

鸚鵡源 I 型禽副粘病毒 *F* 和 *HN* 基因序列测定与分析

赵文华, 宋建领, 朱建波, 信爱国, 王金萍, 李志华, 张念祖

(云南省热带亚热带动物病毒病重点实验室, 云南昆明, 650224)

Sequencing and Analysis on the *F* and *HN* Genes of *Avian paramyxovirus* Type I Isolated from Parrot

ZHAO Wen-hua, SONG Jian-ling, ZHU Jian-bo, XIN Ai-guo, WANG Jin-ping, LI Zhi-hua, ZHANG Nian-zu
(Yunnan Province Tropical and Subtropical Animal Virus Disease Laboratory, Kunming 650224, China)

Abstract: Virion RNA was abstracted from purified type I *Avian paramyxovirus* strain YN-PA01 (isolated from parrot) and used as a template. The fragment containing the fusion gene (*F*) and hemagglutinin-neuraminidase gene (*HN*) of the isolate was amplified by RT-PCR and cloned to the pMD 18-T Vector. Using primer walking method the complete sequence of *F-HN* genes was obtained finally. And the respective amino acid sequence was deduced. Through relative software the phylogenetic trees on *F* gene and *HN* gene were constructed between strain YN-PA01 and reference strains. The results showed that strain YN-PA01 comparing with reference strains displays 98.7%~83.2% nucleotide homology and 98.1%~86.2% amino acid homology on *F* gene; 97.4%~79.1% nucleotide homology and 97.2%~83.2% amino acid homology on *HN* gene. Additional 6 amino acids are encoded by the *HN* gene ORF of strain YN-PA01 comparing with national reference strains. The studied strain YN-PA01 exhibits highest identities with strain JS/5/01/Go either analyzed on *F* gene or *HN* gene.

Key words: *Avian paramyxovirus*; RT-PCR; *F-HN* gene; Sequencing

关键词: 禽副粘病毒; RT-PCR; *F-HN* 基因; 序列测定

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2003) 04-0394-03

禽副粘病毒 (*Avian paramyxovirus*, APMV) 属于副粘病毒科、副粘病毒亚科、腮腺炎病毒属, 现已确定有 9 个血清型 (APMV-1~9)。APMV-1 血清型是禽类最重要的致病型, 几乎所有禽种均对其敏感^[1]。该病毒是一种有囊膜的单股负链 RNA 病毒, 由囊膜、核衣壳和核酸组成; 基因组全长约 15kb, 编码两种囊膜糖蛋白 (HN 蛋白和 F 蛋白) 和四种结构蛋白-基质蛋白 (M 蛋白)、核衣壳蛋白 (NP 蛋白)、磷蛋白 (P 蛋白)、大蛋白 (L 蛋白), 此外还编码两种非结构蛋白 (36ku 和 33ku 蛋白)^[2]; 各结构蛋白基因在基因组上的排列顺序为 3'-NP-P-M-F-HN-L-5'^[3]。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; F 糖蛋白则参与病毒的穿透、细胞融

合和溶血等作用。F 蛋白和 HN 蛋白具有良好的免疫原性, 用真核细胞表达系统表达的 F 蛋白和 HN 蛋白免疫动物后, 对强毒的攻击具有一定保护作用, 因此两者常被用作研制基因工程疫苗的目的基因^[4,5]。本文根据 GenBank 下载的序列, 合成引物, 就在云南省分离到的一株鸚鵡副粘病毒 (编号 YN-PA01), 应用 RT-PCR 技术扩增 *F-HN* 基因全长序列, 并将其克隆至 T 载体上, 然后使用引物步移法 (primer walking) 进行序列测定, 最后得出 *F-HN* 基因全核苷酸序列。现将整个试验过程简报如下。以期试验结果能为副粘病毒的相关研究提供一定的理论依据。

1 材料和方法

收稿日期: 2003-01-03, 修回日期: 2003-03-18

作者简介: 赵文华 (1974-), 女, 山东高唐县籍, 助理研究员, 硕士, 从事动物分子病毒学方面的研究。E-mail: wenhuazhao505@sohu.com

1.1 病毒、菌种和克隆载体

所用病毒株为我重点实验室禽病室分离获取, 编号为 YN-PA01; 所用的菌种为大肠埃希氏菌 DH5 α , 由本实验室保存; 克隆载体为 pMD 18-T Vector, 购自大连宝生物公司。

1.2 酶和其他试剂

RNA PCR Kit 及 Premix Taq 酶均购自大连宝生物公司; TRIzol 试剂、胶回收试剂盒及小量柱式质粒纯化试剂盒, 均购自上海华舜公司。Thermo Sequenase Cy5 Dye Terminator kit 测序试剂盒及 ReproGel Long Read 胶购自 Amersham Pharmacia 公司; 氯仿、异丙醇等其他试剂均为分析纯试剂。

1.3 主要仪器和设备

9600 型 PCR 仪, 紫外-可见一次成像仪, CO₂ 培养箱, ALFexpress II DNA 测序仪等。

1.4 YN-PA01 毒株 *F*-*HN* 基因的 RT-PCR 及测序^[6-7]

根据 GenBank 下载的 *F*、*HN* 基因序列, 设计 1 对引物。

引物 1(P1)5'-TGCAAGATGGGCYCCARAYCTTC TAC-3',

引物 2 (P2)5'-GCCGGTWYTCRGTGGTTGATTC -3'

引物由大连宝生物公司合成。其中 F1 作为反转录引物。扩增片段长约 3700bp, 先对此长片段克隆测序, 然后根据所测序列再合成引物, 进行 RT-PCR 扩增、克隆、测序, 如此循环直至全长序列测出。

1.5 *F*、*HN* 基因编码的氨基酸序列推导

应用 DNAsis 软件, 由 *F*、*HN* 基因核苷酸序列推导出相应的氨基酸序列。

1.6 遗传进化树的构建

用 DNAsar 系列软件来处理数据, 进行进化树的构建。

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增及测序

用所合成引物扩增 YN-PA1 毒株可得 3700bp 扩增带, 与预期条带基本相符合。将其与 pMD18-T 载体连接, 成功克隆。然后进行测序, 再合成引物, PCR, 克隆, 测序, 经几个循环最后得出 *F*-*HN* 基因全长序列。GenBank 登录号为 AY253912。

2.2 YN-PA01 毒株与部分参考毒株的比较

从表 1 及表 2 比较可看出所研究毒株 YN-PA01 与参考毒株 JS/5/01/Go 核苷酸同源性最高, *F* 基因同源性为 98.7%, *HN* 基因同源性为 97.4%; 氨基酸同源性分别为 98.1% 和 96.8%。而与传统毒株 (疫

苗毒株) 如 Lasota、B1 和 F48E9 等同源性较低。

表 1 YN-PA01 毒株与部分参考毒株 *F* 基因序列同源性
Table 1 Homology comparison of *F* gene between YN-PA 01 strain and partial reference strains

GenBank Accession no.	Virus Strain(Origin)	Nucleotide homology(%)	Amino acid homology(%)
AF456422	JS/5/01/Go (China)	98.7	98.1
AF431744	ZJ/1/00/Go(China)	98.6	97.4
AF358787	CH/99/Fowl(China)	98.4	97.8
AF358788	CH/00/Fowl(China)	98.1	98.0
	YN-C1/01/Fowl(China)	96.5	95.8
AF358786	TW/2000/Fowl(China)	96.6	97.1
AF162714	GPMV/QY97-1(China)	97.6	97.1
U62620	TW/95/Fowl(China)	94.1	95.6
AF079172	F48E9(China)	86.2	89.7
AF077761	Lasota(Russia)	83.5	86.6
AF309418	B1(USA)	83.6	86.2

表 2 YN-PA01 毒株与部分参考毒株 *HN* 基因序列同源性
Table 2 Homology comparison of *HN* gene between YN-PA 01 strain and partial reference strains

GenBank Accession no.	Virus Strain(Origin)	Nucleotide homology(%)	Amino acid homology(%)
AF456434	JS/5/01/Go(China)	97.4	96.8
AF456431	JS/3/98/Go(China)	97.4	97.2
AF456430	JS/1/98/Go(China)	97.3	96.5
AF431744	ZJ1/Go(China)	96.3	97.0
AF456433	GD/1/98(China)	94.7	95.9
AF204872	NL-96(China)	94.3	95.2
AF140344	NL-NDV(China)	94.3	95.1
AF192406	GPMV/QY97(China)	87.9	92.6
AY034892	F48E9(China)	82.1	86.1
Y19020	Lasota(Russia)	79.7	83.3
AF309418	B1(USA)	79.9	83.5
AF098289	Clone30(Spain)	79.1	83.2

2.3 遗传进化树的构建

从图 1 和图 2 可见, YN-PA01 毒株通过与参考毒株 *F* 基因的比较, 应属基因 VII 型^[8]。是近年中国一流行基因型毒株。

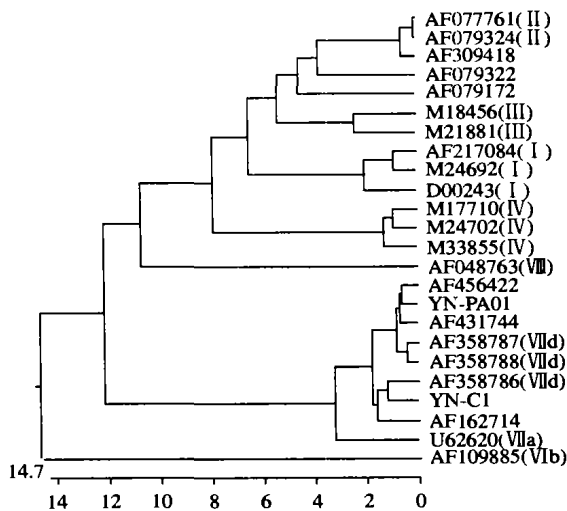


图 1 YN-PA1 毒株与参考毒株所建 *F* 基因核苷酸同源关系树
Fig.1 Nucleotide sequence phylogenetic comparison of complete *F* gene of the YN-PA01 strain with reference strains

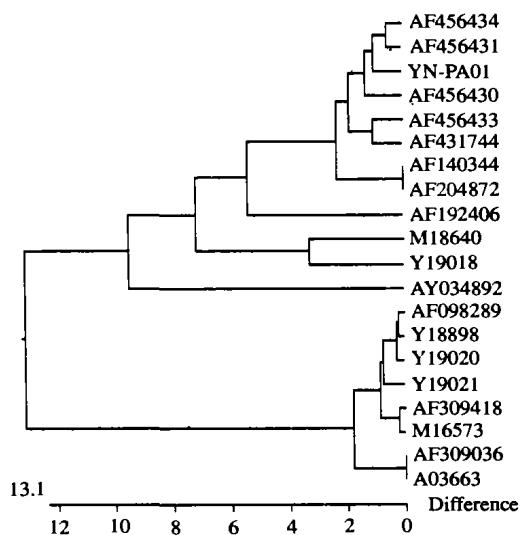


图 2 YN-PA1 毒株与参考毒株所建 *HN* 基因核苷酸同源关系进化树
Fig.2 Nucleotide sequence phylogenetic comparison of complete *HN* gene of the YN-PA01 strain with reference strains

3 讨论

无论自 *F* 基因分析还是 *HN* 基因分析都表明所

研究毒株与传统的疫苗株同源关系都比较远,而与江苏、广东、浙江等地近年所分离的毒株呈现很高的同源性。这就提示常规疫苗株的制备应跟随副粘病毒的流行情况而做出相应的改变。本研究表明,在昆明已分离到基因 VII 型副粘病毒,其毒力待测。

通过比较 *F*、*HN* 基因编码区核苷酸长度发现,所研究 YN-PA01 毒株 *F* 基因 ORF 与参考毒株相等,均为 1662 个碱基,而 *HN* 基因 ORF 却较部分参考毒株多出 18 个碱基(编码 6 个氨基酸),与国外参考毒株 Beaudette C(AF309036), B1(AF 309418), BOR 82(M16573), Clone30(Y18898), Lasota (Y19020), SAH85(Y19021), A03663 *HN* 基因所编码的氨基酸数相同(577aa)。而目前在国内所报道的毒株序列中尚未发现这样的毒株,国内所报 *HN* 基因均编码 571 个氨基酸。本研究结果在国内尚属首次报道。

遗传进化树构建一般都是通过核苷酸的比较而建。但就可编码序列而言,比较氨基酸序列的同源性更确切些,毕竟最后在病毒中发挥作用的是蛋白质。当然对于非编码区序列的比较只能通过核苷酸序列的比较来构建遗传发生树。建议对于编码区序列的比较,采用氨基酸序列比较的方法。

参考文献

- [1] 刘华雷,王永坤,严维巍,等.禽副粘病毒 I 型(APMV-1)分子生物学研究进展[J].动物医学进展,2001,22(1):16-18.
- [2] 殷震,刘景华.动物病毒学[M].第 2 版.北京:科学出版社,1997,736-755.
- [3] Chambers P, Millar N S, Bingham R W, et al. Molecular cloning of complementary DNA to Newcastle disease virus, and nucleotide sequence analysis of the junction between the genes encoding the haemagglutinin-neuramidase and the large protein[J]. J Gen Virol, 1986, 67: 475-486.
- [4] 刘伟忠,吴艳涛,刘秀梵,等.新城疫病毒 F48E9 株血凝素-神经氨酸酶基因的克隆和鉴定[J].中国兽医科技,1997,27(6):16-17.
- [5] 苑纯秀,曹殿军,郭鑫,等.新城疫病毒 F48E9 株 F 基因主要功能区的核苷酸序列分析[J].中国预防兽医学报,1999,21(1):31-35.
- [6] 赵文华,朱建波,姚龙涛,等.鹅副粘病毒 HN 基因的克隆及核苷酸序列分析[J].中国兽医科技,2002,32(2):10-13.
- [7] 赵文华,朱建波,姚龙涛,等.鹅副粘病毒 F 基因的克隆测序及核苷酸序列分析[J].中国兽医学报,2002,22(6):544-546.
- [8] Li Yu, Wang Z, Jiang Y H, et al. Characterization of newly emerging newcastle disease virus isolates from the People's Republic of China and Taiwan[J]. Clin Microbiol, 2001, 39: 3512-3519.