

神经氨酸酶茎部氨基酸缺失对 H5N1 亚型禽流感病毒生物学特性的影响

王曲直, 龙进学, 胡顺林, 吴艳涛, 刘秀梵*

(扬州大学 农业部畜禽传染病重点开放实验室 扬州 225009)

摘 要 近年来 H5N1 亚型禽流感病毒(AIV)神经氨酸酶(NA)茎部 15~20 个氨基酸的自发缺失时有报道,突变对于 AIV 生物学特性的影响还没有得到系统研究。应用反向遗传操作技术,拯救获得 5 株具有不同 NA 茎部长度的 H5N1/PR8 重组 AIV。重组病毒的内部基因和血凝素(HA)基因来源相同,NA 基因来源不同,并在 NA 茎部进行 20 个氨基酸的删除或添加突变。通过研究其生物学特性发现,5 株重组病毒在 SPF 鸡胚中繁殖良好,其 EID₅₀、MDT 和平均病毒滴度相似,NA 茎部长短影响病毒的解凝能力,长茎病毒红细胞解脱能力比短茎病毒强;NA 茎部 15 或 20 个氨基酸删除突变提高了重组病毒在 MDCK 细胞上的繁殖能力,短茎病毒释放出的病毒粒子数量是长茎病毒的 10~100 倍,释放时间提前 6~10h,短茎病毒在 MDCK 细胞上形成的空斑也明显比长茎病毒的空斑大。实验结果揭示了 AIV NA 茎部氨基酸缺失突变的生物学意义,NA 茎部 15 或 20 个氨基酸删除突变增强了 AIV 的细胞适应性,可能与现阶段 H5N1 亚型 AIV 宿主范围进一步扩大有关。利用反向遗传技术成功拯救了 5 株 H5N1/PR8 重组流感病毒,为流感病毒基因功能研究和重组疫苗研究建立了技术平台。通过对 AIV NA 茎部氨基酸的删除突变提高了病毒在 MDCK 细胞上的繁殖产量,为流感病毒细胞苗的生产提供了新的思路。

关键词 :H5N1 亚型禽流感病毒;神经氨酸酶茎部;氨基酸删除突变;反向遗传操作技术

中图分类号 :Q78 **文献标识码** :A **文章编号** :0001-6209(2006)04-0542-05

高致病性禽流感病毒给全球养禽业带来了极大的损失,也严重危害着人类健康。H5N1 亚型 AIV 具有极其重要的公共卫生意义。NA 是流感病毒重要的囊膜纤突,具有亚型特异性,以同源四聚体形式存在,属于 II 类糖蛋白。NA 在电镜下观察,呈蘑菇状结构,由头和茎组成。头部的顶端是 NA 酶活性的催化中心,作用是能水解细胞表面的特异性糖蛋白末端的 N-乙酰基神经氨酸,避免病毒粒子的聚集,有利于病毒释放,对病毒在感染细胞周围的扩散能力有很大影响^[1]。NA 头部和跨膜锚定区之间的部位是茎部^[2]。不同亚型的流感病毒茎部氨基酸的数量和序列存在较大的差异^[3]。许多分离株的 NA 茎部有氨基酸缺失现象^[4,5]。比较本室保存的 A/Goose/Jiangsu/220/2003(H5N1)、A/Goose/Huadong/1/2000(H5N1)和已发表的 17 株 H5N1 亚型 AIV 的 NA 基因 cDNA 序列后发现:A/G/JS/03 NA 茎部第 164 位核苷酸位置缺失了 60 个碱基。A/G/HD/00 茎部没有核苷酸缺失。鸡胚高度适应株 A/PR/8/34(H1N1)茎部天然缺失 15 个氨基酸^[4]。

反向遗传操作技术是随着分子生物学技术发展起来的新方法。Hoffmann 等^[6]首次建立了流感病毒的 8 质粒拯救系统,以数量最少的质粒为基础,利用同一载体实现在细胞内病毒 RNA 的转录和蛋白质的表达,进而包装成病毒。该系统已经用于 A 型和 B 型流感病毒的拯救^[7,8]。我们应用上述 8 质粒系统,用 H5N1 亚型 AIV 的 2 个表面基因 HA、NA 和 PR8 的 6 个内部基因 PB₂、PB₁、PA、NP、M、和 NS 进行重排,同时对 NA 茎部氨基酸进行删除或添加突变,转染 COS-1 细胞后拯救出具有不同茎部长度的 H5N1/PR8 重组流感病毒。研究这 5 个重组病毒的生物学特性差异,以此阐明 NA 茎部氨基酸缺失对 H5N1 亚型 AIV 生物学特性的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒、细胞和鸡胚 :A/Goose/Huadong/1/2000(H5N1)、A/Goose/Jiangsu/220/2003(H5N1)系本室分离、保种。细胞系 COS-1 和 MDCK 用含有 10% 犊牛

基金项目 江苏省属高校重大基础研究项目(05KJA23016)

* 通讯作者。Tel 86-514-7979386;E-mail: xfliu@mail.yzu.edu.cn

作者简介 王曲直(1980-)女,江苏常州人,硕士研究生,主要从事 H5N1 亚型禽流感病毒基因功能研究。E-mail: wangquzhi@163.com

收稿日期 2005-12-28;接受日期 2006-01-23;修回日期 2006-03-26

血清的 DMEM 培养。SPF 鸡胚购自山东家禽所 SPF 鸡场。

1.1.2 主要试剂和仪器 总 RNA 抽提试剂盒是购自上海 Sangon 公司。Expend High Fidelity PCR System, dNTPs 等为 Roche 产品。Agrose Gel DNA Purification Kit 是 TaKaRa 产品。M-MLV 反转录酶、T4 DNA 连接酶和 RNasin(RNA 酶抑制剂)是 Promega 产品。pCR2.0 vector 和转染试剂是 Invitrogen 产品。内切酶 *Bsm*B I 为 Fermentas 产品。PCR 仪(德国 Biometra 公司产品), BIO-RAD3000Xi 型电泳仪、紫外分析仪(德国 Eppendorf 公司产品)等。

1.2 8 质粒拯救系统

8 质粒拯救系统由美国 St. Jude 儿童研究医院的 Robert 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/PR/8/34 8 个片段 cDNA 的 pHW191-PB2, pHW192-PB1, pHW193-PA, pHW194-HA, pHW195-NP, pHW196-NA, pHW197-M, pHW198-NS 质粒。

1.3 分子生物学分析软件包

DANStar 4.0 版本软件包(包括 EditSeq、MegAlign、MapDraw 等软件): DNASTar Inc., Madison, WI 53715, USA。

1.4 RT-PCR、质粒构建及测序

按试剂盒使用说明抽提 A/G/JS/03 基因组 RNA。用 M-MLV 进行反转录得到 cDNA。按 Hoffmann 等^[8]报道的设计扩增 HA 全基因的通用引物, 扩增 HA 片段。扩增产物和 pHW2000 经 *Bsm*B I 酶切、连接, 转化至大肠杆菌 DH5 α , PCR 鉴定克隆质粒中目的片段的大小, 并由上海联众基因公司测定序列。质粒命名为 pHW644-HA(缩写 644)。设计两条引物, 分别和通用引物配对, 扩增出 NA 的上段和下段, 再和载体 pHW2000 实现三分子连接, 由基因公司测定序列, 质粒命名为 pHW646-NA(缩写 646)。A/G/HD/00 的 NA 片段已经由本室完成构建, 命名为 pHW506-NA(缩写 506)。设计引物, 用 PCR 的方法删除 A/G/HD/00 NA 茎部的 60 个碱基后与载体连接, 命名为 Mutant pHW506-NA(缩写 m506-)。A/G/JS/03 的 NA 在茎部加上 60 个碱基后与载体连接, 命名为 Mutant pHW646-NA(缩写 m646+)。将阳性菌送上海联众基因公司测序, 验证序列及突变序列准确。

1.5 共转染

质粒的组合分 5 组。第一组是 646, 644 和 PR8 的内部基因(646 + 644 + PR8)。第二组是 m646 + ,

644 和 PR8 的内部基因(m646 + + 644 + PR8)。第三组是 506, 644 和 PR8 的内部基因(506 + 644 + PR8)。第四组是 m506-, 644 和 PR8 的内部基因(m506- + 644 + PR8)。第五组是 644 和 PR8 的其余 7 个基因(644 + PR8)。按转染试剂的说明书步骤将 5 个组合分别转染 COS-1 细胞。48h 后收集细胞和上清。

1.6 转染病毒的验证和鸡胚传代

转染细胞和上清冻融后, 经尿囊腔接种 10 日龄 SPF 鸡胚, 每胚 0.2mL, 每个样品接种 2 个鸡胚, 35℃ 培养, 定时照胚, 收集死胚尿囊液, 做血凝(HA)和血凝抑制(HI)试验^[10]。HA 阳性的尿囊液作 1:1000 稀释, 用 SPF 胚传至第 4 代, 并测定各代次尿囊液的 HA 效价, 以观察重组转染病毒是否能稳定传代^[11]。

1.7 重组病毒生物学特性的测定

1.7.1 鸡胚半数感染量(EID₅₀)的测定 按参考文献[12, 13]的方法, 将重组病毒尿囊液作 10 倍递进稀释, 经尿囊腔接种 10 日龄 SPF 胚, 每胚 0.2mL, 35℃ 培养, 取出 24h 后的死胚和培养至 96h 未死的胚, 血凝价在 1:16 以上的判定为鸡胚感染阳性, 用 Reed-Muench 法计算 EID₅₀。

1.7.2 MDCK 细胞上空斑形成单位(PFU)的测定 按参考文献[14]的方法, MDCK 细胞在 60mm dishes 上长成无间隙的单层细胞。重组病毒尿囊液作 10 倍递进稀释, 取 1mL 病毒稀释液于 37℃、5% CO₂ 条件下感染单层 MDCK 细胞, 45min 后倒掉病毒液, PBS 洗一次后加第一层覆盖液(0.8% 琼脂, 2% 血清 DMEM)。在 37℃、5% CO₂ 培养 48h 后加第二层覆盖液(0.8% 琼脂, 2% 血清 DMEM, 0.1% 中性红)。12h 后观察空斑形成情况, 计算病毒的 PFU。

1.7.3 红细胞解凝实验 按参考文献[3]的方法将 5 个重组病毒鸡胚尿囊液的 HA 调整至 1:128, 病毒于 4℃ 凝集鸡红细胞和豚鼠红细胞后, 将血凝板置于 37℃, 病毒逐渐从红细胞上解脱下来, 红细胞沉积。观测其解凝速度, 绘制解凝曲线。

1.7.4 重组病毒在 MDCK 细胞上的繁殖特性 MDCK 细胞感染病毒后, 每隔一定时间收集细胞上清, 用空斑计数的方法检测病毒滴度, 绘制病毒繁殖曲线。

2 结果

2.1 重组病毒的产生和验证

将转染细胞和上清接种鸡胚后, 尿囊液血凝价为阳性, 能被 H5 亚型标准阳性血清抑制。重组转

染病毒能在鸡胚中稳定传代。拯救的 5 个重组病毒分别命名为 506、m506-、646、m646+ 和 196。其基因来源见表 1。

表 1 重组病毒基因来源			
Table 1 The origin of recombinants gene fragments			
Viruses	A/G/HD/00	A/G/JS/03	PR8
506	NA	HA	Internal genes
m506-	NA(20 aa deleted)	HA	Internal genes
646	—	HA ,NA	Internal genes
m646 +	—	HA ,NA(20 aa added)	Internal genes
196	—	HA	NA ,Internal genes

2.2 重组病毒生物学特性比较

2.2.1 鸡胚半数感染量(EID_{50})的测定 转染产生的 5 个重组病毒 646、m646+、506、m506- 和 196 的 EID_{50} 分别为 $10^{-7.625}/0.2\text{mL}$ 、 $10^{-7}/0.2\text{mL}$ 、 $10^{-7.5}/0.2\text{mL}$ 、 $10^{-7.67}/0.2\text{mL}$ 和 $10^{-8}/0.2\text{mL}$ 。鸡胚平均死亡时间和平均血凝效价见表 2。

表 2 鸡胚半数感染量(EID_{50})、平均死亡时间和平均血凝效价

Table 2 EID_{50} , Mean HA and MDT					
Virulence index	Recombinant				
	646	m646 +	506	m506-	196
$EID_{50}(\text{ }/0.2\text{mL})$	$10^{-7.625}$	10^{-7}	$10^{-7.5}$	$10^{-7.67}$	10^{-8}
Mean HA	$2^{9.33}$	$2^{9.3}$	$2^{9.63}$	$2^{9.9}$	$2^{8.375}$
MDT(h)	48	47.7	44	46.3	44.8

2.2.2 红细胞解凝实验:重组长茎病毒 506 和 m646+ 的 7 个血凝孔在 2.5h 左右完全解凝,鸡红细胞全部沉积到血凝孔底部。茎部有 20 或 15 个氨基

酸缺失的 m506、646 和 196 在 24h 内都不能完成 7 个血凝孔的解凝。重组病毒在豚鼠红细胞上的解凝情况与之类似,都能看出长茎的重组病毒解凝速度和解凝能力明显强于短茎重组病毒(图 1-A、B)。

2.2.3 重组病毒在 MDCK 细胞上的繁殖特性存在着较大的差异:一是重组短茎病毒 m506-、646 和 196 释放子代病毒的时间早于长茎病毒 506 和 m646+, 后者的子代病毒释放时间推迟了 6~10h;二是重组短茎病毒在细胞培养基中释放出的子代病毒粒子数量多于长茎病毒,约达后者的 10~100 倍(表 3)。

表 3 重组病毒感染 MDCK 细胞后首次检测到子代病毒粒子的时间及检测到的最高 PFU/mL

Table 3 The first time progeny virus particles detected and the highest PFU/mL		
Viruses	Hours after infection	Highest PFU/mL
506 (Long -Stalked)	12	10^5
m506(Short- Stalked)	4	10^7
646 (Short-Stalked)	6	10^7
m646 +(Long-Stalked)	17	10^6
196 (Short-Stalked)	6	10^7

2.2.4 茎部氨基酸缺失对重组病毒的细胞-细胞感染能力影响较大:5 个重组病毒的鸡胚尿囊液在 MDCK 细胞上的 PFU/mL 相似,除 646 为 10^6 ,其余 4 株都为 10^7 ,差异不明显。重组病毒鸡胚尿囊液在 MDCK 细胞上形成的空斑大小有明显差异。长茎病毒 506 和 m646+ 只能形成肉眼可见的针尖大小空斑,而短茎病毒 m506-、646 和 196 的空斑形态明显大于长茎病毒,直径约在 0.2~1mm 之间(表 4)。

表 4 重组病毒尿囊液在 MDCK 细胞上的 PFU/mL 及空斑大小

Table 4 PFU/mL and plaque size of recombinants allantoic fluids in MDCK cells		
Viruses	PFU/mL	Plaque Size(ave.)
506(Long -Stalked)	2.15×10^7	pinpoint
m506(Short- Stalked)	5.575×10^7	0.5~1mm
646 (Short-Stalked)	7.835×10^6	0.5~1mm
m646 +(Long-Stalked)	1.4×10^7	pinpoint
196(Short-Stalked)	2.727×10^7	0.2mm

3 讨论

一般认为流感病毒 NA 茎部约有 40 个氨基酸的长度^[2],NA 茎部 15 或 20 个氨基酸缺失与否决定了病毒茎部的长短。

进行血凝试验时,病毒表面糖蛋白 HA 突起与红细胞表面的唾液酸糖蛋白受体结合,形成红细胞

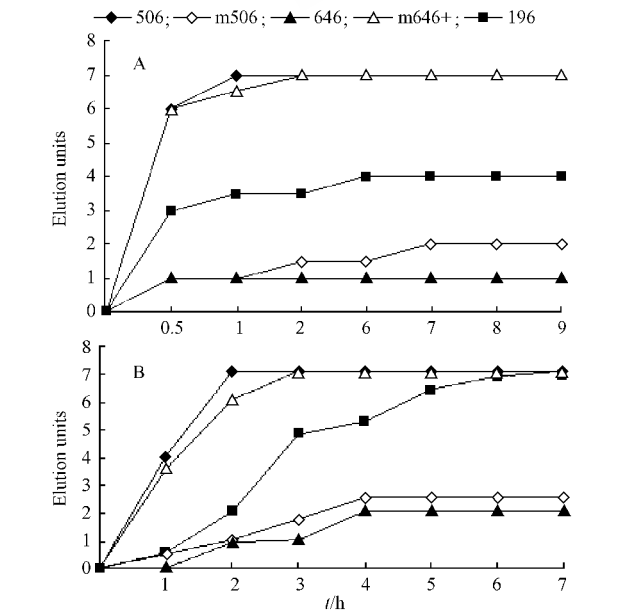


图 1 鸡(A)和豚鼠(B)红细胞解凝曲线
Fig. 1 Viruses elution from chicken (A) and guinea pig (B) erythrocytes.

受体-病毒-红细胞复合体,从而引起红细胞凝集,经 37℃ 孵育,NA 分解破坏了红细胞表面唾液酸糖蛋白受体,病毒粒子又可迅速由红细胞表面释放下来^[1]。通过红细胞解凝速度可以判断 NA 活性强度。茎部多 15 或 20 个氨基酸的重组 H5N1 流感病毒解凝速度和解凝能力明显强于茎部少 15 或 20 个氨基酸的重组病毒。NA 头部酶活性位点没有改变,改变的只是 NA 茎部长短,我们认为可能是由于茎部较长的病毒其头部也即酶活性位点更容易接触到底物,所以能在较短的时间内完成解凝过程。

流感病毒感染 MDCK 细胞时,病毒粒子的 HA 识别和结合宿主细胞表面唾液酸特异性受体,使病毒与宿主细胞接触,穿膜进入,在细胞内进行基因组的转录、复制、蛋白的合成,病毒粒子装配等一系列过程后,大量的子代病毒粒子出芽。NA 破坏连接病毒-细胞及病毒-病毒的唾液酸糖蛋白^[15],释放聚集在宿主细胞周围的子代病毒粒子,这些子代病毒再进一步感染周围的细胞,感染破坏的细胞越来越多,逐渐在 MDCK 细胞上形成肉眼可见的空斑。重组短茎病毒在 MDCK 细胞上的空斑直径远大于长茎病毒(表 4)。其原因可能是因为长茎病毒对唾液酸的降解能力较强,在子代病毒吸附到新的宿主细胞之前或刚吸附到新的宿主细胞还未来得及穿膜进入,NA 就已经分解破坏了宿主细胞上的唾液酸受体,阻碍了扩大感染,使空斑形态较小。短茎重组病毒的 NA 活性适中,只能分解破坏子代病毒粒子和原宿主细胞之间的唾液酸受体,没有多余的能力破坏新的宿主细胞上的唾液酸受体,也就不会阻碍子代病毒粒子感染、破坏周围新的宿主细胞,因此空斑显著增大。也是这个原因使病毒在 MDCK 细胞上繁殖时重组短茎病毒释放子代病毒的时间明显早于长茎病毒,释放出的子代病毒粒子数量也较多(表 3)。

5 株重组病毒的 EID₅₀、MDT 和平均血凝效价相似,不存在统计学差异性(表 2)。病毒在鸡胚尿囊腔中充分繁殖后,通过 PFU 试验可以检测出尿囊液中病毒粒子数量相似,无明显差异(表 4),可见 NA 茎部的长短并不影响病毒在鸡胚中的繁殖性能。病毒在 MDCK 细胞上的繁殖特性存在明显差异(表 3、表 4),短茎 H5N1 病毒表现出更强的繁殖优越性,可见 NA 茎部长短与 H5N1 亚型 AIV 的细胞适应性密切相关,也有可能和病毒的宿主适应性有关。当前 H5N1 亚型 AIV 宿主范围逐渐扩大^[5],其原因之一就是 NA 茎部氨基酸缺失造成的。

实验结果揭示了 AIV NA 茎部氨基酸缺失的生

物学意义;利用反向遗传技术成功拯救了 5 株 H5N1/PR8 重组流感病毒,为流感病毒基因功能研究和重组疫苗研究建立了技术平台;通过对 AIV NA 茎部氨基酸的删除突变提高了病毒在 MDCK 细胞上的繁殖产量,为流感病毒细胞苗的生产提供了新的思路。

参 考 文 献

- [1] 徐耀先,周晓峰,刘立德.分子病毒学.湖北:湖北科技出版社,2000,1.
- [2] Els MC, Air GM, Murti KG, et al. An 18-Amino acid deletion in an influenza neuraminidase. *Virology*, 1989, **142**: 241–247.
- [3] Castrucci MR, KaWaoKa Y. Biologic importance of neuraminidase stalk length in influenza A virus. *Journal of Virology*, 1993, **67** (2): 759–764.
- [4] Block J, Air GM. Block deletion in the Neuraminidase genes from influenza A viruses of the N1 subtype. *Virology*, 1982, **118**: 229–234.
- [5] Matrosovich M, Zhou N, Kawaoka Y, et al. The surface glycoproteins of H5 influenza viruses from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *Journal of Virology*, 1999, **73** (2): 1146–1155.
- [6] Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, et al. A DNA transfection system for generation of influenza A virus eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 6108–6133.
- [7] Hoffmann E, Neumann G, Hobom G, et al. Ambisense ' approach for the generation of influenza A virus: vRNA and mRNA synthesis from one template. *Virology*, 2000, **267**: 310–317.
- [8] Hoffmann E, ZHOU N, Wester RG. Eight-plasmid rescue system for influenza A virus. *International Congress Series*, 2001, **1219**: 1007–1013.
- [9] 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.
- [10] 甘孟侯.禽流感.第二版.北京:中国农业出版社,2002.
- [11] 卢建红,邵卫星,刘玉良,等.用 8 质粒病毒拯救系统产生 H9N2/WSN 重组 A 型流行性感冒病毒.病毒学报,2005, **21** (1): 48–53.
- [12] 殷震,刘景华.动物病毒学.第二版.北京:科学出版社,1997.
- [13] 薛广波,郭振东,郭俊生,等.实用消毒学.北京:人民军医出版社,1984.
- [14] Wagner R, Wolff T, Herwig A, et al. Independence of Hemagglutinin glycosylation and Neuraminidase as regulators of influenza virus growth: a study by reverse genetics. *Journal of Virology*, 2000, **74**: 6316–6323.
- [15] Baigent SJ, Mc Cauley JW. Glycosylation of haemagglutinin and stalk-length of neuraminidase combine to regulate the growth of avian influenza viruses in tissue culture. *Virus Res*, 2001, **79**: 177–185.

Biological significance of amino acids deletion in NA stalk of H5N1 avian influenza virus

WANG Qu-zhi , LONG Jin-xue , HU Shun-lin , WU Yan-tao , LIU Xiu-fan *

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

Abstract : It has been reported that NA gene of some H1N1 Influenza A virus strains isolated since 1933 is characterized by a deletion of 11 to 16 amino acids in the stalk. The spontaneous mutant in NA stalk of H1N1 virus lacks enzyme activity with large substrate (fetuin) but not with small substrate (sialyllactose). Recently , H5N1 virus also has been found that NA has the same unique mutation in the stalk , a deletion of 15 to 20 amino acids. However , biological significance of this mutation has not yet been reported. In order to investigate biological significance of the amino acids deletion in NA stalk of H5N1 , five reassorted H5N1/PR8 viruses were generated via eight-plasmid based reverse genetics system. These five viruses were named 506 , m506- , 646 , m646 + and 196 , respectively. The six internal genes of recombinants were all from A/PR8/34(H1N1) , and HA gene was from A/G/JS/03(H5N1) , however , they had different NA genes. 506 and m506- held NA fragments derived from A/G/HD/00(H5N1) , and the former was distinguished with a longer NA which had no 20 amino acids deletion in the stalk. 646 and m646 + held NA fragments from A/G/JS/03(H5N1) , and the NA stalk of m646 + was 20 amino acids longer than that of 646. The NA of 196 was derived from A/PR8/34 which had 15 amino acids deletion in its stalk. Biological characteristics of these viruses showed that recombinants with different NA length could grow well in embryonated SPF eggs , and their EID₅₀ , MDT , and viral titers were similar. However , the length of NA was related to the capacity of eluting viruses from erythrocytes for 506 and 646 + which holding longer NA stalks eluted from erythrocytes more quickly than m506- , 646 and 196 did. Moreover , 15 or 20 amino acids deletion in NA stalk had a pronounced effect on virus growth ability in MDCK cells. Viral titers in supernatant of MDCK infected with m506- or 646 were 10 to 100 folds higher than those infected by 506 or m646 + . And the plaque size of m506- and 646 were larger than that of 506 and m646 + . The results reveals that H5N1 AIV with amino acids deletion in NA stalk would expand its host range. The unique amino acids deletion in NA molecule of H5N1 may be associated with the adaptation of virus to terrestrial poultry or the increasing ability of interspecies transmission.

Keywords : H5N1 Avian Influenza Virus ; Neuraminidase stalk ; Amino acids deletion ; Reverse genetics technique

Foundation item : Major Basic Research Project for Provincial University and College of Jiangsu (05KJA23016)

* Corresponding author. Tel 86-514-7979386 ; E-mail : xfliu@mail.yzu.edu.cn

Received 28 December 2005/Accepted 23 January 2006/Revised 26 March 2006