

山东地区新城疫病毒分离株的分离鉴定及其 *F* 基因的分子特性分析

杨金兴 朱瑞良

(山东农业大学 动物科技学院 山东 泰安 271018)

摘要: 2011 年从山东不同地区的发病鸡体内分离到 4 株新城疫病毒,分别命名为 SD1~SD4。4 株毒株经病毒蚀斑克隆纯化后动物回归试验可产生典型的 NDV 病变;为了解其遗传起源和分子特性对其融合蛋白(Fusion,F)进行序列和分子特性的分析。研究结果发现,生物学毒力测定显示 4 株毒株均为强毒。F 蛋白多肽裂解位点的序列为¹¹²RRQKRF¹¹⁷符合 NDV 强毒氨基酸基序。*F* 基因分型显示 SD01、SD02、SD03 和 SD04 与另外一株鸡源 SG01 以及广东鹅分离株等属于基因 VII 型。同源性比较显示:SD1~SD4 与同期分离株的同源性明显高于其他的传统毒株,且与国内分离株的同源性高于国外的分离株。

关键词: 新城疫病毒; *F* 基因; 分子特性

中图分类号: S432.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2013)02-0231-04

Isolation, Identification and Molecular Characterization for *F* Gene of Newcastle Disease Virus Isolated in Shandong

YANG Jin-xing, ZHU Rui-liang

(Faculty of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract: Four Newcastle Disease Virus isolates named SD01-SD04 were collected from chicken in Shandong in 2011. The four strains were purified by plaque assay can form typical cytopathic. The *F* genes of the isolates were cloned and sequenced to study its molecular characterization and hereditary variation. The deduced amino acid sequence of *F* gene showed that these viruses shared a velogenic motif¹¹²RRQKRF¹¹⁷ at the cleavage site which were coincident with biological index. Phylogenetic analysis showed that SD01-SD04 and the viruses derived from chicken and goose in China belonged to genotype VII. For *F* gene of the isolates, the homologies of the deduced amino acid sequences of SD01-SD04 with the same time isolates in China were higher compared with traditional strains. There was a closer genetic relationship between the four isolates and epidemic strains in China than foreign epidemic strains.

Key words: Newcastle disease virus; *F* gene; Molecular characterization

新城疫(Newcastle disease, ND)是由新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)引起禽和野禽的一种急性、高度传染性的疾病,可以造成病禽较高的发病率和死亡率^[1-3]。ND 目前仍然是我国养鸡业的两大传染病之一,近年来该病经常呈非典型发生,对我国的养禽业仍会产生巨大的经济损失^[4]。本试验就 2011 年山东地区发病鸡分离到的 4 株 NDV 进行生物学特性的研究,并对其融合蛋白 F 进行序列测定和分子特性分析,以了解 2011 年山东地区

NDV 的遗传起源和分子特性。

1 材料和方法

1.1 试验材料

病毒来源于 2011 年山东发病鸡群,分别命名为 SD1~SD4; SPF 鸡和鸡胚均由山东省农业科学院家禽研究所 SPF 种鸡场提供。Trizol、DNA 回收试剂盒、质粒提取试剂盒、一步法 RT-PCR 试剂盒和 pMD19-T Easy Vector 均为大连宝生物公司产品。

收稿日期: 2012-11-27

基金项目: 山东省自然科学基金项目(ZR2010CQ044)

作者简介: 杨金兴(1978-),男,山东潍坊人,助理研究员,硕士,主要从事禽病诊断研究。

通讯作者: 朱瑞良(1963-),男,山东泰安人,博士,主要从事动物传染病的诊断、防控工作。

1.2 试验方法

1.2.1 病毒的分离纯化和毒力测定 取病死鸡的肝、肺、脾、输卵管等剪碎研磨,以 Hank's 液制成 1:5 匀浆,冻融 3 次,离心后加入双抗作用后取上清液备用。取病料上清液经尿囊腔接种 10 日龄 SPF 鸡胚,弃去 24 h 内死亡鸡胚,收取 24 ~ 96 h 的鸡胚尿囊液,并观察鸡胚病变。接种 40 日龄 SPF 鸡,进行动物回归试验。分离病毒经蚀斑纯化后接种 SPF 鸡胚保存备用。分离毒株的毒力测定(MDT、ICPI、IV-PI)的检测方法按照 OIE 的操作规程进行^[5]。

1.2.2 序列测定 引物设计:参照 GenBank 中已发布的 NDV 的 *F* 基因序列(No. AF077761),用 Primer Premier 6.0 设计了 1 对引物(F-F、F-R),用于扩增 *F* 基因全长。引物由华大基因合成,序列为:

F-F: 5'-ATGGGCTCCAAACCTTCTAC-3';

F-R: 5'-TTGTAGTGGCTCTCATC-3'。

RT-PCR: 按照 Trizol 试剂说明提取病毒 RNA,加入适量的 DEPC 水溶解 RNA, -70 °C。按 RT-

PCR 一步法试剂盒说明加入引物和模板进行基因扩增。启动 PCR 仪器直到温度上升至 50 °C 时,将反应管放入 PCR 仪器中。PCR 反应条件:反转录反应 50 °C 30 min, 94 °C 3 min, 然后 94 °C 1.5 min, 54 °C 1.5 min, 72 °C 1.5 min, 进行 34 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。取 5 μL 反应产物进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检验扩增结果。

转化和测序:回收阳性 PCR 产物,16 °C 过夜连接至 pMD19-T Easy vector,转化感受态大肠杆菌 DH5α,37 °C 震荡培养 1 h 后,均匀涂布于含 Amp、IPTG 和 X-gal 的 LB 固体培养基平板,37 °C 培养 16 ~ 20 h。挑取白色菌落至 Amp⁺ 的 LB 液体培养基小量培养过夜,提取质粒作 PCR 扩增鉴定。将鉴定为阳性菌液送至大连 TaKaRa 生物公司测序。

1.2.3 NDV *F* 基因氨基酸序列分析 从 GenBank 下载已发表的 NDV 分离株的 *F* 基因序列(包括传统毒株和疫苗代表株以及 2011 年的国内外分离株)。毒株信息及其登陆号详见表 1。

表 1 下载毒株的基本出处及登录号

Tab.1 Newcastle disease virus strains and GenBank number

菌株 Strain	缩写 Abbr.	GenBank 登录号 GenBank No.	菌株 Strain	缩写 Abbr.	GenBank 登录号 Genbank No.
La Sota	La Sota	AF077761	Chicken, Iran. 5. 11	Iran5	JQ267581
Bingham	Bingham	A03663	Dove, Italy. VIR. 11	VIR	JN638234
Herts. 33	Herts33	AY741404	Duck, China. JS. 11	JS	JN698890
F48E9	F48E9	AY508514	Goose, China. GD20. 11	GD20	JN627506
TEX-48	TEX-48	M24698	Goose, China. GD450. 11	GD450	JN627508
Taiwan95	TW95	U62620	Pigeon, China. MY. 11	MY	JQ268609
Queenland. V4	V4	AF217084	Chicken, Pakistan. UDL8. 11	UDL8	JQ517285
N. Ireland. Ulster. 67	Ulster67	AY562991	Chicken, China. SDSG01. 11	SDSG01	JN400896
Game, USA. 211472.02	211472	AY562987			

取 *F* 基因的全长氨基酸片段对分离毒株和参考毒株进行基因分型^[6];利用 DNASTar 和 Mega 软件,分析 F1/F2 多肽裂解位点氨基酸序列;比较 4 株分离株与 La Sota、F48E9、B1 等传统毒株以及 SG01、UDL8、Iran5、GD20、GD450 等国内外同期发生的不同宿主源 NDV 的 *F* 基因氨基酸同源性,绘制全基因系统进化发育树,进而对上述所有毒株的 *F* 基因分子遗传变异情况进行分析。

2 结果与分析

2.1 病毒分离鉴定和毒力指标测定

病鸡病料无菌处理后接种 9 ~ 11 日龄 SPF 鸡胚,多数鸡胚在 48 ~ 60 h 内死亡,死亡胚全身严重出血、水肿,部分鸡胚肝脏有明显的坏死和出血点。尿囊液经 HA 试验检验为阳性,效价在 2^{6~8} (log2)

之间。接种的 SPF 鸡在大部分在 48 h 后临床出现典型的 ND 呼吸道症状,气管和泄殖腔拭子均可以分离检测到病毒。剖检呈现 ND 的典型病变,气管充血出血,十二指肠、泄殖腔粘膜、盲肠扁桃体、腺胃等出血。所有病变的组织器官都可以检测到病毒。4 株分离株的 MDT、ICPI、IVPI 结果比较一致,其中 MDT 值在 52.5 ~ 58.0 h 之间,ICPI 值在 1.85 ~ 2.1 之间,IVPI 值在 2.2 ~ 2.4 之间。

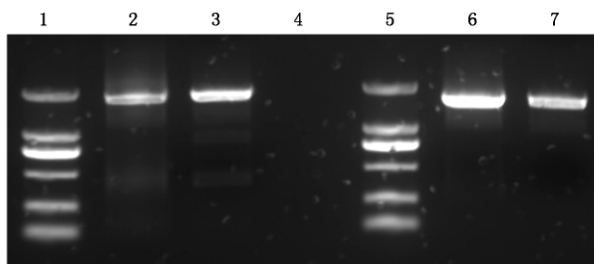
2.2 RT-PCR 和 *F* 基因测序结果

4 株分离株的 *F* 基因均扩增出预期大小的目的片段。4 个扩增出的片段经双向测序、拼接和校正后,确定 *F* 基因 ORF 全长 1 662 bp,编码 553 个氨基酸(图 1)。

2.3 *F* 蛋白裂解位点的氨基酸序列

SD1 ~ SD4 分离株在 *F* 蛋白裂解位点(F1/F2)

的氨基酸序列均为:¹¹²RRQKRF¹¹⁷,完全符合 NDV 强毒株此处的氨基酸序列(图 2)。



1 5. Marker DL2000; 2. SD1; 3. SD2; 4. 尿液对照; 6. SD3; 7. SD4.
1 5. Marker DL2000; 2. SD1; 3. SD2; 4. Allantoic fluid; 6. SD3; 7. SD4.

图 1 分离株 RT-PCR 扩增结果

Fig. 1 Amplification of NDV strains

	112	117
LaSota	GGGRQGRLLG	AIIGGVALGVATA
MY	GGRRQKRF	IGAVIGSVALGVATS
SD1	GGRRQKRF	IGAVIGSVALGVATA
SD2	GGRRQKRF	IGAVIGSVALGVATA
SD3	GGRRQKRF	IGAVIGSVALGVATA
SD4	GGRRQKRF	IGAVIGSVALGVATA
SDSG01	GGRRQKRF	IGAVIGSVALGVATA
TEX-48	GGRRQKRF	IGAVIGGVALGVATA
TW95	GGRRQKRF	IGAVIGSVALGVATA
UDL8	GGRRQKRF	IGAVIGSVALGVATA
Ulster	GGGKQGRLLG	AIIGGAALGVATA
V4	GGGKQGRLLG	AIIGGVALGVATA

图 2 分离株以及部分下载毒株 F 蛋白裂解位点序列

Fig. 2 Cleavage site of the F protein(residues 112 – 117)

2.4 F 蛋白的基因分型、同源性及其系统进化树

利用 F 基因全长核苷酸片段进行 F 基因的分型和系统进化分析。从图 3 中可以看出 SD01、SD02、SD03 和 SD04 与另外一株鸡源 SG01 以及广东鹅分离株 GD450、GD20 等同属于基因 VII 型。另外 2 株国外鸡源分离株 UDL8 和 Iran5 也属于基因 VII 型。

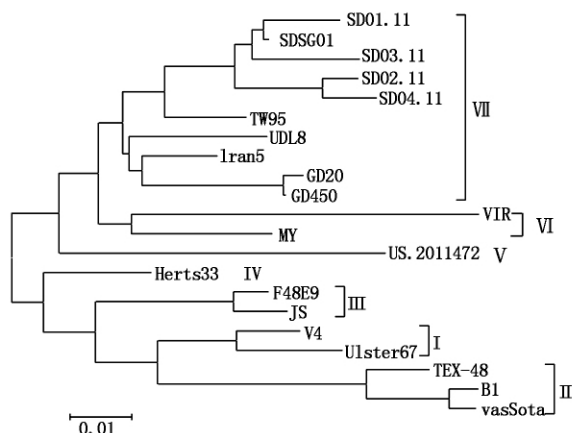


图 3 NDV 的 F 基因全长氨基酸的基因分型和进化树比较图

Fig. 3 Genotype and phylogenetic tree of NDV strains based on F gene amino acids

通过 4 株分离株与 LaSota、F48E9 等传统毒株的 F 基因氨基酸全长同源性的比较后,我们发现:SD1 ~ SD4 这 4 株分离株与同一基因型的各个毒株的同源性非常接近,其中与基因 II 型毒株 LaSota、

B1、TEX-48 氨基酸同源性为 87.4% ~ 87.9%, 87.5% ~ 88.1%, 88.1% ~ 88.6%; 与基因 I 型毒株 Ulster67 和 V4 的氨基酸同源性为 89.0% ~ 89.9% 和 89.5% ~ 90.4%; 与基因 III 型传统强毒 F48E9 的氨基酸同源性为 90.1% ~ 90.8%。就所有基因 VII 型的分离株而言,这 4 株分离株与国内同期鸡分离株 SG01 的氨基酸同源性为 97.1% ~ 98.6%; 与国外鸡分离株 UDL8、Iran5 的同源性分别为 93.3% ~ 94.0%, 94.2% ~ 94.9%。上述结果表明,SD1 ~ SD4 与同期分离株的同源性明显高于其他的传统毒株,且与国内分离株的同源性高于国外的分离株。

由图 3 可知,2 株鸽源分离株 VIR 和 MY 属于鸽源特有的 VI 基因型而处于一小分支上,只有一鸭源株 JS 与 F48E9 处于同一分支上,其余所有的 2011 年分离株均处于同一分支上。这 4 株毒株与国外分离株的遗传距离较远;而与国内分离株的遗传距离较近,处于同一基因亚型上。这也与氨基酸同源性的分析结果相符。

3 讨论

近年来国内外学者对不同年代、不同毒力、不同区域、不同基因型的 NDV 进行了广泛而深入的研究,尤其是针对 F 基因的研究更为深入;因为 F 基因与 NDV 的致病性密切相关,研究主要集中于此^[7-13]。

一般认为,NDV 仅有一个血清型。根据其基因组结构和遗传学特性可分为两大类,即 Class I 和 Class II。其中,Class I 的基因组长度为 15 198 nt,在 P 蛋白的编码区有 12 个核苷酸的插入,一般为低毒力或无毒力的毒株,多从水禽中分离。Class II 又可分为 9 个基因型,分别为基因 I 型 - IX 型^[14]。根据 F 基因分型的情况和流行状况分析,ND 的第 1 次大流行主要与基因 II、III、VII 型毒株有关。在第 2 次大流行中,出现了基因 V 和 VI 这 2 个新的基因型。通过学者研究发现,我国目前流行毒株还是以基因 VII 为主^[15-17]。

山东省 SPE 鸡场课题组于 2011 年从山东地区病鸡体内分离的 4 株毒株,从生物学毒力测定和 F1/F2 基因裂解位点基序均确定其为强毒株,基因型为 VII 型,它们与 LaSota、V4 等传统疫苗株无论是在毒力还是同源性比较、遗传演化等方面都存在较大差异。SD1 ~ SD4 这 4 株分离株的遗传距离非常接近,它们与同期分离株的同源性明显高于其他的传统毒株,且与国内分离株的同源性高于国外的分离株。

参考文献:

- [1] 吴洪俊,刘文斌,彭永刚.新城疫的流行特点[J].中国兽医杂志,2004,40(1):34-37.
- [2] 王华,程太平.大黄乙醇提取物的鸡体内抗新城疫病毒试验[J].天津农业科学,2012,18(2):23-26.
- [3] 银梅,赵坤,陈桂香,等.鸡新城疫病毒新乡株 MD-XX10 的分离与鉴定[J].河南农业科学,2011,40(2):142-145.
- [4] Qin Z M, Tan L T, Xu H Y *et al.* Pathotypical characterization and molecular epidemiology of Newcastle Disease Virus isolates from different hosts in China from 1996 to 2005 [J]. J Clin Microbiol 2008, 46(2):601-611.
- [5] Yuan X Y, Wang Y L, Yang J X *et al.* Genetic and biological characterizations of a Newcastle disease virus from swine in china [J]. Virology Journal 2012, 9:129.
- [6] Liu X F, Wan H Q, Ni X X *et al.* Pathotypical and genotypical characterization of strains of Newcastle disease virus isolated from outbreaks in chicken and goose in some regions of China during 1985-2001 [J]. Archives of Virology 2003, 148(7):1387-1403.
- [7] Mohammed M H, Hair-Bejo M, Omar A R *et al.* Molecular changes of the fusion protein gene of chicken mesenchymal stem cells - adapted velogenic [J]. Journal of Advanced Biomedical & Pathobiology Research, 2012, 2(5):1-59.
- [8] 李红丽,詹丽娥,张伟业,等.麻鸡新城疫病毒 SX-4 株 F 和 HN 基因在真核细胞中共表达研究[J].华北农学报,2011,26(3):47-50.
- [9] 张丽青,王爱华,张秀珊,等.新城疫病毒河北分离株 F 基因的克隆及序列分析[J].华北农学报,2008,23(4):19-22.
- [10] 符芳,姜北宇,张莉,等.鸡新城疫病毒 La Sota 株 F 基因的克隆及原核表达[J].华北农学报,2006,21(3):117-120.
- [11] Qin Z M, Sun L, Ma B C *et al.* F gene recombination between genotype II and VII Newcastle disease virus [J]. Virus Research, 2008, 13(2):299-303.
- [12] McGinnes L W, Gravel K A, Finberg R W *et al.* Assemble and immunological properties of Newcastle Disease virus-like particles containing the respiratory Syncytial Virus F and G Proteins [J]. Journal of Virology 2011, 85(1):366-377.
- [13] Jahangir A, Ruenphet S, Ueda S *et al.* Avian influenza and Newcastle disease viruses from northern pintail in Japan: Isolation, characterization and inter-annual comparisons during 2006-2008 [J]. Virus Research 2009, 143(1):44-52.
- [14] 刘华雷,蒋小刚,张维,等.一株 Class I 新城疫病毒中国分离株分子特性的研究[J].中国动物检疫,2008,25(8):30-33.
- [15] 刘华雷,王永坤.中国部分地区新城疫病毒的分子流行病学研究[J].扬州大学学报:自然科学版,2001,4(1):35-40.
- [16] 吴艳涛,倪雪霞,万洪全,等.我国部分地区不同动物来源新城疫病毒的分子流行病学研究[J].病毒学报,2002,18(3):264-269.
- [17] Liu X, Wan H, Ni X *et al.* Pathotypical and genotypical characterization of strains of newcastle disease virus isolated from outbreaks in chicken and goose flocks in some regions of China during 1985-2001 [J]. Archives of Virology 2003, 148(7):1387-1403.