

## 三株新城疫广西分离株全基因组序列的测定与分析\*

谢芝勋<sup>1\*\*</sup>, 唐小飞<sup>1</sup>, 董建宝<sup>2</sup>, 刘加波<sup>1</sup>, 庞耀珊<sup>1</sup>,  
邓显文<sup>1</sup>, 谢志勤<sup>1</sup>

(1. 广西兽医研究所, 广西南宁, 530001; 2. 广西大学动物科学技术学院, 广西南宁, 530005)

### Sequencing and Analysis of the Genomes of Three Newcastle Disease Viruses Isolated from Guangxi

XIE Zhi-xun<sup>1\*\*</sup>, TANG Xiao-fei<sup>1</sup>, DONG Jian-bao<sup>2</sup>, LIU Jia-bo<sup>1</sup>, PANG Yao-shan<sup>1</sup>,  
DENG Xian-wen<sup>1</sup>, XIE Zhi-qin<sup>1</sup>

(1. Guangxi Veterinary Research Institute, Nanning, 530001, China; 2. College of Animal Sciences and Technology, Guangxi University, Nanning, 530005, China)

**Abstract:** Eight pairs of specific primers were designed and synthesized based on the entire genomic sequence data of Newcastle Disease Virus (NDV) present in GenBank. Complete nucleotide sequences of GX7/02, GX9/03 and GX11/03 strains were acquired by reverse transcription-polymerase reaction. The entire genomic sequences of three NDV strains consisted of 15 192 nt, which was the same in length to 7 NDV ZJ1, U.S/Largo/71, Italy/2736/00 strains, but was 6 nt longer than LaSota, Clone-30 and B1 strains in GenBank. The additional 6 nt motif was located in the non-coding region of nucleoprotein (NP) gene between nucleotides 1647 and 1648 of the entire genomic sequences of NDV LaSota, B1 and Clone-30 strains. The results of identity analysis of nucleotide and amino acid sequences showed that the identities between GX7/02, GX9/03, GX11/03 and ZJ1 strains were higher than that of the three strains of LaSota, B1 and Clone-30.

**Key words:** Newcastle disease virus; Genome; Sequencing and analysis

**摘要:** 根据 GenBank 上所公布的新城疫病毒 (NDV) 的全基因组序列, 设计了 8 对引物, 运用 RT-PCR 方法获取了 3 株广西地方强毒株 GX7/02、GX9/03 和 GX11/03 的全基因组序列, 并对其进行了比较分析。此 3 株病毒的全基因组序列均由 15192 个碱基组成, 与 GenBank 公布的 ZJ1、U.S/Largo/71、Italy/2736/00 等 7 个毒株的全基因组序列长度相同, 比 LaSota、Clone-30 和 B1 的全基因组序列多出 6 个核苷酸, 此 6 个核苷酸位于 *np* 基因的非编码区内, 相对与 NDV 毒株 LaSota、Clone-30 和 B1 序列的 1647~1648nt 位。通过序列的比较分析, 发现 GX7/02、GX9/03 和 GX11/03 与 ZJ1 毒株的同源性较高, 而与 LaSota、Clone-30 和 B1 等毒株的同源性较低。

**关键词:** 新城疫病毒 (NDV); 全基因组; 测定与分析

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)03-0261-06

新城疫是由新城疫病毒 (*Newcastle disease virus*, NDV) 引起的一种烈性传染病, 它的发生常常给养禽业造成巨大的经济损失<sup>[1]</sup>。新城疫病毒为

副粘病毒科 (*Paramyxoviridae*)、副粘病毒亚科 (*Paramyxovirinae*)、腮腺炎病毒属 (*Rubulavirus*) 的成员之一, 为单股不分节段的负链 RNA 病毒<sup>[2]</sup>。其基

收稿日期: 2005-11-15, 修回日期: 2005-12-21

\* 基金项目: 广西科技攻关项目 (桂科攻 0235001-4); 广西留学基金项目 (桂科回 0236005); 广西水产畜牧局科研计划资助。

\*\* 通讯作者: 谢芝勋 (1963-), 男, 汉族, 广西博白籍, 研究员, 主要从事畜禽传染病及其分子生物学技术研究。

Corresponding author. Tel: 0771-3105702, E-mail: xiezhi-xun@126.com.

基因组长度约为 15kb, 包含 6 个基因: 3'-*np-p-m-f-hn-l-5'*, 分别编码 6 个主要蛋白质 (NP 蛋白、P 蛋白、M 蛋白、F 蛋白、HN 蛋白和 L 蛋白)<sup>[3]</sup>, 目前, GenBank 上已发表的 NDV 全基因组序列共有两种长度: 其中 ZJ1 (AF431744)、U.S/Largo/71 (AY562 900)、Italy/2736/00 (AY562989) 等 7 个毒株的全基因组序列长度为 15192bp; 其它毒株如 B1、LaSota、Clone-30 等为 15186bp。近年来, 随着 NDV 毒株 B1、LaSota、Clone-30、Beaudette C 以及 ZJ1 等全基因组序列先后被测定, 使人们在分子生物学领域对 NDV 的研究取得了较大的进展, 为运用反向遗传技术研究 NDV 分子生物学特性提供了依据, 也为基因疫苗的研制奠定了基础。

本实验室于 2002、2003 年分别从广西不同地区的大型规模化养鸡场分离到 3 株 NDV 野毒株 GX7/02、GX9/03 和 GX11/03, 经致病性测定以及对 *f* 基因的克隆测序, 证明为强毒株<sup>[4,5]</sup>。通过对 *f* 基因和 *hn* 基因的序列分析, 发现其抗原位点发生了一定的改变<sup>[5,6]</sup>。为了进一步研究这 3 株新城疫病毒的生物学特性, 从分子水平上揭示其生物学背景, 我们以 GenBank 上发表的 NDV 全基因组序列为依据, 以 ZJ1 等毒株为主要参考, 设计了 8 对引物, 采用 RT-PCR 方法扩增出其完整基因, 并将所得的全基因组序列与 GenBank 上发表的全基因组序列进行了比较和分析, 现将结果报告如下:

## 1 材料和方法

### 1.1 病毒

实验所用毒株 GX7/02、GX9/03 和 GX11/03 由笔者所在实验室分离鉴定和保存。通过 MDT、ICPI、ELD<sub>50</sub> 实验以及 *f* 基因和 *hn* 基因的克隆、测序及分析证明为强毒株<sup>[4-6]</sup>。

### 1.2 主要试剂

RT-PCR 试剂盒、PMD18-T 载体、凝胶回收试剂盒, 购自 Takara 公司; LB 培养基、Trizol 抽提试剂, 购自 Invotrizen 公司; 氨苄青霉素、*x-gal*、IPTG, 为 Promaga 公司产品。

### 1.3 病毒 RNA 的提取

按 Xie 等<sup>[7]</sup>方法, 取感染鸡胚尿囊液用 Trizol 抽提试剂进行 RNA 的抽提。

### 1.4 NDV 各基因组的扩增及克隆

1.4.1 引物的设计与合成: 参考 GenBank 已公布的 NDV 全基因组序列, 以鹅源新城疫病毒 ZJ1

(AF431744) 毒株的核苷酸序列为主要参考, 共设计了 8 对引物, 相邻扩增片段之间, 有部分核酸序列重叠, 引物覆盖整个 NDV 基因组, 由大连宝生物工程有限公司合成, 引物序列在表 1 中列出。

表 1 引物核苷酸序列

Table 1 The nucleotide sequences of the primers used in this study

Prime r	Sequence	Position	Gene	Length (bp)
1	ACCAAACAGAGAATC	1-16	<i>np</i>	1-1792
2	GACAGTCCCACTGGTCTC	1932-1949		
3	ACCCACCCGGGACAACACAGG	1736-1758	<i>p</i>	1764-
4	CGGGCTGTACTTTGATCTCG	3316-3335		3452
5	AAGTAGATGCATCCAGGTCA	3016-3035	<i>m</i>	3056-
6	TTGACGGCAGGCCTCTTGCAGCTG	4644-4665		4716
7	CCATCTCGACTGCTTATAGTTAGTT	4452-4477	<i>f</i>	4439-
8	AACAGAGTCGTGCTGGAGAA	6433-6452		6546
9	GACCTTGCTATGGCTTGGGAA	6150-6172	<i>hn</i>	6208-
10	GCAGAGCACCAGATCATCCTACCAGG	8441-8435		8453
11	ACGGGTAGGACATGGCGAGC	8376-8396	<i>l</i>	l1
12	GCAAGTTGGATTGCAGCAAT	10574-10594		
13	GACATATATATTGTCAGTGC	10505-10525		l2
14	TTGTCACTACTATTATGGC	12707-12727		
15	GTGGTTTCTTATGATGAAGA	12668-12688		l3
16	CCAAACAAAGATTTGGTG	15174-15192		

1.4.2 NDV 各基因的 cDNA 合成: 采用 20 $\mu$ L 的 cDNA 合成体系。在 0.2 ml 反应管中, 取溶于 DEPC 水的 NDV RNA 样品 5 $\mu$ L, 分别加入 50 pmol/ $\mu$ L 的随机引物 (Random 9 mers) 1 $\mu$ L, 10 倍 RT-PCR 缓冲液 2 $\mu$ L, 10 mmol/L 的 dNTPs 2 $\mu$ L, 40 U/ $\mu$ L 的 RNA 酶抑制剂 1 $\mu$ L, 5 U/ $\mu$ L AMV 反转录酶 1 $\mu$ L, 用无 RNase 的超纯水加至总体积为 20 $\mu$ L, 置于 PCR 仪中进行 cDNA 合成, 以 25 $^{\circ}$ C 10min, 42 $^{\circ}$ C 60min, 99 $^{\circ}$ C 5min, 4 $^{\circ}$ C 5min 的程序进行一个循环, 结束 cDNA 合成后, 进入 PCR 扩增。

1.4.3 NDV 各基因的扩增: 采用 100 $\mu$ L PCR 反应体系。在 PCR 反应管中分别加入: cDNA 4 $\mu$ L, 100 pmol/ $\mu$ L 的上、下游引物各 1 $\mu$ L, 5 $\times$  PCR Buffer 10 $\mu$ L, 10 mmol/L 的 dNTPs 2 $\mu$ L, 5 U/ $\mu$ L 的 Taq DNA 聚合酶 0.5 $\mu$ L, 灭菌超纯水加至 100 $\mu$ L, 置于 PCR 仪中进行 PCR 扩增。首先 95 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 然后进行以 94 $^{\circ}$ C 60s, 55 $^{\circ}$ C 45s (*f* 基因为 1min), 72 $^{\circ}$ C 90s 的 PCR 循环, 进行 35 个循环后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min, 4 $^{\circ}$ C 结束反应。取 PCR 产物 10 $\mu$ L, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳观察分析 PCR 产物。

1.4.4 PCR 产物的纯化、克隆、鉴定及序列测定: 取适量 PCR 产物于 12g/L 低熔点琼脂糖凝胶上电泳, EB 染色后, 在紫外观察仪上切割回收所需的片段, 然后按凝胶回收试剂盒操作说明纯化回收

PCR 产物。取适量经纯化回收的 PCR 产物, 按 pMD18-T 载体说明加入连接体系, 于 16℃连接过夜, 取 10 μL 连接产物转化 DH<sub>5</sub>α 大肠杆菌。挑取在含氨苄青霉素的 LB 培养基上长出的白色菌落, 少量培养, 用碱裂解法抽提质粒 DNA 进行 PCR 鉴定。阳性克隆菌由大连宝生生物技术有限公司进行测序。

### 1.5 NDV 其它毒株 np 基因的序列测定

用上述材料和方法对 2000 年至 2004 年本实验室从广西不同地区所分离的其它 8 株新城疫病毒的 np 基因进行克隆和测序。

### 1.6 全基因组及 f 基因编码区的序列比较

应用 DNASTAR 软件将上述 3 株 NDV 广西分离株的基因组序列与 GenBank 上所发表的其它 NDV 毒株的相应序列进行同源性比较, 并将分离株 f 基因编码区的核苷酸序列与 13 株 NDV 参考株的相应序列进行遗传进化分析, 绘制遗传进化树。

## 2 结果及分析

### 2.1 RT-PCR 扩增结果

8 对引物所扩增出的 np、p、m、f、hn、l 基因片段均与设计相符, 将测序所得结果用 DNASTAR 软件进行拼接, 所得 3 株 NDV 广西分离野毒株株 GX7/02、GX9/03 和 GX11/03 的全基因组序列长度均为 15192bp。与 GenBank 上所公布的 ZJ1(AF431-744)、U.S/Largo/71(AY562900)、U.S(ca)/1083(Fontana)/72(AY562988)、Italy/2736/00(AY562989)、U.S(ca)/211472/02(AY562987)、U.S(F1)/44083/93(AY562986)、Indonesia/14698/90 (AY562985) 7 株 NDV 的全基因组长度相同。

### 2.2 np 基因末端的核苷酸序列比较

将所测得 NDV 广西分离株 GX7/02、GX9/03 和 GX11/03 的全基因组序列与 GenBank 上公布 NDV 序列进行比较, 发现分离株比传统毒株 LaSota、B1 和 Clone-30 等 NDV 毒株的全基因组序列 (15186bp) 长 6nt, 多出的 6 个核苷酸都位于基因组的 np 基因末端的非编码区内, 相对于 LaSota、B1、Clone-30 毒株全基因组的 1647nt-1648nt 位。为了进一步验证广西分离株所多出的 6nt 在组成和位置上是否与其它全基因组长度为 15192bp 的毒株相同, 我们将这 3 个分离株和目前 GenBank 上所公布的全部 7 株全基因组序列长度为 15192bp 的毒株进行序列比较, 发现 GX7/02、GX9/03、GX11/03 和国内毒株 ZJ1 所多出的 6 个碱基位置和组成都相同, 都为 T-C-C-C-A-C。而与 6 个国外毒株无论在

位置上还是组成上都缺乏统一性。比较还发现 6 个国外毒株相对于 LaSota、B1、Clone-30 所多出的 6 个碱基在位置上和组成上也缺乏统一性, 毒株 U.S/Largo/71 和 U.S(ca)/211472/02 所多出的碱基位于 1647nt-1648nt, Italy/2736/00、U.S(ca)/1083 (Fontana)/72 所多出的碱基位于 1646nt-1647nt, Indonesia/14698/90 则位于 1645nt-1646nt, U.S(F1)/44083/93 位于 1644nt-1645nt, 所多出的 6 个碱基在组成上只有 U.S/Largo/71 和 U.S(ca)/211472/02 相同。比较结果见表 2。

表 2 NDV 毒株全基因组序列 1640~1660nt 之间的序列比较  
Table 2 Comparison of nucleotide sequences from 1640nt to 1660nt of the genomes

1640 ↓	1660 ↓	NDV strains
.....CGTAGTCG-----	ACCCCTC.....	LaSota, B1, clone-30
.....CAAAACCCCTCCC	ACACTCCCC.....	GX7/02,GX9/03,GX11/03
.....CAAACCTCTCCC	ACACTCCCC.....	ZJ1
.....CGAACCCCTCCCTCACTCCCC.....		U.S/Largo/71,U.S(ca)/211472/02
.....CAAACCCCCC	TCCTCCCCCTC.....	U.S(F1)/44083/93
.....CGAATCTCTCCCA	AACTCCCC.....	U.S(ca)/1083(Fontana)/72
.....GGACCCCTC	CAAAA AATTCCCC.....	Italy/2736/00
.....CGTATTCTCTCCC	TGACCCCTC.....	Indonesia/14698/90

The symbols-overstriking of nucleotides is 6 nt longer than the published full length genome sequences of NDV LaSota, Clone-30 and B1 strains.

### 2.3 全基因组同源性分析

将 GX7/02、GX9/03 和 GX11/03 的全基因组序列与国内外 NDV 参考毒株进行比较分析, 发现此 3 个毒株与弱毒疫苗株 LaSota、Clone-30、B1 以及强毒株 Beaudette C 各基因编码区的核苷酸和氨基酸的同源性较低, 而与序列长度为 15192bp 的国内分离株 ZJ1 的同源性较高, 与 U.S/Largo/71 和 Indonesia/14698/90 等 6 个毒株的同源性相对较低。将分离株 GX7/02、GX9/03 和 GX11/03 的各个基因的编码区序列进行比较, 结果显示此 3 株病毒的同源性非常高, 各个基因编码区的核苷酸和氨基酸同源性分别在 94.2%~99.6% 和 95.8%~99.2% 之间。NDV 各毒株间的核苷酸及其推导的氨基酸序列的同源性比较结果见表 3。

### 2.4 f 基因的遗传进化分析

将本实验所测得的 3 株新城疫广西分离野毒株 GX7/02、GX9/03、GX11/03 的 f 基因所编码的氨基酸序列进行分析, 发现它们 f 基因裂解位点的氨基酸序列都为 <sup>112</sup>R-R-Q-K-R-F<sup>117</sup>, 说明它们都为强毒株<sup>[17~20]</sup>。将此 3 株 NDV 毒株的 f 基因编码区序列与 GenBank 上所公布的其它 7 株全基因组长度为 15192bp 的毒株, 以及 F48E9 (国内标准强毒株)、HB92 (国内弱毒株)、Herts33 (英国标准强毒株)、弱毒疫苗株 B1、LaSota、Clone-30 的相应序列进

行遗传进化分析。结果显示 GX7/02、GX9/03 和 GX11/03 毒株与 ZJ1 毒株亲缘关系较近,而与 F48E9、HB92、Herts33、B1、LaSota、Clone-30

毒株的亲缘关系较远,与序列长度为 15192bp 的国外毒株位于同一分支上,亲缘关系相对较近。结果见图 4。

表 3 新城疫病毒 8 个毒株各基因编码区核苷酸及氨基酸序列同源性比较

Table 3 Comparison of the nucleotide and amino acid homologies of six coding regions of 8 NDV strains (%)

Comp		<i>np</i>	<i>p</i>	<i>m</i>	<i>f</i>	<i>hn</i>	<i>l</i>
1		n	97.4~99.5	96.1~99.7	97.6~99.7	97.4~99.9	96.8~100
		a	98.6~99.6	97.7~99.7	98.9~99.7	99.3~99.8	98.4~99.6
2	GX7/02	n	85.1~85.5	82.0~83.2	83.5~83.8	84.2~84.4	81.9~82.2
		a	90.2~91.4	79.8~82.6	88.3~88.5	88.3~88.6	89.0~89.2
	GX9/03	n	84.8~85.5	81.9~83.1	83.5~83.8	84.4~84.6	84.2~84.4
		a	91.2~91.9	80.1~82.9	88.3~88.5	88.5~88.8	88.8~89.2
GX11/03	n	85.3~85.8	81.7~82.8	83.3~83.5	84.2~84.5	81.7~83.1	
	a	91.0~92.5	78.8~81.6	88.3~88.5	88.6~89.0	88.0~88.1	
3		n	97.5~98.2	97.2~99.6	96.5~99.5	97.6~99.2	94.2~97.9
		a	97.6~98.8	95.7~99.2	96.2~99.2	97.1~98.6	95.8~98.3
4		n	97.5~98.1	97.8~99.6	96.6~99.5	97.8~99.2	94.2~96.9
		a	97.6~98.6	97.2~99.2	96.2~99.2	97.3~98.6	95.8~97.6
5		n	89.1~91.1	83.9~90.2	86.4~94.1	86.0~95.3	86.1~93.7
		a	92.9~95.9	80.4~88.7	91.0~96.2	90.1~96.8	91.1~95.8

Comp 1=comparing 4 NDV strains( LaSota, Clone-30, B1 and Beaudette C ) reciprocally;

Comp 2=comparing GX7/02, GX9/03 and GX11/03 with other 4 NDV strains (LaSota,Clone-30,B1 and Beaudette C ) reciprocally;

Comp 3=comparing GX7/02, GX9/03 and GX11/03 with ZJ1 NDV strain reciprocally;

Comp 4= comparing 3 NDV strains(GX7/02, GX9/03 and GX11/03) reciprocally;

Comp 5= comparing GX7/02, GX9/03 and GX11/03 with other 6 NDV strains (U.S./Largo/71, U.S.(ca)/1083(Fontana)/72,

U.S.(ca)/211472/02, U.S.(F1)/44083/93, Indonesia/14698/90) respectively.

n= nucleotide homology,

a= amino acid homology.

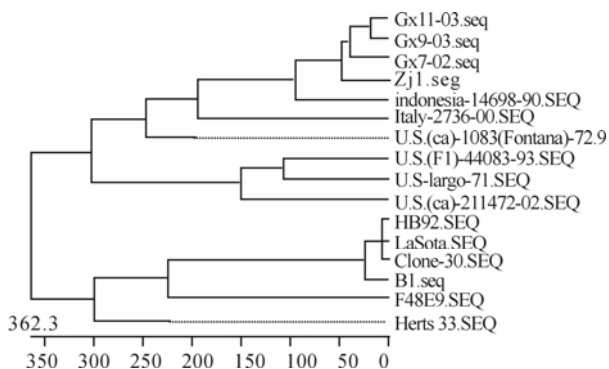


图 4 16 株 NDV 毒株 *f* 基因编码区核苷酸序列的遗传进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of 16 NDV strains based on the coding regions of *f* genes.

## 2.5 全基因组阅读框及基因间区的比较

将分离株 GX7/02、GX9/03 和 GX11/03 全基因组阅读框架及编码区与其它 NDV 毒株进行比较,发现 GX7/02、GX9/03 和 GX11/03 的基因组所编码的蛋白与其它毒株相似。此外,此 3 株病毒各基因的起始、终止及基因间隔区序列与其它 NDV 毒株的相应序列具有高度的同源性。*np-p*、*p-m*、*m-f*、

*f-hn*、*hn-l* 各基因间区的序列长度依次为 1nt、1nt、1nt、31nt 和 32nt,长度符合 NDV 基因组各基因之间的间隔区序列长度范围 1nt-47nt。结果见表 4。

## 2.6 其它 8 株 NDV 广西分离株 *np* 基因的序列分析

对 2000 年至 2004 年本实验室从广西不同地区所分离的其它 8 株新城疫病毒的 *np* 基因进行克隆和测序,并用 DNASTAR 软件进行比较,结果显示,此 8 株新城疫病毒的 *np* 基因同样多出 6 个核苷酸,此 6 个核苷酸的组成和位置均与 GX7/02、GX9/03 和 GX11/03 相同。

## 3 讨论

NDV 广西分离株 GX7/02、GX9/03 和 GX11/03 的全基因组序列长度均为 15192bp,为 6 的倍数,这一长度符合副粘病毒的“六规则”(the rule of six)<sup>[8~12]</sup>,与 GenBank 上所公布的 ZJ1 (AF 431744)、U.S./Largo/71 (AY562900)、Italy/ 2736/00 (AY562989) 等 7 株 NDV 的全基因组长度相同。而比 GenBank 上公布的 LaSota、B1 和 Clone-30 等 NDV 毒株的全基因组序列 (15186bp) 长 6nt。

表 4 13 株新城疫病毒全基因组阅读框架及编码区比较  
Table 4 Comparison of ORFs and coding regions of 13 NDV strains

Gene	Start codon					Stop codon					Number of residues				
	LBC	GX*	ZJ1	F*	Italy	LBC	GX*	ZJ1	F*	Italy	LBC	GX*	ZJ1	F*	Italy
<i>np</i>	122+	122	122	122	122	1591+	1591	1591	1591	1591	490	490	490	490	490
<i>p</i>	1887+	1893	1893	1893	1893	3074+	3080	3080	3080	3080	396	396	396	396	396
<i>m</i>	3290+	3296	3296	3296	3296	4384+	4390	4390	4390	4390	365	365	365	365	365
<i>f</i>	4544+	4550	4550	4550	4550	6205+	6211	6211	6211	6211	554	554	554	554	554
<i>hn</i>	6412+	6418	6418	6418	6418	8145+	8133	8133	8133	8151	578	572	572	572	578
<i>l</i>	6381	8387	8387	8387	8387	14995+	15001	15001	15001	15001	2205	2205	2205	2205	2205

GX\*=three NDV strains isolate from Guangxi(GX7/02, GX9/03 and GX11/03); F\*=foreign NDV strains which sequence consisted of 15192nt, including U.S/Largo/71, U.S(ca)/1083(Fontana)/72, U.S(ca)/211472/02, U.S(F1)/44083/93,Indonesia/14698/90; Italy=NDV strain Italy/2736/00.

NDV 广西分离株 GX7/02、GX9/03 和 GX11 的全基因组在长度上虽然多出了 6 个核苷酸, 但此 6 个核苷酸位于 *np* 基因的非编码区内, 并不参与 NP 蛋白的编码, 因此对 NP 蛋白的表达影响不大。但此 6 个核苷酸是否会在蛋白质的翻译和调控过程中起作用, 还不十分清楚。*np* 基因在正粘病毒中决定着宿主的特异性<sup>[16]</sup>。那么它在副粘病毒中是否扮演着同样的角色? 从同源性比较可以看出, 我们所测得的鸡源性 NDV 毒株 GX7/02、GX9/03 和 GX11/03 与鹅源性毒株 ZJ1 的 *np* 基因的核苷酸和氨基酸同源性分别为 97.5%~98.2%和 97.6%~98.8%, 同源性非常高。同时国外毒株中 U.S/Largo/ 71 和 U.S(ca)/211472/02 的 *np* 基因的核苷酸和氨基酸同源性分别为 95.2%和 97.1%, 而前者是从观赏鸟 (pet birds)体内分离<sup>[21]</sup>, 后者是从猎禽(game fowl)体内分离<sup>[22]</sup>。这说明 *np* 基因在副粘病毒中并不对宿主的特异性起决定性作用。

将本实验所测得的 3 株 NDV 广西分离株 GX7/02、GX9/03、GX11/03 的全基因组所编码的氨基酸序列进行分析, 发现它们 *f* 基因裂解位点的氨基酸序列都为 <sup>112</sup>R-R-Q-K-R-F<sup>117</sup>, 说明它们都为强毒株<sup>[17-20]</sup>。同时, 我们将目前 GenBank 上所公布的全基因组长度为 15192bp 的全部 7 个毒株 (ZJ1、U.S/Largo/71、Italy/2736/00、U.S(ca)/1083 (Fontana) /72、U.S(ca)/211472/02、U.S(F1)/44083/93、Indonesia/14698/90) 的氨基酸序列进行比较, 发现它们也为强毒株, 而且序列分析表明它们所多出的 6 个核苷酸也位于 NP 基因内。此外, 对本实验室所分离的另外 8 株新城疫病毒进行 *np* 基因测序, 结果表明它们的 *np* 基因内也多出 6 个碱基, 且此 8 个毒株也被证实为强毒株<sup>[4]</sup>。那么是否 NP 基因多出 6 个核苷酸的毒株一定为强毒株, 还有待于进一步证实。通过对全基因组序列长度为 15192 的毒株进行序列比较可以看出, 对于各个毒株所多出的 6 个碱

基, 国内毒株 GX7/02、GX9/03、GX11/03 和 ZJ1 在位置和组成上都相同, 而国外毒株只有 U.S/Largo/71 和 U.S(ca)/211472/02 相同, 其它毒株呈现多样性。而且这 6 个国外的毒株的分离宿主不尽相同, U.S/Largo/71 来自观赏鸟<sup>[21]</sup>、Italy/2736/00、U.S(ca)/1083(Fontana)/72 、 U.S(ca)/211472/02 、 U.S(F1)/44083/93、Indonesia/14698/90 分别来自鸽子、鸡、猎禽、美洲鸵鸟、美冠鹦鹉<sup>[22]</sup>, 因此, 所多出的 6 个碱基是否与毒株的特性相关联, 尚需进一步研究。

从核苷酸和氨基酸同源性 (表 3) 以及遗传进化树 (图 4) 可以看出, NDV 毒株 GX7/02、GX9/03 和 GX11/03 与 ZJ1 株的同源性很高, 而与 NDV 疫苗株 LaSota、Clone-30、B1 以及强毒株 Beaudette C 的同源性较低。这说明新城疫病毒是在不断的进行演化的<sup>[15]</sup>。ZJ1 毒株为我国 2000 年的华东 (浙江) 分离株, 且为鹅源性新城疫病毒<sup>[14]</sup>, 而 GX7/02、GX9/03 和 GX11/03 为我国 2002 年和 2003 年的华南 (广西) 分离株, 为鸡源性新城疫病毒, 且此 4 株病毒都为强毒株。GX7/02、GX9/03 和 GX11/03 属于基因 VII 型的 VII d 亚型<sup>[5]</sup>, 与 ZJ1 毒株属于同一个基因型<sup>[13]</sup>, 这说明基因 VII 型的 NDV 其宿主范围广 (鹅和鸡), 毒力较强。同时也表明新城疫病毒在演化的过程中, 不仅其毒力和基因组结构在发生变化, 其感染的宿主范围也在不断的变化。

NDV 毒株 GX7/02、GX9/03 和 GX11/03 是分别于 2002 年和 2003 年从广西不同地区的大型规模化养鸡场所分离, 病鸡发病前都经过正常免疫。根据 NDV 分离株之间的遗传进化树、酶切位点分析和基因分型的结果, 确定 GX7/02、GX9/03 和 GX11/03 毒株在基因型分类上属于基因 VII 型<sup>[5]</sup>。而目前我国在 NDV 疫苗的制作中使用的毒株为 B1 和 LaSota, 它们属于经典的基因 II 型。疫苗株与野毒株在基因型上的较大差异是否是造成免疫保护

率低的因素，有待于进一步证实。

新城疫国内毒株 ZJ1 (鹅源) 以及 GX7/02、GX9/03 和 GX11/03 (鸡源) 的全基因组序列先后被测定，这为揭示我国新城疫病毒的状况以及对其进行分子水平上的流行病学调查提供了可靠的依据，也为开展新城疫病毒反向遗传技术的研究以及新型疫苗的研制与开发奠定了基础。

## References

- [1] Gao F, Su J L (高福, 苏敬良, 译). Calnek B W. Diseases of Poultry (禽病学) [M]. 10th ed. Beijing: Beijing Agricultural University Press, 1999. (in Chinese)
- [2] Rima B K, Alexander D J, Billeter M A, *et al.* Paramyxoviridae [A]. Murphy F A, Fauquet C M, Bishop D H L. Virus taxonomy: sixth report of the International Committee on Taxonomy of viruses [M]. Vienna-Verlag, 1995, 268-274.
- [3] De Leeuw O, Peters B J. Complete nucleotide sequence of Newcastle disease virus: evidence for the existence of a new genus within the subfamily Paramyxovirinae [J]. J Gen Virol, 1999, 80:131-136.
- [4] Liu J B, Xie Z X, Xie Z Q (刘加波, 谢芝勋, 谢志勤) *et al.* Isolation and identification of highvirulent Newcastle disease viruses in Guangxi [J]. Southwest China J Agric Sci (西南农业学报), 2004, 17 (3): 390-392
- [5] Tang X F, Xie Z X, Liu J B (唐小飞, 谢芝勋, 刘加波) *et al.* Cloning and sequencing of fusion protein gene of Newcastle disease virus isolates in Guangxi [J]. Chin J Veter Sci Technol (中国兽医科技), 2005, 35 (5): 333-340.
- [6] Liu J B, Xie Z X, Tang X F (刘加波, 谢芝勋, 唐小飞) *et al.* Cloning and sequence analysis of HN gene of ten Newcastle disease virus isolates from Guangxi [J]. Animal Husbandry Veter Med (畜牧与兽医), 2005, 37 (7): 6-10.
- [7] Xie Z, Fadl A A, Girshick T, *et al.* Amplification of Avian reovirus RNA using the reverse transcriptase polymerase chain reaction [J]. Avian Dis, 1997, 41: 654-660.
- [8] Calain P, Roux L. The rule of six: a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA [J]. J Virol, 1993, 67: 4822-4830.
- [9] Krishnamurthy S, Samal S K. Nucleotide sequence of the trailer, nucleocapsid protein gene and intergenic regions of Newcastle disease virus strain Beaudette C and completion of entire genome sequence [J]. J Gene Biol, 1998, 79: 2419-2424.
- [10] Sidhu M S, Chan J, *et al.* Rescue of synthetic measles virus minireplicons: measles genomic termini direct efficient expression and propagation of a reporter gene [J]. Virology, 1995, 208: 800-807.
- [11] Durbin A P, Siew J W, *et al.* Minimum protein requirements for transcription and RNA replication of a minigenome of human parainfluenza virus type 3 and evaluation of the rule of six [J]. Virology, 1997, 234: 74-83.
- [12] Samal S K, Collins P L. RNA replication by a minigenome of respiratory syncytial virus (RSV) does not obey "the rule of six" describe for other paramyxoviruses [J]. J Virol, 1996, 70: 5075-5082.
- [13] Liu X F, Wan H Q, Ni X X, *et al.* Pathotypical and genotypical characterization of strains of Newcastle disease virus isolated from outbreak in chicken and goose flocks in some regions of China during 1985-2001 [J]. Arch Virol, 2003, 148(7): 1387-1403.
- [14] Huang Y, Wan H Q, Liu H Q, (黄勇, 万洪泉, 刘红旗) *et al.* Complete Nucleotide Sequence of Newcastle Disease Virus (ZJ1 Strain) of Goose Origin [J]. Chin J Virol (病毒学报), 2003, 19 (4): 348-354.
- [15] Westbury H. Newcastle disease virus: an evolving pathogen [J]. Avian Pathol, 2001, 30: 5-11.
- [16] Scholtisse C, Burger H, Kistner O, *et al.* The nucleoprotein as a possible major factor in determining host specificity of influenza H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> viruses [J]. Virology, 1985, 147: 287-294.
- [17] Collins M S, Bashiruddin J B, Alexander D J. Deduced Amino Acid Sequences at the Fusion Protein Cleavage Site of NDV Showing Variation in Antigenicity and Pathogenicity [J]. Arch Virol, 1993, 128: 363-370.
- [18] Glickman R L, Syddall R J, Sheehan R R, *et al.* Quantitative Basic Residue Requirements in the Cleavage Activation Site of Fusion Glycoprotein as a Determinant of Virulence for NDV [J]. J Virol, 1988, 62: 354-356.
- [19] Gorman J J, Corno G, Selleck W. Comparison of the Position and Efficiency of Cleavage of Fusion Protein Precursors of Virulent and Avirulent Strains of NDV [J]. Virology, 1990, 177: 339-351.
- [20] Toyoda T, Sakaguchi T, Imai K, *et al.* Structural Comparison of the Cleavage-Activation Site of the Glycoprotein between Virulent and Avirulent Strains of Newcastle Disease Virus [J]. Virology, 1987, 158: 242-247.
- [21] Bruce S S, Daniel J K, Devin P L *et al.* Phylogenetic Relationships among Highly Virulent Newcastle Disease Virus Isolates Obtained from Exotic Birds and Poultry from 1989 to 1996 [J]. J Clin Microbiol, 1998, 36:1141-1145.
- [22] Janice C P, Dennis A S, Peter R W, *et al.* Phylogenetic Relationships among Highly Virulent Newcastle Disease Virus Isolates from the 2002-2003 Outbreaks in North America [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42: 2329-2334.