

## 特超强毒型马立克病病毒囊膜糖蛋白 I 基因序列 及与其它致病型毒株的比较\*

崔治中\*\*, 何良梅

(扬州大学畜牧兽医学院兽医系, 扬州 225009)

S852.65  
Q78

**摘要:** 特超强毒型 648A 株马立克病病毒(MDV)的囊膜糖蛋白 I(gI)基因经 PCR 扩增后克隆进 pUC18 质粒载体, 并对其 ORF 完成了 DNA 测序。与已发表的其它致病型毒株的糖蛋白 I 的 DNA 和氨基酸序列比较表明, 648A 株的 gI 基因序列与超强毒 RBIB 株已发表的 ORF 5'端 761 个碱基完全相同。但是在该基因中完整 ORF 的 1068 个碱基中, 648A 株与强毒 GA 株间有 8 个碱基变异并导致 7 个氨基酸的变化, 且这一变化主要发生在该基因的 5'端, 其 3'端三分之一完全相同。

**关键词:** 马立克病病毒; 糖蛋白 I 基因; 序列比较

特超强毒株, 基因序列

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2000)02-0180-08

30 年来, 随着抗马立克病(MD)疫苗的广泛应用和不断改进, 在鸡群中流行的马立克病病毒(MDV)的毒力或致病性也在不断演化中。从 60 年代前流行毒株以弱毒(mMDV)为主, 逐渐产生了强毒株(vMDV)、超强毒株(vvMDV)和特超强毒株(vv<sup>+</sup>MDV)<sup>[1,2]</sup>。针对不同致病型毒株流行的鸡群应该选用的疫苗种类也不一样。为了鉴别不同的致病型毒株, 目前还没有找到一种体外试验方法。

迄今为止, MDV 的 8 个囊膜糖蛋白基因均已克隆和测序, 但只在糖蛋白 B 基因(gB)才对不同致病型毒株进行了 MDA 序列比较。结果发现, 该基因的 DNA 和氨基酸序列非常保守, 几个 mMDV、vMDV 和 vvMDV 株的序列几乎完全一致(Ross *et al.*, 1989<sup>[3]</sup>; Lee *et al.*, 个人通讯); Heine *et al.*, 1997<sup>[4]</sup>; 彭大新等, 待发表资料)。鉴于 vMDV 的 GA 株糖蛋白 I 基因(gI)全序列和 vvMDV 的 RBIB 株 gI 的部分序列已发表<sup>[5,6]</sup>, 且已显出一些株间差异, 本研究试图扩增和克隆 vv<sup>+</sup>MDV 的 648A 株<sup>[2]</sup>的 gI 基因, 进而比较分析分属 vMDV、vvMDV、vv<sup>+</sup>MDV 不同致病型的 GA、RBIB 和 648A 三株 MDVgI 基因的 DNA 和氨基酸序列, 以探索从分子水平来区别不同致病型毒株的可能性。

## 1 材料和方法

### 1.1 特超强毒 MDV 株

648A 株是迄今已发表的特超强毒 MDV(vv<sup>+</sup>MDV)中毒力最强的一株病毒<sup>[2]</sup>, 从 648A 感染的鸡胚成纤

收稿日期: 1999-03-01, 修回日期: 1999-05-04

\* 基金项目: 国家“863”项目及国家自然科学基金资助项目的一部分

\*\* 作者简介: 崔治中(1944 年-), 男, 江苏江阴市人, 博士、教授。主要研究方向为兽医微生物学和动物病毒分子生物学。  
现在地址: 山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018

维细胞(CEF)提取的基因组 DNA 由美国农业部禽病和肿瘤学研究所提供。

### 1.2 糖蛋白 I 基因的 PCR 扩增克隆和定序

1.2.1 PCR 引物 为了从 648A 株病毒基因组 DNA 中扩增 gI 基因, 根据已发表的强毒型 GA 株 gI 基因序列<sup>[6]</sup>, 设计并合成了一对引物: 5'-CGATCTAGATAGACGGCGTGTGTGA(相当于 gI 的 ORF 上游的 -24 至 -7 并加入一个 XbaI 酶切位点)和 5'-CTAACAGGTACCACCTACC(相当于 ORF 的 +1105 至此 +1088, 其中已含一个 KpnI 酶切位点)。

1.2.2 PCR 扩增按常规方法进行, 程序为: 在 95 ℃ 变性 5 min 后, 按 95 ℃ (1 min)、52 ℃ (2 min) 和 72 ℃ (2 min) 做 35 个循环, 最后在 72 ℃ 下 5 min 结束。PCR 扩增产物在经酒精沉淀后再溶于少量 TE 缓冲液(0.01 mol/L Tris, 0.001 mol/L EDTA, pH8.0)中。

1.2.3 分别将 PCR 产物和 pUC18 质粒 DNA 经 XbaI 和 KpnI 双酶消化后作琼脂糖凝胶电泳后, 从凝胶上切下相应大小的 DNA 条带, 用 QIAGEN 公司的试剂盒从凝胶中回收相应条带的 DNA。将经 XbaI 和 KpnI 双酶切的 PCR 产物及 pUC18 质粒 DNA 用连接酶连接后转化 TG1 株大肠杆菌。将转化菌接种在含 ampicillin 的 LB 琼脂平板上于 37 ℃ 培养, 分别取白色菌落在 LB 培养液中扩大培养后按常规方法提取质粒 DNA, 再用 XbaI 和 KpnI 双酶切后作琼脂糖凝胶电泳, 根据插入 DNA 片段的大小来筛选阳性重组质粒。

1.2.4 DNA 测序, 委托中国科学院上海植物生理所用 DNA 自动测序仪完成。

### 1.3 蛋白质构象的比较分析

用 SEQAID 程序, 对 648A 和 GA 二株病毒在 gI 蛋白质可能的亲水疏水性和二级结构的一些特性方面分别一一做对应比较。

## 2 结果

### 2.1 MDV 的三个不同致病型毒株的囊膜糖蛋白 I 基因 DNA 序列比较

图 1 列出了特超强毒型 648A 株 MDV 的囊膜糖蛋白 I 基因 ORF 的 DNA 序列, 文献中已发表的超强毒型 RB1B 株及强毒型 GA 株的序列也排列在一起作比较。图 1 可见, 648A 株(vv+MDV)gI 的 ORF 在 DNA 序列上有 8 个碱基不同于 GA 株(vMDV), 且都发生在 5' 端, 而 3' 端的三分之一完全相同。然而已完成并发表的 RB1B(vvMDV)5' 端的 761 个碱基则与 648A 株完全相同。

### 2.2 MDV 的三个不同致病型毒株的囊膜糖蛋白氨基酸序列比较

由三个毒株 gI 基因的 DNA 序列推测出的氨基酸序列见图 2, 在 648A 株与 GA 株间 DNA 序列上的 8 个碱基变化, 有 7 个是有义变异, 导致了相应 7 个氨基酸组成的变化, 另一个碱基突变(在第 552 碱基)为无义突变。

### 2.3 GA 株和 648A 株 gI 蛋白质的亲水性、疏水性比较

用 SEQAID 程序对二个毒株的 gI 蛋白的亲疏水性比较表明, 虽然每一个氨基酸变化都影响相应位点的亲疏水性, 但以 ORF 的第 176 个氨基酸的变化的影响最大。如图 3 所示, 在该位点, 从 648A 株的疏水性亮氨酸(L)变为 GA 株的亲水性的组氨酸(H)后, 使相邻的 170~176 aa 区由疏水性变为亲水性。

### 2.4 GA 株和 648A 株 gI 蛋白质二级结构相关特性的比较

不同毒株 gI 蛋白质上一些氨基酸的变化, 也可能导致与蛋白质二级结构相关特性的变化, 如  $\alpha$ -螺旋(helix)或  $\beta$ -平板(sheet)及肽链折转(turn)或随机绕缠(random coil)等。由图 4 可见, 在 GA 株和 648A 株间, 由于在 112 和 155 位的氨基酸的变异(分别从 G 变为 D 和从 V 变为 A), 可能导致在相应区域的肽链折转位点的移动和由  $\beta$ -平板结构变为  $\alpha$ -螺旋结构(下双划线区)。



图 1 强毒超强毒和特超强毒株 MDV 的囊膜糖蛋白 I 基因 ORF 的 DNA 序列同源性比较。“-”表示同样碱基, GA 和 RB1B 株序列来自 Brunovskis(1994)和 Ross(1991),但发表资料中 RB1B 株的序列没有全部完成。

Fig. 1 Comparing the DNA sequences in ORF of glycoprotein I genes from vMDV, vvMDV and vv<sup>+</sup>MDV. “-” indicates the identical bases. Data of GA and RB1B strains are from published date (Brunovskis *et al.*, 1994; Ross *et al.*, 1991), but the sequence of RB1B was not completed.

|      |  |     |
|------|--|-----|
| 648A | MYLLQLLFWIRLFRGIWSIVYTGTSVTLSTDQSALVAFCGLDKMNVNRGQ | 50  |
| RB1B | -----  |     |
| GA   | -V-----R-----                                      |     |
| 648A | LLFLGDQTRTSSYTGTTEILKWDEEYKCYSVLHATSYMDCPAIDATVFRG | 100 |
| RB1B | -----  |     |
| GA   | -----  |     |
| 648A | CRDAVVYAQPHDRVQPFPEKGTLLRIVEPRVSDTGSYYIRVALAGRMSD  | 150 |
| RB1B | -----  |     |
| GA   | -----G-----S-----                                  |     |
| 648A | IFRMAVIRSSKSWACNHSASSFQALKCIRYVDRMAFENYLIGHVGNLLD  | 200 |
| RB1B | -----  |     |
| GA   | ---V-----H-----                                    |     |
| 648A | SDSELHAIYNITPQSISTDINIITPPFYDNSGTIYSPTVFNLFNNNSHYD | 250 |
| RB1B | -----  |     |
| GA   | -----V-----  |     |
| 648A | AMNSTGMWNTVLKYTLPRLIYPSTMIVLCIIALAIYLVCCRCRSPHRRY  | 300 |
| RB1B | ---  |     |
| GA   | -----  |     |
| 648A | IGEPSDEAPLITSAVNESFQYDYNKETPSDVIKELMEKLEKLVELLE    | 350 |
| GA   | -----  |     |
| 648A | REECV*355  |     |
| GA   | -----  |     |

图 2 强毒(GA)超强毒(RB1B)和特超强毒(648A)株 MDV 囊膜糖蛋白 I 氨基酸序列比较  
图中“-”表示相同。RB1B 株的序列原发表资料没有全部完成。

Fig. 2 Comparing amino acid sequences of glycoprotein I from MDV strains GA (vMDV), RB1B (vvMDV) and 648A (vv<sup>+</sup>MDV).

“-” indicates the identical amino acid, the sequence of RB1B was not finished in the published data.

### 3 讨论

根据 HVT 单价苗或 HVT 和 SB1 双价苗免疫的鸡群中用特定 MDV 毒株人工攻毒后 MD 的发病率,可以确定不同野毒株的毒力指数(virulent index),不同毒力的 MDV 野毒株可区分为 mMDV、vMDV、vvMDV 和 vv + MDV<sup>[2]</sup>。以 JM 株和 Md5 株分别作为 vMDV 和 vvMDV 的参考株原型,如果在非免疫鸡群,其毒力指数小于 JM 株,则属于 mMDV。HVT 疫苗免疫鸡群,其毒力指数等于 JM 则属 vMDV,大于 JM 株属 vvMDV;HVT 和 SB1 二价苗免疫的鸡群,其毒力指数等于 Md5 株则属 vvMDV,大于 Md5 属 vv + MDV<sup>[2]</sup>。这些研究结果还证明,单用 HVT 疫苗只能预防 vMDV 型毒株感染,采用 HVT 和 SB1 二价苗只能预防毒力指数低于 vvMDV 型毒株感染,只有 I 型的 CVI988/Rispens 株疫苗才能有效预防绝大多数流行毒株、包括 vv + MDV 型毒株感染。然而,如果盲目地普遍应用 CVI988/Rispens 株疫苗,不仅会提高

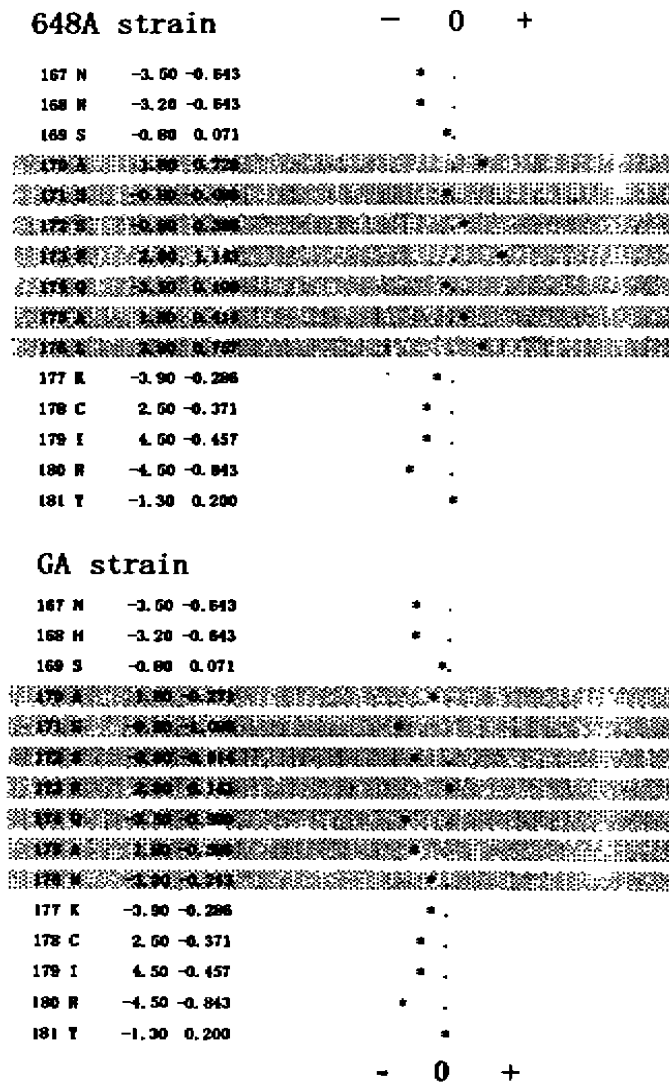


图 3 648 株(上)和 GA 株(下)糖蛋白 I 第 167-181 氨基酸间的亲(0 线左侧)疏(0 线右侧)水性比较, 阴影区为由第 176 氨基酸突变引起的显著不同区。

图中 2 列数字中, 左列代表各氨基酸单独的疏水性数值(负数表示亲水)。右列代表与相邻 6 个氨基酸相互作用下疏水性数值的均数。

Fig. 3 Comparison of hydrophobicity in the region of 167 th-181 th aa of gI between strains 648 A and GA. The shaded area indicates the area with difference.

生产成本,而且有可能在鸡群中造成一种疫苗选择性压力,加速更强毒株的出现,这从流行病学角度考虑也是不可取的。因此,最理想的是根据不同地区和鸡群流行毒株的毒力指数或致病型选用相应种类的疫苗。但是,按上述动物试验的方法来确定一个毒株的致病型需要大量的 SPF 鸡,还需在隔离条件下饲养 3 个月。这不仅成本高,而且经常需要 4~5 个月才会有结

SEQAID II- G.O.R. PREDICTION OF PROTEIN CONFORMATION  
 FOR 648A and GA gI.PEP date: 02-14-1999  
 H=alpha Helix, E=beta sheet (Extended), T=Turn, C=random Coil  
 Decision constants: alpha:-100; beta:-87; turn:0; coil:0

```

VLHATSYMDCPAIDATVFRGCRDAVVYAQP HDRVQPFPEKGTLLRIVEPR 648A
EEEEEEECCHHHHEEETHHHHEEECCCTCCCCCTTTHEEEEEEE
N-端 81- * 130
VLHATSYMDCPAIDATVFRGCRDAVVYAQP HGRVQPFPEKGTLLRIVEPR GA
EEEEEEECCHHHHEEETHHHHEEECTCCCECCCCCTTTHEEEEEEE

VSDTGSYYIRVALAGRNMSDIFRMAVI IRSSKSWACNHSASSFOALKCIR 648A
EETTTEEEEEHHHHHHHHHHHHHHHHHHHTEHHHHHHHHHHHHHHHH
N-端 131- * * * 180
VSDTGSYYIRVSLAGRNMSDIFRMVVI IRSSKSWACNHSASSFOAHKCIR GA
EETTTEEEEEHHHHHHHHHHHEHEEEEEHHTEHHHHHHHHHHHHHHHH

```

图 4 648 A 和 GA 株 gI 蛋白质二级结构特性的比较

图中仅显示第 81-180 aa 区,“\*”表示二病毒株在该位点的氨基酸不同。648 A 和 GA 株的多肽链下的符号表示二级结构的特性,其中“H”“E”“T”“C”的含义见本图顶端第 3 行,下划双线区表示二株病毒在二级结构上不同的区域。

Fig. 4 Comparison of 648 A and GA strains for their gI protein secondary structures.

In the figure, only 81 th-180 th aa are demonstrated. “\*” indicates different aa at the site. Lines under peptide of strains 648A and GA represent the predicted secondary structures of gI proteins, the top 3rd line indicates the meanings of “H” “E” “T” “C”, the changed areas in their secondary structures are double-underlined.

果,对生产单位很不实用,在我国现有条件下就更难实施。

最近几年来,各国科学家都试图用体外试验来鉴别不同致病型的 MDV 野毒株。比如,用 PCR 技术已证明, I 型 MDV 在 CEF 上经多次连续传代后,其基因组上 132 bp 重复片段的拷贝数显著增加<sup>[7,8]</sup>。但是,在不同致病型的原始野毒间,这一差异并不明显。由于 MDV 全基因组 DNA 的测序已接近完成(Lee *et al.*, 个人通讯),再加上现代重组 DNA 技术的迅速改进和 DNA 测序商业化,使扩增、克隆和定序一段 DNA 变得非常容易,因而有可能用来比较某些基因的 DNA 变异与其致病型的相关性。鉴于与 MDV 感染细胞活性密切相关的 8 个囊膜糖蛋白(gB、C、D、E、G、H、I、K、L)的序列都已发表<sup>[3, 5, 6, 9, 10, 11, 12]</sup>,使我们对比较不同毒株的糖蛋白基因感兴趣。在目前已知的与抗感染免疫最可能相关的 gB、gE 和 gI 三个基因中,已发现 gB 非常保守, vvMDV 的 RB1B 株<sup>[3]</sup>、vMDV 的 GA 株(Lee *et al.*, 个人通讯)、疫苗毒 CVI988 株(彭大新等,待发表资料)和一个毒力很强的澳大利亚株<sup>[13]</sup>的 gB 基因 DNA 序列居然完全一致。然而 gI 基因却易发生变化<sup>[5,6]</sup>,因此本研究从 gI 着手。

本研究选用来扩增和测定 gI 基因 DNA 序列的 648A 株 MDV 是特超强毒 MDV 中毒力

指数最高的一株<sup>[2]</sup>, 容易发现它与其它致病型之间的差别。结果表明, 648A 株的 gI 基因的 DNA 序列与已部分完成并发表的超强毒 RB1B 株的 5' 端的 761 个碱基完全相同, 而 648A 株的 gI 全基因组 DNA 则与强毒 GA 株有 8 个碱基变异, 并引起 7 个氨基酸突变。虽然 PCR 可能会造成人为的突变, 本研究也只对选定的一个克隆测序, 但由于 648A 株和 GA 株之间的差别仅发生在第 667 碱基及其上游的 5' 端, 而 648A 株的第 761 碱基以前的 5' 端与 RB1B 株的 761 个碱基完全相同, 这表明 648A 株与 GA 株间的差别确是原 648A 株病毒固有的, 不是在 PCR 过程中产生的人为突变。

用 SEQAID 程序对 648A 和 GA 株 gI 序列的分析发现, 其中有些氨基酸的变化可能导致亲疏水性及与蛋白质二级结构相关特性的变化。当然, 这一结构变化与病毒致病性的关系还有待分析更多的毒株。但根据本研究对 vMDV、vvMDV 和 vv + MDV 三个不同致病型毒株的比较分析, 至少已初步表明, MDV 的 gI 的变异主要发生在其 5' 端, 因而, 对 gI 的序列比较只要对其 ORF 的 5' 端的 700 个以内的碱基测序。此外, 这一 DNA 序列比较可将 vMDV 与毒力更强的毒株区别开来, 但要区别 vvMDV 和 vv + MDV, 还须选择其它基因进行分析比较。鉴于我国目前还没能按 Witter<sup>[2]</sup> 的标准来鉴定国内 MDV 流行毒株的致病型, 本研究结果至少可为将 vMDV 型毒株与更强毒力的 vvMDV 和 vv + MDV 型的区别提供参考数据。

利用从强毒型 GA 株 MDV 克隆到的糖蛋白 gB、gE 和 gI 基因作为目的基因, 日本 Neponzeon 公司与美国农业部禽病和肿瘤学研究所联合研制开发了以禽痘病毒为载体的基因工程疫苗, 据称其对 MD 的免疫保护效果要高于单一表达 gB 的重组 FPV (Lee 等, 个人通讯)。本研究表明, 来自特超强毒株 648A 的 gI 蛋白质成分中有 7 个氨基酸不同于强毒 GA 株, SEQAID 程序分析也表明这可能在抗原性上造成差别 (文中未列出)。因此, 以 648A 株的 gI 基因作为目的基因进一步研制出的基因工程疫苗, 将有可能对超强毒及特超强毒株 MDV 感染产生更有效的免疫保护作用。

## 参 考 文 献

- [1] Witter R L. Influence of serotype and virus strain on synergism between Marek's disease vaccine viruses [J]. Avian Pathol, 1992, 21: 601~614
- [2] Witter R L. Increased virulence of Marek's disease virus field isolates [J]. Avian Diseases, 1997, 41: 149~163
- [3] Ross L J N, Sanderson M, Scott S D, et al. Nucleotide sequence and characterization of Marek's disease virus homologue of glycoprotein B of herpes simplex virus [J]. J Gen Virol, 1989, 70: 1789~1804
- [4] Heine H G, Ford A J, Young P L, et al. Recombinant fowlpox virus vaccines against Australian virulent Marek's disease virus: gene sequence analysis and comparison of vaccine efficacy in specific pathogen free and production chickens [J]. Virus Res, 1997, 50: 23~33
- [5] Ross L J N, Binns M M, Pastorek J. DNA sequence and organization of genes in a 5.5 kbp EcoRI fragment mapping in the short unique segment of Marek's disease virus (strain RB1B). J Gen Virol, 1991, 72: 949~954
- [6] Brunovskis P and Velicer L F. The Marek's disease virus (MDV) unique short region: Alphaherpesvirus-homologous, fowlpox virus-homologous, and MDV-specific genes [J]. Virology, 1995, 206: 324~338
- [7] Maotani K, Kanamori A, Ikuta K, et al. Amplification of a tandem direct repeat within inverted repeats of Marek's disease virus DNA during serial *in vitro* passage [J]. J Virol, 1986, 58: 657~660
- [8] Silva R F. Differentiation of pathogenic and non-pathogenic serotype 1 Marek's disease viruses (MDVs) by the polymerase

- chain reaction amplification of the tandem direct repeats within the MDV genome [J]. *Avian Diseases*, 1992, 36:521~528
- [9] Coussens P M and Velicer L F. Structure and complete nucleotide sequence of the Marek's disease herpesvirus gp57-65 gene [J]. *J Virol*, 1988, 62:2373~2379
- [10] Scott S D, Smith G D, Ross L J N, *et al.* Identification and sequence analysis of the homologues of the herpes simplex virus type I glycoprotein H in Marek's disease virus and the herpesvirus of turkeys [J]. *J Gen Virol*, 1993, 74:1185~1190
- [11] Ren D, Lee L F and Coussens P M. Identification and characterization of Marek's disease virus genes homologous to ICP27 and glycoprotein K of herpes simplex virus-1 [J]. *Virology*, 1994, 204:242~250
- [12] Yoshida S, Lee L F, Yanagida N, *et al.* Identification and characterization of a Marek's disease virus gene homologous to glycoprotein L of herpes simplex virus [J]. *Virology*, 1994, 204:414~419

## Comparing DNA Sequences in Glycoprotein I Gene of Marek's Disease Viruses of Different Pathotypes

CUI Zhi-zhong, HE Liang-mei

(Dept. of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

**Abstract:** The glycoprotein I gene (gI) of vv<sup>+</sup> MDV strain 648A was amplified by PCR, cloned and sequenced, its DNA and amino acid sequences were compared to published sequences of vMDV strain GA and vvMDV strain RB1B. The results indicated that the gI sequence of 648A was identical to the published 761 bases of 5' side of ORF of strain RB1B, but there were 8 bases and then 7 amino acids different between GA and 648A strains. All these base changes located at the 5'-end of gI, about the one third of the 3'-end was identical in different pathotypes.

**Key word:** Marek's disease virus; Glycoprotein I gene; DNA sequence