

利用反向遗传操作技术产生 ZJI 株鹅源新城疫病毒

刘玉良 张艳梅 胡顺林 吴艳涛 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 利用反向遗传操作技术,将 ZJI 株鹅源新城疫病毒全基因组 cDNA 克隆(NDV3GM122)和含该毒株 NP、P 及 L 基因的 3 个表达载体(pCI-NP、pCI-P 与 pCI-L)共转染 BSR-T7/5 细胞,同时,将 NDV3GM122 与含新城疫病毒 La Sota 毒株 NP、P 及 L 基因的 3 个表达载体(pCIneoNP、pCIneoP 与 pCIneoL)进行共转染。通过间接免疫荧光实验(Indirect immunofluorescence assay, IFA)以及接种鸡胚后进行血凝(Hemagglutinin, HA)与血凝抑制(Hemagglutinin inhibition, HI)试验、RT-PCR 扩增和电镜观察,结果均证实全基因组 cDNA 克隆 NDV3GM122 与 La Sota 毒株表达载体共转染组产生了有血凝性的鹅源新城疫病毒,而 NDV3GM122 与 ZJI 株表达载体共转染组暂未检测到有血凝性的病毒。ZJI 株鹅源新城疫病毒的拯救成功为该病毒进行功能基因组研究和疫苗的研制等后续工作打下了基础。

关键词 反向遗传操作技术 鹅源新城疫病毒 鹅 病毒拯救

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2005)05-0780-04

新城疫(Newcastle disease, ND)是由新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)引起多种禽类发生高度死亡的一种急性传染病。我国自从 1997 年开始在鹅群中不断有 NDV 感染和发病死亡的报道,给养鹅业造成了很大的损失并严重威胁其他禽类的养殖^[1,2]。

反向遗传操作技术一般是指通过构建病毒的基因组 cDNA 克隆,在培养细胞或/和易感宿主中重新“复活”病毒,通过基因插入或缺失等方法修饰病毒的基因组序列,以此来进行病毒的功能基因组研究和新型疫苗的研制等,是近年分子病毒学研究领域中倍受瞩目的一门新型技术^[3-5]。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,在辅助质粒提供有关酶的作用下, 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,然后通过接种鸡胚来大量扩增病毒而获得拯救的 NDV^[4,5]。

本实验室在前期工作中对鹅源 NDV ZJI 分离株进行了全基因组测序^[6]、构建了全基因组 cDNA 克隆并进行了序列替换和修饰(文章待发表)以及构建了含该毒株 NP、P 与 L 基因的 3 个表达载体^[7]。在此基础上,本研究通过反向遗传操作技术,将该毒株全基因组 cDNA 克隆与 NDV La Sota 毒株的 3 个表达载体共转染 BSR-T7/5 细胞,通过接种 SPF 鸡胚来培养和扩增病毒,最后通过间接免疫荧光实验、血凝与血凝抑制试验、RT-PCR 扩增和电镜观察等进行鉴定,结果均表明成功拯救出了有血凝性的鹅源 NDV 强毒株。本研究在国内外首次成功拯救出鹅源 NDV,为进一步利用该反向遗传操作系

统对鹅源 NDV 进行功能基因组研究和毒力致弱突变株的构建等研究工作打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 毒株、细胞株、鸡胚、单克隆抗体和质粒 ZJI 株 NDV 由刘秀梵等^[2]分离鉴定(ICPI 为 1.89, MDT 为 51.6h);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,培养于含 1mg/mL G418 和 10% 小牛血清的 DMEM 中,9~11 日龄 SPF 鸡胚种蛋购自山东省 SPF 实验种鸡场;抗 ZJI 株 NDV HN 蛋白单克隆抗体(6B1)由胡顺林等制备(文章待发表);含 ZJI 株 NDV 全基因组 cDNA 的转录载体 NDV3GM122(文章待发表)和 NP、P 与 L 基因的 3 个表达载体(pCI-NP、pCI-P 和 pCI-L)由刘玉良等^[7]构建;含 NDV La Sota 毒株 NP、P 与 L 基因的 3 个表达载体(pCIneoNP、pCIneoP 和 pCIneoL)^[4]由荷兰动物科学与健康研究所的 Ben Peeters 教授惠赠。

1.1.2 试剂 DMEM 培养基和异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗鼠 IgG 购自 Sigma 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;抗生素 G418 购自 BD Biosciences 公司。

1.2 细胞和质粒的准备

将 5×10^5 BSR-T7/5 细胞接种于 35mm 细胞培养皿中,用含 1mg/mL G418 和 10% 小牛血清的 DMEM 培养过夜,约 60%~80% 铺满时用于转染。转染用质粒均用 QIAprep Spin Mini

基金项目:国家 973 项目(G19990199)、国家自然科学基金项目(39893290)、国家科技攻关项目(2004BA519A44)

* 通讯作者: E-mail: xfliu@mail.yzu.edu.cn

作者简介:刘玉良(1973-)男,内蒙古通辽人,博士研究生,主要从事分子病毒学研究。E-mail: ylliu1022@sohu.com

其他作者:龙进学,石火英,张小荣,张如宽

收稿日期:2005-03-24,修回日期:2005-05-31

Prep Kit 抽提后测定浓度和纯度,浓度在 $0.1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 以上且纯度在 $1.6 \sim 1.8 (OD_{260}/OD_{280})$ 之间的质粒用于转染。

1.3 共转染

取 $4\mu\text{g}$ 质粒 pCI-NP 以及 NDV3GM122、pCI-P 与 pCI-L 质粒各 $2\mu\text{g}$,充分混合,然后将混合物等体积分为两份,分别设为转染样品 A1 和 A2;取 $4\mu\text{g}$ 质粒 pCIneoNP 与 NDV3GM122、pCIneoP 和 pCIneoL 质粒各 $2\mu\text{g}$,充分混合,将混合物等体积分为两份,分别设为转染样品 B1 和 B2。将以上 4 个转染样品分别与 $12\mu\text{L}$ 转染试剂 SuperFect 混合,按转染试剂使用说明书分别进行共转染。同时以缺少 L 基因重组质粒即含有 3 个质粒的转染样品为阴性对照进行同样共转染。转染后 A1 和 B1 样品用于 IFA 检测,测定 HN 蛋白的表达。A2 和 B2 样品转染后按下述步骤接种鸡胚。

1.4 IFA 的检测

吸弃 A1 和 B1 的培养液上清,分别用丙酮:甲醇(1:1 混合, V/V)室温固定 10min;用 10mmol/L PBS(pH7.4)洗涤后,加稀释度为 1:1000 的单克隆抗体 6B1 于 37°C 温育 1h;同上洗涤 3 次后用 1:200 稀释的异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗鼠 IgG 于 37°C 孵育 1h;同上洗涤,再加适量超纯水轻轻洗涤一次,然后在倒置荧光显微镜下观察。

1.5 鸡胚接种扩增病毒

依细胞状态, A2 和 B2 样品转染后 48~96h,将转染样品转移到 -70°C 反复冻融 3 次,然后将全部转染细胞轻轻刮下,与细胞上清充分混合后接种 9~11 日龄 SPF 鸡胚,每个样品接种 3 枚, $0.2\text{mL}/\text{枚}$, 37°C 孵育。定时照胚,弃去 24h 内死亡胚。取出 24~96h 内死亡胚,96h 后冻死所有接种胚,收集尿囊液进行 HA 和 HI 试验。将无 HA 特性的同一样品尿囊液混合后继续进行鸡胚传代和 HA 与 HI 测定,方法同上。

1.6 HA 和 HI 的测定

将以上每一代收集的尿囊液按 OIE 标准均进行 HA 测定。HA 为阳性的样品用单克隆抗体 6B1 按 OIE 标准进行 HI 测定。HA 和 HI 试验中均以 NDV ZJI 母本毒株为阳性对照。HA 和 HI 检测均为阳性的尿囊液样品用 PBS(pH7.4)做 1:100、1:500 和 1:1000 不同倍数稀释后继续接种 SPF 鸡胚,每个稀释度接种 3 枚,培养后收集尿囊液做 HA 和 HI 检测。

1.7 RT-PCR 验证拯救病毒

将 HA 和 HI 检测均为阳性的尿囊液、HA 效价为阴性的尿囊液和阴性对照组收集的尿囊液同时进行 RT-PCR 反应,扩增 NDV P 基因片段以及 HN 基因区域长度约为 2.1kb 的片段。PCR 反应体系为:灭菌超纯水 $36.5\mu\text{L}$; $10\times$ Buffer $5\mu\text{L}$; dNTP(10mmol/L) $1\mu\text{L}$; 上、下游引物 $25\text{pmol}/\mu\text{L}$ 各 $1\mu\text{L}$; cDNA $5\mu\text{L}$; Expand High Fidelity Polymerase($3.5\text{U}/\mu\text{L}$) $0.5\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 94°C 4min, 94°C 35s, 54°C 45s, 72°C 2min, 25 个循环; 72°C 10min。取 $5\mu\text{L}$ PCR 产物在 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳观察结果。

1.8 电镜观察

将 HA、HI 和 RT-PCR 均为阳性的尿囊液 $6000\text{r}/\text{min}$ 离心 10min,取上清 $200\mu\text{L}$,用负染法进行处理,然后在透射电镜下

观察病毒粒子,具体方法参考文献[8]。

2 结果

2.1 免疫荧光检测结果

A1 和 B1 样品经固定、洗涤和用 6B1 单克隆抗体温育后,在倒置荧光显微镜下均可观察到特异性绿色荧光(图1),而对照组无特异性荧光(图略),表明共转染后,在辅助质粒提供有关酶的作用下,全基因组 cDNA 克隆已转录并表达 HN 蛋白,证明所构建的基因组 cDNA 克隆 NDV3GM122 具有转录活性,表达载体均具有表达活性。

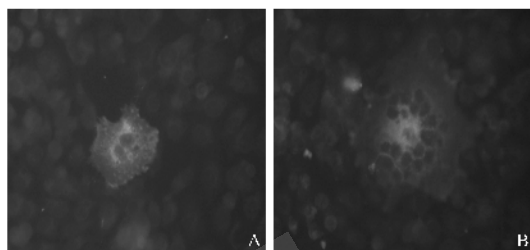


图1 转染样品 A 和 B 的间接免疫荧光鉴定($200\times$)

Fig.1 Identification of the samples A1 and B1 by IFA($200\times$)

A: The identification result of sample A1; B: The identification result of sample B1.

2.2 鸡胚扩增拯救病毒及 HA 和 HI 检测

A2 和 B2 转染样品接种鸡胚后,第 1 代收集的尿囊液均未检测到 HA 效价。将同一样品收集的不同鸡胚尿囊液混合后继续进行鸡胚传代,约 32h 左右 B2 样品尿囊液接种的 3 个鸡胚全部死亡,其尿囊液能检测到 HA 效价,HA 效价达到 1:16~1:32,继续进行鸡胚传代,效价升高到 1:128,与母本病毒效价一样。而阴性对照组无 HA 效价。用第 2 代和第 3 代尿囊液进行 HI 检测,结果血凝活性均被特异性抑制,表明已成功拯救出有感染性的 NDV,命名为 LaZJIR。而 A2 样品连续传 3 代,均未检测到有感染性的 NDV。

2.3 RT-PCR 扩增结果

取样品 B2 接种的并且 HA 和 HI 检测均为阳性的第 2 代尿囊液和样品 A2 接种的且在鸡胚连传 3 代其 HA 与 HI 测定均为阴性的尿囊液以及阴性对照组收集的尿囊液,分别进行 RNA 抽提和反转录,然后进行 PCR 扩增,结果样品 B2 能扩增出 P 基因片段(约 1.2kb)和 HN 基因区域的片段(约 2.1kb),目的片段大小与预期的一致,表明尿囊液中含有拯救的 ZJI 株 NDV 而非其他病毒。而样品 A2 和阴性对照组不能扩增出目的条带(图略)。

2.4 电镜观察

用透射电镜观察转染样品 B2 接种的第 2 代尿囊液和母本病毒 ZJI 株 NDV 接种的尿囊液,两个样品里均能观察到有囊膜的 NDV 颗粒,且二者形态相似(图2)。

3 讨论

1999 年,Peeters 等^[4]和 Roemer-Oberdoerfer 等^[5]几乎同时分别报道拯救成功 NDV La Sota 和 Clone30 毒株,这是 NDV 被

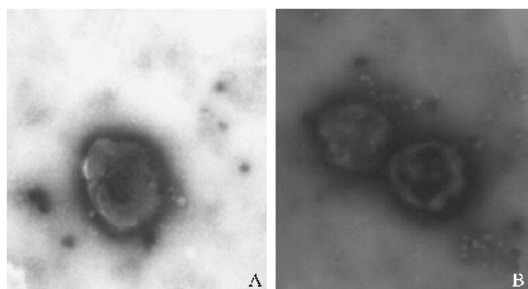


图2 拯救病毒和野生病毒的电镜观察(A: 110000 \times ; B: 135000 \times)

Fig. 2 Identification of the rescued virus and parent wild-type virus strain ZJI by electronic microscope

A: Rescued virus (110000 \times); B: Parent wild-type virus strain ZJI (135000 \times).

拯救成功的最早报道。接着, Hitchner B^[9]和 Beaudette C^[10]等 NDV 毒株被相继拯救成功。利用反向遗传技术,在 NDV 的毒力和致病性等方面均进行了很多有意义的探索工作^[11, 12]。不过,目前为止,拯救出的 NDV 均为弱毒疫苗株或中强毒株(Beaudette C 株),没有关于野生强毒株拯救成功的报道,而且,所拯救成功的毒株均为鸡源毒株而至今无鹅源毒株拯救成功的报道。

本研究利用反向遗传操作技术,将构建并经改造的 ZJI 株鹅源 NDV 全基因组 cDNA 克隆与 NDV La Sota 毒株的 NP、P 和 L 基因的 3 个表达载体克隆共转染 BSR-T7/5 细胞,在 3 个表达载体提供病毒复制所需的酶的作用下,基因组 RNA 复制出反基因组 RNA 和产生出各种 mRNA,进而表达出病毒各蛋白,最终出芽和包装成有感染性的病毒颗粒。本研究通过 IFA 测定、接种鸡胚后进行 HA 与 HI 检测、RT-PCR 扩增和电镜观察,结果均证实已成功拯救出具有血凝性的鹅源 NDV。转染后在鸡胚上传两代即能检测到病毒,传至第 3 代时血凝效价上升到与野生型病毒(ZJI 毒株)一样。鹅源强毒株的成功拯救在国内外均为首次报道。

在前期工作中,作者用所构建的以绿色荧光蛋白(GFP)为报告基因的微型基因组对 ZJI 株 NDV 的 3 个表达载体的表达功能进行了检测,结果证明 3 个表达载体的表达产物均具有功能活性^[13]。同时,从本研究 IFA 结果可知,含该毒株全基因组 cDNA 的转录载体也具有转录功能进而表达出 HN 蛋白。出乎意料的是,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 La Sota 毒株的 3 个表达载体克隆与 ZJI 株 NDV cDNA 克隆进行共转染却能拯救出有血凝性的 NDV。NDV La Sota 毒株与 ZJI 毒株的宿主来源不同,理论上应该用后者 4 个重组质粒更容易拯救出野生型病毒,但为何结果恰恰相反?其原因尚不知,有待于对此进行更深入的探讨和研究。值得一提的是,在拯救时虽然 3 个表达载体来自 La Sota 毒株,但 3 个表达载体的功能是提供 RNA 复制所需的复制酶和包装进核糖核蛋白复合物(RNPs)作为复制模板,进而最终组装成 NDV 粒子,因此,获救病毒的基因组核

苷酸(Nucleotide, nt)序列与原始病毒相同,并未发生变化,其遗传信息并未改变。虽然事实上在病毒拯救过程中污染野生型病毒或其它病毒的可能性非常小或几乎不可能,但从实验的严谨性、科学性上来说,需要在基因组 cDNA 克隆上设计遗传标记,只有这样才能使获救病毒的验证具有更大的说服力。本研究未设计遗传标记,是因在初期实验设计时预最大限度降低序列突变对拯救造成的不利影响,以便最大程度提高拯救效率,初步建立该毒株拯救系统。在同样条件下,阴性对照组不能转染出病毒,重复实验结果相同。另外, Ben Peeters 等也利用该全基因组克隆转染出血凝性的 NDV,得到了与本研究完全一致的结果(数据未列出),这些均充分说明了本研究结果的真实可靠性。最近在禽流感病毒^[14]和马传染性贫血病毒^[15]等一些病毒拯救成功的报道中也均未设计任何遗传标记。从实验的严谨性上考虑,本研究将通过定点突变技术来进行遗传标记的设计和进一步的病毒拯救,相关工作即将开展。

本研究利用反向遗传操作技术,首次成功地拯救出 ZJI 株鹅源 NDV,为后续相关研究工作如鹅源 NDV 的基因功能研究、基因突变减毒株的构建及新型疫苗的研制等打下了基础。

参考文献

- [1] 辛朝安,任涛,马开键,等. 鹅副粘病毒感染诊断初报. 养禽与禽病防治, 1997, 16(1): 5.
- [2] Liu X F, Wan H Q, Ni X X, et al. Pathotypical and genotypical characterization of strain of Newcastle disease virus isolated from outbreaks in chicken and goose flocks in some regions of China during 1985-2001. Arch Virol, 2003, 148(7): 1387-1403.
- [3] Radecke F, Billeter M A. Reverse genetics meets the nonsegmented negative-strand RNA viruses. J Med Virol, 1997, 7: 49-63.
- [4] Peeters B P H, de Leeuw O S, 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: 5001-5009.
- [5] Roemer-Oberdoerfer A, Mundt E, Mebatsion T, et al. Generation of recombinant lentogenic Newcastle disease virus from cDNA. J Gen Virol, 1999, 80: 2897-2995.
- [6] Huang Y, Wan H Q, Liu H Q, 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.
- [7] 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.
- [8] 洪涛. 生物医学显微结构与电子显微镜技术. 北京: 科学出版社, 1980: 511-520.
- [9] Nakaya T, Cros J, Park M S, et al. Recombinant Newcastle disease virus as a vaccine vector. J Virol, 2001, 75: 11868-11873.
- [10] Krishnamurthy S, Huang Z H, Samal S K. Recovery of a virulent strain of Newcastle disease virus from cloned cDNA: Expression of a foreign gene results in growth retardation and attenuation. Virology, 2000, 278: 168-182.

- [11] Huang Z H , Aruna P , Subbiah E . The hemagglutinin-neuraminidase protein of Newcastle disease virus determines tropism and virulence. *J Virol* , 2004 , **78** (8) :4176 – 4184.
- [12] Mebatsion T , Verstegen S , Leonarde T C , *et al.* A recombinant Newcastle disease virus with low-level V protein expression is immunogenic and lacks pathogenicity for chicken embryos. *J Virol* , 2001 , **75** : 420 – 428.
- [13] 张艳梅 , 刘玉良 , 黄 勇 , 等 . 鹅源新城疫病毒 ZJI 株微型基因组的构建及其初步应用 . 微生物学报 , 2005 , **45** (3) : 31 – 35.
- [14] 陈稚峰 , 张立国 , 董 婕 , 等 . 应用反向遗传学技术在哺乳动物细胞中产生甲型流感病毒 . 病毒学报 , 2002 , **18** (3) : 193 – 197.
- [15] 王 柳 , 童光志 , 仇华吉 , 等 . 马传染性贫血病毒弱毒疫苗株感染性分子克隆的构建 . 中国农业科学 , 2003 , **36** (12) : 1560 – 1565.

Generation of Newcastle disease virus strain ZJI isolated from an outbreak in the goose using reverse genetics technique

LIU Yu-liang ZHANG Yan-mei HU Shun-lin WU Yan-tao LIU Xiu-fan *

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

Abstract : The full-length cDNA clone , NDV3GM122 , and the three helperplasmids pCI-NP , pCI-P and pCI-L of Newcastle disease virus strain ZJI isolated from an outbreak in the goose were cotransfected into BSR-T7/5 cell expressing T7 RNA polymerase . Meanwhile , the full-length cDNA clone NDV3GM122 and the three helperplasmids , pCIneoNP , pCIneoP and pCIneoL which were derived from NDV strain La Sota , were also cotransfected into the cell , respectively . Indirect immunofluorescence assay (IFA) was performed 48 to 96 hours post-transfection using NDV HN-specific monoclonal antibody (McAb) 6B1 and bright stainings were found in the transfectants , indicating that the full-length clone was functional and the HN protein was expressed . The transfected cell and the supernatant were mixed well and thereafter the mixture was inoculated into specific pathogen free (SPF) chicken eggs . The allantoic fluid of the injected eggs gave a positive hemagglutinin (HA) titer ranging from 16 to 32 in the secondary passage and increased to 128 in the third passage , which was same to the level of parent wild-type virus . The allantoic fluid containing the recovered NDV was analyzed in hemagglutination inhibition (HI) test by using McAb 6B1 and the specific inhibition was found . The typical morphology of the produced NDV was detected in the electronic microscope . The results mentioned above demonstrated that infectious NDV of strain ZJI was successfully generated , which laid good foundation for the further related research .

Key words : Reverse genetics technique , Newcastle disease virus of goose origin , Goose , Rescue of virus

Foundation item : Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (G19990199) ; Chinese National Natural Science Foundation (39893290) ; Chinese National Program for Science and Technology Development (2004BA519A44)

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

Other authors : LONG Jin-xue , SHI Huo-ying , ZHANG Xiao-rong , ZHANG Ru-kuan

Received date 03-24-2005