

第 2.3.2.1 分支 H5 亚型禽流感变异株 候选疫苗株的构建及免疫效力试验

蒋文明¹, 李金平¹, 侯广宇¹, 王素春¹, 袁万哲², 孙文博³, 彭程¹, 陈继明¹

(1. 中国动物卫生与流行病学中心, 山东青岛 266032; 2. 河北农业大学动物医学院,

河北保定 071001; 3. 山东省农业科学院畜牧兽医研究所, 山东济南 250100)

摘要:第 2.3.2.1 分支 H5N1 亚型禽流感病毒(AIV)抗原性目前已发生显著变异。为应对变异株可能引发的流行, 利用反向遗传技术, 以鸡胚适应毒 A/Puerto Rico/8/34 (PR8) 的内部基因为骨架, 以 H5N1 亚型 AIV A/duck/JS/ZJ/2016 (H5N1) (ZJ, 第 2.3.2.1d 分支)、A/Chicken/SD/YT/2015 (H5N1) (YT, 第 2.3.2.1e 分支) 的基因组为模板, 扩增其 HA 及 NA 基因, 并对 HA 基因进行修饰, 去除裂解位点处的多个碱性氨基酸, 使其获得低致病性 AIV 的分子特征, 成功构建了第 2.3.2.1 分支 H5N1 亚型 AIV 疫苗候选株 rZJ 和 rYT。抗原性分析显示, rZJ 和 rYT 与 Re-6 疫苗株之间的抗原性已有显著差异。免疫效力试验表明, rZJ 和 rYT 重组灭活疫苗免疫 21 d 的平均 HI 抗体效价分别达到 8.8 log₂ 和 8.9 log₂, 说明重组疫苗具备良好的免疫原性。免疫攻毒保护试验表明, rZJ 和 rYT 重组灭活疫苗可以提供 SPF 鸡抵抗同源 H5N1 病毒 100% 的保护, 而针对第 2.3.2.1 分支的 Re-6 疫苗仅提供大约 40% 和 30% 的保护。利用反向遗传技术构建的 rZJ 和 rYT 重组候选疫苗株为该分支病毒的防控提供了技术支持。

关键词: 禽流感病毒; H5; 第 2.3.2.1 分支; 变异株; 反向遗传; 疫苗

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 1005-944X (2017) 09-0079-04

DOI: 10.3969/j.issn.1005-944X.2017.09.022

Generation and Protective Efficacy of Candidate Vaccine Virus against Clade 2.3.2.1 H5 Avian Influenza Variant

Jiang Wenming¹, Li Jinping¹, Hou Guangyu¹, Wang Suchun¹, Yuan Wanzhe², Sun Wenbo³, Peng Cheng¹, Chen Jiming¹

(1. China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao, Shandong 266032; 2. College of Animal Medicine, Hebei Agricultural University, Baoding, Hebei 071001; 3. Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan, Shandong 250100)

Abstract: The significant antigenic changes of clade 2.3.2.1 H5 subtype of Avian influenza virus (AIV) have occurred. To control the potential pandemic threat of variations to poultry, in this study, two reassortant viruses, named rZJ and rYT, were generated using reverse genetics. The viruses contained modified HA and NA genes of epidemic strains A/duck/JS/ZJ/2016 (H5N1) and A/Chicken/SD/YT/2015 (H5N1) respectively, with the internal genes derived from A/Puerto Rico/8/34 (PR8). The reassortant candidate vaccine viruses was attenuated by removal of the multi-basic amino acid motif in the HA gene by mutation and deletion. Antigenicity analysis showed that there was significant difference between rZJ and rYT, compared with Re-6 vaccine strain. Immune efficacy tests showed that the HI antibody titers could reach 8.8 log₂ and 8.9 log₂, respectively, after 21 days from immunization of rZJ and rYT inactivated vaccines, showing a good immunogenicity. Immune challenge tests showed that rZJ and rYT recombinant inactivated vaccines could provide SPF chickens with 100% of the protection against homologous H5N1 viruses, and Re-6 vaccine against clade 2.3.2.1 viruses could only provide about 40% and 30% of the protection, respectively. And rZJ and rYT recombinant vaccine candidate strains using reverse genetics technology provided technical support for prevention and control of the viruses of clade 2.3.2.1.

Key words: Avian influenza virus; H5; clade 2.3.2.1; variant; reverse genetics; vaccine

基金项目: 科技部科技基础性工作专项 (2012FY111000); 山东省博士基金 (BS2013SW022)

2009年以来,第2.3.2.1分支(a、b、c 3个小分支)的H5N1亚型高致病性禽流感(Avian influenza, AI)在我国开始出现和流行。该分支病毒不但给养禽业(鸡和水禽)造成了严重的经济损失,还严重威胁着人类健康。2012年,我国推出Re-6疫苗(b分支)用于该分支病毒的免疫防控,有效控制了该分支病毒的流行。随着病毒的演变和进化,许多抗原变异较大的毒株开始出现,在原有a、b、c 3个小分支的基础上,又出现了d、e 2个小分支^[1]。现有的Re-6疫苗已不能发挥理想的防控效果,导致多起疫情发生。目前,疫苗免疫仍然是防控AI的重要手段。而疫苗的有效性则取决于疫苗株与流行株之间的抗原性匹配程度^[2]。因此,有必要重新构建针对第2.3.2.1分支的疫苗候选株,以应对该分支病毒的流行和威胁。本研究以筛选出的第2.3.2.1d和第2.3.2.1e分支的H5N1亚型代表株ZJ和YT为表面基因供体,以PR8的内部基因为骨架,构建疫苗候选株rZJ和rYT,并进行了免疫效力和攻毒保护试验,为该亚型禽流感的防控提供参考。

1 材料与方法

1.1 病毒株、细胞、载体以及实验动物

A/duck/JS/ZJ/2016(H5N1)(ZJ)和A/chicken/SD/YT/2015(H5N1)(YT),由本实验室分离保存;双向表达载体pH205及表达PR8基因的pH205-PB2、pH205-PB1、pH205-PA、pH205-NP、pH205-M、pH205-NS,由本实验室构建保存;293T细胞,由本实验室保存;SPF鸡胚和SPF鸡,购自北京梅里亚维通实验动物技术有限公司。

1.2 主要试剂

QIAamp Viral RNA mini Kit, 购自Qiagen公司;PrimeSTAR Max DNA Polymerase、PrimeScript Reverse Transcriptase、T4 DNA连接酶、pMD19-T、DL2000 DNA Marker、胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒,购自TaKaRa公司;限制性内切酶BsmBI,购自NEB公司;转染试剂Lipofectamine 3000,购自Invitrogen公司。

1.3 引物设计

HA基因和NA基因的扩增引物按照以前发表

的文献合成^[3]。设计引物使ZJ和YT强毒株HA裂解位点处的氨基酸序列PQRERRRKR/GLF突变成弱毒株的HA裂解位点PQRETR/GLF(表1)。

表1 扩增HA、HA突变体、NA基因的引物

引物名称	序列
Bm-HA-F	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAAGCAGGGG
Bm-HA-R	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTT
HA1-R	ATAGTCCTCGAGTCTCTCGTTGAGGACTATTTCT
HA2-F	CCTCAACGAGAGACTCGAGGACTATTTGGAGCT
Bm-NA-F	TATTCGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGGTGAAAATG
Bm-NA-R	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTT

1.4 病毒RNA的提取及基因扩增

HA基因和NA基因的扩增按照以前发表的文献进行^[4]。按照QIAamp Viral RNA mini Kit说明书提取病毒RNA,利用PrimeScript Reverse Transcriptase进行反转录。以cDNA为模板,利用PrimeSTAR Max DNA Polymerase扩增病毒HA和NA基因片段。将PCR产物经琼脂糖凝胶电泳后,利用DNA胶回收试剂盒纯化回收,然后与T载体连接,将阳性重组质粒送青岛志远生物测序鉴定。对于HA突变体的构建,以鉴定正确的ZJ和YT HA阳性重组质粒为模板,以两对引物Bm-HA-F/HA1-R和HA2-F/Bm-HA-R分别扩增出HA1和HA2片段,然后以HA1和HA2的混合物为模板,Bm-HA-F/Bm-HA-R为引物,用PrimeSTAR Max DNA Polymerase进行重叠延伸PCR(SOE-PCR),扩增出HA突变体片段。对PCR产物经胶回收后,与T载体连接,将阳性重组质粒进行测序鉴定。

1.5 重组表达质粒的构建

将鉴定正确的ZJ和YTHAmut、NA重组质粒,经BsmBI酶切,与BsmBI酶切的表达载体pH205相连,提取重组质粒,进行测序鉴定,并利用DNASar7.0软件进行序列分析。

1.6 病毒拯救与鉴定

按照Lipofectamine 3000脂质体转染试剂盒说明进行。将PR8的6个内部基因重组表达质粒和HA突变体和NA表面基因重组表达质粒各0.6 μg混合共转染293T细胞,48 h后将细胞悬液接种10日龄SPF鸡胚,0.2 mL/枚,37 °C继续孵化,72 h后收集尿囊液,测定其血凝活性。取血凝阳性的尿

囊液经 10 000 倍稀释后接种 10 日龄 SPF 鸡胚，扩增病毒，0.1 mL/枚，72 h 后收集尿囊液，于 -70 °C 保存备用。重组病毒命名为 rZJ 和 rYT。提取救获病毒的 RNA，用 RT-PCR 扩增病毒的全基因组并测序。

1.7 抗原性分析

将重组病毒用甲醛 (0.1%) 灭活后，与白油佐剂乳化制成油佐剂灭活疫苗，颈部皮下免疫 21 日龄 SPF 鸡，0.5 mL/只。21 d 后采集血清，进行交叉血凝抑制 (Haemagglutination inhibition, HI) 试验，计算抗原相关系数，分析重组病毒与 Re-6 疫苗株之间的抗原相关性。

1.8 免疫保护试验

将 60 只 21 日龄 SPF 鸡分成 6 组，每组 10 只。其中：1 组颈部皮下接种 rZJ 灭活油苗；1 组接种 rYT 灭活油苗；2 组接种 Re-6 灭活油苗，接种剂量各为 0.3 mL/只；2 组为不接种疫苗直接攻毒组。免疫 21d 后采血，分离血清，测定抗体效价，并用 10^6 EID₅₀ 的同源病毒对各组鸡进行滴鼻攻毒，连续观察 10 d，统计排毒、发病和死亡情况。

2 结果

2.1 表达 HA 突变体重组质粒的构建

采用 SOE-PCR 扩增 ZJ 和 YT 株的 HA 基因，并将其克隆至 pH205 载体中，构建 pH205-ZJmHA 和 pH205-YTmHA 重组质粒。测序结果表明 (图 1)，HA 裂解位点的氨基酸序列已由强毒病毒 HA 分子的“-PLRERRRKR-”突变为弱毒病毒 HA 分子的“-PQRETR-”。

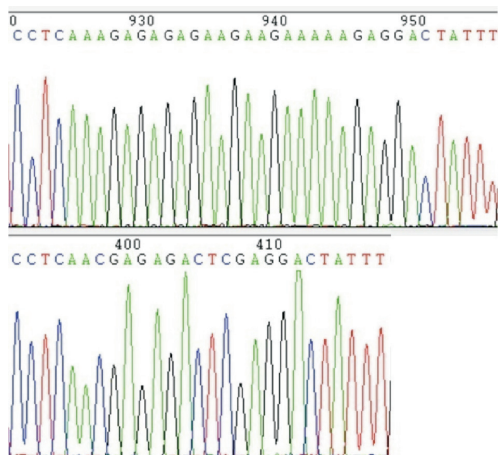


图 1 HA 基因裂解位点突变前后测序结果

2.2 重组病毒的拯救与鉴定

将构建成功的 8 个重组质粒转染 293T 细胞，利用反向遗传技术拯救出重组病毒 rZJ 和 rYT。在鸡胚繁殖 1 代后，提取病毒 RNA，反转录，对拯救病毒的全基因组进行扩增、测序。测序结果表明，HA 基因裂解位点已被突变为“-PQRETR-”，为低致病性 AIV 分子特征，所有 8 个片段序列均与预期的序列一致。

2.3 抗原变异分析

用第 2.3.2.1b 分支疫苗株 Re-6 免疫制备的免疫血清，对 Re-6、rZJ 和 rYT 抗原的交叉 HI 滴度分别为 9.2 log₂、4.5 log₂、3.9 log₂ (表 2)。用第 2.3.2.1d 分支疫苗株 rZJ 免疫制备的免疫血清，对 rZJ、rYT 和 Re-6 抗原的交叉 HI 滴度分别为 9.3 log₂、8.4 log₂、3.3 log₂。用第 2.3.2.1e 分支疫苗株 rYT 免疫制备的免疫血清，对 rYT、rZJ 和 Re-6 抗原的交叉 HI 滴度分别为 9.3 log₂、8.8 log₂、2.6 log₂。

表 2 交叉血凝抑制试验

抗体	HI 滴度 (log ₂)		
	Re-6	rZJ	rYT
Re-6	9.2	4.5	3.9
rZJ	3.3	9.3	8.4
rYT	2.6	8.8	9.3

计算 3 个抗原之间的交叉 HI 相关系数，Re-6 与 rZJ 之间的交叉 HI 相关系数为 0.42 (< 0.5)，说明 rZJ 毒株与疫苗株之间的抗原性差异明显。Re-6 与 rYT 之间的交叉 HI 相关系数为 0.34 (< 0.5)，说明 rYT 毒株与疫苗株之间的抗原性差异明显。rZJ 与 rYT 之间的交叉 HI 相关系数为 0.92 (> 0.5)，说明 rZJ 毒株与 rYT 之间的抗原性无明显差异。

2.4 重组疫苗免疫保护试验和交叉免疫保护试验

重组疫苗免疫和攻毒保护试验结果见表 3。免疫 21 d 后，第 2.3.2.1d 分支疫苗 rZJ 免疫后对母本病毒的平均 HI 滴度为 8.8 log₂，用对 Re-6 抗原的平均 HI 滴度为 2.9 log₂。第 2.3.2.1e 分支疫苗 rYT 免疫后对母本病毒的平均 HI 滴度为 8.9 log₂，用对 Re-6 抗原的平均 HI 滴度为 2.3 log₂。第 2.3.2.1b 分支疫苗 Re-6 免疫后对母本病毒的平均 HI 滴度为 8.7 log₂，对 ZJ 和 YT 的平均 HI 滴度分别为 3.9 log₂ 和 3.2 log₂。

攻毒保护试验结果显示：rZJ 和 rYT 重组灭活疫苗为 SPF 鸡提供的针对同源病毒的免疫保护率均为 100%；Re-6 灭活疫苗对第 2.3.2.1d 分支病毒 ZJ 和第 2.3.2.1e 分支病毒 YT 提供的免疫保护率分别为 40% 和 30%；未免疫对照组经 ZJ 和 YT 攻毒后 5 d 内全部死亡。

表 3 重组灭活疫苗对 SPF 鸡的免疫和攻毒保护试验

疫苗	攻毒病毒	免疫 21 d 后		排毒情况				存活率 (%)
		HI (log ₂)		3 dpi		5 dpi		
		Re-6	攻毒	咽拭子	肛拭子	咽拭子	肛拭子	
Re-6 (2.3.2.1b)	ZJ	8.7	3.9	10/10	9/10	7/7	7/7	40
Re-6 (2.3.2.1b)	YT	8.7	3.2	10/10	10/10	6/6	6/6	30
rZJ (2.3.2.1d)	ZJ	2.9	8.8	ND	ND	ND	ND	100
rYT (2.3.2.1e)	YT	2.3	8.9	ND	ND	ND	ND	100
对照组 1	ZJ	—	—	10/10	10/10	—	—	0
对照组 2	YT	—	—	10/10	10/10	—	—	0

注：ND 表示未检测到排毒

3 讨论

2005 年以来，我国一直施行针对 H5 亚型高致病性禽流感的大规模免疫政策，随着病毒的不断进化和变异，疫苗也在更新换代，从最初的 Re-1 更新到 Re-4 和 Re-5，到目前使用的 Re-6、Re-7 和 Re-8。流行病学调查数据显示，Re-6 对应的第 2.3.2.1 分支的病毒出现了一些变异毒株，在原有 a、b、c 3 个小分支的基础上，又出现了 d 和 e 2 个小分支^[1, 5]。抗原性分析结果显示 ZJ 和 YT 与疫苗株 Re-6 之间的抗原性已有明显差异。抗原表位分析显示，与疫苗株 Re-6 相比，第 2.3.2.1d 分支病毒 ZJ 和第 2.3.2.1e 分支病毒 YT 在 R53K、R115Q、P123S、D124N、L129M、N140K、D154N、N155D、A156T、R189K、S275N、D374E、K384E、N391D 等 13~14 个抗原位点出现了变化^[6-7]。这与交叉 HI 试验结果一致^[5]。

本研究利用反向遗传技术，以鸡胚高产适应度 A/Puerto Rico/8/34 (PR8) 的内部基因为骨架，分别以 ZJ 和 YT 的 HA 和 NA 表面基因为供体，通过对其 HA 基因进行分子突变修饰，去除 HA 蛋白裂解位点处的多个连续碱性氨基酸，使其获得低致病性 AIV 的分子特征^[8]，均不能对鸡胚和

SPF 鸡致死和发病，同时又保证了重组病毒与流行株的抗原匹配性，成功构建了针对第 2.3.2.1d 和第 2.3.2.1e 分支的 H5N1 亚型 AIV 疫苗候选株 rZJ 和 rYT。SPF 鸡免疫结果显示，rZJ 和 rYT 灭活油苗免疫 21 d 的平均 HI 抗体效价分别达到 8.8 log₂ 和 8.9 log₂，说明重组疫苗具备良好的免疫原性。攻毒保护试验结果表明，rZJ 和 rYT 重组灭活疫苗可以提供 SPF 鸡针对同源病毒 100% 的保护，而 Re-6 疫苗仅可提供大约 40% 和 30% 的保护，这也验证了流行毒与 Re-6 疫苗株之间的抗原性已有显著差异。本研究构建的 rZJ 和 rYT 重组病毒株作为候选疫苗株为该分支 H5 病毒的防控提供了可行的探索和尝试，为该分支病毒的防控提供了技术支持。

参考文献：

- [1] JIANG W, HOU G, LI J, et al. Novel variants of clade 2.3.2.1 H5N1 highly pathogenic avian influenza virus in migratory waterfowl of Hongze Lake[J]. *Vet Microbiol*, 2017, 198: 99-103.
- [2] CHEN H. Avian influenza vaccination: the experience in China[J]. *Rev Sci Tech*, 2009, 28: 267-274.
- [3] HOFFMANN E, STECH J, GUAN Y, et al. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses[J]. *Arch Virol*, 2001, 146 (12): 2275-2289.
- [4] 蒋文明, 侯广宇, 王素春, 等. H5N6 亚型禽流感病毒反向遗传疫苗株的构建及免疫保护试验[J]. *中国动物检疫*, 2015, 32 (1): 64-67.
- [5] 蒋文明, 李金平, 侯广宇, 等. H5 亚型高致病性禽流感病毒抗原性变异分析[J]. *中国动物检疫*, 2016, 33 (9): 27-32.
- [6] KAVERIN N V, RNEVA I A, GOVORKOVA E A, et al. Epitope mapping virus by using monoclonal antibodies[J]. *J Virol*, 2007, 81: 12911-12917.
- [7] VELKOV T, ONG C, BAKER M A, et al. The antigenic architecture of the hemagglutinin of influenza H5N1 viruses[J]. *Mol Immunol*, 2013, 56: 705-719.
- [8] GOHRBANDT S, VEITS J, HUNDT J, et al. Amino acids adjacent to the haemagglutinin cleavage site are relevant for virulence of avian influenza viruses of subtype H5[J]. *J Gen Virol*, 2011, 92: 51-59.

(责任编辑：朱迪国)