

## 一步法扩增克隆 IBDV 上海超强毒 VP2-4-3 基因\*

孙建和, 蒋 静, 陆 苹\*\*, 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)

Amplification and Clone of VP2-4-3 Gene of Very Virulent  
Infectious *Bursal disease virus*

SUN Jian-he, JIANG Jing, LU Ping\*\* , ZHAO Yu

(The Institute of Bio-Technology, School of Agriculture, Shanghai JiaoTong University, Shanghai, 201101, China)

**Abstract:** The methods of reverse transcription, polymerase chain reaction (PCR) amplification, and cloning of full-length VP2-4-3 gene of a very virulent infectious *Bursal disease virus* (vvIBDV) strain SH95 were developed. The use of random primer and a reverse transcriptase lacking RNase-H activity produced full-length coding region and non-coding region cDNA copies of the viral genomic segments. The 3060 base-pairs (bp) of VP2-4-3 were amplified by long and accurate PCR in a single step, successfully cloned and sequenced revealing their identity of IBDV.

**Key words:** Very virulent infectious *Bursal disease virus* (vvIBDV); Full-length cDNA; VP2-4-3 gene; Clone and sequence analysis

**摘要:** 分离、纯化了鸡传染性法氏囊病毒超强毒 (vvIBDV) 上海株 SH95 的病毒核酸 dsRNA, 应用随机引物将 RNA 反转录成 cDNA, 以此为模板一步扩增出 A 片段前体融合蛋白基因即 VP2-4-3 基因, 将其克隆入 pGEM-T 载体, 并进行序列分析, 其与超强毒株 HK46 的核苷酸序列的同源性达 98%, 整个基因有 5 个氨基酸差异, 同源性达 99.51% (1007/1012)。

**关键词:** 鸡传染性法氏囊病毒超强毒 (vvIBDV); 全长 cDNA; VP2-4-3 基因; 克隆  
中图分类号: S852.65 文章标识码: A 文章编号: 1003-5125(2002)04-0358-04

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, 其病毒 (IBDV) 主要侵害鸡体的免疫器官, 造成免疫抑制, 已成为危害养鸡业的主要疫病之一。而近年来, 由于超强毒株或变异株的出现, 又使本病的发生和流行出现了新的特点, 传统的疫苗不能提供足够的保护, 更加重了对养鸡业的危害, 也给诊断、预防和治疗带来了新的困难。IBDV 是一种双链、双节段 RNA 病毒, IBDV 基因组的 A、B 两个片段中, 其含 3 200 - 3 400bp, 其正链主要包括一个大的连续的开放式阅读框 (ORF), 编码分子量约 110kD, 由 1012 个氨基酸组成的前体融合蛋白, 后加工成为成熟的 VP2、VP3 和 VP4。B 片段

则由 2800 - 2900bp 组成。近年来, 人们对 IBDV 抗原变异和毒力变异的分子机制进行了研究, 发现各 IBDV 毒株之间的基因变异主要集中在 A 片段的大 ORF 的 5' 端, 即 VP2 区域, 毒力变异也可能与此有关, 但更多研究表明毒力变异可能受多基因控制。为了研究这些变异的分子机制, 国内外不少学者都进行了 IBDV 基因组 A、B 片段以及 VP2-4-3 基因的克隆<sup>[1~4]</sup>, 但他们基本都采用分步扩增, 再连接、克隆的策略, 并且对国内本土分离的超强毒株的克隆尚鲜于报道。我们采用一步法扩增并克隆了 IBDV 上海超强毒前体融合蛋白基因 (ORF), 即 VP2-4-3 基因, 并进行序列分析, 为进一步的研究工作奠

收稿日期: 2002-03-20, 修回日期: 2002-04-28

\* 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.

定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 毒株

IBDV 上海超强毒株 SH95 由上海交通大学农学院生物技术研究所分离鉴定<sup>[5]</sup>。

### 1.2 病毒的繁殖与纯化

用  $10^5$  EID<sub>50</sub> 的 IBDV 上海超强毒株 SH95 经口服和滴鼻感染 4 周龄的 IBDV 非免疫鸡, 攻击后 3d, 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,  $-70^{\circ}\text{C}$  冻存备用。

### 1.3 蛋白酶 K 法提取病毒 dsRNA

参照陈溥言等<sup>[6,7]</sup>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。

### 1.4 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  $6\mu\text{L}$  与随机引物 ( $50\text{ng}/\mu\text{L}$ )  $3\mu\text{L}$  和 dNTP ( $10\text{mmol}/\text{L}$  dNTP mix)  $1\mu\text{L}$  混匀后, 于  $99^{\circ}\text{C}$  水浴 6min, 立即置冰上至少 1min, 短暂离心收集, 加入  $10\times$  RT buffer  $2\mu\text{L}$ ,  $25\text{mmol}/\text{L}$  MgCl<sub>2</sub>  $4\mu\text{L}$ ,  $0.1\text{mol}/\text{L}$  DTT  $2\mu\text{L}$  和 Rnase inhibitor  $1\mu\text{L}$ , 混匀后短暂离心收集,  $25^{\circ}\text{C}$  反应 2min, 加入  $1\mu\text{L}$  SuperScript II RT ( $50\text{u}/\mu\text{L}$ ), 轻轻混匀,  $25^{\circ}\text{C}$  反应 10min, 转入  $42^{\circ}\text{C}$  反应 50min 后于  $70^{\circ}\text{C}$ , 15min 终止反应, 并置冰上冷却, 短暂离心收集后, 加入  $1\mu\text{L}$  RNase H ( $2\text{u}/\mu\text{L}$ ),  $37^{\circ}\text{C}$  反应 20min。即获得 cDNA 第一链。 $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.5 VP2-4-3 基因的扩增

参照 IBDV HK46 毒株的基因组序列 (登录号为 GI:4566479, 该毒株为一超强毒株), 设计、合成了 1 对引物, 引物序列如下:

ORFA5: 5'-ATATACGCGTGATGACGAACCTGCAAGATC-3'

ORFA3: 5'-CGCGTCTAGATCACTCAAGGTCCTCATCAG-3'

画线部分为限制性内切酶位点。

扩增 VP2-4-3 基因应用 Roche 产品 Expand

High Fidelity PCR system 进行。模板采用上述的 RT 产物  $0.5\mu\text{L}$ , 反应体系为  $50\mu\text{L}$ :1 倍的 Expand High Fidelity Buffer, 每种 dNTP 浓度为  $0.2\text{mmol}/\text{L}$ , 每种引物浓度为  $300\text{nmol}/\text{L}$ , 酶混合物为  $2.6\text{U}$ , 镁离子浓度为  $1\text{mmol}/\text{L}$ 。PCR 反应条件为: 先在  $95^{\circ}\text{C}$  变性 5min, 然后进行 PCR 循环:  $94^{\circ}\text{C}$  变性 30s,  $55^{\circ}\text{C}$  退火 30s,  $68^{\circ}\text{C}$  延伸 240s, 循环 30 次, 循环结束后, 于  $68^{\circ}\text{C}$  延伸 15min, 取  $10\mu\text{L}$ , 用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。并应用 QIAquick Gel Extraction Kit 割胶回收 VP2-4-3 基因。

### 1.6 VP2-4-3 基因的克隆和测序

按照产品说明将回收的 VP2-4-3 基因, 与 pGEM-T easy (Promega) 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,  $37^{\circ}\text{C}$  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 VP2-4-3 基因序列后, 与基因库中相关毒株 (超强毒株如: HK46 (GI: 4566479)、UK661 (GI: 1296812)、OKYM (GI: 1669530)、GZ29112 (GI: 2970630); 强毒株如: Cu-1 (GI: 14582975); 弱毒株如: P2 (GI: 854197)、CEF94 (GI: 6539893); 变异株如: Variant E (GI: 4894789); II 型毒株如: OH (II 型) (GI: 1469288)) 的序列进行分析、比较。

## 2 结果

### 2.1 IBDV dsRNA 的分离与纯化

从发病鸡法氏囊中, 应用超速离心分离、纯化得到典型的鸡传染性法氏囊病病毒, 应用蛋白酶 K 消化法提取病毒 dsRNA, 经琼脂糖凝胶电泳, 可获得以 3.2kb 和 2.8kb 为主的两条带, 即基因组 dsRNA 的 A、B 两片段。从低熔点琼脂糖凝胶上分别切下 A 片段和 B 片段, 采用苯酚-氯仿进行 A、B 两片段的纯化, 经琼脂糖凝胶电泳, 可见清晰的 A 片段一条带和 B 片段一条带, 如图 1。

### 2.2 cDNA 第一链的合成

应用随机引物, 合成 cDNA 第一链的效率更高。

以此为模板, 可扩增出 VP2-4-3 基因、全长基因组 A 片段和 B 片段。

### 2.3 IBDV VP2-4-3 基因的扩增

为获得 IBDV 前体融合蛋白的全长基因, 应用特异性引物 ORF A5 和 ORF A3, 经  $94^{\circ}\text{C}$  变性 30s,  $55^{\circ}\text{C}$  退火 30s,  $68^{\circ}\text{C}$  延伸 240s, 循环 30 次, 结果获得

约 3060bp 的条带,如图 2。应用 T-载体进行克隆,并用 PCR 进行了鉴定。VP2-4-3 基因测序结果在 GenBank 中登录号为 AY134874 表明其与基因库中国内的几个毒株及国外的几个毒株的同源性高,因此,认为应用一步法扩增获得的 IBDV 前体融合蛋白全长基因是正确的,本文建立的一步法扩增、克隆 IBDV 超强毒株前体融合蛋白全长基因的方法是可行的。

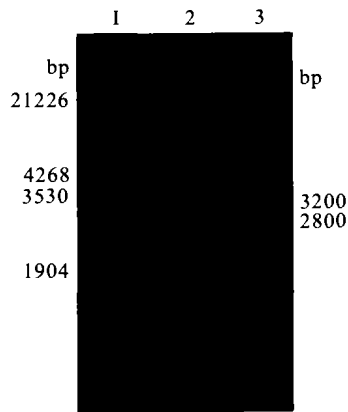


图 1 IBDV RNA 的 A、B 片段  
Fig. 1 A and B segment of IBDV dsRNA  
1, Marker; 2, A segment; 3, B segment

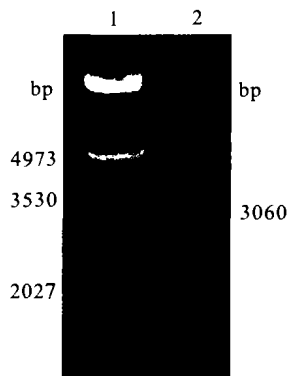


图 2 IBDV VP2-4-3 基因的扩增结果  
Fig. 2 RT-PCR of VP2-4-3 gene  
1, Marker; 2, VP2-4-3 gene

### 2.4 序列分析

序列分析显示,IBDV 超强毒株 SH95 与基因库中某些毒株的同源性在 95% 以上,与超强毒株 HK46 的核苷酸同源率为 98% (2998/3039),编码氨基酸的同源率为 99.51% (1007/1012)。与其它 I 型毒株相比,SH95 VP2-4-3 基因上有 31~173 个核苷酸差异、有 5~27 个氨基酸差异,SH95 VP2-4-3 基因上具有的独特核苷酸位点为:455(G)、497(G)、

644(A)、802(A)、929(G)、1409(G)、1530(C)、1853(C)、2121(A)、2129(T)、2206(G)、2546(T)、2999(C),具有的独特氨基酸位点为:264(K)、704(T)和 732(G)。通过对 12 株 IBDV 编码氨基酸序列的分析、比较,发现毒力不同的毒株主要在如下位点发生氨基酸规律性替代:222 位(Ala - Pro)、242 位(Ile-Val)、253 位(Gln-His)、256 位(Ile-Val)、279 位(Asp-Asn)、284 位(Ala-Thr)、294 位(Ile-Leu)、299 位(Ser-Asn)、451 位(Leu-Ile)、541 位(Ile-Val)、680 位(Tyr-Cys)、685 位(Asn - Lys)、715 位(Ser-Pro)、751 位(Asp-His)、981 位(Pro-Leu)、990 位(Val-Ala)、1005 位(Ala-Thr)等。通过系统发生分析表明其与国内外其他超强毒株形成一个独立的分支,在起源上较为接近,而与一些弱毒株,无论在氨基酸还是在核苷酸水平上都相距较远,如图 3。

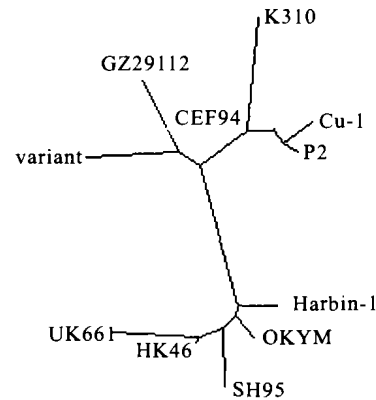


图 3 IBDV SH95 基因组 A 片段上 VP2-4-3 基因核苷酸水平的系统发生树  
Fig. 4 Phylogenetic tree based on the nucleotide sequence encoding VP2-4-3 gene of IBDV SH95

### 3 讨论

最近十年来,在欧洲和亚洲相继分离到鸡传染性法氏囊病毒超强毒株,国内在广州、北京和上海也先后分离到了鸡传染性法氏囊病超强毒株<sup>[8]</sup>,其前体融合蛋白基因核苷酸序列及由此推测的氨基酸序列均与其它弱毒株存在明显差异。克隆不同 vvIBDV 前体融合蛋白基因并分析其序列,对于了解 vvIBDV 的致病的分子机制和系统发生十分必要。我们在应用一步法扩增并克隆 vvIBDV 全长基因组 A 片段和 B 片段的基础上,又以 vvIBDV 上海毒株 SH95 为材料进行前体融合蛋白基因的扩增、克隆和测序,为进一步研究超强毒提供了较好素材。

尽管目前国内外有一步法扩增、克隆 IBDV 基因组的报道,但应用一步法扩增、克隆 IBDV 超强毒国内分离株(上海毒株)的前体融合蛋白基因尚属首次。该方法的建立为进一步在分子水平上研究病毒基因组、抗原变异和毒力变异以及研制生物技术疫苗(如 VLP 疫苗)等打下了坚实的基础,也为进行分子流行病学研究提供了一条有效途径。

通过对鸡传染性法氏囊病毒上海超强毒株 SH95 的 VP2-4-3 基因的克隆与测序及系统发生分析表明,其与香港地区分离、鉴定的鸡传染性法氏囊病毒超强毒株 HK46 的核苷酸同源率为 98%,编码氨基酸的同源率为 99.51%(1007/1012);与国内另一高强毒株 Harbin 株相比,其核苷酸同源率亦为 98%,编码氨基酸的同源率为 98.41%(996/1012),表明上海超强毒株与 HK46 等超强毒株在起源上可能较为接近,进一步的研究工作尚在进行。

#### 参考文献

[1] Boot H J, ter Huurne A H M, Peeters B P H. Generation of full-

length cDNA of the two genomic dsRNA segments of Infectious Bursal Disease virus[J]. *J Virol Methods*, 2000, 84: 49-58.

- [2] Akin A, Wu C C, Lin T L. Amplification and cloning of infectious bursal disease virus genomic RNA segments by long and accurate PCR[J]. *J Virol Methods*, 1999, 82:55-61.
- [3] 曹永长,刘爵,刘有昌,等.传染性囊病病毒完整基因组的克隆和鉴定[J].*中国兽医杂志*,1999,25(8):3-6.
- [4] 胡子信,张曼夫.传染性法氏囊病毒中国强毒株 A 节段 cDNA 基因的克隆和序列分析[J].*病毒学报*,1999,15:330-338.
- [5] 孙建和,陆苹,李晖,等.鸡传染性法氏囊病上海超强毒株 NH99 的分离与鉴定[J].*中国病毒学*,2002,17:252-256.
- [6] 陈溥言,卢春.传染性法氏囊病毒 dsRNA 核酸提纯[J].*南京农业大学学报*,1996,19(4):73-76.
- [7] Akin A, Wu C C, Lin T L. A comparison of two RNA isolation methods for double-stranded RNA of infectious bursal disease virus[J]. *J Virol Methods*, 1998, 74:179-184.
- [8] 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(5):13-15.