

鸡传染性支气管炎病毒变异株的分离及其 S1 基因序列分析*

杨杰华¹, 刁有祥^{1**}, 于申业¹, 刘霞¹, 姜世金¹, 刘悦竹², 陈庆普²

(1. 山东农业大学动物科技学院, 山东泰安 271018; 2. 山东明发兽药研究所, 山东济南 250036)

Isolation and Sequence Analysis of S1 Gene of Avian Infectious Bronchitis Virus A Field Strain

YANG Jie-hua¹, DIAO You-xiang^{1**}, YU Shen-ye¹, LIU Xia¹, JIANG Shi-jin¹,
LIU Yue-zhu², CHEN Qing-pu²

(1. College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai an 271018; 2. Mingfa Animal Pharmaceutical Institute of Shandong Province, Jinan 250022)

Abstract: One strain of Avian Infectious Bronchitis Virus (IBV) was isolated from layer flock which had the symptom of egg drop in Ta'an of Shandong Province, and identified by electron microscope, HA test and animal regressive research. Results of virus neutralization test showed that the isolated virus is a variant strain of IBV. The whole sequence of S1 gene was cloned and analyzed by RT-PCR using specific primers which can differentiate between 793/B IBV and other serotypes of IBV. The strain's serotype can be primary deduced as 793/B.

Key words: Infectious bronchitis virus (IBV); TA03 strain; S1 gene; Sequence analysis

摘要: 本实验对山东省泰安地区某蛋鸡场产蛋下降鸡群发生的临床症状疑似鸡传染性支气管炎病例, 无菌采集气管、肺脏、肾脏等组织, 接种 SPF 鸡胚, 经病毒形态观察、血凝特性试验、动物回归试验等证实, 我们鉴定到一株鸡传染性支气管炎病毒 (IBV); 病毒中和试验表明, 该病毒为一株变异毒株, 使用国外针对 IBV 793/B 血清型发表的血清型特异性引物经 RT-PCR 方法获得了该毒株的免疫原基因 S1 基因, 初步确定该传染性支气管炎病毒变异毒株为 793/B 血清型。

关键词: 鸡传染性支气管炎病毒; TA03 分离株; S1 基因; 序列分析

中图分类号: S852.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2005)03-0283-05

鸡传染性支气管炎 (Infectious Bronchitis, IB) 是由冠状病毒科 (Coronaviridae) 冠状病毒属 (*Coronavirus*) 的传染性支气管炎病毒 (*Infectious bronchitis virus*, IBV) 引起的一种急性高度接触性传染性疫病。自 30 年代在美国爆发以来, 现已成为世界各地流行的重要禽病。IBV 是单股 RNA 病毒, 该病毒基因可因点突变和重组而发生变异, 故传染性支气管炎病毒血清型较多。已知的血清型有以侵害呼吸道为主的 Conn、Iowa97、JM K、Florida、Arkansas99 等和以侵害肾脏为主的 M41、Holte、Gray、Australia“T”等。Gough 等报道了英国一种新的

793/B 血清型的 IBV, 该毒株和其它血清型传支毒株之间无交叉血清学关系; 其免疫原基因 S1 的序列与欧洲 17 个传支毒株之间差异高达 21% ~ 25%^[1]。目前, 该血清型 IBV 在西班牙、德国、荷兰、意大利、泰国等国均有发生和流行, 对养鸡业危害较大。2002 年初, 我们对山东省泰安地区某蛋鸡场产蛋下降鸡群的疑似传染性支气管炎病例进行了病毒分离, 经过病毒形态学观察、血凝特性试验、致鸡胚矮小化试验、动物回归试验等证实我们分离到了一株传染性支气管炎病毒。病毒中和试验结果表明该传支病毒分离株系一株变异毒株。因该 IBV 变

收稿日期: 2004-11-02, 修回日期: 2004-12-10

* 基金项目: 济南市科技攻关项目 (项目编号 41054)

作者简介: 杨杰华 (1978~), 男, 山东济南籍, 硕士研究生, 主要从事禽病学研究。

** 通讯作者: 刁有祥 (1962~), 男, 山东胶州籍, 教授, 主要从事畜禽病原的分离鉴定与防治研究。

Corresponding author. Tel: 0538-8242593, E-mail: yxdiao@163.com

异毒株引发的蛋鸡临床症状与英国报道的 793/B 血清型 IB 发病症状相似,故使用了国外针对 IBV 793/B 血清型发表的血清型特异性引物经 RT-PCR 方法扩增到了该毒株的 S1 基因,初步确定我们分离到的传染性支气管炎病毒为 793/B 血清型支病毒,命名为 TA03 分离株。现将研究结果报告如下:

1 材料与方法

1.1 试验材料

TA03 IBV 毒株分离自山东省泰安市某发病蛋鸡场;IBV 标准毒株及阳性血清由山东澳兰生物工程研究所尹燕博博士惠赠;DNA Marker、Taq 酶、pMD-18T Vector、Catrimox-14 RNA Isolation Kit、mRNA Selective PCR Kit 均购自大连宝生物公司;凝胶回收试剂盒购自 MOBIO 公司,DEPC 与 I 型磷酸酯酶 C 均为 Sigma 公司产品;SPF 鸡胚购自济南斯帕法斯家禽有限公司。

1.2 血清型特异性 PCR 引物

采用了 Adzhar 等(1997)发表的 3 对 IBV 793/B 血清型特异性引物扩增 TA03 分离株 S1 全基因,序列如下(标“+”者为上游引物,标“-”者为下游引物):S1Uni2 + :5'-CCCAATTTGAAAAGTGAACA-3 与 D791- :5'-ACCA GTGTTA TACTGACA TG C-3、B791 + :5'-GGCAA TTCTACATCTG-3 与 S1E- :5'-A GA TGTA TCTAAAATA GC-3、Mid791 + :5'-GTGGTTGTAAGCAATCTG-3 与 IBP1- :5'-CAATTAATTTGGACCTTA TCCA-3。其中引物 S1Uni2 + 与引物 IBP1- 为许多血清型 IBV 所共有,两引物间基因包含 S1 全基因。该 3 对引物可以将流行于英国的 IBV 793/B 血清型与其他血清型 IBV 区分开来,且已证实 VN 试验结果与 PCR 结果是一致的^[2]。3 对引物分别扩增的碱基序列定名为 IBVS11、IBVS12 和 IBVS13,预期扩增的基因片段分别为 776bp、923bp、762bp,引物均由上海博亚公司合成。

1.3 IBV 的分离

无菌采集发病鸡的气管、肺脏、盲肠扁桃腺、肾脏等组织制成匀浆,用 PBS(pH7.4)按照 1:3:4 体积制备悬液,反复冻融 3 次,以 3 000r/min 离心 30min 弃沉淀,上清液加入双抗,4℃ 过夜,菌检阴性后,病毒经 SPF 鸡胚盲传 3 代后收获尿囊液备用。

1.4 IBV 的鉴定

病毒形态学观察:将尿囊液于 4℃ 20 000 r/min 离心 40min,沉淀物以适量 TNE(pH8.0)溶液重悬,经 2% 磷钨酸负染,透射电镜观察病毒形态。

IBV 致鸡胚矮小化试验、血凝试验与 NDV-B1 株干扰试验:IBV 致鸡胚矮小化试验、NDV-B1 株干扰试验均参照文献^[3]介绍的方法进行,IBV 的血凝试验参照林雪等报道的方法^[4]进行。

IBV 半数鸡胚感染量(EID₅₀)与气管环培养半数感染量(TOCID₅₀)的测定:EID₅₀的测定参照文献^[5]介绍的方法进行;TOCID₅₀测定参考杨奇伟等报道的方法^[6]进行。

抗血清的制备:参照 Darbyshire 等介绍的方法^[7]制备 TA03 分离株的抗血清。

IBV 理化特性测定:分离病毒的乙醚敏感性试验、氯仿敏感性试验、酸碱稳定试验、热稳定试验均按照文献^[5]介绍的方法进行。

将分离所得的 TA03 毒株按 10⁵ EID₅₀ 点眼滴鼻方式接种 10 只 7 日龄 SPF 雏鸡,同时设 5 只正常 SPF 雏鸡为对照,每日观察攻毒后试验鸡的临床症状,并对临床症状明显雏鸡剖检观察其内脏病理变化。

按照参考文献^[8]介绍的方法进行气管环组织培养交叉中和试验。

1.5 IBV TA03 分离株 S1 基因的克隆和序列分析

病毒 RNA 提取依据 Catrimox-14 RNA Isolation Kit 说明书按照氯化锂法进行;反转录引物使用 S1 基因下游引物 IBP1-,其反转录产物包含 S1 全基因^[2]。cDNA 的合成应用大连宝生物公司 mRNA Selective PCR Kit 依据说明书进行;PCR 的反应条件和循环参数详见参考文献^[2]。0.8% 琼脂糖凝胶电泳观察结果。

按照常规分子生物学试验方法使用 pMD-18 Vector 连接并转化,对于鉴定出的阳性克隆,送至上海博亚公司进行测序,应用 DNASTar 和 BLAST 软件对测定的序列进行分析。

2 结果

2.1 IBV 的形态学观察

电镜下观察可见呈圆形,表面有纤突,直径为 90nm 左右的典型冠状病毒粒子(图 1)。

2.2 致鸡胚矮小化试验

传代后的 TA03 分离株病毒可引起鸡胚生长受阻,与正常日龄鸡胚相比,病变的胚体明显蜷缩成球形,羊膜增厚,紧紧粘贴胚体,卵黄囊收缩,尿囊液明显增多(图 2)。

2.3 IBV 的血凝试验

未经任何处理的 TA03 株病毒无直接血凝活性,而经 I 型磷酸酯酶 C 处理后对鸡红细胞具有血

凝性,HA 滴度为 1×10^4 。

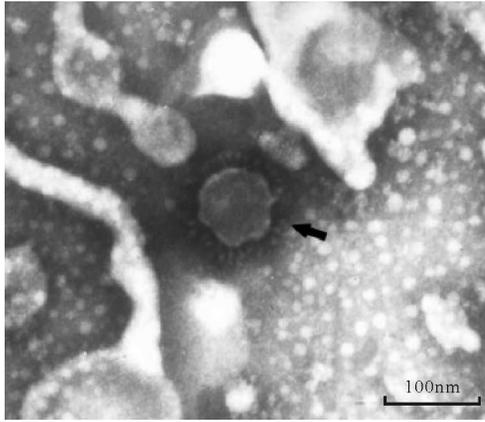


图 1 IBV TA03 分离株病毒粒子
Fig.1 Virions of IBV strain TA03

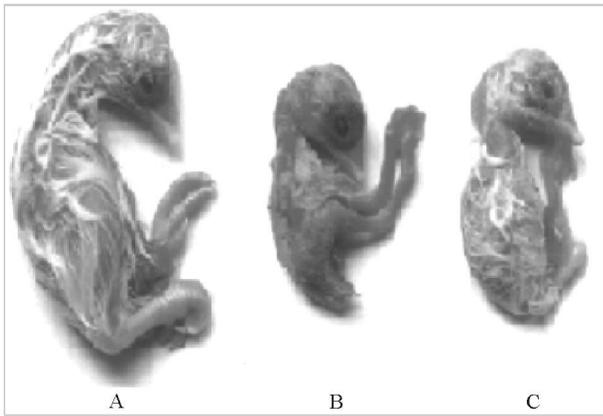


图 2 IBV TA03 分离株病毒引起的“侏儒胚”

Fig.2 The “dwarf embryos” phenomenon that IBV TA03 strain produced

A, Natural embryo of 16 days old; B-C, Dwarf embryos that IBV TA03 strain produced.

2.4 NDV-B1 株干扰试验

试验结果为接种 TA03 病毒和 NDV-B1 株的试验组全部鸡胚尿囊液 HA 滴度均小于 1×10^2 , NDV-B1 对照组全部鸡胚尿囊液 HA 滴度均大于 1×10^4 ,生理盐水对照组无血凝性。这表明 TA03 毒株对于 NDV-B1 毒株的增殖具有明显的抑制作用,该现象为 IBV 所特有。

2.5 IBV 半数鸡胚感染量(EID_{50})与气管环培养半数感染量($TOCID_{50}$)的测定结果

经测定,TA03 毒株的 EID_{50} 为 $10^{6.74}/0.2\text{mL}$, $TOCID_{50}$ 为 $10^{4.52}/\text{mL}$ 。

2.6 IBV 理化特性的测定

理化特性测定结果表明,TA03 分离株病毒对氯仿、乙醚及热均敏感, pH3.0 与 pH11.0 处理后可降低 TA03 毒株的毒力,病毒耐受碱性较酸性的能力略强(表 1)。

2.7 动物回归试验

7 日龄 SPF 鸡在攻毒后 3d 后开始陆续发病,出现典型的 IBV 临床症状,精神沉郁,羽毛蓬松,畏寒,呼吸困难,气管啰音等症状,剖检发病鸡可见气管粘膜脱落,肺脏充血。

表 1 TA03 分离株理化特性测定结果

Table 1 The results of partial physical-chemical properties of TA03 strain

Experimental items	TOCID ₅₀ /ML		Result
	Experimental group	Contrast group	
Chloroform sensitive test	0	$10^{-4.5}$	Sensitive
Aether sensitive test	0	$10^{-4.3}$	Sensitive
pH3.0 stable test	$10^{-2.3}$	$10^{-4.4}$	Resistant
pH11.0 stable test	$10^{-2.7}$	$10^{-4.5}$	Resistant
Heat stable test	0	$10^{-4.5}$	Sensitive

2.8 气管环组织培养交叉中和试验

IBV TA03 分离株的气管环血清交互中和效价如表 2 所示。

表 2 IBV TA03 分离株与标准毒株气管环血清交互中和效价

Table 2 Cross serum neutralization titres between TA03 and other 7 IBV strains in tracheal organcultures

Strain	Antiserum							
	M ₄₁	H ₁₂₀	T	Conn	Gray	Arkansas	TA03	Ma5
M ₄₁	4096	4096	32	16	-	64	-	4096
H ₁₂₀	4096	4096	32	32	-	64	-	4096
T	32	32	4096	-	32	32	-	16
Connecticut	16	32	-	4096	16	32	-	32
Gray	-	-	32	16	4096	32	16	-
Arkansas	64	64	32	32	32	4096	-	64
TA03	-	-	-	-	16	-	4096	-
Ma5	4096	4096	16	32	-	64	-	4096

2.9 IBV TA03 分离株 S1 基因的克隆

从尿囊液中提取病毒 RNA,经 RT-PCR 扩增获得了与预期大小一致的核酸片段,如图 3 所示。

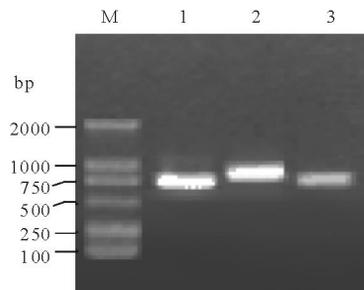


图 3 IBV TA03 分离株产物电泳图

Fig.3 The electrophoresis for the product of PCR

M, Marker; 2000 1, PCR products of IBVS11; 2, PCR products of IBVS12; 3, PCR products of IBVS13.

2.10 IBV S1 基因的核苷酸序列及氨基酸序列分析

2.10.1 测序结果分析:测序结果经拼接,TA03 株 IBV S1 全基因为 1617bp (GenBank 登录号为 A Y837465),四种碱基的分布为:A-28.51%、G-18.99%、C-16.07%、T-36.43%,对该基因序列进行限制性内切酶位点分析发现,其中无 *EcoR* I、*Sac* I、*Pst* I、*Hin* dIII、*Sal* I、*Bam* H I、*Bgl* I 等常用酶的识别序列,与国外报道的对许多 IBV 毒株 S1 基因序列分析结果一致^[9]。由 TA03 株 IBV S1 基因核苷酸序列推导的氨基酸序列共包括 539 个氨基酸,编码一条分子量约为 59.8KD 的多肽,其等电点为 8.11,偏碱性。序列中潜在的 N-糖基化位点有 19 个,与二硫键形成有关的半胱氨酸残基数量为 17 个。疏水性分析表明,该多肽 N 端最初的 18 个氨基酸,为疏水较强的 S 蛋白信号肽。

2.10.2 TA03 株 IBV 与 IBV 标准毒株 S1 基因的同源性分析:分离到的 TA03 毒株与我国普遍应用的 Massachusetts 血清型疫苗毒株例如 H₁₂₀、H₅₂、Ma5 的 S1 基因同源性分别为 77.5%、78.3%、78.4%,而与 GenBank 上注册的 Arkansas、Conn、Gray 等血清型标准 IBV 之间的碱基序列差异也在 20%以上。对 S1 基因编码的氨基酸进行序列分析表明,TA03 株 IBV 与 Arkansas、Conn、Gray、Massachusetts 等血清型 IBV 的氨基酸序列同源性为 74.5~78.3%。

通过 INTERNET 向 NCBI 提交并根据 BLAST 软件分析表明,TA03 株 IBV S1 基因与 793/B 血清型 IBV S1 基因具有最大同源性,其中与 4/91 pathogenic 同源性最高(99.6%)。对 S1 基因编码的氨基酸进行分析显示,TA03 株与 7 株 793/B 血清型毒株氨基酸序列同源性为 93.7%~99.4%,其中与 4/91 pathogenic 同源性最高(99.4%),其差异仅表现于 60 位、107 位、525 位共 3 个氨基酸残基,以上位置 TA03 株分别为丙氨酸、亮氨酸、精氨酸,而 4/91 pathogenic 分别为缬氨酸、苯丙氨酸和谷氨酰胺。

3 讨论

对本研究分离到的 TA03 毒株,通过电镜形态观察、致鸡胚矮小化试验、血凝特性试验、血清学试验及动物回归试验可证实 TA03 分离毒株为一株传染性支气管炎病毒。通过气管环组织培养交叉中和试验鉴定 IBV TA03 毒株的血清型,结果表明 TA03 分离株虽与标准 Gray 阳性血清有一定交叉反应,但不属于 Massachusetts、Arkansas、Conn、T、Gray 等血清型,而是一株 IBV 变异毒株,免疫原 S1

基因序列分析结果也进一步说明我国已经存在着新血清型的 IBV 毒株,故对该变异毒株值得深入研究并进行流行病学方面的调查。

对本试验中的分离毒株,采用了型特异性 PCR 来鉴定其血清型,A. Adzhar 等(1996)设计了 4 对引物,当应用这 4 对引物扩增过去 50 年间从欧洲、日本、美国等分离到的 40 个以上的 IBV 毒株的 S1 基因时,均获得了预期产物^[10]。在上述核苷酸序列分析的基础上并设计的 3 对特异性 PCR 引物(A 型特异性 PCR 引物),能够将英国流行的 793/B 血清型 IBV 和其他 IBV 血清型分别开来^[2],本试验即应用了其发表的 793/B 血清型特异性引物以鉴定 IBV TA03 分离株的血清型。Cavangh 等(1997)也设计了扩增 793/B、荷兰 D274、Massachusetts S1 基因的型特异性引物用于野毒株的鉴定,结果也均都表明 PCR 结果与 VN 试验的结果是一致的^[11]。由于血清型特异性引物对于 IBV 的血清型鉴定和传支的预防免疫有着极其重要的意义,为近年世界各国在传染性支气管炎病毒 S1 基因研究方面的热点之一。

由于使用了 IBV 血清型特异性引物而扩增到 TA03 株 IBV S1 基因,可以初步确定,IBV TA03 分离株系一株 793/B 血清型 IBV。1985 年法国学者最早分离到一株 793/B 血清型传支病毒,后 90 年冬传至英国发病严重,造成了极大经济损失,1992 年英国 Gough 等报道后,该血清型 IBV 又在西班牙、德国以及亚洲的泰国等多个国家发现,TA03 分离株与 4/91 pathogenic S1 基因同源性最高,推测可能系由国外引进家禽品种而传入我国。

目前我国发生的 IBV 分离株多为 Massachusetts 血清型,故普遍应用的疫苗如 H₁₂₀、H₅₂、Ma5 毒株均属该血清型 IBV,这些疫苗毒与 TA03 分离株的 S1 氨基酸均有 25%的不同,VN 试验结果表明,TA03 分离株与 Massachusetts 型 IBV 无交叉中和反应,故 H₁₂₀ 等疫苗毒对 IBV TA03 分离株可能作用微弱或不起作用,由此推断可能会导致 IBV TA03 变异毒株在我国蔓延。本研究结果获得了 IBV TA03 分离株 S1 全基因序列,为今后获得与 S1 基因同源的体外表达产物以研究 IBV 基因工程疫苗奠定了基础。

参考文献

- [1] Gough R E, Randall C J, Dagless M, et al. A new strain of infectious bronchitis virus infecting domestic fowl in Great Britain[J]. Veterinary record, 1992, 130:493.

- [2] Adzhar, Gough, Haydon, *et al.* Molecular analysis of the 793/B serotype of infectious bronchitis virus in Great Britain [J]. *Avian Pathology*, 1997, 26:625-640.
- [3] 辛朝安, 陈天杰. 广州地区鸡传染性支气管炎病毒的分离与鉴定[J]. *华南农学院学报*, 1982, 3(1):90-98.
- [4] 林 雪, 辛朝安. 微量血凝抑制试验检测传染性支气管炎抗体的研究[J]. *中国兽医科技*, 1995, 25(6):8-10.
- [5] 殷 震, 刘景华. *动物病毒学*[M]. 第二版, 北京:科学出版社, 1997, 331-336.
- [6] 杨奇伟, 武志强, 吕化广, 等. 鸡传染性支气管炎可疑病料的分离及初步鉴定[J]. *中国畜禽传染病*. 1995, 82(3):22-24.
- [7] Darbyshire J H, Powell J G. Aetal taxonomic studies on strains of avian infectious bronchitis virus using neutralization tests in tracheai organ cultures[J]. *Archives of virology*, 1979 (61):227-228.
- [8] 刘明春, 康丽娟, 刘思国, 等. 一株传染性支气管炎病毒变异株的分离与鉴定[J]. 2000, 8:17-18.
- [9] Wang L, Junker D, Collisson E W. Evidence of natural recombination within the S1 gene of infectious bronchitis virus [J]. *Virology*, 1993, 192:710-716.
- [10] Adzhar, shaw K, Britton P, *et al.* Universal oligonucleotides for the detection of infectious bronchitis virus by the polymerase chain reaction[J]. *Avian Pathology*, 1996, 25:817-836.
- [11] Cavangh D, Mawditt K, shaw K. Towards the routine application of nucleocacid technology for avain disease diagnose[J]. *Acta veterinaria hungaria*, 1997, 45(3):282-298.