

文章编号: 1001-411X (2001) 04-0075-03

华南地区新城疫病毒 WS₉₉株 HN 基因片断的克隆和序列分析

贺东生, 秦智锋, 刘福安

(华南农业大学动物医学系, 广东 广州 510642)

摘要: 用 RT-PCR 一步法扩增了华南地区野毒 NDV WS₉₉株的 HN 基因 890 bp 片断, 并对其进行克隆、核苷酸测序及同源性分析. 结果表明: WS₉₉株的 HN 基因与其他 29 株 NDV 的核苷酸同源性在 88.0% ~ 99.8% 之间, 氨基酸同源性在 90% ~ 97% 之间. 鸡源 NDV WS₉₉株与鹅源副粘病毒 GPMV 株有极高的同源性, 高达 99.8%. 该毒株与 TEX/48 和 BI/47 一样, 在 HN 基因 1301 bp 处由 G 突变为 A, 对应氨基酸由 V 突变为 I, 但其半胱氨酸位点和个数没有改变, 且所克隆的目的片段中含有 HN 基因上 5 个凝血抗原位点其中的 4 个.

关键词: 新城疫病毒; HN 基因; 克隆; 序列分析

中图分类号: S855.31

文献标识码: A

新城疫病毒 (newcastle disease virus, NDV) 是引起鸡的急性高度接触性和毁灭性的疾病. NDV 属于副粘病毒科, 有囊膜. 其基因组属单股负链 (ss-) RNA 结构, 不分节段. NDV 编码的 2 种糖蛋白, 即融合蛋白 (F 蛋白) 和血凝素-神经氨酸酶 (HN 蛋白), 与其致病作用密切相关. HN 蛋白使病毒粒子能够吸附细胞, F 蛋白则负责病毒的融合穿透^[1].

对 NDV 各野毒 HN 基因的克隆及其核苷酸测序是 NDV 的系统发育和分子流行病学分析的重要研究内容, 对新城疫的防治有理论指导意义和实践应用价值. 国内已开始对此进行研究并取得了一些进展, 如曹殿军等^[2]克隆了我国标准强毒 F48E9 株的 HN 基因并进行了测序等. 本研究对我国华南地区分离的 NDV-WS₉₉地方强毒株 HN 基因片断进行了克隆测序和核酸结构分析, 并与国外的毒株作了初步的比较.

1 材料与方法

1.1 病毒

NDV WS₉₉株, 华南地区分离的强毒, 由华南农业大学动物医学系禽病室保存.

1.2 引物

参照已发表的 NDV HN 基因序列设计引物^[3,4].

P₁: TC GAATTC TGCAGTGTGAGTGCTACT. $t_m = 49^\circ\text{C}$, $t_p = 61.4^\circ\text{C}$.

P₂: GC GTCGAC CTTGACAACCTTTAAACA. $t_m =$

41°C , $t_p = 55.6^\circ\text{C}$.

前 2 个碱基为保护性碱基, GAATTC 为 *EcoR* I 酶切位点, GTCGAC 为 *Sal* I 的酶切位点. P₁ 和 P₂ 的跨幅 897 bp.

1.3 NDV 的繁殖

选取 NDV 病鸡的肝脏、脾脏, 剪碎, 研磨, 加入 10 倍的无菌生理盐水稀释, 经 0.22 μm 滤膜除菌后, 接种 9 日龄的 SPF 鸡胚, 3 d 后收获尿囊液. -20°C 保存备用.

1.4 NDV HN 基因的 RT-PCR

参照 B.M 公司的 one-step RT-PCR Kit 说明进行, 按 50 μL 反应体系进行 RT-PCR: 45°C 反转录 2 h, 加 50 μL 石蜡油, 94°C 2 min 灭活逆转录酶, 于 PCR 扩增仪上进行如下扩增: 94°C 60 s, 55°C 45 s, 72°C 120 s. 重复 35 次循环后, 72°C 延伸 10 min.

1.5 HN 基因的分子克隆

将 RT-PCR 扩增的片段 50 μL 于 50 V 电泳 30 min, 于紫外灯下切下目的条带, 按 RESN-columnTM 琼脂糖 DNA 纯化系统说明回收目的片段, 无水乙醇沉淀后加水 15 μL 溶解.

如下操作对 PCR 产物进行加尾: DNA 6.8 μL 、10 $\times$ buffer 1.0 μL 、MgCl₂ 1.0 μL 、dATP (0.2 mmol/L) 0.2 μL 、Taq 酶 (0.2 U/ μL) 1.0 μL , 总体积 10.0 μL .

70°C 加 Poly A 30 min 之后, 如下建立连接体系: 2 $\times$ Rapid Ligation Buffer 5 μL 、pGEM-T Easy 载体 (50 ng) 1 μL 、PCR 产物 3 μL 、T4 DNA 连接酶 (3 U/ μL)

收稿日期: 2001-04-26

作者简介: 贺东生 (1968-), 男, 博士.

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (980160)

1 μ L、总体积 10 μ L

4 $^{\circ}$ C 连接 24 h. 取连接产物 3 μ L 转化 DH5 α 大肠杆菌, 在含有 Amp (200 mg/mL)、X-gal (750 μ g/mL) 和 IPTG (800 μ g/mL) 的培养板上涂布转化菌. 培养过夜后, 挑取白色菌落进行电泳初步筛选, 进一步用双酶切鉴定阳性重组子.

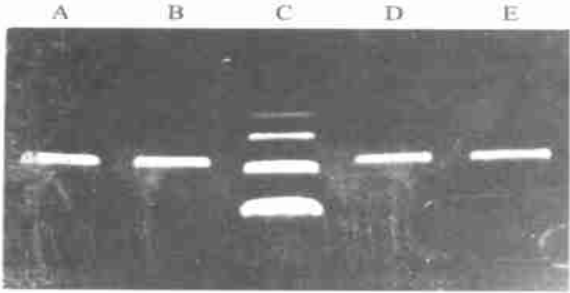
1.6 NDV HN 基因的核苷酸序列测定

将阳性克隆转化菌的质粒经 PEG 纯化后交由上海基康公司测序, 用 DNASIS 和 DNASTAR 软件包将所测序列与发表的 NDV LaSota 等毒株的核苷酸及氨基酸序列进行同源性比较分析.

2 结果

2.1 RT-PCR 一步法扩增 NDV HN 基因

从 0.5 mL 尿囊液中抽提 RNA, 经 RT-PCR 扩增出一条特异性条带, 电泳显示其长度约为 890 bp, 与预期结果相符 (图 1).

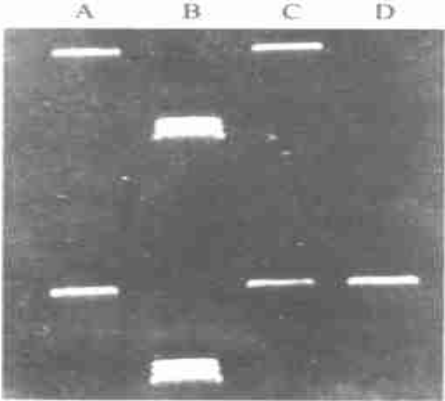


C: 分子量标准, 1543, 994, 697, 515 和 377 bp; A, B, D, E: 均为 PCR 产物. C: DNA marker, 1543, 994, 697, 515, 377 bp; A, B, D, E: PCR products

图 1 NDV WS99 株 HN 的 RT-PCR 产物电泳图
Fig. 1 Electrophoresis of PCR products of NDV WS99 strain HN gene

2.2 NDV HN 基因的克隆与双酶切鉴定

通过电泳初步筛选重组子, 并进行双酶切鉴定 (图 2), 成功地获得了含有 NDV WS99 株 HN 基因 890 bp 片断的阳性重组子.



B: λ Hind III 分子量标准; A, C: 均为阳性重组子的 *EcoRV*/*SalI* 双酶切; D: 空质粒的 *EcoRV*/*SalI* 双酶切
B: λ Hind III DNA marker; A, C: *EcoRV*/*SalI* digest of recombinants; D: *EcoRV*/*SalI* digest of control plasmid

图 2 阳性重组子的酶切鉴定电泳图

Fig. 2 Electrophoresis of RE digest of recombinants

2.3 NDV HN 的核苷酸测序

经测序获得了 NDV WS99 株 HN 基因从 821 到 1 585 bp 的核苷酸序列并推导出其编码的 254 个氨基酸的序列, 见图 3.

```
5'-821
CCCTTAATGTTGGATAAGTTGTGCTCTAAAGTCACGGAACTGAGGAAGAAGATTATAAT
P L M L D K L C S K V T E T E E E D Y N
TCAGTTATCCCCACCAATGGTACATGGGAGGCTGGGGTTTGACGGCCAATACCATGAG
S V J P T P M V H G R L G F D G Q Y H E
AAGGACCTGGATGTCGCAACATTATITGGGGACCTGGGTGGCAAATTACCTGGGGTGGGA
K D L D V A T L F G D W V A N Y P G V G
GGAGGGTCTTTTATTGACAACCGGTATGGTTCACGTCATGAGGGGCTAAAACCCCAAT
G G S F I D N R V W F P V Y G G L K P N
TCGCCTAGTGACACTGCACAAGAGGGGAGATATGTAATATACAAGCGGTACAATGACACA
S P S D T A Q E G R Y V I Y K R Y N D T
TGCCAGATGAGCAAGACTACAGATTGGATGGCTAAGTCITCATATAAGCCTGGGGCGG
C P D E Q D Y Q I R M A K S S Y K P G R
TTTGGTGGGAAACGCGTACAGCAGGCCATCCTATCCATCAAGGTATCAACATCCTTGGGT
F G G K R V Q Q A I L S I K V S T S L G
GAGGACCCGGTGCTGACTGTACCGCCCAACACAATCACACTTATGGGGGCCGAAGGCAGA
E D P V L T V P P N T I T L M G A E G R
GTTCTCAGTAGGGACATCTCATTTCTTTTACCAGCGAGGGTCATCATACTTCTCTCC
V L T V G T S H F F Y Q R G S S Y F S P
GCCTTATTATACCTATGACAGTCGACAATAAAACGCCACTCTTCATAGTCCTTATGCA
A L L Y P M T V D N K T A T L H S P Y A
TTCAATGCTTTCACTCGGCCAGGTAGTGTCCCTTGCCAGGCTTCAGCCAGATGCCCTAAC
F N A F T R P G S V P C Q A S A R C P N
TCGTGTGTTACTGGAGTCTCACTGATCCATACCCCTTAGTCTTCATAGGAACCACT
S C V T G V Y T D P Y P L V F H R N H T
TTGCGAGGGGATTCGGGACAATGCTTGATGATAAACAAACC 1585-3'
L R G V F G T M L D D K Q T
```

图 3 NDV WS99 株的 HN (821 ~ 1 585 bp) 核苷酸序列及编码的氨基酸序列
Fig. 3 Nucleotide sequence (821 ~ 1 585) and coded amino acid sequence of NDV WS99 strain

3 讨论

3.1 NDV HN 基因的一步法 RT-PCR 及克隆
获得病毒基因的常规方法通常较为复杂, 有些还需要进行多次超速离心和梯度离心, 耗费也较大, 本研究表明可直接用尿囊液经 RT-PCR 一步法扩增 NDV 的 HN 基因, 省时且耗费低, 值得推广应用.

用 T 载体和加尾法可快速克隆 PCR 产物, 酶切鉴定也非常方便. 该方法成功率高且快速, 相信将有越来越多的人采用该方法进行克隆.

3.2 NDV HN 基因

根据本测序结果, 利用 DNASTAR 和 DNASIS 软件, 推导出 NDV-WS99 株 HN 基因的 254 个氨基酸序列. 将此结果与基因库联机检索 blast 分析, 可以得知 NDV-WS99 株与 Ulster 等 29 株 NDV 的 HN 基因的核苷酸同源性在 88.0% ~ 99.8% 之间^[5,6], 氨基酸同源性在 90% ~ 97% 之间. 此外, 值得注意的是, NDV WS99 株与 GPMV 株有极高的同源性, 高达 99.8%, 而 GPMV 株是陈金顶从广东省鹅群中分离到的副粘病

毒. 它们之间遗传上的亲缘关系如何? WS₉₉ 株是否为华南地区鹅副粘病毒的亲本株? 这些均有待进一步研究.

核酸序列和结构分析还显示, WS₉₉ 株与 TEX/48 和 B1/47 一样, 在 HN 基因 1 301 bp 处由 G 突变为 A, 使所测片段突变产生酶切位点 GAATTC, 并使氨基酸由 V 突变为 I, 但其半胱氨酸位点和个数均没有改变, 仍在 HN 基因 344、455、461、465 四处出现 4 个半胱氨酸残基, 糖基化位置也没改变. 所克隆的目的片段中含有 HN 基因上 5 个凝血抗原位点其中的 4 个, 即抗原 14、抗原 1、抗原 2 和抗原 12, 其位点分别在 345~353 残基(抗原 14 和 1)、513~521 残基加上第 494、569 残基(抗原 12 和 2).

参考文献:

[1] 曹殿军, 刘春丽, 王莉林. NDV F48E9 株 HN 基因的克隆与酶切分析[J]. 中国兽医学报, 1997, 17(4): 326—330.

[2] 宋长绪, 刘福安, 杜伟贤. 新城疫病毒融合蛋白裂解位点基因的分离克隆及在原核细胞中的表达[J]. 中国兽医学报, 1996, 16(6) 527—533.

[3] OBERDORFER A, WERNER O. Newcastle disease virus: detection and characterization by PCR of recent German isolates differing in pathogenicity[J]. Avian Pathology, 1998, 27: 237—243.

[4] GOHM D S, BARBARA T, HOFMANN M A. Detection of newcastle disease virus in organs and faeces experimentally infected chickens using RT-PCR[J]. Avian Pathology, 2000, 29: 143—152.

[5] 王兴龙, 金宁一, 殷震, 等. 新城疫病毒青岛株 F 蛋白基因的克隆和序列分析[J]. 中国兽医学报, 2001, 21(2): 113—115.

[6] YANG C Y, SHIEH H K. Newcastle disease virus isolated from recent outbreaks in Taiwan phylogenically related to virus (Genotype VII) from recent outbreaks in Western Europe[J]. Avian Diseases, 1999, 43: 125—130.

Cloning and Sequencing of HN Gene of NDV WS₉₉ Strain Isolated in South China

HE Dong-sheng, QIN Zhi-feng, LIU Fu-an
(Dept. of Animal Medicine, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: The HN gene of NDV WS₉₉ strain isolated from South China was amplified by one-step nested RT—PCR. The HN gene was cloned sequenced and analyzed homologically. It was found that the nucleotide sequence homology of WS₉₉ strain with other 29 NDV strains was between 88.0% to 99.8%. Their amino acid sequence showed 90% to 97% homology. Significantly, the NDV WS₉₉ strain isolated from chicken and the GPMV, a paramyxovirus isolated from goose in South China exhibited the highest homology of nucleotide which was 99.8%. The WS₉₉ strain had a nucleotide mutation at the 1 301 bp site of the HN gene, with Guanine replacing Adenine. Thus the amino acid code mutated from V to I, but there were no changes in the quantity and loci of cysteine in the HN. The cloned gene of WS₉₉ strain contained 4 of the 5 haemagglutinating antigenic domains of the HN gene.

Key words: newcastle disease virus; HN gene; cloning; sequencing

【责任编辑 柴 焰】