

## 鹅源新城疫病毒拯救体系的建立\*

胡顺林 张艳梅 孙 庆 刘玉良 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** 参照 GenBank 上公布的鹅源新城疫病毒 ZJI 株全序列,设计 8 对引物,经 RT-PCR 法从尿囊液中扩增目的片段后,分别克隆进 pCR2.1 载体,将 I ~ VII 7 对引物的扩增片段依次亚克隆到 TVT7R 转录载体中,构建了含 NDV 全基因组 cDNA 的转录载体(pNDVZJI),将 V、VI 和 VIII 3 对引物的扩增片段分别克隆进 pCR2.1 载体,并亚克隆到表达质粒 pCI-neo 上,构建了 L 基因的真核表达载体(pCI-L),pNDVZJI、pCI-L 与另外两个辅助表达质粒(pCI-NP 和 pCI-P)共转染 BSR-T7/5 细胞,成功拯救出了具有血凝性的鹅源新城疫病毒 ZJI 株。鹅源新城疫病毒的成功拯救为后续相关研究工作的开展打下了基础。

**关键词** 新城疫病毒, cDNA, 转染, 拯救

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(2007)03-0426-04

## Establishment of Reverse Genetics System for NDV Isolated from Goose\*

HU Shun-Lin ZHANG Yan-Mei SUN Qing LIU Yu-Liang WU Yan-Tao LIU Xiu-Fan\*\*

(Key Laboratory for Animal Infectious Diseases of Ministry of Agriculture, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

**Abstract** Eight fragments were amplified and cloned into pCR2.1 vector with the designed primers. The fragments, amplified with primer I to VII, were subcloned into transcription vector to construct the plasmid pNDVZJI which contained the full-length cDNA of NDV ZJI strain. The eukaryotic expression vector pCI-L was constructed by subcloning the fragments, amplified with the primer V, VI and VIII, into the expression vector pCI-neo. The full-length cDNA clone, pNDVZJI, with three helper plasmids, pCI-NP, pCI-P and pCI-L, were cotransfected into BSR-T7/5 cell expressing T7 RNA polymerase. After inoculation of transfected cell culture into embryonated chicken eggs from specific pathogen free (SPF) flock, The NDV of ZJI strain was rescued successfully, which laid a good foundation for the further related research.

**Key words** Newcastle disease virus, cDNA, Transfection, Rescue

反向遗传操作技术(reverse genetics manipulation technique)是在反转录-聚合酶链反应技术和体外转录 RNA 技术基础上建立起来的一门新型分子病毒学研究技术,常被称为“病毒拯救”。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,在辅助质粒提供相关酶的作用下, 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<sup>[1,2]</sup>。

新城疫(Newcastle disease, ND)是由新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)引起的多种禽类发生高度死亡的一种重要传染病。NDV 在中国已存在

几十年,过去,虽然也有报道 NDV 能自然感染鹅、鸭等水禽,但一般认为水禽对 NDV 有较强的抵抗力,感染后不易发病和造成流行。然而,自 1997 年以来,我国陆续有水禽感染 NDV 强毒并发病的报道<sup>[3]</sup>,因此,本病的出现意味着部分 NDV 毒株的致病特性发生了较大变化。本室对 2001 年分离到的一株鹅源 NDV 强毒 ZJI 株进行了全基因组序列的测定<sup>[4]</sup>,同时构建了该基因组 cDNA 的全长克隆以及构建了含该毒株 NP、P 与 L 基因的 3 个表达载体<sup>[5]</sup>。并在此基础上进行了鹅源新城疫病毒病毒的拯救,但由于基因组和 L 基因片段较长,在 PCR 扩增时部分位置的核苷酸发生了突变,导致病毒拯救

\* 国家自然科学基金重点项目(No. 30630048),国家科技支撑计划(No. 2006BAD06A03)

\*\* 通讯作者 Tel: 0514-7991416, E-mail: xliu@mail.yzu.edu.cn

收稿日期: 2006-07-02, 修回日期: 2006-10-20

一直没能获得成功,因此本研究从减少核苷酸突变的角度出发,重新设计构建了含 NDV 基因组 cDNA 的转录载体和 L 真核表达载体,旨在建立鹅源新城疫病毒的拯救体系,为新城疫病毒各基因的功能、RNA 编辑机理、病毒与宿主间的相互作用关系及抗病毒策略等领域的研究提供技术平台。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 毒株、细胞株、单抗及鸡胚:鹅源 NDV ZJI 株 2001 年本教研室从浙江发病鹅群中分离并鉴定为强毒株<sup>[3]</sup>,能稳定表达 T7 RNA 聚合酶的 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;抗 ZJI 株 NDV HN 蛋白单克隆抗体(6B1)由胡顺林等制备<sup>[6]</sup>,9-11 日龄 SPF 种蛋购自山东省实验种鸡场。

1.1.2 质粒和菌株:转录载体 TVT7R(0.0)由美国 Alabama 大学 L. Andrew Ball 教授惠赠,真核表达载体 pCI-neo 购自美国 Promega 公司;T 载体试剂盒(pCR2.1)为美国 Invitrogen 公司产品;宿主菌

*E. coli* DH5α为本室保存,表达 NP 和 P 基因的真核表达质粒(pCI-NP 和 pCI-P)由刘玉良等构建;鹅源 NDV ZJI 株微型基因组(pLGT)由张艳梅等构建<sup>[7]</sup>。

1.1.3 主要试剂:AMV 反转录酶、高保真 DNA 聚合酶、T<sub>4</sub> DNA 连接酶购自 Promega 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;RNA 抽提试剂盒购自 TaKaRa 公司;各种限制性内切酶均购自晶美生物工程有限公司。

1.2 病毒的反转录

病毒的 RNA 抽提按试剂盒说明书提供的步骤进行。病毒 RNA 的反转录参照文献[5]。

1.3 引物设计与合成

根据所测得的鹅源 NDV ZJI 株全基因组序列和全长克隆上的两个单一切点 *Age*I(2879)和 *Mlu*I(13048)设计了 8 对引物(见表 1)。

引物中所加酶切位点以黑斜体字标注,引物由上海生工生物工程公司合成。PCR 产物经纯化回收后克隆于 pCR2.1 T Vector 进行扩增,阳性克隆送上海联众科技研究院进行测序验证。

表 1 用于载体构建的引物

引物编号 (扩增片段的位置)	引物序列(内切酶)
I (1-2929)	5'- <b><i>CGTCTC</i></b> GTATAACCAAACAGAGAATCTGTGAGG-3'( <i>Bsm</i> B I ) 5'-TTT <b><i>ACTAGT</i></b> CCTTCTCCACTCCCATGTCAG-3'( <i>Spe</i> I )
II (2849-5223)	5'-GGGTGAAATGACGCTCAATAA <i>ACTCTC</i> -3' 5'-AT <b><i>GGTCTC</i></b> ATCTGTGGCCGAATACT-3'( <i>Bsa</i> I )
III (5218-7012)	5'-AT <b><i>ACGTC</i></b> TCACAGATCACCTCCCTGCATTAAC-3'( <i>Bsm</i> B I ) 5'-GTC <b><i>AGATCT</i></b> CTGCAACCGGATAGTATCACA-3'( <i>Bgl</i> II )
IV (7008-9552)	5'-TCCGTCTCAGATCACTCACACTCACATCAAT-3'( <i>Bsm</i> B I ) 5'-TCACGACCATCATATCGAAATCTACCATC-3'
V (8368-10627)	5'-ATA <b><i>TCTAGA</i></b> GAGGGAACACGGGTAGGACA-3'( <i>Xba</i> I ) 5'-TAA <b><i>GAAGAC</i></b> CATGCAGGCAACTCGACAAT-3'( <i>Bbs</i> I )
VI (10621-13060)	5'-TA <b><i>CGTCTC</i></b> CTGCATGGTACAAGGTGACAATC-3'( <i>Bsm</i> B I ) 5'-TGAGACC <b><i>ACGCGT</i></b> CGAGTGC AAGAGA-3'( <i>Mlu</i> I )
VII (12981-15192)	5'-GAC <b><i>ACTAGT</i></b> TGGTCACACCAGCTTG CAGAT-3'( <i>Spe</i> I ) 5'- <b><i>CGTCTC</i></b> TACCC ACCAAACAGAGATTGGTGAATG-3'( <i>Bsm</i> B I )
VIII (13060-15053)	5'-TCG <b><i>ACGCGT</i></b> TGGTCTCAGGCTTATAT-3'( <i>Mlu</i> I ) 5'-TCAGTGAGGGAGTCATCAGTTAGGAAG-3'

#### 1.4 含有全基因组 cDNA 转录载体的构建

引物 I 和 VII 两个扩增片段分别与 T 载体 pCR2.1 连接,经 *Spe* I 酶切后将两片段相连,再经 *Bsm*B I 酶切与经 *Bbs* I 酶切后的转录载体 TVT7R 相连接,构建了重组质粒 pI+VII,引物 II-VI 的 5 个扩增片段分别与 T 载体相连接,通过 T 载体和引物上外加的酶切位点将 5 个片段依次相连构建了质粒 T-II-VI,经 *Age* I 和 *Mlu* I 酶切后回收目的片段与经同样酶切的 pI+VII 相连,构建含有 NDV 基因组 cDNA 全长的转录载体 pNDVZJI。

#### 1.5 L 基因真核表达载体的构建

引物 V、VI 和 VIII 的 3 个扩增片段分别与 T 载体 pCR2.1 连接,通过 T 载体和引物上外加的酶切位点将 3 个片段依次相连,所得阳性质粒经 *Xba* I 和 *Not* I 酶切后回收目的片段与经同样酶切的质粒 pCI-neo 相连,构建 L 基因的真核表达载体 pCI-L。

#### 1.6 L 表达载体的功能鉴定

将 pCI-NP、pCI-P 和 pCI-L 3 个真核表达质粒与 NDV ZJ1 株微型基因组(pLGT)共转染能稳定表达 T7 RNA 聚合酶的 BSR-T7/5 细胞,48h 后置荧光显微镜下观察 GFP 的表达情况。

#### 1.7 病毒的拯救

将 pCI-NP、pCI-P 和 pCI-L 3 个真核表达质粒与含有 NDV 基因组 cDNA 全长的转录载体(pNDVZJI)共转染 BSR-T7/5 细胞,转染方法参照 Superfect transfection Reagent 说明书进行,60h 后收集转染细胞的上清液接种 9~11 日龄 SPF 鸡胚。

#### 1.8 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,同时以 NDVZJI 母本毒株为阳性对照。

#### 1.9 RT-PCR 验证拯救病毒

将 HA 和 HI 检测均为阳性的尿囊液在 SPF 鸡胚上传两代后,收集尿囊液抽提 RNA 用于 RT-PCR 反应,扩增 NDVHN 基因区域长度约为 1.8 kb 的片段。

## 2 结果与分析

#### 2.1 转录载体 pNDVZJI 的构建

利用所设计的酶切位点,构建获得了含有 NDV 基因组 cDNA 全长的转录载体 pNDVZJI。测序结果

显示在全长克隆的 7320 处即 HN 基因 ORF 内的 903 处有一核苷酸发生了同义突变(A→G),此可作为标签序列用于拯救病毒与野生病毒的区分。

#### 2.2 L 表达载体的功能鉴定结果

pCI-NP、pCI-P 和 pCI-L 三个真核表达质粒与 NDV ZJ1 株微型基因组(pLGT)共转染 BSR-T7/5 细胞 48h 后,在荧光显微镜下能见到 GFP 基因的表达(见图 1),说明 pCI-L 与 pCI-NP 和 pCI-P 在细胞中均得到了表达,能与 pLGT 基因组形成 RNP 结构,从而启动了微型基因组的复制和转录。

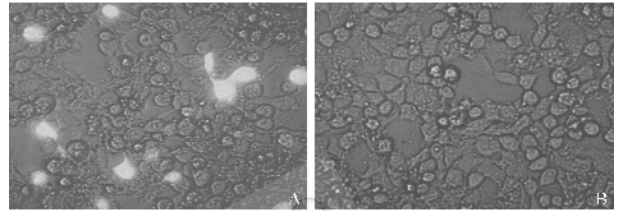


图 1 L 表达质粒的功能鉴定

A 转染结果 B 阴性对照

#### 2.3 病毒拯救

转染样品接种 SPF 鸡胚 48h 左右鸡胚开始死亡,收取尿囊液测 HA,效价为  $2^6$ ,且能被抗 NDV 的单克隆抗体所抑制。

#### 2.4 RT-PCR 产物测序鉴定结果

尿囊液作  $10^4$  稀释后接种 SPF 鸡胚,传两代后再收取尿囊液用于反转录,然后进行 PCR 扩增反应,结果扩增出了同预期大小一致的片段,测序结果与 GenBank 上公布的序列相比发现:在全长克隆 7320 的位置有一个 A→G 的突变(见图 2),从而证明病毒的基因组源于转录载体 pNDVZJI。

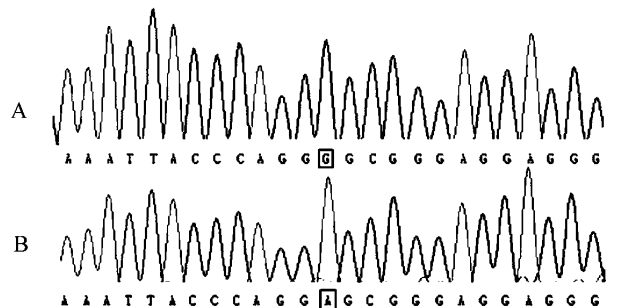


图 2 RT-PCR 产物测序鉴定结果

A 获救病毒 RT-PCR 产物测序的部分结果 B 母本病毒 RT-PCR 产物测序的部分结果

## 3 讨论

技术和体外转录 RNA 技术基础上建立起来的一门新型分子病毒学研究技术,由于最终“拯救”出的 RNA 病毒来源于 cDNA 克隆,因此,可在 DNA 水平上对 RNA 病毒基因组进行各种体外人工操作,以此来研究 RNA 病毒的基因复制和表达调控机理、病毒的基因功能<sup>[1,8]</sup>、病毒与宿主间的相互作用关系,以及构建新型病毒载体表达外源基因<sup>[9,10]</sup>和进行疫苗的研制<sup>[11]</sup>等。

2005 年,刘玉良等<sup>[12]</sup>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 LaSota 毒株的 3 个表达载体克隆与 ZJI 株 NDV cDNA 克隆进行共转染却拯救出了有血凝性的 NDV,但其拯救效率很低,给后续研究带来了困难,理论上应该是 ZJI 株来源的 4 个重组质粒组合更容易拯救出野生型病毒,但为何却一直没有成功?序列分析结果表明,构建过程存在一些核苷酸的变异,尤其是全长 cDNA 克隆和 L 表达质粒中存在多个核苷酸的变异,这在一定程度上影响了病毒的拯救的成功率。

由于 cDNA 克隆和 L 基因偏长,因此为了尽可能减少 PCR 扩增中产生突变,我们将扩增片段控制在 2000bp 左右,同时通过降低 PCR 循环数的方法,对含全长 cDNA 克隆转录载体和 L 表达质粒进行了重新构建,在整个过程中,全长 cDNA 克隆仅有 2 个位置的核苷酸发生了同义突变,这不仅不会影响到病毒的拯救而且还可以作为获救病毒的标记,可与野生病毒进行有效区分。将重新构建的两个质粒

与另外两个辅助表达质粒(pCI-NP 和 pCI-P)共转染 BSR-T7/5 细胞 4 次,均获得了有感染性的病毒粒子,拯救效率明显提高,病毒的成功拯救为接下来的基因功能和疫苗载体开发等方面的研究提供了平台。

## 参考文献

- [1] Peeters B P H, Olavs de Leeuw, Koch G, *et al.* J Virol, 1999, **73**: 5001 ~ 5009.
- [2] Roemer-Oberdoerfer A, Mundt E, Mebatsion T, *et al.* J Gen Virol, 1999, **80**: 2897 ~ 2995.
- [3] Liu X F, Wan H Q, Ni X X, *et al.* Arch Virol, 2003, **148**(7): 1387 ~ 1403.
- [4] Huang Y, Wan H Q, Liu H Q, *et al.* Arch Virol, 2004, **149**(7): 1445 ~ 1457.
- [5] 刘玉良, 吴艳涛, 黄 勇, 等. 微生物学通报, 2004, **31**(2): 37 ~ 40.
- [6] 胡顺林, 吴艳涛, 刘文博, 等. 中国兽医科技, 2005, **35**(5): 341 ~ 345.
- [7] 张艳梅, 刘玉良, 黄 勇, 等. 微生物学报, 2005, **45**(1): 31 ~ 35.
- [8] Mebatsion T, Versteegen S, de Vaan L T C, *et al.* J Virol, 2001, **75**: 420 ~ 428.
- [9] Engel-Herbert I, Werner O, Teifke J P, *et al.* Journal of Virological Methods, 2003, **108**(1): 19 ~ 28.
- [10] Nakaya T, Cros J, Park M S, *et al.* J Virol, 2001, **75**: 11868 ~ 11873.
- [11] Peeters B P H, Olav S DE Leeuw, Iwan V, *et al.* Vaccine, 2001, **19**: 1616 ~ 1627.
- [12] 刘玉良, 张艳梅, 胡顺林, 等. 微生物学报, 2005, **5**: 780 ~ 783.