

传染性法氏囊病毒基因组、蛋白 和分子致病机理研究进展

朱桂银,王旭东,朱建波

(云南农业大学动物科学技术学院,云南 昆明 650201)

摘要:近年来,由于分子生物学技术的发展,传染性法氏囊病(IBD)的得到了较好的控制。但传染性法氏囊病是一种主要传染幼鸡和雏火鸡的急性、高度接触性、杀淋巴细胞性疾病,可引起免疫抑制进而混合感染或继发感染其它传染性疾病。因此,该病仍引起有关学者的关注。该病由传染性法氏囊病毒(IBDV)引起。主要对该病毒的基因、蛋白及其分子致病机理研究的最新进展进行综述。

关键词:传染性法氏囊病毒;基因组;蛋白质;分子致病机理;七肽区

中图分类号: S 858.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-390X(2007)03-0448-04

Recent Research Advances on the Genome, Proteins and Molecular Pathogenesis of Infectious Bursal Disease Virus

ZHU Gui-yin, WANG Xu-dong, ZHU Jian-bo

(Faculty of Animal Science and Technology, Y A U, Kunming 650201, China)

Abstract: Infectious bursal disease (IBD) is an acute, highly contagious and immunosuppressive disease caused by Infectious bursal disease virus (IBDV) which mainly infects chicks or young turkeys. At present, the IBD was tightly checked due to the application of the state of art, advanced molecular biological techniques in this field. But the immunosuppression initiated by IBDV leads the viral hosts to become increasing susceptible to other pathogens, and reduces the growth rate of the survived infected animals, which is still be pinpointed by many expert in veterinary sciences. In this article, the up-to-dated situation in understanding of the IBDV's genome structure, proteins and the molecular basis of IBDV's pathogenesis are briefly reviewed.

Key words: Infectious bursal disease virus; genome; protein; molecular basis of the pathogenesis; heptapeptide

传染性法氏囊病是鸡的急性、高度接触性、杀淋巴细胞性疾病,主要发生于3~8周龄的幼鸡。其病原传染性法氏囊病毒(Infectious Bursal Disease Virus, IBDV)属于双RNA病毒科(Bimaviridae family)禽双RNA病毒属(Avibirnavirus genus)。其分子结构与本科原型病毒——鱼传染性胰坏死病毒(Infectious Pancreatic Necrosis Virus, IPNV)相

似。法氏囊病毒粒子包含由32个直径12nm壳粒组成的单层衣壳,呈二十面体立体对称,直径约60nm,没有囊膜、表面无突起^[1]。

1 IBDV 基因组及蛋白质

IBDV基因组由A、B两个双链RNA片段组成,均包括5'端非编码区(non-coding region,

收稿日期:2006-10-11

作者简介:朱桂银(1978-),女,吉林蛟河人,硕士研究生,主要从事动物分子传染病学研究。

NCR)、编码区和3'端非编码区。A节段约长3.3 kb, B节段约长2.9 kb。近来,对其基因组结构和相应蛋白质的结构和功能都有了更深入的认识。

1.1 A节段基因结构及相应蛋白质

A节段由5端NCR、两个开放阅读框架(open reading frame, ORF)和3端NCR组成。大ORF编码一个多聚蛋白(NH₂-VP2a-VP4-VP3-COOH),大小为110 kDa,经自动催化裂解变成成熟的pVP2(48 kDa), VP4(28 kDa)和VP3(32 kDa)。pVP2羧基端经过进一步加工就变成成熟的VP2(40 kDa)^[2]。在多聚蛋白中从第8个氨基酸到498位属pVP2, 776~997位属VP3,中间为VP4。小ORF编码一个有145个氨基酸的非结构蛋白VP5(16.5~17 kDa), VP5不是病毒粒子必需的,却与病毒的致病性密切相关^[3]。

1.1.1 VP2基因及其蛋白

VP2是病毒的主要结构蛋白,构成病毒衣壳的外层^[4]。VP2具有血清型特异性,占总结构蛋白的51%,分子量为37~40 kDa,有宿主保护性抗原决定簇,具有至少2~3个中和抗原位点,可以刺激机体产生保护性中和抗体,是一种宿主保护性抗原。该蛋白具有高度疏水性和构象依赖性,抗原变异主要发生在VP2的可变区。

1.1.2 VP3基因及其蛋白

VP3也是病毒的主要结构蛋白,构成病毒衣壳的内层^[4]。VP3为群特异性抗原,占病毒颗粒总蛋白的40%,分子量为32~35 kDa,含有群特异性的抗原决定簇,其诱导的抗体只具有很微弱的中和能力,用病毒免疫机体后最早出现的血清抗体是针对VP3的。VP3不但能与VP1结合而且还可与病毒RNA的A、B节段相连接。VP3的C-末端有许多散在分布的脯氨酸,并形成碱性区,该区域可与核酸发生相互连接,使VP3参与病毒的包装和起稳定病毒RNA的作用。VP3许多区域具有亲水性,它们在与抗体发生反应时发挥作用。而VP3与VP1的相互作用则与病毒复制密切相关^[5]。

1.1.3 VP4基因及其蛋白

VP4在病毒蛋白成熟过程中起重要作用,分子量为24~29 kDa,是一个病毒编码的蛋白酶,在病毒蛋白的成熟过程中起着重要作用。VP4与细菌Lon蛋白酶一样能利用丝氨酸-赖氨酸(Ser-652, Lys-692)裂解位点^[6]。VP4能将NH₂-VP2a-VP4-VP3-COOH蛋白质在两个位点水解从而释放出的VP2和VP3,这是一个自发过程^[7]。

VP4作为一个非结构蛋白与直径24 nm的Ⅱ型通道相连^[8]。VP4与其它已知的蛋白水解酶没有多少相似之处,所以它可能是双RNA病毒科中特有的一种新型蛋白酶^[9]。

1.1.4 VP5基因及其蛋白

VP5包含145个氨基酸,大小为21 kDa,由ORF2编码。ORF2是长为435 bp的小阅读框,与ORF1是两个互相重叠的开放阅读框^[10]。VP5首次是在IPNV中发现, MUNDT E用Western印迹和免疫组化的方法在IBDV感染的CEF和法氏囊中均检测到了VP5。VP5被认为与病毒释放有关^[11]。据报道VP5的缺失能引起IBDV复制速度下降,说明VP5可能与毒力增强有关。又有报道,VP2和VP5都有细胞毒性^[12],而VP5对鸡B淋巴细胞(RP9)的毒性更甚于VP2,能引起细胞的染色质浓缩、DNA降解,出现凋亡小体等特征,但VP5蛋白的缺失并不影响多聚蛋白的加工和病毒的扩增,可更大程度地致弱病毒且不引起囊损伤,也不影响天然宿主的体液免疫应答^[13]。

1.2 B节段基因结构及相应蛋白质

B节段包含5'端NCR, 3'端NCR以及一个连续的ORF,编码一个由878个氨基酸组成的蛋白质即VP1,分子量约为95 kDa。5'端NCR含有一插入茎环结构,可能与基因组复制和表达有关。1988年, MORGAN等最先测定并发表了其cDNA序列。VP1是病毒RNA依赖的RNA聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)^[14],它与病毒RNA转录有关,并具有鸟氨酸转移酶和甲基转移酶的活性。已有研究表明,VP1序列中发现氨基酸的个别变异可能与毒力变化有关。MORGAN等用氨基酸序列分析方法对VP1同其他依赖DNA和单链RNA的聚合酶进行比较,发现VP1与这些酶的保守区之间没有任何同源性,因此,IBDV编码的VP1可能代表新的一类聚合酶,参与双链RNA基因组的复制。

2 IBDV的分子致病机理和毒力变异研究

目前,一般认为IBDV的毒力和抗原性主要由VP2蛋白提供。大量证据证明,整个VP2高变区参与形成一个构象依赖性的抗原表位,能刺激机体产生保护性中和抗体^[15]。该区域因此成为IBDV基因组中研究得最广泛、最深入的一个区段^[16]。BRANDT等用强毒与疫苗株相应区段互换得到的重组病毒进行研究,表明IBDV的致病型的标记位于VP2^[17]。但是,BOOT等用反向遗传技术将超强

毒株 D6948 的 VP2 和致弱毒株 CEF94 的 VP2 置换后, D6948 仍表现出超强毒株的特性, 表明 VP2 不是决定 IBDV 毒力的唯一因素^[18]。

VP2 高变区内包括 3 个十分重要的结构, 即分别由 212 ~ 224 位、314 ~ 324 位氨基酸残基组成的两个亲水区, 和位于第 2 个亲水区之后 (326 ~ 332) 的七肽区 (heptapeptide)^[19], 还有 3 个小的亲水部位。

第 1 个亲水区与构象依赖性抗原表位的构象稳定有关, 第 2 个亲水区为中和抗体结合位点^[20]。删去两个亲水区中任意一个都会导致中和单抗 17/82 无法与 VP2 相结合^[21]。经典 I 型株中这两个亲水区的氨基酸序列是完全保守的。美国变异株 A, E, GLS 等可以突破 IBDV 经典株免疫的保护, 这些变异株在这两个亲水区中都有 1 ~ 2 个氨基酸的改变^[22]。亲水性分析结果显示, 亲水区个别氨基酸的改变, 可以导致亲水区的疏水性增加, 从而改变整个构象依赖性抗原的构象。这可能是变异株抗原性发生变异的主要原因^[19]。1996 年, DORMITORIO 等人提出, 两个亲水区氨基酸的差异可能不是毒株抗原型的决定因素。同时提出 254 位的 S 是变异株的特征性氨基酸。曹永长等也指出, 249 位的 K 和 254 位的 S 是变异株的特征性氨基酸^[23]。

进一步分析发现 VP2 高变区内还有 3 个小的亲水部位, 分别位于 VP2 的 248 ~ 252, 279 ~ 290 和 299 ~ 305 位氨基酸。这 3 个小的亲水部位可能也参与中和抗原表位的形成, 不同毒株间在这 3 个区域内氨基酸的差异导致的亲水性的变化, 也会引起抗原的变异^[24]。

七肽区位于第 2 个亲水区之后的 326 ~ 332 位氨基酸, 多年来被认为是 IBDV 毒力强弱的标志^[25]。强毒株具有保守的富含丝氨酸 (S) 的 SWSASGS 序列, 弱毒株具有较少的丝氨酸, 不具致病力的血清 II 型 OH 株在七肽区内也发生了氨基酸变异。与经典强毒株一样, 已知的超强毒株都具有保守的七肽区 (SWSASGS), 在第 2 个亲水区没有氨基酸的改变, 因此抗原性没有发生大的变化^[26]。

YAMAGUCHI 等将两株人工致弱的商品疫苗株分别在 SPF 鸡和 CEF 细胞中传 5 代, 发现在 SPF 鸡中传 5 代后, 其囊重比减少、毒力增强, 对其 VP2 高变区序列分析发现核苷酸 890 (T - A), 从而使氨基酸 253 (H - Q)。而通过在 CEF 细胞中传 5 代后, 核苷酸 890 (A - T), 相应使氨基酸 253 (Q

- H)。从而推测 VP2 高变区 253 位的氨基酸对 IBDV 的毒力是至关重要的^[27]。BRANDT 采用片段重组和反转录遗传手段也得出了一致的结论: VP2 的 253, 279, 284 位的氨基酸对 IBDV 的毒力、细胞嗜性和致病性紧密相关^[28]。

3 展望

近年来, 由于分子生物学技术的发展, 传染性法氏囊病 (IBD) 的得到了较好的控制。但是传染性法氏囊病是幼鸡的急性、高度接触性、杀淋巴细胞性疾病, 可以引起鸡的免疫抑制进而混合或继发感染其他传染性疾病, 因此, 此病在禽病研究中仍然占据重要地位。IBDV 毒力变异和抗原性的漂移会给 IBD 的防治带来困难, 也一直是研究的热点。目前认为 IBDV 毒力变异是一个综合因素产生的结果。从分子水平对 IBDV 毒力的研究不仅有有望在分子水平上揭示 IBDV 的毒力变异和致病机理, 而且有利于新型疫苗的研制和有效防治措施的建立。

[参考文献]

- [1] DOBOS P, HILL B J, HALLETT R, et al. . Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes [J]. J. Virol, 1979, 32(2): 593 - 605.
- [2] DA COSTA B, CHEVALIER C, HENRY C, et al. . The capsid of infectious bursal disease virus contains several small peptides arising from the maturation process of pVP2[J]. J. Virol, 2002, 76(5): 2393 - 2402.
- [3] YAO K, GOODWIN M A, VAKHARIA V N. . Generation of a mutant infectious bursal disease virus that does not cause bursal lesions[J]. J. Virol, 1998, 72(4): 2647 - 2654.
- [4] CASTON J R, MARTINEZ - TORRECUADRADA J L, MARAVER A, et al. . C terminus of infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the T number for capsid assembly[J]. J. Virol, 2001, 75(22): 10815 - 10828.
- [5] TACKEN M G J, PEETERS B P H, THOMAS A A M, et al. . Infectious bursal disease virus capsid protein VP3 interacts both with VP1, the RNA-dependent RNA polymerase, and with viral double-stranded RNA [J]. J. Virol, 2002, 76(22): 11301 - 11311.
- [6] LEJAL N, DA COSTA B, HUET J C, et al. . Role of Ser - 652 and Lys - 692 in the protease activity of infectious bursal disease virus VP4 and identification of its substrate cleavage sites [J]. J. Gen. Virol, 2000, 81:

- 983 - 992.
- [7] LEJAL N, DA COSTA B, HUET J C, et al. . Role of Ser - 652 and Lys - 692 in the protease activity of infectious bursal disease virus VP4 and identification of its substrate cleavage sites [J]. J. Gen. Virol, 2000, 81 (Pt4): 983 - 992.
- [8] GRANZOW H, BIRGHAN C, METTENLEITER T C, et al. . A second form of infectious bursal disease virus-associated tubule contains VP4 [J]. J. Virol, 1997, 71 (11): 8879 - 8885.
- [9] YAMAGUCHI T, T KONDO, Y INOSHIMA, et al. . In vitro attenuation of highly virulent infectious bursal disease virus; some characteristics of attenuated strains [J]. Avian Dis, 1996, 40: 501 - 509.
- [10] MUNDT E, BEYER J, M. LLER H. Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virus-infected cells [J]. J. Gen. Virol, 1995, 76: 437 - 443.
- [11] LOMBARDO E, MARAVER A, ESPINOSA I, et al. . VP5, the nonstructural polypeptide of infectious bursal disease virus, accumulates within the host plasma membrane and induces cell lysis [J]. Virology, 2000, 277: 345 - 357.
- [12] YAO K, VAKHARIA V N. Induction of apoptosis in vitro by the 17 - kDa nonstructural protein of infectious bursal disease virus; possible role in viral pathogenesis [J]. Virology, 2001, 285: 50 - 58.
- [13] YAO K, GOODWING M A, VAKHARIA V N. Generation of a mutant infectious bursal disease virus that does not cause bursal lesions [J]. Journal of Virology, 1998, 72: 2647 - 2654.
- [14] URSULA I. VON EINEM, ALEXANDER E. GORBALENYA, HORST SCHIRRMIEIER, et al. . VP1 of infectious bursal disease virus is an RNA-dependent RNA polymerase [J]. Journal of General Virology, 2004, 85: 2221 - 2229.
- [15] FAHEY K J, P MEWATERS, M A BROWN K EMY, et al. . Virus-neutralizing and passively protective monoclonal antibodies to infectious bursal disease virus of chickens [J]. Avian Dis. , 1991, 35: 365 - 373.
- [16] DORMITORIO T V, GIAMBRONE J J, DUCK L W. Sequence comparisons of the variable VP2 region of eight infectious bursal disease virus isolates [J]. Avian Dis, 1997, 41: 36 - 44.
- [17] BRANDT M, YAO K, LIU M, et al. . Molecular determinants of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus [J]. J. Virol, 2001, 75: 11974 - 11982.
- [18] BOOT H J, HUURNEA A, HOEKMANA J W, et al. . Rescue of very virulent and mosaic infectious bursal disease virus from cloned cDNA: VP2 is not the sole determinant if the very virulent phenotype [J]. J. Virol, 2000, 74 (15): 6701 - 6711.
- [19] SCHNITZLER D, BERNSTEIN F, MULLER H, et al. . The genetic basis for the antigenicity of the VP2 protein of the infectious bursal disease virus [J]. J. Gen. Virol. , 1993, 74: 1563 - 1571.
- [20] HEINE H G, M. HARITOU P FAILLA, et al. . Sequence analysis and expression of the host-protective immunogen VP2 of a variant strain of infectious bursal disease virus which can circumvent vaccination with standard type I strains [J]. J. Gen. Virol. , 1991, 72 (Pt8): 1835 - 1843.
- [21] AZAD A A, JAGADISH M N, BROWN M A, et al. . Deletion mapping and expression in Escherichia coli of the large genomic segment of a birnavirus [J]. Virology, 1987, 161: 145 - 152.
- [22] LANA D P, BEISEL C E AND SILVA R F. Genetic mechanisms of antigenic variation in infectious bursa disease viruses; analysis of a naturally occurring variant virus [J]. Virus Genes, 1992, 6: 247 - 259
- [23] 曹永长, 毕英佐, 梁志清, 等. 超强 1BDV 毒株宿主保护抗原的分子特征 [A]. 第二届海峡两岸禽病防治研讨会论文集 [C]. 1997, 48 - 56.
- [24] VAN DEN BERG T P, GONZE M, MORALES D, et al. . Acute infectious bursal disease in poultry: immunological and molecular basis of antigenicity of a highly virulent strain [J]. Avian Pathol, 1996, 25: 751 - 768.
- [25] 崔静, 周顺伍, 郭玉璞. 传染性法氏囊病毒 CJ - 801bkf 毒株 VP2 cDNA 基因结构的分析 [J]. 病毒学报, 1995, 11 (3): 234 - 241.
- [26] NAGARAJAN M M, KIBENGE F S B. Infectious bursal disease virus: A review of molecular basis for variations in antigenicity and virulence [J]. Can. J. Vet. Res. , 1997, 61: 81 - 88.
- [27] YAMAGUCHI T, SETIYONO A. Infectious bursal disease live vaccine; change in the virus population during serial passage in chicken embryo fibroblast cell [J]. Avian Dis. , 2000, 44 (2): 284 - 290.
- [28] YAMAGUCHI T, SETIYONO A. Infectious disease live vaccine; change in the virus population during serial passage in chicken embryo fibroblast cell [J]. Avian Dis. , 2000, 44 (2): 284 - 290.