

## 表达绿色荧光蛋白重组新城疫病毒 LaSota 疫苗株的构建

葛金英<sup>1,2</sup> 温志远<sup>2,3</sup> 王 永<sup>2,3</sup> 鲍恩东<sup>1</sup> 步志高<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> 南京农业大学动物医学院 南京 210095)

(<sup>2</sup> 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 哈尔滨 150001)

(<sup>3</sup> 内蒙古农业大学动物科学与医学学院 呼和浩特 010018)

**摘 要** 新城疫病毒是理想的新型活病毒疫苗载体,具有巨大的优势和应用前景。采用生产实践中广泛应用、免疫效果良好的 NDV LaSota 弱毒疫苗株,建立了反向遗传操作系统。在此基础上,进一步构建了表达绿色荧光蛋白(GFP)的重组 NDV 基因组 cDNA 克隆,成功救获了重组病毒 rLaSota-EGFP。病毒 F1 代尿囊病毒液按  $1 \times 10^4$  EID<sub>50</sub> 接种 9~10 日龄 SPF 鸡胚尿囊腔,接种后分别于 24h、48h、72h 及 96h 收获尿囊液,检测平均 HA 滴度分别为  $2^8$ 、 $2^{10.3}$ 、 $2^{11.3}$  和  $2^{11}$ ,每 mL 尿囊液病毒量 EID<sub>50</sub> 分别为  $10^{8.64}$ 、 $10^{9.22}$ 、 $10^{9.21}$  和  $10^{9.64}$ 。重组病毒与亲本株生长滴度在相近时间达到峰值,生长动力学特性与亲本株无明显差异。各代次重组病毒按  $1 \times 10^6$  EID<sub>50</sub> 病毒量接种 9~10 日龄 SPF 鸡胚,96h 内完全不致死鸡胚。救获重组病毒保持了 LaSota 弱毒疫苗亲本毒株对鸡胚良好的高滴度生长适应和低致病特性,并且鸡胚连续传 9 代次仍保持 GFP 的稳定表达及生物学特性不变。重组病毒 rLaSota-EGFP 的成功救获为开展新城疫病毒活载体疫苗研制提供了可行的技术平台。

**关键词:** 新城疫;绿色荧光蛋白;反向遗传操作;活载体疫苗

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2006)04-0547-06

新城疫(Newcastle disease, ND)是危害世界养禽业的重大烈性传染病。新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)为不分节段单股负链 RNA 病毒(non segment negative single strain virus),是副粘病毒科的重要成员和模型病毒。重组 NDV 作为活病毒疫苗载体具有极为突出的优点,NDV 弱毒疫苗长期以来一直用于家禽防疫,其安全有效性已被充分证明,NDV 遗传相对稳定,仅有一个血清型,毒株间发生重组及毒力返强可能性极小;复制过程在细胞浆内完成,从 RNA 到 RNA,不存在 DNA 阶段及细胞基因组整合的可能;NDV 弱毒疫苗可同时诱导全身性体液免疫、局部粘膜免疫及细胞免疫的形成,具有确实的免疫保护作用<sup>[1~3]</sup>;可通过饮水、喷雾、滴鼻、点眼或注射等多种方式给苗,使用极为方便;NDV 具有高滴度的鸡胚生长特性,生产成本极为低廉<sup>[4~6]</sup>。NDV 弱毒疫苗免疫在我国养禽业几乎是所有新生雏鸡必不可少的免疫程序,LaSota 毒株所有这些突出的特点使得该疫苗成为最具吸引力的重组活病毒疫苗载体。NDV 为高度传染性和高度致死性的家禽疫病原,我国每年用于新城疫防治的弱毒疫苗至

少在百亿羽份以上。NDV 作为活病毒疫苗载体应用的经济意义十分巨大。

NDV 基因组全长 15186 核苷酸,有 6 个独立转录单元,分别编码核蛋白(NP)、磷蛋白(P)、基质蛋白(M)、融合蛋白(F)、血凝集素神经氨酸酶蛋白(HN)和大聚合酶蛋白(L),NDV 和其它负链 RNA 病毒一样,其最小感染单位是核糖核蛋白复合物,无蛋白包裹的 RNA 本身并无感染性。NDV 的基因组 RNA 与 NP、P、L 蛋白共同组成核蛋白复合体,启动 RNA 的首轮转录及病毒蛋白的翻译合成、产生感染性子代病毒。根据这一原理,1999 年欧洲学者率先建立了第一个高致病性 NDV 的反向遗传操作系统(Reverse genetic system, RGS 系统)<sup>[7]</sup>。研究表明,NDV 基因组在不同位点插入外源报告基因或免疫原基因,经细胞或鸡胚连续高代次传代仍保持高度的遗传和表达稳定性。我们采用生产实践中广泛应用、免疫效果良好的 NDV LaSota 弱毒疫苗株,建立了相应的反向遗传操作系统。在此基础上,进一步构建了表达绿色荧光蛋白(GFP)的重组 NDV 基因组 cDNA 克隆,救获了重组病毒 rNDV-GFP,救获的重组

基金项目:国家十五科技攻关项目(2004BA519A19、2005BA711A10);国家 973 项目(2005CB523200)

\* 通讯作者。Tel: 86-451-85935062; E-mail: zgh@hvri.ac.cn

作者简介:葛金英(1976-),女(蒙古族),黑龙江人,博士研究生,主要从事分子病毒学研究。E-mail: gjy2003@163.com

收稿日期:2005-09-05;接受日期:2005-11-22;修回日期:2006-01-25

病毒保持了 LaSota 弱毒疫苗亲本毒株对鸡胚良好的高滴度生长和低致病特性,经鸡胚连续传 9 代次仍保持 GFP 的稳定表达,主要生物学特性不变。本研究为开展多价新城疫病毒活载体疫苗研制提供了充分可行的载体平台。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞和病毒:**稳定表达 T7 聚合酶的 BSR-7 细胞系由 karl-klaus conzelmann 博士惠赠,培养基为含 10% 胎牛血清及  $1\mu\text{g/mL}$  G418 的 DMEM;NDV LaSota 疫苗株由本研究室保存,接种 9~10 日龄 SPF 鸡胚尿囊腔扩增后  $-70^\circ\text{C}$  冻存备用;鸡抗 NDV 高免疫血清由本研究室制备;SPF 鸡胚及 SPF 鸡雏均由哈尔滨兽医研究所 SPF 实验动物中心提供。

**1.1.2 试剂和仪器:**Taq 酶、T4 DNA 连接酶及其它限制性内切酶均购自 TaKaRa 公司,磷酸钙转染试剂盒(Calcium phosphate Transfection Kit)购自 Invitrogen;荧光显微镜为 Leica DM IRB,购自 Leica 公司。

### 1.2 转录载体的构建

基因组 RNA 转录载体 pBTRT 以低拷贝克隆载体 pBR322 为骨架并在 *EcoR* I / *sal* I 位点插入 T7 启动子(T7 promoter)、丁肝病毒核酶(Rib)和 T7 转录终止信号(T7 terminator),由本实验室自行构建。克隆在 T7 启动子和核酶之间的 DNA 片段可以在 T7 RNA 聚合酶的作用下得到转录,并且由于 Rib 的自身催化功能,可以保证转录产物的 3' 末端与克隆的 DNA 片段精确一致。

### 1.3 表达 GFP 重组基因组全长 cDNA 的构建

NDV LaSota 疫苗株病毒接种鸡胚尿囊液按常规方法提取病毒基因组负链 RNA,整个基因组分为末端部分重叠的 10 个片段(F1~F10)进行 RT-PCR 扩增,cDNA 片段克隆至 pBluescript(Clontech) *Sma* I 位点并经序列分析确证与病毒基因组 RNA 序列完全一致;为引入特异的分子遗传标签,选择 LaSota 疫苗株基因组 cDNA 6172bp 处存在一甲基化的 *Xba* I 位点,序列为 TCTAGATCA,利用 PCR 手段将其突变为 TCTAGACCA,使其不再受甲基化酶识别,因而能够被限制性内切酶 *Xba* I 所识别;利用相邻片段重叠部分存在的限制酶切位点连接成组装完整的 NDV 基因组 cDNA,并克隆在转录载体 pBTRT 上,进一步通过 PCR 方法在 cDNA 第 3165nt 处引入 *Pme* I 限制酶切位点(GTTTAAAC),构建成重组 NDV 病毒基因组转录载体 pBRN-FL-PmeI;再以 pIRES-GFP

(Clontech)为模板,通过 PCR,在 GFP 的 ORF 5' 端引入 *Pme* I 限制酶识别序列和 NDV 自身聚合酶 L 识别的转录终止序列 GE(TTAAGAAAAA)及转录起始序列 GS(ACGGGTAGAA),在 GFP 的 ORF 3' 端引入 *Pme* I 限制酶识别序列;PCR 末端经 *Pme* I 酶切插入 pBRN-FL-PmeI,并确保重组基因组 cDNA 全长总碱基数仍保持 6 的倍数,构建的表达 GFP 重组基因组全长 cDNA 克隆命名为 pBRN-FL-GFP;表达核蛋白(NP)、磷酸蛋白(P)及大聚合酶蛋白(L)基因的开放阅读框架(ORF) cDNA 分别克隆在 pBblescript(+/-)质粒 T7 启动子下游,分别构成转录辅助质粒 pBSNP、pBSP 和 pBSL。

### 1.4 病毒拯救及扩增

BSR-7 细胞接种于 35mm 六孔板内生长达 50%~80% 单层时,转录质粒及辅助质粒 pBRN-FL-GFP、pBSNP、pBSP 和 pBSL 分别以  $5\mu\text{g}$ 、 $2.5\mu\text{g}$ 、 $1.25\mu\text{g}$  共转染 BSR-7 细胞,采用  $\text{CaPO}_4$  转染试剂盒,操作按试剂盒说明书进行。转染后 8~12h,弃去转染混合物,用含 10% DMSO 的 PBS 液体洗细胞 2.5min,加入完全 DMEM 过夜孵育,第二天换成无血清培养基,并加入 TPCK( $1\mu\text{g/mL}$ )继续孵育 2~3d 后,收获培养物上清,  $0.22\mu\text{m}$  孔径滤器过滤后接种 9~11d 的 SPF 鸡胚尿囊腔,接种后的 SPF 胚继续培养 3~5d,取鸡胚尿囊液  $50\mu\text{L}$  按常规进行新城疫病毒的血凝(HA)和血凝抑制(HI)试验。收获 HA 及 HI 试验结果阳性尿囊液,  $-70^\circ\text{C}$  冻存,并按常规方法分别于 9~10 日龄鸡胚尿囊腔接种进行传代、 $\text{EID}_{50}$  滴定及鸡胚生长动力学测定<sup>[12]</sup>。

### 1.5 GFP 表达检测

收获病毒 9~10 日龄鸡胚传代,收获病毒尿囊液分别取  $50\mu\text{L}$  体积 DMEM  $10^{-4}$  倍数稀释的病毒液接种生长于 24 孔板的原代 CEF 细胞,  $37^\circ\text{C}$  孵育 1h 后用 DMEM 洗涤 3 遍,然后加入完全 DMEM 继续培养 24h 后荧光显微镜直接观察 GFP 蛋白在感染细胞的表达结果。

## 2 结果

### 2.1 重组 NDV LaSota 株基因组 cDNA 的构建

为建立 NDV 新城疫 LaSota 疫苗株的反向遗传操作系统,必须首先构建相应基因组的全长 cDNA 克隆,作为基因组负链 RNA 转录模板,为此构建了覆盖整个基因组的 10 个 cDNA 克隆片段,利用各个片段间重叠部分的酶切位点,在低拷贝质粒转录载体 pBTRT 连接组装获得了 15186nt 的完整

cDNA 克隆(图 1-A)在全长 cDNA 片段 5'端前缀 T7 RNA 聚合酶启动子,在 cDNA 片段后连有具有自我催化功能的肝炎  $\delta$  核酶(Rib)和 T7 转录终止信号;在此基础上,进一步利用基因 cDNA 3165nt 处 PCR 引入 *Pme* I 位点,插入 5'端引入了 NDV L 聚合酶特异的转录调控序列 GE 和 GS 的 EGFP 基因,构建成表达 GFP 的重组 NDVcDNA 克隆 pBRN-FL-EGFP(图 1-B)。与其他研究者一样,我们同时在 T7 聚合酶启动子于基因组 cDNA 的 5'末端引入两个多余的 G,根据其他研究者的经验可能有助于副粘病毒反向遗传操作的病毒拯救。

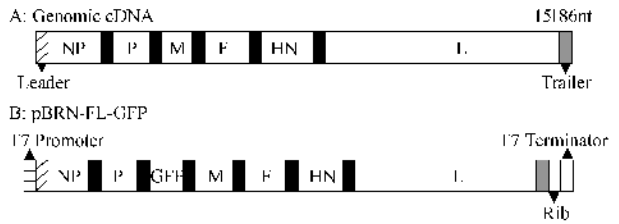


图 1 带有 EGFP 基因的 NDV 基因组的构建  
Fig. 1 Construction of cDNAs encoding NDV antigenomic DNA containing the GFP gene.

2.2 从 cDNA 克隆救获感染性重组 NDV

为了从克隆的 cDNA 中拯救感染性 NDV,以 pBRN-FL-GFP 及表达 NDV NP、P、L 蛋白的辅助质粒共转染 BSR-7 细胞。NDV 的融合蛋白 F0 必须裂解成 F1 和 F2 才具有感染性,对于 LaSota 弱毒株而言,BSR-7 细胞不能分泌裂解 F0 蛋白所需的蛋白酶,因此换成无血清培养基并加入蛋白酶 TPCK (1 $\mu$ g/mL)继续培养 2~3d,收获转染细胞上清接种于 9~11 日龄的 SPF 鸡胚。4d 后收获鸡胚尿囊液,血凝(HA)试验结果阳性,不同鸡胚的 HA 价介于 2<sup>9~11</sup>;NDV 免疫血清血凝抑制(HI)试验分析同样呈现阳性结果。收获病毒阳性尿囊液作为救获病毒 rNDV 的 F1 代。进一步的 RT-PCR 及序列分析结果显示,F1 代救获病毒基因组 cDNA 与用于转染的重组 cDNA 克隆序列完全一致,和预期相符。结果表明通过反向遗传操作技术,利用 NDV LaSota 疫苗株基因组 cDNA 克隆成功地救获具有感染性的重组子代病毒 rLaSota-EGFP。

2.3 重组病毒在鸡胚的生长特性及致病特性

为确定反向遗传操作救获 rLaSota-EGFP 的鸡胚生长特性及其对鸡胚的致病性,rNDV 及 rNDV-GFP 病毒 F1 代尿囊病毒液按 1 $\times$ 10<sup>4</sup>EID<sub>50</sub>接种 9~10 日龄 SPF 鸡胚尿囊腔,接种后分别于 24h、48h、72h 及 96h 收获尿囊液,检测平均 HA 滴度分别为 2<sup>8</sup>、2<sup>10.3</sup>、

2<sup>11.3</sup>和 2<sup>11</sup>,每 mL 尿囊液病毒量 EID<sub>50</sub> 分别为 10<sup>8.64</sup>、10<sup>9.22</sup>、10<sup>9.21</sup>和 10<sup>9.64</sup>,而 rNDV 每 mL 尿囊液病毒量 EID<sub>50</sub> 分别为 10<sup>8.54</sup>、10<sup>8.64</sup>、10<sup>9.56</sup>、10<sup>9.43</sup>。重组病毒与亲本株生长滴度在相近时间达到峰值,生长动力学特性与亲本株无明显差异。rLaSota-EGFP 病毒 F1 代在 9~10 日龄 SPF 鸡胚连续传 9 代,各代次 72h 时收获鸡胚尿囊液 HA 价分别介于 2<sup>8</sup>至 2<sup>12</sup>(表 1),各代次重组病毒按 1 $\times$ 10<sup>6</sup>EID<sub>50</sub>病毒量接种 9~10 日龄 SPF 鸡胚,96h 内完全不致死鸡胚。结果表明表达 GFP 重组新城疫病毒 rLaSota-EGFP 仍然稳定保持 NDV LaSota 疫苗亲本株在鸡胚的高滴度生长及低致死的遗传特性。

2.4 rLaSota-GFP 外源报告基因的稳定表达

NDV LaSota 疫苗株能一过性感染体外培养的哺乳动物细胞。为证明 rLaSota-EGFP 病毒在 BSR 细胞内的复制及插入外源报告基因 GFP 在传代过程中仍然能够保持稳定表达,rLaSota-EGFP 鸡胚尿囊腔接种连续传代 9 次,各代次鸡胚尿囊病毒液分别 10 倍连续梯度稀释 100 $\mu$ L 体积接种 24 孔板培养 CEF 细胞,24h 后荧光显微镜直接观察结果(图版 I-A),根据镜下表达强阳性绿色荧光蛋白的细胞数量,确定各代次 rLaSota-EGFP 每毫升蚀斑形成单位(PFU)介于 10<sup>9</sup>~10<sup>10</sup>之间(表 1)。

表 1 rNDV-EGFP 中 GFP 的稳定表达			
Table 1 Stable expression of GFP in recombinant NDV-EGFP			
Passages	HA titers	PFU/mL	GFP expression
F1	2 <sup>9</sup>	8 $\times$ 10 <sup>9</sup>	+
F2	2 <sup>8</sup>	2 $\times$ 10 <sup>9</sup>	+
F3	2 <sup>10</sup>	4 $\times$ 10 <sup>10</sup>	+
F4	2 <sup>11</sup>	2 $\times$ 10 <sup>10</sup>	+
F5	2 <sup>10</sup>	8 $\times$ 10 <sup>9</sup>	+
F6	2 <sup>10</sup>	3 $\times$ 10 <sup>10</sup>	+
F7	2 <sup>8</sup>	4 $\times$ 10 <sup>9</sup>	+
F8	2 <sup>10</sup>	1 $\times$ 10 <sup>10</sup>	+
F9	2 <sup>12</sup>	2 $\times$ 10 <sup>9</sup>	+

3 讨论

重组 NDV 活载体疫苗亲本株的生物学特性,特别是在宿主体内的复制能力对疫苗的免疫原性及有效性具有重要影响。2001~2002 年,Palese 等<sup>[5]</sup>相继构建表达 H1 亚型流感病毒 HA 免疫原基因的重组 NDV B1 株和表达 H7 亚型流感病毒 HA 免疫原基因的重组 NDVB1 株,免疫试验表明这两种 NDV 活载体疫苗可分别在小鼠和禽类诱导保护性免疫反应。但是由于 R1 本身高度致弱,在免疫接种鸡体

内的复制能力较差,因而诱导免疫鸡形成有效免疫保护的能力也相对较弱,试验表明,表达 H7 亚型 HA 基因的 NDV B1 株对 NDV 及 H7 亚型高致病力禽流感致死性攻击的存活保护分别仅为 60% 和 40%,且不能阻止病毒在体内的复制和排放。2004 年, Samal 等<sup>[4]</sup>采用体内复制能力较强,免疫原性良好的 LaSota 疫苗株为活载体,构建了表达传染性法氏囊病毒( IBDV )变异株 GLS-5 的重组新城疫病毒,免疫 2 日龄雏鸡,结果可有效抵御 IBDV 变异株及新城疫强毒的攻击,保护率均为 100%。为此,我们选择生产中广泛应用、实践证明免疫效果良好的一株 NDV LaSota 弱毒疫苗,作为构建重组 NDV 活载体疫苗的亲本株,以确保未来重组活载体疫苗的免疫保护效果。

重组 NDV 复制能力强、生长滴度高对其活毒疫苗降低制备成本、生产应用的经济可行性以及确保有效免疫剂量具有重要意义。外源基因在基因组内的插入位置可对重组 NDV 的鸡胚复制、生长能力产生显著影响。Peeters 等<sup>[13]</sup>以人类分泌性碱性磷酸酶基因为外源基因,分别插入 NP-P 之间、M-F 之间、H-L 之间或 L-基因组 5'末端非编码区之间。结果表明,上述位点插入外源基因后,重组病毒生长滴度复制较非重组野生型毒株均有不同程度的降低,且病毒滴度高峰的出现也较野生型后移;Palese 和 Samal 等分别以 Cat 报告基因插入 P-M 之间、基因组 3'-NP 之间,也观察到了重组型病毒滴度高峰的出现较野生型后移,但病毒生长滴度较野生型仅有 1~2 倍的下降<sup>[1,44,45]</sup>。同时,外源基因的插入位置还可能对其表达水平产生显著影响,一般认为,外源基因插入位置越接近基因组 3'末端其病毒蛋白表达水平越高,但对有些外源免疫原蛋白,特别是一些病毒囊膜糖蛋白,表达后可装配于 NDV 表达粒子的表面,过高的表达有可能影响到重组病毒在体内的感染、复制、甚至遗传稳定性。综合考虑诸方面因素,我们选择 P-M 之间为重组 NDV 外源基因的插入位置,结果重组病毒 rLaSota-EGFP 与非重组野生型亲本毒株相比,生长特性未发生明显下降,鸡胚接种后 72h 同样可达到  $10^{8.38}$  EID<sub>50</sub> 的高水平病毒滴度,并且连续传代外源基因保持高水平的稳定表达。结果表明, rLaSota 是非常具有应用前景的活病毒疫苗载体系统。

## 参 考 文 献

- [1] Nakaya T, Cros J, Park MS, et al. Recombinant Newcastle disease virus as a vaccine vector. *Journal of Virology*, 2001, **75**:11868 - 11873.
- [2] Huang Z, Elankumaran S, Panda A, et al. Recombinant Newcastle disease virus as a vaccine vector. *Poultry Science*, 2003, **82**:899 - 906.
- [3] Neumann G, Whitt AM, Kawaoka Y. A decade after the generation of a negative-sense RNA virus from cloned cDNA-what have we learned? *Journal of General Virology*, 2002, **83**:2635 - 2662.
- [4] Huang Z, Elankumaran S, Yunus AS, et al. A recombinant newcastle disease virus (NDV) expressing VP2 protein of infectious bursal disease virus (IBDV) protects against NDV and IBDV. *Journal of General Virology*, 2004, **78**:10054 - 10063.
- [5] Swayne DE, Suarez DL, Schultz-Cherry S, et al. Recombinant Paramyxovirus type 1-Avian Influenza-H7 virus as a vaccine for protection of chickens against Influenza and Newcastle disease. *Avian Diseases*, 2002, **47**:1047 - 1050.
- [6] Engel-Herbert I, Ortrud W, Jens P, et al. Characterization of a recombinant Newcastle disease virus expressing the green fluorescent protein. *Journal of Virological Methods*, 2002, **108**:19 - 28.
- [7] Peeters BPH, Deleeuw 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. *Journal of Virology*, 1999, **73**:5001 - 5009.
- [8] Huang Z, Panda A, Elankumaran S, et al. The Hemagglutinin-Neuraminidase protein of Newcastle disease virus determines tropism and virulence. *Journal of Virology*, 2003, **78**:4176 - 4184.
- [9] Huang Z, Krishnamurthy S, Panda A, et al. Newcastle disease virus V protein is associated with viral pathogenesis and functions as an alpha interferon antagonist. *Journal of Virology*, 2003, **77**:8676 - 8685.
- [10] Mebatsion T, de Vaan LTC, de Haas N, et al. Identification of a mutation in editing of defective Newcastle disease virus recombinants that modulates P-Gene mRNA editing and restores virus replication and pathogenicity in chicken embryos. *Journal of Virology*, 2003, **77**:9259 - 9265.
- [11] Park MS, Garc a-Sastre A, Cros JF, et al. Newcastle disease virus V protein is a determinant of host range restriction. *Journal of Virology*, 2003, **77**:9522 - 9532.
- [12] 殷 震, 刘景华. 动物病毒学. 第二版. 北京:科学出版社, 1997, 330 - 343.
- [13] Zhao H, Peeters BPH. Recombinant Newcastle disease virus as a viral vector: effect of genomic location of foreign gene on gene expression and virus replication. *Journal of General Virology*, 2003, **84**:781 - 788.
- [14] Huang Z, Krishnamurthy S, Panda A, et al. High-level expression of a foreign gene from the most 3'-proximal locus of a recombinant Newcastle disease virus. *Journal of General Virology*, 2001, **82**:1729 - 1736.
- [15] Krishnamurthy S, Huang Z, Samal SK. 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.

## Rescue of a recombinant Newcastle disease virus expressing the green fluorescent protein

GE Jin-ying<sup>1,2</sup>, WEN Zhi-yuan<sup>2,3</sup>, WANG Yong<sup>2,3</sup>, BAO En-dong<sup>1</sup>, BU Zhi-gao<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

(<sup>2</sup> National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China)

(<sup>3</sup> College of Animal Science and Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

**Abstract** : A recombinant Newcastle disease virus (NDV) expressing the green fluorescent protein (GFP) was generated by applying reverse genetics techniques. The GFP open reading frame flanked by NDV transcription start and stop sequences was inserted between the phosphoprotein (P) and matrix protein (M) in a full-length cDNA clone of NDV LaSota vaccine strain. This plasmid transcribing antigenome RNA was cotransfected with helper plasmids expressing viral nucleoprotein, phosphoprotein and large protein into cells stably expressing T7 RNA polymerase. The rescued virus was first propagated in 10-day-old embryonated eggs and the allantoic fluid was used to infect primary chicken embryo fibroblasts (CEF) cells. The appearance of GFP in live infected cells confirmed further the recovery of a recombinant NDV (rNDV-GFP) expressing this reporter gene. Nine successive passages in embryonated chicken eggs were performed. Allantoic fluid samples were then titrated by a microtiter plate HA test. HA positive allantoic fluid were used for further egg passages. All the allantoic fluid samples were titrated by end point dilutions and infected cells were examined for the presence of GFP expression. To analyze virus growth, 10-day-old embryonated SPF chicken eggs were inoculated with  $1 \times 10^4$  EID<sub>50</sub> rNDV or rNDV-GFP. At 24, 48, 72 and 96 h p. i. the allantoic fluid of inoculated eggs containing live embryos was harvested and clarified by centrifugation. Supernatants were used for titration of EID<sub>50</sub> in 10-day-old embryonated SPF chicken eggs. rNDV and rNDV-GFP grew to similar titers ( $10^9$  EID<sub>50</sub>/mL). In order to test the virulence of rNDV-GFP, infectious allantoic fluid of rNDV-GFP were inoculated into embryonated SPF chicken eggs at  $1 \times 10^6$  EID<sub>50</sub>. No dead embryonated egg was found within 96 hours. The replication kinetics and pathogenicity in SPF embryonated eggs of rNDV-GFP did not differ significantly from that of the parent virus. LaSota is a widely used NDV live vaccine strain. The reverse genetic system established for this LaSota vaccine strain provided a useful platform for development of novel live viral vector vaccines in future.

**Keywords** : Newcastle disease virus ; GFP ; Reverse genetic ; LaSota ; Live viral vector vaccines

Foundation item : The 10th Five Years Chinese National Programs for Science and Technology Development (2004BA519A19, 2005BA711A10) ; Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2005CB523200)

\* Corresponding author. Tel 86-451-85935062 ; E-mail : zgb@hvri.ac.cn

Received 5 September 2005 / Accepted 22 November 2005 / Revised 25 January 2006