

文章编号: 1001-411X(2001)03-0064-03

传染性囊病病毒 VP5 及非编码区基因的序列分析

马保华, 曹永长, 吕英姿, 陈峰, 毕英佐

(华南农业大学动物科学系 基因工程实验室, 广东 广州 510642)

摘要: 以反转录—聚合酶链反应(RT-PCR)方法从传染性囊病病毒(IBDV)CJ801、LX、HK46 基因组中扩增出 VP5 及 5' 端非编码区基因序列, 然后克隆到质粒 pBsk 中, 用于序列测定和分析。报道了 IBDV CJ801、LX 毒株的 VP5 及 5' 端非编码区基因序列。结果表明: IBDV VP5 及 5' 端非编码区基因序列是高度保守的。一般毒株 VP5 由 145 个氨基酸组成, 只有 1 个亲水区。vIBDV、变异株 VP5 由 149 个氨基酸组成, 有 2 个亲水区, 这可能与毒力变化有关。

关键词: 传染性囊病病毒; VP5; 5' 端非编码区基因; 序列分析

中图分类号: S831.4

文献标识码: A

传染性囊病(infectious bursal disease, IBD)是由传染性囊病病毒(infectious bursal disease virus, IBDV)引起的一种急性、高度接触性传染病^[1]。IBDV 属禽双 RNA 病毒科(Bimaviridae)双 RNA 病毒属(*Avibirnavirus*), 其基因组由 2 个双链 RNA(dsRNA)片断组成, 分别称为 A 片断和 B 片断。A 片断长约 3 300 bp, 编码 VP2、VP3、VP4 及 VP5, 其中 VP2 和 VP3 是 IBDV 的主要结构蛋白^[1], VP5 是一个非结构蛋白^[2]。B 片断长约为 2 900 bp, 编码 VP1。近年来, 变异株和超强毒株的出现使本病出现了新的流行特点。变异株和超强毒株可突破标准株的母源抗体的保护, 给 IBD 的防治带来了困难。因此 IBDV 毒力增强的原因成为学者们研究 IBDV 的新课题。学者们对许多毒株 VP2 基因及序列进行深入的研究, 但目前的研究均不能说明病毒毒力变化的原理。随着研究的深入, 需要了解 IBDV 完整的遗传信息, 包括 VP5 及 5' 端非编码区基因序列。本研究以反转录—聚合酶链反应(RT-PCR)方法从传染性囊病病毒中扩增出 VP5 及 5' 端非编码区基因序列, 然后克隆到质粒 pBsk 中, 用于序列测定和分析。本研究报道了 IBDV CJ801、LX 毒株的 VP5 及 5' 端非编码区基因序列, 旨在探讨 IBDV 毒力变化的分子基础, 为 IBDV 毒力变异机理的研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 毒株来源

IBDV HK46 为华南农业大学动物科学系家禽研

究室分离保存的病毒株。IBDV CJ801、LX 毒株分别由北京市农林科学院畜牧兽医研究所周蛟研究员、刘爵博士惠赠。

1.2 病毒增殖、分离及提取纯化

参照文献^[4~6]的方法进行。

1.3 引物设计

参照已发表的 IBDV A 片段序列^[3~5]设计引物 A5、PII。A5 位于 IBDV A 片段 1~32 位核苷酸位置, 在 5' 端加上 *EcoR* I 位点, 序列为: ATGAATTCAGGATACGATCGTCTGACCCCGGGGAGTCA。PII 位于 IBDV A 片段 511~534 位核苷酸位置, 在 5' 端加上 *Kpn* I 位点, 序列为: TTGGTACCGTCAGTTCAGTTCAGGCTTCCTTGG。

1.4 反转录—聚合酶链反应(RT-PCR)

参照文献^[4~6]的方法进行。

1.5 基因克隆

PCR 产物经 *EcoR* I 及 *Kpn* I 双酶切。质粒 pBsk 经 *EcoR* I 及 *Kpn* I 双酶切, 同时用 CIAP 去磷酸化。使用 T4 DNA 连接酶连接 PCR 产物和质粒 pBsk, 采用 CaCl₂ 的方法转化 *E. coli* XL-1 Blue 受体菌, 然后于含氨苄青霉素的培养基上培养, 获得多个阳性菌落。取阳性菌落, 使用 PCR 检测、酶切分析和 DNA 序列测定进行鉴定。

1.6 序列测定和分析

取多个阳性菌落进行小规模培养, 抽提质粒送往宝生物工程(大连)公司测定序列。确定核酸序列后, 采用 GenBank 的 BLAST 程序, 检索与之最相近的核酸序列。由核酸序列推出蛋白质序列, 用 Tfasta 程

收稿日期: 2001-04-11

作者简介: 马保华(1975-), 男, 硕士, 现在南海出入境检验检疫局工作。

通讯作者: 曹永长(1965-), 男, 副教授, 硕士, E-mail: yccao@scau.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39870550)

序检索与之最相似的蛋白质序列. 将与 HK46、LX、CJ801 VP5 序列最相似的 IBDV 有关序列用 Pileup (Genetics Computer Group, GCG, Wisconsin, USA) 程序进行比较, 确定不同毒株的亲源关系.

2 结果

2.1 病毒基因组 dsRNA 的纯化与 RT-PCR 产物的检测

IBDV 经 40 g/L 的蔗糖介质超速离心, 蛋白酶 K 消化, 酚/氯仿/异戊醇抽提, 乙醇沉淀等操作后, 获得的 dsRNA 经电泳检测, 分别为 3.3 kb 和 2.9 kb, 与已报道的相吻合^[1]. RT-PCR 产物在 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 检测到一条约 500 bp 的 DNA 带, 与预期大小一致.

2.2 PCR 产物的克隆与鉴定

将 PCR 产物双酶切后, 插入 pBsk 质粒的 *EcoR* I 和 *Kpn*I 位点. 采用 $CaCl_2$ 的方法转化 *E. coli* 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, 获得多个阳性菌落. 以 PII 和 A5 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 500 bp 的 DNA 片段. 从小规模培养的 VP5-pBsk 阳性克隆中抽提质粒 DNA, 用 *EcoR* I 和 *Kpn* I 双酶切, 获得 2 条 DNA 片段, 长度分别为 2.9 kb 和 500 bp 左右, 分别与质粒及 VP5 基因和非编码区基因大小一致.

2.3 IBDV VP5 及非编码区 cDNA 的核酸序列

测定的 3 个毒株的相关序列如图 1. 用 Blast 程序对 CJ801、LX、HK46 的 5' 端非编码区及 VP5cDNA 序列进行检索, 发现该 3 个毒株与 GenBank 中已发表的 IBDV 相应序列比较, 同源性在 94.7% 以上.

3 讨论

3.1 IBDV 血清 I 型毒株的同源性非常高, 主要变化发生于 VP2 的高变区, 其他部分的变化较小^[6]. 本文根据已发表^[3]的 IBDV 血清 I 型毒株序列设计引物, 成功地扩增了相应片段, 报道了 CJ801、LX VP5 及 5' 端非编码区序列及推导的氨基酸序列, 说明 CJ801、LX 该部分核苷酸序列与其他 IBDV 毒株之间的差异非常小, 序列分析的结果也证实了这一点.

3.2 Muller 等^[7]发现, 高度致弱的 CuIM 株与其野毒株 Cu1 株相比, 有 2 个点突变位于 5' 端非编码区, 提示非编码区的突变可能会影响病毒的毒力. Schroder 等^[8]将 IBDV 血清 I 型毒株 A 片段 2 段非编码区与 II 型毒株相应位置互换, 构建了一个重组病毒. 通过细胞培养和接种易感鸡来鉴定重组病毒; 发现重组病毒可在细胞中繁殖, 可导致易感鸡法氏囊细胞的轻微减少. 他们认为, IBDV 非编码区与血清 I 型毒株或 II 型毒株的致病性无关. 本研究发现, 5'

CJ801 HK46 LX	GGAIACGATGGTCTGACCECGGGGGAGTCACCCGGGACAGGCTGTAA GGATACGATCGGTCTGACCCCGGGGGAGTCACCCGGGACAGGCTGACAA CGATACGATCGGTCTGACCECGGGGGAGTCAGCCGGGACAGGCTGACAA	50
CJ801 HK46 LX	GGCCTTGTTCCAGGATGGAATCTCTCTTACAACTATCATTTATGG GGCCTTGTTCCAGGATGGAATCTCTCTTACAACTATCATTTATGG GGCCTTGTTCCAGGATGGAATCTCTCTTACAACTATCATTTATGG	100
CJ801 HK46 LX	TTAGTAGAGATCAGACAAACGATCGTAGCGATGACAACTGTCAGATCA TTACTAGAGATCAGACAAACGATCGTAGCGATGACAACTGTCAGATCA TTAGTAGAGATCAGACAAACGATCGTAGCGATGACAACTGTCAGATCA	150
CJ801 HK46 LX	AACTCAACAGATTGTTCGGTTCATAGCGAGGCTCTGATGCCAAACACCG AACTCAACAGATTGTTCGGTTCATAGCGAGGCTCTGATGCCAAACACCG AACTCAACAGATTGTTCGGTTCATAGCGAGGCTCTGATGCCAAACACCG	200
CJ801 HK46 LX	GACCGGCGTCTATTCGGGACGACACCTGGAGAAGCACTCTCAGGTCA GACCGGCGTCTATTCGGGACGACACCTGGAGAAGCACTCTCAGGTCA GACCGGCGTCTATTCGGGACGACACCTGGAGAAGCACTCTCAGGTCA	250
CJ801 HK46 LX	GAGACCTCGACCTACAAATTTGACTGTGGGGAACAGGGGTCAAGGCTAAT GAGACCTCGACCTACAAATTTGACTGTGGGGAACAGGGGTCAAGGCTAAT GAGACCTCGACCTACAAATTTGACTGTGGGGAACAGGGGTCAAGGCTAAT	300
CJ801 HK46 LX	TGTCCTTTTCCCTGGATTCCTGGCTCAATTTGTTGGGTCTCTACTACAC TGTCCTTTTCCCTGGATTCCTGGCTCAATTTGTTGGGTCTCTACTACAC TGTCCTTTTCCCTGGATTCCTGGCTCAATTTGTTGGGTCTCTACTACAC	350
CJ801 HK46 LX	TGCAGAGCAATGGGAATACAACTTCATGATGATGCTCTGATGCTGCCAG TGCAGAGCAATGGGAATACAACTTCATGATGATGCTCTGATGCTGCCAG TGCAGAGCAATGGGAATACAACTTCATGATGATGCTCTGATGCTGCCAG	400
CJ801 HK46 LX	AACTCACTGGGAGTACAACTACTGACAGGCTAGTGAGTGGGATCTTAC AACTCACTGGGAGTACAACTACTGACAGGCTAGTGAGTGGGATCTTAC AACTCACTGGGAGTACAACTACTGACAGGCTAGTGAGTGGGATCTTAC	450
CJ801 HK46 LX	AGTGAAGTCAAGCACTCTCCCTGGTGGGCTTTATGCACTAAACGGCACCG AGTGAAGTCAAGCACTCTCCCTGGTGGGCTTTATGCACTAAATGGCACCG AGTGAAGTCAAGCACTCTCCCTGGTGGGCTTTATGCACTAAATGGCACCG	500
CJ801 HK46 LX	TAAACGCCGTGACCTTCAAGGAAGCCTGAGTGA TAAACGCCGTGACCTTCAAGGAAGCCTGAGTGA TAAACGCCGTGACCTTCAAGGAAGCCTGAGTGA	534

图 1 IBDV 标准 I 型株 CJ801、超强毒株 HK46 和 LX 的 VP5(97~534)及 5' 端非编码区(1~130) cDNA 序列

Fig. 1 Nucleotide sequences of 5' end non-coding region(1~130) and VP5(97~534) cDNA of infectious bursal disease virus classical type 1 strain CJ801, very virulent strain HK46 and LX

端非编码区是高度保守的, 尤其是 5' 端 32 个碱基, 基本未发生任何变化, 这与 Mundt 等^[3]的结论一致. 既然不同毒株的 32 bp 都是一样的, 而不同毒株的毒力或多或少存在差异, 说明虽然 A 和 B 片段 5' 末端开头 32 bp 包含了 IBDV 的主要启动元件, 与 IBDV 基因组复制和表达有关^[9], 但这 32 bp 可能与病毒的致病性无关, 这在一定程度上支持了 Schroder 等^[8]的结论.

3.3 VP5 是 A 片段的第二个小开放阅读框架 (open reading frame, ORF)(ORF-A2)编码的非结构蛋白(NS 蛋白)^[2]; VP5 不存在于病毒粒子中, 只在 IBDV 感染的细胞或鸡法氏囊中检测到^[10]. VP5 的功能尚不清楚. 研究表明, VP5 不参与培养细胞中 IBDV 的复制过程^[11]. IBDV 的 VP5 蛋白是强碱性的, 富含胱氨酸, 在所有血清 I 型 IBDV 株中是高度保守的(一致性超过 95%). 而血清 II 型 IBDV NS 蛋白序列一致性为 73%^[12]. 本研究发现, 不同血清 I 型毒株 VP5 cDNA 差异在 97.3% 至 100% 之间, 这与 Yao 等^[12]的

结论相符.

将不同类型毒株进行比较分析,发现各毒株 VP5 氨基酸的差异在 5 至 8 个之间. 分析中发现:一般毒株 VP5 只有 1 个亲水区;而超强毒株 HK46、LX、UK661 及变异株 GLS 有 2 个亲水区,这是由于 VP5 氨基酸数较多,比其他毒株多 4 个氨基酸. 这几个氨基酸形成 1 个亲水区,使所在区域的亲水性增加,疏水性降低,这些变化引起抗原型的变化,导致抗原决定簇空间结构发生细微变化,可使病毒的毒力改变.

参考文献:

[1] LUKERT P D, SAIF Y M. Infectious bursal disease[A]. CALNEK B W. Disease of poultry, 10th[C]. Ames: Iowa State University Press, 1997. 721—738.

[2] MUNDT E, BEYER J, MULLER H. Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virus-infected cells [J]. J Gen Virol, 1995, 76: 437—443.

[3] MUNDT E, BEYER J, MULLER H. Complete nucleotide sequence of 5' -and 3' -noding regions of both segments of different strains of infectious bursal disease virus[J]. Virol, 1995, 209(1): 10—18.

[4] 曹永长, 毕英佐, 梁志清, 等. 传染性囊病 CJ801 VP2 基因 cDNA 的序列分析[J]. 华南农业大学学报, 1997, 18 (增刊): 65—72.

[5] 曹永长, 刘 爵, 刘有昌, 等. 鸡传染性法氏囊病病毒完整基因组的克隆与鉴定[J]. 中国兽医杂志, 1999, 25 (8): 3—6.

[6] CAO Y C, YEUNG W S, LAW M, et al. Molecular characterization of seven Chinese isolates of infectious bursal disease virus: classical, very virulent, and variant strains[J]. Avian Disease, 1998, 42: 340—351.

[7] MULLER H, SCHNITZLER D, BERNSTEIN F, et al. Infectious bursal disease virus of poultry: antigenic structure of the virus and the control[J]. Vet Microbiol, 1992, 33: 175—183.

[8] SCHRODER A, van LOON A A, GOOVAERTS D, et al. Chimeras in noncoding regions between serotype I and II of segment A of infectious bursal disease virus are viable and show pathogenic phenotype in chickens[J]. J Gen Virol, 2000, 81(2): 533—540.

[9] NAGARAJAN M M, KIBENGE F S B. The 5'-terminal 32 base pairs conserved between genome segments A and B contain a major promoter element of infectious bursal disease virus [J]. Arch Virol, 1997, 142: 2 499—2 514.

[10] BOTTCHEER B, KISELEV N A, STEL MASHCHUK V Y, et al. Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy[J]. J Virol, 1997, 71(1): 325—330.

[11] MUNDT E, KOLLNER B, KRETZSCHMAR D, et al. VP5 of infectious bursal disease virus is not essential for viral replication in cell culture[J]. J Virol, 1997, 71(7): 6 973—6 983.

[12] YAO K, GOODWIN M A, VAKHARIA V. Generation of a mutant infectious bursal disease virus that does not cause bursal lesions[J]. J Virol, 1998, 4: 2 647—2 654.

Sequence Analysis of cDNA of the Gene Coding for VP5 and Noncoding Regions of Infectious Bursal Disease Virus

MA Bao-hua, CAO Yong-chang, Lü Ying-zi, CHEN Feng, BI Ying-zuo
(Dept. of Animal Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract:A cDNA fragment coding for VP5 and noncoding regions of three strains of IBDV were amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) from the genomic dsRNA of CJ801, LX, HK46 respectively. The amplified cDNAs of three strains were cloned into the plasmid pBssk to generate recombinant plasmids, and to be used for sequencing. This experiment is the report about the sequence of VP5 and noncoding regions of CJ801 and LX. The VP5 of most strains consist of 145 AA and has only one hydrophilic region, whereas the VP5 of vvIBDV and variant strains consist of 149 AA and has two hydrophilic regions, which may contribute to virulence variation.

Key words: infectious bursal disease virus; VP5; 5' end noncoding region sequence; sequence analysis

【责任编辑 柴 焰】