

我国一株鸚鵡幼雏病病毒全序列测定与初步分析*

寇 铮, 李天宪**, 钟 靖, 陈绳亮, 范兆军, 张 忠

(中国科学院武汉病毒研究所, 湖北武汉 430071)

Sequencing and Analysis of Complete Sequence of Budgerigar Fledgling Disease Virus Isolated from China

KOU Zheng, LI Tian-xian**, ZHONG Jing, CHEN Sheng-liang, FAN Zhao-jun, ZHANG zhong
(Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)

Abstract: The genome of BFDV strain HB YM02 isolated from Hubei province was sequenced and analyzed. The sequence suggested BFDV isolated from different hosts belonged to one genotype. A phylogenetic tree based on the genomic nucleotide sequences of seven isolates was constructed. This tree showed two main branches. Taking into account of the relation of the hosts, the tree suggested BFDV formed a host-specific evolution, and it was impossible to delineate a geographically based evolution.

Key words: Budgerigar fledgling disease virus(BFDV); Sequence analysis; Evolution

摘要:采用鸡胚成纤维细胞(CEF)培养增殖首次从湖北省云梦县分离的鸚鵡幼雏病病毒(Budgerigar fledgling disease virus, BFDV)分离株(BFDV-HB YM02),经 PCR 分段扩增法获得全基因组并完成序列测定。HB YM02 株全序列测定结果与 GenBank 中仅有的六株 BFDV 全序列进行同源性与进化分析。经 BLAST 分析, HB YM02 株与其他六株 BFDV 同源性为 98%~99%,为同一个基因型。运用 Phylip3.5 软件构建进化树,分析显示,来源于不同宿主的 BFDV 与宿主关系紧密,与地理分布没有明显的相关性。

关键词:鸚鵡幼雏病病毒;序列分析;进化

中图分类号:S852.65 文献标识码:A 文章编号:1003-5125(2005)01-0046-04

鸚鵡幼雏病是由鸚鵡幼雏病病毒(Budgerigar Fledgling Disease Virus, BFDV)引起的多品种鸚鵡雏鸟死亡的急性病毒性传染病^[1,2], BFDV 粒子无囊膜,直径 40~50nm,核酸为双链环状 DNA,分子量为 3.3×10^6 Da。病毒对热,冻融和脂溶剂均不敏感,不易被福尔马林灭活。BFDV 主要感染出壳 1~3 周的鸚鵡,死亡率达到 80%^[3]。病症表现为厌食、消瘦、皮下出血、腹泻和呼吸困难等症状。此病的感染范围广,鸚鵡和其它种类的笼养鸟均是易感群^[3]。我国于 1994 年首次在湖北云梦县和青岛的某集约化鸚鵡养殖基地发生暴发流行,至今仍在我国某些地区散发流行,给我国养鸟业带来重大损失。目前国内外对 BFD 的诊断及预防尚无理想的防治方法。

本研究对我国首次从湖北云梦县患病濒死的鸚鵡体内分离的 BFDV HB YM02 株^[4,5],进行了全基因组序列测定、同源性比较与进化分析,为建立特异性的 BFDV 分子生物学检测方法以及基因工程疫苗的研制提供了科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

BFDV-HB YM02 株为本研究室分离并保存, RMP1640 培养基购自 GIBCO 公司,大肠杆菌 DH5 由本实验室保存提供,PCR 试剂、限制性内切酶及克隆载体 pMD18-T 载体均购自宝生物工程(大连)公司,琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自 OMEGA 公司,引物根据 GenBank 的 BFDV 序列设

收稿日期:2004-07-27,修回日期:2004-10-10

* 基金项目:中国科学院知识创新项目资助(KSCX2-SW-302-3);湖北省科技攻关重点基金项目资助(2001AA201B01)

作者简介:寇 铮(1979-),男,河南洛阳籍,助理研究员,主要从事动物病毒学研究。

** 通讯作者. Corresponding author. Tel:027-87198465, E-mail:litx@pentium.whiov.ac.cn.

计,由北京三博远志生物技术有限公司合成。

1.2 鸡胚成纤维细胞(CEF)培养增殖 BFDV

取 8-9 日龄 SPF 鸡胚制备鸡胚成纤维细胞(CEF),10%小牛血清的 RPMI1640 培养基中 37 培养,3d~4d,80% CEF 形成单层后,接种 BFDV-HB YM02 株细胞病毒液($TCID_{50} = 10^{-4}$),每瓶 0.5 mL,37 吸附 1h,加入维持液,置 37 继续培养,3~4d,观察细胞病变(CPE),当 CPE 病变明显时收获病毒液,冻融 3 次,4 000r/min 离心,10min,收取上清液。

1.3 BFDV DNA 的提取

将上清液采用低温超高速离心,沉淀用微量 PBS 悬浮。加入蛋白酶 K(终浓度 200 μ g/mL),37 过夜,采用氯仿-酚法抽提 DNA,TE(pH8.0)溶解,置于-20 保存。

1.4 引物设计

根据 GenBank 中 BFDV 序列,利用 Primer 引物设计软件设计两对引物,分别为 P1, P2。P1 和 P2 引物互相重叠,扩增产物可拼接出 BFDV 全长序列。P1 扩增 BFDV 早期转录区,产物长度约为 3.5kb。P2 扩增 BFDV 晚期转录区,产物长度约为 3.4kb。

P1: Upper Primer: 5'-CGGGGGA GGCTTTACTA TTTGTGG-3

Lower Primer: 5'-AGGGGTA GGC GA GTTA GGCTGTGA-3

P2: Upper Primer: 5'-CTTTTCCTCA TCCCCTCC TTTGTC-3

Lower Primer: 5'-CGCGCCCGTACTTTGGT TA-3

1.5 PCR 扩增

用设计的引物 P1、P2 进行 PCR,50 μ L 反应体系:(10xLA Taq Buffer 5 μ L, MgCl₂ (25mmol/L) 5 μ L, dNTP (10mmol/L) 2 μ L, 引物(20 μ mol/L) 各 1 μ L, BFDV DNA 2 μ L, LA Taq 酶 0.5 μ L, H₂O 33.5 μ L)。PCR 反应条件为 95 5min, 94 1min, 58 (P1) 或 57 (P2) 1min, 72 1min, 40 个循环, 72 延伸 10min。

PCR 产物采用琼脂糖凝胶电泳,按胶回收试剂盒说明书常规操作,回收目的片段,-20 保存备用。

1.6 重组质粒的筛选和检测

取 4.5 μ L 胶回收产物与 0.5 μ L pMD18-T 载体混合,添加 5 μ L 连接缓冲液,16 过夜。将连接反应产物 10 μ L 加入 CaCl₂ 法制备的 100 μ L 感受态细胞中,充分混匀,感受态细胞作为阴性对照。42 热

休克 90s,取出后迅速置冰浴 2min,加入 37 的 LB 液体培养基 800 μ L,37,250r/min 振荡培养 1h。取 150 μ L 转化混合物铺于含氨苄青霉素(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,16h。挑取白色单菌落接种于含氨苄青霉素(100 μ g/mL)的液体 LB 培养基内振荡培养,按常规方法提取质粒。用 *Bam*HI、*Hind*III 双酶切鉴定重组质粒 pMD18T-P1;用 *Eco*RI、*Sal*I 双酶切鉴定重组质粒 pMD18T-P2。

1.7 全序列测定和分析

P1 和 P2 片段的测定:挑取 3 个阳性克隆,提取重组质粒,以质粒 DNA 为模板,采用引物步移法测定序列,委托北京鼎国生物技术公司完成。P1 和 P2 片段分别有 3 个覆盖度,减少了测序造成的误差。

采用以下软件完成 HB YM02 株序列同源性比较及进化树的构建:BLAST 软件分析同源性、ClustalX1.8 进行多序列比对、BioEdit5.0.9 分析比对结果、PhyIIP3.5 构建进化树。

2 结果

2.1 HB YM02 株全序列分段 PCR 扩增

BFDV-HB YM02 全序列分段扩增电泳结果(图 1)显示用 P1 引物扩增的片段大小约为 3.5kb,与预计的大小相符;用 P2 引物扩增的片段大小为 3.4 kb,与预计的大小相符。

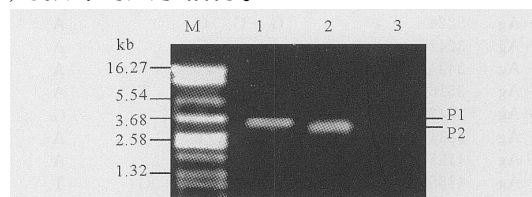


图 1 BFDV-HB YM02 全序列分段 PCR 扩增

Fig. 1 The PCR product of BFDV-HB YM02

1, PCR production with P1 primers; 2, PCR production with P2 primers; 3, negative control; M, *Eco*RI + *Hind*III + *Bam*HI Marker

2.2 重组质粒的构建和鉴定

将 PCR 扩增后纯化的目的片段和 pMD 18-T 载体连接,转化大肠杆菌 DH5 菌株,在含有氨苄青霉素(100 μ g/mL) LB 琼脂筛选平板上筛选的白色菌落,经扩大培养,提取重组质粒 DNA。利用限制性内切酶 *Bam*HI、*Hind*III 双酶切和 PCR 鉴定重组质粒 pMD18T-P1;用 *Eco*RI、*Sal*I 双酶切和 PCR 鉴定重组质粒 pMD18T-P2。

质粒 pMD18T-P1 经双酶切,得到 2.6kb 的载

体片段和约为 2.1kb 和 1.4kb 的两条片段(P1 片段含有一个 *Hind*III 位点),PCR 扩增产物大小为 3.5 kb,证实重组质粒 pMD18 T-P1 正确插入了 P1 片段;质粒 pMD18 T-P2 经双酶切,得到 2.6kb 的载体片段和约为 3.4kb 的片段,PCR 扩增产物大小为 3.4kb,证实重组质粒 pMD18 T-P2 正确插入了 P2 片段。

表 1 不同宿主来源的 BFDV 核苷酸差异分析

Table. 1 Nucleotide exchange analysis in the genomes of BFDV isolates from different hosts

Genome region	Nucleotide position	BFDV strain						Consensus
		1	2	3	4	5	6 HB YM02	
Nc	34	A	A	A				T
Nc	346					C		T
Nc	372					G	G	C
Nc	373					C	C	G
VP2/3	1534				G			T
VP2/3	1582						A	T
VP2/3	1591					T		G
VP2/3	1638					G	G	T
VP1	2086			A				G
VP1	2087			T				A
VP1	2091				A			C
VP1	2077				A			T
VP1	2416					C		G
VP1	2474					C		T
VP1	2486				C			T
VP1	2558					A		G
VP1	2624					G		A
VP1	2646				C			T
VP1	2663				G			A
VP1	2744				A			G
Nc	2945					A		C
Nc	2966			DEL				C
T-Ag	3063			G				T
T-Ag	3080			G				A
T-Ag	3224			G	G	G		A
T-Ag	3242					G		A
T-Ag	3434				C			A
T-Ag	3518						T	A
T-Ag	3643				T			G
T-Ag	3834					T		A
T-Ag	4125					G		A
T-Ag	4155					G	G	T
T-Ag	4306	C	C					G
T-Ag	4307	G	G					C
T-Ag	4433	A	A	A				T
T-Ag	4504	G	G	G				A
T-Ag	4517				G	G	G	A
t-Ag	4618					G		A
T/t-Ag	4948				C	C	C	A
T/t-Ag	4972					G	G	A

Nc: Non-coding region. BFDV strain: BFDV-1 (CEF), BFDV-2 (CEF), BFDV-3 (Melopsittacus undulatus), BFDV-4 (Agapornis pullaria), BFDV-5 (Falco tinnunculus), BFDV-6 (Pteroglossus viridis), HB YM02 (Melopsittacus undulatus); GenBank Access Number: M20775, NC004764, AF241168, AF241170, AF241169, AF118150, A Y672646.

2.3 HBYM02 株序列初步分析

P1 和 P2 引物扩增产物分别涵盖 BFDV 早期转录区和晚期转录区,长 3.5kb 和 3.4kb。以 pMD

18 T-P1 和 pMD18 T-P2 DNA 为模板,采用引物步移法测定全长,两部分序列结果经 CEXPRESS 拼接得出 BFDV-HB YM02 毒株全基因组序列,该序列已登录 GenBank (A Y672646)。

BLAST 分析可知,HB YM02 株与 GenBank 中 6 株已知 BFDV 分离株全序列同源率为 98% ~ 99%。分析序列比对结果,统计不同基因组区域碱基变异情况(表 1),可知 T 抗原变异率最高,有 18 个碱基位点发生改变,未知蛋白没有碱基的改变,最为保守。

利用 GenBank 六株 BFDV 全序列及 HB YM02 株全序列,绘制进化树(图 2)。进化树显示两个分枝,分离自虎皮鹦鹉(Melopsittacus undulatus, China)、绿阿拉卡鸚(Pteroglossus viridis, USA)、牡丹鹦鹉(Agapornis pullaria, Germany)的 BFDV、虎皮鹦鹉(Melopsittacus undulatus, Germany)的 BFDV 及其 CEF 适应株为一个较复杂的分枝,分离自猎鹰(Falco tinnunculus, Germany)的 BFDV 为另一个单独的分枝。宿主范围较广的分枝又分为两个分枝,德国虎皮鹦鹉分离株及其 CEF 适应株形成一枝,另一枝地域较广,HB YM02 株包括其中。

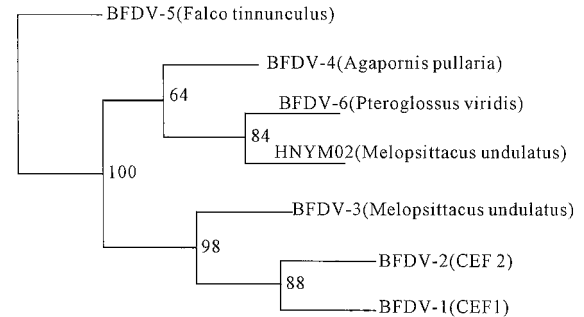


图 2 根据 BFDV 全序列绘制的进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of BFDV isolates based on the nucleotide sequences of BFDV genomes

Trees were generated by using maximum parsimony in the PHYLIP3.5 program. Numbers below branches indicate bootstrap values from 100 replicates. Scale bar, 10 nucleotide change.

3 讨论

BFDV 感染宿主范围广泛,除了各种观赏鹦鹉外,还有部分家禽、野生鸟类。从地理分布来看,涵盖了欧洲、美洲和亚洲。BFDV 不引起家禽死亡,但在家禽免疫力低下时,可产生并发病状。BFDV 对家禽的感染应该引起重视。BFDV 从何而来,如何进化,对家禽等新宿主毒力是否会加强,这一直是各国研究工作者一直关心的问题。目前,GenBank 已经公布全序列的 BFDV 分离株有 6 株病毒,宿主分

别为虎皮鸚鵡、牡丹鸚鵡、绿阿拉卡鸚,源自于欧洲和美洲,初步分析为一个基因型^[6-8]。我国是一个观赏鸟类及家禽养殖业大国,因此,对我国 BFDV 分离株 HB YM02 的全序列测定,初步探讨其进化规律,对我国 BFDV 的预防与控制具有重要意义。

本实验对 HB YM02 株进行了全基因组序列测定,用 BLAST 分析序列,结果显示 HB YM02 株与 6 株 BFDV 全序列同源率为 98%~99%,表明 HB YM02 株与其它已知 BFDV 分离株为同一个基因型。由于 GenBank 中只有这 6 个 BFDV 毒株全序列数据,因此可认为目前世界范围内 BFDV 流行株仅有一个基因型,这为建立快速、灵敏、特异的 BFDV 分子生物学检测方法以及疫苗研制提供了科学依据。

HB YM02 株与已知的 6 株序列进行比对,分析其碱基变异,可知 T 抗原变异率最高,有 18 个碱基位点发生改变,未知蛋白没有碱基的改变,最为保守。可推测 T 抗原高突变可能与 BFDV 广泛宿主范围有关,适应其在不同鸟类中的增殖,而未知蛋白对于 BFDV 晚期蛋白的表达调控起重要作用,需要保持相对稳定。分离自猎鹰的 BFDV 在 346 位为 C,而其它 BFDV (包括 HB YM02 在内)为 T,该区域为晚期启动子 PL₂ 的 TA TAA-Box,此位点的突变肯定影响晚期基因的转录活性,考虑到猎鹰为隼形目,其它分离株宿主都为雀形目,因此 P₁₂ 启动子的识别可能与 BFDV 宿主范围有关,是否是 BFDV 适应新宿主的体现,其机理有待进一步研究^[8]。

7 株 BFDV 进化树显示了两个分枝,一个进化分枝的宿主归属于雀形目(虎皮鸚鵡、绿阿拉卡鸚、牡丹鸚鵡、CEF 细胞),而分离自隼形目(猎鹰)的 BFDV 为另一个单独的分枝,推测不同宿主来源的

BFDV 适应了在各宿主主体内感染增殖,与宿主关系紧密。较复杂分枝中宿主的地理范围包括美洲、欧洲和亚洲,因此这些同源性极高的 BFDV 与地理分布没有明显关联,并不形成地理隔离^[8]。根据进化树显示的结果,一枝适应隼形目宿主,另一枝适应雀形目宿主,产生进化分歧,推测野生鸟类中可能存在 BFDV 的原始宿主,BFDV 从这个未知宿主传播给隼形目及雀形目宿主,传播途径可能包括鸟类的迁徙、带毒商品鸟类及家禽的自由交易和不洁禽类运输工具的使用等,这个推测需进一步开展 BFDV 的分子流行病学调查研究来证实。

参考文献

- [1] Bozeman L H, Davis R B, Gaudry D, *et al.* Characterization of a papovavirus isolated from fledgling budgerigar [J]. *Avian Disease*, 1981, 25: 972-980.
- [2] 龚少宇,李天宪,盛希群,等. 鸟多瘤病毒的研究进展[J]. *中国预防兽医学报*, 1999, 21: 479-480.
- [3] 吴廷功,张子春,王玉东,等. 中国发现澳洲长尾小鸚鵡幼雏病[J]. *中国兽医学报*, 1996, 16: 218-220.
- [4] 夏 苇,冯 峰,李天宪,等. 我国一株鸚鵡新病毒的生化性质及鉴定[J]. *中国病毒学*, 1999, 14: 265-272.
- [5] 李天宪,冯 峰,陈绳亮,等. 我国一株鸚鵡幼雛病毒病的细胞培养特性[J]. *中国兽医学报*, 1999, 6: 479-480.
- [6] Rott O, Käger M, Müller H, *et al.* The genome of budgerigar fledgling disease virus, an avian polyomavirus [J]. *Virology*, 1986, 165: 74-86.
- [7] Phalen D N, Wilson V G, Gaskin J M, *et al.* Genetic diversity in twenty variants of the avian polyomavirus [J]. *Avian Diseases*, 1999, 43: 207-218.
- [8] John R, Muller H. Avian polyomavirus in wild birds: genome analysis of isolates from Falconiformes and Psittaciformes [J]. *Arch Virol*, 1998, 143: 1 501-1 512.