

新城疫病毒 NA-1 株、TL-1 株 主要蛋白基因的分子生物学研究

· 王学理 著 ·

中国农业科学技术出版社

S852.65
20131

阅 览

新城疫病毒 NA-1 株、TL-1 株 主要蛋白基因的分子生物学研究

内蒙古民族大学

· 王学理 著 ·



中国农业科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

新城疫病毒 NA-1 株、TL-1 株主要蛋白基因的分子生物学研究 /
王学理著. —北京: 中国农业科学技术出版社, 2012. 12
ISBN 978 - 7 - 5116 - 1129 - 1

I. ①新… II. ①王… III. ①新城疫病毒 - 分子生物学 - 研究
IV. ①S852. 65

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2012) 第 270197 号

责任编辑 朱 绯

责任校对 贾晓红 范 潇

出 版 者 中国农业科学技术出版社

北京市中关村南大街 12 号 邮编: 100081

电 话 (010) 82106626 (编辑室) (010) 82109702 (发行部)
(010) 82109709 (读者服务部)

传 真 (010) 82109707

网 址 [http://www. castp. cn](http://www.castp.cn)

经 销 者 各地新华书店

印 刷 者 北京富泰印刷有限责任公司

开 本 787 mm × 1 092 mm 1/16

印 张 9. 75

字 数 200 千字

版 次 2012 年 12 月第 1 版 2013 年 6 月第 2 次印刷

定 价 28. 00 元

版权所有 · 翻印必究

目 录

第一篇 文献综述

第一部分 鹅副黏病毒病的研究进展	(3)
1 临床症状、病理变化及病毒的组织嗜性	(3)
2 生物学特性的研究	(5)
3 分子生物学性状	(7)
参考文献	(9)
第二部分 新城疫病毒分子生物学研究进展	(12)
1 NDV 的分类及基本生物学性状	(12)
2 NDV 的结构基因与功能	(15)
3 NDV 基因分型	(25)
参考文献	(28)
第三部分 反向遗传操作在新城疫病毒中的应用	(40)
1 NDV 分子感染性克隆的构建	(41)
2 结构和功能的关系	(41)
3 制备标记疫苗	(44)
4 构建表达外源基因的重组病毒	(45)
5 其他作用	(48)
参考文献	(48)

第二篇 研究内容

第一部分 鹅源禽副黏病毒 NA-1 株生物学特性的研究	(55)
1 材料与方法	(55)
2 结 果	(58)
3 讨 论	(62)

第二部分 鹅源禽副黏病毒 HN 蛋白基因的遗传变异研究	(64)
1 材料与方法	(64)
2 结 果	(69)
3 讨 论	(74)
第三部分 鹅源禽副黏病毒 NA-1 株 F 蛋白基因的克隆及其载体的构建	(88)
1 材料与方法	(88)
2 结 果	(90)
3 讨 论	(91)
第四部分 鹅源商品肉鹅新城疫病毒 NA-1 株母源抗体消长规律及最佳首免日龄的确立	(92)
1 材料与方法	(92)
2 结 果	(93)
3 讨 论	(94)
第五部分 新城疫病毒 TL1 株的分离鉴定及部分生物学特性研究	(95)
1 材料与方法	(95)
2 结 果	(98)
3 讨 论	(100)
第六部分 新城疫病毒 TL1 株全基因组序列测定与分析	(103)
1 材料与方法	(103)
2 结 果	(113)
3 讨 论	(126)
第七部分 新城疫病毒 TL1 株 M、NP、F 和 HN 蛋白基因表达载体的构建及鉴定	(131)
1 材料与方法	(132)
2 结 果	(137)
3 讨 论	(140)
第八部分 新城疫病毒 TL1 株 F、HN 蛋白基因共表达对细胞融合的影响	(144)
1 材料与方法	(144)
2 结 果	(146)
3 讨 论	(147)

第一篇

文 献 综 述

第一部分 鹅副黏病毒病的研究进展

鹅副黏病毒病是近年来在全国大部分地区流行的一种急性病毒性传染病。本病发病率和死亡率较高，使养禽业蒙受了较大的损失。目前，有关本病的研究报道很少，国外至今尚未见报道，人们对其还缺乏足够的认识。国内几家研究机构对此病临床症状、病理变化、病毒的组织嗜性、生物学特性、分子生物学性状等方面进行了深入的研究，但对病毒的具体分类地位尚未达到共识，对病原的起源和致病机理仍不清楚，现就该病的研究进展作一概述。

1 临床症状、病理变化及病毒的组织嗜性

1.1 临床症状

病鹅初期大多表现精神不振，采食、饮水减少，有时勉强采食或饮水又随即甩头吐出；拉白色稀粪或水样腹泻，部分病鹅时常甩头，并发出“咕咕”的咳嗽声。病情加重后，病鹅双腿无力，蹲伏地上，不愿行走。后期病鹅极度衰弱，浑身打颤，眼睛流泪，眼眶及周围羽毛被泪水湿润，有时鼻孔流出清亮水样液体，头颈颤抖，呼吸困难。最终常见病鹅相互拥挤在一起，远离其他尚能行动的鹅，体重迅速下降，并渐渐衰竭而死，重症病鹅及病死鹅泄殖腔周围羽毛常沾污大量白色粪便。该病发病率为40%~100%，平均为60%左右，死亡率为30%~100%，平均为40%左右，其中15日龄以内雏鹅的发病率可高达100%，该病的流行没有明显的季节性，几乎一年四季均可发生。

1.2 病理变化

1.2.1 病理解剖学病变

病鹅各组织器官广泛出现病变，其中消化器官和免疫器官的病变尤为严重，病鹅皮肤淤血。食道黏膜特别是下端有散在的芝麻大小、灰白色或淡黄色结痂，易剥离，剥离后可见斑或溃疡；腺胃、肌胃充血、出血；十二指肠、空肠、回肠黏膜有散在或弥漫性、淡黄色或灰白色纤维素性结痂，结肠黏膜有弥漫性、淡黄

色或灰白色、芝麻大至小蚕豆大的纤维素性结痂，剥离后呈现出血面或溃疡面，盲肠扁桃体肿大，明显出血；盲肠黏膜出血和纤维素性结痂；直肠黏膜和泄殖腔黏膜有弥漫性、大小不一、淡黄色或灰白色纤维性结痂。胰腺、脾脏表现严重的坏死病变，在表面和切面上可见大量大小不等的白色坏死灶，脾脏的坏死灶常呈点状，胰腺的坏死灶呈点状、条状或块状，个别病例整个胰腺严重坏死，形成白垩样外观。其他脏器病变较轻，肝脏轻度淤血肿大；胸腺、哈氏腺偶见出血；大脑、小脑有时充血、水肿；肾脏肿大、色淡，输尿管扩张，充满白色尿酸盐。

1.2.2 病理组织学变化

病死鹅肝细胞、肾小管上皮细胞、心肌细胞等表现一般的颗粒变性或水泡变性，气管黏膜上皮细胞坏死脱落、纤毛消失；腺胃、肠道、胰腺、胸腺、脾脏、法氏囊、脑的组织学变化具有特征性。

腺胃：黏膜上皮坏死脱落，固有层严重水肿，有时可见炎性细胞；黏膜下浅层和深层腺体上皮变性坏死，浅层腺体的破坏尤为严重，有的结构大部分损坏，甚至完全崩解消失；腺体之间结缔组织内血管扩张充血，并常见炎性细胞浸润。

肠道：病鹅肠道黏膜广泛发生凝固性坏死，部分病例坏死发生在肠腺以上绒毛部分，坏死绒毛的轮廓仍可见，但结构严重破坏；部分病例在肠黏膜局部绒毛及肠腺彻底坏死、崩解、形成一片红染物质，坏死物中混有大量细胞碎片、纤维素、胞核及红细胞，肠腺结构亦严重破坏；大部分病例，病变深入到黏膜下层和肌层，黏膜下层常见严重的充血、出血。肠道淋巴组织内淋巴细胞变性坏死，数量显著减少。

胰腺：腺泡结构大部分损坏，常由数个腺泡形成大小不一的坏死灶。

淋巴器官：病鹅淋巴器官均见淋巴组织严重破坏。

法氏囊：滤泡髓质区淋巴细胞大量坏死溶解，皮质区变薄且淋巴细胞数量有所减少。

脾脏：淋巴组织严重变性坏死和空泡化，淋巴细胞显著减少，骨髓结构大部分消失，并可见均匀红染的血浆渗出物。

胸腺、盲肠：扁桃体内淋巴细胞变性坏死，数量显著减少。

脑：脑膜和实质血管扩张充血，实质内有些部位可见小的出血灶，部分血管的内皮细胞因变性肿胀而向管腔内突出，并与基膜分离，血管周围淋巴间隙显著扩张；神经细胞变性，严重者胞核溶解消失；有些病例可见神经胶质细胞呈弥漫性或局灶性增生。

1.3 病毒的组织嗜性

MC-IP 技术集单抗的特异性和免疫酶技术的敏感性于一体,既能检出病毒抗原,又能观察相应组织细胞的病理变化,非常适用于病毒致病机理的研究。万洪全等还通过 MC-IP 技术发现,从鹅副黏病毒病患鹅的呼吸系统、消化系统和免疫系统的多种组织器官中均能检测到病毒抗原,其中尤以气管、胸腺、脾脏、腺胃、肠道、法氏囊的检出率较高。在胸腺、脾脏、法氏囊等淋巴器官中,病毒抗原多见于淋巴细胞及网状细胞内;在腺胃及肠道,病毒抗原则主要分布于黏膜及黏膜下腺体的上皮细胞。这说明鹅源禽副黏病毒是一种泛嗜性病毒,胃肠黏膜上皮组织和淋巴组织可能是其主要侵嗜部位。试验中还发现,部分对照鹅的直肠及法氏囊亦检测到病毒抗原,这可能和对照鹅隐性感染新城疫病毒有关。对照鹅的直肠和法氏囊虽然能检测到病毒抗原,但是并不伴有明显的组织损伤。最值得注意的是,患鹅的脑和心脏虽然可见明显的组织学变化,但均未检测到病毒抗原,是病毒含量太少而不能检出,还是鹅源禽副黏病毒对这两个器官没有侵嗜性,有待进一步研究证实。

2 生物学特性的研究

2.1 病毒鉴定

丁壮等取患鹅、鸡胚尿囊液经磷钨酸负染后电镜观察,可看到电镜下呈现典型的副黏病毒形态,大量大小不一的病毒粒子多数呈圆形,表面有密集的纤突结构,病毒粒子大小在 50 ~ 200nm 之间。吴力力等选择 BY (分离自成年鹅) 及 HJ (分离自雏鹅) 两株鹅源禽副黏病毒作为代表株,对包括两栖类、爬行类、禽类及哺乳类在内的 13 种动物的细胞作血凝试验,探讨鹅源禽副黏病毒的血凝谱,并以鸡新城疫病毒 NDV La Sota 株作对照,比较二者的血凝结果。结果表明,两毒株对两栖类、爬行类及哺乳类动物红细胞的 HA 效价与 La Sota 株相近,为 $2^6 \sim 2^{10}$,但是解凝速度比 La Sota 株慢;对鸭、鹅红细胞的 HA 效价为 $2^3 \sim 2^6$,低于 La Sota 毒株 (2^{11}),且解凝速度比 La Sota 株快。这些结果表明鹅源禽副黏病毒的血凝谱与鸡新城疫病毒相近,但血凝特性有所不同。对此现象目前还无法作出满意的解释,其原因有待进一步研究。陈金顶等对 GPMV/QY97-1 株鹅源禽副黏病毒进行了 HA、HI 试验及血清型的鉴定,试验表明 GPMV/QY97-1 株鹅源禽副黏病毒能够凝集鸡的红细胞,其 HA 效价为 1 : 256, GPMV/QY97-1 株阳性

血清对 GPMV/QY97-1 株及 NDV La Sota 株的血凝活性有抑制作用, HI 效价分别为 1 : 512 和 1 : 256。NDV 阳性血清对 GPMV/QY97-1 株及 NDV La Sota 株的血凝活性有抑制作用, HI 效价分别为 1 : 256 和 1 : 512。从 HI 试验中可观察到, NDV 阳性血清对 NDV La Sota 株的 HI 效价比对 GPMV/QY97-1 株的 HI 效价高, 而 GPMV/QY97-1 株阳性血清对 GPMV/QY97-1 株的 HI 效价比对 NDV 的 HI 效价高。这表明 GPMV/QY97-1 株与 NDV 虽然都具有血凝素, 但结构或活性上存在着差异。血清型的鉴定得出, GPMV/QY97-1 株血凝活性能被 APMV-1 阳性血清所抑制, HI 为 1 : 640, 而不能被 APMV-2、APMV-3、APMV-4、APMV-6、APMV-9 阳性血清所抑制, 被 APMV-8 阳性血清抑制的 HI 效价为 1 : 20。APMV-1 阳性血清对 NDV La Sota 株的 HI 效价为 1 : 1 280。以上结果可以初步判定 GPMV/QY97-1 株属于 I 型禽副黏病毒。在对不同日龄和不同接种途径鹅的致病性试验中, GPMV/QY97-1 株对 1、14、28、48 日龄的鹅均有致病性, 经点眼、滴鼻、口服、肌注、皮下注射不同途径都能感染, 并且临床症状与自然感染病例相似。另外, 该病毒对鸡也有强致病性。而传统的观点认为, 虽然 I 型禽副黏病毒不同毒株之间毒力有很大差异, 但它们一般不感染鹅, 即使感染也不会引起发病死亡。上述结果与传统的观点相悖, 陈金顶等推测这种现象的产生可能有如下原因: 长期以来在鸡群中普遍使用 NDV 疫苗, 使得环境中相应的免疫压力增强, 导致 I 型禽副黏病毒发生变异; 我国家禽饲养量大、品种多, 尤其部分地区水禽(鸭、鹅)与陆禽(鸡)混养的现象普遍存在, 而南方又是候鸟迁徙之地, 这种环境有可能促使 NDV 在毒力及宿主源性方面发生变异。

2.2 病毒毒力研究

刘华雷等采用目前国际上比较科学和应用较多的方法, 对 HC₉₇C₅、YG₉₇F₁₁、YG₉₈₋₂C₄ 3 个毒株用鸡胚和鹅胚进行了病毒的毒力测定。这 3 个毒株致死鸡胚的平均死亡时间 (MDT) 分别为 56.7、52.0、53.2h, 相当于鸡 NDV 的强毒 (< 60h)。1 日龄 SPF 雏鸡脑内接种致病指数 (ICPI) 分别为 1.64、1.69、1.70, 亦相当于鸡 NDV 强毒 (>1.60), 6 周龄非免疫雏鸡静脉接种致病指数 (IVPI) 分别为 2.62、2.60、2.60, 相当于鸡 NDV 强毒 (>1)。结果表明这 3 株鹅源禽副黏病毒对鸡具有较强的致病力, 尽管目前国内还没有出现鸡场暴发鹅副黏病毒病的报道, 但试验证明鸡可自然感染, 这对我国养禽业的健康发展可能是一个巨大的潜在性的隐患。刘华雷等还曾对用新城疫免疫过的 15 只 6 周龄来航雏鸡进行 IVPI 的测定, 其中 NDV 的 HI 滴度平均达 6lg₂ 左右。根据有关资料表明, 在 HI 抗体为 6lg₂ 时, 可使鸡在 NDV 强毒攻击时不出现明显的临床症状, 但以上试验

结果表明根本不能抵抗鹅源禽副黏病毒的感染, 3 个毒株对 15 只鸡均有 100% 的发病率和死亡率, IVPI 测定结果分别为 2.60、2.40、2.54, 这表明鹅源禽副黏病毒与鸡新城疫病毒在抗原免疫原性上存在差异。

禽副黏病毒对不同宿主致病力变化很大, 因为副黏病毒在复制时对致病力起主要作用的前体糖蛋白 F_0 需要裂解成 F_1 和 F_2 , 以使子代病毒颗粒具有感染性, 这种翻译后的裂解是由宿主细胞蛋白酶调理的。上述所测定的指标都是在鸡体上进行的, 尚不能真正反应鹅源禽副黏病毒对鹅的致病力, 因此, 继而在鹅上模仿研究 NDV 的方法进行了一系列致病性试验, 测定结果表明其对鹅的致病性指标与在鸡上测定的指标具有一定的相关性。HG₉₇C₅、YG₉₇F₁₁、YG₉₈₋₂C₄ 所测定的 ICPI 分别为 1.52、1.64、1.66, 与在鸡上测定结果非常接近, IVPI 分别为 1.26、1.65、1.68, 虽然与鸡的测定结果存在一定的差异, 但亦可作为强毒的参考指标, MDT 分别为 68.6、67.4、70.2, 这与鸡上所测定的指标也有一定差异 (相当于中毒 60~90h)。鸡 NDV 的测定指标的判定范围只能作为衡量鹅源禽副黏病毒对鹅的致病力的参考。对于鹅源禽副黏病毒对鹅致病力参数的判定指标, 尚需进行大量试验。通过以上试验可以初步确定, 这 3 株鹅源禽副黏病毒对鹅和鸡均应属于强毒株。

2.3 AGID 试验

将以 GPMV/QY97-1 株感染的鸡胚尿囊液制成的 AGID 抗原, 与 NDV 阳性血清、禽流感病毒 (AIV) 阳性血清和小鹅瘟病毒阳性血清进行 AGID 试验, 同时设立 GPMV/QY97-1 株阳性血清及各病毒阴性血清对照。试验结果为 GPMV/QY97-1 株与 NDV 阳性血清、GPMV/QY97-1 株阳性血清之间均有沉淀线出现, 但与小鹅瘟病毒阳性血清、AIV 阳性血清及各病毒阴性血清之间均不形成沉淀线。

3 分子生物学性状

禽副黏病毒 (APMV) 属于副黏病毒科, 副黏病毒亚科, 腮腺炎病毒属, 现已确定有 9 个血清型, 即 APMV1~9。新城疫病毒 (NDV) 属于 APMV-1, 只有一个血清型。NDV 对不同宿主致病性差别很大, 鸡最为敏感, 野鸡 (雉) 次之, 火鸡、珍珠鸡, 鹌鹑、鸽等禽类也能感染发病。新城疫病毒是一种有囊膜的单股负链 RNA 病毒。新城疫病毒基因组 RNA 全长约 15×10^3 kb, 编码两种囊膜糖蛋白 (即 HN 蛋白和 F 蛋白) 和 4 种结构蛋白 (即 M 蛋白、NP 蛋白、P 蛋白和 L

蛋白)。Chambers 等通过 NDV 基因组 cDNA 的分子克隆确定了各结构蛋白基因在基因组上的排列顺序为 3' - NP - P - M - F - HN - L - 5'。构成病毒囊膜表面纤突的两种结构蛋白血凝素 - 神经氨酸 (HN) 和融合蛋白 (F) 在新城疫的发病过程中起着很重要的作用。其中 F 蛋白是使病毒脂蛋白囊膜与宿主细胞表面包膜融合的主要因子, 是病毒毒力的主要决定因素。F 蛋白首先以惰性前体 F_0 的形成合成, 在病毒增殖过程中, 经宿主细胞蛋白酶水解产生由二硫键连接的 $F_1 - F_2$ 两个片断 ($\text{NH}_2 - F_2 - \text{S} - \text{S} - F_1 - \text{COOH}$) 后, 表现出融合活性, 从而使病毒具有感染性。裂解位点区位于 112 ~ 117 位氨基酸, 其氨基酸组成是决定裂解能力的关键: 强毒株裂解区域氨基酸的组成为¹¹²R/K - R - Q - K/R - R - F¹¹⁷。即由 Q 隔开的两对碱性氨基酸组成, 所以强毒株的裂解位点易于被宿主蛋白水解酶所识别和裂解。而弱毒株则为¹¹²G/E - K/R - Q - G/E - R - L¹¹⁷, 不易被宿主蛋白水解酶识别, 因此, 弱毒株在大多数细胞中不发生裂解, 而以非活性前体 F_0 蛋白的形式传递到子代, 感染活性降低或丧失。因此, F 基因裂解位点区的氨基酸组成是 NDV 致病力强弱的基础。根据 F 基因序列同源性的差异, 对 NDV 的系统发育进行分析, 可以把 NDV 分为 I ~ IX 共 9 个基因型。在分子水平揭示 NDV 的流行特征, 而 HN 糖蛋白具有血凝素和神经氨酸酶两种活性, 在新城疫的发病过程中起着识别细胞受体的作用, 并可破坏受体活性。近年来, 许多学者通过融合囊泡形成的研究发现 HN 蛋白除介导吸附外, 还具有促融合的功能。HN 对毒力也具有一定的影响, 强毒株 HN 不需要裂解而中等毒株 HN 基因的终止密码可能由于突变而消失, 形成一个能编码 55 个额外氨基酸的大编码框; 翻译的 HN_0 需要宿主的蛋白酶裂解才能具有融合活性。鉴于以上 F 基因和 HN 基因的功能和作用, 国内众多研究机构对其进行了深入的研究。

邹键等对分离的鹅源禽副黏病毒 SF02 采用 RT-PCR 方法, 扩增 F 基因后测序, 得到全长的 F 基因。该基因的开放阅读框架总长为 1 662bp, 编码 553 个氨基酸, 其裂解位点的序列为¹¹²R - R - Q - K - R - F¹¹⁷, 与新城疫病毒强毒株的特征相符。对其核苷酸和氨基酸作同源性分析, 并与国内新城疫病毒标准强毒株 $F_{48}\text{E}_9$ 相比较, 表明该毒株在 F 基因上已发生了较大的变异, 而与近年来在我国台湾和部分西欧国家流行的禽副黏病毒有很高的亲缘关系, 通过对 SF02 毒株 HN 基因的克隆, HN 基因的开放阅读框架总长为 1 734bp, 编码 577 个氨基酸, 与 NL-96 毒株具有较近的同源性, 为 86%; 而与中国标准强毒株 $F_{48}\text{E}_9$ 及 La Sota 疫苗株同源性较远。

鹅源禽副黏病毒分离株 YG97 经 10 日龄鸡胚增殖后纯化, 提取病毒基因组 RNA, 采用 RT-PCR 一次性扩增出与预期设计的 1.7 kb 大小相符的特异性条带,

将扩增产物提纯后克隆入 PGEM^R-T 载体,经转化、筛选及酶切鉴定后,初步获得了含鹅源禽副黏病毒 F 基因的阳性克隆,并进行了序列测定,序列分析表明,扩增的 F 基因片段的长度为 1 695bp,共编码 553 个氨基酸,F 蛋白裂解位点的氨基酸顺序为¹¹²R-R-Q-K-R-F¹¹⁷,与 NDV 的强毒株特征相符,同时也与鹅源禽副黏病毒分离株致病性试验结果相符。同源性分析表明:与国内标准强毒株标准 F₄₈E₉ 的核苷酸同源性为 86%,与传统的疫苗株 La Sota 仅有 84% 的同源性,与国内外发表的其他部分 NDV 毒株的核苷酸同源性在 84%~89% 之间,说明 NDV 在国内经过多年的流行之后,在 F 基因的核苷酸序列上已经发生了较大的变化。通过对鹅源禽副黏病毒 F 基因氨基酸序列的分析,根据 NDV 基因分型的方法,发现鹅源禽副黏病毒具有基因 VII 型 NDV 的典型特征:在 101 位和 121 位分别为 K (赖氨酸)、V (缬氨酸) 两种特征性氨基酸,与严维巍等报道的一株鸡副黏病毒的基因型相同。李玉峰等获得的一株单抗,能同时和鹅源禽副黏病毒以及基因 VII 型的鸡副黏病毒发生反应,说明两者在抗原性上具有极大的相似性。通过对 HN 基因的研究发现,YG97 株鹅源禽副黏病毒 HN 基因片段的长度为 1 981bp,共编码 571 个氨基酸,同源性分析表明 YG97 与 La Sota 毒株核苷酸同源性为 79%,氨基酸的同源性为 87%,与我国台湾 1995 年分离株 Taiwan/95 核苷酸和氨基酸的同源性分别为 93%、96%,说明 YG97 与 Taiwan/95 亲缘关系较近、具有较高的相似性。与国内外发表的其他部分 NDV 毒株的核苷酸同源性在 80%~84%,氨基酸的同源性在 87%~91%,同源性分析表明 YG97 相对于经典的 NDV 在 HN 基因上发生了较大的变异。

综上所述,国内的几家研究机构大多认为鹅源禽副黏病毒病原为禽副黏病毒 I 型,属于强毒株,基因分型为 VII 型,但对病原的起源和致病机理仍未清楚。

参考文献

- [1] 万洪全,吴力力,王宝安,等. 雏鹅实验性副黏病毒病的临床症状及病理变化研究 [J]. 畜牧兽医学报,2002,33 (1): 89.
- [2] 丁壮,王承宇,向华,等. 鹅副黏病毒分离株生物学特性的研究 [J]. 中国预防兽医学报,2002,24 (5): 390-392.
- [3] 钱忠明,周继宏,朱国强,等. 鹅副黏病毒病流行病学和血清学研究 [J]. 中国家禽,1999,21 (10): 6-8.
- [4] 邵向群,李瑛,张永生,等. 鹅副黏病毒病调查及防治效果观察 [J]. 中国兽医杂志,2000,26 (11): 26.

- [5] 万洪全, 姜连连, 吴力力, 等. 鹅副黏病毒的组织嗜性 [J]. 中国兽医学报, 2001, 21 (6): 549 - 550.
- [6] 吴力力, 万洪金, 许益民, 等. 鹅副黏病毒血凝谱的初步研究 [J]. 中国禽业导刊, 1998, 15 (6): 12.
- [7] 陈金顶, 任涛, 廖明, 等. 鹅源禽副黏病毒 GPMV/QY97 - 1 株的生物学特性 [J]. 中国兽医学报, 2000, 20 (2): 128 - 130.
- [8] 卡尔尼克. 禽病学 [M]. 第 9 版. 高福, 刘文军主译. 北京: 北京农业大学出版社, 1991. 427 - 444.
- [9] Kontrimavichus L M, Akulov A V. Experimental Newcastle disease in goslings [J]. Vet Bull, 1974, 44 (1): 28.
- [10] Kosovac A Veselinovic S. Biological properties of a Newcastle disease virus isolated from geese [J]. Poult Abstract, 1988, 14 (1): 28.
- [11] Imadi M A AL, Tanyi J. The susceptibility of domestic waterfowls of Newcastle disease virus and their role in its spread [J]. Acta Vet Acad Sci, 1982, 30 (1/3): 31 - 34.
- [12] Hanson R P, Spalatin J, Jacobsom G S. The viscerotropic pathotype of newcastle disease virus [J]. Avi Dis, 1973, (17): 354 - 361.
- [13] Auan W H, Lancaster J E, Toth B. Newcastle disease vaccines - their production and use [A]. FAO Production and Health Series [C]. NO. 10. FAO Rome, Italy, 1978. 245 - 251.
- [14] Graham P H. 禽病原分离鉴定实验室手册 [M]. 第 3 版. 唐桂运, 武华译. 北京: 北京农业大学出版社, 1993. 148 - 149.
- [15] 廖延雄. 兽医微生物实验诊断手册 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1991. 741 - 744.
- [16] 郭玉璞. 家禽传染病诊断与防治 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1994. 4 - 5.
- [17] 刘华雷, 王永坤, 周继宏, 等. 鹅副黏病毒毒力特性的研究 [J]. 江苏农业研究, 2000, 21 (2): 15 - 20.
- [18] 梅锡朝. 防治鸡新城疫应重视的几个问题 [J]. 养禽与禽病防治, 1998, (1): 28 - 29.
- [19] 殷震, 刘景华. 动物病毒学 [M]. 北京: 科学出版社, 1985. 743 - 750.
- [20] Calnek B W, John B H, Lany R M D, et al. Disease of poultry [M]. Tenth edition. 1997. 541 - 562.

- [21] 贺东生, 秦智锋, 刘福安. 新城疫病毒系统发育分析及强弱毒株的鉴别诊断 [J]. 动物医学进展, 2000, 21 (2): 27 - 31.
- [22] Seal B S, King D J, Bennett J D. Characterization of Newcastle disease virus isolates by reverse transcription PCR coupled to direct nucleotide sequencing and development of sequence database for pathotype prediction and molecular epidemiological analysis [J]. Clin Microbiol, 1995, 33 (10): 2624 - 2630.
- [23] Collins M S, Bashiruddin J B, Alexander D J. Deduced amino acids sequences at the fusion protein cleavage site of Newcastle disease viruses showing variation in antigenicity and pathogenicity [J]. Arch Virol, 1993, 128: 363 - 370.
- [24] Scheid A, Choppin P W. Isolation and Purification of the envelope proteins of Newcastle disease virus [J]. Journal of Virology, 1973, (11): 263 - 271.
- [25] Sakaguchi T, Toyoda T, Gotoh B. Newcastle disease virus evolution I: Multiple Lineages defined by sequence variability of the hemagglutinin-neuraminidase gene [J]. Virology, 1989, (169): 260 - 272.
- [26] 邹键, 单松华, 姚龙涛, 等. 鹅副黏病毒 SF02 F 基因的序列分析及 SF02 的多重 RT-PCR 鉴别 [J]. 生物化学与生物物理学报, 2002, 34 (4): 439 - 444.
- [27] 赵文华, 朱建波, 姚龙涛, 等. 鹅副黏病毒 HN 基因的克隆与序列分析 [J]. 中国兽医科技, 2002, 32 (2): 10 - 13.
- [28] 刘华雷, 王永坤, 严维巍, 等. 鹅副黏病毒 F 蛋白基因的克隆和序列分析 [J]. 江苏农业研究, 2000, 21 (3): 46 - 49.
- [29] Cheng Y Y, Shieh H K, Lin Y L, *et al.* Newcastle disease virus isolated from recent outbreaks in Taiwan phylogenetically related to virus (genotype VII) from recent outbreaks in Western Europe [J]. Avian Disease, 1999, 43: 125 - 130.
- [30] 严维巍, 王永坤, 田慧芳, 等. 一株鸡副黏病毒的分子特性研究 [J]. 扬州大学学报 (自然科学版), 2000, 3 (1): 27 - 31.

第二部分 新城疫病毒分子生物学研究进展

新城疫 (Newcastle Disease, ND) 是由新城疫病毒引起的 (Newcastle Disease Virus, NDV) 一种能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。1926 年该病首次被发现于印度尼西亚的爪哇, 1927 年 Doyle 在英国的新城 (Newcastle) 首次分离报道并将其命名为新城疫病毒, 引起的疾病称为新城疫。我国于 1948 年分离到 NDV, 但据载 1935 年曾有过“鸡瘟”流行, 可能是由 NDV 引起。由于新城疫是世界范围分布的禽类重要病原之一, 并给世界养禽业造成巨大的威胁, 世界动物卫生组织 (Office International Des Epizooties, OIE) 将其与高致病性禽流感一起列为危害养禽业的重要疾病。该病传染性强, 传播速度快, 能引起多种禽类感染发病并造成严重的经济损失, 历来为各国政府所重视。近年来对 NDV 的研究取得了一定的进展, 现对有关 NDV 分子生物学的研究进展做一综述。

1 NDV 的分类及基本生物学性状

1.1 NDV 的分类

NDV 属于副黏病毒科、副黏病毒亚科, 是不分节段单分子负链 RNA 病毒目 (Mononegavirales) 成员之一。按照国际病毒分类委员会 (ICVI) 1991 发表在《病毒学文献》(Arch Viral) 上的第五次报告的分类方法, 将副黏病毒科划为 3 个属, 分别为副黏病毒属 (Paramyxovirus)、麻疹病毒属 (Morbillivirus) 和肺病毒属 (Pneumovirus)。NDV 和禽副黏病毒 2~9 型及腮腺炎病毒同属于副黏病毒属, 但它又兼具血凝素 (HA) 和神经氨酸酶 (NA) 双重活性, 基因组不编码 C 蛋白等特征。因此, 1993 年国际病毒分类委员会 (ICTV) 将其与禽副黏病毒 2~9 型、腮腺炎病毒和猴副流感病毒 (SV5) 等单独列为一个新属, 即腮腺炎病毒属 (Rubulavirus), 而将整个副黏病毒科分为副黏病毒亚科和肺病毒亚科。近年研究发现: 在病毒的 mRNA 的起始位点上, NDV La Sota 毒株是由 4 个亚单