

NDV HeB02 分离株的生物学特性及其 F 基因的克隆与序列测定^{*}

孙一敏¹ 于秀俊¹ 柏佳宁¹ 孙继国² 赵宝华^{1**}

(河北师范大学生命科学学院 石家庄 050016)¹

(河北农业大学动物科技学院 保定 071000)²

摘要: 对河北省新城疫分离株 HeB02 的生物学特性进行了鉴定, 根据国外已发表的新城疫病毒 F 基因序列, 设计了一对引物并以 RT-PCR 特异性扩增出 HeB02 分离株的 F 基因, 基因产物大小为 1.63 kb, 与设计相符, 对其进行序列测定后, 与其它标准毒株 F48 E9、La Sota 和 Clone30 的 F 基因进行同源性比较, 结果表明, HeB02 株与国内标准强毒株 F48 E9 及目前广泛应用的弱毒疫苗 La Sota 和 Clone30 的 F 基因核苷酸序列的同源性分别为 88.1 %、84.9 % 和 83.8 %, 由此可以看出 HeB02 分离株与标准毒株和疫苗株在 F 基因上发生了变异。

关键词: 新城疫, 生物学特性, F 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 (2004) 04-0005-04

The Biological Characteristics of NDV Heb02 Isolate and Its Gene Cloning and Sequence Analysis

SUN Yi-Min¹ YUN Xiu-Jun¹ BAI Jia-Ning¹ SUN Ji-Guo² ZHAO Bao-Hua^{1**}

(College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016)¹

(College of Science and Technology for Animal, Hebei Agricultural University, Baoding 071000)²

Abstract: The biological characteristics of NDV Heb02 isolate were identified. One pair of primers for amplifying the F gene of NDV had been designed, with which the predicted 1.63 kb fragment had been amplified via RT-PCR from NDV strain Heb02. The F gene of strain Heb02 was sequenced and compared with standard strains such as F48 E9, La Sota and Clone30. The results showed that the homologies of nucleic acids between Heb02 strain and F48 E9, La Sota and Clone30 strains were 88.1 %, 84.9 % and 83.8 % respectively. The difference of the F gene of NDV strain Heb02 with those of other NDV standard strains had been proved.

Key words: ND, Biological characteristics, F gene, Sequencing

新城疫是由新城疫病毒 (Newcastle disease virus, NDV) 引起的一种急性败血性传染病, NDV 属于副粘病毒科, 副粘病毒亚科, 腮腺炎病毒属, 是一种含囊膜的负链 RNA 病毒^[1]。自 1926 年首次爆发于印度尼西亚的爪哇和英国的新城以来, 新城疫曾有过三次大规模的流行, 目前该病已经传播到全世界的许多国家和地区, 一直是严重危害养鸡业发展的主要禽病之一^[2]。目前防治新城疫的有效方法仍是疫苗接种, 然而疫苗接种仅仅控制了新城疫的大规模流行, 免疫鸡群中仍时有疫病发生。为了从根本上防治

^{*} 河北师范大学分子细胞生物学重点学科基金资助项目 (No. 200102)

^{**} 联系人 Tel: 0311-6268473, E-mail: zhaobao-hua86178@sohu.com

收稿日期: 2003-07-28 修回日期: 2003-09-28

和根除新城疫, 对其病原的研究已成为热点^[3]。新城疫疾病的研究随着分子生物学的飞速发展, 目前已不仅仅局限于传统的生物学特性研究, 而且从分子生物学的角度进行同源性分析。许多研究表明 F 蛋白和 HN 蛋白构成了 NDV 囊膜表面的大纤突和小纤突, 在免疫应答和致病过程中起着极其重要的作用, HN 蛋白在病毒侵染过程中起识别受体的作用, 而 F 蛋白则介导病毒与宿主细胞及宿主细胞间融合, 二者均为 NDV 的保护性抗原基因编码的蛋白^[4]。据此我们对河北省流行的新城疫 HeB02 分离株的生物学特性及其 F 基因的克隆与序列分析进行了研究, 并比较了与其它标准毒株的同源性, 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

Heb02 株: 分离于河北省衡水某鸡场 30 日龄左右的发病鸡群中, 由河北农业大学动物科技学院分离鉴定保存。新城疫标准强毒株 F48E9 购自中国兽药监察所, La Sota 株标准阳性血清和 SPF 鸡胚由辽宁省益康生物制品厂提供; 1% 鸡红细胞、生理盐水按常规本室制备; DNA 凝胶回收纯化 Kit 购自 Promega 公司; AMV Rnasin, dNTP, Taq 酶, 蛋白酶 K, 分子量标准 DL2000, 限制性内切酶等购自 Takara 公司; TRIZOL LS Reagent 购自 Gibco 公司。

1.2 方法

1.2.1 NDV 的增殖: 取出冻干保存的 NDV HeB02 分离株, 用生理盐水作 50 倍或 100 倍稀释, 逐个注入 SPF 鸡胚中, 注射量为 0.1 mL/枚蛋, 于 37 °C 培养, 保持一定湿度, 24 h 开始照蛋, 剔除死亡的鸡胚, 取 36 h 存活的鸡胚于 4 °C 冰箱过夜 (5 h 以上), 冻死鸡胚。在无菌条件下收集尿囊液于无菌瓶中并做无菌检验, 然后于 -20 °C 过夜。

1.2.2 病毒血凝测定: 按常规微量血凝实验方法测定。

1.2.3 病毒的形态和大小: 分别取分离株的 SPF 鸡胚尿囊液各 1 滴, 用 2% 磷钨酸负染 1 min 后电镜观察

1.2.4 HI 实验: 应用新城疫 La Sota 株标准阳性血清做 HI 实验, 在培养病毒液内等量加入新城疫分离株的阳性血清, 按常规微量血凝抑制试验方法测定。

1.2.5 引物的设计与合成: 根据 GenBank 公布的 NDV La Sota 基因组全序列而设计一对引物 P1 和 P2, P1 和 P2 的 5' 端分别加有 *Bam* H I 和 *Kpn* I 的识别序列, 跨幅为 1.63 kb, 引物序列为:

P1: 5'-CGGGATCCTGGCCCCAAAATCTTCTACCAG-3'

P2: 5'-CGGGGTACCCAGATTGTAGTGGCCCTCA-3'

1.2.6 NDV RNA 的提取: 按 Gibco 公司试剂盒说明, 从尿囊液中提取 RNA。

1.2.7 NDV F 基因的 RT-PCR 扩增: 将沉淀抽干的 RNA 溶于 10 μ L DEPC 水中, 加入下游引物 P2 1.5 μ L, 70 °C 水浴 10 min, 立即冰浴 5 min, 然后依次加入 5 $\times$ Buffer 4.0 μ L, Rnasin 1.5 μ L, dNTP miH120 2.0 μ L, AMV 1.0 μ L, 弹匀, 瞬时离心, 42 °C 1 h, 96 °C 10 min, 4 °C 5 min。瞬时离心后, 立即进行 PCR 反应。PCR 反应在 50 μ L 体系中进行, 10 $\times$ Buffer 5.0 μ L, dNTP miH120 4.0 μ L, P1 1 μ L, cDNA 8 μ L, ddH₂O 32.3 μ L, 95 °C 5 min 后, 冰浴 2 min, 再加 Taq 酶 0.7 μ L, 混匀后按下列条件 PCR 扩增: 94 °C 1 min、46 °C 1 min、72 °C 3 min, 30 个循环, 再 72 °C 延伸 10 min。

1.2.8 NDV F 基因 PCR 产物的克隆：将 RT-PCR 特异性扩增产物 F 基因与 pGEM-T 载体连接，并转化至大肠杆菌 JM109 受体菌中，筛选获得阳性克隆菌株并进行酶切鉴定。

1.2.9 F 基因的序列分析：将含 F 基因片段的阳性克隆菌株送大连宝生物工程有限公司进行序列测定。

1.2.10 NDV HeB02 分离株 F 基因的同源性分析：使用 DAN Star 序列分析软件将 HeB02 株 F 基因与标准毒株进行核苷酸序列同源性分析。

2 结果

2.1 病毒的生物学特性鉴定

2.1.1 病毒分离：SPF 鸡胚在接种后 60 h 内死亡，死亡胎儿全身严重出血、水肿、呈现透明状，肝脏有点坏死灶和出血斑点。

2.1.2 病毒的血凝性：取死亡 SPF 鸡胚的尿囊液按 1.2.2 中提供的方法进行 HA 试验，结果 HA： $2^{7.8}$ 。

2.1.3 病毒的形态大小：经电镜观察，见有大量相同形态和大小的病毒颗粒，病毒颗粒大小不一，形态不正，表面有密集的纤突结构，病毒内部有囊膜着的螺旋对称的核衣壳，病毒颗粒大小平均直径为 120 nm 左右 (图 1)。

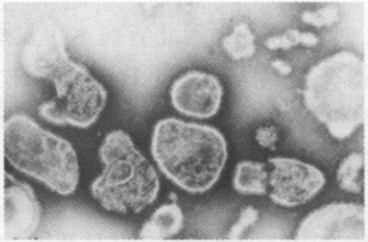


图 1 新城疫病毒的电镜照片 (×60,000)

2.1.4 HI 试验：按 1.2.4 中提供的方法进行 HI 试验，结果：抑制了病毒的血凝活性，标准血清的 HI 效价为 10 (log2)，分离株血清的 HI 效价为 9 (log2)。

2.2 NDV HeB02 分离株 F 基因的 RT-PCR 扩增结果

扩增结果见图 2。从图 2 可以看出，RT-PCR 产物大小为 1.62 kb，与实验设计相符。

2.3 IBV H120 株 S1 基因重组质粒的酶切鉴定

采用 pGEM-T 载体与 F 基因连接，转化受体菌 JM109，用 IPTG/X-gal 琼脂平板蓝白菌落筛选，随机挑取白色菌落，提取质粒后进行双酶切鉴定 (见图 3)，可以看出 BamH I 和 Kpn I 双酶切后得到了 1.63 kb 片段，表明获得了 HeB02 分离株 F 基因的重组质粒，阳性重组质粒命名为 pST-F。

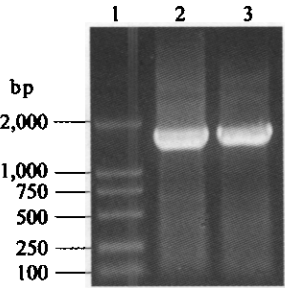


图 2 NDV HeB02 分离株 F 基因的 RT-PCR 结果

- 1 DNA marker DL2000,
- 2 NDV HeB02 分离株 F 基因的 RT-PCR 结果

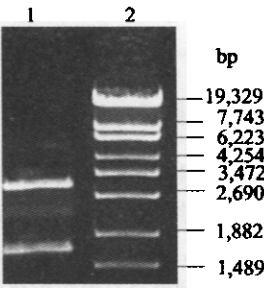


图 3 重组质粒 pST-F 的酶切鉴定

- 1 pST-F/BamH I + Kpn I,
- 2 DNA marker DL2000

2.4 重组质粒 pST- F 的 PCR 鉴定

以阳性重组质粒 pST-F 为模板扩增出了 1.63 kb 的目的片段, 而以空 T 载体对照为模板未扩增出特异性片段, 这进一步说明了构建的重组质粒是正确的。

2.5 NDV HeB02 分离株 F 基因的序列测定及与标准毒株的同源性分析

pST- F 中 F 基因大小为 1,632 bp, 为完整的 F 基因序列。应用 DNA Star 分析软件将 HeB02 分离株的 F 基因与 F48 E9, La Sota 和 Clone30 3 个标准毒株的 S1 基因进行同源性分析 (表 1), 结果表明 HeB02 株与标准毒株在 F 基因上发生了变异。

表 1 HeB02 毒株与其它标准毒株 F 基因核酸序列相比较 (%)

	HeB02/ F48 E9	HeB02/ La Sota	HeB02/ Clone30
同源率	88.4	84.9	83.8
变异率	11.6	15.1	16.2

3 讨论

HeB02 为河北省衡水市发病鸡群中分离所得, 通过病毒的形态结构、生物学特性分析, 我们所分离的 HeB02 毒株为 NDV, 其 F 基因的克隆与核苷酸序列分析的结果表明, HeB02 株与国内标准强毒株 F48 E9 及目前广泛应用的弱毒疫苗 La Sota 和 Clone30 的 F 基因核苷酸序列的同源性分别为 88.1 %、84.9 % 和 83.8 %, 由此可以看出 HeB02 分离株与标准毒株和疫苗株在 F 基因上发生了变异。本研究成功的克隆了我们自己分离保存的 NDV HeB02 毒株的 F 基因。这将为从分子生物学角度分析河北省新城疫病毒变异情况打下了良好的基础, 同时也为新城疫疾病新的诊断与防治方法的研究打下了坚实的基础。了解该毒株的变异情况, 为有针对性的防治本病毒疫情的蔓延, 提供可靠的理论指导。

参 考 文 献

- [1] 邓明俊, 张彦明, 梁 荣, 等. 西北农林科技大学学报, 2003, 31 (2): 9~12.
- [2] 管 宇, 沈志强, 刘吉山, 等. 中国预防兽医学报, 2002, 24 (6): 432~435.
- [3] 仲大莲, 余为一, 刘 兢, 等. 安徽农业大学学报, 2002, 29 (1): 34~37.
- [4] 梁雪芽, 方维焕, 江玲丽. 生物工程学报, 2003, 19 (1): 24~29.
- [5] 施曼玲, 李桂新, 陶小荣. 微生物学通报, 2002, 29 (1): 26~30.

微生物学通报 2004 年再次被确定为综合性生物类核心期刊

依据文献计量学的原理和方法, 经过对相关文献的检索、计算和分析, 并通过学科专家评审, 《微生物学通报》再次被确定为综合性生物类核心期刊, 并被编入《中文核心期刊要目总览》2004 年版。此前, 《微生物学通报》曾在 1992 年第一版、1996 年第二版、2000 年第三版《中文核心期刊要目总览》中被确定为综合性生物类核心期刊。