

秦海斌, 包喜军, 朱骞, 等. H3N2 亚型犬流感病毒 HA1 基因的优化表达与间接 ELISA 检测方法的建立 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (11): 114-120.

QIN H B, BAO X J, ZHU Q, et al. Optimized expression of the HA1 gene of the H3N2 subtype canine influenza virus and establishment of an indirect ELISA for its antibody detection [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (11): 114-120.

H3N2 亚型犬流感病毒 HA1 基因的优化表达与间接 ELISA 检测方法的建立

秦海斌, 包喜军, 朱骞, 陈舒, 贺星亮*

(南京警察学院/警犬技术公安部重点实验室, 江苏 南京 210012)

摘要: 为开展 H3N2 亚型犬流感的血清流行病学调查, 本研究拟原核表达犬流感病毒 (CIV) 血凝素 1 (HA1) 基因, 建立一种灵敏、准确、稳定的 ELISA 检测方法。对地方毒株的 HA1 基因进行氨基酸序列优化, 采用化学合成法合成目的基因, 插入 pET30a 中并转化至大肠杆菌表达, 对蛋白进行纯化、鉴定, 建立 CIV 间接 ELISA 方法。结果显示: 优化后的 HA1 基因序列密码子对原核表达系统的 CAI 指数升至 0.88, 无复杂二级结构, 蛋白可获得高效表达; 原核表达后蛋白主要存在于包涵体中, 经纯化、复性后的蛋白具备作为诊断抗原的应用价值; 建立的间接 ELISA 方法检测国内采集的 1 690 份犬血清, 显示 H3N2 亚型 CIV 整体阳性率为 9.23%, 与商品化试剂盒符合率为 97.9%。提示: 建立的间接 ELISA 方法可靠, 具备良好的应用前景。

关键词: 犬流感; H3N2; 血凝素 1; 原核表达; 间接 ELISA

中图分类号: S852.21

文献标志码: A

文章编号: 0529-5130(2024)11-0114-07

Optimized expression of the HA1 gene of the H3N2 subtype canine influenza virus and establishment of an indirect ELISA for its antibody detection

QIN Haibin, BAO Xijun, ZHU Qian, CHEN Shu, HE Xingliang*

(Nanjing Police University/Ministry of Public Security Key Laboratory of Police Dog Technology, Nanjing 210012, China)

Abstract: To conduct a seroepidemiological survey of canine influenza (CI) H3N2 virus infections in dogs, the HA1 gene of CIV was prepared by prokaryotic expression, and an indirect ELISA was established. Firstly, the HA1 gene of the H3N2 local strain was downloaded from Gene Bank. The gene was artificially synthesized after its amino acid sequences were optimized by the commercialized software the Max-Codon™ Optimization Program. The synthesized gene was inserted into the expression vector pET30a, identified, and transformed into the host strain DE3 for protein expression. The expressed protein was purified and identified. And an indirect ELISA was established with the recombinant HA1 protein to conduct serological investigation. The results of the prokaryotic expression assay showed that, with this technique, the target gene was quickly obtained and the amino acid codons were easily optimized. The codon adaptation index (CAI) of the optimized sequences for the prokaryotic expression system rose to 0.88, and the complex protein secondary structure decreased. The expressed HA1 protein mainly existed in the inclusion bodies. After purification and renaturation, the recombinant protein could be used as a diagnosis antigen to establish an indirect ELISA to be used in the subsequent serological survey. The positive rate of the H3N2 subtype CIV was 9.23% in 1 690 serum samples. To summarized, this study provided a rapid and efficient method to prepare diagnostic antigens and to establish an indirect ELISA for serological survey of the canine H3N2 virus.

Keywords: canine influenza virus; H3N2; HA1; prokaryotic expression; indirect ELISA

犬流感又称犬流行性感冒, 是一种家犬常发的急

性、接触性呼吸道传染病, 患犬表现出体温升高、流鼻涕、咳嗽、呼吸急促等临床症状, 该病传播迅速, 易群体性流行并伴随一定的死亡率, 对规模化犬场造成较大的经济损失^[1-2]。研究证实禽源 H3N2、H5N1、H5N2、H9N2, H3N2 重组的 H3N1 亚型, 马源 H3N8 亚型, 季节性 H3N2 亚型人流感病毒和 2009 年甲型人流感病毒等均可自然感染家犬, 但只有禽源

收稿日期: 2024-07-16; 修回日期: 2024-09-23

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金项目(LGZD202406); 公安部科技强警基础工作专项(2022JC20)

第一作者: 秦海斌, 男, 副研究员

* 通信作者: 贺星亮, 研究员, 主要从事警犬技术研究, E-mail:

ehxl69@163.com。

H3N2亚型和马源H3N8亚型能够水平传播^[3-8]。因此,犬流感病毒(canine influenza virus, CIV)主要指H3N2和H3N8两个亚型,我国CIV流行毒株为H3N2亚型。鉴于犬对流感病毒的天然易感性,以及犬作为伴侣动物与人、禽及其他哺乳动物均会高度密接,犬极有可能成为流感病毒的另一种基因混合器,犬流感的公共卫生问题应当予以密切关注^[9-10]。

除伴侣犬外,工作犬作为犬的重要组成部分,在我国的当前规模已达4万头。工作犬在反恐处突、侦查破案、安保警卫、安全检查、社会面巡逻等方面发挥了独特作用,为社会稳定和公共安全作出很大贡献。调查发现,犬流感在工作犬领域不仅呈现高发态势,而且会导致工作犬出现严重嗅觉障碍,甚至嗅觉丧失,对维护公共安全带来一定隐患^[11]。

解决犬流感在公共安全和卫生领域的问题,首要工作是开展流行病学调查和疫情监测工作,这需要建立一种灵敏、准确、稳定的检测方法。基于此,本文对国内流行的H3N2亚型病毒的基因序列进行了比对分析,对血凝素1(HA1)蛋白进行了氨基酸序列优化,利用原核表达系统表达蛋白并纯化,建立间接ELISA检测方法,并在血清流行病学调查中进行了应用。

1 材料与方法

1.1 试验动物

6月龄健康英国史宾格犬5只,14.7~17.2 kg,用于采血制备CIV阳性血清,2月龄健康英国史宾格犬50只,体重2.8~3.3 kg,用于采血制备CIV阴性血清。犬均由南京警犬研究所提供,采血、制备血清在南京警犬研究所实验动物中心完成。

1.2 主要试剂和仪器

生物酶、表达载体、工程菌为大连宝生物公司产品;蛋白质电泳试剂、IPTG、抗生素、质粒抽提和DNA回收试剂盒为天根生化科技有限公司产品;酵母提取物、蛋白胨为OXOID产品;Ni-IDA树脂、Bradford蛋白浓度测定试剂盒、HRP标记的山羊抗犬IgG、TMB显色液为上海碧云天公司产品;CIV抗体间接ELISA检测试剂盒为江苏酶免公司产品。H3N2亚型犬流感地方毒株、CIV阳性和阴性血清,由警犬技术公安部重点实验室保存、制备;基因的化学合成、测序,由金斯瑞公司完成。

1.3 原核表达载体的构建

参考GenBank公开的H3N2犬流感毒株[A/canine/Nanjing/20170328-7/2017(H3N2)]的HA1基因核苷酸序列(登录号MK212477.1),用MaxCodon™ Optimization Program(V13)软件对参考基因的密码

子和mRNA结构进行优化,包括对稀有密码子、GC含量、二级结构进行调节,基于密码子适应指数(codon adaptation index, CAI)预测优化后基因的表达效率,同时在优化基因的3'端加入6×His标签,插入Nde I和Hind III酶切位点(CATATG和AAGCTT),优化后的基因进行全基因合成、测序验证,进而通过双酶切将合成的HA1基因片段插入到pET30a质粒中,进一步转化到大肠杆菌(TOP10)菌株,对克隆后的质粒进行酶切和测序验证。

1.4 HA1蛋白的表达条件

将构建好的含有HA1基因的质粒转化到BL21(DE3)感受态细胞,均匀涂布到LB平板上(含50 μg/mL的硫酸卡那霉素),倒置于37℃培养箱过夜。从平板中挑选单克隆转化菌,接种到含50 μg/mL的硫酸卡那霉素的LB培养基中进行小量表达,待菌液OD₆₀₀值达到0.5~0.8时加入0.5 mmol/L的IPTG,分别置于15、28、37℃下进行诱导表达。对诱导后的培养液取样,进行SDS-PAGE分析,确定最佳诱导条件。SDS-PAGE方法参考文献[12]进行。

1.5 HA1蛋白的纯化

收集菌体后进行超声裂解,高速离心后取上清液和沉淀,进行SDS-PAGE分析,确定蛋白主要表达部位;进一步采用镍柱纯化,获得最终的蛋白。上清液和包涵体的纯化过程参照文献[13]进行。收集纯度最高时浓度洗脱液下的蛋白进行透析复性,再次SDS-PAGE检测纯度,用Bradford蛋白浓度试剂盒测定HA1蛋白浓度。

1.6 HA1蛋白的反应原性分析

通过Western blot方法检测纯化蛋白的反应原性^[14]:将纯化的HA1蛋白转印至NC膜上,以1:200倍稀释的CIV抗血清为一抗,以1:1000倍稀释的HRP标记的山羊抗犬IgG为二抗,孵育洗涤后进行ECL显色,拍照记录Western blot结果。CIV抗血清的制备方法如下:以血凝(HA)效价为2⁸的弱毒株A/canine/Nanjing/11/2012(H3N2)鸡胚培养物经甲醛灭活后离心纯化,加弗氏佐剂乳化,免疫6月龄健康史宾格犬5只,每间隔10 d免疫1次,进行3次免疫,以第28和35天采集的血清混合后,作为一抗血清。

1.7 间接ELISA方法的建立

基于上述表达纯化的HA1蛋白,参照文献[15-16]方法建立H3N2亚型CIV的ELISA检测方法,其中阳性参考血清和阴性对照血清,均由本实验室制备。阳性血清制备方法同1.6;阴性血清采集自南京警犬研究所犬群中的50只2月龄无CIV发病史的健康史宾格犬,前肢头静脉采血各1 mL,分离血清

混合后作为阴性对照血清。所有血清均经过常规灭活、离心处理。

1.7.1 抗原最适包被浓度和酶标抗体工作浓度的选择

以方阵滴定法，将 HA1 蛋白用碳酸钠/碳酸氢钠包被液依次做 1 : 100、1 : 200、1 : 400、1 : 800、1 : 1 600 倍稀释；兔抗犬 HRP 标记二抗用 PBST (0.2% 的 BSA) 稀释液按 1 : 1 000、1 : 2 000、1 : 4 000、1 : 8 000 稀释。ELISA 其他条件参数如下：包被条件为 100 μ L、4 $^{\circ}$ C 包被过夜；2% PBST 封闭液 200 μ L、37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h；0.2% PBST 洗涤液洗涤 3 次，每次浸泡 3 min；血清进行 1 : 100 倍稀释，100 μ L、37 $^{\circ}$ C 反应 1 h；显色底物为 TMB 单组分显色液，100 μ L、37 $^{\circ}$ C 反应 15 min；10% 硫酸终止液 50 μ L 终止。读取 OD_{450} 值。

1.7.2 封闭液的优化

分别用含 1% BSA、2% BSA、5% 脱脂奶、5% 胎牛血清、10% 胎牛血清的 PBST 作为封闭液，同时做不封闭对照，37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h 后进行 ELISA 检测，测定 OD_{450} 值和 P/N 值，选择 P/N 值最大者作为封闭液。

1.7.3 间接 ELISA 方法临界值的确定

按照上述最优条件组合建立 ELISA 检测方法，对 50 份经血凝/血凝抑制 (HA/HI) 方法筛选的阴性犬血清样本进行 ELISA 检测，测定 OD_{450} 值，进行统计分析，并确定阴阳临界值。

1.7.4 批内、批间重复性试验

用同一批制备的重组抗原包被不同的 ELISA 板，

取 6 份不同抗体水平的血清，在同一时间、同一条件、同一批试验中按间接 ELISA 程序测定，每份血样做 5 个重复，结果进行统计学分析。用 5 个不同批次制备并纯化的重组蛋白包被不同的 ELISA 板，取 3 份不同抗体水平的血清（每份血样做 5 个重复），在同一时间按间接 ELISA 程序测定，结果进行统计学分析。

1.7.5 间接 ELISA 方法的应用

对本实验室保存的采集自全国各地的 1 690 份犬的血清进行了 ELISA 检测，其中包含工作犬血清 1 317 份、伴侣犬血清 373 份，犬种包括拉布拉多犬、史宾格犬、德国牧羊犬、马里努阿犬及其他犬种，与商品化的 CIV 抗体间接 ELISA 试剂盒进行对比检测。

2 结果与分析

2.1 原核表达载体的构建

参考基因在密码子和 mRNA 结构优化过程中去除了信号肽、稀有密码子，GC 含量降为 50%，见图 1。优化后新的基因在原核表达系统中无限制性位点和作用元件、二级结构，CAI 达到 0.88，见图 2。合成的基因经测序验证大小为 1 026 bp，基因长度和序列无错误，预计表达的蛋白长度为 337 个氨基酸，分子量为 37.23 ku，蛋白等电点为 8.53，优化后的基因序列见图 3。将合成的基因片段插入到克隆载体 pET30a 中，经测序及限制性内切酶酶切鉴定（图 4），确定合成片段大小和碱基序列无误，证明片段成功插入到载体中。

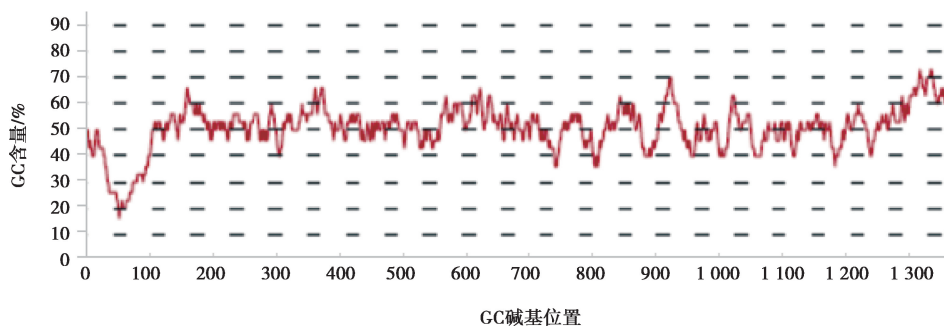


图 1 序列优化后的 GC 含量

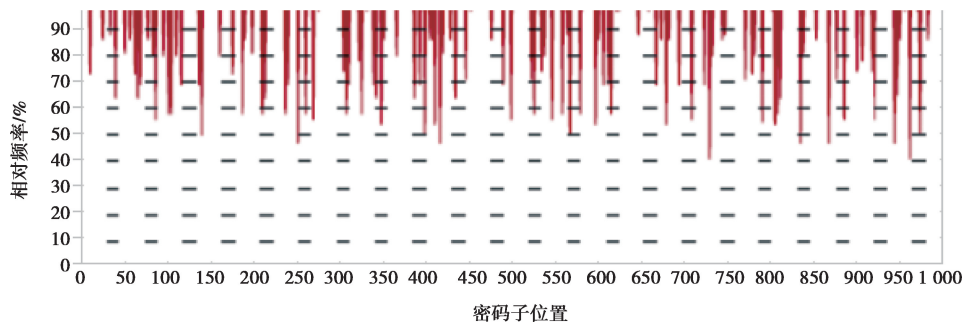


图 2 序列优化后的 CAI

```

1   CATCATCATC ATCATCACCA GAACCTGCCG GGTAACGAAA ATAACGCAGC GACCCTGTGT
61  CTGGGTCATC ACGCAGTTCC GAACGGTACC ATCGTCAAAA CCATCACCGA CGACCAGATC
121 GAAGTTACCA ACGCGACCGA ACTGGTTCAA AACAGCAGCA CCGGCAAAAT CTGCAACAAC
181 CCGCACAAAA TTCTGGACGG TCGCGATTGT ACCCTGATTG ACGCACTGCT GGGCGATCCG
241 CATTGCGACG TTTTTCAGAA CGAGACCTGG GACCTGTTTG TCGAACGTAG CAACGCGTTT
301 AGCAACTGCT ATCCGTACGA CGTTCCGGAT TATGCCAGTC TCGTAGCAT TGTTGCAAGC
361 TCTGGTACCC TGGAAATTTAT CACCGAAGGC TTTACCTGGG CAGGCGTTAC CAAAACGGT
421 GGTTCCTGGCG CTTGTAAACG CGGTCCGGCA AACGGCTTTT TCAGCCGTCT GAACTGGCTG
481 ACCAAAAGCG GTAACACCTA TCCGGTTC TG AACGTCACCA TGCCGAACAA CAACAAC TTC
541 GACAAACTGT ACATCTGGGG CGTCCATCAT CCGAGTACCA ATCAAGAACA GACCAGTCTG
601 TATATTCAGG CGTCTGGTCG CGTTACCGTT AGTACCCGTC GTAGCCAGCA GACCATTATT
661 CCGAATATTG AAAGCCGTCC GCTGGTTCGC GGTCAGTCTG GTCGCATTAG CGTTTATTGG
721 ACCATTGTCA AACCGGGCGA AGTTCTGGTA ATCAACAGCA ACGGTAATCT GATTGCGCCG
781 CGCGGCTATT TCAAAATGCA CATCGGCAA TCCAGCATT TCGGTTCTGA CGCACCGATT
841 GATACCTGCA TTAGCGAGTG TATTACCCCG AACGGTAGCA TTCCGAACGA GAAACCGTTC
901 CAGAACGTCA ACAAATAC CTACGGCGCC TGCCGAAAT ACGTCAAACA GAACACCTG
961 AAACCTGGCTA CGGGTATGCG TAACGTACCG GAACGTCAAAA CCCGCGGT TAATGA.....
    
```

图3 优化后的 HA1 基因序列

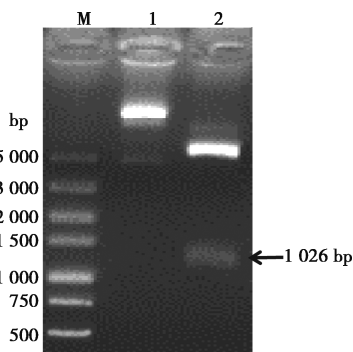


图4 pET-30a-HA1 质粒双酶切鉴定
M. DNA 分子质量标准 DL5000; 1. 构建的 pET-30a-HA1 表达载体; 2. 载体双酶切片段。

图4 pET-30a-HA1 质粒双酶切鉴定

2.2 HA1 蛋白的表达条件

蛋白小量表达后的电泳结果如图5所示，蛋白在15、28、37℃均能表达，以28℃诱导时表达量最高，确定28℃为最佳诱导温度。

2.3 HA1 蛋白纯化

SDS-PAGE 分析显示，在菌体破碎离心后的上清液中，镍柱孵育后流出液以及不同浓度咪唑洗脱液中均无目的蛋白，而在破碎菌体的沉淀中有大量的目的蛋白存在，说明 HA1 蛋白表达在包涵体中，见图

6。对包涵体中的蛋白进行纯化，亲和层析结果显示，在不同浓度咪唑的洗脱液中均可检测到目的蛋白，以0.5 mmol/L 浓度下的纯度较高，见图7。收集该浓度洗脱液下的蛋白进行透析复性，再次 SDS-PAGE 检测纯度，只见唯一清晰条带，见图8。试剂盒定量 HA1 蛋白浓度为 0.46 mg/mL。至此，获得高纯度的表达蛋白。

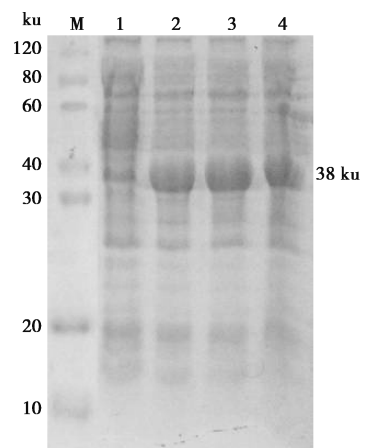
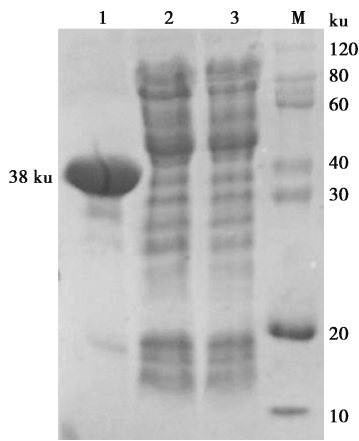


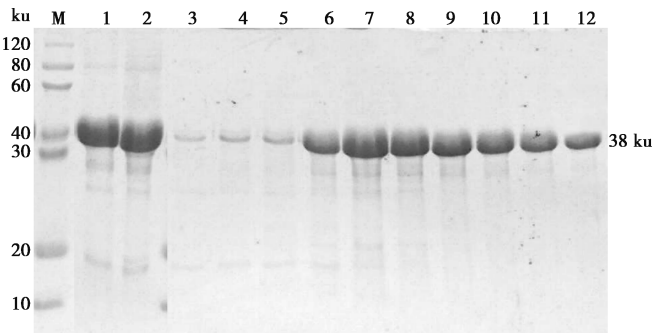
图5 SDS-PAGE 分析 HA1 蛋白表达条件
M. 蛋白质分子质量标准; 1. 对照; 2. 15℃ 24 h; 3. 28℃ 24 h; 4. 37℃ 24 h。

图5 SDS-PAGE 分析 HA1 蛋白表达条件



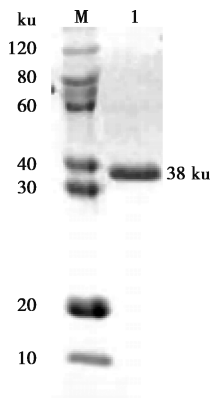
M. 蛋白质分子质量标准；1. 菌体破碎离心后的沉淀；2. 菌体破碎离心后的上清液；3. 上清液经 Ni-IDA 结合后的流出液。

图 6 SDS-PAGE 分析 HA1 蛋白表达形式



M. 蛋白质分子质量标准；1. 8 mol/L 尿素溶解离心后上清液；2. 8 mol/L 尿素溶解上清液与 Ni-IDA 孵育后流出液；3~5. 0.05 mmol/L 咪唑洗脱液；6~9. 0.1 mmol/L 咪唑洗脱液；10~12. 0.5 mmol/L 咪唑洗脱液。

图 7 SDS-PAGE 分析 HA1 蛋白纯化效果



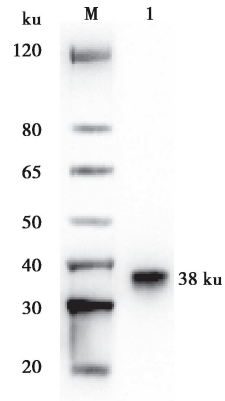
M. 蛋白质分子质量标准；1. HA1 蛋白 (1.5 μg/μL)。

图 8 纯化 HA1 蛋白的 SDS-PAGE 鉴定

2.4 HA1 蛋白的反应原性

Western blot 结果显示，在近 38 ku 处显示唯一的

清晰条带，表明 HA1 蛋白能够与 CIV 抗血清发生反应，表达的蛋白具有良好的反应原性，见图 9。



M. 蛋白质分子质量标准；1. HA1 蛋白。

图 9 HA1 蛋白的 Western blot 鉴定

2.5 间接 ELISA 方法的建立

2.5.1 抗原最适包被浓度和酶标抗体工作浓度的选择

以方阵滴定法测定的不同抗原和二抗稀释度下的 OD_{450} 值，计算出 P/N 值，见表 1。二抗浓度选择原则： OD_{450} 值在 1.0 左右，P/N 值高。结果显示，二抗浓度为 1 : 1 000 时 P/N 值最高，但 OD_{450} 值均在 2.0 左右，不符合要求；当二抗浓度为 1 : 2 000 时的 P/N 值高，且 OD_{450} 值均在 1.0 左右，符合要求。在 1 : 2 000 的二抗浓度下，当抗原浓度在 1.15 μg/mL 时，P/N 值最大。综合上述结果，确定 1.15 μg/mL 为最佳抗原包被浓度，1 : 2 000 为二抗最佳工作浓度。

表 1 不同抗原和二抗工作浓度下的 P/N 值

二抗浓度	抗原浓度 / (μg · mL ⁻¹)				
	4.60	2.30	1.15	0.58	0.29
1 : 1 000	18.42	21.41	24.56	25.38	22.32
1 : 2 000	17.23	18.76	19.68	16.49	17.39
1 : 3 000	15.84	14.91	13.27	13.62	9.32
1 : 4 000	11.43	8.73	7.73	8.62	7.44

2.5.2 封闭液的优化

采用不同封闭液完成 ELISA 测定，结果见表 2，根据 OD_{450} 值和 P/N 值可见，5% 脱脂奶条件下阴性血清的背景值较低，同时 P/N 值最高，说明采用 5% 脱脂奶建立的体系中非特异性反应较少，以 5% 脱脂奶作为最佳封闭剂。

表 2 封闭液及使用浓度的筛选

检测类型	1% BSA	2% BSA	5% 脱脂奶	5% 胎牛血清	10% 胎牛血清
阳性血清 OD_{450} 值	1.61	1.55	1.40	1.58	1.54
阴性血清 OD_{450} 值	0.24	0.28	0.13	0.32	0.30
P/N	6.62	5.49	10.96	4.91	5.08

2.5.3 间接 ELISA 方法临界值的确定

对 50 份经 HA/HI 方法筛选的阴性犬血清样本进行 ELISA 检测, 测定 OD_{450} 值 (见图 10)。进行统计分析, 计算最终 OD_{450} 值平均值 (\bar{x}) 为 0.169, 标准差 (s) 为 0.04, 按照公式, 阳性临界值: $C_p = \bar{x} + 3s = 0.289$, 阴性临界值: $C_n = \bar{x} - 2s = 0.249$, 即当样品的 OD_{450} 值 ≥ 0.29 时可判为阳性, OD_{450} 值 ≤ 0.25 时判为阴性, 两者之间为可疑。

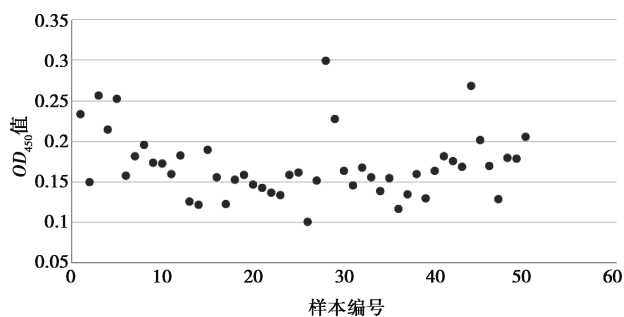


图 10 50 份阴性血清的 OD_{450} 值

2.5.4 批间、批内重复性试验

由表 3、表 4 可见, 批间差异系数和批内差异系数均小于 10%, 表明间接 ELISA 方法具有良好的重复性。

表 3 批内差异系数 %

项目	1	2	3	4	5	6	平均值
差异系数	5.20	6.44	4.69	9.29	3.53	6.60	5.38

表 4 批间差异系数 %

项目	1	2	3	平均值
差异系数	6.90	8.76	9.16	8.27

2.6 间接 ELISA 方法的应用

经过上述步骤, 建立的间接 ELISA 方法参数如下: 1.15 $\mu\text{g/mL}$ 蛋白在 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被 12 h, 以 5% 脱脂奶/PBST 缓冲液为封闭剂封闭 2 h, 血清稀释度为 1:20, 被检血清孵育 1 h, 羊抗犬 IgG 二抗浓度为 1:2000 倍, TMB 显色液 37 $^{\circ}\text{C}$ 显色 10 min, 终止液终止后 10 min 内读取 OD_{450} 值, 阳性结果的 Cut-off

值为 0.29。

在检测方法的应用过程中, 由表 5 可见, 间接 ELISA 方法从 1690 份血清中分别检出阳性 156 份, 阴性 1534 份; 商品化试剂盒则检出阳性 144 份, 阴性 1546 份。两者的阳性符合率为 95.2% (137/144), 阴性符合率为 98.8% (1527/1546), 总符合率为 97.9% (1534/1690)。

间接 ELISA 方法检测工作犬和伴侣犬的血清, 工作犬阳性率为 8.43%, 伴侣犬阳性率为 12.06%, 总体阳性率为 9.23%, 见表 6。

表 5 间接 ELISA 方法与商品化试剂盒的符合率比较

间接 ELISA	商品化试剂盒		合计/份	符合率/%
	阳性/份	阴性/份		
阳性/份	137	19	156	95.2
阴性/份	7	1527	1534	98.8
合计	144	1546	1690	97.9

表 6 工作犬和伴侣犬 CIV 的检出率比较

犬的类型	样本数/份	间接 ELISA		商品化试剂盒	
		阳性/份	阳性率/%	阳性/份	阳性率/%
工作犬	1317	111	8.43	102	7.74
伴侣犬	373	45	12.06	42	11.26
合计	1690	156	9.23	144	8.52

3 讨论

HA 蛋白是甲型流感病毒的主要表面抗原之一, 是病毒基因产物中最大的典型糖蛋白^[17-18], 在介导受体结合、膜融合、病毒粒子包装及致病性方面发挥着重要作用^[19]。该蛋白是宿主获得性免疫应答识别的主要抗原, 具有刺激机体产生中和抗体、阻止病毒感染的能力^[20]。HA 蛋白由 HA1 和 HA2 两个亚单位组成, 其中 HA1 位于 HA 蛋白 N 端, HA2 是 HA 蛋白的部分茎部区域^[21]。HA1 有 4 个抗原决定簇, 比 HA2 具有更高的抗原性和免疫原性。位于 HA1 上的受体结合域相对保守且可以产生广泛反应的 B 细胞免疫抗体, HA 头部结构域上的离散抗原位点似乎是抗体反应的优先目标^[22], 这些位点比病毒的大多数其他 B 细胞表位具有免疫优势^[23]。因此, 选择 HA1 蛋白对于感染早期和抗体滴度较低的样本诊断将会更加准确, 有利于后续流行病学调查。

在蛋白表达上, 真核表达系统的加工、修饰体系更完善, 目的蛋白能够形成正确的空间结构, 是表达生物活性蛋白及疫苗的理想选择, 但表达量低、周期

长、成本高；原核系统最成熟稳定，具有容易操作、时间短、成本低和蛋白表达量高等优点，有利于大量制备诊断抗原或不需要翻译后修饰的蛋白^[24-25]。研究表明，HA 基因含有大肠杆菌稀有密码子，受密码子偏好性影响获得的蛋白含量偏低^[26]。常规基因扩增方法难以对目标基因进行定向改造，而以化学合成的方法制备预表达基因，更有利于实现对氨基酸序列的优化、密码子偏好性修饰、增减其他表达元件。本研究中，在构建表达载体之前，对 HA1 的参考基因应用商业化软件对氨基酸序列进行了系统优化，去除了稀有密码子，调整了 GC 含量至 50%，去除了阻碍蛋白表达的二级结构和作用元件，优选了适应原核表达系统的密码子，优化后密码子的适应指数提升至 0.88，为宿主菌高效表达目的蛋白创造了最佳条件，然后对优化后的基因进行全基因合成，进而构建了用于原核表达系统的 pET-30a-HA1 表达载体，实现了蛋白的高效表达。进一步验证了纯化的原核表达的 HA1 蛋白具备稳定的抗原特性后，以重组 HA1 蛋白作为诊断抗原建立了间接 ELISA 方法，检测出我国 H3N2 亚型 CIV 的阳性率为 9.23%，与商品化试剂盒的符合率为 97.9%，证实了本文建立的间接 ELISA 方法具备良好的应用前景。

综上所述，利用化学合成法合成基因，结合原核表达技术建立 H3N2 亚型 CIV 的 HA1 蛋白制备方法，有利于对目的片段进行定向优化，实现蛋白的高效表达并保持生物学活性，为诊断抗原的制备及相关研究提供了一种优化的途径。

参考文献：

- [1] LI S J, SHI Z H, JIAO P R, et al. Avian-origin H3N2 canine influenza A viruses in Southern China [J]. *Infect Genet Evol*, 2010, 10 (8): 1286-1288.
- [2] 秦海斌, 朱海娟, 朱骞, 等. 犬 IFN- γ 的原核表达及其对 A 型流感病毒 H3N2 亚型的抑制作用 [J]. *动物医学进展*, 2016, 37 (7): 1-6.
- [3] 陈樱, 莫彦宁, 周华波, 等. 类人 H3N2 犬流感病毒广西分离株的鉴定及其遗传演化分析 [J]. *中国预防兽医学报*, 2015, 37 (5): 401-404.
- [4] 于志君, 朱晓文, 刘红, 等. A 型流感病毒跨种传播和致病性相关蛋白研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2011, 32 (11): 90-94.
- [5] SONG D, KANG B, LEE C, et al. Transmission of avian influenza virus (H3N2) to dogs [J]. *Emerg Infect Dis*, 2008, 14 (5): 741-746.
- [6] SU S, CHEN Y, ZHAO F R, et al. Avian-origin H3N2 canine influenza virus circulating in farmed dogs in Guangdong, China [J]. *Infect Genet Evol*, 2013, 19: 251-256.
- [7] 秦海斌, 张汇东. 犬流感研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2010, 31 (6): 96-99.
- [8] LYOO K S, Kim J K, KANG B, et al. Comparative analysis of virulence of a novel avian-origin H3N2 canine influenza virus in various host species [J]. *Virus Res*, 2015, 195 (2): 135-140.
- [9] 秦海斌, 强京宁, 宋珍华, 等. 犬体内唾液酸受体的组织分布及对 H3N2 亚型犬流感病毒的易感性研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29 (5): 76-83.
- [10] 李雪云, 陈永坤, 范颖, 等. 犬流感病毒起源进化和宿主适应性机制研究进展 [J]. *病毒学报*, 2021, 37 (1): 226-233.
- [11] 秦海斌, 温海, 贺星亮, 等. H3N2 亚型犬流感病毒 RT-LAMP 快速检测方法的建立及应用 [J]. *动物医学进展*, 2019, 40 (4): 9-15.
- [12] 姚文浩, 吴兴隆, 秦志博, 等. 大片吸虫磷酸丙糖异构酶基因的克隆表达和免疫原性分析 [J]. *畜牧与兽医*, 2024, 56 (1): 39-45.
- [13] 肖苗苗. 绿僵菌素 A 与五种家蚕蛋白的相互作用 [D]. 广州: 华南农业大学, 2019.
- [14] 耿笑林, 王孟月, 张翼, 等. 禽腺病毒血清 4 型 Fiber-2 蛋白在大肠杆菌中可溶性表达及其免疫原性分析 [J]. *畜牧与兽医*, 2021, 53 (8): 94-99.
- [15] 刘丹, 黄小洁, 吴华伟, 等. 牛病毒性腹泻病毒 E2 蛋白的真核表达及间接 ELISA 抗体检测方法的建立 [J]. *动物医学展*, 2024, 45 (4): 51-56.
- [16] 李龙飞, 黄傲雪, 袁佳欣, 等. H9N2 亚型禽流感病毒 HA1 蛋白的原核表达及间接 ELISA 抗体检测方法的建立 [J]. *中国兽医科学*, 2023, 53 (11): 1377-1383.
- [17] YANG J R, HSU S Z, KUO C Y, et al. An epidemic surge of influenza A (H3N2) virus at the end of the 2016-2017 season in Taiwan with an increased viral genetic heterogeneity [J]. *J Clin Virol*, 2018, 99-100: 15-21.
- [18] NEUMANN G, NODA T, KAWAOKA Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus [J]. *Nature*, 2009, 459 (7249): 931-939.
- [19] WU Y, YANG D, XU B, et al. Immune efficacy of an adenoviral vector-based swine influenza vaccine against antigenically distinct H1N1 strains in mice [J]. *Antiviral Research*, 2017, 147: 29-36.
- [20] 朱广蕊, 潘耀谦, 夏银可, 等. 甲型 H1A1 流感病毒致病机理的研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2011, 32 (8): 70-73.
- [21] 赵丹, 邱冬, 韩德敏, 等. H3N2 亚型犬流感病毒鼠/犬嵌合抗体 scFv-Fc 的制备与活性分析 [J]. *南京农业大学学报*, 2019, 42 (3): 474-481.
- [22] ANGELETTI D, GIBBS J S, ANGEL M, et al. Defining B cell immunodominance to viruses [J]. *Nature Immunology*, 2017, 18 (4): 456-463.
- [23] YU X C, TSIBANE T, MCGRAW P A, et al. Neutralizing antibodies derived from the B cells of 1918 influenza pandemic survivors [J]. *Nature Immunology*, 2008, 9 (7): 532-536.
- [24] 杨理凯, 郭苗苗, 杜伟立, 等. H5N1 亚型禽流感病毒 HA 蛋白的原核表达 [J]. *动物医学进展*, 2018, 39 (8): 10-14.
- [25] 余晓颖, 田园, 张国利, 等. H3N2 犬流感病毒 M1 蛋白的原核表达及鉴定 [J]. *中国兽药杂志*, 2019, 53 (1): 1-8.
- [26] 王晓丽, 毕振威, 王永山, 等. H3N2 亚型犬流感病毒 NP 蛋白的表达纯化及多克隆抗体制备 [J]. *中国动物传染病学报*, 2017, 25 (1): 1-6.