

鸡新城疫病毒分子生物学特性及检测方法研究进展

王青¹, 张改平^{2*}, 赵森林³, 王选年⁴, 胡建和⁴, 王自良⁴, 杨苏珍², 鲁晓翠⁵, 肖治军²

(1. 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 河南省动物免疫学重点实验室, 河南 郑州 450002;

3. 遂平县畜牧局, 河南 遂平 463100; 4. 河南科技学院 动物科学学院, 河南 新乡 453003;

5. 河南科技大学 食品工程学院, 河南 洛阳 471003)

中图分类号: S831 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2007)05-0114-03

鸡新城疫是由新城疫病毒(NDV)引起的一种急性败血性传染病, 是危害养鸡业发展最严重的疫病之一。NDV 属于副黏病毒科、副黏病毒亚科、腮腺炎病毒属, 是一种有囊膜的负链 RNA 病毒^[1]。在病毒复制过程中 RNA 聚合酶缺乏对核酸的校对功能, 具有比 DNA 病毒更高的变异率, 使得新的基因型不断出现。随着 NDV 分子结构、分子生物学特性、强弱毒株分子结构差异等研究的深入, 为 NDV 分子水平上的特异性诊断技术奠定了基础。这些技术不仅用于新城疫病毒的检测、鉴定、特性研究及致病性的确定等, 还可以据此追踪病毒的来源及流行情况。

1 新城疫病毒的分子生物学特性

NDV 基因组全长约 15 kb, 主要编码有 6 种病毒蛋白。其中 3 种与基因组 RNA 有关, 核衣壳蛋白(NP)与病毒基因组复制有关; 大分子蛋白(L)和磷蛋白(P)是 RNA 依赖的 RNA 聚合酶的 2 个亚单位, 两者形成基质蛋白。另外 3 种与病毒的囊膜有关, 即固定在病毒囊膜表面上的血凝素——神经氨酸酶(HN)、融合糖蛋白(F), 以及衬于囊膜内面的非糖基化内膜蛋白(M)。

1.1 F 蛋白

F 蛋白基因全长 1790 个核苷酸, 编码 1 个由 553 个氨基酸组成的多肽。F 蛋白位于病毒的囊膜上, 能够促使病毒和宿主细胞膜的融合, 进入细胞核产生溶血。病毒囊膜和靶细胞融合, 进而使病毒穿入细胞浆脱去核衣壳进行复制, 这一过程是由 F 蛋白来完成的。F 蛋白首先以无活性的前体糖蛋白

F0 形式存在, 在其复制过程中裂解为 F1 和 F2 后, 病毒才有感染性。F 蛋白的前体 F0 在细胞内被细胞的胰蛋白酶水解为 F1 和 F2 2 条多肽链, 以二硫键连接; 裂解后的 F1 多肽的 N 端产生 1 个疏水氨基酸区域, 直接参加融合活动。F 蛋白有 3 个强的疏水区, 第 1 个疏水区位于 1~25 氨基酸残基处, 为 F 蛋白 N 端信号肽区。第 2 个疏水区位于 117~142 氨基酸残基处, 为融合诱导区, 该区正好位于 F1 N 端, 直接参与膜融合。第 3 个疏水区位于 500~522 氨基酸残基处, 与蛋白的胞质区相邻, 为蛋白跨膜区, 具有终止蛋白转移和膜锚定功能。

F 蛋白含有 3 段七肽重复序列(HR1, HR2, HR3), HR1 位于 F 蛋白的 C 端, HR2 与穿膜的 N 端相邻, HR1 和 HR2 对融合作用都很重要, 任何一个区域内的氨基酸突变都会降低融合活性。目前, 国内养禽业中新城疫的流行情况依然非常严重, 免疫失败的现象比较普遍^[2]。近年研究发现, 病毒的遗传变异与疾病的流行有着密切关系。F 蛋白参与病毒的穿透、细胞融合和溶血过程, 可刺激机体产生中和抗体。而且, 决定新城疫毒力强弱的主要因素是: 病毒的 F 前体蛋白裂解位点附近的氨基酸序列组成, 强毒株的 F 前体蛋白可被多种宿主细胞蛋白酶识别裂解, 迅速侵入宿主细胞, 引起传染。不同毒株 F 基因的序列有差异, 这种差异与亲缘关系密切相关, 即亲缘关系越远, 差异越大。

1.2 HN 蛋白

HN 蛋白基因全长 2031 bp, 占基因组的 13.5%。由于开放阅读框架长度和终止密码子位置的差异, 其翻译的多肽链长短不一, 分别编码 571,

收稿日期: 2007-02-07

基金项目: 国家“863”项目资助(2003AA249031)

作者简介: 王青(1978-), 女, 河南社旗人, 在读硕士研究生, 主要从事分子病原学与免疫学研究。

通讯作者: 张改平(1960-), 男, 河南内黄人, 研究员, 博士生导师, 博士, 主要从事分子生物学及免疫学方面的研究。

577, 616 个氨基酸。HN 蛋白具有血凝素和神经氨酸酶活性, 在病毒侵染过程中起着识别细胞受体、介导病毒吸附细胞膜的作用。HN 蛋白是一个二聚体, 由二硫键连接同一多肽组成; HN 蛋白的主要疏水区在 N 端, 以 N 端插入病毒囊膜, 在碱基 C 端具有受体结合位点。HN 主要负责病毒粒子与细胞受体的结合, 并使之破坏; HN 与受体的结合还使 F 蛋白充分接近宿主细胞, 从而促进病毒与细胞的融合。

1.3 M 蛋白

M 蛋白即基质蛋白, 基因全长 1241bp, 有一个开发阅读框。编码一个 346 个氨基酸组成的多肽。它位于病毒囊膜的内侧面, 一部分镶嵌在囊膜内, 参与病毒粒子的组装并调节病毒 RNA 的合成。

1.4 NP 蛋白、L 蛋白和 P 蛋白

这 3 种蛋白与病毒基因组 RNA 相结合构成病毒核衣壳。NP 蛋白有 2 个重要的区域, 一个位于氨基端, 与 RNA 直接结合; 而另一个位于羧基端, 裸露在装配后的核衣壳表面, 胰蛋白酶处理后, 可以从核衣壳上解离下来。L 和 P 蛋白与病毒基因组的转录有关, 两者与病毒模板一起构成转录复合物。

1.5 HN 蛋白和 F 蛋白相互作用

HN 蛋白和 F 蛋白均为 NDV 的保护性抗原基因编码的蛋白, 是 2 种糖基化的功能性蛋白, 位于病毒囊膜上分别构成大小 2 种纤突, 直接与病毒的感染性、致病性和其他生物学特性有关。在免疫应答和致病过程中起着极其重要的作用。两者的相互作用引起病毒与细胞的融合和病毒感染的发生。同时, 由于这 2 种蛋白位于病毒囊膜的表面, 能够诱导机体特异性的免疫应答, 针对 HN 和 F 蛋白的多克隆抗体和单克隆抗体能够中和 NDV 的复制。因此, HN 和 F 蛋白为宿主特异性保护性抗原, 均存在有中和性 B 细胞抗原表位。

2 新城疫病毒分子生物学检测方法

2.1 反转录—聚合酶链反应(RT-PCR)技术

PCR 技术是一种选择性体外扩增 DNA 或 DNA 片段的方法, 具有特异、快速、灵敏、简便等优点, 在疾病的检测方面具有广阔的应用前景。在 PCR 技术中 DNA 聚合酶不能以 RNA 为模板合成 DNA, 故对 RNA 病毒首先必须提取病毒 RNA, 加入反转录酶合成 cDNA 后, 再进行 PCR 扩增, 即所谓的 RT-PCR。

由于新城疫病毒 F 蛋白基因差异较大, 很难用 1 对引物和 1 条(甚至几条)探针检测出所有中、强毒力的新城疫病毒。因此, 建立一种检测所有新城疫病毒的通用型方法显得尤为重要。强毒株 F 蛋

白在裂解位点附近有 2 对成双存在的碱性氨基酸, 即赖氨酸(Lys)或精氨酸(Arg); 而弱毒株在相应位置只有 2 个单个存在的碱性氨基酸。因此, 根据强、弱毒株此处不同的核苷酸序列, 设计 RT-PCR 引物分别扩增强毒株和弱毒株的相应 cDNA 片段即可将它们区分开。张鹤晓等^[3]建立了新城疫病毒通用实时 RT-PCR 检测技术, 不仅可以检出新城疫强毒株, 也可检出缓发型毒株和疫苗毒株; 再结合中强毒检测方法, 对于新城疫病毒的快速检测鉴定具有重要意义。

根据 NDV 强、弱毒株在 F 蛋白裂解位点氨基酸组成和序列上的差异, 王泽霖等^[4]设计了 3 对引物(A+B, A+C, A+D)。引物 A+B 能从 Lasota, B1, I 系和强毒 F48E8 的含毒尿囊液中扩增出 362bp 的核酸片段, 引物 A+C 仅能从强毒 F48E8 的含毒尿囊液中扩增出 254bp 的片段, 引物 A+D 仅能从 LaSota, B1, I 系的含毒尿囊液中扩增出 254bp 片段。利用 A+C, A+D 引物对包括标准株在内的 7 株 NDV 毒株进行 RT-PCR 扩增, 3 个分离株 HE2, HE3, HE11 经传统生物学试验均为 NDV 强毒株, RT-PCR 检出结果与传统的生物学试验鉴定结果完全一致。

2.2 核酸探针技术

核酸探针技术是在已获得的病毒特异片段上标记放射性同位素或生物素作为探针而建立的一种分子杂交诊断方法。随着对 NDV 各段基因序列和功能研究的深入, 对该病毒基因中的保守区、可变区、强弱毒株特异的碱基序列等已经有了明确的认识, 这为人工合成特异性检测 NDV 核酸探针的应用创造了条件。

近年来, 国内外针对新城疫病毒 F₀ 蛋白及其裂解位点的核苷酸序列与毒力之间的关系, 不仅建立了能够区分缓发型 NDV 和速发型 NDV 毒株的核酸探针, 也建立了不同毒力 NDV 株的核酸探针。贺东生等^[5]提取克隆的 NDV 融合蛋白 cDNA, 经光敏生物素标记后制备探针, 成功地杂交检测了 NDV 融合蛋白基因片段和病毒样品。核酸探针杂交技术在实际应用中也存在一些问题, 即同位素标记的核酸探针具有放射性, 对人体有危害; 生物素标记的核酸探针受紫外线照射易分解等。但该技术具有高灵敏度和高特异性的特点, 探针可大量合成, 检测速度快, 结果可靠, 同时可避免扩散病毒, 更适用于临床诊断和进出口检疫。

2.3 单克隆抗体技术

单克隆抗体能够识别并与特定的某个抗原决定簇发生反应, 根据单克隆抗体针对单个抗原决定簇

的特异性,以及单抗的均一性和生物活性单一性使抗原抗体反应结果便于质量控制,利于标准化和规范化。科技人员试图研制和筛选针对与 NDV 毒力相关的抗原决定簇的单克隆抗体,由此对临床发生的非典型 ND 进行确诊,鉴别 ND 强弱毒株表面抗原的差异,以及对 ND 现场分离毒株开展分群研究^[6]。

由于单克隆抗体可以检测抗原性的微小差异,如针对表位的单个氨基酸差异,研制的 NDV 单抗已广泛用于病毒抗原表位和发病机理的研究、疾病诊断和流行病学分析^[7]。为了快速诊断免疫鸡群中是否存在 NDV 强毒感染,吴艳涛等^[8]研制出单抗 ELISA 试剂盒。该试剂盒对 NDV 强毒感染鸡泄殖腔棉拭样品呈检测阳性,而疫苗毒株则呈检测阴性。蒋凤英等^[9]采用传统的病毒分离的方法将免疫鸡群泄殖腔棉拭样品盲传 1 代,再用新城疫单抗夹心 ELISA 对 F₁ 代尿囊液进行 NDV 检测。NDV 阳性样品检出率很高,且鸡禽流感病毒(AIV)对此无干扰作用。表明用单抗夹心 ELISA 法检测鸡泄殖腔棉拭样品 F₁ 代尿囊液新城疫病毒具有实用、准确、稳定、快速、特异性强等优点。

2.4 RNA 指纹图谱法

RNA 指纹图谱法是将病毒 RNA 提纯后,用 T1 RNA 酶降解产生大小不同寡核苷酸片段;利用放射性同位素标记后进行垂直双向电泳,再经放射自显影得到特征性 RNA 指纹图谱。不同的毒株 RNA 组成和序列有差异,可通过指纹图谱反应出来^[10],作为 NDV 检测和分析的一种手段。但这种方法具有放射污染性,且操作复杂,所需设备昂贵,因而不经常应用。

2.5 基因芯片技术

基因芯片又称 DNA 芯片、DNA 微阵列等,是伴随人类基因组计划而产生的,是近年来分子生物学及医学诊断技术的重要进展。该技术的突出特点在于其高度的并行性、多样化、微型化、自动化,被认为是生命科学研究中继基因克隆技术、基因自动测序技术、PCR 技术后的又一次革命性的技术突破^[11]。该技术是近年来发展起来的一种生物新技术,可应用于基因表达谱分析、基因位点突变分析和疫病检测等方面^[12]。曹三杰等^[13]首次构建制备了 NDV,IBV, AIV 和 IBDV 等禽类主要疫病的基因检测基因芯片,该试验分别设计和克隆鉴定了 NDV,IBV, AIV 和 IBDV 的靶基因重组质粒,以克隆的靶基因重组质粒为模板,分别进行 PCR 扩增制备靶基因并纯化;以基因芯片点样仪将制备的靶基因点制在氨基化的基片上,经干燥、水合、紫外线交

联和洗涤后,成功制备了 NDV—IBV—AIV—IBDV 诊断基因芯片,并应用 CY3 荧光标记制备的探针进行芯片的检验。结果表明,制备的 NDV—IBV—AIV—IBDV 诊断基因芯片质量好,对 NDV, IBV, AIV 和 IBDV 的检测具有同步检测和鉴别诊断的功能,同时具有灵敏性好、特异性高和芯片可重复检测的优点。

参考文献:

- [1] 邓明俊,张彦明,梁荣,等.鸡新城疫病毒 F 基因高效真核表达质粒的构建[J].西北农林科技大学学报,2003,31(2):9—12.
- [2] Merz D C, Scheid A, Choppin P W. Importance of antibodies to the fusion glycoproteins in the prevention of spread of infection[J]. J Exp Med, 1981, 151: 275—288.
- [3] 张鹤晓,高志强,赖平安,等.新城疫病毒通用型实时 RT—PCR 检测方法的建立与应用[J].动物医学进展,2005,26(11):53—56.
- [4] 王泽霖,王丽.应用 RT—PCR 对新城疫病毒分离株毒力的快速鉴定[J].中国兽医学报,2004,24(4):317—319.
- [5] 贺东生,宋长绪,刘福安,等. DNA—RNA 杂交法检测新城疫病毒的研究[J].中国动物检疫,1997,14(5):10—11.
- [6] Letellier C, Burny A, Meulemans G. Construction of a pigeonpox virus recombinant expression of the new castle disease virus fusion glycoprotein and protection of chickens against NDV challenge[J]. Arch Viro, 1993, 118: 43—56.
- [7] 刘秀梵.单克隆抗体在农业上的应用[M].合肥:安徽科学技术出版社,1994.
- [8] 吴艳涛,文其乙.应用单抗 ELISA 试剂盒检测免疫鸡群新城疫强毒感染[J].中国农业科学,1998,31(6):1—5.
- [9] 蒋凤英,胡建华.用单抗夹心 ELISA 快速检测鸡新城疫病毒[J].上海农业学报,2004,20(4):130—133.
- [10] Mcmillar B C, R P Hanson. RNA oligonucleotide fingerprinting: A proposed method of identifying strains of Newcastle disease virus[J]. Avian Dis, 1980, 24: 1016—1020.
- [11] Shoemaker D D, Linsley P S. Recent developments in DNA microarrays [J]. Curr Opin Microbiol, 2002, 5(3): 334—337.
- [12] 马立人,蒋中华.生物芯片[M].2版.北京:化学工业出版社,2002.
- [13] 曹三杰,文心田,肖驰,等.几种主要禽疫病诊断基因芯片的制备及初步应用[J].畜牧兽医学报,2006,37(4):356—360.