

# 利用反向遗传学技术构建 H5 亚型禽流感高产疫苗株 Generation High Yield Vaccine Strain Wholly Derived from Avian Influenza Viruses by Reverse Genetics

刘明<sup>1\*</sup> 张云<sup>1</sup> 刘春国<sup>1</sup> 潘蔚琦<sup>1,2</sup> 刘超男<sup>1,2</sup> 杨涛<sup>1</sup>

LIU Ming<sup>1\*</sup>, ZHANG Yun<sup>1</sup>, LIU Chun-Guo<sup>1</sup>, PAN Wei-Qi<sup>1,2</sup>, LIU Chao-Nan<sup>1,2</sup> and YANG Tao<sup>1</sup>

1 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 兽医生物技术国家重点实验室, 哈尔滨 150001

2 东北农业大学, 生命技术学院, 哈尔滨 150030

1 National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute of CAAS, Harbin 150001, China

2 College of Life Science Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

**摘要** 采用 RT-PCR 技术分别扩增了鹅源高产禽流感病毒的 6 条内部基因片段, 近期分离的 H5N1 亚型禽流感病毒的血凝素基因以及 N3 亚型参考毒株的神经氨酸酶基因, 分别构建了 8 个基因的转录与表达载体, 利用反向遗传学技术拯救出了全部基因都源于禽源的重组流感病毒疫苗株 rH5N3。通过对血凝素蛋白 HA1 和 HA2 连接肽处的 5 个碱性氨基酸 (R-R-R-K-K) 基因缺失与修饰, 从而消除了病毒基因的毒力相关序列, 拯救的 rH5N3 疫苗株对鸡和鸡胚均无致病性, 病毒在鸡胚尿囊液和细胞培养上清的 HA 效价得到极大提高, 分别为 1 2048 和 1 512。制备的禽流感疫苗免疫动物后 4~5 周即可诱导产生高效价的 HI 抗体, 鸡免疫后 18 周依然保持高水平的 HI 抗体。重组疫苗不论是对于国内早期分离的禽流感病毒 A/Goose/Guangdong/1/96 还是近期分离的 A/Goose/HLJ/QFY/04 都能够产生完全的免疫保护作用, 免疫鸡攻毒后不发病、不排毒、不死亡。带有 N3 鉴别诊断标记禽流感疫苗株的研制为 H5N1 高致病性禽流感的防治提供了新的技术保障。

**关键词** 禽流感病毒, 反向遗传学, 高产株, 疫苗

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)05-0720-07

**Abstract** Highly pathogenic avian influenza A (HPAI) viruses of the H5N1 subtypes caused enormous economical loss to poultry farms in China and Southeastern Asian countries. The vaccination program is a reliable strategy in controlling the prevalence of these disastrous diseases. The six internal genes of the high-yield influenza virus A/Goose/Dalian/3/01 (H9N2), the hemagglutinin (HA) gene of A/Goose/HLJ/QFY/04 (H5N1) strain, and the neuraminidase gene from A/Duck/Germany/1215/73 (H2N3) reference strain were amplified by RT-PCR technique. The HA gene was modified by the deletion of four basic amino acids of the connecting peptide between HA1 and HA2. Eight gene expressing plasmids were constructed, and the recombinant virus rH5N3 was generated by cells transfection. The infection of chicken embryos and the challenge tests involving chickens demonstrated that the recombinant H5N3 (rH5N3) influenza virus is avirulent. The allantoic fluids of rH5N3-infected eggs contain high-titer influenza viruses with hemagglutination unit of 1 2048, which are eight times those of the parental H5N1 virus. The rH5N3 oil-emulsified vaccine could induce hemagglutination inhibition (HI) antibodies in chickens in 2 weeks post-vaccination, and maximum geometric mean HI-titer were observed 4~5 weeks post-vaccination and were kept under observation

Received: March 27, 2006; Accepted: May 17, 2006.

This work was supported by a grant from the National High Technology Research and Development Program of China (863 program) (No. 2003AA241110).

\* Corresponding author. Tel: 86-451-85935069; E-mail: liuming04@126.com

国家高技术研究与发展计划项目资助 (No. 2003AA241110).

for 18 weeks. The rH5N3-vaccinated chickens were fully protected against morbidity and mortality of the lethal challenge of the H5N1 HPAI viruses, A/Goose/Guangdong/1/96 and A/Goose/HLJ/QFY/04, which had 8 years expansion and differences among multiple amino acids in HA protein. The N3 neuraminidase protein marker makes it possible to distinguish between H5N1-infected and H5N3 vaccinated animals.

**Key words** avian influenza virus, reverse genetics, high yield strain, vaccine evaluation

高致病性禽流感 (HPAI) 是由正黏病毒科 A 型流感病毒中的 H5 或 H7 亚型引起的一种禽类的急性、高度接触性烈性传染病。鸡、火鸡、鸭、鹅、鹌鹑等家禽及野鸟、水禽、海鸟等野禽均可感染<sup>[1]</sup>。从 2003 年末到 2004 年初, 亚洲 8 个国家暴发了家禽感染 H5N1 型禽流感疫情<sup>[2]</sup>。在此期间, 发生疫情的国家中有 1 亿多只家禽死于禽流感或被扑杀。2004 年 3 月疫情得到初步控制。自 2004 年 6 月底以来, 柬埔寨、中国、印度尼西亚、哈萨克斯坦、马来西亚、蒙古、俄罗斯、泰国和越南家禽又暴发了 H5N1 型高致病性禽流感新疫情。土耳其和罗马尼亚的家禽及克罗地亚的野生候鸟中也出现了 H5N1 型禽流感感染。截至目前为止, H5N1 亚型禽流感疫情已经在欧洲大陆十几个国家出现, 并且蔓延到了非洲<sup>[3,4]</sup>。H5N1 亚型高致病性禽流感不仅给养禽业造成了巨大的经济损失, 严重威胁着养禽业健康发展, 同时也对人类的健康带来了巨大的威胁<sup>[5]</sup>。经 WHO 证实, 从 2003 年起至 2006 年 2 月止 H5N1 亚型禽流感病毒至少造成了 169 人感染, 91 人死亡。其中, 中国发生了 12 人感染 H5N1 亚型禽流感病毒, 8 人死亡病例。

流感病毒粒子呈球形, 病毒囊膜表面的血凝素蛋白 (HA) 和神经氨酸酶蛋白 (NA) 是流感病毒的主要免疫原性抗原。HA 是诱导体液免疫的主要保护性抗原, 大量的研究表明 HA 蛋白在病毒入侵宿主细胞的过程中起着重要作用<sup>[6]</sup>。由 HA 蛋白裂解而成的两个蛋白片段 HA1 和 HA2 连接肽处的氨基酸组成决定着 HPAI 的致病性和组织嗜性<sup>[7,8]</sup>。抗 HA 蛋白抗体能抑制病毒的血凝活性并能中和病毒, 是病毒诱导机体产生的主要保护性抗体。由于 HA 基因突变而引起的 HA 抗原变异往往会导致免疫失败和变异毒株流行。

全群扑杀和生物安全防护是及时扑灭和控制高致病性禽流感的主要措施。但是, 对于养殖管理水平参差不齐的东南亚各国, 疫苗免疫接种可能是防止禽流感疫情大范围流行的最经济方法。但是采用传统方法构建 H5 亚型禽流感疫苗株却非常困难<sup>[9]</sup>, 流感病毒反向遗传学操作技术为禽流感疫苗

的研制提供了新的技术手段<sup>[10]</sup>。1999 年 Neumann 等<sup>[11]</sup>首次建立了由 17 个质粒拯救流感病毒的反向遗传学操作技术。2002 年 Hoffmann 等<sup>[12]</sup>报道了采用该技术构建人流感疫苗株, 2003 年 Liu 等<sup>[13]</sup>采用人流感疫苗高产株 PR8 为骨架成功地构建 H5 亚型禽流感疫苗株。本研究通过 RT-PCR 克隆了 H9 亚型禽源高产病毒株的 6 条基因片段, 采用反向遗传学操作构建了全部基因都来自禽源流感病毒的重组疫苗株, 该毒株具有抗原匹配性好、安全、高产、带分子标记的特征。现将实验结果报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒、细胞与载体

高致病性禽流感病毒株 A/Goose/HLJ/QFY/04 (H5N1), 高产禽流感病毒 A/Goose/Dalian/3/01 (H9N2) 和禽流感参考毒株 A/Duck/Germany/1215/73 (H2N3) 分别用无菌磷酸盐缓冲液 (PBS) 作 1:10<sup>3</sup> 稀释后接种 9~11 日龄 SPF 鸡胚, 37℃ 培养 48h 后收集尿囊液, -70℃ 保存备用。pHW2000 转录和翻译双向载体<sup>[14]</sup>由美国 St. Jude 儿童医院的 Webster 教授惠赠。DH5 $\alpha$  大肠杆菌感受态细胞 购自宝生物工程 (大连) 公司。293T 和 MDCK 细胞购自北京博达泰克公司。

### 1.2 主要试剂

病毒 RNA 提取试剂 TRIzol, cDNA 合成试剂, OPTI-MEM 细胞培养液和脂质体 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司; Ex TaqDNA 聚合酶, 限制性内切酶, T4 DNA 连接酶购自宝生物工程 (大连) 公司; 质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒 购自上海华舜生物工程有限公司。

### 1.3 引物设计

参照已知序列设计禽流感反转录通用引物 Uni-12: 5'-AGCAAAGCAGG-3' 根据流感病毒基因片段末端保守特性, 分别合成流感病毒内部基因 NP、M、NS 和 NA 基因 RT-PCR 扩增引物, 引物序列参照 Erich Hoffmann 报道<sup>[15]</sup> 其中 PB2、PB1、PA 基因以及 HA 基因扩增引物进行了重新设计, 上海博亚生物技术有限公司合成。引物序列如表 1。

表 1 禽流感病毒聚合酶基因和 HA 基因引物序列  
Table 1 The primers sequences for three polymerase and HA genes of influenza virus

Designation of Primers	Primer 's sequences	Fragments
Ba-PB2-1	5'-TATTGGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGTC-3'	PB2-I
Ba-PB2-1089R	5'-ATATGGTCTCTATCTTCAATGTTGGAGGTT-3'	
Ba-PB2-1084	5'-TATTGGTCTCAAGATAAAAGTACATGAAGGAT-3'	PB2-II
Ba-PB2-2341R	5'-ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGCTCGTTT-3'	
Aar-PB1-1	5'-TATTCACCTGCCTCAGGGAGCGAAAGCAGGCAAACCATTTG-3'	PB1-I
Aar-PB1-1266R	5'-ATATCACCTGCCATRTTAAACATGCCCATCATCAT-3'	
Aar-PB1-1255	5'-TATTCACCTGCATGTTAAAYATGCTAAGTACGGTC-3'	PB1-II
Aar-PB1-2341R	5'-ATATCACCTGCCTCGTATTAGTAGAAACAAGGCATTT-3'	
Bm-PA-1	5'-TATTGGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGTAC-3'	PA-I
PA-607R	5'-CGGACTGACGAAAGGARTCC-3'	
PA-587	5'-GGGAYTCCTTTCGTCAGTCCG-3'	PA-II
Bm-PA-2233R	5'-ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTACTT-3'	
Bm-HA-1	5'-TATTGGTCTCAGGGAGCAAAGCAGGG-3'	HA1
Bm-H5-1025R2	5'-ATTACGTCTCTCCTCTTGTCTCTCTTTGAGGGTATTTCTGAGT-3'	
Bm-H5-1020	5'-ATTACGTCTCAGGAGACTATTTGGAGCTATAGCAGG-3'	HA2
Bm-NS-890R	5'-ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGTGTTT-3'	

The Ba, Aar and Bm represents primers' 5' end of restriction endonuclease sites (RE) of *Bsa* I, *Aar* I and *Bsm* B I. The digits on the primers represent the first nucleotide of the primers, the character R means reverse direction, and the underline nucleotides represent the restriction endonuclease recognized sites and the bold characters represent the 5' end overhangs post the digestions with the corresponding RE.

#### 1.4 病毒 RNA 提取、cDNA 合成和基因片段的扩增

按 Trizol 试剂说明书从含有流感病毒鸡胚尿囊液中提取病毒 RNA。以禽流感反转录通用引物 Uni-12 为引物,采用禽源反转录酶 AMV,进行反转录合成 cDNA,以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应程序 94℃ 预变性 4min,94℃ 变性 30s,54℃ 退火 30s,72℃ 延伸 3min,循环扩增 30 次,72℃ 延伸 10min。

#### 1.5 高产禽流感病毒内部基因重组质粒的构建

以高产禽流感病毒 A/Goose/Dalian/3/01 (H9N2) 的 cDNA 为模板,RT-PCR 扩增 6 条内部基因片段,回收纯化扩增到的目的片段,分别用各自的引物所带有的限制性内切酶酶切过夜,回收目的片段与经 *Bsm* B I 酶切的 pHW2000 载体进行连接反应。PB2、PB1 基因各自的两条片段分别同时与载体进行三片段连接反应。PA 基因的两个片段通过基因搭桥方法扩增全长片段后再与载体连接。细菌转化、质粒提取、酶切鉴定等按《分子克隆实验指南》方法进行。各基因重组质粒 pML-PB2、pML-PB1、pML-PA、pML-NP、pML-M 和 pML-NS 由上海英俊生物技术公司进行序列测定。

#### 1.6 HA 和 NA 基因重组质粒的构建

以高致病性禽流感病毒 A/Goose/HLJ/QFY/04 (H5N1) 的 cDNA 为模板,分别以引物 Bm-HA-1/Bm-HA-1025R2 扩增 HA 基因的 HA1 片段,以引物 Bm-

HA-1020/Bm-NS-890R 扩增 HA 基因的 HA2 片段;以禽流感参考株 A/Duck/Germany/1215/73 (H2N3) 的 cDNA 为模板,以引物 Bm-NA-1/Bm-NA-1413R 扩增 NA 基因片段。纯化后的 PCR 产物分别经 *Bsm* B I 或 *Bsa* I 酶切,然后与 pHW2000 载体进行连接,按上述方法转化感受态细胞,筛选到重组质粒,然后对重组质粒 pML-HA 和 pML-NA 进行序列测定。

#### 1.7 细胞转染与重组病毒拯救

按 Hoffmann 等报道方法略加改进进行<sup>[14]</sup>。取 8 个阳性质粒 (pML-PB2、pML-PB1、pML-PA、pML-NP、pML-M、pML-NS、pML-HA 和 pML-NA) 各 1μg,加入适量的无血清、无抗生素 OPTI-MEM 细胞培养液使之体积为 100μL。取 8μL 脂质体 lipofectamine 2000 加入到 92μL 的 OPTI-MEM 细胞培养液中,二者充分混合,室温作用 5min 后,将其加到含有质粒的微量反应管中,质粒和脂质体室温作用 30min 后,加 800μL 的 OPTI-MEM 细胞培养液使总体积为 1mL。胰酶消化 293T 和 MDCK 细胞各 5 × 10<sup>5</sup> 混匀后接种 6 孔组织培养板,过夜培养形成单层。OPTI-MEM 细胞培养液洗细胞单层两次,将上述质粒和脂质体混合物加到细胞单层表面。37℃、5% CO<sub>2</sub> 组织培养箱中转染 6h,弃去质粒和脂质体混合物,添加含 0.5μg/mL TPKC - trypsin (Sigma 公司) 的 OPTI-MEM 细胞培养液,培养 72h 后收集细胞上清液,细胞上清液进行血凝活性检测,拯救出的重组病毒命名为 H5N3。重

组流感病毒的拯救与鉴定过程如图 2 所示。

### 1.8 病毒鸡胚扩增及其血凝和血凝抑制试验

rH5N3 细胞上清接种 9~11 日龄的 SPF 鸡胚尿囊腔, 37℃ 孵化 48h, 收集尿囊液, 作为疫苗毒分装保存。采用 0.5% 的公鸡红细胞, 按常规微量法分别进行血凝(HA)和血凝抑制(HI)试验。

### 1.9 重组病毒的基因序列分析

rH5N3 感染鸡胚尿囊液提取病毒 RNA, 合成 cDNA, 各基因片段特异引物 RT-PCR 扩增相应片段后测序, 同时设立未经反转录的 RNA 对照, 以排除尿囊液中转染质粒 DNA 的干扰。

### 1.10 鸡胚半数感染剂量(EID<sub>50</sub>)的测定

rH5N3 分别用 PBS 做 1:10~1:10<sup>10</sup> 稀释, 每个稀释度接种 5 枚(0.1mL/枚)SPF 鸡胚, 37℃ 孵化 48h, 收集尿囊液, 测定尿囊液的血凝活性, 按 Reed-Muench 法计算病毒的 EID<sub>50</sub>。

### 1.11 静脉接种致病指数(IVPI)的测定

1:10 稀释的 rH5N3 病毒尿囊液, 按 0.2mL 的剂量静脉接种 10 只 4 周龄 SPF 鸡, 负压隔离器中饲养, 观察 10d, 每日观察鸡的临床表现, 分别计算 IVPI。

### 1.12 rH5N3 疫苗免疫效力试验

6 周龄 SPF 鸡随机分组, 每组 8 只, 负压隔离器中饲养。rH5N3 重组病毒经甲醛灭活后, 按矿物油: 含毒尿囊液为 1:2 的比例制成油包水型油乳剂灭活疫苗, 颈部皮下免疫注射, 免疫后不同时间采血, 以

```
Original HA nt 1037 → 1078 CCT CAA AGA GAG AGA AGA AGAAAA AAG AGA GGA CTA TTT GGA
Original HA aa 339 → 350 P Q R E R R R K K R G L F G
                                     ↓
Modified HA nt 1037 → 1066 CCT CAA AGA GAG ACA --- --- --- AGA GGA CTA TTT GGA
Modified HA aa 339 → 348 P Q R E T --- --- --- R G L F G
```

图 1 HA 基因修饰前、后的核苷酸序列和编码的氨基酸序列

Fig.1 Original and modified nucleotides and amino acids sequences of the HA gene

## 2.2 重组病毒的拯救与序列测定

8 个重组质粒转染 293T/MDCK 混合培养细胞单层, 72h 后细胞出现明显的细胞病变, 293T 细胞树突消失, 细胞皱缩, 聚集呈团块状, MDCK 细胞出现大量崩解, 相反对照质粒转染细胞无明显的形态学改变。阳性质粒转染前后细胞形态学变化见图 3。收集细胞培养上清既获得重组禽流感病毒 rH5N3, 血凝试验测定细胞上清液的血凝价为 1:32, 经 MDCK 细胞传代后, rH5N3 血凝价可达 1:512。rH5N3 接种的 SPF 鸡胚尿囊液血凝价高达 1:2048。rH5N3 连续鸡胚传 10 代, 第 10 代 rH5N3 病毒核酸序列与

血凝抑制(HI)试验检测血清中的 HI 抗体滴度, 计算抗体效价的几何均数(GMT)。

### 1.13 rH5N3 疫苗免疫鸡攻毒试验

3 周龄 SPF 鸡, 随机分组, 免疫前采血, HI 抗体检测结果全部阴性。rH5N3 灭活疫苗按 0.3mL/只的剂量颈皮下接种免疫, 同时设空白对照组。免疫后 3 周采血测定 HI 抗体滴度, 时采用滴鼻、点眼方式进行 H5N1 亚型强毒攻击, 攻毒剂量 100 CLD<sub>50</sub>, 每天观察记录鸡的临床表现。攻毒后的第 3 天和第 7 天分别采取咽喉和泄殖腔拭子, 进行病毒分离与滴定。攻毒后 14d 采血测定攻毒耐过鸡的 HI 抗体水平。

## 2 结果

### 2.1 重组质粒的构建

经过琼脂糖凝胶电泳初步筛选的重组质粒, 进行 PCR 鉴定和序列测序, 分别筛选到含有 8 个目的基因 PB2、PB1、PA、NP、M、NS、HA 和 NA 的重组质粒 pML-PB2、pML-PB1、pML-PA、pML-HA、pML-NP、pML-NA、pML-M 和 pML-NS。其中重组质粒 pML-HA 基因已按实验设计缺失了 HA 蛋白连接肽处的 4 个连续碱性氨基酸 R-R-K-K, 对其中 343 位的精氨酸 R 突变为苏氨酸(T), HA 基因核苷酸序列与实验设计完全一致。HA 基因连接肽修饰前、后的核苷酸序列和编码的氨基酸序列如图 1。克隆的 N3 基因序列与其他实验室发表的 N3 序列(GenBank 登录号 AY586422)相同。

rH5N3 亲本病毒株核酸序列同。

### 2.3 重组病毒的抗原性分析

HI 试验表明, rH5N3 重组病毒的血凝活性能够被鸡抗 Gs/Guangdong/1/96 和 Gs/HLJ/QFY/04 高免血清完全抑制, HI 抗体效价分别为 1:512 和 1:1024, 但是不能够被亲本毒 Gs/Dalian/01(H9N2)的高免血清所抑制。抗参考株 H2N3 的高免血清对 rH5N3 病毒的 NI 抑制价为 1:800; 抗 Gs/HLJ/QFY/2004 的高免血清对 rH5N3 重组病毒的 NI 抑制价小于 1:10。由此可见 H5N3 病毒具有符合实验设计的 H5 和 N3 亚型血清表型。

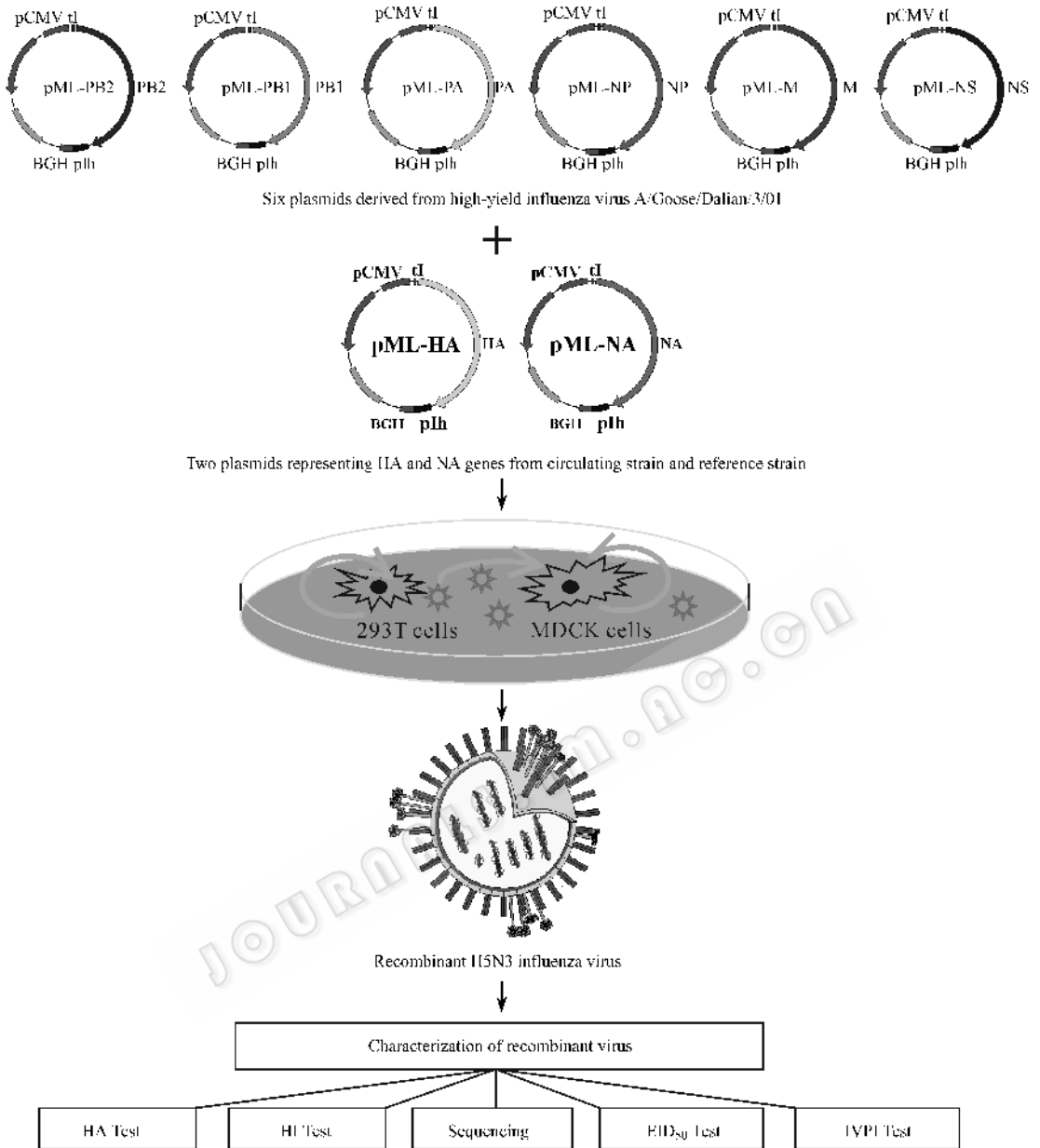


图2 重组 H5N3 禽流感病毒的拯救及其鉴定流程

Fig.2 Characterization and generation of recombinant H5N3 avian influenza virus

## 2.4 重组病毒的生物学特性

rH5N3 重组病毒的 EID<sub>50</sub> 为  $2 \times 10^9$  /mL, SPF 鸡胚感染 rH5N3 48h 后尿囊液的 HA 效价即可达到 1:2048;  $1 \times 10^8$  EID<sub>50</sub> /0.1mL 剂量接种鸡胚, 培养 96h 鸡胚仍然存活, 表明重组病毒对鸡胚无致死性。

## 2.5 鸡致病性试验结果

rH5N3 重组病毒静脉接种 SPF 鸡, 10d 观察期内感染鸡临床表现正常, 无任何异常或临床发病, IVPI 指数等于 0, 可见 rH5N3 对鸡属于低致病性毒株。病毒感染后 3d 从部分鸡 (2/10) 的气管中分离到病毒, 但是所有鸡的泄殖腔样品检测均为阴性 (0/10)。

## 2.6 灭活苗的免疫效力试验

rH5N3 油乳剂灭活苗免疫后 7d 个别鸡检测出现低效价 HI 抗体, 免疫后 2 周所有鸡都产生明显的免疫应答反应, 即使 0.1mL 低剂量免疫组 HI 抗体也可达到 1:128 ( $7 \log_2$ ) 以上; 免疫后 4 周 HI 抗体水平达到高峰, HI 抗体可达 1:256 ( $8 \log_2$ ) 以上; 免疫后 18 周 HI 抗体几何均数仍然大于 1:16 这一抗体保护临界值。鸡免疫抗体水平见表 2。

## 2.7 高致病性禽流感攻毒试验结果

3 周龄鸡以 0.3mL 的剂量免疫同样也能够诱导产生高效价的 HI 抗体, 免疫鸡 HI 抗体的几何均数

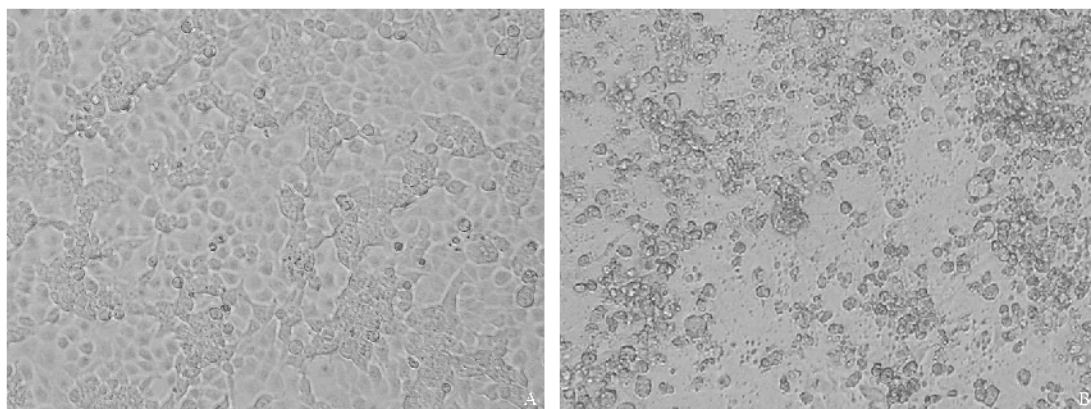


图 3 阳性质粒转染 293T/MDCK 混合培养细胞前后的形态

Fig.3 Microphotographs of mixed cell culture of 293T and MDCK

A before cell transfection ; B 72h after cell transfection.

表 2 rH5N3 免疫后不同时间的 HI 抗体水平  
Table 2 The HI antibodies titers of chickens post rH5N3 vaccination

Group	Dosage/mL	HI antibodies GMT titers post-vaccination/d						
		D7	D17	D22	D29	D43	D84	D126
Vaccine group	0.1L	< 1:10	1:152	1:256	1:445	1:194	1:45	1:45
	0.3	< 1:10	1:256	1:588	1:891	1:294	1:222	1:111
	0.6	< 1:10	1:512	1:675	1:1024	1:445	1:222	1:168
	0.9	< 1:10	1:861	1:1024	1:1024	1:891	1:337	1:222
Control group	0.6	< 1:10	< 1:10	< 1:10	< 1:10	< 1:10	< 1:10	< 1:10

表 3 rH5N3 疫苗免疫接种鸡的强毒攻毒试验结果  
Table 3 Challenge results of rH5N3 vaccine immunized chickens

Group	Virus strains	Before challenge HI titer( GMT )	Diseased/Dead/Total	Virus isolation/Total	Post challenge HI titer( GMT )
Vaccine group	Gs/GD/1/96	1:588	0/0/8	0/8 <sup>a</sup>	1:861
Control group	Gs/GD/1/96	< 1:10	8/8/8	8/8 <sup>b</sup>	-
Vaccine group	Gs/HLJ/QFY/04	1:512	0/0/8	0/8 <sup>a</sup>	1:675
Control group	Gs/HLJ/QFY/04	< 1:10	8/8/8	8/8 <sup>c</sup>	-

a : No viruses were isolated from day 3 and day 7 tracheal and cloacal swabs of challenged chickens ; b : All the chickens were killed on day 5 post-challenge , viruses were isolated from both tracheal and cloacal swabs with the titer  $\geq 10^3$  EID<sub>50</sub>/mL ; c : All chickens were killed on day 2 post-challenge , viruses were isolated from both tracheal and cloacal swabs .

在 1:512 ( 9log<sub>2</sub> ) 以上。100CLD<sub>50</sub> 高致病性禽流感病毒攻击 ,rH5N3 疫苗免疫鸡无任何鸡出现临床发病或死亡 ,病毒分离全部为阴性。空白对照组鸡在攻毒后 2 ~ 5d 全部死亡 ,病毒分离全部阳性。可见 ,rH5N3 疫苗免疫不但能够保护鸡抵抗高致病性禽流感病毒的致死性攻击 ,同时也能够起到减少或防止病毒在鸡群中传播的作用。结果见表 3。

### 3 讨论

A 型流感病毒的反向遗传学操作即指由病毒负链 RNA 合成 cDNA 然后将其克隆到基因转录和/或表达载体 转染易感细胞后拯救出流感病毒的过程。与传统方法相比反向遗传学操作可以大大加速流感

疫苗株的研制速度。尤其是对于人流感疫苗株的构建 ,只需将目前流行株的 HA 和 NA 基因分别克隆 ,然后与人流感病毒 PR8 高产株的内部基因表达质粒共转染细胞 ,即可拯救出理想的疫苗株。Hoffmann 等<sup>[12]</sup> ( 2002 年 ) 用 8 质粒系统证明了这是一个简单而快捷的方法。随后不久 ,Subbarao 等<sup>[16]</sup> ( 2003 年 ) 用 12 质粒系统拯救出 H5N1-PR8 重组疫苗株 ,Liu 等<sup>[13]</sup> ( 2003 年 ) 用 8 质粒系统拯救出 NA 基因亚型不同于流行株的 H5N3-PR8 重组疫苗株。Webby 等<sup>[17]</sup> ( 2004 年 ) 按 GMP 标准 ,采用 H5N1 亚型人流感病毒 ,在 4 周左右时间构建成功 H5N1-PR8 人流感疫苗株。总之 ,上述疫苗株不论是禽流感疫苗株还是人流感疫苗株 ,都是建立在人流感疫苗

PR8 高产株基础之上的。为了克服人-禽流感病毒重组株可能的安全隐患,我们构建了以 H9N2 亚型高产禽流感病毒为骨架的 8 质粒系统,拯救出了全部基因片段都来自禽源的重组禽流感疫苗株 rH5N3。由于重组病毒的所有基因全部来自禽源,保留了禽流感病毒与人流感病毒之间所固有的种间屏障,大大降低了重组禽流感疫苗株感染人的机会。

由于流感疫苗的免疫效果主要取决于疫苗株与流行株的抗原相关性,为此世界卫生组织根据全球流感病毒监测网的检测结果提前一年推荐下一年的流感疫苗株。虽然流行病学证据显示 1996 年中国广东分离株 A/Goose/Guangdong/1/96 是目前东南亚地区流行的 H5N1 亚型高致病性流感病毒的共同祖先,但是 2004-2005 年新分离株与其相比不仅基因型不同,而且存在着较大的抗原性差异<sup>[18]</sup>。为了保证禽流感疫苗的最佳免疫效果,必须根据禽流感的流行变异情况更新疫苗株,以确保疫苗能够有效预防新出现的变异株。

虽然抗 NA 蛋白抗体可能对流感病毒感染起到一定程度的保护作用,但是只有抗 HA 蛋白抗体才能够中和流感病毒感染。因此,本研究选择 2004 年国内流行的 H5N1 亚型高致病性禽流感代表株作为疫苗株 HA 基因供体,通过基因操作删除了 HA1 和 HA2 之间与毒力相关的 5 个连续碱性氨基酸(R-R-R-K-K),从而使得疫苗株对鸡和鸡胚的毒力完全消除。同时选取国内流感病毒中较少见的神经氨酸酶亚型 N3 作为疫苗株的分子标记<sup>[19]</sup>,为疫苗免疫家禽和野毒感染家禽的鉴别诊断提供方便。rH5N3 疫苗株具有安全、低毒、高产的特性,与野毒株相比不仅抗原性完全一致,而且鸡胚生长性能大大改善,尿囊液中病毒 HA 效价提高 8 倍以上,基因重组疫苗株不仅具有很好的遗传稳定性,而且具有良好的免疫原性,免疫动物完全能够抵抗强毒株的致死性攻击。该疫苗株的成功研制为 H5N1 亚型高致病性禽流感的防控提供了新的技术保障。

致 谢 感谢美国 St. Jude 儿童研究医院 Erich Hoffmann 博士和 Richard Webby 博士热心帮助。

## REFERENCES (参考文献)

[ 1 ] Webster RG, Bean WJ, Gorman OT *et al.* Evolution and ecology of influenza A virus. *Microbiol Rev*, 1992, **56**: 152-179

[ 2 ] Li KS, Guan Y, Wang J *et al.* Genesis of a highly pathogenic and

potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature*, 2004, **430**: 209-213

- [ 3 ] Abbott A, Pearson H. Fear of human pandemic grows as bird flu sweeps through Asia. *Nature*, 2004, **427**(6974): 472-473
- [ 4 ] Enserink M, Avian influenza. H5N1 moves into Africa, European Union, deepening global crisis. *Science*, 2006, **311**(5763): 932
- [ 5 ] Ungchusak K, Auewarakul P, Dowell SF *et al.* Probable person-to-person transmission of avian influenza A (H5N1). *N Engl J Med*, 2005, **352**: 333-340
- [ 6 ] Wilson IA, Cox NJ. Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin. *Annu Rev Immunol*, 1990, **8**: 737-771
- [ 7 ] Baigent SJ, McCauley JW. Glycosylation of haemagglutinin and stalk-length of neuraminidase combine to regulate the growth of avian influenza viruses in tissue culture. *Virus Res*, 2001, **79**: 177-185
- [ 8 ] Perdue ML, Suarez DL. Structural features of the avian influenza virus hemagglutinin that influence virulence. *Vet Microbiol*, 2000, **74**: 77-86
- [ 9 ] Kilbourne D. Future influenza vaccines and the use of genetic recombinants. *Bull World Health Organ*, 1969, **41**: 643-645
- [ 10 ] Subbarao K, Katz JM. Influenza vaccines generated by reverse genetics. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2004, **283**: 313-342
- [ 11 ] Neumann G, Watanabe T, Ito H *et al.* Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 9345-9350
- [ 12 ] Hoffmann E, Krauss S, Perez D *et al.* Eight-plasmid system for rapid generation of influenza virus vaccines. *Vaccine*, 2002, **20**: 3165-3170
- [ 13 ] Liu M, Wood JM, Elis T *et al.* Preparation of a standardized, efficacious agricultural H5N3 vaccine by reverse genetics. *Virology*, 2003, **314**: 580-590
- [ 14 ] Hoffman E, Neumann G, Kawaoka Y *et al.* A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 6108-6113
- [ 15 ] Hoffman E, Stech J, Guan Y *et al.* Universal primer set for full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch Virol*, 2001, **146**: 2275-2289
- [ 16 ] Subbarao K, Chen H, Swayne D *et al.* Evaluation of a genetically modified reassortant H5N1 influenza A virus vaccine candidate generated by plasmid-based reverse genetics. *Virology*, 2003, **305**(1): 192-200
- [ 17 ] Webby R, Perez D, Coleman J *et al.* Responsiveness to a pandemic alert: use of reverse genetics for rapid development of influenza vaccines. *Lancet*, 2004, **363**: 1099-1103
- [ 18 ] The World Health Organization Global Influenza Program Surveillance Network. Evolution of H5N1 avian influenza viruses in Asia. *Emerg Infect Dis*, 2005, **10**: 1515-1521
- [ 19 ] Liu M, He S, Walker D *et al.* The influenza virus gene pool in a poultry market in South central china. *Virology*, 2003, **305**: 267-275