

A/California/07/2009 亚型猪流感 冷适应减毒疫苗株的拯救及免疫效果评价*

段跃强^{1, 2)} 罗德炎¹⁾ 邢 丽¹⁾ 杨鹏辉¹⁾ 赵忠鹏¹⁾ 贾卫红¹⁾ 李培峰^{2)**} 王希良^{1)**}

(¹⁾ 军事医学科学院微生物流行病研究所, 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071; ²⁾ 内蒙古农业大学兽医系, 呼和浩特 010018)

摘要 应用反向遗传学技术, 选择冷适应、温度敏感、减毒的 A/Ann Arbor/6/60 ca (H2N2) 型流感病毒的 6 个内部基因为骨架, 与 A/California/07/2009 株流感病毒 2 个抗原基因 HA、NA 分别克隆到 pol I -pol II 转录表达载体 pAD3000 中, 构建 8 个转录表达载体重组质粒, 共转染 Vero 细胞, 获得重配 A/California/07/2009ca 株流感病毒. 重配病毒的 $TCID_{50}$ 为 7.5, 病毒传 4 代后其血凝素(HA)滴度稳定在 1:256, 半数感染剂量 EID_{50} 为 8, 鸡胚传 20 代, 经 RT-PCR 鉴定未发现重组病毒基因突变, 电镜观察重配病毒符合流感病毒的主要特征; 蔗糖纯化的病毒经肌肉注射(灭活)及滴鼻(减毒活病毒)两种途径免疫 BALB/c 小鼠, 结果显示: 滴鼻免疫和肌肉注射都可以产生较高效价的血凝抑制(HI)抗体, 肌肉注射组产生的 HI 抗体略高 ($P = 0.044$), 但肌肉注射组检测不到高效价 IgA 抗体; 滴鼻免疫组鼻冲洗液中可以检测到高效价的 IgA 抗体, 同型病毒感染后, IL-1 β 、TNF α 、IFN- α 等前炎因子分泌较早, 且高于肌肉注射组 ($P < 0.05$), 可见, 喷鼻减毒疫苗比灭活全病毒疫苗能更好地激发黏膜免疫反应. 通过对小鼠各个器官病毒载量的检测发现, 4 天后鼻腔、气管、脑、肺、脾脏没有病毒存在, 证明减毒活疫苗株在小鼠上是安全的. 以上数据可以初步断定, 重组病毒有作疫苗候选株的可能, 而且喷鼻疫苗具有降低免疫剂量、同时激活体内体液免疫和细胞免疫的功能.

关键词 反向遗传学技术, A/California/07/2009 亚型猪流感, 8 质粒拯救系统

学科分类号 R183.3

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00249

2009 年 3 月底至 4 月中旬, 墨西哥、美国等地接连暴发流感样疾病疫情. 4 月 30 日, 世界卫生组织将此次新型流感病毒的名字改为 "A/H1N1"^[1-2], 我国卫生部对其改称为甲型 H1N1 病毒. 此次流感暴发后不久, 研究者就从患者体内分离到其病原体——新甲型 H1N1 流感病毒. 序列分析结果显示, 该流感病毒为四重配病毒, 其基因组 8 个片段分别来源于近年来流行的 4 种病毒: NA 和 M 片段来源于 1979 年以来流行于欧亚大陆的猪流感病毒; HA、NP 和 NS 片段来源于北美普通猪流感病毒; PB2 和 PA 片段来源于禽流感病毒; 而 PB1 来源于人季节性 H3N2 流感病毒^[3-4].

此次猪流感是一种具有高度传染性的急性呼吸道疾病, 由几种猪 A 型流感病毒其中的一种引起, 发病率高死亡率低. 目前, 我国内地已出现 12.7 万余例输入性甲型 H1N1 流感确诊病例, 因此防控

形势非常严峻. 疫苗接种仍是当前预防和控制猪流感流行的主要手段.

本实验应用流感病毒反向遗传学操作技术, 以 A/Ann Arbor/6/60 ca (H2N2) 型流感病毒作为骨架病毒^[5-7], 将其 6 个内部基因(PB1、PB2、NP、NA、M、NS)与 A/California/07/2009 亚型猪流感病毒 HA、NA 基因构建到双向表达载体 pAD3000 上, 成功拯救出可以作为疫苗候选株使用的重配病毒, 并对其安全性、稳定性、免疫原性进行了初步评价.

* 国家自然科学基金资助项目(30700743).

** 通讯联系人.

李培峰. Tel: 0471-4309176, E-mail: lpfneimeng@163.com

王希良. Tel: 010-66948678, E-mail: xiliangw@126.com

收稿日期: 2010-06-24, 接受日期: 2010-10-11

1 材料和方法

1.1 细胞、鸡胚和血清

Vero 细胞用含有 10% 犊牛血清的 DMEM 培养, 购自 ATCC 公司; SPF 鸡胚购自北京梅里亚维通动物技术有限公司; A/California/07/2009 阳性血清及抗原购自 NIBSC; A/California/07/2009 野毒株由中国疾病预防控制中心提供。

1.2 主要试剂

小提质粒试剂盒、转染试剂 Polyfect 购自 Qiagen 公司; DMEM 和胰酶购自美国 Sigma 公司; 生化试剂购自 TAKARA 公司; IL-1 β , TNF α , IFN- α ELISA 试剂盒购自达科为公司, 1% 鸡红细胞按常规方法自行制备。

1.3 实验条件

本试验在 BSL-2 实验室中进行, 其中野毒株部分在军事医学科学院微生物流行病学研究所病原微生物生物安全国家重点实验室 BSL-3 实验室进行。

1.4 病毒 8 质粒的制备

A/Ann Arbor/6/60 ca (H2N2) 株减毒流感病毒 6 个内部基因构建的质粒 pAD-PB2、pAD-PB1、pAD-PA、pAD-NP、pAD-M、pAD-NS, 由军事医学科学院微生物流行病学研究所构建完成并保存; A/California/07/2009 株流感病毒 HA、NA 基因片段由上海生物工程技术服务有限公司合成。用 Qiagen 小提质粒试剂盒, 按照说明书进行提取质粒。

1.5 共转染

将生长状态良好的 Vero 细胞消化后计数, 按 5×10^5 个细胞浓度置于 35 mm $\times$ 10 mm 细胞培养板中培养过夜。将 A/Ann Arbor/6/60 ca (H2N2) 株流感病毒 6 个基因(pAD-PB2、pAD-PB1、pAD-PA、pAD-NP、pAD-M、pAD-NS)及 A/California/07/2009 株流感病毒 2 个基因(pAD-HA、pAD-NA)共 8 个阳性质粒等比例混合。按照 Polyfect 转染试剂操作指南进行转染, 将质粒和转染试剂的混合液加入 Vero 细胞中, 置含 5% CO₂、33 $^{\circ}$ C 的 CO₂ 培养箱中培养 48 h 后, -70 $^{\circ}$ C 冻存待用。

1.6 验证重配 A/California/07/2009ca 病毒

1.6.1 血凝抑制(HI)试验。转染上清-70 $^{\circ}$ C 冻融 1 次, 接种 10 日龄 SPF 鸡胚尿囊腔中, 每胚 0.2 ml, 每个细胞培养皿接种 2 个鸡胚, 置 33 $^{\circ}$ C 培养至 72 h, 收集尿囊液, 作血凝素(HA)试验。阳性者, 做 HI 试验, 用 A/California/07/2009 阳性血清与受

体破坏酶(RDE)按 1:4 混合, 37 $^{\circ}$ C 水浴 16 h, 56 $^{\circ}$ C 50 min, 血清稀释度为 1:10, 用 1% 鸡红细胞检测。

1.6.2 RT-PCR 鉴定。收取鸡胚尿囊液提取 RNA, RT-PCR 扩增 HA、NA 和 NP 基因片段进行序列测定分析。

1.6.3 MDCK 细胞感染。第 2 代鸡胚尿囊液在不加胰酶的情况下感染 MDCK 细胞, 96 h 后显微镜下观察细胞病变, 并且应用红细胞 HA 试验检测细胞上清的 HA 滴度。

1.6.4 间接免疫荧光检测(IFA)。重配病毒感染 MDCK 细胞, 33 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后弃上清, 加入含 2% FBS 的 DMEM 培养基 33 $^{\circ}$ C 培养 24 h, 弃上清, 用 80% 预冷丙酮固定, PBST 洗 3 遍, 加入 A/California/07/2009 亚型阳性血清, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, PBST 洗 3 遍, 加入 1:200 稀释绿色荧光标记的兔抗羊 IgG 二抗, 37 $^{\circ}$ C 作用 45 min, PBS 洗 3 遍后, 晾干, 置荧光显微镜下观察。

1.6.5 电镜检测。用鸡胚传代的第 2 代病毒及野毒株经甲醛(0.025%)灭活后, 经蔗糖密度梯度纯化, 负染电镜观察病毒形态。

1.6.6 鸡胚半数感染剂量(EID_{50})的测定。将共转染产生的重配病毒 1 代尿囊液作 10 倍递进稀释, 经尿囊腔接种于 10 日龄非免疫鸡胚, 每个稀释度接种 4 枚鸡胚, 每枚鸡胚接种 0.2 ml, 33 $^{\circ}$ C 培养 72 h, 用 HA 方法检测病毒复制, 用里得-明其(Reed-Muench)法计算 EID_{50} = 高于 50% 感染病毒稀释度的对数 + (高于 50% 感染百分数 - 50) / (高于 50% 感染百分数 - 低于 50% 感染百分数)。

1.6.7 病毒 $TCID_{50}$ 的测定。用 MDCK 细胞铺 96 孔板, 每孔 $2 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4$ 个细胞, 待长成单层后, 病毒按 10^1 、 10^2 、 10^3 ……稀释。每孔 200 μ l, 稀释液为 DMEM 培养基, 3 天后观察结果, 用 Reed-Muench 法计算 $TCID_{50}$ 。

1.7 重配病毒稳定性研究

第一代病毒连续传 20 代, 用隔两代(2、4、6……20 代)的鸡胚尿囊液提取流感病毒 RNA、RT-PCR 扩增 HA、NA 和 NP 基因片段进行测序。

1.8 动物免疫学评价

1.8.1 动物免疫及抗体检测。4~6 周的 BALB/c 小鼠 5 只, 重配 A/California/07/2009ca 病毒 1, 28 天滴鼻免疫。每只免疫 10^6 $TCID_{50}$ /20 μ l 重配病毒。同时, 灭活重配 A/California/07/2009 病毒 1、14 天肌肉注射, 每只免疫 15 g/100 L(为 HA 的质量)重

配病毒, 经 2 次免疫后, 滴鼻组 28、42 天, 肌注组 14、28 天收集小鼠的血清及鼻冲洗液, 检测 HI 抗体及鼻黏膜 IgA 的效价, 检测 HI 抗体的滴度利用 4 单位病毒在 U 型 96 孔血凝板上用 1% 鸡红细胞检测. 鼻黏膜 IgA 利用 ELISA 检测.

1.8.2 细胞因子的测定. 第 2 次免疫 2 周后, 鼻腔给予 10^7 $TCID_{50}$ 重组病毒, 1 天后收集鼻腔冲洗液, 使用 ELISA 方法定量测定小鼠鼻冲洗液中 IL-1 β 、TNF α 、IFN- α 等前炎因子含量, 按说明书操作.

1.9 重组疫苗安全性评价

4~6 周的 BALB/c 小鼠 25 只, 减毒 A/California/07/2009ca 候选疫苗株滴鼻免疫 20 μ l 含有 10^6 $TCID_{50}$ 重组病毒, 1、2、3、4、5 天每天处死 5 只小鼠, 取鼻甲, 脑、肺、气管、脾脏匀浆研磨(组织按 0.1% 加入 PBS). 应用 FFU 的方法检测病毒在各组织中的病毒复制.

1.10 统计学处理

实验数据采用 SPSS 13.10 统计软件, 经单因素方差分析和 t 检验进行分析.

2 结 果

2.1 pAD-HA、pAD-NA 质粒的构建结果

将合成 A/California/07/2009 亚型的 HA, NA 基因克隆到 pAD3000 载体上, 经 PCR 鉴定及测序, 得到拯救 A/California/07/2009ca 亚型流感病毒的完整 8 质粒系统(图 1).

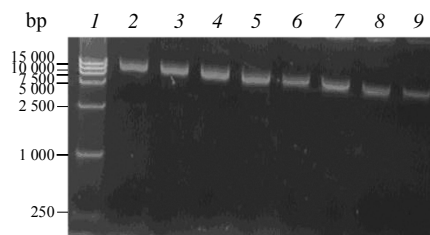


Fig. 1 Eight plasmids system of A/California/07/2009ca
1: 15 000 bp marker; 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9: pAD-PB2, pAD-PB1, pAD-PA, pAD-HA, pAD-NP, pAD-NA, pAD-M, pAD-NS.

2.2 重配 A/California/07/2009ca 病毒的验证

2.2.1 血凝素试验、血凝抑制试验及基因分析. 将第一代重配病毒稀释 10 倍, 无菌接种 10 日龄 SPF 鸡胚, 72 h 收集鸡胚尿囊液, 用 1% 鸡红细胞测得尿囊液 A/California/07/2009ca 病毒血凝素(HA)效价是 $2^6 \sim 2^8$, 分别用 A/Brisbane/59/2007 (H1N1)、

A/Brisbane/10/2007 (H3N2)、B/Florida/4/2006 (B)、A/Anhui/1/2005(H5N1)和 A/California/07/2009(H1N1)阳性血清做 A/California/07/2009ca 的血凝抑制(HI)试验, A/California/07/2009ca 可被 A/California/07/2009 阳性血清抑制, 血凝抑制(HI)效价为 2560, 不能被 H1N1、H3N2、B、H5N1 型阳性血清抑制.

用 RT-PCR 方法获得 A/California/07/2009ca 的 NA、HA 及 NP 基因, 经上海生物工程技术服务有限公司测序鉴定, 重配病毒 A/California/07/2009ca 的 NA、HA 及 NP 与各片段重组质粒序列相比较, 二者序列一致性为 99.99%, 说明该病毒是 A/California/07/2009ca 病毒.

2.2.2 间接免疫荧光检测(IFA). 重配病毒感染 MDCK 细胞后, 经荧光二抗结合后, 荧光显微镜下观察, 结果如图 2 所示, 重配病毒能够与 A/California/07/2009HA 抗体结合.

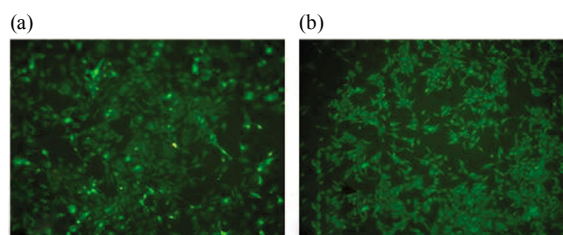


Fig. 2 Detection of the Reassortant influenza viruses with IFA

(a) Reassortant influenza viruses in IFA. (b) Control.

2.2.3 MDCK 细胞感染. 第二代病毒分别在 33 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C 感染 MDCK 细胞, 72 h 后显微镜下观察, 33 $^{\circ}$ C 出现细胞病变, 37 $^{\circ}$ C 细胞有少量病变, 检测 HA 效价, 33 $^{\circ}$ C 时为 $2^6 \sim 2^7$ 、37 $^{\circ}$ C 时为 $2^4 \sim 2^5$. 这初步验证了重配病毒冷适应性和温度敏感表型(图 3).

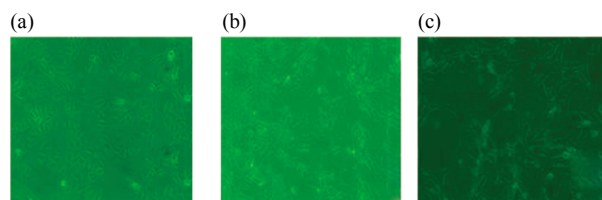


Fig. 3 CPE on the MDCK under different conditions($\times 40$)

(a) Normal MDCK cell. (b) CPE on the MDCK under the condition of 37 $^{\circ}$ C, 72 h. (c) CPE on the MDCK under the condition of 33 $^{\circ}$ C, 72 h.

2.2.4 电镜观察. A/California/07/2009ca 流感病毒结构与野生株 A/California/07/2009 病毒结构一致,

大小相符 (图 4)。

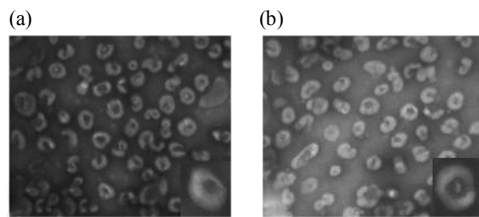


Fig. 4 Morphology of influenza A/California/07/2009 virus
(a) Recovered A/California/07/2009ca reassortant ($\times 65\ 000$). (b) Wild-type A/California/07/2009 ($\times 65\ 000$). At the right bottom of picture (a) or (b) is a single virion ($\times 135\ 000$).

2.2.5 鸡胚半数感染剂量(EID_{50})的测定. 鸡胚尿囊液(重配病毒)接种于 10 日龄非免疫鸡胚, 每个稀释度接种 4 枚鸡胚, 每枚鸡胚接种 0.2 ml, 33℃ 培养 72 h, 测得 EID_{50} 为 8(表 1)。

Table 1 EID_{50} of the Reassortant influenza virus

Dilutions	Infection	Non-infection	Ratio/%
10^{-1}	4	0	100
10^{-2}	4	0	100
10^{-3}	4	0	100
10^{-4}	4	0	100
10^{-5}	4	0	100
10^{-6}	4	0	100
10^{-7}	4	0	100
10^{-8}	4	2	100
10^{-9}	4	4	0

2.2.6 病毒 $TCID_{50}$ 的测定. 用 MDCK 细胞铺 96 孔板, 每孔 $2 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4$ 个细胞, 待长成单层后, 病毒按 10^1 、 10^2 、 10^3 ……稀释, 每孔 200 μ l, 稀释液为 DMEM 培养基, 3 天后观察结果, 用 Reed-Muench 法计算 $TCID_{50}$. 重配病毒 $TCID_{50}$ 为 7.5。

2.3 重配 A/California/07/2009ca 病毒稳定性研究

将鸡胚尿囊液按一定倍数稀释传代, 这样连续传 20 代, 分别在 2、4、6……20 代对病毒进行 RT-PCR 试验, 所得到的 NA、HA 及 NP 与各片段重组质粒序列相比较, 二者序列一致性为 99.99%, 说明重配的病毒有很好的稳定性。

2.4 重配 A/California/07/2009ca 病毒免疫原性研究

2.4.1 HI 试验. 重配病毒经肌肉注射(i.m.)和滴鼻(i.n.)两种途径免疫小鼠, 血清中 HI 测定结果见

图 5, 肌肉注射组一次免疫 2 周与滴鼻组一次免疫 4 周都产生一定水平的 HI, 二次免疫 2 周效价明显升高, 肌肉注射组较滴鼻组的 HI 有所提高($P = 0.044$), 但一次免疫与二次免疫 HI 效价有显著差异($P < 0.05$)。鼻冲洗液 IgA 测定结果见图 5, 肌肉注射组一次免疫 2 周与滴鼻组一次免疫 4 周几乎检测不到 IgA, 二次免疫 2 周滴鼻组明显升高, 滴鼻组的 IgA 要远远高于肌肉注射组($P < 0.001$)。

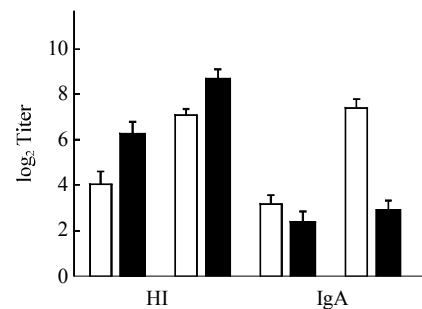


Fig. 5 HI titer in the serum and IgA titer in the nasal lavage fluid of mice immunized with Reassortant influenza viruses
□: i.n.; ■: i.m.

2.4.2 细胞因子检测. 重配病毒经肌肉注射和滴鼻两种途径免疫小鼠, 二次免疫 14 天后, 进行同型高效价病毒再感染 24 h 后, 收集鼻腔冲洗液, 使用 ELISA 方法检测各种前炎因子释放情况, 结果见图 6. 滴鼻免疫组所有前炎因子释放量多于肌肉注射组 ($P < 0.05$), 说明减毒活疫苗黏膜免疫, 可以更好地激发黏膜系统释放前炎因子, 为对抗病毒提供了第一道防线。

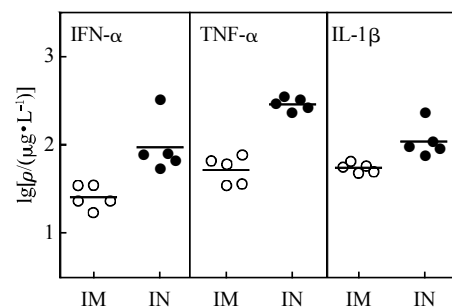


Fig. 6 Pro-inflammation cytokines in the nasal lavage fluid of mice immunized with Reassortant influenza viruses

2.4.3 病毒在小鼠体内安全性检测. 重配 A/California/07/2009ca 病毒滴鼻免疫小鼠, 1、2、3、4、5 天应用 FFU 的方法检鼻腔、气管、脑、肺、脾脏中病毒的含量. 由表 2 可见, 在免疫后 4 天内病毒在鼻腔中有少量复制, 4 天后病毒消失, 肺组织病毒在免疫后 3 天内有少量复制, 气管在免疫后 2 天内有少量复制, 脑、脾脏没有检测出病毒.

Table 2 Replication of reassortant influenza virus in mice

Tissue	lg[Virus titer/(FFU•ml ⁻¹)]				
	1d	2d	3d	4d	5d
Nasal turbinates	2.5	1.5	1.5	1	0
Trachea	2	1	0	0	0
Brain	0	0	0	0	0
Lungs	2.4	1.3	1	0	0
Spleen	0	0	0	0	0

3 讨 论

自 2009 年 4 月 25 日, 世界卫生组织发出甲型 H1N1 流感疫情通报, 此后, 甲型 H1N1 病毒随着高度发达的人流网络传遍世界, 并于 2009 年 5 月 11 日扣开中国大门. 截至 2010 年 3 月 31 日, 全国 31 个省份累计报告甲型 H1N1 流感确诊病例 12.7 万余例, 死亡病例 800 例. 流感病毒严重危害我国人民的身体健康, 目前接种甲型 H1N1 流感疫苗仍是预防甲型 H1N1 流感最有效的手段.

反向遗传学技术是利用流感病毒的 8 个基因质粒共转染细胞后, 产生具有与流感病毒性质相似的流感疫苗候选株, 自 1998 年以来, 此项技术就在流感疫苗的生产中得到了应用. 人流感疫苗是经过基因序列扩增和生物学技术, 克隆到表达载体, 转染细胞后接种 10 日龄鸡胚, 产生一个符合人流感疫苗生产要求的流感疫苗候选株.

当前甲型 H1N1 流感疫苗均为全病毒灭活注射疫苗, 其免疫原性较好, 但交叉保护作用差, 不能产生有效的黏膜免疫, 注射时必须在医生的帮助下完成, 免疫过程较为复杂, 注射时病人较为痛苦^[8-9]. 流感减毒喷鼻疫苗是近年来新兴的一种疫苗, 据相关资料报道^[10-11], 喷鼻疫苗能够成功解决上述问题.

本实验用 A/Ann Arbor/6/60ca(H2N2)的 6 个内

部基因节段为骨架, 与 A/California/07/2009 亚型流行株的 HA 和 NA 基因组合(6+2), 利用 pol I-pol II 双向转录表达载体 pAD3000 转染 Vero 细胞, 得到了 A/California/07/2009ca 病毒株, 经血凝抑制试验, RT-PCR 试验证明重配病毒株为 A/California/07/2009ca 病毒. CPE 试验证明重配 A/California/07/2009ca 病毒株具有温度敏感(Ts)、致弱(att)的表型, 电镜检验其结构形态符合流感病毒的主要特征.

重组 A/California/07/2009ca 流感病毒疫苗候选株免疫 BALB/c 小鼠, 一次免疫 14 天及二次免疫 14 天后, 肌肉注射组的 HI 效价高于滴鼻组($P = 0.044$), 肌肉注射和滴鼻与 PBS 组差异显著($P < 0.05$), 肌肉注射组与滴鼻组一次免疫后的鼻黏膜的 IgA 都很低, 几乎检测不到, 但二次免疫 14 天后滴鼻组有了较大提高与肌肉注射组差异显著($P < 0.05$). 这说明重配减毒流感病毒经滴鼻途径免疫小鼠, 能很好地激发小鼠机体的鼻黏膜免疫, 在黏膜中产生 IgA. 这种在呼吸道黏膜产生的 IgA 在预防流感病毒感染上发挥着重要作用^[12-13].

我们已经知道, 各种疫苗可以提供有效保护, 主要来源于一种加强了获得性免疫. 滴鼻免疫的疫苗可以有效激发局部黏膜免疫反应, 同时可以激发系统免疫. 在此, 我们另辟蹊径, 检测一下滴鼻免疫在提高呼吸道黏膜系统天然免疫方面是否具有独特的优势. 在两种方法免疫后 14 天, 采用同型重组病毒, 鼻腔感染小鼠, 24 h 后分别收集鼻腔冲洗液, 对各种前炎因子进行检测. 结果表明, 滴鼻免疫的小鼠鼻腔内可以检测到高效价的 IL-1 β 、TNF α 、IFN- α , 说明重组病毒经过滴鼻免疫可以提高机体天然免疫反应.

疫苗的安全性是疫苗能否生产的决定性因素, 本试验通过滴鼻免疫 BALB/c 小鼠, 并对小鼠的不同器官进行病毒载量检测, 从而对重配病毒的安全性进行研究^[14-15]. 由结果可见, 在 1~3 天, 病毒在鼻腔、气管、肺中有低量的复制, 第 4 天只在鼻腔中检测到少量的复制, 5 天后, 各个器官都没有检测到病毒的存在, 脑、脾脏中始终没有检测到病毒的存在. 由此可见, 减毒喷鼻疫苗在机体中存活时间较短, 并且只有较低的复制. 因此我们可以初步证明减毒喷鼻疫苗在小鼠上是安全的.

本研究重配了 A/California/07/2009ca 减毒流感病毒疫苗候选株, 并通过实验验证了重配病毒具有冷适应和温度敏感表型. 初步鉴定了重组病毒的生

物学特性、免疫原性及安全性, 这为后期 A/California/07/2009ca 流感减毒喷鼻疫苗的研制及临床应用提供了数据参考.

参 考 文 献

- [1] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Swine influenza A (H1N1) infection in two children—Southern California, March–April 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009, **58**(15): 400–402
- [2] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Swine influenza A (H1N1) in-fections-California and Texas, April 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2009, **58**(16): 435–437
- [3] Maines T R, Jayaraman A, Belser J A, *et al.* Transmission and pathogenesis of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses in ferrets and mice. *Science*, 2009, **84**: 484–487
- [4] Van Hoeven N, Pappas C, Belser J A, *et al.* Human HA and polymerase subunit PB2 proteins confer transmission of an avian influenza virus through the air. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**: 3366–3371
- [5] 杨鹏辉, 安文琪, 石辛甫, 等. 冷适应病毒 B 型流感病毒疫苗候选株的制备及鉴定. *生物化学与生物物理进展*, 2009, **36**(3): 358–363
Yang P H, An W Q, Shi X F, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2009, **36**(3): 358–363
- [6] 杨鹏辉, 叶 艺, 石辛甫, 等. 2006~2007 年流行流感病毒减毒疫苗株的构建. *生物化学与生物物理进展*, 2008, **35**(3): 312–319
Yang P H, Ye Y, Shi X F, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2008, **35**(3): 312–319
- [7] An W Q, Yang P H, Duan Y Q, *et al.* Generation and characterization of a cold-adapted attenuated live H3N2 subtype influenza virus vaccine candidate. *Chin Med J*, 2009, **122**(23): 2880–2885
- [8] Amorsolo L, Suguitan Jr, Josephine McAuliffe, *et al.* Live, attenuated influenza A H5N1 candidate vaccines provide broad cross-protection in mice and ferrets. *Plos Medicine*, **360**(9): 154–169
- [9] Mendelman P M, Cordova J, Cho I. Safety, efficacy and effectiveness of the influenza virus vaccine, trivalent, types A and B, live, cold-adapted (CAIV-T) in healthy children and healthy adults. *Vaccine*, 2001, **19**(17–19): 2221–2226
- [10] Maassab H F, Bryant M L. The development of live attenuated cold-adapted influenza virus vaccine for humans. *Rev Med Virol*, 1999, **9**(4): 237–244
- [11] Alexandrova G I, Maassab H F, Kendal A P, *et al.* Laboratory properties of cold-adapted influenza B live vaccine strains developed in the US and USSR, and their B/Ann Arbor/1/86 cold-adapted reassortant vaccine candidates. *Vaccine*, 1990, **8**(1): 61–64
- [12] Tian S F, Buckler-White A J, London W T, *et al.* Nucleoprotein and membrane protein genes are associated with restriction of replication of influenza A/Mallard/N.Y./78 virus and its reassortants in squirrel monkey respiratory tract. *J Virol*, 1985, **53**(3): 771–775
- [13] Mendelman P M, Cordova J, Cho I. Safety, efficacy and effectiveness of the influenza virus vaccine, trivalent, types A and B, live, cold-adapted (CAIV-T) in healthy children and healthy adults. *Vaccine*, 2001, **19**(17–19): 2221–2226
- [14] Hoelscher M A, Garg S, Bangari D S, *et al.* Development of adenoviral-vector-based pandemic influenza vaccine against antigenically distinct human H5N1 strains in mice. *Lancet*, 2006, **367**(9509): 475–481
- [15] Cox R J, Brokstad K A, Ogra P. Influenza virus: immunity and vaccination strategies. Comparison of the immune response to inactivated and live, attenuated influenza vaccines. *Scand J Immunol*, 2004, **59**(1): 1–15

Rescue and Immunogenic Evaluation of Attenuated Vaccine Candidate From A/California/07/2009*

DUAN Yue-Qiang^{1,2)}, LUO De-Yan¹⁾, XING Li¹⁾, YANG Peng-Hui¹⁾, ZHAO Zhong-Peng¹⁾,
JIA Wei-Hong¹⁾, LI Pei-Feng^{2)**}, WANG Xi-Liang^{1)**}

¹⁾ State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology,
Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China;

²⁾ College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China)

Abstract Six internal protein gene segments of attenuated, cold-adapted(ca), temperature -sensitive (ts) influenza A/Ann Arbor/6/60 ca (H2N2) and HA, NA gene segments of A/California/07/2009ca were introduced to plasmid pAD3000 carrying pol I and pol II promoters, and rescued the reassortant virus from Vero cell using reverse genetics technology. The reassortant has the attenuate characters, ca and ts, the $TCID_{50}$ is 7.5, HA titer maintain at 1 : 256 and EID_{50} is 8 which was detected using SPF eggs. The stable of reassortant is determined by RT-PCR gene segments from virus which were propagated in eggs. The morphology of reassortant conform the wild type virus. In order to test the immunogenicity, the reassortant viruses were purified. Mice were intranasally immunized and intramuscular injected with inactive whole virus as control. The high HI titer can be detected in both groups, seems hinger in i.m.(intramuscular) immunized groups ($P=0.044$), but higher IgA titer can only detected in i.n.(intranasal) immunized group. Compared with i.m. immunized group, higer pro-inflammation cytokines IL-1 β , TNF α , IFN- α were tested in i.n. groups, means faster and stronger mucosal immune response was induced. Virus load were detected in lung, brain, spleen 4 days after immunization to determine the safety of reassortant as vaccine candidate, no detectable virus were found. All results show that the vaccine candidate can be used for vaccine production.

Key words reverse genetics, A/California/07/2009, 8 plasmids rescue system

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00249

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30700743).

**Corresponding author.

LI Pei-Feng. Tel: 86-471-4309176, E-mail: lpfneimeng@163.com

WANG Xi-Liang. Tel: 86-10-66948678, E-mail: xiliangw@126.com

Received: June 24, 2010 Accepted: October 11, 2010