

新城疫病毒分离株 P 基因的分子特性和遗传进化

梁俊文^{1,2}, 田夫林³, 黄 兵⁴, 兰邹然³, 孙圣福³, 庄文忠¹

(1 山东师范大学 生命科学院, 山东 济南 250014; 2 山东省动物卫生监督所, 山东 济南 250022;
3 山东省动物疫病预防与控制中心, 山东 济南 250022; 4 山东省农业科学院 家禽研究所, 山东 济南 250023)

【摘 要】 【目的】探讨新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)磷蛋白基因(P 基因)的分子进化特点, 为科学防控新城疫(Newcastle disease, ND)提供依据。【方法】对 1997~2007 年国内分离的 13 个 NDV 毒株的 P 基因进行扩增测序, 与 15 个已发表的国内外不同时期的 NDV 毒株 P 基因进行核苷酸和推导的氨基酸遗传变异分析及分子特性研究。【结果】国内 NDV 分离株 P 基因核苷酸和 P 蛋白氨基酸高度同源, 同源性分别为 93.9%~99.8% 和 93.4%~99.2%。国内 NDV 毒株与 LaSota、Clone30 和 F48E9 等 P 基因核苷酸和 P 蛋白氨基酸同源性分别为 82.2%~87.7%, 81.3%~83.8%; 与国外毒株则分别为 82.1%~90.2%, 81.1%~90.7%。氨基酸序列分析表明, 我国毒株具有独特的氨基酸位点。分子进化分析表明, NDV P 基因中核苷酸同义替代率高于非同义替代率。【结论】国内分离 NDV 毒株 P 蛋白遗传距离较近, 而与 LaSota、Clone30、F48E9 以及国外毒株遗传距离较远, 有一定的地域性。NDV P 基因以净化选择的方式进化。

【关键词】 新城疫病毒; P 蛋白; P 基因

【中图分类号】 S852.65+9.5 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-9387(2009)01-0049-07

Genetic characteristics and evolution of phosphoprotein
gene of the field Newcastle disease virus

LIANG Jun-wen^{1,2}, TIAN Fu-lin³, HUANG Bing⁴, LAN zhou-ran³,
SUN Sheng-fu³, ZHUANG Wen-zhong¹

(1 College of Life Science, Shandong Normal University, Ji'nan, Shandong 250014, China; 2 Shandong Province Institute of Animal Health Inspection, Ji'nan, Shandong 250022, China; 3 Shandong Province Center for Animal Disease Control and Prevention, Ji'nan, Shandong 250022, China; 4 Institute of Poultry Science, Shandong Academy of Agricultural Science, Ji'nan, Shandong 250023, China)

Abstract: 【Objective】To scientifically control and prevent Newcastle disease (ND), this study researched the molecular evolution characteristics of Phosphoprotein(P) gene of Newcastle disease viruses (NDV). 【Method】The nucleotide sequences and deduced amino acid sequences were analyzed for P gene of thirteen field isolates of NDV during 1997-2007 in China. The P gene sequences of fifteen NDV reference strains in GenBank were also used in this study. 【Result】The nucleotide and amino acid homology of Chinese field NDV strains was 93.9%-99.8% and 93.4%-99.2% respectively, but 82.2%-87.7% and 81.3%-83.8% compared with LaSota, Clone30 and F48E9, and 82.1%-90.2% and 81.1%-90.7% to foreign NDV strains. The unique residues in the amino acid sequence were found in the Chinese isolates. Synonymous nucleotide substitutions were more than non-synonymous substitutions. 【Conclusion】There was the nearest distance, compared with the LaSota, Clone30 and F48E9, and the character of geographical areas among Chinese NDV isolates. The evolution of NDV P gene underwent purifying selection.

* 【收稿日期】 2008-01-28
 【基金项目】 山东省科技攻关项目(031020101)
 【作者简介】 梁俊文(1974—),男,山西定襄人,高级兽医师,在读博士,主要从事动物病毒学研究。E-mail: liangjunwen@sina.com
 【通信作者】 庄文忠(1963—),男,山东东明人,研究员,博士生导师,主要从事动物免疫学与免疫生物技术研究。

Key words: Newcastle disease virus; phosphoprotein; *P* gene

新城疫(Newcastle disease, ND)是由新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)引起的一种烈性传染病,主要危害禽类,特别是鸡。该病在全世界广泛分布,对养殖业造成严重的经济损失^[1]。NDV 是副粘病毒科(*Paramyxoviridae*)*Avulavirus* 病毒属中禽副粘病毒 I 型(APMV-1)的惟一成员^[2],为单股、不分节的负链 RNA 病毒,其基因组全长一般为 15 186 nt,编码 6 个结构蛋白,分别为:核衣壳蛋白(NP)、磷蛋白(P)、基质蛋白(M)、融合蛋白(F)、血凝素-神经氨酸酶(HN)和高分子质量聚合酶(L),以 3'-NP-P-M-F-HN-L-5'顺序排列^[3]。*P* 基因大约含有 1 450 个碱基,编码 395 个氨基酸。*P* 蛋白与 L 蛋白和 NP 蛋白一起形成 RNA 依赖的 RNA 聚合酶,对转录和复制有重要作用^[4]。NDV *P* 蛋白可抑制 NP 蛋白的自身组装,阻止 NP 蛋白对非病毒 mRNA 以及病毒 mRNA 的“非法”衣壳化^[5]。*P* 基因除编码 *P* 蛋白外,还编码 2 种非结构蛋白——V 和 W 蛋白,它们是 *P* 基因在转录阶段发生“RNA 编辑”后生成的^[6]。有研究表明,V 蛋白是重要的毒力因子,与 NDV 的致病性密切相关^[7]。

以往对 NDV 基因的研究主要集中在 *HN* 和 *F* 基因上^[8-10],近年来研究发现,*P* 基因在 NDV 种属分类以及基因进化方面有重要的作用^[11]。因此研究 *P* 基因的分子特性,可以揭示 NDV 毒株间的进化关系,而目前此方面的研究鲜见报道。本研究对 1997~2007 年国内分离到的 13 株 NDV *P* 基因序列进行了分析,并与 GenBank 中发表的 15 个 NDV 参考株的 *P* 基因序列进行了比较,以探讨国内外 NDV 毒株 *P* 基因的差异,发现其遗传规律,为科学防控 ND 提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒 1997~2007 年国内分离到的 13 个 NDV 毒株,由山东省农业科学院家禽研究所提供,其名称及在 GenBank 中的登录号为:Jlan/2/04 (EU345581)、Lchen/4/03 (EU345582)、Lye/2/03 (EU345583)、Lchen/2/00 (EU345584)、Qdao/1/02 (EU345585)、Ytan/1/01 (EU345586)、Qdao/2/02 (EU345594)、Wfan/1/97 (EU345588)、Tan/1/06 (EU345589)、Wfan/2/00 (EU345590)、Duck/1/05 (EU345591)、Lye/1/07 (EU345592) 和 Lye/2/07

(EU345593)。

1.1.2 主要试剂 一步法 RT-PCR 试剂盒、pMD18-T 载体、琼脂糖凝胶回收试剂盒、RNAiso 抽提试剂等均购自 TaKaRa (大连)公司;X-gal、IPTG 为美国 Promega 公司产品。SPF 种蛋由山东省农业科学院家禽研究所 SPF 鸡场提供。

1.2 NDV RNA 的提取

将 NDV 毒株接种鸡胚,扩增后取尿囊液用 RNAiso 抽提试剂按说明书的方法提取 RNA。

1.3 NDV *P* 基因的 RT-PCR 扩增和测序

1.3.1 引物的设计与合成 参考 GenBank 中 NDV *P* 基因序列(登录号为:NC-002617),利用 Primer 软件设计 1 对特异性引物,P1:5'-TGA ATT AGG GTG AAG ATG G-3';P2:5'-GAG CCT GTT ATG AGT TGT GA-3'。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成,预期扩增片段长度为 1 229 bp,扩增片段覆盖整个 *P* 基因编码区。

1.3.2 RT-PCR 扩增 采用一步法 RT-PCR 反应扩增 NDV *P* 基因。取溶于经 DEPC 处理的去离子水中的 NDV RNA 样品 1 μ L,加入引物 P1 和 P2 各 1 μ L,10 $\times$ RT-PCR 缓冲液 2.5 μ L,10 mmol/L dNTPs 3 μ L,40 U/ μ L RNA 酶抑制剂 1 μ L,25 mmol/L MgCl₂ 5 μ L,5 U/ μ L AMV RTase XL 0.5 μ L,5 U/ μ L AMV-Optimized *Taq* 酶 0.5 μ L,加无 RNase 的超纯水至 25 μ L。反转录反应参数:50 $^{\circ}$ C 30 min,94 $^{\circ}$ C 3 min。基因扩增反应参数:94 $^{\circ}$ C 变性 50 s,54 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 2 min,35 个循环;最后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,8 $^{\circ}$ C 结束反应。取 PCR 产物 5 μ L,进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,分析 PCR 产物。

1.3.3 测序 用凝胶回收试剂盒回收纯化 PCR 产物,将纯化产物与 pMD18-T 载体连接,转化 DH5 α 感受态细胞,利用 IPTG、X-gal 筛选阳性菌,并送宝生物工程(大连)有限公司和北京博尚科技有限公司测序。

1.4 NDV *P* 基因核苷酸序列及其推导的氨基酸序列分析

从文献[11-12]和 GenBank 中共得到了 15 株不同年代、具有代表性的 NDV 毒株 *P* 基因序列:Guangxi8/2002 (DQ485246)、Guangxi5/2000 (DQ485244)、Guangxi10/2003 (DQ485247)、Australian99 (AY935498)、Austrialin02 (AY935490)、

US71 (AY562990)、Ireland67 (AY562991)、LaSota (AY845400)、LaSota/US (AF077761)、F48E9 (AY997298)、ZJ1 (AF431744)、Clone30 (Y18898)、Hert/33 (AY741404)、US93 (AY562986) 和 Russia01 (AY865652)。利用 DNASTar 和 MEGA4.0 软件对本研究克隆的 13 株 NDV 毒株和 15 株参考毒株进行核苷酸和氨基酸序列同源性比较和系统发育分析,比较其遗传距离,探讨 *P* 基因的遗传特性。

1.5 NDV *P* 基因的核苷酸分子进化分析

参考文献[13]的方法计算 *P* 基因核苷酸的非

同义替代率(K_a)和同义替代率(K_s),二者的比值与氨基酸残基位点关系图采用 Ina1 方法^[14]绘制。

2 结果与分析

2.1 NDV *P* 基因的 RT-PCR 扩增及测序

RT-PCR 扩增出约 1.2 kb 片段(图 1),与预期片段长度相符。测序结果表明,扩增出的 *P* 基因片段长度为 1 229 bp,开放阅读框为 1 188 bp,编码 395 个氨基酸残基。

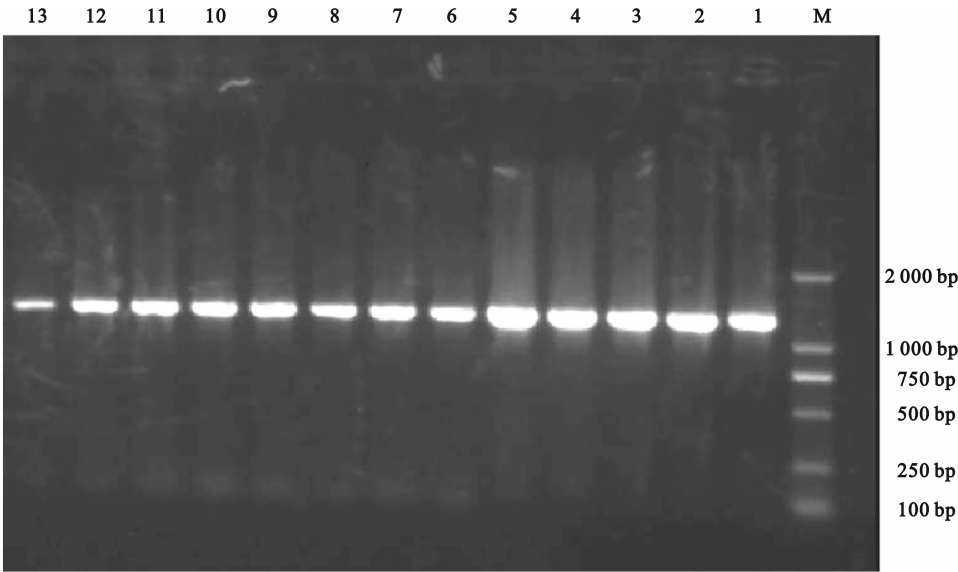


图 1 13 株 NDV 分离株 *P* 基因 RT-PCR 扩增产物的电泳结果

M. 2000 bp DNA Marker;1. Jlan/2/04 株;2. Lchen/4/03 株;3. Lye/2/03 株;4. Lchen/2/00 株;5. Qdao/1/02 株;6. Ytan/1/01 株;7. Qdao/2/02 株;8. Wfan/1/97 株;9. Tan/1/06 株;10. Wfan/2/00 株;11. Duck/1/05 株;12. Lye/1/07 株;13. Lye/2/07 株

Fig. 1 Agarose electrophoresis of RT-PCR products of *P* gene from thirteen NDV isolates

M. 2000bp DNA Marker;1. Jlan/2/04;2. Lchen/4/03;3. Lye/2/03;4. Lchen/2/00;5. Qdao/1/02;6. Ytan/1/01;7. Qdao/2/02;8. Wfan/1/97;9. Tan/1/06;10. Wfan/2/00;11. Duck/1/05;12. Lye/1/07;13. Lye/2/07

2.2 NDV *P* 基因核苷酸和 *P* 蛋白氨基酸序列分析

13 个 NDV 分离株 *P* 基因与国内外 15 个 NDV

参考株 *P* 基因的核苷酸及其推导的氨基酸序列的同源性比较结果见表 1。

表 1 不同 NDV 毒株 *P* 基因核苷酸和 *P* 蛋白氨基酸序列的同源性分析

Table 1 Homologous comparison of nucleotide sequences and deduced amino acids sequences of *P* gene from different strains

毒株 Strain	lasota/u	Us93	Hert33	Rus/01	Us71	Ire/67	Aus99	Aus/02	Clone30	lasotaC	F48E9	ZJ01	WF1/97	TA1/06
Lasto u	* * *	81.6	87.5	83.1	84.5	90.2	88.4	88.1	99.7	99.8	87.1	82.6	82.6	82.2
Us93	78.8	* * *	85.3	84.8	93.0	82.7	81.3	81.1	81.5	81.6	83.4	84.9	84.0	84.4
Hert33	89.1	81.8	* * *	86.6	89.6	89.5	87.1	86.9	87.5	87.5	90.7	87.1	87.3	86.6
Rus/01	81.1	80.6	86.1	* * *	87.4	83.9	83.1	82.7	83.0	83.1	83.4	88.6	88.2	88.5
Us/71	83.3	90.7	87.4	83.1	* * *	85.5	83.9	83.4	84.4	84.5	86.1	88.5	87.5	88.0
Ire/67	91.2	79.0	90.2	83.1	83.1	* * *	92.7	92.3	90.2	90.2	90.2	84.3	83.8	83.5
Aus/99	89.9	77.3	88.9	81.6	81.8	92.4	* * *	99.2	88.3	88.4	87.5	83.2	82.7	82.7
Aus/02	89.1	76.5	88.1	80.8	81.3	91.7	98.5	* * *	88.0	88.1	87.2	82.7	82.4	82.2
Clone30	99.0	78.5	88.9	80.8	83.1	90.9	89.6	88.9	* * *	99.7	87.0	82.5	82.5	82.2

续表 1 Continued table 1

毒株 Strain	lasota/u	Us93	Hert33	Rus/01	Us71	Ire/67	Aus99	Aus/02	Clone30	lasotaC	F48E9	ZJ01	WF1/97	TA1/06
LasotaC	99.5	79.0	89.4	81.3	83.6	91.4	90.2	89.4	99.2	* * *	87.1	82.6	82.6	82.2
F48E9	87.6	79.5	89.4	81.1	82.6	90.2	87.1	86.4	87.4	87.9	* * *	85.0	85.4	84.5
ZJ01	82.1	81.8	87.4	85.6	86.1	83.3	81.3	80.8	81.8	82.3	82.8	* * *	97.8	97.0
WF1/97	82.3	81.8	87.9	86.6	86.6	83.3	81.8	81.3	82.1	82.6	83.3	97.2	* * *	97.1
TA1/06	81.8	81.6	87.9	86.1	86.6	82.8	82.1	81.6	81.6	82.1	83.3	95.7	97.2	* * *
WF2/OO	82.1	82.8	87.4	86.4	86.4	83.1	82.3	81.8	81.8	82.3	83.3	96.0	97.0	95.5
DU1/05	81.6	81.3	87.6	86.1	86.4	82.6	82.3	81.8	81.3	81.8	83.1	95.7	97.2	99.2
LY1/07	82.1	82.6	87.4	86.1	86.4	83.1	81.6	81.1	81.8	82.3	83.1	96	97.0	95.5
JL2/04	81.8	81.6	87.6	86.4	86.4	83.3	81.8	81.3	81.6	82.1	83.3	97.0	98.5	97.0
LC2/04	82.8	82.8	88.4	86.9	87.1	83.8	82.3	81.8	82.6	83.1	83.8	97.0	98.5	97.0
LC4/05	81.8	83.6	87.9	86.6	86.9	82.8	81.3	80.8	81.6	82.1	82.8	94.9	94.9	93.9
LC2/00	81.8	82.1	86.4	85.6	85.9	82.3	81.1	80.6	81.6	82.1	83.3	94.9	96.0	94.4
QD1/02	82.3	83.1	88.4	87.1	87.6	83.8	81.8	81.3	82.1	82.6	83.6	96.5	97.5	96.5
YT1/01	81.8	82.6	87.9	86.6	87.1	83.3	81.3	80.8	81.6	82.1	83.1	96.0	97.0	96.0
QD2/02	82.1	82.1	86.4	86.6	86.6	83.3	81.1	80.6	81.8	82.3	83.1	94.4	95.2	94.4
LY2/07	82.1	82.6	87.4	85.9	86.4	83.1	81.6	81.1	81.8	82.3	83.1	96.0	97.0	95.5
GX5/00	88.1	81.1	90.4	82.8	85.6	90.7	88.4	87.9	87.9	88.4	89.6	83.1	84.1	83.8
GX8/02	82.3	82.3	87.6	86.1	86.1	83.3	81.8	81.6	82.1	82.6	83.3	96.2	97.2	95.7
GX10/03	81.8	82.1	87.4	86.6	86.6	82.8	81.3	80.8	81.6	82.1	83.1	96.5	97.5	96.0
Strain	WF2/00	DU1/05	LY1/07	JL2/04	LC2/04	LC04/03	LC2/00	QD1/02	YT1/01	QD2/02	LY2/07	GX5/00	GX8/02	GX10/03
Lasto u	83.2	82.3	82.3	82.6	82.7	83.1	83.6	83.2	83.1	82.5	82.3	87.7	83.2	82.7
Us93	85.6	84.3	85.1	84.7	85.0	85.7	85.5	86.4	86.2	85.4	85.1	84.1	85.4	85.3
Hert33	87.3	86.7	87.0	87.2	87.4	87.5	87.2	87.7	87.5	87.0	87.0	90.1	87.4	87.0
Rus/01	89.1	88.6	88.1	88.9	89.0	89.4	88.9	90.2	90.0	89.2	88.1	84.0	88.2	88.4
Us/71	88.8	87.9	88.5	88.2	88.5	89.1	88.0	89.7	89.6	88.7	88.5	87.2	88.5	88.3
Ire/67	84.4	83.6	83.9	84.2	84.1	83.9	84.4	84.6	84.4	84.0	83.9	89.7	84.7	84.3
Aus/99	83.6	82.9	82.8	83.2	83.2	82.6	83.4	83.4	83.2	82.5	82.8	87.4	83.8	83.3
Aus/02	83.2	82.5	82.4	82.7	82.8	82.2	83.2	83.0	82.8	82.1	82.4	87.0	83.4	82.9
Clone30	83.1	82.2	82.2	82.5	82.6	83.0	83.5	83.2	83.0	82.4	82.2	87.6	83.2	82.7
LasotaC	83.2	82.3	82.3	82.6	82.7	83.2	83.6	83.2	83.1	82.5	82.3	87.7	83.2	82.7
F48E9	85.0	84.4	84.3	85.2	84.9	84.2	85.1	85.4	85.2	84.6	84.3	91.4	85.2	84.7
ZJ01	97.3	97.1	96.9	98.6	98.4	95.2	95.9	97.1	96.9	95.0	96.9	84.4	97.6	97.5
WF1/97	96.5	97.2	96.0	98.6	98.2	94.2	95.5	96.2	96.0	94.0	96.0	84.1	97.0	96.8
TA1/06	96.0	99.7	95.6	97.7	97.4	93.9	94.9	95.9	95.7	93.7	95.6	84.0	96.1	96.1
WF2/OO	* * *	96.0	96.7	97.4	97.4	96.0	97.1	97.9	97.7	95.8	96.7	84.6	97.1	97.0
DU1/05	95.5	* * *	95.7	97.8	97.5	93.9	94.9	96.0	95.8	93.8	95.7	84.1	96.2	96.2
LY1/07	97.5	95.5	* * *	96.8	97.0	94.3	95.3	96.5	96.3	94.1	99.8	84.3	96.7	96.5
JL2/04	96.7	97.0	96.7	* * *	99.0	95.1	96.2	97.1	97.0	94.9	96.8	84.6	97.6	97.6
LC2/04	97.2	97.0	97.2	98.2	* * *	94.9	96.1	97.0	96.8	94.8	97.0	84.5	97.8	97.6
LC4/05	95.2	93.9	94.9	94.7	94.9	* * *	94.4	96.5	96.3	95.6	94.3	84.1	94.4	94.5
LC2/00	96.2	94.4	96.2	96.0	96.2	93.9	* * *	96.5	96.3	94.2	95.3	85.1	95.9	95.7
QD1/02	97.2	96.5	97.7	97.2	97.2	96.2	96.2	* * *	99.8	96.3	96.5	84.8	96.7	96.5
YT1/01	96.7	96.0	97.2	96.7	96.7	95.7	95.7	99.2	* * *	96.1	96.3	84.7	96.5	96.4
QD2/02	94.7	94.4	94.4	94.7	94.7	94.7	93.4	95.7	95.2	* * *	94.1	84.7	94.5	94.4
LY2/07	97.5	95.5	99.2	96.7	97.2	94.9	96.2	97.7	97.2	94.4	* * *	84.3	96.7	96.5
GX5/00	83.3	83.6	83.3	84.1	84.3	82.8	83.6	84.6	84.1	83.1	83.3	* * *	84.9	84.4
GX8/02	97.0	95.7	97.0	97.0	97.7	94.7	96.0	97.0	96.5	94.4	97.0	84.1	* * *	98.0
GX10/03	96.7	96.0	96.7	97.2	97.2	94.7	96.0	97.2	96.7	94.7	96.7	83.6	97.0	* * *

注:表右上部分为核苷酸的同源性,左下部分为氨基酸的同源性。
Note:Homologous rates of nucleotide sequence were presented in the upper triangle of the table ,and the homologous rate of deduced amino acid in the lower triangle of the table.

由表 1 可看出,所有 NDV 毒株的 P 基因核苷酸序列同源性在 81.1%~99.8%,氨基酸同源性在 76.5%~99.5%;本试验的分离株、国内最近几年分离的广西株(Guangxi5/2000 除外)和浙江株等国内

毒株间同源性较高,核苷酸同源性为 93.9%~99.8%,氨基酸同源性为 93.4%~99.2%。本试验分离株、广西株和浙江株等国内毒株与传统疫苗株,如 LaSota、Clone30 及标准毒株 F48E9 的同源性较低,核苷酸和氨基酸序列同源性分别在 82.2%~87.7%和 81.3%~83.8%;与国外毒株的核苷酸同源性为 82.1%~90.2%,氨基酸同源性为 81.1%~90.7%,与文献[15]报道的国内分离株与国外株 HN 氨基酸同源性在 87.2%~96.2%的结果有所区别。

从核苷酸和氨基酸序列比对中发现,在 P 基因编码区的 392~405 碱基,所有毒株的核苷酸序列均为 CTAAAAAGGGCCCA,这与文献[11]的报道相一致。所有毒株的 P 蛋白氨基端前 10 位氨基酸均为 MATFTDAEID,羧基端变化较少,这些保守序列构成了 P 蛋白的疏水结构域。

2.3 NDV P 蛋白氨基酸序列变异位点分析

氨基酸序列对比分析发现,国内近年来分离毒株的氨基酸序列比较一致,且在某些位点出现的氨基酸残基是我国分离株所特有的,带有明显的“中国

地域”特性,如 65 位 A、72 位 T、73 位 E、84 位 L、87 位 N、90 位 I、104 位 T、105 位 S(或 N)、157 位 Y、162 位 G、171 位 V、179 位 E、216 位 R、224 位 A 和 243 位 H(Guangxi5/2000 除外)。另外,P 蛋白氨基酸残基多见变异,尤以 147~170 和 201~240 位点氨基酸残基变异种类最多,呈现比较复杂的状态。

2.4 NDV P 基因推导氨基酸序列的系统发育分析

应用 NJ 构树法绘制 NDV 的遗传进化树,由图 2 可知本试验 13 个毒株与 GenBank 发表的广西株(Guangxi10/03 和 Guangxi8/02)和浙江株之间 P 蛋白的遗传距离较近,属于Ⅶ型;与疫苗株(LaSota 和 Clone30)和传统毒株 F48E9 遗传距离较远,表明中国 NDV P 蛋白氨基酸已经发生了很大的变化。由图 2 还可看出,2 株美国毒株(US/71 和 US/93)遗传距离较近,属于单独一个分支(V 型);2 株澳大利亚株(AUS/02 和 AUS/99)与 Ireland/67 株毒株遗传距离较近,均属于 I 型;Hert/33 为Ⅳ型;俄罗斯毒株与我国毒株属于同一基因型,具有一定的亲缘关系。

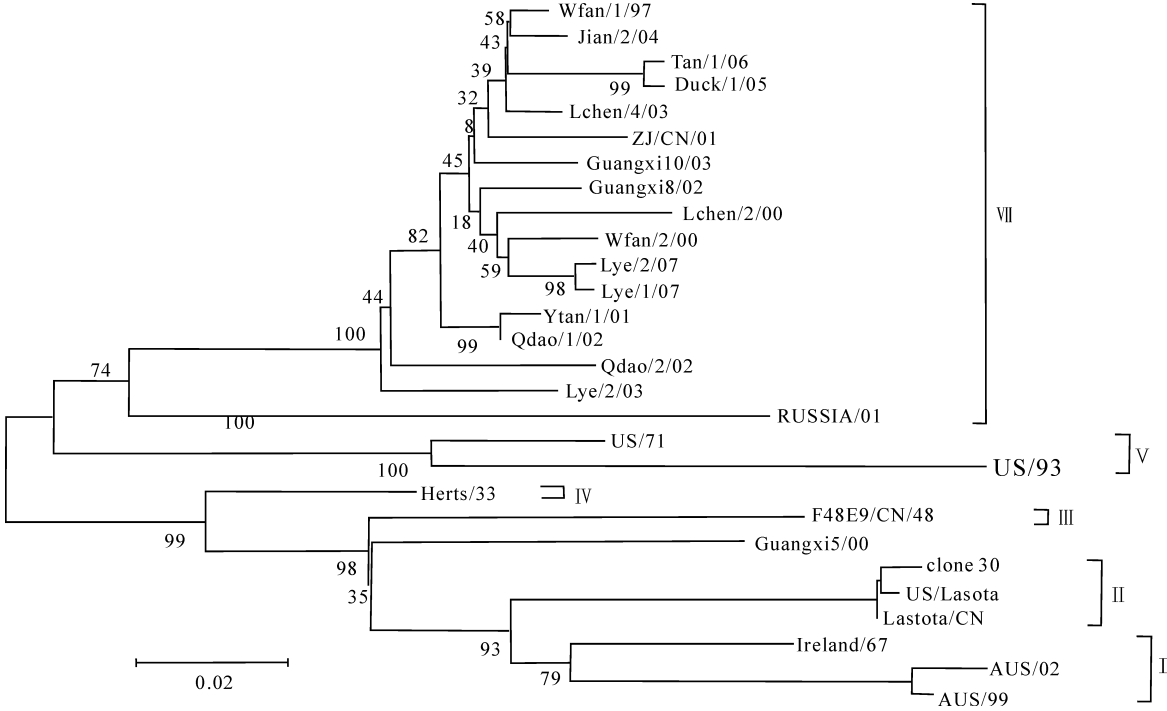


图 2 不同 NDV 毒株 P 蛋白氨基酸序列的遗传进化分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis based on predicted amino acid sequence of P protein genes of NDV strains

2.5 NDV 的分子进化分析

NDV P 基因编码序列共有 1 185 个碱基。本研究所选毒株的 K_s 为 0.299 83, K_a 为 0.066 05,两者之比(K_a/K_s)为 0.22。而我国 NDV 分离株 P 基

因 K_s 为 0.129 73, K_a 为 0.027 36, K_a/K_s 为 0.21;国外分离株 K_s 为 0.350 12, K_a 为 0.079 54, K_a/K_s 为 0.23。经 Z-test 检验,无论是国内还是国外毒株, K_a 显著小于 K_s ,由此可以推测 NDV 的 P 基因

以净化选择的方式进化。从图 3 可以看出,无论是国外毒株还是国内毒株,同义核苷酸替代贯穿于整个 *P* 基因中,而非同义核苷酸替代主要集中在 170

~240 位点附近,且在一些氨基酸位点附近国外毒株 K_a/K_s 明显高于国内毒株。

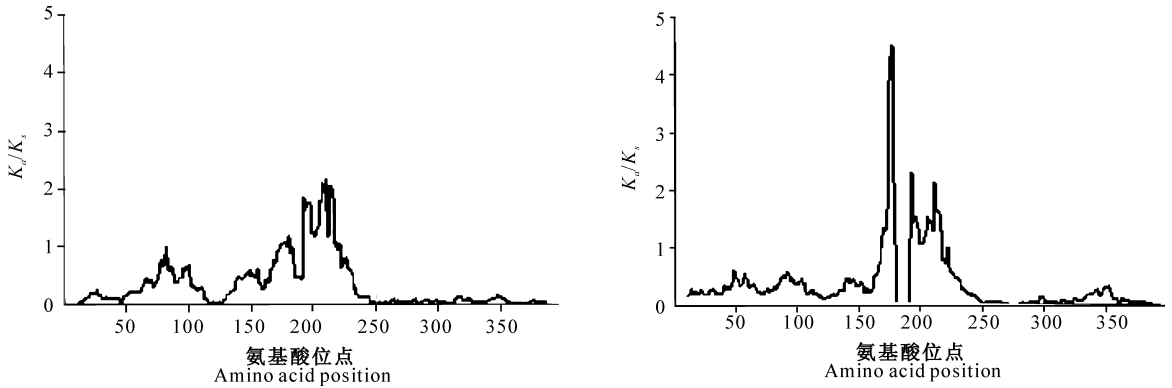


图 3 NDV 毒株 *P* 蛋白氨基酸位点 K_a/K_s 的滑动窗口分析

A. 国内毒株; B. 国外毒株

Fig. 3 Sliding window analysis of the ratio on nonsynonymous to synonymous base substitutions in the phosphoprotein gene coding sequences among NDV isolates

A. Strains from China; B. Isolates from the foreign countries

3 讨论

对 NDV *P* 基因的研究发现, *V* 蛋白是由 *P* 基因 mRNA 插入非模板 G 碱基编辑后翻译而来,而腮腺炎病毒属成员的 *V* 蛋白则是由未编辑的 mRNA 翻译而来^[6],而且 NDV 与腮腺炎病毒属成员的 *P* 蛋白在遗传关系上有明显的不同^[11],这些结果可作为 NDV 重新分类的主要依据。NDV 通过在其 *P* 基因的编辑位点(UUUUCCCC,基因组意义链)上插入 1 个或 2 个 G 碱基来编辑 *P* 基因 mRNA,使得 *P* 基因在翻译过程中出现不同的阅读框,进而产生 2 种非结构蛋白,即+1 阅读框移动产生的 *V* 蛋白和+2 阅读框移动产生的 *W* 蛋白。本研究所选毒株的 *P* 基因在 392~405 碱基间序列均为 CTA-AAAAGGGCCCA,高度保守,这对保证 *P* 基因 RNA 编辑功能有重要意义。

本研究发现,NDV *P* 蛋白氨基酸残基在氨基端和羧基端高度保守,作者推测这与该蛋白在自然状态下具有的略带疏水 α 螺旋结构域有一定关系,有利于 *P* 蛋白与可溶性的多聚体 NP 蛋白相结合,这在副粘病毒的其他成员中也得到证实^[16]。另外, *P* 蛋白 210~240 位点的氨基酸残基高度变异,其原因是这一区域下游是 *P* 蛋白的疏水羧基端疏水区域起始部分。

以往对 NDV 遗传规律的研究,多集中在 *HN* 和 *F* 基因片段,而 *P* 基因的研究国内外均较少。Locke 等^[11]对 23 株美国分离株 *P* 基因序列进行了

进化分析,证实美国 ND 流行以 20 世纪 70 年代为“分水岭”,美国 70 年代以后流行毒株与世界其他地区流行毒株有相似的变异趋势;并且通过序列的同源性比较论证了 *P* 基因编辑位点的存在,从而推动 *P* 基因成为 NDV 遗传规律研究的一个新热点。

从本研究 *P* 基因核苷酸及其推导的氨基酸同源性比较和系统进化分析可以看出,国内分离 NDV 毒株之间的同源性较高,而与国外分离株、疫苗株及传统强毒株的同源性较低,这与文献^[15]报道的结果相似。通过以上分析可知,目前我国流行的 NDV 毒株与生产中常用的疫苗株存在较大程度的差异。从遗传进化角度分析,俄罗斯和美国的毒株与我国野毒具有较近的遗传距离,这可能是我国与这些国家禽及其产品的贸易交流比较频繁以及带毒候鸟迁徙所致。同时,中国 NDV 毒株与其他国外毒株亲缘关系较远,特别是氨基酸的同源性较低,说明 NDV 在遗传变异过程中具有区域独特性。

本研究选用的 NDV 毒株 *P* 基因的 K_a/K_s 为 0.22,而我国分离株的 K_a/K_s 为 0.21,国外为 0.23,与以往报道 *P* 基因 K_a/K_s 为 0.25^[11]相差不大。这说明我国分离株与其他国家和地区的 NDV 毒株均以净化选择的方式进化。提示,NDV 在进化的过程中不断地剔除不利的突变,使核苷酸的同义替代得到长期积累,从而产生不同的毒株。NDV 的 *M* 基因($K_a/K_s=0.14$)^[17], *L* 基因($K_a/K_s=0.064$)^[18]的 K_a/K_s 均比 *P* 基因的小,表明这 2 个基因较 *P* 基因保守。另外,包含 *P* 基因 RNA 编辑位点的 510

~720 bp 序列内非同义核苷酸替代次数远远高于同义核苷酸替代。

[参考文献]

[1] Saif Y M. Diseases of Poultry [M]. 11th ed. United States of America;Iowa State Press,2001;63-87.

[2] Mayo M A. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV [J]. Arch Virol,2002,147:1655-1656.

[3] Zou J,Shan S,Yao N,et al. Complete genome sequence and biological characterizations of a novel goose paramyxovirus-SF02 isolated in China [J]. Virus Genes,2005,30(1):13-21.

[4] Romer-Oberdorfer A,Mundt E,Mebatsion T,et al. Generation of recombinant lentogenic Newcastle disease virus from cDNA [J]. J Gen Virol,1999,80:2987-2995.

[5] Errington W,Emmerson P T. Assembly of recombinant Newcastle disease virus nucleocapsid protein into nucleocapsid-like structures is inhibited by the phosphoprotein [J]. J Gen Virol,1997,78(9):2335-2339.

[6] Mebatsion T,De Vaan L T C,De Haas N,et al. Identification of a mutation in editing of defective Newcastle disease virus recombinants that modulates P-gene mRNA editing and restores virus replication and pathogenicity in chicken embryos [J]. J Virol,2003,77(17):9259-9265.

[7] Huang Z,Krishnamurthy S,Panda A,et al. Newcastle disease virus V protein is associated with viral pathogenesis and functions as an alpha interferon antagonist [J]. J Virol,2003,77(16):8676-8685.

[8] Sakaguchi T,Toyoda T,Gotoh B,et al. Newcastle disease virus evolution 1. Multiple lineages define by sequence variability of haemagglutinin-neuraminidase gene [J]. Virology,1989,169:260-272.

[9] Collins M S,Franklin S,Strong I,et al. Antigenic and phylogenetic studies on a variation Newcastle disease virus using anti-fusion protein monoclonal antibodies and partial sequencing of the fusion protein gene [J]. Avian Pathol,1998,27:90-96.

[10] Gould A R,Hannnson E,Selleck K,et al. Newcastle disease

virus fusion and haemagglutinin-neuraminidase gene motif as markers for viral lineage [J]. Avian Pathol,2003,32:361-373.

[11] Locke D P,Sellers H S,Crawford J M,et al. Newcastle disease virus phosphoprotein gene analysis and transcriptional editing in avian cells [J]. Virus Res,2000,69(1):55-68.

[12] Kattenbelt J A,Stevens M P,Gould A R. Sequence variation in Newcastle disease virus genome [J]. Virus Research,2006,116:168-184.

[13] Pamilo P,Bianchi N O. Evolution of the Zfx and Zfy, gene; rates and interdependence between the genes [J]. Mol Bio Evol,1993,10:271-281.

[14] Ina Y. New methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous substitutions [J]. J Mol Evol,1995,40:190-226.

[15] 秦卓明,马保臣,袁小远,等. 新城疫分离毒 HN 基因的分子特性和片段同源相关性 [J]. 病毒学报,2007,23(1):39-45.

Qin Z M,Ma B C,Yuan X Y,et al. Genetic characterization and correlation among fragments of HN gene of the field Newcastle disease viruses [J]. Chinese Journal of Virology,2007,23(1):39-45. (in Chinese)

[16] Harty R N,Palese P. Measles virus phosphoprotein (P) requires the NH2- and COOH-terminal domains for interactions with the nucleoprotein (N) but only the COOH terminus for interactions with itself [J]. J Gen Virol,1995,76(11):2863-2870.

[17] Seal B S,King D J,Meinersmann R J. Molecular evolution of the Newcastle disease virus matrix protein gene and phylogenetic relationships among the paramyxoviridae [J]. Virus Res,2000,66(1):1-11.

[18] Wise M G,Sellers H S,Alvarez R,et al. RNA-dependent RNA polymerase gene analysis of worldwide Newcastle disease virus isolates representing different virulence types and their phylogenetic relationship with other members of the paramyxoviridae [J]. Virus Res,2004,104(1):71-80.