

鸡贫血病毒哈尔滨分离株全基因克隆和序列分析*

何成强^{1 2} 丁乃峥² 李景鹏² 李云龙^{1**}

(¹ 山东师范大学生物系 济南 250014)

(² 东北农业大学生命科学学院 哈尔滨 150030)

摘 要 通过 PCR 方法克隆了从哈尔滨分离的一株鸡贫血病毒(CAV)的全基因,并对其进行了测序,该病毒基因组为环状,全长 2298bp,含有三个互相重叠的开放读码框和一个调控区。将克隆的基因与 GenBank 收录的 CAV 基因比较,同源性至少为 97%,未发现与本次克隆的 CAV 基因完全一致的分离株。与德国分离株 Cux-1a、26p4 和马来西亚分离株分别有 42、42 和 72 个核苷酸不同,同源性分别为 98.2%、98.2% 和 96.9%。与德国分离株 Cux-1b 相比,除在调控区内少一个类似增强子的重复序列外,尚有 39 处核苷酸不同。它与分离于欧洲的几株 CAV 的亲源性要比来自亚洲的马来西亚株近。对 CAV 哈尔滨分离株、26p4、Cux-1b、Cux-1a 和马来西亚株的 VP1、VP2 和 VP3 蛋白比较,VP2 的保守性最高。

关键词 PCR, 鸡贫血病毒, 基因组

中图分类号: Q785 S852 65 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2002)04-0436-06

1979 年首次于日本分离到鸡贫血病毒(chicken anemia virus CAV)以来,相继在世界各个主要养鸡业发达的国家的鸡群中分离到该病毒^[1],我国于 1992 年由哈尔滨兽医研究所在哈尔滨市郊分离 CAV^[2],并在其他多个省份用血清学方法检测到该病毒的存在^[3]。

因为 CAV 可以引起雏鸡的造血干细胞和胸腺皮质 T 细胞凋亡^[4],CAV 感染后,对幼稚引起严重贫血并可并发免疫缺陷,对成年鸡,一般表现为亚临床症状。CAV 是一个 20 面体对称的、没有囊膜的病毒^[1],它的基因组为单链环状 DNA,全长约 2.3kb。已相继对 Cux-1、26p4、日本分离株 82-8、澳大利亚分离株、TK5803、Del-ros、L-028、TR20 等进行了测序。

本文报道了从哈尔滨分离到的 CAV 全基因组及其编码的三个蛋白的氨基酸序列,并与已报道的其他 CAV 株进行了比较。

1 材料和方法

1.1 病毒及分子生物学相关材料

1.1.1 病毒 感染野生型 CAV 的雏鸡来自于哈尔滨。在本文命名为哈尔滨株(hrb)。

1.1.2 试剂和工具酶 耐热的 DNA 聚合酶 pyrobest,限制性内切酶, T4DNA 聚合酶, T4 连接酶购于 TaKaRa(大连)公司, DNA 回收试剂盒为 Clonetech 产品。

* 黑龙江科委攻关项目 编号 97SG74SG04

** 通讯作者: 李云龙, Tel. 0531-2962645

作者简介: 何成强(1967-),男,讲师,博士研究生,湖南宁乡人,主要从事于分子生物学研究,现就职于山东师范大学生命科学学院生化教研室(Email: hchengqiang@yahoo.com.cn)

收稿日期: 2001-10-11, 修回日期: 2002-02-04 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

1.1.3 质粒及宿主菌 :pUC18、DH5 α 为本实验室保存。

1.2 CAV 模板 DNA 制备及 PCR 反应

1.2.1 病毒毒力检测 :取 CAV 感染的患雏肝脏高速匀浆后 ,用 0.22 μ m 的滤膜过滤 ,滤液作 10⁻¹ 梯度稀释 ,每个梯度分别接种四只一日龄 SPF 雏鸡(购于哈尔滨兽医研究所) ,观察病毒致病能力。

1.2.2 病毒 DNA 分离 :取从野外获得的因 CAV 感染小鸡鸡肝 ,经匀浆后离心并收集上清 ,上清中加蛋白酶 K 和 SDS 至终浓度分别为 300 μ g/mL 和 5g/L ,37 $^{\circ}$ C 消化过夜。分别用酚、酚-氯仿、氯仿各抽提一次 ,再经乙醇沉淀 ,收集沉淀 ,TE 溶解备用。

1.2.3 PCR 反应引物设计和合成 :根据已报道的 Cux-1 的基因组序列设计下列 4 条引物 : a 5'-ATCGAATTCGAGTGGTACTATTTC-3'、b 5'-TGAAGGATCCCTCATTCTTAGT-3'、c 5'-GT-TCCGACACATTGAAACCCGC-3'、d 5'-GCATGCGGAATAGTAACCACTCGGAATTCC-3'。引物设计时在引物的 d 的 5' 加入了 *Sph* I 限制酶位点 ,以便获得 CAV 全基因。引物由 TaKaRa (大连)公司合成。

1.2.4 PCR 反应 :以 1.2.1 所准备 CAV 的 DNA 为模板 ,分别以引物 a 和 b、引物 c 和 d 进行两个 PCR 反应。反应流程均为 94 $^{\circ}$ C 5min ,94 $^{\circ}$ C 1min ,55 $^{\circ}$ C 1min ,72 $^{\circ}$ C 1min ,循环 35 次 ,72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。

1.3 基因克隆及序列测定

1.3.1 全基因克隆 :将所得 PCR 反应产物经琼脂糖电泳作粗步鉴定 ,其中引物 a 和 b(片段 1)、引物 c 和 d 所得的片段(片段 2)大小分别为 1.5kb 和 0.8kb ,与预期结果相同。分别用 DNA 回收试剂盒回收这两个片段。用 *Eco*RI ,*Bam*HI 消化回收的片段 1 ,与用同样的限制酶消化的 pUC18 连接。用 DNA 平滑化试剂盒(购自 TaKaRa(大连)公司)补平片段 2 ,与用 *Sma*I 消化的 pUC18 连接。将上述两种质粒转化到 *E. coli* DH5 α ,在含 Amp、X-Gal、IPTG 的 LB 平板上筛选后 ,挑取数个白色菌落提质粒进一步进行酶切鉴定 ,挑选阳性质粒。鉴定无误后即获得数个分别含片段 1 和片段 2 的质粒(pW-1 和 pW-2)的克隆。进一步将质粒 pW-2 用 *Bam*HI 和 *Sph*I 消化 ,回收片段 2 和用同样酶消化的 pW-1 连接 ,获得含 CAV 全基因的质粒 pCAV ,转化 DH5 α 扩增质粒。

1.3.2 含有目的片段的阳性克隆鉴定 :对 pW-1、pW-2 用分别引物 a、b 和引物 c、d 进行 PCR 鉴定 ,对 pCAV 分别用引物 a、b 和引物 c、d 进行 PCR 鉴定 ,考虑到 pW-1、pW-2 质粒同均有两个以上 *Hind*III 酶切位点 ,对它们各用 *Eco*RI + *Bam*HI、*Hind*III 对进行酶切鉴定。上述各反应结果均用 1% 的琼脂糖进行电泳鉴定。

1.3.3 序列测定 :挑选三个 pCAV 阳性克隆 ,用引物 R :GAGCGGATAACAATTTTCACACAGG , R1 : AACGCTCTCCAAGAAGATACTCCAC , F : CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC , F1 : CTC-CAGCTCTGATCGGGGTG , F2 : GTTTCAATGTG TCGGAACAG 对 pUC-CAV 进行双向双脱氧测序 ,试剂为 ABI PRISM[®] BigDye Terminator Cycle Ready Reaction Kit with Amplitaq[®] DNA polymerase ,FS。测序仪为 ABI PRISM 377XL DAN sequencer。测序反应由大连 TaKaRa 公司进行。

1.4 CAV 基因序列比较

在 GenBank 中 ,将测得的 CAV 哈尔滨分离株的基因组序列用 BLAST 进行比较 ,所得

的数据用 Gene Runner 软件(3.0 版)对 DNA 序列和氨基酸组成进行排序和整理。

2 结果

2.1 病毒毒力实验

患雏肝脏匀浆物的各稀释液分别接种一日龄 SPF 鸡 稀释 10⁴ 后尚可使该组鸡致死 , 因此推测该病毒应该为强毒株。

2.2 PCR 产物、pW-1、pW-2 鉴定

将 PCR 扩增产物在 1% 的琼脂糖凝胶上进行电泳。以引物 a、b 得到的片段约 1.5kb 处发现有所需的电泳带(见图 1A),以引物 c、d 得到的片段约 0.8kb(见图 1A)。在 pW-1、pW-2 转化的蓝白菌落中挑选白色菌落,扩大培养后提质粒,质粒经限制酶和 PCR 鉴定,在 1% 的琼脂糖凝胶上进行电泳,结果与设计一致(见图 1A~C)。

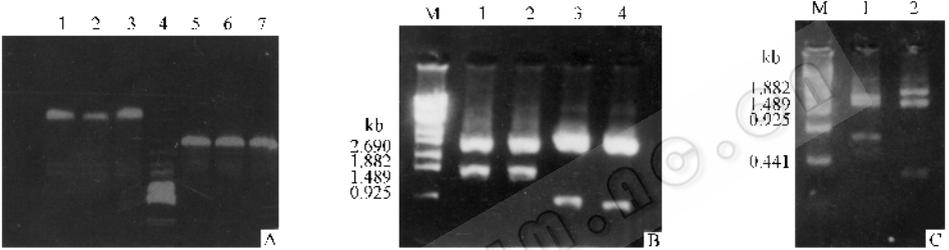


图 1 CAV 基因组片段 1、2 的 PCR 产物、pW-1 和 pW-2 鉴定

Fig.1 Identification of fragment 1 ,fragment 2 of genome of CAV Harbin strain and the recombination plasmid pW1 , pW2. The results were analyzed with 1% agarose gel electrophoresis and stained with EB

A Lines 1 2 3 are fragment 1 of genome of CAV isolated in Harbin. Line 4 is λ DNA digested by Eco T14I. Line 5 ~ 7 are fragment 2 of genome of CAV isolated in Harbin.

B M is λ DNA digested by Eco T 14I. Line 1 2 are pW1 digested by EcoRI and BamHI. Line 3 4 is pW1 digested by Hind III .

C Line 1 is λ DNA digested by Eco T14I. Line 4 is pW2 digested by EcoRI and BamHI. Line 5 is pW2 digested by Hind III .

2.3 pCAV 鉴定

将 pCAV 为模板,以引物 a、b、c、d 进行 PCR,产物在 1% 的琼脂糖凝胶上进行电泳,可以发现 CAV 片段 1 和片段 2 大小的电泳带。

EcoR I、BamH I、HindIII 分别消化 pCAV 的产物在 1% 的琼脂糖凝胶上进行电泳,结果均与预期一致,EcoR I 消化获得 2.3kb 和 2.69kb 两个片段,用 BamH I 消化后获得约 5.0kb 的片段,HindIII 消化后因为在 CAV 上有两个酶切位点,在 pUC 上尚存一个位点,因此将获得三个大小分别为 583bp、968bp 和 3.6kb 的片段。电泳发现三个反应都符合预期结果。

2.4 pCAV 序列测定与比较

进一步将 pCAV 进行双脱氧末端终止法测序,基因组的每一段至少测序 3 次,综合多次反应结果,得出从哈尔滨分离的 CAV 全基因序列,并已经将其提交 GenBank,进入号为 AF475908。发现其基因组长度为 2298bp,与大部分报道的 CAV 基因组长度一致。分析与

GenBank 中收集的 CAV 基因组比较后发现,CAV 哈尔滨株与它们的同源性在 97%~98% 之间。没有与之序列完全一致的毒株。

我们选择了德国分离的 Cux-1a、Cux-1b、马来西亚分离株、26p4(它们在 GenBank 中的进入号分别为 M81223、M55918、AF285882、D10068)通过排序,结果是与德国分离的 Cux-1b 相比,CAV 哈尔滨株基因组的调控序列中仅有 4 个 TCCGTACAGGGGGTACGTCA 类似增强子的重复序列,而德国分离株 Cux-1b 有 5 个这样的重复序列,除此以外的其他部分尚有 39 处核苷酸将发生改变;与德国分离株 Cux-1a、26p4、马来西亚分离株分别有 42、42、72 处核苷酸不同,同源性分别为 98.2%、98.2%、96.9%。看起来,与其他两株病毒相比,CAV 哈尔滨株与马来西亚分离株的亲源性较远。从排序结果我们发现变异主要发生在基因组的后 1/2 区。

分析这次克隆的 CAV 基因组序列发现它包括 3 个完整的开放读码框(ORF),大小分别为 366bp、654bp、1350bp,它们的起始密码子位置分别为 465、358 和 832 号位的核苷酸处,因此 VP3 的 ORF 完全包含在 VP2 的 ORF 内,而 VP1 的 ORF 与 VP2 的 ORF 部分重叠。这 3 个 ORF 编码 CAV 的三个蛋白 VP3、VP2、VP1。我们比较了 CAV 哈尔滨分离株、26p4、Cux-1a、Cux-1b 和 Maraysia 株的 VP1、VP2、VP3 的氨基酸序列,结果见表 1、表 2 和表 3。

表 1 CAV 哈尔滨分离株、26p4、Cux-1a、Cux-1b 和 Maraysia 株的 VP2 比较

Table 1 Comparison VP2 of CAVs Harbin 26p4, Cux-1a,

Cux-1b, Maraysia

| Strain | Code number/Amino acid changes | | | |
|--------|--------------------------------|-----|-----|-----|
| | 7 | 153 | 186 | 187 |
| hrb | A | A | E | D |
| 26p4 | G | V | G | D |
| Cux-1b | G | A | E | D |
| Cux-1a | G | V | E | N |
| Mar | G | V | E | D |

Table 2 Comparison VP3 of CAVs Harbin 26p4, Cux-1a,

Cux-1b, Maraysia

| Strain | Code number/Amino acid changes | | | | | |
|--------|--------------------------------|----|----|-----|-----|-----|
| | 64 | 70 | 73 | 103 | 116 | 118 |
| hrb | N | F | V | S | R | C |
| 26p4 | S | F | A | N | R | C |
| Cux-1b | N | F | V | S | K | R |
| Cux-1a | N | S | V | S | R | C |
| Mar | N | F | V | S | R | C |

表 3 CAV 哈尔滨分离株、26p4、Cux-1a、Cux-1b 和 Maraysia 株的 VP1 比较

Table 3 Comparison VP1 of CAVs Harbin 26p4, Cux-1a, Cux-1b, Maraysia

| strain | Code number/Amino acid changes | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|--------------------------------|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 14 | 29 | 75 | 92 | 96 | 139 | 142 | 157 | 251 | 254 | 265 | 287 | 290 | 294 | 321 | 446 | 447 |
| hrb | A | R | V | G | M | K | E | V | R | E | T | T | A | Q | A | G | T |
| 26p4 | A | R | V | G | M | K | E | M | R | G | T | T | A | Q | A | E | T |
| Cux1b | S | R | V | G | M | K | D | V | Q | G | T | A | A | Q | A | G | T |
| Cux1a | A | K | V | G | M | K | D | V | Q | E | N | A | A | Q | R | G | T |
| Mar | A | R | I | E | L | Q | Q | V | R | E | T | T | P | P | A | G | S |

3 讨论

CAV 感染的成年鸡群一般并不表现明显的临床症状,其危害作用常常会被忽略。但 CAV 感染后,破坏鸡的免疫系统,导致其他病原如马立克氏病毒、传染性法氏囊病毒、网状内皮增生病毒等混合感染,引发疾病的爆发^[4]。另外,感染 CAV 的病鸡会降低其他疫苗,例如新城疫苗的效价^[9]。因此,研制预防该病毒的疫苗极为重要。目前,因为制备该病毒的常规疫苗比较困难,所以我国该病毒的疫苗研究进展缓慢。为了研究 CAV 病毒的基因工程疫苗,我们在哈尔滨获得了一株野生型的 CAV 病毒。已经通过动物实验证明了该病毒为强毒株,并且克隆了这株 CAV 的全基因。而且,经测序、与 GenBank 中其他 CAV 分离株基因比较得到了证实。在测序时,我们考虑了 PCR 过程可能造成基因的变异,故对该 CAV 基因组的各区段至少测序三次,综合多次测序结果获得 CAV 的基因序列,因此所获得的序列应该能够真实反映了该病毒株基因组的核苷酸序列。

目前一般认为 CAV 基因组的编码区主要编码 3 种蛋白(VP1、VP2 和 VP3)。其中,VP1(51.6kD)为病毒的唯一衣壳蛋白^[5,6],VP2(24kD)的功能不详,可能对 VP1 的正确组装有辅助作用^[7]。VP3(13.6kD)具有诱导鸡胸腺皮质 T 细胞和造血干细胞凋亡的功能,并被发现可以特异性引起人肿瘤细胞凋亡,又被称为凋亡素^[8]。所有已报道的 CAV 的这 3 个 ORF 均有下列特点,VP3 的 ORF 完全包含在 VP2 的 ORF 内,而 VP1 的 ORF 与 VP2 的 ORF 部分重叠。CAV 哈尔滨分离株的 ORF 组成与其他报道的 CAV 完全一致。因为已报道的 CAV 基因组一般为环状,因此,在设计引物时考虑了这一特点,根据已报道 Cux-1 的序列,设计了两对引物 a、b 和 c、d。其中,引物 a 和引物 d 为病毒基因组的一段互补区,而且引物 a 的起始点核苷酸为引物 d 的终止点核苷酸,从引物 a、b 和引物 c、d 均可以扩增出相应条带来看,该病毒的基因组也为闭合环状 DNA。

比较我们克隆的 CAV 基因组与 GenBank 中收录的 CAV 基因组序列,CAV 哈尔滨株的变异不大,同源性最高的为 98.8%(29/2298),最低为 96.9%。从病毒毒力试验结果看,这些核苷酸的变化可能并没有致弱病毒的致病性。

迄今为止,发现 CAV 仅有一种血清型,从对 VP1、VP2 和 VP3 的比较结果进一步证明了 CAV 是比较保守的病毒。CAV 哈尔滨分离株 VP1 并未出现新的氨基酸,因此它也可能不是新的血清型病毒,有必要进行血清学实验进一步证明。从表 1、2 和 3 中还可以看到,VP3 蛋白的最容易发生变异(6/121),VP1 次之(17/449),VP2 最低(4/217)。这一规律似乎暗示了 VP2 在病毒中有重要的作用,尽管 VP2 并非病毒的衣壳蛋白,也非毒力蛋白,Notorn 等认为 VP2 的作用是协助 VP1 维持正确表位必需的^[7],可能其功能尚不止此,应当进一步通过实验进行研究,才能深入阐明 CAV 的致病机制。

总之,我们克隆了 CAV 哈尔滨分离株的全基因,对之进行了测序,并通过与其他 CAV 株基因组的比较得到了证实,为进行 CAV 的基因工程疫苗的研制奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Rosenberger J K, Cloud S S. *Poult Sci*, 1998, 77(8):1190~1192.
- [2] 崔现兰, 辛桂香, 吴东来, 等. 中国畜禽传染病, 1992, 6:3~5.
- [3] 李孝欣, 徐为燕, 唐桂云. 中国兽医杂志, 1993, 19(1):10~11. 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [4] McNulty M S. *Avian Pathol* ,1991 **20** :187 ~ 203.
- [5] Renshaw R W ,Soine C ,Weinkle T ,et al. *J Virol* ,1996 **70**(12) :8872 ~ 8878.
- [6] Pallister J ,Fahey K J ,Sheppard M. *Vet Microbiol* ,1994 **39**(1 ~ 2) :167 ~ 78.
- [7] Noteborn M H ,Verschuereen C A ,Koch G ,et al. *J Gen Virol* ,1998 **79**(Pt 12) :3073 ~ 3077.
- [8] Noteborn M H ,Todd D ,Verschuereen C V ,et al. *J Virol* ,1994 **68**(1) :346 ~ 351.
- [9] 刘忠贵,郑世民,杨丽萍,等.畜牧兽医学报,2001 **32**(2) :187 ~ 191.

Gene Cloning and Sequencing of Chicken Anemia Virus(CAV) Isolated From Harbin

He Chengqing¹ Ding Naizheng² Li Jingpeng² Li Yunlong^{1*}

(¹ *Biologic Department of Shandong Normal University ,Jinan 250014 ,China*)

(² *Life Science Colleet of Northeast Agriculture University ,Harbin 150030 ,China*)

Abstract : A Chicken anemia virus has been isolated from a chicken flock in Harbin of China. The genome of the ivrus was cloned through polymerase chain reaction(PCR) and sequence of the genome was analyzed. The cycle genome is made of 2298 base pairs including three overlapping open reading frames(vp1 ,vp2 ,vp3)and a regulative region. Comparing sequence of the genome through BLAST in GenBank ,this sequence exhibits 96.9% identity with other genome of CA Vs and least. Multiple alignment of this genome of this virus ,26p4 ,strain isolated in Germany ,strain isolated in Malaysia and Cux-1 found that this sequence exhibits 98.2%(42/2298) ,98.2%(42/2298) ,96.9%(72/2298)and 97.5%(60/2319)identify with them ,respectively. A new CAV strain was isolated and it has better identify with CAV isolated in Europe countries than is Asia country Malaysia. Multiple alignment of VP1 ,VP2 ,VP3 of 26p4 ,strain isolated in Germany ,strain isolated in Malaysia ,Cux-1 and strain isolated in Harbin of China found the VP2 the most conservative.

Key words : Polymerase chain reaction , Chicken anemia virus , Genome

* Author for Correspondence

重 要 声 明

为适应我国信息化建设需要,扩大作者学术交流渠道,本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》和“中国期刊网”,如作者不同意将文章编入该数据库,请在来稿时声明,本刊将做适当处理。另外,从2002年开始,凡被本刊录用的文章均统一纳入“万方数据—数字化期刊群”,有不同意见者,请事先声明。本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬,不再另付。

从2000年开始,凡被本刊录用的稿件,编辑部将及时发出录用通知;对未被录用的稿件,将及时函告,并说明原因,稿件一律不退,请作者自留底稿。

《微生物学报》编辑部