

• 基础研究 •

利用反向遗传学技术拯救重组H1N1 pdm09亚型流感病毒

黎 燕¹, 周克茹², 季旻珺^{1*}, 王桂芹^{2*}

¹南京医科大学病原生物学系, 江苏 南京 211166; ² 中科南京生命健康高等研究院, 江苏 南京 211135

[摘要] 目的: 利用反向遗传学技术拯救重组H1N1 pdm09病毒, 评价其在MDCK细胞和鸡胚内的生长特性以及对BALB/c小鼠的致病性。方法: RT-PCR技术扩增A/Puerto Rico/8/1934(简称PR8)病毒基因片段, 并克隆至pHW2000双向表达载体上。全球共享流感数据倡议组织(global initiative of sharing all influenza data, GISAID)数据库中下载A/Wisconsin/588/2019(H1N1)的血凝素(hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(neuraminidase, NA)序列, 将其HA非编码区替换为A/California/07/2009(H1N1)的HA非编码区。全基因合成A/Wisconsin/588/2019的HA和NA片段, 分别克隆至pHW2000双向表达载体上。将PR8病毒6个内部基因重组质粒与A/Wisconsin/588/2019的HA和NA重组质粒共转染293T细胞与MDCK细胞, 拯救重组病毒。对重组病毒进行血凝效价测定和RT-PCR鉴定以判断是否拯救成功。将重组病毒接种MDCK细胞和9~10日龄鸡胚, 评价其生长特性并绘制生长曲线。将重组病毒以滴鼻方式感染BALB/c小鼠, 记录小鼠体重变化和生存率以评价其致病性。结果: 成功拯救出重组A/Wisconsin/588/2019病毒, 血凝效价为1:8, 测序鉴定其HA和NA序列与预期一致, 重组病毒接种MDCK细胞后72 h, 大部分细胞完全脱落, 病毒滴度为 $10^{5.38}$ TCID₅₀/mL, 复制高峰期于接种后60 h, 接种鸡胚后的血凝效价最高可达1:2⁸。重组病毒(病毒稀释比为1:1)滴鼻BALB/c小鼠后第8天, 小鼠全部死亡, 对小鼠的半数致死剂量为 $10^{-1.38}$ /50 μ L。结论: 成功拯救一株重组H1N1 pdm09病毒, 该病毒在MDCK细胞上生长良好且具有良好的鸡胚适应性, 对小鼠具有致病性和致死性, 为反向遗传学技术快速拯救流感病毒提供新思路。

[关键词] 季节性流感; H1N1; 反向遗传学技术

[中图分类号] R373.13

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2025)03-319-08

doi: 10.7655/NYDXBNSN240871

Rescue of recombinant H1N1 pdm09 influenza virus by reverse genetics system

LI Yan¹, ZHOU Keru², JI Minjun^{1*}, WANG Guiqin^{2*}

¹Department of Pathogen Biology, Nanjing Medical University, Nanjing 211166; ²Nanjing Advanced Academy of Life and Health, Nanjing 211135, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to rescue a recombinant H1N1 pdm09 virus by reverse genetics method and evaluate its growth characteristics in MDCK cells and eggs as well as its pathogenicity in BALB/c mice. **Methods:** The six internal gene segments of A/Puerto Rico/8/1934 (PR8) virus were amplified by RT-PCR and cloned into pHW2000 bidirectional expression vector. The sequences of hemagglutinin(HA) and neuraminidase(NA) of A/Wisconsin/588/2019(H1N1) were downloaded from global initiative of sharing all influenza data (GISAID) database, the HA non-coding region of the virus was replaced by that of A/California/07/2009 (H1N1). HA and NA of A/Wisconsin/588/2019 were synthesized and cloned into pHW2000 bidirectional expression vector. Both the six internal gene recombinant plasmids of PR8 and the HA and NA recombinant plasmids of A/Wisconsin/588/2019 were co-transfected into 293T and MDCK cells to rescue the recombinant virus. The recombinant virus was identified by hemagglutination test and RT-PCR analysis. The recombinant virus was inoculated into MDCK cells and 9-10 day-old eggs to evaluate their growth characteristics and draw growth curves. BALB/c mice were infected with the recombinant virus by intranasal drip. The changes in body weight and survival rate of the mice were recorded to evaluate the pathogenicity of the recombinant virus. **Results:** The recombinant A/Wisconsin/588/2019 virus was rescued. Its hemagglutination titer was 1:8, and the HA and NA sequences were consistent with

[基金项目] 江苏省“双创人才”项目(JSSCRC2023555); 江苏省重点研发计划(BE2021756)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: jiminjun@njmu.edu.cn (ORCID: 0000-0003-0293-0255); gqwang@ipsnanjing.cn (ORCID: 0000-0002-5733-1797)

expected results. Most MDCK cells were completely shed at 72 hours after inoculation with the recombinant virus, and its viral titer was $10^{5.38}$ TCID₅₀/mL. The peak of replication was 60 hours after inoculation. The hemagglutination titer reached $1:2^8$ on eggs. All BALB/c mice died on the 8th day after intranasal administration of the recombinant virus with a dilution ratio of 1:1, and the median lethal dose of the recombinant virus to mice was $10^{-1.38}$ /50 μ L. **Conclusion:** A recombinant H1N1 pdm09 virus is successfully rescued. The virus grows well in MDCK cells and has good egg-adaptation. It is also pathogenic and lethal in mice. This study provides a new idea for the rapid rescue of influenza viruses by reverse genetics method.

[Key words] seasonal influenza; H1N1; reverse genetic technology

[J Nanjing Med Univ, 2025, 45(03): 319-326]

季节性流感主要发生在冬季,是由流感病毒引起的急性呼吸道传染性疾病。据世界卫生组织(简称WHO)统计,全球每年约有10亿季节性流感病例,其中包括300万~500万重症病例,导致29万~65万病例死亡^[1]。流感病毒根据核蛋白和基质蛋白的抗原性分为甲、乙、丙、丁4种类型,其中甲型流感病毒(influenza A virus, IAV)能引起流感大流行^[2],高峰期给人类医疗体系带来巨大负担。

IAV是负性分节段RNA病毒,完整的病毒粒子包含8个基因片段,每个基因片段包括两端影响病毒组装和复制的非编码区和编码病毒蛋白的编码区^[3],8个片段分别编码血凝素(hemagglutinin, HA)、神经氨酸酶(neuraminidase, NA)、碱性聚合酶1(polymerase basic 1, PB1)、碱性聚合酶2(polymerase basic 2, PB2)、酸性聚合酶(polymerase acidic, PA)、核蛋白(nucleoprotein, NP)、基质蛋白(matrix protein, M)和非结构蛋白(non-structural protein, NS),其中HA和NA是IAV表面抗原蛋白,负责病毒感染和释放,决定病毒亚型^[4-5]。目前人群中流行的IAV亚型是H1N1和H3N2,最近一次流感大流行在2009年由H1N1引起,由于H1N1取代了之前传播的病毒,因此2009年之后的H1N1病毒也被称作H1N1 pdm09^[6]。IAV易发生抗原漂移和抗原转换,变异和传播速度非常快,接种疫苗是预防季节性流感的最佳方法^[7-8]。

反向遗传学技术是一种新兴的分子生物学技术,可在获得病毒核苷酸序列信息的基础上,将病毒cDNA克隆于细菌质粒后转染合适的细胞,从而拯救具有感染性的病毒粒子^[9]。季节性流感疫苗株需要根据流行情况进行更新,传统的疫苗生产方法为遗传重配法,通常是将高产毒株A/Puerto Rico/8/1934(简称PR8)与野生型毒株混合感染使毒株间发生基因片段交换造成重配,用特异方法筛选出含有野生型毒株免疫原性基因片段的重组毒株,此过程耗时且不可预测^[10],相比之下反向遗传学技术显然是一

种可选择的方法,可在更短时间内产生指定基因组合的流感疫苗株^[11]。此外反向遗传学技术可对病毒基因组进行修饰或改造,如基因点突变、插入、缺失及置换等,产生具有指定变异的病毒粒子,以用于病毒的致病性、复制调控、遗传进化和宿主适应性等基础研究。

IAV存在复杂的RNA二级结构,其反向遗传拯救难度较其他病毒增加。影响IAV拯救成功率的实验因素众多,且不同亚型的IAV拯救成功率相差较大,即使拯救成功也存在不能正常生长的缺陷病毒^[8]。本研究利用反向遗传学技术,以PR8病毒内部基因为骨架,2021—2023年北半球候选疫苗株A/Wisconsin/588/2019(H1N1)的HA、NA为表面抗原,通过非编码区的更换,成功拯救一株重组H1N1 pdm09病毒,为H1N1疫苗株的快速制备提供新思路。

1 材料和方法

1.1 材料

293T细胞、MDCK细胞、PR8毒株和用于流感病毒拯救的双向表达载体pHW2000由中科南京生命健康高等研究院提供。DH5 α 和Stb13感受态细胞(上海昂羽生物公司),SPF级鸡胚(江苏勃林格殷格翰公司),10周龄雌性SPF级BALB/c小鼠(浙江维通利华公司)。所有动物实验经中科南京生命健康高等研究院动物伦理委员会审批通过(2406001)。

FastPure Viral DNA/RNA Mini Kit、FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit和ClonExpress® II One Step Cloning Kit(南京诺唯赞公司),PrimeScrip RT reagent Kit和PrimeSTAR HS DNA Polymerase(Takara公司,日本),NucleoBond Xtra Midi(MN公司,德国),0.25% Trypsin-EDTA、Fetal bovine serum、Penicillin-streptomycin、DMEM、Opti-MEM、Lipofectamine™ 2000 Reagent(赛默飞公司,美国),Trypsin(TPCK-Treated)(上海懋康生物)。梯度PCR仪、恒温CO₂培

养箱(赛默飞公司,美国),电泳仪、多功能凝胶图像分析仪(上海天能公司),孵化机(德州科裕孵化设备公司)。

1.2 方法

1.2.1 引物设计和基因合成

IAV 基因组反转录引物序列为 Unit12: 5'-AGCRAAAGCAGG-3', 根据 ClonExpress® II One Step Cloning Kit 要求设计 IAV 基因通用扩增引物和空载 pHW2000 线性化引物(表 1), 所有引物由南京金斯瑞生物科技公司合成。在全球共享流感数据倡议组织(global initiative of sharing all influenza data, GISAID)数据库中下载 A/Wisconsin/588/2019 的 HA

(EPI: 1661231)和 NA(EPI: 1661230)序列,并在 5'端添加 5'-CCGAAGTTGGGGGGG-3', 在 3'端添加 5'-GGCCGCCGGGTTATT-3', 基因序列合成由上海欣卓生物科技公司进行,测序由安徽通用生物公司进行。

1.2.2 病毒基因组 RT-PCR 及空载 pHW2000 线性化

按照 FastPure Viral DNA/RNA Mini Kit 说明书提取 PR8 病毒的 RNA, 使用反转录引物 Unit12 和 PrimeScrip RT reagent Kit 将提取的病毒 RNA 反转录为 cDNA, 以 cDNA 为模板, 使用表 1 的 PCR 引物扩增 PR8 病毒的 8 个基因片段, 同时利用反向 PCR 技术使 pHW2000 载体线性化。1%琼脂糖凝胶电泳验证 PCR 产物, 纯化回收 PCR 产物并测序鉴定。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for PCR

Primer	Sequences(5'→3')
PB2-F	CCGAAGTTGGGGGGGAGCGAAAGCAGGTC
PB2-R	GGCCGCCGGGTTATTAGTAGAAACAAGGTCGTTT
PB1-F	CCGAAGTTGGGGGGGAGCGAAAGCAGGCCA
PB1-R	GGCCGCCGGGTTATTAGTAGAAACAAGGCATTT
PA-F	CCGAAGTTGGGGGGGAGCGAAAGCAGGTAC
PA-R	GGCCGCCGGGTTATTAGTAGAAACAAGGTACTT
NP-F	CCGAAGTTGGGGGGGAGCAAAAGCAGGGTA
NP-R	GGCCGCCGGGTTATTAGTAGAAACAAGGGTATTTTT
M-F	CCGAAGTTGGGGGGGAGCAAAAGCAGGTAG
M-R	GGCCGCCGGGTTATTAGTAGAAACAAGGTAGTTTTT
NS-F	CCGAAGTTGGGGGGGAGCAAAAGCAGGGTG
NS-R	GGCCGCCGGGTTATTAGTAGAAACAAGGGTGTFFF
HA-F	CCGAAGTTGGGGGGGAGCAAAAGCAGGGGAA
HA-R	GGCCGCCGGGTTATTAGTAGAAACAAGGGTGTFFF
NA-F	CCGAAGTTGGGGGGGAGCAAAAGCAGGAGT
NA-R	GGCCGCCGGGTTATTAGTAGAAACAAGGAGTTTTTT
pHW2000-F	AATAACCCGGCGGCC
pHW2000-R	CCCCCAACTTCGGAG

1.2.3 构建重组质粒

将回收的病毒基因片段和线性化 pHW2000 载体按照 ClonExpress® II One Step Cloning Kit 说明书进行重组反应, 产物转化至感受态细胞后涂布到含有氨苄抗性的 LB 培养板, 37 °C、5%CO₂ 培养 16 h, 挑取单菌落进行菌落 PCR 鉴定, 筛选出阳性克隆后送至测序, 对序列正确的质粒抽提后-20 °C 保存备用。

1.2.4 病毒拯救

将 293T 细胞和 MDCK 细胞以 4.5:1 的比例平铺六孔板中并置于 37 °C、5%CO₂ 培养箱孵育, 待细胞汇合 80%~90% 时转染。转染前 2 h 更换无血清

DMEM, 取 PR8 病毒 6 个内部基因质粒和目标拯救病毒 A/Wisconsin/588/2019 的 HA、NA 质粒各 1 μg 加入 250 μL Opti-MEM 中, 取 16 μL Lipo2000 加入 250 μL Opti-MEM 中, 两者混合室温静置 20 min 后均匀滴加至细胞表面, 置于 37 °C、5%CO₂ 培养箱孵育, 转染 6 h 后更换无血清 DMEM, 转染后 24 h 更换含有浓度为 2 μg/mL TPCK 胰酶的 DMEM 继续培养, 转染后 72 h 收集培养液离心, 取一部分上清液用于后续实验, 其余置于-80 °C 冰箱保存备用。

1.2.5 被拯救病毒鉴定

按照全国流感监测技术指南红细胞凝集实验

的方法测定转染72 h后上清液的被拯救流感病毒血凝效价。用试剂盒提取转染上清液中被拯救病毒的RNA, RT-PCR后1%琼脂糖凝胶电泳验证产物, 胶回收纯化HA、NA片段后测序鉴定。

1.2.6 病毒在MDCK细胞上的生长曲线测定

将被拯救病毒以MOI=0.1接种MDCK细胞, 于37℃、5%CO₂细胞培养箱中孵育2 h, 更换含有浓度为2 μg/mL TPCK胰酶的DMEM继续培养, 观察细胞病变情况, 于12、24、36、48、60、72 h收取上清液进行半数组织培养感染剂量(50% tissue culture infective dose, TCID₅₀)测定, 每个时间段测3个平行孔, 绘制病毒在MDCK细胞上的生长曲线, 判断该病毒在MDCK细胞上的最佳生长时间。

1.2.7 病毒的鸡胚扩增

将转染72 h后的上清稀释10倍后接种9~10日龄SPF级鸡胚尿囊腔, 每枚100 μL, 置于37℃、60%湿度的孵化箱中培养, 在24、48、72、96、120、144 h每个时间点取3枚接种后的鸡胚收取尿囊液测定其血凝效价, 判断被拯救病毒在鸡胚上的适应性, 将血凝效价高的病毒尿囊液4℃、3 500 r/min离心20 min, -80℃冰箱保存。

1.2.8 病毒小鼠致病性评价及半数致死量(median lethal dose, LD₅₀)测定

将10~12周龄雌性BALB/c小鼠随机分为4组, 每组5只。0.45 μm滤膜过滤病毒尿囊液后用PBS将病毒液以10倍梯度稀释, 稀释比依次为1:1、1:10、1:100, 对照组为PBS。小鼠按照体重注射三溴乙醇后每组每只滴鼻50 μL病毒液, 观察小鼠每天状态, 当小鼠体重下降至滴鼻前体重的75%时判定为死亡并立即执行安乐死^[12], 记录滴鼻后14 d小鼠的体重变化情况和死亡情况并绘制小鼠体重变化曲线和生存曲线。

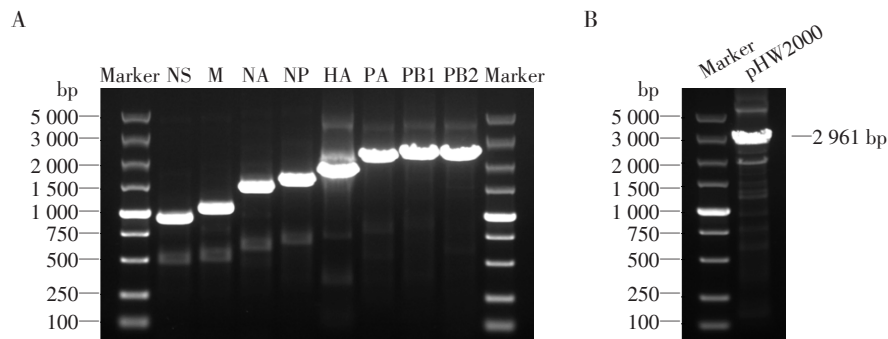
1.3 统计学方法

使用GraphPad Prism 9软件进行数据统计并绘制病毒生长曲线、小鼠体重变化曲线和生存曲线。计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

2.1 病毒基因组RT-PCR及pHW2000线性化结果

PR8病毒8个基因片段PCR及pHW2000线性化结果见图1, 条带大小正确, 胶回收后测序结果正确。



A: Amplification of gene segments from PR8 by RT-PCR. The length of NS=890 bp, M=1 027 bp, NA=1 412 bp, NP=1 565 bp, HA=1 778 bp, PA=2 233 bp, PB1=2 341 bp, PB2=2 341 bp. B: Linearization of pHW2000 by PCR. The length of pHW2000=2 961 bp. Marker: DL 5 000 DNA marker.

图1 PR8基因片段扩增及pHW2000线性化结果

Figure 1 Amplification of gene segments from PR8 and linearization of pHW2000

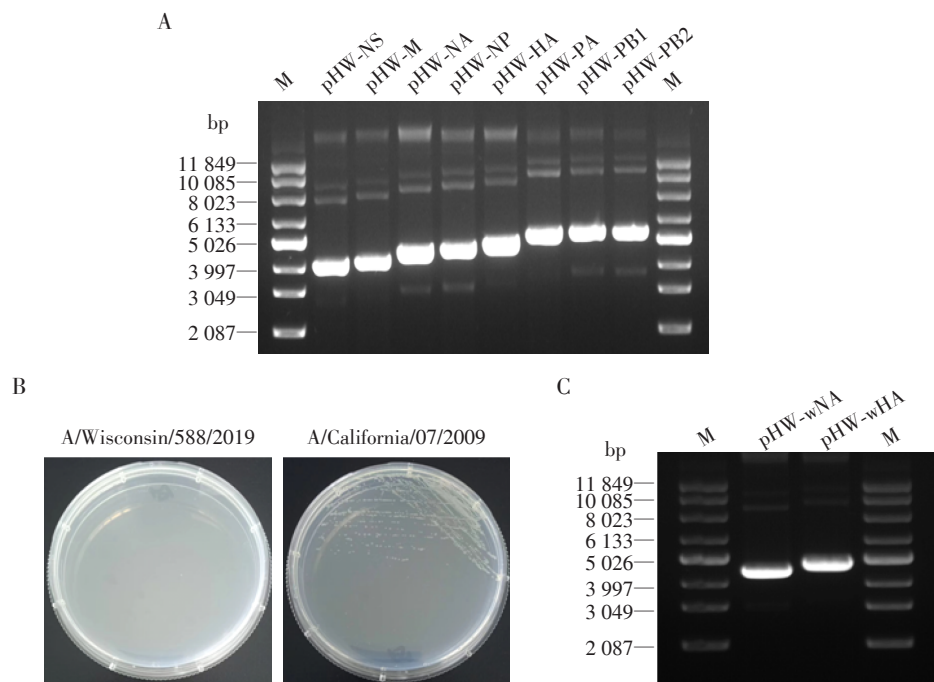
2.2 重组质粒构建结果

PR8病毒8个基因片段重组质粒电泳结果见图2A, 条带位置正确, 测序结果正确。A/Wisconsin/588/2019的HA片段中有影响大肠杆菌生长的有毒序列, 将重组质粒转化至大肠杆菌后, 大肠杆菌几乎不生长, 将非编码区替换为A/California/07/2009(H1N1)病毒的非编码区, 得到的重组质粒转化至大肠杆菌后, 大肠杆菌可正常生长(图2B)。A/Wisconsin/588/2019的HA和NA重组质粒电泳结果如

图2C所示。

2.3 病毒拯救结果

以“6+2”模式将构建的PR8病毒6个内部基因重组质粒与HA、NA重组质粒共转染293T与MDCK细胞, 同时另转染PR8病毒8个基因重组质粒作为阳性对照, 72 h后取上清液测定血凝效价。阳性对照PR8病毒血凝效价为1:32, 目标拯救病毒A/Wisconsin/588/2019血凝效价为1:8(图3A)。提取上清病毒RNA对其中HA、NA片段进



A: Electrophoretic image of eight gene segments recombinant plasmids of PR8. The length of pHW-NS=3 851 bp, pHW-M=3 988 bp, pHW-NA=4 373 bp, pHW-NP=4 526 bp, pHW-HA=4 739 bp, pHW-PA=5 194 bp, pHW-PB1=5 302 bp, pHW-PB2=5 302 bp. B: Transformation of HA recombinant plasmid into *E. coli*. C: Electrophoretic image of HA and NA recombinant plasmids of A/Wisconsin/588/2019. The length of pHW-wNA=4 419 bp, pHW-wHA=4 738 bp. M: Supercoiled DNA marker.

图2 重组质粒构建结果

Figure 2 Construction of recombinant plasmids

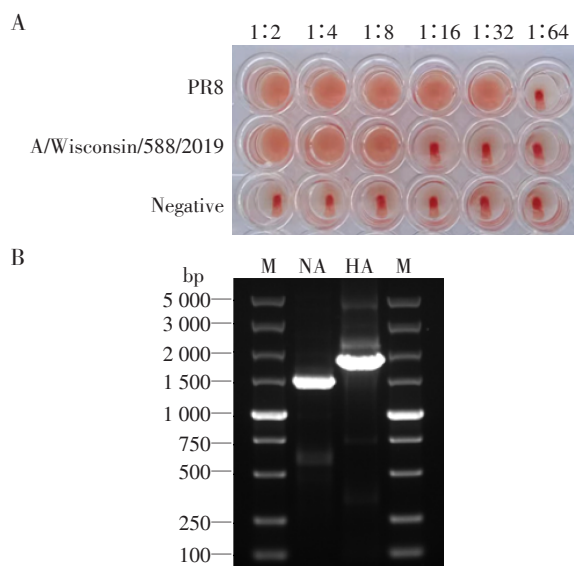
行 RT-PCR (图 3B), 测序后序列比对正确, 说明病毒拯救成功。

2.4 病毒在 MDCK 细胞和鸡胚上的生长曲线

将被拯救病毒转染后上清液接种 MDCK 细胞, 观察细胞病变, 部分细胞在 48 h 后变圆、皱缩, 72 h 后大部分细胞完全脱落 (图 4A)。收获上清液测定病毒滴度为 $10^{5.38}$ TCID₅₀/mL, 说明该重组病毒 A/Wisconsin/588/2019 在 MDCK 细胞上生长良好。以 MOI=0.1 的病毒量感染 MDCK 细胞并在不同时间段收集上清测定 TCID₅₀, 绘制病毒 A/Wisconsin/588/2019 在 MDCK 上的生长曲线 (图 4B), 重组病毒在感染 MDCK 细胞 60 h 后复制达到高峰。将稀释后的 A/Wisconsin/588/2019 病毒液接种鸡胚尿囊腔后于不同时间段测定血凝效价 (图 4C), 重组病毒 A/Wisconsin/588/2019 在接种鸡胚后的血凝效价最高可达 1:2⁸, 提示重组病毒具有良好的鸡胚适应性。

2.5 病毒对小鼠的致病性评价及 LD₅₀ 测定

小鼠滴鼻后记录体重变化 (图 5A), 实验组小鼠从滴鼻后第 2 天开始出现食欲不振, 体重下降, 行动迟缓等症状, 且病毒稀释比为 1:1 组小鼠在滴鼻后第 8 天全部死亡 (图 5B), 说明重组 A/Wisconsin/588/

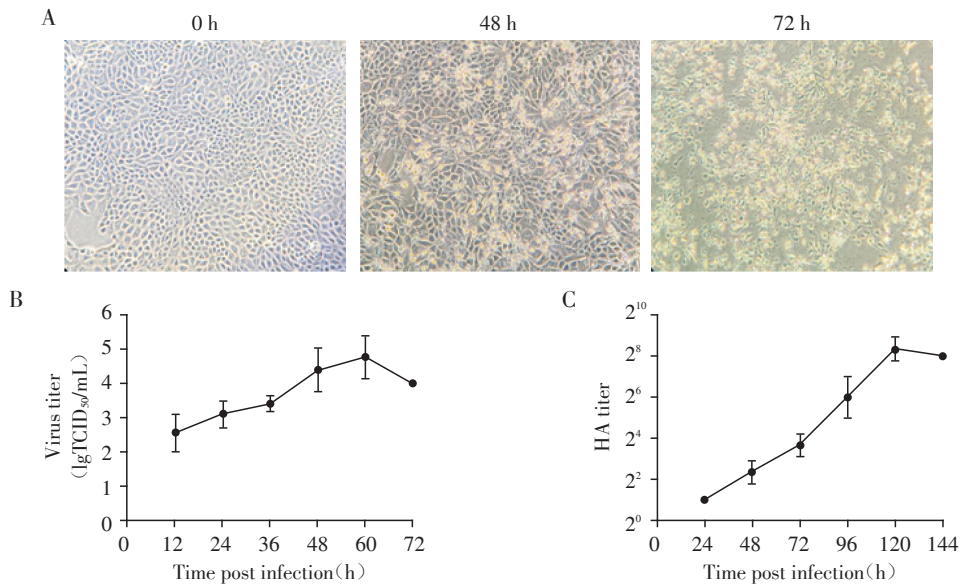


A: Hemagglutination test of recombinant A/Wisconsin/588/2019. B: PCR identification results of HA and NA of recombinant A/Wisconsin/588/2019. The length of NA=1 458 bp, HA=1 777 bp. M: DL 5 000 DNA marker.

图3 重组 A/Wisconsin/588/2019 病毒鉴定结果

Figure 3 Identification results of recombinant A/Wisconsin/588/2019

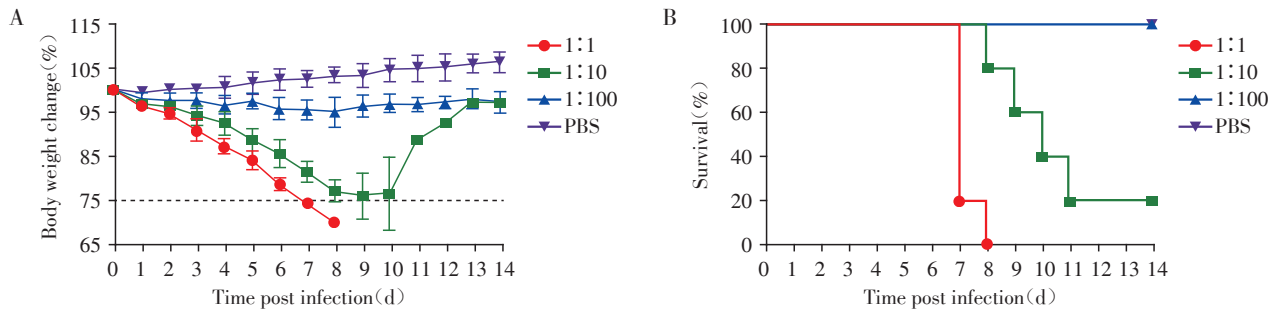
2019 对小鼠具有致病性和致死性。计算该病毒的



A: Images of MDCK cells were taken before infection, at 48 hours post infection, and at 72 hours post infection (×200). B: Virus titer changes of recombinant A/Wisconsin/588/2019 in MDCK cells (n=3). C: HA titer changes of recombinant A/Wisconsin/588/2019 in eggs (n=3).

图4 重组A/Wisconsin/588/2019在MDCK细胞和鸡胚上的生长状况

Figure 4 Growth condition of recombinant A/Wisconsin/588/2019 in MDCK cells and eggs



A: Body weight changes of infected mice (n=5). B: Survival curves of infected mice (n=5).

图5 感染后小鼠的体重变化和生存曲线

Figure 5 Body weight changes and survival curves of the infected mice

LD₅₀, 为 10^{-1.38}/50 μL。

3 讨论

1999年, Neumann等^[13]首次开发了只利用病毒cDNA就能拯救IAV的方法, 该方法依赖单向RNA聚合酶转录系统, 将8个编码IAV基因组的质粒和4个指导病毒RNP表达的辅助质粒共转染细胞从而产生病毒粒子。2000年, Hoffmann等^[14]采用双向RNA聚合酶转录系统, 以病毒cDNA为模板同时合成负义病毒RNA和mRNA, 将转染质粒数量从12个减少为8个, 提高IAV拯救效率并降低成本。其他研究在此基础上将多个病毒cDNA克隆到一个载体上构建了4/3/1质粒病毒拯救系统, 但目前实验研究及工业生产中所使用的IAV拯救系统仍为8或12质粒系统^[14-16]。反向遗传学技术的出现为IAV的基

础研究和药物研发提供了极大便利, 例如拯救带有特定位点突变或缺失的流感病毒可用于致病性和宿主适应性研究, 构建携带荧光蛋白的重组病毒可追踪其感染轨迹^[17], 构建基因修饰后的流感病毒感染肿瘤细胞可使其表面表达某些蛋白质, 从而刺激机体免疫系统识别肿瘤细胞, 产生免疫应答^[8]。WHO每年根据IAV流行情况预测疫苗株, 相比传统重配法, 反向遗传学技术能对流感大流行做出快速反应, 如2009年H1N1流感大流行期间研究人员利用反向遗传学技术快速构建了抗原匹配的重组疫苗株, 避免造成更大损失^[10]。

IAV反向遗传技术依赖大肠杆菌扩增含有病毒cDNA的细菌质粒, 多项研究表明将某些IAV基因片段(如PB2、PB1和HA)克隆到反向遗传载体中存在困难, 这提示某些流感基因在大肠杆菌中不稳定

或“有毒”,且与基因片段两端的非编码区有关^[18]。本研究将 A/Wisconsin/588/2019 的 HA 全长 cDNA 导入双向表达载体 pHW2000,转化至多种感受态细胞后均出现感受态细胞生长极其缓慢的情况。报道的几种方法可改善这一状况,包括替换感受态,使用重组缺陷的大肠杆菌来繁殖质粒^[18],在低温(25~32°C)下培养转化的大肠杆菌^[19],或者对 pHW2000 质粒进行改造以减少有毒基因的表达^[20]。有报道称某些 IAV 非编码区互换不影响病毒增殖且能提高病毒复制效率,因此本研究尝试将不稳定的 HA 片段非编码区替换为同为 IAV 进化树 B6 进化分支的 A/California/07/2009 的非编码区^[21],发现转化至 Stb13 感受态细胞后能正常生长,与上述其他方法相比,本方法耗时少、成本低,为不稳定病毒基因的反向遗传质粒构建提供了新方法。

病毒拯救过程中存在诸多影响因素,如质粒纯度、细胞状态、转染操作等。本研究为提高病毒拯救效率,将重组质粒共转染 293T 细胞和 MDCK 细胞,其中 293T 细胞用于产生病毒蛋白和 RNA 并包装病毒,而 MDCK 细胞作为扩增流感病毒的理想细胞系可使被拯救病毒粒子高效增殖。本研究所拯救重组病毒的 6 个内部基因来自无法在人体内复制的毒株 PR8,大量数据表明这种“6+2”模式的重组病毒对人体健康造成危害的概率很低^[22]。本研究参照 WHO 实验室生物安全手册的规定^[23],所有病毒相关实验操作全程在 BSL-2 实验室进行。WHO 建议,对于非 H5 或 H7 的重组病毒疫苗株,应做的安全性评估包括基因测序、是否在雪貂体内减毒以及连续传代后的遗传稳定性。雪貂是预测流感病毒对人体致病性的最佳动物模型,但由于条件限制本研究并未使用雪貂测试重组病毒的致病性。后续将尝试在细胞或鸡胚连续传代培养重组病毒,完善对其致病性及稳定性的评价。

综上所述,本研究成功拯救一株重组 H1N1 pdm09 病毒,该重组病毒在 MDCK 细胞和鸡胚上表现出良好的适应性,并且对小鼠有致病性,提示无生长缺陷及毒力缺陷。本研究为反向遗传学技术快速拯救流感病毒提供了新思路。

利益冲突声明:

所有作者声明无利益冲突,作者黎燕和季旻珺与期刊出版部同隶属南京医科大学,但审稿决策由独立审稿人和编辑团队负责,未受机构隶属关系的影响。

Conflict of Interests:

All authors declare no conflict of interest. LI Yan, JI Minjun and the publication department of the Journal of Nanjing

Medical University (Natural Sciences) are all affiliated with Nanjing Medical University, but the review decision process is handled by independent reviewers and the editorial team, unaffected by institutional affiliation.

作者贡献声明:

黎燕参与研究设计、数据处理,完成初稿;周克茹参与文章修改和润色;季旻珺参与文章修改;王桂芹负责选题,文章写作和修改。

Author's Contributions:

LI Yan designed experiments, processed the data and completed the first draft; ZHOU Keru revised and polished this article; JI Minjun revised this article; WANG Guiqin was responsible for selecting topics, writing, and revising the manuscript

[参考文献]

- [1] HUANG W J, LI X Y, TAN M J, et al. Epidemiological and virological surveillance of seasonal influenza viruses - China, 2020-2021 [J]. *China CDC Wkly*, 2021, 3(44): 918-922
- [2] NUWARD A R F, ALHARBI A A, KAYSER V. An overview of influenza viruses and vaccines [J]. *Vaccines*, 2021, 9(9): 1032
- [3] LI X L, GU M, ZHENG Q M, et al. Packaging signal of influenza A virus [J]. *Virology*, 2021, 18(1): 36
- [4] DADONAITÉ B, GILBERTSON B, KNIGHT M L, et al. The structure of the influenza A virus genome [J]. *Nat Microbiol*, 2019, 4(11): 1781-1789
- [5] FODOR E, TEVELTHUIS A J W. Structure and function of the influenza virus transcription and replication machinery [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2020, 10(9): a038398
- [6] HARRINGTON W N, KACKOS C M, WEBBY R J. The evolution and future of influenza pandemic preparedness [J]. *Exp Mol Med*, 2021, 53(5): 737-749
- [7] HAAS K M, MCGREGOR M J, BOUHADDOU M, et al. Proteomic and genetic analyses of influenza A viruses identify pan-viral host targets [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 6030
- [8] LI Z Q, ZHONG L P, HE J, et al. Development and application of reverse genetic technology for the influenza virus [J]. *Virus Genes*, 2021, 57(2): 151-163
- [9] XIE X P, LOKUGAMAGE K G, ZHANG X W, et al. Engineering SARS-CoV-2 using a reverse genetic system [J]. *Nat Protoc*, 2021, 16(3): 1761-1784
- [10] ROCKMAN S, LAURIE K, BARR I. Pandemic influenza vaccines: what did we learn from the 2009 pandemic and are we better prepared now? [J]. *Vaccines*, 2020, 8(2): 211
- [11] WEI C J, CRANK M C, SHIVER J, et al. Next-generation

- influenza vaccines: opportunities and challenges [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19(4): 239–252
- [12] 李春令, 刘增祥, 温成丽, 等. 基于3R原则探讨动物实验中人道终点的判定与应用[J]. *药学研究*, 2023, 42(10): 825–829
- LI C L, LIU Z X, WEN C L, et al. Exploring the determination and application of humane end point in animal experiments based on 3R principles [J]. *Journal of Pharmaceutical Research*, 2023, 42(10): 825–829
- [13] NEUMANN G. Influenza reverse genetics-historical perspective [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2021, 11(4): a038547
- [14] HOFFMANN E, NEUMANN G, KAWAOKA Y, et al. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(11): 6108–6113
- [15] AMATO K A, HADDOCK L A, BRAUN K M, et al. Influenza A virus undergoes compartmentalized replication *in vivo* dominated by stochastic bottlenecks [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 3416
- [16] 孙 瑾, 石岩刚, 董铭心, 等. 反向遗传学技术在流感病毒减毒活疫苗研究中的应用进展[J]. *生物技术通讯*, 2020, 31(3): 314–318
- SUN J, SHI Y G, DONG M X, et al. Application progress of reverse genetic technique on development of live attenuated influenza virus vaccine [J]. *Letters in Biotechnology*, 2020, 31(3): 314–318
- [17] FUJII Y, GOTO H, WATANABE T, et al. Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(4): 2002–2007
- [18] MOSTAFA A, KANRAI P, PETERSEN H, et al. Efficient generation of recombinant influenza A viruses employing a new approach to overcome the genetic instability of HA segments [J]. *PLoS One*, 2015, 10(1): e0116917
- [19] BHAT S, BIALY D, SEALY J E, et al. A ligation and restriction enzyme independent cloning technique: an alternative to conventional methods for cloning hard-to-clone gene segments in the influenza reverse genetics system [J]. *Virology*, 2020, 17(1): 82
- [20] MALIK T, KLENOW L, KARYOLAIMOS A, et al. Silencing transcription from an influenza reverse genetics plasmid in *E. coli* enhances gene stability [J]. *ACS Synth Biol*, 2023, 12(2): 432–445
- [21] WILLE M, HOLMES E C. The ecology and evolution of influenza viruses [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2020, 10(7): a038489
- [22] ENGELHARDT O G. Many ways to make an influenza virus-review of influenza virus reverse genetics methods [J]. *Influenza Other Respir Viruses*, 2013, 7(3): 249–256
- [23] World Health Organization. WHO expert committee on biological standardization: sixty-ninth report [R]. Geneva: World Health Organization, 2019: 179–182
- [收稿日期] 2024-08-20
(本文编辑: 陈汐敏)

(上接第300页)

- [17] AIELLO V, ASTOLFI N, GRUPPIONI R, et al. Paracentric inversion of Yq and review of the literature [J]. *Genet Couns*, 2007, 18(4): 379–382
- [18] MUSILOVA P, KADLICKOVA D, HRADSKA H, et al. Chromosome damage in regions with different levels of air pollution [J]. *Environ Mol Mutagen*, 2023, 64(6): 326–334
- [19] XIE X, LI F, TAN W, et al. Analysis of the clinical features of pericentric inversion of chromosome 9 [J]. *J Int Med Res*, 2020, 48(9): 300060520957820
- [20] VERMA R S, KLEYMAN S M, CONTE R A. An unusual G-negative band within Iqh region a rare variant or an abnormality? [J]. *Ann Genet*, 1997, 40(4): 229–231
- [21] 詹绪新, 朱红丽, 张 祥, 等. 染色体多态性对体外受精-胚胎移植患者助孕结局的影响 [J]. *中华男科学杂志*, 2023, 29(10): 916–921
- ZHAN X X, ZHU H L, ZHANG X, et al. Effect of chromosomal polymorphisms on reproductive outcomes of in vitro fertilization-embryo transfer [J]. *National Journal of Andrology*, 2023, 29(10): 916–921
- [22] MARTÍNEZ-PASTOR F, MATA-CAMPUZANO M, ALVAREZ-RODRÍGUEZ M, et al. Probes and techniques for sperm evaluation by flow cytometry [J]. *Zuchthygiene*, 2010, 45(Suppl 2): 67–78
- [23] HUANG C, WANG Q L, WU H L, et al. Genetic testing of sperm donors in China: a survey of current practices [J]. *Front Endocrinol*, 2023, 14: 1230621
- [收稿日期] 2024-08-13
(本文编辑: 戴王娟)