

# 表达 H9 亚型禽流感病毒血凝素基因的 重组鸡痘病毒及其免疫效力\*

程 坚 刘秀梵\*\* 彭大新 刘红旗

(扬州大学畜禽传染病学农业部重点开放实验室 扬州 225009)

**摘 要:**以 RT-PCR 法扩增获得 H9 亚型禽流感病毒(AIV)分离株(A/Chicken/China/F/1998)的血凝素(HA)基因,将其定向插入鸡痘病毒转移载体 1175 的痘苗病毒启动子 P7.5 的下游,得到重组转移载体 1175HA。以脂质体转染法将 1175HA 转染至已感染鸡痘病毒 282E4 疫苗株(wt-FPV)的鸡胚成纤维细胞(CEF)中,通过在含 X-gal 的营养琼脂上连续挑选蓝色病毒蚀斑获得并纯化 rFPV-HA。以间接免疫荧光法证实感染 rFPV-HA 的 CEF 表达了 HA。rFPV-HA 在免疫 7 日龄 SPF 鸡 7 天后即能诱生可检出的血凝抑制(HI)抗体,14 天后诱生的 HI 抗体到达高峰,且诱生的 HI 抗体保持较高水平达 55 天。在 7 日龄 SPF 鸡及含抗 FPV 母源抗体的商品鸡上进行的免疫效力试验表明,rFPV-HV 能显著抑制静脉攻毒后免疫鸡从泄殖腔的排毒,效果与 AIV 全病毒灭活苗相当。

**关键词:** H9 亚型禽流感病毒,重组鸡痘病毒,血凝素

中图分类号 S852.65 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2002)04-0442-06

禽流感病毒(AIV)属正粘病毒科 A 型流感病毒属。根据 AIV 对禽类致病性的差异,可将 AIV 分为高致病性 AIV 和低致病性 AIV。高致病性 AIV 所导致的禽流感对养禽业具有毁灭性的打击,是国际兽疫局规定的 A 类疾病之一;低致病性 AIV 导致的禽流感对养禽业也有较大的危害性<sup>[1]</sup>。因此,综合采用各种手段,包括疫苗接种的手段来控制 H9 亚型禽流感的进一步蔓延和扩散就显得十分必要<sup>[2]</sup>。然而,目前在临床上较广泛使用的抗 H9 亚型禽流感全病毒灭活疫苗却存在着诸多缺陷,包括价格较高、使用不便和使用后产生的针对 AIV 血凝素(HA)和 NP 蛋白的抗体会干扰免疫监测和流行病学调查等<sup>[3]</sup>。为了克服灭活苗的这些缺陷,本研究以鸡痘病毒作为表达系统,构建了表达 H9N2 亚型 AIV 中国分离株 HA 基因的重组鸡痘病毒(rFPV-HA),并初步研究了其免疫效力,旨在为控制 H9 亚型禽流感在我国的发生和流行提供一种新型疫苗。

## 1 材料和方法

### 1.1 毒株及疫苗

H9 亚型禽流感病毒株 A/Chicken/China/F/1998,本室 1998 年从华东地区发病鸡群中分

\*“863”计划资助项目(2001AA213041)

\*\* 通讯作者:刘秀梵,教授,博士生导师。

作者简介:程 坚(1971-),男,江苏扬州人,博士,现为南京大学医药生物技术国家重点实验室博士后。

收稿日期 2001-09-03,修回日期 2001-12-03

离,经国家流感中心鉴定为 H9N2 亚型,简称 F 株 AIV。鸡痘病毒 282E4 疫苗株(wt-FPV)购自中国兽医药品监察所。A 型禽流感低致病性 H9 亚型病毒灭活疫苗(F 株)由本室研制和生产。

## 1.2 质粒和菌株

FPV 转移载体 1175,含痘苗病毒启动子 P7.5 和 P11,以及 FPV 复制非必需片段、筛选标记 *LacZ* 基因和多克隆酶切位点,由本室构建。TG1、pUC18 购自华美生物工程公司。

## 1.3 试剂

各种分子克隆用工具酶及试剂盒购自 Roche 公司。蛋白胨和酵母抽提物购自 OXOID 公司。细胞培养基及其它普通化学试剂购自 Sigma 公司。以 A 型禽流感低致病性 H9 亚型病毒灭活疫苗(F 株)免疫 SPF 鸡,获鸡抗 H9 亚型 AIV 多克隆血清,本室制备。

## 1.4 试验鸡和鸡胚

9~10 日龄 SPF 鸡胚及 1 日龄 SPF 雏鸡购自南京药械厂。1 日龄含抗 FPV 母源抗体的商品肉鸡由上海大江公司提供。

## 1.5 引物的设计与合成

根据本室前期研究结果<sup>[4]</sup>,设计引物 P1、P2 扩增 F 株 AIV HA 基因。P1 5'-CCCAAG CTTATG GAA ACA ATA TCA C-3',P2 5'-CCC GTC GAC GGA ACA AAG ATG A-3'。为便于 PCR 产物克隆,引物 P1、P2 前分别加 *Hind*Ⅲ 和 *Sal* I 酶切位点和三个保护性碱基。引物由宝生物大连有限公司合成。

## 1.6 HA 基因的 RT-PCR 扩增与克隆

以酚-SDS 法抽提的 F 株 AIV 基因组 RNA 为模板,以 P1 为反转录引物,P1、P2 作为 PCR 扩增引物,采用 RT-PCR 法扩增全长 HA 基因序列。纯化的 PCR 产物 *Hind*Ⅲ 和 *Sal* I 酶切后,与同时经 *Hind*Ⅲ 和 *Sal* I 酶切的质粒载体 pUC18 连接。以限制性内切酶法筛选出阳性重组质粒 pUCHA。

## 1.7 含 HA 基因的重组鸡痘病毒转移载体 1175HA 的构建

以 *Hind*Ⅲ 和 *Sal* I 酶切质粒 pUCHA,以低熔点琼脂糖凝胶电泳法纯化、回收 1.7kb 的 HA 基因片段。将该基因片段与经 *Hind*Ⅲ 和 *Sal* I 酶切的鸡痘病毒转移载体 1175 连接,以限制性内切酶法筛选出插入 HA 基因的重组转移载体 1175HA。

## 1.8 表达 HA 基因的重组鸡痘病毒 rFPV-HA 的获得与纯化

转移载体的转染,重组病毒的筛选,纯化方法按文献[5]进行。

## 1.9 感染 rFPV-HA 的 CEF 中 HA 表达产物的间接免疫荧光鉴定

以感染 wt-FPV 的 CEF 作阴性对照,采用间接免疫荧光法鉴定感染 rFPV-HA 的 CEF 能否表达 HA。

## 1.10 rFPV-HA 诱生的 HI 抗体水平的检测

7 日龄 SPF 雏鸡随机分为三组,每组 20 只,于颈部皮下分别接种剂量为  $10^6$  PFU 的 rFPV-HA、wt-FPV 或 0.2mL 的 PBS。接种当天采集各组鸡血清,测定其中针对 H9 亚型 AIV 的特异性血凝抑制抗体(HI)滴度(以  $\log_2$  表示)。以后分别于免疫后 7、10、14、20、25、30、35、40、45、50、44d 采集血清并测定 HI 滴度。各个时间的 HI 抗体滴度以 20 只鸡的 HI 抗体滴度的几何平均数表示,以 SPSS 软件对 rFPV-HA 免疫 SPF 鸡后诱生的 HI 抗体动态变

化作曲线拟合。

### 1.11 免疫鸡静脉攻毒后泄殖腔排毒率的检测

7日龄 SPF 雏鸡分为 5 组,分别于颈部皮下接种 wt-FPV( $10^6$  PFU/只)、rFPV-HA( $10^6$  PFU/只)和油乳剂全病毒灭活疫苗(0.2mL/只),另两组鸡接种 PBS(0.2mL/只),用作攻毒对照和空白对照。免疫后 14d,除空白对照外,其它各组鸡均从静脉攻击剂量为  $10^7$  ELD<sub>50</sub> 的 F 株 AIV(H9N2)。攻毒后 4d、6d 从各组鸡泄殖腔中采集棉拭子样品,作病毒分离试验,测定各组鸡泄殖腔排毒率。排毒率 = 泄殖腔病毒分离为阳性的鸡只数/试验鸡总数。以 7 日龄含抗 FPV 母源抗体的商品肉鸡为试验材料,重复上述免疫效力试验。

## 2 结果

### 2.1 重组转移载体 1175HA 的构建与鉴定

以 P1、P2 为引物,以 RT-PCR 法从 F 株 AIV 的基因组 RNA 中扩增出了全长为 1.7kb 的 HA 基因并将其克隆进质粒 pUC18,获阳性重组质粒 pUCHA。再将其中的 HA 基因片段以 *Hind*III 和 *Sal*I 切出,定向插入转移载体 1175,获重组转移载体 1175HA。1175HA 主要有三部分组成,分别是位于 P7.5 和 P11 双向串联启动子 P7.5 下游的 HA 基因,位于 P11 下游的 *LacZ* 基因以及位于 HA 基因和 *LacZ* 基因两侧、来源于鸡痘病毒基因组的同源重组序列。1175HA 以 *Hind*III 和 *Sal*I 酶切产生 9.7kb 的载体片段和 1.7kb 的 HA 片段,与预期相符(图 1)。

### 2.2 感染 rFPV-HA 的 CEF 中 HA 表达产物的间接免疫荧光鉴定结果

间接免疫荧光试验证实,感染 rFPV-HA 的 CEF 的胞浆和胞膜区呈特异性黄绿色荧光(图 2A),表明感染细胞表达了 HA。感染 wt-FPV 的 CEF 则未呈现特异性的荧光着色(图 2B)。

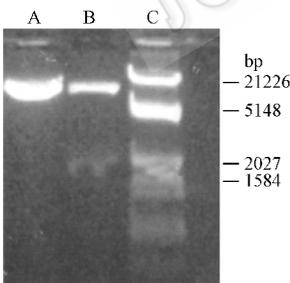


图 1 重组转移载体 1175HA 的 *Hind*III *Sal*I 酶切鉴定电泳图

Fig.1 Restriction endonuclease digestion pattern of recombinant transferring vector 1175HA

A. 1175/*Hind* III + *Sal* I ;

B. 1175HA/*Hind* III + *Sal* I ;

C. λDNA/*Hind* III + *Eco* I .

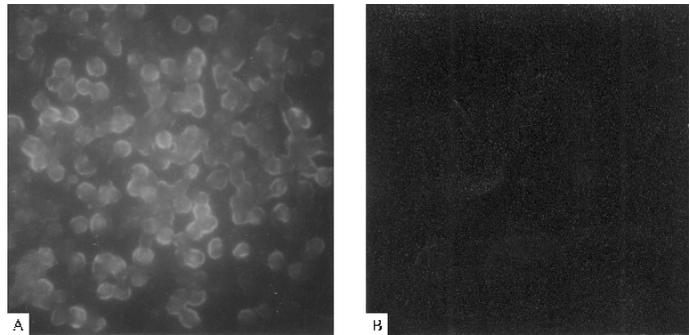


图 2 感染 rFPV-HA 的 CEF 中 HA 表达产物的间接免疫荧光鉴定结果

Fig.2 Immunofluorescence detection of the expressed HA in rFPV-infected CEF

A. CEF infected with rFPV-HA ;

B. CEF infected with wt-FPV .

### 2.3 rFPV-HA 诱生的 HI 抗体效价

rFPV-HA 在免疫 7 日龄 SPF 鸡 7d 后,已能诱生出可检出的 HI 抗体;免疫 14d 后,rFPV-HV 诱生的 HI 效价达到高峰。rFPV-HV 诱生的 HI 效价维持在较高水平( $HI > 4$ )长达 55d。SPF 鸡免疫 rFPV-HA 后,其抗体 HI 抗体动态变化过程见图 3。接种 PBS 及 wt-FPV 的鸡则在检测期中未产生任何特异性 HI 抗体。

### 2.4 rFPV-HA 的免疫效力

以 rFPV-HA 免疫 7 日龄 SPF 鸡及含抗 FPV 母源抗体的商品鸡,静脉攻毒 4d、6d 后,各组鸡从泄殖腔排毒的结果分别见表 1、2。

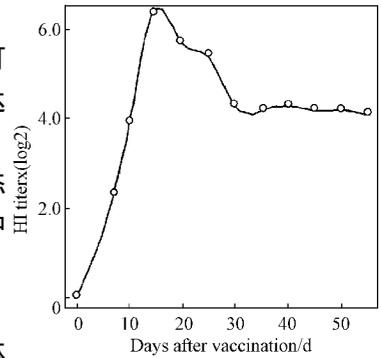


图 3 SPF 鸡免疫 rFPV-HV 后 HI 抗体动态变化

Fig. 3 Kinetics of HI antibody titers in chickens vaccinated with rFPV-HA

表 1 rFPV-HA 免疫的 SPF 鸡静脉攻毒后,各组鸡( $n = 20$ )从泄殖腔排毒的结果

Table 1 Data of virus isolation from cloacal swab specimens of SPF chickens vaccinated with different vaccines and then challenged with F strain AIV(H9N2)

Groups	Dose of inoculation	HI antibody titers at day of challenge( $\log_2$ )	Ratios of chicken shedding virus	
			4 days post challenge	6 days post challenge
Challenged control	0.2mLPBS	0	16/20a	15/20a
wt-FPV	$10^6$ PFU	0	18/20a	18/20a
rFPV-HA	$10^6$ PFU	$5.2 \pm 0.4a$	0/20b	0/20b
Inactivated vaccine	0.2mL	$8.0 \pm 0.6b$	4/20b	2/20b
Negative control	0.2mL PBS	0	0/20b	0/20b

a and b denote significant difference( $P < 0.05$ ).

表 2 rFPV-HA 免疫的商品鸡静脉攻毒后,各组鸡( $n = 20$ )从泄殖腔排毒的结果

Table 2 Data of virus isolation from cloacal swab specimens of commercial broiler chickens vaccinated with different vaccines and then challenged with F strain AIV(H9N2)

Groups	Dose of inoculation	HI antibody titers at day of challenge( $\log_2$ )	Ratios of chicken shedding virus	
			4 days post challenge	6 days post challenge
Challenged control	0.2mLPBS	0	9/20a	13/20a
wt-FPV	$10^6$ PFU	0	10/20a	14/20a
rFPV-HA	$10^6$ PFU	$3.0 \pm 1.4a$	0/20b	0/20b
Inactivated vaccine	0.2mL	$8.0 \pm 0.8b$	0/20b	0/20b
Negative control	0.2mL PBS	0	0/20b	0/20b

a and b denote significant difference( $P < 0.05$ ).

## 3 讨论

在以疫苗控制 AIV 流行和传播的研究中,为了克服灭活苗干扰免疫监测的缺陷,人们

利用 AIV 中最主要的保护性抗原 HA 的基因, 构建了多种基因工程疫苗。目前对表达 HA 基因的重组鸡痘病毒活载体疫苗研究较为深入, 这是一类首先有可能应用于临床的抗禽流感基因工程疫苗<sup>[3]</sup>。但是, 由于 HA 基因有 15 种亚型, 其变异性较强, 且不同的 AIV 疫苗间的交叉保护作用较小。因此, 在构建抗禽流感基因工程疫苗时, 一般使用本地流行毒株的 HA 基因。在前期工作中, 我们已发现 F 株 AIV 的 HA 基因序列与近几年来从国内不同省区流行中分离的 10 多株 H9 亚型 AIV 毒株的 HA 基因序列的同源性在 95% 以上。在本研究中, 我们利用该基因作为目的基因, 成功构建了重组鸡痘病毒 rFPV-HA。这对于利用基因工程疫苗来控制 H9 亚型禽流感在我国的发生和流行具有现实的意义。

许多低致病性 AIV, 包括目前正在我国各地广泛流行的 H9 亚型 AIV, 在现场可致感染鸡产生较为明显的临床症状, 如呼吸道疾病, 产蛋率下降和死淘率上升等。但在实验室水平上, 这些低致病性 AIV 常不引起明显的病症。因此, 评价抗低致病性禽流感疫苗的免疫效力时, 一般以免疫鸡产生的 HI 抗体水平、局部免疫效果、攻毒后排毒的持续天数等作为指标<sup>[6]</sup>。在本研究中, 我们也采用上述指标来评价 rFPV-HV 的免疫效力。

人们对低致病性 AIV 的致病以及疫苗的免疫保护机理虽还了解不多, 但兽医临床实践表明, 禽流感疫苗的免疫效力一般与其诱生的 HI 抗体水平呈正相关<sup>[7]</sup>。故 HI 抗体水平可作为反映疫苗免疫效力的指标之一。rFPV-HA 诱生的 HI 滴度的测定结果表明, rFPV-HA 最早在免疫后 7d 即可诱生出 HI 抗体, 而灭活苗一般在 10d 左右才可诱生出可检出的 HI 抗体。这可能表明 rFPV-HA 能较灭活苗更早地诱生免疫保护力。另外, rFPV-HA 诱生的 HI 效价维持在较高水平 (HI > 4) 可达 55d, 表明 rFPV-HA 的免疫保护期可能较长。

在 SPF 鸡上进行的免疫效力试验表明, rFPV-HA 诱生的特异性的 HI 抗体水平虽明显低于灭活苗产生的 HI 抗体水平, 但在静脉攻毒后, rFPV-HA 抑制免疫鸡排毒的效果好于灭活苗。即疫苗抑制免疫鸡排毒的效果并不与其诱生的 HI 效价成正比。同样, 在含抗 FPV 母源抗体的商品鸡上的试验结果也表明, 灭活苗可诱生出高水平的 HI 抗体, 而 rFPV-HA 诱生的 HI 抗体水平不仅远低于灭活苗诱生的 HI 抗体水平, 也低于它在 SPF 鸡上诱生的 HI 效价。但这两种疫苗均能有效地抑制免疫鸡排毒, 免疫效力相当。这一结果与国外学者的结论类似, 即抗 FPV 母源抗体虽然降低了 rFPV 诱生的体液免疫应答水平, 但 rFPV 仍能发挥显著水平的免疫效力<sup>[8]</sup>。这表明表达 HA 基因的重组鸡痘病毒可能不仅诱生了体液免疫应答, 而且还诱生了细胞免疫应答, 与主要依赖体液免疫应答产生保护作用的灭活疫苗不同, 细胞免疫应答可能在 rFPV-HA 的免疫保护作用中也具有一定的意义。

尽管现在对禽流感疫苗的保护机理还不甚清楚, 但疫苗抑制免疫鸡排毒至少有两个方面的意义: 一是说明疫苗能抑制病毒在体内的大量增殖; 二是免疫鸡排毒量的减少可降低病毒水平传播的水平。这些影响对于控制 H9 亚型禽流感的流行是有利的。

在上述免疫效力试验中, rFPV-HA 的免疫接种剂量和免疫途径参考国外有关资料及本室已有经验确定。有关 rFPV-HA 的最佳免疫剂量和免疫途径、免疫保护期、交叉免疫保护力以及野生型鸡痘病毒的感染是否会对 rFPV-HA 的免疫效力产生干扰等方面的研究正在深入进行中。但上述初步结果已表明, rFPV-HA 对 H9 亚型 AIV 的攻击有良好的保护效力, 有望被开发为抗 H9 亚型禽流感基因工程疫苗, 为控制 H9 亚型 AIV 在我国的发生和流行提供新手段。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Lexander D J. Avian Influenza Historical Aspects. In :Easterday B C, Madison W I. Proceedings of the Second Annual International Symposium on Avian Influenza. United States Animal Health Association, 1986. 1 ~ 36.
- [ 2 ] 于康震, 崔尚金, 付朝阳, 等. 中国预防兽医学报, 2000, 22(4) :312 ~ 316.
- [ 3 ] 马文军, 于康震. 中国预防兽医学报, 1999, 21(5) :398 ~ 400.
- [ 4 ] 程 坚, 刘红旗, 彭大新, 等. 江苏农业研究, 2001, 22(1) :71 ~ 74.
- [ 5 ] 朱爱华, 彭大新, 吴艳涛, 等. 扬州大学学报, 1999, 2(2) :25 ~ 28.
- [ 6 ] 唐秀英, 田国斌, 于康震, 等. 中国预防兽医学报, 1999, 21(6) :401 ~ 405.
- [ 7 ] Johansson B E, Bucher D J, Kilbourne E D. *J Virol*, 1989, 63 :1239 ~ 1246.
- [ 8 ] Taylor J, Christensen L, Gettig R, et al. *Avian Dis*, 1996, 40 :173 ~ 180.

## Recombinant Fowlpox Virus Expressing HA From Subtype H9N2 of Avian Influenza Virus and Its Protective Immunity Against Homologous Challenge in Chickens

Cheng Jian Liu Xiufan\* Pen Daxin Liu Hongqi

(Key Lab for Animal Infectious Disease, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

**Abstract** : The hemagglutinin ( HA ) gene from the AIV A/Chicken/China/F/1998 ( H9N2 ) , was amplified with the RT-PCR technique and directionally inserted into transferring vector 1175 , resulted in recombinant transferring vector 1175HA. In order to generate recombinant fowlpox virus expressing HA ( rFPV-HA ) , the recombinant transferring vector 1175HA was used to transfect the chicken embryo fibroblasts ( CEF ) pre-infected with wide type fowlpox virus. Then , by selection of blue plaques on the CEF overlaid with agar containing X-gal , rFPV-HA was obtained and purified. The expression of HA by rFPV-HA was detected in the recombinant virus-infected CEF by indirect immunofluorescence. Experiments on chickens demonstrated that rFPV-HA could induce detectable HI antibodies 7 days post-vaccination and those HI antibodies of relatively high titers could persist 55 days. rFPV-HA also had the same protective efficacies to suppress SPF chickens or commercial broiler chickens with antibodies against FPV from shedding challenged virus from intestine as inactivated vaccine in oil emulsion.

**Key words** : H9 subtype avian influenza , Recombinant fowlpox virus , Hemagglutinin

\* Supported by the National High Technology Research and Development Program of China ( 2001AA213041 )

\*\* Author for correspondence