

用反向遗传操作技术产生致弱的 H5 亚型重组流感病毒

卢建红 龙进学 邵卫星 韦栋平 刘秀梵*

(扬州大学 农业部畜禽传染病学重点开放实验室 扬州 225009)

摘 要 选择一株鹅源 H5N1 亚型禽流感病毒(AIV), 缺失其 HA 基因裂解序列的 4 个碱性氨基酸、使 HA 裂解模式由高致病性的 PQRERRRKKR ↓ GL 突变为低致病性的 PQRESR ↓ GL, 将修饰的 HA 基因克隆入转录/表达载体 pHW2000, 构建质粒 pHW524-HA, 将该毒株和 H9N2 亚型毒株的 NA 全基因分别克隆入 pHW2000, 构建质粒 pHW506-NA 和 pHW206-NA。将 pHW524-HA 与 pHW506-NA 或 pHW206-NA 组合、均用 A/WSN/33(H1N1)提供 6 个内部基因, 两个组合的 8 个质粒分别共转染 COS-1 细胞, 产生了 H5N1 和 H5N2 两个亚型的基因重排病毒。通过在鸡胚中的连续传代和适应 2 个重组病毒血凝价上升到 1:2⁹、表面基因稳定、对 6 周龄 SPF 鸡不表现致病性, H5N2 重组病毒对鸡胚的毒力低于 H5N1 病毒。这种尝试证明反向遗传操作技术是研究 AIV 致病性和构建疫苗候选株的有用工具。

关键词 禽流感病毒, H5 亚型, 反向遗传操作技术, 基因重排, 致弱

中图分类号 S855.3 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2005)01-0053-05

2004 年初,在东南亚一些国家发生了由 H5N1 亚型禽流感病毒(Avian Influenza Virus, AIV)引起的高致病性禽流感疫情,这也严重地影响到我国的养禽业发展和禽类产品的出口贸易^[1]。1997 年、2003 年和 2004 年发生在香港、越南等地的 H5N1 亚型 AIV 突破种间障碍、直接感染人并致人死亡的事实,引起了全世界对禽流感的公共卫生意义的关注以及对其致病性分子机制的研究^[2~5]。AIV 属于正粘病毒科流感病毒属 A 型流感病毒,基因组分为 8 个片段,是负义的单股 RNA。血凝素(HA)被宿主蛋白酶裂解的能力是 AIV 主要的毒力决定因素,而 HA 裂解位点附近的氨基酸序列是 HA 裂解能力的关键性影响因素,裂解序列含数个碱性氨基酸易造成对宿主的致病性^[6]。禽流感的控制对策是使用疫苗免疫并结合卫生与生物安全措施。目前使用的疫苗是灭活疫苗,但使用强毒疫苗株仍然存在散毒的危险,应该使用具有同样免疫原性的弱毒疫苗株。

RNA 病毒的反向遗传操作技术或称病毒拯救,是指使用以质粒为基础的操作系统从克隆的 cDNA 产生病毒的过程^[7],在对病毒的生活周期、致病基础、新型疫苗构建、表达外源蛋白等方面的研究中显示了良好的应用前景。1999 年以后 Neumann 等、

Hoffmann 等报道了完全以质粒为基础的反向遗传操作系统^[8,9],Hoffmann 等建立的 8 质粒拯救系统其载体的启动子和终止序列为 pol I-pol II 系统,以数量最少的质粒转染细胞,利用同一载体实现在细胞内的病毒 RNA 和蛋白合成,进而包装成病毒^[9,10]。我们应用 8 质粒系统^[9],建立了反向遗传操作技术[△],希望能应用该技术对禽流感病毒的致病性进行研究并探索弱毒疫苗候选株的构建。通过修饰 H5N1 亚型 AIV 的 HA 基因,构建 cDNA 克隆、与该毒株的 NA 基因或 H9N2 亚型 AIV 的 NA 基因组合,以 A/WSN/33(H1N1)内部基因为骨架,产生了致弱表型的 H5N1 和 H5N2 亚型的两个子代病毒。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 毒株、细胞、鸡胚和血清: A/Goose/Huadong/1/2000(H5N1)缩写为 Gs/Hd/00, A/Chicken/Shanghai/F/98(H9N2)缩写为 C/SH/F/98,分离和纯化后,经国家流感中心鉴定亚型。细胞系 COS-1 用含有 10% 犊牛血清的 DMEM 培养。SPF 鸡胚种蛋购自山东省 SPF 鸡实验种鸡场,非免疫鸡胚由扬州大学实验动物室提供。H9、H5 亚型阳性血清自制^[11],H1 亚型

基金项目 江苏省“十五”科技攻关项目(BE2002016)、农业部农办牧 200183 资助项目

* 通讯作者。Tel 86-514-7979386, Fax 86-514-7323112, E-mail xfliu@mail. yzu. edu. cn

作者简介 卢建红(1968 -),女,湖南醴陵人,博士,主要从事病毒分子生物学研究。现在中南大学湘雅医学院。E-mail jianhl@sohu.com

其他作者 张艳梅

收稿日期 2004-06-21, 修回日期 2004-11-12

△卢建红,邵卫星,刘玉良,等. 用 8 质粒病毒拯救系统产生 H9N2/WSN 流感病毒. 病毒学报(待发表),中国畜牧兽医学学会第十次家畜传染病会议论文集(苏州). 2003 年 10 月, 69 - 76.

阳性血清系国家禽流感参考实验室陈化兰研究员惠赠。

1.1.2 8 质粒病毒拯救系统:美国 St. Jude 儿童研究医院的 Webster 博士惠赠。包括用于 cDNA 克隆的双向转录载体 pHW2000, 以及已克隆 A/WSN/33 8 个片段 cDNA 至 pHW2000 的 pHW181-PB2、pHW182-PB1、pHW183-PA、pHW184-HA、pHW185-NP、pHW186-NA、pHW187-M、pHW188-NS 质粒^[9]。

1.1.3 主要试剂:Expand High Fidelity PCR System、dNTPs、Agrose Gel DNA Extraction Kit 等为 Roche 产品, AMV 反转录酶、内切酶 *EcoR* I 和 *Apa* I、T4 DNA 连接酶、RNasin 等为 Promega 产品。内切酶 *BsmB* I (10U/ μ L) 为 Fermentas 产品。转染试剂 Lipofectin reagent 为 Invitrogen 产品。UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒为生工生物工程(上海)有限公司产品。质粒提取试剂盒为上海华舜生物工程

1.2 HA 基因修饰的策略

分 2 段扩增 HA 基因, 然后用“三分子连接法”将这两段与转录/表达载体 pHW2000 连接, 使 HA 裂解序列被切去 4 个碱性氨基酸(RRKK), 裂解模式由 PQRERRRKKR \downarrow GL 突变为 PQRRESR \downarrow GL (图 1)。

Gs/Hd/00 (wild-type) cleavage motif:

cDNA: 5' ...ATG...CCT CAA AGA GAG AGA AGA AGA AAA AAG AGA GGA CTA...TAA...3'
P Q R E R R R R K K R G L

PCR, Ligation

5' ...ATG... CCT CAA AGA GAG AGT AGA GGA CTA ...TAA...3'
P Q R E S R G L

图 1 Gs/Hd/00 HA 裂解模式的修饰

Fig.1 Modification of the HA cleavage motif of Gs/Hd/00 (H5N1)

1.3 引物设计、RNA 的提取和反转录 (RT)

按 Hoffmann 等^[12]的方法设计扩增 HA 和 NA 基因的通用引物。用于突变 HA 基因的下游引物 P-MG4-2 位于编码区 1003-1023nt, 与 Bm-HA-1(上游)配对, 扩增 cDNA 5'端片段 S1(约 1.05kb); 上游引物 P-MG4-1 位于编码区的 1036-1055nt, 与 Bm-HA-2(下游)配对, 扩增 cDNA 3'端片段 S2(约 0.65kb), 被切去的 12nt 位于 1024-1035。在所有引物 5'端均加上 *BsmB* I 酶识别位点(带下划线部分, 引物名称中用 Bm 表示)。用所有片段 cDNA 5'端都具有的 12nt 设计为用于反转录的通用引物(12uni)。引物由 TaKaRa 有限公司合成, Bm-HA-1: 5'-TATTCGTCCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGG-3', Bm-HA-2: 5'-ATATCGTCTC GTATTAGTAGAAACAAGGCTGTTTT-3'; Bm-NA-1: 5'-TATTCGTCCTCAGGGAGCAAAAGCA

GGAGT-3', Bm-NA-2: 5'-ATAT CGTCTCGTATTAGTAG AAACAAGGAGTTTT TT-3'; P-MG4-1: 5'-ACATCG TCTCAGAGTAGAGGACTATTTGGAGCTAT-3', P-MG4-2: 5'-AGATCGTCTCCAC TCTCTCTGAGGGGTATT-3'; 12 uni: 5'-AGCAAAAGCAGG-3'。

用 UNIQ-10 柱式试剂盒直接从含病毒的尿囊液中提取总 RNA, 用通用引物 12uni 反转录得到总 cDNA。

1.4 Gs/Hd/00 的 HA、NA 基因及 C/SH/F/98 的 NA 基因转录和表达载体的构建

按上述设计的引物配对、参照 Hoffmann 等^[12]的方法从总 cDNA 中 PCR 扩增 S1(1.05kb)和 S2(0.65kb)两个片段、测序, 凝胶电泳回收的 S1 和 S2 分别经 *BsmB* I 酶切、回收, 与同样经 *BsmB* I 酶切的载体 pHW2000 进行三分子连接反应。Gs/Hd/00 的 NA(N1)和 C/SH/F/98 的 NA(N2)基因也分别与 pHW2000 连接。电泳、酶切、PCR 扩增、测序(上海联合基因公司)鉴定质粒和验证插入片段的序列。构建的质粒分别命名为 pHW524-HA、pHW506-NA 和 pHW206-NA。

1.5 共转染及其子代病毒的验证、传代和基因测序

1.5.1 质粒的组合:分两组, 第一组为 H5N1/WSN, 表面基因相应的质粒为 pHW524-HA 和 pHW506-NA, 内部基因均来自 WSN。第二组为 H5N2/WSN, 与第一组的区别仅为 NA 基因来自 C/SH/F/98, 相应质粒为 pHW206-NA。以没有 pHW524-HA 的 7 个质粒组合作阴性对照, 以 WSN 的 8 个质粒作阳性对照。

1.5.2 共转染:按设计组合的 8 个质粒, 各取相同量均匀混合。将 7 μ L lipofectin 转染试剂和 2 μ g 混合质粒分别稀释到 100 μ L 无血清、无抗生素的 DMEM 中, 按说明书进行分散和结合。将 24 孔板中已培养约 18-24h、60% ~ 90% 丰度的 COS-1 细胞, 用无血清、无抗生素的 DMEM 洗 2 次, 加入质粒与 lipofectin 的结合物(共 200 μ L), 均匀覆盖于细胞上, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中吸附 6h, 换入含 10% 血清的 DMEM 0.5mL, 30h 后加入含终浓度为 2 μ g/mL 胰酶的无血清 DMEM 0.5mL, 再培养 72h, 小心吹落细胞, 与上清一起收集。

1.5.3 子代病毒的验证、传代和基因测序:转染上清-20 $^{\circ}$ C 和 20 $^{\circ}$ C 冻融两次, 经尿囊腔接种于 10 日龄 SPF 鸡胚, 每胚 0.1mL, 每个样品接种两个胚, 置 35 $^{\circ}$ C 培养至 72h, 收集尿囊液, 用国际兽疫局(OIE)推荐的标准进行血凝(HA)和血凝抑制(HI)试验鉴

定病毒。HI 阳性尿囊液 ,用鸡胚传代的第 2 代尿囊液提取 RNA、通用引物、RT-PCR 扩增 NA 和 NS 基因片段进行测序 ;WSN 对照的 HA 和 HI 阳性尿囊液 ,PCR 扩增 HA、NA 和 NS 基因并测序。未经反转录的 RNA、用通用引物或 pHW2000 载体上的一对特异引物 PCR 扩增对照 ,以排除尿囊液中转染质粒 DNA 的存在。

共转染产生的 H5N1 和 H5N2 病毒 ,在 SPF 鸡胚连续传 15 代 ,每代 3 个胚、分别测定每个胚的 HA 效价 ,取最高效价的尿囊液 1 : 500000 稀释传代。RT-PCR 扩增第 12 代病毒的 HA 和 NA 基因并测序。

1.6 鸡胚半数感染剂量(EID₅₀)的测定

按参考文献的方法^[11] ,分别用 H5N1 和 H5N2 病毒的第 5 代尿囊液 ,取出 24h 后的死胚和培养至 84h 的胚进行 HA 检测 ,HA 效价在 1 : 16 以上的判定为鸡胚感染阳性 ,用 Reed-Muench 法计算 EID₅₀。

1.7 致病性试验

按 OIE 标准。以 0.2mL 1 : 10 稀释的含病毒尿囊液 ,接种 8 只 6 周龄 SPF 鸡 ,隔离饲养 ,10 天内导致 6 只或 6 只以上鸡死亡的病毒为高致病性 AIV。试验组分为 3 组 ,分别用 H5N1 病毒第 3 代、第 12 代和 H5N2 病毒的第 5 代尿囊液 ;对照组用野生型的 Gs/Hd/00。

2 结果

2.1 表达质粒的构建

经过酶切、PCR 鉴定和测序 ,目的片段均正确地插入载体 ,HA 基因已按设计缺失了 4 个碱性氨基酸 ,即成功地构建了质粒 pHW524-HA、pHW506-NA 和 pHW206-NA。

2.2 共转染病毒的产生

共转染上清接种鸡胚 ,H5N1/WSN ,第一代 SPF 鸡胚 47h 死亡 ,尿囊液 HA 效价为 1 : 2¹ ,第二代的 HA 效价 1 : 2⁵ ,H5 亚型阳性(HI 效价为 1 : 2⁸) ,H9、H1 亚型阴性。PCR 扩增、测序验证是预期组合中的 NA 和 NS 基因 ,从未经反转录的 RNA 中扩增不到 NA 和 NS 片段。H5N2/WSN ,第一代 SPF 鸡胚活 ,尿囊液 HA 效价为 1 : 2⁵ ,H5 亚型阳性(HI 效价 1 : 2⁸) ,经验证也为设计基因型的重组病毒。7 质粒阴性对照没有病毒的产生。WSN 8 质粒阳性对照产生了预期的 H1N1 亚型病毒 ,其 HA、NA 和 NS 基因测序与 GenBank 中发表的一致(登录号分别为 J02176 , J02177 和 M12597)。

2.3 H5N1 和 H5N2 转染病毒的传代和基因测序

用 SPF 鸡胚连续传 15 代 ,表 1 中显示 1 ~ 10 代次 3 个胚中的最高 HA 效价值。2 个重组病毒在第

表 1 H5N1 和 H5N2 转染子病毒在鸡胚传代 1-10 代次的 HA 效价

Virus	Passages									
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
H5N1	1 : 2 ¹	1 : 2 ⁵	1 : 2 ⁷	1 : 2 ⁶	1 : 2 ⁶	1 : 2 ⁷	1 : 2 ⁸	1 : 2 ⁸	1 : 2 ⁹	1 : 2 ⁹
H5N2	1 : 2 ⁵	1 : 2 ⁵	1 : 2 ⁶	1 : 2 ⁶	1 : 2 ⁶	1 : 2 ⁷	1 : 2 ⁷	1 : 2 ⁷	1 : 2 ⁸	1 : 2 ⁹

11 ~ 15 代次的 HA 效价均为 1 : 2⁹。它们的第 12 代病毒 HA 和 NA 全长基因经测序均没有任何变化 ,被修饰的 HA 裂解位点也没有改变。

2.4 EID₅₀和鸡胚死亡时间

H5N1 病毒的 EID₅₀ 为 10⁻⁷/0.2mL ,鸡胚死亡时间为 40 ~ 60h ;H5N2 病毒的 EID₅₀ 为 10⁻⁷/0.2mL ,鸡胚一般存活 ,少数在 72 ~ 84h 死亡。

2.5 致病性试验

用 2 个重组病毒的不同代次尿囊液的 3 个试验组均没有鸡只发病和死亡 ,用 Gs/Hd/00(wt)的对照组 48h 后鸡只开始出现精神沉郁、食欲减退、拉稀等明显症状 ,60h 死亡 7 只 ,84h 全部死亡。H5N1 第 3 代尿囊液接种后第 10 天 ,6 只鸡产生了效价为 1 : 2¹ ~ 1 : 2³ 的 H(H5) 抗体 ,1 只抗体效价为 1 : 2⁶ ,1 只未

测到抗体。H5N2 第 5 代尿囊液接种后 10 天 ,5 只鸡产生了效价为 1 : 2^{1~3} 的 H(H5) 抗体 ,其它未测到抗体。

3 讨论

H5N1 和 H9N2 两个亚型的病毒是目前引起我国国家禽发生禽流感的主型。反向遗传操作技术是近几年发展起来的新的方法学 ,为相关研究开阔了视野 ,具有良好的应用前景^[13]。我们应用反向遗传操作技术产生了设计基因型的两个病毒 H5N1/WSN 和 H5N2/WSN ,用 SPF 鸡胚传代后新基因型的病毒适应性增强、毒价上升、保护性抗原基因(表面基因)稳定 ,重组病毒对鸡致弱。

切除 HA 基因的多个碱性氨基酸使其裂解模式由高致病性的 PORERRRKKR ↓ GL 突变为低致病性

的 PQRESR ↓ GL 共转染产生的 H5N1 和 H5N2 病毒,在鸡胚中连续多次传代后对 6 周龄 SPF 鸡不表现致病性,而 Gs/Hd/00(wt)对鸡呈高致病性。这两个重组病毒的内部基因与野生型 H5N1 病毒完全不同,虽然内部基因对病毒的毒力也有一定影响,但 HA 的裂解模式仍然是毒力的主要决定因素。Hatta 等^[4]对 1997 年香港的 H5N1 人分离株的研究表明,在 HA 具有多碱性氨基酸裂解序列的前提下,内部基因编码的 RNA 聚合酶蛋白 PB2 627 位单个氨基酸的变化(Glu→Lys)可以使 H5N1 AIV 对小鼠的毒力从弱到很强地变化,从而揭示了 1997 H5N1 对人致病的分子机制。Subbarao 等^[14]用 1997 人 H5N1 病毒与 A/PR/8/34(H1N1)组合产生的 H5N1/PR8 重组病毒对鸡和鼠的毒力减弱,这与我们的结果相符。本研究中重组病毒能引起部分鸡的抗体反应,但抗体水平低,说明重组病毒在鸡体内的复制受到限制,显然,如果进行疫苗株的构建,这种病毒是不能用作弱毒活疫苗的。

用 SPF 鸡胚传代的结果(表 1)显示,拯救的病毒随着传代次数增加,HA 效价升高,到第 9~10 代以后直到第 15 代,毒价稳定在与野生型 Gs/Hd/00 病毒相当的水平($1:2^9$)。在 Hoffmann 等的报道^[10]中,同样用 8 质粒系统产生的 H5N1/PR8 病毒,其新生病毒在鸡胚上的复制能力也较差,推测是由 HA 基因修饰造成的,但 Hoffmann 没有进行鸡胚传代和致病性试验。

两个重组病毒在鸡胚传代至 11~15 代,HA 效价没有继续上升,而表面基因没有任何改变,这与内部基因有关。内部基因均来自 A/WSN/33,WSN 是流感病毒的 1 个标准毒株,经过长期的鸡胚适应^[15]转染产生的 WSN 在鸡胚中传代的 HA 滴度为 $1:2^{6\sim8}$ (本文没有的数据),而 H5N1 和 H5N2 重组病毒均达到 $1:2^9$,估计已达到上限。如果换成 A/PR/8/34(PR8)的内部基因则可能达到更高的 HA 效价,因为 PR8 在鸡胚的适应性比 WSN 强。Liu 等^[16]构建的 H5N3/PR8 在鸡胚上升的效价高达 $1:2^{11}$ 。高效价是构建疫苗候选株时需要考虑的重要因素,因为可以保证足够的抗原量并降低成本。

从 EID_{50} 测定结果和鸡胚死亡时间、传代中鸡胚死亡情况看,H5N1/WSN 和 H5N2/WSN 对鸡胚的感染能力一致,但是毒力有明显差别,H5N1 病毒能很快(40~60h)上升到一定的效价并致死鸡胚,而 H5N2 病毒一般不致死鸡胚,上升的效价与 H5N1/WSN 相当。这两个病毒仅有 NA 基因的不同,可见

NA 对病毒的毒力有影响。Goto 等^[17]对 WSN 的研究表明,NA 与血清中纤维蛋白溶酶原连接,间接促进 HA 的裂解从而使 WSN 在不加胰酶的情况下即可使 MDCK 和 MDBK 细胞产生病变,来自 H5N1 病毒的 NA 是否也有这种特性,有待进一步研究。

新基因型病毒经过在鸡胚的多次传代,表面基因没有变化,这是在疫苗候选株构建中所需要的。HA 和 NA 是流感病毒的表面糖蛋白,也是其保护性抗原,宿主抗流感病毒的保护性免疫主要针对这两种表面糖蛋白,其中以对 HA 的体液免疫抗体最重要^[18]。Subbarao 等构建的 H5N1/PR8,制成灭活苗能保护小鼠对野生型 H5N1 病毒的攻击,而且阻止 H5N1 强毒在鼠肺中的复制^[14]。Liu 等构建的 H5N3/PR8 不在鸡体内复制,但制成灭活疫苗能保护鸡对强毒的攻击,与商品化疫苗相比,能更明显地阻止排毒^[16]。

综上所述,修饰 HA 基因拯救得到的两个病毒可以稳定地在鸡胚中繁殖,不改变表面抗原,而且对鸡致弱,这种尝试为应用反向遗传操作技术研究 AIV 致病性以及构建新型疫苗候选株、以进一步阻止高致病性 H5 亚型病毒的扩散提供了方法和策略。

致谢 感谢美国 St. Jude 儿童研究医院的 Robert Webster 博士和 Erich Hoffmann 博士惠赠 8 质粒病毒拯救系统及热心帮助。

参 考 文 献

- [1] 王俊勋.禽流感疫情对家禽业的影响.中国家禽,2004,26(4):1-3.
- [2] Webster R G. A molecular whodunit. *Science*, 2001, 293(5536):1773-1775.
- [3] Webby R J, Webster R G. Are we ready for pandemic influenza? *Science*, 2003, 302:1519-1522.
- [4] Hatta M, Gao P, Halfmann P, et al. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science*, 2001, 293:1840-1842.
- [5] Webby R J, Perez D R, Coleman J S, et al. Responsiveness to a pandemic alert: use of reverse genetics for rapid development of influenza vaccines. *Lancet*, 2004, 363:1099-1103.
- [6] Steinhauer D A. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology*, 1999, 258:1-20.
- [7] Neumann G, Kawaoka Y. Synthesis of influenza virus: new impetus from an old enzyme, RNA polymerase I. *Virus Res*, 2002, 82:153-158.
- [8] Neumann G, Kawaoka Y. Reverse genetics of influenza virus. *Virology*, 2001, 287:243-250.
- [9] Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, et al. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, 97:6108-6113.

- [10] Hoffmann E, Krauss S, Perez D, *et al.* Eight - plasmid system for rapid generation of influenza virus vaccines. *Vaccine*, 2002, **20**: 3165 - 3170.
- [11] 殷 震, 刘景华. 动物病毒学. 第二版. 北京: 科学出版社, 1997.
- [12] Hoffmann E, Stech J, Guan Y, *et al.* Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch Virol* 2001, **146**(12) 2275 - 2289.
- [13] Neumann G, Whitt M A, Kawaoka Y. A decade after the generation of a negative-sense RNA virus from cloned cDNA what have we learned? *J Gen Virol*, 2002, **83** 2635 - 2662.
- [14] Subbarao K, Chen H, Swayne D, *et al.* Evaluation of a genetically modified reassortant H5N1 influenza A virus vaccine candidate generated by plasmid-based reverse genetics. *Virology*, 2003, **305**: 192 - 200.
- [15] Lazarowitz S G, Goldberg A R, Choppin P W. Proteolytic cleavage by plasmin of the HA polypeptide of influenza virus: host cell activation of serum plasminogen. *Virology*, 1973, **56**: 172 - 180.
- [16] Liu M, Wood J M, Ellis T. Preparation of a standardized, efficacious agricultural H5N3 vaccine by reverse genetics. *Virology*, 2003, **314** 580 - 590.
- [17] Goto H, Kawaoka Y. A novel mechanism for the acquisition of virulence by a human influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 10224 - 10228.
- [18] Suarez D L, Schultz-Cherry S. Immunology of avian influenza virus: a review. *Develop Comp Immunol*, 2000, **24** 269 - 283.

Generation of attenuated H5N1 and H5N2 subtypes of Influenza virus recombinants by reverse genetics system

LU Jian-hong LONG Jin-xue SHAO Wei-xing WEI Dong-ping LIU Xiu-fan*

(Animal Infectious Disease Laboratory, School of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: The HA connecting peptide at cleavage site, PQRERRKKR↓GL, of an H5N1 subtype avian influenza virus (AIV) was replaced with PQRESR↓GL, and then the modified HA gene was cloned into the transcription/expression vector, pHW2000, constructing a plasmid named pHW524-HA. The NA(N1) gene from the H5N1 virus and the NA(N2) gene from an H9N2 AIV were also cloned into pHW2000 separately, resulting in plasmids pHW506-NA and pHW206-NA. With the organization of pHW524-HA, pHW506-NA or pHW206-NA, and six plasmids containing internal genes from A/WSN/33 backbone virus, two transfectants, H5N1/WSN and H5N2/WSN, were subsequently generated by eight-plasmid system. After 15 consecutive passages in embryonated eggs, the two recombinants grew up to high titers of $1:2^9$ in hemagglutination test with no changes in nucleotide sequences of the surface genes detected. Both the recombinant viruses belonged to mildly pathogen when evaluated by the pathogenicity test in six-week-old SPF chickens. H5N2/WSN recombinant virus was obviously less pathogenic than H5N1/WSN virus for embryonated chicken eggs. This presentation showed that the reverse genetics system is a very useful tool for studying the construction and function of individual genes and for the generation of virus as vaccine candidate.

Key words: Avian influenza virus, H5 subtype, Reverse genetics, Reassortment, Attenuated

Foundation item: The 10th Five Years Key Programs for Science and Technology Development of Jiangsu Province(BE2002016); Project Granted by Chinese Ministry of Agriculture(200183)

* Corresponding author. Tel 86-514-7991416 Fax 86-514-7972591 E-mail: xfliu@mail.yzu.edu.cn

Other author: ZHANG Yan-mei

Received date: 06-21-2004

欢迎订阅《中华微生物学和免疫学杂志》

《中华微生物学和免疫学杂志》由中华医学会主办,是中华系列杂志之一。1981 年创刊,主要报道医学微生物学和免疫学方面的研究论文、简报、综述、评论、国内外学术动态、新书评介、消息等。

本刊辟有细菌学、病毒学、分子微生物学、临床微生物学、基础免疫学、临床免疫学、分子免疫学、免疫遗传学、肿瘤免疫学、中药与免疫、免疫学技术、检测技术、专题综述、学术会议评议、人物述林、医药信息、简讯、书评等栏目。

读者对象为医学微生物学和免疫学专业的科研人员、教师及有关的高、中级卫生防疫、检验工作者。

本刊为月刊,大 16 开本,每册 80 页,每月 30 日出版,每册定价 10.00 元。国内外公开发行,国内由全国各地邮电局发行。国外由中国国际图书贸易公司(中国国际书店)发行。如错过邮局征订,亦可直接向本刊编辑部订购(地址:北京市朝阳区三间房南里 4 号,邮编:100024),收到款后即寄上发票及杂志。

邮发代号 2-55,国外刊号:M507