

吴 民. 鹅副黏病毒 *F* 基因的克隆和序列分析[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(7): 35–36.

鹅副黏病毒 *F* 基因的克隆和序列分析

吴 民

(海南省动物疫病预防控制中心, 海南海口 570203)

摘要: 为了深入研究鹅副黏病毒 (goose paramyxovirus, GPMV) *F* 基因的功能, 利用 PCR 方法克隆了鹅副黏病毒 HN 株的 *F* 基因, 将其与 pMD18-T 载体连接后转化到感受态大肠杆菌 DH5 α 中, 经 PCR 鉴定后, 对插入片段进行序列测定及分析。结果表明: 鹅副黏病毒 HN 株的 *F* 基因全长均为 1 662 bp, 编码 553 个氨基酸, 其裂解位点的氨基酸序列为 112-Arg-Arg-Gln-Lys-Arg-Phe-117, 与已公布的强毒株裂解位点的氨基酸序列相符。

关键词: 鹅副黏病毒; *F* 基因; 克隆; 序列分析

中图分类号: Q785; S858.335.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2014)07-0035-02

鹅副黏病毒 (goose paramyxovirus, GPMV) 是影响养禽业发展的主要病原之一, 它可引起鹅肠道糠麸样溃疡、胰腺肿胀且表面有灰白色坏死灶、脾脏肿大并有大小不等的灰白色坏死灶。近年来, 该病在我国呈上升趋势, 且感染宿主范围不断扩大, 已有鹅、丹顶鹤、鸽等感染该病毒的报道^[1-3]。本研究对以前分离的 GPMV 的 *F* 基因进行克隆, 并与国内外分离株进行序列比对和分析, 以期为进一步研究该病毒的 *F* 基因功能和 GPMV 分子诊断以及基因工程疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

从疑似感染 GPMV 的病死鹅中分离到鹅副黏病毒 HN 株, 经过冻干后, 于海南省动物疫病预防控制中心兽医诊断检验科 -70℃ 冻存。

1.2 病毒增殖

将病毒适当稀释后, 经尿囊腔接种 9~11 d 非免疫鸡胚, 0.2 mL/枚, 于 37℃ 恒温箱孵育 48 h, 弃去 24 h 内死亡胚, 无菌收获尿囊液, 于 -70℃ 保存备用。

1.3 引物设计与合成

根据 GenBank 中的 GPMV 全基因组核苷酸序列, 经 Lasergene 7.10 软件比对和 Primer 5.0 软件分析后, 设计 1 对引物扩增 *F* 基因, 上游 P1: 5'-TAGTTCGCCTGTCTATCAAA-3', 下游 P2: 5'-GTGATGCGGTAGAACGGAT3-3'; 由上海英潍捷基生物技术有限公司合成。

1.4 RT-PCR 反应

将含有 GPMV 的尿囊液按照 Invitrogen 公司提供的 RNA 抽提操作说明书进行 RNA 模板的提取。反转录按照宝生物工程 (大连) 有限公司提供的 Reverse Transcriptase XL (AMV) 反转录酶使用说明书进行。PCR 反应体系为: 2 μ L 模板, 各 50 pmol 上、下游引物, 各 200 μ mol/L 4 种 dNTP, 0.5 μ L Ex Taq DNA 聚合酶, 加水至 50 μ L。PCR 反应条件为: 97℃ 0.5 min, 53℃ 1 min, 72℃ 2 min, 30 个循环; 72℃ 延伸

7 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

1.5 *F* 基因的克隆及鉴定

将新扩增 PCR 产物按一定比例与 pMD18-T 载体连接, 连接产物转化入 DH5 α 感受态细胞, 阳性菌液经 PCR 鉴定后扩大培养并抽提质粒, 重组质粒置于 -40℃ 冰箱保存备用。

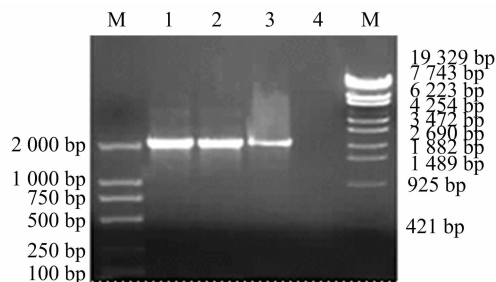
1.6 序列分析

将鉴定的阳性重组质粒, 送上海英潍捷基生物技术有限公司进行测序。用 Lasergene 7.10 软件将所测序列和与国内外病毒分离株的 *F* 基因序列进行相似性比对。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增产物

利用设计的 P1/P2 引物对 GPMV HN 株的 *F* 基因进行 RT-PCR 扩增, 结果获得大小约为 2.1 kb 的特异性条带, 与预计产物大小相符 (图 1)。



M—DL2000 marker和 λ EcoT14 I digest marker;
1~3—GPMV HN株的*F*基因RT-PCR产物; 4—阴性对照

图1 *F* 基因PCR扩增结果

2.2 重组质粒的鉴定

菌液 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 获得大小约为 2.1 kb 的片段。

2.3 序列分析

由序列测定结果可知, GPMV HN 株的 *F* 基因全长为 1 662 bp, 编码 553 个氨基酸。将 GPMV HN 株的 *F* 基因与国内外分离株的 *F* 基因序列进行比对, 结果表明: GPMV HN 株和国内已分离的 GPMV 的 *F* 蛋白核苷酸序列相似性在 96.3%~97.3% 之间, 与传统疫苗株 LaSota 的核苷酸序列相似性为 82.7%, 与国外分离株的 *F* 蛋白核苷酸序列相似性在

收稿日期: 2013-09-27

作者简介: 吴 民 (1964—), 男, 海南海口人, 兽医师, 主要从事畜牧兽医学方面研究。E-mail: WM8398@163.com。

34.8%~38.7% 之间(表 1);从 *F* 基因进化树来看,GPMV 同分支(图 2)。HN 株与国内分离株处于同一分支,而与国外分离株处于不

表 1 *F* 基因核苷酸序列相似性比较

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1		96.5	97.1	96.3	96.6	97.3	97.1	38.7	97.1	34.8	38.4	38.7	82.7
2	3.5		97.8	97.1	98.0	98.3	97.7	38.5	97.8	34.8	38.1	38.5	82.7
3	3.0	2.2		99.2	97.6	98.8	98.6	39.3	100.0	35.3	38.7	39.3	82.6
4	3.7	2.8	0.7		96.8	98.0	97.8	39.2	99.2	35.2	38.7	39.2	82.8
5	3.3	2.0	2.3	3.0		98.3	97.7	38.6	97.6	35.0	38.1	38.6	82.9
6	2.7	1.8	1.2	1.8	1.7		98.9	38.9	98.8	35.0	38.5	38.9	82.9
7	2.8	2.3	1.3	2.0	2.2	1.1		38.8	98.6	35.3	38.4	38.8	82.9
8	80.1	80.3	79.3	78.9	79.9	79.1	80.1		39.3	41.1	97.1	100.0	36.6
9	3.0	2.2	0.0	0.7	2.3	1.2	1.3	79.3		35.3	38.7	39.3	82.6
10	92.0	90.1	89.3	88.9	90.0	90.5	90.3	74.5	89.3		40.7	41.1	33.7
11	81.4	81.0	79.8	79.4	80.6	79.6	80.6	3.0	79.8	74.8		97.1	36.2
12	80.1	80.3	79.3	78.9	79.9	79.1	80.1	0.0	79.3	74.5	3.0		36.6
13	18.5	18.4	18.4	18.3	17.9	18.1	18.1	84.5	18.4	91.4	85.7	84.5	

注:1. GPMV HN strain,2. AF162714,3. AF473851,4. AY325797,5. DQ659677,6. EF540729,7. FJ754273,8. FJ619036,9. NC_005036,10. EF569970,11. FJ215863,12. FJ215864,13. M24696 LaSota 46。

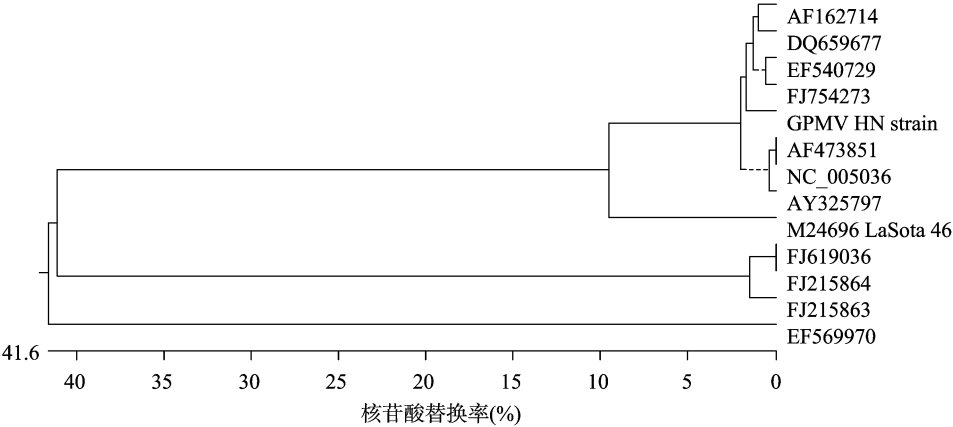


图2 *F* 基因进化树

3 结论与讨论

GPMV HN 株的分离鉴定再次证明水禽不再仅是禽 I 型副黏病毒的宿主,而且已成为禽 I 型副黏病毒自然感染发病、死亡的易感禽类。这可能与禽 I 型副黏病毒发生变异、逐渐适应鹅体有关^[4]。宿主范围的不断扩大,给禽 I 型副黏病毒的综合防控提出了新的挑战。

国内外研究表明,禽 I 型副黏病毒 F 蛋白的变异主要发生于 F 蛋白 N 末端信号肽区(1~32aa)和裂解位点区(112~117aa),其他部位的氨基酸较保守,且裂解位点区氨基酸的组成是构成副黏病毒毒力的分子基础^[5]。GPMV HN 株的裂解位点区的氨基酸序列为 112-Arg-Arg-Gln-Lys-Arg-Phe-117,与国外发表的强毒株序列 112-Arg/Lys-Arg-Gln-Lys/Arg-Arg-Phe-117 相符,表明所分离的 GPMV HN 株为强毒株。基因序列分析发现该分离株的 *F* 基因与 GenBank 登录号为 AF162714 株系的 *F* 基因核苷酸相似性为 97.1%,氨基酸相似性为 97.7%,二者的相似性较高。进化树分析表明两者处于同一分支,具有最近的亲缘关系,且同属

于强毒株。GPMV HN 株与传统疫苗株 LaSota 的核苷酸相似性为 82.7%,氨基酸相似性为 87.4%,二者的相似性较低,进化树上虽属于同一大分支,但亲缘关系相对较远,说明 HN 株与传统的疫苗株 LaSota 相比已发生一定的变异,这可能是造成水禽长期使用传统的新城疫病毒疫苗后仍暴发副黏病毒病的重要原因之一。

参考文献:

[1]秦卫红. 种鹅感染新城疫病毒的诊断[J]. 中国家禽,2012,34(23):55.
[2]李静姬,李福军,梁玉婷. 丹顶鹤非典型新城疫与大肠杆菌混合感染的诊治[J]. 中国畜牧兽医,2013,40(2):211-213.
[3]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.
[4]张 伟,刁有祥,徐福亮,等. 鹅副黏病毒 LS-1 株的分离鉴定及 *F* 基因分析[J]. 西南大学学报:自然科学版,2011,33(4):31-35.
[5]董国英,丁 壮. 鹅副黏病毒 *F* 基因的克隆及遗传变异分析[J]. 中国兽医学报,2007,27(2):176-179.