

# B型流感病毒 B/Yamagata/16/88 反向遗传操作平台的搭建及 BALB/c 小鼠感染模型的建立

孙伟洋<sup>1,2</sup>, 于志君<sup>1,2,4</sup>, 李雪<sup>1,2,3</sup>, 陈强<sup>1,2</sup>, 高晓龙<sup>1,2</sup>, 国娇<sup>1,2</sup>, 张坤<sup>1,2,4</sup>,  
李元果<sup>1,2</sup>, 王铁成<sup>1,2</sup>, 杨松涛<sup>1,2</sup>, 黄耕<sup>1,2</sup>, 赵永坤<sup>1,2</sup>,  
高玉伟<sup>1,2\*</sup>, 夏咸柱<sup>1,2,4\*</sup>

(1. 军事医学科学院军事兽医研究所, 长春 130122; 2. 吉林省人兽共患病预防与控制重点实验室, 长春 130122;  
3. 长春生物制品研究所有限责任公司, 长春 130012;  
4. 北京协和医学院和中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京 100021)

**【摘要】** 目的 利用基因工程技术全基因合成 B 型流感病毒 B/Yamagata/16/88 的 8 个基因片段, 并利用反向遗传技术从体外拯救 B 型流感病毒 B/Yamagata/16/88, 同时建立 BALB/c 小鼠感染模型, 为下一步研究 B 型流感病毒致病机制、传播机制以及开发新型疫苗奠定基础。方法 通过基因合成和反向遗传技术体外拯救 B 型流感病毒 B/Yamagata/16/88。全基因组测序验证拯救病毒基因组序列与 Genbank 序列的一致性。将拯救病毒以  $10^5$  EID<sub>50</sub> 的攻毒剂量人工感染 BALB/c 小鼠, 通过体重变化、生存率、肺脏病毒复制等方面进行致病性分析, 建立小鼠感染模型。结果 成功从体外拯救出 B 型流感病毒 B/Yamagata/16/88, 命名为 B-S9。全基因组测序结果表明, B-S9 基因组序列与 Genbank 公布序列一致。B-S9 能够人工感染 BALB/c 小鼠, 但不致死, 对 BALB/c 小鼠呈现低致病性; 攻毒后第 3 天, B-S9 感染小鼠体重出现下降, 攻毒后第 8 天, 小鼠体重开始回升; 攻毒后第 3 天和第 6 天, B-S9 感染小鼠的肺脏内均能检测到病毒复制, 且攻毒后第 3 天的小鼠肺脏病毒滴度比攻毒后第 6 天的小鼠肺脏滴度高 132 倍。结论 成功搭建 B 型流感病毒 B/Yamagata/16/88 反向遗传操作平台, 并建立 BALB/c 小鼠感染模型。目前国内外对 B 型流感病毒的研究比较少, 该反向遗传操作平台的建立为 B 型流感病毒致病机制和传播机制的研究奠定了基础, 同时也为包括 B 型流感病毒减毒活疫苗在内的新型疫苗的研制开辟了新途径。

**【关键词】** B 型流感病毒; 反向遗传操作; 致病性; BALB/c 小鼠

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 01-0035-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.01.007

## Establishment of a reverse genetics system of influenza B virus B/Yamagata/16/88 and a BALB/c mouse model of influenza B virus infection

SUN Wei-yang<sup>1,2</sup>, YU Zhi-jun<sup>1,2,4</sup>, LI Xue<sup>1,2,3</sup>, CHEN Qiang<sup>1,2</sup>, GAO Xiao-long<sup>1,2</sup>, GUO Jiao<sup>1,2</sup>,  
ZHANG Kun<sup>1,2,4</sup>, LI Yuan-guo<sup>1,2</sup>, WANG Tie-cheng<sup>1,2</sup>, YANG Song-tao<sup>1,2</sup>,  
HUANG Geng<sup>1,2</sup>, ZHAO Yong-kun<sup>1,2</sup>, GAO Yu-wei<sup>1,2</sup>, XIA Xian-zhu<sup>1,2,4</sup>

(1. Institute of Military Veterinary Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Changchun 130122, China;  
2. Key Laboratory of Jilin Province for Zoonosis Prevention and Control, Changchun 130122;  
3. Changchun Institute of Biological Products, Changchun 130012; 4. Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100021)

[基金项目] 863 计划 (2012AA02A403); 国家科技重大专项 (2012ZX10004301008)。

[作者简介] 孙伟洋 (1987-), 男, 硕士, 主要从事病毒分子生物学研究。E-mail: sunweiyang1987@163.com

[通讯作者] 夏咸柱。E-mail: xiaxzh@cae.cn; 高玉伟。E-mail: gaoyuwei@gmail.com

**【Abstract】 Objective** To establish a BALB/c mouse model of influenza B virus infection, and to provide a foundation for studying the pathogenesis, mechanism of transmission of influenza B virus infection and developing new vaccines against influenza B virus. **Methods** Using genetic synthesis and reverse genetic technology, influenza B virus was rescued in vitro. We used the whole genome sequencing approach to validate the identity between the rescued viral genome sequences and the sequences reported in Genbank. To establish the BALB/c mouse model of influenza B virus infection, BALB/c mice were infected with  $10^5$  EID<sub>50</sub> dose of the rescued virus, and the weight change, survival rate, and viral replication in the lungs were analyzed. **Results** We successfully rescued influenza B virus B/Yamagata/16/88 in vitro, and this virus was named B-S9. The genome sequencing results showed that the genome sequences of B-S9 was consistent with the GenBank-reported sequences. BALB/c mice were artificially infected with B-S9, and no death due to infection was observed. The above results indicated that B-S9 is of low pathogenicity to the BALB/c mice. The mice infected with B-S9 showed body weight decline in 3 days post inoculation (dpi) but restored in 8 dpi. The virus titers could be detected in the lungs of mice infected with B-S9 on dpi 3 and dpi 6, respectively. Furthermore, the virus titer in the mouse lungs on dpi 3 was 132 times higher than that on dpi 6. **Conclusions** A reverse genetic system of influenza B virus B/Yamagata/16/88 is successfully established, and a BALB/c mouse model of influenza B virus infection is established. To date, studies of influenza B virus are limited at home and abroad. The establishment of this reverse genetic system provides not only a platform for studying the pathogenesis and mechanism of transmission of influenza B virus, but also provides a way for developing new live-attenuated influenza B virus vaccine.

**【Key words】** Influenza B virus; Reverse genetic system; Pathogenicity; BALB/c mice

流感病毒分为 A 型流感病毒、B 型流感病毒和 C 型流感病毒<sup>[1]</sup>。A 型流感病毒根据表面蛋白血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)的不同,可以分为 18 种 HA 亚型和 10 种 NA 亚型<sup>[2-3]</sup>。流感病毒每年都会以季节性流感的形式在全球范围内流行。目前流行的流感病毒株包括 A 型流感病毒中的 H1N1 亚型流感病毒、H3N2 亚型流感病毒和 B 型流感病毒,流感疫苗中也是这三种成分<sup>[4]</sup>。A 型流感病毒致病性和传播能力较强,历史上有记载的四次流感全球大流行均是由 A 型流感病毒引起<sup>[5-7]</sup>。虽然 B 型流感病毒目前尚没有像 A 型流感病毒那样曾引起过大流行,但是其作为季节性流感病毒的成员之一,也广泛感染人群并可以引发重症病例<sup>[8-9]</sup>。

B 型流感病毒属于正粘病毒科的成员,是单股、负链、有 8 个节段的 RNA 病毒<sup>[10]</sup>。B 型流感病毒包括 B/Yamagata/16/88 和 B/Victoria/2/87 两个谱系,这两个谱系的病毒株交替流行<sup>[11]</sup>。现有流感疫苗中包括的 B 型流感病毒是重配获得的,通过鸡胚传代,最后制备成灭活苗,通过冷适应获得的 B 型流感疫苗重组毒株能够在鸡胚上很好的生长。

本研究选取 B 型流感病毒 B/Yamagata/16/88 病毒株为研究对象,搭建反向遗传操作平台并构建 BALB/c 小鼠感染模型,为下一步新型疫苗的研制提供技术平台,也为 B 型流感病毒致病机制和传播机制的研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 载体

PBD 双向表达载体由陈化兰研究员惠赠。

### 1.2 细胞、鸡胚、小鼠和实验室

293T 细胞和 MDCK 细胞由军事兽医研究所动物病毒学与特种动物疫病学实验室保存;600 枚 9~11 日龄 SPF 鸡胚;20 只 SPF 级 BALB/c 小鼠,4~6 周龄,雌性,14~15 g,均购自北京维通利华实验动物技术有限公司 [SCXK(京)2014-0002];BALB/c 小鼠置于本实验室 P2 + 饲养间 II 型 RVC-独立送风隔离笼饲养 [SYXK(军)2009-045];所有病毒相关操作均在本实验室 P2 级实验室生物安全柜中进行。

### 1.3 主要试剂

DMEM、OPTI-MEM 液体培养基购自 Gibco 公司;AMV 反转录酶、RNase inhibitor 购自 Promega 公司;质粒小提试剂盒购自 Qiagen 公司;胶回收试剂盒购自 Axygen 公司;Lipofectamine 2000 转染试剂购自 Invitrogen 公司;Phusion 超保真 DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、T4 DNA 聚合酶购自 NEB 公司。

### 1.4 全基因合成与引物设计

根据 Genbank 上公布的 B/Yamagata/16/88 株的序列(序列号:CY018765-CY018772),将该毒株全基因序列送上海英骏公司合成。同时以 B/Yamagata/16/88 株各片段的序列为基础,利用 Oligo 6.0 软

件设计合成扩增 B 型流感病毒 8 个基因片段 PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M 和 NS 基因的反向引物,并

表 1 B 型流感病毒反向遗传引物

Tab. 1 Primers used for the reverse genetics system of Influenza B virus

扩增片段 Amplified fragments	上游引物(5' - 3') Forward primer(5' - 3')	下游引物(5' - 3') Reverse primer(5' - 3')
PB2	CCAGCAGAAGCGGAGCGT	TTAGTAGAAACACGAGCATTIT
PB1	CCAGCAGAAGCGGAGCC	TTAGTAGAAACACGAGCC
PA	CCAGCAGAAGCGGTGC	TTAGTAGAAACACGTGCA
HA	CCAGCAGAAGCAGAGCAT	TTAGTAGTAACAAGAGCATTIT
NP	CCAGCAGAAGCACAGCA	TTAGTAGAAACAACAGCAT
NA	CCAGCAGAAGCAGAG	TTAGTAGTAACAAGAGC
M	CCAGCAGAAGCACGCA	TTAGTAGAAACAACGCACT
NS	CCAGCAGAAGCAGA	TTAGTAGTAACAAGAG

### 1.5 重组质粒的构建

按照参考文献[12]的方法将 B 型流感病毒的各项基因片段连接 PBD 载体上,构建重组质粒,将鉴定正确的重组质粒用于下一步的转染。

### 1.6 B 型流感病毒 B/Yamagata/16/88 株的拯救

具体实验方法见参考文献[12]。拯救病毒命名为 B-S9。

### 1.7 B-S9 全基因组序列的鉴定

提取 B-S9 的 RNA,反转录获得 cDNA,利用扩增 B 型流感病毒全基因的反向遗传引物进行 RT-PCR 扩增,将电泳后的胶回收产物连接到 PMD-18T 载体上,并送北京六合华大基因有限公司进行全基因组的测序。用 Lasergene 软件和 MegAlign 软件将 B-S9 与 Genbank 序列进行比对。

### 1.8 拯救病毒的电镜观察

将含拯救病毒的尿囊液离心处理,经磷钨酸负染后,用透射电子显微镜观察病毒的基本形态。

### 1.9 小鼠致病性试验

首先测定拯救病毒 B-S9 的  $EID_{50}$ ,然后将 BALB/c 小鼠随机分为两组,B-S9 组有 11 只小鼠,Mock(对照组)组有 5 只小鼠。用不含血清的 DMEM 培养液将病毒液稀释至  $10^5 EID_{50}/50 \mu L$ 。小鼠经乙醚麻醉后,B-S9 组小鼠鼻腔接种  $50 \mu L$  病毒液,Mock 组小鼠鼻腔接种  $50 \mu L$  无血清的 DMEM 培养液。按照参考文献[12]的方法,每天观察并记录小鼠的体重变化,采集攻毒后第 3 天和第 6 天各组小鼠的肺脏并称量,置于  $-70^\circ C$  冰箱中保存,用于下一步实验。肺脏的处理方法见参考文献[12],然后利用 Reed-Muench 法计算肺脏病毒滴度。

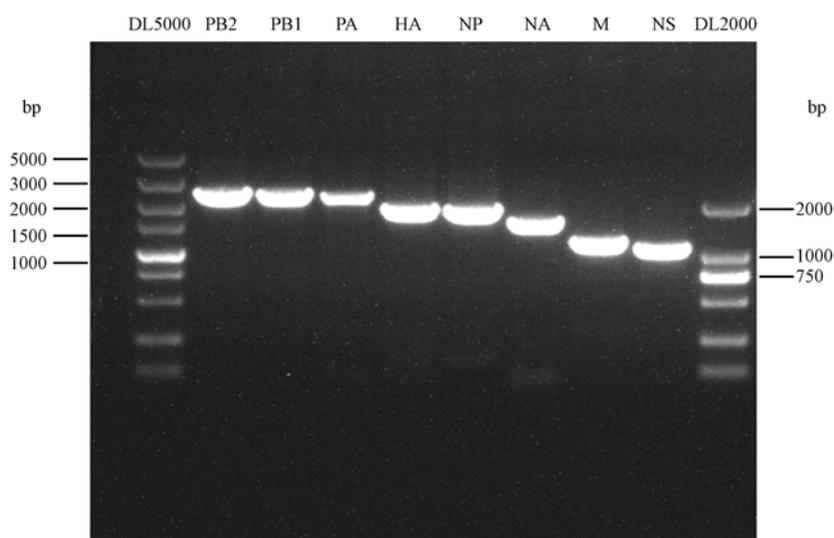


图 1 B 型流感病毒的 8 个基因片段

Fig. 1 Eight gene fragments of Influenza B virus

## 2 结果

### 2.1 B 型流感病毒合成质粒的 PCR 鉴定结果

用反向遗传引物从合成质粒上通过 PCR 分别获得 PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M 和 NS 这 8 个基因片段的大小与预期结果相符(图 1)。

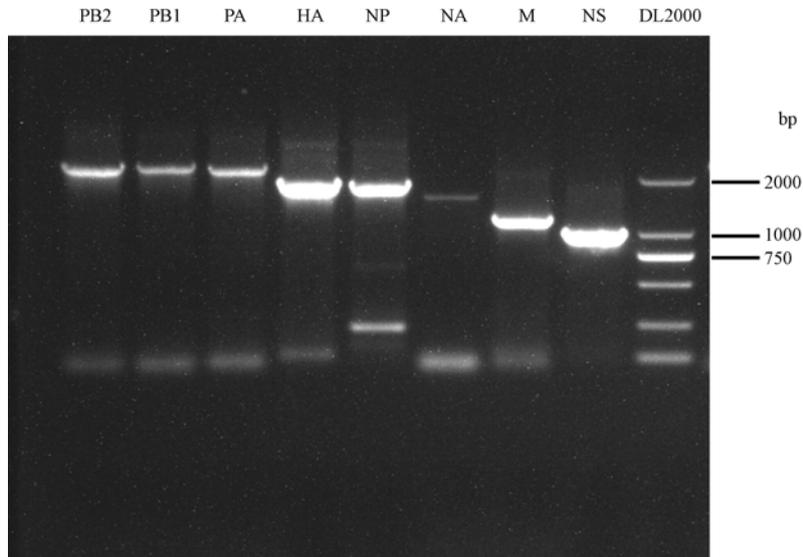


图 2 B-S9 的 8 个基因片段 RT-PCR 结果

Fig. 2 RT-PCR results of eight gene fragments of B-S9

### 2.3 拯救病毒的 EID<sub>50</sub> 测定结果

将拯救病毒进行鸡胚滴定,利用 Reed-Muench 法计算病毒的 EID<sub>50</sub>, B-S9 的病毒滴度为 10<sup>8.75</sup> EID<sub>50</sub>/mL。

### 2.4 电镜观察结果

B-S9 的电镜形态见图 3,黑色箭头指向流感病毒粒子。电镜结果表明病毒粒子呈球状,病毒的囊膜表面可见纤突,符合典型的 B 型流感病毒粒子特征。

### 2.5 感染小鼠的致病性结果

拯救的病毒感染 BALB/c 小鼠后每天记录各组小鼠体重变化及死亡情况,结果表明 14 d 内小鼠生存率为 100% (图 4); B-S9 感染小鼠攻毒后第 3 天至第 7 天体重出现下降(图 5)。

### 2.6 小鼠肺脏病毒滴定结果

检测拯救病毒 B-S9 在攻毒后第 3 天和第 6 天小鼠肺脏中的病毒滴度,评价病毒在小鼠肺脏内复制的情况。结果显示,攻毒后第 3 天和第 6 天, B-S9 感染小鼠的肺脏内均能检测到病毒复制,且攻毒后第 3 天的小鼠肺脏病毒滴度比攻毒后第 6 天的小鼠肺脏滴度高 132 倍(图 6;虚线表示最低检测线)。

### 2.2 拯救病毒株 B-S9 的 PCR 和测序鉴定结果

拯救病毒 B-S9 的血凝效价为 2<sup>10</sup>,对拯救的病毒进行 RT-PCR 鉴定,电泳结果显示基因片段大小与预期相符(图 2);序列比对结果显示 B-S9 与 Genbank 上公布序列保持一致,说明成功搭建了 B 型流感病毒反向遗传操作平台。

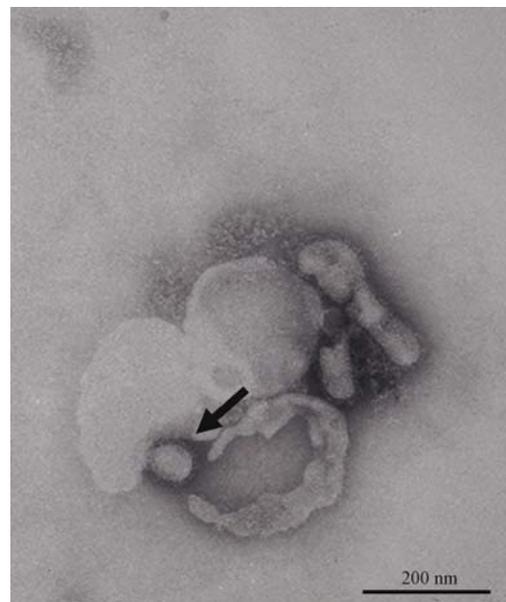


图 3 B-S9 的电镜照片(×40,000)

Fig. 3 Electron micrograph of B-S9 virus

## 3 讨论

流感病毒的研究一直是病毒学研究的一个热点,然而,目前的研究主要集中在对 A 型流感病毒上<sup>[12]</sup>,

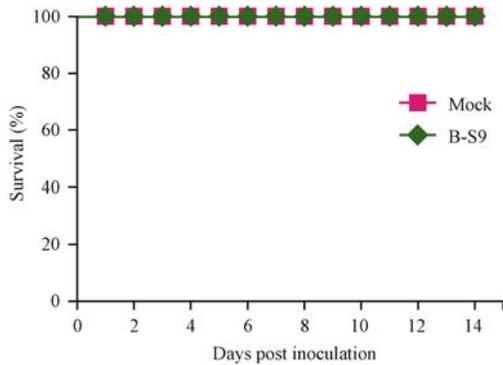


图 4 攻毒后小鼠生存率

Fig. 4 Survival of the mice inoculated with viruses

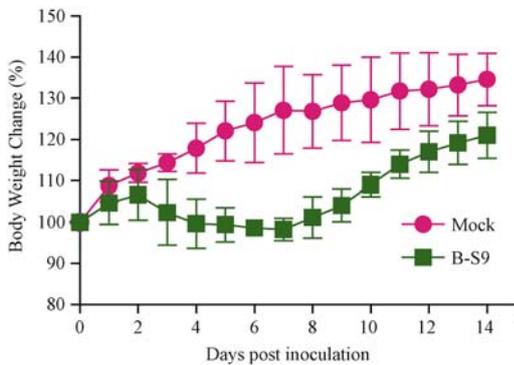


图 5 攻毒后小鼠体重变化率

Fig. 5 The body weight change ratio of the mice inoculated with viruses

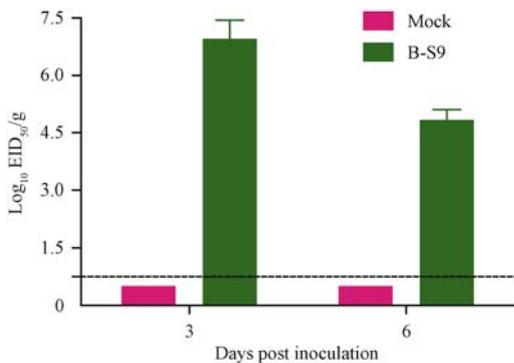


图 6 攻毒后第 3 天和第 6 天小鼠肺脏中的病毒滴度

Fig. 6 Virus titers in the mouse lungs at day 3 and 6

对 B 型流感病毒缺乏深入的研究。目前,流感病毒冷适应减毒活疫苗是研究流感疫苗的一个方向,反向遗传学技术的应用,使得快速生产疫苗获得了可能。通过构建流行株的 NA、HA 基因和冷适应骨架的其余 6 个基因片段,获得的重组疫苗株既有冷适应特性,又有抗原性,可以用于人群的大规模免疫。

本研究成功构建 B 型流感病毒的反向遗传操作平台,经过测序鉴定和生物学特性的分析,成功拯

救出一株 B 型流感病毒 B-S9。通过 BALB/c 小鼠攻毒实验发现,B-S9 感染小鼠攻毒后第 3 天至第 7 天体重出现下降;攻毒后第 3 天和第 6 天,B-S9 感染小鼠的肺脏内均能检测到病毒复制,且攻毒后第 3 天的小鼠肺脏病毒滴度比攻毒后第 6 天的小鼠肺脏滴度高 132 倍。

反向遗传学技术的出现,使人们能够从体外拯救出具有感染性的 B 型流感病毒,增强了人们研究 B 型流感病毒生物学特征的能力。本研究成功搭建了 B 型流感病毒反向遗传操作平台,并建立了小鼠感染模型,为 B 型流感病毒的防控以及治疗药物和疫苗的开发奠定了基础。

参 考 文 献

[ 1 ] Tscherne D M, Garcia-Sastre A. Virulence determinants of pandemic influenza viruses [J]. J Clin Invest, 2011, 121(1): 6 - 13.

[ 2 ] Tong S, Li Y, Rivallier P, et al. A distinct lineage of influenza A virus from bats [J]. Proc Nat Acad Sci U S A. 2012, 109(11): 4269 - 4274.

[ 3 ] Tong S, Zhu X, Li Y, et al. New world bats harbor diverse influenza A viruses [J]. PLoS Pathogens, 2013, 9(10): e1003657.

[ 4 ] Palese P, Garcia-Sastre A. Influenza vaccines: present and future [J]. J Clin Invest, 2002, 110(1): 9 - 13.

[ 5 ] Itoh Y, Shinya K, Kiso M, et al. In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses [J]. Nature, 2009, 460(7258): 1021 - 1025.

[ 6 ] Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus [J]. Nature, 2009, 459(7249): 931 - 939.

[ 7 ] 赵禹, 杜彦丹, 张晓光. 医务人员接种甲型 H1N1 流感疫苗抗体水平的长期随访分析 [J]. 中国医药导报, 2013, 10(18): 125 - 127.

[ 8 ] Jackson D, Elderfield RA, Barclay WS. Molecular studies of influenza B virus in the reverse genetics era [J]. J Gen Virol, 2011, 92(Pt 1): 1 - 17.

[ 9 ] 郝海燕, 戈平. 徐州市儿童流感流行趋势的调查研究 [J]. 中国医药导报, 2012, 9(4): 127 - 129.

[ 10 ] 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(22): 11744 - 11747.

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

[ 12 ] 程凯慧, 于志君, 忻悦, 等. PB2 E627K 对 A/H6N1 亚型禽流感病毒致病性的影响分析 [J]. 中国实验动物学报, 2013, 21(2): 21 - 25.