在 MDCK 细胞上高产的乙型流行性感冒病毒株的筛选及其全基因组克隆

齐立,吴昆昱,李梓,张烨,董婕,张立国,张智清
(中国疾病预防控制中心　病毒病预防控制所　北京　100052)

摘要:流行性感冒(流感)病毒可引起世界范围的大流行,因此需要及时地生产流感疫苗来预防流感的流行。乙型流感病毒是疫苗的重要组成部分。传统制备疫苗的方法是使用鸡胚生产,存在很多缺陷,应用哺乳动物细胞生产流感疫苗是个更好的选择。但是,乙型流感病毒感染 MDCK 细胞后,很难得到持续的高产。此实验筛选到的乙型流感病毒在 MDCK 细胞连续传代 15 代后,PFU 值从第 1 代的 8×10^4 到第 15 代 2×10^9,$TCID_{50}$ 从第 1 代 6.5 到第 15 代的 8.0。将筛选到的毒株进行全基因组克隆,用两套引物获得乙型流感病毒的全部 8 个节段。此结果为利用反向遗传技术将高产毒株与流行毒株重配,进而在哺乳动物细胞上生产基因工程流感疫苗打下基础。

关键词:乙型流感病毒;高产毒株;PFU;通用引物;全基因组克隆
中图分类号:R373.1+3;Q78　　**文献标识码**:A　　**文献编号**:1000-8721(2004)03-0195-05

流行性感冒(流感)病毒在世界范围内引起人畜的发病和死亡。流感的流行常由甲型和乙型流感病毒引起,因此乙型流感病毒的表面抗原是流感疫苗的重要组成部分[1]。流感病毒由于抗原转换或抗原漂移常导致新的变异抗原的出现,因此疫苗株需要经常更换[2]。当前获得批准生产的是鸡胚来源的灭活疫苗,尽管采取了有效的纯化工艺,但是仍然存在着许多不足。不仅成本昂贵,而且鸡胚的残留物可能引起过敏反应。更主要的问题是鸡胚来源的病毒在鸡胚连续传代后常常引起 HA 的变异,这种变异也可能发生在病毒其它节段[3-6],结果使鸡胚来源的疫苗不能与人群中的流行毒株完全匹配。应用哺乳动物细胞生产的疫苗在动物模型显示出比较好的保护作用[7]。MDCK 细胞被认为是培养甲型和乙型流感病毒最合适的细胞系[8],此细胞系具有感染后迅速产生流感病毒,在短时间内取得高滴度的特点。MDCK 来源的病毒经过连续传代后,保持了抗原的稳定性[9]。然而不是所有的病毒都适合疫苗生产,一些病毒在鸡胚和细胞中产量很低。RMS(nation licensure in reference member state)和 MRP(mutual recognition procedure)已经接受用 MDCK 和 Vero 细胞来生产疫苗。因此,当前要解决的问题是获得高产的母株,然后与流行毒株的 HA 和 NA 重配,使疫苗株既保持高产的特性,又具有流行毒株抗原性的特点[2]。反向遗传学技术的发展使快速生产流感疫苗成为可能。本文的目的即是筛选适合于哺乳动物细胞生产的高产乙型流感病毒株。

我们通过大量的工作筛选到高产乙型流感病毒株,并根据乙型流感病毒基因组的特点,设计了通用引物,进行了全基因组克隆。乙型流感病毒根据 HA1 区的不同分为 Yamagata 系和 Victoria 系,在 GenBank 中乙型流感病毒的序列远远少于甲型流感病毒。另外,许多提交给 GenBank 中的序列不带有非编码区序列,这就增加了类比分析的难度。我们根据已知的资料和数据库,对乙型流感病毒的基因序列做了分析,设计了两套引物来扩增乙型流感病毒的全部 8 个基因,大大减少了基因扩增所需要的时间。

材料与方法

1　细胞和病毒　MDCK 细胞来源于美国 CDC,用含 10% FBS 的 DMEM 培养基培养。鸡胚来源的乙型流感病毒 6 株为 Yamagata 系,6 株为 Victoria 系,病毒分别来源于美国 CDC 和中国流感中心。

2　高产毒株的筛选　将两系病毒在鸡胚上传代,检测血凝单位,筛选出在鸡胚上相对高产的毒株,接种 MDCK 细胞,连续传两代,根据血凝单位选出高产毒株,然后进行连续传代。

收稿日期:2003-08-21;**修回日期**:2004-04-15
基金项目:科研院所技术开发研究专项基金(NCSTE-2000-JKZX-231);"973"计划传染病防治基础研究(973-G19999054108)。
作者简介:齐立(1972-),辽宁人,博士,主要从事流感病毒分子生物学研究。

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3 病毒的连续传代 在接种病毒的前一天,将 MDCK 细胞接种于培养瓶,第二天使细胞数达到 3～4 $\times 10^6$,接种病毒 MOI 为 1 $\times 10^{-4}$ $TCID_{50}$/细胞、1 $\times 10^{-5}$ $TCID_{50}$/细胞,维持液包含 TPCK - Trypsin。在感染后 24h、48h 再分别加入 TPCK - Trypsin,使 TPCK - Trypsin 的终浓度达到 1μg/ml,在 33 ℃培养 72h 或 96h 收获病毒,检测血凝单位。

4 病毒毒力的检测 将病毒在 MDCK 细胞传代的第 1 代、第 5 代、第 10 代和第 15 代分别做 $TCID_{50}$ 和 PFU 的检测。

4.1 $TCID_{50}$ 检测 将病毒进行倍比稀释,接种于 24 孔板,每个稀释度平行加入 4 个孔,每孔加入 200μl 稀释液,33 ℃孵育 1h 后用 Hanks 液冲洗,然后加入包含 TPCK - Trypsin 的维持液。在感染后的 24h、48h、72h 分别补加 TPCK - Trypsin,在感染后 72h 收获病毒,冻存于 - 70 ℃冰箱过夜,测定血凝单位效价。

4.2 PFU 检测 将病毒进行倍比稀释,接种于小方瓶,每小方瓶加入 500μl 病毒稀释液,33 ℃孵育 1h 后,用 Hanks 液冲洗,然后加入第一层覆盖液,33 ℃孵育 72h 后,加入第二层覆盖液,24h 后计数空斑。

5 测 DNA 序列 将感染后的第 1 代和第 15 代病毒悬液提取病毒 RNA 做 RT - PCR 后,对 HA 片段进行测序。

6 RNA 提取和 RT - PCR 将筛选到的毒株 B/京科/96/01 接种 MDCK 细胞,72h 后收获病毒,用 Rneasy KIT(Qiagen)提取病毒 RNA,最后溶于 30μl 水。用 RT - PCR 扩增病毒基因片段。首先将病毒核酸在逆转录酶(Invitrogen)、Uni9 引物和 BM - NS 引物的 20μl 体系中逆转录成 cDNA,逆转录反应条件为 94 ℃变性 3min,55 ℃延伸 1h。然后取逆转录产物 1μl 做模板进行 PCR 反应。94 ℃ 45s、50 ℃ 45s、72 ℃ 420s,30 个循环。PFU 酶购自 Promega 公司。使用相对长的延伸时间确保合成大片段。

结 果

1 哺乳动物细胞高产的乙型流感病毒株的筛选

选 12 株乙型流感病毒在鸡胚上传代,血凝单位 > 160 的毒株有 6 株,然后将这 6 株连续在 MDCK 细胞上传代。在 MDCK 细胞上第一代血凝单位 > 160 的毒株有 4 株。将这 4 株继续传代,血凝单位 > 160 为 2 株。其中 B/京科/96/01 显示出在 MDCK 细胞上较好的生长特点。将 B/京科/96/01 在 MDCK 上连续传 15 代,感染病毒的滴度从第 1 代的 8 $\times 10^4$ PFU、6.5 $TCID_{50}$/ml 到第 15 代的 2 $\times 10^9$ PFU、8.0 $TCID_{50}$/ml。从表 1 中可以看出,15 代后病毒的毒力有增加的趋势,高产特性得到保持和提高。对每代病毒悬液进行血凝单位测试,以 1 $\times 10^{-4}$ $TCID_{50}$/细胞接种后,血凝单位平均值为 640 血凝单位;以 1 $\times 10^{-5}$ $TCID_{50}$/细胞接种后,血凝单位平均值为 480 血凝单位。表明以 1 $\times 10^{-4}$ $TCID_{50}$/细胞接种的效果较好。

表 1 B/京科/96/01 在 MDCK 细胞上连续传代 15 代

Table 1 15 serial passages of B/jingke/96/01 in MDCK cell

Virus titer	Virus passage			
	The first	The fifth	The tenth	The fifteenth
PFU	8 $\times 10^4$	9 $\times 10^6$	1 $\times 10^8$	2 $\times 10^9$
$TCID_{50}$/ml	6.5	7.25	7.5	8.0

2 HA 基因序列测定

对连续传代后流感病毒的血凝素基因用 PCR 法进行了序列分析,以检测在连续传代后其抗原成分是否发生变异。测序结果显示,第 15 代病毒的 HA 序列与第一代的 HA 序列完全一致。表明有较好的稳定性(HA 序列结果未附)。

3 应用第一套通用引物扩增病毒的多聚酶片段和 NP、M 片段

乙型流感病毒的基因组由 8 个分节段的负链 RNA 组成,其中 PB1、PB2 和 PA 3 个大片段长度为 2.3kb 左右,NP 和 HA 片段长度为 1.8kb 左右,NA 片段长度大约为 1.5kb,NS 片段大约为 1.1kb,M 片段大约为 1.2kb。病毒 RNA 片段由编码区和非编码区组成,非编码区分成两部分:第一部分在 3′端包含 9 个核苷酸的保守区,第 10、11 位是经常变化的,在 5′端包含 9 个核苷酸的保守区,但是 HA、NA、NS 片段的第 6 位为 T,其余片段第 6 位为 A;第二部分在每一个片段都是不同的。通过 BLAST 分析(WWW.FLULANL.GOV)总结出乙型流感病毒非编码区的基因组特点(表 2)。我们设计了一套通用引物,Forward primer BM - U - 1,5′- AACGTCTCTGGGAGCAGAAGC - 3′; Reverse primer BM - U - 2,5′- GGCGTCTCGTATTAGTAGAAAC - 3′。这套通用引物包含与病毒基因组 5′端和 3′端保守区相匹配的 9 个碱基,用这套引物进行 PCR 反应,扩增出 3 条带,分别为 1.1kb、1.8kb、2.3kb,结果见图 1。1.8kb 为 NP 片段,1.1kb 为 M 片段,2.3kb 为 3 个多聚酶大片段。

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 2　使用 RT - PCR 方法扩增乙型流感病毒基因组 8 个片段所用的引物对

Table 2　Primers used for RT - PCR amplification of eight segments of influenza B virus genome

Gene segment	Forward primer	Reverse primer	Expected size (bp)
PB2	BM - PB2 - 1: 5′- TTGGTCTCAGGG AGCAGAAGCGGAGCGTTTTCAAG. - 3′	BM - U - 2: 5′- GGCGTCTCGTATT AGTAGAAAC - 3′	2381
PB1	BM - PB1 - 1: 5′- TTCGTCTCTGGG AGCAGAAGCGGAGCTTTAAG - 3′	BM - U - 2: 5′- GGCGTCTCGTATT AGTAGAAAC - 3′	2397
PA	BM - PA - 1: 5′- TTCGTCTCAGGG AGCAGAAGCGGT - 3′	BM - U - 2: 5′- GGCGTCTCGTATT AGTAGAAAC - 3′	2309
HA	BM - NS - 1: 5′- ATCGTCTCTGGG AGCAGAAGCAGAGCA - 3′	BM - NS - 2: 5′- GGCGTCTCGTATT AGTAGTAACAAGAG - 3′	1885
NP	BM - U - 1: 5′- AACGTCTCTGGG AGCAGAAGCACA - 3′	BM - U - 2: 5′- GGCGTCTCGTATT AGTAGAAAC - 3′	1844
NA	BM - NS - 1: 5′- ATCGTCTCTGGG AGCAGAAGCAGAGCA - 3′	BM - NS - 2: 5′- GGCGTCTCGTATT AGTAGTAACAAGAG - 3′	1559
M	BM - U - 1: 5′- AACGTCTCTGGG AGCAGAAGCAGG - 3′	BM - U - 2: 5′- GGCGTCTCGTATT AGTAGAAAC - 3′	1191
NS	BM - NS - 1: 5′- ATCGTCTCTGGG AGCAGAAGCAGAGCA - 3′	BM - NS - 2: 5′- GGCGTCTCGTATT AGTAGTAACAAGAG - 3′	1099

The Forward primer 5′- nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnAGCAGAAGC - 3′ and the reverse primer 5′- nnnnnnnnnnnnnnnnnnnn AGTAGAAAC - 3′ (underlined) are universal primers complementary to the conserved termini regions of eight segments of influenza B virus. The sixth base of reverse primer of HA, NA and NS gene segments is T (shaded), of the other gene segments is A (in pane). PB2, PB1, PA. Polymerase; HA. Hemagglutinin; NP. Nucleoprotein; NA. Neuraminidase; M. Matrixgene; NS. Nonstructural gene.

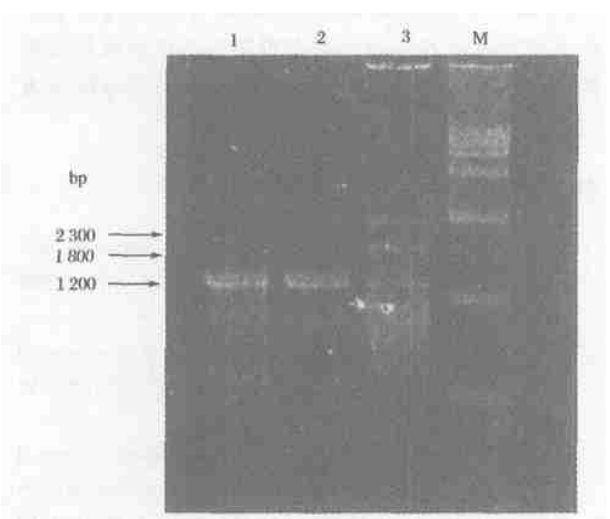

图 1　M、NP、PA、PB1、PB2 片段的 PCR 扩增的结果

Figure 1　Using the first set of universal primers to amplify the polymerase segments and NP, M segments

M. DNA marker (15000 bp ladder); 1 - 2. M segment; 3. M, NP, 3P (PB1, PB2, PA) segments.

4　应用第二套通用引物扩增病毒的 HA、NA、NS 节段

通过类比分析设计了第二套通用引物 Forward primer BM - NS - 1, 5′- ATCGTCTCTGGGAGCAGAAGCAGAGCA - 3′; Reverse primer BM - NS - 2, 5′- GGCGTCTCGTATTAGTAGTAACAAGAG - 3′。用来扩增 HA、NA、NS 节段,结果见图 2。至此,通过两套引物扩增出了乙型流感病毒的全部基因组。但是,因为 3 个多聚酶大片段分子量相近,不能区分开来,所以又分别设计引物来扩增 3 个大片段。

5　应用特异性引物分别扩增 3 个多聚酶片段

用 Forward primer BM - PA - 1, 5′- TTCGTCTCAGGGAGCAGAAGCGGT - 3′; BM - PB2 - 1, 5′- TTCGTCTCTGGGAGCAGAAGCGGAGCGTTTTCAAG - 3′; BM - PB1 - 1, 5′- TTGGTCTCAGGGAGCAGAAGCGGAGCGTTTTAAG - 3′; Reverse primer BM - U - 2, 5′- GGCGTCTCGTATTAGTAGAAAC -

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3′;分别扩增病毒的多聚酶片段(图 3)。

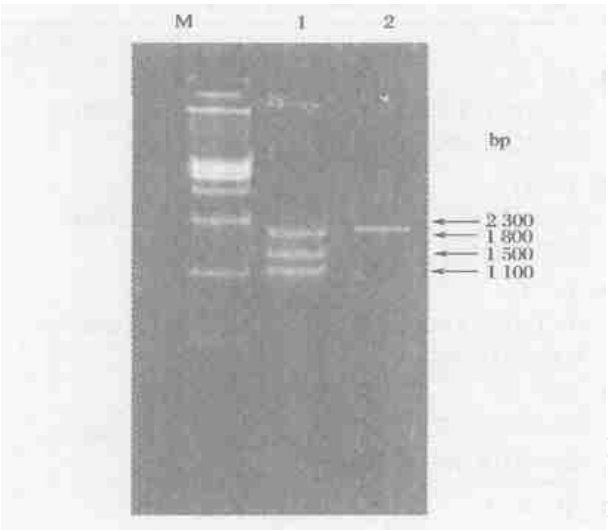

图 2 HA、NA、NS 片段的 PCR 扩增的结果

Figure 2 Using the second set of universal primers to amplify the HA, NA and NS segments

M. DNA marker (15000 bp ladder); 1. NS, HA, NA segments; 2. The PB2 segment.

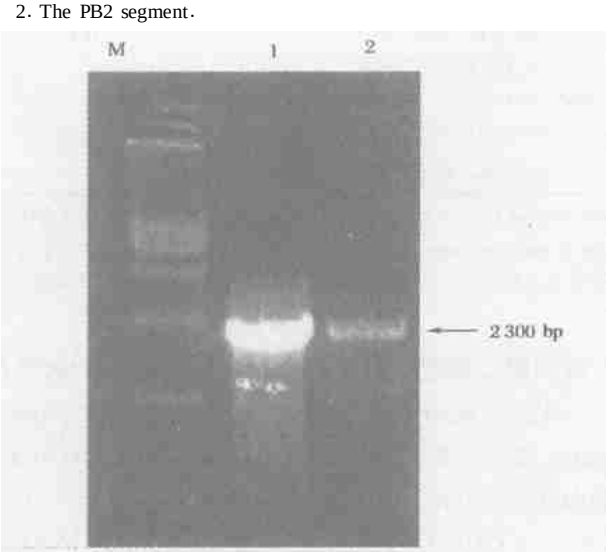

图 3 PA、PB1 片段的 PCR 扩增的琼脂糖凝胶电泳结果

Figure 3 Special polymerase primers to amplify the PB1, PA segments analyzed by agarose gel electrophoresis

M. DNA marker (15000 bp ladder); 1. PB1 segment; 2. PA segment.

讨 论

过去认为流感病毒在细胞传代后,会出现感染力下降的情况,另外用流感病毒感染 MDCK 细胞也很难取得比较高的血凝单位,通常在 160 血凝单位以下。然而根据物种进化的原理,如果流感病毒在 MDCK 连续传两代以上而不出现毒力下降或血凝单位下降,那么可以认为病毒应该在 MDCK 细胞上越来越适应。通过选择压力,那些在细胞上有感染力的病毒颗粒存活下来[10]。毒力下降的原因,可能是培养条件不够优化。在病毒接种 MDCK 细胞后的 24h、48h 加入 TPCK- Trypsin,有利于病毒的繁殖[11,12]。因为 TPCK- Trypsin 在 24h 后可能被细胞产生的因子所抑制,不能很好地切割 HA,因此分时段加入胰酶对流感病毒的复制是十分重要的[12]。另外,流感病毒的最适 pH 为 7～8,在孵育过程中常常由于细胞代谢导致培养基酸化,因此分时段加入 $NaHCO_3$ 使 pH 维持在 7～8 左右,有利于流感病毒的生长。经过连续传 15 代后,病毒 $TCID_{50}$ 和 PFU 值的增加,说明流感病毒的毒力有逐渐增加的趋势。但是血凝单位出现了波动,由第一代最高的 1 280 到第 15 代血凝单位 320,但是均大于 160 血凝单位。血凝单位的波动可能和接种的细胞数和细胞状态存在密切的关系。实验结果表明,B/京科/96/01 为细胞高产毒株,且经过连续传代后 HA 无变异。我们设计的通用引物不仅可以克隆 B/京科/96/01 毒株,而且可以扩增出绝大多数乙型流感病毒基因,还可应用于病毒的分型,研究乙型流感病毒的进化。筛选出在细胞上高产毒株的意义在于可以和流行毒株表面抗原基因进行重配,从而获得在哺乳动物细胞上高产的流感疫苗株。近年来由于反向遗传技术的发展,使疫苗的研究取得了突飞猛进的进展。Hoffmann 等人成功地利用反向遗传技术的 8 个质粒系统完成了乙型流感病毒鸡胚高产株和流行毒株的重配工作[1,2]。我们实验室的细胞高产毒株和流行毒株的重配工作正在进行中。

参考文献:

[1] Jackson D, Cadman A, Zurcher T, et al. A reverse genetics approach for recovery of recombinant influenza B viruses entirely from cDNA [J]. J Virol, 2002, 76: 11744 - 11747.

[2] Hoffmann E, Mahmood K, Yang C F, et al. Rescue of influenza B virus from eight plasmids [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99 (17): 11411 - 11416.

[3] Oxford J S, Newman R, Corcoran T, et al. Direct isolation in eggs of influenza A (H1N1) and B viruses with haemagglutinins of different antigenic and amino acid composition [J]. J Gen Virol, 1991, 72 (Pt1): 185 - 189.

[4] Robertson J S, Bootman J S, Newman R, et al. Structural changes in the haemagglutinin which accompany egg adaptation of an influenza A (H1N1) virus [J]. Virology, 1987, 160 (1): 31 - 37.

[5] Rocha E P, Xu X, Hall H E, et al. Comparison of 10 influenza A

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(H1N1 and H3N2) haemagglutinin sequences obtained directly from clinical specimens to those of MDCK cell and egg grown viruses[J]. J Gen Virol, 1993, 74(Pt 11): 2513 - 2518.

[6] Wang M L, Katz J M, Webster R G. Extensive heterogeneity in the hemagglutinin of egg - grown influenza viruses from different patients[J]. Virology, 1989, 171(1): 275 - 279.

[7] Govorkova E A, Murti G, Meignier B, et al. African green monkey kidney (Vero) cells provide an alternative host cell system for influenza A and B viruses[J]. J Virol, 1996, 70(8): 5519 - 5524.

[8] Robertson J S. An overview of host cell selection [J]. Dev Biol Stand. 1999, 98: 7 - 11.

[9] Govorkova E A, Kodihalli S, Alymova I V, et al. Growth and immunogenicity of influenza viruses cultivated in Vero or MDCK cells and in embryonated chicken eggs[J]. Dev Biol Stand, 1999, 98: 39 - 51.

[10] Merten O W, Manuguerra J C, Hannoun C, et al. Production of influenza virus in serum - free mammalian cell cultures[J]. Dev Biol Stand, 1999, 98: 23 - 37.

[11] Kaverin N V, Webster R G. Impairment of multicycle influenza virus growth in Vero (WHO) cells by loss of trypsin activity[J]. J Virol, 1995, 69(4): 2700 - 2703.

[12] Govorkova E A, Kaverin N V, Gubareva L V, et al. Replication of influenza A viruses in a green monkey kidney continuous cell line (Vero) [J]. J Infect Dis, 1995, 172(1): 250 - 253.

Screening of the High-yield Influenza B Virus on MDCK Cell and Cloning of Its Whole Genome

QI Li, WU Kun - yu, LI Zi, ZHANG Ye, DONG Jie, ZHANG Li - guo, ZHANG Zhi - qing

(National Institute for Viral Disease Control and Prevention, China CDC, Beijing 100052, China)

Abstract: Influenza virus may cause pandemic in the world. Thus, influenza vaccine should be produced timely and effectively. There are many advantages to produce influenza vaccine in mammalian cell culture than in chicken embryos. But it is difficult to obtain high titer of the virus on MDCK cell. We have passaged B/jingke/96/01 influenza virus strain on MDCK cell for 15 passages, the PFU reached from the first passage 8×10^4, to the fifteenth passage 2×10^9, the $TCID_{50}$/ml from 6.5 of the first passage to 8.0 of the fifteenth passage. Not only B/jingke/96/01 had high productive characteristics in MDCK cell, but also had a tendency of virulence increasing. We designed two sets of universal primers to amplify the whole genome of influenza virus B/jingke/96/01. In order to produce the recombinant influenza vaccine, this strain may be reassorted with the current influenza virus strain as a master strain by reverse genetic technique.

Key words: influenza B virus; high-yield strain; PFU; universal primer; cloning of whole genome

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net