

IBV 陕西分离株 M 基因的克隆与遗传变异分析

王晶钰,罗 艳,邓小敏,郭抗抗,张彦明

(西北农林科技大学 动物科技学院,陕西 杨凌 712100)

[摘要] 为了研究 IBV 陕西分离株 M 基因的遗传变异情况及分子特征,参照 NCBI 所登录的 IBV M 基因序列设计了 1 对引物,应用 RT-PCR 方法对陕西 8 株 IBV 分离株的 M 基因进行扩增,并构建克隆载体,对阳性质粒测序后进行核苷酸序列及氨基酸序列同源性和进化发生关系分析,并对 M 蛋白的二级结构和跨膜区进行预测。结果表明,8 个 IBV 分离株间的 M 基因核苷酸和 M 蛋白氨基酸同源性分别为 92.3%~99.8%和 95.4%~100%,分离毒株与参考毒株的 M 基因核苷酸和 M 蛋白氨基酸序列同源性分别为 87.4%~99.5%和 89.4%~99.5%;分离毒株与参考毒株 M 蛋白的 α -螺旋结构主要分布在 N 端前 100 氨基酸肽段区,其他的部分主要是 β -折叠和无规则卷曲结构;分离毒株的 M 蛋白均包含有 3 个跨膜区。表明 IBV 分离株 M 蛋白在基因序列和二级结构上相对保守。

[关键词] IBV;M 蛋白基因;遗传变异;分离株

[中图分类号] S858.312.65⁺9.6

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)10-001-05

Cloning and molecular hereditary variation analysis of M genes of IBV isolates from Shaanxi Province

WANG Jing-yu, LUO Yan, DENG Xiao-min, GUO Kang-kang, ZHANG Yan-ming

(College of Animal Sciences and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: To study the genetic variation of the IBV M protein, a pair of primers were designed according to the nucleotide sequence stowed by NCBI, then the M gene of the 8 nephropathogenic isolates were amplified, and the clonal plasmid was constructed, and then the positive plasmids were sequenced after identification by PCR and restriction endonuclease. The sequence distance of nucleotide and predicted amino acid, phylogenetic tree, the predicted secondary structure and the membrane-spanning regions of M protein were analyzed through DNASTar, AnthePro5.0 and PRED-TMR biological softwares. The results showed that the 8 isolates had *Bam*HI cleavage site, except YX and WH isolates. And they shared 87.4% - 99.5% and 89.4% - 99.5% identity with the control strains in sequence of nucleotide and predicted amino acid, respectively; and 92.3% - 99.8% and 95.4% - 100% identity among the eight IBV isolates. The α -helix regions mainly located in the first 100aa of the isolates M proteins, and the rests were comprised of β -sheets and coils regions. The M protein of all isolates had a triple-spanning region in the α -helix regions of the N end. All in all, the gene of AIBV M protein was rather conservative.

Key words: IBV; Matrix glycoprotein genetic; genetic variation; isolates

鸡传染性支气管炎 (Avian infectious bronchitis, AIB) 是由传染性支气管炎病毒 (Infectious

[收稿日期] 2006-09-06

[基金项目] 陕西省科技攻关项目 (2005 K01-G20-02)

[作者简介] 王晶钰 (1964-), 男, 陕西乾县人, 副教授, 博士, 主要从事预防兽医学及兽医公共卫生学研究。

E-mail: Wjingyu2004@126.com

bronchitis virus, IBV) 引起的鸡的一种急性、高度接触性传染病,可导致雏鸡大量死亡,产蛋鸡产蛋率和蛋品质下降,肉鸡生产性能下降^[1-2],是严重危害养鸡业的重要传染病之一。

IBV 含有 3 种主要的结构蛋白: S 蛋白、M 蛋白和 N 蛋白^[3-5]。M 蛋白含 224~225 个氨基酸残基,据糖基化程度的不同,其相对分子质量为 23~36 ku^[6]。M 蛋白占 IBV 蛋白总量的 40% 左右,在病毒的出芽中发挥重要的作用,也与 IBV 的传染性有关,并可诱导补体依赖性免疫中和反应^[7-8]。近年来,国内外对 IBV M 蛋白研究较少。为此,本研究采用 RT-PCR 方法,对 8 个 IBV 分离株的 M 基因进行了扩增和测序,并利用 *DNAStar* 和 *AnthePro5.0* 等软件对 M 基因的核苷酸序列、M 蛋白氨基酸序列的进化发生关系及其二级结构进行预测分析,以期了解我国 IBV 分离株 M 基因的遗传变异情况、筛选有效的 IBV 疫苗毒株、开发 IBV 基因工程疫苗及以 M 蛋白为抗原的 ELISA 诊断试剂的研发提供理论依据,并为 IBV 分子流行病学研究积累资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 毒株 标准毒株 IBV-W93、IBV-H120 和 IBV-M41,购自中国兽药药品监察所;8 个 IBV 分离株,来源于陕西省不同地区,通过 SPF 鸡胚分离培养,经雏鸡致病力试验和鸡胚中和试验证实为肾型 IBV^[9]。其中,B01 株来源于铜川市的 33 日龄发病鸡群;YL2 来源于榆林市的 25 日龄发病鸡群;WH 来源于韩城市的 32 日龄发病鸡群;YX 来源于洋县 43 日龄发病鸡群;G5 株来源于宝鸡市眉县的 220 日龄 IBV 非免疫发病鸡群;BJ2 株来源于宝鸡市陈仓区的 145 日龄发病鸡群;WG 株来源于武功县的 45 日龄发病鸡群;FF2 株来源于扶风县的 70 日龄发病鸡群。

1.1.2 试剂 Trizol 试剂盒、RNasin,购自美国 *Invitrogen* 公司;胶回收(小量)试剂盒 K1652,上海华舜生物工程有限公司产品;PMD-18T 克隆载体试剂盒、*Reverse Transcriptase XL (ATM)* 逆转录酶、*Ribonuclease Inhibitor*、*TaqDNA* 聚合酶、*BamH* 和 *Hind* 限制性内切酶、dNTPs 和 DNAMarker (DL2000),均购自大连宝生物工程有限公司;DEPC 为 *Amresco* 产品;EB 和琼脂糖等,购自上海生工生物有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 引物的设计与合成

参照 NCBI 所收录的 IBV M 基因的核苷酸序列,应用生物软件 *ClustlX* 和 *Oligo* 设计 1 对引物:上游为:5'-GGA TCC CAA ATT GTA CTC TTG ACT-3';下游为:5'-AAG CTT ACT TCC TCC TGT TGC TAC-3' (上、下游引物中的下划线部分分别为 *BamH*、*Hind* 酶切位点)。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.3 IBV 陕西分离株 RNA 的提取

参照 *Trizol* 试剂盒说明书,从鸡胚尿囊液中提取 8 株 IBV 陕西分离株的 RNA。

1.4 IBV 陕西分离株 RNA 的 RT-PCR 扩增

1.4.1 RT 反应 取 11 μ L 病毒 RNA 溶液与 1 μ L 下游引物 (20 μ mol/L) 混匀,65 $^{\circ}$ C 水浴 10 min,冰浴 5 min,依次加入 5 \times Buffer 4 μ L,dNTPs 2 μ L,40 U/ μ L RNasin 1 μ L,20 U/ μ L AMV-RTase 1 μ L,混匀,42 $^{\circ}$ C 1 h,95 $^{\circ}$ C 10 min,产物 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.4.2 PCR 反应 PCR 反应体系:纯水 30 μ L,10 \times Buffer 5 μ L,RT 产物 5 μ L,dNTPs 4 μ L,MgCl₂ 3 μ L,上、下游引物各 1 μ L,*Taq DNA* 聚合酶 1 μ L,混匀;PCR 反应程序:95 $^{\circ}$ C 作用 5 min;94 $^{\circ}$ C 1 min,54 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 50 s,共 31 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物于 4 $^{\circ}$ C 保存。取 5 μ L PCR 产物在含 EB 的 15 g/L 琼脂糖凝胶上电泳,并用紫外凝胶成像系统观察、拍照。

1.5 PMD-18T-M 重组质粒的构建与筛选

按胶(小剂量)回收试剂盒 K1652 说明书回收目的基因,再参照 PMD-18T 克隆载体试剂盒说明书构建克隆载体。将克隆载体转化 DH5 宿主菌,转化产物在含 Amp 的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 250 r/min 培养 8 h,筛选阳性菌株。采用碱裂解法抽提质粒^[10],对所提的质粒进行 PCR、*BamH* / *Hind* 双酶切及 *BamH* 和 *Hind* 单酶切鉴定。最后将所筛选出的阳性质粒送上海博亚生物技术有限公司测定。

1.6 IBV 陕西分离株 M 基因的测序结果分析

使用 *DNAStar5.0* 软件对 8 株 IBV 分离株与 8 个参考毒株 M 基因的核苷酸和推导氨基酸序列进行同源性分析,了解其变异程度。参考毒株的名称和 GenBank 登录号分别为:H52,AF286185 (荷兰呼吸型);Gray,AF286180 (美国肾型);LX4,A Y338732 (黑龙江腺胃型);SAIB20,A Y302749 (四川肾型);M41,AF286184 (美国呼吸型);IOWA,AF286183;QX,AF221667 (青岛腺胃型);W93,

A Y846835 (国内肾型 IBV 弱毒疫苗株)。

为进一步了解 IBV 分离株 M 蛋白的保守性,应用生物软件 AnthePro5.0 和 PRED-TMR 对 8 个 IBV 分离株 M 蛋白和 IBV 美国肾型 Gray 株、呼吸型 M41 株、青岛肾型 QX 株和肾型疫苗株 W93 M 蛋白的二级结构和跨膜区进行计算机预测,并分析其结果。

2 结果与分析

2.1 IBV 陕西分离株 RNA 的 RT-PCR

结果显示, BJ2、FF2、YX、WH、WG、B01、G5 和 YL2 等 8 株 IBV 陕西分离株,均扩增到 650 bp 的片段(图 1),与预期结果一致。

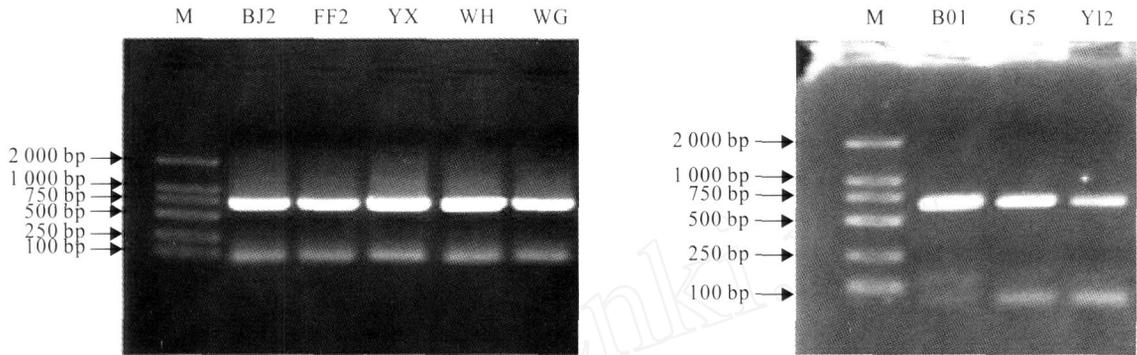


图 1 8 株 IBV 陕西分离株 M 基因的 RT-PCR 结果

M. DNA 标准 DL2 000

Fig. 1 RT-PCR results of M gene of 8 IBV isolates

M. DL2 000 DNA Marker

2.2 重组质粒 PMD-18T-M 的筛选

8 个 IBV 分离株经 PCR 鉴定,均能得到目的条带(图 2);经 Hind / BamH 双酶切, YX 和 WH 株出现目的条带, B01、G5、YL2、FF2、BJ2、WG 等 6 株 IBV 只得到 2 条小片段(图 3)。BamH 单酶切

结果与上述双酶切结果相同。B01、G5、YL2、FF2、BJ2、WG 等 6 个毒株经 Hind 单酶切后均得到目的条带(图 4)。说明这 6 个 IBV 分离株的 M 基因内含有 BamHI 酶切位点,而且其 M 基因是反向插入克隆载体 PMD-18T 的。

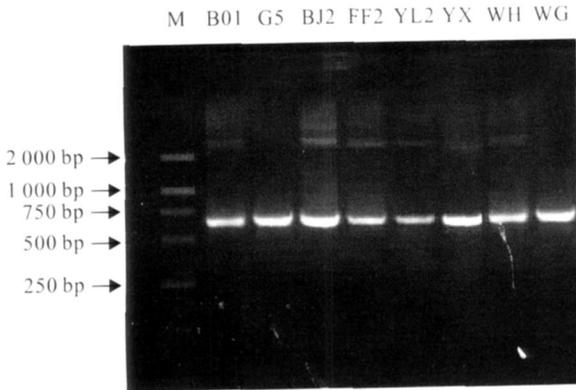


图 2 重组质粒 PMD-18T-M 的 PCR 鉴定结果

M. DNA 标准 DL2 000

Fig. 2 PCR identification of the recombined plasmids PMD-18T-M

M. DL2 000 DNA Marker

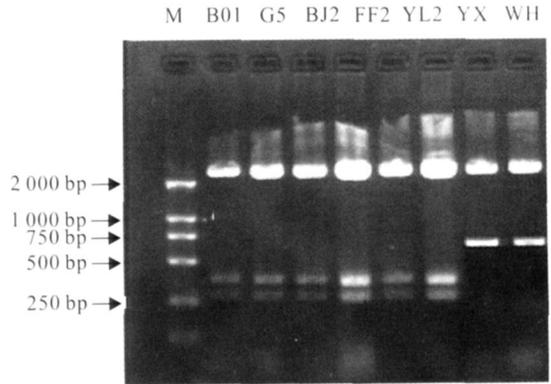


图 3 重组质粒 PMD-18T-M Hind / BamH 双酶切鉴定结果

M. DNA 标准 DL2 000

Fig. 3 Hind and BamH restriction endonuclease identification of the recombined plasmids PMD-18T-M

M. DL2 000 DNA Marker

2.3 IBV 陕西分离株 M 基因和 M 蛋白的同源性分析

结果显示,8 个 IBV 陕西分离毒株与参考毒株

间核苷酸同源性为 87.4%~99.5%(表 1);分离毒株间的同源性为 92.3%~99.8%,与 M41(美国呼吸型)的核苷酸同源性为 92.5%~99.5%。分离毒

株与参考毒株氨基酸同源性为 89.4%~99.5% (表 2); 分离株间的氨基酸序列同源性为 95.4%~100%, 与参考毒株 H52、M41 (H52 与 M41 的氨基

酸同源性为 100%) 的氨基酸序列同源性为 95.8%~99.5%, 高于与其他参考毒株的同源性。

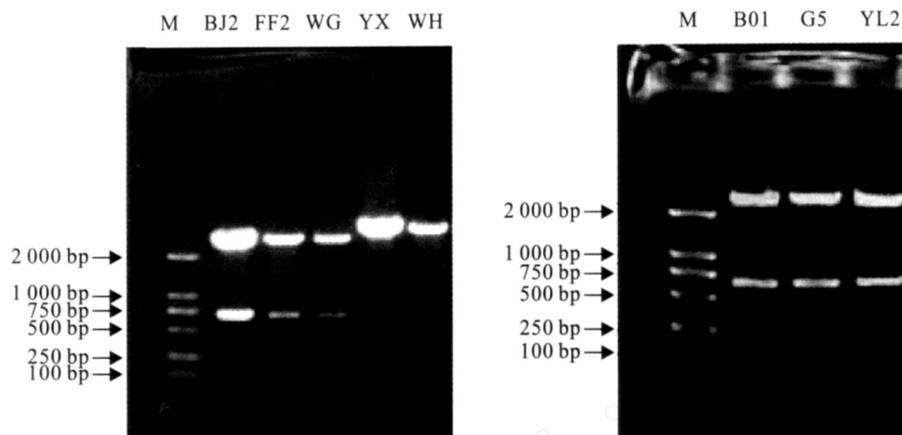


图 4 重组质粒 PMD-18 T-M *Hind* 单酶切鉴定结果

M. DNA 标准 DL2 000

Fig. 4 *Hind* restriction endonuclease identification of the recombinated plasmids PMD-18 T-M

M. DL2 000 DNA Marker

表 1 IBV 陕西分离株与参考毒株 M 基因核苷酸序列的同源性

Table 1 Homology of M gene nucleotide sequence of IBV Shaanxi isolates

分离毒株 Isolates	参考毒株 Controls							
	Gray	H52	IOWA	LX4	M41	QX	SAIB20	W93
B01	90.2	96.6	91.4	89.1	99.5	90.0	88.0	96.3
BJ2	89.8	96.3	91.1	88.8	99.2	89.7	87.8	96.0
FF2	89.8	96.3	91.1	88.9	99.4	89.8	87.7	96.0
G5	90.3	96.5	91.4	89.2	99.1	90.2	88.2	96.3
WG	90.3	96.8	91.2	88.9	99.4	89.8	88.2	96.5
WH	89.8	90.3	88.6	90.9	92.5	89.5	90.5	90.0
YL2	90.2	96.6	91.4	89.1	99.5	90.0	88.0	96.3
YX	89.7	96.2	90.9	88.3	99.1	89.2	87.4	95.8

表 2 IBV 陕西分离株与参考毒株 M 蛋白氨基酸序列的同源性

Table 2 Homology of M protein amino acid sequence of IBV Shaanxi isolates

分离毒株 Isolates	参考毒株 Controls							
	Gray	H52	IOWA	LX4	M41	QX	SAIB20	W93
B01	95.5	99.5	92.1	91.2	99.5	94.4	91.7	99.1
BJ2	95.4	99.1	91.7	91.2	99.1	94.0	91.2	98.6
FF2	94.9	98.6	91.2	90.7	98.6	93.5	90.7	98.1
G5	95.4	99.1	91.7	91.2	99.1	94.0	91.2	98.6
WG	95.4	99.1	91.7	91.2	99.1	94.0	91.2	98.6
WH	97.2	95.8	92.6	94.4	95.8	94.4	94.9	95.4
YL2	95.4	99.1	91.7	91.2	99.1	94.0	91.2	98.6
YX	94.0	97.7	90.3	89.4	97.7	92.6	89.8	97.2

从系统进化发生关系树(图 5)可以看出, 8 个 IBV 陕西分离株可分为 4 个分枝: BJ2、FF2、YL2、WG 在同 1 个分枝上, B01、YX 另属 1 个分枝, G5 和 WH 分别属另外的 2 个分枝; WH 与 QX 的关系较近, 其他的分离毒株与 M41、H52 和 W93 关系较近。

2.4 IBV M 蛋白二级结构和跨膜区分析

膜蛋白的跨膜区均为 α -螺旋结构, 这种结构对

膜蛋白空间结构的稳定有重要的作用。M 蛋白一般含 3 个跨膜区。GIB 法预测的 IBV 陕西分离毒株与参考毒株 M 蛋白的 α -螺旋结构, 均主要分布在 N 端前 100 氨基酸肽段处, 其他的部分主要是 β -折叠结构和其他的松散结构(主要指无规则卷曲)。IBV 陕西分离毒株 M 蛋白的 α -螺旋、 β -折叠和无规则卷曲二级结构各自所占的平均百分比分别为:

25 % ,30 %和 44 % ,参考毒株的平均百分比分别为 : 29 % ,28 %和 43 % 。IBV 陕西分离株 M 蛋白都有 3 个跨膜区 ,主要分布在 N 端前 100 氨基酸肽段的 -螺旋区 ,分别为第 17 ~ 37 ,41 ~ 63 ,74 ~ 93 氨基酸

肽段区 ,较参考毒株 M 蛋白的跨膜区位置向 N 端推进了 2 ~ 3 个氨基酸 ,而区段大小不变 ,表明 IBV 陕西分离株 M 蛋白的二级结构是相对稳定的。

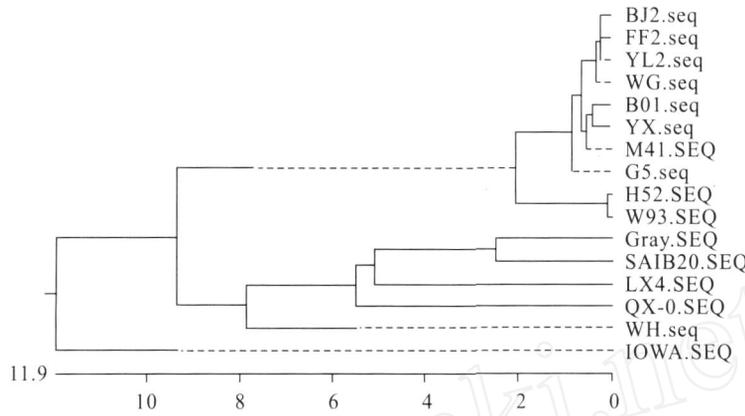


图 5 不同 IBV 毒株的系统进化发生树

Fig. 5 Phylogenetic tree of different IBV isolates

3 讨论

本实验克隆到了 8 个 IBV 陕西分离株的 M 基因 ,它们之中除 YX 和 WH 株的 M 基因中不含 BamH 酶切位点外 ,其他分离株的 M 基因都含有 BamH 酶切位点。因此 ,在 IBV M 基因引物的设计中应尽量避免使用 BamH 酶切位点 ,若所要分离鉴定的 M 基因含有 BamH 酶切位点 ,只有进行 BamH 单酶切才能得到目的片段 ,而 BamH 和别的酶切位点双酶切试验结果则得不到目的片段 ,会影响结果判定。

Cavanagh 等^[11] 研究发现 ,IBV 不同的血清型毒株间 M 基因可能存在点突变、插入或缺失 ,而所有 M 蛋白的糖基化位点具有高度保守的 Asn-Cys-Thr 序列。本试验结果表明 ,8 株 IBV 陕西分离株的 M 基因相对保守 ,这与前人研究结果一致。

8 个 IBV 陕西分离株中的 G5 来源于一个 IBV 非免疫发病鸡群 ,系统进化关系树的分析结果显示 ,G5 株的 M 基因与其他的分离株有所不同 ,属另一个小分枝 ,但其 M 基因核苷酸序列和 M 蛋白氨基酸序列与其他分离毒株的同源性均大于 95 % ,与参考毒株 M41 的核苷酸序列和氨基酸序列同源性均为 99.1 % 。从 IB 未免疫发病鸡群中分离到的 IBV 的 M 基因与从免疫后发病鸡群中分离到的 IBV ,在 M 基因有很高的同源性 ,甚至与呼吸型 IBV 疫苗株 H52 的 M 基因序列也有着高度的同源性 ,进一步证实了 M 基因是相对保守的 ,且 M 基因与 IBV 的血

清型无关^[12]。

Saif^[13] 研究指出 ,冠状病毒 M 蛋白中紧接着 Asn-Cys-Thr 序列的近 80 个氨基酸残基构成 3 个螺旋疏水区 ,至少跨膜 3 次。本研究结果表明 ,8 个 IBV 陕西分离毒株 M 蛋白 -螺旋结构主要分布在 N 端前 100 氨基酸肽段区 ,其他的部分主要由 -折叠和无规则卷曲结构组成 ;M 蛋白有 3 个跨膜区 ,主要分布在 N 端第 17 ~ 37 ,41 ~ 63 ,74 ~ 93 氨基酸肽段区 ;M 蛋白与参考毒株 M 蛋白没有明显差异 ,这与 Seif 的研究相吻合 ,证实了 IBV M 蛋白的相对保守性不仅表现在序列上 ,而且还表现在结构上。对 M 蛋白的二级结构预测分析主要是通过生物软件进行 ,目前预测蛋白质二级结构的方法大多以已知三维结构和二级结构的蛋白质为依据 ,通过人工神经网络、遗传算法等技术构建预测方法。一般对于 -螺旋预测精度较好 ,对 -折叠差些 ,而对 -螺旋和 -折叠等之外的无规则二级结构则效果很差 ,平均预测准确率为 72 %^[14]。由于计算机预测准确率的原因 ,要更加准确地了解该 8 个 IBV 陕西分离株 M 蛋白的二级结构 ,还需要运用 X 光晶体衍射等方法进一步深入研究。

本研究通过对 IBV 陕西分离毒株 M 基因的克隆与遗传变异分析得出 ,8 株 IBV 陕西省分离株 M 基因是相对保守的 ,且与 IBV 的血清型无关 ;M 蛋白可作为诊断抗原 ,用于 IBV 与鸡其他呼吸道传染病的鉴别诊断。

(下转第 10 页)

- [10] Collins M S, Strong I, Alexander D J. Evaluation of the molecular basis of pathogenicity of the variant Newcastle disease viruses termed "pigeon PMV-1 viruses"[J]. Archives of Virology, 1994, 134:403-411.
- [11] Li Z, Sergel T, Razvi E, et al. Effect of cleavage mutants on syncytium formation directed by the wild-type fusion protein of Newcastle disease virus[J]. Journal of Virology, 1998, 72: 3789-3795.
- [12] Peeters B P, Leeuw O S, Koch G, et al. Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence[J]. Journal of Virology, 1999, 73:5001-5009.

(上接第 5 页)

[参考文献]

- [1] Saif Y M, Barnes H J, Glisson J R, et al. Disease of poultry [M]. 11th ed. Ames: Iowa State University Press, 2003:511-526.
- [2] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 北京: 科学技术出版社, 1997.
- [3] Rosa C, Volker T, Stuart G S, et al. Reverse genetics system for the avian coronavirus infectious bronchitis virus[J]. Journal of virology, 2001, 75(24):12359-12369.
- [4] Lai M M, Cavanagh D. The molecular biology of coronaviruses [J]. Adv Virus Res, 1997(48):1-100.
- [5] Farsang A, Ros C, Lena H M, et al. Molecular epizootiology of infectious bronchitis virus in Sweden indicating the involvement of a accine strain[J]. Avian Pathology, 2002, 31, 229-236.
- [6] Cavanagh D. Coronavirus IBV glycopolypeptides: size of their polypeptide moieties and nature of their liga charides[J]. Journal of General Virology, 1983(64):1187-1191.
- [7] Freymuth F, Vabret A, Gouarin S, et al. Epidemiology of respiratory virus infections [J]. Allerg Immunol, 2001, 33(2): 662-669.
- [8] David F S, Bartholomew M S. Coronavirus proteins: structure and function of the oligosaccharides of the avian infectious bronchitis virus glycoproteins[J]. Journal of virology, 1982, 44(3):804-812.
- [9] 王晶钰. 鸡肾型传染性支气管炎病毒陕西分离株 N、M 和 S1 基因分子遗传变异研究[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2006.
- [10] 马学军. 精编分子生物学实验指南[M]. 4 版. 北京: 科学出版社, 2005:95-120.
- [11] Cavanagh D, Davis P J. Evolution of avian coronavirus IBV: senquence of the matrix glycoprotein gene and intergenic region of several serotypes[J]. J Gen Virol. , 1988, 69:621-629.
- [12] 潘杰彦, 陈德胜, 戴亚斌, 等. 传染性支气管炎病毒青岛腺胃分离株(SD/97/02)基质蛋白、5a、5b 蛋白基因的克隆和序列分析[J]. 中国兽医学报 2002, 22(2):108-110.
- [13] Saif L J. Coronavirus immunogens[J]. Vet Microbiol, 1993, 37(34):285-297.
- [14] 梁国栋. 最新分子生物学实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2001.