

# 共表达禽流感病毒 HA 和 NA 基因重组禽痘病毒的遗传稳定性

乔传玲<sup>1</sup> 常洪涛<sup>2</sup> 于康震<sup>3</sup> 陈化兰<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所农业部动物流感重点开放实验室及兽医生物技术国家重点实验室 哈尔滨 150001)

(<sup>2</sup> 河南农业大学畜牧兽医工程学院 郑州 450002)

(<sup>3</sup> 全国畜牧兽医总站 北京 100026)

**摘 要** 将表达禽流感病毒 H5 HA 及 N1 NA 基因的重组禽痘病毒 rFPV-HA-NA 连续传代至 25 代,取第 5、15 及 25 代重组病毒作为受检代次,进行外源基因的 PCR 扩增与测序,同时比较这 3 个代次重组禽痘病毒的免疫效力。结果对各代次重组病毒 DNA 的模板进行 PCR 扩增,均能够获得 HA 和 NA 两个目的片段,经测序证明两个外源基因在细胞传代过程中没有发生氨基酸水平的改变。动物试验结果表明,该重组病毒的毒力在细胞传代过程中没有发生变化,接种试验鸡后在鸡体内能够检测到外源基因的存在,各免疫组在免疫 2 周后的抗体效价平均为 6.5log<sub>2</sub>,完全抵抗了高致病力禽流感病毒的攻击。以上结果表明此重组病毒具有较好的遗传稳定性,经过 25 代的传代后,所插入的外源基因及其表达产物的免疫原性未见变化,重组病毒的免疫效力相当稳定。

**关键词** 禽流感,重组禽痘病毒,遗传稳定性

中图分类号:Q75 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2004)05-0686-03

禽流感(Avian Influenza, AI)是由 A 型流感病毒引起的一种禽类的感染和/或疾病综合征,给养禽业尤其是养鸡业造成严重的经济损失。目前预防 AI 的疫苗主要是全病毒油乳剂灭活疫苗,但这一途径生产的疫苗成本高,疫苗应用后会严重影响现有条件下的禽流感疫情监测,痘病毒(包括鸡痘病毒)作为较为成熟的重组病毒疫苗载体已成功用于多种病原保护性抗原基因的表达,并在接种机体后显示出良好的免疫原性<sup>[1]</sup>。

近几年来,哈尔滨兽医研究所农业部动物流感重点开放实验室已经构建了表达 H5 和 H7 亚型 AIV HA 基因、共表达 H5 HA 和 N1 NA 基因等多株重组禽痘病毒,并对其免疫保护性进行了研究<sup>[2,3]</sup>,结果表明重组禽痘病毒 rFPV-HA 能够 100% 保护免疫鸡群抵抗同一 HA 亚型病毒的攻击, rFPV-HA-NA 免疫鸡群后能够同时诱导产生对 H5N1 和 H7N1 病毒攻击的保护,因而拟将重组禽痘病毒 rFPV-HA-NA 确定为新型基因工程疫苗研发的重点。

国际兽医局(OIE)和《兽医生物制品规程》规定,用于兽医生物制品制造和检验用的菌(毒)种应有一定的使用代次限制<sup>[4]</sup>,以防止疫苗株发生基因突变而导致毒力返强等生物学特征发生改变。因此本试验对此重组疫苗病毒株的遗传稳定性进行了研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 病毒

表达禽流感病毒 H5 HA 及 N1 NA 基因的重组禽痘病毒

rFPV-HA-NA 由哈尔滨兽医研究所农业部动物流感重点开放实验室构建,攻毒用高致病力禽流感毒株 A/Goose/Guangdong/1/96(H5N1)由本实验室保存。

### 1.2 重组病毒的传代

重组禽痘病毒在 SPF 鸡胚成纤维细胞(CEF)上扩增,3~4d 收获,连续传代至 25 代,取 5、15、25 代次的重组病毒进行效价测定后备用。

### 1.3 目的基因的 PCR 扩增

用 PBS 吹下感染 3 个代次重组禽痘病毒的细胞单层,以 SDS-蛋白酶 K 法提取病毒 DNA,分别进行 HA 和 NA 基因的 PCR 反应。PCR 所用的引物为:HA 上游引物 5'-AAAATG-GAGAGAATAGTGCTT-3',下游引物 5'-CTACAATCTGAACTCAATAAAT-3';NA 上游引物 5'-GGAGTTTCATTATGAATCCAAATC-3',下游引物 5'-ATTGACAAGTAGTCCCTACTTGTG-3'。反应条件:94℃ 5min;94℃ 1min,52℃ 0.5min,72℃ 1.5min,35 个循环;72℃ 10min。

### 1.4 基因克隆和序列分析

将 PCR 产物回收纯化,克隆到 pMD18-T Vector 载体上,采用双脱氧链终止法进行测序。将所测得 3 个代次的 HA 及 NA 基因序列分别进行比较分析。

### 1.5 动物试验

**1.5.1** SPF 鸡:由哈尔滨兽医研究所实验动物中心提供,实验期间饲养于禽病感染实验室的负压隔离器内。

**1.5.2** 重组病毒疫苗的毒力稳定性:将以上 3 个代次的重组禽痘病毒按一个免疫剂量接种 4 周龄 SPF 鸡,免疫后 5d

基金项目:国家 863 计划(2001AA213041)

\* 通讯作者。Tel:86-451-82761925;Fax:86-451-82733132;E-mail:hlchen1@yahoo.com

作者简介:乔传玲(1973-),女,河南省宁陵县人,副研究员,博士,主要从事动物病毒分子生物学研究。Tel:86-451-82725786 转 304;E-mail:qchl2001@yahoo.com.cn

收稿日期:2004-01-18,修回日期:2004-05-10

采集接种部位肿胀的皮肤及邻近组织,制备成匀浆液,加入青霉素和链霉素各 1000 单位后接种于 CEF 细胞进行病毒毒价测定。

**1.5.3 重组病毒外源基因在接种鸡体内的检测** 按照 1.5.2 中叙述的方法制备组织匀浆液,接种 10 日龄 SPF 鸡胚绒毛尿囊膜,3d 后收集绒毛尿囊膜,提取禽痘病毒基因组 DNA,PCR 方法检测 HA、NA 基因。

**1.5.4 重组病毒疫苗的免疫效力** 将以上 3 个代次的重组病毒按一个免疫剂量经翅膀刺种接种 4 周龄 SPF 鸡,免疫后 1、2、3 周检测 HI 抗体,3 周时用高致病力禽流感病毒 H5N1 进行攻击。

## 2 结果

### 2.1 HA 和 NA 基因的 PCR 检测

以 3 个代次重组禽痘病毒的核酸作为模板进行 PCR 反应,分别扩增出两条特异性条带,大小依次约为 1.7kb 和 1.4kb,表明各代次重组病毒中包含有所插入的两个外源基因(图 1)。

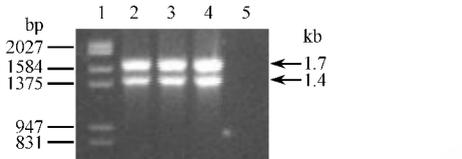


图 1 rFPV-HA-NA 重组病毒中外源基因的 PCR 扩增

Fig.1 Detection of HA and NA gene of rFPV-HA-NA by PCR

1. DNA Marker/H + E; 2. PCR product of rFPV-DNA from 5 passage; 3. PCR product of rFPV-DNA from 15 passage; 4. PCR product of rFPV-DNA from 25 passage; 5. FPV DNA control.

### 2.2 各代次重组病毒基因序列比较

3 个代次的重组禽痘病毒的外源插入基因的序列经过

表 1 不同代次重组禽痘病毒疫苗的免疫效力

Table 1 Immune efficacy induced by the recombinant fowlpox virus of different passage

| Vaccine passage | HI antibody titre post-vaccination( log <sub>2</sub> ) |      |      | Number( sick/total ) | Number( dead/total ) | Protection ratio/% |
|-----------------|--|------|------|----------------------|----------------------|--------------------|
|                 | 1w   | 2w   | 3w   |                      |                      |                    |
| 5               | 2.54   | 6.85 | 6.24 | 0/10                 | 0/10                 | 100                |
| 15              | 3.02   | 6.55 | 6.53 | 0/10                 | 0/10                 | 100                |
| 25              | 2.51   | 6.25 | 6.59 | 0/10                 | 0/10                 | 100                |

## 3 讨论

对于重组疫苗而言,体外或体内的传代均有可能导致外源基因的突变,严重的发生移码突变,使得外源基因不表达<sup>[5]</sup>。本研究通过外源基因克隆和测序、毒力测定及免疫效力评价对重组禽痘病毒 rFPV-HA-NA 的遗传稳定性进行了检测,结果第 5、15 及 25 代重组病毒在连续的细胞传代过程中,所插入的外源基因没有出现变异;重组病毒毒力相当稳定,接种试验鸡后,可在鸡体内检测到 HA 和 NA 基因的存在,并

比较后发现,经过 25 代的传代,外源基因片段没有发生碱基变化。

### 2.3 重组病毒疫苗接种鸡体后毒力稳定性试验

结果将上述匀浆液接种 CEF 细胞上后,均产生了明显的细胞病变(CPE),所测得的蚀斑形成单位(PFU)与原代重组病毒相比,没有出现毒力增强现象。

### 2.4 重组病毒疫苗外源基因在鸡体内的检测

取匀浆液接种鸡胚的绒毛尿囊膜,3d 后形成了白色隆起的大型痘斑。从收集的绒毛尿囊膜中提取禽痘病毒基因组 DNA,PCR 方法扩增得到大小分别为 1.7kb 和 1.4kb 的两条带(图 2),表明重组病毒可以在鸡体内稳定地复制所包含的 HA 和 NA 基因。

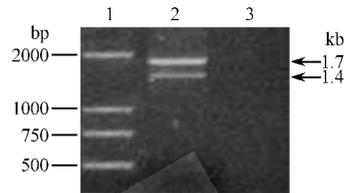


图 2 HA、NA 基因 PCR 检测结果

Fig.2 The PCR result of HA and NA gene

1. DL2000 marker; 2. PCR product of HA and NA gene; 3. Negative control.

### 2.5 不同代次的重组禽痘病毒疫苗免疫效力的比较

第 5、15 及 25 代次的禽流感重组禽痘病毒疫苗免疫后,从第 1 周即检测到 HI 抗体,免疫鸡在攻毒后无一发病和死亡,均能够完全抵抗 H5N1 病毒的攻击(表 1)。表明不同代次的重组禽痘病毒疫苗对免疫鸡的保护效果没有发生改变,均可以诱导产生较高水平的 HI 抗体,证明插入的外源基因能够在病毒的长期传代过程中稳定地遗传并表达出重组 HA 和 NA 蛋白,刺激机体产生针对禽流感病毒的免疫反应。

能够诱导产生良好的免疫效力。进一步表明该重组病毒所插入的外源基因能在长期传代过程中稳定地遗传并表达重组 HA 和 NA 蛋白,刺激机体产生针对禽流感病毒的免疫反应,鸡群使用重组疫苗不会有免疫失败的安全隐患。

Lee 等<sup>[6]</sup>在对脊髓灰质炎病毒载体的研究中发现,重组病毒的遗传稳定性与插入片段的大小无相关性,在遗传上较为稳定的重组体往往会观察到 G/C 的含量较高。在本研究中,我们对第 5 代重组病毒外源基因序列与最初克隆得到的禽流感病毒基因序列比较发现,HA 基因发生了如下的变化:

492 位的 A→G, 1560 位的 T→C 并且这些变异均未导致氨基酸的改变, 这一结果表明重组病毒为保持自身的稳定而使得外源基因发生了一定的改变, 以达到 G/C 的含量相对提高。

总之, 本实验室所获得的表达禽流感病毒 HA 及 NA 基因重组禽流感病毒在基因水平及免疫效力两个方面证明具有良好的遗传稳定性, 经过 25 代传代后的病毒仍可作为疫苗生产用种子。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Boyle D B, Heine H G. Recombinant *fowlpox virus* vaccines for poultry. *Immunol Coll Biol*, 1993, **71**: 391 - 397.
- [ 2 ] 陈化兰, 马文军, 于康震. 表达禽流感病毒血凝素基因的重组禽流感病毒的构建. *中国农业科学*, 2000, **33**(5): 86 - 90.

- [ 3 ] Qiao C L, Yu K Z, Jiang Y P, *et al.* Protection of chickens against highly lethal H5N1 and H7N1 *avian influenza viruses* with a recombinant *fowlpox virus* co-expressing H5 haemagglutinin and N1 neuraminidase genes. *Avian Pathology*, 2003, **32**: 25 - 31.
- [ 4 ] 王明俊. 兽医生物制品学. 北京: 中国农业出版社, 1996: 426.
- [ 5 ] Smiley J R, Jackwood D J. Genetic stability of the VP2 hyper-variable region of four infectious bursal disease virus isolates after serial passage in specific-pathogen-free (SPF) chicken embryos. *Avian Dis*, 2001, **45**(1): 1 - 8.
- [ 6 ] Lee S G, Kim D Y, Hyun B H, *et al.* Novel design architecture for genetic stability of recombinant poliovirus: the manipulation of G/C contents and their distribution patterns increases the genetic stability of inserts in a poliovirus-based RPS-Vax vector system. *J Virol*, 2002, **76**(4): 1649 - 1662.

## Genetic Stability of A Recombinant *Fowlpox Virus* Co-expressing H5 HA and N1 NA Gene of *Avian Influenza Virus*

QIAO Chuan-Ling CHANG Hong-Tao YU Kang-Zhen CHEN Hua-Lan\*

(<sup>1</sup> *Animal Influenza Laboratory of Ministry of Agriculture and National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Science, Harbin 150001, China*)

(<sup>2</sup> *College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China*)

(<sup>3</sup> *National Animal Husbandry and Veterinary Service, Ministry of Agriculture, Beijing 100026, China*)

**Abstract:** A recombinant *fowlpox virus* (rFPV) containing H5 HA and N1 NA gene was serially passaged to passage 25 on specific-pathogen-free (SPF) chicken embryo fibroblast monolayer. The HA gene and NA gene from passage 5, 15 and 25 were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and sequenced. SPF chickens were vaccinated with the recombinant viruses of three passages. The results demonstrated that specific fragments of HA and NA were cloned, identified and sequenced from the three passages, respectively, and there were no change in the amino acid sequences. The virulence and immune efficacy of the recombinant virus was not changed with the passage of the virus. These three passages of recombinant virus could provide complete protection against challenge with homologous HPAIV strain and is genetically stable for at least 25 passages.

**Key words:** Avian Influenza, Recombinant *Fowlpox Virus*, Genetically Stability

Foundation item: Chinese National Program for High Technology Research and Development (2001AA213041)

\* Corresponding author. Tel 86-451-82761925, Fax 86-451-82733132, E-mail: hlchen1@yahoo.com

Received date: 01-18-2004

### 《微生物学报》2005 年征稿计划

为了适应我国生物科技飞速发展的需要, 促进国内外学术交流, 本刊 2005 年征稿的主要内容如下:

1. 国家高技术研究发展计划项目(即国家“863 计划”)和国家基础研究发展规划项目(即国家“973 项目”);
2. 国家自然科学基金资助的重点基金项目、青年基金资助项目、杰出青年基金项目、地区基金项目和面上资助项目以及省部级基金资助项目。
3. 国家科技攻关项目及省部级科技攻关项目。
4. 国际合作项目。
5. 具创新性或有重大突破的基础和应用基础研究成果, 对我国西部大开发具有重要学术价值和应用价值的研究成果。对于高水平的论文本刊将优先发表。欢迎投稿! 欢迎订阅! 欢迎提出宝贵意见!