



基于双质粒拯救系统的新城疫病毒 LaSota 株的拯救

宗宪春, 段姝宇, 朱广美, 徐哲, 肖萌萌, 王丹, 贺怀悦, 王建忠*

吉林农业大学动物医学院 动物重大疫病微生态疫苗(药物)教育部工程研究中心, 吉林 长春 130118

宗宪春, 段姝宇, 朱广美, 徐哲, 肖萌萌, 王丹, 贺怀悦, 王建忠. 基于双质粒拯救系统的新城疫病毒 LaSota 株的拯救[J]. 微生物学报, 2024, 64(5): 1567-1579.

ZONG Xianchun, DUAN Shuyu, ZHU Guangmei, XU Zhe, XIAO Mengmeng, WANG Dan, HE Huaiyue, WANG Jianzhong. A two-plasmid rescue system for rescue of recombinant LaSota strain of newcastle disease virus[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(5): 1567-1579.

摘要: 传统新城疫病毒(newcastle disease virus, NDV)的拯救系统包括一个 cDNA 克隆质粒和分别表达 NDV 的核衣壳蛋白(NP)、磷蛋白(P)、聚合酶蛋白(L)的 3 个辅助质粒, 且必须满足 4 个质粒同时转染进入同一个宿主细胞才能完成病毒的组装, 效率相对低下。【目的】提高 NDV 的拯救效率, 并建立双质粒高效拯救系统。【方法】将 NP、P、L 基因表达盒串联克隆至真核表达载体 pCI 中, 构建为可同时表达 NP、P、L 蛋白的单辅助质粒 PCI-NPL; 同时, 采用分段克隆再拼接的方式, 将 NDV LaSota 株基因组 cDNA 克隆于真核表达质粒 pCI 的 CMV 启动子下游, 并分别在 P 和 M 基因中插入报告基因增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)、5'端引入锤头状核酶序列、3'端引入丁型肝炎病毒核酶序列, 构成全基因组转录质粒 pCI-LaSota-EGFP; 以 pCI-LaSota-EGFP 和 pCI-NPL 组成病毒拯救系统共转染至 BHK-21 细胞, 拯救获得重组子代病毒 rLaSota-EGFP, 并进行系列生物学特性鉴定。【结果】经 RT-PCR、荧光显微镜观察、Western blotting、生长特性测定等系列鉴定, 证明 rLaSota-EGFP 构建正确, 成功拯救获得了重组病毒 rLaSota-EGFP, 且与野生型(wild-type, WT) LaSota 具有相似的生物学特性。【结论】基于 CMV 启动子的 NDV 双质粒新型拯救系统构建成功, 为重组 NDV 及其他副黏病毒的高效拯救奠定了基础。

关键词: 反向遗传学技术; 新城疫病毒; 病毒拯救; 双质粒拯救系统

资助项目: 吉林省自然科学基金(20220101314JC)

This work was supported by the Jilin Provincial Natural Science Foundation (20220101314JC).

*Corresponding author. E-mail: wjzd2005@163.com

Received: 2023-11-30; Accepted: 2024-01-31; Published online: 2024-02-04

A two-plasmid rescue system for rescue of recombinant LaSota strain of newcastle disease virus

ZONG Xianchun, DUAN Shuyu, ZHU Guangmei, XU Zhe, XIAO Mengmeng, WANG Dan, HE Huaiyue, WANG Jianzhong*

Engineering Research Center of Microecological Vaccines (Drugs) for Major Animal Diseases, Ministry of Education, College of Veterinary Medicine, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin, China

Abstract: The conventional rescue system of newcastle disease virus (NDV) contains a cDNA clone plasmid and three helper plasmids expressing NDV: nucleocapsid protein (NP), phosphoprotein (P) and polymerase protein (L), respectively. These four plasmids have to be transfected into the same host cell simultaneously to complete the assembly of the virus, which is relatively inefficient. **[Objective]** To improve the rescue efficiency of NDV, this study aims to establish a two-plasmid rescue system. **[Methods]** The expression cassettes of NP, P, and L genes were constructed and sequentially cloned into the eukaryotic expression vector pCI to generate a single-helper plasmid, named pCI-NPL, capable of co-expressing NP, P, and L proteins. During this process, the genomic cDNA of the NDV LaSota strain was incorporated downstream of the CMV promoter in the pCI expression vector. Simultaneously, the reporter gene EGFP was inserted into the genome between the P and M genes, accompanied by the introduction of a hammerhead ribozyme sequence at the 5' end and a hepatitis delta virus ribozyme sequence at the 3' end. This culminated in the development of the full-genome transcriptional plasmid termed pCI-LaSota-EGFP. The two plasmids pCI-LaSota-EGFP and pCI-NPL were co-transfected as a two-plasmid system into BHK-21 cells to rescue the recombinant virus rLaSota-EGFP. The biological characteristics of the virus were then examined. **[Results]** RT-PCR, fluorescence microscopy, Western blotting, and growth characterization confirmed that rLaSota-EGFP was correctly constructed and expressed the foreign gene. The rescued recombinant virus rLaSota-EGFP had similar biological characteristics to wild-type (WT) LaSota. **[Conclusion]** A novel two-plasmid rescue system for NDV based on the CMV promoter was successfully established, laying a foundation for the efficient rescue of recombinant NDV and other paramyxoviruses.

Keywords: reverse genetics; newcastle disease virus; virus rescue; two-plasmid rescue system

新城疫病毒(newcastle disease virus, NDV)属于单负链病毒目(Mononegavirales)、副黏病毒科(Paramyxoviridae)、腮腺炎病毒亚科(Avulavirinae)、正禽腮腺炎病毒属(Orthoavulavirus)成员,为不分节段的单股负链RNA病毒。NDV基因组由6个结构蛋白基因以

及3'端的引导序列(leader sequence)和5'端的尾随序列(trailer sequence)组成,依次排列为3'-Leader-NP-P-M-F-HN-L-Trailer-5'。每个基因两侧都有转录起始(gene-start, GS)和终止(gene-end, GE)信号序列,用以调控基因转录的起始与终止,编码核衣壳蛋白(NP)、磷蛋白(P)、

基质蛋白(M)、融合蛋白(F)、血凝素-神经氨酸酶蛋白(HN)和 RNA 依赖聚合酶蛋白等 6 种结构蛋白^[1]。反向遗传技术的出现,为深入研究 NDV 基因功能、致病机制及其疫苗的开发提供了有力的工具。

自 1999 年第一株 NDV 拯救成功以来,NDV 拯救系统从最初依赖 T7 RNA 聚合酶,到利用真核细胞内广泛存在的 RNA 聚合酶 II 经历了多次完善^[2]。由于真核宿主细胞中不存在 T7 RNA 聚合酶,可以通过感染禽痘病毒(avian pox virus, FPV/T7)、痘苗病毒(vaccinia virus, MVA/T7)以及构建稳定表达 T7 RNA 聚合酶的细胞系 3 种方式使真核细胞表达 T7 聚合酶^[3]。RNA 聚合酶 II 是存在于所有真核细胞内的催化 DNA 转录产生 mRNA 的酶,可以识别多种启动子启动转录,其中 CMV 启动子的应用最为广泛。在病毒拯救系统的构建上,只需要将基因组 cDNA 克隆至真核表达载体 CMV 启动子的下游,转染至敏感细胞,即可简便高效地拯救出病毒。相较于传统 T7 RNA 聚合酶系统,基于 RNA 聚合酶 II 的病毒拯救系统操作简单便捷,且 RNA 聚合酶 II 具有自动校正的功能,保证了基因组转录的准确性,同时,排除了痘病毒的干扰,适用于大多数细胞系,具有非常显著的优势。RNA 聚合酶 II 反向遗传操作系统的出现极大地简化了负链 RNA 病毒的反向遗传操作程序,增加了病毒拯救的效率。

在病毒拯救过程中,模拟 NDV 自然感染机制,病毒基因组首先与核衣壳蛋白(NP)、磷蛋白(P)、聚合酶蛋白(L)结合,形成核糖核蛋白聚合物(ribonucleoprotein polymers, RNP)^[4],作为病毒的最小感染单位,将病毒基因组 RNA 转录为正链 RNA,并以此为模板合成病毒各结构蛋白,重新组装为完整子代病毒颗粒。这就要求在病毒拯救过程中至少需要基因组和 3 个辅助蛋白的参与,通常将基因组 cDNA 克隆质粒和 3 个辅

助质粒共转染至宿主细胞,而只有 4 个质粒同时进入同一个细胞才能完成表达组装,缺一不可^[5]。

因此,为了提高基因组转录质粒和辅助蛋白表达质粒进入同一个细胞的几率,本研究构建可同时表达 NP、P、L 蛋白的多启动子单辅助质粒,与基于 CMV 启动子构建的 NDV LaSota 株基因组转录质粒组成为双质粒拯救系统,以期通过减少转染质粒数量,增加 NDV 拯救效率,为 NDV 及其他负链 RNA 病毒更加简便、高效拯救系统的构建提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 毒株、细胞和质粒

鸡新城疫活疫苗(LaSota 株)购自哈药集团生物疫苗有限公司;BHK-21 细胞和哺乳动物表达载体 pCI (GenBank 登录号:U47119)均保存于吉林农业大学动物重大疫病微生物生态疫苗(药物)教育部工程研究中心。

1.2 试剂和抗体

2×PhantaMax Master Mix (Dye Plus) DNA 聚合酶、无缝克隆试剂盒购自 Vazyme 公司;限制性内切酶购自 ThermoFisher Scientific 公司;快速 T4 连接试剂盒、Alexa Fluor 555 标记驴抗小鼠 IgG(H+L)、荧光素-5-异硫氰酸酯(fluorescein-5-isothiocyanate, FITC)标记山羊抗兔 IgG(H+L)购自上海碧云天生物技术有限公司;HRP 标记山羊抗小鼠和抗兔 IgG (H&L)购自 Bioworld 公司;辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)和 FITC 标记山羊抗鸡 IgG(H&L)购自北京博奥森生物技术有限公司;鸡抗 NDV 高免血清、鼠源 NP 蛋白单抗、兔源 P 蛋白多克隆抗体和鸡源 L 蛋白多克隆抗体由吉林大学人与动物共患传染病实验室馈赠。

1.3 NDV 基因组 cDNA 克隆质粒构建

根据 NDV LaSota 基因组(GenBank 登录号:

AF077761)序列,将全基因组分为F1–F5五个末端重叠的不同片段进行分段克隆与拼接。提取NDV LaSota株基因组RNA,反转录为cDNA模板,以相应引物对(表1)扩增F1–F5段,并以两轮PCR分别在F1片段5'端引入锤头状核酶(hammerhead ribozyme, HamRz)序列和*Mlu*I酶切位点、在F5段3'端添加丁型肝炎病毒核酶(hepatitis delta virus ribozyme, HdvRz)结构序列和*Not*I酶切位点。在F1和F2片段之间(基因组3155–3162 nt)突变引入*Pme*I酶切位点。各基因片段插入克隆载体,经测序鉴定正确后,通过限制性内切酶依次从克隆载体上切下,以T4连接酶拼接克隆至pCI载体*Mlu*I和*Not*I位点之间,构成基因组全长质粒pCI-LaSota。

以pEGFP-C1质粒为模板,利用EGFP-F和EGFP-R引物对扩增EGFP基因开放阅读框(open reading frame, ORF),并经PCR在EGFP基因

ORF的5'端的*Pme*I酶切位点之后依次引入NDV自身转录调控元件GE序列(5'-TTAGAAAAA-3')、GS序列(5'-ACGGGTAGAA-3')和Kozak序列(5'-GCCACC-3')构成完整基因表达盒;通过最末端引入的*Pme*I位点插入到基因组全长cDNA克隆质粒pCI-LaSota的*Pme*I酶切位点处,构建为含EGFP报告基因的NDV基因组转录质粒pCI-LaSota-EGFP。

1.4 辅助质粒构建

以NDV基因组cDNA为模板分别通过PCR扩增NP、P和L基因ORF,其中L基因以*Xma*I酶切位点为界分为两段(L1和L2)扩增后再拼接(引物见表2),并在各基因ORF上游引入Kozak序列。根据NP和P基因两端引入的*Nhe*I和*Not*I酶切位点、L基因两端引入的*Xba*I和*Not*I酶切位点,分别连接至pCI载体相应多克隆位点处,记为pCI-NP、pCI-P、pCI-L。

表1 重组NDV基因组全长cDNA克隆构建引物

Table 1 Primers were used for construction of the recombinant NDV

引物名称 Primers	引物序列 Sequences (5'→3')	酶切位点 Restriction enzyme cutting sites
F1-PF2	<u>CGACGCGT</u>TCTGTTTGGTCTGATGAGTCCGTGAGGACGAACTATAGGAAAGG	<i>Mlu</i> I
F1-PF1	GGACGAACTATAGGAAAGGAATTCCTATAGTCACCAAACAGAGAATCCGTGA	
F1-PR	<u>GTTTAAACT</u>CTCCAAGCGGCAATCCTCTCTCGCT	<i>Pme</i> I
F2-PF	GG<u>GTTTAAACT</u>TTGGGTCTGCGGGGGGAA	<i>Pme</i> I
F2-PR	GTGGCTCTCATCTGG<u>TCTAGAGT</u>	<i>Xba</i> I
F3-PF	GCTTGGGAATAATACT<u>CTAGA</u>	<i>Xba</i> I
F3-PR	CCAGAATGCCGGGTCC<u>GCTACG</u>	<i>Bsi</i> W I
F4-PF	GCT<u>TCTAGAC</u>ATT<u>CGTACG</u>GATCCGGCAT	<i>Xba</i> I+B <i>si</i> W I
F4-PR	CAATATTGTCTAGGCCTCTTACT	<i>Stu</i> I
F5-PF	GCTCTAGACCTGAGAGTAAGAGGCCTAGACA	<i>Xba</i> I+ <i>Stu</i> I
F5-PR1	<i>TCCGATGCCAGGTCGGACCGCGAGGAGGTGGAGATGC</i> <i>CATGCCGACCCACCAAACAAAGATTTGGTGAAT</i>	
F5-PR2	<i>TTGCGGCCGCGCCCTCCCTTAGCCATCCGAGTGGACGT</i> <i>GCGTCTCCTTCGGATGCCAGGTCGGACCGCG</i>	<i>Not</i> I
EGFP-F	GG<u>GTTTAAACT</u>TTAGAAAAAATACGGGTAGAACGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGA GGAGCTG	<i>Pme</i> I
EGFP-R	GCGCG<u>GTTTAAACT</u>TACTTGTACAGCTCGTCCATGCC	<i>Pme</i> I

The restriction enzyme cutting sites were underlined; the hammerhead ribozyme (HamRz) and hepatitis delta virus ribozyme (HdvRz) sequences were bolded and in italic, respectively.

表 2 辅助质粒构建所用引物

Table 2 Primers used for construction of helper plasmids

引物名称 Primers	引物序列 Sequences (5'→3')	酶切位点 Restriction enzyme cutting sites
NP-PF	CCGGCTAGCGCCACCATGTCTTCCGTATTTGATG	<i>Nhe</i> I
NP-PR	TTGCGGCCGCTCAATACCCCCAGTCGGTGT	<i>Not</i> I
P-PF	CCGGCTAGCGCCACCATGGCCACCTTTACAGATGC	<i>Nhe</i> I
P-PR	TTGCGGCCGCTTAGCCATTTAGAGCAAGGC	<i>Not</i> I
L1-PF	GCTCTAGAGCCACCATGGCGAGCTCCGGTCCTGA	<i>Xba</i> I
L1-PR	CCCCCGGGTCACCGATATTTCT	<i>Xma</i> I
L2-PF	CCCCCGGGGACTACTGCTTTTG	<i>Xma</i> I
L2-PR	TTGCGGCCGCTTAAGAGTCACAGTTACTGT	<i>Not</i> I
NP-PolyA-PF	CGACGCGTGCCACCATGTCTTCCGTATTTGATGA	<i>Mlu</i> I
PolyA-PR	TGGCTAATGGCCAATATTGATACCACATTTGTAGAGGTTTTAC	
CMV-PF	ACCTCTACAAATGTGGTATCAATATTGGCCATTAGCCA	
NP-CMV-PR	GCTCTAGAGCCCGCGGCTGTGGAGAGAAAGGCAAAG	<i>Xba</i> I+ <i>Sac</i> II
P-PolyA-PF	TCCCCGCGGGCCACCATGGCCACCTTTACAGAT	<i>Sac</i> II
P-CMV-PR	GCTCTAGACTGTGGAGAGAAAGGCAAAG	<i>Xba</i> I

The underlines indicate the restriction enzyme cutting sites; the bolds indicate the Kozak sequences.

为构建可同时表达 NP、P 和 L 蛋白的多启动子单辅助质粒，通过 NP-PolyA-PF 和 PolyA-PR 引物对扩增 pCI-NP 质粒上 NP 基因和与其相连的 PolyA 尾记为 NP-PolyA，再通过 CMV-PF 和 NP-CMV-PR 引物 PCR 扩增 CMV 部分，并连接至 NP-PolyA 3'末端，构建为 NP-PolyA-CMV 结构。类似地，通过 PCR 扩增

获得 P-PolyA-CMV 结构。通过 NP-PolyA-CMV 片段两端引入的 *Mlu* I 和 *Sac* II 酶切位点及 P-PolyA-CMV 片段两端引入的 *Sac* II 和 *Xba* I 酶切位点，以 T4 连接酶分别将 NP-PolyA-CMV 片段和 P-PolyA-CMV 片段依次插入到 pCI-L 载体 *Mlu* I、*Sac* II、*Xba* I 位点之间，构建可同时表达 NP、P 和 L 蛋白的载体 pCI-NPL (图 1)。

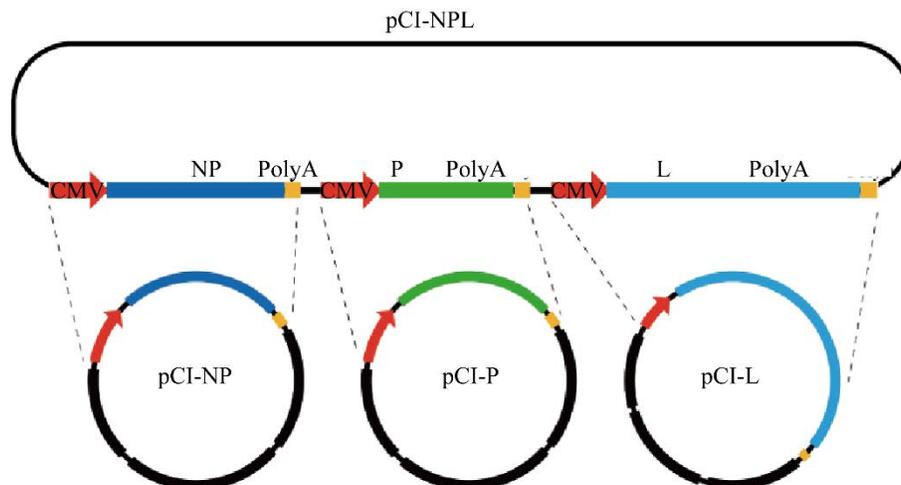


图 1 pCI-NPL 表达载体的构建策略

Figure 1 Construction strategy of the pCI-NPL expression vector.

1.5 载体 pCI-NPL 的间接免疫荧光鉴定

将生长良好的 BHK-21 细胞铺于 24 孔细胞板中, 在 5% CO₂ 培养箱中 37 °C 培养过夜, 以 Lipofectamine 3000 脂质体转染试剂按说明书将 pCI-NPL 转染至 24 孔板细胞内, 2.5 μg/孔。24 h 后, 弃细胞板内培养液, 加入 80% 冷丙酮固定 30 min, 弃掉丙酮, 以 PBS 清洗 3 次。分别以鼠源 NP 蛋白单克隆抗体、兔抗 P 蛋白血清、鸡抗 L 蛋白血清为一抗, 相应 Alexa Fluor 555 标记驴抗小鼠抗体、FITC 标记山羊抗兔 IgG 和 FITC 标记山羊抗鸡 IgG 为二抗进行免疫染色。经 PBST 洗涤后, 以 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染色试剂对细胞核染色, 于 Leica 正置荧光显微镜下观察细胞内荧光信号。

1.6 载体 pCI-NPL 的 Western blotting 鉴定

取生长状况良好的 BHK-21 细胞接种于 6 孔细胞板, 待细胞汇合度到 80%, 以 Lipofectamine 3000 脂质体转染试剂分别转染 pCI-NP、pCI-P、pCI-L 和 pCI-NPL 质粒, 2.5 μg/孔, 步骤如前所述。转染 48 h 后, PBS 清洗 6 孔板两次后加入 RIPA 裂解液 (RIPA:蛋白酶抑制剂:EDTA=98:1:1), 使用细胞刮刀将细胞收集到 1.5 mL 离心管中, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min 收集上清。加入 4× 上样缓冲液后煮沸 10 min。进行 SDS-PAGE, 上层浓缩胶以 80 V 电泳 30 min, 分离胶以 120 V 电泳 50 min。电泳结束后, 通过湿转法将蛋白从胶上转印至 NC 膜上。转印结束后将 NC 膜放于 5% 脱脂奶粉内室温摇床封闭 1 h, PBST (含 0.05% Tween 20 的 PBS) 清洗 3 次后, 分别以鼠源 NP 蛋白抗体、兔源 P 蛋白抗体、鸡源 L 蛋白抗体及 β-actin 抗体为一抗, 1:2 000 稀释辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗鼠 IgG、抗兔 IgG、抗鸡 IgG 为相应二抗进行 Western blotting 免疫检测, 于超灵敏多功能成像仪内曝光显影。

1.7 病毒拯救

准备生长良好的 BHK-21 细胞接种于 6 孔板, 第二天待细胞汇合度 80% 左右时, 以磷酸钙转染试剂盒将全基因组转录质粒 pCI-LaSota-EGFP 和辅助质粒 PCI-NPL 按照 1:1 共转染至 BHK-21 细胞, 5 μg/孔。细胞于 5% CO₂、37 °C 培养箱培养 12 h 后弃去转染混合物, 加入含 10% DMSO 的 PBS 缓冲液进行细胞休克 2.5 min。转染 48 h 后更换培养液为 Opti-MEM, 并加 TPCK 胰酶, 2 μg/孔。转染 96 h 后收获细胞上清, 0.22 μmol/L 滤器过滤后接种 9–11 日龄无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 鸡胚尿囊腔, 孵育 120 h 后收取鸡胚尿囊液进行血凝 (hemagglutinin, HA) 试验, HA 试验结果阳性者记为 rLaSota-EGFP, 保存于 -80 °C。

1.8 病毒 RT-PCR 鉴定

为了从基因水平鉴定拯救重组病毒正确性, 取含 rLaSota-EGFP 的第三代鸡胚尿囊液和 WT LaSota 病毒, 提取基因组 RNA, 反转录获取其 cDNA, 以 EGFP-F 和 EGFP-R 为引物扩增增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 序列, 经琼脂糖凝胶电泳检测分析。

1.9 重组病毒外源蛋白表达鉴定

为了进一步鉴定病毒并验证外源基因 EGFP 在 rLaSota-EGFP 感染的细胞中有效表达, 将生长良好的 DF1 细胞铺于 6 孔板, 在 5% CO₂ 培养箱中于 37 °C 培养过夜。用无血清 DMEM 将含 rLaSota-EGFP 的鸡胚尿囊液和 WT LaSota 尿囊液进行 10⁴ 稀释, 接种于 DF1 细胞中, 200 μL/孔, 于 5% CO₂、37 °C 温箱内孵育 1 h 后, 加入含 2% 血清的 DMEM 维持液继续于温箱内培养。每天观察并记录细胞内荧光信号及细胞病变效应 (cytopathy effects, CPE) 现象。

1.10 重组病毒外源蛋白 Western blotting 鉴定

取含 rLaSota-EGFP 的鸡胚尿囊液按 MOI=1 感染生长状态良好的 DF1 细胞。48 h 后弃去细

胞板内培养液, RIPA 裂解, 煮样变性后进行 Western blotting 分析。分别以 1:2 000 稀释兔抗 GFP 抗体、鸡新城疫病毒高免血清及鼠源 β -actin 单抗为一抗过夜孵育, 1:5 000 稀释 HRP 标记的山羊抗兔 IgG、山羊抗鸡 IgG 和山羊抗鼠 IgG 为二抗室温孵育 1 h, PBST 洗涤后以增强型化学发光试剂于超灵敏多功能成像仪内曝光显影。

1.11 病毒致病性检测

以灭菌生理盐水分别将 rLaSota-EGFP 和 WT LaSota 病毒稀释至 10^6 – 10^9 倍, 每个稀释度接种 5 枚 11 日龄 SPF 鸡胚尿囊腔, 100 μ L/枚。每日照蛋 2 次, 连续观察 7 d, 记录各鸡胚死亡时间, 计算鸡胚平均致死时间(mean death time, MDT)。

将 rLaSota-EGFP 和 WT LaSota 病毒尿囊液用灭菌的生理盐水 10 倍稀释, 脑内接种 10 只出壳 24–40 h 的 SPF 雏鸡, 接种量为 0.05 mL/只, 每天观察并打分, 正常鸡记为 0, 发病鸡记为 1, 死亡鸡记为 2。连续观察 8 d, 按世界动物卫生组织 (World Organization for Animal Health, WOAH) 标准计算脑内致病指数 (intracerebral pathogenicity index, ICPI)。

1.12 病毒鸡胚生长特性

分别将 rLaSota-EGFP 和 WT LaSota 病毒按

1×10^4 的半数感染量(EID_{50})接种鸡胚尿囊腔, 并分别在 24、48、72、96 h 收集尿囊液样品, 经 10 倍系列稀释后, 接种于 9–11 日龄鸡胚, 0.1 mL/胚, 每个稀释度接种 4 枚重复胚, 5 d 后收取鸡胚尿囊液进行血凝(HA)检测, 根据 Reed-Muench 法计算 EID_{50} 。

1.13 统计学分析

使用数据分析软件 GraphPad Prism 9.0 进行统计分析及作图, 对数据进行差异显著性分析。所有实验结果均进行至少 3 次的生物学重复, 表示为平均值 \pm 标准偏差(standard deviation, SD), P 值低于 0.05 认为具有统计学差异(*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$)。

2 结果与分析

2.1 携带 EGFP 的 NDV LaSota 全长基因组 cDNA 构建

将 NDV LaSota 株全基因组分为 5 段 (F1–F5) 分别进行 RT-PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳结果显示, 扩增产物长度分别为 3 216、3 014、2 680、3 985 和 2 437 bp (图 2A), 结果与预期相符。利用各克隆片段重叠部分的酶切位点, 组装并获得了 15 186 bp 完整病毒基因组克隆质粒, 命名为 pCI-LaSota (图 2B)。

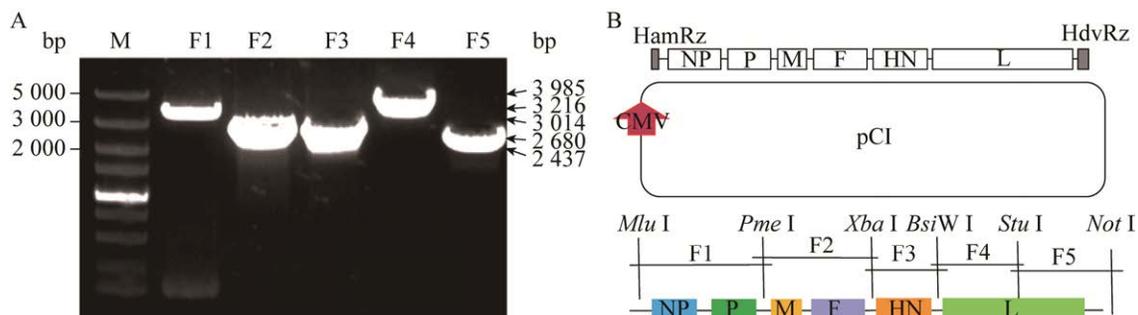


图 2 NDV LaSota 株全基因分段克隆与全长转录质粒的构建 A: NDV LaSota 株 RT-PCR 电泳结果。B: NDV LaSota 株全基因克隆质粒的构建模式图

Figure 2 Construction of full-length transcription plasmid of NDV LaSota strain from subgenomic overlapping cDNA fragments. A: RT-PCR amplification of the complete genome of NDV LaSota strain by 5 fragments. M: DL5000 DNA Marker; Lane F1: RT-PCR product of F1; Lane F2: RT-PCR product of F2; Lane F3: RT-PCR product of F3; Lane F4: RT-PCR product of F4; Lane F5: RT-PCR product of F5. B: Construction pattern of full-length transcription plasmid of NDV LaSota.

在构建完成的 LaSota 基因组全长克隆质粒 pCI-LaSota 的 *Pme* I 限制性酶切位点序列之间通过无缝克隆插入 EGFP 的表达盒, 构建成携带绿色荧光蛋白编码基因的 NDV 基因组转录质粒

pCI-LaSota-EGFP (图 3A)。利用 *Pme* I 酶切 pCI-LaSota-EGFP 质粒, 结果可以观察到 19 298 bp 的载体片段和 756 bp 的基因条带(图 3B), 大小与预期相符。

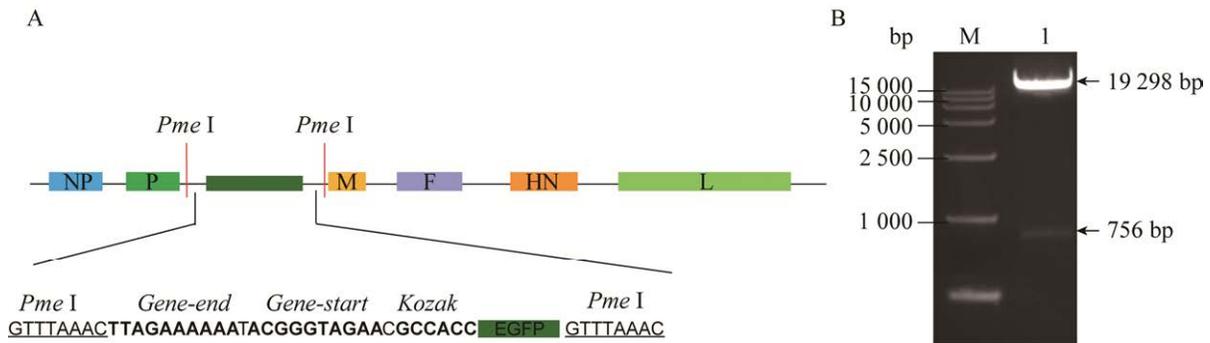


图 3 rLaSota-EGFP 基因组 cDNA 的构建 A: rLaSota-EGFP 基因组 cDNA 的构建模式图. B: pCI-LaSota-EGFP 质粒酶切鉴定. M: DL15000 DNA 分子量标准; 1: pCI-LaSota-EGFP 酶切产物
Figure 3 Construction of the rLaSota-EGFP genomic cDNA clone. A: Construction pattern of rLaSota-EGFP genomic cDNA clone. B: Identification by pCI-LaSota-EGFP plasmid by digestion. M: DL15000 DNA Marker; 1: Digestion products of pCI-LaSota-EGFP.

2.2 辅助质粒构建

分别将 NP、P 和 L 基因 ORF 插入 pCI 载体中, 构建 pCI-NP、pCI-P 和 pCI-L 表达质粒, 分别以 *Nhe* I 和 *Not* I 酶切 pCI-NP 和 pCI-P 质粒、*Xba* I 和 *Not* I 酶切 pCI-L 质粒, 结果可以清晰观察到 3 942 bp 的载体条带(pCI)和 1 477 bp 的 NP、1 195 bp 的 P、6 628 bp 的 L 基因条带(图 4), 大小均与预期相符, 表明 3 个表达质粒均构建成功。

分别将构建的 NP 和 P 基因盒连接到 pCI-L 质粒多克隆位点之间, 组装成一个完整的质粒 pCI-NPL (图 5A)。以限制性内切酶 *Mlu* I 和 *Stu* I 酶切验证质粒, 琼脂糖凝胶电泳检测可见大小分别是 10 605 bp 的外源基因和 5 132 bp 的载体两条片段(图 5B), 大小与预期相符。

2.3 辅助质粒间接免疫荧光鉴定

为了验证 pCI-NPL 质粒能够同时表达 NP、P、L 蛋白, 将 pCI-NPL 质粒转染至 BHK-21 细胞中, 24 h 后进行间接免疫荧光检测。结果显示,

转染 pCI-NPL 的细胞同时观察到表达 NP (红色) 和 P (绿色) 免疫荧光染色信号, 也能同时观察到表达 NP (红色) 和 L (绿色) 免疫荧光染色信号(图 6)。

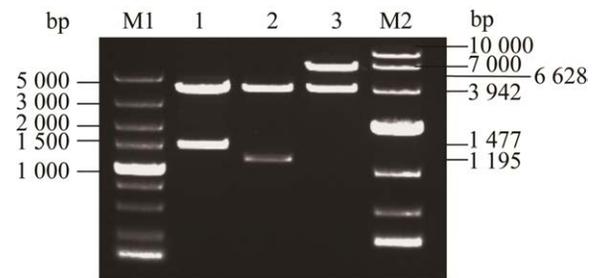


图 4 pCI-NP、pCI-P、pCI-L 质粒酶切鉴定 M1 和 M2: 分别为 DL5000 和 DL10000 的 DNA 分子量标准; 1: pCI-NP 酶切产物; 2: pCI-P 酶切产物; 3: pCI-L 酶切产物
Figure 4 Identification of pCI-NP, pCI-P and pCI-L plasmids by digestion. M1 and M2: DL5000 DNA Marker and DL10000 DNA Marker; 1: Digestion products of pCI-NP; 2: Digestion products of pCI-P; 3: Digestion products of pCI-L.

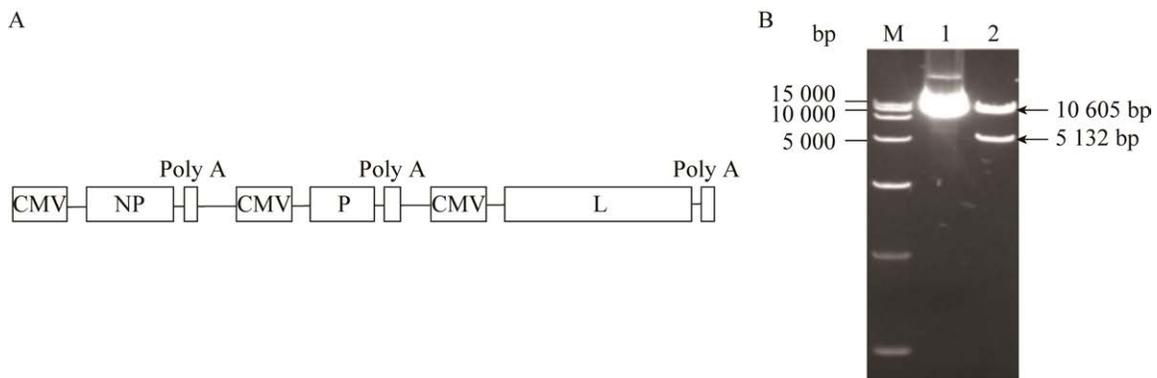


图5 三启动子辅助质粒 pCI-NPL 的构建 A: 三启动子辅助质粒 pCI-NPL 构建模式图. B: 辅助质粒 pCI-NPL 双酶切鉴定结果. M: DL15000 DNA 分子量标准; 1: pCI-NPL 质粒; 2: pCI-NPL 酶切产物

Figure 5 Construction of the helper plasmid pCI-NPL based on three promoters. A: Construction pattern of the helper plasmid pCI-NPL based on three promoters. B: Results of double enzyme digestion of helper plasmid pCI-NPL. M: DL15000 DNA Marker; 1: pCI-NPL plasmid; 2: Digestion products of pCI-NPL.

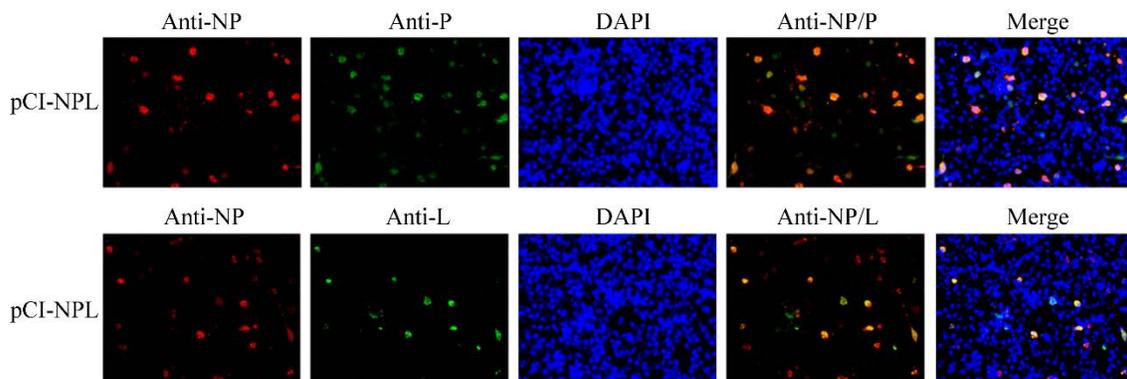


图6 辅助质粒 pCI-NPL 间接免疫荧光鉴定

Figure 6 Identification of the helper plasmid pCI-NPL by indirect immunofluorescence.

2.4 辅助质粒 Western blotting 鉴定

将 pCI-NPL 及 pCI-NP、pCI-P 和 pCI-L 分别转染 BHK-21 细胞, 48 h 后进行 Western blotting 检测, 结果可见大小分别为 53.1、42.3、248.6 kDa 的 NP、P 和 L 蛋白既可在单表达质粒转染的细胞中表达, 也可在 pCI-NPL 转染细胞中表达(图 7)。表明 pCI-NPL 质粒在 BHK-21 细胞中可成功表达 NP、P、L 蛋白。

2.5 重组 rLaSota-EGFP 病毒 RT-PCR 鉴定

为了进一步证明成功获得的病毒 rLaSota-EGFP, 提取重组病毒 rLaSota-EGFP 基因组 RNA 进行反转录 cDNA, 以 EGFP-F 和 EGFP-R 为引

物进行 PCR 扩增, 结果 rLaSota-EGFP 基因组中可扩增出大小为 756 bp 条带, 而 WT LaSota 基因组无任何扩增条带(图 8)。结果表明重组病毒

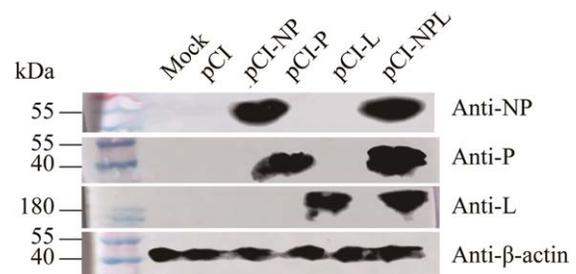


图7 Western blotting 鉴定辅助质粒蛋白表达

Figure 7 Identification of helper plasmid by Western blotting.

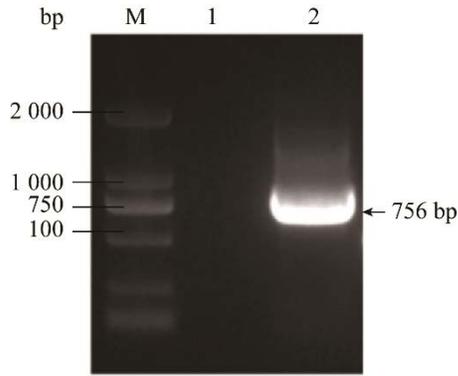


图 8 RT-PCR 检测重组病毒 rLaSota-EGFP
M: DL2000 DNA Marker; 泳道 1: WT LaSota 的扩增结果; 泳道 2: 重组病毒 rLaSota-EGFP 的扩增结果

Figure 8 Identification of the recombinant NDV rLaSota-EGFP by RT-PCR. M: DL2000 DNA Marker; Lane 1: Amplification results of WT LaSota; Lane 2: Amplification results of rLaSota-EGFP.

基因组中含有 EGFP 序列, 证明成功获得 rLaSota-EGFP 病毒。

2.6 重组 rLaSota-EGFP 细胞复制特性观察

取含重组 rLaSota-EGFP 鸡胚尿囊液按 MOI=1 感染 DF1 细胞, 每 24 h 于荧光显微镜下

观察细胞。结果显示, rLaSota-EGFP 感染的细胞可以观察到非常明显的自发荧光, 且出现了与 WT LaSota 感染细胞相似的 CPE 现象, 且随着病毒感染时间增加, 荧光和 CPE 愈发明显。结果证明 rLaSota-EGFP 感染细胞具有与 WT LaSota 相似的细胞病变, 外源基因 EGFP 的表达不影响 rLaSota 病毒的复制(图 9)。

2.7 重组病毒 rLaSota-EGFP 的 Western blotting 鉴定

重组病毒 rLaSota-EGFP 和 WT LaSota 分别感染 DF1 细胞后制备细胞裂解样品, 分别以兔抗 GFP 抗体和鸡抗 NDV 多抗为一抗进行 Western blotting 分析, 结果显示, rLaSota-EGFP 感染的细胞样品中可观察到大小约 27 kDa 的特异性 GFP 蛋白条带; 而 rLaSota 感染细胞无任何条带。以鸡抗 NDV 高免血清检测 rLaSota-EGFP 感染细胞中所表达的蛋白与 WT rLaSota 表达的蛋白带型一致(图 10), 表明外源基因 EGFP 得到了正确表达, 并且 EGFP 的表达不影响 NDV 其他蛋白的表达。

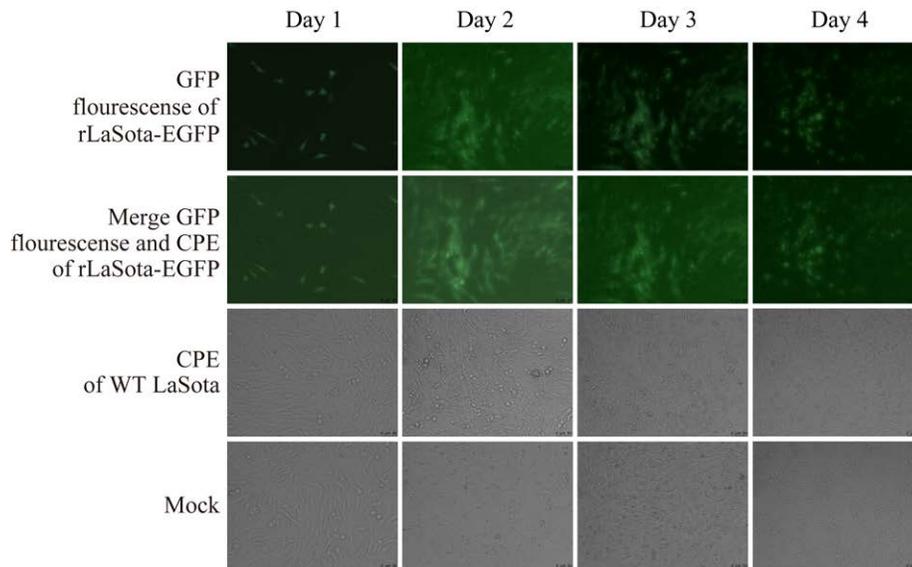


图 9 重组病毒 rLaSota-EGFP 细胞复制特性(200×)

Figure 9 Analysis of the replication characteristic of rLaSota-EGFP (200×).

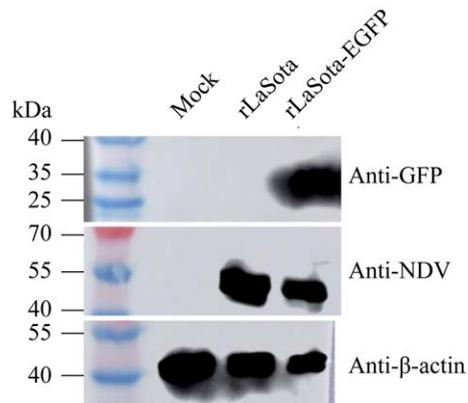


图 10 Western blotting 分析 rLaSota-EGFP 在细胞中的表达

Figure 10 Analysis of the expression of rNDV-EGFP by Western blotting.

2.8 病毒致病力检测

为了确定重病毒 rLaSota-EGFP 与 WT LaSota 的致病性差异, 根据 WOA 标准测定鸡胚平均死亡时间(MDT)和雏鸡脑内接种致病指数(ICPI), 结果如表 3 所示, rLaSota-EGFP 毒株与 rLaSota 毒株鸡胚致死时间均大于 120 h, 脑内接种雏鸡均未出现病理症状, 均符合 O.I.E 新城疫病毒弱毒株标准, 证明 rLaSota-EGFP 保持了与亲本株相似的弱毒特性。

2.9 rLaSota-EGFP 病毒鸡胚生长特性

将 rLaSota-EGFP 及 WT LaSota 分别接种鸡胚后 24、48、72 和 96 h 收获尿囊液, 每一检测点随机收取 6 枚重复鸡胚, 经计算 rLaSota-EGFP 毒株每毫升尿囊液 EID₅₀ 平均值分别为 10^{8.2}、10^{8.75}、10^{9.12} 和 10^{8.44}, 表明 rLaSota-EGFP 虽相较于 WT LaSota 毒株生长速度略微下降, 但最后病毒滴度仍可生长到 10⁸, 具有与 WT LaSota 相似的高滴度生长特性(图 11)。

表 3 rLaSota-EGFP 及 WT LaSota 致病力指标测定

Pathogenicity index	MDT	ICPI
WT LaSota	>120 h	0
rLaSota-EGFP	>120 h	0

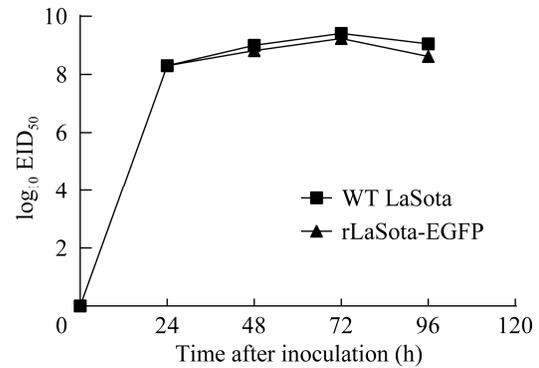


图 11 重组病毒鸡胚复制动力学曲线

Figure 11 Growth curve of rLaSota-EGFP and WT LaSota virus in embryonated chicken eggs.

3 讨论与结论

在负链 RNA 病毒拯救过程中, 通常需要构建不同的质粒来提供不同的功能, 包括基因组、辅助因子、包装信号及外壳蛋白。只有共转染这些质粒到宿主细胞中, 提供所有必需的病毒组成部分, 才能支持负链 RNA 病毒的产生和复制。通过减少共转染质粒的数量, 为多种 RNA 病毒的拯救提高了效率, 如流感病毒拯救系统质粒数量从 12 个减少到 3 个后, 在 Vero 细胞中拯救出来的流感病毒滴度从不到 1×10¹ TCID₅₀/mL 增加到 3.7×10⁴ TCID₅₀/mL^[6]。甚至所构建的单质粒流感病毒拯救系统在鸡胚成纤维细胞 CEF 上拯救出来的子代病毒滴度是 8 质粒系统的 6 倍^[7]。对于 NDV 的拯救, 以往都是转染分别表达 NP、P、L 蛋白的 3 个辅助质粒和基因组全长转录质粒而实现的。本研究构建了同时表达 NP、P、L 蛋白的多启动子单辅助质粒 pCI-NPL, 成功产生了具有感染性的新城疫子代病毒颗粒, 再次证明了双质粒系统的可行性。

2017 年, Liu 等基于 MG-725 株首次构建了新城疫病毒双质粒拯救系统, 与传统四质粒系统相比, 双质粒系统病毒拯救时间更短、滴度更高, 且无法以四质粒系统拯救成功的一部分重组致弱

株也获得了成功拯救^[8], 进一步比较发现, 所构建的 1、2、3、4 不同质粒数量的拯救系统中以双质粒系统的拯救效率最高^[9]。本研究通过将 NP、P 和 L 三个基因表达盒克隆到一个表达载体, 以相似的构建方法成功建立了基于 CMV 启动子的新城疫病毒双质粒拯救系统。然而, Auste 等同样以 3 个 CMV 启动子构建表达 NP、P、L 辅助蛋白的多顺反子载体, 却未能拯救出麻疹病毒(Measles virus, MeV), 随后通过选用效率不同的启动子构建的多顺反子载体, 得以成功拯救病毒, 但效率远不及传统四质粒系统^[10]。可能不同属的副黏病毒在形成 RNP 时, 对 NP、P 和 L 蛋白量的多少和比例不同, 因此, 同样的双质粒系统在不同副黏病毒的拯救上其有效性和效率不尽相同。

此外, 在构建可同时表达多个蛋白的载体上, 除了上述通过多启动子串联不同基因的方式外, 还可通过利用 IRES 或 Furin-2A 构建多顺反子。IRES 可克服单顺反子载体和多启动子表达载体出现的不同启动子间相互干预的问题^[11]。但是, Hennecke 等发现非帽子结构依赖的翻译效率要比帽子结构依赖型效率低^[12], 因此, 尽管所有基因处于同一条转录的 mRNA, 它们的翻译水平也存在差异。Furin-2A 介导的载体表达量要比 IRES 介导的载体高, 但是 Furin-2A 自剪切不完全(85%–95%)。另外, 2A 多肽的 C 端可能影响蛋白的功能和定位^[13], 若将其应用于病毒拯救, 可能影响病毒拯救效率。因此, 未来可通过不同构建策略进行比较并筛选出最佳的单辅助质粒构建方法, 进一步提升负链 RNA 病毒的拯救效率。

本研究将外源基因 EGFP 插入 NDV 基因组 P 和 M 基因之间, 外源基因得到良好复制和表达, 且外源基因的表达不影响基因组结构蛋白的正常表达。研究表明外源基因插入位点越靠近病

毒基因组的 3'端, 其表达效率越高, Zhao 等将 GFP 报告基因分别插入到 NDV VG_GA 疫苗株基因组 NP-P、P-M、M-F、F-HN 和 HN-L 基因之间 5 个不同位点, 发现 GFP 的 mRNA 水平确实从 3'端到 5'端依次递减, 但通过测定感染细胞绿色荧光强度发现将外源基因插入 P 和 M 基因之间非编码区可以获得最佳的表达^[14]。但对于一些表达后可以装配于病毒颗粒表面的囊膜糖蛋白, 表达量过高有可能对病毒的感染、复制和遗传稳定性产生重大的影响^[15]。本研究通过对拯救病毒进行病毒致病性和体外生长特性测定, 重组 rLaSota-EGFP 具有与野生型 LaSota 毒株相似的鸡胚生长特性, 且不改变其弱毒株的生物学特性。

参考文献

- [1] MILLER PJ, DECANINI EL, AFONSO CL. Newcastle disease: evolution of genotypes and the related diagnostic challenges[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2010, 10(1): 26-35.
- [2] WANG JZ, WANG CF, FENG N, WANG HL, ZHENG XX, YANG ST, GAO YW, XIA XZ, YIN RF, LIU XF, HU SL, DING C, YU SQ, CONG YL, DING Z. Development of a reverse genetics system based on RNA polymerase II for newcastle disease virus genotype VII[J]. *Virus Genes*, 2015, 50(1): 152-155.
- [3] MOLOUKI A, PEETERS B. Rescue of recombinant newcastle disease virus: a short history of how it all started[J]. *Archives of Virology*, 2017, 162(7): 1845-1854.
- [4] PEETERS BPH, GRUIJTHUIJSEN YK, de LEEUW OS, GIELKENS ALJ. Genome replication of newcastle disease virus: involvement of the rule-of-six[J]. *Archives of Virology*, 2000, 145(9): 1829-1845.
- [5] ADU-GYAMFI E, KIM LS, JARDETZKY TS, LAMB RA. Flexibility of the head-stalk linker domain of paramyxovirus HN glycoprotein is essential for triggering virus fusion[J]. *Journal of Virology*, 2016, 90(20): 9172-9181.
- [6] NEUMANN G, FUJII K, KINO Y, KAWAOKA Y. An improved reverse genetics system for influenza A virus generation and its implications for vaccine

- production[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(46): 16825-16829.
- [7] ZHANG XM, KONG W, ASHRAF S, CURTISS R 3rd. A one-plasmid system to generate influenza virus in cultured chicken cells for potential use in influenza vaccine[J]. Journal of Virology, 2009, 83(18): 9296-9303.
- [8] LIU HJ, ALBINA E, GIL P, MINET C, de ALMEIDA RS. Two-plasmid system to increase the rescue efficiency of paramyxoviruses by reverse genetics: the example of rescuing newcastle disease virus[J]. Virology, 2017, 509: 42-51.
- [9] LIU HJ, de ALMEIDA RS, GIL P, ALBINA E. Comparison of the efficiency of different newcastle disease virus reverse genetics systems[J]. Journal of Virological Methods, 2017, 249: 111-116.
- [10] AUSTE A, MÜHLEBACH MD. Concentrating all helper protein functions on a single entity allows rescue of recombinant measles virus by transfection of just two plasmids[J]. The Journal of General Virology, 2022, 103(11). <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001815>.
- [11] NAKAJIMA K, IKENAKA K, NAKAHIRA K, MORITA N, MIKOSHIBA K. An improved retroviral vector for assaying promoter activity. Analysis of promoter interference in pIP211 vector[J]. FEBS Letters, 1993, 315(2): 129-133.
- [12] HENNECKE M, KWISSA M, METZGER K, OUMARD A, KRÖGER A, SCHIRMBECK R, REIMANN J, HAUSER H. Composition and arrangement of genes define the strength of IRES-driven translation in bicistronic mRNAs[J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(16): 3327-3334.
- [13] DAVIES SL, O'CALLAGHAN PM, McLEOD J, PYBUS LP, SUNG YH, RANCE J, WILKINSON SJ, RACHER AJ, YOUNG RJ, JAMES DC. Impact of gene vector design on the control of recombinant monoclonal antibody production by Chinese hamster ovary cells[J]. Biotechnology Progress, 2011, 27(6): 1689-1699.
- [14] ZHAO W, ZHANG ZY, ZSAK L, YU QZ. P and M gene junction is the optimal insertion site in newcastle disease virus vaccine vector for foreign gene expression[J]. The Journal of General Virology, 2015, 96(Pt 1): 40-45.
- [15] 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[J]. The Journal of General Virology, 2003, 84(Pt 4): 781-788.