

H9N2 亚型禽流感病毒 HA 基因的克隆 及其 DNA 疫苗的动物免疫试验

何宏轩^{1,2)} 秦曦明¹⁾ 张强哲¹⁾ 汤 义¹⁾ 刘丽艳^{1,2)} 郑昌学¹⁾ 段明星¹⁾*

(¹⁾清华大学生物科学与技术系, 生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100084;

²⁾河南职业技术师范学院动物科学系, 新乡 453003)

摘要 血凝素 (HA) 是决定禽流感病毒的毒力强弱和免疫原性的主要蛋白质。根据已发表的 H9 亚型 AIV 的 HA 基因序列, 设计合成了 1 对 H9 HA 特异引物, 以 AIV A/Chicken/Henan/1/1999/ (H9N2) 核酸为模板, 通过 RT-PCR 扩增出 1 条 1.6 kb cDNA 片段。将 HA 基因插入 pVAX1 中, 构建了真核表达质粒 pVAX-H9。采用活体电击法免疫 3 周龄 SPF 鸡 10 只, 剂量为 50 μ g/只, 3 周后加强免疫一次, 5 周后以 100 倍鸡胚感染剂量 (EID) 的 HA 基因同源病毒对所有鸡进行攻毒。其间每周检测抗体水平变化, 6 周后以棉拭子进行泄殖腔病毒分离。结果为攻毒后免疫组鸡 HI 效价为 $9\log_2 \sim 10\log_2$, 对照组为 $2\log_2 \sim 4\log_2$; 免疫组病毒分离数为 0/10, 对照组为 10/10。表明所构建的 HA 基因表达质粒可作为基因疫苗诱导鸡产生免疫保护反应。

关键词 禽流感病毒, 血凝素基因, RT-PCR, 克隆, DNA 疫苗

学科分类号 S852.659.5

禽流感 (avian influenza, AI) 是由正粘病毒科 A 型流感病毒引起的禽类病毒性传染病。该病于 1878 年首次发生在意大利, 此后国内外学者相继报道该病的发生及其对养禽业造成的危害^[1]。H9 亚型禽流感病毒最早于 1966 年从北美的火鸡体内分离得到, 该亚型的禽流感病毒起初只感染火鸡, 几乎不感染鸡。20 世纪 90 年代后, H9N2 亚型禽流感病毒在亚洲的多数鸡场传播开来。近几年我国许多地方有此病的发生和流行, 其中 H9N2 亚型病毒是主要的流行株^[2]。由于禽流感病毒 (avian influenza virus, AIV) 的高度变异性, 利用弱毒苗有突变为 HPAIV 的危险, 而灭活苗又存在免疫效果差、成本高等缺点, 同时这些疫苗的使用还会影响 AIV 疫情的监测。研究表明, 血凝素 (HA) 是 AIV 的主要保护性抗原, 以 HA 研制的亚单位疫苗可对同一 H 亚型不同毒株产生良好的免疫保护性^[3]。本研究克隆了 AIV H9 亚型的 HA 基因, 并对其真核表达质粒作为基因疫苗的免疫保护性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 毒株: AIV A/Chicken/Henan/1/1999/ (H9N2), 由河南职业技术师范学院禽病研究室分离, 其为本研究 HA 基因的来源并作为免疫后攻毒毒株。

1.1.2 质粒: pMD18-T 购自宝生物公司大连有限公司; pVAX1 购自美国 Invitrogen 公司, 是美国食品药品监督管理局 (FDA) 指定的核酸疫苗专用载体, 以 CMV 为启动子, 抗性为卡那霉素, 该载体去除了与 *E. coli* 复制和重组蛋白在真核细胞中表达不需要的核苷酸序列, 减少与染色体整合的可能。

1.1.3 无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 鸡及 SPF 鸡胚: 北京维通利华实验动物技术有限公司 SPF 实验动物中心提供。

1.1.4 工具酶: 限制性内切酶、RNA 酶、T4 连接酶、Taq DNA 聚合酶、AMV 反转录酶, 分别购自美国 Promega 公司、德国 BM 公司、华美生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 病毒的繁殖与纯化: 将 AIV 接种于 9 ~ 11 日龄鸡胚尿囊腔, 72 h 内收集尿囊液, 3 000 g 离心 20 min。取上清, 110 000 g 离心 60 min。弃上清, 沉淀溶于 TE 中, -20℃ 保存备用。

1.2.2 核酸的提取与纯化: 采用蛋白酶 K-SDS 法提取核酸, 酚、氯仿抽提后乙醇沉淀, 适量 DEPC 处理水重悬 RNA, -20℃ 保存备用。

* 通讯联系人。

Tel: 010-62773255, Fax: 010-62773255,

E-mail: duanmx@mail.tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2003-06-30, 接受日期: 2003-07-28

1.2.3 引物的设计与合成: 据 GenBank 发表的 AIV 序列 (AY294658) 设计并合成 1 对引物. 其序列分别如下. H9P1: 5'AGGATATCCCATGGAAG-CATTATCACTAATA 3' H9P2: 5' TTCTTGAGAAAC-TTATATACAAATGGTGGT 3'. 上、下游引物中分别引入 *EcoR* V 和 *Xho* I 酶切位点, 并分别包含了参考序列中的起始密码和终止密码, 即这对引物中间包含了完整的 HA 阅读框架.

1.2.4 HA 基因的 RT-PCR 扩增: HA cDNA 第一链的合成采用 AMV 反转录系统, 按常规方法进行. PCR 循环参数为 94℃ 1 min, 51℃ 1 min, 72℃ 1.5 min, 30 个循环.

1.2.5 PCR 产物的克隆: 用常规方法将扩增片段直接克隆到 pMD18-T 载体中. 将在氨苄青霉素 (Amp) 琼脂平板上筛选出的阳性重组子经培养和快速提取质粒后, 用 *EcoR* V 和 *Xho* I 双酶切反应进行鉴定, 阳性质粒为 pMD18-T-H9. 采用 Sanger's 双脱氧末端终止法进行测序.

1.2.6 HA 基因真核表达质粒的构建: pMD18-T-H9 和 pVAX1 质粒用 *EcoR* V 和 *Xho* I 双酶切后, 得到 1.6 kb 的 H9 基因片段和 pVAX1 载体的线性片段, 在用 DNA 回收试剂盒回收以后, 将 H9 基因片段与 pVAX1 载体的线性片段进行连接, 转化 Top10 感受态细菌, 挑取菌落振荡提取质粒, 用 *EcoR* V 和 *Xho* I 酶切鉴定, 阳性重组子命名为 pVAX-H9.

1.2.7 重组质粒的筛选、鉴定及大量制备: 按分子克隆有关方法进行.

1.2.8 动物免疫试验: 20 只 3 周龄 SPF 鸡分为 2 组, 每组 10 只, 采用活体电击法, 实验组每只腿肌注射质粒 pVAX-H9 50 μ g (溶于 50 μ l TE), 对照组每羽腿肌注射 TE 50 μ l 作为对照. 免疫后 5 周, 用 100 倍 EID₅₀ 的 HA 基因同源病毒对所有鸡以滴鼻、点眼、肌肉注射 3 种途径攻毒. 1 周后采集泄殖腔棉拭子, 样品经鸡胚尿囊腔繁殖后, 血凝试验检测病毒. 免疫后每周对所有鸡翅静脉采血, 检测 HI 抗体.

2 结 果

2.1 HA 基因的 PCR 结果

以 AIV A/Chicken/Henan/1/1999/ (H9N2) RNA 为模板, 用设计特异引物通过 RT-PCR 扩增出 1 条与预期大小一致的 1.6 kb DNA 片段, 与预

期结果一致.

2.2 PCR 产物的克隆及鉴定

将扩增的 HA 基因片段插入到 pMD18-T 中, 经 *EcoR* V 和 *Xho* I 酶切鉴定, 得到 1.6 kb 的片段, 结果表明 PCR 产物已被成功克隆.

2.3 PCR 产物的序列分析

对克隆的 HA 基因测序, 基因全长 1 683 bp, 编码 560 个氨基酸, 与 A/Chicken/Shandong/6/96 (H9N2) H9 基因在核苷酸和推导的氨基酸水平上进行了比较, 其同源率分别为: 98.6% 和 99.2%, 表明所克隆的基因是 HA 基因, 其中编码蛋白的第 333 ~ 342 位 (即 HA 裂解位点) 为 PARLSRGLF.

2.4 HA 基因真核表达质粒的构建

将 HA 基因片段插入 pVAX1 的 *EcoR* V 和 *Xho* I 位点 (图 1), 并用 *EcoR* V 和 *Xho* I 酶切鉴定, 得到 1.6 kb 的片段, 与预期大小一致, 表明 HA 基因表达质粒 pVAX-H9 构建成功.

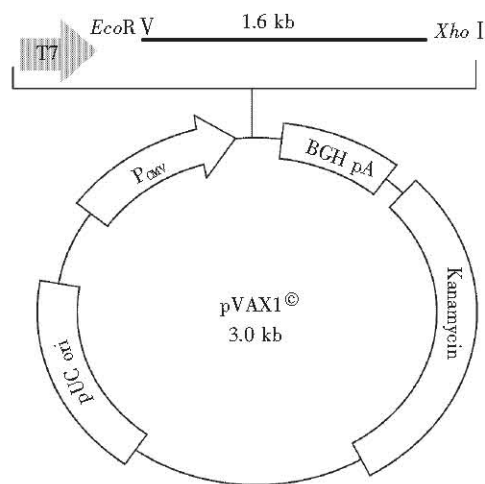


Fig. 1 Construction of the recombinant plasmid pVAX-H9

2.5 动物免疫保护试验

以 50 μ g 质粒 pVAX-H9 活体电击肌肉注射免疫 SPF 鸡 10 只, 5 周后攻毒, 病毒分离结果为 0/10, 而对照组为 10/10. 实验组免疫后第二周检测到抗体效价, 第五周最高, 效价为 8log₂, 攻毒后效价达 10log₂, 并且没有死亡. 对照组在攻毒前一直没有检测到抗体效价, 攻毒后检测效价为 2log₂ ~ 4log₂, 与攻毒后第 9 天死亡 6 只. 表明免疫组鸡获得了对攻毒的完全保护, 对照组则完全未被保护. 具体结果见图 2.

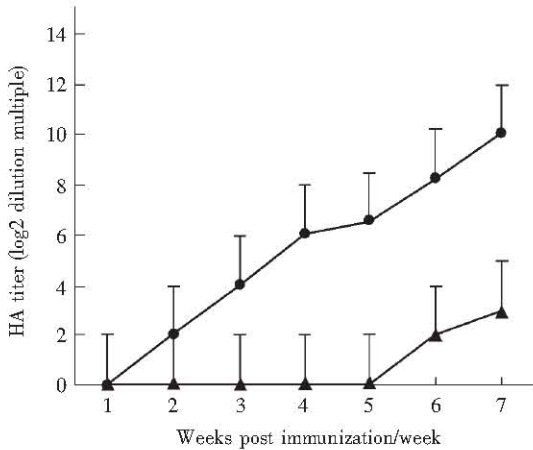


Fig. 2 Changes of hemagglutination titer in serum of SPF chickens after immunization with recombinant plasmid pVAX-H9 by electroporation
●—●: pVAX-H9 plasmid; ▲—▲: TE buffer.

3 讨 论

AIV 是负链 RNA 病毒, 其基因组由 8 个分段的 RNA 片段组成, 血清亚型众多, 遗传变异极为频繁, 其中以 HA 基因最易发生. HA 基因片段全长约为 1.7 kb, 只含有 1 个开放阅读框架, 编码病毒的表面结构蛋白 HA. 大量的研究表明, HA 在病毒入侵细胞的过程中起着极为重要的作用, 它裂解位点的氨基酸序列特点直接决定着 AIV 的组织嗜性与致病力, 同时 HA 又是 AIV 的主要保护性抗原. 由本研究克隆的 HA 基因序列分析结果可知, 在基因的切割位点上 (333 ~ 342 位) 的氨基酸序列为 PARLSRGLF, 仅有 2 个不连续的碱性氨基酸, 说明毒株 A/Chicken/Henan/1/1999/ (H9N2) 为低致病力毒株. 该结果与以往报道一致^[4].

本研究利用 RT-PCR 方法克隆了一株 H9 AIV 的 HA 全基因, 为国内低致病力禽流感的分子监测奠定了实验基础, 同时也为国内 AIV 基因疫苗的研究奠定了基础. 1994 年 Robinson 等^[5]报道了

AIV HA 基因表达质粒直接导入机体, 可诱导鸡对攻毒的免疫保护; 张强哲等^[6]报道了 H5 亚型禽流感病毒 HA 基因的真核表达质粒, 可诱导小鼠对 AIV 攻击产生免疫保护反应; 本研究所构建的 HA 基因表达质粒可诱导鸡对同源病毒的攻击产生确实的免疫保护. 这些都展示了基因疫苗的诱人应用前景.

低致病力 AIV 感染后, 主要局限在呼吸道和消化道内繁殖. 一般在感染后 3 天由泄殖腔排毒, 持续约 2 周, 7 天左右为高峰期, HI 抗体 1 周达到可检测水平. 在本研究中, 为确保病毒分离的可靠性, 我们选择在病毒排泄高峰期采集泄殖腔拭子, 样品经鸡胚繁殖后, 微量血凝试验和血凝抑制试验检测病毒分离结果. 与对照组相比, 免疫组鸡病毒分离均为阴性, HI 抗体效价在攻毒后 1 周为 10lg2. 这些结果表明, HA 基因表达质粒发挥了基础免疫作用.

参 考 文 献

- 甘孟侯. 禽流感. 北京: 中国农业出版社, 2002. 1 ~ 10
Gan M H. Avian Influenza. Beijing: China Agriculture Press, 2002. 1 ~ 10
- Wood G W, McCauley J W, Bashiruddin J B, *et al.* Deduced amino acid sequences at the haemagglutinin cleavage site of avian influenza A viruses of H5 and H7 subtypes. Arch Virol, 1993, **130** (1 ~ 2): 209 ~ 217
- 于康震, 付朝阳, 崔尚金, 等. 我国禽流感防治研究进展. 中国兽医学报, 2001, **21** (1): 103 ~ 106
Yu K Z, Fu C Y, Cui S J, *et al.* Chin J Vet, 2001, **21** (1): 103 ~ 106
- 李建伟, 崔尚金, 于康震, 等. 欧亚大陆 H9N2 亚型禽流感血凝素基因分子演化的研究. 中国畜牧兽医学禽病学分会论文集, 四川, 2002
Li J W, Cui S J, Yu K Z, *et al.* Proceedings of the symposium poultry health branch of Chinese association of animal and veterinary science, Sichuan, 2002
- Robinson H L, Hunt L A, Webster R G, *et al.* Protection against lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin in expressing plasmid DNA. Vaccine, 1993, **11** (9): 957 ~ 960
- 张强哲, 秦曦明, 梁 荣, 等. 禽流感病毒 HA 基因真核表达质粒的构建与表达. 生物物理与生物化学进展, 2003, **30** (3): 483 ~ 487
Zhang Q Z, Qin X M, Liang R, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2003, **30** (3): 483 ~ 487

Cloning of HA Gene of H9N2 Subtype Avian Influenza Virus and Immune Protection Test of Its DNA Vaccine

HE Hong-Xuan^{1,2)}, QIN Xi-Ming¹⁾, ZHANG Qiang-Zhe¹⁾,
TANG Yi¹⁾, LIU Li-Yan^{1,2)}, ZHENG Chang-Xue¹⁾, DUAN Ming-Xing^{1)*}

(¹⁾ State Key Laboratory of Biomembrane & Membrane Biotechnology, Department of Biological Sciences and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

²⁾ Department of Animal Sciences, Henan Vocational Technique Teachers College, Xinxiang 453003, China)

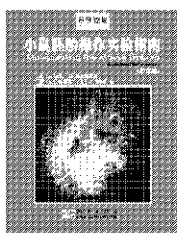
Abstract Avian influenza (AI) was caused by A avian influenza virus in chicken all over the world. One 1.6 kb DNA fragment was amplified by RT-PCR from the RNA of AIV A/Chicken/Henan/1/1999 (H9N2) and proved to

be HA gene by sequencing. The HA gene expression plasmid pVAX-H9 was constructed by inserting the fragment into the pVAX1 vector. 3-week-old SPF chickens were inoculated with 50 μ g DNA of plasmid pVAX-H9 by electroporation, 5 weeks later, all chickens were challenged with $100 \times \text{EID}_{50}$ of AIV A/Chicken/Henan/1/1999 (H9N2), 1 week post challenge all birds were sampled by cloacal swabbing to isolate virus. The virus isolation was negative in all vaccinated birds and positive in all control birds. The HI titers reached to $10\lg 2$ in vaccinated group, in contrast to $2\lg 2 \sim 4\lg 2$ in control group post challenge respectively. These results showed that the plasmid pVAX-H9 designed as DNA vaccine would be able to elicit a firm protective immune response against AIV infection.

Key words avian influenza virus (AIV), HA gene, RT-PCR, cloning, DNA vaccine

* Corresponding author. Tel: 86-10-62773255, Fax: 86-10-62773255, E-mail: duanmx@mail.tsinghua.edu.cn

Received: June 30, 2003 Accepted: July 28, 2003



小鼠胚胎操作实验指南 (影印版)

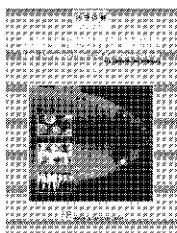
作者: A. 纳吉, K. 文特斯坦, R. 贝林杰

书号: 7-03-012438-3

定价: 99 元

出版时间: 2004 年 1 月

本书对小鼠的发育遗传学、胚胎学研究, 小鼠发育, 转基因小鼠、嵌合小鼠制备的普遍问题, 移植后胚胎的复原、体外培养等方面的理论基础进行了翔实的阐述, 并且对小鼠胚胎的一系列操作技术和方法进行了详细的说明, 具有较大的实验指导意义。版式设计侧重于方便读者使用, 正文中穿插了丰富的图表作为实验设计的辅助说明, 附录中还列出基本溶液、缓冲液的配方和配制方法, 以及实验注意事项等。



爪蟾早期发育实验指南 (影印版)

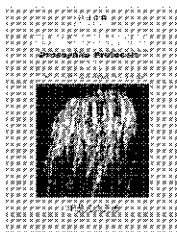
作者: H. L. 西弗, R. M. 格兰杰, R. M. 哈兰

书号: 7-03-01243 9-1

定价: 45.00

出版时间: 2004 年 1 月

书中的实验方案涵盖了爪蟾胚胎、成体的形态发生, 爪蟾中基因表达操作, 胚胎的获取和实验常规操作, 微注射, 免疫细胞化学, 原位杂交, 培养基和培养液等爪蟾早期发育研究的内容。书中既包含了初学者需要了解的基础知识, 也涵盖了资深研究者所需的细节。



果蝇实验指南 (影印版)

作者: W. 沙利文, M. 阿什伯恩纳, R. S. 霍利

书号: 7-03-012440-5

定价: 90.00 元

出版时间: 2004 年 1 月

本书共提供了近 40 个未来 10 年内最可能用到的以果蝇为实验对象的分子生物学、生物化学和细胞生物学研究的实验方案。每一个方案都经过专家的精心挑选和雕琢, 实验设计严谨、准确、简洁、规范, 可操作性强, 值得称道。方案涉及染色体、细胞、基因组和发育等方面, 深入浅出, 十分适合研究者们参考使用。

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书 (免邮费)。邮购地址: 100717 北京东黄城根北街 16 号科学出版社 科学分社

联系人: 阮芯 联系电话: 010-64034622 (带传真)

欢迎访问生命科学图书网站 <http://www.lifescience.com.cn>