

流行性感病毒重组的研究

I. 高产株和表面抗原重组株的选育

任贵方 阮薇琴 李泉根 范瑞莲

陈春荣 龚新昌 朱既明

(中国医学科学院病毒学研究所, 北京)

本文报告了甲型流感病毒重组高产株、血凝素单价抗原重组株及神经氨酸酶单价抗原重组株的选育和鉴定方法。实验证明利用灭活病毒和活病毒两株亲本株混合感染, 在鸡胚系统中重组, 经过抗血清中和选择, 再经终末纯化, 可以简便、快速而又准确地获得重组株。

流感病毒的 RNA 一般公认为 8 个节段^[1-3]。流感病毒在宿主细胞内复制时 8 个节段的 RNA 重新组合, 是造成流感病毒重组率高的主要原因。早在 1960 年 Kilbourne 和 Murphy^[4] 报告用低产的甲₁型活的野毒和实验室高产标准株 PR8 灭活病毒混合感染获得具有野毒抗原性的高产重组株。1971 年 Kilbourne 和 Schulman^[5] 改用甲₁型灭活野毒和 PR8 活毒混合感染, 也获得了甲₁型高产重组株。1970 年 Webster^[6] 报告哺乳类动物的甲型流感病毒和鸟类甲型流感病毒混合感染, 在有特异性抗血清的选择下, 可任意获得具有一个亲代病毒的血凝素抗原和另一个亲代病毒的神经氨酸酶抗原的重组株。近年来利用上述作者们的成果广泛进行各种人工重组, 制备灭活疫苗用的高产株, 制备单价抗原重组株, 选育活疫苗株, 以及用于病毒变异的实验研究等。

本文报告国内研究甲型流感高产重组株及单价表面抗原重组株的选育方法和结果。

材料和方法

(一) 流感病毒

甲型流感病毒包括甲₁/FM/1/47[H₁N₁], 甲₁/京科 71-101[H₃N₂], 甲₁/京科 74-5[H₃N₂], 新甲₁/津防 77-78[H₁N₁], 甲₁/马/Prague/1/56[Heq-1 Neq-1] (简称马₁/56), X15HK[Heq-1N2(68)] 等。

(二) 鸡免疫血清

用上述毒株的新鲜鸡胚尿囊液病毒免疫莱亨公鸡制备免疫血清。用前经霍乱滤液常规处理灭活。用于神经氨酸酶抑制试验的免疫血清则用生理盐水 1:5 稀释后 56℃、50 分钟灭活。

(三) 病毒灭活

1. 加热灭活: 新鲜鸡胚尿囊液病毒于 37℃ 水浴加温灭活 4 天, 病毒灭活不完全, 用于高产重组株选育。

2. 紫外线灭活: 新鲜鸡胚尿囊液病毒, 用无菌 pH7.0、0.1M 的磷酸缓冲盐水或生理盐水作 1:5 稀释, 分装到直径 6—7 厘米的平皿, 每平皿 2—2.5 毫升。平皿置于距紫外灯源 (国产灯管, 功率为 34,800 尔格/厘米²/秒) 10 厘米处的微波

本文于 1979 年 5 月 28 日收到。

振荡器上振荡,开灯照射。照射时间以半分钟或1分钟为间隔分组,一般为1/2'、1'、2'、3'、4'。每组在照射中途更换平皿一次,以保证平皿内病毒灭活均匀,每组灭活病毒接种鸡胚3—4个,每胚0.2毫升,并盲传1代。以照射时间最短又完全灭活的病毒作重组用。

(四) 中和试验

取定量重组子代尿囊液病毒加等量经霍乱滤液常规处理的1:5稀释的特异性鸡免疫血清,37℃水浴中和1小时,每组接种鸡胚4个,每胚0.4毫升,33℃培育3天,收取每胚尿囊液测血凝。

(五) 鸡胚终末试验

新鲜尿囊液病毒用无菌生理盐水或 Hank's 液作10倍系列稀释,用 10^{-4} — 10^{-9} ,每个稀释度接种10日龄鸡胚,33℃培育3天,选取最高稀释度血凝阳性尿囊液作为终末纯化1代(T_1)病毒。

(六) 重组方法

详见实验结果所述。

(七) 重组病毒的血凝素抗原[H]的鉴定

1. 病毒稀释,血清定量,微量血凝抑制法:被鉴定病毒从1:2开始用稀释棒同时稀释3行,其中两行分别加入等量的1:5或1:10的两株亲代病毒的免疫血清,另一行补加盐水作为病毒对照,加1%鸡血球观察血抑效价。

2. 血清稀释,病毒定量,微量血凝抑制法:血清倍比稀释,病毒抗原定量4单位,比较血清对本株和对被鉴定病毒的血抑效价。

(八) 重组病毒的神经氨酸酶抗原[N]的鉴定

使用世界卫生组织流感协作中心标化的神经氨酸酶抑制试验方法^[7]。

1. 定性试验:被鉴定的重组病毒用每0.1毫升含酶抗原1单位(通常光密度为0.45—0.85)分装3管,每管0.1毫升。其中2管分别加入1:5稀释的两株亲代病毒的免疫血清,或神经氨酸酶与两株亲代病毒相同的重组株免疫血清0.1毫升,另一管加0.1毫升盐水作为酶对照管。上列各管经37℃培育1小时,再加5%牛血清胎蛋白0.1毫升,37℃培育18小时,再按标化方法加入各种试剂,然后用分光光度计测各管的残余

酶活性。

2. 定量试验:必要时按标准方法将血清倍比稀释,加定量抗原,比较血清对本身N抗原和被鉴定的病毒N抗原的抑制效价。

实验结果

一、高产重组病毒的选育和鉴定

(一) 甲₃型流感病毒京科71-101株的高产重组株的选育

甲₃/京科71-101 HK₁E₂T₁E₁(HK=人肾细胞,E=鸡胚,T=终末,数字表示代数,下同。)病毒的EID₅₀为 $10^{-7.6}$ 而血凝滴度只有1:40。为了提高其血凝抗原的产量,将它和鸡胚适应高产株FM1(EID₅₀为 $10^{-7.5}$,HA效价为1:640)进行重组。京科71-101病毒经37℃半灭活并稀释 10^{-2} 后和等量的稀释 $10^{-6.5}$ 的FM1病毒混合接种10日龄鸡胚尿囊,每胚0.4毫升。各对照组每胚只接种单一亲本株病毒0.2毫升。每组各种3个胚,33℃培育44小时,收获尿囊液查血凝。分别取每组内的阳性胚尿囊液等量混合,取定量混合尿囊液加等量处理过的FM1高价鸡免疫血清,37℃水浴中和1小时,每组接种鸡胚3个,每胚0.4毫升,33℃培育3天,收取尿囊液测血凝,结果见表1。

从表1结果可见,对照组2 FM1亲代病毒完全被中和,对照组1,另一亲代病毒京科71-101不被中和,但血凝滴度很低,只有混合感染组重组病毒每胚血凝滴度均很高。这些病毒可能是重组成功的高产71-101病毒。

(二) 京科71-101重组病毒的抗原性鉴定

用表1中血凝滴度为1/1280的尿囊液病毒在鸡胚中进行终末纯化,终末纯化的病毒定名为京科71-101(FM1)。用此重组病毒制备鸡免疫血清,并用FM1及京科

表 1 甲₃/京科 71-101 低产病毒和甲₁/FM1

组 别	混合感染用病毒	重组子一代 血凝阳性胚	加 1:5 的 FM1 血清中和子一代 后阳性胚的血凝滴度 ⁵⁾		
			1	2	3
混合感染组	甲 ₃ /京科 71-101(10 ⁻²) ¹⁾ 甲 ₁ /FM1 ³⁾ (10 ^{-6.5}) ²⁾	2/3 ⁴⁾	320	320	1280 ⁶⁾
对照组 1	甲 ₃ /京科 71-101(10 ⁻²) ¹⁾	3/3	20	—	20
对照组 2	甲 ₁ /FM1 ³⁾ (10 ^{-6.5}) ²⁾	3/3	—	—	—

- 1) 示加热半灭活。
- 2) 示混合感染。
- 3) 示高产株。
- 4) 分母示接种鸡胚数,分子示血凝阳性鸡胚数。
- 5) 表中数字为血凝滴度的倒数。
- 6) 用于终末纯化。

图 1、图 2 注同上。

71-101 两亲本株的免疫血清和相应的三种抗原进行交叉血抑试验,结果证明重组病毒京科 71-101(FM1) 的血凝素抗原是 H₃,与其亲本株京科 71-101 的抗原性一致。神经氨酸酶抑制试验结果说明京科 71-101(FM1) 重组株的神经氨酸酶抗原是 N₂,和其亲本株京科 71-101 相同。

(三) 京科 71-101(FM1) 重组病毒高产性状的鉴定

用在鸡胚中传递代数相同的京科 71-101 和京科 71-101(FM1) 尿囊液病毒,10⁻³ 稀释各接种 10 日龄鸡胚 10 个,33℃ 培育 44 小时,逐个收取尿囊液测定血凝效价,计算几何平均值,结果京科 71-101E₇ 为 1:36,而京科 71-101(FM1) 为 1:257。比其亲本株京科 71-101 提高了 7 倍,接近于高产亲本株 FM1。

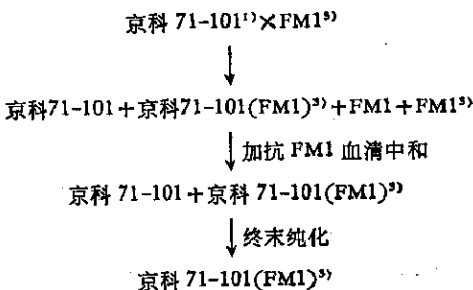


图 1 高产重组株的选育过程

总结高产重组株的选育过程如图 1。

二、单价血凝素抗原
重组株的选育和鉴定

实验使用甲₃/京科 74-5E₈[H3N2] 鸡胚尿囊液病毒(EID₅₀ 为 10^{-7.8}),用生理盐水作 1:5 稀释,进行紫外线灭活,证实 3'、3.5'、4' 照射后均全部灭活。用 3' 灭活死毒作亲本株,和另一亲本株马_{1/56}E₁₀[Hc-1Nc-1]活毒(EID₅₀ 为 10^{-6.5}10⁻³ 稀释)等量混合接种 4 个 10 日龄鸡胚,每胚 0.4 毫升,33℃ 培育 3 天。同时设有死毒京科 74-5 和活毒马_{1/56} 的对照。结果混合感染组中 1/4 胚血凝阳性,血凝滴度 1:16,用此病毒加等量 X15HK[Hc-1N2(68)]免疫血清,室温中和 1 小时,接种 10 日龄鸡胚 4 个,33℃ 培育 3 天后,4 胚均血凝阴性,说明中和后的病毒量很小或无。将阴性胚尿囊液每胚各盲传 2 胚,使病毒增殖,结果其中 2 个原阴性经盲传后均转为血凝阳性。择其中 4-①、4-② 阳性胚尿囊液进行 H 和 N 抗原鉴定。结果见表 2。

从表 2 可见,在血抑试验中 4-①、4-② 均可被京科 74-5 免疫血清完全抑制,从而可初步认为它们的 H 抗原为 H₃(74-5)。

表 2 京科 74-5*×马₁重组株的 H 和 N 抗原鉴定

免疫血清	方 法 抗 原	血 抑 试 验		神经氨酸酶抑制试验	
		4-①	4-②	4-①	4-②T ₂
正常鸡血清		128 ¹⁾	160	0.43 ²⁾	0.44
X15HK[Heq-1N2(68)]				0.55, 100% ³⁾	0.41, 93%
京科 74-5[H3N2]		<2	<2	0.165, 38%	0.07, 16%
马 _{1/56} [Heq-1Neq-1]		64	7	0.03, 7%	0.007, 1.6%

- 1) 表中数字是血凝滴度的倒数, 实验用病毒稀释, 血清定量, 微量血抑试验。 * 紫外灭活(后图表均同)
2) 神经氨酸酶活性光密度值。
3) 加抗血清抑制后, 残余酶活性%, 例 $0.007 \div 0.44 \times 100 = 1.6\%$ 。

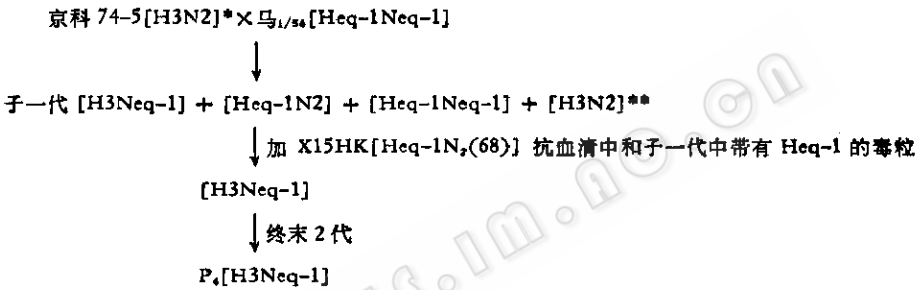


图 2 单价 H 抗原重组株的选育过程

** [H3N2]在重组子一代中从理论上讲有可能经过交叉复活而出现, 但实验中, 未发现此类病毒, 可能是受中和时用的抗血清中的 N2 抗体的抑制, 使其出现的机率低于 [H3Neq-1]。

1:5 的马₁血清对 4-② 病毒也有一定程度的抑制, 其原因可能是病毒不纯。为此在鸡胚中连续终末纯化 2 代, 再用同上血抑试验鉴定其 H 抗原, 结果病毒对照的血凝滴度为 1:96, 加京科 74-5 血清后血凝全被抑制, 加马₁血清的病毒血凝滴度为 1:64。据此可认为它的 H 抗原为 H₃(74-5)无疑, 并命名为 P₄。

在神经氨酸酶抑制试验中, 马₁血清几乎全部抑制 P₄ 的酶活性, 其残余酶活性只有原病毒的 1.6%, 说明 P₄ 的 N 抗原为 Neq-1。至此, 可以肯定 P₄ 的表面抗原为 [H₃Neq-1]。

总结京科 74-5 死毒和马₁活毒的 H 抗原重组株的重组选育过程如图 2。

三、神经氨酸酶单价抗原重组株的选育和鉴定

用 10⁻³ 稀释的甲₁/京科 74-5E₂[H3N2] 尿囊液病毒加等量的 1:5 稀释、紫外线照射 2' 全灭活的马₁E₁₂ 病毒混合感染鸡胚, 方法同前所述。唯一区别是灭活马₁, 而不灭活京科 74-5。子一代病毒用 P₄[H3Neq-1] 免疫血清中和, 获得代号为 2'-3-③ 的血凝阳性胚尿囊液, 鉴定结果见表 3。

从表 3 可见 2'-3-③ 病毒的血凝素抗原为 Heq-1, 神经氨酸酶抗原为 N2。此重组病毒定名为“P₅”。经终末纯化重复鉴定其表面抗原为 [Heq-1N2 (京科 74-5)]。

表 3 京科 74-5×马₁重组株的鉴定

抗 原	血 抑 试 验		神 经 氨 酸 酶 抑 制 试 验 抗 血 清			
	生理盐水	马 ₁ [Heq-1Neq-1] 血清	正常鸡血清	京科 74-5[H3N2]	P ₁ [H3Neq-1]	马 ₁ [Heq-1Neq-1]
2'-3-⑧	384*	<4	0.525	0.058 11%**	0.46 87%	0.17 32%

* 本实验用病毒稀释血清定量血抑试验,数据为血凝滴度倒数。

** 残余酶活性%。

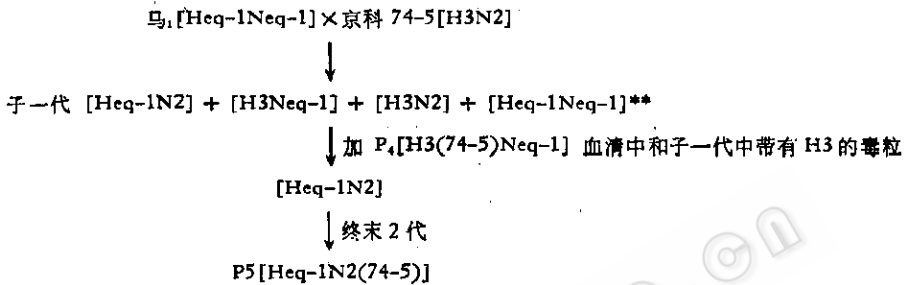


图 3 神经氨酸酶单价抗原重组株选育过程

** 解释见图 2 注。

总结甲₃/京科 74-5 和马₁死毒的神经氨酸酶单价抗原重组株的重组选育过程为图 3。

四、单价抗原重组株的应用

(一) 单价抗原分析

用上述方法除获得血凝素单价抗原重组株 P₄[H₃(京科 74-5)Neq-1] 外,还获得了另外 3 株重组病毒,即 P₁₁[H1(京科 56-1)Neq-1], P₁₂[H1(洛 57-4)Neq-1] 和 P₁₃[H₂(张 57-4)Neq-1]。利用单价抗原重组株可以排除空间干扰的原理,用上述 P₁₁, P₁₂, P₁₃ 三株重组病毒制备免疫血清对各原株病毒京科 56-1, 洛 57-4, 张 57-4, 以及用各原株病毒的免疫血清对 P₁₁, P₁₂, P₁₃ 各重组株病毒进行交叉血抑试验。这样,可在排除 N 抗原抗体的空间干扰作用后,获得单价血凝素抗原之间的抗原关系,较原株血清对原株病毒所求得的抗原关系更为真实。结果见参考文献 [8]。

应用上述方法,还获得了 6 株单价神经氨酸酶抗原重组株。包括 P₁[Heq-1N2(京科 68-1)], P₃₋₁[Heq-1N2(京科 71-67)], P₃₋₂[Heq-1N2(粤防 72-243)], P₅₋₂[Heq-1N2(穗防 74-135)], P₇[Heq-1N2(京防 75-39)] 以及 P₉[Heq-1N2(粤防 77-38)]。这些毒株已用于甲₃型不同阶段变种的神经氨酸酶抗原变异的分析。

(二) 人群神经氨酸酶抗体测定

1968 年以来人群中不断发生甲₃型各阶段变种的流行,人群也不断获得免疫,抗体是 [H3N2]。如用原株检查 N 抗体则受 H 抗原抗体结合的严重空间干扰的影响,如用重组株 [Heq-1N2] 进行 NI 抗体检查则可获得满意的结果。我们已用 P₉[Heq-1N2(粤防 77-38)] 检查过流感患者和非流感患者,急性期和恢复期的 NI 抗体,结果发现 38 名流感患者中急性期血清 ≤ 1/4 者 36 名,恢复期血清 NI 抗体 4 倍升高者 22/36,占 61%。非流感患者 22 名,急性

期血清 NI 抗体 $\leq 1/4$ 者 17 名,恢复期患者无一例升高。这一方法还可利用于测定正常人群血清中 NI 抗体水平,供预测流行的参考。

(三) 新亚型神经氨酸酶的鉴定

1977 年从我国辽宁开始一次新甲₁型流感的流行,为尽快澄清此亚型病毒的表面抗原结构,用同上方法将新甲₁津防 77-78 和灭活的马₁病毒重组,获得单价 N1 抗原重组株,代号为 P₂₁[Heq-1N1 (津防 77-78)] 用以鉴定当时分离的新甲₁病毒的 N 抗原。

用 P₂₁ 重组病毒免疫鸡制备抗血清和老甲₁型病毒如 FM1/47、京科 56-1 及新甲₁病毒如津防 77-78、辽丹 77-5 等病毒进行 NI 试验,结果证明新甲₁病毒和老甲₁病毒的 N 抗原相似,均为 N1,详细结果见参考文献 [9, 10]。

讨 论

本实验原设计使用 Kilbourne 和 Schulman^[5] 的死毒和活毒重组高产株的方法。但实验结果表明灭活不完全,用不完全灭活的甲₃/京科 71-101 株病毒和 FM1 高产活毒重组,选育甲₃/京科 71-101(FM1) 高产株也获得成功。

Webster^[6] 用的方法是活病毒和活病毒混合感染,特异性抗血清中和选择。但由于神经氨酸酶抗体中和效应低,所以要用膜块培养加入神经氨酸酶抗血清压制带有相应的神经氨酸酶抗原的毒粒的释放,连续处理两代,使带有所需的 H 和 N 抗原的毒粒成为占优势的毒粒,再经纯化而获得单价抗原重组株。此法相当繁琐又费时。我们改用一株灭活亲代病毒和另一株活的亲代病毒混合感染重组,再用和活毒相应的抗血清中和,方法简单很多,且经多次考

验,效果也很好。灭活对象视需要而定,如果希望重组株具有甲亲本株的血凝素和乙亲本株的神经氨酸酶抗原,则灭活甲亲本株;反之则灭活乙亲本株。中和用抗血清使用活毒亲本株或与活毒亲本株血凝素抗原类似的重组株的抗血清,目的是把子代中的活的亲本株病毒完全中和,使带有所需的血凝素抗原或神经氨酸酶抗原的重组病毒得以选出。从理论上讲在死毒活毒重组过程中,被灭活的病毒经过和活毒的某些基因的交叉重组而可以复活,从而在子一代中有可能出现复活的被灭活的病毒,但多次实验中从未出现这类病毒。其原因可能是由于中和时使用的抗血清中均有抗灭活病毒的 N 抗原的抗体,从而使这类病毒受到一定程度的抑制,使其出现的机率低,以致在终末纯化时不能选出。实验中曾遇到两株亲本株之一干扰另一株的复制,使重组失败,每胚加入 10—50 微克氢化考的松可消除干扰,使重组获得成功。本实验使用灭活病毒和活病毒混合感染鸡胚,中和活毒,终末纯化,再经血凝抑制和神经氨酸酶抑制试验鉴定其表面抗原,整个过程简单、快速,准确性也较高,为其优点。

参 考 文 献

- [1] Duesberg, P. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **59**: 930, 1968.
- [2] Skehel, J. J.: *J. Gen. Virol.*, **11**: 103, 1971.
- [3] Palese, P. et al.: *J. Virol.*, **21**: 1187, 1977.
- [4] Kilbourne, E. D. and Murphy, J. S.: *J. Exp. Med.*, **111**: 387, 1960.
- [5] Kilbourne, E. D. and Schulman, J. L.: *J. Infect. Dis.*, **124**: 447, 1971.
- [6] Webster, R. G.: *Virol.*, **42**: 633, 1970.
- [7] M. Aymard-Henry, et al.: *Bull. W. H. O.*, **48**: 199, 1973.
- [8] 刘庚起等: *中国科学*, **3**: 300, 1980.
- [9] Kung, H. C., et al.: *Bull. W. H. O.*, **56**: 913, 1978.
- [10] 任贵方等: *中华医学杂志*, **60**: 521, 1980.

STUDIES ON RECOMBINATION OF INFLUENZA VIRUSES

I. SELECTION OF HIGH YIELDING AND SURFACE ANTIGEN RECOMBINANTS

Ren Gui-fang Ruan Wei-qin Li Quan-gen Fan Rui-lian

Chen Chun-rong Gong Xin-chang Zhu Ji-ming

(Institute of Virology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing)

The present work describes the procedures for recombination, selection and identification of a high yielding recombinant and surface antigen recombinants of type A influenza virus containing hemagglutinin of one parent and neuraminidase of the other. The procedure involves mixed infection of one inactivated parent and another infective parent virus in the allantoic sac of chicken embryos, neutro-

lization and selection by proper antisera and cloning by terminal dilution.

One high yielding and many surface antigen recombinants have been obtained by this simple and rapid procedure. The application of surface antigen recombinants to mono-specific antigenic analysis, to the assay of neuraminidase antibody and to the antigenic characterization of 1977 H1N1 virus is briefly described.