

一株新城疫病毒鹌鹑分离株分子生物学特性的研究

吴 扬^{1,2}, 刘华雷², 陈义平², 王志亮², 朱国强¹

(1. 扬州大学兽医学院, 江苏扬州 225009;

2. 中国动物卫生与流行病学中心, 山东青岛 266032)

摘要: 本研究从一例鹌鹑暴发新城疫的病例中成功分离出一株新城疫病毒(NDV)。运用RT-PCR扩增了该分离株F基因的重要功能片段(约535 kb), 并进行了序列测定。序列分析表明其在F蛋白裂解位点的氨基酸顺序为112R-R-Q-K-R-F117, 与NDV的强毒株特征相符。通过构建NDV的F基因遗传进化树, 发现该分离株在分类地位上属于基因VII型NDV, 与同期我国普遍流行的基因VII型NDV在遗传进化上极为相似, 且具有较高的同源性, 表明它们可能具有共同的来源。

关键词: 新城疫病毒; 基因VII型; 遗传进化树

Molecular Characterization of One Newcastle Disease Virus Strain Isolated from Partridges in China

Wu Yang^{1,2}, Liu Hualei², Chen Yiping², Wang Zhiliang², Zhu Guoqiang¹

(1. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009;

2. China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao, Shandong 266032)

Abstract: One strain of Newcastle disease virus (NDV) obtained from outbreaks in partridges in China during 2005 was characterized genotypically. The main functional region of the F gene including 535 nucleotides was amplified by RT-PCR and sequenced. The sequence analysis showed that the nucleotide sequences of the fragment were 535 bp. The amino acid sequence of cleavage site region was ¹¹²R-R-Q-K-R-F¹¹⁷, matching to virulent NDV strains. The isolate possessed K101 and V121, which was similar to the characteristic of genotype VII NDV. A phylogenetic tree based on the nucleotide sequences of the F gene revealed all the forty-four strains obtained from GenBank were divided into seven genotypes, and the isolate was similar to the strain Y98 and YG97, which were the main pathogens caused the ND epidemic recently in China, was grouped into genotype VII.

Key words: Newcastle disease virus; genotype VII; phylogenetic tree

近年来, 许多珍禽因感染新城疫而造成巨大经济损失的报道不断出现, 如鸽、鹌鹑、鹓鹑、鸵鸟等。国内研究报道更多的是病原的分离、初步鉴定以及生物学特性, 而对其分子生物学方面的研究

开展较少且较晚, 且均未对所分离毒株进行基因分型。业已证明, 位于病毒囊膜上的融合蛋白(F)是决定毒力、免疫应答的主要因素, 起到病毒与细胞融合、溶血使其病毒穿过细胞膜的作用, 主要参与病毒穿入细胞、诱导细胞融合和溶血等致病过程, 被认为是新城疫病毒毒株毒力的主要决定因

素^[1]。由于F与病毒的致病性密切相关,因此受到国内外研究者的重视。为了解此新城疫病原分离株的分子生物学特性,本实验利用分子生物学方法,对从某养殖场分离到一株新城疫病毒F基因重要功能区片段进行RT-PCR扩增,并测定其核苷酸序列,然后与GenBank获取的国内外已发表的有关NDV F基因相应序列比较并构建了遗传发生树,分析其分类地位和遗传进化关系。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

NDV和AIV(H₅, H₉)的标准阳性血清由国家新城疫参考实验室提供。禽白血病病毒反转录酶(AMV)、Taq DNA聚合酶、pGEM[®]-T vector等购自上海Promega公司。QIAquick Gel Extraction Kit 购自QIAGEN公司。大肠杆菌DH5 α 由本实验室保存。

1.2 实验室诊断与病毒分离

1.2.1 实验室检测

无菌取病死鸚鵡肝、脾做涂片,自然干燥,火焰固定,革兰氏染色镜检。对当天死亡的以及病重的鸚鵡进行剖检,观察其病理变化。随机抽取10只鸚鵡血液,常规分离血清,测新城疫HI效价。

1.2.2 病毒分离与鉴定

按照常规方法进行。鉴定时分别取NDV和AIV(H₅, H₉)的标准阳性血清HI试验血凝抑制试验对病毒进行鉴定。

1.3 引物设计

根据国外发表的NDV的F基因序列,参考文献^[2]合成一对简并引物,用于扩增自F基因起始密码子ATG开始长度为535 bp包含了F基因主要功能区的片段。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成,序列为:P1:5'-ATG GGC(C/T)CC AGA C(C/T)CT TCT AC-3'

P2:5'-CTG CCA CTG CTA GTT GTG ATA ATC C-3'

1.4 病毒的提纯和F基因片段的扩增

将此NDV分离株尿囊液毒接种于10日龄SPF鸡胚,按照文献^[3]方法进行纯化,参照Promega公司的RNAgents[®]Total RNA Isolation System的说明书提取其RNA后进行反转录和PCR反应。其中PCR反应条件参数:95℃预变性2 min;94℃变性50 s、52℃退火45 s、72℃延伸90 s,进行30个循环;

最后72℃延伸10 min。取PCR产物10 μ L,1.5%琼脂糖凝胶电泳,鉴定所扩增片段的大小。

1.5 PCR产物的克隆与鉴定

将PCR产物回收纯化后,按pGEM[®]-T载体操作手册进行连接和转化。常规方法提取质粒,用BstZ I进行酶切鉴定重组质粒。

1.6 序列测定

将经酶切初步鉴定为阳性的重组质粒克隆进行序列测定。序列测定由大连宝生物工程有限公司完成。

1.7 F基因片段序列比较和系统发育进化树的建立

以基因分析软件DNASTar分析试验结果,将此分离株将所测定的分离株的F基因序列与其它已发表的多株NDV相应片段作序列比较,并绘制NDV的系统发育进化树。

2 结果

2.1 实验室诊断与病毒分离

无菌取病死鸚鵡肝、脾做涂片,固定后革兰氏染色镜检,未见细菌。对死亡的以及病重的鸚鵡进行剖检,可见消化道严重出血,腺胃黏膜水肿、出血,肠道黏膜呈弥漫性出血,伴有炎性变化,气管内有大量黏液等典型病变。肝质脆,呈暗褐色,心冠脂肪有出血点;肺脏淤血呈紫褐色;其他无明显变化。随机抽取的血清样品测定NDV的HI效价在0~2⁸,HI效价参差不齐,高低相差悬殊,说明该鸚鵡群可能已经感染新城疫。取脑组织作病毒分离,结果所接种鸡胚均于48~53 h死亡。鸡胚病变:整个胚体充血,在头、腹、背、翅和趾部有出血点,尤其趾部更明显。

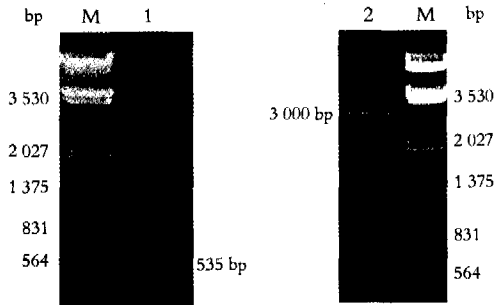
2.2 血凝及血凝试验

结果所分离的病毒具有血凝性,能够凝集鸡的红细胞,血凝效价平均为2⁹。所分离病毒的血凝性可被NDV的阳性血清所抑制,而不能被禽流感病毒的阳性血清(包括H₅和H₉)抑制。从而可以鉴定所分离的病毒为NDV,命名为ZG。

2.3 RT-PCR扩增和克隆

应用引物P1、P2,对病毒分离株经提取基因组RNA后进行RT-PCR扩增,反应产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳观察,以 λ DNA/EcoR I + Hind III消化物为Marker,得到1条0.5 kb左右的特异性扩增条带,与预期设计的扩增片段大小相符。PCR产物纯化后按照常规方法与pGEM[®]-T载体连接、

转化, *Bst*Z I 酶切鉴定, 出现1条0.5 kb左右和1条3.0 kb左右的条带, 分别与预期的扩增片段和 pGEM[®]-T载体大小相符, 说明所扩增的F基因片段已经克隆入重组质粒中(见图1、2)。



M:ADNA *Eco*R I/*Hind* III marker, 1:RT-PCR 产物, 2:*Bst*Z I 酶切产物

图1 PCR 产物电泳图 图2 重组质粒酶切电泳图

2.5 F基因片段的核苷酸序列及氨基酸序列分析

序列测定结果已经登陆到GenBank, 登陆号为AY390294。序列测定结果表明所扩增的ZG株F片段的长度为535 bp, 与预期扩增的片段长度相符。应用DNASar软件推导出其氨基酸序列, 发现其F蛋白裂解位点的氨基酸顺序为112R-R-Q-K-R-F117, 与NDV强毒株的特征相符。同时, 其具备VII型基因型NDV的典型特征^[2,3]; 具有101处的K和121处V两个特征性氨基酸, 而其它各型NDV在上述两个位置皆分别为R和I。

2.6 F基因片段同源性分析

此ZG分离株与近年来的我国流行的基因VII型Y98毒株的同源性较高, 核苷酸和氨基酸的同源性分别为97.9%和96.6%, 说明它们可能具有共同的起源, 与台湾ND大流行期间基因VII型的分离株Taiwan95核苷酸和氨基酸的同源性也较高, 分别为94.0%和94.4%。而与其它基因型的核苷酸和氨基酸的同源性相对较低, 与基因II型的La Sota株核苷酸和氨基酸的同源性分别在84.1%和84.9%。

2.7 进化树的构建

选取GenBank中已发表的NDV毒株的序列, 构建了一个包含44株NDV的遗传发生树(见图3)。所选取的44株NDV在进化树上共可分为7个基因型, 分别为I~VII型。而我们此次所分离的毒株ZG在分类地位上属于基因VII型, 与我国近年来流行的基因VII型分离株Y98、YG97以及台湾近年来的流行毒株在遗传进化关系最为接近。

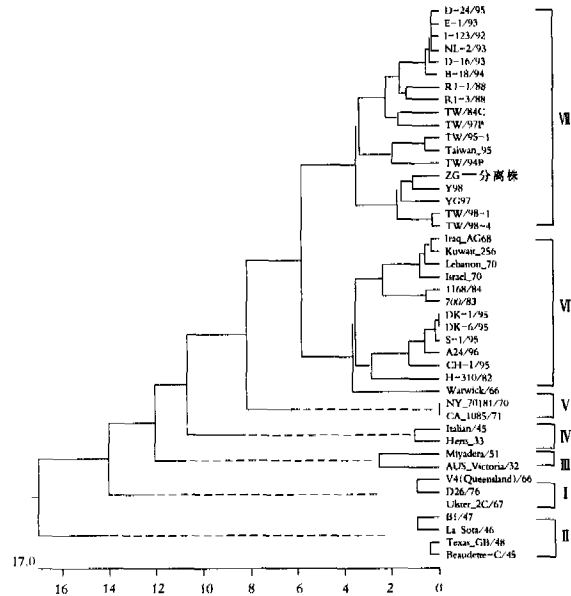


图3 NDV 各毒株的基因进化树

3 结论

本研究从发病鹌鹑中成功分离到一株NDV, 对该分离株F基因重要功能区的片段进行了RT-PCR扩增、克隆及序列测定, 序列分析表明该分离株在分裂位点的氨基酸顺序为:112R-R-Q-K-R-F117, 与NDV的强毒株特征相符, 同时该分离株具有基因VII型NDV的典型特征: 在101位和121位分别为K(赖氨酸)、V(缬氨酸)两种特征性氨基酸, 而其它各型NDV上述两个位置皆分别为R和I^[2,4]。通过构建NDV的F基因的遗传进化树, 发现其分类地位与国内近年来的主要流行基因型毒株相似, 处在同一个分支当中, 均属于基因VII型, 而且其核苷酸和氨基酸的同源性也比较高, 从而进一步证明引起该例ND的病原为基因VII型NDV。

参考文献:

- Ballagi-Pordany A, Wehmann E, Herczeg J, et al. Identification and grouping of Newcastle disease virus strains by restriction site analysis of a region from the F gene[J]. Arch Virol, 141:243-261.
- Lomniczim 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, 143:49-64.
- 刘华雷, 王永坤, 严维巍等. 我国部分地区新城疫病毒的流行现状分析[J]. 中国兽医学报, 2003, 23(3):218-221.
- Yang Chengyao, Shieh Happy K, Lin Yeouliang, 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 Disease, 43:125-130.