

鸡传染性支气管炎病毒 CK/CH/LDL97 /97 株 S 基因特征*

刘 昕^{1,2}, 刘胜旺^{1**}, 孔宪刚¹, 张庆霞¹, 荣骏弓¹, 韩宗玺¹, 邵昱昊¹

(1. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150001;

2. 新疆农业大学动物医学学院, 新疆乌鲁木齐 830052)

Characterization of Spike Gene of Infectious Bronchitis Coronavirus CK/CH/ LDL97 /97 Isolated in China

LIU Xin^{1,2}, LIU Sheng-wang¹, KONG Xian-gang¹, ZHANG Qing-xia¹,
RONG Jun-gong¹, HAN Zong-xi¹, SHAO Yu-hao¹

(1. National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Institute of Harbin Veterinary Medicine, CAAS, Harbin 150001, China; 2. College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

Abstract: The spike gene (*S*) of *Infectious bronchitis virus* (IBV) CK/CH/LDL97 /97 isolate was amplified, cloned, sequenced and analyzed. Results showed that the *S* gene was 3501 bp encoding a polypeptide of 1167 amino acids. The precursor of the *S* protein was cleaved into *S*1 and *S*2 fragments, which comprised 541 and 626 amino acid residues, respectively. The cleavage site sequence was RRTGR. The homologies of nucleotide and amino acid sequences of *S*1 gene between CK/CH/LDL97 /97 and 27 reference IBV strains ranged from 60.6% to 99.6%, and 50.5% to 99.1%, respectively. The CK/CH/LDL97 /97 *S*1 was most similar to that of three proventriculus IBV isolates, Q1(99.1%), J2(98.9%), T3 (98.9%), which were isolated in China. Phylogenetic analysis of *S*1 proteins indicated that CK/CH/LDL97 /97, Q1, J2 and T3 formed a separated cluster, which might belong to a novel genotype of IBV.

Key words: *Infectious bronchitis virus*; Spike glycoprotein; Molecular characterization

关键词: 传染性支气管炎病毒; S 糖蛋白; 基因特征

中图分类号: S831.7

文献标识码: A

文章编号: 1003-5153(2006)01-0068-03

鸡传染性支气管炎 (Infectious bronchitis, IB) 是由传染性支气管炎病毒 (*Infectious bronchitis virus*, IBV) 引起的一种急性高度接触性传染病。该病主要侵害鸡的呼吸系统、消化系统和泌尿生殖系统, 可引起雏鸡死亡, 蛋鸡产蛋量和蛋品质下降, 给养禽业造成很大的经济损失, 成为影响世界各国养禽业发展的主要疫病之一。IBV 是尼多病毒目 (*Nidovirales*) 冠状病毒科 (*Coronaviridae*) 冠状病毒属 (*Coronavirus*) 第三群的典型代表种^[1]。其基因组为不分节段的单股正链 RNA, 全长约 27.6kb^[2]。IBV S 蛋白形成病毒表面的纤突结构, 翻译后的前体蛋白在跨膜时被裂解为 N 端的 S1 和 C

端的 S2 两个亚单位。S1 为 IBV 的重要免疫原蛋白, 能诱导机体产生血凝抑制抗体和病毒中和抗体^[3]。而且 S1 基因的点突变、插入、缺失或重组是 IBV 产生新血清型、亚型或变异株的主要原因^[4]。S2 糖蛋白的主要功能是将 S1 蛋白锚定在病毒粒子的囊膜上, 同时其 N 端也存在抗原表位^[5]。

中国自 1982 年在广东省首次发现肾型 IB 以来, 该致病型 IB 已在全国各地广泛流行。疫苗的接种较好地控制了 IBV 在我国的流行。但近年来, 有报道在我国江苏、浙江、山东、天津等地出现了一种以腺胃肿大为主要特征的腺胃病变型 IB。1997 年荣骏弓等人在大连某鸡场分离到一株 IBV 毒株,

收稿日期: 2005-05-30, 修回日期: 2005-08-09

* 基金项目: 黑龙江省政府博士后科研启动金资助项目 (LRB-KY01045)

作者简介: 刘昕 (1973-), 男, 湖南茶陵县籍, 在读硕士研究生, 主要从事动物病毒分子生物学和分子免疫学研究。

** 通讯作者: 刘胜旺 (1969-), 男, 研究员。主要从事病毒分子生物学和分子免疫学研究。

Corresponding author. Tel: 0451-85935065, E-mail: swliu@hvri.ac.cn

认为是不同于呼吸型和肾型的 IBV 毒株^[6]。本研究室曾对该毒株 mRNA_{3,6} 的 5' 端独特区 cDNA 分子特征作了一些研究^[7,8]。本研究对该毒株的 S 基因的分子特征进行了研究, 并与国内外不同致病型的 IBV 毒株进行了序列比较和分析, 现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

鸡传染性支气管炎病毒 CK/CH/LDL97 /97 分离株, 本实验室保存^[6-8]; 9~11 日龄 SPF 鸡胚由哈尔滨兽医研究所实验动物中心提供。克隆载体 pMD18-T 购自宝生物(大连)工程有限公司; 受体菌 TG1 由本实验室保存。Ex TaqDNA 聚合酶、DNA Marker(DL2000) 购自宝生物(大连)工程有限公司; 鼠源反转录酶 SuperScriptTM RT、RNasin、TRIzol Reagent RNA 提取试剂盒与 DNA 片段快速纯化/回收试剂盒均购自 Gibco BRL 公司。参照已发表的 IBV 标准毒株 Beaudette S 基因序列设计引物, 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成 3 对引物, 分别为 P1+ : 5'-AATTTGAAAAGTGAACA-3'、P1- : 5'-TTGGGTG GTGTTAGCAAGAGAGATA-3' ; P2+ : 5'-GCTTCTTG AGAATCAGTTTT-3'、P2- : 5'-TAGACGATCAACTTG TGCATCT-3' ; 和 P3+ : 5'-GGTAGGGGCATTTTTATA CA-3'、P3- : 5'-ACAAAAGAAAGACACGCAAACAC AG-3'。其中+表示 genome sense; -表示 antigenome sense。扩增产物可拼接成 IBV S 基因全序列。P1 扩增 S1 基因, P2 扩增 S2 基因上游片段, P3 扩增 S2 基因下游片段。

1.2 病毒的增殖与 RNA 的提取

将 CK/CH/LDL97 /97 接种 9~11 日龄 SPF 鸡胚 37 培养 72h 后(弃去 24h 内的死胚), 无菌收集尿囊液。取 200 μ L 尿囊液按 TRIzol Reagent 说明方法提取病毒基因组 RNA。

1.3 RT-PCR 及基因的克隆和序列测定

RT-PCR 按参考文献^[9]进行。将回收后的 PCR 产物与 pMD18-T 载体进行连接反应后, 转化大肠

杆菌 TG1 感受态细胞。碱裂解法提质粒, 经 PCR 初步鉴定, 选取阳性质粒委托上海生工生物工程技术服务有限公司进行核苷酸序列测定。

1.4 基因序列分析

参考 IBV Beaudette^[2]和 LX4^[9]毒株的 S 基因序列, 用 Gene Runner 和 DNASTar 软件, 首先确定 CK/CH/LDL97 /97 株 S 基因开放阅读框(open reading frame, ORF)序列, 然后应用这些软件将其和国内外 IBV 参考株的核苷酸序列及推导的氨基酸序列进行分析比较。

2 结果与讨论

2.1 S 基因的克隆及鉴定

经 RT-PCR 扩增, 分别得到了与预期目的片段大小相符的 3 条片段, 大小分别约 2.1kb、1.05kb 和 1.5kb。将这些 PCR 产物分别克隆到 pMD18-T 载体后, 经 PCR 扩增鉴定, 筛选重组阳性质粒。

2.2 S 基因的组成

CK/CH/LDL97 /97 S 基因 ORF 由 3 501 个核苷酸组成, 编码一条由 1 167 个氨基酸残基组成的多肽。S 蛋白裂解识别位点序列为 RRTGR, 与 J2、T3 具有相同的裂解识别位点, 但与常见的 S 蛋白裂解识别位点氨基酸序列(RRF/SRR)^[10]不同。推测 CK/CH/LDL97 /97 S 蛋白裂解后形成的 S1 亚单位由 1 623 个核苷酸组成, 编码含 541 个氨基酸残基的多肽, S2 亚单位由 1 878 个核苷酸组成, 编码 626 个氨基酸残基组成的多肽。CK/CH/LDL97 /97 S 基因推导的氨基酸共有 30 个潜在的 N-糖基化位点, 37 个半胱氨酸。CK/CH/LDL97 /97 与 12 株已报道 S 基因全序列的国内外参考毒株的裂解位点和裂解产物 S1、S2 亚单位长度见表 1。

2.3 S1 基因的序列分析

CK/CH/LDL97 /97 与国内外 27 株参考毒株 S1 基因进行比较, 结果显示: CK/CH/LDL97 /97 与 27 个参考毒株 S1 基因核苷酸序列同源性在 60.6% ~

表 1 IBV 各毒株 S 糖蛋白前体的裂解位点和编码 S1 和 S2 蛋白基因的核苷酸长度

Table 1 Comparison of spike glycoprotein cleavage sites among IBV strains and length of S1 and S2 subunits of spike gene

Strain	Cleavage site	S1 subunit (bp)	S2 subunit (bp)	Accession number
CK/CH/LDL97 /97	RRTGR	1623	1878	DQ068701
H52	RRFRR	1611	1878	AF352315
M41	RRFRR	1611	1851	X04722
Ark 99	HRSRR	1629	1851	AF094814
Holte	RRSRR	1629	1878	L18988(S1)/AF334685(S2)
Gray	RRSRR	1629	1878	L14069(S1)/AF394180(S2)
Beaudette	RRFRR	1611	1878	M95169
LH2	HRRRR	1617	1878	AY180958
LX4	HRRRR	1617	1878	AY189157
ZJ971	RRFRR	1611	1621	AF352311
SD/97/02	HRRRR	1621	1878	AF193423(S1)/AF288146(S2)
CU-T2	HRSRR	1632	1875	U04739
KB8523	RRFRR	1614	1875	M21515

99.6% 之间；推导的氨基酸序列同源性在 50.5% ~ 99.1% 之间。在 S1 蛋白氨基酸进化关系上可分成 5 个群（图 1）。CK/CH/LDL97 /97 与国内“腺胃病变型”分离株 Q1、J2、T3 台湾分离株 2992/02 和荷兰株 D207 形成一个明显的系统发育进化群（第 1 群）。CK/CH/LDL97 /97 与疫苗株 H120、H52 的氨基酸同源性低于 74.4%。此外，CK/CH/LDL97 /97 与 27 株参考毒株相比，在 S1 蛋白氨基酸的第 151 ~ 152 位分别插入赖氨酸（K）和甘氨酸（G），该位置插入的氨基酸与 Q1、T2、J3、2992/02 插入的氨基酸相同。且该位置处在高变区（HVR）。有报道认为 S1 基因高变区的基因型与血清型有关^[11]，且 S1 蛋白高变区被认为与中和表位相关^[12]。本研究显示，在此区间 CK/CH/ LDL97 /97 S1 蛋白氨基酸与 27 株参考株相比有 6 个点突变。以上这些插入和突变均可能导致 CK/CH/LDL97 /97 的致病性发生改变。

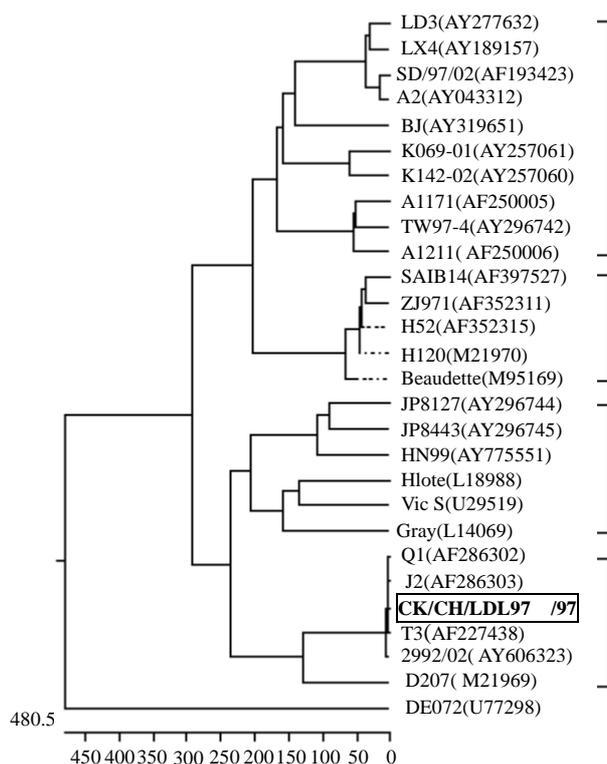


图 1 CK/CH/LDL97 /97 与参考毒株 S1 蛋白氨基酸的系统发育进化树分析(区段从 S 蛋白氨基酸起始密码至 535 位)

Fig. 1 Phylogenetic tree constructed on the basis of deduced S1 amino acid sequences

“腺胃病变型”IB 是近年来发生于我国鸡群中的一类以腺胃肿大为主要病理特征的病变型 IB。国外该病变型 IB 还尚未见报道。目前，已报到的“腺胃病变型”毒株有 Q1、T2、J3、SD/97/02 和 ZJ971 等。本研究对这些毒株及部分其他致病性的 IBV 毒株进行了

基因的系统发育进化研究(图 1),发现 CK/CH/LDL97 /97 与 Q1(99.1%)、J2(98.9%)、T3(98.9%)三个分离株^[16]氨基酸的同源性均很高。它们均属一个群(第 1 群)。表明 CK/CH/LDL97 /97 与 Q1、J2、T3 的亲缘关系很近。但 CK/CH/LDL97 /97 与青岛分离株 SD/97/02 (76.2%) 和浙江分离株 ZJ971 (74.1%) 氨基酸同源性较低，属于不同的基因型。

综上所述，CK/CH/LDL97 /97 与 Q1、J2、T3 均属于不同于我国其他基因型的另外一个基因型病毒。“腺胃病变型”病毒之间与其 S1 基因无相关性。

References

- [1] Cavanagh D. A nomenclature for avian coronavirus isolates and the question of species status[J]. Avian Pathol, 2001, 30:109-115.
- [2] Boursnell M E, Brown T D, Foulds I J, *et al.* Completion of the sequence of the coronavirus avian infectious bronchitis virus[J]. J Gen Virol, 1987, 68:57-77.
- [3] Cavanagh D, Davis P J, Daarbysire J H, *et al.* Coronavirus IBV: virus retaining spike glycopolyptide S2 but not S1 is unable to induce virus-neutralizing or haemagglutination-inhibiting antibody, or induce chicken tracheal protection[J]. J Gen Virol, 1986, 67: 1435- 1442.
- [4] Wang L, Junker D, Hock L, *et al.* Evolutionary implication of genetic variations in the S1 gene of infectious bronchitis virus[J]. Virus Res, 1994, 34:327-338.
- [5] Wang L, Junker D, Collission E W. Evidence of natural recombination within the S1 gene of infectious bronchitis virus[J]. Virology, 1993, 192: 710-716.
- [6] Rong J G, Kang L J, Gu S L(荣骏弓, 康丽娟, 谷守林)*et al.* Isolation and Identification of a Proventriculus Disease Avian Infectious Bronchitis Virus[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine (中国预防兽医学报), 1999, 21: 124- 127.
- [7] Liu Y F, Rong J G, Liu S W(刘玉芬, 荣骏弓, 刘胜旺)*et al.* Cloning and Sequence Analysis of 5a, 5b and Nucleocapsid Genes of Infectious Bronchitis Virus D971 Isolated from China[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine (中国预防兽医学报), 2003, 25:81-87.
- [8] Liu Y F, Liu S W, Rong J G(刘玉芬, 刘胜旺, 荣骏弓) *et al.* Molecular Characteristics of mRNA-3 and mRNA-4 cDNA of Infectious Virus D971 Isolateal from China [J]. Chinese Journal of Veterinary(中国兽医学报), 2004, 24:31-35.
- [9] Liu S, Kong X. A new genotype of nephropathogenic infectious bronchitis virus circulating in vaccinated and non-vaccinated flocks in China[J]. Avian Pathol, 2004, 33: 321-327.
- [10] Jackwood M W, Hilt D A, Callison S A, *et al.* Spike glycoprotein cleavage recognition site analysis of infectious bronchitis virus[J]. Avian Dis, 2001, 45:366-372.
- [11] Wang C H, Huang Y C. Relationship between serotypes and genotypes based on the hypervariable region of the S1 gene of infectious bronchitis virus[J]. Arch Virol, 2000, 145:291-300.
- [12] Koch G, Hartog L, Kant A, *et al.* Antigenic domains of the peplomer protein of avian infectious bronchitis virus: correlation with biological functions [J]. J Gen Virol, 1990, 71: 1929-1935.