

文章编号: 1001-411X(2000)03-0075-03

新城疫病毒中国株 F₄₈E₉ 融合蛋白基因序列分析

陈金顶, 廖 明, 辛朝安

(华南农业大学动物医学系, 广东 广州 510642)

摘要: 该研究经全自动序列测定, 获得了新城疫病毒中国株 F₄₈E₉ 融合蛋白(F)基因 1 838bp 的 cDNA 核苷酸序列, 并推导出编码 549 个残基的氨基酸序列. 序列分析表明, 该序列中有 6 个潜在的糖基化位点, 13 个半胱氨酸残基, 裂解位点区氨基酸序列为 Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Phe. 同源性分析表明, 新城疫病毒中国株 F₄₈E₉ 融合蛋白(F)氨基酸序列与国外发表的其他新城疫病毒株 F 蛋白相比, 同源性在 96.17%~92.16% 之间.

关键词: 新城疫病毒; 融合蛋白基因; 序列分析

中图分类号: S852.6 S855 文献标识码: A

新城疫(newcastle disease, ND)是一种在鸡群中具有高度传染性的病毒性传染病, 能感染鸽、火鸡、野禽和观赏鸟等多种鸟类. 新城疫病毒(newcastle disease virus, NDV)为 I 型禽副粘病毒的原型病毒, 该病毒的基因组为无节段的负链单股 RNA, 分别编码 NP、P、M、F、HN 和 L^[1,2] 6 种结构蛋白. 其中融合蛋白(fusion protein, F)位于病毒脂质囊膜上形成纤突, 与病毒毒力的形成有关, 它通常以非活性前体(F₀)形式存在, 需经宿主细胞的蛋白水解酶裂解为 F₁ 和 F₂ 两个片段后, 才能使病毒获得感染性^[3-5]. 由于不同毒力的毒株 F 基因的序列存在差异, 使得毒株的 F 蛋白非活性前体(F₀)被细胞的蛋白水解酶裂解后所表现的毒力强弱不同. 目前国外已分离出致病性不同的 NDV 毒株达数十种之多, 已对 NDV 分子结构与 NDV 致病性关系进行了深入研究, 国内有关 NDV 分子生物学方面的研究起步较晚, 为了揭示不同的致病性毒株在分子结构上的差异, 笔者对新城疫病毒中国株 F₄₈E₉ 的 F 基因核苷酸序列进行测定, 并对核苷酸序列进行分析, 为了解新城疫病毒的致病作用及免疫防制研究打下基础.

1 材料与方法

1.1 病毒

新城疫病毒中国株 F₄₈E₉ 购自中国兽药监察所.

1.2 F 基因的分子克隆

新城疫病毒中国株 F₄₈E₉ 基因组 RNA 的提取, F 基因的 RT-PCR 扩增、克隆、转化及阳性重组质粒的筛选和鉴定, 另见报道.

1.3 F 基因的核苷酸序列测定及序列分析

利用 ABI 377 型全自动测序仪, 读取中国株 F₄₈E₉ 的 F 基因 cDNA 核苷酸序列. 应用 DNASIS(version 3.0)

软件和 GENEPRO(version 6.10), 由 F 基因核苷酸序列推导出相应的氨基酸序列, 与查自 GenBank 的国外 NDV Australia-Victoria、Miyadera、Beaudette C、La Sota 株的 F 基因相应氨基酸序列进行同源性比较分析.

2 结果与讨论

通过序列测定获得了 NDV 中国株 F₄₈E₉ 的 F 基因 1 838bp cDNA 核苷酸序列, 推导出含 549 个氨基酸序列的蛋白多肽. 该氨基酸序列中有 6 个可能的糖基化位点, 即 Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T)结构(图 1),

```
TCTTCTACCAATGTCCTCCAGCATCTCTGATTCTGACCGTCAGGATTGCGCTGGCACTGAGC 60
S S T N V P A S L I L T V R I A L A L S
TGTCCTCGCTGCAAAATTCTCTCGATTGGAAGGCGCTTCGACGTGCGGGATTGTAGTA 120
C V R L T N S L D G R P L A A A G I V V
▲
ACGGGAGACAAAGCAGTCAACATATACACCTCATCTCAGACGGGTCAATAATAGTCAAG 180
T G D K A V N I Y T S S Q T G S I I V K
TTACTCCCAATATGCCTAAGGATAAAGAGGGCGTGTGCAAAAGCCCGTGGAGGCATAC 240
L L P N M P K D K E A C A K A P L E A Y
▲
AACAGGACACTGACTACTTTGCTCACCCCGCTTGGTGATTCTATCCGAGGATACAAGAG 300
N R T L T T L L T P L G D S I R R I Q E
TCTGCACTACGTCCGGAGGAAGCAGGAGAGACCGCTTTATAGGTGCCATTATCGGCAGT 360
S A T T S G G R R Q R R I F I G A I I G S

GTAGTCTTTGGGGTGGCCAGCTGCACAGATAACAGCAGCCTCAGCTCTGATACAAGCC 420
V A L G V A T A A Q I T A A S A L I Q A
AACCAGAATGCTGCCAATCCTCCGGCTTAAGAGAGCATTGCTGCACTAATGAAGCT 480
N Q N A A N I L R L K E S I A A T N E A
GTACATGAAGTCACTGACGCGATTATCGCACTAGCAGTGGCAGTGGGAAGATGCAGCAG 540
V H E V T D G L S Q L A V A V G K M Q Q
TTTGTTAATGACCAAGTTTAAATACACAGCTCAGGAATTGGACTGTATAAAATTACACAG 600
F V N D Q F N N T A Q E L D C I K I T Q
▲
CAGGTGGTGTAGAATCAACCTGTACCTAACTGAATTGACTACAGTATTCGGGCCACAA 660
Q V G V E L N L Y L T E L T T V F G P Q
ATCAGTTCCTCCCTGCTTAACCTAGCTGACTATCCAGCGCTTTACAATCTAGCTGGTGGT 720
I T S P A L T Q L T I Q A L Y N L A G G
```

收稿日期: 1999-11-26

作者简介: 陈金顶(1964-), 男, 讲师, 博士.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39770563); 广东省自然科学基金资助项目(970017)

AATATGATTATTGTTGACTAAGTTAGGTGTTGGGAACAACCAACTCAGCTCATTAATC 780
N M D Y L L T K L G V G N N Q L S S L I
GGTAGCGGCTTGATCACCGGTAAACCTATTCTGTACGATTACAGAGCTCAACTCTTGGGT 840
G S G L I T G N P I L Y D S Q T Q L L G
ATACAGGTAACCTTACCTCAGTCGGTAACCTAAATAATATGCGTGCTACCTACTTGAG 900
I Q V T L P S V G N L N N M R A T Y L E
ACCTTGCTGTGAAGCACAACCAAGGATTTGCCTCAGCACTTGCCCAAAAGTGGTGACA 960
T L S V S T T K G F A S A L V P K V V T
CAGGTGCGGCTCTGTGATAGAGAACTTGACACCTCATACTGTGTAGAGACCGATTGGAT 1020
Q V G S V I E E L D T S Y C V E T D L D
▲
TTATATTGTACAAGAATAGTGACATTCCCTATGTCTCTGGTATTATTCTGTCTGAGC 1080
L Y C T R I V T F P M S P G I Y S C L S
▲
GGTAATACATCAGCTTGCGTATTCAAAGACTGAAGGTGCACTTACTACGCCATATATG 1140
G [N T S] A C M Y S K T E G A L T T P Y M
▲
ACTATCAAGGCTCAGTTATTGCCAATTGCAAGATGACAATCAGAGTGTGAGACCCCT 1200
T I K G S V I A N C K M T T C R C A D P
▲
CCGGGTATCATATCGCAAAATATGGAAGCTGTGTCTCTAATAGATAGGCACTCATGC 1260
P G I I S Q N Y G E A V S L I D R H S C
▲
AATGTCCTTATCCTAGACGGGATAACTTTGAGGCTCAGTGAGAAATTTGATGAACCTAT 1320
N V L S L D G I T L R L S G E F D V T Y
CAAAAGAAATATCTCAATATTAGATTCTCAGGTAATAGTGACAGCAATCTCGATATCTCA 1380
Q K [N I S] I L D S Q V I V T G N L D I S
ACTGAATCTGGGAATGTCAACACTCGATAAGTAATGCTTTGATAAGTATAGAGAAAGC 1440
T E L G N V [N N S] I S N A L D K L E E S
AATAGCAAACTTGACAAAGTCAATGTCAAGCTGACCGGCACGCTCTGCTCTATTACCTAT 1500
N S K L D K V N V K L T G T S A L I T Y
ATAGTTTAACTATCATATCTCTGTTTGTGTATCTAGCTGGTCTAGCATGCTAT 1560
I V L T I I S L V C G I L S L V L A C Y
▲
CTGATGTATAAGCAAAAGGCGCAACAAAGACCTTATTATGCGTTGGGAATAATACCCCTA 1620
L M Y K Q K A Q Q K T L L W L G [N N T] L
AATCAGATAGGGGCACTACAAGATGTGAATGCAGACAAGAGGCAGAGGTATCTCCAAG 1680
N Q M R A T T R M *
AGCAATTTGTGTGTAATTCAGGCAGCCTGTCAATTAGAAGAATAAGAAAAAACTACCG 1740
GATTTGGGTGATCAAAGGCAACATACGGGTAGAACGCCAGAGGCCACTCTCTAGCC 1800
AGGAATCGGGCTCACACCATCCGTCTACCGCATCACCA 1840

▲ 半胱氨酸残基位置；方框内为潜在糖基化位点；箭头指示裂解位点，横线上为裂解位点区 ▲Cysteine residues; framed potential glycosylation sites; arrow point to cleavage site; underlined cleavage area

图1 中国株 F₄₈E₉ 融合蛋白(F)基因核苷酸序列和推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of Fusion protein of NDV Chinese strain F₄₈E₉

其中 1 个位于 F₂ 亚单位, 其他 5 个位于 F₁ 亚单位, 数目和位置相对比较保守^[3], 这使 F 蛋白合成后经过修饰、糖基化后成为成熟的具有功能的糖蛋白成为可能。

半胱氨酸残基(Cys)在蛋白的一级结构中参与形成链内和链间二硫键, 与蛋白质立体构型的维持有关。NDV 中国株 F₄₈E₉ 的 F 蛋白氨基酸序列中有 13 个半胱氨酸残基(Cys), 与国外 NDV Australia-Victoria 和 Miyadera 株的数目和位置完全相同, 其中大部分 Cys 分布在 F₁ 亚单位内, 这对于维持 NDV F 蛋白特有的结构框架具有重要意义^[6]。

SSTNYPASLILTVRIALALSCVRLTNSLDGRPLAAGIVVTGDKAVNIYTSSQTSIIIVKLLPNMPKDKE 70
--RI-IP-M-I--H-AS
--RI-P-M-IW-G-S--I--
P--KN-VPMM--V-V-ICPA-I--L--
P--KN-PMM-I-V-V-ICPA-I--L--
900
ACAKAPLEAYNRTLTTLLTPLGDSIRRIQESATTSGRRQRFFIGAIIGSVALGVATAAQITAASALIQA 140
--V--K--
--V--
--D--V--K--G--A--
--D--V--G-G-L--G--A--
1020
NQNAANILRLKESIAATNEAVHEVTGSLQAVAVGKMQQFVNDQFNNTAQELDCIKITQQGVVELNLVL 210
--T--
--T--H-E--
K--K--G-R-A--
K--K--A--
280
TELTTVFGPQITSPALTQLTIQALYNLAGGNMDYLLTKLGVGNQLSSLIGSLITGNPILYDSQTQLLG
--N--L--
--NK--
--NK--
350
IQVTLPSVGNLNNMRATYLETSLVSTTKGFASALVPKVVTVQVGSVIEELDTSYCVETDLDYCTRIYTFP
--S--I--
--R--I--
--R--I--
420
MSPGIYSLSGNTSACMYSKTEGALTTPYMTIKGSVIANCKMTTCRCADPPGIISQNYGEAVSLIDRHSC
--N--L--
--T--L--
--VN--KQ--
--VN--KQ--
490
NVLSLDGITLRLSGEFDVTYQKNISILDSQVIVTGNLDISTELGNVNSISNALDKLEESNKLKVNK
--A--
--AA-V-N--A--N--R--
--A--Q-I--N--
--G--Q-I--N--R--
560
LTGTSALITYIVLTIIJSLVCGIISLVACIYLMYKKAQKQKTLWLGNTLNQMRATTRM
--S--A-A--G--K--
--N--V--H--D--KA--
--S--F--D--K--
--S--F--I--D--K--

第 1 行为 F₄₈E₉ 株序列; 第 2 行为 Australia-Victoria 株序列; 第 3 行为 Miyadera 株序列; 第 4 行为 Beaudette C 株序列; 第 5 行为 La Sota 株序列; 图中—表示相同的氨基酸 Row 1 Chinese F₄₈E₉ strain sequence; Row 2 Australia-Victoria strain sequence; Row 3 Miyadera strain sequence; Row 4 Beaudette strain sequence; Row 5 La Sota strain sequence; — represent identical amino acid

图2 NDV 中国株 F₄₈E₉ 与国外毒株融合蛋白(F)氨基酸序列比较

Fig. 2 Comparison of fusion protein amino acid sequences between NDV Chinese strain F₄₈E₉ and some foreign strains

F 蛋白被裂解为 F₁ 和 F₂ 2 个亚单位后, 才能使病毒具有感染活性, 而 F 蛋白裂解位点区域的氨基酸组成和排列顺序是 NDV 致病力的分子基础。有研究表明, NDN 强毒株的 F 蛋白裂解位点在谷氨酰胺残基两侧各有一对碱性氨基酸, 而弱毒株的裂解位点在谷氨酰胺两侧只有 1 对碱性氨基酸^[5, 7, 8]。NDV 中国株 F₄₈E₉ 的 F 蛋白裂解位点区域氨基酸组成和排列顺序为 Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Phe(图 1), 在谷氨酰

胺残基两侧各有 1 对碱性氨基酸 Arg-Arg, 与国外其他 NDV 强毒株裂解位点区域的氨基酸组成与序列相同, 具有强毒株特异性序列, 这与其致病性相一致.

NDV 中国株 F₄₈E₉ 与其它 NDV 毒株氨基酸序列的比较(图 2)表明, F 蛋白氨基酸残基的变异主要发生在 N 末端(4~24 位), 而其他部位也有变异, 但缺乏明显的规律性, 这与文献报道的相符^[5-8].

将 NDV 中国株 F₄₈E₉ 的 F 基因 cDNA 核苷酸序列推导出的氨基酸序列与国外已发表的 NDV 的相应序列比较(图 2), 结果表明, NDV 中国株 F₄₈E₉ 与 Australia-Victoria (嗜内脏强毒)、Miyadera (嗜内脏强毒)、Beaudette C (中等毒力) 和 La Sota 株 (低毒力) 的氨基酸序列同源性分别为在 96.17%、94.17%、92.53% 和 92.16%, 其中与强毒株 Australia-Victoria (嗜内脏强毒) 的同源性最高(96.17%), 与 La Sota 株 (低毒力) 的同源性最低(92.16%).

NDV 中国株 F₄₈E₉ 的 F 基因的序列测定, 为了解 F 蛋白的结构和功能, 进行 NDV 的分子流行病学调查及防制打下了基础.

参考文献:

[1] MILLAR N S, CHAMBERS P, EMMERSON P T. 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]. J Gen Virol, 1988, 69: 613-620.

[2] CHAMBERS P, MILLER N S, BINGHAM R W, et al. Molecular cloning of complementary DNA to Newcastle disease virus and Nucleotide sequence analysis of the junction between the genes encoding Haemagglutinin-Neuraminidase and the large protein[J]. J Gen Virol, 1986, 67: 475-486.

[3] GLICKMAN R L, SYDDALL R J, IORIO R M, et al. Quantitative basic residue requirements in the cleavage activation site of the fusion glycoprotein as a determinant of virulence for NDV [J]. J Viro, 1988, 62: 354-356.

[4] GORMAN J J, CORNO G, SELLECK P W. Comparison of the position and efficiency of cleavage of fusion protein precursors of virulent avirulent strains of NDV[J]. Viro, 1990, 177: 339-351.

[5] TOYODA T, SAKAGUCHI T, IMAI K, et al. Structural comparison of the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein between virulent and avirulent strains NDV[J]. Viro, 1987, 158: 242-247.

[6] TOYODA T, SAKAGUCHI T, HIROTA H, et al. Newcastle disease virus evolution: II. Lack of gene recombination in generating virulent and avirulent strains[J]. Viro, 1989, 16: 273-282.

[7] TAYLOR J, EDBAUER, REY S A, et al. NDV fusion protein expressed in a fowlpox virus recombinant confer protection in chickens[J]. J Virol, 1990, 64: 1441-1450.

[8] SCHAPER U M, FULLER F J, WARD M D W, et al. Nucleotide sequence of the envelope protein genes of a highly virulent neurotropic strain of Newcastle disease virus[J]. Viro, 1988, 165: 291-295.

Sequence Analysis of Fusion Protein Gene of the Chinese Strain F₄₈E₉ of Newcastle Disease Virus

CHEN Jin-ding, LIAO Ming, XIN Chao-an

(Dept. of Vet. Med., South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: The nucleotide sequence of the cDNA consisting of 1 838 bp which encoded the fusion(F)protein of the Chinese strain F₄₈E₉ of newcastle disease virus(NDV)was obtained by fully automatic sequencing technique, and the encoded 549 amino acid polypeptide sequence deduced. Sequence analysis showed that there were 6 potential glycosylation sites and 13 cysteine residues in the amino acid sequence, and that the amino acid sequence of the cleavage site region was Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Phe. The deduced amino acid sequence of the fusion(F)protein of the Chinese strain F₄₈E₉ of NDV was compared with published sequences of other NDV strains, and the homology was found to be 96.17%~92.16%.

Key words: newcastle disease virus; fusion protein gene; sequence analysis

【责任编辑 柴 焰】