

鸡传染性支气管炎病毒两个地方分离株 S1 基因的扩增 克隆与序列分析*

戴亚斌^{1,2}, 陈德胜¹, 潘杰彦¹, 姜焱¹, 刘兴友¹, 芦银华¹,
刘梅², 丁铲³, 陈溥言^{1**}, 蔡宝祥¹

(1. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095; 2. 江苏沿海地区农业科学研究所, 江苏 盐城 224002;
3. 江苏省家畜科学研究所, 江苏 扬州 225003)

Amplification, Cloning and Sequence Analysis of S1 Genes from Infectious Bronchitis Virus Isolates JS/95/03 and SD/97/01

DAI Ya-bin^{1,2}, CHEN De-sheng¹, PAN Jie-yan¹, JIANG Yan¹, LIU Xing-you¹, LU Yin-hua¹,
LIU Mei², DING Chan³, CHEN Pu-yan^{1**}, CAI Bao-xiang¹

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Agriculture sciences
in Jiangsu Coastal Area, Yancheng 224002, China; 3. Jiangsu Institute of Poultry Science, Yangzhou 225003, China)

Abstract: The entire S1 genes from nephropathogenic strain JS/95/03 and respiratory strain SD/97/01 of infectious bronchitis virus were amplified, cloned and sequenced. The nucleotide and deduced amino acid sequences of S1 genes from two isolates and ten reference strains were compared. The results showed that JS/95/03 and SD/97/01 were genetically closely related to M41 and H120, respectively. So it is speculated that they were possible variants of vaccine strains. Two isolates were different in pathogenicity, but they genetically related. Only 24 amino acid differences were found between S1 glycoproteins of two isolates, and 15 of them occurred in the region of the first 130 amino acid residues. A amino acid difference at the position 116 might be involved in pathogenicity. The comparison of the predicted secondary structures of S1 glycoproteins from two isolates revealed that only one or a few amino acid differences were responsible for different antigenicity and structure.

Key words: Infectious bronchitis virus (IBV); S1 gene; Amplification; Cloning; Sequence analysis

摘要: 对 IBV 肾型毒株 JS/95/03 和呼吸型毒株 SD/97/01 的 S1 全基因进行了扩增、克隆和序列测定, 将两毒株的 S1 基因序列与 10 个参考毒株进行了比较。结果表明, JS/95/03 和 SD/97/01 分别与 M41 和 H120 株亲缘关系最近, 它们可能是疫苗毒株的变异株。JS/95/03 和 SD/97/01 间的亲缘关系也较近, 两者 S1 蛋白中只有 24 个氨基酸的差异, 其中有 15 个位于前 130 个氨基酸中, 第 116 位氨基酸可能与毒株的致病性有关。对两毒株 S1 蛋白的二级结构进行了预测和比较, 结果发现, 一个或极少数氨基酸的差异即可导致 S1 蛋白二级结构和抗原性的改变。

关键词: 传染性支气管炎病毒 (IBV); S1 基因; 扩增; 克隆; 序列分析

中图分类号: S852.65964; Q78 文章标识码: A 文章编号: 1003-5125(2002)02-0172-06

传染性支气管炎病毒 (infectious bronchitis virus, IBV) 属于套病毒目 (Nidovirales), 冠状病毒科 (Coronaviridae), 冠状病毒属 (Coronavirus), IBV 是该属的代表种, 主要侵害鸡的呼吸系统和泌尿生

收稿日期: 2001-09-24, 修回日期: 2002-01-04

* 基金项目: 国家自然科学基金重大项目 (3989329); 江苏省自然科学基金项目 (BK99185)

作者简介: 戴亚斌 (1964-), 男, 江苏泰兴籍, 副研究员, 博士, 从事畜禽疫病防治研究和推广工作。现在厦门大学从事博士后研究。

** 通讯作者。Correspondence author.

殖系统,以呼吸道症状、肾脏损害、蛋产量和蛋品质下降为特征。其基因组为不分段的单股正链 RNA,全长约为 27kb^[1],编码三个主要结构蛋白,即:纤突糖蛋白(S)、膜蛋白(M)和核衣壳蛋白(N)。S 糖蛋白形成病毒表面的纤突结构,翻译后裂解为两个非共价结合的多肽,N 端 S1 和 C 端 S2。S2 的 C 端有一个小跨膜区“锚”定于病毒囊膜并形成纤突的柄,S1 则形成纤突的顶部。IBV 基因组 RNA 特有的先导引物转录机制,使病毒具有高度变异性,导致新血清型和组织嗜性的毒株不断出现,常规疫苗的免疫效果下降,给疾病的防制带来了很大的困难。

大量研究表明,IBV 的各个基因均可发生变异,但 S1 基因变异最为活跃。由于 S1 糖蛋白与病毒的许多生物学功能有关,可以诱导血凝抑制(HI)和病毒中和(VN)抗体的产生,是病毒的主要免疫原蛋白^[2,3],其 N 端还可能对病毒的组织亲嗜性和毒力起决定作用^[4,5]。因此,可以根据不同毒株 S1 基因间的差异来分析 IBV 的变异原因,为 IB 的防治提供理论依据。

本研究分别扩增了两个致病性不同的 IBV 地方分离株的 S1 基因,并对其核苷酸及由此推定的蛋白质氨基酸序列进行了比较和分析,从分子水平上探讨了 IBV 的变异机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 毒株 IBV JS/95/03 和 SD/97/01 株分别从发病的免疫鸡病料中分离获得,经鉴定分别为肾型和呼吸型毒株^[6]。由南京农业大学传染病学教研室保存。

1.1.2 质粒和菌种 质粒 pMD18-T 购自 TaKaRa (大连)公司。大肠杆菌 JM109 由南京农业大学传染病学教研室保存。

1.1.3 酶和试剂 反转录酶 M-MLV RT、连接酶 T4 DNA ligase、RNasin、Taq 酶、限制性内切酶 BamH I、Sal I 和 Pst I 等均购自 Promega 公司,DNA 分子量标准 DL-2000 及 λDNA/Hind III 购自 TaKaRa (大连)公司, RNA 纯化试剂盒(High Pure Viral RNA Extraction Kit)和 DNA 快速纯化回收试剂盒分别为 Boehringer Mannheim 公司和博大公司产品。

1.1.4 引物 参照 GenBank 上公开的 IBV S1 基因序列设计了一对引物:

5'-primer: 5'-GCAAACCTGAACAAAAGACCGACTTAG-3'

3'-Primer: 5'-CTTACCATAACTAACATAAGGGCA-3'

扩增范围包括 S1 基因全序列、部分 S 基因 5'端非编码序列和少量的 S2 基因序列。由 TaKaRa (大连)公司协助合成。

1.2 方法

1.2.1 病毒增殖与浓缩 IBV 种毒液稀释后,接种 10d 龄非免疫鸡胚,37℃ 孵育 40h,收获尿囊液,2 500r/min,离心 10min,取上清,-20℃ 冻融 3 次,3 000r/min,离心 10 min 加入 PEG6000 和 NaCl 至终浓度分别为 8% 和 95g/L,4℃ 缓慢搅拌过夜,10 000r/min,4℃ 离心 30min,沉淀用适量 PBS 液溶解后,将其置于预先制备好的 20%~60% 的连续蔗糖梯度之上,35 000r/min,4℃ 离心 3h 后,收集 40%~50% 处的白色病毒带,PBS 透析除去蔗糖后,再用 PEG6000 除去部分水分,即得浓缩的病毒液。

1.2.2 RNA 的提取 取浓缩病毒液 100μL,按 RNA 纯化试剂盒的操作说明快速提取病毒 RNA,最后溶于 10μL 无 RNase 的水中,立即进行反转录。

1.2.3 RT-PCR RT 和 PCR 反应均在基因扩增仪(PE2400,Perkin-Elmer Applied Biosystems)上进行。

RT:反应体系中各成分组成为:病毒 RNA 液 8μL,3'-primer (20pmol/L) 2μL,5 × M-MLV RT buffer 4μL,10mmol/L dNTPs 2μL,25mmol/L Mg-Cl₂ 2μL,RNasin (40U/μL) 1μL。离心混匀后,置 65℃,15min 后,加入 M-MLV RT (200U/μL,42℃ 1h,然后 95℃ 5min 灭活反转录酶,冷却至 4℃ 后,进行 PCR 反应。

PCR:反应体积为 100μL。反应体系中含:RT 产物 20μL,10 × PCR buffer (Mg²⁺ free) 8μL,25mmol/L MgCl₂ 8μL,5'-primer (20pmol/L) 2μL,超纯水 66.2μL。混匀后,94℃ 预变性 5min,加 Taq 酶(SU/μL) 1μL,然后进入 PCR 循环。循环条件为:92℃ 1min,45℃ 2min,72℃ 4min,循环 40 次。循环结束后,72℃ 延伸 10min,最后置 4℃ 保存。PCR 产物在含 1% EB 的琼脂糖上电泳,紫外灯下观察结果。

1.2.4 PCR 产物的克隆 PCR 产物在 1% 琼脂糖电泳后,切下目的条带,用 DNA 快速纯化回收试剂盒回收凝胶中的 DNA,然后与 T 载体连接,反应体系组成为:目的 DNA 溶液 2μL,pMD18-T 载体

(50 μ g/ μ L), 2 \times ligase buffer 5 μ L, 10mmol/L ATP Na₂O₃ 5 μ L, T4DNA 连接酶(3weiss U/ μ L)0.5 μ L, 超纯水 1 μ L。离心混合后, 22 $^{\circ}$ C 孵育 2h, 70 $^{\circ}$ C 灭活连接酶, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

将连接产物转化进大肠杆菌菌株 JM109, 待长出菌落后, 挑取白色菌落接种 LB 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C 过夜摇瓶培养。小量提取法提取质粒, 用其进行 PCR 以及酶切鉴定, 获得重组质粒。

1.2.5 序列测定 重组质粒的测序工作由 TaKaRa(大连)公司协助完成。利用 M13 通用引物在 DNA 测序仪(ABI PRISMTM377 型, Perkin-Elmer Applied Biosystems)上进行双向测序, 然后在序列中间再合成一个引物将此序列测通, 通过自动序列拼接软件进行拼接后, 即得 S1 基因的全序列。

1.2.6 序列分析 将所得序列与 NCBI 网上 GenBank 中公开的 IBV S1 基因序列进行同源性比较, 然后用 DNASTAR 软件(DNASTAR Inc. Madison, WI)等进行基因及据其推定的氨基酸序列分析。

用于比较的各参考毒株 S1 基因序列在 GenBank 中的登录号为: Beau, M95169; CU-T2, U49858; Gray, L14069; H120, M21970; Holte, L18988; M41, M21883。

2 结果

2.1 IBV S1 基因的 RT-PCR 扩增

IBV JS/95/03 和 SD/97/01 两个毒株均扩增出一条 1.72kb 的片段, 与预期的结果相符(图 1)。

2.2 IBV S1 基因的克隆与鉴定

将 RT-PCR 产物分别与克隆载体 pMD18-T 连接, 转化大肠杆菌 JM109, 挑取白色菌落, 增菌培养后, 提取质粒。以质粒为模板与原引物进行 PCR, 均扩增出 1.72kb 的片段, 用 *Bam*H I 单酶切, 切出约 4.4kb 的条带, *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切, 切出大小分别为 1.7 和 2.7kb 的条带(图 2), 证实连接成功, 将两重组质粒分别命名为 pMDJS9503S1 和 pMDSD9701S1。

2.3 序列测定

以重组质粒为材料进行序列测定, 经网上 Blast 软件比较证实所测序列为 IBV S1 基因, 碱基长度为 1.72kb, 包括部分 S 基因先导序列和 S2 基因。JS/95/03 和 SD/97/01 的 S1 基因序列均已在 GenBank 上登录, 序列号分别为 AF208239 和 AF208240。S1 基因序列推定的氨基酸序列见图 3。

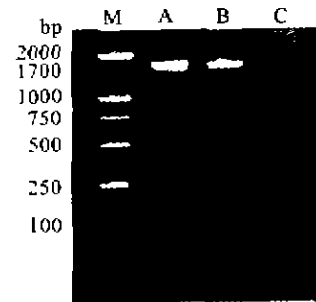


图1 IBV JS/95/03 和 SD/97/01 株的 S1 基因 RT-PCR 扩增结果 A, JS/95/03 株; B, SD/97/01 株; C, 阴性对照; M, 分子量标准。

Fig 1 RT PCR results of S1 genes from IBV isolates JS/95/03 and SD/97/01

A, JS/95/03 strain; B, SD/97/01 strain; C, Negative control; D, DNA molecular weight marker.

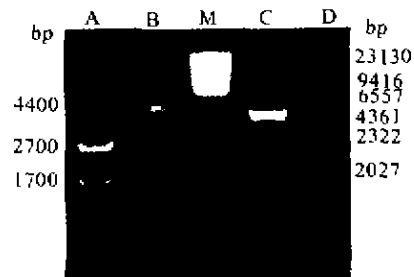


图2 重组克隆质粒 pMDJS9503S1 和 pMDSD9701S1 的酶切鉴定

A, pMDJS9503S1 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切; B, pMDJS9503S1 *Bam*H I 单酶切; C, pMDSD9701S1 *Bam*H I 单酶切; D, pMDSD9701S1 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切; M, 分子量标准 λ -DNA/*Hind* III。

Fig 2 Restriction enzyme analysis of recombinant plasmid pMDJS9503S1 or pMDSD9701S1

A, pMDJS9503S1 digested with *Bam*H I and *Sal* I; B, pMDJS9503S1 digested with *Bam*H I; C, pMDSD9701S1 digested with *Bam*H I; D, pMDSD9701S1 digested with *Bam*H I and *Sal* I; M, DNA molecular weight marker λ -DNA/*Hind* III

2.4 序列分析

2.4.1 JS/95/03 和 SD/97/01 株与其它 IBV 毒株 S1 基因核苷酸和蛋白质氨基酸序列比较

采用 Clustal 法将 JS/95/03 和 SD/97/01 株的 S1 基因核苷酸和蛋白质氨基酸序列与其它 6 个参考毒株进行了比较(表 1)和进化树分析(图 4)。结果表明, 8 个毒株可分为两大基因群, I 群由 JS/95/03、SD/97/01、M41、H120 和 Beau 毒株组成, 它们之间核苷酸和氨基酸序列同源性分别为 97.0% ~ 99.7% 和 94.4% ~ 99.3%; II 群包括 Holte、CU-T2 和 Gray 毒株, 它们之间的核苷酸和氨基酸序列同源性分别为 82.3% ~ 82.7% 和 76.1% ~ 79.2%。两

17个 Cys, Gray 株的第 16 位缺失,但在第 11 位增加了一个,除此以外,其它 Cys 的位置完全一致。两个基因群毒株间有 15 个 Cys 的位置是完全一致的。

2.4.2 JS/95/03 和 SD/97/01 株 S1 基因核苷酸和蛋白质氨基酸序列及其它一些特征的比较

比较结果表明,JS/95/03 和 SD/97/01 株在遗传上分别与 M41 和 H120 株关系最近。JS/95/03 与 M41 S1 基因核苷酸和蛋白质氨基酸同源性分别为 99.2% 和 98.0%,而 SD/97/01 与 H120 间分别为 99.7% 和 99.3%。JS/95/03 和 SD/97/01 间的遗传关系也比较近,它们的 S1 基因核苷酸和蛋白质氨基酸的同源性分别为 97.5% 和 95.3%。两个毒株的 S1 蛋白均由 537 个氨基酸组成,两者的糖基化和 Cys 位点和数量均完全一致。它们之间有 24 个氨基酸的差异,其中 15 个位于前 130 位。两毒株 S1 蛋白在 533~537 位有一富含精氨酸的序列

RPFRR,该处应为 S1 和 S2 间的裂解位点。

根据 S1 蛋白氨基酸序列对两个毒株的二级结构进行了预测(图 5)和比较。较之于 SD/97/01 株,JS/95/03 株 S1 蛋白中约 20~100 位氨基酸间, α -螺旋结构数量较多,而 β -折叠和 β -转角数量较少。在该区域中或附近两毒株存在着 2 个氨基酸的差异,JS/95/03 株第 19 和 94 位氨基酸分别为 Ala 和 Ser,而 SD/97/01 则分别为 Val 和 Gly。在抗原性方面,JS/95/03 株在第 380~400 位氨基酸间的抗原性较 SD/97/01 弱,而在与此对应的区域,两毒株间有 2 个氨基酸的差异,JS/95/03 株第 390、391 位氨基酸分别为 Gly 和 Leu,是不带电荷的极性氨基酸或非极性氨基酸,而 SD/97/01 株则分别为 Asp 和 His,为带正或负电荷的极性氨基酸^[7]。

两毒株 S1 蛋白的前 18 个氨基酸有强烈的疏水性,此处应为信号肽序列。

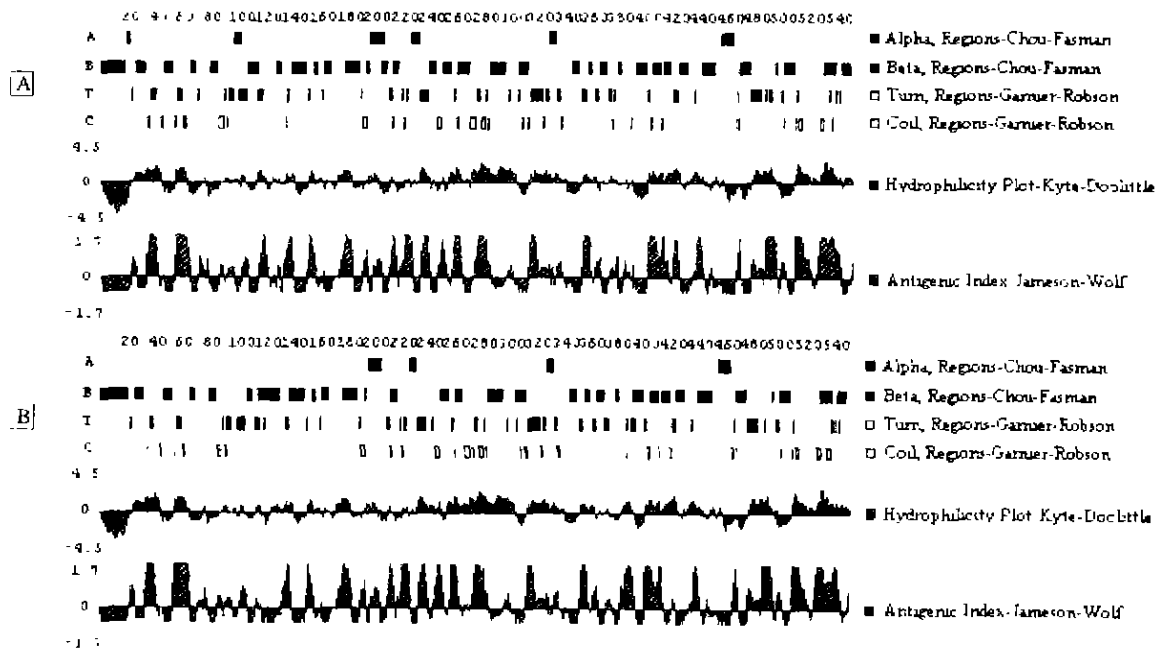


图 5 JS/95/03 和 SD/97/01 株 S1 蛋白的二级结构预测(A, JS/95/03 株; B, SD/97/01 株)

Fig. 5 Predicted secondary structures of S1 glycoproteins from IBV strains JS/95/03(A) and SD/97/01(B)

3 讨论

S1 糖蛋白是 IBV 的主要保护性抗原,病毒抗原性和致病性的改变主要是 S1 蛋白引起的。因此根据各毒株 S1 基因的差异可以探讨病毒变异的原因。本试验扩增了两个致病性不同的 IBV 毒株的 S1 蛋白全基因序列,并与 6 个参考毒株进行了比较。结

果表明不同毒株间的 S1 蛋白的基因和氨基酸同源性分别为 79.6%~99.7% 和 73.2%~99.3%,变异幅度较大,碱基的点突变分布于整个 S1 基因内,难以探究其规律性。根据 S1 基因的同源性对这些毒株进行了基因分群,JS/95/03、SD/97/01 与 Beau、H120 和 M41 的 S1 基因高度同源,它们同属于 I 群。JS/95/03 和 SD/97/01 的 S1 基因分别与 M41

和 H120 毒株亲缘最近。实际上 JS/95/03 与 H120 间遗传关系也很近,两者 S1 基因核苷酸和蛋白质氨基酸同源性也分别高达 97.7% 和 96.3%。由于 H120 为长期使用的疫苗毒株,因此这两个毒株可能是由疫苗毒株在野外条件下经点突变产生的变异毒株。

IBV S1 蛋白的 N 端,即 S1 蛋白的前 300 个氨基酸变异频率较高,称为高变区(hypervariable region, HVR)^[8-10]。本研究采用的 JS/95/03 和 SD/97/01 是从两个相距较远的鸡群分离到的,它们的 S1 蛋白基因核苷酸和氨基酸的同源性很高,分别高达 97.5% 和 95.3%。它们的 S1 蛋白中有 24 个核苷酸的差异,其中有 15 个位于前 130 个氨基酸中。由此可见, S1 蛋白 N 端前 130 个氨基酸,尤其是 101~130 位(其中有 7 个氨基酸的差异)是高变区,变异的形式主要是氨基酸的替换。该结果与其它报道基本一致。此外,两个毒株 S1 蛋白二级结构比较后发现 S1 蛋白二级结构及抗原性上的差异,仅仅是由一个或少数几个氨基酸残基的替换引起的,表明极少数氨基酸的变异即可引起 S1 蛋白的结构和抗原性改变。当然,预测的结果与实际情况可能会有差异,极少数这样的差异也许不会引起病毒的抗原性和/或致病性发生根本性的变化,但点突变积累到一定程度时将会使病毒发生质的变化。

IBV S 蛋白介导的病毒与细胞结合功能决定了病毒的致病性和组织亲嗜性。因此许多研究工作者试图通过比较不同毒株间 S1 基因的差异,来探讨不同 IBV 毒株间致病性和组织亲嗜性差异的分子基础,然而进展甚微。肾型毒株 H52 与弱毒株 H120 间仅表现在 126 位氨基酸的不同^[4]。呼吸型毒株 V5/90 和肾型株 Vic S 只是在 126 位氨基酸处发生变异,即由前者的 Asp 突变为后者的 Gly,而与其它呼吸型毒株比较,则未发现类似的变异,但在 126 位的两侧有氨基酸的差异^[11]。本研究采用的 IBV 毒株 JS/95/03 和 SD/97/01 是两个致病性不同的毒株,它们在 S1 蛋白的第 126 位氨基酸前后约 20 个氨基酸的跨度中,就存在着 6 个氨基酸的差异,即 116、117、118、128、129、130 位。JS/95/03 在这些位

点的氨基酸分别为 Arg、Tyr、Lys、Asn 和 Phe,后四个与 M41 株相同,而 SD/97/01 为 Lys、His、Val、Gln、His 和 Ser,与 H120 株相同。由于 M41、H120 和 SD/97/01 株均为呼吸型毒株,因此,仅有 116 位氨基酸可能会与两个毒株的致病性和组织亲嗜性差异有关,这尚待进一步研究证实。

参考文献

- [1] Bousnell M E G, Brown T D K, Binns M M. Completion of the sequence of the genome of the coronavirus avian infectious bronchitis virus[J]. *Virus Research*, 1984, 1:303 - 313.
- [2] Cavanagh D, Davis P J, Darbyshire J H *et al.* Coronavirus IBV: virus retaining spike glycopolyepetide S2 but not S1 is unable to induce virus-neutralizing or haemagglutination-inhibiting antibody, or induce chicken tracheal protection[J]. *Journal of General Virology*, 1986, 67: 1435 - 1442.
- [3] Ignjatovic J, Galli L. The S1 glycoprotein but not N or M protein of avian infectious bronchitis virus induces protection in vaccinated chickens. *Archives of Virology*, 1994, 138: 117 - 134
- [4] Cavanagh D, Davis P J, Cook J K A. Location of the amino acid differences in the S1 spike glycoprotein subunit of closely related serotypes of infectious bronchitis virus[J]. *Avian Pathology*, 1992, 21: 33 - 43.
- [5] Kwon H M, Jackwood M W. Molecular cloning and sequence comparison of the S1 glycoprotein of the Gray and JMK strain of avian infectious bronchitis virus[J]. *Virus Genes*, 1995, 9: 219 - 229
- [6] 陈德胜. 传染性支气管炎病毒中国流行地方毒株的分子流行病学研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2000
- [7] 沈同, 王镜岩, 赵邦悌, 等. 生物化学[M]. 第二版, 北京: 高等教育出版社, 1993
- [8] Kusters J G, Neesters H G, Lenstra J A, *et al.* Phylogeny of antigenic variants of avian coronavirus IBV[J]. *Virology*, 1989, 169: 217 - 221
- [9] Cavanagh D, Davis P J, Mockett A P A. Amino acids within hypervariable region 1 of avian coronavirus IBV (Massachusetts serotype) spike glycoprotein are associated with neutralization epitopes[J]. *Virus Research*, 1988, 11: 141 - 150
- [10] Moore K M, Bennett J D, Seal B S, *et al.* Sequence analysis of the avian infectious bronchitis virus S1 glycoprotein of the Florida serotype and variant isolates from Georgia and California[J]. *Virus Genes*, 1998, 17(1): 68 - 83.
- [11] Sapates S I, Ashton F, Wright P J, *et al.* Sequence analysis of the S1 glycoprotein of infectious bronchitis virus: identification of a novel genotypic group in Australia[J]. *Journal of General Virology*, 1996, 77: 413 - 418