

本栏目主持人: 胡藕祥 zgdwjy@sina.com

## 一株 Class I 新城疫病毒分离株 NP 和 P 蛋白基因分子特征和遗传进化分析

陈云霞<sup>1,2</sup>, 刘华雷<sup>1</sup>, 郑东霞<sup>1</sup>, 赵云玲<sup>1</sup>, 黄伟坚<sup>2</sup>, 王志亮<sup>1</sup>

(1. 中国动物卫生与流行病学中心, 山东青岛 266032; 2. 广西大学动物科学学院, 广西南宁 530005)

**摘要:** 本研究对 2009 年实验室保存的一株 Class I 新城疫病毒分离株 NDV09-056 的 NP 和 P 基因进行了扩增和序列分析, 对其分子特征和遗传进化关系进行了分析。结果表明该分离株 NP 蛋白基因全长为 1 746 nt, 共编码 489 aa, 其 N 端 1~401 氨基酸相对比较保守, C 端 402~479 氨基酸变化比较大; 同源性分析表明本分离株的 NP 蛋白基因与 I 类新城疫病毒代表毒株之间核苷酸的同源性为 93.5%~98.5%, 而与 II 类新城疫病毒代表毒株的同源性较低, 介于 77.0%~79.2%。P 蛋白主要氨基酸突变区集中在 57~107 aa 和 135~212 aa 两个区域, 而 N 端和 C 端相对保守; 同源性分析表明本分离株的 P 蛋白基因与 I 类新城疫病毒代表毒株之间核苷酸的同源性为 90.4%~95.3%, 而与 II 类新城疫病毒代表毒株的同源性较低, 介于 68.3%~72.5%。遗传进化分析表明本分离株与 I 类基因 3 型新城疫病毒代表株 NDV08-004 的亲缘关系最近。

**关键词:** 新城疫病毒; I 类; NP 基因; P 基因

中图分类号: S852. 659. 5 文献标识码: A 文章编号: 1005-944X(2011)03-0037-04

### Molecular Characterization and Phylogenetic Analysis of NP and P Genes of a Class I Newcastle Disease Virus

Chen Yunxia<sup>1,2</sup>, Liu Hualei<sup>1</sup>, Zheng Dongxia<sup>1</sup>, Zhao Yunling<sup>1</sup>, Huang Weijian<sup>2</sup>, Wang Zhiliang<sup>1</sup>

(1. China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao 266032;

2. College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005)

**Abstract:** The NP and P genes of a Newcastle disease virus (NDV) isolate NDV09-056, obtained from domestic duck in China in 2009, were amplified by RT-PCR and sequenced. The complete NP gene of NDV09-056 isolate was composed of 1746 nucleotides encoding 489 amino acids. Homology analysis of NP gene of the isolate revealed that the homology of nucleotides among class I NDV isolates were between 93.5%~98.5%, and showed relative lower homology between this isolate and the class II NDV strains, 77.0%~79.2%. The full length of P gene of the isolate was composed of 1463 nucleotides, encoding 399 amino acids. Homology analysis of the P gene of the isolate revealed that the homology of nucleotides among class I NDV isolates were between 90.4%~95.3%, and showed relatively lower homology between the isolate and the class II NDV strains, 68.3%~72.5%. Phylogenetic analysis based on the complete NP gene and P gene showed that the NDV09-056 isolate was grouped into genotype 3 in class I. The evolutionary rates of NP gene and P gene of class I was similar based on the homology analysis and phylogenetic analysis.

**Key words:** Newcastle disease virus; Class I; NP gene; P gene

新城疫 (Newcastle Disease, ND) 是由新城疫病毒 (Newcastle Disease Virus, NDV) 引起的对世界养禽业危害极为严重的一种烈性传染病, 主要特征是呼吸困难、下痢、神经机能紊乱、黏膜和浆膜出血。该病发病急、致死率高, 对养禽业的发展构成严重威胁。世界动物卫生组织 (OIE) 将其列为必须报告的传染病

(2005 年之前列为 A 类传染病), 我国农业部在 2008 年颁布的动物疫病病种目录中将其列为一类动物疫病。NDV 在分类地位上属于副黏病毒科禽腮腺炎病毒属, 基因组是单股、负链、不分节段的 RNA 病毒, 基因组的结构模式是 3'-NP-P-M-F-HN-L-5', 依次编码 6 种结构蛋白: 核衣壳蛋白 (NP)、磷蛋白 (P)、基质蛋白 (M)、融合蛋白 (F)、血凝素 - 神经氨酸酶蛋白 (HN) 和大分子蛋白 (L)<sup>[1]</sup>。根据病毒的遗传学特性 NDV 可以分为两大类: 即 I 类和 II 类, 每类又可进一

基金项目: 国家自然科学基金资助 (30901079), 农业部动物疫病监测与防治项目

通讯作者: 王志亮

步分为9个基因型,分别为基因1~9型和基因I~IX型<sup>[2]</sup>。新城疫病毒基因组长度包括三种,即15186 nt、15192 nt和15198 nt。基因组长度存在差异主要是不同分离株在NP基因的非编码区插入了6个碱基或者是在P基因的编码区插入了12个碱基<sup>[3]</sup>。NP蛋白是组成病毒核衣壳的主要结构蛋白,其亚单位构成了核衣壳典型的人字形骨架结构,P蛋白和L蛋白散布在NP蛋白组成的人字形骨架中,共同包裹病毒RNA形成一个螺旋的核糖核蛋白(ribonucleoprotein, RNP),与病毒的转录和复制密切相关<sup>[4]</sup>。我们在2008年首次报道了I类NDV在我国的存在,通过分子流行病学分析表明我国I类NDV主要存在两个基因型,即基因2型和基因3型<sup>[2,6]</sup>。目前对NDV的研究主要集中在与致病性密切相关的F和HN蛋白上,对NP和P蛋白及其基因的研究相对较少。本研究对本实验室保存的一株I类NDV分离株的NP和P蛋白基因进行了分子特征和遗传进化分析,为研究其致病机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 病毒

I类新城疫病毒分离株NDV09-056,系2009年从健康家鸭中分离,由中国动物卫生与流行病学中心国家新城疫参考实验室保存。

1.2 主要分子生物学试剂

High pure viral RNA kit为德国Roche公司产品;SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum<sup>®</sup> Taq HiFi试剂盒为Invitrogen公司产品;胶回收试剂盒为QIAGEN公司产品。

1.3 引物设计与合成

利用DNASTar软件根据GenBank中已发表的I类NDV毒株的NP和P基因序列进行比对,通过软件Primer 5.0各设计一对扩增NP、P基因(包括两端的非编码区)的引物(表1)。

表1 本研究中使用的引物

名称	序列	扩增片段大小
NP-R	GAGAATCTGTAAGGTACG	1912bp
NP-R	TCGGGACACTACTCTTCTAC	
P-F	ACAACGACACCGACTGGGGAT	1913bp
P-R	GATGAACACCGAGTCCTCTTTG	

1.4 病毒RNA的提取

取200 μL分离株病毒的尿囊液,按照Roche公司High pure viral RNA kit使用说明书提取病毒的RNA,直接用于RT-PCR或者-80℃保存备用。

1.5 RT-PCR

取3 μL病毒RNA采用一步法RT-PCR进行NP和P蛋白基因的扩增。RT-PCR的反应条件为:

50℃反转录30 min;94℃预变性2 min;94℃变性30 s、52℃退火30 s、68℃延伸2 min,30个循环;最后68℃延伸7 min。取5 μL PCR产物在1%琼脂糖凝胶上电泳鉴定结果。将鉴定正确的PCR产物经胶回收纯化后送宝生物工程(大连)有限公司测序。

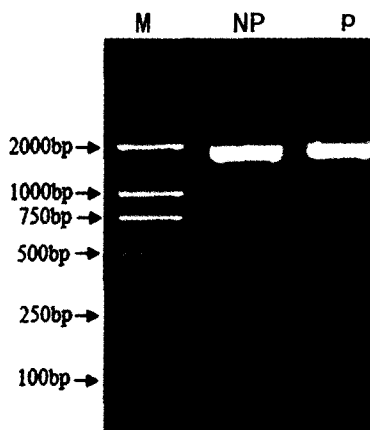
1.6 遗传进化树的构建

利用DNASTar软件对所测定的NDV分离株的NP和P基因序列与GenBank中其他已发表的I类和II类NDV具有代表性的NDV基因进行序列分析和同源性比较,应用遗传进化分析软件MEGA 3.1以Neighbor-joining方法构建新城疫病毒NP基因和P基因的系统发生树,其中Bootstrap重复数设定为1000。

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增结果

NDV09-056分离株NP、P基因RT-PCR扩增结果见图1,扩增条带与预期大小相符。



M: DL2000 Marker; NP: NP基因PCR产物; P: P基因PCR产物

图1 RT-PCR产物电泳图

2.2 NP基因分子特征和遗传进化分析

序列测定结果表明本分离株NP基因长度为1746 nt,编码区长度为1470 bp,可编码489个氨基酸。同源性分析表明,本分离株与国内代表株NDV08-004核苷酸分别为93.9%和96.9%。与II类NDV中的代表株LaSota核苷酸和氨基酸的同源性分别为77.3%和89.2%,与国内强毒株F48E9核苷酸和氨基酸的同源性分别为78.9%和91.4%。通过比对分析I类和II类NDV的NP氨基酸序列,NP基因的氨基酸序列均有4个半胱氨酸高度保守区,分别位于55、78、139、213位。NP基因N端1~401氨基酸相对比较保守,C端402~479氨基酸变化比较大。通过构建新城疫病毒NP基因遗传进化树表明本分离株NDV09-056与I类NDV中基因3型代表株NDV08-004遗传关系关系最近,位于同一个基因型分支上(图2)。

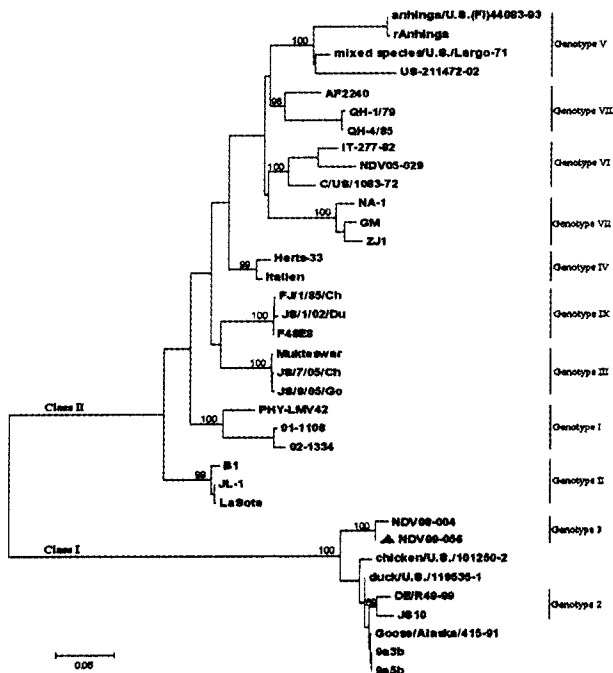


图2 新城疫病毒P基因进化树

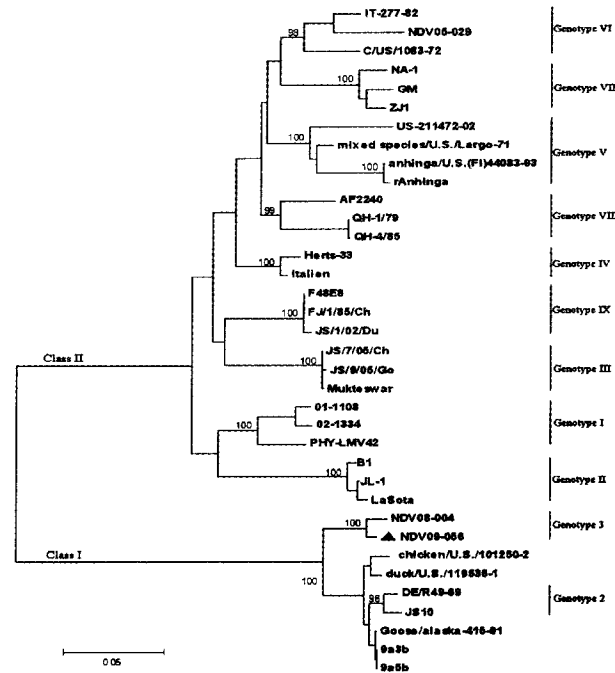


图3 新城疫病毒P基因进化树

### 2.3 P 蛋白基因分子特征和遗传进化分析

序列测定结果表明本分离株 NDV09-056 的 P 基因长度为 1 463 nt, 编码区长度为 1 200 bp, 可编码 399 个氨基酸, 比 II 类 NDV 毒株多 4 个氨基酸, 插入位置在 165~166 氨基酸残基之间, 本研究的毒株插入序列均为“WETG”。同源性分析表明本分离株与 I 类 NDV 国内代表株 NDV08-004 核苷酸和氨基酸的同源性分别为 95.3% 和 95.3%, 与 DE-R49/99 核苷酸和氨基酸的同源性分别为 90.4% 和 89.3%。与 II 类 NDV 代表株 LaSota 核苷酸和氨基酸的同源性分别为 72.4% 和 69.2%。与国内标准株 F48E8 核苷酸和氨基酸的同源性分别为 70.8% 和 68.9%。P 蛋白主要氨基酸突变区集中在 57~107aa 和 135~212aa 两个区域, 而 N 端和 C 端相对保守。I 类毒株 V 蛋白含有 245 个氨基酸, II 类毒株的 V 蛋白含有 240 个氨基酸。II 类毒株的 W 蛋白从 147 到 227 个氨基酸不等。I 类毒株中除了 DE-R49/99 的 W 蛋白含有 174 个氨基酸之外, 其他毒株的 W 蛋白均含有 183 个氨基酸。I 类 NDV 的 P 蛋白中丝氨酸和苏氨酸含量较高, 但是只有一个半胱氨酸位点位于 290 位。而且所有的 NDV 都有保守的氨基酸序列 KKG, 刚好是位于 P 基因的编辑位点。通过构建新城疫病毒 P 基因的遗传进化树表明本分离株 NDV09-056 与 I 类 NDV 中基因 3 型代表株 NDV08-004 遗传关系最近, 位于同一个基因型分支上(图 3)。

### 3 分析与讨论

新城疫病毒基因组全长有三种长度: 15 186 bp、15 192 bp 和 15 198 bp, 基因组长度存在差异主要是

由于不同分离株在 NP 基因非编码区插入 6 个核苷酸基或者在 P 基因编码区插入 12 个核苷酸造成的。其中 Class I 新城疫病毒均是在 P 基因的码区插入了 12 个核苷酸, 全长为 15 198 bp<sup>[1-3]</sup>。本研究中的分离株 NP 蛋白 N 端有 4 个保守的半胱氨酸序列, 这可能与维持 N 末端的构象及结合病毒 RNA 有关, 而且 NP 蛋白 1~401 氨基酸相对比较保守, 402~479 位氨基酸变化比较大, 这个结果与 NP 的生物学功能有一定的关联。NP 蛋白有两个结构域, 其中 1~400 位氨基酸残基为蛋白中心区, 呈球形, 是 NP 蛋白自我装配和与病毒 RNA 结合的部位, 因此序列相对比较保守, 1~375 位氨基酸残基为与 P 蛋白结合区; 401~489 氨基酸残基为 NP 蛋白尾部, 是一个本质上无序的单体结构域, 该区域高度变异。然而对于 I 类和 II 类 NDV 病毒的 NP 蛋白均有保守基序 SFAMG, 这些基序与 NDV 生物学特性的关系目前还没有相关研究报道。

本分离株 P 蛋白基因长度为 1 463 bp, 可编码 399 个氨基酸, 与 II 类 NDV 相比, 在 165~166 氨基酸残基之间插入了 4 个氨基酸。本研究毒株与 GenBank 上参考毒株的插入氨基酸均为 WTEG。P 蛋白主要氨基酸突变区集中在 57~107 aa 和 135~212 aa 两个区域, 而 N 端和 C 端相对保守。mRNA 编辑功能区位于 P 基因高频突变区域内, 使病毒能够利用有限的基因资源应对外界选择压力。目前发现 NDV 可通过在 P 基因第 484 位保守的编辑位点(UUUUCCCC 基因组意义链)上插入一个或两个鸟嘌呤核苷酸(G), 将发生所谓的“RNA 编辑”现象, 结果导致 P 基因翻译过程中不同阅读框的出现, 进而产生出 2 种非结构蛋

白, 即有 +1 阅读框移动产生的 V 蛋白和有 +2 阅读框移动产生的 W 蛋白<sup>[14-15]</sup>。插入的 4 个氨基酸均包含在 P、V、W 蛋白中。P、V、W 三个蛋白是共一个 N 端的, 但各有自己的 C 端, 各个 C 端的长度和氨基酸组成均不相同。I 类毒株 V 蛋白含有 245 个氨基酸, II 类毒株的 V 蛋白含有 240 个氨基酸。V 蛋白的 C 端结构域是相当保守的, 包含 7 个半胱氨酸富集区结合二个锌原子一起形成一个锌指基序, 这可能与其功能有一定的联系。Mebatsion T 和 Park MS 等<sup>[13]</sup>人的研究表明了 V 蛋白参与病毒复制, 其特异的干扰素拮抗剂活性影响到 NDV 的宿主范围, 活性定位于 V 蛋白的 C 端结构域。不同毒株之间 W 蛋白的长度是多变的, 从 147 aa 到 227 aa。本研究中的 I 类毒株中除了 DE-R49/99 的 W 蛋白含有 174 个氨基酸之外, 其他毒株的 W 蛋白均含有 183 个氨基酸。目前的研究尚未发现 W 蛋白的长度与毒力、基因型和分离年代有关。而且至于 W 蛋白的功能目前没有研究报道。

I 类新城疫病毒大多从野生水禽和家养水禽中分离到, 绝大多数都是弱毒株。近年来, 不断有报道从活禽市场的鸡群中分离到 I 类 NDV, 说明这种类型毒株可以在水禽和陆禽之间传播<sup>[2,6-7]</sup>。随后 2002 年 Yu 等人的研究结果显示水禽的弱毒株具有典型的弱毒序列, 当在鸡群中传播和流通时, 具有演变为强毒株的潜能<sup>[8-9]</sup>。2009 年 Lee 等人的研究暗示了在 NDV 的暴发流行中, 家鸭的潜能作用, 以及鸭到鸡的传播方式<sup>[11]</sup>。因此, 杜绝 NDV 的暴发流行, 加强对家禽的规范化管理以及疫病监测工作, 对弱毒株进行全面监测是非常有必要的。

参考文献:

[1] 甘孟侯. 中国禽病学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1999: 8-23.  
 [2] 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.  
 [3] Czegledi A, Ujvari D, Somogyi E, et al. Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications [J]. Virus Res, 2006, 120(1-2): 36-48.  
 [4] Jahanshiri F, Eshaghi M, Yusoff K. Identification of phosphoprotein: phosphoprotein and phosphoprotein:nucleocapsid protein interaction domains of the Newcastle disease virus [J]. Arch Virol, 2005, 150(3): 611-618.  
 [5] 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.  
 [6] 刘华雷, 张维, 胡北侠, 等. 中国部分地区 2008 年 I 类新城疫病毒 F 基因遗传变异分析 [J]. 病毒学报, 2009, 25 (5): 382-387.

[7] Kim L M, King D J, Suarez D L, et al. Characterization of class I Newcastle disease virus isolates from Hong Kong live bird markets and detection using real-time reverse transcription-PCR [J]. J Clin Microbiol, 2007, 45 (4): 1310-1314.  
 [8] Yu S Q, Kishida N, Ito H, et al. Generation of velogenic Newcastle disease viruses from a nonpathogenic waterfowl isolate by passaging in chickens[J]. Virology, 2002, 301 (2): 206-211.  
 [9] Collins M J, Bashiruddin D, Alexander, et al. Deduced amino acid sequences at the fusion protein cleavage site of Newcastle disease viruses showing variation in antigenicity and pathogenicity[J]. Arch Virol, 1993, 128 (3): 363-370.  
 [10] Seal B S, Wise M G, Pedersen J C, et al. Genomic sequences of low-virulence avian paramyxovirus-1 (Newcastle disease virus) isolates obtained from live-bird markets in North America not related to commonly utilized commercial vaccine strains [J]. Vet Microbiol, 2005, 106(1-2): 7-16.  
 [11] Lee E K, Jeon W J, Kwon J H, et al. Molecular epidemiological investigation of Newcastle disease virus from domestic ducks in Korea[J]. Vet Microbiol, 2009, 134(3-4): 241-248.  
 [12] Aldous E W, Mynn J K, Banks J, et al. A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene [J]. Avian Pathol, 2003, 32 (3): 239-256.  
 [13] Park M S, Garcia-Sastre A, Cros J F, et al. Newcastle disease virus V protein is a determinant of host range restriction[J]. J Virol, 2003, 77(17): 9522.  
 [14] Paterson R G, Lamb R A. RNA editing by G-nucleotide insertion in mumps virus P-gene mRNA transcripts [J]. J Virol, 1990, 64(9): 4137-4145.  
 [15] 刘玉良, 刘秀梵. 新城疫病毒 p 基因的 RNA 编辑及其抗干扰素作用[J]. 动物医学进展, 2004, 25 (6): 1-3.

