

利用反向遗传技术研究 H9N2 亚型 AIV 传播途径的分子机制

石火英, 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 利用反向遗传技术, 通过基因重排方法, 产生两个表面基因来自 A/Chicken/Guangdong/SS/94(H9N2) 禽流感病毒(avian influenza virus, AIV) 株和其余基因来自 A/Chicken/Shanghai/F/98(H9N2) AIV 株的 3 株 H9N2 亚型重排 AIV 动物传播性试验发现 A/Chicken/Shanghai/F/98(H9N2) 株、A/Chicken/Guangdong/SS/94(H9N2) AIV 株和 3 株 H9N2 亚型重排 AIV 都可以经直接接触途径传播; 在粪便接触途径下, 3 株重排 AIV 都不经粪便接触传播; 只有 A/Chicken/Shanghai/F/98(H9N2) 株和重排 AIV RF7/SSHA 能经过气溶胶途径传播。HI 试验结果进一步证明了以上的结果。实验结果表明 H9N2 亚型 AIV 的 NA 基因与 H9N2 亚型 AIV 气溶胶传播途径有重要的关系, 即 1998 年中国大陆 H9N2 亚型 AIV 大流行可能是因为病毒获得气溶胶传播途径的特性, 推测病毒的 NA 基因发挥了重要作用。

关键词 : AIV ; H9N2 亚型 ; 传播途径 ; 反向遗传技术 ; HA 和 NA 基因

中图分类号 : Q933 **文献标识码** : A **文章编号** : 0001-6209(2006)01-0048-07

反向遗传技术是近几年快速发展的一项新方法, 在研究病毒的基因结构与功能的关系和构建新型疫苗等方面显示了良好的应用前景^[1,2]。流感病毒能够大流行是由于它能有效地从感染动物传播到未感染动物, 即它的传播性。已有的证据表明, 九十年代以前在中国大陆鸡群中没有检测到 H9 亚型禽流感病毒(avian influenza virus, AIV) 感染。我国于 1994 年首次公开报道从鸡群中分离到 H9 亚型 AIV, 随后几年在一些地区形成小规模局部流行, 未波及全国。但 1998 年春夏开始的 H9 亚型禽流感则不同, 在短短的几个月时间内就形成波及 20 多个省区的全国范围大流行, 给我国的养禽业造成了巨大的经济损失。显然造成 1998 年大流行的 H9 亚型 AIV 的传播效率要高于 1994 年报道的 H9 亚型 AIV。为了解影响 AIV 传播效率的分子机制, 本研究选择 H9N2 亚型 AIV 中国大陆最早分离株 A/Chicken/Guangdong/SS/94(H9N2) 和 1998 年大流行时期的分离株 A/Chicken/Shanghai/F/98(H9N2) 作为研究对象, 利用反向遗传技术, 通过基因重排方法, 产生两个表面基因来自 SS 株和其余基因来自 F 株的重排 H9N2 亚型 AIV, 确定影响 H9N2 亚型 AIV 传播效率的基因, 从分子水平上探讨中国大陆 1998 年 H9N2 亚型禽流感病毒大流行的机制, 以有助于人们研究抗病

毒策略, 为有效控制流感的流行提供有力的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒株和细胞 : A/Chicken/Shanghai/F/98(H9N2) AIV 缩写为 F 株, 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^[3], 全基因序列登录在 GenBank, 登录号为 AY253750-AY253756^[4]。病毒 A/Chicken/Guangdong/SS/94(H9N2) AIV^[5] 缩写为 SS 株, 由华南农业大学辛朝安教授惠赠。细胞系 COS-1 细胞用含有 10% 犊牛血清的 DMEM 培养。

1.1.2 鸡胚和血清 : 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中心提供。H9、H5 亚型禽流感阳性血清、新城疫病毒阳性血清自制, 并且都与标准抗原进行血凝反应, 血凝价为 $2^9 \sim 2^{10}$ 。

1.1.3 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-T easy 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;

基金项目 : 江苏省属高校重大基础科研项目资助 (05KJA23016); 农业部资助项目 (农办牧 200183)

* 通讯作者。Tel : 86-514-7991416; Fax : 86-514-7323112; E-mail : xliu@mail.yzu.edu.cn

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

收稿日期 : 2005-05-16; 接受日期 : 2005-07-15; 修回日期 : 2005-10-09

DMEM 和胰酶为美国 Sigma 公司产品。1% 鸡红细胞按常规方法自行制备。

1.1.4 8 质粒病毒拯救系统 pHW2000 和 F 株 8 个基因转录/表达载体质粒 :8 质粒病毒拯救系统由美国 St. Jude 儿童研究医院的 Robert Webster 博士惠赠^[6] 在 8 质粒病毒拯救系统 pHW2000 中,插入 F 株 8 个基因形成 8 个质粒 :pHW201-PB2、pHW202-PB1、pHW203-PA、pHW204-HA、pHW205-NP、pHW206-NA、pHW207-M 和 pHW208-NS[△]。

1.2 SS 株 HA 和 NA 基因转录和表达载体质粒的构建

设计 PCR 引物时,在上游和下游引物的 5' 端加上克隆的酶切位点 :*Bsm* B I 位点,缩写为 Bm。参照 Hoffmann 等^[7] 的报道,HA 和 NA 片段的上游(“-1”表示)和下游(“-2”表示)引物均为通用引物,带下划线处为相应酶的识别位点。另外,用所有片段 cDNA 5' 端都具有的 12nt 作为反转录(RT)的通用引物(12uni),用于反转录。所有引物由大连 TaKaRa 公司合成。引物序列如下 :Bm-HA-1 : 5'-TATTCGCTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGG-3' ; Bm-NA-1 : 5'-TATTCGCTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGAGT-3' ; Bm-NA-2 : 5'-ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGAGTTTTTT-3' ; Bm-HA-2 : 5'-ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT-3' ; 12 uni : 5'-AGCAAAAGCAGG-3'。

按常规方法进行 RT-PCR,获取 SS 株的 HA 和 NA 基因,将获取 SS 株的 HA 和 NA 基因和 pHW2000 分别用 *Bsm* B I 酶切,酶切片段和载体分别经凝胶电泳、回收,再用 T4 DNA 连接酶连接,转化至大肠杆菌 JM109 感受态细胞,挑菌落扩大培养,小量提取质粒,凝胶电泳鉴定阳性克隆,即在 8 质粒病毒拯救系统 pHW2000 中插入 SS 株 HA 和 NA 基因形成 2 个转录/表达载体质粒 :pHWSS04-HA、pHWSS06-NA。

1.3 基因重排组合

1.3.1 F7/SSHA 7 + 1 质粒组合 :把 F 株的 7 个基因相应质粒(pHW201-PB2、pHW202-PB1、pHW203-PA、pHW205-NP、pHW206-NA、pHW207-M、pHW208-NS)与 SS 株的 HA 基因(pHWSS04-HA)质粒组合,预期产生一个 H9N2 亚型的重排病毒,命名为 RF7/SSHA。

1.3.2 F7/SSNA 7 + 1 质粒组合 :把 F 株的 7 个基因相应质粒(pHW201-PB2、pHW202-PB1、pHW203-PA、

pHW204-HA、pHW205-NP、pHW207-M、pHW208-NS)与 SS 株的 NA 基因(pHWSS06-NA)的质粒组合,预期产生一个 H9N2 亚型的重排病毒,命名为 RF7/SSNA。

1.3.3 F6/SSHA/SSNA 6 + 2 质粒组合 :把 F 株的 6 个基因相应质粒(pHW201-PB2、pHW202-PB1、pHW203-PA、pHW205-NP、pHW207-M、pHW208-NS)与 SS 株的 HA 基因(pHWSS04-HA)、NA 基因(pHWSS06-NA)的质粒组合,预期产生一个 H9N2 亚型的重排病毒,命名为 RF6/SSHA/SSNA。

1.4 转染质粒的准备和共转染

将 F 株的 8 个基因质粒(pHW201-PB2、pHW202-PB1、pHW203-PA、pHW204-HA、pHW205-NP、pHW206-NA、pHW207-M 和 pHW208-NS)和 SS 株的 pHWSS04-HA 和 pHWSS06-NA 2 个质粒扩大培养,用 QIAGEN 公司的小提质粒试剂盒小提质粒,制备高纯度的质粒用于转染。

将含以上组合的质粒按 1:1 的比例混合。按照参考文献 8 的方法进行转染 :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 收取转染细胞接种 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。同时设对照转染孔,即不加转染试剂和质粒,其它同上。

1.5 拯救病毒的鉴定

1.5.1 拯救病毒的 HA 和 HI 试验 :拯救病毒 RF7/SSHA、RF7/SS 和 RF6/SSHA/SSNA 的血凝和 HI 试验按 OIE 标准进行^[9]。拯救病毒的尿囊液,用 1% 鸡红细胞进行血凝(HA)试验,HA 阳性者用 H9、H5 亚型和新城疫(ND)阳性血清进行 HI 试验。

1.5.2 RT-PCR 测序鉴定拯救的重排流感病毒 :对拯救病毒的阳性尿囊液,用鸡胚传代的第 2 代尿囊液提取 RNA,用流感病毒的通用引物进行 RT-PCR 分别扩增 RF7/SSHA 的 HA、NS 基因,RF7/SSNA 的 NA、NS 基因,RF6/SSHA/SSNA 的 HA、NA、NS 基因,并对这 7 个片段进行测序,扩增 HA 和 NA cDNA 的通用引物参照 Hoffmann 等^[7] 的报道设计。

1.6 F 株、SS 株和 3 株 H9N2 亚型重排 AIV 的 ELD₅₀ 和 EID₅₀ 测定

将 F 株、SS 株和 3 株 H9N2 亚型重排 AIV 的尿

[△]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 重排流感病毒. 扬州大学博士学位论文, 2004,

囊液用灭菌的 PBS 稀释 1000 倍,接种同一批 SPF 鸡胚 4 个,每胚接种 0.2mL,收取 70~90h 死亡鸡胚的尿囊液,混匀后再取其尿囊液稀释 1000 倍,各自接种 10 个 SPF 鸡胚,每胚接种 0.2mL,收取 70~90h 死亡鸡胚的尿囊液混匀后,测其血凝效价。按每管 0.5mL 分装于 1mL 灭菌指形管中,置 -70℃ 的冰箱存放,备用于以下各个实验。取以上病毒尿囊液,用灭菌 PBS 连续 10 倍稀释,取 10^{-5} ~ 10^{-12} 8 个稀释度,每个稀释度经尿囊膜接种 4 枚 10 日龄 SPF 鸡胚,0.2mL/胚,35℃ 孵育,每隔 12h 观察,连续 5d 观察和记录鸡胚死亡情况,按 Reed-Muench 公式计算 ELD₅₀ 和 EID₅₀。

1.7 5 株 H9N2 亚型 AIV 的传播性试验

试验设计见表 1^[10]。72 只 4 周龄的 SPF 鸡分成 6 大组,每大组 12 只,标为 F 组、SS 组、RF7/SSHA 组、RF7/SSNA 组、RF6/SSHA/SSNA 组和健康对照组。每大组分为 4 小组:第一组是接种组(g),接种 AIV 组;第二组是直接接触组(z),与接种组放在同一笼子里饲养;第三组是气溶胶传播组(q),与接种组的笼子平行放置,间隔 40cm;第四组是粪便接触组(f),每日将接种组的粪便倒入笼子中饲养鸡的组,与接种组分室饲养,并且在笼子底部铺上塑料薄膜,使粪便能一直保留在笼内而能与鸡充分接触;以上各大组严格隔离,试验鸡的饲养笼子由铁架子悬架,鸡的饲料和饮水均由专用器皿悬挂在鸡笼外侧,而不会被试验鸡的粪便污染,同时试验鸡的粪便能及时从鸡笼网孔中落到最下层的塑料薄膜上,以便收取。用灭菌 PBS 稀释 AIV 的尿囊液,使接种病毒含量为 10^7 ELD₅₀/0.2mL,通过气管、口腔和滴鼻共计每只鸡接种 0.2mL,健康对照组接种灭菌 PBS 0.2mL。F 组的接种组接种 F 株,SS 组的接种组接种 SS 株,RF7/SSHA 组的接种组接种 RF7/SSHA 株,RF7/SSNA 组的接种组接种 RF7/SSNA 株,RF6/SSHA/SSNA 组的接种组接种 RF6/SSHA/SSNA 株。分别在接种后第 3、5、7、9、12 天采集每只试验鸡的气管和泄殖腔棉拭子,浸泡于含 2% 小牛血清、双抗的灭菌 PBS 中,-70℃ 冰箱和 37℃ 水浴箱冻融 3 次后 4000r/min 离心 1min,取上清经尿囊腔接种非免疫胚,35℃ 的孵箱中孵育,每 12h 照胚一次,弃去 24h 内死亡的鸡胚,5d 后收取鸡胚尿囊液测其血凝效价。

试验时对 4 周龄的 SPF 鸡接种 F 株、SS 株、RF7/SSHA、RF7/SSNA 和 RF6/SSHA/SSNA 重排 AIV 后,分别在第 10 日龄和第 20 日龄,经翅静脉采集接

种组、直接接触组、气溶胶传播组、粪便接触组和健康对照组的血液,4℃ 下作用 24h,5000r/min 离心 10min。吸取上清入灭菌指形管,用 SS 株和 F 株作为抗原分别测 F 组、SS 组、RF7/SSHA 组、RF6/SSHA/SSNA 组、RF7/SSNA 组和健康对照组的 HI 效价。

2 结果

2.1 拯救和鉴定重排的 AIV

经共转染重排质粒,分别获得重排 AIV RF7/SSHA、RF7/SSNA、和 RF6/SSHA/SSNA。用 H9、H5 亚型和新城疫(ND)病毒阳性血清分别对 RF7/SSHA、RF7/SSNA、和 RF6/SSHA/SSNA 进行 HI 试验,3 株病毒都可以被 H9 阳性血清抑制,不能被 H5 亚型和新城疫(ND)病毒阳性血清抑制。

对拯救病毒的阳性尿囊液,进行 RT-PCR,分别扩增 RF7/SSHA 的 HA、NS 基因;RF7/SSNA 的 NA、NS 基因;RF6/SSHA/SSNA 的 HA、NA、NS 基因,并对这 7 个片段进行测序,测序结果显示,拯救的重排病毒是设计的基因重排病毒。

2.2 F 株、SS 株和 3 株 H9N2 亚型重排 AIV 的 ELD₅₀ 和 EID₅₀ 测定结果

经测定 F 株的 ELD₅₀/EID₅₀ 是: $10^8/10^{10.5}/0.2\text{mL}$, HA 效价 2^{10-11} ; SS 株的 ELD₅₀/EID₅₀ 是: $10^8/10^{10.17}/0.2\text{mL}$, HA 效价 2^9 。拯救的重排病毒 RF7/SSHA 的 ELD₅₀/EID₅₀ 是: $10^{8.0}/10^{8.75}/0.2\text{mL}$, HA 效价 2^9 ; RF7/SSNA 的 ELD₅₀/EID₅₀ 是: $10^{7.0}/10^{8.75}/0.2\text{mL}$, HA 效价 2^{10} ; RF6/SSHA/SSNA 的 ELD₅₀/EID₅₀ 是: $10^{8.0}/10^{9.25}/0.2\text{mL}$, HA 效价 2^{10} 。

2.3 F 株、SS 株和 3 株 H9N2 亚型重排 AIV 传播性试验结果

2.3.1 F 株和 SS 株接种后 3~12d 气管棉拭子分离病毒结果: F 株和 SS 株接种后 3~12d 对接种组、直接接触组、气溶胶传播组、粪便接触组的鸡采集气管棉拭子进行病毒分离。在接种组, F 株和 SS 株气管棉拭子都是在接种后第 3 天至第 7 天分离到病毒;在直接接触组, F 组气管棉拭子在直接接触后第 3 天至第 9 天分离到病毒, SS 组气管棉拭子在第 7 天至第 9 天分离到病毒;在气溶胶传播组, F 组气管棉拭子在气溶胶传播第 3 天至第 12 天分离到病毒, SS 组气管棉拭子在第 3 天至第 12 天都没有分离到病毒; F 组和 SS 组粪便接触组气管棉拭子在粪便接触后第 3 天至第 12 天都没有分离到病毒(表 1)。健康对照组没有分离到病毒。

表 1 F 株和 SS 株接种后 3 ~ 12d 气管棉拭子分离病毒结果(阳性鸡数/3 只鸡)

Transmission route	F group(trachea)					SS group(trachea)				
	3d	5d	7d	9d	12d	3d	5d	7d	9d	12d
Inoculated	3/3	2/3	1/3	0/3	0/3	3/3	3/3	1/3	0/3	0/3
Direct contact	1/3	1/3	2/3	2/3	0/3	0/3	0/3	2/3	1/3	0/3
Aerosol contact	1/3	2/3	2/3	2/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Fecal contact	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

2.3.2 F 株和 SS 株接种后 3 ~ 12d 泄殖腔棉拭子分离病毒结果 :F 株和 SS 株接种后 3 ~ 12d ,对接种组、直接接触组、气溶胶传播组、粪便接触组的鸡采集泄殖腔棉拭子进行病毒分离。在接种组 ,F 组泄殖腔棉拭子接种后第 3 天分离到病毒 ,SS 组接种后第 9 天分离到病毒 ,在直接接触组 ,F 组泄殖腔棉拭子在接种后第 3 天至第 12 天都没有分离到病毒 ,SS 组泄

殖腔棉拭子在接种后第 3、7、9 天分离到病毒 ;在气溶胶传播组 ,F 组在第 5、7、9 天有 1/3 只鸡分离到病毒 ,SS 株泄殖腔棉拭子在气溶胶传播后第 3 天至第 12 天都没有分离到病毒 ;F 组和 SS 组粪便接触组泄殖腔棉拭子在粪便接触后第 3 天至第 12 天都没有分离到病毒(表 2)。健康对照组没有分离到病毒。

表 2 F 株和 SS 株接种后 3 ~ 12 天泄殖腔分离病毒结果(阳性鸡数/3 只鸡)

Transmission route	F group(cloacal)					SS group(cloacal)				
	3d	5d	7d	9d	12d	3d	5d	7d	9d	12d
Inoculated	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3
Direct contact	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3	1/3	3/3	0/3
Aerosol contact	0/3	1/3	1/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Fecal contact	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

2.3.3 F 株和 SS 株接种后第 10 日龄和第 20 日龄的 HI 效价结果 :对 4 周龄的 SPF 鸡接种 F 株和 SS 株后 ,分别第 10 日龄和第 20 日龄 ,经翅静脉采集接种组、直接接触组、气溶胶传播组、粪便接触组和健康对照组的血液分离血清 ,测 HI 效价。F 组接种组接种后第 10 日龄和 20 日龄 HI 效价分别是 $2^{7 \pm 0.75}$ 和 $2^{10 \pm 0.2}$,SS 组分别是 $2^{6 \pm 0.25}$ 和 $2^{8 \pm 0.5}$;F 组直接接触组接种后第 10 日龄和 20 日龄 HI 效价分别是 $2^{6 \pm 0.5}$ 和 $2^{9 \pm 0.3}$,SS 组分别是 0 和 $2^{7 \pm 0.3}$;F 组气溶胶传播组接种后第 10 日龄和 20 日龄 HI 效价分别是 $2^{2.3 \pm 0.25}$ 和 $2^{9 \pm 0.3}$,SS 组在接种后第 10 日龄和 20 日龄血清中都没有测到抗体 ;F 组和 SS 组粪便接触组接种后第 10 日龄和 20 日龄 HI 效价都是 0(表 3)。

表 3 F 株和 SS 株接种后第 10 和第 20 日龄的血清中平均 HI 效价结果(2^n)

Transmission route	F group		SS group	
	10d	20d	10d	20d
Inoculated	7 ± 0.75	10 ± 0.2	6 ± 0.25	8 ± 0.5
Direct contact	6 ± 0.5	9 ± 0.3	0	7 ± 0.3
Aerosol contact	2.3 ± 0.25	9 ± 0.3	0	0
Fecal contact	0	0	0	0

2.3.4 重排 AIV 接种后 3 ~ 12d 气管棉拭子分离病毒结果 :重排 AIV :RF7/SSHA、RF7/SSNA 和 RF6/SSHA/SSNA 接种后第 3 ~ 12 天 ,对接种组、直接接触组、气溶胶传播组、粪便接触组的鸡采集气管棉拭子进行病毒分离。在接种组 ,RF7/SSHA、RF7/SSNA 和 RF6/SSHA/SSNA 气管棉拭子在接种后第 3 天开始分离到病毒 ;在直接接触组 ,RF7/SSHA 气管棉拭子在接种后第 5、7、9 天分离到病毒 ,RF7/SSNA 气管棉拭子仅在接种后第 3 天分离到病毒 ,RF6/SSHA/SSNA 气管棉拭子在接种后第 3 和 5 天分离到病毒 ;在气溶胶传播组 ,RF7/SSHA 气管棉拭子在接种后第 7、9、12 天各有一只鸡分离到病毒 ,RF7/SSNA 和 RF6/SSHA/SSNA 气管棉拭子在接种后第 3 天至第 12 天都没有分离到病毒 ;3 组重排 AIV 的粪便接触组组鸡的气管棉拭子在接种后第 3 天至第 12 天都没有分离到病毒(表 4)。健康对照组试验鸡没有分离到病毒。

2.3.5 重排 AIV 接种后 3 ~ 12d 泄殖腔棉拭子分离病毒结果 :重排 AIV 接种后 3 ~ 12d ,对接种组、直接接触组、气溶胶传播组、粪便接触组的鸡采集泄殖腔棉拭子进行病毒分离。在接种组和直接接触组 ,RF7/SSHA、RF7/SSNA 和 RF6/SSHA/SSNA 在接种后

第3至12d内偶尔分离到病毒,在气溶胶传播组,只有RF7/SSHA接种后第7和9天各有一只鸡分离到病毒,3组重排AIV的粪便接触组气管棉拭子在接

种后第3天至第12天都没有分离到病毒(表5),健康对照组所有鸡都没有分离到病毒。

表4 重排AIV接种后3~12d气管棉拭子分离病毒结果(阳性鸡数/3只鸡)

Table 4 Isolation for reassortants viruses of trachea swabs in chickens 3~12 days after inoculation with reassortants
(Number of positive trachea/total number of chickens)

Transmission route	RF7/SSHA (trachea)					RF7/SSNA (trachea)					RF6/SSHA/SSNA (trachea)				
	3d	5d	7d	9d	12d	3d	5d	7d	9d	12d	3d	5d	7d	9d	12d
Inoculated	3/3	3/3	2/3	1/3	1/3	3/3	3/3	2/3	1/3	0/3	3/3	3/3	1/3	1/3	1/3
Direct contact	0/3	2/3	2/3	1/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	2/3	1/3	0/3	0/3	0/3
Aerosol contact	0/3	0/3	1/3	1/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Fecal contact	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

表5 重排AIV接种后3~12d泄殖腔棉拭子分离病毒结果(阳性鸡数/3只鸡)

Table 5 Isolation for reassortants viruses of cloacal swabs in chickens 3~12 days after inoculation with reassortants
(Number of positive cloacal/total number of chickens)

Transmission route	RF7/SSHA (cloacal)					RF7/SSNA (cloacal)					RF6/SSHA/SSNA (cloacal)				
	3d	5d	7d	9d	12d	3d	5d	7d	9d	12d	3d	5d	7d	9d	12d
Inoculated	0/3	1/3	1/3	1/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3	1/3
Direct contact	0/3	1/3	1/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3
Aerosol contact	0/3	0/3	1/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Fecal contact	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

2.3.6 重排AIV接种后第10日龄和第20日龄血清中平均抗体效价测试试验结果:对4周龄的SPF鸡接种RF7/SSHA、RF7/SSNA和RF6/SSHA/SSNA后,分别在第10日龄和第20日龄,经翅静脉采集接种组、直接接触组、气溶胶传播组、粪便接触组和健康对照组的血液。在接种组,RF7/SSHA接种后第10日龄和20日龄HI效价分别是 $2^{5.7\pm 1}$ 和 $2^{9.8\pm 1}$ 、RF7/SSNA分别是 $2^{3.6\pm 0.25}$ 和 $2^{8\pm 0.3}$ 、RF6/SSHA/SSNA分别是 $2^{5.3\pm 1}$ 和 $2^{9.5\pm 0.5}$;在直接接触组,RF7/SSHA接种后

第10日龄和20日龄HI效价分别是0和 $2^{9\pm 0.2}$ 、RF7/SSNA分别是0和 $2^{2.5\pm 0.5}$ 、RF6/SSHA/SSNA分别是0和 $2^{8\pm 0.5}$;在气溶胶传播组,RF7/SSHA接种后第10日龄和20日龄HI效价分别是0和 2^3 ,RF7/SSNA和RF6/SSHA/SSNA在接种后第10日龄和20日龄血清中都没有测到抗体;在粪便接触组,3组重排AIV接种后第10日龄和20日龄HI效价都是0(表6),健康对照组的试验鸡HI都是0。

表6 重排AIV接种后第10日龄和第20日龄的血清中平均抗体效价结果(2^n)

Table 6 Mean HI titer of the serum at 10 and 20 day after inoculation with reassortants(2^n)

Transmission route	RF7/SSHA group		RF7/SSNA group		RF6/SSHA/SSNA group	
	10d	20d	10d	20d	10d	20d
Inoculated	5.7 ± 1	9.8 ± 1	3.6 ± 0.25	8 ± 0.3	5.3 ± 1	9.5 ± 0.5
Direct contact	0	9 ± 0.2	0	2.5 ± 0.5	0	8 ± 0.5
Aerosol contact	0	3 ± 0.5	0	0	0	0
Fecal contact	0	0	0	0	0	0

3 讨论

经过RT-PCR、HA和HI鉴定证明,本试验成功拯救出按基因重排设计的重排AIV:RF7/SSHA、RF7/SSNA和RF6/SSHA/SSNA。3株重排AIV的母本病毒F株的 ELD_{50}/EID_{50} 是 $10^{8.0}/10^{10.5}/0.2\text{mL}$,SS株的 ELD_{50}/EID_{50} 是 $10^{8.0}/10^{10.17}/0.2\text{mL}$,重排AIV RF7/SSHA的 ELD_{50} 和RF6/SSHA/SSNA的 ELD_{50} ,都与其母本病毒

SS株一样: $10^{8.0}/0.2\text{mL}$,仅在 EID_{50} 上有一点不同,RF7/SSHA的 EID_{50} 是 $10^{8.75}/0.2\text{mL}$,RF6/SSHA/SSNA的 EID_{50} 是 $10^{9.25}/0.2\text{mL}$,后者稍高,可能与RF6/SSHA/SSNA的两个表面基因都来自同一个毒株(SS株)有关,因为其HA和NA基因更匹配:RF7/SSHA的HA基因是SS株的,与F株的NA基因重排,显然要有适应的过程。RF7/SSNA的 ELD_{50} 最小,只有 $10^{7.0}/0.2\text{mL}$,因此病毒毒力最低,但是其HA基因却

是 F 株的, F 株的 ELD_{50} 有 $10^{8.0}/0.2\text{mL}$, 仅仅替换了一个 NA 基因, 就明显降低了流感病毒的毒力, 其原因可能与 SS 株的 NA 基因有直接的关系, 也可能是 SS 株的 NA 基因与 F 株的 HA 基因在功能上不匹配所致, 是否还与 F 株其它内部基因存在不相容的可能性, 还有待进一步研究。

在气管、口腔、眼睛粘膜 3 种途径同时接种方式下, F 株和 SS 株都可以引起鸡的感染, 但是没有导致鸡的死亡。对于接种组鸡的气管棉拭子, 2 株病毒在分离到病毒的时间和时间段方面都没有区别, 表现为病毒主要在鸡的呼吸道复制, 偶尔在泄殖腔能分离到病毒, 而直接接触组鸡的气管棉拭子, 虽然 F 组和 SS 组的直接接触组在气管和泄殖腔都分离到病毒, 但是能分离到病毒的时间有区别: 即 SS 组总是比 F 组能分离到病毒的时间延后一个时间段, 因此表明通过直接接触这种方式, F 株比 SS 株的传播速度要快, F 组和 SS 组气溶胶传播组的病毒分离结果区别最明显, F 组的气溶胶传播组从接种病毒后第 3 天, 在气管有 1/3 只鸡能分离到病毒, 并且延续到接种病毒后第 12 天, 在泄殖腔是在接种后第 7、9 天各有 1/3 只鸡分离到病毒。SS 组的气溶胶传播组在试验期 12d 内, 在气管和泄殖腔都没有分离到病毒。证明在本实验设定的实验条件下, F 株可以通过气溶胶传播, 并且主要在呼吸道复制。SS 株未发现通过气溶胶传播, F 组和 SS 组粪便接触组和健康对照组的病毒分离结果是相同的, 在气管和泄殖腔都没有分离到病毒。表明在本实验设定的气管、口腔、眼睛粘膜接种方式下, 未发现 F 株和 SS 株通过粪便接触传播。健康对照组没有分离到病毒, 证明试验周围环境没有 H9N2 亚型 AIV 的存在。由表 3 可知, 在同样的传播途径下, 都是 F 株产生的抗体高。其中气溶胶传播组的测试结果显示, 接种 F 株后第 10 日龄, 测到的抗体效价很低, 接种后第 20 日龄抗体效价达到 9 ± 0.3 。接种 SS 株后第 10 日龄和第 20 日龄, 在试验鸡的血清中都没有测到 SS 株的抗体, 这进一步验证了 F 株可以通过气溶胶传播, 而 SS 株不可以通过气溶胶传播。

3 株重排 AIV 的传播试验中, RF6/SSHA/SSNA 能经直接接触途径传播, 但不能经气溶胶途径传播。RF6/SSHA/SSNA 的 HA 和 NA 基因均来自 SS 株, 6 个内部基因来自 F 株。RF6/SSHA/SSNA 的传播途径特性与 SS 株一致, 推测 H9N2 亚型 AIV 传播途径特性只与流感病毒表面基因有关, 而与内部基因无关。RF7/SSHA 可以经气溶胶途径传播, 但是其传播的效

率低于其母本病毒 F 株, 推测当 F 株的 HA 基因由 SS 株的 HA 基因替换后, 其气溶胶传播途径的特性没有改变, 变化的是其传播效率, 因此推测 HA 基因影响流感病毒的传播效率, 其原因可能是: 一方面 HA 基因本身的原因, 如 SS 株与 F 株在 HA 基因序列的变异, 另一方面可能与 HA 基因和 NA 及与其它基因片段的匹配有关。RF7/SSNA 可以经直接接触途径传播, 但是传播效率明显下降, 不能经气溶胶途径传播, RF7/SSNA 中只有 NA 基因是来自 SS 株, 其余基因来自 F 株, 替换一个 NA 基因就将 F 株原有的能经气溶胶途径传播的特性改变, 直接接触传播的效率下降。因此推测 H9N2 亚型流感病毒的气溶胶传播途径的性质主要与 NA 基因有关, HA 和 NA 基因的匹配性可能也是原因之一。由 RF7/SSNA 的 ELD_{50} 明显小于其母本病毒 F 株和 SS 株, 到传播途径的变化, SS 株的 NA 基因可能起了关键性的作用。

NA 基因能从病毒和感染的细胞上除去唾液酸等残基, 防止病毒粒子的聚集, 以有助于病毒的扩散^[1]。本研究中 H9N2 亚型 AIV 获得气溶胶传播途径的特性, 可能是 NA 基因结构决定, 也可能是 NA 与 HA 基因相互匹配原因, 即中国大陆 1998 年 H9N2 亚型 AIV 获得气溶胶传播途径特性的分子机制可能是病毒的 NA 基因发挥了重要作用。要从分子水平更深入地明确 NA 基因上与之相关的功能区还需要利用反向遗传技术进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Neumann G, Whitt MA, 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.
- [2] Neumann G, Kawaoka Y. Reverse genetics of influenza virus. *Virology*, 2001, **287**: 243–250.
- [3] 程 坚, 刘红旗, 彭大新, 等. 两株 H9 亚型禽流感病毒 HA 基因序列分析. *江苏农业研究*, 2001, **22**(1): 71–74.
- [4] 卢建红, 刘秀梵, 邵卫星, 等. H9N2 亚型 AIV 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.
- [5] Guo X, Liao M, Xin C. Sequence of HA gene of avian influenza A/Chicken/Guangdong/SS/1994 (H9N2) virus. *Avian Dis*, 2003, **47**(3 Suppl): 1118–1121.
- [6] Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, et al. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2000, **97**: 6108–6113.
- [7] 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.

- [8] 石火英, 卢建红, 陈素娟, 等. 利用 8 质粒系统拯救 A/Chicken/Shanghai/F/98(H9N2) 株 AIV. *微生物学报*, 2005, 45(3): 57 - 60.
- [9] 国际兽疫局著. 诊断试验和疫苗标准手册. 第 3 版. 马洪超, 等译. 青岛: 青岛市新闻出版局, 1996, 136 - 139.
- [10] Daniel RP, Wilina L, Jon PS, *et al.* Role of quail in the interspecies transmission of H9 influenza A viruses: Molecular changes on HA that correspond to adaptation from ducks to chickens. *J Virol*, 2003, 77: 3148 - 3156.
- [11] 甘孟侯主编. 禽流感. 第二版. 北京: 农业出版社, 2002, 36.

Molecular mechanism affecting route of transmission for H9N2 subtype AIV

SHI Huo-ying, LIU Xiu-fan*

(Key Laboratory of Animal Infectious Diseases Ministry of Agriculture, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: The available evidence suggests that H9 subtype avian influenza virus (AIV) did not circulate in Chicken flocks in China until the early 1990s. However, the pandemic of H9 subtype AI, which started in summer of 1998, spread very rapidly to more than 20 provinces within several months. Obviously, the virus responsible for the 1998 pandemic was quite different from the virus isolated in early 1990s. In order to investigate the molecular mechanism affecting the route of transmission for H9N2 AIVs, strains of A/Chicken/Guangdong/SS/94(H9N2)(SS) and A/Chicken/Shanghai/F/98(H9N2)(F) were compared in their route of transmission. SS strain representing the earlier strain was isolated in chickens in Guangdong province in 1994, whereas F strain was isolated in Shanghai during 1998 pandemic. The findings suggested that F strain could be transmitted in chickens by direct contact and by aerosol route. Whereas SS strain only by direct contact, and neither of two viruses by fecal contact. The cDNAs derived from the HA and NA genes of SS strain were cloned into vector pHW2000 to construct two transcription/expression plasmids respectively, and the cDNAs derived from 8 genes of F strain was done in the same way. Three recombinants were generated by reverse genetics: RF7/SSHA with the HA gene from SS strain and the remaining seven genes from F strain, RF7/SSNA with the NA gene from SS strain and the remaining seven genes from F strain, and RF7/SSHA/SSNA with the HA and NA genes of SS strain and the remaining six genes from F strain. In order to identify three recombinants, a total of seven genes from them were amplified by using PCR with universal primer pairs of H9N2 influenza virus and sequenced. In addition, three recombinants were characterized by HA and HI tests and sequence analysis. The results indicated that three recombinants were successfully rescued by reverse genetics. To determine the genes associated with the ability to transmit by aerosol route in chickens, a set of transmission experiments were designed. Groups of three chickens were inoculated with equal dose of virus by oral, intratracheal and intranasal routes. Each group was placed in direct, aerosol or fecal contact with three uninoculated chickens. Virus isolation and identification showed that only the RF7/SSHA recombinant was transmitted from inoculated to uninoculated chickens by aerosol route, whereas three recombinants were transmitted by direct contact, but not by fecal contact. The results were further confirmed by HI test of serum samples from uninoculated chickens. The data suggest that the NA gene might be the major determinant of the ability of aerosol transmission for H9N2 subtype AIVs in chickens.

Keywords: Avian influenza virus; H9N2 subtype; Route of transmission; Reverse genetics; HA and NA genes