

新城疫不同毒株交叉鸡胚中和指数及其与 F 和 HN 基因变异的相关性

秦卓明, 徐怀英, 欧阳文军, 王友令, 王莉莉, 袁小远, 谭雷涛

(山东农业科学院家禽研究所, 济南 250100)

摘要: 选取 13 株国内 2001~2004 年分离的新城疫流行病毒(Newcastle disease virus, NDV), 经蚀斑纯化, 克隆其融合蛋白(F)和血凝素-神经氨酸酶(HN)基因, 结合疫苗株 La Sota、Clone30 和国内标准强毒株 F₄₈E₉ 等的基因序列, 进行遗传变异分析。利用纯化的病毒制备特异阳性血清, 进行鸡胚交叉中和试验, 确定不同 NDV 毒株之间的抗原相关性, 并与 NDV 不同毒株之间的 HN 和 F 基因核苷酸(氨基酸)同源性进行相关比较。结果表明: 病毒中和指数与 HN 基因的核苷酸(氨基酸)同源性显著相关 ($P < 0.01$, $r = 0.35$), 与 F 基因呈弱相关 ($P < 0.05$, $r = 0.20$), 而与 F 基因前 374bp 的核苷酸同源性不相关。这表明, NDV 的分子变异已经对 NDV 的抗原性变异产生了影响, 研制新型的疫苗成为必然。

关键词: 新城疫病毒; F 基因; HN 基因; 抗原性; 相关性

中图分类号: S852.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008) 02-0226-08

新城疫(Newcastle disease, ND)是由新城疫病毒(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严重疾病。NDV 又称“禽副黏病毒-1 型(Avian Paramyxovirus 1, APMV-1)”, 是一种具有囊膜的单股、负链、不分节段的 RNA 病毒, 由 15186、15192 和 15198 个核苷酸组成。基因组含 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)^[1,2]。HN 糖蛋白在病毒脂质囊膜上形成纤突, 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^[3-5], 是重要的免疫原基因。

NDV 只有一个血清型, 不同的毒株之间具有一定的交叉保护。但近年来, 国内 ND 发病频繁, 免疫失败的鸡群增多, 非典型性发病增多, 危害的禽类品种增多, 水禽传统上不感染新城疫, 但自 1997 年以后, 鹅、鸭、番鸭等水禽相继发病^[6], 甚至连高抗体水平

的鸡群也不能幸免^[7]。NDV 的抗原性是否发生变异, 传统疫苗的保护性成为研究的焦点。

血清中和试验(VN)是评价毒株不同型或亚型的精确方法, 是区别毒株间抗原性差异的敏感手段, 是生产中衡量疫苗是否有效的重要指标^[8]。国内已有对 NDV HN 基因变异及其对 HI 相关影响的报告^[9]。然而, 国内外尚未进行 F、HN 基因遗传变异对病毒中和特性等抗原性的影响研究。

本文利用近年来在国内分离、鉴定的 NDV 野毒和标准株, 制备了特异阳性血清, 进行了鸡胚交叉中和试验, 克隆了 NDV 的 F 和 HN 基因, 结合统计学软件 SSPP8.0 对 NDV 抗原性和基因变异的相关性进行了分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒: 2001~2004 年间山东、天津等 13 株 NDV 分离株, 经用特异性 NDV 阳性血清作 HI 交叉试验鉴

定,排除H₉和H₅亚型禽流感、减蛋综合症(EDS-76)等病毒。按OIE规程进行ICPI(1日龄脑内接种指数)毒力测定^[10]。利用CEF对分离株进行蚀斑纯化,接种10日龄SPF鸡胚,进行病毒增殖。

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。DH5a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。

1.2 特异阳性血清制备

将纯化的NDV特定毒株接种SPF鸡胚,收取病毒液,灭活,加入Freund's佐剂,分别免疫SPF鸡3次,每次间隔10d,饲养于隔离器中。三免10d后,采集血清即成,-20℃保存。同理制备La Sota、Clone30和国内标准强毒株F₄₈E₉血清。

1.3 交叉中和试验

采用固定病毒稀释血清法进行病毒交叉中和试验^[8]。测定NDV流行株的鸡胚半数感染量(EID₅₀),将病毒稀释成200EID₅₀/0.1 mL,与等量系列倍比稀释的血清混合,37℃水浴1h,每稀释度接种5个SPF鸡胚,0.2mL/个,同时设各种对照。37℃培养,每4h照胚1次。观察鸡胚死亡情况,测定HA效价,以鸡胚死亡和HA阳性判为感染。24h死亡者弃去。按Reed-Muech法计算EID₅₀。能使半数鸡胚保护的最高血清稀释度即为该血清的中和效价^[11]。中和指数的计算按免疫学方法^[11]进行: $r = \sqrt{r_1 r_2}$, $r_1 =$ 异源中和血清效价₁/同源血清中和效价₁, $r_2 =$ 异源血清中和效价₂/同源血清中和效价₂。

1.4 引物设计

参照Genbank中NDV的F和HN序列,设计两对引物,T₁和T₂用于扩增F基因(约1700bp),HN₁和HN₂用于扩增HN基因(约1801bp)。引物由上海Sangon合成,序列为:T₁: 5'-ATGGGCTCCAAACCT TCTAC-3', T₂: 5'-TTGTAGTGGCTCTCATC-3'; HN₁: 5'-TCCGTTCTACCACATCACCA-3', HN₂: 5'-CGCTTCCCAACCATCCTAT-3'。考虑到NDV不同编码基因均有共同的起始序列^[12],设计通用RT引物。

1.5 RT-PCR

按Trizol试剂盒说明提取病毒RNA,加入经DEPC处理的灭菌超纯水12μL溶解RNA。取7μLRNA,加入10mol/L RT引物4.5μL,70℃5min,冰浴5min,反应总体积20μL,混匀,37℃水浴1h。然后,95℃5min,

冰浴5min,-20℃保存。合成的cDNA可作为PCR扩增F和HN的模板。扩增反应体系:cDNA 5μL,上、下游引物各1.0μL,2×PCR Master Mix 25μL,补足灭菌水至50μL。F(HN)反应条件:94℃3min,94℃1min,54℃1min,72℃2.5min(HN为2min),33(HN为32)个循环,72℃10min。取反应产物,以1%琼脂糖凝胶电泳检验。

1.6 克隆测序

将回收PCR产物连接至pGEM-T Easy Vector,16℃1.5h,转化至感受态DH_{5a},均匀涂布于含Ampicillin、IPTG、X-gal的LB固体培养基平板,37℃培养14~16h。挑取白色菌落小量培养,作EcoR I酶切鉴定和PCR扩增双重鉴定。将阳性质粒送上海博采生物技术有限公司测序。

1.7 序列分析

从GenBank中获取LaSota、Clone30和国内标准强毒株F₄₈E₉等F、HN序列。利用DNA Star Lasergen6.0和Mega3.0按文献方法^[13-15]分别对NDV的F和HN基因进行基因分型、核苷酸(氨基酸)同源性比较和系统发育分析。

1.8 中和指数与F和HN基因同源性的相关比较

利用统计学软件SPSS8.0对鸡胚中和指数和NDV F、HN基因的核苷酸(氨基酸)全长同源性以及决定F基因分型的F前374个核苷酸片段的同源性进行一一对应相关分析,比较NDV的中和指数与F和HN基因核苷酸(氨基酸)同源性的相关性。

2 结果和分析

2.1 生物学毒力和中和指数

ICPI测定结果表明,13株NDV均为强毒(表1)。16株NDV鸡胚交叉中和试验结果见表2,抗原性中和指数见表3。

由表2知:NDV流行毒与疫苗和经典强毒株之间的中和效价存在差异,反应出NDV流行毒的抗原性变化。

La Sota、Clone30与经典强毒F₄₈E₉之间的中和指数较高,其中,La Sota与Clone30的中和值为0.93,与F₄₈E₉的中和值为0.77,而与NDV流行株的中和指数较低,仅为0.22~0.50,证实了La Sota疫苗对经典强毒具有较好的保护,而对流行株保护效果较差。NDV流行株之间,中和指数大小不一,反应出NDV不同毒株之间免疫原性的差异。同时发现:SGM01对NDV流

行株的中和指数介于 0.35~0.88, 对大多数流行株具有较好的交叉保护, 明显优于 La Sota。

2.2 RT-PCR 和 F 基因分型

13 株 NDV 流行毒均扩增出目的片段。F 基因 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(见表 1)。

按照经典对 F 基因的分型方法, 13 株 NDV 流行株有 9 株为基因 VII(69.2%); 2 株为基因 II(15.4%); 2 株为基因 IX(15.4%), 见图 1。

表 1 试验用新城疫毒株
Table 1 Properties of Newcastle disease virus strains

Strains	Abbreviation	ICPI	F Accession no.	HN Accession no.	F Genotype
Chicken/USA/Isota/46	La	0.40	AF077767	AF077767	II
Clone30	Clone	0.00	AF098289	AF098289	II
Fowl/F48E9/46	F ₄₈ E ₉	1.91	AY997298	AY997298	IX
Broiler/Shandong/Jlan/04	WHZ03	1.94	DQ227244	DQ228924	VII
Broiler/Tianjin/TJ03/03	TJ03	1.75	DQ228925	DQ228925	IX
Chicken/Shandong/SDD/01	SDD01	2.00	DQ227247	DQ234591	VII
Broiler/Shandong/SGM/01	SGM01	1.78	DQ227248	DQ234592	VII
Penguin/Beijing/QE01/99	QE01	1.81	DQ227250	DQ234580	II
Broiler/Shandong/SL/03	SL03	1.94	DQ228922	DQ234579	VII
Chicken/Shandong/SSX/03	SSX03	1.95	DQ234581	DQ234581	VII
Layer/Shandong/SF/02	SF02	1.81	DQ234582	DQ234582	VII
Broiler/Shandong/SKY/03	SKY03	1.89	DQ227251	DQ234583	VII
Chicken/Shandong/SRZ/03	SRZ03	1.90	DQ234584	DQ234584	II
Broiler/Shandong/SBD/02	SBD02	1.70	DQ227252	DQ234586	IX
Broiler/Shandong/SPY/03	SPY03	1.92	DQ227253	DQ234587	VII
Broiler/Shandong/SWS/03	SWS03	1.91	DQ227254	DQ234588	VII

表 2 NDV 不同毒株间鸡胚中和效价
Table 2 Results of embryo neutralization assays among different NDV strains

	La*	Clone	F ₄₈ E ₉	TJ03	SGM01	SDD01	SRZ03	SKY03	SL03	WHZ03	SF02	SSX03	QE01	SPY03	SWS03	SBD02
La**	427	129	80	189	129	153	20	38	32	80	363	81	108	38	25	50
Clone	589	204	204	204	165	610	20	32	32	200	813	81	132	38	22	108
F ₄₈ E ₉	407	50	129	513	153	108	12	432	20	188	131	129	150	32	81	129
TJ03	129	108	26	513	631	610	28	32	32	152	50	91	98	38	25	96
SGM01	321	100	20	257	420	324	81	129	31	408	153	39	108	32	32	108
SDD01	129	38	20	324	776	771	108	425	32	200	105	81	153	32	151	124
SRZ03	118	38	27	420	432	645	108	38	20	80	204	38	108	49	129	108
SKY03	363	108	32	139	432	447	32	363	27	517	561	50	129	38	102	513
SL03	128	129	32	257	363	140	81	142	50	128	527	50	432	108	33	100
WHZ02	132	32	27	153	321	776	64	209	18	612	324	27	108	32	41	77
SF02	118	20	32	512	432	776	81	421	27	324	659	39	129	105	77	324
SSX03	100	38	129	475	813	432	28	145	22	324	561	129	432	129	28	324
QE01	102	96	129	512	432	601	32	81	32	200	525	50	407	102	162	324
SPY03	513	50	204	513	513	512	28	153	20	152	513	109	324	204	178	513
SWS03	42	50	32	501	363	94	52	87	20	124	305	54	29	63	102	129
SBD02	128	50	27	32	153	363	20	204	16	324	204	20	32	16	36	324

*Anti-serum against; **NDV strains.

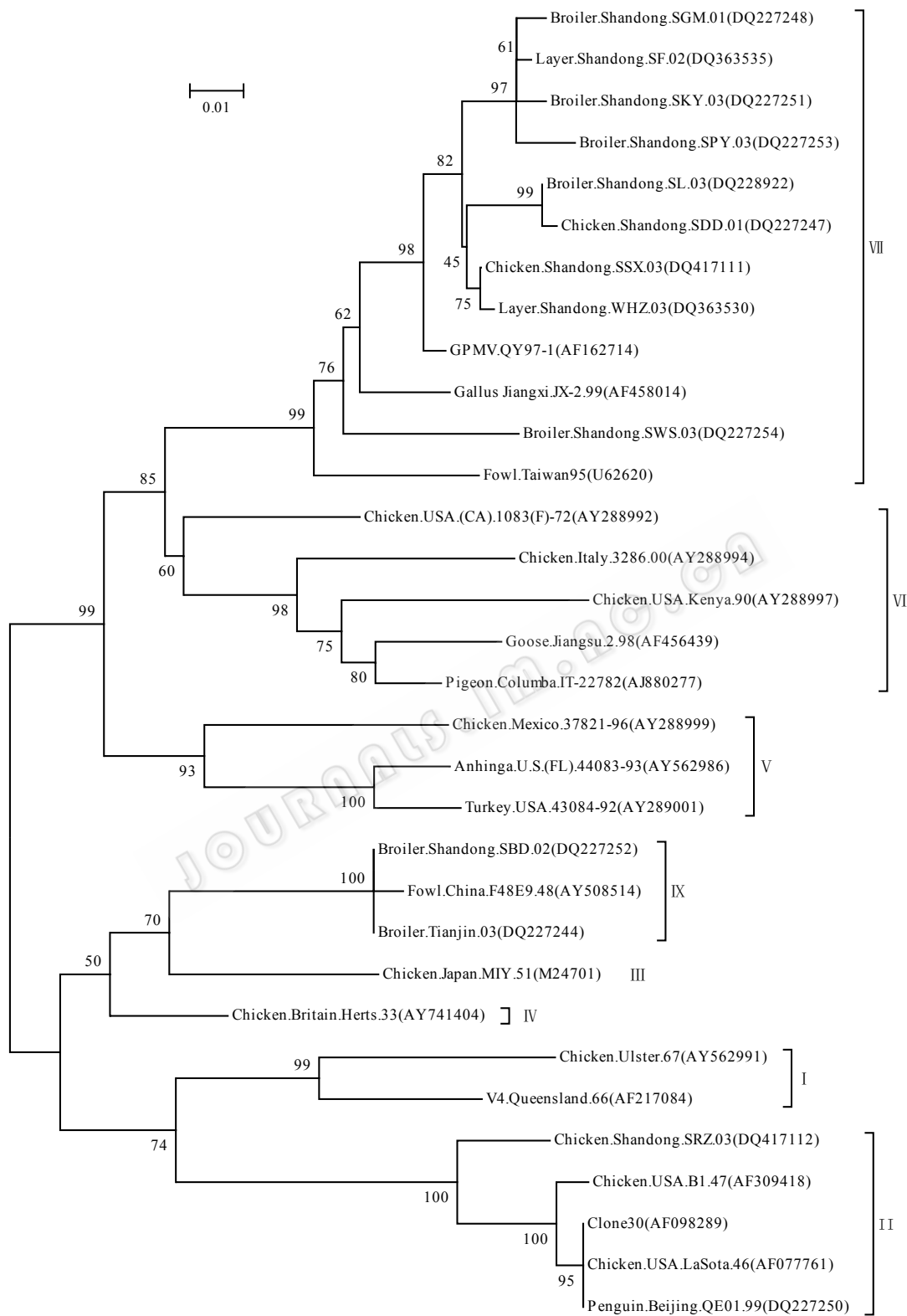


图 1 根据 F 基因 47-420 核苷酸序列构建的 NDV 分离株与参考毒株系统进化树

Fig.1 Phylogenetic tree based on nt 47-420 fragment of the F gene of NDV isolates and reference strains. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap with 500 repetitions. Bar, 0.01 sequence divergence. Sequences accession numbers in GenBank are in brackets.

表3 NDV不同毒株间的鸡胚中和指数
Table 3 Indexes of embryo neutralization assays among different NDV strains

	La	Clone	F ₄₈ E ₉	TJ03	SGM01	SDD01	SRZ03	SKY03	SL03	WHZ03	SF02	SSX03	QE01	SPY03	SWS03	SBD02
La	*															
Clone	0.93	*														
F ₄₈ E ₉	0.77	0.62	*													
TJ03	0.33	0.46	0.45	*												
SGM01	0.48	0.44	0.24	0.87	*											
SDD01	0.24	0.38	0.15	0.71	0.88	*										
SRZ03	0.23	0.19	0.15	0.46	0.88	0.91	*									
SKY03	0.30	0.22	0.54	0.15	0.60	0.82	0.18	*								
SL03	0.44	0.64	0.31	0.57	0.73	0.34	0.55	0.46	*							
WHZ02	0.20	0.23	0.25	0.27	0.71	0.57	0.28	0.70	0.27	*						
SF02	0.39	0.35	0.22	0.28	0.49	0.40	0.48	0.99	0.66	0.51	*					
SSX03	0.38	0.34	1.00	0.81	0.76	0.59	0.28	0.39	0.41	0.33	0.51	*				
QE01	0.25	0.39	0.61	0.49	0.52	0.54	0.28	0.27	0.82	0.29	0.50	0.64	*			
SPY03	0.47	0.21	0.50	0.43	0.44	0.32	0.25	0.28	0.46	0.20	0.63	0.73	0.63	*		
SWS03	0.50	0.23	0.44	0.49	0.52	0.42	0.78	0.49	0.36	0.29	0.59	0.34	0.34	0.73	*	
SBD02	0.22	0.29	0.29	0.14	0.35	0.42	0.25	0.94	0.31	0.35	0.56	0.39	0.28	0.35	0.37	*

2.3 F 基因核苷酸(氨基酸)同源性比较

16 株 NDV 毒株 F 基因的核苷酸(氨基酸)全长同源性比较结果见表 4。2 株基因 II 型野毒与 LaSota 之间的核苷酸(氨基酸)同源性较高, 为 88.6%~99.9% (93.1%~100%); 9 株基因 VII 型毒株之间的同源性为

94.6%~99.3%(95.5%~99.6%); 2 株基因 IX 型野毒与经典强毒 F₄₈E₉ 等之间的同源性为 98.9%~99.6%(98.7%~99.35%)。相反, 不同基因型之间的同源性较低。以 LaSota 与基因 VII 型为例, 其核苷酸(氨基酸)同源性为 82.7%~84.15%(88.1%~88.8%)。

表 4 NDV 毒株 F 基因核苷酸和氨基酸同源性比较
Table 4 Comparison of F genes among different NDV strains in nucleotides/amino acids

	La	Clone	F ₄₈ E ₉	TJ03	SGM01	SDD01	SRZ03	SKY03	SL03	WHZ03	SF02	SSX03	QE01	SPY03	SWS03	SBD02
La	*	99.9	88.6	89.0	83.1	82.8	88.6	82.7	82.7	83.4	83.6	84.1	99.5	83.3	83.7	88.7
Clone	99.6	*	88.7	89.1	83.2	82.9	88.6	82.9	82.9	83.5	83.8	84.1	99.5	83.4	83.8	88.8
F ₄₈ E ₉	91.7	91.9	*	99.6	85.5	85.3	86.6	85.4	85.6	86.2	86.1	86.1	88.1	86.2	86.3	98.9
TJ03	92.2	92.4	99.3	*	85.7	85.4	86.8	85.6	85.8	86.4	86.3	86.3	88.6	88.6	86.5	99.2
SGM01	88.6	88.8	90.8	91.3	*	97.8	92.5	98.7	97.4	98.1	98.4	96.9	83.6	98.5	95.1	86.0
SDD01	88.4	88.6	90.8	91.3	97.7	*	92.4	97.4	99.3	98.0	97.1	96.9	83.3	97.2	94.6	85.8
SRZ03	93.1	93.0	91.2	91.3	92.8	93.5	*	92.2	92.4	93.4	92.5	94.0	88.4	92.8	91.5	86.4
SKY03	88.6	88.8	91.0	91.5	98.2	97.5	92.8	*	97.0	97.7	98.3	96.5	83.3	98.1	94.9	86.0
SL03	88.1	88.3	91	91.5	97.3	99.1	93.1	97.1	*	98.1	97.2	96.9	82.7	97.8	94.9	85.4
WHZ02	88.8	89.0	91.5	92.1	98.0	98.7	94.2	98.0	98.4	*	98.1	98.6	83.2	98.1	95.8	86.0
SF02	89.2	89.4	91.3	91.9	98.7	98.2	93.3	98.9	97.8	98.4	*	96.9	83.5	98.3	95.2	85.9
SSX03	88.8	88.6	91.2	91.7	96.6	97.3	94.2	96.6	97.1	98.4	96.9	*	83.9	97.1	94.6	85.9
QE01	99.6	99.5	91.5	92.1	88.6	88.4	93.1	88.6	88.1	88.8	89.2	88.8	*	83.3	83.5	89.0
SPY03	88.8	89.0	91.5	92.1	98.0	97.3	93.0	97.8	97.7	97.7	98.4	96.4	88.8	*	95.2	86.0
SWS03	88.8	89.0	90.8	91.3	95.8	96.2	93.3	96.0	96.0	96.9	96.2	95.5	88.8	95.7	*	86.1
SBD02	92.4	92.6	98.7	99.3	91.5	91.5	91.5	91.7	91.2	92.2	92.1	91.5	92.2	91.7	91.3	*

The homologies of F gene are presented in the right-upper triangle, and the left is amino acids.

2.4 HN 基因核苷酸(氨基酸)同源比较和系统发育

表 5 显示的是 NDV 不同毒株 HN 基因核苷酸(氨基酸)全长的同源性比较。结果显示: 13 株 NDV 流行株(1997 年以后)之间的核苷酸(氨基酸)全长同源性较

高, 为 95.2%~99.8%(95.8%~100%), 而与传统的毒株 La Sota、Clone30、F₄₈E₉ 之间同源性较低, 仅为 79.1%~84.3%(87.7%~90.0%), 显示出经典毒株与目前流行株的 HN 基因之间已有明显的差异。

表 5 不同毒株间的 NDV HN 核苷酸(氨基酸)同源性
Table 5 Comparison of HN genes among different NDV strains in nucleotides/amino acids

	La	Clone	F ₄₈ E ₉	TJ03	SGM01	SDD01	SRZ03	SKY03	SL03	WHZ03	SF02	SSX03	QE01	SPY03	SWS03	SBD02
La	*	99.7	87.3	80.1	79.8	79.1	80.0	79.9	80.1	80.2	80.1	79.7	79.2	80.7	79.9	80.7
Clone	99.3	*	87.6	80.2	80.0	79.2	80.1	80.0	80.2	80.3	80.2	79.8	79.3	80.8	80.0	80.8
F ₄₈ E ₉	91.2	91.9	*	82.9	82.9	81.9	82.9	82.9	83.1	82.8	83.2	82.5	82.3	84.3	82.9	84.3
TJ03	88.3	89.0	89.8	*	98.0	97.3	99.4	98.3	98.3	98.3	99.1	98.1	98.1	95.4	98.1	95.4
SGM01	87.6	88.3	89.1	98.4	*	98.8	97.6	97.4	99.6	97.6	98.1	97.4	97.3	95.4	99.8	95.4
SDD01	87.7	88.4	89.3	98.8	99.6	*	96.9	96.7	99.0	96.9	97.3	96.6	96.5	94.6	99.1	94.6
SRZ03	87.7	88.4	89.3	98.9	97.7	98.1	*	98	97.9	98	98.8	97.8	97.7	95.3	97.7	95.3
SKY03	87.7	88.4	89.3	97.9	96.7	97.0	97.2	*	97.7	98.8	98.5	99.0	98.0	95.2	97.6	95.2
SL03	88.3	89.0	89.8	99.3	99.1	99.5	98.6	97.5	*	97.9	98.4	97.7	97.6	95.7	99.8	95.7
WHZ02	88.4	89.1	89.7	98.6	97.4	97.7	97.9	98.1	98.2	*	98.6	99.1	98.4	95.3	97.7	95.3
SF02	88.4	89.1	90	99.5	98.2	98.6	98.8	98.1	99.1	98.6	*	98.4	98.2	95.6	98.2	95.6
SSX03	87.9	88.6	89	97.7	96.5	96.8	97.0	98.4	97.4	98.2	97.9	*	98.6	94.9	97.5	94.9
QE01	87.0	87.7	88.3	97.0	95.8	96.1	96.3	96.5	96.7	97.2	97.2	97.2	*	94.8	97.4	94.8
SPY03	87.9	88.6	90.0	97.9	96.7	97.0	97.5	96.8	97.5	97.4	98.1	96.7	96.0	*	95.5	100.0
SWS03	87.7	88.4	89.3	98.8	99.6	100.0	98.1	97.0	99.5	97.7	98.6	96.8	96.1	97.0	*	95.5
SBD02	87.9	88.6	90.0	97.9	96.7	97.0	97.5	96.8	97.5	97.4	98.1	96.7	96.0	100.0	97.0	*

The homologies of HN gene are presented in the right-upper triangle of the table, the left is amino acids.

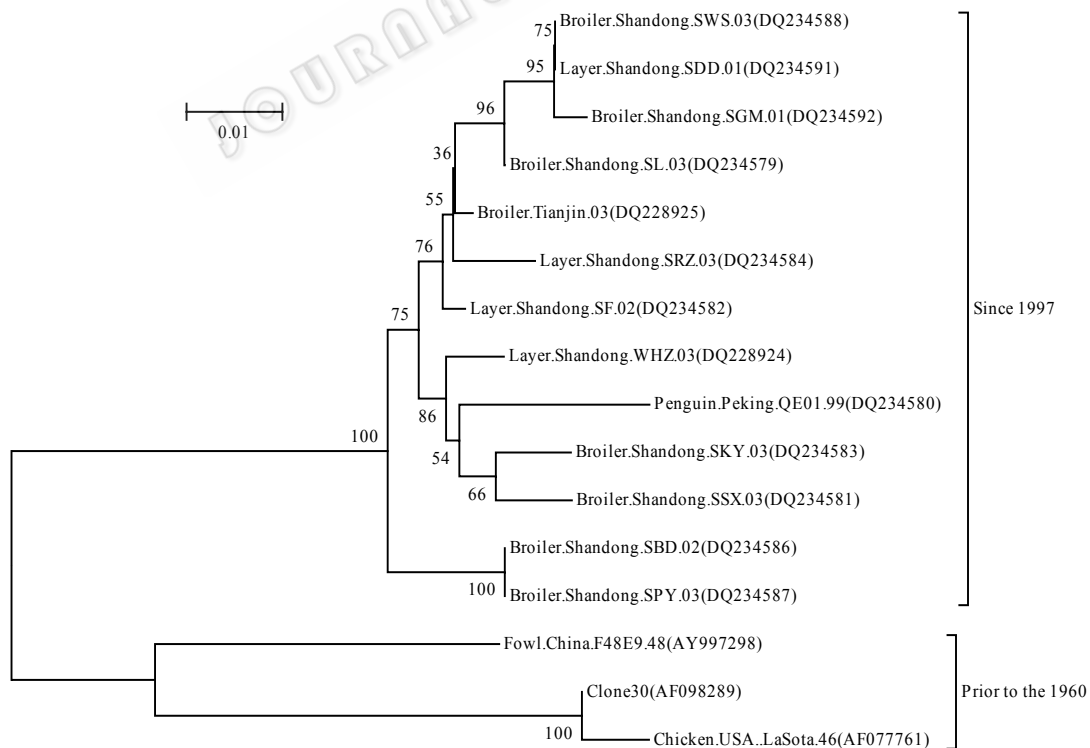


图 2 根据 HN 基因前 571 推导氨基酸序列构建的 NDV 分离株与参考毒株系统进化树

Fig.2 Phylogenetic tree based on deduced amino acid sequences (aa 1-571) of the HN gene of NDV isolates and reference strains. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap with 500 repetitions. Bar, 0.01 sequence divergence. Sequences accession numbers in GenBank are in brackets.

图 2 具体显示了 16 株 NDV 包括疫苗株、经典强毒与流行毒之间的系统发育。结果表明: NDV 流行毒之间特别是 1997 年以后的毒株遗传距离较近, 同属一个大分支; 而与 1960 年以前 La Sota、Clone30 和 1946 年分离的中国经典强毒 F₄₈E₉ 距离较远; 这表明: NDV 流行株与国内标准强毒株和疫苗株具有明显的差别。

2.5 NDV 中和指数与基因同源性的相关性

NDV 中和指数与其 HN 基因核苷酸(氨基酸)的同源性具有显著的相关性($P < 0.01$), $r = 0.35(0.34)$, 与 F 基因核苷酸(氨基酸)的同源性呈弱相关, ($P < 0.05$), $r = 0.20(0.19)$, 而与进行经典 F 基因分型的 F 基因前 374 核苷酸的同源性不相关, $r = 0.13$ 。这表明: NDV 的中和能力抗原性可能主要与 HN 基因的遗传变异相关。

3 讨论

3.1 NDV 抗原性的变异

有关新城疫抗原性变异的争论较多, 目前尚未形成共识。中和试验是一种特异性较高的血清学方法, 在一定程度上反应出病毒之间的抗原性交叉保护关系。对 13 个 NDV 流行株和 3 个标准株进行中和试验, 结果发现: 疫苗 La Sota 对经典的强毒 F₄₈E₉ 具有较好的保护, 抗原中和指数为 0.77, 但对大部分 NDV 流行株则较低, 只有 1/13(7.69%) 的 NDV 流行株与 La Sota 间的同源性接近 0.5, 而其余大部分 NDV 野毒与 La Sota 和 F₄₈E₉ 的同源性已降至 0.15~0.5, 进而证实了目前的 NDV 野毒与疫苗相比已经发生了抗原变异。

研究还发现: 即使同属于基因 VII 型的 NDV 野毒之间中和指数变化在 0.15~0.99, 反应出 F 基因型与抗原性之间没有必然的联系。这是国内外首次尝试对足够数量的 NDV 毒株间进行抗原性差异的比较, 而且用客观量化的数据证明了我国鸡群中已经出现了与常规疫苗株有显著抗原性差异的野毒。提示: 研制新型的 NDV 疫苗成为我国 ND 控制的必然。

3.2 NDV 抗原性及其与 HN 和 F 基因变异的相关性

通过对 16 株 NDV HN 核苷酸(氨基酸)的同源性和系统发育比较证实: 13 株 NDV 分离株之间核苷酸和氨基酸均高度同源, 而与 La Sota、Clone30、F₄₈E₉ 等同源性相对较低。这表明目前流行的 NDV 应该在分子水平上发生了一定程度的变异。

利用 SPSS8.0 统计学软件对鸡胚中和指数与 NDV HN 基因、F 基因的核苷酸(氨基酸)遗传变异进行

相关分析。结果表明: NDV 不同毒株的鸡胚中和指数与 HN 基因同源性的相关系数显著高于与 F 基因的相关系数, 更显著高于 F 基因前 374bp 的同源性的相关系数, 而后者是 F 基因分型的重要依据。该结论与国外利用针对 F 和 HN 蛋白的单抗得出的结论类似^[16]。多年来, 学术界在对 NDV 的分子流行病学调查中一直强调 F 基因分型对于疫病防控的重要作用, 本试验证实, 这种观点可能是片面的, 至少对疫病控制的指导作用不大。

下一步的工作是: 利用反向遗传操作技术和单克隆抗体等技术对 NDV 的 HN 和 F 蛋白的关键位点进行回复突变和表达, 制备表达产物抗体, 进行中和试验来证实。

致谢 本项目得到了中国农业大学赵继勋教授, 山东农业大学崔治中教授的指点和帮助, 在此表示感谢!

参 考 文 献

- [1] YM Saif. 禽病学. 苏敬良, 高福, 索勋译. 第十一版. 北京: 中国农业出版社, 2005.
- [2] Czegledi A, Ujvari D, Somogyi E, et al. Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. *Virus Research*, 2006, 120: 36-98.
- [3] Wang Z, Iorio RM. Amino acids substitutions in a conserved region in the stalk of Newcastle disease virus HN glycoprotein spike impair its neuraminidase activity in the globular domain. *Journal of Virology*, 1999, 80: 749-753.
- [4] McGinnes LW, Wilde A. The role of the individual cysteine residues in the formation of the mature, antigenic HN protein of Newcastle disease virus. *Virology*, 1994, 200: 470-483.
- [5] Sagrera A, Cobaleda C, Gonzalez De Buitrago JM, et al. Membrane glycoproteins of Newcastle disease virus: Nucleotide sequence of hemagglutinin-neuraminidase cloned gene and structure function relationship of predicted amino acid sequence. *J Glycoconj*, 2001, 18(4): 283-289.
- [6] 王永坤, 严维巍, 周继宏, 等. 鸡副粘病毒病防制的探讨. 中国禽业导刊(*Guide to Chinese Poultry*), 2000, 17(11): 4-5.
- [7] 马保臣, 何叶峰, 徐怀英, 等. 高抗体水平种鸡 NDV 的分离鉴定和分子特征. *微生物学通报(Microbiology)*, 2007, 34(1): 95-100.
- [8] 黄祯祥. 主编. 医学病毒学基础及实验技术. 第一版. 北京: 科学出版社, 1990.
- [9] 秦卓明, 王友令, 马保臣, 等. 新城疫病毒 HN 基因的遗传变异和 HI 相关性的研究. *病毒学报(Chinese Journal of Virology)*, 2006, 22(9): 379-384.

- [10] 世界动物卫生组织(OIE)著. 农业部畜牧兽医局译. 哺乳动物、禽、蜜蜂 A 和 B 类疫病诊断试验和疫苗标准手册. 北京: 中国农业科学技术出版社, 1996. 140–146.
- [11] 杜念兴. 主编. 兽医免疫学(第二版). 北京: 中国农业出版社, 1998, 133–134.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 秦卓明, 马保臣, 崔治中, 等. 新城疫病毒 HN 和 F 基因遗传变异相关性的研究. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2006, 46(2): 227–232.
- [15] 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.
- [16] Umino Y, Kohama T, Kohase M, *et al.* Biological functions of monospecific antibodies to envelope glycoproteins of Newcastle disease virus. *Arch Virol*, 1984, 81: 53–65.

Correlation of the neutralization index in chicken embryo with the homologies of F and HN gene of different Newcastle-Disease isolates

Zhuoming Qin*, Huaiying Xu, Wenjun Ouyang, Youling Wang, Lili Wang, Xiaoyuan Yuan, Leitao Tan

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

Abstract: Thirteen prevailed Newcastle-disease viruses (NDV) isolated in China during 2001–2004 were purified by chick embryo fibroblast (CEF) plaque assay and characterized pathotypically and genotypically. The biological tests showed that these viruses were highly virulent. Sequence analysis based on the variable region (nucleotide 47–420) of the F gene indicated that of the 13 NDV isolates 2 belonged to genotype II, 2 to genotype IX and 9 to genotype VII. Isolates with genotype VII shared 94.6%–99.3% nucleotide (nt) homology with the F gene, whereas for genotype VII and La Sota was only 82.7%–84.1%. In addition, these NDV isolates all shared 95.2%–100% nt homology with the hemagglutinin-neuraminidase (HN) gene, whereas only 79.1%–84.3% compared these viruses with La Sota. The cross neutralization assays were done using positive serums in specific pathogen free (SPF) chicken embryos respectively. Correlation of the neutralization index in chicken embryo with the homologies of F and HN gene of different NDV isolates were analyzed by SPSS8.0 software. The result showed that the neutralization index was closely correlated with nt sequence ($P < 0.01$, $r = 0.35$) or deduced amino acid sequence ($P < 0.01$, $r = 0.34$) of the HN gene, whereas weakly correlated ($P < 0.05$, $r = 0.20$ or 0.19) with the F gene, and non-correlated with 374 nt segment. This implied that the genetic mutations of HN resulted in antigenic variations of these viruses and the search for new vaccines would be necessary.

Keywords: Newcastle disease virus; F gene; HN gene; antigenicity; correlation

Supported by the Key Project for Science and Technology Development of Shandong Province (030317) and the Key Project of Shandong Academy of Agricultural Sciences (2006YCX024)

* Corresponding author. Tel: +86-531-88961344; E-mail: qinzm1997@163.com

Received: 6 June 2007/ Revised: 29 August 2007