

## 置换 HN 基因对新城疫病毒 LaSota 株致病力的影响

王永<sup>1,2</sup>, 葛金英<sup>1</sup>, 丁玉林<sup>1,3</sup>, 解希帝<sup>1,3</sup>, 步志高<sup>1\*</sup>

(<sup>1</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>2</sup> 哈尔滨医科大学公共卫生学院, 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:** 【目的】新城疫病毒的血凝素-神经氨酸酶 (HN) 和融合蛋白 (F) 在病毒装配、出芽、释放及侵入宿主细胞的过程中发挥关键作用, 但 HN 对病毒致病力的影响程度尚不完全清楚。【方法】为探讨这一问题, 本研究以中等毒力毒株 Mukteswar 的 HN 基因替换我国广泛应用的 LaSota 疫苗株 HN 基因, 通过反向遗传操作技术拯救出嵌合病毒 (rL-MuHN)。【结果】rL-MuHN 红细胞吸附能力较亲本株 rLaSota 无显著升高, 具有相似的细胞融合活性; 嵌合病毒 ICPI 由 rLaSota 株的 0.36 降为 0, MDT 90, IVPI=0 与 rLaSota 株相同, 保持典型低致病力缓发型特点不变。进一步以 Mukteswar 株 F 基因替换 rL-MuHN 的 F 基因, 拯救出 F 和 HN 双基因替换嵌合病毒 rL-MuFHN, 尽管该病毒的细胞融合能力显著提高, 但其 MDT、ICPI 和 IVPI 分别为 98 h, 0.59 和 0, 显示 F 和 HN 双基因替换仍未能使嵌合新城疫病毒 rL-MuFHN 的致病力达到中等毒力毒株 Mukteswar (MDT、ICPI 及 IVPI 分别为 46 h、1.32 和 0.64) 的水平。【结论】试验结果表明, F 及 HN 囊膜蛋白基因之外的病毒基因组骨架背景对病毒的致病性同样具有重要的决定性意义, 不同 HN 蛋白对嵌合病毒的致病能力的影响不同, 与供体毒株毒力无关; 以流行野毒株 HN 替代 rLaSota 疫苗株构建抗原针对性更强的弱毒疫苗株存在技术可行性。

**关键词:** 重组新城疫病毒; F 蛋白; HN 蛋白; 致病力

中图分类号: S85 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 05-0638-06

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) 属副黏病毒科腮腺炎病毒属 (*Avulavirus*)<sup>[1]</sup>, 可感染几乎所有禽类, 但毒株间致病力差异显著, 根据其脑内致病指数 (ICPI) 和平均鸡胚致死时间 (MDT) 等指标, 可分为高致病力的速发型 (velogenic)、中等致病力的中发型 (mesogenic) 与低致病力的缓发型 (lentogenic)。

一般认为 NDV 的囊膜糖蛋白即融合蛋白 (F) 介导病毒囊膜与寄主细胞膜的融合, 是病毒核酸侵入寄主细胞建立感染的关键。已有的研究表明 NDV

F 蛋白裂解位点的氨基酸序列是影响其毒力的一个关键因素。HN 蛋白介导病毒粒子对细胞受体的吸附以及子代病毒粒子的解离 (即受体识别和神经氨酸酶活性) 在其吸附细胞受体的同时因构象的变化而促进 F 蛋白融合功能; 2004 年, Melanson 等<sup>[2]</sup>发现 NDV HN 蛋白柄部 F 蛋白特异的氨基酸对于 F 蛋白发挥融合活性至关重要。同年, Huang 和 Wakamatsu<sup>[3,4]</sup>等将中发型的 BC 株 (ICPI 和 MDT 分别为 1.52 和 62 h) 的 HN 基因和 LaSota 克隆株 (ICPI 为 0) 的 HN 基因进行互换, 构建嵌合型重组病毒, 试验证明 HN 基因嵌合型病毒的致病力和组织嗜性变化取决于 HN 供体株的

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

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

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

收稿日期: 2007-08-23; 修回日期: 2007-12-14

毒力。2007年, Estevez等<sup>[5]</sup>用嗜神经和内脏型强毒株HN基因替换中发型毒株Anhinga的HN基因,经反向遗传手段拯救病毒,但重组嵌合型病毒的毒力并无明显增强。至此HN对NDV致病力发挥的重要作用是一种普遍现象,还是因毒株不同的个案,尚无明确答案。

为探讨这一问题,本研究以NDV中等毒力毒株Mukteswar(ICPI为1.32)的HN基因替换我国广泛应用的LaSota疫苗株(ICPI为0.36)的HN基因,利用反向遗传操作技术拯救嵌合病毒,对其致病力和生物学特性进行系统研究。

## 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;中等毒力毒株Mukteswar由本实验室滴定保存;弱毒疫苗株rLaSota由本实验室克隆,拯救并保存<sup>[6]</sup>。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, T4 DNA连接酶及其它限制性内切酶均购自TaKaRa公司, *Pfu*高保真DNA聚合酶购自NEB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 基因替换

提取中等毒力毒株Mukteswar基因组RNA,利用引物经RT-PCR获得其F和HN基因的PCR产物,经测序无误后,在pBRN-FL<sup>[2]</sup>载体上利用特定的*Mun*和*Spe*酶切位点进行相应cDNA片段的替换,即构建完成pBRN-MuHN全基因组cDNA克隆。在pBRN-MuHN的基础上,进一步利用*Xcm*位点以Mukteswar株F基因替换LaSota基因组骨架上的F基因片段,构建完成双基因替换的嵌合型全基因组克隆pBRN-MuFHN。

### 1.3 嵌合病毒的拯救

嵌合病毒的拯救方法见文献[6,7]。收获HA及HI试验结果均为阳性的尿囊液, -70℃冻存,并按常规方法分别于9~11日龄鸡胚滴定每毫升病毒液EID<sub>50</sub>含量。

### 1.4 嵌合病毒的RT-PCR与序列分析鉴定

取250 μL各重组病毒鸡胚接种尿囊液,加750 μL

Trizol经常规方法提取基因组RNA。提取的RNA进行反转录反应,按照鼠源反转录酶(M-MLV)试剂盒说明书加入各成分(反转录引物见表1), 37℃反应2~3 h,反转录出病毒的cDNA。反转录产物直接用于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,反应条件为: 94℃ 5 min, 进入以下循环: 94℃ 1 min, 54.6℃ 30 s, 72℃ 2 min, 30个循环,最后72℃延伸10 min。

PCR产物胶回收净化后,克隆到pBluescript KS(+/-)(Clontech)载体的多克隆位点上,利用应用TSS(Transformation and Storage Solution)法制备的感受态细胞DH5α,转化连接产物。挑菌、摇菌后提取试剂盒提取质粒进行测序。

### 1.5 嵌合病毒在SPF鸡胚的生长特性

为确定反向遗传操作拯救的嵌合病毒在SPF鸡胚的生长特性,各重组病毒F3代尿囊病毒液按2×10<sup>2</sup>EID<sub>50</sub>接种SPF鸡胚尿囊腔。接种后间隔12 h取样,每时间点随机抽取3枚胚,直至72 h。每个时间点抽取的样品混合收获尿囊液,在非免疫胚内滴定每0.1 mL样品中病毒EID<sub>50</sub>含量,详细过程为:将病毒液用灭菌PBS进行10倍系列稀释,每稀释度接种4枚胚,于38℃、湿度为45%~50%的孵化器内继续孵化,孵化满72 h后进行血凝(HA)检测,计算检测EID<sub>50</sub>。每个时间点抽取样品的EID<sub>50</sub>含量测定重复3次,计算平均值及标准误差,绘制动力学曲线图。

### 1.6 红细胞吸附试验(Had)

病毒以1×10<sup>5</sup>EID<sub>50</sub>的量接种密度50%~70%的单层BHK-21细胞。接种后20 h,弃去培养基,用PBS轻洗3遍,加入浓度为1%的SPF鸡红细胞悬液,用量为6孔板每孔500 μL, 4℃孵育15 min, PBS洗两遍,洗去未结合的红细胞,然后用0.05 mol/L的氯化铵溶解结合在细胞表面的红细胞,释放出的血红素在分光光度计、549 nm波长下进行OD值测定。

### 1.7 嵌合病毒融合指数检测

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核包体。多数学者认为细胞融合的形成取决于NDV F蛋白碱裂解位点的氨基酸序列,也有不同看法认为HN蛋白决定了NDV的组织嗜性。为了研究NDV HN蛋白对于NDV组织嗜性特征的影响,将嵌合病毒rL-MuHN、rL-MuFHN与其亲本株rLaSota及HN供体株Mukteswar分别以1×10<sup>5</sup>EID<sub>50</sub>病毒量接种生长达50%~80%的单

层 BHK-21 细胞,一式两份,一份于接种后 24 h 以 3% 的多聚甲醛固定细胞,进行间接免疫荧光检测<sup>[7]</sup>,以确定病毒感染和引起细胞融合的情况。

为了对细胞融合情况进行量化,我们取另一份细胞测定融合指数。具体过程为:弃掉细胞培养基,经 0.02% 的 EDTA 洗过后再加入 1 mL,室温作用 2 min。PBS 再洗两遍,甲醇室温固定 20 min。固定完成的细胞经苏木素-伊红染色。细胞在光镜下计数,融合的细胞核总数与细胞总数的比值即是融合指数。

### 1.8 嵌合病毒致病力指标测定

鸡胚平均致死时间 (MDT) 测定、脑内致病指数 (ICPI) 测定以及静脉接种致病指数 (IVPI) 的测定方法见文献<sup>[7]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 从全长 cDNA 克隆拯救嵌合型 NDV

在本实验室前期的工作中曾经成功拯救过 LaSota 疫苗株相关感染性克隆,见文献<sup>[6,7]</sup>。在本试验中,用中等毒力 NDV Mukteswar 株的 F 和 HN 基因在疫苗株 LaSota 骨架上进行 HN 基因单替换和 F、HN 基因双替换。并对构建完成的嵌合病毒的 cDNA 克隆进行相应基因片段的测序,以确保目的基因的正确替换。来自于 BHK-21 细胞的转染上清接种 9~11 日龄的 SPF 鸡胚尿囊腔,继续培养 5 天后收获 HA 与 HI 试验结果均为阳性的鸡胚尿囊液作为拯救病毒的 F1 代。带有 NDV Mukteswar 株 HN、F 基因的嵌合病毒命名为 rL-MuHN 和 rL-MuFHN。病毒样品经 9~11 日龄的 SPF 鸡胚尿囊腔连续传代 3 次,收获病毒阳性尿囊液提取病毒基因组 RNA,进行 RT-PCR 及序列分析,结果显示嵌合病毒基因组的 HN 基因获得了正确替换(数据未显示),而且嵌合病毒经 SPF 鸡胚连续传代,异源 HN 基因仍旧稳定存在(数据未显示)。

### 2.2 嵌合病毒在 SPF 鸡胚的生长特性

各重组病毒 F3 代尿囊病毒液随机抽取的样品测定每 0.1 mL 尿囊液 EID<sub>50</sub>,重复 3 次,计算平均值,并绘制生长动力学曲线图(图 1)。从图 1 可以看出,嵌合病毒 rL-MuHN、rL-MuFHN 与亲本毒株 rLaSota 生长曲线几乎重叠,表现出极其相似的生长特征,两株嵌合病毒仅在 36~60 h 之间稍高于 rLaSota。HN 基因供体株 Mukteswar 表现出完全不同的生长特征,病毒在 12 h 内快速达到 7log<sub>10</sub>EID<sub>50</sub> 以上,此后缓慢上升,60 h 达到峰值,由于鸡胚趋于死亡而导致病毒滴

度开始下降。嵌合病毒与 rLaSota 和 Mukteswar 株同样具有高滴度生长的特性。试验结果显示,HN 基因的替换并没有改变嵌合病毒在鸡胚内复制的动力学特征。

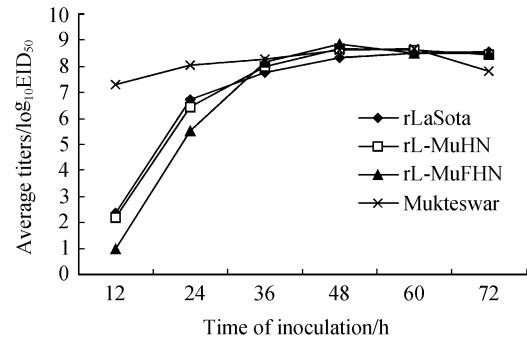


图 1 嵌合新城疫病毒在鸡胚内的复制动力学曲线

Fig. 1 Growth kinetics of parental and chimeric NDVs in embryonated chicken eggs.

### 2.3 嵌合病毒的红细胞吸附能力及细胞融合活性

经过对各不同病毒的红细胞吸附能力以及细胞融合活性的检测,结果见图 2。以 Mukteswar 株的检测结果当作 100%,其它毒株以其检测值所占 Mukteswar 株的百分比来表示。从图 2-A 可以看出,rLaSota 株的 HAd 活性为 Mukteswar 株的 9.2%,rL-MuHN 株则为 8.8%,而 rL-MuFHN 高达 33.1%。由图 2-B 可以看出,嵌合株 rL-MuHN 的融合活性与亲本株 rLaSota 相近,rL-MuFHN 的融合能力则高于亲本株 rLaSota。以上结果说明,HN 蛋白在 NDV

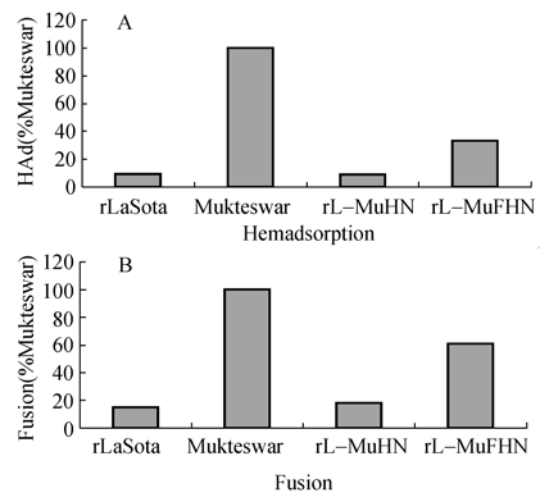


图 2 嵌合新城疫病毒与亲本毒株红细胞吸附和细胞融合活性比较

Fig. 2 Comparison of parental and chimeric NDVs in Hemadsorption and Fusion index. A: Hemadsorption (HAd) assay; B: Fusion index assay.

吸附细胞的过程中起重要作用, Mukteswar 株的 HN 与 rLaSota 株的 HN 对唾液酸受体的识别和结合能力相近, 对于诱导细胞融合亦未起到明显的促进作用, 细胞融合的形成仍然由 F 蛋白裂解位点的性质决定。

#### 2.4 嵌合病毒的细胞致病性

将嵌合病毒 rL-MuHN、rL-MuFHN 与其亲本株 rLaSota 及 HN 供体株 Mukteswar 进行间接免疫荧光

检测, 细胞病变情况见图 3。HN 替换株(图 3-A)所导致的 CPE 与亲本毒株(图 3-B)并无明显差别, 而 rL-MuFHN(图 3-C)在感染后 24 h 出现典型细胞融合, 其导致细胞融合的能力显著高于 rL-MuHN 和亲本株 rLaSota, 但仍达不到 Mukteswar 株所引起的细胞融合程度(图 3-E), 图 3-D 为阴性对照。结果说明在 F 蛋白不变的情况下, HN 蛋白对于 NDV 细胞融合能力的提高并无明显促进作用。

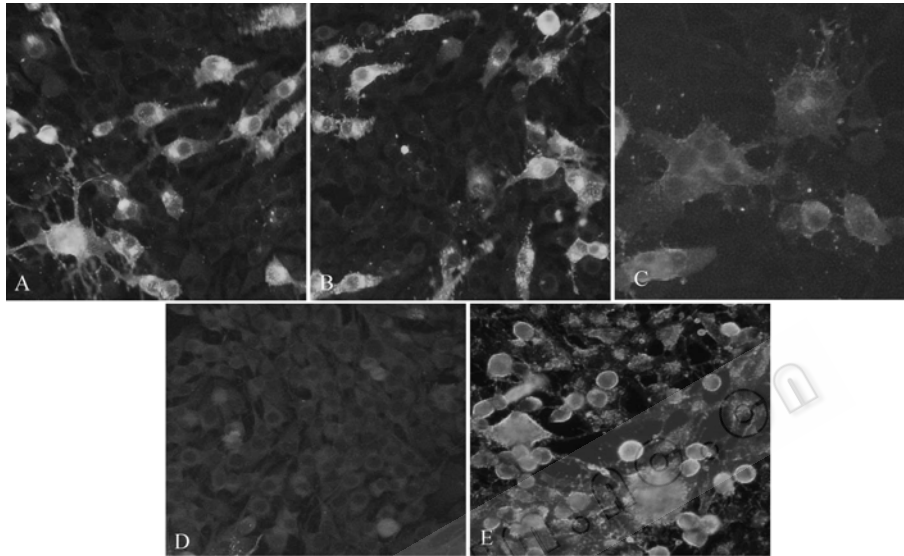


图 3 亲本毒株和嵌合病毒的细胞致病(10×0.25)

Fig. 3 Cytopathogenicities of parental and chimeric viruses in BHK-21 cells. Panels A to D show results after 24h post infection. Uninfected BHK-21 cells (D) and BHK-21 cells infected with rL-MuHN (A) and rLaSota (B) or Mukteswar (E) were incubated with anti-NDV(10×0.25).

#### 2.5 嵌合病毒的体内致病性

嵌合病毒 rL-MuHN、rL-MuFHN 与其亲本毒株 rLaSota, 以及 HN 基因供体毒株 Mukteswar 的致病力指标见表 2。由表 2 可见, HN 蛋白替换的嵌合病毒 ICPI 值未升反降, 由其亲本毒株 rLaSota 的 0.36 降为 0.00; IVPI 值仍然为 0.00。在进一步替换 F 基因后, 嵌合病毒 rL-MuFHN ICPI 值升为 0.59, IVPI 值仍为 0。以上结果同样低于与其具有相同 HN 蛋白的 Mukteswar 株 (ICPI 为 1.32, IVPI 为 0.64)。以上结果显示: HN 蛋白对 NDV 的致病性具有重要影响, 但在本试验中表现为导致毒力下降。

另外, 在 9~11 日龄 SPF 胚上进行了 MDT 检测(表 2), rL-MuHN 的 MDT 值与 rLaSota 的 MDT 相近, 均 90 h。按照 O.I.E 的判定标准 rL-MuHN 株嵌合病毒仍然为弱毒株 (MDT 90 h), 这说明 HN 蛋白替换与否并未增强嵌合病毒的致病能力。rL-MuFHN 的 MDT 值为 98 h, 对鸡胚的致病性与其

亲本毒株 rLaSota 相似, 与 Mukteswar 株相去甚远。

表 2 嵌合病毒致病指数表

Table 2 HN chimeras of NDV and virus pathogenicity in vivo

Strains	Passages	MDT/h	ICPI	IVPI
rLaSota	F3	90	0.36	0.00
rL-MuHN	F3	≥90	0.00	0.00
rL-MuFHN	F3	98	0.59	0.00
Mukteswar	Unknow	46	1.32	0.64

### 3 讨论

新城疫病毒的 HN 蛋白在感染过程中扮演重要角色, 它在与寄主细胞的唾液酸受体结合后, 构型发生改变, 从而导致 F 蛋白对寄主细胞膜的融合, 启动病毒感染过程。对 HN 基因进行人工突变的相关研究, 揭示了 HN 蛋白生物学活性的重要方面<sup>[8-10]</sup>。但在 NDV 感染宿主细胞过程中 HN 蛋白对 NDV 致病性的确切影响还知之甚少。在本研究中, 为了评估 HN 蛋白对 NDV 毒力的影

响,利用现有的反向遗传操作平台,在 LaSota 疫苗株的骨架上,采用中发型毒株 Muktaswar 的 HN 基因替换 LaSota 基因组内的相应部分,构建成嵌合型病毒基因组 cDNA。通过把 NDV LaSota 株的 HN 基因替换为中等毒力株的 HN 基因,利用反向遗传技术拯救出 HN 基因替换的嵌合新城疫病毒 rL-MuHN。

对嵌合新城疫病毒进行序列分析,证实 HN 基因完全替换。嵌合新城疫病毒与亲本毒株 rLaSota 具有相似的生长滴度和动力学特征,而与 HN 供体株差别很大。这一发现提示异源的 HN 与 F 配对并不影响其发挥正常的生物学功能。但与 Huang 等<sup>[3,4]</sup>的研究结果不同,嵌合新城疫病毒毒力并没有因供体株是中发型毒株而获得提升,这一结果印证了 Estevez 等<sup>[5]</sup>的研究结果。Melanson 等<sup>[2]</sup>发现 NDV HN 蛋白柄部 F 蛋白特异的氨基酸对于 F 蛋白发挥融合活性至关重要,F 蛋白特异的氨基酸的改变可能会改变 HN 蛋白的空间构象,从而改变 HN-F 蛋白之间的相互作用,乃至融合活性。嵌合新城疫病毒 rL-MuHN 相对于亲本 LaSota 表现为毒力下降,可能是由于两个毒株 F 蛋白和 HN 蛋白氨基酸序列之间同源性较低,F 蛋白同源性为 93%,HN 蛋白同源性为 88%,不同来源的 F 和 HN 蛋白之间不完美匹配可能影响了嵌合病毒的致病能力。

因此,在嵌合新城疫病毒 rL-MuHN 的基础上,再以 Mukteswar 株 F 基因替换 rLaSota 的 F 基因,拯救嵌合病毒 rL-MuFHN,双基因替换嵌合新城疫病毒的致病力明显高于亲本株 rLaSota 和嵌合新城疫病毒 rL-MuHN,但仍然远远低于基因供体株 Mukteswar。HN 蛋白决定 NDV 与宿主细胞间的相互作用及病毒粒子对宿主细胞的吸附,嵌合病毒的体外试验结果证实,在相同 F 蛋白存在的情况下,Mukteswar 株 HN 蛋白与 rLaSota 的 HN 蛋白在生物学活性上并无明显差别,并不会影响细胞融合的形成。嵌合毒株 rL-MuFHN 相对于 rL-MuHN 和亲本株 rLaSota 表现为 HAd 值的升高和融合能力的增强,这说明 NDV F 蛋白的性质决定病毒的融合能力,融合能力的提高增加了感染细胞的数量,从而导致两株嵌合新城疫病毒 HAd 活性的差异。但嵌合毒株 HAd 值和融合能力仍低于 HN 供体 Mukteswar 株,这说明 NDV 的自主复制能力不仅与 F 蛋白相关,基因组的其它成分同样影响着 NDV 的生长复制,乃至 NDV 的致病能力。Huang 等<sup>[3]</sup>发现 HN 蛋白能够改变 NDV 的融合能力,与 HAd 呈正相关。通过在弱毒株基因骨架上替换中等毒力毒

株的 HN 基因,证明 HN 基因并非 NDV 的关键毒力基因,但我们的研究结果与 Huang 研究小组不同的是,HN 基因单替换嵌合病毒受体结合能力以及细胞融合能力均未升高,在进一步替换 F 基因之后此病毒的融合能力等大大提高。试验结果证明 HN 蛋白对于 NDV 的影响是通过与 F 蛋白的相互作用实现的。

通过对嵌合病毒 rL-MuHN 的 MDT、ICPI、IVPI 等毒力指标的测定来评估病毒毒力。结果显示,此嵌合体病毒的 ICPI 值较其亲本株 rLaSota 和 HN 供体株 Muktaswar 的 ICPI 值均明显降低,表现为毒力下降。MDT 和 IVPI 结果相对于亲本株 rLaSota 没有变化,相对于 Muktaswar 则表现为毒力下降。结果,当中等毒力毒株的 HN 基因替换弱毒株的 HN 基因后,嵌合病毒毒力未升反降,表明 HN 的氨基酸序列的不同是影响病毒毒力的一个因素,不同来源的 HN 蛋白对嵌合新城疫病毒的影响不同。研究结果也表明 NDV 的毒力是由多个基因决定的。

研究异源 HN 基因改变嵌合病毒毒力的分子机制将是又一个令人感兴趣的切入点。HN 蛋白的球状末端含有病毒吸附和神经氨酸酶活性<sup>[11-15]</sup>。研究结果显示,在融合过程中 F 蛋白 HR2 结构域和 HN 蛋白近膜外功能区 124 到 152 氨基酸序列间发生了特异的相互作用<sup>[16]</sup>。在 rLaSota 和 Muktaswar 的 HN 之间只有 55 个氨基酸的不同。氨基酸的差异遍布整个 HN 蛋白,但大部分发生在 HN 蛋白的球状区域。鉴于已然建立的 NDV rLaSota 株反向遗传操作系统,可以对影响其生物功能的氨基酸进行定点突变,并观察这些突变对于病毒感染能力带来的影响。此外,在反向遗传操作平台基础上,NDV 不同毒株间整合基因替换技术的进一步成熟,为筛选新的抗原变异疫苗株提供了新的途径。

## 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] Melanson VR, Iorio RM. Amino acid substitutions in the F-specific domain in the stalk of the newcastle disease virus HN protein modulate fusion and interfere with its interaction with the F protein. *J Virol*, 2004, 78(23):13053-13061.
- [3] Huang Z, Aruna P, and Siba KS, et al. The Hemagglutinin-Neuraminidase Protein of Newcastle Disease Virus Determines Tropism and Virulence. *J Virol*, 2004, 78: 4176-4184.
- [4] Wakamatsu N, King DJ, Seal BS, et al. The pathogenesis of Newcastle disease: A comparison of selected Newcastle disease virus wild-type strains and their infectious clones. *Virology*, 2006, 353: 333-343.

- [5] Estevez C, King D, Seal B. Evaluation of Newcastle disease virus chimeras expressing the Hemagglutinin-Neuraminidase protein of velogenic strains in the context of a mesogenic recombinant virus backbone. *Virus Res*, 2007, 129: 182–190.
- [6] Ge J, Deng G, Wen Z. Newcastle Disease Virus-Based Live Attenuated Vaccine Completely Protects Chickens and Mice from Lethal Challenge of Homologous and Heterologous H5N1 Avian Influenza Viruses. *J Virol*, 2007, 81: 150–158.
- [7] 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.
- [8] Deng RZ, Wang A, Mirza M, *et al.* Localization of a domain on the paramyxovirus attachment protein required for the promotion of cellular fusion by its homologous fusion protein spike. *Virology*, 1995, 209: 457–469.
- [9] McGinnes LW, Morrison TG. Modulation of the activities of HN protein of Newcastle disease virus by non-conserved cysteine residues. *Virus Res*, 1994, 34: 305–316.
- [10] McGinnes LW, Morrison TG. The role of individual oligosaccharide chains in the activities of the HN glycoprotein of Newcastle disease virus. *Virology*, 1995, 212: 398–410.
- [11] Crennell S, Takimoto T, Portner A, *et al.* Crystal structure of the multifunctional paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase. *Nat Struct Biol*, 2000, 7: 1068–1074.
- [12] Gravel KA, Morrison TG. Interacting domains of the HN and F proteins of Newcastle disease virus. *J Virol*, 2003, 77: 11040–11049.
- [13] Iorio RM, Syddall RJ, Glickman RL, *et al.* Identification of amino acid residues important to the neuraminidase activity of the HN glycoproteins of Newcastle disease virus. *Virology*, 1989, 173: 196–204.
- [14] Iorio RM, Glickman RL, Riel AM, *et al.* Functional and neutralization profile of seven overlapping antigenic sites on the HN glycoproteins of Newcastle disease virus: monoclonal antibodies to some sites prevent viral attachment. *Virus Res*, 1989, 13: 245–261.
- [15] Mirza AM, Deng RT, Iorio RM. Site-directed mutagenesis of a conserved hexapeptide in the paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase glycoproteins: effects on antigenic structure and function. *J Virol*, 1994, 68: 5093–5099.
- [16] Yusoff K, Nesbit M, McCartney H, *et al.* Mapping of three antigenic sites on the hemagglutinin-neuraminidase protein of Newcastle disease virus. *Virus Res*, 1988, 11: 319–333.

## Evaluation of Newcastle disease virus with derivated Hemagglutinin-Neuraminidase gene of mesogenic strain

Yong Wang<sup>1,2</sup>, Jinying Ge<sup>2</sup>, Yulin Ding<sup>1,2</sup>, Xidi Xie<sup>1,2</sup>, Zhigao Bu<sup>2\*</sup>

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

<sup>(2)</sup>Public Health College Harbin Medical University, Harbin 150001, China)

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

**Abstract: [Objective]** The hemagglutinin-neuraminidase (HN) and fusion protein of Newcastle disease virus (NDV) plays a crucial role in the process of budding and infection. To understand the exact contribution of the HN gene to NDV pathogenicity, a reverse genetics system was developed using the lentogenic NDV LaSota strain. **[Methods]** the HN genes of an avirulent recombinant NDV strain (rLaSota) was replaced by an HN gene from Mukteswar mesogenic NDV strain by reverse genetics. Furthermore, the F gene of rL-MuHN was replaced with that of Mukteswar strain, resulting the double genes replaced chimeric virus, rL-MuFHN. **[Results]** Although the rescued chimeric virus (rL-MuHN) did not show significant increase in ability of hemadsorption, the intracerebral pathogenicity index test (ICPI=0) in chickens and mean death time for eggs (MDT = 90 h). rL-MuHN kept the low pathogenicity similar to its parent rLaSota strain. Compared to single gene replaced rL-MuHN, rL-MuFHN induced stronger cell fusion and showed a mild increase in ICPI (from 0 to 0.59) and no significant change in MDT ( = 90 h). rL-MuFHN showed much lower pathogenicity than that of Mukteswar (ICPI.=1.32 and MDT=46,respectively). A HN gene exchange alone within the context of the NDV rLaSota backbone failed to increase virus virulence from unvelogenic to mesogenic pathotype. **[Conclusion]** These results indicated that the virulence of NDV is determined multigenically. The heterotypic HN and F pairs were not equally effective in virus pathogenicity. The HN gene derivated from mesogenic strain dose not alter the lentogenic property of NDV LaSota strain. NDV can be manipulated by gene replacement in the future for use as a vaccine candidate.

**Keywords:** recombinant newcastle disease virus; F protein; HN protein; virulence

Supported by the Foudation item National Key Technologies Research and Development Program(2004BA519A19, 2005BA711A10)and the National Basic Research Program of China(2005CB523200)

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

Received: 23 August 2007/ Revised: 14 December 2007