

# 重组虎源 H5N1 流感病毒 HA 基因犬 2 型腺病毒的 构建与实验免疫研究

高玉伟<sup>1</sup> 夏咸柱<sup>1\*</sup>, 王立刚<sup>2</sup> 刘 丹<sup>2</sup> 黄 耕<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 军事医学科学院军事兽医研究所 长春 130062)

(<sup>2</sup> 黑龙江省东北虎林园 哈尔滨 150027)

**摘 要** H5N1 流感病毒可以对虎和猫产生致死性感染,为研制可用于预防猫科动物流感的新型疫苗,构建了重组虎源 H5N1 流感病毒 HA 基因的犬 2 型腺病毒。将 A/Tiger/Harbin/01/2003(H5N1)的 HA 基因克隆入 pVAX1 载体中,然后将含有 HA 基因的表达盒(CMV + HA + PolyA)克隆入 pVAXΔE3 的 SSP I 酶切缺失处,获得含有 HA 表达盒的穿梭载体 pΔEHA。用 *Sal* I + *Nru* I 分别对 pΔEHA 和 pPoly-2-CAV2 进行双酶切,将含有 HA 表达盒的 *Sal* I + *Nru* I 片段克隆入 pPoly2-CAV2,获得了在 E3 区缺失处插入 HA 表达盒的重组质粒 pCAV-2/HA。释放 CAV-2/HA 重组基因组转染 MDCK 细胞,获得了重组活病毒 CAV2/HA。经 Western blot 分析表明重组表达产物可被流感病毒 HA 单克隆抗体 3A13 所识别。使用该重组病毒免疫猫可以产生效价为 1:8~1:16 的抗 H5 亚型流感病毒血凝抑制抗体。

**关键词** HPAIV 血凝素基因 犬 2 型腺病毒

中图分类号:Q852.65 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2006)02-0297-04

自 2003 年 12 月以来,在韩国、日本、越南、泰国和中国等东亚各国相继爆发了 A 型 H5N1 亚型流感病毒引起的禽流感<sup>[1]</sup>,而且继 1997 香港“禽流感”事件后再次出现了 H5N1 亚型高致病性流感病毒感染人的事件<sup>[2]</sup>。研究表明近年来在亚洲流行的 H5N1 亚型流感病毒对哺乳动物的感染性与致病性日趋增强<sup>[3]</sup>。2003 年 12 月,泰国动物园的两只虎和两只豹死于 H5N1 流感病毒感染<sup>[4]</sup>。2004 年 10 月,泰国再次出现了禽流感病毒感染虎的事件,有近 80 只虎感染,23 只虎死亡,泰国政府表示将对所有病虎进行宰杀。Kuiken 证实 H5N1 流感病毒可感染与虎同为猫科动物的猫并可在猫之间水平传播,用 H5N1 感染的鸡饲喂家猫同样可以使家猫发病死亡<sup>[5]</sup>。本研究曾从发病虎中分离获得流感病毒,并证明该虎源流感病毒对猫具有致病性<sup>[6]</sup>。这些研究表明 H5N1 流感病毒已对虎等猫科动物构成了威胁,而且这些动物也有可能成为 H5N1 流感病毒的新宿主甚至成为“混合器”,如何采取有效的防治措施保护这些珍贵的野生与经济动物成了一个迫在眉睫的问题。目前控制流感,降低发病率和死亡率的最有效、经济的方法是接种疫苗。因而我们以具有广泛的动物感染谱的犬 2 型腺病毒(CAV-2)疫苗株为载体,

将 HA 表达盒插到 CAV-2 的 E3 区缺失处,构建了表达 HA 蛋白的重组 CAV-2 病毒(CAV2/HA),为 H5 亚型流感病毒重组活载体疫苗研究提供了新的思路,也为保护珍贵的濒危野生动物——虎免受 H5 亚型流感病毒的危害提供物质与技术基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 病毒株、细胞株、工程细菌和质粒** CAV-2 SY 毒株、DK 细胞、大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109 菌株、质粒 pVAXΔE3、pPoly2-CAV2、含有虎源流感病毒 A/Tiger/Harbin/01/2003(H5N1) HA 基因的质粒 PVAXHA 和 HA 蛋白的单克隆抗体 3A13 均为本实验室构建并保存(另文发表)。

**1.1.2 主要试剂** T4 DNA 连接酶、AMV Reverse Transcriptase、TaKaRa Ex Taq<sup>TM</sup>、牛小肠碱性磷酸酶(CIAP)、pMD18-T、DNA Blunting kit 和限制性内切酶(*Ssp* I、*Xba* I、*Eco* RV、*Eco* R I、*Kpn* I、*Bsp* I、*Bam* H I、*Hind* III、*Sal* I、*Nru* I)均为 TaKaRa 公司产品。*Asc* I 和 *Cla* I 购自纽英伦生物技术(北京)有限公司。

### 1.2 重组基因组的构建

**1.2.1 转移载体 pVAXΔEHA 的构建** 用 *Mlu* I 和

基金项目 全军医学科研基金(04Z016) 国家自然科学基金(30471Z95)

\* 通讯作者。Tel: 86-431-6758799; E-mail: xia\_xzh@yahoo.com.cn

作者简介 高玉伟(1975-)男,吉林公主岭人,博士研究生,主要从事分子病毒学研究。E-mail: gywtext@yahoo.com.cn

收稿日期 2005-07-21 接受日期 2005-08-31 修回日期 2005-11-10

*Spe* I 双酶切 pVAXHA, 进行凝胶电泳回收含有 HA 表达盒目的片段, 对两末端进行平滑化; 用 *Ssp* I 酶切 pVAXΔE3, 去磷酸化, 两片段连接后获得了 HA 表达盒的转移载体, 重组子命名为 pΔEHA。

**1.2.2 CAV-2/HA 基因组重组质粒的构建** 用 *Sal* I + *Nru* I 分别双酶切 pPoly2-CAV2 和 pΔEHA, 回收目的片段, 将含 HA 表达盒的 *Sal* I + *Nru* I 片段克隆入 pPoly2-CAV2 载体, 构建含 HA 表达盒重组 CAV-2 基因组的质粒 pCAV-2/HA, 分别用 *Xba* I、*Eco*R V、*Eco*R I、*Kpn* I、*Bst*p I、*Bam*H I 和 *Hind* III 进行酶切鉴定。

### 1.3 重组 CAV-2/HA 基因组转染 DK 细胞

将重组 pCAV-2/HA 质粒用 *Asc* I 和 *Cla* I 双酶切后, 在脂质体介导下转染 DK 细胞。按常规进行传代培养, 每隔 7d 传代一次, 出现 CPE 后, 进行常规病毒增殖。将获得的重组病毒命名为 CAV2/HA。

### 1.4 CAV-2/HA 重组病毒的 PCR 鉴定与表达盒的克隆测序

利用 E3 缺失区两侧的特异性引物, 以重组病毒 CAV-2/HA 为模板, 扩增 HA 表达盒核酸片段(在两侧含有 E3 区的部分序列), 以 1% 琼脂糖凝胶电泳分析扩增效果。回收所扩增的核酸片段, 将其克隆入 pMD18-T 后测序, 测序工作由上海联合基因(集团)科技有限公司完成。

### 1.5 CAV-2/HA 病毒中 HA 蛋白表达转录水平的检测

用 CAV-2/HA 的第 4 代 DK 细胞培养物接种 DK 细胞, 置 37℃ 培养 30h, 弃上清, 用 mRNA 提取试剂盒提取 mRNA, 将提取的 mRNA 用 HA 基因特异性引物进行 RT-PCR, 同时用 CAV-2 感染的 DK 细胞培养物作为对照。

### 1.6 表达产物的 SDS-PAGE 和 Western blot 检测

用 CAV-2/HA 的第 4 代 DK 细胞培养物接种 DK 细胞, 置 37℃ 培养 40h 后, 收集上清, 刮下细胞 500 × g 离心, 用 PBS 洗 2 次, 进行 SDS-PAGE 分析, 并用同样方法处理 CAV-2 病毒感染的 DK 细胞作为阴性对照。将 SDS-PAGE 的电泳产物转移至硝酸纤维素膜上, 5% 的脱脂乳封闭, 用虎源流感病毒 HA 蛋白的单克隆抗体 3A13 作为一抗, 以辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 作为二抗, 经 DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 显色, 观察特异性条带。

### 1.7 CAV2/HA 免疫猫试验

用 CAV2-HA 免疫 3 只 40 ~ 50 日龄猫(抗 CAV-2 和 H5N1 病毒的 HI 抗体效价均小于 1:2), 肌注,

剂量  $1 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/只, 免疫前和免疫后第 7d、14d、21d 分别采血制备血清, 56℃ 30min 灭活, -20℃ 冻存待检。用微量 HI 试验检测猫血清抗 H5N1 流感病毒的 HI 抗体。

## 2 结果

### 2.1 pCAV-2/HA 重组质粒的构建与鉴定

将 pVAXHA 表达盒连接到 pVAXΔE3 的 E3 区缺失处, 获得了 HA 表达盒方向与 E3 区转录方向一致的重组子 pΔEHA。将 HA 表达盒克隆入 pPoly2-CAV-2 载体中, 获得了在 E3 区缺失处插入 HA 表达盒的 CAV-2 重组质粒 pCAV-2/HA, pCAV-2/HA 酶切鉴定结果见图 1。

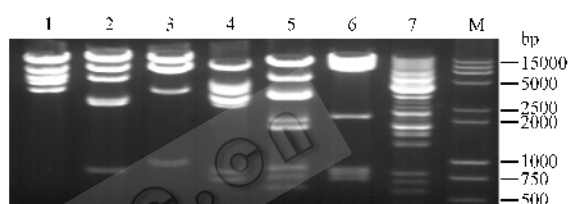


图 1 重组质粒 CAV-2 的酶切鉴定

Fig. 1 Identification of pCAV2/HA by restriction endonuclease digestion. 1. Digested with *Xba* I; 2. Digested with *Eco*R V; 3. Digested with *Eco*R I; 4. Digested with *Kpn* I; 5. Digested with *Bst*p I; 6. Digested with *Bam*H I; 7. Digested with *Hind* III; M. Wide range marker.

### 2.2 重组 CAV-2/HA 基因组转染 DK 细胞

转染 DK 细胞后, 盲传至 3 代时出现典型的 CAV-2 样 CPE, 细胞肿胀变圆, 呈葡萄串样病变, 获得重组病毒 CAV-2/HA。

### 2.3 重组病毒 CAV2/HA 的鉴定

**2.3.1 CAV-2/HA 病毒的 PCR 鉴定与表达盒的测序** 以 CAV-2/HA 病毒基因组为模板, 扩增出与预期片段大小相一致的片段, 约为 3.6kb。将该片段克隆入 pMD18-T, 进行序列测定, 测序结果与 E3 区中的相关序列、pVAX1 中的相关序列以及 HA 基因的测序结果一致。

**2.3.2 CAV-2/HA 病毒中 HA 蛋白表达转录水平的检测结果** 用 RT-PCR 能够扩增出大小约为 1.7kb 的 HA 特异的核酸片段, 而 CAV-2 感染的 DK 细胞扩增结果为阴性。

**2.3.3 表达产物的 SDS-PAGE 和 Western blot 检测** 将得到的重组病毒接种 DK 细胞, 感染后出现 70% 以上 CPE 时(约 40h)分别收集细胞和上清, 使用抗 HA 蛋白的单克隆抗体 3A13, 对上述表达产物进行了蛋白印迹分析(图 2)。Western blot 结果表明, 在 CAV-

2/HA 感染的细胞中可检测到大小约为 64kDa 的表达产物,与预期大小相一致,证明本实验所得的表达产物为 HA 蛋白,在感染细胞上清中没有检测到表达产物,表明所表达的蛋白没有分泌到上清中。

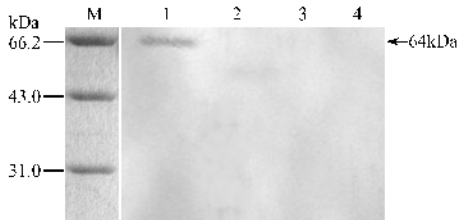


图 2 Western blot 检测图谱

Fig.2 Analysis of Western blot. M. Low weight molecular protein marker ; 1. MDCK cells infected by CAV-2/HA ; 2. Supernatant of MDCK cells infected by CAV-2/HA ; 3. MDCK cells ; 4. Supernatant of MDCK cells infected by CAV-2.

2.3.4 实验免疫结果 :用 CAV2-HA 免疫 3 只 45 ~ 50 日龄猫 (图 3)。免疫前 3 只猫的血清 HI 抗体效价均小于 1:2 3 次免疫后 3 只猫的血清抗 H5N1 流感病毒的 HI 抗体效价为 1:8 ~ 1:16。

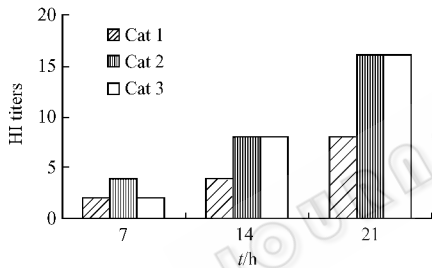


图 3 免疫猫血清 HI 抗体检测结果

Fig.3 The serum HI titers of the immunized cat.

3 讨论

“禽流感”事件在以我国为中心的东亚地区的屡次发生引起了人们高度的重视,研究者认为中国大陆的鸭和其它禽类可能是 H5N1 病毒的储存库。Chen 等<sup>[3]</sup>对在 1999 ~ 2002 年间从中国南部分离的鸭源流感病毒的研究表明近年来在我国流行的 H5N1 亚型流感对哺乳动物的感染性与致病性日趋增强。近日在泰国发生的虎感染禽流感事件和猫 的感染实验表明 H5N1 亚型流感病毒对猫科动物的感染不但对这些动物本身具有危害性,而且也可能作为新的传染源或是中间宿主对人类构成威胁。研制可用于这些动物的疫苗是防治“禽流感”在这些哺乳动物中发生与流行的关键,血凝素抗原是流感病毒最主要的保护性抗原,血凝抑制抗体的水平与病毒中和抗体的水平呈正相关。因此在本实验中采用流

感血凝素基因来构建重组病毒,对猫的免疫实验表明该重组病毒能够诱导机体产生 HI 抗体。此外,呼吸道粘膜表面的分泌型 IgA 在阻止病毒感染中有重要的地位,它能抑制病毒的粘附,是机体保护机制不但可以诱导机体产生体液免疫,还可以诱导机体产生细胞免疫和通过适当的免疫途径产生粘膜免疫。用腺病毒载体表达狂犬病膜蛋白的重组疫苗显示,缺失 E3 区的重组病毒可以通过口服方式进行免疫,而 E1 区缺失的重组病毒则不能通过口服方式免疫<sup>[7]</sup>。因此我们构建了缺失 E3 区的重组病毒,以便于今后的研究中对大型野生动物进行口服免疫,从而达到同时诱导机体产生体液免疫、细胞免疫和粘膜免疫的目的。

犬腺病毒(Canine adenovirus, CAV)属于腺病毒科哺乳动物腺病毒属成员,是在已发现的哺乳动物腺病毒属中致病性最强、感染动物最广的病毒。CAV 分为犬腺病毒 1 型(CAV-1)和犬腺病毒 2 型(CAV-2),两个血清型具有交叉免疫作用,且 CAV-2 弱毒苗克服了 CAV-1 弱毒苗的现有缺点,能激发体液免疫和细胞免疫,通过呼吸道与消化道接种时可以诱导粘膜免疫,同时保护动物抵抗 CAV-1 和 CAV-2 的感染,被应用于预防犬腺病毒的感染<sup>[8]</sup>,大量的血清学调查资料证实,野生动物如黑熊、灰熊、山狗、臭鼬和狼等 CAV-1 的感染率较高,有的可达 81%。在我国,多个地区的不同动物中有相继分离到该病毒和检测到该病毒抗体的报道<sup>[9]</sup>。本室对虎的血清抗体调查过程中发现抗 CAV-1 和 CAV-2 抗体阳性率分别达 26.9%和 9.17%,表明犬腺病毒可以感染虎等猫科动物,Lakatos1 等<sup>[10]</sup>通过抗体调查证实腺病毒可能感染猫。目前本研究室已用犬 2 型腺病毒作为重组活疫苗的病毒载体研制出了表达狂犬病毒糖蛋白,犬瘟热病毒 H 蛋白等重组病毒,免疫研究表明具有良好的应用前景<sup>[11,12]</sup>。本实验中将表达流感病毒 HA 蛋白的重组犬 2 型腺病毒用作重组疫苗可以一举两得:既可以用于预防 H5N1 亚型流感病毒感染又可以预防犬腺病毒的感染,本研究为猫科动物流感的预防提供了一个新的备选方案。

参 考 文 献

[ 1 ] Zeitlin GA, Maslow MJ. Avian Influenza. *Curr Infect Dis Rep*, 2005, 7(3): 193 - 199.

[ 2 ] John HB, Jeremy F, Frederick G, et al. Avian influenza A (H5N1) infection in humans. *N Engl J Med*, 2005, 353(13): 1374 - 1385.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [ 3 ] Chen H, Deng G, Li Z, *et al.* The evolution of H5N1 influenza viruses in ducks in southern China. *PNAS* 2004, **101**( 28 ):10452 – 10457.
- [ 4 ] Keawcharoen J, Oraveerakul K, Thijs K, *et al.* Avian influenza H5N1 in tigers and leopards. *Emerg Infect Dis* 2004, **10**( 12 ):2189 – 2191.
- [ 5 ] Kuiken T, Rimmelzwaan G, Debby van Riel, *et al.* Debby van Riel, Avian H5N1 influenza in cats. *Science* 2004, **306**( 5694 ): 241.
- [ 6 ] 夏咸柱,高玉伟,扈荣良,等.通过病毒分离和基因检测首次发现虎流感.中国兽医学 2003, **23**( 02 ): 107 – 110.
- [ 7 ] Xiang ZQ, Yang YP. A replication-defective human adenovirus serves as a highly efficacious vaccine. *Virology* 1996, **219** :220 – 227.
- [ 8 ] 殷震,刘景华.动物病毒学.第二版.北京:科学出版社, 1997.
- [ 9 ] 贺文琦,夏咸柱,高玉伟,等.大熊猫血清犬腺病毒抗体调查.中国兽医杂志 2004, **40**( 4 ) 24 – 26.
- [ 10 ] Lakatos B, Farkas J, Adam E, *et al.* Serological evidence of adenovirus infection in cats. *Arch Virol* 2000, **145**( 5 ):1029 – 1033.
- [ 11 ] 王永志,张守峰,扈荣良,等.表达狂犬病病毒糖蛋白膜外区重组犬 2 型腺病毒的构建及其免疫原性研究.微生物学报, 2005 **45**( 2 ) 213 – 217.
- [ 12 ] 闫芳,夏咸柱,扈荣良,等.表达犬瘟热病毒 H 基因的重组犬 2 型腺病毒的构建与鉴定.中国兽医学报 2004, **24**( 5 ):425 – 428.

## Construction and experimental immunity of recombinant replication-competent Canine adenovirus type 2 expressing hemagglutinin gene of H5N1 subtype tiger influenza virus

GAO Yu-wei<sup>1</sup>, XIA Xian-zhu<sup>1\*</sup>, WANG Li-gang<sup>2</sup>, LIU Dan<sup>2</sup>, HUANG Geng<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> The Military Veterinary Institute of Academy of Military Medical Science of PLA, Changchun 130062, China)

(<sup>2</sup> Heilongjiang Siberia Tiger Park, Harbin 150027, China)

**Abstract:** H5N1 highly pathogenic avian influenza virus was highly pathogenic and sometimes even fatal for tigers and cats. To develop a new type of vaccine for Felidae influenza prevention, recombinant replication-competent canine adenovirus Type 2 expressing hemagglutinin gene of H5N1 subtype tiger influenza virus was constructed. A/tiger/Harbin/01/2003 (H5N1) HA gene was cloned into PVAX1. The HA expression cassette which included CMV and HA and PolyA was ligated into the E3 deletion region of pVAXΔE. The recombinant plasmid was named pΔEHA. The pΔEHA and the pPoly2-CAV2 were digested with Nru I /Sal I, respectively. The purified Nru I /Sal I DNA fragment containing the HA expression cassette was cloned into pPoly2-CAV2 to generate the recombinant plasmid pCAV-2/HA. The recombinant genome was released from pCAV-2/HA, and was transfected into MDCK cells by Lipofectamine. The recombinant virus named CAV2/HA was gained. Anti-H5N1 influenza virus HI antibody (1:8 ~ 1:16) was detected in the cat immunized with CAV-2/HA.

**Keywords:** HPAIV; HA gene; Canine adenovirus type 2

Foundation item: The Fund of Military Medical Science of PLA (04Z016); Chinese National Natural Science Fund (30471295)

\* Corresponding author. Tel: 86-431-6758799; E-mail: xia\_xzh@yahoo.com.cn

Received: 21 July 2005/Accepted: 31 August 2005/Revised: 10 November 2005

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>