

稳定携带 H5 亚型禽流感病毒候选 DNA 疫苗减毒沙门氏菌的构建及其免疫原性

唐丽华* * 潘志明* * 程宁宁 焦新安* 张晓明

(扬州大学江苏省人兽共患病学重点实验室 扬州 225009)

摘 要 采用 PCR 技术从重组质粒 pVAX1-HA 扩增出禽流感病毒 JSGC(H5N1) 株的血凝素(HA) 基因, 将其克隆入真核表达质粒 pmcDNA3.1+ 中, 获得重组表达质粒 pmcDNA3.1-HA。通过电穿孔转化法将重组质粒转入减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL7207* 构建成功携带 DNA 疫苗的重组沙门氏菌 SL7207*(pmcDNA3.1-HA)。经体内体外试验证实, 重组质粒 pmcDNA3.1-HA 在沙门氏菌中的稳定性显著高于 pcDNA3.1-HA。将重组菌 SL7207*(pmcDNA3.1-HA) 和 SL7207*(pcDNA3.1-HA) 分别以 2×10^9 CFU 剂量两次口服免疫 BALB/c 小鼠, 免疫小鼠可产生针对禽流感病毒 HA 蛋白的黏膜抗体。重组菌以 5×10^9 CFU 剂量两次口服免疫试验鸡, 免疫鸡的小肠样品中可测到针对禽流感病毒 HA 蛋白的黏膜抗体, 且 SL7207*(pmcDNA3.1-HA) 免疫组的抗体效价高于 SL7207*(pcDNA3.1-HA) 免疫组。免疫保护试验结果显示, SL7207*(pmcDNA3.1-HA) 和 SL7207*(pcDNA3.1-HA) 免疫组的免疫保护率均与空载体组之间存在显著性差异 ($P < 0.05$), 且 SL7207*(pmcDNA3.1-HA) 免疫组的保护率较 SL7207*(pcDNA3.1-HA) 免疫组提高了 22.6%, 说明稳定携带 H5 亚型禽流感病毒 DNA 疫苗的减毒沙门氏菌具有良好的免疫原性和免疫保护性。

关键词 : 禽流感; DNA 疫苗; 减毒鼠伤寒沙门氏菌; 质粒稳定性; 免疫效力

中图分类号: Q78; Q93 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)04-0662-05

高致病性禽流感 (highly pathogenic avian influenza, HPAI) 是由正粘病毒科 A 型流感病毒引起的一类禽类病毒性传染病, 是国际兽疫局 (OIE) 确定的法定通报疾病 (List disease) [1]。目前, 我国对该病的防治主要采用油乳剂全病毒灭活疫苗进行免疫预防, 效果确实, 在禽流感的防治中发挥了巨大的作用。但是灭活苗也存在一些缺陷, 如存在散毒的潜在危险, 不能有效激发细胞和黏膜免疫应答等。因此, 有必要研究一种安全、高效的新型禽流感疫苗以弥补上述不足。研究表明, 利用减毒沙门氏菌载体运送 DNA 疫苗, 具有同时激发机体产生细胞免疫、体液免疫和黏膜免疫应答, 并可获得对载体菌的免疫等优点, 有良好的应用前景 [2-5]。但是, 高拷贝外源性真核表达质粒在细菌中的稳定性是影响沙门氏菌介导的 DNA 疫苗免疫效果的关键因素之一 [6-8]。

为此, 本研究在真核表达载体 pmcDNA3.1+ 的基础上 [9] 构建禽流感病毒候选 DNA 疫苗, 并将其导入减毒鼠伤寒沙门氏菌, 获得携带 DNA 疫苗的重组沙门氏菌, 通过体外和体内试验判断 DNA 疫苗在沙门氏菌中的稳定性。在此基础上, 对重组沙门氏

菌的免疫原性进行评价, 以期开发一种新型的禽流感基因工程黏膜疫苗奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和毒株 真核表达质粒 pcDNA3.1+ 购自 Invitrogen 公司, 真核表达载体 pmcDNA3.1+、重组真核表达质粒 pVAX1-HA、pcDNA3.1-HA 由本室构建保存; 鼠伤寒沙门氏菌 SL7207*(*sifA*⁻) 本室构建保存 [10], 禽流感病毒 JSGC(H5N1) 由本室保存。

1.1.2 试剂 限制性内切酶 *Hind* III、*Nhe* I、*Apa* I 和 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; Expand High Fidelity PCR System、Agarose Gel DNA Extraction Kit 和 High Pure Plasmid Isolation Kit 购自 Roche 公司; 5-溴-4-氯-β-D-半乳糖苷 (X-gal) 和异丙基硫代-β-D-半乳糖苷 (IPTG) 购自 Promega 公司; 酵母抽提物、蛋白胨购自 Oxoid 公司; HRP 标记的羊抗鼠 IgG、IgM 和 IgA 酶标二抗以及 HRP 标记的羊抗鸡 IgA 和兔抗鸡 IgG、IgM 酶标二抗均购自 Sigma 公司; 其它化学试剂均为国产分析纯。

基金项目: 国家自然科学基金 (30425031); 全国优秀博士学位论文作者专项资金 (FANEDD200358); 国家 863 计划 (2006AA10A206) 扬州大学高层次人才科研启动基金 (2004)

* 通讯作者。Tel: 86-514-7971136; Fax: 86-514-7311374; E-mail: jiao@yzu.edu.cn

** 作者简介: 两位作者对本文有同等贡献。唐丽华 (1980-), 女, 江苏大丰人, 现在盐城市疾病预防控制中心工作。潘志明 (1972-), 男, 江苏靖江人, 博士, 副教授, 研究方向为微生物学与免疫学。E-mail: zmpan@yzu.edu.cn

其他作者: 黄金林

收稿日期: 2006-12-12; 接受日期: 2007-01-25; 修回日期: 2007-05-22

1.1.3 试验动物:6 周龄雌性 BALB/c 小鼠由扬州大学比较医学中心提供;1 日龄商品代伊莎褐蛋鸡购自江苏省无锡市养鸡场集团公司。

1.2 引物的设计与合成

设计合成一对引物,用于 HA 基因的 PCR 扩增,上游引物 5'-ACAGCTAGCAAAATGGAGAAAATAGTG-3';下游引物:5'-CACAAAGCTTTACAATCTGAAGTCACAG-3'。其中上游引物的 5'端引入了 *Nhe* I 限制性酶切位点,下游引物的 3'引入了 *Hind* III 限制性酶切位点,下划线为酶切位点序列。这对引物覆盖 HA 基因的完整阅读框架,预期扩增出的目的带为 1748bp。

1.3 重组真核表达质粒 pmcDNA3.1-HA 的构建

以重组真核表达质粒 pVAX1-HA 为模板,采用设计的一对引物,以高保真 DNA 聚合酶扩增目的基因。扩增产物回收后连入 pmcDNA3.1+载体,连接产物转化与重组克隆的酶切鉴定均参照文献[11]进行。重组质粒命名为 pmcDNA3.1-HA,由上海英骏生物工程技术有限公司测序鉴定。

1.4 重组沙门氏菌的构建

采用电转化的方法将质粒 pmcDNA3.1-HA 和 pcDNA3.1-HA 分别转化进减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL7207*。所获得阳性转化子命名为 SL7207*(pcDNA3.1-HA)、SL7207*(pmcDNA3.1-HA)。

1.5 重组沙门氏菌的稳定性试验

1.5.1 重组沙门氏菌的体外稳定性试验:分别挑取新鲜的 SL7207*(pmcDNA3.1-HA)和 SL7207*(pcDNA3.1-HA)单个菌落接种于含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C,100r/min 振荡培养 10~12h,在培养的不同时间点吸取菌液测定 OD₆₀₀值,同时,菌液涂布于含与不含氨苄青霉素的 LB 平板上,37 $^{\circ}$ C 培养 24h 后菌落计数,以含氨苄青霉素 LB 平板上生长的菌落数除以不含氨苄青霉素 LB 平板上的菌落数来计算质粒的稳定性,结果以百分数表示。

1.5.2 重组沙门氏菌的体内稳定性试验:6 周龄 BALB/c 小鼠随机分为 3 组,每组 12 只,腹腔接种 2 \times 10⁶CFU 的 SL7207*(pmcDNA3.1-HA)或 SL7207*(pcDNA3.1-HA),空白对照组腹腔注射 100 μ L 无菌 PBS。在免疫后的 1、3、5、7d 每组扑杀 3 只小鼠,无菌取脾脏,用含 0.1% Triton X-100 的 PBS 研磨后作梯度稀释,分别涂布含与不含氨苄青霉素的 LB 平板,37 $^{\circ}$ C 培养 24h,计算质粒的稳定性。

1.6 重组沙门氏菌对小鼠的免疫原性试验

1.6.1 免疫:6 周龄 BALB/c 小鼠分为 4 组,每组 7 只,分别为 SL7207*(pmcDNA3.1-HA)免疫组、SL7207*(pcDNA3.1-HA)免疫组、SL7207*

(pcDNA3.1)免疫组以及空白对照组。细菌以口服途径免疫,免疫剂量为 2 \times 10⁹CFU/0.2mL/只,空白对照组以 PBS 替代,于首免后 2 周以同样的方式再次免疫。

1.6.2 血清样品及黏膜样品的采集与测定:分别于首免后 2 周、二免后 2 周采集血清样品,二免后 2 周采集肠道黏膜样品[4]。以 ELISA 法测定 HA 蛋白特异性血清和小肠黏膜抗体效价[12]。具体方法如下:以纯化的 H5 亚型禽流感病毒用碳酸盐缓冲液(pH9.6)作一定倍数稀释包被酶标板,50 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C 过夜包被;PBST 洗涤,用含 10% 犊牛血清的 PBS 封闭,200 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C 24h;PBST 洗涤,加样品,50 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 水浴孵育 2h;PBST 洗涤,每孔再加入 1:10000 稀释的 HRP 标记羊抗鼠 IgG、IgM 酶标二抗或 1:10000 稀释的 HRP 标记羊抗鼠 IgA 酶标二抗 50 μ L,37 $^{\circ}$ C 水浴孵育 2h;PBST 洗涤,加入新配置的 OPD 底物溶液每孔 50 μ L,37 $^{\circ}$ C 水浴避光显色 10min;2mol/L H₂SO₄ 终止反应,50 μ L/孔,测 OD₄₉₀值。以 P/N \geq 2.1 判为阳性,以满足 P/N \geq 2.1 的抗体最大稀释倍数的倒数作为抗体的效价。

1.7 重组沙门氏菌对商品鸡的免疫原性试验

1.7.1 试验鸡分组与免疫接种:1 日龄商品代伊莎褐蛋鸡分为 5 组,每组 35 羽,分别为 SL7207*(pmcDNA3.1-HA)免疫组、SL7207*(pcDNA3.1-HA)免疫组、SL7207*(pcDNA3.1)免疫组、油苗免疫组和空白对照组。细菌免疫组均以 5 \times 10⁹CFU/0.2mL/羽的剂量口服免疫,空白对照组以 PBS 替代,共免疫 2 次,分别于 4 日龄和 18 日龄进行,油苗组于 4 日龄颈部皮下接种商品化油乳剂灭活疫苗,0.2mL/羽。

1.7.2 样品采集与测定:各免疫组在首免后第 14、35 天分别经翅静脉采血,每组各采 10 只,分离血清,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。首免后第 35 天每组剖杀 5 只试验鸡,制备肠道黏膜样品。HA 蛋白特异性血清抗体效价的测定按照国际兽医局(OIE)标准进行。按 1.6.2 方法测定小肠黏膜抗体效价,测定结果用 SPSS11.5 软件进行统计分析。

1.7.3 攻毒:于二免后 3 周,试验鸡用禽流感病毒 JSGC(H5N1)以滴鼻和口服途径进行攻击,攻毒剂量为 6 \times 10⁴ELD₅₀,攻毒后连续观察 14 天,计算免疫保护率,结果用 SPSS11.5 软件进行统计分析。

$$\text{免疫保护率} = \frac{\text{攻毒后存活鸡只数}}{\text{攻毒鸡只数}} \times 100\%$$

2 结果

2.1 重组表达质粒 pmcDNA3.1-HA 的构建结果

以重组真核表达质粒 pVAX1-HA 为模板,经 PCR 扩增获得了编码 H5N1 AIV HA 的 DNA 片段(7kb),经酶切连接至 pmcDNA3.1+载体,获得的

重组质粒 pmcDNA3.1-HA。重组质粒经 *Nhe* I 和 *Hind* III 双酶切后电泳,出现 1.7kb 的插入片段和 5.0kb 的载体片段,与预期结果相符,说明 HA 基因已被正确插入表达载体 pmcDNA3.1+。序列测定结果表明,扩增出的 HA 基因没有发生碱基突变。

2.2 重组表达质粒转化减毒沙门氏菌的结果

将 pmcDNA3.1-HA 和 pcDNA3.1-HA 转化减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL7207* 挑取单个菌落抽提质粒,以质粒为模板,PCR 扩增各重组质粒中的 HA 基因,电泳结果表明,出现约 1.7kb 大小的条带,表明重组质粒已被成功地导入减毒沙门氏菌中。

2.3 重组沙门氏菌的稳定性试验结果

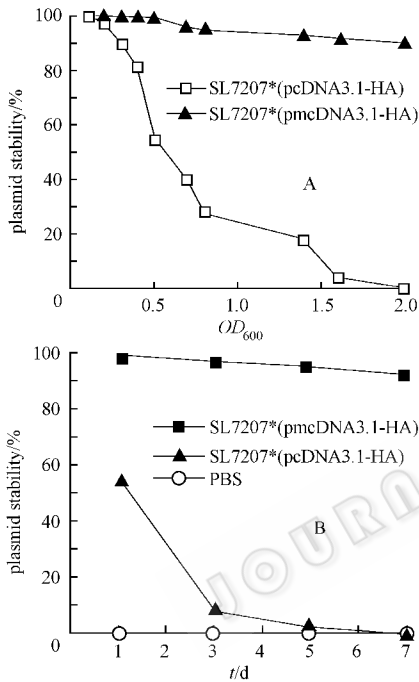


图1 SL7207* (pcDNA3.1-HA) 和 SL7207* (pmcDNA3.1-HA) 的体外质粒 (A) 和 BALB/c 小鼠体内的质粒 (B) 稳定性比较结果

Fig. 1 The plasmid stability of SL7207* (pcDNA3.1-HA) and SL7207* (pmcDNA3.1-HA) in LB liquid medium culture (A), and in BALB/c mice (B).

2.3.1 重组沙门氏菌体外稳定性试验结果:图 1-A 所示,SL7207* (pcDNA3.1-HA) 接种含氨苄青霉素 (100 μ g/mL) LB 液体培养基后,在细菌生长至 OD_{600} 值为 1.0 时,质粒就丢失达 70%。而 SL7207* (pmcDNA3.1-HA) 在 OD_{600} 值达到 1.0 时含质粒细菌的比例在 95% 左右,说明重组质粒 pmcDNA3.1-HA 在细菌保持稳定。

2.3.2 重组沙门氏菌体内稳定性试验结果:SL7207* (pcDNA3.1-HA) 在小鼠体内不稳定,在第 1 天约有 40% 的质粒丢失,第 3 天 90% 的质粒丢失,到第 7 天 100% 质粒丢失;而 SL7207* (pmcDNA3.1-HA) 在体内却相当稳定,在免疫后的第 7 天携带质粒的重组菌仍保持在 90% 以上(图 1-B)。

2.4 重组沙门氏菌对小鼠的免疫原性试验结果

由表 1 可知,首免后 2 周和二免后 2 周,各免疫组小鼠抗 H5 亚型 AIV 血清抗体效价都较低,与空载体 SL7207* (pcDNA3.1) 免疫组之间差异不显著 ($p > 0.05$)。在激发黏膜抗体应答方面,在二免后 2 周,SL7207* (pcDNA3.1-HA) 和 SL7207* (pmcDNA3.1-HA) 免疫组均检测到特异性抗体,且与空载体 SL7207* (pcDNA3.1) 免疫组和空白组之间差异显著 ($p < 0.05$)。

2.5 重组沙门氏菌对商品鸡的免疫原性试验结果

2.5.1 HA 蛋白特异的血清及黏膜抗体测定结果:免疫前通过抽样检测发现试验鸡群带有较高的抗 H5 亚型 AIV 的母源抗体,HI 效价在 $2^8 \sim 2^9$ 之间。对首免后 2 周 (18d) 和二免后 3 周 (39d) 各试验组的血清样品进行测定,结果如表 2 所示。首免后 2 周,各试验组血清抗体效价都较低,各组之间没有显著性差异 ($P > 0.05$);二免后 3 周,灭活苗免疫组的血清抗体效价较高 (26.40 ± 1.71),与其它试验组差异显著 ($P < 0.05$),而其它试验组的血清抗体效价都较低,各组之间的差异不显著 ($P > 0.05$)。小肠黏膜抗体的测定结果显示,SL7207* (pmcDNA3.1-HA) 免疫组和 SL7207* (pcDNA3.1-HA) 免疫组均与空载体 SL7207* (pcDNA3.1) 免疫组、空白对照组以及油苗组之间存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

表 1 重组沙门氏菌对 BALB/c 小鼠的免疫原性试验结果

Table 1 The results of immunogenicity assay of DNA vaccines delivered by *Salmonella typhimurium* in BALB/c mice

Group	GM antibody titers as determined by ELISA		
	Titers of antibodies in serum		Titers of antibodies in small intestinal mucosa
	2W post-priming	2W post-boosting	2W post-boosting
SL7207* (pcDNA3.1-HA)	7.00 \pm 2.74	14.00 \pm 5.48	28.00 \pm 10.95*
SL7207* (pmcDNA3.1-HA)	10.00 \pm 6.12	20.00 \pm 12.24	36.00 \pm 8.94*
SL7207* (pcDNA3.1)	6.00 \pm 2.24	12.50 \pm 5.00	6.80 \pm 5.58
Control	5.00	10.00	5.60 \pm 2.19

* denotes significant difference compared with corresponding control group and SL7207* (pcDNA3.1) group ($p < 0.05$).

表 2 重组沙门氏菌对商品代伊莎褐蛋鸡的免疫原性试验结果

Table 2 The results of immunogenicity assay of DNA vaccines delivered by *Salmonella typhimurium* in commercial ISA brown chickens

Group	Antibody titers of sera determined by HK (log ₂)		Antibody titers of samples of small intestinal mucosa determined by ELISA
	18d	39d	39d
SL7207* (pcDNA3.1-HA)	2.40 ± 0.69	1.90 ± 0.57	36.00 ± 16.73*
SL7207* (pmcDNA3.1-HA)	2.40 ± 0.52	2.40 ± 1.07	44.00 ± 16.73*
SL7207* (pcDNA3.1)	2.10 ± 0.56	2.10 ± 0.86	14.00 ± 5.48
Killed vaccine	3.30 ± 0.48	6.40 ± 1.71*	12.00 ± 4.47
Control	2.50 ± 0.66	1.60 ± 0.52	10.00

* denotes significant difference compared with corresponding control group SL7207* (pcDNA3.1) group and killed vaccine group ($p < 0.05$).

2.5.2 免疫保护试验结果:表 3 所示,重组菌免疫组和灭活苗免疫组的免疫保护率均与空载体免疫组以及空白对照组之间存在显著性差异($p < 0.05$),其中,SL7207* (pmcDNA3.1-HA)免疫组与 SL7207* (pcDNA3.1-HA)免疫组相比,保护率提高了 22.6%。

表 3 重组沙门氏菌对商品代伊莎褐蛋鸡的免疫保护结果

Table 3 The protective efficacy of DNA vaccines delivered by recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* for commercial ISA brown chickens

Group	Number of chickens	Number of survivors	Number of dead	Protective rate/%
SL7207* (pcDNA3.1-HA)	30	17	13	56.7*
SL7207* (pmcDNA3.1-HA)	29	23	6	79.3*
SL7207* (pcDNA3.1)	29	8	21	27.6
Killed-vaccine	30	30	0	100*
Control	30	8	22	26.7

* denotes significant difference compared with corresponding control group and SL7207* (pcDNA3.1) group ($p < 0.05$).

3 讨论

携带高拷贝外源表达质粒的重组沙门氏菌一般都存在着质粒不稳定现象。陈洪等^[13]在体外培养携有柯萨奇 B 组病毒 DNA 疫苗的沙门氏菌 SL7207 (pcDNA3-VPI) 时发现,细菌在培养 6h 前,含有质粒的细菌比例可在 95% 以上,但培养时间超过 16h,质粒的稳定性不足 20%。在本试验中也出现了这一现象。重组菌 SL7207* (pcDNA3.1-HA) 在体外培养的早指数期能很好保持质粒的稳定性,随后质粒迅速丢失。小鼠体内试验也说明了该重组菌很不稳定,在第 1 天就约有 40% 的质粒丢失,第 3 天 90% 的质粒丢失,到第 7 天 100% 质粒丢失。而本试验所用的真核表达质粒 pmcDNA3.1+ 是由 pcDNA3.1+ 改造而来,该质粒在沙门氏菌中的稳定性较 pcDNA3.1+ 显著提高^[9]。重组菌 SL7207* (pmcDNA3.1-HA) 体外培养至 OD 值达 1.0 时仍能保持很高的质粒稳定性,含质粒的有效重组菌比例可达 90%。小鼠体内试验也发现 SL7207* (pmcDNA3.1-HA) 相当稳定,在免疫后的第 7 天携带质粒的重组菌仍保持在 90% 以上。

pcDNA3.1+ 是高拷贝质粒,在沙门氏菌中很不稳定,在无抗性压力下的体外或体内条件下极易丢

失^[7]。质粒丢失的主要原因在于外源的高拷贝质粒对于宿主菌来讲是一个沉重的“代谢负担”,高拷贝质粒在单个细菌中的拷贝数可达到 500 个,其中 DNA 的复制、相关蛋白质的表达占用了细菌的大量资源,在抗生素压力下,高拷贝质粒依赖其携带的抗生素抗性基因来维持在宿主菌体内的稳定性;一旦外源压力不再存在,高拷贝质粒将迅速从宿主菌丢失^[14]。这种情况在以氨苄青霉素抗性基因为选择标记的高拷贝质粒中更为明显,氨苄青霉素抗性基因编码的 β -内酰胺酶是一种周质酶,在周质中积聚超过一定量后会分泌至培养液中,导致氨苄青霉素迅速失效,从而导致质粒从宿主菌中快速丢失。而本试验中的真核表达质粒 pmcDNA3.1+ 是以 PCR 扩增出 pcDNA3.1+ 不含启动子的 bla 基因来代替原先的完整基因,新质粒 pmcDNA3.1+ 保留了其它的元件如 pUC 复制位点,多克隆位点等。结果表明,通过降低高拷贝质粒抗性基因表达量有助于减轻宿主沙门氏菌的代谢压力,提高质粒的稳定性。

研究中发现,质粒在细菌中的稳定性会影响重组菌对小鼠的免疫原性。在二免后 2 周,质粒稳定性高的重组菌 SL7207* (pmcDNA3.1-HA) 免疫组在激发机体产生的黏膜 IgA 抗体效价高于 SL7207* (pcDNA3.1-HA) 免疫组。对鸡的免疫原性试验中也得到相似结论,从激发机体黏膜免疫方面来看,质粒稳定性高的重组菌 SL7207* (pmcDNA3.1-HA) 免疫组优于 SL7207* (pcDNA3.1-HA) 免疫组;从各免疫组对鸡的免疫保护效力来看,SL7207* (pmcDNA3.1-HA) 免疫组的攻毒保护率比 SL7207* (pcDNA3.1-HA) 免疫组提高了 22.6%。这些结果说明,对于沙门氏菌介导的 DNA 疫苗来说,提高其外源重组质粒稳定性有助于提高免疫效力。

本研究前期工作显示,重组沙门氏菌可以提供 SPF 鸡良好的免疫保护(未发表资料)。大量的研究表明,DNA 疫苗免疫可克服母源抗体的干扰^[15],本研究则采用带有 H5 亚型禽流感母源抗体的商品代伊莎褐蛋鸡。从免疫保护结果来看,油苗免疫组产生了高水平的体液免疫应答,并能提供强毒攻击的有效保护,但亦存在不能有效诱导黏膜免疫应答的不足,而重组菌免疫组却能有效激发机体产生良好

的黏膜免疫应答。如果将这两种疫苗联合免疫,就可以取长补短,从而提高免疫效果,有可能克服免疫鸡带毒排毒的关键问题。

本研究初步显示了提高质粒稳定性可增强沙门氏菌介导的 DNA 疫苗免疫保护作用,预示这一疫苗技术对于禽流感的防治将有良好的应用前景。

参 考 文 献

- [1] 甘孟侯. 禽流感. 第二版. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [2] Dietrich G, Spreng S, Gentschev I, *et al.* Bacterial systems for the delivery of eukaryotic antigen expression vectors. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 2000, **10**: 391 - 399.
- [3] 潘志明, 焦新安, 黄金林, 等. 携带新城疫病毒 DNA 疫苗的鼠伤寒沙门氏菌及其安全性与免疫效力. *微生物学报*, 2005 **45** (6): 937 - 941.
- [4] 张小荣, 焦新安, 潘志明, 等. 以减毒鼠伤寒沙门氏菌运送的 H5 亚型禽流感病毒 DNA 疫苗的安全性及免疫效力. *中国兽医学报*, 2004 **24**: 531 - 533.
- [5] 潘志明, 张晓明, 焦新安, 等. 重组减毒细菌运送 CD8 + T 细胞表位的效应分析. *细胞与分子免疫学杂志*, 2006 **22** (6): 730 - 733.
- [6] Curtiss R, Galan JE, Nakayama K, *et al.* Stabilization of recombinant avirulent vaccine strains in vivo. *Res Microbiol*, 1990, **141**: 797 - 805.
- [7] Dunstan SJ, Simmons CP, Strugnell RA. In vitro and in vivo stability of recombinant plasmids in a vaccine strain of *Salmonella enterica* var. Typhimurium. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2003, **37**: 111 - 119.
- [8] Spreng S, Viret JF. Plasmid maintenance systems suitable for GMO-based bacterial vaccines. *Vaccine*, 2005, **23**: 2060 - 2065.
- [9] 张晓明, 焦新安, 唐丽华, 等. 下调 *bla* 表达提高 pcDNA3.1+ 在重组菌中的稳定性. *微生物学通报*, 2005 **32**: 51 - 55.
- [10] 张晓明, 焦新安, 唐丽华, 等. 鼠伤寒沙门氏菌 SL7207 *SifA*-突变株的构建和鉴定. *微生物学报*, 2005 **45** (3): 349 - 354.
- [11] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T 主编. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫主译. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1997: 19 - 323.
- [12] Fukutome K, Watarai S, Mukamoto M, *et al.* Intestinal mucosal immune response in chickens following intraocular immunization with liposome-associated *Salmonella* antigen. *Dev Comp Immunol*, 2001, **25** (5 - 6): 475 - 84.
- [13] 陈洪, 刘晶星, 何平, 等. 口服基因疫苗质粒稳定性测定. *微生物学杂志*, 2003 **23**: 1 - 2.
- [14] Galen JE, Levine MM. Can a 'flawless' live vector vaccine strain be engineered? *Trends Microbiol.* 2001, **9**: 372 - 376.
- [15] Krishnan B R. Current status of DNA vaccines in veterinary medicine. *Adv Drug Delivery Rev*, 2000, **43**: 3 - 11.

Construction and immunogenicity of attenuated *Salmonella typhimurium* harbouring stable DNA vaccine against H5 subtype of Avian influenza virus

TANG Li-hua, PAN Zhi-ming, CHENG Ning-ning, JIAO Xin-an*, ZHANG Xiao-ming
(Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract : The hemagglutinin protein (HA) gene of avian influenza virus was amplified by polymerase chain reaction (PCR) from the recombinant plasmid pVAX1-HA, and subcloned into eukaryotic expression vector pmcDNA3.1+. The HA gene was identified by sequencing. The recombinant plasmids were transformed into attenuated *Salmonella typhimurium* SL7207*, and the recombinants were designated as SL7207(pmcDNA3.1-HA). *In vitro* and *in vivo* experiments showed that the plasmid stability of pmcDNA3.1-HA is apparently higher than pcDNA3.1-HA in SL7207*. In order to compare the immune response induced by those two recombinant bacteria, BALB/c mice were immunized orally with them at the dosage of 2×10^9 CFU respectively. Both SL7207*(pcDNA3.1-HA) and SL7207*(pmcDNA3.1-HA) initiated HA-specific mucosal antibodies in immunized mice. Furthermore, commercial ISA brown chickens were immunized with SL7207*(pcDNA3.1-HA) and SL7207*(pmcDNA3.1-HA) at the dosage of 5×10^9 CFU and boosted two weeks later with the same dose. Intestinal mucosal immune responses were observed and their levels were significantly higher than that of negative and positive control. The result of protective immunity showed that the chicken immunized with SL7207*(pmcDNA3.1-HA) had the protective rate of 79.3%, higher than that of SL7207*(pcDNA3.1-HA) with 56.7%. In summary, the DNA vaccine delivered by attenuated *Salmonella typhimurium* has good immunogenicity. A novel mucosal DNA vaccine was developed and could be useful for controlling the infection and epidemic of avian influenza in the poultry.

Keywords : avian influenza ; DNA vaccine ; attenuated *Salmonella typhimurium* ; plasmid stability ; immune efficacy

Foundation item : National Natural Science Foundation of China (30425031) ; FANEDD200358 ; National Programs for High Technology Research and Development of China (2006AA10A206), Science Foundation of High Level Scholar of Yangzhou University (2004)

* Corresponding author. Tel 86-514-7971136 ; Fax 86-514-7311374 ; E-mail : jiao@yzu.edu.cn

Other authors : HUANG Jin-lin

Received : 12 December 2006 / Accepted : 25 January 2007 / Revised : 22 May 2007 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>