

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
55 (12) :1619 - 1625; 4 December 2015  
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20150150

## 替换基因片段对流感病毒生长的影响

蒋文明, 于美芳, 李金平, 于建敏, 王素春, 侯广宇, 陈继明\*

中国动物卫生与流行病学中心, 山东 青岛 266032

**摘要:** 【目的】探索流感病毒内部基因对病毒滴度的影响, 构建高产流感疫苗种子病毒。【方法】将 A/chicken/ZJ/China/2013 (H5N1) (ZJ) 病毒的 6 个内部基因或点突变体或聚合酶复合物基因逐个替换鸡胚高度适应的 A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) 病毒 (PR8) 的相同基因, 构建重组病毒, 通过血凝试验比较重组病毒在鸡胚上的增殖滴度。【结果】PB2 基因影响最大, 替换后未能产生重组病毒; PB1、PA、M 基因替换后, 重组病毒滴度分别下降了 3.7、3.4、3.0 个滴度 ( $\log_2$ ); NS 基因替换后基本没有影响; 聚合酶复合体基因替换后, 病毒滴度稍有下降 ( $7.6 \log_2$ ), 没有提供像完全来自 PR8 的聚合酶复合体相同的生长特性 ( $8.4 \log_2$ ); PR8 PB2 基因 627 位点替换成谷氨酸 (E) 后, 病毒滴度从  $8.4 \log_2$  上升到  $8.7 \log_2$ 。【结论】合适优化的基因组合可以通过病毒 RNA 与蛋白之间、蛋白与蛋白之间的相互作用促进病毒复制, 从而筛选出能在鸡胚中高效复制的重组体, 为高产流感疫苗的生产奠定基础。

**关键词:** 流感病毒, 反向遗传, 高产, 疫苗

**中图分类号:** Q812      **文章编号:** 0001-6209 (2015) 12-1619-07

A 型流感病毒是单股负链 RNA 病毒, 基因组包含 8 个 RNA 片段, 编码至少 11 种蛋白。片段 4 和 6 编码两种表面糖蛋白, 分别为 HA 和 NA。其余的 6 个片段编码内部和非结构蛋白。核糖核蛋白复合物包括 PB2、PB1、PA 和 NP 蛋白。最短的片段 7 和 8 是双顺反子, 片段 7 编码基质蛋白 M 和离子通道蛋白 M2。片段 8 编码非结构蛋白 NS1 和核输出蛋白/非结构蛋白 NEP/NS2<sup>[1]</sup>。基因组这种分段式的结构使得流感病毒之间可以进行基因片段的交换, 产生重组病毒。

由于抗原漂移和抗原漂变会导致流感病毒的遗传不稳定性, 因此流感疫苗需要经常更新。目前, 预防流感主要的一个方法就是使用灭活的流感疫苗。

而制约疫苗生产中最主要的一个问题是病毒在鸡胚中的增殖滴度不高。

经典的生产流感疫苗种子的方法是利用流感病毒基因组分段式的结构, 通过重组产生高产量的流感疫苗。将流行毒与高产供体病毒共接种鸡胚, 由流行毒提供 HA 和 NA 基因, 高产供体病毒提供鸡胚高生长表型所必需的基因片段, 产生高产重组疫苗病毒<sup>[2-3]</sup>。

另一种方法是通过反向遗传方法生产流感疫苗种子病毒。此过程是将高产供体病毒的 6 个内部基因和流行毒的 2 个表面糖蛋白基因转染细胞, 拯救出种子病毒, 然后接种鸡胚进行疫苗生产<sup>[4-5]</sup>。反向遗传系统的优势是可以对流感病毒基因片段进行

**基金项目:** 国家自然科学基金 (31200123); 青岛市科技计划 (14-2-4-105-jch)

\* 通信作者。Tel: +86-532-85623396; Fax: +86-532-85628464; E-mail: chenjiming@cahec.cn

**作者简介:** 蒋文明 (1979 -), 男, 山东诸城人, 副研究员, 博士, 研究方向为流感分子流行病学及防控。E-mail: civcul@163.com

**收稿日期:** 2015-04-01; **修回日期:** 2015-05-13

直接操作。已经通过反向遗传技术生产了 H5N1 禽流感疫苗,将 H5N1 病毒的 HA 片段进行修饰,降低它的毒力,以便更好地在鸡胚上进行增殖<sup>[6-7]</sup>。

A/Puerto Rico/8/1934 (PR8) 是鸡胚高度适应的 H1N1 亚型的病毒。不管是经典方法还是反向遗传技术生产灭活流感疫苗都是利用 PR8 病毒或其基因片段作为高产供体骨架。研究表明,携带 PR8 M 基因的重组病毒为高产表型病毒<sup>[8-9]</sup>。但是,目前对其他 5 个内部基因是否能产生鸡胚高产表型病毒不是很清楚<sup>[8,10]</sup>。本研究利用反向遗传技术,用 H5N1 病毒的内部基因或点突变体或聚合酶复合物基因逐个替换 PR8 病毒的相同基因,构建重组病毒,通过血凝试验比较重组病毒在鸡胚上的增殖滴度,探讨哪些基因在高产重组病毒中起关键作用,为生产高产流感疫苗奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 材料病毒、细胞、载体:** A/chicken/ZJ/China/2013 (H5N1) (ZJ) 由本实验室分离保存;双向表达载体 pH205 (在 pcDNA3.1 质粒基础上,在 pol II 启动子和 BGH 终止子外侧反向插入 pol I 启动子和终止子)、表达 A/Puerto Rico/8/1934 (PR8) 六个内部基因的重组载体 pH-PR-PB2、pH-PR-PB1、pH-PR-PA、pH-PR-NP、pH-PR-M 和 pH-PR-NS 由本实验室构建<sup>[11]</sup>;293T 细胞由本实验室保存。

**1.1.2 主要试剂:** QIAamp Viral RNA Mini Kit 购自 Qiagen 公司,HiScript II One Step RT-PCR Kit、ExFect Transfection reagent 购自 Vazyme 公司,zero-TOPO 载体购自 Clonesmrtter 公司,Opti-MEM 购自 Gibco 公司;PrimeSTAR Max DNA Polymerase、DNA 胶回收试剂盒、质粒提取纯化试剂盒购自 TaKaRa 公司;限制性内切酶购自 New England Biolabs;SPF 鸡胚购自济南斯帕法斯家禽有限公司。

**1.1.3 引物:** 扩增 ZJ 内部基因和 NA 基因的引物根据 Hoffmann 发表的文献合成 [12]。扩增 ZJ 病毒株 HA 基因突变体 (HAMut) 的引物根据其 HA 的多个连续碱性氨基酸位点的特异性序列设计,从而使具有强毒株分子特征的 HA 裂解位点-PLRERRRKR-突变成弱毒株的 HA 裂解位点-PQRETR-。

PR8 PB2 基因 K627E 突变的引物根据编码第 627 位氨基酸的核苷酸序列,将 AAG 突变成 GAG。

表 1. 本研究中所用引物

Table 1. Primers used in this study

Primers	Oligonucleotide (5'→3')
Bm-PB2-F	TATTCGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGTC
Bm-PB2-R	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTCGTTT
PB2-627E-F	AGCCGCTCCACCAGAGCAAAGTAGAATG
PB2-627E-R	CATTCTACTTTGCTCTGCTGGAGCGGCT
Bm-PB1-F	TATTCGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGCA
Bm-PB1-R	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGCATTT
Ba-PA-F	TATTGGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGTAC
Ba-PA-R	ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTA CTT
Bm-HA-F	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAGCAGGGG
Bm-HA-R	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGT TTT
HAMut-F	AGTCCTCAACGAGAGACTCGAGGGCTATT TGG A
HAMut-R	AAATAGCCCTCGAGTCTCTCGTTGAGGACT AT T
Ba-NP-F	TATTGGTCTCAGGGAGCAAAGCAGGGTA
Ba-NP-R	ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGT AT TTT T
Bm-NA-F	TATTCGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGGTGA AAATG
Bm-NA-R	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGT TTT T
Bm-M-F	TATTCGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGTAG
Bm-M-R	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTAGT TTT T
Bm-NS-F	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAGCAGGGTG
Bm-NS-R	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGT TTT T

### 1.2 病毒 RNA 提取

根据 QIAamp Viral RNA Mini Kit 操作说明提取病毒 RNA,置 -80 °C 保存备用。

### 1.3 RT-PCR 扩增

取 3.0 μL RNA 模板,加入到 22.0 μL RT-PCR 预混液中,包括 12.5 μL 2 × RT-PCR Buffer,引物各 1.0 μL (10 μmol/L),1.25 μL Enzyme Mix,6.25 μL ddH<sub>2</sub>O。RT-PCR 反应条件为 50 °C 30 min,94 °C 2 min,然后进行 30 个循环 (94 °C 30 s,57 °C 30 s,72 °C 3 min),最后 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。利用 DNA 胶回收试剂盒纯化回收,然后与 zero-TOPO 载体连接,阳性重组质粒进行测序鉴定。

### 1.4 HA 突变体 (HAMut) 的构建

对于 HAMut 的构建,以鉴定正确的 ZJ HA 阳性重组质粒为模板,以两对引物 Bm-HA-F/HA-Mut-R 和 HA-Mut-F/Bm-HA-R 分别扩增出 HA1 和 HA2 片段,然后以 HA1 和 HA2 的混合物为模板,Bm-HA-F/Bm-HA-R 为引物,用 PrimeSTAR Max DNA Polymerase 进行重叠延伸 PCR (SOE-PCR),扩增出 HAMut 片段。PCR 产物经胶回收后,与 zero-TOPO 载体连接,阳性重组质粒测序鉴定。

### 1.5 PB2 K627E 突变体的构建

对于 PB2 K627E 的构建, 以 pH-PR-PB2 重组质粒为模板, 以两对引物 Bm-PB2-F/PB2-627E-R 和 PB2-627E-F/Bm-PB2-R 分别扩增出 PB2-1 和 PB2-2 片段, 然后以 PB2-1 和 PB2-2 的混合物为模板, Bm-PB2-F/Bm-PB2-R 为引物, 用 PrimeSTAR Max DNA Polymerase 进行 SOE-PCR, 扩增出 PB2 K627E 片段。PCR 产物经胶回收后, 与 zero-TOPO 载体连接, 阳性重组质粒测序鉴定。

### 1.6 突变体重组表达质粒的构建

将测序鉴定正确的 PB2 K627E、ZJ HAmut、NA 重组质粒以及 ZJ 的内部基因片段重组质粒经相应的 *BsmB* I 或 *Bsa* I 酶切, 与 *BsmB* I 酶切的表达载体 pH205 相连, 提取重组质粒, 进行测序鉴定, 并利用 DNASTar7.0 软件进行序列分析。

### 1.7 病毒拯救与鉴定

按照 ExFect Transfection reagent 脂质体转染试剂盒说明进行。用表达 ZJ 的内部基因重组质粒依次分别替换 PR8 相应的 6 个内部基因重组表达质粒, 或用 ZJ 的 PB2、PB1、PA 聚合酶复合体替换 PR8 的聚合酶复合体重组表达质粒, 或使用表达 PR8 PB2 K627E 的重组质粒, 和表达 ZJ HAmut 和 NA 表面基因的重组质粒各 0.6  $\mu\text{g}$  混合共转染 293T 细胞, 48 h 后将细胞悬液接种 10 日龄 SPF 鸡胚, 0.2 mL/枚, 37  $^{\circ}\text{C}$  继续孵化, 72 h 后收集尿囊液, 测定其血凝活性。取血凝阳性的尿囊液经 10000 倍稀释后接种 10 日龄的 SPF 鸡胚扩增病毒, 0.1 mL/枚, 72 h 后收集尿囊液, 于 -70  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。提取拯救病毒的 RNA, 用 RT-PCR 扩增病毒的全基因组, 测序鉴定。

### 1.8 拯救病毒的滴度测定

将拯救病毒 10000 倍稀释后经尿囊腔接种 10 枚 10 日龄的 SPF 鸡胚, 0.1 mL/枚, 72 h 后收集尿囊液, 用 1% 的鸡红细胞测定 HA 效价, 以平均值表示该病毒的血凝效价。

## 2 结果

### 2.1 表达 ZJ 病毒 8 个基因重组质粒的构建

ZJ 的 8 个基因片段 PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M、NS 经 RT-PCR 扩增后, 与 zero-TOPO 载体连接, 测序正确后经酶切后分别与酶切处理好的 pH205

表达载体连接, 构建表达 8 个基因的重组质粒 (图 1)。经 PCR、测序鉴定重组质粒构建正确 (图 2)。

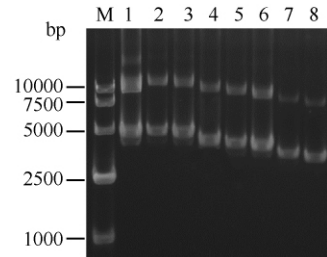


图 1. 表达 ZJ 病毒 8 个基因重组载体的电泳鉴定

Figure 1. Identification of recombinant plasmids expressing eight genes of ZJ virus by electrophoresis. M, 1 kb DNA Marker; lane 1, pH-ZJ-PB2; lane 2, pH-ZJ-PB1; lane 3, pH-ZJ-PA; lane 4, pH-ZJ-HA; lane 5, pH-ZJ-NP; lane 6, pH-ZJ-NA; lane 7, pH-ZJ-M; lane 8, pH-ZJ-NS.

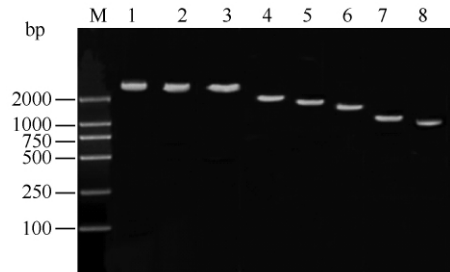


图 2. 表达 ZJ 病毒 8 个基因重组载体的 PCR 鉴定

Figure 2. Identification of recombinant plasmids expressing eight genes of ZJ virus by PCR. M1: DL2000 DNA Marker; lane 1: PB2; lane 2: PB1; lane 3: PA; lane 4: HA; lane 5: NP; lane 6: NA; lane 7: M; lane 8: NS.

### 2.2 突变体的构建

**2.2.1 表达 HAmut 重组质粒的构建:** 以表达 ZJ 株 HA 基因的阳性重组质粒 pH-ZJ-HA 为模板, 采用 SOE-PCR 方法扩增得到 HA 突变体基因, 并将其克隆至 pH205 载体中, 构建 pH-ZJ-HAmut 重组质粒 (图 3)。经 PCR 鉴定构建正确, 进一步测序结果表明, HA 裂解位点的氨基酸序列已由野生型病毒 HA 分子的 -PLRERRRKR- 突变为 -PQRETR-, 即被修饰为典型的 H5 亚型低致病性 AIV HA 分子特征。

**2.2.2 表达 PR8 病毒 K627E 突变体重组质粒的构建:** 以表达 PR8 株 PB2 基因的阳性重组质粒 pH-ZJ-PB2 为模板, 采用 SOE-PCR 方法扩增得到 PB2K627E 突变体基因, 并将其克隆至 pH205 载体中, 构建 pH-ZJ-PB2K627E 重组质粒 (图 3)。经 PCR 鉴定构建正确, 进一步测序结果表明, PB2 蛋白的 627 为氨基酸由赖氨酸 (K) 突变为谷氨酸 (E)。

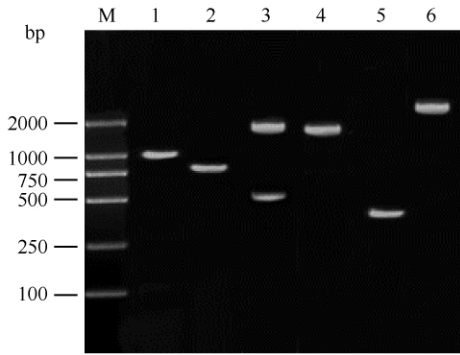


图 3. 构建 ZJ 病毒株和 PR8 病毒 PB2 K627E 突变体重组质粒的 PCR 扩增

Figure 3. Construction of recombinant plasmids of HAmut of ZJ virus and of mutation of K627E of PB2 of PR8 virus by amplification of PCR. M, DL2000 DNA Marker; lane 1, HA1; lane 2, HA2; lane 3, HAMut; lane 4, PB2-1; lane 5, PB2-2; lane 6, PB2 K627E.

### 2.3 重组病毒的拯救与鉴定

将构建成功的重组质粒转染 293T 细胞, 利用反向遗传技术拯救出多个重组病毒。在鸡胚繁殖一代

后, 提取病毒 RNA、反转录, 对拯救病毒的全基因组进行扩增、测序。测序结果表明, 与预期的病毒基因组序列一致。

### 2.4 不同基因组合的重组病毒的滴度测定

用表达 ZJ 的内部基因重组质粒依次分别替换 PR8 相应的 6 个内部基因重组表达质粒, 或用 ZJ 的 PB2、PB1、PA 聚合酶复合体替换 PR8 的聚合酶复合体重组表达质粒, 和表达 ZJ HAmut 和 NA 表面基因的重组质粒进行病毒拯救, 测定重组病毒的 HA 效价 (表 2)。高产重组体指的是与母本病毒相比, 能在鸡胚中生长良好, HA 效价提高 2 倍或更高。从表 2 中可以看出, 有 3 个病毒属于高产病毒 (ZJ 流行毒的 HA 效价为  $2^7$ )。

### 2.5 PB2 627 位点对病毒滴度的影响

对 6:2 基因比例中的 PR8 PB2 基因的 627 位点进行突变 (K→E), 进行病毒拯救, 测定重组病毒的 HA 效价 (表 3)。PB2 基因的 627 位点为 E 时, 重组病毒上升了 0.3 个滴度。

表 2. 不同基因组合的重组病毒滴度

Table 2. Titers of recombinant viruses with different gene constellation

Reassortants	Gene constellation								HA titer (log <sub>2</sub> )
	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS	
ZJ-1	WT	P	P	WT	P	WT	P	P	0
ZJ-2	P	WT	P	WT	P	WT	P	P	4.7
ZJ-3	P	P	WT	WT	P	WT	P	P	5.0
ZJ-4	P	P	P	WT	WT	WT	P	P	8.2
ZJ-5	P	P	P	WT	P	WT	WT	P	5.4
ZJ-6	P	P	P	WT	P	WT	P	WT	8.4
ZJ-7	WT	WT	WT	WT	P	WT	P	P	7.6
ZJ-8	P	P	P	WT	P	WT	P	P	8.4

P: high yield donor virus A/PR/8/1934 gene. WT: wild type virus (ZJ) gene.

表 3. PB2 627 位点对重组病毒滴度的影响

Table 3. The effect of amino acids of position 627 of PB2 on recombinant viruses

Reassortants	Gene constellation								HA titer (log <sub>2</sub> )
	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS	
ZJ-9	627K	P	P	WT	P	WT	P	P	8.4
ZJ-10	627E	P	P	WT	P	WT	P	P	8.7

P: high yield donor virus A/PR/8/1934 gene. WT: wild type virus (ZJ) gene.

## 3 讨论

影响流感疫苗生产的一个主要因素是能否获得能够在鸡胚中生长良好的流感种子病毒。目前, 可通过经典方法和反向遗传方法这两种方法可以生产

高产的流感种子株。经典方法没有一个固定的基因比例, 在整个生产过程中严格使用鸡胚。相反, 反向遗传方法使用固定的 6:2 基因比例, 必须从培养的细胞中拯救病毒。与经典方法中获得的高产重组病毒相比, 反向遗传方法获得的病毒常常不能表现出很好的生长特性<sup>[13]</sup>。

高产重组病毒是由两种不同亚型的病毒产生的子代, 每个母本病毒含有 8 个基因片段, 除了 HA 和 NA 表面抗原来自于流行毒外, 剩余的 6 个基因可以产生  $2^6$  个重组子。因此, 必须弄清楚哪种基因组合可以更有效地产生高产重组体。

有研究表明, 来自高产供体病毒的基因以某种方式起作用, 因此最高产的重组病毒应该包含高产供体病毒的大部分基因<sup>[8]</sup>。通常来说, 这是正确的。但是也存在一些例外, 本研究中只替换了 PB2、PB1、PA、M 中的一个基因, 而保留了 A/Puerto Rico/8/1934 (PR8) 鸡胚高产病毒的其他 5 个基因, 重组病毒滴度仍然下降很多。而且, 替换了 PB2 基因, 未能拯救出重组病毒。在 PR8 病毒 RNA 聚合酶复合体晶体结构中, PB2 亚基通过其 N 末端 (1-37) 氨基酸与 PB1 亚基 C 末端 86 个氨基酸相互连接。尽管该晶体结构的体积较小, 但是对于三聚体之间的互动却是必须的。PB2 替换后可能破坏了这种结构, 造成病毒拯救失败<sup>[14]</sup>。

聚合酶复合体 PB2、PB1、PA 来自于同一病毒可能会增强病毒的生长优势, ZJ-8 使用的完全是高产 PR8 病毒的聚合酶复合物, ZJ-7 使用的完全是流行毒的聚合酶复合体。两者的滴度都比流行毒的滴度高, 但是 ZJ-7 的滴度稍低于 ZJ-8。说明重组病毒的聚合酶复合体完全来自流行毒, 3 个亚基之间相互作用发挥其功能, 但是并没有提供像完全来自 PR8 的聚合酶复合体相同的生长特性。值得注意的是, NP 蛋白是核糖核蛋白复合物的基本的组成部分, 因此, NP 的来源也可能影响聚合酶复合体的效率。在本研究中, 保留了流行毒的 NP 基因的重组体中 (5:3) HA 效价降低很多, 推测可能是流行毒的 NP 基因抑制了核糖核蛋白复合物的功能发挥, 从而抑制了重组病毒的高产。

研究表明, 高产供体病毒的 M 基因是产生高产重组体所必需的<sup>[8-9]</sup>。这可能是由 M 蛋白的多功能决定的。M1 蛋白位于病毒囊膜的内部, 是病毒粒子最丰富的蛋白, 决定着病毒粒子的形态结构<sup>[15]</sup>。丝状的病毒表现出较低的复制滴度, 而球形的病毒表现出较高的复制滴度。研究表明, 丝状流行毒与 PR8 重组, 如果子代病毒带有 PR8 来源的 M 基因, 重组体会表现为球形<sup>[15]</sup>, 重组体可能为高生长表型。

M1 蛋白负责将 RNP 复合物从核内转运至胞

浆。这是病毒粒子组装的关键步骤。M1 与 RNP 的结合力越强, 越能促进 RNP 的转运、病毒粒子的组装和成熟、释放<sup>[16]</sup>。本研究中, 重组体 ZJ-5 使用的是流行毒的 M 基因, 导致了 HA 滴度下降了 3 个滴度。说明高产供体的 M 基因与高产表型存在高度相关。

序列比较发现, ZJ 和 PR8 病毒的 PB2、PB1、PA、NP、M1、M2、NS1、NS2 氨基酸同源性分别为 94.6%、96.3%、94.4%、92.2%、93.3%、84.5%、85.3%、86.1。替换 NP 基因、NS 基因以及聚合酶复合物后, 重组病毒滴度上升, 而其他基因替换后病毒滴度下降。在所有蛋白中, NP 和 NS1 蛋白氨基酸同源性是比较低的, 说明基因变化与病毒滴度之间没有必然的关系。

许多研究表明, PB2 的 627 位可能是 A 型流感病毒宿主范围的重要决定位点之一<sup>[17]</sup>。数据分析显示, 所有人源流感病毒 PB2 的 627 位均为 K, 禽源流感病毒则均为 E, 因此推测 PB2 的 627 位与宿主嗜性相关。对 6:2 基因比例中的 PR8 PB2 基因的 627 位点进行突变 (K→E), 发现重组病毒滴度有所上升 (表 3), 推测可能是 627 位点突变为 E 后, 重组病毒对鸡胚具有更好的嗜性, 增强其复制效率<sup>[18]</sup>。

在高产重组体中, 6:2 基因比例的重组体, 仅 HA 和 NA 来源于流行毒, 是最主要的组合方式, 但是它并不是产生高滴度的唯一基因比例。合适优化的基因组合可以通过病毒 RNA 与蛋白之间、蛋白与蛋白之间的相互作用促进病毒复制。这些功能可以筛选出能在鸡胚中高效复制的重组体。高产重组体的基因比例和基因组成依赖于流行毒和高产供体病毒的相互作用。

## 参考文献

- [1] Palese P, Shaw ML. Orthomyxoviridae: The viruses and their replication // Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishing, 2007.
- [2] Kilbourne ED. Future influenza vaccines and the use of genetic recombinants. *Bulletin of the World Health Organization*, 1969, 41 (3): 643-645.
- [3] McCahon D, Schild GC. Segregation of antigenic and biological characteristics during influenza virus recombination. *Journal of General Virology*, 1972, 15

- (1) : 73-77.
- [4] Neumann G, Watanabe T, Ito H, Watanabe S, Goto H, Gao P, Hughes M, Perez DR, Donis R, Hoffmann E, Hobom G, Kawaoka Y. Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96 (16) : 9345-9350.
- [5] Hoffmann E, Krauss S, Perez D, Webby R, Webster RG. Eight-plasmid system for rapid generation of influenza virus vaccines. *Vaccine*, 2002, 20 (25/26) : 3165-3170.
- [6] Subbarao K, Chen HL, Swayne D, Mingay L, Fodor E, Brownlee G, Xu XY, Lu XH, Katz J, Cox N, Matsuoka Y. Evaluation of a genetically modified reassortant H5N1 influenza A virus vaccine candidate generated by plasmid-based reverse genetics. *Virology*, 2003, 305 (1) : 192-200.
- [7] Webby RJ, Perez DR, Coleman JS, Guan Y, Knight JH, Govorkova EA, McClain-Moss LR, Peiris JS, Rehg JE, Tuomanen EI, Webster RG. Responsiveness to a pandemic alert: use of reverse genetics for rapid development of influenza vaccines. *The Lancet*, 2004, 363 (9415) : 1099-1103.
- [8] Baez M, Palese P, Kilbourne ED. Gene composition of high-yielding influenza vaccine strains obtained by recombination. *Journal of Infectious Diseases*, 1980, 141 (3) : 362-365.
- [9] Johansson BE, Bucher DJ, Pokorny BA, Mikhail A, Kilbourne ED. Identification of PR8 M1 protein in influenza virus high-yield reassortants by M1-specific monoclonal antibodies. *Virology*, 1989, 171 (2) : 634-636.
- [10] Rudneva IA, Timofeeva TA, Shilov AA, Kochergin-Nikitsky KS, Varich NL, Ilyushina NA, Gambaryan AS, Krylov PS, Kaverin NV. Effect of gene constellation and postreassortment amino acid change on the phenotypic features of H5 influenza virus reassortants. *Archives of Virology*, 2007, 152 (6) : 1139-1145.
- [11] Jiang WM, Hou GY, Wang SC, Li JP, Liu S, Chen JM. Construction of reverse genetic vaccine strain against variant H5N6 avian influenza virus and its protective efficacy test. *China Animal Health Inspection*, 2015, 32 (1) : 64-67. (in Chinese)
- 蒋文明, 侯广宇, 王素春, 李金平, 刘朔, 陈继明. H5N6 亚型禽流感病毒反向遗传疫苗株的构建及免疫保护试验. *中国动物检疫*, 2015, 32 (1) : 64-67.
- [12] Hoffmann E, Stech J, Guan Y, Webster RG, Perez DR. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Archives of Virology*, 2001, 146 (12) : 2275-2289.
- [13] Robertson JS, Nicolson C, Harvey R, Johnson R, Major D, Guilfoyle K, Roseby S, Newman R, Collin R, Wallis C, Engelhardt OG, Wood JM, Le JH, Manojkumar R, Pokorny BA, Silverman J, Devis R, Bucher D, Verity E, Agius C, Camuglia S, Ong C, Rockman S, Curtis A, Schoofs P, Zoueva O, Xie H, Li X, Lin ZS, Ye ZP, Chen LM, O'Neill E, Balish A, Lipatov AS, Guo Z, Isakova I, Davis CT, Rivaller P, Gustin KM, Belser JA, Maines TR, Tumpey TM, Xu XY, Katz JM, Klimov A, Cox NJ, Donis RO. The development of vaccine viruses against pandemic A (H1N1) influenza. *Vaccine*, 2011, 29 (9) : 1836-1843.
- [14] Sugiyama K, Obayashi E, Kawaguchi A, Suzuki Y, Tame JRH, Nagata K, Park SY. Structural insight into the essential PB1-PB2 subunit contact of the influenza virus RNA polymerase. *The EMBO Journal*, 2009, 28 (12) : 1803-1811.
- [15] Kilbourne ED, Murphy JS. Genetic studies of influenza viruses. I. Viral morphology and growth capacity as exchangeable genetic traits. Rapid *in ovo* adaptation of early passage Asian strain isolates by combination with PR8. *Journal of Experimental Medicine*, 1960, 111 : 387-406.
- [16] Liu T, Muller J, Ye ZP. Association of influenza virus matrix protein with ribonucleoproteins may control viral growth and morphology. *Virology*, 2002, 304 (1) : 89-96.
- [17] Subbarao EK, London W, Murphy BR. A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range. *Journal of Virology*, 1993, 67 (4) : 1761-1764.
- [18] Shinya K, Hamm S, Hatta M, Ito H, Ito T, Kawaoka Y. PB2 amino acid at position 627 affects replicative efficiency, but not cell tropism, of Hong Kong H5N1 influenza A viruses in mice. *Virology*, 2004, 320 (2) : 258-266.

# Effects of different gene segments of influenza virus on the growth of recombinants

Wenming Jiang, Meifang Yu, Jinping Li, Jianmin Yu, Suchun Wang, Guangyu Hou, Jiming Chen\*

China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao 266032, Shandong Province, China

**Abstract:** [Objective] We explored which internal genes of influenza virus that affect the titer of recombinant viruses and contribute to the high yield of Influenza A seed virus *in ovo*. [Methods] Six internal genes or mutant or polymerase complex of A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) (PR8) virus genes were replaced individually by corresponding gene of A/chicken/ZJ/China/2013 (H5N1) virus, and the hemagglutination titers of recombinant viruses were compared by HA assay. [Results] PB2 gene had the greatest influence, its replace failed to generate recombinant virus. When PB1, PA, or M gene was replaced, the titers of recombinant viruses dropped by 3.7, 3.4, 3.0 (log<sub>2</sub>), respectively. NS gene had little influence upon HA titer. When polymerase complex genes were replaced, virus titer dropped slightly to 7.6 log<sub>2</sub>, and it did not confer the same growth characteristics (8.4 log<sub>2</sub>) found when a complete polymerase complex was of PR8 origin. When amino acids of position 627 of PR8 PB2 gene were mutated to glutamic acid, virus titer rose from 8.4 log<sub>2</sub> to 8.7 log<sub>2</sub>. [Conclusion] The optimal gene combinations may facilitate replication through viral RNA and protein interaction with cellular components as well as interaction of viral RNA and protein or protein-protein interactions within the virus. These multi-factorial contributions resulted in selection of a high replication competent reassortant in embryonated chicken eggs in comparison to the respective low yield wild type viruses, and laid the foundation for high yield of influenza vaccine production.

**Keywords:** influenza virus, reverse genetics, high yield, vaccine

(本文责编: 张晓丽)

---

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31200123) and by the Science and Technology Plan of Qingdao (14-2-4-105-jch)

\* Corresponding author. Tel: +86-532-85623396; Fax: +86-532-85628464; E-mail: chenjiming@cahec.cn

Received: 1 April 2015/Revised: 13 May 2015