



西北农林科技大学

博士学位论文

猪流感病毒 H1 和 H3 亚型二价纳米颗粒疫苗
的研制及动物免疫效果评价

专业学位类别 兽医博士

论文作者 唐攀

指导教师 王晶钰 教授

合作指导教师 杜恩岐 副教授

论文提交时间 2023 年 5 月

Dissertation Submitted to Northwest A&F University
in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Professional Degree of
Doctor of Veterinary Medicine

Development of bivalent nanoparticle vaccine for
H1 and H3 subtype swine influenza viruses and
evaluation of animal immunity

Degree Type: Veterinary Medicine

Candidate: Tang Pan

Supervisor: Prof. Wang Jingyu

Co- Supervisor: A.P. Du Enqi

Date of submission: May, 2023

College of Veterinary Medicine
Northwest A&F University

分类号：S852

UDC：636

密级：公开

学校代码：10712

研究生学号：2019065011

西北农林科技大学博士学位论文

猪流感病毒 H1 和 H3 亚型二价纳米颗粒疫苗的 研制及动物免疫效果评价

论文作者：唐攀

指导教师：王晶钰 教授

指导小组：张彦明教授 郭抗抗教授 齐雪峰教授

答辩委员会：

西北农林科技大学 动物医学院 张彦明 教授（主席）

西北农林科技大学 动物医学院 杨增岐 教授（委员）

西北农林科技大学 动物医学院 童德文 教授（委员）

河南农业大学 动物医学院 张龙现 教授（委员）

西北农林科技大学 动物医学院 齐雪峰 教授（委员）

西北农林科技大学 动物医学院 王立珍 讲师（秘书）

答辩日期：2023 年 5 月 22 日

本研究得到国家自然科学基金（No. 32172843）资助。

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 32172843).

摘要

猪流感 (Swine influenza, SI) 是由猪流感病毒 (Swine influenza virus, SIV) 引起的猪的急性、接触性呼吸道疾病, 临床上以高热、呼吸困难、咳嗽、厌食为特征。SIV 感染具有高发病率、低死亡率的特点, 能引起感染猪饲料利用率降低、生长发育停滞及体重减轻。同时, SIV 能与其他病原体合并感染, 导致严重症状及死亡。SI 的发生和流行不但给养猪业造成重大经济损失, 还对全球公共卫生体系造成了巨大影响。疫苗接种是预防和控制动物及人类流感病毒感染的最有效和最经济策略, 现阶段已上市的 SI 疫苗为传统鸡胚全病毒灭活疫苗, 有一定的局限性。纳米颗粒 (Nanoparticle, NPs) 疫苗可在特定纳米骨架表面展示多个病毒抗原成分, 诱导强烈的体液和细胞免疫反应, 近年来已在新冠、乙肝、流感、艾滋病及肿瘤等重大疾病的预防和治疗中展现出了广阔的应用前景。

本研究中, 我们利用昆虫细胞-杆状病毒系统表达并生成了猪流感病毒 H1 和 H3 亚型二价纳米颗粒疫苗 (Bivalent nanoparticle vaccines, BNV), 对纳米颗粒粒径和形态进行了表征, 对重组纳米颗粒蛋白特性进行了鉴定, 通过 Balb/C 小鼠和仔猪免疫及攻毒保护试验评估了疫苗效力。研究结果如下:

1. H1 和 H3 亚型 SIV 流行毒株 HA 基因重组杆状病毒的构建。通过 GISAID 数据库获取 H1 和 H3 亚型 SIV 流行毒株 HA 基因序列, 使用同源重组方法构建 pBacPAK9-SIV-H1-HA-TM, pBacPAK9-SIV-H3-HA-TM 重组质粒, 将重组质粒与线性化杆状病毒基因组 Bacmid 共转染进 Sf9 细胞并包毒传代, 通过 PCR、WB 和血凝实验对重组杆状病毒 rBac- H1-HA-TM, rBac- H3-HA-TM 的生成和表达进行鉴定。

2. 重组杆状病毒表达 H1 和 H3 亚型 SIV HA 蛋白及其纯化和鉴定。利用 Hi5 昆虫细胞系表达重组杆状病毒 HA 蛋白, 筛选阴离子交换层析和扁豆凝集素亲和层析对重组杆状病毒 HA 蛋白进行纯化, 通过在亲和纯化过程中高浓度 PS80 缓冲液的置换实现 HA 蛋白与 PS80 在扁豆亲和柱上共孵育, 三聚体 HA 的茎部疏水跨膜域与 PS80 洗涤剂疏水内核实现稳定结合, 进而形成洗涤剂核心的纳米颗粒。SDS-PAGE 检测显示, 纯化获得的 HA 纳米颗粒蛋白纯度 > 85%; 动态光散射 (DLS) 分析显示, 纳米颗粒粒径在 28 nm-68 nm; 透射电镜 (TEM) 分析显示, HA 头部域突出于纳米颗粒外部; 血凝实验显示, 纯化获得的纳米颗粒蛋白血凝活性滴度 > 2¹¹, 能用于后续动物免疫评价。

3. SIV H1 和 H3 亚型 BNV 疫苗的 Balb/C 小鼠免疫评价。制备 SIV H1 和 H3 亚型 BNV 疫苗免疫 Balb/C 小鼠, 同时评价不同佐剂对 BNV 疫苗的免疫增强作用。结果显示, 与市售二价猪流感灭活疫苗 (Influenza Inactivated vaccines, IIV) 相比, BNV 疫苗可诱导小鼠产生更强的免疫反应, MF59 和 CPG1 佐剂可显著提高 BNV 的 HI 抗体滴

度。ELISA 方法对二免后 14d 小鼠血清中特异性 IgG 抗体及亚型进行分析, 结果显示 BNV 组及 BNV+MF59 佐剂组表现出平衡的 Th1/Th2 免疫反应, 而 BNV+CPG1 佐剂组倾向于更强的 Th1 型免疫反应。Balb/C 攻毒试验结果表明, BNV 疫苗具有较好的保护作用, 能有效减轻病毒感染引起的肺部大体和微观病变。

4. SIV H1 和 H3 亚型 BNV 疫苗的仔猪免疫及攻毒保护试验。仔猪免疫试验表明, BNV 疫苗可诱导仔猪产生高水平的 HI 抗体。二免后 14d, BNV 组仔猪血清中的针对 H1 和 H3 亚型病毒的 HI 抗体滴度分别达到 $10 \log_2$ 和 $9 \log_2$, BNV+MF59 组仔猪血清中的针对 H1 和 H3 亚型病毒的 HI 抗体滴度分别达到 $11 \log_2$ 和 $9 \log_2$, 而市售灭活疫苗 IIV 针对 H1 和 H3 亚型病毒的 HI 抗体滴度仅为 $7 \log_2$ 。此外, 免疫组仔猪体内还检测到了高水平的特异性 IgG 抗体。仔猪攻毒保护试验表明, BNV 疫苗可产生高效的免疫保护作用, 免疫组仔猪攻毒后未见明显肺脏病理损伤。

综上所述, 本研究成功研制出 SIV H1 和 H3 二价纳米颗粒疫苗, 该疫苗能诱导仔猪产生高水平的抗体, 对 H1N1 和 H3N2 亚型 SIV 的感染可提供保护作用, 能较好的抑制免疫猪的排毒以及病毒在体内的复制, 减轻 H1N1 和 H3N2 亚型 SIV 引起的肺部损伤。研究为 SIV 新型亚单位疫苗的研制提供了新思路。

关键词: 猪流感病毒; H1N1; H3N2; 纳米颗粒疫苗; 免疫评价

ABSTRACT

Swine influenza (SI) is an acute, contact respiratory disease of pigs caused by swine influenza virus (SIV). Clinically, it is characterized by high fever, dyspnea, cough and anorexia. Simple SIV infection has the characteristics of high morbidity and low mortality, but SIV infection can cause reduced feed utilization, growth stagnation and weight loss. SIV may be co-infected with other pathogens leading to severe symptoms and death. The occurrence and prevalence of swine influenza has caused significant economic losses to the pig industry. Vaccination remains the most effective and economical strategy to prevent and control influenza virus infections in animals and humans, and the SI vaccines available at this stage are traditional chicken embryo whole virus inactivated vaccines with certain limitations. Nanoparticle (NPs) vaccines, which can display multiple viral antigenic components on the surface of specific nanoskeletons and induce strong humoral and cellular immune responses, have been a hot spot in vaccine development in recent years and have shown promising applications in the prevention and treatment of major diseases such as neocrown, hepatitis B, influenza, AIDS, and tumors.

In this study, we expressed and generated a bivalent nanoparticle vaccine(BNV) against SIV subtypes H1 and H3 using an insect cell-baculovirus system, characterized the nanoparticle particle size and morphology, characterized the recombinant nanoparticle protein properties, and evaluated the vaccine efficacy by immunization and challenge assays in Balb/C mice and piglets. The results of the study are as follows:

1. Construction of recombinant baculovirus with HA gene of H1 and H3 subtype of SIV endemic strains. HA gene sequences of H1 and H3 subtype SIV epidemic strains were obtained from GISAID database, pBacPAK9-SIV-H1-HA-TM and pBacPAK9-SIV-H3-HA-TM recombinant plasmids were synthesized by homologous recombination, and the recombinant plasmids were cotransfected with linearized baculovirus genomic bacmid into Sf9 cells, and the recombinant baculovirus rBac-H1-HA-TM and rBac-H3-HA-TM were identified by PCR, WB and hemagglutination assay.

2. Recombinant baculovirus expressing H1 and H3 subtypes of SIV HA proteins and their purification and identification. The recombinant baculovirus HA protein was expressed in a clean Hi5 insect cell and purified by anion-exchange chromatography and lentil agglutinin affinity chromatography. The HA protein was coincubated with PS80 on the lentil

affinity column by displacing a higher concentration of PS80 buffer during the purification process, and the hydrophobic transmembrane domain of the stem of the trimeric HA was stably bound to the PS80 detergent core to form detergent-core nanoparticles. SDS-PAGE showed that the purity of HA nanoparticles was > 85%, and dynamic light scattering(DLS) analysis showed that the nanoparticles were 28-68 nm in size, transmission electron microscopy (TEM) analysis showed that the HA head domain protruded from the outside of the nanoparticles. Hemagglutination assay showed that the purified HA nanoparticle proteins have high activity and can be used for subsequent animal experiments.

3. Immune evaluation of SIV H1 and H3 subtype BNV vaccine in Balb/C mice. Balb/C mice were immunized with BNV, and the immunological enhancement effects of different adjuvants on BNV were evaluated. The results showed that BNV induced stronger immune responses in mice compared with commercial influenza inactivated vaccines (IIV), and MF59 and CPG1 adjuvants significantly increased the HI antibody titers of BNV. Specific IgG antibody and subtypes in serum of mice 14 days after boost immunization were analyzed by ELISA, results showed that the BNV group and BNV + MF59 adjuvant group exhibited balanced Th1/Th2 immune responses, while the BNV + CPG1 adjuvant group tended to show stronger Th1-type immune responses; Challenge test in Balb/c mice showed that the BNV was sufficiently protective to reduce the gross and microscopic lesions in the lungs caused by viral infection.

4. Experiments on immunization and challenge of BNV in piglets. The piglet immunization experiment showed that BNV could induce high level of HI antibodies, and the HI antibody titers against H1 and H3 subtypes of viruses in the serum of piglets in the BNV group reached 10 log₂ and 9 log₂, respectively, while 11 log₂ and 9 log₂ of the BNV+MF59 group, respectively. In addition, high levels of antigen-specific IgG antibodies were detected in the piglets of the immunized group; Challenge experiment of piglets showed that the BNV could produce highly effective immune protection, and no significant pulmonary damage was observed in the immunized piglets. No significant lung pathological damage was observed in the immunized piglets.

In summary, the SIV H1 and H3 bivalent nanoparticle vaccine (BNV) developed in this study induced a high level of immune response, provided protection against H1N1 and H3N2 subtype SIVs, inhibited detoxification and virus replication in immunized pigs, and attenuated lung injury caused by SIV subtypes H1N1 and H3N2. This study provides a new idea for the development of a new SIV subunit vaccine.

KEY WORDS: Swine influenza virus; H1N1 subtype; H3N2 subtype; Nanoparticle vaccine; Immune evaluation

目 录

第一章 文献综述	1
1.1 猪流感病毒病原学特征.....	1
1.2 猪流感病毒的流行概况.....	2
1.2.1 猪流感的血清型及地理分布概况.....	2
1.2.2 猪流感病毒在中国大陆地区的流行情况	3
1.3 猪流感病毒的进化分析.....	7
1.4 猪流感的种间传播现状.....	8
1.5 猪流感诊断方法.....	9
1.5.1 血清学检测方法.....	9
1.5.2 分子生物学诊断方法.....	10
1.5.3 病毒分离鉴定.....	10
1.6 猪流感疫苗研究进展.....	11
1.6.1 国内猪流感疫苗签发批概况.....	11
1.6.2 猪流感疫苗生产系统概述.....	12
1.6.3 猪流感基因工程疫苗研究进展.....	13
1.6.4 猪流感纳米颗粒疫苗研究进展.....	14
1.6.5 猪流感通用疫苗研究进展.....	15
1.7 猪流感的综合防控措施.....	17
1.7.1 做好疫情预测.....	17
1.7.2 加强疫苗免疫.....	18
1.7.3 提高饲养管理水平.....	18
1.7.4 落实生物安全防护.....	18
1.7.5 完善标准化培训水平.....	18
1.8 研究的目的是和意义.....	19
1.9 技术路线.....	19
第二章 H1 和 H3 亚型 SIV 流行毒株 HA 基因重组杆状病毒的构建	21
2.1 试验材料.....	21
2.1.1 质粒和细胞.....	21
2.1.2 主要试剂.....	21
2.1.3 主要仪器设备.....	22
2.1.4 主要溶液.....	22
2.2 实验方法.....	22
2.2.1 重组质粒的合成.....	22

2.2.2 重组杆状病毒的生成及鉴定.....	23
2.2.3 重组杆状病毒的病毒滴度测定.....	27
2.2.4 重组杆状病毒的 HA 滴度检测.....	28
2.3 实验结果.....	28
2.3.1 Sf9 细胞系外源毒及支原体检测结果.....	28
2.3.2 重组杆状病毒的构建.....	30
2.3.3 重组杆状病毒的 PCR 鉴定.....	30
2.3.4 重组杆状病毒的 WB 鉴定.....	31
2.3.5 重组杆状病毒病毒滴度的测定.....	32
2.3.6 重组杆状病毒的血凝滴度检测.....	33
2.4 讨论.....	34
2.5 小结.....	35
第三章 重组杆状病毒表达 H1 和 H3 亚型 SIV HA 蛋白及其纯化和鉴定.....	36
3.1 材料.....	36
3.1.1 细胞.....	36
3.1.2 主要试剂.....	36
3.1.3 设备及耗材.....	36
3.2 方法.....	37
3.2.1 重组杆状病毒 HA 蛋白的表达.....	37
3.2.2 纳米颗粒蛋白的纯化.....	38
3.2.3 纳米颗粒的生成.....	41
3.2.4 血凝(HA)实验.....	41
3.2.5 纳米颗粒蛋白的鉴定.....	41
3.3 结果.....	42
3.3.1 Hi5 细胞系外源毒及支原体检测结果.....	42
3.3.2 重组杆状病毒 HA 蛋白的表达检测.....	43
3.3.3 HA 纳米颗粒蛋白的纯化及纯度分析.....	44
3.3.4 纳米颗粒的鉴定.....	50
3.3.5 二价纳米颗粒疫苗的制备.....	51
3.4 讨论.....	52
3.5 小结.....	53
第四章 猪流感病毒 H1 和 H3 亚型二价纳米颗粒疫苗的 Balb/C 小鼠免疫评价.....	54
4.1 材料.....	54
4.1.1 毒株、鸡胚.....	54
4.1.2 Balb/C 小鼠.....	55
4.1.3 试剂及耗材.....	55

4.1.4 主要仪器设备.....	55
4.2 方法.....	55
4.2.1 猪流感病毒小鼠感染模型的建立.....	55
4.2.2 免疫分组.....	56
4.2.3 免疫、采血及攻毒.....	56
4.2.4 HI 实验.....	56
4.2.5 中和实验.....	57
4.2.6 病毒特异性 IgG ELISA 及细胞因子分析.....	58
4.2.7 攻毒后体重监测及采样.....	59
4.2.8 病毒载量的检测.....	59
4.2.9 病理分析.....	60
4.2.10 统计分析.....	60
4.3 结果.....	60
4.3.1 HI 分析.....	60
4.3.2 中和抗体检测分析结果.....	61
4.3.3 病毒特异性 IgG ELISA 分析.....	62
4.3.4 细胞因子水平分析.....	62
4.3.5 攻毒后体重曲线及生存率分析.....	63
4.3.6 病毒载量分析.....	64
4.3.7 病理分析.....	65
4.4 讨论.....	67
4.5 小结.....	68
第五章 猪流感病毒 H1 和 H3 亚型二价纳米颗粒疫苗的仔猪免疫及攻毒保护试验.....	69
5.1 材料.....	69
5.1.1 毒株、细胞.....	69
5.1.2 仔猪及试验场地.....	69
5.1.3 试剂及耗材.....	69
5.1.4 主要仪器设备.....	70
5.2 方法.....	70
5.2.1 猪流感病毒仔猪感染模型的建立.....	70
5.2.2 免疫分组.....	70
5.2.3 免疫、采血及攻毒.....	71
5.2.4 HI 实验.....	71
5.2.5 抗原特异性 IgG 检测.....	71
5.2.6 细胞因子检测.....	72
5.2.7 病毒载量检测.....	72
5.2.8 病理分析.....	72

5.2.9 统计分析.....	72
5.3 结果.....	72
5.3.1 HI 抗体水平分析结果.....	72
5.3.2 HA 特异性 IgG 检测结果.....	73
5.3.3 细胞因子表达水平检测.....	74
5.3.4 病毒载量.....	75
5.3.5 病理分析.....	75
5.4 讨论.....	78
5.5 小结.....	79
结论.....	80
本研究的创新点.....	80
参考文献.....	81
附录.....	88

第一章 文献综述

猪流感 (swine influenza, SI) 是由猪流感病毒 (swine influenza virus, SIV) 引起的猪的急性、接触性呼吸道疾病, 临床上以高热、呼吸困难、咳嗽、厌食为特征。单纯的 SIV 感染具有高发病率、低死亡率的特点, 但 SIV 感染可引起饲料利用率降低、生长发育停滞及体重减轻, 同时, SIV 也可能与其他病原体合并感染导致严重症状及死亡 (Dobrescu et al. 2014; Schmidt et al. 2016), 猪流感的发生和流行给养猪业造成重大经济损失。

与人类流感病毒相似, SIV 也有不同的亚型和毒株。目前为止, 已经发现了至少 7 种不同的 SIV 血清亚型 (Lewis et al. 2016), 临床上常见的主要包括 H1N1、H1N2 和 H3N2 三种亚型, 根据病毒基因片段来源的不同又可分为多个谱系。近年来在中国猪群中流行的主要 SIV 是经典的猪型 H1N1 (Classical swine H1N1, CS H1N1)、欧亚类禽型 H1N1 (Eurasian avian-like H1N1, EA H1N1) 和类人型 H3N2 毒株。已有的 SI 血清流行病学调查表明, SIV 在中国的分布和演化日趋复杂。

疫苗接种仍然是预防和控制动物及人类流感感染的最有效和最经济策略, 现阶段已上市流感疫苗以灭活苗为主, 但流感病毒的变异特性常造成流行株和疫苗株不匹配, 导致疫苗有效性降低 (Ryt-Hansen et al. 2021; Tenforde et al. 2021), 需根据病毒流行特征对抗原进行周期性修订。猪对禽流感病毒、人类流感病毒和猪流感病毒均易感, 被称为流感病毒的“混合器”, 不同病毒在猪体内可能发生基因重排进而引起更大范围的传播和流行 (Ma et al. 2008; Shinde et al. 2009)。SI 的流行对全球公共卫生体系造成了巨大影响, 2009 年爆发的 H1N1/pdm09 (又称“猪流感”) 提高了全球跨部门对 SIV 演变和流行病学的认识, 对 SI 的监测、了解和防控进入了一个新阶段 (Garten et al. 2009; Shieh et al. 2010)。本章节针对 SIV 流行病学特点、进化特征、跨物种传播现状、疫苗研发进展等进行综述, 阐明猪流感在中国的流行传播现状, 为进一步的防控提供支持。

1.1 猪流感病毒病原学特征

SIV 在分类地位上属于正粘病毒科 A 型流感病毒属。目前发现可感染猪的 A 型流感病毒很多, 临床上较为常见的主要包括 H1N1、H1N2 和 H3N2 三种亚型 (Baudon et al. 2017)。SIV 病毒基因组由 8 个负链的单链 RNA 片段组成, 编码 10 个病毒蛋白, 其中有 HA、NA、NP、M1、M2、PB1、PB2 和 PA 8 种结构蛋白和 NS1, NS2 两种非结构蛋白 (Nypaver et al. 2021; Paules et al. 2017a)。SIV 通常呈 80-120nm 的球形, 表面有 10nm 左右的钉状物或纤突覆盖, 这两种不同形状的表面钉状物为三聚体血凝素 HA 蛋

白和四聚体神经氨酸酶 NA 蛋白。SIV 的传染性主要由 HA 和 NA 两种蛋白质决定，HA 可以识别并结合宿主细胞受体，促进病毒入侵，NA 负责切割唾液酸，促进病毒粒子的释放。

SIV 对热、pH、紫外线等环境条件敏感，对干燥和低温抵抗力强。56 °C 30 min 即可灭活，pH 3.0 以下或 pH 10.0 以上短时间内可失去感染力。SIV 为囊膜病毒，对乙醚、氯仿、丙酮等有机溶剂敏感；高锰酸钾、75%乙醇、碘酊、甲醛、环氧乙烷等化学消毒剂均可进行有效灭活。猪流感病毒在 5 °C 的浆液中存活 6 周以上仍保持感染性，在 20 °C 的浆液中可以保持 14 天(Botner et al. 2012)，在 -70 °C 冻干条件下可稳定保存数年。

1.2 猪流感病毒的流行概况

猪流感传播迅速，传播范围广，呈地方性流行，世界性分布。各个年龄段、性别和品种的猪对本病毒均易感，发病率高达 100%。以往研究表明，猪流感的流行具有明显季节性，天气多变的秋末、早春和寒冷的冬季易发生，但随着高密度集约化养猪生产方式的普及，猪流感季节性发病的特点已不太明显。作为主要的免疫抑制疾病之一，猪流感在规模化养猪场中普遍存在，难以根除。SIV 对猪呼吸道上皮细胞具有高度亲嗜性，感染造成猪体与外界的天然屏障被破坏，导致嗜血杆菌、胸膜肺炎放线杆菌、猪 2 型链球菌、巴氏杆菌、支原体、猪繁殖与呼吸综合征病毒等的继发或混合感染，使病情复杂化、严重化，导致发病和死亡率升高，同时造成人工、饲料的巨大浪费及药物的消耗，对养殖业的危害不可小觑(Hou et al. 2012; Jimenez et al. 2014; Ouyang et al. 2019; Sunaga et al. 2020; Sura et al. 2022)。从传播途径和传染源而言，SIV 主要是通过与病猪直接接触后经口鼻途径传播，病猪和带毒猪是猪流感的传染源，该病通常具有 1-3d 的潜伏期，感染后的 3-5d 为排毒高峰，病猪症状消失后仍可持续带毒 2 周以上。

1.2.1 猪流感的血清型及地理分布概况

SIV 有多个亚型，猪群中流行最广泛的是 H1N1、H3N2 和 H1N2 亚型。美国的主要毒株是经典的 1A 型 H1N1、三重组型 H3N2、1C 型禽样猪 H1N1 和 2009 年大流行的 pdm09/H1N1 病毒(Bakre et al. 2020)；欧洲主要的毒株是 1C 型类禽型猪 H1N1, 1B 类人重组猪 H1N2, 类人重组猪 H3N2, 以及 pdm09/H1N1 病毒(Brown 2013)；而在中国，美国和欧洲的所有谱系都已被证明在猪群中传播，在同一个猪场种不同 SIV 毒株的共循环很常见(Zhu et al. 2022)。一项意大利的研究报告了当地一个商业养殖场发生的多个重组基因型 H1N2 感染(Beato et al, 2016)；Song 调查了在中国南方某地的 9 个县猪群 SIV 检测发现，其中 7 个县的 24% 的猪 H1 和 H3 均呈阳性(Song et al 2010)。

猪流感于 1918 年首次被发现。Corzo 等(Corzo et al. 2013)使用 RT-PCR 方法对美国大型猪场猪流感在 12-24 个月内的猪流感感染情况进行动态跟踪检测，结果发现猪群

的个体阳性率为 4.6%，农场猪流感病毒阳性率为 90.6%。墨西哥北部的一项研究发现 (Lopez-Robles et al. 2014)，300 至 2500 头母猪的商业农场检测的样本中有超过 50% 的样本对 H1 或 H3 亚型 SIV 呈血清阳性，本研究主要对不到 10 周龄的猪进行了采样，而来自母体的抗体(MDA)在猪中可以持续长达 10 周，并可能导致假阳性结果，此外，本研究通过 RT-PCR 检测，16.7%(25/150)的猪样本对 A 型流感呈阳性。

猪流感在欧洲也很普遍。在比利时、法国、意大利和西班牙的一项研究中(Simon et al. 2014)，从 2006 年到 2008 年对 80 个分娩至产程农场进行了监测。90%的农场被分类为 SIV 阳性，个体水平血清阳性率为 62%。49%的农场感染了 SIV 的一种亚型，38% 感染了两种亚型，3.9%感染了三种亚型。然而，在这项研究中，抽样也有偏差，导致可能高估了流行率，因为抽样农场选择了来自猪密度高的地区或有呼吸问题史的猪。对挪威历史监测数据的分析表明，全国猪群甲型 H1N1 流感 pdm09 病毒的血清流行率约为 43%，受感染农场中 H1N1 大流行猪的个体流行率超过 60%(Forberg et al. 2013)。2009 年在西班牙进行的另一项研究涉及从 98 个随机选择的猪场抽检猪，报告农场水平的血清阳性率接近 100%，动物水平的血清阳性率为 62.3%(Simon-Grife et al. 2011)。

1.2.2 猪流感病毒在中国大陆地区的流行情况

猪流感血清及病原学流行病学调查分析表明，猪流感病毒在我国主要养殖区域广泛分布，H1、H3 亚型猪流感在我国东北、华北、华东、华南、华中以及西南等地普遍存在，且部分省市猪群感染呈地方性流行趋势（表 1-1，表 1-2）。哈兽研团队(刘丽萍 et al. 2014)对全国近 10 个养猪重点省份的养殖场、屠宰场 SIV 流行情况的调查发现 2012-2013 年我国猪群中类禽型 H1N1(EA H1N1)、2009 甲型 H1N1(pdm/09 H1N1)和 H3N2 亚型 SIV 抗体阳性率分别为 55.52 %、13.92 %和 2 %；兰德松等(兰德松 et al. 2019)对辽宁省 2012-2017 年间分离的 2161 份血清样品检测发现，辽宁省猪群中 SIV 感染率为 50.02%，以 EA H1N1、pdm09/H1N1 亚型 SIV 感染为主，分别占比 15.36%和 34.48%。

华南农大研究团队(朱旭辉 2019)在对 2016-2017 年间采集于广东地区的猪鼻拭子样品、血清样品检测显示，猪流感抗原阳性率为 4.53%，H1 亚型和 H3 亚型 SIV 血清阳性率分别为 26.5%和 27.3%，显示 SIV 在广东流行普遍；肖一红等(肖一红 et al. 2019)对山东省猪流感血清学流行情况监测显示，2016-2017 年山东省 SIV 感染比较普遍，SIV 抗体总阳性率为 63.79%，其中 EA H1N1 抗体阳性率最高(56.31%)，2009/H1N1 抗体阳性率次之(24.61%)，H3N2 抗体阳性率较低(1.61%)；中国动物疫病预防控制中心(徐琦 et al. 2018)对 2016 年全国不同区域 25 个重点屠宰场的猪血清进行了 HI 抗体的检测显示，我国屠宰场猪群中 SIV 感染比较普遍，EA H1N1、pdm/09 H1N1、CS H1N1、H3、H9 抗体阳性率分别为 28.12%、23.18%、19.34%、7%、7.41%，在所监测地区中，

华南地区屠宰场猪流感血清平均抗体阳性率最高(42.02%); 韩乐斌(韩乐斌 2022)等对山东省、辽宁省、四川省、内 蒙古省、山西省、广西省等不同省份的养猪场样本 SI 流行病学调查显示, 2020-2021 年间, 以上地区猪流感病毒平均阳性率为 42.47%, 单一亚型 SIV 的感染中, EA H1N1 的血清阳性率最高 (22.73%), 在两种及以上亚型 SIV 的混合感染中, EA H1N1+pdm/09 H1N1 的血清阳性率最高 (11.73%)。

流行病学研究表明, 猪流感病毒在我国主要养殖区域广泛流行, 且分布及流行毒株呈现越来越复杂的情况(Cai et al. 2018; Cao et al. 2019; Feng et al. 2021; He et al. 2021; Song et al. 2020; Yu et al. 2008; Zhao et al. 2020), 不同亚型毒株的混合感染比例也越来越高, 值得引起高度重视。

表 1-1 近 10 年中国主要养殖区域猪流感病毒病原学调查结果

Table 1 Pathogenetic findings of swine influenza virus in major breeding regions of China in the last decade

省份 Province	样品数量 No. of samples	阳性率%(n) Positive rate %(n)	年份 Year	样品类型 Sample type	检测方法 Methods	参考文献 Reference
广东	1522	4.53% (69/1522)	2016- 2017	鼻拭子	RT-PCR	(朱旭辉 2019)
山东(泰安)	1353	1.03% (14/1353)	2020- 2021	鼻拭子、肺 脏	鸡胚分离	(韩乐斌 2022)
广东(东莞)	7707	1.22% (94/7707)	2009- 2018	鼻咽拭子	RT-PCR	(蔡奕琪 et al. 2020)
山东	5260	0.72% (38/5260)	2016- 2018	鼻拭子	鸡胚分离	(孙法超 2018)
广东	2127	3.8% (81/2127)	2017- 2019	鼻拭子	RT-PCR	(于亚南 2020)
山东、河南、 湖北	6006	0.35% (21/6006)	2018- 2020	鼻拭子、肺 脏、支气管	鸡胚分离	(赵玉仲 2021)
江苏(扬州)	802	0.25% (2/802)	2019- 2020	鼻拭子	鸡胚分离 +RT-PCR	(张金燕 2021)
广东、广西	379	0.79% (3/379)	2016- 2017	鼻拭子、肺 脏	鸡胚分离 +RT-PCR	(付新亮 et al. 2020)

表 1-2 近 10 年中国主要养殖区域猪流感病毒血清学调查结果

Table 2. Serological findings of swine influenza virus in major breeding regions of China in the last decade

省份 Province	样品数量 No. of samples	阳性率%(n) Positive rate %(n)	年份 Year	样品类型 Sample type	检测方法 Methods	参考文献 Reference
四川、天津、江苏、河北、山东等 18 省份	5856	EA H1N1 55.52 %; pdm/09 H1N1 13.92 %; H3N2,2.00 %	2012-2013	血清样品	HI	(刘丽萍 et al. 2014)
广东	4850	36.14%	2012-2013	血清样品	ELISA	(刘丽萍 et al. 2014)
湖南	5060	34.89%	2012-2013	血清样品	ELISA	(刘丽萍 et al. 2014)
辽宁	2161	50.02% (EA H1N1 15.36%; pdm/09 H1N1 34.48%; H3N2,0.28%)	2012-2017	血清样品	HI	(兰德松 et al. 2019)
广东	132	53.8% (H1N1,26.5%; H3N2,27.3%)	2016-2017	血清样品	HI	(朱旭辉 2019)
山东	7000	63.79% (EA H1N1 56.31%; pdm/09 H1N1 24.61%; H3N2,1.61%)	2016-2017	血清样品	HI	(肖一红 et al. 2019)
全国不同区域屠宰场 (CADC)	/	EA H1N1 28.12%; pdm/09 H1N1 23.18%; H3N2 7% 42.47%	2016	血清样品	HI	(徐琦 et al. 2018)
山东、辽宁、内蒙、四川、山西、广西	16100	(EA H1N1 22.73%; pdm/09 H1N1 8.13%; H3N2,0.05%;	2020-2021	血清样品	HI	(韩乐斌 2022)

广东（东莞）	7534	EA H1N1+ pdm/09 H1N1 11.73% 44.85%（H1N1） 52.14%	2009-2018	血清样品	ELISA	（蔡奕琪 et al. 2020）
山东、河南、吉林、辽宁、山西	17865	（EA H1N1 28.89%； pdm/09 H1N1 9.05%； H3N2,0.07%； EA H1N1+ pdm/09 H1N1 14.01%）	2018-2020	血清样品	HI	（赵玉仲 2021）
广东、广西	3265	EA H1N1 27.53%； pdm/09 H1N1 20.98%； H3N2,34.85% 56.31%	2016-2017	血清样品	HI	（付新亮 et al. 2020）
中南地区（广东、福建、江西、河南）	5514	（EA1 H1N1 31.19%； pdm/09 H1N1 13.78%； EA2 H1N1 11.72%； H3N2,19.15%）	2017-2020	血清样品	HI	（胡晓坤 et al.）
河南（安阳）	1169	H1N1 54.49%； H3N2 30.62%； H1N1&H3N2 24.29%	2018-2019	血清样品	ELISA	（王庆云 et al. 2021）
广东（粤北地区）	376	27.62%（H1N1）	2014-2015	血清样品	ELISA	（胡鸿惠 et al. 2017）

1.3 猪流感病毒的进化分析

从公开数据库 GeneBank 和 GISAID 上检索到 2009-2022 年间中国大陆地区上传的猪流感病毒毒株共 798 例，具有完整毒株序列信息的 721 例，H1N1，H1N2，H3N2 三种亚型毒株分别为 619、35、67 例。筛选到 2013-2022 年间猪流感病毒毒株共计 533 例，其中 H1N1，H1N2，H3N2 三种亚型毒株数量分别为 521、435、8 例，毒株涵盖大陆地区 24 个省份，包含全部主要传统养殖区域，其中广东 92 例，辽宁 80 例，山东 66 例，天津 65 例，河南 44 例，河北 31 例，吉林 24 例，湖南 22 例，涵盖所有主要传统养殖区域，毒株以 H1N1 亚型为主，H1N2 和 H3N2 亚型占比相对较少，可见 H1N1 亚型是我国大陆地区流行的主要猪流感病毒。筛选近 10 年中分离自不同省份的 159 株猪流感病毒代表株全基因序列进行系统发育进化树分析，结果显示，H1N1 亚型中欧亚类禽型 H1N1（EA H1N1）是主要组成部分，占比 H1N1 亚型分离株的 90%以上。

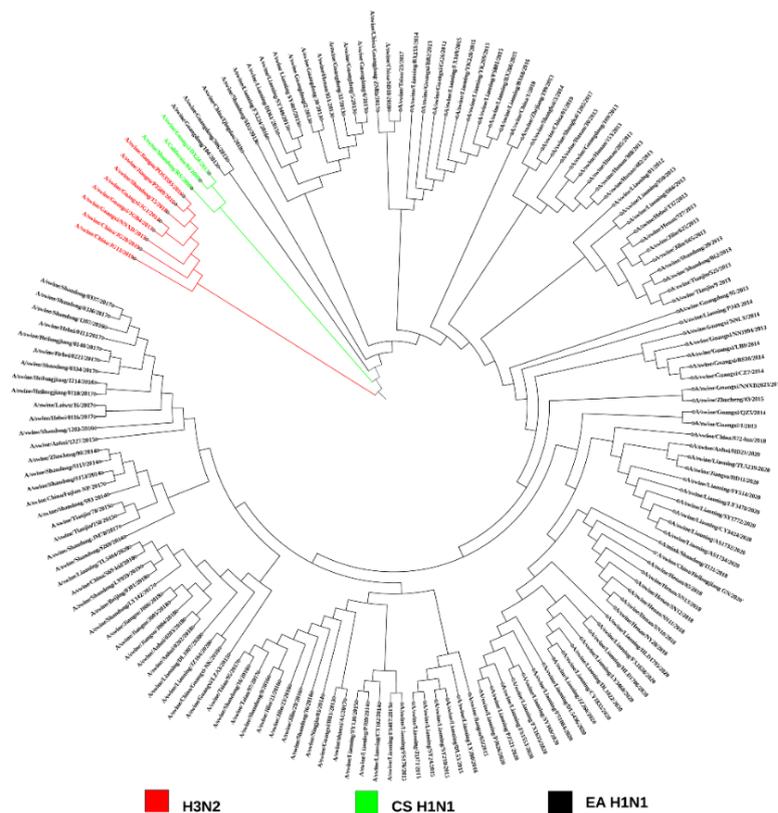


图 1-1 近 10 年中国不同地区猪流感病毒流行毒株基因进化树

Fig. 1-1 Genetic evolution tree of SIV circulating strains in different regions of China in recent ten years

1979 年，比利时和德国的猪群中发现了与经典猪流感病毒遗传进化不同的禽流感 H1N1 病毒，后被称为 EA H1N1 SIVs，其在猪群中迅速流行并超过了原有的 CS SIVs。2001 年，香港首次报道了中国大陆第一株 EA H1N1 SIV，随后 EA H1N1 SIVs 在中国大陆猪群中广泛流行，2009-2011 年，EA H1N1 SIV 登录序列数目达到峰值，随后略有

下降,但总体仍位维持高位。从病毒的流行趋势、遗传进化分析等均可以看出,EA H1N1 SIV 已逐渐成为养殖业的重要危害,因此开展对 EA H1N1 SIV 的研究迫在眉睫。

1.4 猪流感的种间传播现状

猪呼吸道中兼具禽 SA α -2,3Gal 受体和人 SA α -2,6Gal 受体两种唾液酸受体,被认为是流感病毒的“混合器”,在“禽-猪-人”的种间传播中扮演着重要的中间和储存宿主。禽源、人源流感病毒在猪体内不发病,但极易重组产生新毒株,进而跨越宿主屏障感染人并造成流行,对公共卫生产生重大威胁。世界多个国家、地区及中国国内曾报道过 SIV 可以感染人并导致机体发病甚至死亡的案例(Dawood et al. 2012)。

1976 年美国发生 H1N1 猪流感病毒感染并导致人死亡(Sencer 2011)。2009 年一种新型猪源 H1N1 流感病毒最先在美国和墨西哥出现,且在短时间内传播至全球 30 余国家,给人类健康造成巨大威胁(Dawood et al. 2012)。2011 年,美国发现携带 2009/H1N1 病毒基因的重组 H3N2 猪流感病毒,且发现该病毒对人具有致死能力(Jhung et al. 2013)。H1N1 亚型流感病毒的宿主范围不断扩大,已证实 2009/H1N1 流感病毒经基因重排后可以在人、猫、狗、火鸡等多种动物间传播。

中国农科院研究团队(Ding et al. 2021)对 2015-2017 年的猪场血清样品监测显示,猪群中季节性人 H1N1 和禽流感 H9N2 的感染率分别为 12.9%和 10.3%; Ma 等(Ma et al. 2018)对中国大陆养殖人员的血清学调查显示,53.1% (17/32) 从业者血清中存在猪流感病毒抗体; Nelson 等(Nelson et al. 2015)对美国猪流感流行株的系统发育分析表明,2009/H1N1 流感病毒的人-猪传播在 2009 年 H1N1 大流行之后的几年中已持续发生,并成为引起美国 SIV 遗传多样性的重要原因; 中国农业大学研究人员(Sun et al. 2020)对 2011-2018 年间中国 10 个主要养猪省份猪流感病毒的流行监测中发现了一种主要的突发性 EA 重组基因型 4 (G4)病毒,对职业接触人群的血清学监测表明,10.4%(35/338) 的饲养人员对该病毒呈阳性反应,其中 18-35 岁养殖人员血清学阳性率为 20.5%(9/44),表明 G4 EA H1N1 病毒已具备较强的传染人类的特性; Yu 等(Yu et al. 2011)在中国不同地区猪场样品中检测分离到 28 株 H9N2 毒株; Sun 等(Sun et al. 2019)对分离自家禽的 H9N2 禽流感毒株进行了猪感染实验,发现病毒可猪上呼吸道成功复制并脱落,且复制能力相对早前分离株增强,显示在该地区出现新的重组病毒流行的风险较大。

基因重排已成为人类流感大流行毒株的主要产生方式,有记录以来的 5 次流感大流行中有 3 次均与猪流感病毒相关,1957 年亚洲流感 (H2N2), 1968 年“香港流感”以及 2009 年甲型 H1N1 流感的毒株都是基因重配株,也都是经过在猪体内基因重配而来。由此可见,猪流感的流行对流感病毒的进化具有重要意义,加强对猪流感病毒的监测对公共卫生安全重要且迫切。

1.5 猪流感诊断方法

目前猪流感的诊断方法主要包括病毒抗原检测、核酸检测、分离培养以及血清学检测。不同方法都有其优缺点,适用于不同应用场景。抗原检测敏感性低于核酸检测,阳性支持诊断,但阴性不能排除流感;抗体检测多为回顾性监测,IgM 抗体检测敏感性低不建议常规使用,IgG 抗体水平恢复期比急性期呈 4 倍或以上升高有回顾性诊断意义;病毒培养周期长,生物安全等级要求高,已经很少应用于一线诊疗。

1.5.1 血清学检测方法

1.5.1.1 ELISA

SIV 的血清学检测主要针对是宿主-病毒的抗体反应,最常用的血清学检测方法是血凝抑制试验(HI)和酶联免疫吸附试验(ELISA)。现阶段,已有许多商用 ELISA 试剂盒已被开发用于检测甲型流感病毒核蛋白(NP)抗体,因为它在流感病毒中高度保守,研究表明,用于检测鸟类抗体的 NP 阻断型 ELISA 试剂盒也可用于检测猪的 NP 抗体(Panyasing et al. 2014)。

1.5.1.2 HI

HI 检测相对 elisa 检测具有更简单、快捷且成本低的优势,但由于猪流感病毒亚型和谱系的多样性,抗原选择较为复杂,直接决定实验的成败和准确性。尽管 HI 具有鉴别病毒亚型的优势,但当存在异源病毒时,如果仅用于 SIV 流行的监测,HI 检测的敏感性可能较低(Goodell et al. 2016)。此外,红细胞的种类及质量也是影响实验成败的关键因素之一,鸡、火鸡和豚鼠等的红细胞均可用于 HI 检测,且红细胞种属可直接影响针对 SIV 的 HI 检测滴度(Ovsvyannikova et al. 2014)。

血清学调查往往基于现有已收集的血清样本,因收集血液样本涉及大量的时间、人力和成本投入,为了克服这一困扰,科学家们开发了针对猪口腔分泌液中抗体的新方法,使用 np 蛋白阻断 ELISA 技术(Panyasing et al. 2014),该方法能针对单一猪场或猪群开展高水平的评估。在实验中,所有攻毒组猪只在感染后 7-42 天可在口腔分泌液中检出 NP 抗体。同一猪圈内猪的口腔分泌液与血清样本阴性(S/N)比的相关性达到 0.796,表明口腔分泌液样本和血清样本的检测结果具有较高的符合性。然而,另一项针对现场收集口腔样本和血清样本的 NP 阻断 ELISA 对比研究发现,口腔样本在 10-14 周龄猪群中的敏感性仅为 19%,而血清样品为 93%(Gerber et al. 2017)。

使用血清学检测方法的优点有:成本低廉,且与病毒分离(VI)及聚合酶链式反应(PCR)相比,血清学检测更容易进行;此外,血清学检测在甲型流感病毒感染方面比 PCR 测试或病毒分离更敏感,因为感染后高水平抗体可持续 1.5 个月以上,因此,血清学测试对采样时间的要求不太严苛。然而,血清学检测的局限性在于仅能证明 SIV 曾经感染,无法获取病毒遗传信息或分离到活病毒,而这些资料对于追踪毒株是否具有潜在

大流行风险至关重要;不同亚型以及同一亚型的不同谱系之间可能存在交叉反应,同时,母源抗体也可能会干扰检测的准确性(Allerson et al. 2013)。

1.5.2 分子生物学诊断方法

分子生物学方法对鼻或口腔拭子进行检测,主要用于监测病毒 RNA,并通过反转录 PCR 获取扩增子用于进一步测序。对于 A 型流感病毒的分子生物学分析通常以 M 基因为靶标。对于病毒基因分型,需要设计特定的引物来检测不同的基因片段,主要针对高频突变区基因 HA 和 NA (Henritzi et al 2020)。通用引物也可用于扩增 cDNA,用于后续的基因测序。

Richt 等于 2004 年开发了用于 SIV 检测的实时 RT-PCR 检测方法,与传统 RT-PCR 相比,它可以在更短的时间内完成,并且可以区分 SIV 亚型。它也比病毒分离和传统的 RT-PCR 检测成本更低。最重要的是,实时 RT-PCR 不需要处理 pcr 后的样本,从而减少了交叉污染的可能性(Richt et al. 2004)。

对猪群不同病毒株的合并感染情况及时监测对公共卫生健康具有重要价值,多重 RT-qPCR 方法可用于区分 SIV H1、H3、N1 和 N2 亚型,以及对 H1 亚型内的不同谱系,如对 1B“hu”(欧洲人源性),1C“av”(欧洲禽源性)和 1A“pdm”(H1N1pdm09)进行精准区分。Henritzi 等人开发的多重 RT-qPCR 检测方法可用于在一个临床样本中检出不同谱系的双重或多重感染。然而,RT-qPCR 的效率很大程度上依赖于与目标扩增子序列正确匹配的特异性引物,需根据流行株变异情况及时调整检测引物,过时的引物将导致检测灵敏度较低。

1.5.3 病毒分离鉴定

SIV 的分离常通过鸡胚 (ECEs) 或细胞系中进行,常用的细胞系包括 MDCK (犬肾细胞)和 CACO-2 细胞系(Chiapponi et al. 2010)。用不同方法分离 SIV 的敏感性与毒株本身关系密切,一项对 A/Swine/Indiana/1726/88 (H1N1)毒株的分离实验显示,ECEs 比 MDCK 细胞株更敏感(Clavijo et al. 2002)。另一项临床样本研究中,使用 MDCK 细胞系比使用 ECE 分离出更多的 H1N2 和 H3N2 分离株(Bowman et al. 2013),而意大利一项研究表明,与 MDCK 细胞和 ECEs 相比,CACO-2 细胞系对分离出 H1N1 和 H1N2 亚型病毒更敏感,而 ECEs 对于分离 H3N2 病毒效果优于细胞(Chiapponi et al. 2010)。病毒分离通常是困难的、昂贵的且耗时的,但对于需要活病毒的研究,如评估新发 SIV 的致病性和筛选疫苗候选毒株时,病毒分离是必要的。

综上,血清学检测可用于猪流感病毒暴露史的回顾性监测,PCR 检测更适合检测猪流感病毒的存在,获得的基因信息用于进一步分子研究;如需攻毒保护实验和疫苗研究,活病毒作为研究材料,则通常需要病毒分离。

1.6 猪流感疫苗研究进展

疫苗接种仍是防控 SIV 最经济最有效的方法。现阶段国内外使用最多是 H1 亚型和 H3 亚型单价或双价 SI 全病毒灭活疫苗，已在中、美、欧等多个国家实现商品化供应。然而，现阶段猪流感及季节流感灭活疫苗的生产仍严重依赖鸡胚，其存在明显的缺陷，当大流行来临时面对需求的陡然增加，可能因鸡胚供应不足而妨碍疫苗的生产供应，此外，因病毒在鸡胚中连续传代易过程中极易产生关键位点的适应性突变(Becker et al. 2021; Gao et al. 2019; Ryt-Hansen et al. 2020)，导致抗原性改变，进而降低疫苗的有效性。

细胞为基础的流感疫苗生产已成为传统鸡胚生产系统的重要替代方案，并已在一些国家获得监管部门的批准，如 MDCK，VERO 和昆虫细胞，但考虑到成本因素，这种新型疫苗在养殖业上的应用仍有诸多问题亟待解决。鉴于猪流感的危害性大且易变异，开发有针对性的疫苗任务迫切且意义重大。

1.6.1 国内猪流感疫苗签发批概况

现阶段国内猪流感商用疫苗均为灭活苗，目前共有获批猪流感疫苗生产批文厂家 5 家，均为灭活苗，其中 H1N1 单价灭活苗 3 家，H1N1 和 H3N2 二价灭活苗 2 家；正在申报 2 家，均为二价灭活苗，从申报及生产批次来看，二价苗淘汰单苗是必然趋势。从疫苗签发批数据来看，2022 年共签发 H1N1 和 H3N2 二价灭活苗 19 批，其中华威特（江苏）生物制药有限公司签发 14 批（全年共生产各类疫苗 89 批次），扬州优邦生物制药有限公司签发 5 批，相比之下，2022 年猪流感病毒 H1N1 亚型灭活疫苗仅签发 1 批，生产厂家为武汉科前生物股份有限公司。

表 1-3 现阶段国内已获批猪流感疫苗新兽药文号产品及厂家

Table 1-3 Approved swine influenza vaccine manufacturers in China at this stage

企业名称	通用名	批准文号	批准日期	有效日期
国药集团动物保健股份有限公司	猪流感病毒 H1N1 亚型灭活疫苗 (TJ 株)	兽药生字 170261101	2020/04/23	2025/04/22
武汉科前生物股份有限公司	猪流感病毒 H1N1 亚型灭活疫苗 (TJ 株)	兽药生字 170041101	2019/11/28	2024/11/27
扬州优邦生物药品有限公司	猪流感二价灭活 (H1N1LN+H3N2HLJ 株)	兽药生字 101081130	2018/10/19	2023/10/18
华威特(江苏)生物制药有限公司	猪流感二价灭活 (H1N1LN+H3N2HLJ 株)	兽药生字 101451130	2019/10/09	2024/10/08
中牧实业股份有限公司成都药械厂	猪流感病毒 H1N1 亚型灭活疫苗 (TJ 株)	兽药生字 220051101	2016/7/27	2021/7/26
武汉科前生物股份有限公司	猪流感病毒 H1N1 亚型 ELISA 抗体检测试剂盒	兽药生字 170048115	2018/1/23	2023/1/22

表 1-4 现阶段国内正在进行的猪流感疫苗临床试验情况

Table 1-4 Status of ongoing clinical trials of swine flu vaccine in China

批件号	项目名称	申请单位	临床试验地点	有效期
2022016	猪支原体肺炎、猪流感（H1N1,H3N2）二联灭活疫苗（XJ03株+HN株+SD株）	武汉科前生物股份有限公司	枝江市宜合众畜牧有限公司、湖南大唐牧业有限公司	2022.3-2024.3
202204	猪流感二价灭活疫苗（H1N1 HN株+H3N2 GD株，悬浮培养）	广东永顺生物制药股份有限公司	广东永顺生物制药股份有限公司；广东开平广三保畜牧有限公司；福建南平和兴种猪发展有限公司	2021.1-2024.1

1.6.2 猪流感疫苗生产系统概述

影响疫苗最终能否走向应用的关键因素之一就是表达系统的选择。已应用的主要的宿主表达系统包括细菌系统、昆虫表达系统、酵母系统、植物和动物细胞表达系统等。决定目标蛋白表达成功的关键不仅在于其设计构建，表达系统的选择更是影响巨大。表达系统的选择要考虑蛋白的性质、表达量及下游生产成本等。

用于疫苗生产的不同表达系统各有优缺点，大肠杆菌表达系统生产简单、迅速、成本低，被证明是最受欢迎的重组蛋白表达宿主，但重组蛋白常以不可溶包涵体形式存在，纯化难度较大，且原核系统缺乏完善的翻译后加工修饰体系，导致目标产物的生物活性较低；昆虫细胞和酵母表达系统蛋白表达水平高，成本可控，但翻译后加工修饰体系与哺乳动物存在差别；哺乳动物细胞表达系统产生的蛋白更趋近于天然状态，但表达量低，生产过程繁琐。因此，选择疫苗表达系统时，要统筹考虑目标蛋白的性质、表达水平、生产成本、表达周期、安全性等。随着对外源基因表达系统研究的深入及对表达机理和影响因素的持续探索发现，原核与真核两种表达系统的天然缺陷将被逐一攻克，且更多更加完善的表达系统将被开发及应用。

表 1-5 不同疫苗表达系统的优缺点

Table 1-5 Advantages and disadvantages of different vaccine expression systems

表达系统	优势	缺点	应用
大肠杆菌表达系统	成本低，产量高，转化操作简单，培养条件简单，生产条件易优化，生产迅速培养周期短，容易形成二硫键；	易形成包涵体，蛋白折叠性较差；与真核生物不同的密码子体系，缺乏的翻译后修饰，内毒素含量高。	适合表达原核蛋白，简单的真核蛋白或对糖基化功能要求不高的蛋白。
酿酒酵母表达系统	表达水平高，易培养且培养低成本，细胞表达或分泌蛋白的良好选择；无内毒素；拥有大多数真核生物的翻译后修饰，有效的蛋	表达水平及蛋白分泌能力低于毕赤酵母；糖基化与哺乳动物细胞不同，过糖基化N-端糖基链结构有致敏性。	分泌蛋白、真核蛋白、无糖基化修饰蛋白

毕赤酵母表达系统	白折叠。 表达水平高,生长快速,易培养;分泌蛋白或细胞内表达的良好选择,蛋白分泌高效且允许简单纯化;无内毒素分泌;广泛的翻译后修饰,N-端糖基化能力优于酿酒酵母。	以甲醇作为诱导剂具有一定毒性作用;糖基化水平低于哺乳动物细胞。	无糖基化修饰蛋白、真核蛋白、分泌蛋白
昆虫细胞-杆状病毒表达系统	表达水平高(尤其是胞内蛋白),生长速度快,广泛的翻译后修饰,有效的蛋白折叠;无内毒素;糖基化与哺乳动物细胞相当,相对容易地酶促的去糖基化(利于蛋白结构测定)。	需要大量的病毒;培养基成本高;亲肽的分泌通路低效;糖基化仍然不同于哺乳动物细胞;病毒侵染会导致细胞裂解及潜在的蛋白降解;残留的杆状病毒难以去除,影响免疫原性	毒性蛋白、跨膜蛋白、细胞因子、激酶等
哺乳动物细胞表达系统	高表达水平,可中度放大;细胞的悬浮培养特性可大规模生产,微载体培养放大培养;无内毒素;有效的蛋白折叠,适合分泌蛋白,充分的翻译后修饰。	培养基昂贵、生产成本高;生长条件复杂,培养周期长。	跨膜蛋白、酶类、蛋白复合物、离子通道蛋白、重组抗体等
动植物反应器	动植物反应器可表达来自动物、细菌、病毒以及植物本身的蛋白质;在基因表达与修饰及安全性方面有优势;成本低。	公众对转基因安全的质疑;量产有难度。	表达动物、菌体及植物本身的蛋白质

1.6.3 猪流感基因工程疫苗研究进展

猪流感灭活疫苗在制备过程中通常需加入抗原之外的复杂成分而存在引发未知风险的可能,此外,灭活疫苗诱导机体产生的免疫反应水平较低,需要多次注射或添加免疫增强佐剂。基因工程亚单位疫苗是近年研发的重点,亚单位疫苗通过体外蛋白纯化获取抗原,制备方法简单,与传统疫苗相比,不含遗传物质,具备更高的安全性,但也存在免疫原性差,需多次接种及佐剂辅助的缺点。纳米颗粒疫苗的出现弥补了亚单位疫苗的不足,纳米颗粒疫苗可展示多个或多种抗原组分,具备较高的免疫原性和稳定性,被认为是良好潜力的疫苗开发平台。

近年来,新型基因工程疫苗成为流感疫苗研究的热点,且取得了较大进展。Ruan等(Ruan et al. 2020)开发了一种基于流行CS和EA H1N1 SIV的HA和NA基因基因的二价重组H1N1流感病毒灭活疫苗,用致死剂量的EASH1病毒或CSG11病毒攻击小鼠,发现二价疫苗具有完全保护作用,而单价疫苗无法产生完全保护作用。Shelby等(Aubrey et al. 2022)通过反向遗传方法设计了猪流感二价减毒活疫苗(LAIV)并验证了疫苗在猪体内的保护作用,结果显示,LAIV可以在猪体内刺激产生较高的保护性抗体反应,在随后的H1N2和H3N2病毒攻击实验中也表现出较好的保护效果。Wu等(Wu

et al. 2017)开发了表达禽样 H1N1 猪流感病毒 HA 基因的重组腺病毒(rAd5-avH1HA)活载体疫苗, BALB/c 小鼠模型发现, 两剂免疫后小鼠体内产生了高水平的血凝抑制抗体, 并能防御同源 H1N1 和异源 H1N1 病毒攻击造成的损伤。唐攀等(Tang et al. 2022)利用杆状病毒-昆虫细胞表达系统表达了 H1 和 H3 亚型猪流感病毒血凝素蛋白的二价纳米颗粒疫苗, 研究显示, 纳米颗粒疫苗表现出比灭活疫苗更高的抗体水平和攻毒保护效果, MF59 佐剂和 CPG 佐剂能显著促进小鼠抗体水平及对不同病毒攻击的保护效果。Kim 等(Kim et al. 2017)分别制备了含有人源、猪源和禽源流感病毒的异源串联 M2e 重复序列(M2e5x)的病毒样颗粒(M2e5x VLP)疫苗和 H5 亚型流感病毒血凝素的 VLP(HA VLP)疫苗, 并比较了两种疫苗在小鼠上的免疫原性, 结果表明两种 VLP 疫苗均具有良好的免疫效果, M2e5x VLP 疫苗在交叉保护力方面更优于 HA VLP 疫苗。范桂芳等(范桂芳 2018)以变异伪狂犬病病毒基因缺失毒株(rSMXΔgI/gEΔTK)为载体开发了表达 H1N1 亚型猪流感病毒 HA 基因的基因工程亚单位苗, 攻毒保护试验显示两种疫苗单独及联合免疫对小鼠均有较好的保护力, 保护率分别为 85.7%、85.7%和 71.4%。

1.6.4 猪流感纳米颗粒疫苗研究进展

纳米颗粒疫苗递呈抗原有 3 种主要途径: 吸附(在纳米颗粒表面)、共价结合和包封(在纳米颗粒内)。纳米颗粒疫苗尺寸和免疫原性均接近天然病毒, 使用中无需额外佐剂。纳米疫苗的主要优势包括: (1) 纳米载体能提高疫苗制剂的稳定性, 避免抗原过快被降解; (2) 纳米颗粒兼具佐剂功能, 可协助激活抗原提呈细胞; (3) 纳米颗粒可增强抗原在淋巴系统的富集, 进一步提升免疫应答水平。在免疫方式上, 纳米颗粒疫苗可穿透毛细血管和黏膜, 这使得其免疫方式不仅局限注射, 还可以通过鼻腔给药, 这有利于激活黏膜免疫, 提高免疫效力。目前, 已有超过 20 种纳米颗粒疫苗开展临床试验阶段, 另有 60 种处于临床前研发阶段(Vu et al. 2021)。

中科院过程工程研究所的马光辉研究员报道了一种可在生物体内一步合成纳米疫苗的 Nano-B5 平台(Pan et al. 2020), 该平台由细菌 AB5 毒素和非天然三聚体肽融合表达后自组装而成, 采用蛋白融合或糖基化修饰策略, 可在减毒病原菌株或普通大肠杆菌菌株中生产负载多肽、多糖等不同类型抗原的纳米颗粒疫苗, Nano-B5 平台实现了纳米骨架与抗原的模块化组装, 为新型疫苗的快速构建提供了新思路。中山大学张辉教授基于铁蛋白纳米颗粒构建了两种新冠疫苗(Ma et al. 2020), 分别偶联 S 蛋白的 RBD 区域、RBD/HR(七肽重复序列), ACE2 人源化小鼠试验和恒河猴试验均表明两种铁蛋白纳米疫苗比常规亚单位疫苗能诱导更强的保护性免疫响应, 且将病毒滴度控制在更低水平。Yassine 等(Yassine et al. 2015)构建了基于 HA 茎结构的自组装纳米颗粒疫苗, 使用 ELISA 技术和生物分子干涉技术发现这些纳米颗粒可以被一些 HA 茎定向抗体识别, 小鼠和白鼬实验显示纳米颗粒疫苗产生了广泛的交叉反应性抗体, 且可耐受致死

性流感病毒 H5N1 的攻击。Brune 等(Brune et al. 2017; Bruun et al. 2018)开发了在同一种颗粒上展示两种不同抗原的模式化方法,使用两种正交反应分离蛋白质-SpyCatcher-SpyTag 多肽、SnoopCatcher-SnoopTag 多肽生成 SpyCatcher-IMX-SnoopCatcher 纳米颗粒,可同时展示 Pfs25 和 Pfs28 两种疟疾抗原分子,动物实验显示这种双抗原相对单体蛋白质可在极高水平上增强免疫应答。Metz 等(Metz et al. 2016)使用 PRINT 技术在纳米颗粒上展示登革热病毒的 E 蛋白外侧结构域,免疫实验表明得到的纳米颗粒 E 蛋白疫苗可以诱导机体产生比可溶性 E 蛋白更强的 IgG 滴度。He 等(He et al. 2019)设计了展示多样式固定型 gp140 三聚体的铁蛋白纳米颗粒平台,纳米颗粒可在亚皮摩尔亲和力和下与中和抗体广泛结合,纳米颗粒相较于单独 gp140 三聚体可更稳定的激发 B 细胞活性。

表 1-6 不同纳米颗粒疫苗的对比

Table 1-5 Comparison of different nanoparticle vaccines

纳米颗粒种类	优点	缺点
有机聚合物纳米颗粒	纳米颗粒大小、电荷等可操控;给药方式多样,可鼻腔接种,提高免疫原性。	抗原加载效率较低
VLPs (病毒样颗粒)	接近天然病毒的方式递呈抗原蛋白;体外表达,可规模化生产。	需对抗原蛋白的构象,密度等精确控制
脂质体纳米颗粒	可递呈并保护 mRNA 及其它具有潜在免疫原性的物质,可人工合成,颗粒大小、电荷可控制,可封装佐剂。	对运输和保存条件要求高,需全程冷链。
自组装纳米颗粒	比亚单位疫苗有更高的免疫原性;接近天然病毒的抗原递呈方式;可展示多种抗原蛋白。	需在细胞中表达,周期长,成本高,规模化生产受制约。
无机纳米颗粒	可吸附多种抗原组分,可同时递呈抗原和佐剂,给药方式多样,具备较高的免疫原性。	无机纳米颗粒在人体代谢过程中可能富集,存在一定的毒性风险。
去溶剂化纳米颗粒	抗原载量高,可与多种抗原共同组装	形成纳米颗粒过程呈动态变化,因此纳米颗粒大小不均一
噬菌体蛋白外壳	具有独特的大小及形状,蛋白外壳呈高度对称结构,可以天然方式递呈抗原;内部可包裹核酸,作为核酸疫苗递送载体;可鼻内给药,保留免疫原性。	自身具有一定的免疫原性

1.6.5 猪流感通用疫苗研究进展

开发通用疫苗,用于应对多种流感病毒株及其引起的流行(Deng et al. 2018)。全球通用流感疫苗开发基金会统计显示,目前已有 92 款通用型流感疫苗在临床前研究阶段,21 款进入临床阶段,其中有 3 款进入临床 III 期试验,虽然通用疫苗在动物实验及早期临床试验中显示了较好的免疫原性及安全性,但截止目前尚未有产品批准上市(Paules et al. 2017b)。美国国家卫生研究院过敏和传染病研究所(NIAID)于 2017 年举办了“研

制通用流感疫苗的途径”研讨会，提出通用流感疫苗的合理目标是人群中患甲型流感病毒 Group 1/2 引起的有症状流感提供至少 12 个月且不低于 75% 的保护效力(图 1-2)。WHO 在“2019-2030 年全球流感战略”会议上提倡流感通用疫苗的开发，旨在降低全球范围内流感的发病和死亡率，该战略列明了到 2030 年底实现尽可能高的流感预防、控制的全球优先事项，成功实施该战略将需要 WHO、各国及合作伙伴将这些优先事项纳入各自的政策、方案及制度。

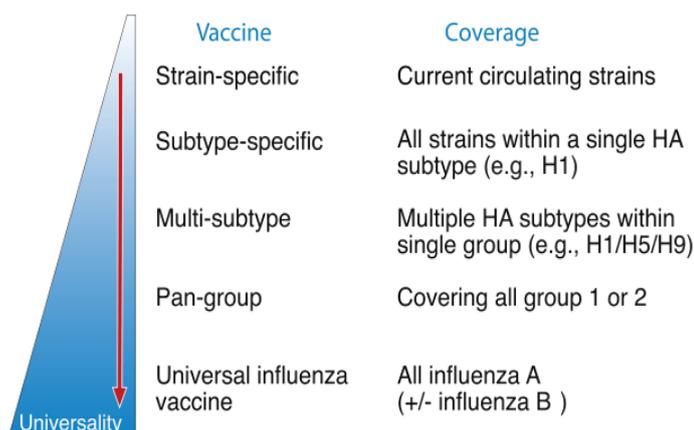


图 1-2 通用疫苗研发示意图(Paules et al. 2017b)

Fig. 1-2 Schematic diagram of universal vaccine development

目前，通用流感疫苗的几个靶点主要包括基质蛋白 M2 离子通道的胞外域(M2e)、HA 的保守茎部、核蛋白(NP)和基质蛋白 1(M1) (图 1)。研究较成熟的案例主要有：

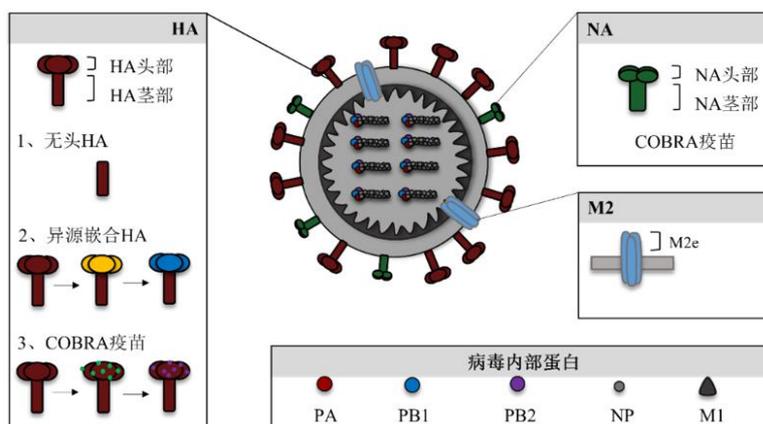


图 1-3 通用流感疫苗的主要靶点

Fig. 1-3 Main targets for a universal influenza vaccine

以色列 BiondVax 制药公司开发了新型候选流感疫苗 M-001，旨在针对当前和未来的季节及大流行流感提供多毒株的保护(Atmar et al. 2023; Atsmon et al. 2012)。在旨在测

试免疫原性的 1/2 期和 2 期临床的 7 项试验中, M-001 能够有效刺激多种流感毒株的免疫反应。2020 年 10 月 M-001 完成了 3 期临床试验, 但未能满足试验的主要和次要疗效终点; FLU-v 候选通用流感疫苗是由英国 PepTcell 公司研发的合成肽疫苗(Abbasi 2020; Pleguezuelos et al. 2012), 旨在对 A 型和 B 型流感提供广泛的保护性免疫应答, 肽段主要是来源于甲型和乙型流感病毒 M1、PB1、NP 和 M2 蛋白的 6 个保守 T 细胞表位肽, 并配合了 Montanide ISA-51 佐剂。与传统流感疫苗不同, FLU-V 主要依靠诱导机体产生细胞免疫应答来介导病毒感染的保护作用, 该疫苗先后于 2012 年、2015 年和 2017 年完成了 I 期, II 期和 IIa 期临床试验, 初步证明了疫苗的安全性和免疫原性; Vaccitech (UK) 公司研发的基于 M1+NP 抗原的复制缺陷痘病毒载体疫苗已在数千名患者中进行安全性测试(Evans et al. 2022), 临床试验结果可对基质蛋白 M1 和核蛋白 NP 流感抗原产生强烈的免疫反应; 牛津大学研究团队使用 ChAdOx1 和 MVA 病毒载体, 设计了共表达嵌合 HA (cHA) 和 NP+M1 融合多肽(cHA-NP+M1)等多个抗原组分的通用疫苗, 并对雪貂进行了疫苗接种, 通用疫苗在与 cHA 或 NP+M1 的单价疫苗对照中显示出较好的应用前景(Antrobus et al. 2014; McMahon et al. 2019)。

Julia 等(Sei et al. 2021)从 H5 和 H1 亚型流感病毒的 HA1 亚基中筛选出了高度保守的肽序列并制备了流感多肽疫苗, 动物实验表明该疫苗能够诱导免疫猪产生体液免疫和 T 细胞免疫应答, 并且免疫猪血清中的抗体还能与异源的流行毒株 pH1N1 和临床分离的猪 H1N1 和 H3N2 亚型的毒株以及 H5N1 高致病性禽流感病毒发生特异性结合, 该研究证实了该合成肽疫苗可以诱导产生广谱的流感病毒抗体, 进一步推动了合成肽疫苗的研究。

目前国内对流感通用疫苗的研究较为局限, 虽然国外已经研制出多种针对流感病毒不同靶点的候选通用疫苗且在动物模型和临床阶段显示较好前景, 但是目前尚无通用型流感疫苗批准上市(Darricarrere et al. 2018; Du et al. 2010)。季节性流感疫苗对流感病毒只能提供部分保护, 迫切需要针对不同谱系病毒的交叉保护性流感疫苗, 相信随着分子生物学、免疫学、病毒学和疫苗递送领域的不断发展, 具有广泛交叉保护作用的新一代通用疫苗必将有所突破, 这些疫苗不仅可以用于预防流感感染, 还有望用于治疗途径。

1.7 猪流感的综合防控措施

目前针对猪流感病毒尚无有效的药物治疗方案, 做好疫情预测, 加强免疫接种, 提高饲养管理水平和落实生物安全防护措施是控制猪流感流行的关键。

1.7.1 做好疫情预测

随着计算机、大数据及人工智能领域的应用和推广, 预测理论及其应用得到了迅

速发展,并逐渐成为一门学科。疫情预测在新冠病毒的流行及综合防控中大放异彩,给全国及各地区精准防控政策的实施、减少对人民生活的影响方面提供了有力支撑(白云 et al. 2022; 王正安 et al.)。我国动物疫病预测方法研究关注度低、起步晚,近年来,面对非洲猪瘟等重大动物疫病突发频发的态势,各级疫控部门加大了监测预警体系的研究,特别是对预警方法的研究及系统软件的开发,以期在疫情初期早预警、快处理,减少疫情对经济发展和社会民生造成的负面影响(陈军 et al. 2010)。

1.7.2 加强疫苗免疫

制定科学合理的免疫计划可有效防护猪流感的流行。猪流感病毒具有多个亚型,其中 H1 和 H3 亚型流行最为广泛,接种二价疫苗可获得较好的保护作用,现阶段国内已上市的猪流感灭活疫苗涵盖 H1N1 LN 株, H1N1 TJ 株及 H3N2 HLJ 株,需要密切关注病毒的进化特征,适时开展猪流感病毒流行毒株抗原替换工作。

1.7.3 提高饲养管理水平

加强猪群饲养管理可有效降低疫病的发生率。在猪流感高发的冬春季节,加强舍内温度控制,做好猪群特别是自身免疫力低下仔猪群的防寒保暖尤为重要。同时,注意保持舍内良好通风,防止氨、硫化氢等毒害气体聚集而刺激猪群呼吸道,进而诱发猪流感等呼吸道疾病。此外,合理搭配日粮,适当提高蛋白质水平及添加维生素、矿物质等,保证猪群足够的营养摄入,提高抗病力,进一步降低疫病发生率。

1.7.4 落实生物安全防护

建立切实规范的生物安全防控制度并严格实施。建立并配套高效的消毒、隔离设施设备,实行封闭式管理,对进出养殖场的人员和车辆进行严格的消毒,做好厂区内公共区域环境消毒及猪舍熏蒸消毒、带猪喷雾消毒等,降低环境病毒载量。此外,关口前移,坚持“早发现、早隔离”原则,对猪群定期检疫,及时隔离疑似感染的猪只,防止扩散至大群。实施全进全出,自繁自养,高度重视引种生物安全,严格执行隔离检疫制度和措施。

1.7.5 完善标准化培训水平

通过高标准的定期培训,内化养殖和技术人员的疫病防控意识,提高饲养和防疫专业技能,配合畜牧兽医主管部门推进各项动物免疫及防疫制度,同时严格落实场内猪群健康、免疫、评估等各项措施,对不按照规定进行饲养管理的人员严格追责。

我国拥有全球一半以上的肉猪养殖规模,庞大的猪群与传统的畜禽混养模式为新亚型或新基因型 SIV 的产生提供了机会,给全球公共卫生体系和人类健康带来严重挑战。因此,对猪流感病毒开展系统性、长期性、全面性地监测对猪流感防控具有至关重要的意义。

1.8 研究的目的和意义

猪流感的流行给养猪业造成重大损失，且对公共卫生带来严重威胁。SI 血清学流行病学调查表明，H1N1、H3N2 亚型 SI 在我国猪群中普遍存在，且我国猪群中分布和进化越来越复杂。疫苗是预防 SI 传播的最有效手段，纳米颗粒疫苗作为新型基因工程亚单位疫苗的重要代表近年来在新冠、乙肝、流感、艾滋病及肿瘤等传染病和重大疾病的预防和治疗中展现出了广阔的应用前景。

目前，尚未有猪流感亚单位疫苗批准上市。本研究中，我们利用昆虫细胞-杆状病毒系统表达并生成了猪流感病毒 H1 和 H3 亚型二价纳米颗粒疫苗，对纳米颗粒粒径和形态进行了表征，对重组纳米颗粒蛋白特性进行了鉴定，并通过 Balb/C 和仔猪免疫和攻毒保护实验对疫苗的效力和保护作用进行评估。本研究开发的纳米颗粒疫苗可作为现有二价鸡胚灭活疫苗的有效替代，为潜在的猪流感大流行做技术储备。

1.9 技术路线

本研究的技术路线如图所示（图 1-4）。

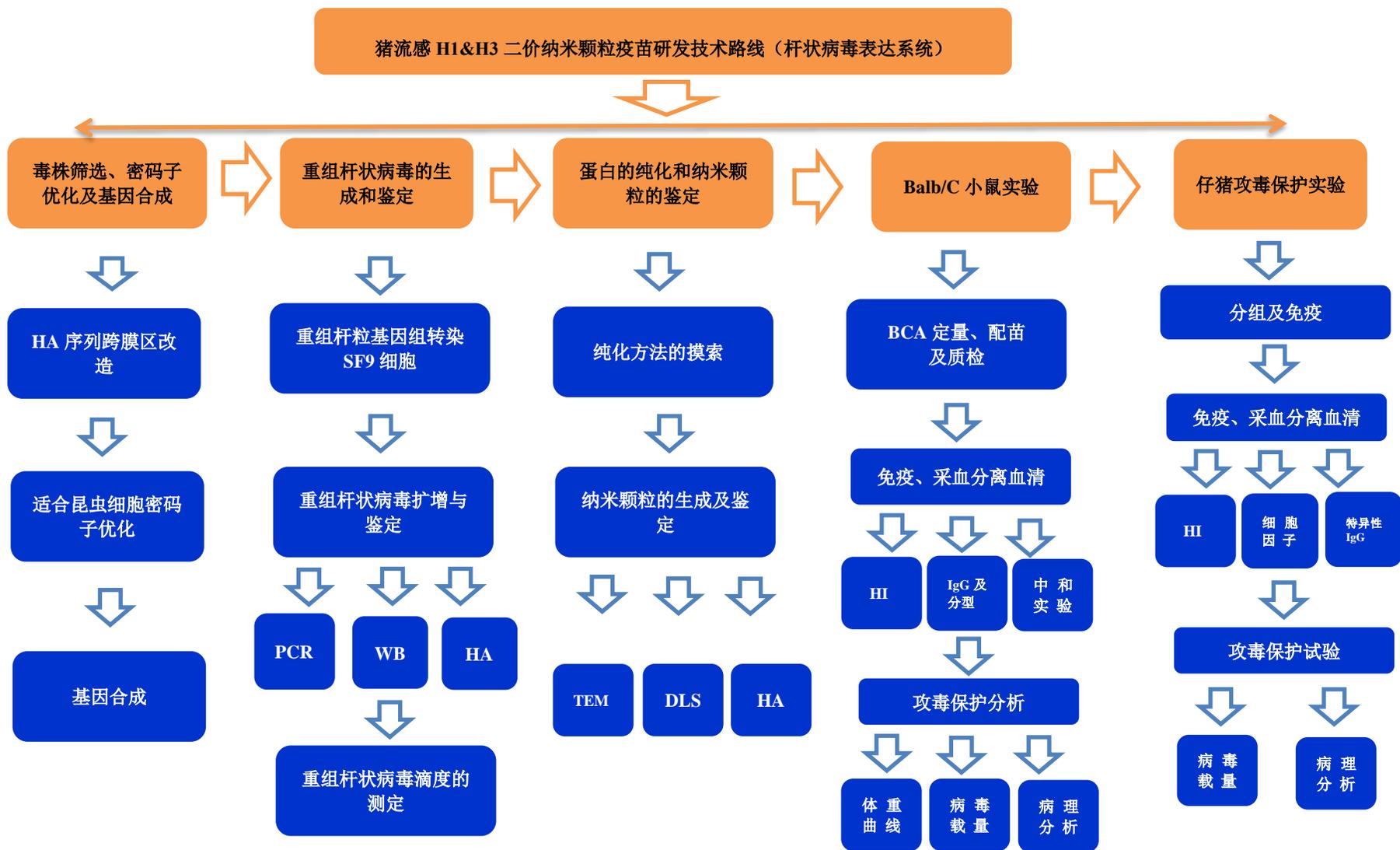


图 1-4 研究的技术路线

Fig.1-4 Technology route of this research

第二章 H1 和 H3 亚型 SIV 流行毒株 HA 基因重组杆状病毒的构建

血凝素 (Hemagglutinin, HA) 蛋白是流感病毒表面的主要糖蛋白, HA 作为主要保护性抗原可以诱导出高水平的中和抗体, 能够预防感染、阻止病毒入侵和清除体内的流感病毒, 以 HA 抗原为靶标的四价流感纳米颗粒疫苗已完成三期临床试验(Shinde et al. 2022)。目前已上市和在研流感疫苗主要针对 HA 抗原。

HA 能自形成 3 聚体, 3 聚体结构的跨膜区可与 PS80 疏水内核结合得到稳定的纳米颗粒(Smith et al. 2017), 1 个 PS80 可结合 4-7 个 HA 3 聚体蛋白, PS80 作为非离子型表面活性剂, 这种纳米颗粒结合形式一定程度上具有稳定蛋白结构, 保证蛋白活性, 抑制蛋白析出变性的优势, 国外 Novavax 公司基于此种方法的流感疫苗、RSV 疫苗产品已完成了 3 期临床试验且效果显著(Krueger et al. 2021; Shinde et al. 2022)。

既有研究表明, H3 亚型流感病毒 HA 蛋白的跨膜域 (transmembrane domain, TM) 具有独特的结构, 能形成分子间二硫键, 从而使 HA 蛋白具有高稳定性以及亚型间的交叉免疫力(Liu et al. 2014; Wang et al. 2017; Zhang et al. 2017; Zhou et al. 2014)。本研究筛选 SIV H1N1 和 H3N2 流行毒株的 HA 蛋白基因序列, 对 H1N1 毒株 HA 序列跨膜区改造以提高稳定性。

2.1 试验材料

2.1.1 质粒和细胞

从 GISAID Epiflu 数据库下载 SIV A/swine/Qingdao/2018 (H1N1, EPI_ISL_370660) 和 A/swine/Jiangsu/P3589/2016 (H3N2, EPI_ISL_256394) HA 蛋白序列 (氨基酸序列见附录 C)。pBacPAK9 载体质粒、大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞由杨凌凯瑞生物科技有限公司实验室保存; 引物由北京擎科生物科技有限公司西安分公司合成。

2.1.2 主要试剂

质粒小提试剂盒 (DP103-02, 天根生化科技(北京)有限公司); 通用型 DNA 纯化回收试剂盒 (DP214, 天根生化科技(北京)有限公司); Primerstar Max (R045A, 购自宝日医生物技术(北京)有限公司)、闪电克隆试剂盒 (BDIT0014-5, 北京博奥龙免疫技术有限公司); Protein Ladder (P0063, Thermo Fisher Scientific) DL2000 DNA Maker (TSJ011-500, 北京擎科生物科技有限公司); 限制性内切酶 BamHI, KpnI, 购自 NEB 公司; BacPAK™ 杆状病毒快速滴度试剂盒购自 Clontech; His 单抗购自武汉三鹰生物技术有限公司 (货号: HRP-66005-1-Ig); T5 super Mix、DNA Maker, 购自北京擎科

生物科技有限公司西安分公司。

2.1.3 主要仪器设备

基因扩增仪 (TC-96/G/H (b), 杭州博日科技有限公司); 细菌摇床 (TS-180C, 上海天呈实验仪器制造有限公司); 凝胶成像系统 (JY04S-3C, 北京君意东方电泳设备有限公司); 高速离心机 (H1750, 购自湖南湘仪集团有限公司); 水浴锅 (DK-8D 三控三温, 上海一恒科学仪器有限公司); 超净工作台 (SW-CJ-2FD, 苏州苏信环境科技有限公司); 立式压力蒸汽灭菌器 (BXM-30R, 上海博讯); 鼓风干燥箱 (DHG-9240A, 上海天呈实验仪器制造有限公司); 医用冷藏箱 (HYC-310, 海尔); 医用离心机 (TD4, 湖南湘仪集团有限公司); 涡旋振荡仪 (QL-901, 其林贝尔); pH 计 (2013C004-31 PHS-3C, 仪电科学); 微量分光光度计 (Nano-100, 杭州澳盛); 电泳仪 (JY300HC, 北京君意东方电泳设备)。

2.1.4 主要溶液

常见主要溶液配置方法见附录 B。

2.2 实验方法

2.2.1 重组质粒的合成

2.2.1.1 抗原改造示意图

研究表明, H3 亚型流感病毒 HA 蛋白的跨膜区具有独特的结构 (CFLLC), 能形成分子间二硫键, 从而使 HA 蛋白具有高稳定性以及亚型间的交叉免疫力。本研究 HA 蛋白跨膜区改造示意图见图 2-1。

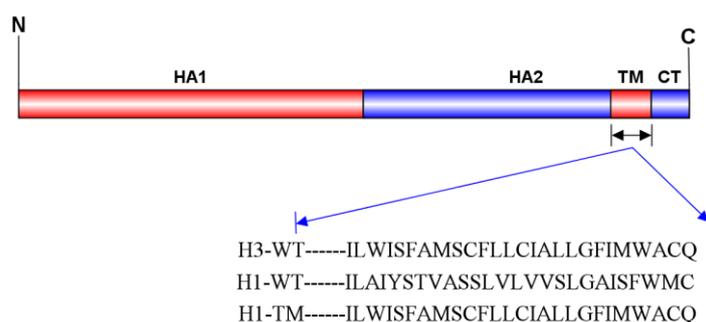


图 2-1. SIV HA 蛋白的跨膜域改造示意图

Fig 2-1. Schematic diagram of transmembrane domain modification of SIV HA protein

其中箭头部分显示了 TM 结构域的氨基酸序列。H3-WT 为 H3 野生型 HA 蛋白, H1-WT 为 H1 野生型 HA 蛋白, H1-TM 为 H1 野生型 HA 蛋白跨膜域替换为 H3 TM。

2.2.1.2 质粒的合成

真核表达载体质粒 pBacPAK9-SIV-H1-HA-WT (BamH1,Kpn1) pBacPAK9-SIV-H1-HA-TM (BamH1,Kpn1), pBacPAK9-SIV-H3-HA-TM(BamH1,Kpn1) 由南京金斯瑞生物科技有限公司合成并测序验证。阳性荧光质粒 pBacPAK9-GFP 由本实验保存。

2.2.2 重组杆状病毒的生成及鉴定

2.2.2.1 Sf9 洁净细胞系的检验

(1) 细胞复苏及传代: Sf9 细胞自液氮中取出后迅速转移至 37°C 水浴锅中, 匀速搅动使其加速融化, 加等体积常温 IB905 培养基并充分混悬, 800 rpm 离心 5 min, 弃上清, 并加入新的 IB905 培养基, 用台盼蓝染色、计数并调整细胞密度至 2×10^6 cell/mL 左右, 转移至 125 mL 细胞摇瓶内并于 27 °C, 110 rpm 的恒温培养箱内培养 24 h 以上, 细胞进入对数生长期后进行传代。

(2) 外源病毒的检验:

①引物设计: 对 Sf9 细胞弹状病毒 (Rhabdoviruses, RV) 污染情况进行检测, 根据弹状病毒序列, 设计引物如下:

上游引物 RV-F: TGGCGAGGGACTGCTTACAGAAGG

下游引物 RV-R: CACAGCCGGGGGTGCAATCA

② RV 病毒基因组提取: 随机收集第 3 代、5 代次培养对数期的 Sf9 细胞悬液, 按照 RNA 提取试剂盒提取全基因组, 具体步骤见试剂盒说明书。

③反转录: 以 RNA 为模板, 用一步合成法试剂盒反转录合成 cDNA。体系如下:

成分 Components	体积 Volume
Primer (random primer)	1 μ L
2*ES Reaction Mix	10 μ L
E Mix	1 μ L
DNA Remover	1 μ L
RNA Template	3 μ L
RNase-free Water	4 μ L

PCR 的反应条件: 42°C 孵育 30min, 85°C 加热 5s 灭活 g DNA Remover。

④ PCR: 将反转录产物按 10 倍倍比稀释, 进行 PCR 扩增, 反应体系如下:

成分 Components	体积 Volume
2*primer star Max	10 μ L
RV-F	1 μ L
RV-R	1 μ L
cDNA	1 μ L
RNase-free Water	7 μ L

PCR 反应程序为: 95°C 1min; 95°C 15 s, 56°C 20 s、72°C 15 s, 35cycles; 72°C 10min, 16°C Hold。PCR 结束后扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳分析, 预期阳性产

物大小为 730 bp 左右, 如果 PCR 产物大小分布符合以上结果, 则判定 Sf9 细胞弹状病毒阳性。

(3) 支原体的检验

①引物设计: 对 Sf9 细胞进行支原体污染的检测, 设计引物如下:

上游引物 MS-F: GGCGAATGGGTGAGTAACACG

下游引物 MS-R: CGGATAACGCTTGCGACCTATG

② 支原体基因组提取: 随机收集第 3 代、5 代次培养对数期的 Sf9 细胞悬液 200 μL , 按照全基因组提取试剂盒方法提取基因组, 具体步骤参照试剂盒说明书。

③ PCR: 按照下表配置 PCR 反应体系, 具体如下:

成分 Components	体积 Volume
2*primer star Max	10 μL
MS-F	1 μL
MS-R	1 μL
DNA	1 μL
RNase-free Water	7 μL

PCR 反应程序为: 98 $^{\circ}\text{C}$ 1 min; 98 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 35 cycles; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 16 $^{\circ}\text{C}$ Hold。PCR 完成后用 1%琼脂糖凝胶进行电泳分析, 预期阳性产物大小为 500 bp 左右, 如果 PCR 产物大小分布符合以上结果, 则判定 Sf9 细胞支原体污染阳性。

2.2.2.2 重组杆状病毒的构建

(1) 配液

按照下表所示分别配置 A 液, B 液。

表 2-1 转染试剂 A,B 液配置表

Table 2-1 Transfection reagents A,B liquid configuration table

A 液		B 液	
成分	质量/体积	成分	质量/体积
质粒	5 μg	转染试剂	5 μL
IB905	100 μL	IB905	100 μL

(2) 将 B 液轻轻加至 A 液中并轻柔吹打混匀或轻弹管壁混匀, 室温静置 20 min。

(3) 细胞状态观察及计数: 检查 Sf9 细胞状态, 原则上细胞活力 95%以上, 细胞直径 17 nm 左右可满足包毒需要; 取过夜培养的 Sf9 细胞用细胞计数仪计数, 用 IB905 培养基将 Sf9 细胞稀释至 1.5×10^6 cell/mL 左右。

(4) 铺板: 将调整好的细胞加入干净的 6 孔板, 每孔 1 mL, 另补加 1 mL IB905 培养基, 27 $^{\circ}\text{C}$ 培养 1 h, 根据包毒数量设置铺板数量, 每板设置 1 孔 GFP 阳性对照及 1 孔阴性 (细胞) 对照。

(5) 将预先静置的 A+B 混合液全部吸出并加至对应的细胞孔中, 完成后轻柔前

后左右晃动混匀，用封口膜沿侧面封闭，做好标记并于 27°C 静置培养。

(6) 将 6 孔板于 27 °C 恒温培养箱内培养，每天观察细胞状态，当细胞直径出现明显变大，出现脱落或堆积，同时在 48-72 h 可观察到 GFP 阳性对照孔出现荧光，说明包毒成功。

2.2.2.3 重组杆状病毒的扩增

(1) 收集 6 孔板的毒至冻存管，1 mL 每支，共 2 支，做好标记，记为 P1 代。

(2) 准备 6 mL 密度为 2.0×10^6 cell/mL、细胞活率 95% 以上的 Sf9 细胞加入 T25 方瓶中，于 27 °C 恒温培养箱内静置培养 1 h，使其贴壁生长。

(3) 取 200 μ L P1 代毒加入 T25 方瓶，轻柔晃动混匀，27 °C 静置培养，6 d 后收取上清液记为 P2 代毒，用细胞刮刀刮下第壁的细胞，进行 WB 检测分析，使用或 His 单抗检测目的蛋白表达情况。

(4) 取 T25 方瓶的 P2 代次毒 1 mL 继续传代接种于含 20 mL Sf9 细胞的 125 mL 细胞摇瓶，27 °C 恒温摇床培养 96 h 收毒，记为 P3 代次。以此类推，共收集 Sf9 细胞毒 4 代次。

2.2.2.4 重组杆状病毒的 PCR 鉴定

按照 TIANGEN® 病毒基因组 DNA 提取试剂盒(DP315)说明书操作进行重组杆状病毒 DNA 提取，具体如下：

(1) 将 200 μ L 重组杆状病毒样品加入含有 20 μ L Proteinase K 的干净的 1.5 mL 离心管中并混匀；

(2) 加入 200 μ L Carrier RNA 工作液（缓冲液 GB 与 Carrier RNA 溶液的混合液，混合比例见说明书），盖上管盖并斡旋震荡 20 s 以上彻底混匀，瞬时离心收集管壁液体；

(3) 将离心管置于 56 °C 金属浴或水浴锅中 15 min，瞬时离心收集管盖和管壁液体；

(4) 加入 250 μ L 无水乙醇，涡旋振荡 20 s 彻底混匀，室温放置 5 min(如环境温度高于 25 °C，需将乙醇预冷后加入)，瞬时离心收集管壁液体；

(5) 将离心管中溶液和沉淀全部转移至吸附柱并置于新的 2 mL 收集管中，盖上管盖，10000 rpm 离心 1 min，弃废液，将吸附柱放回收集管中；

(6) 向吸附柱中加入 500 μ L 缓冲液 GD，8000 rpm 离心 1 min 弃废液；

(7) 将 600 μ L 漂洗液 PW 加入吸附柱，室温静置 2 min 后 8000 rpm 离心 1 min，弃废液，重复洗涤 1 次；

(8) 加入 500 μ L 无水乙醇，8000 rpm 离心 1 min，弃废液，继续 12000 rpm 离心 3 min，于室温下开盖放置 5 min 使无水乙醇完全晾干；

(9) 将吸附膜置于新的 1.5 mL RNAase-Free 离心管中，向吸附膜中间悬空加入 60

μL RNAase-Free ddH₂O, 室温放置 5 min 后 12000 rpm 离心 1 min 洗脱核酸。

(10) PCR 鉴定: 分别使用 H1-TM-F/ H1-TM-R 和 H3-TM-F/ H3-TM-R 对重组杆状病毒 HA 基因进行 PCR 鉴定, 相关引物序列及 PCR 反应体系如下:

表 2-2 重组杆状病毒 HA 基因 PCR 鉴定引物

Table 2-2 PCR primers for the identification of recombinant baculovirus HA gene

引物名称	序列
H1-TM-F	ATGAAGGCAAAGCTCTTTGACTTT
H1-TM-R	TCAAATACATATCCTACATTGCAACG
H3-TM-F	ATGAAAACCATTTATCGCATTGTCATAT
H3-TM-R	TCAGATACAAATGTTACATCGAATATTG
H1-WT-F	ATGAAGGCAAAGCTCTTTGTA
H1-WT-R	TCAAATACATATCCTACATTGCA

表 2-3 重组杆状病毒 HA 基因鉴定 PCR 反应体系

Table 2-3 PCR reaction system for the identification of recombinant baculovirus HA gene

名称	体积
Primer Star Max	25 μL
H1-TM-F/ H3-TM-F/ H1-WT-F	1 μL
H1-TM-R/H3-TM-R/ H1-WT-R	1 μL
模板	1 μL
ddH ₂ O	22 μL

反应条件: 95 °C 1 min; 95 °C 15 S, 56 °C 20 S, 72 °C 15 S, 30 cycles; 72 °C 10 min, 16 °C Hold. PCR 完成后用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳分析, 预期阳性产物大小为 1700 bp 左右。切割目的位置条带并用 DNA 凝胶提取试剂盒纯化和回收, 送由北京擎科生物科技有限公司西安分公司测序。将重组杆状病毒做好标记于 4 °C 暂存, 用于下一步传代扩毒及表达。

2.2.2.5 重组杆状病毒的 WB 鉴定

(1) SDS-PAGE: 配置 5% 浓缩胶, 12% 分离胶; 样品上样体积 10 μL , 上样后调整电压 120 V, 恒压 2 h 至溴酚蓝完全跑出分离胶。

(2) 转膜

按顺序在转膜架内放置预先经转移缓冲液浸泡的海绵、Whatman 3# 滤纸、凝胶、硝酸纤维素 (PVDF) 膜、Whatman 3# 滤纸、海绵, 并清除每层之间气泡。将转膜架移至电泳槽, 向其中加满 1x 转膜缓冲液, 整个槽放入冰水混合物中, 架板固定后通电 (注意电极方向), 恒压 100 V, 转膜 90 min。

(3) 封闭: 取出转膜架, 弃去胶条, 用镊子转移 PVDF 膜至 20 mL 5% 脱脂奶粉

中，于 4 °C 冰箱封闭过夜。

(4) 洗膜：取出 PVDF 膜，用 1x TBST 洗涤 3-5 次，每次 5 min；

(5) 抗体孵育：按照 1: 5000 稀释 His 单抗 (10 mL TBST+2 μ L His 单抗，将 PVDF 膜抗体稀释液中于室温下孵育 90 min。

(6) 洗膜：取出 PVDF 膜，用 1 \times TBST 洗涤 3 次，每次 5 min；

(7) 将化学发光 A, B 液按照 1: 1 混合并 5 倍稀释，滴加在 PVDF 膜上，设置图片参数及捕获条件，拍照并保存。

2.2.3 重组杆状病毒的病毒滴度测定

使用 BacPAK™ 杆状病毒快速滴度试剂盒 (Clontech) 对重组杆状病毒的病毒滴度进行测定。

(1) 铺板：将对数生长早期的 Sf9 细胞铺于 96 孔微滴定板，通过细胞计数和稀释 (图 2-2)，确定 Sf9 细胞铺板密度为 6.5×10^4 cells/孔，使用试剂盒配套的密封塑料袋将 96 孔板封好，于 27 °C 温箱中孵育 1 h；

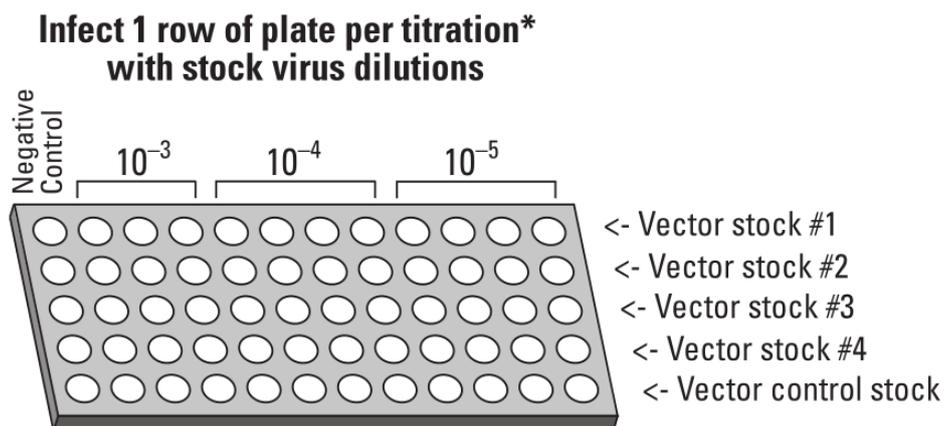


图 2-2. 重组杆状病毒的病毒滴度测定示意图

Fig 2-2. Schematic diagram of viral titer determination of recombinant baculovirus

(2) 向 100 μ L 重组杆状病毒培养上清中加入 900 μ L IB905 完全培养基，连续倍比稀释至 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5} 稀释度，并混合均匀。以上稀释度适用于滴度在 5×10^5 到 1×10^8 IFU/mL 的病毒检测。

(3) 用排枪移液器从微量滴定板中轻柔的吸取培养基并废弃，注意移液器枪头不要触碰到底部，向滴定板孔内加入 25 μ L 病毒稀释液，每个浓度做 3 个重复，阴性对照孔加入 25 μ L IB905 培养基，轻轻敲击滴定板边缘，使病毒均匀分布，将 96 孔板置于密封塑料袋，于室温下孵育 1 h；

(4) 吸去 96 孔板中的病毒稀释液，向每孔加入 50 μ L 甲基纤维素，置于密封塑

料袋封好后于 27 °C 温箱中培养 42-46 h;

(5) 向每孔加入 150 μL 预冷的 80% 丙酮, 室温固定 10 min 后弃去固定液, 继续加入 200 μL PBST, 轻柔敲击晃动并废弃, 连续洗 3 次, 每次 5 min, 在开启风机的生物安全柜中放置 5 min 至 96 孔板完全干燥;

(6) 向孔内加入 50 μL 稀释的正常羊血清, 室温封闭 5 min 后弃掉板中液体;

(7) 向孔内加入 50 μL 稀释的鼠单克隆抗体 gp64, 37 °C 孵育 25 min 后弃掉板中液体, 向孔内加入 200 μL PBST 连续清洗两次, 每次 5 min;

(8) 向孔内加入 50 μL 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠二抗, 37 °C 孵育 25 min 后弃掉板中液体, 向孔内加入 200 μL PBST 连续清洗两次, 每次 5 min;

(9) 向孔内加入 50 μL 过氧化物酶底物显色剂, 25 °C 放置 3 h 观察蓝色斑点并计数, 根据斑点数和稀释浓度计算重组杆状病毒的滴度;

(10) 结果判定: 使用光学显微镜对蓝色斑点进行计数, 三个复孔取平均值, 数值在 5-25 为可信, 将平均斑点数乘以相应的稀释因子和 40 (稀释倍数), 即为每毫升感染单位(IFU/mL)中的病毒滴度。

$$\text{病毒滴度 (IFU/mL)} = \text{平均斑点数 (foci)} \times (\text{稀释倍数})^{-1} \times 40 (\text{稀释因子})$$

2.2.4 重组杆状病毒的 HA 滴度检测

血凝试验按中华人民共和国国家标准 GB/T-27536-2011 进行。主要步骤如下:

(1) 准备干净的 96 孔 V 型微量反应板, 用移液器向 1-12 孔加入 50 μL PBS;

(2) 用干净枪头吸取 50 μL Sf9 细胞扩毒的不同代次重组杆状病毒细胞混悬液, 加入微量反应板的第 1 孔, 反复吹打 6-8 次混匀;

(3) 用排枪移液器自第 1 孔吸取 50 μL 病毒液加入第 2 孔, 反复吹打 6-8 次混匀后继续吸取 50 μL 加入第 3 孔, 如此倍比稀释至第 11 孔, 自第 11 孔吸取 50 μL 液体弃去, 第 12 孔作为红细胞对照;

(4) 向微量反应板所有孔均加入 50 μL 体积分数为 0.5% 的鸡红细胞悬液, 在混合器上震荡混匀, 于 25 °C 温箱静置 15-30 min 后观察结果, 当对照孔红细胞呈较明显的纽扣状时判定结果。

(5) 结果判读: 将反应板呈 45° 倾斜, 与第 12 孔红细胞组做参照, 观察红细胞状态, 如没呈泪滴状流淌, 则判为 HA 阴性, 如没有呈泪滴状流淌, 则判为 HA 阳性。完全凝集 (红细胞不流淌) 的病毒最高稀释倍数为病毒的 HA 效价 (以 HAU 血凝单位)。

2.3 实验结果

2.3.1 Sf9 细胞系外源毒及支原体检测结果

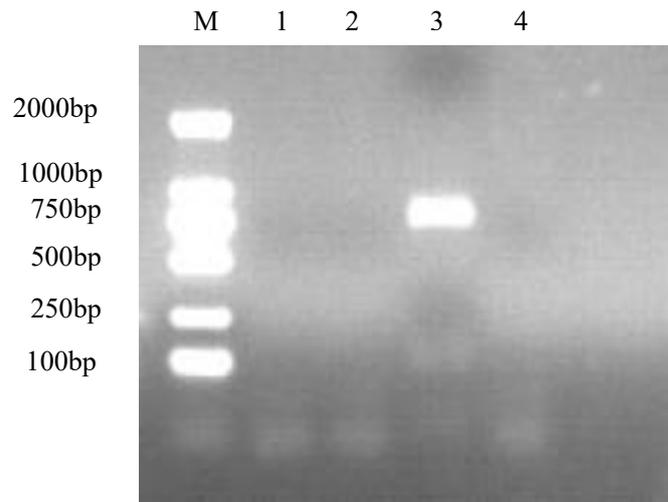


图 2-3 Sf9 细胞弹状病毒基因片段扩增

Fig. 2-3 Amplification of Rhabdoviruses gene fragment

1. DL2000 Marker (M) ; 1, Sf9-P3; 2, Sf9-P5; 3. 阳性对照; 4. 阴性对照

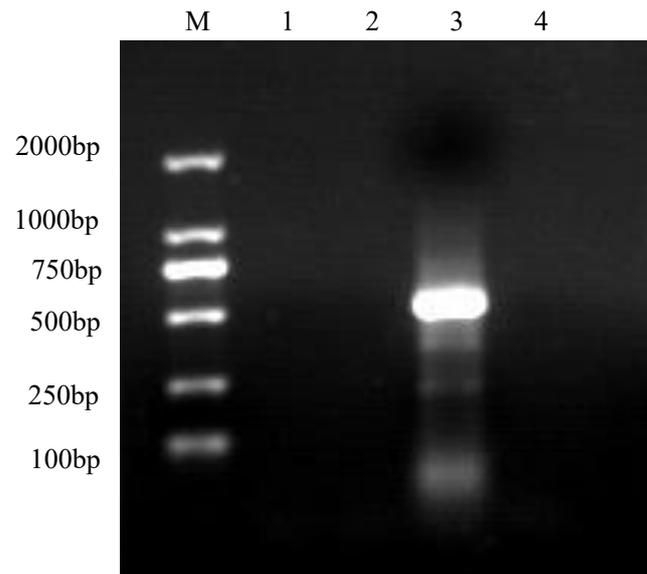


图 2-4 Sf9 细胞支原体污染检测

Fig. 2-4 Detection of mycoplasma cytoplasm contamination in Sf9 cell

M : DL2000 Marker; 1, Sf9-P3 代; 2, Sf9-P5 代; 3. 阳性对照; 4. 阴性对照

如图所示，使用弹状病毒检测引物 RV-F/RV-R 对 Sf9 细胞第 3 代、第 5 代细胞悬液进行检测，结果显示，目标位置未检出阳性条带，而阳性对照在 730 bp 位置出现明显条带，阴性对照无条带（图 2-3），以上结果证明 Sf9 细胞系无外源弹状病毒污染。使用支原体检测引物 MS-F/MS-R 对 Sf9 细胞第 3 代、第 5 代细胞悬液进行检测，结果显示，预期位置未检出阳性条带，而阳性对照在 500 bp 位置出现明显条带，阴性对照无条带（图 2-4），以上结果证明 Sf9 细胞系无支原体污染。

2.3.2 重组杆状病毒的构建

按照 2.2.2.2 方法进行包毒，同时设置 GFP 阳性对照，每天观察包毒出毒状态，根据是否有荧光以及荧光斑点数量初步判定包毒是否成功。如下图所示：

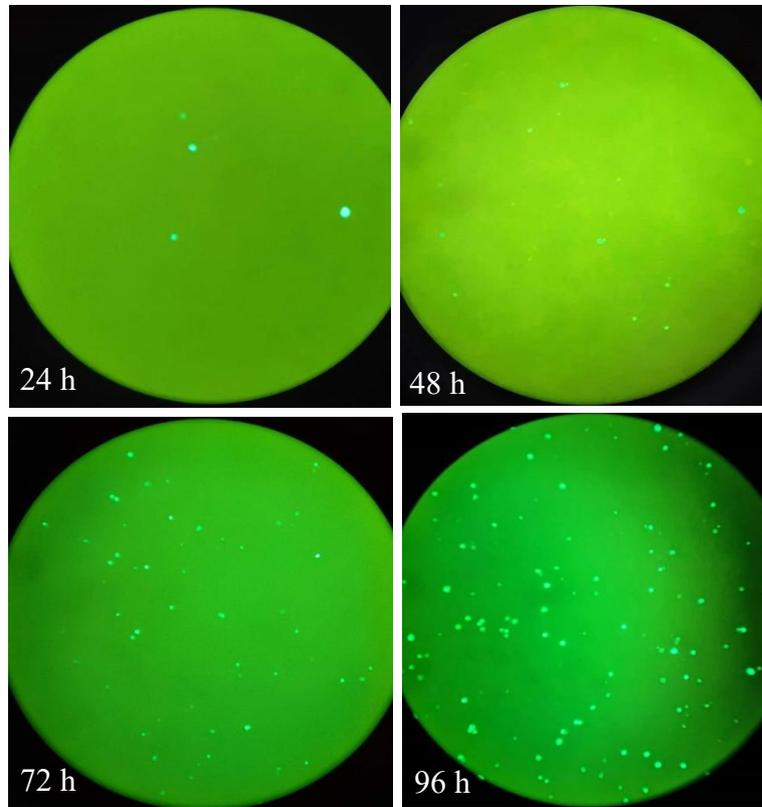


图 2-5 重组杆状病毒包毒荧光示意图

Fig. 2-5 Fluorescence diagram of recombinant baculovirus

结果显示，对照组荧光自 24 h 起出现荧光，至 96 h 荧光斑点铺满整个视野，表明本次包毒转染成功（图 2-5）。收集 120 h 的病毒和细胞混悬液，记为 P0 代毒，取 250 μL 接毒 T25 方瓶 Sf9 细胞，进行 P1 代次传毒。

2.3.3 重组杆状病毒的 PCR 鉴定

PCR 鉴定结果显示，重组杆状病毒 rBac-SIV-H1-HA-WT，rBac-SIV-H1-HA-TM，rBac-SIV-H3-HA-TM 的不同样品均在预期位置 1700 bp 位置左右出现特异性目的条带（图 2-6），测序结果显示，与预期构建序列完全一致。证明，HA 基因成功插入杆状病毒基因组，重组杆状病毒构建成功。

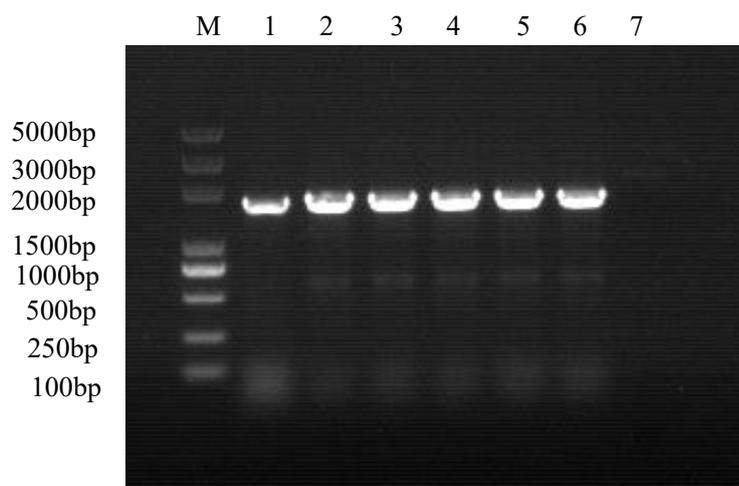


图 2-6 重组杆状病毒中 HA 基因的 PCR 鉴定

Fig. 2-6 PCR identification of HA gene in recombinant baculovirus

M: DL5000 Marker; 1-2, rBac-SIV-H1-HA-WT; 3-4, rBac-SIV-H1-HA-TM;
5-6, rBac-SIV-H3-HA-TM; 7, 阴性对照

2.3.4 重组杆状病毒的 WB 鉴定

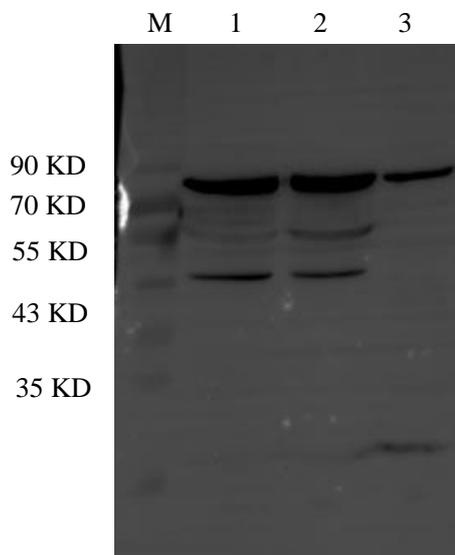


图 2-7 重组杆状病毒 HA 蛋白表达的 WB 鉴定

Fig. 2-7 WB identification of HA protein expression in recombinant baculovirus

M: Marker; 1, rBac-SIV-H1-HA-WT(P3代); 2, rBac-SIV-H1-HA-TM(P3代);
3, rBac-SIV-H3-HA-TM(P3代)

取重组杆状病毒rBac-SIV-H1-HA-TM, rBac-SIV-H3-HA-TM的P2代, P3代细胞混悬样品制样进行WB鉴定, 结果显示, 不同代次重组杆状病毒样品在预期位置均出现特异性的条带(图2-7), 重组杆状病毒中HA蛋白在Sf9细胞中可正常表达。

2.3.5 重组杆状病毒病毒滴度的测定

按照杆状病毒快速滴度试剂盒(BacPAK™ Rapid Titer Kit, Clontech)方法对P2,P3代次重组杆状病毒rBac-SIV-H1-HA-WT, rBac-SIV-H1-HA-TM, rBac-SIV-H3-HA-TM 的病毒滴度进行测定。经过氧化物酶底物显色剂显色后于光学显微镜下对蓝色斑点进行计数(图2-8), 计三个复孔取平均值, 根据斑点数和稀释浓度计算重组杆状病毒的滴度。

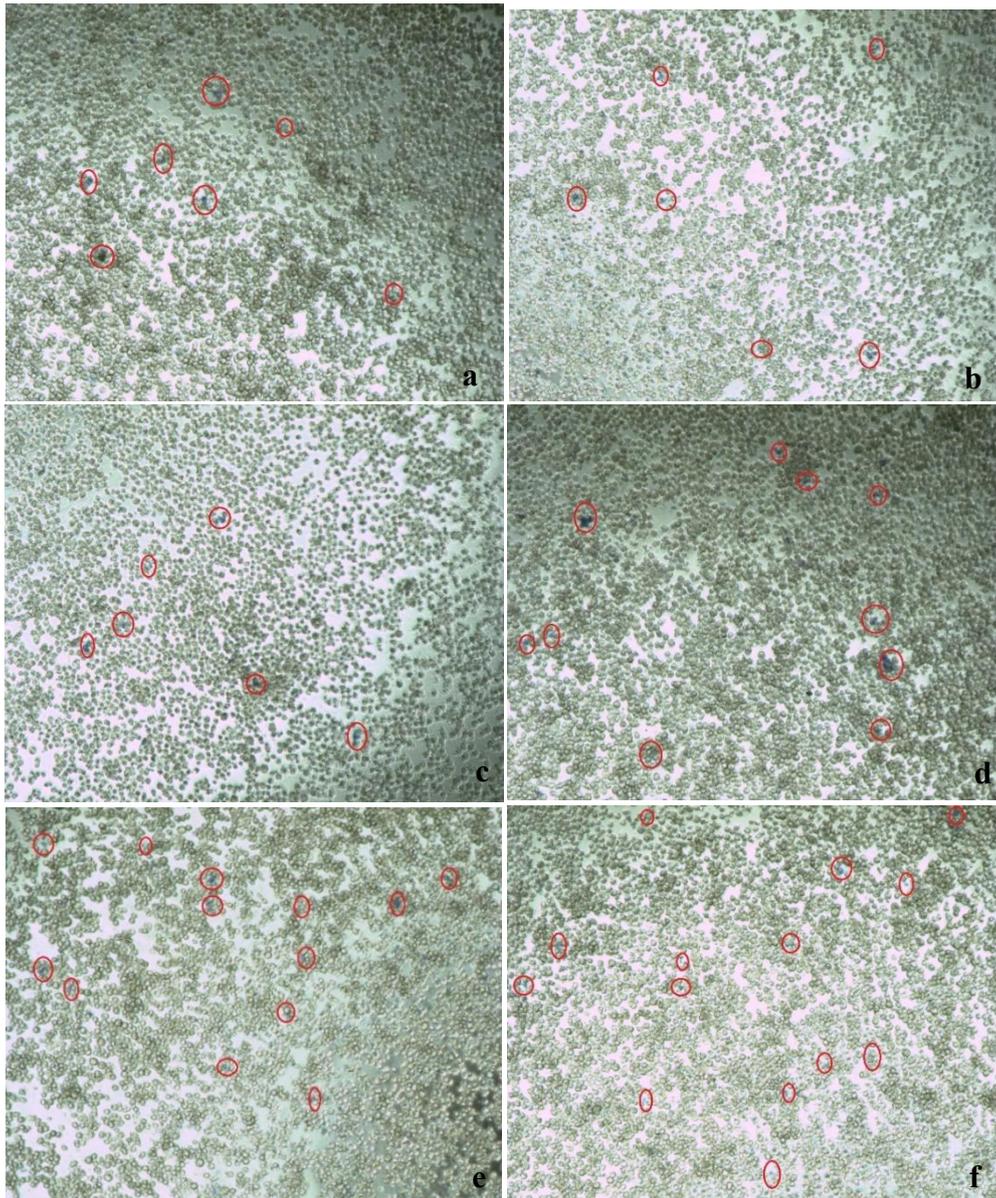


图 2-8 光学显微镜下不同代次重组杆状病毒显示的蓝色斑点计数

Fig 2-8 Blue spot counts shown by different generations of recombinant baculovirus
 a, rBac-SIV-H1-HA-WT (P2); b, rBac-SIV-H1-HA-TM (P2); c, rBac-SIV-H3-HA-TM (P2);
 d, rBac-SIV-H1-HA-WT; e, rBac-SIV-H1-HA-TM; f, rBac-SIV-H3-HA-TM

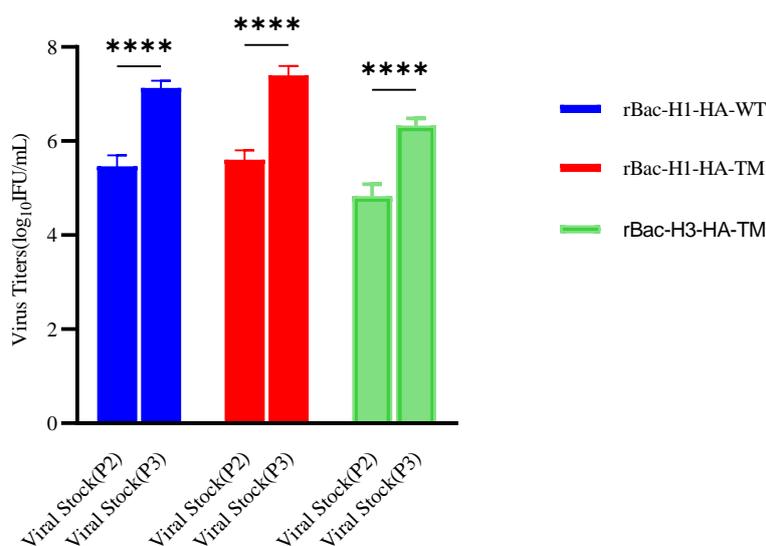


图 2-9 不同代次重组杆状病毒病毒滴度结果

Fig 2-9 Results of recombinant baculovirus virus titers of different generations

结果显示,重组杆状病毒 rBac-SIV-H1-HA-WT, rBac-SIV-H1-HA-TM, rBac-SIV-H3-HA-TM 的 P2 代次病毒滴度分别为 5.4×10^6 IFU/mL, 5.6×10^6 IFU/mL, 4.8×10^6 IFU/mL; P3 代次病毒滴度分别为 7.1×10^7 IFU/mL, 7.4×10^7 IFU/mL, 6.3×10^7 IFU/mL, 相同病毒不同代次间病毒滴度差异极显著(图 2-9), 满足的 High Five (Hi5) 细胞表达实验需要, 可用于下一步表达研究。

2.3.6 重组杆状病毒的血凝滴度检测

按中华人民共和国国家标准 GB/T-27536-2011 中血凝试验方法对重组杆状病毒 rBac-SIV-H1-HA-WT, rBac-SIV-H1-HA-TM, rBac-SIV-H3-HA-TM 的不同代次病毒血凝活性进行检测, 实验结果如下:

由图 2-10 可知, 不同代次重组杆状病毒均具有血凝活性, 且随着包毒传代次数的增加, 血凝活性滴度也随之增加。P2 代次 rBac-SIV-H1-HA-WT, rBac-SIV-H1-HA-TM, rBac-SIV-H3-HA-TM 血凝活性滴度均为 2^5 ; P3 代次 rBac-SIV-H1-HA-WT 血凝活性滴度为 2^7 , rBac-SIV-H1-HA-TM 血凝活性滴度为 2^8 , rBac-SIV-H3-HA-TM 血凝活性滴度为 2^7 ; P4 代次 rBac-SIV-H1-HA-WT 血凝活性滴度为 2^8 , rBac-SIV-H1-HA-TM, rBac-SIV-H3-HA-TM 血凝活性滴度均达到 2^{11} 以上。以上结果说明, 重组杆状病毒在 Sf9 细胞中增殖效果较好, 不同代次血凝活性滴度随病毒增殖而提高, 跨膜区的替换不影响重组杆状病毒的血凝活性, P3、P4 代次重组杆状病毒可用于进一步的表达纯化研究。

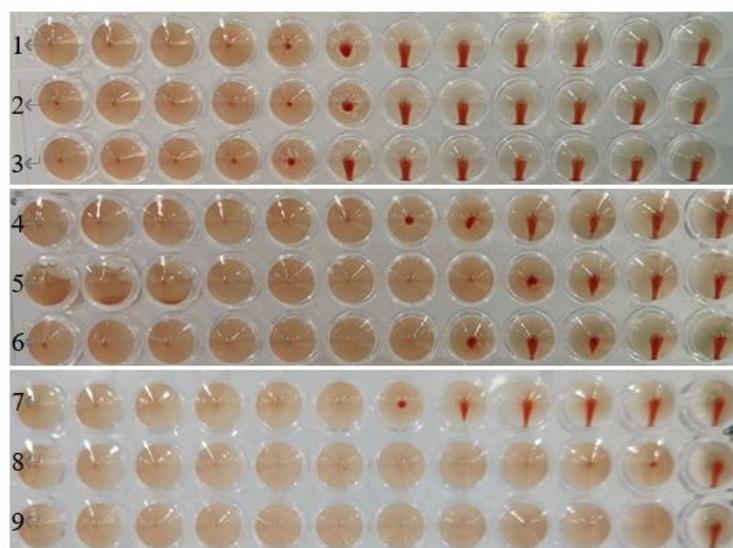


图 2-10 不同代次重组杆状病毒血凝滴度

Fig 2-10 Hemagglutination titers of recombinant baculovirus of different generations

- 1, rBac-SIV-H1-HA-WT(P2), 2, rBac-SIV-H1-HA-TM(P2), 3, rBac-SIV-H3-HA-TM(P2),
 4, rBac-SIV-H1-HA-WT(P3), 5, rBac-SIV-H1-HA-TM(P3), 6, rBac-SIV-H3-HA-TM(P3),
 7, rBac-SIV-H1-HA-WT(P4), 8, rBac-SIV-H1-HA-TM(P4), 9, rBac-SIV-H3-HA-TM(P4)

2.4 讨论

杆状病毒表达系统具有可插入多个外源基因、翻译后修饰、表达量大、安全等优势，被广泛用于重组蛋白的生产(Hernandez et al. 2016; Zahmati et al. 2021)。杆状病毒-昆虫细胞表达系统(IBEVs)在蛋白表达、疫苗开发、药物筛选、基因治疗等领域已应用多年(荣芮 et al. 2019)，现阶段已有 10 种基于 IBEVs 的产品已获批准，包括 5 种人用疫苗和 5 种兽用疫苗。杆状病毒系统的商业化应用最早在兽用疫苗领域，如用于预防猪瘟疫病毒的 Porcilis® Pesti (默沙东, MSD)，BAYOVAC CSF E2® (拜尔, Bayer)，以及用于预防猪圆环病毒的 Cirumvent® PCV (默克, Merck)、CircoFLEX® (勃林格, Boehringer)、Porcilis® PCV (默沙东, MSD)。在人用疫苗领域，美国食品和药物管理局(FDA) 2022 年 10 月 19 日，FDA 批准 Novavax 基于杆状病毒表达平台制备的新冠疫苗接种剂 NVX-CoV2373 加强针获得用于 18 岁以上成年人的紧急使用授权(Dunkle et al. 2022; Toback et al. 2022)；2013 年 1 月，Protein Sciences 的基于 IBEVs 和重组 DNA 技术开发的三价流感疫苗 Flublok® 获得 FDA 批准用于 18-49 岁人群季节性流感的预防。2009 年由葛兰素史克(GSK)开发的人乳头瘤状病毒(HPV)疫苗 Cervarix 获批上市，这是第一个利用 IBEVs 生产上市的人用疫苗，临床试验显示该疫苗可对 HPV 16、18 型的感染提供完全保护；此外，也有不少基于 BEVs 系统开发的疫苗处于临床试验阶段，用于预防流感、寨卡病毒及糖尿病等。在基因治疗和药物筛选等新兴领域，IBEVs

也逐渐显示出其独特优势：世界首款基因治疗药物 Glybera 也是基于 BEVS 生产。

目前，使用 IBEV_s 生产猪流感疫苗的报道非常有限(Hernandez et al. 2016; Zahmati et al. 2021)。相关研究表明，IBEVS 表达的猪流感疫苗具有较好的免疫原性及保护效果，可作为大流行期间的候选疫苗。

Sf9 为杆状病毒表达系统常用细胞株之一，现阶段商品化 Sf9 细胞株均存在弹状病毒污染问题，影响细胞的进一步产业化。筛选无外源病毒污染的 Sf9 细胞对于重组杆状病毒的生成、表达及疫苗生产至关重要，本研究使用的 Sf9 细胞为本实验室筛选并保存的无弹状病毒、支原体污染的洁净 Sf9 昆虫细胞系，经由中国食品药品检定研究院检定合格，同时建立了主细胞库，工作细胞库，可用于未来疫苗的报批和生产。

与同属于 A 型流感病毒的其它所有十七种亚型流感病毒 HA 蛋白的跨膜区 (Transmembrane domain, TM) 相比较，H3 亚型流感病毒 HA 蛋白的跨膜区具有独特的结构，能形成分子间二硫键，从而使 HA 蛋白具有高稳定性以及亚型间的交叉免疫力(Liu et al. 2014; Wang et al. 2017; Zhang et al. 2017; Zhou et al. 2014)。研究显示，将 H3 亚型 HA 跨膜区替换到其他亚型流感病毒如 H1、H5 和 H9 亚型 HA 蛋白上，增加了 HA 蛋白的稳定性。然后用改造过的 HA 蛋白免疫小鼠，用致死剂量的不同亚型病毒攻击小鼠，这些不同亚型的 HA 蛋白也获得了针对不同亚型流感病毒的交叉免疫力。在本研究中，我们利用 H3-HA_{TM} 结构域置换的方法获得了重组 H1N1 株(H1-HA-TM) 杆状病毒。与未置换跨膜结构域的野毒 H1-HA-WT 相比，TM 结构域的替换不影响重组杆状病毒的产生，且表现出更高的血凝活性滴度和病毒滴度，这与之前的报道(Wang et al. 2017)一致。

2.5 小结

(1) 根据 GISAID 中公布的 SIV 流行毒株序列，筛选 H1N1 和 H3N2 的 HA 序列，对 H1N1 HA 基因的跨膜区进行改造，构建合成真核表达质粒。

(2) 将真核表达载体质粒转染 Sf9 昆虫细胞系，经包毒传代及 PCR、WB 检测分别对重组杆状病毒 rBac-SIV-H1-HA-WT, rBac-SIV-H1-HA-TM, rBac-SIV-H3-HA-TM 的生成及蛋白表达情况进行鉴定。

(3) 对不同代次重组杆状病毒 rBac-SIV-H1-HA-TM, rBac-SIV-H3-HA-TM 的病毒滴度、血凝性表达特性进行分析，筛选病毒滴度较高的 P4 代次及血凝活性 $>2^{11}$ 的重组杆状病毒用于表达和纯化研究。

第三章 重组杆状病毒表达 H1 和 H3 亚型 SIV HA 蛋白及其纯化和鉴定

亚单位疫苗通过体外蛋白纯化获得抗原, 不含遗传物质, 具有更高的安全性。纳米颗粒疫苗被认为是极具潜力的疫苗研发平台, 近年来在新冠、乙肝、流感、艾滋病及肿瘤等传染病和重大疾病的预防和治疗中展现出了广阔的应用前景(He et al. 2019; Hong et al. 2020; Kanekiyo et al. 2013; Karch et al. 2018; Sun et al. 2021; Wang et al. 2020; Yan et al. 2020)。常见的天然生物纳米粒子主要有脂质体蛋白、热休克蛋白、铁蛋白和数以万计的病毒等。

本研究中, 我们利用昆虫细胞-杆状病毒系统表达并生成了 SIV H1 和 H3 亚型二价纳米颗粒疫苗, 通过 Western-Blot (WB) 和血凝实验 (HA) 对重组纳米颗粒蛋白特性进行鉴定, 通过 SDS-PAGE 分析纳米颗粒蛋白纯度, 通过动态光散射 (DLS) 和透射电镜 (TEM) 技术分别对纳米颗粒粒径和形态进行表征, 对纳米颗粒蛋白定量分析并配置 H1 和 H3 亚型二价纳米颗粒疫苗用于 Balb/C 小鼠和仔猪免疫研究。

3.1 材料

3.1.1 细胞

洁净 High five (Hi 5) 昆虫细胞由本实验室保存。

3.1.2 主要试剂

昆虫细胞培养液 (IB905, 苏州沃美生物科技有限公司); 不同规格细胞板 (6 孔板, 96 孔板, 无锡耐思生命科技股份有限公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (P0012S, 碧云天生物); 台盼蓝细胞染色液 (PB180423, 武汉普诺赛生命科技股份有限公司); Tween-80 (T485985, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 磷钨酸水合物 (P431659, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 阴离子交换色谱柱填料 Q Focurose FF (HL06030600, 武汉汇研生物科技有限公司); 阳离子交换色谱柱填料 SP Focurose FF (HL06030100, 武汉汇研生物科技有限公司); 扁豆凝集素亲和层析 (Lentil Lectin Sepharose 4B, 思拓凡生物科技有限公司); 不同 pH 的 PBS、纯化缓冲液等现配现用。

3.1.3 设备及耗材

超净工作台 (SW-CJ-2FD, 苏州苏信环境科技有限公司); 超净工作台 (KLCZ-880A, 北京亚泰科隆); 医用离心机 (H1750, 湘仪集团); 大容量高速冷冻离心机 (GL-21M, 湘仪集团); 医用冷藏箱 (HYC-650, 海尔); 恒温振荡培养箱 (MQT-60, 上海旻泉设备有限公司); 激光纳米粒度仪 (Zetasizer Nano ZS, 英国马尔文仪器有限公司 Malvern

Instruments Ltd)；生物安全柜 (HR40-IIA2(KY), 海尔医用低温科技有公司)；蛋白纯化仪 (SDL-100, 苏州赛谱仪器有限公司)；自动化细胞计数系统 (IC1000, 上海睿钰生物)；倒置相差显微镜 (CKX31SF-1, 奥林巴斯)；电热恒温水浴箱 (DK-S26, 上海精宏)；脱色摇床 (TS-2000A, 其林贝尔)；智能恒温数显定时磁力搅拌器 (GL-6250A, 其林贝尔)；凝胶成像系统 (JY04S-3C, 君仪)；10 μ L/20 μ L/200 μ L/1mL/排枪等不同量程移液器均购自艾本德仪器；枪头、离心管等耗材购自无锡耐思生命科技股份有限公司，高压灭菌后使用。

3.2 方法

3.2.1 重组杆状病毒 HA 蛋白的表达

3.2.1.1 Hi5 洁净细胞系的检验

(1) 细胞复苏：从液氮中取出冻存 Hi5 细胞，用镊子夹持在 37 $^{\circ}$ C 水浴中快速晃动直至冻存管内冰块完全融化，将细胞加入到 5mL 新鲜 IB905 培养基中，800 rpm 离心 5 min，弃上清，加入 6mL 新鲜培养基重悬，转移至 T25 细胞培养瓶，于 27 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养过夜。

(2) 细胞传代：取复苏培养 3-4 天的细胞培养瓶，移除瓶中多余培养基，加入 5mL 新鲜培养基，轻轻吹打瓶底细胞，将细胞悬液转移至新的培养瓶中，按 1:3 比例进行传代，27 $^{\circ}$ C 恒温培养箱贴壁培养。

(3) 外源病毒的检验

① 引物设计：对 Hi5 细胞进行诺达病毒检测，根据诺达病毒 (Nodavirus, NV) 序列，设计引物如下：上游引物 NV-F: ACATCCAGATCCGATCAAGT，下游引物 NV-R: GCCAGGAATGTTGCTTGCAA。

② NV 病毒基因组提取：随机收集第 3 代次、第 4 代次 (P4)、第 5 代次 (P5) 培养 48 h 左右的 Hi5 细胞悬液，使用 RNA 提取试剂盒提取全基因组；

③ 反转录：以 RNA 为模板，用一步合成法试剂盒反转录合成 cDNA。体系见下表：

表 3-1 诺达病毒检测反转录体系

Table 3-1 Reverse transcription system for Nodavirus detection

成分 Components	体积 Volume
Primer (random primer)	1 μ L
2*ES Reaction Mix	10 μ L
E Mix	1 μ L
DNA Remover	1 μ L
RNA Template	3 μ L
RNase-free Water	4 μ L
Total	20 μ L

PCR 的反应条件：42 °C 孵育 30 min，85 °C 加热 5 s 灭活 g DNA Remover。

④ PCR: 将反转录产物按 10 倍稀释后作为模板, 按照如下体系配置 PCR 反应液:

表 3-2 诺达病毒 PCR 检测体系

Table 3-2 Nodavirus PCR detection system

成分 Components	体积 Volume
2*primer star Max	10 μ L
NV-F	1 μ L
NV-R	1 μ L
cDNA	1 μ L
RNase-free Water	7 μ L
Total	20 μ L

充分涡旋混匀并简短离心后上机实验, PCR 反应程序为: 预变性 95 °C 1 min; 95 °C 15 s, 55 °C 20 s, 72 °C 60 s, 35 cycles; 72 °C 10 min; 16 °C hold。PCR 结束后扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳分析, 电压设置 120 V, 时间 30 min。预期阳性产物大小为 690 bp 左右, 如果 PCR 产物大小分布符合以上结果, 则判定 Hi5 细胞诺达病毒检测阳性。

(4) 支原体的检验

参照 2.2.2.1 中方法进行。

3.2.1.2 重组杆状病毒 HA 蛋白的表达

(1) 将悬浮培养 Hi5 细胞从恒温摇床中取出, 于超净工作台中用台盼蓝染色, 通过细胞计数板计数, 如细胞活率 $\geq 95\%$, 大小均一, 细胞密度不超过 1.0×10^7 cell/mL, 则为用于表达的较理想状态。

(2) 通过加入新鲜 IB905 培养基稀释, 调整 Hi5 细胞密度为 2.5×10^6 cell/mL, 将细胞悬液置于合适规格的细胞摇瓶内。根据重组杆状病毒病毒滴度, 接毒量通常在 1-5 MOI, 将接毒后的细胞摇瓶置于 27 °C 110 rpm 恒温摇床继续培养 96 h 左右。

(3) 血凝性检测: 1% 鸡红细胞分析血凝性。

(4) 取细胞 1 mL 离心, 用等体积 PBS 重悬细胞泥, 制样进行 SDS-PAGE 检测, 初步观察蛋白表达情况。

3.2.2 纳米颗粒蛋白的纯化

3.2.2.1 样品澄清

按上述表达方法扩大体积对重组杆状病毒 rBac-SIV-H1-HA-TM, rBac-SIV-H3-HA-TM 进行表达, 总表达体积分别 1 L, 感染 96 h 后 12000 rpm 离心 40 min 收集重组杆状病毒的发酵产物细胞泥 (上清保留备用)。

3.2.2.2 细胞裂解

(1) 细胞裂解液: 25 mM Tris, 65 mM NaCl, 1% Triton X-100, pH 7.4, 2 μ g/mL

亮肽素:

(2) 细胞裂解: 对细胞菌泥称重, 按 1 g 菌泥/10 mL 裂解缓冲液对菌泥重悬, 4 °C 电磁搅拌器搅拌 2 h, 然后 4 °C 10000 rpm 离心 40 min, 上清液过 0.45 μm 滤膜备用。

3.2.2.3 阴离子柱 (Q 柱) 纯化

按照如下程序进行:

(1) 缓冲液配置:

平衡液 A: 25 mM Tris, 70 mM NaCl, 0.02 % Triton X-100, pH 7.4;

洗杂液: 25 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.02 % Triton X-100, pH 8.0;

洗脱液 B: 25 mM Tris, 1 M NaCl, 0.02 % Triton X-100, pH 8.0;

层析柱再生缓冲液: 0.5 M NaOH, 1 M NaCl。

(2) 柱平衡: 将 5 倍柱体积平衡缓冲液 A 以 1-2 mL/min 流速平衡 Q 柱;

(3) 上样: 将 3 倍柱体积的样品以 1-2 mL/min 流速加载 Q 柱, 收集流穿液, 上样完成后用平衡液 A 继续平衡;

(4) 洗杂: 根据离子柱体积, 设置 AB 泵流速, 用 2 倍柱体积的 15 % B 进行洗杂;

(5) 洗脱: 用 3 倍柱体积的洗脱液 B 以 3 mL/min 流速洗脱 Q 柱, 收集洗脱峰。

(6) 用再生缓冲液清洗层析柱并保存。

3.2.2.4 扁豆凝集素亲和纯化

扁豆凝集素亲和树脂, 高盐洗脱, buffer 中含有 0.5 % PS80, 换液洗脱。

(1) 缓冲液配置:

平衡液 A1: 25 mM Tris, 10 mM NaCl, 0.05 % PS80, pH 7.4;

平衡液 A2: 25 mM Tris, 500 mM NaCl, 0.5% PS80, pH 7.4;

洗脱液 B: 25 mM Tris, 10 mM NaCl, 0.05 % PS80, 500 mM 甲基- α -D-甘露糖苷 (Methyl- α -D-Mannopy-ronoside) pH 7.4;

亲和柱再生缓冲液: 0.5 M NaCl (pH 8.5), 0.5 M NaCl (pH 5.5)。

(2) 柱平衡: 将 3 倍柱体积平衡液 A1 以 2 mL/min 流速对扁豆凝集素亲和柱进行平衡;

(3) 上样: 将样品以 1 mL/min 流速加载亲和柱, 收集流穿液, 上样完成后平衡液 A2 继续上样平衡 3 个柱体积, 收集流穿峰;

(4) 平衡: 平衡液 A1 继续平衡 6 倍柱体积, 收集流穿液;

(5) 洗脱: 用 3 倍柱体积的洗脱液 B 以 2 mL/min 流速洗脱亲和柱, 收集洗脱峰;

(6) 亲和柱再生及保存: 用两种不同 pH 再生缓冲液交替冲洗 3-5 个柱体积后保存于 20 % 乙醇 (含 1 mM MnCl₂, 1 mM CaCl₂ 和 150 mM NaCl) 中于 4 °C 储存。

3.2.2.5 阳离子柱 (SP) 纯化

根据亲和纯化洗脱后蛋白样品的浓度及纯度决定是否进行 SP 柱纯化。

(1) 缓冲液配置:

平衡液 A: 25 mM Tris, 10 mM NaCl, 0.05 %PS80, pH 6.0;

洗脱液 B: 25 mM Tris, 500 mM NaCl, 0.05 %PS80, pH 7.5;

层析柱再生缓冲液: 0.5 M NaOH, 1 M NaCl。

(2) 柱平衡: 将 3 倍柱体积平衡液 A 以 2 mL/min 流速对 SP 柱进行平衡;

(3) 上样: 将样品以 1 mL/min 流速加载 SP 柱, 收集流穿液, 上样完成后平衡液 A 继续平衡 3 个柱体积, 收集流穿峰;

(4) 用 3 倍柱体积的洗脱液 B 以 2 mL/min 流速洗脱, 收集洗脱峰;

(5) 用再生缓冲液清洗柱子并保存。

3.2.2.6 纯化样品的 SDS-PAGE 分析

(1) 配胶及制样: 配置 5 % 浓缩胶, 12 % 分离胶; 收集不同纯化样品的柱前、流穿、洗杂、洗脱样品, 取 80 μ L 样品加入 20 μ L 5 \times Loading Buffer, 混匀并离心, 于 100 $^{\circ}$ C 水浴中煮沸 10 min 使蛋白变性。

(2) SDS-PAGE 分析: 已变性处理的纯化产物进行 SDS-PAGE 分析, 每个加样孔点样 20 μ L, 于 130 V 电泳 100 min 至溴酚蓝完全跑出胶板停止, 电泳结束后用考马斯亮蓝染色 20 min, 加热脱色 4-5 次, 每次煮沸 3 min 直至能看到清晰条带, 凝胶成像系统拍照保存。

(3) 用灰度扫描对纯化后纳米颗粒蛋白纯度进行分析。

3.2.2.7 蛋白定量分析

(1) 配制 BCA 工作液: 将试剂盒试剂 A、B 按 50:1 (体积比) 混合, 配置 BCA 工作液 (混合时会有沉淀, 混匀后沉淀消失, 混合后应为澄清淡蓝色溶液)。

(2) 标准品配制: 室温条件下解冻蛋白标准品, 用 PBS 溶液将 20 μ L 5 mg/mL BSA 蛋白标准溶液稀释至 100 μ L, 至终浓度 1 mg/mL。

(3) 按下表配制 BSA 标准测定溶液

表 3-3 BSA 标准溶液配制表

Table 3-3 BSA standard solution preparation table

编号	0	1	2	3	4	5	6	7	8
PBS 溶液 μ L	20	19.5	17.5	15	10	5	0	14	12
BSA 标准溶液	0	0.5	2.5	5.0	10	15	20	6	8
BSA 终浓度	0	25	125	250	500	750	1000	1500	2000
总体积	20 μ L								

(4) 加样: 将适当体积的待测样品加入到微孔板中, 并用 PBS 补足到 20 μ L; 向微孔板中加入 200 μ L BCA 工作液, 混匀, 37 $^{\circ}$ C 放置 30 min; 测定 562 nm 处的吸光

值，并记录数据，以不含 BSA 的样品的光吸收值作为空白对照；

(5) 上机及测量：

- ①打开软件 SpectrophotometerV 20，打开微量分光光度计，点击 BCA 测定；
- ②使用纯水对微量分光光度计的点样孔进行清洗，加入空白对照组后，再依次对标准品进行检测，形成数据曲线后，对待测样品进行蛋白测定；
- ③测定结束后保存数据并对微量分光光度计的点样孔进行清洗；
- ④关闭软件，关闭微量分光光度计。

3.2.3 纳米颗粒的生成

洗涤剂核心纳米颗粒由围绕非离子型洗涤剂 PS80 核心的多个 HA 蛋白三聚体组成 (Smith et al. 2017)，纳米颗粒形成示意图见图 3-16。本研究中，使用 Triton X-100 作为第一洗涤剂从宿主细胞中萃取 HA 粗蛋白，使用 PS80 作为第二洗涤剂，配置缓冲液并用于纯化研究。在亲和纯化过程中，HA 蛋白的跨膜区与非离子型洗涤剂 (PS80) 核心通过疏水作用在扁豆亲和柱上缔合形成纳米颗粒，HA 蛋白的末端部分以三聚体形式嵌入 PS80 疏水内核中。

3.2.4 血凝 (HA) 实验

通过血凝实验对纯化后样品进行血凝活性分析。血凝试验按中华人民共和国国家标准 GB/T-27536-2011 进行。具体方法参照 2.2.2.7。

3.2.5 纳米颗粒蛋白的鉴定

3.2.5.1 动态光散射 (DLS)

按照如下步骤准备样品及进行纳米颗粒粒径检测：

- (1) 打开 Nano ZS 设备和计算机，预热 30 min，使激光稳定；
- (2) 打开 Zetasizer DTS(Nano)软件，选择测量类型“size”并建立 SOP 程序；
- (3) 检查样品池，确保样品窗未吸附气泡；设置测量温度 25 °C 保，每个样品测量 3 次，以保证实验的可重复性。
- (4) 稀释样品：用 PBS 对样品进行稀释，同时测量样品 Attn 值（衰减值），确保 Attn 值在 5-10 之间，以 7 为最好。
- (5) 准备样品：使用擦镜纸清洁样品池，确保清洁、干燥、无污染；将稀释后样品加入到 3.5 mL 透明比色皿中，体积约为 1/3，盖上盖子；
- (6) 启动 Zetasizer 软件测量，连续测量三次。
- (7) 测量结束后，退出软件，关闭仪器；打开已保存的测量文件，收集测量结果。

3.2.5.2 透射电镜观察 (TEM)

通过透射电镜(TEM)观察纳米颗粒形态。将纯化后的 rBac-H1-HA-TM，rBac-H3-HA-TM 样品稀释至 10 μg/mL，经染色、清洗、干燥后观察。具体方法如下：

纳米颗粒蛋白经磷钨酸负染色处理后于透射电镜下观察，具体方法如下：

- (1) 用尖头镊子从铜网盒中夹取铜网置于封吸水纸上，将铜网正面向上，吸取大约 10 μ L 纯化后的蛋白样品垂直滴于铜网上，室温下吸附约 15 min。
- (2) 用滤纸把铜网上面残留蛋白吸干，于阴凉干燥处继续风干 10 min。
- (3) 吸取 10 μ L 2 % 磷钨酸钠水溶液滴于铜网上负染约 20 min。
- (4) 负染时间到用滤纸吸干铜网上的溶液，于阴凉干燥处继续风干 10 min。
- (5) 将铜网置于 Tecnai G2 透射电镜下观察，调整合适视野并拍照保存。

3.3 结果

3.3.1 Hi5 细胞系外源毒及支原体检测结果

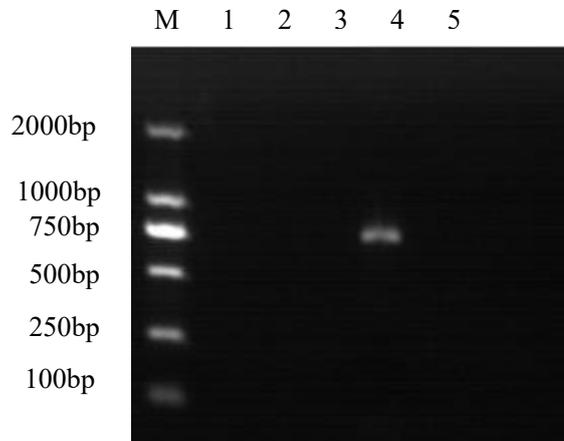


图 3-1 Hi5 细胞诺达病毒基因片段扩增

Fig. 3-1 Amplification of Nodavirus gene fragment

M: DL2000 Marker; 1, Hi5-P3; 2, Hi5-P4; 3, Hi5-P5; 4. 阳性对照; 5. 阴性对照

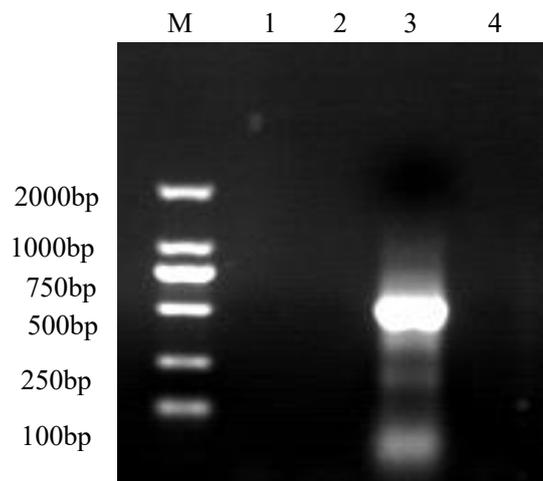


图 3-2 Hi 5 细胞支原体污染检测

Fig. 3-2 Detection of mycoplasma cytoplasm contamination in Sf9 cell

M: DL2000 Marker; 1, Hi5-P3 代; 2, Hi5-P5 代; 3. 阳性对照; 4. 阴性对照

如图所示，使用诺达病毒检测引物 NV-F/NV-R 对 Hi5 细胞第 3 代、第 4 代、第 5 代细胞悬液进行检测，结果显示，目标位置未检出阳性条带，而阳性对照在 690 bp 位置出现明显条带，阴性对照无条带，以上结果证明 Hi5 细胞系无外源诺达病毒污染（图 3-1）。使用支原体检测引物 MS-F/MS-R 对 Hi5 细胞第 3 代、第 4 代、第 5 代细胞悬液进行检测，结果显示，预期位置未检出阳性条带，而阳性对照在 500 bp 位置出现明显条带，阴性对照无条带，以上结果证明 Hi5 细胞系无支原体污染（图 3-2）。

3.3.2 重组杆状病毒 HA 蛋白的表达检测

用 SDS-PAGE 对重组杆状病毒 HA 蛋白在 Hi5 细胞中表达 96 h 的结果进行检测，同时分析细胞混悬液的血凝活性。结果如下：

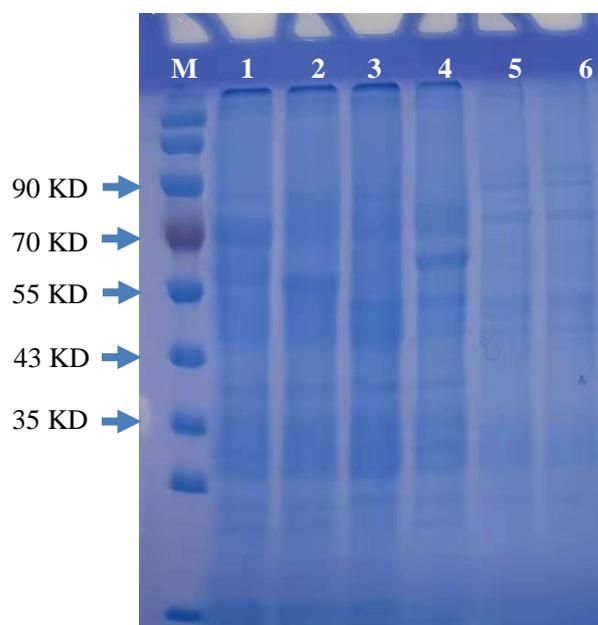


图 3-3 重组杆状病毒 Hi5 表达的 SDS-PAGE 检测

Fig 3-3 SDS-PAGE detection of recombinant baculovirus expression in Hi5

M:Marker; 1, rBac-H1-HA-TM 混悬液; 2, rBac-H3-HA-TM 混悬液; 3, rBac-H1-HA-TM 细胞沉淀; 4, rBac-H3-HA-TM 细胞沉淀; 5, rBac-H1-HA-TM 表达上清; 6, rBac-H3-HA-TM 表达上清

对病毒感染 Hi5 细胞 96 h 后收获细胞混悬液进行离心，取细胞混悬液、离心后细胞泥、离心上清进行 SDS-PAGE 和 HA 效价测定以初步观察表达效果。结果显示，重组杆状病毒 rBac-H1-HA-TM, rBac-H3-HA-TM 在预期 70 kd 左右有明显表达，主要存在于细胞泥中，上清中表达量较少，需进一步对细胞泥进行裂解、纯化以获取高纯度 HA 蛋白。对重组杆状病毒感染 Hi5 细胞后收获的细胞混悬液、细胞泥、离心上清血凝实验显示重组杆状病毒 rBac-H1-HA-TM, rBac-H3-HA-TM 具有较好的血凝活性，HA 活性滴度可达 2^{11} 以上（图 3-4）。以上结果说明，重组蛋白在 Hi5 昆虫细胞中能够良好表达且具有较高的 HA 活性。

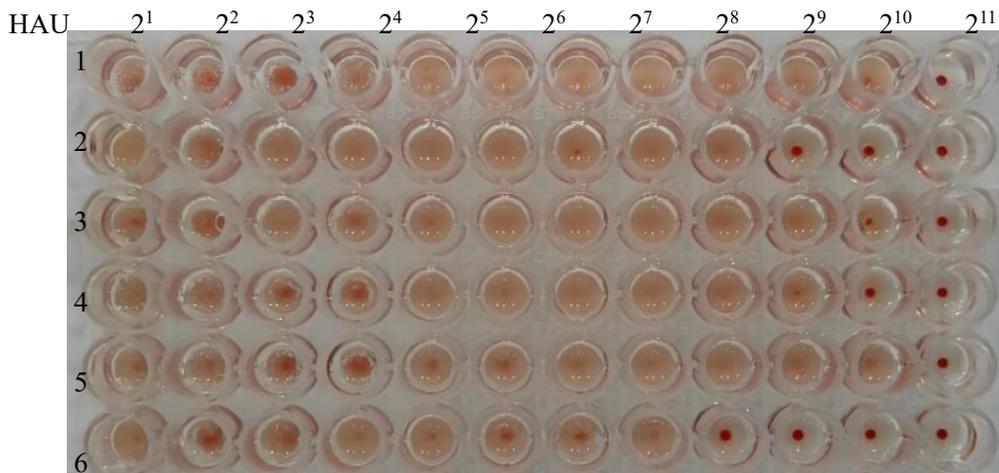


图 3-4 重组杆状病毒 Hi5 表达的血凝活性检测

Fig 3-4 Detection of hemagglutination activity of recombinant baculovirus expression in Hi5

1, rBac-H1-HA-TM 表达混悬液; 2, rBac-H1-HA-TM 细胞沉淀; 3, rBac-H1-HA-TM 表达上清
4, rBac-H3-HA-TM 表达混悬液; 5, rBac-H3-HA-TM 表达上清; 6, rBac-H3-HA-TM 细胞沉淀

3.3.3 HA 纳米颗粒蛋白的纯化及纯度分析

3.3.3.1 HA 纳米颗粒蛋白的纯化

用非离子洗涤剂 Triton X-100 从细胞膜中提取 HA, 通过离子交换层析 Q 柱、亲和层析 Lentil Lectin Sepharose 4B 柱、透析和纳滤纯化 HA。在 HA 蛋白亲和纯化的过程中, 进行了聚山梨酯 80 (PS80) 的洗涤剂交换, HA 三聚体蛋白跨膜区以疏水作用和 PS80 内核结合形成 HA-PS80 纳米颗粒复合物。

(1) Q 柱纯化

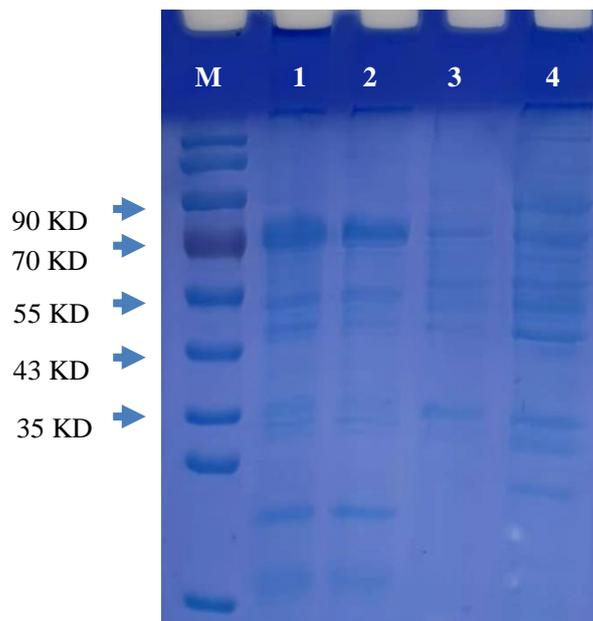


图 3-5 rBac-H1-HA-TM 的 Q 柱纯化

Fig. 3-5 Purification of rBac-H1-HA-TM by anion exchange column

M: Marker; 1, rBac-H1-HA-TM 裂解上清 (柱前); 2, rBac-H1-HA-TM Q 柱流穿液 1;
3, rBac-H1-HA-TM Q 柱流穿液 2; 4, rBac-H1-HA-TM Q 柱洗脱

收取 96 h 重组杆状病毒 Hi5 细胞表达后的细胞泥进行裂解，离心收取上清并用 Q 柱纯化，取柱前、流穿、洗脱进行 SDS-PAGE 检测分析（图 3-5，3-6）。

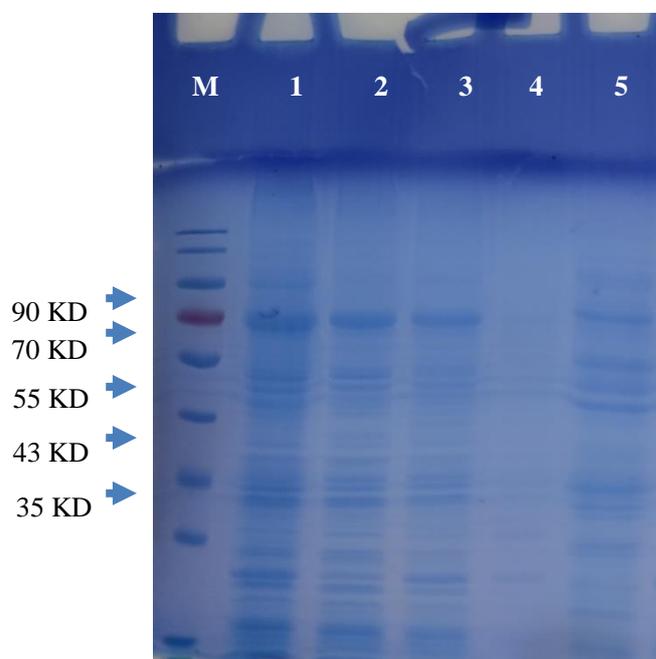


图 3-6 rBac-H3-HA-TM 的 Q 柱纯化

Fig. 3-6 Purification of rBac-H3-HA-TM by anion exchange column

M: Marker; 1, rBac-H3-HA-TM 裂解上清; 2, rBac-H3-HA-TM Q 柱流穿液 1; 3, rBac-H3-HA-TM Q 柱流穿液 2; 4, rBac-H3-HA-TM Q 柱流穿液 3; 5, rBac-H3-HA-TM Q 柱洗脱

重组杆状病毒 rBac-H1-HA-TM, rBac-H3-HA-TM Hi5 表达产物经裂解, HA 蛋白从细胞膜上被洗脱, 将裂解产物 12000 rpm 离心 40 min 后用 0.45 μm 滤膜过滤后进行 Q 柱上样纯化。结果显示, 表达的 HA 蛋白主要存在于 Q 柱流穿液中, 相对柱前, 一部分杂质被去除, 但单一 Q 柱纯化不能对 HA 蛋白有效纯化 (图 3-5, 图 3-6)。

(2) 扁豆凝集素亲和纯化

收取 Hi5 细胞表达 96 h 后的重组杆状病毒细胞泥进行裂解, 离心收取上清并用 Lentil Lectin Sepharose 4B 扁豆凝集素亲和柱纯化, 取柱前、流穿、洗脱样品进行 SDS-PAGE 检测分析。

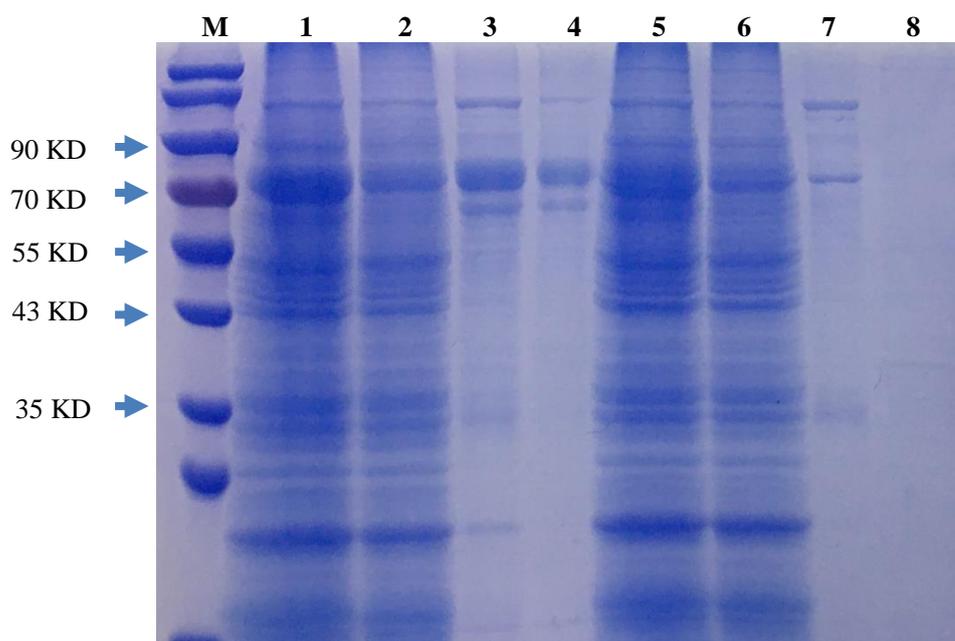


图 3-7 rBac-H1-HA-TM 及 rBac-H3-HA-TM 的亲和纯化

Fig. 3-7 Affinity purification results of rBac-H1-HA-TM and rBac-H3-HA-TM

M: Marker; 1, rBac-H1-HA-TM 裂解上清 (柱前); 2, rBac-H1-HA-TM 亲和纯化流穿液; 3, rBac-H1-HA-TM 亲和纯化洗脱液 1; 4, rBac-H1-HA-TM 亲和纯化洗脱液 2; 5, rBac-H3-HA-TM 裂解上清 (柱前); 6, rBac-H3-HA-TM 亲和纯化流穿液; 7, rBac-H3-HA-TM 亲和纯化洗脱液 1; 8, rBac-H3-HA-TM 亲和纯化洗脱液 2

重组杆状病毒 rBac-H1-HA-TM, rBac-H3-HA-TM Hi5 表达产物经裂解, HA 蛋白从细胞膜上被洗脱, 将裂解产物 12000 rpm 离心 40 min 后用 0.45 μm 滤膜过滤后用扁豆亲和素进行亲和纯化。结果显示, 表达的 HA 蛋白主要存在于亲和纯化洗脱液中, 纯度得到明显提升, 但单一亲和纯化不能对 HA 蛋白有效纯化 (图 3-7)。

(3) Q 柱+ Lentil Lectin Sepharose 4B 纯化

考虑到单一 Q 柱、Lentil Lectin Sepharose 4B 均不能对 HA 蛋白达到高效纯化, 但 Q 柱通过流穿可以去除一部分杂蛋白, Lentil Lectin Sepharose 4B 亲和柱可以有效吸附 HA 蛋白, 但纯度达不到动物疫苗配置标准, 因此考虑先通过 Q 柱除杂, 收集流穿液继续用 Lentil Lectin Sepharose 4B 亲和柱吸附洗脱, 以此提升 HA 蛋白纯度。方案实施结果如下:

① rBac-H1-HA-TM 的纯化

将重组杆状病毒 rBac-H1-HA-TM Hi5 表达产物的裂解后离心沉淀、上清, Q 柱流穿液, 洗脱液, 分段接取亲和柱流穿液 (2 mL/管), 分段接取亲和柱洗脱液 (2 mL/管) 制样并 SDS-PAGE 分析。结果见图 3-8。

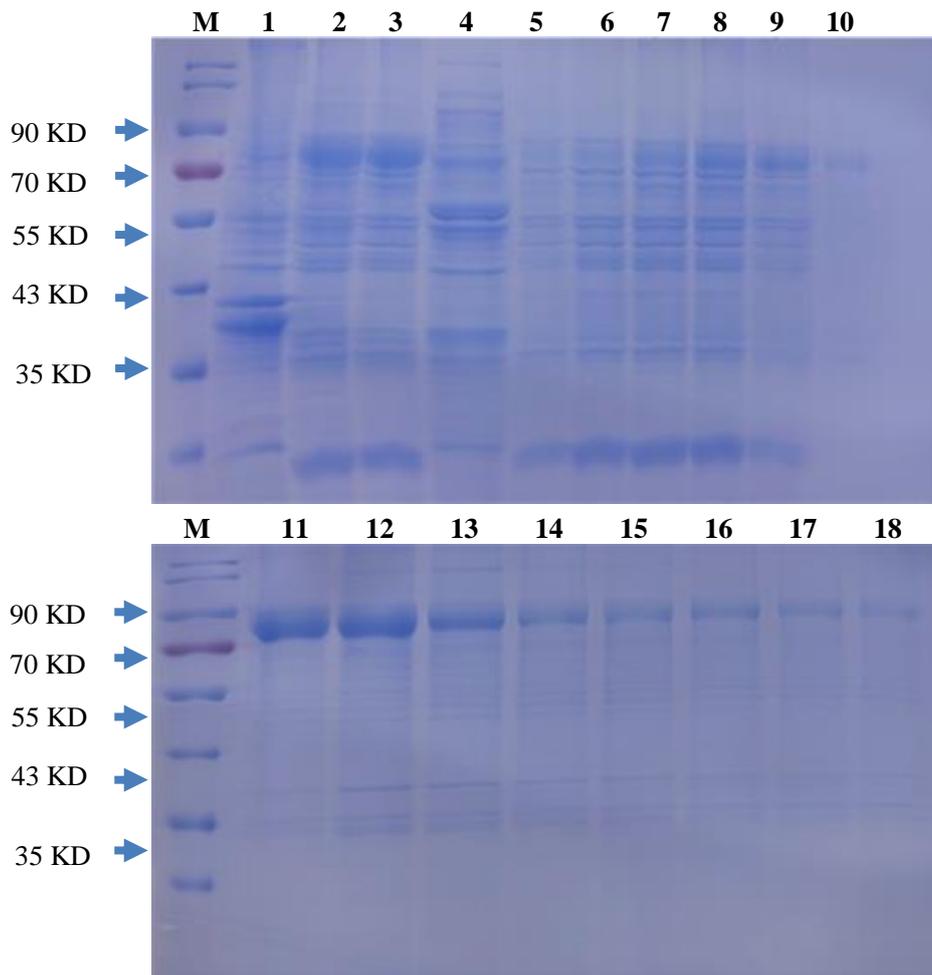
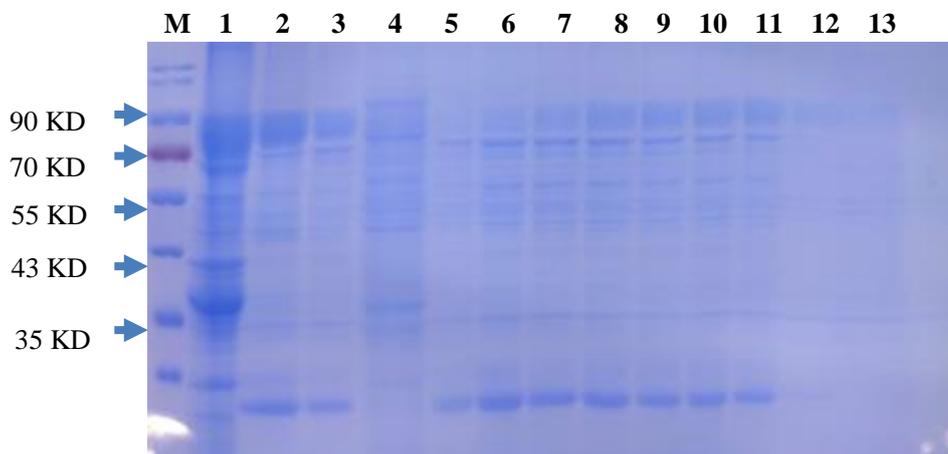


图 3-8 rBac-H1-HA-TM 的纯化

Fig. 3-8 Purification of rBac-H1-HA-TM

M: Marker; 1, rBac-H1-HA-TM 裂解沉淀; 2, rBac-H1-HA-TM 裂解上清 (柱前); 3, rBac-H1-HA-TM Q 柱流穿液; 4, rBac-H1-HA-TM Q 柱洗脱液; 5-10, 分段接取的 rBac-H1-HA-TM 亲和纯化流穿液; 11-18, 分段接取的 rBac-H1-HA-TM 亲和纯化洗脱液

②rBac-H3-HA-TM 的纯化



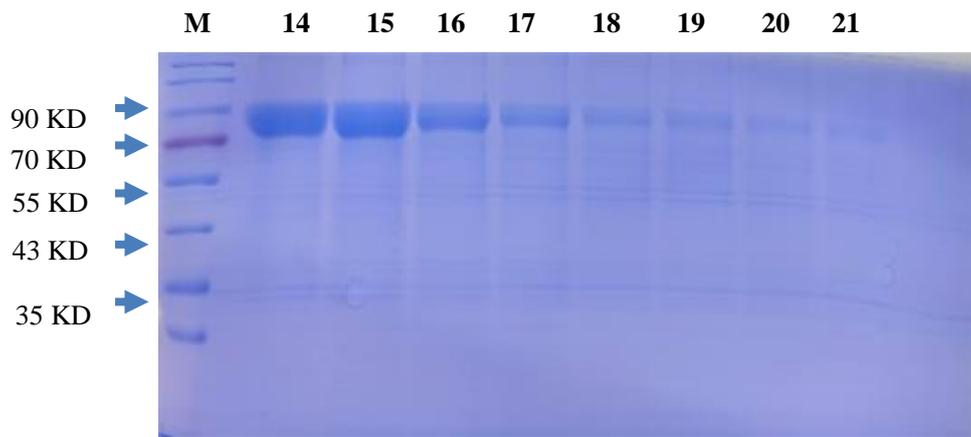


图 3-9 rBac-H3-HA-TM 的纯化

Fig. 3-9 Purification of rBac-H3-HA-TM

M: Marker; 1, rBac-H3-HA-TM 裂解沉淀; 2, rBac-H3-HA-TM 裂解上清 (柱前); 3, rBac-H3-HA-TM Q 柱流穿液; 4, rBac-H3-HA-TM Q 柱洗脱液; 5-13, 分段接取的 rBac-H3-HA-TM 亲和纯化流穿液; 14-21, 分段接取的 rBac-H3-HA-TM 亲和纯化洗脱液

将重组杆状病毒 rBac-H3-HA-TM Hi5 表达产物的裂解后离心沉淀、上清, Q 柱流穿液, 洗脱液, 分段接取亲和柱流穿液 (2 mL/管), 分段接取亲和柱洗脱液 (2 mL/管) 制样并 SDS-PAGE 分析, 结果见图 3-9。

3.3.3.2 纳米颗粒蛋白的纯度分析

使用灰度扫描对重组杆状病毒纯化后蛋白电泳结果进行分析, 计算目的蛋白占总蛋白的百分比。

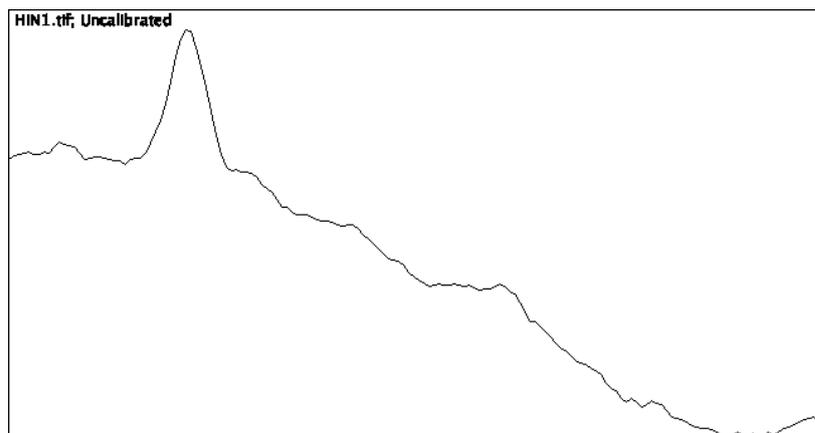


图 3-10 rBac-H1-HA-TM 纯化的灰度扫描结果

Fig. 3-10 Gray scanning analysis of rBac-H1-HA-TM after purification

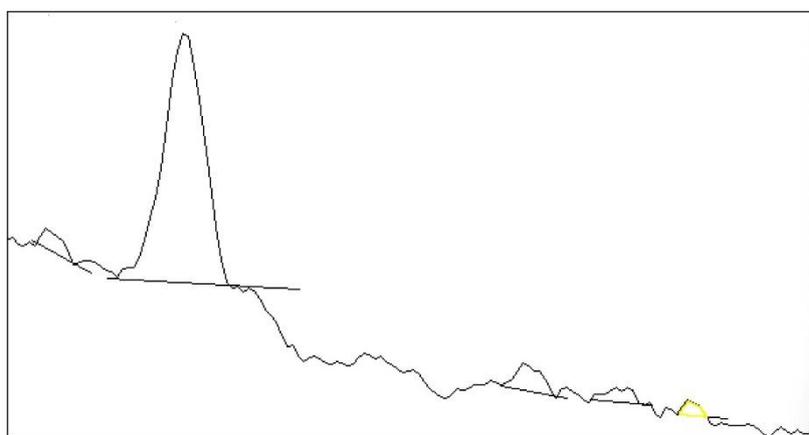


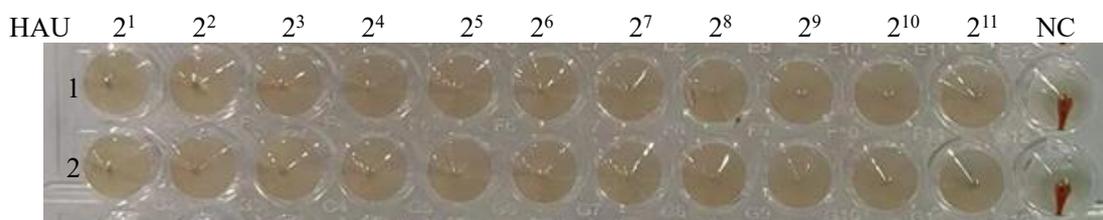
图 3-11 rBac-H3-HA-TM 纯化的灰度扫描结果

Fig. 3-11 Gray scanning analysis of rBac-H3-HA-TM after purification

灰度扫描分析显示，rBac-H1-HA-TM 纯化后目的蛋白灰度值（图 3-10）：3741.912，杂蛋白灰度值为 181.556、90.021、89.314，目的蛋白纯度：91.21%；rBac-H3-HA-TM 纯化后目的蛋白灰度值（图 3-11）：3211.549，杂蛋白灰度值为 178.163、139.121、96.578、43.649，目的蛋白纯度：87.53%。

3.3.3.3 纳米颗粒蛋白的 HA 活性分析

对纯化获得的高纯度的纳米颗粒 HA 蛋白进行血凝实验分析，以确定蛋白活性，结果如下：



1, rBac-H1-HA-TM 亲和洗脱液；2, rBac-H3-HA-TM 亲和洗脱液；NC, 红细胞对照

图 3-12 纯化后纳米颗粒蛋白的血凝活性检测

Fig. 3-12 Determination of hemagglutination activity of purified nanoparticle protein

对重组杆状病毒 rBac-H1-HA-TM, rBac-H3-HA-TM Hi5 表达产物的 Q 柱+ Lentil Lectin Sepharose 4B 纯化结果显示，在亲和和流穿液中 HA 蛋白有部分损失，但大部分 HA 蛋白在亲和洗脱中被收获，且具有较高的纯度。血凝结果显示，纯化获取的 rBac-H1-HA-TM, rBac-H3-HA-TM 纳米颗粒蛋白具有较高的血凝活性，均达到 2¹¹ 以上（图 3-12）。以上结果说明，重组蛋白经 Q 柱和 Lentil Lectin Sepharose 4B 亲和纯化可得到较高纯度的活性 HA 纳米颗粒蛋白。

3.3.3.5 HA 纳米颗粒蛋白的定量

将纯化洗脱蛋白透析于 PBS 中，用 BCA 定量试剂盒定量，标准曲线见图 3-13：

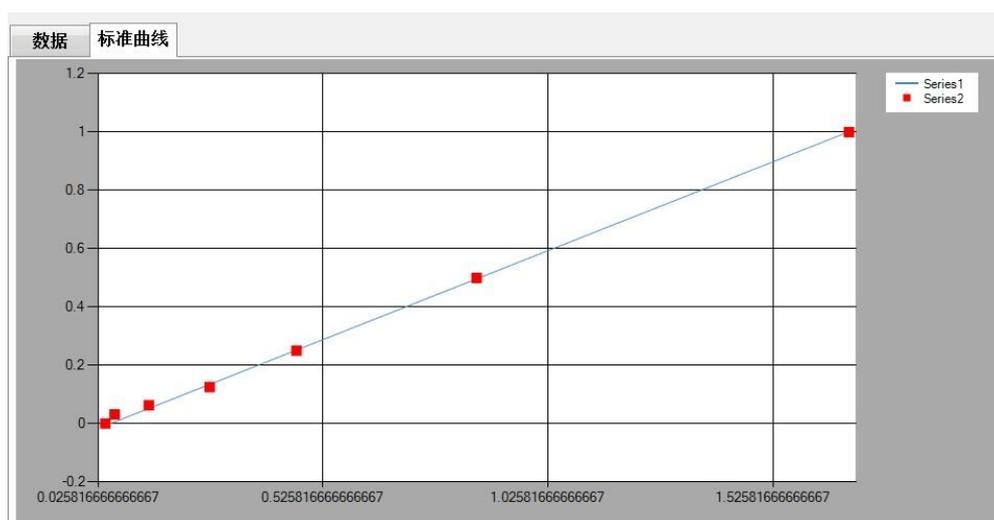


图 3-13 纯化后纳米颗粒蛋白 BCA 定量标准曲线

Fig 3-13 Quantitative standard curve of nanoparticle protein BCA after purification

纳米颗粒蛋白定量结果如下：

表 3-4 纳米颗粒蛋白定量结果

Table 3-4 Nanoparticle protein quantification results

样品编号	A562 nm	样品名称	蛋白浓度
1	1.299	rBac-H1-HA-TM	0.765 mg
2	1.466	rBac-H3-HA-TM	0.963 mg

纳米颗粒蛋白 rBac-H1-HA-TM 浓度为 0.765 mg，纳米颗粒蛋白 rBac-H3-HA-TM 浓度为 0.963 mg，分别收获体积为 120 mL 和 97mL，可满足小鼠免疫和仔猪免疫实验需要。

3.3.4 纳米颗粒的鉴定

3.3.4.1 DLS 分析

使用 Zetasizer Nano ZS 激光纳米粒度仪（Malvern Instruments Ltd, UK）对纯化获得的纳米颗粒蛋白进行动态光散射分析，对纳米颗粒的粒径进行测量。结果如下：

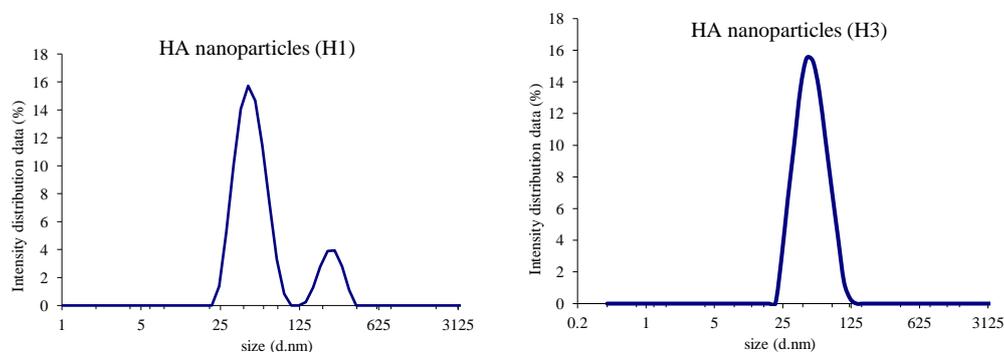


图 3-14 纳米颗粒的 DLS 检测

Fig 3-14 DLS detection of nanoparticles

动态光散射分析表明, rBac-H1-HA-TM, rBac-H3-HA-TM 纳米颗粒粒径主要集中在 28 nm-68 nm (图 3-14), 从 DLS 数据来看, rBac-H1-HA-TM 在 300 nm 左右形成有复合物, 可能与杂质蛋白有关, 总体而言, rBac-H3-HA-TM 纳米颗粒纯化效果较 rBac-H1-HA-TM 好。考虑到 PS80 内核可结合的 HA 数量不是固定的, 因此这种非固定的纳米颗粒粒径是合理的。

3.3.4.2 TEM 分析

将纯化得到的 rBac-H1-HA-TM, rBac-H3-HA-TM 纳米颗粒进行磷钨酸负染, 在 Tecnai G2 显微镜(FEI)上用 CCD 相机(Morada G3)放大 30 000×倍观察。

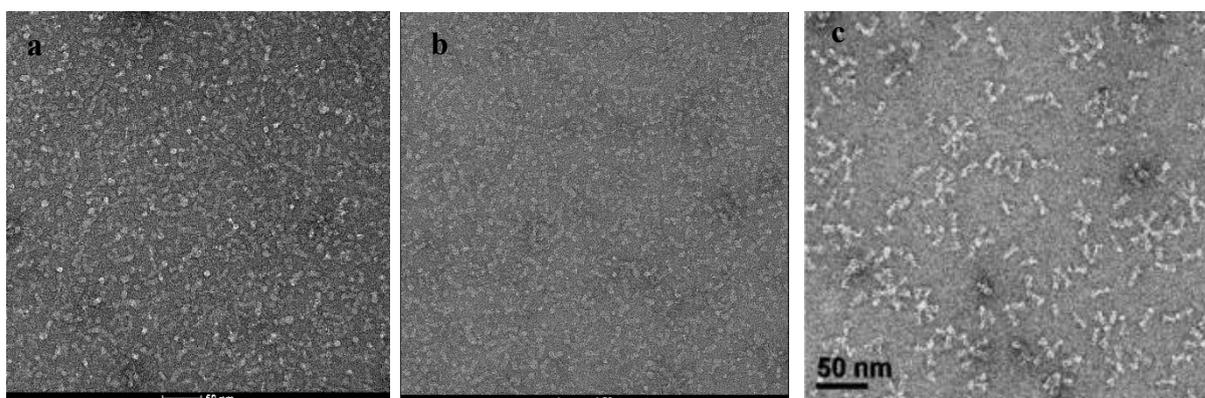


图 3-15 纳米颗粒的 TEM 检测

Fig 3-15 TEM detection of nanoparticles

- a, rBac-H1-HA-TM 纳米颗粒 TEM 分析; b, rBac-H3-HA-TM 纳米颗粒的 TEM 分析;
c, 文献报道的纳米颗粒形态

透射电镜结果显示, 电镜可见高密度的纳米颗粒(图 3-15), 纳米颗粒直径 50 nm 左右, 与文献报道(Smith et al. 2017)及 Novavax 专利报道 (CN112469436A) 纳米颗粒在形态、大小上相似度较高。

3.3.5 二价纳米颗粒疫苗的制备

根据 3.3.3.5 中 HA 纳米颗粒蛋白的定量结果, 结合实验动物剂量分组、佐剂分组配置二价纳米颗粒疫苗, 抗原配置前需经 0.22 μm 滤膜过滤除菌。

其中用于小鼠免疫的猪流感病毒 H1 和 H3 亚型二价纳米颗粒疫苗 HA 抗原含量分别为 5 $\mu\text{g}/200 \mu\text{L}$, 用于仔猪免疫的猪流感病毒 H1 和 H3 亚型二价纳米颗粒疫苗 HA 抗原含量分别为 60 $\mu\text{g}/2 \text{ mL}$; 含 MF59 佐剂及 CPG 佐剂疫苗配置完成后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 存放 24 h, 观察均一度及是否有分层或沉淀, 均一旦无分层无沉淀的疫苗于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存并用于后续动物免疫。

3.4 讨论

血凝素（HA）是流感病毒的主要保护性抗原，能够诱导产生较高水平的保护性免疫反应，大多数的流感疫苗研究均以 HA 为靶标，以 HA 为靶标的四价流感纳米颗粒疫苗已完成三期临床试验(Smith et al. 2017)，但 HA 作为糖蛋白，其高效的纯化技术一直是困扰疫苗研发和生产的主要难题之一，不同的纯化方式对 HA 结构的影响均不同，也直接决定了 HA 三聚体蛋白的活性。血凝素的纯化一直以来是行业难题，已报道的对流感血凝素具有良好纯化效果的方案有串联 Q+SP 柱，羟基磷灰石，扁豆凝集素等，本研究中，我们采用 Q 柱流穿+扁豆凝集素亲和洗脱的方式获得高纯度的 HA 蛋白，经 DLS，TEM 分析显示纳米颗粒粒径及形态相对均一，且在血凝实验中表现出较高的活性，证明这种纯化方式是高效的、可行的，同类别可使用的凝集素系列还有刀豆球蛋白 A(concanavalin A, con A)、豌豆凝集素、红豆草凝集素等，但凝集素亲和纯化也具有成本较高、可重复利用次数少的缺点，急需国产替代的纯化介质投入市场以降低成本，否则很难在动物疫苗的生产上大规模使用。

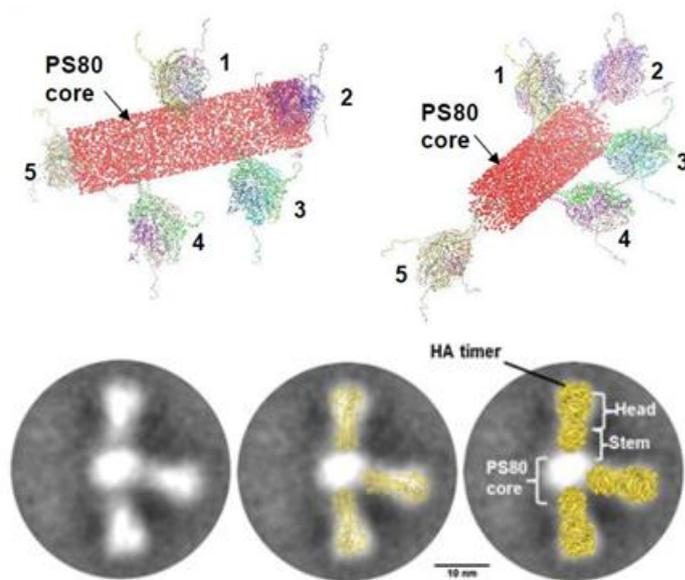


图 3-16 三聚体 HA 抗原与 PS80 内核结合示意图(Smith et al. 2017)

Fig 3-16 Schematic diagram of trimeric HA antigen binding to PS80 core

近年来，纳米颗粒疫苗在人类重大传染病的预防和治疗中展现出了广阔的应用前景。常见的天然生物纳米粒子主要有脂质体蛋白、热休克蛋白、铁蛋白和数以万计的病毒等。在本研究中，我们制备的新型纳米颗粒疫苗 HA/PS80，由重组表达的全长流感 HA 三聚体，通过疏水跨膜结构域与 PS80 分子核心稳定相互作用而形成的混合胶束纳米颗粒。PS80 核与蛋白疏水区通过疏水力发生相互作用，从而增加蛋白质亲水性。在形态上，本研究中 HA/PS80 纳米颗粒在大小和形状上呈现多样性，不同于我们所熟悉的球形或笼状纳米颗粒，如自组装铁蛋白纳米颗粒、双组分 I53-50A/50B 纳米颗粒、脂

质体纳米颗粒等。DLS 显示, 本研究中 HA/PS80 纳米颗粒的直径大多在 28.67-68.06 nm 之间, 与以往报道的季节性流感疫苗 28.9-33.7 nm 不同(Smith et al. 2017)。这一结果可能是由于与 PS80 胶束结合的 HA 三聚体数量不同所致。通常, 一个 PS80 胶束上可结合 2-7 个 HA 三聚体(图 3-16)(Smith et al. 2017)。

类似的纳米颗粒结构已应用于人用四价季节性流感疫苗和 RSV 疫苗的开发(Krueger et al. 2021)。RSV F/PS80 纳米颗粒疫苗已被验证具有较好的免疫原性, 可在小鼠中产生保护性免疫和母源抗体, 以及在新生儿犊犊感染 RSV 时具有高效的保护作用。在人体实验中, 该疫苗对 20 岁、21 岁及更年长的育龄妇女具有免疫原性和安全性(NCT02624947)。在免疫反应类型和效率方面, 与灭活疫苗相比, 二价纳米颗粒 BNV 疫苗是否能够在小鼠和随后的仔猪免疫实验中诱导高度平衡的体液免疫和细胞免疫, 以及在攻毒保护试验的表现则需要进一步验证。

3.5 小结

(1) 利用洁净的 Hi5 昆虫细胞系表达了 H1N1 和 H3N2 猪流感病毒 HA 蛋白的重组杆状病毒, 经 SDS-PAGE 检测显示 HA 蛋白在目标位置 70kd 左右高效表达, 血凝实验显示, 制备的 HA 蛋白具有良好的血凝活性。

(2) 通过阴离子交换和扁豆凝集素亲和层析两步纯化获得 HA 蛋白。在亲和纯化过程中, 三聚体 HA 的茎部疏水跨膜域与 PS80 洗涤剂内核在亲和柱上实现结合, 形成了洗涤剂核心的纳米颗粒。

(3) 经两步纯化形成的 HA 纳米颗粒蛋白纯度>85%, 纳米颗粒粒径在 28 nm-68 nm; HA 头部域突出于纳米颗粒外部; 纳米颗粒蛋白血凝活性 $>2^{11}$, 满足后续动物免疫研究需求。

第四章 猪流感病毒 H1 和 H3 亚型二价纳米颗粒疫苗的 Balb/C 小鼠免疫评价

接种疫苗是防控猪流感感染的最经济有效的手段之一。通过疫苗接种,已消灭牛瘟、牛肺疫等重大动物传染病。然而有很多重大疫病仍缺乏有效的疫苗,如近年造成灾难性后果的非洲猪瘟。同时,某些 RNA 病毒,如禽流感病毒、猪流感病毒、猪流行性腹泻、猪丁型冠状病毒等的高突变性使现有疫苗效力持续减弱,因此开发广谱、安全、高效的疫苗十分必要。纳米颗粒疫苗因可展示多个抗原及不同抗原表位而备受关注,纳米颗粒疫苗诱导更强更广谱的免疫保护,以及更高水平的细胞免疫,已在多种重大疾病的防控上展示出巨大的应用潜力。目前市售猪流感疫苗主要以灭活苗为主,虽然具有较好的安全性好,但同时也存抗体水平低、无法提供完全保护及免疫持续期短需多次接种的缺点。从人用流感疫苗发展历程来看,细胞为基础的猪流感疫苗生产也必将成为传统鸡胚生产系统的重要替代方案(Manini et al. 2017; Wong et al. 2013),如 MDCK, Vero 和昆虫细胞等(Hu et al. 2015; Khurana et al. 2019; Matsuda et al. 2020; Montomoli et al. 2012)。

小鼠是研究流感病毒发病机制、疫苗效力、药物药效和抗病毒治疗最常用的动物模型(Taubenberger et al. 2008)。小鼠作为流感病毒感染模型优势在于其背景清晰,小鼠免疫因子的检测试剂及相关抗体均已成熟,易于采用遗传学手段进行基因功能操作或使用人源化小鼠构建符合特定实验需求的模型,有利于对流感病毒的发病机制、抗病毒药物药效机理、疫苗效力评估等进行深入研究(Matsuoka et al. 2009)。本研究利用杆状病毒-昆虫细胞表达系统制备了 SIV H1 和 H3 BNV 疫苗,经 TEM 鉴定及血凝实验分析显示,纳米颗粒 HA/PS80 形成良好且具备较高的血凝活性。本章我们将制备的二价纳米颗粒疫苗免疫 Balb/C 小鼠,通过设置不同分组,筛选适合的抗原剂量及佐剂,通过监测 HI 抗体效价评估疫苗的效力,同时对抗体亚型、细胞因子分泌水平进行分析,并通过攻毒保护实验进一步研究疫苗的保护作用。

4.1 材料

4.1.1 毒株、鸡胚

猪流感病毒毒株 CVCC AV1523 (H1N1), CVCC AV1519 (H3N2) 购自中国兽医药品监察所,由杨凌凯瑞生物科技有限公司保存;SPF 鸡胚购自杨凌绿方生物科技有限公司;用于攻毒试验的猪流感病毒株是在 10 d SPF 鸡胚中增殖获得的尿囊液经无菌过滤后保存,病毒含量为 H1N1: $10^{6.5}$ EID₅₀/0.1 mL, H3N2: $10^{7.2}$ EID₅₀/0.1 mL。

4.1.2 Balb/C 小鼠

6 周龄 Balb/C 小鼠（雌性，SPF 级）购自北京维通利华实验动物技术有限公司；小鼠饲养在独立通风笼(IVC)系统中(苏州市冯氏实验动物设备有限公司)，自由采食饲料，自由饮水。每笼 8 只小鼠，室温为 $22\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度为 50%，光照周期为 12 h 关闭、开启。

4.1.3 试剂及耗材

MF59 佐剂由杨凌凯瑞生物科技有限公司保存并提供；CPG1 佐剂（(5'-TsCsGsCsCsCsGsTsCsGsCsCsAsGsCsGsAsGsGsCsGsTsTsT-3'）由武汉依为康生物技术有限公司合成；商品化猪流感 H1+H3 二价灭活疫苗（H1N1 LN 株+ H3N2 HLJ 株）购自陕西疫苗代理商；Primerstar Max 购自宝日医生物技术（北京）有限公司；猪流感病毒检测引物级探针（序列参照国家标准 GB/T 27521-2011）由北京擎科生物科技有限公司西安分公司合成；小鼠 IL-4, IFN- γ 细胞因子检测试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司；小鼠免疫球蛋白 G1 (IgG1)、G2a (IgG2a) 酶联免疫分析试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司；RDE II 受体破坏酶(货号：340122)购自日本生研株式会社；0.5% 鸡红细胞悬液由本实验配置，现配现用，保存于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 不超过 5 d。

各型号注射器购自镇江康利医疗器械有限公司；1.5 mL、15 mL 及 50 mL 规格无菌离心管购自无锡耐思生命科技股份有限公司；0.22 μm ，0.45 μm 一次性针头滤器（Millipore Millex）购自默克密理博公司；单道、多道移液器购自 Eppendorf（德国艾本德股份公司）；96 孔微量板（V 型底）；不同型号枪头购自苏州赛普生物科技股份有限公司。

4.1.4 主要仪器设备

生物安全柜（型号：1300 SERIES A2, Thermo 公司），超净工作台(型号：SW-CJ-2FD, 苏州苏信环境科技有限公司)；恒温振荡培养箱（型号：MQT-60, 上海旻泉仪器有限公司）；小鼠 IVC 独立送风隔离笼具（型号：FS-001-1, 苏州市冯氏实验动物设备有限公司）；酶标仪（型号：DNNF9602, 北京普朗新技术有限公司）。

4.2 方法

4.2.1 猪流感病毒小鼠感染模型的建立

猪流感病毒小鼠感染模型，由杨凌凯瑞生物科技有限公司动物疫苗注册评价组建立（流程卡编号：KRSW202112-SIV-01）。根据感染模型分析结果确定小鼠攻毒剂量并用于本方案小鼠的攻毒保护研究。小鼠感染模型研究方案及结果见附录 D。

4.2.2 免疫分组

按照下表配制试验用疫苗，并按规定的实验分组和免疫接种程序免疫小鼠。

表 4-1 Balb/C 小鼠免疫实验分组

Table 4-1 Grouping of Balb/C mice immune test

分组	剂量/只	数量/组/只	免疫途径
H1N1-TM/ PS80	5 μ g (0.2 mL)	8	皮下多点注射
H3N2 -TM/ PS80			
H1N1-TM/ PS80	5 μ g (0.2 mL)	8	皮下多点注射
H3N2 -TM/ PS80			
MF59 佐剂	5 μ g (0.2 mL)	8	皮下多点注射
H1N1-TM/ PS80			
H3N2 -TM/ PS80	5 μ g (0.2 mL)	8	皮下多点注射
CPG1 佐剂			
市售疫苗组	5 μ g (0.2 mL)	8	皮下多点注射
PBS	2 mL	8	皮下多点注射

4.2.3 免疫、采血及攻毒

(1) 免疫及采血

0d 首免，21 d 加强免疫一次，注射剂量及注射方式参照图 4-1；免疫前 (-1 d)，免疫后 14 d，28 d，42 d 对各组小鼠眼球采血，分离血清。

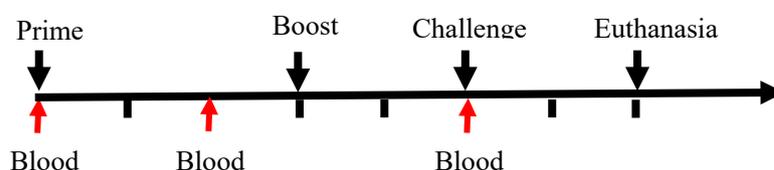


图 4-1 Balb/C 小鼠免疫及攻毒实验进程图

Fig. 4-1 Progress of immune and challenge experiments of Balb/C test

(2) 攻毒

二免后 14 d 攻毒，Balb/C 小鼠经乙醚轻度麻醉后滴鼻感染病毒（50 μ L 病毒液，注意少量多次）；对照组小鼠滴入 50 μ L PBS。按照上表分组一分为二，5 只/笼，用 CVCC AV1523 (H1N1) 和 CVCC AV1519 (H3N2) 分别进行攻毒。

4.2.4 HI 实验

参照如下方法开展血凝抑制实验：

(1) 4 单位 (4HAU) 抗原制备

参照 2.2.2.7 血凝实验方法对标准抗原效价进行测定。根据抗原血凝效价计算 4HAU 抗原，并用生理盐水进行稀释，标准抗原效价/4 即为稀释倍数。对 4HAU 抗原进行回

标检测, 设定 5 个稀释度, 每个稀释度三个重复。向 96 孔板左上角选择 5 列 x3 行共 15 个孔中加入 25 μL PBS, 向每行的第 1 个孔加入 25 μL 标定的 4 HAU 抗原并混匀, 吸取 25 μL 混合液, 倍比稀释至第 4 孔, 弃掉枪头; 第 5 孔不加抗原作为阴性对照, 25 $^{\circ}\text{C}$ 30 min 后观察结果。判读标准: 若第 1 和第 2 孔发生完全凝集, 第 3 孔不完全凝集, 第 4 孔和第 5 孔不凝集, 则证明 4 HAU 抗原制备成功, 可用于下一步 HI 实验。

(2) 血凝抑制 (HI) 试验

① 血清样品的处理: 将血清用 RDE II 受体破坏酶在 37 $^{\circ}\text{C}$ 处理过夜, 然后 56 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 30 min, 以去除非特异性血凝素抑制剂和天然血清凝集素。

② 在 96 孔板 2-11 孔加入 25 μL PBS, 第 12 孔加入 50 μL PBS;

③ 吸取 50 μL 待检血清加入第 1 孔, 并从中吸取 25 μL 至第 2 孔, 充分吹打混匀后吸取 25 μL 至第 3 孔, 依次倍比稀释至第 11 孔, 自第 11 孔吸取 25 μL 混合液弃去;

④ 向 1-11 孔均加入 25 μL 配置好的 4 HAU, 第 12 孔作为红细胞对照, 于室温下静置 10-30 min;

⑤ 向每孔加入 50 μL 0.5% 的鸡红细胞悬液, 震荡混匀, 于室温下静置 30 min, 观察红细胞对照孔呈纽扣状沉于孔底时即可判读结果。

⑥ 以完全抑制 4 HAU 抗原的血清最高稀释倍数作为 HI 效价。

4.2.5 中和实验

血清中和实验参照如下步骤进行:

(1) 细胞培养及传代: 将 MDCK 自液氮中取出, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴快速摇晃解冻, 800 rpm 离心 5 min 后弃上清, 用含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基重悬并吹散细胞, 转移至 T25 细胞瓶, 于 5% CO_2 培养箱中培养 48 h, 24 h 更换培养基, 继续观察细胞密度至 80% 单层时进行传代。

(2) 铺板: 将 T25 细胞瓶中 MDCK 胰酶消化并吹散混匀后铺于 96 孔细胞板, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱培养 48 h, 再次至细胞长满 96 孔板底部的 80% 为宜;

(3) 病毒稀释: 自 -70 $^{\circ}\text{C}$ 取冻存的猪流感病毒鸡胚尿囊液, 用 DMEM 病毒维持液 (含 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TPCK-胰酶) 按照 1:10 稀释 (100 μL 病毒液+900 μL DMEM), 并依次倍比稀释至 10^{-10} ;

(4) 病毒液接种细胞: 取出 96 孔板, 吸取并弃去孔中培养液, 用 PBS 洗涤一次后在第 1 行的 1-10 孔分别加入 100 μL 稀释好的病毒液, 每个稀释度作 8 个重复, 第 11、12 列设置细胞对照, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱孵育 1 h 后弃去孔中培养基, 向每孔补加细胞维持液 200 μL (含 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TPCK-胰酶), 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱继续培养, 使用倒置显微镜连续每日观察并记录 CPE, 按照 Reed-Muench 法计算 TCID_{50} 。

(5) 中和实验

① 用 DMEM 培养基 (含 5% FBS) 将细胞密度调整 1×10^5 cells/mL, 按照 100 μ L/孔铺于 96 孔细胞板, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 的培养箱中培养 24 h。

② 将待检血清于 56 $^{\circ}$ C 30 min 灭活处理; 用 DMEM 维持液 (含 2 μ g/mL TPCK-胰酶) 进行稀释, 先 1:10 稀释, 后 2 倍倍比稀至 1:2560; 将 H1N1 和 H3N2 病毒稀释至 100 TCID₅₀/0.1 mL。

③ 中和反应: 100 μ L 血清与 100 μ L 病毒稀释液 (100 TCID₅₀) 充分混合, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; 弃去孔内培养基, 用 PBS 清洗 2 遍后将上一步中血清病毒混合物加入细胞板中, 同时设置病毒对照孔、阴性对照血清孔、阳性血清孔及细胞对照孔, 于 37 $^{\circ}$ C 5% CO_2 的培养箱中培养 96 h, 观察 CPE 并记录结果。

④ 结果判定: 当病毒对照及阴性血清组孔均出现 CPE, 阳性血清对照及正常细胞组无 CPE 时, 结果成立。以能够抑制 50% 以上细胞出现 CPE 的血清最高稀释度的倒数为该血清中和效价。

4.2.6 病毒特异性 IgG ELISA 及细胞因子分析

使用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清中抗原特异性 IgG 和 IgG 亚类(IgG1 和 IgG2a)水平; 使用小鼠 IFN- γ / IL-4 酶免疫测定试剂盒分析二免两周后小鼠血清样品中 IFN- γ 和 IL-4 的浓度; 使用酶标分析仪读取 450 nm 处吸光度值。以 IFN- γ 检测为例, 操作方法如下:

(1) 标准品加样: 设置标准品孔及样本孔, 标准品孔分别加入不同浓度的标准品 50 μ L;

(2) 加样: 设空白孔、待测样品孔, 空白孔不加样品及酶标试剂, 其余各步操作相同。在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液 40 μ L, 然后再加待测样品 10 μ L (稀释度为 5 倍)。注意加样时将样品加于酶标板孔底部, 不触及孔壁, 轻柔晃动混匀;

(3) 加酶: 除空白孔外, 每孔加入酶标试剂 100 μ L;

(4) 温育及配液: 用封板膜封板后置 37 $^{\circ}$ C 温育 60 min; 等待过程中将 20 倍浓缩洗涤液用蒸馏水稀释 20 倍备用;

(5) 洗涤: 揭开封板膜, 甩去孔内液体, 每孔加满洗涤液, 轻轻敲击振荡 30s 后弃去, 如此重复清洗 5 次, 在吸水纸上拍干;

(6) 显色: 每孔依次加入底物显色剂 A、B 各 50 μ L, 轻轻振荡混匀, 37 $^{\circ}$ C 避光显色 10-15 min;

(7) 终止: 每孔加终止液 50 μ L, 终止反应 (此时蓝色立转黄色) 取出酶标板, 迅速加入终止液 50 μ L, 此时蓝色立转黄色, 于酶标仪测定结果;

(8) 测定：以空白孔调零，450 nm 波长依序测量各孔的吸光度（OD 值）。测定应在加终止液后 15 min 以内进行。

4.2.7 攻毒后体重监测及采样

接毒后的小鼠用标准日粮正常饲养，饮灭菌水。Balb/C 小鼠感染后连续观察 14 d，监测精神状态、临床症状、存活率及体重变化，当小鼠体重减轻 25 %（初始体重）以上时，被定义为死亡，并处以安乐死。

感染后 6 d，每组 3 只处以安乐死，取左肺均质提取 RNA，右肺用 10% 缓冲福尔马林固定，苏木精、伊红染色，组织病理学检查；攻毒后每天采集粪便样本，直至研究结束，采用 RT-PCR 方法测定猪流感病毒的病毒脱落情况。

4.2.8 病毒载量的检测

针对肺脏样本和粪便样本中的病毒含量，提取 RNA，采用 RT-PCR 方法进行检测分析，以肺脏病毒载量为例方法如下：

(1) 样品处理：

称取等重量小鼠左肺于 1.5 mL EP 管，加入 1 mL 含 1000 单位双抗的 PBS 缓冲液，进行无菌研磨。将组织匀浆液 5000 rpm 离心 15 min，收获上清。

(2) RNA 提取：

参照试剂盒说明书进行，每次实验均要将标准品作梯度稀释，且设置阴性对照（H₂O）、样品复孔，与样品同时提取 RNA。

(3) 反转录：

以 RNA 为模板，用一步合成法试剂盒反转录合成 cDNA。体系见下表：

表 4-2 反转录实验体系

Table 4-2 Reverse transcription system for detection.

成分 Components	体积 Volume
Primer (random primer)	1 μL
2*ES Reaction Mix	10 μL
E Mix	1 μL
DNA Remover	1 μL
RNA Template	3 μL
RNase-free Water	4 μL

反应条件：42 °C 孵育 30 min，85 °C 加热 5 s 灭活 g DNA Remover。

(4) RT-PCR：按照如下反应体系配置反应液：

表 4-3 荧光定量 PCR 实验体系

Table 4-3 Fluorescence quantitative PCR experimental system

名称	体积
Primer-F	1 μ L
Primer-R	1 μ L
2 \times RT-PCR Mix	12.5 μ L
Taq 酶	0.25 μ L
Probe	0.25 μ L
cDNA	1 μ L
DEPC 水	9 μ L
总体积	25 μ L

加样完成后瞬时离心,将 PCR 管放在荧光定量 PCR 仪器上进行扩增,程序如下: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C/15 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s (采集 FAM 荧光信号), 40 cycles。

4.2.9 病理分析

攻毒 6 天后,对小鼠实施安乐死,并收集肺组织用 10%福尔马林固定后样品送至成都里来生物科技有限公司,按病理检验 SOP 程序进行,脱水、修剪、包埋、切片、染色、封片等,最后镜检。采用 3D HISTECH (Hungary)生产的 Pannoramic 250 数字切片扫描仪对切片进行图像采集,每张切片先于低倍下观察全部组织大体病变,选择要观察的区域采集 100 倍图片,观察具体病变。并出具病理分析报告,详细记录病理变化及评分。

4.2.10 统计分析

所有的实验数据均以平均数 \pm 标准差(SD)表示,统计分析采用 GraphPad Prism 9.0 版软件进行。各组间差异有统计学意义,两者间比较使用 t-test 检验方法。 $P < 0.05$, 两组存在显著差异, $P < 0.01$, 两组存在极显著差异。

4.3 结果

4.3.1 HI 分析

为了评估二价纳米颗粒疫苗的免疫原性,按照分组和时间节点对小鼠进行免疫,并在加强免疫后第 2 周采集分离小鼠血清样本。测定血清 HI 抗体滴度,以 Hi5 细胞表达的重组杆状病毒上清作为抗原配置 4HAU 进行 HI 试验。

结果显示,PBS 对照组未检测到 HI 抗体,而 BNV 组检测到较高的 HI 滴度(图 4-2)。在 BNV 与灭活流感疫苗(IIV)在小鼠中的比较中,BNV 诱导的 HI 滴度在没有佐剂的情况下比 IIV 高 4 倍。MF59 和 CPG1 佐剂可显著提高 BNV 的 HI 抗体滴度,MF59 佐剂组的平均 HI 滴度是单个纳米颗粒组的 2-4 倍。两种佐剂组间无显著差异。

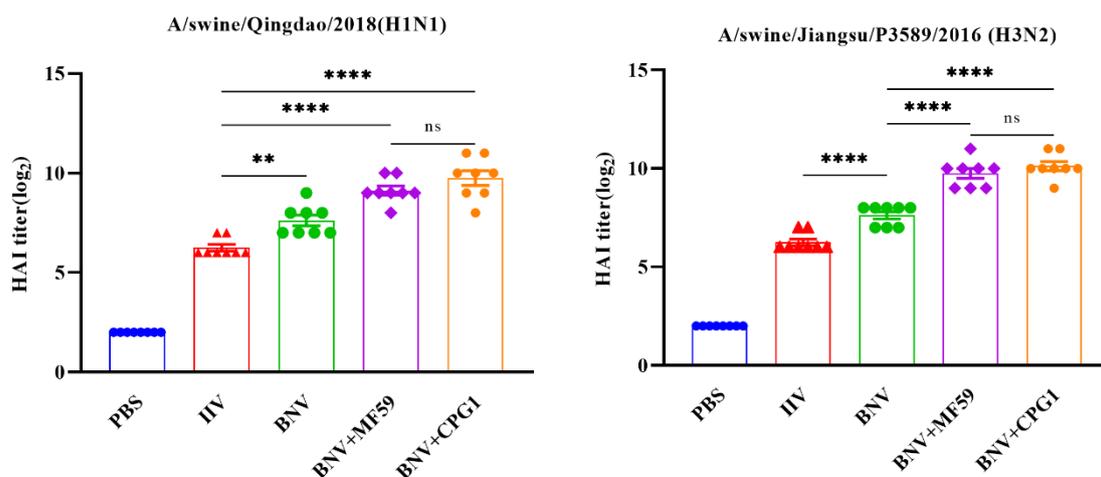


图 4-2 不同免疫组小鼠 HI 实验结果

Fig. 4-2 Results of HI experiment in mice of different immune groups

4.3.2 中和抗体检测分析结果

采集二免后 14 d 实验组小鼠血清样本，通过中和实验分析血清中中和抗体水平。

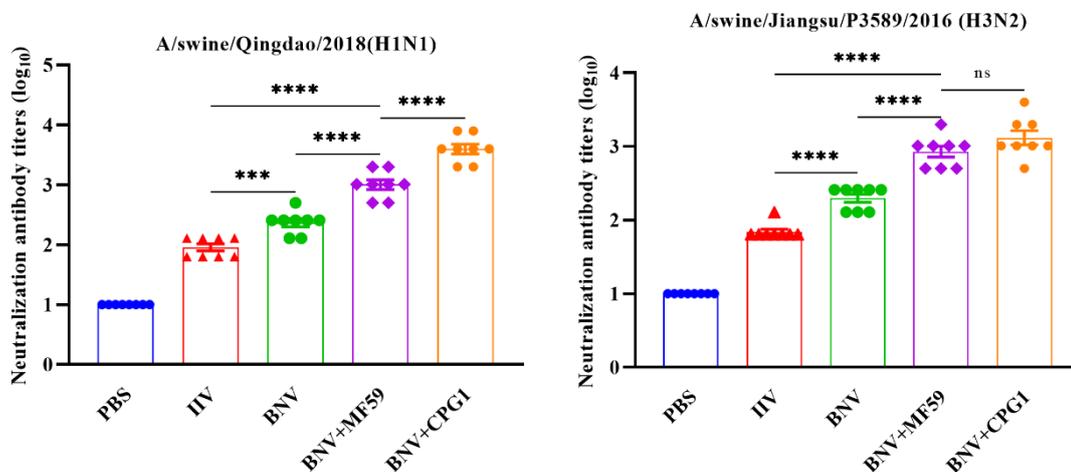


图 4-3 不同免疫组小鼠中和抗体实验结果

Fig. 4-3 Experimental results of neutralizing antibody in mice of different immune groups

结果显示(图 4-3)，不同猪流感疫苗免疫组对 H1N1 SIV 的中和抗体滴度存在较大差异，BNV 组、BNV+MF59 组、BNV+CPG1 组和商用疫苗组分别为 2.7 log₁₀，2.1 log₁₀，3.6 log₁₀ 和 3.9 log₁₀；BNV 组、BNV+MF59 组、BNV+CPG1 组及商用疫苗组检测到的抗 H3N2 病毒的中和抗体滴度分别为 2.4 log₁₀，1.8 log₁₀，3.3 log₁₀ 和 3.6 log₁₀；PBS 对照组血清中未检测到针对 H1N1 和 H3N2 病毒的中和抗体。

4.3.3 病毒特异性 IgG ELISA 分析

血清中抗原特异性 IgG1 和 IgG2a 水平分别与 Th2 和 Th1 应答的大小相关。采取加强免疫后 2 周的小鼠血清，用病毒特异性 IgG1 / IgG2a ELISA 分析试剂盒检测血清中特异性 IgG1 / IgG2a 水平。

结果显示（图 4-4），MF59 和 CPG1 增强 H1N1/H3N2 - HA 特异性 IgG 和 IgG 亚类反应。BNV+MF59 或 CPG1 比单独 BNV 和 IIV 组产生更显著的 IgG 和 IgG 亚类抗体。对于 IIV 组，IgG1 高于 IgG2a，提示 th2 偏向反应。在 BNV 单独组和 MF59+BNV 组中，IgG1 和 IgG2a 抗体相当，表现出平衡的 th1 和 th2 免疫反应，而 CPG1 + BNV 组表现出较明显的 th1 型反应。

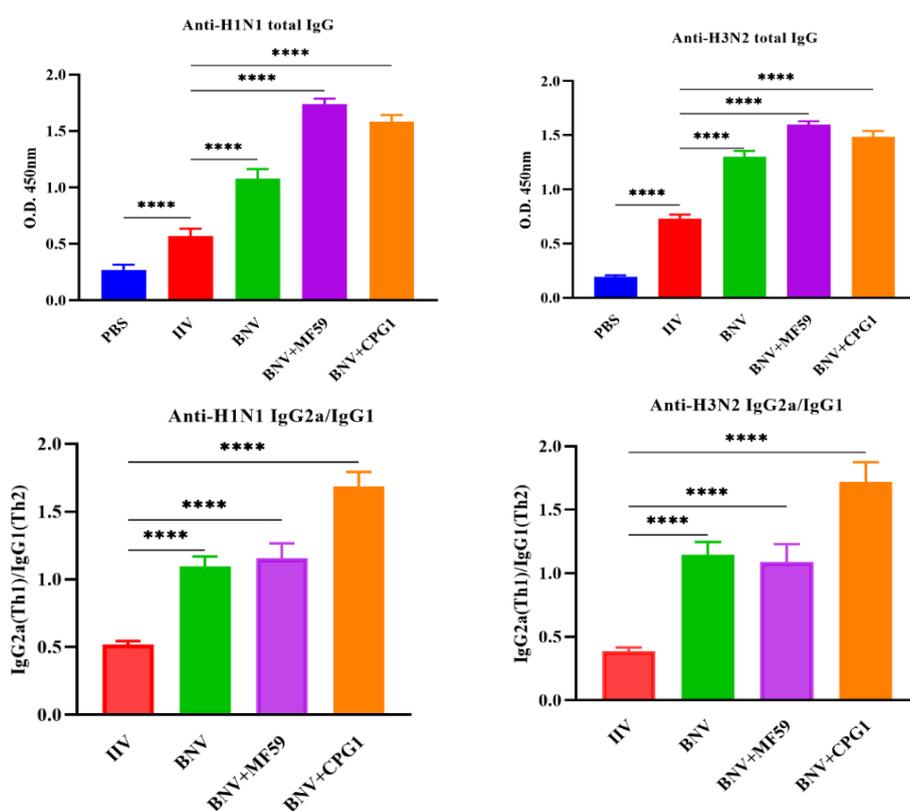


图 4-4 不同免疫组小鼠特异性 IgG 抗体及抗体亚型分析

Fig. 4-4 Analysis of specific IgG antibody and antibody subtype in mice of different immune groups.

4.3.4 细胞因子水平分析

细胞免疫在预防猪流感病毒感染中起着重要作用。免疫细胞经刺激后分泌细胞因子，通过与靶细胞上的受体结合发挥免疫应答、免疫调节、介导炎症反应等作用。疫苗接种后细胞因子的产生及表达水平决定了免疫反应的大小和程度。

IFN- γ 属 II 型干扰素, 是连接天然免疫和获得性免疫的桥梁, 在机体抗流感病毒早期免疫中发挥重要作用。IL-4 对于多种类型病毒的复制和表达具有抑制作用, 研究发现, IL-4 可以通过激活 MAPK 途径刺激 DC 成熟产生 IFN- γ , 进而调节 Th1 细胞活化, 间接介导细胞免疫(Fukao et al. 2000)。同时, IL-4 可以防止细胞免疫应答过强引起免疫病理性损伤而加强病毒扩散, 使免疫防御和免疫稳态之间达成协调, 促进病毒感染的恢复(Bot et al. 2004)。

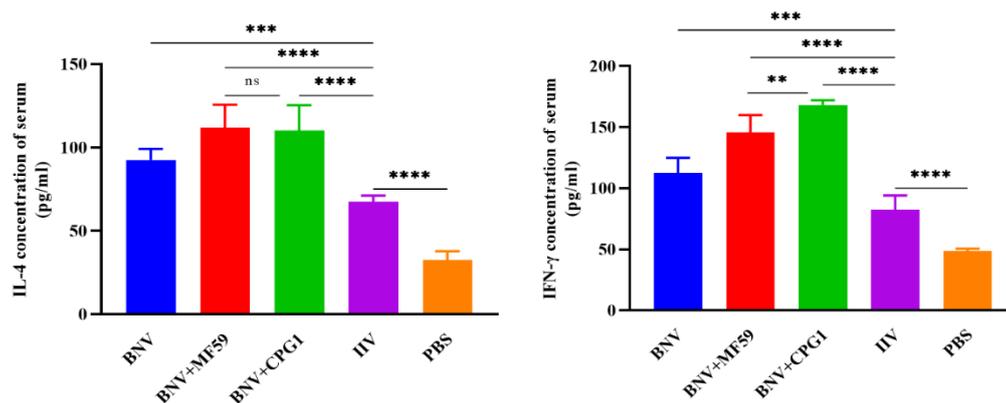


图 4-5 二免后 2 周不同免疫组小鼠细胞因子检测结果

Fig 4-5 Cytokine detection of different groups two weeks after immunization

本研究采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)在 450 nm 波长下测定加强免疫后 2 周血清样品中 IFN- γ 和 IL-4 细胞因子的浓度。结果显示(图 4-5), 与 PBS 或 IIV 组相比, 单独 BNV 组和 MF59-或 CPG1 佐剂的 BNV 组 IFN- γ 水平升高明显。IL-4 检测也有相似的趋势, MF59 + BNV 组与 CPG1 + BNV 组间差异无统计学意义。

综上所述, BNV 可引起平衡的体液和细胞免疫反应, 在 CPG1 佐剂联合免疫时则偏向更强的细胞免疫。

4.3.5 攻毒后体重曲线及生存率分析

在加强免疫后 14 d, 疫苗组和对照组小鼠按照分组分别用猪流感病毒 H1N1 (CVCC AV1523)和 H3N2 (CVCC AV1520)进行攻毒感染。通过观察攻毒后小鼠的精神状态、体重减轻情况、分析不同组别小鼠的生存率来初步评估二价纳米颗粒疫苗的保护效果。结果显示(图 4-6), 攻毒后, BNV 接种组和 IIV 接种组小鼠体重轻微下降, 而 PBS 接种组小鼠在两种病毒攻毒一周后体重分别下降 27.2%和 17.5%。尽管 PBS 组在随后的几天中体重恢复增加, 但直至 14 d 仍未恢复至攻毒前的水平。记录小鼠的存活率, 并使用 Kaplan-Meier 方法绘制存活率曲线, 两种病毒攻击后在观察期内均未引起小鼠直接

死亡，但在攻毒后 PBS 组部分体重下降超过 25%，可判定为死亡，疫苗株表现良好，未有明显体重减轻及死亡。

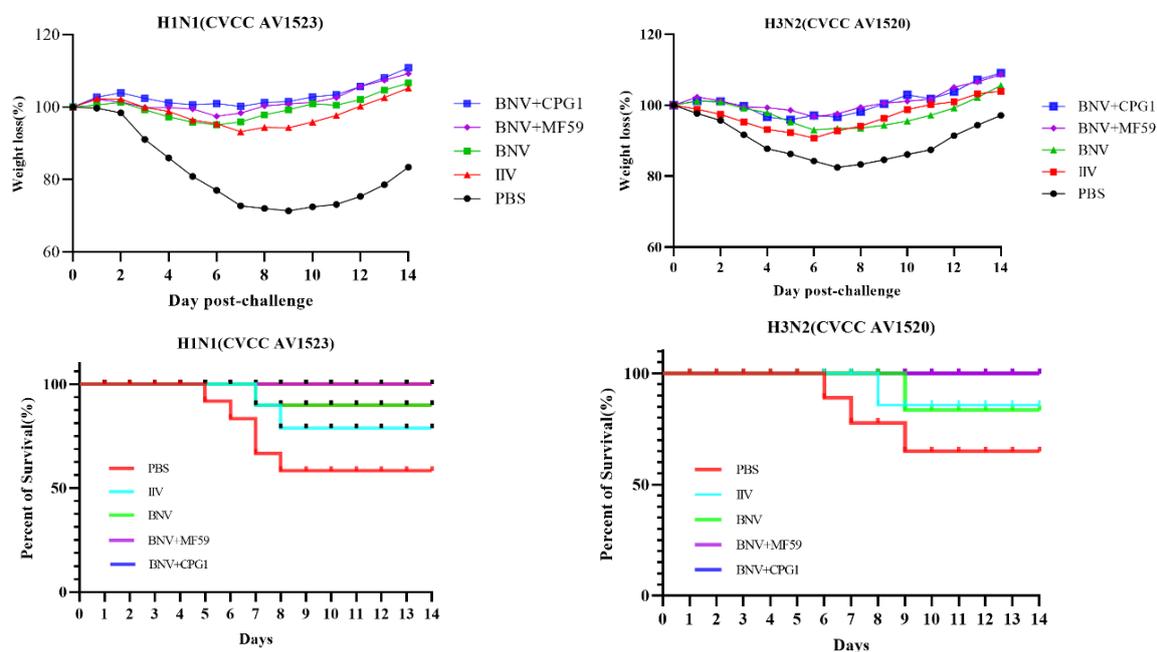


图 4-6 攻毒后小鼠体重曲线及生存曲线

Fig 4-6 Body weight curve and survival curve of mice after challenge

4.3.6 病毒载量分析

攻毒后第 6 天，每组取 3 只小鼠处以安乐死，采集肺脏提取 RNA 用 RT-PCR 定量分析肺脏中病毒载量；连续追踪并收集攻毒后不同组别小鼠粪便，参照肺脏病毒载量方法进行持续排毒时长的分析。结果如下：

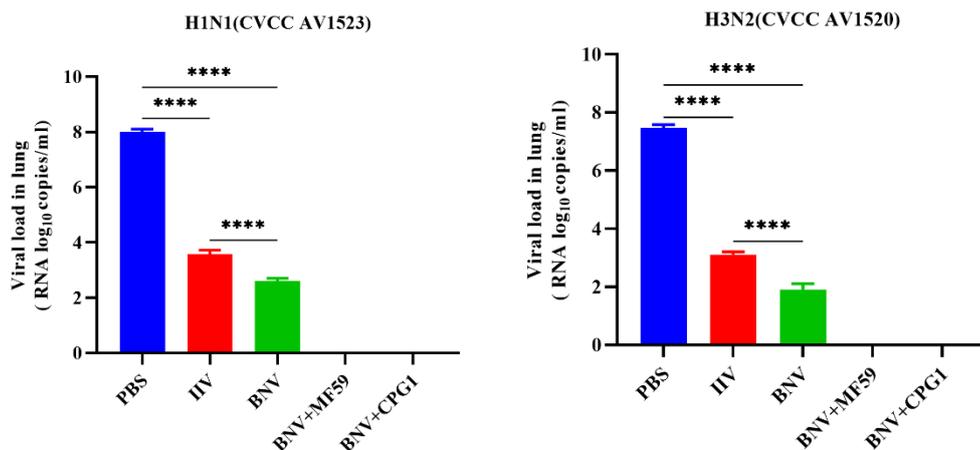


图 4-7 攻毒后不同组小鼠肺脏病毒载量分析

Fig4-7 Analysis of lung viral load in different groups of mice after challenge.

在攻毒后第 6 天(dpc), BNV + MF59 和 CPG1 组免疫小鼠在 H1N1 和 H3N2 病毒攻毒后未检测到肺部病毒。此外, 从接种 BNV 的小鼠中肺脏中检测到的病毒载量明显低于 IIV 组 ($p < 0.0001$)。相比之下, 接种 PBS 组小鼠肺组织中感染性病毒载量较高, H1N1 病毒载量为 6.4×10^8 copies/mL, H3N2 病毒载量为 $6.8 \times 10^{7.6}$ copies / mL (图 4-7)。与对照组和 BNV 接种组相比, BNV 及 BNV 加佐剂组小鼠在第 4 天和第 6 天的病毒脱落显著减少。与单独使用 BNV 相比, 在 BNV 疫苗中添加 MF59 和 CPG1 佐剂可增强对病毒脱落的保护作用, 并且在攻毒 14 d 后粪便中检测不到病毒 (图 4-8)。

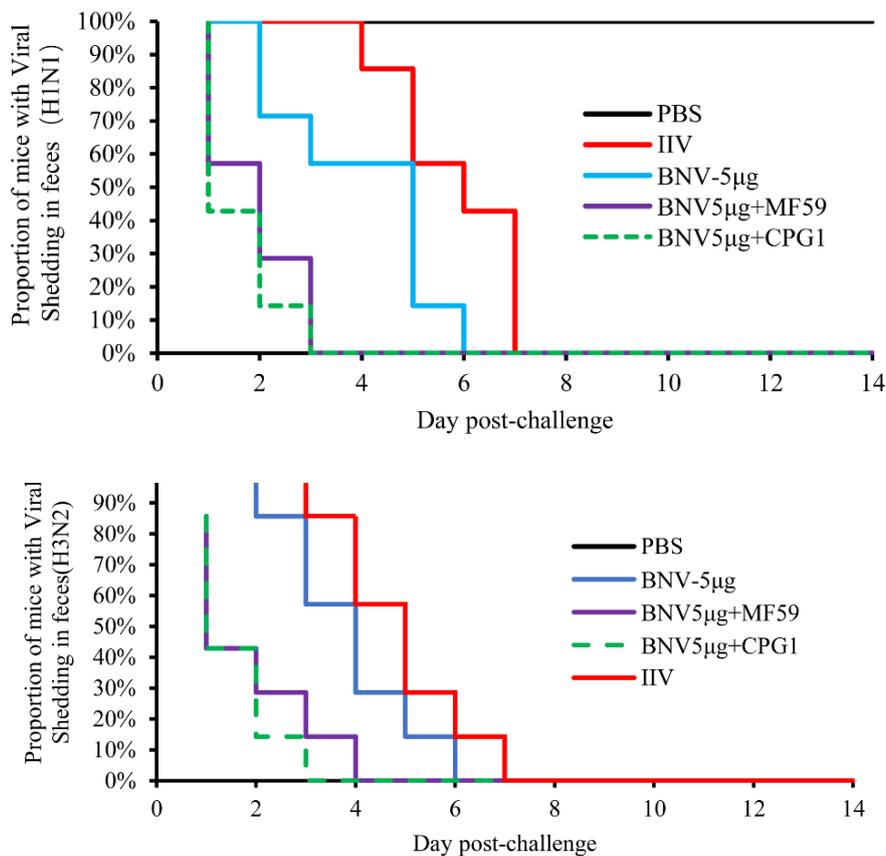


图 4-8 攻毒后不同组小鼠粪便持续排毒时长检测

Fig4-8 Detection of viral shedding duration of feces in different groups after challenge.

4.3.7 病理分析

取 H1N1 病毒(CVCC AV1523)和 H3N2 病毒(CVCC AV1520)攻毒后第 6 天的小鼠肺组织进行病理检查, 观察肺脏损伤情况。

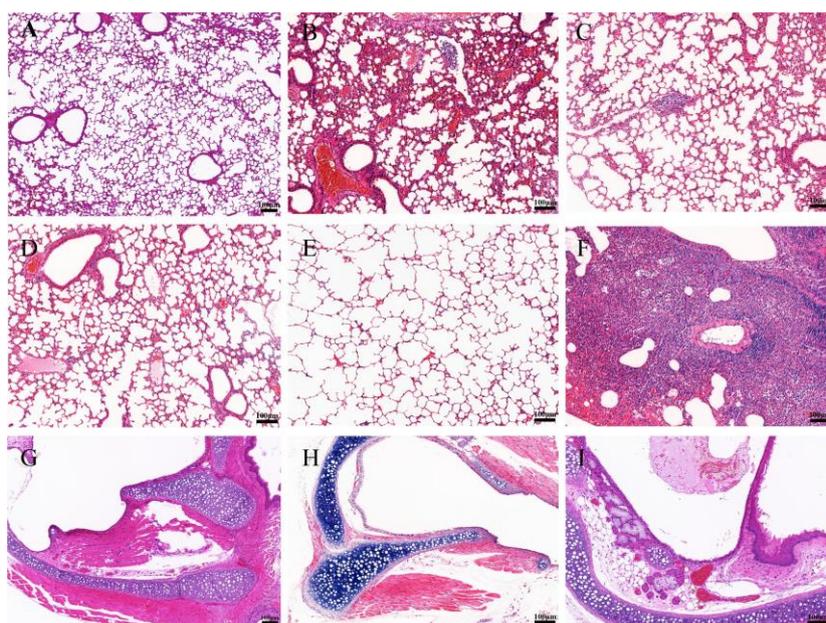


图 4-9 H1N1 感染后第六天小鼠肺和气管病变的组织病理学检查(CVCC AV1523)

Fig. 4-9 Histopathologic examination of lung and trachea lesions in mice at sixth day post-challenge of H1N1 (CVCC AV1523)

(A-F):各组肺变化。(A): NC(肺);(B):灭活疫苗(iv)组;(C): BNV 组;(D): BNV + MF59 组;(E): BNV + CPG 组;(F): PBS 对照组;(G-I):各组气管变化;(G): NC(气管)(H):灭活疫苗(iv)组;(I):BNV 组(比例尺 = 100 μ m)。

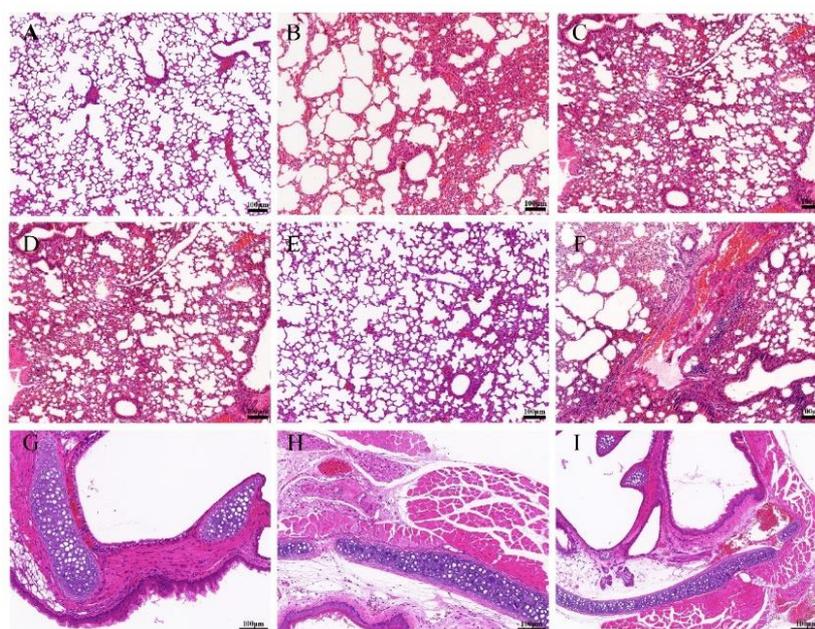


图 4-10 H3N2 攻毒第六天小鼠肺和气管病变的组织病理学检查(CVCC AV1520)。

Fig.4-10 Histopathologic examination of lung and trachea lesions in mice at sixth day post-challenge of H3N2 (CVCC AV1520).

(A-F):各组肺变化。(A): NC(肺);(B):灭活疫苗(iv)组;(C): BNV 组;(D): BNV + MF59 组;(E): BNV +

CPG 组;(F): PBS 对照组;(G-I):各组气管变化;(G): NC(气管)(H):灭活疫苗(iv)组;(一):BNV 组(比例尺 = 100 μ m)。

表 4-4 小鼠肺脏病理评分

Table 4-4 Pathological scores of lung in mice

分组	组织名称	结果 (H1N1 攻毒组)	结果 (H3N2 攻毒组)
BNV	肺脏	(—)	(—)
BNV+MF59		(—)	(—)
BNV+CPG1	肺脏	(—)	(—)
市售疫苗	肺脏	炎性细胞浸润 (++)	炎性细胞浸润 (+)
PBS	肺脏	肺泡上皮细胞坏死 (++) 增生 (+) 炎性细胞浸润 (+++)	肺泡上皮细胞坏死 (+) 炎性 细胞浸润 (++)

没有病变: (—); 病变: 采用 4 级法, 分别为轻微 (+)、轻度 (++)、中度 (+++)、重度 (++++)。

结果显示, 接种 IIV 的小鼠肺组织结构基本正常, 仅出现轻微的组织病理改变(图 4-9B 和 4-10B)。BNV 和 BNV + MF59 或 CPG1 佐剂组接种小鼠均未见明显病理变化(图 4-9C-E 和 4-10C-E)。PBS 接种组肺泡壁充血, 肺泡腔结构消失, 肺泡上皮细胞坏死, 细胞结构解体, 核固缩, 溶解, 伴有肺泡上皮细胞轻度增殖, 浸润炎性细胞较多。感染 H1N1 (CVCC AV1523)和 H3N2 (CVCC AV1520)病毒后, 主要呈圆形和深染的淋巴细胞表现为典型的间质性肺炎症状(图 4-9G 和 4-10G)。免疫组均未见明显气管出血症状, 仅见轻度气管壁增厚及淋巴细胞浸润(图 4-9H,I 和 4-10H,I)。根据临床症状和病理变化, H1N1 引起的病理损伤较 H3N2 更严重。

综上所述, 这些数据表明, BNV 可以有效地减少 H1N1 (CVCC AV1523)和 H3N2 (CVCC AV1520)感染小鼠的肺部大体和微观病变。

4.4 讨论

在本研究中, 我们比较了 MF59 和 CPG1 佐剂对二价纳米颗粒疫苗的增强作用。结果表明, 与灭活疫苗和单纳米颗粒疫苗相比, MF59 佐剂对体液免疫和细胞免疫的刺激更高、更强, 在攻毒保护研究中显示出更少的肺部病理病变, 更低的病毒载量和粪便脱落。CPG1 佐剂组主要诱导细胞免疫, 象征细胞免疫的 IgG2a 抗体水平是 IgG1 的 1.6 倍以上。此外, 添加 CPG1 佐剂组诱导高 IFN- γ 水平, 这与之前的报道一致(Rudicell et al. 2019)。IL-4 是一种具有多效性的细胞因子, 在 Th2 反应中起重要作用。高水平的 IL-4 可以帮助清除流感病毒, 对抗过度炎症, 促进恢复。在本研究中, 我们检测到高水平

的 IL-4, 这可能在一定程度上与较高的体液免疫水平相一致, 但 IL-4 在流感的感染和检测中有一定争议, 对 IL-4 指标的使用和数据指证分析仍需进一步研究。我们还比较了剂量对纳米颗粒疫苗免疫力的影响。10 μg 组和 5 μg 组抗体水平无显著差异(数据未显示)。因此, 本研究免疫剂量上优选 5 μg 。

攻毒实验结束后, 连续 14 d 记录小鼠的体重变化。根据先前的研究, 当小鼠体重下降到初始体重的 $>25\%$ 时, 将其定义为终点并对其实施安乐死。在这项研究中, 两只小鼠在 PBS 组 H1N1 病毒感染后死亡, 三只小鼠在观察期间体重减轻超过初始体重的 25%。虽然 PBS 组小鼠的体重从第 9 天开始逐渐恢复, 但直到第 14 天体重才恢复到接近攻毒前的水平(H1N1 约为 83.39%, H3N2 约为 97.13%)。结果进一步证明了 SIV 的严重危害, SIV 感染虽然致死率不高, 但可导致进行性消瘦, 生长性能差, 并可能因与其他呼吸道病原体或细菌性疾病合并感染而死亡。因此, 猪流感的临床感染和发病情况应引起重视。

到目前为止, 已经发现了至少 7 种不同的 SIV 血清亚型, 经典的猪型 H1N1、类禽型 H1N1 和类人型 H3N2 毒株在猪群中广泛流行。SI 的血清学流行病学调查表明, SIV 在中国的分布和演变日趋复杂。BNV 的应用对阻断猪流感病毒在中国的传播具有重要意义。虽然经小鼠被经常用作流感疫苗评价的动物模型(Matsuoka et al. 2009), 但不同动物之间存在物种差异, 二价纳米颗粒疫苗的效力仍需通过仔猪免疫及攻毒保护实验进一步验证。

4.5 小结

(1) 与市售猪流感二价灭活疫苗相比, BNV 可诱导小鼠产生更强的免疫反应, MF59 和 CPG1 佐剂可显著提高 BNV 的 HI 抗体滴度, BNV 联合佐剂使用平均 HI 滴度可提高 2-4 倍。

(2) 对小鼠血清中特异性 IgG 抗体及其亚型分析结果显示, BNV 疫苗组及 BNV +MF59 佐剂组表现出平衡的 Th1/Th2 免疫反应, 而 BNV +CPG1 佐剂组倾向于表现出较强的 Th1 型免疫反应。

(3) Balb/C 攻毒试验表明, BNV 疫苗显示出高效的保护作用, 可有效地减轻病毒感染引起的肺部大体和微观病变。

第五章 猪流感病毒 H1 和 H3 亚型二价纳米颗粒疫苗的仔猪免疫及攻毒保护试验

本研究中我们开发了基于猪流感病毒 H1N1 和 H3N2 的二价纳米颗粒疫苗,使用昆虫-杆状病毒表达系统生产重组 HA 蛋白,相关检测结果表明重组蛋白具有较高的表达量以及较好的血凝活性,且在小鼠免疫实验中展示了良好的效果。猪作为猪流感病毒感染及发病的靶动物,是研究猪流感病毒疫苗效力不可替代的动物模型,猪流感病毒感染成年猪症状不典型,但感染 4 周龄以下仔猪则会导致明显症状和损伤。本章节我们开展了二价纳米颗粒疫苗的仔猪免疫实验研究,并实施了攻毒保护效果研究,进一步对疫苗效力进行评估。

5.1 材料

5.1.1 毒株、细胞

猪流感病毒毒株 CVCC AV1519, CVCC AV1523 购自中国兽医药品监察所,由本实验室保存,经 10 d SPF 鸡胚扩增后用于仔猪攻毒试验;MDCK 细胞由本实验室保存。

5.1.2 仔猪及试验场地

28 只 4 周龄普通仔猪购自宝鸡市扶风县绛帐镇崔全奇养殖场,提前一周现场采样,经 ASFV, SIV, CSFV, PEDV, PRRSV 抗原检测均呈阴性后购买引进(SIV 检测引物来自本课题组,ASFV, CSFV, PEDV, PRRSV 检测引物由杨凌凯瑞生物科技有限公司王雅婷博士提供);免疫及攻毒保护实验场地位于咸阳杨陵区店背湾村秦亥旺养殖场,猪舍全舍地面、墙壁、食槽及饮水龙头经高浓度烧碱消毒 3 遍后空置 72 h 通风晾干,待仔猪各项病原检测阴性后引进。

仔猪饲养在在保育床上,自由采食饲料,自由饮水。疫苗免疫组 8 头/组, PBS 对照 4 头/组,加装保温灯,室温控制 $20^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$,相对湿度控制 50%,每天清理粪便,保持室内适度通风,防止氨气、硫化氢等有毒有害气体聚集;在仔猪引进后设置 5 天观察期,针对应激引起的拉稀症状用 5 mL 硫酸庆大霉素注射液进行干预治疗。

5.1.3 试剂及耗材

MF59 佐剂由杨凌凯瑞生物科技有限公司保存并提供;商品化猪流感 H1+H3 二价灭活疫苗(H1N1 LN 株+H3N2 HLJ 株)购自陕西疫苗代理商;Primerstar Max 购自宝日医生物技术(北京)有限公司;猪流感病毒检测引物级探针(序列参照国家标准 GB/T 27521-2011)由北京擎科生物科技有限公司西安分公司合成;HRP-conjugated Affinipure Goat Anti-Swine IgG(H+L)购自自武汉三鹰生物技术有限公司;

猪 γ 干扰素(IFN- γ)ELISA 检测试剂盒 (ml002333)、猪白介素 2(IL2)ELISA 试剂盒 (ml025974), 购自上海酶联生物科技有限公司; TPCK-胰蛋白酶, 购自 Sigma 公司; 仔猪配合饲料“仔猪宝”购自陕西华秦农牧科技有限公司; 兽用硫酸庆大霉素注射液购自陕西芮城科龙兽药有限公司; 胎牛血清 (FBS)、DMEM 高糖培养液 (含 L-谷氨酰胺) 购自 HyClone; 青、链霉素母液购自 Gibco 公司, 分装后保存于 -20°C ; 各型号注射器购自镇江康利医疗器械有限公司; 各规格无菌离心管、无菌的 T25、T75 细胞瓶购自无锡耐思生命科技股份有限公司; $0.22\ \mu\text{m}$, $0.45\ \mu\text{m}$ 一次性针头滤器 (Millipore Millex) 购自默克密理博公司; 单道、多道移液器购自 Eppendorf (德国艾本德股份公司); 96 孔微量板 (V 型底); 不同型号枪头购自苏州赛普生物科技股份有限公司; 0.5% 鸡红细胞悬液由本实验配置, 现配现用, 保存于 4°C 不超过 5 d。

5.1.4 主要仪器设备

生物安全柜 (HR40-IIA2(KY), 海尔), 双人超净工作台 (SW-CJ-2FD, 苏州安泰); 恒温振荡培养箱 (型号: MQT-60, 上海旻泉仪器有限公司); 振荡器 (QL-901, 其林贝尔); 电子天平 (FA2204B, 欧莱博); 二氧化碳培养箱 (CCL-170B-8, 新加坡 ESCOCelCulture®); 酶标仪 (型号: DNNF9602, 北京普朗新技术有限公司)。

5.2 方法

5.2.1 猪流感病毒仔猪感染模型的建立

猪流感病毒仔猪感染模型由杨凌凯瑞生物科技有限公司动物疫苗注册评价组建立 (流程卡编号: KRSW202201-SIV-02)。根据感染模型分析结果确定仔猪攻毒剂量并用于本方案仔猪攻毒保护研究。仔猪感染模型研究方案及结果见附录 D。

5.2.2 免疫分组

按照下表配制试验用疫苗, 并按规定的实验分组和免疫接种程序免疫仔猪。

表 5-1 仔猪攻毒免疫及攻毒保护实验分组

Table 5-1 Experimental grouping of piglets for attack immunization and challenge.

分组	剂量/只	数量/组/ 只	免疫途径
H1N1-TM/ PS80	60 μg (2 mL)	8	颈部肌肉注射
H3N2 -TM/ PS80			
H1N1-TM/ PS80	60 μg (2 mL)	8	颈部肌肉注射
H3N2 -TM/ PS80			
MF59 佐剂			
市售疫苗组	2 mL	8	颈部肌肉注射
PBS	2 mL	4	颈部肌肉注射

5.2.3 免疫、采血及攻毒

(1) 免疫及采血

0 d 首免，21 d 加强免疫一次，注射剂量及注射方式参照图 5-1；免疫前 (-1 d)，一免后第 14 天，二免后第 14 天(35 d)分别对各组仔猪前腔静脉采血，分离血清。

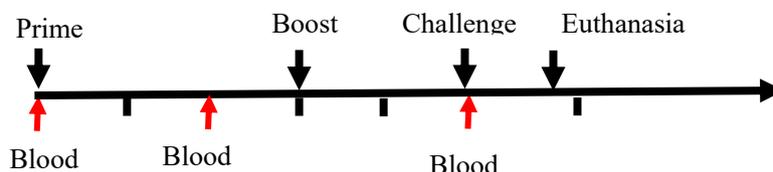


图 5-1 仔猪免疫及攻毒实验进程图

Fig 5-1 Progress of immune and challenge experiments of piglets

(2) 攻毒

二免后第 14 天攻毒，仔猪经气管注射方式感染病毒(气管注射方法：猪仰卧保定，前躯略高于后躯。注射部位：颈上部、腹侧面正中，两个气管轮软骨环之间。沿气管轮软骨环之间垂直进针，摆动针头有空虚感时，即可缓慢注入病毒液。)；对照组仔猪注入 2mL PBS。按照上表分组一分为二，实验组 4 头/组，PBS 组 2 头/组，用耳标做好标记，用 CVCC AV1523 (H1N1) 和 CVCC AV1519 (H3N2) 分别攻毒。

5.2.4 HI 实验

方法参照 4.2.3 部分。

5.2.5 抗原特异性 IgG 检测

用 ELISA 方法检测 HA 抗原特异性 IgG 抗体水平，操作方法如下：

① 包被：根据 BCA 蛋白定量的结果，将抗原用 PBS 稀释至 4 $\mu\text{g/mL}$ ，将稀释后的抗原按照 100 μL /孔铺板并于 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜。

② 洗板：每孔加入 200 μL 的 PBST，轻柔敲击震荡 30 s 后弃去液体，于吸水纸上拍干，重复“洗-拍”过程 3 次；

③ 封闭：向每孔加入 200 μL 5% 脱脂奶粉，37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱封闭 90 min 后用 PBST 重复上一步“洗-拍”过程 3 次；

④ 加样：将血清用 5% 的脱脂奶粉作 1: 1000 倍稀释，按照 100 μL /孔铺板，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育 60 min 后用 PBST 重复上一步“洗-拍”过程 3 次；

⑤ HRP 标记：向每孔加入 100 μL 1:5000 稀释的二抗，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 45 min，重复第二步“洗-拍”过程 3 次；

⑥ 显色：向孔中加入 100 μL TMB 显色液，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光温育 10 min；

⑦ 终止及测定：向孔内加 50 μL 终止液，用酶标仪测量 450 nm 波长处的 OD 值。

5.2.6 细胞因子检测

使用猪 γ 干扰素(IFN- γ)ELISA 检测试剂盒、猪白介素 2(IL-2) ELISA 试剂盒测定二免后第 14 天猪血清中的 IFN- γ 和 IL-2 水平。具体方法可参照 4.2.4 章节进行。

5.2.7 病毒载量检测

针对猪肺脏样本和鼻拭子样本中的病毒含量，提取 RNA，采用 RT-PCR 方法进行检测。具体方法参照 4.2.6 方法进行。

5.2.8 病理分析

攻毒 5 d 后，对仔猪实施安乐死并剖检，并收集肺组织用 10 %福尔马林固定后样品送至武汉塞维尔生物科技有限公司进行病理分析，按病理检验 SOP 程序进行，脱水、修剪、包埋、切片、染色、封片等，最后镜检。采用 3DHISTECH (Hungary) 生产的 Pannoramic 250 数字切片扫描仪对切片进行图像采集，每张切片先于低倍下观察全部组织大体病变，选择要观察的区域采集 20 倍图片，观察具体病变。出具病理分析报告，详细记录病理变化及评分。

5.2.9 统计分析

所有的实验数据均以平均数 \pm 标准差 (SD) 表示，统计分析采用 GraphPad Prism 9.0 版软件进行。各组间差异有统计学意义，两者间比较使用 t -test 检验方法。P <0.05，两组存在显著差异，P < 0.01，两组存在极显著差异。

5.3 结果

5.3.1 HI 抗体水平分析结果

为了评价 BNV 对仔猪的免疫原性，分别于一免后第 14 天，二免后第 14 天 (35 d) 采集免疫仔猪和对照组仔猪的血清样本，检测血清 HI 抗体滴度。

结果显示 (图 5-2)，所有 PBS 组仔猪针对 H1 和 H3 两种抗原的 HI 抗体均为血清阴性，而 BNV 组、BNV+MF59 组和 IIV 组的 HI 滴度随着时间的推移而升高，一免后 14 d，BNV 组和 BNV+MF59 组针对 H1 抗原的 HI 滴度均为 7 log₂，市售灭活疫苗 IIV 组 HI 滴度为 5 log₂；二免后 14 d，BNV 组和 BNV+MF59 组对 H1 抗原的 HI 滴度分别达到 10 log₂ 和 11 log₂，市售灭活疫苗 IIV 组 HI 滴度为 7 log₂。

针对 H3 抗原进行的 HI 抗体滴度趋势与 H1 趋势相同，但总体抗体滴度相对 H1 抗体滴度稍低，一免后 14 d，BNV 组、BNV+MF59 组及市售灭活疫苗 IIV 组针对 H3 抗原的 HI 抗体滴度分别为 6 log₂，7 log₂，5 log₂；二免后 14 d，上述三组 HI 抗体滴度则分别升高至 9 log₂，9 log₂，8 log₂。

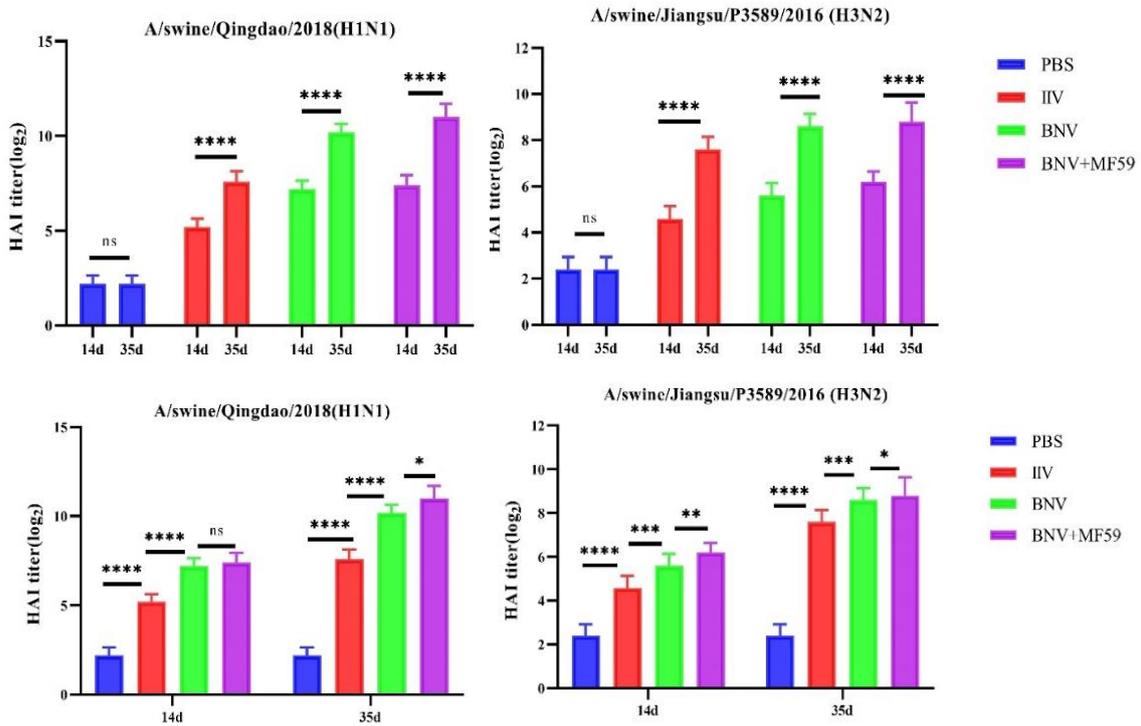


图 5-2 不同免疫组仔猪 HI 实验结果

Fig. 5-2 Results of HI experiment in pigs of different immune groups

5.3.2 HA 特异性 IgG 检测结果

本研究中，我们还通过 ELISA 实验检测不同实验组血清与两种纳米颗粒 HA 蛋白结合产生的 IgG 抗体水平。

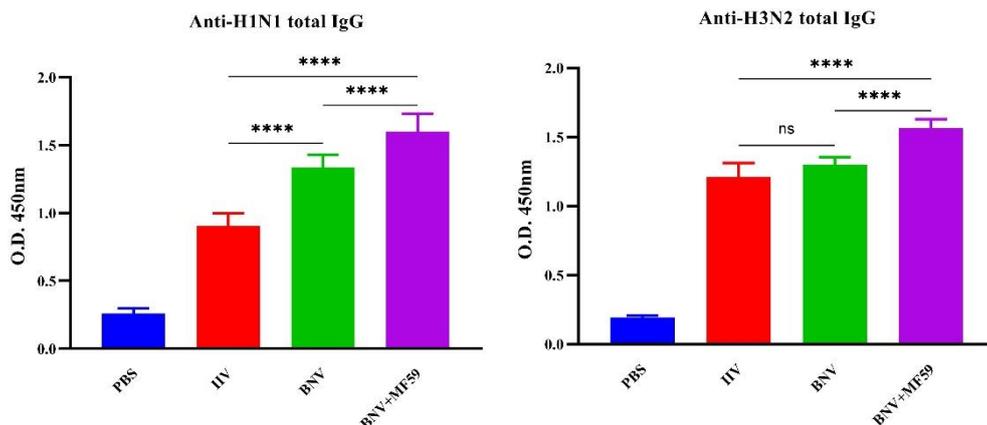


图 5-3 不同免疫组仔猪特异性 IgG 抗体分析

Fig. 5-3 Analysis of specific IgG antibody in pigs of different immune groups

结果显示（图 5-3），不同疫苗均可在仔猪体内诱导产生 IgG 抗体，不同疫苗组间

存在显著性差异。BNV 组和 BNV+MF59 组针对 H1N1 亚型 HA 的特异性 IgG 滴度显著高于市售疫苗组，BNV+MF59 组显著高于 BNV 组；BNV+MF59 组针对 H3N2 亚型 HA 的特异性 IgG 滴度显著高于 BNV 组和市售疫苗 IIV 组，BNV 组和 IIV 组之间无显著差异。

5.3.3 细胞因子表达水平检测

IFN- γ 在诱导抗病毒免疫中起着重要的免疫调节作用，疫苗免疫后机体产生 IFN- γ 的水平一定程度上反映辅助性 T 细胞的活动，因此，检测 IFN- γ 的水平就是间接地检测辅助性 T 细胞活性。IL-2 是由 CD4+T 细胞产生的细胞因子，在免疫细胞活化和增殖中起着关键作用，检测 IL-2 的生物学活性可间接了解辅助性 T 细胞的功能。疫苗免疫后抗体和细胞因子水平在 2 周内可达到较高水平，因此检测时间选取免疫后 2 周。

本研究中，我们使用猪 γ 干扰素(IFN- γ) ELISA 检测试剂盒和猪白介素 2(IL-2)ELISA 试剂盒测定二免后 14 d 时猪血清中的 IFN- γ 和 IL-2 水平。

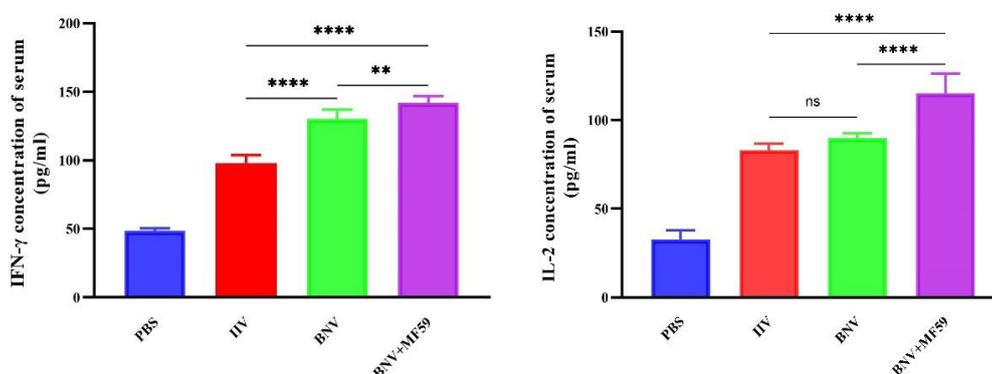


图 5-4 二免后 14d 不同免疫组仔猪细胞因子检测结果

Fig. 5-4 Cytokine detection of different groups 14d after immunization.

结果显示（图 5-4），与 PBS 或 IIV 组相比，BNV 组和 BNV+MF59 组的 IFN- γ 水平升高明显，BNV 组和 BNV+MF59 组 IFN- γ 水平显著高于 IIV 组；BNV+MF59 组的 IL-2 水平显著高于 BNV 和 IIV 组，但 BNV 组和 IIV 组的 IL-2 水平差异无统计学意义。

5.3.4 病毒载量

攻毒后第 5 天，对仔猪进行安乐死并剖检，采集肺脏提取 RNA 用 RT-PCR 定量分析肺脏中病毒载量；连续追踪并收集攻毒后不同组别仔猪鼻拭子，参照肺脏病毒载量方法检测病毒载量。结果如下（图 5-5）。

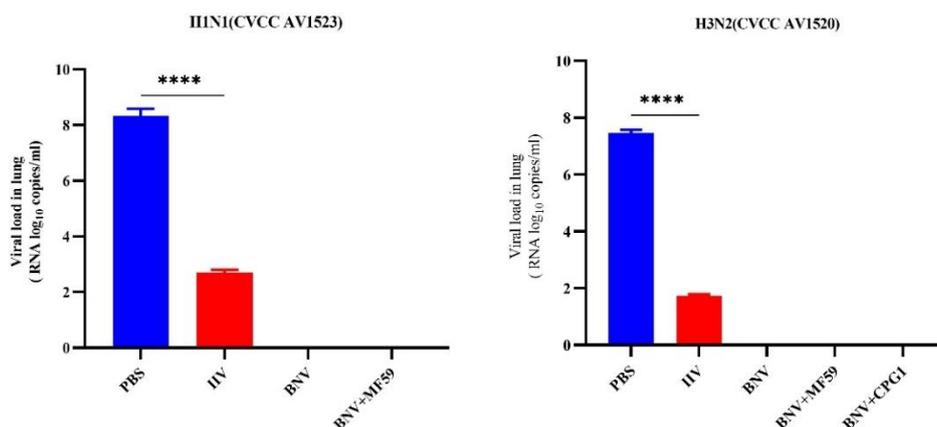


图 5-5 攻毒后不同组仔猪肺脏病毒载量分析

Fig.5-5 Analysis of lung viral load in different groups of pigs after challenge

攻毒后第 5 天(dpc)，BNV 和 BNV + MF59 组免疫仔猪在 H1N1 和 H3N2 病毒攻毒后未检测到肺部病毒，接种商用疫苗 IIV 组的仔猪肺脏中病毒载量为 2.6×10^7 copies/mL， 1.8×10^7 copies/mL。相比之下，接种 PBS 组仔猪肺组织中感染性病毒载量较高，H1N1 病毒载量为 8.4×10^7 copies/mL，H3N2 病毒载量为 7.6×10^7 copies/mL。

攻毒后各疫苗免疫组的仔猪鼻拭子在监测期内均未检测到病毒，PBS 组 H1N1 病毒攻毒对照组在第 3-5 天均检测到猪流感病毒，病毒载量分别为 3.7×10^7 copies/mL， 4.1×10^7 copies/mL， 4.3×10^7 copies/mL；PBS 组 H3N2 病毒攻毒对照组在第 4、5 天检测到猪流感病毒，病毒载量分别为 2.6×10^7 copies/mL， 3.1×10^7 copies/mL。

5.3.5 病理分析

取 H1N1 病毒(CVCC AV1523)和 H3N2 病毒(CVCC AV1520)攻毒第 5 天的仔猪肺脏组织进行病理检查，观察肺脏及气管损伤情况。

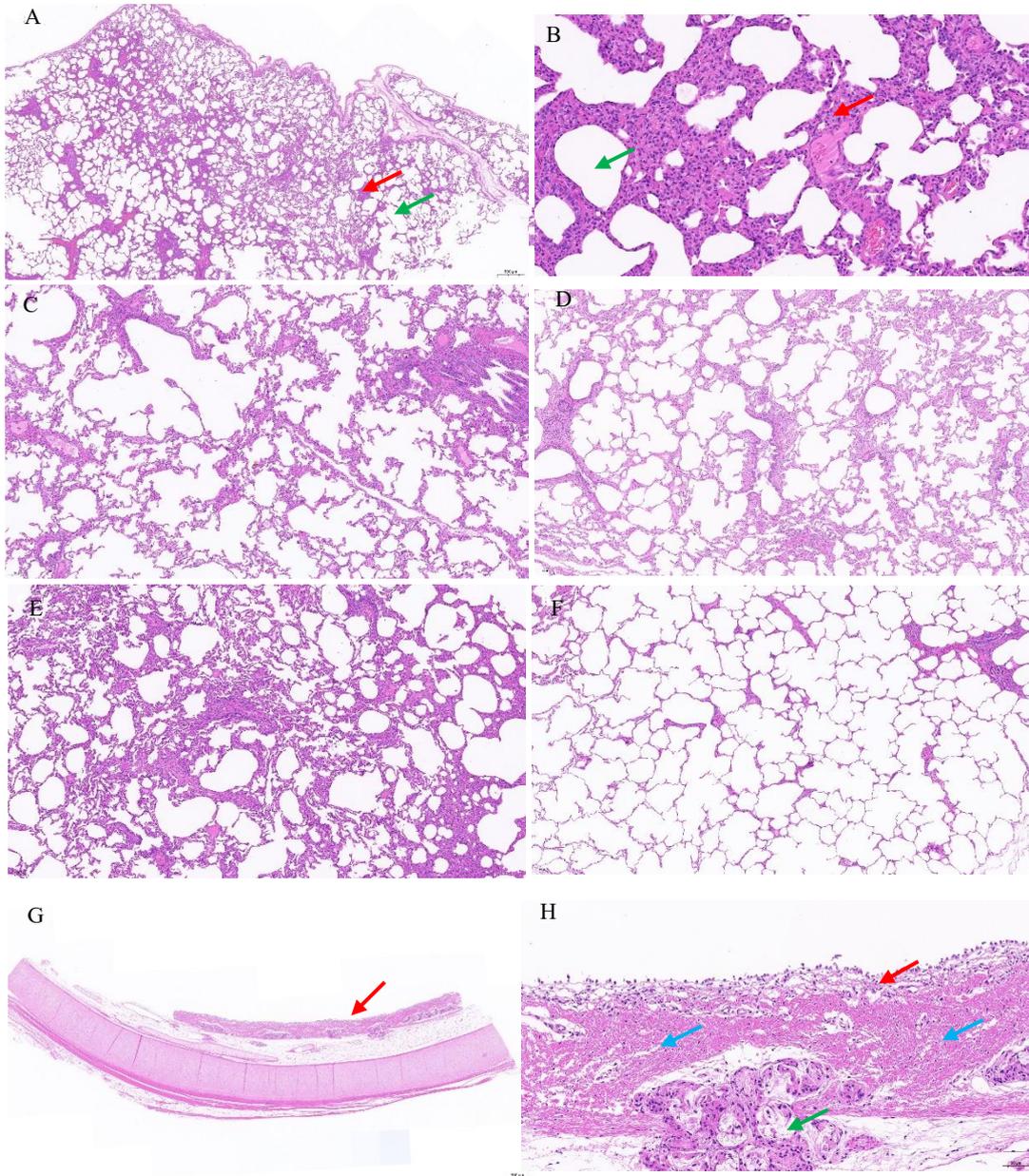


图 5-6 仔猪感染 H1N1 后肺脏病变的组织病理学分析

Fig.5-6 Histopathological analysis of lung lesions in piglets infected with H1N1

(A-F):各组肺变化。(A): PBS 对照组 (20x) ;(B): PBS 对照组 (200x) ;(C): BNV+MF59 组 (100x) ;(D): BNV 组 (100x) ;(E): IIV 组 (100x) ;(F): NC 组 (100x) ;(G-H):PBS 对照组气管变化;(G): PBS 对照组 (20x) ;(H): PBS 对照组 (200x) (比例尺= 500 μ m)

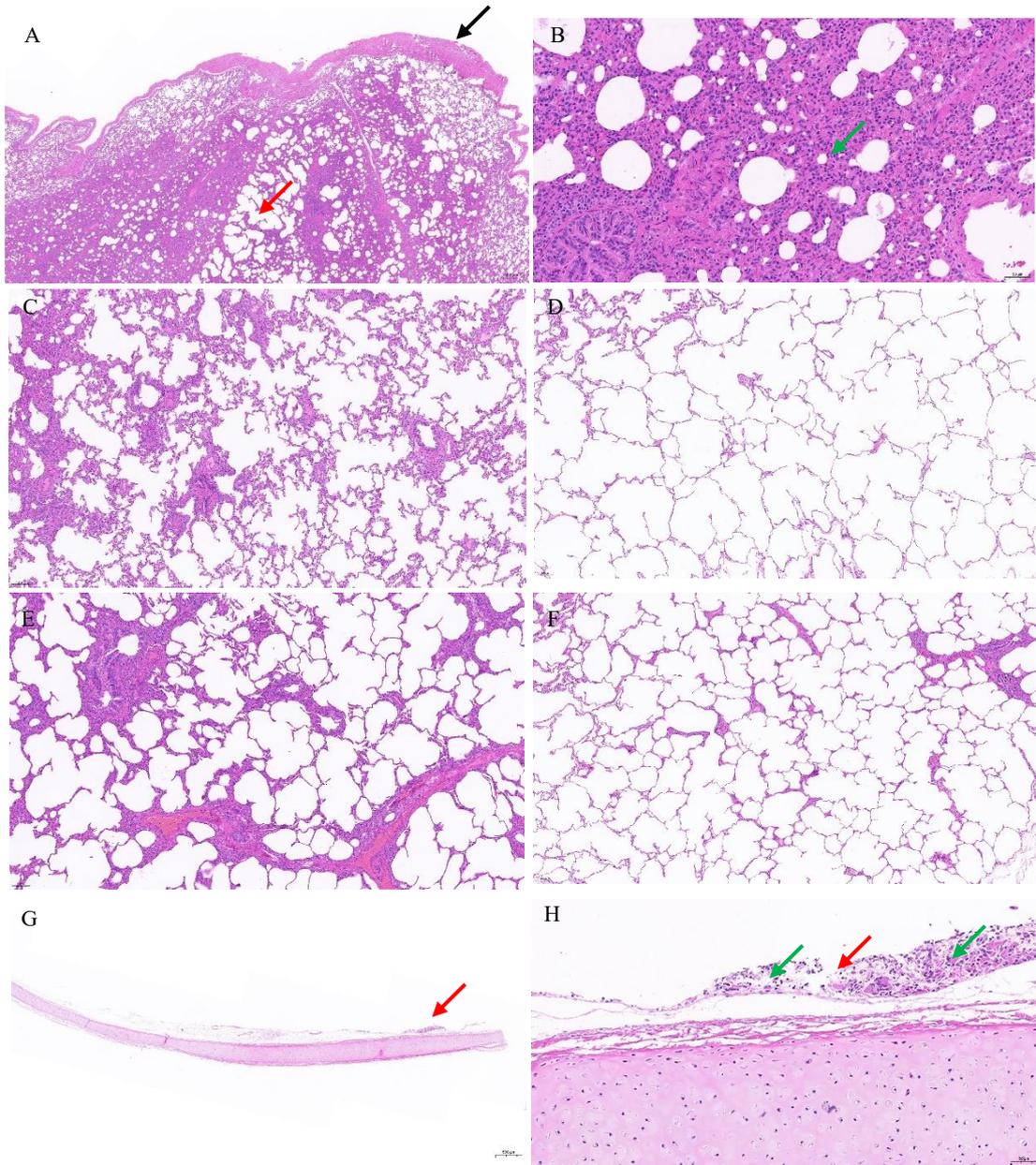


图 5-7 仔猪感染 H3N2 后肺脏病变的组织病理学分析

Fig.5-7 Histopathological analysis of lung lesions in piglets infected with H3N2.

(A-F):各组肺变化。(A): PBS 对照组 (20x) ;(B): PBS 对照组 (200x) ;(C): BNV+MF59 组 (100x) ;(D): BNV 组 (100x) ;(E): IIV 组 (100x) ;(F): NC 组 (100x) ;(G-H):PBS 对照组气管变化;(G): PBS 对照组 (20x) ;(H): PBS 对照组 (200x) (比例尺=500 μ m)

表 5-2 攻毒仔猪肺脏病理评分

Table 5-1 Pathological scores of lung in pigs after challenge

分组	组织名称	结果 (H1N1 攻毒组)	结果 (H3N2 攻毒组)
BNV	肺脏	(—)	(—)
BNV+MF59	肺脏	(—)	(—)
IIV	肺脏	(—)	(—)
PBS	肺脏	肺泡上皮细胞增生 (+) 炎性细胞浸润 (++)	炎性细胞浸润 (+)

没有病变: (—); 病变: 采用 4 级法, 分别为轻微 (+)、轻度 (++)、中度 (+++)、重度 (++++)。

对攻毒后各实验组仔猪肺脏和气管 HE 分析显示, H1N1 攻击后, PBS 对照组肺脏组织肺泡隔较大范围增厚, 炎性细胞多点状浸润, 以中性粒细胞为主 (图 5-6A, B, 红色箭头), 肺泡较大范围扩张 (图 5-6A, B, 绿色箭头); 同时气管表面纤毛脱落, 上皮细胞大量脱落、稀疏 (图 5-6G, H, 红色箭头); 固有层炎性细胞点状浸润, 主要为淋巴细胞和中性粒细胞 (图 5-6G, H, 蓝色箭头); 腺体上皮细胞结构不清、脱落 (图 5-6G, H, 绿色箭头)。H3N2 攻击后, PBS 对照组肺脏组织被膜不规则增厚 (图 5-7A, 黑色箭头), 肺泡隔重度增厚, 炎性细胞较多量浸润, 以中性粒细胞为主 (图 5-7B, 绿色箭头), 肺泡较大范围扩张 (图 5-7A, 红色箭头); 同时气管表面纤毛脱落, 上皮细胞大量脱落、稀疏 (图 5-7G, H, 红色箭头); 固有层炎性细胞点状浸润, 主要为淋巴细胞和中性粒细胞 (图 5-7H, 绿色箭头)。

疫苗免疫组仔猪肺脏组织表面被覆浆膜, 未见明显水肿、炎性浸润或纤维结缔组织增生; 各级支气管结构完整清晰, 支气管上皮细胞形态正常, 无明显变性坏死或脱落。

5.4 讨论

近年来, 猪流感单价疫苗或多价疫苗的研发成为热点, 研究方向涵盖灭活苗、减毒活疫苗及新型基因工程疫苗等。Ruan 等(Ruan et al. 2020)开发了基于流行经典型 CS 和类禽型 EA H1N1 猪流感病毒的 HA 和 NA 基因的二价重组灭活疫苗, 用致死剂量的异源病毒攻击小鼠, 发现二价疫苗具有完全保护作用。Shelby 等(Aubrey et al. 2022)设计了基于反向遗传技术的猪流感二价减毒活疫苗 (LAIV), 免疫后抗体监测结果显示, LAIV 可以在猪体内刺激产生较高的保护性抗体反应, H1N2 和 H3N2 攻毒保护实验也显示出较好的保护作用。

Wu 等(Wu et al. 2017)开发了基于重组腺病毒的活载体疫苗(rAd5-avH1HA), 表达

H1N1 猪流感病毒 HA 基因, Balb/C 小鼠实验表明, 两剂免疫后小鼠体内产生了高水平的血凝抑制抗体, 并能防御同源和异源 H1N1 病毒攻击造成的损伤。范桂芳等(范桂芳 2018)以变异伪狂犬病病毒基因缺失毒株(rSMXΔgI/gEΔTK)为载体开发了表达 H1N1 亚型猪流感病毒 HA 基因的基因工程亚单位苗, 攻毒保护试验显示两种疫苗单独及联合免疫对小鼠均有较好的保护力, 保护率分别为 85.7 %、85.7 %和 71.4 %。本研究中, 我们开发了基于 IBEVs 系统的猪流感 H1 和 H3 亚型的二价纳米颗粒疫苗, 并验证了仔猪的免疫保护效果, 结果显示, 开发的 BNV 疫苗可产生高水平的 HI 抗体和 HA 特异性 IgG 抗体, 并在攻毒保护中表现出完全的保护作用, 这种新型纳米颗粒疫苗可作为猪流感大流行时的候选疫苗。

精神状态和体重指标是评价免疫动物在面临病毒攻击时耐受作用的一个重要指标, 以往的流感疫苗研究大多在小鼠等替代动物上开展, 体重减轻甚至死亡明显, 而在针对本体动物的免疫及攻毒研究中体重指标使用较少, 可能由于猪流感毒株自身的致病力因素, 实验仔猪在面临活病毒攻击时表现出厌食、嗜睡、被毛凌乱等特点, 但体重减轻不明显, 本研究中我们连续称重了攻毒后 5 天的体重指标, 但差异较小, 该指标在本研究中未展现, 后期应扩大实验群体数量并进行更深入细致的研究。

5.5 小结

(1) 与市售猪流感二价灭活疫苗相比, BNV 可诱导仔猪产生更强的免疫反应, MF59 佐剂能显著提高 BNV 的 HI 抗体滴度。

(2) 通过 ELISA 分析了二免后 14d 仔猪血清中特异性 IgG 抗体的含量, 结果显示 BNV 组和 BNV+MF59 组 IgG 水平显著高于市售疫苗组, BNV+MF59 组 IgG 水平高于 BNV 组, 但差异不显著。

(3) 仔猪攻毒试验表明, BNV 疫苗及 BNV+MF59 佐剂组能提供完全的保护作用, 免疫猪攻毒后肺脏中未检测到 SIV 病毒。HE 病理分析显示, BNV 疫苗及 BNV+MF59 佐剂组免疫猪的肺脏和气管未见病理损伤。

结 论

1、通过 GISAID 数据库筛选猪流感病毒 H1N1 和 H3N2 流行毒株 HA 基因序列，利用昆虫细胞-杆状病毒系统成功构建表达 HA 基因的重组杆状病毒 rBac-H1-HA-WT, rBac-H1-HA-TM, rBac-H3-HA-TM, 分析对比不同代次重组杆状病毒的病毒滴度、血凝滴度，筛选表达活性最优毒株用于表达、纯化及疫苗制备。

2、通过阴离子交换和扁豆凝集素亲和层析两步纯化获得 HA 蛋白。在亲和纯化过程中，三聚体 HA 的茎部疏水跨膜域与 PS80 洗涤剂内核在亲和柱上实现结合，形成了洗涤剂核心的纳米颗粒。经两步纯化的 HA 纳米颗粒蛋白纯度>85%，纳米颗粒粒径在 28 nm-68 nm；HA 头部域突出于纳米颗粒外部；纯化获得的纳米颗粒蛋白血凝活性>2¹¹，满足动物免疫评价需求。

3、Balb/C 小鼠免疫评价结果显示 BNV 疫苗可诱导产生比市售疫苗 IIV 更强的免疫反应，MF59 和 CPG1 佐剂可提高 BNV 的 HI 抗体滴度 2-4 倍；特异性 IgG 抗体及亚型分析显示，BNV 组及 BNV+MF59 佐剂组表现出均衡的 Th1/Th2 免疫反应；Balb/C 攻毒试验表明，BNV 疫苗具有较好的保护作用，可有效地减轻病毒感染引起的肺部大体和微观病变。

4、仔猪免疫试验表明，BNV 疫苗可诱导仔猪产生高水平的 HI 抗体，二免后 14d, BNV 组仔猪血清中的针对 H1 和 H3 亚型病毒的 HI 抗体滴度分别达到 10 log₂ 和 9 log₂；仔猪攻毒试验表明，BNV 疫苗及 BNV+MF59 佐剂组能提供充分的保护作用，免疫猪攻毒后肺脏中未检测到 SIV 病毒。HE 病理分析显示，BNV 疫苗及 BNV+MF59 佐剂组免疫猪的肺脏和气管未见病理损伤。

本研究的创新点

(1) 利用昆虫细胞-杆状病毒系统表达 H1 和 H3 亚型猪流感病毒的 HA 蛋白，通过在亲和纯化过程中三聚体 HA 的茎部疏水跨膜域与 PS80 洗涤剂内核在亲和柱上稳定结合，进而形成洗涤剂核心纳米颗粒，并对纳米颗粒蛋白进行表征。

(2) 对猪流感病毒 HA 跨膜区进行定向改造，将 H1 亚型 HA 跨膜区置换为 H3 亚型 HA 跨膜区，使 H1 亚型 HA 蛋白具有更高稳定性以及亚型间的交叉免疫力。

(3) 通过小鼠和仔猪攻毒保护实验对纳米颗粒疫苗的有效性进行评价，并初步筛选了免疫剂量和佐剂。

参考文献

- <Interspecies Transmission of Reassortant Swine Influenza A Virus Containing Genes from Swine Influenza A(H1N1)pdm09 and A(H1N2) Viruses.pdf>
- Abbasi, J. 2020. FLU-v, a Universal Flu Vaccine Candidate, Advances in Trial. *JAMA*, 323(14):1336.
- Allerson, M., Deen, J., Detmer, S. E., Gramer, M. R., Joo, H. S., Romagosa, A., Torremorell, M. 2013. The impact of maternally derived immunity on influenza A virus transmission in neonatal pig populations. *Vaccine*, 31(3):500-5.
- Antrobus, R. D., Coughlan, L., Berthoud, T. K., Dicks, M. D., Hill, A. V., Lambe, T., Gilbert, S. C. 2014. Clinical assessment of a novel recombinant simian adenovirus ChAdOx1 as a vectored vaccine expressing conserved Influenza A antigens. *Mol Ther*, 22(3):668-674.
- Atmar, R. L., Bernstein, D. I., Winokur, P., Frey, S. E., Angelo, L. S., Bryant, C., Ben-Yedidia, T., Roberts, P. C., El Sahly, H. M., Keitel, W. A. 2023. Safety and immunogenicity of Multimeric-001 (M-001) followed by seasonal quadrivalent inactivated influenza vaccine in young adults - A randomized clinical trial. *Vaccine*.
- Atsmon, J., Kate-Ilovitz, E., Shaikevich, D., Singer, Y., Volokhov, I., Haim, K. Y., Ben-Yedidia, T. 2012. Safety and immunogenicity of multimeric-001--a novel universal influenza vaccine. *J Clin Immunol*, 32(3):595-603.
- Aubrey, L., Barron-Castillo, U., Detmer, S., Zhou, Y. 2022. A Bivalent Live Attenuated Influenza Virus Vaccine Protects against Drifted H1N2 and H3N2 Clinical Isolates in Swine. *Viruses*, 15(1).
- Bakre, A. A., Jones, L. P., Kyriakis, C. S., Hanson, J. M., Bobbitt, D. E., Bennett, H. K., Todd, K. V., Orr-Burks, N., Murray, J., Zhang, M. et al. 2020. Molecular epidemiology and glycomics of swine influenza viruses circulating in commercial swine farms in the southeastern and midwest United States. *Vet Microbiol*, 251108914.
- Baudon, E., Peyre, M., Peiris, M., Cowling, B. J. 2017. Epidemiological features of influenza circulation in swine populations: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 12(6):e0179044.
- Becker, T., Elbahesh, H., Reperant, L. A., Rimmelzwaan, G. F., Osterhaus, A. 2021. Influenza Vaccines: Successes and Continuing Challenges. *J Infect Dis*, 224(12 Suppl 2):S405-S419.
- Bot, A., Smith, K. A., von Herrath, M. 2004. Molecular and cellular control of T1/T2 immunity at the interface between antimicrobial defense and immune pathology. *DNA Cell Biol*, 23(6):341-50.
- Botner, A., Belsham, G. J. 2012. Virus survival in slurry: analysis of the stability of foot-and-mouth disease, classical swine fever, bovine viral diarrhoea and swine influenza viruses. *Vet Microbiol*, 157(1-2):41-9.
- Bowman, A. S., Nelson, S. W., Edwards, J. L., Hofer, C. C., Nolting, J. M., Davis, I. C., Slemons, R. D. 2013. Comparative effectiveness of isolation techniques for contemporary Influenza A virus strains circulating in exhibition swine. *J Vet Diagn Invest*, 25(1):82-90.
- Brown, I. H. 2013. History and epidemiology of Swine influenza in Europe. *Curr Top Microbiol Immunol*, 370133-46.
- Brune, K. D., Buldun, C. M., Li, Y., Taylor, I. J., Brod, F., Biswas, S., Howarth, M. 2017. Dual Plug-and-Display Synthetic Assembly Using Orthogonal Reactive Proteins for Twin Antigen Immunization. *Bioconjug Chem*, 28(5):1544-1551.
- Bruun, T. U. J., Andersson, A. C., Draper, S. J., Howarth, M. 2018. Engineering a Rugged Nanoscaffold To Enhance Plug-and-Display Vaccination. *ACS Nano*, 12(9):8855-8866.
- Cai, M., Huang, J., Bu, D., Yu, Z., Fu, X., Ji, C., Zhou, P., Zhang, G. 2018. Molecular evolution of H1N1 swine influenza in Guangdong, China, 2016-2017. *Infect Genet Evol*, 60103-108.
- Cao, Z., Zeng, W., Hao, X., Huang, J., Cai, M., Zhou, P., Zhang, G. 2019. Continuous evolution of influenza A viruses of swine from 2013 to 2015 in Guangdong, China. *PLoS One*, 14(7):e0217607.
- Chiapponi, C., Zanni, I., Garbarino, C., Barigazzi, G., Foni, E. 2010. Comparison of the usefulness of the CACO-2 cell line with standard substrates for isolation of swine influenza A viruses. *Journal of Virological Methods*, 163(1):162-5.

- Clavijo, A., Tresnan, D. B., Jolie, R., Zhou, E. M. 2002. Comparison of embryonated chicken eggs with MDCK cell culture for the isolation of swine influenza virus. *Can J Vet Res*, 66(2):117-21.
- Corzo, C. A., Culhane, M., Juleen, K., Stigger-Rosser, E., Ducatez, M. F., Webby, R. J., Lowe, J. F. 2013. Active surveillance for influenza A virus among swine, midwestern United States, 2009-2011. *Emerg Infect Dis*, 19(6):954-60.
- Darricarrere, N., Pougatcheva, S., Duan, X., Rudicell, R. S., Chou, T. H., DiNapoli, J., Ross, T. M., Alefantis, T., Vogel, T. U., Kleanthous, H. et al. 2018. Development of a Pan-H1 Influenza Vaccine. *J Virol*, 92(22).
- Dawood, F. S., Iuliano, A. D., Reed, C., Meltzer, M. I., Shay, D. K., Cheng, P. Y., Bandaranayake, D., Breiman, R. F., Brooks, W. A., Buchy, P. et al. 2012. Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study. *Lancet Infect Dis*, 12(9):687-95.
- Deng, L., Wang, B. Z. 2018. A Perspective on Nanoparticle Universal Influenza Vaccines. *ACS Infect Dis*, 4(12):1656-1665.
- Ding, F. Y., Li, Y., Huang, B. X., Edwards, J., Cai, C., Zhang, G. H., Jiang, D., Wang, Q., Robertson, I. D. 2021. Infection and risk factors of human and avian influenza in pigs in south China. *Preventive Veterinary Medicine*, 190.
- Dobrescu, I., Levast, B., Lai, K., Delgado-Ortega, M., Walker, S., Banman, S., Townsend, H., Simon, G., Zhou, Y., Gerdts, V. et al. 2014. In vitro and ex vivo analyses of co-infections with swine influenza and porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Vet Microbiol*, 169(1-2):18-32.
- Du, L., Zhou, Y., Jiang, S. 2010. Research and development of universal influenza vaccines. *Microbes Infect*, 12(4):280-6.
- Dunkle, L. M., Kotloff, K. L., Gay, C. L., Anez, G., Adelglass, J. M., Barrat Hernandez, A. Q., Harper, W. L., Duncanson, D. M., McArthur, M. A., Florescu, D. F. et al. 2022. Efficacy and Safety of NVX-CoV2373 in Adults in the United States and Mexico. *N Engl J Med*, 386(6):531-543.
- Evans, T. G., Bussey, L., Eagling-Vose, E., Rutkowski, K., Ellis, C., Argent, C., Griffin, P., Kim, J., Thackwray, S., Shakib, S. et al. 2022. Efficacy and safety of a universal influenza A vaccine (MVA-NP+M1) in adults when given after seasonal quadrivalent influenza vaccine immunisation (FLU009): a phase 2b, randomised, double-blind trial. *Lancet Infect Dis*, 22(6):857-866.
- Feng, Z., Zhu, W., Yang, L., Liu, J., Zhou, L., Wang, D., Shu, Y. 2021. Epidemiology and Genotypic Diversity of Eurasian Avian-Like H1N1 Swine Influenza Viruses in China. *Viol Sin*, 36(1):43-51.
- Forberg, H., Hauge, A. G., Gjerset, B., Hungnes, O., Kilander, A. 2013. Swine influenza in Norway: a distinct lineage of influenza A(H1N1)pdm09 virus. *Influenza Other Respir Viruses*, 7 Suppl 4(Suppl 4):21-6.
- Fukao, T., Matsuda, S., Koyasu, S. 2000. Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-dependent IFN-gamma production by dendritic cells. *J Immunol*, 164(1):64-71.
- Gao, J., Couzens, L., Burke, D. F., Wan, H., Wilson, P., Memoli, M. J., Xu, X., Harvey, R., Wrammert, J., Ahmed, R. et al. 2019. Antigenic Drift of the Influenza A(H1N1)pdm09 Virus Neuraminidase Results in Reduced Effectiveness of A/California/7/2009 (H1N1pdm09)-Specific Antibodies. *mBio*, 10(2).
- Garten, R. J., Davis, C. T., Russell, C. A., Shu, B., Lindstrom, S., Balish, A., Sessions, W. M., Xu, X., Skepner, E., Deyde, V. et al. 2009. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*, 325(5937):197-201.
- Gerber, M. D., Lucia, T., Jr., Correa, L., Neto, J. E. P., Correa, E. K. 2017. Phytotoxicity of effluents from swine slaughterhouses using lettuce and cucumber seeds as bioindicators. *Sci Total Environ*, 59286-90.
- Goodell, C. K., Prickett, J., Kittawornrat, A., Johnson, J., Zhang, J., Wang, C., Zimmerman, J. J. 2016. Evaluation of Screening Assays for the Detection of Influenza A Virus Serum Antibodies in Swine. *Transbound Emerg Dis*, 63(1):24-35.
- He, J., Fan, K., Yan, X. 2019. Ferritin drug carrier (FDC) for tumor targeting therapy. *J Control Release*, 311-312288-300.
- He, W., Zhang, W., Yan, H., Xu, H., Xie, Y., Wu, Q., Wang, C., Dong, G. 2021. Distribution and evolution of H1N1 influenza A viruses with adamantanes-resistant mutations worldwide from 1918 to 2019. *J Med Virol*, 93(6):3473-3483.

- Hernandez, L. A., Miller, C. L., Vaughn, E. M. 2016. Particle and subunit-based hemagglutinin vaccines provide protective efficacy against H1N1 influenza in pigs. *Vet Microbiol*, 19135-43.
- Hong, S., Choi, D. W., Kim, H. N., Park, C. G., Lee, W., Park, H. H. 2020. Protein-Based Nanoparticles as Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics*, 12(7).
- Hou, D., Bi, Y., Sun, H., Yang, J., Fu, G., Sun, Y., Liu, J., Pu, J. 2012. Identification of swine influenza A virus and *Stenotrophomonas maltophilia* co-infection in Chinese pigs. *Virology Journal*, 9169.
- Hu, W., Zhang, H., Han, Q., Li, L., Chen, Y., Xia, N., Chen, Z., Shu, Y., Xu, K., Sun, B. 2015. A Vero-cell-adapted vaccine donor strain of influenza A virus generated by serial passages. *Vaccine*, 33(2):374-81.
- Jhung, M. A., Epperson, S., Biggerstaff, M., Allen, D., Balish, A., Barnes, N., Beaudoin, A., Berman, L., Bidol, S., Blanton, L. et al. 2013. Outbreak of Variant Influenza A(H3N2) Virus in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 57(12):1703-1712.
- Jimenez, L. F., Ramirez Nieto, G., Alfonso, V. V., Correa, J. J. 2014. Association of swine influenza H1N1 pandemic virus (SIV-H1N1p) with porcine respiratory disease complex in sows from commercial pig farms in Colombia. *Virol Sin*, 29(4):242-9.
- Kanekiyo, M., Wei, C. J., Yassine, H. M., McTamney, P. M., Boyington, J. C., Whittle, J. R., Rao, S. S., Kong, W. P., Wang, L., Nabel, G. J. 2013. Self-assembling influenza nanoparticle vaccines elicit broadly neutralizing H1N1 antibodies. *Nature*, 499(7456):102-6.
- Karch, C. P., Matyas, G. R., Burkhard, P., Beck, Z. 2018. Self-Assembling Protein Nanoparticles: implications for HIV-1 vaccine development. *Nanomedicine (Lond)*, 13(17):2121-2125.
- Khurana, S., Hahn, M., Coyle, E. M., King, L. R., Lin, T. L., Treanor, J., Sant, A., Golding, H. 2019. Repeat vaccination reduces antibody affinity maturation across different influenza vaccine platforms in humans. *Nat Commun*, 10(1):3338.
- Kim, Y. J., Lee, Y. T., Kim, M. C., Lee, Y. N., Kim, K. H., Ko, E. J., Song, J. M., Kang, S. M. 2017. Cross-Protective Efficacy of Influenza Virus M2e Containing Virus-Like Particles Is Superior to Hemagglutinin Vaccines and Variable Depending on the Genetic Backgrounds of Mice. *Frontiers in Immunology*, 8.
- Krueger, S., Curtis, J. E., Scott, D. R., Grishaev, A., Glenn, G., Smith, G., Ellingsworth, L., Borisov, O., Maynard, E. L. 2021. Structural Characterization and Modeling of a Respiratory Syncytial Virus Fusion Glycoprotein Nanoparticle Vaccine in Solution. *Mol Pharm*, 18(1):359-376.
- Lewis, N. S., Russell, C. A., Langat, P., Anderson, T. K., Berger, K., Bielejec, F., Burke, D. F., Dudas, G., Fonville, J. M., Fouchier, R. A. M. et al. 2016. The global antigenic diversity of swine influenza A viruses. *Elife*, 5.
- Liu, Q., Liu, K., Xue, C., Zhou, J., Li, X., Luo, D., Zheng, J., Xu, S., Liu, G. D., Cao, Y. 2014. Recombinant influenza H1, H5 and H9 hemagglutinins containing replaced H3 hemagglutinin transmembrane domain showed enhanced heterosubtypic protection in mice. *Vaccine*, 32(25):3041-9.
- Lopez-Robles, G., Montalvo-Corral, M., Burgara-Estrella, A., Hernandez, J. 2014. Serological and molecular prevalence of swine influenza virus on farms in northwestern Mexico. *Vet Microbiol*, 172(1-2):323-8.
- Ma, M. J., Wang, G. L., Anderson, B. D., Bi, Z. Q., Lu, B., Wang, X. J., Wang, C. X., Chen, S. H., Qian, Y. H., Song, S. X. et al. 2018. Evidence for Cross-species Influenza A Virus Transmission Within Swine Farms, China: A One Health, Prospective Cohort Study. *Clinical Infectious Diseases*, 66(4):533-540.
- Ma, W., Kahn, R. E., Richt, J. A. 2008. The pig as a mixing vessel for influenza viruses: Human and veterinary implications. *J Mol Genet Med*, 3(1):158-66.
- Ma, X., Zou, F., Yu, F., Li, R., Yuan, Y., Zhang, Y., Zhang, X., Deng, J., Chen, T., Song, Z. et al. 2020. Nanoparticle Vaccines Based on the Receptor Binding Domain (RBD) and Heptad Repeat (HR) of SARS-CoV-2 Elicit Robust Protective Immune Responses. *Immunity*, 53(6):1315-1330 e9.
- Manini, I., Trombetta, C. M., Lazzeri, G., Pozzi, T., Rossi, S., Montomoli, E. 2017. Egg-Independent Influenza Vaccines and Vaccine Candidates. *Vaccines (Basel)*, 5(3).
- Matsuda, T., Tanijima, T., Hirose, A., Masumi-Koizumi, K., Katsuda, T., Yamaji, H. 2020. Production of influenza virus-like particles using recombinant insect cells. *Biochem Eng J*, 163107757.
- Matsuoka, Y., Lamirande, E. W., Subbarao, K. 2009. The mouse model for influenza. *Curr Protoc Microbiol*, Chapter 15Unit 15G 3.

- McMahon, M., Asthagiri Arunkumar, G., Liu, W. C., Stadlbauer, D., Albrecht, R. A., Pavot, V., Aramouni, M., Lambe, T., Gilbert, S. C., Krammer, F. 2019. Vaccination With Viral Vectors Expressing Chimeric Hemagglutinin, NP and M1 Antigens Protects Ferrets Against Influenza Virus Challenge. *Front Immunol*, 10:2005.
- Metz, S. W., Tian, S., Hoekstra, G., Yi, X., Stone, M., Horvath, K., Miley, M. J., DeSimone, J., Luft, C. J., de Silva, A. M. 2016. Precisely Molded Nanoparticle Displaying DENV-E Proteins Induces Robust Serotype-Specific Neutralizing Antibody Responses. *PLoS Negl Trop Dis*, 10(10):e0005071.
- Montomoli, E., Khadang, B., Piccirella, S., Trombetta, C., Mennitto, E., Manini, I., Stanzani, V., Lapini, G. 2012. Cell culture-derived influenza vaccines from Vero cells: a new horizon for vaccine production. *Expert Rev Vaccines*, 11(5):587-94.
- Nelson, M. I., Stratton, J., Killian, M. L., Janas-Martindale, A., Vincent, A. L. 2015. Continual Reintroduction of Human Pandemic H1N1 Influenza A Viruses into Swine in the United States, 2009 to 2014. *Journal of Virology*, 89(12):6218-6226.
- Nypaver, C., Dehlinger, C., Carter, C. 2021. Influenza and Influenza Vaccine: A Review. *J Midwifery Womens Health*, 66(1):45-53.
- Ouyang, T., Zhang, X., Liu, X., Ren, L. 2019. Co-Infection of Swine with Porcine Circovirus Type 2 and Other Swine Viruses. *Viruses*, 11(2).
- Ovsyannikova, I. G., White, S. J., Albrecht, R. A., Garcia-Sastre, A., Poland, G. A. 2014. Turkey versus guinea pig red blood cells: hemagglutination differences alter hemagglutination inhibition responses against influenza A/H1N1. *Viral Immunol*, 27(4):174-8.
- Pan, C., Wu, J., Qing, S., Zhang, X., Zhang, L., Yue, H., Zeng, M., Wang, B., Yuan, Z., Qiu, Y. et al. 2020. Biosynthesis of Self-Assembled Proteinaceous Nanoparticles for Vaccination. *Adv Mater*, 32(42):e2002940.
- Panyasing, Y., Goodell, C. K., Wang, C., Kittawornrat, A., Prickett, J. R., Schwartz, K. J., Ballagi, A., Lizano, S., Zimmerman, J. J. 2014. Detection of influenza A virus nucleoprotein antibodies in oral fluid specimens from pigs infected under experimental conditions using a blocking ELISA. *Transbound Emerg Dis*, 61(2):177-84.
- Paules, C., Subbarao, K. 2017a. Influenza. *Lancet*, 390(10095):697-708.
- Paules, C. I., Marston, H. D., Eisinger, R. W., Baltimore, D., Fauci, A. S. 2017b. The Pathway to a Universal Influenza Vaccine. *Immunity*, 47(4):599-603.
- Pleguezuelos, O., Robinson, S., Stoloff, G. A., Caparros-Wanderley, W. 2012. Synthetic Influenza vaccine (FLU-v) stimulates cell mediated immunity in a double-blind, randomised, placebo-controlled Phase I trial. *Vaccine*, 30(31):4655-60.
- Richt, J. A., Lager, K. M., Clouser, D. F., Spackman, E., Suarez, D. L., Yoon, K. J. 2004. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assays for the detection and differentiation of North American swine influenza viruses. *J Vet Diagn Invest*, 16(5):367-73.
- Ruan, B. Y., Yao, Y., Wang, S. Y., Gong, X. Q., Liu, X. M., Wang, Q., Yu, L. X., Zhu, S. Q., Wang, J., Shan, T. L. et al. 2020. Protective efficacy of a bivalent inactivated reassortant H1N1 influenza virus vaccine against European avian-like and classical swine influenza H1N1 viruses in mice. *Vet Microbiol*, 246:108724.
- Rudicell, R. S., Garinot, M., Kanekiyo, M., Kamp, H. D., Swanson, K., Chou, T. H., Dai, S., Bedel, O., Simard, D., Gillespie, R. A. et al. 2019. Comparison of adjuvants to optimize influenza neutralizing antibody responses. *Vaccine*, 37(42):6208-6220.
- Ryt-Hansen, P., Krog, J. S., Breum, S. O., Hjulsgaard, C. K., Pedersen, A. G., Trebbien, R., Larsen, L. E. 2021. Co-circulation of multiple influenza A reassortants in swine harboring genes from seasonal human and swine influenza viruses. *Elife*, 10.
- Ryt-Hansen, P., Pedersen, A. G., Larsen, I., Kristensen, C. S., Krog, J. S., Wacheck, S., Larsen, L. E. 2020. Substantial Antigenic Drift in the Hemagglutinin Protein of Swine Influenza A Viruses. *Viruses*, 12(2).
- Schmidt, C., Cibulski, S. P., Andrade, C. P., Teixeira, T. F., Varela, A. P., Scheffer, C. M., Franco, A. C., de Almeida, L. L., Roehle, P. M. 2016. Swine Influenza Virus and Association with the Porcine Respiratory Disease Complex in Pig Farms in Southern Brazil. *Zoonoses Public Health*, 63(3):234-40.

- Sei, C. J., Rao, M., Schuman, R. F., Daum, L. T., Matyas, G. R., Rikhi, N., Muema, K., Anderson, A., Jobe, O., Kroscher, K. A. et al. 2021. Conserved Influenza Hemagglutinin, Neuraminidase and Matrix Peptides Adjuvanted with ALFQ Induce Broadly Neutralizing Antibodies. *Vaccines (Basel)*, 9(7).
- Sencer, D. J. 2011. Perspective: Swine-origin influenza: 1976 and 2009. *Clin Infect Dis*, 52 Suppl 1S4-7.
- Shieh, W. J., Blau, D. M., Denison, A. M., Deleon-Carnes, M., Adem, P., Bhatnagar, J., Sumner, J., Liu, L., Patel, M., Batten, B. et al. 2010. 2009 pandemic influenza A (H1N1): pathology and pathogenesis of 100 fatal cases in the United States. *Am J Pathol*, 177(1):166-75.
- Shinde, V., Bridges, C. B., Uyeki, T. M., Shu, B., Balish, A., Xu, X., Lindstrom, S., Gubareva, L. V., Deyde, V., Garten, R. J. et al. 2009. Triple-reassortant swine influenza A (H1) in humans in the United States, 2005-2009. *N Engl J Med*, 360(25):2616-25.
- Shinde, V., Cho, I., Plested, J. S., Agrawal, S., Fiske, J., Cai, R., Zhou, H., Pham, X., Zhu, M., Cloney-Clark, S. et al. 2022. Comparison of the safety and immunogenicity of a novel Matrix-M-adjuvanted nanoparticle influenza vaccine with a quadrivalent seasonal influenza vaccine in older adults: a phase 3 randomised controlled trial. *The Lancet Infectious Diseases*, 22(1):73-84.
- Simon-Grife, M., Martin-Valls, G. E., Vilar, M. J., Garcia-Bocanegra, I., Mora, M., Martin, M., Mateu, E., Casal, J. 2011. Seroprevalence and risk factors of swine influenza in Spain. *Vet Microbiol*, 149(1-2):56-63.
- Simon, G., Larsen, L. E., Durrwald, R., Foni, E., Harder, T., Van Reeth, K., Markowska-Daniel, I., Reid, S. M., Dan, A., Maldonado, J. et al. 2014. European surveillance network for influenza in pigs: surveillance programs, diagnostic tools and Swine influenza virus subtypes identified in 14 European countries from 2010 to 2013. *PLoS One*, 9(12):e115815.
- Smith, G., Liu, Y., Flyer, D., Massare, M. J., Zhou, B., Patel, N., Ellingsworth, L., Lewis, M., Cummings, J. F., Glenn, G. 2017. Novel hemagglutinin nanoparticle influenza vaccine with Matrix-M adjuvant induces hemagglutination inhibition, neutralizing, and protective responses in ferrets against homologous and drifted A(H3N2) subtypes. *Vaccine*, 35(40):5366-5372.
- Song, Y., Zhang, Y., Zhang, B., Chen, L., Zhang, M., Wang, J., Jiang, Y., Yang, C., Jiang, T. 2020. Identification, Genetic Analysis, and Pathogenicity of Classical Swine H1N1 and Human-Swine Reassortant H1N1 Influenza Viruses from Pigs in China. *Viruses*, 12(1).
- Sun, H. L., Lin, J. T., Liu, Z. T., Yu, Y. N., Wu, M. H., Li, S., Liu, Y., Feng, Y. L., Wu, Y. Q., Li, M. L. et al. 2019. Genetic, Molecular, and Pathogenic Characterization of the H9N2 Avian Influenza Viruses Currently Circulating in South China. *Viruses-Basel*, 11(11).
- Sun, H. L., Xiao, Y. H., Liu, J. Y., Wang, D. Y., Li, F. T., Wang, C. X., Li, C., Zhu, J. D., Song, J. W., Sun, H. R. et al. 2020. Prevalent Eurasian avian-like H1N1 swine influenza virus with 2009 pandemic viral genes facilitating human infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(29):17204-17210.
- Sun, W., He, L., Zhang, H., Tian, X., Bai, Z., Sun, L., Yang, L., Jia, X., Bi, Y., Luo, T. et al. 2021. The self-assembled nanoparticle-based trimeric RBD mRNA vaccine elicits robust and durable protective immunity against SARS-CoV-2 in mice. *Signal Transduct Target Ther*, 6(1):340.
- Sunaga, F., Tsuchiaka, S., Kishimoto, M., Aoki, H., Kakinoki, M., Kure, K., Okumura, H., Okumura, M., Okumura, A., Nagai, M. et al. 2020. Development of a one-run real-time PCR detection system for pathogens associated with porcine respiratory diseases. *J Vet Med Sci*, 82(2):217-223.
- Sura, T., Gering, V., Cammann, C., Hammerschmidt, S., Maass, S., Seifert, U., Becher, D. 2022. Streptococcus pneumoniae and Influenza A Virus Co-Infection Induces Altered Polyubiquitination in A549 Cells. *Front Cell Infect Microbiol*, 12817532.
- Tang, P., Cui, E. H., Chang, W. C., Yu, C., Wang, H., Du, E. Q., Wang, J. Y. 2022. Nanoparticle-Based Bivalent Swine Influenza Virus Vaccine Induces Enhanced Immunity and Effective Protection against Drifted H1N1 and H3N2 Viruses in Mice. *Viruses*, 14(11).
- Taubenberger, J. K., Morens, D. M. 2008. The pathology of influenza virus infections. *Annu Rev Pathol*, 3499-522.
- Tenforde, M. W., Kondor, R. J. G., Chung, J. R., Zimmerman, R. K., Nowalk, M. P., Jackson, M. L., Jackson, L. A., Monto, A. S., Martin, E. T., Belongia, E. A. et al. 2021. Effect of Antigenic Drift on Influenza Vaccine Effectiveness in the United States-2019-2020. *Clin Infect Dis*, 73(11):e4244-e4250.

- Toback, S., Galiza, E., Cosgrove, C., Galloway, J., Goodman, A. L., Swift, P. A., Rajaram, S., Graves-Jones, A., Edelman, J., Burns, F. et al. 2022. Safety, immunogenicity, and efficacy of a COVID-19 vaccine (NVX-CoV2373) co-administered with seasonal influenza vaccines: an exploratory substudy of a randomised, observer-blinded, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Respir Med*, 10(2):167-179.
- Vu, M. N., Kelly, H. G., Kent, S. J., Wheatley, A. K. 2021. Current and future nanoparticle vaccines for COVID-19. *EBioMedicine*, 74103699.
- Wang, W., Zhou, X., Bian, Y., Wang, S., Chai, Q., Guo, Z., Wang, Z., Zhu, P., Peng, H., Yan, X. et al. 2020. Dual-targeting nanoparticle vaccine elicits a therapeutic antibody response against chronic hepatitis B. *Nat Nanotechnol*, 15(5):406-416.
- Wang, Y., Wu, J., Xue, C., Wu, Z., Lin, Y., Wei, Y., Wei, X., Qin, J., Zhang, Y., Wen, Z. et al. 2017. A recombinant H7N9 influenza vaccine with the H7 hemagglutinin transmembrane domain replaced by the H3 domain induces increased cross-reactive antibodies and improved interclade protection in mice. *Antiviral Res*, 14397-105.
- Wong, S. S., Webby, R. J. 2013. Traditional and new influenza vaccines. *Clin Microbiol Rev*, 26(3):476-92.
- Wu, Y., Yang, D., Xu, B., Liang, W., Sui, J., Chen, Y., Yang, H., Chen, H., Wei, P., Qiao, C. 2017. Immune efficacy of an adenoviral vector-based swine influenza vaccine against antigenically distinct H1N1 strains in mice. *Antiviral Res*, 14729-36.
- Yan, Y., Wang, X., Lou, P., Hu, Z., Qu, P., Li, D., Li, Q., Xu, Y., Niu, J., He, Y. et al. 2020. A Nanoparticle-Based Hepatitis C Virus Vaccine With Enhanced Potency. *J Infect Dis*, 221(8):1304-1314.
- Yassine, H. M., Boyington, J. C., McTamney, P. M., Wei, C. J., Kanekiyo, M., Kong, W. P., Gallagher, J. R., Wang, L., Zhang, Y., Joyce, M. G. et al. 2015. Hemagglutinin-stem nanoparticles generate heterosubtypic influenza protection. *Nat Med*, 21(9):1065-70.
- Yu, H., Hua, R. H., Zhang, Q., Liu, T. Q., Liu, H. L., Li, G. X., Tong, G. Z. 2008. Genetic evolution of swine influenza A (H3N2) viruses in China from 1970 to 2006. *J Clin Microbiol*, 46(3):1067-75.
- Yu, H., Zhou, Y. J., Li, G. X., Ma, J. H., Yan, L. P., Wang, B., Yang, F. R., Huang, M., Tong, G. Z. 2011. Genetic diversity of H9N2 influenza viruses from pigs in China: A potential threat to human health? *Veterinary Microbiology*, 149(1-2):254-261.
- Zahmati, S., Taghizadeh, M., Haghghat, S., Jalalirad, R., Mahdavi, M. 2021. Recombinant hemagglutinin of swine H1N1 influenza virus expression in the insect cells: Formulation in Montanide ISA71 adjuvant and the potency studies. *Iran J Basic Med Sci*, 24(11):1546-1553.
- Zhang, Y., Wei, Y., Liu, K., Huang, M., Li, R., Wang, Y., Liu, Q., Zheng, J., Xue, C., Cao, Y. 2017. Recombinant influenza H9N2 virus with a substitution of H3 hemagglutinin transmembrane domain showed enhanced immunogenicity in mice and chicken. *Sci Rep*, 7(1):17923.
- Zhao, Y., Sun, F., Li, L., Chen, T., Cao, S., Ding, G., Cong, F., Liu, J., Qin, L., Liu, S. et al. 2020. Evolution and Pathogenicity of the H1 and H3 Subtypes of Swine Influenza Virus in Mice between 2016 and 2019 in China. *Viruses*, 12(3).
- Zhou, J., Xu, S., Ma, J., Lei, W., Liu, K., Liu, Q., Ren, Y., Xue, C., Cao, Y. 2014. Recombinant influenza A H3N2 viruses with mutations of HA transmembrane cysteines exhibited altered virological characteristics. *Virus Genes*, 48(2):273-82.
- Zhu, H., Li, X., Chen, H., Qian, P. 2022. Genetic characterization and pathogenicity of a Eurasian avian-like H1N1 swine influenza reassortant virus. *Virology Journal*, 19(1):205.
- 白云, 钱箴, 孙玉莹, 汪寿阳. 2022. 基于综合集成预测方法的新冠肺炎疫情预测. *系统工程理论与实践*, 42(06):1678-1693.
- 蔡奕琪, 谢海燕, 温清萍. 2020. 2009~2018年东莞市 H1N1 亚型猪流感监测分析. *广东畜牧兽医科技*, 45(03):38-40.
- 陈军, 王昌建, 张朝阳. 2010. 动物疫情预测方法的研究. *中国动物检疫*, 27(12):74-76.
- 范桂芳. 2018. 两种 H1N1 亚型猪流感基因工程疫苗的制备及免疫效果评价[D]: 华中农业大学.
- 付新亮, 方博, 蔡孟楷, 黄俊明, 卜德新, 张桂红. 2020. 华南地区猪群猪流感病毒病原学和血清学调查. *中国预防兽医学报*, 42(01):23-28.
- 韩乐斌. 2022. 2020~2021年山东省猪流感病毒分离鉴定和猪流感血清学调查[D]: 山东农业大学.

-
- 胡鸿惠, 黄健强, 南文金, 吴静波, 彭国良. 2017. 2014年-2015年粤北规模猪场 H1 亚型猪流感血清学调查与分析. *动物医学进展*, 38(01):125-128.
- 胡晓坤, 钟如婷, 麦湛卓, 罗依琢, 蔡孟楷, 李美娣, 贾聪俊, 张梦玲, 龚浪, 张桂红. 2017—2020年我国中南地区猪流感病毒感染情况的血清学调查研究. *黑龙江畜牧兽医*, 1-5.
- 兰德松, 魏澍, 侯振中. 2019. 2012-2017年辽宁省猪流感血清学调查分析. *中国人兽共患病学报*, 35(01):91-95.
- 刘丽萍, 乔传玲, 杨焕良, 隋金钰, 王昌建, 陈艳, 邱立新, 唐小明, 何世成, 陈化兰. 2014. 2012年~2013年我国养猪重点省份猪流感的血清学调查. *中国预防兽医学报*, 36(06):431-434.
- 荣芮, 李婷婷, 张玉云, 顾颖, 夏宁邵, 李少伟. 2019. 昆虫杆状病毒表达载体系统在疫苗研究中的应用进展. *生物工程学报*, 35(04):577-588.
- 孙法超. 2018. 2016-2018年山东省部分地区猪流感病毒分离株的进化分析及对小鼠的致病性研究[D]: 山东农业大学.
- 王庆云, 赵琳, 郭希萍, 王会英. 2021. 2018~2019年安阳市规模猪场猪流感病毒病调查研究. *畜牧兽医杂志*, 40(01):48-50.
- 王正安, 徐贞顺, 林令德. 新冠肺炎疫情传播预测方法综述. *计算机工程与应用*, 1-15.
- 肖一红, 王玉超, 彭涛, 孙法超, 古金元, 马梓承, 王宏宇, 孟凡亮, 李宝全, 刘思当. 2019. 2016~2017年山东省三种亚型猪流感血清学调查. *中国动物传染病学报*, 27(05):97-100.
- 徐琦, 吴佳俊, 訾占超, 张远, 宋晓晖, 杨林. 2018. 2016年我国部分地区屠宰场猪流感血清学调查. *中国兽医杂志*, 54(02):82-85.
- 于亚南. 2020. 2017~2019年广东省猪流感病毒遗传演化、受体特性及致病性分析[D]: 华南农业大学.
- 张金燕. 2021. 2019-2020年度扬州地区猪流感病毒分离鉴定及其单克隆抗体的研制[D]: 扬州大学.
- 赵玉仲. 2021. 2018-2020年猪流感病毒分离鉴定和猪流感血清学调查[D]: 山东农业大学.
- 朱旭辉. 2019. 2016~2017年广东省猪流感病毒的分离鉴定与生物特性分析[D]: 华南农业大学.

附录

附录 A 缩略词

英文缩写	英文全称	中文全称
SI	Swine Influenza	猪流感
SIV	Swine Influenza Virus	猪流感病毒
NPs	Nanoparticles	纳米颗粒
BNV	Bivalent nanoparticle vaccine	二价纳米颗粒疫苗
IBVES	Insect Baculovirus Expression Vector System	昆虫杆状病毒表达系统
WB	Western blot	蛋白质印迹
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
RNA	Ribonucleic Acid	核糖核酸
bp	Base pair	碱基对
PS80	Polysorbate 80	聚山梨酯 80
TCID ₅₀	50% cell infective dose	半数细胞感染量
EID ₅₀	50% Embryo infective dose	半数鸡胚感染量
HPV	Human papillomavirus	人乳头瘤病毒
HI	Hemagglutination Inhibition	血凝抑制
DLS	Dynamic Light Scattering	动态光散射
TEM	Transmission electron microscope	透射电镜
M2e	The extracellular domain of M2	M2 胞外功能域
TM	Transmembrane domain	跨膜域
HA	Hemagglutinin	血凝素
NA	Neuraminidase	神经氨酸酶
MDCK	Madin-Darby canine kidney	犬肾传代细胞
CHO	Chinese hamster ovary	中国仓鼠卵巢细胞
Vero	African Green Monkey Kidney	非洲绿猴肾细胞
VLPs	Virus like particles	病毒样颗粒
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay	酶联免疫吸附实验
RT-PCR	Real-time PCR	实时荧光定量 PCR
VN	Virus Neutralizing	病毒中和实验
Sf9 cells	Spodoptera Frugiperda Line sf9 Cell	Sf9 细胞
Hi5 cells	High Five cells	Hi5 细胞
KDa	Kilo-dalton	千道尔顿
MOI	Multiplicity of Infection	感染复数
CPE	Cytopathic effect	细胞病变
IFU	Infectious units per mL	病毒感染滴度
PBS	Phosphate-buffered Saline	磷酸盐缓冲液
SPF	Specific pathogen Free	无特定病原体

附录

SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate olyacrylamide Gel Electrophoresis	十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid	乙二胺四乙酸
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium	杜氏改良 Eagle 培养基
BCA	Bicinchoninic acid	聚氰基丙烯酸正丁酯
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
HE	Hematoxylin-eosin staining	苏木精-伊红染色法
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine	3,3',5,5'-四甲基联苯胺
DPI	Days Post Inoculation	接种后天数
WHO	World Health Organization	世界卫生组织
NIH	National Institutes of Health	美国国家卫生研究院
GISAID	Global Initiative on Sharing All Influenza Data	全球共享流感数据倡议组织

附录 B 溶液配制

1. 50×TAE 电泳缓冲液: 称取 Tris 15.1 g、Glycine 94 g、SDS 5 g 于洁净的烧杯中, 用 800 mL 的超纯水搅拌至充分溶解定容至 1 L, 室温备用, 使用时用超纯水稀释成 1×TAE 缓冲液。

2. 1% 琼脂糖核酸胶: 称取琼脂糖粉末 1.0 g 于洁净的烧杯中, 用 100 mL 的 1×TAE 缓冲液加热溶解, 待温度降至 60°C 左右时 5 μL SYBR Green I 混合均匀后倒入制胶槽中制胶。

3. 1000×Amp 抗生素: 称取 ampicillin 粉末 1 g 于洁净的 15 mL 无菌 EP 管中, 用 8 mL 的超纯水充分溶解后定容至 10 mL。在超净工作台使用 0.22 μm 滤膜无菌过滤, 1 mL/管分装后 -20°C 保存备用。

4. 50% 甘油菌种保存液: 量取甘油 50 mL 于洁净的烧杯中与 40 mL 超纯水充分混匀, 定容至 100 mL, 储存于蓝盖瓶中, 121°C 高压灭菌 30 min, 常温保存备用。

5. SDS-PAGE 电泳缓冲液: 称取 Tris 15.1 g、Glycine 94 g、SDS 5 g 于洁净的烧杯中, 用 800 mL 的超纯水搅拌至充分溶解定容至 1 L, 室温备用。

6. 5×Loading Buffer: 量取上述的试剂置于 10 mL 无菌 EP 管中, 加入超纯水定容至 5 mL。每份 500 μL 分装至 1.5 mL 的无菌 EP 管中, 室温保存。当每次使用前添加 25 μL 的 2-ME, 充分混匀后使用, 室温下保存。

7. 考马斯亮蓝染色剂: 称取 1 g 的考马斯亮蓝 R-250 置于洁净的烧杯中, 缓慢的加入 250 mL 的冰醋酸, 搅拌至充分溶解混匀, 加入 100 mL 的冰醋酸搅拌均匀后定容至 1 L, 如果有较多杂质可以通过滤纸过滤去除, 室温保存。

8. 考马斯亮蓝脱色剂: 量取 100 mL 的醋酸和 50 mL 的乙醇, 混匀后定容至 1 L。室温保存。

9. Western blot 转膜缓冲液: 48 mmol/L Tris-Cl (pH 8.3), 39 mmol/L 甘氨酸, 0.037% SDS, 20% 甲醇, 溶解后定容至 1 L。

10. Western blot 洗液: 10 mmol/L Tris-Cl (pH 7.5), 0.15 mmol/L NaCl, 0.05% Tween-20。

11. Western blot 封闭液: 10 mmol/L Tris-Cl (pH 7.5), 0.15 mmol/L NaCl, 3% BSA (5% 脱脂奶), 0.01% 的 Tween-20。

12. Western blot 抗体稀释液: 10 mmol/L Tris-Cl (pH 7.5), 0.15 mmol/L NaCl, 0.05% Tween-20, 2% (0.5%) 脱脂奶。

13. 蛋白透析液: 称取 0.2 g KH₂PO₄、2.9 g NaHPO₄·12H₂O、8 g NaCl 和 0.2 g KCl 置于烧杯中, 加入去离子水定容至 1 L, 充分混合, 调节 pH 至 7.4, 置于室温保存。

14. 终止液的配制：称取 22 mL 浓硫酸置于烧杯中，加入去离子水定容到 200 mL，充分混合，置于 室温保存。

15. 细胞裂解液：25mM Tris, 65mM NaCl, 1% Triton100, pH7.5, 2 μ g/ml 亮肽素；

16. 流感纯化缓冲液：

Q 柱：平衡液 A：25mM Tris, 70mM NaCl, 0.02% Triton100, pH7.5；

洗脱液 B：25mM Tris, 1M NaCl, 0.02% Triton100, pH8.0。

扁豆亲和素柱：平衡液 A1：25mM PB 缓冲液, 10mM NaCl, 0.05% PS80, pH 7.4；

平衡液 A2：25mM PB 缓冲液, 500mM NaCl, 0.5% PS80, pH7.4；

洗脱 B：25mM PB 缓冲液, 10mM NaCl, 0.05% PS80 , 500mM 甲基- α -D-甘露糖苷 (Methyl- α -D-Mannopy-ronoside) pH7.4。

附录 C 蛋白序列

>A/swine/China/Qingdao/2018|EPI_ISL_370660| H1N1|HA| EPI1521569|

MKAKLVFLFCVFTALKADTICVGYHANNSTDTVDTILEKNVTVTHSVNLLNRHNG
KLCSLNGKIPLQLGNCNVAGWILGNPECDLLLTANSWSYIIETSNSKNGACYPGEFAD
YEELKEQLSTVSSFERFEIFPKATSWPDHDTTRGTTVACSHSGVNSFYRNLLWIVKKG
NSYPKLSKSYTNNKGKEVLVIWGVHHPPTDSNQQTLYQNNHTYISVGSSKYYKKFT
PEIVARPKVREQAGRMNYYWTLDDQGDITFEATGNLIAPWHFAFALEKGSSSGIMTS
DAQVHNCTTKCQTPHGALKSNLQFQNVHPVTIGECPKYVKSTQLRMTGLRNIPSIQ
SRGLFGAIAAGFIEGGWTGMIDGWYGYHHKNEQSGYAADQKSTQIAIDGISNKVNS
VIEKMNIQFTSVGKEFNSLEKRMENLNKKVDDGFLDVWTYNAELLILLENERTLDF
HDLNVKNLYERVKSQLRNNAKEIGNGCFEFYHKCDNECMESVKNGTYNYPKYSEE
SKLNREEIDGVKLESMGIHQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

>A/swine/Jiangsu/P3589/2016|EPI_ISL_256394| H3N2|HA||EPI961894

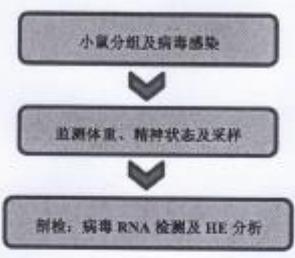
MKTIIALSYILCLVFAQKFPNDNNMAMLCLGQPAVTKRQVETIRNDQIEVTNGTE
MVQSSSTGGIRNSRFQILDGGNCTIIDEHQGDPHIDGFQNKKWDLFVERSKAYSNCY
PYDVPDYASLRSIIASSGTLEFNNEFNWTGVTQNGKSASCKRGSDNSFFSRLNWL
HLNYKYPALKVTMPNNEKFDKLYIWGAHHPGTYNDQISLYAQASGIITVSTKRTQQT
VIPNIGSRPRIRDISSRISYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKLQDGKSSIMRSDAPI
GKCNSECITPNGSIPNDRPFQNVNRIAYGACPRYVKQNTLKLATGMRNIPEKQTRGIF
GAIAGFIENGWEGMVDGWYGFRHQNSEGMGQAADLKSTQAAINQINGKLNRLIGK
TNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMN
KLFERTKKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALSNRFQ
IKGVELKAGYKDWILWISFAISCFLLCVVLLGFIMWACQKGNIRCNICI

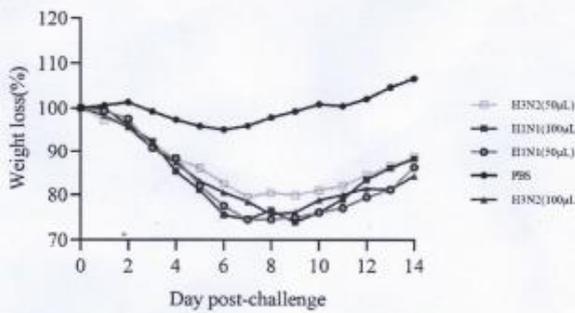
附录 D 动物模型建立方法及结果

注册项目部-猪流感病毒 Balb/C 小鼠感染模型建立

实验任务卡

编号 KRSW202112-SIV-01

试验名称	猪流感病毒 Balb/C 小鼠感染模型建立
试验类型	<input checked="" type="checkbox"/> 预实验、 <input type="checkbox"/> 对照试验、 <input type="checkbox"/> 产品研发试验、 <input type="checkbox"/> 替补试验、 <input type="checkbox"/> 复核试验
目的意义	建立猪流感病毒 Balb/C 小鼠实验动物感染模型,分析猪流感病毒 H1N1、H3N2 的致病性,为下一步免疫及攻毒保护实验做准备。
保密级	II 级
技术路线	 <pre> graph TD A[小鼠分组及病毒感染] --> B[监测体重、精神状态及采样] B --> C[剖检: 病毒 RNA 检测及 HE 分析] </pre>
人员安排	注册评价组
试验材料	<p>① 4 周龄 SPF 级 Balb/c 小鼠, 体重 18-22g, 40 只;</p> <p>② 猪流感病毒(鸡胚增殖毒): CVCC AV1519 (H3N2, $10^{7.2}$EID₅₀/0.1ml), CVCC AV1523 (H1N1, $10^{6.5}$EID₅₀/0.1mL)。</p> <p>③ 其它: 1ml 注射器、酒精、酒精棉、无菌 EP 管、剪刀、镊子;</p>
进度安排	2021.12.15-1.15 (含送检分析时间)
试验方法	<p>1、动物分组</p> <p>小鼠按体重随机分成 PBS 对照组、H1N1 (CVCC AV1523) 流感病毒感染组(感染剂量 50μL, 100μL), H3N2 (CVCC AV1519)流感病毒感染组(感染剂量 50μL, 100μL), 共 5 组, 每组 8 只。</p> <p>2、攻毒及监测</p> <p>Balb/C 小鼠经乙醚轻度麻醉后滴鼻病毒(注意少量多次), 对照组小鼠滴入 50μL PBS。接毒后的小鼠用标准日粮正常饲养, 饮灭菌水。小鼠感染后观察 14 天, 监测临床症状、及体重变化率。感染第 6d, 每组 2 只处以安乐死, 剖检观察肺脏病理变化及检测肺组织病毒 RNA。</p>

	<p>3、小鼠肺组织病毒 RNA 检测</p> <p>参照 GB/T 27521-2011 方法进行。Ct 值<35, 扩增曲线呈 S 型, 判定待检样本猪流感病毒 RNA 检测阳性。</p> <p>4、HE 分析</p> <p>采集小鼠的肺组织用 4%多聚甲醛进行固定, 经石蜡包埋、切片后送由武汉赛维尔生物科技有限公司进行 HE 分析。</p>
结果汇总 分析	<p>1、小鼠精神状态及体重变化</p> <p>小鼠感染不同剂量病毒后, 第 3 天开始出现明显临床症状, 主要表现为精神不振、弓背、蜷缩、扎堆、竖毛、活动减少及食量下降。病毒感染组小鼠体重减轻明显 (图 1), 其中 H1N1 感染组平均体重下降均超过 25%, 监测期内 50μL 感染组死亡 3 只, 100μL 感染组死亡 2 只, 至 14d 监测期结束, H1N1 感染组小鼠体重未恢复原始体重; H3N2 病毒 50μL 感染组平均体重下降接近 20%, 100μL 感染组平均体重下降接近 25%, 监测周期内未出现死亡, 至 14d 监测期结束, H3N2 感染组小鼠体重尚未恢复原始体重。PBS 对照组小鼠体重上升明显, 体重上升率最高可达 11%。</p>  <p>图 1 不同剂量病毒感染后小鼠体重变化曲线</p> <p>Fig 1. Curves of body weight of mice infected with different doses of SIVs.</p> <p>2、肺组织病毒 RNA 检测</p> <p>对猪流感病毒 H1N1 和 H3N2 不同剂量感染组小鼠肺脏 RNA PCR 检测显示, 感染组猪流感病毒检出均为阳性, Ct 值为 21.74-25.36, 扩增曲线呈标准 S 型曲线。PBS 组小鼠肺脏组织猪流感病毒 RNA PCR 检测结果均为阴性, 无扩增曲线。</p> <p>3、病理变化分析</p> <p>剖检观察可见 PBS 组小鼠肺脏呈淡粉红色, 质地柔软, 肺叶表面光滑润泽。病</p>

毒感染组小鼠肺脏出现不同程度的肺炎病理改变,可见成片的实变区,充血较明显。HE染色分析显示,PBS组小鼠肺肺泡腔大小较一致,无萎缩或扩张,无充血或炎细胞浸润,支气管完整。感染组肺壁增厚、毛细血管扩张充血、支气管壁不完整,见大量炎性细胞浸润,形成实变区。

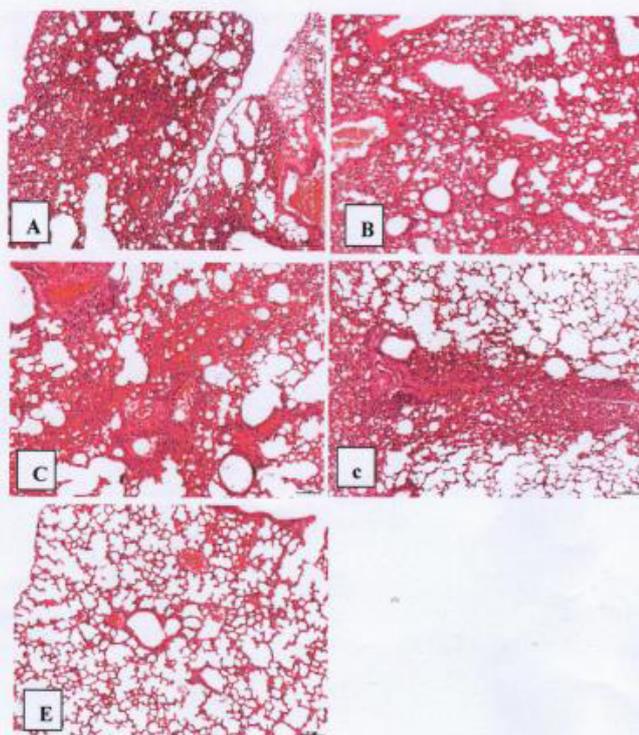


图2 对照组和感染组小鼠肺脏病理变化分析(HE,×100)

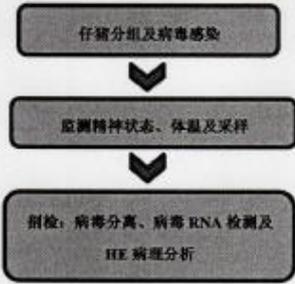
Fig 2. Analysis of lung pathological changes in control group and infection group.
A, H1N1-50µL 组; B, H1N1-100µL 组; C, H3N2-50µL 组; D, H3N2-100µL 组;
E, PBS 对照组

结论与分 析	本试验建立了猪流感病毒 Balb/C 小鼠感染模型: 50µL 猪流感病毒 H1N1 (10 ^{6.5} EID50/0.1mL), H3N2 (10 ^{7.2} EID50/0.1ml) 感染小鼠可产生明显症状及病理变化, H1N1 感染后症状较 H3N2 严重。本任务卡为下一步猪流感疫苗评价研究及注册材料整理做准备。		
执行人/ 日期		复核人/日期	
收卡人		归档人	

注册项目部-猪流感病毒感染仔猪模型的建立

实验任务卡

编号 KRSW202201-SIV-02

试验名称	猪流感病毒感染仔猪模型的建立
试验类型	<input checked="" type="checkbox"/> 预实验、 <input type="checkbox"/> 对照试验、 <input type="checkbox"/> 产品研发试验、 <input type="checkbox"/> 替补试验、 <input type="checkbox"/> 复核试验
目的意义	建立猪流感病毒感染仔猪实验动物模型，分析猪流感病毒 CVCC AV1519 (H3N2, $10^{7.2}$ EID ₅₀ /0.1mL)，CVCC AV1523 (H1N1, $10^{6.5}$ EID ₅₀ /0.1mL) 的对仔猪的致病性，为疫苗免疫评价研究做准备。
保密级	II 级
技术路线	 <pre> graph TD A[仔猪分组及病毒感染] --> B[监测精神状态、体温及采样] B --> C[剖检、病毒分离、病毒 RNA 检测及 HE 病理分析] </pre>
人员安排	注册评价组
试验材料	<p>① 4 周龄断奶仔猪，15 头；</p> <p>② 猪流感病毒(鸡胚增殖毒)：CVCC AV1519(H3N2, $10^{7.2}$EID₅₀/0.1mL)，CVCC AV1523 (H1N1, $10^{6.5}$EID₅₀/0.1mL)。</p> <p>③ 其它：10 日龄鸡胚；5mL/10mL 注射器、酒精、酒精棉、无菌 EP 管、剪刀、镊子；</p>
进度安排	2022.01.15-2.10 (含送检分析时间)
试验方法	<p>1、分组</p> <p>4 周龄断奶仔猪分为 3 组，其中 H1N1 流感病毒 2mL、4mL 剂量感染组分别 3 头，H3N2 流感病毒 2mL、4mL 剂量感染组分别 3 头，PBS 阴性对照组 3 头。</p> <p>2、攻毒及采样</p> <p>仔猪经仰卧保定后，按照分组及感染剂量要求经气管注射猪流感病毒(用食指压迫住气管位置，针头垂直刺入，如有刺破软骨的感觉，回抽针管有大量气泡，即可注入)。感染后正常饲喂和饮水，观察精神状态并监测体温，感染后连续 5d 采集鼻拭子。感染后第 5</p>

	<p>d 处以安乐死并剖检采样，剖检观察肺脏病理变化及检测病毒 RNA。</p> <p>3、仔猪肺组织病毒 RNA 检测</p> <p>参照 GB/T 27521-2011 方法进行。Ct 值<35，扩增曲线呈 S 型，判定待检样本猪流感病毒 RNA 检测阳性。</p> <p>4、病毒分离</p> <p>将采集的猪鼻拭子样品无菌处理后接种 9-11 日龄 SPF 鸡胚，每只胚接种 0.2ml，孵化 72h 后收获病毒。血凝实验检测鸡胚尿囊液的效价，HA 效价>1:16，即判定病毒分离阳性。</p> <p>5、HE 病理分析</p> <p>采集剖检猪的肺组织，用 4%多聚甲醛进行固定，经石蜡包埋、切片后送由武汉赛维尔生物科技有限公司进行 HE 分析。</p>																																									
结果汇总分析	<p>1、仔猪精神状态及体温变化</p> <p>猪流感病毒株病毒感染 2d 后，不同剂量组仔猪均出现体温升高，咳嗽、喷嚏、精神沉郁等临床症状中的一种或多种；H1N1 和 H3N2 不同剂量感染组均出现体温升高，体温 40.2℃及以上持续时间超过 2d；PBS 组仔猪无体温升高和临床症状。</p> <p>表 1 猪流感病毒感染仔猪后仔猪体温变化 Table 1 Changes in body temperature of piglets infected with swine influenza virus.</p> <table border="1" data-bbox="485 1115 1267 1451"> <thead> <tr> <th rowspan="2">组别</th> <th colspan="5">感染天数 (体温/℃)</th> </tr> <tr> <th>1d</th> <th>2d</th> <th>3d</th> <th>4d</th> <th>5d</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>H1N1 (2mL)</td> <td>39.5/39.6/39.5</td> <td>39.8/39.9/40.2</td> <td>41/40.9/40.6</td> <td>40.3/40.6/40.2</td> <td>39.8/39.7/39.9</td> </tr> <tr> <td>H1N1 (4mL)</td> <td>39.5/39.7/39.7</td> <td>39.9/40.1/39.9</td> <td>40.1/40.8/40.9</td> <td>40.2/40.2/40.6</td> <td>39.8/39.8/39.9</td> </tr> <tr> <td>H3N2 (2mL)</td> <td>39.6/39.8/39.6</td> <td>39.9/40.2/39.8</td> <td>40.3/40.3/40.5</td> <td>40.2/40.3/40.5</td> <td>39.8/39.7/39.5</td> </tr> <tr> <td>H3N2 (4mL)</td> <td>39.6/39.6/39.7</td> <td>39.9/39.9/39.7</td> <td>40.4/40.8/40.2</td> <td>40.3/40.3/40.6</td> <td>39.6/39.8/39.5</td> </tr> <tr> <td>PBS</td> <td>39.8/39.8/39.7</td> <td>39.5/39.6/39.7</td> <td>39.7/39.7/39.7</td> <td>39.4/39.6/39.5</td> <td>39.5/39.4/39.5</td> </tr> </tbody> </table> <p>2、肺组织病毒 RNA 检测</p> <p>对猪流感病毒 H1N1 和 H3N2 不同剂量感染组仔猪肺脏 RNA PCR 检测显示，感染组猪流感病毒检出均为阳性，Ct 值为 20.35-26.47，扩增曲线呈 S 型曲线。PBS 组仔猪肺脏组织猪流感病毒 RNA PCR 检测为阴性，无扩增曲线。</p> <p>3、病毒分离</p> <p>猪流感病毒 H1N1 不同剂量感染组第 3d，4d 猪鼻拭子接种鸡胚后尿囊液血凝价均大</p>	组别	感染天数 (体温/℃)					1d	2d	3d	4d	5d	H1N1 (2mL)	39.5/39.6/39.5	39.8/39.9/40.2	41/40.9/40.6	40.3/40.6/40.2	39.8/39.7/39.9	H1N1 (4mL)	39.5/39.7/39.7	39.9/40.1/39.9	40.1/40.8/40.9	40.2/40.2/40.6	39.8/39.8/39.9	H3N2 (2mL)	39.6/39.8/39.6	39.9/40.2/39.8	40.3/40.3/40.5	40.2/40.3/40.5	39.8/39.7/39.5	H3N2 (4mL)	39.6/39.6/39.7	39.9/39.9/39.7	40.4/40.8/40.2	40.3/40.3/40.6	39.6/39.8/39.5	PBS	39.8/39.8/39.7	39.5/39.6/39.7	39.7/39.7/39.7	39.4/39.6/39.5	39.5/39.4/39.5
组别	感染天数 (体温/℃)																																									
	1d	2d	3d	4d	5d																																					
H1N1 (2mL)	39.5/39.6/39.5	39.8/39.9/40.2	41/40.9/40.6	40.3/40.6/40.2	39.8/39.7/39.9																																					
H1N1 (4mL)	39.5/39.7/39.7	39.9/40.1/39.9	40.1/40.8/40.9	40.2/40.2/40.6	39.8/39.8/39.9																																					
H3N2 (2mL)	39.6/39.8/39.6	39.9/40.2/39.8	40.3/40.3/40.5	40.2/40.3/40.5	39.8/39.7/39.5																																					
H3N2 (4mL)	39.6/39.6/39.7	39.9/39.9/39.7	40.4/40.8/40.2	40.3/40.3/40.6	39.6/39.8/39.5																																					
PBS	39.8/39.8/39.7	39.5/39.6/39.7	39.7/39.7/39.7	39.4/39.6/39.5	39.5/39.4/39.5																																					

于 1: 64, 为病毒分离阳性; 猪流感病毒 H3N2 的 2mL 剂量感染组的第 3d 猪鼻拭子样品中有 2 头份血凝价均大于 1: 16, 4mL 剂量感染组的第 3d, 4d 猪鼻拭子样品中各有 1 头份血凝价大于 1: 16, 为病毒分离阳性。PBS 组仔猪鼻拭子鸡胚尿囊液血凝价均低于 1: 2, 为病毒分离阴性。

3、病理变化分析

剖检观察可见 PBS 组仔猪肺脏呈粉色, 浆膜完整。不同剂量病毒感染组猪的肺脏均有不同程度实变病变, 主要分布在膈叶和尖叶, 多呈斑块状。取肺脏病变部位进行 HE 染色, 显微镜下观察可见肺脏上皮细胞坏死、支气管上皮细胞脱落, 支气管充满坏死的上皮细胞和以中性粒细胞为主的炎性细胞浸润。

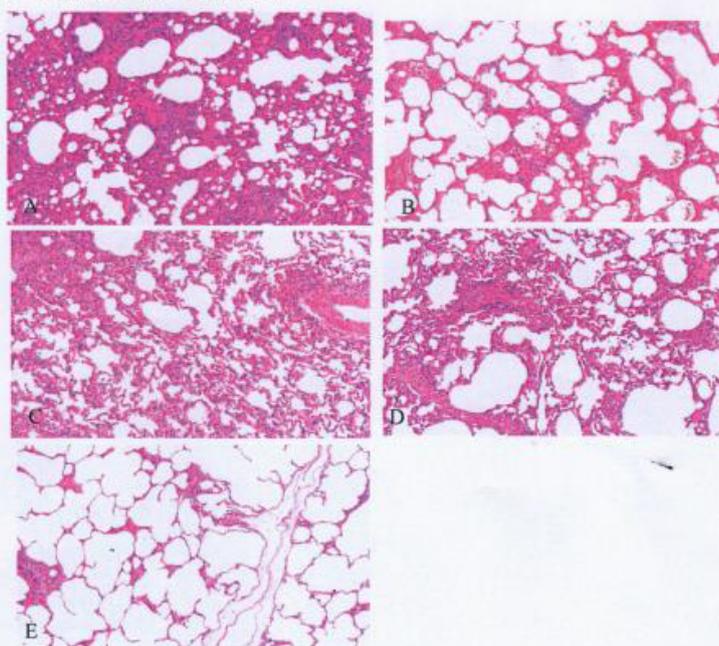


图 2 对照组和感染组仔猪肺脏病理变化分析 (HE, ×20)

Fig 2. Analysis of lung pathological changes of piglets in control group and infected group.
A, H1N1-2mL 组; B, H1N1-4mL 组; C, H3N2-2mL 组; D, H3N2-4mL 组; E, PBS 对照组

结论与分析

本试验建立了猪流感病毒仔猪感染模型, 2mL 猪流感病毒 H1N1 ($10^{6.5}$ EID₅₀/0.1mL), H3N2 ($10^{7.2}$ EID₅₀/0.1ml) 感染仔猪可产生典型症状及病理变化, 本研究为下一步猪流感疫苗评价研究及注册材料整理做准备。

执行人/日

复核人/日期