

张雪花,王卫华,武 奇,等. H9 亚型禽流感广谱亚单位疫苗抗原设计及其免疫效力[J]. 江苏农业学报,2023,39(9):1901-1907.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2023.09.012

H9 亚型禽流感广谱亚单位疫苗抗原设计及其免疫效力

张雪花^{1,2}, 王卫华^{1,3}, 武 奇^{1,2}, 李 丁^{1,2}, 平继辉³, 梅 梅^{1,2}

(1.江苏省农业科学院动物免疫工程研究所/国家兽用生物制品工程技术研究中心/江苏省食品质量与安全重点实验室,江苏南京 210014; 2.兽用生物制品<泰州>国泰技术创新中心,江苏 泰州 225300; 3.南京农业大学动物医学院,江苏 南京 210095)

摘要: H9N2 亚型禽流感病毒(AIV)变异快、传染性强,由病毒流行株制备而成的灭活疫苗达不到完全保护的效果,导致 H9N2 亚型禽流感时有发生。为研发具有广谱保护性的 H9 亚型禽流感疫苗,本研究利用生物信息技术,对 H9 亚型 AIV HA 基因序列进行分析,设计获得 HA 基因序列。将 HA 基因构建于杆状病毒表达系统,表达的重组 HA 蛋白血凝效价为 1×2^{12} ,与不同分支 H9 亚型 AIV 阳性血清具有良好的交叉反应活性。将重组蛋白制备成疫苗(rHA 疫苗)免疫 10 日龄雏鸡,免疫后 28 d 将不同亚分支的 H9 亚型 AIV 流行毒株 115 和 YZ 株分别以 1×10^6 EID₅₀(半数鸡胚感染量)感染试验鸡,rHA 疫苗组交叉保护效力明显优于商品苗组。本研究结果表明 H9 亚型禽流感广谱型亚单位疫苗具有较好的应用前景,可以用于防控 H9 AIV 感染。

关键词: H9 亚型禽流感; HA 基因; 杆状病毒表达系统; 广谱亚单位疫苗; 免疫

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2023)09-1901-07

Antigen design and immune efficacy of a universal subunit vaccine against H9 subtype avian influenza

ZHANG Xue-hua^{1,2}, WANG Wei-hua^{1,3}, WU Qi^{1,2}, LI Ding^{1,2}, PING Ji-hui³, MEI Mei^{1,2}

(1.Institute of Veterinary Immunology & Engineering, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/National Research Center of Engineering and Technology for Veterinary Biologicals/Jiangsu Key Laboratory for Food Quality and Safety, Nanjing 210014, China; 2.GuoTai (Taizhou) Center of Technology Innovation for Veterinary Biologicals, Taizhou 225300, China; 3.College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The H9N2 subtype avian influenza virus (AIV) evolved rapidly with enhanced infectivity, and the inactivated vaccine prepared from the epidemic strain could not provide complete protective effect, which led to H9N2 AIV epidemics occurring frequently. In order to develop a broad-spectrum protective vaccine against H9 AIV, the HA gene sequences of H9 AIV epidemic strains were analyzed by biological information technology, and HA gene sequence was obtained. The HA gene was constructed into the baculovirus expression system, and the hemagglutination titer of rHA protein was 1×2^{12} . The rHA showed good cross-reactivity with the positive sera of different branches of H9 AIV. Ten-day-old chickens were immunized with rHA protein. After 28 days of immunization, testing chickens were infected with 1×10^6 EID₅₀ of

H9 subtype AIV strain 115 and strain YZ, respectively. The protective efficacy of rHA vaccine was obviously better than that of commercial vaccine group. The results suggest that the broad-spectrum subunit vaccine against H9 subtype AIV has the potential to be developed as universal vaccine that can protect against H9 AIV infection.

Key words: H9 subtype avian influenza; HA

收稿日期:2023-03-23

基金项目:江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(22)3031]

作者简介:张雪花(1982-),女,山东郓城人,硕士,助理研究员,主要从事动物免疫学及兽用生物制品研究。(E-mail) zhangxuehua1213@163.com

通讯作者:梅 梅,(E-mail) jacqui18@163.com

gene; baculovirus expression system; broad-spectrum subunit vaccines; immunity

中国于 1994 年在广东分离出第一个 H9N2 病毒。中国提供的数据中(全球共享所有流感数据倡议, GISAID) H9N2 分离株超过 70%。最新的活禽市场监测结果显示, 2014–2022 年 H9N2 分离率持续居高不下, H9N2 亚型逐渐超越其他亚型, 成为家禽中最主要的亚型, 同时也成为养禽业的头号感染源^[1-2]。大多数感染 H9N2 AIV(亚型禽流感)的鸡不会直接死亡, 从而保留了二次感染其他亚型流感病毒的机会, 促进了病毒重组。H9N2 禽流感病毒作为“供体病毒”, 为包括 H3N8、H5N1、H7N9、H10N8 和 H10N3 在内的各种病毒亚型提供多个内部基因^[3-6]。H9N2 AIV 继续传播和进化将进一步增加它作为新 AIV 基因供体的风险。尽管 H9N2 AIV 对禽类的致病性不强, 但当与家禽中的其他病原体发生共感染或继发感染时, 会造成重大经济损失^[7-9]。

1998 年, 中国广东报道了世界首例人类感染 H9N2 禽流感病毒的病例^[10]。截至 2021 年 12 月, 在全球报告中, 人类感染 H9N2 禽流感病毒确诊病例已达 95 例, 其中 2020–2021 年报道的 33 例病例中有 32 例来自中国, 证实了 H9N2 禽流感病毒存在宿主溢出的高风险^[11]。可见 H9N2 不仅给家禽业造成严重的经济损失, 也对人类健康构成重大的威胁, 是重要的人兽共患病病毒。

H9 型 AIV 与 H5、H7 型高致病性禽流感的控制策略不同。虽然没有强制接种 H9N2 禽流感疫苗, 但几乎所有鸡群都接种了 H9 疫苗, 以减少潜在的经济损失。中国兽药基本信息数据库数据表明, 在过去 5 年中, 全国大约有 50 家生物公司生产了单价或多价 H9N2 疫苗。经认证的 H9 疫苗相关产品中, 疫苗株多达 25 株, 且均为全病毒灭活疫苗。研究和临床数据表明, 接种 H9N2 疫苗可以减少病毒感染引起的临床症状, 为免疫鸡群提供有效保护。然而, H9N2 频繁的抗原漂移是当前 H9N2 疫苗接种的挑战之一。当 H9N2 疫苗毒株与流行毒株之间的抗原性存在差异时, 全病毒灭活疫苗无法提供足够的保护^[12]。H9N2 疫苗需要优化毒株以适应当前病毒变异、多抗原群共流行的情况。重要的是, H9N2 灭活疫苗主要诱导体液免疫, 难以阻断鸡上呼吸道的病毒感染和排毒。H9N2 AIV 能够有效地在鸡与鸡之间进行气溶胶传播, 即使在接种疫苗的鸡之间也是

如此^[13], 加大了病毒防控难度。因此, “防排毒”成为 H9N2 新型疫苗研制的新标准和又一挑战。目前迫切需要开发更高效的疫苗来防控 H9N2, 例如在细胞和黏膜免疫水平上改进现有疫苗, 或开发广谱疫苗以对抗抗原的频繁变异^[14]。

本研究室拟通过对 H5 亚型 AIV 的血凝素(HA)蛋白质序列进行比对分析, 设计出 HA 共有序列, 制备成 HA 亚单位疫苗, 效力试验结果证明, HA 亚单位疫苗对不同流行毒株具有理想的保护效果^[15-16]。基于以上研究成果, 本研究同样选择具有免疫原性的 HA 基因, 通过对 2010–2019 年 H9 亚型 AIV HA 蛋白关键性氨基酸位点进行分析 and 统计, 选择每个位点最高频率氨基酸序列, 并对关键性抗原位点进行校正, 设计出 HA(H9 亚型)共有序列^[16], 利用杆状病毒表达系统表达 HA 蛋白。免疫效力试验结果表明, 该疫苗具有良好的、广谱的免疫效果, 为后续广谱疫苗的研究提供了研究数据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本实验室于 2017–2019 年在浙江、安徽、江苏和山东等省份的养鸡场分离筛选 H9 亚型 AIV 毒株 115、236、YZ, 经进化树分析, 3 个毒株属于 h9.4.2.5 分支的不同亚分支。H9 亚型禽流感代表性毒株[A/chicken/Shandong/6/1996(h9.4.2.3)(SD/6)、A/chicken/Guangxi/55/2005(h9.4.2.5)(GX/55)、A/turkey/Wisconsin/1/1966(h9.1)(WI/1)]由南京农业大学平继辉教授惠赠。杆状病毒表达系统为本实验室保存。

1.2 试验方法

1.2.1 目的基因的设计 对 2010–2019 年公布的 H9 亚型 AIV HA 蛋白的抗原相关位点、受体结合位点、潜在糖基化位点等关键序列进行分析, 结合本试验室分离的 H9 流行株关键性氨基酸位点, 利用生物信息学软件选择高频氨基酸, 并对关键性位点进行校正, 设计合成基因 HA。

1.2.2 重组杆状病毒的获得与鉴定 利用杆状病毒表达系统构建和制备含有目的基因 HA 的重组杆状病毒, 经蓝白斑筛选获得含有 HA 基因的重组质粒。用 HA 重组质粒转染 Sf9 细胞, 27 °C 静置培养, 每天观察, 待转染细胞出现停止生长、变圆、脱落等细胞病变

症状时,收获,得到重组杆状病毒 rVHA。提取 rVHA 基因组 DNA,然后进行 PCR 鉴定。PCR 鉴定正确后,取重组病毒 rVHA 上清液接种 Sf9 细胞,观察 4 d,固定细胞,进行间接免疫荧光鉴定重组病毒特异性。

1.2.3 重组蛋白的表达、分析 取重组杆状病毒 rVHA 上清液,接种悬浮培养的 high five 细胞,同时将野生型杆状病毒感染 high five 细胞作为对照。每天取少量细胞液进行台盼蓝染色,观察细胞死亡情况,待细胞 90% 变蓝后收获,利用高压均质机将细胞破碎,进行 Western-Blot、血凝活性等分析。

1.2.4 红细胞凝集试验检测重组蛋白 HA 血凝活性 在微量血凝板上先加 25 μ l 磷酸缓冲盐溶液 (PBS),第一孔加 25 μ l 重组蛋白 (rHA) 混匀,倍比稀释至 2^{16} ;每孔再加入 25 μ l PBS、25 μ l 1% 鸡红细胞悬液,室温 (20~25 $^{\circ}$ C) 下反应 30 min,记录结果。

1.2.5 重组杆状病毒传代后遗传稳定性及增殖性能鉴定 将重组杆状病毒 rVHA 连续传代至第 8 代,对每代 HA 基因的核酸序列进行测序。对每代重组杆状病毒进行病毒滴度 ($TCID_{50}$) 鉴定,评价重组杆状病毒的增殖性能。

1.2.6 交叉血凝抑制试验 (HI) 检测 rHA 与不同分支 H9 亚型 AIV 病毒阳性血清 (115、236、YZ、SD/6、WL/1) 的交叉反应活性,设无特定病原 (SPF) 阴性血清为对照。

1.2.7 重组蛋白的免疫原性评价 重组蛋白 rHA 与白油按体积比 1:3 乳化制备成 HA 油乳剂疫苗。乳化完全后,经性状、稳定性和无菌检验后,无菌装入疫苗瓶内,命名为 rHA 疫苗,4 $^{\circ}$ C 保存。

10 日龄 SPF 鸡 30 只,分 3 组,每组 10 只鸡。第一组, rHA 疫苗组,颈部皮下注射 rHA 疫苗,每只注射 0.5 ml;第二组,商品疫苗组,每只注射 0.3 ml;第三组,阴性对照组,每只注射 0.5 ml 无菌生理盐水。免疫后第 14 d、21 d、28 d 采血,分离血清,检测血清 HI 抗体效价。免疫 28 d 后,选取 2 株处于不同亚分支的 H9 亚型 AIV 流行毒株 115 和 YZ 株进行攻毒,每只攻毒剂量为 $1 \times 10^{6.0} EID_{50}$ (半数鸡胚感染量)。每日观察鸡群采食量、饮水量以及精神状态是否出现异常,观察是否出现发病和死亡情况。攻毒后 2 d、4 d、6 d、8 d、10 d、12 d、14 d 称量各组试验鸡的质量,计算鸡的相对增质量率。攻毒后 3 d、5 d、7 d 用无菌棉拭子采集鸡喉头和泄殖腔分泌物,采集的拭子样品通过尿囊腔途径接种 10 日龄 SPF 鸡胚 3 枚,每枚 0.2 ml,

每天观察,连续观察 5 日,检测鸡胚尿囊液血凝效价。若接种喉拭子或泄殖腔拭子的鸡胚任何一个出现鸡胚尿囊液血凝效价 $\geq 1 \times 2^2$,则该鸡排毒;若鸡胚尿囊液血凝效价 $< 1 \times 2^2$ 则为可疑,需要盲传一代,盲传后血凝效价 $< 1 \times 2^2$ 则判定为阴性,表明该鸡不排毒。

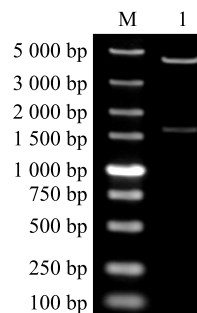
1.3 数据处理

用 Reed-Muench 法计算病毒滴度。用 Graph-Pad Prism 5 软件进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 重组质粒的鉴定

对构建的 pFastBac1-HA 重组杆状病毒转移质粒进行双酶切验证,获得目的基因和载体 2 个条带 (图 1),结果表明 HA 基因与载体 pFastBac1 连接成功。



M: DL5 000 marker; 1: 双酶切重组质粒。

图 1 重组质粒 pFastBac1-HA 的鉴定

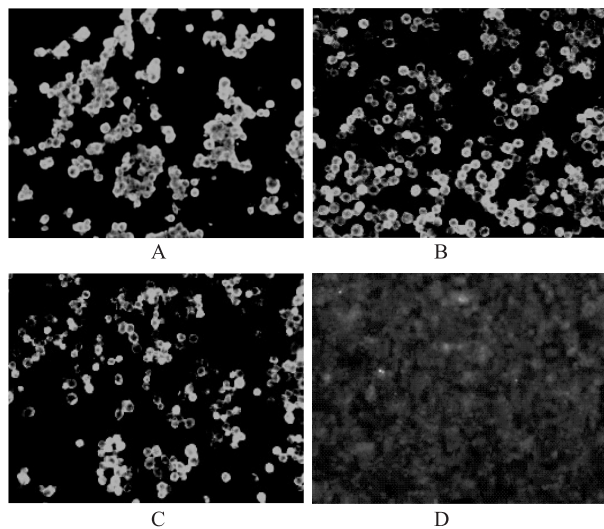
Fig.1 Identification of the recombinant plasmid pFastBac1-HA

2.2 重组病毒的拯救与鉴定

用重组质粒转染 Sf9 细胞,细胞变大变圆,折光率增加,细胞停止生长,表明细胞出现病变,收获为 rVHA。通过间接免疫荧光检测重组病毒 rVHA 感染的细胞与不同 H9 阳性血清反应的情况,荧光显微镜下可见,感染重组病毒的细胞出现明亮的绿色荧光 (图 2A~图 2C);野生型杆状病毒感染细胞未出现明显荧光 (图 2D),表明含 HA 基因的重组杆状病毒拯救成功,且表达的 HA 蛋白与不同 H9 阳性血清间有反应活性。

2.3 Western blot 鉴定重组蛋白的表达

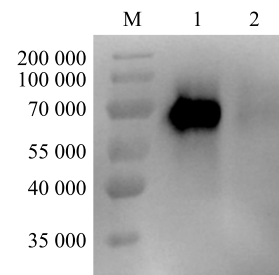
rVHA 感染的 high five 细胞完全病变后收获,用高压均质机裂解细胞,然后进行 Western-Blot 鉴定, rHA 与 H9 亚型 AIV 阳性血清孵育后,出现与预期大小一致、较明显的特异条带 63 000 (图 3),证明 HA 蛋白成功获得大量表达。



A: rVHA 感染 SF9 细胞 (115 血清); B: rVHA 感染 SF9 细胞 (SD/6 血清); C: rVHA 感染 SF9 细胞 (WI/1); D: 野毒感染 SF9 细胞 (115 血清)。

图 2 重组蛋白 HA 与不同 H9 亚型禽流感阳性血清结合的间接免疫荧光法鉴定

Fig.2 Indirect immunofluorescence assay identification of recombinant protein HA reacting with positive sera of different H9 avian influenza subtypes



M: 蛋白 marker; 1: 重组蛋白 HA; 2: 野生杆状病毒对照。

图 3 Western blot 分析重组蛋白质与 H9 阳性血清的反应

Fig.3 Reaction of recombinant protein with positive sera of H9 subtypes avian influenza by Western blot

2.4 重组蛋白 HA 血凝活性

通过微量血凝试验检测 rHA 血凝活性,同时设 115 病毒尿囊液为对照,表达的重组蛋白 HA 血凝效价为 1×2^{12} (图 4),说明 rHA 具有凝集红细胞的生物学活性。

2.5 重组病毒遗传稳定性及增殖性能鉴定

测序结果显示,第 1~8 代重组杆状病毒的外源 HA 基因与目的序列完全一致,表明重组病毒具有良好的遗传稳定性。重组杆状病毒传至第 7~8 代时病毒滴度达 $10^{8.00} TCID_{50}/ml$ 以上 (表 1),表明重组杆状病毒增殖性能良好。

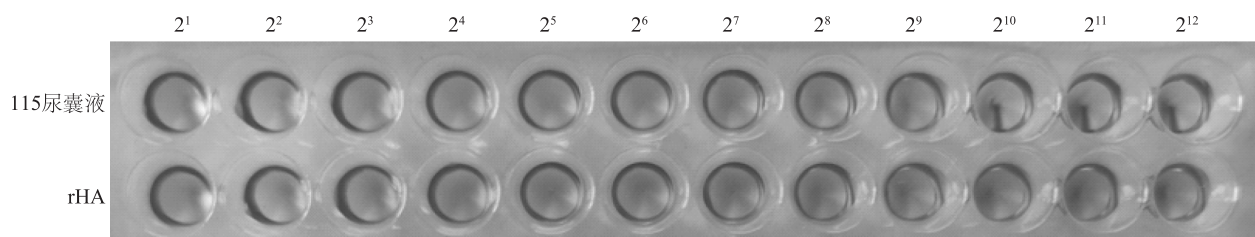


图 4 重组 HA 蛋白的血凝活性检测

Fig.4 Detection of hemagglutination activity of recombinant HA protein

表 1 重组杆状病毒稳定性检测结果

Table 1 Stability test result of recombinant baculovirus

毒种代次	$TCID_{50}$ 的对数
P3	6.00
P4	6.50
P5	7.25
P6	7.50
P7	8.50
P8	8.25

$TCID_{50}$: 病毒滴度。

2.6 重组 HA 蛋白交叉反应活性

通过 HI 试验测定 rHA 与不同分支 H9 阳性血清交叉反应的抗原性,并同时与不同分支 H9 病毒

进行比较。由图 5 可知, rHA 与现有流行毒株血清 (h9.4.2.5) 反应的 HI 滴度较高,与分支较远的 WI/1 (h9.1) 反应最差。除去血清与同源病毒的反应, rHA 反应活性明显优于其他病毒,表明 rHA 具有良好的交叉反应活性。

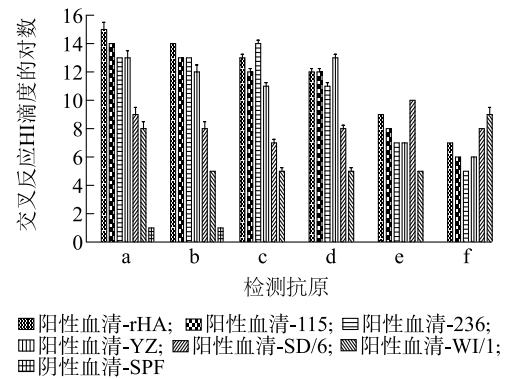
2.7 重组病毒的免疫原性评价

HI 血清抗体作为流感疫苗血清学保护的反应指标,商品疫苗效力评判标准为 HI 抗体效价 $\geq 1 \times 2^{6.00}$ 。试验组于免疫后 14 d、21 d、28 d 采集静脉血,以分离的流行毒株 115、YZ 作为检测抗原检测血清抗体 HI 效价。重组蛋白疫苗免疫后 14 d 即可诱导鸡产生较高水平的 HI 抗体应答,免疫后 14 d HI 效

价能达到 $1 \times 2^{12.00}$ 以上,免疫后 28 d 达到 $1 \times 2^{14.59}$,rHA 组抗体效价显著高于商品苗组(图 6)。

SPF 鸡免疫 28 d 后,对不同亚分支的 H9 亚型 AIV 流行株 115 和 YZ 以 $1 \times 10^6 EID_{50}$ 的病毒量进行攻毒。临床观察结果显示,各攻毒试验组在攻毒后 14 d 内均无死亡。rHA 组、商品苗组在攻毒后无异常,饮水量、采食量、精神状态均正常,空白组(阴性组)在攻毒后 4 d 食欲与饮水欲相对较差。

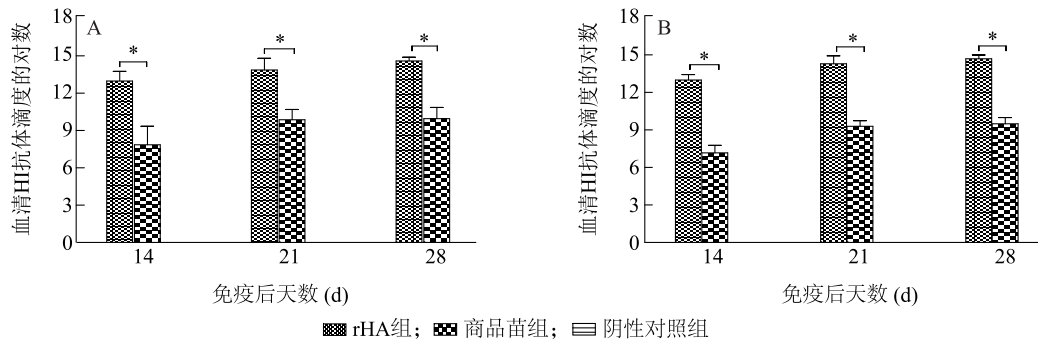
攻毒后 2 d、4 d、6 d、8 d、10 d、12 d、14 d 分别对各组试验鸡称体质量,并计算不同试验组鸡体质量相对增长率。结果显示,rHA 免疫组的试验鸡相对增质量率最高;空白组(阴性组)的鸡相对增质量率明显低于免疫组(图 7)。



a:rHA;b:h9.4.2.5-115;c:h9.4.2.5-236;d:h9.4.2.5-YZ;e:h9.4.2.5-SD/6;f:h9.1-WI/1。h9.4.2.5 为流行毒株。

图 5 重组蛋白 HA 与 H9 不同阳性血清型交叉反应活性

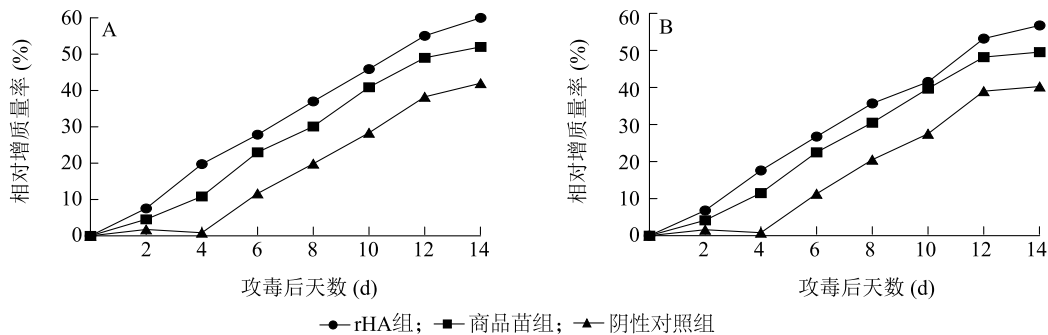
Fig.5 Cross-reactivity of recombinant protein HA with different positive serotypes of H9



A:以病毒 115 为检测抗原检测免疫后血清 HI 抗体;B:以病毒 YZ 为检测抗原检测免疫后血清 HI 抗体。* 表示差异显著($P < 0.05$)。

图 6 不同抗原检测免疫后血清 HI 抗体

Fig.6 HI antibody in sera after immunization detected with different antigens



A:感染 115 毒株后试验鸡相对增质量率;B:感染 YZ 毒株后试验鸡相对增质量率。

图 7 攻毒后不同试验鸡的相对增质量率

Fig.7 Relative weight gain rate of chickens in different experimental groups after challenge

115 和 YZ 毒株感染后 3 d、5 d、7 d 分别采集各组试验鸡的咽拭子和泄殖腔拭子样品,测定攻毒后每只鸡的排毒情况。

感染 115 毒株 3 d 后,rHA 疫苗组喉头排毒率为 20%,泄殖腔排毒率为 0;感染 5 d 后,喉头排毒率为

20%,泄殖腔排毒率为 0;商品苗感染 3 d 后,喉头排毒率为 100%,泄殖腔排毒率为 20%;感染 5 d 后,喉头排毒率为 20%,泄殖腔未检测到排毒;阴性对照组感染 3 d、5 d 后,喉头排毒率为 100%,泄殖腔排毒率为 100%;感染 7 d 后所有组未测到排毒(表 2)。

表 2 感染 115 毒株免疫保护结果

Table 2 Results of immune protection against 115 strains after infection

组别	喉头排毒率(%)			泄殖腔排毒率(%)		
	3 d	5 d	7 d	3 d	5 d	7 d
rHA 组	20	20	0	0	0	0
商品苗组	100	20	0	20	0	0
阴性对照组	100	100	0	100	100	0

攻击 YZ 毒株 3 d 后,rHA 疫苗组的喉头排毒率为 20%;其余未检测到病毒,排毒率为 0。商品苗组攻毒 3 d 后的喉头排毒率为 100%,泄殖腔排毒率为 20%;攻毒 5 d 后喉头排毒率为 40%,泄殖腔未检测到排毒。阴性对照组攻毒 3 d、5 d 后的喉头排毒率

为 100%,泄殖腔排毒率也为 100%。7 d 后所有组未测到排毒(表 3)。

综上,rHA 疫苗组保护率明显高于商品苗组,表明 rHA 疫苗对当前 H9 亚型 AIV 流行株毒株具有良好的保护效果。

表 3 感染 YZ 毒株免疫保护结果

Table 3 Results of immune protection against YZ strains after infection

组别	喉头排毒率(%)			泄殖腔排毒率(%)		
	3 d	5 d	7 d	3 d	5 d	7 d
rHA 组	20	0	0	0	0	0
商品苗组	100	40	0	20	0	0
阴性对照组	100	100	0	100	100	0

3 讨论

目前,中国控制 H9N2 禽流感的主要策略是疫苗接种。然而,中国 H9N2 病毒多种抗原型同时流行,疫苗更新速度落后于病毒变异速度,使有效疫苗接种面临挑战。灭活疫苗免疫可有效减轻 H9N2 病毒感染后的临床症状,大大减少经济损失。然而,另一个挑战是全病毒灭活疫苗免疫不能阻止 H9N2 AIV 再感染或病毒脱落。在中国,包括散养和混养在内的传统畜牧业系统继续占据重要地位,然而,中国家禽业的主要发展方向是集约化圈养。研制具有广谱性中和活性的通用疫苗对于控制 H9N2 具有重要意义。关于广谱疫苗的研究已有报道,利用 Epigraph 算法来设计猪 H3 流感疫苗血凝素蛋白,该疫苗接种小鼠后可产生显著针对不同 H3 分离株的交叉反应抗体和 T 细胞反应,免疫雪貂后,用 2 种 H3N2 病毒攻击,该疫苗可保护雪貂免受攻击毒株的侵害^[17-18];基于马赛克 HA 序列的 H9 亚型禽流感灭活疫苗能对异源 H9N2 AIV 株产生较好的交叉攻毒保护效果^[19]。

随着基因工程技术的发展,重组病毒表达系统成

为生产有广谱交叉免疫效果的禽流感疫苗的技术平台。杆状病毒表达系统具有诸多优点:不使用活病毒,生物安全性高;表达的 HA 蛋白可组装成病毒样颗粒(VLP),其结构功能与天然蛋白质相似,免疫原性良好,蛋白质表达效率高;重组杆状病毒基因遗传稳定,病毒增殖性能良好,保证了疫苗的生产质量^[20-21]。

新型广谱疫苗一直是防控禽流感病毒相关研究的热点方向,只研究单个毒株的 HA 免疫原性,不能得到具有广谱保护效果的疫苗,本研究通过对 2010-2019 年 H9 亚型禽流感及本试验室分离的最新流行株 HA 蛋白的抗原相关位点、受体结合位点、潜在糖基化位点等关键位点序列进行分析,并对关键位点进行校正,利用生物信息学软件选择每个位点最高频次氨基酸设计合成 HA 基因,并构建杆状病毒表达系统获得重组蛋白,经间接免疫荧光、免疫印迹、交叉血凝抑制试验对其广谱活性进行鉴定,初步证明重组蛋白具有广谱的交叉反应活性。

重组蛋白疫苗免疫后 14 d 即可诱导鸡产生较高水平的 HI 抗体应答,14 d HI 效价能达到 $2^{12.00}$ 以

上,28 d 达到 $1 \times 2^{14.59}$,显著高于商品苗组。用2株不同亚分支的H9亚型AIV毒株115、YZ攻击免疫组鸡,各组均未出现临床症状。攻击115毒株3 d后,rHA疫苗组保护率为80%,商品苗保护率为0;5 d后,rHA疫苗组保护率为80%,商品苗保护率为80%。攻击YZ毒株3 d后,rHA疫苗组保护率为80%,商品苗保护率为0;5 d后,rHA疫苗组保护率为100%,商品苗保护率为60%。表明,重组蛋白疫苗组产生较好的交叉保护效果,明显高于商品苗组。

另外,本研究采用高表达效率的high five细胞,提高了蛋白质的表达量,血凝活性高达 1×2^{12} ;high five细胞为无血清培养基培养的全悬浮细胞,降低了成本,生产周期变短,适于大规模培养,为亚单位疫苗规模化生产提供了可行性。

综上,通过分析、设计H9亚型禽流感HA关键位点等得到HA基因,利用Bac-to-Bac表达的外源蛋白HA具有广谱的保护效力,可为研究H9亚型广谱亚单位疫苗提供技术基础和科学依据。

参考文献:

- [1] BI Y H, CHEN Q J, WANG Q L, et al. Genesis, evolution and prevalence of H5N6 avian influenza viruses in China[J]. *Cell Host & Microbe*, 2016, 20(6): 810-821.
- [2] BI Y H, LI J, LI S Q, et al. Dominant subtype switch in avian influenza viruses during 2016–2019 in China[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 5909.
- [3] PU J, WANG S G, YIN Y B, et al. Evolution of the H9N2 influenza genotype that facilitated the genesis of the novel H7N9 virus [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112: 548-553.
- [4] GUAN Y, SHORTRIDGE K F, KRAUSS S, et al. Molecular characterization of H9N2 influenza viruses: were they the donors of the "internal" genes of H5N1 viruses in Hong Kong? [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(16): 9363-9367.
- [5] QI W, ZHOU X, SHI W, et al. Genesis of the novel human-infecting influenza A (H10N8) virus and potential genetic diversity of the virus in poultry, China[J]. *Eurosurveillance*, 2014, 19(25): 20841.
- [6] LI F T, LIU J Y, YANG J Z, et al. H9N2 virus-derived M1 protein promotes H5N6 virus release in mammalian cells: mechanism of avian influenza virus inter-species infection in humans[J]. *PLoS Pathogens*, 2021, 17(12): e1010098.
- [7] LI C J, YU K Z, TIAN G B, et al. Evolution of H9N2 influenza viruses from domestic poultry in mainland China[J]. *Virology Journal*, 2005, 340(1): 70-83.
- [8] CHOI Y K, OZAKI H, WEBBY R J, et al. Continuing evolution of H9N2 influenza viruses in southeastern China[J]. *Journal of Virology*, 2004, 78(16): 8609-8614.
- [9] GUO Y J, KRAUSS S, SENNE D A, et al. Characterization of the pathogenicity of members of the newly established H9N2 influenza virus lineages in Asia[J]. *Virology Journal*, 2000, 267(2): 279-288.
- [10] 郭元吉, 李建国, 程小雯, 等. 禽 H9N2 亚型流感病毒能感染人的发现[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1999, 13(2): 5-8.
- [11] ADLHOCH C, FUSARO A, GONZALES J L, et al. Avian influenza overview September–December 2021 [J]. *EFSA Journal*, 2021, 19(12): e07108.
- [12] SUN Y P, PU J, FAN L H, et al. Evaluation of the protective efficacy of a commercial vaccine against different antigenic groups of H9N2 influenza viruses in chickens[J]. *Veterinary Microbiology*, 2012, 156(1/2): 193-199.
- [13] ZHONG L, WANG X Q, LI Q H, et al. Molecular mechanism of the airborne transmissibility of H9N2 avian influenza A viruses in chickens[J]. *Journal of Virology*, 2014, 88(17): 9568-9578.
- [14] DONG J Z, ZHOU Y, LIU L T, et al. Status and challenges for vaccination against avian H9N2 influenza virus in China[J]. *Life-basel*, 2022, 12(9): 1326.
- [15] WU P P, LU J H, ZHANG X H, et al. Single dose of consensus hemagglutinin-based virus-like particles vaccine protects chickens against divergent H5 subtype influenza viruses[J]. *Frontiers in Immunology*, 2017, 8: 1649.
- [16] 张雪花, 陆吉虎, 华涛, 等. 通用型 H5 亚型禽流感病毒亚单位疫苗抗原表达和免疫效力研究[J]. *病毒学报*, 2019, 35(6): 864-872.
- [17] BULLARD B L, COEDER B N, DEBEAUCHAMP J, et al. Epigraph hemagglutinin vaccine induces broad cross-reactive immunity against swine H3 influenza virus [J]. *Nature Communication*, 2021, 12(1): 1203.
- [18] BULLARD B L, DEBEAUCHAMP J, PEKAREK M J, et al. An epitope-optimized human H3N2 influenza vaccine induces broad protective immunity in mice and ferrets[J]. *NPJ Vaccines*, 2022, 7(1): 65.
- [19] 李丽, 唐国毅, 冯贺龙, 等. 基于马赛克 HA 序列的 H9 亚型禽流感灭活疫苗的免疫效力分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2021, 52(12): 3569-3577.
- [20] BUCKLAND B, BOULANGER R, FINO M, et al. Technology transfer and scale-up of the Flublok recombinant hemagglutinin (HA) influenza vaccine manufacturing process [J]. *Vaccines*, 2014, 32(42): 5496-5502.
- [21] MANNINI I, TROMBETTA M, LAZZERI G, et al. Egg-independent influenza vaccines and vaccine candidates [J]. *Vaccines (Basel)*, 2017, 5(3): 18.

(责任编辑:陈海霞)