

利用 8 质粒系统拯救 A/Chicken/Shanghai/F/98(H9N2) 株禽流感病毒

石火英 卢建红 陈素娟 孙 蕾 刘秀梵*

(扬州大学兽医学院 农业部畜禽传染病学重点开放实验室 扬州 225009)

摘 要 应用反向遗传技术将含有 1998 年中国大陆分离株 H9N2 亚型禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV)的 8 个基因片段的质粒共转染 COS-1 细胞,产生了与野生病毒生物学特性相同的 H9N2 亚型 AIV。将 A/Chicken/Shanghai/F/98(CK/SH/F/98)株 H9N2 亚型 AIV 的 8 个基因组 cDNA 分别克隆到 pol I-pol II 转录/表达载体 pHW2000 中,构建成 8 个转录/表达载体重组质粒。将这 8 个质粒共转染 COS-1 细胞,24h 后收获细胞及上清接种 SPF 鸡胚 48h 后收取鸡胚尿囊液继续进行鸡胚传代,产生能致死鸡胚的病毒。经血凝、血凝抑制试验、序列分析和电镜观察,证实产生了 CK/SH/F/98(H9N2)株 AIV。

关键词 反向遗传技术 H9N2 亚型 AIV 质粒 转染

中图分类号:Q75 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2005)03-0373-04

禽流感(Avian influenza, AI)是由 AIV 引起的一类对人类和禽类危害极大的传染性疾病。AIV 分为高致病性禽流感病毒和低致病性禽流感病毒,世界范围内几次 AI 大爆发,都是由高致病性禽流感病毒引起的。低致病性禽流感可以给养禽业带来灭顶之灾,对人类的威胁同样严重,尤其是 H9N2 亚型 AI 不仅流行于全世界,而且可以感染人类,如 H9N2 亚型 AIV 被认为是引起 1997 年香港流感事件的 H5N1 亚型 AIV 内部基因的供体。因此 H9N2 亚型 AIV 倍受世界流感研究工作者关注。我国于 1994 年从广东省某鸡场分离到第一株 H9N2 亚型 AIV 后,虽采取了很多控制措施,但自 1998 年以来在我国大部分地区仍然不断发生 H9N2 亚型 AI 的爆发和流行。近几年在我国部分商品蛋鸡场及养鸡专业村的禽流感调查中发现 H9 亚型 AIV 阳性鸡群占总的 AIV 抗体阳性鸡群的 93.67%^[1],说明在我国大部分地区都存在 H9 亚型 AIV,是我国现有 AIV 的主要亚型。

为探讨 H9N2 亚型 AIV 的致病机理及 H9N2 亚型 AIV 基因组结构与功能的关系,本研究选用 1998 年中国大陆分离株 CK/SH/F/98(H9N2)株 AIV 为研究对象,利用 8 质粒系统,建立了反向遗传技术,成功拯救出 CK/SH/F/98(H9N2)株 AIV。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒株和细胞株:CK/SH/F/98(H9N2)株 AIV 由扬州大学农业部畜禽传染病学重点开放实验室分离纯化,经国家流感中心鉴定为 H9N2 亚型,全基因序列在 GenBank 的登录号为 AY253750-AY253756^[2]。SPF 鸡胚购自山东省 SPF 鸡实验种鸡场;COS-1 细胞系用含 10% FBS 的 DMEM 培养基培养。

1.1.2 主要试剂:Expand High Fidelity PCR System、dNTP 和 Agrose Gel DNA Extraction Kit 购自 Roche 公司;AMV 反转录酶、T4 DNA 连接酶和 pGEM-Teasy vector 购自 Promega 公司;Lipofectin Reagent 转染试剂购自 Invitrogen 公司;小提质粒试剂盒购自 Qiagen 公司;1% 鸡红细胞按常规方法自行制备。

1.1.3 基因和质粒:在 pol I-pol II 转录/表达载体 pHW2000 中^[3],含 A/WSN/1/33(H1N1)株流感病毒 8 个基因组 cDNA 构成的 8 个阳性质粒(能够拯救出病毒的质粒):pHW181-PB2、pHW182-PB1、pHW183-PB3、pHW184-HA、pHW185-NP、pHW186-NA、pHW187-M 和 pHW188-NS 均由美国 St. Jude 儿童研究医院的 Webster 博士惠赠;在 pol I-pol II 转录/表

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

* 通讯作者。Tel:86-514-7971416;Fax:86-514-7323112;E-mail:xfliu@mail.yzu.edu.cn

作者简介:石火英(1963-),女,江苏丹阳人,博士研究生,研究方向为分子病毒学。E-mail:shihuoying2002@hotmail.com

其他作者:刘玉良

收稿日期:2004-10-13,修回日期:2005-01-10

达载体 pHW2000 中,插入 CK/SH/F/98(H9N2)株 AIV 8 个基因形成 8 个质粒:pHW201-PB2、pHW202-PB1、pHW203-PB3、pHW204-HA、pHW205-NP、pHW206-NA、pHW207-M 和 pHW208-NS,其中 NA 基因在 1298 位引入 A→C 的人工突变。该部分工作由本室卢建红完成[△]。

1.2 转染质粒和转染细胞的准备

将 CK/SH/F/98(H9N2)株 AIV 的 8 个质粒扩大培养,用小提质粒试剂盒小提质粒,测定质粒的含量和纯度,制备高纯度的质粒用于转染。

将生长状态良好的 COS-1 细胞消化后计数,按 10^5 个细胞/孔的细胞浓度置于 24 孔细胞培养板中培养过夜。

1.3 8 质粒共转染 COS-1 细胞

1.3.1 用阳性质粒拯救流感病毒:将含 A/WSN/1/33(H1N1)株 8 个基因的阳性质粒按 1:1 的比例混合。按照 Lipofectin Reagent 转染试剂操作指南和 Hoffmann 等^[3]提供的方法稍作改进转染:即将混合的质粒和转染试剂加入 COS-1 细胞中,置含 5% CO₂、37℃ 培养箱中培养 24h 后,吹下转染的细胞接种 10 日龄 SPF 鸡胚,培养 48h 后再取尿囊液接种 10 日龄 SPF 鸡胚,每日观察鸡胚死亡情况,适时收集鸡胚尿囊液进行病毒鉴定,获救病毒简称 R-WSN。同时设对照转染孔(不加转染试剂和质粒)其它同上。

1.3.2 A/WSN/1/33(H1N1)株流感病毒与 CK/SH/F/98(H9N2)株 AIV 基因重组病毒的拯救:将含 A/WSN/1/33(H1N1)株 6 个内部基因的阳性质粒与 CK/SH/F/98(H9N2)株 AIV 2 个表面基因的质粒共 8 个质粒按 1:1 的比例混合,按 1.3.1 方法操作。获救的病毒简称 R-W6/F2。

将含 A/WSN/1/33(H1N1)株流感病毒 3 个内部基因(NA、M 和 NS)的阳性质粒与 CK/SH/F/98(H9N2)株 AIV 5 个表面基因(PB2、PB1、PB3、HA 和 NP)的质粒共 8 个质粒按 1:1 的比例混合,按 1.3.1 方法操作。获救的病毒简称 R-W3/F5。

1.3.3 CK/SH/F/98(H9N2)株禽流感病毒的拯救:将含 CK/SH/F/98(H9N2)株 AIV 8 个基因的质粒按 1:1 的比例混合,按 1.3.1 转染方法操作。获救的病毒简称 R-F。

1.4 获救病毒的鉴定

1.4.1 病毒的血凝和血凝抑制试验:获救病毒 R-

WSN、R-W6/F2、R-W3/F5 和 R-F 的血凝和血凝抑制试验按 OIE 标准进行。

1.4.2 RT-PCR 测序鉴定拯救的 R-F 禽流感病毒:用 RT-PCR 方法抽提获救病毒 R-F 中的 NA 基因,由联合基因上海联众基因研究院测序鉴定。与野毒株比较,用于拯救 CK/SH/F/98 的 NA 基因在 1298 位有碱基 A→C 的突变。

1.4.3 获救病毒 R-F 的鸡胚致死性试验:将含获救病毒 R-F 的尿囊液稀释 1000 倍,无菌接种 10 日龄 SPF 鸡胚,观察鸡胚死亡的情况。

1.4.4 获救病毒的电镜观察:用获救病毒的鸡胚尿囊液经离心后,取上清进行负染色,用 FEI 公司 Tecnai-12 型电镜观察。

2 结果

2.1 阳性质粒和重组质粒病毒的拯救

用 A/WSN/1/33(H1N1)株流感病毒 8 个阳性质粒,按 1.3.1 转染方法成功拯救出能致死鸡胚的流感病毒,其鸡胚尿囊液的血凝效价为 2^7 ;A/WSN/1/33(H1N1)株流感病毒 6 个内部基因质粒与 CK/SH/F/98(H9N2)株 AIV 2 个表面基因质粒转染 COS-1 细胞接种的第一代 10 日龄 SPF 鸡胚尿囊液,血凝效价达 2^7 ;A/WSN/1/33(H1N1)株流感病毒 3 个基因(NA、M 和 NS)的阳性质粒与 CK/SH/F/98(H9N2)株 AIV 5 个基因(PB2、PB1、PB3、HA 和 NP)的质粒转染 COS-1 细胞接种的第一代 10 日龄 SPF 鸡胚尿囊液,未测到血凝效价,用其尿囊液接种的第二代 10 日龄 SPF 鸡胚尿囊液血凝效价是 2^8 。分别用 H1 和 H5 阳性血清做 R-WSN 的血凝抑制试验,R-WSN 病毒可被 H1 阳性血清抑制,血凝抑制效价为 2^9 ,不能被 H5 阳性血清抑制;分别用 H9 和 H5 阳性血清做 R-W6/F2、R-W3/F5 血凝抑制试验,结果 R-W6/F2、R-W3/F5 病毒可被 H9 阳性血清抑制,不能被 H5 阳性血清抑制,血凝抑制效价为 2^{10} 。对照转染孔的上清和细胞接种鸡胚,连续传 2 代,未测到血凝价。图 1-A 显示电镜观察的 R-WSN 病毒结构。

2.2 CK/SH/F/98(H9N2)株禽流感病毒的拯救

将含 CK/SH/F/98(H9N2)株 AIV 8 个基因的质粒转染 COS-1 细胞接种的第一代 10 日龄 SPF 鸡胚尿囊液,血凝效价达 2^8 ;将第二代 10 日龄 SPF 鸡胚尿囊液稀释 1000 倍,无菌接种 10 日龄 SPF 鸡胚,鸡

[△]卢建红. H9N2 亚型 AIV 基因组序列分析及反向遗传技术产生多个 H9N2 和 H5 重组流感病毒. 扬州大学博士学位论文, 2004, 99 - 113.

胚在 72~96h 死亡,收集死亡鸡胚的尿囊液,用鸡红细胞测得尿囊液中的 R-F 病毒血凝效价是 $2^8 \sim 2^{10}$; 分别用 H9 和 H5 阳性血清做 R-F 的血凝抑制试验, R-F 可被 H9 阳性血清抑制,血凝抑制效价为 2^9 , 不能被 H5 阳性血清抑制;用 RT-PCR 方法获得 R-F 的 NA 基因,由联合基因上海联众基因研究院测序,获救病毒 R-F 的 NA 基因 1298 位有碱基 A→C 的突变,说明该病毒是拯救出的 CK/SH/F/98 病毒。电镜观察可见 R-F 流感病毒结构与野生的 CK/SH/F/98 病毒结构一致(图 1-B)。

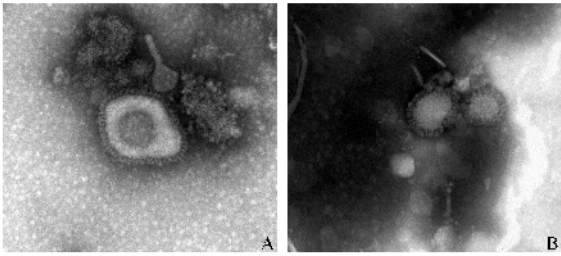


图 1 获救病毒的电镜照片(195000 ×)

Fig. 1 Electronic microscope photograph of rescued viruses (195000 ×)

A: Rescued A/WSN/1/33 strain; B: Rescued CK/SH/F/98 strain.

3 讨论

Luytjes 等^[4]将外源 RNA 分子引入流感病毒的基因组中,开创了负链 RNA 病毒分子生物学的反向遗传技术。建立流感病毒的反向遗传技术要求较高,因为要同时在一个细胞内形成 8 个功能性核糖核蛋白复合物,组装成的病毒又要能快速繁殖。开始我们应用美国 St. Jude 儿童研究医院的 Webster 博士惠赠的含 A/WSN/1/33(H1N1) 株流感病毒 8 个基因的阳性质粒,按照 Hoffmann 等^[3]的方法,将转染细胞培养 72h 后接种 10 日龄 SPF 鸡胚拯救出了病毒。同时用同样的方法进行了 CK/SH/F/98(H9N2) 株禽流感病毒的拯救,没有能拯救出。为寻找原因,我们进行了一系列反向遗传技术的摸索。首先对 CK/SH/F/98(H9N2) 株禽流感病毒的序列进行重新对比、调整转染质粒的比例、改选 293T 细胞作转染细胞和调节转染细胞的浓度等等,但均未能拯救出 CK/SH/F/98(H9N2) 株禽流感病毒。然后我们对已构建的 CK/SH/F/98(H9N2) 株 AIV 8 个质粒的可工作性分别进行了测试,即用 A/WSN/1/33(H1N1) 株 8 个阳性质粒与 CK/SH/F/98(H9N2) 株 AIV 8 个质粒进行重组,用 Hoffmann 等^[3]的方法拯救出了 W6/F2

(6+2) 重组病毒,但不能拯救出 W3(NA、M 和 NS) F5(PB2、PB1、PA、HA 和 NP) 重组病毒。究其原因可能与弱毒的 AIV 在转染细胞上的复制能力有关。用野生的 CK/SH/F/98(H9N2) 株 AIV 稀释 10 倍后接种 COS-1 细胞和 293T 细胞,培养 96h 后测得细胞和上清血凝效价为 2^4 ; 但用野生 CK/SH/F/98(H9N2) 株 AIV 稀释 1000 倍后接种 10 日龄 SPF 鸡胚,尿囊液血凝价达 $2^{10} \sim 2^{11}$, 显然 CK/SH/F/98(H9N2) 株 AIV 在 10 日龄 SPF 鸡胚中繁殖能力更强。于是我们对 Hoffmann 等^[3]的方法作了改进,将转染细胞提前到转染后 24h 接种 10 日龄 SPF 鸡胚,不仅拯救出 R-WSN、R-W6/F2 和 R-W3/F5,并最终拯救出 R-F。Subbarao^[5]也是在转染质粒 24h 后就收获细胞接种 10 日龄 SPF 鸡胚,拯救出 A/PR/8/34(H1N1) 株 6 个内部基因与 H5N1 亚型 2 个表面基因的重组病毒。

本研究从血清学试验、鸡胚致死性、形态学观察和比较野毒株与获救株序列方面鉴定拯救的 R-F 病毒。将拯救的 R-F 禽流感病毒稀释 1000 倍时,接种 10 日龄 SPF 鸡胚,病毒不仅可致死鸡胚,鸡胚尿囊液血凝价最高达 2^{10} , 说明病毒有感染性,并可在鸡胚中大量繁殖。用拯救的 R-F 通过 RT-PCR,将获得的 NA 基因 PCR 产物连接到 pGEM-T easy vector,送联合基因上海联众基因研究院测序,与野毒株相比,发现获救病毒的 NA 基因在 1298 位也有碱基 A→C 的突变,与所设计的人工突变完全一致,证明确为拯救株。成功拯救 R-F 株为研究 H9N2 亚型 AIV 传播的分子致病机制及构建新的流感疫苗株,打下了坚实的基础。

参 考 文 献

- [1] 甘孟侯主编. 禽流感. 第二版. 北京: 农业出版社, 2002: 224.
- [2] 卢建红, 刘秀梵, 邵卫星, 等. H9N2 亚型禽流感病毒基因组全长序列测定和各基因的遗传分析. 微生物学报, 2003, 43(4): 434-441.
- [3] 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 USA*, 2000, 97: 6108-6113.
- [4] Luytjes W, Krystal M, Enami M, et al. Amplification, expression and packaging of a foreign gene by influenza virus. *Cell*, 1989, 58: 1107-1113.
- [5] 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.

Generation of A/Chicken/Shanghai/F/98 (H9N2) Avian influenza virus from eight plasmids

SHI Huo-ying LU Jian-hong CHEN Su-juan SUN Lei LIU Xiu-fan*

(Animal Infectious Disease Laboratory , MOA , Yangzhou University , Yangzhou 225009 , China)

Abstract : Eight-plasmid system was used for the generation of Avian influenza virus(AIV) strain A/Chicken/Shanghai/F/98 (H9N2) which was isolated in China in 1998. In this plasmid-based expression system , viral cDNA was inserted between the RNA polymerase I (pol I) promoter and terminator sequences. The entire pol I transcription unit was flanked by an RNA polymerase II (pol II) promoter and a poly(A) site. Twenty-four hours after the transfection of eight expression plasmid into cos1 cells , the supernatant and cos1 cells transfected were inoculated into the allantoic cavity of 10-day-old specific-pathogen-free(SPF) chicken eggs . The HA titer was determined after passage of the rescued virus in chicken eggs , and as high as that of the parental wild-type virus.

Key words : Reverse genetics method , H9N2 AIV , Plasmid ; Transfection

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 : 86-514-7971416 ; Fax : 86-514-7323112 ; E-mail : xliu@mail.yzu.edu.cn

Other author : LIU Yu-liang

Received date : 10-13-2004

2003 ~ 2004 年《微生物学报》审稿专家名单 按姓名汉语拼音排序

以下专家在 2003 年(全年)和 2004 年(部分)为本刊审阅过稿件 ,在此谨向您表示衷心地感谢 ! 为编辑部审阅稿件给专家们增加了额外的工作量 ,但是本着对作者、读者和期刊负责的原则 ,审稿又是一件非常重要的事情。为了扩大学术影响、促进微生物学科的发展 ,同时也为了提高《微生物学报》的质量 ,本刊编辑部希望您今后能够继续给予支持。

白逢彦 鲍时翔 蔡文启 蔡永峰 曹竹安 陈冠军 陈洪章 陈剑平 陈民钧 陈润生 陈三凤 陈文新 程光胜
程元荣 储 炬 丁 鉴 丁久元 丁明孝 丁清泉 东秀珠 董志扬 方 勤 方维焕 冯德荣 高培基 高 松
葛 诚 耿运琪 弓明钦 龚建华 龚祖坝 郭三堆 郭志儒 何朝族 何秀良 何忠效 赫荣乔 洪 健 胡丰林
胡福泉 胡学智 胡远扬 还连栋 黄 力 黄大昉 黄年来 黄秀梨 黄耀煌 黄耀玉 吉鑫松 焦瑞身 焦新安
江 宁 姜道宏 姜文侠 蒋立科 荆玉祥 阚 飙 柯家骏 孔宪刚 雷肇祖 黎高翔 李 元 李电东 李阜棣
李季伦 李琦涵 李若瑜 李士东 李永泉 李育阳 李越中 李祖义 梁 龙 梁宗琦 廖延雄 林 敏 刘华珍
刘会洲 刘如林 刘双江 刘湘涛 刘杏忠 刘秀梵 刘志敏 刘志培 娄无忌 陆 健 陆承平 陆德如 吕国忠
罗信昌 马德钦 马清钧 马贤凯 马延和 闵 航 倪汉文 潘兹书 钱世钧 钱新民 邱井生 曲音波 茹炳根
阮继生 邵宗泽 沈 萍 盛 军 施巧琴 苏国富 孙 明 孙君社 孙万儒 孙忠富 谭华荣 唐 宏 唐国敏
唐亚林 陶天申 田杰生 王 东 王敖全 王惠莲 王慧敏 王金生 王守一 王锡锋 王修垣 王以光 王用楫
王有智 王在时 王正祥 文华安 吴 润 吴加全 吴克刚 吴庆余 夏春谷 夏桂先 向 华 肖 天 谢 红
刑建民 徐 冲 徐冠珠 徐建国 许建和 严 杰 杨海花 杨汉春 杨怀文 杨建民 杨廉婉 杨苏声 杨希才
杨秀山 杨蕴刘 姚 斌 于嘉林 喻子牛 袁 生 袁勤生 袁正宏 袁志明 袁中一 张 杰 张 正 张博润
张楚瑜 张惠展 张建中 张曼夫 张小青 张渝英 张兆山 章克昌 赵立平 赵乃昕 赵小凡 郑天凌 周俊初
周培瑾 周雪平 周宇光 朱 军 朱 祯 朱宝泉 朱关福 朱厚础 朱庆裴 朱圣庭 朱伟云 朱玉贤 诸葛健
庄文颖 庄玉辉