

## 4 株鹅源新城疫病毒融合蛋白基因的克隆及序列分析\*

万洪全 吴艳涛 刘秀梵\*\* 张如宽

(扬州大学农业部畜禽传染病学重点开放实验室 扬州 225009)

**摘 要** 测定了 4 株鹅源新城疫病毒(NDV)融合蛋白(F)基因 5'端 1700 核苷酸片段的序列,并由此推导了 F 蛋白氨基酸序列,并对鹅源 NDV 的基因型分类地位进行探讨。结果表明 4 株病毒 F 基因的同源性大于 97%,与 DNV 标准强毒株 F48E8 F 基因的同源性为 86.0%~86.8%。F 基因转录起始序列及起始密码子位置与已知 NDV 完全相同;F 蛋白具有和已知 NDV 相似的各种功能区,F 蛋白前体 F0 裂解位点附近的氨基酸序列为<sup>112</sup>RRQKRF<sup>117</sup>,符合 NDV 强毒株的特征。对 F 基因第 334~1682 位核苷酸之间 3 种限制性内切酶 *Hinf* I、*Bst* I、*Rsa* I 酶切图谱的分析表明 4 株病毒的基因型与文献报道的 I~VIII 型有明显差异。

**关键词:** 鹅,新城疫病毒,融合蛋白基因,序列,基因型

中图分类号 S85 文献标识码:A 文章编号 1001-6209(2002)02-0208-06

新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)是一种负单股 RNA 病毒,基因组全长 15186 个核苷酸(nt),编码 6 种结构蛋白,即基质蛋白(M)、核衣壳蛋白(NP)、磷蛋白(P)、大蛋白(L)、血凝素—神经氨酸酶蛋白(HN)及融合蛋白(F),其中 HN 和 F 位于病毒囊膜表面,前者负责识别细胞受体并介导病毒对细胞的吸附,后者则参与病毒的穿透、细胞融合和溶血等过程。NDV 可以感染多种禽类,其中在鸡可致严重发病,造成重大的经济损失,现有的文献记载一般认为水禽如鸭、鹅对 NDV 具有较强的抵抗力<sup>[1]</sup>,感染后症状轻微或不表现临床症状<sup>[2]</sup>。然而自 1997 年以来,我国华东地区部分省市陆续爆发一种被称为“鹅的禽副粘病毒感染”或“鹅副粘病毒病”的传染病<sup>[3,4]</sup>,对养鹅业构成较大威胁。本实验室从江苏、浙江和广东等地的患病鹅群分离到数株 NDV,对其生物学特性进行了鉴定,并用这些野毒株和从野毒株中获得的克隆毒株成功地复制了本病,从而证实了 NDV 是本病的一种主要病原。本文报道 4 株鹅源 NDV 毒株 F 基因部分片段的序列测定及分析结果。

## 1 材料和方法

### 1.1 毒株

鹅源 NDV 克隆株 JS/1/97/Go、JS/3/98/Go、ZJ/1/00/Go、GD/1/98/Go 由本室保存,为从江苏、浙江和广东 3 省患病鹅群分离的野毒株经克隆、纯化而得。

### 1.2 分子生物学试剂

禽白血病毒反转录酶(AMV)、Taq DNA 聚合酶及 PGEM-T Easy 载体等分子生物学

\* 国家自然科学基金重大项目(39893290)

\*\* 通讯作者

作者简介:万洪全(1970-)男,江苏省涟水县人,扬州大学畜牧兽医学院讲师,博士,主要从事动物病毒分子生物学及其致病机理研究。

收稿日期 2001-01-31,修回日期 2001-05-20 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

试剂购自 Promega 公司或 Boehringer mennheim 公司。

### 1.3 F 基因部分片段的扩增、克隆及测序

根据已发表的 NDV 核酸序列设计 2 对引物,引物对 P1 和 P2 用于扩增 F 基因 5'端约 890nt,引物对 P3 和 P4 用于扩增 F 基因 3'端约 850nt,前一引物对的下游引物 P2 和后一引物对的上游引物 P3 之间有部分交叉;病毒的增殖、纯化、RNA 抽提及 F 基因的扩增、克隆、鉴定均按常规进行,所用质粒载体为 PGEM-T Easy 载体,测序工作由宝生物工程(大连)有限公司完成。引物 P1、P2、P3 及 P4 的序列为:

P1 5'—GCC CAA TTC CCG AAT CAT CAC GAC GCT TAA—3'

P2 5'—GTG AAG CTT GAG TCT GTG AGT CGT AC—3'

P3 5'—CAC CGG TAC CCC TAT TCT GTA CG—3'

P4 5'—TTA AGC TTG TAG TGG CTC TCA TCT GAT C—3'

### 1.4 鹅源 NDV F 基因部分序列的分析比较及其基因型分析

利用基因分析软件 DNASTER 对测定的序列及由其推导的氨基酸序列进行分析,比较鹅源 NDV 之间及其与鸡源 NDV 标准株 F48E8 株 F 基因的核苷酸同源性,并参照 Ballagi 等<sup>[5]</sup>的方法对鹅源 NDV 的基因型进行分析。

## 2 结果和讨论

### 2.1 鹅源 NDV F 基因部分序列及 F 蛋白氨基酸序列分析

通过 RT-PCR-技术扩增、克隆了 4 株鹅源 NDV F 基因 5'端约 890nt 及 3'端约 850 nt 片段,经测序获得 F 基因 170nt(F 基因全长为 1705nt)片段的序列。对测序结果的分析表明,4 株病毒 F 基因具有相同的转录起始序列—ACGGGTAGAA—,蛋白质翻译的起始密码子 ATG 的位置亦完全相同,即都在 47~49nt;比较从起始密码子 ATG 到 3'端第 1700nt 间 1654nt 片段的同源性可见,4 株病毒 F 基因的同源性为 97.8%~98.9%,与 F48E8 株 F 基因的同源性为 86.0%~86.8%。在绘制的遗传发生树(图 1)上,4 株病毒靠得很近,形成 1 个分支,而 F48E8 株则形成另 1 分支。

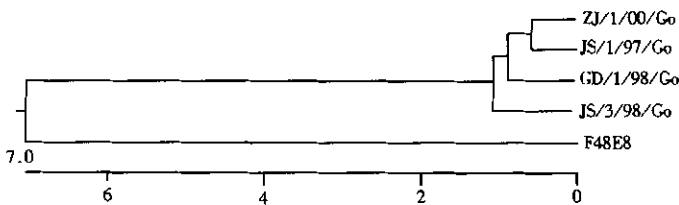


图 1 鹅源 NDV 及其与鸡源 NDV F48E8 株 F 基因的遗传发生关系

Fig. 1 Phylogenetic analysis of NDV strains of goose origin and a standard challenge strain F48E8

由 F 基因推导的氨基酸序列可看出,和已知的 NDV 一样,鹅源 NDV F 蛋白具有 N 末端信号肽区(第 1~25 位氨基酸)、F 蛋白裂解激活区域(第 112~116 位氨基酸)、融合诱导区(第 117~142 位氨基酸)和 C 末端跨膜区(第 500~522 位氨基酸)等重要功能区;F 蛋白一级结构中,含有 6 个可糖基化位点(第 85~87、191~193、366~368、447~449、471~473 及 541~543 位氨基酸)和 12 个半胱氨酸残基(第 25、76、199、338、347、362、370、394、399、

401、424、523 位氨基酸)。4 株病毒信号肽区氨基酸序列相当一致,与近年来华东地区流行的鸡源 NDV 的相应序列(待发表)相近,与国外报道的序列<sup>[6]</sup>则存在较大差异(表 1);F 蛋白裂解位点附近的序列为<sup>112</sup>RRQKR<sup>117</sup>,符合 NDV 强毒株的特征,这一结果与病毒生物学特性鉴定结果(待发表)相吻合。

表 1 19 株 NDV F 蛋白信号肽序列的比较

Table 1 Comparison of N-terminal signal sequences of F protein among 19 NDV strains

Strain	Amino acid sequences <sup>②</sup> of signal peptide (position 1 ~ 25)																								
D26/76	M	G	S	R	S	S	T	R	I	P	V	P	L	M	L	T	V	R	I	M	L	A	L	S	C
QUE/66																				V					
ULS/67																				V	A				
B1/47					P			K		A		M					I		V	A					
LAS/46					P			K		A		M					I		V	A			V		
BEA/45					P		P		K	N			M						V	A			V		
TEX/48					P		P		K	N		T	M						V	A			V		
AUS/32					P							I						I		A					
MIY/51												A						I	W	A					G
HER/33													P					I	I	V			T		
ITA/45					R													I	I	A			T		
F48E8					P		K			N	V		A							A			A		
FJ/2/99/Ch <sup>①</sup>								K	P			A						I	T				I		
SH/1/97/Ch								K	P			S						I	T			T	I		
ZJ/2/97/Ch								K	P			S						I	T	Q		T	I		
JS/1/97/Go								K	P			A						I	T				I		
JS/3/98/Go								K	P			A						I	T				I		G
ZJ/1/00/Go								K	L			A						I	T				I		G
GD/1/98/Go								K	P			A						I	T				I		

①Ch = strains of chicken origin, Go = strains of goose origin; ②The sequences of goose strains were determined in the present study, the remainder were obtained from papers or the data unpublished.

## 2.2 鹅源 NDV 基因型的分析结果

用计算机分析 F 基因第 334 ~ 1682nt 间 *Hinf* I、*Bst*o I、*Rsa* I 的酶切位点分布情况,结果见图 2。4 株鹅源 NDV F 基因 *Hinf* I、*Bst*o I 酶切位点的位置和数量完全相同,即分别第 335、875、883、1064、1400nt 处有 1 个 *Hinf* I 酶切位点,在 752、1116 和 1260nt 处有 1 个 *Bst*o I 酶切位点;*Rsa* I 位点的分布在不同毒株之间则有所差异,4 株病毒在 973nt、1087nt 和 1625nt 处均各有 1 个 *Rsa* I 位点,但 JS/1/97/Go、ZJ/1/00/Go 和 GD/1/98/Go 株与 I、II、III、IV 型 NDV 一样,在第 872nt 处有 1 个 *Rsa* I 酶切位点,JS/3/98/Go 则无此位点;除 GD/1/98/Go 株外,JS/1/97/Go、JS/3/98/Go 和 ZJ/1/00/Go 株还在 1249nt 处有 1 个 *Rsa* I 位点。

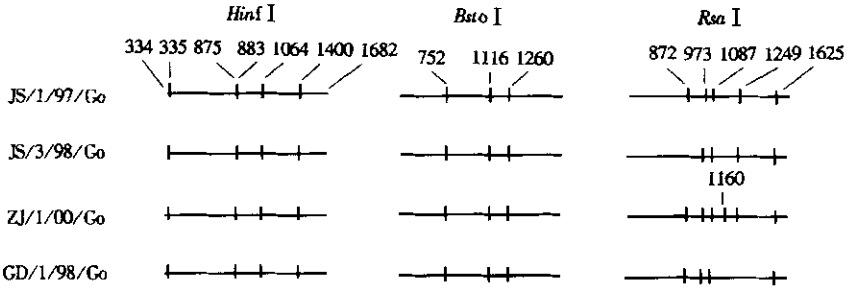


图 2 鹅源 NDV F 基因第 334 ~ 1682nt 间 3 种限制性内切酶的酶切位点分布图谱

Fig. 2 Cleavage sites distributions in the F gene (between 334 ~ 1682nt) of 4 NDV Strains of goose origin

表 2 I ~ VIII 型 NDV、F48E8 株及鹅源 NDV F 基因第 334 ~ 1682nt 间 3 种限制性内切酶特征性酶切位点的比较

Table 2 Characteristic cleavage sites between the 334 ~ 1682nt part of the F gene of some NDV genotypes and strains

Genotype or strain <sup>①</sup>	<i>Hinf</i> I					<i>BstO</i> I					<i>Rsa</i> I				
	736 <sup>②</sup>	883	1064	1350	372	752	1116	1260	1478	1601	872	973	1160	1249	1625
I	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+
II	-	+/-	-	-	-	-	+	-	-	+/-	+/-	-	-	-	+/-
III	-	+	-	-	-	+/-	+	-	-	+/-	+	-	-	-	+/-
IV	-	+	-	-	-	+	+	+/-	-	+/-	+	-	-	-	+
V	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
VIa	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
VIb	-	+	+	-	-	+	+	+/-	+	-	-	-	+	-	+
VIc	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
VIIa	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+
VIIb	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
VIII	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+
F48E8	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
JS/1/97/Go	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+
JS/3/98/Go	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
ZJ/1/00/Go	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
GD/1/98/Go	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+

①Go = strains of goose origin; ②The cleavage sites distributions of F gene of goose strains were determined in the present study, the remainder were obtained from papers.

Ballagi 等<sup>[5]</sup> 和 Lominica 等<sup>[7]</sup> 曾依据 NDV F 基因第 334 ~ 1682nt 间 *Hinf* I、*BstO* I、*Rsa* I 3 种限制性内切酶酶切图谱的不同,将 NDV 分成 8 种基因型 (I ~ VIII 型),每种基因型有其特定的图谱特征;例如 V 型 NDV F 基因在 883nt 处无 *Hinf* I 位点,872nt 和 1625nt 处无 *Rsa* I 位点,VI 型 NDV F 基因在 683nt 和 872nt 处缺少 *Rsa* I 位点,但在 V 型 NDV 缺

表 3 I ~ VIII 型 NDV 及部分 NDV 分离株 F 蛋白 N 端 27 个高变位点的氨基酸残基比较

Table 3 Amino acid sequences of 27 residue sites in the variable portion of the F protein

Genotype or strain	4 <sup>A</sup>	5	16	17	19	22	23	24	28	33	51	65	81	86	91	93	98	104	107	112	113	114	115	116	117	121	124
	R <sup>B</sup>	S	T	I	V	A	L	S	P	D	N	L	L	R	L	T	S	E	T	R	R	Q	K	R	F	I	G
I (Le) <sup>f</sup>				V																G	K		G		L		
II (Le)								V												G			G		L		
(Me/Ve)		P		V		V																					
III					I				G	L													R			S	
IV				I	I	T				L													R			S	
V		K	P	I	T	I	I			L								G								S	
VI		K	P	I	T	I	I			L								G	S							S	
VII a		K	P	I	T	I	I			L								G	S							V	S
VII b		K	P	I	T	V	I			S								G					R			V	S
VIII early <sup>D</sup>		K		I	T	T	I			L								G				R				V	S
VIII recent		K		V	T	I	I			L												R				L	S
F48E8		K		I	V	I				L													R				S
FJ/1/99/Ch		K	P	I	T	I	I			L								G	S							V	S
SH/1/97/Ch		K	P	I	T	I	I			L							S	G	S								S
ZJ/1/97/Ch		K	P	I	T	I	I			L							S	G	S								S
JS/1/97/Go		K	P	I	T	I	I			L				G				G	S							V	S
JS/3/98/Go		K	P	I	T	I	I			L								G	S							V	S
ZJ/1/00/Go		K	L	I	T	I	I			L								G	S							V	S
GD/1/98/Go		K	P	I	T	I	I			L								G	S							V	S

A: residue site; B: amino acid residues shared by most strains of genotype I ~ VIII; C: Le = lentogenic strain, Me = mesogenic strain, Ve = velogenic strain; D: early = early strains, recent = recent strains

失的 883nt 处 *Hinf* I 点、1625nt 处 *Rsa* I 位点则同时出现; Ballagi 等<sup>[5]</sup>还发现,用 F 基因 5' 端部分片段作遗传发生图所反映的毒株间的遗传关系与上述酶切图谱反映的遗传关系相当一致。比较 4 株鹅源 NDV 与已报道的 I ~ VIII 型 NDV F 基因的部分特征性酶切位点<sup>[7]</sup>可以发现,和已知的 NDV 相比,鹅源 NDV 的酶切位点出现了显著变化(表 2)。例如, I ~ IV 型 NDV 具有而在 V ~ VIII 型 NDV 缺失的 872nt *Rsa* I 位点重新出现,而 I ~ VIII 型 NDV 具有的 1601nt *Bst*o I 位点在鹅源毒株则全部缺失;此外,4 株病毒中有 3 株在 1249nt 处出现了 I ~ VIII 型 NDV 皆不具有的 *Rsa* I 位点。实际上,用国内外 50 余株 NDV F 基因部分序列(第 47 ~ 435 nt)绘制的遗传发生图表明,4 株鹅源毒株与数株近年来华东地区流行的鸡源 NDV 一起,在 VI 型与 VII 毒株的遗传分支之间形成了一个独特的分支(待发表)。Ballagi 等<sup>[5]</sup>曾将 70 年代末从我国香港地区健康鸭分离的 NDV 强毒株(HK/109/78)归入基因 VIc 型,然而,4 株鹅源 NDV 与 VIc 型 NDV 在 1478nt、1601nt 处 *Bst*o I 位点及 872nt、973nt 处 *Rsa* I 位点的差异可资区别。这些结果表明,鹅源 NDV 的基因型与已报道的 I ~ VIII 型均不相同,有可能是一种新的基因型。虽然鹅源毒株的酶切图谱及遗传学分支与已报道的 NDV 存在显著差异,其 F 蛋白一级结构中 N 端 27 个高变位点的氨基酸残基却与 V ~ VII NDV<sup>[8]</sup>趋于一致(表 3)。因此,如何对导致鹅群严重发病的 NDV 进行基因型分类,尚需进一步研究探讨。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] 殷 震,刘景华.动物病毒学.第 2 版.北京 科学出版社,1997.743 ~ 748.
- [ 2 ] Calnek B W. Diseases of poultry. Tenth edition. Ames, Iowa, USA Iowa state university press, 1998. 541 ~ 550.
- [ 3 ] 辛朝安,任 涛,罗开键,等.养禽与禽病防治,1997,16(1)5.
- [ 4 ] 王永坤,田慧芳,周继宏,等.江苏农学院学报,1998,19(1)59 ~ 62.
- [ 5 ] Ballagi A, Wehmann E, Herczeg J, et al. Archives of Virology, 1996, 141 243 ~ 162.
- [ 6 ] Tetsuya T, Takemasa S, Hideki H, et al. Virology, 1989, 169 273 ~ 282.
- [ 7 ] Lomniczi B, Wehmann E, Herczeg J, et al. Archives of virology, 1998, 143 49 ~ 64.
- [ 8 ] Herczeg J, Wehmann E, Bragg R R, et al. Archives of Virology, 1999, 144 2087 ~ 2099.

## Sequence Analysis of the Fusion( F ) Protein Genes of Four Newcastle Disease Virus Strains Causing Clinical Disease in Geese \*

Wan Hongquan Wu Yantao Liu Xiufan Zhang Rukuan

( College of Animal Science and Veterinary Medicine , Yangzhou University , Yangzhou 225009 , China )

**Abstract :** Four strains of Newcastle disease virus( NDV ), which have proven to be responsible for the disease outbreaks in south and east China regions called “ geese paramyxovirus infection ” or “ avian paramyxovirus infection of geese ”, were examined for the features of their fusion( F ) protein genes. A 1700 nucleotides( nt ) fragment of the F gene ( 1705nt ) of each of the 4 strains were sequenced , the results revealed that the NDV strains of goose origin share common transcriptional sequence and translational start position with the hitherto reported NDV , the F gene homologies among the 4 strains were 97.8% ~ 98.9% , while the corresponding homologies between these strains and the standard challenge strain F48E8 were only 86.0 ~ 86.8% . The deduced amino acid sequences near cleavage site of F0 proteins showed a <sup>112</sup>RRQKR/F<sup>117</sup> motif , conforming well with that of the virulent strains. The cleavage sites distribution of 3 restriction enzymes( *Hinf* I , *Bst*o I , *Rsa* I ) in 75% region of the F gene( between 334 ~ 1682nt ), which is used to group NDV strains into different genotypes , were also analysed with the aid of computer program MegAlign , it is very interesting to find that the 4 strains showed a distinct distribution pattern from all the genotypes so far reported( genotype I ~ VIII ), characterized by the simultaneously presence of a *Bst*o I site at 752nt and two *Rsa* I sites at 872nt and 973nt. Additionally , 3 out of the 4 strains , despite their different geographical locations , showed a novel *Rsa* I site at position 1249 which is absent in all of the other genotypes. The 4 NDV strains of goose origin were essentially virulent ones , and probably belong to a new genotype.

**Key words :** Geese , Newcastle disease virus , F protein gene , Sequence , Genotype

\* Major Project of National Natural Science Foundation of China( 39893290 )