

我国部分地区近年来新城疫病毒流行株

分子生物学特征的研究

任 涛, 敖艳华, 曹伟胜, 张桂红, 罗开健, 徐成刚, 廖 明

(农业部养禽与禽病防治重点开放实验室, 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要: 参考 GenBank 中的新城疫病毒 (NDV) 的基因序列, 在 F 基因的 3' 端相对保守区设计 1 对引物, 利用 RT-PCR 方法对华南农业大学兽医学院禽病学教研室近几年来分离并保存的 24 株新城疫病毒毒株的 F 基因进行了扩增, 其扩增长度为 450 bp. 测序结果表明: 近十几年来, 我国流行的新城疫毒株主要为基因 VII 型, 其氨基酸序列均符合 F 蛋白裂解位点区 (112~117) 强毒株的氨基酸序列特征, 并从分子水平上进一步证明我国最近流行的 NDV 主要为基因 VII 型 NDV 强毒株.

关键词: 新城疫病毒; F 基因; 基因 VII 型; 强毒株

中图分类号: S852.652; Q78 文献标识码: A 文章编号: 1001-411X(2006)03-0089-04

Molecular Biological Characterization of Newcastle Disease Viruses

Isolated from Different Geographical Locations in China

REN Tao, AO Yan-hua, CAO Wei-sheng, ZHANG Gui-hong,

LUO Kai-jian, XU Cheng-gang, LIAO Ming

(The Agricultural Ministry Key Laboratory of Poultry Feeding and Disease Control,

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

Abstract: Twenty four field strains of newcastle disease viruses (NDV) isolated from different geographical locations in China in the last 10 years were characterized genetically. A pair of primers specific to NDV gene F 3' end was designed according to the known sequences from GenBank, and was used to amplify the NDV cDNA gene F 3' end by RT-PCR from total RNA, which was 450 bp in length. Analysis of the F gene sequence revealed that 20 strains belonged to the genotype VII, whose amino acid sequences of the cleavage site region (112-117) were similar to that of all other virulent strains. The results confirmed that the majority of epidemic strains of NDV in China recently are virulent.

Key words: newcastle disease virus; F gene; genotype VII; virulent strain

新城疫病毒 (newcastle disease viruses, NDV) 属副粘病毒科, 其基因组为单股负链 RNA, 大小约 15 kb, 编码 6 种结构蛋白 (NP-P-M-F-HN-L), 其中 M、F 和 HN 3 种蛋白属于囊膜糖蛋白, 其他 3 种蛋白则形成 NDV 的核衣壳^[1]. 对于编码这几种蛋白的基因,

F 和 HN 基因倍受关注. 因为 HN 蛋白属表面糖蛋白, 它介导病毒与细胞附着, 故又称作附着蛋白, 具有血凝素和神经氨酸酶活性; F 蛋白又称为融合蛋白, 将病毒囊膜与宿主细胞表面脂蛋白融合, 促使核衣壳释放到胞浆内^[1]. 通过对 NDV 的研究, 发现其

收稿日期: 2006-03-31

作者简介: 任 涛 (1968-), 男, 副教授, 博士; 通讯作者: 廖 明 (1968-), 男, 教授, 博士, E-mail: mliao@scau.edu.cn

基金项目: 广东省科技计划项目 (2005A20401003)

变异与 F 基因和 HN 基因有直接关系,使得新的基因型不断出现,而决定其毒力强弱主要是 F 基因^[1-2]. 为了有效地防控这种高变异的烈性传染病大流行,降低养禽业的损失,密切关注 NDV 流行株分子生物学特征的研究十分有必要. 本试验对我国部分地区,尤其是广东地区近几年来分离的 24 个 NDV 毒株的 F 糖蛋白部分区段的基因进行了序列分析,并与国内外其他相关研究结果进行了比较,从而了解我国近年来 NDV 流行株之间及与国外 NDV 主要

流行株之间的联系和遗传、进化规律,为制定合理有效的控制 ND 措施提供流行病学依据.

1 材料与方法

1.1 材料

本研究中使用的 24 个 NDV 毒株均为华南农业大学兽医学院禽病学教研室分离鉴定和保存,各毒株的流行病学资料详见表 1.

表 1 进行分子流行病学研究的 24 个 NDV 分离毒株及其背景
Tab.1 Source of NDV 24 isolates used for molecular characterization

毒株名称 strain name	分离地点 place of isolation	分离时间 date of isolation	毒株名称 strain name	分离地点 place of isolation	分离时间 date of isolation
GD-94	广东	1994-04	NH-03	广东南海	2003-03
FS-98	广东佛山	1998-06	HB-LZ-03	湖北力竹	2003-03
GD-99	广东	1999-12	HB-YM-03	湖北云梦	2003-03
SD-99	广东顺德	1999-12	JF-03	广州九佛	2003-07
SJ-00	广州石井	2000-01	DH-04	肇庆鼎湖	2004-02
ZLT-00	广州钟落潭	2000-04	DL-04	南海大沥	2004-02
DG-01	广东东莞	2001-04	DT-04	增城大塘	2004-02
SZ-01	广东深圳	2001-05	LC-04	广东罗村	2004-02
JM-02	广东江门	2002-12	HN-04	海南	2004-02
SZ-03	广东深圳	2003-01	HD-04	广东花都	2004-11
HY-03	广东河源	2003-01	GD-05-1	广东	2005-04
MM-03	广东茂名	2003-02	GD-05-2	广东	2005-05

1.2 NDV mRNA 提取

TRIzol LS Reagent 为 Invitrogen 公司的产品,操作按其说明书进行.

1.3 引物设计及合成

参考 GenBank 中公开发表的 NDV 核苷酸序列,利用 DNASTAR (Version5.07) 和 Primer Premier (Version5.0) 分析软件,在 F 基因 3' 端确定相对保守区,并在此区域设计 1 对引物,上游引物序列为:5'-CAA ATT AGA AAA AAC ACG-3'; 下游引物序列为:5'-GCA ACC CCA AGC GC-3',由上海英骏生物技术有限公司合成.

1.4 RT-PCR

F 基因的 RT-PCR 扩增参照大连宝生物公司 (TaKaRa) 的 RT-PCR 试剂盒说明进行.

1.5 NDV F 基因 3' 端的序列测定和序列分析

将 100 μ L PCR 产物送上海英骏生物技术有限公司进行序列测定. 利用 DNASTAR5.07 软件包中

的 EditSeq 软件从测定序列中截取位于 47 ~ 421 位长 375 bp 的核苷酸序列,参照基因分型方法^[3],利用 MegAlign 软件对试验毒株和参考毒株的序列进行同源性比较,绘制出系统发育进化树,并对毒株进行分型. 同时,应用 MegAlign 软件分析其 F 基因裂解位点区 112 ~ 117 的氨基酸序列特征^[4].

2 结果

2.1 系统发育进化树及基因分型

以 NCBI 上发表的并已经明确基因分型的 14 株 NDV 毒株为参考,分别为: TW98-3 (序列号 AF083974)、ShX3-99 (序列号 AF378246)、TW99-159 (序列号 AF234034)、TW99-157 (序列号 AF234032)、ZA25-93 (序列号 AF136768)、ASTR-74 (序列号 Y19012)、IT129-88 (序列号 AF218131)、SG4H-65 (序列号 AF136786)、herts' 33 (序列号 M24702)、Australia-Victoria (序列号 M21881)、F48E9

(序列号 AF079172)、Que-66(序列号 M24693)、B1-47(序列号 M24695)和 La Sota(序列号 AF077761),与24株试验毒株的F基因核苷酸序列进行同源性分析并进行基因分型,其中1株为基因I型,即HN-04;2株为基因III型,即JM-02和SZ-01;1株为基因IX型,即GD-94毒株;SZ-03虽然与其他的基因VII型株的同源性关系比较远,也暂归为基因VII型;其余的19株,如FS-98等均为基因VII型(见图1)。

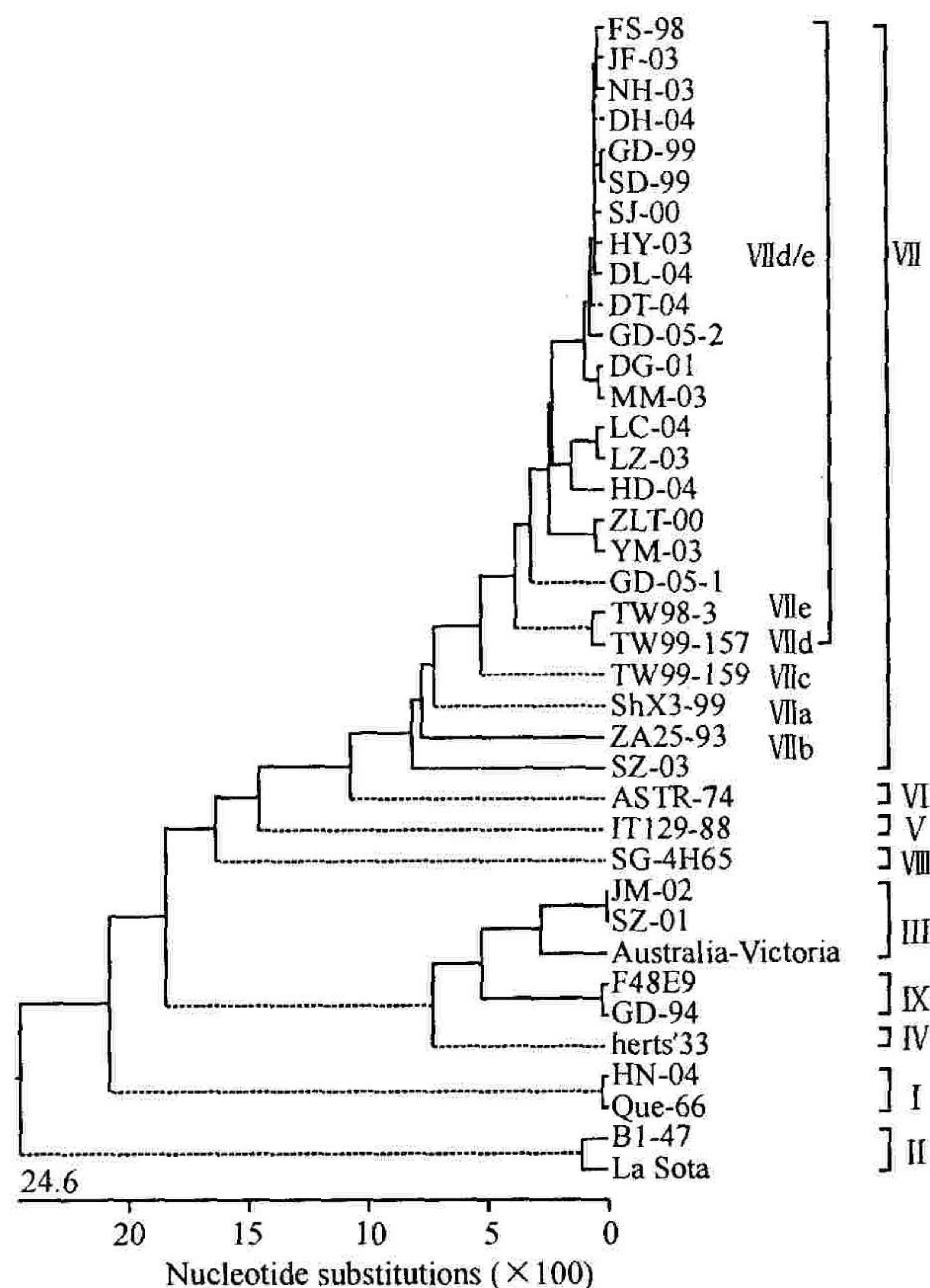


图1 24株NDV与14株已知基因型的NDV F基因1~374 bp核苷酸序列绘制的系统发育进化树

Fig.1 Phylogenetic tree of NDV strains according to the F gene sequence (1-374 bp)

2.2 F蛋白裂解位点区(112~117)氨基酸序列比较

24株NDV的F蛋白裂解位点区(112~117)氨基酸的序列分析结果为:HN-04在该区域的序列为¹¹²Gly-Lys-Gln-Gly-Arg-Leu¹¹⁷,与国外发表的部分NDV弱毒株如Que-66完全一致,与标准弱毒株La Sota,B1-47相似,只有113位不同,属于弱毒株;JM-02、SZ-01和GD-94在该区域的序列则为¹¹²Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Phe¹¹⁷,其余的均为¹¹²Arg-Arg-Gln-Lys-Arg-Phe¹¹⁷,完全符合NDV强毒株如Australia-Victoria、F48E9、herts'33及IT129-88等在该区域的氨基酸序列特征(表2)。

表2 24株NDV F蛋白裂解位点区(112~117)氨基酸序列与NDV参考毒株之间的比较

Tab.2 Comparison of sequence in the cleavage site region (112-117) among the NDV strains

毒株 strain	氨基酸序列位点 positions of amino acid sequences					
	112	113	114	115	116	117
La Sota	Gly	Arg	Gln	Gly	Arg	Leu
B1-47	Gly	Arg	Gln	Gly	Arg	Leu
Que-66	Gly	Lys	Gln	Gly	Arg	Leu
HN-04	Gly	Lys	Gln	Gly	Arg	Leu
Australia-Victoria	Arg	Arg	Gln	Lys	Arg	Phe
F48E9	Arg	Arg	Gln	Lys	Arg	Phe
N ¹⁾	Arg	Arg	Gln	Lys	Arg	Phe
herts'33	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Phe
IT129-88	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Phe
JM-02	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Phe
SZ-01	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Phe
GD-94	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Phe

1)“N”代表除了JM-02、SZ-01、HN-04、GD-94以外的20个毒株;La Sota,B1-47和Que-66属于弱毒株;Australia-Victoria,F48E9,herts'33和IT129-88属于强毒株

3 讨论

NDV基因VII型是目前主要流行基因型,对养禽业有着非常重要的影响。国内王永坤等^[5-6]2000年首次详细地报道了该基因型,可引起抗体水平较高的产蛋鸡产蛋率下降,而对于仔鸡和肉鸡,由于其抗体水平一般较低则可引起极高的发病率和死亡率。目前欧洲ND的流行及台湾地区自1984年以来ND的流行也是NDV新的基因VII型毒株所致,而且NDV新的基因VII型毒株已引起了东亚和西欧多次ND爆发,是正在发生的第4次ND大流行的起源,造成巨大的经济损失^[7]。

从系统发育进化树上看,本试验的24株NDV分离株中,属于NDV基因VII型的有20株,约占83%,而且大部分与VII型的d和e亚型的同源性关系较近,如TW99-157和TW98-3,与欧洲流行的毒株没有直接的联系。近10年来,我国鸡群中同时流行至少4个型,主要原因是我国一直以来对ND的控制采用以疫苗为主、隔离消毒为辅的措施,从而造成在同一时期的鸡群中同时流行多种基因型的NDV毒株,而欧美等发达国家往往在特定的时间流行特定基因型毒株;因为他们主要以扑灭强毒感染群的措施来控制ND。因此,必须尽快从主要依赖疫苗的传统措施向无特定疫病区的建设上转变,才能更有效

地控制和消灭 ND.

F 蛋白在 NDV 的致病性上发挥着重要作用,它将病毒囊膜与宿主细胞表面脂蛋白膜融合,从而使病毒穿入细胞浆脱去核衣壳进行复制,F 蛋白的合成先以无活性的 F0 存在,F0 经蛋白酶裂解为 F1 和 F2 两个亚单位后,才发挥其融合活性,使病毒具有感染力^[1]. F 蛋白能否被裂解取决于 F 蛋白裂解位点区(112~117)处氨基酸组成和宿主细胞的特性,F 蛋白的裂解位点处在 116 和 117 位氨基酸之间^[8]. 研究表明,强毒株融合蛋白裂解位点处的氨基酸序列为¹¹²Arg-Arg-Gln-Arg/Gly-Arg-Phe¹¹⁷,具有这一序列的 F 蛋白对蛋白酶修饰敏感易裂解,并对多种细胞具有感染力;弱毒株这一区域的氨基酸序列为¹¹²Gly-Arg/Lys-Gln-Gly/Ser-Arg-Lue¹¹⁷,112 位和 115 位以中性氨基酸取代了强毒株中的碱性氨基酸,这样的 F 蛋白的前体 F0 蛋白不易裂解,只对少数细胞具有感染力^[9]. 117 位的氨基酸也是影响裂解的主要因素之一,强毒株为 Phe,弱毒株为 Lue. 本研究中的 24 株 NDV,只有 HN-04 为弱毒,其 112~117 位的氨基酸序列为¹¹²Gly-Lys-Gln-Gly-Arg-Lue¹¹⁷,与 Que-66 的完全一致,为基因 I 型,二者的同源性高达 99.7%;其余的 23 株均为强毒. 由此可见,近 10 多年来我国 NDV 流行株主要为强毒性,其出现时间跨幅大,地区也很广泛.

究竟 NDV 基因 VII 型为何如此广泛地流行,有些学者认为是长期使用活苗造成的^[6-7],但是目前使用的一些疫苗如 La Sota、B1、Texas-48、Clone30 等均不是 VII 型,且与它的亲缘性关系相当远,因此尚有待进一步研究. 目前最令人关注的是现有疫苗能否为基因 VII 型强毒株的流行提供有效的保护,许多学者均对此做了比较深入的研究,然而结论不一,必须做进一步深入的研究. 在疫苗研究方面,近几年一些专家将目光投向于新技术的运用,Panda 等^[10]利用反向遗传操作技术将现有的疫苗进一步致弱,Ivomar 等^[11]也通过反向遗传操作构建了 NDV 感染性分子克隆,在此基础上改造 HN 基因,构建嵌合病毒,用 NDV 来构建载体病毒将会是疫苗研究领域的重大突破,同时这些疫苗也可应用于鉴别疫苗毒和野毒,对今后 ND 的控制将会起到不可估量的作用.

参考文献:

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 第2版. 北京:科学技术出版社,1997:739-741.
- [2] COLLINS M S, STRONG I, ALEXANDER D J. Evaluation of the molecular basis of pathogenicity of the variant newcastle disease viruses termed "pigeon PMV - 1 viruses" [J]. Archives of Virology, 1994,134(3-4):403-411.
- [3] ALDOUS E W, MYNN J K, BANKS J, et al. A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene[J]. Avian Pathology, 2003,32(3):239-257.
- [4] LI Zeng-ji, THERESA S, ENAL R, et al. Effect of cleavage mutants on syncytium formation directed by the wild-type fusion protein of newcastle disease virus[J]. J Virol, 1998, 72: 3 789-3 795.
- [5] 王永坤,严维巍,周继宏,等. 鸡副粘病毒特性和基因型的研究及防制[J]. 动物科学与动物医学, 2000, 17(3):31-34.
- [6] 王永坤,严维巍,周继宏,等. 新城疫高抗体水平的鸡群产蛋下降其病因和防治对策的探讨[J]. 中国禽业导刊, 2000, 17(3):5.
- [7] 程相朝,吴庭才,李清利,等. 新城疫病毒的基因分型与分子流行病学[J]. 中国畜牧兽医, 2004, 31(8):39-41.
- [8] ALDOUS E W, ALEXANDER D J. Detection and differentiation of newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1) [J]. Avian Pathology, 2000, 30: 117-128.
- [9] THERESA A S, LORI W M, TRUDY G M. Mutations in the fusion peptide and adjacent heptad repeat inhibit folding or activity of the newcastle disease virus fusion protein [J]. J Virol, 2001, 9:7 934-7 943.
- [10] PANDA A, HUANG Zhu-hui, ELANKUMARAN S, et al. Role of fusion protein cleavage site in the virulence of newcastle disease virus[J]. Microb Pathog, 2004, 36:1-10.
- [11] IVOMAR O, CORRIE C B, DANIEL J K, et al. The use of in situ hybridization and immunohisto-chemistry to study the pathogenesis of various newcastle disease virus strains and recombinants in embryonated chicken eggs[J]. Microb Pathog, 2005, 39:69-75.

【责任编辑 柴 焰】