

IBDV 超强毒株和弱毒株 VP2 基因同义 密码子使用偏爱性研究^{*}

李银聚¹, 吴庭才¹, 张春杰¹, 程相朝¹, 陈溥言²

(1 河南科技大学 动物科技学院, 河南 洛阳 471003; 2 南京农业大学 动物医学院, 江苏 南京 210095)

[摘 要] 应用 RT-PCR 方法扩增并克隆了分离自河南省的 30 株 IBDV 超强毒和 9 株弱毒株 VP2 基因 cDNA 序列, 研究 IBDV 超强毒和弱毒株的 VP2 高变区基因不同位点同义密码子的使用情况。结果表明, 超强毒株和弱毒株除特定位点的特征性氨基酸不同外, 在同义密码子的使用上也有明显的偏爱性。这预示着同义密码子的使用与 VP2 基因表达及其表达产物的空间结构有关, 进而可能影响到 IBDV 的毒力。

[关键词] 鸡传染性法氏囊病病毒; VP2 基因; 超强毒株; 弱毒株; 密码子偏爱性

[中图分类号] S858.312.65⁺9.4

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)05-0034-05

Study on the preference of synonymous codon usage of VP2 gene of very virulent IBDV and attenuated IBDV strains

LI Yin-ju¹, WU Ting-cai¹, ZHANG Chun-jie¹, CHENG Xiang-chao¹, CHEN Pu-yan²

(1 College of Animal Science and Technology, He'nan University of Science and Technology, Luoyang, He'nan 471003, China; 2 College of Animal Veterinary, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: The VP2 gene cDNA of 30 very virulent IBDV isolates and 9 attenuated IBDV isolates that were cloned and amplified by RT-PCR in He'nan province were compared. Synonymous codon usage in VP2 high variable region gene was studied. The results showed that many amino acids in synonymous codon usage had obvious preference besides the difference of the feature amino acids of very virulent IBDV and attenuated IBDV strains. This indicated that there was certain relation between the synonymous codon usage, VP2 gene expression and the space structure of its expression product, which may influence the virulence of IBDV.

Key Words: chicken infectious bursal disease virus (IBDV); VP2 gene; very virulent strain; attenuated strain; synonymous codon usage

传染性法氏囊病 (Infectious Bursal Disease, IBD) 是由传染性法氏囊病毒 (Infectious Bursal Disease Virus, IBDV) 引起的一种急性、高度接触性传染病。IBDV 主要影响法氏囊内 B 淋巴细胞的分化, 导致不同程度的免疫抑制, 从而使鸡对其他病毒及细菌的易感性增加, 导致 3~6 周龄雏鸡发病死

亡。IBDV 属双链双节段 RNA 病毒, 主要由 VP1、VP2、VP3 和 VP4 4 种结构蛋白组成, 并分别由相应的基因所编码。其中, VP2 不仅是病毒的主要结构蛋白, 还是病毒的主要宿主保护性抗原, 其含有能诱导中和抗体的抗原决定簇, 与病毒的抗原漂移、毒力变异、中和抗体的诱导和细胞凋亡有关^[1-2]。不同

^{*} [收稿日期] 2006-04-03

[基金项目] 河南省科技攻关项目 (0524030004)

[作者简介] 李银聚 (1965 -), 男, 河南中牟人, 副教授, 博士, 主要从事病毒分子生物学与转基因动物研究。

IBDV 毒株基因的变异主要发生在 VP2 区域,VP2 蛋白第 206~350 位氨基酸残基之间的区域为高度可变区,包含 2 个重要的亲水区和 1 个七肽区。其中,212~224 位氨基酸残基为第一亲水区,此区氨基酸的变异直接影响病毒的抗原决定簇与稳定性;314~324 位氨基酸残基为第二亲水区,中和抗原表位即位于该区,其氨基酸的变异直接影响病毒与单克隆抗体的结合,这也可能是变异株避开血清型疫苗免疫作用的根本原因。紧接在第二亲水区后的结构是七肽区,由七个氨基酸残基组成,位于第 326~332 位氨基酸残基。七肽区氨基酸的变化可导致 IBDV 毒力改变,但也有不同的看法^[3-4]。目前普遍认为,蛋白质的一级结构决定其高级结构与功能。最近研究表明,基因同义密码子的使用与基因表达产物的生理功能有密切关系^[5-6]。在蛋白质的合成过程中,由于密码子与反密码子特性以及细胞环境的不同,同义密码子翻译为氨基酸的过程差异显著,这些差异会影响到新生肽链折叠的动力学过程,进而影响到蛋白质的空间结构,并最终影响到蛋白质的性质和功能。

VP2 蛋白高变区氨基酸的变化会影响 IBDV 的毒力和抗原性。但 VP2 高变区基因同义密码子的使用,是否也能影响到 VP2 蛋白功能,目前还不清楚。为此,本试验对 2002~2004 年自河南省分离的 39 株 IBDV 地方流行株(IBDV 超强毒 30 株,弱毒 9 株)的 VP2 基因进行了克隆和序列分析,并与 GenBank 中登录的我国和世界不同国家及地区分离的超强毒株(very virulent IBDV strain, vvIBDV)和弱毒株(attenuated IBDV strain, attIBDV)的 VP2 高变区的基因序列进行了比较,以期对 IBDV 不同毒株的毒力改变和抗原性的漂移进行有益的探索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 IBDV 毒株 试验毒株为本课题自 2002~2004 年在河南省分离并鉴定的 39 株 IBDV 地方流行株,其中 30 株为超强毒株,9 株为弱毒株。参考毒株为 GenBank 中登录的我国和其他国家及地区的 18 株弱毒株(登录号分别为:AF076235、AF281231、AF076236、X03993、AF281312、X84034、X16137、D00868、AF109154、AF312371、AF416620、AF413069、AF076231、AF413071、AF076230、AF006694、AF006697 和 AF321054)及 38 株超强毒株(登录号分别为:AF159216、Y14956、AJ001941、

AJ001948、AJ001945、AJ001946、X92760、Z25418、AF240686、D49706、AB024076、AF165150、AF165151、AJ238647、AF247006、X95883、AF159217、AF159218、AJ245884、Y18650、Y18612、AJ277801、AJ404327、Y18682、AJ95029、AJ249521、AJ249520、AJ245886、AF155127、AF006696、AF006698、AF076228、AF076223、AF076227、AF076226、AF051838、AF303219、AF279287)。

1.1.2 菌种与质粒 JM109 工程菌购自洛阳华美生物工程公司;pMD18-T 载体购自大连宝生物工程公司。

1.1.3 工具酶与试剂盒 λ DNA/ Hind + EcoR Marker、EcoR I 和 Pst I 等限制性内切酶及 RNA 提取试剂盒等均为洛阳华美生物工程公司产品;一步法 RT-PCR 扩增试剂盒、琼脂糖、X-gal、IPTG、SDS、EB 等购自大连宝生物工程公司;其余试剂均为国产或进口分析纯级。

1.2 病料的处理

将经过 IBDV 快速诊断试纸和 AGP 试验鉴定的、采自河南省不同地区各发病鸡群的法氏囊组织,按常规方法处理,-20℃保存备用。

1.3 引物设计与合成

根据 GenBank 提供的 IBDV U K661 株(登录号:X92760)VP2 基因序列,在 VP2 基因高变区设计了 1 对引物,序列如下:

上游:5'-AGCTGCA GCCGATGATTACCAAT-TCTC-3';

下游:5'-CGGAATTCCCGATTATGTCTTT-GAAGC-3'。

引物由大连宝生物工程公司合成,预期扩增片段长度为 0.72 kb。

1.4 IBDV RNA 的提取

按华美生物工程公司 RNA 样品提取试剂盒的要求,提取各 IBDV 毒株的 RNA,在实际提取过程中半量操作完全能够满足 RT-PCR 扩增的需要。取 25 μ L 处理后的 IBDV 毒株上清液,先后加入 100 μ L 变性液和 25 μ L V(氯仿) V(异戊醇) = 24 : 1 的混合液,振荡器上振荡 1 min 以充分混匀,14 000 r/min 离心 10 min,上清液移至一个新的离心管中,加入等体积异丙醇,颠倒混匀,14 000 r/min 离心 10 min。倾去上清,加入 400 μ L 体积分数 75% 的乙醇,淋洗后,14 000 r/min 离心 5 min,弃去上清,沉淀于真空浓缩系统中 65℃、300 r/min 快速抽干。抽提的 RNA 溶于 40 μ L 无 RNA 酶水中,最好及时

用于 RT-PCR 扩增,或于体积分数 75 %乙醇中 - 20 保存待测。

1.5 IBDV VP2 高变区基因 cDNA 的 RT-PCR 扩增

按照一步法 RT-PCR 扩增试剂盒的要求进行扩增。RT 反应参数为:热盖温度 104 ,50 反转录 30 min。PCR 反应参数为 94 2 min; 94 50 s,56 45 s,72 100 s,循环 5 次;94 50 s,55 45 s,72 100 s,循环 29 次;最后 72 延伸 10 min。扩增产物进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 IBDV VP2 高变区基因 RT-PCR 扩增产物的回收、纯化与序列测定

回收目的条带进行抽提纯化后直接送大连宝生物工程公司测序,或 - 20 保存备用。对于分离自反复发病鸡群的 IBDV 毒株,将其 PCR 产物克隆于 pMD18-T 载体,转化 JM109 受体菌,蓝白斑筛选菌落,提取重组质粒 YX10、YB11 和 YN05,经 *EcoR* I

和 *Pst* I 双酶切鉴定正确后测序。

1.7 各分离 IBDV 株 VP2 基因序列同源性比较与变异分析

利用 DNASTar 软件,对分离自河南省的 39 株 IBDV 地方流行株与各参照毒株的 VP2 高变区基因 cDNA 进行对比分析。

2 结果与分析

2.1 39 株 IBDV 地方毒株 VP2 基因的 RT-PCR 扩增、克隆和鉴定结果

提取的各 IBDV RNA 经 RT-PCR 扩增后,进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定,结果显示扩增产物长度为 0.7 kb 左右,与设计片段长度完全相符(图 1);重组质粒经 *EcoR* I 和 *Pst* I 双酶切后,分别切出 2.69 和 0.72 kb 两个预期片段(图 1)。

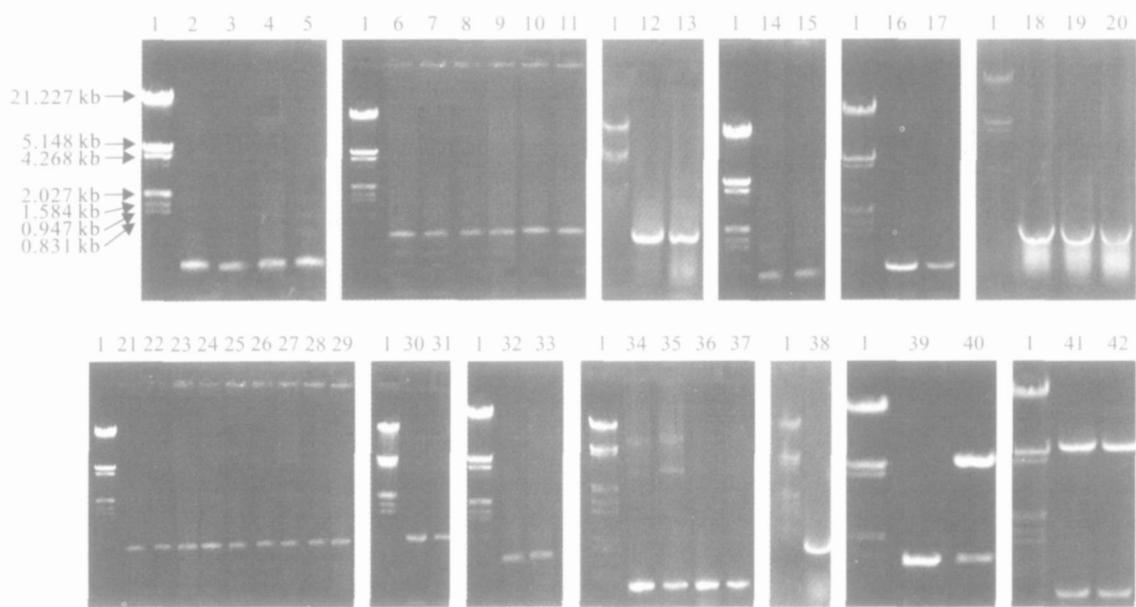


图 1 IBDV 分离株 VP2 基因 RT-PCR 扩增产物和重组质粒的酶切鉴定电泳图谱
1. Marker λDNA/ *EcoR* + *Hind* ;2 ~ 39, IBDV-VP2 基因扩增产物;40 ~ 42, YX10、YB11 和 YN05 重组质粒
EcoR / *Pst* 双酶切产物

Fig.1 PCR products and identification of recombinant plasmids of VP2 gene by restriction endonuclease

1. Marker λDNA/ *EcoR* + *Hind* ;2 ~ 39. PCR products of VP2 gene;40 ~ 42. YX10, YB11 and YN05 identified by digested with *EcoR* + *Pst*

2.2 IBDV 超强毒株和弱毒株 VP2 基因高变区同一位点密码子的比较

由图 2 可以看出,几乎所有的弱毒株 VP2 蛋白高变区的 232 和 259 位 A、233 位 N、234 位 I、245 位 E、258 位 G、282 位 L、283 位 T、320 位 Q、326 位 S 和 338 位 H 等 11 处氨基酸的密码子分别为

GCC、GCC、AAC、A TT、GAG、GGC、CTG、ACA、CAA、TCG 和 CA T,而几乎所有超强毒株在相应的位置的密码子分别为 GCT、GCT、AAT、ATC、GAA、GGT、CTA、ACG、CAG、TCA 和 CAC 等同义密码子,这种差异可能与 IBDV 毒力有一定的关系。在 269、283、286、298 和 350 位等 5 处的 T,弱

毒株分别使用 ACA、ACA、ACC、ACA 和 ACG 等密码子编码,而超强毒株则使用 ACT、ACG、ACT、ACC 和 ACA 等同义密码子编码,这可能是 IBDV 在进化过程中位点特异性选择的结果,与其毒力的变异有潜在的关系。

	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230
超强毒株 vv	GCC	GAT	GAT	TAC	CAA	TTC	TCA	TCA	CAG	TAC	CAA	GCA	GGT	GGG	GTA	ACA	ATC	ACA	CTG	TTC
弱毒株 att	GCC	GAT	GAT	TAC	CAA	TTC	TCA	TCA	CAG	TAC	CAA	<u>CCA</u>	GGT	GGG	GTA	ACA	ATC	ACA	CTG	TTC
211	A	D	D	Y	Q	F	S	S	Q	Y	Q	A	G	G	V	T	I	T	L	F
	第一亲水区 The first hydrophilic region										P									
	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250
vv	TCA	GCT	AAT	ATC	GAT	GCC	ATC	ACA	AGC	CTC	AGC	ATC	GGG	GGA	GAA	CTC	GTG	TTT	CAA	ACA
att	TCA	GCC	AAC	ATT	GAT	GCC	ATC	ACA	AGC	CTC	AGC	<u>GTT</u>	GGG	GGA	GAG	CTC	GTG	TTT	CAA	ACA
231	S	A	N	I	D	A	I	T	S	L	S	<u>I</u>	G	<u>G</u>	<u>V</u>	L	V	F	Q	T
											<u>V</u>									
	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270
vv	AGC	GTC	CAA	GGC	CTT	ATA	CTG	GGT	GCT	ACC	ATC	TAC	CTT	ATA	GGC	TTT	GAT	GGG	ACT	GCA
att	AGC	GTC	<u>CAC</u>	GGC	CTT	<u>GTA</u>	CTG	GGC	GCC	ACC	ATC	TAC	CTC	ATA	GGC	TTT	GAT	GGG	ACA	<u>ACA</u>
251	S	V	<u>Q</u>	G	L	<u>I</u>	L	G	A	T	I	Y	L	I	G	F	D	G	T	<u>A</u>
											<u>H</u>									
	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290
vv	GTA	ATC	ACC	AGA	GCT	GTG	GCC	GCA	GAC	AAT	GGG	CTA	ACG	GCC	GGC	ACT	GAC	AAC	CTT	ATG
att	GTA	ATC	ACC	AGG	GCT	GTG	GCC	GCA	<u>AAC</u>	AAT	GGG	CTG	ACA	<u>ACC</u>	GGC	ACC	GAC	AAC	CTT	ATG
271	V	I	T	R	A	V	A	A	<u>D</u>	N	G	L	T	A	G	T	D	N	L	M
											<u>T</u>									
	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310
vv	CCA	TTC	AAT	ATT	GTG	ATT	CCA	ACC	AGC	GAG	ATA	ACC	CAG	CCA	ATC	ACA	TCC	ATC	AAA	CTG
att	CCA	TTC	AAT	ATT	GTG	<u>CTT</u>	CCA	ACA	<u>AAC</u>	GAG	ATA	ACC	CAG	CCA	ATC	ACA	TCC	ATC	AAA	CTG
291	P	F	N	I	V	<u>L</u>	P	T	<u>S</u>	E	I	T	Q	P	I	T	S	I	K	L
											<u>N</u>									
	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330
vv	GAG	ATA	GTG	ACC	TCC	AAA	AGT	GGT	GGT	CAG	GCG	GGG	GAT	CAG	ATG	TCA	TGG	TCA	GCA	AGT
att	GAG	ATA	GTG	ACC	TCC	AAA	AGT	GGT	GGT	CAA	GCG	GGG	GAT	CAG	ATG	TCG	TGG	TCA	GCA	<u>AGA</u>
311	E	I	V	T	S	K	S	G	G	Q	A	G	D	Q	M	S	W	S	A	<u>S</u>
	第二亲水区 The second hydrophilic region										七肽区 Seven peptides region									
	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350
vv	GGG	AGC	CTA	GCA	GTG	ACG	ATC	CAC	GGT	GGC	AAC	TAT	CCA	GGG	GCC	CTC	CGT	CCC	GTC	ACA
att	GGG	AGC	CTA	GCA	GTG	ACG	ATC	CAT	GGT	GGC	AAC	TAT	CCA	GGG	GCC	CTC	CGT	CCC	GTC	ACG
331	G	S	L	A	V	T	I	H	G	G	N	Y	P	G	A	L	R	P	V	T

图 2 IBDV 强毒株和弱毒株 V P2 高变区核苷酸及氨基酸序列的比较
黑体表示同义密码子置换;- .示变化密码子及其编码的氨基酸

Fig.2 Sequences of vvIBDV and attIBDV strains V P2 nucleotide and amino acids
Boldface type means synonymous codon replicated; - . means variable codon and its amino acid

3 讨 论

Trradossi 等^[7]和 Eterradosi 等^[8]认为,IBDV 不同毒株间毒力及抗原性的差异,主要是 VP2 高变区的氨基酸发生了变化所致。因此,本试验对河南省不同地区分离的 39 株 IBDV 超强毒株的 VP2 高变区基因与弱毒 IBDV 株进行了比较,结果显示,IBDV 超强毒和弱毒株除特征性氨基酸不同外,同义密码子的偏爱性也不同。

目前,在 IBDV 的毒力研究中,均以特定氨基酸的变异作为划分毒力强弱的基础,但有些毒株的

VP2 区域特征氨基酸相同,但毒力仍然存在差异^[9-10],说明在翻译过程中,除氨基酸序列影响到蛋白质的结构与功能外,基因编码序列可能也携带相关的信息。其中,同义密码子的使用会影响到新生肽链折叠的动力学过程,进而影响到蛋白质的空间结构及其功能。Komar 等^[11]的研究结果表明,同义密码子可以影响蛋白质的折叠。本研究发现,IBDV 超强毒株与弱毒株有 16 处同义密码子使用不同,均表现出明显的偏爱性。超强毒株和弱毒株对某些氨基酸同义密码子在使用上的偏爱性,可能会影响到 VP2 蛋白的折叠,进而影响到病毒的毒力。

虽然基因中同义密码子的置换并不改变其表达产物的氨基酸序列,但同义密码子的使用却并非随机的。本研究结果显示,在 IBDV VP2 高变区基因中,超强毒株和弱毒株在 269,283,286,298 和 350 位等 5 处的 T 的同义密码子使用不同,同一毒株在不同位点使用的同义密码子也不相同,263 和 282 位的 L 也呈现相似的情况;232 和 259 位的 A,超强毒株偏嗜于 GCT,弱毒株则偏向于 GCC。这说明,在基因中同义密码子的使用具有位点特异性。进一步推测,基因中不同位点同义密码子使用的偏爱性,能够影响到其表达的蛋白质的空间结构,并最终影响到蛋白质的功能。VP2 作为 IBDV 的主要结构蛋白,可影响病毒的毒力。

病毒没有完整的自我复制系统,必须借助于宿主细胞中的原料加以复制,因此要受到宿主诸多因素的制约,病毒必须对宿主产生适应性的改变,其中包括同义密码子的使用。在鸡细胞中,密码子 CAA 和 TCG 的使用频率较低,而 CAG 和 TCA 的使用频率很高^[12]。本研究结果显示,IBDV VP2 高变区基因中,编码第二亲水区 320 位 Q 和七肽区 326 位 S 的密码子,超强毒株分别为 CAG 和 TCA,而弱毒株则分别为 CAA 和 TCG,这样很可能使核糖体在该区域对 mRNA 的阅读速度减慢,甚至出现堆积和停顿,使翻译后多肽链的折叠发生变化,从而改变蛋白质的空间结构,进而影响到病毒的毒力。

在 IBDV 分子生物学特性研究中,对 IBDV VP2 高变区研究较多,而且基本阐明了毒力相关区域和中和抗原表位。这些研究均是建立在氨基酸发生变化的基础之上。IBDV 不同毒株 VP2 高变区基因同义密码子使用的偏爱性,说明基因序列的一维信息中蕴涵着蛋白质空间结构和蛋白质功能的信息。这对进一步诠释病毒的毒力和抗原性的变异,以及病毒的毒力分型具有重要意义。

[参考文献]

- [1] Mundt E. Tissue culture infectivity of different strains of infectious bursal disease virus determined by distinct amino acids in VP2 [J]. J. Gene Virol, 1999, 80: 2067-2076.
- [2] Yu L, Song K, Zhang Y, et al. Cloning and expression of the VP2 gene of an infectious bursal disease virus [J]. Avian Dis, 2000, 44(1): 170-178.
- [3] Yamaguchi T, Ogama M, Miyoshi M, et al. Sequence and phylogenetic analyses of highly virulent infectious bursal disease virus [J]. Arch. Virol, 1997, 142(7): 1441-1458.
- [4] 沈咏舟, 郑新勇. 鸡传染性法氏囊病病毒氨基酸变异对其毒力的影响 [J]. 中国预防兽医学报, 2000, 22(5): 391-393.
- [5] Helene C, Frederique L, Michel C, et al. Codon usage and gene function are related in sequences of Arabidopsis thaliana [J]. Gene, 1998, 209: 1-38.
- [6] Kichard J, Lin K, Tan A. A functional significance for codon third bases [J]. Gene, 2000, 245: 291-298.
- [7] Terradossi N, Arnould C, Toquin D, et al. Critical amino acid changes in VP2 variable domain are associated with typical and antigenicity in very virulent infectious bursal disease viruses [J]. Arch Virol, 1998, 143: 1627-1636.
- [8] Terradossi N, Toquin D, Rivallan G, et al. Modified activity of a VP2-located neutralizing epitope on various vaccine, pathogenic and hypervirulent strains of infectious bursal disease virus [J]. Arch Virol, 1997, 142: 255-270.
- [9] Lin Z A, Kato Y, Otaki Y, et al. Sequence comparison of a highly virulent infectious bursal disease virus prevalent in Japan [J]. Avian Disease, 1993, 7: 315-323.
- [10] Trown M D, Green P, Skinner M A. VP2 sequence of recent European very virulent isolates of infectious bursal disease are closely related to each other but are distinct from those of classical strains [J]. J. Gene Virol, 1994, 75(3): 675-680.
- [11] Komar A A, Lesink T, Reiss C. Synonymous codon substitutions affected ribosome traffic and protein folding during in vitro translation [J]. FEBS Lett, 1999, 462: 387-391.
- [12] Brown T A. Molecular Biology I. Recombinant DNA [M]. New York: Academic Press, 1993: 270.