



论文

季节性和大流行性 H1N1 流感血凝素 DNA 疫苗电穿孔免疫小鼠及攻毒保护实验

谭磊^{①②}, 鲁会军^①, 张丹^{①②}, 王开艳^{①③}, 田明尧^{①②}, 刘存霞^{①②}, 刘燕瑜^{①②}, 胡博^{①②}, 金宁一^{①*}

① 中国人民解放军军事医学科学院军事兽医研究所基因工程重点实验室, 长春 130062;

② 吉林大学农学部畜牧兽医学院, 长春 130062;

③ 延边大学农学院, 延吉 133400

* 联系人, E-mail: jinningyi2000@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-12-13; 接受日期: 2011-01-19

国家高技术研究发展计划(批准号: 2006AA10A205)、国家科技支撑计划(批准号: 2006BAD06A15)和国家科技重大专项(批准号: 2009ZX10004-103)资助

摘要 在流感病毒疫苗中, DNA 疫苗有望成为常规疫苗的替代品. 研究构建了两个分别编码 A/New Caledonia/20/99(H1N1)和 A/California/04/2009(H1N1)流感病毒株血凝素抗原的 DNA 疫苗 pV1A5 和 pVEH1, 目的抗原经验证能够正确表达后, 利用小鼠模型通过电穿孔方法肌肉注射免疫进行疫苗免疫效力评价. 采用血凝抑制实验和酶联免疫吸附实验对免疫小鼠的血清进行血凝素特异性抗体检测, 对血凝素特异性的 T 淋巴细胞经 IFN- γ 酶联免疫斑点实验进行检测. 然后选择小鼠适应株 A/New Caledonia/20/99(H1N1) 100 个半数致死剂量对候选疫苗免疫的小鼠攻毒并监测生存率和体重变化率, 以此评价疫苗保护效力. 两疫苗组免疫小鼠 T 淋巴细胞和体液免疫水平显著高于 pVAX1 空载体对照组($P < 0.05$). 此外, pV1A5 组能够 100% 保护免疫小鼠抵抗 100 致死剂量同源病毒小鼠适应株的攻毒, 而同种病毒下 pVEH1 组只有 40% 的保护率. 结果表明, 本实验构建的季节性流感 DNA 疫苗能够对同源病毒攻毒提供完全保护, 而大流行流感株 DNA 疫苗只能部分抵抗季节性流感病毒.

关键词

季节性流感
大流行性流感
血凝素
DNA 疫苗
电穿孔
H1N1 流感病毒

最近流行的甲型 H1N1 流感, 在人群中引发大流行. 接种疫苗是控制病毒传播、预防疾病的最为有效的手段. 但事实证明, 先前使用的三联流感疫苗不能对甲流毒株提供保护. 因此, 迫切需要研制开发一种新疫苗来应对这种新型流感病毒.

灭活疫苗一直被作为一种主要的方法用来预防

流感病毒感染. 然而, 除了这种传统的疫苗方法外, 目前已经有很多其他方法可以诱导针对甲型 H1N1 流感主要结构蛋白的保护性免疫. 这些有希望替代传统疫苗的方法包括: 重组蛋白疫苗^[1]、腺病毒载体疫苗^[2]和质粒 DNA 疫苗^[3]. 质粒 DNA 疫苗无致病性, 室温环境下稳定, 生产上经济, 而且能够重复免疫.

英文版见: Tan L, Lu H J, Zhang D, et al. Efficacy of seasonal pandemic influenza hemagglutinin DNA vaccines delivered by electroporation against a seasonal H1N1 virus challenge in mice. *Sci China Life Sci*, 2011, 54, doi: 10.1007/s11427-011-4150-5

大量研究报道显示, DNA 疫苗能够对 H1, H3, H5, H7 和 H9 亚型流感病毒在鸡(*Gallus domesticus*)和小鼠(*Mus musculus*)等免疫动物中提供保护^[4~8]。表达血凝素(HA)蛋白的 DNA 疫苗经特别的方法免疫能保护小鼠抵抗甲型和乙型流感病毒的攻击^[9~13]。暂不论疫苗抗原的选择, 疫苗免疫的方式也能在一定程度上影响免疫效果。最近有动物研究显示, DNA 疫苗通过体内电穿孔(EP)方式免疫能够大大提高转染效率和蛋白表达水平^[14,15]。应用电穿孔可以在目标组织产生短的电脉冲, 可以使细胞膜暂时的浸透性增强而使质粒 DNA 和其他分子进入细胞内。电穿孔在非病毒基因免疫方式的功效和增强 DNA 疫苗的能力两个方面都已得到了证明。此外, 电穿孔方法已经广泛而且成功地增强肌肉注射 DNA 疫苗的潜能。

异源亚型免疫(HSI)是指初次感染或者免疫后能对一种以上的亚型流感病毒血清型有交叉免疫保护。异源亚型免疫被认为是由细胞毒性 T 淋巴细胞识别保守性的结构蛋白表位介导的血清交叉反应, 但最近有研究报道, 抗体(Abs)在异源亚型免疫中也起到重要作用^[16]。本实验利用小鼠模型评价表达季节性流感和大流行流感的血凝素基因的 DNA 疫苗, 采用电穿孔免疫后用致死剂量的季节性 H1N1 流感病毒攻毒, 检测两种 DNA 疫苗的保护效力。

1 材料与方法

1.1 病毒与细胞

A/New Caledonia/20/99(H1N1)季节性流感病毒(GeneBank 登录号: CY033622)实验室保存。A/California/07/2009(H1N1)大流行流感病毒 HA 基因由大连宝生物公司合成。A/New Caledonia/20/99(H1N1)病毒经重复在小鼠肺组织传代以适应小鼠, 接种 10 日龄无特定病原体鸡胚 37℃增殖病毒, -70℃保存。通过 Reed 和 Muench 方法测定小鼠适应性 A/New Caledonia/20/99 的半数组织细胞感染量(TCID₅₀=10^{-6.25}/0.05 mL)并对 Balb/c 小鼠(12 周龄)攻毒测定半数致死量(LD₅₀=10^{-3.5}/0.05 mL)。仓鼠肾细胞(BHK-21)用于转染、检测目的基因的瞬时表达。所有涉及到 H1N1 病毒(A/New Caledonia/20/99)的实验, 包括动物攻毒等, 全部依照生物安全实验室二级(BSL-2)规程操作。

1.2 质粒构建

将来源不同的两株流感病毒(A/New Caledonia/20/99(H1N1), GeneBank 登录号: CY033622 和 A/California/07/2009, GeneBank 登录号: GQ117044)HA 蛋白基因克隆入质粒载体。A/New Caledonia/20/99(H1N1)病毒的 HA 基因经常规 RT-PCR 扩增得到, 并通过引物在其上游序列前端加入 KOZAK 序列和 *Nhe* I 限制性酶切位点, 在下游引物加入 *Xho* I 酶切位点。A/California/07/2009 流感病毒的 HA 基因经大连宝生物公司合成。两株病毒的 HA 基因从限制性酶切位点 *Nhe* I 和 *Xho* I 处连接进入真核表达载体 pVAX1(英骏生物公司), 分别得到重组质粒 DNA 命名为 pV1A5 和 pVEH1, 利用 DNA 测序仪(ABI PRISM 377XL, 应用生物系统公司, 美国)对 HA 基因进行测序验证。重组质粒转化入大肠杆菌 JM109 大量增殖后, 使用质粒大量提取试剂盒(Omega 公司, 美国)提取纯化质粒 DNA。纯化后的质粒 DNA 重悬于无菌生理盐水, -20℃保存备用。

1.3 间接免疫荧光分析免疫原性

纯化后的 pV1A5, pVEH1 和 pVAX1 质粒 DNA 按脂质体 Lipofectamine 2000 说明书步骤转染 BHK-21 细胞。步骤如下: 将细胞种于置有盖玻片的六孔细胞板内, 然后转染质粒 DNA(10 μg/孔)。转染 48 h 后, 用 0.05% 的戊二醛固定细胞, 后用含有 0.5% Triton X-100 的 PBS 洗板, 封闭后分别用兔抗 A/New Caledonia/20/99 和 A/California/07/2009 HA 特异性多克隆抗体(1:2000 稀释)37℃孵育 1 h。PBST 洗板 3 次, 每次 5 min, 加入异硫氰酸荧光素(FITC)标记羊抗兔 IgG 二级抗体(1:200)和伊文斯蓝(1:200)室内孵育 1 h。洗去二抗及伊文斯蓝后将样品封片后, 于荧光显微镜下观察拍照。

1.4 电穿孔免疫 DNA 疫苗

6~8 周龄雌性 Balb/c 小鼠随机分成 3 个免疫组(每组 15 只), 分别免疫 pV1A5, pVEH1 和空载体 pVAX1 对照, 使用微量注射器进行肌肉内注射质粒 DNA(每只小鼠两腿腓肠肌注射 100 μg 溶于 100 μL PBS 的质粒)。注射后, 用 5 mm 电极插入到 DNA 注射部位的肌肉内, 使用 ECM 830 电脉冲发生器进行电脉冲(BTX, 美国), 电穿孔脉冲参数为电压 75 V, 3

次单极性脉冲 5 Hz, 每次 20 ms)^[17]. 每组小鼠在初次免疫后第 3 周用相同剂量质粒 DNA 加强免疫一次. 于初免后 1, 2, 3 和 5 周从小鼠尾静脉采血以备抗体滴度的检测.

1.5 动物攻毒实验

为了评价两株疫苗对致死剂量流感病毒的保护效力, 二免后第 2 周将小鼠麻醉后滴鼻攻毒终体积 50 μL 含 100 LD₅₀ 的小鼠适应性 A/New Caledonia/20/99 H1N1 流感病毒. 未连入外源片段的空载体 pVAX1 作为阴性对照. A/New Caledonia/20/99 活病毒操作遵照有关规章进行(www.cdc.gov/flu/h2n2bsl3.htm). 感染病毒后 14 天, 每天观察小鼠生存情况和临床症状, 并记录体重变化. 无菌条件下取接毒死亡小鼠肺组织并匀浆收取上清进行 RT-PCR 分析, 将扩增出的 HA 基因连接入 pMD18-T 载体挑选阳性克隆测序分析.

1.6 酶联免疫吸附实验

利用已发表过的间接酶联免疫吸附实验(ELISA)方法对初次免疫后 0, 7, 14, 21 和 35 天小鼠血清进行 IgG 抗体的检测^[18]. 96 孔板包被 50 ng 灭活 A/New Caledonia/20/99 流感病毒于 4℃ 过夜, 另外选用商品化小鼠 A/California/07/2009 IgG 抗体 ELISA 检测试剂盒(Cusabio Biotech). 用 PBS 将抗原包被的免疫测定板清洗 5 次, 然后用含有 1%BSA 的 PBS 封闭免疫测定板 37℃ 作用 1 h, 用含有 0.5% 明胶, 0.15% 吐温 20 和 4% 小牛血清的 PBS 将血清样品稀释 100 倍后加入到免疫测定板孔 37℃ 作用 1 h, 每个样品做一个复孔. PBS 清洗免疫测定板 5 次后加入 1:2000 稀释的辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 二级抗体(中杉金桥公司)37℃ 反应 1 h. 再次用 PBS 洗板 5 次后, 加入底物显色液(10 mg 邻苯二胺+20 mL 0.015% 的磷酸盐/柠檬酸过氧化氢缓冲液), 37℃ 反应 15 min, 加入 2N H₂SO₄ 终止显色, 随后用光密度自动测定仪(Sunrise)492 nm 波长吸收值并用微软 Excel 2007 分析测定数据, $P < 0.05$ 示差异显著.

1.7 血细胞凝集抑制实验

初次免疫 5 周后每组处死 5 只小鼠, 收集的血清在实验前与受体破坏酶(RDE, Denka-Seiken)37℃ 孵育过夜, 然后将血清样品于 56℃ 灭活 30 min 后连续

倍比稀释于 V 型孔微量滴定板, 再分别对应加入等体积 4 单位 A/New Caledonia/20/99 病毒和 A/California/07/2009 HA 抗原, 微量滴定板震荡混匀, 加盖室温作用 30 min. 随后, 加入 50 μL 1% 红细胞, 37℃ 作用 15 min. 血凝抑制效价判定标准为能完全抑制红细胞凝集的血清最大稀释倍数. 在微量滴定板内同时设立阳性和阴性对照^[19].

1.8 体外 γ -干扰素 Elispot 实验

DNA 疫苗免疫刺激产生的细胞免疫应答通过测定脾淋巴细胞分泌的 γ -干扰素进行评价, 按照小鼠 γ -干扰素 Elispot 试剂盒(达科为生物公司)说明操作. 将每只小鼠的脾细胞加入聚偏乙烯及二氟化物处理过的预包被单抗小鼠 γ -干扰素的 96 孔板(10^6 细胞 $100 \mu\text{L}^{-1}$ 孔⁻¹), 每个样品做 3 个复孔, 稀释液为 10% 血清 1640 培养基. 用完全培养基稀释灭活全病毒 A/New Caledonia/20/99 和 A/California/07/2009 HA 抗原终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 每孔加入 100 μL 稀释好的刺激物. 阳性对照刀豆蛋白 A(ConA)浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 不加刺激物的脾细胞作为阴性对照. 然后将 96 孔板置于 CO₂ 恒温培养箱 37℃ 过夜孵育, 第 2 天弃去淋巴细胞并用预冷的蒸馏水洗板, γ -干扰素产生的斑点可以被生物素标记的抗小鼠 γ -干扰素特异性抗体结合. 先后加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二级抗体和 3-氨基-9 乙基卡唑(AEC)底物溶液显色. 最后用 Elispot 自动读板机(Bioreader 4000 PRO, 德国)读取斑点数, 结果表示为斑点数/ 10^6 个脾细胞 $\bar{x} \pm \text{SE}$.

1.9 统计分析

通过统计分析, 对动物的免疫反应进行评价. 利用 GraphPad 软件的二因素方差分析工具计算细胞和体液免疫的 P 值. Mantel-Cox 分析是用来评价免疫组间的保护水平, $P < 0.05$ 示差异显著.

2 结果

2.1 表达质粒的构建及其免疫原性的体外评价

分别表达 A/New Caledonia/20/99 和 A/California/07/2009 H1N1 流感病毒 HA 基因的质粒 DNA 测序无误. pV1A5, pVEH1 和 pVAX1 在转染 BHK-21 细胞 48 h 后加入抗 HA 蛋白抗体进行免疫荧光测定以判定疫苗的免疫原性(图 1). 结果显示, pV1A5 和 pVEH1 构

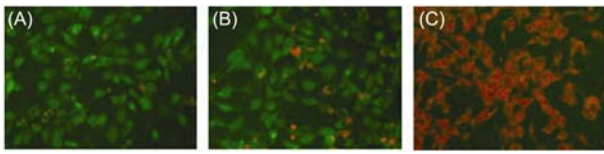


图 1 间接免疫荧光检测 DNA 疫苗 HA 蛋白的表达
(A) pVEH1; (B) pV1A5; (C) pVAX1

建成功并能表达相应蛋白. 因此, 所构建的质粒 DNA 可用于后续实验.

2.2 DNA 疫苗免疫小鼠引起的体液免疫反应

为了比较两个 DNA 疫苗诱导的 HA 特异性免疫反应的能力, 全部小鼠在初免 5 周后采血, 利用 A/New Caledonia/20/99 病毒和 A/California/07/2009 病毒 HA 抗原检测 H1N1 特异性 IgG 抗体和血凝抑制抗体(HI). 值得注意的是, 用 4 单位 A/New Caledonia/20/99 病毒检测时, pV1A5 组 HI 抗体效价达到 79(6.3 $\log_2$), 大约比 pVEH1 组高 12 倍(图 2(A)), 而用 4 单位 A/California/07/2009 病毒 HA 抗原刺激时, pV1A5 组较 pVEH1 组低 4.2 倍(图 2(B)).

用间接 ELISA 方法检测 IgG 抗体, A/New Caledonia/20/99 灭活全病毒做为包被抗原时, pV1A5

免疫组血清样品的吸收值从免疫后 7 天的 0.27(7 DPI) 上升到免疫后 14 天的 0.46, 在 21 天略有下降, 加强免疫后, 抗体滴度迅速升高, 在第 35 天达到 0.68. pVEH1 免疫组小鼠则呈现出比较温和的抗体变化趋势, 抗体滴度最高仅相当于 pV1A5 组 14 天时, 除第 7 天外, pV1A5 组 HA 特异性的抗体都显著高于 pVEH1 免疫组($P<0.05$). 除了第 35 天外, pVEH1 组与对照组 pVAX1 无显著差异($P>0.05$)(图 2(C)). 当 A/California/07/2009 病毒 HA 抗原包被的 ELISA 检测特异性抗体时, 发现了相似的反应趋势. 除第 7 天外, pVEH1 组显著高于 pV1A5 组抗体水平($P<0.05$)(图 2(D)). 在对照组 pVAX1 小鼠血清中未检测到 H1HA 特异性的 IgG 抗体, pV1A5 组除第 7 天外, 其他时间在统计学上显著高于 pVAX1 对照组($P<0.05$). 上述结果显示, 表达 HA 蛋白的 DNA 疫苗电穿孔肌肉内初次免疫后 14 天可显著引发特异性抗体应答, 此外, 这两个候选疫苗诱导的抗体反应对异源亚型病毒交叉保护水平较低.

2.3 DNA 疫苗免疫小鼠诱导的细胞免疫应答

在加强免疫后 3 天, 每个免疫组处死 5 只小鼠取得脾细胞, 通过 Elispot 检测 HA 特异性的 γ 干扰素水平,

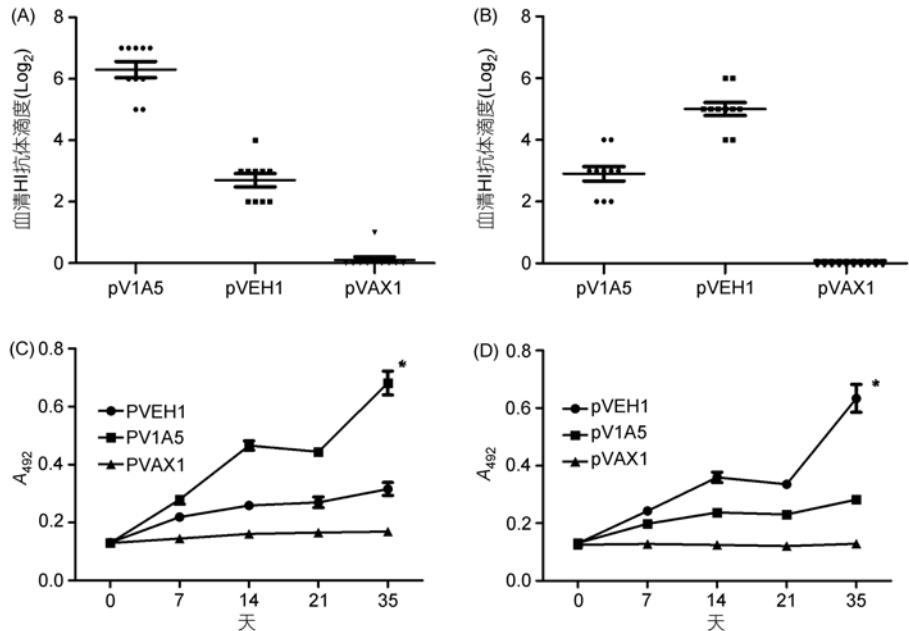


图 2 免疫小鼠体液免疫应答

(A) A/New Caledonia/20/99(H1N1)抗原刺激血凝抑制效价; (B) A/California/07/2009 HA 抗原刺激血凝抑制效价; (C) A/New Caledonia/20/99 病毒包被的 IgG 抗体效价; (D) A/California/07/2009 HA 抗原包被的 IgG 抗体效价. *: $P<0.05$

收获的脾细胞分别用 A/New Caledonia/20/99 灭活病毒和 A/California/07/2009 病毒 HA 抗原作用 24 h, 记录 Elispot 检测得到的 γ 干扰素产生的细胞. 如图 3 所示, 用灭活病毒刺激后, pV1A5 组平均产生 (353 ± 18) 个斑点/ 10^6 个细胞, 与 pVEH1 组 (317 ± 14) 个斑点/ 10^6 个细胞相比差异不显著 ($P > 0.05$). 用 A/California/07/2009 病毒 HA 抗原刺激时也发现了同样的趋势, pVEH1 组产生 (275 ± 6) 个斑点/ 10^6 个细胞, 而 pV1A5 组产生 (253 ± 20) 个斑点/ 10^6 个细胞. 对照组中仅产生极少数非特异性的 γ 干扰素(少于 10 个斑点/ 10^6 个细胞), Elispot 板未加脾细胞的背景对照和对照组产生的斑点数大致相同, 用刀豆蛋白 A(ConA)作为非特异性刺激物的 γ 干扰素 Elispot 反应产生 300 个斑点/ 10^6 个细胞. 免疫组小鼠产生的 HA 特异性 γ 干扰素 Elispot 斑点数显著高于未免疫组 ($P < 0.05$), 结果证明 DNA 疫苗诱导了抗原特异性的 γ 干扰素反应. 而 A/New Caledonia/20/99 和 A/California/07/2009 抗原刺激产生的 Elispot 斑点数差异不显著 ($P > 0.05$).

2.4 H1N1 流感病毒攻毒保护实验

初次免疫后 35 天, 对 3 组小鼠进行滴鼻攻毒 A/New Caledonia/20/99, 随后 14 天观察临床症状和生存率. 所有免疫 pVAX1 对照组的小鼠体重从第 2 天开

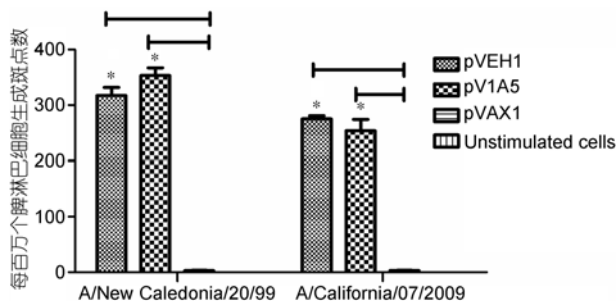


图 3 免疫小鼠脾淋巴细胞分泌 γ 干扰素 Elispot 检测

*: 与对照组相比, $P < 0.05$

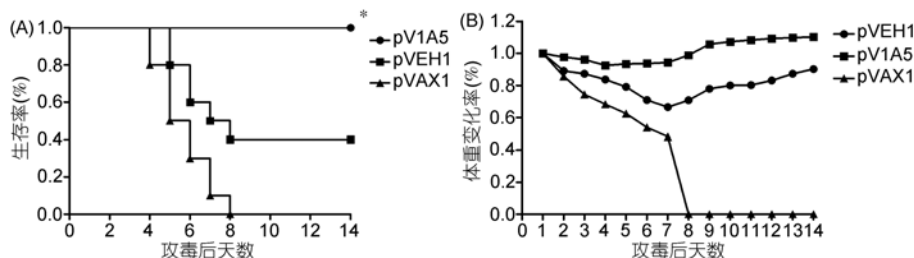


图 4 DNA 疫苗免疫小鼠致死剂量攻毒生存率及体重变化

(A) 生存率变化; (B) 体重变化率. *: $P < 0.05$

始下降并且从第 4 天开始死亡, 直到第 8 天全部死亡. pV1A5 组小鼠仅出现短暂的体重变化, 而且全部存活. pVEH1 免疫组出现畏冷、沉郁等临床症状, 并从第 5 天开始死亡, 死亡率达到 60%. 统计分析表明, pVEH1 免疫组保护率显著低于 pV1A5 组 ($P < 0.05$). 小鼠攻毒保护率如图 4(A)所示, 体重变化率如图 4(B)所示.

通过测序比较从 pVEH1 和 pVAX1 组小鼠肺上清分离到的病毒 HA 基因序列发现, 与 A/New Caledonia/20/99 流感病毒 H1HA 氨基酸同源性分别为 99.1% 和 99.7%, 而在 pV1A5 组小鼠肺上清中未扩增到 HA 基因.

3 讨论

预防接种流感疫苗能够有效地预防流感病毒的感染. 目前批准使用的三联流感疫苗如果和流行毒株抗原性不匹配时, 疫苗的保护效果会大大降低甚至无效. 为了有效控制大流感的流行, DNA 疫苗被认为有希望替代灭活疫苗. 已有报道, 表达 H1, H3, H5, H7 和 H9 亚型流感病毒 HA 的 DNA 流感疫苗能够有效保护小鼠、鸡、猪免受同源病毒的感染^[8,20-25]. 本实验评价了 DNA 疫苗免疫是否能够保护小鼠抵抗同源病毒的攻击.

HA 蛋白是病毒包膜上的主要组件, 它的纤突介导病毒与宿主细胞的表面受体结合并进入细胞内^[26], 因此, 免疫 HA 蛋白抗原能够保护流感病毒的感染. 有许多以 HA 基因为基础的疫苗能够保护同源亚型病毒的攻击^[27].

本实验构建了分别表达 A/New Caledonia/20/99 和 A/California/07/2009(H1N1)流感病毒 HA 蛋白的 DNA 疫苗, 并以小鼠动物模型评价疫苗对季节性流感病毒株 A/New Caledonia/20/99 的攻毒保护情况. 利用电穿孔辅助免疫 DNA 疫苗能够引发特异性的细胞

和体液免疫应答, 这与先前报道的结果一致^[28,29]. 实验前做了一个用传统方法免疫 DNA 疫苗和电穿孔方法免疫的比较, 结果显示电穿孔方法免疫 DNA 疫苗在体液细胞免疫应答均显著高于未使用电穿孔组. pV1A5 免疫组产生的体液免疫应答能够有效中和同源 A/New Caledonia/20/99(H1N1)攻毒. 相对 pVEH1 组表达的大流行流感 HA 蛋白对季节性流感 A/New Caledonia/20/99 只能提供 40% 的保护, 提示 pVEH1 免疫组不能完全保护小鼠免受异源亚型病毒的攻击. pVEH1 组的 IgG 和 HAI 异源交叉免疫抗体效价相对较低.

不同抗原刺激的 HA 特异性 γ 干扰素 T 淋巴细胞应答 Elispot 分析评价显示, 两个 DNA 疫苗免疫组细胞介导的对 A/New Caledonia/20/99 病毒免疫应答差异不显著($P>0.05$), 可能与在季节性 H1N1 流感和大流行性 H1N1 流感之间免疫原性 T 淋巴细胞表位比较保守有关. 该结果与已报道的“H1N1 大流行性流感 HA 预测 CTL 表位也存在于常规流感疫苗 HA 蛋白中”一致^[30]. Elispot 分析显示, 两候选疫苗诱导产生

的细胞交叉免疫反应差异不显著($P>0.05$), 而体液免疫反应的差异显著($P<0.05$). pVEH1 组对 A/New Caledonia/20/99 抗原刺激产生的平均 HAI 效价为 65, 显著低于 pV1A5 的平均值 79($P<0.05$). 在 IgG 抗体效价中也得到了相同的结果. 这可能与 H1N1 病毒的 HA 蛋白同源性只有 80.1% 有关, 抗原漂移对保护性免疫产生了重要的影响.

基于上述结果, 结论是体液免疫应答的差异可能对异源亚型病毒交叉保护高低有关. A/California/07/2009(H1N1)流感病毒与 A/New Caledonia/20/99 病毒的 HA 蛋白氨基酸同源性相差 19.9%, 这种巨大的蛋白序列变化引起的“抗原漂移”造成了流感的大流行^[16].

本研究采用电穿孔辅助方法免疫 DNA 疫苗, 比较了季节性流感和大流行性流感 HA 基因 DNA 疫苗在体内和体外的交叉免疫水平并用致死剂量的季节性流感病毒攻毒. 证实了使用电穿孔方法免疫 DNA 疫苗对流感病毒是有效的.

参考文献

- 1 Fries L F, Dillon S B, Hildreth J E, et al. Safety and immunogenicity of a recombinant protein influenza A vaccine in adult human volunteers and protective efficacy against wild-type H1N1 virus challenge. *J Infect Dis*, 1993, 167: 593–601
- 2 Steitz J, Barlow P G, Hossain J, et al. A candidate H1N1 pandemic influenza vaccine elicits protective immunity in mice. *PLoS One*, 2010, 5: e10492
- 3 Kong W P, Hood C, Yang Z Y, et al. Protective immunity to lethal challenge of the 1918 pandemic influenza virus by vaccination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 15987–15991
- 4 Kodihalli S, Kobasa D L, Webster R G. Strategies for inducing protection against avian influenza A virus subtypes with DNA vaccines. *Vaccine*, 2000, 18: 2592–2599
- 5 Kodihalli S, Goto H, Kobasa D L, et al. DNA vaccine encoding hemagglutinin provides protective immunity against H5N1 influenza virus infection in mice. *J Virol*, 1999, 73: 2094–2098
- 6 Ljungberg K, Wahren B, Almqvist J, et al. Effective construction of DNA vaccines against variable influenza genes by homologous recombination. *Virology*, 2000, 268: 244–250
- 7 Ljungberg K, Kolmskog C, Wahren B, et al. DNA vaccination of ferrets with chimeric influenza A virus hemagglutinin (H3) genes. *Vaccine*, 2002, 20: 2045–2052
- 8 Lee C W, Senne D A, Suarez D L. Development of hemagglutinin subtype-specific reference antisera by DNA vaccination of chickens. *Avian Dis*, 2003, 47: 1051–1056
- 9 Chen Z, Sahashi Y, Matsuo K, et al. Comparison of the ability of viral protein-expressing plasmid DNAs to protect against influenza. *Vaccine*, 1998, 16: 1544–1549
- 10 Chen Z, Kadowaki S, Hagiwara Y, et al. Cross-protection against a lethal influenza virus infection by DNA vaccine to neuraminidase. *Vaccine*, 2000, 18: 3214–3222
- 11 Kadowaki S, Chen Z, Asanuma H, et al. Protection against influenza virus infection in mice immunized by administration of hemagglutinin-expressing DNAs with electroporation. *Vaccine*, 2000, 18: 2779–2788
- 12 Chen Z, Kadowaki S, Hagiwara Y, et al. Protection against influenza B virus infection by immunization with DNA vaccines. *Vaccine*, 2001, 19: 1446–1455
- 13 Chen J, Fang F, Li X, et al. Protection against influenza virus infection in BALB/c mice immunized with a single dose of

- neuraminidase-expressing DNAs by electroporation. *Vaccine*, 2005, 23: 4322–4328
- 14 Luxembourg A, Evans C F, Hannaman D, et al. Electroporation-based DNA immunisation: translation to the clinic. *Expert Opin Biol Ther*, 2007, 7: 1647–1664
- 15 Luckay A, Sidhu M K, Kjekken R, et al. Effect of plasmid DNA vaccine design and *in vivo* electroporation on the resulting vaccine-specific immune responses in rhesus macaques. *J Virol*, 2007, 81: 5257–5269
- 16 Nguyen H H, Michael Z, Ivanov I I, et al. Heterosubtypic immunity to influenza A virus infection requires a properly diversified antibody repertoire. *J Virol*, 2007, 81: 9331–9338
- 17 Zhang L, Nolan E, Kreitschitz S, et al. Enhanced delivery of naked DNA to the skin by non-invasive *in vivo* electroporation. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1572: 1–9
- 18 Thomas R, Robert A A, Jean H P, et al. Detection of antibody to avian influenza A (H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays. *J Clin Microbiol*, 1999, 37: 937–943
- 19 Holman D H, Wang D, Raja N U, et al. Multi-antigen vaccines based on complex adenovirus vectors induce protective immune responses against H5N1 avian influenza viruses. *Vaccine*, 2008, 26: 2627–2639
- 20 贾雷立. 禽流感病毒分离、复合多表位重组体构建及实验免疫研究. 博士学位论文. 长春: 吉林大学, 2006
- 21 Ljungberg K, Kolmskog C, Wahren B, et al. DNA vaccination of ferrets with chimeric influenza A virus hemagglutinin (H3) genes. *Vaccine*, 2002, 20: 2045–2052
- 22 Cherbonnel M, Rousset J V J. Strategies to improve protection against low-pathogenicity H7 avian influenza virus infection using DNA vaccines. *Avian Dis*, 2003, 47: 1181–1186
- 23 Qiu M, Fang F, Chen Y, et al. Protection against avian influenza H9N2 virus challenge by immunization with hemagglutinin- or neuraminidase- expressing DNA in BALB/c mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 343: 1124–1131
- 24 Laddy D J, Yan J, Corbitt N, et al. Immunogenicity of novel consensus-based DNA vaccines against avian influenza. *Vaccine*, 2007, 25: 2984–2989
- 25 南文龙. 流感病毒表位筛选与复合多表位核酸疫苗设计及免疫研究. 博士学位论文. 长春: 吉林大学, 2009
- 26 Carroll S M, Paulson J C. Differential infection of receptor-modified host cells by receptor-specific influenza viruses. *Virus Res*, 1985, 3: 165–179
- 27 Wang S X, Taaffe J, Parker C, et al. Hemagglutinin (HA) proteins from H1 and H3 serotypes of influenza A viruses require different antigen designs for the induction of optimal protective antibody responses as studied by codon-optimized HA DNA vaccines. *J Virol*, 2006, 80: 11628–11637
- 28 Zheng L, Wang F Y, Yang Z D, et al. A single immunization with HA DNA vaccine by electroporation induces early protection against H5N1 avian influenza virus challenge in mice. *BMC Infect Dis*, 2009, 9: 17
- 29 Zhang L, Widera G, Rabussay D. Enhancement of the effectiveness of electroporation-augmented cutaneous DNA vaccination by a particulate adjuvant. *Bioelectrochemistry*, 2004, 63: 369–373
- 30 De Groot A S, Ardito M, McClaine E M, et al. Immunoinformatic comparison of T-cell epitopes contained in novel swine-origin influenza A (H1N1) virus with epitopes in 2008–2009 conventional influenza vaccine. *Vaccine*, 2009, 27: 5740–5747