

92,7(3)  
241-245

8415(1)

第7卷第3期  
1992年9月

中国病毒学  
VIROLOGICA SINICA

Vol.7 No.3  
Sep. 1992

## 传染性法氏囊病病毒分子生物学研究进展

陈士友

张兹钧

(南京农业大学兽医系, 南京 210014)

(珠海动植物检疫局, 珠海 519020)

5852.65

### Advances in Molecular Biology of Infectious Bursal Disease Virus

Chen Shi-you

Zhang Zi-jun

(Department of Veterinary Science, Nanjing  
Agriculture University, Nanjing 210014)

(Zhuhai Animal & Plant Quarantine  
Bureau 519020)

关键词: 传染性法氏囊病病毒 分子生物学

法氏囊病病毒

Key words: Infectious bursal disease virus

Molecular biology

传染性法氏囊病病毒 (Infectious bursal disease virus, IBDV) 是引起鸡的最严重的传染病之一, 给养鸡业造成了巨大的经济损失, 其危害除了直接引起临床症状外, 更为重要的是破坏机体的免疫器官, 主要是破坏 B 淋巴细胞前体, 引起严重的免疫抑制, 使鸡对其他病原的免疫力丧失, 结果导致死亡。

IBDV 最初被认为是呼肠孤病毒科的成员, 主要是因为其在鸡胚肾细胞上培养出现的细胞病变和对某些理化因素的抵抗力以及电镜下的形态同呼肠孤病毒 (REOV) 相似。但后来发现 IBDV 与已知的禽 REOV 在结构和生物学特性上并无多少相似之处, 并且发现它与其它许多 RNA 病毒也有很大不同<sup>[1]</sup>。IBDV 的结构特点与鱼的传染性膜坏死病毒 (IPNV)、软体动物的 Tellina 病毒和牡蛎病毒以及果蝇的 X 病毒很相似, 它们的基因组均由两个节段的双链 RNA 组成, 因而将它们合在一起组成一个新的病毒科——双 RNA 病毒科 (Birnaviridae)<sup>[1]</sup>。

IBDV 无囊膜, 为二十面体对称结构, 大小 60nm。核衣壳内的核酸为双链双节段 RNA (dsRNA), 其沉降系数为 165, 浮密度 1.62g/ml, G : C ≈ 1, G + C 约占 55.3%, 核酸熔点为 95.5°C, dsRNA 两个片段 (A、B) 的分子量分别为 2.5 × 10<sup>6</sup> 和 2.2 × 10<sup>6</sup> 道尔顿<sup>[2]</sup>。

近几年来 IBDV 分子生物学方面的研究进展很快, 特别在基因组结构, 病毒蛋白的结构与功能及 IBDV 基因工程等方面作了大量的工作, 本文将这些进展作一概述。

本文于 1991 年 8 月 19 日收到, 10 月 8 日修回。

本文承蒙蔡宝祥教授和金由辛副研究员审阅, 深表感谢。

## 一、病毒基因组结构<sup>[4-7]</sup>

IBDV 是双链 RNA 病毒科中最先被测定核苷酸序列的病毒,基因组的两个片段中, A 片段含 3300—3400 个碱基对 (bp), B 片段则由 2800—2900bp 组成。

**A 片段:** IBDV A 片段正链主要包括一个大的连续的开放式阅读框 (ORF), 其中含有 3036 个 bp (各毒株略有不同), 编码分子量约 110K 由 1012 个氨基酸组成的前体融合蛋白, 融合蛋白的顺序为 NH<sub>2</sub>-VP<sub>2</sub>-VP<sub>1</sub>-VP<sub>3</sub>-COOH, 大 ORF 的启动子为 AUG。除此启动子外, 在大 ORF 上游非编码区内还有两个潜在的启动子, 其中之一启动一个编码 12 个氨基酸的小 ORF, 另一启动子则开始一个可编码 17K 蛋白质并与大 ORF 相互重叠的 ORF, 此 ORF 5' 端非编码区没有脊椎动物 mRNA 翻译起始部位所共有的保守序列 (Kozak 一致顺序)<sup>[8]</sup>, 所以它不能表达蛋白。这种编码两种蛋白而又相互重叠的 ORF 结构在 REOV 的一个片段中也曾发现, 推测这些小的 ORF 修饰了融合蛋白 ORF 的翻译。有一个明显的特点是这两个小 ORF 的位置相当保守, 说明它们及其产物在病毒的生活周期中起着一定的作用, 尽管这些产物在病毒感染的细胞中没有被发现。不同 IBDV 毒株大 ORF 的终止密码子不完全相同, 如 STC-IBDV 的终止密码子是 UGA, 而 002-73-IBDV 则为 UAA。

在融合蛋白 ORF 的 5' 端和 3' 端均有非编码区, 与其他双链 RNA 病毒如 REOV、蓝舌病病毒和轮状病毒等相比, IBDV A 片段 5' 端非编码区较长, 为 132 个 bp。在由 130 个 bp (包括终止密码子) 构成的 3' 端非编码区内有一反向互补重复序列, 该序列可维持一个发夹构象。

核苷酸序列比较分析发现, IBDV dsRNA A 片段中, 92% 以上的序列是保守的, 而且从地理位置相近的地方分离出的毒株比相距较远的毒株的核酸序列具有更大的保守性。将 IBDV 与同属的另一种病毒即 IPNV 比较发现它们的 A 片段只有 55% 相同, 且相似区域多分布在 5' 端, 而在 VP<sub>1</sub> 编码区几乎没有相同的序列 (已知 VP<sub>1</sub> 与前体融合蛋白的加工有关), 这种情况出现在同属病毒中是不可思议的。另一值得注意的问题是, IBDV 与 IPNV 的非编码区序列完全不同, 这在基因组的构成和功能都相同的同属病毒中是少见的。在其他 RNA 病毒如布尼亚病毒科、呼肠孤病毒科及微核糖核酸病毒科中, 同属病毒基因组的编码区结构很少相同, 但非编码区的序列则是很保守的, 因为非编码区一般与病毒的转录、翻译、复制和装配等过程有关, 而在双股双节段核糖核酸病毒科中出现特殊情况, 可能的解释是在双股双节段核糖核酸病毒科中存在两个或更多的属, 而 IBDV 和 IPNV 则应划分在不同的属里, 当然这只是一种推测。

**B 片段:** B 片段含有 2800—2900 个 bp, 主要包括一个连续的开放阅读框 (ORF), 在 ORF 内有一个精确的 Kozak 的一致顺序, Kozak 顺序始于 ORF 的 -5 位, 是翻译的起点。B 片段 ORF 翻译出一个由 878 个氨基酸组成的多肽, 其分子量约为 97KD。

## 二、病毒蛋白的结构与功能

### 1. 病毒蛋白的结构<sup>[4-7,9]</sup>

IBDV dsRNA 基因组共编码 4 种蛋白, 其中 A 片段编码 VP<sub>2</sub>、VP<sub>1</sub>、VP<sub>3</sub> 三种蛋

白, B 片段编码  $VP_1$ , 其分子量分别是  $VP_2: 37K-40K$ ,  $VP_3: 32K-35K$ ,  $VP_4: 24-29K$ ,  $VP_5: 90-97K$ 。 $VP_2$ 、 $VP_3$  和  $VP_4$  是先被 A 片段的大 ORF 编码成分子量为 110K 的前体融合蛋白, 即  $N-VP_2-VP_3-VP_4-C$ , 在病毒成熟过程中被加工成  $VP_2$ 、 $VP_3$  和  $VP_4$ 。在融合蛋白中从第 8 个氨基酸到 498 位属  $VP_2$ , 从 776 位至 997 位属  $VP_3$ , 中间是  $VP_4$  区。IBDV 各种蛋白在成熟过程中均未被糖基化。

IBDV 各毒株的病毒蛋白结构相当保守, 在氨基酸顺序上只有 0.5—2.7% 的不同, 而这些不同的 50% 集中在  $VP_2$  区的 239 位至 332 位氨基酸之间, 这段区域只占 ORF 的 9%。而 ORF 的中心区域即 333 位至 676 位间的氨基酸顺序则是完全保守的, 这段区域的大部分属  $VP_4$ 。其余的不同序列主要散布在 ORF 编码区的右手末端即氨基酸序列的 677—992 位之间 (多属  $VP_3$  区)。

$VP_2$  有一可变区, 如前所述, 病毒蛋白氨基酸非保守序列的 50% 分布在此区内, 而且可变区占据了大部分的构象依赖区 (206—350 位), 这一段区域也是病毒的主要中和性抗原位点。在构象依赖区有两个亲水性位点, 一个在 212—224 位之间, 另一个在 314—324 位, 如果这两个位点缺失, 则单克隆抗体 (McAb) 不能与  $VP_2$  结合。尽管此区的氨基酸经常发生变化, 但亲水性位点在一定范围内却是保守的, 因为针对几个不同 IBDV 毒株的 McAb 均可与一个毒株的亲水位点结合。

$VP_4$  分子 N 端序列完全保守, 说明这部分氨基酸是  $VP_4$  发挥作用所必需的, 其依据是 N 端的缺失将导致融合蛋白加工过程的抑制。在  $VP_4$  区存在两个双碱性氨基酸位点, 它们在 451—452 位 (两个精氨酸) 和 721—722 位 (赖氨酸和精氨酸)。融合蛋白的裂解常发生在双碱性氨基酸处, 而 451—452 和 721—722 又正处于  $VP_2-VP_3$  和  $VP_3-VP_4$  的连接部位, 在这两点水解可产生预期的蛋白质。若将这两个位点换成非碱性氨基酸, 则不能产生预期的蛋白质, 所以这两个双碱性氨基酸所在部位即使不是切割位点, 那也至少是加工作用不可缺少的结构。另外在  $VP_4$  区内的 483—503 位之间三次重复出现 A-X-A-A-S 序列, 在 752—756 间也出现一次, 这种序列正好也处在  $VP_2-VP_3$  及  $VP_3-VP_4$  的连接处, 因此也可能与融合蛋白的加工有关, 但还没有证据证明这一点。

$VP_5$  的 C 端有许多散在分布的脯氨酸, 从而形成一个碱性区, 该区域可与核酸发生相互连结, 使  $VP_5$  参与病毒的包装和稳定 RNA 基因组。 $VP_5$  的许多区段具有亲水性, 这些区域在与抗体反应时发挥作用。

$VP_5$  的氨基酸序列 C 末端同  $VP_2$  一样也有一个高度碱性区域, 具体位置是在最后的 20 个氨基酸中, 这个区域可与病毒核酸结合。

## 2. 病毒蛋白的功能

$VP_2$  和  $VP_3$  是病毒的主要结构蛋白, 共同构成病毒核衣壳。其中  $VP_2$  含有型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被动地保护宿主不受 IBDV 的感染,  $VP_2$  是主要的宿主保护性免疫原。 $VP_3$  含有群特异性的抗原决定簇, 其诱导的抗体只有很微弱的病毒中和能力。用病毒免疫机体后最早出现的血清抗体是针对  $VP_3$  的。另外,  $VP_3$  可与 RNA 连结从而具有稳定病毒 RNA 的作用<sup>[11]</sup>。

$VP_4$  是一个具有酶活性的蛋白质, 它在病毒蛋白的成熟过程中起着重要的作用, 被认为是一个蛋白水解酶, 能将  $NH_2-VP_2-VP_3-COOH$  水解从而释放出成熟的  $VP_2$  和  $VP_3$ 。

VP<sub>1</sub>与其他已知病毒蛋白酶没有多少相似之处,所以它可能是双RNA病毒科中特有的一种新型蛋白酶。在双RNA病毒科中,VP<sub>1</sub>产物的结构和功能以及对融合蛋白的加工过程是各不相同的<sup>[11]</sup>。

VP<sub>1</sub>是病毒RNA聚合酶,它与病毒RNA的复制有关,而且VP<sub>1</sub>还具有鸟苷酸转移酶和甲基转移酶的活性<sup>[12]</sup>。VP<sub>1</sub>还能通过与病毒基因组末端紧密结合而使其环化<sup>[13]</sup>。由于VP<sub>1</sub>序列与其他单链RNA依赖的RNA聚合酶没有相同之处,因此,由IBDV编码的双链RNA聚合酶代表了一种新类型的聚合酶,这种聚合酶催化双链RNA基因组的复制。

### 三、遗传变异

IBDV基因组的非编码区以及VP<sub>1</sub>编码区等部位是相当保守的,病毒蛋白的绝大部分序列能在各毒株间稳定遗传。经常发生变异的部位主要在VP<sub>2</sub>的可变区,该区域的变化构成了抗原漂移的主要原因。Snyder等(1988)用抗原捕获ELISA(Antigen-capture-ELISA)研究了IBDV的抗原变异,发现两株中和性McAb R63和B69中只有R63既可与古典或较早分离的毒株起反应,也可与新分离的毒株反应,而B69则只能与古典毒株反应,说明新分离毒株的B69中和抗原位点已经改变或丢失<sup>[14]</sup>。1990年他们利用9株McAb(其中7株具有中和性)进一步对IBDV的抗原漂移进行了研究,发现在美国特玛瓦半岛,变异株占有IBDV分离株的96%,在东南部变异株占70%,西部和西北部则只有3%,而且大部分变异株也发生了致病类型的变化<sup>[15]</sup>。抗原漂移的发生可以解释为什么IBDV疫苗免疫后仍然发生法氏囊病且导致较高死亡率的现象。

### 四、IBDV的基因工程

IBDV基因克隆的工作最早是从1984年开始的,澳大利亚学者Azad等首先将IBDV 002-73株的基因克隆在质粒pBR322中并建成了IBDV基因组的第一个cDNA基因文库<sup>[16]</sup>。随后,美国<sup>[17]</sup>、英国也相继在IBDV基因工程方面做了许多工作,先后构建了STC株、52/70株、PBG98株、Cul株的cDNA重组质粒,得到了工程菌并进而建立了这些毒株的cDNA基因文库。在此基础上,IBDV分子生物学的研究得以开展,正如前文所述已经取得了很大的进展。

在构建IBDV基因组cDNA文库的基础上,Azad等又将文库中的cDNA片段克隆到表达载体pUR290、291、292中进行表达,筛选出了表达VP<sub>1</sub>的工程菌D<sub>1</sub>和D<sub>2</sub>两个克隆,其中D<sub>1</sub>能编码VP<sub>1</sub>的50%,而D<sub>2</sub>则能表达VP<sub>1</sub>的全部蛋白。将表达的融合蛋白免疫鸡后均能产生与VP<sub>1</sub>发生特异性反应的抗体,但这些抗体与完整病毒的反应能力很差<sup>[18]</sup>。随后他们又通过缺失表达确定了VP<sub>2</sub>中和性抗原决定簇的编码区是AclI-SpeI两个酶切位点之间的一段核苷酸序列,其编码的145个氨基酸的多肽与中和性单抗的反应性很强,因而这一序列就成为研制IBDV基因工程苗的目的基因<sup>[19]</sup>。

### 五、展 望

虽然IBDV的分子生物学研究取得了可喜的进展,但仍有许多待解决的问题,如

IBDV RNA 是如何复制的? Morgan等(1988)认为双股双节段核糖核酸病毒科 RNA的复制模式是半保留复制,但没有得到确实的证据。病毒核酸与病毒蛋白如何连结在一起并装配成完整的病毒也是一个有必要探讨的问题,这个问题的解决可使我们了解 IBDV 的增殖动力学。另外,决定 IBDV 病原性强弱的基因在基因组的哪个部位以及病毒抗原变异的问题仍然困扰着我们。Muller(1988)认为决定致病力的基因在 IBDV dsRNA 的 B 片段,但具体在什么部位及其组成均没有弄清楚;抗原变异主要发生在 A 片段 VP<sub>1</sub>可变区,但变异发生的机理却不得而知。以上这些问题(以及另外一些问题)的解决必将能使我们对 IBDV 有一个全面而清晰的认识,从而为有效地控制由 IBDV 引起的传染病提供可靠的理论依据。

### 参 考 文 献

- [1] J.O.A.Okoye et al., 1984, *Veterinary Bulletin*, 54(6): 425—436.
- [2] DOSO P. et al., 1979, *J.Virol.*, 32: 593—605.
- [3] Müller H. et al., 1979, *J.Virol.*, 31: 584—589.
- [4] Peter J.Hudson et al., 1986, *Nucleic Acids Research*, 14: 5001—5012.
- [5] Morgan M.M. et al., 1988, *Virology*, 163: 240—242.
- [6] Frederick S.B. et al., 1990, *J.Gen.Virol.*, 71: 569—577.
- [7] Bayliss C.D. et al., 1990, *J.Gen.Virol.*, 71: 1303—1312.
- [8] Kozak M., 1987, *Nucleic Acids Research*, 15: 8125—8130.
- [9] Müller H. & Becht H., 1982, *J.Virol.*, 44: 384—392.
- [10] Becht H., 1988, *J.Gen.Virol.*, 69: 631—640.
- [11] Jagadish M.N., 1988, *J.Virol.*, 62: 1084—1087.
- [12] Spina u. and Müller H., 1990, *J.Gen.Virol.*, 71: 977—981.
- [13] Müller H. et al., 1987, *Virology*, 159: 174—177.
- [14] Snyder D.B. et al., 1988, *Avian Disease*, 32: 535—539.
- [15] Snyder D.B., 1990, *Avian Pathology*, 19: 419—423.
- [16] Azad A.A. et al., 1984, *Virology*, 143: 35—44.
- [17] Jackwood D.J. et al., 1990, *Avian Disease*, 34: 129—136.
- [18] Azad A.A. et al., 1986, *Virology*, 149: 190—198.
- [19] Azad A.A. et al., 1987, *Virology*, 161: 145—152.