

DOI:CNKI:61-1390/S.20120109.1219.002

网络出版时间:2012-01-09 12:19

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120109.1219.002.html>

新城疫病毒 HN09-69 株 *P* 基因的克隆、 序列分析及表达

陈礼朋¹, 王忠田², 岳旭龙¹, 王泽仁¹, 高文明¹,
李双亮¹, 张宇耕¹, 崔保安¹, 李新生¹

(1 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002; 2 中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[摘要] **【目的】**对新城疫病毒(NDV)HN09-69 株 *P* 基因进行克隆、序列分析和表达鉴定, 为研究 *P* 和 *V* 蛋白的功能, 及 NDV 新流行毒株的免疫预防提供理论依据。**【方法】**以 HN09-69 株 NDV 为研究对象, 根据 GenBank 上发布的相关 *P* 基因参考序列设计引物, 进行 RT-PCR 扩增、克隆和序列测定分析, 将 *P* 基因的核苷酸序列与相关参考株的 *P* 基因序列进行比对分析并构建进化树。将 *P* 基因克隆到原核表达载体 PET28a(+) 中, 得到重组质粒 rPET28a(+)-*P*, 将重组表达质粒转化到 BL21(DE3) 中诱导表达, 用 SDS-PAGE 电泳和 Western blotting 检测表达情况。**【结果】**扩增出了 HN09-69 株 *P* 基因的 ORF, 序列长度为 1 188 bp。NDV HN09-69 株核苷酸与弱毒株 La Sota、clone-30 同源性分别为 82.5% 和 82.4%, 与强毒株 F48E8 同源性为 84.9%, 与鸭源、鹅源 NDV 核苷酸同源性分别为 97.9%~98.4% 和 96.0%~98.0%。SDS-PAGE 电泳和 Western blotting 检测结果表明, 重组 *P* 蛋白分子质量约为 54 ku, 符合预期结果, 在大肠杆菌中主要以可溶性的形式表达。**【结论】**NDV HN09-69 株与 SDWF-02 和 SD-09 鸭源强毒分离株同源性高, 亲缘关系近。重组 *P* 蛋白在大肠杆菌中得到了高效表达。

[关键词] 新城疫病毒; *P* 基因; 原核表达; SDS-PAGE; Western blotting

[中图分类号] S852.65⁺9.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2012)02-0020-07

Cloning, sequence analysis and expression of *P* gene of Newcastle disease virus HN09-69 strain

CHEN Li-peng¹, WANG Zhong-tian², YUE Xu-long¹, WANG Ze-ren¹,
GAO Wen-ming¹, LI Shuang-liang¹, ZHANG Yu-geng¹,
CUI Bao-an¹, LI Xin-sheng¹

(1 College of Husbandry and Veterinary, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China;

2 China Institute of Veterinary Drugs Control, Beijing 100081, China)

Abstract: **【Objective】**In order to provide support for the prevention new epidemic Newcastle disease virus(NDV) and forming the foundation for study the function of *P* and *V* protein, the *P* gene of NDV HN09-69 was amplified, analyzed and expressed. **【Method】**Specific primers were designed according to the reported sequences of NDV in GenBank and the *P* gene of HN09-69 strain was amplified and sequence was analyzed. Sequence of *P* gene of HN09-69 strain was compared with relevant reference strains and the phylogenetic tree was constructed. The *P* gene was cloned into the prokaryotic expression vector PET28a(+). The recombinant plasmids rPET28a(+)-*P* was constructed, identified and transformed into BL21(DE3)

* [收稿日期] 2011-08-23

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2006BAD06A08)

[作者简介] 陈礼朋(1988—), 男, 河南信阳人, 硕士, 主要从事分子病毒学研究。E-mail: cp4020502@163.com

[通信作者] 李新生(1969—), 男, 河南濮阳人, 副教授, 博士, 主要从事分子病毒学研究。E-mail: harmony69@gmail.com

competent cells and induced to expression by IPTG. The expressed protein was detected by SDS-PAGE and Western blotting. 【Result】 The complete open read frame (ORF) of *P* gene was amplified by RT-PCR and contains 1 188 bp in size. The homology of nucleotides was 82.5%, 82.4% and 84.9%, respectively. Compared with duck, goose source NDV, the homology of nucleotides was 97.9%–98.4%, 96.0%–98.0%, respectively. The results of SDS-PAGE and Western blotting assay show that the recombinant *P* protein is about 54 ku in size in accordance with the expected result. 【Conclusion】 The NDV HN09-69 strain and Shandong, Heilongjiang virulent strains of source in ducks have high homology and close relationship. The recombinant *P* protein has high effective expression in *E. coli*.

Key words: NDV; *P* gene; procaryotic expression; SDS-PAGE; Western blotting

新城疫 (Newcastle disease, ND) 又称亚洲鸡瘟, 是由新城疫病毒 (Newcastle disease virus, NDV) 引起的一种以导致大多数禽类消化道、胃肠道和中枢神经系统损伤为主要特征的急性高度接触性传染病^[1]。ND 被世界动物卫生组织 (OIE) 列为法定必须报告的疾病, 在我国也被列为 I 类烈性传染病^[2]。该病发病急、致死率高, 对养禽业的发展构成了严重威胁。

新城疫病毒 (NDV) 属于副黏病毒科 (Paramyxoviridae), 副黏病毒属 (*Paramyxovirus*) 中的一个种, 其基因组全长 15 186 或 15 192 bp, 结构模式为 3'-NP-P-M-F-HN-L-5', 依次编码核衣壳蛋白 (Nucleocapsid protein, NP)、磷蛋白 (Phosphor protein, P)、基质蛋白 (Matrix protein, M)、融合蛋白 (Fusion protein, F)、血凝素-神经氨酸酶蛋白 (Hemagglutinin Neuraminidase protein, HN) 和大分子蛋白 (Large protein, L) 6 种结构蛋白^[3-4], 其中 HN 和 F 蛋白在病毒的毒力和免疫应答方面起着决定性的作用^[5]。目前, 对于组成新城疫病毒感染所必需的核糖核蛋白复合体 (ribonucleoprotein complex, RNP) 的 *P* 蛋白研究尚少, *P* 蛋白位于核衣壳内, 作为分子伴侣辅助 NP 蛋白正确折叠, 阻止非法衣壳化^[6], 是 RNA 依赖的 RNA 聚合酶的 2 个亚单位之一, 它与 L 蛋白形成的复合物具有完整的酶活性^[7], 对病毒 RNA 的合成起中心调节作用^[8]。NDV *P* 基因表达产物的种类和功能最复杂, 在转录过程中通过“RNA 编辑”机制在转录产物特定位点插入 1 个或 2 个非模板 G, 从而编码额外的 2 种非结构蛋白 V 和 W。其中, V 蛋白是 IFN (干扰素) 的拮抗剂, 而且与 NDV 的复制和宿主嗜性有关^[9]; W 蛋白对于 NDV 生物活性也很重要^[10]。最近研究发现, *P* 基因在 NDV 种属分类、基因进化和限制机体产生抗病毒反应中都有重要的作用^[11]。*P* 基因还与病毒的遗传变异相关, 有研究指出, NDV HN 和 *P* 基因虽以

不同的方式进化, 但是其遗传变异的趋势是相同的^[12]。另有研究表明, *P* 基因在 NDV 6 个基因中最容易发生变异, 对其进行分析更有助于了解病毒的演化规律^[13-14]。*P* 蛋白还具有良好的免疫原性, 是 NDV 主要的保护性抗原。相关的分子病毒学研究表明, NDV *P* 蛋白是决定 NDV 毒力强弱和免疫原性的主要因子之一。由于 *P* 蛋白在 NDV 免疫限制、基因进化及毒力因素方面起到的重要作用, 及当前在 *P* 蛋白, 特别是 *P* 基因“RNA 编辑”后产生的 V 和 W 蛋白的研究上还需要深入。因此, 本研究通过 PCR 扩增 *P* 基因并构建重组原核表达质粒, 进而表达出重组 *P* 蛋白, 为研究 *P* 和 V 蛋白的功能及 NDV 新流行毒株的免疫预防提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒、血清及菌种 NDV HN09-69 株从河南一鸡场分离鉴定并命名。新城疫阳性血清, 购自哈尔滨兽医研究所。DH5 α 、BL21 (DE3) 基因工程宿主菌, 均由动物性食品质量与安全实验室保存。

1.1.2 载体和感受态细胞 PET28a (+) 原核表达载体, 由动物性食品质量与安全实验室保存; DH5 α 和 BL21 (DE3) 感受态细胞, 由动物性食品质量与安全实验室自制。

1.1.3 工具酶和主要试剂 T4 DNA Ligase, 购自 Promage 公司; 2 $\times$ Taq PCR mix 聚合酶, 购自 NEB 公司; Premix LA Taq、EcoR I 和 Hind III 限制性内切酶、DNA Marker DL 2000、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG)、胰蛋白胨、酵母提取物和高纯度琼脂糖等, 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司; B 型质粒小量快速提取试剂盒, 购自北京博大泰克基因技术有限公司; B 型小量 DNA 片段快速回收试剂盒 (离心柱型)、NI 琼脂糖凝胶、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗 His-tag 鼠单抗和 DAB 显色试剂盒, 均购自

康为世纪公司。

1.1.4 HN09-69 株 *P* 基因引物的设计与合成 根据 GenBank 上发布的相关 *P* 基因参考序列(AF431744.3),采用 DNASTar 和 Primer Premier5.0 软件设计 1 对特异性引物:P1,5'-CGGAAT-TCATGGCTACTTTTACAGATGCGG-3';P2,5'-CCCAAGCTTTTCAACCATTCAGCGCAAGG-3'。P1 和 P2 5' 端下划线碱基分别引入 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切位点,引物由上海生工合成,预期扩增片段长度为 1 188 bp,包含完整开放阅读框。

1.2 方 法

1.2.1 NDV HN09-69 株的增殖与 RNA 的提取 将种毒进行 1:10⁴ 倍稀释,按 0.1 mL/胚接种 10 日龄 SPF 鸡胚,37 ℃ 孵育,收取尿囊液,8 000 r/min 离心 15 min,吸取上清液,按照文献[15]的方法提取 RNA。

1.2.2 NDV HN09-69 株 *P* 基因的 RT-PCR 扩增

将 1.2.1 提取的 RNA 按 Takara 公司的 MMLV 反转录酶说明书进行反转录。RT 反应条件:70 ℃ 10 min,冰浴 5 min,42 ℃ 1 h,70 ℃ 15 min。PCR 反应体系为 25 μL:上、下游引物(25 μmol/L)各 0.5 μL、cDNA 模板 2 μL、Premix LA Taq (0.1 U/μL) 12.5 μL、灭菌超纯水补足至 25 μL。对 *P* 基因引物设置退火温度梯度进行 PCR 扩增,通过核酸电泳结果选取最佳退火温度。PCR 扩增程序为:95 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 1 min,52.7 ℃ 退火 52 s,72 ℃ 延伸 90 s,32 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。取 5 μL PCR 产物于 10 g/L 琼脂糖凝胶中电泳,观察结果,并采用 B 型小量 DNA 片段快速回收试剂盒将剩余的 PCR 产物进行切胶回收。

1.2.3 rPET28a(+)-P 重组质粒的构建 对回收纯化的 PCR 产物和 PET28a(+)-P 原核表达载体,分别用 *EcoR* I (8~20 U/μL)、*Hind* III (8~20 U/μL) 限制性内切酶进行同步双酶切,酶切体系为 10×M Buffer 3 μL、PCR 产物或 PET28a(+)-P 质粒 23 μL、*EcoR* I 2 μL、*Hind* III 2 μL,将其瞬时离心后,于 37 ℃ 恒温箱内酶切 5 h。取酶切产物进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,按照胶回收试剂盒说明书切胶回收目的片段。将酶切回收的目的基因与表达载体按照适当的物质的量比(1:3~1:10)混合,并加入 T4 DNA Ligase 和缓冲液,在 16 ℃ 下过夜。将连接的产物转化到 DH5α 感受态细胞中,并取 100 μL 涂布在含有 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 平板上,37 ℃ 培养 12~16 h,挑取单个菌落于含卡那霉素的

LB 液体培养基中,37 ℃ 摇菌,培养过夜。提取质粒,进行 *EcoR* I、*Hind* III 双酶切鉴定,将鉴定为阳性的质粒命名为 rPET28a(+)-P。

1.2.4 NDV HN09-69 株的遗传进化分析 将 rPET28a(+)-P-DH5α 菌送华大基因测序。用 DNASTar 软件的 J Hein 方法,将 HN09-69 株 *P* 基因核苷酸序列与 GenBank 上已发表的 NDV *P* 基因序列进行比对,并分析其遗传进化地位。

1.2.5 重组 P 蛋白的诱导表达 将鉴定为阳性的重组质粒 rPET28a(+)-P 转化到 BL21(DE3)感受态细胞中,挑取阳性菌落,接种于新鲜的含卡那霉素的 LB 液体培养基中,37 ℃、200 r/min 培养过夜至 OD₆₀₀ 约为 0.6 时,加入 100 mmol/L IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,37 ℃ 诱导振荡培养 5 h 后,12 000 r/min 离心 3 min,每 mL 菌体用 40 μL 的双蒸水重悬,并加入 10 μL 的 5×SDS loading buffer 混匀,水浴煮沸 5 min,取 10 μL 上样进行 SDS-PAGE 电泳,经考马斯亮蓝染色 2 h 和脱色液脱色 4 h 后观察电泳结果。同时设空载体及未诱导菌对照。

1.2.6 重组 P 蛋白的纯化及 Western blotting 鉴定 取 1 L 诱导表达后的 BL21 菌,7 000 r/min 离心得菌体沉淀。按每 100 mg 菌体沉淀加入 4 mL 结合缓冲液(pH7.8)重悬菌体,加入溶菌酶至终质量浓度 1 mg/mL,冰上放置 30 min 后,于 4 ℃ 摇床上孵育 10 min,再加入 Triton X-100,至终质量浓度 10 g/L,孵育 10 min;将孵育好的菌体冰浴下超声破碎,得菌体裂解液,然后于 4 ℃、15 000 r/min 离心 30 min,得菌体裂解液上清和沉淀;将菌体裂解液上清经 0.45 μm 滤膜过滤后负载上平衡好的镍琼脂糖凝胶层析柱纯化。纯化步骤参照文献[16]。纯化的重组 P 蛋白经 SDS-PAGE 电泳后转印至 PVDF 膜上,用 50 g/L 的脱脂奶粉室温封闭 1 h,然后用 1:1 000 倍稀释的 HRP 标记的抗 His-tag 鼠单抗孵育,4 ℃ 过夜,孵育结束后 TBST 缓冲液洗涤 2 次,每次 10 min。最后用 DAB 和 H₂O₂ 显色反应。

2 结果与分析

2.1 *P* 基因的 RT-PCR 扩增结果

NDV HN09-69 株 *P* 基因的 RT-PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳后,在 1 188 bp 处有一特异性条带(图 1),与预期结果相符合。

2.2 重组质粒 rPET28a(+)-P 的酶切鉴定

重组质粒 rPET28a(+)-P 经 *EcoR* I、*Hind* III 双酶切后,出现 5 369 bp 的线性载体和 1 188 bp 的

目的片段 2 条带(图 2)。结果表明,目的片段以正 确方向插入原核表达载体 PET28a(+)中。

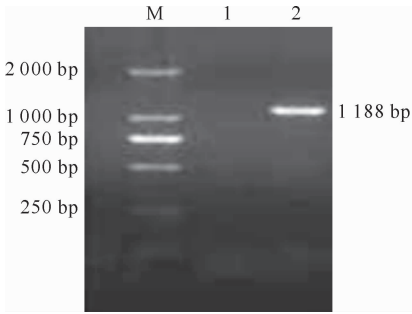


图 1 NDV HN09-69 株 P 基因的 RT-PCR 扩增结果

M. DNA Marker DL2000;1. 阴性对照;
2. P 基因的 RT-PCR 扩增产物

Fig.1 Products of amplification of NDV HN09-69 P gene by RT-PCR

M. DNA Marker DL2000;1. Negative control;
2. RT-PCR product of P gene

2.3 P 基因核苷酸和氨基酸序列同源性比较及遗传进化分析

NDV HN09-69 与 GenBank 上已发表的 NDV P 基因序列相比,核苷酸同源性为 81.3%~98.4%;与国外、国内新城疫毒株的核苷酸同源性分别为 81.3%~87.2%和 82.5%~98.4%;与鸡源、鸭源、鹅源 NDV 的核苷酸同源性分别为 81.3%~97.2%,97.9%~98.4%和 96.0%~98.0%;与 NDV La Sota、clone-30、VG/GA、F48E8 株的核苷

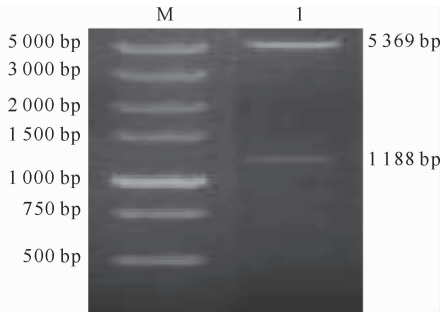


图 2 重组质粒 rPET28a(+)-P 的 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定结果

M. DNA Marker DL5000;1. rPET28a(+)-P 双酶切产物

Fig.2 Recombinant plasmid rPET28a(+)-P digested with *EcoR* I and *Hind* III

M. DNA Marker DL5000;
1. Digestion product of rPET28a(+)-P

酸同源性较低,分别为 82.5%,82.4%,82.6%和 84.9%。P 蛋白氨基酸序列比较结果与核苷酸相似,与 29 个参考株同源性为 79.3%~98.2%;与鸡源、鸭源、鹅源 NDV P 蛋白氨基酸同源性分别为 79.3%~97.0%,97.5%~98.2%和 96.0%~97.5%;与 NDV La Sota、clone-30、VG/GA、F48E8 株 P 蛋白氨基酸同源性分别为 82.1%,81.9%,81.4%和 83.9%。根据 NDV P 基因的核苷酸序列比对结果绘制遗传进化树,如图 3 所示。

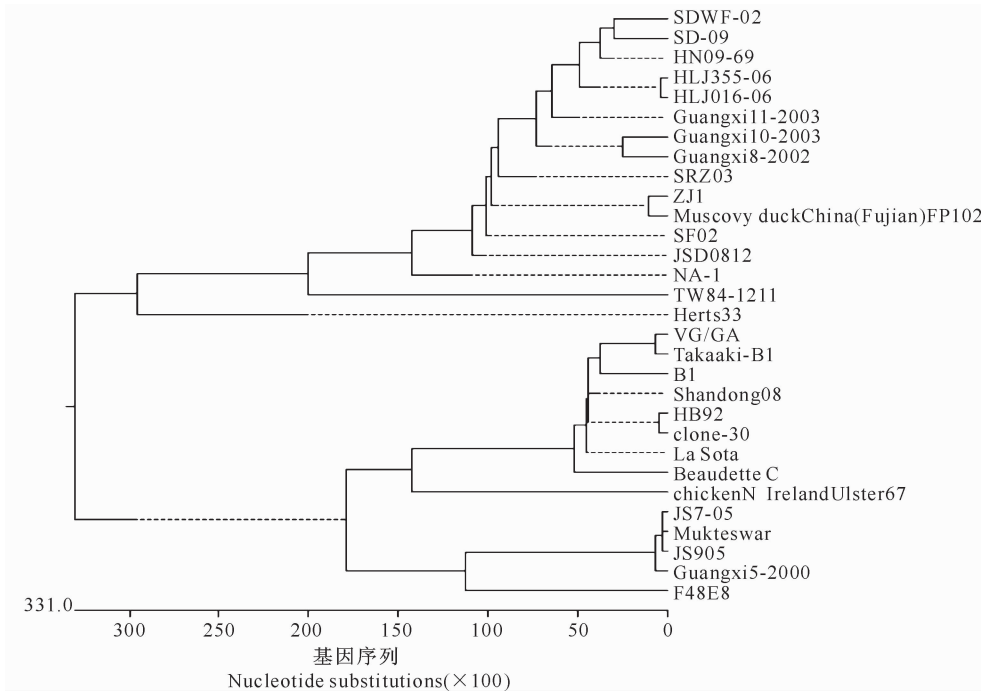


图 3 NDV 不同毒株 P 基因序列遗传进化分析

Fig.3 Evolutionary analysis of P gene of differents reference NDV strains

由图 3 可以看出,NDV 从祖代分化为 2 个大分支,NDV HN09-69 株与同一大分支中的 SDWF-02、SD-09、HLJ355-06 和 HLJ016-06 亲缘关系较近,且均属于强毒株;另一大分支包括弱毒 NDV La Sota、B1、VG/GA、clone-30 及国内强毒 F48E8。

2.4 HN09-69 株 P 基因表达产物的可溶性分析

通过在线预测软件 ProtScale 对 P 蛋白氨基酸

序列的疏水性进行预测,结果显示,P 蛋白是亲水性的。对诱导的 P 蛋白上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE 电泳分析,结果(图 4)显示,菌体裂解液上清中的蛋白含量明显较沉淀中的高,由此可知重组 P 蛋白在大肠杆菌中主要以可溶性的形式表达。

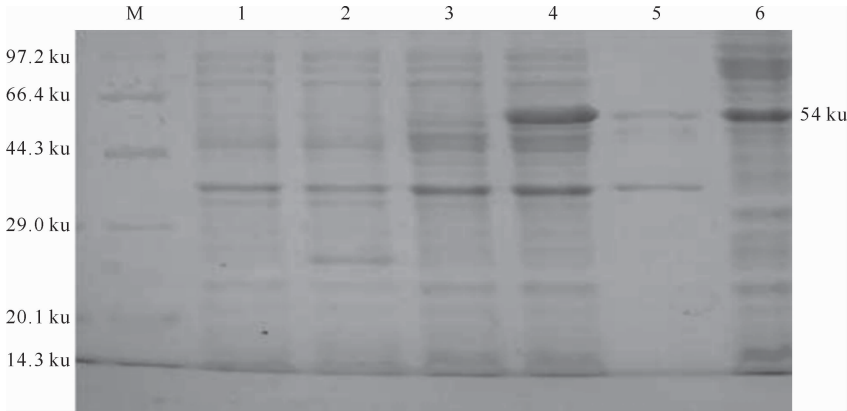


图 4 重组 P 蛋白可溶性的 SDS-PAGE 鉴定结果

M. 蛋白分子质量标准;1. BL21;2. PET28a(+)空载体;3. 未诱导的 rPET28a(+)-P-BL21;4. 诱导的 rPET28a(+)-P-BL21 菌体裂解液;5. 诱导的 rPET28a(+)-P-BL21 菌体裂解沉淀;6. 诱导的 rPET28a(+)-P-BL21 菌体裂解液上清

Fig. 4 Soluble identification of recombinant P protein with SDS-PAGE

M. Protein molecular weight Marker;1. BL21;2. Empty PET28a(+) vector induced;

3. rPET28a(+)-P-BL21 whithout induced;4. All bacteria cracking liquid of induced rPET28a(+)-P-BL21;

5. Deposit of induced rPET28a(+)-P-BL21;6. Liquid supernatant of induced rPET28a(+)-P-BL21

2.5 不同浓度 IPTG 对 HN09-69 株重组 P 蛋白表达量的影响

不同浓度 IPTG 诱导表达产物在约 54 ku 处出现目的蛋白条带(图 5),BandScan 5.0 软件扫描显示,在

不同浓度 IPTG(0.2~1.2 mmol/L)诱导,重组 P 蛋白表达量分别占菌体总蛋白的 39.7%,41.2%,38.4%,40.1%,39.5%和 38.9%。说明不同浓度 IPTG 对 HN09-69 株 P 蛋白表达量的影响较小。

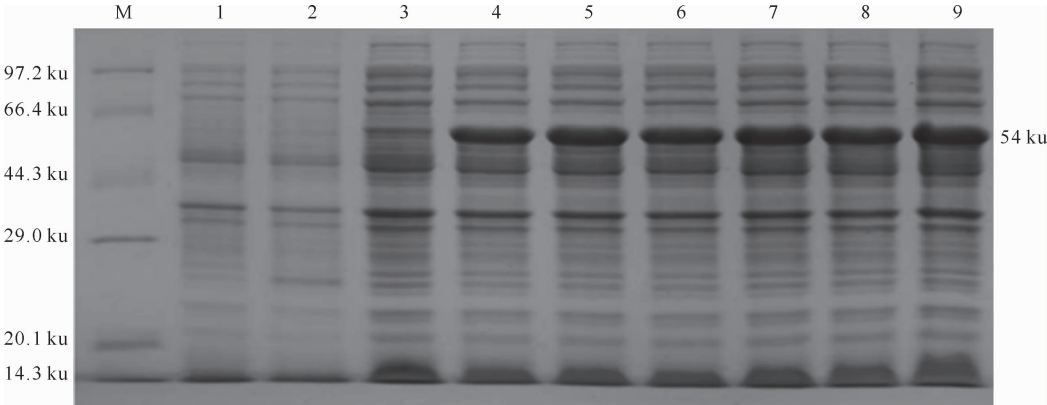


图 5 不同浓度 IPTG 对重组 P 蛋白表达量的影响

M. 蛋白分子质量标准;1. BL21 菌;2. PET28a(+)空载体;3. 未诱导的 rPET28a(+)-P-BL21;

4~9. 分别为 rPET28a(+)-P-BL21 在 0.2,0.4,0.6,0.8,1.0,1.2 mmol/L IPTG 诱导下的表达产物

Fig. 5 Expression of recombinant P protein in *E. coli* under different concentration of IPTG

M. Protein molecular weight Marker;1. BL21;2. Empty PET28a(+)vector induced;3. rPET28a(+)-P-BL21 whithout induced;

4~9. Expression products of rPET28a(+)-P-BL21 in 0.2,0.4,0.6,0.8,1.0,1.2 mmol/L concentration of IPTG

2.6 HN09-69 株重组 P 蛋白的 Western blotting 鉴定

HN09-69 株重组 P 蛋白在约 54 ku 处出现单一且特异的清晰条带(图 6),说明 HN09-69 株重组 P 蛋白在大肠杆菌中得到了高效表达,且与预测蛋白大小一致。

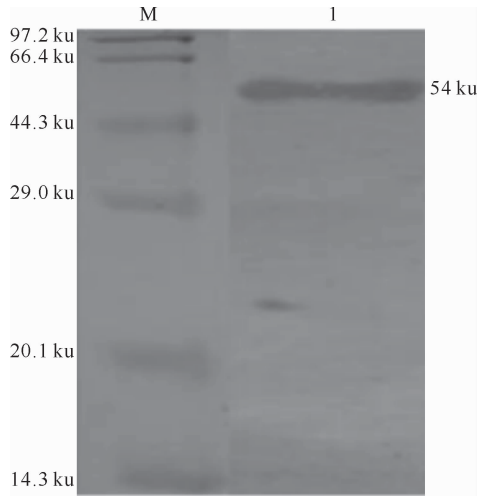


图 6 重组 P 蛋白的 Western blotting 鉴定结果

M. 蛋白分子质量标准;1. 重组 P 蛋白

Fig. 6 Western blotting analysis of the recombinant P protein

M. Protein molecular weight Marker;1. Rcombinant P protein

3 讨 论

P 蛋白在 NDV 的免疫逃逸、致病性、宿主范围和组织嗜性等方面起着十分重要的作用。仇旭升^[17]通过反向遗传技术成功拯救了 3 株 P 基因替换株,经过 MDT(最小致死量引起所有鸡胚死亡的平均时间)、ICPI(1 日龄 SPF 鸡脑内接种分离病毒致病指数)、IVPI(6 周龄 SPF 鸡翅下静脉接种致病指数)试验,得出 3 株 P 基因替换株的毒力强弱排序与其 P 基因来源毒株的毒力强弱排序相同,表明 P 基因也是影响 NDV 毒力的因素之一。

本研究通过 NDV HN09-69 株与图 3 中各参考株 P 基因序列推导的氨基酸序列比对结果发现,强毒 NDV 和弱毒 NDV 在第 11,86 和 360 位的氨基酸分别为 D 和 E、N 和 D 及 T 和 M,这些差异可能与其毒力有关;在第 49,72,90,94,95,104,138,148,151,153,159,162,166,168,171,179,187,201,216,221,224,234,243,271,348 和 380 位点上,HN09-69 与水禽(鸭、鹅)源 NDV 相同,而与鸡源 NDV 差异较大。本研究中 P 基因核苷酸及其推导的氨基酸同源性比较和系统进化结果表明,HN09-

69 与国内分离 NDV 毒株之间的同源性较高,而与国外分离株、疫苗株及传统强毒株的同源性较低,这与文献[18]的结论相似:在进化关系上,HN09-69 与 SD-09 和 SDWF-02 2 株鸭源新城疫病毒的亲缘关系最近,与 HLJ355-06、HLJ016-06 2 株鸭源新城疫病毒的亲缘关系次之,由此可推断,HN09-69 可能是由鸭源新城疫病毒通过某种方式传播到鸡。本研究结果还表明,新城疫病毒在进化上从祖先分化为 2 支,一支全为强毒,另一支在进化的过程中又分为强毒和弱毒 2 个分支,这可能与目前临床上弱毒 NDV 或疫苗株毒力返强有一定联系。近年来新城疫对水禽的感染呈上升趋势,且从水禽体内分离的 NDV 毒力在增强。Takakuwa 等^[19]在水禽体内分离出了具有强毒株特征的 NDV 毒株,在分离的 47 株 NDV 中,有 5 株 NDV 的 F 蛋白裂解位点已经变为强毒的特征,因此认为自然界迁徙的水禽体内含有潜在的强毒株,这些毒株可能传给陆生禽类并增强其致病性。吴艳涛等^[20]分析了从鹅群中分离到的 10 株 NDV,发现有 9 株属于基因 VIIc 型,与同期分离到的鸡源 NDV 的基因型一致。水禽是 NDV 的天然贮存库,具有潜在危害性,在 NDV 传播和流行中起着重要作用。NDV 在水禽和鸡等宿主的循环传播过程中,加速了能突破现有鸡新城疫疫苗保护的强毒株的出现,致使现有疫苗易于失去保护作用。这可能是由于病毒受到环境的压力,在分子水平上一些核苷酸位点发生突变导致氨基酸改变,从而使其毒力和致病性发生变化,具体的机制尚有待进一步研究。

本实验室分离到的 NDV HN09-69 为强毒,病毒效价较高,毒力稳定,是当前我国大部分养鸡地区流行的主要鸡 NDV 毒株。NDV HN09-69 重组 P 蛋白在大肠杆菌中主要以可溶性的形式表达,且含量高。经过 NI 层析柱方法纯化速度快,回收率高,为后续研究及应用带来了方便,也为动物免疫试验及进一步研究新城疫病毒的变异机制及 P 蛋白结构和功能奠定了基础。

[参考文献]

[1] 殷震,刘景华. 动物病毒学 [M]. 2 版. 北京:科学出版社,1997:736-750.
Yin Z, Liu J H. Animal virology [M]. 2nd ed. Beijing: Science Press,1997:736-750. (in Chinese)
[2] 卡尔尼克 B W. 禽病学 [M]. 9 版. 高福,刘文军,译. 北京:北京农业大学出版社,1991:427-454.
Calnek B W. Disease of poultry [M]. 9 th ed. Gao F, Liu W J,

- translate. Beijing: Beijing Agricultural University Press, 1991: 427-454. (in Chinese)
- [3] 王学理, 武迎红, 鲁金波, 等. 新城疫病毒分子生物学研究进展 [J]. 内蒙古民族大学学报: 自然科学版, 2009, 24(3): 318-322.
Wang X L, Wu Y H, Lu J B, et al. Progress in the molecular biology of newcastle disease virus [J]. Journal of Inner Mongolia University for Nationalities: Natural Sciences, 2009, 24(3): 318-322. (in Chinese)
- [4] 符芳, 姜北宇, 张莉, 等. 鸡新城疫病毒 La Sota 株 *F* 基因克隆及原核表达 [J]. 华北农学报, 2006, 21(3): 117-120.
Fu F, Jiang B Y, Zhang L, et al. Cloning and prokaryotic expression of the *F* gene of NDV La Sota strain [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2006, 21(3): 117-120. (in Chinese)
- [5] Gravel K A, Morrison T G. Interacting domains of the HN and F proteins of newcastle disease virus [J]. J Virol, 2003, 77(20): 110402-110409.
- [6] Errington W, Emmerson P T. Assembly of recombinant Newcastle disease virus nucleocapsid protein into nucleocapsid-like structures is inhibited by the phosphoprotein [J]. J Gen Virol, 1997, 78: 2335-2339.
- [7] 刘光清. 动物病毒反向遗传学 [M]. 北京: 科学出版社, 2009: 180-181.
Liu Q G. Reversed genetics of animal virus [M]. Beijing: Science Press, 2009: 180-181. (in Chinese)
- [8] 徐耀先, 周晓峰, 刘立德, 等. 分子病毒学 [M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2000: 289-290.
Xu Y X, Zhou X F, Liu L D, et al. Molecular virology [M]. Wuhan: Hubei Science and Technology Press, 2000: 289-290. (in Chinese)
- [9] Man-Seong P, Garcia-Sastre A, Cros J F, et al. Newcastle disease V protein is a determinant of host range restriction [J]. J Virol, 2003, 77(7): 9522-9532.
- [10] Wakamatsu N, King D J, Seal B S, et al. The pathogenesis of Newcastle disease: A comparison of selected Newcastle disease virus wild-type strains and their infectious clones [J]. Virology, 2006, 353: 333-343.
- [11] 韩青松, 代鹏, 杨增岐, 等. 鸽源新城疫病毒陕西分离株 *P* 基因的克隆及序列分析 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2010, 38(6): 7-12.
Han Q S, Dai P, Yang Z Q, et al. Cloning and sequence analysis of *P* gene of NDV strains isolated from pigeon of Shaanxi [J]. Journal of Northwest A&F University: Nat Sci Ed, 2010, 38(6): 7-12. (in Chinese)
- [12] 梁俊文, 于可响, 陈静, 等. 新城疫病毒分离株 *HN* 和 *P* 基因分子进化及其相关研究 [J]. 病毒学报, 2008, 24(5): 390-394.
Liang J W, Yu K X, Chen J, et al. Molecular evolution and correlation of *HN* and *P* gene among the field newcastle disease viruses [J]. Chinese Journal of Virology, 2008, 24(5): 390-394. (in Chinese)
- [13] 刘晓文, 王晓泉, 吴双, 等. 鸭源新城疫病毒 *P* 基因遗传变异分析 [J]. 中国动物传染病学报, 2009, 17(4): 1-6.
Liu X W, Wang X Q, Wu S, et al. Genetic variation of *P* gene of avirulent newcastle disease virus of duck origin in China [J]. Chinese Journal of Veterinary Parasitology, 2009, 17(4): 1-6. (in Chinese)
- [14] Miller P J, Kim L M, Ip H S, et al. Evolutionary dynamics of Newcastle disease virus [J]. Virology, 2009, 391(1): 64-72.
- [15] 温贵兰, 瞿继红, 李永明, 等. RT-PCR 对新城疫病毒 (NDV) 分离株的鉴定及其临床应用 [J]. 中国兽医学报, 2008, 28(10): 1137-1140.
Wen G L, Qu J H, Li Y M, et al. Identification of Newcastle disease virus (NDV) isolates by RT-PCR and its clinical application [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2008, 28(10): 1137-1140. (in Chinese)
- [16] 萨姆布鲁克 J. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 黄培堂, 王加玺, 朱厚础, 等译. 北京: 科学出版社, 2002: 1252-1255.
Sambrook J. Molecular cloning: A laboratory manual [M]. 3th ed. Huang P D, Wang J X, Zhu H C, et al, translate. Beijing: Science Press, 2002: 1252-1255. (in Chinese)
- [17] 仇旭升. 反向遗传技术研究新城疫病毒 *P* 基因功能及其对病毒毒力的影响 [D]. 江苏扬州: 扬州大学, 2009.
Qiu X S. The function of *P* gene of Newcastle disease virus and its role in pathogenicity [D]. Yangzhou, Jiangsu: Yangzhou University, 2009. (in Chinese)
- [18] 梁俊文, 田夫林, 黄兵, 等. 新城疫病毒分离株 *P* 基因的分子特性和遗传进化 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2009, 37(1): 49-55.
Liang J W, Tian F L, Huang B, et al. Genetic characteristics and evolution of *P* gene of the field Newcastle disease virus [J]. Journal of Northwest A&F University: Nat Sci Ed, 2009, 37(1): 49-55. (in Chinese)
- [19] Takakuwa H, Ito T, Takada A, et al. Potentially virulent newcastle disease viruses are maintained in migratory water fowl populations [J]. Jpn J Vet Res, 1998, 45(4): 207-215.
- [20] 吴艳涛, 倪霞雷, 万洪全, 等. 我国部分地区不同动物来源新城疫病毒的分子流行病学研究 [J]. 病毒学报, 2002, 18(3): 264-269.
Wu Y T, Ni L X, Wan H Q, et al. Molecular epidemiological characterization of newcastle disease virus isolates from China [J]. Chinese Journal of Virology, 2002, 18(3): 264-269. (in Chinese)