

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49(6): 813–819; 4 June 2009
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

H3N2 亚型猪流感病毒的拯救及 HA 与 NA 基因的替换

杜金玲, 刘明*, 刘春国, 杨涛, 李洪涛

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 兽医生物技术国家重点实验室, 农业部动物流感重点开放实验室, 哈尔滨 150001)

摘要:【目的】为研究流感病毒突破种间屏障分子机制, 筛选流感基因工程疫苗株。【方法】本试验以猪流感病毒 A/Swine/Henan/S4/01(H3N2)为亲本株, 利用反向遗传学操作技术, 采用 RT-PCR 技术对该病毒的 8 个基因片段分段进行扩增, 通过与双向转录载体 pHW2000 连接, 重组质粒转染 293T 和 MDCK 共培养细胞, 拯救出全部基因均来自于亲本株的猪流感病毒 rgH3N2, 并分别以人流感病毒 A/PR/8/34(H1N1)、禽流感病毒 A/Duck/Nanchang/4-165/2000(H4N6)、马流感病毒 A/Equine/Fuyun/2008/(H3N8)的 HA 和 NA 基因替换 A/Swine/Henan/S4/01 的相应基因。【结果】生物学试验结果表明 rgH3N2 在鸡胚半数感染量、组织培养半数感染量、稳定性试验等方面都与亲本株保持一致。rgH3N2 经鸡胚多次传代后血凝价最高可达到 1:256, 接种 MDCK 细胞 60 h 后, 血凝价可以达到 1:64。基因替换后成功拯救出的重组病毒 rgH1N1、rgH4N6 和 rgH3N8 在鸡胚和细胞上均具有较高的增殖能力。【结论】病毒的成功拯救为流感病毒突破种间屏障分子机制, HA、NA 基因在流感病毒跨种属传播中所扮演角色的研究和流感基因工程疫苗株的筛选奠定了基础。

关键词: 猪流感; 反向遗传; RT-PCR; H3N2 亚型; 病毒拯救

中图分类号: **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2009) 06-0813-07

猪流感病毒(Swine influenza virus, SIV)属正粘病毒, 能引起急性高度接触性呼吸道疾病, 是猪呼吸道综合征的原发性致病原。猪流感病毒血清亚型目前至少发现有 H1N1、H1N2、H1N7、H2N3、H3N1、H3N2、H3N6、H4N6、H5N1、H9N2 等 10 种^[1-3]。其中 H3N2 亚型流感病毒也是人流感病毒的一个主要亚型, 自 1968 年引起流感大流行后, 近年来又有再度流行的趋势, 引起世人的高度关注。一般而言, 流感病毒具有宿主特异性, 从一种动物传到另一种动物是相当困难的。但现在越来越多的迹象表明, 流感病毒突破种间屏障感染哺乳动物的能力正逐渐增强^[4]。猪的种间屏障相对较低, 是禽、猪、人流感病毒唯一的共同易感宿主, 在流感病毒跨种属障碍而感染新宿主的过程中起着重要的作用。历史上每次人流感的大流行都与猪流感密切相关^[5], 而且, 猪可

以作为人流感病毒的保存宿主, 人群中的流行株消失后, 可在猪体内保持很长时间, 在适当的条件下, 这些病毒可在人群中造成流行^[6]。由于猪流感病毒可直接感染人, 导致人们患病或死亡, 因此, 猪流感已成为备受世界瞩目的人畜共患病之一, 其在流感病毒分子流行病学及“禽-猪-人”种间传播中都有着不可替代的特殊地位和作用^[7]。

鉴于猪流感病毒作为人畜共患病在公共卫生学中的特殊地位和作用, 对其突破种间屏障感染哺乳动物的分子机制的研究已成为当前研究的热点。而 H3N2 亚型流感病毒更是人流感病毒的一个主要亚型, 对其的研究也就备受关注, 本研究利用反向遗传学操作系统, 成功拯救了 rgH3N2, 并对其 HA、NA 基因应用人源、禽源、马源流感病毒的 HA、NA 基因替换, 拯救出了重组的 rgH1N1、rgH4N6、rgH3N8。为流

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划资助项目(2006BAD06A05); 黑龙江省自然科学基金项目(ZJN0702-02)

* 通信作者。Tel: +86-451-85935069; E-mail: Liuming04@126.com

作者简介: 杜金玲(1981-), 女, 满族, 黑龙江人, 硕士研究生, 从事流感病毒分子生物学及分子疫苗的研究。E-mail: dujinling2006@163.com

收稿日期: 2009-02-05; **修回日期:** 2009-03-31

感病毒突破种间屏障分子机制, HA、NA 基因在流感病毒跨种属传播中所扮演角色的研究和流感基因工程疫苗株的筛选奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒和鸡胚株:猪流感病毒 A/Swine/Henan/S4/01(H3N2)作 1:10³ 稀释后接种 9~11 日龄的 SPF 鸡胚尿囊腔, 37℃ 培养 48 h, 4℃ 冷藏过夜, 收获尿囊液, 分装, -70℃ 保存备用。9~11 日龄 SPF 鸡胚由哈尔滨兽医研究所实验动物中心提供。人流感病毒 A/PR/8/34(H1N1)、禽流感病毒 A/Duck/Nanchang/4-165/2000(H4N6)、马流感病毒 A/Equine/Fuyun/2008(H3N8)的 HA、NA 基因的 pHW2000 重组质粒由本实验室构建并保存。

1.1.2 载体:pHW2000 转录和翻译双向载体由美国 St. Jude 儿童医院的 Webster 教授惠赠。

1.1.3 菌种:大肠杆菌 TOP10 感受态细胞由本室 -80℃ 保存。

1.1.4 细胞株:人胚胎肾细胞系 293T 细胞和 MDCK 犬肾细胞为本室常规培养。

1.1.5 主要试剂:病毒 RNA 提取试剂 Trizol 和脂质体 lipofectamine2000 转染试剂购自 Invitrogen 公司; cDNA 反转录试剂禽源反转录酶 AMV、*ExTaq* DNA 聚合酶、T4DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; DMEM 培养基、OPTI-MEM 细胞培养液均购自 GIBCO 公司; TPCK- trypsin 购自 Sigma 公司; 限制性内切酶 *Aar* I 购自 Fermentas 公司, *Bsa* I 和 *Bsm*BI 购自 NEB 公司; 胶回收试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、质粒抽提试剂盒购自 Watson Biotechnologies, Inc 公司。

1.2 引物的设计

参照已知序列设计禽流感病毒反转录通用引物 Uni-12: 5'-AGCAAAAGCAGG-3'; 在流感病毒数据库中查找最近几年 A 型流感病毒中 H3N2 亚型猪流感病毒的 PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M、NS 基因序列, 用 Bioedit 软件分别对其全序列中的酶切位点进行分析, 选取在全序列中没有或仅有一个酶切位点的 II_s 型酶作为克隆用酶。用 DNASTAR 软件包中的 MegAlign 程序分别对上述 8 个基因片段进行多序列比较, 根据基因片段本身的特点, 参照 Hoffman 等^[8] 的文章, 利用 Oligo6.0 软件设计基因片段全长扩增引物或分段扩增引物。引物由 Invitrogen 公司合成。

1.3 RNA 的提取

用 Trizol 法从含有流感病毒的鸡胚尿囊液中提

取病毒 RNA。方法参见 Trizol 说明。

1.4 反转录

以禽流感反转录通用引物 Uni-12 为引物, 采用禽源反转录酶 AMV, 将 vRNA 转录成 cDNA, 方法参见 RNA 反转录酶说明。

1.5 重组质粒的构建

PB2、PB1、PA 3 个较长的片段分段扩增, 其中 PA、PB2 基因, 得到分段扩增的两端产物后, 采用重叠 PCR 法扩增全长; PB1 基因与载体 pHW2000 采用三分子连接法进行克隆; 其余 5 个片段一次性扩增全长。

在 100 μL PCR 反应体系中依次加入制备好的 cDNA 模板 1 μL, 相应的上、下游引物 (20 μmol/L) 各 1 μL, 2.5 mmol/L dNTP 2 μL, 10 × *Ex Taq* buffer 10 μL, *Ex Taq* 聚合酶 0.5 μL, 灭菌水 85 μL。反应程序: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 54℃ 30 s, 72℃ 2 min, 30 个循环; 72℃ 10 min。

RT-PCR 扩增的基因片段应用胶回收试剂盒得到目的片段后, 分别用各自的引物所带有的限制性内切酶酶切过夜, 再经 PCR 纯化试剂盒纯化后与经 *Bsm*BI 酶切的 pHW2000 载体进行连接反应。转化 TOP10 感受态细胞, 在含氨苄青霉素的 LB 平板上筛选阳性菌落, 在 LB 培养基中扩增, 经 PCR 鉴定, 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 筛选阳性质粒。将经过鉴定为阳性的菌液, 送至上海英俊生物技术公司进行序列测定。

1.6 细胞转染、病毒的拯救及电镜观察

取对数生长期的 293T 细胞和经胰酶/EDTA 常规消化的 MDCK 细胞, 以 9:1 的比例混合铺于 6 孔的组织培养板中。待细胞生长至 80% 左右时, 取 8 个阳性质粒 (ZPB2、ZPB1、ZPA、ZHA、ZNP、ZNA、ZM、ZNS) 各 1 μg, 按文献[9]方法进行转染, 37℃, 5% CO₂ 组织培养箱中转染 6 h, 弃去质粒和脂质体混合物, 添加含 0.5 μg/mL TPCK-trypsin (Sigma 公司) 的 OPTI-MEM 细胞培养液, 培养 72 h 后收集细胞上清液。细胞上清液进行血凝活性检测, 拯救出的病毒命名为 rgH3N2。在转染 8 质粒的同时, 设不含 ZHA 质粒的 7 质粒共转染阴性对照。在电镜下进行拯救病毒粒子的观察。

1.7 病毒鸡胚扩增及血凝性试验

转染的 rgH3N2 细胞上清经 2000 × g 离心 2 min 后, 取 0.2 mL 经尿囊腔接种 9~11 日龄的 SPF 鸡胚, 37℃ 孵化 72 h, 收集尿囊液, 分装保存。采用 0.5% 的公鸡红细胞, 按常规微量法进行血凝 (HA)

试验。

1.8 拯救病毒的序列验证

收取第 2 代鸡胚尿囊液, Trizol 提取总 RNA, 用 Uni-12 反转录成 cDNA, 然后用各基因片段的特异引物进行 PCR 扩增。PCR 产物胶回收后送至上海博亚生物公司测序。用 DNASTAR 软件包中的 Seqman 软件对拯救病毒各基因片段 PCR 产物测序结果与重组质粒中病毒基因序列进行对比, 确定拯救病毒序列是否与预期一致。

1.9 病毒的稳定性试验

rgH3N2 鸡胚传 10 代后收获的病毒, 经尿囊腔接种 9~11 日龄的 SPF 鸡胚, Trizol 提取总 RNA, 用 Uni-12 反转录成 cDNA, 然后用各基因片段的特异引物进行 PCR 扩增。PCR 产物胶回收后送至上海博亚生物公司测序。用 DNASTAR 软件包中的 Seqman 软件对拯救病毒各基因片段 PCR 产物测序结果与重组质粒中病毒基因序列进行对比, 验证拯救病毒的稳定性。

1.10 拯救病毒 HA 与 NA 基因的替换

本实验室先前已成功构建了人流感病毒 A/PR/8/34 (H1N1)、禽流感病毒 A/Duck/Nanchang/4-165/2000 (H4N6)、马流感病毒 A/Equine/Fuyun/2008/(H3N8)HA、NA 基因的 pHW2000 重组质粒, 将 3 种流感病毒的 HA、NA 基因分别替换 rgH3N2 亚型猪流感病毒的 HA、NA 基因。分别救获了重组的流感病毒 rgH1N1、rgH4N6、rgH3N8。接种鸡胚, 测血凝价, 方法同 1.7。

3 种重组病毒 rgH1N1、rgH4N6、rgH3N8 在鸡胚连传 5 代, 进行病毒的稳定性试验, 方法同 1.9。

1.11 血凝抑制试验

将 HA 为 2^8 的 rgH3N2 亚型猪流感病毒、 2^{11} 的 rgH1N1 亚型人流感病毒、 2^4 的 rgH4N6 亚型禽流感病毒、 2^7 的 rgH3N8 亚型马流感病毒采用抗猪 H3N2、抗人 H1N1、抗禽 H4N6、抗马 H3N8 高免血清按常规方法进行血凝抑制 (HI) 试验。

1.12 鸡胚半数感染剂量 (EID₅₀) 和组织培养半数感染剂量 (TCID₅₀) 的测定

将猪流感病毒 A/Swine/Henan/S4/01 (H3N2)、拯救的 rgH3N2、rgH1N1、rgH4N6、rgH3N8 病毒分别用 PBS 作 $1:10^{-1}:10^0$ 稀释, 取 $1:10^3 \sim 1:10^8$ 6 个稀释度各接种 5 枚 SPF 鸡胚, 37℃ 孵化 72 h, 收集尿囊液, 测定尿囊液的血凝活性, 按 Reed-Muench 法^[10] 计算病毒的鸡胚半数感染剂量 (50% embryo infective dose, EID₅₀), 以 10 个稀释度进行 TCID₅₀ 试验, 每个稀

释度做 5 个重复, 然后按世界卫生组织 (WHO, 2004) 规定的方法计算组织细胞培养半数感染剂量 (50% tissue culture infective dose, TCID₅₀)。

1.13 病毒在 MDCK 细胞中增殖试验

使用 75 cm² 培养瓶进行 rgH3N2、H3N2 亲本毒株、rgH1N1、rgH4N6、rgH3N8 毒株在 MDCK 细胞中的增殖试验, 按文献[11]方法进行: 在其中一组加入终浓度为 5 μg/mL 的 TPCK-trypsin, 同时分别设不加胰酶的对照组。37℃, CO₂ 温箱培养。观察接毒后细胞病变情况, 在接毒 24 h 后每间隔 6 h 收细胞培养上清 0.2 mL, 5000 × g 离心 2 min, 放入 -20℃ 冰箱中保存。直至接毒后 72 h, 将冻存的上清样品融化, 做血凝试验检测各时间段细胞培养上清的血凝价。

2 结果

2.1 RT-PCR 结果

8 个基因片段的 RT-PCR 结果: PB2-1、PB2-2、PB1-1、PB1-2、PA-1、PA-2、HA、NA、NP、M、NS 分别约为 1646 bp、714 bp、1562 bp、1736 bp、607 bp、1646 bp、1.7 kb、1.4 kb、1.5 kb、1.0 kb、0.8 kb, 与预期的大小相符, 见图 1 和图 2。

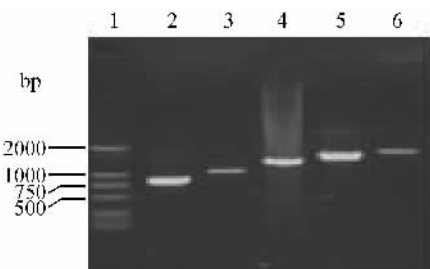


图 1 HA、NP、NA、M 和 NS 基因个片段 PCR 扩增结果

Fig.1 PCR results of the fragments of HA, NP, NA, M and NS. 1: Marker DL2000; 2: NS; 3: M; 4: NA; 5: NP; 6: HA.

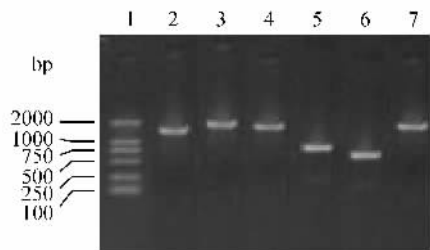


图 2 PB2、PB1 和 PA 基因各片段 PCR 扩增结果

Fig.2 PCR results of the fragments of PB2, PB1 and PA. 1: Marker DL2000; 2: PB1-1; 3: PB1-2; 4: PB2-1; 5: PB2-2; 6: PA-1; 7: PA-2.

2.2 重组阳性质粒的构建

经 PCR 鉴定、1% 琼脂糖凝胶电泳分析和测序, 筛选到含有 8 个目的基因片段的重组质粒, 见图 3。

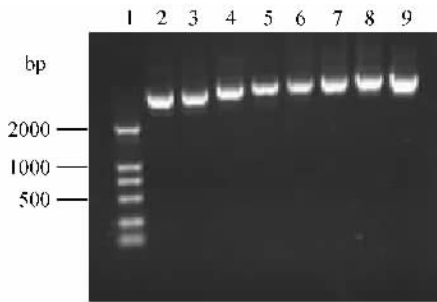


图3 rgH3N2 株 8 个目的基因的重组阳性质粒

Fig.3 Eight recombinant plasmid of rgH3N2 strain. 1: Marker DL2000; 2-9: NS; M; NA; NP; HA; PA; PB1; PB2.

2.3 重组病毒的拯救

8 个重组质粒转染 293T/MDCK 单层细胞 48 h 后细胞出现明显的细胞病变, 293T 细胞树突消失, 细胞皱缩, 聚集成团块状, MDCK 细胞出现大量崩解(图 4-A)。用 7 质粒共转染所作的阴性对照组转染后细胞无明显的形态学改变(图 4-B)。

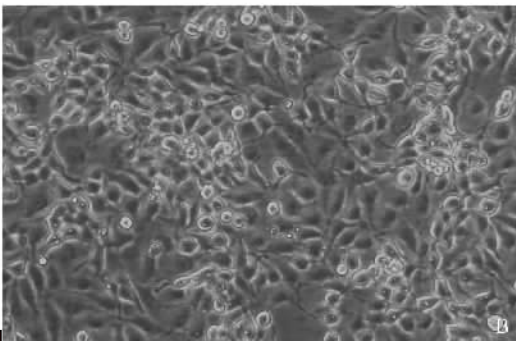
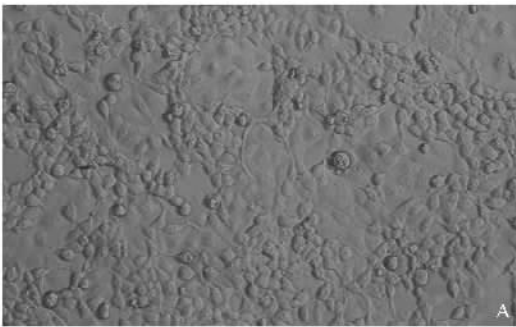


图4 阳性质粒转染 293T/MDCK 混合培养细胞前(A)、后(B)的形态

Fig.4 Microphotographs of mixed cell culture of 293T and MDCK. A: Before cell transfection; B: 48 h after cell transfection.

电镜下观察救获的猪流感病毒粒子呈圆形、椭

表 1 重组病毒的血凝抑制试验

Table 1 Hemagglutination inhibition assays of reassortment viruses

Serum	Viruses	rgH3N2	rgH1N1	rgH4N6	rgH3N8
HI	H3N2 Swine Influenza Serum	2 ¹⁰	0	0	0
	H1N1 Human Influenza Serum	0	2 ⁹	0	0
	H4N6 Avian Influenza Serum	0	0	2 ⁹	0
	H3N8 Equine Influenza Serum	0	0	0	2 ¹⁰

圆形, 少数呈不规则的形状, 可见病毒囊膜和纤突, 直径约为 60~120 nm, 具有流感病毒粒子形态特征(图 5)。

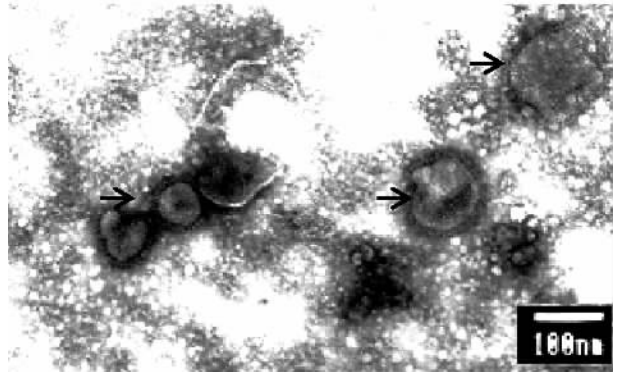


图 5 获救病毒的电镜照片

Fig.5 The electron microscope photograph of rescued viruses (bar = 100 nm).

2.4 病毒鸡胚扩增及血凝性试验

rgH3N2 拯救病毒细胞转染上清经一次鸡胚传代后, 血凝价可达到 1:16。

2.5 拯救病毒的序列验证

拯救病毒各基因的 PCR 产物测序结果与各片段的重组质粒中测序结果比较, 二者序列完全一致, 表明拯救病毒的基因组完全来源于重组质粒。

2.6 病毒的稳定性试验

第 10 代 rgH3N2 重组病毒核苷酸序列与 rgH3N2 原代病毒核苷酸序列相同, 无任何氨基酸变异, 表明该拯救株的稳定性很好。

2.7 rgH1N1、rgH4N6 和 rgH3N8 病毒的拯救

基因替换后, 成功拯救出了重组病毒 rgH1N1、rgH4N6 和 rgH3N8, 经 1 次鸡胚传代后血凝价分别可达到 1:2048、1:16、1:128。重组病毒经鸡胚连续传代后稳定性很好, 核苷酸序列无任何氨基酸变异。

2.8 血凝抑制试验结果

血凝抑制试验结果中, 重组病毒 rgH3N2、rgH1N1、rgH4N6、rgH3N8 均能被相应的高免血清完全抑制, 但不能被其它的血清抑制。试验结果如表 1 所示。

2.9 鸡胚半数感染剂量(EID_{50})的测定和组织半数感染剂量($TCID_{50}$)的测定

rgH3N2 毒株的 EID_{50} 和 $TCID_{50}$ 分别为 $10^{5.53}$ EID_{50}/mL 、 10^4 $TCID_{50}/mL$, 与亲本的 EID_{50} 、 $TCID_{50}$ 值相近, 表明拯救毒株与亲本毒株生物学特性一致。重组病毒 rgH1N1、rgH4N6 和 rgH3N8 的组织培养半数感染剂量测定结果为: $5 \times 10^{4.5}$ $TCID_{50}/mL$ 、 $5 \times 10^{5.67}$ $TCID_{50}/mL$ 、 $5 \times 10^{3.5}$ $TCID_{50}/mL$; 鸡胚半数感染量为: $5 \times 10^{4.5}$ EID_{50}/mL 、 $5 \times 10^{4.25}$ EID_{50}/mL 、 $5 \times 10^{4.63}$ EID_{50}/mL 。

2.10 病毒在 MDCK 细胞中增殖试验

在加入 $5 \mu g/mL$ TPCK- trypsin 的条件下, rgH3N2 病毒接种 MDCK 细胞后最高血凝价可达到 1:64, 与亲本病毒相同, rgH1N1、rgH4N6、rgH3N8 3 种重组病毒均具有在 MDCK 细胞上的高产特性。未加入胰酶条件下, 病毒几乎不能增殖。加有胰酶的条件下, rgH3N2、rgH1N1、rgH4N6、rgH3N8 毒株各时间段的血凝价测定结果如图 6。

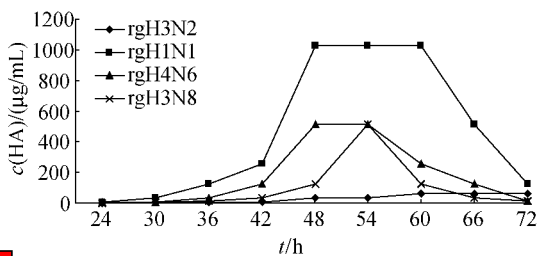


图6 接种 MDCK 细胞后不同时间病毒血凝价的比较

Fig.6 Comparison of hemagglutination unit of the virus at different time spots after infection of MDCK cell.

3 讨论

本研究利用 8 质粒流感病毒拯救系统, 成功拯救了 rgH3N2、rgH1N1、rgH4N6、rgH3N8, 所拯救病毒与亲本病毒各基因片段之间虽有个别碱基发生突变, 但氨基酸序列保持一致, 并且连续传代后稳定性良好, HI 试验各重组病毒均能被相应的高免血清完全抑制, EID_{50} 、 $TCID_{50}$ 均与亲本毒株的指标接近, 在鸡胚上都具有较高的增殖能力, 而且 rgH1N1、rgH4N6、rgH3N8 在 MDCK 细胞上具有高繁殖特性, 尤其 rgH1N1 在鸡胚上最高血凝价可达 1:2048, 在细胞上最高血凝价可达 1:1024, 为鸡胚苗和细胞苗的生产奠定了良好的基础。本试验拯救的 rgH3N2 亚

型猪流感病毒与杨涛等^[11]拯救的 rH3N2 的 HA、NA 基因相同, 转染上清血凝价分别为 1:8、1:32, 经多次鸡胚传代后血凝价最高分别达到 1:256、1:1024; 2 拯救毒株在接种 MDCK 60 h 后, 血凝价分别为 1:64、1:512, 表明流感病毒内部基因对毒株增殖特性有极大的影响作用。

猪在“禽-猪-人”的种间传播链中, 充当禽、人、猪流感病毒重组和复制的“混合器”, 扮演着流感病毒中间宿主及多重宿主的作用^[12], 1957 年亚洲流感和 1968 年香港流感都为重组病毒, 而且都经过了猪体的基因重配过程。近年来重组病毒更是不断出现, 尤其猪流感和禽流感的重组, 猪流感与人流感的重组更是频繁, 随时可能会引致流感的暴发。对此, 研究者们进行了大量的研究工作, 以求拯救出具有与母本病毒生物学特性相似且拯救效率高的病毒株。Gabriele 等^[13]采用 8 质粒系统, 将猪 H3N2 毒株 (Sw/MN) 的 HA 和 NA 取代人 H3N2 病毒 (Sw/ONT) 的 HA 和 NA, 保持人流感病毒其他 6 个片段不变, 得到的重配病毒 (Sw/ONT + MN HA/NA), 在排毒和致病性方面较供体株有所增强; 反之, 将人流感病毒的 HA 和 NA 片段置换猪流感病毒相应片段, 则重配病毒 (Sw/MN + ONT HA/NA) 排毒情况和致病性下降。流感病毒的 8 个基因片段在不同亚型的病毒中所起的作用不尽相同, 而且也并非来自于不同宿主、亚型的基因片段进行组合都能产生重组病毒, 单个基因替换后及每个基因片段中个别氨基酸突变后对重组病毒生物学特性和致病性等方面的影响还需要我们不断的研究和探索。Rudneva IA 等^[14-15]以 A/USSR/90/77 (H1N1) 的 NA 与 H3、H4 和 H13 亚型的 HA 重组人、禽和人、哺乳动物的 A 型流感病毒, 试验说明 HA、NA 基因的任意组合可能会出现 HA、NA 功能不能完全匹配, 导致形成低产的重组病毒, 其可能是自然条件下重组病毒出现的一种限制因素。Taronna R^[16]利用反向遗传学操作技术以禽 H5N1、HK486 和人 H3N2、Vic75 病毒株为亲本株进行基因组合拯救病毒, 发现当 HK486 HA、NA 基因与 HK486 的 NS、M 基因同时存在时得到重组病毒的感染能力较亲本毒株有所增强; 而 Vic 的 HA、NA 只在与 Vic 所有内部基因组合的情况下才能有效地进行复制, 表明某些基因片段间相互影响, 各基因之间随机组合存在不利于病毒复制的组合存在, 拯救不出病

毒。Hatta 等^[17]在 12 质粒系统中,将人流感病毒 A/Memphis/8/88 (H3N2) 的 HA、NA、NP、M、NS、PB2 分别更换禽流感病毒 A/Mallard/New York/6750/78 (H2N2) 基因组中相应片段,而保持禽流感病毒基因组中的其他基因片段不变。当仅替换 A/Memphis/8/88 的 HA 或 NA 片段时不能产生重组病毒;当同时替换人流感病毒的 HA 和 NA 片段时,才得以成功拯救出活病毒颗粒。可见 HA 和 NA 之间的平衡对病毒复制是极其重要的。我们对试验中拯救的 rgH3N2 的 HA、NA 基因以人源、禽源、马源流感病毒的 HA、NA 基因替换,成功救获了人流感病毒 rgH1N1、禽流感病毒 rgH4N6、马流感病毒 rgH3N8,各重组病毒无论基因序列还是生物学特性方面均与亲本毒株保持了高度的一致性,且具有高的拯救效率,这为流感病毒突破种间屏障分子机制的研究和流感基因工程疫苗株的筛选奠定了基础。更有利于加强和完善动物流感与人流感的预测系统,以便及时发现有可能引起流感大流行的病毒,防患未然。

参考文献

- [1] Olsen CW. The emergence of novel swine influenza virus in North America. *Virus Research*, 2002, 85(2): 199 – 210.
- [2] Ma W, Vincent A, Gramer M, et al. Identification of H2N3 influenza A viruses from swine in the United States. *Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America*, 2007, 104(52): 20949 – 20954.
- [3] Ma WJ, Gramer M, Rossow K, et al. Isolation and genetic characterization of new reassortant H3N1 swine influenza virus from pigs in the Midwestern United States. *Journal of Virology*, 2006, 80(10): 5092 – 5096.
- [4] Keawcharoen J, Oraveerakul Kuiken T, Fouchier R A, et al. Avian influenza H5N1 in tigers and leopards. *Emerging Infectious Disease*, 2004, 10(12): 2189 – 2191.
- [5] Brown IH, Harris PA, Alexander DJ, et al. Serological studies of influenza viruses in pigs in Great Britain 1991 – 2. *Epidemiology and Infection*, 1995, 114(3): 511 – 520.
- [6] Brown IH. The epidemiology and evolution of influenza in pigs. *Veterinary Microbiology*, 2000, 74(1 – 2): 29 – 46.
- [7] 李海燕, 辛晓光, 于康震, 等. H3N2 亚型猪流感病毒中国分离株的克隆纯化及生物学特性. *中国预防兽医学报* (*Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*), 2003, 23(6): 560 – 563.
- [8] Hoffmann E, Stech J, Guan Y, et al. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Archives Virology*, 2001, 146(12): 2275 – 2289.
- [9] 刘明, 张云, 刘春国, 等. 利用反向遗传学技术构建 H5 亚型禽流感高产疫苗株. *生物工程学报* (*Chinese Journal of Biotechnology*), 2006, 22(5): 720 – 726.
- [10] Reed LJ, Muench H. A simple method for estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Hygiene*, 1938, 27: 493 – 497.
- [11] 杨涛, 刘明, 刘春国, 等. 重组细胞高产型 H3N2 猪流感病毒株的拯救. *病毒学报* (*Chinese Journal of Virology*), 2007, 23(6): 471 – 475.
- [12] Kida H, Ito T, Yasuda J, et al. Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs. *The Journal of General Virology*, 1994, 75(9): 2183 – 2188.
- [13] Landolt GA, Karasin AI, Schutten MM, et al. Restricted infectivity of a human lineage H3N2 influenza A virus in pigs is hemagglutinin and neuraminidase gene dependent. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006, 44 (2): 297 – 301.
- [14] Rudneva IA, Kovaleva VP, Varich NL. Influenza A virus reassortants with surface glycoprotein genes of the avian parent viruses: effects of HA and NA gene combinations on virus aggregation. *Archives of Virology*, 1993, 133(3 – 4): 437 – 450.
- [15] Rudneva IA, Sklyanskaya EI, Barulina OS. Phenotypic expression of HA-NA combinations in human-avian influenza A virus reassortants. *Archives of Virology*, 1996, 141(6): 1091 – 1099.
- [16] Maines TR, Chen LM, Matsuoka Y. Lack of transmission of H5N1 avian – human reassortant influenza viruses in a ferret model. *Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America*, 2006, 103(32): 12121 – 12126.
- [17] Hatta M, Halfmann P, Wells K, et al. Human influenza A viral genes responsible for the restriction of its replication in duck intestine. *Virology*, 2002, 295(2): 250 – 255.

Rescue of H3N2 subtype swine influenza virus and substitution of Hemagglutinin, Neuraminidase

Jinling Du, Ming Liu*, Chunguo Liu, Tao Yang, Hongtao Li

(National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology/Avian Influenza Lab of Ministry of Agriculture, Harbin Veterinary Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China)

Abstract: [Objective] To study the mechanisms of trans-species transmission of influenza virus for developing novel vaccine of influenza in future. [Methods] We rescued H3N2 subtype swine influenza virus strain A/Swine/Henan/S4/01 successfully by a plasmid-base reverse genetics. Eight gene segments were synthesized by reverse transcriptase-PCR and cloned into bidirection expression vector pHW2000. We cotransfected 8 recombinant plasmids into 293T and MDCK cells and got the rescued virus rgH3N2. Then we replaced Hemagglutinin, Neuraminidase of rgH3N2 by Hemagglutinin, Neuraminidase gene from Human influenza virus, Avian influenza virus, Equine influenza virus. [Results] The rescued virus rgH3N2 and the wild type virus shared similar biological properties such as in titers of 50% embryo infective, 50% tissue culture infective dose and stability tests. The rescued virus titer in MDCK cell culture was measured by hemagglutination assay and the maximum virus titre of 1:64 hemagglutination unit was obtained after infection of MDCK cell for 60 h, The hemagglutination titre was 1:256 after several passages in embryonated eggs. With various combinations of HA, NA genes, we successfully generated high-yield reassortant viruses rgH1N1, rgH4N6 and rgH3N8 in embryonated eggs and MDCK cells. [Conclusion] The successful rescue of reassortment viruses establish the foundation for the molecular mechanism research on how the swine influenza virus breakthrough the intermediate barriers and the function of HA, NA during transmitting among species, Also it is feasible to be used for developing novel vaccine of H3N2 subtype Swine influenza in future.

Keywords: swine influenza; reverse genetics; reverse transcriptase-PCR; H3N2 subtype; virus rescue

(本文责编:张晓丽,谷志静)

Supported by the 11th Five-year Support Programs for Science and Technology Development of China (2006BAD06A05) and Natural Science Foundation of Heilongjiang (ZJN-0702-02)

* Corresponding author. Tel: +86-451-85935069; E-mail: liuming04@126.com

Received: 5 February 2009/Revised: 31 March 2009

《微生物学报》投稿方式

从2006年起,本刊采用“稿件远程处理系统”,全面试行网上投稿、网上审稿、网上查询等方式进行工作。欢迎广大作者通过登陆本刊网站进行投稿和查询。

- (1) 远程投稿:请先登陆本刊网站 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>, 点击“作者投稿”。如果您是第一次通过“远程”给本刊投稿,请先进行“注册”,注册成功后再进行投稿。如果曾在本刊网站投过稿,则可直接投稿。如果忘了用户名和密码,请联系本刊编辑部找回登录口令。
- (2) 邮寄纸样:所有来稿均需要邮寄1份纸稿和介绍信。
- (3) 稿件受理费:投稿时请随寄100元受理费,务必通过邮局汇款,切忌随信邮寄!
注:务请在汇款单上注明“第一作者姓名”和“稿件编号”。