

## H5N1 亚型禽流感病毒基因重排后毒力的变化

唐应华, 吴培培, 彭大新, 龙进学, 张评浒, 张文俊, 李彦芳, 汪文斌, 刘秀梵\*

(扬州大学兽医学院, 农业部畜禽传染病学重点开放实验室, 扬州 225009)

**摘要:**【目的】为了探讨高致病性禽流感病毒对水禽致病性差异的分子致病机理。【方法】我们对从野鸭分离到的 H5N1 亚型禽流感病毒的生物学特性进行鉴定, 其中 A/mallard/Huadong/Y/2003(Y)是对麻鸭无致病性病毒, 而 A/mallard/Huadong/S/2005(S)是对麻鸭高致病性病毒。利用反向遗传技术构建一系列单个和多个基因组合替换基因重排病毒, 并验证重排病毒在麻鸭上的致病力。【结果】研究表明, PB2, PB1, PA(3P), HA 单基因以及 3P 基因组合替换的使 S 病毒对麻鸭的毒力完全致弱, 但相应的基因替换后仅使 Y 病毒对麻鸭的毒力略有上升。两病毒的其它基因对毒力影响较小。【结论】H5N1 亚型禽流感病毒对麻鸭的致病力受多基因调控, 且这种调控作用在不同病毒骨架上的影响不一致, 强毒受影响程度远比弱毒的大。

**关键词:** H5N1; 致病力; 反向遗传; 麻鸭

**中图分类号:** Q78      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2008) 06-0745-05

流感病毒属于正粘病毒科负义分节段单链 RNA 病毒, 病毒的八个基因片段编码至少 11 个不同的蛋白。遗传研究表明, 流感病毒的毒力是多基因控制的<sup>[1]</sup>, 由强毒和无毒力毒株所产生的重排病毒的毒力不仅受替换的基因所影响, 同时还受母本骨架病毒的基因影响, 即多重等位基因控制重排病毒的毒力。强毒的基因重排病毒, 其母本病毒可能是源自于无毒力毒株, 反之依然, 弱毒的基因重排病毒, 其母本病毒可能是强毒。有时因为两个完全不同的毒株, 由于其基因之间不匹配, 它们之间无法发生重排, 这使得在阐释病毒基因对毒力作用时显得更加复杂。母本病毒的核糖核蛋白(PB2, PB1, PA(3P)和 NP)的重组是决定子代重排病毒毒力的先决条件<sup>[2]</sup>。也有研究表明 M<sub>1</sub> 基因的突变影响 HA 和 M<sub>2</sub> 蛋白的功能<sup>[3,4]</sup>。

在本研究中, 我们对两株野鸭源 H5N1 亚型流感病毒的部分生物学特性进行鉴定, 并完成其全基因测序。根据已报道的研究, 可以知道, 能对麻鸭产生明

显的临床症状的 H5N1 亚型禽流感病毒逐渐增多。因此, 我们有必要研究 H5N1 亚型禽流感病毒对麻鸭致病性增强的相关分子机制。流感病毒各基因片段各有其特定功能, 因此, 我们利用反向遗传技术平台, 构建重组病毒, 探讨在不同毒力病毒骨架背景中, 各个基因片段对病毒毒力的影响。结果表明, PB2, PB1, PA, HA 单基因以及 3P 基因组合对病毒毒力有显著影响, 且这种影响在强毒毒株的骨架中比在弱毒骨架中要明显。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 病毒、细胞和载体:** A/mallard/Huadong/Y/2003(Y)分离自华东地区表观健康野鸭 A/mallard/Huadong/S/2005(S), 分离自华东地区一发病野鸭, 均经 SPF 鸡胚传代纯化, -70℃ 保存备用。H5 亚型禽流感标准阳性血清由国家流感中心提供, 病毒经血凝抑

基金项目: 国家科技支撑计划(2006BAD06A01); 江苏省高校重大基础研究项目(05KJA23016)

\*通讯作者: Tel: +86-514-87991416; E-mail: xfliu@yzu.edu.cn

作者简介: 唐应华(1981-), 男, 湖南东安人, 博士研究生, 研究方向为动物性病毒致病分子机理研究。E-mail: tyhlw@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-12-17; 修回日期: 2008-02-21

制试验(Haemagglutination Inhibition, HI)及测序鉴定, 均为 H5 亚型, RT-PCR, 克隆测序分析, 其 NA 基因均为 N1 亚型。pHW2000 转录/翻译载体<sup>[5]</sup>, 以及已克隆至 pHW2000 中的 A/Puerto Rico/8/34 (H1N1, PR8) 8 个基因的 cDNA (191~198, 分别编码 PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M 和 NS 基因), 均由美国 St. Jude 儿童医院 Webster R.G. 博士惠赠。转染用 COS-1 细胞用含 10% 小牛血清 DMEM 培养液培养。

**1.1.2 主要试剂、引物和仪器**: UNIQ-10 柱式总 RNA 提取试剂盒、T4 DNA ligase 购自上海 Sangon 公司, Expand High Fidelity PCR System、dNTPs (10 mol/μL)

等购自 Roche 公司, AMV 反转录酶(10 U/μL), RNa-sin(40 U/μL)购自 Promega 公司, pCR2.1<sup>®</sup>-T vector 和 Lipofectamine<sup>™</sup> 2000 转染试剂购自 Invitrogen 公司, *BsmB*, *Bsa*, *Bpi*, *Nsi* 等限制性内切酶购自 NEB 公司; PCR 仪购自 Applied Biosystems Co. Ltd, BIO-RAD 3000Xi 型电泳仪、UV-2000 紫外分析仪购自天能上海科技有限公司。在获得病毒的各个基因片段的完整序列后, 分析两毒株的 8 个基因中限制性酶切位点的情况, 设计用于构建转录/表达载体的引物, 两病毒中 M 和 NS 基因的引物参照龙进学及 Hoffmann 等<sup>[6,7]</sup>, 其它片段引物见表 1。

表 1 S 和 Y 病毒构建拯救质粒的引物

Table 1 Primer for S and Y isolate construction of rescue plasmid for S and Y viruses.

Primer name		Primer sequence(5' → 3')	Amplification length/bp
For S virus			
PB2	Ba-PB2-1 <sup>a</sup>	TATTGGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGTC	1560
	Ba-PB2-1d <sup>b</sup>	TATTGGTCTCTGATCCCGACCCTCAAGAAGCG	
	Ba-PB2-2u <sup>c</sup>	TATTGGTCTCAGATCAGAGAGGAAACGTGCTCCTGTCTC	814
	Ba-PB2-2	ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTCGTTTT TAAACAA	
PB1	Bm <sup>d</sup> -PB1-1	TATTCGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGCA	1269
	Bm-PB1-1d	ATTACGTCTCTCAGGACTCAATGAGGCTGTACC	
	Bm-PB1-2u	TTATCGTCTCACCTGGAATGATGATGGGCA	1117
	Bm-PB1-2	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGCATT	
PA	Bm-PA-1	TATTCGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGTAC	1144
	Bm-PA-1d	CCCGTCTCCGCCCCTTTA ATTGGC	
	Bm-PA-2u	TACGTCTCTGGGCACTCGGTGAGAACATGGC	1122
	Bm-PA-2	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTA CTT	
HA	S-Ba-HA-1	TATTGGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGGTT	1805
	S-Ba-HA-2	ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTG	
NP	Ba-NP-1	TATTGGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGTA	1594
	Ba-NP-2	ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTATTTTT	
NA	Ba-NA-1	TATTGGTCTCAGGGAGCA AAAGCAGGAGT	1427
	Ba-NA-2	ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGAGTTTTTT	
For Y virus			
PB2	Ba-PB2-1	Same as S virus	1357
	Y-Ns-PB2-1d <sup>e</sup>	TTATATGCATGCGGGTTTAATCTTTGGTTTG	
	Y-Ns-PB2-2u	TTATATGCATCAACTCCTGAGACATTTTCAAAAGGACGCA	1038
	Y-Bp-PB2-2 <sup>f</sup>	TATAGAAGACGCTATTAGTAGAAACAAGGTCGTTTT TAAACAAT	
PB1	Bm-PB1-1	Same as S virus	1269
	Y-Bm-PB1-1d	ATTACGTCTCTCAGGGCTCAATGAGGCTGTACC	
	Bm-PB1-2u	TTATCGTCTCACCTGGAATGATGATGGGCA	1117
	Bm-PB1-2L	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGCATTTTTT	
PA	Bm-PA-1	Same as S virus	1531
	Y-Bm-PA-1dm	TTATCGTCTCAGTCTTCCGTCGCCCTTCTTTGG	
	Y-Bm-PA-2um	TATTCGTCTCGAGACAAATCTATATGGATTC	734
	Bm-PA-2	Same as S virus	
HA	Ba-HA-1	TATTGGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGG	1805
	Ba-NS -2	ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGT	
NP	Ba-NP-1	Same as S virus	1594
	Ba-NP-2	Same as S virus	
NA	Ba-NA-1	Same as S virus	1427
	Ba-NA-2	Same as S virus	

Ba, Bm, Ns and Bp represents the restriction endonuclease of *Bsa*I, *Bsm*BI, *Nsi*I and *Bpi*I, and show in italic in primer sequence. The character at the end of the primer name, such as 1d means the reverse primer of the first fragment and 2u means the forward primer of the second fragment.

1.2 反转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR)及 PCR 产物的克隆、鉴定和准确全序列的获得

病毒 RNA 提取与 RT-PCR 均按试剂盒说明进行。将 PCR 产物电泳，切胶回收预期大小的目的片段，取胶回收产物与 pCR2.1®-T vector 连接。连接产物转化至 DH5α 感受态细胞，在 LB(IPTG+X-gal+Amp)平板上筛选白斑，常规方法小量提取质粒。质粒经酶切电泳初步鉴定后，再进行 PCR 鉴定。选择 3~5 个阳性克隆，送上海联合基因科技有限公司测序。选择正确的克隆用于构建拯救载体。

1.3 病毒基因拯救载体的构建

拯救载体的构建参考文献<sup>[8]</sup>报道的方法进行。连接于 pCR2.1-T vector 上的目的片段用相应的限制性内切酶进行酶切，电泳回收。目的片段与用 BsmB 酶切后电泳回收的线性 pHW2000 进行连接，连接产物转化至 DH5α 感受态细胞，在 Amp+LB 平板上筛选白斑，扩大培养，常规方法小量提取质粒。质粒初步电泳验证后，测序验证。对序列正确的拯救载体进行转化，扩大培养，用 QIAGEN 试剂盒提取高纯度质粒。

1.4 基因重排病毒的获得和鉴定

依次以 S 病毒为骨架，用 Y 病毒中的基因片段替换 S 病毒中相应的基因片段，构建基因重排病毒。相应的，以 Y 病毒为骨架，用 S 病毒中的基因片段替换 Y 病毒中相应的基因片段，构建基因重排病毒，详见表 2。用 PR8 的 8 个质粒作阳性对照，用 PR8

中的 7 个质粒作阴性对照。转染方法和步骤参照 Lipofectamine™2000 转染试剂说明及卢建红等<sup>[8]</sup>。

对拯救的基因重排病毒按照本文材料与方法的步骤中的 1.3 进行 RT-PCR 鉴定。扩增每一重排病毒的替换基因片段的部分序列，以及骨架病毒上的一个基因的部分序列，进行测序验证。

1.5 基因重排病毒在非免疫麻鸭上的 IVPI 测定

参照 OIE 标准<sup>[9]</sup>，病毒尿囊液用无菌 PBS 稀释 10 倍后经静脉接种 10 只 6 周龄非免疫麻鸭，0.1 mL/只，每隔 12 h 记录发病和死亡情况，连续观察 10 d，计算静脉接种致病指数(IVPI)。

2 结果

2.1 S 和 Y 病毒的转录/表达载体的构建

通过分别对 S 和 Y 病毒的 8 个基因片段进行 PCR 扩增后，经克隆测序验证，成功获得 22 段高保真序列的克隆。根据先前设计添加在各基因片段上的酶切位点，用相应的酶对各基因片段的克隆进行酶切。酶切条带经电泳，将目的条带进行胶回收，按各个基因片段的构建策略与事先酶切开的 pHW2000 载体相连。连接后的质粒转化挑斑。用相应引物进行 PCR 鉴定，经测序进行进一步鉴定，最终获得与预期符合的编码 S 和 Y 病毒的 PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M 和 NS 基因 16 个转录/表达载体。

表 2 基因重排病毒的构建及生物学特性  
Table 2 Construction and biological characterization of reassortant virus

Reassortant virus	Gene <sup>a</sup>								IVPI in mallards
	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS	
S-wt <sup>b</sup>	A/Mallard/Huadong/S/2005 (S) wild type virus								2.65
Y-wt	A/Mallard/Huadong/Y/2003 (Y) wild type virus								0
S-r <sup>c</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	2.45
Y-r	■	■	■	■	■	■	■	■	0
S-Y1	■	■	■	■	■	■	■	■	0.2
S-Y2	■	■	■	■	■	■	■	■	0.48
S-Y3	■	■	■	■	■	■	■	■	0.09
S-Y123	■	■	■	■	■	■	■	■	0
S-Y1235	■	■	■	■	■	■	■	■	0
S-Y4	■	■	■	■	■	■	■	■	0
S-Y46	■	■	■	■	■	■	■	■	0
S-Y78	■	■	■	■	■	■	■	■	2.19
Y-S123	■	■	■	■	■	■	■	■	0.475
Y-S1235	■	■	■	■	■	■	■	■	0.5
Y-S4	■	■	■	■	■	■	■	■	0.395
Y-S46	■	■	■	■	■	■	■	■	0.38
Y-S78	■	■	■	■	■	■	■	■	0

Gene<sup>a</sup>, black indicated the the viral gene origin from A/Mallard/Huadong/S/2005(S), gray indicated the the viral gene origin from A/Mallard/Huadong/Y /2003 (Y), wt<sup>b</sup>, wild type virus, r<sup>c</sup>, virus rescued from plasmid.

## 2.2 基因重排病毒拯救, 鉴定及其生物学活性

分别以 S 和 Y 病毒为骨架, 相互替换其中相应的片段, 构建基因重排病毒(表 2), 以探究各个基因或者基因组合对病毒在麻鸭上毒力的影响。

对获救的重排病毒进行 RT-PCR 和测序验证, 所测的目的序列与原来供体病毒的基因序列同源性在 99.9% 以上, 且个别碱基的变化没有引起氨基酸的突变, 说明每一重排病毒的基因均来自相应的供体病毒。阳性对照经接种鸡胚后收取尿囊液, 经 HI 试验验证为 H1 亚型, 而阴性对照没有产生病毒。

从表 2 可以看出, 当以 S 病毒为骨架, 单个替换 PB2, PB1, PA 基因时, 重组病毒的毒力显著下降; 另外组合替换其中的 3P 基因(S-Y123), 或 3P 和 NP(S-Y1235), 或单个替换 HA 基因(S-Y4), 或组合替换 HA 和 NA 基因(S-Y4,6), 获得的基因重排病毒在麻鸭上的毒力亦随之显著下降。但组合替换 M 和 NS 基因时, 获得的基因重排病毒在麻鸭上的毒力变化不大。可以得知, 在 S 病毒骨架上, PB2, PB1, PA 和 HA 单基因以及 3P 基因组合替换对病毒毒力有显著的影响, 而 NP, NA, M, NS 基因对病毒毒力无明显作用。

同样, 以 Y 病毒为骨架, 分别组合替换其中的 3P 基因(Y-S123), 或 3P 基因和 NP 基因(Y-S1235), 或替换单个 HA 基因(Y-S4), 或组合替换 HA 和 NA 基因(Y-S46), 获得的基因重排病毒在麻鸭上的毒力略有上升。但组合替换 M 和 NS 基因时, 获得的基因重排病毒在麻鸭上的毒力没有变化, 仍为对麻鸭不致病的病毒。可以推知, 在 Y 病毒骨架上, PB2, PB1, PA 和 HA 单基因以及 3P 基因组合替换对病毒毒力有显著的影响, 而 NP, NA, M, NS 基因对病毒毒力影响不明显。

## 3 讨论

### 3.1 聚合酶基因对毒力的影响

根据在 Influenza A Virus Genotype Tool ([www.flugene.org](http://www.flugene.org)) 上的比对, 可以得知, S 和 Y 病毒自身就是一个自然重组病毒。在本研究中, 将 3P 基因同时全部替换, 或者将其中的 PB2, PB1, PA 单独替换, 重组病毒的毒力显著下降。可能同 S 和 Y 病毒的 PB2 和 PB1 的来源不同有一定的关系, 类似于 1957 年的“亚洲大流感”(A/Singapore/1/57, H2N2) 和 1968 年的“香港流感”(A/NT/60/68, H3N2), 其 PB1 基因

均来源于禽类<sup>[10]</sup>。大部分研究表明 PB2 基因上的 Glu-627-Lys 的突变能提高病毒对哺乳动物的致病力。Labadies 等研究认为 PB2 和 PA 蛋白具有对病毒的核糖核蛋白体的转录/复制活性具有协同作用<sup>[11]</sup>。本研究中的 S-Y123 重组病毒在麻鸭上是无毒力的, 相反, 而 Y-S123 重组病毒在麻鸭上的毒力略有上升。可以推测, PB2 同 PB1 和 PA 基因有一定的协同作用, 病毒的 3P 基因组合对病毒的毒力有显著, 这种影响在强毒骨架比在弱毒骨架要显著。

### 3.2 血凝素基因对毒力的影响

HA 是流感病毒的主要表面抗原之一, 对病毒毒力有至关重要的作用<sup>[12-13]</sup>。本研究中的 S 和 Y 病毒的 HA 基因共有 15 个氨基酸差异, 其中值得注意的是在 HA<sub>1</sub> 和 HA<sub>2</sub> 之间的裂解位点区有 2 个氨基酸差异, 分别是在 322 位(以 H3 ORF 计; S, Leu; Y, Gln) 与 329(S, 缺失; Y, Lys)。而其它 13 个差异性氨基酸残基均与糖基化位点受体结合区的保守氨基酸无关。从结果可知, HA 基因对病毒毒力有重要影响。但是具体是 HA 上哪些特定的氨基酸位点对病毒毒力有影响, 有待于进一步研究。

### 3.3 其它基因对重排病毒毒力的影响

有关 NP、NA、M 和 NS 基因对流感病毒毒力的影响有许多报道<sup>[14-15]</sup>, 但在本研究中的 Y 和 S 病毒的 NP、NA、M 和 NS 四个基因对病毒在麻鸭上的毒力的影响不是很明显。

由此可以推知, PB2, PB1, PA 基因以及三者的组合, 另有 HA 基因, 对病毒的毒力均有一定影响, 且这种效应在对鸭致病性强的病毒骨架上表现更加明显, 在弱毒骨架上也有明显的影响, 但是程度不如在强毒骨架上显著。而 NP, NA, M 和 NS 基因在 H5N1 亚型 AIV 对麻鸭的毒力上的作用不是很明显。我们的研究结果可以提示禽流感病毒的对麻鸭的毒力受多基因控制, 且不同病毒骨架背景对病毒在麻鸭上的毒力有显著影响。

## 参 考 文 献

- [1] Rott R. Molecular basis of infectivity and pathogenicity of myxovirus. *Arch Virol* 1979, 59: 285-298.
- [2] Rott R, Orlich M, Scholtissek C. Correlation of pathogenicity and gene constellation of influenza A viruses. III. Nonpathogenic recombinants derived from highly pathogenic parent strains. *J Gen Virol*, 1979, 44(2): 471-477.

- [3] Tong N, Nobusawa E, Morishita M, *et al.* M protein correlates with the receptor-binding specificity of haemagglutinin protein of reassortant influenza A (H1N1) virus. *J Gen Virol*, 1998, 79(10): 2425–2434.
- [4] Zebedee SL, Lamb RA. Growth restriction of influenza A virus by M2 protein antibody is genetically linked to the M1 protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989(3); 86: 1061–1065.
- [5] 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(11): 6108–6113.
- [6] 龙进学, 吴艳涛, 张小荣, 等. H5N1 亚型禽流感病毒拯救体系的建立. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2006, 46(1): 55–59.
- [7] Hoffmann E, Stech J, Guan Y, *et al.* Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch Virol*, 2001, 146: 2275–2289.
- [8] 卢建红, 龙进学, 邵卫星, 等. 用反向遗传操纵技术产生致弱的 H5 亚型重组流感病毒. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2005, 45(1): 43–57.
- [9] World Organization for Animal Health. Avian influenza: H5N1 timeline. [http://www.oie.int/eng/info\\_ev/en\\_AI\\_factoids\\_H5N1\\_Timeline.htm](http://www.oie.int/eng/info_ev/en_AI_factoids_H5N1_Timeline.htm)
- [10] Kawaoka Y, Krauss S, and Webster R.G. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J Virol*, 1989, 63(11): 4603–4608.
- [11] Labadie K, Dos Santos Afonso E, Rameix-Welti MA, *et al.* Host-range determinants on the PB2 protein of influenza A viruses control the interaction between the viral polymerase and nucleoprotein in human cells. *Virology*, 2007, 362(2): 271–282.
- [12] Chen J, Lee KH, Steinhauer DA, *et al.* Structure of the hemagglutinin precursor cleavage site, a determinant of influenza pathogenicity and the origin of the labile conformation. *Cell*, 1998, 95(3): 409–417.
- [13] Li KS, Guan Y, Wang J, *et al.* Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature*, 2004, 430(6996): 209–213.
- [14] Kaverin NV, Gambaryan AS, Bovin NV, *et al.* Postreassortment changes in influenza A virus hemagglutinin restoring HA-NA functional match. *Virology*, 1998; 244(2): 315–321.
- [15] Li Z, Jiang Y, Jiao P, *et al.* The NS1 Gene Contributes to the Virulence of H5N1 Avian Influenza Viruses. *J Virol*, 2006, 80: 11115–11123.

## Virulence Changes of H5N1 Avian Influenza Virus after Gene Reassortment

Yinghua Tang, Peipei Wu, Daxin Peng, Jinxue Long, Pinghu Zhang,  
Wenjun Zhang, Yanfang Li, Wenbin Wang, Xiufan Liu\*

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

**Abstract:** [Objective] Recently H5N1 subtype avian influenza virus (AIV) is capable of mortality to aquatic bird. The molecular basis for the virulence of this virus is still poorly understood. [Methods] We characterized two H5N1 subtype viruses, A/mallard/Huadong/Y/2003 (Y) is nonpathogenic to mallard whereas A/mallard/Huadong/S/2005 (S) is highly pathogenic to mallard. Using reverse genetics, we constructed a series of single-gene or multiple-gene reassortants from these two viruses. [Results] Substitution of single-gene for PB2, PB1, PA (3P), HA and of combination for 3P gene resulted in complete attenuation of S virus in mallard. However, these corresponding substitutions only slightly increased virulence of Y virus in mallard. Other gene segments had little contribution to the virulence of both viruses. [Conclusion] These results indicate that the pathogenicity of H5N1 AIV to mallard was regulated by multiple gene segments, and these regulations had more sensitive effect on highly pathogenic virus backbone than on low pathogenic virus backbone.

**Keywords:** H5N1; pathogenicity; reverse genetics; mallard

Supported by the National Key Technologies R & D Program of China Plan Grant(2006BAD06A01) and the Jiangsu Advanced School Major Basic Science Research Plan Grant (05KJA23016)

\*Corresponding author. Tel: +86-514-87991416; E-mail: xfliu@yzu.edu.cn

Received: 17 December 2007/ Revised: 21 February 2008