

新城疫病毒 F 蛋白碱裂解位点修饰及外源基因的插入对新城疫 LaSota 疫苗株致病力的影响

王永^{1,2}, 葛金英¹, 解希帝^{1,3}, 丁玉林^{1,3}, 步志高^{1*}

(¹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)

(²哈尔滨医科大学公共卫生学院, 哈尔滨 150001)

(³内蒙古农业大学动物科学与医学学院, 呼和浩特 010018)

摘要:新城疫是危害养禽业发展的重要传染病。新城疫病毒(NDV)具有高度传染性和高致病性,融合蛋白(F)的 F1/F2 裂解位点存在多个碱性氨基酸并由此形成的泛组织嗜性一直以来被认为是 NDV 致病的主要决定因素。本研究利用已经构建 NDV 弱毒 LaSota 疫苗株反向遗传操作平台,将 LaSota 病毒 F 蛋白的碱裂解位点由 GGRQGR↓L 分别突变为 GRRQRR↓F 和 GRRQRR↓L,在未加入 TPCK 胰酶的情况下分别成功拯救出突变修饰 LaSota 疫苗病毒株 rL-FmF 和 rL-FmL,通过测定鸡胚平均致死时间(MDT)、脑内致病指数(ICPI)和静脉内致病指数(IVPI)等指标对其毒力进行评估,结果 rL-FmF 和 rL-FmL 的 ICPI 值由 LaSota 的 0.36 分别上升为 1.18 和 1.05,但 MDT 均大于 90 小时,IVPI 仍然均为 0,表明碱裂解位点的突变可显著增强致病力。为了检测外源基因插入对病毒致病力的影响,进一步以 rL-FmF 为载体,分别构建并拯救出表达 H5 亚型禽流感病毒血凝素 HA 和增强绿色荧光蛋白 EGFP 基因的重组病毒 rL-FmF-HA 和 rL-FmF-EGFP,经测定 ICPI 分别为 0.67 和 1.10,但 MDT 均大于 90 小时,IVPI 仍然均为 0。结果表明,对 rLaSota 病毒 F 蛋白裂解位点 2 个非碱性氨基酸突变为碱性氨基酸,无论 F2 蛋白氨基端为 F 或 L,均可显著增强其脑内接种致病力,接近中发型毒株标准,但对静脉内接种致病能力均无显著影响,而对鸡胚致死能力均保持 rLaSota 病毒缓发型特点(MDT≥90);外源基因的重组、表达可不同程度致弱病毒,其致弱程度与外源基因及其表达产物性质有关。结果提示,影响 NDV 致病力不仅仅局限于 F 蛋白裂解位点氨基酸序列;通过 F 裂解位点修饰及 HA 基因插入可以获得致病力较高但基本接近缓发型标准的重组病毒。

关键词:新城疫病毒;裂解位点;突变修饰;基因重组表达;致病力

中图分类号: R392 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 03-0362-07

新城疫(Newcastle disease, ND)是危害世界养禽业的重大烈性传染病。在病毒学分类上将其归于副粘病毒科禽腮腺炎病毒属(Avulavirus)^[1]。新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)为不分节段单股负链 RNA 病毒,是副粘病毒科的重要成员和模型病毒。NDV 全基因组长 15186bp,包含 6 个基因,分别编码

至少 8 种蛋白,即核蛋白(NP),磷酸蛋白(P),基质蛋白(M),融合蛋白(F),血凝素-神经氨酸酶(HN)和聚合酶蛋白(L),以及由 P 基因编码的 V 与 W 两种蛋白。根据 NDV 毒株对鸡致病力的强弱,可以分为强毒株(如 velogenic)、中等毒力株(如 mesogenic)与弱毒株(如 lentogenic)3 种,强毒株根据其致病症状又可以分为

基金项目: 国家科技攻关项目(2004BA519A19, 2005BA711A10); “973 项目”(2005CB523200)

*通讯作者: Tel: +86-451-85935062; E-mail: zgb@hvri.ac.cn

作者简介: 王永(1975-), 男, 内蒙古达拉特旗人, 博士研究生, 主要从事分子病毒学研究。E-mail: nmqwy@163.com

收稿日期: 2007-07-17; 修回日期: 2007-12-12

嗜神经型与嗜内脏型两种。

NDV F蛋白以前体F0的形式存在, F0在宿主细胞蛋白酶作用下裂解成F1和F2才能使病毒获得感染性^[2,3]。融合蛋白(F)的F1/F2裂解位点存在多个碱性氨基酸并由此形成的泛组织嗜性一直以来被认为是NDV致病的主要决定因素; F蛋白裂解位点的碱性氨基酸序列在NDV毒株间存在差异^[4], 但所有弱毒株NDV的碱裂解位点却具有共性的GGRQGR↓L序列, 那就是只有类胰酶的细胞外蛋白酶能够裂解NDV弱毒株F蛋白, 因此NDV弱毒株只能局限于特定的组织内复制, 如禽类呼吸道与消化道^[5], 而典型的强毒F蛋白裂解位点为GR/KRQR/KR↓F序列, 能够裂解强毒株F蛋白的蛋白酶广泛存在于各种组织和器官中^[6], 因此能够导致致命的全身性感染, 形成高致病力, 这一点已经为其他研究者实验证明; 同时, 由于所有中等或高致病力自然分离株F2亚单位氨基端残基为F, 低致病力毒株为L, 因此F2氨基端为F也被认为是影响裂解效率并决定中、高致病力的重要因素, 但尚未得到系统深入的实验研究。

本研究利用已经建立NDV LaSota疫苗株反向遗传操作系统及重组病毒构建技术平台, 将LaSota病毒F蛋白的碱裂解位点由GGRQGR↓L分别突变为典型中、高致病力毒株序列的GRRQRR↓F与非典型的GRRQRR↓L序列, 探讨裂解位点碱性氨基酸突变修饰及F2氨基端氨基酸F或L不同对LaSota病毒致病力的影响。在此基础上, 进一步探讨不同性质的外源目的基因表达框架的插入对裂解位点修饰重组LaSota病毒致病力的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和病毒: BHK-21细胞由本实验室传代培养, 培养基为含10%胎牛血清的DMEM; 表达T7聚合酶的痘病毒vTF7-3接种Hela细胞系扩增并滴定PFU, -70℃冻存备用; NDV Mukteswar株由哈尔滨兽医研究所保存; 新城疫LaSota克隆株rLaSota由本实验室保存; rLaSota反向遗传操作系统基因组转录模板质粒pBRN-FL, 大聚合酶、核蛋白及磷酸蛋白表达辅助质粒pBSL、pBSNP、pBSP分别由本研究室保存, H5亚型高致病力禽流感病毒A/Goose/Guangdong/1/96/H5N1(GD/96)株HA基因由哈尔滨兽医研究所国家禽流感参考实验室提供; 鸡抗NDV高免血清由本

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 主要试剂和仪器: Taq酶, Pfu高保真DNA聚合酶, T4 DNA连接酶及其它限制性内切酶均购自TaKaRa公司, TPCK胰酶、FITC标记的兔抗鸡荧光抗体购自Sigma公司, 反转录酶M-MLV、优化的无血清培养基opt-MEM以及磷酸钙转染试剂盒(Calcium phosphate Transfection Kit)购自Invitrogen; 荧光显微镜为Leica DM IRB, 购自Leica公司。

1.2 碱裂解位点突变型F基因的克隆以及外源基因的插入

以质粒pBRN-FL为模板, 以带有Hind III酶切位点的引物P1F5'-GCAAGAGGTGCACGGACTAAGCTTTTGGC-3'为上游引物, 引物P1R5'-CAACCC AAGAGCCACACCGCCAATAATGGCGCCTATAAAGCGCCtCTGTCTCCgCCCTC-3'为下游引物, 将NDV F基因裂解位点突变为GRRQRRF, 其中小写字母代表突变碱基。PCR产物克隆于pBlue载体, 命名为pBS-FmF; 以P1F为上游引物, 以P2R5'-CAACCC CAAGAGCCACACCGCCAATAATGGCGCCTATAAGGCGCCtCTGTCTCCgCCCTC-3'为下游引物, 将NDV F基因裂解位点突变为GRRQRRLL, 获得的PCR片段克隆于pBlue载体, 命名为pBS-FmL。再用引物P1F与P4R5'-CAGAGCTGCGGCCGCTGTTATTTGTGCGGAGTTGCAACCCCAAGAGCCACACC-3'配对, 分别以FmF和FmL的基因片段为模板进行PCR反应, 在FmF和FmL的基因片段下游引入Not I限制性酶切位点, 利用Hind III与Not I限制性酶切位点进行相应DNA片段的替换, 即构建完成pBRN-FL-F和pBRN-FL-L全基因组cDNA的克隆。

将经Hind III与Not I限制性酶切的FmF和FmL的基因片段替换pBRN-FL-Pme I^[7]克隆的相应片段, 然后利用P基因与M基因之间特定酶切位点Pme I分别插入H5亚型禽流感病毒HA基因和增强绿色荧光蛋白基因EGFP, HA基因和EGFP基因来源于已有的克隆质粒pBRN-FL-HA^[7]和pBRN-FL-GFP^[8], 即构建完成pBRN-FL-F-HA与pBRN-FL-F-EGFP全基因组cDNA克隆。

1.3 重组病毒的拯救

病毒的拯救过程参见文献^[7, 8]。转染上清接种9~11日龄的SPF鸡胚尿囊腔。收获HA及HI试验结果均为阳性的尿囊液, -70℃冻存, 重组病毒分别命名为rL-FmF、rL-FmL、rL-FmF-HA和rL-FmF-EGFP。

按常规方法分别于 9~11 日龄鸡胚及鸡胚成纤维细胞滴定每毫升 EID₅₀ 病毒含量。

1.4 重组病毒的 RT-PCR 与序列分析

取收获病毒 F1 代尿囊液 250 μ L, 加入 750 μ L Trizol 经常规方法提取基因组 RNA。采用引物 P1F 和 P3R(5'-GTTGTGCTTACGGATAAG-3') 进行 RT-PCR, 反转录出的病毒 cDNA 直接用于 PCR 反应, PCR 是在 Pfu 高保真 DNA 聚合酶作用下进行, 按试剂盒说明书加入各成分, PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 1min, 54.5 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 2min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10min。

为了检测重组病毒的突变是否能够稳定遗传, 按照常规方法将重组病毒在 9~11 日龄 SPF 鸡胚上进行连续传代, 取 F3 代按以上方法进行 RT-PCR 反应。上述 PCR 产物胶回收净化后, 进行序列测定。

1.5 重组病毒引起寄主细胞融合的差别

NDV 可以引起感染细胞的严重细胞病变 (CPE), 即细胞融合, 在单层培养细胞中形成明显的合胞体, 根据其核包体产生的时间及形成核包体的大小与数量, 可以反映病毒裂解能力的强弱。将 rLaSota、rL-FmF、rL-FmL、rL-FmF-HA、rL-FmF-EGFP 和 Mukteswar 毒株以 1×10^5 EID₅₀ 病毒量接种生长达 50%~80% 的单层 BHK-21 细胞, 分别于接种后 24h, 48h 用 3% 的多聚甲醛固定细胞, 除 rL-FmF-EGFP 感染孔以外的细胞均以 NDV 多抗血清为一抗, FITC 标记的兔抗鸡抗体为二抗进行间接免疫荧光检测 (IFA), 观察 CPE 程度, rL-FmF-EGFP 感染细胞观察自发荧光。

1.6 重组病毒的生长特性

NDV 在 F 蛋白碱裂解位点突变后, 其复制能力大大提高。为了观察突变型重组病毒与亲本毒株在鸡胚内的复制差异, 将 rLaSota、rL-FmF、rL-FmL 和 Mukteswar 毒株按 200 EID₅₀ 接种 9~11 日龄 SPF 鸡胚。自接种后 12 h 起, 每间隔 12 h 收集鸡胚尿囊液, 每时间段随机抽取 3 枚胚, 直至 72 h。采集的样品在非免疫胚上测定每 0.1 ml 上清所含病毒的 EID₅₀。试验结果绘制病毒生长动力学曲线。

为了研究不同外源基因插入对重组病毒复制的影响, rL-FmF-HA 与 rL-FmF-EGFP 按同样方法接种鸡胚并取样, 测定每个样品的病毒滴度, 绘制重组病毒生长曲线。

1.7 重组病毒的致病性

按照世界动物卫生组织 (OIE) 标准测定重组病毒的鸡胚平均致死时间 (MDT), 脑内致病指数 (ICPI), 静脉接种致病指数 (IVPI) 等致病力指标。雏鸡接种安

全性试验采用 2 日龄 SPF 来亨鸡, 以 10^7 EID₅₀ 新城疫病毒经滴鼻途径接种感染, 负压隔离器内饲养观察 3 周。

2 结果

2.1 重组病毒的拯救

为了从克隆的 cDNA 中拯救感染性 NDV, 首先分别以 pBRN-FL-F、pBRN-FL-L、pBRN-FL-F-HA 与 pBRN-FL-F-EGFP 连同表达 NDV NP、P、L 蛋白的辅助质粒共转染 BHK-21 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, BHK-21 细胞不能分泌裂解 F0 蛋白所需的蛋白酶, 因此需在培养基中加入相应蛋白酶, 所以此时应换成加入 TPCK (1 μ g/mL) 的无血清培养基, 然而, 当 LaSota 弱毒株 F 基因碱裂解位点突变成 GRRQRR↓F 与 GRRQRR↓L 后, 重组病毒应该具有强毒株的组织嗜性特征, 因此, 在没换成加入 TPCK (1 μ g/mL) 的无血清培养基的情况下继续培养 4 天, 收获转染细胞上清接种于 9~11 日龄的 SPF 鸡胚尿囊腔。4d 后收获鸡胚尿囊液, HA 试验结果阳性, NDV 免疫血清 HI 试验分析同样呈现阳性结果。证明重组病毒无需胰酶就可感染细胞, 其 F 基因碱裂解位点获得了正确突变。收获病毒阳性尿囊液作为拯救病毒 rL-FmF 和 rL-FmL 的 F1 代。取 F1 代病毒尿囊液进行 RT-PCR 及序列分析结果也证实重组病毒 F 蛋白裂解位点氨基酸序列已突变, 结果和预期完全相符 (数据未显示)。

为了检测重组病毒的遗传稳定性, 将重组病毒 F1 代连续传 3 代, 取 F3 代进行 RT-PCR 反应并测序。序列分析结果证实裂解位点突变以及外源基因能够稳定存在至少 3 代 (数据未显示)。

2.2 重组病毒引起寄主细胞融合的差别

在 F 蛋白裂解位点突变后, 重组病毒在哺乳动物细胞的复制能力将大大提高。为了验证这一推断, 将 rLaSota、rL-FmF、rL-FmL、rL-FmF-HA、rL-FmF-EGFP 和 Mukteswar 毒株以 1×10^5 EID₅₀ 病毒量接种生长达 50%~80% 的单层 BHK-21 细胞, 分别于接毒后 24h, 48h 固定细胞, 以 NDV 多抗血清为一抗, FITC 标记的兔抗鸡抗体为二抗进行间接免疫荧光检测。在 24 小时, Mukteswar 野毒株出现广泛的细胞融合现象 (图 1-E); 突变型重组病毒 rL-FmF 和 rL-FmL 株出现散在的细胞融合, 融合细胞面积较大 (图 1-B、C);

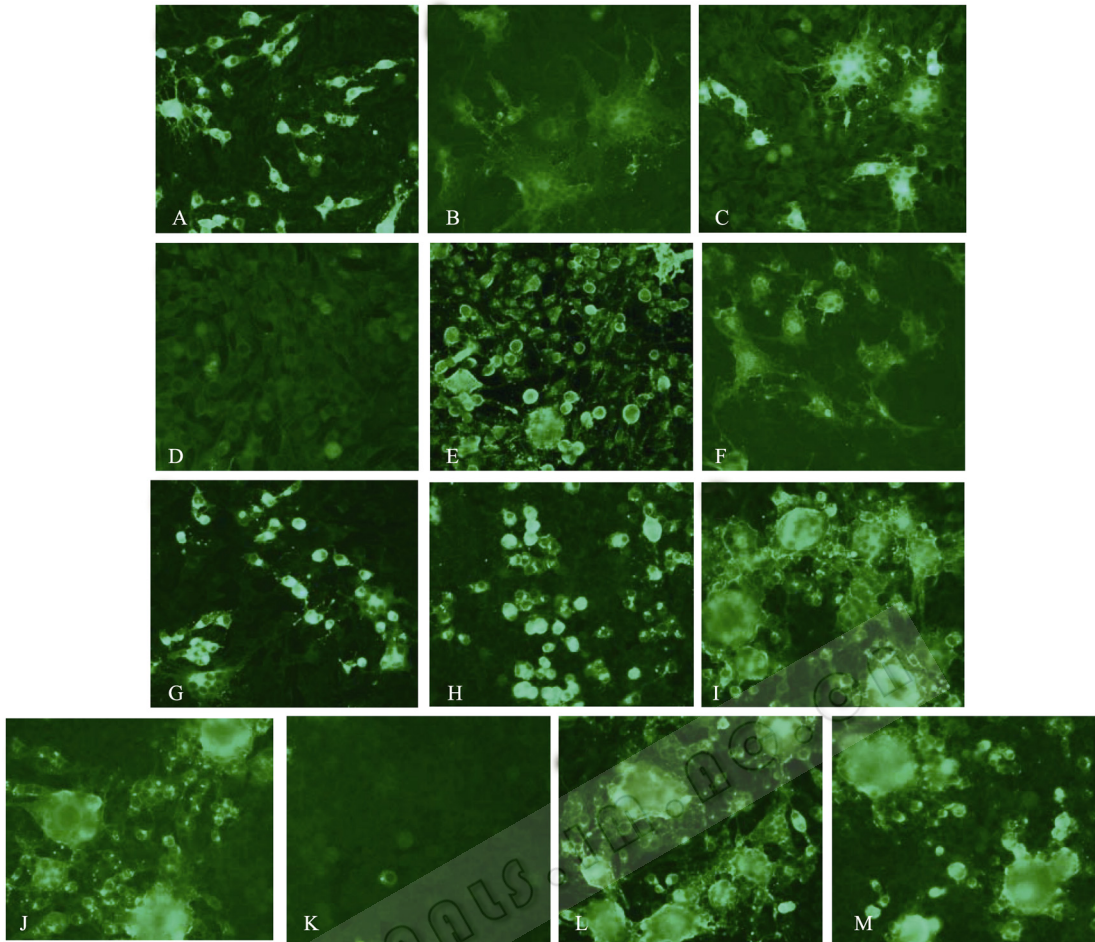


图 1 间接免疫荧光法检测突变型重组病毒引起 BHK-21 细胞融合的差异

Fig. 1 Detection the difference of BHK-21 cells fusion induced by mutational recombinant virus infection by immunofluorescence. Panels A to G show results after 24h post infection, panels H to K show results after 48h post infection. Uninfected BHK-21 cells (panel D and K) and BHK-21 cells infected with rLaSota (panel A and H) and rL-FmF (panel B and I) and rL-FmL (panel C and J) and rL-FmF-HA (panel F and L) or Mukteswar (panel E) were incubated with anti-NDV. rL-FmF-EGFP(panel G and M) were autofluorescence.

而 rL-FmF-HA 和 rL-FmF-EGFP 也有明显的细胞融合, 但融合细胞面积较小, 荧光信号多为单个细胞感染 (图 1-F、G); rLaSota 感染细胞无明显可见细胞融合 (图 1-A)。在以后的持续观察中, rL-FmF 和 rL-FmL 感染细胞的细胞融合持续增多, 变大 (图 1-I、J), 但 rL-FmL 的 CPE 发展较 rL-FmF 慢, rL-FmF-HA 和 rL-FmF-EGFP 也呈现同样的趋势 (图 1-L、M); 野毒株 Mukteswar 到 48 h 观察时细胞 90% 以上脱落 (图片未显示), 而 rLaSota 直至试验结束仍未出现细胞融合现象 (图 1-H)。

2.3 重组病毒的生长特性

rLaSota、rL-FmF、rL-FmL、rL-FmF-HA、rL-FmF-EGFP 和 Mukteswar 毒株在 SPF 鸡胚上的生长动力学采用多级生长曲线的方法测定 (图 2-A、B)。rL-FmF、rL-FmL 重组病毒在 24 h 取样时仅能达到 10^{6-7} EID₅₀/0.1 mL, 低于 Mukteswar 毒株 10^8 EID₅₀/0.1 mL

的高生长滴度。24h 时 rL-FmF 超过 rLaSota 疫苗株, 而 rL-FmL 仍然低于 rLaSota 疫苗株, 表现为生长滞后。在 36h 时, 所有的 2 株重组病毒均超过 rLaSota 疫苗株, 与 Mukteswar 毒株生长滴度接近一致。以上 2 株重组病毒均与 Mukteswar 毒株一样在 60h 达到生长峰值, 而不同于 rLaSota 疫苗株的 72h, 但生长趋势与 rLaSota 疫苗株十分相似。

外源基因的插入影响病毒的生长复制, 为评估外源基因造成的影响, 在野生型重组病毒基因组突变特定酶切位点, 并插入糖蛋白基因 HA 和非糖蛋白基因 EGFP。外源基因插入前后生长情况发生变化, 外源基因的插入导致重组病毒生长阻滞, 达到生长峰值的时间较野生型突变株滞后, 但其复制动力学研究表明, 插入外源基因的重组病毒仍然保持与野生型突变株相似的复制特征。

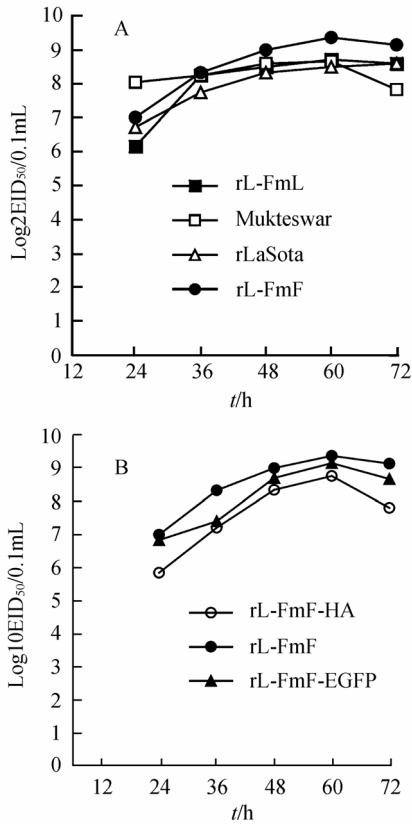


图2 突变型重组病毒复制动力学曲线

Fig. 2 Growth curve of mutational recombinant virus in embryonated chicken eggs.

2.4 重组病毒的致病性

为了检测重组病毒 rL-FmF、rL-FmL、rL-FmF-HA、rL-FmF-EGFP 与其亲本毒株 rLaSota 的致病力是否存在差异, 在 1 日龄 SPF 雏鸡脑内进行接种, 测定其 ICPI 值; 在 6 周龄 SPF 雏鸡静脉内接种重组病毒, 测定其 IVPI 值(表 2)。ICPI 结果显示 F 蛋白裂解位点的突变导致重组病毒 ICPI 值显著升高, rL-FmF 由其亲本毒株的 0.36 升高至 1.18, rL-FmL 则升高至 1.05。在插入外源基因以后, 重组病毒 ICPI 值下降, rL-FmF-HA 为 0.67, rL-FmF-EGFP 为 1.10。然而 rL-FmF、rL-FmF-HA 和 rL-FmF-EGFP 却显著低于与其具有相同裂解位点的中发型 NDV Mukteswar 株(ICPI 为 1.32)及速发型 NDV 如 F48E9(ICPI 为 1.82)。而 IVPI 值表现的正相反, Mukteswar 株的 IVPI 值为 0.64, 重组病毒的 IVPI 值均为 0.00。以上结果显示: 当病毒直接进入雏鸡脑内时, F 蛋白的裂解效率起到至关重要的作用, 但外源基因的插入会降低病毒的致病力。而病毒在外周的复制、病毒血症的发生以及病毒对中枢神经系统的入侵可能受其它因素的影响。

另外, 在 9~11 日龄 SPF 胚上进行了 MDT 检测(表 2), rL-FmF 和 rL-FmL 的 MDT 值分别为 90 h 和 115 h(rLaSota 的 MDT 90h), rL-FmF-HA 和 rL-FmF-EGFP 则分别延长至 117 h 和 101 h。按照 O.I.E 的判定标准 rL-FmF、rL-FmL、rL-FmF-HA 和 rL-FmF-EGFP 株重组病毒均为弱毒株(90h), 这说明重组病毒 F 蛋白 F1 蛋白的氨基末端氨基酸以及是否插入外源基因对其毒力具有显著影响, 但在鸡胚内的生长特性相对于其亲本毒株 rLaSota 只表现出复制能力增强的特征。

表 2 重组病毒致病指数表

Table 2 The pathogenicity of rL-F and rL-L in vivo

Viruses	Passages	MDT/h	ICPI	IVPI
rLaSota	F3	90	0.36	0
rL-FmL	F3	115	1.06	0
rL-FmF	F3	90	1.18	0
rL-FmF-EGFP	F3	101	1.10	0
rL-FmF-HA	F3	117	0.67	0
Mukteswar	-	46	1.32	0.64

3 讨论

NDV 的毒力决定因素到目前为止仍不十分明了, 一直以来学术界都认为 F 蛋白裂解位点起至关重要的作用。中等毒力和强毒株 F 蛋白裂解位点内含有较多碱性氨基酸, 如精氨酸, 其数量多于弱毒株 F 蛋白裂解位点内碱性氨基酸^[6,9]。近来, 由于反向遗传操作技术的应用, 有几个研究小组成功获得 F 蛋白裂解位点突变毒株, 如将弱毒株突变成典型强毒株的氨基酸序列, 然而突变株病毒的致病力却没有获得相应的提高^[10]。上述结果提示所谓“裂解效率”不是唯一的毒力因子, 因此毒力决定因素有待进一步的深入研究。

运用反向遗传技术, 将弱毒疫苗株 LaSota 裂解位点的氨基酸序列 GGRQGR↓L 成功突变成 GRRQRR↓F 与 GRRQRR↓L。根据 O.I.E 的标准, F1 蛋白 N 端氨基酸残基为 F 是典型的强毒株裂解位点氨基酸序列。突变的结果是重组病毒 rL-FmF 和 rL-FmL 无需加入 TPCK 胰酶就可在哺乳动物细胞上生长, 说明重组病毒 F 蛋白裂解位点能够被细胞内的蛋白酶所裂解。而 rL-FmL 的 ICPI 低于 rL-FmF, 证明 F1 蛋白氨基末端氨基酸残基突变为 F 的重组病毒其致病性高于 L 突变。重组病毒在细胞上的生长动力学与 Mukteswar 株十分相似。上述结果显示 rLaSota 弱毒疫苗株 F 蛋白裂解位点突变成 Mukteswar 株 F

蛋白裂解位点的氨基酸序列后,在细胞上重组病毒具有了与 Mukteswar 株相似的复制特征。由此可见,通过裂解位点的突变,F0蛋白的裂解能力显著增强,同时使病毒具有广泛的组织嗜性,使其能够在哺乳动物细胞内复制增殖,引起严重的细胞融合。

外源基因的插入可对重组NDV的鸡胚复制、生长能力产生显著影响。Peeters、Palese和Samal等^[11-13]分别在NDV基因组非编码区内插入外源基因。结果表明,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。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。在本试验室前期研究工作中,我们在rLaSota骨架上插入H5亚型禽流感病毒HA基因,拯救的重组病毒进一步致弱,证明外源基因的插入会导致重组病毒毒力下降^[7]。在本试验中,我们选择糖蛋白基因-H5亚型禽流感病毒HA基因和非糖蛋白基因EGFP作为外源基因,结果重组病毒rL-FmF-HA、rL-FmF-EGFP与非重组野生型亲本毒株相比具有相似的生长曲线。rL-FmF-EGFP鸡胚接种后60h接近rL-FmF的生长滴度,而rL-FmF-HA生长峰值较rL-FmF和rL-FmF-EGFP明显滞后,说明糖蛋白基因的插入影响病毒的复制能力,从而导致其毒力降低。但其复制动力学研究表明,插入外源基因的重组病毒仍然保持与野生型突变株相似的复制特征。另外,rL-FmF-HA接近中等毒力毒株的致病力指标,这提示我们,也许毒力增强的rL-FmF-HA株在现地商品鸡高母源抗体存在的情况下依然具有良好的免疫效果。

曾经有文献报道,证明NDV的HN、V、W和C与NDV的毒力有关^[14-16]。有研究证明F蛋白融合功能的有效发挥需要HN蛋白的参与,这也许暗示两种病毒蛋白的相互作用有可能影响病毒的感染能力^[17]。HN蛋白影响NDV的致病性在弱毒株中表现较为明显,如Ulster,它的HN蛋白含有616个氨基酸,相对于含有577个氨基酸的BC株具有较长的阅读框架^[4]。因此HN蛋白有可能影响NDV的致病性。另一个影响病毒毒力的蛋白是V蛋白,它可以拮抗宿主细胞的 α 、 β 干扰素,有助于病毒的存活和进一步扩散^[16]。因此V蛋白也可能是NDV毒力的另一个重要的决定因素。

在本研究中,我们证明F蛋白的裂解效率不是决定NDV毒力的唯一因素,但对于NDV的致病力具有至关重要的影响;外源基因的插入表达降低NDV的

致病力,其影响的程度取决于插入基因的性质和长度。所得结论与Peeters和Huang等人^[7,10-13]的研究结果不谋而合。NDV其它致病因素及其致病性和神经毒性的分子机制的确定将会有助于在总体上深入了解副黏病毒致病机制。经过遗传修饰的NDV可以通过反向遗传操作技术获得拯救,其毒力可以通过对其裂解位点以同义突变的修饰方式而人为改变,随着不同修饰结果,重组病毒毒力改变的水平也呈现不同。这一结果也提示我们,反向遗传操作技术提供了另一个快速构建、筛选疫苗候选株的捷径。

参 考 文 献

- [1] 陆承平. 最新动物病毒分类简介. 中国病毒学(*Virologica Sinica*), 2005, 20(6): 682-688.
- [2] Scheid A, Choppin PW. Identification of biological activities of paramyxovirus glycoproteins. Activation of cell fusion, hemolysis, and infectivity by proteolytic cleavage of an inactive protein of Sendai virus. *Virology*, 1974, 57: 470-490.
- [3] Gotoh B, Ohnishi Y, Inocencio NM, et al. Mammalian subtilisin-related proteinases in cleavage activation of the paramyxovirus fusion glycoproteins: superiority of furin/PACE to PC2 or PC1/PC3. *Journal of Virology*, 1992, 66: 6391-6397.
- [4] Millar NS, Chambers P, Emmerson PT. Nucleotide sequence of the fusion and hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein genes of Newcastle disease virus, strain Ulster: molecular basis for variations in pathogenicity between strains. *Journal of General Virology*, 1988, 69: 613-620.
- [5] Fujii Y, Sakaguchi T, Kiyotani K, et al. Comparison of substrate specificities against the fusion glycoprotein of virulent Newcastle disease virus between a chick embryo fibroblast processing protease and mammalian subtilisin-like proteases. *Microbiological Immunology*, 1999, 43(2): 133-140.
- [6] Seal BS, King DJ, Bennett JB. Characterization of Newcastle disease virus isolates by RT-PCR coupled to direct nucleotide sequencing and development of sequence database for pathotype prediction and molecular epidemiologic analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 1995, 33: 2624-2630.
- [7] Ge Jinying, Deng Guohua, Wen Zhiyuan, et al. Newcastle Disease Virus-Based Live Attenuated Vaccine Completely Protects Chickens and Mice from Lethal Challenge of Homologous and Heterologous H5N1 Avian Influenza Viruses. *Journal of Virology*, 2007, 81: 150-158.
- [8] 葛金英, 温志远, 王永, 等. 表达绿色荧光蛋白重组新城疫病毒 LaSota 疫苗株的构建. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2006, 46(4): 547-551.
- [9] Collins MS, Strong I, Alexander DJ. Pathogenicity and phylogenetic evaluation of the variant Newcastle disease viruses termed pigeon PMV-1 viruses based on the nucleotide sequence of the

- fusion protein gene. *Archive Virology*, 1996, 141: 635–647.
- [10] Peeters BP, 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. *Journal of Virology*, 1999, 73: 5001–5009.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] Cabaleta C, Munoz-Barroso I, Sagrera A, *et al.* Fusogenic activity of reconstituted Newcastle disease virus envelopes: a role for the hemagglutinin-neuraminidase protein in the fusion process. *International Journal Biochemical Cell Biology*, 2002, 34 (4): 403–413.
- [15] Mebatsion T, Versteegen S, De Vaan LT, *et al.* A recombinant Newcastle disease virus with low-level V protein expression is immunogenic and lacks pathogenicity for chicken embryos. *Journal of Virology*, 2001, 75 (1): 420–428.
- [16] Park MS, Shaw ML, Munoz-Jordan J, *et al.* Newcastle disease virus (NDV)-based assay demonstrates interferon-antagonistic activity for the NDV V protein and the Nipah virus V, W, and C proteins. *Journal of Virology*, 2003, 77 (2): 1501–1511.
- [17] Takimoto T, Taylor GL, Connaris HC, *et al.* Role of the hemagglutinin-neuraminidase protein in the mechanism of paramyxovirus-cell membrane fusion. *Journal of Virology*, 2002, 76 (24): 13028–13033.

Impact of modification of cleavage site of fusion protein and foreign gene insertion on the virulence of Newcastle Disease Virus LaSota vaccine strain

Yong Wang^{1,2}, Jinying Ge¹, Xidi Xie^{1,3}, Yulin Ding^{1,3}, Zhigao Bu^{1*}

⁽¹⁾ National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China)

⁽²⁾ Public Health College, Harbin Medical University, Harbin 150001, China)

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

Abstract: Newcastle disease virus (NDV) cause a highly contagious and economically loss in poultry. The amino acid sequence at the protease cleavage site of the fusion (F) protein has been postulated as a major determinant of NDV virulence. In this study, we have examined the role of F protein cleavage site sequence in NDV virulence by use reverse genetics technology. The sequence G-R-Q-G-R-L present at the cleavage site of the F protein of avirulent strain LaSota was mutated to R-R-Q-R-R-F or R-R-Q-R-R-L. The resultant mutated rL-FmF and rL-FmL virus were evaluated by mean death test (MDT) in eggs, intracerebral pathogenicity index (ICPI) and intravenous pathogenicity index (IVPI) tests in chickens. The results showed that the modification of the F protein cleavage site resulted in a dramatic increase in virulence from an ICPI value of 0.36 for LaSota to a value of 1.18 for rL-FmF and 1.06 for rL-FmL, respectively. In addition, the mutational viruses showed increase MDT and identical IVPI values to parent virus. The virulence of rescued viruses was greatly enhanced by the amino acid replacements, whether the amino acid on the N terminus of F2 was F or L. On this base, we constructed another two NDVs that expressed a H5 subtype avian influenza virus hemagglutinin (rL-FmF-HA) and green fluorescent protein (rL-FmF-EGFP). The ICPI value of recombinant virus rL-FmF-HA and rL-FmF-EGFP were 0.67 and 1.10, respectively lower than that of rL-FmF. The IVPI of both recombinant viruses still keep 0.00. The values of MDT for rL-FmF-HA and rL-FmF-EGFP were 117h and 101h, greater than 90h. Thus, introduction of a foreign gene into NDV genome resulted in growth retardation and attenuation, the decrease degree depended on the nature of foreign protein expressed. These results also indicate that cleavability of the F0 protein is an important determinant for virulence of NDV. NDV can be manipulated in the future for use as a vaccine vector.

Keywords: Newcastle disease virus; Reverse genetic; LaSota; virulence; F gene; cleavage site

Supported by the Chinese National Programs for Science and Technology Development (2004BA519A19, 2005BA711A10) and the 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: 17 July 2007/ Revised: 12 December 2007