

华南地区新城疫病毒 HN 基因的克隆及其系统发育分析*

贺东生, 秦智锋, 刘福安

(华南农业大学动物医学系, 广州 510642)

Study on the HN Gene Cloning of NDV Isolates in South China and their Phylogenesis

HE Dong-sheng, QIN Zhi-feng, LIU Fu-an

(Vet Dept., South China Agricultural University, Guangzhou, 510642, China)

Abstract: Three HN genes of NDV isolates from South China were amplified by one-step RT-PCR. They were subsequently cloned and sequenced. The Phylogenesis of these NDV isolates was also studied. The gene types of South China NDV strains were found to be separated from those of Euro-American NDV strains exhibiting farther genetic distance. NDV isolates from Taiwan Province belonged to the same gene type as those from Mainland China. However, one of the Chinese NDV strain, FS1, belonged to none of these gene types. Significantly, a paramyxovirus strain, named GPMV that was isolated from Guangdong Province, had a rather close genetic relationship with FS2 strain that was isolated from chicken in Guangdong.

Key words: Newcastle Disease Virus; HN gene; Phylogenesis

摘要: 用 RT-PCR 一步法扩增了华南地区 NDV 野毒 HN 基因, 并对其中的 3 株的 HN 基因 897bp 片段进行了克隆、测序及同源性分析。本试验还对该毒株的系统发育情况进行了分析: 中国华南地区 NDV 各毒株与欧美国家 I 至 V 基因型明显分离, 遗传关系较远。台湾省的 NDV 各毒株归属为一型, 并且与华南株的遗传距离较近。NDV 华南 FS1 株不能归类到任何一个基因型中。广东地区从鹅群中分离到的副粘病毒 GPMV 株与我们从鸡体中获得的 NDV FS2 株有很近的亲缘关系。

关键词: 新城疫病毒; HN 基因; 系统发育

中图分类号: S855.31 **文章标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2002)02-0163-03

新城疫病毒(Newcastle Disease Virus, NDV)是引起鸡的急性高度接触性和毁灭性的疾病。NDV 属于副粘病毒科, 有囊膜。其基因组属单股负链(ss-)RNA 结构, 不分节段。NDV 编码的其中二种糖蛋白, 即融合蛋白(F 蛋白)和血凝素-神经氨酸酶(HN 蛋白), 与其致病作用密切相关。HN 蛋白使病毒粒子能够吸附细胞受体, F 蛋白则负责病毒的融合穿透^[1]。HN 基因的系统发育分析是 NDV 分子流行病学的重要研究内容, 对新城疫的防治不仅有理论指导意义, 更有实际的应用价值。国内已开始对此进行研究并取得了一些进展, 如曹殿军等^[2]克

隆了我国标准强毒 F48E9 株的 HN 基因并进行了测序等。本研究对我国华南地区的 NDV 地方强毒株进行了克隆和测序, 并对其基因系统发育情况与国外的毒株做了初步的比较和分析。

1 材料与方法

1.1 病毒

NDV 华南地区分离的强毒株多株, 由本系禽病室分离和保存。

1.2 引物

参照已发表的 NDV HN 基因序列设计引物。

收稿日期: 2001-08-28, 修回日期: 2001-10-11

* 基金项目: 广东省自然科学基金资助(980160)

作者简介: 贺东生(1968-), 男, 博士。主要从事兽医分子病毒学及基因工程疫苗研究。现在美国作博士后。E-mail: drhe@21cn.com

P1:TCGAATTCTGCAGTGTGAGTGCTACT.

Tm3 = 49°C, Tp3 = 61.4°C

P2:GCGTCGACCTTGACAACCTTTAAAACA.

Tm4 = 41°C, Tp4 = 55.6°C

前两个碱基为保护性碱基, GAATTC 为 *EcoRI* 酶切位, GTCGAC 为 *Sal I* 的酶切位点。PIP2 跨幅 897bp。

1.3 NDV RNA 的提取

选取 NDV 病鸡的肝脏、脾脏, 剪碎, 研磨, 加入 10 倍的无菌生理盐水稀释, 经 0.22 微米滤膜除菌后, 接种 9d 龄的 SPF 鸡胚, 3d 后收获尿囊液。-20°C 保存备用。

1.4 RT-PCR

参照 B.M 公司的 one-step RT-PCR Kit 说明进行。按 50μl 反应体系进行 RT-PCR: 45°C 反转录 2h, 加 50μL 石蜡油, 94°C 120s 灭活逆转录酶, 于 PCR 扩增仪上进行如下扩增: 94°C 60s, 55°C 45s, 72°C 120s。

重复 35 循环后, 72°C 延伸 600s。

1.5 HN 基因的分子克隆

将 RT-PCR 扩增的片段 50μl 于 50V 电泳 30min, 于紫外灯下切下目的条带, 按 RESNcolumn™琼脂糖 DNA 纯化系统的说明, 回收目的片段, 经无水乙醇沉淀后加水 15μL 溶解。将此纯化的 PCR 产物按 BM 公司试剂盒的说明进行加尾并和 pGEM-T Easy Vector 进行连接反应。4°C 连接 24h 后, 取 3μL 反应液转化 DH5α 大肠杆菌, 在同时含 Amp (200mg/mL), X-gal (750μg/mL) 和 IPTG (800μg/mL) 的培养板上涂布转化菌。培养过夜后, 挑取白色菌落, 用碱抽提法提取质粒 DNA, 进行电泳初步筛选和酶切鉴定。

1.6 序列测定和 NDV 系统发育分析

将阳性克隆转化菌的质粒交由上海基康公司测序, 用 DNASIS 软件包将所测序列与发表的 NDV LaSota 等毒株的核苷酸及氨基酸序列进行同源性比较, 并分析其系统发育状况。

2 结果

2.1 RT-PCR 一步法扩增 NDV HN 基因

从接种病毒收获得的 0.5ml 尿囊液中抽提新城疫病毒 RNA, 经 RT-PCR 扩增出一条特异性条带, 长度约为 900bp, 片断大小与预期结果相符。

2.2 NDV 的克隆与酶切

通过电泳初步筛选和酶切鉴定, 分别获得了 3 株插入了 NDV HN 基因的阳性菌落。

2.3 HN 基因序列测定和 NDV 的系统发育

3 株 NDV 的 HN 基因部分序列分别被测定, 其中的 NDV WS2 株的 HN 基因核苷酸及其编码的氨基酸序列如图 1。

用 DNASIS 软件包分析并获得了 NDV 广东地方毒株的系统发育树, 结果见图 2。根据 DNASIS 软件比较各毒株的核苷酸序列间的交互关系及其节点评估, 我们分析了华南地区新城疫病毒强毒株的系统发育树图, 从中可以发现, 与欧美国家的 I 至 V 基因型不同, 中国 NDV 株明显地归类在另一基因型中, 部分毒株与台湾毒株的亲缘关系较近。

3 讨论

获得病毒基因的常规方法通常较为复杂, 有些还需要进行多次超速离心和梯度离心, 耗费也较大, 我们的研究表明, 可以直接用含病毒的尿囊液经 RT-PCR 一步法扩增 NDV 的 HN 基因, 省时且耗费低, 值得推广应用。

用 T 载体和加尾法可以快速克隆 PCR 产物, 酶切鉴定也非常方便。该方法成功率高且快速, 相信将有越来越多的人采用该方法进行基因克隆。

```

CCCTTAATGTTGGATAAGTTGTGCTCTAAAGTCACGAAACTGAGGAAGAAGATTATAAT
P L M L D K L C S K V T E T E E E D Y N
TCAGTTATCCCCACACCAATGGTACATGGGAGGCTGGGTTTGACGGCAATACCATGAG
S V I P T P M V H G R L G F D G G Q Y H E
AAGGACCTGGATGTCGCAACATJATTTGGGACTGGGTGGCAATTACCCGCGGTGGGA
K D L D V A T L F G D W V A N Y P G V G
CGAGGGTCTTTTATTGACAACCGGATGGTTCGCCAGTGTATGGAGGGCTAAAACCCAAT
G G S F I D N R V W F P Y Y G G L K P N
TGGCCTAGTGACACTGCAGAAGAGGGGAGATATGTAATATAACAAGGGTACAATGACACA
S P S D T A Q E G R Y V I Y K R Y N D T
TGCCAGATGAGCAAGACTACCAGATTGGATGGCTAAGTCTTCATATAAGCCTGGGGG
C P D E Q D Y Q I R M A K S S Y K P G R
TTTGGTGGGAAACGGGTACAGCAGGCCATCCATCCATCAAGGTATCAAGATCGTTGGGT
F G G K R Y Q Q A I L S I K V S T S L G
GAGGACCGGGTGTGACTGTACCGCCCAACACAATCACACTTATGGGGCCGAAGGCAGA
E D P V L T V P P N T I T L M G A E G R
GTTCTCACAGTAGGGACATGCTATTTCTTTTACGACGAGGGTATCATAGTCTGTCGCC
V L T V G T S H F F Y Q R G S S Y F S P
GGCTTATTATGCCCTATGACAGTCGACAATAAAACAGCCAGCTCTTCATAGTCCTTATGCA
A L L Y P M T V D N K T A T L H S P Y A
TTCAATGCTTTCACCTCGGCGAGGTAGTGTCCCTTCCAGGCTTCAGCCAGATGCCCTAAC
F N A F T R P G S V P C Q A S A R C P N
TGTGTGTTACTGGAGTGTACACTGATCCATACCCCTTAGTCTTCATAGGAAGCCACAGT
S C V T G Y Y T D P Y P L V F H R N H T
TTGCGAGGGGATTCGGGACAATGCTTGATGATAAACAAGC -3'
L R G V F G T M L D D K Q T
    
```

图 1 NDV WS2 株的 HN 核苷酸序列(821-1585)和氨基酸序列
Fig 1 Nucleotide and Amino Acid sequence of HN gene of NDV WS2 strain

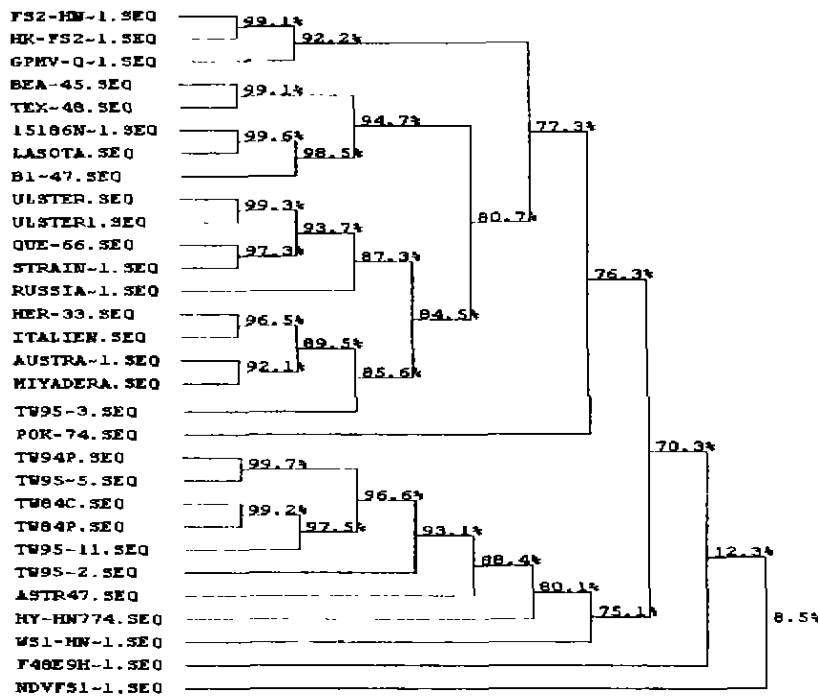


图 2 NDV 广东地方毒株的系统发育树

Fig 2 Phylogenesis Analysis of NDV strains in South China

利用 NDV 不同的基因序列研究它们之间的演化关系,已有多人进行尝试^[6]。无论是用 F 基因、M 基因、HN 全基因或是 HN 的 382bp 基因,所得到的遗传进化树结果都大致相同。我们使用 782bp 的 HN 基因所获得的基因演化树同台湾和国外学者发表的结果也一致。

我们的研究资料显示:中国(华南)地区 NDV 各毒株与欧美国家的 I 至 V 基因群明显分离,遗传进行规律较远。但中国 NDV 毒株存在有二个分支,其中一支 FS1/95 不能归类到任何一个基因群当中。台湾省 NDV 各毒株归属为一组,并且与中国毒株的遗传距离较近。我们推测中国 NDV 毒株与其他许多亚洲毒株一样,可能早已存在,并且从来未能被扑灭,随着时间的推移而不断衍生出新的病毒株。这与台湾学者谢快乐的结论相似^[3]。但该结论尚待进一步确证。

值得注意的是,从广东地区鹅群中分离到的副粘病毒 GPMV 株与我们从鸡体中获得的 NDV FS2 有相近的亲缘关系。它们之间的关系值得进一步研究。

参考文献

[1] 曹殿军,刘春丽,王莉林. NDV/F48E9 株 HN 基因的克隆与酶

切分析[J]. 中国兽医学报,1997, 17(4): 326-330.
 [2] 贺东生,秦智锋,刘福安. 禽副粘病毒 1 型(APMV-1)系统发育分析及强弱毒株的鉴别诊断[J]. 动物医学进展,2000, 121(2):27-31
 [3] 杨程尧,张伯俊,谢快乐. 台湾地区新城疫病毒之间基因序列及演化图谱分析[A]. 第二届海峡两岸禽病防治研讨会论文集[C]. 广州,1997,114-117
 [4] Oberdorfer A, Werner O. Newcastle Disease virus: Detection and characterization by PCR of recent German isolates differing in pathogenicity[J]. Avian Pathology, 1998, 27:237-243.
 [5] Lomnicz B, Wehmann E, Herzeg J. Newcastle Disease outbreaks in recent years in novel genotype[J]. Archives of Virology 1998 143:49-64.
 [6] King J D, Seal B S. Biological and molecular characterization of NDV field isolate with comparisons to reference NDV strains[J]. Avian Disease. 1998. 42:507-516
 [7] He D, Liu F. Studies on the expression of Newcastle Disease Virus F protein polypeptide and its differentiate application [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2000, 31:224-228
 [8] Collins M S, Sally F, Strong I. Antigenic and phylogenetic studies on a variant NDV using anti-fusion protein monoclonal antibodies and partial sequencing of fusion protein gene[J]. Avian Pathology, 1998 27:90-96
 [9] Stram Y, Shchorr D, Chintch Y. Molecular characterization of an unassigned Israel NDV isolate[J]. Avian Disease, 1998, 42: 746-751.