维普资讯 http://www.cqvip.com

第16卷1期 中国病毒学 16(1): 22-27
2001年3月 VIROLOGICA SINICA Mar. 2001

传染性支气管炎病毒江苏分离株核蛋白基因序列测定与同源性分析*

陈德胜[1], 潘杰彦[1], 贾立群[2], 蔡宝祥[1], 陈溥言[1**]

(1. 南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 江苏南京 210095;
2. 新疆维吾尔自治区畜牧兽医总站, 新疆乌鲁木齐 830000)

Sequencing and Homology Analysis for the Nucleocapsid Gene of JS/95/03 Strain of Avian Infectious Bronchitis Virus Isolated from Jiangsu, China

CHEN De-sheng[1], PAN Jie-yan[1], JIA Li-qun[2], CAI Bao-xiang[1], CHEN Pu-yan[1**]

(1 *Key laboratory of animal disease diagnostic and immunology, Ministry of Agriculture, Nanjiang agricultural university, Nanjing* 210095, *China*;
2. *Husbandry and veterinary station of Xinjiang Uighur Autonomous Region, Ulumuqi* 830000, *China*)

Abstract: Field avian infectious bronchitis virus (IBV) designated as JS/95/03, which was isolated from Jiangsu province of china, was cultivated in chicken embryo. It's single strain RNA was extracted from purified virus and worked as template of reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), a pair of primer designed according to megalign results of published IBV sequences in Genbank was used to amplify the neucleocapsid gene, the RT-PCR product was sequenced directly. Sequence analysis revealed that the sequence of JS/95/03 is most homologized with that of M41 strain.

key words: Avian infectious bronchitis virus; Sequence analysis; Neucleocapsid gene

摘要: 将本室鸡传染性支气管炎病毒(IBV)江苏省地方分离肾型毒株JS/95/03接种鸡胚, 分离、纯化病毒, 提取单股RNA做为反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)的扩增模板。用Genbank公开序列多重比较后设计一对引物, 使用单管RT-PCR方法, 特异扩增IBV核蛋白(N)基因5'端854 bp的片段。扩增产物纯化后测序, 序列分析表明, IBV N基因也存在较大变异, 此毒株与呼吸型疫苗株M41序列同源性最高。

关键词: 传染性支气管炎病毒; 地方流行株; 序列分析; N基因
中图分类号: S858.31 **文献标识码**: A **文章编号**: 1003-5125(2001)01-0022-06

鸡传染性支气管炎病毒(avian infectious bronchitis virus, IBV)为冠状病毒科的代表种, 该病毒的主要结构蛋白有三种, 纤突蛋白(S), 膜蛋白(M)和核蛋白(N)。S蛋白是纤突蛋白的主要成分, 其中S1蛋白是血清中和抗体的主要诱导者, 比较容易发生变异, 是IBV具有众多血清型的基础[1]。也是国内外IBV研究工作的热点, 但是, IBV不同血清型病毒之间免疫交叉保护很弱以及疫苗免疫效果不好

收稿日期: 1999-11-22, 修回日期: 2000-04-30
* 基金项目: 国家自然科学基金重大项目(39893290 2-2)
作者简介: 陈德胜(1965-), 男(回族), 新疆籍, 讲师, 博士, 研究方向为传染病与预防兽医学。
** 通讯作者: 陈溥言(1942-), 男, 江苏籍, 教授, 研究方向为传染病与预防兽医学. For correspondence.

维普资讯 http://www.cqvip.com

的问题一直没有得到很好的解决[2,3,4]。N蛋白存在于病毒的内部,由409个氨基酸组成,分子量46 kD,是一种磷酸化的蛋白,占病毒蛋白总量的40%,通常认为变异率不大,相对保守,主要作用是包裹核酸并参与RNA的复制。但近来研究发现,N蛋白涉及宿主的细胞免疫[5,6]。Seo等应用感染能表达IBV N蛋白semliki forest virus(SFV)载体的靶细胞对IBV N蛋白特异性的细胞毒性T细胞(CTL)进行识别[7]。从感染IBV Gray株或接种能表达IBV N蛋白基因DNA载体的雏鸡中获取效应细胞,其CTL表位定位于N蛋白C端120个左右的氨基酸上,裂解感染能表达N蛋白的SFV重组病毒的靶细胞CTL裂解,受主要组织相容性复合体(MHC)限制并由$CD8^+$ T细胞介导,而且这种CTL裂解可能不受病毒血清型的限制[7~11],这为IBV的预防免疫研究,开辟了一种新的思路。本文以临床表现组织嗜性为肾型的国内IBV江苏省野外流行毒株(JS/95/03)为研究对象,以GenBank公开序列为依据,经多序列比较后设计一对特异引物,采取单管反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法扩增出其N基因一段850 bp的基因序列,多序列比较分析,肾型株JS/95/03与呼吸型M41序列相似性最高。

1 材料和方法

1.1 病毒

标准毒株M41株,购于南京药械厂。地方毒株JS/95/03,1995年采集于江苏省某发病鸡场,组织嗜性表现为肾型,鸡胚传代保存,通过Dot-ELISA、鸡胚矮小化实验、RT-PCR法鉴定。NDV N79株,由南京农业大学传染病组保存。

1.2 试剂

反转录酶M-MLV, dNTP, Taq酶为Promega产品,总RNA提取Kit为罗氏公司产品。PE2400 PCR扩增仪。

1.3 引物

参考IBV N基因网上Genbank公开序列多重比较、分析后设计,扩增范围包括N基因的前段大部分序列,全长854 bp。由大连TaKaRa公司合成。

Primer 5' 5'CGCGTGTACCTCTCTAGTATTC3'

Primer 3' 5'CCCTCCTCATTCATCTTGTCATCACC3

1.4 病毒的增殖、浓缩

取种毒按10^4EID50/胚尿囊腔接种50枚10日龄SPF鸡胚,37℃培养36 h收获尿囊液,-20℃冻融三次,5 000 r/min离心30 min,上清移入透析带,置4℃,用PEG6000吸水至60 mL,分装至12 mL离心管中,离心管中事先加2 mL 25%蔗糖垫35 000 r/min离心2.5 h,各用1 mL PBS(pH7.2)悬浮沉淀。-20℃备用。

1.5 病毒纯化

梯度离心纯化病毒,采用30%~60%的连续蔗糖梯度,将上面处理好的病毒液1 mL置梯度之上,35 000 r/min离心3 h,收取40%~50%处的白色病毒带,PBS透析去蔗糖。

1.6 RNA提取

取400 μL纯化病毒用Boechringer Mannheim总RNA提取Kit提取病毒RNA,操作按说明进行,提取的RNA马上进行RT-PCR。

1.7 RT-PCR

采用单管RT-PCR法。即:20 μL反应体积:取RNA溶液8 μL,加入下游引物2 μL(40 pmol),加入反转录混合物9 μL(5×buffer 4 μL, 10 mmol/L each dNTP 2 μL, 25 mmol/L $MgCl_2$ 2 μL, RNasin 40units (1 μL)。65℃ 15 min,加入M-MLV 1 μL 200units)42℃ 1 h, 95℃ 5 min灭活反转录酶后置4℃。加入配好的PCR混合液80 μL(含10×PCR Buffer 8 μL, $MgCl_2$终浓度1.5 mmol/L,上游引物2 μL, Taq 5 u),循环条件为:94℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 2 min, 35个循环, 72℃ 10 min。置4℃。

1.8 RT-PCR产物检测

取PCR产物6 μL在1%琼脂糖凝胶上检测结果。

1.9 基因测序

从胶内回收纯化RT-PCR产物,使用所设计的特异引物分别由3'端和5'端直接测序。

1.10 序列分析

将所测序列与GenBank公开序列进行多序列比较并用DNAstar序列分析软件分析。

2 结果

2.1 标准毒株M41与地方分离株JS/95/03都能扩增出预期核蛋白基因850 bp大小左右的清晰片段。含NDV N79株的尿囊液和正常鸡胚尿囊液阴性对照没有扩增产物(图1)。

2.2 将JS/95/03测序结果与GenBank公开序列比较,与JS/95/03最接近的10个序列均为IBV核蛋白基因序更,比较结果在图2中列出,相似性评分

维普资讯 http://www.cqvip.com

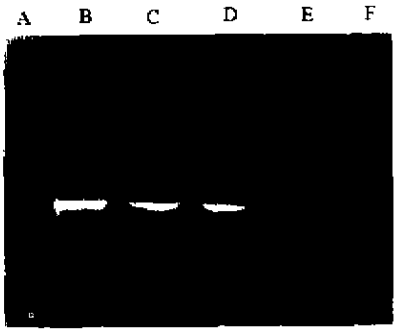

图1 N基因RT-PCR扩增结果

A为Marker DL2000，分子量从上到下依次为2000 bp，1000 bp，750 bp，500 bp，250 bp，100 bp。B为M41N基因扩增产物，C、D为JS/95/03N基因扩增产物，E为NDV N79对照。F为正常尿囊液阴性对照。

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR amplified product of nucleocapsid gene

A, DL2000 Marker; B, M41; C, D, JS/95/03; E, control of NDV N79; F, negative control.

值由高到低按从上到下的顺序排列，依次为：M28566、S48137、M85244、M21515、M85246、U49858、U04805、M95169、M28565、U52596，（均为GenBank序列号，代表的毒株序列依次为：M41，Gray，Ark99，KB8523，IBNUPRC，CU-T2，AIU04805，BEAUDATTE，IBABEAU，N1/62），Tmpseq为JS/95/03序列。其中KB8523，IBNUPRC，CU-T2，AIU0480为最近报道的强变异毒株。

2.3 序列同源性分析结果 用Dnastar分析软件将JS/95/03 N基因序列与以上GenBank中评分值最近的10个序列两两对比分析，两者结果基本一致（表1），其中，M41与JS/95/03 N基因的同源性最高。为95.7%。

3 讨论

在多数RNA的RT-PCR扩增中，引物设计是最关键的因素之一。在引物设计中尽可能多分析一

```
Tmpseq   142   cgagaacccttcttctgctgatcctgaatgatcctigctgcaccgagctataagatcatc 201
M28566   739   ..............................t.............-....a........... 681
S48137   638   ........................g..t...t.........-....a........... 580
M85244   638   ........................g..t...t.........-....a........... 580
M21515   7711        ...........t...........a...t.........-....a........... 7659
M85246   638   ................................t.........-................ 580
U49858   6307  ................................t.........-................ 6249
U04805   638   ................................t.........-................ 580
M95169   26510 .....g.....t..............g..t...t.........-....a.....g..... 26452
M28565   739   .....g.....t..............g..t...t.........-....a.....g..... 681
U52596   613         ......t........g........a...t.a..c....-................ 560

Tmpseq   202   ttcagaaccactcctgcgaccacgcgaaacttcacgcgatggtgctctactagatgctgc 261
M28566   680    ...................................t........................ 621
S48137   579   ............t..a...........gc..........c....g............... 520
M85244   579   ............t..a...........gc.g........c...................... 520
M21515   7658  .....c......t..a...........c.......t.....c..................... 7599
M85246   579   .....ct..g..t..a..t........gc.a........c...................... 520
U49858   6248  .....ct..g..t..a..t........gc.a........c...................... 6189
U04805   579   .....ct..g..t..a..t........gc.a........c...................... 520
M95169   26451 .c.....t....t..a...........c.......t................c...... 26392
M28565   680   .c.....t....t..a...........c.......t................c...... 621
U52596   559   .....ct........a..c.........c.......t..a....................... 500

Tmpseq   262   tgatgaagctgctgttgatcttccactcctgccacgattcagaggaaatgaaatcccaac 321
M28566   620   ......................c........a....c...........-............ 562
S48137   519   ................................a...............-....g....... 461
M85244   519   ................................a...............-....g....... 461
M21515   7598  ......g...........ct..........a...............-..a..g....... 7540
M85246   519   .........c.....................a........t.tt....-....g....... 461
U49858   6188  .........c....a................a........t.tt....-....g....... 6130
U04805   519   .........c....a................a........t.tt....-....g....... 461
M95169   26391 ................................a.....g.....g....-....g....... 26333
M28565   620   ................................a.....g.....g....-....g....... 562
U52596   499   ........................tg.....a...........c....-....g....... 441

Tmpseq   322   ggaaattaccatcaggtcctccgtctgaagaatcgtagcggngtattggtcaaacttgtc 381
M28566   561   ..............................-............a-................ 504
S48137   460   ........................c..-...........-................... 403
M85244   460   ........................c..-.........t..a-................... 403
M21515   7539  ..............................-.........t..a-...............a.. 7482
M85246   460   ......................a.....-...........-................a.. 403
U49858   6129  ......................a..c..-.........t..a-................... 6072
U04805   460   ......................a..c..-.........t..a-................... 403
M95169   26332 ....................g..a..c..-.........t..-................a.. 26275
M28565   561   ....................g..a..c..-.........t..-................a.. 504
U52596   440   .......t........a.....a......-..c.....a..a-................a.. 383
```

维普资讯 http://www.cqvip.com


```
Tmpseq   382    agagtcacgcgtaccctgattagatctaaatttagtatcagcacccttaccagcaaccca 441
M28566   503    .........a.................................................. 444
S48137   402    ..g...c.tt..................g.....ac............tg......... 343
M85244   402    ..g...c.tt........g.g.......g.....ac............tg......... 343
M21515   7481   g.g...t.tt..................tg..................tg......... 7422
M85246   402    ..ga..c.tt........g........g...................tg......... 343
U49858   6071   ..g...c.tt........g........gg..................tgg........ 6012
U04805   402    ..g...c.tt........g........gg..................tgg........ 343
M95169   26274  ..ga..t.tt..........g......g....................g......... 26215
M28565   503    ..ga..t.tt..........g......g....................g......... 444
U52596   382    t.g...t.tt..............c...g............a.....tg......... 323

Tmpseq   442    cactataccatcttggctatcaccccaattcaggttagcggctggtcctgttccagtgta 501
M28566   443    ........................................a.............a.. 384
S48137   342    ...............................a..c.....................a.. 283
M85244   342    ...............................c.....................a.. 283
M21515   7421   ...............................c.....................a.. 7362
M85246   342    ...............................c..................... 283
U49858   6011   .............c.....................c.....................a.. 5952
U04805   342    .............c.....................c.....................a.. 283
M95169   26214  ................ag.........g.......c.....a.............a.. 26155
M28565   443    ................ag.........g.......c.....a.............a.. 384
U52596   322    ...............................................a.. 263

Tmpseq   502    gtaaaaataccaagcatctgggactggttttcttccacctttacctggcttaaacctagc 561
M28566   383    ........................................g............g.... 324
S48137   282    a..g..g.....................................gc.....g.. 223
M85244   282    a..g..g.....................g.....a.....g.. 223
M21515   7361   a..g.....................g.....t..... 7302
M85246   282    a..g..g.....................a.....g.....gt.....g.. 223
U49858   5951   a..g..g.....g..... 5892
U04805   282    a..g..g.....g..... 223
M95169   26154  ......g.....g.....g.. 26095
M28565   383    ......g.....g.....g.. 324
U52596   262    .............c.....a.....g.....t....g.. 203

Tmpseq   562    ttggcgtctccagtatccatgctgctggcttggtttaagatttcattatcaggaacacc 621
M28566   323    ...............ac..t..... 264
S48137   222    ...............g..t.....t.....a..... 163
M85244   222    ......c.....t.....a....t..... 163
M21515   7301   ...............c.....t.....t..... 7242
M85246   222    ...a.....c.....t.....aa.....g.. 163
U49858   5891   .....a.....t.....t..... 5832
U04805   222    .....a.....t.....t..... 163
M95169   26094  .....t.....c....tg.....g..... 26035
M28565   323    .....t.....c....tg.....g..... 264
U52596   202    .............a.....t..... 143

Tmpseq   622    gctaccttcaaacttaggcggaggtgaatttaacttcttggcttttagtgcttgaaacca 681
M28566   263    ................g.........at.........a.........t..... 204
S48137   162    ...................tt.............g.............t..... 103
M85244   162    ...................t...t.........g.............t..... 103
M21515   7241   a................a.t.............g.............t..... 7182
M85246   162    ...............a..... 103
U49858   5831   .............a.....t.....g.....t..... 5772
U04805   162    .............a.....t.....g.....t..... 103
M95169   26034  ................g.........t.....t..... 25975
M28565   263    ................g.........t.....t..... 204
U52596   142    a...........a..t..tt.........g.gt.....t..gc..... 83

Tmpseq   682    agatgcatttccagaagaaccaactttaggtggcct 717
M28566   203    ..... 170
S48137   102    ..... 67
M85244   102    ..... 69
M21515   7181   ..... 7148
M85246   102    ..... 70
U49858   5771   ..... 5739
U04805   102    ..... 70
M95169   25974  .....g..... 25942
M28565   203    .....g..... 171
U52596   82     ................g..c.....t..... 50
```

维普资讯 http://www.cqvip.com

图2 JS/95/03核蛋白基因5′端部分序列测序结果与GenBank公开序列比较

Tmpseq为JS/95/03, M28566为IBV M41株核蛋白基因序列'.'表示相同的碱基,右侧为序列位置。

Fig.2 The alignment result of partial JS/95/03 Nucleoprotein gene sequence in Genbank

Tmpseq is the sequence of JS/95/03, the others are accession numbers of that registered in GenBank, Same base expressed with '.', Base position are indicated at rightside.

表1 JS/95/03 N基因序列与Genbank中评分值最近的10个毒株序列比较结果

Table 1 Comparation Between sequences of JS/95/3 and ten most similar strains in GenBank

	GenBank中被比较序列 Analysised IBV sequences in GenBank									
序号 No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
序列号 Acce. No	M28566	S48137	M85244	M21515	M85246	U49858	U04805	M95169	M28565	U52596
代表毒株 strain name	M41	Gray	Ark99	KB8523	IBBNUP RC	CU-T2	AIU0480 5	BEAU IBACGB	IBABEA U	N1/62
与JS/95/03同源性 Similarity with JS/95/03	95.7%	92.0%	91.8%	91.5%	89.9%	90.7%	89.9%	88.7%	88.2%	88.1%

些参考序列,使用引物分析软件仔细分析所选引物,能收到事半功倍的效果。本文使用的这对引物,在JS/95/03毒株N基因的扩增中十分稳定。在对其他一些IBV毒株N基因的扩增中,用这对引物也可以进行有效的扩增,表明此对引物有一定的通用性。

冠状病毒核蛋白基因的保守性超过94%,一般认为是高度保守的。Sapats等[12]测了8株致病力和组织嗜性不同的IBV自然发生毒的N蛋白基因和3′端非编码区(UTR)序列,序列分析后按推导出的氨基酸相似性将这8株病毒分为Ⅰ、Ⅱ两群,Ⅰ群内毒株间的相似性在92.3%~98.8%。Ⅱ群内毒株的相似性在85.8%-89.2%,但不同群毒株之间的序列相似性仅为60.0%~63.3%,在整个N基因内,甚至在过去认为保守的区域,有广泛的替换、缺失和插入。Jia等分离鉴定了一株独特的IBV抗原变异株CU-T2,它的S1糖蛋白携带了Arkansas(Ark)和Massachusetts(Mass)两个血清型的病毒中和和血清型特异的抗原表位[13]。序列分析发现此病毒原为Ark血清型,通过突变获得了Mass型特异的抗原表位,证实点突变可以在野外产生IBV抗原变异株。进一步观察发现,涉及3个不同IBV毒株的两处不同重组发生在CU-T2的S2糖蛋白基因和核蛋白基因,说明自然界中的RNA重组可以发生在多个基因。CU-T2的另一个重要特性是其核蛋白基因的一半被Holland 52株(H52疫苗株)的基因序列所取代,证明了疫苗株之间的基因重组与IBV野外变异毒株的产生有关。Kottier等用两个不同的IBV毒株M41和Beaudette共同实验感染鸡胚,观察能否在两株病毒间发生重组,通过基因序列分析、单克隆抗体中和实验等方法证实在N基因和3′端UTR区发生了重组,产生有感染性的重组基因组,获得环境因素影响IBV分化变异的实验室证据[14]。因此,IBV的N基因的保守性可能并非如通常所认为的那么严格,N蛋白可能也不仅仅在包裹核酸和病毒复制方面有作用,在病毒的基因变异与蛋白质变异,血清型变化与免疫防护,病毒的进化与免疫逃逸等方面也有重要作用。

JS/95/03毒株是从江苏省本地分离的IBV流行株,毒力较强,临床表现型为肾病变型,能够造成一定范围内的流行,在致病感染实验中,其损伤的主要器官是肾脏,发病率和病死率也远远高于传统的呼吸型弱毒疫苗株M41,但其N基因多序列比较的结果是这两者的序列同源性最高。另外,我们也将JS/95/03的完整SI基因进行了测序和序列分析(GenBank Accession No:AF208239,未发表),与JS/95/03 S1基因序列同源性最高的也是M41株。既两个不同结构基因的分析结果一致,都与表现型互相矛盾。JS/95/03究竟是M41的突变株还是自然界中的野生型肾病变毒株,从序列分析的结果来看似乎更倾向于前者,如果这样,JS/95/03致病力的改变有可能就是由突变引起的。现在仍然有许多问题不是很清楚,比如病毒致病力的改变需要多少突变?在哪些位点上的突变更重要?单基因突变还是两个或两个以上的基因突变更重要?哪些因素容易引起IBV的突变?以及IBV弱毒疫苗使用的安全性如何?自然界中有多少不同IBV毒株共存?这些毒株的来源是什么?各不同毒株在自然界中的相互作用关系如何等。弄清这些问题可能很不容易,

维普资讯 http://www.cqvip.com

需要做更多的工作来证实。

参考文献

[1] Calnek. B W, Barnes H J, Beard C W, *et al*. Disease of Poultry [M]. 10th ed. Iowa State University Press, 1997, 511 - 526.

[2] Kwon H M, Mark W J, Jack G J. Differentiation of Infectious Bronchitis Virus Serotypes Using Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis[J]. Avian Diseases, 1993, 37, 194 - 202.

[3] Cavanagh D, Davis P J, Mockett A P. Amino acids within hypervariable region of avian coronavirus IBV (Massachusetts serotype) spike glycoprotein are associated with neutralization epitopies[J]. Virus Research, 1988, 11: 141 - 150.

[4] Mark W J, Nadia M H Y, Deborah A. H, Further Development and Use of a Molecular Serotype Identification test for infectious bronchitis virus[J]. Avian Diseases. 1997, 41, 105 - 110.

[5] Boots A M H, Banlierop M J, Kusterrs J G, Vankooten P J S, *et al*. MHC class Ⅱ-restricted T-cell hybridomas recognizing the nucleocapsid protein of avian coronavirus IBV [J]. Immunology, 1991, 72: 10 - 14.

[6] Seo S H, Collisson E W, Li Wang, *et al*. Specific cytotoxic T lymphocytes are involved in vivo clearance of infectious bronchitis virus[J]. J Virol, 1997, 71: 5173 - 5177.

[7] Li W, Sang H S, Roger S, *et al*. A Potential Multivalent IBV Gene Vaccine Using Nucleocapsid containing CTL epitipe[C]. International Conference and Exhibition on veterinary poultry Proceedings, 32 - 43.

[8] Boots A M H, Kusters J G, Vanmoort J M, *et al*. Localization of a T-cell epitope within the nucleocapsid protein of avian coronavirus[J]. Immunology, 1991, 74: 8 - 13.

[9] Boursnell M E G, Binns M M, Foulds I J, *et al*. Sequences of the Nucleocapsid Genes from Two Strains of Avian Infectious Bronchitis Virus[J]. J gen Virol., 1985, 66: 573 - 580.

[10] Williams A K, Wang L, Sneed, *et al*. Comparative analyses of the nucleocapsid genes of several strains of infctious bronchitis virus and other coronaviruses[J]. Virus Res, 1992, 25: 213 - 222.

[11] Stohlman S A, Berhmann C C, Cua D, *et al* Mouse hepatitis virus nucleocapsid-specific cytotoxic T cells protect from lethal infection without eliminating virus from oligodendroglis[J] J Virol, 1995, 69: 684 - 694.

[12] Sapats SI, Ashton F, Wright P J, Ignjatoviv J. Novel variation in the N protein of avian infectious bronchitis virus[J]. Virology, 1996, 226(2): 412 - 417.

[13] Jia W, Karaca K, Parrish CR, Naqi SA. A novel variant of avian infectious bronchitis virus resulting from recombination among three different strains[J]. Arch Virol 1995, 140(2): 295 - 271.

[14] Kottier S A, Cavanagh K, Britton P. Experimental evidence of recombination in coronavirus infectious bronchitis virus. Virology 1995, 213(2): 569 - 580.