

H5 亚型禽流感重组鸡痘病毒活载体疫苗的构建 及其遗传稳定性与免疫效力

贾立军 彭大新 张艳梅 刘红旗 刘秀梵*

(扬州大学畜牧兽医学院 扬州 225009)

摘要:以鹅源 H5 亚型禽流感病毒(AIV)基因组为模板,用 RT-PCR 扩增血凝素(Hemagglutinin, HA)基因,克隆入鸡痘病毒表达载体 pFG1175,转染鸡痘病毒感染的鸡胚成纤维细胞,通过蓝斑筛选和间接免疫荧光检测,获得表达 HA 基因的重组鸡痘病毒(Recombinant fowlpox virus, rFPV-HA)。rFPV-HA 经鸡胚成纤维细胞连续传 15 代后,报告基因 *LacZ* 和 HA 基因可稳定表达。用 10^3 PFU 和 10^5 PFU 的 rFPV-HA 免疫无特定病原体的(Specific pathogen free, SPF)鸡,免疫后 22d 血凝抑制(Hemagglutinin inhibition, HI)抗体监测阳性率分别为 0% 和 20%,但均抵御了 H5 亚型毒株的致死性攻击,保护率为 100%。结果表明,构建了表达 HA 基因的重组鸡痘病毒,该重组病毒具有良好遗传稳定性,免疫鸡可提供完全保护,显示出了一定的应用前景。

关键词: H5 亚型,禽流感,血凝素基因,重组鸡痘病毒,遗传稳定性,免疫效力

中图分类号: Q782 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2003)06-0722-06

高致病性禽流感(Highly pathogenic avian influenza, HPAI)是由特定亚型的禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV)引起的禽类急性高度致死性传染病,被国际兽疫局列为 A 类疾病,常对疫区禽业发展造成毁灭性打击,严重影响国际贸易^[1]。1997 年香港“禽流感事件”中, H5N1 亚型高致病性禽流感病毒(HPAIV)跨越种间障碍直接感染人类,造成 18 人感染, 6 人死亡^[2]。2003 年 2 月,香港再次发生 H5N1 亚型 HPAIV 感染人并致感染者死亡事件^[3],其巨大的公共卫生学意义引起世人关注。近年来,国际上 HPAI 发生越来越频繁^[1]。我国也从水禽中分离到 H5 亚型禽流感毒株,因此该病对我国养禽业和人类健康已构成了巨大的现实威胁^[4]。

发生 HPAI 时,扑杀销毁感染群及受威胁动物、清除传染源、进行严格检疫和采取生物安全措施是控制疫情的首选方案。但当疫情已大面积扩散,以上措施难以奏效、巨大的经济损失无法承担时,免疫接种就成为控制疫情的关键措施之一^[1]。目前应用的疫苗是油乳剂全病毒灭活苗,灭活苗具有保护率高,免疫期长,研制周期短等优点^[5]。但灭活苗也存在一些难以克服的缺陷,如灭活苗除诱导产生针对流感病毒保护性抗原血凝素蛋白的抗体外,还会诱导针对内部蛋白的抗体,从而影响运用针对内部蛋白抗体的血清学方法进行疫情监测^[6]。此外,灭活苗还存在制备成本高、散毒风险大、影响肉品品质等缺点。

基金项目: 国家“863 计划”(2001AA213041);农业部农办牧 2001-83 项目

* 通讯作者。Tel: 86-514-7979386; Fax: 86-514-7323112; E-mail: xfliu@mail.yzu.edu.cn

作者简介: 贾立军(1974-)男,黑龙江人,博士生,从事流感病毒新型疫苗研究。E-mail: jialijun2002@yahoo.com.cn

其他作者: 程坚,陈素娟,韦栋平,黄勇,张如宽

收稿日期: 2003-01-24, 修回日期: 2003-05-25

因此,开发并应用新型疫苗已迫在眉睫。本研究构建了表达 H5 亚型禽流感病毒 HA 基因的重组鸡痘病毒,初步鉴定了其遗传稳定性,评价其免疫保护作用,旨在为该病的防治提供新的工具。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒:禽流感病毒鹅体分离株(G5 株)经国家流感中心鉴定为 H5N1 亚型。本研究用 G5 株作为构建重组鸡痘病毒 HA 基因的供体,并作为免疫后攻毒毒株。鸡痘病毒疫苗株 282E4(FPV282E4)购自中国兽药监察所,作为构建重组病毒的亲本鸡痘病毒和开展动物保护试验时的野生型鸡痘病毒接种对照。

1.1.2 质粒和菌株:鸡痘病毒表达载体 pFG1175,内含痘苗病毒启动子 P11 和 P7.5、筛选标记细菌 β -半乳糖苷酶基因(*LacZ* 基因)和鸡痘病毒复制非必需片段等元件,由王志亮等构建^[7];大肠杆菌 DH5 α 和 pGEM-T Easy Vector 购自 Promega 公司。

1.1.3 主要试剂:禽成髓细胞病毒反转录酶、*Taq* DNA 聚合酶、限制性内切酶和其他修饰酶均购自 Promega 公司;Ampicillin、X-gal、IPTG 和 DOSTER Lipofectin 转染试剂盒购自 Roche 公司;抗 H5 亚型禽流感病毒多抗由扬州大学传染病教研室制备;兔抗鸡 IgG FITC 标记荧光抗体购自 Promega 公司。

1.1.4 SPF 鸡胚和实验动物:SPF 鸡胚和 SPF 白来航鸡均购自南京药械厂 SPF 鸡场。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 扩增 G5 株 HA 基因:根据 GenBank 中 H5 亚型禽流感毒株 HA 基因的序列,设计上游引物和下游引物,并分别引入 *Hind*Ⅲ 和 *Sal* I 限制性内切酶酶切位点。上游引物为 5'-CCCAAGCTTATGGAGAAAATAGTGCTT-3',下游引物为 5'-CCAGTCGACCTA-CAATCTGAACTCACA-3'。RT-PCR 反应条件按参考文献进行^[8]。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳和测序鉴定。引物合成及 PCR 产物测序由大连宝生物工程有限公司完成。

1.2.2 含 HA 基因的鸡痘病毒重组质粒 pFG1175-HA 的构建:将 HA 基因克隆入 pGEM-T Easy Vector 形成 T-HA 质粒。T-HA 经 *Hind*Ⅲ 和 *Sal* I 双酶切后,分离纯化 HA 基因并与经 *Hind*Ⅲ 和 *Sal* I 双酶切的 pFG1175 连接,构建含 HA 基因的重组质粒 pFG1175-HA。利用限制性内切酶分析和 PCR 扩增鉴定 pFG1175-HA。

1.2.3 重组质粒 pFG1175-HA 转染和重组鸡痘病毒筛选纯化:按照参考文献[9]进行。

1.2.4 重组病毒表达产物的鉴定:以 FPV282E4 感染的鸡胚成纤维细胞(Chicken embryo fibroblast, CEF)作阴性对照,采用间接免疫荧光试验鉴定重组病毒在感染 CEF 后的 HA 表达情况。用纯化的重组病毒接种 24 孔细胞培养板上培养的单层 CEF,37℃、5% CO₂ 条件下培养,至 CEF 出现单个散在的痘病毒蚀斑,吸弃培养液,冷甲醇固定细胞 10min。以 10mmol/L PBS buffer(PH7.4)洗涤后,用稀释度为 1:200 的鸡抗 H5 亚型禽流感病毒的阳性血清(内含 1% 的 BSA 进行封闭)37℃孵育 1h。以 PBS 振荡洗涤 3 次后,再以 1:200 稀释的异硫氰酸荧光素(Fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的兔抗鸡 IgG 在 37℃孵育 30min,最后以 PBS 振荡洗涤 3 次,置于荧光显微镜下观察。

1.2.5 重组鸡痘病毒遗传稳定性测定:将纯化的重组鸡痘病毒经 CEF 连传 15 代后,取第

1 代和第 15 代病毒感染 CEF 细胞 ,待形成单个散在的病毒蚀斑后 ,分别用含 X-gal 的营养琼脂覆盖 ,3d 后随机观察 20 个病毒蚀斑 ,计算蓝斑所占比例。在平行实验中 ,待形成病毒蚀斑后 ,进行间接免疫荧光检测 ,随机观察 20 个蚀斑 ,计算呈现特异性荧光的蚀斑所占比例。以上试验中设 FPV282E4 感染 CEF 为阴性对照。

1.2.6 动物保护试验分组和处理 :100 只 1 日龄 SPF 白来航鸡随机分为 4 组 ,每组 25 只。分别以 10^3 蚀斑形成单位(PFU)及 10^5 PFU 的 rFPV-HA、 10^5 PFU 的 FPV282E4 和 0.2mL PBS 进行颈部皮下接种。接种后 22d 用 10^3 ELD₅₀ 的 G5 株病毒经肌肉注射攻毒 ,攻毒后观察 14d 统计发病和死亡情况。分别在免疫后 7、10、13、16、19 和 22d 分离血清检测 HI 抗体效价。试验动物饲养于隔离器内。

1.2.7 临床发病判断标准 精神沉郁、垂头蜷缩、食欲不振或废绝、腹泻、头部水肿、呼吸困难、神经症状、可视粘膜或无毛皮肤发绀、出血等。

1.2.8 血清学检测 血凝试验(HA 试验)和血凝抑制试验(HI 试验)方法见参考文献 [10]。

1.2.9 统计分析 采用 SPSS 统计分析软件进行数据处理 ,对 HI 抗体应答阳性率、攻毒后各组鸡只发病率和死亡率进行卡方检验 ,统计数据间差异的显著性。

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增 G5 株 HA 基因

以 G5 株基因组为模板 ,利用 HA 基因特异性引物进行 RT-PCR 扩增后 ,进行 1% 琼脂糖凝胶电泳 ,可见大小约为 1.7kb 的单一一条带 ,与预期大小一致。测序分析显示 ,该片段完整阅读框长度为 1707bp ,与 A/Chicken/HongKong/258/97(H5N1 ,AF057291)HA 基因核苷酸同源性为 97.3% ,表明扩增产物为 G5 株的 HA 基因(序列未附)。

2.2 含 HA 基因的重组质粒 pFG1175-HA 的鉴定

利用 *Sal*I 和 *Hind*III 双酶切 pFG1175-HA 后 ,产生了大小分别约为 1.7kb 和 9.7kb 的两个条带 ,与预期片段大小一致 ;同时利用 PCR 也扩增出 1.7kb 的条带 ,初步表明 HA 基因已克隆入 pFG1175 中。

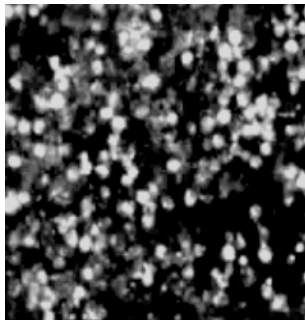


图 1 重组病毒的间接免疫荧光鉴定

Fig.1 Immunofluorescence detection of the expressed HA in CEF infected with pFG1175-HA

2.3 表达 HA 基因的重组鸡痘病毒的筛选和鉴定

利用 pFG1175-HA 转染 FPV282E4 感染的 CEF ,待形成完全细胞病变后 ,收获细胞 ,反复冻融 3 次 ,离心去除细胞碎片 ,收获上清。利用转染产物的离心上清接种单层 CEF ,待形成单个散在的病毒蚀斑后利用含 X-gal 的琼脂覆盖细胞 ,获得了呈蓝色的重组病毒蚀斑。利用蓝斑筛选纯化 3 代后的重组病毒感染单层 CEF ,形成病毒蚀斑后进行间接免疫荧光染色。结果重组鸡痘病毒感染 CEF 产生的蚀斑呈现特异性绿色荧光(图 1) ,而 FPV282E4 感染 CEF 产生的病毒蚀斑及对照 CEF 细胞均无特异性荧光(图略) 。结果表明筛选的重组病毒表达了 HA 蛋白 ,命名为 rFPV-HA。

2.4 重组病毒遗传稳定性

利用纯化后的第 1 代和第 15 代重组病毒感染 CEF 细胞后

进行蓝斑检测和免疫荧光检测,分别随机观察的病毒蚀斑均为蓝色或呈现特异性荧光,且荧光强度无差别;而FPV282E4感染CEF后形成的病毒蚀斑在检测中不显蓝,也无特异性荧光(图片略)。

2.5 动物保护试验

10⁵ PFU的rFPV-HA免疫1日龄SPF鸡后19d可检出HI抗体,阳性率为10%(1/10),滴度为4.0log₂;免疫后22d,10⁵ PFU免疫组HI抗体阳性率为20%(2/10),滴度为4.5log₂。10³ PFU rFPV-HA接种组直至免疫后22d仍检测不出HI抗体。FPV282E4接种组和攻毒对照组HI抗体均为阴性(表1)。

表1 1日龄免疫的SPF鸡HI抗体应答和免疫保护效力

Table 1 HI antibody response of SPF chickens and protective efficacy of vaccines against G5 challenge

Group	Dosage	HI antibody response		Morbidity ^d	Mortality	Protection
		dpi ^a 19	dpi 22			
rFPV-HA	10 ⁵ PFU	1/10 ^b (4.0)	2/10(4.5)	0/25 ^A	0/25 ^A	100 ^A
rFPV-HA	10 ³ PFU	0/10	0/10	0/25 ^A	0/25 ^A	100 ^A
FPV282E4	10 ⁵ PFU	0/10	0/10	25/25 ^B	25/25 ^B	0 ^B
Control	0.2	0/10	0/10	25/25 ^B	25/25 ^B	0 ^B

^a dpi = days post immunization. ^b chickens with HI antibody/chickens detected. ^c Average HI antibody titer. ^d Different super-script uppercase letters indicate very significant differences ($P < 0.01$).

FPV282E4对照组和攻毒对照组从攻毒后第2天陆续出现发病症状,表现为精神沉郁、食欲废绝、腹泻下痢、鸡冠和足部皮下出血等,并于攻毒后2~6d内100%死亡,死亡高峰为攻毒后第3~4天。而10³ PFU和10⁵ PFU的rFPV-HA免疫SPF鸡均抵御了G5株的致死性攻击,没有任何鸡只发病,保护率为100%,与对照组差异极显著($P < 0.01$)(表1)。

3 讨论

3.1 表达HA基因的重组鸡痘病毒的构建及其遗传稳定性

鸡痘病毒基因组庞大,不便于进行体外操作,需依靠表达载体协助才能将外源基因整合入鸡痘病毒基因组。鸡痘病毒表达载体含有痘病毒启动子、筛选标记基因、外源目的基因和痘病毒复制非必需片段等^[7,8]。pFG1175含有P7.5与P11两个痘苗病毒启动子,以P11表达的β-半乳糖苷酶基因(LacZ基因)作为筛选标记,用P7.5表达HA基因。pFG1175所用复制非必需片段pFPV7s由彭大新等^[11]筛选,全长2909bp。利用pFG1175构建的重组鸡痘病毒成功地表达了G5株的血凝素基因。

构建重组病毒用表达载体所含启动子及复制非必需片段是影响重组病毒遗传稳定性的两个关键因素。pFG1175所含的P7.5与P11是常用的痘病毒启动子,已用于构建多种重组痘病毒。利用序列相似性检索软件BLAST进行GenBank数据库检索发现,pFG1175所含的复制非必需片段pFPV7s共跨越鸡痘病毒的6个连续的基因片段(FPV072~FPV077,AF198100),该区域主要编码β神经生长因子(β-NGF)等细胞同源物,既不编码病毒结构蛋白,也不编码病毒复制、转录和翻译的必需酶类和调控因子^[12],揭示了pFPV7s

适于作为复制非必需片段的分子基础。rFPV-HA 在 CEF 连续传 15 代后,报告基因 *LacZ* 和 HA 蛋白均稳定表达,具有良好的遗传稳定性,提示 pFG1175 所含启动子及复制非必需片段适合构建重组鸡痘病毒。

3.2 rFPV-HA 的免疫保护效力

Beard 等^[13]用 6.5×10^6 PFU 的表达高致病性禽流感病毒 HA 基因的重组鸡痘病毒免疫鸡体后 4 周,HI 阳性率仅为 20%。Swayne 等^[14]用 $10^{1.5}$ 组织半数感染量(TCID₅₀) $\times 10^{2.0}$ TCID₅₀和 $10^{3.0}$ TCID₅₀ 的重组鸡痘病毒经皮下注射免疫鸡,3 周后 HI 抗体阳性率分别为 0%、0%和 20%。用 10^3 PFU 和 10^5 PFU 的 rFPV-HA 于 1 日龄免疫 SPF 鸡,免疫后 22d HI 抗体阳性率分别为 0%和 20%。结果提示,HPAI 重组鸡痘病毒疫苗不能有效诱导 HI 抗体应答,提高免疫剂量可促进抗体生成,但差异不显著。

Swayne 等^[14]利用表达 HA 基因的重组鸡痘病毒以 $10^{1.5}$ TCID₅₀、 $10^{2.0}$ TCID₅₀ 和 $10^{3.3}$ TCID₅₀ 的免疫剂量经皮下注射或翼部刺种免疫鸡,可使 90% ~ 100% 的免疫鸡抵抗 HPAIV 的致死性攻击。 10^3 PFU 和 10^5 PFU 的 rFPV-HA 免疫组均 100% 抵御了同亚型毒株的攻击,进一步证实了重组鸡痘病毒活载体疫苗的有效性。而且, 10^3 PFU 的 rFPV-HA 即可诱导 100% 保护,为制备价格低廉的重组鸡痘病毒疫苗奠定了坚实的基础。

Swayne 等(2000 年)^[15]研究表明,表达 A/Turkey/Ireland/1378/83(H5N3)HA 基因的重组鸡痘病毒免疫鸡,可抵御跨越 38 年、分离自四大洲不同种属动物的 H5 亚型 HPAIV 的致死性攻击,提供良好保护。利用 rFPV-HA 免疫鸡,可完全抵御鹅源 G5 株的致死性攻击。以上结果表明,当 H5 亚型 HPAIV 发生一定限度内的抗原漂移或他种属 H5 亚型毒株威胁鸡群时,不需频繁构建表达流行毒株 HA 基因的重组病毒,这为尽早控制疫情,减少经济损失提供了有力的工具,这对于我国目前面临的威胁有十分重大的意义。

与灭活苗相比,rFPV-HA 疫苗仅表达 HA 蛋白,不影响应用琼脂扩散或 ELISA 方法进行疫情监测,可有效区分感染群和重组病毒免疫群。而且重组鸡痘病毒活载体疫苗在制备过程中,不需大量扩增高致病性禽流感病毒,不存在散毒的危险,生产和使用安全。H5 亚型 HPAI 重组鸡痘病毒活载体疫苗的良好保护效果和以上优点使之有望代替灭活苗或与之互补应用于 HPAI 的防治实践。

参 考 文 献

- [1] 于康震,崔尚金,付朝阳,等. 禽流感与养禽业发展和人类健康. 中国预防兽医学报, 2000, 4: 312 ~ 315.
- [2] John S T. Influenza A (H5N1) in Hong Kong: an overview. *Vaccine*, 2002, 164: 1 ~ 5.
- [3] 郭志儒. 香港再次发生禽流感病毒感染人. 中国兽医学报, 2003, 23(2): 123.
- [4] 唐秀英,田国斌,赵传删,等. 中国禽流感流行株的分离鉴定. 中国畜禽传染病, 1998, 20(1): 1 ~ 5.
- [5] 唐秀英,田国斌,于康震,等. 禽流感油乳剂灭活苗的研究. 中国预防兽医学报, 1999, 21(6): 401 ~ 405.
- [6] Suarez L, Schultz-Cherry S. Immunology of influenza virus: a review. *Developmental and Comparative Immunology*, 2000, 24: 269 ~ 283.
- [7] 王志亮,彭大新,刘秀梵. 中国疫苗株鸡痘病毒插入载体的构建与 MDV 糖蛋白 B 的表达. 病毒学报, 1996, 12: 48 ~ 54.
- [8] Wood G W, Banks J, McCauley J W, et al. Deduced amino acids sequences of the haemagglutinin of H5N1 avian influenza virus isolates from an outbreak in turkey in Norfolk, England. *Arch Virol*, 1994, 134: 185 ~ 194.

- [9] 刑 力,彭大新,朱爱华,等. 马立克氏病病毒 Rispsens 株 B 抗原基因的克隆及其重组鸡痘病毒的构建. 微生物学报,1999,39(2):164~167.
- [10] 国际兽疫局编著,马洪超,王长江,王涌玲,等译. 诊断试验和疫苗标准手册. 第三版. 青岛:青岛市新闻出版局,1996,136~139.
- [11] 彭大新,王志亮,刘秀梵,等. 鸡痘病毒基因组 DNA 复制非必需片段的鉴定. 江苏农学院学报,1995,16(14):13~17.
- [12] Afonso C L, Tulman E R, Lu Z, *et al.* The genome of fowlpox virus. *J Virol*, 2000, 74(8):3815~3831.
- [13] Beard C W, Schnitzlein W M, Tripathy D N. Protection of chickens against highly pathogenic avian influenza virus(H5N2) by recombinant fowlpox viruses. *Avian Dis*, 1991, 35(2):356~359.
- [14] Swayne D E, Beck J R, Mickle T R. Efficacy of recombinant fowl poxvirus vaccine in protecting chickens against a highly pathogenic Mexican-origin H5N2 avian influenza virus. *Avian Dis*, 1997, 41(4):910~922.
- [15] Swayne D E, Garcia M, Beck J R, *et al.* Protection against diverse highly pathogenic H5 avian influenza virus in chickens immunized with a recombinant fowlpox vaccine containing an H5 avian influenza hemagglutinin gene insert. *Vaccine*, 2000, 18:1088~1095.

Construction , Genetic Stability and Protective Efficacy of Recombinant Fowlpox Virus Expressing Hemagglutinin Gene of H5N1 Subtype Avian Influenza Virus

Jia Lijun Peng Daxin Zhang Yanmei Liu Hongqi Liu Xiufan *

(Animal Science and Veterinary Medicine college , Yangzhou University , Yangzhou 225009 , China)

Abstract : Construction , genetic stability and protective efficacy of a recombinant fowlpox virus expressing hemagglutinin(HA) gene(rFPV-HA) of H5 subtype avian influenza virus were conducted. The results indicated that the recombinant fowlpox virus was obtained and purified by blue plaque selection. HA expressed by rFPV-HA was identified by indirect immunofluorescence array. The rFPV-HA could express reporter gene LacZ and HA gene after fifteen successive passages in chicken embryo fibroblast. The rFPV-HA induced completely protection of chickens against lethal challenge with homologous avian influenza virus. The results show that rFPV-HA has good genetic stability and antigenicity and should be a useful tool in HPAI control program by preventing illness and death in chickens when the disease spreads widely.

Key words : H5 subtype , Avian influenza , Hemagglutinin gene , Recombinant fowlpox virus , Genetic stability , Protective efficacy

Foundation item :Chinese National Programs for High Technology Research and Development (2001AA213041) ; The Project Supported by Ministry of Agriculture (2001-83)

* Corresponding author. Tel : 86-514-7979386 ; Fax : 86-514-7323112 ; E-mail : xfliu@mail.yzu.edu.cn

Other authors :Cheng Jian , Chen Sujuan , Wei Dongping , Huang Yong , Zhang Rukuan.

Received date 01-24-2003