

禽传染性支气管炎病毒 SAIBk 株全基因组的分段克隆、测序及分析

周生¹, 王红宁^{1,2*}, 唐梦君¹, 黄勇¹, 柳萍¹

(1. 四川农业大学动物科技学院动物预防医学生物工程实验室, 雅安 625014;

2. 四川大学生命科学学院, 成都 610064)

摘要: 根据 GenBank 上公布的 IBV 基因组序列, 经多重比较后设计 19 对引物, 用 RT-PCR 方法对禽传染性支气管炎病毒致肾病变型分离株 SAIBk 株的全基因组进行了分段扩增、克隆和序列测定。测序结果表明: SAIBk 株基因组序列全长 27 520 bp, A+T 的含量占 61.74%, 具有典型的冠状病毒基因组结构。基因组内碱基的插入和缺失主要分布在 3 220-3 470 位、20 560-20 810 位、25 310-25 600 位和 27 150-27 220 位。与 GenBank 上公布的 5 株 IBV 基因组序列 Beaudette、Mass41、Cal99、BJ、KQ6 的同源率分别为 87.2%、87.6%、87.2%、85.6% 和 87.5%。SAIBk 株基因组不同区域的后源性分析结果表明, 3' UTR 和 5' UTR 是基因组中最为保守的区域, 同源率在 90.9%~97.7%, 而 S1 基因是基因组中变异最大的区域, 同源率在 74.8%~83.2%。系统进化分析结果表明 SAIBk 株与国内分离株 S14、LX4、BJ 的亲缘关系较近。

关键词: 禽传染性支气管炎病毒; 致肾病变型; 基因组; 序列分析

中图分类号: S852.659.6

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2007)01-0072-06

Cloning and Sequence Analysis of the Genome of IBV SAIBk Strain Isolated in China

ZHOU Sheng¹, WANG Hong-ning^{1,2*}, TANG Meng-jun¹, HUANG Yong¹, LIU Ping¹

(1. College of Animal Science & Technology,

Sichuan Agricultural University, Yaan 625014, China;

2. College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: According to the published genome sequences of infectious bronchitis virus (IBV) on GenBank, nineteen pairs of primers were designed and the genome of isolated SAIBk strain of IBV was amplified by RT-PCR. All the RT-PCR products were cloned into the pMD18-T vector and sequenced. The genome sequence of SAIBk strain was 27 520 bp in length. The ratio of A+T in the genome was 61.74%. Compared with the genome of Beaudette, Mass41, Cal99, BJ and KQ6, the similarity was 87.2%, 87.6%, 87.2%, 85.6% and 87.5%, respectively. The 3' UTR and 5' UTR were the most conservative region in the genome, the similarity was between 90.9% - 97.7%. The S1 gene have the most variations, the similarity was between 74.8% - 83.2%. The phylogenetic analysis results showed that the SAIBk genome have a close relationship with S14, LX4, BJ strains which were isolated in China.

Key words: infectious bronchitis virus; nephropathic type; genome; sequence analysis

1931 年 Schalk 等^[1]首次报道了禽传染性支气管炎 (IB), Beach 和 Schalm^[2]于 1936 年确定该病病

原为病毒, Beaudette 和 Hudson^[3]于 1937 年首次在鸡胚上培养该病毒。王红宁等^[4]首次在四川分离鉴

收稿日期: 2006-03-30

基金项目: 国家“863 计划”(2003AA241120)

作者简介: 周生 (1976-), 男, 浙江嵊州人, 博士, 主要从事动物传染病研究

* 通讯作者: 王红宁, Tel/Fax: 0835-2886083; E-mail: whongning@163.com

定出了 IBV 肾型毒株。目前世界上已分离的主要流行株有 M₄₁ 株、Conn 株、澳大利亚 T 株、Hotle 株、Gray 株等,临床上可表现多种病型,如呼吸型、肾型、肠型、腺胃型等,还有一些变异的中间型^[5]。

IBV 为典型的冠状病毒,基因组为单股正链 RNA,本身具有感染性。根据 Boursenell^[6] 1987 年测定的 IBV 毒株 Beaudette 株的报道,基因组全长为 27 608 个核苷酸,后来对不同毒株的序列分析表明不同毒株的基因组长度可能略有差异。IBV 3' 端具有真核 Poly(A) 信号,5' 端为一复制引导序列构成的帽样结构。IBV 基因组含 10 个以上的开放阅读框(ORF)。在感染细胞内可以检测到 6 种转录的 mRNA,都具有共同的 3' 末端结构,而 5' 末端则长短不一。目前的研究表明,各 mRNA 上只有位于 5' 末端且与比它短的 mRNA 不重叠的单一序列部分的 ORF 才具有编码表达功能。mRNA₂ 编码纤突蛋白 S,mRNA₄ 编码基质蛋白 M,mRNA₆ 编码核壳蛋白 N,mRNA₁ 编码依赖 RNA 的 RNA 聚合酶,mRNA₃ 和 mRNA₅ 分别编码 5 种小蛋白^[5]。由于 IBV 很容易发生变异,不同地区分离的毒株基因组存在较大的差异。本研究选择具有一定代表性的致

肾病变型分离株 SAIBk 株进行全基因组的分段克隆、测序及序列分析,对从分子水平研究 IBV 的致病机理、变异机制以及流行进化等具有积极的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 毒株 IBV 肾型分离株 SAIBk 株,由四川农业大学动物预防医学生物工程实验室鉴定并保存。

1.1.2 菌种、质粒和试剂 大肠杆菌 JM109 由本实验室保存。pMD18-T 载体、RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0、TaKaRa EX Taq、DNA Ligation Kit、5'-Full RACE Core Set、λ-EcoT14I Digestion Marker 等购自 TaKaRa 有限公司。E. Z. N. A. Plasmid Miniprep Kit、E. Z. N. A. Gel Extraction Kit 为 Omega 公司产品。小量病毒 RNA/DNA 抽提试剂盒为上海华舜生物工程有限公司产品。

1.2 引物合成

根据 GenBank 公布的 IBV Beaudette(NC001451) 株全基因组序列,用 Primer Premier5.0 软件设计引物,相邻扩增片段之间有部分核酸序列相互重叠。引物由上海 Sangon 公司合成,序列见表 1。

表 1 用于全基因组 RT-PCR 的引物

Table 1 RT-PCR Primers for complete genome sequencing

引物 Primer	位置* Location/bp *	上游引物 Upstream primer	下游引物 Downstream primer
V1	410-2 341	GGCTACGTTCTCGCATAAGG	CATCAACACTATCAATGGCGTC
V2	2 263-4 382	CTCTTCTGGAAAGGAGGTGTGC	GCTTGAAGGAGAACTATTGCTG
V3	3 789-5 608	TGTCAAAGGCATTCAATGTGTG	CACCACCACCTACTTTATCAGC
V4	5 156-7 283	AAGATTCTAAGTTGCCATTGACAC	GCAATAACTTGTTTAGCACCAGAC
V5	7 113-9 252	TGCAGATGCTTCCATTGCTAAC	ACGCATAGTAACAGGGTAGAGTCC
V6	9 072-10 607	TGGTGTACTTTGAATGTTGTC	GTCGAAAAGACTTCCCACACAG
V7	10 463-12 092	GTTACTTTGGGTTGTATTGGTG	GCTCCTCCATAAGAATCCTG
V8	11 730-14 023	GATTTATGTAGACTTAGACCCACC	AGGATAGACACACCTGCCAC
V9	13 866-15 951	GGAAAAGCCCGCTCTATTATG	GACCTACTAAATGGTAAAGTGGAATG
V10	15 837-17 436	GTAGCGCCAACTTTGTGTCCTC	ACATTTGAACAATCCTTGGTCT
V11	17 175-19 193	GTAAGAGGTTGGGTAGGTTTTGATG	TTGGGGCTTTTCAACTTCACC
V12	18 948-20 475	TTGCTCGTTCAGAATGGTATGC	TGGTCTGAAGGCACTTTGGTAG
V13	20 350-22 031	GTAAGTTATTGGTTAGAGATGTTG	TCAAACCTGCCATAACTAACAT
V14	21 247-23 273	CAAACAAAAACAGCTCAGAGTGG	GCGGGCACTATTGCATACTGAC
V15	23 141-24 893	TACCGCAAAAATGCACCTAATGG	TGTTGACGATTAGTTAGGAGTATTG
V16	24 461-26 306	TCCTAAGAACGGTTGGAATAAT	GAGAATCGTAGTGGGTATTGGTC
V17	25 777-27 366	CAAAGCAGGACAAGCAGAGC	TAGACATTTCCCTGGCGATAGAC
3E	26 894-27 608	GCTCAAGTTCAAGACCTGCTACAAG	
5E	1-441	TGGCACTACCCCTACAAACG	GGAGTGGACAAAATAACACCTGG

* 相对引物在 Beaudette 株基因组上的位置

* The location is the primer in genome of Beaudette strain

1.3 病毒的增殖及 RNA 提取

将种毒接种 11 日龄 SPF 鸡胚, 弃去 24 h 内死亡的鸡胚, 接毒 48 h 后将鸡胚放入 4 °C 冰箱过夜, 无菌收集尿囊液, 分装后于 -20 °C 冻存。病毒液经反复冻融 3 次后, 10 000 r/min 4 °C 离心 25 min, 取上清液经 40 000 r/min 4 °C 离心 2 h, 弃上清加入少量 DEPC 水, 旋涡振荡后使沉淀分散溶解, Eppendorf 管分装。参照上海华舜生物工程公司小量病毒 RNA/DNA 抽提试剂盒的操作手册提取 RNA。

1.4 SAIBk 株基因片段的 RT-PCR

1.4.1 基因组内部序列的 RT-PCR 扩增 RT 的反应体系为 RNA 10 μ L, 反转录引物 1 μ L, MgCl₂ 3 μ L, 10 × Buffer 2 μ L, RNasin (40U/ μ L) 1 μ L, dNTP mix (各 10 mmol/L) 2 μ L, AMV (10U/ μ L) 1 μ L。瞬时离心, 30 °C 10 min, 42 °C 1 h, 95 °C 5 min。PCR 反应体系: 10 × buffer 5 μ L, 4 × dNTP mix (2.5 mmol/L) 4 μ L, 上、下游引物 (20 μ mol/L) 各 1 μ L, MgCl₂ 4 μ L, cDNA 2 μ L, ddH₂O 32.5 μ L, EX Taq 酶 (5U/ μ L) 0.5 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 1 min, 52 °C 1 min, 72 °C 2 min, 共 31 个循环; 72 °C 10 min。

1.4.2 基因组 3' 末端和 5' 末端的 RT-PCR 扩增参照 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 和 5'-Full RACE Core Set 试剂盒使用说明进行。

1.5 RT-PCR 产物的克隆和重组质粒的序列测定

RT-PCR 产物用胶回收试剂盒进行纯化, 具体方法参见 E. Z. N. A. Gel Extraction Kit 说明书进行。pMD18-T 与 RT-PCR 产物连接反应体系: 胶回收产物 4.5 μ L, pMD18-T 0.5 μ L, DNA Ligation

Solution I 5 μ L。瞬时离心, 16 °C 反应 30 min。参照文献[7]的方法, 将连接产物转化 JM109 载体菌。PCR 方法鉴定的阳性菌落用 LB 穿刺管保存, 送上海 Sangon 公司进行序列测定。

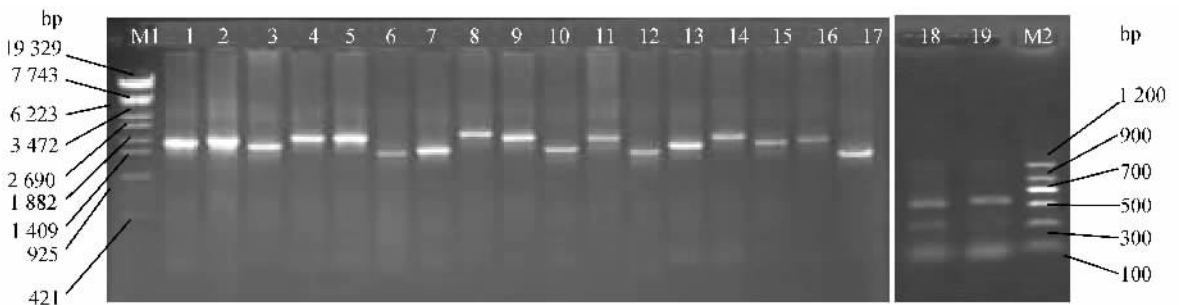
1.6 序列的拼接和分析

用 DNASTAR 中的 SeqManII 软件, 将 SAIBk 株 19 个扩增片段的测序结果进行拼接, 并将测序结果登录 GenBank。用 BioEdit 软件对基因组序列碱基组成、编码区等特性进行分析。将 SAIBk 株的全基因组序列与 GenBank 公布的 IBV 基因组全序列进行比较分析。目前 GenBank 上公布的 IBV 基因组全序列有 8 株, 其登录号及来源如下: Beaudette (NC001451, 美国呼吸型毒株)、BeaudetteCK (IBR311317, Beaudette 株反向遗传拯救株)、IB-Vp65 (DQ001339, Beaudette 株细胞传代变异株)、IBVEP3 (DQ001338, Beaudette 株鸡胚传代变异株)、Mass41 (AY851295, 美国呼吸型毒株)、Cal99 (AY514485, 美国呼吸型毒株)、BJ (AY319651, 中国北京分离株)、KQ6 (AY641576, 中国广东省孔雀分离株)。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 扩增

RT-PCR 扩增共获得 19 个片段, 用 V1~V17 表示基因组内部的 17 个片段, 3E 和 5E 分别表示 3' 末端和 5' 末端。PCR 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳观察, 扩增条带大小与预期的结果基本一致 (图 1)。



M1. λ -EcoT14I DNA 分子量标准; M2. DNA 分子量标准 II; 1~17. 片段 V1~V17 的 RT-PCR 产物;
18. 5E 的 RT-PCR 产物; 19. 3E 的 RT-PCR 产物
M1. λ -EcoT14I DNA marker; M2. DNA marker II; 1~17. RT-PCR products of V1~V17 fragment;
18. RT-PCR products of 5E fragment; 19. RT-PCR products of 3E fragment

图 1 全基因组的 RT-PCR 产物电泳图谱

Fig. 1 The electrophoresis results of RT-PCR products of complete genome sequence

2.2 序列测定与拼接

重组质粒的测序结果表明:V1~V17 的长度分别为 1 934、2 107、1 819、2 127、2 139、1 538、1 629、2 270、2 085、1 599、2 018、1 527、1 699、2 026、1 746、1 893、1 448 bp,3E 和 5E 的长度为 604、538 bp。由于基因组内部的插入和缺失,RT-PCR 产物的长度与根据 Beaudette 株推测的结果有一定的差异。拼接结果表明 SAIBk 株基因组核苷酸全长 27 520 bp(不包括 polyA),核苷酸组成中 A+T 的含量较高,占 61.74%,与 Beaudette、Mass41、Cal99、BJ、KQ6 的 A+T 含量(分别为 62.07%、62.13%、61.89%、61.77%和 61.96%)基本一致。

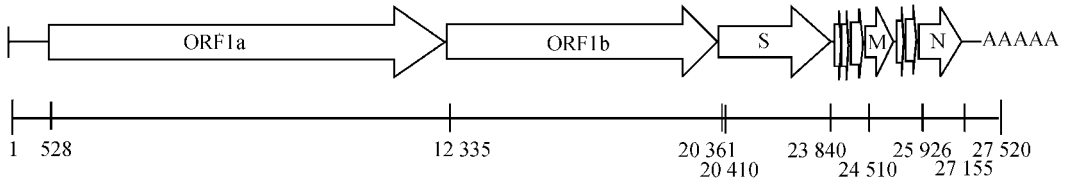


图 2 禽传染性支气管炎病毒 SAIBk 株基因组结构

Fig. 2 The genomic structure of IBV SAIBk strain

2.4 基因组的碱基插入和缺失分析

SAIBk 株基因组内存在明显的碱基插入和缺失现象,使其与不同毒株的基因组全长具有一定的差异。Beaudette、Mass41、Cal99、BJ、KQ6 基因组全长分别为 27 608、27 474、27 693、27 717 和 27 420 bp,与 SAIBk 株比较,分别相差+88、-46、+173、+197、-100 bp。碱基的插入和缺失主要分布在 4 个区域,分别位于 3 220—3 470 位、20 560—20 810 位、25 310—25 600 位和 27 150—27 220 位。

2.5 序列的同源性分析

将 SAIBk 株与 GenBank 上公布的 5 株 IBV

SAIBk 株的基因组全序列已经登录 GenBank,登录号为 DQ288927。

2.3 基因组的结构分析

SAIBk 株具有典型的冠状病毒基因组结构(图 2),其 528—20 410 位为 RNA 依赖的 RNA 聚合酶基因,约占据基因组 2/3 长度,编码 2 个多聚蛋白 ORF1a 和 ORF1b。20 361—27 155 位主要编码病毒的结构蛋白,包括纤突蛋白基因 S、小膜蛋白基因 E、膜蛋白基因 M 和核衣壳蛋白基因 N,另外还编码一些功能未知的非结构蛋白 3a、3b、5a、5b 等。在基因组两侧为 527 bp 和 364 bp 的非编码区——5' UTR 和 3'UTR。

Beaudette、Mass41、Cal99、BJ、KQ6 基因组全序列进行比较分析,同源率分别为 87.2%、87.6%、87.2%、85.6%和 87.5%。6 株 IBV 基因组序列的同源率在 84.6%~97.8%,其中以 Mass41 和 KQ6 毒株基因组的同源率最高(97.8%),其次为 Mass41 和 Beaudette 毒株,同源率为 92.7%;以 BJ 和 KQ6 毒株的同源率最低(84.6%)。SAIBk 株基因组不同区域的同源性分析结果表明,3'UTR 和 5'UTR 是基因组中最为保守的区域,同源率在 90.9%~97.7%,而 S1 基因是基因组中变异最大的区域,同源率在 74.8%~83.2%(表 2)。

表 2 SAIBk 株基因组不同区域与其它 IBV 毒株的同源性分析

Table 2 The homologies of different region between the genome of SAIBk and other IBV strains

Strain	5'UTR	1ab	S1	S2	E	M	N	3'UTR*
Beaudette	90.9	88.5	80.8	86.0	88.5	89.5	86.5	96.4
Mass41	91.8	88.4	81.2	86.2	88.5	89.2	86.3	95.4
Cal99	91.6	88.8	74.8	86.4	86.1	89.2	86.9	97.7
BJ	91.6	85.8	83.2	86.0	80.6	87.9	87.0	96.4
KQ6	90.9	88.1	81.2	86.0	88.5	89.2	87.2	94.1

* 3'UTR 没有包括 N 基因后的高变区

* The 3'UTR not include the hypervariable region which follow close behind the N gene

2.6 全基因组的系统进化分析

将 SAIBk 株与 GenBank 上公布的 8 株 IBV 基

因组全序列进行系统进化分析。9 个毒株分为 3 个分支,其中 Beaudette 及其衍生毒株 BeaudetteCK、

IBVp65 和 IBVEP3 聚为一支, KQ6 和 Mass41 聚为一支, SAIBk、BJ 和 Cal99 聚为一支(图 3)。表明 SAIBk 株与 BJ 株的亲缘关系较近。

2.7 结构蛋白基因的系统进化分析

将 SAIBk 株的结构蛋白基因与 10 株已经完成结构蛋白基因测序的 IBV 进行系统进化分析。S、M、N 和 E 基因的进化树均一致将 11 个毒株分为 3 个分支, 其中 Beaudette 及其衍生毒株 BeaudetteCK、IBVp65 和 IBVEP3 聚为一支, KQ6 和 Mass41 聚为一支, SAIBk、S14、LX4、BJ 和 Cal99 聚为一支(图 4)。表明除 KQ6 外, 国内分离株

SAIBk、S14、LX4、BJ 的亲缘关系较近。

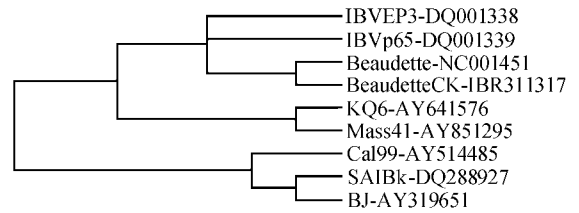
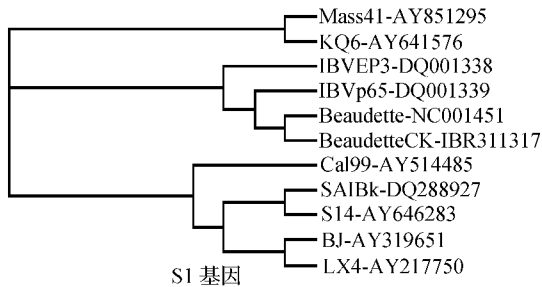
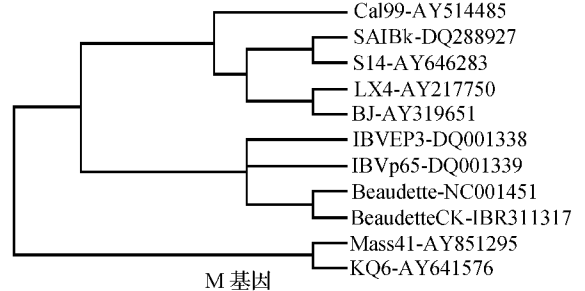


图 3 SAIBk 株基因组序列的系统进化分析

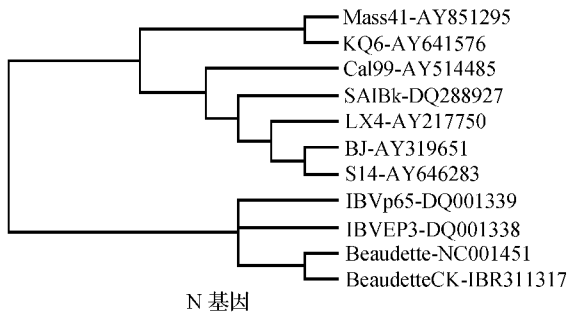
Fig. 3 Phylogenetic analysis of the SAIBk genome sequence



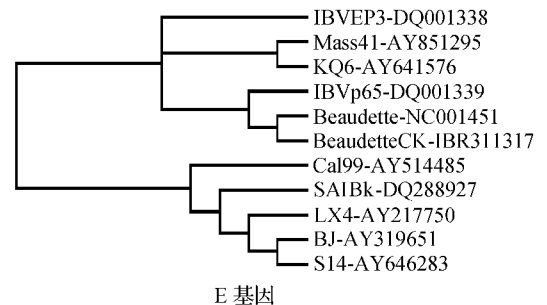
S1 基因



M 基因



N 基因



E 基因

图 4 SAIBk 株结构蛋白基因的系统进化分析

Fig. 4 Phylogenetic analysis of the SAIBk structural protein genes

3 讨论

IBV 为冠状病毒科冠状病毒属的代表种, 其基因组 RNA 是目前所知的 RNA 病毒中最大的。在 GenBank 上已经注册的 IBV 全基因组有 8 株 (Beaudette、BeaudetteCK、IBVp65、IBVEP3、Mass41、Cal99、BJ、KQ6), 而其中的 BeaudetteCK、IBVp65、IBVEP3 均来源于 Beaudette 株, BJ 和 KQ6 为严重急性呼吸综合征(SARS)暴发后测定的中国分离株^[8~11]。以上毒株均为致呼吸病型毒株。本研究用 RT-PCR 方法分段扩增了致肾病变型分离株 SAIBk 株的全基因组, 并完成了片段的克隆与序列测定。SAIBk 株是目前全世界报道的第 6 株

IBV 分离株的全基因组, 特别是 IBV 致肾病变型毒株的全基因组目前国内外未见报道。

由于 IBV 基因组变异较大, 对 IBV 全基因组进行 RT-PCR 扩增时引物的设计是关键。本试验根据 GenBank 上公布的 IBV 基因组序列经多重比较后, 在相对比较保守的区域设计引物, 但在实际扩增中还是遇到了不少困难, 在测序结果基础上经多次调整引物后才获得了所有设计的片段。为了获得完整的基因组序列, 对于基因组末端序列的扩增采用了 5' Full RACE 和 3' Full RACE。SAIBk 株基因组序列全长 27 520 bp (不包括 polyA), 与 Boursenell^[6] 1987 年测定的 Beaudette 株的基因组全长相差 88 bp, 缺失的核苷酸主要分布于基因组

内 4 个高度变异的区域,这些区域内核苷酸的插入或缺失现象很频繁,是造成不同 IBV 毒株基因组长度存在差异的主要原因。对这些高度变异的区域进一步分析发现,具有较近亲缘关系的毒株,某些区域具有相同的插入或缺失序列,因此对插入或缺失区域的研究能更好的反映 IBV 的变异、重组等现象。SAIBk 株与其它 5 株 IBV 的同源性均小于 87.6%,序列的变异较大,是一株相对比较独立的毒株。SAIBk 株不同区域的同源性分析结果表明,3'UTR 和 5'UTR 是基因组中相对最为保守的区域,该区域可能是病毒基因组 RNA 的复制和病毒粒子的装配所必需,因此变异较小;而 S1 基因是基因组中变异最大的区域,与病毒具有不同的组织嗜性和能逃避疫苗的免疫保护等作用有关。系统进化分析结果表明 SAIBk 株与国内分离株 S14、LX4、BJ 的亲缘关系较近。根据 IBV 基因组全序列从分子水平深入研究病毒的变异机制比通过单独研究某个基因片段更为可靠^[12],由于目前能够获取的 IBV 基因组全序列还很少,因此不能更加全面地探讨 IBV 的分子变异机制。本试验丰富了冠状病毒的生物信息数据库,为进一步从分子水平研究 IBV 的致病机理、变异机制等奠定了基础。

参考文献:

- [1] Schalk A K, Hawn M C. An apparently new respiratory disease of baby chicks[J]. J Am Vet Med Assoc, 1931,78:413~422.
- [2] Beach J R, Schalm O W. A filterable virus distinct from that of laryngotrachitis the cause of a respiratory disease of chicks[J]. Poult Sci, 1936,15:199~206.
- [3] Beaudette F R, Hudson C B. Cultivation of the virus of infectious bronchitis[J]. J Am Vet Med Assoc, 1937,90:51~60.
- [4] Wang H N, Wu Q Z, Huang Y, *et al.* Isolation and identification of infectious bronchitis virus from chickens in Sichuan, China[J]. Avian Disease, 1997, 41(2): 279~282.
- [5] 王红宁. 禽传染性支气管炎综合防治[M]. 北京:中国农业出版社, 2000.
- [6] Bournsnel M E C, Brow T D K, Foulds I J, *et al.* Completion of the sequence of the genome of the Coronavirus infectious bronchitis virus[J]. J Gen Virol, 1987, 68:57~77.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁, 黎孟枫, 侯云德, 译. 第 2 版. 北京:科学出版社, 1996.
- [8] Casais R, Thiel V, Siddell S G, *et al.* Reverse genetics system for the avian coronavirus infectious bronchitis virus[J]. J Virol, 2001, 75(24): 12 359~12 369.
- [9] Mondal S P, Cardona C J. Comparison of four regions in the replicase gene of heterologous infectious bronchitis virus strains[J]. Virology, 2004, 324(1): 238~248.
- [10] Fang S G, Shen S, Tay F P, *et al.* Selection of and recombination between minor variants lead to the adaptation of an avian coronavirus to primate cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 336(2): 417~423.
- [11] 金渭武, 陈 晨, 张 莹, 等. 鸡传染性支气管炎冠状病毒北京分离株全基因组序列的测定及其特征分析[J]. 科学通报, 2004, 49(4):352~357.
- [12] 刘兴友, 何宏轩, 姚四新, 等. 鸡传染性支气管炎病毒 TJ9602、HN9604、BJ9601 分离株特性的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(12):1 323~1 328.