

鸡传染性法氏囊病病毒河南分离株 HeYD VP2 基因高变区基因克隆及序列分析

鄂巍^{1,2}, 张改平¹, 罗俊², 滕蔓², 王兴涛², 王爱萍^{1*}

(1. 郑州大学 生物工程系, 河南 郑州 450001; 2. 河南省农业科学院

农业部动物免疫学重点开放实验室/河南省动物免疫学重点实验室, 河南 郑州 450002)

摘要: 为初步确定新分离的鸡传染性法氏囊病病毒(IBDV)河南株 HeYD 的毒力, 根据 GenBank 数据库中已报道的 IBDV 基因组序列, 设计合成了 1 对 VP2 基因高变区特异性引物, 应用 RT-PCR 方法对分离自河南省某发病鸡场的 IBDV 野毒株 HeYD 的 VP2 基因高变区进行了基因克隆及序列分析, 并与其他参考毒株高变区进行了序列比对。序列分析结果表明, HeYD 株的 VP2 基因高变区具有 IBDV 超强毒株典型的氨基酸序列特征, 即 222 位(A)、256 位(I)、294 位(I)和 299 位(S), 表明 HeYD 为超强毒株。利用 VP2 基因高变区序列构建基因进化树, 发现 HeYD 株与国内超强毒株如 xin-1、GX8-99 以及国外超强毒株如日本的 OKYM 和欧洲的 DV86 毒株亲缘关系较近。

关键词: 传染性法氏囊病病毒; VP2 基因高变区; 基因克隆; 基因进化树

中图分类号: S852.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2011)03-0149-05

Sequence Analysis of the VP2 Hypervariable Region of A Field Infectious Bursal Disease Virus Strain HeYD Isolated from Henan Province

E Wei^{1,2}, ZHANG Gai-ping¹, LUO Jun², TENG Man², WANG Xing-tao², WANG Ai-ping^{1*}

(1. Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 2. Key Laboratory of

Animal Immunology of the Ministry of Agriculture/ Henan Provincial Key Laboratory of Animal

Immunology, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: To identify the subtype of a field infectious bursal disease virus (IBDV) strain HeYD isolated from Henan province, a pair of specific primers were designed according to the genome sequences of IBDV previously reported for amplifying the cDNA of IBDV VP2 hypervariable region. The VP2 hypervariable region of HeYD was cloned by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), sequenced and compared with other reference IBDV strains. The results showed that the amino acid sequence of HeYD VP2 hypervariable region represents the typical feature of those of very virulent IBDV (vvIBDV) strains at the positions of 222 (A), 256 (I), 294 (I), and 299 (S). The phylogenetic tree based on the DNA sequences of IBDV VP2 hypervariable regions indicated that HeYD strain was far away from some of China vvIBDV strains, but close to other China vvIBDV strains such as xin-1, GX8-99, and some foreign vvIBDV strains such as OKYM and DV86.

Key words: IBDV; VP2 gene hypervariable region; Gene cloning; Phylogenetic tree

收稿日期: 2010-11-15

基金项目: 河南省基础与前沿计划项目 (082300433201)

作者简介: 鄂巍 (1984-), 男, 内蒙古锡林郭勒人, 在读硕士研究生, 研究方向: 动物学。E-mail: pangpangdede@126.com

*通讯作者: 王爱萍 (1970-), 女, 青海西宁人, 副教授, 硕士生导师, 主要从事动物免疫学研究。E-mail: pingaw@126.com

©1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

鸡传染性法氏囊病 (infectious bursal disease, IBD) 是由鸡传染性法氏囊病病毒 (infectious bursal disease virus, IBDV) 引起鸡的一种免疫抑制性疾病^[13]。IBDV 的基因组为双链 RNA, 包括 A、B 2 个片段^[4]。片段 A 长度为 3.2 kb, 含有 2 个开放性阅读框 (open reading frame, ORFs), 2 个 ORF 有部分重叠且大小不等。A 片段上的小 ORF 编码分子量为 17 kD 的非结构蛋白 VP5^[5]。大 ORF 先编码 1 个大的多聚蛋白 VP2-4-3 (110kD), 而 VP2-4-3 通过蛋白酶的作用自动加工成 3 个蛋白: VP2 (48kD), VP4 (28kD) 和 VP3 (32kD)^[6-7]。B 片段只含有 1 个 ORF, 负责编码病毒的 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)^[8-9]。

VP2 蛋白是 IBDV 的主要结构蛋白, 与宿主保护性抗原、细胞嗜性、病毒毒力等有关。Brandt 等^[10] 和 Boot 等^[11] 的研究表明, IBDV 的病毒毒力相关分子和致病性分子标志主要分布在 VP2 蛋白上。分析不同 IBDV 毒株之间的氨基酸序列, 发现差异主要发生在 VP2 蛋白的高变区^[12]。本研究以新分离的 IBDV HeYD 毒株为研究对象, 在体外克隆出 VP2 基因的高变区并对其进行测序。将测序结果与其他 IBDV 参考毒株一同比较并构建系统进化树, 从分子水平来确定 HeYD 分离毒株所属的基因类型, 旨在为进一步研究 IBDV 强毒感染 B 淋巴细胞靶细胞的分子致病机制提供依据。

1 材料和方法

1.1 IBDV 毒株

IBDV 地方野毒分离株 HeYD, 按常规方法分离自河南省某发病鸡场, 发病鸡法氏囊研磨液于 -70℃ 保存备用。

1.2 主要试剂、载体与菌株

Trizol 购自 invitrogen 公司, 预混 Ex Taq premix、M-MLV 反转录酶、RNA 酶抑制剂、dNTP、pMD-19T 载体和胶回收试剂盒购自大连 Takara 公司, *E. coli* Top10 菌株购自天根生化科技有限公司, 其他试剂均为分析纯。

1.3 引物设计与合成

根据 GenBank 收录的 IBDV 基因序列, 用 Primer 5.0 软件设计用于扩增 IBDV VP2 基因高变区的引物对 VP2h-5 和 VP2h-3, 上游引物 VP2h-5 序列为 5'-CGATGAATTCCCCATTCCCG-CAATAGGGC-3', 位于 VP2 基因的 537—565 位核苷酸, 下游引物 VP2h-3 序列为 5'-TCAGAAGCT-TGTTGCCACCATGGATCGT-3', 位于 VP2 基因

的 1006—1033 位核苷酸。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.4 IBDV 病毒 RNA 的提取

在 1.5 mL 的离心管中加入 200 μL 法氏囊研磨液和 1.0 mL Trizol 试剂, 振荡均匀后冰上静置 5 min, 加 200 μL 氯仿后剧烈振荡 20 s, 冰上静置 5 min, 4℃ 条件下 12 000 r/min 离心 15 min。吸取上清转入新的 1.5 mL 离心管中, 加入 500 μL 异丙醇, 冰上静置 10 min, 4℃, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加入 1 mL DEPC 处理水配制的 75% 乙醇洗涤沉淀, 振荡混匀, 1 000 r/min 离心 5 min, 慢慢倒出上清, 室温下晾 5~10 min。用 12.5 μL DEPC 处理水溶解 RNA 沉淀。

1.5 VP2 基因高变区的 RT-PCR 扩增

以提取的总 RNA 为模板, 用 MLV 反转录酶和 VP2 基因下游引物 VP2h-3 合成 cDNA 第 1 链。首先将 12.5 μL RNA 与 1 μL 浓度为 10 μmol/L 的 VP2h-3 引物混匀, 65℃ 水浴 5 min 后立即取出置冰上, 使 RNA 模板与 VP2-3 引物复性结合。然后加入反转录反应酶体系, 42℃ 反应 1 h, 最后 75℃ 温浴 10 min 使反转录酶失活。反转录体系如下: MLV 反转录酶 1 μL, M-MLV 反转录 5× 反应缓冲液 4 μL, 10 mmol/L 的 dNTP 1 μL, RNA 酶抑制剂 0.5 μL, 总体积 20 μL。

在反转录反应结束后, 以 RT 产物为模板, 用 Ex Taq 聚合酶在 PCR 仪上扩增 VP2 基因。PCR 反应体系如下: RT 产物 1 μL, 预混 Ex Taq premix 10 μL, 上游引物 VP2h-5 1 μL (10 μmol/L), 下游引物 VP2h-3 1 μL (10 pmol/μL), 灭菌双蒸水 7 μL, 终体积 20 μL。PCR 反应程序如下: 94℃ 预变性 1 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 总计 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。

1.6 VP2 基因高变区的克隆鉴定

将 PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳分离, 目的片段用 Takara 胶回收试剂盒回收, 回收产物用分光光度计测定 DNA 含量, 将其与 pMD-19T 载体按要求在 16℃ 条件下连接过夜。连接产物按常规方法转化至 *E. coli* Top10 感受态细胞并涂布到含有 Amp 抗性的 LB 琼脂平板上, 37℃ 培养过夜。挑取生长良好的菌落接种于含 50 mg/L Amp 的 LB 培养基中进行扩增培养, 以 1 μL 培养菌液为模板应用与 1.5 中相同的体系进行 PCR 鉴定。

1.7 VP2 基因高变区的序列测定与分析

挑选 PCR 鉴定为阳性的菌种培养液送样至上海生工生物工程技术有限公司进行序列测定。

用 DNASTar 和 MEGA 3.1 软件将测得的 HeYD 株 VP2 基因高变区序列同其他参考毒株进行序列比对, 并构建基因进化树, 进行分子进化分析。

2 结果与分析

2.1 VP2 基因高变区的扩增、克隆和鉴定

以发病鸡法氏囊研磨液总 RNA 为模板进行 RT 反应, 设计特异的引物对扩增 IBDV VP2 基因高变区, PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分离, 在约 497 bp 处存在 1 条明显的 PCR 产物条带, 这与预期扩增长度相符(图 1)。对该 PCR 产物进行割胶回收后连接 pMD-19T 载体, 转化 E. coli Top10 感受态细胞后铺板, 37℃ 培养过夜。挑取单菌落摇菌, 37℃ 振荡培养 16h 后进行菌液 PCR 鉴定。结果显示, 随机挑取的 2 个菌落中, 均可以扩增出与 RT-PCR 反应大小相同的 PCR 产物条带(图 2)。

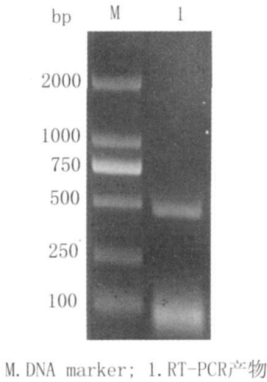
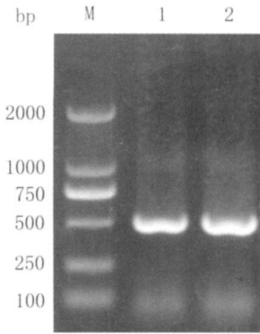


图 1 IBDV VP2 基因高变区 RT-PCR 扩增图谱



M. DNA marker; 1, 2. 菌液 PCR 产物

图 2 IBDV VP2 基因高变区菌液 PCR 扩增图谱

2.2 IBDV HeYD 株 VP2 基因高变区序列测定及分析

将经菌液 PCR 鉴定的 2 个阳性菌送样测序, 结果表明, 这 2 个阳性菌质粒中的外源插入片段序列完全一致, 长度均为 497 bp。为了判断 HeYD 毒株的毒力类型, 从 GenBank 中挑选了 23 个 IBDV 毒株作为参考毒株(图 3), 包括欧洲超强毒株 DV86 (D16630.1)、UK661 (AJ878898.1); 日本超强毒株 OKYM (D49706.1); 香港超强毒株 HK46 (AJ878900.1); 中国内地超强毒株 GX8/99 (AY305386.1)、BH11 (DQ656497.1)、JS30-99 (AY288048.1)、SD1-97 (AY288047.1)、标准毒株 CEF94 (AF194428.1)、52-70 (Y14958.1)、D78 (AF499929.1)、Harbin-1 (AF092171.1)、HN3 (AF076229.1)、ZJ2000 (AF321056.1); 疫苗株 B87 (DQ656516)、Bursine-2 (DQ656517); 变异毒株

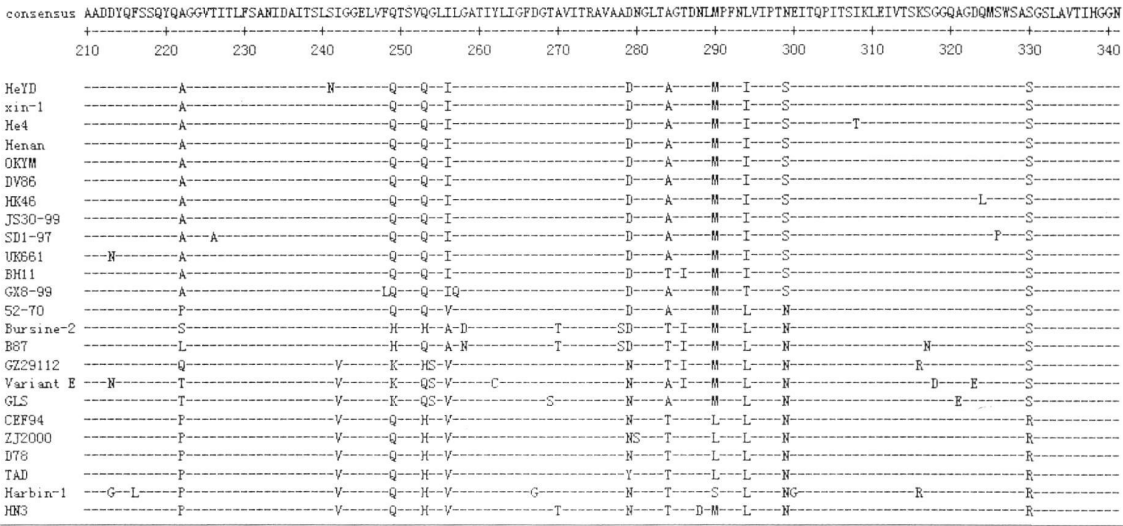


图 3 24 株 IBDV VP2 基因高变区氨基酸序列比对

Variant E (AF133904.1)、GLS (AY368653.1)、河南超强毒株 He4 (AF487340)、Henan (AJ878901)、xin-1 (EF080952)。IBDV 将 HeYD 株 VP2 高变区的

推导氨基酸序列与这 24 个 IBDV 参考毒株的相应氨基酸序列用 Clustal X 软件进行比对分析, 结果表明, HeYD 株 VP2 高变区的特征性氨基酸分别为 222 位(A)、249 位(Q)、253 位(Q)、254 位(G)、256 位(I)、279 位(D)、284 位(A)、294 位(I)、299 位(S)、330 位(S), 与此前报道的超强毒株的特征氨基酸位点 222 位(A)、256 位(I)、294 位(I)和 299 位(S)一致。

2.3 IBDV HeYD 株 VP2 基因高变区基因进化分析

将 IBDV HeYD 株的 VP2 基因高变区序列与

参考毒株的相应序列用 DNASTar 和 MEGA3.1 构建基因进化树, 进行分子进化分析。结果表明, 这些毒株共形成 2 个大的分支: 超强毒株分支和经典毒株及变异株分支, 其中经典毒株又分为强毒株、中等毒力疫苗株、变异株和弱毒株 4 个小的分支(图 4)。HeYD 毒株处于超强毒株分支, 与超强毒株 GX8-99、OKYM、DV68、HK46 和 xin-1 处于同一小的分支, 并且与其中的 GX8-99 进化关系最近, 说明 HeYD 株与中国内地超强毒株有密切的亲缘关系。

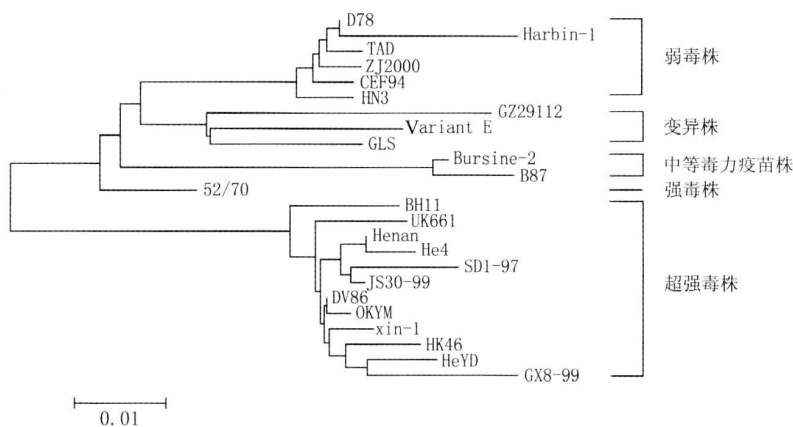


图 4 IBDV VP2 基因高变区基因进化树

3 结论与讨论

早期研究发现, 不同 IBDV 毒株氨基酸差异主要在 VP2 基因的高变区。高变区中有 2 个大亲水区(分别位于 212—224 和 314—324 位氨基酸)和 2 个小亲水区(分别位于 248—252 和 279—290 位氨基酸), 它们与病毒抗原性有关^[12]。有一些毒株在亲水区发生氨基酸替换, 使得病毒不与抗体作用, 逃避抗体中和作用^[13]。对 IBDV 毒力的研究一直都存在争议, 至今为止都没有明确定论。早期的研究认为, IBDV 的毒力与富含丝氨酸七肽区 S-W-S-A-S-G-S 有关, 但是随后的研究发现, 很多强毒株七肽区并不保守, 而有的致弱毒株虽然致病力减弱但七肽区序列并未发生变化^[14]。

目前, 通过一些特征性氨基酸可以区分不同的毒株, 这些氨基酸分别为超强毒株的 222 位(A)、256 位(I)、294 位(I)和 299 位(S), 变异株的 249 位(K)、254 位(S)和弱毒株的 253 位(H)、279 位(N)、284 位(T)和 330 位(R)^[15-17]。本研究利用 RT-PCR 技术成功从分离毒株 HeYD 克隆出 497 bp 的部分 VP2 基因, 经测序并推导出氨基酸序列。通过 Clustal X 软件进行序列比较, HeYD 毒株同

OKYM、xin-1、SD1-97 等超强毒株最接近, 氨基酸相似性达到 98.5%。HeYD 毒株同超强毒株的相似性在 98.5%~96.2%, 同标准强毒、弱毒的相似性在 95.5%~88.7%, 同变异株相似性 95.5%~88.7%。通过特征性氨基酸分析, 可初步确定 HeYD 为超强毒株。

根据 24 株 IBDV 毒株的 VP2 高变区核苷酸序列所作的系统进化树进行分析, 发现 HeYD 株与国内部分超强毒株如 JS30-99、SD1-97、Henan、He4 亲缘关系较远, 而与另一些国内超强毒株如 xin-1、GX8-99 以及国外超强毒株如日本的 OKYM 和欧洲的 DV86 毒株亲缘关系较近。然而, 同一地区分离的 IBDV 超强毒株, 如河南分离株 HeYD、Henan、He4 以及 xin-1 在基因进化树中的亲缘关系差异也较大, 说明中国内地超强毒株可能不是由同一毒株进化而来, 其来源甚为复杂, 需要进一步深入研究。

参考文献:

[1] 雷变兰, 周玉武. 复方黄芪颗粒防治鸡传染性法氏囊病的疗效试验[J]. 山西农业科学, 2007(1): 72-74.

[2] 王娟平, 姚敬明. 鸡传染性法氏囊病母源抗体对弱毒疫

- 苗免疫效果的影响[J]. 山西农业科学, 2001(4): 73-75.
- [3] 任玉红. IBDV 人工感染雏鸡免疫器官病理形态学观察[J]. 山西农业科学, 1998(2): 80-83.
- [4] 赵渝, 陆苹, 孙建和. 幼鸡传染性法氏囊病病毒超强毒株 VP2 基因的克隆和分析[J]. 河南农业大学学报, 2002, 36(4): 387-391.
- [5] Mundt E, Beyer J, Muller H. Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virus-infected cells[J]. J Gen Virol, 1995, 76(2): 437-443.
- [6] 席俊, 张改平, 王选年, 等. IBDV 地方野毒株(XX 株) VP2 基因高变区的克隆与序列分析[J]. 河南农业科学, 2008(4): 102-105.
- [7] Muller H, Nitschke R. The two segments of the infectious bursal disease virus genome are circularized by a 90 000 Da protein[J]. Virology, 1987, 159(1): 174-177.
- [8] Spies U, Muller H, Becht H. Properties of RNA polymerase activity associated with infectious bursal disease virus and characterization of its reaction products[J]. Virus Res, 1987, 8(2): 127-140.
- [9] Morgan M, Macreadie I G, Harley V R, *et al.* Sequence of the small double stranded RNA genomic segment of infectious bursal disease virus and its deduced 90 kDa product[J]. Virology, 1988, 163(1): 240-242.
- [10] Brandt M, Yao K, Liu M, *et al.* Molecular determinants of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus[J]. J Virol, 2001, 75(24): 11974-11982.
- [11] Boot H J, ter Huurne A A, Hoekman A J, *et al.* Rescue of very virulent and mosaic infectious bursal disease virus from cloned cDNA: VP2 is not the sole determinant of the very virulent phenotype[J]. J Virol, 2000, 74(15): 6701-6711.
- [12] 祁小乐, 王笑梅, 高玉龙, 等. 鸡传染性法氏囊病病毒 VP2 蛋白研究进展[J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(8): 656-660.
- [13] Eterradossi N, Arnould C, Toquin D, *et al.* Critical amino acid changes in VP2 variable domain are associated with typical and atypical antigenicity in very virulent infectious bursal disease viruses[J]. Arch Viro, 1998, 143(8): 1627-1636.
- [14] Yamaguchi T, Ogawa M, Inoshima Y, *et al.* Identification of sequence changes responsible for the attenuation of highly virulent infectious bursal disease virus[J]. Virology, 1996, 223(1): 219-223.
- [15] van Loon A A, de Haas N, Zeyda I, *et al.* Alteration of amino acids in VP2 of very virulent infectious bursal disease virus results in tissue culture adaptation and attenuation in chickens[J]. J Gen Virol, 2002, 83(1): 121-129.
- [16] 李建荣, 于涟, 黄耀伟, 等. 传染性法氏囊病病毒浙江分离株(ZJ2000)基因组 A 节段全长 cDNA 的克隆和序列分析[J]. 中国兽医学报, 2002, 22(1): 10-14.
- [17] 俞伏松. 鸡传染性法氏囊病病毒福建株的分离与初步鉴定[J]. 现代农业科技, 2009(11): 218-219.