

H1N1 亚型猪流感病毒的拯救

彭亚平, 周红波, 李春, 金梅林

华中农业大学动物医学院农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要: 利用 8 质粒拯救系统成功拯救出了猪流感病毒毒株 A/Swine/TianJin/01/2004(H1N1)(A/S/TJ/04)。将猪流感病毒 8 个基因片段经 RT-PCR 合成 cDNA 后, 分别克隆到 RNA 聚合酶 I/II 双向表达载体 PHW2000 中, 构建成 8 个重组质粒。用 8 个重组质粒共转染 COS-1 细胞, 30 h 后加入 TPCK-胰酶至终浓度 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。共转染 48 小时后收获 COS-1 细胞及其上清, 经尿囊腔接种 9 日龄 SPF 鸡胚。收获死亡鸡胚尿囊液并继续用 SPF 鸡胚传 3 代, 得到有感染性的病毒。经血凝、血凝抑制、测序分析、电镜观察等均证实了 A/S/TJ/04 猪流感病毒的成功拯救。这是目前国内首次报道拯救出 H1N1 亚型猪流感病毒, 为进一步研究猪流感病毒基因组结构与功能的关系、流感跨种传播的机制以及构建新型猪流感疫苗株奠定了基础。

关键词: 猪流感病毒, 双向表达载体, 拯救, 共转染

The Rescue of H1N1 Subtype Swine Influenza Virus

Yaping Peng, Hongbo Zhou, Chun Li, and Meilin Jin

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract: The swine influenza virus (SIV) strain A/Swine/TianJin/01/2004(H1N1) (A/S/TJ/04) was rescued successfully by an eight-plasmid rescue system. The cDNAs of SIV 8 gene segments were synthesized by RT-PCR and cloned into the RNA polymerase I/II bidirection expression vector PHW2000 independently, resulting in 8 recombinant plasmids. The 8 recombinant plasmids were cotransfected into COS-1 cell, 30 h later TPCK-trypsin was added to 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The COS-1 cell and supernatant were harvested 48 h after cotransfection and were inoculated into the allantoic cavity of 9-day-old specific-pathogen free (SPF) chicken eggs. The allantoic fluid of dead eggs was harvested and passaged 3 generations in SPF chicken eggs to get infective virus. The successful rescue of A/S/TJ/04 SIV was identified by hemagglutination assay, hemagglutination inhibition assay, sequence analysis and electron microscope observation. The successful rescue of SIV built a platform for the research of the relationship between genome structure and function of SIV, the mechanisms of trans-species transmission of influenza virus and for the generation of new SIV as vaccine.

Keywords: swine influenza virus (SIV), bidirection expression vector, rescue, cotransfection

猪流感(Swine influenza, SI)是由猪流感病毒(Swine influenza virus, SIV)引起猪的一种急性、热性和高度接触性的呼吸道传染病,其在临床上表现为

突发高热、咳嗽、呼吸困难、衰竭、迅速康复或死亡。SIV 属于正粘病毒科 A 型流感病毒属,基因组共 13.6 kb, 分为 8 个节段。这 8 个节段共编码 10 个

Received: September 28, 2007; **Accepted:** November 1, 2007

Supported by: the National "973" Program of China (No. 2005CB523003) and Chinese National 10th Five-Year Science and Technology Plan Grant (No. 2004BA519A65).

Corresponding author: Meilin Jin. Tel: +86-27-87282608; Fax: +86-27-87281795; E-mail: jml8328@126.com

国家“973”计划项目(No. 2005CB523003)和国家“十五”科技攻关项目(No. 2004BA519A65)资助。

蛋白,其中M和NS节段分别编码两种蛋白,其余6个节段都只编码一种蛋白。这8个基因节段中,HA和NA基因是猪流感病毒的两个重要基因,分别编码血凝素和神经氨酸酶,它们是猪流感病毒重要的表面蛋白,分别在病毒识别靶细胞表面受体以及穿膜、成熟病毒粒子的释放过程中具有重要作用,它们也是猪流感病毒亚型分型的依据。自从1918年美国首次报道猪流感以来,现在SI已遍布亚、非、欧、美洲等世界各地^[1]。1930年Shope从猪体中首次分离到了H1N1亚型SIV,它属于古典型H1N1病毒株。现在世界上SIV主要分为3种亚型:古典型和类禽源H1N1亚型病毒、类人源H3N2亚型病毒和由H1N1、H3N2亚型病毒重组产生的H1N2亚型病毒。猪是流感病毒重组和复制的“混合器”,而SIV不需重组就具有感染人和禽类的潜力,因而SIV在流感病毒的流行、跨种传播等方面的研究以及在公共卫生上都具有重要意义^[2]。8质粒拯救系统是一个RNA聚合酶I和RNA聚合酶II启动转录的双向系统,即RNA聚合酶I/II系统,它是完全以质粒为基础的操作系统,不需要辅助病毒,从而避免了大量的筛选工作,因此可以对病毒基因组方便地进行操作^[3]。

本研究以8质粒拯救系统成功地拯救了猪流感毒株A/S/TJ/04病毒,这是目前国内首次报道成功拯救出H1N1亚型猪流感病毒,为进一步研究猪流感病毒基因组结构与功能的关系、流感跨种传播的机制以及新型猪流感疫苗奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒、细胞、鸡胚和阳性血清

猪流感毒株A/S/TJ/04由本实验室分离并保存,经国家流感中心鉴定为H1N1亚型,其全基因序列在GenBank的登录号为:EU004440-EU004447;转染用细胞COS-1细胞用含有10%胎牛血清(FBS)的1640培养基培养;SPF鸡胚购自北京梅里亚维通实验动物技术有限公司;H1、H5、H9亚型阳性血清由本实验室制备。

1.1.2 主要试剂及质粒

RNA抽提试剂TRIzol Reagent和转染试剂Lipofectamine 2000 Reagent均购自Invitrogen公司;

AMV反转录酶购自TaKaRa公司;pTA2 vector、KOD-Plus-高保真DNA聚合酶及dNTPs等购自TOYOBO公司;无血清培养基OPTI-MEM I购自GIBCO公司;去内毒素质粒抽提试剂盒购自OMEGA公司;T4连接酶购自Fermentas公司;BsmBI和BsaI内切酶均购自NEB公司。用于病毒拯救的双向表达载体PHW2000由美国St. Jude儿童研究医院的Robert Webster博士惠赠。

1.2 引物设计

根据Hoffmann等^[4]的文献报道,按已测序列设计扩增A/S/TJ/04的8个基因片段的引物。其中在扩增M和NA基因的引物5'端引入BsaI酶切位点,在扩增其余6个基因的引物5'端引入BsmBI酶切位点。

1.3 RT-PCR和质粒的构建

按TRIzol Reagent的说明书从鸡胚尿囊液中提取病毒RNA。RNA用3'端保守区的12nt引物(5'-AGCAAAGCAGG-3')反转录(RT)成cDNA,之后用KOD-Plus-高保真酶进行PCR扩增:95°C 3 min;95°C 30 s,58°C 30 s,68°C 1 min/kb,30个循环;68°C,10 min。PCR产物经BsaI(M和NA基因)或BsmBI(其余6个基因片段)酶切后,与经过BsmBI酶切的PHW2000载体相连接,转化大肠杆菌DH5 α ,提质粒经过初步的酶切鉴定后每个基因送3~4个克隆到北京奥科生物技术有限公司测序,选取无突变的克隆用于病毒拯救。在双向表达载体PHW2000中分别插入了A/S/TJ/04的8个基因片段的cDNA,这些重组质粒分别为:PHW041-PB2,PHW042-PB1,PHW043-PA,PHW044-HA,PHW045-NP,PHW046-NA,PHW047-M,PHW048-NS,其中在HA基因的683位引入T→A同义突变(Ser: TCT→TCA)。

1.4 转染质粒和转染细胞的准备

按质粒抽提试剂盒的说明提取A/S/TJ/04猪流感的8个重组质粒,制备去内毒素的高纯度质粒,并测定其浓度和纯度以便转染。将生长状态良好的COS-1细胞消化后按约 5×10^5 个细胞/孔的密度接种6孔细胞培养板,待细胞长至80%~90%时用于转染。

1.5 8质粒的共转染

将克隆有A/S/TJ/04病毒8个基因的重组质粒(PHW041-PB2,PHW042-PB1,PHW043-PA,PHW044-HA,PHW045-NP,PHW046-NA,PHW047-M,PHW048-NS)按1:1的比例混合后共转染COS-1细胞。转染步

骤按 Lipofectamine 2000 Reagent 转染试剂操作指南的方法稍作修改后进行: 将 4 μg 8 质粒混合物 (0.5 $\mu\text{g}/\text{质粒}$) 和 8 μL Lipofectamine 转染试剂分别溶于 250 μL OPTI-MEM I 无血清培养基中, 室温静置 5 min 后相互混匀, 使之在室温结合 20 min。将 6 孔板中的细胞生长液吸弃后用无血清、无抗生素的 1640 培养液洗 3 次, 再补加 1 mL OPTI-MEM I 无血清培养基。将结合好的质粒与 Lipofectamine 的混合物 (共 500 μL) 均匀覆盖于细胞上, 37°C、5% CO_2 中培养 6 h 后吸弃转染液, 用 OPTI-MEM I 洗一次后每孔加入 1.5 mL 新鲜的 OPTI-MEM I 无血清培养基。37°C、5% CO_2 培养 24 h 后向转染孔中加 TPCK-胰酶至终浓度 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 24~48 h 后将细胞吹下并与上清一起回收。在转染 8 质粒的同时, 设不加 TPCK-胰酶的对照和不含 PHW043-PA 质粒的 7 质粒共转染阴性对照。

1.6 获救病毒的验证

1.6.1 获救病毒的鸡胚增殖及传代

将收集的转染上清以 0.4 mL/胚的量经尿囊腔接种 9 日龄 SPF 鸡胚, 35°C 温箱培养。每日观察鸡胚死亡情况, 适时收获鸡胚尿囊液, 用血凝(HA)、血凝抑制(HI)试验进行获救病毒的初步鉴定, 获救病毒称为 TJ-R。将 HA 阳性尿囊液 1:5000 稀释后用 SPF 鸡胚传 3 代, 检测每代鸡胚尿囊液的血凝价。

1.6.2 获救病毒的 RT-PCR 测序鉴定

提取获救病毒 TJ-R 的 RNA 后经 RT-PCR 扩增 HA 基因, 送北京奥科生物技术有限公司测序。同时以 NS 基因为参照, 将经 RT-PCR 的扩增产物与以未经反转录的 RNA 为模板直接进行 PCR 扩增的产物进行比较, 以排除提取的 RNA 中有转染质粒的存在而扩增出的 HA 为假阳性。将 HA 测序结果与野生毒株 A/S/TJ/04 的 HA 序列比较, 以鉴定是否在 HA 基因的 683 位存在 T→A 同义突变。

1.6.3 获救病毒的电镜观察

将含有获救病毒的尿囊液超速离心后用灭菌 PBS 重悬沉淀。重溶病毒液经过磷钨酸负染后用电镜观察。

2 结果

2.1 质粒共转染及病毒的拯救

用 8 质粒共转染上清液接种 SPF 鸡胚, 其中转

染时加有 TPCK-胰酶(0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的转染上清所接种的鸡胚(即第 1 代)死亡时间在 48 h 左右, 血凝价在 $2^8\sim 2^9$ 之间, 而没加 TPCK-胰酶的对照组鸡胚死亡时间为 72 h, 血凝价为 2^8 。分别用 H1、H5、H9 亚型阳性血清对 TJ-R 做血凝抑制试验, TJ-R 病毒可被 H1 阳性血清抑制, 血凝抑制效价达 2^{11} , 而 H5、H9 亚型阳性血清均不能抑制 TJ-R 病毒。用 7 质粒共转染所作的阴性对照鸡胚尿囊液未检测到血凝价, 其尿囊液盲传 2 代也未检测到血凝价, 从而排除了 TJ-R 的获救是由于野生毒株污染而产生的可能性。

2.2 获救病毒在鸡胚中的传代

获救病毒在 SPF 鸡胚中传至第 4 代, 检测每代鸡胚尿囊液的血凝价, 其范围在 $2^8\sim 2^9$ 之间, 这表明获救病毒 TJ-R 能在鸡胚上稳定地增殖。

2.3 获救病毒的测序鉴定

以 TJ-R 的 RNA 为模板没有扩增出 NS 目的带, 而通过 RT-PCR 则有 NS 目的带(图 1), 从而排除了提取的 RNA 中有转染质粒的存在, 进而表明 RT-PCR 的产物是由病毒 RNA 而来而非残余的转染质粒。通过 RT-PCR 扩增获救病毒 HA 基因送去测序, 与野生毒株 A/S/TJ/04 的 HA 序列比较, TJ-R 的 HA 在 683 位存在 T→A 同义突变, 这表明 TJ-R 确实是由转染质粒拯救出的 A/S/TJ/04 病毒。

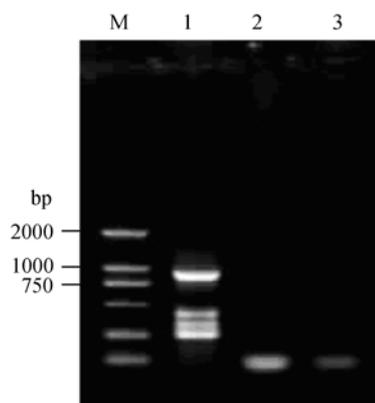


图 1 NS 基因(890 bp)PCR 产物电泳图

Fig. 1 The PCR product of NS gene(890 bp)

1: cDNA as template; 2: RNA as template; 3: negative control; M: DNA marker

2.4 获救病毒的电镜观察

TJ-R 的电镜结果显示, 病毒粒子大多呈球状, 少数呈不规则的形状。病毒粒子大小约为 80~120 nm, 可清楚地看到病毒囊膜表面的纤突。这些特征都与典型的 A 型流感病毒一致(图 2)。

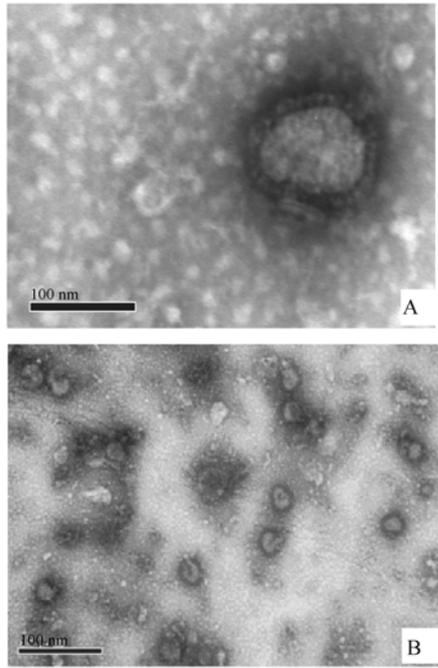


图 2 获救病毒的电镜照片

Fig. 2 The electron microscope photograph of rescued viruses
A: 440 000 ×; B: 290 000 ×

3 讨论

反向遗传学技术作为近年来发展起来的一项新型技术,它是在 cDNA 水平上对 RNA 病毒进行操作,从克隆的 cDNA 产生感染性 RNA 病毒的过程,从而为病毒的功能基因组研究提供了强有力的手段。流感病毒的反向遗传学技术经过多年的发展,Neumann^[5]和 Hoffmann 等^[3]分别建立了流感的 17 质粒和 8 质粒拯救系统,这极大地促进了流感病毒基因功能和疫苗开发等领域的深入研究,是流感病毒反向遗传操作技术发展史上的一次转折。本研究是采用 Hoffmann 等的 8 质粒系统来拯救猪流感病毒。8 质粒系统即双向 RNA 聚合酶 I/II 转录系统,它是将流感病毒各节段的 cDNA 分别反向插入到聚合酶 I(po1I)启动子和终止序列之间,而此 po1I 转录单位又是反向插在聚合酶 II(po1II)表达框的启动子和多聚腺嘌呤化信号之间,这样从同一个 cDNA 模板既可以由 po1I 转录出病毒 RNA (vRNA),也可由 po1II 转录出表达病毒蛋白的 mRNA^[3]。这样通过构建最少的 8 个重组质粒就可拯救出病毒,因而极大地提高了拯救效率。通过此方法,国外已能高效地拯救 A 型、B 型流感病毒,而在国内龙学进等^[6]已建

立了 H5N1 亚型禽流感病毒拯救体系,石火英等^[7]也成功拯救出了 H9N2 亚型禽流感病毒。

本研究中采用 COS-1 细胞作为转染细胞,能够高效地拯救出病毒。在实验中我们设置了转染时不加胰酶的对照,虽然最终接种的 SPF 鸡胚尿囊液血凝价与加有胰酶的实验组相差无几,但其 SPF 鸡胚死亡时间则要推迟约 24 h。这表明在转染 30 h 后加入胰酶有利于提高病毒的拯救效率,这可能是由于胰酶的加入促进了 HA 的前体 HA₀水解切割成 HA₁和 HA₂,从而使获救的病毒能更易感染细胞而增殖。猪流感病毒(SIV)HA 序列上受体结合位点具有与禽流感病毒(AIV)和人流感病毒受体相同的结合特异性,这决定了 SIV 不仅可感染猪,同时也具有感染禽、人、马等鸟类和其他哺乳动物的能力。而猪可被 AIV 和人流感病毒感染,是流感病毒基因重组或重配的“混合器”和流感病毒新流行毒株产生的“孵育器”,因而猪是流感病毒“禽-哺乳动物”种间传播链中重要的中间宿主。SIV 及猪的这些特征决定了它们在流感病毒种间传播中具有不可替代的地位^[2,8,9]。我国猪流感的血清学和病原学调查结果都表明,在我国横跨南北的多个省市都有严重的猪流感流行,其主要亚型是 H1N1 和 H3N2^[10]。在单独感染的情况下 SIV 很少引起死亡,所以在国内并没有引起足够的重视。但近年来猪流感越来越朝着多病原混合感染的方向发展,当 SIV 与蓝耳病病毒、胸膜肺炎放线杆菌、肺炎支原体等混合感染时,其危害性会显著增加,死亡率显著增高^[11,12]。SIV 与其他病原体共感染或继发感染常常给猪场造成重大的经济损失,而近年来我国 SIV 的阳性检测率却越来越高,因而当务之急是研制有效的猪流感疫苗。目前使用的 SIV 疫苗主要是灭活苗,但减毒活疫苗对宿主能够提供更持久的保护,而且能够诱导局部和全身性的综合性抗体以及细胞免疫。流感反向遗传学质粒拯救技术能在体外对流感基因组方便地进行操作,可以通过引入突变而产生致弱毒株,研制出安全性更好的弱毒疫苗。在国外, Alicia Solo'rzano 等^[13]利用 8 质粒系统成功拯救出了 H3N2 亚型猪流感病毒,并且构建了一系列 NS1 基因的突变株,而在国内还未见有成功拯救出猪流感病毒报道。本研究利用 Hoffmann 等的 8 质粒拯救系统成功地拯

救出了 SIV 毒株猪流感病毒 A/S/TJ/04, 并通过血凝、血凝抑制试验、测序鉴定和电镜观察得到确证。这是目前国内首次报道拯救出猪流感病毒, 为研制新型猪流感疫苗、发展病毒载体、研究猪流感病毒基因组结构与功能的关系和阐明流感病毒跨种传播分子机制等方面奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, *et al.* Disease of swine (8th ed). Ames, Iowa, USA: Iown State Press, 1999: 277-290.
- [2] Scholtissek C. Pigs as the "mixing vessel" for the creation of new pandemic influenza A viruses. *Med Princ Pract*, 1990, (2): 65-71.
- [3] Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, *et al.* A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 6108-6113.
- [4] 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**: 2275-2289.
- [5] Neumann G, Watanabe T, Ito H. Generation of influenza A virus entirely from cloned cDNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 9345-9350.
- [6] Long JX, Wu YT, Zhong XR, *et al.* Establishment of reverse genetics system for H5N1 subtype AI. *Acta Microbiologica Sini*, 2006, **46**(1): 55-59.
龙进学, 吴艳涛, 张小荣, 等. H5N1 亚型禽流感病毒拯救体系的建立. *微生物学报*, 2006, **46**(1): 55-59.
- [7] Shi HY, Lu JH, Chen SJ, *et al.* Generation of A/Chicken/Shanghai/F/98(H9N2)Avian influenza virus from eight plasmids. *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, **45**(3): 373-376.
石火英, 卢建红, 陈素娟, 等. 利用 8 质粒系统拯救 A/Chicken/Shanghai/F/98(H9N2)株禽流感病毒. *微生物学报*, 2005, **45**(3): 373-376.
- [8] Reid A H, Fanning T G, Hultin J V, *et al.* Origin and evolution of the 1918 "Spanish" influenza A virus hemagglutinin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 1651-1656.
- [9] Ito T, Kawaoka Y, Vines A, *et al.* Continued circulation of reassortant H1N2 influenza viruses in pigs in Japan. *Arch Virol*, 1998, **143**: 1773-1782.
- [10] Li HY, Yu KZ, Xin XG, *et al.* Serological studies versus isolation and identification of swine influenza virus in different regions in China. *Progress in Veterinary Medicine*, 2003, **24**(3): 67-72.
李海燕, 于康震, 辛晓光, 等. 部分省市猪群猪流感的血清学调查及猪流感病毒的分离与鉴定. *动物医学进展*, 2003, **24**(3): 67-72.
- [11] Gu XG, Yu GQ, Zhu JX, *et al.* Diagnosis of mixed infection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and swine influenza virus. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2002, **24**(6): 64-66.
顾小根, 俞国乔, 朱家新, 等. 猪繁殖与呼吸综合征和猪流感混合感染的诊断. *中国预防兽医学报*, 2002, **24**(6): 64-66.
- [12] Thacker EL, Thacker BJ, Janke BH, *et al.* Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and swine influenza virus. *J Clin Microbiol*, 2001, **39**(7): 2525-2530.
- [13] Alicia S, Richard JW, Kelly ML, *et al.* Mutations in the NS1 protein of swine influenza virus impair anti-interferon activity and confer attenuation in pigs. *J Virol*, 2005, **79**: 7535-7543.



第 14 届关于植物铁营养和相互作用国际会议暨

2008 年 HarvestPlus · China 年会

铁营养不仅对植物而且对动物及人类是必需的。植物铁营养缺乏或不足将导致失绿症的发生, 影响植物正常生长发育, 易引发病害, 导致作物收成降低。研究植物铁营养及相互作用有着十分重要的意义。2008 年 10 月将在北京举行第 14 届关于植物铁营养和相互作用国际会议暨 HarvestPlus·China 年会, 本次国际学术研讨会将有 8 个方面的议题: 1、环境(陆地土壤、荒地沉积物、海洋)中的铁化学与植物微生物在根际中的相互作用; 2、铁缺失与毒性的相关性分析; 3、植物中铁的吸收和调节; 4、铁的易位(Translocation)、分布和调节; 5、植物中铁的代谢和蛋白质组学; 6、铁与其他成分相互作用及植物除污(Phytoremediation); 7、铁的生物强化(Biofortification)与人类健康; 8、HarvestPlus · China 项目年会。这次学术研讨会由中科院遗传与发育生物学研究所、中国农业科学院作物研究所、中国农业大学、首都师范大学以及 HarvestPlus · China 项目组年会联合举办。

注: HarvestPlus · China (中国生物强化项目)是国际 HarvestPlus 项目(主席 Dr. Howarth Bouis)的分支, 于 2004 年 3 月成立, 主要探讨“中国生物强化”等事宜。生物强化项目于同年 5 月正式启动, 每年召开一次年会, 交流研究成果和下一步打算。中国生物强化项目负责人为范云六院士等, 办公室设在中国农业科学院内, 还设有国内外 10 位专家组成的顾问委员会, 主席为陈春明教授。详情可参考 2007 年 2 月 26 日《光明日报》。

(柯为)