

# 用反向遗传技术致弱基因 VII<sub>d</sub> 型鹅源新城疫病毒 ZJI 株

胡顺林 孙 庆 吴艳涛 张艳梅 刘秀梵\*

(扬州大学 农业部畜禽传染病学重点开放实验室 扬州 225009)

**摘 要** 将新城疫病毒 ZJI 株基因组 cDNA 全长分成 7 个片段,依次连接并克隆至 TVT7R 转录载体中,构建了含 ZJI 株全基因组 cDNA 的转录载体(pNDV/ZJI)。pNDV/ZJI 与 3 个辅助表达质粒 pCI-NP、pCI-P 和 pCI-L 共转染 BSR-T7/5 细胞,成功拯救出了具有感染性的新城疫病毒粒子。设计两对引物,经 overlap PCR 方法将该毒株 F 蛋白裂解位点的 112、115 和 117 位碱性氨基酸突变成弱毒株特征的非碱性氨基酸后,替换 pNDV/ZJI 上的对应序列,构建了转录载体 pNDV/ZJIFM。将 pNDV/ZJIFM 与 3 个辅助表达质粒共转染 BSR-T7/5 细胞,成功拯救出了致弱的基因 VII<sub>d</sub> 型鹅源新城疫病毒 NDV/ZJIFM。获救病毒的鸡胚最小致死剂量平均死亡时间(MDT)大于 120h,同时该病毒的脑内接种致病指数(ICPI)为 0.16,上述结果表明,获救病毒的毒力已被致弱,是一个较为理想的疫苗候选株。

**关键词**: 新城疫病毒;拯救;致弱;基因 VII<sub>d</sub> 型

中图分类号: S852.65; Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)02-0197-04

反向遗传操作技术(Reverse genetics manipulation technique)是在反转录-聚合酶链反应技术和体外转录 RNA 技术基础上建立起来的一门新型分子病毒学研究技术,常被称为“病毒拯救”。新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)的拯救过程一般是将构建的全基因组 cDNA 克隆(转录载体)和分别含 NP、P 与 L 基因的辅助质粒(表达载体)共转染细胞,在辅助质粒提供相关酶的作用下, cDNA 克隆进行转录和各基因的表达,最终组装成有感染性的病毒粒子<sup>[1,2]</sup>。

新城疫(Newcastle disease, ND)是由 NDV 引起的多种禽类发生高度死亡的一种重要传染病。NDV 在中国已存在几十年,过去,虽然也有报道 NDV 能自然感染鹅、鸭等水禽,但一般认为水禽对 NDV 有较强的抵抗力,感染后不易发病和造成流行。然而,自 1997 年以来,我国陆续有水禽感染 NDV 强毒并发病的报道<sup>[3]</sup>,万洪全等<sup>[4]</sup>对分离的 NDV 鹅源毒株进行分析时发现,它们绝大多数属于基因 VII 型,与当前 ND 流行毒株的基因型一致。本室对 2000 年分离到的一株鹅源 NDV 强毒 ZJI 株进行了全基因组序列的测定<sup>[5]</sup>,在此基础上,构建了含有该基因组 cDNA 全长的转录载体以及该毒株 NP、P 与 L 基因的 3 个表达载体<sup>[6]</sup>,并进行了该病毒的拯救,同时对

其进行了致弱突变,旨在为新型疫苗的研制探寻新的途径。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 毒株、细胞株、单抗及鸡胚** 鹅源 NDV ZJI 株由本室从浙江发病鹅群中分离并鉴定为强毒株(MDT 为 51.6h, ICPI 为 1.89)<sup>[5]</sup>,能稳定表达 T7 RNA 聚合酶的 BSR-T7/5 细胞由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所步志高研究员惠赠;抗 ZJI 株 NDV HN 蛋白单克隆抗体(6B1)由胡顺林等制备<sup>[7]</sup>;SPF 种蛋购自山东省实验种鸡场。

**1.1.2 质粒和菌株** 转录载体 TVT7R(0.0)<sup>[8]</sup>由美国 Alabama 大学 L. Andrew Ball 教授惠赠;真核表达载体 pCI-neo 购自美国 Promega 公司;T 载体试剂盒(pCR2.1)为美国 Invitrogen 公司产品;宿主菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  为本室保存;表达 NP 和 P 基因的真核表达质粒(pCI-NP 和 pCI-P)由刘玉良等<sup>[6]</sup>构建。

**1.1.3 主要试剂** AMV 反转录酶、高保真 DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司;转染试剂 SuperFect 和质粒抽提试剂盒(QIAprep Spin MiniPrep Kit)为 Qiagen 公司产品;RNA 抽提试剂盒购自 TaKaRa 公司;各种限制性内切酶均购自晶美生物工

基金项目: 国家自然科学基金重大项目(30630048)

\* 通讯作者。Tel 86-514-7991416; Fax 86-514-7972591; E-mail: xfliu@yzu.edu.cn

作者简介: 胡顺林(1978-),男,江苏高邮人,博士研究生,主要从事病毒的分子生物学研究。

其他作者: 刘玉良,王曲直

收稿日期: 2006-07-21;接受日期: 2006-09-21;修回日期: 2006-11-10

程公司。

1.2 反转录

病毒的 RNA 抽提按试剂盒说明书提供的步骤进行。病毒 RNA 的反转录参考文献 [6]。

1.3 含有全基因组 cDNA 转录载体和 L 基因真核表达载体的构建

参照 GenBank 公布的鹅源新城疫病毒 ZJI 株全序列,设计 7 对引物,经 RT-PCR 法从尿囊液中扩增目的片段后,分别克隆进 pCR2.1 载体,再将 7 对引物的扩增片段依次亚克隆到 TVT7R 转录载体中,构建了含 NDV 基因组 cDNA 的转录载体 pNDV/ZJI,设计引物,将 L 基因分成 3 段进行扩增后分别克隆进 pCR2.1 载体,再将 3 个片段连接并亚克隆至表达质粒 pCI-neo 上,构建 L 基因的真核表达载体 pCI-L。

1.4 NDVZJI 株的拯救与鉴定

将 pCI-NP、pCI-P 和 pCI-L 3 个真核表达质粒与含有 NDV 基因组 cDNA 全长的转录载体 (pNDV/ZJI) 共转染 BSR-T7/5 细胞,转染方法参照 SuperFect Transfection Reagent 说明书进行,60h 后收集转染细胞的上清液接种 9~11 日龄 SPF 鸡胚。尿囊液按 OIE 标准进行血凝 (Hemagglutination, HA) 试验。HA 为阳性的样品用单克隆抗体 6B1 按 OIE 标准进行血凝抑制 (Hemagglutinin inhibition, HI) 试验,同时以 NDVZJI 母本毒株为阳性对照。

1.5 F 裂解位点的突变

根据发表的序列设计两对引物, P1: 5'-ACA ACCGGTGCAGCACCCCTCTGAATTGAT-3'; P2: 5'-GAGGGAGACAAGAACGCCCTTATAGGTGCTGTTATTGG-3'; P3: 5'-AAGGCGTTCTTGTCTCCCTCCTCCAGACGTGAC-3'; P4: 5'-GGTTATAAAGTGCCTGGATGGTCAGATGAGTTAA-3'。引物外带 Age I 和 Pst I 酶切位点用下划线标注,突变碱基由黑体标注。以上引物由上海生物工程有限公司合成。

通过 RT-PCR 方法,用引物 P1 和 P2 扩增病毒基因组的 2870~4917nt 区域,用引物 P3 和 P4 扩增基因组的 4864~5270nt 区域,再用引物 P1 和 P4 将以上两个片段通过 overlap PCR 方法相连,得到裂解位点发生 3 个氨基酸突变的 F 基因。PCR 产物回收后克隆于 pCR2.1 载体进行扩增,最后将目的片段

经 Age I 和 Pst I 酶切后替换转录载体 pNDV/ZJI 上的对应序列。重组质粒用酶切和 PCR 方法鉴定,阳性克隆命名为 pNDV/ZJIFM,突变模式见图 1。

1.6 致弱病毒的拯救

将 pCI-NP、pCI-P 和 pCI-L 3 个真核表达质粒与重组质粒共转染 BSR-T7/5 细胞,转染 24h 后,加入 1/10 体积的 SPF 鸡胚尿囊液,60h 后收集转染细胞的上清液接种 9~11 日龄 SPF 鸡胚,尿囊液按 OIE 标准进行 HA 和 HI 测定,同时以 NDVZJI 母本毒株为阳性对照。

1.7 病毒的鉴定

将 HA 和 HI 检测均为阳性的尿囊液在 SPF 鸡胚上传两代后,收集尿囊液,抽提 RNA 用于 RT-PCR 反应,扩增 F 基因长度约为 1700bp 大小的片段,回收目的片段进行测序鉴定。

1.8 鸡胚最小致死剂量平均死亡时间 (MDT) 与脑内接种致病指数 (ICPI) 的测定

用灭菌生理盐水分别连续 10 倍 ( $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、..... $10^{-7}$ ) 递增稀释致弱病毒,每个稀释度接种 5 只 9~11 日龄 SPF 鸡胚,37℃ 孵育 5d,按文献 [9] 的方法计算病毒的 MDT,致弱病毒的尿囊液以灭菌生理盐水 10 倍稀释后经脑内接种 10 只 1 日龄的 SPF 鸡,按文献 [9] 的方法计算病毒的 ICPI。

1.9 病毒的感染性试验

致弱病毒  $10^{-3}$  稀释后,接种鸡胚成纤维细胞,48h 后在显微镜下观察细胞的病变情况,同时设母本毒株作为对照。

2 结果

2.1 NDVZJI 株的拯救

转染样品接种 SPF 鸡胚 48h 左右鸡胚开始死亡,收取尿囊液测 HA,效价为  $2^6$ ,且能被抗 NDV 的单克隆抗体所抑制,表明鹅源 NDVZJI 株已拯救成功。

2.2 致弱病毒的拯救与鉴定

转染样品接种 SPF 鸡胚,接种 4d 后收集鸡胚尿囊液,在 SPF 鸡胚上再传一代后,收集尿囊液用于 HA 和 HI 试验,结果表明,尿囊液的 HA 效价为  $2^7$ ,且 HI 试验呈阳性,初步表明致弱病毒已成功获救,获救病毒命名为 NDV/ZJIFM。阳性样品传两代后再收取尿囊液用于反转录,然后进行 PCR 扩增反应,扩增出的片段与预期的大小一致,扩增片段的测序结果显示 F 基因的裂解位点已突变成功 (图 2)。

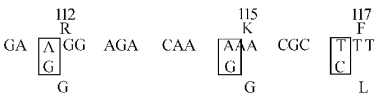


图 1 F 蛋白裂解位点突变模式图

Fig.1 The schematic representation of mutation in F protein cleavage region.

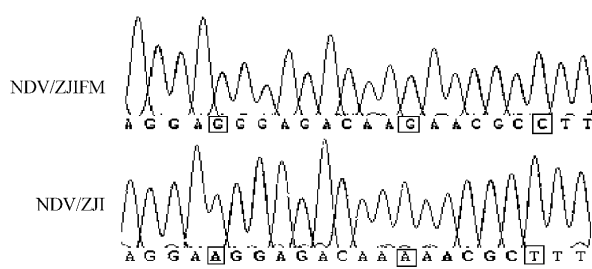


图2 F 基因裂解位点核苷酸序列  
Fig.2 Nucleotide sequence of the F gene cleavage region.

2.3 MDT 与 ICPI 的测定

病毒 5 个稀释度的接种鸡胚在 120h 内没有发生死亡,说明该毒株的 MDT 值大于 120h;尿囊液经脑内接种 SPF 鸡后,接种鸡没有发生死亡,ICPI 的测定值仅为 0.16,表明获救病毒的毒力完全符合弱毒株的标准<sup>[10]</sup>。

2.4 细胞感染性试验

致弱病毒 NDV/ZJIFM 感染 CEF 48h 后,细胞没有出现病变,而母本病毒感染细胞则出现了拉网和脱落现象,形成了明显的空斑(图 3)。说明拯救后病毒的 F 蛋白在 CEF 上不能有效裂解,进一步表明获救病毒的毒力已明显减弱。

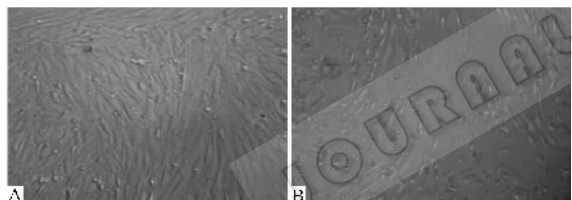


图3 细胞感染试验结果  
Fig.3 The results of infection test. A : CEF infected with NDV/ZJIFM ; B : CEF infected with NDV/ZJI.

3 讨论

2005 年,刘玉良等<sup>[10]</sup>用 NDV ZJI 株的 3 个辅助质粒和其全基因组 cDNA 克隆进行共转染经多次摸索均不能拯救出野生型 NDV,而同时换用 NDV LaSota 毒株的 3 个表达载体与 ZJI 株 NDV cDNA 克隆进行共转染时却拯救出了有血凝性的 NDV,但其拯救效率较低给后续研究带来了困难,这可能与前期 cDNA 克隆和 L 基因表达质粒构建过程中因 PCR 扩增而引入了多处碱基的突变有关,因此为了提高病毒的拯救成功率,本研究在减少碱基突变的前提下,对含 ZJI 株全长 cDNA 克隆转录载体及其 L 基因的表达质粒进行了重新构建。将新构建的两个质粒与另外两个辅助表达质粒(pCI-NP 和 pCI-P)共转染 BSR-T7/5 细胞 4 次,均获得了有感染性的病毒粒子,

拯救效率较以前明显提高,并且获救病毒的生物学特性(MDT 为 54h,ICPI 为 1.90)与母本病毒相似。病毒的成功拯救为接下来的基因功能和疫苗载体开发等方面的研究提供了平台。

F 蛋白是 NDV 毒力和致病性的主要决定因素,在病毒的感染过程中介导病毒和细胞膜发生融合<sup>[11]</sup>。强毒株的裂解位点为多个碱性氨基酸连续排列,可被机体多个组织器官的多种蛋白酶裂解,因此可导致全身性感染。弱毒株在该区域碱性氨基酸则被中性氨基酸所代替,使相应序列成为 G/E112-K/R-Q-G/E115-R-L117,这种 F 蛋白前体仅能被有限的组织或器官分泌的胰样蛋白酶裂解,感染性很低或无感染性<sup>[12]</sup>。国外利用反向遗传学技术已经成功拯救了 NDV Clone-30 株、La Sota 株等鸡源弱毒株,并开展许多毒力相关因素的研究<sup>[13,14]</sup>,但迄今利用反向遗传学技术对速发性强毒株毒力相关因素进行研究的报道很少。本研究将基因 VIII 型强毒株 F 蛋白的裂解位点进行了突变,成功拯救出了致弱的基因 VIII 型鹅源 NDV,其 MDT 大于 120h 且 ICPI 仅为 0.16,与致弱前的毒株相比其毒力明显降低。该重组病毒的成功拯救,首次实现了 NDV 由强毒到弱毒的改变,进一步证明 F 蛋白裂解位点的氨基酸序列与 NDV 的毒力密切相关。

自 1926 年发现 ND 以来,ND 已发生了 4 次大流行,而且每一次流行都有不同基因型的毒株出现,研究发现,近年来引起我国 ND 大流行的毒株主要为基因 VII 型,该型毒株与以往的毒株特别是疫苗株相比,遗传距离越来越远,有学者认为<sup>[15]</sup>即使常规的疫苗对目前分离株强毒的攻击具有良好的保护作用,但保护抗体的 HI 阈值在不断的提高,而且很有可能正是这种阈值的变化为流行毒株的存在和传播提供了更多的机会,导致高 HI 抗体水平下的非典型 ND 的不断发生。本研究所致弱毒株的母本病毒为基因 VII 型,与流行毒株的基因型相一致,因此致弱后的病毒可作为一个理想疫苗候选株,在控制当前新城疫的发生和流行方面有较大的优势和潜力。

参 考 文 献

[ 1 ] Neumann G, Whitt MA, Kawaoka Y. A decade after the generation of a negative-sense RNA virus from cloned cDNA - what have we learned? *J Gen Virol*, 2002, **83**(11) : 2635 - 2662.  
[ 2 ] Roemer-Oberdoerfer A, Mundt E, Mebatsion T, et al. Generation of recombinant lentogenic Newcastle disease virus from cDNA. *J Gen Virol*, 1999, **80**(Pt 2): 2995-2999.  
© 中国科学院微生物研究所微生物学编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [ 3 ] Liu XF, Wan HQ, Ni XX, *et al.* Pathotypical and genotypical characterization of strain of Newcastle disease isolated from outbreaks in chicken and goose flocks in some regions of China during 1985 – 2001. *Arch Virol*, 2003, **148**( 7 ): 1387 – 1403.
- [ 4 ] 万洪全, 吴艳涛, 刘秀梵, 等. 鹅源新城疫病毒血凝素-神经氨酸酶基因的序列分析. *病毒学报*, 2003, **19**( 2 ): 176 – 178.
- [ 5 ] Huang Y, Wan HQ, Liu HQ, *et al.* Genomic sequence of an isolate of Newcastle disease virus isolated from an outbreak in geese: a novel six nucleotide insertion in the non-coding region of the nucleoprotein gene. *Arch Virol*, 2004, **149**( 7 ): 1445 – 1457.
- [ 6 ] 刘玉良, 吴艳涛, 黄 勇, 等. 鹅源新城疫病毒 NP、P 和 L 基因的克隆与 P 基因的表达鉴定. *微生物学通报*, 2004, **31**( 2 ): 37 – 40.
- [ 7 ] 胡顺林, 吴艳涛, 刘文博, 等. 鹅源新城疫病毒单克隆抗体的研制及其与不同 NDV 毒株的反应性. *中国兽医科技*, 2005, **35**( 5 ): 341 – 345.
- [ 8 ] Johnson KN, Zeddarn JL, Ball LA. Characterization and construction of functional cDNA clones of Pariacoto virus, the first Alphonavirus isolated outside Australasia. *J Virol*, 2000, **74**( 11 ): 5123 – 5132.
- [ 9 ] Alexander DJ. Newcastle disease virus and other avian paramyxoviruses. In: Purchase HG, Arp LH. eds. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, 4<sup>th</sup> ed. Kennett Square, PA: America association of Avian Pathologists, 1998, 156 – 163.
- [ 10 ] 刘玉良, 张艳梅, 胡顺林, 等. 利用反向遗传操作技术产生鹅源新城疫病毒. *微生物学报*, 2005, **45**( 5 ): 780 – 783.
- [ 11 ] Sergel T, Morrison TG. Mutations in the cytoplasmic domain of the fusion glycoprotein of Newcastle disease virus depress syncytia formation. *Virology*, 1995, **210**( 2 ): 264 – 272.
- [ 12 ] Seal BS, King DJ, Bennett JD. Characterization of Newcastle disease virus isolates by reverse transcription PCR coupled to direct nucleotide sequencing and development of sequence database for pathotype prediction and molecular epidemiological analysis. *J Clin Microbio*, 1995, **33**( 10 ): 2624 – 2630.
- [ 13 ] Peeters BPH, De Leeuw OS, Koch G, *et al.* Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: Evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *J Virol*, 1999, **73**( 6 ): 5001 – 5009.
- [ 14 ] De Leeuw OS, Hartog L, Koch G, *et al.* Effect of fusion protein cleavage site mutations on virulence of Newcastle disease virus: non-virulent cleavage site mutants revert to virulence after one passage in chicken brain. *J Gen Virol*, 2003, **84**( 1 ): 475 – 484.
- [ 15 ] 曹殿军. 新城疫诊断和流行病学的分子生物学时代. *中国家禽*, 2002, **24**( 20 ): 5 – 9.

## Attenuation of a genotype VIIId Newcastle disease virus ZJI strain of goose origin by reverse genetics

HU Shun-lin, SUN Qing, WU Yan-tao, ZHANG Yan-mei, LIU Xiu-fan\*

( Animal Infectious Disease Laboratory, School of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China )

**Abstract** Based on the complete genome sequence of Newcastle disease virus (NDV) ZJI strain isolated from an outbreak in the goose, seven pairs of primers were designed to amplify cDNA fragment for constructing the plasmid pNDV/ZJI, which contained the full-length cDNA of NDV ZJI strain. The pNDV/ZJI with three helper plasmids, pCI-NP, pCI-P and pCI-L, were then cotransfected into BSR-T7/5 cells expressing T7 RNA polymerase. After inoculation of the transfected cell culture supernatant into embryonated chicken eggs from specific-pathogen-free (SPF) flock, infectious NDV ZJI strain was successfully rescued. The recombinant plasmid pNDV/ZJIFM was generated by converting the multi-basic amino acid sequence of the F0 protein cleavage region in pNDV/ZJI to the non-basic amino acid sequence characteristic of avirulent NDV strain. After cotransfection of the resultant plasmid and the three helper plasmids into BSR-T7/5 cells, the recombinant NDV, NDV/ZJIFM, was generated. The mean death time (MDT) of NDV/ZJIFM was more than 120h and the intracerebral pathogenicity index (ICPI) was 0.16, indicating that the rescued virus was highly attenuated. This attenuated genotype VIIId NDV of goose origin could be a desirable vaccine in controlling the current epidemic of ND.

**Keywords** : Newcastle disease virus; rescue; attenuate; genotype VIIId

Foundation item: National Natural Sciences Foundation of China (30630048)

\* Corresponding author. Tel 86-514-7991416; Fax 86-514-7972591; E-mail: xfliu@yzu.edu.cn

Other authors: LIU Yu-liang, WANG Qu-zhi

Received 21 July 2006/Accepted 21 September 2006/Revised: 10 November 2006