有限公司;T 载体 PCR 产物克隆试剂盒购自上海生工生物工程股份有限公司;Bam H I 和 Sal I 限制性内切酶购自中国 NEB 公司;DNA marker DL5000/1000 购于湖南艾科瑞生物工程有限公司;His-Tag Mouse Monoclonal Antibody 购于武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;Ultra High Sensitivity ECL Kit 购于美国 MedChemExpress 公司;高保真 PCR 酶和质粒纯化试剂盒购于赛默飞世尔科技公司;DNA 纯化试剂盒和 180 ku 预染蛋白 marker 购于南京诺唯赞生物科技股份有限公司;普通型透析袋(8000-14000)购自上海源叶生物科技有限公司;PEG2000 购于安徽白鲨生物科技有限公司;甲醇和丙酮购于天津市富宇精细化工有限公司。

1.3 实验动物 80 日龄雌性新西兰兔购于广东省医学动物中心。

2 方法

2.1 NA 基因 PCR 扩增引物的设计与合成 根据 BS/19 NA 基因序列设计并合成 NA 基因引物,上下游引物分别加入 Bam H I 和 Sal I 酶切位点(引物序列中有下划线的部分)。上游引物序列为:H9N2-NA-F:5'-GGCTGATATCGGATCCATGAATCCAAAT-CAGAAGATAACAG-3';下游引物序列为:H9N2-NA-R:5'-CCGCAAGCTTGTGCGACTTATATAGGCATGAAGTTGATATTC-3'。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

2.2 pET-32a-NA 重组原核表达载体的构建 以 PHW2000-BS/19-NA 为模板 PCR 扩增 NA 基因。PCR 扩增体系:PCR 酶 12.5 μL,上、下游引物各 1.25 μL,模板质粒 1 μL,ddH₂O 9 μL。PCR 扩增条件:98 °C 30 s;98 °C 10 s,53 °C 30 s,72 °C 1 min 30 s,进行 35 轮循环;72 °C 10 min,4 °C 保温。PCR 扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳,利用 DNA 纯化试剂盒纯化目的片段,后克隆到 pUCm-T 载体,得到的质粒命名为 pUCm-T-H9N2-NA。利用 Bam H I 和 Sal I 酶酶切 pUCm-T-H9N2-NA 和 pET-32a。双酶切后的

pUCm-T-H9N2-NA 与双酶切后的 pET-32a 连接。连接产物转化到 TOP10 大肠埃希菌感受态细胞中, 扩大培养并提取出重组质粒, 命名为 pET-32a-H9N2-NA。对 pET-32a-H9N2-NA 进行 *Bam* H I 和 *Sal* I 酶切验证后, 送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

2.3 重组 NA 蛋白的诱导表达 将 pET-32a-H9N2-NA 质粒转化到 Rosetta(DE3) 感受态细胞。将含有 pET-32a-H9N2-NA 质粒和 pET-32a 空载体质粒的菌液以 1:100(V/V) 接种到含 AMP 的 LB 培养基中, 37 °C、220 rpm 培养 150 min 至菌液的 A₆₀₀ 值为 0.6。取 1 mL 菌液作为未诱导表达的对照, 剩下的菌液加入终浓度 1 mmol/L 的 IPTG, 在 37 °C、220 rpm 培养 5 h。取 1 mL 诱导后的菌液, 4 °C、12 000 r/min 离心 5 min, 收集菌体沉淀。

2.4 重组 NA 蛋白的 SDS-PAGE 分析、Western blot 验证和可溶性分析 超声破碎至菌液澄清, 离心后分别收集上清和沉淀, 并取步骤 2.3 的菌体沉淀, 加入 5 × 上样缓冲液, 煮沸 10 min 后进行 SDS-PAGE 电泳, 最后经考马斯亮蓝染色。另取菌体沉淀进行 SDS-PAGE 电泳, 转印至 PVDF 膜, 用 5% 脱脂奶粉于 4 °C 封闭过夜后, 用 PBST 洗三次; 用 6 × His 标签单克隆抗体作为第一抗体, 孵育 2 h, 用 PBST 清洗三次; 用 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG(H+L) 作为第二抗体, 孵育 2 h, 用 PBST 洗三次, 用 ECL 化学发光液进行显影。

2.5 重组 NA 蛋白表达条件的优化 分别设置 IPTG 浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 和 1.6 mmol/L, 诱导时间 1、2、3、4、5、6、7 和 8 h, 诱导温度 16、25 和 37 °C 进行优化。收集每个条件诱导的菌液, 经 SDS-PAGE 中电泳完毕后进行考马斯亮蓝染色。

2.6 蛋白纯化、复性及浓缩 按照摸索出的最佳诱导条件, 大量诱导表达重组 NA 蛋白。超声破碎至菌液澄清, 收集沉淀, 用变性裂解液重悬。利用 His 标签蛋白纯化试剂盒纯化重组 NA 蛋白。把纯化后的重组 NA 蛋白装到透析袋内, 在 6、4、2、1 和 0 mol/L 尿素浓度的缓冲液下复性。复性后经 PEG20000 浓缩, 利用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白的浓度。

2.7 兔抗 NA 蛋白多克隆抗体的制备 将纯化后的蛋白与弗氏佐剂以等体积比例乳化, 皮下注射新西兰兔。一共免疫三次, 每只兔子每次免疫 1 mg 蛋白。每次免疫间隔 14 d。第一次免疫时乳化蛋白采用的佐剂为弗氏完全佐剂, 第二次和第三次采用弗氏不完全佐剂。第三次免疫一周后, 对新西兰兔心脏采血。析出的血清保存于 -80 °C。

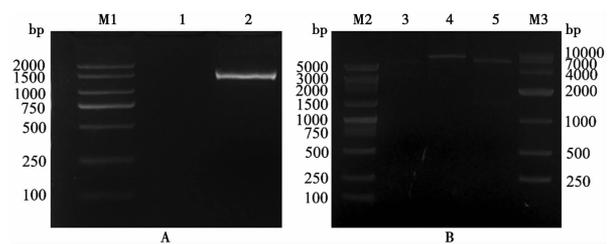
2.8 兔抗 NA 蛋白多克隆抗体的评价 利用纯化后

的 NA 蛋白与 H9N2 亚型 AIV 病毒液为抗原, 以制备的兔抗 NA 蛋白多克隆抗体为第一抗体, HRP 标记山羊抗兔 IgG(H+L) 为第二抗体, 按照 2.4 方法进行 Western blot 验证。H9N2 亚型 AIV 病毒液接种 96 孔板 MDCK 细胞, 感染 24 h 后用甲醇、丙酮(1:1) 混合液固定 30 min。用 PBS 对兔抗 NA 蛋白多克隆抗体从 1:100 开始 2 倍比稀释至 1:1 600, 作为第一抗体; Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG(H+L) 作为第二抗体, 进行 IFA 试验。用 ELISA 包被缓冲液(10 ×) 将蛋白稀释至浓度为 2 μg/mL, 包被到 ELISA 板中, 制备的兔抗 NA 蛋白多克隆抗体为第一抗体, HRP 标记山羊抗兔 IgG(H+L) 为第二抗体, 测定兔抗 NA 蛋白多克隆抗体的效价。

结果

1 H9N2 NA 基因扩增及原核表达质粒构建

利用设计的 NA 基因引物, 以 PHW2000-BS/19-NA 为模板, 成功扩增出约 1 400 bp 大小的片段, 符合预期(图 1A)。胶回收纯化目的基因片段, 连接到 T 载体上, 经双酶切后连接 pET-32a 载体, 得到的质粒命名为 pET-32a-H9N2-NA。*Bam* H I、*Sal* I 双酶切 pET-32a-H9N2-NA 后得到两条条带, 一条大小约为 5 900 bp, 另一条大小约为 1 400 bp, 符合预期(图 1B)。经测序, pET-32a-H9N2-NA 质粒的 NA 基因序列与毒株序列一致。



M1 DL2000 DNA Marker 1 阴性对照 2 H9N2 NA 基因扩增产物 M2 DL5000 DNA Marker 3 重组质粒 pET-32a-H9N2-NA 4 重组质粒 pET-32a-H9N2-NA *Bam* H I 单酶切 5 重组质粒 pET-32a-H9N2-NA *Bam* H I 和 *Sal* I 双酶切 M3 DL10000 DNA Marker

图 1 H9N2 NA 基因的扩增(A)和重组质粒的酶切鉴定(B)

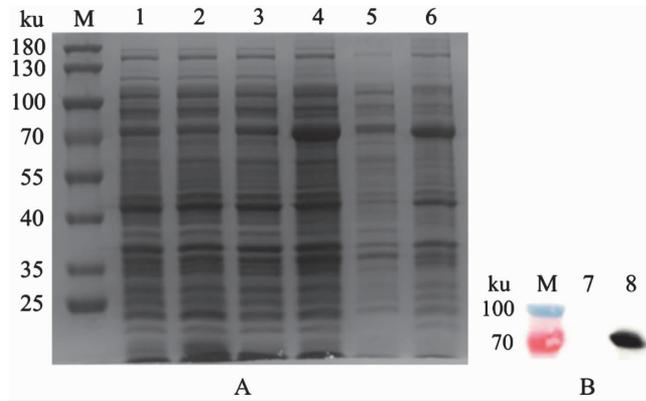
M1 DL2000 DNA Marker 1 Negative control 2 PCR amplification products of H9N2 NA gene M2 DL5000 DNA Marker 3 The recombinant plasmid pET-32a-H9N2-NA 4 The recombinant plasmid identified by *Bam* H I digestion 5 The recombinant plasmid identified by *Bam* H I and *Sal* I digestion M3 DL10000 DNA Marker

Fig. 1 PCR amplification of H9N2 NA gene (A) and enzymatic identification of the recombinant plasmid (B)

2 重组 NA 蛋白表达的 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定

pET-32a-H9N2-NA (Rosetta) 诱导表达后经 SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色, 在 70 ku 附近有较粗

的条带,粗于诱导前的对照(图 2A)。Western blot 结果显示,诱导表达的重组 NA 蛋白能和 His 标签抗体结合(图 2B)。



M 蛋白分子质量标准 1 pET-32a/Rosetta(DE3)未诱导 2 pET-32a/Rosetta(DE3)诱导 5 h 3 pET-32a-NA /Rosetta(DE3)未诱导 4 pET-32a-NA/Rosetta(DE3)诱导后 5 pET-32a-NA/Rosetta(DE3)破碎上清 6 pET-32a-NA/Rosetta(DE3)破碎沉淀 7 pET-32a-NA/Rosetta(DE3)未诱导 8 pET-32a-NA/Rosett(DE3)诱导后

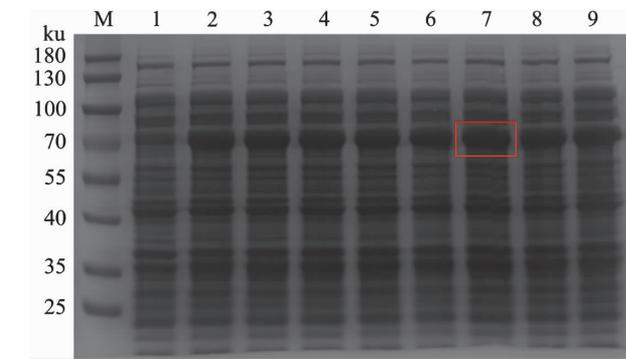
图 2 重组蛋白表达的 SDS-PAGE(A)和 Western blot(B)分析

M Protein Makrer 1 pET-32a was not induced 2 Induction of pET-32a 3 pET-32a-NA was not induced 4 Induction of pET-32a-NA 5 Hyperacoustic supernatant 6 Hyperacoustic precipitation 7 pET-32a-NA was not induced 8 Induction of pET-32a-NA

Fig. 2 Expression of recombinant protein

3 重组 NA 蛋白表达条件的优化

优化重组 NA 蛋白的诱导表达条件,最终确定重组 NA 蛋白的最佳诱导表达条件为 37 °C、IPTG 浓度 1.2 mmol/L、时间 6 h(图 3,图 4,图 5)。



M 蛋白分子质量标准 1 空白对照 2~9 IPTG 浓度依次为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 和 1.6 mmol/L

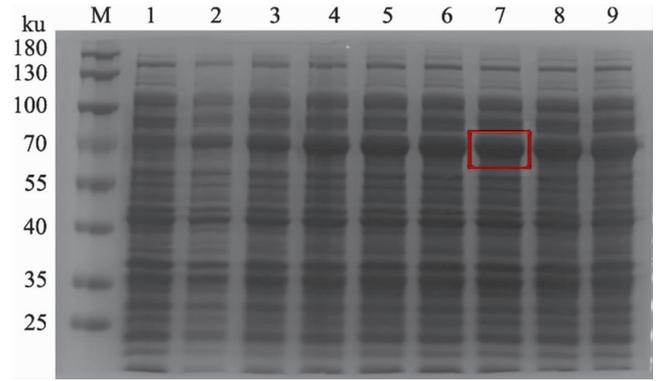
图 3 重组蛋白表达诱导剂 IPTG 浓度的优化

M Protein Makrer 1 Blank control 2-9 IPTG concentration of 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 and 1.6 mmol/L

Fig. 3 Induction of IPTG at different concentrations

4 镍柱纯化重组 NA 蛋白与鉴定

对经镍柱纯化后的重组 NA 蛋白进行 SDS-PAGE 分析,发现条带单一,大小约为 70 ku(图 6)。相对于纯化前的蛋白,纯化后的杂蛋白明显减少。

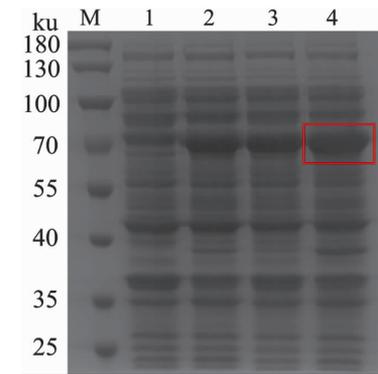


M 蛋白分子质量标准 1~9 诱导时间依次为 0、1、2、3、4、5、6、7 和 8 h

图 4 诱导时间的优化

M Protein Makrer 1-9 The induction time of 1,2,3,4,5,6,7 and 8 h

Fig. 4 Induction of IPTG at different time

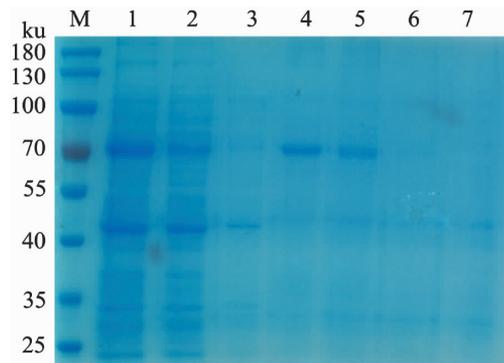


M 蛋白分子质量标准 1 未诱导对照 2 诱导温度 18 °C 3 诱导温度 28 °C 4 诱导温度 37 °C

图 5 诱导温度的优化

M Protein Makrer 1 pET-32a-NA was not induced 2 pET-32a-NA was induce by 18 °C 3 pET-32a-NA was induce by 28 °C 4 pET-32a-NA was induce by 37 °C

Fig. 5 NA protein expression induced by different temperatures



M 蛋白分子质量标准 1 诱导沉淀 2 穿流液 3 洗涤液 4 纯化后蛋白

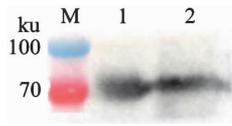
图 6 NA 蛋白纯化 SDS-PAGE 结果

M Protein Makrer 1 Hyperacoustic precipitation 2 Flow through 3 Wash solution 4 Purified protein

Fig. 6 SDS-PAGE result of the purification of NA protein

5 浓缩后蛋白浓度测定及 Western blot 鉴定

经 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测,浓缩复性后的蛋白浓度为 0.67 mg/mL。经 Western blot 鉴定,纯化后的蛋白可以和 His 标签抗体结合(图 7)。



M 蛋白分子质量标准 1 纯化前蛋白 2 纯化浓缩后蛋白

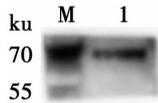
图 7 浓缩后蛋白的 Western blot 鉴定

M Protein Marker 1 Unpurified recombinant protein 2 Purified recombinant protein

Fig. 7 Western blot identification of the purified recombinant protein

6 兔抗 NA 蛋白多克隆抗体验证及效价测定

利用制备的兔抗 NA 蛋白多克隆抗体为第一抗体,纯化后蛋白和 H9N2 亚型 AIV 病毒液作为抗原,进行 Western blot。结果显示兔抗 NA 蛋白多克隆抗体稀释 10^3 倍后仍能结合 H9N2 亚型 AIV 的 NA 蛋白(图 8)。H9N2 亚型 AIV 感染 96 孔板 MDCK 细胞 20 h 后进行 IFA 试验,结果显示,兔抗 NA 蛋白多克隆抗体稀释 1 600 倍后仍有绿色荧光(图 9)。间接 ELISA 测得兔抗 NA 蛋白多克隆抗体的效价达到 1 : 409 600(图 10)。



M 蛋白分子质量标准 1 H9N2 亚型 AIV

图 8 兔抗 NA 蛋白多克隆抗体的 Western blot 鉴定

M Protein Marker 1 The antigen is H9N2 subtype AIV

Fig. 8 Western blot identification of rabbit anti-NA protein polyclonal antibody

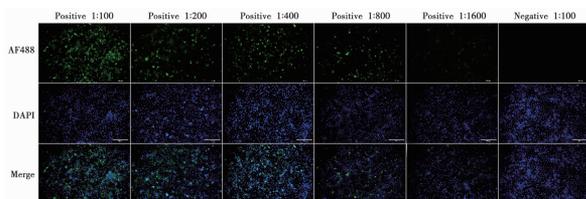


图 9 兔抗 NA 蛋白多克隆抗体 IFA 鉴定(200×)

Fig. 9 IFA identification of rabbit anti-NA protein polyclonal antibody(200×)

讨论

H9N2 亚型 AIV 是目前中国最流行的 LPAIV,其以强大的空气传播能力而闻名,与其他病原体的混合感染往往会增加禽类的发病率和死亡率^[16-17]。因此需要有效的快速的诊断方法去防控 H9N2 亚型 AIV。当前 AIV 的检测方法主要是分子生物学检测方法和免疫学检测方法。其中,ELISA 的准确性和灵敏性较高^[18]。Kwon 等^[19]开发了建立了 H9N2 亚型 NA 蛋

白的 ELISA 检测方法,能区分被感染和接种疫苗的禽类,为 H9N2 AIV 的防控提供帮助。

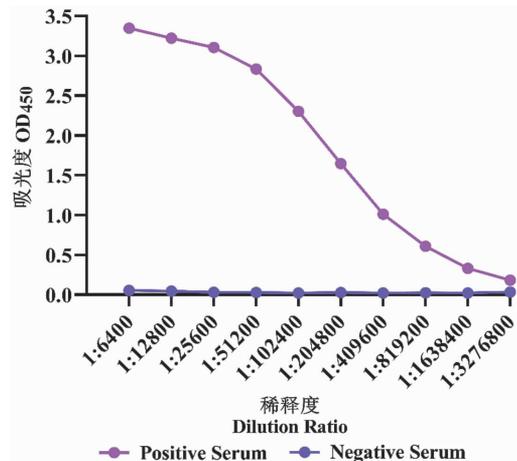


图 10 ELISA 检测兔抗 NA 蛋白多克隆抗体效价

Fig. 10 Rabbit anti-NA protein polyclonal antibody titer detection by ELISA

接种疫苗是预防 AIV 感染和相关疾病潜在并发症的最佳方法^[20]。现有的流感疫苗的 NA 含量各不相同,有些疫苗的 NA 含量几乎检测不到,向现有疫苗补充纯化的 NA 是替代策略^[21]。另外,与 HA 相比,NA 随时间推移的抗原变化率较低^[22]。这表明抗 NA 抗体比抗 HA 抗体维持有效结合活性的时间更长,基于 NA 的疫苗可能不需要像基于 HA 的疫苗那样频繁地更新。另外,NA 特异性免疫已被证明可以限制流感病毒的传播,从而减轻疾病症状^[23]。

本研究在不同温度、诱导时间和 IPTG 浓度条件下进行表达诱导,摸索重组 NA 蛋白的最佳诱导表达条件。结果显示,浓度在 0.2~1.2 mmol/L 的范围内,不同 IPTG 浓度对诱导表达的影响没有十分显著。诱导时间在 6 h 后,延迟诱导表达的时间对蛋白的表达量无明显影响。根据可溶性分析结果,重组 NA 蛋白主要是包涵体形式,这与赫珊珊等^[24]研究结果相似。因此,纯化后的蛋白需要经过复性步骤,恢复蛋白正确的生物学活性。本研究曾尝试利用 His 标签蛋白纯化磁珠进行重组 NA 蛋白的纯化,但发现蛋白和磁珠不结合,故后续采用镍离子亲和层析柱纯化蛋白。

本研究利用原核表达系统,诱导表达的重组 NA 蛋白经纯化后,其 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定结果中除重组 NA 蛋白外,没有明显的杂蛋白,说明镍柱纯化 NA 蛋白的效果好。制备的兔抗 NA 蛋白多克隆抗体经 Western blot 与 IFA 验证,可特异性结合 H9N2 亚型 AIV。经间接 ELISA 试验测得抗体效价高达 1 : 409 600。这表明本研究表达的 NA 重组蛋白的免疫原性好,制备的兔抗 NA 蛋白多克隆抗体的特异性良好,为单克隆抗体的制备提供抗原,为疫苗研发

和为建立 H9N2 亚型 AIV NA 蛋白血清学鉴定方法提供帮助。

【参考文献】

- [1] Dong J, Zhou Y, Pu J, et al. Status and challenges for vaccination against Avian H9N2 influenza virus in China[J]. *Life (Basel)*, 2022, 12(9):190.
- [2] Homme PJ, Easterday BC. Avian influenza virus infections. I. Characteristics of influenza A-turkey-Wisconsin-1966 virus[J]. *Avian Dis*, 1970, 14(1):66-74.
- [3] 陈伯伦, 张泽纪, 陈伟斌. 鸡 A 型禽流感病毒的分离与血清学初步鉴定[J]. *中国家禽*, 1997(11):5-7.
- [4] Caceres CJ, Rajao DS, Perez DR. Airborne transmission of avian origin H9N2 influenza A viruses in mammals[J]. *Viruses*, 2021, 13(10):1999.
- [5] Nagy A, Mettenleiter TC, Abdelwhab EM. A brief summary of the epidemiology and genetic relatedness of avian influenza H9N2 virus in birds and mammals in the Middle East and North Africa[J]. *Epidemiol Infect*, 2017, 145(16):3320-3333.
- [6] Guo YJ, Krauss S, Senne DA, et al. Characterization of the pathogenicity of members of the newly established H9N2 influenza virus lineages in Asia[J]. *Virology*, 2000, 267(2):279-288.
- [7] Guan Y, Shortridge KF, Krauss S, et al. H9N2 influenza viruses possessing H5N1-like internal genomes continue to circulate in poultry in southeastern China[J]. *J Virol*, 2000, 74(20):9372-9380.
- [8] Lam TT, Wang J, Shen Y, et al. The genesis and source of the H7N9 influenza viruses causing human infections in China[J]. *Nature*, 2013, 502(7470):241-244.
- [9] 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.
- [10] Shen YY, Ke CW, Li Q, et al. Novel reassortant avian influenza A (H5N6) viruses in humans, Guangdong, China, 2015 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2016, 22(8):1507-1509.
- [11] Yuan R, Liang L, Wu J, et al. Human infection with an avian influenza A/H9N2 virus in Guangdong in 2016[J]. *J Infect*, 2017, 74(4):422-425.
- [12] Gaymard A, Le Briand N, Frobert E, et al. Functional balance between neuraminidase and haemagglutinin in influenza viruses [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2016, 22(12):975-983.
- [13] Wagner R, Matrosovich M, Klenk HD. Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections[J]. *Rev Med Virol*, 2002, 12(3):159-166.
- [14] Han AX, de Jong S, Russell CA. Russell, Co-evolution of immunity and seasonal influenza viruses[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2023, 21(12):805-817.
- [15] Wen F, Li W, Guo J, et al. Genetic characterization of a novel genotype H9N2 avian influenza virus from chicken in South China[J]. *J Infect*, 2020, 81(5):816-846.
- [16] Bi Y, Li J, Li S, et al. Dominant subtype switch in avian influenza viruses during 2016-2019 in China[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1):5909.
- [17] Arafat N, Abd El Rahman S, Naguib D, et al. Co-infection of *Salmonella enteritidis* with H9N2 avian influenza virus in chickens[J]. *Avian Pathol*, 2020, 49(5):496-506.
- [18] 莫一群, 王雅琴, 陆辉, 等. 禽流感病毒检测方法研究进展[J]. *中国家禽*, 2023, 45(6):82-95.
- [19] Kwon JS, Kim MC, Jeong OM, et al. Novel use of a N2-specific enzyme-linked immunosorbent assay for differentiation of infected from vaccinated animals (DIVA)-based identification of avian influenza[J]. *Vaccine*, 2009, 27(24):3189-3194.
- [20] Pica N, Palese P. Toward a universal influenza virus vaccine: prospects and challenges[J]. *Annu Rev Med*, 2013, 64:189-202.
- [21] Giurgea LT, Morens DM, Taubenberger JK, et al. Influenza neuraminidase: a neglected protein and its potential for a better influenza vaccine[J]. *Vaccines (Basel)*, 2020, 8(3):409.
- [22] Westgeest KB, de Graaf M, Fourment M, et al. Genetic evolution of the neuraminidase of influenza A (H3N2) viruses from 1968 to 2009 and its correspondence to haemagglutinin evolution[J]. *J Gen Virol*, 2012, 93(Pt 9):1996-2007.
- [23] Prevato M, Ferlenghi I, Bonci A, et al. Expression and characterization of recombinant, tetrameric and enzymatically active influenza neuraminidase for the setup of an enzyme-linked lectin-based assay[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8):e0135474.
- [24] 郝珊珊, 郑阳, 余远楠, 等. H9N2 亚型禽流感病毒 NA 和 M2 基因的克隆与表达[J]. *畜牧与兽医*, 2019, 51(5):121-127.
- 【收稿日期】 2024-01-19 【修回日期】 2024-04-12

(上接 624 页)

- [12] Franzo G, Mira F, Schiro G, et al. Not Asian anymore: Reconstruction of the history, evolution, and dispersal of the "Asian" lineage of CPV-2c[J]. *Viruses*, 2023, 15(9):1962.
- [13] Chen XY, Xie ZJ, Zhao ZP, et al. Genetic diversity of parvovirus isolates from dogs and wild animals in China[J]. *J Wildl*, 2011, 47(4):1036-1039.
- [14] Jiang H, Yu Y, Yang R, et al. Detection and molecular epidemiology of canine parvovirus type 2 (CPV-2) circulating in Jilin Province, Northeast China[J]. *Comp Immunol Microb*, 2021, 74:101602.
- [15] 张仁舟, 杨松涛, 冯昊, 等. 中国国内首次检测到犬细小病毒 CPV-2c[J]. *中国病原生物学杂志*, 2010, 5(4):246-249, 275.
- [16] Zhao H, Wang J, Jiang Y, et al. Typing of canine parvovirus strains circulating in North-East China[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2017, 64(2):495-503.
- [17] Wu H, Li X, Wang L, et al. Molecular epidemiological survey of canine parvovirus in domestic dogs in four provinces, China[J]. *Virusdisease*, 2018, 29(1):113-117.
- [18] Zhuang QY, Qiu Y, Pan ZH, et al. Genome sequence characterization of canine parvoviruses prevalent in the Sichuan province of China[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2019, 66(2):897-907.
- [19] 刘海防. 蓝狐细小病毒泰安株分子生物学特征研究及其 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法的建立[D]. 泰安: 山东农业大学, 2009.
- [20] Liu C, Gao J, Li H, et al. Phylogenetic characteristics of canine parvovirus type 2c variant endemic in Shanghai, China[J]. *Viruses*, 2021, 13(11):2257-2257.
- [21] Li S, Chen X, Hao Y, et al. Characterization of the VP2 and NS1 genes from canine parvovirus type 2 (CPV-2) and feline panleukopenia virus (FPV) in Northern China[J]. *Front Vet Sci*, 2022, 9:934849.
- [22] Hao X, He Y, Wang C, et al. The increasing prevalence of CPV-2c in domestic dogs in China[J]. *PeerJ*, 2020, 8:e9869.
- [23] Liu CQ, Gao J, Li H, et al. Phylogenetic characteristics of canine parvovirus type 2c variant endemic in Shanghai, China[J]. *Viruses*, 2021, 13(11):2257-2257.
- [24] Truyen U, Gruenberg A, Chang SF, et al. Evolution of the feline-subgroup parvoviruses and the control of canine host range *in vivo*[J]. *J Virol*, 1995, 69(8):4702-4710.
- [25] Miao BC, Chen SB, Zhang XZ, et al. T598 and T601 phosphorylation sites of canine parvovirus NS1 are crucial for viral replication and pathogenicity [J]. *Veter Microbiol*, 2022, 264:109301.
- 【收稿日期】 2024-01-15 【修回日期】 2024-04-09