

## 流感病毒反向遗传学技术研究进展

刘大飞<sup>1)</sup> 刘春国<sup>1)</sup> 刘 明<sup>1)\*</sup> 刘大程<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>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;

<sup>2)</sup>莱阳市城厢兽医站, 莱阳 265200)

**摘要** 流感病毒亚型众多, 且极易发生变异, 给防控带来很大困难, 所以当务之急应加强其在致病机理、传播机制等方面的研究和加快新型流感疫苗的开发。近年来, 反向遗传学技术的发展为流感病毒基因功能研究和疫苗制备方面开辟了新思路。

**关键词** 流感病毒, 反向遗传学技术, 功能研究, 标记疫苗

**学科分类号** S852.659.5, Q786

流感病毒(influenza virus, IV)属正黏病毒科, 流感病毒属, 为分节段单股负链 RNA 病毒。病毒基因组约 13.6 kb, 由大小不等的 8 个独立片段组成。8 个片段编码流感病毒的 2 类蛋白: 结构蛋白(PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M1、M2)和非结构蛋白(NS1、NS2)。核蛋白(NP)高度保守<sup>[1]</sup>, 具有型特异性, 根据其抗原性不同, 可将流感病毒分为 A、B、C 三型。A 型流感毒除可感染人外, 还可感染许多其他种属的动物, 如马、猪、禽类、海豹等, 并且可引起人类/ 畜禽流感大流行, 血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)是流感病毒 2 种主要表面抗原, 具有亚型特异性, 根据 HA 和 NA 的不同, A 型流感病毒又可分为不同亚型, 目前已鉴定出 16 种 HA 和 9 种 NA 亚型<sup>[2, 3]</sup>, 而水禽特别是野生水禽是所有 16 个 HA 亚型和 9 个 NA 亚型的自然宿主和贮存宿主。

流感一旦暴发, 不仅会对禽类造成严重危害, 给养殖业造成毁灭性打击, 而且严重威胁人类健康。为了更好地防控流感, 应加强对流感病毒在分子流行病学、病毒复制及其调控、病毒治疗与预防等领域的研究, 其中流感病毒复制及其调控机制是揭示流感病毒感染性与致病性机制, 研究有效治疗与预防措施的基础。但由于流感病毒属于 RNA 病毒, 因而利用经典遗传学对其基因组进行操作十分困难, 严重影响了对流感病毒进行研究的进度, 而发展起来的反向遗传学技术解决了这一困扰

研究者多年的难题, 为流感病毒的基础研究提供了有力的武器。

虽然一些抗病毒药物在流感的防治中发挥一定作用, 但由于流感病毒极易发生变异, 因而极易导致耐药毒株的出现, 所以疫苗免疫始终被认为是预防流感的最佳措施。目前已被广泛接种的流感疫苗主要是来自于鸡胚培养的全病毒灭活苗。传统的全病毒灭活疫苗制备工艺简单, 安全性好, 抗原组分齐全, 免疫原性强, 不会出现毒力返强和变异危险。同时也存在以下缺点: 一是免疫畜禽不仅产生针对表面蛋白 HA 和 NA 的抗体, 而且产生针对流感病毒内部蛋白 M1 和 NP 的抗体, 利用常规的血清学方法不能区分出免疫家禽和自然感染家禽, 对流感病毒流行病学监测造成干扰; 二是由于依靠鸡胚增殖病毒, 使得其成本比较高; 三是病毒增殖后鸡胚残体的处理只能采用焚烧的办法, 在增加成本的同时, 又会对环境造成污染。反向遗传学技术建立与发展, 使得流感病毒分子生物学研究得以迅速开展, 尤其在流感病毒疫苗株的构建方面, 为流感疫苗的不断完善奠定基础。本文主要从反向遗传学技术最新研究进展, 及其在流感病毒基因功能研究中的应用, 与重组病毒的拯救以及重组疫苗株的构建等方面进行阐述。

\* 通讯联系人。

Tel: 0451-85935069, E-mail: Liuming04@126.com

收稿日期: 2008-02-18, 接受日期: 2008-05-29

## 1 反向遗传学技术概述

反向遗传学是相对于经典遗传学而言的。经典遗传学是从生物的性状、表型到遗传物质来研究生命的发生与发展规律。反向遗传学则是在获得生物体基因组全部序列的基础上,通过对靶基因进行必要的加工和修饰,如定点突变、基因插入/缺失及基因置换等,再按组成顺序构建含生物体必需元件的修饰基因组,让其装配出具有生命活性的个体,研究生物体基因组的结构与功能,以及这些修饰可能对生物体的表型、性状有何种影响等方面的内容。

反向遗传学技术(reverse genetics)是指通过对病毒的 cDNA 进行操作,从而研究病毒结构与方法。感染性分子克隆包括感染性 cDNA 和感染性体外转录。构建感染性 cDNA 就是通过反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)扩增 RNA 病毒基因组的 cDNA 片段,然后利用其限制性酶切位点,将 cDNA 片段顺次相连并克隆于合适的载体,获得基因组全长 cDNA 克隆,以其转染适当细胞,全长 cDNA 在细胞内转录并包装成感染性病毒粒子。而感染性体外转录本也是运用常规克隆方法获得病毒基因组全长 cDNA,在体外进行转录,获得基因组全长 RNA,用此 RNA 转染适当细胞以获得感染性病毒粒子。获得 RNA 病毒的感染性分子克隆后,就可在 DNA 水平上通过突变、缺失、插入和互补等手段来研究 RNA 病毒的基因复制和表达, RNA 的自发重组和诱导重组, RNA 病毒与宿主的相互作用(如病毒细胞间的传递机制)等,也可进行抗病毒策略研究,还可用于构建新的病毒载体。

## 2 流感病毒反向遗传学技术发展历史

流感病毒为负链 RNA 病毒,其病毒基因组无信使功能并且无感染性,因而其拯救的难度较之正链 RNA/DNA 病毒有所增加。但是在研究者们不懈努力下,流感病毒的反向遗传学技术得到了很好发展且日渐成熟,其发展过程主要经历以下几个阶段:

### 2.1 借助辅助病毒拯救流感病毒

核蛋白转染法:1989 年 Luytjes 首次报道了从克隆的 cRNA 产生 vRNA 并且拯救出流感病毒。方法是采用 T7RNA 聚合酶体外转录系统,重组质粒的构建策略是将流感病毒 NS 基因的编码区用报告基因的编码区(CAT 基因)取代,但是保留着含有

流感病毒启动子成分的 5'端和 3'端非编码区, T7RNA 聚合酶启动子序列和一个限制性内切酶位点序列构成了病毒的 3'端,基因排列的顺序为 NS-CAT-NS,首先构建的质粒进行体外转录,然后从病毒粒子中纯化的聚合酶和 NP 蛋白混合进而构成 RNP 复合体。体外产生的 vRNA 进而转染经辅助病毒感染的真核细胞,新产生的子代病毒含有编码 CAT 基因的流感病毒样 RNA 和 8 个流感病毒 vRNA。虽然该系统首次实现了流感病毒基因的定点突变,但是该系统所产生的子代病毒绝大多数都是辅助病毒,必须提供强有力的筛选方法方能有效应用。如必须提供温度敏感性,宿主范围限制,或者药物抗性这样的辅助病毒。由于该项技术操作起来非常复杂,现已被淘汰。

RNA 聚合酶 I 法:1994 年 Neumann 等建立一种新的拯救流感病毒方法。新系统采用 RNA 聚合酶 I 代替 T7RNA 聚合酶进行细胞内合成流感病毒的 vRNA。与其他 RNA 转染方法相比 RNA 聚合酶 I 系统不需要进行体外的 RNA 转录、蛋白质纯化、体外 RNP 重新合成和 RNP 转染。使用 RNA 聚合酶 I 法较 RNP 转染法要方便得多,然而这两种方法都是辅助病毒依赖性系统。病毒拯救的效率低,而且需要强筛选系统来区分辅助病毒与重组病毒。

### 2.2 由克隆的基因拯救流感病毒

反义 RNA 聚合酶 I 法,即 17(或 12)质粒系统:Neumann 等(1999 年)建立全部从克隆的 cDNA 拯救出流感病毒的方法。由于从克隆的 cDNA 拯救流感病毒效率非常高,使得将突变引入任一位点成为可能。同时,由于这一方法是非辅助病毒依赖性的,从而消除了对选择压力的依赖。另外,该技术只需要分子生物学实验室的 DNA 克隆、纯化和转染等常规技术,有利于其推广应用。

单向 RNA 聚合酶 I / II 转录系统,即 cRNA 法:Hoffmann 等(2000 年)报道了从流感病毒反基因组互补 RNA (cRNA)产生流感病毒的新方法。编码 8 个互补 cRNA 的 cDNA 被克隆于 RNA 聚合酶 I 启动子和终止子之间,外侧为聚合酶 II 启动子(人巨细胞病毒极早期启动子)和多聚腺苷酸信号(来自牛生长因子),质粒转染进入细胞后指导 RNA 聚合酶 I 合成 cRNA。试验结果表明,从反基因组 RNA 同样可以高效地拯救出流感病毒。

双向 RNA 聚合酶 I / II 转录系统,8 质粒系统:Hoffmann 等(2000 年)为了克服流感病毒 17 质粒转染系统在构建和转染方面的不便,建立了拯救

流感病毒的 8 质粒系统. 该系统的优点是一方面不需要构建专门的蛋白质表达质粒, 另一方面大大减少了为拯救病毒而构建质粒的数量, 同时使得反向遗传学系统产生流感病毒的时间和成本也随之缩短和降低. 另外, 该系统对转染效率低的细胞系非常有用, 因而目前应用最为广泛.

双向 RNA 聚合酶 I / II 转录系统, 3/4 质粒系统: Neumann 等(2005 年)对 8 质粒系统作了进一步改进, 建立了拯救流感病毒的 3/4 质粒系统. 众所周知, 理论上流感病毒的拯救同时需要 vRNA 的转录与聚合酶蛋白、核蛋白的表达, 而该系统只有 vRNA 转录而无聚合酶蛋白、核蛋白的表达. 对于其发生机制还不清楚, 有待进一步研究. 虽然该系统进一步减少为拯救病毒而构建的质粒的数量, 但是由于该系统要求同时把多个基因组片段克隆到同一载体上, 因而给克隆过程带来了困难, 同时由于构建的转录子的分子质量较大, 会降低转染的成功率. 鉴于以上原因, 目前该系统应用还不是很广泛.

Crescenzo-Chaigne 等(2007 年)为突破当时反向遗传学技术的研究与应用只限于 A、B 型流感病毒的局限, 首次建立了 C 型流感病毒的反向遗传学操作平台. 该系统在对病毒诱变研究和开发新型的表达载体方面有重要的意义.

### 3 流感病毒反向遗传学技术应用

#### 3.1 在流感病毒基因功能研究中的应用

经典遗传学研究思路是从表型改变到基因特征研究, 研究周期漫长. 加之流感病毒亚型多, 变异频率高, 重组 / 重排现象严重, 因而对新出现毒株很难进行及时有效的研究, 很难迅速掌握变异株的生物学特性, 这就有可能延误流感防控的最佳时间. 反向遗传学技术则恰恰相反, 研究者可以通过对病毒基因组进行操作来快速定位病毒的致病力因素、确定病毒传播途径和传播机制等, 为有效防控流感争取了时间.

##### 3.1.1 突变对宿主致病力影响的研究.

Seo 等<sup>[4]</sup>将 1997 年香港 H5N1 亚型流感病毒人体分离株的 NS 基因替换到 PR/8 株后, 明显增强了对猪的致病力, 而起关键作用的是 NS1 蛋白 92 位的谷氨酸, 由于该氨基酸的存在使该病毒能逃脱 IFN 和 TNF- $\alpha$  的抗病毒效应. 2000 年以来很多 H5N1 亚型禽流感病毒分离株在 NS 基因的第 263~277 位之间发生碱基缺失. 龙进学等<sup>[5]</sup>为利用

反向遗传学技术对这一缺失现象的生物学意义展开研究, 以 WSN(H1N1)内部基因为骨架, 与构建 A/D/SD/04(H5N1)株和 A/D/YZ/04(H5N1)株 NS 突变表达载体组合后进行病毒拯救. 重组 4 株病毒平均鸡胚繁殖效价(HA)、鸡胚的平均死亡时间(MDT)和鸡胚半数感染量(EID50)均无显著差异. 但在致病力方面, NS 基因缺失的毒株明显高于未发生缺失的毒株, 说明 H5N1 亚型禽流感病毒 NS 基因在 263~277 位核苷酸发生缺失后不影响其在鸡胚中的繁殖性能, 但提高了病毒对鸡的致病力.

Horimoto 等<sup>[6]</sup>试图将未做任何修饰的 B 型流感病毒的 HA 基因重组到 A 型流感病毒中, 但未获成功. 而将 A 型流感病毒 HA 基因非编码区与 B 型流感病毒 HA 编码区或者某单个位点、或者跨膜区等组合后, 可以表达出完整的 B 型流感病毒 HA 蛋白或者嵌合的 A/B HA 蛋白. 该嵌合的 A/B HA 蛋白与 A 型流感病毒的其他片段共转染 COS-7 细胞后, 拯救的嵌合病毒对鼠的致病力减弱.

近年来, 猪流感在猪群中的流行日渐严重. 鉴于猪流感在“禽-猪-人”之间的特殊地位和作用, 因而对它的研究也越来越引起世人关注. Solórzano 等<sup>[7]</sup>利用反向遗传学技术将野生型猪流感病毒 A/Swine/Texas/4199-2/98 株的 NS1 蛋白截短, 获得重组猪流感病毒. 对该重组病毒进行研究发现, 由于 NS1 蛋白的变异导致猪体内  $\alpha/\beta$  干扰素的合成能力降低, 而且对猪的致病力也有所减弱, 说明 NS1 蛋白是猪流感病毒的毒力因素之一.

##### 3.1.2 突变、删除或替换对病毒复制能力影响的研究.

Massin 等<sup>[8]</sup>构建了功能性核糖核蛋白在细胞内重组的遗传操作系统, 并且发现禽源的聚合酶复合体在哺乳动物细胞上具有冷敏感性, 而人流感病毒的聚合酶复合体没有这一特性. 通过进一步研究发现, PB2 蛋白 627 位氨基酸是在哺乳动物细胞中进行复制时的冷敏感决定因素, 该位点单个氨基酸的变化(E627K), 提高了病毒复制能力. 杨涛等(2007 年)利用反向遗传学技术将 A/Goose/Dalian/3/01(H9N2)毒株的 PB1、PA、NP、M、NS 基因和人流感病毒 A/PR/8 毒株的 PB2 基因作为内部基因与猪流感病毒 A/Swine/Henan/S4/01(H3N2)毒株的 HA、NA 基因进行重组, 成功拯救出了具有高度细胞适应性毒株 rH3N2 株, 重组后的病毒接种 MDCK 细胞血凝价可以达到 1:512. 而将 A/Goose/Dalian/3/01(H9N2)毒株的 6 个内部基因与

A/Swine/Henan/S4/01(H3N2)毒株的2个表面基因重组,重组后的病毒接种MDCK细胞后血凝价只能达到1:64,说明该重组病毒无高产特性,进一步证实PB2基因在病毒复制方面发挥着重要作用。

研究指出,A、B型人流感病毒呈交替流行的趋势,但是并未发现二者之间发生基因重组。Flandorfer等<sup>[9]</sup>通过构建分别包含嵌合HA/NA基因的重组病毒对这一现象进行研究。研究结果显示,嵌合有HA基因的重组病毒在MDCK细胞上生长滴度不高,且不能形成空斑,但经过连续传代之后,此现象发生明显改变。序列分析发现,由于HA基因545(H545Y)位突变,引起嵌合NA基因的重组病毒在MDCK细胞上生长滴度是野生型毒株的十分之一。该研究证实,A、B型流感病毒之间未发生基因重组的原因可能是嵌合基因的存在影响病毒的复制能力。

流感病毒变异频繁,但主要集中在HA和NA。最近常有报道,H5N1亚型禽流感病毒NA茎部15~20个氨基酸缺失,这种缺失对禽流感病毒生物学特性是否造成影响及有何影响尚未得到系统研究。王曲直等<sup>[10]</sup>利用反向遗传学技术构建了5株重组H5N1/PR8流感病毒,这5株重组病毒NA茎部的20个氨基酸被删除或突变。研究发现,NA茎部氨基酸缺失的重组毒株解凝速度和能力明显弱于没有缺失的毒株,而且前者感染MDCK细胞形成的空斑直径明显大于后者,提示我们,NA茎部缺失的这20个氨基酸在病毒复制和传播过程中起着十分重要的作用。Lugovtsev等<sup>[11]</sup>分别通过对B/Victoria/504/2000、B/Beijing/184/93株HA蛋白抗原表位区之外的氨基酸进行如下替换,(R162M)和(G141E),获得了重组的B型流感病毒。研究发现2株重组病毒的复制能力显著增加,推测该区域可能临近受体结合区,为B型流感病毒基因功能研究奠定基础。

**3.1.3 突变对病毒传播机制影响的研究。**石火英等<sup>[12]</sup>将禽流感A/Chicken/Guangdong/SS/94(H9N2)株(SS/94株)的HA基因或NA基因,分别与A/Chicken/Shanghai/F/98(H9N2)株(F/98株)的其他几个基因片段组合(即SS/94株HA与F/98株其余7个片段、SS/94 NA与F/98株其余7个片段、SS/94 HA、NA与F/98株其余6个片段),拯救出3株H9N2亚型禽流感病毒。本研究结果证实,3株重组病毒都不经粪便接触传播,只有按照第一种组合方法获得重组的H9N2亚型AIV能通过气溶胶途

径传播,说明中国大陆1998年爆发的H9N2亚型禽流感获得气溶胶传播途径特性的分子机制可能是病毒的NA基因发挥了重要作用。

**3.1.4 突变对病毒耐药性的研究。**a. 离子通道抑制剂金刚烷胺类药物作用靶点为流感病毒M2蛋白,通过干扰M2离子通道活性,抑制病毒脱壳。流感病毒对金刚烷胺类药物易产生耐药性,并且金刚烷胺类药物对B型流感病毒缺乏活性<sup>[13]</sup>。临床试验表明,应用金刚烷胺后M2跨膜区中的4个氨基酸位点26、27、30和31最易产生突变<sup>[14]</sup>。并且不同亚型病毒突变位点与频率不同:H3N2亚型(S31N),H1N1亚型(V27A),前者的突变频率高于后者。Ozaki等<sup>[15]</sup>用12质粒系统,将A/WSN/33(H1N1)株M2蛋白跨膜区5个氨基酸进行突变(L26F、V27A、A30T、S31N、G34E),获得7株重组流感病毒,其中1株是未作任何修饰用作对照,另外5株M2蛋白分别含有1个突变位点,最后1株在M2蛋白27位和31位同时引入突变。用空斑减少试验检验7个毒株对金刚烷胺的敏感性,发现突变株均对金刚烷胺产生抗性,且单个位点突变的重组病毒 $IC_{50}$ (50% inhibiting concentration)明显高于对照毒株,而双位点突变株则比相应的单个位点突变株低。b. 神经氨酸酶抑制剂(zanamivir、oseltamivir),它们通过干扰病毒NA保守的唾液酸结合位点,抑制病毒的复制。由于C型流感病毒缺少真正的NA,所以这两个药物仅对A、B型流感病毒有效。与离子通道抑制剂相比,流感病毒对该类药物产生耐药性的频率相对较低,但并不意味着不会发生耐药性。研究者从接受过oseltamivir治疗的成人和儿童分离出的A型流感病毒中,已鉴别出H3N2亚型(R292K、E119V)、H1N1亚型(H274Y)及B型流感病毒(D198N/E、R152K)等几处不同的单点突变<sup>[16~18]</sup>。Abed等<sup>[19]</sup>利用反向遗传学系统将H1N1亚型流感病毒NA基因氨基酸(H274Y)、(E119Q)突变后,构建了2株重组流感病毒。神经氨酸酶抑制试验和空斑减少试验显示:与野生型毒株相比,274位突变株对oseltamivir的抵抗力明显增加,但对zanamivir比较敏感,而119位突变株对二者的抵抗力都不是很高。Cheam等<sup>[20]</sup>研究发现,HA基因单位点氨基酸突变可减少B型流感病毒对zanamivir(90倍)和oseltamivir(7倍)的敏感性。Yen等<sup>[21]</sup>在流感病毒N2中引入突变(E227D、E276D),研究重组病毒发现:前者由于病毒稳定性不够或者酶活性不高,无法确定其对

zanamivir 和 oseltamivir 的敏感性, 而后者对 zanamivir(160 倍)和 oseltamivir(15 倍)的敏感性都有所降低. Hui-Ting 等(2007 年)将 H1N1 亚型流感病毒 N1 基因 2 个位点的氨基酸突变(E227D、E276D), 发现前者明显降低对 zanamivir 敏感性(126 倍), 而后者变化不明显.

### 3.1.5 基因突变对宿主范围影响的研究.

目前, 研究已经证实禽流感病毒 PB2 基因 627 位总是谷氨酸(E), 而人流感病毒则总是赖氨酸(K). Hatta 等<sup>[23]</sup>利用反向遗传学技术, 对 1997 年突破种间障碍直接感染人的 H5N1 亚型禽流感病毒香港分离株 2 个不同亚群(按照对小鼠致病性分为高 / 低致病性亚群)研究发现: PB2 基因 627 位单个氨基酸的变化(E627K)可以显著增强 H5N1 亚型禽流感病毒对小鼠的毒力, 从而揭示了 H5N1 亚型禽流感病毒对人致病的分子机制, 而导致这种转化的机制可能与组成 PB2 的第 199 位氨基酸丝氨酸(S)的突变有关<sup>[23]</sup>. Yao 等<sup>[24]</sup>利用反向遗传操作系统对两株 H7 AIV 进行重组比较, 发现将 PB2 基因 362~581 位氨基酸替换, 可使重组病毒更易感染哺乳动物细胞, 证明该区域含有促进病毒在哺乳动物细胞上复制的重要氨基酸. 此外, 还推测 PB2 上 647、701 以及 482 位的氨基酸也起着决定宿主范围的作用. Li 等<sup>[25]</sup>利用反向遗传学技术, 首次发现流感病毒 PB2 基因 701 位的氨基酸变化(D701N), 可以导致本来对哺乳动物无感染性的 H5N1 亚型流感病毒突破中间屏障感染人或其他哺乳动物, 甚至有致死的能力.

众所周知, H5N1 亚型禽流感病毒对家鸭无致病性, 但最近越南发生 H5N1 亚型禽流感病毒感染并导致家鸭死亡的病例. Hulse-Post 等<sup>[26]</sup>利用反向遗传学技术对 A/Vietnam/1203/04(H5N1)研究发现: PA(T515A)和 PB1(Y436H)突变是导致这一现象发生的关键因素, 但其在自然界中的致病机制还不是很明确.

研究推测 NS1 蛋白可能是 H5N1 亚型禽流感病毒对哺乳动物致病力的一个决定因素. Li 等<sup>[27]</sup>利用反向遗传学技术证实这一推测的可靠性, 并且发现起关键作用的是该蛋白质第 149 位氨基酸. Jiao 等(2007 年)在对流感监测中发现 2 株对小鼠致病力存在显著差异的 H5N1 亚型禽流感病毒. 利用反向遗传学技术对 2 个毒株的 8 个基因片段分别进行单基因替换研究证实: NS 基因 42 位氨基酸变异是 H5N1 亚型禽流感病毒对哺乳动物致病力又一决定

因素.

### 3.2 在流感病毒重组疫苗株构建中的应用

目前, 世界范围内用于流感防控的疫苗主要为全病毒灭活油乳剂疫苗, 理想的灭活疫苗种毒株应该具备以下 4 方面的条件: a. 良好的抗原针对性, 即疫苗株病毒应该具有和流行病毒相一致的抗原性; b. 高度生物安全性, 疫苗株病毒对鸡和其他动物以及人不应具有致病性; c. 高度鸡胚 / 细胞生长适应性, 疫苗株应该在鸡胚 / 细胞上有效复制, 所制备的疫苗抗原含量高, 可以确保免疫效果; d. 疫苗的应用不会干扰禽流感的疫情调查和流行病学监测. 反向遗传学技术的发展为理想疫苗的研制奠定基础.

Horimoto 等<sup>[6]</sup>拯救了 1 株 HA 基因嵌合的重组流感病毒, 该重组病毒对鼠的致病力减弱. 用其免疫鼠, 可使其获得对 B 型流感病毒很好的免疫保护力. Liu 等<sup>[28]</sup>以 A/PR/8/34 株内部基因为骨架, 利用 8 质粒系统构建了 rH5N3 株, 其中 HA 基因来自于 A/Goose/HK/437.4/99(H5N1), 但在其裂解位点处的碱性氨基酸被删除掉, NA 基因来自于 A/Duck/Germany/1215/73(H2N3). 该病毒灭活后免疫鸡, 可诱导产生高的抗体滴度. Song 等<sup>[29]</sup>对 PB1 和 PB2 基因突变产生温度敏感变异株 A/Guinea Fowl/Hong Kong/WF10/99(H9N2). 对该毒株的 PB1 基因修饰, 使其致病性进一步减弱, 以该毒株为骨架通过替换该 HA、NA 分别构建了 2 株重组疫苗株 H7N2 和 H5N1, 2 个重组疫苗株分别对野生 H7N2 亚型流感病毒和高致病性的 H5N1 亚型流感产生很好的免疫保护力.

Neumann 等<sup>[30]</sup>将 A/WSN/33(H1N1)流感病毒的 8 个片段克隆到载体 pTM1(含有 Pol I 启动子和终止子, 保证 vRNA 的转录)和 pCAWS(含有 Pol II 启动子和终止子, 保证蛋白质的表达)中, 构建下述几种质粒: pTM-Pol I -WSN-PB2-PB1-PA-HA-NP-NA-M-NS(Ⅰ), pTM-Pol I -WSN-HA-NA(Ⅱ), pTM-Pol I -WSN-PB2- PB1 -PA-NP-M-NS(Ⅲ), pC-Pol II -WSN-PB2-PB1-PA(Ⅳ), pC-Pol II -WSN-NP(Ⅴ), (pCAWS-PB2、pCAWS-PB1、pCAWS-PA、pCAWS-NP)(Ⅵ), (pPol I -WSN-PB2, -PB1, -PA, -HA, -NP, -NA, -M, -NS)(Ⅶ). 将以上质粒经相应组合后分别转染细胞, 结果证实多种组合均成功拯救出流感病毒. 我们推测如果同时把流感病毒的 8 个片段克隆到含有 Pol I 和 Pol II 的双向转录表达载体中, 也应该可以拯救出流感病毒, 该研究为流

感疫苗株的筛选奠定基础。

与传统疫苗相比,利用反向遗传学技术构建的疫苗的优点显而易见,但是不足之处还在于构建的重组疫苗免疫动物后,利用常规的血清学方法仍不能区分出免疫动物和自然感染动物,干扰病毒流行病学监测,标记疫苗的出现克服这一弊端。所谓标记疫苗,就是用一种疫苗给动物免疫后,通过与之相配套的血清学检测方法,可以将免疫动物和自然感染动物区分开来<sup>[31]</sup>,该策略也称之为 DIVA (differentiating infected from vaccinated animals) 策略。以下主要对反向遗传学技术在流感病毒 DIVA 苗构建中的研究进展作一总结:

a. 异源 NA 标记:2004 年, H5N2、H7N2 亚型低致病性禽流感给美国养殖业造成巨大经济损失,但未发现 H5N1、H7N8 亚型的流行。Lee 等<sup>[32]</sup>分别构建了 N1 和 N8 标记的 rH5N1 和 rH7N8 疫苗株,接种 SPF 鸡后攻毒,结果表明该重组疫苗可对鸡提供很好的免疫保护力,其免疫效果与亲本株 H5N2、H7N2 制备的疫苗效果相当。同时利用神经氨酸酶抑制试验和间接 ELISA 方法对 NA 进行检测又可用以区分自然感染。刘明等(2006 年)利用反向遗传学技术构建了重组 H5N3 亚型禽流感高产疫苗株,其 6 个内部基因来源于高产 A/Goose/Dalian/3/01 (H9N2) 株, HA 基因来源于 A/Goose/HLJ/QFY/04(H5N1) 株,且缺失了 HA 蛋白连接处的 5 个连续碱性氨基酸, NA 则来源于 A/Duck/Germany/1215/73(H2N3) 株。由于 N3 亚型在国内很少见,因而用其进行标记后可以建立相应的血清学方法进行鉴定。用该重组疫苗免疫鸡,能诱导鸡体产生高滴度的 HI 抗体,且抗体在很长时间内保持在一个较高的水平,而且该重组病毒 8 个片段全部来源于禽类,其安全性大大提高。同时该疫苗株可以在 MDCK 细胞中大量增殖<sup>[33]</sup>,避免了常规的鸡胚增殖方法,使操作简便,成本降低,为细胞培养灭活疫苗的大规模生产奠定了基础。

b. 对 NA、HA 进行修饰后用作标记: Castrucci 等<sup>[34]</sup>将淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV) 的细胞毒性 T 细胞表位插入 A/WSN/33 (H1N1) 病毒 NA 基因的颈部,所产生的重组病毒免疫后能够对 LCMV 的攻击提供有效的保护。这表明对于流感病毒 NA 基因进行修饰,构建重组流感病毒是可行的。Li 等(2004 年)利用反向遗传学技术去除 HA 裂解位点的多个连续碱性氨基酸,并且将鼠肝炎病毒(murine hepatitis virus, MHV)S2 糖蛋白

的优势 B 细胞表位 5B19 插入 NA 基因颈部,以替换野生型 NA 基因颈部的 49~67 位氨基酸,构建了 1 株低致病力的、高度鸡胚适应的 H5N1 亚型禽流感病毒标记疫苗株 H5N1/PR8-5B19。该重组病毒多次传代后毒力不返强,且其分子标记 5B19 序列可稳定遗传。该标记疫苗对鸡加强免疫一次之后,用原核表达系统表达的该表位作为包被抗原进行 ELISA 检测,发现所有的 10 只鸡均可检测到抗体,因此可用该方法对自然感染的畜禽和接种该重组疫苗的畜禽进行鉴别,该疫苗的研制为有效防控 H5N1 亚型高致病性禽流感奠定了基础。

## 4 结 语

反向遗传学技术为研究流感病毒开辟了全新的思路,利用该技术可以从分子水平上研究病毒生活史,可以很容易地对病毒的复制及致病性分子机理进行研究,同时还可用于流感标记疫苗的研制。该技术目前已经被广泛应用,且发挥了巨大作用,相信不久的将来该项技术会得到进一步发展和不断完善,为流感防控开创新的局面。

反向遗传操作技术最具潜力、最吸引人的应用还是在于流感疫苗株的筛选,其优越性一方面在于可以解决流感大流行发生时疫苗生产的时效问题,因为传统疫苗株的筛选大约需要 3~4 个月,而反向遗传学技术可将时间缩短至 1~2 周。这样为流感大流行时争取时间,可以使尽可能多的人得到免疫保护。另一方面我们可以通过体外基因修饰的方式,将决定毒力的基因突变掉同时又保持了病毒的抗原性,这样获得的重组疫苗株可以被所有疫苗生产厂家应用,不需要更高级别的生物防护。但同时我们必须看到流感病毒反向遗传学技术是一把双刃剑,在有效地利用它的同时,应当高度警惕,不能忽视以下问题: a. 构建的体外转录本比野生型病毒的感染性可能还要强,因而不要盲目地构建不可预知的新病毒病; b. 只对少数感染性克隆进行了测序,一般推测感染性分子克隆的序列与亲本病毒的序列相同,在体内的命运与亲本病毒相同,其实并不尽然; c. 感染性转录本是具有生物活性的人工合成分子,就像野生型病毒 RNA 的拷贝,在病毒复制中也可发生 RNA 的重组和基因修饰(例如由于病毒复制酶造成的错配而发生点突变),因而我们应时刻保持警惕以避免构造出对人类健康造成威胁的流感病毒株; d. 反向遗传学技术的出现在病毒功能研究及疫苗研制等方面有着巨大的理论与实

践意义,但也使人为制造病毒成为现实,这使流感病毒作为生物武器变得轻而易举,因此在科学利用该技术为人类造福的同时也应加强该技术在生物安全方面的管理,防患于未然.

## 参 考 文 献

- Shibaguchi H, Kuroki M. Cloning and sequencing of variable region cDNA of a novel human monoclonal antibody to carcinoembryonic antigen, and generation of a single chain variable fragmented antibody. *Anticancer Res*, 2004, **24**(5c): 3355~3360
- Earn D J, Dushoff J, Levin S A. Ecology and evolution of the flu. *Trends in Ecology & Evolution*, 2002, **17**(7): 334~340
- Fouchier R A M, Munster V, Wallensten A, *et al.* Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol*, 2004, **79**(5): 2814~2822
- Seo S H, Hoffmann E, Webster R G. Lethal H5N1 influenza virus escape host anti-viral cytokine response. *Nat Med*, 2002, **8** (9): 950~954
- 龙进学, 薛 峰, 彭 宜, 等. H5N1 亚型禽流感病毒 NS 第 263-277 位核苷酸缺失提高病毒对鸡的致病力. *微生物学报*, 2006, **46**(2): 301~305  
Long J X, Xue F, Peng Y, *et al.* *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, **46**(2): 301~305
- Horimoto T, Takada A, Kiyoko Iwatsuki-Horimoto, *et al.* Generation of influenza A viruses with chimeric (TypeA/B) hemagglutinins. *J Virol*, 2003, **77**(14): 8031~8038
- Solórzano A, Webby R J, Lager K M, *et al.* Mutations in the NS1 protein of swine influenza virus impair anti-interferon activity and confer attenuation in pigs. *J Virol*, 2005, **79**(12): 7535~7543
- Massin P, Sylvie Van der Werf, Naffakh N. Residue 627 of PB2 is a determinant of cold sensitivity in RNA replication of avian influenza viruses. *J Virol*, 2001, **75**(11): 5398~5404
- Flandorfer A, Adolfo García-Sastre, Christopher F. Basler, *et al.* Chimeric influenza A viruses with a functional influenza B virus neuraminidase or hemagglutinin. *J Virol*, 2003, **77**(17): 9116~9123
- 王曲直, 龙进学, 胡顺林, 等. 神经氨酸酶茎部氨基酸缺失对 H5N1 亚型禽流感病毒生物学特性的影响. *微生物学报*, 2006, **46** (4): 542~546  
Wang Q Z, Long J X, Hu S L, *et al.* *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, **46**(4): 542~546
- Lugovtsev V Y, Vodeiko G M, Strupczewski C M, *et al.* Generation of the influenza B viruses with improved growth phenotype by substitution of specific amino acids of hemagglutinin. *Virology*, 2007, **365**(2): 315~323
- 石火英, 刘秀梵. 利用反向遗传技术研究 H9N2 亚型 AIV 传播途径的分子机制. *微生物学报*, 2006, **46**(1): 48~54  
Shi H Y, Liu X F. *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, **46**(1): 48~54
- Crumpacker C. Antiviral therapy. In: Knipe D M, Howley P M. Eds. *Fields virology*. 4th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. 393~433
- Saito R, Sakai T, Sato I, *et al.* Frequency of amantadine-resistant influenza A viruses during two seasons featuring co-circulation of H1N1 and H3N2. *J Clin Microbiol*, 2003, **41**(5): 2164~2165
- Ozaki H, Govorkova E A, Li C, *et al.* Generation of high-yielding influenza A viruses in African green monkey kidney (Vero) cells by reverse genetics. *J Virol*, 2004, **78**(4): 1851~1857
- Gubareva, L V. Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Virus Res*, 2004, **103**(2): 199~203
- Hurt A C, Iannello P, Jachno K, *et al.* Neuraminidase inhibitor-resistant and sensitive influenza B viruses isolated from an untreated human patient. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, **50** (5): 1872~1874
- Hurt A C, Ho H T, Barr I. Resistance to anti-influenza drugs: adamantanes and neuraminidase inhibitors. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2006, **4**(5): 795~805
- Abed Y, Goyette N, Boivin G. A reverse genetics study of resistance to neuraminidase inhibitors in an influenza A/H1N1 virus. *Antivir Ther*, 2004, **9**(4): 577~581
- Cheam Ai Lee, Barr I G, Hampson A W, *et al.* *In vitro* generation and characterization of an influenza B variant with reduced sensitivity to neuraminidase inhibitors. *Antiviral Res*, 2004, **63**(3): 177~181
- Yen H L, Hoffmann E, Taylor G, *et al.* Importance of neuraminidase active-site residues to the neuraminidase inhibitor resistance of influenza viruses. *J Virol*, 2006, **80**(17): 8787~8795
- Hatta M, Gao P, Halfmann P, *et al.* Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science*, 2001, **293**(5536): 1840~1842
- Noda T, Sagara H, Yen A, *et al.* Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature*, 2006, **439**(7075): 490~492
- Yao Y X, Mingay L J, Barclay W S. Sequences in influenza A virus PB2 protein that determine productive infection for an avian influenza virus in mouse and human cell lines. *J Virol*, 2001, **75**(11): 5410~5415
- Li Z, Chen H, Jiao P, *et al.* Molecular basis of replication of duck H5N1 influenza viruses in a mammalian mouse model. *Virology*, 2005, **79**(18): 12058~12064
- Hulse-Post D J, Franks J, Boyd K, *et al.* Molecular changes in the polymerase genes (PA and PB1) associated with high pathogenicity of H5N1 influenza virus in mallard ducks. *J Virol*, 2007, **81**(16): 8515~8524
- Li Z J, Jiang Y P, Jiao P R, *et al.* The NS1 gene contributes to the virulence of H5N1 avian influenza viruses. *J Virol*, 2006, **80**(22): 11115~11123
- Liu M, Wood J M, Ellis T, *et al.* Preparation of a standardized, efficacious agricultural H5N3 vaccine by reverse genetics. *Virology*, 2003, **314**(2): 580~590
- Song H, Nieto G R, Perez D R. A new generation of modified live-attenuated avian influenza viruses using a two-strategy combination as potential vaccine candidates. *J Virol*, 2007, **81** (17): 9238~9248
- Neumann G, Fujii K, Kino Y, *et al.* An improved reverse genetics

- system for influenza A virus generation and its implications for vaccine production. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102** (46): 16825~16829
- 31 Babiuk L A. Broadening the approaches to developing more effective vaccines. *Vaccine*, 1999, **17**(13-14): 1587~1595
- 32 Lee C W, Senne D A, Suarez D L. Generation of reassortant influenza vaccines by reverse genetics that allows utilization of a DIVA (differentiating infected from vaccinated animals) strategy for the control of avian influenza. *Vaccine*, 2004, **22**(23-24): 3175~3181
- 33 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*, 2006, **22**(5): 720~726  
Liu M, Zhang Y, Liu C G, *et al.* *Chin J Biotechnology*, 2006, **22**(5): 720~726
- 34 Castrucci M R, Hou S, Kawaoka Y. Protection against lethal lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) infection by immunization of mice with an influenza virus containing an LCMV epitope recognized by cyto-toxic T lymphocytes. *J Virol*, 1994, **68** (6): 3486~3490

## Progress of Reverse Genetics Technique in Influenza Virus

LIU Da-Fei<sup>1)</sup>, LIU Chun-Guo<sup>1)</sup>, LIU Ming<sup>1)\*</sup>, LIU Da-Cheng<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology/Avian Influenza Laboratory of Ministry of Agriculture, Harbin Veterinary Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China; <sup>2)</sup>Chengxiang Veterinary Station, Laiyang 265200, China)

**Abstract** For the characteristics of numerous subtypes and frequent variations of influenza virus, it brings great difficulty to influenza in the prevention and control. Thus, the most pressing matter of the moment is to reinforce the research in pathogenesis and transmission mechanism, as well as to develop new type vaccines. Recently, the development of reverse genetics technique breaks a new path for influenza virus in research of function analysis and preparation of vaccines.

**Key words** influenza virus, reverse genetics, function analysis, marker vaccine

---

\*Corresponding author.

Tel: 86-451-85935069, E-mail: Liuming04@126.com

Received: February 18, 2008 Accepted: May 29, 2008