

基因 VIb 亚型半番鸭源新城疫病毒基因组测序及分析

黄秋芳^{1,2}, 孙敏华², 陈少莺³, 吕殿红², 董嘉文², 尚毅^{1,2}, 吴玄光¹, 胡奇林²

(1 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642; 2 广东省农业科学院 兽医研究所, 广东省兽医公共卫生公共实验室, 广东 广州 510640; 3 福建省农业科学院 畜牧兽医研究所, 福建 福州 350013)

摘要:根据 GenBank 上发布的新城疫病毒基因组序列, 设计了 9 对引物, 对从福建福州地区发病半番鸭场分离的新城疫病毒 FJ-SMD-03 株进行了基因组 cDNA 扩增测序和分析. 结果表明: FJ-SMD-03 的基因组序列由 15 192 nt 组成, 在 NP 基因非编码区比 Lasota 株多了 6 个核苷酸 AACTCT; 基因组由 6 个 ORF 组成, 即 3'-NP-P-M-F-HN-L-5' 序列. BLAST 结果显示: FJ-SMD-03 基因组核苷酸与 1.3/carrion-pigeon/Guangdong/2008、pigeon/Italy/1166/00、AV324/96 和 dove/Italy/2736/00 相似性最高, 达 94.9% ~ 98.5%; 与疫苗株 Lasota、Mukteswar 和 B1 的相似性最低, 为 80.7% ~ 83.3%; 与我国标准强毒株 F₄₈E₈ 及 2002 年从福建番鸭中分离到的基因 VIId 亚型强毒株 Muscovy duck/China (Fujian)/FP1/02 相似性较低, 分别为 82.5% 和 87.1%. F 蛋白裂解位点的氨基酸序列为¹¹²R-R-Q-K-R-F¹¹⁷, 具有强毒株序列特征, 进化树分析发现, FJ-SMD-03 属于 Class II 类基因 VIb 亚型, 证明鸭群中有 VIb 亚型 NDV 强毒株; FJ-SMD-03 株 NDV 与 1.3/carrion-pigeon/Guangdong/2008 和 pigeon/Italy/1166/00 亲缘关系较近, 与 carrion-pigeon/Guangdong/2008 形成一个小的进化分支, 推测 FJ-SMD-03 株与 carrion-pigeon/Guangdong/2008 和 pigeon/Italy/1166/00 株来源于共同的祖代毒株, 可能与鸽携带的病毒有关.

关键词:新城疫病毒; VIb 亚型; 基因组; 序列测定; 遗传分析

中图分类号: S855.3

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2012)01-0106-07

Sequencing and Analysis Genome of a VIb Subgenotype of Newcastle Disease Virus Isolated from Semi-Muscovy Duck

HUANG Qiu-fang^{1,2}, SUN Min-hua², CHEN Shao-ying³, LÜ Dian-hong², DONG Jia-wen²,
SHANG Yi^{1,2}, WU Xuan-guang¹, HU Qi-lin²

(1 College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 Guangdong Open Laboratory of Veterinary Public Health, Institute of

Veterinary Medicine, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China;

3 Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China)

Abstract: Based on the genome sequence of newcastle disease virus (NDV) published in GenBank, nine pairs of gene-specific primers were designed to amplify cDNA of FJ-SMD-03 strain isolated from Semi-Muscovy duck in Fuzhou, Fujian, then sequencing and analysis were performed. The results showed that FJ-SMD-03 was 15 192 nucleotides in length which consisted of six ORFs in the order of 3'-leader-NP-P-M-F-HN-L-5' trailer and it had six nucleotides longer than Lasota strain in non-coding region of NP gene. The genome shared the highest similarity of the nucleotide with 1.3, carrion-pigeon/Guangdong/2008, pigeon/Italy/1166/00, AV324/96 and dove/Italy/2736/00 (94.9% - 98.5%), and shared the lowest similarity of the nucleotide with vaccine strain Lasota, Mukteswar and B1 (80.7% - 83.3%), whereas it shared lower similarity of the nucleotide with strain F₄₈E₈ and Muscovy duck/China (Fujian)/FP1/02, Subgenotype VIId, velogenic, isolated from Muscovy duck in Fujian during 2002 for 82.5% and 87.1% respectively. The motif of cleavage site region of F gene was ¹¹²R-R-Q-K-R-F¹¹⁷, which was the sequence

收稿日期: 2011-06-02

作者简介: 黄秋芳 (1983—), 女, 硕士研究生; 通信作者: 胡奇林 (1963—), 男, 研究员, E-mail: hql562713@163.com

基金项目: 广东省兽医公共卫生公共实验室开放基金 (GSKJ090201)

signature of virulent strain. Phylogenetic analysis revealed that FJ-SMD-03 belonged to subgenotype VIIb, Class II, which was the first report of the subgenotype VIIb virulent NDV strain isolated from Semi-Muscovy duck. FJ-SMD-03 was closely associated with 1.3, carrier-pigeon/Guangdong/2008 and pigeon/Italy/1166/00 and formed a secondary branch in the phylogenetic tree with carrier-pigeon/Guangdong/2008, which suggested that FJ-SMD-03, carrier-pigeon/Guangdong/2008 and pigeon/Italy/1166/00 came from the same origin, which might be due to virus carried by pigeons.

Key words: newcastle disease virus; VIIb subtype; genome; sequencing; genetic analysis

新城疫(Newcastle disease, ND)是由新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)引起的一种急性、高度接触性、致死性传染病,是危害世界养禽业的主要传染病之一。NDV为副粘病毒科(Paramyxoviridae)副粘病毒亚科(Paramyxovirinae)禽腮腺炎病毒属(*Avulavirus*)成员^[1],是单股负链不分节段RNA病毒,其基因组长约15.2 kb,基因组至少编码6种蛋白,顺序为3'-NP-P-M-F-HN-L-5'。NDV一直处于不断的演化中,自ND发生以来,在世界范围内已发生了4次大流行,每次大流行都出现了新的基因型^[2],且其宿主范围也不断扩大,迄今为止,除家禽外,至少250种鸟类可自然或试验感染NDV^[2]。先前观点认为,水禽对NDV具有极强的抵抗力,仅表现为带毒,即使感染强毒也不致病^[3],自1997年报道我国广东、江苏鹅群中发生鹅新城疫并导致鹅群死亡(鹅副粘病毒病)以来^[3],鹅、鸭等水禽发生新城疫常有报道^[4-6],也有从猪分离到该病毒的报道^[7]。2003年,陈少莺等^[8]从福建福州地区临床上以拉白色稀粪、肝出血、脾黄白色坏死点和胰腺出血等为特征、发病率40%左右、病死率约25%左右的发病半番鸭中分离到1株NDV(半番鸭副粘病毒),研究结果表明,该病毒是该病病原,经理化、生物学和血清学等鉴定为NDV强毒株,命名为FJ-SMD-03。为了了解该半番鸭NDV的遗传进化情况及其与鸡和鸽NDV等的遗传关系,我们对FJ-SMD-03株的基因组进行了克隆和测序,证明为基因VIIb型新城疫病毒强毒株,并分析了该病毒的遗传变异情况。

1 材料与方法

1.1 毒株、SPF鸡胚和菌种

NDV FJ-MD-04株,由福建省农科院畜牧兽医研究所陈少莺等从福建福州发生新城疫死亡的半番鸭中分离、鉴定^[8],广东省农科院兽医研究所禽病研究室保存。9~11日龄SPF鸡胚由广东永顺生物制药有限公司提供。pMD18-T Vector为大连宝生物工程有限公司产品。

1.2 试剂

ExTaq、dNTP、DNA marker、胶回收试剂盒为大连宝生物工程有限公司产品,TRIzol Reagent、M-MLV为Invitrogen公司产品;其他试剂均为分析纯。

1.3 FJ-SMD-03基因组RNA的提取

在1.5 mL离心管内加入300 μ L尿囊液,600 μ L TRIzol,剧烈震荡1 min,室温静置10 min。加入300 μ L的氯仿,剧烈震荡1 min,室温静置10 min。12 000 r/min,4 $^{\circ}$ C离心10 min,吸取上清液于新的离心管。加入600 μ L的异丙醇,颠倒混匀,-20 $^{\circ}$ C放置20 min。12 000 r/min,4 $^{\circ}$ C离心10 min,弃上清液。加入750 μ L -20 $^{\circ}$ C保存的体积分数为75%冰乙醇,轻轻混匀。12 000 r/min,4 $^{\circ}$ C离心10 min。弃上清液,超净台内晾干RNA沉淀。用20 μ L DEPC水溶解,-20 $^{\circ}$ C保存备用。

1.4 FJ-SMD-03基因组各片段的扩增、克隆和测序

1.4.1 引物的设计和合成 参考GenBank上公布的国内外已发表的NDV各基因型的代表毒株的基因组核苷酸序列,利用Oligo 6.0设计了9对引物(表1),相邻扩增片段之间有部分核苷酸序列重叠,9对引物覆盖NDV的基因组。引物由Invitrogen广州分公司合成。

1.4.2 FJ-SMD-03各基因的cDNA合成 采用40 μ L体系。在200 μ L反应管中加入RNA 20 μ L,加入dNTPs(2.5 mmol/L each)4 μ L,随机引物(10 mmol/L)2 μ L,瞬时离心,65 $^{\circ}$ C水浴10 min,冰浴2~3 min,瞬时离心。再加入5 $\times$ 第一链合成缓冲液8 μ L,0.1 mol/L DTT 4 μ L,RNase抑制剂1 μ L,M-MLV 1 μ L。25 $^{\circ}$ C水浴10 min,37 $^{\circ}$ C水浴60 min,70 $^{\circ}$ C灭活15 min,瞬时离心,冻存备用。

1.4.3 FJ-SMD-03各基因的扩增 采用25 μ L PCR反应体系。扩增程序为:94 $^{\circ}$ C预变性5 min;94 $^{\circ}$ C 40 s,52 $^{\circ}$ C 40 s,72 $^{\circ}$ C 1.5~2.5 min为1个循环,做30个循环,最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min。取PCR产物5 μ L,用10 g/L琼脂糖凝胶电泳观察分析。

1.4.4 FJ-SMD-03各基因PCR产物的纯化、克隆和序列测定 PCR产物的回收、纯化参照Agarose Gel

DNA Purification Kit(TaKaRa)说明书进行. 扩增产物回收纯化后,按 pMD18-T Vector 说明书进行连接,连接产物分别命名为 pT- NP1、pT- NP2、pT- P、pT- F、pT- HN、pT- L1、pT- L2、pT- L3 和 pT- L4,转

化感受态 DH5 α ,复苏后涂布含氨苄青霉素抗性的 LB 平板. 挑取单个菌落,过夜培养后,用菌液做模板进行 PCR 初步鉴定. 将初步鉴定为阳性的克隆送至 Invitrogen 广州分公司测序.

表1 FJ-SMD-03 株鸭源新城疫病毒基因组序列扩增引物
Tab.1 Oligonucleotide primers used for RT-PCR amplifying of FJ-SMD-03

引物名称	序列(5'~3') ¹⁾	位点/nt ²⁾	扩增产物长度/nt
NP1	ACCAAACAGAGAATCBGTG	1~19	856
NP838	GCTCCACCTGCTGTATTG	838~856	
NP749	CATCCTGTATGCAGGAGTG	749~767	1 496
NP2226	AAAGAGAGTTGCTTGCTCC	2 226~2 244	
P2107	CAGACAAACARCCATCCAC	2 107~2 125	2 380
P4470	CGACAGGTRAACAACT	4 470~4 486	
F4358	GCCATTGCYAAATACAATCC	4 358~4 377	1 993
F6331	GGCTCCTCTKACCGTTCTAC	6 331~6 350	
HN6178	CCTMGATCAGATGAGAGC	6 178~6 195	2 265
HN8426	TGTGACTCTGGTAGGAT	8 426~8 442	
L8091	CGTTCBTTAYTAGTTGAGAT	8 091~8 111	2 245
L10317	CTCCAGTTAAGACARTACT	10 317~10 335	
L10245	CAAACCGYAATCATGATC	10 245~10 262	2 155
L12371	TCTTGGTTGTTGTCATTGG	12 371~12 399	
L12258	TTCACATATCCAATGATTC	12 258~12 276	1 405
L13644	TGAGATRCCTTATACCAAG	13 644~13 662	
L13514	GATCTAAGTGCYCCAGCAAGGT	13 514~13 535	1 679
L15192	ACCAAACARAGATTTGCTGAAT	15 171~15 192	

1) B=G、T 或 C, R=G 或 A, Y=T 或 C, K=G 或 T, M=A 或 C; 2) 核苷酸位点与 NDV dove/Italy/2736/00 全基因序列相对应.

1.4.5 FJ-SMD-03 基因组序列的拼接及分析 用 DNASTar 中的 SeqMan 和 Editseq 软件进行基因组的序列拼接,得出 FJ-SMD-03 的基因组序列. 用 BLAST 进行基因组序列相似性分析;用 DNASTar 软件包中的 MegAlign 软件进行基因组各片段核苷酸及氨基酸相似性分析.

1.5 F 和 HN 基因核苷酸相似性分析和系统发育分析

从 GenBank 选取 NDV 代表株 F 基因和 HN 基因的 ORF 序列,利用 DNASTar 5.0 软件包分析分离株与上述毒株 F、HN 基因相似性;分别根据 F 基因 47~435 nt 之间片段的核苷酸序列^[9]和 HN 基因全长序列绘制系统进化发生树.

2 结果

2.1 FJ-SMD-03 基因组序列测定

应用 RT-PCR 方法分 9 个片段扩增了 FJ-SMD-03 基因组序列,经琼脂糖凝胶电泳检测,各片段的扩增产物与设计的大小相符(图略). 将 NP1、NP2、P、F、HN、L1、L2、L3 和 L4 共 9 个片段连接到 pMD18-T

载体后,经 PCR 鉴定后其片段大小与预期大小相符(图略). 测序结果用 DNASTar 中的 SeqMan 和 Editseq 进行基因组的序列拼接,得到 FJ-SMD-03 的基因组序列,为 15 192 nt,比 GenBank 上公布的传统 NDV 毒株 Lasota、B1 和 Clone-30 等的基因组序列(15 186 nt)长 6 nt,多出的 6 个核苷酸都位于基因组的 NP 基因末端的非编码区内,相对于 Lasota、B1、Clone-30 毒株基因组的 1 648~1 649 nt 位. FJ-SMD-03 基因组信息见表 2.

2.2 FJ-SMD-03 与类似毒株基因组核酸序列相似性分析

BLAST 结果显示:FJ-SMD-03 基因组核苷酸与 1.3、carrier-pigeon/Guangdong/2008、pigeon/Italy/1166/00、AV324/96 和 dove/Italy/2736/00 相似性最高,达 94.9%~98.5%,这些毒株均为鸽源强毒株;与疫苗株 Lasota、Mukteswar 和 B1 的相似性最低,为 80.7%~83.3%;与我国标准强毒株 F₄₈E₈ 及 2002 年从福建番鸭中分离到的基因 VIIId 型强毒株 Muscovy duck/China(Fujian)/FP1/02 相似性较低,分别为 82.5%和 87.1%(表 3).

表 2 FJ-SMD-03 的基因组结构

Tab.2 Model structure of FJ-SMD-03 genome

基因	基因起始序列	基因终止序列	基因长度/nt	基因间隔序列
Leader	ACCAAACAGAGAATCTGTG AGTTACGGTAAAGGGCGAA TAAGCAATCGAAATCGC		55	
NP	ACGGGTAGAA	TTAGAAAAAAA	1 753	T
P	ACGGGTAGAA	TTAAGAAAAAA	1 451	T
M	ACGGGTAGAA	TTAGAAAAAAA	1 241	C
F	ACGGGTAGAA	TTAAGAAAAAA	1 792	CTACTGGATATAA GCAACTGATAGG CAATAC TATGGATGGCAGT GAAATACAAGGG AAAACAACATAC AAGGGACAC
HN	ACGGGTAGAA	TTAAGAAAAAA	2 002	
L	ACGGGTAGGA	TTAGAAAAAAA	6 703	
Trailer	GTAAATTCTGATCCTTTGAA GCTCGTGTTCCGATTCAAGCA ATTATCTTAAAGCAGAACTGA ACGTGTTGTCTTAATTATAA TCTTGTCAATTCACCAAATCTCT GTTTGGT		114	
总长度			15 192	

表 3 FJ-SMD-03 与类似毒株核苷酸序列相似性比较

Tab.3 Comparison of FJ-SMD-03 nucleotide sequence with its closest genetic relatives

		Percent identity																			%	
Divergence		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		
	1		98.5	95.1	80.7	97.7	87.7	94.9	82.5	85.3	81.2	86.6	83.3	87.1	85.9	96.4	86.9	79.2	82.3	86.6	1	FJ-SMD-03
	2	1.6		96.1	80.5	97.7	89.2	96.4	83.3	85.6	81.0	87.4	84.3	86.9	86.6	97.7	87.1	79.4	82.3	86.9	2	1.3
	3	5.1	4.0		81.0	94.9	87.7	98.2	82.8	86.4	81.2	86.9	83.8	85.3	85.3	95.1	85.6	79.4	82.5	85.3	3	AV324/96
	4	19.9	19.9	20.0		80.5	79.7	78.7	82.3	83.3	97.9	81.5	83.5	80.2	78.7	80.7	79.9	86.6	85.1	80.5	4	B1
	5	2.4	2.4	5.4	20.3		87.9	94.6	82.0	84.8	81.0	87.1	83.0	86.9	85.9	95.6	87.1	78.4	81.0	86.9	5	carrier-pigeon/Guangdong/2008
	6	12.9	11.3	12.6	22.4	13.2		88.9	85.1	88.2	79.4	89.2	85.1	93.8	94.6	90.2	94.3	79.9	83.0	94.1	6	cockatoo/Indonesia/14698/90
	7	5.4	3.7	1.8	22.5	5.6	11.3		83.5	86.6	79.9	86.9	83.8	86.1	86.6	95.4	86.4	78.7	81.5	86.1	7	dove/Italy/2736/00
	8	17.5	16.5	17.5	18.6	17.9	16.0	16.5		90.0	83.3	86.6	90.2	82.8	83.5	84.6	82.5	86.9	87.4	82.8	8	F ₄₈ E ₈
	9	15.3	14.5	13.8	17.6	15.9	12.4	13.8	9.8		84.6	88.2	93.3	85.1	85.6	86.1	85.1	86.9	89.2	85.1	9	Hert 33
	10	19.5	19.5	19.6	2.1	19.9	22.4	21.3	17.8	16.1		82.3	83.8	80.5	78.9	81.5	79.9	86.4	84.6	80.7	10	Lasota
	11	14.2	12.9	13.5	20.6	13.5	11.4	13.5	14.3	12.7	19.8		85.3	86.9	87.1	88.4	86.6	82.0	82.3	86.9	11	Largo 71
	12	17.6	15.9	16.2	17.5	17.6	15.0	16.5	10.1	6.5	16.8	15.4		82.0	82.5	85.1	82.0	86.9	88.4	82.3	12	mukteswar
	13	13.5	13.9	15.2	21.6	14.2	6.3	14.5	18.1	15.7	21.5	14.0	18.9		96.7	87.9	98.5	77.6	80.7	99.0	13	muscovy duck/China(fujian)/FP1/02
	14	14.9	13.9	15.3	23.2	14.9	5.7	13.9	17.4	15.0	23.2	13.4	17.8	3.2		87.7	96.1	77.6	81.2	96.7	14	NA-1
	15	3.4	1.8	4.8	20.0	4.3	10.4	4.5	15.9	14.2	19.2	12.0	15.6	12.9	13.0		88.2	80.2	82.3	87.9	15	pigeon/Italy/1166/00
	16	13.9	13.6	14.9	22.0	13.9	6.0	14.2	18.4	15.7	21.9	14.3	18.9	1.6	3.7	12.6		77.6	81.0	98.5	16	SF02
	17	21.4	20.7	21.0	13.4	22.2	20.5	21.4	13.8	13.2	14.0	19.1	13.1	23.6	23.6	20.4	24.0		92.5	78.7	17	Ulster67
	18	18.7	18.3	18.7	14.4	19.8	17.8	19.0	12.6	10.7	15.1	18.2	12.0	21.1	20.4	18.8	20.9	7.0		80.7	18	V4
	19	14.2	13.9	15.3	21.7	14.2	6.3	14.6	18.1	15.7	21.6	14.0	18.5	1.0	3.2	13.0	1.6	22.8	21.2		19	ZJ1
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19			

2.3 FJ-SMD-03 株基因组各基因编码区核苷酸及其氨基酸相似性分析

FJ-SMD-03 中 6 个基因片段的 ORF 及其推导的氨基酸序列与不同毒株相似性比较结果见表 4。由表 4 数值可知, FJ-SMD-03 与 dove/Italy/2736/00、AV324/96、PPMV-1/New York/1984 和 1.3 的核苷酸和氨基酸相似性最高, 分别达 93.2% ~ 99.5% 和 92.2% ~

99.8%, 上述毒株均为鸽源强毒株; 与 B1、V4、Lasota 株及 Mukteswar 等疫苗株相似性最低, 仅分别为 80.3% ~ 88.8% 和 75.8% ~ 94.7%; 与 F₄₈E₈ 和 FJ-1/85/CH 的相似性较低, 分别为 84.2% ~ 89.2% 和 80.6% ~ 94.5%, 与 cockatoo/Indonesia/14698/90、NA-1、SF02、ZJ1 和 Muscovy duck/China(Fujian)/FP1/02 的相似性也较低, 分别为 86.0% ~ 91.0% 和 82.9% ~ 96.0%。

表4 FJ-SMD-03 与新城疫病毒各毒株基因编码区核苷酸及氨基酸相似性比较

Tab. 4 Comparison of the nucleotide and amino acid similarity of genes coding sequence of FJ-SMD-03 with NDVs %

病毒株	核苷酸与 氨基酸 ¹⁾	基因					
		NP	P	M	F	HN	L
Ulster	n	87.9	82.9	86.2	85.9	81.5 ~ 84.3	88.1
	a	93.5	80.4	89.9	90.6	88.3 ~ 90.2	94.7
B1、V4 和 Lasota	n	84.6 ~ 84.7	80.3 ~ 81.3	84.9 ~ 87.0	84.8 ~ 85.0	83.1 ~ 83.2	86.5 ~ 87.9
	a	90.0 ~ 90.8	75.8 ~ 78.3	88.5 ~ 91.5	89.2 ~ 89.4	88.5 ~ 88.7	92.4 ~ 94.5
Mukteswar	n	88.4	83.9	87.7	86.0	86.7	88.8
	a	93.3	81.9	91.0	91.0	89.9	94.7
Herts/33 和 Italien	n	90.7 ~ 91.0	86.0 ~ 86.3	89.4 ~ 89.5	88.6 ~ 88.8	87.2 ~ 88.0	89.9 ~ 90.1
	a	94.9 ~ 95.3	83.9 ~ 84.6	93.7 ~ 94.0	93.2 ~ 93.3	90.1 ~ 90.6	95.7 ~ 95.8
Largo/71	n	91.5	87.1	90.5	88.7	88.2	91.1
	a	95.3	84.1	96.2	93.0	91.8	96.5
dove/Italy 和 AV324/96	n	96.4 ~ 99.5	93.2 ~ 98.8	94.5 ~ 99.5	94.5 ~ 99.3	93.8 ~ 99.4	95.5 ~ 99.4
	a	96.5 ~ 99.8	92.2 ~ 98.2	96.4 ~ 99.5	96.2 ~ 99.3	95.1 ~ 99.5	97.7 ~ 99.7
PPMV-1 和 1.3 US(C. A.)	n	93.1	91.6	93.6	92.4	91.6	93.9
	a	95.9	89.7	97.0	96.2	94.2	97.2
cockatoo、NA-1、SF02、 ZJ1 和 Muscovy duck	n	89.9 ~ 90.1	86.0 ~ 86.5	90.1 ~ 91.0	89.8 ~ 90.3	87.8 ~ 88.5	90.5 ~ 90.7
	a	94.3 ~ 95.1	82.9 ~ 84.6	95.1 ~ 95.4	93.9 ~ 95.5	91.4 ~ 92.0	95.3 ~ 96.0
F ₄₈ E ₈ 和 FJ-1/85/CH	n	89.2	84.2 ~ 84.3	86.9	86.7	85.4	88.5
	a	94.5	80.6 ~ 80.9	91.5 ~ 91.8	92.3 ~ 92.4	89.5 ~ 89.9	94.4

1)n:核苷酸;a:氨基酸.

2.4 FJ-SMD-03 株主要毒力基因分析

2.4.1 FJ-SMD-03 株 F 基因编码氨基酸序列分析

将本试验的 FJ-SMD-03 株 NDV 的 F 基因所编码的氨基酸序列进行分析,发现其 F₀ 蛋白裂解区氨基酸序列为¹¹²R-R-Q-K-R-F¹¹⁷,符合强毒株特征性氨基酸序列

(表5);FJ-SMD-03 株 F 蛋白上潜在的糖基化位点位于 85、191、366、447、471 和 541 氨基酸残基处;半胱氨酸残基位于第 27、76、199、338、347、362、370、394、399、401、424、514 和 523 位,表明 FJ-SMD-03 株 F 蛋白上 6 个糖基化位点、13 个半胱氨酸残基高度保守。

表5 NDV F 蛋白裂解位点序列

Tab. 5 Cleavage site of NDV F protein

病毒株	氨基酸组成						毒力
	112	113	114	115	116	117	
FJ-SMD-03	R	R	Q	K	R	F	强
dove/Italy/2736/00	R	R	K	K	R	F	强
NA-1	R	R	Q	K	R	F	强
F ₄₈ E ₈	R	R	Q	R	R	F	强
SF02	R	R	Q	K	R	F	强
cockatoo/Indonesia/14698/90	R	R	Q	K	R	F	弱
Lasota	G	R	Q	G	R	L	弱
Ulster	G	K	Q	G	R	L	弱
B1	G	R	Q	G	R	L	弱
V4	G	R	Q	G	R	L	弱

2.4.2 FJ-SMD-03 株 F 基因遗传进化分析 根据各毒株 F 基因开放阅读框内 47 ~ 435 nt 序列,应用 DNASTar 5.0 软件包绘制了各毒株系统进化发生树(图1).从图1可以看出,19 个毒株可被分成 9 个基因型.其中,FJ-SMD-03 株与 carrier-pigeon/Guangdong/2008、1.3、pigeon/Italy/1166/00、AV324/

96 和 dove/Italy/2736/00 同属于基因 VIIb 亚型,且亲缘关系较近,它们与 Lasota、V4 和 B1 等疫苗株,我国标准强毒株 F₄₈E₈ 和我国上世纪 90 年代中期以来的优势基因型毒株 ZJ1、Muscovy duck/China (Fujian)/FP1/02、SF02 和 NA-1 等遗传距离相对较远。

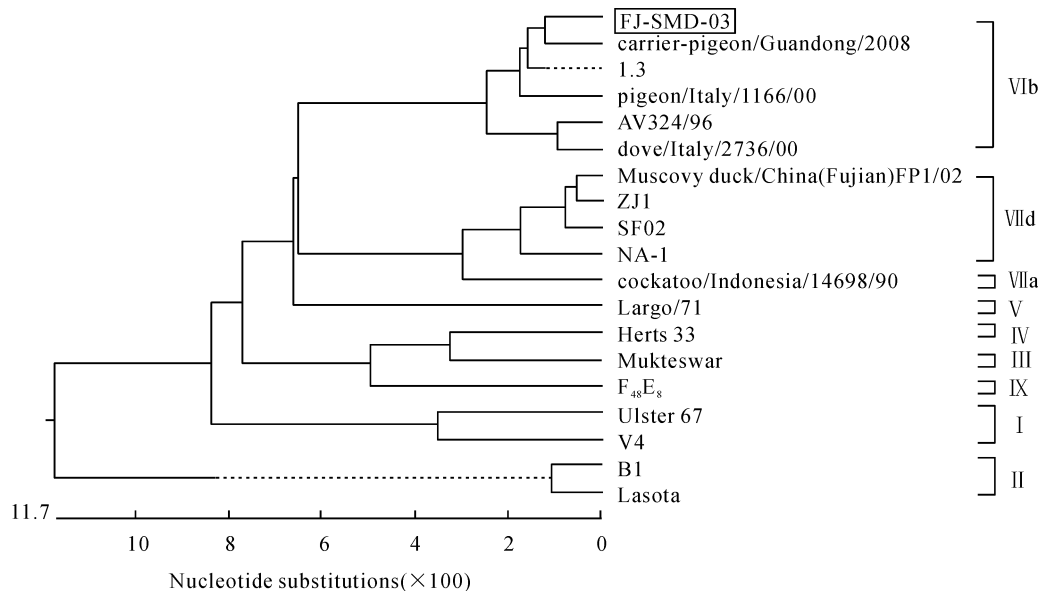


图1 F 基因 47 ~ 435 位核苷酸序列系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on the nucleotide sequences of F gene fragment (47 - 435) of NDV strains

2.4.3 FJ-SMD-03 株 HN 基因编码氨基酸序列分析

序列分析结果表明:HN 蛋白包含 6 个潜在的糖基化位点,分别在第 118、341、433、481、508 和 538 处;有 12 个半胱氨酸残基,分别在 172、186、196、238、247、251、344、455、461、465、531 和 542 处. 分析表明 HN 蛋白上的 6 个糖基化位点,12 个半胱氨酸残基高度保守. 在 HN 蛋白的 2 个中和位点中,第 347 位抗原位点由 E 突变为 G,第 495 位抗原位点则没有变化.

2.4.4 FJ-SMD-03 株 HN 基因遗传进化分析

测序拼接表明 HN 基因全长 2 002 nt,其完整的开放阅读

框有 1 716 nt,编码 571 个氨基酸. 利用 MegAlign (Clustal V Method) 绘制遗传进化树(图 2),结果表明, FJ-SMD-03 株与 carrier-pigeon/Guangdong/2008、1.3、pigeon/Italy/1166/00、AV324/96 和 dove/Italy/2736/00 均属于基因 VIIb 亚型,且亲缘关系较近,它们与 Lasota、V4 和 B1 等疫苗株、我国标准强毒株 F₄₈E₈ 和我国上世纪 90 年代中期以来的优势基因型毒株 ZJ1、Muscovy duck/China (Fujian)/FP1/02、SF02 和 NA-1 等遗传距离相对较远. HN 基因所体现出的遗传进化关系与 F 基因完全相似.

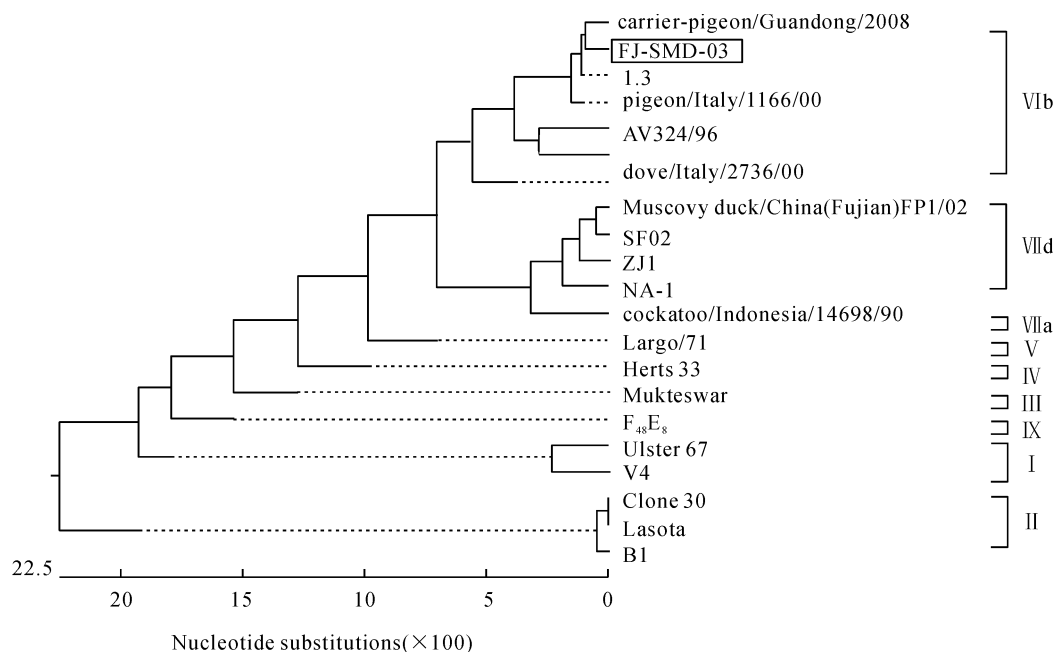


图2 HN 基因的 ORF 核苷酸系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of the nucleotide sequences of HN gene ORF of NDV strains

3 讨论

水禽是 NDV 的天然储存库,对水禽致病的 NDV 强毒株能直接传染给鸡等陆禽并使之发病,因此,研究对水禽致病的 NDV 强毒株的遗传变异情况对了解 NDV 的遗传演化趋势,制定有效的防治措施具有重要意义。

本研究对 2003 年从福建发病半番鸭群中分离的 NDV 强毒株进行了基因组克隆和测序,结果表明,FJ-SMD-03 株 NDV 基因组全长为 15 192 nt,是 6 的倍数,符合副粘病毒的“六规则”(the rule of six)^[10],比 Lasota、B1 和 Clone 30 等 NDV 毒株的基因组序列(15 186 nt)长 6 nt,多出的 6 个核苷酸位于基因组的 NP 基因末端的非编码区内,相对于 Lasota、B1、Clone-30 毒株基因组的 1 648 ~ 1 649 nt 位;与 dove/Italy/2736/00, ZJ1, NA-1, cockatoo/Indonesia/14698/90, Largo/71 等 NDV 毒株基因组长度一致,与 NDV 基因 V ~ IX 型基因组长度均为 15 192 nt 的推论相符^[11]。

序列分析结果表明,FJ-SMD-03 株 NDV F 基因编码的 F₀ 蛋白裂解位点的氨基酸序列为¹¹²R-R-Q-K-R-F¹¹⁷,符合强毒株 F 蛋白裂解位点序列特征,证明了我们先前的致病性试验结果^[8]。

根据 F 基因前 47 ~ 435 nt 构建的 F 基因核苷酸系统发育进化树,可见 FJ-SMD-03 株 NDV 属于 Class II 类基因 VIb 亚型。该研究结果丰富了水禽中 NDV 生态分布信息,对了解 NDV 遗传演化趋势,制定有效的 NDV 防控策略具有重要意义。

对 FJ-SMD-03 基因组各基因编码区核苷酸及其编码的氨基酸进行序列对比表明,FJ-SMD-03 与鸽源强毒株 dove/Italy/2736/00、AV324/96 和 1.3 核苷酸和氨基酸序列相似性最高,分别达 93.2% ~ 99.5% 和 92.2% ~ 99.8%,与 B1、V4、Lasota 和 Mukteswar 等疫苗株相似性最低,仅分别为 80.3% ~ 88.8% 和 75.8% ~ 94.7%;与 F₄₈E₈ 的相似性较低,分别为 84.2% ~ 89.2% 和 80.6% ~ 94.5%,与基因 VII 型强毒株 cockatoo/Indonesia/14698/90、NA-1、SF02、ZJ1 和 Muscovy duck/China (Fujian)/FP1/02 的相似性也较低,分别为 86.0% ~ 91.0% 和 82.9% ~ 96.0%,说明 FJ-SMD-03 株与上述鸽源毒株亲缘关系较近;另一方面,对 F 基因和 HN 基因进行的进化发育分析结果表明,FJ-SMD-03 株 NDV 与 carrier-pigeon/Guangdong/2008、1.3 和 pigeon/Italy/1166/00 亲缘关系较近,与 carrier-pigeon/Guangdong/2008 形成一个小的进化分支,与 Lasota、V4 和 B1 等疫苗株、我国标准强毒株 F₄₈E₈ 和我国上世纪 90 年代中期以来的优势基因型(基因 VII 型)毒株 ZJ1、Muscovy

duck/China (Fujian)/FP1/02、SF02 和 NA-1 等遗传距离较远,推测 FJ-SMD-03 株与 carrier-pigeon/Guangdong/2008 和 pigeon/Italy/1166/00 株来源于共同的祖代毒株,可能与鸽携带的病毒有关。

通过对 FJ-SMD-03 株 NDV 株 F 和 HN 基因编码的氨基酸序列分析可知,HN 蛋白的 2 个抗原位点中,第 347 位抗原位点由 E 突变为 G,表明 FJ-SMD-03 株 NDV 株的抗原性发生了改变,但这是不是 FJ-SMD-03 株 NDV 株抗原性发生变异^[8]的原因,有待进一步研究。

参考文献:

- [1] MAYO M A. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV[J]. Arch Virol, 2002, 147(8):1655-1656.
- [2] ALDOUS E W, ALEXANDER D J. Detection and differentiation of newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1)[J]. Avian Pathol, 2001,30:117-128.
- [3] 辛朝安,任涛,罗开健,等.疑似鹅副粘病毒感染诊断初报[J]. 养禽与禽病防治,1997(1):5.
- [4] MATHIVANAN B, KUMANAN K, MAHALINGA N A. Characterization of a newcastle disease virus isolated from apparently normal guinea fowl *Numida melagris*[J]. Vet Res Commun,2004,28(2):171-177.
- [5] ROY P, VENUGOPALAN A T, SELVARANGAM R, et al. Velogenic newcastle disease virus in captive wild birds [J]. Trop Anim Health Prod, 1998,30(5):299-303.
- [6] KUMANAN K, MEIGNANALAKSHMI A, MEENU R, et al. Pathotyping of a newcastle disease virus isolated from emus *Dromaius novaehollandiae*[J]. Trop Anim Health Prod, 2003,35(5):391-395.
- [7] 沈咏舟,潘鑫,郑新勇.猪源性新城疫病毒的分离与鉴定[J].安徽农业科学,2006,34(19):4941.
- [8] 陈少莺,胡奇林,陈仕龙,等.鸭副粘病毒的分离与初步鉴定[J].中国预防兽医学报,2004,26(2):118-120.
- [9] LOMNICZI 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.
- [10] DURBIN A P, SIEW J W, MURPHY B R, et al. Minimum protein requirements for transcription and RNA replication of a minigenome of human parainfluenza virus type 3 and evaluation of the rule of six [J]. Virology, 1997,234(1):74-83.
- [11] HUANG Yong, WAN Hong-quan, LIU Hong-qi, et al. Genomic sequence of an isolate of newcastle disease virus isolated from an outbreak in geese: a novel six nucleotide insertion in the non-coding region of the nucleoprotein gene[J]. Arch Virol,2004,149(7):1445-1457.

【责任编辑 柴 焰】