

# IBDV 流行强毒 HQ-b 株与其细胞适应毒生物学特性比较及 VP2、VP5 基因序列分析

杨霞, 周欣, 赵军, 姚惠霞, 王川庆, 王泽霖\*

(河南农业大学禽病研究所, 郑州 450002)

**摘要:** 为了解 IBDV 流行强毒 HQ-b 株囊毒与其细胞适应毒间生物学特性差异及 2 毒株毒力变化与 VP2、VP5 基因变异的关系, 对 2 毒株的细胞适应性、致病性等进行比较, 同时对其 VP2、VP5 基因序列进行分析。结果表明, HQ-b 株囊毒对 CEF、CEK、CELi、DF-1 和 Vero 均不适应, 而细胞适应毒 HQ 株仅不能适应 Vero 细胞、且批内及批间毒价稳定。致病性结果显示 HQ-b 株对 4 周龄 SPF 鸡致死率高达 80%, 是真正的超强毒, 而细胞适应毒致死率已降为 0%。对 VP2 基因高变区研究表明, HQ-b 株具备 IBDV 超强毒株的分子特征, 即 222 A、256 I、294 I 和 299 S; 其细胞适应毒 HQ 株除 222 A→P、256 I→V、294 I→L 和 299 S→N 外, 在 VP2 公认的毒力位点 253(Q→H)、279(D→N)、284(A→T) 位氨基酸也发生改变, 导致细胞适应毒具备经典弱毒株的分子特征, 即 222 P、256 V、279 N、284 T、294 L 和 299 N。对 VP5 基因研究表明: 流行强毒 HQ-b 株也具有 IBDV 超强毒株的分子特征; 其细胞适应毒 VP5 基因有 12 个位点碱基突变并导致 9 处氨基酸变异, 尤其是 ORF 区第 2 个碱基由“T”突变为“C”后, 导致细胞适应毒 VP5 的 N 端丢失了 4 个氨基酸, 这种突变与现有的疫苗毒完全一致。本研究提供了超强毒 HQ-b 培育、驯化后致病性和细胞适应性转变的分子机理, 也丰富了 IBDV 分子流行病学的理论。

**关键词:** 传染性法氏囊病病毒 (IBDV); 培养特性; 致病性; VP2 基因高变区; VP5

中图分类号: S852.659.4

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)06-0928-09

## Comparison of Biological Characteristics and Sequence Analysis of VP2 and VP5 Genes of Infectious Bursal Disease Virus Field Strain HQ-b and Its Cell-adapted Strain HQ

YANG Xia, ZHOU Xin, ZHAO Jun, YAO Hui-xia, WANG Chuan-qing, WANG Ze-lin\*

(Engineering College of Animal Husbandry and Veterinary Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** The objective of this study was to investigate the difference of biological characteristics between infectious bursal disease virus (IBDV) field strain HQ-b and its cell-adapted virus strain HQ, and the relationship between the virulence change and mutation of VP2 and VP5 genes. Cell culture characteristics, pathogenicity to SPF chicken, sequences of VP2 and VP5 genes of the two strains were analyzed and compared. The results showed that the field strain HQ-b can not be adapted to grow in CEF, CEK, CELi, DF-1 and Vero cell lines. Cell-adapted virus strain HQ can be adapted to above cells except for Vero cell line. TCID<sub>50</sub> titers in cultured cells were stable in different lot. It was indicated that the Field Strain HQ-b was a very virulent IBDV strain (vvIBDV). Mortality of 4-week-old SPF chicken infected with HQ-b and HQ was 80% and 0% respectively. The results of VP2 sequence (the hv regions) analyses showed that the Field Strain HQ had vvIBDV conserved amino acids (aa): 222 A, 242 I, 256 I, 294 I and 299 S. The 222th

收稿日期: 2011-06-23

基金项目: 国家农业科技成果转化资金 (2008GB2D000182; 2011GB2D000007)

作者简介: 杨霞 (1973-), 女, 河南扶沟人, 副教授, 博士, 主要从事分子病原学研究, E-mail: liyihan2001@163.com; 周欣 (1978-), 女, 河南信阳人, 研究生, 主要从事分子病原学研究, E-mail: zhouxin20088002@yahoo.cn. 二人共为第一作者

\* 通讯作者: 王泽霖 (1942-), 男, 教授, 主要研究方向为动物传染病, E-mail: wangzelincn@yahoo.com.cn

(A→P), 256th (I→V), 294th (I→L), 299th (S→N), 253th (Q→H), 279th (D→N) and 284th (A→T) aa of HQ were all changed, which caused it having attenuated strain conserved aa: 222 P, 256 V, 279 N, 284 T, 294 L and 299 N. The analyses results of VP5 sequence showed that the HQ-b had molecular characteristics of vvIBDV. HQ virus had 12 mutation sites and 9 of them made the corresponding aa change, especially, the mutation from T to C at the second bp of VP5 gene open-reading-frame of HQ virus caused lose first "ATG" and 4 aa at the N-terminal of VP5 protein. The mutations were very similar to vaccine strains. The research provides the molecular mechanism of alteration of culture properties and pathogenicity for vvIBDV HQ-b after adaption and enriches the molecular epidemiological theory for IBDV.

**Key words:** infectious bursal disease virus; culture characteristics; pathogenicity; hypervariable region of VP2; VP5

传染性法氏囊病 (Infectious bursal disease, IBD) 是由传染性法氏囊病病毒 (Infectious bursal-disease virus, IBDV) 引起鸡的一种高度接触性、免疫抑制性传染病。IBD 主要感染 3 月龄以内的青年鸡, 是目前影响世界养禽业的一种非常重要的疾病, 特别是超强毒株和变异毒株的出现, 给该病的防控带来了更大的挑战<sup>[1-2]</sup>。

IBDV 有 I、II 2 个血清型, 仅 I 型对鸡有致病性<sup>[3-4]</sup>。其基因组为双股 RNA, 由 A 和 B 2 个片段组成, 其中 A 片段包含 2 个部分重叠的开放阅读框 (ORFs), 大 ORF 编码 VP2、VP3 和 VP4 3 种蛋白, 小 ORF 编码非结构蛋白 VP5<sup>[5-8]</sup>。VP2 蛋白既是 IBDV 的主要结构蛋白, 又是重要的宿主保护性抗原, 与病毒中和抗体的诱导与识别、毒力的变异、细胞凋亡等有关。VP2 基因既是 IBDV 重要的毒力基因, 又决定着细胞嗜性<sup>[9-12]</sup>。VP5 是 IBDV 感染过程中具有重要作用的病毒非结构蛋白。文献显示, VP5 蛋白在病毒感染早期有抗细胞凋亡的功能, 与正常病毒相比, 缺失 VP5 的重组病毒可诱导更早期、更严重的细胞凋亡, 显然 VP5 蛋白在 IBDV 的致病性中发挥重要作用<sup>[13-16]</sup>。

本研究拟通过对 IBDV 流行强毒 HQ-b 株囊毒及其细胞适应毒 HQ 株的细胞适应性、对 SPF 鸡致病性等进行比较, 同时分析其 VP2、VP5 基因序列, 进一步研究 HQ 株囊毒与其细胞适应毒的细胞适应性差异及毒株毒力变化与 VP2、VP5 基因变异的关系, 从分子水平探讨造成这种变化的机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 SPF 鸡胚、SPF 鸡

SPF 鸡胚、SPF 鸡购自济南 SPAFS 实验室及

山东省农业科学院家禽研究所实验鸡场。

### 1.2 毒株及细胞

IBDV 流行强毒 HQ-b 株囊毒分离自 1993 年传染性法氏囊感染鸡群; 细胞适应毒 HQ 株是由 HQ-b 株囊毒经鸡胚囊源细胞→鸡胚肾细胞 (CEK)→鸡胚成纤维细胞 (CEF) 多次传代培育、驯化而成的, 经中国兽医药品监察所鉴定的现行灭活苗制苗毒株之一, 由河南农业大学禽病研究所分离、鉴定、培育并保存。

DF-1 细胞是鸡胚源细胞系, 从美国 ATCC 公司购入, 能无限繁殖, 无致瘤性; Vero 细胞为本实验室保存。

### 1.3 仪器和试剂

PTC2000-PCR 仪为 MJ Research Inc 公司产品; 凝胶成像系统为 Alpha Innotech corporation 产品; Taq 酶、dNTPs、pMD18-T vector、JM109 大肠杆菌感受态细胞、DL15000、DL2000 DNA ladder Marker 均为大连宝生物工程有限公司产品; Trizol 为美国 Invitrogen 公司产品; 其他试剂均为国产分析纯。

### 1.4 IBDV 流行强毒 HQ-b 株囊毒和细胞适应毒 HQ 株的细胞适应性比较

1.4.1 细胞适应性 按常规制备 CEF、CEK 及鸡胚肝细胞 (CELi), 培养成单层后分别接种 HQ-b 株和 HQ 株, 置 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养, 逐日观察细胞病变 (CPE), 连传 3 代。另分别取 Vero 细胞和 DF-1 细胞, 将细胞培养至单层后, 接上述病毒, 连续传 3 代。

1.4.2 细胞适应毒 HQ 株在细胞上传代的稳定性 将 HQ 株分别在 CEF 和 DF-1 细胞上连传 10 代, 取各代毒液, 按常规方法<sup>[17]</sup> 测定每代毒液的

TCID<sub>50</sub>,并按 Reed—Muench 法计算 TCID<sub>50</sub>。

### 1.5 HQ-b 株及其细胞适应毒对鸡胚的致病性

将 HQ-b 株的原始囊毒经 28 日龄的 SPF 鸡复活后取囊,参照文献[18]的方法测定其与 HQ 株的半数鸡胚致死量(ELD<sub>50</sub>)。

### 1.6 HQ-b 株及其细胞适应毒对雏鸡的致病性差异

取 28 日龄 SPF 鸡 30 只,随机分成 3 组,每组 10 只,第 1 组每只鸡滴眼滴鼻 1 000 个 ELD<sub>50</sub> HQ-b 株囊毒,第 2 组每只鸡滴眼滴鼻 1 000 个 ELD<sub>50</sub> 细胞适应毒 HQ 株,第 3 组为对照。3 组均饲养在负压隔离器中,观察各组的发病时间、症状、过程,并于第 5 天、第 10 天从各组中取 5 只鸡扑杀,观察囊的病变及计算囊/体质量比及囊指数(BBIX),BBIX < 0.7 即为萎缩。

### 1.7 IBDV 流行强毒 HQ-b 株和细胞适应毒 HQ 株 VP2 与 VP5 高变区的扩增、克隆与测序

参考文献[18、19]分别设计针对 VP2、VP5 的 2 对引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成,引物序列分别如下,VP21 5'-CCCAGAGTC-TACACCATA-3'(位于 737—754 位核苷酸),VP22 5'-TCCTGTTGCCACTCTTTC-3'(位于 1210—1193 位核苷酸);VP51 5'-TCCAGGATG-GAACTCCTCCT-3'(位于起始密码上游);VP52 5'-TCAGTTCACCTCAGGCTTCCT-3'(位于终止密码区)。预计扩增 IBDV VP2 高变区 474 bp 的片段、VP5 为 482 bp 的片段。

分别将 PCR 产物回收纯化后,进行连接和转化,鉴定为阳性的克隆进行序列测定。序列测定由上海生工生物工程技术有限公司完成。

### 1.8 IBDV 流行强毒及细胞适应毒 VP2、VP5 基因的序列分析与系统遗传进化树的构建

首先分别用 Clustalx1.81 软件对来源于流行强毒 HQ-b 株及其细胞适应毒 HQ 株的 VP2、VP5 基因及 GenBank 中已知的超强毒参考株 HK46 和疫苗毒 D78 及其它同源性较高的毒株的序列进行比较,再以基因分析软件 PHYLIP 中的邻位相连法比较,绘制系统进化树,并应用 Bootstrapping 对所建进化树进行评估;同时使用 DNASTAR 中的 MegAlign 及 Protean 程序分别对 2 基因的核苷酸及由其推导的氨基酸进行分析,在此基础上对 VP5 和 VP2 高变区序列进行差异比较与遗传进化分析。

## 2 结果

### 2.1 IBDV 流行强毒 HQ-b 株与其细胞适应毒 HQ 株的细胞培养特性比较

2.1.1 细胞适应性 将流行毒 HQ-b 株与细胞适应毒 HQ 株分别接种于已长成单层的 CEF、CEK、CELi、DF-1 和 Vero 细胞培养物中盲传 3 代。由结果可知, HQ-b 株流行毒在 CEF、CEK、CELi、DF-1 和 Vero 培养物种盲传 3 代都没有 CPE,且盲传培养物 PCR 检测阴性,说明 HQ-b 株不能适应上述几种细胞;而细胞适应毒 HQ 株在 CEF、CEK、CELi、DF-1 上第 1 代培养物就有 CPE,但在 Vero 细胞培养物中盲传 3 代均未见 CPE,且盲传培养物 PCR 检测阴性,可见 HQ 株不能适应 Vero 细胞生长。

2.1.2 细胞适应毒 HQ 株在 CEF 和 DF-1 细胞上的稳定性 将 HQ 毒株分别在 CEF 和 DF-1 细胞上连续传 10 代,取各代的培养毒液作 10 倍系列稀释,分别接种长成单层 CEF 和 DF-1 的 96 孔板上,按常规方法测定每代毒液的 TCID<sub>50</sub>,并对批内、批间进行标准差分析。见表 1。

表 1 试验结果显示细胞适应毒在 CEF、DF-1 细胞上连续传 10 代,其 TCID<sub>50</sub> 的对数分别在 6.7~7.0、7.5~8.3。在 CEF 上多在 36~56 h 出现 CPE,至 72 h 病变超过 75%,毒价稳定;在 DF-1 细胞上多在 12~24 h 出现 CPE,至 36~56 h 病变超过 75%,表现比在 CEF 上更敏感,出现病变更快、毒价更高。

### 2.2 流行强毒和细胞适应毒对鸡胚的致病性

将流行强毒 HQ-b 株及其细胞适应毒 HQ 株接种 SPF 鸡胚测定 ELD<sub>50</sub>,2 个毒株均可在 SPF 鸡胚上复制并使鸡胚致死(表 2),ELD<sub>50</sub> 值相对稳定。

### 2.3 IBD 流行强毒与细胞适应毒株对 SPF 鸡的致病力比较

流行强毒 HQ-b 株与细胞适应毒 HQ 株对 28 日龄的 SPF 鸡的致病力比较见表 3。HQ-b 株的原始囊毒虽已保存了 20 余年,但接种后很快发病,死亡率达 80%,致死率程度仍属超强毒株(vvIBDV),其细胞适应毒株对 SPF 鸡仅有轻度的一过型表现,无一死亡,致死率已降至 0%。

HQ-b 株的原始囊毒组接种后 40 h 有个别鸡出现症状,60 h 左右全部发病,很快表现脱水、死亡。死亡鸡腿部和胸部肌肉严重出血,法氏囊水肿,严重出血,有的囊呈现紫葡萄样;细胞适应毒于感染

后第 72 小时出现厌食、精神不振等,但 1~3 d 很快恢复正常。扑杀部分鸡,可见肌肉少量出血,法氏囊少量出血,萎缩。攻毒后 5 d,2 组鸡均表现法氏囊严重萎缩,原始囊毒组及细胞适应毒组的囊指数分

别为 0.36、0.50;攻毒后 10 d,流行强毒及细胞适应毒组的囊指数分别为 0.28、0.39;可见细胞适应毒 HQ 株组法氏囊萎缩的程度也较 HQ-b 株的原始囊毒株稍轻微些。

表 1 细胞适应毒 HQ 株 1~10 代的 TCID<sub>50</sub> 测定

Table 1 The TCID<sub>50</sub> value of the HQ cell-adapted strain(1 to 10 passaged times)

细胞 Cell	不同代次 lgTCID <sub>50</sub> /0.1 mL lgTCID <sub>50</sub> of different passaged times										批间标准差 Inter-s
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
CEF	6.8	6.8	7.0	7.0	6.75	6.75	6.8	7.0	6.7	7.0	0.12
	6.75	6.7	7	6.75	7.0	6.7	7.0	6.75	6.8	7.0	0.13
	7.0	6.8	6.7	7.0	7.0	7.0	6.7	7.0	7.0	6.8	0.13
	6.7	7.0	7	6.8	6.8	7.0	7.0	6.7	6.8	6.75	0.13
批内标准差 Intra-s	0.13	0.13	0.15	0.13	0.13	0.16	0.15	0.16	0.13	0.13	
DF-1	8.00	7.75	8.00	7.75	7.70	8.00	7.75	8.00	7.75	7.75	0.13
	7.50	7.70	8.00	7.75	8.00	7.70	8.00	7.75	8.00	7.70	0.18
	8.30	8.00	7.70	8.00	8.00	8.30	7.50	8.00	8.00	8.00	0.24
	8.00	7.70	8.00	8.00	7.50	7.70	8.30	7.70	8.00	8.00	0.23
批内标准差 Intra-s	0.33	0.14	0.15	0.14	0.25	0.29	0.34	0.16	0.13	0.16	

表 2 HQ-b 株原始囊毒及其细胞适应毒 ELD<sub>50</sub> 的测定

Table 2 The ELD<sub>50</sub> value of the HQ-b original strain and the HQ cell-adapted strain

毒株 Strain	lgELD <sub>50</sub> /0.1 mL(批内重复)		lgELD <sub>50</sub> /0.1 mL (intra assay)		均值 $\bar{x}$	标准差 <i>s</i>
The HQ-b original strain	7.50	7.50	7.33	7.50	7.46	0.09
The HQ cell-adapted strain	7.00	7.25	7.00	6.84	7.02	0.17

表 3 HQ-b 株的原始囊毒及其细胞适应毒 HQ 株的致病性测定

Table 3 Pathogenicity of the HQ-b original strain and the HQ cell-adapted strain tested

毒株 Strain	攻毒时间/d Challenged time	总数 Total	死亡率/% Death rate	感染率/% Infection rate	攻毒后 5 d 囊指数 BBIX at 5 days after challenge	攻毒后 10 d 囊指数 BBIX at 10 days after challenge
HQ original strain	28	10	80	100	0.36	0.28
HQ cell-adapted strain	28	10	0	100	0.50	0.39

囊指数(BBIX) = (感染鸡囊质量/体质量) / (正常鸡囊质量/体质量)

Bursa body index (BBIX) = (Bursa weight of infected chicken/Body weight of infected chicken)/(Bursa weight of normal chicken/Body weight of normal chicken)

## 2.4 IBDV 流行强毒及其细胞适应毒 VP2 高变区序列比较与遗传进化分析

### 2.4.1 VP2 高变区序列相似性分析 参考文献

[20]方法,选取 D00499、AF362747 做为经典毒株的代表株,以 AF092943、AF362776、D49706 和 NC\_004178 做为超强毒株的代表株,AF133904、

AF281238 做为变异株的代表株, AF499929 为疫苗株的代表株, 并选用其它高度同源株为参考, 对 HQ-b 株及 HQ 株的 VP2 基因高变区进行核苷酸与氨基酸相似性比较。核苷酸比较结果可知, 流行强毒 HQ-b 株 VP2 高变区与超强毒株同源性最高, 相似性为 98.3%~99.2%; 细胞适应毒 HQ 株的 VP2 高变区与疫苗株及致弱毒株同源性最高, 相似性为 99.4%~99.6%。流行强毒与其细胞适应毒 VP2 登陆号分别为 JF812064、JF812065。

根据 HQ-b 株及 HQ 株 VP2 基因高变区的 cDNA 序列推导出其 VP2 位于 203—360 位的氨基酸序列, 并对其进行相似性比对, 结果可知, HQ-b 株 VP2 高变区与中国香港经典超强毒 HK46 株等氨基酸同源性最高, 相似性为 99.4%~100.0%; HQ 株 VP2 高变区则与疫苗株及致弱毒株同源性高, 相似性为 96.2%~98.7%。

2.4.2 VP2 基因高变区的遗传进化分析 按照上述同源性分析的原则分别选取 GenBank 中发表的相应序列, 用分析软件 PHYLIP 中的邻位相连法

构建 VP2 的进化树(图 1A)。由核苷酸进化树可知, 所有毒株可分为 4 个相对独立的群:(1)由超强毒株构成;(2)由经典毒株构成;(3)由致弱毒株和疫苗毒株构成;(4)由变异株构成。流行强毒 HQ-b 株属于超强毒群, 细胞适应毒 HQ 株属于由致弱毒株和疫苗毒株构成的群。

由氨基酸进化树(图 1B)可知, 所有毒株分为 3 个相对独立的群:(1)由超强毒和经典毒株构成;(2)由致弱毒和疫苗毒株构成;(3)由变异株构成。流行强毒 HQ-b 株位于超强毒株和经典毒株构成群的超强毒分支中, 细胞适应毒 HQ-b 株属于由致弱毒株和疫苗毒株构成的群。

2.4.3 流行强毒 HQ-b 株及其细胞适应毒 HQ 株 VP2 高变区核苷酸与氨基酸序列的比较 由 2.4.1 相似性比对可知, 流行强毒 HQ-b 株与其细胞适应毒 HQ 株的 VP2 高变区核苷酸序列有 31 个差异位点, 相似性仅为 93%; 氨基酸序列相似性为 92.4%, 有 12 个氨基酸发生改变; 2 毒株与超强毒株、疫苗株间 VP2 氨基酸差异见表 4。

表 4 IBDV 部分毒株的 VP2 高变区氨基酸差异

Table 4 Amino acid differences of IBDV VP2 hypervariable region

毒株 Strain	氨基酸位点 Amino acid site											
	222	242	249	253	256	279	284	290	294	299	313	330
vvIBDV HK46(AF092943)	A	I	Q	Q	I	D	A	M	I	S	V	S
vvIBDV UK661(NC004178)	A	I	Q	Q	I	D	A	M	I	S	V	S
HQ-b original strain	A	I	Q	Q	I	D	A	M	I	S	V	S
HQ cell-adapted strain	P	V	K	H	V	N	T	L	L	N	M	R
D78(AF499929)	P	V	Q	H	V	N	T	L	L	N	V	R

由表 4 可知: 流行强毒 HQ-b 株具备传染性法氏囊病毒超强毒株的分子特征, 即 222 A、256 I、294 I 和 299 S。细胞适应毒 HQ 株的除上述相应位点发生如下变化: 222 A→P、256 I→V、294 I→L 和 299 S→N 外, 在 VP2 公认的毒力位点 253、279、284 位氨基酸也发生改变, 分别由 Q→H、D→N、A→T, 使得该毒株具备经典弱毒株的分子特征, 即 222 P、256 V、279 N、284 T、294 L 和 299 N。

对氨基酸亲水性及抗原表位分析表明, 流行强毒 HQ-b 株 VP2 编码的衣壳蛋白在 210—224 位、314—324 位和 340—347 位的氨基酸残基处有较高的亲水性, 在 210—218 位、276—291 位、297—304

位和 312—327 位可能存在较高的抗原表位; 适应毒 HQ 株 VP2 编码的衣壳蛋白在 210—225 位、281—290 位、314—324 位和 340—347 位的氨基酸残基处有较高的亲水性, 在 210—218 位、241—245 位、280—288 位、297—304 位、312—332 位可能存在较高的抗原表位; 由上可知, 在 VP2 编码区细胞适应毒在 281—290 区亲水性比流行强毒明显、且多 1 个 241—245 位的抗原表位区, 其余亲水区与抗原表位仅轻微差异(见图 2A)。

## 2.5 IBDV 流行强毒及其细胞适应毒 VP5 序列比较与遗传进化分析

2.5.1 VP5 基因序列同源性的分析 按照上述

VP2 分析的原则分别选取 GenBank 中发表的相应序列进行核苷酸与氨基酸同源性比较。核苷酸比较结果可知, HQ-b 株 VP5 序列与超强毒株同源性最高, 相似性为 99.1%~99.6%; HQ 株 VP5 序列与疫苗株及致弱毒株同源性最高, 相似性为 99.3%~99.6%; HQ-b 株与 HQ 株 VP5 登录号分别为 JF812066、JF812067。

氨基酸同源性比较结果可知, HQ-b 株 VP5 序列与超强毒序列同源性最高, 相似性为 97.3%~98.7%; HQ 株 VP5 序列与疫苗株及致弱毒株同源性最高, 相似性为 98.6%~99.3%。

2.5.2 VP5 基因的遗传进化分析 同上原则分别选取 GenBank 中发表的相应序列, 用分析软件 PHYLIP 中的邻位相连法构建 VP5 的进化树(图 1)。由 VP5 核苷酸进化树可知, 所有毒株可分为 2 个相对独立的群:(1)由超强毒株构成;(2)由经典毒株、变异株、致弱毒株和疫苗毒株构成; HQ-b 株位

于超强毒株群中, HQ 株位于经典毒株、变异株、致弱毒株和疫苗毒株构成的群, 并分布于由致弱毒株和疫苗毒株构成的分支。

由 VP5 氨基酸进化树可知, 所有毒株可分为 2 个相对独立的群:(1)由超强毒株构成;(2)由经典毒株、变异株、致弱毒株和疫苗毒株构成; 流行强毒 HQ-b 株位于超强毒株群中, 细胞适应毒 HQ 株位于经典毒株、变异株、致弱毒株和疫苗毒株构成的群, 且分布于由致弱毒株和疫苗毒株构成的分支。

2.5.3 IBDV 流行强毒及其细胞适应毒的 VP5 基因核苷酸与氨基酸序列的比较 由 2.5.1 同源性比对可知, HQ-b 株与其细胞适应毒 HQ 株的 VP5 序列相似性仅为 97.1%, 二者核苷酸有 12 个差异位点; 2 毒株的 VP5 氨基酸相似性仅为 94.6%, 有 9 个氨基酸发生改变, 2 毒株与超强毒株、疫苗株间 VP5 氨基酸差异见表 5。

表 5 IBDV 部分毒株间 VP5 氨基酸差异

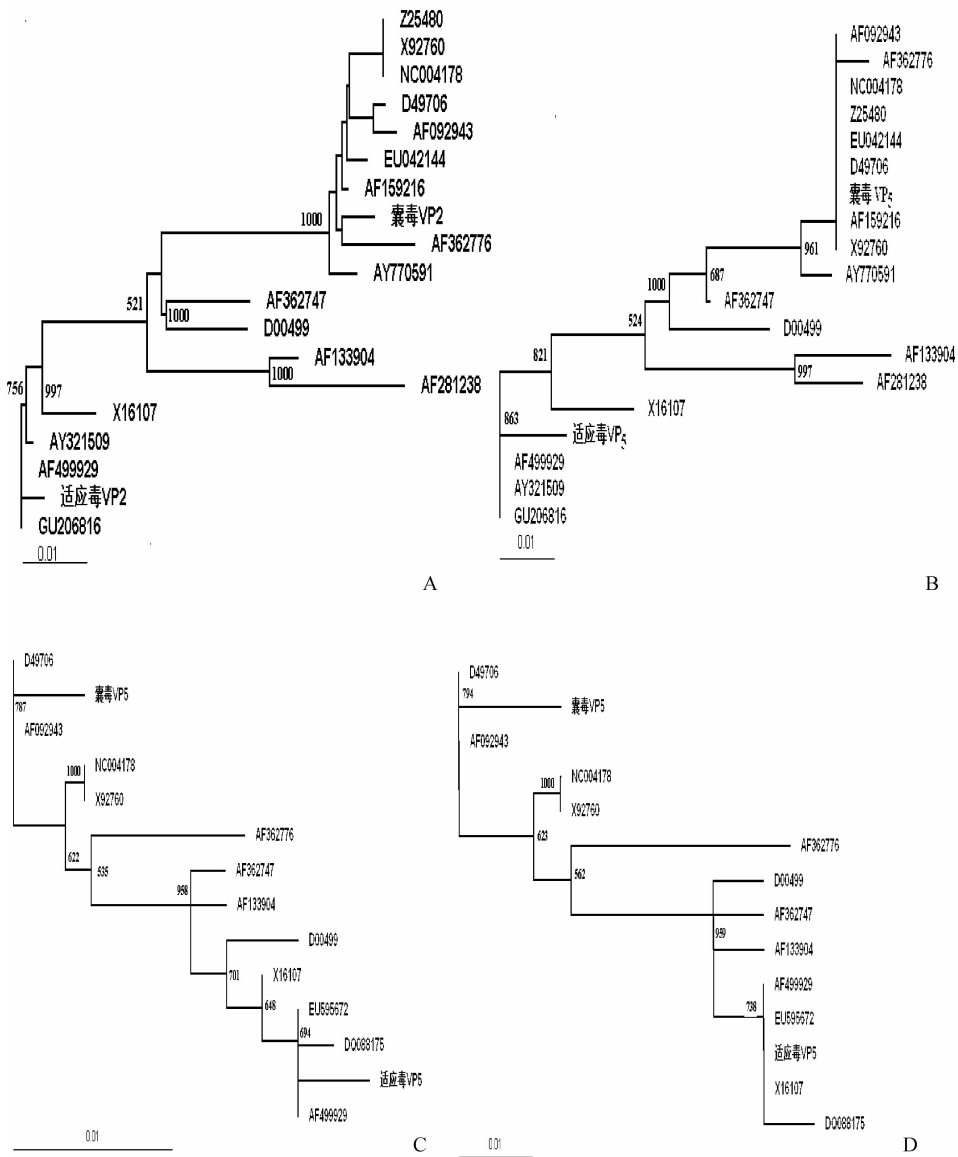
Table 5 Amino acid differences of IBDV VP5 region

毒株 Strain	氨基酸位点 Amino acid site							
	1	18	21	43	49	78	101	129
vvIBDV HK46(AF092943)	M	E	R	H	R	F	A	P
vvIBDV UK661(NC004178)	M	K	R	H	R	L	A	P
HQ-b original strain	M	E	R	R	R	F	T	P
HQ cell-adapted strain	T	K	-	H	G	I	A	S
D78(AF499929)	T	K	R	H	G	I	A	S

由表 5 可知, 流行强毒 HQ-b 株具有传染性法氏囊病毒超强毒株的分子特征; HQ-b 株的原始囊毒在细胞适应过程中 VP5 基因的 ORF 区有 12 个位点碱基突变并导致 9 处氨基酸变异, 特别是 ORF 的第 2 个碱基由“T”突变为“C”后, 使起始密码子后移了 12 个碱基, 虽然从氨基酸比对上起始端仅第 1 位氨基酸改变, 实际由移位而导致细胞适应毒 VP5 的 N 端丢失了 4 个氨基酸。这种突变与现有的疫苗毒完全一致。这似乎表明, VP5 的这些突变与致病性相关; 其它变异: 18 位 E→K, 21 位 R→缺失, 43 位 R→H, 49 位 R→G, 78 位 F→I, 101 位 T→A, 129 位 P→S, 137 位 W→R。结合病毒的适应过程及增殖量的变化, 以上 VP5 基因的变异更可能与

适应细胞培养或在细胞培养上的复制能力密切相关。

对氨基酸亲水性及抗原表位分析表明, HQ-b 株 VP5 编码的蛋白在 7—72 位、88—112 位和 116—149 位的氨基酸残基处有较高的亲水性, 在 6—74 位、96—111 位、116—132 位和 137—149 位可能存在较高的抗原表位; HQ 株 VP5 编码的蛋白在 7—71 位、87—111 位和 113—149 位的氨基酸残基处有较高的亲水性, 在 6—73 位、94—110 位、115—129 位和 132—149 位可能存在较高的抗原表位, 由上可知, 在 VP5 编码区 HQ 株与 HQ-b 株亲水区及抗原表位基本一致(图 2B)。



A. VP2 的核苷酸; B. VP2 的氨基酸; C. VP5 的核苷酸; D. VP5 的氨基酸; 欧洲超强毒 UK661 (NC\_004178, X92760), 中国香港经典超强毒 HK46 (AF092943), 日本超强毒株 OKYM (D49706), 孟加拉国超强毒株 BD 3/99 (AF362776), 经典毒株 Cu-1wt (AF362747), 经典毒株 STC (D00499), 变异株 Variant E (AF133904), 变异株 T1 (AF281238), 疫苗株 D78 (AF499929), 英国超强毒 (Z25480), 西班牙超强毒 SP/33/02 (AY770591), 德国超强毒 K357/88 (AF159216), 中国超强毒 HLJ-8 (EU042144), 台湾疫苗株 P98/19 (GU206816), 欧洲细胞毒株 CU-1 (X16107), 中国浙江 NB 株 AY321509 (EU595672), 疫苗株 D78 (AF499929), 中国浙江 TL2004 (DQ088175)

A, B, C, D stand for phylogenetic tree of VP2 nucleotide, VP2 amino acid, VP5 nucleotide, VP5 amino acid, respectively

图 1 VP2、VP5 的核苷酸及氨基酸进化树  
 Fig. 1 Phylogenetic tree generated by the neighbour-joining method for nucleotide and amino acid sequence of VP2, VP5 of IBDV from Chicken Bootstrap values are 1 000 replications

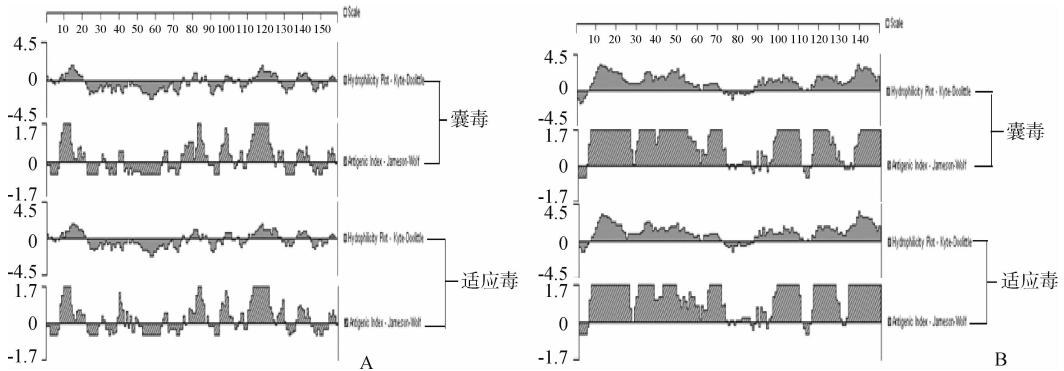
### 3 讨论

本研究对 1993 年 IBD 大流行时收集和保存下来的 IBDV 流行毒 HQ-b 株与其经过培育、驯化的细胞适应毒 HQ 株进行了细胞培养特性、鸡胚致病力、SPF 鸡致病性比较试验及 VP2、VP5 序列分析,

结果表明, 2 毒株对细胞的适应性存在明显差异, 且 HQ 毒株对 DF-1 细胞更为敏感, 出现病变快、毒价更高; 对 SPF 鸡致病性方面, HQ-b 株对 4 周龄 SPF 鸡的感染率达 100%, 死亡率均达 80%, 剖检具有明显的超强毒感染特征; 其细胞适应毒 HQ 株无一死亡, 但均导致法氏囊迅速萎缩, 由此说明适应毒虽然

致病性大大下降,但仍保留有超强毒的某些特性,在抗原性和免疫原性上也没有发生根本改变;对 HQ-b 株和 HQ 株 VP2 基因高变区及 VP5 全基因进行克隆与序列分析结果表明:HQ-b 株具有超强毒株的分子特征,即 VP2 蛋白中含有 vvIBDV 所具有的 222A、256I、294I 和 299S 4 个特征氨基酸<sup>[11]</sup>;其 VP5 核苷酸序列、氨基酸序列均与超强毒同源性最

高,在遗传进化分析中均处于超强毒分支。细胞适应毒 HQ 株具有疫苗毒或致弱毒株的分子特征,即 VP2 蛋白中 222 位的 A 被 P 代替使 IBDV 毒力减弱,284T 是弱毒株的特征性氨基酸<sup>[11]</sup>,其 VP5 核苷酸、氨基酸序列均与疫苗毒株同源性最高,且在遗传进化分析中均处于疫苗毒与致弱毒分支。



A. VP2; B. VP5

A, B respectively for IBDV VP2 and VP5 protein of HQ strain

图 2 HQ 囊毒及其适应毒 VP2 高变区、VP5 氨基酸分析

Fig. 2 Aanalysis of antigenic epitopes and hydrophilicity of IBDV VP2 and VP5 protein of HQ strain

VP2 蛋白是法氏囊病毒的主要宿主保护性抗原。而 2 个大亲水区(212—224 aa, 314—324 aa)与病毒抗原性有关,在 2 个亲水区之间存在 2 个小亲水区,即 248—252 aa 和 279—290 aa,也与 IBDV 的抗原性有关。紧接第 2 个亲水区后是 1 个富含丝氨酸(S)的七肽区(326—332 aa),与毒力有关<sup>[17]</sup>,这些区域内的氨基酸的改变可能引起 VP2 抗原性改变,造成抗原变异。在本研究中,与流行强毒 HQ-b 株相比其细胞适应毒 HQ 株的 2 大亲水区的 222 位点(A→P)、313 位点(V→M)氨基酸发生变异,2 个小亲水区内 249(Q→K)、279(D→N)及 284(A→T)位氨基酸均发生变异;七肽区的 330 位(S→R)发生改变,这些可能都是导致细胞适应毒毒力减弱的原因;另外,VP2 是 IBDV 重要的毒力基因也决定细胞嗜性。目前,VP2 的 253、279、284 位氨基酸是公认的毒力位点和细胞嗜性的分子基础集中位点<sup>[9-12]</sup>,该位点的改变对病原毒力及细胞嗜性产生很大影响。本研究中 IBDV 流行毒 HQ-b 株与其细胞适应毒 HQ 株间的 VP2 氨基酸在 3 个公认的位点——253(Q→H)、279(D→N)、284(A→T)也均发生改变,这也可能是细胞适应毒株细胞适应性发生改变的原因;另外,据文献可知,大多 IBDV 细胞适应毒均能适应 Vero 细胞,而本适应毒对 Vero 细

胞的不能适应,是否是由于这些氨基酸改变的结果还需更深入的探讨。

VP5 蛋白是由 IBDV 的 A 节段中小 ORF 编码的非结构蛋白,发现较晚<sup>[16]</sup>,很多资料显示 VP5 在病毒复制和致病性方面扮演着重要的角色<sup>[21]</sup>。鉴于 HQ-b 的原始囊毒在细胞上传代后其对鸡的致病性减弱的同时,VP5 基因的 ORF 区有 12 个位点碱基突变并导致 9 处氨基酸变异,特别是 ORF 的第 2 个碱基由“T”突变为“C”后,使起始密码子后移了 12 个碱基,因而导致细胞适应毒 HQ 株 VP5 的 N 端丢失了 4 个氨基酸。这种突变与现有的疫苗毒完全一致。这似乎表明,VP5 的这些突变与致病性相关。但是,对已发表的不同的超强毒及强毒株的 VP5 基因比较表明,一部分超强毒 IBDV 的 VP5 基因与 HQ-b 株 VP5 基因相同,而另一部分超强毒株 IBDV 的 VP5 基因与 HQ 株的 VP5 基因相同(表 5)。由此推测,超强毒 HQ-b 株在细胞上传代适应过程中 VP5 基因那 12 个位点的突变更可能与细胞适应性相关。另外,与超强毒株、疫苗株相比, HQ 株细胞适应毒丢失了位于 21 位的氨基酸,这是与细胞适应特性改变有关,还是与毒力变异相关在以后的研究中将做深入研究。

另外,本研究中 HQ 细胞适应毒对 Vero 细胞



的不适应性、在 DF-1 细胞上的毒价较高、虽具有疫苗株与弱毒株的分子特征等但又能使法氏囊迅速萎缩等,这些是否由于以上位点氨基酸改变而真正造成,还有待于进一步深入研究。

综上所述,通过对细胞适应性、致病性、VP2 及 VP5 同源性比较和遗传进化分析等的研究进一步证实 IBDV 流行强毒 HQ 株是 1 株有代表性的超强毒株,且与中国香港超经典超强毒 HK46、国外(主要是日本和欧洲)vvIBDV 有密切的亲缘关系。经培育而成的细胞适应毒 HQ 株在致病性上大大减弱,在分子水平上也发生了核苷酸与氨基酸的变化,出现了致弱毒株的分子特征,但该毒株仍保留有超强毒株的某些特性,抗原性和免疫原性没有发生根本改变,且对 DF-1 细胞表现更为敏感,出现病变更快、毒价更高,因而可将它在 DF-1 细胞上、生物反应器上大量繁殖,制备法氏囊灭活疫苗,更好地为生产服务。

#### 参考文献:

[1] 袁维峰,吴保明,张鑫宇,等. 三株鸡传染性法氏囊病毒弱毒株的分离与分子鉴定[J]. 中国动物传染病学报,2009,17(1):29-32.

[2] GAO Y,IAU W,GAO H,et al. Effective inhibition of infectiou bursal desease virus replica ion in virtro by DNA vector-based RNA interference[J]. *Antiviral Res*, 2008,79(2):89-94.

[3] MCFERRAN J B,MCNULTY M S,MCKILLOP E R,et al. Isolation and serological studies with Infectious bursal disease viruses from fowl, turkeys and ducks;demonstration of a second serotype [J]. *Avian Pathol*, 1980,9(3):395-404.

[4] VAN B T,ETERRADOSSI N,TOQUIN D,et al. Infectious bursal disease(Gumboro disease)[J]. *Rev Sci Tech*, 2000,19(2):509-543.

[5] 高玉龙,高宏雷,邓小芸,等. 鸡传染性法氏囊病毒 VP2 基因的原核表达与抗原分析[J]. 中国生物制品学杂志,2006,19(2):143-145.

[6] 朱桂银,王旭东,朱建波. 传染性法氏囊病毒基因组、蛋白和分子致病机理研究进展[J]. 云南农业大学学报,2007,22(3):448-451.

[7] WEI Y,YU X,ZHENG J,et al. Reassotrant infectious bursal desease virus isolated in China[J]. *Virus Res*, 2008,131(2):279-282.

[8] DENG X Y,GAO Y L,GAO H L, et al. Identincation of VP3 antigenic epitopes of infectious bursal desease virus[J]. *Bing Du Xue Bao*, 2007, 23(4):305-311.

[9] BOOT H J,TER H A,PEETERS B P. Generation of

full-length cDNA of the two genomic dsRNA segments of infectious bursal disease virus[J]. *J Virol Methods*,2000,84(1):49-58.

- [10] 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(24):11974-11982.
- [11] VAN LOON A A, DE HAAS N, ZEYDA I, et al. Alteration of amino acidsin VP2 of very virulent infectious bursal disease virus results in tissue culture adaptation and attenuation in chickens[J]. *J Gen Virol*, 2002, 83(1): 121-129.
- [12] BOOT H J, TER H A, HCEKMAN A J, et al. Rescue of very virulent an mosaic infectious bursal disease virus from cloned cDNA; VP2 is not the sole determinant of the very virulent phenotype [J]. *J Virol*, 2000, 74 (15) :6701-6711.
- [13] MILLER H, ISLAM M R, RAUE R. Research on infectious bursal disease—the past, the present and the future[J]. *Vet Microbiol*, 2003,97:153-165
- [14] 张厚双,王笑梅,高宏雷,等. 传染性法氏囊病超强毒 Gx 株的 VP5 基因在病毒致弱过程中变异规律的研究[J]. 中国预防兽医学报,2005,27(1):25-28.
- [15] 高立,祁小乐,秦立廷,等. 鸡传染性法氏囊病病毒超强毒株 HLJ-0504 VP5 基因缺失株感染性克隆的构建及鉴定[J]. 中国动物传染病学报,2010,18(2):1-7.
- [16] LIU H J, HUANG P H, WU Y H, et al. Molecular characterisation of very virulent infectious bursal disease viruses in Taiwan [J]. *Res Vet Sci*, 2001, 70 (2): 139-147.
- [17] CUI X, NAGESHA H S, HOLMES I H. Identification of crucial residues of conform ational epitopes on VP2 protein of infectious bursal disease virus by phage display [J]. *J Virol Methods*, 2003, 109(1):75-83.
- [18] 朱秀同. IBDV 超强毒 GX8/99 株细胞适应毒和回鸡毒的致病性、免疫原性及 VP5 基因的比较[D]. 泰安:山东农业大学,2007.
- [19] SAPATS S I, IGNJATOVIC J. Antigenic and sequence heterogeneity of infectious bursal disease virus strains isolated in Australia[J]. *Arch Virol*, 2000, 145:773-785.
- [20] JACKWOOD D J, SOMMER-WAGNER S. Genetic characteristics of infectious bursal disease viruses from four continents [J]. *Virology*, 2007, 365(2):369-375.
- [21] QIN L T, QI X L, GAO Y L, et al. VP5-deficient mutant virus induced protection against challenge with very virulent infectious bursal disease virus of chickens[J]. *Vaccine*, 2010, 28: 3735-3740.