

IBDV B87 株不同鸡胚代次毒力和细胞嗜性差异的比较研究

陈玲,蒋桃珍*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2015-05-04 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2015) 10-0005-05 [中图分类号] S858.31

[摘要] 对 IBDV 疫苗株 B87 的鸡胚传代毒 E2 和 E6 的 VP2 片段进行测序和分析,发现两个代次毒株 VP2 序列存在 7 个氨基酸的差异,即 S76G、L217S、Q253H、D279N、A284T、I294L、S330R。将 E2 和 E6 接种 CEF 细胞,E2 不能在 CEF 上增殖,而接种 E6 的 CEF 细胞可以产生明显的 CPE,说明两个毒株对 CEF 的嗜性不同。分别将 E2 和 E6 接种 3 周龄 SPF 鸡,对鸡的毒力进行比较,接种后第 7 天开始,E2 出现囊体比下降,BB 指数明显低于 E6,相应的法氏囊切片经 HE 染色后,接种 E2 的法氏囊滤泡萎缩严重,结构松散,E6 只有部分滤泡出现萎缩,滤泡间隔基本正常,说明 E2、E6 对 SPF 鸡法氏囊毒力存在明显差异。根据两个毒株的 VP2 序列差异以及相关研究,推测 Q253H/D279N/A284T 三个位点突变可能是 IBDV 毒力和细胞嗜性差异的分子基础,但另外 4 个位点也可能对 IBDV 毒力差异产生影响。

[关键词] 传染性法氏囊病毒;VP2 基因;毒力差异;细胞嗜性

Study on Virulence and Cell Tropism Difference of IBDV B87 Passage Strains in Chicken Embryo

CHEN Ling,JIANG Tao-zhen*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Abstract: E2 and E6 were passage strains of moderate virulent vaccine strain B87 in chicken embryo, VP2 was sequenced and analyzed, and there are 7 amino acid mutations in VP2 between E2 and E6, S76G, L217S, Q253H, D279N, A284T, I294L, S330R. CEF were infected with E2 and E6, E2 could not adapt to CEF, but E6 could induce CPE. 3-weeks SPF chickens were inoculated to compare the safety difference of the two strains, then bursas of Fabricius from each group were removed and evaluated for histopathologic lesions at 3 d, 7 d, 14 d and 21 d, separately, and the bursa to body weight ratio and bursa: body-weight index (BB Index) were also determined. Chicken experiments reveal that the bursa to body weight ratio of SPF chickens infected with E2 began to decrease from 7 days post inoculation, and the BB Index of E2 was also much lower than that of E6. Bursas of chicks inoculated with E2 show atrophy and loss of the follicular architecture at 7 days post infection,

作者简介: 陈玲,硕士研究生,从事预防兽医学研究。

通讯作者: 蒋桃珍。E-mail: taozhen_jiang@163.com

while bursas of that inoculated with E6 had a small part of follicles atrophy, with normal follicular connective tissues. This study suggests that mutations of Q253H/D279N/A284T may be the molecular basis of virulence and cell tropism, but the other 4 mutations may also influence the virulence of IBDV.

Key words: IBDV; VP2 gene; virulent difference; cell tropism

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)引起的雏鸡的一种急性、高度接触性传染病,给世界养禽业造成了严重的经济损失^[1]。VP2 是 IBDV 的主要宿主保护性抗原,病毒的抗原变异、细胞嗜性和毒力强弱都与 VP2 的高变区密切相关,但是具体的毒力位点尚存在争议^[2-3]。

1987 年以来,超强毒株 (very virulent IBDV, vvIBDV)的出现和流行使得 IBDV 成为危害世界养禽业的重要病源之一^[4],随着反向遗传学的发展,尤其是 1996 年 vvIBDV 反向遗传操作系统的建立^[5],越来越多的研究集中在 vvIBDV 的细胞嗜性和毒力位点上,取得了较大的进展,但具体的毒力位点仍没有确定。本研究从中等毒力疫苗株 B87 入手,通过分析不同鸡胚传代毒株 E2 和 E6 的 VP2 序列变化,比较两个毒株细胞嗜性和对 SPF 鸡毒力差异,探究 IBDV 的细胞嗜性和毒力位点,对于明确 IBDV 毒力变异的分子基础,探索 IBDV 致弱的方法和疫苗研发具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 种毒 IBDV B87 E2 (AV140 1987.05), E6 (AV140 2010.12)为本所保藏。

1.2 SPF 鸡和鸡胚 三周龄 SPF 鸡和 SPF 鸡胚均购自北京梅里亚维通公司。

1.3 菌株、载体和主要试剂 大肠杆菌 JM109 感受态细胞、RNA 提取试剂盒、DNA Marker 为 Takara 产品;Reverse Transcription System 为 Invitrogen 公司产品;pfu 高保真聚合酶为 Promega 公司产品;Zero - TOPO 载体购于 Clonesmarter 公司;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒为 Omega 产品;DMEM/F12 (1:1), Foetal Bovine Serum 为 GIBCO 产品。

1.4 PCR 引物设计和合成根据 GeneBank 中

IBDV B87 株 VP2 序列,利用引物设计软件 Primer 5.0,在 A 片段的上半段设计一对引物(表 1),由上海立菲生物科技有限公司合成。

表 1 VP2 扩增引物

引物名称	序列(5' to 3')	位置
A5	TCCTTCTACAACGCTATCA	75 ~ 93
A3	TACCTCGTACCCCTTGTC	1670 ~ 1687

1.5 IBDV 基因组 RNA 的提取 参照 Takara MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver. 5.0 说明书进行。

1.6 RT - PCR 根据反转录试剂盒说明,用随机引物作为反转录引物,对提取的 RNA 进行反转录。以反转录产物为模板,以 A5/A3 为引物进行 PCR 扩增。反应体系:10 × Buffer 5 uL, dNTP 4 uL, A5、A3 (10 umol/L) 各 2 uL, 模板 5 uL, pfu 0.5 uL, ddH₂O 31.5 uL;反应条件:95 ℃ 2 min;95 ℃ 40 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 3 min, 30 个循环;72 ℃ 10 min。取 5 uL PCR 产物,用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检查 PCR 扩增结果。

1.7 PCR 产物的克隆和鉴定 将 PCR 产物回收后,与 pCloneEZ - TOPO 载体连接,转化到 JM109 细胞,取 100 uL 涂布含有氨苄的 LB 琼脂,37 ℃ 过夜培养。利用菌落 PCR 的方法鉴定重组子,挑选阳性克隆送往上海立菲生物技术有限公司测序。

1.8 E2、E6 在 CEF 上的增殖 按照《中国兽药典》中鸡胚成纤维细胞的制备方法,制作 CEF 细胞,分装到 T25 细胞瓶中,细胞密度为 10⁶/mL。将 E2 和 E6 毒株稀释 100 倍,分别取 1 mL 同步接种 9 mL CEF 细胞,37 ℃ 5% CO₂ 培养 72 h。

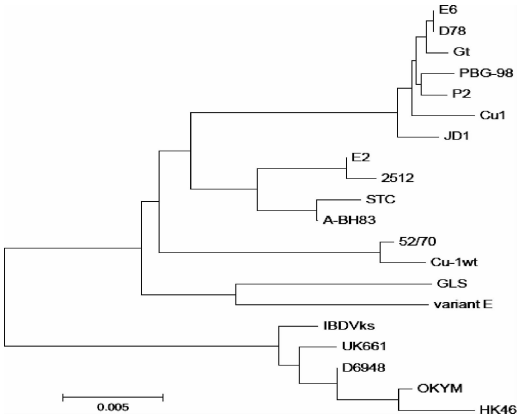
1.9 E2、E6 对 SPF 鸡的毒力比较 75 只三周龄 SPF 鸡随机分成三组,每组 25 只,第一组和第二组作为试验组,其余为对照组;分别将 E2 和 E6 进行 10 × 稀释,点眼接种 25 只 SPF 鸡,0.2 mL/只;在接种后 3 d、7 d、14 d 和 21 d,每组取 5 只 SPF 鸡致死,称取鸡重,碘酊涂抹后采囊,观察有无明显病变,称取法氏囊重量,并收集

不同时间的法氏囊,保存在 10% 中性福尔马林液中,用于制作病理切片。

2 结果与分析

2.1 E2、E6 VP2 序列 比较从 E2 和 E6 VP2 氨基酸水平系统进化树(图 1)可以看出,E2 和 E6 位于不同的分支上,E6 与弱毒株处于同一进化群,而 E2 则与经典毒株亲缘关系更近一些。

E2 和 E6VP2 氨基酸序列差异如表 2 所示。E2 和 E6 在 VP2 上有 7 个氨基酸差异,其中 253、279 和 284 是目前研究最多的三个位点,与 IBDV 的毒力和细胞嗜性密切相关;294I 是 vvIBDV 的特征性氨基酸之一;330 位于富含丝氨酸的七肽区(S-W-S-A-S-G-S),该区域通过氢键影响分子内部或分子间的相互作用从而影响毒力;另外两个位点 76 和 217,目前没有相关文献报道。



D78、Gt、PBG-98、P2、Cu1、JD1 为弱毒株;
STC、A-BH83、52/70、Cu-1wt 为经典毒株;
GLS、variant E 为变异株;
IBDVks、UK661、D6948、OKYM、HK46 为超强毒株;
2512 为中等毒力疫苗株

图 1 E2 和 E6 VP2 氨基酸水平系统进化树

表 2 E2 和 E6VP2 上存在差异的氨基酸位点

毒株	76	217	253	279	284	294	330
E2	S	L	Q	D	A	I	S
E6	G	S	H	N	T	L	R

2.2 E2 和 E6 对 CEF 细胞嗜性比较 E6 在接种 CEF 后 24 h,开始出现细胞病变,细胞团聚,碎裂,折光性增强,呈砂砾状,48 h 细胞病变加剧;E2 在接种后 72 h,一直没有出现 CPE。结果说明 E2 和 E6 对 CEF 细胞嗜性存在差异,E6 可以在 CEF 上增殖,但是 E2 不能适应 CEF 培养。

2.3 E2 和 E6 对 SPF 鸡的毒力比较 实验过程中,所有的 SPF 鸡均没有出现死亡或者 IBD 的典型临床症状,接种后 3 d,法氏囊均没有出现胶冻样水肿、出血等法氏囊强毒感染后的特征性病理变化,接种两个代次毒的法氏囊大小也与正常对照相似。但接种后 7d 开始,E2 代接种鸡法氏囊明显萎缩,其两个代次毒接种后不同时间的囊体比和 BB 指数分别见图 2 和图 3。

图 2 结果显示,E2 与 E6 株在接种后 3 d,囊体比与对照没有差异,E6 株在接种后 14 d 出现短暂性的法氏囊萎缩,21 d 时恢复正常;E2 株从接种后 7 d 开始,囊体比明显下降。

从图 3 可以看出,与囊体比指标一致,E2 与 E6 株在接种后 3 d 时,BB 指数相同。E6 株在接种后

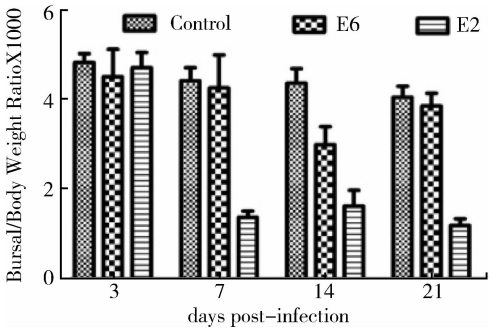
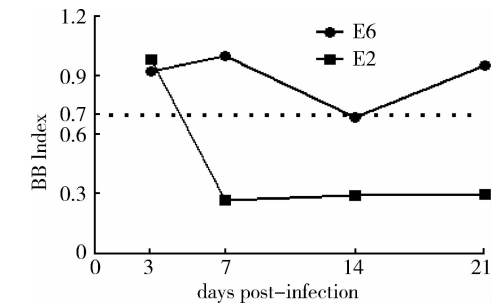


图 2 接种 E2、E6 的 SPF 鸡囊体比

第 14 天 BB 指数为 0.69,略低于 0.7,其余时间点均高于 0.7。E2 株从第 7 天开始,BB 指数明显下降,维持在 0.3 左右。

2.4 法氏囊的病理组织学变化 结果见图 4。接种 E6 的 SPF 鸡在第 3 天法氏囊部分滤泡出现轻微萎缩,接种后 7 d,滤泡淋巴细胞开始流失,滤泡间隔增宽,第 14 天开始恢复,21 d 基本正常。E2 在接种后 3 d 少量滤泡开始萎缩,髓质中淋巴细胞出现流失,7 d 和 14 d 滤泡间结缔组织增生,间隔变宽,滤泡变小,大量淋巴细胞流失,21 d 萎缩开始恢复。



BB 指数低于 0.7 表示法氏囊萎缩

图 3 接种 E2、E6 的 SPF 鸡 BB 指数动态曲线

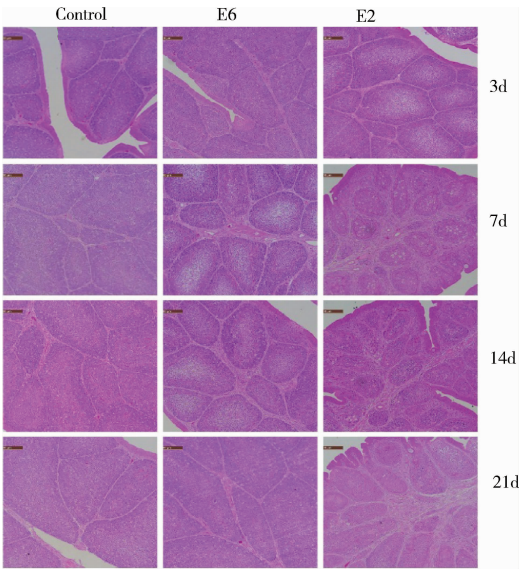


图 4 E2、E6 和对照组在接种 SPF 鸡后 3 d、7 d、14 d 和 21 d 法氏囊 HE 染色图 (10 ×)

3 讨论

晶体学结构表明每一个 VP2 蛋白亚单位分为 base (B)、shell (S) 和 projection (P) 三个结构域, B 和 S 分别由相对保守的 VP2 的 N 端和 C 端构成, 而 P 则是由 VP2 的可变区 (aa206 ~ 350) 构成。通过对大量的野毒株 VP2 序列进行比对, Van den Berg 等^[6]认为 IBDV 的 VP2 的可变区可以看做是 vvIBDV 在演化系谱中的一种分子标志, VP2 可变区的氨基酸变异可能会造成 IBDV 毒力和细胞嗜性的变化。

IBDV 在鸡体传代后毒力会增强, 而在鸡胚和细胞上传代后毒力会减弱^[7]。本研究选择中等毒力疫苗株在鸡胚上传代后的 E2 和 E6 毒株, 测序发现其 VP2 上氨基酸存在较大差异。通过接种三周

龄 SPF 鸡, 发现两个毒株对法氏囊造成的萎缩程度明显不同, E6 代毒株对于 SPF 鸡的毒力比 E2 代毒株弱。

VP2 片段测序分析发现, E2 与 E6 在 VP2 上存在 7 个位点的差异, 即 S76G、L217S、Q253H、D279N、A284T、I294L、S330R。Yamaguchi^[2]、Brandt^[8]、Van loon^[9] 等的研究表明, Q253H、D279N 和 A284T 三个位点与病毒毒力密切相关。根据 VP2 片段的多序列比对结果, 发现位于 VP2 P 结构域顶端的 P_{DE} (aa240 ~ 265) 和 P_{FG} (aa270 ~ 293) 两个区域可能与 IBDV 毒力相关^[10], 而 253、279 和 284 三个位点正好位于 P_{DE} 和 P_{FG} 上, 253 位点由线性的氨基酸 Q 变成环形的 H 以及 284 位由非极性氨基酸 A 变成极性的 T 都有利于 β 转角角的形成, 从而改变 VP2 的构象^[11]。Yamaguchi 将 253H 的疫苗株在鸡体内连续传代后会发生 H253Q 的变异, 并且变异后毒力明显增强; Jackwood 等^[12]研究发现, H253Q/N 的突变可以显著增强弱毒株的毒力, 与 Yamaguchi 等^[2]的研究结果一致; 宫世玲等^[13]将两株弱毒株在机体内连续传代 6 次, 也发现了同样的规律。本研究中的 B87 E2 和 E6 代毒株也存在 Q253H、D279N 和 A284T 的变异, 但由于还有其他 4 个位点的差异, 所以不能确定接种 E2 株 SPF 鸡法氏囊的变化是否只是由这 3 个位点引起。

294I 是 IBDV 超强毒株的特征性氨基酸位点^[14], 该位点的突变可能与毒力差异相关; VP2 的可变区有两个亲水峰, A (aa 210 ~ 215) 和 B (312 ~ 324), 这两个亲水峰编码序列的突变与抗原变异和血清 I 型毒株的毒力相关^[17], 因此 L217S 的突变也可能也会造成毒力下降, 但需要进一步的研究证实; 另外一个位点 S76G 位于 VP2 的 N 端的保守区, 对毒力影响不大; Heine^[7]在比对了强毒株和能适应 CEF 的低致病性毒株的 VP2 序列后, 认为富含丝氨酸的七肽区 S - W - S - A - S - G - S (aa 326 ~ 332) 是高致病性毒株的保守序列, 该区域可能通过氢键改变分子间或分子内的相互作用从而影响毒力, 但 Yamaguchi 等^[2]在比对超强毒株 OKYM 及其细胞适应毒株 OKYMT 后, 发现这两个毒株都有 S - W - S - A - S - G - S 七肽序列, 因此, 330 位 S 到 R 的突变或许并不影响毒力。

将两个毒株同时接种 CEF, E6 可以在 CEF 上

产生 CPE, E2 则不能在 CEF 上增殖, 说明 E2 和 E6 株对 CEF 的嗜性不同。研究表明, VP2 的氨基酸位点 253、279 和 284 与细胞嗜性有关, Q253H 和 A284T 同时突变, 可以使毒株在 CEF 上有效复制, 但是单一位点的突变不能适应 CEF 培养^[15]; 双突变 D279N 和 A284T 可以使 HK46(vvIBDV) 适应细胞生长并获得较高滴度, 但 UK661 经过双突变后, 病毒滴度低了很多^[16], Abdeljel 等^[17]通过定点突变 D279N/A284T 发现 vvIBDV PO7 突变株也可以适应 CEF 生长。说明 284T 是 IBDV 适应细胞的关键位点, 但也需要 Q253H 或者 D279N 发生突变。研究表明 Q253H、D279N 和 A284T 是 IBDV 细胞嗜性的分子基础, 但具体的分子机制还需要进一步的研究。

为进一步确定 E2 和 E6 代毒株的毒力和细胞嗜性位点, 可以利用反向遗传学技术对 E2 毒株的 VP2 进行定点突变来进行验证, 通过疫苗毒株来研究 IBDV 毒力与细胞嗜性的分子机制。

参考文献:

- [1] Cosgrove A. An apparently new disease of chickens: avian nephrosis[J]. *Avian Diseases*, 1962, 6(3):385-389.
- [2] Yamaguchi T, Ogawa M, Inoshima Y, *et al.* Identification of sequence changes responsible for the attenuation of highly virulent infectious bursal disease virus[J]. *Virology*, 1996, 223(1):219-223.
- [3] Boot H J, ter Huurne A A H, Hoekman A J, *et al.* Rescue of very virulent and mosaic infectious bursal disease virus from cloned cDNA: VP2 is not the sole determinant of the very virulent phenotype[J]. *Journal of Virology*, 2000, 74(15):6701-6711.
- [4] Berg T P V D. Acute infectious bursal disease in poultry: a review[J]. *Avian Pathology*, 2000, 29(3):175-194.
- [5] Mundt E, Vakharia V N. Synthetic transcripts of double-stranded Birnavirus genome are infectious[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, 93(20):11131-11136.
- [6] Van den Berg T P, M Gonze, G Rivallan, *et al.* Assessment of genetic, antigenic and pathotypic criteria for the characterization of IBDV strains[J]. *Avian Pathology*, 2004, (33):470-476.
- [7] Heine H-G, Haritou M, Failla P, *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]. *The Journal of General Virology*, 1991, 72:1835-1843.

- [8] Brandt M, Yao K, Liu M, *et al.* Molecular determinants of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus[J]. *Journal of Virology*, 2001, 75(24):11974-11982.
- [9] Van Loon A, De Haas N, Zeyda I, *et al.* Alteration of amino acids in VP2 of very virulent infectious bursal disease virus results in tissue culture adaptation and attenuation in chickens[J]. *Journal of General Virology*, 2002, 83(1):121-129.
- [10] Qi X, Gao H, Gao Y, *et al.* Naturally occurring mutations at residues 253 and 284 in VP2 contribute to the cell tropism and virulence of very virulent infectious bursal disease virus[J]. *Antiviral Research*, 2009, 84(3):225-233.
- [11] Coulbaly F, Chevalier C, Gutsche I, *et al.* The birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses[J]. *Cell*, 2005, 120(6):761-772.
- [12] Jackwood D J, Sreedevi B, LeFever L J, *et al.* Studies on naturally occurring infectious bursal disease viruses suggest that a single amino acid substitution at position 253 in VP2 increases pathogenicity[J]. *Virology*, 2008, 377(1):110-116.
- [13] 宫世玲. IBDV 弱毒株鸡体传代毒基因序列与毒力关系的比较研究[D]. 中国兽医药品监察所, 2014.
- [14] Mardassi H, Khabouchi N, Ghram A, *et al.* A very virulent genotype of infectious bursal disease virus predominantly associated with recurrent infectious bursal disease outbreaks in Tunisian vaccinated flocks[J]. *Avian Diseases*, 2004, 48(4):829-840.
- [15] Mundt E. Tissue culture infectivity of different strains of infectious bursal disease virus is determined by distinct amino acids in VP2[J]. *Journal of General Virology*, 1999, 80(8):2067-2076.
- [16] Lim B-L, Cao Y, Yu T. Adaptation of very virulent infectious bursal disease virus to chicken embryonic fibroblasts by site-directed mutagenesis of residues 279 and 284 of viral coat protein VP2[J]. *Journal of Virology*, 1999, 73(4):2854-2862.
- [17] Abdeljelil N B, Khabouchi N, Kassar S, *et al.* Simultaneous alteration of residues 279 and 284 of the VP2 major capsid protein of a very virulent infectious bursal disease virus (vvIBDV) strain did not lead to attenuation in chickens[J]. *Virology Journal*, 2014, 11(1):199.

(编辑:李文平)