

家禽流行性感冒核酸疫苗製備亞型特異性抗體之研發

李敏旭*、陳麗璇、劉玉彬、鄭明珠、李淑慧

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要

將家禽流行性感冒病毒 H5 基因之 HA1 片段以 RT-PCR 增幅出來後，將此基因轉殖到 pCI-neo 及 pCDNA3.1 載體，篩選好之真核表現載體配合微脂體以肌肉注射 100 μ g 接種在 6 週齡 BALB/c 小鼠 及 3 週齡無特異病原小雞，之後每月補強接種共二次，經三次免疫後測試其抗體反應，結果顯示血球凝集抑制抗體反應均不佳。

關鍵字：家禽流行性感冒，DNA 疫苗，特異性抗體

緒言

家禽流行性感冒(avian influenza; AI)是由正黏液病毒科(Orthomyxoviridae)之 A 型流行性感冒病毒(type A influenza virus) 所引起之呼吸道疾病，依據血球凝集素及神經氨酸酶二個表面蛋白可區分 16 種 HA 亞型及 9 種 NA 亞型。所有 16 種 HA 亞型病毒均可在水禽類發現，為此病毒之儲主[2]。自 1878 年 Perroncito 首先描述此病後，全球各地陸續發生許多的疫情，其間更有多次高死亡率之大爆發，造成嚴重的經濟損失；而在台灣，雖然於 1972 年曾發生鴨子之病例，但經謝等於 1988~1991 年對於台灣飼養之家禽進行抗體調查及病毒分離的結果，證實在家禽普遍有家禽流行性感冒之抗體存在，並且可分離到許多亞型之病毒株。由於水禽為家禽流行性感冒病毒主要之保毒者，而候鳥每年的遷移會將病毒帶入台灣，因此，在國外陸續發現禽源之 H5N1 及 H9N2 流行性感冒病毒感染人類之事件後，更凸顯出家禽流行性感冒防疫檢疫工作的重要性。家禽流行性感冒病毒 HA 亞型的區別是利用參考血清進行血球凝集抑制試驗(hemagglutination - inhibition test)當作標準方法[8]，藉由亞型特異性抗體抑制病毒封套上之血球凝集素與紅血球表面接受器的交互作用

之原理。而目前所使用來製造參考血清之方法通常以活毒或不活化病毒注射雞隻以誘發抗體產生[7]，但這種方式所產生之抗體非只針對血球凝集素而是對全病毒所轉譯出的十個蛋白均有抗體反應，若使用在血球凝集抑制試驗會對於結果產生干擾現象[4]，在血清亞型的區分上則造成混淆。基於對本地產業之永續經營及公共衛生上對人類所造成之威脅性，建立標準抗血清是診斷實驗室必備之材料[6]，故在本試驗中我們嘗試以 DNA 疫苗方式接種試驗動物來製備參考抗血清[8]，希望利用此方法製備單一蛋白之抗血清以減少多源抗體產生之困擾。

材料與方法

病毒株與 RNA 萃取：以 2003 年由台灣雞場所分離之家禽流行性感冒病毒株(A/CK/TW/1209/03 (H5N2))，取 200 μ L 的病毒液檢體置入樣本微量管中，加入 1 毫升 Trizol®試劑(Invitrogen)均勻混合後靜置 5 分鐘，加入 0.2 毫升 phenol / chloroform / isoamylalcohol (25 : 24 : 1)，混合均勻後以 12,000 rpm 離心 15 分鐘，取上清液至另一新管，加入等量之 isopropanol 待混合均勻後以 12,000 rpm 離心 20 分鐘，倒去上清液加入 70% 酒精以

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

1,2000 rpm 離心 5 分鐘，去除液體後風乾或烘乾，再加入經 DEPC 處理過之去 RNase 水予以溶解。

增幅基因片段：以 RT-PCR 增幅出血球凝集素 HA1 部分之全段基因，將所增幅得到之 PCR 產物以含有 0.5 μ g/mL ethidium bromide 的 2.0 % 洋菜膠及 0.5 % TAE 緩衝液之 mini-gel 電泳槽中進行，取 10 μ L 產物與 1 μ L 6x BPB (bromophenol blue) 混合後，施以 10.7 V/cm 電壓電泳 25-30 分鐘後，與 DNA 標準長度溶液 (DNA marker) 輔助產物的判讀。

基因選殖與序列確認：經電泳分析確認符合預期產物大小之 PCR 產物再以 Topo blunt end cloning kit (Invitrogen) 進行基因選殖後，利用載體上之 M13 primer 進行挑選，挑選出之菌落經質體純化後以在載體上之 T3 及 T7 primer 進行鹼基標示螢光反應，最後利用自動定序儀 (ABI 3730) 進行定序反應，所得序列再以 DNASTAR 套裝軟體中之 "Megalign" 與 "SeqMan" 等程式進行序列比對與接合，最後將所得之基因序列輸入 NCBI 之 Blast 比對確認產物之基因序列無誤。

構築 DNA 疫苗：將上述確認過質體上之 HA1 基因轉殖到 pCI-neo 載體 (Promega, Madison, WI) 及 pCDNA3.1 (Invitrogen)，經挑選並確認選殖的菌落中質體含有 HA1 基因，將二種帶有 HA1 基因之質體菌落以 LB 培養液大量培養 16~18 小時後以 plasmid mega kit (Qiagen) 萃取出質體備用。

動物接種：將佐劑 lipofectin (Life technologies) 20 μ L 加入 100 μ L PBS 緩衝液混合後室溫感作 30 分鐘以形成微脂體 (liposome)。將製備好之 100 μ g 質體以 PBS 緩衝液稀釋成 280 μ L，並且加入上述微脂體混合後置放 15 分鐘。每組取三隻 3 週齡 SPF 雞，每隻雞接種 400 μ L，並分成二個部位以肌肉注射方式接種，每個月採血測定力價後再補強接種持續三個月。另外以 6 隻四周齡 BALB/c 小鼠分成二組接種不同質體，每隻小鼠注射 200 μ L，並分成二個部位以皮下肌肉注射方式接種，每個月採血測定力價後再補強接種持續三個月[3、5]。

抗體力價測定：抗體力價的測定是以同源病毒稀釋成 4HA 單位抗原，並將待測血清進行連續 2 倍稀釋

後，利用血球凝集抑制試驗測定抗體力價。

結果與討論

DNA 疫苗接種在雞隻及小鼠的免疫反應以同源病毒進行血球凝集抑制測定三次抗體力價，結果三次採樣其抗體產生結果均無明顯上升，尤其在小鼠的試驗上以二種載體所構築之質體經三次補強接種後所產生抗體力價均小於 4 倍，在雞隻的接種試驗中，以 pCDNA3.1 載體所構築之質體接種部份可見在三次接種後只有部分出現 2~4 倍抗體，另以 pCI 載體所構築之質體接種部份可見在三次接種後有一隻產生 16 倍抗體，此表現顯得抗體力價反應不佳 (表一)。

在選殖基因上，根據核酸序列的分析比對我們發現在 HA1 片段具有亞型間的差異性均達 30% 以上 [9]，但在 HA2 部分則亞型間的相同性較大可能造成交叉反應的情形 [1]，故我們只選用 HA1 片段進行試驗。Lee [5] 等人利用 pCI 載體所構築之質體 DNA 疫苗製造特異性抗體之研發，發現不同亞型在此一系統上引起雞隻的免疫反應不同，而且若只選擇以 HA1 片段進行則效果更差。另外 Fouchier 等人 [3] 也利用此方式以 pCDNA3.1 載體所構築之質體進行特異性抗體之製造，結果以 100 μ g 劑量接種四次後其抗體均小於 12 倍顯示反應效果不佳，之後提高劑量至 500 μ g 再追加接種二次後則可得到約 96 倍的抗體力價。然而過多的免疫次數易造成免疫耐性及干擾因子出現，所製造之抗體若再經濃縮則會更加強干擾因子的出現故並不建議使用。總結在此試驗中雖然未能如願的順利製造特異性血清，歸究其原因可能是選擇的基因片段反應不良外或許提高施打劑量及選擇接種動物的感受性可改善，日後我們仍繼續改良方法來進行此特異抗體之製造以提供實驗室鑑別之用。

表一：不同載體構築之基因疫苗接種雞及小白鼠後抗體反應結果

接種 次數	pCDNA3 vector		pCI vector	
	BALB/c mice	Chicken	BALB/c mice	Chicken
1st	0, 0, 0	0, 0, 0	0, 0, 0	0, 0, 2
2nd	0, 0, 0	0, 0, 2	0, 0, 0	0, 2, 4
3rd	0, 0, 2	2, 2, 4	0, 0, 4	2, 4, 16

註：抗體測試方法為以 4 HA/25 μ L 病毒力價進行血球凝集抑制試驗

參考文獻

1. Air GM. Sequence relationships among the hemagglutinin genes of 12 subtypes of influenza A virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:7639–7643. 1981
2. Easterday BC, Hinshaw VS, and Halvorson DA. Influenza. In: *Diseases of poultry*, 10th ed. Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, Reid WM, and Yoder HW, eds. Iowa State University Press, Ames, IA. pp. 583–606. 1997
3. Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen B, Osterhaus AD. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol.* 79(5):2814–22. 2005
4. Kendal AP. Newer techniques in antigenic analysis with influenza viruses. In: *Basic and applied influenza research*. A. S. Beare, ed. CRC Press, Boca Raton, FL. 51–78. 1982
5. Lee CW, Senne DA, Suarez DL. Development of hemagglutinin subtype-specific reference antisera by DNA vaccination of chickens. *Avian Dis.* 47(3 Suppl):1051–6. 2003
6. Lee MS, Chang PC, Shien JH, Chung MC, and Shieh HK. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *J. Virol. Methods* 97:13–22. 2001
7. Palmer DF, Coleman HT, Dowdle WR, and Schild GC. In: *Advanced laboratory technique for influenza diagnosis*. Immunology series No. 6. U.S. Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta, GA. 1975
8. Suarez DL, and Schultz-Cherry S. The effect of eukaryotic expression vectors and adjuvants on DNA vaccines in chickens using an avian influenza model. *Avian Dis.* 44:861–888. 2000
9. Swofford D. Paup 4.0: Phylogenetic analysis using parsimony, Smithsonian Institution. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA.
10. Thayer SG, and Beard CW. Serologic Procedures. In: *A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens*, 4th ed. Swayne DE, Glission JR, Jackwood MW, Pearson JE, and Reed WM, eds. American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, PA. pp. 255–266. 1998

Development of avian influenza subtype-specific reference antisera by DNA vaccination

Lee MS*, Chen LH, Liu YP, Cheng MC, Lee SH

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract The HA1 subunit of the H5 gene was amplified by reverse transcriptase / polymerase chain reaction (RT-PCR) and cloned into the PCR- II Blunt Topo vectors (Invitrogen). Then the HA1 gene was subcloned into the pCI-neo vector (Promega, Madison, WI) and pCDNA3.1 vector (Invitrogen). Six-week-old BALB/c mice and three-week-old specific pathogen free (SPF) chickens were vaccinated with 100 µg of eukaryotic expression vectors mixed with a liposome by intramuscular injection. Then the animals were boosted twice at monthly intervals after the first vaccination. The HI antibody titers were low.

Keywords : Avian influenza, DNA vaccine, Specific antibody

*Corresponding Author
Animal Health Research Institute