

鸽 I 型禽副粘病毒 F 基因克隆及序列分析

陈金顶 廖 明 辛朝安

(华南农业大学动物医学系, 广州, 510642)

摘要 利用 RT-PCR 技术获得了编码鸽 I 型禽副粘病毒 GD/P1 分离株 F_0 裂解位点附近 884 bp 的 F 基因 cDNA 片段, 并将其克隆到 pGEM-T Easy 质粒中, 获得了重组质粒 T-pPMV-F-I, 核酸序列测定和分析表明, 该片段与新城疫病毒强毒株 $F_{48}E_9$ 和 HER/33 相应区域的同源性分别为 87.5% 和 88.19%, 与新城疫病毒弱毒株 LaSota 和 B₁ 株的同源性分别为 83.83% 和 84.15%. 该病毒 F_0 裂解位点的氨基酸序列为 Arg-Arg-Gln-Lys-Arg-Phe-Ile-Gly-Ala. 这在分子水平上证明该毒株较接近于新城疫病毒强毒.

关键词 鸽 I 型禽副粘病毒; F 基因; 分子克隆; 序列分析

中图分类号 S 855.3

鸽 I 型禽副粘病毒可引起鸽一种急性传染病, 给养鸽业造成较大的损失. 该病在世界其他国家都有流行(Ballou et al, 1985), 我国也不例外(黄鉴明, 1996; 任祖伊等, 1998). 鸽 I 型禽副粘病毒基因组编码的 2 种囊膜蛋白(Millar et al, 1988; Chambers et al, 1986), 即 F 蛋白(融合蛋白, fusion protein)和 HN 蛋白(血凝素-神经氨酸酶, hemagglutinin-neuraminidase protein), 其中 F 糖蛋白是以非活性前体(F_0)形式存在, 经裂解产生 F_1 和 F_2 2 个片段后, 才能使病毒具有感染力, 而决定这种感染力的因素主要与 F 蛋白裂解位点的氨基酸组成和序列有密切关系(殷震等, 1997). 因此, 笔者对一株分离自病鸽的 I 型禽副粘病毒 F 基因片段(含 F_0 裂解位点)进行了扩增、克隆、测序及序列分析.

1 材料与方法

1.1 病毒、细菌、质粒、工具酶

鸽 I 型禽副粘病毒 GD/P1 分离株从广东省某鸽场病死鸽中分离, 并进行了鉴定; 大肠杆菌 DH 5 α 由华南农业大学禽病研究室提供; RNA 提取试剂盒为 B.M. 公司产品; pGEM-T Easy 质粒载体为 Promega 公司产品; RT-PCR System 混合酶为 GIBCO BRL 公司产品; T₄ DNA 连接酶为 Promega 公司产品; Eco R I 酶为华美公司产品.

1.2 引物的设计与合成

根据国外已发表的其他 I 型禽副粘病毒的 F 基因核酸序列(Toyoda et al, 1989)设计上、下游引物各一条, 其跨幅约 884 bp, 由上海 Sangon 生物工程公司合成.

1.3 病毒的繁殖、收获及浓缩

病毒的繁殖、收获及浓缩按陈金顶等(1998)方法进行.

1.4 病毒 RNA 的提取

取适量经离心浓缩纯化的病毒悬液, 参照 B.M 公司试剂盒说明书抽提病毒 RNA.

1999-01-27 收稿 陈金顶, 男, 34 岁, 讲师, 硕士

* 国家自然科学基金(39770563)和广东省自然科学基金(970017)资助项目

1.5 病毒 F 基因片段的 RT-PCR 扩增

参照 GIBCO BRL 公司的 SuperScript One-StepTM RT-PCR System 使用说明进行如下反应。反应体系如下:2×反应缓冲液 25 μL, 病毒 RNA 溶液 8 μL, 上、下游引物各 1.5 μL(40 pmol/μL), RT/PCR 混合酶 1 μL, 补灭菌双蒸水至终体积为 50 μL。然后执行如下反应程序:50 °C 30 min, 94 °C 2 min, 94 °C 15 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。取 5 μL PCR 反应产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/mL E. B.)电泳检测。

1.6 病毒 F 基因 cDNA 片段的克隆

将纯化后的 F 基因 cDNA PCR 产物与载体质粒 pGEM-T Easy 于 4 °C 过夜连接, 连接产物转化到感受态 *E. coli* DH 5α 中, 参见 Sambrook 等(1989)方法。

1.7 重组质粒的酶切鉴定

按照 Sambrook 等(1989)的方法提取质粒 DNA, 用 *Eco*R I 单酶切, 选出阳性克隆。

1.8 重组质粒 PCR 鉴定

取经酶切鉴定为阳性的质粒, 适当稀释后进行 PCR 扩增, 反应条件同 1.5。同时设立以载体质粒为模板的 PCR 阴性对照。然后取 5 μL PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/mL E. B.)电泳检测。

1.9 目的基因的序列测定及比较分析

用 AMI377 型全自动测序仪, 对经过鉴定和纯化的阳性克隆进行核酸序列测定, 并应用 DNASIS 分析软件将所获得的鸽 I 型禽副粘病毒 GD/PI 株的 F 基因序列与 I 型禽副粘病毒的代表株——新城疫病毒的强毒株 F₄₈E₉、HER/33 和弱毒株 LaSota、B₁ 株 F 基因相应的区段(查自 GENBANK)相比较。同时分析其 F₀ 裂解位点的氨基酸序列。

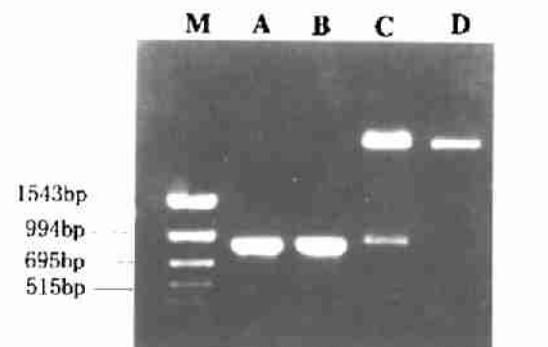
2 结果

2.1 鸽 I 型禽副粘病毒 GD/PI 株 F 基因片段的 RT-PCR 扩增

以鸽 I 型禽副粘病毒 GD/PI 株基因组 RNA 为模板, 利用自行设计的一对引物, 通过 RT-PCR 方法扩增出一条约 884 bp 的片段(图 1)。

2.2 鸽 I 型禽副粘病毒 GD/PI 株 F 基因 cDNA 片段的克隆及鉴定

将鸽 I 型禽副粘病毒 GD/PI 株 F 基因 cDNA 片段克隆到 pGEM-T Easy 质粒中, 构建了 T-pPMV-F-I 重组质粒, 对重组质粒首先用 *Eco*R I 单酶切, 结果切出 884 bp 左右的目的片段和 3 000 bp 左右的载体片段 2 条带(图 1)。然后对酶切鉴定为阳性的质粒进行 PCR 鉴定, 扩增出 884 bp 左右的特异条带(图 1)。



M: DNA 分子组成标准; A: F 基因片段的 RT-PCR 产物; B: T-pPMV-F-I 重组质粒 PCR 产物; C: T-pPMV-F-I 重组质粒经 *Eco*R I 酶切产物; D: pGEM-T 质粒经 *Eco*R I 酶切产物

图 1 鸽 I 型禽副粘病毒 GD/PI 株 F 基因的 RT-PCR 结果及重组质粒 T-pPMV-F-I 鉴定结果

2.3 鸽 I 型禽副粘病毒 GD/P1 株 F 基因核酸序列比较及 F_0 裂解位点附近氨基酸序列分析

将鸽 I 型禽副粘病毒 GD/P1 株 F 基因片段核酸序列与新城疫病毒强毒株 $F_{48}E_9$ 、HER/33 和弱毒株 LaSota、B₁ 株相应基因序列比较,结果发现,与强毒株 $F_{48}E_9$ 和 HER/33 的同源性分别为 87.5% 和 88.19%,而与弱毒株 LaSota 和 B₁ 株的同源性分别为 83.83% 和 84.15%.

根据鸽 I 型禽副粘病毒 GD/P1 株 F 基因片段核酸序列,推导出相应的氨基酸序列,其 F_0 裂解位点附近的氨基酸序列为 Arg-Arg-Gln-Lys-Arg-Phe-Ile-Gly-Ala.

3 讨论

根据国外发表的禽副粘病毒 F 基因核酸序列(Toyoda et al, 1989),设计并合成了一对引物,用 RT-PCR 的方法扩增出了预期大小(884 bp)的鸽 I 型禽副粘病毒 F 基因片段,它包含了完整的 F_0 裂解位点功能区.通过对该 cDNA 片段的分子克隆及序列测定,为比较鸽 I 型禽副粘病毒 GD/P1 株与其它禽副粘病毒株之间的相互关系奠定了基础.

本研究应用 SuperScript One-StepTM RT-PCR System 扩增鸽 I 型禽副粘病毒 F 基因片段,反转录和扩增反应在同一反应体系内进行,简化了操作步骤,有效的防止操作中的交互污染;50℃反转录可避免 RNA 二级结构对反转录的影响,提高反转录的效率;*Taq* DNA 聚合酶混合物扩增效率高,错配率低,这为 F 基因的克隆及序列测定提供了保证.

核苷酸序列分析表明,鸽 I 型禽副粘病毒 GD/P1 株与新城疫病毒强毒株和弱毒株的 F 基因裂解位点附近核酸序列同源性在 80% ~ 90% 之间,尤其与强毒株的基因离散率较近,因此推断,GD/P1 分离株与现有新城疫强毒株和弱毒株有差异.

F_0 蛋白是 F 蛋白的前体,其裂解位点的氨基酸组成和序列与禽 I 型副粘病毒的毒力有密切关系,强毒株的 F_0 蛋白裂解位点在谷氨酰胺残基两侧各有一对碱性氨基酸,即 Arg-Arg-Gln-Lys 或 Arg-Phe 或 Arg-Ile-Gly-Ala;而弱毒株的裂解位点在谷氨酰胺两侧只有一对碱性氨基酸,即 Gly-Arg 或 Lys-Gln-Gly-Arg-Leu-Ile(Gorman et al, 1990).本研究表明鸽 I 型禽副粘病毒 GD/P1 株的 F_0 蛋白裂解位点的氨基酸序列为 Arg-Arg-Gln-Lys-Arg-Phe-Ile-Gly-Ala,这与强毒株的 F_0 蛋白裂解位点氨基酸的组成和序列相符,从而在分子水平上证明鸽 I 型禽副粘病毒 GD/P1 株为强毒株,这对鸽 I 型禽副粘病毒病的防制具有指导意义.

参 考 文 献

- 任祖伊,陆新洁,朱梦代,等.1998.鸽 I 型副粘病毒病防治初报.养禽与禽病防治,9:34
- 陈金顶,廖 明,辛朝安.1998.鹅源 I 型禽副粘病毒血凝素-神经氨酸酶基因 RT-PCR 扩增及克隆.中国畜禽传染病,20(增刊):74~75
- 黄鉴明.1996.鸽 I 型副粘病毒病的诊断.中国畜禽传染病,1(86):39~40
- 殷 震,刘景华.1997.动物病毒学.第 2 版.北京:科学出版社,736~767
- Ballouh A, Abu Elzein E M E, Elmubarak A K. 1985. Outbreak of the pigeon paramyxovirus serotype 1 in the Sudan . Veterinary Record, 116:375
- Chambers P, Miller N S, Bingham R W. 1986. Molecular cloning of complementary DNA to newcastle disease virus and nucleotide sequence analysis of the junction between the genes encoding the haemagglutinin-neuraminidase and the large protein. J Gene Virol, 67:475~486
- Gorman J J, Cormo G, Selleck P W. 1990. Comparision of the position and efficiency of cleavage of fusion protein pre-

- cursors of virulent avirulent strains of NDV. Virol, 177:339~351
- Millar N S, Chambers P, Emmerson P T. 1988. Nucleotide sequence of the fusion and haemagglutinin neuraminidase glycoprotein gene of newcastle disease virus, strain Ulster: molecular basis for variations in pathogenicity between strains. J Gene Virol, 69:613~620
- Sambrook J, Fritsch E F, Manitatis T. 1989. Molecular cloning. 2nd ed. New York :Cold Spring Harbor A Laboratary Manual, 40~56
- Toyoda T, Sakaguchi T, Hirota H, et al. 1989. Newcastle disease virus evolution: II. Lack of gene recombination in generating virulent and avirulent strains. Virol, 16: 273~282

Cloning and Sequencing of F Gene from the Pigeon¹ Avian Paramyxovirus- I

Chen Jinding Liao Ming Xin Chao'an

(Dept. of Veterinary Medicine, South China Agric. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract In this study, a 884 bp cDNA fragment encoding the cleavage site of F₀ protein, from a pigeon-derived avian paramyxovirus- I isolate called strain GD/P1, was got by using RT-PCR. The fragment was cloned into pGEM-T Easy vector. Yielding the recombinant plasmid-T-pPMV-F-I . After sequencing, it was found that the nucleotide sequence showed 87.5%, 84.15%, 83.83% and 84.15% homology with the newcastle disease virus (NDV) virulent strains (F₄₈E₉ and HER/33) and avirulent strains (LaSota and B₁) respectively. The dedveted amino acid sequence at the cleavage site of F₀ protein was Arg-Arg-Gln-Lys-Arg-Phe-Ile-Gly-Ala. It concluded that this virus was closly related to the NDV virulent strains.

Key words pigeon' avian paramyxovirus- I ; F gene; molecular cloning; sequence

【责任编辑 柴 焰】

重要启事 《华南农业大学学报》从2000年起,参考文献的文后著录及文内标引采用顺序编码制,详情参阅《华南农业大学学报》“征稿简约”.特此敬告各位作者.

华南农业大学学报编辑部