

新城疫病毒 HN 和 F 基因遗传变异相关性的研究

秦卓明^{1,2}, 马保臣¹, 何叶峰², 王友令², 崔治中^{1*}

(¹ 山东农业大学动物科技学院 泰安 271018)

(² 山东省农业科学院家禽研究所 济南 250100)

摘 要 选取国内 1999~2005 年发生的 NDV 毒株,经 CEF 蚀斑纯化和 SPF 鸡胚增殖,对其融合蛋白(F)和血凝素-神经氨酸酶(HN)基因分别进行克隆测序,结合在 GenBank 中发表的具有 F 和 HN 基因的 NDV 序列,利用 DNASTar 软件,对其不同毒株的 F 或 HN 基因片段和全长、F 和 HN 基因全长分别进行遗传变异的研究,利用统计学软件 SPSS8.0 进行同源性相关分析。结果表明:不同 NDV 毒株 F 或 HN 基因片段与其全长之间,核苷酸 $r \geq 0.973$,氨基酸 $0.911 \leq r \leq 0.968$,遗传变异高度相关,但 F 与 HN 基因全长之间核苷酸的遗传变异呈现弱相关($r = 0.312$)。国内 NDV 野毒株之间 HN 核苷酸高度同源(同源率 97% 以上),而与 La Sota 同源率仅为 79.2%~80.7%,且显示出明显的地域性。

关键词 新城疫病毒;F 基因;HN 基因;同源性;遗传变异;相关性

中图分类号:Q933 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2006)02-0227-06

新城疫(Newcastle disease, ND)是由属禽副黏病毒-1 型的新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)引起禽的一种急性、烈性传染性疫病,主要侵害鸡和火鸡,发病率和死亡率均很高,是危害我国养禽业生产的最严重疾病之一^[1,2]。国际兽医卫生组织(OIE)将其定为 A 类动物疫病,中国将其定为一类动物传染病。NDV 虽然只有一个血清型,但毒株众多,毒力差别较大^[2~4],给 ND 的防制带来极大困难。

NDV 是一种具有囊膜的单股、负链、不分节段的 RNA 病毒,由 15186 个核苷酸组成。基因组包含 6 个基因,分别编码 3' NP-P-M-F-HN-L 5' 六个主要多肽(即 NP 核蛋白、P 磷蛋白、M 基质蛋白、F 融合蛋白、HN 血凝素-神经氨酸酶和 L 聚合酶)^[5]。NDV 的囊膜由 F 和 HN 两个糖蛋白组成,F 糖蛋白能够融合宿主细胞膜,使病毒侵入宿主细胞内;HN 糖蛋白具有血凝素和神经氨酸酶活性,在病毒侵染过程中识别细胞受体、介导病毒吸附细胞膜。这两种基因产物决定着 NDV 的毒力强弱^[6~9]。因此,对 F 和 HN 进行分子遗传变异研究,对了解和把握 NDV 的变异规律具有重要意义。

然而,国内外尚未有 F 和 HN 基因遗传变异相关性的研究报告。本文对近年来在国内分离、鉴定

的 NDV,分别进行了 F 和 HN 基因克隆测序,并对二者的遗传变异做了相关比较。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒来源:1999~2005 年间山东、江苏等 NDV 分离株,采用 HA 和 HI 交叉抑制试验,排除 H₅ 和 H₅ 亚型禽流感、减蛋综合症(EDS-76)等具有 HA 特性的病毒。利用 CEF 对分离株进行蚀斑纯化 3 代后接种 10 日龄 SPF 鸡胚,进行病毒增殖,利用差速离心法进行浓缩病毒。

1.1.2 主要试剂:TRIzol 为 Gibco BRL 产品;AMV 逆转录酶、Rnasin、pGEM-T Easy Vector 购自 Promega 公司;DNA 回收试剂盒、dNTPs 购自 TaKaRa(大连)公司。PCR Master Mix 增强剂购自北京朋远公司。DH5 α 由山东农科院家禽所禽病重点实验室保存;SPF 种蛋由山东家禽所 SPF 鸡场提供。

1.1.3 引物设计:参照 GenBank 中 NDV 的 F 和 HN 序列,利用 Primer 设计两对引物,T₁ 和 T₂ 用于扩增 F 基因(1700bp),HN₁ 和 HN₂ 用于扩增 HN 基因(1801bp)。引物由上海 Sangon 合成,序列为:T₁:5'-ATGGGCTCCAAACCTTCTAC-3', T₂:5'-TTGTAGTGG

基金项目:山东省科技攻关重点支持项目(030317);山东省自然科学基金支持项目(031020101)

* 通讯作者。Tel: 86-538-8241560; E-mail: zzcui@sdau.edu.cn

作者简介:秦卓明(1968-),男,河南淮阳人,研究员,在职博士研究生,主要从事禽病和分子病毒学研究。E-mail: qinzm1997@163.com

其他作者:徐怀英²,袁小远²

收稿日期:2005-11-05;接受日期:2005-11-23;修回日期:2005-12-06

CTCTCATC-3'; HN₁: 5'-TCCGTTCTACCACATCACCA-3', HN₂: 5'-CGTCTCCCAACCATCCTAT-3'。考虑到 NDV 不同编码基因均有共同的起始序列^[9,10],设计通用 RT 引物 5'-ACGGGTAGAA-3'。

1.2 逆转录 (RT)

按照 TRIzol 试剂盒说明提取病毒 RNA,加入经 DEPC 处理的灭菌超纯水 12 μ L 溶解 RNA。取 7 μ L RNA,加入 10mmol/L RT 引物 4.5 μ L,经 70 $^{\circ}$ C 变性 5min 后,冰浴 5min,依次加入下列体系: 5 \times RT buffer 4 μ L; 10mmol/L dNTP 2 μ L; 40U/ μ L RNasin 0.5 μ L; 10U/ μ L 的 AMV 2 μ L,反应总体积 20 μ L,混匀,37 $^{\circ}$ C 水浴 1h。然后 95 $^{\circ}$ C 5min,冰浴 5min,-20 $^{\circ}$ C 保存。合成的 cDNA 可作为 PCR 扩增 F 和 HN 的模板。

1.3 PCR 扩增

F (HN)反应条件: 94 $^{\circ}$ C 3min; 94 $^{\circ}$ C 1min, 54 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 2.5min (HN 为 2min), 33 (HN 为 32) 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。反应产物 1% 琼脂糖凝胶电泳检验。

1.4 克隆转化和鉴定

回收 PCR 产物,将回收物连接 16 $^{\circ}$ C 1.5h 至 pGEM-T Easy Vector,转化至感受态 DH5 α ,均匀涂布于含 Ampicillin、IPTG、X-Gal 的 LB 固体培养基平板,37 $^{\circ}$ C 培养 14~16h。挑取白色菌落少量培养,作 EcoR I 酶切鉴定和 PCR 扩增双重鉴定。

1.5 基因测序和基因分型

将阳性质粒送上海博采生物技术有限公司测序。另从 GenBank 中获取同时发表 F 和 HN 序列且代表不同基因型的 11 个 NDV 毒株 (表 1) 用于这两个基因的比较。利用 DNASTar 6.0 软件,按传统基因

分型方法^[12~14]对 F 基因分型。

1.6 不同毒株 F 和 HN 基因遗传变异的相关性比较

1.6.1 不同毒株 F 和 HN 基因全长及片段同源性相关分析:利用 DNASTar 6.0 软件分别对 NDV 不同 F 和 HN 基因片段进行核苷酸 (nt) 和氨基酸 (aa) 同源性比较,利用 SPSS8.0 统计学软件对其同源性进行相关分析。以不同 NDV 毒株 F 全长基因的 nt 同源性为纵坐标,以不同毒株 F 基因高变区 (1~374nt) 的 nt 同源性为横坐标作图。按同样方法构建 HN 基因及其高变区 (1~270nt) 相关图。

1.6.2 不同毒株 F 和 HN 全长基因核苷酸同源性相关分析:利用 DNASTar 6.0 软件分别对 NDV 的 HN 与 F 基因之间进行核苷酸同源比较,利用统计学软件 SPSS8.0 进行相关分析。以不同毒株间 F 基因的全长核苷酸同源性为横坐标,以 HN 基因的全长核苷酸同源性为纵坐标作图。

2 结果

2.1 RT-PCR 和基因分型

14 个 NDV 野毒株的 F 和 HN 基因均扩增出了目的片段。经双向测序后,F 基因开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF) 全长 1662bp,编码 553 个氨基酸;HN 基因 ORF 全长 1716bp,编码 571 个氨基酸。序列已被 GenBank 收录 (表 1)。

14 株 NDV 野毒株基因分型结果: 8 株为基因 VII (57.1%); 4 株为基因 II (28.6%); 2 株为基因 IX (14.3%)。基因 VII 仍是目前 NDV 流行的优势毒株。

表 1 试验用新城疫毒株

Table 1 Properties of Newcastle disease virus strains

No.	NDV strain	Location	Host	Time of isolation	F GenBank accession No.	HN GenBank accession No.	Genotype
1	TJ03	Tianjin	Broiler	03-4-6	DQ227244	DQ228925	IX
2	SBZ02	Binzhou	Chicken	02-4-16	DQ227245	DQ228926	II
3	JS02	Jiangsu	Goose	99-5-10	DQ227246	DQ228928	VII
4	SDD01	Dezhou	Layer	01-5-20	DQ227247	DQ234591	VII
5	SGM01	Gaomi	Broiler	01-5-11	DQ227248	DQ234592	VII
6	SQD04	Qingdao	Broiler	04-3-18	DQ227249	DQ228933	VII
7	SQZ04	Qingdao	Broiler	04-11-18	DQ228921	DQ228934	II
8	SL03	Lingxian	Broiler	03-11-11	DQ228922	DQ234579	VII
9	QE01	Beijing	penguin	00-5-12	DQ227250	DQ234580	II
10	SKY03	Kaiying	Broiler	03-2-9	DQ227251	DQ234583	VII
11	SY03	Weifang	Duck	03-11-23	DQ228923	DQ234585	II
12	SBD02	Boda	Broiler	02-4-22	DQ227252	DQ234586	IX
13	SPY03	Pingyi	Broiler	03-2-16	DQ227253	DQ234587	VII
14	SWS03	Wenshang	Broiler	03-1-14	DQ227254	DQ234588	VII
15	YN03	Yunnan	Chicken	03-3-11	AY253912	AY253912	VII

续表 1

No.	NDV strain	Location	Host	Year of isolation	F GenBank accession No.	HN GenBank accession No.	Genotype
16	Goose	Zhejiang	Goose	03-4-13	AF431744	AF431744	VII
17	TW95	Taiwan	Chicken	96-8-10	NDU62620	NDU62620	VII
18	Aus01	Austrian	Chicken	99-1435	AY935500	AY935499	I
19	Ind90	Indonesia	Chicken	90-14698	AY562985	AY562985	VII
20	US02	USA	Chicken	02-211472	AY562987	AY562987	V
21	Italy	Italy	Pigeon	00-2736	AY562989	AY562989	VII
22	Rus01	Russian	Chicken	01-2755	AY865652	AY865652	VII
23	US93	USA	Chicken	93-44083	AY562986	AY562986	V
24	La Sota	Vaccine	Chicken	1946	AY636147	AY636147	II
25	F ₄₈ E ₉	China	Chicken	1948	AY997298	AY997298	IX

2.2 不同 NDV 毒株的 F 基因全长和基因片段遗传变异的相关比较

表 2 为国、内外不同基因型的 25 个 NDV 毒株 F 基因全长和不同片段的核苷酸(nt)和氨基酸(aa)的相关比较结果。结果表明,不同毒株的 1 ~ 374 nt (125aa) 375 ~ 960 nt(126 ~ 320aa) 961 ~ 1662 nt

(321 ~ 554aa)和全长的 nt(aa)之间,核苷酸 : $r \geq 0.973$ 氨基酸 : $0.911 \leq r \leq 0.952$,遗传变异高度相关。上述表明:不同 NDV 毒株在 F 基因上全长和片段的遗传变异都是密切相关的。其中,前 374nt (125aa)最具代表性。F 基因全长及其前 374bp 的核苷酸同源性比较见表 3。

表 2 NDV 不同毒株 F 全长基因与不同片段的核苷酸/氨基酸同源性相关系数

Table 2 Correlations among different length F genes of NDV isolates in homology of nucleotides/amino acids

N = 300	1662nt/553aa	1 ~ 374nt/1 ~ 125aa	375 ~ 960nt/126 ~ 320aa	961nt 1662nt/321 553aa
1662nt/553aa	1	0.973**/0.952**	0.984**/0.911**	0.985**/0.941**

**Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

表 3 不同毒株间的 NDV F 基因全长与其前 374 核苷酸同源性

Table 3 The homology between F gene and 5'-terminus first 374bp nucleotides of different NDV isolates

	lasota	F ₄₈ E ₉	1F	2F	3F	4F	5F	6F	7F	8F	9F	10F	11F	12F	13F	14F	15F	16F	17F	18F	19F	20F	21F	22F	23F
lasota	***	88.6	89	98.9	83.6	82.8	83.1	82.6	99.3	82.7	99.5	82.7	99.5	88.7	83.3	82.6	82.9	83	83.4	87.1	83.9	83.3	82.4	82.7	84.1
F ₄₈ E ₉	83.2	***	99.6	87.8	86.3	85.3	85.5	85.3	88	85.6	88.1	85.4	88	98.9	86.2	85.3	85.5	86.6	86.3	89.2	87.7	85.3	85.6	85.3	86.1
1F	84	99.5	***	88.1	86.5	85.4	85.7	85.5	88.4	85.8	88.6	85.6	88.4	99.2	86.4	85.5	85.7	86.9	86.2	89.4	87.8	85.6	85.7	85.4	86.2
2F	98.4	82.9	83.4	***	83.2	82.7	83	82.3	99	82.4	98.9	82.7	99.5	88.3	83	82.2	82.6	82.9	82.9	86.1	83.6	82.6	81.8	81.8	83.5
3F	82.4	83.7	84.2	81.3	***	94.9	95.4	94.6	83.7	95	83.8	95.1	83.4	86.4	95.3	99	95.4	94	95.2	85	94.9	89.5	90.6	85	86.2
4F	78.6	80.5	81	78.3	92	***	97.8	99.1	82.9	99.3	83.3	97.4	82.5	85.8	97.2	93.9	97.1	93.1	97.2	84.7	94.2	88.6	90	84.3	86.2
5F	80.2	81.8	82.4	79.9	93	96.3	***	97.1	83.2	97.4	83.6	98.7	82.8	86	98.5	94.3	98.1	93.7	98.4	84.4	94.7	88.1	89.8	84.4	86.5
6F	78.1	79.9	80.5	77.8	91.2	99.2	96	***	82.4	99.6	82.6	96.8	82.3	85.1	97.5	93.6	97.4	93.2	97.5	84.5	94.5	88.7	90.1	84.4	86
7F	99.7	83.2	84	98.1	82.4	78.3	79.9	77.8	***	82.6	99.4	82.8	98.9	88.6	83.2	82.7	82.7	83.2	83.3	86.6	83.8	83	82.2	82.3	83.6
8F	78.9	80.7	81.3	78.6	92.2	99.7	96.5	99.5	78.6	***	82.7	97	82.4	85.4	97.8	94	97.7	93.5	97.8	84.7	94.8	88.9	90.4	84.5	86.3
9F	100	83.2	84	98.4	82.4	78.6	80.2	78.1	99.7	78.9	***	83.3	99	89	83.3	82.8	82.9	83.1	83.4	86.6	83.8	82.9	82.2	82.4	84
10F	80.5	82.1	82.6	80.7	92.5	96	98.7	95.7	80.2	96.3	80.5	***	82.6	86	98.1	94.2	97.8	93.5	98	84.4	94.6	88.1	89.7	84.1	86.1
11F	99.2	81.8	82.6	99.5	81.6	77.5	79.1	77	98.9	77.8	99.2	79.9	***	88.1	83	82.4	82.6	82.7	83.1	86.4	83.6	82.7	81.8	82	83.6
12F	84	99.5	100	83.4	84.2	81	82.4	80.5	84	81.3	84	82.6	82.6	***	86	85.4	85.3	86.6	85.7	89	87.4	85.1	85.3	85	86.1
13F	80.2	82.1	82.6	79.9	92.2	95.7	98.4	95.5	79.9	96	80.2	98.1	79.1	82.6	***	94.3	98.6	94	98.8	85	95.2	88.7	90.6	85	86.9
14F	82.1	83.4	84	81	99.7	91.7	92.8	90.9	82.1	92	82.1	92.2	81.3	84	92	***	94.4	93	94.2	83.9	93.9	88.6	89.5	84	85.2
15F	80.5	82.1	82.6	80.2	93	96.3	98.9	96	80.2	96.5	80.5	98.7	79.4	82.6	98.4	92.8	***	93.8	98.6	84.1	94.9	88.9	90	84.4	86.2
16F	77.8	83.2	83.7	77.3	91.4	90.4	92.2	89.8	77.5	90.6	77.8	92	76.5	83.7	91.4	91.2	92.2	***	94.1	84.2	96.3	89.4	91.9	85.9	87.1
17F	80.5	82.6	81.8	79.4	92.2	95.5	98.1	95.2	80.2	95.7	80.5	97.9	79.4	81.8	97.6	92	98.1	91.4	***	84.8	95.1	88.6	90.2	84.9	86.9
18F	83.4	85	85	83.2	82.6	78.6	78.9	78.1	83.2	78.9	83.4	79.1	82.4	85	79.1	82.4	79.1	78.1	79.1	***	85.7	84.1	84.1	83.9	83.2
19F	79.4	84.5	85	79.1	93.6	93	93.9	92.5	79.1	93.3	79.4	94.1	78.3	85	93	93.3	93.9	95.7	93	81	***	90.9	92.4	86.9	87.8
20F	79.7	82.9	83.7	79.4	88.5	85.6	85.6	85	79.4	85.8	79.7	85.8	78.6	83.7	85.3	88.5	85.6	86.6	84.5	79.7	88.5	***	88.6	85.3	86
21F	79.4	82.4	82.9	78.9	88.8	86.9	87.4	86.4	79.1	87.2	79.4	88	78.1	82.9	86.9	88.5	87.4	90.1	86.6	82.6	90.9	86.6	***	85.4	85.4
22F	77.8	82.6	83.2	77.5	82.9	81.3	82.1	80.7	77.5	81.6	77.8	82.6	76.7	83.2	82.9	82.6	82.6	84.2	81.8	80.7	85.3	82.9	83.7	***	91
23F	79.9	83.7	84.5	79.1	83.7	83.7	85.6	83.2	79.7	84	79.9	85.8	78.6	84.5	85.8	83.4	85.8	85.3	85.8	78.9	86.9	84.8	83.2	89.6	***

Homology of F gene (top), Homology of F gene of 5'-terminus first 374bp (bottom).

图 1 更具体显示了 NDV 不同毒株间 F 全长基因与其前 374bp 遗传变异的一一对应的相关性。对

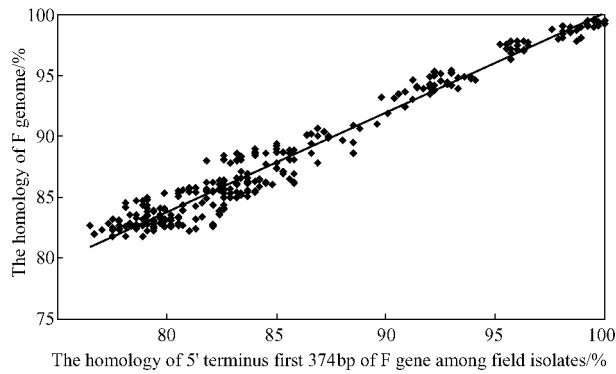


图 1 不同毒株 NDV 的 F 基因核苷酸及其前 374 个核苷酸同源相关性比较

Fig.1 Homology Correlations between F gene and 5'-terminus first 374bp nucleotides of different NDV isolates.

近 300 个点的分析表明 :当两个毒株间 F 基因全长 nt 同源性高时 ,其前 374bp 片段的同源性亦高 ,反之亦然。推导公式为 : $Y = 18.5 + 0.816X$ (Y 表示 F 基因全长之间的 nt 同源性 ,X 表示 F 前 374bp 之间的 nt 同源性)。

2.3 NDV 不同毒株间 HN 基因全长与片段遗传变异的相关比较

25 个 NDV 毒株 HN 基因全长和不同片段的核苷酸和氨基酸的相关比较结果见表 4。结果表明 ,1 ~ 270nt(90aa) , 300 ~ 960nt(100 ~ 320aa) , 961 ~ 1716 nt(321 ~ 572aa)和基因全长的核苷酸和氨基酸之间 ,核苷酸 : $r \geq 0.983$;氨基酸 : $0.924 \leq r \leq 0.968$ 遗传变异高度相关。上述表明 :不同毒株在 HN 基因全长和片段的遗传变异都是密切相关的。其中 ,前 270nt (90aa)最具代表性。HN 基因及其前 270bp 的核苷酸同源性的比较见表 5。

表 4 不同 NDV 毒株 HN 基因及不同片段的核苷酸和氨基酸的同源相关比较

Table 4 Correlations among different length HN genes of NDV isolates in homology of nucleotides/amino acids

N = 300	1716nt/571aa	1 ~ 270nt/1 ~ 90aa	300 ~ 960nt/91 ~ 320aa	961nt 1716nt/321 571aa
1716nt/571aa	1	0.983**/0.968**	0.985**/0.924**	0.992**/0.942**

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

表 5 不同毒株间的 NDV HN 基因全长与其前 270 核苷酸同源性

Table 1 The homology among HN genes and 5'-terminus first 270bp nucleotides of different NDV isolates

	lasota	F ₄₈ E ₉	1H	2H	3H	4H	5H	6H	7H	8H	9H	10H	11H	12H	13H	14H	15H	16H	17H	18H	19H	20H	21H	22H	23H
lasota	***	87.3	80.1	79.9	79.9	79.9	79.8	80.3	80	80.1	79.2	79.9	79.9	80.7	80.7	79.9	80.2	81.6	79.5	87.8	80.9	81.9	80.5	82.3	81.4
F ₄₈ E ₉	83.7	***	82.9	82.9	83	82.9	82.9	82.9	82.9	83.1	82.3	82.9	82.9	84.3	84.3	82.9	83.7	84.6	82.2	88.1	84.2	84.7	83.9	86.1	85.1
1H	70.7	73.3	***	99.4	98.4	98.1	98	98.8	98.5	98.3	98.1	98.3	98.1	95.4	95.4	98.1	98.5	93.8	97.2	83.3	93.8	87.2	89.6	86.5	85.4
2H	69.6	72.2	99.3	***	98.1	97.8	97.7	98.3	98	98	97.7	98	97.8	95.3	95.3	97.8	98.2	93.6	96.9	83	93.6	87.2	89.4	86.4	85.1
3H	71.1	73.7	98.1	97.4	***	97.8	97.7	97.9	97.6	98	97.7	98	97.8	95.3	95.3	97.8	98.4	93.6	97.3	83.4	93.6	86.8	89.3	86.3	85.2
4H	71.1	73	96.7	95.9	96.3	***	99.8	97.8	97.3	99.8	97.4	97.6	100	95.5	95.5	100	98.1	94.2	96.6	82.9	93.8	87.2	90	86.9	85.5
5H	71.1	73	96.7	95.9	96.3	100	***	97.7	97.2	99.6	97.3	97.4	99.8	95.4	95.4	99.8	98	94.1	96.4	82.9	93.6	87.1	89.9	86.8	85.4
6H	71.5	72.2	97	95.9	95.2	94.4	94.4	***	99.4	98	97.7	98	97.8	95	95	97.8	98.1	93.5	96.8	83	93.3	86.5	89.5	86	85.3
7H	71.9	73	96.3	95.6	94.4	93.3	93.3	98.5	***	97.5	97.4	97.7	97.3	94.7	94.7	97.3	97.8	93.2	96.4	82.5	92.9	86.4	89.5	86.3	85.6
8H	71.1	73	96.7	95.9	96.3	100	100	94.4	93.3	***	97.6	97.7	99.8	95.7	95.7	99.8	98.3	94.4	96.7	83.2	93.9	87.5	90.2	87.2	85.7
9H	69.3	73.3	97.4	96.7	97	95.9	95.9	95.2	95.2	95.9	***	98	97.4	94.8	94.8	97.4	97.8	93.2	96.4	82.7	92.8	85.9	89	85.9	84.9
10H	70.4	75.2	97.4	96.7	97	95.2	95.2	95.2	95.2	95.2	97.8	***	97.6	95.2	95.2	97.6	98.2	93.5	96.9	83.4	93.2	86.6	89.5	86.4	85.3
11H	71.1	73	96.7	95.9	96.3	100	100	94.4	93.3	100	95.9	95.2	***	95.5	95.5	100	98.1	94.2	96.6	82.9	93.8	87.2	90	86.9	85.5
12H	72.2	73.7	95.2	94.4	95.2	95.2	95.2	93	93.3	95.2	95.2	95.2	95.2	***	100	95.5	95.9	95.2	94.5	84	94.9	87.7	91.1	87.7	86.2
13H	72.2	73.7	95.2	94.4	95.2	95.2	95.2	93	93.3	95.2	95.2	95.2	100	***	95.5	95.9	95.2	94.5	84	94.9	87.7	91.1	87.7	86.2	
14H	71.1	73	96.7	95.9	96.3	100	100	94.4	93.3	100	95.9	95.2	100	95.2	95.2	***	98.1	94.2	96.6	82.9	93.8	87.2	90	86.9	85.5
15H	70.7	74.1	97.8	97	97.4	96.7	96.7	95.6	94.8	96.7	96.7	96.7	95.2	95.2	96.7	***	94.2	97.6	83.6	93.9	86.9	90	86.9	85.8	
16H	75.6	73.7	90.7	90	90.7	92.2	92.2	88.5	88.9	92.2	91.5	90.7	92.2	93	93	92.2	92.2	***	92.9	84	95	87.4	92	88	86.3
17H	70.7	73.3	97.8	97	98.1	95.9	95.9	95.6	94.8	95.9	96.7	96.7	95.9	94.8	94.8	95.9	97	91.1	***	82.4	92.7	85.6	88.6	85.9	84.7
18H	85.9	84.8	78.1	77	78.9	74.8	74.8	75.2	74.4	74.8	77	78.5	74.8	77	77	74.8	77.4	77.4	***	84.1	83.3	82.1	83.7	83.2	
19H	71.9	72.6	91.1	90.4	91.5	90.7	90.7	88.5	87.8	90.7	89.3	90.7	90.7	91.1	91.1	90.7	90.7	90.4	90.7	76.7	***	87.4	90.9	87.1	85.8
20H	77	76.7	78.5	77.4	78.1	78.9	78.9	75.6	75.6	78.9	75.2	75.9	78.9	77.4	77.4	78.9	75.9	77	75.6	75.2	77	***	86.7	87.2	86
21H	71.1	73.7	83.3	82.6	83	85.2	85.2	81.9	83	85.2	83.7	84.1	85.2	85.2	85.2	85.2	83.7	85.9	83.3	70.7	83	76.7	***	86.8	86
22H	74.4	77	78.9	77.8	80	81.1	81.1	76.3	78.1	81.1	79.6	80.7	81.1	81.1	81.1	81.1	80	81.1	79.6	75.2	78.5	75.9	78.1	***	91.4
23H	73.7	77	75.6	74.4	75.6	74.8	74.8	75.2	76.3	74.8	75.9	77	74.8	78.1	78.1	74.8	76.3	76.7	76.7	73	74.1	75.6	77.4	84.4	***

Homology of HN gene(top) , Homology of HN gene of 5'-terminus first 270bp(bottom).

图 2 更具体显示了不同 NDV 毒株间, HN 基因全长与其前 270bp 片段遗传变异的一一对应的关系性。对近 300 个点的分析表明: 当两个 NDV 毒株间 HN 基因全长 nt 同源性高时, 其前 270bp 片段的同源性亦高; 反之, 亦然。推导公式为: $Y = 36.2144 + 0.6357X$ (Y 表示 HN 全长之间的 nt 同源性, X 表示 HN 前 270nt 之间的 nt 同源性)。

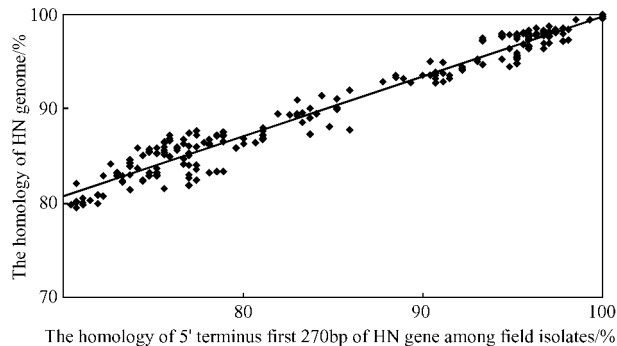


图 2 NDV 不同毒株基因序列全长与其前 270 个核苷酸序列同源相关性比较

Fig.2 Homology correlations between HN genes and 5'-terminus first 270bp nucleotides of different NDV isolates.

2.4 NDV 不同毒株间 HN 和 F 基因的核苷酸同源相关比较

25 株 NDV F 与 HN 基因全长的核苷酸同源性具有显著的相关性 ($p < 0.01$), $r = 0.312^{**}$ 。图 3 具体显示了 NDV 不同毒株间 F 和 HN 基因遗传变异的一一对应的关系性。对近 300 个点的分析表明: 当两个毒株间 F 基因全长同源性高时, 其 HN 基因同源性大多数较高, 但个别偏低。这表明: F 与 HN 基因全长的遗传变异, 呈现弱相关, 既具有联系性, 又具有相对的独立性。

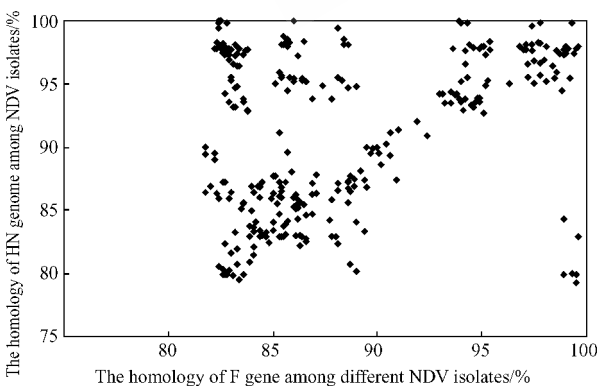


图 3 不同 NDV 毒株间 HN 与 F 基因的核苷酸同源相关性比较

Fig.3 Homology correlations among HN genes and F genes of different NDV isolates.

3 讨论

3.1 基因片段替代性

国外学者^[15-18]对 NDV 研究发现: 利用 F、HN 等基因中的不同片段所绘制的系统发育树十分相似, 甚至利用较短的核苷酸序列所绘制的进化树与其全

长基因所构建的进化树是一致的; 国内秦智锋^[1]、曹殿军^[14]等也有类似的推论, 但均缺乏有力的证据。本实验通过对代表不同基因型的 25 株 NDV 毒株的 F 和 HN 基因不同片段的核苷酸和氨基酸同源率进行比较, 并通过统计学分析证实: 不管是 F 还是 HN 基因, 其不同片段的核苷酸和氨基酸与其全长之间息息相关, 反应出 NDV 遗传变异的规律。F 和 HN 基因内部不同片段之间遗传变异高度相关, 反应出 F 或 HN 基因在自然界中的突变可能是随机的、均匀分布的。可以利用其中一个片段来推测 F 或 HN 基因全长的遗传变化。但应注意到: 不同株 NDV F 或 HN 基因的不同片段, 其核苷酸和氨基酸之间尚有一定差别, 不同片段绘出的系统进化树有差异。因此, 在进行遗传变异比较时, 最好选择核苷酸和氨基酸(特别是后者)与全长均密切相关的片段, 例如: F 基因的 1~374nt 或 HN 基因的 1~270nt。因为氨基酸与抗原性的关系更密切, 更准确。

3.2 F 和 HN 基因的遗传变异相关性

国内外对 NDV F 或 HN 遗传变异的研究大都局限在对其自身的研究, 其中对 F 基因的研究占了多数, 对 HN 研究较少^[4, 13, 14, 19, 20]。本文把 F 和 HN 基因的遗传变异统筹考虑, 通过对不同毒株 NDV 的 F 和 HN 基因全长之间进行核苷酸同源相关比较, 证实 F 和 HN 基因之间的遗传变异既具有联系性, 又具有独立性。

联系性: 国内 10 个 NDV 野毒株基因 VII (本实验 8 株和 2 个国内株) 之间, F 基因核苷酸同源率为 93.6%~99.1%, HN 基因核苷酸同源率 94.8%~100%, 与疫苗株如 La Sota (基因 II) 的 F 和 HN 基因同源率均较低(80%左右)。表明目前流行的 NDV 基因 VII 野毒株与传统毒株相比, 其 F 与 HN 基因均发生了较大的遗传变异, 但野毒株之间具有较高的一致性。

独立性: 4 个 NDV 基因 II 野毒株与传统疫苗株 La Sota (基因 II) 相比, F 基因同源率较高(98.9%~99.5%), HN 基因同源率较低(79.2%~82.3%)。进而证实: 基因型相同(F 核苷酸同源率高), HN 核苷酸同源率可能高(野毒株基因 VII), 也可能低(基因 II 野毒株), 具有不确定性; 反之, 亦然。例: 国内 NDV 所有分离株 HN 之间高度同源(同源率 94.8%~100%), 但 F 基因同源率: 同一基因型之间较高, 不同基因型, 则较低。因此, F 基因分型的结果与 HN 同源率高低无关, 反应出 F 与 HN 基因在遗传变异过程中各自的独立性。

研究还发现: 国内外不同国家和地区的情况也有差异: 同一个地区, 基因型相同, 同源较高, 否则, 同源相对较低。如我国与欧洲 NDV 野毒株基因 VII 之间, F 基因同源率不到 90%, 显示出地域差异。

此外, 国内 NDV 野毒株之间, 不论是家禽, 还是水禽, HN 基因高度同源。何种原因导致此种现象值得进一步研究。

3.3 对新城疫控制的思考

近年来,高抗体水平(HI 平均抗体滴度 $\geq 10\text{Log}_2$) 均匀度较好的鸡群 NDV 发病较多(而传统认为 HI 临界保护值为 8Log_2)^[21, 22]。国内 NDV 的 HN 基因高度同源,但与传统疫苗如 La Sota 等同源较低,一般为 79.2% ~ 82.3%。这表明:HN 的抗原性可能已发生了较大变异,现有的疫苗是否能够产生足够的免疫力?而生产中和免疫评估时,人们往往把 ND 免疫后抗体水平的高低作为评价鸡群安全性的标志。

致谢 本项目得到了中国农业大学赵继勋教授、山东农科院科研处、山东省作物与畜禽品种改良生物技术重点实验室和山东省科技厅的大力支持,在此表示感谢!

参 考 文 献

- [1] 甘孟侯主编. 中国禽病学. 第一版. 北京:中国农业出版社, 1997.
- [2] 崔治中. 我国家禽新城疫流行现状. 中国家禽, 2002, 24(4): 4-6.
- [3] Saif YM. 禽病学. 苏敬良, 高福, 索勋, 等译. 11th ed. 北京:中国农业出版社, 2005.
- [4] Liu XF, Wan HQ, Ni XX, et al. Pathotypical and genotypical characterization of strains of Newcastle Disease virus isolated from outbreaks in chicken and goose in some regions of China during 1985-2001. Arch Virol, 2003, 148(7): 1387-1403.
- [5] Alexander DJ. Newcastle disease. In: Samson ACR. Virus Structure. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1988.
- [6] Aldous EW, Alexander DJ. Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1). Avian Pathol, 2001, 30(2): 117-128.
- [7] Runa P, Huang ZH, Subbiah E, et al. Role of fusion protein cleavage site in the virulence of Newcastle disease virus. Microbial Pathogenesis, 2004, 36: 1-10.
- [8] Nagai Y, Klenk HD, Rott R. Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and its significance for the virulence of Newcastle

- disease virus. Virology, 1976, 69: 523-538.
- [9] Peeters BP, De Leeuw OS, Koch G, et al. Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. J Vir, 1999, 73(6): 5001-5009.
- [10] Philips RJ, Samson ACR, Emerson PT. Nucleotide sequence of the 5'-terminus of Newcastle disease virus and assembly of the complete genomic sequence: agreement with the "rule of six". Arch Virol, 1998, 143: 1993-2003.
- [11] 黄勇, 万洪全, 刘红旗, 等. 鹤源新城疫病毒 ZJ1 株全基因组的序列测定. 病毒学报, 2003, 19(4): 348-352.
- [12] Ballagi-Pordany A, Wehman E, Herczeg J, et al. Identification and grouping of Newcastle disease virus strains by restriction site analysis of a region from F gene. Arch Virol, 1996, 141: 243-261.
- [13] 吴艳涛, 倪雪霞, 万洪全, 等. 我国不同地区动物来源新城疫病毒的分子流行病学研究. 病毒学报, 2002, 3: 264-269.
- [14] 曹殿军, 郭鑫, 梁荣, 等. 我国部分地区 NDV 的分子流行病学研究. 中国预防兽医学报, 2001, 22(1): 29-32.
- [15] Sakaguchi T, Toyoda T, Gotoh B, et al. Newcastle disease virus evolution I. Multiple lineages define by sequence variability of hemagglutinin-neuraminidase gene. Virology, 1989, 169: 260-272.
- [16] Seal BS, King DJ, Bennet JD. Characterization of Newcastle disease virus isolates by reverse transcription PCR coupled to direct nucleotide sequencing and development of sequence database for pathotype prediction and molecular epidemiological analysis. J Clin Microbiol, 1995, 33: 2624-2630.
- [17] Toyoda T, Sakaguchi T, Hirota H, et al. Newcastle disease virus evolution II. Lack of gene recombination in generating virulent and avirulent strains. Virology, 1989, 69: 273-282.
- [18] Collins MS, Franklin S, Strong I, et al. Antigenic and phylogenetic studies on a variation Newcastle Disease virus using anti-fusion protein monoclonal antibodies and partial sequencing of the fusion protein gene. Avian Pathology, 1998, 27: 90-96.
- [19] 秦智锋, 贺东生, 吴红专, 等. 华南地区三株新城疫地方强毒株的序列测定及其系统发育分析. 畜牧兽医学报, 2003, 34(1): 67-71.
- [20] 田夫林, 陈静, 马惠玲, 等. 10 株新城疫分离 F 基因的克隆及遗传变异分析. 中国预防兽医学报, 2004, 26(1): 28-31.
- [21] 秦卓明, 何叶峰, 徐怀英, 等. 种鸡感染新城疫强毒的诊断及其防制. 山东家畜, 2002, 5: 35-37.
- [22] 刘文斌, 崔尚金, 李秀云, 等. 新城疫分离株 APMV1/chicken/China/JL-11/02 的致病性研究. 中国兽医杂志, 2005, 41(5): 8-9.

Newcastle disease virus heredity mutation and correlation of HN and F gene

QIN Zhuo-ming^{1, 2}, MA Bao-chen¹, HE Ye-feng², WANG You-ling², CUI Zhi-zhong^{1*}

(¹ College of Animal Science and Technology, Shandong Agriculture University, Tai'an 271018, China)

(² Institute of Poultry Science, Shandong Academy of Agricultural Science, Jinan 250100, China)

Abstract: Prevailed Newcastle disease virus isolates were collected during 1999-2005 in China. These isolates were purified by CEF plaque assay and replicated in SPF embryos. The fusion protein (F) gene and hemagglutinin-neuraminidase (HN) gene of these isolated viruses were cloned and sequenced. Some of the F gene and HN gene sequences from GenBank were also used in this study. The homologies of nucleotide and amino acids were compared and correlations were analyzed by SPSS8.0 software among different length sequences of the F gene or HN gene. The nucleotide homologies and correlation among the F gene and HN gene were also analyzed. The results indicated there are good correlation among different length sequences of the F gene or HN gene and the F genome or HN genome ($r \geq 0.973$). There was also good correlations among different length amino acids of NDV F protein or HN protein ($0.911 \leq r \leq 0.968$). But, there was only a less correlation between the whole F gene and HN gene ($r = 0.312$). The heredity mutation of HN genes had the character of geographical areas. The sequences of HN gene in Chinese isolates had an identity of more than 97%. But there was only 79.2% ~ 80.7% in HN nucleotide homology among the Chinese isolates and La Sota (vaccine).

Keywords: Newcastle disease virus; F gene; HN gene; Homology; Heredity mutation; Correlation

Foundation item: Key Project for Science and Technology Development of Shandong Province (030317); Natural Science Foundation of Shandong Province (031020101)

* Corresponding author. Tel: 86-538-8241560; E-mail: zzcui@sdau.edu.cn

Other authors: XU Huai-ying², YUAN Xiao-yuan²

Received 5 November 2005/Accepted 23 November 2005/Revised 16 December 2005