

乳胶凝集试验检测 H5 亚型禽流感病毒血凝素抗体的研究

喻正军 金梅林* 徐晓娟 张瑞华 陈焕春

(华中农业大学动物医学院动物病毒室 武汉 430070)

摘 要 利用原核表达并经过纯化的 H5 亚型禽流感病毒的血凝素蛋白做为抗原,经碳二亚胺(EDAC)将表达产物和羧基化的乳胶共价偶联,并对偶联乳胶的蛋白量和偶联时间进行合理选择,建立 H5 亚型禽流感病毒血凝素蛋白乳胶凝集试验的方法。临床检测 H5 亚型禽流感病毒实验免疫鸡血清 126 份,同血凝抑制试验相比,其敏感性为 87.03%,特异性为 88.8%,两者的符合率为 87.30%。结果证明建立的方法可用于 H5 亚型禽流感抗体水平监测和流行病学调查。

关键词 禽流感病毒,血凝素(HA)蛋白,羧化乳胶,乳胶凝集试验(LAT)

中图分类号 S852.4 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2005)06-0942-05

禽流感(Avian Influenza, AI)是由 A 型流感病毒引起的一种病毒性传染病,它于 1887 年在意大利首次被发现,现已呈广泛性传播和全球性分布。自 1959 年高致病性禽流感首次报道以来,共有 5 起由高致病性禽流感 H5N1 造成的大爆发,每次都给养殖业造成巨大的经济损失。并且,随着高致病性禽流感致病力的增强,其公共卫生意义越来越重大。特别是 1997 年香港首次爆发高致病性禽流感导致 18 人感染 6 人死亡以来^[1],2004 年越南和泰国又有 8 例和 15 例人因感染禽流感死亡^[2,3],引起了人们对禽流感病毒广泛关注。临床上,迫切需要能对禽流感病毒的抗原和抗体进行简单快速的检测方法。

针对 H5 亚型禽流感抗体水平检测,有很多种血清学方法,如:血凝抑制(Hemagglutination inhibition test, HI)中和试验(Serum Neutralization, SN)琼脂扩散试验(Agar Gel Precipitation, AGP)免疫荧光试验(Indirect Immunofluorescence Assay, IFA)和酶联免疫吸附试验(Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)等^[4]。上述方法各有所长,但也有共同的缺点,如:操作技术要求较高、过程繁琐、花费时间长、有的需要昂贵的仪器设备等。乳胶凝集试验(Latex Agglutination Test, LAT)由于具有快速敏感、简单易行、无需昂贵仪器等优点,已广泛用于多种动物疾病抗原抗体的检测和流行病学调查^[5]。

本文建立 H5 亚型禽流感病毒血凝素蛋白乳胶

凝集试验,是以羧化的聚苯乙烯乳胶为载体,采用了共价偶联的技术经双功能试剂将表达产物和羧基化的乳胶共价偶联起来,对血清中特异性 HA 抗体进行检测,由于采用了共价偶联的技术,克服了蛋白致敏普通乳胶时,致敏抗原量少、不稳定、致敏上的蛋白容易脱落等缺点。同时,采用 HA 蛋白做为抗原,使该方法具有更高的生物安全性。经试验证实,乳胶凝集试验操作简单、快速,不需要贵重的仪器设备和操作技能^[5],同时将分子生物学手段和普通的试验方法有机结合,为临床早期快速检测 H5 亚型禽流感血清特异性抗体水平提供了行之有效的方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 表达 H5 亚型禽流感病毒血凝素(HA)蛋白的重组菌(BL21/pGEX-HAM)由本实验室保存。

1.1.2 试剂和仪器 胰蛋白酶、牛血清白蛋白(BSA)为 DIFCO 公司产品, -20℃ 保存。抗 H5 亚型禽流感病毒血清由哈尔滨兽医研究所提供, 50 份 SPF 鸡血清以及新城疫、传染性法氏囊、传染性喉气管炎、传染性支气管炎、马立克氏病和禽流感 H9 亚型的标准血清购自北京试验动物中心, 587 份来自 H5 亚型禽流感病毒免疫鸡场的免疫鸡血清。主要缓冲液为磷酸缓冲液(pH7.4)碳酸缓冲液(pH9.6)硼酸缓冲液(pH8.4) 2% 碳二亚胺(pH 4.5 的 PBS 配

基金项目 国家十五科技攻关项目(2004BA519A07)

* 通讯作者。Tel 86-27-87282608; Fax 86-27-87281795; E-mail: hzavet@public.wh.hb.cn

作者简介 喻正军(1977-)男,湖北人,硕士研究生,主要从事动物病毒分子生物学研究。

收稿日期 2005-03-30,修回日期 2005-08-24

制 λ 0.1mol/L 乙醇胺、0.1% BSA 和储存缓冲液。乳胶直径为 $0.7\mu\text{m}$ 的羧化聚苯乙烯乳胶, 4°C 保存。UV-120 紫外分光光度计(Amersham Biosciences)。

1.2 HA 蛋白的提取和纯化

参照文献 7~10 进行。

1.3 HA 蛋白羧化乳胶制备

用 0.1mol/L pH 9.6 碳酸缓冲液洗涤商品化羧化乳胶 3 遍, 离心, 弃上清后用 0.02mol/L pH 4.5 磷酸缓冲液重悬后, 洗 3 遍, 离心弃上清; 然后用 2% 的 EDAC 溶液重悬后, 室温作用 4h, 离心弃上清; 用 0.01mol/L pH 8.4 硼酸缓冲液重悬洗 3 遍, 离心重悬, 加入 HA 蛋白, 缓慢摇动到适当时间; 用乙醇胺封闭 5min、BSA 封闭 30min 后悬浮于贮存液中。

1.4 HA 蛋白羧化乳胶制备过程中各条件的选择

1.4.1 最佳致敏时蛋白加入量的选择 :经 UV-120 分光光度计测定蛋白含量, 加入蛋白量为 $X_1\text{mg/mL}$, 致敏完毕后, 上清蛋白含量为 $X_2\text{mg/mL}$, 计算偶联的蛋白量 $X = X_1 - X_2$, 经方阵滴定确定敏感性, 选择最佳致敏时蛋白加入量。

1.4.2 最佳致敏时间的选择 :在确定最佳蛋白加入量的基础上, 改变致敏时间, 经方阵滴定确定敏感性, 选择最佳致敏时间。

1.4.3 最佳乳胶浓度的选择 :确定上述条件的基础上, 改变偶联时乳胶的浓度, 经方阵滴定来确定敏感性, 选择最佳致敏时乳胶浓度。

1.5 乳胶凝集试验操作程序和结果判定

将待检血清滴一滴(约 $20\mu\text{L}$)于洁净的玻璃片上, 再滴加一滴(约 $20\mu\text{L}$)乳胶悬液, 同时设置阳性和阴性血清对照, 用牙签混匀, 慢慢摇动, 使其形成直径为 $1.5\sim 2.0\text{cm}$ 的液面, 摇动玻片 $30\sim 60\text{s}$, 在黑色的背景下出现肉眼可见的凝集颗粒, 表明待检样品含有禽流感 H5 亚型的病毒血清抗体, 不出现凝集反应者为禽流感 H5 亚型抗体阴性。

1.6 乳胶抗原质量的检测

1.6.1 乳胶抗原自凝检测 :致敏乳胶抗原同等量的生理盐水 PBS 和 BBS 反应, 观察有无自凝现象。

1.6.2 乳胶抗原特异性检验 :致敏的乳胶抗原分别同 SPF 鸡血清、新城疫传染性法氏囊、传染性喉气管炎、传染性支气管炎、马立克氏病和禽流感 H9 亚型的标准血清反应, 观察有无凝集现象。

1.7 乳胶抗原的重复性试验

1.7.1 批内重复试验 :用同一批制备的乳胶抗原在

不同的时间对 100 份血清样品进行检测, 比较其凝集效果。

1.7.2 批间重复试验 :用 3 批不同批次的乳胶抗原检测 100 份血清样品, 比较其凝集效果。

1.8 LAT 的稳定性试验

100 份血清样品, 每份血清分做数等份于 -20°C 冻存。致敏一批乳胶, 4°C 保存到 1 个月和 2 个月, 取出做 LAT 试验。

1.9 LAT 和 HI 的符合率

用本室制备的乳胶抗原检测 126 份来自 H5 亚型禽流感病毒实验免疫鸡血清, 同 HI 试验结果比较, 分析两者的符合率。

1.10 临床血清样品检测

用本室制备的乳胶抗原检测 587 份来自 H5 亚型禽流感病毒免疫鸡场免疫鸡血清, 同 HI 试验结果比较, 分析两者的符合率。

2 结果

2.1 H5 亚型禽流感病毒 HA 蛋白特异性分析

对表达产物经 SDS-PAGE 后转膜进行 Western blot 分析表明, 92kD 的蛋白带与抗原性 H5 亚型 AIV 的阳性血清发生了特异性的免疫反应, 目标带所在位置显示出明显的棕褐色印迹, 而对照处 pGEX-KG 的 *E. coli* BL21 没有出现明显的条带, 证明该表达目标蛋白具有良好的特异性(图 1)。

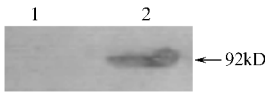


图 1 表达产物的 Western blot 检测

Fig.1 Western blot analysis of the expressed proteins

1. Negative control 2. Proteins expressed by BL21/pGEX-HAM.

2.2 HA 蛋白羧化乳胶制备过程中条件的选择

2.2.1 最佳偶联蛋白量的选择 :经 UV-120 分光光度计测每 mL 蛋白含量为 1.5mg , 致敏乳胶时加入蛋白量和致敏蛋白量的关系见表 1, 同时经方阵滴定

表 1 加入蛋白量和偶联蛋白量的关系

Table 1 The relationship of the protein added and coated				
Number of latex	Original HA protein/mg	Covalent protein/mg	Agglutination	The level of positive
1	1.50	1.39	+	—
2	0.75	0.74	+	—
3	0.325	0.24	+	—
4	0.163	0.15	—	1:256
5	0.082	0.034	—	1:128
6	0.041	0.030	—	1:64

“ + ” shows agglutination itself ; “ - ” shows no agglutination itself ; “ — ” shows no test

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

试验表明 ,当抗原 1 : 8 稀释时即加入蛋白量为 0.163mg 时 ,敏感性最高 ,且致敏后的乳胶不发生自凝(表 1)。

2.2.2 最佳偶联时间的选择 :由表 2 可知当加入蛋白量为 0.163mg 时 ,偶联时间为 4 ~ 5h ,敏感性即可达最高 ,且偶联后的乳胶不发生自凝(表 2)。

Table 2 The relationship of the coated protein and the coated time			
Covalent time/h	Latex agglutination	Level of positive serums	Covalent protein/mg
3	-	1:32	0.062
4	-	1:128	0.134
5	-	1:256	0.147
6	-	1:256	0.149
7	-	1:256	0.151
8	-	1:256	0.156

2.2.3 最佳乳胶浓度的选择 :确定加入蛋白量为 0.163mg/mL ,致敏时间为 4 ~ 5h 后 ,经方正滴定证实 ,当用浓度为 0.5% 的羧化乳胶时 ,偶联效率最高 ,敏感性最高 ,偶联后的乳胶不发生自凝(表 3)。

Table 3 Selecting the optimal latex concentration			
Concentration of latex/%	Level of positive serum	Covalent protein/mg	Agglutination
2	—	0.158	+
1	1:128	0.137	-
0.5	1:256	0.143	-
0.25	1:64	0.106	-
0.125	1:32	0.0937	-

“+” shows agglutination itself ;“-” shows no agglutination itself ;“—” shows no test .

2.3 乳胶抗原质量检测

2.3.1 乳胶抗原自凝性检测 :致敏乳胶抗原同等量的生理盐水 PBS 和 BBS 不反应 ,证明胶抗原没有自凝性。

2.3.2 乳胶抗原特异性检验 :分别用 SPF 鸡血清、新城疫传染性法氏囊、传染性喉气管炎、传染性支气管炎、马立克氏病和禽流感 H9 亚型的标准血清与致敏的乳胶抗原进行乳胶凝集试验 ,无凝集现象 ,结果表明制备的乳胶试剂不与上述血清反应。

2.4 乳胶抗原的重复性试验

2.4.1 批内重复试验 :用同一批制备的羧化乳胶在不同的时间对 100 份血清样品进行检测 ,两次检测的结果基本一致 ,表明致敏的乳胶抗原是比较稳定

的(图 2)。

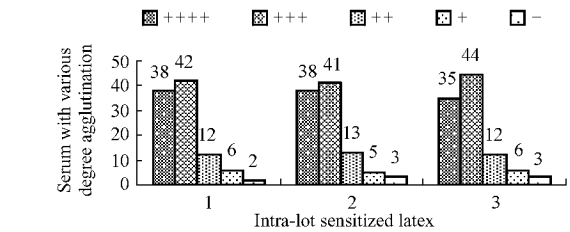


图 2 同一批乳胶抗原在不同时间检测 100 份血清的结果
Fig.2 The results of 100 chicken sera detected with same lot latex antigen in different time

2.4.2 批间重复试验 :用 3 批不同批次的乳胶检测 100 份血清样品 ,不同批次的乳胶抗原检测血清凝集结果基本一致 ,证明本文介绍的制备乳胶抗原的工艺流程是稳定的(图 3)。

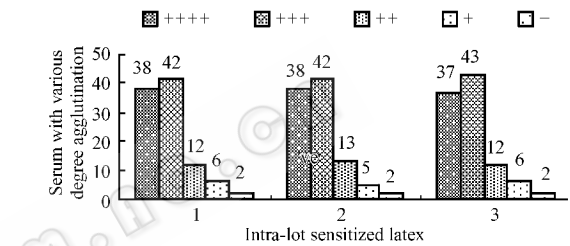


图 3 3 批乳胶抗原在同一时间检测 100 份血清的结果
Fig.3 The results of 100 chicken sera detected with three lots of latex antigen simultaneously

2.5 LAT 的稳定性试验

100 份血清样品 ,每份血清分作数等份于 -20℃ 冻存。致敏一批乳胶 4℃ 保存到 1 个月和 2 个月 ,取出做 LAT 试验。两次检测血清阳性份数分别为 95 和 94 份 ,同新鲜乳胶抗原无差异。进一步的不保存期试验正在进行中。

2.6 LAT 和 HI 的符合率

用本室制备的乳胶抗原检测 126 份来自 H5 亚型禽流感病毒实验免疫鸡血清 ,108 份是 HI 阳性 (血凝抑制价 $\geq 2^4$) ,18 份是 HI 阴性 (血凝抑制价 $< 2^4$)。LAT 试验中 ,108 份 HI 阳性血清中 ,有 94 阳性 ,14 份阴性 ;18 份 HI 阴性血清中 ,有 16 份 LAT 阴性 ,仅有 2 份血清阳性。结果表明 :对于试验免疫鸡血清 ,相对 HI 而言 ,羧化乳胶的敏感性是 87.03% (94/108) ,特异性为 88.8% (16/18) ,符合率为 87.30% (94 + 16/126)。

2.7 待检血清的检测

用本室制备的乳胶抗原检测 587 份来自 H5 亚型禽流感病毒免疫鸡场临床血清样品 ,487 份是 HI 阳性 (血凝抑制价 $\geq 2^4$) ,100 份是 HI 阴性 (血凝抑制价 $< 2^4$)。LAT 试验中 ,487 份 HI 阳性血清中 ,有 402

份是 LAT 阳性, 14 份阴性; 100 份 HI 阴性血清中, 有 86 份 LAT 阴性, 14 份血清阳性。结果表明: 对于临床免疫鸡血清样品的检测中, 相对 HI 而言, 羧化乳胶的敏感性是 82.5% (402/487), 特异性为 86% (86/100), 符合率为 83.1% (402 + 86/587)。

3 讨论

血凝素蛋白是位于病毒囊膜的蛋白质, 是一种诱导机体产生重要免疫原性蛋白, 因此, 以血凝素蛋白偶联羧化乳胶检测血清中和抗体, 可以对临床血清抗体水平高低及抗体可提供保护力直接进行检测。本研究中表达的血凝素蛋白经 SDS-PAGE 后转膜进行 Western blot 分析, 目的带处呈现明显的条带而未见非特异性条带, 表明表达产物的特异性较好, 是成功建立本方法的关键。

致敏前, 乳胶处理的方法有两种: 化学偶联和物理吸附。就物理吸附而言, 致敏乳胶的敏感性受抗原的分子量、pH 值和离子强度等影响, 同时, 物理吸附无选择性。随着致敏乳胶储存时间的延长, 蛋白质抗原会逐渐从乳胶颗粒上脱落, 更有甚者, 物理吸附的乳胶抗原一旦与含有其他蛋白的血液接触, 会导致已吸附在乳胶颗粒表面的蛋白抗原被血液中的蛋白替代造成试验误差。而且, 物理吸附致敏乳胶过程容易使蛋白生物活性丧失。本文采用共价偶联 HA 蛋白做为乳胶抗原来检测血清中和抗体, 避免因物理吸附而产生的上述缺点, 使乳胶抗原可以稳定的保存。

制备乳胶抗原时, 发现其敏感性与下述因素有关, 如致敏过程中蛋白的加入量、偶联时间和乳胶采用的浓度。试验结果显示: 蛋白加入量并不是和乳胶抗原的敏感性成正相关, 当蛋白加入量为 0.163mg/mL 时, 乳胶抗原的敏感性最高, 此时, 阳性血清效价为 1:256; 当致敏时间在 4~5h 之间时, 致敏后乳胶抗原的敏感性即可达到最高; 在对致敏乳胶过程中乳胶浓度的选择时, 发现浓度太高容易造成乳胶发生自凝, 浓度过低时, 蛋白的吸附量降低, 乳胶抗原的敏感性降低, 当浓度为 0.5% 时, 致敏乳胶的敏感性最高。

上述条件优化后, 乳胶抗原与 SPF 鸡血清、新城疫、传染性法氏囊、传染性喉气管炎、传染性支气管炎、马立克氏病和禽流感 H9 亚型的标准血清没有出现非特异性凝集, 与生理盐水 PBS 和 BBS 不发生自凝, 表明乳胶抗原的特异性好。批间和批内重复试验表明本试验可以稳定制备蛋白致敏乳胶抗原。

方法建立后, 检测 H5 亚型禽流感病毒实验免疫鸡血清 126 份, 同血凝抑制试验相比, 其敏感性为 87.03%, 特异性为 88.8%, 两者的符合率为 87.30%。初步运用于临床检测, 与 HI 试验同时检测 587 份 H5 亚型禽流感病毒免疫鸡场免疫鸡血清样品, 相对 HI 而言, 致敏乳胶抗原的敏感性为 82.5%, 特异性为 86%, 两者的符合率为 83.1%。检测结果, 试验免疫鸡的敏感性和特异性比临床血清样品高, 可能与 LAT 检测的主要是 IgM 抗体有关^[11]。临床样品中, 有免疫后 30d、60d 和 120d 的血清, 还有的血清样品背景不清楚, 而试验免疫鸡血清样品都采集于免疫后 60d 以内。通过上述试验证明, 本文建立的方法可以运用于 H5 亚型禽流感抗体水平监测和流行病学调查。

操作简单、试验快速和结果稳定是本方法最大的优点。同其他诊断技术相比, 本文建立的方法更加适用于临床实践, 未经培训的个体养殖户可以在很短的时间内熟练运用该技术进行抗体检测。每次反应耗时短, 阳性反应的凝集在 30~60s 之间出现, 凝集颗粒可以持续存在, 直到液面干燥, 阴性反应呈现乳白色的无非特异性凝集的液面直到干燥。因此, 我们建立了临床上可以快速检测 H5 亚型禽流感病毒血凝素抗体的方法。

参 考 文 献

- [1] Webster R G. Influenza virus: Transmission between species and relevance to emergence of the next human pandemic. *Archives of Virology Supplement*, 1997, **13**: 105-133.
- [2] World health organization. Situation updates-Avian influenza. <http://www.who.int/en/>, 17 March 2004.
- [3] World health organization. Situation updates-Avian influenza. <http://www.who.int/en/>, 23 February 2004.
- [4] 甘孟侯主编. 禽流感. 第二版. 北京: 农业大学出版社, 2004, **16**: 112-117, 137-139.
- [5] 邱德新, 陈焕春. 乳胶凝集试验检测鸡新城疫病毒血清抗体的研究. *中国预防兽医学报* 2000 **22**(5): 208-212.
- [6] Harlow E, Lane D. 抗体技术实验指南. 第一版. 沈关心, 龚非力等译. 北京: 科学出版社, 2002.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 第二版. 金冬雁, 侯云德, 等译. 北京: 科学出版社, 1993.
- [8] 隋广超, 胡美浩. 大肠杆菌中包涵体的形成及其活性表达产物的分离. *生物技术*, 1993 **2**(2): 6-9.
- [9] 白东亭. 重组大肠杆菌的包涵体. *中国生物制品学杂志*, 1996 **19**(4): 188-191.
- [10] 唐勇, 陈焕春, 覃雅丽, 等. 狂犬病病毒 gC 基因的表达及 gC2LA T 诊断方法的建立. *畜牧兽医学报* 2003 **34**(1): 72-76.
- [11] Smits H L, van der Hoek M A, Goris M G, et al. Simple latex agglutination assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology* 2000, **38**: 1272-1275.

A latex agglutination test for detection of hemagglutinin serum antibodies to H5 Avian influenza virus in chicken

YU Zheng-jun JIN Mei-lin* XU Xiao-juan ZHANG Rui-hua CHEN Huan-chun

(Laboratory of Animal Virology, College of Animal Science and Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract : A Latex Agglutination Test (LAT) was developed for quick detection of hemagglutinin serum antibodies of H5 Avian Influenza Virus (AIV) in chicken. Recombinant hemagglutinin protein of H5 AIV were obtained and purified, then HA protein were covalently linked to carboxylated polyethylene latex beads by EDAC. The sensitisation condition such as ionic strength of the diluting mixture pH, concentration, antigen, the times of linking were optimized. 126 fresh serum after vaccination were detected by this LAT and HI simultaneously, the result show that sensitivity for the LAT was 87.03%, the specificity was 88.8%, the coincidence rate of both methods was 87.30%. The result indicated that this LAT method can be used for quick detection of serum antibodies and epidemiological study of H5 AIV.

Key words : Avian Influenza Virus (AIV), Hemagglutinin (HA) protein, Carboxylated polyethylene latex, Latex Agglutination Test (LAT)

Foundation item : The 10th Five Years Chinese National Programs for Science and Technology Development (2004BA519A07)

* Corresponding author. Tel 86-27-87282608, Fax 86-27-87281795, E-mail : hzavet@public.wh.hb.cn

Received date 2005-03-30