

5 株野生鸟类Ⅹ型 NDV 分离株 HN 基因的 分子特征分析

张 鹏,马 静,杨增岐

(西北农林科技大学 动物医学院,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】【目的】探讨新城疫病毒(Newcastle disease virus,NDV)血凝素-神经氨酸酶基因(HN 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 2008 年从陕西省周至县楼观台及其周边地区分离的 5 个野生鸟类 NDV 毒株的 HN 基因进行扩增与测序,与 8 个国内外不同时期已发表的 NDV 毒株 HN 基因进行核苷酸和推导的氨基酸序列的遗传变异分析及分子特性研究。【结果】所有分离株与国内参考强毒株 F48E9 和国外参考强毒株 Herts-33 在 HN 基因 C 末端终止密码子的位置相同,符合强毒株的特征。从核苷酸和氨基酸同源性来看,分离株与 F48E9 的核苷酸和氨基酸同源性分别为 99.6%~99.8%和 99.1%~99.7%,与 LaSota、B1 和 clone-30 的同源性分别为 90.2%~91.8%和 87.9%~88.5%,与 ZJ1 的同源性为 84.8%~85.0%和 89.3%~89.7%;从系谱进化分析来看,这 5 个毒株与 F48E9 关系较近,同属一支,与 LaSota、ZJ1、Herts-33 等疫苗株和参考毒株关系较远。【结论】该生态区 NDV 野生鸟类分离株与目前流行的基因Ⅶ型毒株和传统疫苗毒株的关系较远,且具有强毒株的分子特征,因此必须加强该地区野生鸟类新城疫病毒的监测。

【关键词】新城疫病毒;HN 基因;分子特征分析

【中图分类号】 S852.65⁺9.5

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)06-0001-06

Molecular characteristic analysis of five Newcastle disease virus isolates' HN gene originated from wild birds

ZHANG Peng, MA Jing, YANG Zeng-qi

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract:【Objective】To scientifically control and prevent Newcastle disease (ND), this study researched the molecular evolution characteristics of HN gene of Newcastle disease viruses(NDV).【Method】The nucleotide sequences and deduced amino acid sequences were analyzed for HN gene of five field isolates of NDV. The HN gene sequences of fifteen NDV reference strains in GenBank were also used in this study.【Result】The nucleotide and amino acid homology of NDV isolates and F48E9 were 99.6%—99.8% and 99.1%—99.7% respectively, but 90.2%—91.8% and 87.9%—88.5% compared with LaSota, clone-30 and B1, and 84.8%—85.0% and 89.3%—89.7% to ZJ1 strains. The phylogenetic tree based on the nucleotide sequences of HN gene revealed that the 5 isolates of NDV and F48E9 were of the same sub-genotype.【Conclusion】The wild birds in the area of Louguantai carry Virulent NDVs, HN gene of the five NDV isolates had a distant genetic relationship with the vaccine strain e. g. LaSota, clone-30, and epidemical strain in poultry. Thus, epidemiological studies should be carried out constantly to monitor wild bird populations in general.

* [收稿日期] 2009-12-07

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD06A08)

[作者简介] 张 鹏(1981—),男,山西沁县人,在读硕士,主要从事动物传染病的诊断与防制研究。

[通信作者] 杨增岐(1963—),男,陕西岐山人,教授,博士,博士生导师,主要从事动物疫病诊断与防制研究。

E-mail: yzq8162@163.com

Key words: NDV; *HN* gene; molecular characteristic analysis

新城疫(Newcastle disease, ND)又名亚洲鸡瘟,是由新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)引起的一种多病型的高度接触性传染病。国际兽疫局(OIE)规定,引起 ND 暴发的 NDV 的特征为:(1)NDV 的颅内接种指数(Intracerebral pathogenicity indices, ICPI)大于 0.7;(2)NDV 的融合蛋白 C 端的裂解位点(即 113—117 位)包含 3 个或 3 个以上的碱性氨基酸(R 或 K)^[1]。NDV 可引起多种禽类和鸟类发病,其中鸡最易感,人偶尔也可以感染。该病在世界范围内广泛流行,给世界养禽业造成了巨大的经济损失。

NDV 属副黏病毒科腮腺炎病毒属,是一种具有囊膜的单股、负链、不分节段的 RNA 病毒,其基因组包含 6 个基因,分别编码 3'NP-P-M-F-HN-L 5' 6 个主要蛋白^[2]。血凝素-神经氨酸酶糖蛋白(HN 蛋白)在病毒脂质囊膜上形成纤突,具有血凝素和神经氨酸酶活性,其在病毒侵染过程中通过识别细胞受体,介导病毒吸附细胞膜,增强 F 蛋白的融合作用,并通过去除新合成病毒核衣壳蛋白上的唾液酸,对子代病毒粒子进行加工。*HN* 基因是决定 NDV 毒力、神经氨酸酶活性和血凝性等抗原性的关键基因^[3-5]。

国内外已经对 NDV 的 *HN* 基因进行了系统研究^[6-11],但是关于野生鸟类 NDV *HN* 基因的研究相对较少。本试验以 2008 年从陕西省周至县楼观台及其周边健康野生鸟类样品中分离到的 5 株新城疫病毒为研究对象,对其 *HN* 基因进行了克隆和序列分析,以期了解该生态区野生鸟类所携带 NDV 的分子特征和遗传变异情况,为该生态区 NDV 的监测积累资料,同时也为该地区 ND 的预防和控制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒 5 株野生鸟类Ⅸ型 NDV 分离株(Peafowl-CH-08、WhooperSwan-CH-08、heiniaio-CH-08、SpottedDove-CH-08、White-cheeked Starling-CH-08),2008 年从陕西省周至县楼观台及其周边地区野生鸟类样品中分离获得。NDV F48E9 株,由西北农林科技大学动物医学院禽病研究室保存。

1.1.2 鸡胚、阳性血清、宿主菌与载体 非免疫鸡胚,由陕西杨凌绿方生物工程公司提供;NDV 和禽流感阳性血清等,由西北农林科技大学禽病研究室

提供;DH5 α 感受态细胞,由该实验室制备;pMD18-T 克隆载体试剂盒,购自大连宝生物工程有限公司。

1.1.3 主要试剂 Trizol 试剂盒,购自美国 Invitrogen 公司;胶回收(小量)试剂盒,上海生物工程有限公司产品;RNA 酶抑制剂、*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、DNA Marker、M-MLV 反转录试剂盒、限制性内切酶,均购自大连宝生物工程有限公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.1.4 引物 根据 GenBank 数据库中 NDV *HN* 基因核苷酸序列,设计 2 对引物,分 2 段扩增 *HN* 基因,引物序列如下:F6150-6173: 5'-AAC AA/GA AGA CC/TT TA/GC/T TA/GT GGC TTG-3', R7146-7123: 5'-ACA CAC ACT GCA A/GGA CTT C/TCG ATT-3',用于扩增 *HN* 基因前段;F7060-7084: 5'-ACA TCT GCA ACA GGG/A AGG TAT TCT-3', R8402-8379: 5'-AGC T/CCG CCA TG/TT CCT ACC CGT-3',用于扩增 *HN* 基因后段。引物均由上海 Sangon 生物工程有限公司合成。

1.2 NDV RNA 的提取与 cDNA 的合成

依据 Trizol 试剂盒和 M-MLV 反转录试剂盒说明书进行。

1.3 NDV *HN* 基因的 PCR 扩增

PCR 扩增体系为 50 μ L: 10 $\times$ Buffer 5 μ L, MgCl₂ 4 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 1 μ L, 20 mmol/L 引物 F6150-6173 与 R7146-7123 (或 F7060-7084 与 R8402-8379) 各 1 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 1 μ L, 灭菌三蒸水 33 μ L, cDNA 4 μ L。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 43 $^{\circ}$ C (F7060-7084 与 R8402-8379 用 46 $^{\circ}$ C) 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。取 6 μ L 扩增产物在含 EB 的 10 g/L 琼脂糖凝胶中电泳检测。

1.4 NDV *HN* 基因的克隆与测序

回收 PCR 产物,与 pMD18-T 载体连接,转化 DH5 α 感受态细胞,均匀涂布于含 Ampicillin (50 μ g/mL)、IPTG (40 μ g/mL)和 X-gal (40 μ g/mL)的 LB 固体培养基平板上,37 $^{\circ}$ C 培养 14~16 h。挑取白色菌落少量培养,进行 *Eco*R I 和 *Hind* III 酶切鉴定及 PCR 扩增鉴定。将阳性质粒送上海 Sangon 生物工程有限公司测序。

1.5 NDV *HN* 基因序列的分析

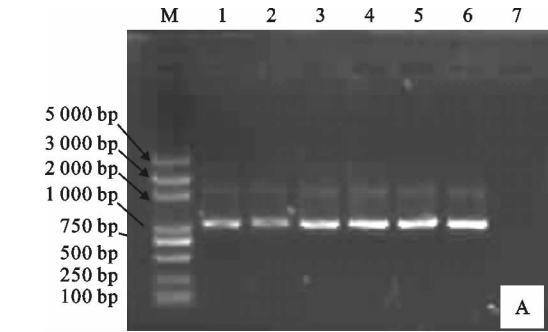
用 DNASTar 软件包对分离株 *HN* 基因序列进行分析,同时绘制其系统发育进化树。其他参考毒

株的序列均从 GenBank 或已发表的文献中获得。

2 结果与分析

2.1 NDV *HN* 基因的 RT-PCR 扩增

5 株新城疫病毒中均可见到清晰的 1 005 bp 左右和 1 342 bp 左右的目的条带(图 1),与预期结果相符。



2.2 NDV 分离株 *HN* 基因的分子特征

2.2.1 *HN* 基因片段长度的差异 由图 2 可知,NDV *HN* 基因的 ORF 有 3 种类型,其长度分别为 1 856,1 734 和 1 716 bp。本试验分离的 NDV *HN* 基因的 ORF 长度为 1 716 bp,与 F48E9、Herts-33、ZJ1、Mukteswar 等强毒株同属第 3 种类型。

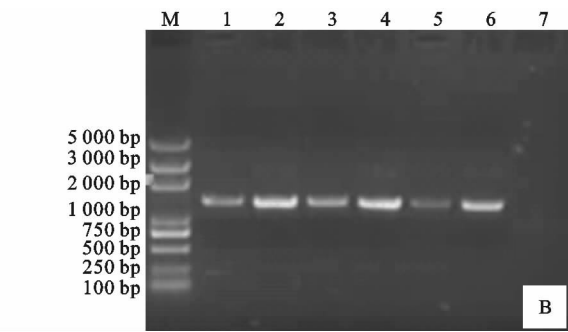


图 1 5 株 NDV 野生鸟类分离株及 F48E9 株 *HN*1(A)和 *HN*2(B)基因片段的 RT-PCR 扩增结果

M, 5 000 bp DNA Marker; 1. Peafowl-CH-08; 2. WhooperSwan-CH-08; 3. heiniaio-CH-08; 4. SpottedDove-CH-08; 5. White-checked Starling-CH-08; 6. F48E9; 7. 阴性对照 Negative control

Fig. 1 Agarose electrophoresis of RT-PCR products of *HN*1(A)and *HN*2(B) from five NDV isolated in wild birds and F48E9

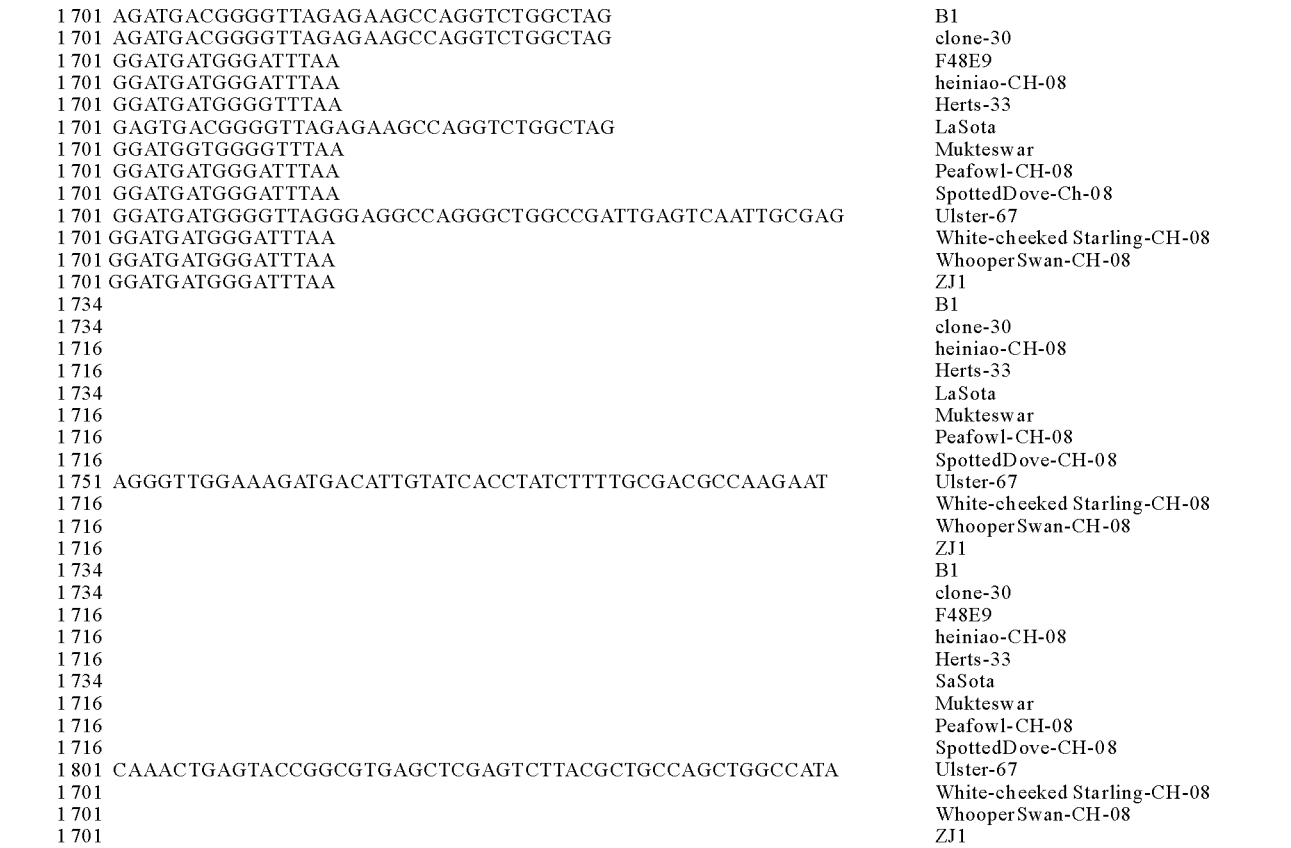


图 2 5 株新城疫病毒分离株及其他参考株 *HN* 基因的终止位点序列

Fig. 2 Termination site of *HN* gene in five NDV isolates from wild birds and other strains

2.2.2 *HN* 基因核苷酸及其编码氨基酸序列的同源性分析 由表 1 可知,Peafowl-CH-08,Whooper-Swan-CH-08,heiniaio-CH-08,SpottedDove-CH-08,White-cheeked Starling-CH-08 与 F48E9 的亲缘关系最近,其核苷酸同源性为 99.6%~99.8%,氨基酸同源性为 99.1%~99.7%;与 ZJ1 的核苷酸同源性为 84.8%~85.0%,氨基酸同源性为 89.3%~89.7%;与 Herts-33 的核苷酸同源性为 91.0%~

91.1%,氨基酸同源性为 93.0%~93.5%;与 LaSota、B1 和 clone-30 的核苷酸同源性为 87.9%~88.5%,氨基酸同源性为 90.2%~91.8%;与 Mukteswar 的核苷酸同源性为 91.8%~91.9%,氨基酸同源性为 92.7%~93.2%;与 Ulster-67 的核苷酸同源性为 91.2%~91.6%,氨基酸同源性为 94.1%~94.6%。

表 1 5 株新城疫病毒分离株与其他毒株 *HN* 基因的同源性分析

Table 1 Homology of <i>HN</i> gene between the five strains of NDV isolated from wild birds and other strains													%
毒株 Strain	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1		99.1	88.4	88.3	87.9	98.8	88.2	88.3	88.1	90.6	88.3	88.4	82.2
2	99.3		88.5	88.4	87.5	99.7	88.1	88.4	88.2	90.3	88.4	88.5	82.1
3	91.4	91.8		99.7	91.2	88.2	92.0	99.8	99.6	91.5	99.7	99.8	85.1
4	91.3	91.6	99.3		91.0	88.1	91.8	99.7	99.4	91.6	99.8	99.8	84.9
5	91.4	91.6	93.7	93.2		87.5	92.2	91.1	91.0	91.0	91.0	91.1	87.5
6	98.3	98.8	90.7	90.6	90.6		87.7	88.1	87.9	90.0	88.1	88.2	81.8
7	90.0	90.2	93.4	92.8	93.0	89.2		91.9	91.8	92.2	91.8	91.8	85.7
8	91.3	91.6	99.7	99.1	93.5	90.6	93.2		99.8	91.4	99.7	99.7	85.0
9	90.9	91.3	99.3	98.8	93.2	90.2	92.8	99.5		91.2	99.4	99.5	84.8
10	94.5	94.8	94.6	94.4	93.7	93.8	90.2	94.4	94.1		91.4	91.5	85.1
11	91.1	91.4	99.1	99.3	93.0	90.4	92.7	99.0	98.6	94.2		99.8	84.9
12	91.4	91.8	99.5	99.7	93.4	90.7	93.0	99.3	99.0	94.6	99.5		85.0
13	88.5	88.6	89.9	89.5	90.9	97.6	89.2	89.7	89.3	90.4	89.3	89.7	

注:右上角为 *HN* 基因核苷酸同源性比较,左下角为 *HN* 蛋白的氨基酸同源性比较。1. B1;2. clone-30;3. F48E9;4. heiniaio-CH-08;5. Herts-33;6. LaSota;7. Mukteswar;8. Peafowl-CH-08;9. SpottedDove-CH-08;10. Ulster-67;11. White-cheeked Starling-CH-08;12. WhooperSwan-CH-08;13. ZJ1。

Note:Homology of *HN* gene on the right, Homology of *HN* protein on the left.

2.2.3 *HN* 蛋白的主要变异区段分析 由图 3 可知,与 F48E9 相比,5 株 NDV 分离株 *HN* 蛋白突变主要集中在 110~116 位,其中 Peafowl-CH-08 和 SpottedDove-CH-08 的 110 位由 L 变为 F,Whoop-

erSwan-CH-08、heiniaio-CH-08 和 White-cheeked Starling-CH-08 的 116 位由 G 变为 R,White-cheeked Starling-CH-08 的 111 位由 S 变为 Y,SpottedDove-CH-08 的 113 位由 Q 变为 R。

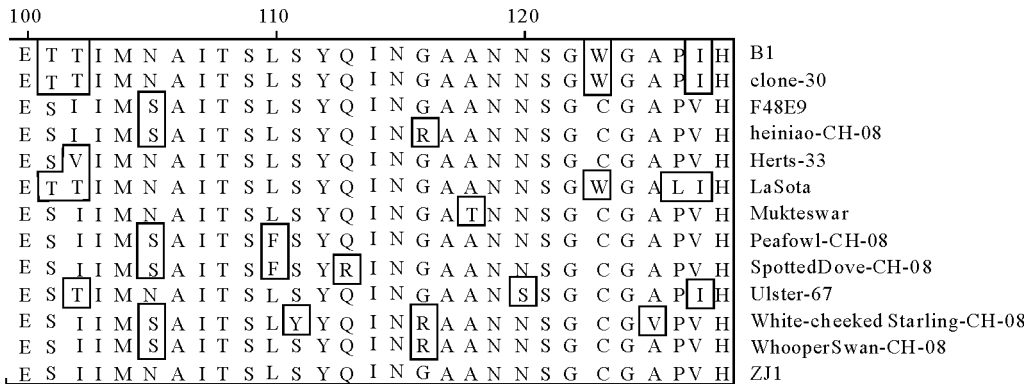


图 3 5 株野生鸟类新城疫病毒分离株及其他参考株 *HN* 蛋白的主要变异区段

Fig. 3 Region of the main sequence variation of *HN* protein in five NDV isolates from wild birds and other strains

2.3 NDV 分离株 *HN* 基因的遗传进化分析 选取 5 个 NDV 分离株的 *HN* 基因 ORF 核苷酸共 1 716 bp,与国内外已发表的部分 NDV 的 *HN* 基因相应片段序列进行比较,应用 DNASar 分析软

件绘制了 18 个毒株的系谱树(图 4)。由图 4 可知,5 个野生鸟类分离株均与 F48E9 位于同一支,而与 传统疫苗株(LaSota、clone-30、B1、Mukteswar)和目 前流行的基因Ⅶ型的 ZJ1、NA-1 等株系关系较远。

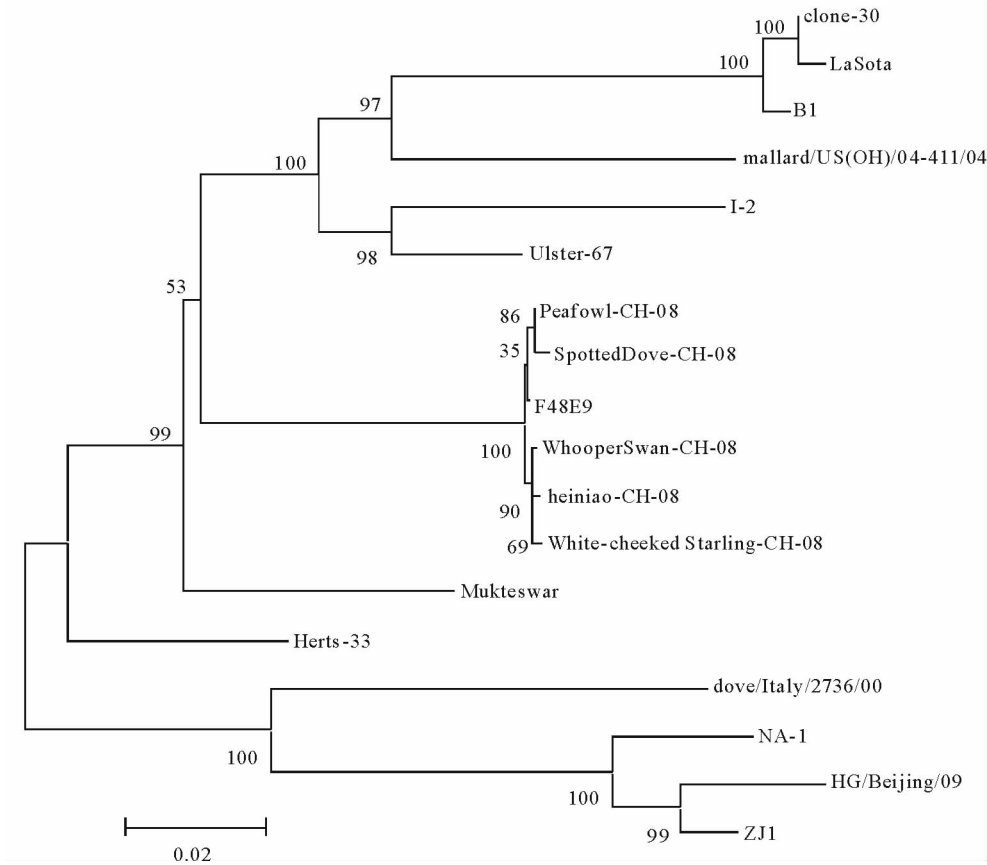


图 4 NDV HN 基因的系统发育进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of HN gene of NDV isolated strains

3 讨 论

HN 的编码基因长约 2 031 bp,约占基因组的 13.5%,含一个开放阅读框^[6]。因终止密码位置的差异,其翻译的多肽链长短不一,第 1 类 HN 的多肽链含有 616 个氨基酸,为无活性的前体(HN0),代表株有 D26/76、QUE/66 和 ULS/65 等,主要是弱毒株;第 2 类 HN 的多肽链含有 577 个氨基酸,为有生物活性的蛋白,代表株有 B1/47、LAS/46、BEA/45 和 TEX/48 等,其中既有强毒株,又有弱毒株;第 3 类 HN 也具有生物学活性,多肽链含有 571 个氨基酸,代表株有 AUS/32、MIY/51、Herts-33、ITA/45、CHI/85 和 IBA/85 等,均为强毒株^[12]。本试验分离毒株 HN 基因的 ORF 长度均为 1 716 bp,编码 571 个氨基酸,属于第 3 类,从基因长度上符合强毒株特征。野生鸟类中携带这样的强毒株,可能会对周边的养禽业造成很大威胁。

从同源性分析来看,Peafowl-CH-08,Whooper-

Swan-CH-08, heiniaio-CH-08, SpottedDove-CH-08, White-cheeked Starling-CH-08 与 F48E9 的亲缘关系最近,其核苷酸同源性为 99.6%~99.8%,氨基酸同源性为 99.1%~99.7%,但与目前流行的基因Ⅶ型的毒株和传统疫苗毒株的关系较远。从系谱进化分析来看,这 5 个毒株与 F48E9 的关系较近,同属一支,而与目前流行的基因Ⅶ型毒株和传统疫苗毒株的关系较远。由此可以推测,这 5 株来源于野生鸟类的新城疫病毒与周围养禽业关系不大,该生态区内存在着这些毒株特定的循环系统。

HN 蛋白是 NDV 除 F 蛋白之外另一种较大的糖蛋白。成熟的 HN 是一种四聚体寡聚蛋白,亚单位之间通过二硫键相连形成二聚体,2 个二聚体非共价结合形成四聚体。HN 蛋白具有血球凝集(HA)和神经氨酸酶(NA)2 种活性,血凝素成分负责病毒吸附到易感细胞含唾液酸的受体,这是病毒感染细胞的第一步;神经氨酸酶则有分解与膜或糖结合的唾液酸的能力,在病毒生命周期中起增加病

毒粒子迁移性的作用,包括破坏细胞受体和从感染细胞表面释放病毒粒子。HN 还可作用于受体位点,使 F 蛋白充分接近而发生病毒与细胞膜的融合,并且这种促进 F 蛋白融合作用的启动功能具有种属特异性。HN 柄状区有 2 个七肽重复序列,它们可形成 α 螺旋结构,据此可介导蛋白质间的相互作用,特别是与 F 蛋白七肽重复序列的互动,对增进 F 蛋白的融合功能具有重要意义。研究表明,HN 110 位氨基酸的突变,会导致其促融合活性和 NA 活性的降低^[13]。本研究发现,与 F48E9 相比,5 个 NDV 分离株在 110~116 位有一个高突变区,关于这种突变对 5 株病毒 HN 基因的血凝活性、神经氨酸酶及其促融合活性的影响,还有待于进一步研究。

[参考文献]

[1] OIE. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals; mammals, birds and bees [M]. Paris: Biological Standards Commission, World Organization for Animal Health, 2009: 576-589.

[2] Saif Y M. 禽病学 [M]. 苏敬良, 高 福, 索 勋, 译. 北京: 中国农业出版社, 2005: 65-921.

Saif Y M. Disease of avian [M]. Su J L, Gao F, Suo X, translated. Beijing: China Agricultural Publishing, 2005: 65-921. (in Chinese)

[3] Niikura M, Matsuura Y, Hattori M, et al. Characterization of HN glycoprotein of NDV expressed by a recombinant baculovirus [J]. Virus Res, 1991, 21: 31-43.

[4] Huang Z H, Panda A, Elankumaran S, et al. The hemagglutinin-neuraminidase protein of Newcastle disease virus determines tropism and virulence [J]. J Virol, 2004, 78(8): 4176-4184.

[5] Connaris H, Takimoto T, Russell R, et al. Probing the Sialic acid binding site of hemagglutinin-neuraminidase of Newcastle disease virus: identification of key amino acids involved in cell binding, catalysis and fusion [J]. J Virol, 2002, 76(4): 1816-1824.

[6] Sakaguchi T, Toyoda T, Gotoh B, et al. Newcastle disease virus

evolution I: Multiple lineages defined by sequence variability of hemagglutinin-neuraminidase gene [J]. Virology, 1989, 169(2): 260-272.

[7] Aldous E W, Alexander D J. Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1) [J]. Avian Pathol, 2001, 30(2): 117-128.

[8] 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): 39-44.

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): 39-44. (in Chinese)

[9] 姚春峰, 仇旭升, 刘文博, 等. 新城疫分离毒 HN 蛋白的抗原性初步分析及分子特性研究 [J]. 微生物学通报, 2008, 35(1): 87-93.

Yao C F, Qiu X S, Liu W B, et al. Genetic characterization and antigenic analysis of Hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of Newcastle Disease Virus isolates [J]. Microbiology, 2008, 35(1): 87-93. (in Chinese)

[10] 刘 栋, 莫贞峰, 赫 静, 等. 3 株新城疫山东分离株 HN 基因全序列测定和分析 [J]. 畜牧与兽医, 2008, 40(2): 20-23.

Liu D, Mo Z F, He J, et al. Cloning and sequence analysis of HN genes of three strains of Newcastle disease virus isolated from Shandong province [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2008, 40(2): 20-23. (in Chinese)

[11] 秦卓明, 徐怀英, 欧阳文军, 等. 新城疫不同毒株交叉鸡胚中和指数及其与 F 和 HN 基因变异的相关性 [J]. 微生物学报, 2008, 48(2): 226-233.

Qin Z M, Xu H Y, Ouyang W J, et al. Correlation of the neutralization index in chicken embryo with the homologies of F and HN gene of different Newcastle-disease isolates [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48(2): 226-233. (in Chinese)

[12] Yang C, Shieh H K, Lin Y, et al. Newcastle disease virus isolated from recent outbreaks in Taiwan phylogenetically related to viruses (Genotype VII) from recent outbreaks in Western Europe [J]. Avian Dis, 1999, 43(1): 125-130.

[13] Hulslander J S, Gmorrison T. Mutational analysis of heptad repeats in the membrane-proximal region of Newcastle disease virus HN protein [J]. J Virol, 1999, 73(5): 3630-3637.