

研究报告

## 应用跨膜区置换的血凝素蛋白建立 H7N9 禽流感病毒抗体 间接 ELISA 检测方法

王洋 吴芷慧 薛春宜 曹永长\*

(中山大学生命科学学院 有害生物控制与资源利用国家重点实验室 广东 广州 510006)

**摘要:**【目的】由于 H7N9 禽流感病毒能够感染鸡, 并且已经变异成了高致病性毒株, 因此, 鸡群中 H7N9 禽流感疫苗的免疫是一个趋势, 而鸡群免疫后抗体检测方法的建立也十分必要。本研究旨在建立一种灵敏、高效、高通量的鸡群 H7N9 亚型禽流感病毒抗体间接酶联免疫吸附试验(ELISA)检测方法。【方法】通过昆虫杆状病毒表达系统分别表达属于 W1、W2-A 和 W2-B 分支 H7N9 流感病毒的 3 种野生型血凝素(HA)蛋白, 以及跨膜区(TM)置换为 H3 HA TM 的 W2-B 分支 HA 蛋白(H7-53TM)。4 种 HA 蛋白经过离子交换层析纯化后作为抗原, 通过 ELISA 检测 H7N9 禽流感病毒抗体。【结果】ELISA 特异性、敏感性和重复性试验结果显示, 跨膜区置换主要影响 HA 蛋白 ELISA 检测的重复性, 以 H7-53TM 为抗原的 ELISA 方法具有较好的重复性, 其批内和批间变异系数小于 10%, 然而 3 种野生型 HA 蛋白与部分血清反应批内和批间变异系数大于 10%, 重复性较差, 因此选择 H7-53TM 蛋白作为 ELISA 包被抗原。通过受试者工作特征曲线(ROC 曲线)分析, 以 H7-53TM 为抗原的 ELISA 能够精准地区分 H7N9 亚型流感病毒抗体阳性和阴性血清。通过相关性分析, 该 ELISA 方法与 134 份鸡血清 HI 试验结果具有显著强相关性( $r=0.8546$ ,  $P<0.0001$ ), 并且与 3 个分支疫苗株免疫血清的 HI 试验结果也具有显著相关性( $r>0.5$ ,  $P<0.05$ )。【结论】跨膜区置换能够提高 HA 蛋白抗原检测 H7N9 禽流感病毒抗体的重复性, 并应用跨膜区置换的 HA 蛋白建立了一种能够检测不同分支疫苗株免疫的 H7N9 亚型禽流感病毒抗体间接 ELISA 检测方法。

**关键词:** 流感病毒, H7N9 亚型, 间接 ELISA, 血凝素蛋白, 跨膜区

**Foundation item:** Guangzhou Science and Technology Plan (No. 201504010025); H7N9 Avian Influenza Joint Research of Guangdong Province (No. [2014]380)

\*Corresponding author: Tel: 86-20-39332938; E-mail: caoych@mail.sysu.edu.cn

Received: April 28, 2017; Accepted: September 04, 2017; Published online (www.cnki.net): September 07, 2017

基金项目: 广州市科技计划项目(No. 201504010025); 广东省农业厅 H7N9 流感联合攻关项目(粤财农[2014]380 号)

\*通讯作者: Tel: 86-20-39332938; E-mail: caoych@mail.sysu.edu.cn

收稿日期: 2017-04-28; 接受日期: 2017-09-04; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-09-07

## Establishment of an indirect ELISA for detecting H7N9 subtype avian influenza virus antibodies applied with hemagglutinin containing a replaced transmembrane domain

WANG Yang WU Zhi-Hui XUE Chun-Yi CAO Yong-Chang\*

(State Key Laboratory of Biocontrol, School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

**Abstract:** [Objective] H7N9 avian influenza virus can infect chickens, and high pathogenic avian influenza (HPAI) H7N9 strains have appeared after natural mutation. Thus, H7N9 vaccines immunization in chickens would be a tendency, and developing an antibody detection method for immunization is a need. The present article is aimed at establishing a sensitive, rapid, high-throughput enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect H7N9 subtype avian influenza virus antibodies in chickens. [Methods] Three wild-type hemagglutinin (HA) proteins belonging to W1, W2-A and W2-B clades were expressed by an insect cell-baculovirus expression system, and one recombinant HA (H7-53TM) containing a replaced H3 HA transmembrane domain (TM) was expressed as well. Four HA proteins were purified by ion-exchange chromatography and used as ELISA antigens to detect H7N9 avian influenza virus antibodies. [Results] The results of specificity, sensitivity and repeatability assays showed TM replacement mainly affected the repeatability of the HA antigen. The intra- and inter-coefficient of variables of H7-53TM were less than 10%, showing better repeatability; whereas those of 3 wild-type HA proteins were more than 10%, showing worse repeatability. Therefore, H7-53TM was chosen as ELISA antigen. The results of the Receiver operating characteristic curve (ROC curve) analysis showed that the established ELISA could accurately discriminate between H7N9 subtype avian influenza virus-positive and -negative serum specimens. Based on correlation, the established ELISA had significantly strong correlation with HI assay to test 134 chicken serum specimens ( $r=0.8546$ ,  $P<0.0001$ ), and the established ELISA had significantly correlation with HI assay to test sera collected from chickens vaccinated with vaccine strains belonging to three different clades ( $r>0.5$ ,  $P<0.05$ ). [Conclusion] The present study suggests TM replacement can increase the repeatability of the HA protein to detect H7N9 avian influenza virus antibodies, and establishes an indirect ELISA for detecting specific antibodies against H7N9 subtype avian influenza viruses belonging to different clades applied with HA containing a replaced transmembrane domain.

**Keywords:** Influenza virus, H7N9 subtype, Indirect ELISA, Hemagglutinin, Transmembrane domain

2013年3月,我国首次报道了人感染H7N9流感病毒的病例<sup>[1]</sup>,之后H7N9流感病毒在我国反复流行,至今已发生了5次流行<sup>[2]</sup>。H7N9流感病毒在鸡群中表现为低致病性,但2017年初广东省疾病预防控制中心报道:新分离的H7N9流感病毒毒株血凝素(Hemagglutinin, HA)蛋白的裂解位点具有多个碱性氨基酸的插入,暗示已经出现了高致病性H7N9禽流感病毒毒株<sup>[3]</sup>。疫苗是禽流感病毒防控的主要手段之一,并且研究表明H7亚型

禽流感病毒灭活疫苗<sup>[4-5]</sup>和H7N9病毒样颗粒(VLP)疫苗<sup>[6]</sup>等对鸡群具有良好的免疫原性,因此对鸡群进行H7N9禽流感疫苗的免疫是一个趋势。然而鸡群在疫苗免疫后,需要一种可靠的抗体检测方法。

目前禽流感病毒抗体检测的常用方法主要包括血凝抑制(HI)试验和酶联免疫吸附试验(ELISA)<sup>[7]</sup>。HI试验检测对象为阻断HA蛋白与受体结合的功能性抗体,而基于HA蛋白的间接

ELISA 可以检测所有结合 HA 蛋白的抗体, 在保留亚型特异性的同时具有更高的灵敏性<sup>[8]</sup>。ELISA 具有简便、高效、可用于高通量检测和结果判定客观的优点<sup>[9]</sup>, 因此本研究旨在提供一种基于 HA 蛋白的 H7N9 亚型禽流感病毒抗体间接 ELISA 检测方法。

H7N9 HA 蛋白在流行过程中发生了迅速变异, 形成了长江三角洲系(Yangtze River Delta, YRD)和珠江三角洲系(Pearl River Delta, PRD)两个系(Lineage)<sup>[3]</sup>, 这两个系又可以进一步分为至少 6 个分支(Clade), 包括 W1、W2-A、W2-B、W2-C、W3-A 和 W3-B 分支<sup>[10-11]</sup>。为了建立检测多个分支 HA 蛋白抗体的 ELISA 检测方法, 我们分别表达和纯化了属于 W1、W2-A 和 W2-B 3 个分支的 3 个 H7N9 毒株全长 HA 蛋白作为 ELISA 抗原。我们之前的研究显示跨膜区 (Transmembrane domain, TM) 替换为 H3 HA TM 的 H7-53TM 蛋白 (W2-B 分支) 具有更好的稳定性, 因此同时表达、纯化了 H7-53TM 作为抗原, 比较跨膜区置换对 HA 蛋白检测 H7N9 禽流感病毒抗体的影响, 并建立一种可靠的 H7N9 亚型禽流感病毒抗体间接 ELISA 检测方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 毒株和基因片段

H7N9 流感病毒毒株 A/Chicken/Guangdong/53/2014(H7N9) (H7N9-53)、A/Hangzhou/1/2013(H7N9) (H7N9-HZ13) 和 A/Chicken/Guangdong/MCX/2014(H7N9) (H7N9-MCX) 的 HA 基因: H7-53WT (GenBank 登录号: KY221841)、H7-HZ13 (GenBank 登录号: KC853766.1) 和 H7-MCX (GenBank 登录号: KY221844) 分别由 Thermo Fisher Scientific 公司或华大基因公司合成, 同时合成来源自 H7-53WT 基因、跨膜区置换为 H3 HA TM 的 H7-53TM 基因片段。内部基因来源于 A/Puerto Rico/8/34(H1N1), NA 基因来源于 H7N9-53 毒株, HA 基因分别来源于 H7N9-53、H7N9-HZ13 和

H7N9-MCX 的重组 H7N9 流感病毒 rH7N9-53WT、rH7N9-HZ13 和 rH7N9-MCX, 由本实验室制备并保存<sup>[12]</sup>。

### 1.2 主要试剂和仪器

Sf9 昆虫细胞、pFastBac1 质粒由本实验室保存; 大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、DH10Bac 感受态由本实验室制备并保存; H1N1 流感病毒、H5N1 禽流感病毒、H9N2 禽流感病毒、禽传染性支气管炎病毒 (IBV)、新城疫病毒 (NDV) 单因子阳性 SPF 鸡血清由实验室制备并保存。Sf900II 无血清培养基购自 Thermo Fisher Scientific 公司; H7N9 亚型流感病毒 HA 蛋白兔 IgG 单克隆抗体购自义翘神州公司; HRP (辣根过氧化物酶) 标记羊抗兔 IgG(H+L)、HRP 标记驴抗鸡 IgY(H+L) 以及 Cy3 标记的羊抗兔 IgG(H+L) 购自 Proteintech 公司; H7N9 禽流感病毒 HI 抗原购自哈尔滨维科公司。

激光共聚焦显微镜 (Leica TCS-SP5), 德国徕卡显微系统有限公司; 流式细胞仪 (FACSCalibur), BD Biosciences 公司; 全自动酶标仪 (ELx800), BioTek 公司。

### 1.3 重组质粒和重组杆状病毒的构建

**1.3.1 重组质粒的构建:** 以 1.1 中合成的 4 个基因片段为模板, 通过 PCR 扩增出相应的 HA 基因, 并分别插入 pFastBac1 质粒中<sup>[12]</sup>。所构建的重组质粒通过双酶切和测序进行鉴定。

**1.3.2 重组杆状病毒的构建:** 分别将 4 个重组质粒转化至含有杆状病毒基因组转座子 (Bacmid) 的大肠杆菌 DH10Bac, 含有 HA 基因的重组转座子 (rBacmid) 通过 M13 引物进行 PCR 鉴定。将鉴定正确的 rBacmid 转染至 Sf9 细胞, 28 $\pm$ 2 °C 培养 72 h 后收集 (4 °C、3 000 $\times$ g 离心 5 min) 转染上清, 即为重组杆状病毒 (rBV) 种毒。

### 1.4 蛋白表达、纯化与检测

**1.4.1 蛋白表达与纯化:** 分别将含有 4 个 HA 基因的重组杆状病毒以感染复数 (MOI) 为 1 感染 Sf9 细胞, 感染 65 h 后收集 (室温 500 $\times$ g 离心 5 min) 细胞

进行表达的检测或者进行蛋白纯化。所表达的 4 种 HA 蛋白通过离子交换层析方法进行纯化<sup>[13]</sup>, 纯化的 HA 蛋白用于间接 ELISA 包被抗原。

**1.4.2 SDS-PAGE 与 Western blot:** 取细胞裂解液或者纯化的蛋白通过 10% 的聚丙烯酰胺凝胶进行 SDS-PAGE 电泳。将电泳分离后的凝胶转印至 PVDF 膜, PVDF 膜经过封闭后, 分别以 H7N9 HA 单抗为一抗、HRP 标记的羊抗兔 IgG 为二抗进行孵育, 最后通过 ECL 进行显色。

**1.4.3 间接免疫荧光(IFA):** 分别将感染 4 种 rBV 或野生杆状病毒(wt-BV)的 Sf9 细胞进行固定后, 用 3% 牛血清白蛋白(BSA)封闭, 以 H7N9 HA 单抗为一抗、Cy3 标记的羊抗兔 IgG 为二抗标记 HA 蛋白, 用 DAPI 染核, 通过激光共聚焦显微镜进行观察和拍摄。

**1.4.4 流式细胞术:** rBV 或 wt-BV 感染的悬浮 Sf9 细胞, 用 70% 乙醇固定, 以 H7N9 HA 单抗为一抗、Cy3 标记的羊抗兔 IgG 为二抗标记 HA 蛋白后通过流式细胞仪进行分析。

## 1.5 SPF 鸡血清的收集

分别将重组 H7N9 流感病毒 rH7N9-53WT、rH7N9-MCX、rH7N9-HZ13 制备的全病毒灭活疫苗免疫 SPF 鸡, 以 PBS 免疫的 SPF 鸡为阴性对照。分别在 2 周龄进行首次免疫, 首次免疫后 2 周用相同的疫苗进行加强免疫, 加强免疫后 2 周进行第三次免疫, 首次免疫前和每次免疫后对鸡进行翅静脉采血并分离血清, 并通过 HI 试验确定每份血清的 HI 滴度。共收集 H7N9 阳性鸡血清 90 份, H7N9 阴性鸡血清 44 份。

## 1.6 血凝抑制(HI)试验

将 H7N9 禽流感病毒 HI 抗原制备为 4 单位抗原, 同时制备 1% 鸡红细胞。HI 试验按照《兽药典》中的方法进行。

## 1.7 间接 ELISA 反应条件的确定

通过棋盘法确定间接 ELISA 的血清样品稀释度、抗原包被浓度和酶标驴抗鸡 IgY 二抗的稀释

度。用 ELISA 方法对 44 份 H7N9 阴性鸡血清进行检测, 计算 Cutoff 值, Cutoff 值计算方法为阴性血清平均  $OD_{450}$  值( $\bar{x}$ )+3×标准差( $s$ )。

## 1.8 特异性试验

分别将 4 种 HA 蛋白为包被抗原的 ELISA 方法对 H1N1、H5N1、H9N2 流感病毒、IBV、NDV 单因子阳性 SPF 鸡血清进行检测, 同时以 H7N9 阳性鸡血清作为阳性对照, 将得到的  $OD_{450}$  值与 Cutoff 值进行比较确定 ELISA 方法的特异性。

## 1.9 敏感性试验

分别取 rH7N9-53WT、rH7N9-HZ13 和 rH7N9-MCX 灭活疫苗免疫的阳性鸡血清进行梯度稀释, 以 ELISA 结果  $OD_{450}$  值小于 Cutoff 值时的血清稀释度为 ELISA 滴度, 并与 HI 滴度进行比较。

## 1.10 重复性试验

取 H7N9 阳性鸡血清和阴性鸡血清各 3 份, 按建立的间接 ELISA 方法对 3 个批次蛋白进行 3 次检测, 计算批内、批间变异系数。

## 1.11 ELISA 检测方法的统计学分析

通过间接 ELISA 方法对 44 份阴性血清和 90 份 H7N9 禽流感病毒阳性鸡血清进行检测。检测结果通过 GraphPad Prism 6 软件受试者工作特征曲线(Receiver operating characteristic curve, ROC 曲线)分析方法对间接 ELISA 方法进行可靠性分析<sup>[14]</sup>。根据 ROC 曲线分析得到的特异性和敏感度值, 取两者之和最大时的 Cutoff 值作为优化 Cutoff 值, 进而优化 ELISA 方法的准确性<sup>[15]</sup>。通过 Spearman's 等级相关方法对 ELISA 与 HI 试验的相关性进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 H7N9 流感病毒 HA 蛋白的表达和纯化

**2.1.1 重组杆状病毒的构建:** HA 基因 H7-53WT、H7-HZ13 和 H7-MCX 分别属于 W2-B、W1 和 W2-A 分支<sup>[10]</sup>, 为了在昆虫细胞-杆状病毒表达系统中表达 HA 基因, 分别将其插入 pFastBac1 质粒中。我

们之前的实验结果显示跨膜区置换为 H3 HA TM 的 H7-53TM 具有更好的稳定性, 为了比较其与 H7-53WT 作为间接 ELISA 包被抗原是否具有差异, 同时将 H7-53TM 基因插入 pFastBac1 质粒中。4 个重组质粒双酶切和测序鉴定结果符合预期, 表明重组质粒均构建成功。之后通过 1.3.2 中的方法构建重组杆状病毒(rBV), 通过 PCR 检测, 结果符合预期, 因此插入 4 种 HA 基因的 rBV 分别构建成功。

**2.1.2 HA 蛋白的表达:** 将分别插入 H7-53WT、H7-53TM、H7-HZ13 和 H7-MCX 基因的 rBV 感染 Sf9 细胞后检测 HA 蛋白在细胞中的表达。Western blot 结果显示 4 种 HA 蛋白均能够表达, 并且分子量大小相近, 略小于 70 kD (图 1)。IFA 结果显示 4 种 HA 蛋白均定位于 Sf9 细胞膜上(图 2A)。流式细胞技术检测结果显示, rBV 感染的 Sf9 细胞(红色曲线)中表达 4 种 HA 蛋白的比例均在 95.67%–95.81% 之间(图 2B)。

**2.1.3 HA 蛋白的纯化:** 将 Sf9 细胞表达的 HA 蛋白经过离子交换层析方法进行纯化, 纯化的 HA 蛋白进行 SDS-PAGE 检测, 结果显示 4 种 HA 蛋白纯化后的纯度相当, 可以达到约 90% (图 3)。

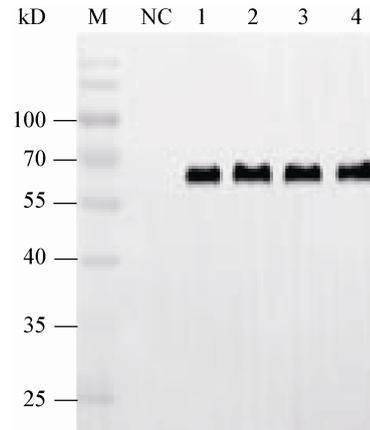


图 1 HA 蛋白的 Western blot 检测

**Figure 1 Western blot analysis of HA protein expression**

注: M: 蛋白 Marker; NC: 感染 wt-BV 的 Sf9 细胞; 1: H7-53WT; 2: H7-53TM; 3: H7-HZ13; 4: H7-MCX.

Note: M: Protein marker; NC: Sf9 cells infected with wt-BV; 1: H7-53WT; 2: H7-53TM; 3: H7-HZ13; 4: H7-MCX.

**2.2 4 种 HA 蛋白作为 ELISA 抗原的比较**

**2.2.1 间接 ELISA 反应条件的确定:** 以 4 种 HA 蛋白为抗原通过棋盘法间接 ELISA 检测, 结果显示 4 种 H7 HA 蛋白的最佳包被浓度均为 90 ng/孔, 最佳鸡血清稀释度均为 1:200, 抗鸡 IgY 二抗最佳稀释度均为 1:5 000。根据 44 份阴性血清确定

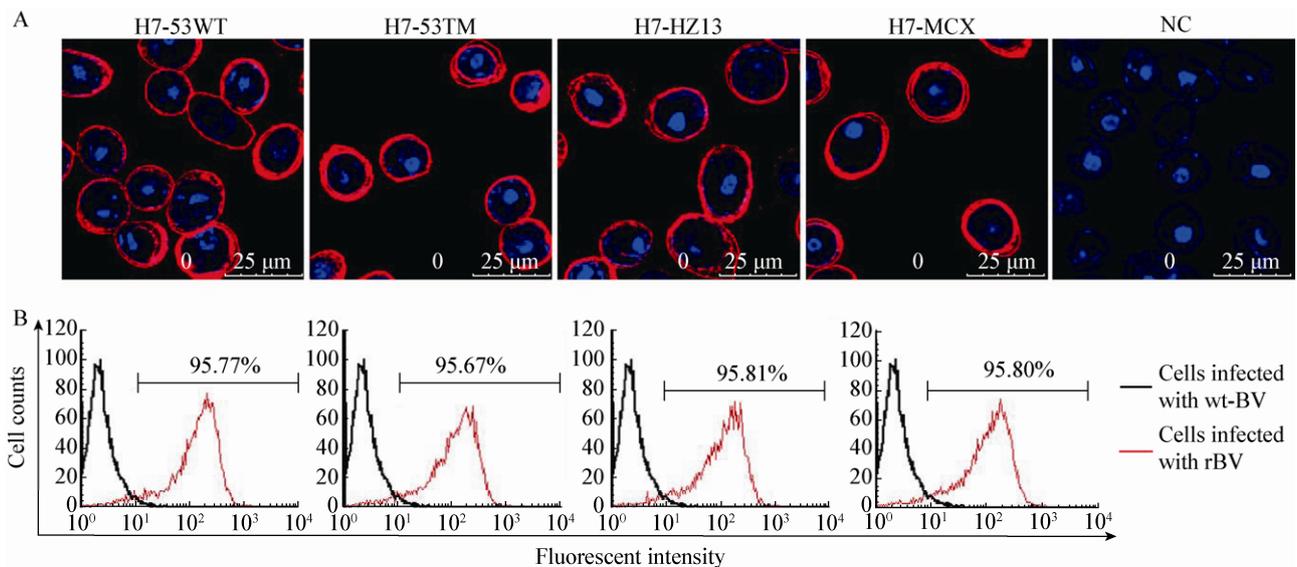


图 2 HA 蛋白的 IFA (A)和流式检测(B)

**Figure 2 Detection of HA protein expression by IFA (A) and flow cytometry (B)**

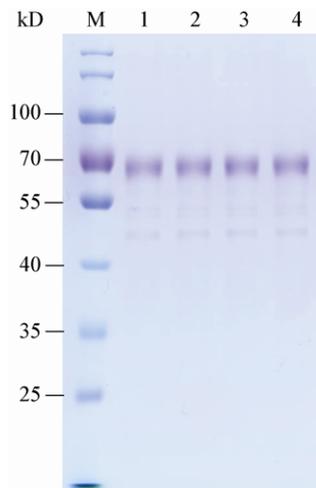


图3 纯化 HA 蛋白的 SDS-PAGE 检测

**Figure 3 Analysis of purified HA proteins by SDS-PAGE**

注: M: 蛋白 Marker; 1: H7-53WT; 2: H7-53TM; 3: H7-HZ13; 4: H7-MCX.

Note: M: Protein marker; 1: H7-53WT; 2: H7-53TM; 3: H7-HZ13; 4: H7-MCX.

H7-53WT、H7-53TM、H7-HZ13 和 H7-MCX 蛋白为抗原的 Cutoff 值分别为 0.256 7、0.273 1、0.268 1 和 0.274 5, 均在 0.25–0.28 之间。

**2.2.2 特异性试验:** 特异性试验结果显示: H7-53WT、H7-53TM 和 H7-MCX 为包被抗原对 H1N1、H5N1、H9N2 流感病毒、IBV 和 NDV 阳性鸡血清 ELISA 检测的  $OD_{450}$  值小于 Cutoff 值, 具有良好的特异性; 但是以 H7-HZ13 (W1 分支) 为包被抗原对 H1N1 和 H5N1 流感病毒阳性鸡血清 ELISA 反应结果高于 Cutoff 值, 表现为假阳性, 其特异性较差(表 1)。

**2.2.3 敏感性试验:** 敏感性试验结果显示, 4 种 HA

蛋白作为抗原检测 W1、W2-A 和 W2-B 分支灭活病毒疫苗产生的血清具有相同的敏感性(表 2)。

**2.2.4 重复性试验:** 以 3 个批次制备的 4 种 HA 蛋白作为抗原分别对 3 份 H7N9 阳性血清和 3 份阴性血清进行重复性试验, 结果显示: H7-53TM 作为抗原, 批内变异系数(CV)为 0.6%–6.3%, 批间变异系数为 4.1%–6.7%, 均小于 10%, 重复性良好。但是 3 种野生型 HA 蛋白对部分血清检测的变异系数超过 10%, 其重复性较差。其中, H7-53WT 作为抗原, 批内变异系数为 1.5%–16.6%, 批间变异系数为 1.7%–16.0%; H7-HZ13 作为抗原, 批内变异系数为 0.7%–25.5%, 批间变异系数为 2.7%–9.1%; H7-MCX 作为抗原, 批内变异系数为 0.9%–16.5%, 批间变异系数为 3.3%–7.8%。

**2.3 以 H7-53TM 为抗原的间接 ELISA 方法**

**2.3.1 ROC 曲线分析:** 4 种 HA 蛋白中, H7-53TM 作为抗原具有最好的特异性和重复性, 因此 H7-53TM 最适合作为 H7N9 亚型禽流感病毒抗体间接 ELISA 检测方法抗原。以 H7-53TM 为抗原对 134 份鸡血清进行检测, 通过 ROC 曲线分析该检测方法的鉴别能力。结果显示, 该检测方法的线下面积(Area under curve, AUC)为  $1.0 \pm 0.0$  ( $P < 0.000 1$ ), 这表示该检测方法具有极高的鉴别能力(图 4A)。当 Cutoff 值为 0.273 1 时, 可以精准区分阴性和阳性的鸡血清(图 4B)。

**2.3.2 ELISA 方法与 HI 试验相关性:** 134 份血清 HI 滴度与以 H7-53TM 为抗原的 ELISA 结果的相关性分析结果显示, 其相关系数为 0.854 6,  $P < 0.000 1$ , 为显著强相关(图 5A)。线性回归方程为:

表 1 特异性试验结果

Table 1 Results of specificity test

抗原 Antigen	NDV ( $OD_{450}$ )	IBV ( $OD_{450}$ )	H1N1 ( $OD_{450}$ )	H5N1 ( $OD_{450}$ )	H9N2 ( $OD_{450}$ )	H7N9 ( $OD_{450}$ )
H7-53WT	0.076	0.134	0.139	0.247	0.218	1.800
H7-53TM	0.062	0.145	0.122	0.193	0.153	1.995
H7-HZ13	0.123	0.151	0.332*	0.499*	0.160	2.068
H7-MCX	1.150	0.154	0.111	0.180	0.148	1.963

注: \*: 假阳性。

Note: \*: False positive.

表 2 敏感性试验结果			
Table 2 Results of sensitivity test			
抗原 Antigen	H7N9 流感病毒阳性血清 Positive serum of H7N9 influenza virus		
	1	2	3
H7-53WT	729 000	2 187 000	2 187 000
H7-53TM	729 000	2 187 000	2 187 000
H7-HZ13	729 000	2 187 000	2 187 000
H7-MCX	729 000	2 187 000	2 187 000

注：1、2 和 3 分别代表免疫 rH7N9-53WT、rH7N9-HZ13 和 rH7N9-MCX 灭活疫苗的鸡血清。

Note: 1, 2 and 3 represent sera collected from chickens vaccinated with rH7N9-53WT, rH7N9-HZ13 and rH7N9-MCX respectively.

$Y=5.7937X-1.8940$  ( $X$  为  $OD_{450}$  值,  $Y$  为 HI 滴度), 拟合度为 0.864 3,  $P<0.0001$ 。为了评价研究建立的 ELISA 方法能否同时检测不同分支疫苗株免疫产生的抗体, 分别对不同分支疫苗株免疫的血清 HI 滴度与 ELISA 结果的相关性进行了分析, 相关性系数分别为 0.822 9 (rH7N9-53WT,  $P<0.0001$ )、0.517 0 (rH7N9-HZ13,  $P=0.0034$ ) 和 0.540 3 (rH7N9-MCX,  $P=0.0021$ ), 表明建立的 ELISA 方法与 W2-B、W1 和 W2-A 分支疫苗株免疫血清 HI 滴度具有显著相关性(图 5B-D)。

**2.3.3 弱阳性样品 ELISA 方法可靠性:** 由于所收集的阳性血清(除 3 份以外) HI 抗体滴度均大于等于  $2^5$ , 为了分析建立的 ELISA 方法对于弱阳性样品是否同样具有良好的鉴别能力, 随机选取 17 份阳性血清样品进行梯度稀释, 将稀释后 HI 滴度为  $2^5-2^1$  以及恰好检测不到的稀释血清样品采用 ELISA 方法进行检测, 并通过 ROC 曲线分析其鉴别能力。ROC 分析结果显示, 该 ELISA 方法 AUC 为  $0.96\pm 0.02$  ( $P<0.0001$ ), 具有较好的鉴别能力(图 6A)。根据 1.11 中的方法, 该 ROC 曲线也可以用于优化 Cutoff 值。当 Cutoff 值取值为 0.527 5 时, 该 ELISA 方法的特异性为 97.7%, 敏感性为 82.4%, 两者之和达到最大, 同时具备高特异性和高敏感性的特性, 能够准确区分 HI 阴性血清和弱阳性血清, 因此将 Cutoff 值调整为 0.527 5 (图 6B)。

### 3 讨论

H7N9 亚型禽流感病毒血清学检测对于鸡群 H7N9 亚型禽流感病毒的感染情况和免疫水平的监测具有重要意义。目前, H7 亚型禽流感病毒血清学检测方法主要采用 HI 试验<sup>[16]</sup>, 而 ELISA 方法具有更加高效、简便、高通量等优点, 并且待检

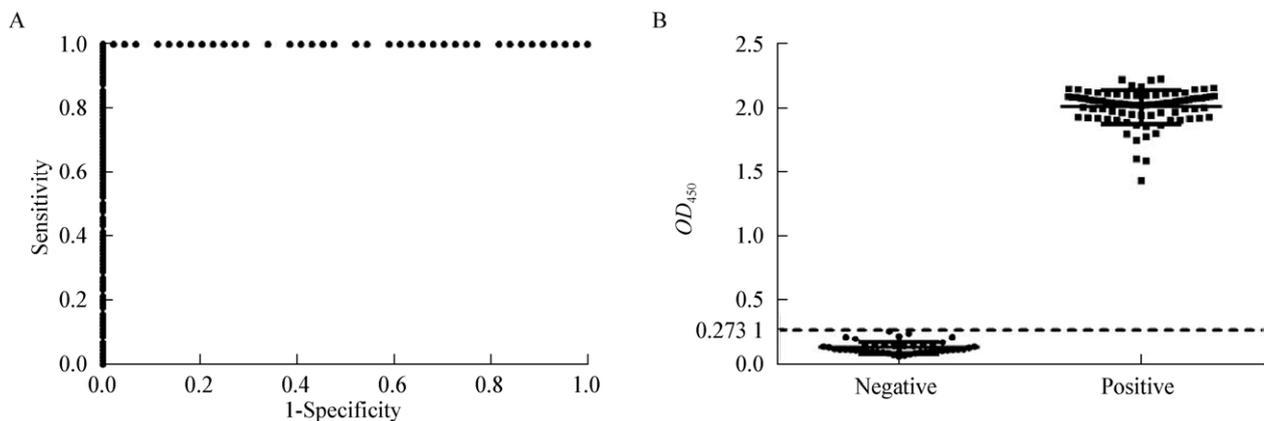


图 4 应用 H7-53TM 蛋白 ELISA 检测 134 份鸡血清

Figure 4 Detection of 134 chicken serum specimens by ELISA using recombinant H7-53TM protein

注: A: ELISA 的 ROC 曲线分析; B: 鸡血清的  $OD_{450}$  值。

Note: A: ROC curve analysis of the ELISA; B:  $OD_{450}$  values of chicken sera.

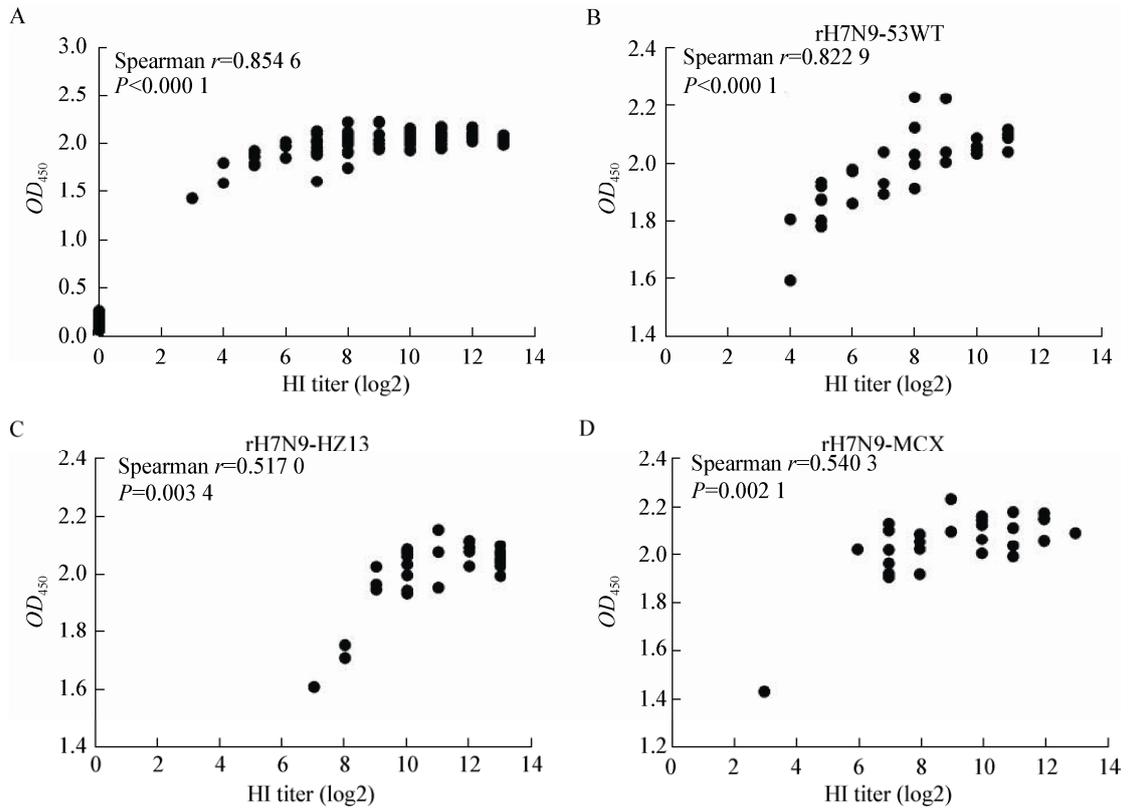


图 5 ELISA 与 HI 相关性分析

Figure 5 Analysis of correlation between ELISA and HI assay

注: A: 134 份鸡血清 ELISA 结果和 HI 试验结果的相关性分析; B-D: 分别为 rH7N9-53WT、rH7N9-HZ13 和 rH7N9-MCX 免疫鸡血清 ELISA 结果和 HI 试验结果的相关性分析。

Note: A: Correlation between ELISA and HI assay of chicken sera (n=134); B-D: Correlation between ELISA and HI assay of sera collected from chickens vaccinated with rH7N9-53WT, rH7N9-HZ13 and rH7N9-MCX, respectively.

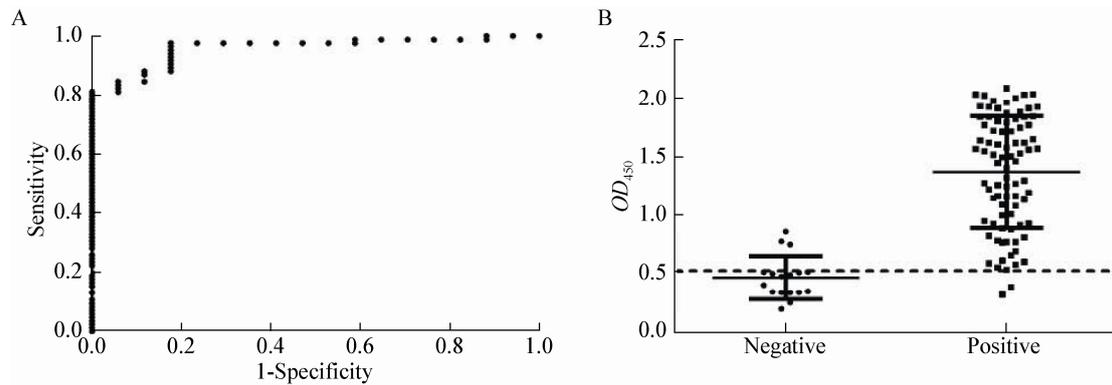


图 6 弱阳性样品 ELISA 检测结果

Figure 6 Detection of weakly positive serum specimens by ELISA

注: A: ELISA 的 ROC 曲线分析; B: 梯度稀释的血清样品的  $OD_{450}$  值。

Note: A: ROC curve analysis of the ELISA; B:  $OD_{450}$  values of gradient diluted serum sample.

血清不需要进行前处理, 因此更加适合现地检测。已报道的 H7 亚型 HA 抗体 ELISA 检测方法主要为竞争 ELISA。Sala 等<sup>[17]</sup>、Yang 等<sup>[18]</sup>和 Jensen 等<sup>[19]</sup>以灭活的 H7N1 亚型流感病毒为抗原, 通过检测待检血清抑制 H7 HA 蛋白单抗与抗原的反应来评价血清中 H7 抗体的含量。为了避免灭活病毒为抗原的竞争 ELISA 受到待检血清中 NA 蛋白抗体的干扰, Shien 等<sup>[20]</sup>和 He 等<sup>[21]</sup>分别以大肠杆菌表达和杆状病毒表面展示的 H7 HA 蛋白为抗原建立了竞争 ELISA 方法。这些竞争 ELISA 方法具有特异性高和能够检测多物种血清的优点, 但是还存在一些缺点, 例如: (1) 由于单抗特异识别 HA 蛋白的表位, 竞争 ELISA 方法不能检测所有 H7 亚型的抗体; (2) 当抗原为灭活病毒时, 血清中 NA 蛋白抗体会影响竞争 ELISA 的特异性; (3) 竞争 ELISA 的敏感度较低, Shien 等<sup>[20]</sup>建立的竞争 ELISA 在检测 HI 滴度为  $2^6$  和  $2^5$  的血清时, 敏感性仅有 33% 和 20%。间接 ELISA 方法具有特异性高、灵敏度好的优点, 因此本研究建立了一种基于 H7N9 流感病毒 HA 蛋白的间接 ELISA 方法, 对鸡血清中 H7 亚型 HA 抗体进行检测。

前期研究表明昆虫细胞表达的 HA 蛋白具有良好的抗原性, 其作为抗原的间接 ELISA 检测具有良好的特异性、敏感性和重复性<sup>[22]</sup>。因此本研究通过昆虫细胞-杆状病毒表达系统表达了不同分支的 4 种 H7N9 流感病毒 HA 蛋白, 其表达水平没有明显差异, 所表达的蛋白进一步通过离子交换层析的方法进行纯化。由于 4 种 HA 蛋白具有相同的等电点, 因此其纯化效果相似, 终产物的纯度保持一致。然而以 4 种 HA 蛋白为抗原的 ELISA 检测方法表现出不同的特异性和重复性, 跨膜区置换为 H3 HA TM 的 H7-53TM 作为抗原的 ELISA 方法不仅特异性良好, 并且具有最好的重复性, 批内和批间变异系数小于 10%, 而 3 种野生型 HA 蛋白作为抗原检测部分 H7N9 阳性或阴性血清批内和(或)批间变异系数大于 10%, 并且 H7-HZ13 作为抗原特异性较差。我们之前的研究证明 H7-53TM 蛋白

相比于 H7-53WT 具有更高的二硫键连接的三聚体和更高的热稳定性<sup>[12]</sup>, 这可能是跨膜区置换影响 HA 蛋白抗原 ELISA 重复性的原因。

进一步通过 ROC 曲线对以 H7-53TM 为抗原的 ELISA 方法的鉴别能力进行分析, 发现其能够精准地区分 H7N9 亚型禽流感病毒抗体阳性和阴性血清(图 5)。对于 HI 滴度  $<2^5$  的弱阳性鸡血清, ROC 曲线分析结果显示该 ELISA 具有良好的可靠性, 可以准确区分弱阳性血清和阴性血清。通过弱阳性血清 ELISA 结果的 ROC 曲线, 我们进一步将 Cutoff 值确定在 0.527 5, 以提高该 ELISA 方法的准确性。与 HI 试验进行比较发现, 以 H7-53TM 为抗原的 ELISA 方法与 HI 试验具有显著强相关性, 并且所得到的线性回归方程拟合度较好, 可以通过 ELISA 结果估算 HI 抗体滴度。Lam 等研究表明 H7N9 流感病毒在流行过程中变异形成了不同的 HA 分支<sup>[10]</sup>, 并且 H7N9 流感病毒正在持续不断地变异。我们相信 H7 亚型禽流感疫苗在使用后会像其他亚型禽流感疫苗一样, 需要根据流行情况周期性地更换疫苗株。然而本研究建立的 ELISA 方法与 W1、W2-A 和 W2-B 分支疫苗株血清 HI 滴度都具有显著相关性, 能够同时检测不同分支疫苗株免疫产生的 HA 抗体, 这提示该 ELISA 方法能够满足不同 H7N9 亚型禽流感疫苗株免疫水平的检测要求, 不需要频繁更换检测抗原。

综上所述, 跨膜区置换的 H7-53TM 蛋白检测 H7N9 禽流感病毒抗体具有更好的重复性, 以 H7-53TM HA 蛋白为抗原的间接 ELISA 检测方法能够精准区分 H7N9 亚型禽流感病毒阳性和阴性血清, 检测结果与 HI 试验结果具有强相关性, 为 H7N9 亚型禽流感病毒抗体的检测提供了一种适用于实验室和现地的灵敏、便捷的检测方法。

## 参 考 文 献

- [1] Gao RB, Cao B, Hu YW, et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2013, 368(20): 1888-1897
- [2] Zhou L, Ren RQ, Yang L, et al. Sudden increase in human infection with avian influenza A (H7N9) virus in China,

- September-December 2016[J]. *Western Pacific Surveillance and Response Journal*, 2017, 8(1): 6-14
- [3] World Health Organization. Antigenic and genetic characteristics of zoonotic influenza viruses and development of candidate vaccine viruses for pandemic preparedness[EB/OL]. (2017-03-02). [http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/201703\\_zoonotic\\_vaccinevirusupdate.pdf?ua=1](http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/201703_zoonotic_vaccinevirusupdate.pdf?ua=1) (2017-04-28)
- [4] Sakabe S, Sakoda Y, Haraguchi Y, et al. A vaccine prepared from a non-pathogenic H7N7 virus isolated from natural reservoir conferred protective immunity against the challenge with lethal dose of highly pathogenic avian influenza virus in chickens[J]. *Vaccine*, 2008, 26(17): 2127-2134
- [5] Abbas MA, Spackman E, Fouchier R, et al. H7 avian influenza virus vaccines protect chickens against challenge with antigenically diverse isolates[J]. *Vaccine*, 2011, 29(43): 7424-7429
- [6] Hu CMJ, Chien CY, Liu MT, et al. Multi-antigen avian influenza A (H7N9) virus-like particles: particulate characterizations and immunogenicity evaluation in murine and avian models[J]. *BMC Biotechnology*, 2017, 17: 2
- [7] Charlton B, Crossley B, Hietala S. Conventional and future diagnostics for avian influenza[J]. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2009, 32(4): 341-350
- [8] Katz JM, Hancock K, Xu XY. Serologic assays for influenza surveillance, diagnosis and vaccine evaluation[J]. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 2011, 9(6): 669-683
- [9] Shiraishi R, Nishiguchi A, Tsukamoto K, et al. Comparison of commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits with agar gel precipitation and hemagglutination-inhibition tests for detecting antibodies to avian influenza viruses[J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2012, 74(9): 1217-1220
- [10] Lam TTY, Zhou BP, Wang J, et al. Dissemination, divergence and establishment of H7N9 influenza viruses in China[J]. *Nature*, 2015, 522(7554): 102-105
- [11] Xie SM, Jia WX, Lin YC, et al. Third wave of influenza A(H7N9) virus from poultry, Guangdong Province, China, 2014-2015[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2015, 21(9): 1657-1660
- [12] Wang Y, Wu JL, Xue CY, et al. A recombinant H7N9 influenza vaccine with the H7 hemagglutinin transmembrane domain replaced by the H3 domain induces increased cross-reactive antibodies and improved interclade protection in mice[J]. *Antiviral Research*, 2017, 143: 97-105
- [13] Wang Y, Zhang Y, Wu JL, et al. Recombinant influenza H7 hemagglutinin containing CFLC minidomain in the transmembrane domain showed enhanced cross-protection in mice[J]. *Virus Research*, 2017, 242: 16-23
- [14] Rodriguez A, Rodriguez PN. Understanding and predicting sovereign debt rescheduling: a comparison of the areas under receiver operating characteristic curves[J]. *Journal of Forecasting*, 2006, 25(7): 459-479
- [15] Schmitz A, Le Bras MO, Guillemoto C, et al. Evaluation of a commercial ELISA for H5 low pathogenic avian influenza virus antibody detection in duck sera using Bayesian methods[J]. *Journal of Virological Methods*, 2013, 193(1): 197-204
- [16] Lebarbenchon C, Brown JD, Luttrell MP, et al. Comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assays for detection of Influenza A virus antibodies[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2012, 24(1): 161-165
- [17] Sala G, Cordioli P, Moreno-Martin A, et al. ELISA test for the detection of influenza H7 antibodies in avian sera[J]. *Avian Diseases*, 2003, 47(3 Suppl): 1057-1059
- [18] Yang M, Clavijo A, Graham J, et al. Evaluation of diagnostic applications of monoclonal antibodies against avian influenza H7 viruses[J]. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2010, 17(9): 1398-1406
- [19] Jensen TH, Ajjouri G, Handberg KJ, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of avian influenza virus subtypes H5 and H7 antibodies[J]. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 2013, 55(1): 84
- [20] Shien JH, Fu LF, Wu JR, et al. Development of blocking ELISA for detection of antibodies against avian influenza virus of the H7 subtype[J]. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection*, 2008, 41(5): 369-376
- [21] He F, Prabakaran M, Tan YR, et al. Development of dual-function ELISA for effective antigen and antibody detection against H7 avian influenza virus[J]. *BMC Microbiology*, 2013, 13: 219
- [22] Yang Q, Xue CY, Zhu DZ, et al. Comparison of three methods for detection of antibodies to H1N1 swine influenza virus[J]. *Guangdong Journal of Animal and Veterinary Science*, 2014, 39(1): 16-20 (in Chinese)
- 杨倩, 薛春宜, 朱道中, 等. 三种抗原检测 H1N1 猪流感病毒抗体的比较[J]. *广东畜牧兽医科技*, 2014, 39(1): 16-20