

H5N1 亚型禽流感病毒 NS 第 263 ~ 277 位核苷酸缺失 提高病毒对鸡的致病力

龙进学, 薛 峰, 彭 宜, 顾 敏, 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: 为研究 2000 年以来绝大多数 H5N1 亚型禽流感病毒分离株在非结构基因的第 263 ~ 277 位发生 15 个碱基缺失现象的生物学意义, 构建 H5N1 A/D/SD/04 株 HA、NA、NS 的全基因表达/转录载体, 以及 NS 的删除突变载体 (m248), A/D/YZ/04 株的 NS 基因表达/转录载体 (848) 和其补加 15 个核苷酸的 NS 突变载体 (m848)。构建的载体分别与编码 WSN (H1N1) 内部基因载体进行组合转染, 拯救获得 4 个具不同 NS 的重组的 H5N1 亚型禽流感病毒: RWSN-848 和 RWSN-m248 在 263 ~ 277 位缺失 15 个碱基, RWSN-m848 和 RWSN-248 则在相同位置不发生缺失。4 个重组病毒的平均鸡胚繁殖效价 (HA), 鸡胚的平均死亡时间 (MDT) 和鸡胚半数感染量 (EID₅₀) 均无显著差异, 但 RWSN-848 和 RWSN-m248 对 6 周龄 SPF 鸡的致病力明显高于 RWSN-m848 和 RWSN-248。结果说明 H5N1 的 NS 基因在 263 ~ 277 位核苷酸发生缺失后, 不影响重组 H5N1 在鸡胚中的繁殖性能, 但提高了病毒对鸡的致病力。

关键词: H5N1 亚型禽流感病毒; 病毒拯救; 突变; 非结构基因 NS; 病毒蚀斑形成单位

中图分类号: S855.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2006) 02-0301-05

NS 基因是流感病毒的第 8 节段基因。由于不同的流感病毒之间常常发生基因片段的重组 (Reassortant), 进化过程中, 在同一亚型的流感病毒中常有不同来源的 NS 基因出现。NS 编码流感病毒的非结构蛋白 NS1 和 NS2, NS1 是最主要的一个蛋白, 是干扰素的拮抗物。NS1 是流感病毒在感染细胞的早期大量表达的, 它是流感病毒突破宿主细胞第一道防线的重要利器^[1]。通过 RNA 编辑作用, NS 产生 NS2 的 mRNA 并翻译得到具有调节病毒 RNA 的核转运功能 NS2 蛋白^[2], NS1 和 NS2 都是病毒复制的重要调控因子之一^[1, 2, 11]。Seo 等发现, H5N1 的 NS1 在决定流感病毒对哺乳动物的致病力方面起重要作用, 因为用 A/HongKong/156/97 (H5N1) 的 NS 置换 H1N1 的 NS 基因后, 重组 H1N1 对猪的致病能力大为提高^[4]。Ana^[6] 和 Nicola^[10] 分别证实 NS1 蛋白部分氨基酸缺失导致病毒抗干扰素能力降低, 从而导致流感病毒在细胞中的有效复制减弱。因此, 置换或破坏流感病毒的 NS 基因, 均会不同程度的影响病毒复制和抗宿主细胞干扰素的能力^[4, 6, 10~12]。我们在对 H5N1 亚型禽流感病毒 A/SD/04 株进行 NS 全基因核酸序列测定及其分析发现, 目前公布 NS 序列可分为两类, 一类是 NS 在 263 ~ 277 位有 15 个

碱基缺失的, 这类 H5N1 多数是 2000 年后的分离株, 此缺失的生物学意义已经引起了国内外一些学者的关注^[12, 13]。2004 年初亚洲各国 (日本、韩国、越南、泰国、中国等) 暴发 H5N1 禽流感, 和 2005 年中国青海湖迁徙野鸟群暴发的 H5N1^[8, 9], 其 NS 均在 263 ~ 277 位有 15 个碱基的缺失, 属于第一类。第二类则是没有在相同位置发生核苷酸缺失的。A/SD/04 和 A/G/GD/96 (H5N1 代表株), 属于第二类^[14]。反向遗传学技术为流感病毒的基因功能和致病性等研究提供了一快捷的方法^[1, 7, 12], 我们对 A/SD/04 和 A/YZ/04 的 NS 进行突变, 分别拯救出具不同 NS 组合的 H5N1 重组病毒, 比较 4 个病毒的生物学差别, 以研究此核苷酸序列缺失的生物学意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒: A/Duck/Shandong/093/2004 (H5N1) (简 A/D/SD/04) 和 A/Duck/Yangzhou/232/2004 (简 A/D/YZ/04) 均由本实验室分离、鉴定并保存, 完成了其全序列测定 (序列已登陆 NCBI, 登陆号: DQ354060, AY845190, AY845191 和 AY856861 ~ AY856866)^[14]。

1.1.2 试剂和质粒: Expand High Fidelity PCR

基金项目: 国家科技攻关项目 (2004BA519A19); 江苏省属高校重大基础科研项目 (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: 2005-09-16; 接受日期: 2005-11-22; 修回日期: 2005-12-15

System, dNTP (10mmol/L) 和 Agrose Gel DNA Extraction Kit 购自 Roche 公司,反转录酶 MLV-L (10U/ μ L) 和 RNA 酶抑制剂 (RNasin) (40U/L) 购自 Promega 公司, PCR2.1[®]-T vector 和 Lipofectamine[™] 2000 转染试剂购自 Invitrogen 公司, UNIQ-10 柱式总 RNA 提取试剂盒、T4 DNA 连接酶和 PCR 产物回收试剂盒购自上海 Sangon 公司,质粒小提试剂盒购自 Qiagen 公司。WSN (H1N1) 流感 8 质粒拯救系统 (181、182、183、184、185、186、187 和 188) 及双向转录载体 PHW2000

由美国 St. Jude 儿童研究医院的 Webster 博士惠赠。

1.2 引物设计

根据文献 [3],设计合成用于构建 A/SD/04 株 HA、NA 和 NS 拯救载体的通用引物。根据测定的 NS 序列^[14],设计 NS 基因的中间引物 (表 1),与 NS 拯救载体的通用引物^[3]配合,进行分段扩增,完成 NS 的 263 ~ 277 位核苷酸进行删除或添加突变。反转录用 12bp 碱基引物 (5'-AGCGAAAGCAGG-3')^[3]。

表 1 H5N1 重组病毒拯救载体用引物
Table 1 The primers of plasmids for four reassorted H5N1

Primer		Primers ' sequence (5'-3')
HA	Bm-HA-1	TATT <u>CGTCTC</u> AGGGAGCGAAAGCAGGGG
	Bm-HA-2	ATAT <u>CGTCTC</u> GTATTAGTAGAAACAAGGCTGTTTT
NA	Ba-NA-1	TATT <u>GGTCTC</u> AGGGAGCGAAAGCAGGAGT
	Ba-NA-2	ATAT <u>GGTCTC</u> GTATTAGTAGAAACAAGGAGTTTTTT
NS	Bm-NS-1	TATT <u>CGTCTC</u> AGGGAGCGAAAGCAGGGTG
	Bm-NS-2	ATAT <u>CGTCTC</u> GTATTAGTAGAAACAAGGCTGTTTT
NS Mutation	m248-1	ATAC <u>CGTCTC</u> GCCGGCTTTACGCTACCTAAC
	m248-2	ATT <u>CGTCTC</u> GCCGGCATTTTAACTGCTCA
	m848-1	TATT <u>CGTCTC</u> GCCTCTCTG CCGGCTTCACGCTACCTAAC
	m848-2	TATT <u>CGTCTC</u> AGAGGCAATAGTCATTTTAAGTGCCTCATCAG

1.3 RT-PCR 反应

A/SD/04 RNA 的提取按 RNA 提取试剂盒的方法进行。26 μ L 病毒 RNA, 8 μ L 5 $\times$ 反转录 buffer, 2.5 μ L dNTP, 1.5 μ L 50pmol/L 的 12 碱基引物, 1.5 μ L 反转录酶 MLV-L, 0.5 μ L RNasin, 37 $^{\circ}$ C 保持 1h, 置于 75 $^{\circ}$ C 灭活反转录酶 15min。取 1 μ L 模板进行 PCR 扩增,体系如下: 5 μ L 10 倍 buffer, 1 μ L 10mmol/L dNTP, 50pmol/L 上、下游引物各 1 μ L, 超纯水 40 μ L, Expand High Fidelity DNA 聚合酶 1U, 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 3min; 94 $^{\circ}$ C 20s, 58 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 5min, 30 个循环。

1.4 HA、NA、NS 和 NS 缺失突变的拯救载体构建

参考卢建红等^[5]的方法,产物电泳回收后用 BsmB I 或者 Bsa I 酶切,回收酶切产物与载体 PHW2000 连接。1 μ L 10 $\times$ T4 buffer, 1 μ L T4 DNA 连接酶, 2 μ L PHW2000, 6 μ L AIV 基因片段,置于 15 $^{\circ}$ C, 连接过夜。突变 NS 时,分为两段扩增,各段先克隆至 PCR2.1[®]-T vector,经测序验证后, BsmB I 酶切回收,各取 3 μ L 与 PHW2000 进行 3 分子连接。连接产物转化 DH5 α 感受态细胞,在 Amp + LB 平板上筛选白斑,常规方法小量提取质粒,送上海联合基因公司测序,获得 6 个拯救质粒,简写 24A (HA), 24B (NA), 24C (NS), m248, 848 (NS) 和 m848。用 Qiagen 小提试剂盒提取高纯度质粒备用。

1.5 重组病毒的拯救

构建的 A/SD/04 的 HA、NA、NS 和 NS 突变载体与 Webster 博士赠送的 WSN (H1N1) 的 6 个内部基因质粒进行组合 (表 2),转染 COS-1 细胞。转染方法参考 Lipofectamine[™] 2000 转染试剂转染程序和卢建红的方法进行^[5]。转染 72h 左右,收获细胞,冻融 1 次,细胞悬液 0.2mL 接种 9 ~ 11 日龄的鸡胚。

1.6 重组病毒的生物学特性

对获得的 4 个重组病毒进行生物学特性测定,分别研究 NS 的 263 ~ 277 位核苷酸缺失后对病毒生物学特性的影响,测定项目有:鸡胚半数致死量 (EID₅₀),鸡胚平均死亡时间 (MDT),鸡胚平均血凝效价 (HA),6 周龄 SPF 鸡的静脉接种致病指数 (IVPI),重复 3 次。在 Vero、COS-1 和 MDCK 上的病毒繁殖情况 (相同感染复数 0.001),病毒感染细胞后,于不同时间收集细胞上清,用 MDCK 进行病毒蚀斑形成单位计数 (Plaque forming units, PFU)。所有涉及 H5N1 活病毒相关的试验,均在扬州大学农业部畜禽传染病学重点开放实验室的生物安全 3 级实验 (BSL-3) 进行。

2 结果

2.1 拯救载体的构建

应用合成的引物 (表 1),构建了 A/D/SD/04 的

HA、NA、NS 和 NS 突变的拯救载体 ,分别命名为 244、246、248 和 248 的缺失突变载体 m248 ,以及 A/ D/YZ/04 的 NS 拯救载体 848 和 848 的突变载体 m848。测序验证 ,m248 和 848 在 263 ~ 277 位缺失 15 个核苷酸。

2.2 重组病毒的拯救及其生物学特性

对获得的 4 个重组病毒分别命名为 RWSN-m248 与 RWSN-248、RWSN-848 和 RWSN-m848 ,它们

的表面基因(HA244 和 NA246 均由 A/SD/04(H5N1) 提供 ,内部结构基因(PB2、PB1、PA、NP、M)由 WSN 提供的(表 2)。4 个重组病毒在鸡胚中的繁殖能力和对鸡胚的致病力相似 ,但对 6 周龄 SPF 鸡的致病力有明显的差异 ,RWSN-m248 比 RWSN-248 致病力强 ,RWSN-848 比 RWSN-m848 致病力强。IVPI 试验进行了 3 次重复 ,结果一致。表 2 只列出其中一次的数据。

表 2 H5N1 亚型重组病毒的生物学特性

Table 2 Bio-characteristics of the reassortants

Reassorted viruses	EID ₅₀ (log10)	MDI(h)	HA (log2)	IVPI	
				Index	Death/total
RWSN-248	8.87	39.2	9.2	0.45	1/10
RWSN-m248	9	42	9.6	1.63	4/10
RWSN-848	9.5	45	9	0.81	3/10
RWSN-m848	9	47	8	0.175	1/10

2.3 4 个重组病毒在 MDCK COS-1 和 Vero 细胞上的繁殖情况

在 MOI 为 0.001 时 ,重组病毒在感染细胞后 12、18、24、30、36 和 42h ,取上清 ,用 MDCK 通过空斑计数试验 ,测定病毒的繁殖情况。结果是 RWSN-

848、RWSN-m848、RWSN-248 和 RWSN-m248 在没有干扰素产生的 Vero 细胞上 ,各时段所收的细胞上清中病毒滴度相似 ;在能产生干扰素的 MDCK 和 COS-1 细胞各时段的细胞上清中 ,RWSN-248 和 RWSN-m848 比 RWSN-m248 和 RWSN-848 的病毒滴度高(图 1)。

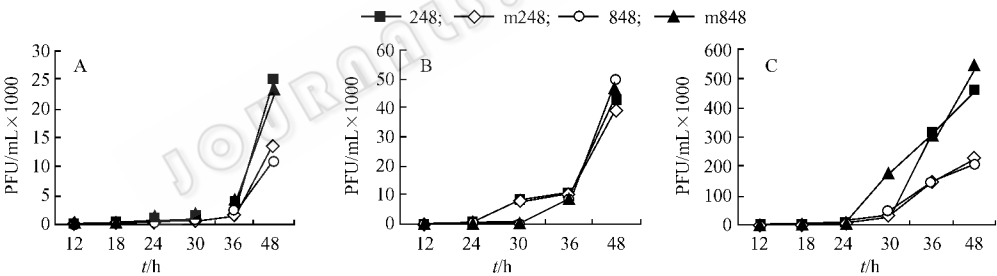


图 1 4 个重组病毒在 COS-1 (A)、Vero (B) 和 MDCK (C) 上的繁殖情况

Fig.1 Viral replication ability of the four reassortants in COS-1 (A) , Vero (B) and MDCK (C) cell.

3 讨论

3.1 H5N1 亚型禽流感病毒 NS 第 263 ~ 277 位碱基缺失具有一定的时间规律性和亚型特异性

对 NCBI 公布的(1996 ~ 2004 年) 共 41 株 AIV 的 NS 序列(39 株 H5N1 和 2 株 H9N2) 进行比较 ,发现 有 22 株 H5N1 在 263 ~ 277 位发生了 15 个核苷酸的 缺失 ,这 22 株病毒均是 2000 年后的分离株 ,具有一 定的时间规律。说明 2000 年以后 ,H5N1 的 NS 基因 开始在 263 ~ 277 位核苷酸发生特异性的缺失突变。 NS 在核酸序列进化上分为 A 和 B 两个系 ,多数的 H5N1 同属于 A 系 ,H9N2 代表株 ,BJ94 或 G1 株的 NS 也属于 A 系。A 系则进一步向两个亚系进行分 化 ,亚系 I 的特征是继续保持完整的 NS 基因 ;亚系

II 则在 NS 的 263 ~ 277 位发生 15 碱基的缺失突变。 在时间上是以 2000 年为分界点 ,NS 有 15bp 缺失的 病毒有逐渐成为了优势群的趋势 ,2004 和 2005 年的 绝大多数 H5N1 分离株的 NS 均有缺失即是证明。 进一步对 NCBI 上公布的 91 株(包括 H9N2 ,H5N1 , H5N2 ,H7N7 ,H3N2 ,H3N8 ,H11N3 ,H6N2 ,H6N8 , H6N1 ,H7N3 ,H7N4 和 H1N3) 流感病毒的 NS 序列进 行比较 ,发现有除 H5N1 以外的其它亚型流感病毒 的 NS 在 263 ~ 277 位没有 15 碱基的缺失。因此 ,认 为 NS 的 263 ~ 277 位核苷酸的缺失 ,极可能是 H5N1 亚型 AIV 在 2000 年以后所特有的进化遗传标志 ,这 或许与目前 H5N1 毒力的增强和其宿主范围的日益 扩大有关。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

3.2 NS 的 263 ~ 277 位碱基缺失降低 H5N1 病毒在能产生干扰素的体外细胞培养物上的繁殖能力

流感病毒感染宿主细胞后,产生的病毒蛋白均可诱导宿主细胞产生干扰素。细胞产生的干扰素进一步诱导细胞中的双股 RNA 与 PRK(双股 RNA 依赖性蛋白激酶, dsRNA-dependent protein kinase, PKR)结合,并同时使真核翻译启动子 α 亚单位发生磷酸化,激活 PKR。激活的 PRK 抑制细胞内包括宿主细胞和病毒在内的 mRNA 翻译,达到抑制入侵病毒在细胞中的有效繁殖的目的。流感病毒在感染的初期大量表达 NS1, NS1 可抢先与双股 RNA 结合或直接与 PRK 结合,以阻断 PRK 的激活,从而阻断 PRK 介导的对细胞内所有 mRNA 翻译的抑制作用,有利于病毒的复制和繁殖^[1,2]。

NS1 的氨基端 1 ~ 73 位是 mRNA 的结合区^[1,2,40]。NS1 的 83 ~ 113 位氨基酸与 eIF4G(真核转录启动因子)结合引起宿主细胞对 mRNA 转录偏向以利于病毒 RNA 的转录翻译而抑制细胞自身 mRNA 的转录翻译,包括干扰素的表达^[15]。NS 基因在 263 ~ 277 位缺失 15 个碱基后,直接导致了编码的 NS1 第 79 ~ 83 位发生 5 个氨基酸的缺失后使 eIF4G 结合区缩短,可能导致结合 eIF4G 的能力下降,使病毒对 mRNA 转录偏向诱导能力降低,同时 NS1 第 79 ~ 83 位的缺失也可能影响前 73 位氨基酸的 mRNA 结合活性。最终导致病毒抑制 IFN 的能力减弱。本研究结果显示,在能产生干扰素的细胞系 MDCK 和 COS-1 上,两个 NS 缺失 15bp 的 H5N1 均比对应两个具完整 NS 的 H5N1 的繁殖能力低。在不产生干扰素的细胞 Vero 上,四者的繁殖曲线无明显差异。结果说明在体外细胞试验中,NS 的 263 ~ 277 位核苷酸的缺失降低 H5N1 病毒在能产生干扰素细胞上的繁殖滴度,推测 NS1 蛋白的第 79 ~ 83 位氨基酸缺失可能导致 H5N1 在体外抗干扰素能力下降。

3.4 NS 的 263 ~ 277 位碱基缺失提高了 H5N1 病毒对鸡的致病力

动物体中,流感病毒在侵入初期,如果表达的 NS1 蛋白不能有效抵抗宿主 IFN 的抗病毒作用,极可能导致病毒在宿主体内的繁殖与扩散,即可能降低病毒对动物的致病力。4 个 H5N1 重组病毒的致病力试验结果表明,RWSN-m248 和 RWSN-848 的致病指数和致死的鸡只数都明显高于 RWSN-248 和 RWSN-m848(表 2)。我们进行了 2 次重复的动物致病性试验,结果相同,说明在重组 H5N1 中,无论是

人工删除和自然进化删除了 NS 的 263 ~ 277 位核苷酸后,都提高了病毒对鸡的致病力。本研究结果 H5N1 的 NS 的 263 ~ 277 位核苷酸缺失后,使病毒在体外具干扰素的细胞中繁殖能力降低的同时对鸡的毒力却是增强,也证明了 NS1 蛋白的抗干扰素能力并非 H5N1 的 NS 基因与病毒对动物高致病性密切相关的主要机制^[12]。

NS 在决定 H5N1 对动物的致病性上起非常重要作用。我们拯救了由 WSN(H1N1)提供全部内部基因,A/SD/04 提供 HA 和 NA 的重组 H5N1,但此 H5N1 的 6 周龄 SPF 鸡静脉致病指数为 0(内部资料),而把重组 H5N1 中 WSN(H1N1)的 NS 替换成 A/D/SD/04 的 NS 后(即 RWSN-248),指数为 0.45,说明 H5N1 的 NS 决定了重组 H5N1 对鸡的致病性。另外,Seo 发现,NS1 蛋白的第 92 位谷氨酸(E)是提高重组 H1N1(含 H5N1 的 NS)对猪的致病力的关键^[4]。Aleksandr 对 NS 功能研究认为,A/HongKong/156/97(H5N1)通过其编码的 NS1 影响宿主细胞细胞因子的失衡(B 和 T 的免疫应答)来帮助新组合的流感病毒对动物具更高的致病力,而认为 NS1 蛋白的 92 位谷氨酸关键^[12]。本研究人工删除 248 的 263 ~ 277 位的 15 个核苷酸后,使其编码的 NS1 第 92 位氨基酸成了 E,而在 848 的 263 ~ 277 位后人工添加 15 个碱基,使其编码的 NS1 第 92 位氨基酸成为 D,这也可能就是导致 4 个重组 H5N1 对鸡只致病力变化的主要原因之一。NS1 第 92 氨基酸是否决定重组 H5N1 对鸡的致病性的机理正在进一步研究验证中。

参 考 文 献

- [1] Brown EG. Influenza virus genetics. *Biomed & Pharmacother*, 2000, **54**: 196 ~ 209.
- [2] Kiyoko IH, Taisuke H, Yutaka F, et al. Generation of influenza A virus NS2 (NEP) mutation with an altered nuclear export signal sequence. *Journal of Virology*, 2004, **78** (18): 10149 ~ 10155.
- [3] 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.
- [4] Seo SH, Hoffmann E, Webster RG. The NS1 gene of H5N1 influenza viruses circumvents the host anti-viral cytokine responses. *Virus Research*, 2004, **103**: 107 ~ 113.
- [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): 53 ~ 57.
- [6] Ana MF, Rosa MM, Thonas Z, et al. Defective RNA replication and late gene expression in temperature-sensitive influenza viruses expressing deleted forms of the NS1 protein. *Journal of Virology*, 2004, **78** (8): 3880 ~ 3888.

- [7] Neumann B , Kawaoka Y . Genetic approach to studying influenza pathogenesis. *International Congress Series* , 2001 , **1219** : 587 – 590.
- [8] 曹伟胜 , 辛朝安 , 梁昭平 , 等 . 2004 年亚洲 H5N1 亚型高致病性禽流感流行特点及启示 . 中国人兽共患病杂志 , 2004 , **20** (9) : 801 – 804.
- [9] Liu JH , Xiao H , Lei F , *et al.* Highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in migratory birds. *Science* , 2005 , **309** : 1206.
- [10] Nicola RD , Christopher FB , Adolfo GS . A recombinants influenza a virus expressing an RNA-binding-defective NS1 protein induces high levels of beta interferon and is attenuated in mice. *Journal of Virology* , 2003 , **77** (24) : 13257 – 13266.
- [11] Ken F , Yutaka F , Takeshi N , *et al.* Importance of both the coding and the segment-specific noncoding regions of the influenza A virus NS segment for its efficient incorporation into virions. *Journal of Virology* , 2005 , **79** (6) : 3766 – 3774.
- [12] Aleksandr SL , Samita A , Richard JW , *et al.* Pathogenesis of Hong Kong H5N1 influenzavirus NS gene reassortants in mice : the role of cytokines and B- and T-cell responses. *Journal of General Virology* , 2005 , **86** : 1121 – 1130.
- [13] 张志珍 , 赵丽纯 , 李康生 . H5N1 亚型禽流感病毒 NS1 基因修饰 . 汕头大学医学院学报 , 2005 , **18** (2) : 65 – 68.
- [14] 龙进学 , 王曲直 , 卢建红 , 等 . H5N1 亚型禽流感病毒 A/duck/Shandong/093/2004 的全基因克隆及序列分析 . 微生物学报 , 2005 , **45** (5) : 690 – 696.
- [15] Aragon T , Luna SD , Novoa I , *et al.* Eukaryotic translation factor 4GI is a cellular target for NS1 protein , a translational activator of influenza virus. *Molecular and Cellular Biology* , 2000 , **20** : 6259 – 6268.

The deletion of nucleotides of NS gene from 263 to 277 of H5N1 increases viral virulence in chicken

LONG Jin-xue , XUE Feng , PENG Yi , GU Min , LIU Xiu-fan *

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

Abstract : Since 2000 , more and more NS fragment of H5N1 subtype influenza A virus had a unique deletion of nucleotides from 263 to 277 . In order to investigate the biological significance of the mutation , four recombinants , RWSN-848 , RWSN-m848 , RWSN-248 and RWSN-m248 , were generated via eight-plasmid reverse genetic system . These reassortants had the same inner gene and outer gene derived from A/WSN/33(H1N1) and A/D/SD/04(H5N1) , respectively . But their NS genes were different . RWSN-m248 and RWSN-848 were isogenic with RWSN-248 and RWSN-m848 respectively , except for the NS gene , the formers encoded a mutant NS with a deletion from 263 ~ 277 nucleotides . All of the four recombinants could grow well in embryonated chicken eggs and had the similar viral titer , EID₅₀ and MDT . Infections were done with the same Multiplicity of infection (MOI , 0.001) , and the viruses in supernatants from infected cells were titrated at 12 , 24 , 36 , and 48 h post-infection by plaque assay in fresh MDCK . The results show that four viruses grown well and had the same viral title in Vero cell , a non-IFN-responsive cell system . But in MDCK and COS-1 , the cell lines can produce IFN , RWSN-248 and RWSN-m848 had a higher viral titer (two fold) than RWSN-m248 and RWSN-848 . It revealed that the deletion of nucleotides of NS from 263 ~ 277 of H5N1 influences decreases viral growth ability in IFN producing cell line . IVPI were done for the virulence test of reassorted H5N1 viruses . Ten six-week-old SPF White Leghorn chickens were inoculated intravenously with 0.2mL of a 1 : 10 dilution of allantoic fluid containing each of the four recombinant viruses . The chickens were daily monitored for disease signs and death for 10 days post-inoculation . Finally , IVPI was counted for each virus . RWSN-m248 caused 4 chickens died in 10 days and its index was 1.63 . RWSN-248 only caused one chicken died and its index was 0.45 . RWSN-848 caused 3 chickens died in 10 days and its index was 0.81 . RWSN-m848 caused one of the ten chickens died and its index was only 0.175 . The results revealed that the deletion of nucleotides of NS gene from 263 to 277 sites increases H5N1 pathogenesis in chicken .

Keywords : H5N1 subtype Influenza A Virus ; Virus rescue ; Mutation ; NS gene ; Plaque forming unit (PFU)

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 : 16 September 2005 / Accepted : 22 November 2005 / Revised : 15 December 2005

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>