

抗禽流感病毒多表位 DNA 疫苗的构建及其免疫效力研究

彭金美 童光志* 王云峰 仇华吉

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室 哈尔滨 150001)

摘要 多表位 DNA 疫苗是建立在常规 DNA 疫苗基础上的一种新型疫苗。它是用表位作免疫原,这样就比较容易在一个表达载体上克隆病原体的多个抗原基因中具有免疫活性的部分。本试验以 H5N1 亚型禽流感病毒的 HA 和 NP 基因及其表位为基础构建了 4 个重组质粒: 1. pIRES/HA(表达全长的 HA 基因) 2. pIRES/tHA(只表达 HA 基因的主要抗原表位区) 3. pIRES/tHA-NPep(融合表达 HA 基因的抗原表位区和 NP 基因的 3 个 CTL 表位) 4. pIRES/tHA-NPep-IFN- γ (用鸡的 IFN- γ 基因取代质粒 pIRES/tHA-NPep 中的 neo 基因)。分别用这 4 个重组质粒和空载体质粒 pIRES1neo 肌注免疫 30 日龄 SPF 鸡。免疫 3 次,间隔为 2 周,每次每只鸡的剂量为 200 μ g。第 3 次免疫后两周以高致病性禽流感病毒 H5N1 强毒攻击,免疫及攻毒前后均采血检测 HI 抗体效价和外周血 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞的变化。结果发现,攻毒前各质粒免疫组均检测不到 HI 抗体,攻毒后 1 周存活鸡 HI 抗体效价迅速升高到 64~256。流式细胞仪检测显示外周血 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞在疫苗免疫后都有不同程度的升高。空载体质粒对照组鸡(10 只)在攻毒后 3~8 d 内全部死亡,其他各重组质粒免疫组鸡都获得了部分保护,保护率分别是:pIRES/HA 组为 54.5%(6/11), pIRES/tHA 组为 30%(3/10), pIRES/tHANPep 组为 36.3%(4/11), pIRES/tHANPep-IFN- γ 组为 50%(5/10)。这些结果表明我们构建的多表位 DNA 疫苗能够诱导机体产生特异性免疫应答,并在同型禽流感强毒攻击时对鸡只提供了一定的保护。

关键词 多表位, DNA 疫苗, 禽流感病毒

中图分类号 Q352 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2003)05-0623-05

DNA 疫苗不仅具有减毒活疫苗既能诱导体液免疫应答又能诱导细胞免疫应答的优势,而且还具有亚单位疫苗的安全性,是目前疫苗研究的一大热点。常规的 DNA 疫苗设计仅含病原体的单个抗原基因,虽然也能诱导机体产生保护性免疫应答,但忽略了病原体的其他抗原成分,因而保护效果常常不理想。多表位 DNA 疫苗是将病原体抗原基因中的抗原活性部位(包括 B 细胞表位和 T 细胞表位)串联在一起并插入真核表达质粒中构建而成的,与常规 DNA 疫苗相比具有更多的优势,至少它避免了将多个抗原基因克隆入同一载体的困难以及可能引起的转录干扰问题^[1],而且不必构建多个单一质粒进行混合免疫就可充分发挥病原体中各个抗原成分的作用。

禽流感是由 A 型流感病毒引起的禽类的感染和/或疾病综合征。高致病性禽流感多以突然发病和高死亡率为主要特征,这对于研究疫苗的免疫保护效力是一个良好的疾病模型。在本试验中,我们以 H5 亚型禽流感作为指示系统来研究多表位 DNA 疫苗诱导的免疫应答效果。血凝素(Haemagglutinin, HA)能够诱导机体产生中和抗体,是禽流感病毒的主要保护性抗原。据分析其抗原表位主要位于 HA

基因的 HA1 段^[2-3]核蛋白(Nucleoprotein, NP)是病毒的内部蛋白,以诱导细胞免疫为主,并且它作为型特异性抗原可以诱导对不同亚型病毒的交叉保护^[4]。我们选取 HA 基因及其主要抗原表位区以及 NP 基因的细胞毒性 T 细胞(Cytotoxic T lymphocyte, CTL)表位构建了 4 个重组质粒,并进行了动物的免疫及攻毒保护试验。结果证明以 H5N1 亚型禽流感病毒的 HA 和 NP 基因的表位为基础构建的多表位 DNA 疫苗能对同源强毒的攻击提供一定程度的保护。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株: pSY538/HA 质粒含有 A/Goose/GuangDong/1/96(H5N1)HA 基因的 cDNA 片段,由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所农业部动物流感重点实验室提供。pBlueBacHisC/IFN- γ 质粒由哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室刘胜旺博士提供,它含有鸡 IFN- γ 基因的 cDNA 片段。试验中所用的真核表达载体为 pIRES1neo(结构如图 1A)。DH5 α 宿主菌由本室保存。H5N1 禽流感病毒由中国农科院哈尔滨兽医研究所农业部动物流感重点实验室

提供。

1.1.2 工具酶和试剂: 所用限制酶、Taq DNA 聚合酶、Klenow 酶、碱性磷酸酶、T4 DNA 连接酶为 TaKaRa 公司产品,其余试剂均为分析纯。

1.1.3 SPF 鸡: 购自哈尔滨兽医研究所实验动物中心,试验前检测无禽流感病毒(AIV)抗体。

1.2 方法

1.2.1 pIRES/HA 载体的构建: 根据已知 HA 基因的序列,应用 Oligo 6.0 软件设计了一对特异性引物:上游引物为 5'-TCG GATATCATGGAGAGAATC-3',下游引物为 5'-TTACGAATTCGAGCTCGG-3'。PCR 反应条件为 95°C/5min;94°C/1min,54°C/1min,72°C/1.5min 30 个循环,最后 72°C 延伸 10 min。这样就在 HA 基因的 5'和 3'端分别引入了 *EcoRV* 和 *BamHI* 限制性内切酶的切割位点,并获得大小约为 1.7kb 的 HA 基因,然后利用这两个位点将 HA 基因克隆到真核表达质粒 pIRES1neo 中,获得的含全长 HA 基因的质粒命名为 pIRES/HA,在本试验中将被用作阳性对照(结构如图 1B)。

1.2.2 pIRES/tHA 载体的构建: 将上述的 PCR 产物克隆到 pMD18T 载体中,筛选与 LacZ 基因方向相反的克隆(pMD18T/HA)经 *Tth111I* 酶切并补平后,再重新环化连接,得到 pMD18T/tHA 质粒,这样就在 *Tth111I* 酶切位点后获得了一个终止密码子(TAG)。截短的 HA(tHA)基因去掉了 3'端疏水的跨膜区,保留下来的是该基因的主要中和抗原表位区。我们用 *EcoRV* 和 *BamHI* 将 pMD18T/tHA 质粒酶切后回收约 1.7kb 的片段,与用同样的酶切处理的 pIRES1neo 载体连接,得到的阳性克隆命名为 pIRES/tHA(结构如图 1C)。

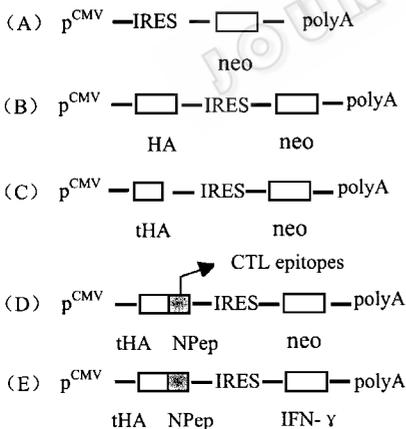


图 1 载体质粒 pIRES1neo 和四种重组质粒的结构示意图

Fig.1 Structures of pIRES1neo and four recombinant plasmids

1.2.3 pIRES/tHA-NPep 载体的构建: NP 基因的 3 个 CTL 表位(表位序列见图 2)通过基因合成的方法由 TaKaRa 公司合成后连接于 pMD18-T 载体,插入方向与 LacZ 方向相反。将该载体用 *Tth111I* 和 *BamHI* 酶切后回收约 100bp 的片段,与同样酶切处理的 pMD18T/HA 载体连接,阳性克隆再用 *EcoRV* 和 *BamHI* 酶切后回收约 1.5kb 的片段,与经同样酶切处理的 pIRES1neo 连接,阳性克隆命名为 pIRES/tHA-NPep(结构如图 1D)。

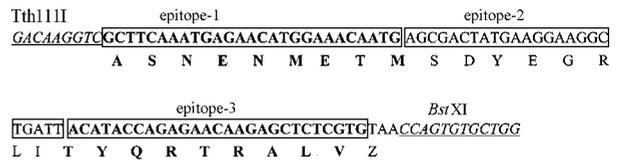


图 2 合成的禽流感病毒 H5N1 亚型 NP 基因 3 个 CTL 表位核苷酸序列

Fig.2 Sequences of CTL epitopes located in NP gene of AIV(H5N1)

1.2.4 pIRES/tHA-NPep-IFN- γ 载体的构建: 为了研究细胞因子对多表位 DNA 疫苗免疫效力的影响,用 PCR 方法从 pBlueBacHisC/IFN- γ 质粒中扩增得到鸡的 IFN- γ 基因片段,并用其取代了 pIRES/tHA-NPep 质粒中的 neo 基因,获得了在同一个 CMV 启动子控制下共表达抗原基因和 IFN- γ 基因的质粒 pIRES/tHA-NPep-IFN- γ (结构如图 1E)。

1.2.5 质粒 DNA 的大量制备: 将上述构建的 4 个重组质粒和载体质粒 pIRES1neo 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细菌,分别挑取单个阳性克隆,参照《分子克隆实验指南》(第二版)中质粒的大量制备方法进行。提取的质粒 DNA 通过紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳进行纯度和浓度鉴定,并用 PBS(pH 7.4)将质粒 DNA 的浓度稀释到 1 μ g/ μ L,于 -70°C 保存备用。

1.2.6 动物的免疫及攻毒: 30 日龄的 SPF 鸡,饲养于哈尔滨兽医研究所禽病感染实验室的负压隔离器中,免疫前随机分为 5 组,每组 11 只。第 1 组为载体质粒对照组,第 2 组为 pIRES/HA 免疫组,第 3 组为 pIRES/tHA 免疫组,第 4 组为 pIRES/tHA-NPep 免疫组,第 5 组为 pIRES/tHA-NPep-IFN- γ 免疫组,各组鸡均采用股四头肌多点注射的方式进行了 3 次免疫,间隔为两周,每次每只鸡的剂量为 200 μ g/200 μ L。第 3 次免疫后两周,所有鸡只均用 0.2mL(含 10LD₅₀)的同亚型强毒在腿部肌肉注射的方法进行攻击。攻毒后每天观察并详细记录鸡只的发病和死亡情况。

1.2.7 抗体水平的监测: 监测 HA 特异性抗体动态变化的血凝抑制试验,按照常规方法进行^[5]。

1.2.8 外周血 T 淋巴细胞亚类的监测: 从鸡的翅静脉采集 0.5mL 肝素抗血,用淋巴细胞分离液(中国医学科学院血液学研究所生产)进行淋巴细胞的分离。分离的淋巴细胞用含 5% 牛血清的 PBS(pH 7.4)洗涤 3 次后,用 PBS 洗液调整细胞浓度至 2 \times 10⁷ 个细胞/mL。将适量淋巴细胞悬液分装于两个 1.5mL 的离心管中,然后分别加入鼠抗鸡的 CD₄ 和 CD₈ 的单抗,混匀后置冰浴中作用 30min,400g 离心 5min,弃上清,加入 200 μ L 淋巴细胞洗液反复洗 3 次,再向各管中加入适量 FITC 标记的兔抗鼠 IgG 的荧光抗体,混匀后避光冰浴 30min。淋巴细胞洗液洗涤 3 次后,用 1mL PBS 重悬细胞,流式细胞仪检测。

1.2.9 统计学分析: 用 *t* 检验法对免疫后各组的有关数据进行统计学处理。

2 结果

2.1 免疫鸡的体液应答

真核表达载体经酶切和 PCR 鉴定后,又进行了测序鉴

定,然后按方法 1.2.6 进行了动物的免疫及攻毒保护试验。表 1 显示了质粒免疫组鸡在免疫及攻毒后 HI 抗体滴度的变化。攻毒前 5 种质粒免疫组的鸡都没有可检测到的 HI 抗体,攻毒后存活鸡的 HI 抗体滴度迅速升到 6~9 log₂,且各组鸡的抗体水平差异不显著 ($P > 0.05$)。

表 1 各免疫组鸡在病毒攻击前后 HI 抗体的变化

Table 1 HI antibody levels of immunized chickens before and after virus loading

| Groups | HI antibody titers (log ₂) | | |
|----------------------|--|-----------------------|------------------------|
| | Pre-challenge | 1 week post challenge | 2 weeks post challenge |
| pIRES1neo | 0 | * | * |
| pIRES/HA | 0 | 7.00 ± 0.63 | 7.33 ± 0.82 |
| pIRES/tHA | 0 | 7.00 ± 0.00 | 7.33 ± 0.58 |
| pIRES/tHA-NPep | 0 | 6.75 ± 0.50 | 7.50 ± 1.29 |
| pIRES/tHA-NPep-IFN-γ | 0 | 7.80 ± 1.09 | 7.40 ± 1.67 |

* Control chickens died in one week after challenged with the virus

2.2 外周血 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞亚类的动态变化

CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞是机体内最重要的参与特异性免疫应答的两类淋巴细胞,其中 CD4⁺ T 淋巴细胞主要识别由主要组织相容性复合体 (Major Histocompatibility Complex, MHC) II 类分子递呈的抗原,它可以辅助 B 细胞合成抗体,另

外也可以诱导 Th1 型细胞因子的分泌,活化其他淋巴细胞; CD8⁺ T 细胞主要识别由 MHC-I 类分子递呈的抗原短肽,CD8⁺ CTL 在病毒感染过程中对病毒的清除起着重要的作用。DNA 疫苗的优势之一就是可诱导机体产生细胞免疫应答,体现在各类功能性 T 淋巴细胞发生数量和免疫活性的改变。利用流式细胞术,可以监测 T 淋巴细胞数量的变化,从而间接反映机体的细胞免疫应答水平。从图 3(A)中可以看出,各质粒免疫组鸡的 CD4⁺ T 淋巴细胞占总淋巴细胞的百分比在免疫后都在不断上升,到第 3 次免疫后两周,各疫苗质粒免疫组的 CD4⁺ T 淋巴细胞的百分比均高于空载体质粒免疫组,尤其是 pIRES/HA (44.89%)、pIRES/tHA-NPep (39.59%)、pIRES/tHA-NPep-IFN-γ (36.93%) 质粒免疫组鸡的 CD4⁺ T 淋巴细胞的百分比明显高于载体质粒对照组 (31.83%) ($P < 0.05$)。

图 3(B)显示的是免疫后外周血 CD8⁺ T 淋巴细胞的变化。各质粒免疫组鸡在经多次免疫后其外周血 CD8⁺ T 淋巴细胞的百分比也一直呈上升趋势。至攻毒前,pIRES/HA (42.03%)、pIRES/tHA-NPep (39.59%) 和 pIRES/tHA-NPep-IFN-γ (36.93%) 质粒免疫组鸡的 CD8⁺ T 淋巴细胞的百分比均明显高于载体质粒对照组 (30.76%) ($P < 0.05$)。

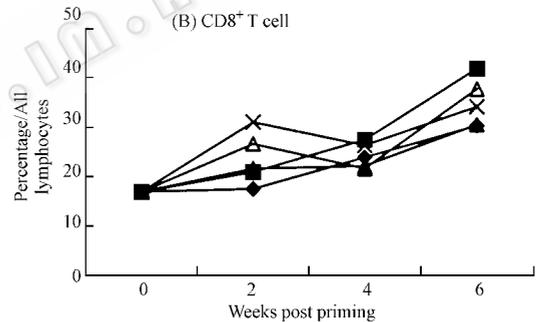
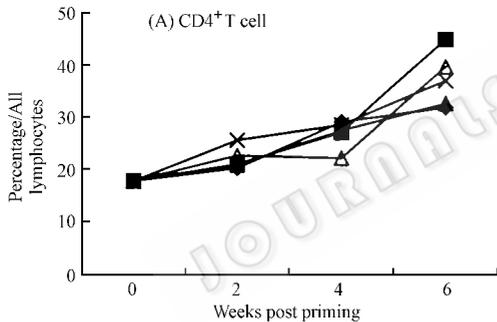


图 3 质粒免疫鸡外周血 CD4⁺(A)、CD8⁺(B) T 淋巴细胞的动态变化

Fig. 3 Dynamics of CD4⁺(A) and CD8⁺(B) T lymphocytes in peripheral blood of immunized chickens

pIRES (—◆—) pIRES/HA (—■—), pIRES/tHA (—▲—) pIRES/tHA-NPep (—△—) pIRES/tHA-NPep-IFN-γ (—×—)

2.3 免疫鸡的攻毒保护效果

各质粒免疫组鸡在第 3 次免疫后两周,用 10 倍 LD₅₀ 剂量的 H5N1 亚型高致病性禽流感病毒以注射腿部肌肉的方法进行攻击,剂量为 0.2mL/只。攻毒后每天观察并详细记录鸡只的发病和死亡情况,观察期为两周。结果显示,空载体质粒对照组鸡 10 只在攻毒后 3~8d 内全部发病并死亡,其他各重组质粒免疫组鸡从攻毒后第 3、4 天开始陆续有鸡只发病,有的很快死亡,少数鸡耐过,截止攻毒后两周各疫苗质粒免疫组鸡都获得了部分保护,保护率分别为 pIRES/HA 组为 54.5% (6/11)、pIRES/tHA 组为 30% (3/10)、pIRES/tHA-NPep 组为 36.3% (4/11)、pIRES/tHA-NPep-IFN-γ 组为 50% (5/10) (图 4)。

3 讨论

多表位 DNA 疫苗的研究目前可以说还处于起步阶段,它的免疫效力究竟如何,是一个非常值得关注的问题。在本

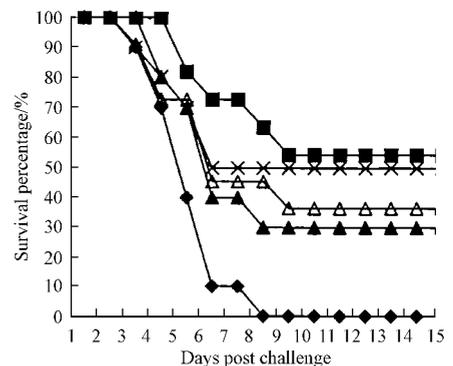


图 4 不同重组质粒免疫后对禽流感病毒 H5N1 强毒攻击的保护效果

Fig. 4 Efficacy of immunized chickens against highly pathogenic AIV (H5N1)

—◆—empty vector; —■—HA; —▲—tHA; —△—tHANPep; —×—tHANPep-IFN-

次试验中我们发现,以 HA 和 NP 基因的表位为基础构建的 DNA 疫苗可以对免疫鸡提供不同程度的保护力。虽然在攻毒前,质粒免疫组都没有检测到 HI 抗体,但在用 AIV 强毒攻击后可以从存活鸡的血清中检测到高滴度的 HI 抗体。根据这一现象,我们推测有两种可能:一是 DNA 疫苗免疫后虽然未能诱导产生可被检测到的 HI 抗体,但起到了诱发基础免疫的作用,使得鸡体在受到强毒攻击时由于免疫记忆效应,迅速产生高滴度的抗体从而抵抗了强毒的攻击。这与以往的一些研究结果相似^[6-11]。二是 DNA 疫苗免疫诱导产生的细胞免疫应答在抵抗强毒攻击中发挥了一定的作用^[12,13]。虽然许多研究认为对禽流感起免疫作用的主要是体液应答,其中 HI 抗体能够中和病毒的感染,NI 抗体能够在一定程度上限制病毒的繁殖。但在对鼠和人的研究中发现,识别来源于内部蛋白表位的细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)在对病毒的免疫应答中具有重要作用^[12-14]。从我们用流式细胞术检测的结果来看,有 3 个重组质粒免疫组鸡在经多次免疫后大部分鸡的 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞占外周血总淋巴细胞的比例均高于载体质粒对照组,说明重组质粒确实都在一定程度上激活了机体的细胞免疫系统。虽然最终疫苗保护效果并不理想,但从中我们可以看出,在 HA 基因主要抗原表位区的基础上融合了 NP 基因 3 个 CTL 表位的 DNA 疫苗(pIRES/tHA-NPep)激发的细胞免疫应答水平明显高于只表达 HA 基因主要抗原表位区的 DNA 疫苗(pIRES/tHA) ($P < 0.05$),并且对免疫鸡的保护也稍具优势,间接说明添加的 3 个 CTL 表位可能在其中发挥了一定的作用;另外,IFN- γ 作为一种介导和调节特异性免疫的细胞因子,它既可以激活 CD4 辅助 T 细胞和促进 CTL 成熟,也可以刺激 B 细胞分泌抗体。在本次试验中,添加了 IFN- γ 的试验组对鸡只的保护效力明显增强。

总体来说,在保留了 HA 基因主要抗原表位区的基础上添加了核蛋白(NP)基因 3 个 CTL 表位的多表位 DNA 疫苗与常规 HA 基因 DNA 疫苗相比并没有显示出优势。虽然它们能在一定程度上抵抗强毒的攻击,但还有待进一步完善,尤其是需要弄清楚究竟是抗体还是 CTL 在抗流感病毒的免疫中发挥着主要的作用,从而能更有目的地筛选表位用于流感疫苗的研制。另外,在设计多表位 DNA 疫苗时,还需在提高表位的加工和提呈方面作一些努力,比如在各表位之间添加适当的接头序列、在表位序列之前加上具有靶向作用的前导序列等,以使各个表位能够更有效地发挥作用。

致谢 在攻毒及血清学检测过程中得到哈尔滨兽医研究所农业部动物流感重点实验室田国斌、李海燕以及本室刘恒贵的协助,在此表示感谢。

REFERENCES(参考文献)

[1] Thomson S A , Sherritt M A , Medveczky J *et al.* Delivery of multiple CD8 cytotoxic T cell Epitopes by DNA Vaccination. *J Immunol* ,

1998 , **160** (4) : 1717 - 1723

- [2] Wiley D C , Wilson I A , Skehel J J *et al.* Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation. *Nature* , 1981 , **289** (29) : 373 - 378
- [3] Philott M , Easterday B C , Virginia S. Neutralizing epitopes of the H5 Hemagglutinin from a virulent avian influenza virus and their relationship to pathogenicity. *J Virol* , 1989 , **63** (8) : 3453 - 3458
- [4] Tite J P , Russell S M , Dougan G *et al.* Antiviral immunity induced by recombinant nucleoprotein of influenza A virus . I. Characteristics and cross-reactivity of T cell response. *J Immunol* , 1988 , **141** (11) : 3980 - 3987
- [5] Webster R G , Kawaoka Y , Taylor J *et al.* Efficacy of nucleoprotein and haemagglutinin antigens expressed in fowlpox virus as vaccine for influenza in chickens. *Vaccine* , 1991 , **9** : 303 - 308
- [6] Suarez D L , Schultz-cherry S. The effect of eukaryotic expression vectors and adjuvant on DNA vaccines using an avian influenza model. *Avian Dis* , 2000 , **44** (4) : 861 - 868
- [7] Kodihalli S , Kobasa D L , Webster R G *et al.* Strategies for inducing protection against avian influenza A virus subtypes with DNA vaccines. *Vaccine* , 2000 , **18** (23) : 2592 - 2599
- [8] Macklin M D , McCabe D , McGregor M W *et al.* Immunization of pigs with a particle-mediated DNA vaccine to Influenza A virus protects against challenge with homologous virus. *J Virol* , 1998 , **72** (2) : 1491 - 1496
- [9] Chen Z , Sahashi Y , Matsuo K *et al.* Comparison of the ability of viral protection- expression plasmid DNAs to protect against influenza. *Vaccine* , 1998 , **16** (16) : 1544 - 1549
- [10] Robinson H L , Hunt L A , Webster R G *et al.* Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with haemagglutinin expressing plasmid DNA. *Vaccine* , 1993 , **11** (9) : 957 - 960
- [11] Chang H C , Lin T L , Wu C *et al.* DNA-mediated vaccination against infectious bursal disease in chickens. *Vaccine* , 2002 , **20** (3 - 4) : 328 - 335
- [12] Ulmer J B , Donnelly J J , Parker S E *et al.* Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* , 1993 , **259** (5102) : 1745 - 1749
- [13] Ulmer J B , Fu T M , Deck K R *et al.* Protection CD4⁺ and CD8⁺ T cells against influenza virus induced by vaccination with nucleoprotein DNA. *J Virol* , 1998 , **72** (7) : 5648 - 5653
- [14] Wells M A , Ennis F A , Albrecht P *et al.* Recovery from a viral respiratory tract infection II. Passive transfer of immune spleen cells to mice with influenza pneumonia. *J Immunol* , 1981 , **126** (3) : 1042 - 1046

Multi-epitope DNA Vaccines Against Avian Influenza in Chickens

PENG Jin-Mei TONG Guang-Zhi* WANG Yun-Feng QIU Hua-Ji

(*National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin*

Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China)

Abstract Multiple epitopes from one or more viruses can be lined up and co-expressed in one vector to generate multi-epitopes DNA vaccines. In the study, four recombinant plasmids were constructed based on HA and NP gene of avian influenza virus (AIV)(H5N1):(1) pIRES/HA, carrying the complete HA gene;(2) pIRES/tHA, carrying a truncated HA gene fragment of major neutralizing antigenic epitopes;(3) pIRES/tHA-NPep, in which three CTL epitopes of NP gene of AIV were fused to the truncated HA from the C-terminal; and(4) pIRES/tHA-NPep-IFN- γ , which was constructed by replacing neo gene in pIRES/tHA-NPep with IFN- γ of chicken. Fifty five SPF chickens were randomly divided into five groups and immunized with the above four constructs and control plasmid. Each chicken was intramuscularly immunized with 200 μ g plasmid DNA three times in a two-week interval. Two weeks after the third immunization, chickens were injected with H5N1 subtype avian influenza virus. Before the virus loading no detectable antibodies to HA were found in the chicken serum; but high levels of HI antibodies were detected in the serum of the survived chickens. The percentages of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte in peripheral blood of immunized chickens increased steadily after the vaccination. After virus loading all chickens in the control group died within three to eight days, and the survival rates of the four DNA vaccine groups were as follows: pIRES/HA, 54.5%; pIRES/tHA, 30%, pIRES/tHA-NPep, 36.3%, pIRES/tHA-NPep-IFN- γ , 50%. These results indicated that multi-epitopes DNA immunization can induce immune response and protect chickens from homologous virus loading.

Key words multi-epitope, DNA vaccine, avian influenza virus

Received: 03-31-2003

This work was supported by a grant from the National Basic Research Program (973)(No. G1999014902) 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

* Corresponding author. Tel: 86-451-2734181; Fax: 86-451-2734181; E-mail: gztong@public.hr.hl.cn