

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (9) :1073 – 1081; 4 September 2014
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.09.012

新城疫病毒非编码序列的遗传演化趋势

徐怀英^{1,2}, 秦卓明², 亓丽红², 张伟², 王友令², 刘金华^{1*}

¹ 中国农业大学动物医学院, 北京 100094

² 山东省农业科学院, 山东 济南 250100

摘要: 【目的】探讨新城疫病毒全基因序列中非编码序列的分子演化规律。【方法】结合本研究室 2012 年自产蛋下降鸭群中分离测序的一株鸭源新城疫病毒全序列, 从 GenBank 下载 35 株不同基因型新城疫病毒全长 cDNA 序列, 获取非编码序列, 分别绘制引导序列、尾随序列、F-HN 及 HN-L 基因间隔序列 (IGS) 的遗传进化树, 比较编码基因内 5' 及 3' UTR 序列核苷酸序列替代特点。【结果】非编码序列的长度及位置高度保守, 而其核苷酸基因序列在不断发生变异, 且变异趋势与编码基因序列相一致。【结论】新城疫病毒在整个基因组上编码和非编码序列同步发生变异。

关键词: 新城疫, 基因组, 非编码序列, 演化

中图分类号: Q933 **文章编号:** 0001-6209 (2014) 09-1073-09

新城疫 (Newcastle disease, ND) 是由禽副黏病毒 I 型的新城疫病毒 (Newcastle disease virus, NDV) 引起禽的一种急性、高度传播性疫病, 主要感染鸡、火鸡及鸽等多种禽类^[1]。NDV 属副黏病毒科的 Avulavirus 病毒属, 为单股、负链、不分节段的 RNA 病毒。新城疫病毒只有 1 个血清型, 可分为两大类 Class I (1-9 型) 和 Class II (I-X VIII 型)^[2-6]。其中 I 类分离株绝大多数为弱毒株, 系从活禽市场或野生水禽中分离到的, 基因组长度为 15198 个核苷酸 (nt); II 类中的基因 I-IV, 弱毒和强毒均有, 基因组长度为 15186nt; 15192nt; II 类中的 V-X VIII 型都是强毒, 基因组长度为 15192nt^[7]。Class II NDV 包括了传统意义上的所有 NDV 毒株类型。当前世界范围内流行的 NDV 强毒株和正在使用的疫苗株均属于 Class II 型^[8]。

NDV 负链 RNA 基因组的排列顺序为 3' -NP-P-

M-F-HN-L-5', 包括 6 个编码基因, 编码 6 种结构蛋白和 2 种非结构蛋白, 结构蛋白分别为核衣壳蛋白 (Nucleocapsid protein, NP)、磷酸化蛋白 (Phosphate 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 (Haemagglutinin Neuraminidase protein, HN) 和 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (Large protein, L), 非结构蛋白为 V 和 W 蛋白^[9]。F 和 HN 是位于病毒表面的两种糖蛋白, 是主要的功能性蛋白, F 蛋白能够融合宿主细胞膜, 使病毒侵入宿主细胞内; HN 蛋白具有血凝素和神经氨酸酶活性, 在病毒侵染过程中识别和结合细胞受体、介导病毒吸附细胞膜, 是重要的抗原结合位点。基因组两端还有顺反子外片段: 3' 端引导序列 (Leader sequence) 及 5' 端尾随 (Trailer sequence) 序列, 这些区域是病毒基因转录及基因组的复制所必需的^[10]。基因和基因间有 1-47 个核

基金项目: 山东省科学发展计划项目 (2009GG10009006); 国家自然科学基金项目 (31372332)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-40-62733837; E-mail: ljh@cau.edu.cn

作者简介: 徐怀英 (1976-), 女, 山东冠县人, 副研究员, 博士研究生, 研究方向为家禽病毒分子变异及诊断研究。E-mail: hyingxu@163.com

收稿日期: 2013-12-02; **修回日期:** 2014-01-24

苷酸不等的基因间片段 (intergenic sequences, IGS)。前 3 个 IGS 为 1 或 2nt, F-HN 基因 IGS 为 31nt, HN-L 为 47nt^[11-12]。在各编码基因的前后端有非编码区 (untranslated regions, UTR), 非编码区内有保守的转录调控片段基因起始端 (Gene start, GS)、基因末端 (Gene end, GE) 及未知功能的非编码序列^[13]。

目前, 国内外对 NDV 的大量研究集中在结构基因的开放阅读框架的分子变异或蛋白功能的研究, 而对非编码基因及编码基因内的 UTR 区的基因序列鲜有报道。本研究拟对 36 株 NDV cDNA 基因组序列的引导序列、尾随序列、IGS 及 UTR 区核酸序列进行比较, 分析其变异趋势和特点。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

TRIzol 试剂、RT-PCR 一步法试剂盒及 pMD18-T 载体试剂盒为 TaKaRa (大连) 公司产品; DNA 回收试剂盒及普通质粒小提试剂盒为天根生化科技有限公司产品; 引物由华大基因合成; 感受态细胞 DH5 α 由山东省禽病免疫与诊断重点实验室自制。PCR 仪为德国 Biometra 公司产品; 电泳仪为北京君意华鑫科技有限公司产品; 凝胶成像系统为北京科创锐新生物科技有限公司产品。

1.2 毒株序列

从 GenBank 获取 LaSota 等已发表全基因组序列 36 个 NDV 毒株的 cDNA 序列, 其中 LC12 (KF771883) 为本研室 2012 年自出现产蛋下降的鸭群中分离纯化并测序的一株鸭源 NDV 强毒, 下载序列信息见表 1。

表 1. 获取自 GenBank 的 NDV 毒株
Table 1. Reference NDV strains from GenBank

GenBank accession	strain name	abbreviation	class	genotype	genome length/nt	virulence
FJ794269	NDV08-004	NDV08-004	I	3	15198	Lentogenic
HQ008337	JS10	JS10	I	2	15198	Lentogenic
JN688863	Ch. ZJ. 10. 03	ZJ. 10. 03	I	3	15198	Lentogenic
AY562991	Ulster. 67	Ulster. 67	II	I	15186	Lentogenic
JX524203	V4	V4	II	I	15186	Lentogenic
JN653339	Duck. M4. 2007	M4. 2007	II	I	15186	Lentogenic
AY845400	LaSota	LaSota	II	II	15186	Lentogenic
AF309418	B1	B1	II	II	15186	Lentogenic
JX193080	duck. China. Guangxi19. 2009	GX19. 2009	II	II	15186	Lentogenic
EF201805	Mukteswar	Mukteswar	II	III	15186	Velogenic
FJ430159	JS. 7. 05. Ch	JS. 7. 05	II	III	15186	Velogenic
FJ430160	JS. 9. 05. Go	JS. 9. 05	II	III	15186	Velogenic
FJ436302	F48E8	F48E8	II	IX	15192	Velogenic
FJ43606	JS. 1. 02. Du	JS. 1. 02	II	IX	15192	Velogenic
HQ717357	Duck. GD09-2	GD09-2	II	IX	15192	Velogenic
AY741404	Herts. 33	Herts. 33	II	IV	15186	Velogenic
EU293914	Italien	Italien	II	IV	15186	Velogenic
AY562986	anhinga. U. S. (Fl) . 44083. 93	anhinga. 93	II	V	15192	Velogenic
AY562987	gamefowl. U. S. (CA) . 211472. 02	gamefowl. 02	II	V	15192	Velogenic
EF065682	rAnhinga	rAnhinga	II	V	15192	Velogenic
AY562989	dove. Italy. 2736. 00	Italy. 2736. 00	II	VI	15192	Velogenic
JQ993431	pigeon. China. SDS. 2011	SDS. 2011	II	VI	15192	Velogenic
FJ766528	Pigeon. NDV05-029	NDV05-029	II	VI	15192	Velogenic
AF431744	ZJ1	ZJ1	II	VII	15192	Velogenic
KF771883	Duck. Shandong. LC. 2012	LC12	II	VII	15192	Velogenic
KC542902	Chicken. China. Beijing. 01. 2009	BJ01. 2009	II	VII	15192	Velogenic
KC542905	Chicken. China. Liaoning. 01. 2009	LN01. 2009	II	VII	15192	Velogenic
JN400897	Chicken. China. SDLY01. 2011	SD01. 2011	II	VII	15192	Velogenic
KC542910	Chicken. China. Hebei. 01. 2011	HB01. 2011	II	VII	15192	Velogenic
KC542911	Chicken. China. Beijing. 01. 2012	BJ01. 2012	II	VII	15192	Velogenic
JN400895	Duck. China. SD03. 2009	SD03. 2009	II	VII	15192	Velogenic
HQ717357	Duck. GD09-1	GD09-1	II	VII	15192	Velogenic
GQ849007	JSD0812	JSD0812	II	VII	15192	Velogenic
JX012096	AF2240-1	AF2240-1	II	VIII	15192	Velogenic
FJ751918	Chicken. QH1. 1979	QH1. 1979	II	VIII	15192	Velogenic
FJ751919	Chicken. QH4. 1985	QH4. 1985	II	VIII	15192	Velogenic

1.3 全基因组核苷酸同源率及进化树分析

利用 DNASTar Lasergene7.1 软件比较 LC12 株与其它 NDV 核苷酸同源性, 使用 MEGA5.2 软件中 Neighbor-joining method 方法, 并以 cDNA 序列绘制遗传进化树, 比较各代表毒株的遗传变异特点。

1.4 非编码基因序列分析

使用 MEGA5.2 软件中 Neighbor-joining method 方法, 绘制 NDV 毒株的引导序列、尾随序列、F-HN 及 HN-L 基因间隔区的核苷酸序列系统发育树。

1.5 编码基因内的非编码序列分析

分析 NDV 6 个编码基因起始和终止序列内的差异、非编码序列的长度及 NP 基因 5' 端非编码区的核苷酸变异。

2 结果

2.1 基于 NDV 全基因组 cDNA 的基因分型及同源率分析

下载的参考毒株名称、GenBank 登录号见表 1, 全基因组分型结果见图 1。36 株 NDV 分为 Class I 和 Class II 2 大类, Class I 毒株基因长度为 15198nt, Class II 毒株基因长度有 2 种, 15186nt 和 15192nt。将测序所得 LC12 全基因组序列与 GenBank 上发表的序列比较, 与 Class I 毒株基因组同源率为 71.3% - 71.7%, 与 Class II 基因 I -IX 的同源率分别为 83.5% - 84.6%、82.5% - 82.6%、84.9% - 85.0%、86.8% - 87.1%、85.6% - 86.0%、86.7% - 87.5%、95.7% - 99.0%、87.0% -

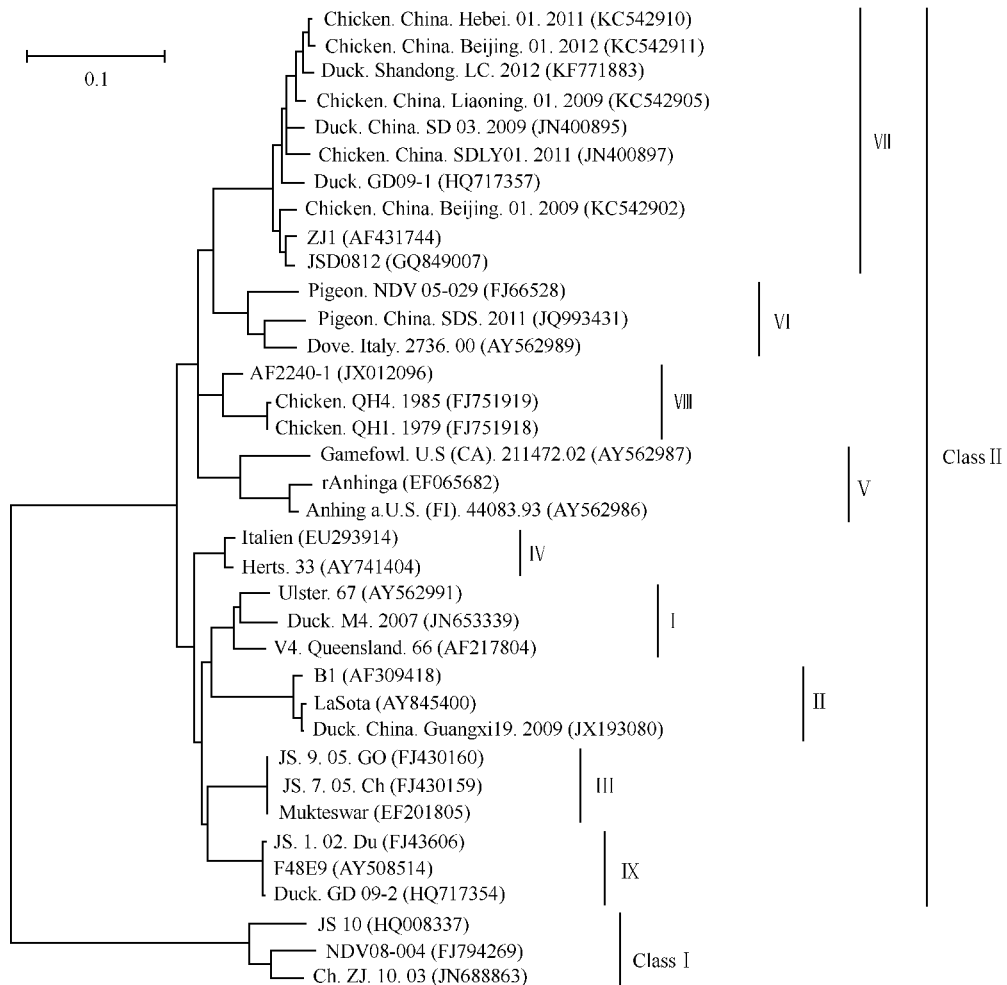


图 1. 根据 NDV 全基因组 cDNA 核苷酸序列绘制的遗传进化树

Figure 1. Phylogenetic tree analysis based on NDV cDNA genomes. The phylogram was generated by the Lasergene 7.1 software. The phylogram was generated by the neighbor-joining method using MEGA 5.2 software. The bootstrap consensus tree inferred from 1000 replicates is taken to represent the evolutionary history of the taxa analyzed.

88.4% 和 84.8% - 84.9% , 其中与基因 VII 型 d 亚型毒株 Chicken. China. Hebei. 01. 2011 (KC542910) 的同源率最高为 99.0% 。

2.2 非编码基因序列分析

NDV 毒株 cDNA 基因组非编码基因的核苷酸数量高度保守, 引导序列长为 55nt, 尾随序列为 114

nt, NP-P 基因间隔区一般为 1 个核苷酸, 仅基因 I 和 II 型为 2 个核苷酸; P-M 和 M-F 基因间隔区均为 1 个核苷酸; F-HN 及 HN-L 基因间隔区分别为 31 及 47 个核苷酸。分别取引导序列、尾随序列、F-HN 及 HN-L 核苷酸序列, 按照常规方法绘制的进化树 (见图 2), 35 株 NDV 所属的分类或分型位置基本与全

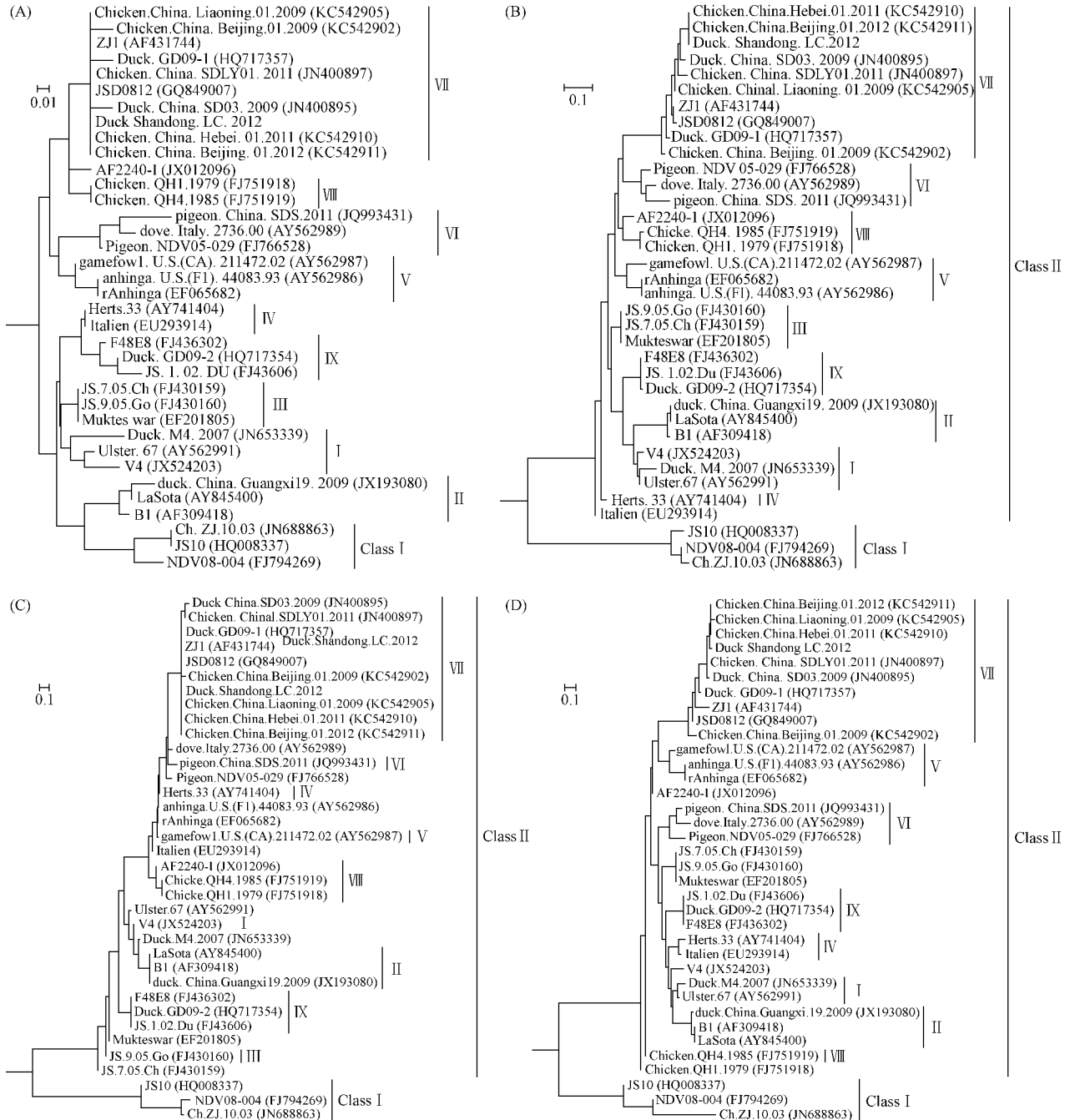


图 2. 根据 NDV 非编码区及基因间隔区 cDNA 核苷酸序列绘制的遗传进化树

Figure 2. Phylogenetic tree analysis based on NDV NTR and IGS region. A. Leader region (55 nt); B. trailer sequences (114 nt); C. F-HN IGS (31 nt); D. HN-L IGS (47 nt). The phylogram was generated by the neighbor-joining method using MEGA 5.2 software. The bootstrap consensus tree inferred from 1000 replicates is taken to represent the evolutionary history of the taxa analyzed.

基因组序列一致,与报道中毒株的 F 基因分型结果一致^[14-15],表明不同片段的非结构基因序列的变异是具有规律性的,与全基因组和结构基因的分子变异是具有同步性。

2.3 NDV 编码基因内的非编码序列分析

以基因 VII 型毒株 15192nt 计算,编码基因核苷酸数量所占的比例为 98.4%,编码氨基酸的 ORF 核苷酸数量占全基因组的 90.5%,在编码基因内存在约占基因组总数 8% 的非编码序列。根据 NDV cDNA 序列推导的各基因长度、非编码区长度及基因编码氨基酸数量见表 2,NDV 的起始序列和终止序列均高度保守,NP、P、M、F 及 HN 基因起始序列均为 5'-ACGGGTAGAA-3',L 基因起始序列为

5'-ACGGGTAGGA-3'。NP、M 及 L 基因的终止序列为 TTAGA₆₋₇,P、F 及 HN 基因的终止序列为 TTAAGA₆。与 15186 nt 毒株序列比较,15192nt 是在 NP 基因的 3' 端非编码区有 6nt 的插入,且终止序列为 TTAGA₆₋₇,造成其 NP 基因 3' UTR 长度为有 3 种:基因 I 和 II 型有 210bp,基因 III 及 IV 型为 211bp,基因 V-VIII 型为 217bp;15198nt 为在 P 基因 ORF 内插入 12bp,因而其 P 基因较其它两种长度毒株的 P 基因长 12nt,编码蛋白多 4 个氨基酸残基。不同毒株相同基因的长度高度保守,而不同基因的 5' 或 3' UTR 长度不一,L 基因 5' UTR 区最短,由起始序列后及一个 T 或 C 核苷酸组成;NP 基因的 3' UTR 最长,为 210、211 或 217nt。

表 2. 编码基因内非编码区及开放阅读框架比较

Table 2. Genome characteristics of NCRs of coding genes

genes	gene length/bp	amino acid	5' UTR			3' UTR	
			nucleotide number	GS(5' → 3')	ORF	nucleotide number	GE(5' → 3')
NP	1746, 1747, 1753	489	66	ACGGGTAGAA	1470	210, 211, 217	TTAGA6-7
P	1451, 1463	395, 399	83	ACGGGTAGAA	1188, 1200	180	TTAAGA6
M	1241	364	34	ACGGGTAGAA	1095	112	TTAGA6
F	1792	553	46	ACGGGTAGAA	1662	84	TTAAGA6
HN	2002	571, 577	91	ACGGGTAGAA	1716, 1734	195, 177	TTAAGA6
L	6703	2204	11	ACGGGTAGGA	6615	77	TTAGA6

比较 NDV NP 基因的 5' NCR 有 66nt,位于基因组的 56-121 核苷酸(表 3),核苷酸替代与基因型相关。不同基因型毒株具有特异位点,基因 II 型具有特异位点 95A,基因 VI 型 120G,基因 VII 76C、81C、97G,121T 特异位点,Class I 107T、121G。部分基因型具有相同的核苷酸替代,基因 I 和 II 87C 特异位点,基因 III 和 IV 型 87A,V、VI、VIII 在 74 位出现 74C,基因 I、II、III 和 VIII 为 119A。而在 121 位点,基因 II、III、IV、V、VI、VIII 为 C,基因 I 和 IX 为 A,基因 VII 为 T。以上核苷酸替代显示出基因型相关的特性,在对其它基因 5' 及 3' NCR 分析时,可以观察到同样的核苷酸替代特性。

L 基因的终止序列 TTAGA₆ 出现在基因 I-IV 型毒株的 15063nt 及基因 V-IX 型毒株的 15169nt,转录遇终止信号结束,L 基因的长度为

6703nt,相应的 Tailer sequence 为 114nt。而基因 I 型毒株 15121nt 和 IX 型毒株 15127nt 又出现一次 TTAGA₆,其作用或机理目前仍不清楚。1998 年 Philips 测序了 D26 (AJ225128) 和 Ulster (AJ225129) 2 个 NDV 的基因组末端 256nt,与其它 NDV 比较发现在对应 L 基因 1586nt 的 15070 处 TTAGAAAGAA 连续 A 的第 4 个 A 处为 G,以 15121 开始的 TTAGAAAAA 作为 L 基因的终止序列,L 基因长度较其它毒株长 58nt 为 6761,相应的基因组末端的 Tailer sequence 则由 114nt 缩短为 56nt^[10],但这 2 个毒株无全长序列,仅有基因组末端的 256nt,且为 1998 年提交序列,而 Ulster (AY562991) 为 2004 年 GenBank 收录的全长序列,具有 15063nt 起始的终止序列,因此 NDV L 基因长度仍应为 6703, Tailer sequence 则为 114nt。

表 3. NDV NP 基因 5' UTR 核苷酸替代

		Table 3. Nucleotide substitution in the NP gene 5' UTR of NDV cDNA genome.																			
genotype	abbreviation	74	76	81	87	88	93	95	96	97	101	102	106	107	108	109	116	118	119	120	121
		T	T	T	G	C	G	T	C	A	T	C	G	G	A	G	G	C	G	A	C
I	Ulster. 67	•	•	•	C	•	•	•	•	•	•	•	A	•	•	•	•	•	A	•	A
	V4	•	•	•	C	•	•	•	•	•	•	•	A	•	•	•	•	•	A	•	A
	M4. 2007	•	•	•	C	•	•	•	•	•	•	•	A	•	•	•	•	•	A	•	A
II	LaSota	•	•	•	C	•	•	A	•	•	•	•	A	A			•	•	A	•	•
	B1	•	•	•	C	•	•	A	•	•	•	•	•	A			•	•	A	•	•
	GX19. 2009	•	•	•	C	•	•	A	•	•	•	•	•	A			•	•	A	•	•
III	Mukteswar	•	•	•	A	•	•	•	T	•	•	•	A	•	•	•	•	•	A	•	•
	JS. 7. 05	•	•	•	A	•	•	•	T	•	•	•	A	•	•	•	•	•	A	•	•
	JS. 9. 05	•	•	•	A	•	•	•	T	T	•	•	A	•	•	•	•	•	A	•	•
IX	F48E8	•	•	•	A	T	•	•	•	•	•	•	A	•	•	•	•	•	•	•	A
	JS. 1. 02	•	•	•	A	T	•	•	•	•	•	•	A	•	•	•	•	•	•	•	A
	GD09-2	•	•	•	A	T	•	•	•	•	•	•	A	•	•	•	•	•	•	•	A
IV	Herts. 33	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	A	•	•	•	•	•	T	•	•
	Italien	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	A	•	•	•	•	•	T	•	•
V	anhinga. 93	C	•	•	•	•	A	•	•	•	•	•	•	A	A	•	A	•	•	•	•
	gamefowl. 02	C	•	•	•	•	A	•	•	•	•	•	•	A	•	•	A	•	•	•	•
	rAnhinga	C	•	•	•	•	A	•	•	•	•	•	•	A	A	•	A	•	•	•	•
VI	Italy2736. 00	C	•	•	•	•	A	•	•	•	•	T	•	•	A	•	•	•	•	G	•
	SDS. 2011	C	•	•	•	•	•	•	•	•	C	•	•	•	A	•	•	•	•	G	•
	NDV05-029	C	•	•	•	•	A	•	•	•	C	T	•	•	A	•	•	•	•	G	•
VII	ZJ1	C	C	C	•	•	•	•	T	G	C	T	•	•	A	•	A	•	•	•	T
	LC12	C	C	C	•	•	•	•	T	G	C	T	•	•	A	•	A	•	•	•	T
	BJ01. 2009	C	C	C	•	•	•	•	T	G	C	T	•	•	A	•	A	•	•	•	T
	LN01. 2009	C	C	C	•	•	•	•	T	G	C	T	•	•	A	•	A	•	•	•	T
	SD01. 2011	C	C	C	•	•	•	•	T	G	C	T	•	•	A	•	A	•	•	•	T
	HB01. 2011	C	C	C	•	•	•	•	•	G	C	T	•	•	A	•	A	•	•	•	T
VIII	AF2240-I	C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	A	•	A	•	•
	QH1. 1979	C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	A	•	•	•	•	A	•	A	•
	QH4. 1985	C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	A	•	•	•	•	A	•	A	•
Class I	NDV08-004	C	•	•	C	•	•	•	•	•	•	•	•	A	•	T	A	•	•	A	G
	JS10	C	•	•	C	•	•	•	•	•	•	•	•	A	•	T	A	•	•	A	G
	ZJ. 10. 03	C	•	•	C	•	•	•	•	•	•	•	•	A	•	T	A	•	•	•	G

3 讨论

自 1926 年首次确诊以来,世界范围内曾发生过 4 次大规模的 NDV 疫病流行,每次大流行都是以新出现的基因型为主,且伴随着感染宿主种类的扩大。目前出现的 NDV 强毒株包括多个基因型:基因 III-X VIII 型等,其中基因 VII 型(尤其是 VII d 亚型)是目前在东南亚地区、非洲及南美洲主要流行的强毒株^[16-17]。基因 VII 型在 2001 年前占有分离基因型毒株的 58.7%,至 2005 年则上升到分离株的 66.7%,呈明显上升趋势^[8-18],而其它基因型 NDV 的分离率

均较低,原因待考证。点突变是 NDV 变异的主要方式,核苷酸变异频率为 $0.98 \times 10^{-3} - 1.56 \times 10^{-3}$ /年。Yee Ling Chong 等对不同历史时期、不同国家、不同禽种的 54 个 NDV 全长的不同基因进行了生物信息学统计分析。结果表明:NDV 病毒不同基因之间的分子变异频率有一定差异,其中 P 基因变异的频率最大,其次是 F 和 HN 基因。在不同基因型的 NDV 毒株中,以基因 VII 的变异频率较大,为 $1.27 \times 10^{-3} - 4.43 \times 10^{-3}$ /年^[14]。NDV 在持续的疫苗免疫选择压力下和 RNA 病毒本身异变的特性,病毒本身变异的速率越来越快,新的基因型或新的亚型可能会不断出现。

NDV 基因组是非常高效的,编码蛋白的开放阅读框架核苷酸数量约占全基因组的 90.5%。F、HN 和 M 蛋白是位于病毒表面的蛋白。F 蛋白裂解位点因存在多个碱性氨基酸并由此形成的泛组织嗜性被认为是 NDV 毒力的主要决定因素^[1]。HN 蛋白具有血凝素和神经氨酸酶两种活性,在发病过程中起着识别细胞受体的作用,并且还具有良好的免疫原性^[19-20]。M 蛋白是非糖基化蛋白,构成囊膜内表面的支撑物;另一类为内部蛋白,包括 NP、P 及 L 蛋白,这 3 种蛋白共同参与病毒 RNA 的转录与复制,形成有活性的 mRNA。对 NDV 变异的早期研究,主要集中在与毒力相关的 F 基因,后来通过对 NP、P、HN、L 基因序列分析表明这些基因也存在变异^[21-22]。

单股负链 RNA 病毒的 IGS 长度和序列存在差异,某些病毒如仙台病毒(HVJ)、水泡性口炎病毒(VSV)及麻疹病毒,其 IGS 为保守的二核苷酸或三核苷酸;而 NDV、呼吸道合胞病毒(RSV)及猴病毒(PIV5) IGS 的长度和序列存在变异,NDV 的前 3 个 IGS 为 1-2nt,而后两个却为 31 及 47nt。通过病毒反向遗传操作系统,增加或删减 F-HN 或 HN-L 基因的 IGS 均会减弱重组 Beaudette C 病毒的毒力,且随着插入长度的增加,毒力降低的明显^[23];缩短 Beaudette C 病毒的 HN 基因的 5' 和 3' 非编码序列(untranslated regions,UTRs)长度对 HN 蛋白的表达产生的影响较小,而将 5' UTRs 全部删除时,将极大地降低 HN 蛋白的表达^[13],这表明 IGS 的长度变化将影响下游基因的高效表达。以上实验表明非编码基因序列长度可影响 NDV 的转录,进而影响病毒的毒力。

对非编码基因序列的分析表明,非编码基因的长度高度保守。但是,非编码序列的核苷酸并非一成不变,也会不断地发生变异。利用引导序列、尾随序列、F-HN 及 HN-L 序列绘制遗传进化树,不同基因型毒株所在的进化位置与基因组全长及 NDV 传统基因分型方法(F 基因 47-420nt)分类结果一致^[24],表明以上非编码序列并非保守而是不断发生变异,且变异具有规律性与全基因组及结构基因(F 基因)的演化趋势是同步的。或许在将来,可以利用这些长度较短的非编码序列进行基因分型或制备核酸探针,以建立快速诊断方法。

NP 基因 5' UTR 区核苷酸替代比较表明,核苷

酸替代与基因型相关。不同基因型毒株具有特异位点,基因 II 型具有特异位点 95A,基因 VI 型 120G,基因 VII 型 76C、81C、97G,121T 特异位点,Class I 毒株的 107T、121G。部分基因型具有相同的核苷酸替代,以上核苷酸替代显示出基因型相关的特性,在对其它基因 5' 及 3' NCR 分析时,可以观察到同样的变化。NDV 每个编码基因均以终止序列结束,基因 I 和 IX 型毒株的 L 基因终止序列基因 TTAGA₆ 后间隔 48nt 又出现一次 TTAGA₆,基因 II-VIII 型毒株没有终止序列的重复,其作用机制目前还没有研究报道。

纵观 NDV 编码序列及非编码序列及变异特点和趋势,可以发现 NDV 的毒力是由多个因素决定的,这其中包括病毒的组织嗜性、侵袭力、复制效率及对宿主的免疫系统逃避的能力等,涉及编码蛋白的基因也同样包含非编码基因序列。NDV 的分子演化是在基因组的整体水平上进行的,而并非单个结构基因或某几个结构基因,应包括引导序列、尾随序列、IGS 及基因内 UTR,因此应重视对非编码序列的长度保守性及序列的变异对 NDV 毒力的影响。

参考文献

- [1] Alexander DJ. Avian Paramyxoviridae—recent developments. *Veterinary Microbiology*, 1990, 23(1-4): 103-114.
- [2] Courtney SC, Susta L, Gomez D, Hines NL, Pedersen JC, Brown CC, Miller PJ, Afonso CL. Highly divergent virulent isolates of Newcastle disease virus from the Dominican Republic are members of a new genotype that may have evolved unnoticed for over 2 decades. *Journal of Clinical Microbiology*, 2013, 51(2): 508-517.
- [3] Herczeg J, Wehmann E, Bragg RR, Travassos Dias PM, Hadjiev G, Werner O, Lomniczi B. Two novel genetic groups (VIIb and VIII) responsible for recent Newcastle disease outbreaks in Southern Africa, one (VIIb) of which reached Southern Europe. *Archives of Virology*, 1999, 144(11): 2087-2099.
- [4] Seal BS, Wise MG, Pedersen JC, Senne DA, Alvarez R, Scott MS, King DJ, Yu Q, Kapeczynski DR. Genomic sequences of low-virulence avian paramyxovirus-1 (Newcastle disease virus) isolates obtained from live-bird markets in North America not related to commonly utilized commercial vaccine strains. *Veterinary Microbiology*, 2005, 106(1-2): 7-16.
- [5] Snoeck CJ, Owoade AA, Couacy-Hymann E, Alkali BR,

- Okwen MP, Adeyanju AT, Komoyo GF, Nakoune E, Le Faou A, Muller CP. High genetic diversity of Newcastle disease virus in poultry in West and Central Africa: cocirculation of genotype XIV and newly defined genotypes XVII and XVIII. *Journal of Clinical Microbiology*, 2013, 51 (7) : 2250-2260.
- [6] Wang LC, Pan CH, Severinghaus LL, Liu LY, Chen CT, Pu CE, Huang D, Lir JT, Chin SC, Cheng MC, Lee SH, Wang CH. Simultaneous detection and differentiation of Newcastle disease and avian influenza viruses using oligonucleotide microarrays. *Veterinary Microbiology*, 2008, 127 (3-4) : 217-226.
- [7] Huang Y, Wan HQ, Liu HQ, Wu YT, Liu XF. Genomic sequence of an isolate of Newcastle disease virus isolated from an outbreak in geese: a novel six nucleotide insertion in the non-coding region of the nucleoprotein gene. Brief Report. *Archives of Virology*, 2004, 149 (7) : 1445-1457.
- [8] Qin ZM, Tan LT, Xu HY, Ma BC, Wang YL, Yuan XY, Liu WJ. Pathotypical characterization and molecular epidemiology of Newcastle disease virus isolates from different hosts in China from 1996 to 2005. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, 46 (2) : 601-611.
- [9] Jang J, Hong SH, Choi D, Choi KS, Kang S, Kim IH. Overexpression of Newcastle disease virus (NDV) V protein enhances NDV production kinetics in chicken embryo fibroblasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85 (5) : 1509-1520.
- [10] Phillips RJ, Samson AC, Emmerson PT. Nucleotide sequence of the 5'-terminus of Newcastle disease virus and assembly of the complete genomic sequence: agreement with the "rule of six". *Archives of Virology*, 1998, 143 (10) : 1993-2002.
- [11] Chambers P, Millar NS, Bingham RW, Emmerson PT. Molecular cloning of complementary DNA to Newcastle disease virus, and nucleotide sequence analysis of the junction between the genes encoding the haemagglutinin-neuraminidase and the large protein. *Journal of General Virology*, 1986, 67 (Pt 3) : 475-486.
- [12] Krishnamurthy S, Samal SK. Nucleotide sequences of the trailer, nucleocapsid protein gene and intergenic regions of Newcastle disease virus strain Beaudette C and completion of the entire genome sequence. *Journal of General Virology*, 1998, 79 (Pt 10) : 2419-2424.
- [13] Yan Y, Rout SN, Kim SH, Samal SK. Role of untranslated regions of the hemagglutinin-neuraminidase gene in replication and pathogenicity of newcastle disease virus. *Journal of Virology*, 2009, 83 (11) : 5943-5946.
- [14] Miller PJ, Decanini EL, Afonso CL. Newcastle disease: evolution of genotypes and the related diagnostic challenges. *Infection Genetics and Evolution*, 2010, 10 (1) : 26-35.
- [15] Zhang S, Wang X, Zhao C, Liu D, Hu Y, Zhao J, Zhang G. Phylogenetic and pathotypical analysis of two virulent Newcastle disease viruses isolated from domestic ducks in China. *PLoS One*, 2011, 6 (9) : e25000.
- [16] Samuel A, Nayak B, Paldurai A, Xiao S, Aplogan GL, Awoume KA, Webby RJ, Ducatez MF, Collins PL, Samal SK. Phylogenetic and pathotypic characterization of newcastle disease viruses circulating in west Africa and efficacy of a current vaccine. *Journal of Clinical Microbiology*, 2013, 51 (3) : 771-781.
- [17] Khan TA, Rue CA, Rehmani SF, Ahmed A, Wasilenko JL, Miller PJ, Afonso CL. Phylogenetic and biological characterization of Newcastle disease virus isolates from Pakistan. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010, 48 (5) : 1892-1894.
- [18] Liu XF, Wan HQ, Ni XX, Wu YT, Liu WB. Pathotypical and genotypical characterization of strains of Newcastle disease virus isolated from outbreaks in chicken and goose flocks in some regions of China during 1985-2001. *Archives of Virology*, 2003, 148 (7) : 1387-1403.
- [19] Nishikawa K, Isomura S, Suzuki S, Watanabe E, Hamaguchi M, Yoshida T, Nagai Y. Monoclonal antibodies to the HN glycoprotein of Newcastle disease virus. Biological characterization and use for strain comparisons. *Virology*, 1983, 130 (2) : 318-330.
- [20] Qin Z, Xu H, Ouyang W, Wang Y, Wang L, Yuan X, Tan L. Correlation of the neutralization index in chicken embryo with the homologies of F and HN gene of different Newcastle-disease isolates. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48 (2) : 226-233. (in Chinese)
秦卓明, 徐怀英, 欧阳文军, 王友令, 王莉莉, 袁小远, 谭雷涛. 新城疫不同毒株交叉鸡胚中和指数及其与 F 和 HN 基因变异的相关性. *微生物学报*, 2008, 48 (2) : 226-223
- [21] Seal BS, Crawford JM, Sellers HS, Locke DP, King DJ. Nucleotide sequence analysis of the Newcastle disease virus nucleocapsid protein gene and phylogenetic relationships among the Paramyxoviridae. *Virus Research*, 2002, 83 (1-2) : 119-129.
- [22] Seal BS, King DJ, Meinersmann RJ. Molecular evolution of the Newcastle disease virus matrix protein gene and

phylogenetic relationships among the paramyxoviridae. *Virus Research*, 2000, 66(1): 1-11.

[23] Yan Y, Samal SK. Role of intergenic sequences in newcastle disease virus RNA transcription and pathogenesis. *Journal of Virology*, 2008, 82(3): 1323-1331.

[24] Wehmann E, Ujvari D, Mazija H, Velhner M, Ciglar-

Grozdanic I, Savic V, Jermolenko G, Cac Z, Pukner-Radovic E, Lomniczi B. Genetic analysis of Newcastle disease virus strains isolated in Bosnia-Herzegovina, Croatia, Slovenia and Yugoslavia, reveals the presence of only a single genotype, V, between 1979 and 2002. *Veterinary Microbiology*, 2003, 94(4): 269-281.

Evolution of non-coding nucleotide sequences in Newcastle disease virus genomes

Huaiying Xu^{1,2}, Zhuoming Qin², Lihong Qi², Wei Zhang², Youling Wang², Jinhua Liu^{1*}

¹College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094

²Shandong Academy of Agricultural Science, Jinan 250100, Shandong Province, China

Abstract: [Objective] Although much is done in the coding genes of Newcastle disease virus (NDV), limited papers can be found with non-coding sequences. In this paper, the evolution tendency of non-coding sequences was studied.

[Methods] NDV strain LC12 isolated from duck with egg drop syndrome in 2012, and others 35 strains genome cDNA of different NDV genotype were sought and obtained from GenBank. Analytical approaches including nucleotide homology, nucleotide alignment and phylogenetic tree were associated with the leading sequences, trailer sequences, intergenic sequences (IGS), and coding gene between 5' and 3' UTR nucleotide, respectively. [Results] The location and the length of the non-coding sequences highly conserve, and the variation trend of non-coding sequences is synchronous with the entire genomes and coding genes. [Conclusion] The molecular variation of the coding gene was indistinguishable with the non-coding gene in view of the NDV genome.

Keywords: Newcastle disease virus, genome, non-coding nucleotide sequence, evolution

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31372332) and by the Programs for Fundamental Research and Development of Shandong Province (2009GG10009006)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-40-62733837; E-mail: ljh@cau.edu.cn

Received: 2 December 2013 / Revised: 24 January 2014