

鸡传染性支气管炎病毒中国流行株免疫原 S1 基因的 分子克隆、序列分析及其 DNA 免疫的初步研究*

江国托 步志高 刘思国 康丽娟 祁 贤 卢景良

(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 哈尔滨 150001)

摘 要 对来源于我国华东地区的鸡传染性支气管炎病毒流行株 QD 免疫原 S1 基因 cDNA 进行了克隆、序列分析和 DNA 免疫的初步研究。RT-PCR 扩增 QD 毒株的 S1 基因, 将其 5' 和 3' 端分别进行分子修饰后插入克隆载体 pUC18 的 *Bam*HI / *Hind*III 位点, 在大肠杆菌中实现了目的基因的克隆; 利用英国 IBV 毒株 S1 全基因核酸探针与 QD 毒株 S1 基因的重组克隆质粒分子杂交后, 采用 *Hae*III, *Pvu*II 和 *Xba*I 等限制酶对此流行毒株 S1 基因 cDNA 进行了酶切分析; 在测定 QD 毒株 S1 基因 5' 端高变区核苷酸序列并以此与 IBV M41, H120, 6/82 及 Beaud 等参考毒株序列对比分析的基础上, 构建了 QD 株 S1 基因 DNA 免疫表达质粒, 肌肉注射免疫小鼠后, 鸡胚病毒中和试验的结果表明, IBV S1 基因 DNA 免疫表达质粒能诱导小鼠产生病毒特异的中和抗体, 具有良好的免疫原性, 初步显示基因疫苗在鸡传染性支气管炎防治上应用前景。

关键词 鸡传染性支气管炎病毒, 免疫原 S1 基因, 分子克隆, 序列分析, DNA 免疫

分类号 Q789 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)03-0305-09

随着我国养鸡业规模逐步扩大, 集约化程度也日益提高, 传染病的预防和控制显得尤为重要。同鸡新城疫, 马立克氏病等病毒性传染病一样, 近年来, 鸡传染性支气管炎 (Avian Infectious Bronchitis, IB) 的暴发与流行严重影响着我国养鸡业的发展。尽管常规的综合防治措施在一定程度上控制了本病的大规模流行, 但免疫鸡群高发病率、高死亡率的现象仍时有发生。究其原因, 免疫程序不当、饲养管理不善、疫苗质量欠佳以及多种以呼吸道及肾炎病变为特点的疫病病原的混合感染固然是不可忽视的因素, 但鸡传染性支气管炎病毒 (Avian Infectious Bronchitis Virus, IBV) 抗原地方性分布的特点以及病毒基因组点突变、缺失、插入和不同毒株之间的同源重组等所造成的病毒高度变异是至关重要的原因^[1]。

IBV 在不同地区受免疫接种程序、家禽密度等因素的影响, 正以不同的速度和不同的演化方向发生变异。已经发现, S 蛋白上仅有 2~3 个氨基酸的改变就有可能导致新的病毒血清型的产生^[2], 常规的血清学方法很难准确地反映病毒高度变异的情况, 具体体现不同地区 IBV 抗原分布的差异, 而分子生物学技术为我们认识和解决上述问题提供了有效手段。因此从分子水平研究不同地区、不同毒株之间的同源性和变异情况, 揭示病毒遗

* 国家攀登计划 B 类资助课题项目 (No. 85-44-01-44)。

收稿日期: 1998-03-02, 修回日期: 1999-03-15。

传变异的分子基础,研制和应用其免疫原基因 DNA 疫苗对本病的有效防治可能具有重要的指导意义。

1 材料与方 法

1.1 病毒

表 1 中所列 QD 株已经过病毒的病原性、形态结构、理化特性、结构多肽、血清型分析和基因分型等多方面的鉴定^[3~6]。

表 1 本试验所用 IBV 毒株来源

Table 1 Sources description of IBV strains in this test

Strains	Sources
1. M41	American
2. H52	Holland
3. T	Australia
4. QD	East of China

Note: 1, 2 and 3 are standard strains, 4 is isolate.

1.2 S1 基因的分子克隆

差速离心及密度梯度离心纯化病毒鸡胚尿囊液毒;SDS-蛋白酶 K 法提纯病毒基因组 RNA^[7];参考 IBV Beaud 株的发表序列^[8],设计并合成一对可扩增 IBV S1 基因的寡核苷酸引物,两引物间跨度约 1.7kb,其中在 3' 与 5' 端分别进行 *Bam*H I 和 *Hind*III 酶切识别位点的分子修饰。

以病毒基因组 RNA 为模板,在上游引物的引导下,反转录合成第一链 cDNA,以此 cDNA 为模板 PCR 扩增 S1 基因 cDNA^[9];将 PCR 产物插入克隆载体 pUC18 的 *Bam*H I / *Hind*III 位点构建重组质粒,转化 *E. coli* JM83 感受态细胞, Amp 抗性 & α -互补筛选重组质粒以备鉴定。

1.3 目的基因的鉴定

1.3.1 Southern blot: 用英国兽医中心实验室李德山博士赠送的英国 IBV 全长 S1 基因重组质粒 PCR-IIS1 为模板,随机引物法制备 DIG 标记的核酸探针;以此探针同 QD 株 S1 基因重组质粒 pUCQDS1 进行 Southern 杂交。

1.3.2 重组质粒的酶切分析: 将 Southern blot 阳性反应的重组质粒以 *Bam*H I 酶切线性化后,电泳分析其分子量,同时以 *Bam*H I / *Hind*III 双酶切 pUCQDS1,回收其约 1.7kb 的 *Bam*H I / *Hind*III 片段。

1.3.3 S1 基因 RFLP 分析: 回收并纯化 QD 株 S1 基因 PCR 产物,分别以 *Hea* III, *Pvu* II 和 *Xba* I 等限制性核酸酶消化,2% 琼脂糖凝胶电泳,分析 QD 株 S1 基因的限制性酶切长度多态性(Restriction Enzyme Fragment Length Polymorphism, RFLP)。

1.4 QD 株 S1 基因 5' 端高变区核苷酸序列分析

Southern blot 及酶切分析正确的 QD 株 S1 基因克隆质粒,以荧光素标记的 pUCM13 Forward (-20)通用引物,用 2.0 测序酶双脱氧链终止法测定其 5' 端高变区序列,同时将其与 IBV M41, H120, 6/82 和 Beaud 等参考株的序列进行比较分析。

1.5 QD 株 S1 基因 DNA 免疫表达质粒的构建及其免疫原性分析

将 pUCQDS1 克隆的 S1 基因片段插入 pSY538 载体,在其 3' 端引入了终止密码子 TAA,再将开放阅读框架完整的 S1 基因片段克隆到 pSY- β -LacZ 的 SV40 启动子和增强子下游,SV40 polyA 剪接信号上游并取代 *LacZ* 基因构成 IBV S1 基因 DNA 免疫表达质

粒 pSYQDS1。大量扩增并经 PEG 纯化的 pSYQDS1 溶于 PBS,以每头份 300 μ g 的剂量肌肉注射免疫小鼠,4 周后分离免疫小鼠的血清进行鸡胚病毒中和试验。

2 试验结果

2.1 S1 基因的分子克隆及鉴定

采用 RT-PCR 方法可成功地获得与试验设计相吻合的约 1.7kb 的 DNA 片段(电泳图略,采用本方法已扩增并克隆了包括 M41, H52, T 和来源于国内不同地区的 17 株 IBV S1 基因,详细结果作者另有报道);重组克隆质粒 pUCQDS1 *Bam*H I 线性化分

子长为 4.4kb, *Bam*H I / *Hind*III 双酶切可回收 1.7kb 的外源 DNA 片段;QD 株 S1 基因重组质粒可与英国 IBV 全长 S1 基因核酸探针出现阳性 Southern blot 杂交反应;*Hae*III 酶切分析的结果表明, QD 株具有与 M41 和 H52 相同的 RFLP 带型,同时 *Pvu* II 的酶切结果可进一步将 QD 与 M41 区分,结果如表 2。

2.2 QD 株 S1 基因 5'端高变区序列分析

以 M13pUC(-21) Forward 通用引物对 QD 株 S1 基因 5'端高变区序列测定的结果显示, QD 株 S1 基因 5'端高变区序列与 M41 高度同源。在所测定的起始密码子上游 60 个核苷酸和下游 380 个核苷酸共 440bp 中, QD 与 M41 仅在起始密码子后 131bp 处相差一个碱基,由 M41 的 C 突变为 QD 的 G,即 S1 蛋白第 41 个氨基酸由 M41 的 Ala 突变为 QD 的 Gly,两者同源率达 99.80%;而在此 440bp 中, QD 与 Beaud 株相比有 13 个碱基不同,两者同源率仅为 97.10%;QD 与 H120 同源率为 96.36%,与 IBV 6/82 株的同源率只有 66.59%。

2.3 QD 株 S1 基因 DNA 免疫表达质粒的构建及其免疫原性分析

以 *Pvu* II 酶切 pUCQDS1,结果出现 2.3, 1.6 和 0.46kb 三条带,表明所克隆的 QD S1 基因中存在一个不对称的 *Pvu* II 酶切位点,再以 *Pvu* II 和 *Hind*III 双酶切 pUCQDS1,原 0.46kb 和 2.3kb 的片段电泳迁移速率不变,而 1.6kb 片段变小,出现在 1.45kb 的位置,表明 *Pvu* II 酶切位点位于 S1 基因近 3'端,距克隆位点约 0.37kb。回收 pUCQDS1 的 *Bam*H I 片段,插入 pSY 538 的 *Bam*H I 位点,阳性克隆经 *Eco*RI 线性化为 4.9kb, *Bam*HI 酶切则为和 3.2kb 的 pSY538 载体和 1.7kb 的 S1 基因,表明 QD 株 S1 基因已插入 pSY538;以 *Pvu* II 酶切阳性克隆,挑取切下的约 0.6kb 片段的克隆为所需正向插入克隆,即在 S1 基因下游引入了 pSY538 三个 ORF 通用随机终止密码 TAATTAATTAA 和 *Sma* I 位点,定名为 P538QDS1。pSY- β -LacZ 经 *Eco*RI 部分酶切后,以 Klenow 酶完全补平,再以 *Hind*III 彻底酶切,回收 3.4kb 片段与 P538QDS1 (*Bam*HI/*Hind*III) 1.7kb 片段连接,转化后的阳性质粒以 *Hind*III 和 *Eco*RI 线性化,均为 5.3kb, *Bam*HI/*Hind*III 双酶切则出现 3.1kb, 1.7kb 和 0.48kb 三条带, *Pst* I 酶切则为 4.2kb 和 1.1kb 两条带,表明含有

表 2 IBV S1 基因 RFLP 带型及其基因分型

Table 2 S1 gene RFLP patterns of IBV strains and their deduced genotypes

IBV strains	RFLP patterns of S1 gene/kb	Deduced genotypes
M41	0.9, 0.5, 0.3	Mass
H52	0.9, 0.5, 0.3	Mass
QD	0.9, 0.5, 0.3	Mass
T	0.65, 0.55, 0.3, 0.2	T

SV40 启动子, SV40 增强子和 SV40 polyA 信号及完整 ORF 的 S1 基因 DNA 免疫表达质粒 pSQDS1 构建成功。以其免疫小鼠可产生病毒特异的中和抗体, 结果如表 3。

表 3 QD 株 S1 基因 DNA 免疫的病毒中和试验

Table 3 VN test of QD S1 gene DNA vaccine

Groups	Chickens embryo No.	Immunogen of VN test	Embryo stunt	Urate deposit in kidney
Immuno-experiment	6	pSYQDS1	0	0
Immuno-control	5	pSY- β -LacZ	5	5
Control	5		5	5

3 讨论

采用 IBV M41, H52 及澳大利亚 T 株所建立的 RT-PCR 方法可成功地扩增我国不同地区的 IBV 流行毒株 S1 基因(另文报道)。

Hae III RFLP 分析表明, QD 株具有与呼吸道 IBV M41 和 H52 相同的带型, 表现为 0.9, 0.5 和 0.3kb, 而不同于肾型澳大利亚 T 株的 0.65, 0.55, 0.3 和 0.2kb 的带型; 此结果与 QD 株的临床表现、组织嗜性和血清型鉴定的结果基本一致, 初步表明此分离株为一株以引起鸡呼吸道病变为主的 IBV 流行毒株。

QD 株 S1 基因 5'端高变区序列的测定与其 S1 基因 RFLP 分析的结果一致; 序列测定的结果显示, QD 株 S1 基因 5'端高变区(HVR)序列与呼吸道型 IBV M41 高度一致, 同源率达 99.80%, 同时与其他两个呼吸道型 IBV Beaud 和 H120 的同源率也分别可达到 97.10% 和 96.36%; 而 QD 株与肾型 IBV 6/82 株的同源率只有 66.59%。

成功地构建了 QD 株 S1 基因 DNA 免疫表达质粒, 肌肉注射免疫小鼠后, 鸡胚病毒中和试验的结果表明, IBV S1 基因 DNA 免疫表达质粒能诱导小鼠产生病毒特异的中和抗体, 并具有良好的免疫原性。

IBV QD 株 S1 基因的分子克隆与序列分析为进一步从分子生物学角度探讨 IBV 遗传变异的规律打下了基础; 鸡传染性支气管炎病毒中国流行毒株免疫原 S1 基因 DNA 免疫表达质粒的构建及其免疫原性分析, 初步显示基因疫苗在 IB 防治上的应用前景。

参 考 文 献

- [1] D. Cavanagh, P. J. Davis, J. K. A. Cook. *Avian Pathology*, 1992(a); 21: 33~43.
- [2] J. K. A. Cook, M. B. Huggins. *Avian Pathology*, 1986, 15: 129~138.
- [3] 江国托, 王秀荣, 刘思国等. 谢庆阁, 翟中和主编, 畜禽重大疫病免疫防治研究, 北京: 中国农业科技出版社, 1997, 78~81.
- [4] 江国托, 王永坤. 中国畜禽传染病, 1996, 6: 1~3.
- [5] 江国托, 王永坤. 中国兽医杂志, 1996, 22(6): 8~9.
- [6] Jiang G. T., Lu J. L. *Japanese J. Pathophy*, 1995, 4(2): 47.
- [7] J. 萨姆布鲁克等著, 金冬雁等译. 分子克隆实验指南, 北京: 科学出版社, 1992.
- [8] M. B. Matthew, E. G. Micheal *et al. J. Gen. Viril.*, 1985, 66: 719~726.

[9] 江国托,步志高,刘思国等. 谢庆阁,翟中和主编, 畜禽重大疫病免疫防治研究,北京:中国农业科技出版社, 1997, 92~92.

Cloning, Sequencing and the S1 Gene DNA Vaccine of Infectious Bronchitis Virus QD Isolate in China*

Jiang Guotuo Bu Zhigao Liu Siguo Kang Lijuan Qi Xian Lu Jingliang

(State Key Lab of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, CAAS, Harbin 150001)

Abstract One local strain of avian infectious bronchitis virus (IBV) designated as QD from the east of China was identified and used in this test. The gene encoding S1 glycoprotein of the isolate was obtained by RT-PCR, cloned in *E. coli*, and identified by Southern blot, Restriction enzyme fragment length polymorphism analysis (RFLP) and sequencing. To investigate the probability of DNA vaccine in controlling IB, cDNA of S1 gene was transferred from pUCQDS1 to pSY538 for adding end code TAA at its 3' end. After that, the fragment containing intact open reading fragment of S1 gene was inserted into pSY- β -LacZ at downstream of the SV40 enhancer and promoter and upstream of SV40 polyA signal to replace the *LacZ* gene and the plasmid was designated as S1 gene DNA vaccine expressive plasmid pSYQDS1. Solved in PBS, the plasmid was injected into quadriceps muscular of mice at a dose of 300 μ g. Four weeks post intramuscular injection, the serum of the immunized mice was collected to neutralize IBV on SPF chicken embryos. Results demonstrated that the S1 gene DNA vaccine plasmid pSYQDS1 could efficiently induce the neutralizing antibodies in mice.

Key words Avian infectious bronchitis virus, S1 gene, sequencing, DNA vaccine

* Supported by National Pan Deng Plan-Program B(No. 85-44-01-44).