

H9N2 禽流感病毒反向遗传系统转录/表达载体的构建和验证*

卢建红, 邵卫星, 龙进学, 刘玉良, 石火英, 刘秀梵**

(扬州大学 农业部畜禽传染病学重点开放实验室, 江苏扬州 225009)

Construction and Confirmation of Plasmids Transcribing and Expressing Genes

from Avian Influenza Virus H9N2 Subtype

LU Jian-hong, SHAO Wei-xing, LONG Jin-xue, LIU Yu-liang, SHI Huo-ying, LIU Xiu-fan**

(Animal Infectious Disease Laboratory, School of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: Eight full-length cDNAs of H9N2 Avian influenza virus (AIV) genes were amplified and separately cloned into the transcription/expression vector, pHW2000. A total of three genetic tags of silent mutations were introduced into PB2, PB1 and NA genes, respectively. Six 3+5 reassortants were generated by reverse genetics, each containing three genes, HA, NA and any one of the internal genes, from the H9N2 virus, and the remaining five internal genes from A/WSN/33. Thereby, the six transfectants were all designed as H9N2 subtypes. The results showed that influenza A virus could obtain one or more gene segments from another virus which was remotely related, and suggested that the surface genes and a single internal gene were not enough to exhibit host range restriction for the H9N2 virus on COS-1 mammalian cells. The results also showed that each of the eight constructs worked efficiently. This reverse genetics system would be a useful tool for further studies on the structure and function of H9N2 influenza virus genes, and the relationship between AIV and its hosts.

Key words: Avian influenza virus; H9N2 subtype; Reverse genetics; Reassortment

摘要:设计带有 *BsmBI*、*BsaI* 或 *AarI* 酶切位点的引物,用 RT-PCR 扩增 H9N2 亚型禽流感病毒(AIV)的 8 个基因全长片段,克隆入双向转录/表达载体 pHW2000,并在 PB2、PB1 和 NA 基因中共引入了 3 个沉默突变标签。将其 2 个表面基因(HA 和 NA 基因)加上任意 1 个内部基因,而其它 5 个内部基因来自 A/WSN/33,进行了 6 种 3+5 组合形式的基因重排,把相应组合的转录/表达质粒共转染 COS-1 细胞,均产生了预期组合、有感染性的 H9N2 亚型流感病毒,表明亲缘关系遥远的流感病毒可以互相获取基因片段产生重组病毒,提示表面结构基因和单个内部基因不足以限制 H9N2 AIV 在哺乳动物细胞上的宿主范围,同时也验证了构建的 8 个转录/表达载体均能有效工作,为进一步研究 H9N2 亚型 AIV 基因结构与功能、AIV 与宿主之间的关系打下了基础。

关键词: 禽流感病毒; H9N2 亚型; 反向遗传技术; 基因重排

中图分类号: Q789

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2005)04-0388-05

禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV)是引起人类、禽和低等哺乳动物共患病的病原体,属于正粘病毒科流感病毒属 A 型流感病毒,基因组分为 8 个片段,是负义的单股 RNA,片段 1~8 由大到小依次命名为 *pb2*、*pb1*、*pa*、*ha*、*np*、*na*、*m* 和 *ns* 基因。根据病毒表面蛋白血凝素(HA)和神经氨酸酶

(NA)的不同,A 型流感病毒又可分为不同的亚型,目前已经鉴定 15 个 H 亚型和 9 个 N 亚型,其中 H9N2 是目前亚洲的流行主型之一,虽然表现低致病性,但由于传播广泛、能造成免疫抑制并使宿主易发生继发感染、并具有重要的公共卫生意义,其危害不可忽视^[1~3]。Li 等^[4]对 H9N2 亚型 AIV 基

收稿日期: 2004-12-31, 修回日期: 2005-02-21

* 基金项目: 江苏省“十五”科技攻关项目(BE2002016); 农业部农办牧 200183 项目资助。

作者简介: 卢建红(1968-), 女, 湖南籍, 博士, 副研究员, 主要从事病毒分子生物学研究。现在中南大学湘雅医学院肿瘤研究所。

** 通讯作者. Corresponding author. Tel: 0514-7991416, E-mail: xfliu@yzu.edu.cn

因组变化的监测还揭示了水禽和陆基禽之间存在双向传播,从而使基因的多样性和种间传播的机会增加,因此有必要继续加强监测和研究。

RNA 病毒的反向遗传技术(Reverse Genetics, RG)或称病毒拯救,是指根据病毒基因组及其复制的特点建立操作系统、从克隆的 cDNA 产生病毒的过程,是近年来的研究热点,由于可以产生经过人工操作基因后的病毒,因此在病毒的生活周期、基因功能、致病机理、疫苗构建和病毒载体等方面具有良好的应用前景^[5]。A 型流感病毒的产生需要在细胞中同时形成 8 种核糖核蛋白复合物(RNPs),其 RG 技术经过前人的艰苦努力,发展了 2 个完全以质粒为基础的新操作系统,即 12 质粒系统^[5,6]和 8 质粒系统^[7],其中 8 质粒系统不需要单独表达形成 RNPs 必需的 3 种聚合酶(PB2、PB1、PA)和核蛋白(NP),而是利用同一个载体上的 RNA 聚合酶 I、II 启动子分别实现基因的转录和表达。

此前,我们测定了 H9N2 亚型毒株 A/Chicken/Shanghai/F/98(C/SH/F/98)的基因组全长序列,遗传进化分析结果表明,C/SH/F/98 拥有早期中国分离株 Chicken/Beijing/1/94 的基因^[8],进一步的比较和分析还表明,C/SH/F/98 与近年的水禽分离株有高度的同源性和 HA 种属特异性,提示 C/SH/F/98 的基因回传给水禽并在循环^[9]。为了进一步对 C/SH/F/98 进行基因结构与功能等方面的研究,我们构建了 C/SH/F/98 8 个基因的转录/表达载体,首先用其 2 个表面基因(HA 和 NA)与 A/WSN/33 的内部基因产生(2+6)重组病毒,然后通过基因组合逐个验证了构建的 6 个内部基因的全长 cDNA 克隆,最终证明 8 个转录/表达载体均能有效工作。

1 材料和方法

1.1 实验材料

A/Chicken/Shanghai/F/98(H9N2),缩写为 C/SH/F/98,基因组各基因全长序列^[8]的 GenBank 登录号为 AY253750 ~ AY253756, AF743216。COS-1 细胞用含有 10% 犊牛血清的 DMEM 培养。SPF 鸡胚种蛋购自山东省 SPF 鸡实验种鸡场。H9、H5 亚型阳性血清自制^[10],H1 亚型阳性血清系国家禽流感参考实验室陈化兰研究员惠赠。

用于 cDNA 克隆的双向转录/表达载体 pHW2000,是由 pcDNA3.0 衍生的,载体上有方向相反的 RNA 聚合酶 I(*pol* I)和 *pol* II 启动子,即 P_I和 P_{II}CMV^[7];已克隆 A/WSN/33 8 个片段全长 cD-

NA 至 pHW2000 的质粒分别命名为 pHW181-PB2、pHW182-PB1、pHW183-PA、pHW184-HA、pHW185-NP、pHW186-NA、pHW187-M、pHW188-NS 质粒^[7],均由美国 St. Jude 儿童研究医院的 Webster 博士惠赠。

Expand High Fidelity PCR System、dNTPs、Agrose Gel DNA Extraction Kit 等为 Roche 产品,AMV 反转录酶、pGEM-T easy vector、内切酶 *Eco*R I、*Acc* III、*Hap* I、*Sal* I、T4 DNA 连接酶、RNasin(RNA 酶抑制剂)等为 Promega 产品。内切酶 *Bsm*B I (10U/ μ L)、*Bsa* I (10U/ μ L)和 *Aar* I (3U/ μ L)为 Fermentas 产品。转染试剂 Lipofectin reagent 为 Invitrogen 产品。UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒为生工生物工程(上海)有限公司产品。质粒提取试剂盒为上海华舜生物工程有限公司产品。

1.2 分子生物学分析软件

DNASTar 4.0 版本软件包(包括 EditSeq、MegAlign、MapDraw 等软件):DNASTAR Inc. Madison, WI153715, USA.

1.3 转录/表达载体构建的策略

PCR 扩增的 8 个基因全长片段,经 *Bsm*B I 或者 *Bsa* I 和 *Aar* I 酶切,直接与经过 *Bsm*B I 酶切线性化的载体 pHW2000 连接。载体 pHW2000 中的只有 2 个 *Bsm*B I 位点可用于克隆,因此片段中使用与 *Bsm*B I (CGTCTCN \downarrow NNNN)有相似内切特征的上述 3 种酶位点。为了保证片段中没有不必要的突变,对克隆后的转录/表达载体中的插入片段进行测序,用 DNASTar 的 MegAlign 软件包中的 Clustal 方法与已知序列比较,并对序列出现错误的,增加克隆测序、利用载体和片段中的酶切位点修补或重新构建。序列测定由上海联合基因公司完成。

1.4 引物设计和引入沉默突变标签

按 Hoffmann 等报道^[11]的方法设计扩增 8 个基因的通用引物对,与 Hoffmann 等的报道相区别的是有些引物 5'端添加的酶切位点不同,片段 2、4、6、7 和 8 用 *Bsm*B I、片段 1 和 5 使用 *Bsa* I,片段 3 使用 *Aar* I,这是根据 C/SH/F/98 各基因中这三种酶切位点的有无情况而定的。用所有片段 cDNA 5'端都具有的 12nt 设计为用于反转录的通用引物^[11],除片段 1 外的 7 个片段直接从反转录产物(cDNA)中扩增。由于片段 1(PB2 基因)中含有上述三种酶切位点,首先比较分析已发表序列中自然突变的频率,选择突变含 *Bsa*I 位点的 1722nt。设计

引物通过重叠 PCR 的方法^[12]、在 1722 位引入沉默突变 T→C, 含突变位点(框中所示)的上游和下游引物分别为 5'-ATGGTC CCAAGACCCAACAATG-3', 5'-GTCTTG GGACCATTGAATCTTCA-3', 2 条引物的前 13 个核苷酸为重叠部分。利用 PB2 cDNA 中 662nt 处的单一酶切位点 *Acc* III、在 pGEM-T easy vector 上操作(可利用 PB2 cDNA 1668nt 处的 *Hap* I 和 T 载体上的 *Sal* I 位点鉴定连接方向), 分 3 段扩增和连接(参见结果中图示)。

引物由宝生物(大连)有限公司合成。

1.5 尿囊液中 RNA 的提取和 RT-PCR

用 UNIQ-10 柱式试剂盒直接从含病毒的尿囊液中提取总 RNA。按 Hoffmann 等^[11]报道的方法 RT-PCR。

1.6 质粒的组合和共转染

在已经知道 C/SH/F/98 的 HA 和 NA 基因与 A/WSN/33 可以产生 H9N2/WSN 2+6 重组流感病毒的基础上(待发表), 把 6 个来自 WSN 的内部基因更换为 C/SH/F/98 的内部基因中的任意一个, 共有 6 种 3+5 的组合形式, 预期产生 6 个 H9N2 亚型重组流感病毒。对每一个 3+5 组合, 以没有更换对应内部基因的 7 个质粒作阴性对照, 以 WSN 的 8 个质粒作阳性对照。

按设计组合的质粒, 各取相同量均匀混合。将 7 μ L lipofectin 转染试剂和 2 μ g 混合质粒分别稀释

到 100 μ L 无血清、无抗生素的 DMEM 中, 按说明书进行分散和结合。将 24 孔板中已培养约 18-24h、60%~90% 丰度的 COS-1 细胞, 用无血清、无抗生素的 DMEM 洗 2 次, 加入质粒与 lipofectin 的结合物, 均匀覆盖于细胞上, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中吸附 6h, 换入含 10% 血清的 DMEM 1.0mL, 再培养 72h, 小心吹落细胞, 与上清一起收集。

1.7 共转染子代病毒的验证

转染细胞和上清在 -20 $^{\circ}$ C 和 20 $^{\circ}$ C 冻融 2 次, 经尿囊腔接种于 10 日龄 SPF 鸡胚, 每胚 0.2mL, 每个样品接种 3 个胚, 置 35 $^{\circ}$ C 培养至 72h, 观察鸡胚死亡情况, 分别收集尿囊液, 用 OIE 推荐的标准进行血凝(HA)试验, HA 阳性者用 H1、H9、H5 亚型的阳性血清进行血凝抑制(HI)试验。第 1 代阴性的取尿囊液再盲传一代。HI 阳性尿囊液, 取其鸡胚传代的第 2 代尿囊液提取 RNA、用通用引物 RT-PCR 扩增 NA 和 NS 基因及组合中更换的 C/SH/F/98 内部基因, 进行 1 个反应的测序; 未经反转录的 RNA、用通用引物进行 PCR 扩增对照, 以排除尿囊液中转染质粒 DNA 的存在。7 质粒阴性对照和 WSN 阳性对照的尿囊液同样进行验证。

2 结果

2.1 转录/表达载体的构建

经过一定的构建过程(图 1)和测序验证, C/SH/

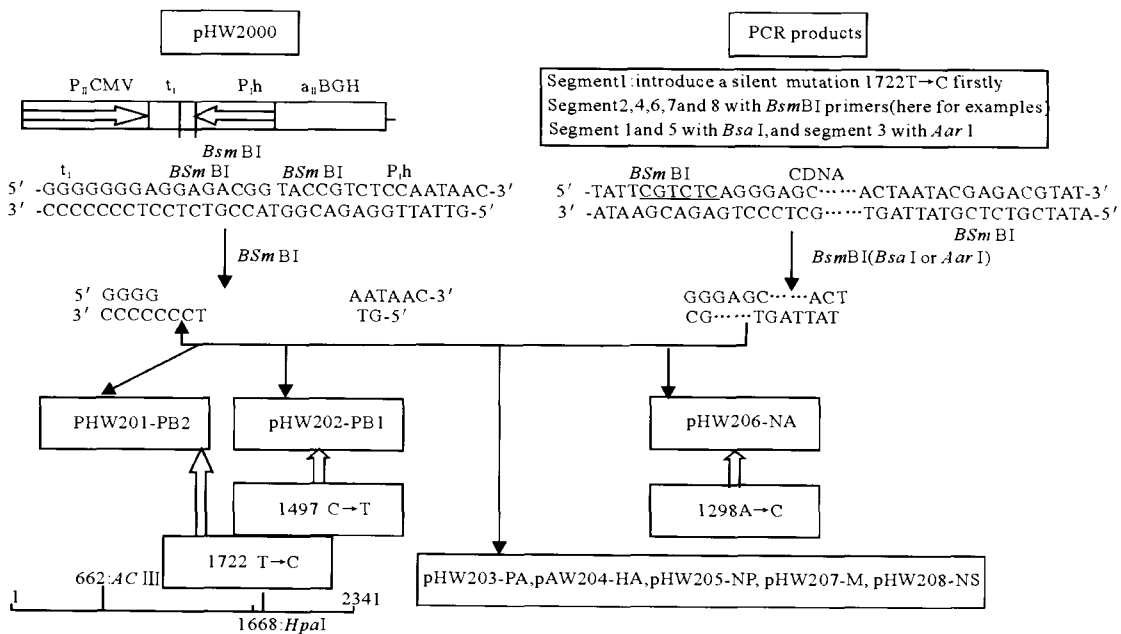


图 1 8 个转录/表达载体的构建

Fig. 1 The eight influenza viral cDNAs being cloned into transcription/expression vector pHW2000

F/98 的 8 个全长基因都正确地插入转录/表达载体 pHW2000,其中片段 1(*pb2* 基因)按预先设计引入了沉默突变 1722 T→C,片段 2(*pb1* 基因)和片段 6 分别由于 PCR 扩增过程中的错误引入了沉默突变 1497 C→T 和 1298A→C,其它出现错误并引起对应的氨基酸序列发生变化的位点,经过反复校对、修补或重新构建,全部进行了修正。克隆后的转录/表达载体因插入片段的不同分别命名为 pHW201-PB2、pHW202-PB1、pHW203-PA、pHW204-HA、pHW205-NP、pHW206-NA、pHW207-M、

pHW208-NS。

2.2 共转染产生的重组病毒

经 HA 和 HI 试验检测,转染后产生了所有预期 HA 亚型(H9)的 3+5 组合及 WSN(H1)阳性对照重组病毒,阳性的 HI 效价均在 1:2⁸ 以上,检测的阳性尿囊液代次及其 HA 效价见表 1,多数组合(4/7)转染上清接种鸡胚在第一代(F1)尿囊液检测为阳性,各种组合在检测阳性时的鸡胚平均 HA 效价范围为 1:2⁷~1:2¹⁰。

含重组病毒的鸡胚第 2 代尿囊液、RT-PCR 扩

表 1 共转染产生的重组病毒鸡胚阳性代次、HA 和 HI 试验检测结果

Table 1 Positive egg passages, titers and subtypes of transfectants determined by HA and HI tests

	3+5 reassortants						WSN control
	146 *	246	346	546	746	846	
Positive passages	F1 ≠	F1	F1	F2 ≠	F2	F2	F1
HA titers	1:2 ⁴	1:2 ⁷	1:2 ⁹	1:2 ⁹	1:2 ⁷	1:2 ⁸	1:2 ⁸
HI test subtype	H9	H9	H9	H9	H9	H9	H1

* 146: One of the 3+5 reassortants with 3 gene segments. 1(PB2), 4(HA), 6(NA) from C/SH/F/98 and the other 5 segments from WSN. As 146 reassortant, 246, 346, 546, 746, 846 are 3+5 reassortants, in which segment 2, 3, 5, 7 and 8 represent PB1, PA, NP, M and NS genes respectively.

≠: F1/F2 represent the first or second egg passage in which HA and HI tested positive.

增 *na*、*ns* 基因及 C/SH/F/98 的内部基因片段,经过测序和序列比较,都是预期组合中的对应基因,序列未发生任何变化,*na* 基因中的沉默突变标签 1298A→C 保留。组合“146”和“246”(表 1)经扩增 *pb2* 基因和 *pb1* 基因,预先引入的标签 1722T→C 和 1497 C→T 仍然保留。WSN 重组病毒的 *ha*、*na* 和 *ns* 基因序列与 GenBank 发表序列一致,登录号分别为 J02176、J02177 和 M12597。

用 7 质粒阴性对照转染上清经鸡胚传代,没有检测到具有血凝性的病毒,第 2 代尿囊液也扩增不到与 *na* 和 *ns* 大小相当的片段,排除了质粒污染的可能性。第 2 代尿囊液未经反转录的 RNA、用通用引物 PCR 扩增不到相应片段,排除了阳性传至第二代的尿囊液中仍存在转染质粒 DNA 的可能性。

3 讨论

流感病毒的反向遗传技术已经应用于探讨病毒基因结构与功能、揭示病毒的致病和免疫机理、构建疫苗候选株等方面的研究^[3]。国内应用反向遗传技术对禽流感病毒(AIV)的研究起步较晚。我们选择以 H9N2 亚型 AIV 为基础开展研究,构建了用于 8 质粒病毒拯救系统的 8 个转录/表达载体,并验证它们均可以分别在不同的组合中有效工作,实现 vRNA 和 mRNA 的转录,进而包装成设计基因型的重

组流感病毒。

双向转录/表达载体 pHW2000 在同一个载体上利用不同的两套启动子和终止序列实现 vRNA 和 mRNA 的转录^[7],使 8 质粒系统使用最少数量的质粒数进行病毒拯救,但是这又会减少系统的“弹性”,某个位点的变化可能成为致死性突变导致不能进一步拯救出病毒^[13]。因此,在建立技术平台时首先不要引入突变,为了方便拯救病毒的验证,可适当地引入沉默突变。在流感病毒的序列中,各基因两端的序列尤其是非编码区的序列的正确性也很重要,因为非编码区包含流感病毒基因转录和复制的顺式操作信号,是重要的启动成分^[14]。尽管我们已经得到了 C/SH/F/98 的各基因全长序列,各片段也已克隆到 T 载体^[8],为保证序列的准确性,重新进行 RT-PCR 扩增,反复地比较,不能确定以哪一次为准的进行了对包含可疑位点的短片段扩增并测序确定。虽然使用高保真系统,还是进行了费时费力的序列修正。为了减少麻烦,在构建长片段如 *pb2*、*pb1* 和 *pa* 基因的全长克隆时可以分 2 段扩增和连接^[15]。

产生了 6 个 3+5 组合的 H9N2 亚型重组流感病毒,从而验证了构建的 8 个转录/表达载体均可以有效地工作,即在细胞内转录和表达目的基因、进而产生有感染性和相应生物学特性(如血凝性)的病

毒。同时,结果也表明,亲缘关系遥远的流感病毒能互相获取基因片段组合成新的流感病毒,这也是自然界发生 AIV 抗原转变的原因^[16]。各种组合质粒的共转染上清接种鸡胚,第一代或第二代的尿囊液 HA 和 HI 检测阳性(表 1),但鸡胚第二代阳性的或阳性 HA 效价较低的并不代表该组合的质粒拯救效率低,经过多次试验,我们认为,这与提取的质粒的纯度、转染细胞的生长状况、鸡胚的敏感性等因素有关,在共转染中应经常设已知的有效组合作为对照,以便优化条件。

与大多数禽流感病毒一样^[17],野生型的 C/SH/F/98 在 COS-1 细胞上的复制受到限制(本文没有数据),因此用本文中的共转染体系不能直接拯救 C/SH/F/98,改变一定的条件才能获得(待发表),而本研究的结果显示,使用 C/SH/F/98 的 2 个表面基因加上任意 1 个内部基因,都不限制其复制,共转染经过 72h 后的上清可感染鸡胚在第 1 代或第 2 代得到高滴度的病毒,这提示,表面基因和单个内部基因不足以限制 H9N2 AIV 在哺乳动物细胞上的宿主范围,一定的基因组成才会造成 AIV 宿主范围的限制,这有待进一步的研究,并且反向遗传技术将是有效的研究工具。Hatta 等^[18]就是通过构建各种重组病毒揭示了 1997 H5N1 亚型 AIV 对人致病的分子机制。H9N2 亚型 AIV 8 个转录/表达质粒的构建、工作验证及反向遗传技术的建立和完善,为进一步进行 AIV 基因结构与功能的研究、AIV 与宿主之间的关系等方面的研究打下了良好的基础。

致谢:美国 St. Jude 儿童研究医院的 Robert Webster 博士和 Erich Hoffmann 博士惠赠 8 质粒病毒拯救系统及热心帮助。

参考文献

- [1] Webster R G. A molecular whodunit[J]. *Science*, 2001, 293(5536):1773-1775.
- [2] Guo Y J, Krauss S, Senne D A, *et al.* Characterization of the pathogenicity of members of the newly established H9N2 influenza virus lineages in Asia[J]. *Virology*, 2000, 267:279-288.
- [3] 甘孟侯. 禽流感[M]. 第二版,北京:中国农业大学出版社,2002,15-79.
- [4] Li K S, Xu K M, Peiris J S, *et al.* Characterization of H9 subtype influenza viruses from the ducks of southern China; a candidate for the next influenza pandemic in humans [J]. *J Virol*, 2003, 77(12): 6988-6994.
- [5] Neumann G, Whitt M A, Kawaoka Y. A decade after the generation of a negative-sense RNA virus from cloned cDNA - what have we learned? [J]. *J Gen Virol*, 2002, 83:2635-2662.
- [6] Neumann G, Watanabe T, Ito H, *et al.* Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96:9345-9350.
- [7] Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, *et al.* A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97:6108-6113.
- [8] 卢建红,刘秀梵,邵卫星,等. H9N2 亚型 AIV 基因组全长序列测定和各基因的遗传分析[J]. *微生物学报*, 2003, 43:434-441.
- [9] 卢建红. H9N2 亚型 AIV 基因组序列分析及用反向遗传技术产生多个 H9N2 和 H5 重组流感病毒[D]. 扬州:扬州大学,2004.
- [10] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 第二版,北京:科学出版社,1997.
- [11] Hoffmann E, Stech J, Guan Y, *et al.* Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses[J]. *Arch Virol*, 2001, 146(12):2275-2289.
- [12] 黄培堂,王翔,王建华,等. PCR 技术实验指南(现代生物技术译丛)[M]. 北京:科学出版社,2000,416-444.
- [13] Neumann G, Kawaoka Y. Reverse genetics of influenza virus [J]. *Virology*, 2001, 287:243-250.
- [14] Neumann G, Hobom G. Mutational analysis of influenza virus promoter elements *in vitro* [J]. *J Gen Virol*, 1995, 76:1709-1717.
- [15] Hoffmann E, Mahmood K, Yang C F, *et al.* Rescue of influenza B virus from eight plasmids[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(17):11411-11416.
- [16] Webster R G, Bean W J, Gorman O T, *et al.* Evolution and ecology of influenza A viruses[J]. *Microbiol Rev*, 1992, 56:152-179.
- [17] Naffakh N, Massin P, Escriou N, *et al.* Genetic analysis of the compatibility between polymerase proteins from human and avian strains of influenza A viruses [J]. *J Gen Virol*, 2000, 81:1283-1291.
- [18] Hatta M, Gao P, Halfmann P, *et al.* Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses [J]. *Science*, 2001, 293:1840-1842.