

## 三株传染性法氏囊病病毒 A 节段全长基因组结构 和编码蛋白的序列分析\*

于 涟 黄耀伟 李建荣 宋坤华 叶伟成

(浙江大学动物预防医学研究所 杭州 310029)

**摘 要:**用长距离 RT-PCR 方法分别克隆了浙江地区传染性法氏囊病病毒(IBDV)细胞致弱株 HZ2、弱毒疫苗株 JD1 和野毒株 ZJ2000 的 A 节段基因组全长,三毒株的 A 节段均长 3259bp,都包含两个相互重叠的开放阅读框架和两端的 5'、3' 非编码区(NCR)。它们在核苷酸和推导的四种病毒蛋白 VP2、VP3、VP4、VP5 的氨基酸水平上高度同源,并具有位于 VP2 高变区的特征性氨基酸 H253、N279、T284、R330,这些氨基酸是弱毒株和几个强毒株的标志。野毒株 ZJ2000 的高强毒力可能与 VP2 高变区和 VP2-VP4 剪切位点附近的几个突变有关。序列比较进一步支持 VP2 并非是决定 IBDV 毒力的唯一因素。不同毒力表型毒株的两端 NCR 序列高度保守提示 NCR 可能与 IBDV 毒力并不直接相关。另外,根据 VP5 在十种不同表型毒株中高度保守,作者提出了一种 VP5 与病毒毒力关系的推测。

**关键词:**传染性法氏囊病病毒 A 节段全长,非编码区,VP5,VP2,毒力

**中图分类号:**S858.31;Q343.1 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209(2001)05-0573-09

传染性法氏囊病病毒(IBDV)是双链 RNA 病毒,属于双 RNA 病毒科(Birnaviridae)禽双 RNA 病毒属(Avibirnavirus),其基因组由 A、B 两个节段组成。A 节段(长约 3.3kb)具有两个相互重叠的开放阅读框架(ORF),上游的 ORF A2 编码 VP5 蛋白,它与病毒致病性有关<sup>[1]</sup>。下游的 ORF A1 编码一前体蛋白 VP2-4-3,该前体蛋白进一步剪切加工为 VP2、VP4、VP3 蛋白。其中 VP2 是病毒的主要宿主保护性抗原,一直以来是研究 IBDV 的热点所在,因为病毒的抗原变异、毒力强弱被认为与 VP2 的高变区密切相关<sup>[2]</sup>。VP4 最近被正式确认为一种新的丝氨酸蛋白酶,前体蛋白 VP2-4-3 的自我剪切由它执行,新鉴定的剪切位点与原来预测的不同<sup>[3]</sup>。VP3 则是病毒的结构蛋白之一,具有群特异性抗原。B 节段(长约 2.8kb)编码 VP1 蛋白,它是依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶。A、B 节段两端均有非编码区(NCR),不同表型 IBDV 的 NCR 高度保守<sup>[4]</sup>。

IBDV 感染幼鸡的法氏囊 B 淋巴细胞使其受损,导致高度免疫抑制,给世界范围内养鸡业带来严重经济损失。IBDV 分 I、II 两种血清型,I 型具有致病性而 II 型无。根据表型上的抗原变异和毒力,I 型 IBDV 一般又分为经典毒株、弱毒株、变异株和超强毒株(vvIBDV)。以往的序列比较显示它们的差异主要反映在 VP2 的高变区上,但没有确切的

\* 国家 863 计划资助项目(101-j99-02)

**作者简介:**于 涟(1943-),女,江苏镇江人,教授,博士生导师,主要从事动物微生物与免疫学及应用生物技术研究。

**收稿日期:**2000-12-20,修回日期:2001-04-16

功能学实验证据。有学者认为除 VP2 外,其它病毒蛋白以及 NCR 也是使 IBDV 发生抗原变异和毒力增强的原因<sup>[5]</sup>。鉴于近年来世界范围内频频出现的 IBDV 变异与毒力增强趋势,有必要获得 IBDV 的全基因组序列进行深入分析,为开发新型、有效的抗 IBDV 疫苗打下基础。

目前国内尚少见有含完整 NCR 的 IBDV 基因组全长序列的报道。本研究对浙江省三株 IBDV:两株弱毒株(其中之一为疫苗株)和一株野毒株的 A 节段全长进行了克隆和序列分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 病毒

IBDV HZ2 株是一株从野毒经 15 代鸡胚成纤维细胞(CEF)传代所得的致弱株。IBDV JD1 株是另一株野毒经 35 代 CEF 传代所得的具有良好免疫原性的致弱株,已被用作弱毒疫苗。IBDV ZJ2000 株是 2000 年在杭州地区新近分离的毒力高强的野毒,该毒株在 SPF 鸡胚中连续传 6 次代,每次均引起 100% 鸡胚致死率(另文发表)。

### 1.2 病毒纯化和基因组双链 RNA(dsRNA)提取

HZ2 和 JD1 分别从病毒的 CEF 细胞培养液中超速离心纯化,用蛋白酶 K-酚氯仿法抽提 dsRNA<sup>[6]</sup>。ZJ2000 从病料的法氏囊匀浆中分离,同法抽提病毒基因组。

### 1.3 RT-PCR

根据德国弱毒株 P2 序列设计位于两端 NCR 的一对引物:

A5:5'—GGATACGATCGGTCTGACCCCGG—3'(1~23nt);

A3:5'—GGGGACCCGCGAACCGAT—3'(3243~3260nt)。

以各自的病毒 dsRNA 为模板,A3 为引物,参考 Superscript II Preamplification System (LTI 公司)提供的方法略有改动,在反应温度 50℃ 下反转录合成 A 节段全长 cDNA。以各自的 cDNA 为模板,使用 Expand High Fidelity PCR 系统(Roche 公司)或 One Shot LA PCR Mix (TaKaRa 公司)进行 PCR 扩增。反应条件为:首先 94℃ 热变性 2min;94℃ 15s,61℃ 30s,68℃ 3min 进行 30 次循环;然后 72℃ 延伸 3min。

### 1.4 cDNA 克隆和测序

PCR 产物直接连接到 pGEM-T easy 载体(Promega 公司)上,转化大肠杆菌 HD5 $\alpha$ ,经酶切和 PCR 鉴定,每个毒株各选 3 个独立的阳性克隆进行测序。测序用引物步进法,在 ABI377 测序仪上进行。

### 1.5 序列分析

所测定的三株 IBDV A 节段核苷酸序列及其推导的氨基酸序列用 Lasergene99 的 Edit-Seq 软件编辑。非编码区二级结构预测用 RNAstructure3.5 软件进行。相关序列同源性比较用 Lasergene99 的 MegAlign 进行。比较时引用的序列及其特征见表 1。

表 1 引用的血清 I 型 IBDV 毒株

Table 1 Description of serotype I IBDV strains used in this study

Strain	Accession number	Geographic origin	Phenotype*	Compared regions
P2	X84034	Germany	ATT	Full-length
CEF94	AF194428	Netherlands	ATT	Full-length
PBC98	D00868	Britain	ATT	VP2-4-3
OKYMT	D83985	Japan	ATT	VP2-4-3
GZ29112	AF051837	Guangzhou, China	ATT	VP2-4-3
Gu-1M	/(Ref.[4])	Germany	ATT	NCR
Cu-1	X16107	Germany	V	Full-length
Harbin	AF092171	Harbin, China	V	VP2-4-3, VP5
STC	D00499	USA	V	VP2-4-3, VP5
52/70	D00869	Britain	V	NCR
E	AF133904	USA	V&Variant	VP2-4-3, VP5
GLS	M97346	USA	V&Variant	VP-4-3, VP5
HK46	AF051837	HongKong, China	VV	Full-length
OKYM	D49706	Japan	VV	VP2-4-3, VP5
UK661	X92760	Britain	VV	VP2-4-3, VP5
D6948	AF240686	Netherlands	VV	Full-length
KK1	AF165150	Korea	VV	VP2-4-3, VP5
KSH	AF165151	Korea	VV	VP2-4-3, VP5
K310	AF165149	Korea	V&Variant	VP2-4-3, VP5

\* Phenotype: ATT = attenuated, V = virulent, VV = very virulent

## 2 结果

### 2.1 三株 IBDV A 节段 cDNA 的克隆、鉴定和序列测定

三个毒株的 PCR 扩增均得到预期大小(3.0 ~ 3.5kb)的片断,表明用长距离 RT-PCR 直接获得 IBDV 基因组全长是可行的(以上结果另文发表)。它们各自的 PCR 产物经克隆筛选,酶切鉴定,最后测定了各自的核苷酸序列。三个毒株的 A 节段 cDNA 全序列均为 3259bp, GenBank 接受号分别为 AF321054(HZ2), AF321055(JD1), AF321056(ZJ2000)。

### 2.2 非编码区(NCR)结构

三个毒株在两端 NCR 的序列完全相同,其中 5'-NCR 位于 1 ~ 96nt, 3'-NCR 位于 3170 ~ 3259nt(图 1)。所有参与比较的 I 型 IBDV 在 5'-NCR 上前 43nt 的序列完全一致,在随后的 53nt(44-96 位直至 VP5 的起始密码 ATG 前)中, HZ2、JD1、ZJ2000 只在第 44、47、83 位与

所比较毒株的共有序列 (consensus sequences) 不同, 其余位置完全一致。其中 47 位 C, 83 位 T 为三个毒株特有, 44 位 T 则也在弱毒株 P2, 强毒株 Cu-1 上出现。二级结构预测表明这些替换 (C44T, T47C, C83T——数字前为共有序列上的核苷酸, 后面为所替换的核苷酸, 下同) 并不影响 5'-NCR 共有序列所形成的“Y”形结构——从一个短茎环中伸出两个发夹环的结构, 因为 G-C 与 G-T 都可配对 (图 2 圆圈所示)。在 3'-NCR 上, HZ2 等三个毒株只在 3235 位缺失 C, 其余部分与其它毒株的共有序列相同 (图 1)。二级结构分析显示由于该位点旁边是连续两个 C, 因此这 3 个 C 中缺少任何一个都可在长茎环结构“端点”的环上删去 (图 2 箭头所示), 改变的只是环上碱基数目, 对二级结构并无影响。两端 NCR 结构分析表明 HZ2 等三个毒株具有明显的 I 型 IBVD 特征。它们和其它 I 型毒株一样, NCR 高度保守。

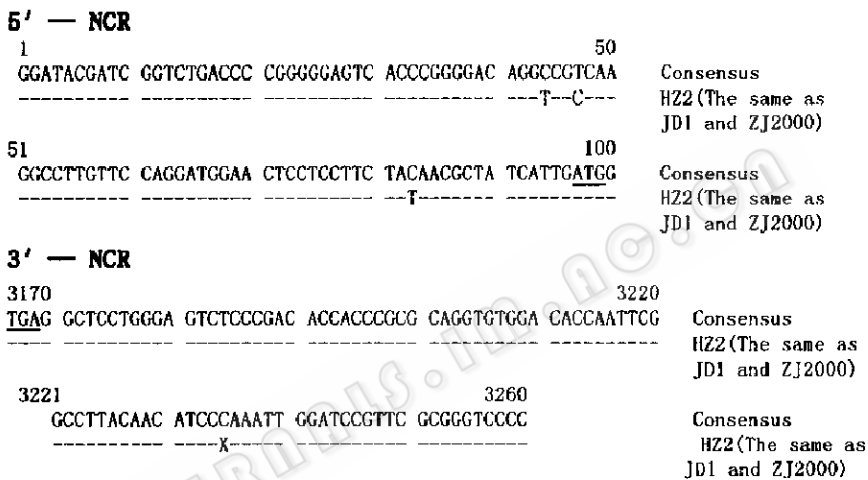


图 1 HZ2, JD1, ZJ2000 的 5'-和 3'-NCR 序列

Fig. 1 Nucleotide sequences of the 5'-and 3'-NCR of segment A of the strains HZ2, JD1 and ZJ2000. The consensus sequences are based on the serotype I strains P2, Cu-1, Cu-1M [4], 52/70 (Accession No. D00869), CEF94, D6948 [9] and HK46 [8]. The identical nucleotides are marked by dash (-), and (X) indicates depletion sequence. The start codon for VP5 and the stop codon for VP2-4-3 are underlined.

### 2.3 ORFA2 及其编码的 VP5 蛋白

HZ2 与 JD1 的 ORF A2 核苷酸序列 (97 ~ 534 位共 438nt) 完全相同, 因此它们编码的 VP5 蛋白 (145aa) 也相同 (图 3)。与之相比, ZJ2000 只在 219 位有一突变 A219G, 该位置处于 VP5 与 VP2 N 端编码区的重叠区内, 对 VP5 为沉默突变, 因此三个毒株的 VP5 蛋白氨基酸序列一致。另外, 它们与一荷兰弱毒株 CEF94 也有 T102C 的沉默突变。

同源性比较显示 HZ2、JD1、ZJ2000、CEF94、P2、Cu-1、K310、KSH 的 VP5 氨基酸序列完全相同, Harbin、KK1 则只有两处氨基酸不同, 这 10 种毒株的同源性为 98.62% ~ 100%, 在进化树上归为一簇 (图 4A)。它们分别代表了 I 型 IBVD 的弱毒株 (P2、CEE94、HZ2、JD1), 变异株 (K310), 经典毒或强毒株 (Cu-1、Harbin、ZJ2000), vvIBVD (KK1、KSH)。两种美国变异株 E 和 GLS 为另一簇, 但与前十种毒株亲缘关系接近。另外四种 vvIBVD 归为第三簇 (图 4A, 只示出 HK46 和 OKYM, D6948 和 UK661 未示), 它们均有特有的氨基酸变化 R49G

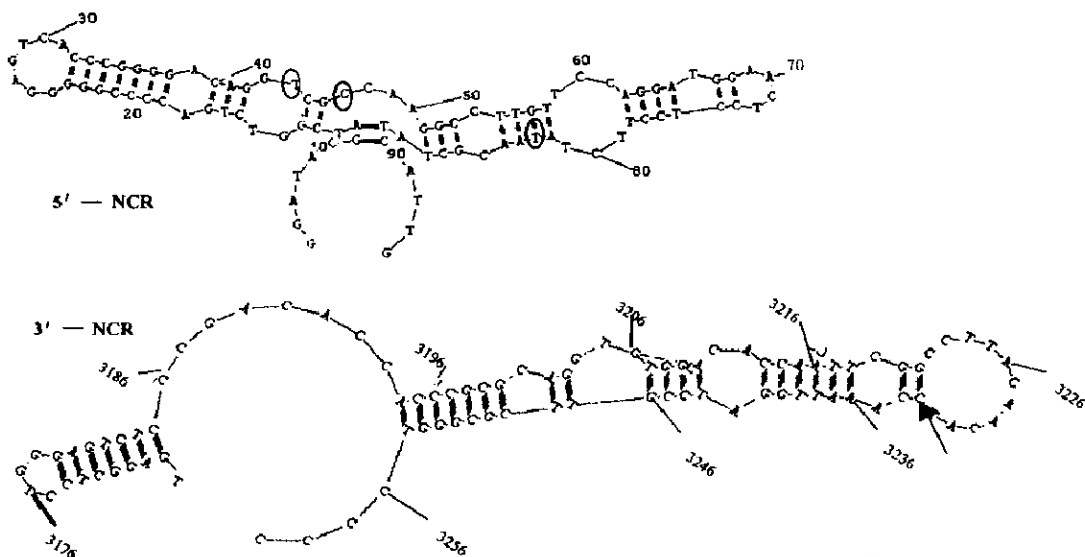


图 2 从 HZ2 的 5'-和 3'-NCR 序列推导的二级结构

Fig. 2 Predicted secondary structures for nucleotides sequences of the 5'- and 3'-NCR of segment A of the strain HZ2. Arrows (↑) indicate the depletion nucleotide compared with the consensus sequences and circled (O) nucleotides indicates the difference.

1	MVSRDQTNDR	SDDKPARSNP	TDCSVHTEPS	DANNRTGVHS	GRHPGEAHSQ	VRDLDLQFDC	60	Consensus
MLSL	-----E-----	-----	-----	-----	-----R-----	-----		HK46
MLSL	-----R-----	-----	-----	-----	-----	-----		HZ2
	-----	-----	-----	-----	-----	-----		GLS
61	GGHRVRANCL	FPWIPWLNCG	CSLHTAEQWE	LQVRSDAPDC	PEPTGQLQLL	QASESESHSE	120	Consensus
	-----	-----F-----	-----	-----	-----	-----		HK46
	-----	-----	-----	-----	-----	-----		HZ2
	-----	-----	-----	-----	-----	-----		K GLS
121	VKHTSWWRLC	TKRHHKRRDL	PRKPE				154	Consensus
	-----P-----	-----W-----	-----					HK46
	-----	-----	-----					HZ2
	-----P-----	-----	-----					GLS

图 3 HZ2(JD1, ZJ2000), HK46, GLS 株的 VP5 氨基酸序列

Fig. 3 Amino acid sequences of VP5 of the strains HZ2 (the same as stains JD1 and ZJ2000), HK46 and GLS

The consensus sequences are based on all the attenuated strains and virulent strains.

和 W137R,但是值得注意的是 HK46, UK661, D6948 及变异株 GLS 的 VP5N 端多出 4 个氨基酸残基“MLSL”(相应的 OKYM 株序列未知,图 3)。这是由于它们在 5'-NCR 上有一点突变 C86T,从而使 ACG 转为起始密码 ATG(图 1)之故,但该 ATG 是否为这些 IBDV VP5 的翻译起点仍有待确认。

### 2.4 ORF A1 及其编码的 VP2、VP4、VP3 蛋白

三个毒株的 OFR A1 均长 3039nt,编码 1012 氨基酸的前体蛋白 VP2-4-3,与已知的其它毒株相符。与共有序列相比,三个毒株共同的特征性氨基酸有 3 处,分别为 VP4 上的

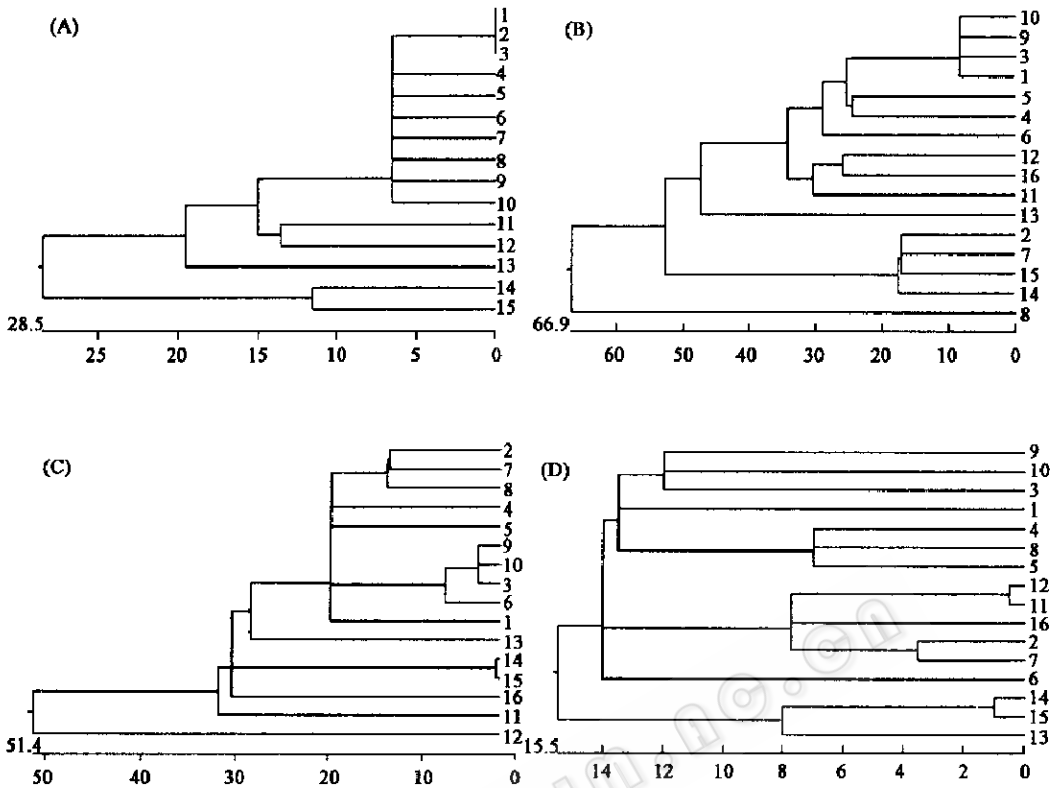


图4 各种IBDV毒株的VP5(A)、VP2(B)、VP3(C)、VP4(D)蛋白系统进化树

Fig.4 Phylogenetic trees of proteins VP5(A)、VP2(B)、VP3(C)、VP4(D) of IBDV strains

Sixteen IBDV strains are represented by NO.1 ~ 16. 1. CEF94; 2. KK1; 3. JD1; 4. Harbin; 5. Cu-1; 6. P2;

7. KSH; 8. K310; 9. ZJ2000; 10. HZ2; 11. GLS; 12. E; 13. STG; 14. HK46; 15. OKYM; 16. GZ29112.

D614G, VP3 上的 M814V 和 L922Q。另外 VP2 高变区上 M290L 为它们与弱毒株 CEF94 所特有。除了这四个位点外, JD1 的其它氨基酸序列与所有参与比较毒株的共有序列相同, 总变异率为 0.39%; HZ2 的其它特征性氨基酸为 VP2 非高变区上的 D201N, D406G, VP4 上的 L734P, L739Q, VP3 上的 S784P, 总变异率 0.88%; ZJ2000 的其它特征性氨基酸则为 VP2 非高变区上的 D30G, L511R, VP2 高变区上的 N280S, VP4 上的 G540R, VP3 上的 E794G, N952D, 高变异率为 0.99%。

在 VP2 高变区(205 ~ 350aa)上, HZ2 等三个毒株具有典型的细胞弱毒株特征性氨基酸; H253, N279, T284, R330。另外, 高变区上的两个亲水峰, A, B 被认为与病毒的中和和作用密切相关<sup>[2]</sup>, 三个毒株在 A, B 上并无氨基酸变化(图 5)。Van den Berg 等认为在两个亲水峰之间还有两个更小的亲水峰 1, 2 影响 IBDV 的抗原性和毒力<sup>[7]</sup>(图 5)。事实上 HZ2, JD1, ZJ2000 在高变区上的变化只出现在小亲水峰 2 上, 即 M290L(对三个毒株)和 N280S(仅对 ZJ2000), 但这两个位点的替换均不影响氨基酸本身的极性(N→S)或非极性(M→L)。因此单从高变区来看, 三个毒株并无显著差异。

根据最新确认的 VP2 - VP4 剪切位点, VP4 蛋白的 N 端定位在前体蛋白的 513 位<sup>[3]</sup>。ZJ2000 株在 511 位有一显著的突变 L→R, 在 VP4 上还有 G540R 的突变, HZ2 和 JD1 没有

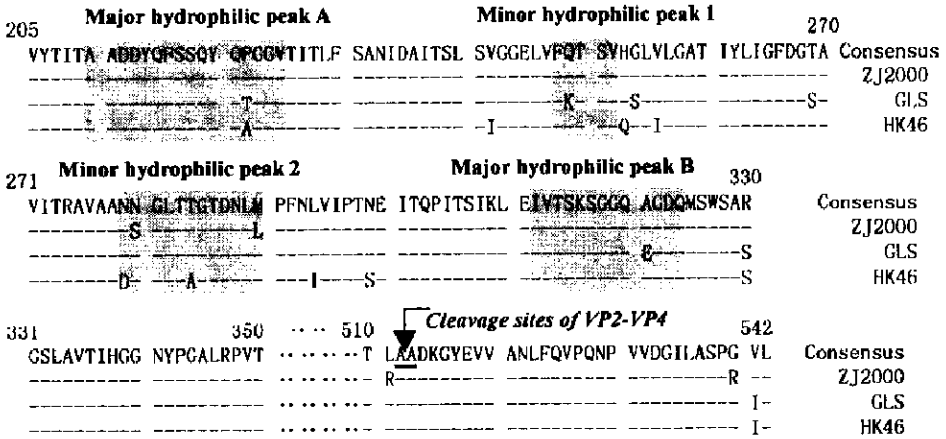


图 5 ZJ2000, GLS, HK46 的 VP2 高变区(305 - 350)与 VP2 - VP4 剪切位点附近(510 - 542)的氨基酸序列

Fig. 5 Amino acid sequences of hypervariable regions of VP2(305 - 350) and cleavage sites of VP2 - VP4 (510 - 542) of the strains ZJ2000, GLS and HK46. The consensus sequences are based on the attenuated strains and virulent strains.

The sequences of strains HZ2 and JD1 in these two regions are the same as consensus except M290L.

(图 5)。这两个变化可能影响了 VP2 - VP4 的剪切从而影响 IBDV 的毒力,因此可能是 ZJ2000 区别于 HZ2 和 JD1 表型的关键所在。

VP4 - VP3 的剪切位点在 755 ~ 766 位,与 VP2 - VP4 一样,新确认的两个剪切位点都与旧有推测位点不同<sup>[3]</sup>。我们据此划分 VP2、VP4、VP3 的氨基酸序列,并分别作这三种蛋白的同源性分析。HZ2、JD1、ZJ2000 的亲缘关系最近(VP2:99.0% ~ 99.6%、VP4:98.8% ~ 99.6%、VP3:98.8% ~ 99.6%),并与弱毒株 CEF94、P2 归为进化树上的同一分支,经典毒株 Cu-1、强毒 Harbin 在亲缘关系上与它们接近(图 4B、C、D),这与它们在 VP5 上比较的结果一致。这明显区别于以 HK46、OKYM 为代表的 vvIBDV 和以 E、GLS 为代表的变异株。

### 3 讨论

Expand High Fidelity 系统和 One Shot LA PCR Mix 均含有高保真的 DNA 聚合酶成分,可以减少在长距离 RT-PCR 过程中引入的突变,从测序结果看,序列还是有一定精确性的。长距离 RT-PCR 方法简化了常规的 IBDV 基因组分段克隆程序,为大规模进行 IBDV 分子流行病学调查及建立病毒反向遗传系统打下基础。

在毒力表型上, HZ2、JD1 为弱毒株, ZJ2000 为高强的野毒株,但它们在序列上却高度同源。它们在 VP2 高变区上有明显的细胞致弱株特征性氨基酸: H253、N279、T284、R330。其中 N279 和 T284 通过定点突变试验已被证实是 IBDV 适应 CEF 细胞的关键性氨基酸<sup>[8]</sup>。不能直接适应细胞的四种 vvIBDV: HK46, OKYM, D6948, UK661 在这两个位点发生了相同的变化(N279D, T284A),提示适应细胞是病毒致弱的前提条件。然而病毒有适应细胞的特征性氨基酸并不意味着它就是弱毒,这一点可从强毒株 Cu-1, Harbin, 超强毒株 KSH 中看出,它们都具有 N279 和 T284, ZJ000 也与之相符。最近 Boot 等通过超强毒 D6948 和弱

毒 CEF94 的 VP2 基因置换实验证实 VP2 并非是决定 IBDV 毒力的唯一因素,有力地支持了 A 节段上除 VP2 外的其它结构域也对 IBDV 毒力产生影响这一猜测<sup>[9]</sup>。

ZJ2000 的序列特征也从另一方面提示了这种可能性。分析显示 ZJ2000 与 HZ2、JD1 的区别仅在有限的几个点突变上,其中以 N280S, L511R 和 G540R 最值得注意。N280S 位于 VP2 高变区的小亲水峰 2 上,尽管从 Asn(N)到 Ser(S)的改变并不影响这一亲水峰的亲水性(因两者同为不带电荷的极性氨基酸),但这一位置靠近 279 和 284 位,很可能局部的分子基团变化即可引起 VP2 上与毒力相关的模体(motif)发生改变。更关键的突变位点可能是 511 和 540 位,特别是 511 位。这两个位点与新确认的 VP2-VP4 剪切位点 512~513 位接近,它们可能影响了前体蛋白的剪切,从而在某种程度上增强了病毒毒力。当然也不排除其它几个位点(如 VP3 上)的变化所起的作用。

序列比较还揭示,在 A 节段其它与毒力有关的“候选”区域中,两端 NCR 似乎与病毒表型关系不大。首先,克隆的三种不同表型毒株 5'-、3'-NCR 完全相同。第二,它们在 NCR 上特有的核苷酸变化并不使已知二级结构发生转换。第三,已有报道 Cu-1 与其致弱株 Cu-1M 在 NCR 上的差别仅为 T44C,并且该变化也不影响二级结构<sup>[4]</sup>。最后,最近的 NCR 交换实验表明 I 型 IBDV 的毒力并不因置换了 II 型无毒力 IBDV 的相应 5'-NCR 而有所改变<sup>[10]</sup>。

VP5 的情况则较为复杂。Yao 等发现 VP5 缺失的 IBDV 没有致病性<sup>[11]</sup>。另外不同地区分离的四种 vvIBDV: HK46、UK661、D948、OKYM 在 VP5 上均有共同的特征性氨基酸,前三种毒株的 VP5 上游多出四个氨基酸残基(OKYM 的相应序列未知)<sup>[9]</sup>,以上一切显示 VP5 是决定 IBDV 毒力的因素。然而,ZJ2000、最近发表的两株韩国 vvIBDV KK1、KSH、一种变异株 K310 的序列<sup>[11]</sup>与经典毒 Cu-1,致弱株 CEF94, P2 包括 HZ2, JD1 几乎相同,这与上述事实不符。有趣的是,三个韩国毒株除在 VP5 上与致弱株高度同源外,在 VP4, VP3 分类上也与致弱株较为接近,但在 VP2 上却完全与前面的 HK46 等四种 vvIBDV 同源,这与 ZJ2000, Cu-1, Harbin 的情况不一样(图 4)。据此,我们猜想 VP5 是 IBDV 具备致病力的基础——缺失 VP5 的 IBDV 没有致病性(毒力)。在此基础上,具备 VP5 的 IBDV 通过基因组上其它序列的变化(如 VP2)决定其毒力强弱,例如 KK1, KSH, K310, ZJ2000, Cu-1, Harbin 等 6 种非弱毒株有其它因素协同 VP5 使它们表现为强毒;而 CEF94, P2, HZ2, JD1 的其它因素则对 VP5 呈负(或零)作用,使得有 VP5 的 IBDV 也可能是无致病性的。当然 VP5 本身的变异(如 HK46 等四种 vvIBDV)也可能使病毒毒力增强。最新发表的 I、II 型 IBDV VP5 交换实验支持这一猜想,德国 Mundt 等用 II 型无毒力 IBDV 的 VP5 基因替换了 I 型 IBDV 的相应部位,产生的嵌合 IBDV 仍然具有致病性,提示 II 型 IBDV 的无致病性并非由 VP5 决定<sup>[12]</sup>。

尽管 HZ2 和 JD1 同为弱毒株,但 HZ2 有不同于 JD1 的特征性氨基酸,并且 JD1 的序列与弱毒株的共有序列更为接近,反映在表型上是 JD1 的免疫原性优于 HZ2,提示两种毒株有差异的位点中存在与免疫原性有关的氨基酸,尽管这些氨基酸可能并不起到直接决定弱毒表型的作用。

## 参 考 文 献

[1] Yao K, Goodwin M A, Vakharia V N. *J Virol*, 1998, 72: 2647 ~ 2654.



- [ 2 ] Bayliss C D, Spies U, Shaw K, *et al.* *J Gen Virol*, 1990, **71**: 1303 ~ 1312.
- [ 3 ] Lejal N, Costa B D, Huet J C, *et al.* *J Gen Virol*, 2000, **81**: 983 ~ 992.
- [ 4 ] Mundt E, Muller H. *Virology*, 1995, **209**: 10 ~ 18.
- [ 5 ] Brown M D, Skinner M A. *Virus Res*, 1996, **40**: 1 ~ 15.
- [ 6 ] Yu L, Song K, Zhang Y, *et al.* *Avian Dis*, 2000, **44**: 170 ~ 178.
- [ 7 ] Van den Berg T P, Gonze M, Morales d, *et al.* *Avian Pathol*, 1996, **25**: 751 ~ 768.
- [ 8 ] Lim B L, Cao Y C, Yu T, *et al.* *J Virol*, 1999, **73**: 2854 ~ 2862.
- [ 9 ] Boot H J, ter Huurne A A H M, Hoekman A J W, *et al.* *J Virol*, 2000, **74**: 6701 ~ 6711.
- [ 10 ] Schroder A, van Loon A A W M, Goovaerts D, *et al.* *J Gen Virol*, 2000, **81**: 533 ~ 540.
- [ 11 ] Kwon H M, Kim D K, Hahn T W, *et al.* *Avian Dis*, 2000, **44**: 691 ~ 696.
- [ 12 ] Schroder A, van Loon A A W M, Goovaerts D, *et al.* *J Gen Virol*, 2001, **82**: 159 ~ 169.

## GENOMIC STRUCTURE AND PROTEINS SEQUENCE ANALYSIS OF FULL-LENGTH OF SEGMENT A OF THREE INFECTIONS BURSAL DISEASE VIRUSES \*

Yu Lian Huang Yaowei Li Jianrong Song Kunhua Ye Weicheng  
(*Institute of Preventive Veterinary Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China*)

**Abstract:** The full-length of segment A of three infectious bursal disease viruses (IBDV), including an attenuated strain HZ2, an attenuated vaccine strain JD1 and a virulent field isolate ZJ2000, were cloned by long RT-PCR and sequenced respectively. All the three results revealed the identity of IBDV with two overlapping open reading frames (ORF) flanked by 5'-and 3'-noncoding regions (NCR) in 3259bp long. The strains shared high identity with each other at nucleotide or deduced amino acid level, and also had four unique sites H253, N279, T284, R330 which are common in other attenuated and some classic or highly virulent strains. The virulent strain ZJ2000 had several key amino acid mutations located in hypervariable region of VP2 and near the VP2-VP4 cleavage site of polypeptide, which is probably related to the virulence. Sequence comparison supported that VP2 is not the sole determinant of the virulence. The highly conservation in 5'-and 3'-NCR of different strains indicated the NCR may be not responsible for the virulence. But the same conservation appeared in VP5 revealed another complex relationship between VP5 and the virulence.

**Key words:** Full-length of segment A of infectious bursal disease virus (IBDV), Noncoding regions (NCR), VP5, VP2, Virulence

\* Project Granted by Chinese National 863 Program(101-j99-02)