

NDV 山东分离株的生物学特性及其 HN 基因的克隆与序列分析*

刘 栋¹ 李建亮¹ 秦卓明^{1,2} 崔言顺^{1**}

(山东农业大学动物科技学院 泰安 271018)¹ (山东省农业科学院 济南 250100)²

摘要: 2004 年从山东某鸡场发病蛋鸡群中分离到一株新城疫病毒 (编号: ShD-2-04), 对其生物学特性进行了研究, 并对其 HN 基因进行了克隆和序列分析。结果表明: 该病毒的最小致死量病毒致死鸡胚的平均时间 (MDT) 为 50.4, 1 日龄 SPF 鸡脑内接种分离病毒致病指数 (ICPI) 为 1.85, 6 周龄 SPF 鸡静脉接种致病指数 (IVPI) 为 2.42, 表明该病毒具有新城疫强毒株的一些特征; 其 HN 基因开放性阅读框架 (ORF) 为 1,716bp, 编码 571 个氨基酸; 与国外发表的部分新城疫病毒强毒株和弱毒株之间相应序列进行比较, 核苷酸序列的同源性在 81.6% ~ 87.2% 之间, 氨基酸同源性在 87.6% ~ 90.7% 之间。

关键词: 新城疫病毒, 生物学特性, HN 基因, 序列分析

中图分类号: S852.65, Q785 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 04-0123-06

Biological Characteristics of One Strain of Newcastle Disease Virus and Sequence Analysis of HN Gene*

LIU Dong¹ LI Jian-Liang¹ QIN Zhuo-Ming^{1,2} CUI Yan-Shun^{1**}

(College of Animal Science & Veterinary Medicine of Shandong Agricultural University, Taian 271018)¹

(Shandong Academy of Agricultural Science, Jinan 250100)²

Abstract: The biological characteristics of one strain of newcastle disease virus (NDV) isolated from chickens in Shandong in 2004 were studied. Its haemagglutinin-neuraminidase (HN) gene was cloned and analyzed. The results showed that: MDT, ICPI and IVPI are 50.4, 1.85 and 2.42 respectively. It means that the isolated virus belongs to virulent strain. Its HN gene has an opening reading fragment (ORF) of 1,716 bp and it encodes 571 amino acids. Compared with the published virulent strains and avirulent ones of NDV, the homology of the nucleotide of HN gene is 81.6% ~ 87.2% and the homology of the deduced amino acids sequences of HN gene is 87.6% ~ 90.7%.

Key words: Newcastle disease virus, Biological characteristics, HN gene, Sequence analysis

新城疫 (newcastle disease, ND) 是由新城疫病毒 (newcastle disease virus, NDV) 引起的极易传染的毁灭性疾病。NDV 是一种有囊膜的单股负链 RNA 病毒, 在其编码的 6 种结构蛋白中, F 和 HN 两种糖蛋白与 NDV 致病性密切相关。HN 糖蛋白具有血凝素和神经氨酸酶两种活性, 在发病过程中起着识别细胞受体的作用, 并且还具有良好的免疫原性, 用真核细胞表达系统表达的 HN 蛋白免疫动物后, 对强毒的攻击具有一定的保护作用^[1~3], 因此, 研究 HN 基因具有重大的现实意义。

虽然新城疫病毒的变异不像正粘病毒那么显著, 但常引起免疫原性的变化, 造成

* 山东省自然科学基金项目 (No. Y2002D20)

** 通讯作者 Tel: 0538-8241103, E-mail: yscui@sdaa.edu.cn

收稿日期: 2005-08-09, 修回日期: 2006-01-01

免疫逃逸株不断出现。本研究在分离到的一株新城疫野毒株的生物学特性的研究基础上, 对其 HN 基因全基因序列进行克隆与分析研究并比较与其他标准毒株的同源性, 为研究我国新城疫分子流行病学特征和研制基因工程疫苗提供了理想的基因材料。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

- 1.1.1 新城疫山东分离株 (ShD-2-04): 2004 年分离于山东某鸡场的发病蛋鸡群。
- 1.1.2 新城疫标准强毒株 F48E9: 购自中国兽药监察所。
- 1.1.3 标准阳性血清: 新城疫 La Sota 株标准阳性血清, 本研究室自制, HI 为 2^{10} ; 禽流感 (H₉ 和 H₅) 单因子阳性血清由中国农业大学试验动物研究所病毒室惠赠。
- 1.1.4 SPF 鸡胚: 山东省农业科学院家禽研究所 SPF 鸡研究中心提供。
- 1.1.5 1% 鸡红细胞、生理盐水: 按常规本研究室自制。
- 1.1.6 菌种和克隆载体: 菌种为大肠埃希氏菌 DH5 α , 由本实验室保存; PGEM-T 载体连接试剂盒购自 Promega 公司。
- 1.1.7 主要酶和试剂: 各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶、禽源反转录酶 (AMV)、RNA 酶抑制剂、dNTP、IPTG、X-gal 等均购自宝生物工程 (大连) 有限公司或 Promega 公司; 琼脂糖、EcoR I、DNA marker III 和 250bp DNA marker plus 购自上海 Sangon 生物工程有限公司, DNA 快速回收试剂盒和质粒微量快速提取试剂盒均购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 其余试剂均为进口或国产分析纯试剂。

1.2 病毒的生物学特性测定

- 1.2.1 空斑纯化试验: 参照文献[4, 5]方法, 将鸡胚成纤维细胞在 96 孔板中培养成单层, 接种粗提病毒后逐日观察细胞形态, 直至出现空斑。在倒置显微镜下标记空斑的位置, 在超净工作台中, 用灭菌滤纸条吸出空斑, 放在营养液中。连续纯化 3 次, 扩毒, -70℃ 保存。
- 1.2.2 纯化病毒的扩增: 将纯化病毒分别以 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 稀释度接种 10 日龄 SPF 鸡胚 10 枚。检测其病毒血凝效价, 无菌收集最佳稀释倍数的效价较高的鸡胚尿囊液。
- 1.2.3 血凝及血凝抑制试验: ① 血凝试验 (HA): 取扩增的鸡胚尿囊液, 按常规方法进行。② 血凝抑制试验 (HI): 分别取 NDV 和禽流感病毒 (AIV) 的标准阳性血清, 按常规方法进行。
- 1.2.4 各项毒力指标的测定: ① 最小致死量病毒致死鸡胚的平均时间 (MDT) 测定、1 日龄 SPF 鸡脑内接种分离病毒致病指数 (ICPI) 测定及 6 周龄 SPF 鸡静脉接种致病指数 (IVPI) 测定, 均按照 2001 年版《中华人民共和国兽用生物制品质量标准》方法^[6-8]利用 SPF 鸡和鸡胚测定。② 血凝解脱及血凝素热稳定性试验: 根据 1.2.3 中测得的 NDV ShD-2-04 株的对鸡红细胞的凝集价 (HA), 读数后振荡, 使红细胞悬浮, 4℃ 过夜, 读数后再悬浮, 再于 2h 后读 HA 值。洗脱速度分快速、中速和慢速。第 1 次悬浮过夜后不凝集者为快速解脱, 第 2 次悬浮 2h 后不凝集者为中速解脱, 仍凝结者为慢速解脱。将该病毒以 1,500 ~ 2,000 r/min 离心 10min, 取上清 0.5 ~ 1.0mL, 装于 7 个小试管中, 置于 56℃ 水浴中分别处理 1, 3, 5, 10, 30, 60 和 120min; 立即冷却后

测定其 HA 值, 不凝集者证明血凝素消失。一般病毒的血凝素解脱时间短, 血凝素稳定性差。

1.3 NDV HN 基因的 RT-PCR 扩增

1.3.1 NDV 的浓缩及总 RNA 的提取: 将无菌收集的最佳稀释倍数的血凝效价较高的鸡胚尿囊液反复冻融 3 次, 8,000 r/min 离心 45min, 上清于 4℃, 27,000 r/min 离心 2h, 收集沉淀, 1:100 倍 PBS 悬浮沉淀。取病毒浓缩液按 Trizol 试剂说明书操作提取总 RNA。

1.3.2 引物的设计与合成: 根据已发表的 NDV HN 基因序列, 利用 Oligo 5.0 Demer 软件自行设计了 RT 及 PCR 引物。该特异性的 RT 引物在 NDV 基因组中位于 HN 基因前端的保守区, 用于扩增 HN 全序列, 其序列为: 5' - ACGGGTAGAA - 3'; PCR 引物序列: HN1: 5' - TCCGTTCTACCACATCACCA - 3', HN2: 5' - CGTCTTCCCAACCATCCTAT - 3'。设计引物由上海 Sangon 生物工程有限公司合成。

1.3.3 RT-PCR 扩增: 用设计的 RT 专用引物序列, 按照 Promega 公司禽源反转录酶 (AMV) 的使用说明书进行反转录。反应体系为 20μL。取 5μL 反转录产物作模板, 加入 10×PCR Buffer 5μL, 10mmol/L dNTP 混合物 3μL, 上下游引物各 1μL, Taq DNA 聚合酶 1μL, 加 ddH₂O 至总体积 50μL。瞬时离心混匀后进行 PCR 扩增。循环条件为: 94℃ 3min; 94℃ 1min, 52℃ 1min, 72℃ 2min, 30 循环; 最后 72℃ 延伸 10min。PCR 扩增结束后, 取 20μL 反应液于 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳分析。

1.4 HN 基因克隆与鉴定

RT-PCR 产物用低熔点琼脂糖电泳回收。按照 PGEM-T Easy vector 试剂盒说明书进行克隆, 并进行 PCR 和 *EcoR* I 单酶切鉴定。

1.5 核苷酸全序列的测定及分析

HN 基因阳性克隆核苷酸序列由上海英骏生物技术有限公司完成测序。利用 DNA Star 和 DNA MAN 软件进行序列分析并绘制系统发育进化树。

2 结果与分析

2.1 新城疫山东分离株 (ShD-2-04) 的生物学特性

2.1.1 蚀斑纯化: 分离株经 CEF 培养后, 显微镜下可见清晰的病毒蚀斑 (图 1)。

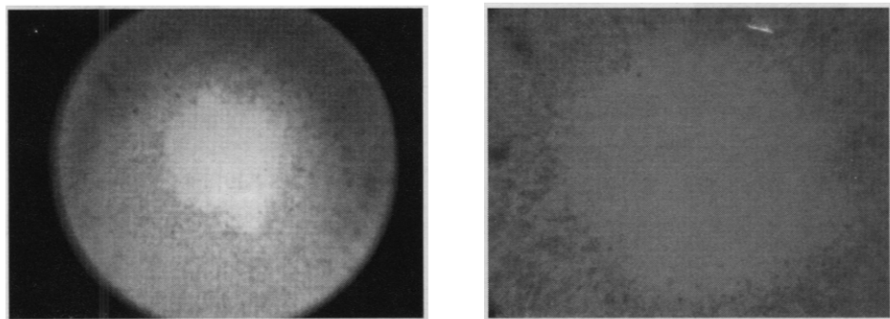


图 1 NDV 在鸡胚成纤维细胞上形成的空斑

2.1.2 病毒扩增: 本试验采用 NDV 分离株的 3 个不同稀释倍数, 即 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 稀

释度接种 10 枚 10 日龄 SPF 鸡胚, 每 12h 照检 1 次, 并测定其相应效价。结果表明 10^{-4} 稀释倍数接种鸡胚的死亡时间较集中 (36h), 且相应的效价较高 (2^9), 因此采用 10^{-4} 稀释倍数的病毒液接种鸡胚大量培养。

2.1.3 血凝及血凝抑制试验: 新城疫山东分离株 (ShD-2-04) 病毒具有血凝性, 血凝效价平均为 2^9 左右。该病毒的血凝性可被 NDV 阳性血清所抑制, 而不能被禽流感病毒的阳性血清抑制, 从而可以鉴定所分离毒为新城疫病毒。

2.1.4 MDT、ICPI 和 IVPI 3 项毒力指标的测定: 由表 1 可见, 该新城疫分离株为强毒。

表 1 新城疫 ShD-2-04 株的毒力指标

毒株	MDT	ICPI	IVPI
ShD-2-04	50.4	1.85	2.42

2.1.5 血凝解脱及血凝素热稳定性试验: NDV ShD-2-04 株凝集红细胞后, 再振荡悬浮, 过夜观察, 未出现凝集, 表明该毒株为快速解脱型。56℃ 时, 5min 血凝性消失。

2.2 HN 基因的 RT-PCR 扩增结果

以 NDV ShD-2-04 株病毒基因组 RNA 为模板, 特异性 RT 引物以及 HN 的引物经 RT-PCR 均扩增出一条约 1,700 bp 大小的特异性条带, 这与预期设计相吻合。RT-PCR 产物电泳图片见图 2。

2.3 HN 基因的克隆及阳性克隆的鉴定

1% 琼脂糖电泳结果显示, 重组质粒分子量 (约 4,700bp) 明显大于空质粒载体 (约 3,000bp); 以重组质粒为模板进行 PCR, 结果也扩增出 1,700bp 左右的目的片段, 初步证明了我们得到了阳性克隆, 后将初步筛选的阳性克隆进行 *EcoR* I 单酶切, 酶切电泳结果见图 3。

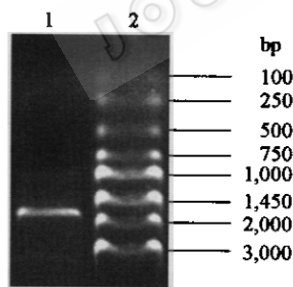


图 2 NDV 山东分离株 HN 基因 RT-PCR 产物的电泳图

1 HN 基因目的条带, 2 250bp DNA marker plus

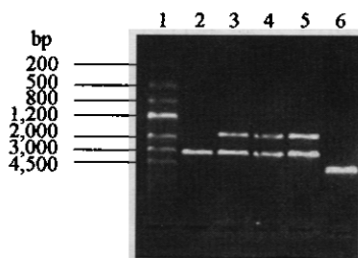


图 3 NDV 山东分离株 HN 基因阳性克隆的鉴定

1 DNA marker III, 2 空质粒载体, 3~5 HN 基因重组质粒酶切, 6 HN 基因阳性重组质粒

以内切酶 *EcoR* I 进行单酶切重组质粒及空质粒, 由于 PGEM-T Easy vector 的 49 位上有一 *EcoR* I 位点, 而 HN 基因的开放性阅读框架 (ORF) 的 1,664 位亦含有该酶的惟一酶切点, 故阳性质粒酶切后 HN 基因应出现约 1,700bp 及 3,000bp 的两条带, 而空质粒酶切后仅有约 3,000bp 的一条带 (见图 3), 电泳显示, 酶切结果与预期的一致, 说明 HN 基因克隆进入 PGEM-T Easy vector 中。

2.4 HN 基因的克隆测序及序列分析比较

挑选出的阳性克隆进行序列测定，经拼接后得到 NDV ShD-2-04 株 HN 基因的 ORF 全核苷酸序列（GenBank 编号：DQ023554），HN 基因 ORF 全长 1,716bp，编码 571 个氨基酸。

2.5 与国内外标准株同源性分析比较

将 NDV ShD-2-04 株与国内外标准强毒株和弱毒株进行 HN 基因核苷酸及氨基酸序列同源性比较，结果见图 4 和图 5。

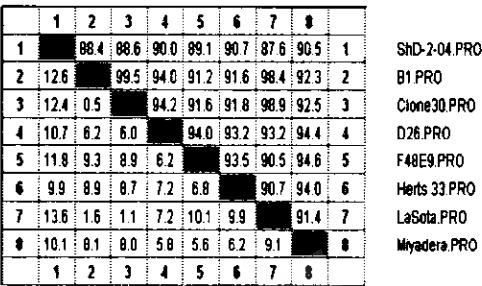
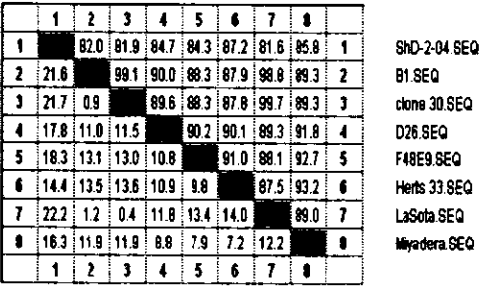


图 4 NDV ShD-2-04 株与标准株 HN 基因核苷酸同源性比较 (%)

图 5 NDV ShD-2-04 株与标准株 HN 基因氨基酸同源性比较 (%)

NDV ShD-2-04 株与国外发表的部分 NDV 强毒株和弱毒株之间相同序列进行比较，HN 基因核苷酸序列的同源性在 81.6% ~ 87.2% 之间（图 4），氨基酸同源性在 87.6% ~ 90.7% 之间（图 5）。

2.6 系统发育进化树

根据本研究毒株与近期国内外发表的一些有代表性的参考毒株的 HN 基因所构建的进化树见图 6。

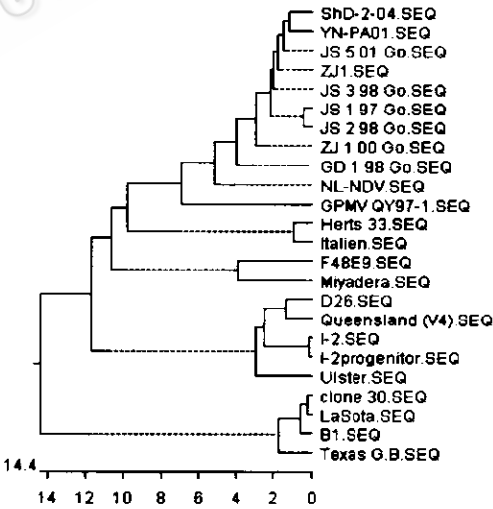


图 6 NDV 不同毒株 HN 基因全序列遗传进化树图谱

3 讨论

NDV 只有一个血清型，但毒力不同的 NDV 毒株广泛存在于自然界，尤其是随着

NDV 中等毒、弱毒、无毒活疫苗预防接种的普及,从免疫失败病死鸡分离到的 NDV 往往呈现强、弱毒混杂现象,本研究中用蚀斑克隆纯化了分离自山东鸡新城疫病毒的种毒,避免了可能混杂在一起的 NDV 毒株的干扰。

通过对 NDV ShD-2-04 株生物学特性研究,结果表明:该病毒的 MDT 为 50.4,ICPI 为 1.85,IVPI 为 2.42,血凝解脱及血凝素热稳定性试验表明该病毒株为快速解脱型,所以确定 NDV ShD-2-04 株为强毒株。

HN 基因是 NDV 主要的致病性抗原和免疫保护性抗原。本研究成功扩增出了 HN 基因全部的核苷酸序列。经测定 NDV ShD-2-04 株的 HN 基因开放性阅读框架 (ORF) 为 1,716bp,编码 571 个氨基酸。根据 HN 的氨基酸同源性,NDV 可分为 A, B, C 3 群,分别含有 616, 577 和 571 个氨基酸。一般 A 群为弱毒, C 群为强毒, B 群弱毒株、中毒株、强毒株皆有^[9,10]。本研究中的 NDV ShD-2-04 株 HN 基因 ORF 全长 1,716bp, HN 基因编码 571 个氨基酸,属于强毒的 C 群。与国外发表的部分 NDV 强毒株和弱毒株之间对应序列进行比较, HN 基因核苷酸序列的同源性在 81.6% ~ 87.2% 之间,氨基酸同源性在 87.6% ~ 90.7% 之间,可见已发生一定的变异。

本研究毒株与近期国内外发表的一些有代表性的参考毒株所构建的进化树 (见图 5), 我们可以看到从山东某鸡场所分离的这株病毒与近年来在云南 (如 YN-PA01, GenBank 编号: AY253912)、江苏 (如 JS/5/01/Go, GenBank 编号: AF456434) 一带所分离的毒株同源性较近,基本为同一基因群;而与传统疫苗株同源性较远,分属不同基因群。参考已发表的文献资料^[11-14],与 NDV ShD-2-04 株同源性较近的这几株云南和江苏分离株均属于近年流行的基因 VII 型,根据对 HN 基因的分析,初步估计山东分离株也应属于 VII 型,对于该分离毒 F 基因的研究以及该毒株是否还具有其他鹅源 NDV 分离株^[11-12]的特点等其他深层次的研究有待于进一步的进行。

参考文献

- [1] Morgan R W, Gelb J, Schreurs C S, *et al.* Avian Disease, 1992, 36: 858 ~ 870.
- [2] Taylor J, Christensen L, Getting R, *et al.* Avian Disease, 1996, 40: 173 ~ 180.
- [3] Meulemans G, Vanden Berg T P, Decaesstecker M, *et al.* Avian Pathology, 1998, 31 (5): 9 ~ 15.
- [4] 梁 荣, 曹殿军, 阎丽辉, 等. 中国兽医学报, 2003, 23 (6): 533 ~ 534.
- [5] 沈志强, 管 宇, 刘吉山, 等. 动物医学进展, 2005, 26 (4): 78 ~ 83.
- [6] 农业部. 中华人民共和国兽用生物制品质量标准 (2001 年版). 北京: 中国农业出版社, 2001. 316 ~ 318.
- [7] 白文彬, 于康震. 动物传染病诊断学. 北京: 中国农业出版社, 2002. 224 ~ 225.
- [8] 孙一敏, 于秀俊, 柏佳宁, 等. 微生物学通报, 2004, 31 (4): 5 ~ 8.
- [9] 肖 肖, 郑增忍, 王树双, 等. 中国动物检疫, 1998, 15 (1): 46 ~ 49.
- [10] 田兴华, 陈燕军, 郝侵宗, 等. 中国兽医杂志, 2003, 39 (10): 7 ~ 10.
- [11] 吴艳涛, 倪雪霞, 万洪全, 等. 病毒学报, 2002, 18 (3): 264 ~ 269.
- [12] 黄 勇, 万洪全, 刘红旗, 等. 病毒学报, 2003, 19 (4): 348 ~ 354.
- [13] 曹殿军. 中国预防兽医学报, 2001, 23 (1): 29 ~ 32.
- [14] 刘华雷, 王永坤, 严维巍, 等. 中国兽医学报, 2003, 23 (3): 218 ~ 221.