

传染性囊病病毒 CJ 801 VP 2 基因 cDNA 的序列分析^{*}

曹永长¹ 毕英佐¹ 梁志清² 周 蛟³ 林文量²

(1 华南农业大学动物科学系, 广州, 510642; 2 香港大学动物学系, 香港;

3 北京农林科学院畜牧兽医研究所, 北京, 100081)

摘要 用 RT-PCR 从传染性囊病病毒 CJ 801 的第 14 代囊毒中扩增编码 VP 2 蛋白的 cDNA 基因片段, 长度为 1 500 bp, 并对该片段进行了 DNA 序列分析。结果表明, CJ 801 与 IBDV 标准 I 型毒株 52/70, STC 和 Cul 的同源性最高, 分别为 97.4%、97.6% 和 96.9%, 与变异株 A、E、GLS 的同源性稍低, 分别为 96.5%、96.3% 和 96.7%。而与 II 型毒株的同源性只有 81% 左右。从遗传进化树上看, CJ 801 处于标准 I 型毒株和变异株之间。根据 cDNA 序列推导出蛋白质序列, 比较蛋白质序列发现, CJ 801 与 I 型 IBDV 毒株的同源性均在 96% 以上, 其中与 52/70 的同源性最高, 为 98.2%。CJ 801 VP 2 高可变区的七肽区(S-W-S-A-S-G-S)未发生变化。以上结果说明 CJ 801 为 IBDV I 型强毒株。另外, CJ 801 和所有 IBDV 强毒株在 VP 2 的 253、279 和 284 位上的氨基酸均相同, 分别为 Q、D 和 A; 而 CJ 801 的细胞适应株 CJ 801 BKF 和所有弱毒株一样, 其相应位置的氨基酸分别为 H、N 和 T。这 3 个氨基酸可能和 IBDV 的毒力有关。

关键词 传染性囊病病毒; 基因克隆; 序列分析

中图分类号 S831.4

传染性囊病(IBD)是由传染性囊病病毒(IBDV)引起的影响养鸡业的最主要疾病之一。3~6 周龄的易感鸡受 IBDV 感染之后, 会引起严重的免疫抑制, 甚至死亡。IBDV 属于双 RNA 病毒科, 其基因组由 A、B 两个双链 RNA(dsRNA)片段组成。B 片段为小片段, 编码 VP 1; A 片段为大片段, 编码 VP 2、VP 3 和 VP 4。VP 2 和 VP 3 是病毒的主要结构蛋白, 其中 VP 2 含有血清特异性的能诱导中和抗体的抗原决定簇, 其诱导的中和抗体能保护宿主免受 IBDV 的感染。因此 VP 2 是 IBDV 的主要宿主保护免疫原。IBDV 有两个血清型, I 型病毒的强毒株可引起鸡发病, 而 II 型病毒对鸡无致病力。I 型 IBDV 又可分为标准 I 型和变异型。不同 IBDV 毒株基因组之间的同源性很高, 其抗原型和毒力的差异主要是由 VP 2 的少数氨基酸的变化引起的, 因此, 近年对 IBDV 基因组的分析多集中在对 VP 2 的分析方面。

1979 年, 中国大陆首次分离到 IBDV(周蛟等, 1981), 其中 1 株命名为 CJ 801 的毒株, 是中国大陆最早分离的 IBDV 强毒株, 血清学鉴定为标准 I 型毒株。崔静等(1995)对该毒株适应鸡胚肾细胞并致弱的细胞适应株 CJ 801 BKF 的 VP 2 cDNA 进行了序列分析, 认为该细胞适应株已变为弱毒株。本文对该毒株(CJ 801)的囊毒的病毒基因组 VP 2 片段进行了克隆和序列分析, 并与细胞适应株作比较, 现将结果报道如下。

1997-07-25 收稿 曹永长, 男, 32 岁, 讲师, 硕士

^{*} 本文是国家攀登计划项目《鸡传染性法氏囊病病毒抗原漂移及基因分型的研究》的一部分, 受到香港政府工业署工业支援计划的资助, 在香港大学动物学系完成。

1 材料与方法

1.1 病毒基因组的提取

参考 Bayliss 等(1990)的方法,加以改进。
用 CJ 801 感染 28 日龄的 SPF 鸡,感染 3 d 后剖杀鸡只,取法氏囊保存备用。本次研究用的 IBDV 是 CJ 801 的第 14 代囊毒。将 CJ 801 感染的法氏囊用 TNE 缓冲液(10 mmol/L Tris, 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, pH8.0)匀浆,冻融 3 次之后,14 000 r/min 离心 15 min。取上清液 1 mL 置于 4 mL 40%蔗糖溶液中,50 000 g (SW 55 Ti 转头,21 000 r/min)超速离心 3 h。用 100 μL 蛋白酶 K 缓冲液(TNE+0.5%SDS)悬浮沉淀,用蛋白酶 K (1 mg/mL)于 37℃消化病毒蛋白 1 h,然后用苯酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)抽提,酒精沉淀病毒 dsRNA。dsRNA 经 70%酒精洗涤,风干后用 DEPC 处理水溶解,-20℃冰箱保存备用。

1.2 病毒 dsRNA 的反转录

采用 Gibcobl Superscript™ 反转录试剂盒进行。参照已发表的 IBDV 基因序列,设计了一对引物作为反转录之用,序列如下。

P I : TTTAGCGCCGCGAGATCAGACAAACGATCGCAG
P II: TTTAGCGCCGCTAG(A)CACGCAGTCGAGGTTG(A)T

反转录的反应按试剂盒说明书,略作改变。先将 50 pmole 引物 P I 和 P II 与 5 μg 左右的 dsRNA 混合,反应体积为 25 μL,100℃煮沸 5 min,然后置于冰上 5 min,加预热至 42℃的反应液 25 μL(5 μL 10×PCR 缓冲液,5 μL 25 mmol/L MgCl₂,2.5 μL 10 mmol/L dNTP,5 μL 100 mmol/L DDT,7.5 μL DEPC 水),混匀后加 200 U 反转录酶,于 50℃反应 1 h,70℃ 15 min 终止反应,再加 2 U RNaseH 于 37℃保温 20 min。反转录产物保存于-20℃备用。

1.3 VP2 cDNA 的聚合酶链反应(PCR)

以反转录的 cDNA 为模板,采用 pfuDNA 聚合酶对 CJ 801 病毒的 VP2 基因进行扩增。PCR 引物是根据 IBDV VP2 的序列而设计的,P III 位于 VP2 基因的起始位点,在 5' 端加上 EcoRI 酶切位点,P IV 和 P II 约相距 1500 碱基,在 5' 端加上 BglII 酶切位点,其序列分别如下。

P III: TAGAATTCCTACCTTAG(T)GGCCCGGATTA
P IV: TAAGATCTATGACAAACCTGCAAGATCAAAC

PCR 反应体积为 50 μL,其中含 10×PCR 缓冲液 5 μL,10 mmol/L dNTP 1 μL,cDNA 1 μL,P II 和 P IV 各 50 pmole,pfu 0.5 U。温度循环程序如下:循环 1:94℃3 min;循环 2~31:94℃45 s,55℃45 s,72℃2 min 30 s;循环 32:72℃10 min。

1.4 PCR 产物的克隆及鉴定

将 PCR 产物用 BglII 和 EcoRI 双酶切;pBssk(pBluescript IIKS)质粒用 BamHI 和 EcoRI 双酶切,同时用 CIAP(小牛碱性磷酸酶)去磷酸化。用 T₄DNA 连接酶将 cDNA 和 pBssk 连接。电脉冲法转化大肠杜菌 XL-1 Blue 受体菌,氨苄青霉素筛选,并用 PCR 鉴定阳性克隆。将阳性克隆小规模培养于 3 mL LA 培养液中,用 Promega DNA purification Kit 提取重组质粒 DNA,然后用 NotI 和 EcoRI 酶切,1%琼脂糖凝胶检测酶切产物。

1.5 VP2 cDNA 的序列测定

DNA 序列测定采用 Autocycle DNA sequencing 试剂盒(Pharmacia 产品),以重组质粒为模板,先按试剂盒说明进行 PCR 反应,然后将反应产物在 ALF 快速自动核酸序列仪上进行

序列测定。PCR 序列测定的引物除了试剂盒提供的 M 13Rev 和 M13—40 两个引物之外, 另外还设计了 5 个引物, 其序列如下:

- P V: TGACCTTCCAAGGAAGCCTG
- P VI TTGTCTTTTCCCTGGATTCC
- P VII CCAGAGTCTACACC(T)ATAACTGC
- P VIII CTGTTGCCACTCTTTCA (G)TAGGC
- P IX AA(G)TTTTGTGTAGTTCATGGCTC

每个引物的 5' 端均加上荧光素。

1. 6 VP2 核酸序列的比较分析

CJ 801 VP2 核酸序列确定之后, 采用 GCG (Genetics Computer Group, Wisconsin, USA) 的 Fasta 程序, 检索与之最相似的核酸序列。由核酸序列推导出蛋白质序列, 用 TFasta 程序检索与之最相似的蛋白质序列。将与 CJ 801 VP2 序列最相似的 IBDV 的有关序列用 Pileup (GCG) 程序进行比较, 确定不同 IBDV 毒株的亲缘关系, 聚类分析图用 postscript (GCG) 程序画出。

2 结果

2. 5 病毒基因组 dsRNA 的纯化及 RT-PCR 产物的检测

IBDV CJ 801 经 40%蔗糖介质超速离心, 蛋白酶 K 消化, 酚/氯仿/异戊醇抽提, 乙醇沉淀等操作之后, 获得的 dsRNA 经电泳检测, 有 2 条带, 分别为 3. 3 kb 和 2. 9 kb 左右, 与已报道的相吻合 (Lukert et al, 1991)。RT-PCR 产物在 1%琼脂糖凝胶上电泳, 检测到一条约 15 00 bp 的 DNA 带, 与预期的大小一致。

2. 2 PCR 产物的克隆及鉴定

将 PCR 产物双酶切后, 插入 pBssk 质粒的 BamHI 和 EcoRI 位点, 采用电脉冲的方法转化 Ecoli XL-1 Blue 受体菌, 再将转化菌培养于含氨苄青霉素的培养基上培养, 获得了多个阳性菌, 以 P II和 P IV为引物, 用 PCR 对阳性克隆进行筛选, 从所有阳性克隆中都能扩增到约 1 500 bp 的 DNA 片断。从小规模培养的阳性克隆中提取质粒 DNA, 用 Not I 和 EcoRI 双酶切, 获得 2 条 DNA 片断, 长度分别为 2. 9 kb 和 1. 5 kb 左右, 分别与质粒及 VP2 基因的大小相吻合。

2. 3 CJ 801 VP2 cDNA 的核酸序列

对 CJ 801 的 VP2 cDNA 的核酸序列进行了两次独立的测定, 两次结果一致。用 Fasta 程序对该序列进行检索, 发现已发表的 IBDV 序列中, 下列毒株与 CJ 801 同源性都在 95% 以上: STC (Kibenge et al, 1990) 97. 6%, 52/70 (Bayliss et al, 1990) 97. 4%, Cul (Bayliss et al, 1990) 96. 9%, PBG-98 (Bayliss et al, 1990) 96. 9%, GLS (Vakharia et al, 1994) 96. 7%, UK 661 (Brown et al, 1996) 96. 3%, 变异株 A (Lana et al, 1992) 96. 5%, 变异株 E (Heine et al, 1991) 96. 3%。而 II 型毒株 23/82 (Schnitzler et al, 1993) 和 OH 株 (Kibenge et al, 199) 与 CJ 801 的同源性则分别只有 81. 4%和 81. 5%。

根据 CJ 801 VP2 的 cDNA 序列, 推导出 CJ 801 VP2 的 500 个氨基酸的蛋白质序列, 用 TFasta 程序进行检索, 发现 CJ 801 与以上 I 型毒株的同源性均超过 96%, 而与 II 型毒株 23/82 和 OH 的同源性则分别为 87. 8%和 86. 2%。

1	ATGACAAACC	TGCAAGATCA	AACCCAACAG	ATTGTTCGT	TCATACGGAG
51	CCTTCTGATG	CCAACAACCG	GACCGGCGTC	CATTCCGGAC	GACACCCTGG
101	GGAAGCACAC	TCTCAGGTCA	GAGACCTCGA	CCTACAATTT	GA CTGAGGGG
151	TGTGGGTGCT	CAGGGCTAAT	TGTCTTTTTC	CCTGGTTTCC	CTGGCTCAAT
201	TGTGGGTGCT	CACTACACAC	TG CAGAGCAA	TGGGA ACTAC	AAGTTCGATC
251	AGATGCTCCT	GACTGCCAG	AACCTACCGG	CCAGTTACAA	CTACTGCAGG
301	CTAGTGAGTC	GGAGTCTCAC	AGTGAGGTCA	AGCACACTCC	CTGGTGGCGT
351	TTATGCACTA	AACGGCACCG	TAAACGCCGT	GACCTTCCAA	GGAAGCCTGA
401	GTGAACTGAC	AGATGTTAGC	TACAATGGGT	TGATGTCTGC	AACGGCCAAC
451	ATCAACGACA	AAATTGGGAA	TGTCCTAGTA	GGGGAAGGGG	TCACCGTCTT
501	CAGCTTACCC	ACATCATATG	ATCTTGGGTA	TGTGAGGCTT	CGTGACCCCA
551	TTTCTGCTAT	AGGGCTTGAC	CCAAA AATGG	TAGCCACATG	TGACAGCAGT
601	GACAGGCCCA	GAGTCTACAC	CATAACTGCA	GCCGATGATT	ACCAATTCTT
651	ATCACAGTAC	CAAACAGGTG	GGGTAACAAT	CACACTGTTC	TCAGCCAACA
701	TTGATGCTAT	CACAAGCCTC	AGCATTGGGG	GAGAGCTCGT	GTTCCA AACA
751	AGCGTCCAAG	ACCTTG TACT	GGGCGCTACC	ATCTACCTTA	TAGGCTTTGA
801	TGGGACTACA	GTAATCACCA	GAGCTGTGGC	CTCAGACAAT	GGGCTGACGG
851	CCGGCACCGA	CAATCTTATG	CCATTCAATC	TTGTGATTCC	GACCAACGAG
901	ATAACCCAGC	CAATCACATC	CATCAA ACTG	GAGATAGTGA	CCTCCAAAAG
951	TGGCGGTCAG	GCAGGGGACC	AGATGTCATG	GTCCGCAAGT	GGGAGCCTAG
1001	CAGTGACAAT	CCATG GTGGC	AACTATCCAG	GGGCCCTCCG	TCCCGTCACA
1051	CTAGTAGCCT	ACGAAAGAGT	GGCAACAGGA	TCCGTCGTTA	CGGTCGCCGG
1101	GGTGAGCAAC	TTCGAGTTGA	TCCCAAA CCC	TGAACTAGCA	AAGAACCTGG
1151	TTACAGAATA	CGGCCGATTT	GACCCAGGAG	CCATGAACTA	CACAAAATTG
1201	ATACTGAGTG	AGAGGGACCG	TCTTGGCATC	AAGACCGTCT	GGCCAA CAAG
1251	GGAGTACACT	GACTTTCGTG	AGTACTTCAT	GGAGGTGGCC	GACCTCAACT
1301	CTCCCCTGAA	GATTGCAGGA	GCATTTG GCT	TCAAAGACAT	AATCCGGGCC
1351	ATAAGGAGGA	TAGCTGTGCC	GGTGGTCTCT	ACATTGT TCC	CACCTGCAGC
1401	TCCCCTAGCC	CTTGCAATTG	GGAAGGTGT	AGACTACCTG	CTGGGTGATG
1451	AGGCACAGGC	TGCTTCAGGA	ACTGC TCGAG	CCGCGTCAGG	AAAAGCAAGA

图 1 CJ801 毒株 VP2 基因的 cDNA 序列

3 讨论

3.1 通过 RT-PCR 从 CJ 801病毒基因组中扩增到 IBDV 的 VP2 cDNA 基因片断,在该片断的 3' 端加上 Bgl II 位点(AGATCT), 5' 端加上 EcoRI 位点(GAATTC), 可以成功地将 VP2 cDNA 插入到 pBssk 的 BanHI 位点(GGA TCC)和 EcoRI 位点之间。通过对阳性克隆的检测, 可知该方法是有效的。

3.2 将 CJ 801 VP2 的核酸序列与其它已发表的 IBDV 的相应序列用 Pileup 程序进行比较, 发现在遗传进化树上(图 2), CJ 801 与 STC、52/70、Cu1 等标准 I 型毒株的距离最近, 与 GLS、A、E 等变异株和欧洲强毒株 UK661 及澳大利亚毒株 002-73(Hudson et al, 1986)的距离较远, 而与 23/82 和 OH 两个 II 型毒株的关系最远。从进化关系上来看, CJ 801 属于 IBDV 标准 I 型毒株。

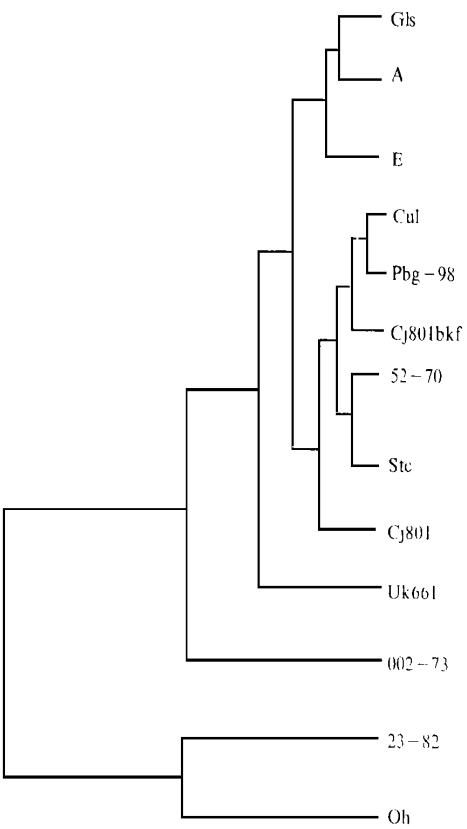


图 2 根据 VP2 的 cDNA 序列对 13 个 IBDV 毒株进行的聚类分析

表 1 CJ 801 VP2 与不同毒株同源性的比较

毒株	核酸		蛋白质		
	比较长度/ bp	同源性/(%)	比较长度/ AA	同源性/(%)	氨基酸差异/个
52/70	1 500	97. 4	500	98. 2	9
STC	1 500	97. 6	500	97. 6	12
Cu 1	1 500	96. 9	500	97. 2	14
pBG—98	1 445	96. 9	481	96. 9	15
002—73	1 500	92. 3	500	96. 0	20
UK 661	1 500	96. 3	500	97. 4	13
CJ 801 BKF	1 480	97. 2	493	96. 3	18
A	1 500	96. 5	500	97. 2	14
CLS	1 500	96. 7	500	96. 8	16
E	1 482	96. 3	494	96. 8	16
23/82	1 503	81. 4	501	87. 8	61
OH	1 503	81. 5	501	86. 2	69

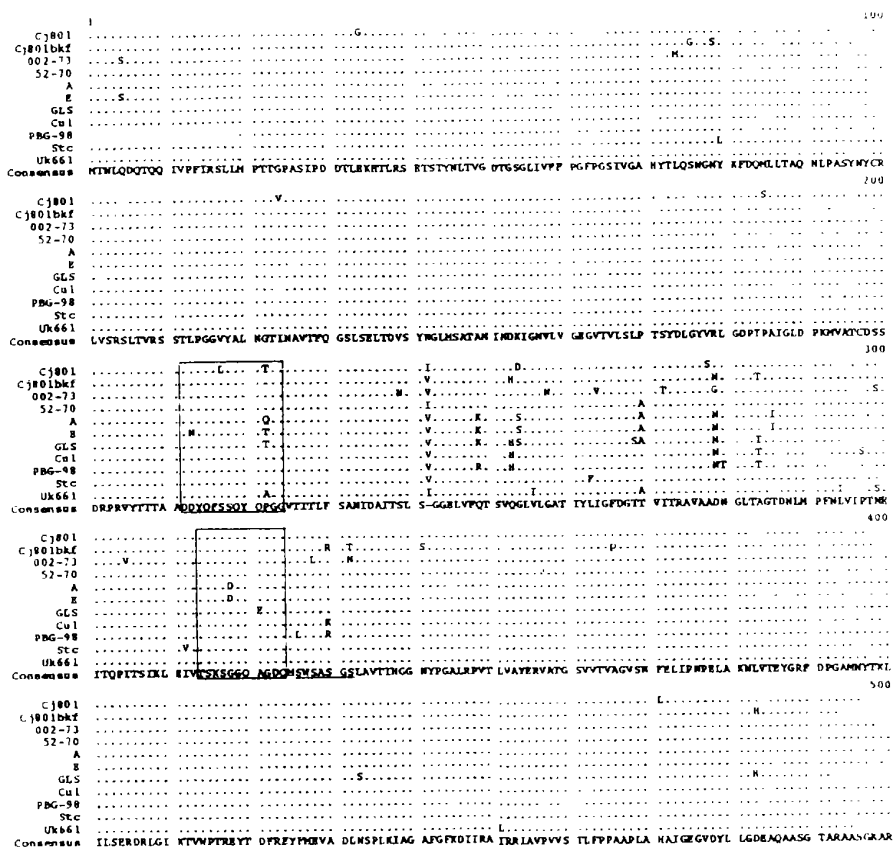


图 3 CJ801 与部分已发表的 IBDV 毒株 VP2 蛋白质序列的比较
方框内为亲水区, 下面划线的是七肽区

3.3 将 CJ 801 VP2 的蛋白质序列与几株 I 型毒株比较(表 1, 图 3), 发现其与各毒株的氨基酸差异在 9 至 20 个之间, 而与两个 II 型毒株 23/82 和 OH 的差异分别为 61 和 69 个氨基酸。分析 CJ 801 的氨基酸序列, 发现有以下两个特点: ①217 位的 S 变成 L, 222 位的 P 变为 L, 这两个位点均处于 VP2 高可变区的第 1 个亲水区; ②第 2 个亲水区之后的七肽区仍然保持了 S—W—S—A—S—G—S 的序列, 与所有致病毒株一致。在临床中, 用高代次的 CJ 801 囊毒攻击雏鸡, 发现该毒株仍然能使鸡只致病, 但鸡的死亡率有所下降, 这可能与以上氨基酸的变化有关。

3.4 本文分析的 CJ 801 囊毒和崔静等(1995)分析的 CJ 801 BKF 虽然都来源于同一毒株, 但经过不同的系统多次传代培养, 两者的氨基酸差异达到 18 个。本文分析的 CJ 801 毒株在 SPF 鸡中传代 14 次, 仍保持了对鸡的致病力, 而 CJ 801BKF 经过在鸡胚肾细胞和鸡胚成纤维细胞中多次传代, 已经变为一个 IBDV 弱毒株。比较二者的氨基酸顺序, 除了 S—W—S—A—S—G—S 七肽区的差别以外, 还有 3 个位置的变化特别引人注目。即 253、279 位和 284 位, CJ 801 分别为 Q、D 和 A, 与 STC、52/70、UK661 等可以致死鸡的毒株相同, 而 CJ 801 BKF 和 Cul、PBG—98 等不能致死鸡的毒株相同, 分别为 H、N 和 T。这几个位置上氨基酸

的差异可能和 IBDV 毒力的差异有关。

参 考 文 献

- 周 蛟, 刘福致, 陶素华, 等. 1981. 北京地区鸡传染性法氏囊病病原分离. 中国兽医杂志, 8(7), 25~26
- 崔 静. 周顺伍, 郭玉璞. 1995. 传染性法氏囊病病毒 CJ 801 BKF 毒株 VP2 cDN 基因结构的分析. 病毒学报, 11(3), 234~240
- Bayliss C D, Spies U, Shaw K, et al. 1990. A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2. J. of General Viro, 71: 1303~1312
- Brown M D, Skinner M A. 1996. Coding sequences of both genome segments of European 'very virulent' infectious bursal disease virus. Virus Research, 40(1): 1~15
- Heine H G, Haritou M, Failla P, et al. 1991. Sequence analysis and expression of the hostprotective immunogen VP2 of a variant strain of infectious bursal disease virus which can circumvent vaccination with standard type. J Gen Virol, 72: 1835~1843
- Hudson P J, McKern N M, Power B E, et al. 1986. Genomic structure of the large RNA segment of infectious bursal disease virus. Nucleic Acids Res. 14: 5001~5012
- Kibenge F S, Jackwood D J, Mercado C C. 1990. Nucleotide sequence analysis of genome segment A of infectious bursal disease virus. J Gen Virol, 71: 567~577
- Lana D P, Beisel C E, Silva R F. 1992. Genetic mechanisms of antigenic variation in infectious bursal disease virus: analysis of a naturally occurring variant virus. Virus Girus, 6: 247~259
- Lukert P D & Saif Y M. 1991. Infectious bursal disease. In: Calnek B W ed. Diseases of Poultry. 9th edn. Ames: Iowa State University Press, 648~663
- Schnitzler D, Bernstein F, Muller H, et al. 1993. The genetic basis for the antigenicity of the VP2 protein of the infectious bursal disease virus. J Gen Virol, 74: 1560~1571
- Vakharia V N, He J, Ahamed B, et al. 1994. Molecular basis of antigenic variation in infectious bursal disease virus. Virus Res, 31: 265~273

SEQUENCE ANALYSIS OF cDNA GENE CODING FOR VP2 OF CJ801 STRAIN OF INFECTIOUS BURSAL DISEASE VIRUS

Cao Yongchang¹ Bi Yingzuo¹ F. C. Leung² Zhou Jiao³ B. L. Lim²

(1 Dept. of Animal Science, South China Agric. Univ., Guangzhou, 510642;

2 Dept. of Zoology, The Univ. of Hong Kong, Hong Kong;

3 Institute of Husb. and Vert. Science, Beijing Academy of Agric. Sci.)

Abstract

A cDNA fragment with a length of 1500bp coding for VP2 of infectious bursal disease virus (IBDV) has been amplified by reverse transcription—polymerase chain reaction (RT—PCR)

from CJ 801 strain isolated in China. DNA sequence analysis showed that the similarities of nucleotide sequence of CJ801 strain with classical type I strains 52/70, STC and Cul were 97.4%, 97.6% and 96.9% respectively, those with variant strains A, E and GLS were a little smaller, 96.5%, 96.3% and 96.9%, respectively, and those with type II strains were about 81%. Cluster analysis of nucleotide sequences indicated that CJ801 strain is more closely related to classical virulent strains and classical tissue culture-adapted strains than to variant strains, very virulent strains and type II strains. Comparison of deduced amino acid sequences showed that the homogeneities of CJ 801 strain with all classical type I strains were over 96%. The most closely related strain to CJ801 strain is 52/70 strain, in which the divergence of amino acid sequences was only 1.8%. A serine-rich heptapeptide(S-W-S-A-S-G-S), which is a signature of virulent IBDV strains, is also present in CJ801, indicating that CJ801 is a classical virulent IBDV strain. At positions 253, 279 and 284, the amino acid residues of CJ801 strain are Q, D and A respectively, conserved in that of virulent strains. However, in the attenuated strain of CJ801 (CJ801 BKF), the residues at these positions were substituted by H, N and T respectively. These substitutions were commonly found in cell culture adapted IBDV strains. It is suggested that these amino acid residues, 253 Q, 279 D and 284 A can be regarded as signature of virulent strains of IBDV in addition to the serine rich heptapeptide.

Key words infectious bursal disease virus(IBDV); gene cloning; sequence analysis