

2008—2009年部分地区新城疫病毒分离株的进化分析

尤永君^{1,2}, 王延树¹, 梁武¹, 杨保收¹, 李建丽¹, 邹立宏¹, 王和平¹, 乔健²

(1. 瑞普(保定)生物药业有限公司, 河北保定 071000; 2. 中国农业大学动物医学院, 北京 100193)

摘要:本研究旨在从分子水平上掌握中国新城疫病毒的变异情况和新城疫的流行规律, 对2008—2009年从中国部分省市养殖场分离的9株新城疫病毒毒株, 采用RT-PCR方法扩增其F和HN基因, 经克隆和测序, 对所得序列进行同源性和遗传进化分析。结果显示, 9株分离株有8株为基因Ⅶ型, 1株为基因Ⅱ型, F基因开放性阅读框架(ORF)为1662 bp, 强毒株同La Sota的核苷酸同源性为83.5%~84.2%。HN基因开放性阅读框架(ORF)为1716或1734 bp, 强毒株在538位缺失1个糖基化位点。结果表明, 近年流行的ND疫情主要是由基因Ⅶ型NDV引起, F和HN基因的变异可能与频繁的疫苗免疫选择压力有关。

关键词:新城疫病毒; F基因; HN基因; 序列分析; 基因型

中图分类号: S858.32

文献标识码: A

文章编号: 1671-7236(2011)08-0085-04

新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)是一种有囊膜的病毒, 含有一条单股、负链RNA, 基因组全长约15000 nt, 可编码6种结构蛋白, 即核衣壳蛋白(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)及大聚合酶蛋白(L)(Yusoff等, 2001)。融合蛋白(F)是位于病毒囊膜表面的一种糖蛋白, 其功能是介导病毒囊膜与靶细胞膜的融合, 使病毒基因组进入细胞浆(Bagai等, 1995)。F蛋白首先以无活性前体F0的形式合成(Chambers等, 1986), F0被酶裂解为以二硫键相连接的F1和F2后, 才能使新生病毒具有感染性(Gotoh等, 1992), F蛋白是决定NDV毒力的主要因素之一。血凝素—神经氨酸酶(HN)是位于新城疫病毒(NDV)囊膜表面的一种糖蛋白, 负责识别靶细胞含唾液酶受体, 介导病毒对靶细胞的吸附, 促使新生的病毒粒子从感染细胞膜表面释放; 还能促进融合蛋白的融合功能(Peeters等, 2001)。此外, HN蛋白还与NDV的毒力有一定关系。因此弄清新城疫病毒F基因和HN基因进化规律以及中国流行毒株之间的关系, 可为制定防制新城疫流行的有效对策提供重要的科学依据。

1 材料与方法

1.1 病毒 病毒HN0902、HN0904、SD0801、HN0906、SD0903、JS0902、SD0904、BJ0901和SX0905为2008—2009年从田间分离的毒株, 经HA-HI验证为新城疫病毒。

1.2 引物 根据GenBank上发表的NDV的F基

因序列, 寻找相对保守区域, 用Primer 5.0软件和Oligo 6.0软件设计上、下游引物, F1: 5'-ATGGGCTCAAACCTTCTA-3', F2: 5'-CTTGTAAGTGGCTCTCACTCTG-3', F1和F2扩增片段为1662 bp。引物由北京擎科生物技术有限公司合成。

根据GenBank上发表的NDV的HN基因序列, 寻找相对保守区, 用Primer 5.0软件和Oligo 6.0软件设计上、下游引物, HN1: 5'-TCCGTTC-TACCACATCACCA-3', HN2: 5'-CGTCTTCCCAACCATCCTAT-3', HN3: 5'-CATCTTTCCAACTCCTTTAT-3', HN1和HN2扩增强毒株HN基因, 片段大小为1716 bp, HN1和HN3扩增弱毒株HN基因, 片段大小为1734 bp。引物由北京擎科生物技术有限公司合成。

1.3 主要试剂 pGM-T载体、Amp^r、感受态细胞Top10、Trizol试剂、禽源反转录酶(MLV)、T4 DNA连接酶、Taq DNA聚合酶、RNA酶抑制剂、dNTP、琼脂糖、DL2000 DNA Marker、DNA快速回收试剂盒和质粒微量快速提取试剂盒均购自TIANGEN公司。

1.4 病毒的培养与收获 利用纯化好的病毒接种10日龄SPF鸡胚, 每株病毒接种两枚, 每枚接种0.1 mL, 进行病毒增殖, 37℃孵育, 弃去24 h内死亡的鸡胚, 收获24~96 h内感染胚的尿囊液, 测定尿囊液血凝性, 大于6 log₂者置-20℃保存备用。

1.5 F基因和HN基因的RT-PCR 按照Trizol试剂说明书提取病毒RNA。RT过程按照TIANGEN公司TIANScript M-MLV反转录酶说明书进行, PCR反应参数如下: 95℃预变性2 min; 94℃变性30 s, 54℃退火30 s, 72℃延伸2 min 30 s, 30个

收稿日期: 2010-12-14

作者简介: 尤永君(1973—), 男, 河北人, 硕士, 主要从事临床疾病的诊断。

循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min, 4 ℃ 保存。

1.6 PCR 产物的连接、序列测定及分析 RT-PCR 产物在 0.01 g/mL 琼脂糖凝胶中进行电泳, 按 DNA 快速回收试剂盒纯化核酸。回收纯化后的 RT-PCR 产物与 pGM-T 载体连接并转化感受态 Top10, 挑取在 Amp 的 LB 培养基上长出的白色菌落, 37 ℃ 摇床上培养 12 h, 按质粒微量快速提取试剂盒说明书提质粒, PCR 验证后送北京擎科生物技术有限公司测序。测序结果提交到 GenBank 进行比对, 并用 DNASTar 软件与多株经典毒株进行核苷酸序列和氨基酸序列的比对, 绘制系统发育进化树。

2 结果

2.1 F 基因和 HN 基因的 RT-PCR 结果 9 株 NDV 分离株的 F 基因均扩增出了目的片段(图 1), 与预期结果相符。经克隆测序后, F 基因开放阅读框全长 1662 bp, 编码 553 个氨基酸。引物 HN1 和 HN2 扩增出 8 株强毒的 HN 基因, 用引物 HN1 和 HN3 扩增出 1 株弱毒株(SX0905)的 HN 基因(图 2)。

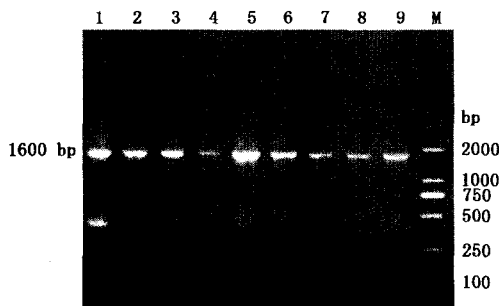


图 1 NDV 分离株的 F 基因 RT-PCR 电泳结果
注: M, DNA 分子质量标准 DL2000; 1, HN0902; 2, HN0904; 3, SD0801; 4, HN0906; 5, SD0903; 6, JS0902; 7, SD0904; 8, BJ0901; 9, SX0905。

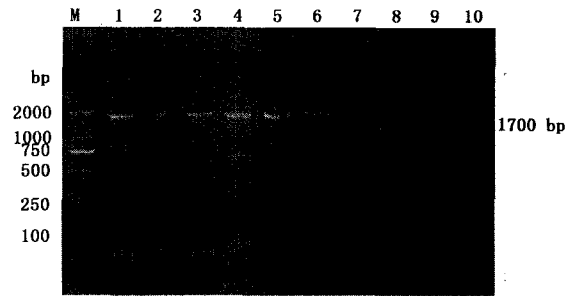


图 2 NDV 分离株的 HN 基因 RT-PCR 电泳结果

注: M, DNA 分子质量标准 DL2000; 1, HN0902; 2, HN0904; 3, SD0801; 4, HN0906; 5, SD0903; 6, JS0902; 7, SD0904; 8, BJ0901; 9, SX0905; 10, 阴性对照。

2.2 F 基因分型比较 选取所测定分离株的 F 基因, 参考 Lomniczim 等(1998)介绍的方法与国内外已发表的 NDV F 基因典型的 9 个基因型代表毒株 20 株作序列比对, 应用 DNASTar 6.0 软件包中的 MegAlign 程序将分离株 F 基因核苷酸序列与参考毒株进行同源性比较, 并绘制系统发育进化树, 结果见图 3。由进化树可知, 在本研究的 9 株分离毒株中, 基因 VII 型有 8 株, 分别为 HN0902、HN0904、SD0801、HN0906、SD0903、JS0902、SD0904 和 BJ0901, 它们同基因 VII 型的 CH2000 和 Y98 同源性较高, 且全部是基因 VII 型 d 亚型, 其 F 基因 111 到 117 位的裂解位点都为“G-R-R-Q-K-R * F”, 完全符合强毒株的特征。SX0905 为基因 II 型, 这也和目前其他专家学者分离情况相同。

2.3 F 基因与 HN 基因同源性分析 各毒株之间 F 基因核苷酸同源性见图 4。由图 4 可知, 强毒株与 La Sota 株同源性在 83.5%~84.2% 之间, SX0905

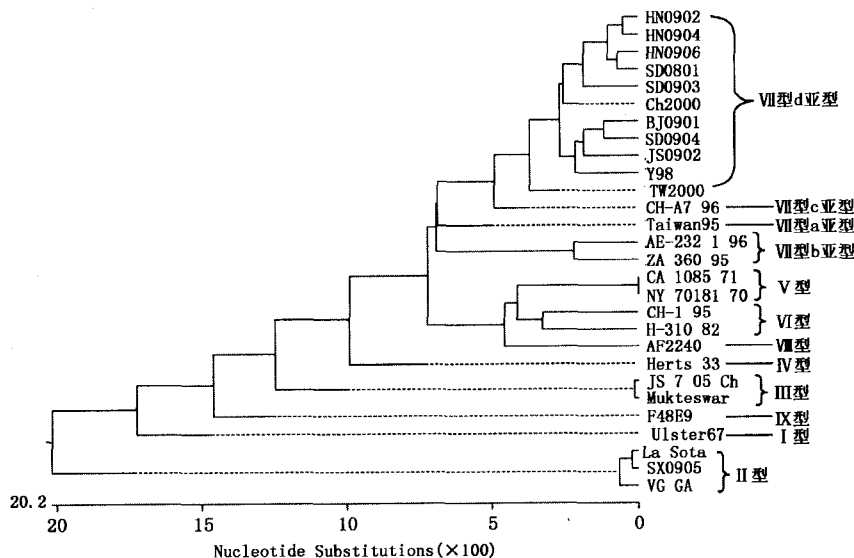


图 3 NDV 分离株与参考基因型代表毒株系统发育进化树

表1 分离株HN蛋白糖基化位点

毒株	119-121位氨基酸	341-343位氨基酸	433-435位氨基酸	481-483位氨基酸	501-510位氨基酸	538-540位氨基酸
La Sota	NNS	NDT	NKT	NHT	STS	NKT
SX0905	NNS	NDT	NKT	NHT	STS	NKT
HN0902	NNS	NNT	NKT	NHT	NIS	NKA *
HN0904	NNS	NNT	NKT	NHT	NIS	NKA *
SD0801	NNS	NNT	NKT	NHT	NIS	NKA *
HN0906	NNS	NNT	NKT	NHT	NIS	NKA *
SD0903	NNS	NNT	NKT	NHT	NIS	NKA *
JS0902	NNS	NNT	NKM *	NHT	NIS	NKA *
SD0904	NNS	NNT	NKT	NHT	NIS	NKA *
BJ0901	NNS	NNT	NKT	NHT	NIS	NKV *

注：“*”为糖基化位点缺失；“N”为天冬酰胺，“M”为蛋氨酸，“V”为缬氨酸，“K”为赖氨酸，“T”为苏氨酸，“A”为丙氨酸，“S”为丝氨酸，“D”为天冬氨酸。

根据HN多肽的长度不同,把NDV毒株分为3类:A类病毒HN多肽有616个氨基酸,相应的毒株为无毒株;B类病毒HN多肽有577个氨基酸,相应的毒株既有无毒株也有强毒株;C类病毒HN多肽有571个氨基酸,相应的毒株全为典型的强毒株。本研究所分离强毒株的HN基因长度为1716 nt,编码571个氨基酸,同C类的典型强毒株;所分离弱毒株的HN基因长度为1734 nt,编码577个氨基酸,同B类病毒中的无毒株。

Mcginnes等(1994)研究报道HN蛋白有6个潜在的糖基化位点,即N-X-T/S结构,分别位于119、341、433、481、508及538位氨基酸,前4个位点可被糖基化,后2个位点不能被糖基化。王志玉等(2002)对NDV HN蛋白中前4个糖基化位点进行定点突变分析结果表明,去糖基化对HN蛋白在细胞表面的表达量、受体识别活性、神经氨酸酶活性、协助F蛋白细胞融合作用及其泳动特性等方面均有不同程度的影响。通过点突变分析和X射线结构分析证明341-343 aa和481-483 aa位是真正的糖基化位点。糖基化作用对于HN转运到细胞表面无作用,但对于神经氨酸酶活性则是必需的。序列分析结果表明,国内所有野毒株均缺乏538-540 aa位糖基化位点。吴双等(2010)研究表明HN蛋白线性表位发生E347K突变的变异株的分离率在中国呈上升趋势。传统认为NDV HN基因是相对保守的,变异以点突变为主,上述变化提示,长期积累的点突变可能是目前NDV HN基因遗传变异的主要原因。因此,应该在生产中密切关注HN基因的变化。

参 考 文 献

- 1 王志玉,王战勇,于修平.糖化作用对新城疫病毒HN糖蛋白功能的影响[J].病毒学报,2002,18(2):155~161.
- 2 吴双,胡增磊,王伟伟,等.2006~2008年华东地区新城疫病毒HN基因序列分析[J].中国动物传染病学报,2010,28(2):61~66.
- 3 蔡丽丽,吴志新,王俊峰,等.一株基因Ⅵ型鸭新城疫病毒F基因的克隆及序列分析[J].中国畜牧兽医,2010,37(5):90~95.
- 4 Bagai S, Lamb R A. Quantitative measurement of paramyxovirus fusion; differences in requirements of glycoproteins between simian virus 5 and human parainfluenza virus 3 or Newcastle disease virus[J]. Journal of Virology, 1995, 69: 6712~6719.
- 5 Chen L, Colman P M, Cosgrove L J, et al. Cloning, expression and crystallization of the fusion protein of Newcastle disease virus[J]. Virol, 2001, 290: 290.
- 6 Gotoh B, Ohnishi Y, Innocencio M, et al. Mammalian subtilisin-related proteinases in cleavage activation of the paramyxoviruses fusion glycoprotein; superiority of furin/PACE to PC2 or PC1/PC3[J]. Journal of Virology, 1992, 66: 6391~6397.
- 7 Lomniczim B, Wehmann E, Herczeg J, et al. Newcastle disease outbreaks in recent years in western Europe were caused by an old(Ⅵ) and a novel genotype(Ⅶ)[J]. Arch Virol, 1998, 143(1): 49~64.
- 8 Mcginnes L W, Morrison T G. The role of individual cysteine residues in the formation of the mature, antigenic HN protein of Newcastle disease virus[J]. Virology, 1994, 200: 470~483.
- 9 Peeters B P H, Leeuw O S, Verstegen I, et al. Generation of a recombinant chimeric Newcastle disease virus vaccine that allows serological differentiation between vaccinated and infected animals[J]. Vaccine, 2001, 19: 1616~1627.
- 10 Waters M G, Hughson F M. Membrane tethering and fusion in the secretory and endocytotic pathways[J]. Traffic, 2000, 1: 588~597.
- 11 Yusoff K, Wen S T. Newcastle disease virus; macromolecules and opportunities[J]. Avian Pathology, 2001, 30: 439~455.

Sequence and Analyses on Newcastle Disease Virus from 2008 to 2009

YOU Yong-jun^{1,2}, WANG Yan-shu¹, LIANG Wu¹, YANG Bao-shou¹,

LI Jian-li¹, ZOU Li-hong¹, WANG He-ping¹, QIAO Jian²

(1. Ringpu (Baoding) Bio-Pharmaceutical Co., Ltd., Baoding 071000, China;

2. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

新城疫病毒 *HN* 基因功能结构域的原核表达

俞宁¹, 张兆敏^{2,3}, 岳华^{2,4}

(1. 成都农业科技职业学院, 四川成都 611130; 2. 西南民族大学生命科学与技术学院, 四川成都 610041;

3. 高密市畜牧局, 山东潍坊 261500; 4. 动物医学四川省高等院校重点建设实验室, 四川成都 610041)

摘要:本研究对新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)分离株 sc05 的 *HN* 基因进行了克隆、序列测定, 在此基础上将其 C 端功能结构域 76—571 aa 片段亚克隆到 pET32a(+) 表达载体上, 构建重组表达质粒 pET32a-*HN*, 鉴定正确后转化进 BL21 *plysS*(DE3) 细胞, 筛选出阳性克隆, 用 1 mmol/L IPTG 诱导表达, 并对表达产物进行鉴定。SDS-PAGE 电泳结果显示, *HN* 基因功能结构域片段在 BL21 *plysS*(DE3) 细胞中实现融合表达, 表达产物大小约为 76 ku, Western blotting 试验证实其能与 NDV 阳性血清反应。本研究为进一步研究 *HN* 蛋白功能结构域的免疫原性和研制鸡新城疫 *HN* 基因工程疫苗奠定了基础。

关键词: NDV; *HN* 基因; 克隆; 功能结构域; 原核表达

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 1671-7236(2011)08-0089-04

新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)为有囊膜的单股负链 RNA 病毒, 只有一个血清型, 但各毒株之间毒力、抗原性等生物学特性的差异较大(殷震等, 1997; Sai, 2005; 田夫林等, 2003)。分子流行病学研究结果表明, 基因 VII 型是目前中国 NDV 的流行基因型, 而目前养禽业使用的疫苗株多为基因 I、II 型(曹殿军等, 2001; 吴艳涛等, 2002)。尽管 NDV 的变异尚不足以改变常规疫苗的交叉保护作用, 但疫苗株与流行毒株间抗原性的差异可能进一步加剧免疫鸡群中高致病性毒株的存在和流行(Sai, 2005; Panshin 等, 2002)。NDV 基因组编码的 6 个结构蛋白中, *HN* 蛋白在病毒对宿主细胞的感染、促进病毒与细胞及细胞与细胞之间的融合、病毒粒子的播散、病毒毒力和抗原性的决定等方面具有重要的作用(殷震等, 1997; Connaris 等, 2002; 王忠

田等, 2002)。用通过表达系统体外表达的 *HN* 蛋白免疫动物, 可对强毒的攻击产生良好的免疫保护作用(Stone-Hulslander 等, 1997; Schaper 等, 1998)。*HN* 基因已成为研究 ND 基因工程苗的首选基因之一, 得到越来越多学者的研究、认知和应用(刘艳华等, 2007; 张立娜等, 2008; 冉旭华等, 2008)。分子生物学研究结果表明, *HN* 基因 N 端 1—26、27—48、49—75 位氨基酸分别对应亲水性膜内区、疏水性跨膜区及膜外区, 为 *HN* 蛋白的主要疏水区域(殷震等, 1997; Gravel 等, 2003; 陈亚波等, 2007)。有研究结果表明, 当胞质区 4—26 位氨基酸缺失时其仍能在细胞表达, 并具有受体结合活性, 只是促进融合的作用有所减弱(冉旭华等, 2008; Cho 等, 2007; Elizabeth 等, 2007)。*HN* 基因 C 端编码 *HN* 蛋白上的 7 个保守性抗原位点(位点 4-14-1-12-2-23-3)及所有与三级结构相关的半胱氨酸残基, 为 *HN* 基因的主要功能区域, 与 *HN* 蛋白的成熟和抗原活性密切相关(Gravel 等, 2003; Susan 等, 2000; Mcginnes 等, 1994)。本研究以基因 VII 型 NDV 强毒分离株为模板, 克隆并原核表达了 NDV *HN* 基因

收稿日期: 2010-12-19

作者简介: 俞宁(1980—), 女, 四川人, 硕士, 研究方向: 畜牧生产及兽医临床。

通信作者: 岳华。E-mail: yhua900@163.com

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAD06A11)。

Abstract: In order to explore the genetic mutations of the *F* gene and *HN* gene and the law of molecular epidemiology of Newcastle disease virus in China, nine influenza virus NDV were isolated from some poultry yards in China, the whole *F* and *HN* cDNA fragments of them were amplified by reverse transcription polymerase chain reaction, with primers specific to *F* gene and *HN* gene. After cloning and sequencing, gene sequences were analyzed on homology and heredity evolution. The sequence analysis showed 8 NDV isolates belonged to genotype VII, and 1 NDV isolates belonged to genotype II. The *F* gene of NDV isolates had a 1662 bp open reading fragment (ORF) and the homology of the nucleotide of *F* gene is from 83.5% to 84.2%. The *HN* gene of NDV isolates had 1716 or 1734 bp. The glycosylation site of *HN* in virulent virus strains absence on 538 aa. The results revealed that VII genotype was the main genotype of NDV occurred in China now, variation of *F* gene and *HN* gene might be related to frequent vaccine selection pressure.

Key word: Newcastle disease virus (NDV); *F* gene; *HN* gene; sequence analysis; genotype