反向遗传学技术在流感病毒研究和防控中的应用

李呈军, 陈化兰*

中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 兽医生物技术国家重点实验室, 国家禽流感参考实验室, 哈尔滨 150001

* 联系人, E-mail: chenhualan@caas.cn

收稿日期: 2015-03-13; 接受日期: 2015-04-16

国家科技重大专项(批准号: 2012ZX10004214)和国家自然科学基金(批准号: 31422054)资助

doi: 10.1360/N052015-00043

摘要 流感病毒严重危害动物和人类健康. 完全以质粒为基础的反向遗传系统的建立在流感病毒研究和防控领域是一个具有里程碑意义的事件. 作为一个强有力的工具, 反向遗传技术的应用拓宽和加深了流感病毒的基础和应用研究, 在人流感和动物流感的防控中发挥了重要的作用. 本文简要回顾了流感病毒反向遗传技术的发展历程, 重点介绍了该技术在流感病毒致病性、跨宿主传播以及疫苗研制方面的研究进展.

关键词

反向遗传技术
流感病毒
致病性
跨宿主传播
疫苗研制

流感病毒分为 A, B, C 3 型, 其中 A 型流感病毒是重要的人兽共患传染病病原, 严重危害动物和人类健康. 自 20 世纪至今, 已经发生 4 次人流感大流行, 包括 1918 年 H1N1“西班牙流感”、1957 年 H2N2“亚洲流感”、1968 年 H3N2“香港流感”和 2009 年甲型 H1N1 流感, 每次大流行都对人类的生命健康造成严重危害. 除了偶尔发生的人流感大流行外, 每年发生的季节性流感也导致大约 25~50 万人死亡^[1]. 而且, 流感病毒最重要的特点就是变异频繁, 可以不断产生出威胁动物和人类健康的新病毒, 如 H5N1 和 H7N9 禽流感病毒.

A 型流感病毒是有囊膜的单股负链 RNA 病毒, 基因组分为 8 个节段, 编码 10 种必需蛋白(PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M1, M2, NS1, NS2)(图 1)和多达 7 种非必需的附件蛋白(PB1-F2, N40, PA-X, PA-N155, PA-N182, M42, NS3)^[2~7]. 其中, 病毒的聚合酶是一

个由 3 种蛋白组成的复合体, 即碱性聚合酶 1(polymerase basic protein 1, PB1)、碱性聚合酶 2(polymerase basic protein 2, PB2)和酸性聚合酶(polymerase acidic protein, PA). 它们结合在负链病毒 RNA(viral RNA, vRNA)末端, 而核蛋白(nucleoprotein, NP)则作为支架结构与 vRNA 结合在一起. 这 4 种蛋白和 vRNA 共同构成病毒的核糖核蛋白复合体(viral ribonucleoprotein, vRNP), 负责病毒基因组的转录和复制, 是流感病毒复制的最小功能单位. 流感病毒编码两种表面糖蛋白, 血凝素(hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(neuraminidase, NA), 其中 HA 在病毒感染时与宿主细胞表面的唾液酸受体结合, 病毒通过受体介导的内吞作用侵入细胞. NA 蛋白的功能则与 HA 相反, 它可以切割宿主细胞表面或新生成的病毒粒子表面的唾液酸, 阻止病毒粒子在细胞表面的聚积, 促进新生病毒粒子在出芽后释放出细胞. 根据

引用格式: 李呈军, 陈化兰. 反向遗传学技术在流感病毒研究和防控中的应用. 中国科学: 生命科学, 2015, 45: 1051–1066

Li C J, Chen H L. Application of reverse genetics technique in the research, prevention and control of influenza viruses. SCIENTIA SINICA Vitae, 2015, 45: 1051–1066, doi: 10.1360/N052015-00043

图1 流感病毒的结构模式图(网络版彩图)

HA 和 NA 抗原性的不同, 现在已经发现的 A 型流感病毒有 18 种不同的 HA 亚型和 11 种不同的 NA 亚型, 其中 H1-H16 和 N1-N9 亚型病毒的自然宿主是家禽和野鸟, 而 H17N10 和 H18N11 则是近期从蝙蝠体内分离到^[8,9]. 流感病毒编码的另外一种表面蛋白, 即基质蛋白 2(matrix protein 2, M2), 构成病毒的质子通道, 在内吞体的酸性环境中发生构象变化, 内吞体中的质子则通过质子通道进入到病毒粒子内部, 促进病毒囊膜与内吞体膜的融合以及 vRNP 复合体向细胞质中的释放. 流感病毒编码的基质蛋白 1(matrix protein 1, M1)和非结构蛋白 2(nonstructural protein 2, NS2; 也称为核输出蛋白, nuclear export protein, NEP)参与病毒 vRNP 复合体由细胞核到细胞质的输出过程. 非结构蛋白 1(nonstructural protein 1, NS1)则是病毒编码的宿主天然免疫反应的拮抗剂, 它可以抑制宿主细胞干扰素的合成, 破坏细胞核内宿主 mRNA 前体 3'末端的正常加工, 抑制宿主蛋白合成, 最终促进病毒的复制, 影响病毒的致病性.

流感病毒严重威胁动物和人类健康, 干扰正常的社会生活秩序, 使它成为一种严重的经济病和社会病. 因此, 针对流感病毒的研究一直是病毒学研究领域的热点. 但是, 直到以质粒为基础的反向遗传技术(reverse genetics)发明以后, 流感病毒的基础和应用研究才得以全面发展. 可以说, 反向遗传技术是流感病毒领域最具重要意义的技术, 自从以质粒为基础的反向遗传技术诞生以后, 整个流感病毒研究和

防控领域就焕然一新了. 反向遗传学是与经典遗传学比较而言的, 就是对生物体从基因水平上进行操作, 然后确定对生物体表型和性状的影响. 病毒的反向遗传技术, 通常被称为病毒拯救(the rescue of virus), 是通过构建 RNA 病毒的感染性分子克隆(infectious clone), 在 DNA 分子水平上对其进行体外操作, 从而研究病毒结构与功能的方法. 感染性分子克隆包括感染性 cDNA 和感染性体外转录本^[10]. 构建感染性 cDNA 就是通过 RT-PCR 扩增 RNA 病毒基因组的 cDNA 片段, 然后利用限制性酶切位点, 将其克隆于合适的载体, 获得基因组全长 cDNA 克隆, 以其转染适当细胞, 全长 cDNA 在细胞内转录、复制并产生病毒的所有组分, 最后包装成具有感染性的病毒粒子. 感染性体外转录本是将克隆获得的病毒基因组全长 cDNA 进行体外转录, 获得基因组全长 RNA, 用此 RNA 转染适当细胞以获得感染性病毒粒子. 流感病毒反向遗传技术的建立, 可以在 cDNA 水平上对流感病毒的基因进行突变、插入、缺失、重组等操作, 拯救出病毒后就可以研究这些基因水平上的改变对病毒的影响. 完全以质粒为基础的流感病毒反向遗传技术建立后的十几年来, 极大地推动了对流感病毒复制周期、致病因子、免疫机制、跨宿主传播、抗原变异、基因重组和耐药性等方面的深层次理解, 也大大促进了流感病毒疫苗的研制和应用, 为人流感和动物流感的防控发挥了重要作用.

1 流感病毒反向遗传技术的发展历程

流感病毒的基因组为单股负链 vRNA, 本身不具有感染性, 而且它的基因组分为 8 个节段. 因此, 与正链不分节段的 RNA 病毒相比, 流感病毒反向遗传系统的建立存在着更大的难度和挑战. 首先, 流感病毒的 vRNA 必须与 3 种聚合酶蛋白以及 NP 蛋白结合在一起, 形成 vRNP 复合体才能在细胞核内进行转录和复制. 其次, 流感病毒基因组的 8 种 vRNP 必须在细胞内均存在, 才能进行正常的复制周期, 产生完整的病毒粒子.

早在 1978 年, Taniguchi 等人^[11]建立了第一个基因组不分节段的正链 RNA 病毒的反向遗传操作系统, 他们将 Q β 噬菌体 mRNA 反转录产生的 cDNA 克隆到质粒载体中后, 通过转化细菌, 最后获得了具有感染性的 Q β 噬菌体. 1989 年, Palese 研究组^[12]首次实现了

对负链 RNA 病毒的基因组进行操作, 成为负链 RNA 病毒反向遗传学研究的起点. 他们利用氯霉素乙酰转移酶基因(chloramphenicol acetyltransferase, CAT)替换了流感病毒 NS 基因的编码区, 通过 T7 RNA 聚合酶介导的体外转录法获得了重组的病毒 vRNA, 再与体外纯化得到的病毒聚合酶蛋白共转染细胞后, 借助于辅助流感病毒提供重组 vRNA 转录和复制所需要的所有病毒组分, 最后筛选得到了含有重组 vRNA 片段的病毒. 这项研究首次证明了流感病毒 vRNA 片段的 3' 和 5' 非编码区足以完成病毒基因的转录、复制以及向子代病毒粒子的包装过程. 但是这一系统需要在体外进行病毒 vRNA 的转录和纯化, 而且需要进行蛋白的体外纯化和转染, 过程复杂繁琐.

1994 年, Neumann 等人^[13]实现了利用人的 RNA 聚合酶 I 系统在细胞内转录产生流感病毒的 vRNA 片段. RNA 聚合酶 I 在细胞核内负责转录细胞的 tRNA, 是细胞内唯一不在转录本上添加 5' 帽子和 3' poly-A 尾巴的 RNA 聚合酶, 因而可以保证流感病毒 vRNA 形成正确的末端. 在这项研究中, 通过将含有外源 CAT 基因的 HA vRNA 克隆在 RNA 聚合酶 I 的启动子和终止子之间, 所形成的质粒转染细胞后, 再利用辅助病毒感染提供转录和复制所需要的病毒成分, 最后可以在产生的重组病毒粒子中检测到 CAT 活性. 这种策略不再需要进行病毒 RNA 的体外转录和蛋白纯化等过程, 为后来流感病毒反向遗传技术的最终建立打下了坚实的基础. 随后, 科学家们在 1994 年首先利用 T7 RNA 聚合酶系统建立了完全以质粒为基础的不分节段的负链狂犬病病毒的反向遗传系统^[14]. 在接下来的几年里, 科学家们利用类似的方法攻克了其他多种不分节段负链 RNA 病毒的反向遗传系统, 如人的呼吸道合胞体病毒、副流感病毒、仙台病毒、牛瘟病毒等^[15-18]. 在这些实践取得成功的基础上, Bridgen 和 Elliott^[19]利用 T7 RNA 聚合酶系统建立了布尼亚维拉病毒的反向遗传系统, 它是基因组分为 3 个节段的负链 RNA 病毒, 这一成功使人们看到了建立其他基因组分节段负链 RNA 病毒反向遗传系统的曙光.

1999 年, Kawaoka 研究小组的 Neumann 等人^[20]首先建立了完全以质粒为基础的流感病毒反向遗传系统. 在这一系统中, 流感病毒 8 种 vRNA 片段的 cDNA 被逐个克隆到含有人(*Homo sapiens*)RNA 聚合酶 I 启动子和小鼠(*Mus musculus*)RNA 聚合酶 I 终止

子的质粒载体中, 而编码病毒 9 种结构蛋白(PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M1, M2, NS2)的基因则被逐个克隆到含有 RNA 聚合酶 II 启动子和 poly-A 信号的蛋白表达载体中. 当将这 17 种(8+9)质粒共同转染 293T 细胞后, 细胞内的 RNA 聚合酶 I 转录产生病毒的 8 种 vRNA, 而细胞内的 RNA 聚合酶 II 则转录产生病毒 9 种结构蛋白的 mRNA, 进而翻译产生病毒的结构蛋白. 这样, 在细胞内既具有病毒的所有 vRNA 节段, 又具有所有的结构蛋白, 即可起始病毒的复制周期, 拯救出完整的病毒粒子. 由于 vRNP 复合体是流感病毒复制的最小功能单位, Neumann 等人还尝试了仅转染 12 种质粒, 即 PB2, PB1, PA 和 NP 等 4 种 RNA 聚合酶 II 表达质粒和 8 种 RNA 聚合酶 I 表达质粒, 这些质粒在细胞内转录和表达产生的 vRNA 和蛋白组装产生功能性的 vRNP 复合体后即可进行病毒的正常复制, 产生有感染性的病毒粒子. 利用相似的策略, Fordor 等人^[21]也在 1999 年建立了流感病毒的反向遗传系统, 不同的是他们将病毒 8 种 vRNA 片段的 cDNA 克隆到人 RNA 聚合酶 I 启动子和 Delta 肝炎病毒的核酶序列之间. 在以 RNA 聚合酶 I 为基础的反向遗传系统中, 需要同时转染至少 12 种质粒. 但是由于 293T 细胞的转染效率很高, 12 质粒系统具有很高的病毒拯救效率. 在 12 质粒系统的基础上, Hoffmann 等人^[22]在 2000 年进一步建立了流感病毒反向遗传操作技术的 8 质粒系统. 他们将病毒 8 种 vRNA 片段的 cDNA 克隆在 RNA 聚合酶 I 启动子和终止子之间, 然后再将整个转录单元反向插入到 RNA 聚合酶 II 的启动子和 poly-A 信号之间, 形成一个双向转录的质粒载体. 由 RNA 聚合酶 I 转录产生病毒的 vRNA, 由 RNA 聚合酶 II 转录产生病毒 mRNA, 翻译后产生各种病毒蛋白, 进而进行病毒的整个复制周期, 产生具有感染性的病毒粒子. 与 12 质粒系统相比, 8 质粒系统减少了所操作的质粒数量, 且病毒拯救效率与 12 质粒系统相当. 但是由于在该系统中, 病毒的 vRNA 和蛋白都来源于相同的转录本, 所以当对病毒进行突变研究时, 有可能由于致死性突变的存在导致无法拯救出目的病毒.

12 质粒系统以及 8 质粒系统发明后, 科学家们尝试了进一步减少所需构建的质粒数量, 以使病毒的拯救更加简单方便. Neumann 等人^[23]将所有 8 个基因片段的 RNA 聚合酶 I 转录单元克隆到一个质粒中, 将表达病毒 3 个聚合酶蛋白 PB2, PB1, PA 的 RNA 聚

合酶 II 转录单元克隆到一个质粒中, 另外将表达病毒核蛋白 NP 的 RNA 聚合酶 II 转录单元克隆到一个质粒中. 利用这一系统, 仅需要转染 3 个质粒就可以拯救出流感病毒, 可以大大提高在转染效率低的细胞系中(如 Vero 细胞)拯救流感病毒的效率. 2009 年, Zhang 等人^[24]将流感病毒所有 8 个基因片段的双向转录单元克隆到一个质粒中, 通过转染一个质粒就可以高效的在鸡(*Gallus domestica*)胚成纤维细胞中拯救出流感病毒. 最近, Chen 等人^[25]将流感病毒 8 个基因片段的双向转录单元克隆到一个杆粒载体中, 转染后可以在多种细胞中高效拯救出流感病毒. 尽管这些新的尝试大大减少了拯救流感病毒所需要的质粒数量, 但是由于需要将病毒 8 个基因片段同时整合到一个或几个载体中, 因此显著增加了克隆过程的难度和复杂性. 目前, 经典的 12 质粒或 8 质粒反向遗传操作系统在流感病毒研究领域的应用依然最为广泛.

2 反向遗传技术与流感病毒的致病性研究

流感病毒的致病性是由多个病毒基因决定的, 这些基因编码的蛋白在整个病毒复制周期的不同阶段影响病毒的致病性, 例如, 病毒对细胞的吸附与入侵、病毒基因组转录和复制以及子代病毒粒子的包装和释放, 而且病毒编码的蛋白还会对宿主免疫系统的作用产生干扰和拮抗. 流感病毒基因编码的蛋白中含有与病毒致病性相关的氨基酸突变, 可以作为影响病毒致病性高低的决定因子, 反向遗传技术的应用在流感病毒致病性决定因子的发现中发挥了重要作用.

2.1 HA 蛋白

流感病毒利用 HA 蛋白与宿主细胞表面的唾液酸受体结合, 通过受体介导的内吞作用进入细胞. HA 蛋白在宿主细胞内表达后以前体 HA0 的形式存在, HA0 在蛋白酶的作用下裂解为 HA1 和 HA2, 在内吞体的酸性条件诱导下, 暴露出 HA2 氨基端的融合肽, 嵌入内吞体膜后促进病毒囊膜与内吞体膜的融合. 低致病性禽流感病毒在 HA 裂解位点只有一个碱性的精氨酸, 能够被存在于呼吸道和消化道中的胰酶样蛋白酶裂解, 因此病毒一般仅局限在呼吸道和消化道中复制. 高致病性的 H5 和 H7 亚型禽流感病毒

的 HA 裂解位点则有多个连续的碱性氨基酸, 可以被细胞内广泛存在的蛋白酶(如弗林蛋白酶(furin)和前蛋白转化酶 6(proprotein convertase 6, PC6))所裂解, 因此可以导致全身性感染. 利用反向遗传系统, 将高致病性禽流感病毒 HA 裂解位点的多个碱性氨基酸去除后, 发现病毒对家禽和小鼠的致病性降低^[26,27].

除了 HA 裂解位点影响流感病毒的致病性外, HA 蛋白的糖基化可以改变病毒与细胞表面受体的结合, 因而也会影响流感病毒的复制和致病性. 研究表明, H5N1 禽流感病毒 HA 蛋白 158 位发生糖基化后, 与野生型病毒相比, 糖基化病毒对小鼠和雪貂(*Mustela putorius furo*)的致病性降低^[28,29]. 此外, 2009 年甲型 H1N1 流感病毒 HA 蛋白的糖基化位点少于季节性流行的 H1N1 流感病毒, 当通过反向遗传技术在其 HA 蛋白上添加额外的糖基化位点后, 与野生型病毒相比, 突变病毒对小鼠和雪貂的致病性降低^[30].

2.2 NA 蛋白

流感病毒的 NA 蛋白在病毒复制周期中所起的作用与 HA 蛋白相反, 它在病毒复制后期的释放过程中切割宿主细胞和新生病毒粒子表面的唾液酸, 促进子代病毒粒子的释放. 由于 HA 和 NA 的作用恰恰相反, 所以两者之间需要在功能上保持平衡, 才能保证病毒的有效复制. H5N1 禽流感病毒在流行过程中, NA 蛋白茎部缺失了 49~68 位的 20 个氨基酸, 含有这种缺失的病毒在 2002 年大量增加, 到 2007 年时, 所有的 H5N1 禽流感病毒都获得了这个缺失^[29]. 通过反向遗传技术拯救出含有这种缺失的突变病毒后, 发现与野生型病毒相比, NA 茎部缺失的病毒致病性显著增加^[31].

奥塞米韦, 俗称达菲, 是临床上常用的抗流感病毒药物, 它可以与流感病毒 NA 蛋白的活性位点结合, 阻止 NA 蛋白对唾液酸的结合及切割, 导致病毒粒子在细胞表面聚积, 抑制病毒粒子的释放^[32]. 奥塞米韦在患者体内使用过程中, 可以导致流感病毒产生抗药性的突变. H5N1 流感病毒 NA 蛋白的抗药性突变包括 V116A, I117V, E119A, Y252H, H274Y 和 N294S 等. 利用反向遗传技术拯救出这些突变病毒后的研究发现, 这些抗药性突变仍然保持了 H5N1 病毒对小鼠或雪貂的高致病性, 并对有的 H5N1 病毒的

致病性具有增强作用,但对有的病毒则发挥致弱作用^[33-36].

2.3 聚合酶蛋白

流感病毒的聚合酶复合体由 PB2, PB1 和 PA 蛋白组成,参与流感病毒基因组的转录和复制,对病毒的致病性发挥重要作用,尤其以 PB2 蛋白影响致病性的研究最为深入. 禽流感病毒 PB2 蛋白的 627 位具有谷氨酸(glutamic acid, E),而人流感病毒则具有赖氨酸(lysine, K). H5N1 禽流感病毒感染人或小鼠后,在体内的适应过程中可以获得 PB2 蛋白的 E627K 突变^[37-40]. 利用反向遗传技术拯救出 PB2 蛋白含有 627K 突变的病毒后,发现与野生型病毒相比,突变病毒的致病性显著增强^[41,42]. 相反,当将含有 627K 的 H5N1 禽流感病毒突变为 627E 后,病毒的致病性则大大降低^[26]. 在体外的细胞感染试验中发现,627K 突变病毒在 33℃ 的复制能力显著提高,而且病毒在小鼠上呼吸道及肺脏中的复制能力显著增强^[37,43]. 除作为 H5N1 禽流感病毒致病性的重要决定因子外, E627K 突变同样影响 H7N9 流感病毒的致病性. 研究发现,目前从患者体内分离到的 H7N9 流感病毒约有 70% 获得了 PB2 蛋白的 E627K 突变,而且反向遗传学研究也直接证明了该突变可以显著增强 H7N9 流感病毒的致病性^[44]. 除了 E627K 突变外,另外一个研究比较深入且影响流感病毒致病性的 PB2 突变是 D701N. Li 等人^[45]的研究发现, H5N1 禽流感病毒在获得 D701N 突变后,可以在感染小鼠体内全身性复制,致病性显著增强. 此外,反向遗传技术的研究发现 PB2 蛋白的诸多突变,如 M147L, E158G, D253N, T271A, I504V, T588I, G590S, Q591K, Q591R 和 S714R 等^[46-54],以及 PA 蛋白的多个突变,如 T85I, T97I, S224P, L336M, N383D, I550L 和 T552S 等^[54-60],也可以促进流感病毒的复制或增强病毒的致病性.

2.4 PB1-F2 蛋白

PB1-F2 蛋白是由 PB1 基因的+1 可读框编码的,全长在 79~101 个氨基酸之间. 禽流感病毒的 PB1-F2 蛋白一般为全长的 90 个氨基酸,而一些人流感病毒和猪(*Sus scrofa*)流感病毒的 PB1-F2 蛋白由于终止密码子的存在则以无功能的截短体形式存在. PB1-F2 蛋白通过与细胞线粒体膜上的腺嘌呤核苷酸转运子

3(adenine nucleotide translocator 3, ANT3)和电压依赖性阴离子通道 1(voltage dependent anion channel 1, VDAC1)蛋白结合,导致细胞凋亡^[2,61],还可以增强流感大流行病毒以及 H5N1 禽流感病毒所诱导产生的免疫病理反应^[62]. 当利用反向遗传技术拯救出不能表达 PB1-F2 蛋白的突变病毒后发现,突变病毒对小鼠的致病性降低,而且也易于在小鼠体内被清除^[63]. 此外,在 PB1-F2 蛋白中还发现了增强流感病毒致病性的 N66S 突变. 当在 H5N1 或 1918 年 H1N1 流感病毒 PB1-F2 蛋白中引入 S66N 突变后,突变病毒的致病性降低^[64]. 而且与 66N 病毒相比, PB1-F2 蛋白含有 66S 的病毒感染小鼠后,在小鼠肺脏中的复制滴度显著提高,并在小鼠肺脏中诱导产生大量的细胞因子.

2.5 NS1 蛋白

NS1 蛋白是流感病毒 NS 基因编码的拮抗宿主天然免疫反应的重要因子. 利用反向遗传技术拯救出的 NS1 缺失病毒在犬肾细胞 MDCK(Madin-Darby canine kidney)和鸡胚中的复制滴度显著降低,而且病毒失去了对小鼠的致病性^[65]. NS1 蛋白可以与三结构域包含蛋白 25(tripartite motif containing 25, TRIM25)结合,阻止 TRIM25 对模式识别受体维甲酸诱导基因蛋白 I (retinoic acid-inducible gene I, RIG-I)的泛素化,抑制 RIG-I 下游信号通路的激活,从而抑制干扰素的产生和抗病毒状态的建立^[66]. NS1 蛋白还与 30-kD 切割与多聚腺苷酸化特异性因子(30-kD cleavage and polyadenylation specificity factor, CPSF30)结合,抑制宿主 mRNA 的加工,导致包括干扰素在内的宿主蛋白的表达受到抑制^[67]. 此外, NS1 还与多种其他宿主蛋白存在直接或间接的相互作用,抑制宿主的免疫反应^[68].

利用反向遗传技术,在 NS1 蛋白中发现了多个影响流感病毒致病性的氨基酸突变. 1997 年香港 H5N1 禽流感病毒 NS1 蛋白具有 D92E 突变,可以使病毒在体外培养时抵抗干扰素的抑制作用. 当将 NS1 蛋白的 92 位氨基酸由 D 突变为 E 后,病毒对小鼠的致病性降低,在小鼠肺脏中的复制滴度下降^[69,70]. 位于 NS1 蛋白 RNA 结合结构域的 P42S 突变也可以显著增强 H5N1 禽流感病毒对小鼠的致病性,而且可以在体外细胞培养时显著抑制干扰素的产生^[71]. H5N1 禽流感病毒 NS1 蛋白的 L103F 和 I106M 突变则可以增强 NS1 蛋白与 CPSF30 的结合,

促进病毒的复制^[72]。流感病毒 NS1 蛋白羧基末端的 4 个氨基酸残基形成了 1 个 PDZ 结构域结合基序。其中 H5N1 和 1918 年 H1N1 流感病毒的基序序列为 ESEV, 可以与多种含有 PDZ 结构域的宿主蛋白结合, 是流感病毒致病性的重要毒力因子^[73,74]。当将 ESEV 基序导入 WSN 病毒的 NS1 蛋白后发现, 突变病毒的致病力显著增强^[73]。此外, 一些 H5N1 禽流感病毒在 NS1 蛋白的 80~84 位存在 5 个氨基酸的缺失, 研究发现, 这一缺失不仅可以增强 H5N1 禽流感病毒的复制和致病性, 而且对 H1N1 禽流感病毒的复制也具有促进作用^[75~77]。与此相反, H5N1 流感病毒 NS1 蛋白 191~195 位的 5 个氨基酸缺失则使病毒的致病性降低^[78]。

2.6 M1 蛋白

流感病毒的基质蛋白 M1 与病毒囊膜蛋白 HA, NA 以及 M2 蛋白的胞质区相互作用, 还与 vRNP 复合体直接结合, 因此在病毒包装过程中发挥重要作用。此外, M1 蛋白也影响流感病毒的致病性。反向遗传技术的研究发现, H5N1 禽流感病毒 M1 蛋白获得 N30D 和 T215A 突变后, 对小鼠的致病性显著增强^[79]。此外, M1 蛋白中含有半胱氨酸和组氨酸的锌指结构域以及 101 和 105 位的精氨酸发生突变后也会影响流感病毒的致病性^[80,81]。

2.7 基因重组影响病毒的致病性

流感病毒的基因组由 8 个基因片段组成, 当不同毒株感染同一个细胞时, 就会发生病毒间基因片段的交换, 即基因重组。基因重组在流感病毒的进化过程中发挥着重要作用, 自从 20 世纪初至今的 4 次人流感大流行, 其中有 3 次是由基因重组病毒引起的。应用反向遗传技术所进行的大量研究表明, 基因重组也可以显著影响流感病毒的致病性。研究发现, 2009 年甲型 H1N1 流感病毒的 PA 基因不仅可以提高禽流感病毒的致病性, 还可以提高季节性 H1N1 流感病毒的致病性^[58,82,83]。Zhang 等人^[84]利用反向遗传技术, 拯救了 H5N1 禽流感病毒和 2009 年甲型 H1N1 流感病毒之间的 127 种组合重组 H5N1 病毒, 发现这些重组病毒的致病性存在很大差异。其中, 38 种重组病毒的致病性低于亲本 H5N1 禽流感病毒, 54 种重组病毒具有与亲本 H5N1 禽流感病毒相似的致病性, 另外 35 种重组病毒的致病性则高于亲本 H5N1 禽流感病毒。反向遗传学研究也表明, H3N2 人流感病毒与

H5N1 禽流感病毒之间具有很高的基因兼容性, 但两者之间重组 H5 病毒的致病性则因亲本 H5N1 病毒的不同而存在差异。Chen 等人^[85]研究了 H5N1 禽流感病毒与 H3N2 人流感病毒之间 39 种重组 H5 病毒对小鼠的致病性, 发现所有重组病毒的致病性均低于亲本 H5N1 禽流感病毒。与此不同的是, Li 等人^[86]的研究发现, H5N1 禽流感病毒与 H3N2 人流感病毒之间的重组病毒致病性存在很大差异, 在所研究的 75 种重组 H5 病毒中, 45 种重组病毒的致病性低于亲本 H5N1 禽流感病毒, 8 种重组病毒的致病性与亲本 H5N1 禽流感病毒相似, 其余 22 种重组病毒的致病性则高于亲本 H5N1 禽流感病毒, 而且他们发现 H3N2 人流感病毒的 PB2 基因对重组 H5 病毒获得高致病性具有决定作用。此外, 也有研究表明, H5N1 禽流感病毒的 NS 基因可以增强 H7N1 禽流感病毒的致病性^[87]。

3 反向遗传技术与流感病毒传播机制研究

近年来, 随着反向遗传技术的应用, 在流感病毒传播方面取得了许多令人关注的研究进展。与致病性一样, 流感病毒的传播能力也是由多个基因决定的, 其中 HA 蛋白的受体结合特性发挥着非常关键的作用。禽流感病毒与宿主细胞表面的 α -2,3 唾液酸受体结合, 而人流感病毒则与 α -2,6 唾液酸受体结合。除了 HA 蛋白的受体结合特性外, 其他基因对于流感病毒的传播能力也非常重要, 研究最为深入的是 PB2 蛋白。利用反向遗传技术, 已经发现了 PB2 蛋白的多个位点与流感病毒的传播能力有关, 主要包括 E627K, D701N 和 T271A 等^[88~90]。这些位点的突变可以增强病毒在哺乳动物宿主体内的复制能力, 促进病毒的传播。

3.1 H1N1 流感大流行病毒

1918 年的西班牙流感导致全世界大约 5000 万人死亡, 是迄今为止人类发生的危害最为严重的传染病^[91]。为什么 1918 年 H1N1 流感大流行病毒具有如此迅猛的传播能力, 一直是病毒学家们非常关注的科学问题。Tumpey 研究组^[92]利用反向遗传技术, 拯救出了 HA 蛋白含有 D190E 和 D225G 突变的病毒, 发现突变病毒的受体结合特性发生了改变, 由识别人的 α -2,6 唾液酸受体到识别禽的 α -2,3 唾液酸受体。重

要的是, 突变病毒丧失了 在雪貂之间的呼吸道飞沫传播能力. 2009 年甲型 H1N1 流感大流行病毒的传播也非常迅速, Zhang 等人^[90]研究发现 HA 蛋白的 226Q 和 PB2 蛋白的 271A 对于病毒的传播能力非常重要. HA 的 Q226R 突变使病毒由结合 α -2,6 唾液酸受体改变为结合 α -2,3 唾液酸受体, 突变病毒失去了在豚鼠 (*Cavia porcellus*) 之间的呼吸道飞沫传播能力, 这一突变与 PB2 蛋白的 A271T 突变一起, 使病毒丧失了 在雪貂之间的呼吸道飞沫传播能力.

3.2 H5N1 禽流感病毒

H5N1 高致病性禽流感病毒目前已经扩散到亚洲、非洲和欧洲等 60 多个国家. 伴随着在家禽和野鸟中的流行, H5N1 禽流感病毒偶尔感染人, 自 2003 年至今已发生 844 起人感染 H5N1 禽流感病例, 死亡 449 人, 致死率达到 53.2% (<http://who.int>), 而最让人担心的问题是 H5N1 病毒是否会获得在人与人之间的水平传播能力, 如此将可能导致新的流感大流行. 由于具备与 α -2,6 唾液酸受体的结合能力是流感病毒获得在人与人之间有效传播能力的先决条件, 科学家们利用反向遗传技术对 H5N1 禽流感病毒突变株的受体结合特性进行了大量研究. 最初的研究发现, H5N1 禽流感病毒 HA 蛋白的多个位点可以使病毒获得对 α -2,6 唾液酸受体的结合能力, 这些位点包括 S125N, L133V/A138V, 133 缺失 /I155T, G143R, S159N, T160A, N186K, K193R, Q196H, Q196R, N197K, V214I, Q226L, S227N, G228S 和 S239P 等^[93-97], 但是这些位点突变在多数情况下仍然保持了对 α -2,3 唾液酸受体的结合能力. Gao 等人^[89]利用豚鼠模型进行的研究发现, HA 蛋白含有 T160A 突变的 A/duck/Guangxi/35/2001(H5N1) 和 A/bar-headed goose/Qinghai/3/2005(H5N1) 病毒能够在豚鼠之间通过直接接触传播. 值得一提的是, 这两株病毒除了能够识别和结合 α -2,6 唾液酸受体外, 在病毒的 PB2 蛋白上还分别具有影响流感病毒传播能力的 D701N 和 E627K 突变.

2012 年以后, 科学家们在 H5N1 禽流感病毒在哺乳动物间的水平传播研究方面取得了令人瞩目的进展. Chen 等人^[98]利用反向遗传技术拯救了一株 H5N1 禽流感病毒, 其 HA 蛋白含有 Q196R/Q226L/G228S 突变, 具有很强的与人 α -2,6 唾液酸受体结合能力. 他们进一步拯救了一株重组 H5N2 病毒, HA 基因含

有上述 3 个突变, NA 基因来源于 H3N2 人流感病毒, 6 个内部基因来源于 H5N1 禽流感病毒. 研究发现, 重组 H5N2 病毒获得了部分的在雪貂之间通过呼吸道飞沫传播能力, 病毒可以传播给两只雪貂中的一只. 美国威斯康辛大学 Yoshihiro Kawaoka 研究组^[99]利用随机突变技术, 在 H5N1 流感病毒 HA 蛋白的头部引入了随机突变, 利用反向遗传技术拯救出突变体病毒库后, 筛选出了可以完全识别和结合人 α -2,6 唾液酸受体的 HA 突变 N224K/Q226L. 在此基础上, 他们利用反向遗传技术拯救出了含有该 HA 突变基因的重组病毒, 其他 7 个基因片段来源于一株 2009 年甲型 H1N1 流感病毒, 该重组病毒不能在雪貂之间通过呼吸道飞沫传播. 但是, 当该重组病毒在雪貂体内复制过程中获得了另外两个突变(N158D 和 T318I)后, 则获得了在雪貂之间通过呼吸道飞沫高效传播的能力. 荷兰伊拉斯莫斯医学中心的 Ron Fouchier 研究组^[100]采取了不同的研究策略, 他们从野生型的 H5N1 流感病毒开始, 在病毒 HA 蛋白中导入可以识别和结合 α -2,6 唾液酸受体的突变 Q226L/G228S, 在 PB2 蛋白中导入突变 E627K, 利用反向遗传技术拯救出突变病毒后在雪貂体内连续传代 10 次, 获得了可以在雪貂之间通过呼吸道飞沫传播的突变病毒. 研究发现, 突变病毒含有的 5 个突变, 即 HA 突变 H110Y/T160A/Q226L/G228S 和 PB2 突变 E627K 对病毒的呼吸道飞沫传播能力具有决定作用. 本研究团队^[84]在研究中利用反向遗传技术, 拯救了 H5N1 禽流感病毒与 2009 年甲型 H1N1 流感病毒之间的 127 种组合基因重组 H5N1 病毒, 发现多株重组 H5N1 病毒可以在豚鼠之间经过呼吸道飞沫传播. 深入分析发现, 2009 年 H1N1 流感病毒的 PA 和 NS 基因可以显著增强重组 H5N1 病毒的呼吸道飞沫传播能力, 其 NA 和 M 基因对基因重组 H5N1 病毒的传播能力也有一定的促进作用, 而它的 NP 基因则对其 PA 基因增强呼吸道飞沫传播的能力起到协同作用. 这些不同的研究工作揭示了 H5N1 禽流感病毒具有在哺乳动物间水平传播, 进而演化为人流感大流行病毒的潜力, 为大流行的风险预警和防控措施的制定实施提供了重要的科学依据.

3.3 H7N9 禽流感病毒

2013 年初中国出现人感染 H7N9 流感疫情, 截至 2015 年 2 月 23 日, 共导致 571 人感染, 其中 212 人

死亡, 死亡率为 37.1%(<http://who.int>). 而且 H7N9 病毒已经部分获得了对人 α -2,6 唾液酸受体的结合能力, 具有一定的在哺乳动物间通过呼吸道飞沫传播的能力, 其中以 A/Anhui/1/2013 病毒的水平传播能力最强^[101-107]. 通过反向遗传技术以及受体结合特性分析方法, 发现 H7N9 病毒 HA 蛋白的 Q226L 和 G186V 突变对病毒的传播能力非常重要^[108,109].

3.4 H9N2 禽流感病毒

H9N2 禽流感病毒目前在世界范围内广泛分布, 尤为重要, 它可以作为内部基因的供体, 直接参与与其他亚型病毒的进化以及新病毒的产生, 如 H5N1 和 H7N9 禽流感病毒^[110-112]. H9N2 禽流感病毒在流行过程中, 许多病毒都获得了 HA 蛋白的 Q226L 突变, 具备了对哺乳动物 α -2,6 唾液酸受体的结合能力, 而且 Q226L 突变可以使病毒在人呼吸道上皮细胞以及雪貂体内的复制能力增强^[113-115]. 目前, 已有几项研究对 H9N2 亚型禽流感病毒的传播能力进行了评估. Wan 等人^[115]利用反向遗传技术, 拯救了一株基因重组 H9N2 病毒, 其 HA 和 NA 基因来源于 H9N2 禽流感病毒, 6 个内部基因则来源于 H3N2 人流感病毒. 与亲本 H9N2 禽流感病毒相比, 重组 H9N2 病毒在雪貂之间的接触传播能力增强, 但不能通过呼吸道飞沫传播. 在此基础上, Sorrell 等人^[116]将该重组病毒在雪貂中传代 10 次后, 病毒在 HA 基因上获得了适应性突变, 从而获得了在雪貂之间的水平传播能力. Kimble 等人^[117]的研究中则拯救了 H9N2 禽流感病毒与 2009 年甲型 H1N1 人流感病毒之间的 4 株重组病毒, 发现其中 3 株病毒可以在雪貂之间通过呼吸道飞沫传播. 这些研究证实了 H9N2 亚型禽流感病毒具有引起新的人流感大流行的潜力. 此外, Zhong 等人^[118]还对 H9N2 禽流感病毒在鸡与鸡之间的呼吸道飞沫传播能力进行了研究, 发现 HA 蛋白的 363K 和 PA 蛋白的 672L 突变对 H9N2 禽流感病毒在鸡与鸡之间的呼吸道飞沫传播能力非常重要, 可能促进了 H9N2 禽流感病毒在家禽中的广泛流行和扩散.

4 反向遗传技术与流感病毒疫苗的研制

早在 20 世纪 40 年代, 就有应用全病毒灭活疫苗预防和控制人流感的报道^[119]. 现今, 世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 每年都向世界各国

推荐疫苗的组成病毒株. 目前世界上应用最广的人流感疫苗是三价灭活疫苗, 组成毒株包括季节性流行的 A 型 H1N1, H3N2 流感病毒以及 B 型流感病毒^[120]. 其中, H1N1 和 H3N2 疫苗株病毒的内部基因来源于高滴度鸡胚适应株 A/Puerto Rico/8/1934(H1N1, PR8). 疫苗株病毒的获得是通过传统的基因重组方法, 将亲本 H1N1 或 H3N2 病毒与 PR8 病毒共同感染鸡胚后, 在存在 PR8 病毒 HA 和 NA 抗体的条件下, 筛选出表面基因含有流行毒株 HA 和 NA 基因的重组病毒, 经过进一步克隆和纯化得到疫苗株病毒. 这种传统基因重组方法的缺点是耗时, 需要花费数周甚至更长的时间. 与之相比, 反向遗传技术的应用则可以大大提高疫苗株病毒制备的效率.

目前, 反向遗传技术在流感病毒疫苗研究方面最为广泛的应用就是 H5N1 禽流感疫苗的研制. H5N1 禽流感病毒因为具有高致病性的特点, 一方面会对疫苗生产人员的人身安全造成威胁, 另一方面由于病毒会快速地致死鸡胚, 导致收获的病毒产量低, 给疫苗制备带来困难. 反向遗传技术的应用则同时解决了这两方面的难题. HA 蛋白裂解位点的多个连续碱性氨基酸是 H5N1 禽流感病毒致病性的主要决定因子^[26,27]. 因此, 在 H5N1 禽流感疫苗的制备过程中将 HA 裂解位点的多个碱性氨基酸缺失, 使它获得与低致病性禽流感病毒相同的特征, 然后利用反向遗传技术拯救出致弱的疫苗株, 其 HA 和 NA 基因来源于自然流行 H5N1 病毒株, 6 个内部基因则来源于高滴度鸡胚适应株 PR8^[121-123]. 在 H5N1 禽流感疫苗应用过程中, 影响疫苗免疫保护效果的一个重要因素是疫苗株的 HA 基因与自然流行病毒株 HA 基因的抗原性是否匹配. 所以在疫苗使用过程中, 需要对 H5N1 禽流感病毒自然分离株的抗原性进行密切监测, 当自然流行株的抗原性发生变化后, 则及时运用反向遗传技术的疫苗研制平台对疫苗株进行更新. 目前, 灭活疫苗仍然是 H5N1 禽流感防控中应用最为广泛的疫苗类型. 其中, 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所利用反向遗传技术研制的 H5N1 禽流感灭活疫苗已在家禽中累计应用超过 1000 亿羽份, 并在疫苗使用过程中针对现地流行病毒株抗原性的变化对疫苗株进行了数次更新^[124]. 此外, 由于 H5N1 禽流感病毒具有潜在的引起新的人流感大流行的风险, 所以在应用反向遗传技术研制人 H5N1 禽流感灭活疫苗方面也进行了大量的尝试, 其中一些疫苗已经进

行了临床试验, 在志愿者体内产生了具有一定保护作用的免疫力^[125].

在流感病毒弱毒活疫苗的研制方面, 反向遗传技术也有广泛的应用. 与灭活疫苗相比, 弱毒活疫苗能够诱导细胞免疫和局部的黏膜免疫, 因此具有更好的免疫效果. 美国从 2003 年开始使用弱毒活疫苗, 商品名为 FluMist, 是一种冷适应株, 在生长特性上具有温度敏感性, 在人体内使用后具有很好的安全性^[120]. 反向遗传技术的应用使冷适应疫苗株的拯救非常容易, 疫苗株的内部基因来源于具有冷适应特性的供体株, 如 A/Ann Arbor/6/60(H2N2) 或 A/Leningrad/134/17/57(H2N2), 而表面基因则来源于季节性流行的 H1N1 或 H3N2 人流感病毒. 此外, 对于 H5N1, H7N9 以及 H7N7 禽流感病毒冷适应疫苗株的研究也进行了有益的尝试, 证实这些疫苗株具有很好的安全性, 在雪貂和非人灵长类的恒河猴(*Macaca mulatta*)试验中可以提供对这些不同亚型禽流感病毒攻击的完全保护, 为可能发生的大范围人感染禽流感疫情提供了良好的疫苗储备^[126-130]. 此外, 随着反向遗传技术的应用, 已经发现流感病毒的多个基因发生突变或修饰后都可以导致病毒致弱, 因此也有希望用于弱毒活疫苗的研制. 这些突变和修饰主要集中在 HA, M2, NS1, NS2 等病毒蛋白, 例如, NS1 缺失突变体以及 M2 胞质尾段截短突变体都可以导致病毒致弱, 这些潜在的弱毒疫苗株在实验室研究中都获得了不错的免疫保护效果^[131-135].

反向遗传技术在流感疫苗研究方面的应用还体现在应用该技术可以研制具有高度生长特性的疫苗种子株. 例如, 应用反向遗传技术, 将流感病毒 vRNA 3'端的第 4 位碱基由 C 突变为 U 后, 可以提高突变病毒的生长滴度^[136]. 此外, 也有研究对疫苗株供体病毒的 HA 或 NA 基因进行修饰, 构建与 PR8 病毒 HA 或 NA 基因间的嵌合基因, 利用反向遗传技术拯救出的嵌合 6+2 重组疫苗株的生长特性得到改善和提高^[137-140].

5 结语

流感病毒最大的特点就是它可以持续不断地进行自我更新, 通过基因突变和重组产生出威胁动物和人类健康的新病毒. 因此, 针对流感病毒的研究一直以来都是病毒学研究领域的热点, 而且对于流感

病毒的研究也促进了整个病毒学和免疫学的发展. 例如, 干扰素最初就是在研究流感病毒的过程中发现的^[141]. 但是, 直到反向遗传技术发明后, 流感病毒各个研究领域才得到了全面的发展. 借助于这个有利的平台和工具, 许多以前无法实现的研究都具有了实现的可能性. 截至目前, 在 PubMed 搜索引擎中与流感病毒反向遗传技术相关的文献有约 2300 篇, 真实地反映出了该技术在流感病毒研究中的地位和作用. 反向遗传技术的应用不仅促进了流感病毒的基础研究, 加深了对病毒复制周期、致病和免疫、跨宿主传播、抗原变异和耐药性等方面机制的深入理解, 而且促进了流感病毒的应用研究, 加速了抗流感病毒药物和疫苗以及新的诊断方法和试剂的研制与应用, 在人流感和动物流感的防控中发挥了重要作用. 由于流感病毒的自然宿主是家禽和野鸟, 在客观上决定了流感病毒很难根除, 因此有可能对动物和人类健康构成持续的危害. 可以预见的是, 反向遗传技术将在流感病毒的研究和防控方面发挥进一步的作用.

当然, 与其他生命科学领域新技术一样, 流感病毒反向遗传技术的应用在流感研究中取得重大突破的同时, 总伴随着一些这样那样的批评声音. 近年来, 最典型的案例是关于“H5N1 亚型禽流感病毒在哺乳动物之间水平传播潜力”的有关研究. H5N1 高致病性禽流感病毒是目前地理分布最广的禽流感病毒亚型之一, 关于“H5N1 病毒能否获得在人与人之间的水平传播能力”这一科学问题的答案将为世界卫生组织和各国如何就“H5N1 流感大流行”进行政策和技术储备提供科学依据. 为此, 中国、美国和荷兰的科学家团队分别开展了独立的研究工作, 利用反向遗传技术证明了 H5N1 病毒可以获得在哺乳动物之间的水平传播能力^[84,99,100]. 然而, 上述研究在公开发表前后却引起了广泛的争议. 其中, Kawaoka 和 Fouchier 的研究因为受美国国立卫生研究院(National Institutes of Health, NIH)项目资助, 文章发表之前必须接受美国国家生物防卫科学咨询委员会(National Science Advisory Board for Biosecurity, NSABB)的审查. NSABB 认为这两篇文章全文发表后, 其技术方法可能会被恐怖分子利用, 因此要求 *Nature* 和 *Science* 杂志保留发表这两项研究的关键方法. 然而, 2012 年 2 月末, 世界卫生组织召集会议讨论后并不同意 NSABB 的观点, 因为这两项研究所使用的技术都是

早已公开发表的流感病毒研究中很常用的技术, 并且与会专家认为这两项研究对公共卫生很重要, 应该全文发表. 2012 年 2 月 29 日, 美国卫生与公共服务部要求 NSABB 重新对这两项研究进行审查. NSABB 重新审查后改变了以前的决定, 建议这两项研究全文发表. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所陈化兰研究团队的文章发表后, 英国生态学家 Robert May 指责“中国科学家在二流的实验设施条件下, 从事这么危险的工作是不负责的.” Robert May 等人对这项研究的担心不是“相关技术被恐怖分子利用”, 而是“中国的实验室级别不够”. 事实上, 中国科学家是在完全符合国际标准的生物安全三级实验室从事这项研究的. 哈尔滨兽医研究所的生物安全三级实验室是我国最早批准和认可使用的高级别生物安全实验室, 2003 年曾经用于 SARS 病毒的动物实验, 其后一直用于高致病力禽流感病毒的研究. 我国主管部门农业部对该生物安全实验室的实验活动实行严格的审查和审批制度. 在这项研究工作提交 *Science* 评审期间, 研究者按要求向 *Science* 杂志编辑提交了所

有关于实验涉及的“生物安全实验室”认可文件和实验活动批准文件. *Science* 杂志 2013 年 7 月 12 日就此项研究及其所用实验室的安全级别在其“焦点”栏目发表文章专门澄清^[142]. 因此, Robert May 对“中国的实验室级别不够从事该项研究”的指责带有明显的偏见.

根据上述案例, 认为对流感病毒合成生物学研究存在的反对意见虽然值得尊重, 但并不能成为阻止这些研究的理由. 原因有以下 3 个方面: (i) H5N1 流感病毒目前在全球广泛存在, 不通过研究对这些病毒具有的公共卫生风险进行科学分析, 而是凭经验主观臆断, 是一种不负责任的行为; (ii) 这些研究结果极大地提高了人们对 H5N1 病毒的认知水平, 这些知识可以直接用于对自然界中有风险病毒的严密监测和制定相应的防控对策; (iii) 从事这些研究的科学家比任何其他人都更了解这类研究具有的风险和更懂得如何控制这些研究的风险, 而反对者对这些研究工作的意义、技术手段和实验设施缺乏全面的了解.

参考文献

- 1 World Health Organization. Influenza Seasonal Fact Sheet, No. 211. 2009. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>
- 2 Chen W, Calvo P A, Malide D, et al. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med*, 2001, 7: 1306–1312
- 3 Wise H M, Foeglein A, Sun J, et al. A complicated message: identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *J Virol*, 2009, 83: 8021–8031
- 4 Jagger B W, Wise H M, Kash J C, et al. An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response. *Science*, 2012, 337: 199–204
- 5 Muramoto Y, Noda T, Kawakami E, et al. Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA. *J Virol*, 2013, 87: 2455–2462
- 6 Wise H M, Hutchinson E C, Jagger B W, et al. Identification of a novel splice variant form of the influenza A virus M2 ion channel with an antigenically distinct ectodomain. *PLoS Pathog*, 2012, 8: e1002998
- 7 Selman M, Dankar S K, Forbes N E, et al. Adaptive mutation in influenza A virus non-structural gene is linked to host switching and induces a novel protein by alternative splicing. *Emerg Microbes Infect*, 2012, 1: e42
- 8 Tong S, Li Y, Rivailler P, et al. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 4269–4274
- 9 Tong S, Zhu X, Li Y, et al. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog*, 2013, 9: e1003657
- 10 薛强, 仇华吉, 童光志. RNA 病毒的反向遗传学. *生物技术通报*, 2001, 4: 1–4
- 11 Taniguchi T, Palmieri M, Weissmann C. QB DNA-containing hybrid plasmids giving rise to QB phage formation in the bacterial host. *Nature*, 1978, 274: 223–228
- 12 Luytjes W, Krystal M, Enami M, et al. Amplification, expression, and packaging of foreign gene by influenza virus. *Cell*, 1989, 59: 1107–1113
- 13 Neumann G, Zobel A, Hobom G. RNA polymerase I-mediated expression of influenza viral RNA molecules. *Virology*, 1994, 202: 477–479
- 14 Schnell M J, Mebatsion T, Conzelmann K K. Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *EMBO J*, 1994, 13: 4195–4203
- 15 Baron M D, Barrett T. Rescue of rinderpest virus from cloned cDNA. *J Virol*, 1997, 71: 1265–1271
- 16 Hoffman M A, Banerjee A K. An infectious clone of human parainfluenza virus type 3. *J Virol*, 1997, 71: 4272–4277

- 17 Garcin D, Pelet T, Calain P, et al. A highly recombinogenic system for the recovery of infectious Sendai paramyxovirus from cDNA: generation of a novel copy-back nondefective interfering virus. *EMBO J*, 1995, 14: 6087–6094
- 18 Collins P L, Hill M G, Camargo E, et al. Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 11563–11567
- 19 Bridgen A, Elliott R M. Rescue of a segmented negative-strand RNA virus entirely from cloned complementary DNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 15400–15404
- 20 Neumann G, Watanabe T, Ito H, et al. Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 9345–9350
- 21 Fodor E, Devenish L, Engelhardt O G, et al. Rescue of influenza A virus from recombinant DNA. *J Virol*, 1999, 73: 9679–9682
- 22 Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, et al. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 6108–6113
- 23 Neumann G, Fujii K, Kino Y, et al. An improved reverse genetics system for influenza A virus generation and its implications for vaccine production. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 16825–16829
- 24 Zhang X, Kong W, Ashraf S, et al. A one-plasmid system to generate influenza virus in cultured chicken cells for potential use in influenza vaccine. *J Virol*, 2009, 83: 9296–9303
- 25 Chen H, Angel M, Li W, et al. All-in-one bacmids: an efficient reverse genetics strategy for influenza A virus vaccines. *J Virol*, 2014, 88: 10013–10025
- 26 Hatta M, Gao P, Halfmann P, et al. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science*, 2001, 293: 1840–1842
- 27 Suguitan A L Jr, Matsuoka Y, Lau Y F, et al. The multibasic cleavage site of the hemagglutinin of highly pathogenic A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) avian influenza virus acts as a virulence factor in a host-specific manner in mammals. *J Virol*, 2012, 86: 2706–2714
- 28 Chen H, Bright R A, Subbarao K, et al. Polygenic virulence factors involved in pathogenesis of 1997 Hong Kong H5N1 influenza viruses in mice. *Virus Res*, 2007, 128: 159–163
- 29 Matsuoka Y, Swayne D E, Thomas C, et al. Neuraminidase stalk length and additional glycosylation of the hemagglutinin influence the virulence of influenza H5N1 viruses for mice. *J Virol*, 2009, 83: 4704–4708
- 30 Medina R A, Stertz S, Manicassamy B, et al. Glycosylations in the globular head of the hemagglutinin protein modulate the virulence and antigenic properties of the H1N1 influenza viruses. *Sci Transl Med*, 2013, 5: 187ra170
- 31 Zhou H, Yu Z, Hu Y, et al. The special neuraminidase stalk-motif responsible for increased virulence and pathogenesis of H5N1 influenza A virus. *PLoS One*, 2009, 4: e6277
- 32 Moscona A. Oseltamivir resistance—disabling our influenza defenses. *N Engl J Med*, 2005, 353: 2633–2636
- 33 Govorkova E A, Ilyushina N A, Marathe B M, et al. Competitive fitness of oseltamivir-sensitive and -resistant highly pathogenic H5N1 influenza viruses in a ferret model. *J Virol*, 2010, 84: 8042–8050
- 34 Yen H L, Ilyushina N A, Salomon R, et al. Neuraminidase inhibitor-resistant recombinant A/Vietnam/1203/04 (H5N1) influenza viruses retain their replication efficiency and pathogenicity *in vitro* and *in vivo*. *J Virol*, 2007, 81: 12418–12426
- 35 Ilyushina N A, Seiler J P, Rehg J E, et al. Effect of neuraminidase inhibitor-resistant mutations on pathogenicity of clade 2.2 A/Turkey/15/06 (H5N1) influenza virus in ferrets. *PLoS Pathog*, 2010, 6: e1000933
- 36 Kiso M, Ozawa M, Le M T, et al. Effect of an asparagine-to-serine mutation at position 294 in neuraminidase on the pathogenicity of highly pathogenic H5N1 influenza A virus. *J Virol*, 2011, 85: 4667–4672
- 37 Hatta M, Hatta Y, Kim J H, et al. Growth of H5N1 influenza A viruses in the upper respiratory tracts of mice. *PLoS Pathog*, 2007, 3: 1374–1379
- 38 Mase M, Tanimura N, Imada T, et al. Recent H5N1 avian influenza A virus increases rapidly in virulence to mice after a single passage in mice. *J Gen Virol*, 2006, 87: 3655–3659
- 39 de Jong M D, Simmons C P, Thanh T T, et al. Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat Med*, 2006, 12: 1203–1207
- 40 Puthavathana P, Auewarakul P, Charoenying P C, et al. Molecular characterization of the complete genome of human influenza H5N1 virus isolates from Thailand. *J Gen Virol*, 2005, 86: 423–433
- 41 Shinya K, Hamm S, Hatta M, et al. PB2 amino acid at position 627 affects replicative efficiency, but not cell tropism, of Hong Kong H5N1 influenza A viruses in mice. *Virology*, 2004, 320: 258–266

- 42 Kim J H, Hatta M, Watanabe S, et al. Role of host-specific amino acids in the pathogenicity of avian H5N1 influenza viruses in mice. *J Gen Virol*, 2010, 91: 1284–1289
- 43 Massin P, van der Werf S, Naffakh N. Residue 627 of PB2 is a determinant of cold sensitivity in RNA replication of avian influenza viruses. *J Virol*, 2001, 75: 5398–5404
- 44 Zhang H, Li X, Guo J, et al. The PB2 E627K mutation contributes to the high polymerase activity and enhanced replication of H7N9 influenza virus. *J Gen Virol*, 2014, 95: 779–786
- 45 Li Z, Chen H, Jiao P, et al. Molecular basis of replication of duck H5N1 influenza viruses in a mammalian mouse model. *J Virol*, 2005, 79: 12058–12064
- 46 Wang J, Sun Y, Xu Q, et al. Mouse-adapted H9N2 influenza A virus PB2 protein M147L and E627K mutations are critical for high virulence. *PLoS One*, 2012, 7: e40752
- 47 Zhou B, Li Y, Halpin R, et al. PB2 residue 158 is a pathogenic determinant of pandemic H1N1 and H5 influenza viruses in mice. *J Virol*, 2011, 85: 357–365
- 48 Mok C K, Yen H L, Yu M Y, et al. Amino acid residues 253 and 591 of the PB2 protein of avian influenza virus A H9N2 contribute to mammalian pathogenesis. *J Virol*, 2011, 85: 9641–9645
- 49 Bussey K A, Bousse T L, Desmet E A, et al. PB2 residue 271 plays a key role in enhanced polymerase activity of influenza A viruses in mammalian host cells. *J Virol*, 2010, 84: 4395–4406
- 50 Liu Q, Qiao C, Marjuki H, et al. Combination of PB2 271A and SR polymorphism at positions 590/591 is critical for viral replication and virulence of swine influenza virus in cultured cells and *in vivo*. *J Virol*, 2012, 86: 1233–1237
- 51 Mehle A, Doudna J A. Adaptive strategies of the influenza virus polymerase for replication in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 21312–21316
- 52 Czudai-Matwich V, Otte A, Matrosovich M, et al. PB2 mutations D701N and S714R promote adaptation of an influenza H5N1 virus to a mammalian host. *J Virol*, 2014, 88: 8735–8742
- 53 Zhao Z, Yi C, Zhao L, et al. PB2-588I enhances 2009 H1N1 pandemic influenza virus virulence by increasing viral replication and exacerbating PB2 inhibition of beta interferon expression. *J Virol*, 2014, 88: 2260–2267
- 54 Rolling T, Koerner I, Zimmermann P, et al. Adaptive mutations resulting in enhanced polymerase activity contribute to high virulence of influenza A virus in mice. *J Virol*, 2009, 83: 6673–6680
- 55 Song M S, Pascua P N, Lee J H, et al. The polymerase acidic protein gene of influenza A virus contributes to pathogenicity in a mouse model. *J Virol*, 2009, 83: 12325–12335
- 56 Bussey K A, Desmet E A, Mattiaccio J L, et al. PA residues in the 2009 H1N1 pandemic influenza virus enhance avian influenza virus polymerase activity in mammalian cells. *J Virol*, 2011, 85: 7020–7028
- 57 Cheng K, Yu Z, Chai H, et al. PB2-E627K and PA-T97I substitutions enhance polymerase activity and confer a virulent phenotype to an H6N1 avian influenza virus in mice. *Virology*, 2014, 468–470C: 207–213
- 58 Mehle A, Dugan V G, Taubenberger J K, et al. Reassortment and mutation of the avian influenza virus polymerase PA subunit overcome species barriers. *J Virol*, 2012, 86: 1750–1757
- 59 Song J, Feng H, Xu J, et al. The PA protein directly contributes to the virulence of H5N1 avian influenza viruses in domestic ducks. *J Virol*, 2011, 85: 2180–2188
- 60 Song J, Xu J, Shi J, et al. Synergistic effect of S224P and N383D substitutions in the PA of H5N1 avian influenza virus contributes to mammalian adaptation. *Sci Rep*, 2015, 5: 10510
- 61 Zamarin D, Garcia-Sastre A, Xiao X, et al. Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1. *PLoS Pathog*, 2005, 1: e4
- 62 McAuley J L, Chipuk J E, Boyd K L, et al. PB1-F2 proteins from H5N1 and 20 century pandemic influenza viruses cause immunopathology. *PLoS Pathog*, 2010, 6: e1001014
- 63 Zamarin D, Ortigoza M B, Palese P. Influenza A virus PB1-F2 protein contributes to viral pathogenesis in mice. *J Virol*, 2006, 80: 7976–7983
- 64 Conenello G M, Zamarin D, Perrone L A, et al. A single mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 influenza A viruses contributes to increased virulence. *PLoS Pathog*, 2007, 3: 1414–1421
- 65 Garcia-Sastre A, Egorov A, Matassov D, et al. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology*, 1998, 252: 324–330
- 66 Gack M U, Albrecht R A, Urano T, et al. Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by the host viral

- RNA sensor RIG-I. *Cell Host Microbe*, 2009, 5: 439–449
- 67 Nemeroff M E, Barabino S M, Li Y, et al. Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3' end formation of cellular pre-mRNAs. *Mol Cell*, 1998, 1: 991–1000
 - 68 Engel D A. The influenza virus NS1 protein as a therapeutic target. *Antiviral Res*, 2013, 99: 409–416
 - 69 Seo S H, Hoffmann E, Webster R G. Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. *Nat Med*, 2002, 8: 950–954
 - 70 Lipatov A S, Andreansky S, Webby R J, et al. Pathogenesis of Hong Kong H5N1 influenza virus NS gene reassortants in mice: the role of cytokines and B- and T-cell responses. *J Gen Virol*, 2005, 86: 1121–1130
 - 71 Jiao P, Tian G, Li Y, et al. A single-amino-acid substitution in the NS1 protein changes the pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in mice. *J Virol*, 2008, 82: 1146–1154
 - 72 Twu K Y, Kuo R L, Marklund J, et al. The H5N1 influenza virus NS genes selected after 1998 enhance virus replication in mammalian cells. *J Virol*, 2007, 81: 8112–8121
 - 73 Jackson D, Hossain M J, Hickman D, et al. A new influenza virus virulence determinant: the NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 4381–4386
 - 74 Obenauer J C, Denson J, Mehta P K, et al. Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates. *Science*, 2006, 311: 1576–1580
 - 75 Long J X, Peng D X, Liu Y L, et al. Virulence of H5N1 avian influenza virus enhanced by a 15-nucleotide deletion in the viral nonstructural gene. *Virus Genes*, 2008, 36: 471–478
 - 76 Trapp S, Soubieux D, Marty H, et al. Shortening the unstructured, interdomain region of the non-structural protein NS1 of an avian H1N1 influenza virus increases its replication and pathogenicity in chickens. *J Gen Virol*, 2014, 95: 1233–1243
 - 77 Li Y, Chen S, Zhang X, et al. A 20-amino-acid deletion in the neuraminidase stalk and a five-amino-acid deletion in the NS1 protein both contribute to the pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in mallard ducks. *PLoS One*, 2014, 9: e95539
 - 78 Zhu Q, Yang H, Chen W, et al. A naturally occurring deletion in its NS gene contributes to the attenuation of an H5N1 swine influenza virus in chickens. *J Virol*, 2008, 82: 220–228
 - 79 Fan S, Deng G, Song J, et al. Two amino acid residues in the matrix protein M1 contribute to the virulence difference of H5N1 avian influenza viruses in mice. *Virology*, 2009, 384: 28–32
 - 80 Hui E K, Smee D F, Wong M H, et al. Mutations in influenza virus M1 CCHH, the putative zinc finger motif, cause attenuation in mice and protect mice against lethal influenza virus infection. *J Virol*, 2006, 80: 5697–5707
 - 81 Liu T, Ye Z. Attenuating mutations of the matrix gene of influenza A/WSN/33 virus. *J Virol*, 2005, 79: 1918–1923
 - 82 Hsieh E F, Lin S J, Mok C K, et al. Altered pathogenicity for seasonal influenza virus by single reassortment of the RNP genes derived from the 2009 pandemic influenza virus. *J Infect Dis*, 2011, 204: 864–872
 - 83 Sun Y, Qin K, Wang J, et al. High genetic compatibility and increased pathogenicity of reassortants derived from avian H9N2 and pandemic H1N1/2009 influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 4164–4169
 - 84 Zhang Y, Zhang Q, Kong H, et al. H5N1 hybrid viruses bearing 2009/H1N1 virus genes transmit in guinea pigs by respiratory droplet. *Science*, 2013, 340: 1459–1463
 - 85 Chen L M, Davis C T, Zhou H, et al. Genetic compatibility and virulence of reassortants derived from contemporary avian H5N1 and human H3N2 influenza A viruses. *PLoS Pathog*, 2008, 4: e1000072
 - 86 Li C, Hatta M, Nidom C A, et al. Reassortment between avian H5N1 and human H3N2 influenza viruses creates hybrid viruses with substantial virulence. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 4687–4692
 - 87 Ma W, Brenner D, Wang Z, et al. The NS segment of an H5N1 highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) is sufficient to alter replication efficiency, cell tropism, and host range of an H7N1 HPAIV. *J Virol*, 2010, 84: 2122–2133
 - 88 Steel J, Lowen A C, Mubareka S, et al. Transmission of influenza virus in a mammalian host is increased by PB2 amino acids 627K or 627E/701N. *PLoS Pathog*, 2009, 5: e1000252
 - 89 Gao Y, Zhang Y, Shinya K, et al. Identification of amino acids in HA and PB2 critical for the transmission of H5N1 avian influenza viruses in a mammalian host. *PLoS Pathog*, 2009, 5: e1000709
 - 90 Zhang Y, Zhang Q, Gao Y, et al. Key molecular factors in hemagglutinin and PB2 contribute to efficient transmission of the 2009 H1N1 pandemic influenza virus. *J Virol*, 2012, 86: 9666–9674
 - 91 Johnson N P, Mueller J. Updating the accounts: global mortality of the 1918–1920 “Spanish” influenza pandemic. *Bull Hist Med*, 2002, 76: 105–115
 - 92 Tumpey T M, Maines T R, Van Hoeven N, et al. A two-amino acid change in the hemagglutinin of the 1918 influenza virus abolishes transmission. *Science*, 2007, 315: 655–659

- 93 Watanabe Y, Ibrahim M S, Ellakany H F, et al. Acquisition of human-type receptor binding specificity by new H5N1 influenza virus sublineages during their emergence in birds in Egypt. *PLoS Pathog*, 2011, 7: e1002068
- 94 Chutinimitkul S, van Riel D, Munster V J, et al. *In vitro* assessment of attachment pattern and replication efficiency of H5N1 influenza A viruses with altered receptor specificity. *J Virol*, 2010, 84: 6825–6833
- 95 Auewarakul P, Suptawiwat O, Kongchanagul A, et al. An avian influenza H5N1 virus that binds to a human-type receptor. *J Virol*, 2007, 81: 9950–9955
- 96 Yamada S, Suzuki Y, Suzuki T, et al. Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature*, 2006, 444: 378–382
- 97 Wang W, Lu B, Zhou H, et al. Glycosylation at 158N of the hemagglutinin protein and receptor binding specificity synergistically affect the antigenicity and immunogenicity of a live attenuated H5N1 A/Vietnam/1203/2004 vaccine virus in ferrets. *J Virol*, 2010, 84: 6570–6577
- 98 Chen L M, Blixt O, Stevens J, et al. *In vitro* evolution of H5N1 avian influenza virus toward human-type receptor specificity. *Virology*, 2012, 422: 105–113
- 99 Imai M, Watanabe T, Hatta M, et al. Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. *Nature*, 2012, 486: 420–428
- 100 Herfst S, Schrauwen E J, Linster M, et al. Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets. *Science*, 2012, 336: 1534–1541
- 101 Belser J A, Gustin K M, Pearce M B, et al. Pathogenesis and transmission of avian influenza A (H7N9) virus in ferrets and mice. *Nature*, 2013, 501: 556–559
- 102 Watanabe T, Kiso M, Fukuyama S, et al. Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. *Nature*, 2013, 501: 551–555
- 103 Xiong X, Martin S R, Haire L F, et al. Receptor binding by an H7N9 influenza virus from humans. *Nature*, 2013, 499: 496–499
- 104 Zhang Q, Shi J, Deng G, et al. H7N9 influenza viruses are transmissible in ferrets by respiratory droplet. *Science*, 2013, 341: 410–414
- 105 Zhou J, Wang D, Gao R, et al. Biological features of novel avian influenza A (H7N9) virus. *Nature*, 2013, 499: 500–503
- 106 Richard M, Schrauwen E J, de Graaf M, et al. Limited airborne transmission of H7N9 influenza A virus between ferrets. *Nature*, 2013, 501: 560–563
- 107 Zhu H, Wang D, Kelvin D J, et al. Infectivity, transmission, and pathology of human-isolated H7N9 influenza virus in ferrets and pigs. *Science*, 2013, 341: 183–186
- 108 Liu Q, Zhou B, Ma W, et al. Analysis of recombinant H7N9 wild-type and mutant viruses in pigs shows that the Q226L mutation in HA is important for transmission. *J Virol*, 2014, 88: 8153–8165
- 109 Dortmans J C, Dekkers J, Wickramasinghe I N, et al. Adaptation of novel H7N9 influenza A virus to human receptors. *Sci Rep*, 2013, 3: 3058
- 110 Guan Y, Shortridge K F, Krauss S, et al. Molecular characterization of H9N2 influenza viruses: were they the donors of the “internal” genes of H5N1 viruses in Hong Kong? *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 9363–9367
- 111 Shi J, Deng G, Liu P, et al. Isolation and characterization of H7N9 viruses from live poultry markets—Implication of the source of current H7N9 infection in humans. *Chin Sci Bull*, 2013, 58: 1857–1863
- 112 Gao R, Cao B, Hu Y, et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus. *N Engl J Med*, 2013, 368: 1888–1897
- 113 Matrosovich M N, Krauss S, Webster R G. H9N2 influenza A viruses from poultry in Asia have human virus-like receptor specificity. *Virology*, 2001, 281: 156–162
- 114 Wan H, Perez D R. Amino acid 226 in the hemagglutinin of H9N2 influenza viruses determines cell tropism and replication in human airway epithelial cells. *J Virol*, 2007, 81: 5181–5191
- 115 Wan H, Sorrell E M, Song H, et al. Replication and transmission of H9N2 influenza viruses in ferrets: evaluation of pandemic potential. *PLoS One*, 2008, 3: e2923
- 116 Sorrell E M, Wan H, Araya Y, et al. Minimal molecular constraints for respiratory droplet transmission of an avian-human H9N2 influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 7565–7570
- 117 Kimble J B, Sorrell E, Shao H, et al. Compatibility of H9N2 avian influenza surface genes and 2009 pandemic H1N1 internal genes for transmission in the ferret model. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 12084–12088
- 118 Zhong L, Wang X, Li Q, et al. Molecular mechanism of the airborne transmissibility of H9N2 avian influenza A viruses in chickens. *J Virol*, 2014, 88: 9568–9578
- 119 Salk J E. Reactions to concentrated influenza virus vaccines. *J Immunol*, 1948, 58: 369–395
- 120 Wong S S, Webby R J. Traditional and new influenza vaccines. *Clin Microbiol Rev*, 2013, 26: 476–492
- 121 Tian G, Zhang S, Li Y, et al. Protective efficacy in chickens, geese and ducks of an H5N1-inactivated vaccine developed by reverse genetics.

- Virology, 2005, 341: 153–162
- 122 Hwang S D, Kim H S, Cho S W, et al. Single dose of oil-adjuvanted inactivated vaccine protects chickens from lethal infections of highly pathogenic H5N1 influenza virus. *Vaccine*, 2011, 29: 2178–2186
- 123 Kim J K, Seiler P, Forrest H L, et al. Pathogenicity and vaccine efficacy of different clades of Asian H5N1 avian influenza A viruses in domestic ducks. *J Virol*, 2008, 82: 11374–11382
- 124 Li C, Bu Z, Chen H. Avian influenza vaccines against H5N1 “bird flu”. *Trends Biotechnol*, 2014, 32: 147–156
- 125 Baz M, Luke C J, Cheng X, et al. H5N1 vaccines in humans. *Virus Res*, 2013, 178: 78–98
- 126 Fan S, Gao Y, Shinya K, et al. Immunogenicity and protective efficacy of a live attenuated H5N1 vaccine in nonhuman primates. *PLoS Pathog*, 2009, 5: e1000409
- 127 Chen Z, Baz M, Lu J, et al. Development of a high-yield live attenuated H7N9 influenza virus vaccine that provides protection against homologous and heterologous H7 wild-type viruses in ferrets. *J Virol*, 2014, 88: 7016–7023
- 128 Min J Y, Vogel L, Matsuoka Y, et al. A live attenuated H7N7 candidate vaccine virus induces neutralizing antibody that confers protection from challenge in mice, ferrets, and monkeys. *J Virol*, 2010, 84: 11950–11960
- 129 Suguitan A L Jr, McAuliffe J, Mills K L, et al. Live, attenuated influenza A H5N1 candidate vaccines provide broad cross-protection in mice and ferrets. *PLoS Med*, 2006, 3: e360
- 130 Kong H, Zhang Q, Gu C, et al. A live attenuated vaccine prevents replication and transmission of H7N9 virus in mammals. *Sci Rep*, 2015, 5: 11233
- 131 Steel J, Lowen A C, Pena L, et al. Live attenuated influenza viruses containing NS1 truncations as vaccine candidates against H5N1 highly pathogenic avian influenza. *J Virol*, 2009, 83: 1742–1753
- 132 Hai R, Martinez-Sobrido L, Fraser K A, et al. Influenza B virus NS1-truncated mutants: live-attenuated vaccine approach. *J Virol*, 2008, 82: 10580–10590
- 133 Watanabe T, Watanabe S, Kim J H, et al. Novel approach to the development of effective H5N1 influenza A virus vaccines: use of M2 cytoplasmic tail mutants. *J Virol*, 2008, 82: 2486–2492
- 134 Akarsu H, Iwatsuki-Horimoto K, Noda T, et al. Structure-based design of NS2 mutants for attenuated influenza A virus vaccines. *Virus Res*, 2011, 155: 240–248
- 135 Gabriel G, Garn H, Wegmann M, et al. The potential of a protease activation mutant of a highly pathogenic avian influenza virus for a pandemic live vaccine. *Vaccine*, 2008, 26: 956–965
- 136 Jiang H, Zhang S, Wang Q, et al. Influenza virus genome C4 promoter/origin attenuates its transcription and replication activity by the low polymerase recognition activity. *Virology*, 2010, 408: 190–196
- 137 Jing X, Phy K, Li X, et al. Increased hemagglutinin content in a reassortant 2009 pandemic H1N1 influenza virus with chimeric neuraminidase containing donor A/Puerto Rico/8/34 virus transmembrane and stalk domains. *Vaccine*, 2012, 30: 4144–4152
- 138 Gomila R C, Suphaphiphat P, Judge C, et al. Improving influenza virus backbones by including terminal regions of MDCK-adapted strains on hemagglutinin and neuraminidase gene segments. *Vaccine*, 2013, 31: 4736–4743
- 139 Harvey R, Nicolson C, Johnson R E, et al. Improved haemagglutinin antigen content in H5N1 candidate vaccine viruses with chimeric haemagglutinin molecules. *Vaccine*, 2010, 28: 8008–8014
- 140 Adamo J E, Liu T, Schmeisser F, et al. Optimizing viral protein yield of influenza virus strain A/Vietnam/1203/2004 by modification of the neuraminidase gene. *J Virol*, 2009, 83: 4023–4029
- 141 Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1957, 147: 258–267
- 142 Hvistendahl M. Veterinarian-in-chief. *Science*, 2013, 341: 122–123, 125

Application of Reverse Genetics Technique in the Research, Prevention and Control of Influenza Viruses

LI ChengJun & CHEN HuaLan

National Avian Influenza Reference Laboratory, State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China

Influenza virus poses serious threats for the health of humans and animals. The invention of entirely plasmid-based reverse genetics system is a landmark event in the field of research, prevention and control of influenza viruses. As a powerful tool, the application of reverse genetics technique has greatly broadened and deepened both the basic and applied research of influenza viruses, and has played an important role in the prevention and control of human and animal influenza. In this article, we briefly review the course of development of the influenza virus reverse genetics technique, and focus on the application of this technology in the research of pathogenesis, interspecies transmission and vaccine development of influenza viruses.

reverse genetics, influenza virus, pathogenesis, interspecies transmission, vaccine development

doi: 10.1360/N052015-00043