

鸡传染性支气管炎病毒澳大利亚 T 株 S1 全基因的克隆与序列分析

陈红英^{1,2}, 李新生¹, 崔保安^{1,2}, 张红英¹, 夏平安¹, 崔 沛³, 廖仲磊¹

(1 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002; 2 河南省动物性食品安全重点实验室, 河南 郑州 450002;

3 河南省兽医防治站, 河南 郑州 450008)

【摘要】 【目的】研究鸡传染性支气管炎病毒(IBV)澳大利亚 T 株 S1 基因全序列。【方法】采用 RT-PCR 技术, 对 IBV T 株 S1 基因进行扩增、克隆和测序。【结果】测序结果表明, IBV T 株 S1 基因大小为 1 739 bp。与 GenBank 中的 29 株 IBV S1 基因进行比较发现, IBV T 株与吉林疫苗株(JAAS)S1 基因核苷酸同源性为 99.8%, 有 4 个核苷酸的差异, 其中有 3 个碱基发生非同义突变, 氨基酸同源性为 99.4%; 与其余 28 株 IBV S1 基因核苷酸同源性为 73.8%~84.4%, 氨基酸同源性为 66.8%~85.9%。进化分析发现 T 株与 JAAS 株之间的亲缘关系很近, 与其他 IBV 株的亲缘关系均较远。【结论】JAAS 株是 T 株的变异病毒, IBV T 株的变异病毒在我国存在。

【关键词】 传染性支气管炎病毒; 澳大利亚 T 株; S1 基因; 序列分析

【中图分类号】 S851.31

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2008)02-0012-05

Cloning and sequence analysis of S1 gene of Australian T strain of infectious bronchitis virus

CHEN Hong-ying^{1,2}, LI Xin-sheng¹, CUI Bao-an^{1,2}, ZHANG Hong-ying¹,
XIA Ping-an¹, CUI Pei³, LIAO Zhong-lei¹

(1 College of Animal Husbandry And Veterinary, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China;

2 Animal Food Safety Key Laboratory Henan Province, Zhengzhou, Henan 450002, China;

3 Henan Province Veterinary Preventive and Treatment Station, Zhengzhou, Henan 450008, China)

Abstract: 【Objective】The research is to study S1 glycoprotein gene nucleotide sequence of infectious bronchitis virus(IBV) Australian T strain. 【Method】S1 glycoprotein gene of IBV T strain was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR), then was cloned and sequenced. 【Result】The sequencing result showed that the sequence consisted of 1 739 bp. When the nucleotide sequence of S1 gene of T strain was compared with that of 29 strains of IBV in GenBank, homology between T strain and JAAS strain was 99.8% at nucleotide level, only four nucleotide differences (A⁴⁹⁸G, C⁹⁷⁴T, T^{1 251}A, G^{1 396}T) were found, leading to three amino acids substitution (F³²⁵S, Q⁴¹⁷H, S⁴⁶⁶A), and the deduced amino acid homology was 99.4%. However, nucleotide homologies with other strains ranged between 73.8% to 84.4% and the deduced amino acid homologies ranged between 66.8%~85.9%. Evolution analysis indicated that the T strain was closely related to JAAS, very colse to the other strains of IBV. 【Conclusion】The result showed that JAAS

* [收稿日期] 2007-03-08

[基金项目] 国家“十五”食品安全重大攻关专项(2001BA804A30-11)

[作者简介] 陈红英(1965—), 女, 四川仁寿人, 副研究员, 博士, 主要从事分子免疫学和分子病毒学研究。

E-mail: chhy927 @163.com

[通讯作者] 崔保安(1948—), 男, 河南荥阳人, 教授, 博士生导师, 主要从事分子病原学及分子免疫学研究。

E-mail: baoancui@henau.edu.cn

strain was a variant virus of T strain and there was a variant virus of IBV T strain in our country.

Key words: infectious bronchitis virus; Australian T strain; S1 gene; sequence analysis

鸡传染性支气管炎(Infectious Bronchitis, IB)是由鸡传染性支气管病毒(IBV)引起的一种鸡传染病,呈世界性流行,是危害养鸡业发展的重要疫病之一,我国为高发病区。该病毒可分别或同时导致不同年龄的鸡呼吸道、肾脏、输卵管和消化道的损伤,给养禽业带来很大的经济损失^[1]。

IBV 的基因组核酸在复制过程中易发生突变和高频重组,导致该病毒血清型众多。目前世界上临床分离到的 IBV 毒株已有 100 多株,分属 30 种以上血清型,按致病型又可以分为呼吸型、肾型、产蛋下降型及肠型^[2]。1962 年 Winterfield 等^[3]在美国首次报道了肾型 IB,20 世纪 90 年代开始在国内相继爆发。IBV 澳大利亚 T 株(以下简称 T 株)首先在澳大利亚被分离到^[4],与传统 IBV 引起呼吸道病变不同的是,该病毒主要引起鸡肾病变,如肾脏肿大、颜色苍白,肾小管及输尿管沉积大量尿酸盐等,给养禽业带来很大损失。T 株是肾型 IBV 的主要代表毒株之一^[1],虽然在 IBV 检测中其与 H120 株和 M41 株一样均可作为标准株,但目前相关生物数据库中仍无 T 株 S1 全基因序列。本研究对该毒株的 S1 基因进行了克隆与序列测定,并与国内外已报道的部分分离毒株进行序列分析比较,以期为我国肾型 IB 的分子流行病学研究及基因工程疫苗的研制积累资料。

1 材料与方法

1.1 材料

IBV T 株(肾型 IBV 的代表株)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)JM109 由动物性食品安全重点实验室保存。9~11 日龄 SPF 鸡胚购自北京梅里亚维通实验动物技术有限公司。Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 为 MBI 公司产品; pGEM-T Easy 载体购自 Promega 公司; Ex Taq DNA 聚合酶,5-溴-4-氯-3-吡啶-β-D 半乳糖苷(X-gal)和异丙基-β-D-硫代半乳糖(IPTG),限制性内切酶 *EcoR* I、*Sal* I 等均为大连宝生物工程有限公司产品;UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒为上海生物工程公司产品;QIAquick gel extraction kit 为 Qiagen 公司产品。

1.2 引物设计

参照国外发表的 IBV-Beaudette 株基因组序列

(M95169)设计 1 对引物^[5],上游引物 P1 与 S1 基因 5'端序列相同,覆盖了 S1 基因前非编码区的前导序列,包含同源序列 CTGAACAA;下游引物 P2 与 S2 基因 5'端序列互补,两引物扩增长度为 1 739 bp。引物由上海生物工程公司合成。

上游引物 P1 序列为:5'-CCCGAAACTGAA-CAAAAGAC-3';下游引物序列为 P2: 5'-CA-GATACTAACATAAGGGCA-3'。

1.3 IBV T 株的增殖及其 RNA 的提取

将 IBV T 株经尿囊腔接种 10 日龄 SPF 鸡胚,收集 24~72 h 死亡鸡胚和 72 h 后活胚尿囊液,置于-20℃保存备用。取 T 株尿囊液 300 μL,参照 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒说明书提取 RNA,直接用于第一链 cDNA 的反转录或保存于-70℃冰箱。

1.4 IBV T 株 S1 基因的 RT-PCR 扩增

取 1.3 中 RNA 悬浮液 11 μL,按照 Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书进行反转录。取 8 μL 反转录产物 cDNA,加入 10× Ex Taq 反应缓冲液 5 μL,10 mmol/L dNTP 混合物 1 μL、上游引物 P1 (50 μmol/L)1 μL、下游引物 P2(50 μmol/L)1 μL、灭菌双蒸水 33.5 μL,混匀,加入 Ex Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)0.5 μL 进行 PCR 反应。PCR 反应程序为:94℃预变性 5 min;94℃ 1 min,54℃ 50 s,72℃ 2 min,共循环 36 次;72℃延伸 10 min。取 5 μL PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/mL EB)进行电泳检测。

1.5 IBV T 株 S1 基因的克隆及鉴定

回收 1.4 中 PCR 产物,与 pGEM-T Easy 载体连接,构建重组质粒,命名为 pGEM-T-T,并按常规方法转化 *E. coli* JM109 感受态细胞^[6],涂抹在含有 X-gal(40 μg/mL)、IPTG(40 μg/mL)和氨苄青霉素(Amp,50 μg/mL)的 LB 琼脂平板培养基上,37℃培养 12~16 h,进行蓝白斑筛选。挑取白斑菌落接种于含有 Amp(50 μg/mL)的 LB 肉汤培养基^[6],37℃振荡培养 12~16 h。提取重组质粒 pGEM-T-T 进行 PCR 扩增并用 *EcoR* I、*Sal* I 进行酶切鉴定。

挑选 PCR 和酶切鉴定为阳性的 2 个重组菌进行序列测定。测序反应由上海生工生物工程技术服务有限公司在 ABIPRISM 377DNA Sequencer 上完成。

1.6 IBV T 株与其他毒株 S1 基因核苷酸序列及其推导氨基酸序列的比较分析

用 Dnastar 软件对 IBV T 株与 GenBank 中的 29 株 IBV S1 基因核苷酸序列及其推导的氨基酸序列进行比较,分析它们间的同源性及变异程度,并用 Dnastar 软件绘制进化树。

2 结果与分析

2.1 IBV T 株 S1 基因的 RT-PCR 扩增、克隆

用合成的特异引物对 IBV T 株 RNA 进行 RT-PCR 扩增,电泳结果(图 1)显示,扩增出 1 条约 1.7 kb 的条带,与预期的结果相符。

重组质粒 PCR 和酶切鉴定电泳结果(图 2)显示,经 *Sal* I 酶切后,电泳中出现 1 条约 4 700 bp 的条带;经 *Eco*R I 酶切后,电泳中出现 2 条带:其中一条带为载体质粒(约 3 000 bp),另一条带为所克隆的 S1 基因片段(约 1 700 bp);以质粒为模板进行 PCR 扩增、电泳,出现 1 条约 1 700 bp 的带,与理论结果相一致,表明重组质粒构建成功。

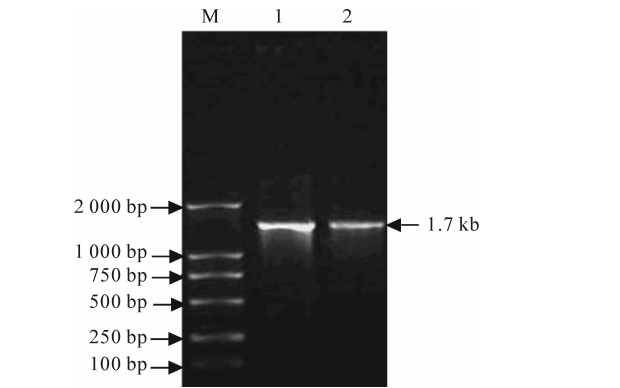


图 1 IBV T 株 S1 基因的 RT-PCR 扩增结果
M. DL2000 DNA Marker;1~2. T 株 S1 基因 RT-PCR 产物
Fig. 1 RT-PCR amplifying of S1 gene for IBV T strain
M. DL2000 DNA Marker;1~2. cDNA PCR products of T strain

2.2 IBV T 株 S1 基因序列的测定及分析

测序结果表明,克隆的基因长度为 1 739 bp (GenBank 登录号 AY775779),除去前导序列和部分 S2 基因,S1 基因由 1 617 个核苷酸组成,(G+C)为 35.96%,编码 539 个氨基酸,有 17 个潜在的 N-糖基化位点。S1 基因推导的氨基酸序列亲水性分析发现,T 株 S1 蛋白前 20 个氨基酸残基构成一段强疏水区域,在推导的信号肽切点上游-1 位和-3 位分别是中性的小氨基酸 A 和 C,这些结构符合信号肽的共同特征,因此推测其为 S 前体蛋白信号肽序列。S 蛋白切割识别位点序列为精氨酸-精氨酸-丝氨酸-精氨酸(R-R-S-R-R)。

将 T 株与 GenBank 中的 29 株 IBV S1 基因核苷酸序列比较发现,各毒株 S1 基因核苷酸序列普遍存在碱基置换、插入或缺失突变;对推导的氨基酸序列分析发现,变异主要集中在 N 端前 26,52~148,246~293 位氨基酸残基区域。

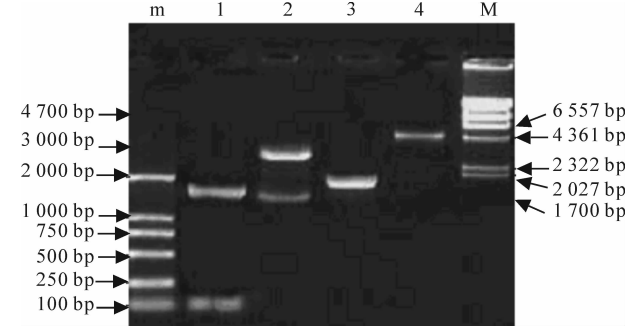


图 2 重组质粒 pGEM-T-T 的 PCR 产物及酶切鉴定结果
m. DL2000 DNA Marker;1. 重组质粒 pGEM-T-T 的 PCR 产物;
2. *Eco*R I 酶切重组质粒 pGEM-T-T;3. 空载体对照;4. *Sal* I 酶切重组质粒 pGEM-T-T;M. λ -Hind III Fragment DNA Marker
Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pGEM-T-T by digestion (*Eco*R I, *Sal* I) and PCR
m. DL2000 DNA Marker;1. Recombinant plasmid pGEM-T-T PCR product;2. Recombinant plasmid pGEM-T-T digestion by *Eco*R I;
3. Control;4. Recombinant plasmid pGEM-T-T digestion by *Sal* I;M. λ -Hind III Fragment DNA Marker

T 株与吉林疫苗株(JAAS)S1 基因核苷酸同源性最高(99.8%),有 4 个核苷酸的差异,分别是第 498 位(A→G),第 974 位(C→T),第 1 251 位(T→A),第 1 396 位(G→T),从而引起该毒株 S1 基因推导的氨基酸序列中存在 3 个氨基酸的变化:第 325 位苯丙氨酸(Phe)变为丝氨酸(Ser),第 417 位谷氨酰胺(Gln)变为组氨酸(His),第 466 位丝氨酸(Ser)变为丙氨酸(Ala);与 SAIB4 株 S1 基因核苷酸的同源性最低(73.8%);与 H120、H52、M41、Gray、Holte、Beaudette、A2、D41、GX1、GX2、J、J2、J9、JL9701、JP8443、JS9503、JX9901、LX4、Q1、QX、SAIB14、SAIBwj、SD9701、SDA、T3、Z、ZJ971 株核苷酸的同源性为 78.0%~84.4%。

T 株与 JAAS 株 S1 基因氨基酸的同源性最高,为 99.4%;与 SAIB4 株 S 基因氨基酸的同源性最低,仅为 66.8%;与 H120、H52、M41、Gray、Holte、Beaudette、A2、D41、GX1、GX2、J、J2、J9、JL9701、JP8443、JS9503、JX9901、LX4、Q1、QX、SAIB14、SAIBwj、SD9701、SDA、T3、Z、ZJ971 株 S 基因氨基酸的同源性为 72.7%~85.9%。

2.3 IBV T 株 S1 基因的氨基酸进化树分析

图 3 显示,T 株与 29 株 IBV S1 基因氨基酸在

进化关系上可形成 3 个主要的基因群。T 株、JAAS 株等 10 个毒株在第 I 群内,主要为肾型 IBV,S 蛋白切割识别位点序列主要为 R-R-S-R-R。T 株与 JAAS 株处在一个小的分支中,表明 T 株与 JAAS 株之间的亲缘关系较近。国内分离株 LX4 等 7 个毒株为第 II 群,主要为肾型 IBV,S 蛋白切割识别位

点序列主要为 H-R-R-R-R。由 H120 及 H52 等 12 个毒株组成第 III 群,主要为呼吸型 IBV,S 蛋白切割识别位点序列均为 R-R-F-R-R。该群有 2 个明显的分支,H120、H52 等毒株所在的分支为第 1 个分支,M41 等毒株所在的分支为第 2 个分支。SAIB4 毒株不形成明显的分支。

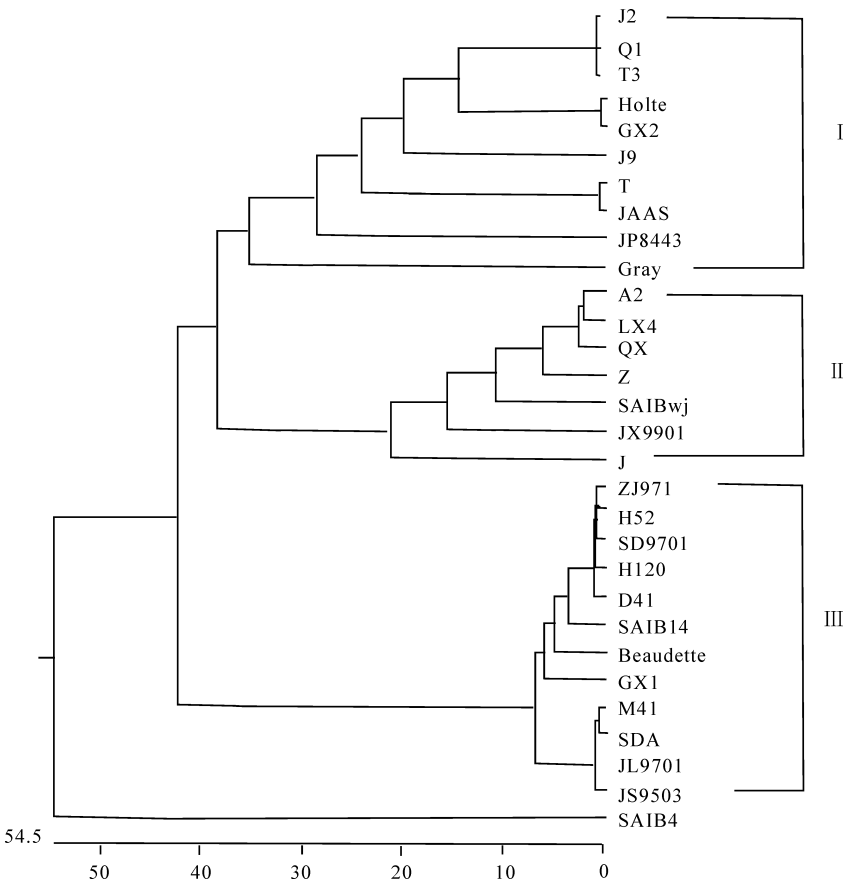


图 3 不同 IBV 毒株 S1 基因的氨基酸进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of the deduced amino acid sequences of S1 genes of different IBV strains

3 讨 论

自 1962 年 Winterfield 等^[3]首次在美国报道肾型 IB 以来,世界各地均有肾型 IB 的报道。我国自 1982 年邝荣禄首次报告了肾型 IB 后,肾型 IB 在国内相继爆发,给养禽业带来了很大的经济损失^[7]。澳大利亚 T 株是肾型 IB 的代表毒株,对其基因组相关基因的克隆和序列分析,有助于 IB 的分子生物学诊断及免疫预防等方面的研究。目前,在相关生物数据库中仍无 T 株 S1 全基因序列,因此本试验参照国外发表的 IBV-Beaudette 株基因组序列设计 1 对引物^[5],采用 RT-PCR 技术对 T 株 S1 全基因进行了扩增、克隆及测序。结果显示,S1 基因由 1 617 个核苷酸组成,编码 539 个氨基酸,有 17 个潜

在的 N-糖基化位点。根据亲水性分析发现,T 株 S1 蛋白前 20 个氨基酸残基构成一段强疏水区域,在推导的信号肽切点上游-1 位和-3 位分别是中性的小氨基酸 A 和 C,这些结构符合信号肽的共同特征,因而可以推断:T 株 S 蛋白前 18 个氨基酸残基为信号肽。IBV T 株 S1 基因的成功克隆,对新型疫苗和诊断试剂的开发及我国肾型 IB 的起源及分子流行病学研究具有指导意义。

有研究表明,IBV 抗原变异部位主要集中在 S1 糖蛋白,由于在 S1 蛋白前 300 个氨基酸残基最易发生碱基的置换、插入或缺失突变,因而此区又被称为高变区^[8]。在高变区内的变异主要集中在 3 个区域:N 端第 37~81 氨基酸处为 HVR I 区,内有两个亲水区;第 117~160 氨基酸处为 HVR II 区,为一个

疏水区;第 269~298 氨基酸处为 HVRⅢ区,为一个强亲水区。根据以前的研究结果^[9-10],推断这些区域均可以成为 S1 蛋白的抗原决定簇,而抗原决定簇的特异结构依赖于其中某些氨基酸,如果这些氨基酸中的一个发生改变,即可产生一个新的变异株。本研究发现,各毒株的 S1 基因核苷酸序列普遍存在碱基置换或插入、缺失突变;对推导氨基酸序列分析发现,变异主要集中在 N 端前 26,52~148,246~293 位氨基酸残基区域,这与 Cavanagh 等^[10]、付家栋等^[11]的研究结果相一致。

本研究结果表明,T 株与 JAAS 株 S1 基因核苷酸同源性为 99.8%,仅有 4 个核苷酸的差异,即第 498 位(A→G),第 974 位(C→T),第 1 251 位(T→A),第 1 396 位(G→T),从而引起该毒株 S1 基因推导氨基酸序列中存在 3 个氨基酸的变化:第 325 位苯丙氨酸(Phe)变为丝氨酸(Ser),第 417 位谷氨酰胺(Gln)变为组氨酸(His),第 466 位丝氨酸(Ser)变为丙氨酸(Ala),氨基酸同源性为 99.4%。将 T 株与 29 株 IBV S1 基因推导的氨基酸序列进行分子进化分析发现,T 株与 JAAS 株处在一个分支中(图 4),表明它们的亲缘很近,因此推测 JAAS 株为 T 株的变异病毒。

IBV 属于单股正链 RNA 冠状病毒,基因组全长为 27.6 kb^[5],至少含有 10 个明显的可读框(ORF),分别编码聚合酶蛋白和 3 种主要结构蛋白(纤突蛋白 S、膜蛋白 M 和核衣壳蛋白 N)以及其他未知蛋白。其中 S 蛋白在翻译后被切割成 S1 和 S2 蛋白,S1 蛋白诱导产生保护性免疫^[12-14],是决定 IBV 血清型的主要结构蛋白,与病毒的组织嗜性有关。本研究还发现,T 株与 JAAS 株等 10 个毒株在进化树第Ⅰ群内,主要为肾型 IBV,S 蛋白切割识别位点序列主要为 R-R-S-R-R;国内分离株 LX4 等 7 个毒株为第Ⅱ群,主要为肾型 IBV,S 蛋白切割识别位点序列主要为 H-R-R-R-R;由 H120 及 H52 等 12 个毒株组成第Ⅲ群,主要为呼吸型 IBV,S 蛋白切割识别位点序列均为 R-R-F-R-R,由此推测 IBV 各毒株的组织嗜性、S1 基因亲缘关系与 S 蛋白切割识别位点序列之间有一定的相关性。本研究中广东 D41 株和江苏 JS9503 株在组织嗜性上均属于肾型 IBV,在 S1 基因分子进化上均属于第Ⅲ群,并且 S 蛋白切割识别位点均为 R-R-F-R-R;而浙江 J 株在组织嗜性上也属于肾型 IBV,但在 S1 基因分子进化上属于第Ⅱ群,S 蛋白切割识别位点序列却为 R-R-F-R-R,其中的差异还有待于进一步探讨。

[参考文献]

[1] 殷 震,刘景华. 动物病毒学[M]. 北京:科学出版社,1997.
Yin Z,Liu J H. Animal virology [M]. Beijing: Science Press, 1997. (in Chinese)

[2] 马德星,李广兴. 鸡传染性支气管炎组织嗜性的研究进展[J]. 畜禽业,2004(5):40-41.
Ma D X,Li G X. Research advances in tissue tropism of chicken infectious bronchitis virus [J]. Livestock and Poultry Industry,2004(5):40-41. (in Chinese)

[3] Winterfield R W,Hitchner S B. Etiology of an infections nephritis-nephrosis syndrome of chickens[J]. Am J Vet Res, 1962,23:1273-1279.

[4] 卡尔尼克 B W. 禽病学[M]. 高 福,刘文军,译. 北京:北京农业大学出版社,1991:407-418.
Calnek B W. Diseases of poultry[M]. Translated by Gao F and Liu W J. Beijing: Beijing Agricultural University Press, 1991: 407-418. (in Chinese)

[5] Bournsnell M E, Brown T D, Foulds I J, et al. Completion of the sequence of the genome of the coronavirus avian infectious bronchitis virus[J]. J Gen Virol, 1987,68:57-77.

[6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[7] 甘孟侯. 中国禽病学[M]. 北京:中国农业出版社,1999:43-44.
Gan M H. Diseases of Chinese poultry[M]. Beijing: China Agricultural Press, 1999:43-44. (in Chinese)

[8] Cavanagh D. Coronavirus IBV: structural characterization of the spike protein[J]. J Gen Virol, 1983,64:2577-2583.

[9] Kwon H M, Jackwood M W. Molecular cloning and sequence comparison of the S1 glycoprotein of the Gray and JMK strains of avian infectious bronchitis virus [J]. Virus Genes, 1995, 9(3):219-229.

[10] Cavanagh D, Davis P J, Mocker A P. Amino acids within hypervariable region 1 of avian coronavirus IBV (*Massachusetts serotype*) spike glycoprotein are associated with neutralization epitopes[J]. Virus Res, 1988,11(2):141-150.

[11] 付家栋,张桂红,廖 明,等. 两株禽源野生动物冠状病毒分离株 S1 基因特性的研究[J]. 中国预防兽医学报,2005,27(5):380-384.
Fu J D,Zhang G H,Liao M, et al. Study on the S1 gene of the two isolated stain of coronavirus from the wild birds[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2005,27(5): 380-384. (in Chinese)

[12] Cavanagh D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus[J]. Vet Res, 2007,38(2):281-97.

[13] Cavanagh D. Coronavirus IBV glycopolypeptides: size of their polypeptides and nature of their oligosaccharides[J]. J Gen Virol, 1983,64:1187-1191.

[14] Cavanagh D, Davis P J. Coronavirus IBV: removal of spike glycopolypeptide S1 by urea abolishes infectivity and haemagglutination but not attachment to cells[J]. J Gen Virol, 1986, 67:1443-1448.