

IBDV $vp2$ 基因高变区序列测定与进化分析*

闫笑, 李天宪**, 范兆军, 寇铮, 陈绳亮

(中国科学院武汉病毒研究所, 湖北武汉 430071)

Sequencing and Phelogenetic Analysis of Hypervariable Region of Infectious Bursal Disease Virus $vp2$ GeneYAN Xiao, LI Tian-xian**, FAN Zhao-jun, KOU Zheng, CHEN Sheng-liang
(Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)

Abstract: Hypervariable region of $vp2$ gene of six different IBDV (*Infectious bursal disease virus*) isolates, which were isolated from Jiangsu province, was amplified by RT-PCR and sequenced. Furthermore, sequences of six IBDV isolates were analyzed by ClustalX and Phylip3.5. It was suggested that three isolates (Y3, P2G, P8G) were closely related to vvIBDV (*very virulent IBDV*) strains isolated from China and Europe. Other isolates (SZ, Y5, W04) were very close with Japanese vvIBDV strains. This study laid on foundation for the research of molecular epidemiology and the development of IBDV vaccines.

Key words: *Infectious Bursal Disease Virus* (IBDV); $vp2$ gene; Hypervariable region; Very virulent IBDV

摘要: 本实验采用来源于江苏地区的六株不同鸡传染性法氏囊病毒 (*Infectious bursal disease virus*, IBDV) 毒株, 应用 RT-PCR 法对 $vp2$ 基因高变区进行了扩增, 构建重组质粒 pMD18T- $vp2$, 测序。与有代表性的 IBDV 毒株 VP2 基因高变区序列进行比较分析, 以 ClustalX 软件进行序列比对, 得到基因序列及氨基酸序列同源性, IBDV Y3、P2G、P8G、SZ、Y5 和 W04 (6 株) IBDV 与 D6984 (荷兰) 的同源性达到 99.0% 以上, 与其它一些超强毒株 (very virulent IBDV, vvIBDV) 的同源性也达到了 97.8% 以上, 并在关键氨基酸位点符合 vvIBDV 特征, 采用 Phylip3.5 软件分析作出进化树, 其结果从分子水平说明六个毒株均为 vvIBDV, 与欧洲和日本的超强毒株有较近的亲缘关系, 而与美洲株的较远, 从而为 IBDV 分子流行病学研究和疫苗的研制提供了科学依据。

关键词: 鸡传染性法氏囊病毒 (IBDV); $vp2$ 基因; 高变区; 超强毒株

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2004) 06-0620-04

鸡传染性法氏囊病毒 (*Infectious bursal disease virus*, IBDV) 引起鸡 (I 型) 和火鸡 (II 型) 的一种高度接触性传染病—传染性法氏囊病 (*Infectious bursal disease*, IBD), 给世界各国的禽养殖业带来了巨大损失。IBDV 基因组由 A (3.2kb)、B (2.8kb) 两个双链 RNA 节段构成。 $vp2$ 基因位于 A 节段内, 形成的 VP2 为主要的结构蛋白和保护性抗原成分。携带有宿主保护性抗原决定簇, 可诱导产生保护性

中和抗体, 具有血清型特异性, 并可诱导哺乳动物细胞凋亡^[1]。IBDV 不同毒株氨基酸的差异主要发生于 VP2 区特别是 206 至 305 个氨基酸, 称之为 VP₂ 高变区, 是抗原性的主要部位。这段区域内不同毒株间的变异很大, 其分子结构的改变常导致病毒致病力的改变及宿主对疫苗应答的改变, 使得传统的疫苗不能控制其流行。在 VP2 基因高变区内包括两个亲水区和一个七肽区。亲水区是变异发生的

收稿日期: 2004-06-01, 修回日期: 2004-07-15

* 基金项目: 国家科技攻关计划项目 (2004BA519A11)

作者简介: 闫笑 (1978-), 女, 陕西西安籍, 硕士研究生, 研究方向为动物病毒学。

** 通讯作者. Corresponding author. E-mail: Litx@wh.iov.cn.

热点部位^[2],对于超强毒株抗原性极为重要。因此,亲水区氨基酸残基的改变将会导致病毒抗原性的改变,甚至新型变异株的出现。七肽区(S-W-S-A-S-G-S)的氨基酸位点与IBDV的毒力和致病力密切相关。

本实验对来源于江苏地区的6株IBDV的_{vp2}基因高变区段进行序列分析,从IBDV结构的分子机理研究毒株间的同源性与亲缘关系,分析其变异规律,为IBDV的分子流行病学和疫苗的研制提供科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

IBDV细胞毒SZ、Y3、Y5、W04(分别以SZ、Y3、Y5、W04代称)和组织毒P2G、P8G(分别以P2G、P8G代称)分别来自苏州、扬州和南京某鸡场,由南京农业大学姜平教授和南京军事医学研究所王永山研究员惠赠。vero细胞和大肠杆菌DH5 α 均由本室保存。限制性内切酶(*EcoRI*、*HindIII*、*BamHI*)、Rnase Inhibitor、pMD-18T载体试剂盒、DL2000Marker购自Takara;随机引物、AMV购自Promega;Taq购自Biostar;胶回收试剂盒购自Omega;Trizol、DEPC购自Invitrogen;新生小牛血清、1640培养基购自Gibco。

1.2 病毒的增殖

细胞毒:1640培养基加入10%新生小牛血清培养vero细胞,培养24h以内的vero细胞接毒,48h观察到明显CPE后收毒,反复冻融三次,-20℃进行保存。

组织毒:取患病组织0.5g,以PBS(DEPC水配制)按5:1比例研磨,5000r/min 5min低温离心后,保留上清弃去沉淀,上清液-20℃进行短期保存。

1.3 病毒RNA的提取

细胞毒100,000g 4℃超离心2.5h,适量PBS重悬沉淀,使用Trizol试剂按照常规方法进行病毒RNA的提取;研磨并重悬后的组织毒使用Trizol试剂按照常规方法进行病毒RNA的提取。得到的RNA用DEPC水溶解,立即进行RT-PCR。

1.4 引物设计

根据GeneBank已发表IBDV序列,以Oligo6.0和PrimerPremier5.0软件设计一对引物,委托北京奥科生物公司合成。引物序列如下:

上游引物(573-590):5' -GCCAACATCAACG ACAA-3'

下游引物(1227-1210):5' -GGCGACCGTAAC

GACA(G)GA-3'

1.5 病毒RNA的反转录及扩增

RT:20 μ L体系中template4 μ L;随机引物(1 μ g/ μ L)1 μ L; dNTP(10 mmol/L)2 μ L; Rnasin(40 u/ μ L)0.5 μ L; AMV(9u/ μ L)1 μ L; 5 \times buffer4 μ L; DEPC水7.5 μ L 反应条件:模板与随机引物混合后92℃5min,迅速冰浴5min;剩余成份加入后室温放置10min,42℃1h,迅速冰浴5min,-20℃保存

PCR:50 μ L体系中template 2 μ L;上下游引物(25 mmol/L)各2 μ L; dNTP(10mmol/L)4 μ L; Taq(2u/ μ L)0.5 μ L; 10 \times buffer 5 μ L; H₂O 34.5 μ L 反应条件:95℃5min; 94℃5min, 50℃30s, 72℃40s(35个循环); 72℃10min。

1.6 PCR产物的检测和胶回收

PCR产物按常规方法进行1%琼脂糖电泳,预期扩增片段约为654bp;胶回收按照试剂盒说明进行,使用无菌去离子水代替试剂盒内的溶解buffer溶解胶回收产物。

1.7 VP2片段的克隆、鉴定和序列测定

胶回收产物与pMD-18T载体16℃过夜连接后,连接产物与感受态细胞进行电击转化大肠杆菌DH5 α ,转化产物涂含氨苄青霉素(100 μ g/mL)并且表面均匀涂布40 μ L 2% X-gal、7 μ L 20% IPTG的LB琼脂平板上,置37℃培养,挑取白色单菌落接种于含氨苄青霉素(100 μ g/mL)的液体LB培养基内37℃振荡培养,挑取白色单菌落接种于含氨苄青霉素的液体LB培养基内振荡培养,碱裂解法提取质粒^[3],*EcoR I*、*Hind III*双酶切鉴定重组质粒pMD18T-_{vp2}后测序。测序由上海生工完成。

1.8 _{vp2}片段序列的同源性比较

从GeneBank中选取了来自各地的代表性IBDV毒株(中、日、美、欧洲各国等):STC(D00499)、52/70(D00869)、PBG-98(D00868)、CU-1(X16107)、Harbin(AF092171)、ZJ2000(AF321056)、CEF94(AF194428)、GLS(M97346)、VariantE(X54858)、GZ902(AF006699)、VariantA(M64285)、OKYM(D49706)、OKYMT(D83985)、HK46(AF092943)、D6984(AF240686)、UK661(X92760)、G9201(AF006696)、BD3/99(AF362776)、CJ801(AF006701)、002-73(X03993)。本实验6株病毒为:P2G(AY628214)、P8G(AY628215)、SZ(AY628216)、Y3(AY628217)、Y5(AY628218)、W04(AY624999)。将测得的序列与已报道序列进行核苷酸序列及氨基酸序列的比较(表1)。

1.9 采用Phylip3.5软件分析作出进化树。

采用 Phylip3.5 软件对本实验 6 株病毒和选自 GeneBank 的毒株进行分析做出进化树, 从进化树所显示的亲缘关系对本实验 6 株病毒进行分析。

表 1 本文所引用的序列

Table1 Sequences used in this paper

Sequences labelled with * were six IBDVs used in the experiment			
Strains	GenBank No	Strains	GenBank No
P2G*	AY628214	GLS	M97346
P8G*	AY628215	VariantE	X54858
SZ*	AY628216	GZ902	AF006699
Y3*	AY628217	VariantA	M64285
Y5*	AY628218	OKYM	D49706
W04*	AY624999	OKYMT	D83985
STC	D00499	HK46	AF092943
52/70	D00869	D6984	AF240686
PBG-98	D00868	UK661	X92760
CU-1	X16107	G9201	AF006696
Harbin	AF092171	BD3/99	AF362776
ZJ2000	AF321056	CJ801	AF006701
CEF94	AF194428	002-73	X03993

* Used 6 IBDV strains in this test.

2 结果

2.1 细胞毒增殖 CPE

以 vero 细胞增殖病毒 48h 出现明显 CPE。

2.2 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

以 1% 的琼脂糖电泳检测 PCR 产物, 显示 P2G、S2、Y3、Y5 和 W04 样品均得到约 654bp 的条带, 与预期大小相符, (图未示)。

2.3 pMD18T-*vp2* 质粒双酶切鉴定

PCR 产物以 1% 的琼脂糖电泳后进行胶回收, 得到的产物与 pMD-18T 载体连接, 转化 DH5 α , 随机挑取生长于含 X-gal 和 IPTG 的 LB-Amp 平板上的白色单菌落, 对得到的 pMD18T-*vp2* 质粒进行 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定, 得到约 2.8kb 和 654bp 两条带, 这与 RT-PCR 结果是一致的, 如图 1 所示;

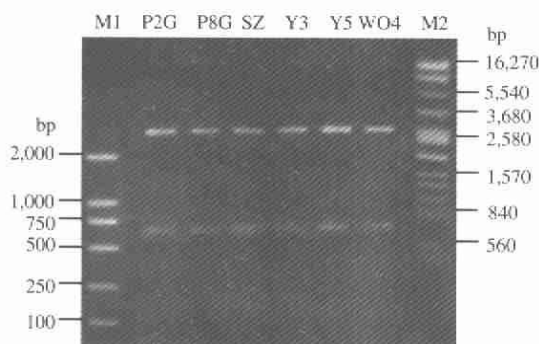


图 2 pMD18T-VP2 重组质粒 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定

Fig.2 The identification of pMD18T-*vp2* (unit: bp)

M1, DL2, 000Marker; M2, λ DNA/*EcoR* I + *Hind* III + *Bam* H I; P2G, P8G, SZ, Y3, Y5, W04; pMD18T-*vp2*/*EcoR* I + *Hind* III

2.4 VP2 片段序列的同源性比对

序列测定获得 *vp2* 基因高变区序列 654bp, 并推导出其氨基酸序列。从同源性比较和 *vp2* 高变区核苷酸序列比对表明: Y3 和 P8G 与 D6984 (荷兰) 同源性达到 99.3%, P2G 与 D6984 同源性达到 99.0%, SZ、Y5 和 W04 与 D6984 同源性达到 99.5%; 与其它几株 vvIBDV 也表现出较高同源性, 如 OKYM (日本) \geq 98.9%, HK46 (香港) \geq UK661 (英国) \geq 98.7%, BD3/99 (德国) \geq 98.0%, G9201 (广州) \geq 97.8%。与国外的一些经典毒株和变异株比较, 其同源性普遍在 95% 以下, 与我国 Harbin、ZJ2000、CJ801、GZ902 等毒株的同源性相对也较低, 说明在这一段抗原位点易发生变异。结果说明本实验所采用的 6 株 IBDV 与来自日本、欧洲和我国的 vvIBDV 均有较高的序列同源性, 而与经典株和弱毒株的同源性较差。

2.5 进化树的构建

进化树图 3 显示, 这 6 株 IBDV 处于同一大分支中, 并且与中、日、欧的 vvIBDV (OKYM (日本)、HK46 (香港)、UK661 (英国)、BD3/99 (德国)、G9201 (广州)、D6984 (荷兰)) 和源于 OKYM 的致弱毒株 OKYMT 处于同一大分支中。其中 Y3 与 HK46、D6984、G9201 形成一个分支, P8G、P2G 与 BD3/99 在同一分支内, SZ、Y5 和 W04 则与 OKYM 有着较近的亲缘关系, UK661 为独立的一支。表明本实验的 6 株 IBDV 主要与来自日本、欧洲和我国的 vvIBDV 有较近的亲缘关系。

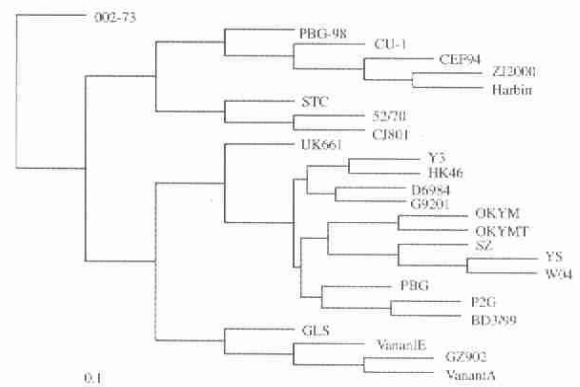


图 3 根据 VP2 高变区核苷酸序列所作的进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of the 654-bp *vp2* gene fragment based on GenBank reference IBDV strains and isolates from Jiangsu province

3 讨论

本实验所采用的 6 株 IBDV 与来自日本、欧洲

和我国的 vvIBDV 有较高的序列同源性,6 株 IBDV 与中、日、欧等地的 vvIBDV 同源性最高,均在 97% 以上。

IBDV 分子七肽区 (S-W-S-A-S-G-S) 的分子结构与 IBDV 的毒力和致病力密切相关,其中 1 个或 2 个丝氨酸被取代必将导致毒力的下降。七肽区保持 SWSASGS 不变是 vvIBDV 结构上的一个典型特征,另外有一些对 IBDV 毒力强弱具有决定作用的特征性氨基酸位点 Q249、G254、N279、T284、A222、I294、S299^[4]。其中 N279 和 T284 是 IBDV 适应 CEF 细胞的关键性氨基酸^[5],适应细胞后得到的弱毒株可作为活疫苗,而四种 vvIBDV: HK46、OKYM、D6948、UK661 在这两个位点发生了相同的变化 (N279D, T284A) 后均不能适应 CEF 细胞,也说明了这些位点对毒力的重要性^[6]。结合其分子结构的比较,本实验毒株 P2G、P8G、Y3、SZ、Y5、W04 的七肽区保持 SWSASGS 未发生任何变化,此结构符合 vvIBDV 特征。另外,当 249、254、279、284、222、294、299 位氨基酸发生变化 Q249、G254、N279D、T284A、A222、I294、S299, IBDV 具有超强毒性,成为 vvIBDV。经对 P2G、P8G、Y3、SZ、Y5、W04 六株 IBDV 的 249、254、279、284、222、294、299 位氨基酸分析,证实这几个位点分别为 Q、G、D、A、A、I、S,不存在弱毒株特征,完全符合 vvIBDV 典型结构特征。因此,确定该六个分离株为 vvIBDV。亲水区氨基酸的保守性对 IBDV 的抗原性是极为重要的。P2G、P8G、Y3 在第一亲水区和第二亲水区内的氨基酸与所选 vvIBDV 相比均未发生变化;SZ、Y5、W04 只在第一亲水区发生了一个氨基酸 Q219R 的变化,这一变化是否会引起病毒抗原表位的变化还有待进一步研究。

进化树的分析中,本实验六株 IBDV (P2G、P8G、

Y3、SZ、Y5、W04) 与中、日、欧 (OKYM、HK46、UK661、BD3/99、G9201、D6984) 的 vvIBDV 和源于 OKYM 的致弱毒株 OKYMT 处于同一大分支中。具有最近的亲缘关系。

综上所述,同源性比较和进化树的研究分析结果表明,实验中 6 株来源不同的 IBDV 分离株 P2G、P8G、Y3、SZ、Y5、W04 在本实验分子水平的分析可认为是超强毒株,且与国外 (主要是欧洲和日本) vvIBDV 有密切的亲缘关系。结合众多国内外资料,发现亚洲流行的 IBDV 多与欧洲株的同源性较高并有较近的亲缘关系,上世纪 80 年代至 90 年代亚洲正是我国大量进口鸡种及蛋产品的时期,分析推测本实验的 6 株 IBDV 很有可能起源于欧洲而非美洲。

参考文献

- [1] Fernández-Arias A, Martínez S, Rodríguez J F, *et al.* The major antigenic protein of infectious bursal disease virus, VP2, is an apoptotic inducer[J]. *J Virol*, 1997, 71:8014-8018.
- [2] Schnitzler D, Bernstein F, Müller H, *et al.* The genetic basis for the antigenicity of the VP2 protein of the infectious bursal disease virus[J]. *J Gen Virol*, 1993, 74:1563-1571.
- [3] 金冬雁,黎孟枫. 分子克隆实验指南[M]. (第三版) 北京: 科学出版社, 2002.
- [4] 曹永长,毕英佐. 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 (6): 521-526.
- [5] Boon-Leong Lim, Cao Y C, Tiffany Yu, *et al.* Adaptation of very virulent infectious bursal disease virus to Chicken Embryonic Fibroblasts by site-directed mutagenesis of residues 279 and 284 of viral coat protein VP2[J]. *J Virol*, 1999, 73: 2854-2862.
- [6] 于 涟,黄耀伟,李建荣,等. 三株传染性法氏囊病毒中国强毒株 A 节段全长基因组结构和编码蛋白的序列分析[J]. *微生物学报*, 2001, 41(5):573-581.