

H5 亚型禽流感 DNA 疫苗质粒 pCAGGoptiHA5 对高致病力禽流感病毒攻击的免疫保护

姜永萍¹, 张洪波¹, 李呈军¹, 步志高², 于康震³, 陈化兰^{1*}

(1. 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/ 兽医生物技术国家重点实验室, 哈尔滨 150001; 2. 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; 3. 农业部畜牧兽医总站, 北京 100026)

摘要: 对 H5 亚型禽流感 DNA 疫苗质粒 pCAGGoptiHA5 的免疫效果进行了研究。pCAGGoptiHA5 分别以 100 和 10 μ g 剂量一次或两次免疫 3 周龄 SPF 鸡, 首次免疫后 4 周以同样剂量和途径进行第二次免疫, 一次免疫后 4 周、两次免疫后 2 周分别用 100LD₅₀ 的 HPAIV A/Goose/GuangDong/1/96(H5N1) 鼻腔途径进行攻击, 观察发病与死亡情况, 分别于攻毒后第 3、5、7 天采集喉头及泄殖腔拭子进行病毒分离、滴定检测排毒情况, 同时检测免疫后、攻毒前及攻毒后血清 HI 抗体、NT 抗体以及 AGP 抗体的动态变化。结果, 100 μ g pCAGGoptiHA5 一次免疫、100 μ g pCAGGoptiHA5 两次免疫以及 10 μ g pCAGGoptiHA5 两次免疫均可对免疫鸡形成 100% 完全保护(不发病、不致死、不排毒), 10 μ g 剂量 pCAGGoptiHA5 一次免疫可对免疫鸡形成 100% 的保护(不发病、不致死), 结果表明, pCAGGoptiHA5 作为疫苗效果良好、成本低廉, 有望成为预防 H5 亚型高致病力禽流感的高效、安全新型基因工程疫苗。

关键词: 禽流感; H5 亚型; DNA 疫苗 pCAGGoptiHA5; 免疫保护

中图分类号: S858.32.5⁺ 2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2005)11-1178-05

DNA 疫苗是防制禽流感最具潜力的基因工程疫苗之一, DNA 免疫能够诱导机体产生抗体反应和特异性 CTL 反应, 在克服了灭活疫苗的和普通亚单位疫苗缺点的同时, 又避免了重组活载体疫苗免疫反应受母源抗体、循环抗体及细胞免疫记忆干扰的不足及其潜在的突变危险; 另外, DNA 免疫还具有高度安全稳定、不受宿主种属特性及免疫状态限制、可反复加强免疫以及可在免疫后迅速启动有效而全面的免疫反应记忆效应、免疫持续期长的突出优点^[1-3]。以 A/Goose/GuangDong/1/96(H5N1)[GD/1/96(H5N1)] HA 基因为免疫原基因及 CMV 启动子-增强子构建的 H5 亚型 DNA 疫苗 pCIHA5 高剂量免疫具有良好的免疫保护性和长达一年的 HI 抗体持续期^[4,5], 但与传统的 H5 亚型禽流感全病毒灭活疫苗相比, 存在免疫剂量大、使用成本高、难以推广应用的严重缺陷。

免疫原基因的宿主密码子优化及其高效真核表达载体的选择使用是提高 DNA 疫苗免疫保护效果的有效策略^[4-9]。笔者利用寡核苷酸合成及重叠延伸 PCR 法构建了含有鸡体偏嗜使用密码子、表达 A/Goose/GuangDong/1/96(H5N1)[Gs/GD/1/96(H5N1)] HA 蛋白的基因 *optiHA5*, 将该基因作为 H5 亚型禽流感 DNA 疫苗免疫原基因插入表达载体 pCAGGS 的鸡 β -actin 启动子下游, 构建的 H5 亚型 DNA 疫苗质粒 pCAGGoptiHA5 在 293T 细胞中可以高效表达^[10]。本研究对 H5 亚型 DNA 疫苗质粒 pCAGGoptiHA5 的免疫保护效果进行了研究。

1 材料与方法

1.1 病毒

高致病力禽流感病毒 A/Goose/GuangDong/1/96(H5N1)[Gs/GD/1/96(H5N1)], 由哈尔滨兽医研究所农业部动物流感重点开放实验室保存。

1.2 质粒

含有密码子优化的基因 *optiHA5* 的 DNA 疫苗质粒 pCAGGoptiHA5 由作者构建^[9]。

1.3 SPF 鸡胚和 SPF 鸡

SPF 鸡胚和 SPF 鸡由哈尔滨兽医研究所实验

收稿日期: 2005-05-12

基金项目: 国家重点基础研究规划“973”项目(G1999011902)

作者简介: 姜永萍(1972-), 女, 甘肃会宁人, 助理研究员, 博士, 主要从事禽流感基因工程疫苗及禽流感病毒分子生物学研究

* 通讯作者: 陈化兰, Tel/Fax: 0451-82761925; E-mail: hlchen@hvri.ac.cn.

动物中心提供, 3 周龄 SPF 鸡试验期间饲养于禽病感染实验室的负压隔离器中。

1.4 HI 阳性抗原

针对 H5 亚型 AIV 的 HI 抗原由本室保存。

1.5 DNA 疫苗质粒的大量制备及其纯化

参照萨姆布鲁克主编的《分子克隆实验指南》进行提取, 紫外分光光度计定量后溶于磷酸盐缓冲液 (PBS) (pH 7.2) 中冻存备用。

1.6 SPF 鸡的免疫保护试验

将 3 周龄 SPF 鸡随机分为 6 组, 5 只/组, DNA 疫苗质粒以 200 μ L 体积在腿部肌肉注射免疫。第 1 组为 DNA 疫苗 pCAGGoptiHA5 100 μ g 剂量一次免疫组, 第 2 组为 DNA 疫苗 pCAGGoptiHA5 10 μ g 剂量一次免疫组, 第 3 组为一次免疫对照组, 第 4 组为 pCAGGoptiHA5 100 μ g 剂量两次免疫组, 首次免疫后 4 周以同样剂量和途径进行第二次免疫, 第 5 组为 pCAGGoptiHA5 10 μ g 两次免疫组, 第 6 组为两次免疫对照组, 注射 200 μ L PBS 溶液。在一次免疫后 4 周、两次免疫后 2 周分别用 100LD₅₀ 的 Gs/GD/1/96(H5N1) HPAIV 经鼻腔途径感染, 0.1 mL/只, 攻毒后 2 周内每天观察记录鸡只的发病和死亡情况, 并统计死亡率。对每组鸡于免疫后和攻毒后每周采集其翅静脉血, 分离血清, 分别采用 HI、NT、AGP 方法测定其相应的抗体滴度。在攻毒后第 3 天、第 5 天和第 7 天采集每组鸡的泄殖腔拭子和喉头拭子, 将每个拭子 10 倍连续稀释至适当稀释度, 每个稀释度(包括原液)经尿囊腔接种 3 枚 9~11 日龄鸡胚, 0.1 mL/枚, 48 h 收集尿囊液, 微量血凝法检测病毒, 并根据其不同稀释度的血凝结果用 Reed & Muench 法计算其病毒分离的滴度。

2 结果

2.1 不同剂量 pCAGGoptiHA5 免疫及高致病性禽流感病毒攻击后的 HI 抗体反应

分别以 100 和 10 μ g 不同剂量 pCAGGoptiHA5 一次和两次免疫后, 在免疫后所有免疫鸡均可检测到较高水平的 HI 抗体。pCAGGoptiHA5 100 μ g 一次免疫组的 HI 抗体平均水平在免疫后 2 周即可达 6.3 log₂, pCAGGoptiHA5 10 μ g 一次免疫组的 HI 抗体平均水平在免疫后 2 周即可达 2.3 log₂, pCAGGoptiHA5 100 μ g 两次免疫组的 HI 抗体平均水平在免疫后可高达 8.4 log₂, pCAGGoptiHA5

10 μ g 两次免疫组的 HI 抗体平均水平在免疫后也高达 5.6 log₂。无论一次免疫还是两次免疫, 相对于 pCAGGoptiHA5 10 μ g 免疫组来说, pCAGGoptiHA5 100 μ g 免疫组免疫鸡只间的 HI 抗体水平比较接近, 没有明显的个体差异(图 1)。

2.2 不同剂量 pCAGGoptiHA5 免疫及高致病性禽流感病毒攻击后的 NT 抗体反应

采用固定病毒-稀释血清法(β 法)在 MDCK 细胞上进行中和抗体的测定, 结果 pCAGGoptiHA5 不同剂量和方法免疫后诱导的 NT 抗体水平均明显高于同期的 HI 抗体水平, 并与其 HI 抗体呈现出一定的正相关关系, pCAGGoptiHA5 100 μ g 一次免疫组、pCAGGoptiHA5 10 μ g 一次免疫组、pCAGGoptiHA5 100 μ g 两次免疫组以及 pCAGGoptiHA5 10 μ g 两次免疫组的 NT 抗体平均水平在免疫后分别高达 11.63 log₂, 9.63 log₂, 13.62 log₂ 和 11.63 log₂ (图 1)。

2.3 AGP 抗体

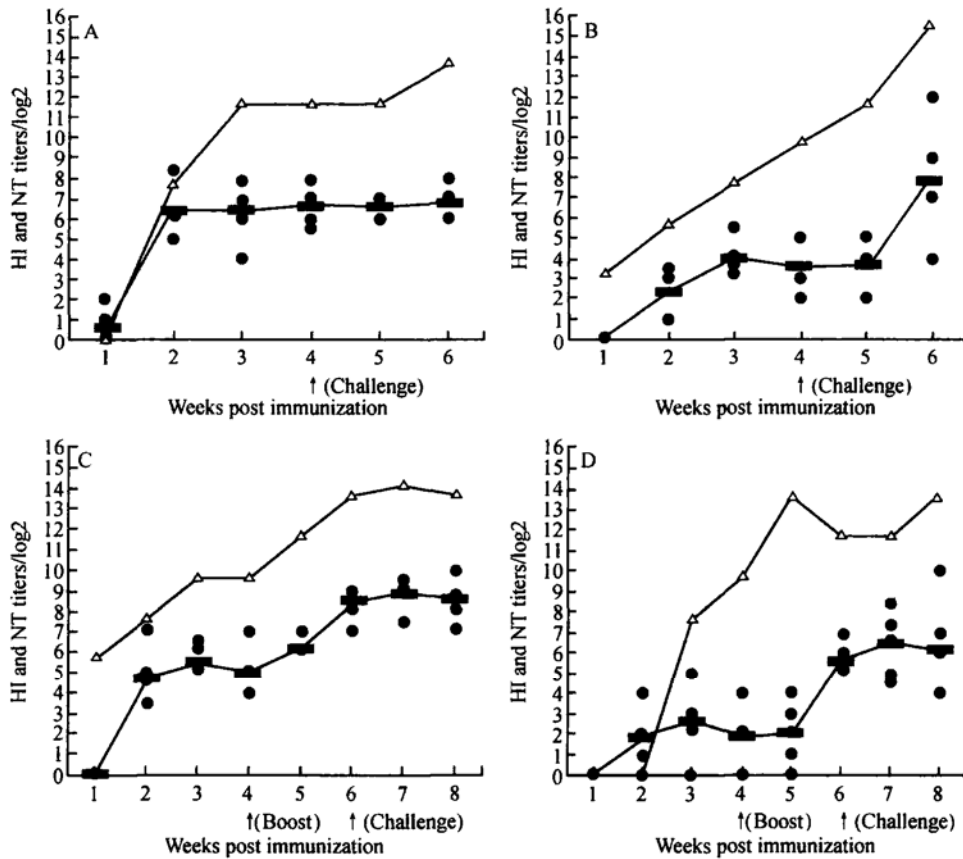
用杆状病毒表达的 AIV 重组 NP 蛋白作为阳性抗原, 对免疫试验中所有的血清进行检测, 结果免疫后血清 AGP 抗体检测均为阴性。在攻毒后 2 周时, pCAGGoptiHA5 10 μ g 一次免疫组中有 1 只鸡 AGP 抗体为阳性; 其它所有存活鸡的 AGP 抗体检测均为阴性(表 1)。

2.4 病毒分离滴定结果

将采集的拭子进行病毒分离和滴定, 拭子原液为阳性时病毒滴度赋值为 0.9。两个对照组在病毒攻击后的 3d 均有 2 只鸡死亡, 其余存活鸡在病毒攻击后的 3 d 和 5 d 均有排毒, 在病毒攻击后 7 d 内所有对照鸡发病死亡。在 100 μ g pCAGGoptiHA5 一次免疫组、100 μ g 和 10 μ g pCAGGoptiHA5 两次免疫组的所有免疫鸡在喉头和泄殖腔部位均未分离到病毒, 形成完全免疫保护; 10 μ g pCAGGoptiHA5 一次免疫组的个别免疫鸡在泄殖腔部位有极低滴度的排毒现象(见表 2)。

2.5 发病和死亡情况

H5N1 亚型高致病力病毒攻击后的观察期限为 2 周, 所有对照鸡在攻毒后 2~7 d 之内全部发病并死亡。100 μ g 和 10 μ g pCAGGoptiHA5 一次免疫组及两次免疫组的所有免疫鸡在用高致病力病毒攻击后无发病、无死亡, 其死亡保护率均为 100% (表 1)。



▲ NT 抗体; ■ HI 抗体, 图中显示了各组 HI 抗体水平的离散性
 A. 100µg pCAGGoptiHA5 一次免疫; B. 10µg pCAGGoptiHA5 一次免疫;
 C. 100µg pCAGGoptiHA5 两次免疫; D. 10µg pCAGGoptiHA5 两次免疫
 ▲ NT antibody; ■ HI antibody, the dispersant of HI antibody were showed in these figures
 A. Singly immunized with 100µg pCAGGoptiHA5; B. Singly immunized with 10µg pCAGGoptiHA5;
 C. Boosted with 100µg pCAGGoptiHA5; D. Boosted with 10µg pCAGGoptiHA5

图 1 各组鸡免疫后 HI 和 NT 抗体变化

Fig. 1 HI and NT antibody titers in chickens priming and boost immunized with 100 and 10µg pCAGGoptiHA5

表 1 pCAGGoptiHA5 免疫鸡 AGP 抗体检测及用 Gs/ GD/ 1/96 攻击后发病与死亡情况

Table 1 The AGP antibody response and protection of chickens immunized with pCAGGoptiHA5 when challenged with Gs/ GD/ 1/96

组别 Groups	免疫原 Vaccine	剂量 Dose	免疫后 AGP 抗体 AGP antibody after immunization	攻毒后 AGP 抗体 AGP antibody after challenge		发病数/ 鸡总数 No. Sick/ total	死亡数/ 鸡总数 No. Death/ total	保护率 (存活/ 总数) The protection ratio (Survival/ T total)
				1	2			
1	pCAGGoptiHA5	100µg	-	0/5	0/5	0/5	0/5	5/5
2	pCAGGoptiHA5	10µg	-	0/5	1/5	0/5	0/5	5/5
3	Control 1	—	-	×	×	5/5	5/5	0/5
4	pCAGGoptiHA5	100µg × 2	-	0/5	0/5	0/5	0/5	5/5
5	pCAGGoptiHA5	10µg × 2	-	0/5	0/5	0/5	0/5	5/5
6	Control 2	—	-	×	×	5/5	5/5	0/5

- 代表所有试验鸡 AGP 抗体检测为阴性; 攻毒后 AGP 抗体项以 AGP 抗体阳性鸡数/ 当时存活鸡数表示; × 表示鸡在攻毒 1 周后已全部死亡
 - means AGP results were negative; AGP antibody after challenge was represented by "positive chickens/ Survivors"; × means that all chickens died in a week after challenge

表 2 pCAGGoptiHA5 免疫鸡用 Gs/ GD/ 1/96 攻击后病毒分离及滴定结果

Table 2 The result of virus shedding and titres from chickens immunized with pCAGGoptiHA5 after challenge with Gs/ GD/ 1/96

组别 Group	免疫原 Vaccine	剂量 Dose	病毒分离阳性鸡/ 存活鸡(滴度: logEID ₅₀) [*]					
			Day 3		Day 5		Day 7	
			喉头 Oropharyngeal	泄殖腔 Cloacal	喉头 Oropharyngeal	泄殖腔 Cloacal	喉头 Oropharyngeal	泄殖腔 Cloacal
1	pCAGGoptiHA5	100 μg	0/5(< 0.9)	0/5(< 0.9)	0/5(< 0.9)	0/5(< 0.9)	0/5(< 0.9)	0/5(< 0.9)
2	pCAGGoptiHA5	10μg	0/5(< 0.9)	1/5(0.9)	0/5(< 0.9)	1/5(0.9)	0/5(< 0.9)	3/5(0.9)
3	Control 1	-	2/3(1.2)	3/3(1.47)	0/1(< 0.9)	0/1(< 0.9)	-	-
4	pCAGGoptiHA5	100 μg × 2	0/5(< 0.9)	0/5(< 0.9)	0/5(< 0.9)	0/5(< 0.9)	0/5(< 0.9)	0/5(< 0.9)
5	pCAGGoptiHA5	10 μg × 2	0/5(< 0.9)	0/5(< 0.9)	0/5(< 0.9)	0/5(< 0.9)	0/5(< 0.9)	0/5(< 0.9)
6	Control 2	-	1/3(2.02)	2/3(1.21)	1/1(4.5)	1/1(2.75)	-	-

* 拭子原液为阳性时病毒滴度赋值为 0.9

* A numeric value 0.9 was assigned for calculations if virus was detected in the undiluted samples

3 讨论

为评估 H5 亚型禽流感 DNA 疫苗质粒 pCAGGoptiHA5 对 SPF 鸡的免疫效果, pCAGGoptiHA5 分别以 100 μg 和 10 μg 剂量一次和两次免疫 3 周龄 SPF 鸡, 一次免疫后 4 周、两次免疫后 2 周分别用 100LD₅₀ 的 HPAIV GD/ 1/96(H5N1) 鼻腔途径进行攻击, 结果表明, pCAGGoptiHA5 具有良好的免疫原性和免疫保护性。

大量的毒株监测、分子流行病学及抗原变异分析研究证明, 我国不同时期、不同地域流行的所有 H5 亚型高致病力禽流感病毒进化起源均与 Gs/ GD/ 1/96(H5N1) 密切相关^[11], 作为主要免疫原的 HA 基因同源性及抗原性高度接近。表达 Gs/ GD/ 1/96(H5N1) 株 HA 蛋白的 DNA 疫苗, 不仅仅是实验室的研究工具或模型, 同时也是具有巨大潜在应用前景的高效、安全新型基因工程疫苗。

H5 亚型 DNA 疫苗质粒 pCAGGoptiHA5 以不同剂量和方法免疫 SPF 鸡后均诱导了高水平的 HI 抗体。从 HI 抗体免疫反应看, pCAGGoptiHA5 以不同剂量和方法免疫后各免疫组内个体间 HI 抗体滴度差异小、免疫后 HI 抗体的阳转率高、免疫后抗体上升速度快; 而 pCAGGoptiHA5 以 100 μg 两次免疫后诱导产生了平均水平高达 8.4 log₂ 的 HI 抗体, 这一结果提示一定剂量的 DNA 疫苗免疫可以诱导产生足够抵抗高致病力病毒攻击的 HI 抗体水平。

中和抗体(NT)在 DNA 免疫中起到了与 HI 抗体同等重要的作用。pCAGGoptiHA5 以不同剂量和方法免疫 SPF 鸡后不仅诱导了高水平的 NT 抗

体, 而且 NT 抗体水平远远高于 HI 抗体水平, HI 抗体和 NT 抗体呈现明显的正相关关系, 这一研究结果进一步说明了在禽流感病毒感染及其疫苗免疫反应中 HI 和 NT 抗体反应是两种重要的体液免疫反应^[12]。

本研究中 pCAGGoptiHA5 以 10 μg 剂量一次免疫 SPF 鸡后诱导的 HI 和 NT 抗体水平偏低, 由此而导致个别免疫鸡未能完全阻止 H5 亚型高致病力禽流感病毒在体内建立极低水平的感染, 但低剂量 10 μg pCAGGoptiHA5 一次免疫 SPF 鸡也能耐过高致病性禽流感病毒攻击而得到死亡保护的事实, 为 DNA 疫苗进一步应用于实践提供了有力的保障。

本研究结果表明, HA 基因密码子和表达载体优化的 H5 亚型禽流感 DNA 疫苗质粒 pCAGGoptiHA5 免疫效果良好, 有望成为预防 H5 亚型高致病力禽流感的新型基因工程疫苗。有关 pCAGGoptiHA5 的有效免疫持续时期、最佳有效免疫剂量、最佳免疫程序、对其它异源 H5 高致病力禽流感毒株的免疫保护效率等, 亟需进一步的深入研究。

参考文献:

- [1] Robinson H L, Boyle C A, Feltquate D M, et al. DNA immunization for influenza virus: studies using hemagglutinin and nucleoprotein expressing DNAs[J]. *Infect Dis*, 1997, 176: S50~ S55.
- [2] 乔传玲, 姜永萍, 田国斌, 等. 表达禽流感 HA 和 NP 双基因重组禽痘病毒的免疫保护性[J]. *畜牧兽医学报*, 2004, 35(2): 178~ 181.
- [3] Garmory H S, Brown K A, Titball R W. DNA vac-

- cines: improving expression of antigens [J]. *Genet Vaccines Ther*, 2003, 1: 2.
- [4] 姜永萍, 张洪波, 李呈军, 等. 鸡体偏嗜性密码子优化免疫原基因增强 H5 亚型禽流感 DNA 疫苗免疫保护效果 [A]. 中国畜牧兽医学学会学术年会暨第五届全国畜牧兽医青年科技工作者学术研讨会论文集 [C]. 北京, 2004. 763~ 767.
- [5] 姜永萍, 张洪波, 李呈军, 等. 鸡 β -actin 启动子表达载体 pCAGGS 显著增强 H5 亚型禽流感 DNA 疫苗免疫保护效果 [A]. 中国畜牧兽医学学会禽病学分会第十二次学术研讨会论文集 [C]. 贵阳, 2004. 417~ 423.
- [6] Hamdan F F, Mousa A, Ribeiro P. Codon optimization improves heterologous expression of a *Schistosoma mansoni* cDNA in HEK293 cells [J]. *Parasitol Res*, 2002, 88(6): 583~ 586.
- [7] Haas J, Park E C, Seed B. Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein [J]. *Curr Biol*, 1996, 6(3): 315~ 324.
- [8] Cid-Arregui A, Juarez V, zur Hausen H. A synthetic E7 gene of human papillomavirus type 16 that yields enhanced expression of the protein in mammalian cells and is useful for DNA immunization studies [J]. *J Virol*, 2003, 77(8): 4 928~ 4 937.
- [9] Gao W, Tamin A, Soloff A, et al. Effects of a SARS-associated coronavirus vaccine in monkeys [J]. *Lancet*, 2003, 362(9 399): 1 895~ 1 896.
- [10] 姜永萍. 抗原基因密码子及其表达载体的优化增强 H5 亚型禽流感 DNA 疫苗的免疫保护效果 [D]. 哈尔滨: 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 2004.
- [11] 李雁冰, 田国斌, 施建忠, 等. 引起我国 2004 年 H5N1HPAI 暴发的病毒特征 [A]. 中国畜牧兽医学学会禽病学分会第十二次学术研讨会论文集 [C]. 贵阳, 2004. 357~ 360.
- [12] Tonegawa K, Nobusawa E, Nakajima K, et al. Analysis of epitope recognition of antibodies induced by DNA immunization against hemagglutinin protein of influenza A virus [J]. *Vaccine*, 2003, 21: 3 118~ 3 125.

Immunity Protection of H5 Subtype Avian Influenza DNA Vaccine pCAGGoptiHA5 from HPAIV Lethal Challenge

JIANG Yong-ping¹, ZHANG Hong-bo¹, LI Cheng-jun¹, BU Zhigao²,
YU Kang-zhen³, CHEN Hua-lan^{1*}

(1. *Animal Influenza Laboratory of the Ministry of Agriculture and National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin 150001, China*; 2. *National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China*; 3. *National Animal Husbandry and Veterinary Service of the Ministry of Agriculture, Beijing 100026, China*)

Abstract: For evaluating the efficacy of DNA vaccine pCAGGoptiHA5, 6 groups of 3-week-old SPF chickens were intramuscular inoculated singly and boosted with 100 μ g or 10 μ g of pCAGGoptiHA5 in 200 μ L volume. A group of chickens were injected with 200 μ L PBS as controls. Sera were collected weekly after vaccination for detecting the HI, NT and AGP antibodies. Four-weeks after the single vaccination, two weeks after the boost, all chickens were challenged with 100LD₅₀ of highly pathogenic A/Goose/Guang-Dong/1/96(H5N1) strain, oropharyngeal and cloacal swab specimens were collected from all chickens 3, 5 and 7 days after inoculation for titration of virus in eggs, and chickens were observed daily for disease signs and deaths for 2 weeks. Results shown that 100 μ g or 10 μ g pCAGGoptiHA5 boosted chickens, 100 μ g pCAGGoptiHA5 priming chickens were completely protected from virus challenge (no disease sign, no virus shedding and no death). The constructed pCAGGoptiHA5 could protect chickens from lethal H5N1 virus challenge even at the low dose of 10 μ g, implied the potential possibility for the commercialization of avian influenza DNA vaccine in the future.

Key words: avian influenza; H5 subtype; DNA vaccine pCAGGoptiHA5; immunity protection

* Corresponding author