

## H5N1 亚型禽流感病毒拯救体系的建立

龙进学, 吴艳涛, 张小荣, 王曲直, 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** 选择鸡胚高产的鸭源 H5N1 亚型禽流感病毒 A/Duck/Shandong/093/2004 株作为骨架病毒, 在完成了全基因组序列测定基础上, 设计合成的 11 对引物对病毒的 8 个基因分 11 段进行扩增。通过与转录载体 PHW2000 连接, 构建 A/SD/04 的 8 个基因的拯救载体。经测序获得序列准确的拯救质粒: 241、242、243、244、245、246、247 和 248。A/SD/04 的 8 质粒与 PR8(H1N1) 进行不同组合的拯救, 获得 8 个均含 A/SD/04 HA 基因的 H5 重组禽流感病毒。鸡胚尿囊液中重组病毒的血凝效价在  $2^8 \sim 2^{10}$ ,  $EID_{50}$  在  $10^{-8.5} \sim 10^{-9}$  之间, MDT 在 34 ~ 46h 之间, 均与野生 A/SD/04(wt A/SD/04) 相似。重组病毒对 6 周龄的 SPF 鸡的静脉接种指数 (IVPI) 与 wt A/SD/04 却有明显的差异, 说明不同组合的内部基因影响病毒对鸡的致病力, 但不影响病毒的鸡胚致死能力、对鸡胚的感染能力和病毒在鸡胚中的繁殖能力。构建的 A/SD/04 的 8 个质粒拯救系统, 为 H5N1 的基因功能研究和新型疫苗开发奠定基础。

**关键词** H5N1 亚型禽流感病毒; 8 质粒拯救系统; 病毒拯救; 重组病毒

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)01-0055-05

病毒拯救 (Rescue) 是 20 世纪 90 年代初发展起来的分子生物学技术, Neumann 和 Hoffmann 等<sup>[1,2]</sup> 分别建立了人流感 A/WSN/33 和 A/PR/8(H1N1) 的 12 质粒和 8 质粒系统, 极大地促进了人流感病毒基因功能和疫苗开发等领域的深入研究, 也取得了丰硕的成果。禽流感 (Avian influenza, AI) 方面的病毒拯救研究相对起步较晚, 在 97 香港禽流感事件后才得以加强<sup>[3]</sup>。我国的陈稚峰<sup>[4]</sup> 和卢建红等<sup>[5,6]</sup> 分别进行 H1N1 和 H9N2 流感病毒的拯救体系的建立。H5N1 已成为目前严重危害养禽业的最重要疾病之一, 对其进行病毒致病机理、病毒宿主范围的扩大、病毒的组织嗜性和细胞嗜性、基因功能研究以及高效新型疫苗的开发等诸多方面具有重要的意义。本文选择 A/Duck/Shandong/093/2004 株 (简 A/SD/04) 作为骨架病毒进行拯救系统建立, 是因为 A/SD/04 为 2004 年分离于鸭的 H5N1 亚型禽流感病毒, 对鸡高度致病 (IVPI = 3.0), 对 BALB/C 小鼠也具较高的致病力 (人工滴鼻感染后的死亡率为 33%), 全基因序列分析结果认为 A/SD/04 是 H5N1 间的自然重组病毒, 没有 H9N2 的内部基因的重组。以 A/SD/04 作为骨架病毒, 进行反向遗传学研究, 在揭示当前 H5N1 宿主范围扩大的原因和 H5N1 如何获得对哺乳类动物致病性等方面具有重要的实际意义。A/SD/04 具有良

好的鸡胚繁殖性能, 构建其全病毒的 8 质粒拯救系统, 可替代 PR8(H1N1) (提供内部基因) 进行致弱 H5 等新型禽流感疫苗的研发<sup>[5]</sup>。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 毒株、细胞、SPF 鸡胚和检测抗体** : A/Duck/Shandong/093/2004 (简写 A/SD/04) 由本实验室分离并保存。中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提供的 H5 亚型禽流感标准阳性血清, 进行血凝抑制试验 (HI) 确定为 H5 亚型 AIV, 对 HA 及 NA 全序列测定分型 (序列已登录 NCBI, 登录号: AY845190, AY845191 和 AY856861 ~ AY856866), 鉴定为 H5N1 亚型 AIV。细胞系 COS-1 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养。SPF 鸡胚购自山东省 SPF 鸡实验种鸡场。H9、H5 和 NDV 单抗为本实验室研制, H1 阳性血清为国家禽流感参考实验室陈化兰博士惠赠。

**1.1.2 流感病毒 8 质粒拯救系统** : 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, 以及已经克隆好的 A/PR/8/34(H1N1) (简 PR8) 的 8 个基因 cDNA 至 PHW2000 的载体 (编号: 191、192、193、194、195、196、197 和 198, 分别编码病毒的 PB2、PB1、PA、HA、NP、

基金项目: 国家科技攻关项目 (2004BA519A19); 江苏省属高校重大基础研究项目 (05KJA23016)

\* 通讯作者。Tel: 86-514-7991416; Fax: 86-514-7972591; E-mail: xfliu@mail.yzu.edu.cn

作者简介: 龙进学 (1976 - ) 男, 广西桂林人, 博士研究生, 主要从事禽流感病毒基因功能研究。E-mail: long.zx.1976@163.com

收稿日期: 2005-04-13; 接受日期: 2005-07-12; 修回日期: 2005-09-16

NA、MP、NS 基因)。

**1.1.3 试剂和引物** Expand High Fidelity PCR System、dNTP(10mmol/L)、Agrose Gel DNA Extraction Kit 等购自 Roche 公司;MLV 反转录酶(10U/L)、RNasin(40U/L)购自 Promega 公司;PCR2.1(r)-T vector 和 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 转染试剂购自 Invitrogen 公司;UNI-Q-10 柱式总 RNA 提取试剂盒、T4 连接酶购自上海 Sangon 公司。限

制性内切酶:*Bsm*I、*Bsa*I 购自 NEB 公司;小提质粒试剂盒购自 QIAGEN 公司。在 A/SD/04 全序列测定的基础上,分析 8 个基因所含内切酶 *Bsm*I、*Bsa*I 和 *Aar*I 的情况(表 1)。参照文献 [7] 设计合成了 11 对构建 A/SD/04 拯救载体用的引物,其中的 PB2、PB1 和 PA 是分段扩增的 6 对 PCR 引物和 12 碱基的反转录引物均由上海 Sangon 公司合成(表 2)。

表 1 A/SD/04 的 8 基因 3 酶位点(*Aar*I、*Bsm*I 和 *Bsa*I)分析

Table 1 Sites of the 3 restriction endonucleases in eight genes of A/SD/04

Restriction endonucleases	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	MP	NS
<i>Aar</i> I	2044	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bsm</i> I	2210	-	-	-	59, 337	-	-	-
<i>Bsa</i> I	1727	-	262	-	-	-	415, 511	650

表 2 PB2、PB1 和 PA 分段引物

Table 2 The primers for RT-PCR amplification of PB2、PB1 和 PA

Name of the primers	Primer sequence (5'-3')	Fragment/bp
PB2	Bm-PB2-1 TATT CGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGTCAA	1112
	P B2-M-R ATAT CGTCTCTCATAACCCCTCATGTATTCT	
	PB2-M-F TATT GGTCTCATATGAGGAATTCACAATGG	1237
	Ba-PB2-2 ATAT GGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTCGTTT	
PB1	Bm-PB1-1 TATT CGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGCA	1103
	PB1-M-R ATAT CGTCTCCTACTCTCGAACATGTATCC	
	PB1-M-F TATT CGTCTCAAGTAGGACATGAAGCTAC	1244
	Bm-PB1-2 ATAT CGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGCATTT	
PA	Bm-PA-1 TATT CGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGTAC	1058
	PA-M-R ATAT CGTCTCCAGTTCTGCCAGTACTTGCT	
	PA-M-F TATT CGTCTCGAACTTCAGGATATTGAA	1181
	Bm-PA-2 ATAT CGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTACTT	

## 1.2 反转录-聚合酶链反应

RNA 提取按上海 Sangon 公司的 RNA 提取试剂盒的方法进行。提取的病毒 RNA 取 26 $\mu$ L 进行反转录,加入 8 $\mu$ L 5 $\times$  反转录 buffer,2.5 $\mu$ L dNTP,1.5 $\mu$ L 50pmol/L 的 12 碱基引物,1.5 $\mu$ L 反转录酶(MLV-L),0.5 $\mu$ L RNA 酶抑制剂(RNasin),37 $^{\circ}$ C 下反转录 1h,置于 75 $^{\circ}$ C 灭活反转录酶 15min。

PCR 反应体系:10 $\times$  buffer 5 $\mu$ L,10mmol/L dNTP 1 $\mu$ L,上、下游引物(50pmol/ $\mu$ L)各 1 $\mu$ L,反转录产物 1 $\mu$ L,超纯水 40 $\mu$ L,Expand High Fidelity DNA 聚合酶 1 $\mu$ L。反应程序:94 $^{\circ}$ C 3min,94 $^{\circ}$ C 20s,57 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 5min,30 个循环。

## 1.3 A/D/SD/04 基因的克隆、准确序列的筛选和拯救载体的构建

PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,切割预期大小的目的条带,用胶回收 DNA,与 PCR2.1<sup>®</sup>-T vector 连接,连接产物转化至 DH5 $\alpha$  感受态细胞,在 Amp + X-Gal + IPTG + LB 平板上筛选白斑,质粒的常规方法小量制备。质粒进行酶切和 PCR 鉴定。每个基因片段选择 3~5 个阳性克隆,送上海联合基因科技有

限公司侧序,选择正确克隆序列进行拯救载体构建。

拯救载体的构建参考文献 [5] 报道的方法进行。连接于 PCR2.1<sup>®</sup>-T vector 上的的片段用限制性内切酶(*Bsa*I 和 *Bsm*I)进行酶切,电泳回收。目的片段与用 *Bsm*I 酶切后电泳回收的线性 PHW2000 进行连接,连接体系和条件:1 $\mu$ L 10 $\times$  T4 连接酶 buffer,1 $\mu$ L T4 连接酶,2 $\mu$ L PHW2000,6 $\mu$ L AIV 基因片段,15 $^{\circ}$ C 连接过夜。PB1 和 PA 分为两段与 PHW2000 进行 3 分子连接。PB2 基因由于其在 1727 位有 1 个 *Bsa*I 酶切位点,克隆于 PCR2.1<sup>®</sup>-T vector 前,用 Overlapping PCR 进行了点突变(GGTCTC  $\rightarrow$  GGTGTC),再用 *Bsa*I 酶切时,获得的片段进行 3 分子连接。连接产物转化至 DH5 $\alpha$  感受态细胞,在 Amp + LB 平板上筛选白斑,扩大培养,常规方法小量提取质粒。质粒初步电泳验证后,测序验证。对序列正确的拯救载体扩大培养,用 QIAGEN 试剂盒提取高纯度质粒。

## 1.4 病毒的拯救

进行 H5N1 重组病毒的拯救,构建的 A/D/SD/04 的 8 个质粒与 PR8 H1N1 的 8 个阳性质粒进行组合

(首先用 A/D/SD/04 的 HA 替换 PR8 的 HA, 然后逐步增加 A/SD/04 的拯救质粒, 而依次替换 PR8 的 NA, NP, MP, PB1, PA, PB2, NS, 表 3)。PR8 的 8 个质粒作为阳性对照, PR8 的 7 个质粒作阴性对照。转染步骤主要参考 Lipofectamine™ 2000 转染试剂的使用说明和卢建红<sup>[5]</sup>的方法进行: 转染后 48~72h 的细胞上清接种 MDCK 细胞或者 9~11 日龄的鸡胚, 扩大繁殖获救的病毒。

1.5 重组病毒的鉴定及其生物学特性研究

鸡胚接种后, 收获尿囊液用 1% 鸡血球进行血凝试验 (HA), 对血凝效价在 2<sup>4</sup> 以上的样品, 用 A/SD/04 的 HA 蛋白特异性单克隆抗体 (A8E8), H9, NDV 和 H1N1 阳性血清进行血凝抑制试验 (HAI)。对获救病毒按材料与方法 1.2 进行 RT-PCR 鉴定, 扩增 8 个重组病毒的部分 HA 基因、部分 PB2 基因和 NS 全基因, 进行测序验证。按文献 [5, 6] 对拯救获得的重组 H5N1 进行简单的生物学特性研究, 主要有对鸡胚的半数致死量 (ELD50), 平均鸡胚致死时间 (MDT) 和对 6 周龄 SPF 鸡的静脉接种指数 (IVPI)。

2 结果

2.1 载体的构建

对 A/SD/04 的 8 个基因进行 PCR 扩增并克隆后经测序, 成功的获得 11 段序列的克隆。用设计的限制性内切酶对连接于 T 载体上的正确克隆进行酶切, 回收片段与 PHW2000 连接, 构建获得 A/SD/04 的 8 个拯救载体。分别命名为: 241、242、243、244、245、246、247 和 248 (依次分别编码 A/D/SD/04 的

PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、MP 和 NS 基因)。经测序验证, PB2 (241) 的 1727 位确实引入碱基突变 (C→G), 此突变不引起氨基酸变化的。

2.2 病毒的拯救、鉴定和部分生物学特性

PR8 的 7 个质粒 (阴性对照) 转染后, 细胞上清接种鸡胚未收获到具血凝效价的病毒。其他 8 个含 A/SD/04 的 HA 基因的组合转染后接种 SPF 鸡胚, 在 36~50h 内致死鸡胚。PR8 阳性对照不致死鸡胚, 检测尿囊液具有血凝效价。获救病毒接种 SPF 鸡胚, 在第一 (P1) 和第二代 (P2) 就可以达到很高的血凝效价 (表 3)。用 H5、H9、H1 和 NDV 阳性血清进行血凝抑制 HI 试验结果证明, 所拯救获得重组病毒的是 H5 亚型禽流感, 阳性对照 PR8 是 H1。进一步的 RT-PCR 鉴定结果 8 个重组病毒 HA 基因与 A/SD/04 的 HA 基因的同源性在 99.9% 以上, 前 1+7、2+6、3+5、4+4、5+3、6+2 组合的重组病毒的 NS 与 A/SD/04 的同源性为 88.7%, 而与 PR8 的 NS 的同源性为 99.9%, 说明此 6 个获救病毒的 HA 和 NS 分别来源于 A/SD/04 与 PR8 (数据未列)。对 7+1 重组病毒则扩增了其 PB2 部分基因, 其同源性为 99.9%, 说明是由 PR8 的 191 质粒转染提供的。8 个重组病毒在鸡胚中传代后, 其繁殖滴度在 2<sup>8</sup>~2<sup>11</sup> 之间, 没有明显的差异, 对鸡胚的半数致死量在 10<sup>-8.5</sup>~10<sup>-9</sup> 之间, 鸡胚的平均致死时间在 34~46h 之间, 均与野生的 A/SD/04 相近; 各重组病毒对 6 周龄 SPF 鸡静脉接种指数 (IVPI) 却明显低于野生病毒 A/SD/04 (wt A/SD/04), 但是 4+4 组合是 2.5 最为接近 wt A/SD/04, 其对鸡胚的平均致死时间也是最少的 (34h) (表 3)。

表 3 基因组合共转染后产生的 H5N1 重组病毒及其检测情况

Table 3 The results of co-transfection and detection of the eight reassorted H5N1 viruses

		Reassorted viruses							PR8 control	Negative control	Wt A/SD/04	
		1+7	2+6	3+5	4+4	5+3	6+2	7+1	rA/SD/04			
		244	244	244	244	244	244	244	241	198	198	
		191	246	246	246	246	246	246	242	197	197	
		192	191	245	245	245	245	248	243	196	196	
		193	192	191	247	247	247	245	244	195	195	
		195	193	192	191	242	242	247	245	194	194	
		196	195	193	192	191	243	242	246	193	193	
		197	197	197	193	193	191	243	247	192	192	
		198	198	198	198	198	198	191	248	191		
HA	P1	2 <sup>11</sup>	2 <sup>8</sup>	2 <sup>9</sup>	2 <sup>8</sup>	2 <sup>8</sup>	2 <sup>9</sup>	2 <sup>8</sup>	2 <sup>8</sup>	2 <sup>10</sup>	0	2 <sup>11</sup>
	P2	2 <sup>10</sup>	2 <sup>9</sup>	2 <sup>8</sup>	2 <sup>9</sup>	2 <sup>9</sup>	2 <sup>9</sup>	2 <sup>9</sup>	2 <sup>9</sup>	2 <sup>12</sup>	0	
HAI	H5	2 <sup>11</sup>	2 <sup>11</sup>	2 <sup>11</sup>	2 <sup>11</sup>	2 <sup>11</sup>	2 <sup>11</sup>	2 <sup>11</sup>	2 <sup>11</sup>	0	NT	2 <sup>12</sup>
	H9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NT	0
	H1	0	0	0	0	0	0	0	0	2 <sup>8</sup>	NT	0
	NDV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NT	0
EID <sub>50</sub> (/0.1mL)		10 <sup>-8.5</sup>	10 <sup>-8.5</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-8.67</sup>	10 <sup>-8.67</sup>	10 <sup>-8.5</sup>	10 <sup>-8.5</sup>	10 <sup>-8.6</sup>	NT	NT	10 <sup>-8.67</sup>
MDI (hrs)		40	46	34	34	36	37	39	39	NT	NT	37
IVPI		1.3	1.05	1.05	2.5	1.9	1.25	1.55	1.60	0	NT	3.0

191~199 was the eight plasmids of PR8. 241~248 was the plasmid encoding the eight genes of A/SD/04, the number was in italics. "P1" and "P2" are the reassorted viruses' first and second passage in embryonated eggs. "NT" is not test.

### 3 讨论

水禽中的 H5N1 AIV 正在逐步获得向哺乳类动物感染致病的能力<sup>[8]</sup>,以鸭源 H5N1 A/SD/04 株作为目的病毒,建立反向遗传操作系统,能进行 H5N1 宿主范围扩大机理研究。A/SD/04 的 8 个拯救质粒与 PR8 (H1N1) 进行的 7 种置换组合(表 3),以及全部 A/SD/04 的 8 个质粒,均能在 COS-1 细胞上拯救重组的 H5 亚型流感病毒。获救病毒的第一代鸡胚病毒效价高达  $2^8 \sim 2^{11}$ ,说明成功构建了 A/SD/04 的 8 质粒拯救体系。此系统为今后 A/SD/04 (H5N1) 基因功能的研究、流行 H5N1 病毒的抗原表位变化情况和 H5N1 新型疫苗的开发研制奠定了坚实的基础。

当前禽流感疫情严峻,快速开发应用于田间的新的高效 H5N1 禽流感疫苗是急需解决的技术关键。目前,一般采用基因修饰手段,删除 HA 基因裂解位点的多位碱性氨基酸,与鸡胚高产株的 PR8 的内部基因进行重组,拯救获得的重组病毒既能提供针对流行毒株的免疫保护,同时又是鸡胚高产的<sup>[5,9,11]</sup>。Lee 等<sup>[12]</sup>还通过基因重组技术研制的疫苗在接种后产生的抗体能与野毒感染所产生抗体相区别的“标记疫苗”,有利于疫情的监测。卢建红等<sup>[5]</sup>对 H5 毒株的 HA 基因进行修饰后(删除裂解位点的 4 个碱性氨基酸)与 WSN 的内部基因进行组合拯救,获得的重组病毒没有改变其抗原性,但是重组的致弱 H5 在鸡胚中的繁殖能力较差,认为主要原因可能是 WSN 是非鸡胚高产株,其提供的内部基因不能使重组病毒在鸡胚中高滴度的繁殖,因此建议用鸡胚高度适应的高产株 PR8 进行组合。但是,PR8 也是人源的 H1N1 流感病毒,使用其内部基因进行禽流感病毒疫苗候选株的重排,必将威胁到人类安全。全部采用禽源流感病毒基因的禽用疫苗候选株,可以避免生物安全性的问题。高效价可以降低成本和保证足够的抗原量以维持较长的免疫保护期,是构建疫苗候选株时需要重点考虑的因素。A/SD/04 株 (wt A/SD/04) 具有良好的鸡胚繁殖滴度 (HA :  $2^{11}$ ),拯救后的 r A/SD/04 与 wt A/SD/04 一样仍具有很好的鸡胚繁殖滴度。A/SD/04 拯救质粒与 PR8 的基因(质粒)进行组合,获得的 7 种不同基因组合病毒在鸡胚中也均具有较高的病毒滴度。说明构建的 A/SD/04 的 8 基因拯救质粒与鸡胚高度适应的 PR8 拯救质粒具有相似的鸡胚高产性能<sup>[10]</sup>。用 A/SD/04 替代 PR8 用于 H5 疫苗候选株的研发,既可满足生产的高繁殖滴度需要,同时重组 H5N1 的 8 个基因全部是来源于禽类

则更符合生物安全性要求。

拯救获得的 8 个重组病毒均具有完整 A/SD/04 的 HA (高致病性禽流感的裂解位点特征),此 8 个重组病毒对鸡胚的毒力、感染力和在鸡胚中的繁殖滴度是相似的。然而 8 个重组病毒对 6 周龄的 SPF 鸡的静脉接种指数 (IVPI) 却有明显差异,其原因可能是内部基因的改变,进而影响了重组 H5 病毒的致病力。2+6 组合的 IVPI 为 1.5,但在置换了 A/SD/04 的 NP 基因后,获得的 3+5 重组病毒的 IVPI 明显降低了(为 1.05),再置换上 A/SD/04 的 M 基因后,形成的 4+4 组合(244, 246, 245, 247+191, 192, 193, 198)的重组病毒 (IVPI 为 2.5) 致病力又得到大幅度的提高,并较为接近 wt A/SD/04,说明 NP 和 M 基因的原配组合对重组病毒的致病力影响很大。用 A/SD/04 的 8 质粒转染获得的 rA/SD/04 的 IVPI 为 1.60,仍明显低于 wt A/SD/04 的 3.0,原因可能是我们构建的 241 质粒(编码 PB2 的 1727 位进行了点突变)存在的突变引起了 H5N1 致病力的降低,也可能是所构建的 3 个表达 RNA 聚合酶复合体蛋白的载体仍有缺陷。所以,HA 在决定 H5N1 的致病力上起主要作用,但是内部基因不同程度地影响着 H5N1 对鸡致病性。所以,在自然界中,H5N1 理论上可以与许多流感病毒相互进行内部基因的重排,但是,并不是所有的重排病毒能够行成流行株。

流感病毒的 5' 和 3' 端的序列是调控病毒复制的重要部位,此部分的序列正确与否对病毒的复制等影响较大。本研究设计的引物中,部分是流感病毒的通用引物,是基于流感病毒 8 基因组片段两端保守区序列设计的 (5'-AGUAGAAACAAGGNNNUU UUU.....NNCCUGCUUUUGCU-3')。病毒 RNA 的 3' 端的第 4 个碱基有的是毒株是 U,有的是 C,那么设计引物时只能取其中之一。使用通用引物扩增流感病毒基因以构建载体的主要缺点就是此位点的不确定性,而对拯救产生不利的影响<sup>[7]</sup>。本研究选用的是 C,试验结果表明,构建 8 质粒拯救体系的载体能高效的拯救出生物学特性与亲本病毒相似的重组病毒,说明此位点核苷酸 U 和 C 的互换不影响病毒的复制。进一步说明本研究采用通用引物扩增 H5N1 的方法进行拯救载体的构建是可行的,可以便捷的用于其他流感毒株的构建。

### 参 考 文 献

- [1] Neumann G, Watanabe T, Ito H, et al. Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *PNAS*, 1999, **96**: 9345 - 9350.

- [ 2 ] Hoffmann E , Neumann G , Kawaoka Y , *et al.* A DNA transfection system for generation of influenza virus from eight plasmids. *PNAS* , 2000 , **97** : 6108 – 6113 .
- [ 3 ] Jacqueline MK , Lu XH , Teremce MT , *et al.* Molecular correlates of influenza A H5N1 virus pathogenesis in mice. *Journal of Virology* , 2000 , **74** , ( 22 ) : 10807 – 10810 .
- [ 4 ] 陈稚峰 , 张立国 , 董 婕 , 等 . 应用反向遗传学技术在哺乳动物细胞中产生甲型流感病毒. *病毒学报* , 2002 , **18** ( 3 ) : 193 – 197 .
- [ 5 ] 卢建红 , 龙进学 , 邵卫星 , 等 . 用反向遗传操纵技术产生致弱的 H5 亚型重组流感病毒. *微生物学报* 2005 **45** ( 1 ) : 43 – 57 .
- [ 6 ] 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* 2005 **21** ( 1 ) : 48 – 53 .
- [ 7 ] Hoffmann E , Stech J , Guan Y , *et al.* Universal primer set the full-length amplification of all influenza A viruses. *Archives of Virology* , 2001 , **146** : 2275 – 2289 .
- [ 8 ] Chen H , Deng G , Li Z , *et al.* 2004 the evolution of H5N1 influenza viruses in ducks in southern China. *PNAS* , **101** ( 28 ) : 10452 – 10457 .
- [ 9 ] Hoffmann E , Krauss S , Perez D , *et al.* Eight-plasmid system for rapid generation of influenza virus vaccines. *Vaccine* , 2002 , **20** : 3165 – 3170 .
- [ 10 ] 董 婕 , 张立国 , 陈爱君 , 等 . 流行性感冒病毒鸡胚高产株的遗传特性分析. *病毒学报* 2002 , **18** ( 4 ) : 367 – 370 .
- [ 11 ] Ozaki H , Govorkova EA , Li CH , *et al.* Generation of high-yielding Influenza A viruses in African green monkey kidney (Vero) cells by reverse genetics. *Journal of Virology* , 2004 , **78** ( 4 ) : 1851 – 1857 .
- [ 12 ] Lee CW , Senne DA , Suarez DL . Generation of reassortant influenza vaccines by reverse genetics that allows utilization of a DIVA ( Differentiating Infected from Vaccinated Animals ) strategy for the control of avian influenza. *Vaccine* , 2004 , **13** **22** ( 23 – 24 ) : 3175 – 3181 .

## Establishment of reverse genetics system for H5N1 subtype AI

LONG Jin-xue , WU Yan-tao , ZHANG Xiao-rong , WANG Qu-zhi , LIU Xiu-fan \*

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

**Abstract** : H5N1 subtype influenza virus A/Duck/Shandong/093/2004 ( A/SD/04 ) strain was chosen as the master strain for rescue research. 11 sets of primers for 8 plasmids construction were designed base on the sequencing of the full-length of A/SD/04. Eleven fragments of A/SD/04 were amplified by the designed primers and were ligated with PHW2000 for rescue plasmid construction. Eight transcription/expression plasmids were obtained , which encoded the eight segments of A/SD/04 , and designated as 241 , 242 , 243 , 244 , 245 , 246 , 247 and 248 , respectively. The COS-1 cell was cotransfected with eight plasmids with different combination of A/SD/04 and PR8. The eight reassortants shared the same HA ( from A/SD/04 ) but contained different internal genes and NA. All of the eight reassorted viruses had some similar bio-characteristics , such as the viral title in fertilized eggs was range from 256 to 1024 , the EID<sub>50</sub> were between 10<sup>-8.5</sup> ~ 10<sup>-9</sup> , and MDT were between 34 ~ 46h. But the IVPI of the eight reassortants was differently and all were lower than the wild-type A/SD/04. These results confirmed that different recombination of internal genes of H5N1 has influence on viral virulence to 6-week SPF chicken but not on viral replication ability in embryonated chicken eggs. The establishment of eight-plasmid rescue system for A/SD/04 is the base for farther research on genes function of H5N1. And A/SD/04 can be used as a backbone to replace PR8 entirely in generation of H5 AIV vaccine candidate.

**Keywords** : H5N1 subtype influenza A virus ; Eight-plasmid system ; Virus rescue ; Reassorted virus

Foundation item : Chinese National Programs for Science and Technology Development ( 2004BA519A19 ) ; Major Basic Research Project for Provincial University and college of Jiangsu Province

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

Received date : 13 April 2005 / Accepted : 12 July 2005 / Revised : 16 September 2005