

吴 双,王永娟,左伟勇,等.新城疫病毒 LaSota 疫苗株的准种遗传变异分析[J].江苏农业科学,2014,42(3):161-163.

新城疫病毒 LaSota 疫苗株的准种遗传变异分析

吴 双,王永娟,左伟勇,王安平,洪伟鸣,秦 枫,朱善元

(江苏农牧科技职业学院/江苏省兽用生物制药高技术研究重点实验室,江苏泰州 225300)

摘要:为开展新城疫病毒(NDV)LaSota 疫苗株的反向遗传操作技术研究,了解该病毒的准种分化情况,运用鸡胚极限稀释法对 NDV LaSota 疫苗株进行传代纯化,选择病毒稀释度最高、血凝价较高的鸡胚尿囊液作为传代接种物,传至第 5 代,RT-PCR 扩增序列,测定并分析其全基因组序列,阐述 LaSota 疫苗株准种分化情况,为基因工程疫苗的研制奠定了一定基础。

关键词:新城疫病毒;LaSota 疫苗株;准种;极限稀释法

中图分类号: S852.65⁺7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)03-0161-03

新城疫(newcastle disease,ND)是由新城疫病毒(newcastle disease virus,NDV)强毒株引起的一种禽类致死性传染病,是当今世界上危害最大的家禽传染病之一^[1-4],被国际兽疫局(OIE)列为必须呈报的疫病之一。该病最常侵袭鸡和火鸡,至少 250 种鸟类可自然或实验室感染 NDV,且强毒感染能对其造成 100% 的死亡率^[5]。NDV 属于副黏病毒科,禽腺肺炎病毒属,其基因组由单股负链 RNA 构成,基因组结构为 3'-NP-P-M-F-HN-L-5',依次编码 6 种结构蛋白:核衣壳蛋白(NP)、磷蛋白(P)、基质蛋白(M)、融合蛋白(F)、血凝素-神经氨酸酶蛋白(HN)和大分子蛋白(L),其中病毒囊膜表面的 2 种糖蛋白 F 和 HN 是构成 NDV 致病性的主要分子基础^[6]。对于 ND 疾病的控制,在发达国家以捕杀强毒感染群为主,同时结合疫苗接种,而在广大发展中国家疫苗接种仍是控制该病的主要手段。NDV 经典弱毒疫苗毒株 LaSota 具有抗体提升快、繁殖性能良好、免疫原性好、抗体效价高、遗传稳定性好等优势,被世界各国广泛应用于雏鸡免疫。然而,在长达近百年的使用过程中,LaSota 毒种被反复鸡胚传代,准种分化严重。准种是由 Eigen 在 1971 年提出的用于描述同种生物遗传异质性的概念^[7],感染个体内同种病毒的遗传异质性是 RNA 病毒具有的一种普遍的生物学特性,实际上是由一系列基因序列相近而又不完全相同的突变体构成的。准种是病毒基因组突变或重组的结果,是连续的遗传变异、竞争和选择所产生的^[8]。

本研究使用 SPF 鸡胚极限稀释法对笔者所在实验室保存的 NDV LaSota 病毒株进行纯化,测定其全基因组序列,以揭示该毒株的准种遗传变异,这对后续开展该毒株的反向遗传学研究具有重要意义,也为基因疫苗的研制奠定了一定的基础。

1 材料与方法

1.1 病毒和鸡胚

LaSota 株和 NDV 阳性血清购自中国兽医药品监察所,由江苏省兽用生物制药高技术研究重点实验室保存。SPF 种蛋购自山东家禽研究所 SPF 鸡场,由本室孵化至所需日龄。

1.2 常用分子生物学试剂和分子生物学软件

Trizol 抽提试剂购自 Invitrogen 公司;DNA 凝胶回收试剂盒、大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌种 DH5 α 感受态细胞、质粒小提试剂盒购自天根生物有限公司;X-Gal、IPTG、dNTPs、6 nt 随机引物等购自宝生物工程(大连)有限公司;高保真聚合酶 2 \times LAmp MasterMix 购自北京康为世纪生物科技有限公司;EcoRI、DNA Markers 购自 Fermentas 生物工程有限公司;禽白血病反转录酶、RNA 酶抑制剂、pGEM-T easy 载体 vector 和琼脂糖购自 Promega 公司;焦碳酸二乙酯购自 AMRESCO 公司;蛋白胨和酵母提取物购自英国 OXOID 公司;饱和酚、三氯甲烷、异丙醇等常规试剂购自生工生物有限公司;其余试剂均为国内分析纯;磷酸盐缓冲液(PBS)、1% 鸡红细胞按 OIE 标准方法自制。Primer Premier 5.0 和 DNASTar 4.0 版本软件包中的分析软件有 DNASTAR Inc. Madison、WI53715,USA。

1.3 NDV LaSota 株复壮和增殖

取 -80 $^{\circ}$ C 保存的 LaSota 种毒,室温融化,用无菌 PBS 进行 10⁻⁶ 稀释,按 0.2 mL/胚接种到 9~11 日龄 SPF 鸡胚上,37 $^{\circ}$ C 孵育,每 12 h 观察 1 次,观察 120 h。弃去 24 h 内死亡的鸡胚,将 24 h 以后死亡及 120 h 以后未死亡的鸡胚置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中过夜,收集尿囊液,单胚单收,逐个测定每胚尿囊液的血凝价(HA 效价),从所收获的尿囊液中挑选 HA 效价高的尿囊液,保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱。HA 试验按 OIE 标定的 β 微量法进行。

1.4 NDV LaSota 株纯化和筛选

毒种纯化采用鸡胚极限稀释法,将 HA 效价高的尿囊液作 10 倍系列稀释至 10⁻¹⁰,然后取 10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸、10⁻⁹、10⁻¹⁰ 等 5 个连续稀释度的尿囊液,按 0.1 mL/胚接种到 9~11 日龄 SPF 鸡胚上,每个稀释度接种鸡胚 5 枚,接种后置于 37 $^{\circ}$ C 温箱孵育,逐个收获 24~120 h 死亡鸡胚及 120 h 后存

收稿日期:2013-07-26

基金项目:江苏省科技支撑计划(编号:BE2012366)。

作者简介:吴 双(1983—),女,江苏徐州人,博士,副教授,从事动物传染病防控和流行病学研究。Tel:(0523) 86356818;E-mail:jswshuang@sina.cn。

通信作者:朱善元,博士,教授,从事畜禽传染病和兽医微生物学与免疫学研究。E-mail:jstzsy@126.com。

活鸡胚的尿囊液,无菌操作,单胚单收,分别测定每个鸡胚尿囊液的血凝价。同时,根据 Reed - Muench 法计算鸡胚半数感染量(EID₅₀)。选择病毒稀释度最高、血凝价 HA 较高的鸡胚尿囊液作为传代接种物,按上述方法进行,继续病毒接种传代。

表 1 扩增 NDV LaSota 株全基因组序列的引物

引物名称	引物序列(5' →3')	引物位置(bp)
1F	ACCAAACAGAGAATCCGTGAGTTACG	1 ~ 26
1R	GACA AGATCT AGCTGATAGTCAACCTTAC	2 602 ~ 2 630
2F	TGTGCAAGCGATGATGCTATGATGGAGG	2 555 ~ 2 583
2R	CAGACTCGAGCCAGAAACCTTCAATACTGC	3 863 ~ 3 892
3F	GTCTACAAGATCCCAGCTGCAGTATTGAAGGT	3 845 ~ 3 876
3R	AGTCGGAGGATGTTGGCAGCATTTTGTTTGG	4 974 ~ 5 004
4F	CCGTAGGATACAAGAGTCTGTGACTACATCTG	4 840 ~ 4 871
4R	TAGTCGCTATGCCTACAAGATCGCTAGGTG	6 566 ~ 6 596
5F	CAGTAGTGACCTTGGCTATATCTGTAGCCTC	6 509 ~ 6 539
5R	AGACCTGGCTTCTCTAACCCCGTCATCTTTG	8 109 ~ 8 139
6F	GTTACTAGTTGAGATCCTCAAAGATGACG	8 091 ~ 8 119
6R	AAATGTACCTGACGGCTCGAGTAGCTGGAC	9 269 ~ 9 398
7F	TATCACTAATGGAGGGATTTGCATACGGAGCTGT	9 237 ~ 9 270
7R	GCTTAAGAACAATATTTGGGCTTGCAACAGTC	11 326 ~ 11 358
8F	GCCAGTCTGTGCAACGACCCATACTCTTTTC	11 288 ~ 11 317
8R	ACCGCAACAGGTGCTTCTCTGATACAGCAAC	12 423 ~ 12 453
9F	GACATTCAACCCCTGCATCTCTCTACAGGGTGTC	12 211 ~ 12 243
9R	GATTGGACCCTGGAGGAATTTCAATGTCAC	14 019 ~ 1 4048
10F	CAGATCTGTATCATTGCTGCATTGTGACATTG	13 996 ~ 14 027
10R	ACCAAACAAAGATTTGGTGAATGACC	15 156 ~ 15 186

1.6 病毒全基因组片段的扩增和序列分析

取 250 μL 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组 RNA。按文献[9]报道的方法进行反转录和 PCR 扩增。PCR 产物以琼脂糖凝胶 DNA 回收纯化试剂盒回收后,与 pGEM - T easy 载体进行连接和转化。常规方法进行质粒小量提取,用 *EcoR* I 进行酶切鉴定。每个片段至少有 5 个阳性克隆送至南京金斯特科技有限公司进行测序验证。使用序列分析软件将 10 段部分重叠的核苷酸序列拼接成长基因组,比较分析纯化的 LaSota 疫苗株与原种毒株以及 GenBank 中的 LaSota 毒株在基因组结构上的异同。

2 结果与分析

2.1 LaSota 疫苗株纯化前后的生物学特性

LaSota 种毒通过鸡胚极限稀释法纯化 5 次传代后,获得 1 株血凝效价高、病毒滴度高且稳定的疫苗用生产种毒。该纯

1.5 引物设计与合成

参考 GenBank 中 NDV LaSota 的全基因组序列,利用 Premier 5.0 设计 10 对引物,相邻扩增片段之间有 50 ~ 200 nt 核酸序列相互重叠,拼接起来可以覆盖 NDV 全基因组。引物序列见表 1,引物均由上海 Invitrogen 公司合成。

化株相对于原毒株,其血凝价(HA)从 29 提高到 211,鸡胚半数感染量从 10^{-8.2}/mL 提高到 10^{-8.5}/mL。该毒株在连续传代后均显示出稳定的生物学特性。其致病力在传代过程中的变化见表 2。

表 2 LaSota 各传代毒株致病力分析

毒株	血凝价	F 蛋白裂解位点氨基酸 (112 ~ 117)	EID ₅₀ (mL ⁻¹)	MDT (h)
种毒株	29	GRQGR/L	10 ^{-8.2}	80
第一代次	29	GRQGR/L	10 ^{-8.2}	90
第二代次	210	GRQGR/L	10 ^{-8.3}	96
第三代次	211	GRQGR/L	10 ^{-8.3}	105
第四代次	211	GRQGR/L	10 ^{-8.5}	115
第五代次	211	GRQGR/L	10 ^{-8.5}	> 120

2.2 LaSota 疫苗株纯化后全基因组片段的扩增

通过 RT - PCR 扩增纯化后的 NDV LaSota 疫苗株,经 1% 琼脂糖凝胶电泳结果显示,10 个 PCR 产物片段与预期的结果大小一致,具体结果见图 1。

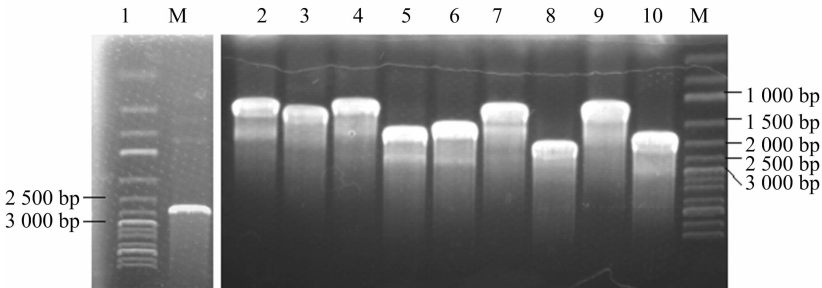


图1 La Sota疫苗株全基因组的 RT-PCR 产物电泳结果

2.3 纯化 LaSota 疫苗株的基因序列分析

利用 DNASTar 软件把 10 个基因片段拼接成 NDV LaSota 全基因组的序列,拼接结果显示其全基因组长度为 15 186 nt。基因组的 3'端和 5'端分别有 55、114 nt 的 Leader 和 Trailer 序列,由基因序列由 3' - NP - P - M - F - HN - L - 5'等 6 个 ORF 组成。将此序列与种毒株序列相比较,基因组核苷酸和它们所推导的氨基酸的同源性均为 99.2%,共有 32 个碱基发生变化,各基因片段上核苷酸和所编码的氨基酸突变个数及突变率见表 3。

表 3 LaSota 传代株与种毒株之间突变统计

基因	核苷酸 突变数(个)	碱基 突变率(%)	氨基酸 突变数(个)	氨基酸 突变率(%)
NP	3	0.02	2	0.05
P	2	0.17	2	0.06
M	2	0.18	0	0.00
F	1	0.06	0	0.00
HN	5	0.29	3	0.06
L	14	0.21	10	0.05

测序比对结果表明,纯化株与原病毒株在基因序列上并没有太大差异,HN 蛋白氨基酸突变率最高,为 0.29%,M 蛋白和 F 蛋白没有突变,说明该纯化株仍为 LaSota 病毒株,没有筛选传代的过程中发生根本变异。

将此纯化株分别与 GenBank 上的 LaSota(登录号分别为 AF077761.1、AY845400.2 和 JF950510.1)全基因组序列相比,核苷酸的同源性分别为 99.2%、99.0%和 99.6%,突变主要集中在 L 和 HN 蛋白上。

3 结论与讨论

准种是同一株病毒在宿主体内表现为一群系统发育密切相关的变异株,它是由一定数量核苷酸相同的优势准种和序列互不相同的劣势准种组成的。RNA 依赖的 RNA 聚合酶因缺乏 3'→5'核酸外切酶活性而使复制中产生的错误未能校正、宿主本身的选择(正选择作用)和病毒基因组结构的限制(负选择作用)3 种机制会导致优势准种不固定,在一些外界选择压力作用下,劣势准种甚至可替代优势准种。

为了更好地开展该毒株的反向遗传操作技术研究,在病毒纯化过程中,有必要进行几个病毒克隆株的筛选,以获得一株能代表绝大多数病毒克隆株性质的克隆株。首先,在病毒传代过程中考虑到疫苗制备需要,每次应选择病毒稀释度最高、血凝价较高的尿囊液作为传代接种物;其次,扩增基因片段时选择高保真聚合酶,PCR 循环数设为 25 次;最后,为避免 PCR 过程可能造成基因的变异以及测序过程中可能带来的突变,对该病毒基因片段至少测序 5 个阳性克隆,综合多次测序结果获得其全长基因序列,因此所获得的序列应该能够真实反映该病毒株基因组的核苷酸序列。

纯化株序列与种毒株序列以及 GenBank 中的 3 株 LaSota

株序列相比较,结果发现核苷酸发生变异,表明该疫苗株是在自然界的选压力与免疫压力下对外界环境变化而发生的一种适应性突变。NDV 囊膜表面的 F 和 HN 等 2 个糖蛋白容易经受选择压力的作用,同时也是构成 NDV 主要致病性的分子基础^[10]。Peeters 等在 1999 年发现尤其是 F 蛋白在 NDV 致病过程中发挥着重要作用^[2]。然而,巩艳艳等在 2009 年抗体免疫选择压可显著影响 HN 基因变异,且其受影响程度高于 F 基因,认为 HN 基因的变异更能代表 NDV 的进化规律和趋势^[11]。笔者发现 F 蛋白没有发生突变,而 HN 蛋白的突变率最高,碱基突变率达到了 0.29%,与巩艳艳等的研究结果^[11]一致。本研究结果在一定程度上也表明 NDV 的进化是多个基因包括调控区共同演化的结果。

参考文献:

[1]于 洋,封振,何孔旺,等.新城疫病毒毒力分子机制研究进展[J].江苏农业学报,2013,29(2):435-439.

[2]梁淑珍,郭 兵,王海风.中药复方对鸡新城疫疫苗免疫效果的影响[J].江苏农业科学,2012,40(2):176-178.

[3]段志强,胡 娇,胡增全,等.鹅源新城疫病毒 M 基因的原核表达及其多克隆抗体制备[J].江苏农业学报,2012,28(1):125-130.

[4]魏 宁,桂文龙,李巨银,等.新城疫疫苗及免疫程序对蛋鸡免疫效果的研究[J].江苏农业科学,2012,40(11):232-234.

[5]Qiu X,Sun Q,Wu S,et al. Entire genome sequence analysis of genotype IX newcastle disease viruses reveals their early - genotype phylogenetic position and recent - genotype genome size [J]. Virology Journal,2011,8:117.

[6]Peeters B H,de Leeuw O S,Koch G,et al. Rescue of NDV from cloned cDNA:evidence that cleavability of fusion protein is a major determinant for virulence[J]. Virology Journal,1999,73(6):5001-5009.

[7]Eigen M. Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules [J]. Naturwissenschaften,1971,58(10):465-523.

[8]Kissi B,Badrane H,Audry L,et al. Dynamics of rabies virus quasispecies during serial passages in heterologous hosts [J]. Journal of General Virology,1999,80(8):2041-2050.

[9]Liu X,Wang X,Wu S,et al. Surveillance for avirulent newcastle disease viruses in domestic ducks (*Anas platyrhynchos* and *Cairina moschata*) at live bird markets in Eastern China and characterization of the viruses isolated [J]. Journal of the W V P A,2009,38(5):377-391.

[10]aldous E W,Mynn J K,Banks J,et al. A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene [J]. Journal of the W V P A,2003,32:239-257.

[11]巩艳艳,崔治中.细胞培养上新城疫病毒 HN 基因在抗体免疫选择压作用下的抗原表位变异 [J]. 中国科学,2009,39(12):1175-1180.