

共表达 H5 亚型禽流感病毒 HA 和 NA 基因的重组鸡痘病毒及其免疫效力

陈素娟, 孙 蕾, 刘武杰, 孙学辉, 刘秀梵*

(扬州大学 农业部畜禽传染病学重点开放实验室 扬州 225009)

摘 要: 为了构建更为安全有效地抵抗高致病性 H5 亚型禽流感病毒的基因工程疫苗, 将 H5 亚型禽流感病毒分离株的血凝素(HA)基因和神经氨酸酶(NA)基因定向插入鸡痘病毒转移载体 p11S 中, HA 和 NA 基因的启动子分别为 PS 和 PE/L, 获得用不同的启动子启动不同的外源基因且两基因盒方向为背向串联的重组转移载体 p11SH5ANA。将 p11SH5ANA 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。p11SH5ANA 与 wt-FPV 基因组 DNA 之间的同源重组产生了重组鸡痘病毒 rFPV-11SH5ANA。通过在含 X-Gal 的营养琼脂上连续挑选蓝色病毒蚀斑, 获得纯化的重组病毒。经传代证实该重组病毒具有良好的遗传稳定性。用 10^5 PFU 的 rFPV-11SH5ANA 免疫无特定病原体(SPF)鸡, 能激发机体产生有效的血凝抑制(HI)抗体。初步的动物试验表明, 该重组病毒能使经肌肉注射攻毒的 SPF 鸡抵抗 H5 亚型 AIV 的致死性攻击, 保护率为 100%, 显示出一定的应用前景。

关键词: H5 亚型禽流感病毒; 重组鸡痘病毒; 血凝素; 神经氨酸酶

中图分类号 S852.65 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2006)01-0111-04

鸡痘病毒(Fowlpox virus, FPV)是近年来研究开发并逐渐转向实际应用的一个新的病毒载体^[1]。与痘苗病毒(Vaccinia vaccine, VV)相比, 鸡痘病毒具有宿主特异性, 不容易散毒, 对人类及其它哺乳动物无危险性。FPV 基因组庞大, 可插入较长外源基因, 构建多价或多联重组病毒活疫苗, 诱导机体产生体液免疫和细胞免疫, 具有明显的优势, 因而 FPV 是具有广阔应用前景的动物病毒载体。

高致病性禽流感(Highly pathogenic avian influenza, HPAI)是由特定亚型的禽流感病毒引起的禽类高度致死性传染病。HPAI 以感染群呈现高发病率和高死亡率为特征, 常对发病地区养禽业造成毁灭性打击, 影响国际贸易^[2]。AIV 的 NA 蛋白能裂解细胞表面的神经氨酸酶残基, 对病毒的扩散、病毒粒子的释放及防止病毒的聚集有很重要的作用。NA 所诱生的特异性抗体能够一定程度地限制病毒的繁殖。虽然对 AI 起免疫作用的主要是体液免疫, 疫苗的保护力与它所诱导的 HI 抗体水平呈正相关。但有资料显示, HI 抗体的效价与疫苗中的抗原含量呈正相关^[3]。因此, 为更有效地控制 H5N1 亚型 HPAI 的发生, 我们构建了稳定表达 HA 和 NA 基因的重组鸡痘病毒(rFPV-11SH5ANA), 以克服目前在

兽医临床上较广泛使用的抗 H5 亚型禽流感全病毒灭活疫苗的一些缺陷, 如价格高使用不便, 使用后干扰免疫监测和流行病学调查等^[4]。旨在为控制 AI 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 材料

1.1.1 病毒和实验动物: 鸡痘病毒(FPV)282E4 疫苗株购自中国兽药监察所, SPF 鸡胚购于山东家禽研究所实验动物房。SPF 鸡由本室自行孵化。

1.1.2 质粒和宿主菌: 含人工合成强启动子 PS 和 P11-lacZ 标记基因盒的质粒载体由朱爱华^[5]等构建, H5 亚型禽流感病毒的 HA 基因由贾立军等^[6]克隆鉴定, NA 基因由作者克隆鉴定。宿主菌大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 购自华美生物工程公司。

1.1.3 酶和试剂: GeneJammerTM 转染试剂购自瑞士 Roche 公司; F₁₀、M₁₉₉、DMEM 细胞培养基和细胞培养覆盖用琼脂购自美国 Sigma 公司; Klenow 酶、DNA 快速连接试剂盒、DNA 琼脂凝胶抽提试剂盒购自美国 Promega 公司; 限制性内切酶、化学试剂均为国产分析纯。

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目(2004BA519A19)

* 通讯作者。Tel 86-514-7991416; Fax 86-514-7972591; E-mail xfliu@mail.yzu.edu.cn

作者简介 陈素娟(1976-), 女, 江苏靖江人, 在读博士生, 主要从事动物病毒分子生物学方面的研究。

收稿日期 2005-03-24, 接受日期 2005-04-20, 修回日期 2005-09-21

1.2 AIV H5A 和 NA 基因引物的设计

根据本实验室的前期研究设计引物, H5A 基因的扩增引物: 上游引物 PH5A1 的 5' 端引入 *Bam*H I 位点和 Kozak 序列(如方框所示), 下游引物 PH5A2 的 5' 端引入 *Bam*H I、*Hind* III 位点外, 还引入了痘病毒基因组早期基因的转录终止信号(如方框所示)。上、下游引物跨幅约为 1.7kb, 覆盖整个 H5A 基因编码框。引物序列为 H5A-1 5'-AAAGGATCC GCCACC ATGGAGAAAATAGTCTTCTTC -3'; H5A-P2 5'-GGGGATCCAAGCTT ATAAAAA CTGAACTCACAGATTTAAATGC-3';

NA 基因的扩增引物: 上游引物 PNA1 的 5' 端引入 *Sma*I 位点和 Kozak 序列(如方框所示); 下游引物 PNA2 的 5' 端引入 *Xba*I、*Hind* III 位点外, 还引入了痘病毒基因组早期基因的转录终止信号(如方框所示)。上、下游引物跨幅约为 1.4kb, 覆盖整个 NA 基因编码框。引物序列为 NA-P1 5'-AAAGGATCC GCCACC ATGGAAACAATATCACTAATAGCT-3'; NA-P2 5'-GCTGGATCCAAGCTT ACAAAAA GCCAATTA TATACAAATCTTGC-3'。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.3 AIV 的 H5A 和 NA 基因的克隆

用 Expand High Fidelity PCR System 分别扩增出 H5A 和 NA 基因, 经电泳鉴定为预期长度的 PCR 产物, 用 DNA 琼脂凝胶抽提试剂盒进行回收和纯化, 将目的基因与 pGEM-T easy vector 进行连接, 连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 涂布含氨苄青霉素、X-Gal 和 IPTG 的 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 培养 16~18h, 分别挑取白色菌落少量抽提质粒酶切鉴定, 得阳性质粒 pTH5A 和 pTNA。

1.4 共表达 AIV H5A 和 NA 基因的转移载体 p11SH5ANA 的构建

将质粒 pTH5A 用 *Hind* III 酶切经 Klenow 酶补平 酚: 氯仿(1:1)抽提回收质粒 DNA, 用 *Bam*H I 酶切电泳回收 1.7kb 左右片段与用 *Sma*I 和 *Bam*H I 酶切的载体质粒 p11S 连接, 构建成中间载体 p11SH5A 将 pTNA 用 *Bam*H I 酶切电泳回收 1.7kb 片段与用 *Bam*H I 酶切的质粒 pSKIFN 连接构建成插入载体 pSKNA 将 pSKNA 用 *Sal*I 和 *Sac*I 酶切与用 *Sal*I 和 *Sac*I 酶切的质粒 PUC18 连接得到插入载体 pPELNA 将 pPELNA 用 *Hind* III 酶切电泳回收 1.6kb 左右的片段与用 *Hind* III 酶切的 p11SH5A 连接得转移载体 p11SH5ANA。

1.5 共表达 AIV H5A 和 NA 基因的重组病毒 (rFPV-11SH5ANA) 的转染和纯化

转染按 GeneJammerTM 转染试剂的说明进行。待细胞完全产生病变后收获病毒, 反复冻融 3 次, 低速离心去除细胞碎片, 上清用于重组病毒的筛选和纯化, 方法参见文献 [5]。

1.6 重组病毒的遗传稳定性试验

首先分别将 rFPVs 在 CEF 上连续传 20 代, 然后进行后续试验。

1.6.1 模板提取: 将重组病毒接种 CEF 单层, 待病变达 80% 以上时将病毒收获, 1000r/min 5min, 弃上清, 用 200 μ L PBS 轻轻悬浮沉淀, 以 High Pure PCR Template Preparation kit 提取核酸模板 DNA 进行 PCR 反应。

1.6.2 重组病毒的纯度检测: 取第 20 代重组病毒接种形成致密单层的 CEF, 待形成单个散在的病毒蚀斑后, 用含有 200 μ g/mL X-Gal 的营养琼脂进行覆盖, 72h 后在倒置显微镜下观察病毒蚀斑并计算蓝色蚀斑和白色蚀斑所占的比例。

1.6.3 重组病毒的间接免疫荧光试验检测: 在平行实验中, 待形成病毒蚀斑后, 用间接免疫荧光试验进行检测, 然后在倒置荧光显微镜下观察, 计算呈现和未呈现特异荧光的病毒蚀斑比例。以上试验设 wt-FPV 感染的 CEF 为阴性对照。

1.7 动物保护试验

7 日龄 SPF 鸡分别用 10⁵ PFU 的 rFPV-11SH5ANA、rFPV-11SH5A、wt-FPV、和 H5 亚型 AIV 油乳剂灭活苗经颈部皮下进行免疫。分别在免疫后 7、10、14、18 和 21d 分离血清检测 HI 抗体效价, 方法参见文献 [6]。免疫 21d 后以 10⁵ ELD₅₀ H5 亚型 AIV G5 株病毒经肌肉注射攻毒。观察攻 H5 亚型 AIVG5 株病毒的鸡只发病和死亡情况。

2 结果

2.1 中间载体 p11SH5A 及转移载体 p11SH5ANA 的鉴定

将 AIV H5A 基因顺向插入 PS 启动子的下游, 酶切分析证实获得了重组质粒 p11SH5A(图 1-A), 将 PE/L-NA 基因盒相反方向置于 H5A 的背侧, 酶切分析证实获得了重组质粒 p11SH5ANA(图 1-B)。

2.2 rFPVs 的遗传稳定性

用 H5A、NA 基因的扩增引物对第 20 代的 rFPVs 基因组进行扩增, 结果均可以扩增出 1.7kb、1.4kb 大小的目的条带, 与预期值相符合(图 2)。

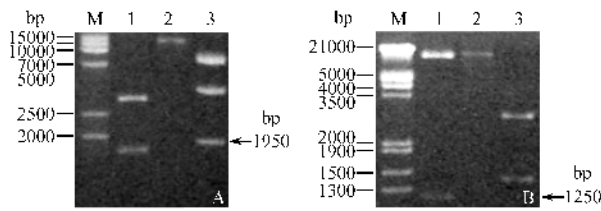


图1 载体 p11SH5A 及 p11SH5ANA 的鉴定图

Fig.1 Restriction enzymes analysis of insertion vector p11SH5A and transferring vector p11SH5ANA

A: 1. pTH5A(*Hind* III + *Bam* HI); 2. p11S(*Bam* HI + *Sma* I); 3. p11SH5A(*Eco* RI); M. DL15000. B: 1. p11SH5ANA(*Pst* I); 2. p11SH5A(*Sal* I + *Sac* I); 3. pPELNA(*Sal* I + *Sac* I); M. λ DNA/*Hind* III + *Eco* RI .

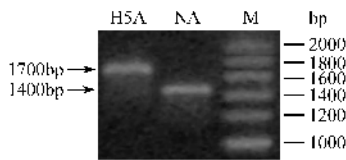


图2 rFPVs PCR 的鉴定

Fig.2 PCR identification of rFPVs

用同一代的 rFPVs 感染 CEF 后,同时进行蓝白斑检测和免疫荧光试验鉴定。当重组病毒在 CEF 上形成蚀斑后,用含有 200 μ g/mL X-Gal 的营养琼脂进行覆盖后,发现所有病毒蚀斑均呈蓝色。

免疫荧光试验检测发现所有病毒蚀斑均呈现特异性荧光,阴性对照组无特异性荧光,以上表明 rFPVs 基因组内的 *LacZ* 基因、H5A 基因和 NA 基因能够稳定遗传和表达。

2.3 共表达 AIV H5A 和 NA 基因的重组鸡痘病毒产生的 HI 抗体

用 rFPV-11SH5ANA、rFPV-11SH5A、wt-FPV 和 H5 亚型 AI 油乳剂灭活苗免疫 SPF 鸡,免疫后采集血清检测 HI 抗体,rFPV-11SH5ANA 在鸡体内诱生的 HI 抗体效价比单表达的 rFPV-11SH5A 在鸡体内诱生的 HI 抗体效价略高,但 21d 后却远远低于 H5 亚型 AI 油乳剂灭活苗诱生的 HI 抗体效价(图 3)。

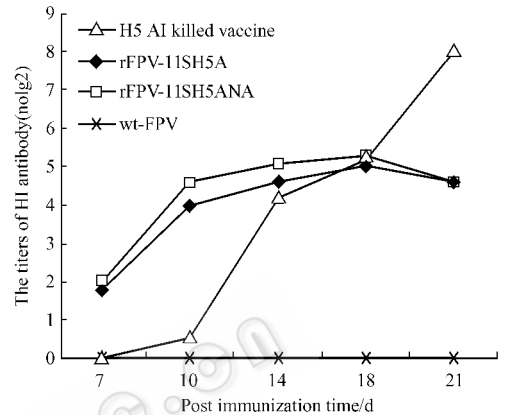


图3 重组病毒产生的针对 H5 亚型 AIV 的 HI 抗体

Fig.3 The titer of HI antibody of post immunized SPF chickens to H5 subtype AIV

2.4 共表达 AIV H5A 和 NA 基因的重组鸡痘病毒在 SPF 鸡体内的免疫效力

免疫后 21d,各组试验鸡用 10^5 ELD₅₀ AIV G5 株肌肉注射攻毒,观察结果显示 rFPV-11SH5ANA 和 rFPV-11SH5A 与 H5 亚型 AI 油乳剂灭活苗均能有效地抵制野毒对试验鸡的致死性攻击(表 1)。

表1 SPF 鸡接种 rFPV-11SH5ANA 后抵抗 H5 亚型 AIV 攻击的免疫保护作用

Table 1 Protection of vaccines against H5 subtype AIV challenge in SPF chickens

Vaccines	Day of immunization	Dose of immunization	Dose of challenge	Morbidity	Mortality	Protection /%
rFPV-11SH5ANA	7d	10^5 PFU	10^5 ELD ₅₀	0/10	0/10	100
rFPV-11SH5A	7d	10^5 PFU	10^5 ELD ₅₀	0/10	0/10	100
H5 subtype killed vaccine	7d	0.2 mL	10^5 ELD ₅₀	0/10	0/10	100
wt-FPV	7d	10^5 PFU	10^5 ELD ₅₀	10/10	10/10	—

Protection = (Mortality of the control group - Mortality of the vaccines group) / Mortality of the control group \times 100% .

3 讨论

DNA 重组技术的快速发展,使得基因工程苗代替传统的灭活苗成为可能。近几年来,禽痘病毒作为重组病毒载体疫苗株之一,以其独特的优越性已成功地用于多种病原基因的表达^[7-12]。HA 和 NA 是构成流感病毒囊膜纤突的主要成分,是流感病毒主要的两种糖蛋白,免疫后刺激机体产生的中和抗体可中和病毒的毒力以抵抗感染和疾病。因此,我

们构建了双表达 HA 和 NA 基因的重组病毒,以提高疫苗的免疫效力。

有学者采用相同的启动子且顺向串联启动不同的外源基因,产生的重组病毒遗传可能不稳定,连续传代后相同的启动子间的外源基因有丢失的可能^[13]。为减少重组病毒的不稳定性,同时克服多个启动子之间可能存在的干扰现象^[14],我们在构建转移载体时,两个不同的基因分别使用不同的启动子连接且背向启动转录,在各个基因终止密码子后引

入痘病毒早期启动子所能识别的转录终止信号 (T5NT), 以减少基因转录时的相互干扰。结果显示, H5A 基因和 NA 基因均能够在重组病毒中得到正确表达, 且具有良好的遗传稳定性。

从 SPF 鸡免疫后产生的 HI 抗体曲线可以看出, 重组鸡痘疫苗比全病毒灭活苗能更快地诱导机体产生有效的 HI 抗体, 双表达的重组鸡痘疫苗比单表达的重组鸡痘疫苗诱导鸡体所产生的 HI 抗体水平略高, 证明插入到同一载体的两个外源基因在鸡体产生 HI 抗体的过程中起到了一定的协同作用, 并没有产生相互干扰。通过本实验获得了双表达 H5 亚型 AIV HA 和 NA 基因的重组鸡痘病毒, 为更好地预防 HPAI 的发生与流行提供了新的工具。

参 考 文 献

- [1] Moss E. Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *PNAS*, 1996, **93**: 1132 - 1138.
- [2] 甘孟侯主编. 禽流感. 北京: 北京农业大学出版社, 1 - 12.
- [3] Wood JM, Kawaoka LA, Newberry E, *et al.* Standardization of inactivated H5N2 influenza vaccine and efficacy against lethal *a/* chicken/pennsylvania/1370/83 infection. *Avian Dis*, 1985, **29**(3): 867 - 872.
- [4] Suarez DL, Schultz-Cherry S. Immunology of avian influenza virus: a review. *Developmental and Comparative Immunology*, 2000, **24**(2-3): 269 - 283.
- [5] 朱爱华, 彭大新, 吴艳涛, 等. 鸡痘病毒载体强启动子的构建和筛选. 扬州大学学报, 1999, **2**(2): 25 - 28.
- [6] 贾立军, 彭大新, 张艳梅, 等. 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. 微生物学报, 2003, **43**(6): 722 - 727.
- [7] Taylor J, Weinberg R, Kawaoka Y, *et al.* Protective immunity against avian influenza induced by a fowlpox virus recombinant. *Vaccine*, 1988, **6**: 504 - 508.
- [8] Tripathy DN, Schnitzlein WM. Expression of avian influenza virus hemagglutinin by recombinant fowlpox virus. *Avian Dis*, 1991, **35**: 186 - 191.
- [9] Heine HG, Boyle DB. Infectious bursal disease virus structural protein VP2 expressed by fowlpox virus recombinant confers protection against diseases in chickens. *Arch Virol*, 1993, **131**: 277 - 292.
- [10] Iritani Y, Aoyama S, Takigami S, *et al.* Antibody response to Newcastle disease virus of recombinant fowlpox expressing a hemagglutinin-neuraminidase of NDV into chickens in the presence of antibody to NDV and FPV. *Avian Dis*, 1991, **34**: 185 - 192.
- [11] Nazerian K, Yanagida N. A recombinant fowlpox virus expressing the envelope antigen of subgroup A avian leukosis/sarcomavirus. *Avian Dis*, 1995, **39**(3): 514 - 520.
- [12] Yu QZ, Thomas B, David TK, *et al.* Protection against turkey rhinotracheitis penumovirus (TRTV) indicated by a fowlpox virus recombinant expressing the TRTV fusion glycoprotein. *Vaccine*, 1994, **12**(6): 569 - 573.
- [13] 乔传玲, 于康震, 贾永清, 等. 表达 H5 亚型禽流感病毒学凝素和神经氨酸酶双基因重组禽痘病毒的构建. 中国预防兽医学报, 2000, **31**.
- [14] 曹慧青, 金凤. 多基因共表达载体的构建策略. 国外医学分子生物学分册, 2002, **24**(1): 1 - 4.

Recombinant fowlpox virus coexpressing HA and NA gene from subtype H5N1 of avian influenza virus and its protective efficacy

CHEN Su-juan, SUN Lei, LIU Wu-jie, SUN Xue-hui, LIU Xiu-fan*

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

Abstract: The hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) gene from subtype H5N1 avian influenza virus were directly inserted into the transferring vector p11S, resulting in the recombinant transferring vector p11SH5ANA. Then p11SH5ANA was transfected into the chicken embryo fibroblast (CEF), which was pre-infected with wild type fowlpox virus, to generate the recombinant fowlpox virus coexpressing H5A and NA (rFPV-11SH5ANA). By selection of blue plaques on the CEF, rFPV-11SH5ANA was obtained and purified. Experiments on SPF chickens demonstrated that the HI antibody titers in chickens vaccinated with HA-NA coexpressed vaccine was higher than those with HA expressed monovalent vaccines, and all chickens receiving either rFPV-11SH5ANA or rFPV-11SH5A were completely protected from the virulent AIV (H5N1) challenge, while those receiving wt-FPV experienced 100% mortality. The results showed that the rFPV-11SH5ANA was a safe and highly efficient gene engineering vaccine candidate for preventing HPAI.

Keywords: H5N1 subtype avian influenza; Recombinant fowlpox virus; Hemagglutinin; Neuraminidase