

新城疫病毒河北分离株 *F* 基因的克隆及序列分析

张丽青^{1,4}, 王爱华², 张秀珊¹, 潘丽娜³, 杜冬华², 周 静², 闫书彩¹, 孙继国¹

(1. 河北农业大学 动物科技学院, 河北 保定 071000; 2. 河北北方学院 动物科技学院医学系, 河北 张家口 075000;

3. 承德市双桥区农业畜牧局, 河北 承德 067000; 4. 瑞普(保定)生物药业有限公司, 河北 保定 071000)

摘要:参照 GenBank 中 NDV 的核酸序列设计一对引物, 利用 RF-PCR 扩增 *F* 基因并得到长约 1.7 kb 的全基因片段, 并将其构建到 pMD-19T 载体上。核苷酸序列测定结果表明: 该基因片段全长 1 662 bp, 编码 553 个氨基酸, 与 GenBank 下载的 13 株参考毒株 *F* 基因比较, 核苷酸和氨基酸序列同源性分别为 97.2% ~ 99.2% 和 96.9% ~ 98.7%; 但与 LaSota、F48E9 及 B1 等常见疫苗株的氨基酸同源性仅为 88.6% ~ 91.5%。NDV 分离株 *F* 蛋白裂解位点的氨基酸序列为 112R-R-Q-K-R-F-I-G119, 属于基因 VII NDV。

关键词:新城疫病; *F* 基因; 克隆; 序列分析

中图分类号: S432.4⁺1 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2008)04-0019-04

Cloning and Sequence Analysis of *F* Gene of Newcastle Disease Virus Isolated from Hebei Province

ZHANG Li-qing^{1,4}, WANG Ai-hua², ZHANG Xiu-shan¹, PAN Li-na³, DU Dong-hua²,
ZHOU Jing², YAN Shu-cai¹, SUN Ji-guo¹

(1. College of Science and Technology for Animal, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China;

2. Department of Animal Medicine, College of Animal Science, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China;

3. Chengde City Shuangqiao District Agricultural Bureau of Animal Husbandry, Chengde 067000, China;

4. Ringpu (Baoding) Bio-pharmaceutical Co. Ltd, Baoding 071000, China)

Abstract: One pair of primers for amplifying the *F* gene of NDV on GenBank were designed, with which the predicted 1.7 kb fragment had been amplified via RF-PCR from NDV strain Hebei. The 1.7 kb fragment was inserted into pMD-19T vector. DNA sequence analysis showed that the cloned fragment consisted of 1 662 bp and coding for 553 amino acid. Compared with 13 strains of NDV on GenBank, nucleotide and amino acid sequence homologies were found to be 97.2% - 99.2% and 96.9% - 98.7% respectively, but the amino acid sequence homologies to other NDV strains such as LaSota, F48E9 and B1 were only 88.6% - 91.5%. The deduced amino acid sequence of the cleavage site of *F* protein of the NDV isolates were 112R-R-Q-K-R-F-I-G119. the NDV isolates belonged to the genotype VII

Key words: Newcastle disease virus; *F* gene; Cloning; Sequence analysis

新城疫(Newcastle disease, ND)是由新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)引起的一种禽类烈性传染病。新城疫的研究已不仅局限于传统的生物学特性,从分子生物学的角度,已将新城疫病原细分为多种基因亚型^[1,2]。*F* 基因的分子流行病学研究表明,我国ND的主要流行毒株为基因VII型,但传统的基因II、III、IV型依然存在。*F* 蛋白是NDV主要的宿主保护性抗原,与NDV的致病性和免疫应答密切相关。*F*1与*F*2裂解位点区的氨基酸组成是NDV毒株毒力强弱的主要因素^[3]。目前LaSota、I系等

活疫苗和灭活苗的应用,在ND的防治中发挥了重要作用。尽管如此,由于近年来ND的流行和发病特点发生了很大变化,以非典型为主,常在免疫禽群中发生,表现为无法解释的“免疫失败”现象,且20世纪90年代以来流行于我国的基因VII型新城疫病毒,与疫苗毒的遗传距离越来越远,促使人们开始重新思考新城疫病毒的基因型与病毒毒力和疫苗免疫保护的关系究竟如何^[4]? 据此,我们对河北省流行新城疫病毒分离株进行了*F* 基因的克隆与序列分析研究,鉴定了其毒力强弱、进化地位并确定了基因

收稿日期: 2008-04-22

作者简介: 张丽青(1980-),女,河北井陉人,在读硕士,主要从事新城疫病毒*F* 基因的克隆及转基因马铃薯的研究工作。

通讯作者: 孙继国(1956-),男,河北保定人,教授,硕士,主要从事兽医卫生检验的研究工作。

型,为研究我国新城疫分子流行病学特点和制定综合防治措施提供依据。

1 材料和方法

1.1 毒株

新城疫病毒河北分离株为本实验室保留毒株 HBW-1。

1.2 试剂和主要仪器

限制性内切酶 *Sac*I 和 *Xba*I 购自 Takara 公司;反转录酶 (M-MLV) 购自 Promega 公司;RNA 酶抑制剂 Solarbio 公司;rfaq 酶购自 Takara 公司;质粒抽提试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、Marker III 购自北京天根生化科技有限公司。

高速冷冻离心机,PCR 仪(25 型基因扩增仪宁波新芝生物科技股份有限公司),凝胶成像系统,电泳系统(北京六一仪器公司)。

1.3 方法

1.3.1 NDV 河北分离株的增殖及总 RNA 的提取
用实验室保存 NDV 河北分离株接种 9 日龄 SPF 鸡胚,37℃ 孵育,24~120 h,收取尿囊液。尿囊液反复冻融 3~5 次,6 000 r/min 离心 20 min,取尿囊液上清按 Trizol 试剂说明书提取病毒总 RNA,并稍做改进。

1.3.2 *F* 基因的 RT-PCR 扩增

1.3.2.1 根据 GenBank 已发表的新城疫病毒 *F* 基因的序列,利用 Primer Premir 5.0 设计一对引物,上游引入 *Xba*I 酶切位点,下游引入 *Sac*I 酶切位点(下划线部分)引物由三博远志有限公司合成。

上游引物 P1: 5'-TGCTCTAGAAATGGGCTCTACATCTCTACG-3'; 下游引物 P2: 5'-CGAGCTCTCATGTTCTGTAGTGGCTG-3'。

1.3.2.2 RT-PCR 反转录引物为特异性引物 P1。RT 反应条件: 70℃ 5 min, 42℃ 70 min, 95℃ 5 min。PCR 体系(25 μL): 引物各 1 μL、模板 cDNA 4 μL、10× 反应缓冲液 2.5 μL、dNTP 2 μL、rfaq 0.5 μL、灭菌三蒸水 14 μL。反应程序: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 1 min; 50℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2.5 min, 35 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。取 PCR 产物 5 μL, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检查后,PCR 产物全部上样电泳,用 DNA 凝胶回收试剂盒回收。

1.3.3 扩增产物连接克隆载体和序列测定 回收片段与 pMD19-T Simple Vector 连接后转化感受态 *E. coli* TOP10,涂布于含氨苄青霉素(100 μg/mL),X-gal, IPTG 的 LB 培养板,37℃ 培养过夜,挑取白色菌落,增殖后提取质粒,经酶切和 PCR 初步鉴定为阳性的重组质粒进行序列测定。阳性菌液送北京诺塞

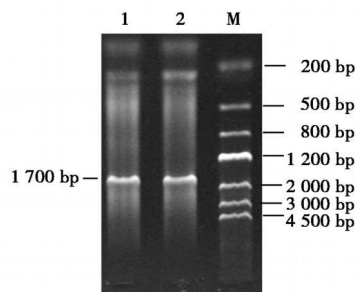
基因生物技术有限公司测序,正反向各测一个反应。

1.3.4 *F* 全基因序列分析、同源性比较、遗传进化树的构建 将所测 *F* 全基因序列与 Genbank 中已发表的 9 株 NDV 相应片段进行比较,应用 DNASTar 软件分析各株之间核苷酸同源性、氨基酸同源性、绘制系统发育进化树。

2 结果与分析

2.1 *F* 基因的 RT-PCR 扩增

RT-PCR 扩增产物的电泳结果,在 1 700 bp 处有特异性目的条带(图 1)。用所设计的引物从 pMD19-T-F 质粒中扩增到特异性条带,大小约 1 700 bp,与预期大小相符(图 2)。

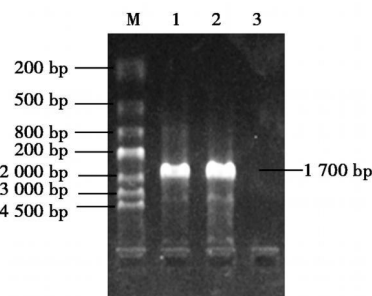


M. Marker III; 1, 2. PCR 结果

M. Marker III; 1, 2. Result of PCR

图 1 *F* 基因 RT-PCR 扩增结果

Fig. 1 Result of amplification by RT-PCR for *F* gene

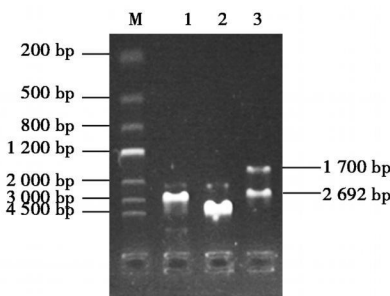


M. Marker III; 1, 2. PCR 结果; 3. 阴性对照

M. Marker III; 1, 2. Result of PCR; 3. Negative control

图 2 重组质粒 pMD19-T-F 的 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of plasmid pMD19-T-F by PCR



M. Marker III; 1. 质粒 pMD19-T-F;

2. *Sac*I 单酶切结果; 3. *Sac*I, *Xba*I 双酶切结果

M. Marker III; 1. Plasmid pMD19-T-F; 2. Result of plasmid pMD19-T-F by *Sac*I, *Xba*I

*Sac*I; 3. Result of plasmid pMD19-T-F by *Sac*I, *Xba*I

图 3 重组质粒 pMD19-T-F 的酶切鉴定

Fig. 3 Identification of plasmid pMD19-T-F by PCR

2.2 重组质粒的酶切鉴定

重组质粒用相应的酶单酶切和双酶切后, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 可见均获得了符合预期的目的基因条带。表明成功构建了含有 *F* 基因目的片段的

重组表达质粒。

2.3 核苷酸同源性、氨基酸同源性比较结果及绘制的系统发育树(图 4~ 6)

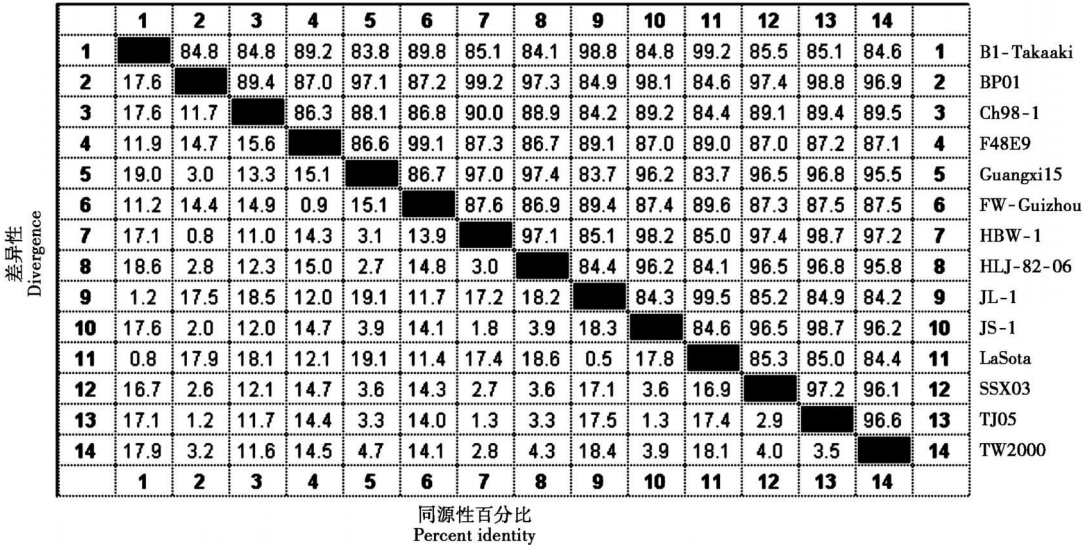


图 4 NDV 分离株 *F* 基因核苷酸全序列及氨基酸同源性比较

Fig. 4 Comparison of NDV strains *F* gene nucleotide acid and amino acid homology



图 5 NDV 分离株 *F* 基因氨基酸全序列同源性比较

Fig. 5 Comparison of NDV strains *F* gene amino acid homology

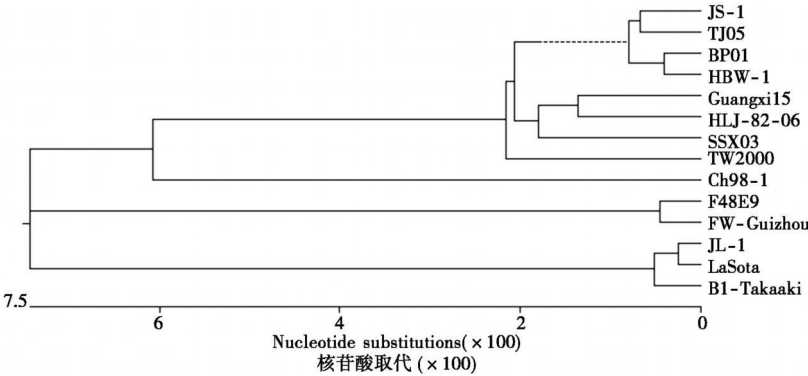


图 6 NDV *F* 基因核苷酸序列绘制的系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree of the nucleotide sequence of NDV strains *F* gene

3 结论与讨论

本研究成功克隆了河北分离株 NDV F 基因的全序列 1 662 bp。由于 NDV 为负股单链 RNA 病毒,其核酸极易降解,操作时所有塑料器具包括枪头和离心管均需用 0.1% 的 DEPC 水浸泡后高压 30 min,配试剂用水均须用 DEPC 处理的三蒸水,玻璃器皿均需在 160℃ 高热灭菌 4 h 以上。要勤换一次性手套,佩戴口罩防止汗液和唾液中的 RNA 酶污染。为了提高 NDV RNA 提取过程中成功的几率,也可采用浓缩病毒的方法来增加单位体积病毒的含量^[5]。

F 基因核苷酸序列分析的结果表明,该毒株与我国标准的强毒株 F48E9 的同源性最低只有 87.3%,与新城疫弱毒株 LaSota 的同源性只有 85%。其 F 基因裂解位点区氨基酸序列均为 112R-R-Q-K-R-F117 与强毒株在这一区域的序列相符合,表明该河北分离株 HBW-1 为 NDV 强毒株。

新城疫病毒是副粘病毒中的典型代表,是重要的人和动物致病病毒,其致病力的强弱主要在于病毒体表面的两种包膜糖蛋白—融合蛋白(Fusion protein, F) 和血凝素-神经氨酸酶(Hemagglutinin-neuraminidase, HN),特别是 F 蛋白,其一级结构决定了细胞融合能力的强弱,而细胞融合能力越强,则病毒表现出来的致病力越强。细胞融合同时也是副粘病毒侵入靶细胞的重要手段^[6]。F 蛋白和 HN 蛋白具有良好的免疫原性,用真核细胞表达系统表达的 F 蛋白和 HN 蛋白免疫动物后,对强毒的攻击具有一定的保护作用。HN 和 F 相互作用的部位尚存在着争论^[7],某些学者认为,同源性 F 和 HN 在细胞表面发生物理性相互作用,提示这种作用是副粘病毒引起细胞融合所必需的^[8]。

NDV F 基因的遗传变异与 NDV 的变异和流行密切相关,是 NDV 分子流行病学研究的首选基因。最初的研究是根据 NDV F 基因全长序列分析绘制系统发育进化树的。随着研究的深入,人们发现 F 基因的 1~374 位的核苷酸序列具有很好的代表性,根据其绘制的进化树和全长序列绘制的完全一致,并且与当地的流行病学资料符合性很好,是进行 ND 分子流行病学研究的良好材料^[9,10]。攻毒试验结果可以看出,分离株 HBW 灭活苗免疫组鸡在免疫后不同时期(对 HI 抗体效价为 6log₂ 以上时),对 F48E9 标准强毒株、基因 VI 型野毒株 HBW 和基因 VI 型野毒株 HBB 的攻击均能 100% 保护。说明 HBW 的免疫原性好,可以作为以后疫苗研究的后备毒株^[11]。本试验克隆出河北分离株 NDV F 基因的全

基因序列主要是用于进一步研究,为新型疫苗的研发,如转基因植物口服疫苗的研究打下基础。

目前,国内众多学者从分子生物学角度对我国西北地区、广东地区、山东地区、河北地区,以及标准株 F48E9, LaSota 株新城疫病毒进行分析^[12-14],为研究该病毒的变异情况打下了良好的基础,同时,也为新城疫的诊断与防治方法的研究打下了坚实的基础,为有针对性地防治本病疫情的蔓延提供了可靠的理论指导。同一基因型的新城疫病毒具有较近的亲缘关系,其抗原位点也基本相同。据此我们可以有的放矢的防治不同基因型新城疫的流行。总之,从分子生物学的角度出发,研究疾病的抗原性质及其变化,必将为新城疫的防治带来新的突破。^[15]

参考文献:

- [1] Collins M S, Bashiruddin J B. Deduced amino acid sequences at the fusion protein cleavage site of Newcastle disease viruses showing variation in antigenicity and pathogenicity[J]. Virol, 1993, 128: 363-370.
- [2] 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: 49-64.
- [3] 何庆兰. 新城疫病毒基因组中 F 基因的研究进展[J]. 浙江畜牧兽医, 2007(1): 10.
- [4] 冯涛, 刘金凤. NDV 基因型与其毒力、现有疫苗免疫保护之间的关系[J]. 家禽科学, 2007(9): 39-42.
- [5] 郑世兰, 姜北宇, 刘福致, 等. 用平板式超滤机浓缩鸡新城疫病毒及法氏囊病毒试验效果观察[J]. 华北农学报, 1999, 14(2): 1-5.
- [6] 王志玉, 任桂杰, 温红玲, 等. 新城疫病毒 F 蛋白细胞融合活性位点中保守氨基酸基因突变分析[J]. 病毒学报, 2006, 22(1): 38-43.
- [7] Cobaleda C, Munoz-Barroso I, Sagera A, et al. Fusogenic activity of reconstituted Newcastle disease virus envelopes: a role for the hemagglutinin-neuraminidase protein in the fusion process[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2002, 34(4): 403-413.
- [8] Yao Q, Hu X, Compans R W. Association of the parainfluenza virus fusion and hemagglutinin-neuraminidase glycoproteins on cell surfaces[J]. J Virol, 1997, 71(1): 650-656.
- [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: 49-64.
- [10] 管宇, 沈志强, 刘吉山, 等. NDVsdBx-99 分离株的生物学特性及其基因的克隆与序列分析[J]. 中国预防兽医学报, 2002(6): 13-15.
- [11] 王玉珠, 李庆锁, 李占雷, 等. 鸡新城疫强毒株的分离鉴定及免疫保护试验[J]. 河北农业大学学报, 2007, 30(5): 75-78.
- [12] 梁荣, 曹殿军, 陈杰, 等. 西北地区新城疫病毒分离株 F 基因的克隆与序列分析[J]. 中国预防兽医学报, 2000, 22(5): 351-354.
- [13] 周静, 杜冬华, 孙继国. 鸡新城疫病毒地方株的分离鉴定及其遗传变异分析[J]. 中国家禽, 2007, 29(10): 8-11.
- [14] 符芳, 姜北宇, 张莉, 等. 新城疫病毒 LaSota F 基因克隆及原核表达[J]. 华北农学报, 2006, 21(3): 117-120.
- [15] 沈志强, 管宇, 刘吉山, 等. 4 株 NDV 分离株 F 基因的克隆与序列分析[J]. 动物医学进展, 2005, 26(4): 78-83.