

鸡传染性支气管炎病毒 W 株膜蛋白基因的分子特征

贺秀媛¹, 张淑霞², 张君涛¹, 陈红英¹, 王川庆¹, 崔保安¹, 王建华²

(1 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002; 2 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘要】 **【目的】**研究鸡传染性支气管炎病毒(IBV)W 株膜蛋白基因的分子特征。**【方法】**根据 GenBank 中已发表的鸡传染性支气管炎病毒 M 基因序列,设计并合成 1 对特异性引物,利用 RT-PCR 技术成功扩增了 IBV 河南地方分离毒株 W 株 M 基因全长片段,然后进行克隆、测序,并与 GenBank 中发表的 11 株国内外参考毒株进行比较分析。**【结果】**获得的 W 株 M 基因全长为 681 bp,编码 M 蛋白 226 个氨基酸残基,其 N 端的前 60 nt 为前导序列,近 N 端含有 2 个潜在的 N-糖基化位点;3 个跨膜区域分别位于 21~37,45~68,74~94 aa 处,在 171~176,183~193 aa 处有 2 个潜在的抗原位点,且 M 蛋白上有 9 个高度保守的半胱氨酸;与参考毒株相比,IBV-W 株 M 基因的核苷酸同源性为 88.2%~92.7%,推导的氨基酸同源性为 91.1%~95.6%;M 蛋白的突变主要发生在前 16 位氨基酸,其中第 2 位缺失 1 个氨基酸,第 3~6 位连续插入 4 个氨基酸,第 8~9 位缺失 2 个氨基酸,第 14~16 位的 3 个氨基酸发生连续突变,其他位点的氨基酸变异为点突变,M 蛋白核苷酸序列的变异主要表现为静默突变,亲水区较疏水区更易变异;在系统发生进化树中,W 株与 BJ 株处于同一个小的分支上,亲缘关系较近,而与其他参考株的亲缘关系较远。**【结论】**推测 W 株可能是一个新的变异株。

【关键词】 鸡传染性支气管炎病毒(IBV);M 基因;分子特征

【中图分类号】 S858.315.3;Q785

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)09-0027-07

Molecular characterization of matrix glycoprotein gene of infectious bronchitis virus W strain

HE Xiu-yuan¹, ZHANG Shu-xia², ZHANG Jun-tao¹, CHEN Hong-ying¹,
WANG Chuan-qing¹, CUI Bao-an¹, WANG Jian-hua²

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

2 College of Animal Science and Veterinary Science, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objection】** The research was to study molecular characterization of matrix glycoprotein gene of infectious bronchitis virus (IBV) W strain. **【Method】** The matrix glycoprotein gene of IBV-W strain isolated from Henan province was successfully amplified with a pair of specific primers by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The PCR products were cloned, sequenced and compared with 11 reference IBV strains published in GenBank. **【Result】** The results showed that the full length sequence of M gene of W strain consisted of 681 nucleotides, coding 226 amino acid residues of M protein. A leading sequence (signal peptide, about 60 nucleotides) and two glycosylated sites were located nearby the N-terminal. Three transmembrane domains were located in the regions from 21 to 37, from 45 to 68, and from 74 to 94 amino acids respectively. Two potential antigen sites existed in the regions between 171-176 and between 183-193. M protein included nine highly conserved cysteine residues. The M gene

* [收稿日期] 2008-12-10

[基金项目] 河南省科技攻关项目(0424050015);陕西省自然科学基金项目(SJ08C110)

[作者简介] 贺秀媛(1965—),女,湖南道县人,副教授,博士,硕士生导师,主要从事动物营养代谢病与免疫学研究。

E-mail:xyhe1984@163.com

[通信作者] 张淑霞(1967—),女,宁夏中宁人,副教授,博士,硕士生导师,主要从事动物疫病诊断与防控研究。

E-mail:zhangshuxia316@163.com

sequence analysis showed that it shared 88.2%—92.7% nucleotide homology and 91.1%—95.6% deduced amino acid sequence homology with IBV strains from GenBank. In M protein, there was a variable region which was mainly located in the sites from 1 to 16 amino acids, for example, one amino acid was lost at site 2, 4 amino acids were inserted at site 3—6, 2 amino acids were lost at the site 8—9, and 3 amino acids were mutated at site 14—16, but variations of amino acids at other sites were point mutations. The variations of nucleotide sequence in M protein were mainly manifested as silent mutation. Variations within the hydrophilicity region were easier than that in the hydrophobicity region. Phylogenetic analysis based on the nucleotide sequences of M gene revealed that IBV-W strain was situated in the same branch of the phylogenetic tree with BJ strain for more close relation, while it was far related to the other strains of IBV. 【Conclusion】 These results suggested that IBV-W isolated in this study was a new strain.

Key words: infectious bronchitis virus (IBV); matrix glycoprotein gene; molecular characterization

鸡传染性支气管炎病毒(Infectious Bronchitis Virus, IBV)是冠状病毒科的代表株,外被囊膜,其基因组为不分节段的正链单股 RNA,全长约 27.6 kb,主要编码 4 种结构蛋白:纤突蛋白(S)、小囊膜蛋白(sE)、膜蛋白(M)^[1]和核衣壳蛋白(N)。S 蛋白位于病毒粒子表面,由等摩尔的 S₁ 和 S₂ 两个亚单位组成,其中 S₁ 蛋白为 IBV 的主要免疫原,可诱导机体产生中和抗体、血凝抑制抗体,与病毒的组织嗜性有关^[2]。由于 S₁ 基因极易发生变异,导致 IBV 有众多的血清型^[3]。因此,以往国内外学者对 IBV 的研究主要集中在 S₁ 基因上。近年来的研究表明,IBV 的 M 蛋白也具有重要的生物学功能。M 蛋白位于病毒外表面,约占病毒总蛋白的 40%,由 224~225 个氨基酸组成,横跨囊膜,大部分位于囊膜内侧,仅 N 端糖基化的小部分暴露于双层脂质外面,膜外部分的亲水端含有多个糖基化位点,对病毒的传染性具有决定性作用;M 蛋白还与病毒复制^[4]、抗感染^[5]、诱导白细胞产生 α -干扰素^[6]等有关。目前研究表明,M 蛋白具有较高的保守性^[7-10],但其分子结构与免疫功能有何关系尚不清楚。为此,本研究对 IBV 河南地方分离毒株 W 株的 M 基因进行克隆、测序与遗传进化分析,研究 M 基因的分子特征,进而推测 M 蛋白可能的抗原表面位点,以期深入研究 IBV M 基因的分子生物学特征及其遗传演变规律,进一步阐明 M 蛋白在免疫中的作用,为筛选有效的 IBV 疫苗毒株、开发研制新型高效的 M 基因工程疫苗及 M 蛋白 ELISA 诊断试剂,有效控制和预防 IB 在我国的发生与流行提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验毒株

IBV-W,为 1 株经鉴定为肾型的 IBV 河南地方

分离毒株,由河南农业大学王川庆教授惠赠。HN99,为本试验的另一河南 IBV 地方分离株。

1.2 SPF 鸡胚

9~11 日龄 SPF 鸡胚,由乾元浩生物股份有限公司郑州生物药厂提供。

1.3 载体与菌株

pMD18-T 克隆载体试剂盒,购自 TaKaRa 公司;大肠杆菌菌株 Top10,由武汉大学医学分子病毒学国家重点实验室提供。

1.4 主要试剂

本试验所用的限制酶,均购自 TaKaRa 公司;TRIzol 试剂盒,购自美国 Invitrogen 公司;逆转录试剂盒 Reverse Transcription System,为 ToYoBo 公司产品;DNA 快速回收试剂盒,为上海申能博彩生物工程有限公司产品;质粒快速提取试剂盒,为上海中科开瑞生物芯片科技股份有限公司产品;DNA 分子量标准,为北京鼎国生物技术有限公司产品。其他试剂均为国产分析纯。

1.5 引物设计与合成

参照 GenBank 中注册的 IBV M 基因的核苷酸序列,采用引物设计软件 Prime Premier 5.0 设计 1 对引物,上、下游引物分别引入 *EcoR* I、*Hind* III 酶切位点(下划线部分),该对引物理论跨幅约 700 bp,由上海生物工程公司合成。

上游引物: 5'-CGGAATTCAGTTTCCTAAGAACG-GTTGGAA-3';

下游引物: 5'-CCCAAGCTTCTCTCTACACGCA-CACATTTAT-3'。

1.6 IBV 参考毒株及 GenBank 登录号

IBV M 基因的参考毒株有 H52、Cal99、H120、GDS14、EP3、Gray、LX4、BJ、M41、Beaudette 和 SAIB20,其 GenBank 的登录号分别为 AF286185、

AY514485、AY028295、AY646283、DQ001338、AF363607、AY851295、AY319651、AF286184、M95169 和 AY302749。

1.7 IBV 病毒增殖与总 RNA 的提取

于 10 日龄 SPF 鸡胚尿囊腔中接种 IBV-W 株病毒液 0.2 mL,37 ℃ 培养 36 h 后,弃去 24 h 内的死胚,无菌收集尿囊液,于 4 ℃、5 000 r/min 离心 30 min,除去杂质,回收上清液,再以 27 000 r/min 离心 2 h,弃去上清,留沉淀约 1 mL,吹打,混匀。按照 TRIzol 试剂盒说明书从尿囊液中直接提取病毒基因组 RNA。

1.8 IBV M 基因的 RT-PCR 扩增

1.8.1 cDNA 链的合成 取 5 μL 病毒 RNA 溶液与 1 μL 下游引物(20 μmol/L)混匀,65 ℃ 水浴 10 min,冰浴 5 min,依次加入 5×Buffer 4 μL,dNTPs 2 μL,40 U/μL RNasin 1 μL,20 U/μL AMV-RTase 1 μL,混匀;42 ℃ 1 h,95 ℃ 5 min,4 ℃ 5 min,进行反转录,以特异性下游引物为模板合成 cDNA 第一链。反转录产物于-20 ℃ 保存。

1.8.2 IBV-W 株 M 蛋白基因的 PCR 扩增 反应体系总体积为 20 μL,其组成如下:ddH₂O 10.8 μL,10×Buffer 2 μL,RT 产物 5 μL,dNTPs 0.4 μL,上、下游引物各 0.8 μL,Taq DNA 聚合酶 0.2 μL,混匀;按以下程序进行扩增:95 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 45 s,53 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 2 min,35 个

循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min,PCR 产物于 4 ℃ 保存。另取 5 μL PCR 产物于 12 g/L 琼脂糖凝胶中电泳,并通过紫外凝胶成像系统观察、拍照。

1.9 IBV-W 株 M 基因的克隆与鉴定

按照凝胶回收(小量)试剂盒说明书进行 PCR 产物的回收。参照 pMD18-T 克隆载体试剂盒说明书对回收的 PCR 产物与 pMD18-T 克隆载体进行克隆。用构建的克隆载体转化大肠杆菌感受态细胞 Top10,在 Amp 的 LB 液体培养基中,于 37 ℃、250 r/min 振荡培养 8 h,采用碱裂解法进行质粒抽提^[7]。对提取的质粒 DNA 进行 PCR 和 *EcoR* I、*Hind* III 双酶切。利用 Sanger’S 末端双脱氧链终止法对 PCR 和酶切鉴定为阳性的重组质粒进行核苷酸序列测定,测序由上海生物工程有限公司进行。

1.10 IBV-W 株 M 基因的序列分析

应用 DNASTar 4.0 生物软件对 IBV-W 株 M 基因与 GenBank 中发表的 11 株国内外参考毒株进行核苷酸和氨基酸同源性比较,并绘制系统发生进化树。同时对 IBV-W 株 M 蛋白的抗原指数、亲水性、表面可能性进行分析。

2 结果与分析

2.1 IBV M 基因的 RT-PCR 扩增

IBV-W 分离株经 RT-PCR 扩增,得到了 1 条约 700 bp 的目的片段,与预计大小相符(图 1)。

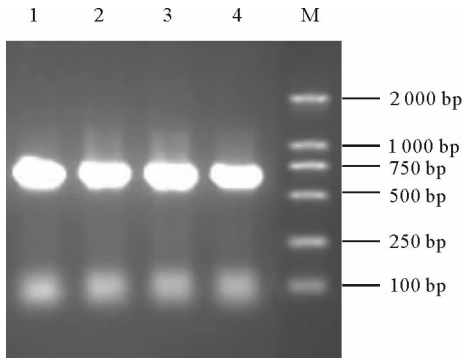


图 1 IBV-W 株 M 基因的 RT-PCR 扩增结果
M. DNA 分子量标准;1~4. IBV-W 株 M 基因的 RT-PCR 产物
Fig. 1 Amplification results of M gene of IBV-W strain by RT-PCR
M. DL2000 DNA Marker;1-4. RT-PCR products of M gene of IBV-W strain

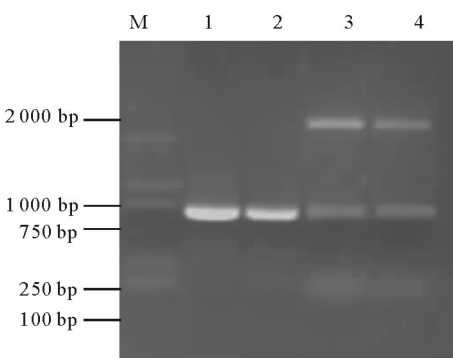


图 2 重组质粒的双酶切和 PCR 鉴定
M. DNA 分子量标准;1~2. pMD18-T-M 的 PCR 产物;
3~4. pMD18-T-M 的 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切产物
Fig. 2 Restriction endonuclease analysis and PCR of recombinant plasmid
M. DL2000 DNA Marker;1-2. PCR amplified fragments of pMD18-T-M;3-4. products of pMD18-T-M digested by *EcoR* I and *Hind* III

2.2 重组质粒 PMD18-T-M 的鉴定

图 2 表明,重组质粒 pMD18-T-M 经 PCR 鉴

定,得到 1 条与 W 株 M 基因 RT-PCR 产物大小相近(0.7 kb)的片段,与预期结果一致;用 *EcoR* I 和

Hind III 双酶切消化后,得到 1 条约 700 bp 的目的片段和 1 条与 pMD18-T 载体质粒大小相近(2 692 bp)的片段,与预期相符。以上结果表明,IBV-W 株 *M* 基因的 cDNA 片段已经正确地插入到 pMD18-T 载体中。

2.3 IBV-W 株 *M* 基因的序列测定及同源性分析

选择 *Eco*R I、*Hind* III 双酶切和 PCR 鉴定为

阳性的重组质粒,由上海生物工程公司对其进行正、反 2 个方向的序列测定,结果发现,W 株 *M* 基因的全序列为 681 bp,编码由 226 个氨基酸残基组成的多肽,包含完整的阅读框架(图 3)。*M* 基因编码的膜蛋白 N 端,含有约 60 nt 的前导序列、2 个潜在的 N-糖基化位点及 9 个高度保守的半胱氨酸。

ATGTCGAACGGCAGGAAAAATTGCACTCTTAGTACTCAGCAAGCAGCTGAGCTCTTCAAGGAATATAATCTATTTCATAACCGCATTCCTGTTGTTCTA	99
M S N G T E N C T L S T Q Q A A E L F K E Y N L F I T A F L L F L	
ACCATACTACTTCAGTATGGATACGCAACTAGGAGTCTGTTTATTTACATACTGAAATGATAGTGTATGGTGCTTCTGGCCCCTTAACATAGCAGTA	198
T I L L Q Y G Y A T R S L F I Y I L K M I V L W C F W P L N I A V	
GGTATAATTCATGTATATATCCGCCAAACACGGGAGGTCTTGTGCGAGCGATAATTCTTACTGTGTTTGGTGTCTGTCTTTGTAGGTTATTGGATC	297
G I I S C I Y P P N T G G L V A A I I L T V F A C L S F V G Y W I	
CAGAGTTTACTACTCTTTAAGCGGTGTAGGTCATGGTGGTCATTTAACCCCGAATCTAATGCCGTAGGTTCAATACTCCTAACTAATGGTCACAATGT	396
Q S F R L F K R C R S W W S F N P E S N A V G S I L L T N G R Q C	
AATTTTGCTATAGAAAGTGTCCAATGGTGCTTGCTCCAATTATTAAGAAATGGTGCTTATTGTGAGGGTCAGTGGCTTGCTAAATGTGAACCAGAC	495
N F A I E S V P M V L A P I I K N G A L Y C E G Q W L A K C E P D	
CACTTGCTAAAGACATTTTGTGTGTACACCAGATAGAAGAAATATCTATCGCATGGTGCAGAAATACACTGGTGACCAAAGCGGAAATAAGAAAAGG	594
H L P K D I F V C T P D R R N I Y R M V Q K Y T G D Q S G N K K R	
TTTGCTACATTTGTATATGCCAAGCAGTCAGTAGATACTGGCGAGCTAGAAAAGTGTAGCAACAGGAGGAAGTAGTCTTTACACA	681
F A T F V Y A K Q S V D T G E L E S V A T G G S S L Y T	

图 3 IBV-W 株 *M* 基因核苷酸序列和推导的氨基酸序列

加方框部分分别为起始密码子和终止密码子;带阴影部分为 N-糖基化位点;下划线部分的 60 nt 为前导序列,带下划线的 C 为半胱氨酸

Fig. 3 Sequences of nucleotide and deduced amino acid of *M* gene from IBV-W strain

The boxed parts indicate start codon and stop codon respectively;the shadowed parts indicate N-glycosylated sites;the 60nt of underlined parts indicate a leading sequence,the underlined C parts indicate cysteine residues

表 1 IBV-W 株与 HN99 及 11 个参考毒株 *M* 基因核苷酸及推导氨基酸序列同源性的比较

Table 1 Comparison of homologies of the nucleotide and the deduced amino acid sequence of the *M* gene of IBV-W strain and HN99 and 11 reference IBV strains

毒株 Strain*	Beaudette	BJ	Cal99	EP3	GDS14	Gray	H52	H120	HN99	LX4	M41	SAIB20	W
Beaudette	*	87.9	91.9	99.7	89.2	90.9	96.0	95.9	87.9	90.7	98.7	89.4	90.3
BJ	92.4	*	90.3	88.2	89.2	89.6	89.0	88.8	90.3	90.0	88.2	87.5	92.7
Cal99	95.2	92.9	*	92.2	89.5	96.6	93.2	93.1	89.4	90.7	92.3	94.1	90.9
EP3	99.1	92.9	96.0	*	89.5	91.1	96.3	96.2	88.0	91.0	99.0	89.7	90.6
GDS14	91.6	91.5	92.5	92.5	*	89.6	89.4	89.2	87.0	91.5	89.4	92.6	90.3
Gray	94.7	94.2	96.4	95.1	93.8	*	91.7	91.5	88.6	90.8	90.8	95.2	90.2
H52	97.8	93.8	97.4	98.7	93.4	95.6	*	99.9	88.6	90.6	96.5	90.4	90.6
H120	97.4	93.3	96.9	98.2	93.0	95.1	99.6	*	88.5	90.4	96.3	90.3	90.4
HN99	91.1	94.2	92.0	91.5	90.6	93.3	92.4	92.0	*	87.3	88.0	87.1	88.2
LX4	91.2	92.4	91.2	92.1	92.5	92.9	92.1	91.6	90.6	*	90.6	90.9	90.6
M41	97.8	93.8	97.4	98.7	93.4	95.6	100.0	99.6	92.4	92.1	*	89.2	90.7
SAIB20	91.6	90.2	93.4	92.5	95.6	94.7	92.5	92.1	89.7	91.6	92.5	*	89.2
W	92.4	95.6	94.2	92.9	92.4	95.1	94.2	93.8	94.2	91.1	94.2	91.1	*

注:右上角为核苷酸同源性,左下角为氨基酸同源性。

Note:The upper-right corner is nucleotide sequence homogeneity,the bottom left corner is the deduced amino acid sequence homogeneity.

应用 Blast、DNASar 4.0 生物软件,对 IBV W 株与 GenBank 中登录的国内外 11 个 IBV 参考株和

另一河南分离株 HN99 的 M 基因进行核苷酸同源性、氨基酸同源性及系统发生进化树分析。分析结果(表 1)表明,W 株与 HN99、GDS14、M41、Gray、H52、BJ 等 11 个参考毒株 M 基因的核苷酸同源性为 88.2%~92.7%,其中与 BJ 的同源性最高,为 92.7%,而与 HN99 的同源性最低,为 88.2%;W 株 M 基因编码的氨基酸与其他 IBV 毒株的氨基酸同源性为 91.1%~95.6%,其中与 BJ 的同源性最高,为 95.6%,与 SAIB20、LX4 的同源性最低,为 91.1%。

系统发生进化树分析结果(图 4,5)显示,W 株

在进化中与 BJ 株属于同一个小的分支,亲缘关系较近;而与其他参考株属于不同的分支,亲缘关系较远。

IBV-W 株 M 基因的同源性分析表明,W 株存在碱基的插入现象,在 20~22 位的核苷酸有 3 个碱基插入。W 株 M 蛋白突变主要发生在前 16 位氨基酸,在第 2 位缺失 1 个氨基酸,在第 8~9 位缺失 2 个氨基酸,在第 3~6 位有 4 个氨基酸插入,在第 14~16 位有 3 个氨基酸连续突变,其他位点的氨基酸变异均为点突变。

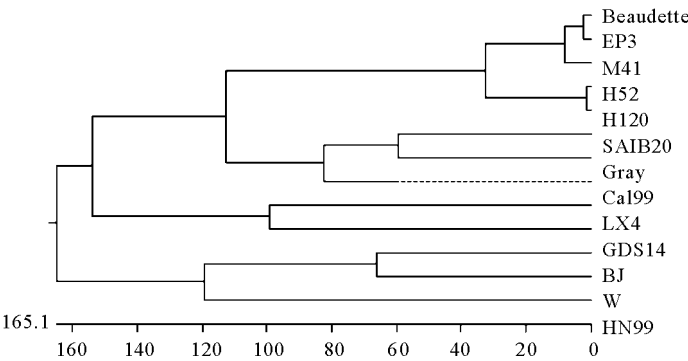


图 4 不同 IBV 毒株 M 基因核苷酸序列系统发生进化分析

Fig. 4 Phylogenetic tree of of different IBV strains based on the sequences of their M gene

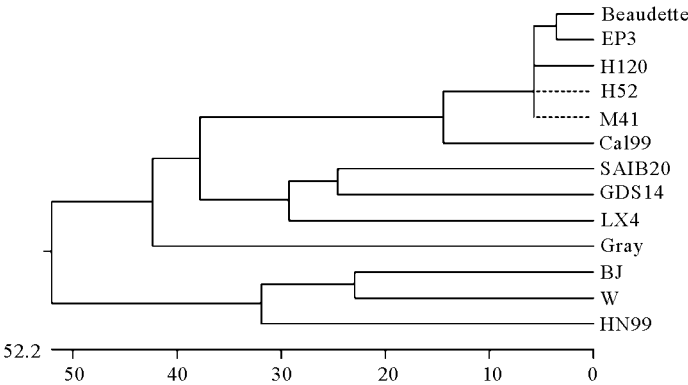


图 5 不同 IBV 毒株 M 蛋白系统发生进化分析

Fig. 5 Phylogenetic tree of different IBV strains based on the deduced amino acid sequences of their M protein

2.4 IBV-W 株 M 蛋白的抗原性分析

对 IBV-W 株及重要参考毒株 HN99、BJ 和 H120,采用 DNASTar 4.0 生物软件对 M 蛋白抗原指数、亲水性及表面可能性进行分析,结果(图 6~8)发现,W 株 M 蛋白的抗原指数在 Gln 100~Arg 107、Trp 111~Pro 116、Trp 158~Asp 165、Ile 171~Asp 177、Val 185~Asn 195、Val 203~Thr 211 位的氨基酸处较高,而在 Try 39~Thr 43 处抗

原指数较低,与其他毒株存在差异;在 Glu 21~Leu 37、Ser 45~Ile 68、Pro 74~Phe 94 位的氨基酸处为疏水区,是 M 蛋白的 3 个跨膜区,与 HN99、BJ、H120 株相似性较高;在 Ile 171~Pro 176、Arg 183~Ser 193 位氨基酸处含有 2 个潜在抗原位点,与其他参考毒株相似性较高,而在 Try 39~Thr 43 处抗原位点较低,与其他毒株不同。

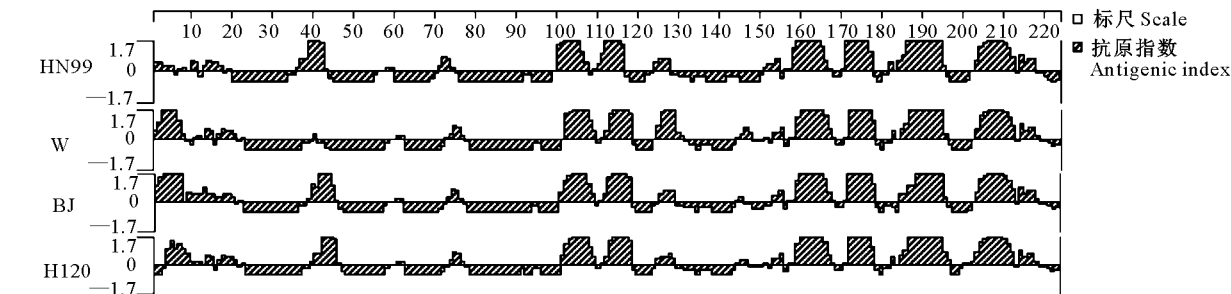


图 6 IBV-W 株 M 蛋白与参考毒株 HN99、BJ、H120 抗原指数的差异

Fig. 6 Difference between antigenic index of IBV-W M protein and reference strains HN99,BJ,H120

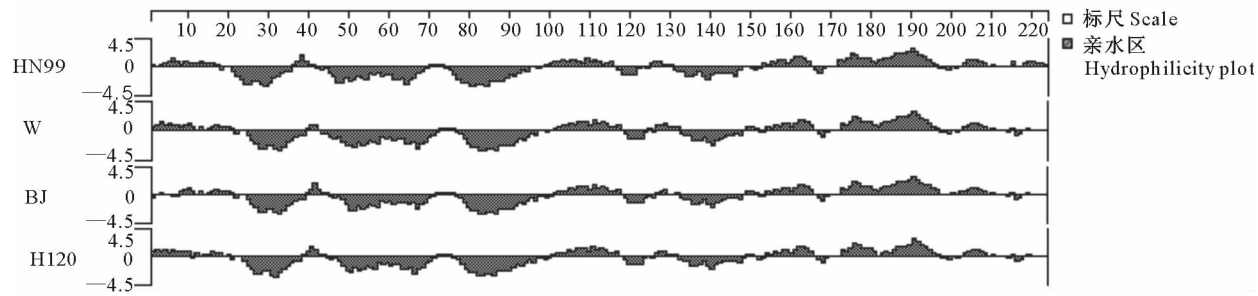


图 7 IBV-W 株 M 蛋白与参考毒株 HN99、BJ、H120 亲水性的差异

Fig. 7 Difference between hdrophilicity plot of IBV-W M protein and reference strains HN99,BJ,H120

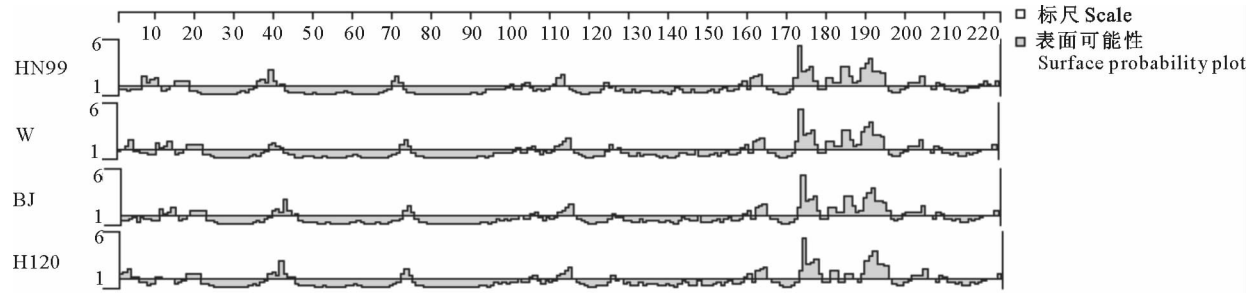


图 8 IBV-W 株 M 蛋白与参考毒株 HN99、BJ、H120 表面可能性的差异

Fig. 8 Difference between surface probability plot of IBV-W M protein and reference strains HN99,BJ,H120

3 讨论

本试验应用 RT-PCR 技术,从 IBV 河南分离株 W 株中克隆得到的基因全长为 681 bp,编码 226 个氨基酸残基,包含完整的阅读框架,其 N 端含有约 60 nt 的前导序列,在近 N 端含有 2 个糖基化位点,其编码的蛋白结构中含有 9 个高度保守的半胱氨酸和 3 个跨膜区域,且该蛋白大部分是亲水性的,穿膜部分由疏水区组成,这与文献报道的一致^[11-13],证实克隆的基因为 M 基因。本研究还发现,在 M 基因结构中含有 *Bam*H I、*Sal*I 和 *Taq*I 酶切位点,与文献[8]报道的相似。因此在设计扩增 IBV M 基因的引物时,应对 M 基因中可能含有 *Bam*H I、*Sal*I 和 *Taq*I 的酶切位点予以考虑。

序列分析结果表明,IBV-W 株 M 蛋白缺失的

氨基酸总数为 3 个,新插入的氨基酸总数为 5 个,使得 IBV-W 株 M 基因编码的多肽为 226 个氨基酸残基,从而不同于国际公认的 M 基因长度为 224~225 个氨基酸残基,进一步证实了 IBV-W 株 M 基因存在着缺失和插入变异^[14]。这为 IBV 基因组结构补充了新的科学数据,同时也为及时准确地追踪新的变异株的出现提供了依据。

同源性分析表明,与 GenBank 中 11 个国内外参考毒株及另一河南分离株 HN99 相比,IBV-W 株膜蛋白基因的核苷酸序列与国内分离株 BJ 的同源性最高,为 92.7%,而与另一河南分离株 HN99 的同源性最低,为 88.2%;氨基酸的同源性也与 BJ 株的同源性最高,为 95.6%,而与 SAIB20、LX4 的同源性最低,为 91.1%。在系统发生进化树中,W 株与 BJ 株处于同一个小的分支上,亲缘关系很近;而

与其他参考株处于不同分支,亲缘关系较远。由此推测,W 株可能是一个新的变异株。这一现象表明,在免疫压力下,常常能够在免疫鸡群中分离到新毒株,这些毒株通过基因点突变、基因重组、基因缺失和基因插入等方式发生变异后,一旦在环境中适应,则很可能成为决定 IBV 新的变异株流行趋势的重要因素^[15]。

IBV-W 株与主要参考株 HN99、BJ、H120 M 蛋白的抗原指数、亲水性及表面抗原位点的分析结果表明,W 株 M 蛋白的抗原指数在 Gln 100~Arg 107、Trp 111~Pro 116、Trp 158~Asp 165、Ile 171~Asp 177、Val 185~Asn 195、Val 203~Thr 211 位的氨基酸处较高,在 Ile 171~Pro 176、Arg 183~Ser 193 位氨基酸处含有 2 个潜在抗原位点,均与 HN99、BJ、H120 株相似性较高。且 IBV-W 株 M 蛋白的疏水区主要分布于 C 端的 Glu 21~Leu 37、Ser 45~Ile 68、Pro 74~Phe 94 位的氨基酸处,形成 M 蛋白的 3 个跨膜区,在跨膜区内为疏水区,其余部分为亲水区;在亲水区,IBV-W 株与 HN99、BJ、H120 株相似性亦较高。由于亲水区与蛋白抗原位点的形成有密切关系,上述结果提示,IBV-W 株 M 蛋白可能具有较好的抗原性,与文献^[16]的报道一致。但是这些结果究竟与 IBV-W 株 M 蛋白的抗原性关系如何,还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Bournsnel 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.
- [2] Hodgson T, Casais R, Dove B, et al. Recombinant infectious bronchitis coronavirus beaudette with the spike protein gene of the pathogenic M41 strain remains attenuated but induces protective immunity [J]. Journal of Virology, 2004, 78: 13804-13811.
- [3] Smati R, Silim A, Guertin C, et al. Molecular characterization of three new avian infectious bronchitis virus (IBV) strains isolated in Quebec [J]. Virus Genes, 2002, 25(1): 85-93.
- [4] Corse E, Machamer C E. The cytoplasmic tails of infectious bronchitis virus E and M proteins mediate their interaction [J]. Virology, 2003, 312: 25-34.
- [5] Pei J, Ellen E. Specific antibody secreting cells from chickens can be detected by three days and memory B cells by three weeks post-infection with the avian respiratory coronavirus [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2005, 29: 153-160.
- [6] Dar A, Munir S, Vishwanathan S, et al. Transcriptional analysis of avian embryonic tissues following infection with avian infectious bronchitis virus [J]. Virus Research, 2005, 110: 41-55.
- [7] 廖明, 曹伟胜, 任涛, 等. 国产 IBV 疫苗株膜蛋白基因的亲缘关系研究 [J]. 中国预防兽医学报, 2002, 24(3): 185-188.
- [8] 王晶钰, 罗艳, 邓小敏, 等. 鸡肾型 IBV 分离株 M 基因的克隆与特性分析 [J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(8): 591-595.
- [9] 任涛, 廖明, 曹伟胜, 等. 4 株 IBV 中国地方分离株部分结构基因变异的研究 [J]. 中国预防兽医学报, 2006, 28(3): 285-288.
- [10] 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 M、5a、5b 基因的克隆和序列分析 [J]. 中国兽医学报, 2002, 22(2): 108-109.
- [11] 刘胜旺, 贺秀媛, 孔宪刚, 等. 鸡传染性支气管炎病毒中国分离株 M 基因的分子特征 [J]. 中国预防兽医学报, 2001, 23(6): 404-406.
- [12] 刘胜旺, 杜恩岐, 孔宪刚, 等. 鸡传染性支气管炎病毒 LX4 株 mRNA5 和 mRNA6cDNA 的分子特征 [J]. 中国病毒学报, 2003, 18(3): 265-270.
- [13] Koch G, Hartog L, Kant A. Antigenic domains on the peplomer protein of avian infectious bronchitis virus: correlation with biological functions [J]. J Gen Virol, 1990, 71: 1929-1935.
- [14] Farsang A, Ros C, Renstrom L H, et al. Molecular epizootiology of infectious bronchitis virus in Sweden indicating the involvement of a vaccine strain [J]. Avian Pathol, 2002, 31(3): 229-236.
- [15] Cavanagh D, Davis P J. Evolution of avian coronavirus IBV: sequence of the matrix glycoprotein gene and intergenic region of several serotypes [J]. J Gen Virol, 1988, 69: 621-629.
- [16] Karaca K K, Naqi S A, Palukaitis P, et al. Serological and molecular characterization of three interic isolates of infectious bronchitis virus of chickens [J]. Avian Dis, 1990, 34: 899-904.