

# A/PR8/34(H1N1) NA 基因包装信号对 H5N1 流感疫苗株 NIBRG-14 产量的影响

郑薇<sup>1,2,3</sup>, 潘蔚琦<sup>1,3</sup>, 杨化强<sup>1,3</sup>, 李婷<sup>1,3</sup>, 张北武<sup>1,3</sup>, 李锋<sup>1,3</sup>, 陈凌<sup>1,2,3</sup>

(1. 中国科学技术大学生命科学学院, 安徽合肥 230026;

2. 中国科学院广州生物医药与健康研究院, 广州 510663; 3. 呼吸病国家重点实验室, 广州 510120)

**摘要:** NIBRG-14 是采用“6+2”策略制备的一株 H5N1 灭活疫苗株, 其表面抗原 HA 和 NA 基因来自于 A/Vietnam/1194/2004 (H5N1, VN1194), 内部基因来自于 A/Puerto Rico/8/34 (H1N1, PR8), 已有研究表明该疫苗株在鸡胚中的产量不佳. 本研究发现在 PR8 背景下, VN1194 NA 基因被包装入重组病毒中的效率仅为正常包装量的 38%~68%, 因此有一部分重组病毒为不含有 NA vRNA 的缺陷型病毒粒子. 本研究通过在 VN1194 NA 基因完整编码区(CDS)的 5' 和 3' 两端嵌合 PR8 NA 基因包装信号序列(vRNA 3' 末端 41bp, 5' 末端 67bp)的方法, 使重组病毒中 NA vRNA 的包装效率得到完全恢复, 并且病毒在鸡胚的生长滴度提高了 10 倍, 血凝素 HA 含量提高了约 2.7 倍, 从而为 H5N1 流感疫苗株的研制提供了新的思考方向.

**关键词:** H5N1 流感; 疫苗; 包装信号; 病毒生长

**中图分类号:** S852.659; Q78      **文献标识码:** A      doi: 10.3969/j.issn.0253-2778.2010.04.001

## Enhanced growth of the H5N1 influenza vaccine strain NIBRG-14 by the neuraminidase's packaging signal sequence of A/Puerto Rico/8/34

ZHENG Wei<sup>1,2,3</sup>, PAN Weiqi<sup>1,3</sup>, YANG Huaqiang<sup>1,3</sup>, LI Ting<sup>1,3</sup>,  
ZHANG Beiwu<sup>1,3</sup>, LI Feng<sup>1,3</sup>, CHEN Ling<sup>1,2,3</sup>

(1. School of Life Science, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China;

2. Guangzhou Institute of Biomedicine and Health, Chinese Academy of Sciences (GIBH), Guangzhou 510663, China;

3. National Key Laboratory of Respiratory Disease, Guangzhou 510120, China)

**Abstract:** NIBRG-14 is one of the H5N1 candidate vaccine viruses developed using “6+2” approach with the hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) genes derived from A/Vietnam/1194/2004 (H5N1, VN1194) and the remaining six internal segments from A/Puerto Rico/8/34 (H1N1, PR8). However, NIBRG-14 was reported to yield low amounts of HA antigen. This study found that the NA vRNA of VN1194 is poorly packaged (38%~68%) into the recombinant viruses with a backbone of PR8 genes, causing the formation of defective virions without the NA vRNA in viral genome. Using recombinant DNA techniques, we constructed a chimeric NA gene with the coding region of VN1194 NA flanked by the packaging signal sequence (vRNA 3' end 41bp, 5' end 67bp) of PR8 NA. The packaging of NA vRNA is

收稿日期: 2009-05-12; 修回日期: 2009-06-06

基金项目: 广州市科技计划项目(2006E1-E0011)和中国科学院广州生物医药与健康研究院院内启动经费资助.

作者简介: 郑薇, 女, 1983 年生, 硕士生. 研究方向: 分子病毒学. E-mail: zheng\_wei@gibh.ac.cn

通讯作者: 潘蔚琦, 博士. E-mail: pan\_weiqi@gibh.ac.cn

completely restored in the recombinant viruses with the chimeric NA gene. Moreover, the recombinant viruses contained the chimeric NA gene replicate better in chicken embryonated eggs than recombinant viruses with wild type NA gene of VN1194, as indicated by a 10-fold increase in virus titer and 2.7-fold increase in HA antigen content. These findings suggest a novel strategy to improve the *in ovo* growth and increase the available dose of NIBRG-14 in vaccine manufacture.

**Key words:** H5N1 influenza; vaccine; packaging signal; virus growth

## 0 引言

自 1997 年首次报道 H5N1 亚型禽流感病毒突破种间屏障感染人并致死事件以来, 该病毒对人类的威胁一直没有解除. 疫苗免疫接种是流感防治的主要手段, 为避免流感大流行的暴发, 世界各国都在加大力度进行 H5N1 流感疫苗的研制. 在全病毒灭活疫苗株的制备中, 世界卫生组织 (WHO) 推荐使用反向遗传操作技术进行 H5N1 流感疫苗株的拯救, 即选择能够在鸡胚中高效生长的 A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)(PR8) 作为 6 个内部基因的供体, 选择具有代表性的 H5N1 流行株作为 HA 和 NA 表面抗原基因的供体, 并敲除 HA 基因 HA1、HA2 裂解位点处多个连续碱性氨基酸, 去除 H5HA 基因的毒力决定位点, 以保证疫苗株的安全性<sup>[1-2]</sup>. NIBRG-14, 是英国国家生物制品检定所 (NIBSC) 用该方法制备的一株 H5N1 流感疫苗株, 其表面抗原基因来自 A/Vietnam/1194/2004 (H5N1)(VN1194). 实验室研究表明 NIBRG-14 的抗原性、免疫原性和鸡胚生长特性均可满足其作为疫苗株的要求, 但是在实际生产中该疫苗株的 HA 抗原产量通常较低<sup>[3-5]</sup>. 当面临流感大流行疫情时, 为保证公共卫生安全, 疫苗生产商需要尽最大可能生产最大份额的疫苗, 因此疫苗候选株的产量和抗原含量对于疫苗生产是至关重要的. 导致 NIBRG-14 产量不高的原因何在? 如何提高该疫苗株的产量? 这些问题的回答将对 H5N1 疫苗株的制备和生产具有重大的推动作用.

流感病毒基因组内含有 8 条分节段的 vRNA 片段, vRNA 在核内转录和复制后, 与 3 个聚合酶蛋白 (PB2, PB1, PA) 和核蛋白 (NP) 组成核糖核蛋白复合体 (RNP), 在出核转运蛋白 (NEP) 的作用下进入胞浆, 8 条 vRNA 片段被等摩尔地包装入病毒粒子中, 产生有感染性的子代病毒粒子<sup>[6-7]</sup>. 关于流感病毒的包装机制有“随机性包装”和“选择性包装”两种观点, 目前有越来越多的研究表明流感病毒基因

组的包装机制为“选择性包装”, 每条基因片段 5' 和 3' 末端非编码区和编码区内部分碱基具有包装信号 (packaging signal) 的作用. 包装信号区域碱基的突变或缺失会导致基因片段包装入病毒粒子中的效率大大下降, 进而会影响子代病毒的产生<sup>[8-14]</sup>. 本研究以 VN1194 毒株的 NA 基因为研究对象, 就 PR8 NA 基因包装信号序列对异源 NA 基因的包装、重组毒株的生长以及 HA 抗原含量的影响进行了探讨, 为提高 H5N1 流感疫苗株的产量提供了解决方案.

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞与病毒

MDCK 与 293T 细胞系均为本室保存, 均以含 10% 胎牛血清的 DMEM 进行常规培养. 流感病毒 A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)(Cat. No. VR-95<sup>TM</sup>) 购自美国典型培养物保存中心 (ATCC).

### 1.2 质粒和载体

转录载体 pPOLI 与真核蛋白表达载体 pCAGGs 由美国纽约 Mount Sinai 医学院 Peter Palese 教授馈赠. 含 A/Vietnam/1194/2004 HA 和 NA 基因的重组质粒 pUC-VN1194HA, pUC-VN1194NA 由香港大学陈洪霖教授馈赠. 含 A/Puerto Rico/8/34 毒株重组转录质粒 (pPOLI-PR<sup>8</sup>PB2, pPOLI-PR<sup>8</sup>PB1, pPOLI-PR<sup>8</sup>PA, pPOLI-PR<sup>8</sup>HA, pPOLI-PR<sup>8</sup>NP, pPOLI-PR<sup>8</sup>NA, pPOLI-PR<sup>8</sup>M, pPOLI-PR<sup>8</sup>NS), 4 个聚合酶表达质粒 (pCAGGs-PB2, pCAGGs-PB1, pCAGGs-PA, pCAGGs-NP) 均由本室构建并保存. 重组质粒 pPOLI-MutVN1194HA (将 VN1194HA 裂解位点处多个连续碱性氨基酸 RERRKKR 改造为 RETR-) 和 pPOLI-VN1194NA 由本室构建并保存.

### 1.3 主要试剂及鸡胚

RNA 提取试剂 Trizol、SuperScript II 逆转录酶、OPTI-MEM、Lipofectamine 2000、SYBR greenII RNA gel stain kit 购自 Invitrogen 公司; DNA 凝胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒、病毒 RNA

提取试剂盒购自 Qiagen 公司; Pyrobest DNA 聚合酶、SYBR Premix Ex Taq 定量 PCR 试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司; 限制性内切酶 ClaI、Sall, T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司; 抗流感病毒 NP 蛋白单克隆抗体购自美国 ViroStat 公司; AEC 显色试剂、TPCK-Trypsin、蔗糖购自美国 Sigma 公司; SPF 鸡胚购自北京梅里亚实验动物有限公司; 10 日龄鸡胚购自华南农业大学畜牧厂。

#### 1.4 重组质粒 pPOLIPR8 (21)VNNA(39) 的构建

以 pPOLI-VN1194NA 质粒为模板, 用引物 ClaI-VN1194-21F (5'-ATCATCGA TGAATCCAAA TCAGAAGATAATA-3') 和 Sall-VN1194-1370R (5'-ATCGTCTGACTACTTG TCAATGGTGAA TGG-3') 扩增 VN1194NA 完整编码区(CDS)。为了将 PR8 NA vRNA 3' 和 5' 非编码区和编码区内 3' 端 21 个碱基、5' 端 39 个碱基嵌合在 VN1194NA CDS 两侧, 设计一对“背靠背”引物 Sall-pPOLIPR8-4235F (5'-CATGTCGACCAGACGG TGCTGAGTTGCCA-3') 和 ClaI-pPOLIPR8-2928R (5'-GTAATCGATATTTTCTGATTTGGA TTCGTTTTAAACC-3')。在 ClaI-pPOLIPR8-2928R 中引入单个碱基突变, 使 PR8NA 编码区内的起始密码子 ATG 突变为 ACG, 以保证嵌合基因中只含有完整的 VN1194NA 编码区。以 pPOLI-PR8NA 质粒为模板, 以此对引物进行反向 PCR (inverse PCR) 扩增重组 pPOLI-PR8NA 质粒中的 pPOLI 载体组分及 PR8 NA 3' 和 5' 两端的包装信号区。两段 PCR 产物分别用 Sall 和 ClaI 双酶切处理, 酶切产物切胶纯化后用 T4DNA 连接酶 16 °C 连接过夜, 转化 Top10 大肠杆菌感受态细胞。小提质粒, 重组质粒经 PCR、酶切鉴定后命名为 pPOLIPR8 (21)VNNA(39), 送交广州英骏生物技术有限公司进行序列测定。

#### 1.5 病毒的拯救及鉴定

用 12 质粒流感反向遗传操作系统进行病毒拯救。取转录质粒 pPOLIs 每种 0.5  $\mu$ g, 蛋白表达质粒 pCAGGs 每种 1  $\mu$ g 混合, 按照说明用 lipofectamine2000 转染 293T 和 MDCK 单层混合细胞。37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 8 h, 吸弃孔内转染液, 加入 1 mL Opti-MEM (含 0.5 mg/L TPCK-Trypsin), 继续培养 48 h, 收获转染细胞上清, 4 000 r/min 离心 2 min, 取 0.2 mL 接种 9 日龄 SPF 鸡胚, 37 °C 孵育 48 h, 收集尿囊液, 血凝试验检

测血凝活性。

Trizol 提取拯救病毒总 RNA, 用引物 Uni-12 (5'-AGCAAAGCAGG-3') 反转录成 cDNA, 用各基因片段的特异引物进行 PCR 扩增, 同时设立未经反转录的 RNA 模板作为 PCR 反应对照, 以排除转染上清中残存质粒对 PCR 反应的污染。PCR 产物胶回收纯化后进行序列测定, 用 DNASTAR 软件包中的 Seqman 软件对拯救病毒各基因片段 PCR 产物测序结果与重组质粒中的基因序列进行比对, 确定拯救病毒的序列是否与预期一致。

#### 1.6 病毒在鸡胚中复制生长曲线的测定

鸡胚半数感染量(EID<sub>50</sub>)的测定: 用 PBS 将病毒原液做 10 倍系列稀释, 将 10<sup>5</sup>~10<sup>10</sup> 稀释的病毒接种 4 枚鸡胚(0.2 mL/胚), 37 °C 孵育 48 h, 通过测定感染鸡胚尿囊液的血凝活性来判断是否感染, 按 Reed-Muench 法计算 EID<sub>50</sub>。病毒接种: 100 EID<sub>50</sub> 的病毒经尿囊腔接种 10 日龄鸡胚, 接种后 12~72 h 时间内每隔 12 h 收集 4 枚鸡胚尿囊液, 于 4 °C, 4 000 r/min 离心 5 min 后, 分装冻存, 统一测定血凝价 HA 和病毒滴度(pfu/mL)。病毒滴定: 将病毒用含 0.3% BSA 的 DMEM 做 10 倍梯度稀释后, 加入到长满 MDCK 单层细胞的 6 孔细胞培养板中, 37 °C 吸附 1 h, 吸弃孔内病毒稀释液, 加入固定琼脂混合物(1×MEM, 1% agrose, 0.3% BSA, 100 mg/L DEAE-Dextran, 1 mg/L TPCK-Trypsin), 将培养板置于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48 h, 除去上层固定琼脂, 加入 4% 甲醛溶液室温固定细胞 15 min; 弃固定液, 加入浸透液(0.1% TritonX-100, PBS)室温作用 20 min; 弃浸透液, 加入封闭液(0.5% 脱脂乳, PBS)室温封闭 1 h; 弃封闭液, 用 PBST(0.05% Tween20)洗 3 次, 加入 1:100 稀释的抗 A 型流感 NP 蛋白单克隆抗体 37 °C 孵育 1 h; PBST 洗 3 次后, 加入 1:2 000 稀释的山羊抗小鼠 IgG 抗体溶液 37 °C 孵育 1 h; PBST 洗 3 次后加入 AEC 显色底物, 室温显色 10~20 min, 弃显色液, 在显微镜下观察单个噬斑并计数, 绘制病毒生长曲线。用 GraphPad Prism 软件(GraphPad Software, San Diego, CA) 处理数据, T 检验分析不同病毒组别间的数据差异, P<0.05 为显著性差异。

#### 1.7 病毒浓缩纯化及 SDS-PAGE 分析

病毒以 100 EID<sub>50</sub> 剂量接种 15 枚鸡胚, 37 °C 培养 48 h, 将鸡胚放置 4 °C 过夜, 收集病毒尿囊液。每种病毒取 100 mL 收获的尿囊液, 4 °C, 8 000 r/min

离心 30 min, 收获上清; 4 °C, 26 000 r/min 离心 2 h, 弃上清, 在病毒粒子沉淀中加入 1 mL TNE (10 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA), 吹打沉淀, 充分混匀; 混匀后的病毒沉淀悬液用 30% 和 60% 蔗糖溶液进行密度梯度离心, 4 °C, 26 000 r/min 离心 4 h, 吸取位于 30% 和 60% 蔗糖溶液层之间完整的病毒粒子层. 将病毒粒子用 TNE 重悬, 4 °C, 26 000 r/min 离心 1.5 h 除去残留的蔗糖; 弃上清, 在沉淀中加入 400  $\mu$ L PBS, 浸泡过夜, 吹打混匀. 将纯化后的病毒原液用 PBS 做 5 倍稀释, 取稀释后的病毒液 40  $\mu$ L 加入 10  $\mu$ L 5 $\times$  上样缓冲液, 振荡混匀, 煮沸 3 次, 每次 5 min. 4 °C, 10 000 r/min, 离心 10 min, 取 10  $\mu$ L 处理好的样品进行 12% 的 SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色. SDS-PAGE 结果图片用 BandScan 5.0 软件分析, 比较不同株病毒等量浓缩纯化样品中 HA 蛋白的含量.

### 1.8 病毒基因组 RNA 电泳

提取浓缩纯化后的病毒总 RNA, 紫外分光光度计测定 RNA 浓度, 取等量 RNA 加入等体积的 2 $\times$  RNA 上样缓冲液, 在 3% 变性聚丙烯酰胺凝胶 (7.7 mol/L 尿素) 中, 恒压 150 V 电泳 3 h, 用 SYBR green II RNA gel stain 染色, 观察结果.

### 1.9 定量 PCR 测定病毒基因组中 NA 包装效率

取 140  $\mu$ L 病毒尿囊液提取病毒 RNA, 用引物 Uni-12 和 Superscript II 反转录酶制备 cDNA, cDNA 产物稀释 1 000 倍后作为模板, 用 MJ 四通道 Chromo 4 连续荧光检测仪进行荧光定量 PCR (qPCR) 分析. 反应体系 (20  $\mu$ L) 包括 cDNA 模板 2  $\mu$ L, 上下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 0.4  $\mu$ L, SYBR Premix Ex Taq (2 $\times$ ) 10  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 7.2  $\mu$ L. 扩增条件为 95 °C 预变性 10 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s,

70 °C 1 s, 共 44 个循环. QPCR 所用引物如下:

NP-F884 (5'-TGTATGGACCTGCCGTAGC-3'); NP-R1113 (5'-CCCTCTTGGGAGCACCTT-3'); VNNA-F909 (5'-ATATGCAGTGGAGTTTTCGGAGAC-3'); VNNA-R1037 (5'-GATCCAGACACCATTGCCGTA-3'); PR8NA-F376 (5'-TGACCC AAGGTGCCTTACTGA-3'); PR8NA-R516 (5'-CTGACCAAGCAACCGATTCAA-3').

以 NP 基因作为内参, 以 PR8 NA 作为标准参照, 用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法相对定量不同病毒基因组中 NA 基因的包装效率. 结果表示为 3 次独立实验的平均值  $\pm$  标准误.

## 2 结果

### 2.1 重组质粒 pPOLIPR8 (21)VNNA (39) 的构建

PR8 (21)VNNA (39) 的设计如图 1 所示, 在 VN1194 NA 基因完整编码框的 5' 和 3' 两端分别嵌入 PR8 NA 基因的包装信号序列, 即: PR8 NA vRNA 3' 端非编码区、3' 端编码区内 21 碱基、5' 端编码区内 39 碱基、5' 端非编码区. 并在 PCR 扩增上游引物中引入点突变, 将 PR8 NA vRNA 3' 端 21 碱基内出现的 ATG 突变为 ACG. 重组质粒 pPOLIPR8NA (21)VNNA (39) 的测序结果表明, PR8NA (21)VNNA (39) 已正确地克隆入转录载体 pPOLI 中, 序列与预期设计完全相同.

### 2.2 病毒的拯救及鉴定

利用 12 质粒反向遗传操作系统, 选择 PR8 病毒的内部基因重组质粒与不同的 HA 和 NA 基因组合, 转染 293T 和 MDCK 混合细胞, 进行病毒拯救. 拯救的病毒经 RNA 提取、RT-PCR 扩增、序列测定, 结果表明拯救病毒基因完全来源于重组质粒. 各重组病毒名称、基因组成见表 1.

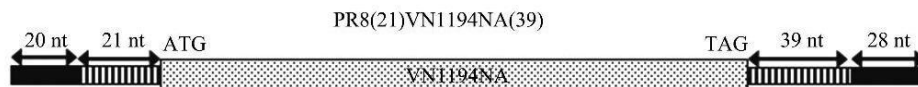


图 1 含 PR8 NA 包装信号序列的 VN1194 NA 基因结构图

Fig. 1 Schematic representation of the VN1194 NA with the packaging signal sequence of PR8 NA

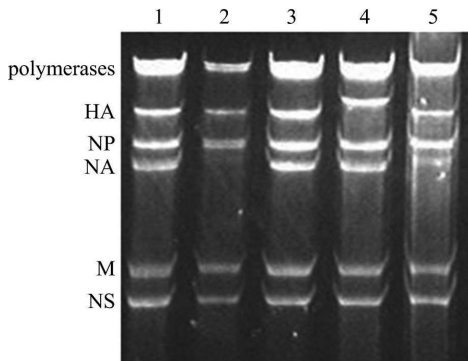
表 1 拯救病毒株基因背景及鸡胚半数感染量 (EID<sub>50</sub>)

Tab. 1 Genome background and EID<sub>50</sub> of the rescued viruses

| 毒株                   | HA 基因  | NA 基因           | 内部基因 | 鸡胚半数感染量/mL           |
|----------------------|--------|-----------------|------|----------------------|
| PR8HA-VNNA           | PR8    | VN1194          | PR8  | 10 <sup>-9.20</sup>  |
| PR8HA-PR8(21/39)VNNA | PR8    | PR8(21)VNNA(29) | PR8  | 10 <sup>-10.20</sup> |
| VNHA-VNNA            | VN1194 | VN1194          | PR8  | 10 <sup>-8.30</sup>  |
| VNHA-PR8(21/39)VNNA  | VN1194 | PR8(21)VNNA(29) | PR8  | 10 <sup>-8.20</sup>  |

### 2.3 病毒基因组 RNA 电泳

提取纯化病毒基因组 RNA, 紫外分光光度计测量 RNA 的纯度及浓度, 取等量的不同病毒基因组 RNA 进行 3% Urea-PAGE 电泳, SYBR green II 染色, 结果见图 2。从电泳图中可以看出, 病毒 PR<sup>8</sup>HA-VNNA 和病毒 VNHA-VNNA 基因组中 NA 片段含量明显少于其他 7 个基因片段的含量; 而含有嵌合 PR<sup>8</sup> NA 包装信号区的病毒 PR<sup>8</sup>HA-PR8(21/39)VNNA 和 VNHA-PR8(21/39)VNNA 基因组中的 NA 片段含量则与病毒其他 7 条 RNA 片段含量基本相同。由此表明, 野生型 VN1194 NA 基因不能完全被包装入重组病毒的基因组中, 病毒 PR<sup>8</sup>HA-VNNA 与 VNHA-VNNA 中有一部分为不含有 NA vRNA 的缺陷型病毒粒子, 而嵌合 PR<sup>8</sup> NA 的包装信号后, VN1194 NA 被包装入子代病毒粒子中的效率可被明显提高。



1. PR<sup>8</sup>HA-PR8(21/39)VNNA; 2. PR<sup>8</sup>HA-VNNA; 3. wt PR<sup>8</sup>;  
4. VNHA-PR8(21/39)VNNA; 5. VNHA-VNNA

图 2 纯化病毒基因组 RNA 聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig. 2 Polyacrylamide gel electrophoresis of RNAs extracted from purified viruses

### 2.4 定量 PCR 测定病毒基因组中 NA 包装效率

由于 RNA 电泳只能定性、不能精确定量基因片段包装含量, 故采用荧光定量 PCR 法测定不同 NA 基因被包装入病毒粒子内的效率。选择 NP 基因为内参, 以野生型 PR<sup>8</sup> 基因组内 NA 含量为标准参照, 采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法相对定量不同病毒基因组中 NA 基因的包装效率。测定结果(表 2)表明病毒 PR<sup>8</sup>HA-VNNA 与 VNHA-VNNA 中 NA 的包装

表 2 NA vRNA 片段包装入病毒粒子中的效率(%)

Tab. 2 Packaging efficiency of NA vRNA into virions (%)

| Virus        | PR <sup>8</sup> | PR <sup>8</sup> HA-VNNA | PR <sup>8</sup> HA-PR8(21/39)VNNA | VNHA-VNNA | VNHA-PR8(21/39)VNNA |
|--------------|-----------------|-------------------------|-----------------------------------|-----------|---------------------|
| NA packaging | 100.0           | 38.1±1.6                | 103.4±6.4                         | 67.7±6.2  | 101.2±3.1           |

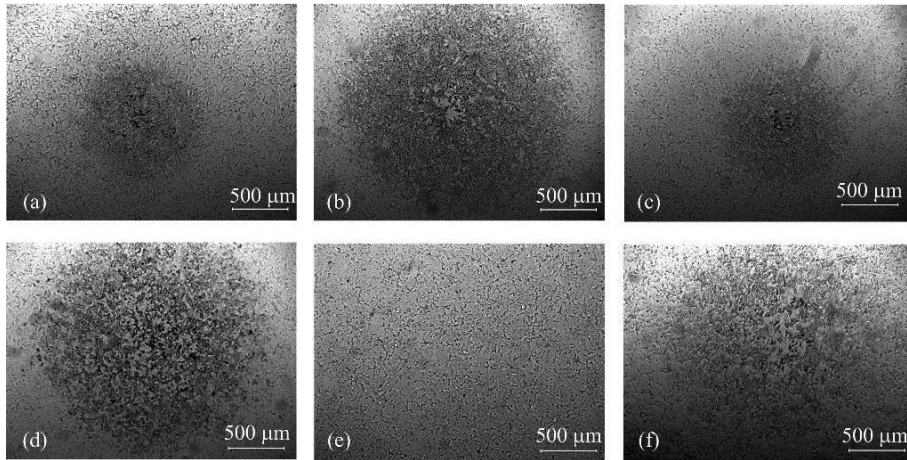
效率分别为(38.1%±1.6%)和(67.7%±6.2%), 而嵌合有 PR<sup>8</sup> NA 包装信号的病毒 PR<sup>8</sup>HA-PR8(21/39)VNNA 和 VNHA-PR8(21/39)VNNA 中 NA 的含量与野生型 PR<sup>8</sup> 中 NA 含量相当。由此表明, PR<sup>8</sup> NA 的包装信号有利于 VNNA 基因在重组病毒中的包装。

### 2.5 噬斑形成实验

将重组病毒分别用含 0.3% BSA 的 DMEM 做 10 倍梯度稀释, 感染单层 MDCK 细胞, 在感染后 2 d 后移去上层胶, 免疫染色后, 在 50 倍显微镜下观察, 选取可产生单个独立噬斑的病毒稀释度感染孔, 拍摄病毒的噬斑形态。显微镜下, 病毒可在单层细胞形成形态较为规则的、边缘整齐的典型噬斑。如图 3 所示, 嵌合有 PR<sup>8</sup> NA 包装信号的病毒 PR<sup>8</sup>HA-PR8(21/39)VNNA 和 VNHA-PR8(21/39)VNNA 噬斑直径略大于 PR<sup>8</sup>, 明显大于 PR<sup>8</sup>HA-VNNA 与 VNHA-VNNA。由此表明, 包装信号的恢复能使病毒的复制感染能力明显提高, 病毒粒子在细胞间更容易扩散。

### 2.6 病毒在鸡胚中复制生长曲线的测定

根据测定的重组病毒鸡胚半数感染量(EID<sub>50</sub>) (表 1), 将病毒以 100 EID<sub>50</sub> 剂量接种 10 日龄鸡胚尿囊腔, 接种后 12~72 h 之间, 每隔 12 h 收获 4 枚鸡胚尿囊液, 测定收获病毒的血凝价(HA)和病毒滴度(pfu/mL), 用 GraphPad Prism 软件绘制病毒生长曲线。结果表明, 当病毒的 HA 基因为 PR<sup>8</sup>HA 时, PR<sup>8</sup>HA-PR8(21/39)VNNA 在 12~60 h 间的病毒滴度与 24~60 h 间血凝价滴度均显著高于病毒 PR<sup>8</sup>HA-VNNA1194 ( $P < 0.001$ ) (图 4)。在病毒复制最高点(接种后 36 h), 病毒 PR<sup>8</sup>HA-PR8(21/39)VNNA 的滴度比 PR<sup>8</sup>HA-VNNA1194 高 10 倍(图 4(a)), 血凝价比 PR<sup>8</sup>HA-VNNA1194 高约 4 倍(图 4(b))。当病毒的 HA 基因为 VN1194 HA 时, VNHA-PR8(21/39)VNNA 在 12~48 h 间的病毒滴度均显著高于病毒 VNHA-VNNA1194 ( $P < 0.01$ ) (图 4(a)), 24 h、48~72 h 间血凝价滴度也显著高于 VNHA-VNNA1194 ( $P < 0.01$ ) (图 4(b))。在接种后 36 h, 病毒 VNHA-PR8(21/39)VNNA



Microphotographs of the plaques with magnification of 50 times after 2 days of infection (ruler bar represents 500  $\mu\text{m}$ )  
(a) PR8HA-VNNA; (b) PR8HA-PR8(21/39)VNNA; (c) VNHA-VNNA; (d) VNHA-PR8(21/39)VNNA; (e) Cell control; (f) wtPR8

图 3 病毒噬斑形成实验

Fig-3 Plaque assay of different viruses in MDCK cell

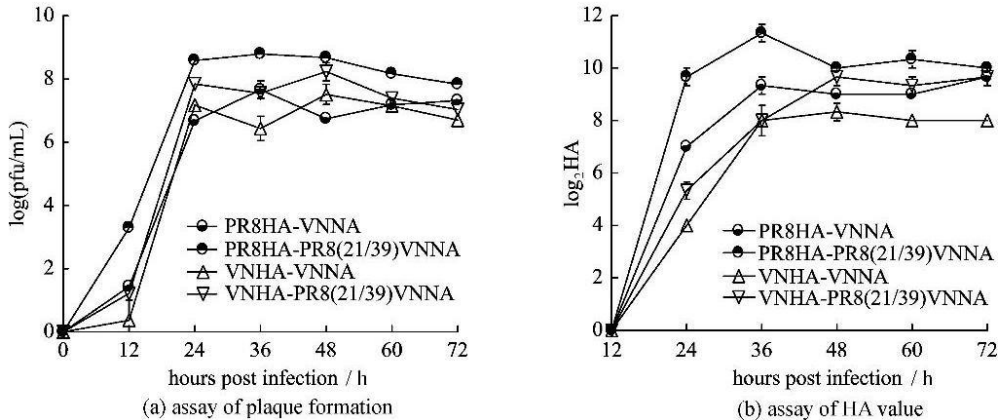


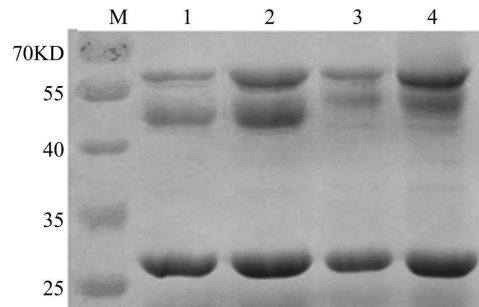
图 4 病毒在鸡胚中的生长曲线

Fig-4 Growth curve of different viruses in embryonated chicken eggs

滴度是病毒 VNHA-VNNA 的 10 倍左右(图 4(a)); 在接种后 60 h, 病毒 VNHA-PR8(21/39)VNNA 的血凝价比病毒 VNHA-VNNA 高约 3 倍(图 4(b)). 由此表明, 不论在 H1 亚型 HA (PR8 HA) 还是 H5 亚型 HA (VN1194 HA) 基因背景下, 在 VN1194 NA 基因编码区两侧嵌合 PR8 NA 基因包装信号后有利于病毒在鸡胚中的生长复制, 能够提高病毒复制滴度和 HA 效价.

## 2.7 HA 蛋白含量的测定

如前所述, 将含有不同 HA 与 NA 基因组合的重组病毒以相同的剂量 ( $100\text{EID}_{50}$ ) 接种鸡胚, 培养 48 h 后收获鸡胚尿囊液, 取等体积 (100 mL) 尿囊液进行蔗糖密度梯度离心纯化. 取相同体积浓缩纯化后的病毒进行 SDS-PAGE 电泳. 从图 5 可见, 病毒



1. PR8HA-VNNA; 2. PR8HA-PR8(21/39)VNNA;  
3. VNHA-VNNA; 4. VNHA-PR8(21/39)VNNA

图 5 纯化病毒 SDS-PAGE 凝胶电泳

Fig-5 SDS-PAGE electrophoresis of purified viruses

PR8HA-PR8(21/39)VNNA 与病毒 VNHA-PR8(21/39)VNNA 中主要蛋白成分 HA、NP 和 M 的

含量明显高于病毒 PR<sup>8</sup>HA-VNNA 与病毒 VNHA-VNNA 中的蛋白含量. SDS-PAGE 结果用 BandScan<sup>5.0</sup> 软件分析表明病毒 PR<sup>8</sup>HA-PR<sup>8</sup>(21/39)VNNA 中 HA 蛋白含量是 PR<sup>8</sup>HA-VNNA 中的 2.8 倍;病毒 VNHA-PR<sup>8</sup>(21/39)VNNA 中 HA 蛋白含量是 VNHA-VNNA 的 2.65 倍.

### 3 讨论

WHO 推荐 H<sup>5</sup>N<sup>1</sup> 亚型疫苗株的制备采用“6+2”策略,即 6 个内部基因选自于供体 PR<sup>8</sup> 病毒, HA 和 NA 基因选自流行病毒株,使疫苗株既保持与流行株相同的抗原匹配性又具有良好的鸡胚生长特性,满足疫苗株生产的需求. Horimoto 等<sup>[5]</sup> 的研究发现当疫苗株的组成为“7+1”时,即 HA 基因为流行株的 H<sup>5</sup> 亚型 HA, NA 为 PR<sup>8</sup> 病毒 NA 基因(而不是流行株的 NA 基因),“7+1”疫苗株的产量比“6+2”疫苗株有显著的提高.然而,虽然“7+1”策略可以提高疫苗株的产量,但 NA 是流感病毒主要的表面抗原基因,在抗病毒过程中发挥着重要的作用,故 NA 也应为疫苗株的重要组成成分<sup>[16-17]</sup>.

在本研究中,我们发现野生型 VN1194 NA 在重组病毒中被包装入病毒粒子中的效率较低,仅为正常含量的 38% 和 68%,当在该基因编码区两端嵌合 PR<sup>8</sup> NA 的包装信号序列后,其包装效率可得到完全恢复.同时,病毒在鸡胚中的生长复制水平也得到提高,在相同条件下,含有嵌合 PR<sup>8</sup> NA 包装信号序列 VN1194NA 的病毒滴度比含野生型 VN1194NA 病毒高 10 倍左右,血凝素 HA 含量提高约 2.7 倍.这些现象表明野生型 VN1194 NA 基因自身的包装信号在 PR<sup>8</sup> 病毒基因背景下不能被完全识别,导致 NA vRNA 包装入重组病毒粒子中的效率降低,产生不含有 NA vRNA 的缺陷病毒,进而影响了病毒的产量.

现有研究表明,流感病毒基因的包装信号序列由 vRNA 3' 和 5' 两端高度保守的非编码区以及编码区两端 27~125 碱基组成,这些区域碱基的缺失和突变都能导致 vRNA 的包装效率大大下降,同时影响病毒的生长复制<sup>[8-14]</sup>.虽然目前各个基因片段的包装信号序列都已被初步定位,但是这些区域发挥包装信号功能的分子机制仍然不清楚. Muramoto 等<sup>[18]</sup> 推测在核糖核蛋白复合体(vRNP)的三级结构中,同一基因片段的 vRNA 3' 和 5' 两端包装信号区碱基之间,不同基因片段 vRNA 包装信

号区之间通过 RNA-RNA 相互作用或 RNA-蛋白相互作用来指导 vRNA 的包装.在本研究中, VN1194 NA 和 PR<sup>8</sup> NA 包装信号区内(vRNA 3' 端 1~41bp; 1347~1413bp)序列比较发现共有 6 处不同,分别为 C4G, A13G, C17U, G38A, C1372G 和 U1387C,其中第 4, 13, 17 和 1387 位为非编码区内碱基的突变, G38A 和 C1372G 为编码区内的错义突变,当把 PR<sup>8</sup> NA 的包装信号嵌合在 VN1194 NA 编码区的两端后, VN1194 NA vRNA 在病毒粒子中的包装量随之恢复,因此我们推测这些位置碱基的突变导致了 VN1194 NA 在 PR<sup>8</sup> 背景病毒中包装效率的降低,同时也使重组病毒的生长受到影响.

目前流感病毒基因包装信号的研究已初步确定了流感基因组 8 个基因片段的包装信号区域,并且明确了 A 型与 B 型流感病毒之间、不同基因片段之间、NS 基因 A 系和 B 系之间的包装信号是特异的,不能互换,否则会严重影响 vRNA 片段的包装,使病毒毒力致弱<sup>[9-14, 19-20]</sup>.虽然包装信号序列位于 vRNA 片段的 3' 和 5' 末端,属于相对保守的区域,但是不同亚型、不同年份的毒株之间还是会存在一些碱基的突变,我们推测流感病毒的包装信号很可能存在亚型、甚至株的特异性.

综上所述,本研究以 VN1194 NA 为研究对象,证实了该基因 vRNA 在 PR<sup>8</sup> 病毒背景下不能有效包装入病毒粒子中,并通过在该基因编码区两侧嵌合 PR<sup>8</sup> NA 包装信号的手段,恢复了该基因的包装效率,提高了重组病毒株的产量,为 H<sup>5</sup>N<sup>1</sup> 流感疫苗株的研究提供了新的思考方向.

### 参考文献 (References)

- [1] 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 [J]. *The Lancet*, 2004, 363: 1099-1103.
- [2] WHO guidance on development of influenza vaccine reference viruses by reverse genetics: (WHO/CDS/CSR/GIP/2005.6) [EB/OL]. Geneva: World Health Organization, 2005 [2009-05-12]. [http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO\\_CDS\\_CSR\\_GIP\\_2005\\_6/en/index.html](http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CSR_GIP_2005_6/en/index.html).
- [3] Bresson J L, Perronne C, Launay O, et al. Safety and immunogenicity of an inactivated split-virion influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) vaccine: Phase I randomized trial [J]. *The Lancet*, 2006, 367: 1657-

- 1 664.
- [4] Leroux-Roles I, Borkowski A, Vanwolleghem T, et al. Antigen sparing and cross-reactive immunity with an adjuvanted rH<sup>5</sup>N<sup>1</sup> prototype pandemic influenza vaccine: A randomized controlled trial [J]. *The Lancet*, 2007, 370: 580-589.
- [5] Havey R, Wheeler J X, Wallis C L, et al. Quantitation of haemagglutinin in H<sup>5</sup>N<sup>1</sup> influenza viruses reveals low haemagglutinin content of vaccine virus NIBRG-14 (H<sup>5</sup>N<sup>1</sup>) [J]. *Vaccine*, 2008, 26: 6 550-6 554.
- [6] Cros J F, Palese P. Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus; Influenza, Thogoto and Borna disease viruses [J]. *Virus Research*, 2003, 95: 3-12.
- [7] Palese P. The genes of influenza virus [J]. *Cell*, 1977, 10: 1-10.
- [8] Tchatalbachev S, Flick R, Hobom G. The packaging signal of influenza viral RNA molecules [J]. *RNA*, 2001, 7: 979-989.
- [9] Liang Y, Hong Y, Parslow T G. Cis-Acting packing signals in the influenza virus PB<sup>1</sup>, PB<sup>2</sup>, and PA genomic RNA segments [J]. *J Virol*, 2005, 79: 10 348-10 355.
- [10] Watanabe T, Watanabe S, Noda T, et al. Exploitation of nucleic acid packaging signals to generate a novel influenza virus-based vector stably expressing two foreign genes [J]. *J Virol*, 2003, 77: 10 575-10 583.
- [11] Ozawa M, Fujii K, Muramoto Y, et al. Contributions of two nuclear localization signals of influenza A virus nucleoprotein to viral replication [J]. *J Virol*, 2007, 81: 30-41.
- [12] Fujii Y, Goto H, Watanabe T, et al. Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100: 2 002-2 007.
- [13] Hutchinson E C, Curran M D, Read E K, et al. Mutational analysis of cis-acting signal in segment 7 of influenza A virus [J]. *J Virol*, 2008, 82: 11 869-11 879.
- [14] Fujii K, Fujii Y, Noda T, et al. Importance of both the coding and the segment-specific noncoding regions of the influenza A virus NS segment for its efficient incorporation into virions [J]. *J Virol*, 2005, 79: 3 766-3 774.
- [15] Horimoto T, Murakami S, Muramoto Y, et al. Enhanced growth of seed viruses for H<sup>5</sup>N<sup>1</sup> influenza vaccines [J]. *Virology*, 2007, 366: 23-27.
- [16] Chen Z, Kadowaki S, Hagiwara Y, et al. Cross-protection against a lethal influenza virus infection by DNA vaccine to neuraminidase [J]. *Vaccine*, 2000, 18: 3 214-3 222.
- [17] Kilbourne E D, Laver W G, Schulman J L, et al. Antiviral activity of antiserum specific for an influenza virus neuraminidase [J]. *J Virol*, 1968, 2: 281-288.
- [18] Muramoto Y, Takada A, Fujii K, et al. Hierarchy among viral RNA (vRNA) segments in their role in vRNA incorporation into influenza A virions [J]. *J Virol*, 2006, 80: 2 318-2 325.
- [19] Muster T, Subbarao E K, Enami M, et al. An influenza A virus containing influenza B virus 5' and 3' noncoding regions on the neuraminidase gene is attenuated in mice [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, 88: 5 177-5 181.
- [20] Luo G, Bergmann M, Garcia-Sastre A, et al. Mechanism of attenuation of a chimeric influenza A/B transfectant virus [J]. *J Virol*, 1992, 66: 4 679-4 685.