

表达禽流感 HA 和 NP 双基因重组禽痘病毒的免疫保护性

乔传玲, 姜永萍, 田国斌, 邓国华, 王秀荣, 陈化兰, 于康震*

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所农业部动物流感重点实验室, 哈尔滨 150001)

摘要: 将分别来自禽流感病毒 A/Goose/Guangdong/3/96(H5N1) 毒株的 HA 基因和 A/Goose/Guangdong/1/96(H5N1) NP 基因重组到禽痘病毒基因组中, 获得了能同时高效表达这两种蛋白的重组禽痘病毒(rFPV-HA-NP)。将 rFPV-HA-NP 经翅膀刺种途径接种 8 周龄 SPF 鸡, 并设亲本禽痘病毒免疫和非免疫对照组。免疫后 4 周分别用 10LD₅₀ 的高致病力禽流感病毒(HPAIV) A/Goose/Guangdong/1/96(H5N1) 和 A/FPV/Rostock/34(H7N1) 毒株进行攻击。结果重组禽痘病毒 rFPV-HA-NP 免疫鸡群后能够诱导产生高水平的特异性抗体, 可完全抵抗 H5N1 毒株的致死性攻击, 并可有效阻止 H7N1 病毒攻击后病毒在泄殖腔的排出。而禽痘病毒免疫组和非免疫对照组在攻毒后全部发病并死亡。结果表明 NP 在与 HA 共同表达时, 在诱导交叉保护性方面有一定的免疫增强功能。

关键词: 禽流感病毒; 血凝素; 核蛋白; 重组禽痘病毒; 免疫保护性

中图分类号: S858.31

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2004)02-0178-04

高致病力禽流感(Highly pathogenic avian influenza, HPAI)是由部分 H5 和 H7 亚型的 AIV 引起的, 常以突然死亡和高死亡率为主要特征, 一旦暴发即可导致感染鸡的全群覆没, 已被国际兽疫局列为 A 类烈性传染病^[1]。

AI 的免疫保护力包括体液和细胞免疫两个方面, 病毒蛋白血凝素(HA)能够诱导中和抗体的产生, 核蛋白(NP)主要诱导细胞毒性 T 细胞介导的免疫力, 二者在诱导保护性及感染恢复方面具有相当重要的作用^[2]。据报道基于 HA 基因的活载体疫苗、亚单位疫苗或核酸疫苗均可对同一 HA 亚型病毒的攻击产生近 100% 的保护, 而对其它亚型病毒攻击的保护性较差^[3-6]。如果能够利用 NP 蛋白较为保守的特性, 同时结合 HA 蛋白的较好的免疫保护性来研制基因工程重组疫苗, 将会为 AI 的免疫预防带来极大的方便。

本研究小组已构建了表达 AIV 单个 HA 基因及 HA 和 NP 双基因的重组禽痘病毒 rFPV-HA、rFPV-HA-NP^[7,8], 在本试验中拟对 rFPV-HA-NP 在 SPF 鸡体内诱导产生的免疫保护性进行检测, 并进一步弄清 AIV 重组表达蛋白的免疫学功能。

1 材料与方法

1.1 病毒 免疫用重组禽痘病毒 rFPV-HA、rFPV-HA-NP 由本室保存; 禽痘病毒疫苗株 S-FPV-017 由美国加利福尼亚大学 Yilma 教授惠赠。攻毒用高致病力禽流感病毒(HPAIV) A/Goose/Guangdong/1/96(H5N1) 和 A/FPV/Rostock/34(H7N1) 由哈尔滨兽医研究所动物流感实验室保存。

1.2 SPF 鸡胚和 SPF 鸡 由哈尔滨兽医研究所实验动物中心提供, 8 周龄 SPF 鸡实验期间饲养于禽病感染实验室的负压隔离器中。

1.3 免疫 将 8 周龄 SPF 鸡随机分为 3 组, 20 只/组。第 1 组为空白对照组, 攻毒前不作任何处理。第二组用禽痘病毒疫苗株 S-FPV-017 免疫, 经翅下刺种 2.5×10^6 PFU 的病毒。第 3 组、第 4 组分别免疫重组病毒为 rFPV-HA、rFPV-HA-NP, 接种途径同第 2 组, 接种重组病毒的含量大约为 5×10^6 PFU/ml。

1.4 攻毒 免疫后 4 周将各组鸡于攻毒前一分为二到两个隔离器中, 分别用 10LD₅₀ 的 GD1/96(H5N1) 和 A/FPV/Rostock/34(H7N1) 株 HPAIV 经胸部肌肉注射接种到鸡体内, 0.2 ml/只, 攻毒后每天观察并详细记录鸡只的发病和死亡情况, 并根据死亡统计死亡率。

1.5 抗体检测 对每组鸡于免疫前、免疫后和攻毒后每周采集其翅静脉血, 分离血清, 置 -20℃ 保存备用。分别采用 HI-AGP 和间接 ELISA 方法测定其相应的抗体滴度。

收稿日期: 2003-04-25

作者简介: 乔传玲(1973-), 女, 河南省宁陵县人, 在站博士后, 主要从事动物病毒分子生物学的研究。

* 通讯作者: 于康震, E-mail: yukangzhen@agri.gov.cn

1.5.1 抗原 针对 H5 和 H7 亚型 AIV 的 HI 抗原由哈尔滨兽医研究所动物流感研究中心提供, ELISA 抗原为 AIV NP 蛋白的重组杆状病毒表达产物, 由本室邓国华博士提供。

1.5.2 二抗 碱性磷酸酶标记的兔抗鸡 IgG 购自 Sigma 公司。

1.6 病毒分离 在攻毒后第 4 d 采集每组鸡的泄殖腔拭子, 置于 1 ml 的 PBS 中(含庆大霉素 50 mg/ml), 室温下作用 1 h, 经尿囊腔接种于 9~11 日龄 SPF 鸡胚, 一个样品至少接 3 枚鸡胚, 0.2 ml/枚, 收集 24 h 以后死亡鸡胚的尿囊液, 微量血凝法(HA)检测病毒。第 1 次检测为阴性的样品, 进行 3 次盲传后方可判定结果。

2 结果

2.1 重组禽痘病毒 rFPV-HA-NP 免疫后诱导产生的抗体水平 于免疫前及免疫后每周采集鸡血清, 根据疫苗中的不同抗原成分采用相应的方法(HI、AGP 和 ELISA)检测各类抗体。

2.1.1 HI 抗体 对所保存的血清测定其 HI 抗体, 结果免疫组从免疫后的第 2 周即可检测到高滴度的 HI 抗体; 而 S-FPV-017 免疫组、空白对照组及各组的免疫前血清都没有检测到 HI 抗体(表 1)。

2.1.2 AGP 抗体 用杆状病毒表达的 AIV 重组 NP 蛋白作为阳性抗原, 对所有的血清进行检测, 结果免疫前和免疫后的血清 AGP 抗体检测均为阴性; rFPV-HA-NP 免疫鸡在用 H5N1 攻击后未检出 AGP 抗体, 而用 H7N1 攻击后 AGP 抗体为阳性(表 2)。

表 1 试验鸡免疫和攻毒后 HI 抗体的动态变化

Table 1 HI antibody of SPF chickens after vaccination and challenge

组别 Groups	免疫前 Pre immunization	免疫后周数 Weeks post-immunization				攻毒后周数 Weeks post-challenge		
		1	2	3	4	1	2	3
非免疫对照 Unvaccinated control	0	0	0	0	0	- ^a	-	-
禽痘病毒免疫 S-FPV-017 immunized	0	0	0	0	0	- ^a	-	-
单重组病毒免疫 rFPV-HA immunized	0	0	7.17 ± 0.61	6.97 ± 0.73	6.55 ± 0.81	6.06 ± 0.81 ^a	6.61 ± 2.23	5.67 ± 1.00
双重组病毒免疫 rFPV-HA-NP immunized	0	0	4.24 ± 0.95	4.74 ± 0.99	4.81 ± 1.18	4.59 ± 1.14 ^a	5.55 ± 2.21	4.18 ± 1.19
						4.17 ± 1.01 ^b	5.99 ± 0.89	6.50 ± 0.71

带有 a、b 符号的一行分别为免疫鸡在用 HPAIV H5N1 和 H7N1 攻击后的抗体检测结果, - 表示在攻毒后鸡群已全部死亡。免疫后第 4 周攻毒。

表 2 试验鸡在免疫和攻毒后 AGP 抗体检测结果

Table 2 AGP antibody response of chicken after vaccination and challenge

组别 Groups	免疫前 Pre immunization	免疫后周数 Weeks post-immunization				攻毒后周数 Weeks post-challenge		
		1	2	3	4	1	2	3
非免疫对照 Unvaccinated control	-	-	-	-	-	×	×	×
禽痘病毒免疫 S-FPV-017 immunized	-	-	-	-	-	×	×	×
单重组病毒免疫 rFPV-HA immunized	-	-	-	-	-	- / ×	- / ×	- / ×
双重组病毒免疫 rFPV-HA-NP immunized	-	-	-	-	-	- / +	- / +	- / +

注: - 代表 AGP 抗体检测为阴性; + 为 AGP 抗体阳性; × 表示鸡在攻毒一周后已全部死亡; 斜线 '/' 的上面和下面分别为 H5N1 和 H7N1 病毒攻击后的检测结果。

2.1.3 ELISA 抗体 对 rFPV-HA-NP 免疫组鸡群免疫 和攻毒后血清用杆状病毒表达的 NP 蛋白纯化后用作

ELISA 抗原,间接法测定其特异性抗体的效价。同时对 S-FPV-017 免疫组和空白对照组的相应血清进行检测。结果重组病毒免疫组的 AIV 抗体水平明显高于对照组,在免疫后的第 1 周即可检测到高水平的 ELISA 抗体,而后略有下降;攻毒后抗体效价迅速升高,并一直持续到攻毒后第 3 周(图略)。

2.2 病毒分离结果 于攻毒后第 4 d 采集泄殖腔拭子,进行病毒分离。结果 H5N1 攻击后, rFPV-HA-NP 免疫组的样品均没有分离到病毒;而 H7N1 病毒攻击时,病毒分离的阳性率为 25%。S-FPV-017 免疫组和空白对照鸡在攻毒后病毒的分离阳性率均为

100% (表 3)。

2.4 发病和死亡情况 临床发病的判定标准为:鸡群中个别鸡表现呆立、对外界刺激反应不灵敏,头下垂、眼睛呈全闭或半闭状态、羽毛杂乱等;眼观病变有流鼻涕和眼泪、无毛部位皮肤发绀、出血、水肿,鸡冠肉髯坏死。结果 rFPV-HA-NP 免疫组的鸡完全抵抗了同一 HA 亚型 H5N1 毒株的攻击,无一发病和死亡,保护率为 100%。而用同一 NA 亚型 H7N1 毒株攻击时有 7 只鸡发病,保护率为 40%,禽痘病毒 (FPV) 免疫组和空白对照组在攻毒后全部发病并死亡。

表 3 实验鸡在用 H5N1 和 H7N1 攻击后病毒分离、发病及死亡情况

Table 3 The result of virus re-isolation from chickens after challenge with H5N1 and H7N1 HPAIV

组别 Groups	攻击病毒 Challenge virus	阳性数/总数 No. positive/No. tested	检出率(%) Recovery rate	发病数/总数 No. sick/total	死亡数/总数 No. dead/total	保护率(%) Protection rate
非免疫对照 Unvaccinated control	H5N1	7/7	100	10/10	10/10	0
禽痘病毒免疫 S-FPV-017 immunized	H7N1	-*	-	10/10	10/10	0
单重组病毒免疫 rFPV-HA immunized	H5N1	8/8	100	10/10	10/10	0
双重组病毒免疫 rFPV-HA-NP immunized	H7N1	1/1	100	10/10	10/10	0
	H5N1	0/10	0	0/10	0/10	100
	H7N1	3/3	100	10/10	10/10	0
	H5N1	0/10	0	0/10	0/10	100
	H7N1	2/8	25	7/10	6/10	40

* 表示免疫鸡全部死亡

3 讨论

随着 DNA 重组技术的发展和运用,目前疫苗研究已逐步从常规疫苗向基因工程疫苗过渡。在美国已经研制出了表达 H5 亚型 AIV HA 基因的重组禽痘病毒,可以对同一 HA 亚型病毒的攻击产生 100% 的免疫保护。1998 年,重组禽痘病毒疫苗已获得美国农业部的批准可在紧急情况下使用,并于同年在墨西哥的商品肉鸡群中应用,从而有效地控制了 H5N2 的流行^[9]。

针对禽流感病毒易于变异的特点,防治该病最为理想的疫苗关键是能否对多种亚型的病毒侵袭具有保护性。多年来的研究表明,病毒糖蛋白 HA 对同种亚型 HA 流感病毒攻击的免疫保护性是毫无疑问的。有很多有关 NP-DNA 疫苗保护效果的报道^[10-11],所以人们一直将提高禽流感疫苗交叉保护效力的希望集中在 NP 蛋白上。在本实验中,对表达 AIV HA 和 NP 双基因重组禽痘病毒 rFPV-HA-NP 的免疫效力进行了检测,结果 8 周龄 SPF 鸡用重组病毒 rFPV-HA-NP 免疫后获得了 100% 抵抗 H5N1

HPAIV 的攻击,在泄殖腔中没有病毒的排出,此结果与 Webster 等人的研究结果相符合;当用 H7N1 攻击时, rFPV-HA-NP 免疫鸡的保护率为 40%,病毒分离的阳性率为 25%。而 rFPV-HA 免疫组的鸡在 H7N1 攻击后一周内全部发病并死亡。二者相比,对不同 HA 亚型病毒 H7N1 的抵抗力, rFPV-HA-NP 免疫保护效果明显增强。本研究的结果进一步证实了 NP 蛋白在与 HA 蛋白联合后在机体内能够诱导产生高水平的特异性抗体,有效阻止病毒的感染、发病和死亡。

实验中 rFPV-HA-NP 免疫组所检测到的 HI 抗体效价与同期的 rFPV-HA 免疫组相比略低一些,这是否与文献报道的抗原竞争现象有关还有待于进一步探讨。

参考文献:

- [1] Alexander D J. A review of avian influenza in different bird species[J]. *Vet Microbiol*. 2000, 74(1-2): 3~ 13.
- [2] Webster R G, Kawaoka Y, Taylor J, et al. Efficacy of nucleoprotein and haemagglutinin antigens expressed in fowlpox

- virus as vaccine for influenza in chickens[J]. *Vaccine*, 1991, 9: 303~ 308.
- [3] 陈化兰, 于康震, 田国斌, 等. DNA 免疫诱导鸡对禽流感病毒的免疫保护反应[J]. *中国农业科学*, 1998, 31(5): 63~ 68.
- [4] Johansson B E. Immunization with influenza A virus hemagglutinin and neuraminidase produced in recombinant baculovirus results in a balanced and broadened response superior to conventional vaccine[J]. *Vaccine*, 1999, 17: 2073~ 2080.
- [5] Kodihalli S, Kobasa D L, Webster R G. Strategies for inducing protection against avian influenza A virus subtypes with DNA vaccines[J]. *Vaccine*, 2000, 8: 2592~ 2599.
- [6] Webster R G, Taylor J, Pearson J, et al. Immunity to Mexican H5N2 avian influenza viruses induced by a fowl pox-H5 recombinant[J]. *Avian Dis*, 1996, 40: 461~ 465.
- [7] 贾永清. 表达禽流感病毒 HA 基因重组禽痘病毒的构建及其免疫效力的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学动物医学院, 2000.
- [8] 乔传玲, 于康震, 贾永清, 等. 表达禽流感 HA 与 NP 基因双重组禽痘病毒的构建[J]. *中国预防兽医学报*, 2002, 24(Suppl): 139~ 142.
- [9] Swayne D E, Garcian M, Beck J R, et al. Protection against diverse highly pathogenic H5 avian influenza viruses in chickens immunized with recombinant fowlpox vaccine containing an H5 avian influenza hemagglutinin gene insert[J]. *Vaccine*, 2000, 18: 1088~ 1095.
- [10] Ulmer J B, Deck R R, Dewitt C W, et al. Expression of a viral protein by muscle cells in vivo induces protective cell-mediated immunity[J]. *Vaccine*, 1997, 15(8): 839~ 841.
- [11] Bot A, Bot S, Bona C. Enhanced protection against influenza virus of mice immunized as newborns with a mixture of plasmids expressing Hemagglutinin and Nucleoprotein[J]. *Vaccine*, 1998, 16(17): 1675~ 1682.

Protective Immunity of Recombinant Fowlpox Virus Co-expressing HA and NP Gene of Avian Influenza Virus

Qiao Chuangling, Jiang Yongping, Tian Guobin, Deng Guohua,
Wang Xiurong, Chen Hualan, Yu Kangzhen

(*Animal Influenza Laboratory of Ministry of Agriculture of Harbin Veterinary
Research Institute, CAAS, Harbin, 150001*)

Abstract: A recombinant fowlpox virus co-expressing Haemagglutinin(HA) and Nucleoprotein(NP) named as rFPV-HA-NP was produced by HA gene of A/Goose/Guangdong/3/96(H5N1) and NP gene of A/Goose/Guangdong/1/96(H5N1) isolate of avian influenza virus recombined into the genome of fowlpox virus. In this study, to evaluate its ability to protect chickens against challenge with a lethal dose of highly pathogenic isolates of avian influenza virus, eight-week-old specific-pathogen-free(SPF) chickens were vaccinated with recombinant virus or the parent fowlpox vaccine virus by wing-web puncture. Following challenge 4 weeks later with 10LD₅₀ highly pathogenic avian influenza virus H5N1 and H7N1 isolate, all chickens vaccinated with recombinant virus were protected against the challenge with H5N1, and were effectively inhibited to shed viruses in cloaca when challenge with H7N1, while the chickens vaccinated with the unaltered parent fowlpox vaccine virus or unvaccinated controls experienced 100% mortality respectively following challenge. And these protections were accompanied by the high levels of specific antibody response to the respective components of the recombinant virus. The above results indicated that NP protein would enhance the immunogenicity of the vaccine at cross-reactivity level.

Key words: Avian Influenza Virus; Haemagglutinin; Nucleoprotein; Recombinant Fowlpox Virus; Protective Immunity