

非结构蛋白 NS1-ELISA 检测禽流感野毒感染抗体

Detection of Virus Infected Poultry on the Basis of Antibody to NS1 of Influenza Virus by NS1-ELISA

王泽霖 / WANG ZE-lin, 李建丽 / LI Jian-li, 陈少渠 / CHEN Shao-qu, 刘守川 / LIU Shou-chuan

河南农业大学禽病研究所, 郑州 450002

Avian Disease Institute, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

[摘要] 利用 RT-PCR 技术扩增获得了 H5N2 亚型禽流感病毒的 NS1 基因, ORF 长度为 678 bp。成功构建了重组表达载体 pET-NS1, 将其转化 BL21(DE3), 用终浓度 1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 5 h, 经 15% 的 SDS-PAGE 分析表明, 诱导表达出了分子量大约为 28 KD 的 NS1 融合蛋白, 且以包涵体的形式存在。NS1 融合蛋白经 His trap Hp Kit 柱子纯化或用尿素变性复性, 获得纯度较高的 NS1 蛋白, 并以此为抗原, 建立了检测抗 NS1 蛋白抗体的 ELISA (NS1-ELISA) 方法。最佳包被浓度为 2.5 μ g/ml, 血清的最佳稀释倍数为 1:200, 酶标二抗的最佳工作稀释度为 1:5 000。重组 NS1 蛋白只与 AIV 感染的血清反应, 而不与 ND、IB、IBD、EDS76 的阳性血清反应。分别检测 H9N2、H5N2 和 H5N1 亚型灭活疫苗和 H9N2 纯化病毒免疫的血清, 各 5 份, 其平均 OD490 值分别为 0.225、0.210、0.205 和 0.184, 均为阴性; 而对 H9N2 和 H5N2 亚型活毒感染 10~15 d 的血清进行检测, 各 5 份, 其平均 OD490 值分别为 0.610 和 0.619, 均为阳性。因此, NS1 蛋白能特异地区分野毒感染和灭活疫苗免疫鸡群, 可作为一种鉴别诊断标记, 但不能区分亚型, 具有 A 型特异性。NS1-ELISA 方法的初步应用, 不仅为生产提供了一种快速、特异、敏感的鉴别诊断方法, 为进一步组装成试剂盒奠定了基础, 也为禽流感的早期诊断、适时监控和净化提供了行之有效的方法。

[关键词] AIV, H5N2 亚型; RT-PCR; NS1 基因; 表达; 间接 ELISA

[中图分类号] S858.3, 855.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-7857 (2006) 03-0014-04

Abstract: Nonstructural gene 1 (NS1) of H5N2 subtype avian influenza virus QS strain was amplified by RT-PCR, whose nucleotide sequences is 678bp in length. The fragment was cloned into the pET-28(a) vector to construct a recombinant expression plasmid. The recombinant expression plasmid was induced by 1mmol/L IPTG for 5 hours and analyzed by 15% SDS-PAGE. The result showed that NS1 protein was highly expressed by inclusion body. Its molecular weight was 28KD as expected. The expressed NS₁ protein was denatured by SKL, then the denatured protein refolded by slow diluting and dialyzing method. The result indicated that the high pure and active protein was obtained. Based on the purified recombinant protein, an indirect ELISA assay for detection of anti-NS1 protein antibody was developed. The best concentration of coating antigen was 2.5 g/mL, and the best dilution of serum and HRP labeled goat anti-chicken was 1:200 and 1:5000 respectively. The positive serum of ND, IB, IBD and EDS76 were all negative to NS1 protein by ELISA assay. The sera of virus-infected chicken and vaccinated chicken were detected. The average OD490 value of the former were 0.592, 0.623 and 0.619, positive. The average OD490 value of the latter were 0.225, 0.210 and 0.205, negative; The result demonstrated that the NS1-ELISA assay can differentiate infected from vaccinated poultry on the basis of antibody to NS1 protein. So the approach not only afforded a kind of quick, sensitive, specific differentiating diagnostic approach, making a solid foundation of special diagnosis kit, but also can provide an effective method for early diagnosis, real-time detection, controlling and clearing of AIV.

Key Words: AIV; H5N1 subtype; RT-PCR; NS1 gene; expression; indirect ELISA

CLC Numbers: S858.3, 855.3

Document Code: A

Article ID: 1000-7857(2006)03-0014-04

关于禽流感的控制和消灭措施, 国外采用淘汰和扑杀阳性禽群的方法, 不主张使用疫苗。但是, 随着禽流感防制难度的增加, 国外部分国家也建议使用疫苗免疫来控制 AI 的流行和发生。我国

对高致病性禽流感主要采用疫苗免疫和扑杀相结合的措施, 对低致病性禽流感主要采用疫苗免疫的方法。疫苗免疫虽然在一定程度上能减少死亡, 但不能完全抗感染, 因免疫程序不当、漏免、疫苗质量等原因,

收稿日期: 2006-01-21

作者简介: 王泽霖, 男, 河南郑州文化路 95 号河南农业大学禽病研究所, 教授, 主要研究方向为动物传染病研究;

E-mail: wangzelincn@yahoo.com.cn

造成免疫后抗体水平不高,导致温和性和隐性感染禽群增加,继续带毒排毒,给禽流感的消灭带来更大的困难。另外,由于疫苗的广泛使用,无法区分野毒感染和疫苗免疫的禽群,这不仅干扰禽流感的诊断,掩盖了禽流感的流行,增加AI防制的难度,而且还严重影响贸易出口。因此,生产中迫切需要建立一种特异、敏感的鉴别诊断方法来区分野毒感染和疫苗免疫,做到对感染禽群早发现、早诊断、早消灭,从而更好地控制AI的发生和流行。

NS 基因编码两种蛋白质,即 NS1 和 NS2,其中 NS1 蛋白在病毒复制及病毒早期抗机体的抗病毒免疫应答中具有重要作用。Skehel^[1]进一步研究表明,NS1 蛋白在病毒复制的早期就大量表达,仅出现于病毒感染的细胞内,且能诱导机体产生针对 NS1 蛋白的抗体。这提示我们,NS1 蛋白可作为一种鉴别诊断标志,通过检测抗 NS1 蛋白的抗体来区分野毒感染和疫苗免疫,并可作为早期感染的依据。1997 年 Birch-Machin 等^[2]利用表达的 NS1 蛋白,从人工感染 H3 亚型 AIV 的马血清中检测到 NS1 蛋白抗体。2001 年 Ozaki 等^[3]利用表达的重组 NS1 蛋白作为抗原,建立了 ELISA 诊断方法,能够检测出用 A/equine/Miami/1/63 (H₃N₂) 感染的马血清中的 NS1 蛋白抗体,而灭活疫苗免疫的马血清中,检测不到该抗体。2005 年 Tumpey 等^[4]分别用大肠杆菌表达的重组 NS1 蛋白建立了 ELISA 方法,待检血清 1:200 稀释时能很好地区分免疫禽群和野毒感染禽群。

本实验参照有关文献,利用 RT-PCR 技术获得 A 型流感的 NS1 基因并克隆,构建了重组表达载体,且在大肠杆菌中诱导表达了 NS1 蛋白,并以此为诊断抗原,建立可区分灭活疫苗免疫鸡群和野毒感染鸡群的间接 ELISA,旨在为生产上提供一种特异、敏感的鉴别诊断方法,为进一步组装试剂盒提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 病毒与血清

低致病性 H5N2 亚型 AIV 和 H5N1 亚型 AIV 灭活疫苗由有关人士惠赠。H9N2 亚型 AIV HHP 株和 NDV、IBV、IBDV 及 EDSV 由河南农业大学禽病研究所分离、鉴定、保存。NS1 阳性血清由华中农业大学陈焕春院士惠赠。

1.2 载体与菌株

克隆载体 PMD 18-T Vector 购自大连宝生物工程公司;表达载体 PET-28a 购自 Novagen 公司;大肠杆菌 JM 109 菌株,由本实验室保存;BL 21(DE 3)购自北京

博大泰克生物基因技术有限公司。

1.3 主要试剂

Trizol 购自 Promega 公司;反转录试剂盒 购自上海生工生物工程公司;DNA 胶回收试剂盒和小量质粒快速提取试剂盒均购自杭州维特洁生化技术有限公司;Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶 BamH I、Xho I 均购自大连宝生物工程公司;T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司;His trap Hp Kit 柱子购自安玛西亚公司。

1.4 试验动物

SPF 鸡胚、SPF 鸡均购自山东斯帕法斯公司;禽流感非免疫鸡,由郑州郊区养鸡场提供。

1.5 HI 试验

采用 β 微量法,按常规方法进行,鸡的 HI 抗体水平以 2 为底的对数 (lg2) 表示。

1.6 AIV NS1 基因扩增与克隆

1.6.1 引物设计

参考 GenBank 中已发表的 H9N2 亚型 AIV 的 NS1 基因序列,用 Primer 5.0 软件设计合成了一对引物,扩增片断长度为 678 bp:

P1: 5'-TTAGGATCCATGGATTCCAACACTGTG-3'

标记部分为 BamH I 酶切位点;

P2: 5'-TCCCTCGAGCTAACTTCTGACTCAAT-3'

标记部分为 Xho I 酶切位点。

1.6.2 病毒 RNA 的提取

将 H5N2 种毒接种 10 日龄鸡胚,按常规方法收毒、灭活、纯化,取 50 μ l 纯化的 AIV,加入 1 000 μ l Trizol,混匀后按说明书提取病毒 RNA,最后溶于 10 μ l 灭菌 DEPC 水中。

1.6.3 RT-PCR

取提取的 RNA 2 μ l,按反转录试剂盒说明书进行反转录,即为 cDNA 第一链。然后进行 PCR。反应程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 50 s,57 $^{\circ}$ C 50 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,30 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.6.4 NS1 基因的克隆与鉴定

用 DNA 胶回收试剂盒回收 PCR 产物,然后与 PMD18-T vector 连接,按产品说明书进行。4 $^{\circ}$ C 连接过夜,转化 JM109 感受态细胞,经含有 Amp、IPTG 和 X-gal 的 LB 琼脂平板初步筛选阳性克隆子。挑取单个白菌落,培养后,按小量质粒快速提取试剂盒说明书小量提取质粒,用于阳性克隆子的鉴定。

1.7 重组表达载体 (pET-NS1) 的构建及鉴定

用 BamH I 和 Xho I 分别双酶切重组克隆质粒 (PMD-NS1) 和表达质粒 PET-28a,分别回收目的条带,16 $^{\circ}$ C 连接过夜,转化 BL21 (DE3) 感受态,经 PCR、酶切及序列测定筛选出阳性重组子,表明重组表达

载体 PET-NS1 已构建成功。

1.8 NS1 蛋白的诱导表达与鉴定

挑取单个阳性菌落接种于 3~5 ml Kan/LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜,再按 1% 的比例接种于 10 ml Kan/LB 液体培养基中,振荡培养 2~3 h,当其 OD₆₀₀ 约为 0.4~0.6 时,加入 IPTG (100 mg/ml) 至终浓度为 1 mmol/l,继续振荡培养 5 h,经 15% 的 SDS-PAGE 鉴定,结果在大约 28 KD 的位置出现一条特异的蛋白带,与预期结果一致,说明 NS1 基因已在大肠杆菌中得到高效表达,主要以包涵体的形式存在于沉淀中。

1.9 重组 NS1 蛋白的纯化和鉴定

采用超声波和溶菌酶相结合的方法裂解菌体,分离包涵体,经 His trap Hp Kit 柱子纯化或用含 1% 的 Triton X-100 和 2 mol/l 尿素的洗涤液,各洗涤 2 遍,获得了较纯净的包涵体,用温和性变性剂 SKL 溶解包涵体,采用缓慢稀释和透析相结合的方法复性 NS1 蛋白,经 15% 的 SDS-PAGE 分析,均获得了纯度较高的 NS1 蛋白,并用标准的 NS1 阳性血清经 western-blotting 进行 NS1 蛋白鉴定。

1.10 检测 NS1 抗体间接 ELISA (NS1-ELISA) 的建立

1.10.1 最佳工作条件的选择

按常规方法确定抗原最佳包被量、血清最佳稀释倍数、酶标二抗的最佳工作浓度、阴阳性临界值的确定,建立检测 NS1 抗体的间接 ELISA;将 AIV 抗原用包被液稀释至最佳工作浓度后包被酶标板,100 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C 放置 4 h 后置 4 $^{\circ}$ C 过夜。甩去包被液,用 PBST 洗涤 3 次,每次 2~3 min。然后,加入封闭液,200 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h。甩去封闭液,洗涤同上,用 PBS 液将血清稀释至最佳稀释度,加入血清,100 μ l/孔,每份样品设 2 个重复,37 $^{\circ}$ C 作用 1 h,洗涤同上,加入酶标羊抗鸡 IgG,100 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C 作用 1 h,洗涤同上。然后加入底物溶液,37 $^{\circ}$ C 避光作用 10~15 min,加入终止液,50 μ l/孔,终止反应,立即于酶标仪上读取 490 nm 处的吸光值 (OD₄₉₀)。同时设阳性对照、阴性对照及空白对照。

1.10.2 敏感性试验

按常规方法进行,将阳性血清作 1:50、1:100、1:200、1:300、1:400、1:500、1:600 稀释,按已建立的 ELISA 方法进行检测,确定该方法的敏感性。

1.10.3 特异性试验

按常规方法进行 ELISA 交叉试验和特异性阻断试验,从而确定 NS1-ELISA 方法的特异性。

1.11 人工感染试验

取40只50日龄SPF鸡,分为3组,第1组为活毒组,分别用H9N2亚型、H5N2亚型AIV 10倍稀释经静脉注射感染SPF鸡,各5只,0.2 ml/只,隔离饲养,均于感染后5 d、10 d、15 d采血,制备血清。第2组为灭活疫苗组,分别用H9N2亚型、H5N2亚型和H5N1亚型AI灭活疫苗肌肉注射免疫SPF鸡,各5只,0.5 ml/只,20 d后采血,制备血清。第3组为纯化病毒组,将H9N2纯化病毒灭活后1:10稀释,肌肉注射免疫SPF鸡5只,0.5 ml/只。另10只SPF鸡作阴性对照。用已建立的ELISA方法进行检测,并设阳性、阴性血清对照,确定该方法能否区分灭活疫苗免疫和活毒感染。

2 结果

2.1 NS1基因的扩增与克隆

经1%的琼脂糖凝胶电泳分析,扩增出了大约678 bp的特异性条带,与预期结果一致,说明引物设计合理、特异。经PCR、酶切鉴定及序列测定,证明获得了阳性克隆子。

2.2 NS1重组表达载体(pET-NS1)的构建与鉴定

经PCR、酶切鉴定及序列测定,表明NS1基因已正确插入到表达载体中,且插入方向正确,阅读框完整,无碱基突变,说明已成功构建了NS1重组表达载体。

2.3 NS1蛋白的表达及纯化

诱导表达产物经15%的SDS-PAGE分析,出现了1条大约28 KD的蛋白带,用标准NS1阳性血清经western-blotting鉴定为NS1蛋白,与预期结果一致,表明NS1蛋白成功表达。经超声波裂解、再经His trap Hp Kit柱子纯化或将包涵体洗涤、SKL变性及缓慢稀释复性,均获得了纯度较高的NS1蛋白。

2.4 检测NS1抗体的间接ELISA (NS1-ELISA)的最佳工作条件的选择

2.4.1 抗原最佳包被浓度和血清最佳稀释度的确定

分别将抗原和标准阳性、阴性血清作系列稀释,进行方阵滴定试验。可见当抗原1:80倍稀释,血清1:160倍稀释时,P/N值最大,且阴性血清非特异性反应较小。综合考虑,确定抗原的最佳稀释度为1:80,血清最佳稀释倍数为1:200,此时抗原的包被浓度为2.5 μ g/ml。

2.4.2 酶标二抗最佳工作浓度的确定

将酶标二抗作不同倍数的稀释,其它均为最适条件,进行NS1-ELISA试验,确定二抗的最佳工作浓度,当二抗作1:5 000以上稀释时,OD490值下降幅度明显,确定

酶标二抗的最佳工作浓度为1:5 000倍稀释。

2.5 NS1-ELISA 阴、阳性临界值的确定

用已建立的间接ELISA方法检测10份SPF鸡血清,计算10份SPF鸡血清OD490值的平均值(X)为0.226,标准差(SD)为0.026,计算 $X+3SD$ 为0.304,为了便于判定,确定当样品OD490 $\geq$ 0.31判为阳性,OD490 < 0.31判为阴性。

2.6 NS1-ELISA 试验的敏感性

将阳性血清作系列稀释,用已建立的ELISA方法检测,测定其OD490值,见表1。

表1 敏感性试验结果
Tbl. 1 The result of sensitivity test

样品	OD490 值						
	1:50	1:100	1:200	1:300	1:400	1:500	1:600
阳性血清	0.703	0.718	0.686	0.531	0.432	0.352	0.203
阴性血清	0.397	0.315	0.234	0.210	0.204	0.195	0.190

可见,当阳性血清1:500倍稀释,OD490值为0.352,仍能检测到NS1蛋白的抗体,说明该方法比较敏感。

2.7 NS1-ELISA 特异性试验

2.7.1 NS1-ELISA 交叉试验

用已建立的ELISA方法,分别检测ND、IB、IBD、EDS阳性血清,同时设NS1蛋白的阳性和阴性血清作对照。结果见表2。

表2 NS1-ELISA 交叉试验
Tbl. 2 The results of specific test

样品序号	OD490 值					
	ND 血清	IB 血清	IBD 血清	EDS76 血清	SPF 鸡血清	NS1 阳性血清
1	0.224	0.206	0.196	0.207		
2	0.200	0.221	0.203	0.198		
3	0.210	0.208	0.187	0.200		
4	0.210	0.213	0.205	0.203	0.221	0.672
5	0.198	0.205	0.200	0.223		
OD490 平均值	0.208	0.210	0.198	0.206		

可见,ND、IB、IBD、EDS阳性血清的OD490值均小于0.31,根据本实验建立的判定标准,均为阴性,表明重组NS1蛋白不与NDV、IBV、IBDV、EDSV感染的血清反应,只与NS1蛋白阳性血清反应,说明该方法具有较好的特异性。

2.7.2 NS1-ELISA 特异性阻断试验

5份NS1阳性血清OD490值分别为0.632、0.612、0.703、0.654、0.590,当和NS1抗原等体积混合作用30 min后,再用NS1-ELISA测定其OD490值,结果为0.256、0.295、0.312、0.302、0.248,其阳性反应已被NS1蛋白阻断,也表明NS1-ELISA试验有较高的特异性。

2.8 AIV 灭活苗、纯化病毒和活病毒感染鸡群的NS1抗体比较

分别取人工感染AIV (H9N2、H5N2)、灭活疫苗免疫(H9N2、H5N2、H5N1)和AIVH9N2纯化病毒免疫10~15 d后的动物血清,各5份,用HI试验测其HI抗体均在4~7 log₂,用已建立的NS1-ELISA方法检测NS1抗体,其OD490值结果见表3、表4。

由表3、表4可见用H9N2、H5N2亚型AIV人工感染鸡的血清,其平均OD490值分别为0.610和0.619,均大于0.31,根据本实验的判定标准,均为阳性;3种灭活疫苗免疫组的血清,其平均OD490值分别为0.225、0.210和0.205,均为阴性;纯化病毒免疫组的血清,其OD490值为0.184,也为阴性。说明该方法能区分野毒感染和灭活疫苗或灭活纯病毒免疫鸡群,显示了良好的应用前景。同时也表明该方法不分亚型,具有A型流感的特异性。

表3 AIV人工感染10天后血清中NS1抗体的检测结果(OD490值)
Tbl. 3 The detection result of NS1 Protein Antibody of AIV-infected poultry

人工感染 AIV亚型	检测抗体	感染鸡编号					NS1阴性	NS1阳性
		1#	2#	3#	4#	5#	血清	血清
H9N2	H9 HI 抗体	6	5	6	6	7	0	10
亚型	NS1 抗体	0.632	0.587	0.621	0.596	0.613	0.206	0.676
H5N2	H5 HI 抗体	6	5	4	6	5	0	8
亚型	NS1 抗体	0.634	0.594	0.567	0.624	0.637	0.206	0.652

表4 不同亚型AIV灭活疫苗及纯化病毒免疫鸡20天后的NS1抗体的检测
Tbl. 4 The detection result of NS1 Protein Antibody of AIV-vaccinated poultry(H9N2, H5N2, H5N1 and inactive AIV)

AIV 疫苗	抗体 类型	抗体水平					NS1阴	NS1阳
		1#	2#	3#	4#	5#	性血清	性血清
H9N2	H9 HI(log2)	9	8	8	8	10	0	10
亚型	NS1 抗体(OD492)	0.221	0.213	0.241	0.243	0.207	0.206	0.721
H5N2	H5 HI(log2)	6	7	5	6	5	0	8
亚型	NS1 抗体(OD492)	0.235	0.189	0.196	0.216	0.215	0.210	0.709
H5N1	H5 HI(log2)	7	7	6	8	7	0	6
亚型	NS1 抗体(OD492)	0.212	0.187	0.204	0.198	0.224	0.203	0.687
纯化	H9HI(log2)	6	7	7	5	6	0	10
病毒	NS1 抗体(OD492)	0.189	0.178	0.190	0.176	0.185	0.200	0.718

3 讨论和结论

1) 2003年刘金华等^[1]运用RT-PCR技术对1996年至2001年间我国部分鸡源H9N2亚型的AIV的NS1基因进行扩增,并进行序列分析,表明NS1基因高度保守。2004年杨涛等^[2]运用RT-PCR技术对4株H5N1亚型的NS基因进行了扩增和测序,指出H9和H5亚型间存在着广泛的遗传交换。2004年张志珍^[3]、孙明等^[4]均运用RT-PCR方法扩增了NS1基因,并利用原核表达载体PGEX-4T成功地表达出AIV的NS1融合蛋白。2004年孙明等^[5]运用RT-PCR方法,并用表达载体PGEX-4T-3成功地表达了NS1蛋白。本试验利用RT-PCR技术成功地扩增了鸡源H5N2亚型禽流感的NS1基因,长度为678 bp,并成功构建了原核表达载体(pET-NS1),用终浓度1 mmol/L的IPTG诱导表达5 h,经15%的SDS-PAGE分析表明,诱导表达出了大约28 KD的蛋白质,经Western-blotting鉴定为NS1蛋白,与预期的结果一致。NS1蛋白的成功表达,不仅为建立敏感、特异、区分灭活疫苗和野毒感染的鉴别诊断方法奠定了基础,也为进一步研究NS1蛋白的功能、单克隆抗体制备提供了基础。

2) 本试验利用变性剂SKL较好溶解了包涵体,运用缓慢稀释复性和透析复性相结合的方法对表达的NS1蛋白进行了体外复性纯化病毒,或用His trap Hp kit柱子直接纯化NS1蛋白,并以NS1蛋白作为包被抗原建立了ELISA方法,分别检测人工感染AIV和灭活疫苗免疫的SPF鸡血清,结果2种亚型AIV人工感染鸡的血清OD490值均大于0.31,均为阳性,3种灭活疫苗免疫组,其平均OD490值均小于0.31,均为阴性,表明该方法能区分野毒感染和灭活疫苗免疫鸡群,但不具有亚型特异性,具有A型流感的特异性。LPAIV已在我国流行多年,造成了一定的经济损失,自1997年香港禽流感事件及2004年东南亚地区的禽流感感染事件以来,人们赋予HPAI更高的公共卫生学意义。疫苗的免疫对控制禽流感流行、减少经济损失有很大作用,但疫苗免疫会干扰禽流感的诊断,常规的实验方法无法区分野毒感染和疫苗免疫的禽群,从而掩盖了禽流感的流行,增加了AI防制的难度,而且还严重影响到贸易出口。我们用NS1蛋白作为一种鉴别诊断标记,建立了检测NS1抗体的ELISA试验,区分野毒感染和灭活疫苗免疫,做到对感染的禽群早发现、早诊断、早消灭,在当前具有重大的现实意义。

3) 研究中发现,本实验存在一定的非特异性反应,这可能与抗原纯度及生物活性有关。

Tumpey等认为,NS1蛋白纯化后,其非特异性反应可显著降低,其OD490值可从0.235~0.588降到0.09~0.149。因此为克服非特异性,进一步采用亲和层析等方法纯化表达的蛋白十分必要。另外,常规的灭活疫苗都采用鸡胚尿液生产,因病毒的复制也会在鸡胚液中存在少量NS1蛋白,但Tumpey等的研究表明,当血清的稀释倍数为1:200时可克服非特异性反应。本实验研究的结果与Tumpey等报道的一致,非特异性反应随着血清倍数的增加而减小,当血清1:200倍稀释时最佳。为了进一步降低试验的非特异性,Tumpey等还利用人工合成的短肽(NS1²⁹⁻⁴¹和NS1³⁶⁻⁴⁸)作抗原,同样能检测到抗NS1蛋白的抗体,且非特异性反应较低。NS1-ELISA方法快速、敏感、特异,但要完全克服非特异性反应,在生产实践中推广应用,还需作进一步深入的研究。

(致谢:对于内蒙古金宇集团生物药品厂提供的企业合作基金资助予以感谢。)

参考文献 (References)

- [1] SKEHEL J J. Polypeptide synthesis in influenza virus-infected cells[J]. Virology, 1972, 49(1): 23-36.
- [2] BIRCH-MACHIN I, ROWAN A, PICK J, et al. Expression of the nonstructural protein NS1 of equine influenza A virus: detection of anti-NS1 antibody in post infection equine sera [J]. J. Virol Methods, 1997, 65(2): 255-263.
- [3] OZAKI H, SUGIURA T, SUGITA S, et al. Detection of antibodies to the nonstructural protein(NS1) of influenza A virus allows distinction between vaccinated and infected horses [J]. Vet Microbiol, 2001, 82(2): 111-119.
- [4] TUMPEY T M, ALVAREZ R, SWAYNE D E, et al. Diagnostic approach for differentiating infected from vaccinated poultry on the basis of antibodies to NS1, the nonstructural protein of influenza A virus[J]. J. Clin Microbiol, 2005, 43(2): 676-283.
- [5] 刘金华, 史为民, 吴清民, 等. 我国部分鸡源H9N2亚型流感病毒NS1基因序列分析[J]. 微生物学报, 2003, 43(5): 547-553.
- [6] 杨涛, 刘明, 张云, 等. H5N1亚型高致病性禽流感病毒NS1基因的克隆及序列分析[J]. 中国兽医科技, 2005, 35(1): 5-9.
- [7] 张志珍, 洪文彬, 李康生, 等. 流感病毒NS1基因的克隆及原核表达载体的构建[J]. 中国病毒学, 2004, 19(5): 449-453.
- [8] 孙明, 赵铁柱, 王传彬, 等. 禽流感病毒H5N1亚型NS1基因在大肠杆菌中的表达[J]. 中国实验动物学报, 2004, 12(4): 208-211.

(责任编辑 李慧敏)