

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49(3) 302-308; 4 March 2009
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

两株基因 III 型强毒新城疫的全基因组测序及其与 I 系苗的亲缘性分析

仇旭升, 孙庆, 姚春峰, 董丽, 吴艳涛, 胡顺林, 刘秀梵

(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【目的】研究基因 III 型新城疫(Newcastle disease, ND)强毒分离株 JS/7/05/Ch 和 JS/9/05/Go 与中等毒力疫苗株 Mukteswar 的亲缘性关系, 分析三株新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)的全基因差异。【方法】采用 RT-PCR 方法获得两株 NDV 分离株的全基因组核苷酸序列, 与 GenBank 中公布的 Mukteswar 序列比对分析。【结果】强毒分离株与中等毒力疫苗株 Mukteswar 全基因组核苷酸同源性均为 99.7% ; 病毒 6 个阅读框核苷酸序列与 Mukteswar 同源性为 99.6% ~ 99.9% ; 预测的 8 种病毒编码蛋白同源性在 98.8% ~ 99.8%。然而, 测定 MDT, ICPI 和 IVPI 发现 JS/7/05/Ch 和 JS/9/05/Go 毒力明显强于 Mukteswar, 其中 JS/7/05/Ch 株的 IVPI 达到了 2.18。【结论】综合 3 株 NDV 的遗传分析结果和已有的流行病学资料可以推断分离株 JS/7/05/Ch 和 JS/9/05/Go 是由疫苗株 Mukteswar 自然进化而来的返强毒株。因此, 必须停止使用中等毒力疫苗以免造成更大的危害。

关键词: 基因 III 型, 新城疫病毒, Mukteswar, 全基因组, 毒力返强

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)03-0302-07

新城疫(Newcastle disease, ND)能够感染多种禽类的一种急性、高度传染性疫病, 是危害世界养禽业的重要传染病之一, 给许多国家的养禽业造成巨大的经济损失^[1]。最新的分类将 NDV 归类为副粘病毒科, 副粘病毒亚科, 禽腮腺炎病毒属^[2]。目前, 已知的新城疫病毒基因组长度有 3 种, 15186 bp, 15192 bp 和 15198 bp^[3-4]。3 种长度的 NDV 都包含相同的 6 个阅读框, 基因排列方式为 3'-NP-P-M-F-HN-L-5', 主要编码 6 种病毒蛋白^[5], 依次分别为核衣壳蛋白、磷蛋白、基质蛋白、融合蛋白、血凝素-神经氨酸酶蛋白和大分子蛋白。另外, 在 P 基因的转录过程中会出现 RNA 编辑现象^[6], 即在 mRNA 特定的位置上插入一到两个 G, 从而产生额外的 V 蛋白及 W 蛋白。

尽管 NDV 只有一个血清型, 不同毒株之间的生物学特性存在明显差异。根据致病力的不同, NDV 通常分为强毒株, 中等毒力株和弱毒株。强毒株会导致感染动物大量急性死亡, 其发病症状以神经呼吸道症状或者肠道严重出血为主; 中等毒力株引起雏鸡的呼吸道症状和产蛋母鸡产蛋下降, 而弱毒株一般不致病, 偶尔能引起雏鸡轻微的呼吸道症状。根据 1999 年 Alexander 等的报道^[7], 可以用 1 日龄雏鸡脑内接种致病指数(intracerebral pathogenicity index in 1-day-old, specific-pathogen-free chickens, ICPI)判定 NDV 的毒力。ICPI 值小于 0.5 为弱毒, 介于 0.5 到 1.5 之间为中等毒力, 大于 1.5 为强毒。

基因 III 型 NDV 疫苗株 Mukteswar, 在中国也称

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(30630048); 江苏省高校自然科学基金面上项目(07KJB230140); 教育部科技创新工程重大项目培育资金项目(N0706032)

* 通信作者。Tel: +86-514-87991416; Fax: +86-514-87972591; E-mail: xfliu@yzu.edu.cn

作者简介: 仇旭升(1981-)男, 江苏扬州人, 博士研究生, 主要从事新城疫病毒分子生物学方向研究。E-mail: qiuxvsheng@163.com

收稿日期: 2008-11-04; 修回日期: 2008-12-19

为 I 系苗,曾在国内大规模应用。一般认为, Mukteswar 的毒力较强,属于中等毒力,大规模使用可能会导致毒株毒力返强,造成新的流行。因此,目前很多国家已经停止了中等毒力疫苗的使用。本实验室分离到的 NDV 毒株 JS/7/05/Ch 和 JS/9/05/Go 鉴定为基因 III 型, F 基因 47 nt ~ 420 nt 序列与 Mukteswar 的同源性高达 99.9%^[8]。然而, JS/7/05/Ch 和 JS/9/05/Go 的 ICPI 指数明显高于 Mukteswar。为了探讨两株 NDV 分离株与中等毒力疫苗株 Mukteswar 的遗传进化关系,我们展开了进一步的研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒、实验动物:鸡源 NDV 分离株 JS/7/05/Ch, 鹅源 NDV 分离毒株 JS/9/05/Go 为本实验室近期分离,分离株通过蚀斑筛选的方法纯化 3 次^[8]。测定和分析病毒 F 基因 47nt ~ 420nt 的核苷酸序列后,两株病毒鉴定为基因 III 型。SPF 鸡胚购自山东家禽研究所, SPF 鸡由本室孵化。

1.1.2 主要仪器和试剂:PT-2000 PCR 仪, Model 3000Xi 电泳仪购自 BioBAD 公司; Agarose Gel DNA Extraction Kit, X-Gal, IPTG, dNTP, *Taq* 酶等购自宝生物工程(大连)有限公司; LB 培养基、Trizol 抽提试剂购自 Invitrogen life technologies; 限制性内切酶主要为上海生物工程公司产品; M-MLV 反转录酶、RNasin、T-easy 载体和琼脂糖购自 Promega

Corporation。

1.2 静脉接种致病指数实验 (Intravenous pathogenicity index, IVPI)

按照 OIE 标准进行 IVPI 实验。取新鲜病毒尿囊液用无菌 PBS 做 10 倍稀释。稀释液接种 10 只 6 周龄 SPF 鸡, 静脉接种, 每只注射 100 μ L。饲养 10 d, 每隔 24 h 观察一次, 记录实验动物发病情况并评分。正常为 0, 发病为 1, 瘫痪或神经症状为 2, 死亡为 3。最后计算 10 d 内平均每只鸡每天的评分值, 即为该毒株的 IVPI 值。

1.3 鹅致病力实验

采用未免疫的隆昌鹅雏鹅, 隔离饲养, 定期采血分离血清, 检测针对 NDV 的 HI 效价, 待平均母源抗体水平低于 1 时(24 日龄), 分别用 10^5 个 EID₅₀ 的病毒尿囊液病毒点眼滴鼻。设 F48E8 攻毒组做阳性对照, PBS 组做阴性对照。实验鹅每组 7 只, 隔离饲养 2 周, 记录发病情况。病死鹅采集病料做病毒分离, 存活的实验鹅采血分离血清, 检测 HI 效价。

1.4 病毒全基因的 RT-PCR 扩增

1.4.1 引物设计:参考 GenBank 中 III 型新城疫病毒 Mukteswar 毒株的全基因组核苷酸序列(登录号: EF201805)以及其它 NDV III 型、IV 型和 IX 型部分核苷酸序列, 共设计了 10 对引物。相邻扩增片段之间有 50 nt ~ 100 nt 重叠, 连接起来可以覆盖 NDV 全基因组。引物在上海生物工程有限公司合成。引物序列均在表 1 中列出。

表 1 针对基因 III 型 NDV 的 10 对核苷酸引物序列

Table 1 Ten pairs of primers used to generate PCR products from genotype III NDV strains

Fragment designation	Primer sequence (5'→3')	Position	Expected product size /bp
A1	ACCAAACAGAGAATCCGTGAG	1-21	1270
	CITTAGCTCGGCAGCCATATCCTC	1247-1270	
A2	TGAGCACATCATTCTGGAGACTTG	1185-1208	1096
	TGGACGATTTATTGCTAAGCTTG	2258-2280	
B	CAAGACTGGAGCAAGCAACT	2219-2238	2003
	GGAGAGGCATTTGCTATAGG	4202-4221	
C	GGGCTCACTGATGTGCTCG	4100-4118	1964
	ATATAGGTAATGAGAGCAGATGTC	6040-6063	
D	AAATAATATGCGTGCCACCT	5434-5453	1661
	GAACGCAGAGTAGAAAAGAATA	7073-7094	
E	CAAGAACACCTGAATTTTATCCCG	6686-6909	2260
	TTAGATGCCTTTGGACCTGTTTTA	8922-8945	
F	TGGTTTCACTCAAAATGGTCC	8876-8896	1223
	ATCCCTTCTGCCATTACCTG	10079-10098	
G	ACCCTTGAGTACCTAAGAGATGA	9965-9987	2116
	TGTCCCATAAAGCCCAGAT	12062-12080	
H	AATCCTGATACCATAGAACTTGT	11801-11823	2032
	GTCCGAAATGTCGCTGTG	13815-13832	
I	CTAGGAAGAGCCTTAATTTGAT	13350-13371	1838
	ACAAAGATTTGGTGAATGACA	15167-15187	

1.4.2 病毒 RNA 提取:取 250 μ L 分离株病毒的尿囊液,按照 Invitrogen 公司 Trizol 试剂使用说明书流程提取病毒全基因 RNA^[8]。每份病毒 RNA 样品溶解于 50 μ L DEPC 处理水,保存于 -70 $^{\circ}$ C 备用。

1.4.3 病毒全基因的 RT-PCR 扩增:用 6 碱基随机引物进行反转录,表 1 中的 10 对特异引物对 JS-7-05-Ch 和 JS-9-05-Go 的全基因进行 PCR 扩增。RT 反应条件为:42 $^{\circ}$ C 60 min,70 $^{\circ}$ C 15 min;PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 3 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 2 min,30 个循环,72 $^{\circ}$ C 10 min。取 PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳检查结果。

1.5 全基因片段的克隆转化和基因测序分析

PCR 产物的回收按 Agarose Gel DNA Purification Kit 说明书进行。将纯化后的产物按 pGEM-T easy

Vector 说明书进行连接和转化。经 AIX 平板筛选阳性克隆,常规方法提取质粒,用 *Eco*R I 进行酶切鉴定。将含有重组质粒的菌液送上海生物工程有限公司进行测序。应用分析软件 DNASTAR 对实验毒株和 GenBank 收录的其它 NDV 毒株的相应序列进行比对分析。

2 结果

2.2 两株 III 型 NDV 对实验鸡的致病力

根据 OIE 标准进行 IVPI 实验,测定 JS/7/05/Ch 株 IVPI 为 2.18,JS/9/05/Go 株 IVPI 为 1.33。综合 MDT,ICPI 和 IVPI 实验数据,JS/7/05/Ch 株为强毒,JS/9/05/Go 株稍弱,接近于中等毒力。本实验两株病毒以及 III 型疫苗株 Mukteswar 的各项毒力指标见表 2。

表 2 JS/7/05/Ch, JS/9/05/Go 和 Mukteswar 的来源、特性及毒力

Table 2 Origin, properties and virulence of JS/7/05/Ch, JS/9/05/Go and Mukteswar

Isolate	Origin	Host	MDT/h	ICPI	IVPI	Genotype
JS-7-05-Ch	Haimeng	chicken	46.8	1.88	2.18	III
JS-9-05-Go	Yizheng	goose	49.2	1.61	1.33	III
Mukteswar		chicken	46.4	1.44	0.08	III

2.3 两株 III 型 NDV 对实验鹅致病力

JS/9/05/Go 攻毒组实验鹅,未出现明显的症状,饮食饮水正常,泄殖腔棉拭没有分离到病毒;JS/7/05/Ch 株攻毒后,第 3 天全部出现症状,至全部转归,共死亡 2 只,从病料和泄殖腔棉拭中分离到 NDV 病毒,测序后证明为 JS/7/05/Ch 株。阴性对照组未出现症状,阳性对照组攻毒后第 3 天出现病变,7 只实验鹅死亡 3 只,与早期报道相符^[9]。

2.4 全基因组分析

RT-PCR 扩增出的 10 个目的片段与预期大小相符,测序后,利用 DNASTAR 软件拼接,获得除 3'和 5'最末端引物设计区域以外的整个基因组的核苷酸序列。鉴于副粘病毒在末端的高度保守,可以确定获得了 NDV III 型毒株 JS/7/05/Ch 和 JS/9/05/Go 的全基因序列。JS/7/05/Ch 和 JS/9/05/Go 全基因组序列 GenBank 登录号为 FJ430159 和 FJ430160。两株病毒在 NP 5'NCR 上没有文献报道的 6 nt 插入,全基因组长度为 15,186 bp,与 GenBank 上公布的 I-IV 型 NDV 全基因长度相同。比对发现,JS/7/05/Ch 和 JS/9/05/Go 全基因组核苷酸序列的同源性高达 99.6%。在所有 GenBank 公布的 NDV 全基因组核苷酸序列中,Mukteswar 与本文两株病毒的同源性最高,3 株病毒全基因组核苷酸序列同源性超过 99%。此外,两株病毒均为标准的强毒 F 蛋白裂解位点¹¹² RRQRR ↓

F¹¹⁷ 编码 HN 蛋白长度为 571 aa。

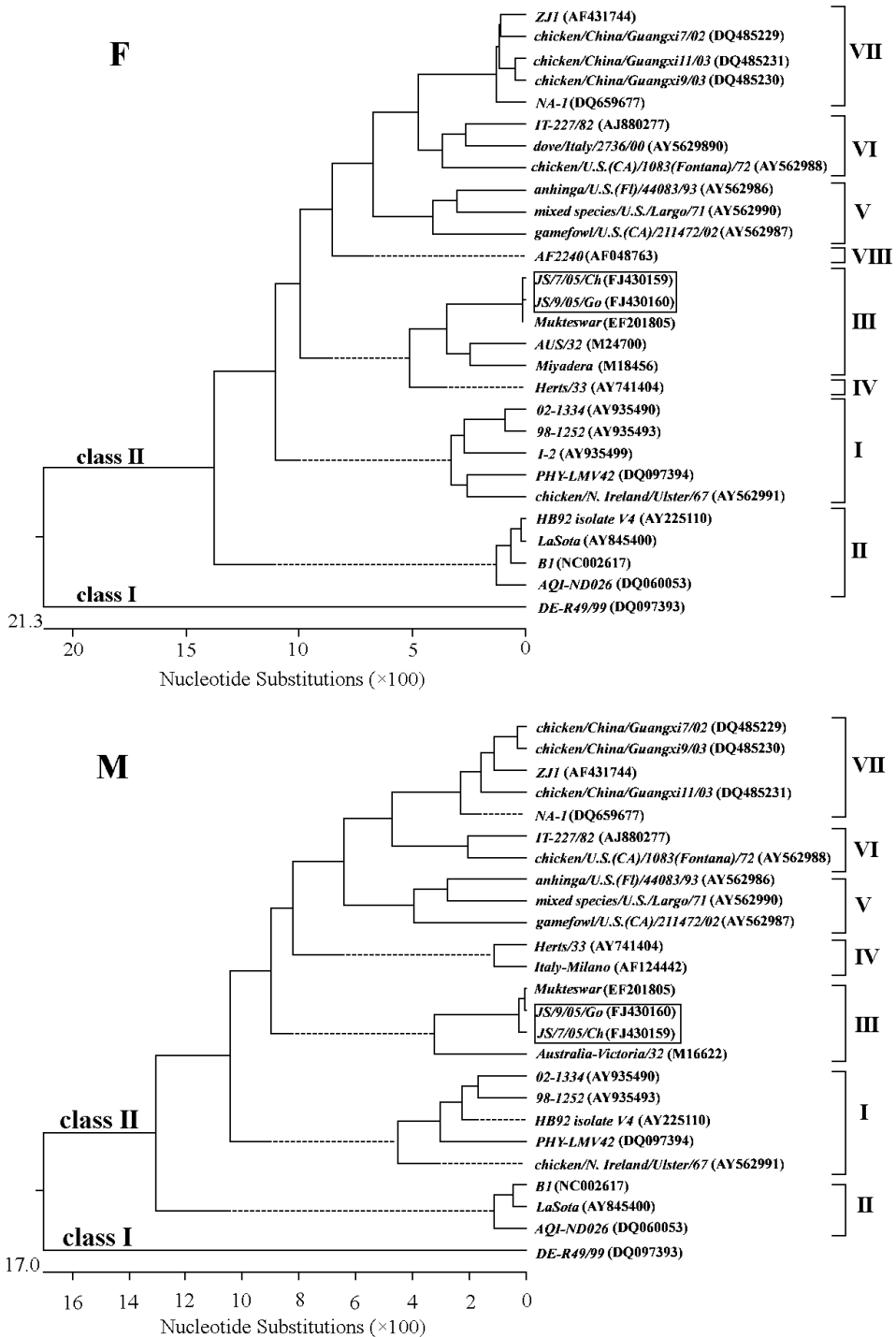
将 JS/7/05/Ch 和 JS/9/05/Go 全基因组非编码区,间隔区与其它 NDV 毒株进行比较,发现两株病毒 6 个基因的起始信号、终止信号及基因间隔区核苷酸序列与其它 NDV 毒株的相应序列具有高度的同源性。*np-p*、*p-m*、*m-f*、*f-hn*、*hn-l* 各基因间区的序列长度依次为 1 nt、1 nt、1 nt、31 nt 和 32 nt,长度与 NDV 基因组各基因之间的间隔区序列长度相符。

2.5 同源性及遗传进化分析

将测序获得的病毒全基因组序列与 GenBank 上发表的序列比较,发现本文两株 III 型毒株与疫苗株 Mukteswar 全基因组同源性均为 99.7%;病毒 6 个阅读框核苷酸序列与 Mukteswar 同源性为 99.6%~99.9%,预测的 8 种病毒编码蛋白同源性在 98.8%~99.8%。进一步的比对分析发现 3 株病毒的氨基酸差异主要集中在 HN 和 L 蛋白,而病毒蛋白 NP、P、V、W、M 和 F 的氨基酸序列同源性很高,只存在两到 3 个氨基酸的差异,且大多属于保守突变。

利用测定的病毒 6 个阅读框核苷酸序列及预测的 8 种病毒蛋白氨基酸序列绘制遗传进化树。两株病毒在几个进化树上的位置保持不变,始终与基因 III 型毒株处于同一分支,且与 Mukteswar 最为靠近。图 1 为根据 F 基因和 M 基因核苷酸序列绘制的遗传进化树。图 2 为根据最保守的 L 蛋白的氨基酸序

列绘制的遗传进化树。



1 根据 NDV F 基因和 M 基因核苷酸序列绘制的遗传进化发生树

Fig. 1 Phylogenetic tree analysis based on nucleotide sequence of F and M gene of NDV strains. Horizontal-line distances are proportional to the minimum numbers of nucleotide changes needed to join nodes and gene sequences. The vertical lines are present simply for spacing the branches and labels.

3 讨论

全基因组的比对分析结果显示,本研究中的两株基因 III 型分离株 JS/7/05/Ch 和 JS/9/05/Go 与 Mukteswar 的亲缘性最高。一方面,两株分离株与

Mukteswar 全基因组以及 6 个阅读框核苷酸序列的同源性为 99.6% ~ 99.9%,而预测的 8 种病毒编码蛋白质的氨基酸序列同源性在 98.8% ~ 99.8%。另一方面,NDV 所有基因和编码蛋白质的遗传进化分析结果显示,在所有比对的基因 III 型 NDV 中,JS/7/

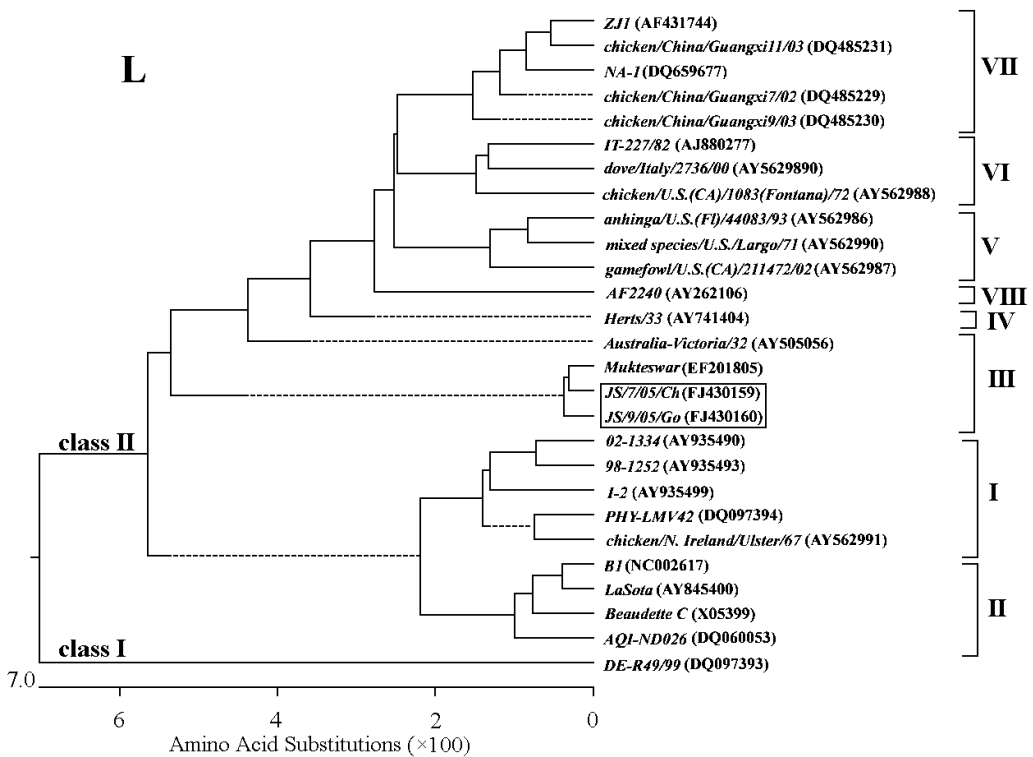


Fig.2 根据 NDV L 蛋白的氨基酸序列绘制的遗传进化树

Fig.2 Phylogenetic tree analysis based on amino acid sequence of L gene of NDV strains. Horizontal-line distances are proportional to the minimum numbers of amino acid changes needed to join nodes and sequences. The vertical lines are present simply for spacing the branches and labels.

05/Ch, JS/9/05/Go 和 Mukteswar 的遗传距离最近,与 AUS victoria/32、Miyadera/51 等强毒株遗传距离稍远。

一般认为,基因 III 型和 IV 型 NDV 强毒与 20 世纪 20 年代的 NDV 第一次大流行有关^[10],不过,半个多世纪以来,世界范围内很少有基因 III 型 NDV 的分离。中国一直没有基因 III 型强毒 NDV 流行的报道,而且国内偶尔分离到的基因 III 型毒株也都与 Mukteswar 具有很高的同源性^[11]。因此,除了曾经大规模使用的中等毒力疫苗株 Mukteswar 以外,国内应该不存在其它来源的基因 III 型 NDV。综合 3 株 NDV 的遗传分析结果和流行病学资料可以推断 JS/7/05/Ch 和 JS/9/05/Go 是由疫苗株 Mukteswar 自然进化而来的返强毒株。

从实验数据上看,JS/7/05/Ch 和 JS/9/05/Go 的毒力明显强于 Mukteswar,JS/7/05/Ch 毒力最强,ICPI 达到了 2.18,对鹅均有一定的致病力。在免疫压力下,中国基因 III 型 NDV 毒株可能会获得更强的毒力,造成更大的危害。值得注意的是,在分子流行病学的研究中,通常测定 NDV 分离株 F 基因的部分核苷酸序列进行毒株鉴定。在未测定病毒 ICPI 和 IVPI 的情况下,很容易将 JS/7/05/Ch 一类的基因 III 型强毒误判为疫苗株 Mukteswar。JS/7/05/Ch 等毒株

的存在严重干扰了流行病学检测。因此,必须停止使用中等毒力疫苗株,同时加强对 NDV 的流行病学监测。

JS/7/05/Ch 和 JS/9/05/Go 的毒力为什么会明显强于 Mukteswar,其分子机制如何?一般认为,F 蛋白的裂解位点基序决定了细胞蛋白酶对病毒 F 蛋白的剪切能力,从而决定了 NDV 的毒力。在病毒蛋白合成的过程中,F 蛋白最早以没有融合活性的前体状态存在,即 F₀。细胞蛋白酶将 F₀ 剪切成两个以二硫键相连的多肽片段(F₁和 F₂)之后,F 蛋白才具有融合活性^[12]。然而 3 株基因 III 型病毒具有相同的强毒 F 蛋白裂解位点基序¹¹²RRQRR↓F¹¹⁷,因此,应该存在影响毒力的其它分子机制。

基因测序结果显示 JS/7/05/Ch、JS/9/05/Go 和 Mukteswar 所有基因的起始信号、终止信号及基因间隔区核苷酸序列完全相同。3 株病毒的 8 个编码蛋白(尤其 NP、P、M 和 F)的氨基酸序列均高度同源,氨基酸差异主要集中在 HN 和 L 蛋白。

NDV 的 HN 蛋白的长度曾经被认为是影响病毒毒力的因素之一^[13]。然而,2003 年 Angela 等^[14]利用反向遗传技术构建了带有不同 HN 蛋白长度的 Clone-30 重组毒株,认为 HN 蛋白的长度不影响 NDV

的毒力。HN 蛋白在膜外区可分为近膜的柄部和与柄部相连的球状区, HN 蛋白受体结合位点和神经氨酸酶活性位点都位于球状区^[15], 柄部则具有促融合作用^[16]。Peeters 等^[17]认为病毒蛋白 HN 的球状区和柄部都影响病毒的毒力。L 蛋白是 NDV 基因组中最后一个被转录的基因, 主要参与 NDV 基因组复制, 病毒基因的转录以及对新合成 mRNA 加帽和加尾^[17-18]。一般认为, L 蛋白与病毒的繁殖速度有关, 可能会影响病毒毒力。最近 Samal 等^[19]通过反向遗传技术将强毒 Beaudette C 替换为疫苗株 LaSota 的 L 基因, 重组病毒的繁殖速度和致病力明显高于母本病毒。本研究中 3 株基因 III 型 NDV 毒株病毒蛋白氨基酸的差异是否影响蛋白的功能, 是否是导致分离株 JS/7/05/Ch 和 JS/9/05/Go 毒力明显强于疫苗株 Mukteswar 的决定因素还需要实验进一步的验证。

参考文献

- [1] Alexander DJ. Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections//Saif JM, Barnes HJ, Glisson JR, et al. Diseases of Poultry. 11th ed. Ames, Iowa : Iowa State University Press, 2003 : 63 - 99.
- [2] Mayo MA. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Archives of virology*, 2002, 147 : 1655 - 1656.
- [3] Czeglédi A, Ujvári D, Wehmann E, et al. Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. *Virus Research*, 2006, 120 : 36 - 48.
- [4] Huang Y, Wan HQ, Liu HQ, et al. Genomic sequence of an isolate of Newcastle disease virus isolated from an outbreak in geese : a novel six nucleotide insertion in the non-coding region of the nucleoprotein gene. *Archives of Virology*, 2004, 149 : 1445 - 1457.
- [5] Kattenbelt JA, Stevens MP, Gould AR. Sequence variation in the Newcastle disease virus genome. *Virus Research*, 2006, 116 : 168 - 184.
- [6] Steward M, Vipond IB, Millar NS, et al. 1993. RNA editing in Newcastle disease virus. *Journal of General Virology*, 1993, 74 : 2539 - 2547.
- [7] Alexander DJ. Newcastle disease//Swayne DE, Glisson JR, Jackwood MW, et al. A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens. 4th ed. Kennett Square, PA : American Association of Avian Pathologists, 1999 : 156 - 163.
- [8] 姚春峰, 仇旭升, 刘文博, 等. 新城疫分离毒 HN 蛋白的抗原性初步分析及分子特性研究. *微生物学通报 (Microbiology)* 2008, 35(1) : 87 - 93.
- [9] 刘文博, 万洪全, 吴艳涛, 等. 鸡新城疫标准强毒感染鹅试验. *中国家禽 (China Poultry)*, 2001, 23(19) : 10 - 11.
- [10] 殷震, 刘景华. 动物病毒学. 第 2 版. 北京 : 科学出版社, 1997 : 743 - 748.
- [11] Liu HL, Wang ZL, Wu YG. Molecular characterization and phylogenetic analysis of new Newcastle disease virus isolates from the mainland of China. *Research in Veterinary Science*, 2008, 85 : 612 - 616.
- [12] 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. *Journal of Virology*, 1999, 73 : 5001-5009.
- [13] Sakaguchi T, Toyoda T, Gotoh B, et al. Newcastle disease virus evolution I. Multiple lineages defined by sequence variability of the hemagglutinin-neuraminidase gene. *Virology*, 1989, 169 : 260 - 271.
- [14] Angela R, Ortrud W, Jutta V, et al. Contribution of the length of the HN protein and the sequence of the F protein cleavage site to Newcastle disease virus pathogenicity. *Journal of General Virology*, 2003, 84 : 3121 - 3129.
- [15] Huang ZH, Panda A, Elankumaran S, et al. The Hemagglutinin-Neuraminidase Protein of Newcastle Disease Virus Determines Tropism and Virulence. *Journal of Virology*, 2004, 78 : 4176-4184.
- [16] Melanson VR, Iorio RM. Amino Acid Substitutions in the F-Specific Domain in the Stalk of the Newcastle Disease Virus HN Protein Modulate Fusion and Interfere with Its Interaction with the F Protein. *Journal of Virology*, 2004, 78 : 13053 - 13061.
- [17] Ishihama A, Barbier P. Molecular anatomy of viral RNA-directed RNA polymerase. *Archives of Virology*, 1994, 134 : 235 - 258.
- [18] Poch O, Blumberg BM, Bougueleret L, et al. Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses : theoretical assignment of functional domains. *Journal of General Virology*, 1990, 71 : 1153 - 1162.
- [19] Rout SN, Samal SK. The Large Polymerase Protein Is Associated with the Virulence of Newcastle Disease Virus. *Journal of Virology*, 2008, 82 : 7828 - 7836.

Full-length genome analysis of two genotype III velogenic Newcastle diseases virus strains reveals their close relationship with vaccine Mukteswar

Xusheng Qiu, Qing Sun, Chunfeng Yao, Li Dong, Yantao Wu, Shunling Hu, Xiufan Liu*

(Key Laboratory of Animal Infectious Diseases, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract [Objective] The purpose of this research is trying to uncover the homology between two velogenic genotype III Newcastle disease virus (NDV) isolates with NDV strain Mukteswar, which was commonly used as vaccine in China. **[Methods]** The full-length genome of NDV isolates, JS/7/05/Ch and JS/9/05/Go, were determined by RT-PCR and then analyzed. **[Results]** The full-length genome of 2 genotype III velogenic NDV isolates shared 99.7% nucleotide identity with that of Mukteswar. The results of alignment of 6 viral genes showed that JS/7/05/Ch and JS/9/05/Go shared nucleotide and amino acid identities of 99.6% ~ 99.9% and 98.8% ~ 99.8% with that of Mukteswar, respectively. Furthermore, the IVPI score of JS/7/05/Ch and JS/9/05/Go was 2.18 and 1.33, remarkably higher than that of Mukteswar, while the 3 NDV strains shared the consensus cleavage site of virulent NDV strains (112RRQRRF117). Virulence of NDV is mainly determined by the amino acid sequence of the fusion (F) protein cleavage site, since host proteases that cleave the F protein of virulent strains are present in more tissues than those that cleave the F protein of lentogenic strains. However, 3 NDV strains with same F protein cleavage site showed different virulence. The entire genomic sequence of JS/7/05/Ch, JS/9/05/Go and Mukteswar was further analyzed. Three strains shared some gene-start signal, gene-end signal, intergenic region and six highly identical viral genes. Most amino acid differences among JS/7/05/Ch, JS/9/05/Go and Mukteswar were found in the predicted HN and L protein, and the predicted NP, P, V, W, M and even F protein had few amino acid differences. **[Conclusion]** First, it is concluded that field isolates JS/7/05/Ch and JS/9/05/Go are derived from Mukteswar and more attention must be paid to the virulence enhancement of vaccine strains. Second, it is proposed that the differences in the amino acid sequence of HN and L protein may give rise to the significant virulence differences between two NDV isolates and Mukteswar.

Keywords : genotype III ; Newcastle disease virus ; Mukteswar ; entire genome sequence ; virulence enhancement

(本文责编 :王晋芳)

Supported by the Major Programs of National of Natural Science Foundation(30630048), the Natural Scientific Found for Colleges and Universities in Jiangsu Province(07KJB230140) and the Cultivation Found of the Key Scientific and Technical Innovation Project of Education Ministry of China(N0706032)

* Corresponding author. Tel : + 86-514-87991416 ; Fax : + 86-514-87972591 ; E-mail : xfliu@yzu.edu.cn

Received : 4 November 2008 / Revised : 19 December 2008

《微生物学报》答作者问——关于署名

问 我想问一下作者及单位署名顺序的修改问题。投稿后经过专家审查通过后即将发表, 如果想在作者和单位方面增、减新的内容, 并且修改作者及单位署名顺序是否可以? 是否需要提供什么证明或者相关的材料?

答 : 可以变更, 但需要作者再提供以下材料。

- (1) 如变单位署名顺序, 需要原研究内容所属单位(通常是第一署名单位)的证明信, 证明内容: 原署名顺序 → 现署名顺序 → 盖章。
- (2) 如变更作者署名顺序, 需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容: 原作者姓名及顺序 → 修改之后的作者姓名及顺序。
- (3) 将此证明信返回编辑部(邮寄或扫描后 E-mail 发来), 新的变更即可生效。