

综 述

A 型流感病毒的反向遗传技术研究进展

卢建红^{1,2*} 刘秀梵¹ 邵卫星¹

(1 扬州大学 农业部畜禽传染病学重点开放实验室 扬州 225009 2 中南大学肿瘤研究所 长沙 410078)

摘要 A 型流感病毒基因组为单股负义 RNA,分为 8 个片段。反向遗传技术即从克隆的 cDNA 产生病毒的过程,是研究 RNA 病毒、也是研究 A 型流感病毒基因结构与功能的新技术。介绍了 A 型流感病毒反向遗传技术的发展,完全以质粒为基础的新操作系统及其在研究病毒的生命周期、致病性、产生基因修饰的疫苗候选株等方面的应用。

关键词 A 型流感病毒 反向遗传技术 质粒基础的操作系统

RNA 病毒(包括 A 型流感病毒)的反向遗传技术或称病毒拯救,是指从克隆的 cDNA 产生感染性病毒的过程,实现了在 cDNA 水平上对 RNA 病毒的操作,从而为病毒的功能基因组研究提供了强有力的手段^[1],这一技术是根据病毒基因组特征和复制特点等利用分子生物学技术而建立和完善起来的,技术体系要满足病毒复制和包装的各种必要条件。本文将从 A 型流感病毒的基因组特征和复制特点出发,重点介绍流感病毒反向遗传操作技术的发展与应用。

1 A 型流感病毒的基因组特征与复制特点

A 型流感病毒在温血动物(禽类和哺乳动物)中广泛存在,也是目前致人类和各种动物流感疾病的主型^[2],它是正粘病毒科的成员,基因组是单股、负义的 RNA,分为 8 个片段,编码 11 种功能蛋白^[2,3]。HA 和 NA 是病毒表面的 2 种糖蛋白,也是病毒表面抗原,根据 HA 和 NA 的不同,A 型流感病毒(以下简称流感病毒)又可区分为不同亚型,目前已鉴定 15 种 HA 和 9 种 NA 亚型^[2]。

流感病毒各基因片段 3' 末端和 5' 末端的部分序列反向互补,通过碱基配对形成锅柄状的二级结构,组成 vRNA 的启动子成分,对病毒的复制、核酸内切酶和 mRNA 的多聚腺苷酸化是必需的。由于基因组不具有感染性,各个 RNA 片段被核蛋白

(NP)包裹,并必须与 3 个聚合酶亚基(PB2、PB1、PA)结合在一起形成核糖核蛋白复合物(RNPs)才有活性。病毒感染时,首先与宿主细胞表面的特异性 HA 受体结合,通过融膜进入细胞后,释放出 RNPs,RNPs 进入细胞核才开始病毒基因组的复制和转录,每个 RNA 片段单独组成一个转录单位,转录出 mRNA 和互补 RNA(cRNA),mRNA 翻译合成病毒蛋白,cRNA 复制生成病毒的负链子代 RNA,进而在细胞浆中组装成完整的病毒粒子^[4]。

2 流感病毒反向遗传技术的发展历史

从克隆的 cDNA 产生 RNA 病毒,最关键的是形成功能性的 RNPs,并且要保证包括病毒复制启动成分的 3' 和 5' 末端在内的序列准确。对于分节段的负链 RNA 病毒,其拯救工作是个挑战,而且与大多数负义 RNA 病毒不同,A 型流感病毒基因组在细胞核内复制,因此必须在细胞核内同时含有 8 种功能性的 RNPs。

早期通过用去污剂处理病毒或其它方法分离、纯化 NP 和聚合酶蛋白重建 RNP 复合物(RNPs),证实 RNPs 与短的或全长 vRNA 结合形成了功能完全的 RNPs^[5],从而也证实了流感病毒 RNA 复制和转录形成 RNP 最小单位的中心蛋白是 3 个聚合酶(P)蛋白和核蛋白(NP)。接着,进一步建立了能稳定表达这 4 种蛋白的系统(如痘苗病毒、SV40)或细胞系,这些体系可以对 vRNP 非编码区进行修饰以鉴定其重要的启动与调节信号作用,也允许对聚合酶和 NP 蛋白的诱变以研究它们在病毒复制和转

收稿日期:2004-08-26 修回日期:2005-01-04

*电子信箱:jianhl@sohu.com

录中的功能。其缺点是无法掌握 P 蛋白和 NP 蛋白的比例使之尽量与自然感染细胞中的一致,这样就可能影响到病毒的复制与转录。但是,这种系统显示出已经能在细胞内人工产生 vRNPs。

在认识到功能 vRNPs 能够重建并导入细胞的基础上,为了使人工产生的 vRNPs 导入病毒粒子,发展了以辅助病毒为基础的操作系统。cDNA (可操作基因) 转录合成的 vRNA 与 P 蛋白和 NP 形成 vRNPs,再与辅助病毒提供的其它 vRNPs 混合在一起产生有感染性的病毒。辅助流感病毒,不仅提供进一步 RNA 合成所需的蛋白质,基于基因组的分节段特性,也可以使合成的基因片段包装进后代病毒中,报告(或目的)基因的活性也在组织培养物中得到传递。大致有两种可达到这种方法:

一种为核糖核蛋白(RNPs)转染法。Luytjes 等^[6]首次报道产生的流感病毒其 vRNA 是由克隆的 cDNA 产生的,在 NS 基因编码区位置(不改变非编码区,即启动成分不变)插入氯霉素乙酰转移酶(CAT)在体外与提取的 RNP 结合成 RNPs,再转染已用辅助流感病毒感染的真核细胞,产生了含 CAT 的 RNA 和其它 8 个片段的子代病毒。但经过在细胞传 3 代,含 CAT 的片段即不能稳定地保持在病毒中。Enami 等^[7]则首次引入突变产生了病毒子。这种方法需要在含大量辅助病毒的背景中筛选目的病毒子。因此必须有强大的筛选系统,例如,可用具有温度敏感性、宿主范围限制性或药物抗性等辅助病毒。

另一种为 RNA 聚合酶 I 方法。Neumann 等^[8]建立了可供修饰病毒基因的系统即 RNA 聚合酶(pol) I 系统,这一系统不需要体外装配 vRNPs 后转染细胞,不用 T7 RNA 聚合酶及其表达系统,而是利用细胞核内的酶 polI 转录出核糖体 RNA (rRNA),rRNA 与流感 vRNA 一样不含 5 帽子和 3 poly(A) 结构, polI 是细胞的 3 种 RNA 聚合酶中唯一不使转录的 RNA 加上帽子和 poly(A) 尾的,而且,利用细胞中的 polI 定位于流感病毒复制的地点——细胞核。polI 的使用是一大突破,此后完全以质粒为基础的新操作系统都使用这个酶实现 vRNA 的转录。与 RNPs 转染法比较, polI 法虽然也需要辅助病毒,但不需要进行体外 RNA 转录、蛋白质纯化、体外 RNP 合成和 RNP 转染。

3 完全以质粒为基础的新操作系统

流感病毒的反向遗传技术经过 10 年的探索历程, Neumann 等^[9]及 Fodor 等^[10]于 1999 年分别报道了能完全从克隆的 cDNA 产生流感病毒的新技术,这是该技术领域发展史上的一次转折。与以前的方法相比,这种方法应用简便,只需要 DNA 克隆和转染技术,这在任何分子生物学和病毒学实验室都可以推广。由于不再需要辅助病毒,也就免去了大量繁琐的筛选工作。

Neumann 和 Fodor 等报道的新操作系统为 17/12 质粒系统。Neumann 等^[9]把编码流感病毒 A/WSN/33 8 个 vRNA 片段的 cDNA 克隆至人 RNA 聚合酶(pol) I 启动子和鼠 polI 终止子之间,即 8 个基因片段的转录质粒,可以由细胞提供的 polI 启动合成 vRNA,另外,病毒的 9 个结构蛋白(PB1、PB2、PA、NP、HA、NA、M1、M2 和 NS2)基因分别克隆到真核表达载体,上述 17 个质粒构成 17 质粒系统,共转染 293T(人胚肾)细胞,上清中产生了 8×10^7 个/ml 的感染性病毒子。在蛋白表达中也可以只使用表达 3 种聚合酶和 NP 即形成 RNPs 的 4 种蛋白的表达质粒即构成 12 质粒系统。在 17/12 质粒系统中,虽然共转染的质粒数目很多,但转染上清中均产生了 107 个/ml 以上的感染性病毒粒子,这样的效率在所有负义 RNA 病毒的拯救中都是最高的,其中重要的原因之一是使用的 293T 细胞具有很高的转染效率并且细胞内具有所有启动病毒复制的成分,尤其是细胞中具有足够的 RNA 聚合酶 I,并且能随着细胞增殖保证 polI 的供给。

Fodor 等^[10]报道的操作系统与 Neumann 等的系统类似,只是在 vRNA 的转录载体中,终止序列用丁肝核酶以使转录后产生准确的 3 端。

为了减少共转染质粒的数量, Hoffmann 等^[11]另辟蹊径,建立了另一种操作系统即 8 质粒系统,这是一个双向双表达系统,也称 RNA 聚合酶 I/II 系统。在这种转录/表达载体(图 1)中,把编码 vRNA 的 cDNA 正向克隆至 polII 启动子(从人巨细胞瘤病毒 CMV 启动子衍化而来)和终止序列(牛生长激素 poly(A) 信号 aIBGH)之间,在此表达盒之间还反向插入了人 polI 启动子(P1h)和鼠 polI 终止序列(tI)。8 个基因片段 cDNA 分别克隆后,共转染真核细胞,在同一个模板上由 polI 控制合成(转录)负义 vRNA,由 polII 控制合成正链 mRNA 并进一步合成



图1 双向 RNA 聚合酶 I/II 转录系统模式图

Fig. 1 Schematic representation of the bidirectional pol I/pol II transcription system

(表达)病毒的功能蛋白质。Hoffmann等^[12]还构建了单向表达的8质粒系统,与双向载体的区别仅仅是 polI 启动子和终止序列交换位置使 polI 和 polII 启动子同向,其拯救效率比双向的低。

与 17/12 质粒系统相比,8 质粒系统中减少了单独用于蛋白质表达的质粒数,拯救效率相当于或高于前者。但由于使用同一个模板获得蛋白表达和 vRNA 合成,又会减小系统的“弹性”,例如,在病毒蛋白和基因传递的研究中,缺少一个或多个片段或者某个(些)片段中存在致死性突变时,就不可能产生病毒,所以,在表达外源基因或突变比较多的研究中,12 质粒系统优于 8 质粒系统,在野生型或基因重排病毒的产生中,这 2 种新操作系统都可以选择,而 8 质粒系统的分子克隆工作量少,共转染时使用的质粒数少。

目前应用最多的是 12 质粒系统和 8 质粒系统,许多实验室自己构建了这种系统,也可以与 Fodor 等^[10]或 Hoffmann 等^[11]所在的实验室建立合作关系,应用他们的系统开展研究。笔者应用 Hoffmann 等^[11]的 8 质粒系统进行了有关研究,其分子克隆过程容易。为了使产生的病毒尽量与野生型的一样以保证进一步研究病毒表型和基因功能的结果的准确性,首先必须保证序列的准确性,要对插入载体的基因序列进行校对和修正工作,虽然使用高保真酶扩增基因,整个基因组中只出现数个错误位点,这个过程也是费时费力的。如果转染中的基本因素如质粒的纯度高、细胞状态好等,病毒拯救技术重复性就很好,共转染上清接种鸡胚在第 1 代或第 2 代获得可在鸡胚上高滴度生长、形态与野生型的一致^[13,14]。

4 A 型流感病毒反向遗传技术的应用

通过突变基因,然后拯救出新的病毒,与野生型或父母代病毒进行表型比较,在阐明病毒的生活周期和致病性、基因组的结构与功能等方面可以得到广泛的应用。

应用反向遗传技术可以了解哪些病毒蛋白对

病毒生活周期具有重要作用。Hui 等^[15]对 M1 蛋白的核定位信号区(101~105 氨基酸位点)进行突变,结果显示,某些形式的单位点和双位点突变甚至数个氨基酸替换产生的病毒都具有与野生型病毒一样的表型,而某些形式的突变则不能产生病毒或者 M1 蛋白只能在细胞浆中由克隆的 cDNA 表达,而不能定位到细胞核,可见,这 5 个氨基酸的某些组合形式并不是病毒复制必需的。

在人类流感历史上,两次流感的发生引起世界性关注和研究流感病毒的致病性。一次是 1918~1919 年发生的“西班牙流感”,夺去世界上 2~4 千万人的生命。Basler 等^[16]把从福尔马林固定的病理组织中克隆到的 1918 NS1 或 NS 全长基因片段与鼠适应株 A/WSN/33(H1N1)或 A/PR/8/34(H1N1)重组,重组病毒能在 MDCK 中生长良好,但对鼠致病弱,说明重组病毒不能在小鼠的细胞中有效发挥其抑制干扰素的功能。从另一方面也可知,对于重组的骨架病毒 A/WSN/33 和 A/PR/8/34 来说,NS1 是它们对小鼠毒力的关键因素,NS 基因可能对 1918 流感病毒的致病性作用不大。另一次受到关注的是 1997 年在香港首次发生禽流感病毒(AIV)突破种间障碍、直接感染人的事件。Hatta 等^[17]应用完全以质粒为基础的反向遗传系统,对 1997 年 H5N1 分离株,以两个毒力组的代表株 HK483 和 HK486 为基础,构建一系列的基因重排病毒子,并用它们感染小鼠。结果表明,在 HA 具有多碱性氨基酸裂解序列的前提下,PB2 627 位单个氨基酸的变化(Glu→Lys)可以使 H5N1 AIV 对小鼠的毒力从弱到很强烈地变化。这些结果从分子水平上揭示了 1997 香港流感的致病机制。

从理论上讲,反向遗传技术允许对任何基因片段任何位置进行突变,不过,对某个操作系统而言,这种突变必须是非致死性的(但难以预知),否则不能产生病毒。由于流感病毒各基因片段不长,可以快速地进行突变,而且基因组分片段,所以定向突变和基因重排是研究流感病毒基因结构与功能中的常用操作技术。

反向遗传技术的另一个方面的应用是研制经基因修饰的疫苗候选株。目前,人用流感灭活疫苗的毒株要通过传统的(6+2)重排策略构建,而且,由于抗原的变异,每年都要对疫苗进行评价,然后用经评价确定使用的流行毒株与高度鸡胚适应株 A/PR/8/34(PR8)同时感染鸡胚,经过传代反复筛选,最终得到含有流行毒株 HA 和 NA 基因的重组病毒作为新疫苗株。反向遗传技术可以大大加速这个过程,只需将用流行株的 HA 和 NA 基因与 PR8 的内部基因的分别构建的转录/表达质粒组合、共转染细胞,拯救的病毒就是所需要的疫苗株, Hoffmann 等^[18]用 8 质粒系统的实验证明了这是一个容易而又直接的过程。

2003、2004 年在香港、越南、泰国等地区和国家又发生了多人感染 H5N1 亚型 AIV 并死亡的事件。Webby 等^[19]使用 2003 年从人分离的 H5N1 毒株,通过缺失 HA 裂解位点的部分碱性氨基酸,用 8 质粒系统迅速产生了致弱的 H5N1/PR8 疫苗候选株。Subbarao 等(2003)用 12 质粒系统、Liu 等(2003)用 8 质粒系统报道了类似的 H5N1/PR8 和 H5N3/PR8 疫苗候选株。我们^[14]用 8 质粒系统产生的 H5N1/WSN 和 H5N2/WSN 重组病毒能逐渐适应鸡胚,也表现致弱表型、且遗传稳定。因此,反向遗传技术也是迅速应对流感大流行的技术储备。

此外,由于流感病毒的核酸复制不经过 DNA 阶段,无致瘤性,而且能激发有效的系统抗体、粘膜抗体和(或)细胞毒性 T 淋巴细胞反应(CTL),因此可用反向遗传技术产生作为基因传递的流感病毒或没有复制能力的流感病毒样粒子(influenza virus-like particle, VLP),用表面或内部蛋白的基因作为插入位点,表达外源基因^[11]。有趣的是,表达肿瘤相关抗原或操作过 NS1 基因的流感病毒在一定条件下还具有抗肿瘤特性^[20]。但由于流感病毒各基因片段短,因此表达的外源表位大小受到限制。

5 结 语

流感病毒亚型众多,毒力差异大,基因分节段,需要方便的研究手段,而反向遗传技术已经达到可以完全从克隆的 cDNA 产生病毒的水平,新的反向遗传操作系统提供了进行更方便快速研究的有用工具,必将使流感病毒的复制和致病性、产生基因修饰的疫苗候选株、表达外源基因等方面得到更深入的研究,为控制流感在动物和人类的发生与流行

作出积极的贡献。但流感病毒复制和毒力变化的机制还不十分清楚,研究者要充分考虑到生物安全问题,利用已有的知识和研究结果作为基础,不能盲目地构建不可预知的新病毒,确保对环境、动物和人类的安全性。

参考文献

- [1] 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 Gen Virol*, 2002, 83: 2635 ~ 2662
- [2] Alexander D J. A review of avian influenza in different bird species. *Vet Microbiol*, 2000, 74: 3 ~ 13
- [3] Chen W, Calvol P A, Malide D, et al. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nature Medicine*, 2001, 7(12): 1306 ~ 1312
- [4] Portela A, Zurcher T, Nieto A, et al. Replication of orthomyxoviruses. *Adv Virus Res*, 1999, 54: 319 ~ 348
- [5] Honda A, Mukaigawa J, Yokoyama A, et al. Purification and molecular structure of RNA polymerase from influenza virus A/PR8. *J Biochem(Tokyo)*, 1990, 107: 624 ~ 628
- [6] Luytjes W, Krystal M, Enami M, et al. Amplification, expression, and packaging of foreign gene by influenza virus. *Cell*, 1989, 59: 1107 ~ 1113
- [7] Enami M, Luytjes W, Krystal M, et al. Introduction of site-specific mutations into the genome of influenza virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 3802 ~ 3805
- [8] Neumann G, Zobel A, Hobom G. RNA polymerase F-mediated expression of influenza viral RNA molecules. *Virology*, 1994, 202: 477 ~ 479
- [9] Neumann G, Watanabe T, Ito H, et al. Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 9345 ~ 9350
- [10] Fodor E, Devenish L, Engelhardt O G, et al. Rescue of influenza A virus from recombinant DNA. *J Virol*, 1999, 73: 9679 ~ 9682
- [11] 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
- [12] Hoffmann E, Webster R G. Unidirectional RNA polymerase F-polymerase II transcription system for the generation of influenza A virus from eight plasmids. *J Gen Virol*, 2000, 81: 2843 ~ 2847
- [13] 卢建红, 邵卫星, 刘玉良, 等. 用 8 质粒病毒拯救系统产生 H9N2/WSN 流行性感冒病毒. *病毒学报*, 2005 (在排印中)
Lu J H, Shao W X, Liu Y L, et al. *Chinese Journal of Virology*, 2005, in press
- [14] 卢建红, 龙进学, 邵卫星, 等. 用反向遗传操作技术产生致弱的 H5 亚型重组流感病毒. *微生物学报*, 2005 (在排印中)
Lu J H, Long J X, Shan W X, et al. *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, in press
- [15] Hui E K, Barman S, Yang T Y, et al. Basic residues of the helix six

- domain of influenza virus M1 involved in nuclear translocation of M1 can be replaced by PTAP and YPDL late assembly domain motifs. *J Virol*, 2003, 77(12): 7078 ~ 7092
- [16] Basler C F, Reid A H, Dybing J K, et al. Sequence of the 1918 pandemic influenza virus nonstructural gene (NS) segment and characterization of recombinant virus bearing the 1918 NS genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(5): 2746 ~ 2751
- [17] Hatta M, Gao P, Halfmann P, et al. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science*, 2001, 293: 1840 ~ 1842
- [18] Hoffmann E, Krauss S, Perez D, et al. Eight-plasmid system for rapid generation of influenza virus vaccines. *Vaccine*, 2002, 20: 3165 ~ 3170
- [19] Webby R J, Perez D R, Coleman J S, et al. Responsiveness to a pandemic alert: use of reverse genetics for rapid development of influenza vaccines. *Lancet*, 2004, 363: 1099 ~ 1103
- [20] Zheng H, Palese P, Garcia-Sastre A. Antitumor properties of influenza virus vectors. *Cancer Res*, 2000, 60: 6972 ~ 6976

Advances on the Reverse Genetics of Influenza A Virus

LU Jian-hong^{1,2} LIU Xiufan¹ SHAO Wei-xing¹

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

(2 Cancer Research Institute, Central South University Changsha 410078, China)

Abstract The genome of influenza A virus is comprised of eight separate segments of single-stranded, negative-sense RNA. Reverse genetics which enables one to generate negative-sense RNA viruses such as influenza A virus from cloned cDNA is a novel technique for studying structure and function of the virus. The background for the development of the technique and new systems entirely based on plasmids were introduced, and the implication in applications for studying virus life cycle, pathogenesis, and generation of vaccine candidates was also discussed.

Key words Influenza A virus Reverse genetics Plasmid-based system

科学出版社新书

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>

人体生理学

蒋正尧主编 沈行良 谢俊霞 副主编

2005 年 3 月出版, ISBN 7-03-014532-1/Q. 1511 定价: 68.00 元

本书为《人体生理学 Human Physiology》五年制或七年制高等医学院校临床医学、口腔医学、预防医学类专业大二教材。提供系统的、内容更新的生理学基本理论、概念。全书强调有机地联系临床实践,并结合生理学史上的伟大发现,启迪青年学生的思维:“捕捉有趣现象 提出假设 实验验证 结论”。

临床免疫学

谭锦泉 邓涛 主编

ISBN 7-03-014321-3/Q. 1476 定价: 98.00 元

免疫学是生命科学中发展最快的学科之一。随着分子生物学技术理论和方法的建立、改进与完善,基础免疫学和临床免疫学等方面都得到了极大的发展,并由此产生了许多新的理论和概念。本书共有 23 个章节,是集中外研究应用的最新进展而编写的一本注重介绍免疫学相关疾病的基础理论、临床应用及研究进展等内容的著作。本书涉及胃肠道疾病、肝脏疾病、呼吸系统疾病、肾脏疾病、内分泌疾病、血液系统疾病、结缔组织疾病、神经系统疾病、心血管疾病、生殖系统疾病、热带和传染疾病、器官移植、儿童免疫、眼科疾病、免疫缺陷综合征、肿瘤免疫等。

邮购地址:100717 北京东黄城根北 16 号科学出版社科学分社,联系人:阮芯 电话/传真:010-64034622
欢迎致电索要书目,010-64012501 欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)