

文章编号:1000-5404(2012)16-1691-04

## 技术方法

# H5N1 亚型禽流感病毒 NS1 蛋白多克隆抗体的制备及鉴定

贺 贞<sup>1</sup>, 林东子<sup>2</sup>, 李观强<sup>3</sup>, 马卫列<sup>1</sup>, 丁 航<sup>1</sup>, 张志珍<sup>1</sup> (523808 广东 东莞, 广东医学院生物化学与分子生物学教研室<sup>1</sup>, 东莞市慢性病防治院检验科<sup>2</sup>; 518172 深圳, 深圳市龙岗区人民医院检验科<sup>3</sup>)

**[摘要]** 目的 获取 H5N1 亚型禽流感病毒 NS1 蛋白的多克隆抗血清, 制备 NS1 蛋白的多克隆抗体。方法 利用异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达融合蛋白 GST-NS1, 采用 Glutathione-sepharose 4B 亲和层析纯化融合蛋白。纯化的 GST-NS1 蛋白以不同剂量皮下注射免疫 BALB/c 小鼠, 收集抗血清, 采用 Protein A-sepharose 和 CNBr-sepharose 4B 亲和层析从抗血清中纯化抗 NS1 蛋白的多克隆抗体。Western blot 和免疫荧光法鉴定多克隆抗体的特异性, 酶联免疫吸附法(ELISA)检测抗体的效价。结果 SDS-PAGE 结果表明, 融合蛋白 GST-NS1 以可溶形式表达, 诱导 4 h 的表达量占细菌可溶性蛋白的 32.6%, 融合蛋白的纯度达到 90% 以上。Western blot 分析显示, 亲和层析制备的多克隆抗体对 NS1 蛋白具有高度特异性。ELISA 结果表明, 皮下注射 25、50、100 μg GST-NS1 融合蛋白的 BALB/c 小鼠血清光密度  $D(450)$  值均明显增高 ( $P < 0.01$ ), 其滴度达到 1:3 200。免疫荧光观察到病毒感染的 A549 细胞中, 有内源性 NS1 蛋白的表达。结论 成功地从抗血清中制备出 NS1 蛋白的多克隆抗体, 制备的抗体具有高度特异性。

**[关键词]** 禽流感病毒; NS1; 融合蛋白; 多克隆抗体

**[中图分类号]** R373.13; R392.7

**[文献标志码]** B

A 型流感病毒包含 8 个单链 RNA 片段, 可编码 10 或 11 种蛋白。根据血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)的抗原差异, 病毒可分成不同的亚型<sup>[1-2]</sup>。目前, 在鸟类中已发现 16 种 HA 和 9 种 NA 亚型流感病毒<sup>[3]</sup>。禽流感病毒(avian influenza A viruses, AIV)主要存在于野生禽类和家禽, 大部分 AIV 在鸡身上是低致病性的, 然而, 某些亚型 AIV 可感染人类并引起严重的病症, 包括 H5N1、H5N2、H7N7、H9N2 等亚型<sup>[1]</sup>。自 1997 年香港出现高致病性禽流感病毒 H5N1 亚型感染人类并导致死亡之后<sup>[4]</sup>, 禽流感事件频繁发生。迄今尚不清楚为何 H5N1 亚型禽流感病毒具有如此强的致病性。H5N1 毒性与病毒的非结构蛋白(nonstructural protein 1, NS1)有关<sup>[5-7]</sup>。NS1 蛋白是由病毒第 8 片段 ns 基因共线性转录而来。A 型流感病毒的 NS1 蛋白包含 2 个功能域: N 端的 RNA 结合域和 C 端的功能域。在感染过程中, NS1 蛋白在参与蛋白质-RNA 和蛋白质-蛋白质的相互作用中发挥多种功能, NS1 蛋白已被证明能拮抗干扰素-α 和干扰素-β 从而能对抗宿主的抗病毒反应<sup>[8]</sup>。本课题组在前期研究中, 以 A/Quail/Shantou/852/01 (H5N1) 病毒株为实验材料, 采用 RT-PCR 扩增了 ns1 基因, 成功构建了含 pGEX-4T-3/ns1 重组载体的 BL21 (DE3) 工程菌, 并优化了工程菌的诱导表达条件, 实现了融合蛋白的可溶性高表

达<sup>[9]</sup>。本实验进一步采用亲和层析法纯化重组 GST-NS1 融合蛋白, 免疫小鼠获取多克隆抗血清, 为制备 NS1 蛋白的特异性抗体提供一个有效的策略。

## 1 材料与与方法

### 1.1 菌株和主要试剂

含 pGEX-4T-3/ns1 重组载体的 BL21 (DE3) 工程菌由本实验室保存, 胰蛋白酶、酵母提取物、琼脂粉购自 Oxoid 公司, IPTG、氨苄青霉素(Amp)、还原型谷胱甘肽购自 Sigma 公司, 其他试剂主要购自上海生工公司。凝血酶 Thrombin、Glutathione-sepharose 4B、Protein A-sepharose、CNBr-sepharose 4B 亲和层析填料购自 GE Healthcare 公司。鼠抗 GST 单克隆抗体、HRP 标记的羊抗小鼠二抗购自 Santa Cruz 公司, FITC 标记的兔抗小鼠二抗购自 Sigma 公司, ECL 发光试剂购自碧云天生物科技有限公司。

### 1.2 细胞培养和实验动物

将 A549 细胞(购自中科院上海细胞库)培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基(购自 Gibco 公司), 37 °C、饱和湿度、5% CO<sub>2</sub> 常规传代培养。8 周龄健康雄性 BALB/c 小鼠(购自中科院上海实验动物中心)在广东医学院动物中心饲养。室温(22 ± 2) °C, 光照时间 08:00 ~ 22:00, 给予足够常规饲料和饮水。

### 1.3 方法

1.3.1 融合蛋白 GST-NS1 的诱导表达 取构建的工程菌 50 μl 接种于 5 ml 含 Amp 的 LB 培养基中, 37 °C 过夜培养。次日以 1:100 转接, 37 °C 剧烈振荡, 待  $D(600)$  值达 1.0 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.6 mmol/L, 37 °C 诱导 4 h。诱导结束后离心

**[基金项目]** 东莞市高等院校科研机构科技计划项目(2011108101007)

**[通信作者]** 张志珍, 电话: (0769) 22896339, E-mail: zzzhang@gdmc.edu.cn

收集菌体, SDS-PAGE 电泳, 灰度扫描分析融合蛋白的表达量。

1.3.2 亲和层析法纯化融合蛋白及酶切鉴定 大量扩增工程菌, 4℃、9 000 × g 离心 10 min 收集菌体, 冷冻待用。取 10 g 冰冻菌体重悬于 100 ml 预冷的 PBS 溶液中, 超声裂解。加入 1% Triton X-100, 4℃ 静置 30 min, 15 000 × g 离心 20 min。将上清转移至 Glutathione-sepharose 4B 中, 温和振荡 30 min。500 × g 离心 5 min 后装柱, 用 10 mmol/L 还原型谷胱甘肽洗脱纯化融合蛋白 GST-NS1。将纯化的融合蛋白在室温下酶切过夜, 融合蛋白与 Thrombin 比例为 100 μg: 1 μg。融合蛋白酶切后 SDS-PAGE 分析鉴定。

1.3.3 多克隆抗体的制备 将 BALB/c 小鼠分为 3 组, 每组 10 只, 分别在背部皮下多点注射 25、50、100 μg 的与弗氏完全佐剂混合的纯化融合蛋白 GST-NS1, 每点 0.1 ml, 以注射 PBS 作为对照。于第 1 次免疫后第 20、34 天加强免疫, 第 48 天将小鼠处死并收集血清。抗血清中的 IgG 成分用 Protein A-sepharose 进行亲和纯化, 洗脱下来的抗体再经过 CNBr-sepharose 4B 亲和层析柱以除去 GST 标签蛋白的特异性抗体, 最后制备得到抗重组 NS1 蛋白的多克隆抗体。

1.3.4 Western blot 检测多克隆抗体的特异性 将纯化的 GST-NS1 融合蛋白、Thrombin 酶切的蛋白产物进行 10% 的 SDS-PAGE 电泳后, 将蛋白条带转移到 PVDF 膜上。PVDF 膜用 5% BSA 室温封闭 2 h 后, 加入不同稀释倍数的抗血清、制备的多克隆抗体, 或 1:2 000 稀释的鼠抗 GST 特异性抗体作为对照, 4℃ 孵育过夜。再加入 HRP 标记的羊抗小鼠抗体 (1:2 000), 室温孵育 2 h, 用 ECL 进行化学发光分析。

1.3.5 ELISA 检测多克隆抗体水平 用纯化的融合蛋白包被 96 孔板, 4℃ 孵育过夜后, 用 0.5% BSA 室温封闭 1 h, PBST 缓冲液洗板。将制备的多克隆抗体倍数稀释后加入 96 孔板, 室温孵育 3 h。PBST 缓冲液洗去未结合的抗体, 加入 HRP 标记的羊抗小鼠抗体 (1:2 000), 室温孵育 2 h。PBST 缓冲液洗板 4 次, 加入 ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 混合底物显色 15 min, 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应, 酶标仪测定光密度值 [D(450)]。

1.3.6 免疫荧光法鉴定多克隆抗体 先将 A549 细胞传代, 当细胞生长到 80% 融合度时, 以 MOI = 1.0 剂量的 A/Quail/Shantou/852/01 (H5N1) 亚型流感病毒感染 A549 细胞, 用无病毒感染的 A549 细胞作对照, 37℃ 继续培养。病毒感染 24 h 后, 用预冷的甲醇: 丙酮 (3:1) 固定细胞 10 min, 3% BSA 封闭, 漂洗后分别与含有制备的多克隆抗体 (1:1 000)、鼠抗 GST 的一抗的工作液孵育, 4℃ 过夜, 漂洗后与 FITC 标记的兔抗小鼠二抗 (1:2 000), 37℃ 孵育 2 h, 漂洗后荧光显微镜观察结果。

## 1.4 统计学处理

计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 应用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素方差分析和 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 融合蛋白 GST-NS1 的诱导表达

IPTG 诱导结束后, 离心收集菌体, SDS-PAGE 电泳显示, 重组融合蛋白 GST-NS1 以可溶形式表达, 在相对分子质量约

53.0 × 10<sup>3</sup> 处出现融合蛋白条带, 其大小与预期相符。随着 IPTG 诱导时间从 1 h 延长至 4 h, GST-NS1 蛋白的表达量逐渐增加, 灰度扫描显示其最大表达量占可溶性蛋白总量的 32.6%。

### 2.2 融合蛋白 GST-NS1 的纯化及酶切鉴定

GST-NS1 融合蛋白用 Glutathione-sepharose 4B 亲和层析柱分离纯化, SDS-PAGE 分析显示, 融合蛋白纯度达到 90% 以上。转化了空载体 pGEX-4T-3 的对照组经 IPTG 诱导 4 h 后, 可见 GST 标签蛋白的高表达。GST-NS1 融合蛋白被 Thrombin 酶切成 NS1 和 GST (图 1)。

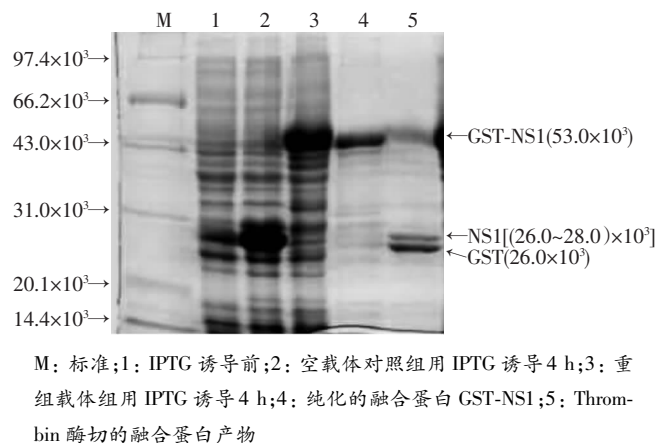


图 1 SDS-PAGE 电泳分析融合蛋白 GST-NS1 的纯化及酶切鉴定

### 2.3 Western blot 检测多克隆抗体的特异性

抗血清能与 GST-NS1 融合蛋白及酶切后产生的 NS1 蛋白和 GST 蛋白反应, 出现特异的阳性条带 (图 2A), 而纯化后的多克隆抗体能与融合蛋白及 NS1 蛋白反应, 出现特异性条带 (图 2B), 提示所制备的 NS1 蛋白多克隆抗体对 NS1 蛋白抗原具有高度特异性, 而与 GST 标签蛋白没有反应。

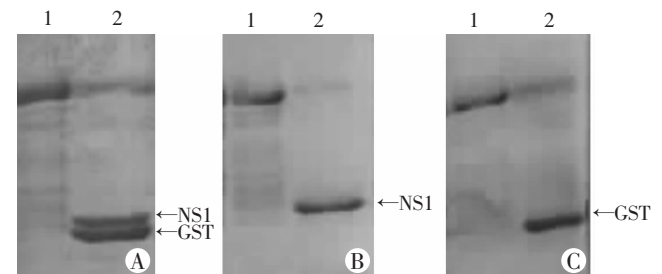


图 2 Western blot 鉴定 NS1 蛋白多克隆抗体的特异性

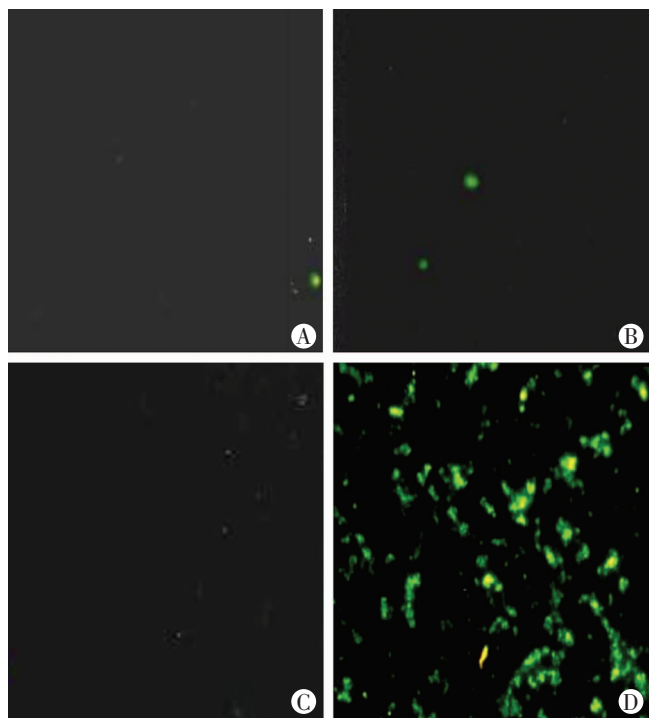
### 2.4 ELISA 检测免疫小鼠血清中多克隆抗体水平

ELISA 结果表明, 与注射 PBS 对照组比较, 皮下注射 25、50、100 μg GST-NS1 融合蛋白的 BALB/c 小鼠血清 D(450) 值均明显增高 ( $P < 0.01$ ), 而且注射剂量为 50 μg 的小鼠血清 D(450) 值为对照组的 9 倍, 说明此剂量能最大程度激活小鼠的免疫反应并产生相应的特异性抗体。所制备的多克隆抗体

的滴度可达1:3 200。

## 2.5 免疫荧光法鉴定多克隆抗体

荧光显微镜观察显示,无病毒感染的对照细胞,用 GST 抗体或制备的多克隆抗体作为一抗均没有明显的荧光出现,提示对照细胞中没有内源性 NS1 蛋白的表达;病毒感染的 A549 细胞,用制备的多克隆抗体作为一抗,在感染 24 h 时出现明显的荧光,而用抗 GST 的抗体作为一抗,则没有荧光出现(图 3)。



A、C:用 GST 抗体作为对照;B、D:用制备的多克隆抗体作为一抗;  
A、B:对照细胞;C、D:用病毒感染 24 h 的细胞

图 3 H5N1 亚型禽流感病毒感染的 A549 细胞免疫荧光分析

## 3 讨论

有效区分疫苗免疫和野生型病毒感染,鉴别疫苗接种的动物是否感染了禽流感病毒,成为禽流感鉴别诊断的当务之急。NS1 蛋白及其多克隆抗体在鉴别诊断灭活疫苗免疫动物与自然感染病毒动物方面有重要应用。NS1 蛋白仅存在于病毒感染的宿主细胞内,且能刺激机体产生特异性抗体;而病毒颗粒内不存在 NS1 蛋白,用灭活疫苗免疫的动物不会产生针对 NS1 蛋白抗体,因此 NS1 蛋白抗体可作为病毒感染的一个重要标记,成为区分野生型病毒感染的重要工具<sup>[10]</sup>。我们选择 A/Quail/Shantou/ 852/01 (H5N1) 亚型病毒作为实验材料,高表达 GST-NS1 融合蛋白来制备抗 NS1 蛋白的多克隆抗体,是由于该病毒株的氨基酸序列与 A/HK/156/97 毒株具有很高的同源性<sup>[11]</sup>。此外,该病毒株分离自小型家禽鹌鹑,鹌鹑对多种亚型的禽流感病毒易感,有利于病毒的基因重组,其可能是

1997 年香港禽流感大流行病毒株的重要中间宿主<sup>[12]</sup>。

为提高融合蛋白的表达水平,我们从两方面进行优化。①选择合适的表达载体。本研究采用 pGEX 表达载体,结果表明,带有 GST 标签的融合蛋白以可溶性形式表达, GST-NS1 的表达量占可溶性蛋白的 32.6%。②优化培养条件。我们前期对培养温度、IPTG 诱导浓度及诱导时间进行了优化。在 37 °C 进行培养,用 0.6 mmol/L IPTG 诱导 4 h,当  $D(600)$  达 1.0 时,融合蛋白的表达量最高,每 100 ml 菌液可纯化 5.82 mg 重组 GST-NS1 融合蛋白。融合蛋白的得率会随着培养条件的变化而变化,并且可进一步得到优化。在 *E. Coli* 系统中诱导表达的重组蛋白通常作为免疫小鼠的抗原<sup>[13]</sup>。实验中纯化的重组蛋白 GST-NS1 以不同剂量免疫小鼠均表现出良好的免疫原性,其中 50  $\mu\text{g}$  剂量的重组蛋白诱导小鼠产生的抗体,其滴度明显高于 25  $\mu\text{g}$  和 100  $\mu\text{g}$  剂量。我们采用重组 GST-NS1 融合蛋白作为抗原的主要目的:①可通过 GST 标签快速从小鼠抗血清中制备抗 NS1 蛋白的多克隆抗体;②重组 GST-NS1 融合蛋白具有更高的免疫原性。在 ELISA 实验中,同样采用纯化的 GST-NS1 融合蛋白作为包被抗原,其最佳的工作浓度为 1.126  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,且多克隆抗体的最佳稀释倍数为 1:800。提示本实验制备的 NS1 蛋白多克隆抗体,可用来建立简便的 ELISA 检测方法,以区分野生型病毒感染禽和灭活疫苗免疫禽。免疫荧光观察显示,病毒感染 A549 细胞 24 h 后,使用制备的多克隆抗体可观察到明显的荧光,并且随着感染时间的延长其荧光强度增加;相反使用抗 GST 抗体,在病毒感染的细胞中没有荧光出现,进一步证实了制备的多克隆抗体的高效性和对 NS1 抗原蛋白的高度特异性。NS1 蛋白能使病毒逃逸宿主的免疫防御,在拮抗干扰素- $\alpha/\beta$  及肿瘤坏死因子- $\beta$  介导的抗病毒免疫应答中起重要作用。本研究所制备的针对 NS1 蛋白的多克隆抗体,在研究 NS1 蛋白拮抗天然抗病毒免疫反应及开发新的抗病毒药物中发挥重要作用。

## 参考文献:

- [1] Bui H H, Peters B, Assarsson E, et al. Ab and T cell epitopes of influenza A virus, knowledge and opportunities [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(1): 246-451.
- [2] 王欢, 吴中明, 马锐, 等. 甲型流感病毒 H3N2 诱导人子宫内膜腺癌细胞凋亡的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(3): 219-221.
- [3] Fouchier R A, Munster V, Wallensten A, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from

- black-headed gulls [J]. *J Virol*, 2005, 79(5): 2814-2822.
- [4] Subbarao K, Klimov A, Katz J, *et al.* Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness [J]. *Science*, 1998, 279(5349): 393-396.
- [5] Soubies S M, Volmer C, Croville G, *et al.* Species-specific contribution of the four C-terminal amino acids of influenza A virus NS1 protein to virulence [J]. *J Virol*, 2010, 84(13): 6733-6747.
- [6] Spesock A, Malur M, Hossain M J, *et al.* The virulence of 1997 H5N1 influenza viruses in the mouse model is increased by correcting a defect in their NS1 proteins [J]. *J Virol*, 2011, 85(14): 7048-7058.
- [7] Sarkar M, Chanda S, Chakrabarti S, *et al.* Surveillance in Eastern India (2007-2009) revealed reassortment event involving NS and PB1-F2 gene segments among co-circulating influenza A subtypes [J]. *J Virol*, 2012, 9: 3.
- [8] Lin D, Lan J, Zhang Z. Structure and function of the NS1 protein of influenza A virus [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2007, 39(3): 155-162.
- [9] 李观强, 张志珍, 李国明. H5N1 亚型禽流感病毒 NS1 蛋白表达影响因素分析 [J]. *中国热带医学*, 2012, 12(1): 1-5.
- [10] 李观强, 李国明, 张志珍. H5N1 亚型禽流感病毒 NS1 蛋白研究进展 [J]. *医学检验与临床*, 2011, 22(3): 56-57, 79.
- [11] 张志珍, 段炼, 李康生. 华南流感病毒 NS1 基因特性研究 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2004, 31(3): 237-243.
- [12] Xu K M, Li K S, Smith G J, *et al.* Evolution and molecular epidemiology of H9N2 influenza A viruses from quail in southern China, 2000 to 2005 [J]. *J Virol*, 2007, 81(6): 2635-2645.
- [13] Montano R F, Penichet M L, Blackall D P, *et al.* Recombinant polymeric IgG anti-Rh: a novel strategy for development of direct agglutinating reagents [J]. *J Immunol Methods*, 2009, 340(1): 1-10.
- (收稿:2012-01-12;修回:2012-04-05)  
(编辑 汪勤俭)

## 技术方法

文章编号:1000-5404(2012)16-1694-02

### HPLC 法测定活络镇痛胶囊中欧前胡素的含量

孙 燕 (100071 北京,解放军第 307 医院药学部)

**[摘要]** 目的 建立测定活络镇痛胶囊中欧前胡素含量的高效液相色谱法。方法 采用 Diamonsil™ C18 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水 (55: 45); 检测波长: 300 nm; 流速: 1.0 ml/min。结果 欧前胡素在 0.120 ~ 0.600 μg 范围内呈良好线性关系 ( $r=0.9999$ ); 欧前胡素平均回收率 98.11%, RSD 为 0.93% ( $n=6$ ); 重现性较好; 6 次测定结果平均值为 0.182 mg/粒, RSD 为 1.68%; 精密度和稳定性的相对标准偏差 RSD 分别为 0.09% 和 0.51%。结论 高效液相色谱法操作简便, 重现性好, 结果准确可靠, 适用于该药的质量控制。

**[关键词]** 活络镇痛胶囊; HPLC; 欧前胡素; 含量测定  
**[中图分类号]** R283.65; R284.1

**[文献标志码]** B

活络镇痛胶囊是由《部标》WS3-B-2959-98 活络镇痛片<sup>[1]</sup>改变剂型而来, 处方由天南星、红花、防风、白芷、当归 5 味药组成, 具有舒筋活血、消瘀止痛功能。用于闪腰岔气, 淤血作痛, 筋骨疼痛, 腰痛、腿痛, 疗效确切, 与片剂相比, 胶囊具有崩解快、生物利用度高的优点。故我们在工艺考察对比的基础上, 将其制成了胶囊剂, 原片剂的质量标准仅有鉴别方法, 未建立含量测定项目, 不能有效对其进行质量控制。方中白芷为其主要成分, 欧前胡素为白芷药材中的主要有效成分, 研究报道其对酪氨酸酶活性具有抑制作用, 进而抑制皮肤黑色素的生成<sup>[2]</sup>。本研究在分析处方和文献 [3-4] 的基础上, 建立了方中白芷主要成分欧前胡素的高效液相色谱测定方法, 操作简便, 结果准确, 可用于本品的质量控制。

#### 1 材料与方

##### 1.1 仪器与试剂

SP8010 液相色谱仪 (SP8010 泵, SP1200 紫外检测器); 美

国物理光谱公司, SePu3000 色谱工作站。欧前胡素对照品 (110844-200003, 供含量测定), 购自中国药品生物制品鉴定所, 甲醇为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。3 批样品制剂室自制。

##### 1.2 方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱 Diamonsil™ C<sub>18</sub> (5 μm, 150 mm × 4.6 mm), 流动相: 甲醇-水 (55: 45); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长为 300 nm; 柱温: 室温; 欧前胡素色谱峰理论板数: 4 166; 对照品、供试品、空白色谱图见图 1。

1.2.2 对照品溶液的制备 精密称取欧前胡素对照品, 加甲醇制成每毫升含 20 μg 的溶液。

1.2.3 测定波长的选择 采用紫外分光光度计, 将对照品溶液在波长 200 ~ 400 nm 范围内进行光谱扫描, 结果最大吸收波长为 300 nm, 故确定测定波长为 300 nm。

1.2.4 提取完全性实验 取本品装量差异项下的内容物, 研细, 混匀, 取 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 ml, 密塞, 称定质量, 分别超声 (功率 300 W, 频率 50 kHz) 处理 10、20、30、40 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足缺失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 进样测定, 结果欧前胡素含量分别为 0.10、0.12、0.17、0.17 mg/粒。说明超声处理 30 min 就提取完全, 故确定提取时间为 30 min。