

鸡传染性支气管炎病毒 D₄₁株 S1 基因 部分序列的测定^{*}

廖 明 辛朝安 王林川

(华南农业大学动物医学系, 广州 510642)

摘要 通过反转录及变退火温度 PCR 方法扩增出含先导序列的 IBV 广东地方分离株 D₄₁的 S1 基因 cDNA, 长度约 1.7 kb. 利用双脱氧链终止法对其 5'端测序, 准确读到 342 个碱基, 并确定了翻译起始密码子 ATG 的位置.

关键词 鸡传染性支气管炎病毒(IBV); D₄₁株; S1 基因; 测序

中图分类号 S 855.3

鸡传染性支气管炎 (IB) 是严重危害世界养鸡业的一种病毒性疾病, 其病原为鸡传染性支气管炎病毒 (IBV). IBV 的基因组核酸在复制过程中易发生突变和高频重组, 从而导致该病毒血清型众多 (Cavanagh et al, 1992), 并给 IB 的防治工作带来很大麻烦. 现已证实, 在 IBV 的 3 种主要结构蛋白中, 纤突 (S) 蛋白的 S1 糖多肽亚单位与 IBV 的免疫原性关系最密切, 血凝抑制抗体和多数病毒中和抗体由 S1 诱发, 血清型特异抗体也主要是针对 S1 糖多肽的. 另外, IBV 基因组中的高变区大多集中在 S1 部位 (Bernard et al, 1990). 所以 S1 基因是 IBV 的免疫原基因, 研究其序列, 有利于从分子水平上揭示 IBV 的变异基础和规律, 并对开发相应的基因工程疫苗有重要意义.

近年来, 我国 IB 的流行呈上升趋势, 尤其是肾变病型 IB 已蔓延到所有养鸡地区, 造成了严重的经济损失. 但目前有关我国 IBV 地方分离株的基因序列数据还非常缺乏. 本研究的目的就是从 IBV 广东地方分离致弱疫苗株 D₄₁ (陈天杰等, 1987) (简称 IBV D₄₁株) 入手, 对其 S1 基因 5'端序列进行测定, 以便确定翻译起始密码子 ATG 的位置, 为进一步表达该基因奠定基础.

1 材料与方法

1.1 引物的设计与合成

根据血清学实验 (陈天杰等, 1987) 及 RFLP 研究 (王林川等, 1997) 的结果, D₄₁株很可能属于 Mass 血清型, 所以引物设计参照该血清型的标准毒株之一 Beaudette 株的 S1 基因两侧序列 (Sutou et al, 1988), 并通过 PCRDESN 软件辅助分析. 上游引物 L 5'与王林川等 (1997) 报道的引物 S1 OLIGO 5'相同, 位于先导序列 5'端, 27 个碱基, 引物 5'端加有 *Hind* III 识别序列. 下游引物 Lx 按照纤突 (S) 前体蛋白裂解位点 (Sutou et al, 1988) 附近的序列设计, 25 个碱基, 其 5'端加有 *Sac* I 识别序列. 两条引物均由上海 Sangon 生物工程公司合成, 二者之间

1997-10-07 收稿 廖 明, 男, 29 岁, 讲师, 博士

^{*} 国家自然科学基金 (39710210896) 和广东省自然科学基金 (940351) 资助

包括整个 S1 基因片段(含先导序列), 跨幅约 1.7 kb. L 5' 和 Lx 的序列如下:

L5': 5'—CAAAGCTTGAAAAC TGAACA AAAAGACA—3',

Hind III

Lx: 5'—GCGAGCTCCTA ACG TCTAAAACGAC—3'.

Sac I

1.2 病毒的繁殖、纯化及 RNA 提取

按陈天杰等(1987)的报道, 用 10 日龄 SPF 鸡胚(购自山东 SPF 鸡场)复壮 IBV D₄₁ 株种毒(广东省农业科学院兽医研究所提供); 经蔗糖密度梯度超速离心后, 取适量病毒悬液加入 20 mg/L 的 SDS 和 250 mg/L 的蛋白酶 K, 55 °C 45 min; 再用等体积水饱和酚、氯仿/异戊醇(24:1)反复抽提数次, 经无水乙醇沉淀后, 用 DEPC 处理过的灭菌水溶解病毒 RNA, 立即进行反转录.

1.3 IBV D₄₁ 株 S1 基因 cDNA 第一链的合成及扩增(RT-PCR)

反转录(RT): 取病毒核酸溶液(6.5 μL)与引物 Lx(1.5 μL, 45 pmol)于 90 °C 水浴 5 min, 再冰浴 2 min 后加入 5×RT Buffer(4.0 μL)、2.5 mmol/L dNTPs(6.0 μL)、RNasin(Promega 公司, 40 u)及 AMV RTase(Promega 公司, 10 u), 42 °C 作用 1 h. 反应产物直接用于 PCR 扩增.

变退火温度 PCR(简称变温 PCR): 取 10×Buffer 4.0 μL、2.5 mmol/L dNTPs 4.0 μL、引物 L 5' 1.0 μL(30 pmol)、RT 产物 10.0 μL、灭菌水 30.4 μL 混匀, 97 °C 水浴 10 min, 冰浴 2 min 后加入 AmpliTaq DNA 聚合酶(PE 公司, 3 u)及适量灭菌液体石蜡, 于 1109 型 DNA 扩增仪(北京军事医学科学院新技术应用研究所)上执行以下程序: 90 °C 1 min, 45 °C 1 min, 72 °C 2 min, 共 10 个循环; 然后提高退火温度至 50 °C, 其余条件不变, 再经 25 个循环后, 72 °C 作用 10 min. 同时设立无模板阴性对照体系.

1.4 IBV D₄₁ 株 S1 基因 cDNA 的克隆

参照 BOEHRINGER MANNHEIM 公司的琼脂糖酶使用说明, 纯化上述特异性 RT-PCR 产物(约 1.7 kb), 并分别进行 *Hind* III 和 *Sac* I 单酶切鉴定. 然后, 按常规方法与载体质粒 pGEM-7Zf(+) 连接、转化. 重组质粒采用熊占(1995)报道的方法进行快速筛选, 最终通过质粒 PCR 和 *Hind* III+*Sac* I 及 *Hind* III+*Bam*H I 双酶切鉴定.

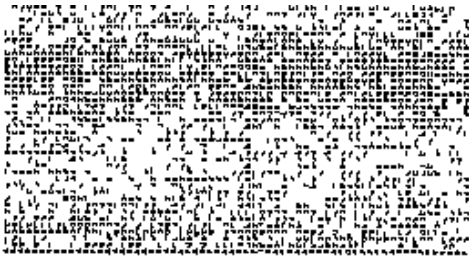
1.5 IBV D₄₁ 株 S1 基因 cDNA 5' 端序列的测定

用 PEG 沉淀法(Sambrook et al, 1989)纯化重组质粒, 然后, 通过 Sanger 双脱氧链终止法进行序列测定, 具体操作参照 Pharmacia 公司 T7 SequencingTM Kit 的说明及叶长明(1994)的报道进行.

2 结果

2.1 引物设计与 RT-PCR

PCRDESN 软件分析表明, 上游引物 L 5' 和下游引物 Lx 长度适中, 其内部没有连续 4 个以上碱基构成反向互补配对序列(即发夹结构), 二者 3' 端之间无同源性, 不会形成引物二聚体. L5' 和 Lx 的 *T_m* 值分别为 72 和 76. 电泳结果显示, 利用这对引物通过 RT 及变温 PCR 方法成功地扩增出一条长约 1.7 kb 的特异条带(图 1), 其大小与预计的完全吻合. 阴性对照组无任何产物生成. 这说明 IBV D₄₁ 株 S1 基因(含先导序列)已被调出并得到扩增.



A: pBR322 DNA 经 *Bst*NI 酶切产物
 B: IBV D₄₁株 S1 基因 RT-PCR 产物(含先导序列)
 C: pGEM IBVS1-I . D₄₁质粒 PCR 产物(用引物 L5'和 Lx)
 D: pGEMIBVS1-I . D₄₁经 *Hind* III+*Sac* I 酶切产物
 E: pGEM IBVS1-I . D₄₁经 *Hind* III+*Bam*H I 酶切产物
 F: pGEM-7Zf(+)经 *Bam*H I 酶切产物
 G: λDNA 经 *Hind* III 酶切产物

图 1 重组质粒 pGEMIBVS1-I . D₄₁的鉴定

2.2 重组质粒鉴定

IBV D₄₁株 S1 基因 RT-PCR 产物经 *Hind* III和 *Sac* I 分别酶切, 均未发现模板长度减小, 初步表明该基因内部没有这些内切酶的识别序列存在. 将其插入到载体质粒 pGEM-7Zf(+)用 *Hind* III和 *Sac* I 切开的窗口中, 获得重组质粒 pGEMIBVS1-I . D₄₁. 该重组质粒经 *Hind* III+*Sac* I 双酶切, 产生长约 1.7 kb 和 3.0 kb 的两条带, 它们分别与 RT-PCR 产物及载体质粒大小一致. 而用 *Hind* III+*Bam*H I 酶切重组质粒, 只得到 1 条长约 4.7 kb 的大片段, 说明随着目的基因的正确导入, 原载体上 *Hind* III和 *Sac* I 之间的 *Bam*HI 位点消失, 符合预先设计. 另外, 用引物 L5'和 Lx 对重组质粒进行 PCR, 得到长约 1.7 kb 的特异性扩增产物. 上述结果(图 1)表明 IBV D₄₁株 S1 基因 cDNA 已被正确插入载体质粒 pGEM-7Zf(+)中.

2.3 IBV D₄₁株 S1 基因 cDNA 5'端序列的测定

用 Sanger 双脱氧链终止法对含先导序列的 IBV D₄₁株 S1 基因 cDNA 5'端人工测序, 其放射自显影结果如图 2 和图 3 所示.



图 2 IBV D₄₁株 S1 基因 5'端部分序列的双脱氧-测序胶放射自显影图谱

CAaaggttGAAAACTGAACAAAAGACA

	TAAGAG					
1	ATGTTGGTAA	CACCTCTTTT	ACTAGTGACT	CTTTTGTG TG	CACFATGTAG	TGCTGCTTTG
61	TATGACAGTA	GTTCTTACGT	GTA CTACTAC	CAAAGTGCCT	TCAGACCACC	TGATGGTTGG
121	CATTTACATG	GGGGTCCGTA	TGCGGTTGTT	AATATTCTA	GTGAATCTAA	TAATGCAGGC
181	TCTTCATCTG	GGTGTACTGT	TGGTATTATT	CATGGTGGTC	GTGTTGTTAA	TGCTTCTTCT
241	ATAGCTATGA	CGGCACCGTC	ATCAGGTATG	GCTTGGTCTA	ACAGTCAGTT	TGTACTGCA
301	TACTGTA ACT	TTTCAGATAC	TACAGTGT TT	GTTACA.....		

图中方框为引物 L5'的序列, 小写字母表示 *Hind* III识别序列; 划线部分为 S1; 糖蛋白翻译起始密码子 ATG 及其信号肽编码序列; ... 表示未测到的碱基

图 3 IBV D₄₁株 S1 基因 5'端部分序列

3 讨论

3.1 引物设计

IBV D₄₁株是一个地方分离致弱毒株(陈天杰等, 1987), 要想正确完整地表达其 S1 糖蛋白就必须首先确定该基因的翻译起始位点, 这也是本研究的主要目的. 现已证明, IBV 基因组的转录遵循特殊的先导-引物转录模式, 其产物是一组长度递减的 mRNA, 它们具有共同的 5' 端先导序列(内含保守性很高的侧翼序列 CTG/TAACAA (Sutou et al, 1988) 和 3' 端序列. 所以若上游引物按先导序列中的保守区设计, 则受毒株变异的影响较小, 与模板结合的效率较高. 目前, 国内外相关研究中普遍采用这种设计方案, 本文使用的 L5' 也不例外. 另外, L5' 的结合部位与翻译起始密码子 ATG 之间相隔几十个碱基, 有利于通过测序确定 D41 株 S1 基因 5' 端翻译起始密码子 ATG 的位置及其附近的序列.

根据前人推测的 IBV S 前体蛋白裂解模式, 分析已发表的 IBV 不同毒株 S 基因序列 (Cavanagh et al, 1992; Binns et al, 1985; Sutou et al, 1988; Wang et al, 1993), 发现即使不同血清型的毒株在该部位的氨基酸序列同源性都很高, 而同一血清型的毒株在该部位更有较强的核酸序列保守性. 因此, 本人参照与 IBV D₄₁株同一血清型的 Beaudette 株 S1 基因 3' 端的序列 (Binns et al, 1985) 设计了与之互补的下游引物 L_x, 同时, 在 L_x 中加入翻译终止密码子 TAG 的互补碱基, 以便限制 S2 基因的掺入, 确保下一步获得完整的 S1 基因表达产物. 实验结果证明, L5' 和 L_x 的设计是正确合理的.

由于 IBV 基因核酸突变率高, 所以引物设计时, 若要人为加入酶切位点, 则需慎重选择并先对 PCR 产物做预酶切, 以保证克隆到完整的目的基因.

3.2 变温 PCR

本研究总结前人经验, 采用变温 PCR 扩增 RT 产物. 其依据是: 最初几轮 PCR 扩增时, 模板与每条引物的实际配对碱基数只有 17~20 个. 考虑到引物设计是按标准序列, 而被扩增的模板却来自变异毒株, 因此, 适当调低退火温度, 将有利于引物与模板的稳定结合. 经过几轮反应后, 提高退火温度至合适的值, 有助于删减非特异反应背景. 实验结果显示, 上述改进的 PCR 方法效果良好.

3.3 测序

本研究报道了 IBV D₄₁株 S1 基因 5' 端的部分序列. 分析表明, 第一个 ATG 附近的序列与 IBV Mass 血清型的 Beaudette 株、M₄₁株和 H₁₂₀株 S 基因翻译起始密码子附近序列完全一致. 若该 ATG 是翻译起始密码子, 则随后的 17 个氨基酸中大多数是高度疏水性氨基酸, 如丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、缬氨酸(V)、半胱氨酸(C)等, 它们形成了一段较强的疏水区, 并在推导的信号肽切点上游-1 位和-3 位分别是中性的小氨基酸 A 和 C. 这些结构符合信号肽的共同特征 (von Heijne, 1984) 及 Binns 等 (1985) 和 Sutou 等 (1988) 对 S 蛋白信号肽的判断. 因此, 可以认为该 ATG 就是 IBV D₄₁株 S1 基因翻译起始密码, 它与随后的 17 个氨基酸一起编码 S 蛋白的信号肽. 这一发现为进一步完整表达该基因创造了有利条件.

致谢 本研究主要内容在华南农业大学农业部养禽与禽病防治重点开放实验室完成, 工作中得到中山大学生命科学院叶长明博士的大力协助, 在此表示衷心感谢!

参 考 文 献

- 王林川, 廖 明, 王红宁, 等. 1997. 用 RT-PCR 和 RFLP 对 IBV 中国分离株分型的研究. 见: 郑诚主编. 第四届优质肉鸡的改良生产及发展研讨会论文集. 广州: 华南理工大学出版社, 152 ~ 154
- 叶长明. 1994. 番木瓜环斑病毒外壳蛋白基因的克隆、测序及在大肠杆菌和转基因番木瓜中的表达. [学位论文]. 广州: 华南农业大学植保系
- 陈天杰, 梁眷衡, 辛朝安, 等. 1987. 鸡传染性支气管炎 D₄₁ 等弱毒株的培育与抗原性筛选试验. 广东农业科学, (4): 41 ~ 43
- 熊 占. 1995. 质粒 DNA 快速提取法. 江西科学, 13(4): 241 ~ 243
- Bernard N, David M K. 1990. Fields virology. 2nd ed. New York: Raven Press, 841 ~ 856
- Binns M M, Bournsnel M E G, Cavanagh D, et al. 1985. Cloning and sequencing of the gene encoding the spike protein of the coronavirus IBV. J Gen Virol, 66: 719 ~ 726
- Cavanagh D, Davis P J. 1992. Sequence analysis of strains of avian infectious bronchitis coronavirus isolated during the 1960s in the UK. Arch Virol, 130: 471 ~ 476
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 1989. Molecular cloning a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 30
- Sutou S, Sato S, Okabe T, et al. 1988. Cloning and sequencing of genes encoding structural proteins of avian infectious bronchitis virus. Virology, 165: 589 ~ 595
- van Heijne G. 1984. How signal sequences maintain cleavage specificity. J Mol Biol, 173: 243 ~ 251
- Wang L, Junker D, Collisson E W. 1993. Evidence of natural recombination within the S1 gene of infectious bronchitis virus. Virology, 192: 710 ~ 716

SEQUENCING OF PARTIAL S1 GENE OF AVIAN INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS STRAIN D₄₁

Liao Ming Xin Chao'an Wang Linchuan

(Dept. of Veterinary Medicine, South China Agric. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract

Avian Infectious Bronchitis Virus (IBV) strain D₄₁ is an attenuated vaccine strain of an isolate from Guangdong province. In this study, the cDNA of the D₄₁ S1 gene (containing leader sequence, 1.7 kb) was amplified by reverse transcription (RT) and polymerase chain reaction (PCR), with alternating annealing temperature. Using dideoxy-mediated chain termination method, the sequencing assay results revealed the partial sequence of 5' end of this segment (342bp) and the location of initiation codon ATG.

Key words Avian Infectious Bronchitis Virus (IBV); strain D₄₁; S1 gene; sequencing