

## 禽流感病毒 NS 第 263 ~ 277 位核苷酸缺失降低其抗干扰素能力\*

龙进学 王曲直 刘秀梵\*\*

(扬州大学农业部畜禽传染病学重点开放实验室 扬州 225009)

**摘要:** 2000 年以来, 多数 H5N1 亚型禽流感病毒在 NS 基因的 263 ~ 277 位发生 15 个碱基的缺失。为了研究此缺失在流感病毒进化中的生物学意义, 构建 H5N1 亚型流感病毒 A/SD/04 株的 HA、NA、NS 的全基因表达载体, 以及 NS 基因 263 ~ 277 位删除的突变载体。通过反向遗传学技术, 与编码 WSN 的其他内部基因 (PB2, PB1, PA, NP 和 M) 的表达载体进行组合转染, 获得在 NS 基因的 263 ~ 277 位缺失和不缺失的 2 个重组 H5N1 亚型流感病毒 (RWSN-m248 和 RWSN-248)。此两个重组病毒在无干扰素产生的 Vero 细胞上的繁殖滴度相似, 在能产生干扰素的细胞 MDCK 和 COS-1 细胞上的繁殖滴度有明显差异。两个重组病毒在鸡胚中的繁殖滴, IVPI, MDT 和 EID<sub>50</sub> 均无显著差异。说明 NS 基因的 263 ~ 277 位核苷酸的缺失不影响病毒的整体毒力, 但降低了 H5N1 的抗干扰素能力。

**关键词:** 拯救, 重组病毒, NS, 缺失突变, 病毒空斑形成单位 (PFU)

**中图分类号:** S855.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 02-0034-06

### Deletion of Nucleotides of NS Gene from 263 to 277 Decreases the Viral Anti-IFN Ability of H5N1\*

LONG Jin-xue WANG Qu-zhi LIU Xiu-fan\*\*

(Key Laboratory of Animal Infectious Diseases of Ministry of Agriculture, Yangzhou University, Yangzhou 225009)

**Abstract:** Since 2000, most of H5N1 subtype influenza A virus had a unique mutation of NS gene with 15 base pair deletion from 263 to 277. In order to investigate the bio-characteristics of this mutation, two different NS recombinants, RWSN-248 and RWSN-m248, were generated via plasmid rescue from A/WSN/33 (H1N1) and A/SD/04 (H5N1). RWSN-248 had a higher viral titer than RWSN-m248 in MDCK and COS-1 cells that have an IFN response, but they had the similar growth ability in Vero cells that lack an IFN response. Both of two recombinants grew well in embryonated chicken eggs and had the similar viral titer and MDT. The results above revealed that the deletion from 263 to 277 sites of NS gene did not influence viral virulence to but decreased viral anti-IFN ability of H5N1.

**Key words:** Rescue, Recombined viruses, NS gene, Deleted mutation, Plaque forming unit (PFU)

NS 基因是流感病毒 (influenza virus) 的第 8 节段, 编码流感病毒的非结构蛋白 (NS1 和 NS2)。由于流感病毒是分节段的, 8 个基因片段可发生自由组合, 不同的流感病毒之间常常发生基因重组 (reassortment), 同亚型流感病毒中, 常有不同来源 (同源性很低) NS 基因出现。流感病毒在感染细胞的早期大量表达 NS1 蛋白, NS1 蛋白作为干扰素的拮抗物是病毒突破宿主细胞第一道防线的重要利器<sup>[1]</sup>。通过 RNA 编辑作用,

\* 国家科技攻关项目 (No. 2004BA519A19)

Project Granted by ministry of science and technology of China (No. 2004BA519A19)

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

收稿日期: 2005-05-26, 修回日期: 2005-06-28

由 NS 还产生 NS2 的 mRNA，翻译的 NS2 蛋白具有调节病毒 RNA 的核转运功能，是病毒复制的重要调控因子<sup>[1,2]</sup>。破坏 NS 基因均能不同程度的影响流感病毒的复制和抗宿主细胞干扰素的能力<sup>[1-3]</sup>。Sang Heui 等认为，H5N1 的 NS1 在决定流感病毒对哺乳动物的致病力方面起重要作用，其用 97 香港 H5N1 的 NS 置换 H1N1 的 NS 基因后，重组病毒对猪的致病能力大为提高<sup>[4]</sup>。在对 H5N1 亚型禽流感病毒 A/SD/04 株进行 NS 全基因核酸序列测定和分析，发现 NCBI 公布的共 22 株禽流感的 NS 在 263 ~ 277 位有 15 碱基的缺失，而 A/SD/04 与包括 H5N1 代表株 A/G/GD/96 在内的 19 株 AIV 在 263 ~ 277 位没有任何碱基缺失。本研究运用反向遗传学技术，对 A/SD/04 的 NS 序列的 263 ~ 277 位核苷酸进行删除突变，试图找出此段核苷酸序列缺失与否对 H5N1 亚型 AIV 的生物学意义。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Expand High Fidelity PCR System、dNTPs (10mmol/L) 和 Agrose Gel DNA Extraction Kit 购自 Roche 公司，反转录酶 MLV-L (10U/ $\mu$ L) 和 RNA 酶抑制剂 (40U/L) 购自 Promega 公司，PCR2.1<sup>®</sup>-T vector 和 Lipofectamine<sup>™</sup> 2000 转染试剂购自 Invitrogen 公司，UNIQ-10 柱式总 RNA 提取试剂盒、T4 连接酶和 PCR 产物回收试剂盒购自上海生物工程公司。Qiagen 小提试剂盒。

1.2 流感拯救质粒

8 质粒拯救系统由美国 St. Jude 儿童研究医院的 Webster 博士惠赠，包括用于 cDNA 克隆的双向转录载体 PHW2000 和 A/WSN/33 的 8 个拯救载体 (181、182、183、184、185、186、187 和 188)。

1.3 引物

A/Duck/Shandong/093/2004 (H5N1) (A/SD/04) 由本实验室分离、鉴定并保存，完成了其全序列测定 (序列已登陆 NCBI，登陆号：AY845190，AY845191 和 AY856861 ~ AY856866)。设计合成用于构建 A/SD/04 株 HA，NA，和 NS 拯救载体的引物 (表 1)，以及删除 NS 基因 263 ~ 277 位核苷酸的引物，反转录用 12bp 碱基引物 (5' - agcgaagcagg -3')。

表 1 构建 A/SD/04 株拯救载体的引物

引物名称		引物序列
HA	Bm-HA-1	5' -TATTCGTCCTCAGGGACCGAAAGCAGGGG-3'
	Bm-HA-2	5' -ATATCGTCCTGATTAGTAGAAACAAGGCTGTTTT-3'
NA	Ba-NA-1	5' -TATTGCTCTCAGCGACCGAAAGCAGGACT-3'
	Ba-NA-2	5' -ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGCAGTTTTTT-3'
NS	Bm-NS-1	5' -TATTCGTCCTCAGGGACCGAAAGCAGGGTG-3'
	Bm-NS-2	5' -ATATCGTCCTGATTAGTAGAAACAAGGCTGTTTT-3'
NS	MNS-1	5' -ATACGTCTCGCCGGCTTTACGCTACCTAAC-3'
Mutation	MNS-2	5' -ATTCTCTCTCGCCGGCATTTTAAGTCCTCA-3'

1.4 反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR)

A/SD/04 RNA 的提取按上海生物工程公司的 RNA 提取试剂盒的方法进行。26 $\mu$ L

提取的病毒 RNA, 8 $\mu$ L 5 $\times$  反转录 buffer, 2.5 $\mu$ L dNTP, 1.5 $\mu$ L 50pmol/L 的 12 碱基引物, 1.5 $\mu$ L 反转录酶 MLV-L, 0.5 $\mu$ L Rnasin, 37 $^{\circ}$ C 保持 1h, 置于 75 $^{\circ}$ C 灭活反转录酶 15min. 取 1 $\mu$ L 模板进行 PCR 扩增, 体系如下: 5 $\mu$ L 10 倍 buffer, 1 $\mu$ L 10mmol/L dNTP, 50pmol/L 的上游和下游引物各 1 $\mu$ L, 超纯水 40 $\mu$ L, Expand High Fidelity DNA 聚合酶 1 $\mu$ L, 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 3 min, 94 $^{\circ}$ C 20s $\rightarrow$ 58 $^{\circ}$ C 30s $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 5 min, 30 个循环。

1.5 HA、NA、NS 和 NS 缺失突变的拯救载体构建

参考卢建红等的方法<sup>[5]</sup>, 产物电泳回收后用 *Bsm*B I 或者 *Bsa* I 酶切, 回收酶切产物与载体 PHW2000 连接。1 $\mu$ L 10 $\times$  T4 buffer, 1 $\mu$ L T4 连接酶, 2 $\mu$ L PHW2000, 6 $\mu$ L AIV 基因片段, 置于 15 $^{\circ}$ C, 连接过夜。突变 NS 时, 分为两段扩增, 片段酶切后各取 3 $\mu$ L 与 PHW2000 进行三分子连接。连接产物转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 在 Amp + LB 平板上筛选白斑, 常规方法小量提取质粒, 质粒送上海联合基因公司测序, 用 QIAGEN 小提试剂盒提取高纯度质粒用于转染。

1.6 重组病毒的拯救

构建的 A/SD/04 的 HA、NA、NS 和 NS 突变载体与 Webster 博士赠送的 WSN (H1N1) 的 5 个内部基因质粒进行组合 (见表 2), 转染 COS-1 细胞。转染方法: 在转染前一天, 于 35mm 的平皿中加入 30 万细胞, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 培养 14~20 h, 细胞长至 80%~90%, 参考 Lipofectamine™ 2000 转染试剂和卢建红的方法进行<sup>[5]</sup>。转染 72 h, 收获细胞, 冻溶 1 次后细胞悬液 0.2mL 接种 9~11 日龄的鸡胚。

1.7 重组病毒的生物学特性

对获得的两个重组病毒进行生物学特性测定, 以研究 NS 的 263~277 位核苷酸缺失后对病毒的影响, 测定项目为鸡胚半数致死量 (EID<sub>50</sub>), 鸡胚平均死亡时间 (MDT), 鸡胚平均血凝效价 (HA), 6 周龄 SPF 鸡的致病指数 (IVPI), 在 Vero、COS-1 和 MDCK 上的病毒繁殖情况, 感染细胞后不同时间收集细胞上清进行病毒空斑计数 (PFU)。所有 H5N1 活病毒的相关试验均在扬州大学农业部畜禽传染病学重点开放实验室的生物安全 3 级实验 (BSL-3) 进行。

2 结果

2.1 拯救载体的构建

应用设计合成的引物 (见表 1), 成功扩增并构建了 A/SD/04 的 HA、NA、NS 和 NS 突变的拯救载体, 分别命名为 PHW244-HA (简 244)、PHW246-NA (简 246)、PHW248-NS (简 248) 和 PHWM248-NS (简 m248)。经过测序, PHWM248-NS 在 263~277 位比 PHW248-NS 缺失了 15 个核苷酸, 如图 1。

File Edit Align View Options Help	
Sequence N * Pos = 240	
<input checked="" type="checkbox"/> Consensus	GAGTCTGATGAGGCACTTAAATGACTATTGCCTCTCTGCCGGCTTTACGCTACCTAACTGAC
2 Sequence:	40 250 260 270 280 290 300
248	GAGTCTGATGAGGCACTTAAATGACTATTGCCTCTCTGCCGGCTTTACGCTACCTAACTGAC
m248	GAGTCTGATGAGGCACTTAAAT-----GCCGGCTTTACGCTACCTAACTGAC

图 1 A/SD/04 NS 基因 263~277 位的删除突变

2.2 重组病毒的拯救及其生物学特性

用构建的质粒通过组合转染，结果获得两个重组病毒：RWSN-m248 与 RWSN-248。两重组病毒的表面基因（HA 和 NA）是由 A/SD/04（H5N1）提供，内部结构基因（PB2、PB1、PA、NP、M）是由 WSN 提供的，NS 基因则是未突变的 248 和突变的 m248。

生物学特性的试验结果是 RWSN-m248 和 RWSN-248 对鸡胚的半数致死量（EID<sub>50</sub>）和鸡胚平均死亡时间（MDT），的 EID<sub>50</sub> 和 MDT 均没有明显的差异。对 10 只 6 周龄 SPF 鸡的致病指数为 0.55 和 0.44，为低致病性毒株。RWSN-m248 在静脉接种后的第 7d，开始出现发病，比 RWSN-248 推迟 5d，见表 2。

表 2 H5N1 亚型重组病毒 RWSN-248 和 RWSN-m248 的生物学特性比较

重组病毒	WSN + 244 + 246 + 248	WSN + 244 + 246 + m248
测定指标	(RWSN-248)	(RWSN-m248)
EID <sub>50</sub>	10 <sup>-8.87</sup>	10 <sup>-9</sup>
MDT (鸡胚平均死亡时间)	39.2	42
HA (鸡胚血凝效价)	2 <sup>9.2</sup>	2 <sup>9.6</sup>
IVPI (静脉接种指数)	0.44 (第 3d 发病, 死亡 1 只)	0.55 (第 7d 发病, 死亡 3 只)

2.3 二个重组病毒在 MDCK 和 COS-1 上的繁殖情况

重组病毒 RWSN-248 和 RWSN-m248 在没有干扰素产生的 Vero 细胞上的繁殖滴度相似，在能产生干扰素的 MDCK 和 COS-1 上繁殖滴度有明显差异，NS 基因 263 ~ 277 位核苷酸缺失株 RWSN-m248 比 RWSN-248 的繁殖滴度低约 1 倍，两个重组病毒在 3 种细胞上的生长曲线见图 2。

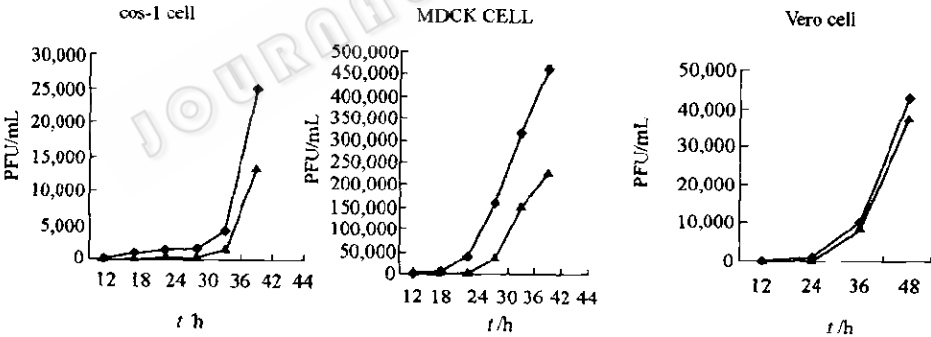


图 2 二个重组病毒在 MDCK、COS-1 和 Vero 上的繁殖情况  
—●— RWSN243, —▲— RWSNm248

3 讨论

3.1 NS 节段 263 ~ 277 位碱基的缺失具有一定的时间规律性

比较 A/SD/04 和 NCBI 公布的 1996 ~ 2004 年的共 41 株 AIV 的 NS 序列（39 株 H5N1 和 2 株 H9N2），发现有 22 株 H5N1 在 263 ~ 277 位发生了 15 个核苷酸的缺失，这 22 株病毒均是 2000 年后的分离株，具有一定的时间规律。说明是在 2000 年后，才开始逐渐出现了 NS 的 263 ~ 277 位缺失株。在核酸序列进化树上，多数的 H5N1 同属于 A 系，其以 BJ94 或 G1 株为祖先。2000 年似乎是一分界点，A 系向两个亚系进行分化：

亚系一继续保持完整的 NS 基因, 亚系二则在 NS 的 263 ~ 277 位发生 15 碱基的缺失, 缺失株有逐渐成为了优势群的趋势 (2004 年的多数分离株有缺失, 见图 3)。进一步对 NCBI 上公布的 91 株 (包括 H9N2, H5N1, H5N2, H7N7, H3N2, H3N8, H1N3, H6N2, H6N8, H6N1, H7N3, H7N4 和 H1N3) 的流感病毒 NS 序列进行比较, 则未发现其它亚型流感病毒的 NS 在 263 ~ 277 位发生 15 碱基的缺失, 认为 NS 的 263 ~ 277 位缺失可能是 H5N1 在 2000 年以后特有的遗传标志, 其缺失的生物学意义是值得关注的。

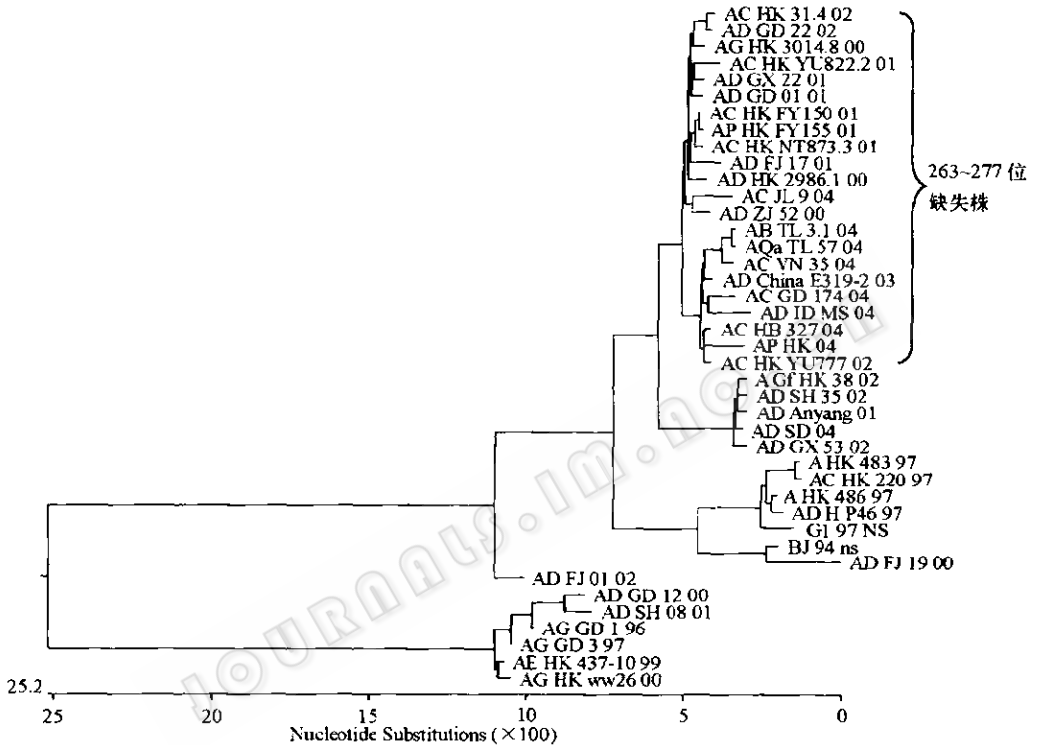


图 3 禽流感分离株 NS 基因的进化树

### 3.2 NS 的 263 ~ 277 位碱基缺失的生物学意义

NS1 是在流感病毒感染细胞的早期大量表达<sup>[1,3,4]</sup>的, 作为  $\alpha$  干扰素的拮抗物是流感病毒突破宿主第一道免疫防线的利器。NS1 共 230 个氨基酸, 其氨基端 1 ~ 73 位是 mRNA 的结合区, 氨基端的 1 到 100 位氨基酸估计是 PRK 的结合区<sup>[1,10]</sup>, PRK 是双股 RNA 依赖性蛋白激酶 (dsRNA-dependent protein kinase, PKR)。病毒在宿主细胞中繁殖时, 在宿主干扰素的诱导下, 双股 RNA 与 PRK 结合, 同时真核翻译启动子  $\alpha$  亚单位发生磷酸化, 导致 PKR 的激活。激活的 PRK 能同时抑制宿主细胞和病毒 mRNA 的翻译, 从而最终抑制入侵病毒在细胞中的有效繁殖和扩散。流感病毒在感染初期表达 NS1, NS1 与双股 RNA 结合或直接与 PRK 结合, 阻断 PRK 的激活, 从而阻断 PRK 介导的对 mRNA 翻译的抑制作用, 利于病毒的复制和繁殖<sup>[1,2]</sup>。

NS 基因在 263 ~ 277 位的缺失, 导致了 NS1 的 78 ~ 83 位 (PRK 结合区的末端) 发生 5 个氨基酸的缺失。PRK 结合区的缩短导致结合 PRK 的能力下降, 最终导致病毒抑制 PRK 激活的能力减弱。本研究结果显示, 在能产生干扰素的细胞系 MDCK 和 COS-1 上, 缺失突变病毒比 NS 完整的病毒株的繁殖滴度低, 在不产生干扰素的细胞 Vero 上,

二者的繁殖滴度无明显差异,说明前者的抗干扰素能力比后者低。证明人工缩短 RWSN-m248 的 NS1 的 PRK 结合区后,导致该病毒在具有干扰素的细胞中繁殖能力下降。另外,两个重组病毒的静脉接种指数差异不明显,接种后的发病时间有显著差异: RWSN-m248 比 RWSN-248 晚 5 天,原因可能是 RWSN-m248 在侵入初期,表达的 78 ~ 83 位氨基酸缺失的 NS1 蛋白不能有效抵抗宿主 IFN 的干扰,延缓了病毒的繁殖,这与重组病毒在 MDCK、COS-1 和 Vero 上感染试验结果一致。所以,初步认为 NS1 的 263 ~ 277 段序列的缺失,使 H5N1 体外抗干扰素能力下降。

具有高致病性 AIV 分子特征 (HA 裂解位点为多个碱性氨基酸) 的 RWSN-m248 和 RWSN-248,对 6 周龄鸡的致病指数为 0.55 和 0.44,为低致病株,也证实内部基因对 H5N1 毒力确实有重要的影响。H5N1 亚型禽流感病毒的毒力基因 (HA 和 NA 等) 不断适应宿主细胞得到加强的同时,适当削弱 NS1 蛋白的抗干扰素能力,以平衡病毒对宿主细胞的整体毒力,保证病毒能在宿主细胞中有效繁殖,可能是物种进化的一种平衡。但 RWSN-m248 对鸡的致死率为 30%,表现出比 RWSN-248 (10%) 明显高的毒力,原因有待进一步研究。

### 3.3 AIV 作载体疫苗应用中 NS 的作用

应用反向遗传技术进行流感病毒致弱疫苗候选株以及用流感病毒作为载体表达外源蛋白是目前流感病毒研究的两大热点<sup>[6~8]</sup>。Nicola R 的研究证实,NS1 的 RNA 结合区的删除,可以导致流感病毒抗干扰素能力和对小鼠致病力的降低<sup>[9]</sup>。Ken Fujii 等发现 NS 的前 30 碱基处和编码区的前端序列含有引导病毒 RNA 有效装配的信号结构域<sup>[10]</sup>。Kitted 等<sup>[3]</sup>采用 NS1 的前 125 个氨基酸与 GFP 连接,拯救的病毒可以稳定传代和表达 GFP,但不能有效的拮抗干扰素。为使表达的 GFP 与 NS1 分开,以上研究使用自身切割序列,如口蹄疫 2A 蛋白酶序列 (2A protease of foot-and mouth disease) 或 caspase 识别序列 (caspase recognize site)。但应用 NS 表达外源基因时,需保持 NS1 功能的完整性才能获得稳定的重组病毒。本研究中, RWSN-m248 与 RWSN-248 对鸡胚的半数致死量、平均鸡胚死亡时间和在鸡胚中的繁殖滴度没有明显的差异,说明 NS1 蛋白的 78 ~ 83 段氨基酸的存在与否,不影响重组病毒在鸡胚中的整体的繁殖能力和病毒对鸡胚的毒力。所以,进行流感病毒载体疫苗研究时,可尝试以 NS 的 263 ~ 277 位作为外源基因的插入点,不添加对外源基因自身剪切识别序列,在保留 NS1 对干扰素的拮抗作用和避免破坏引导病毒 RNA 有效装配的信号结构域的情况下表达外源蛋白。

### 参考文献

- [1] Brown E G. Biomed & Pharmacother, 2000, **54**: 196 ~ 209.
- [2] Kiyoko I H, Taisuke H, Yutaka F, *et al.* Journal of Virology, 2004, **78** (18): 10149 ~ 10155.
- [3] Kittle C, Sereining S, Ferko B, *et al.* Virology, 2004, **324**: 97 ~ 73.
- [4] Seo S H, Hoffmann E, Webster R G. Virus Research, 2004, **103**: 107 ~ 113.
- [5] 卢建红, 龙进学, 邵卫星, 等. 微生物学报, 2005, **45** (1): 53 ~ 57.
- [6] Ana M F, Rosa M M, Thomas Z, *et al.* Journal of Virology, 2004, **78** (8): 3880 ~ 3888.
- [7] Neumann B, Kawaoka Y. International Congress Series, 2001, **1219**: 587 ~ 590.
- [8] Adolfo G S, Peter P. Biologicals, 1995, **23**: 171 ~ 178.
- [9] Nicola R D, Christopher F B, Adolfo G S. Journal of Virology, 2003, **77** (24): 13257 ~ 13266.
- [10] Ken F, Yutaka F, Takeshi N, *et al.* Journal of Virology, 2005, **79** (6): 3766 ~ 3774.