

doi: 10.3969/j.issn.1008-0589.2013.01.18

一株基因 b 亚型新城疫病毒 F 和 HN 基因的序列分析

孙敏华, 董嘉文, 李林林, 袁建丰, 胡奇林*

(广东省农业科学院兽医研究所 广东省公共卫生公共实验室禽病研究室, 广东 广州 510640)

摘 要: 为分析从某鹅病料样品中分离鉴定的一株新城疫病毒(NDV)(Goose/Foshan/2010) F 和 HN 基因的序列特征, 本研究采用 RT-PCR 方法扩增该病毒的 F 和 HN 基因的 ORF 序列, 并进行序列测定。经序列比对、进化分析表明, Goose/Foshan/2010 株属于基因 b 亚型病毒株, F 蛋白裂解位点序列为 ¹¹²RRQKR¹¹⁷, HN 蛋白由 571 个氨基酸残基组成, 具有强毒株分子特征。对 F 和 HN 蛋白分析表明, 其 HN 蛋白存在 E³⁴⁷D 和 K⁴⁸⁵E 两个点突变; 此外, HN 蛋白缺失了 538 位~540 位的糖基化位点。该分离株为我国首次报道的鹅源基因 b 亚型 NDV 分离株, 与秘鲁及马来西亚早期基因 b 亚型分离株进化关系密切, 表明我国目前新城疫的流行情况十分复杂。

关键词: 新城疫病毒; 基因 b 亚型; 鹅; F 和 HN 基因

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1008-0589(2013)01-0074-03

Sequence analysis of the F and HN genes of a Newcastle disease virus belonged to subgenotype b

SUN Min-hua, DONG Jia-wen, LI Lin-lin, YUAN Jian-feng, HU Qi-lin*

(Laboratory of Avian Diseases, Guangdong Open Laboratory of Public Health, Guangdong Veterinary Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In this study, a Newcastle disease virus (NDV) was isolated from goose in Sanshui district, Foshan, designated Goose/Foshan/2010. The ORF sequences of F and HN gene of the isolate were amplified by RT-PCR and sequenced. The aligning analysis results showed that the isolate was placed into genotype b of NDV with a F protein cleavage motif of ¹¹²R-RQKR-F¹¹⁷ which was the molecular character of the virulent NDV. Two point mutations of E³⁴⁷D and K⁴⁸⁵E occurred in neutralizing epitopes of in HN protein. Furthermore, a glycosylation site was deleted in HN protein at aa 538-aa 540. Phylogenetic analysis showed that the Goose/Foshan/2010 was closely related to the early isolates of genotype b from Peru and Malaysia. While, it is the first report of genotype b NDV isolated from goose in China.

Key words: Newcastle disease virus; subgenotype b; goose; F and HN gene

新城疫(Newcastle disease, ND)是由新城疫病毒(NDV)引起的, 一种严重危害养禽业的急性高度接触性传染病^[1]。NDV 为副粘病毒科副粘病毒亚科禽腮腺炎病毒属成员^[2]。其基因组为单股负链不分节

段 RNA, 长约 15.2 kb^[1], 至少编码 6 种蛋白, 分别为 NP、P、M、F、HN 和 L 蛋白。F 蛋白(融合蛋白)和 HN 蛋白(血凝素神经氨酸酶蛋白)是病毒的主要免疫原性蛋白, 可以诱导机体产生中和抗体。F

*Corresponding author

收稿日期: 2011-12-31

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201003012); 广东省科技厅项目(2008B020700001); 广东省农业厅项目([2010]540)

作者简介: 孙敏华(1984-), 男, 湖北荆门人, 硕士研究生, 主要从事病毒分子生物学及分子免疫学研究。

* 通信作者: E-mail: hq1562713@163.com

蛋白介导病毒与宿主细胞的膜融合, 其裂解位点序列与病毒毒力有关^[1,3], HN 蛋白具有吸附、神经氨酸酶及促进融合等作用, 此外还可能与病毒毒力有关^[4]。

尽管 NDV 只有一个血清型, 但其包含两个 Class, 其中 Class I 包含 9 个基因型, 而 Class II 包含的基因型多达 10 个。目前我国主要流行 Class II 中的基因型, 其中以 d 亚型多见, 尽管基因 a、c、d、e、f 亚型均见报道^[5], 但基因 b 亚型分离株尚未见报道。本研究从佛山三水发病鹅病料中分离鉴定出一株 NDV, 经序列分析表明其为基因 b 亚型。因此, 本研究主要对该病毒株的 F 和 HN 蛋白进行分析, 了解其主要免疫原性蛋白的变化情况, 为 ND 的防治提供参考。

1 材料和方法

1.1 SPF 鸡胚 9 日龄~11 日龄 SPF 鸡胚由广东永顺生物制药有限公司提供。

1.2 主要试剂 NDV 标准抗原及标准阳性血清购自中国兽医药品监察所; 引物由 Invitrogen 公司合成; Ex Taq DNA 聚合酶、DNA 分子量标准、pMD18-T 载体、胶回收试剂盒购自 TaKaRa 公司; TRIzol 试剂、M-MuLV 购自 Invitrogen 公司; DH5 α 感受态购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.3 病毒的分离鉴定 采集 2010 年佛山市三水区某养鹅场疑似 ND 发病鹅的心脏、肝脏、脾脏、肾脏等组织, 并进行病毒分离^[6], 收获死亡鸡胚尿囊液, 按 ND 诊断技术的国家标准进行 HA 和 HI 试验^[7]。

1.4 引物的设计及 F 和 HN 基因的扩增 参照文献[6]设计并合成引物, 进行 PCR 扩增、克隆, 阳性菌液由 Invitrogen 公司进行序列测定。

1.5 F 和 HN 基因核苷酸进化树绘制及序列分析 从 GenBank 下载 44 株 NDV F 基因 ORF 的前 374 nt 序列及 21 株 NDV HN 基因的 ORF 序列, 利用 DNASTar 6.0 软件包将它们与本次分离株的 F 和 HN 基因一起进行序列分析。使用 MegAlign 中的 Clustal V 方法, 在 F 基因核苷酸水平上绘制系统进化树。

2 结果与讨论

2.1 病毒的鉴定及分子特征 病料接种 SPF 鸡胚后, 所有鸡胚 72 h 内死亡。HA 和 HI 试验结果显

示, 所收获的尿囊液具有血凝活性, 并且能够被 NDV 标准阳性血清完全抑制。经 F 和 HN 基因扩增、序列测定和分析表明, 该分离株 F 蛋白裂解位点序列为¹¹²RRQKR¹¹⁷, 符合强毒株裂解位点特征; HN 蛋白由 571 个氨基酸残基组成, 也符合强毒株的分子特征。从 F 和 HN 蛋白序列的分子特征综合判断, Goose/Foshan/2010 株为强毒株。

2.2 F 和 HN 基因系统进化树及序列相似性分析 参考文献[5]和[6], 利用 Mega 4.0 软件绘制 F 基因 ORF 前 374 nt 序列的进化树, 并将 44 株 NDV 划分为 9 个基因型(图 1)。进化分析显示, 本次所分离的病毒株属于基因 b 亚型。经核苷酸及推导氨基酸序列相似性比较后显示, Goose/Foshan/2010 株与基因型(Queensland V4)、型(B1、La Sota)、型(Mukteswar)疫苗株之间 F 基因核苷酸的相似性分别为 82.6 %、79.9 %和 81.6 %, 氨基酸的相似性分别为 83.1 %、77.4 %和 79.8 %。这表明, 与疫苗株相比, 基因 b 亚型病毒株已经存在一定变异。Goose/Foshan/2010 株与基因 b 亚型病毒株间核苷酸及氨基酸相似性均高于 90.4 %, 其中与秘鲁分离株 APECK92173 (AV 1474/92 2), 马来西亚分离株 BMYBU87078 (AV 1094/90 144)、MB076/05 之间核苷酸和氨基酸序列相似性最高, 分别为 93.3 %~95.5 %和 93.5 %~97.6 %, 表明 Goose/Foshan/2010 株可能与它们具有共同来源。尽管周边国家(如哈萨克斯坦、日本)曾发现过基因 b 亚型病毒株, 但这些病毒株与欧洲流行株关系密切, 而 Goose/Foshan/2010 株与秘鲁及东南亚基因 b 亚型病毒株关系密切。流行情况及进化关系表明, 我国首次分离的基因 b 亚型病毒株 Goose/Foshan/2010 株极可能来自东南亚。相对而言, Goose/Foshan/2010 株与基因 a、c、d、e 亚型病毒株核苷酸及氨基酸相似性略低, 分别为 88.0 %~92.8 %、89.5 %~96.0 %; 它与我国标准强毒 F₄₈E₉ 株间核苷酸及氨基酸相似性分别为 84.8 %、92.2 %。由此, 同一基因型中的分离株序列相似性较高, 而进化关系较远的分离株间则较低。尽管此前有报道表明个别 NDV 分离株出现了重组现象^[8], 并推荐利用 F 和 HN 基因序列同时分析。本研究用 Goose/Foshan/2010 株 F 和 HN 基因及其推导氨基酸序列绘制的系统进化树极其相似, 并且它们与 F 基因 ORF 前 374 nt 所绘制的系统进化树并无明显差异。

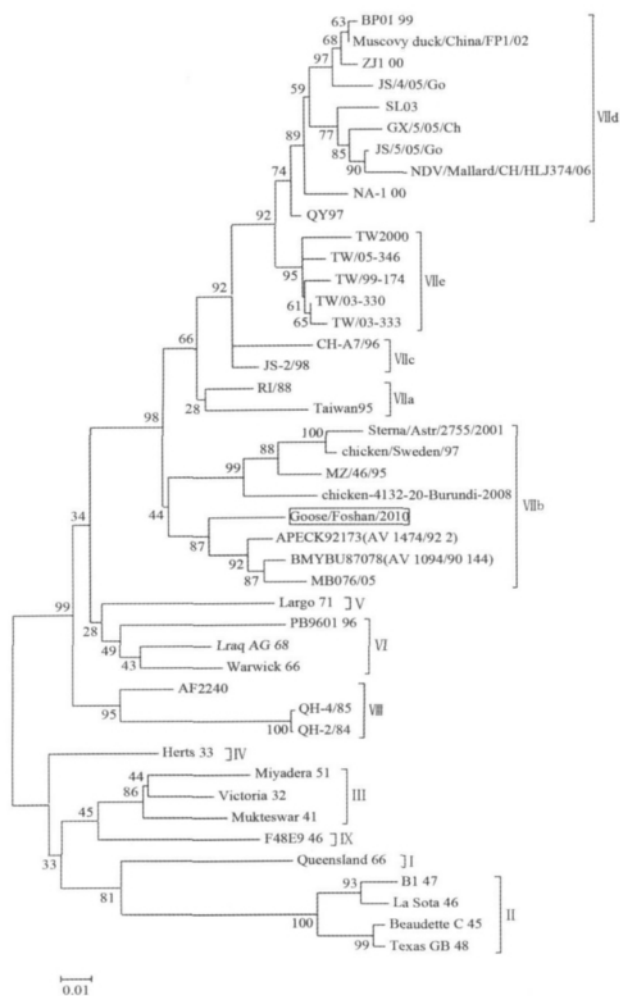


图1 44株NDV F基因前374 nt绘制的系统进化树
Fig.1 Phylogenetic tree of 44 NDV strains based on the first 374 nt of F gene

2.3 F 蛋白和 HN 蛋白的变异 F 和 HN 蛋白是病毒的两个主要免疫原性蛋白。Goose/Foshan/2010 株 F 蛋白上的 6 个潜在的糖基化位点、12 个半胱氨酸残基、7 个中和位点均高度保守,表明其 F 蛋白并未发生大的变异。HN 蛋白中也有 6 个潜在的糖基化位点,Goose/Foshan/2010 株缺失了 538 位~540 位的潜在糖基化位点。尽管该位点不被糖基化,但分析表明,基因型、型、型、型和型病毒株多存在此位点,而基因型、型、型则多缺失该位点。此外,HN 蛋白发生 E³⁴⁷D 和 K⁴⁹⁵E 两个点突变。经分析表明,基因型病毒株第 347 位抗原位点变异无明显规律,而第 495 位抗原位点除基因型、型、和型为 K,基因型为 G,基因型弱病毒株为 V 外,其余基因型病毒株多为 E。

HN 蛋白第 347 和 495 位抗原位点极其重要,可能是不同病毒株抗原性差异的原因之一^[9]。这表明 Goose/Foshan/2010 株的 HN 蛋白可能与疫苗株的抗原性存在一定差异。

目前,基因型病毒株在我国广泛流行,并以基因d亚型为主,基因b亚型病毒株尚未见报道。本研究从广东地区首次分离鉴定出一株鹅源基因b亚型NDV,丰富了病毒的流行病学资料。由于鸡、鸭、鹅、鸽甚至野鸟群中广泛存在基因型病毒株,新基因型的出现使得我国ND的流行情况更加复杂。因此,对ND的不断监测,做好综合防控措施将有利于防控该病。

参考文献：

- [1] Alexander D J. Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections. In: Saif YM, editor. Diseases of poultry [M]. 11th ed. 2003, Iowa State University Press, Ames, LA, pp 63-92.
- [2] Mayo M A. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV [J]. Arch Virol, 2002, 147(8): 1655-1656.
- [3] Collins M S, Bashiruddin J B, Alexander D J. Deduced amino acid sequences at the fusion protein cleavage site of NDV showing variation in antigenicity and pathogenicity [J]. Arch Virol, 1993, 128: 363-370.
- [4] Huang Zhu-hui, Panda A. The hemagglutinin-neuraminidase protein of Newcastle disease virus determines tropism and virulence [J]. J Virol, 2004, 78(8): 4176-4184.
- [5] Ke G M, Yu S W, Ho C H, et al. Characterization of newly emerging Newcastle disease viruses isolated during 2002-2008 in Taiwan [J]. Virus Res, 2010, 147: 247-257.
- [6] 孙敏华, 吕殿红, 董嘉文, 等. 一株鸽源新城疫病毒主要毒力基因分析[J]. 广东畜牧兽医科技, 2010, 35(5): 30-34.
- [7] 刘华雷, 吴艳涛, 王志亮, 等. 中华人民共和国国家标准. 新城疫诊断技术[S]. GB/T 16550-2008.
- [8] Qin Zhuo-ming, Tan Lei-tao, Xu Huai-ying, 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.
- [9] Hu Shu-lin, Wang Tong-yan. Identification of a variable epitope on the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase protein [J]. Vet Microbiol, 2010, 140(1-2): 92-97.

(本文编辑：李 爽)