维普资讯 http://www.cqvip.com

第17卷 3期
2002年8月

中 国 病 毒 学
VIROLOGICA SINICA

17(3):252－256
August 2002

# 鸡传染性法氏囊病上海超强毒株NH99的分离与鉴定*

孙建和，陆 苹**，李 晖，赵 渝
（上海交通大学农业与生物学院生物技术研究所，上海 201101）

# Isolation and Identification of Very Virulent Infectious Bursal Disease Virus(vvIBDV) Strain NH99

SUN Jian-he, LU Ping**, LI Hui, ZHAO Yu
(*The Institute of Bio-Technology, School of Agriculture and Biology, Shanghai JiaoTong University, Shanghai* 201101, *China*)

**Abstract**: An infectious bursal disease virus(IBDV) field strain, named NH99, was isolated and identified from some flocks with immune failure in Shanghai according to the clinical symptom, pathology, serological test, animal challenge and virus morphology. The virus was characterized as a very virulent infectious bursal disease virus(vvIBDV) through nucleic acid isolation and related DNA sequence analysis which have the same molecular characteristics as vvIBDV. This is the first report of outbreak of acute infectious bursal disease caused by vvIBDV in Shanghai.

**Key words**: Very virulent infectious bursal disease virus(vvIBDV); Animal challenge ; Virus purification; DNA sequence analysis

**摘要**：通过对上海近郊某鸡场数群10日龄左右的病鸡的临床症状、病理变化、病毒分离、纯化、动物回归、血清学检测及病毒核酸纯化、VP2基因序列的测定与分析，确认上海地区以发病日龄早，发病率、死亡率高为特征的鸡传染病为超强毒型鸡传染性法氏囊病，病原具有鸡传染性法氏囊病病毒超强毒（vvIBDV)的分子特征，为vvIBDV。

**关键词**：鸡传染性法氏囊病病毒超强毒（vvIBDV)；病毒提纯；动物回归；序列分析
**中图分类号**：S831.7　　**文章标识码**：A　　**文章编号**：1003-5125(2002)03-0252-05

鸡传染性法氏囊病(IBD)是一种呈现世界性流行的烈性传染病，已成为危害养鸡业的主要疫病之一。1987年以前，流行的IBDV均为低毒力毒株，引起的死亡率低于2%，应用疫苗控制该病取得了满意的效果。但在1986年和1987年，世界各地都有免疫失败发生的报道。在美国，发现应用传统的疫苗不能提供理想的保护，提出由于抗原漂移出现了新的毒株。而在欧洲则报道了第一例超强毒型鸡传染性法氏囊病[1,2]，其以高发病率和高死亡率为特征。令人不解的是，首次爆发该病的鸡群，有些是处于育肥后期的母鸡，而且这些鸡场均采取了防疫措施。这些情况表明IBD的发生出现了新的特点。由于缺少能简易鉴定超强毒株的标记，从而延缓了早期检测和采取预防措施，给养禽业造成了重大经济损失。在90年代初，国内也证明有超强毒存在，并已分离、鉴定了广州、北京IBDV超强毒[3,4]。本文通过对IBDV超强毒的分离、鉴定，确证上海地区爆发超强毒型鸡传染性法氏囊病，并为进一步研究IBDV超强毒的分子流行病学、分子生物学及进行有效免疫预防打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

初步诊断为鸡传染性法氏囊病病鸡1999年采样于上海近郊某鸡场。健康苗鸡购自上海泗泾某鸡场，清洁环境中饲养。IBDV阳性血清上海交通大

收稿日期：2001-12-24，修回日期：2002-01-18
* 基金项目：上海市科学技术发展基金资助项目(01JC14034)
作者简介：孙建和(1968-)，男，江苏省籍，副教授，在读博士，专业为生物化学与分子生物学。
** 通讯作者：陆 苹(1937-)，女，上海市籍，教授，研究方向为预防兽医学。Correspondence author.

维普资讯 http://www.cqvip.com



学农学院动物科学系惠赠。

### 1.2 动物回归试验

用0.01mol/L的TNE(pH7.2)按1:5匀浆病料,冻融三次后,取上清,加青、链霉素抑菌后,过滤除菌,以每只鸡0.1mL的量经滴鼻和口服,攻击200只18日龄的小鸡,另外设对照,观察发病情况。

### 1.3 病毒的繁殖与纯化

将上述病料匀浆液经口服和滴鼻感染4周龄的IBDV非免疫鸡,攻击后3天,扑杀鸡群,无菌采取鸡法氏囊,匀浆,冻融三次后,进行差速离心和蔗糖密度梯度超速离心,收集含病毒的相应条带,透析,负染、电镜观察,-70℃冻存备用。

### 1.4 蛋白酶K法提取病毒dsRNA

参考陈溥言等[5]的方法进行,获得粗提的dsRNA后,用1.2%的低熔点琼脂糖电泳,长波紫外灯下割胶分离dsRNA。并进一步采用酚-氯仿抽提、乙醇沉淀获得高纯度的dsRNA。

### 1.5 cDNA第一链的合成

采用GibcoBRL生产的SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR试剂盒,选用随机引物法进行。将纯化的IBDV RNA的A片段6μL与随机引物(50ng/μL)3μL和dNTP(10mmol/L dNTP mix)1μL混匀,于99℃水浴6min,立即置冰上至少1min,短暂离心收集,加入10×RT buffer 2μL, 25mmol/L $MgCl_2$ 4μL, 0.1mol/L DTT 2μL和RNase inhibitor 1μL,混匀后短暂离心收集,25℃反应2min,加入1μL SuperScript II RT(50u/μL),轻轻混匀,25℃反应10min,转入42℃反应50min后于70℃、15min终止反应,并置冰上冷却,短暂离心收集后,加入1μL Rnase H(2u/μL),37℃反应20min。即获得cDNA第一链。-20℃保存备用。

### 1.6 VP2基因的扩增

参照IBDV GZ29112毒株的基因组序列(登录号为AF051837,该毒株为中国广州的一株致弱毒株),设计、合成了1对引物,引物序列如下:

Primer VP2 a :5′-ATC GGTACCCAGATTGTTCCGTTCATACGG-3′

Primer VP2 b : 5′-GGCGAATTCCCGGATTATGTCTTTGAAGC-3′

画线部分为限制性内切酶位点。

扩增VP2基因应用Roche产品Expand High Fidelity PCR system进行。模板采用上述的RT产物2μL,反应体系为50μL:1倍的Expand High Fidelity Buffer,每种dNTP浓度为0.2 mmol/L,每种引物浓度为300nmol/L,酶混合物为2.6u, PCR反应条件为:先在95℃变性5min,然后进行PCR循环,94℃变性30s,56℃退火30s,68℃延伸150s,循环30次,循环结束后,于68℃延伸10min,取10μL,用1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测。并应用QIAquick Gel Extraction Kit割胶回收VP2基因。

### 1.7 VP2基因的克隆和测序

按照产品说明将回收的VP2基因,与pMD18-T(TAKARA)载体连接,转化大肠杆菌TG1感受态细胞,涂布于含X-Gal、IPTG、Amp的LB培养基上,37℃培养过夜,挑选白色菌落扩大培养,提取质粒,应用PCR进一步进行鉴定。样品测序由Takara公司完成。获得VP2基因序列后,与基因库中的弱毒株Cj801bkf和超强毒株HK46等的序列进行分析、比较。

## 2 结果

### 2.1 传染性法氏囊病病鸡的症状

1999年上海近郊某鸡场数群2周龄左右的鸡先后发病,发病率达70%,死亡率达40%。病鸡饮食减退,闭目呆立,羽毛蓬乱,发抖,步态不稳,拉白色水样稀粪,最后衰竭而亡。病理剖检可见,死亡鸡常有脱水现象,腿部及胸部肌肉有条、斑状出血,多数鸡脾脏肿大,法氏囊肿大充血、出血尤为明显,切开囊腔可见粘膜条纹状或斑状出血,内有粘稠的奶酪样物质,多数法氏囊呈紫葡萄样。

### 2.2 病毒的提纯

病料经处理、通过差速离心和密度梯度超速离心后,经负染、电镜观察,可见到典型的六角形无囊膜病毒粒子,其直径约25-55nm(见图1)。

图1 鸡传染性法氏囊病毒上海超强毒株NH99(负染)

Fig.1 Negative stain of isolated vvIBDV NH99 strain(×40,000)

维普资讯 http://www.cqvip.com



### 2.3 琼扩试验

提纯病毒经倍比稀释后，与抗 IBDV 阳性血清能形成明显的沉淀带。

### 2.4 动物回归试验

用无菌的病毒液攻击 200 只小鸡，2d 后开始发病，并陆续开始死亡，病鸡症状与原鸡场发病鸡症状相似，剖检可见法氏囊肿胀，内有干酪样物质或血块，多数法氏囊肿大呈紫葡萄状，腿部及胸部肌肉条、斑状出血明显，有些鸡脾脏肿大。发病 3d 后，病鸡大量死亡，至第 5 天，死亡率达 80%。扑杀未死鸡，剖检也可见典型症状。将该毒株命名为 NH99。

### 2.5 病毒核酸分析

应用蛋白酶 K 消化法提取新鲜纯化病毒的核酸 dsRNA，经琼脂糖凝胶电泳，可获得清晰的约 3.2kb和 2.8kb 两条带，即基因组 A、B 两片段（图 2）。

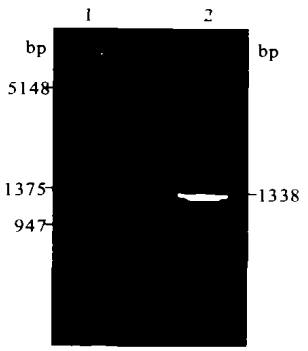


图 2 IBDV RNA 的 A、B 片段

Fig.2 A and B segment of IBDV dsRNA

1, Marker; 2, A and B segment

### 2.6 VP2 基因的扩增与分析

用 Primer VP2 a 和 Primer VP2 b 为引物，94℃变性 30s，56℃退火 30s，68℃延伸 150s，循环 30 次，获得很清晰的一条约 1.34 kb 的 VP2 基因（图 3）。应用 T－载体进行克隆，并用 PCR 对阳性克隆进行了鉴定。VP2 基因测序结果表明其与基因库中国内的几个鸡传染性法氏囊病病毒毒株及国外的几个毒株的同源性高，在 94% 以上，从分子水平上验证了导致本病的病原为鸡传染性法氏囊病病毒。进一步通过对 VP2 基因，尤其是高变区某些位点的分析、比较，不难发现，IBDV 上海毒株（NH99）具有超强毒株所具有的分子特征，在关键位点上与弱毒株（如：IBDV Cj801bkf 毒株，其为 IBDV 中国分离株的鸡胚成纤维细胞适应毒，基因登录号为 AF006694。）存在明显差异（图 4）。在第 1 个亲水区上即 222 位的氨基酸残基由 P 变为 A，在第 294 和 299 位氨基酸残基分别由 L 和 N 变为 I 和 S，在超强毒株，这 3 个氨基酸通常导致毒株的亲和性发生变化，从而导致毒力大大增强；进一步研究发现，上海株在七肽区的氨基酸是保守的，为 SWSASGS，而非弱毒株的 SWSARGT，且 279 位和 284 位氨基酸分别是 D 和 A，七肽区的保守性以及 279D 和 284A 2 个特征性氨基酸是强毒株的两个重要标志；此外，256 位为 I，而非弱毒株的 V 等。所有这些都从分子水平上说明 IBDV 上海毒株 NH99 具备超强毒株的特征。

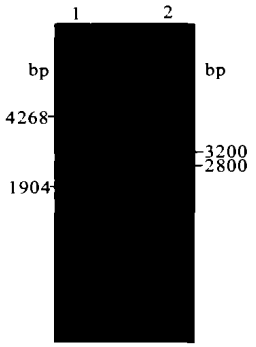


图 3 IBDV VP2 基因的扩增结果

Fig.3 RT－PCR of VP2 gene

1, Marker; 2, VP2 gene

## 3 讨论

十年前，超强毒型鸡传染性法氏囊病首次在欧洲发生，随后传遍世界各地，造成重大经济损失。十年后的今天，该病对养禽业仍是一大威胁。这一烈性疾病彻底改变了 IBD 的流行病学。IBDV 超强毒株感染以出现严重的临床症状和较高的死亡率为特征，尽管 IBDV 超强毒株所致的临床症状与通常的 I 型感染相似，但是症状更严重并且发病率更高，易感鸡龄区间扩大，包括母鸡的整个生长期。病鸡的死亡高峰较为集中，随后很快康复。在超强 IBD 急性期死亡的鸡，法氏囊是主要的诊断器官：肿胀、水肿，有时出血，感染后 7－10d 内萎缩。依据流行病学，结合病毒的分离、纯化，国内在广州、北京已分离到了鸡传染性法氏囊病超强毒[3,4]，但上海迄今没有鸡传染性法氏囊病超强毒分离、鉴定的系统报道。

从世界不同地区分离的 IBDV 超强毒株间存在抗原和分子相似性，表明它们有着共同的起源和相似的抗原进化[6,7]。尽管在世界各地由 IBDV 超强

维普资讯 http://www.cqvip.com



毒株引起的发病数量明显增长,但不同毒力的毒株仍然共存,因此,须对流行毒株进行快速鉴定。遗憾的是迄今尚未获得一株针对超强毒株的特异性单克隆抗体,因此给超强毒株的诊断带来了一定的难度。

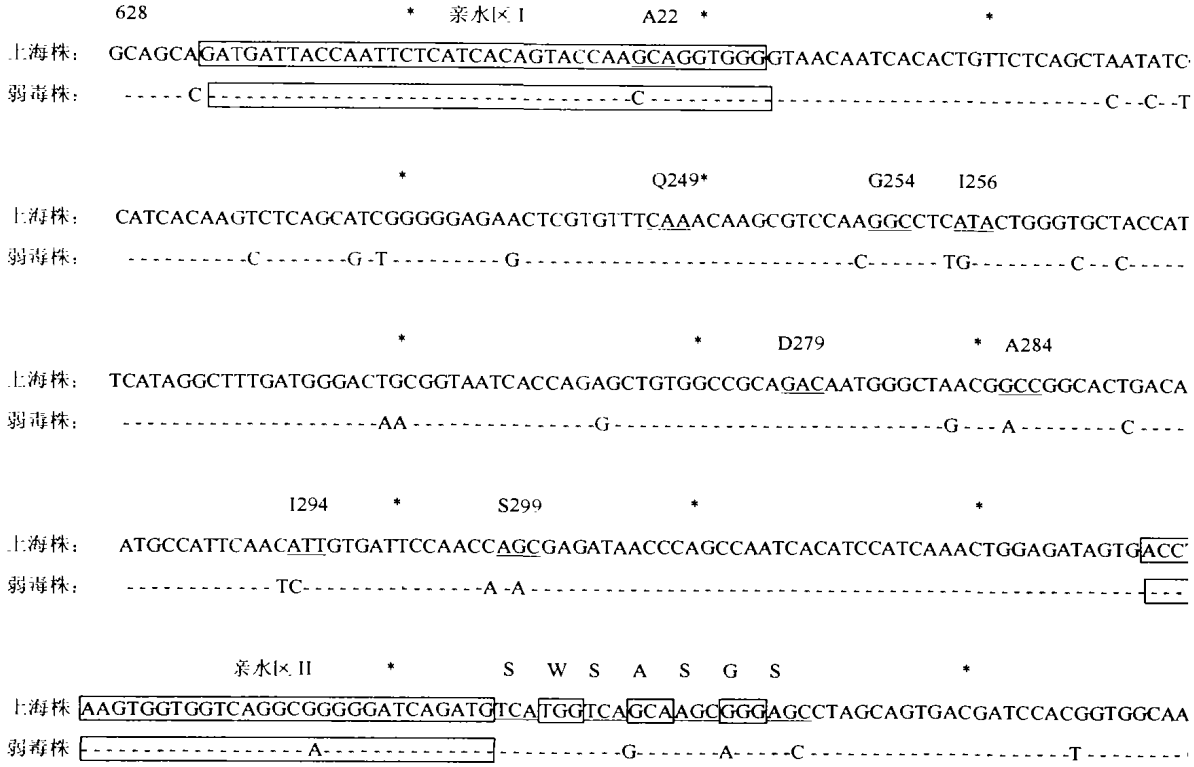


图 4　上海超强毒株(NH99)的分子特征

Fig.4　The characteristic of very virulent virus of IBDV

目前,国内外不少学者对 IBDV VP2 基因进行了克隆和测序,通过对超强毒株、强毒株和变异株的相关序列的分析、比较,揭示了超强毒株具有独特的氨基酸残基[1],从而通过对分离毒株的核苷酸或氨基酸序列的分析、比较并与病毒的生物学特性相关联,来鉴定超强毒株。在 80 年代后期和 90 年代初期,欧洲部分国家与日本、中国等都先后报道分离到 IBDV 超强毒株。Lin 等[8]对日本本土分离的 vvIBDV 的 VP2 可变区序列研究表明,90－11vvIBDV 株的 VP2 高可变区与 STC、52/70 株相比,第 1 个亲水区有 1 个氨基酸发生了变化,即 222 位氨基酸残基由 P 变为 A,第 2 个亲水区及七肽区均无变化,而疏水区有 3 个氨基酸残基发生变化,即 256 位 V、294 位 L 和 299 位 N 分别变为 I、I 和 S,不同地区的 5 株 vvIBDV 序列相同。Brown 等[1]对 DV86、74/89A、JY86、CS/89 和 661 等 5 株欧洲超强毒株测定的序列分析表明,VP2 可变区的氨基酸序列与日本的超强毒株极为一致,而且发现富含丝氨酸的七肽区在 vvIBDV 上是保守的,与标准型强毒株如 STC、52/70 株相同,但在第 1 个亲水区的 222 位氨基酸由 P 变为 A,疏水区有 3 个氨基酸发生变化,即 256 位 V、294 位 L 和 299 位 N 分别变为 I、I 和 S。随后超强毒株 HK46、ISRAEL31/10/95、849VB、OKYM、F9502、G9201 和 G9303 等的 VP2 高可变区序列相继被测定,比较分析表明,在 222 位上,超强毒株均为 A,而其他毒株则为 P、Q 或 T;256 位,超强毒株为 I,其他毒株为 V;294 位和 299 位,超强毒株分别为 I 和 S(849VB299 位为 E),而其他毒株则分别为 L 和 N。进一步研究发现,强毒株和超强毒株在七肽区的氨基酸是保守的,但 279 位和 284 位氨基酸不是弱毒株的 N(279 位)和 T(284 位),而分别是 D 和 A,因此认为 SWSASGS 七肽区的保守性以及 279D 和 284A 2 个特征性氨基酸是强毒株的两个重要标志。目前认为超强毒株应具备如下特征:(1)249 和 254 位的氨基酸分别为 Q 和 G,而非 K 和 S;(2)七肽区保持 SWSASGS 不变,且 279 和

维普资讯 http://www.cqvip.com



284位氨基酸分别为D和A,而非N和T,这是IBDV毒株具有致病力的必要条件;(3)222、294和299位具有3个特征性氨基酸,分别为A、I和S,其使得超强毒株的亲和性发生变化,从而导致毒力大大增强。我们通过对上海NH99株VP2基因的分析比较,发现其具备超强毒株的分子特征,结合其临床症状和流行病学特点,认为上海NH99株为超强毒株,对其分子生物学方面的研究工作目前正在开展。

## 参考文献


[1] Brown M D, Green P, Skinner M A. VP2 sequences of recent European veryvirulent isolates of infectious bursal disease virus are closely related to each other but distinct from those of classical strains[J]. J Gen Virol, 1994, 75:675-680.

[2] 刘 爵,刘有昌,曹永长,等.鸡传染性法氏囊病病毒变异的分子生物学研究进展[J].中国兽医学报,2000,20:205-208.

[3] 曹永长,毕英佐,梁志清,等.超强IBDV毒株宿主保护抗原的分子特征[J].中国兽医学报,1998,18:521-526.

[4] 刘 爵,刘尚高,周 蛟.鸡传染性法氏囊病超强毒LX株的分离鉴定[J].中国兽医杂志,2000,26:13-15.

[5] 陈谂言,卢 春.传染性法氏囊病病毒dsRNA核酸提纯[J].南京农业大学学报,1996,19:73-76.

[6] Dormitorio T V, Giambrone J J, Duck L W. Sequence comparisons of the variable VP2 region of eight infectious bursal disease virus isolates[J]. Avian Dis, 1997, 41:36-44.

[7] VandenBerg T P, Gonze M, Morales D, *et al*. Acute infectious bursal disease in poultry: immunological and molecular basis of antigenicity of a highly virulent strain[J]. Avian Pathol, 1996, 25:751-768.

[8] Lin Z, Kato A, Otaki Y, *et al*. Sequence comparisons of a highly virulent infectious bursal disease virus prevalent in Japan[J]. Avian Dis, 1993, 37:315-323.


# 建议将Prion的中文译名定为"朊病毒"
## ——与毛江森院士商榷


严家新

(武汉生物制品研究所,湖北武汉,430060)


本刊今年第2期转载了毛江森院士的一篇短文,题目是《建议将Prion的中文名定为"朊毒"》。笔者认为Prion的中文译名仍应以在国内已被较广泛采用的"朊病毒"为好。现提出以下三条理由与毛院士商榷。

一、Prion虽尚未有正式的中文定名,但据笔者的了解,"朊病毒"这一译名已被较广泛地采用,按"约定俗成"的原则,似不宜再更改为"朊毒"。

国内由科学出版社1994年初版、后来又不止一次加印的《英汉分子生物学与生物工程词汇》(金冬雁、黎孟枫编订)一书,发行量很大,在国内相关学术界有较大影响。其中的"Prion"译为"朊病毒"(或"感染性蛋白质")。国内较早开始宣传、普及有关Prion的知识并对推进国内相关领域的研究工作贡献最多的是中国预防医学科学院的洪涛院士。他早在上世纪八十年代起就一直使用"朊病毒"的译名。闻玉梅院士(上海医科大学)主编、1999年出版的《现代医学微生物学》一书,是目前国内较权威的一部大型教科书。在该书中,洪涛院士专门写了名为"朊病毒—传染性蛋白颗粒"的一章。在同一书中,南京医科大学周瑶玺教授写了"病毒的分类"一章,在其中的"亚病毒因子"一节中也包括Prion,而且译名为"朊病毒"。

此外,笔者在国内相关书刊上看到的采用"朊病毒"译名的例子还有很多,粗略的印象是比其他各种译名的使用频率大得多,在此不再一一列举。

二、Prion与病毒的关系到底是亲还是疏?

(下转第262页)