

A 型流感病毒 NS1 基因密码子去优化改造引起病毒毒力减弱

栾世家^{1,2}, 潘蔚琦^{1,3}, 李婷^{1,3}, 杨化强¹, 张北武^{1,3}, 李锋^{1,3}, 陈凌^{1,2,3}

1 中国科学院广州生物医药与健康研究院, 广州 510663

2 中国科学技术大学 医药生物技术系, 合肥 230027

3 广州呼吸疾病研究所 呼吸疾病国家重点实验室, 广州 510120

摘要: 根据 A 型流感病毒密码子使用偏嗜性, 选取稀有密码子对 A/Puerto Rico/8/34(H1N1)病毒 NS1 基因内部 110 个氨基酸区域进行密码子同义突变改造, 并全基因合成 NS 基因, 利用反向遗传操作技术拯救出含有密码子去优化 NS1 基因的重组病毒(deoNS)。体外细胞噬斑形成实验和病毒生长曲线证明该病毒在 MDCK 细胞内的感染和复制能力比野生型病毒低约 1000 倍; BALB/c 小鼠体内致病力实验证明 deoNS 病毒不能引起小鼠发病和死亡, 该病毒在小鼠肺内的复制滴度比野生型病毒低 100~1000 倍。本研究探索了通过基因组密码子去优化改造途径降低 A 型流感病毒毒力的可行性, 首次证明流感病毒 NS1 基因密码子去优化同义突变可以降低病毒毒力, 为流感减毒活疫苗的研究提供了新的思路。

关键词: A 型流感病毒, NS1 基因, 密码子去优化, 致弱, 减毒活疫苗

Rescued influenza A virus with codon deoptimized NS1 gene is attenuated both *in vitro* and *in vivo*

Shijia Luan^{1,2}, Weiqi Pan^{1,3}, Ting Li^{1,3}, Huaqiang Yang¹, Beiwu Zhang^{1,3}, Feng Li^{1,3}, and Ling Chen^{1,2,3}

1 Guangzhou Institute of Biomedicine and Health (GIBH), Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510663, China

2 Department of Biomedicine and Biotechnology, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China

3 Guangzhou Institute of Respiratory Disease, National Key Laboratory of Respiratory Disease, Guangzhou 510120, China

Abstract: To develop novel live attenuated influenza vaccine, we explored the feasibility to attenuate influenza virus by codon deoptimization of NS1. According to the codon usage bias in influenza A virus, we designed and synthesized a condon-deoptimized NS gene by substituting codons of 110 amino acids in the NS1 gene of A/Puerto Rico/8/34(H1N1) with unpreferred synonymous codons. The influenza A virus with the codon deoptimized NS1 gene (deoNS virus) was rescued by reverse genetics. Plaque forming assay and virus growth curve showed that the growth of deoNS virus was reduced about 1000 times in MDCK cells compared to that of the wild-type virus. Intranasal inoculation with deoNS virus did not cause death or evident disease in infected BALB/c mice. Furthermore, the virus titer in the lungs of mice infected with deoNS virus was significantly lower (i.e. 100–1000 times) than that of wild-type virus. Our results indicated that influenza virus could be effectively attenuated by synonymous codon deoptimization of

Received: January 23, 2009; **Accepted:** March 13, 2009

Supported by: Guangzhou Science and Technology Program (No. 2006E1-E0011).

Corresponding author: Weiqi Pan. Tel: +86-20-32290577; Fax: +86-20-32290606; E-mail: pan_weiqi@gibh.ac.cn

Ling Chen. Tel: +86-20-32290600; Fax: +86-20-32290606; E-mail: chen_ling@gibh.ac.cn

广州市科技计划项目(No. 2006E1-E0011)资助。

NSI gene. This strategy will be useful to develop new attenuated candidates for the production of live attenuated influenza vaccines.

Keywords: influenza A virus, NSI gene, codon-deoptimization, attenuation, live influenza vaccine

A 型流感病毒是引起世界流感大流行的主要病原体, 通过抗原漂移和抗原转换, 病毒不断的进行变异, 逃避人体免疫系统的防御和攻击。目前预防流感唯一有效的措施是疫苗接种, 以灭活苗和冷适应减毒活苗的应用较为广泛。灭活苗通过肌肉注射途径免疫, 能够诱发机体产生针对血凝素的中和抗体, 但无法刺激鼻腔黏膜产生分泌型抗体, 也无法诱导产生细胞免疫应答。而冷适应减毒活苗通过鼻吸入的方式免疫, 由于其温度敏感性只能在上呼吸道内有限复制, 可充分诱导鼻粘膜免疫、体液免疫及细胞免疫应答。因此, 减毒活苗无论从免疫途径还是免疫效果上都优于传统灭活苗, 研究出安全有效的减毒活苗已成为新型流感疫苗的发展方向^[1-3]。

反向遗传操作技术的诞生及成熟为流感病毒的研究打开了新的局面。研究者们利用此技术, 通过对病毒基因组的改造, 使病毒的正常复制功能受损, 制备出一系列新型流感减毒病毒株^[4-8]。流感病毒 NSI 基因是一个理想的病毒致弱靶基因, 该基因编码的非结构蛋白在拮抗 I 型干扰素诱导的抗病毒效应中发挥重要作用, 同时也是调控病毒和细胞内基因转录及表达的重要因子, Garcia-Sastre 等^[9]通过删除 NSI 基因的方法获得了复制缺陷流感减毒株。

本研究根据 A 型流感病毒基因组密码子使用偏嗜规律的研究结果^[10], 对流感病毒 NSI 基因编码区进行去优化改造, 利用反向遗传操作技术拯救出含有密码子去优化 NSI 基因的流感病毒, 并在细胞和小鼠体内对改造病毒的毒力进行验证, 证实了 NSI 基因密码子去优化改造方式可以降低流感病毒毒力, 此策略的验证为新型流感减毒活苗的设计提供了一种新的思路和途径。

1 材料与方法

1.1 细胞、质粒和载体

MDCK 与 293T 细胞系均为本室冻存, 两者均以含 10%胎牛血清的 DMEM 进行常规培养。转录载体 pPOLI 与真核蛋白表达载体 pCAGGs 均由美国纽约西奈山医学院 Peter Palese 教授惠赠。含 A/Puerto Rico/8/34(H1N1)(PR8)毒株基因组的重组转录质粒

(pPOLI-PR8PB2、pPOLI-PR8PB1、pPOLI-PR8PA、pPOLI-PR8HA、pPOLI-PR8NP、pPOLI-PR8NA、pPOLI-PR8M)与蛋白表达质粒(pCAGGs-PB2、pCAGGs-PB1、pCAGGs-PA、pCAGGs-NP)均由本室构建并保存。

1.2 病毒和实验动物

由 12 质粒系统拯救的 A/Puerto Rico/8/34(H1N1)病毒(R-PR8)由本实验室制备。SPF 鸡胚购自北京梅里亚维通实验动物技术有限公司, 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。

1.3 主要试剂

Sap I 限制性内切酶购自 NEB 公司, Trizol 和 Lipofectamine 2000 Reagent 购自 Invitrogen 公司, TPCK-Trypsin 和 AEC Chromogen Kit 购自 Sigma 公司, DNase I(RNase free)、SYBR PrimeScript RT-PCR Kit 购自宝生物工程(大连)有限公司, RNase A(DNase free)购自美国 MBI 公司, Viral RNA Extraction Kit 购自 Qiagen 公司, 抗 A 型流感 NP 蛋白单克隆抗体购自 Virostat 公司, 山羊抗小鼠 IgG 抗体购自武汉博士得生物工程有限公司。

1.4 密码子去优化 NS 基因的设计与合成

在不影响 NS 基因包装信号^[11]和 NSI 与 NS2 剪切位点^[12]的前提下, 以 PR8 病毒 NSI 基因读码框第 151~480 位共 330 碱基区域为改造对象, 根据 A 型流感病毒密码子使用偏嗜性的研究结果^[10], 选取流感病毒使用频率最低的密码子对该区域的氨基酸进行同义突变即密码子去优化(Codon deoptimization)改造, 并在 NS 基因 5'和 3'非编码区末端引入定向克隆至 pPOLI 载体的 Sap I 酶切位点, 将该基因命名为 deoptimized NS, 送至宝生物工程(大连)有限公司进行全基因合成, 合成后的基因被克隆至 PUC57 质粒。

1.5 pPOLI-deoNS 转录质粒的构建及制备

用 Sap I 酶切 pUC57-deoNS 质粒, 酶切产物用琼脂糖凝胶电泳分离, 胶回收 900 bp 左右的目的片段; 同时用 Sap I 酶切 pPOLI 质粒, 琼脂糖凝胶电泳后胶回收线性化片段。将二者用 T4 DNA 连接酶在 16°C 连接过夜, 转化 Top10 感受态, 提取质粒 pPOLI-deoNS。

1.6 病毒拯救和鉴定

取质粒 pPOLI-deoNS 和其余 7 个转录质粒 pPOLIs(PB2、PBI、PA、HA、NP、NA、M)各 0.5 μg , 4 个蛋白表达质粒 pCAGGs(PB2、PBI、PA、NP)各 1 μg , 按照说明用 lipofectamine 2000 转染 293T 和 MDCK 单层混合细胞。37°C、5% CO₂ 培养箱中培养 8 h, 吸弃孔内转染液, 加入 1 mL Opti-MEM(含 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TPCK-*Trypsin*), 继续培养 48 h, 收获转染细胞上清, 4000 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, 按照 WHO 推荐的方法进行血凝试验^[13], 检测血凝活性, 将救获的病毒命名为 deoNS。

Trizol 提取拯救病毒总 RNA, 产物经 DNase I 处理后, 用引物 Uni-12(5'-AGCAAAGCAGG-3')反转录成 cDNA, 用 NS 基因特异引物(NS-1:5'-AGCAAAGCAGGGTGACAAAG-3'和 NS-890:5'-AGTAGAACAAGGGTGTT-3')进行 PCR 扩增, 以经 RNase A 处理的 RNA 模板为阴性对照。PCR 产物回收后进行序列测定, 用 DNASTAR 中的 Seqman 软件将 PCR 产物测序结果与 pPOLI-deoNS 重组质粒中的基因序列比对, 确定拯救病毒的序列是否与预期一致。

1.7 噬斑形成和免疫染色

将 deoNS 和 R-PR8 病毒分别用含 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 \times MEM, 1% agarose, 0.3% BSA, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DEAE-Dextran, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TPCK-*Trypsin*), 将培养板置于 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养。分别于 2 d 和 4 d 后取出培养板, 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 1:2000 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 Chromogen 显色底物, 室温显色 10~20 min, 观察并拍照。

1.8 荧光实时定量 PCR 法检测病毒生长曲线

根据 Youil 等^[14]的研究方法, 以 NP 基因为检测

对象, 以 pPOLI-PR8NP 重组质粒为标准品, 通过荧光实时定量 PCR(qRT-PCR)的方法检测病毒在 MDCK 细胞上的生长特性。

标准曲线的绘制: 根据 pPOLI-PR8NP 质粒的分子量和浓度, 计算单位体积内质粒的基因拷贝数。以 10 倍梯度稀释的 pPOLI-PR8NP 质粒为模板, 用 NP 基因特异性引物(NP-884:5'-TGTATGGACCTGC CGTAGC-3'和 NP-1113:5'-CCCTCTTGGGAGCACC TT-3')进行 qRT-PCR 扩增, 绘制标准曲线。

病毒尿囊液中基因拷贝数的测定: 分别取 deoNS 与 R-PR8 病毒尿囊液各 140 μL , 用 Viral RNA Extraction Kit 提取 RNA, 溶于 60 μL 无 RNase 的水中。用 SYBR PrimeScrip RT-PCR Kit 进行 2 步法 qRT-PCR, 分别取上述制备的 deoNS 和 R-PR8 病毒 RNA 溶液 8 μL , Uni12 反转录引物(2 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 1 μL , 配制 20 μL 反转录体系, 42°C 反应 1 h; 分别以 deoNS、R-PR8 反转录产物和质粒标准品为模板, NP-884 和 NP-1113 为引物, 配制 20 μL PCR 反应体系, 在 MJ 四通道实时定量 PCR 仪上扩增, 每个循环 3 步: 95°C 熔解, 60°C 退火和延伸, 70°C 熔解引物的同时读取荧光值, 共 40 个循环。反应结束后, 根据标准曲线计算单位体积尿囊液中含有的基因拷贝数 (genome copies/mL)。

病毒在 MDCK 中生长曲线的绘制: 将等量 (0.5 genome copy/cell) 的 deoNS 和 R-PR8 病毒感染 MDCK 单层细胞, 12 h~72 h 之间每隔 12 h 收取细胞感染上清, 按照上述方法进行 RNA 提取、反转录及 qRT-PCR 测定, 绘制病毒生长曲线。

1.9 小鼠致病力实验

取等量的 deoNS 和 R-PR8 病毒(10^4 PFU/只)分别感染 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠, 每组 15 只, 并设立 PBS 对照组。小鼠经干冰麻醉后, 将 deoNS 和 R-PR8 病毒经鼻腔感染。攻毒后每天观察小鼠的状态, 记录发病与死亡情况, 隔日称量体重。于攻毒后第 3、5、7 天每组随机选取 3 只小鼠, 断颈处死并收取肺脏, 制备肺脏组织悬液(10%, W/V), 用 PBS 将肺脏悬液做 10 倍系列稀释, 将原倍至 10^9 每个稀释度接种 4 枚 9 日龄鸡胚(0.2 mL/胚), 37°C 孵育 48 h, 通过测定鸡胚尿囊液的血凝活性来判断是否感染, 按 Reed-Muench 法计算 EID₅₀, 得出肺脏内病毒含量 (logEID₅₀/mL)。

2 结果

2.1 密码子去优化 NSI 基因的设计及分析

根据 A 型流感病毒密码子的使用偏嗜性研究结果^[10], 选取病毒使用频率最低密码子, 对 NSI 基因读码框第 151nt~480nt 区域内共 68 个氨基酸进行了同义突变, 密码子突变率为 62%, 基因序列如图 1 所示。通过密码子使用分析网站 <http://gcua.schoedl.de/> 内的“each codon vs. usage table”方法^[15], 根据 A 型流感病毒密码子使用频率统计数据(<http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=465364>)对 deoptimized NS 基因的密码子使用频率进行了分析。结果表明, 该段基因中的氨基酸(蛋氨酸、色氨酸除外)编码密码子均为 A 型流感病毒使用频率最低的密码子, 具体数据见图 2。

2.2 deoNS 病毒的拯救及鉴定

取 0.2 mL 12 质粒共转染的细胞上清接种 9 日龄 SPF 鸡胚, 37°C 孵育 48 h, 血凝实验检测鸡胚尿囊液血凝价为 2⁹, 收取尿囊液, Trizol 提取总 RNA, RNA 经 DNase I 处理后, RT-PCR 扩增该病毒 NS 基因, 得到约 900 bp 的产物, 而 RNase A 处理的 RNA 模板阴性对照组则未出现特异产物(图 3), 说明扩增产物来自于病毒基因组, 而非残留转染质粒 DNA。PCR 产物测序结果经序列比对表明, 拯救病毒的 NS 序列与 pPOLI-deoNS 重组质粒中的 NS 序列完全一致, 证明已成功救获含密码子去优化 NSI 基因

的 deoNS 病毒。

2.3 噬斑形成实验

首先通过传统的结晶紫染色方法进行噬斑实验, 结果肉眼未能观察到 deoNS 病毒的空斑, 故又采用检测灵敏度更高的免疫染色的方法观察病毒在 MDCK 细胞上的噬斑形态。10 倍梯度稀释后的病毒感染 MDCK 细胞, 分别在感染后 2 d 和 4 d 移去上层胶, 免疫染色后, 肉眼或显微镜下观察, 选取可产生单个独立噬斑的病毒稀释度感染孔, 扫描或拍摄病毒的噬斑形态。病毒感染细胞 2 d 后, 在 40 倍显微镜下观察, 可见 R-PR8 病毒形成典型的病毒感染细胞团, 噬斑的中心致密, 边缘整齐(图 4A); 而 deoNS 病毒感染细胞 2 d 后, 形成的噬斑明显小于 R-PR8 病毒, 噬斑中心松散, 边缘不明显(图 4B)。为了显示病毒空斑的整体形态, 将感染 4 d 的细胞免疫染色后, 用扫描仪扫描细胞培养板, 如图 4C 和图 4D 所示, R-PR8 病毒可见明显的空斑, 直径约为 3~4 mm, 而 deoNS 病毒的空斑则仅有针尖大小, 肉眼不易分辨。由此表明 NSI 基因密码子去优化改造使病毒的感染力降低, 病毒粒子在细胞与细胞间正常传播与扩散受到限制。

2.4 MDCK 细胞中的病毒生长曲线的测定

由于 deoNS 病毒的成斑能力较差, 本研究通过测定病毒基因拷贝数的方法精确比较两株病毒在 MDCK 细胞中的复制能力。以 10 倍梯度稀释的

```

1 *GGT CTG GAC ATC GAG ACA GCC ACA CGT GCT GGA AAG CAG ATA GTG GAG CGG ATT CTG AAA GAA GAA
2 *GGC TTA GAC ATC GAG ACG GCG ACG CGT GCG GGC AAG CAG ATC GTC GAG CGT ATC TTA AAG GAG GAG
3 G L D I E T A T R A G K Q I V E R I L K E E
1 TCC GAT GAG GCA CTT AAA ATG ACC ATG GCC TCT GTA CCT GCG TCG CGT TAC CTA ACT GAC ATG ACT
2 TCG GAC GAG GCG TTA AAG ATG ACG ATG GCG TCG GTG CCG GCG TCG CGT TAC TTA ACG GAC ATG ACG
3 S D E A L K M T M A S V P A S R Y L T D M T
1 CTT GAG GAA ATG TCA AGG GAC TGG TCC ATG CTC ATA CCC AAG CAG AAA GTG GCA GGC CCT CTT TGT
2 TTA GAG GAG ATG TCG GGT GAC TGG TCG ATG TTA ATC CCG AAG CAG AAG GTC GCG GGC CCG TTA TGT
3 ...L E E M S R D W S M L I P K Q K V A G P L C
1 ATC AGA ATG GAC CAG GCG ATC ATG GAT AAG AAC ATC ATA CTG AAA GCG AAC TTC AGT GTG ATT TTT
2 ATC GGT ATG GAC CAG GCG ATC ATG GAT AAG AAC ATC ATC TTA AAG GCG AAC TTC TCG GTC ATC TTT
3 I R M D Q A I M D K N I I L K A N F S V I F
1 GAC CGG CTG GAG ACT CTA ATA TTG CTA AGG GCT TTC ACC GAA GAG GGA GCA ATT GTT GGC GAA ATT
2 GAC CGT TTA GAG ACG TTA ATC TTA TTA CGT GCG TTT ACG GAG GAG GGC GCG ATC GTC GGC GAG ATC
3 D R L E T L I L L R A F T E E G A I V G E I
    
```

图 1 NSI 基因 330 核苷酸(151nt-480nt)密码子去优化同义突变

Fig. 1 Synonymous codon-deoptimization in 330 nucleotides of NSI gene (151 nt-480 nt). 1: the cDNA sequence of PR8 NSI gene(151 nt-480 nt, GenBank Accession No. AF389122); 2: the sequence with the deoptimized synonymous mutations (the synonymous mutations are shown in grey); 3: the deduced amino acids sequence(51 aa-160 aa).

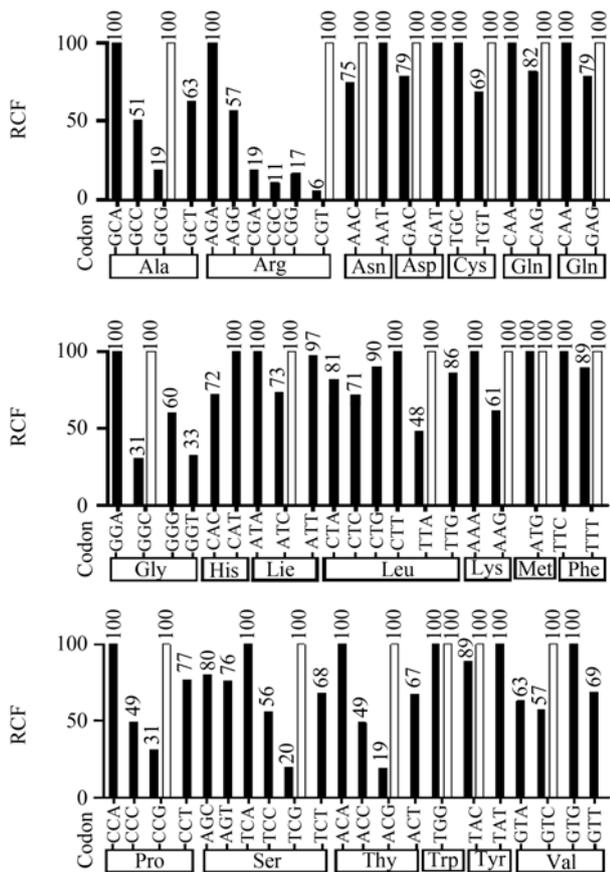


图2 设计合成的 deoptimized NS 基因中密码子使用频率分析

Fig. 2 Codon usage analysis of synthetic deoptimized NSI gene. Y axis: the relative codon frequency (RCF); X axis: amino acid and codon usage. The relative frequency of individual codon (RCF) is shown for each amino acid in black for influenza A virus genome and in white for the synthetic deoptimized NSI gene.

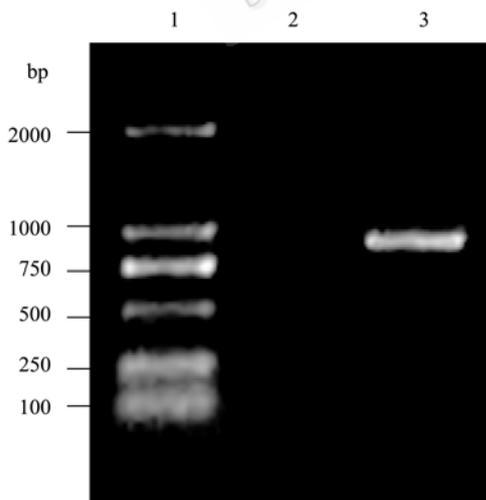


图3 救获病毒 NS 基因 RT-PCR 扩增

Fig. 3 RT-PCR amplification of the NS gene from the rescued virus. 1: DL 2000 marker; 2: negative control; 3: RT-PCR product of NS gene.

Journals.im.ac.cn

PPOLI-PR8NP 质粒为模板进行 qRT-PCR 反应,绘制标准曲线。首先测定尿囊液中病毒的基因拷贝数,平均 3 次的测量结果,单位体积尿囊液中 R-PR8 和 deoNS 病毒含量分别为 3.75×10^{10} 和 3.75×10^9 (gene copies/mL)。然后将 deoNS 和 R-PR8 病毒以相同基因拷贝数 $moi=0.5$ (gene copy/cell) 感染 MDCK 细胞,用 qRT-PCR 测定不同时间点细胞感染上清中的病毒含量。结果表明,病毒感染后 24~72 h 时间范围内,deoNS 病毒的基因拷贝数始终低于 R-PR8 病毒,在感染后 48 h,两株病毒的生长均达到最高点,此时 deoNS 病毒滴度比野生株低约 1000 倍(图 5)。

2.5 小鼠致病力实验

将 10^4 PFU 剂量的病毒经鼻腔感染小鼠后,R-PR8 病毒感染鼠逐渐出现精神沉郁、背毛蓬乱、蜷缩弓背等症状,体重持续下降;而 deoNS 病毒感染鼠则无上述疾病症状,体重没有下降,并略有增长(图 6)。感染小鼠肺脏病毒滴定结果显示在感染后第 3 天,deoNS 病毒感染鼠肺中病毒滴度比 R-PR8 病毒感染鼠低 100 倍;感染后第 5 天,deoNS 病毒感染鼠肺中病毒滴度比 R-PR8 病毒感染鼠低 1000 倍左右;感染后第 7 天,deoNS 病毒感染鼠肺中未分离到病毒,而 R-PR8 病毒感染鼠肺内仍检测到病毒存在,具体数值见表 1。综上,deoNS 病毒在小鼠肺内的复制能力低于野生型 PR8,病毒在感染后第 7 天即可被完全清除,感染小鼠未出现明显的疾病症状。因此,小鼠体内实验也证明 deoNS 病毒具有减毒表型。

表 1 感染小鼠肺脏病毒滴定

Table 1 Virus titer in mice lungs after challenge with viruses

Group	Days post infection	Virus titer (logEID ₅₀ /mL±SD)
deoNS	3	6.20±0.7
	5	3.70±1.4
	7	ND (none detectable virus)
R-PR8	3	8.20±0.4
	5	6.53±0.5
	7	3.20±0.6

3 讨论

20 种基本氨基酸中除了蛋氨酸和色氨酸外,其他均由 2 个或 2 个以上同义密码子编码。生物进化导致进化距离较远的不同物种甚至同一物种的不同组织中使用同义密码子的频率并不相等,即产生了密码

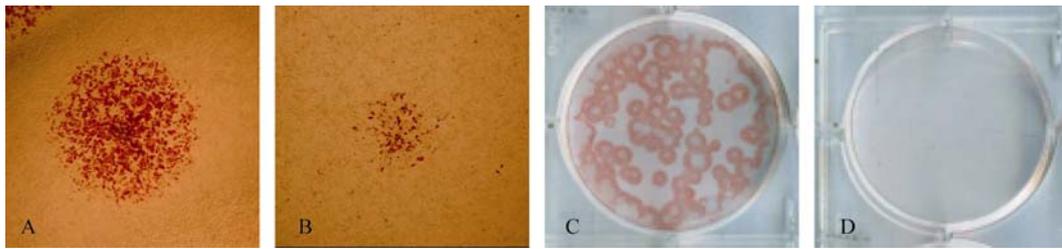


图 4 病毒噬斑形成实验

Fig. 4 Plaque assay of R-PR8 and deoNS virus. (A, B) Microphotographs of the plaque with magnification of 40 times after 2 days of infection (A: R-PR8; B: deoNS). (C, D) Scanned pictures of the plaque after 4 days of infection (C: R-PR8; D: deoNS).

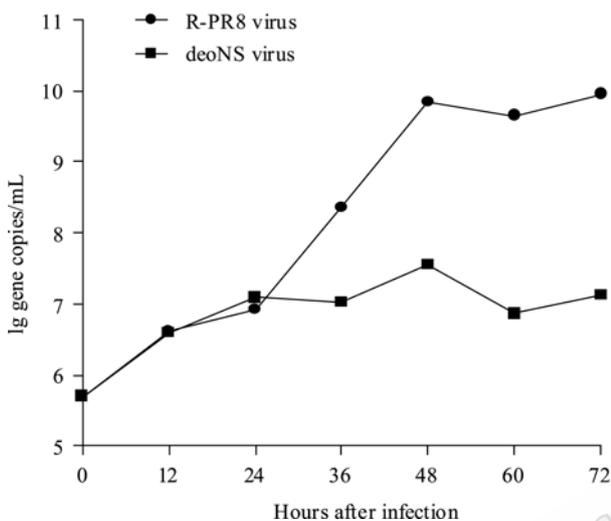


图 5 定量 PCR 测定病毒在 MDCK 细胞中的生长曲线
Fig. 5 Real-time quantitative PCR analysis of virus growth in MDCK cell.

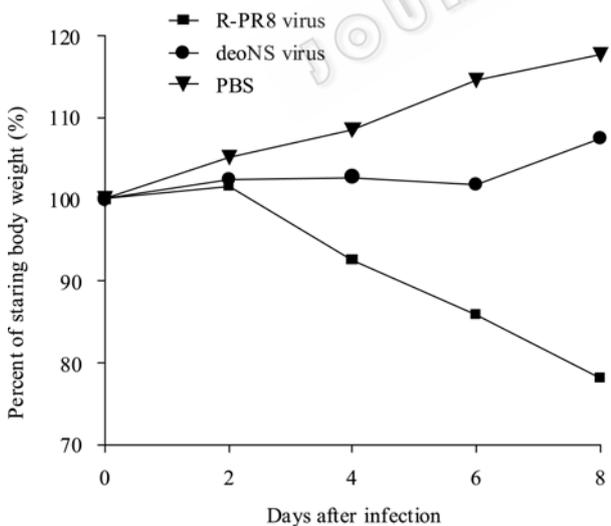


图 6 小鼠体重变化曲线
Fig. 6 Body weight changes of mice after challenge with viruses.

子使用的“偏嗜性”。稀有密码子的使用会由于: 1) 宿主内与之相匹配的同功 tRNA 含量低; 2) mRNA 二

级结构的稳定性降低, 降解速率快; 3) 核糖体对 mRNA 阅读速率降低, 甚至出现停顿和堆积等因素, 影响基因正常转录与翻译的速度和水平, 最终影响编码蛋白的正常功能^[16,17]。Mueller 等^[18]和 Burns 等^[19]分别在脊髓灰质炎病毒(Poliiovirus)的研究中, 通过在病毒衣壳蛋白编码区内大规模的使用稀有密码子对该基因进行去优化改造, 使病毒在体内外的复制和毒力均明显减弱, 并能够诱导 CD155 转基因小鼠产生对致死剂量病毒攻击的免疫保护力。由于这种减毒表型是由大规模的密码子改造引起, 而不是由个别位点突变引起, 故该减毒株具有遗传稳定性, 不存在回复突变的危险, 因此基因编码密码子去优化改造可以作为一种有效手段用于减毒活疫苗的研制。

本研究首次探索了基因密码子去优化改造对流感病毒毒力的影响, 在 NSI 基因内部引入稀有密码子, 成功拯救了含有密码子去优化 NSI 基因的流感病毒, 并在细胞和动物水平验证了该病毒具有减毒表型, 其复制能力和致病力相对于野生型毒株都显著下降。关于 NSI 密码子去优化改造引起病毒毒力致弱的具体机制以及该减毒株可诱导机体产生免疫保护力的水平还有待后续实验的进一步研究。

REFERENCES

[1] Palese P, Garcia-Sastre A. Influenza vaccines: Present and future. *J Clin Invest*, 2002, **110**(1): 9-13.
 [2] Cox RJ, Brokstad KA, Ogra P. Influenza virus: Immunity and vaccination strategies. Comparison of the immune response to inactivated and live, attenuated influenza vaccines. *Scand J Immunol*, 2004, **59**(1): 1-15.
 [3] Palese P. Making better influenza virus vaccines? *Emerg Infect Dis*, 2006, **12**(1): 61-65.
 [4] Watanabe T, Watanabe S, Kida H, et al. Influenza A virus

with defective M2 ion channel activity as a live vaccine. *Virology*, 2002, **299**(2): 266–270.

[5] Watanabe T, Watanabe S, Kim JH, *et al.* Novel approach to the development of effective H5N1 influenza A virus vaccines: Use of M2 cytoplasmic tail mutants. *J Virol*, 2008, **82**(5): 2486–2492.

[6] Talon J, Salvatore M, O’Neill RE, *et al.* Influenza A and B viruses expressing altered NS1 proteins: A vaccine approach. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(8): 4309–4314.

[7] Ferko B, Stasakova J, Romanova J, *et al.* Immunogenicity and protection efficacy of replication-deficient influenza A viruses with altered NS1 genes. *J Virol*, 2004, **78** (23): 13037–13045.

[8] Watanabe T, Watanabe S, Neumann G, *et al.* Immunogenicity and protective efficacy of replication-incompetent influenza virus-like particles. *J Virol*, 2002, **76**(2): 767–773.

[9] Garcia-Sastre A, Egorov A, Matassov D, *et al.* Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology*, 1998, **252**(2): 324–330.

[10] Zhou T, Gu W, Ma J, *et al.* Analysis of synonymous codon usage in H5N1 virus and other influenza A viruses. *Biosystems*, 2005, **81**(1): 77–86.

[11] 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 Virol*, 2005, **79**(6): 3766–3774.

[12] Lamb RA, Choppin PW. Segment 8 of the influenza virus genome is unique in coding for two polypeptides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, **76**(10): 4908–4912.

[13] Webster R, Cox N, Stohr K. WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance. 2nd Ed. The World Health Organization(WHO), 2002: 32–33.

[14] Youil R, Su Q, Toner TJ, *et al.* Comparative study of influenza virus replication in Vero and MDCK cell lines. *J Virol Methods*, 2004, **120**(1): 23–31.

[15] Fuhrmann M, Hausherr A, Ferbitz L, *et al.* Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene. *Plant Mol Biol*, 2004, **55**(6): 869–881.

[16] Duan J, Wainwright MS, Comeran JM, *et al.* Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2(DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Hum Mol Genet*, 2003, **12**(3): 205–216.

[17] Duan J, Antezana MA. Mammalian mutation pressure, synonymous codon choice, and mRNA degradation. *J Mol Evol*, 2003, **57**(6): 694–701.

[18] Mueller S, Papamichail D, Coleman JR, *et al.* Reduction of the rate of poliovirus protein synthesis through large-scale codon deoptimization causes attenuation of viral virulence by lowering specific infectivity. *J Virol*, 2006, **80**(19): 9687–9696.

[19] Burns CC, Shaw J, Campagnoli R, *et al.* Modulation of poliovirus fitness in Hela cells by deoptimization of synonymous codon usage in the capsid region. *J Virol*, 2006, **80**(7): 3259–3272.



本 期 广 告 索 引

企 业	版 位	企 业	版 位
GE Healthcare 公司	封 底	美国 Promega 公司	内 页
Roche 诊断产品有限公司	封 二	生物谷网站	内 页
赛默飞世尔科技有限公司	封 三	上海国强生化工程装备有限公司	内 页
泰州贝今生物技术有限公司	内 页	镇江东方生物工程公司	内 页
上海同田生物技术有限公司	内 页		