

鸡新城疫病毒SXWN株的分离鉴定与基因分型

朱小甫

(咸阳职业技术学院畜牧兽医研究所, 动物疫病分子生物学诊断实验室, 陕西 咸阳 712046)

摘要: 从渭南某鸡场的产蛋率下降并出现神经症状的新城疫高抗体蛋鸡群中分离到一株病毒。采用血凝-血凝抑制试验和RT-PCR方法证实分离到一株新城疫病毒, 命名为SXWN株。对SXWN株进行毒力测定, 鸡胚半数致死量(ELD₅₀)为108.6/0.1mL; 鸡胚最小致死量的平均致死时间(MDT)为52h。通过F基因主要功能区片段克隆测序, 发现SXWN株与我国常用的疫苗B1、LaSota株核苷酸同源性仅83.4%和83.7%, 相应的氨基酸序列同源性均为85.4%。进化树分析表明, SXWN株属于基因Ⅶ型毒株。F蛋白裂解位点为112RRQ↓KRF117, 符合新城疫强毒株的裂解位点特征。结果提示分离到的SXWN株为基因Ⅶ型新城疫强毒株。

关键词: 新城疫; 分离; 鉴定; SXWN株

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 94047-(2015)01-024-05

自1926年确认新城疫(Newcastle disease, ND)以来, 此病一直是严重威胁世界养禽业的重大传染病。国际动物卫生组织将此病确定A类动物疫病, 我国农业部将新城疫划为一类动物疫病。新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)属副黏病毒科、黏病毒亚科、禽腮腺炎病毒属^[1]。NDV基因组为单股负链RNA, 长约15kb, 编码6种结构蛋白, 依次为血凝素神经氨酸酶糖蛋白(HN)、融合糖蛋白(F)、内膜蛋白(M)、核衣壳蛋白(NP)、磷蛋白(P)和高分子量蛋白(L)。其中, F蛋白在NDV致病性中起重要作用^[2]。

虽然养禽场对新城疫的预防高度重视, 但新城疫在我国的流行形势依然严峻^[3-5]。2013年4月, 在陕西省渭南市某规模蛋鸡场爆发一种雏鸡出现典型神经症状, 死亡率高达30%; 产蛋鸡产蛋率由93%下降至50%左右, 产软蛋、变形蛋, 有呼吸道症状, 拉绿色、黄白色稀粪。病死雏鸡剖检病变典型, 可见盲肠扁桃体出血溃疡, 腺胃肿胀、腺胃乳头呈枣核状出血,

泄殖腔出血, 气管、喉头出血。产蛋鸡的剖检病变主要是输卵管变薄, 内有蛋清样物质, 喉头及气管中有粘液或干酪样物。为查明原因, 本试验从

发病鸡场采集组织病料, 进行了病原的分离和鉴定, 为临床控制疫情提供了技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料 采自于上述发病鸡场中病死鸡的气管、肺、肝脏和脾脏等组织, 加5倍体积灭菌PBS剪碎, 组织研磨器研磨粉碎组织细胞, 12000r/min离心10min, 取上清液-70℃保存备用。

1.1.2 试剂 NDV标准阳性血清、NDV标准阴性血清、标准抗原同购自中国兽医药品监察所。TRIzol Reagent为Invitrogen公司产品; AMV反转录酶(10 U·μL⁻¹)、RNA酶抑制剂(40 U·μL⁻¹)、DEPC处理水、rTaq酶(5 U·μL⁻¹)、dNTP(各成分均为10 mmol·L⁻¹)和EcoR I(15 U·μL⁻¹)等均购自生工生物工程(上海)有限公司。

1.1.3 SPF鸡胚 SPF鸡蛋购自杨凌绿方生物工程有限公司, 在本实验室孵化至所需日龄使用。

1.1.4 引物设计与合成 参考国标GB/T16550-2008合成两条NDV特异性引物, NDV-F: 5'-ATGGGCYCCAGAYCTTCTAC-3'; NDV-R: 5'-CTGCCACTGCTAGTTGTGATAATCC-3'。采用反转

收稿日期: 2014-10-20

作者简介: 朱小甫(1977—), 男, 陕西眉县人, 执业兽医师, 硕士, 主要从事动物疫病分子病原学与免疫学研究工作。

录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 方法, 预期扩增片段535 bp, 引物由生工生物工程 (上海) 有限公司合成, 均用DEPC处理水稀释到 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.2 方法

1.2.1 病毒分离 给处理好的组织病料上清液加入青、链霉素, 至终浓度含青霉素2000U/mL, 链霉素2mg/mL, 在室温下静置30min。取上清液按每枚0.2 mL, 经尿囊腔接种至5枚9日龄SPF鸡胚, 置孵化器中继续孵化, 每6h照胚一次, 收获24h~72h死亡鸡胚的尿囊液。将收获尿囊液100倍稀释, 按照上述方法连续传代3次, 最后收获尿囊液-70℃保存备用。

1.2.2 血凝-血凝抑制试验鉴定 用血凝试验 (HA) 测定收集的尿囊液具有血凝性后, 再用抗NDV标准阳性血清与分离株进行血凝抑制试验 (HI), 同时进行标准抗原和标准阳性血清血凝抑制试验作为参照, 鉴定完成后的毒株命名为SXWN株。

1.2.3 毒力测定 将尿囊液按照10倍梯度稀释, 稀释度为 10^{-1} - 10^{-11} , 取 10^{-7} - 10^{-11} 共5个稀释梯度接种10日龄SPF鸡胚, 每个稀释梯度接种4枚鸡胚, 每枚鸡胚接种0.1 mL, 继续孵化, 弃去24h内死亡鸡胚, 24 h后每隔6h照蛋1次, 记录鸡胚死亡情况, 连续观察120 h。根据Reed-Muench法计算ELD50。参照《中国兽药典》(2010年版三部) 提供的方法进行鸡胚最小致死量的平均致死时间 (MDT) 的测定。

1.2.4 RT-PCR检测与基因克隆测序与分析 按照TRIzol Reagent试剂说明提取总RNA, 自然干燥。反转录反应液体系为 DEPC处理水10.5 μL , 上游引物NDV-F 1.0 μL , dNTP 4.0 μL , $5 \times$ AMV Buffer 4.0 μL , AMV 0.25 μL , RNA酶抑制剂 0.25 μL , 总体积20.0 μL 。用反转录反应液充分溶解核酸, 置42℃水浴反转录90 min, 取出后冰浴5min, 即可进行PCR反应。PCR反应体系为cDNA 2.0 μL , 超纯水16.25 μL , $10 \times$ PCR Buffer 2.5 μL , MgCl_2 2.0 μL , dNTP 1.0 μL , NDV-F、NDV-R各0.5 μL , rTaq 酶0.25 μL , 总体积25.0 μL ; 条件为: 95℃预变性5 min, 94℃30 s, 55℃30 s, 72℃45 s共30个循环, 最后72℃充分延伸10 min。取5.0 μL 第2次扩增产物, $15 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂糖凝胶中电泳, 凝胶成像系统中照相观察。将PCR产物回收纯化, 连接

pGEM-Teasy载体, 转化DH5 α 感受态细胞, 经Amp筛选, 挑取单个菌落, 37℃摇动培养至饱和, 菌液PCR鉴定为阳性, 提取质粒, EcoR I 酶切鉴定, 阳性质粒由生工生物工程 (上海) 有限公司测序。将获得序列和参考序列比对分析。

2 结果

2.1 血凝-血凝抑制试验

经HA-HI实验测定, 标准阳性血清与标抗原的血凝抑制效价为8 Log₂, 标准阴性血清与标准抗原的血凝抑制效价为0 Log₂, 对照成立。待检尿囊液血凝效价为7Log₂, 标准阳性血清的对待检尿囊液血凝抑制效价为7 Log₂, 根据国标判定方法, 可确定所分离毒株为新城疫病毒, 并命名为SXWN株。

2.2 ELD50 和MDT测定

经过测定, SXWN株鸡胚半数致死量 (ELD50) 为108.6/0.1mL, 鸡胚最小致死量的平均致死时间 (MDT) 为52h。根据NDV毒力划分标准, 本实验分离到的SXWN株为强毒力株。

2.3 RT-PCR扩增结果

采用RT-PCR方法对SXWN株尿囊液进行F基因主要功能区扩增, 克隆出了特异性目的基因条带, 符合预期长度535 bp。见图1。

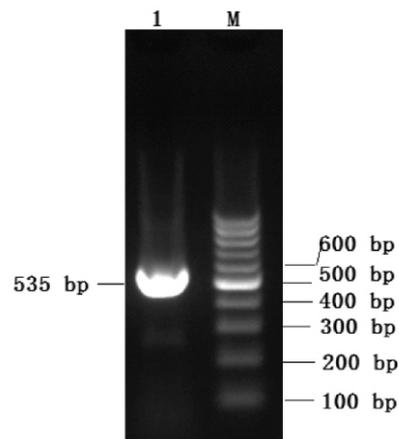


图1 SXWN株尿囊液RT-PCR扩增结果

M: DNA分子质量标准 (100 bp~1000 bp); 1: SXWN株尿囊液

Fig.1 The result of cloning F gene of SXWN strain

M: DNA Marker (100bp~1000bp); 1: NDV SXWN strain

2.4 核苷酸与氨基酸序列比对分析

将扩增的SXWN株F基因主要功能区片段进行测序, 将获得的序列和GenBank中参考毒株比较分析。主要参考毒株有AF375823 (B1) 基因II型、

AY508514 (F48E9) 基因 IX 型、AY562987 基因 V 型、AY562989 基因 VI 型、AY562991 (Ulster 67) 基因 I 型、AY734534 基因 VIII 型、AY741404 (herts) 基因 IV 型、DQ097394 基因 I 型、JF950509 (Mukteswar) 基因 III 型、JF950510 (LaSota) 基因 II 型、NDV05-005 基因 VII 型和 NDV05-009 基因 VII 型。将序列导入 DNASTAR 软件, 比较核苷酸和氨基酸同源性。结果见表 1。

表 1 核苷酸、氨基酸序列同源性 (%)
Table 1 nucleotide and amino acid sequence homology (%)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1		96.3	97.2	88.6	83.9	89.0	89.0	84.1	85.6	83.7	83.4	85.8	86.2
2	96.1		96.1	87.9	83.2	87.9	87.9	83.9	85.4	83.6	83.2	84.7	84.7
3	96.1	96.6		88.4	83.0	88.0	88.4	83.2	85.4	83.2	83.2	85.6	85.2
4	91.6	89.9	88.8		83.9	89.0	88.6	84.3	85.8	83.7	83.6	86.0	86.0
5	84.8	83.1	82.0	83.1		87.3	89.7	93.8	88.8	88.8	89.2	88.4	84.9
6	90.4	88.8	88.2	91.6	84.3		91.8	87.5	88.8	85.6	85.2	89.0	88.6
7	91.0	89.9	88.8	90.4	88.2	92.1		90.1	94.2	86.7	86.4	91.2	87.9
8	87.1	86.0	83.7	85.4	91.6	86.0	89.9		88.8	89.2	89.5	89.0	84.1
9	88.8	87.6	86.5	88.8	88.2	89.9	95.5	91.0		85.4	85.4	90.5	86.4
10	85.4	84.8	82.0	84.8	88.2	84.8	87.6	88.8	86.0		99.3	86.2	83.0
11	85.4	84.8	82.0	84.8	88.2	84.8	87.6	88.8	86.0	100		85.8	83.0
12	87.1	86.5	84.8	88.2	86.5	88.2	92.1	90.4	93.8	86.5	86.5		85.8
13	88.8	87.1	86.0	89.3	82.6	89.3	88.2	84.3	86.5	83.7	83.7	86.0	

注：右上角为核苷酸同源性，左下角为氨基酸同源性。1-13 分别为 SXWN、NDV05-005、NDV05-009、AY562989、AY562991 (Ulster 67)、AY734534、AY741404 (herts)、DQ097394、JF950509 (Mukteswar)、JF950510 (LaSota)、AF375823 (B1)、AY508514 (F48E9) 和 AY562987。

由表 1 可见，SXWN 株与参考毒株核苷酸同源性在 83.4%~97.2% 之间，与 SXWN 株同源性最低的是疫苗株 B1 株，最高的是 NDV05-009 株。

氨基酸同源性在 84.8%~96.1% 之间，与 SXWN 株同源性最低的是 Ulster 67 株，最高的是 NDV05-

005 和 NDV05-009 株。

2.5 F 基因系统发生树的绘制

将序列用 DNASTAR 软件中 MegAlign 比较分析，绘制出系统发生树，对这些毒株进行基因分型，能够直观地表示毒株之间的进化关系，结果见图 2。

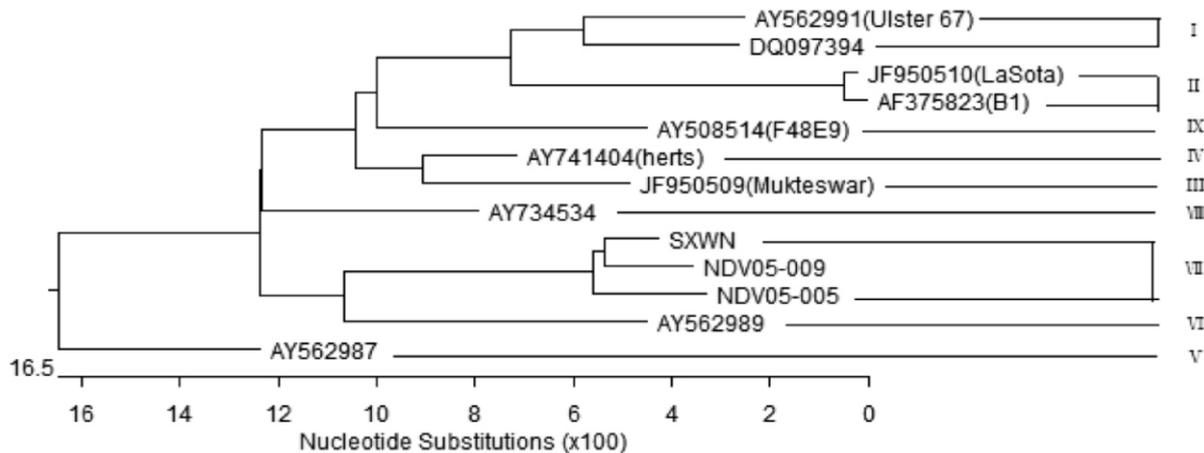


图 2 基于 F 基因绘制的系统发生树
Fig. 2 phylogenetic tree of NDV F gene

从进化树可以看出, SXWN株与参考毒株NDV05-005和NDV05-009处在同一个进化分支上, 明显亲缘关系较近, 都属于基因Ⅶ型。

2.6 F蛋白氨基酸裂解位点分析

推导氨基酸序列, 分析F蛋白氨基酸裂解位点, 见图3。

	LEAYNRTLTTLLTPLGDSIRRIQESVTTSGGRRQKRFIGA	Majority		
	90	100	110	120
241	LEAYNRTLTTLLTPLGDSIRRIQESVTTSGGRRQKRFIGA	SXWN		
241	LEAYNRTLTTLLTPLGDSIRRIQESVTTSGGRRQKRFIGA	NDV05-005		
241	LEAYNRTLTTLLTPLGDSIRRIQESVSMRGRQKRFIGA	NDV05-009		
241	LEAYNRTLTTLLTPLGDSIRRIQESVTTSGVRRQKRFIGA	AY562989		
241	LEAFNRTLTTWLTPLGDSIRRIQESVTTSGGGKQGRFIGA	AY562991(Ulster 67)		
241	LEAYNRTLTTLLTPLGDSIRRIQESVTTASGGRRQKRFIGA	AY734534		
241	LEAYNRTLTTLLTPLGDSIRRIQESVTTSGGRRQRRFIGA	AY741404(herts)		
241	LEAYNRTLTTLLTPLGDSIRRIQESVTTSGGGKQGRFIGA	DQ097394		
241	LEAYNRTLTTLLTPLGDSIRRIQESVTTSGGRRQRRFIGA	JF950509(Mukteswar)		
241	LDAYNRTLTTLLTPLGDSIRRIQESVTTSGGGRRQGRFIGA	JF950510(LaSota)		
241	LDAYNRTLTTLLTPLGDSIRRIQESVTTSGGGRRQGRFIGA	AF375823(B1)		
241	LEAYNRTLTTLLTPLGDSIRRIQESATTSGGRRQRRFIGA	AY508514(F48E9)		
241	LEAYNRTLTTLLTPLGESIRRIQESATTSGGRRQKRFIGA	AY562987		

图3 部分推导氨基酸序列 Fig. 3 The part of amino acid sequence

从图2可见, SXWN株F蛋白氨基酸裂解位点组成为112RRQ↓KRF117, 符合新城疫病毒强毒株的裂解位点特征。

3 讨论

新城疫作为一种严重威胁养禽业的重大传染病, 对其准确诊断是防控的前提。近年来, 新城疫流行形式发生变化, 高抗体产蛋鸡群产蛋下降并伴有呼吸道症状, 免疫仔鸡发病率高、死亡率高, 发病报道屡见不鲜^[6]。由于临床症状和剖检变化和禽流感相似, 基层兽医常误诊为禽流感。在本病例中, 通过鸡胚接种分离和血凝-血凝抑制试验确定分离到一株新城疫病毒, 命名为SXWN株。又进行了ELD50和MDT的测定, 发现SXWN株ELD50为108.6/0.1mL, MDT为52h, 属于强毒力毒株。

随着分子生物学的兴起, PCR技术在动物疫病诊断中运用越来越广泛, 国内外许多学者运用这一技术对NDV开展相关研究^[7-8]。新城疫病毒属RNA病毒, 通过RT-PCR技术扩增F基因, 可对NDV进行生物学和遗传学鉴定。本研究通过克隆SXWN株F基因主要功能区片段, 序列分析发现, 与我国常用的疫苗B1、LaSota株仅83.4%和83.7%, 相应的氨基酸序列同源性均为85.4%, 同源性明显偏低。正是这一显著的遗传差异导致了流行毒株与疫苗株在抗原性上存在差异, 导致生产常用疫苗不能完全保护鸡群免受新城疫流行毒株的攻击^[9]。通过与不同基因型参考毒株比较绘制进化树, 直观的展现了毒株之间的亲缘关系, SXWN株与我国近年的流行毒

株NDV05-005、NDV05-009处在同一个进化分支上, 而与疫苗B1、LaSota株明显距离较远。基因分型表明, SXWN株属于基因Ⅶ型, 与国内近年研究结果一致, 属于目前流行的优势基因型^[10,11]。

NDV F蛋白刚合成后是以F0前体蛋白形式存在, 不具有活性, F0蛋白必须裂解为F1和F2两个亚单位后才具备融合活性, 病毒才具有感染力。F蛋白能否被裂解取决于F蛋白裂解位点区(112-117)处氨基酸组成和宿主细胞的特性^[12]。研究表明, NDV强毒株融合蛋白裂解位点处的氨基酸序列为112RRQ↓KRF117, 具有这一序列的F蛋白能被多种细胞产生的蛋白酶裂解, 并对多种细胞具有感染力。弱毒株这一区域的氨基酸序列为112GRQ↓GRL117和112GKQ↓GRL117。通过对SXWN株F基因主要功能区片段测序, 推导其氨基酸序列, 发现SXWN株F蛋白氨基酸裂解位点为RRQ↓KRF, 完全符合NDV强毒株特征, 这也和毒力测定结果相一致, 再次确证SXWN株为一株新城疫野毒强毒株。这一结果为进一步深入分析SXWN株全基因分子特征和灭活疫苗试验研究奠定了基础。

参考文献

- [1] Barbezange C, Jestin V. Molecular study of the quasispecies Evolution of a typical pigeon paramyxovirus type 1 After serial passages in pigeons by contact[J]. Avian Pathol, 2005, 34: 111-122.

- [2] Calnek B W, Barnes H J, Beard C W, et al. Disease of Poultry[M]. Tenth edition. Iowa, USA: Iowa State University, 1997: 541-562.
- [3] 张鹏, 马静, 杨增岐, 等. 5株野生鸟类 IX 型 NDV 分离株 HN 基因分子特征分析[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2010, 38(6): 1-6.
- [4] 赵扬, 郭明萍, 邹年莉, 等. 两株鸽源新城疫病毒的分离鉴定及 F 基因序列分析[J]. 中国家禽, 2012, 34(23): 10-13.
- [5] 连宏军, 闫丽辉, 刘培欣, 等. 株新城疫病毒强毒株的分离鉴定及部分生物学特性[J]. 动物医学进展, 2006, 27(6): 64-69.
- [6] 王永坤, 严维巍, 周继宏, 等. 新城疫高抗体水平的鸡群产蛋下降其病因和防治对策的探讨[J]. 中国禽业导刊, 2000, 17(3): 5.
- [7] 刘华雷, 张维, 胡北侠, 等. 中国部分地区 2008 年 I 类新城疫病毒 F 基因遗传变异分析[J]. 病毒学报, 2009, 25(5): 382-387.
- [8] Samuel A, Nayak B, Paldurai A, et al. Phylogenetic and pathotypic characterization of Newcastle disease viruses circulating in west africa and efficacy of a current vaccine[J]. Clin Microbiol, 2013, 51(3): 771-781.
- [9] 刘秀梵, 胡顺林. 新城疫病毒的进化及其新型疫苗的研制[J]. 中国兽药杂志, 2010, 44(1): 12-18.
- [10] Liu H, Wang Z, Wu Y, et al. Molecular Epidemiological Analysis of Newcastle Disease Virus Isolated in China in 2005[J]. J Virol Methods, 2007, 140(1/2): 206-211.
- [11] Liu H, Wang Z, Wu Y, et al. Molecular Characterization and Phylogenetic Analysis of Newcastle Disease Virus Isolates from the Mainland of China[J]. Res Vet Sci, 2008, 85(3): 612-616.
- [12] E W Aldous, D J Alexander. Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1)[J]. Avian Pathology 2000, 30, 117-128.

[责任编辑、校对: 王军利]

Isolation, identification and genotyping Newcastle disease virus SXWN strain

ZHU Xiao-fu

(Animal Epidemic Disease Diagnostic Laboratory of Molecular Biology, Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Xianyang Vocational & Technical College, Xianyang, Shaanxi, China 712046)

Abstract: We isolated a virus strain in chicken farm in Wienan, these chicken egg production rate was dropped and these chicken had neurological symptoms. We confirmed the virus was NDV by hemagglutination-hemagglutination inhibition test and RT-PCR method, we named it SXWN strain. We determined SXWN strain chick median lethal dose (ELD₅₀) was 108.6 / 0.1mL, the minimum lethal dose of chick average death time (MDT) was 52h. The main functional areas of F gene was cloned and sequenced, we found SXWN compared with common vaccine strain B1, LaSota nucleotide homology was only 83.4% and 83.7%, amino acid sequence homology were 85.4%. Phylogenetic analysis showed that SXWN strain belong to genotype VII strains. F protein cleavage site was 112RRQ ↓ KRF117, it was in line with the cleavage site features virulent strain of Newcastle disease. The results suggested that the isolated SXWN strain was a genotype VII virulent strain of Newcastle disease virus.

Key words: Newcastle disease; separation; identification; SXWN strain