

# H5N1 亚型高致病性禽流感病毒 A/goose/Guangdong/1/96 株反向基因操作系统的建立

李泽君<sup>1</sup>, 焦培荣<sup>1</sup>, 于康震<sup>2</sup>, 陈化兰<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所/农业部动物流感重点实验室和兽医生物技术国家重点实验室, 哈尔滨 150001;

<sup>2</sup> 农业部畜牧兽医总站, 北京 100026)

**摘要:** A/goose/Guangdong/1/96 (GSGD/1/96) 是中国分离的第 1 株 H5N1 亚型禽流感病毒, 它不仅是 97 香港感染并致人死亡的 H5N1 亚型流感病毒 HA 基因供体株, 而且是中国目前已报到的 H5 亚型流感病毒分离株的共同祖先。本研究建立了该病毒的 8 质粒反向基因操作系统, 并通过细胞转染成功拯救了该病毒 (R-GSGD/1/96)。R-GSGD/1/96 在对 SPF 鸡和 Balb/c 小鼠的致病性方面保持了与亲本野毒 (W-GSGD/1/96) 一致的生物学特性, 即对鸡都是高致病性毒株, R-GSGD/1/96 与 W-GSGD/1/96 的静脉致病指数分别为 2.01 和 2.10; 救获病毒与野生病毒一样, 尽管  $10^6$ EID<sub>50</sub> 经鼻腔感染小鼠后 1~2 d 内能从肺脏检测到低滴度的病毒, 但不能在小鼠体内成功复制。GSGD/1/96 反向基因操作系统的成功建立为进一步开展中国高致病性禽流感病毒分离株的生物学特性、遗传衍化及结构与其功能关系研究奠定了基础。

**关键词:** 禽流感病毒; H5N1; 反向基因操作

## Establishment of Reverse Genetics System of Highly Pathogenic H5N1 Avian Influenza Virus A/goose/Guangdong/1/96

LI Ze-jun<sup>1</sup>, JIAO Pei-rong<sup>1</sup>, YU Kang-zhen<sup>2</sup>, CHEN Hua-lan<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> *Animal Influenza Laboratory of the Ministry of Agriculture and National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Harbin 150001;*

<sup>2</sup> *National Animal Husbandry and Veterinary Service of the Ministry of Agriculture, Beijing 100026)*

**Abstract:** A/goose/Guangdong/1/96(GSGD/1/96) is the first highly pathogenic H5N1 avian influenza virus isolated from the mainland of China. It is the HA gene donor of the Hong Kong 97 H5N1 viruses and the ancestor of current H5N1 viruses circulating in the mainland of China. In the present study, the authors have established an eight-plasmid reverse genetics system and rescued GSGD/1/96 (R-GSGD/1/96) through cell transfection. Animal studies confirmed that the rescued virus maintained the biological properties of the wild type GSGD/1/96 virus (W-GSGD/1/96). Both R-GSGD/1/96 virus and W-GSGD/1/96 are highly pathogenic for chickens with intravenous pathogenicity index (IVPI) of 2.01 and 2.10, respectively. The viruses could not replicate in mice, though lower titer viruses could be recovered from the lungs of few mice 1-2 days after inoculated intranasally with  $10^6$ EID<sub>50</sub> of the viruses. The successfully establishment of the reverse genetics system of GSGD/1/96 will enable us to conduct extensive studies of the molecular basis of the evolution of H5N1 avian influenza viruses.

**Key words:** Avian influenza virus; H5N1; Reverse genetics system

收稿日期: 2004-09-08

基金项目: 国家重点基础研究规划“973”项目 (G1999011902, G1999011905) 和国家自然科学基金资助项目 (C020306-30440008)

作者简介: 李泽君 (1974-), 男, 内蒙古卓资人, 博士, 主要从事动物流感病毒致病性分子基础研究。Tel: 0451-82725786-304; E-mail: lizejun1230045@sina.com。陈化兰为通讯作者, Tel: 0451-82725786-304; Fax: 0451-82761925; E-mail: hlchen1@yahoo.com

禽流感病毒属于正粘病毒科流感病毒属 A 型流感病毒, 1878 年意大利首次报道爆发禽流感至今已有 120 多年的历史。到目前该病在世界各地广泛存在, 给养禽业带来巨大损失, 特别是高致病性禽流感虽然只包括 H5 和 H7 两个亚型中的部分病毒, 但其对养禽业的危害却是毁灭性的。更值得注意的是近年来高致病性禽流感病毒感染人并致人死亡事件不断发生, 1997 香港 H5N1 亚型禽流感病毒感染 18 人, 其中 6 人死亡。2003 年香港 H5N1 亚型禽流感病毒感染 2 人, 1 人死亡; 荷兰 H7N7 亚型禽流感病毒感染 84 人, 1 人死亡。2004 年泰国 H5N1 亚型禽流感病毒感染 11 人, 7 人死亡, 越南 H5N1 亚型禽流感病毒感染 22 人, 15 人死亡。由此可见, 一旦感染高致病性禽流感, 感染者病死率极高, 而高致病性禽流感又在逐渐地获得感染人的能力, 人类正面临着流感大爆发的威胁<sup>[3]</sup>。

中国大陆于 1996 年分离到了第一株 H5N1 亚型高致病性禽流感病毒 Goose/Guangdong/1/96<sup>[4]</sup>, 而且随着时间的推移该病毒不断与其它一些流行毒株发生内部基因片段的交换产生新的 H5N1 亚型重组病毒, 这些重组病毒在中国大陆健康家鸭中广泛存在, 并且逐渐获得了感染哺乳动物的能力<sup>[3]</sup>。序列比较发现, 1999 年到 2002 年间鸭体分离株与 Goose/Guangdong/1/96 的一些基因同源性很高, Goose/Guangdong/1/96 是已报道的所有 H5N1 亚型禽流感病毒中国大陆分离株的共同祖先<sup>[2]</sup>, 非常适合作为研究中国高致病性禽流感病毒变异机制及对禽致病性和对哺乳动物感染性分子基础的病毒模型。1997 年陈化兰博士将 Goose/Guangdong/1/96 病毒的 HA 全基因进行了克隆测序<sup>[5,6]</sup>。然而在引入反向基因操作系统之前, 该病毒生物学特性与其基因之间的关系及基因与其表达产物结构和功能关系的研究只能处于一种推测阶段或体外试验阶段, 缺乏一套代表 H5N1 亚型中国大陆分离株的反向基因操作系统严重的阻滞了对中国该亚型病毒的进一步研究<sup>[7,8]</sup>。本研究的目的在于构建 H5N1 亚型禽流感病毒 A/goose/Guangdong/1/96 株的反向基因操作系统。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒与纯化

病毒株 Goose/Guangdong/1/96 由哈尔滨兽医研究所动物流感中心保存。将保存毒株按有限稀释法于 10 日龄 SPF 鸡胚中纯化 3 代后, 增殖, 分装, -70℃ 保存备用。

### 1.2 引物

根据 GenBank 中 Goose/Guangdong/1/96 各个片段的序列设计, 每对引物都包含上游 12 bp 和下游 13 bp 保守序列。

### 1.3 病毒全基因组克隆与序列测定

1.3.1 载体与处理 pBD 双向表达载体是将 pPoll-SapI-ribozyme<sup>[9]</sup>质粒用 Xba I 酶切后, 将聚合酶 I 启动子、Sap I 酶切位点及核酶形成的结构框插入到 pCI 载体 (Promega, Madison, WI) 的 Xba I 位点, 使得 pBD 质粒上各个构件的顺序依次为 PolII (CMV)-ribozyme-SapI-PolI-SV40 多聚 A 信号, 其中 Sap I 位点被用来插入流感病毒 cDNA。Sap I 酶和 Kleonw 大片段购自 NEB 公司, dGTP 和 dATP 购于宝生物工程有限公司, 胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司。pBD 载体分别用 Sap I 酶和 Kleonw 大片段处理, 回收, 备用。

1.3.2 病毒 RNA 提取与反转录 PCR RNA 提取试剂 Trizol, 鼠源反转录酶 (MLV) 试剂盒, RNaseOUT 和 Pfx 高保真 DNA 聚合酶均购自 Invitrogen 公司。病毒 RNA 提取与反转录 PCR 均按试剂盒说明进行。

1.3.3 连接、转化与阳性菌鉴定 T4 DNA 聚合酶与 T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司, dCTP 和 dTTP 购于宝生物工程有限公司, 鉴定用 Taq 酶和 dNTP 购于宝生物工程有限公司。将 8 个基因片段的 PCR 产物在 dCTP 和 dTTP 存在下用 T4 DNA 聚合酶处理后, 分别与处理好的 PBD 载体按 4 : 1~6 : 1 的比例, 16℃ 下, T4 DNA 连接酶作用数小时, 然后按常规方法转化 Jm109 感受态大肠杆菌, 挑取阳性菌, 提取质粒, PCR 鉴定。

1.3.4 阳性质粒的序列测定 测序引物由禽流感国家参考实验室提供; CEQ<sup>TM</sup> DTCS Quick Start Kit 购自 BECKMAN 公司, 按试剂盒说明反应后, 在 CEQ 8000 DNA 序列仪上测定序列, 利用 CEQ8000 测序软件进行分析。

### 1.4 病毒拯救

1.4.1 转染质粒的准备 序列正确无误的质粒转化 Jm109 大肠杆菌感受态细胞, 用 Eppendorf 公司生产的 Perfectprep Plasmid Mini 试剂盒提取质粒, 紫外分光光度仪定量。

1.4.2 细胞的准备 转染前 1 d, 将 293T 细胞传到 6 孔板上, 使每孔细胞数达到  $2 \times 10^5 \sim 10 \times 10^5$ , 当细胞密度达到 90% 以上时即可进行转染。

1.4.3 转染 转染试剂盒 lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司, 将含病毒各基因片段的 8 个重组质粒按参考文献[10]的方法共转染 293T 细胞, 进行病毒拯救, 救获病毒经 10 日龄 SPF 鸡胚尿囊腔繁殖, 分装,  $-70^{\circ}\text{C}$  保存。

1.4.4 救获病毒的鉴定 提取救获病毒的 RNA, 经 RT-PCR 分别扩增病毒基因组的 8 个片段, 胶回收后测序, 用 DNA Star 软件比较病毒的序列与预期序列是否一致。

## 1.5 动物实验

1.5.1 实验动物 10 日龄 SPF 鸡胚和 6 周龄 SPF 鸡购自中国农业科学院哈尔滨兽医研究所实验动物中心 SPF 实验动物室; 6 周龄 SPF Balb/c 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司。动物实验均在生物安全三级实验室进行。

1.5.2 对鸡的致病性试验 将救获病毒与其亲本野毒 Goose/Guangdong/1/96 分离株的病毒尿囊液用 PBS 稀释 10 倍, 翅静脉接种 6 周龄 SPF 鸡, 0.1ml/只, 连续观察 10 d, 记录发病和死亡情况, 计算平均死亡时间、静脉致病指数(IVPI), 并于攻毒后第 3 天采集喉拭子与泄殖腔拭子进行病毒滴定。

1.5.3 对 SPF Balb/c 小鼠的致病性试验 测定含救获病毒与亲本野毒 Goose/Guangdong/1/96 尿囊液的鸡胚半数感染量 ( $\text{EID}_{50}$ ), 将其分别稀释到  $10^6\text{EID}_{50}$  病毒/50  $\mu\text{l}$ , 置于冰水混合物上。用干冰轻度麻醉 6 周龄

SPF Balb/c 小鼠, 每只小鼠经鼻腔滴注 50  $\mu\text{l}$  病毒稀释液, 攻毒后两周内每日称量体重, 1~6 d, 每日剖杀 3 只小鼠, 取血液、脑、肺脏、脾脏和肾脏用于病毒分离滴定。

## 2 结果与分析

2.1 将 Goose/Guangdong/1/96 纯化后, 从含病毒的尿囊液中提取病毒 RNA, 用 8 对特异引物进行 RT-PCR, 扩增到病毒基因组中全部 8 个基因的完整序列, 将这 8 个片段克隆到 pBD 载体上, PCR 鉴定为阳性的测定其序列, 获得与每一基因相对应而且克隆位点和序列完全正确的 8 个重组质粒。

2.2 8 种质粒共转染 293T 细胞后 72 h, 将转染细胞培养液经尿囊腔接种 10 日龄 SPF 鸡胚。接种 48 h, 死亡两枚鸡胚, 其尿囊液的血凝价均为  $2^6$ , 其余未死亡鸡胚尿囊液均无血凝活性。将有血凝活性的尿囊液稀释  $10^5$  倍, 接种 10 日龄 SPF 鸡胚, 48 h 收获尿囊液提取 RNA, 经 RT-PCR 扩增, 回收测序, 与 PBD 重组质粒上的序列比较, 无任何核苷酸的变化, 救获病毒的 RNA 完全来源于 8 质粒系统。

2.3 含救获病毒 (R-GSGD/1/96) 与亲本野毒 (W-GSGD/1/96) 尿囊液稀释 10 倍, 经翅静脉接种 6 周龄 SPF 鸡, 平均死亡时间为 5.1 和 5.5 d, 静脉致病指数 (IVPI) 为 2.01 和 2.10, 攻毒后第 3 天均可从部分鸡的喉拭子和泄殖腔拭子中分离到毒 (表 1)。

表 1 GSGD/1/96 及其救获病毒对 SPF 鸡的致病性比较

Table 1 Comparison of the pathogenicity in SPF chickens of GSGD/1/96 and rescued virus

毒株 Virus	静脉致病指数 Intravenous pathogenicity index	死亡率(死亡数/总数) Mortality (death/total)	平均死亡时间 Mean mortal time (d)	拭子病毒分离情况 (排毒/总数) Results of virus isolated from swabs (shedding/total)	
				喉 Oropharyngeal	泄殖腔 Cloacal
				RGD	2.01
WGD	2.10	9/10	5.5	2/10	8/10

2.4 R-GSGD/1/96 与 W-GSGD/1/96 的  $\text{EID}_{50}$  分别为  $10^{7.17}$  和  $10^{7.5}$ , 稀释后,  $10^6\text{EID}_{50}$  病毒鼻腔感染 6 周龄 SPF Balb/c 小鼠, R-GSGD/1/96 与 W-GSGD/1/96 攻毒小鼠的体重都保持持续增长, 二者的增长趋势与对照组一致, 小鼠体重变化见图。攻毒后第 1 天和第 2 天救获病毒 R-GSGD/1/96 与 W-GSGD/1/96 感染小鼠的肺组织中都分到病毒, 但病毒滴度非常低, 只能在未经稀释的原液中分离到病毒, 而其他脏器 (包括脑、脾、肾) 中均分离不到病毒; 第 3 天后, 小鼠体内的病毒逐渐被清除干净, 所有脏器都未分离到病毒, 病

毒分离情况见表 2。

## 3 讨论

虽然上个世纪 90 年代, Neumann 等已报道了用 17 质粒系统拯救出 A 型禽流感病毒, 但到目前为止还没有拯救出中国大陆分离株的报道。本试验将 Goose/Guangdong/1/96 基因组 8 个片段分别完整地克隆到 pBD 载体上, 共转染 293T 细胞后成功拯救出该病毒 (R-GSGD/1/96), 经 RT-PCR 鉴定, 救获病毒的 cDNA 与克隆到 PBD 载体上的相应序列完全一致, 说

表 2 接种 W-GSGD/1/96 和 R-GSGD/1/96 后不同天数小鼠各脏器病毒分离情况比较

Table 2 Results of virus isolated from the mice infected by W-GSGD/1/96 and R-GSGD/1/96 in different days after infection

毒株 Virus	第 1 天 1st day				第 2 天 2nd day				第 3~5 天 3rd-5th days			
	肺 Lung	脑 Brain	脾 Spleen	肾 Kidney	肺 Lung	脑 Brain	脾 Spleen	肾 Kidney	肺 Lung	脑 Brain	脾 Spleen	肾 Kidney
R-GSGD/1/96	2/3	0/3	0/3	0/3	2/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
W-GSGD/1/96	3/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

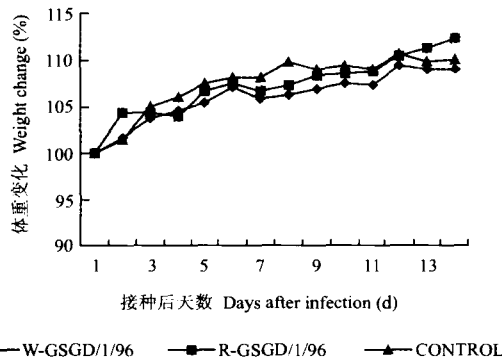


图 小鼠体重变化  
Fig. Weight changes of mice

明救获病毒的基因组 8 个片段均来源于重组质粒。

含 R-GSGD/1/96 与 W-GSGD/1/96 尿囊液稀释 10 倍, 经翅静脉接种 6 周龄 SPF 鸡后第 3 天, 从喉拭子和泄殖腔拭子均可分离到病毒, 两病毒株都可引起部分感染鸡只通过呼吸道和消化道排毒。本试验中救获病毒与亲本野毒静脉接种 SPF 鸡后 10d 内致死 90% 的鸡只, 根据 OIE 规定, 静脉接种后 10d 内导致 75% 以上感染鸡只死亡的禽流感病毒为高致病力毒株, 因此均为高致病力毒株。R-GSGD/1/96 与 W-GSGD/1/96 静脉致病指数分别为 2.01 和 2.10, 而且 HA 基因的碱性裂解位点均为 6 个连续的碱性氨基酸(-RRRKKR-), 按欧盟国家的判定标准亦均为高致病力毒株。

R-GSGD/1/96 与 W-GSGD/1/96 接种 Balb/c 小鼠后, 小鼠体重持续增长, 与对照组体重增长曲线近乎平行, 而且没有任何发病症状。攻毒后只在第 1、2 天内可从部分小鼠肺内分离到低滴度禽流感病毒, 病毒滴度呈下降趋势, 第 3 天后所有脏器都未分离到病毒。陈化兰等报道可感染小鼠的毒株经鼻腔接种后, 肺内病毒滴度呈逐渐上升趋势, 第 3 天病毒含量均在  $10^{1.4}EID_{50}/ml$  以上<sup>[2]</sup>。所以笔者认为 R-GSGD/1/96 与 W-GSGD/1/96 一样在小鼠肺内不能复制, 之所以二者接种后第 1、2 天可从肺脏中分离到, 可能是高滴度病毒经鼻腔进入肺脏后, 在短时间内尚未清除干净。这些表明救获病毒与亲本野毒对哺乳动物模型的致病力

方面是一致的, 二者均不感染 Balb/c 小鼠<sup>[2]</sup>。

Goose/Guangdong/1/96 不仅是中国大陆 H5N1 亚型禽流感病毒分离株的共同祖先, 而且某些基因与 2004 年亚洲禽流感病毒在进化树上亲缘关系很近。笔者已建立的 Goose/Guangdong/1/96 反向基因操作系统为分子水平上研究该亚型病毒打下了坚实的基础。研究发现, 虽然某些分离株所有基因核苷酸序列与 Goose/Guangdong/1/96 同源性均很高, 但对小鼠的致病性却有明显差别, 其中一些毒株可感染并杀死小鼠<sup>[2]</sup>, 可以利用建立的这一系统, 通过基因替换及定点突变, 来揭示禽流感病毒跨越禽-哺乳动物种间屏障的遗传变异机制。此外, 在该系统的基础上还可进一步对病毒 cDNA 进行人为改造, 开发更适合用于疫苗生产的毒株; 对生物学特性不同毒株进行基因替换, 获得重组病毒来研究引起生物学特性差异的分子基础, 进而研究流感病毒各蛋白的结构与功能的关系; 在 cDNA 片段中插入一段非流感基因, 救获病毒可作为载体, 用于某些疾病(如肿瘤或艾滋病)的预防和治疗。

## 4 结论

构建了 GSGD/1/96 全部 8 个基因的双向表达质粒, 将 8 质粒共转染 293T 细胞后拯救了该病毒(R-GSGD/1/96), 救获病毒保持了与亲本野毒(W-GSGD/1/96)一致的生物学特性, 表明已成功建立了 GSGD/1/96 的 8 质粒反向基因操作系统。该系统的建立为进一步开展我国高致病性禽流感病毒分离株的生物学特性、遗传衍化及结构与其功能关系研究奠定了基础。

## References

[1] Xu X Y, Subbarao K, Cox N J, Guo Y J. Genetic Characterization of the Pathogenic Influenza A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) Virus: Similarity of Its Hemagglutinin Gene to Those of H5N1 Viruses from the 1997 Outbreaks in Hong Kong. *Virology*, 1999, 261(1): 15-19.

[2] Chen H, Deng G, Li Z, Tian G, Li Y, Jiao P, Zhang L, Liu Z, Webster

