

# 鸡传染性法氏囊病病毒内蒙古毒株 VP<sub>2</sub> 基因的克隆和序列分析

哈斯阿古拉 张 彤 张七斤\* 张鹤龄

(内蒙古大学生物工程中心生物系 呼和浩特 010021)

**摘 要** 以鸡传染性法氏囊病病毒内蒙古毒株(IBDV-NM) dsRNA 为模板,用 RT-PCR 法扩增其主要寄主保护抗原 VP<sub>2</sub> 基因的全长 cDNA,克隆于 pUC19 的 XbaI/KpnI 位点,进行了全序列分析。序列比较发现 IBDV-NM 毒株 VP<sub>2</sub> 基因与已报道的其它 7 个 IBDV CJ-801bkf、Cu1、PBG98、52/70、002—73、STC 及 Variant E 毒株之间高度同源,其核苷酸序列的同源率为 91.6%~96.2%,推测的氨基酸序列的同源率为 96.2%~98.6%。IBDV-NM 毒株 VP<sub>2</sub> 高变异区的第一个亲水区氨基酸序列与 CJ-801bkf、Cu1、PBG98、52/70、STC、002—73 比较,有一个氨基酸差异,第二个亲水区氨基酸序列与上述 6 个毒株完全相同。而与 Variant E 比较,两个亲水区内各有两个氨基酸差异。此外,IBDV-NM 毒株 VP<sub>2</sub> 具有强毒株所特有的 7 肽保守区:SWSASGS。这些结果表明,IBDV-NM 毒株为标准血清 I 型 IBDV 强毒株。

**关键词** 鸡传染性法氏囊病病毒,主要寄主保护抗原,VP<sub>2</sub>,基因克隆,核苷酸序列

鸡传染性法氏囊病病毒(Infectious bursal disease virus, IBDV)是鸡传染性法氏囊病(IBD)的病原,其危害除了直接引起临床症状外,还造成严重的免疫抑制,使鸡对其他病原的免疫力丧失,结果导致严重死亡<sup>[1]</sup>。IBDV 属双片段双股 RNA 病毒科(Birnaviridae)<sup>[2]</sup>。IBDV 含有 VP<sub>1</sub>、VP<sub>2</sub>、VP<sub>3</sub> 和 VP<sub>4</sub> 4 种病毒蛋白,其中 VP<sub>2</sub> 携带主要寄主保护抗原决定簇,诱发产生保护性中和抗体,是 IBDV 最重要的功能蛋白<sup>[3]</sup>。

国外已报道了澳大利亚弱毒株 002-73<sup>[4]</sup>、英国强毒株 52/70 和弱毒疫苗毒株 PBG98、德国弱毒株 Cu1<sup>[5]</sup>、美国强毒攻毒株 STC<sup>[6]</sup> 和美国超强毒变异株 Variant E<sup>[7]</sup> 等毒株的 VP<sub>2</sub> 基因序列。国内崔静等 1995 年报道从北京地区分离的 IBDV CJ-801bkf 毒株 VP<sub>2</sub> 基因克隆及序列分析结果<sup>[8]</sup>。陈士友等 1994 年报道了 IBDV 青岛株 cDNA 文库构建工作<sup>[9]</sup>。

本文报道鸡传染性法氏囊病病毒内蒙古毒株主要寄主保护抗原 VP<sub>2</sub> 基因的克隆、序列分析及与其它毒株进行比较的结果。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

内蒙古生物高技术基金项目。

\* 内蒙古农牧学院动物医学系。

本文于 1995 年 12 月 25 日收到。

**1.1.1 毒株:**IBDV 分离自内蒙古呼和浩特市郊区鸡场<sup>[10]</sup>,定名为 IBDV 内蒙古毒株(NM 毒株)。将 IBD 囊毒经鸡胚接种传代,收集尿囊液、绒毛尿囊膜和胚体,剪碎、研磨和离心获 IBD 鸡胚毒。用 IBD 鸡胚毒接种 4 周龄来航鸡,4d 后剖杀收集病变法氏囊,于 -80℃ 冻存备用。

**1.1.2 主要试剂:**反转录试剂盒、X-gal、IPTG 为美国 promega 公司产品。Taq DNA 聚合酶、限制酶、修饰酶、pUC19 等均为华美生物工程公司产品。

## 1.2 方法

**1.2.1 引物的设计和合成:**根据已报道的 IBDV 002-73、STC、Cu1、PBG98 和 52/70 毒株 A 片段 cDNA 序列<sup>[4,5,6]</sup>,在 VP<sub>2</sub> 编码基因的 5' 端和 3' 端分别设计了两个引物:

引物 1:5' - TTAATCTAGACACCATGACAAACCTGCAAGATCAAACCCA - 3'

引物 2:5' - TTAAGGTACCTCATGCTTTTCCTGACGCGGCTCGAGCAG - 3'

其中引物 1 为 5' 端引物,长 40mer,包括 28 个与靶序列同源的碱基、一个 XbaI 位点和 4 个保护碱基,同时在其起始密码 ATG 前引入了真核细胞中高效表达序列 ACC<sup>[11]</sup>。引物 2 为 3' 端引物,长 39mer,包括 26 个与靶序列互补的碱基、一个 KpnI 位点和 4 个保护碱基,并在此引物中引入一个终止密码 TCA(即正链为 TGA),因 VP<sub>2</sub> 以融合蛋白形式表达,VP<sub>2</sub> 基因的编码序列本身无终止密码。

**1.2.2 病毒的分离纯化:**取病变法氏囊组织,按 1:5 加入 TNE(10mmol/L Tris·HCl, 100mmol/L NaCl, 1mmol/L EDTA, pH7.5) 缓冲液匀浆,冻融 3 次,离心取上清,氯仿处理,两次 PEG6000 沉淀,超离心收集病毒,用 TE 回溶, -20℃ 保存备用。

**1.2.3 病毒 RNA 的提取:**用常规的 SDS-酚法提取。

**1.2.4 反转录合成 cDNA:**取提纯的 IBDV dsRNA 5μl(含 1μg),经 100℃ 变性 5min,置冰浴 5min,反转录体系 20μl:含引物 1 和 2 各 1μg, 10mmol/L Tris·HCl (pH8.8, 25℃), 50mmol/L KCl, 0.1% Triton X-100, 5mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 每种 dNTP 1mmol/L, 20u rRNasin, 25u AMV 反转录酶。42℃ 保温 60min。

**1.2.5 聚合酶链反应(PCR):**取上述反转录产物 5μl, 100℃ 变性 5min, 冰浴 5min, 建立 50μl PCR 扩增体系:含引物 1 和 2 各 25pmol, 每种 dNTP 250μmol/L, 10mmol/L Tris·HCl (pH9.0, 25℃), 50mmol/L KCl, 0.01% 明胶, 0.1% Triton X-100, 1.5mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 3u Taq DNA 聚合酶。94℃ 变性 1min, 58℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 3min, 进行 30 个循环。

**1.2.6 克隆与鉴定:**用 XbaI 和 KpnI 双酶切 PCR 产物和 pUC19, 低融点琼脂糖凝胶回收所需片段, 于 16℃ 连接 12h。转化 *E. coli* DH5α, 选取白色菌落, 快速提取质粒, 电泳筛选重组质粒, 进一步用 PCR 和限制酶酶切鉴定重组质粒。

**1.2.7 亚克隆:**将阳性克隆 pINM30 用 SpeI 和 EcoRI 切割; 电泳回收大片段, klenow 酶补齐, 自连得 pINM30-1。将 pINM30 用 StuI 和 EcoRI 切割, 电泳回收大片段, klenow 酶补齐, 自连得 pINM30-2。

**1.2.8 cDNA 序列分析:**用常规碱法提取质粒, 双链 DNA 为模板, 用 ABI370 DNA 自动序列分析仪分别对重组克隆 pINM30 和亚克隆 pINM30-1 和 pINM30-2 进行序列分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 病毒提纯及病毒 RNA 提取

电镜观察提纯病毒的负染样品得到清晰的 IBDV 粒体。用琼脂糖凝胶电泳检测病毒 RNA 样品,观察到 3.4kb 和 2.9kb 左右的两条带符合 IBDV 基因组 A 和 B 片段的大小。

## 2.2 反转录合成和 PCR 扩增 cDNA

放射自显影结果表明,反转录合成的 cDNA 主要分布在 0.56~2.3kb 标准分子量 DNA 之间,满足待扩增 VP<sub>2</sub> 基因 1.5kb cDNA 的长度要求。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测,获得预期大小的 1.5kb 的特异性 DNA 带(图 1)。

## 2.3 重组质粒的 PCR 鉴定和限制酶酶切鉴定

对筛选得到的 3 个重组克隆 pINM30、pINM46 和 pINM61 分别进行 PCR 检测,均获得 1.5kb 的特异性 DNA 带,证明这 3 个克隆均已插入目的基因。对 pINM30 克隆进一步进行限制酶酶切分析,证明插入片段大小为 1.5kb,且 cDNA 上含有 AccI、StuI、SpeI、PstI 等酶切位点,与已报道的其它毒株的酶切位点分布一致(图 2 和图 3)。

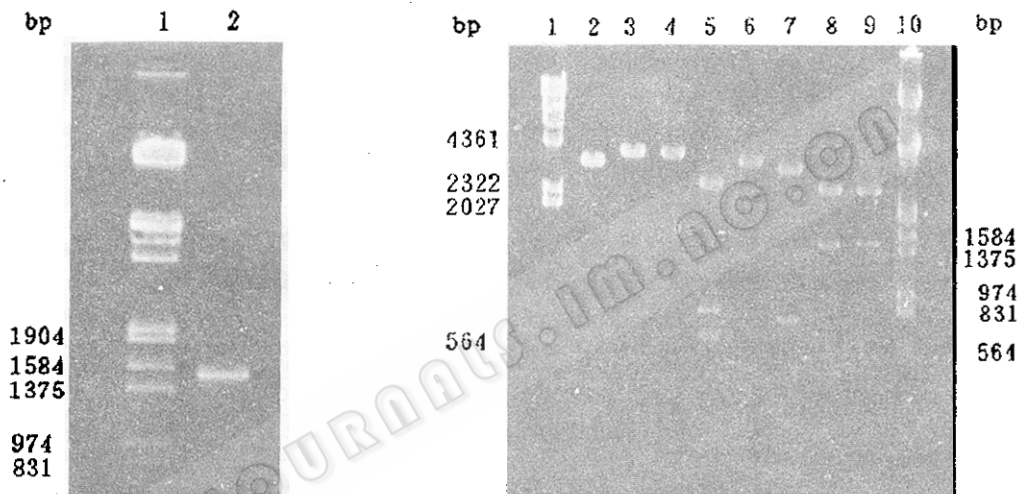


图 1 VP<sub>2</sub> 基因 cDNA 的 PCR 扩增

Fig. 1 Amplification of VP<sub>2</sub> gene cDNA by PCR

1. lambdaDNA/EcoRI + Hind III marker;
2. PCR product

图 2 限制酶酶切分析重组质粒 pINM30

Fig. 2 Analysis of recombinant plasmid pINM30 by restriction enzyme digestion

1. lambdaDNA/Hind III marker; 2. PstI; 3. KpnI; 4. XbaI; 5. AccI;
6. SpeI + EcoRI; 7. StuI + EcoRI; 8. XbaI + KpnI;
9. EcoRI + Hind III; 10. lambdaDNA/EcoRI + Hind III marker

## 2.4 序列分析及比较

通过对全长 cDNA 克隆 pINM30 和两个亚克隆 pINM30-1 和 pINM30-2 的序列分析(图 3),获得了中国 IBDV-NM 毒株 VP<sub>2</sub> 基因全长 cDNA 序列(图 4)。序列比较发现 NM 毒株与 CJ-801bkl、Cu1、PBG98、52/70、STC.002-73 及 Variant E 毒株之间高度同源,其核苷酸序列的同源率达 91.6%~96.2%(表 1)。推测的氨基酸序列的同源率为 96.2%~98.6%(表 1)。

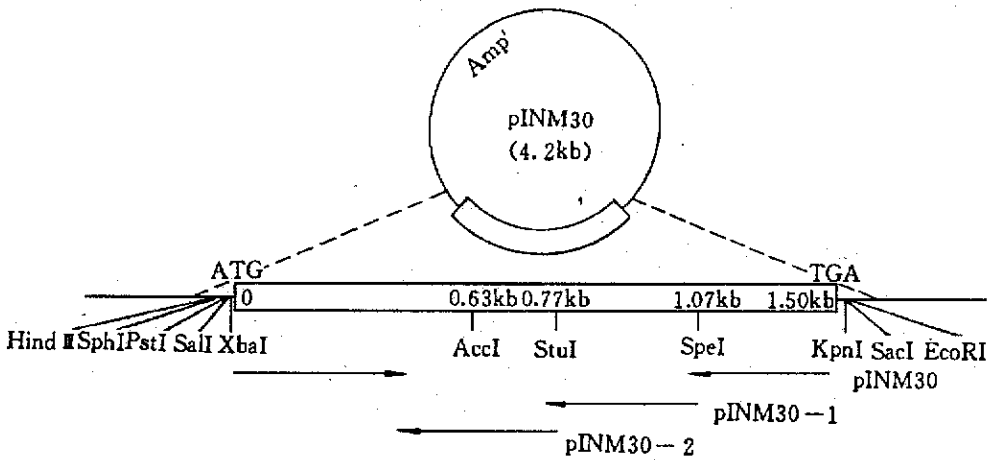


图3 重组质粒 pINM30 酶切图谱、亚克隆和测序策略

Fig. 3 Physical map of recombinant plasmid pINM30 and strategy of subcloning and sequencing

Arrow line indicate the direction and size of fragment sequenced

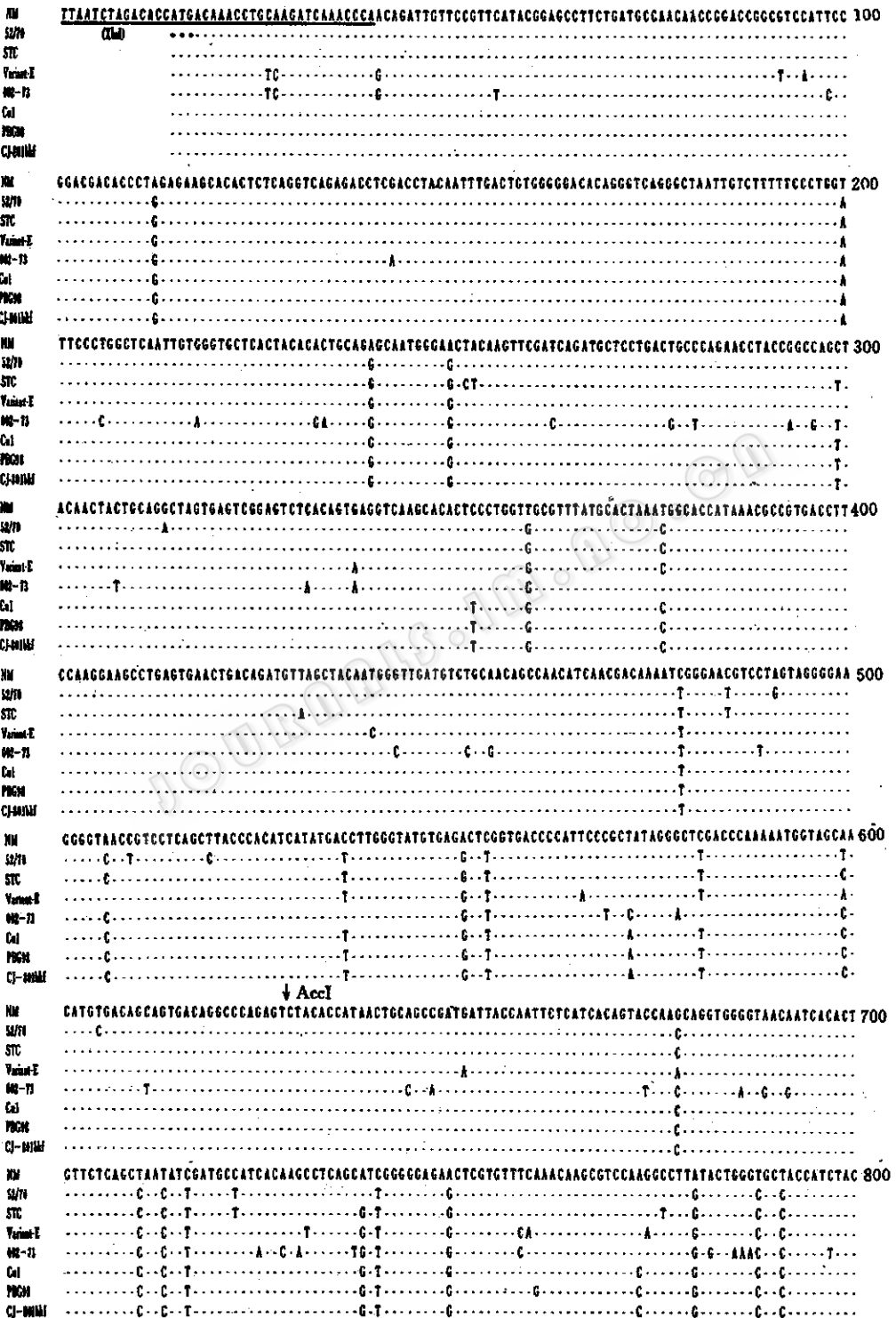
表1 IBDV-NM 毒株与其它 7 株 IBDV VP<sub>2</sub> 基因核苷酸和氨基酸的同源率比较

Table 1 Homology comparison of nucleotide and amino acid of VP<sub>2</sub> gene between NM and 7 other IBDV strains

	Strain	52/70	STC	Variant-E	002-73	Cu1	PBG98	CJ-801bkf
Nucleotide changes	NM	57	58	67	125	63	62	58
Nucleotide homology/ %	NM	96.2	96.1	95.5	91.6	95.8	95.9	96.1
Amino acid changes	NM	7	12	16	19	14	16	14
Amino acid homology/ %	NM	98.6	97.6	96.8	96.2	97.2	96.8	97.2

序列分析结果表明 IBDV-NM 毒株 VP<sub>2</sub> 两端氨基酸序列高度保守,其变异氨基酸主要分布在 VP<sub>2</sub> 中间高变异区 AccI-SpeI(206-350)内,与其它毒株的变异规律一致<sup>[5,12]</sup>。高变异区内第一个亲水区的氨基酸序列与 CJ-801bkf、Cu1、PBG98、52/70、STC、002-73 比较,有一个氨基酸的差异。第二个亲水区氨基酸序列与上述 6 个毒株完全相同。而与 Variant E 比较,两个亲水区各各有 2 个氨基酸的差异。此外,中国 IBDV-NM 毒株 VP<sub>2</sub> 具有强毒株 52/70、STC、Variant E 等特有的含有 4 个丝氨酸的 7 肽区: SWSASGS(图 5)<sup>[7,13]</sup>,此结果与张七斤等报道的 IBDV-NM 毒株的生物学特性相符<sup>[10]</sup>。这些结果表明中国 IBDV-NM 毒株应属标准血清 I 型 IBDV 强毒株。

从 IBDV 的分子生物学研究结果推断 VP<sub>2</sub> 高变异区,特别两个亲水区和一个 7 肽区的核苷酸和氨基酸的变异可能是随机的和多元化的,世界各地流行的 IBDV 毒株存在着抗原性和毒力的差异。比较国内分离的 NM 和 CJ-801bkf 两个毒株,发现其亲水区和 7 肽区均有差异,导致其抗原性和毒力的差异。因此,对国内不同地区流行的其它 IBDV 毒株 VP<sub>2</sub> 结构和功能的分析,显得十分迫切。在鸡传染性法氏囊病的防治方面,目前尚未研制出对各种流行株都具有免疫效果的理想疫苗,因此利用当地流行株进行免疫,将会得到良好的效果。



(图 4, 接下页)

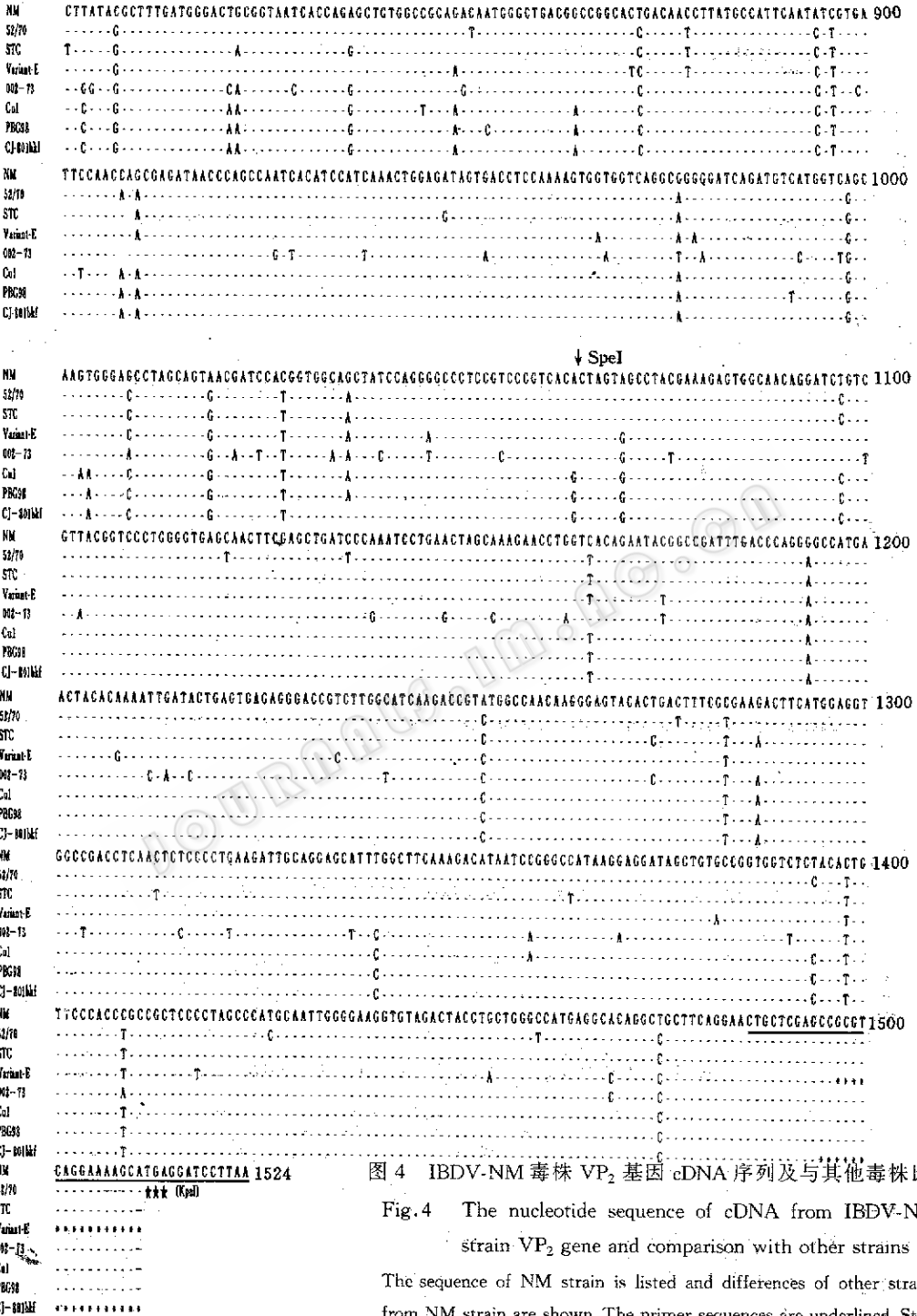


图 4 IBDV-NM 毒株 VP<sub>2</sub> 基因 cDNA 序列及与其他毒株比较

Fig.4 The nucleotide sequence of cDNA from IBDV-NM strain VP<sub>2</sub> gene and comparison with other strains

The sequence of NM strain is listed and differences of other strains from NM strain are shown. The primer sequences are underlined. Start codon is marked with (···) and stop condon is marked with (★★★). The AccI and SpeI sites are marked. (\*) denote sequences not determined.

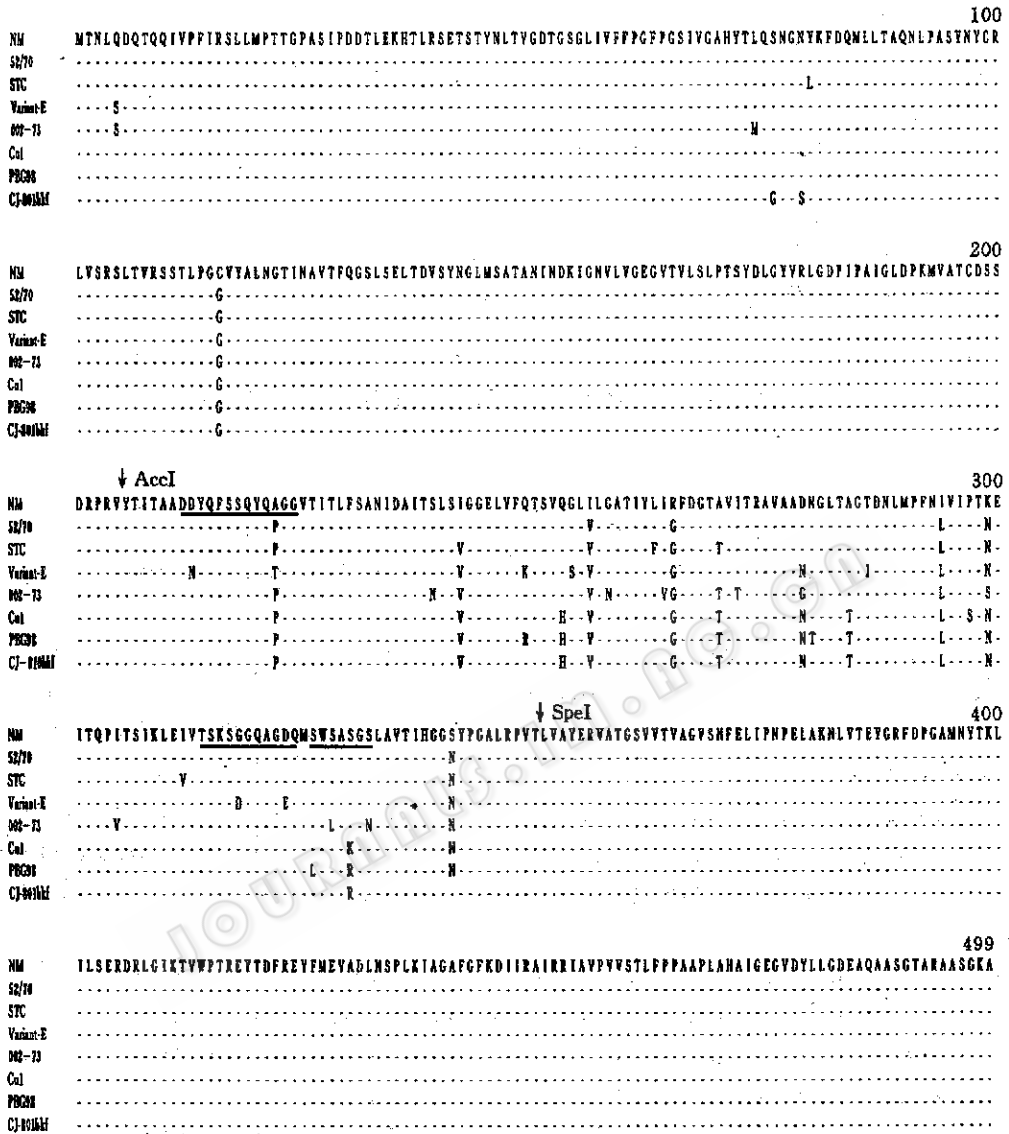


图 5 IBDV-NM 毒株 VP<sub>2</sub> 氨基酸序列及与其他毒株比较

Fig.5 The amino acid sequence of IBDV-NM VP<sub>2</sub> and comparison with other strains

The sequence of NM strain is listed and differences of other strains from NM are shown. The AccI and SpeI sites are marked. The two hydrophilic regions and one heptapeptide region are underlined.

### 参 考 文 献

[1]陈士友,张兹钧. 中国病毒学, 1992, 7(3): 241~245.

[2]Brown F. Intervirology, 1986, 25: 141~143.

[3]Kibenge F S B, Dhillon A S, Russell R G. J Gen Virol, 1988, 69: 1757~1775.

[4]Hudson P J, Mckern N M, Power B E *et al.* Nucleic Acids Research, 1986, 14(12): 5001~5012.

- [5] Bayliss C D, Spies U, Shaw K *et al.* J Gen Virol, 1990, 71:1303~1312.
- [6] Kibenge F S B, Jackwood D J, Mercado C C. J Gen Virol, 1990, 71:569~577.
- [7] Heine H G, Haritou M, Failla P *et al.* J Gen Virol, 1991, 72:1835~1843.
- [8] 崔 静, 周顺伍, 郭玉璞. 病毒学报, 1995, 11(3):234~241.
- [9] 陈士友, 张兹钧, 金由辛等. 病毒学报, 1994, 10(2):159~163.
- [10] 张七斤, 王克恭, 霍树田等. 中国兽医杂志, 1994, 20(7):3~5.
- [11] Kozak M. Cell, 1986, 44:283~293.
- [12] Azad A A, Jagadish M N, Brown M A *et al.* Virology, 1987, 161:145~152.
- [13] 周顺伍, 崔 静, 郭玉璞. 病毒学报, 1994, 10(3):285~289.

## The Cloning and Sequencing of cDNA Gene Coding for VP<sub>2</sub> of Chinese IBDV-NM Strain

Hasi Agula Zhang Tong Zhang Qijin Zhang Heling

(Biotechnology Centre and Biology Department, Inner Mongolia University, Huhehot 010021)

**Abstract** The cDNA of major host-protective antigen VP<sub>2</sub> gene from Chinese IBDV-NM strain isolated from Inner Mongolia in North China was synthesized by reverse transcription followed by polymerase chain reaction (PCR) using a pair of specific synthetic primers. The amplified cDNA was cloned at XbaI and KpnI sites in pUC19. The nucleotide sequence of VP<sub>2</sub> gene cDNA was determined and the amino acid sequence was deduced. Both the nucleotide sequence and amino acid sequence were compared with seven published sequences of VP<sub>2</sub> gene from IBDV strains CJ-801bkf (Chinese isolate), Cu1 (German strain), PBG98 (British attenuated vaccine strain), 52/70 (a virulent British isolate), 002-73 (Australian strain), STC (the United States standard challenge strain) and Variant E (Delaware variant strain E). All eight strains are closely related. The sequence homology between IBDV-NM strain and the seven other strains was 91.6%~96.2% at the nucleotide level and 96.2%~98.6% at the amino acid level. In the first hydrophilic region of VP<sub>2</sub> only one amino acid is different between IBDV-NM and CJ-801bkf, Cu1, PBG98, 52/70, STC, and 002-73 strains. But in the second hydrophilic region there were not any amino acid changes between IBDV-NM and these six strains. Compared with VP<sub>2</sub> gene of Variant E two different amino acids in each of both hydrophilic regions were found. The VP<sub>2</sub> of IBDV-NM strain has a typical heptapeptide motif: SWSASGS found in all highly virulent strains, suggesting that the Chinese IBDV-NM strain is a highly virulent strain of standard serotype I of IBDV.

**Key words** Infectious bursal disease virus (IBDV), major host-protective antigen, VP<sub>2</sub>, gene cloning, nucleotide sequence