

# 2008年江苏地区基因Ⅶd亚型新城疫病毒遗传变异分析

吴双<sup>1</sup>, 黄伟平<sup>2</sup>, 王伟伟<sup>1</sup>, 胡顺林<sup>1</sup>, 王晓泉<sup>1</sup>, 刘秀梵<sup>1\*</sup>

(1. 扬州大学 农业部畜禽传染病学重点开放实验室, 扬州 225009; 2. 铜山县禽病门诊部, 徐州 221009)

**摘要:** 为了研究基因Ⅶd亚型新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)的分子流行病学及遗传变异规律, 作者对2008年分离自江苏地区16株具有一定代表性NDV分离株的F和HN基因片段进行了扩增。根据F基因和HN基因序列绘制的2个遗传进化树基本一致, 表明分离株中不存在囊膜糖蛋白基因发生重组的NDV; 同时, HN蛋白线性表位发生E347K突变的变异株的分离率在我国呈上升趋势。基因Ⅶd亚型变异株的出现应引起相关领域从业者的高度重视。

**关键词:** 新城疫病毒; 基因Ⅶd亚型; 变异株

中图分类号: S852.659.5

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)12-1782-06

## Genetic Variation Analysis of Subgenotype Ⅶd Newcastle Disease Viruses Isolated from Jiangsu Province in 2008

WU Shuang<sup>1</sup>, HUANG Wei-ping<sup>2</sup>, WANG Wei-wei<sup>1</sup>, HU Shun-lin<sup>1</sup>, WANG Xiao-quan<sup>1</sup>, LIU Xiu-fan<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Animal Infectious Diseases of Ministry of Agriculture, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 2. Clinic for Avian Disease in Tongshan County, Xuzhou 221009, China)

**Abstract:** In order to explore the molecular epidemiology of subgenotype Ⅶd Newcastle disease virus (NDV) in Jiangsu Province, 16 NDVs isolated from different regions in 2008 were characterized phylogenetically. Fusion (F) and hemagglutinin-neuraminidase (HN) genes were amplified by RT-PCR and sequenced. The phylogenetic trees based on the sequences of the F and HN genes, respectively, were almost identical. These results suggesting that no recombination was present among these NDVs. In addition, the isolation frequency of the variant strain with E347K mutation on HN increased significantly in more recent years. More attention should be paid to the emergence of the variant genotype Ⅶd NDV strains.

**Key words:** Newcastle disease virus; subgenotype Ⅶd; variant strains

新城疫(Newcastle disease, ND)为能够感染多种禽类的一种急性、高度传染性疫病,是危害世界养禽业的重要传染病之一,给许多国家的养禽业造成巨大的经济损失<sup>[1]</sup>。新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)属于副黏病毒科,禽腮腺炎病毒属<sup>[2]</sup>,其基因组由单负股RNA构成。基因组结构为3'-NP-P-M-F-HN-L-5',依次编码6种病毒蛋

白,即核衣壳蛋白(NP)、磷蛋白(P)、基质蛋白(M)、融合蛋白(F)、血凝素-神经氨酸酶(HN)和大蛋白(L)。病毒囊膜表面的2种糖蛋白F和HN是构成NDV主要致病性的分子基础,尤其F蛋白在NDV致病过程中发挥着重要作用<sup>[3]</sup>。

NDV分为Class I和Class II两大谱系,Class I基因组长度为15 198 nt;Class II中I-IV型和V-

收稿日期:2009-08-06

基金项目:国家自然科学基金重点项目(30630048);“十一五”国家支撑计划项目(2006BAD06A03)

作者简介:吴双(1983-),女,江苏徐州人,博士生,主要从事新城疫病毒分子生物学方向的研究, E-mail: jswshuang@yahoo. com. cn

\* 通信作者:刘秀梵, Tel: +86-514-87991416, Fax: +86-514-87972591, E-mail: xfliu@yzu. edu. cn

IX 型 NDV 分别为 15 186 和 15 192 nt<sup>[4-6]</sup>, 其中, 基因 VII 型又分为 VII a、VII b、VII c、VII d 和 VII e 5 个亚型<sup>[7]</sup>。诸多文献表明, 开始于 20 世纪 90 年代的第 4 次 NDV 大流行主要是由基因 VII 型 NDV 引起的, 在亚洲、非洲和欧洲则主要由基因 VII d 亚型引起。为了研究近年来基因 VII d 亚型 NDV 分离株流行特点及其变异情况, 作者对 2008 年分离自江苏地区的 16 株 NDV 进行了 *F* 和 *HN* 基因序列的分析, 旨在为当前中国 ND 的防制提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 病毒和实验动物 2008 年间从江苏采集疑似 ND 发病禽群病料, 参考 OIE 标准进行 NDV 分离、鉴定<sup>[8]</sup>。所有毒株均先通过接种鸡胚成纤维细胞 (CEF) 进行蚀斑克隆纯化 3 代后, 再在 10 日龄

SPF 鸡胚传代 3 次<sup>[9]</sup>。SPF 种蛋购自山东家禽研究所, 在实验室自行孵化至所需日龄。

1.1.2 常用分子生物学试剂及其工程菌 Agarose Gel DNA Extraction Kit, X-Gal, IPTG, dNTP 和 *Taq* 酶等购自宝生物工程 (大连) 有限公司; LB 培养基、Trizol 抽提试剂, 购自 Invitrogen life technologies; 6 nt 随机引物、*EcoI*、*EcoRI* 购自上海生物工程公司; Mo-MLV 反转录酶、RNasin、pGEM-Teasy vector 和琼脂糖购自 Promega 公司; *E. coli* 菌种 DH5 $\alpha$  为本室保存。PBS、1% 鸡红细胞按 OIE 标准方法自制。

### 1.2 引物设计

依据 GenBank 上公布的 NDV 基因序列, 针对 *F*、*HN* 基因核苷酸序列两端的保守区域运用 Oligo6.0 引物设计软件设计引物, 由上海生物工程公司合成。引物序列见表 1。

表 1 *F* 和 *HN* 引物序列

Table 1 Primers for amplifying the *F* and *HN* genes

| 引物名称<br>Primer | 引物序列 (5'-3')<br>Primer sequence | 位置<br>Position | 片段大小/bp<br>Expected size |
|----------------|---------------------------------|----------------|--------------------------|
| F1             | GTTAGAAAAAACACGGGTAGAAGA        | 4 486-4 509    | 975                      |
| F2             | TCCAAATAGGTGGCACGCATA           | 5 440-5 460    |                          |
| HN1            | GATCAGATGAGAGCCACTACAA          | 6 182-6 204    | 2 267                    |
| HN2            | GATAGATGTGACTCTGGTAGGAT         | 8 425-8 448    |                          |

### 1.3 病毒 RNA 提取和基因片段的扩增

取 250  $\mu$ L 分离株病毒的尿囊液, 按照 Invitrogen 公司 Trizol 试剂使用说明书流程提取病毒全基因 RNA。RT 反应体系: 17  $\mu$ L 病毒 RNA 悬液, 1  $\mu$ L 50 pmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 的 6 碱基随机引物, 70  $^{\circ}$ C 水浴 10 min 后立即冰浴 5 min, 依次加入 5  $\mu$ L 5 $\times$  反转录 buffer, 1  $\mu$ L dNTP (10 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>), 0.5  $\mu$ L 反转录酶 MLV, 0.5  $\mu$ L RNasin, 42  $^{\circ}$ C 反应 60 min, 于 95  $^{\circ}$ C 下 5 min 灭活反转录酶。*F* 和 *HN* 基因片段一起扩增, PCR 扩增体系: 2.5  $\mu$ L 10 $\times$  *Taq* DNA 聚合酶缓冲液, 0.5  $\mu$ L dNTPs, 0.5  $\mu$ L *Taq* DNA 聚合酶 (5 U  $\cdot$   $\mu$ L<sup>-1</sup>), 上、下游引物各 0.5  $\mu$ L, 1.5  $\mu$ L cDNA, 灭菌超纯水加至 25  $\mu$ L; PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 3 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 55  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 2 min, 5 个循环; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 58  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 2 min, 20 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。

### 1.4 基因片段的克隆转化和序列分析

取 PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳检查结

果。PCR 产物的回收按 Agarose Gel DNA Purification Kit 说明书进行, 将纯化后的产物按 pGEM-T easy Vector 说明书进行连接和转化, 转化感受态大肠杆菌, 经 AIX 平板筛选阳性克隆, 常规方法提取质粒, 用 *EcoRI* 进行酶切鉴定。

每个样品挑取 3 个阳性克隆, 送至上海生物工程有限公司进行测序。测序片段经比对分析后进行拼接, 应用 DNASTar 软件对测定基因编码区的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列与 GenBank 上已发表的序列进行比对分析, 并构建系统进化发生树。

## 2 结果

### 2.1 病毒分离

2008 年在江苏地区共分离到 16 株基因 VII d 亚型 NDV, 序列分析表明: 其中有 5 株 NDV 在 *HN* 的线性表位发生了 E347K 突变 (表 2)。

表 2 16 株基因 VII d 亚型 NDV 的具体信息

Table 2 Details of 16 subgenotype VII d NDVs

| F 基因登录号<br>Accession number<br>of F gene | HN 基因登录号<br>Accession number<br>of HN gene | 分离株<br>Isolations | 宿主<br>Host | 裂解位点<br>Cleavage site | 线性表位(345-353 bp)<br>Linear epitope<br>(Residues 345 to 353) |
|--|--|-------------------|------------|-----------------------|---|
| GQ245805                                 | GQ245860                                   | SY-1-08-Ch        | Chicken    | RRQKRF                | PDEQDYQIR   |
| GQ245782                                 | GQ245837                                   | DT-3-08-Ch        | Chicken    | RRQKRF                | PDGQDYQIR   |
| GQ245802                                 | GQ245839                                   | HA-4-08-Ch        | Chicken    | RRQKRF                | PDGQDYQIR   |
| GQ245791                                 | GQ245846                                   | SN-5-08-Ch        | Chicken    | RRQKRF                | PDGQDYQIR   |
| GQ245784                                 | GQ245857                                   | SN-6-08-Ch        | Chicken    | RRQKRF                | PDKQDYQIR   |
| GQ245810                                 | GQ245865                                   | XZ-7-08-Ch        | Chicken    | RRQKRF                | PDEQDYQIR   |
| GQ245812                                 | GQ245867                                   | XZ-9-08-Ch        | Chicken    | RRQKRF                | PDKQDYQIR   |
| GQ245798                                 | GQ245853                                   | CZ-10-08-Ch       | Chicken    | RRQKRF                | PDEQDYQIR   |
| GQ245806                                 | GQ245861                                   | XY-11-08-Ch       | Chicken    | RRRKRKRF              | PDEQDYQIR   |
| GQ245814                                 | GQ245869                                   | XZ-12-08-Ch       | Chicken    | RRQKRF                | PDEQDYQIR   |
| GQ245815                                 | GQ245870                                   | XZ-13-08-Ch       | Chicken    | RRQKRF                | PDEQDYQIR   |
| GQ245807                                 | GQ245862                                   | XY-14-08-Ch       | Chicken    | RRQKRF                | PDKQDYQIR   |
| GQ245819                                 | GQ245874                                   | ZJ-17-08-Ch       | Chicken    | RRQKRF                | PDEQDYQIR   |
| GQ245800                                 | GQ245855                                   | JS-18-08-Go       | Goose      | RRKKRF                | PDEQDYQIR   |
| GQ245803                                 | GQ245858                                   | SN-19-08-Ch       | Chicken    | RRQKRF                | PDKQDYQIR   |
| GQ245804                                 | GQ245859                                   | SN-20-08-Ch       | Chicken    | RRQKRF                | PDKQDYQIR   |

## 2.2 F 基因序列分析

应用 Lasergene 7.0 软件对分离株和从 EM-BL/GenBank 选取代表性毒株的 F 基因(47-420 nt)进行比较,绘制了系统进化发生树(见图 1)。XY-11-08-Ch 和 JS-18-08-Go 的 F0 蛋白裂解位点序列分别为<sup>112</sup>R-R-R-K-R-F<sup>117</sup>和<sup>112</sup>R-R-K-K-R-F<sup>117</sup>,其余均为<sup>112</sup>R-R-Q-K-R-F<sup>117</sup>。七肽重复序列(HR)、信号肽区以及抗原表位-关键氨基酸位点高度保守。

## 2.3 HN 基因序列分析

分析分离株 HN 编码氨基酸序列发现:HN 基因编码的氨基酸长度均为 571 aa;13 个半胱氨酸残基和神经氨酸酶活性部位完全保守;119、341、433 和 481 位 4 个糖基化位点完全保守,除 XZ-7-08-Ch、XY-11-08-Ch 和 CZ-10-08-Ch 3 株病毒外,其余 13 株 NDV 在 508 位均具有糖基化位点,16 株 NDV 均缺失 538 位糖基化位点;HN 的受体结合部位相关区域(第 193-201、345-353、494、513-521 及 569 位氨基酸)除 345-353 位氨基酸外,其余 4 个区域在这 16 株 NDV 中完全保守。

另外,以分离株 HN 基因绘制的系统进化发生树(图 2)与根据 F 绘制的系统进化发生树基本一致,表明分离株中并不存在 F 和 HN 基因发生重组的 NDV。

## 3 讨论

目前,我国通过长期大剂量重复使用疫苗来预防和控制 ND,对 NDV 造成较大的免疫压力。NDV 囊膜表面的 F 和 HN 两个糖蛋白,容易经受选择压力的作用,导致 F 和 HN 基因在 NDV 的进化过程中发生点突变。F 蛋白裂解位点基序是 NDV 毒力的主要决定因素,所以 F 基因一直是 NDV 分子流行病学研究的首选基因<sup>[10]</sup>。本试验中,根据 F 基因绘制的遗传进化树与 HN 编码区绘制的遗传进化树相似,仅有个别毒株的位置发生细微变化。此结果表明 HN 基因的变化同样能代表 NDV 的进化规律和趋势,同时也表明分离株中并不存在 F 和 HN 基因发生重组的 NDV。

分析 F 和 HN 蛋白的氨基酸序列发现,很多重要的功能性氨基酸位点高度保守,暗示 NDV 没有发生大的变异。在 HN 蛋白上至少有 5 个受体结合相关区域,即第 193-201、345-353、494、513-521 及 569 位氨基酸<sup>[11]</sup>,其中 345-353 位氨基酸为线性表位<sup>[12]</sup>。值得注意的是 347 位氨基酸的变异。347 位氨基酸多数为 E,但也有突变为 G 或 K。作者实验室通过反向遗传操作技术以及 HN 蛋白单抗排谱试验推测 347 位点可能对单抗所针对的抗原决定簇的

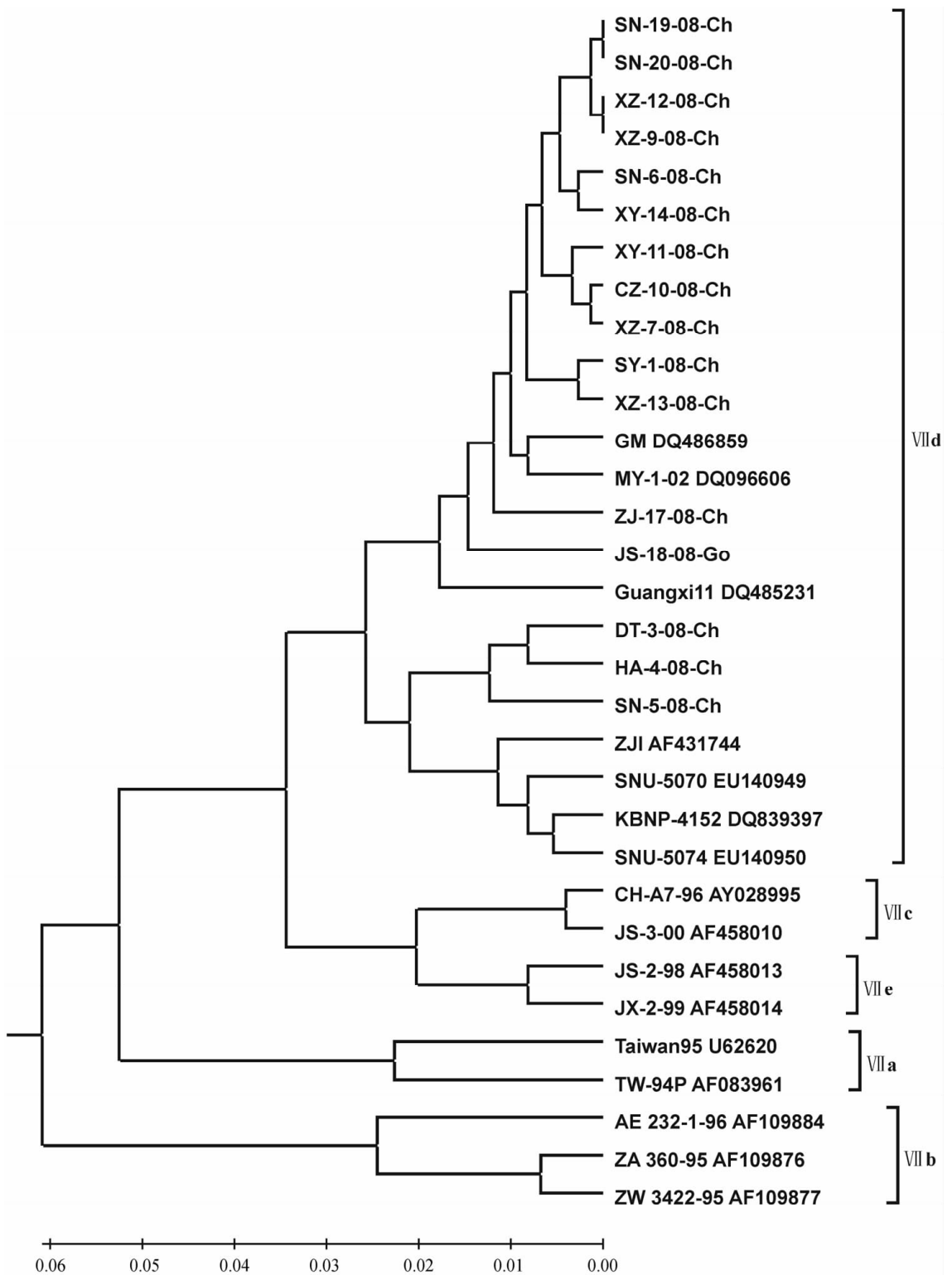


图 1 根据 F 基因 47-420 位核苷酸绘制的系统进化发生树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on nucleotide sequences of the F gene fragments (47-420 nt) of NDV strains

空间构象起决定性作用<sup>[13]</sup>。2007 年 Cho 等<sup>[14]</sup>报道了基因 VII d 亚型 NDV 变异株的存在,认为基因 VII d 亚型 347 位氨基酸发生 E→K 的突变与疫苗免疫相

关,并且发现这类变异株已成为韩国当前的主要流行毒株,给该国的养禽业造成了严重的经济损失。2007 年姚春峰等<sup>[13]</sup>对分离的 15 株基因 NDV 进行

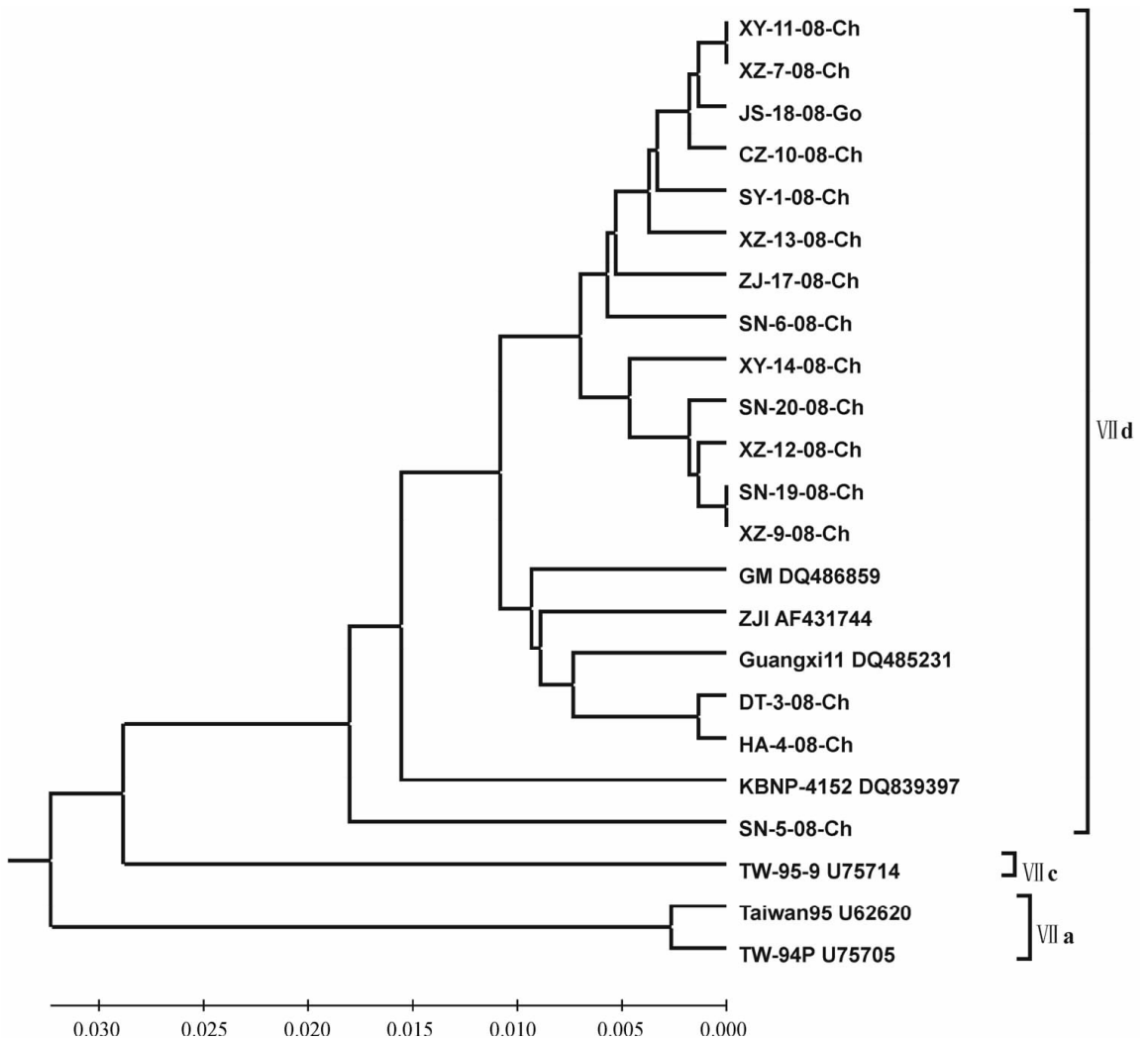


图2 根据HN基因编码区核苷酸绘制的遗传发生树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on nucleotide sequences of the coding regions of HN gene

了遗传变异分析,发现有3株NDV发生E347K突变,分离率为20%(3/15),而本研究中E347K变异株分离率为31%(5/16),说明此类突变株的分离量和分离率均呈上升趋势,这些变异株的出现与流行给当前ND的防控带来了新的挑战,同时研制具有针对性的新型疫苗也迫在眉睫。

#### 参考文献:

- [1] 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.
- [2] MAYO M A. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV [J]. *Arch Virol*, 2002, 147(8): 1655-1663.
- [3] PEETERS B P H, DE LEEUW O S, KOCH G, et al.

Rescue of NDV from cloned cDNA: evidence that cleavability of fusion protein is a major determinant for virulence [J]. *J Virol*, 1999, 73(6):5001-5009.

- [4] KATTENBELT J A, STEVENS M P, GOULD A R, et al. Sequence variation in the Newcastle disease virus genome [J]. *Virus Res*, 2006, 116(1-2):168-184.
- [5] HUANG Y, WAN H Q, LIU X F, et al. Genomic sequence of an isolate of Newcastle disease virus isolated from an outbreak in geese: a novel six nucleotide insertion in the non-coding region of the nucleoprotein gene [J]. *Arch Virol*, 2004, 149(7):1445-1457.
- [6] KRISHNAMURTHY S, SAMAL S K. Nucleotide sequences of the trailer, nucleocapsid protein gene and intergenic regions of Newcastle disease virus strain Beaudette C and completion of the entire genome sequence [J]. *J Gen Virol*, 1998, 79:2419-2424.

- [7] LIU X F, WAN H Q, NI X X, et al. Pathotypical and genotypical characterization of strains of Newcastle disease virus isolated from outbreaks in chicken and goose flocks in some regions of China during 1985-2001 [J]. *Arch Virol*, 2003, 148(7):1387-1403.
- [8] ALEXANDER D J. Newcastle disease and other avian Paramyxoviridae infections [M]// Calnek B W. Disease of Poultry. 10th edition. Ames: Iowa State University Press, 1997:541-569.
- [9] 梁 荣, 曹殿军, 阎丽辉, 等. 新城疫病毒分离株的蚀斑纯化及影响蚀斑形成的主要因素[J]. 中国兽医学报, 2003, 23(6):533-535.
- [10] 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):239-257.
- [11] TOYODA T, SAKAGUCHI T, HIROTA H, et al. Newcastle disease virus evolution II. Lack of gene recombination in generating virulent and avirulent strains [J]. *Virology*, 1989, 169(2):273-282.
- [12] IORIO R M, GLICKMAN R L, RIEL A M, et al. Functional and neutralization profile of seven overlapping antigenic sites on the HN glycoprotein of Newcastle disease virus: monoclonal antibodies to some sites prevent viral attachment [J]. *Virus Res*, 1989, 13(3):245-261.
- [13] 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):1-7.
- [14] CHO S H, KWON H J, KIM T E, et al. Variation of a Newcastle disease virus Hemagglutinin-Neuraminidase linear epitope [J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(4):1541-1544.