微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
48(12)：1666~1670; 4 December 2008
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
http://journals.im.ac.cn

鸡传染性法氏囊病病毒 Gt 株 VP5 基因缺失株感染性克隆的构建

秦立廷，祁小乐，高玉龙，高宏雷，步志高，王笑梅*

（中国农业科学院哈尔滨兽医研究所，兽医生物技术国家重点实验室，禽传染病研究室，哈尔滨 150001）

摘要：传染性法氏囊病病毒 (IBDV)是双链，双节段 RNA 病毒，其基因组由 A、B 两个节段组成，编码结构蛋白 VP1-VP4 和非结构蛋白 VP5。【目的】利用反向遗传操作构建拯救 VP5 基因缺失重组 IBDV。【方法】利用体外定点突变技术，缺失 IBDV Gt 株 VP5 基因，通过多重 PCR 在基因组两端分别引入锤头状核酶序列(HamRz)和丁肝病毒核酶序列(HdvRz)。将带有核酶序列的 IBDV 基因组插入载体 pCAGG 的β肌动蛋白启动子下游，构建了 IBDV 感染性克隆 pCAGGmGtA △VP5HRT，将该感染性克隆与 pCAGGmGtBHRT 共转染 DFⅠ细胞。【结果】RT-PCR 和间接免疫荧光均显示获得重组病毒，将其命名为 rmGtA △VP5。IBDV VP5 基因缺失感染性克隆的成功构建为从分子水平上深入研究 vp5 基因功能奠定了基础。

关键词：传染性法氏囊病病毒；VP5；感染性克隆；重组病毒
中图分类号：Q933　　文献标识码：A　　文章编号：0001-6209 (2008) 12-1666-05

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）引起的一种危害鸡的急性、高度接触性传染病[1]。已知 IBDV 存在两个血清型，血清 I 型和血清Ⅱ型。血清Ⅰ型 IBDV 对鸡具有致病性，血清Ⅱ 型分离自火鸡，对鸡和火鸡均无致病性[2]。IBDV 是双链、双节段 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，B 节段（约 2.8 kb）编码 VP1 蛋白，为 RNA 依赖的 RNA 聚合酶[3]。A 节段（约 3.3 kb）具有两个相互部分重叠的开放阅读框（Open reading frame，ORF），ORF1 编码分子量约为 110 kDa 的前体融合蛋白(NH2-VP2-VP4-VP3-COOH)，前体融合蛋白经过加工，成熟后变为 VP2、VP3 和 VP4[4]。ORF2 编码 VP5 蛋白，也称非结构蛋白（Nonstructural protein，NSP)。IBD 能引起雏鸡的免疫抑制及多种疫苗的免疫失败，增加病原体的易感性，降低幸存鸡的生长率，是目前影响世界养禽业的一种非常重要的疾病[5]。

VP5 蛋白富含半胱氨酸，高度疏水，在血清Ⅰ型 IBDV 中高度保守，强、弱毒之间仅存在少量氨基酸差异，然而两个血清型 IBDV 的 VP5 蛋白之间存在较大差异[6]。Mundt 等首先在 IBDV 感染的细胞中检测到 VP5 蛋白，而在 IBDV 病毒粒子中检测不到 VP5 蛋白 [7]。此后，国外学者利用反向遗传操作系统获得 VP5 基因缺失的突变株，发现 VP5 蛋白在体外复制过程中是非必需的，而且 VP5 基因缺失病毒，感染鸡后降低了 IBDV 对鸡的致病性[8,9]；Yao 等通过体外表达证实 VP5 可以引起细胞凋亡[10]。Lombardo 等发现 VP5 表达后积聚在细胞膜上并可以引起细胞的崩解，推测 VP5 蛋白在病毒的释放过程中发挥作用[11]。2006 年，Liu 等又发现 VP5 在病毒复制早期可以抑制细胞凋亡[12]，显然 VP5 蛋白在 IBDV 的

基金项目：国家“973 项目”— 国家重点基础研究发展规划项目(2005CB523202)
*通讯作者。Tel: +86-451-85935047; E-mail：xmw@hvri.ac.cn
作者简介：秦立廷(1981–), 男，山东泰安人，博士研究生，主要从事动物病毒学研究。Tel: +86-451-85935078; E-mail:qinliting@yahoo.com.cn
收稿日期：2008-06-24；修回日期：2008-09-02

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

复制和致病性中发挥重要而复杂的作用，但其分子机制至今尚不清楚。

作为 RNA 病毒的 IBDV，在其生命过程中不经历 DNA 阶段，对其进行分子水平修饰研究，必须借助反向遗传操作技术[13]。作为双链双节段 RNA 病毒，IBDV 的拯救有其特殊性，此前，本实验室借助 RNA 聚合酶Ⅱ系统成功拯救 IBDV Gt 株[14]。本研究通过体外定点突变技术缺失 IBDV Gt 株 A 节段 VP5 基因；用多重 PCR（Multi-PCR）在基因组两端引入了锤头状核酶序列（Hammerhead ribozyme ，HamRz）和丁肝病毒核酶序列（Hepatitis delta ribozyme，HdvRz），构建感染性克隆 pCAGGmGtA△VP5HRT，与 pCAGGmGtBHRT 共转染拯救出重组 IBDV[14]。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和病毒：重组质粒 pUC18-GtA（克隆有 IBDV Gt 株全基因组的 A 节段）由本课题组构建保存；真核表达载体 pCAGG 和 DFⅠ细胞由哈尔滨兽医研究所步志高研究员馈赠；原代鸡胚成纤维细胞（CEF）按常规方法用 SPF 鸡胚制备；抗 IBDV VP2 单克隆抗体，抗 IBDV VP5 单克隆抗体由本课题组制备；重组质粒 pCAGGmGtBHRT 和重组病毒 rmGt 由祁小乐博士构建和拯救[14]。Gt 为血清Ⅰ型细胞适应株 IBDV，经超强毒 Gx 株传代致弱。

1.1.2 主要试剂和仪器：各种限制性内切酶，PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase、DNA Marker、dNTP 等购于大连宝生物公司；*Dpn*I 为 NEB 公司产品；胶回收试剂盒和质粒小提试剂盒购于上海华舜生物工程有限公司；Plasmid Midi Kit 为 QIAGEN 产品；Lipofectamine™2000，SuperScrime™Ⅲ Reverse Transcriptase 为 Invitrogen 产品；Opti-MEMⅠMedium 为 GIBCO 产品；荧光素（FITC）标记的羊抗鼠 IgG 为 Sigma 产品。

1.2 引物设计与合成

用于定点突变，基因组两端核酶引入和 RT-PCR 的引物见表 1，由英俊生物技术有限公司（invitrogen）合成。

表 1 引入突变，核酶结构和 **RT-PCR** 的引物

Table 1 Primers for mutation, ribozyme sequences introduction and RT-PCR

Primer	Sequence（5′→3′）	Orientation	Position/nt
99U	CGCTATCATTGATCGTTAGTAGAGA	+	86–110
99L	TCTCTACTAACGATCAATGATAGCG	–	110–86
Au01	TGAGGACGAAACTATAGGAAAGGAATTCCTATAGTCGGATACGATCGGTCTGAC	+	–36–18
Al01	CGGACCGCGAGGAGGTGGAGATGCCATGCCGACCCGGGGACCCGCGAACGGATC	–	3242–+35
Au02	**ATTA***ATCGAT*TGTTAAGCGTCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACTATAGGAAAG	+	–58––15
Al02	GAGTGGACGTGCGTCCTCCTTCGGATGCCCAGGTCGGACCGCGAGGAGGTGGAG	–	+16–+69
Al03	**ATTA***GGTACC*CGCCCTCCCTTAGCCATCCGAGTGGACGTGCGTCCTCCTTC	–	+48–+88
up	ACAGGCCGTCAAGGTCTTGT	+	39–58
down	ATCAACCCATTGTAGCTAAC	–	564–545

Note: The nucleotides in box are mutant sites. Ribozyme sequences are underline. Restriction sites used are italic and extra nucleotides are bold. Orientation of the virus-specific sequence of the primers is shown as sense (+) or antisense (–). The “+” or “–” symbols in front of the positions of nucleotides mean that the nucleotides positions are in the upstream or downstream of the genome, respectively. The positions where the primers bind (nucleotide number) are in accordance with the published sequence of strain Gt (DQ403248)[14].

1.3 感染性分子克隆的构建

以 pUC18-GtA 为模板，用 PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase 通过 PCR 的方法突变 VP5 基因起始密码子，引物是 99U/99L（表 1）。然后用 *Dpn*I 降解 PCR 产物中甲基化的模版 pUC18-GtA，将处理过的 PCR 产物转化感受态细胞 DH5a，挑取若干克隆进行测序。选取引入突变克隆（pUC18-mGtA）通过多重 PCR 分三步在基因组 A 节段的 5 端引入 HamRz （58 bp），在 3 端引入 HdvRz （88 bp）。第一步 PCR 以 pUC18-mGtA 为模板，下一步 PCR 以上一步 PCR 产物为模板，三步所用的引物分别是 Au01/ Al01、Au02/ Al02、Au02/ Al03，将最终 PCR 产物命名为 mGtA△VP5HRT。用 *Cla*Ⅰ和 *Kpn*Ⅰ分别处理 mGtA△VP5HRT 和真核表达载体 pCAGG，纯化后连接，重组质粒双酶切鉴定，选取阳性质粒进行全长测序，测序正确克隆命名为 pCAGGmGtA△VP5HRT。

1.4 转染

用 QIAGEN Plasmid Midi Kits 中量提取重组质粒。按照 Invitrogen 说明书，各取 2 μg 质粒 pCAGGmGtA△VP5HRT 和 pCAGGmGtBHRT，采用 Lipofectamine™

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

2000 脂质体介导转染 DFⅠ细胞（单层细胞生长至 90%）。同时设立空白对照（转染空载体 pCAGG）。转染后 4 h 吸去细胞上清，用 Hanks 液洗细胞 3 次，每个孔中加入 2 mL DMEM（含 10%PAA 胎牛血清）置 37℃ CO_2 继续培养。转染后 72 h 收获病毒，反复冻融 3 次后连续在 CEF 上传代，直到出现明显细胞病变，拯救重组病毒命名为 rmGt△VP5。

1.5 IFA 检测病毒

将重组病毒 rmGt△VP5 和 rmGt 以 MOI=1 感染 CEF，16 h 后，75%乙醇固定细胞，分别以 1:100 稀释抗 IBDV-VP2 单克隆抗体和抗 IBDV-VP5 单克隆抗体为一抗，作用 1 h。PBST（0.05% Tween-20）洗涤后加入 1:100 倍稀释荧光素(FITC)标记的羊抗鼠 IgG 为二抗，作用 1 h，PBST 洗涤后荧光显微镜（Leica DMIRES2）观察结果。同时设非感染细胞对照。

1.6 RT-PCR 鉴定重组病毒及其基因组的稳定性

用 RNeasy Mini Kit（QIAGEN）按说明书从第四代细胞毒中提取 RNA，然后用 SuperScrime^{TM}III Reverse Transcriptase （Invitrogen）进行反转录。以 up 和 down 引物扩增包含突变位点片段，将 PCR 产物测序。为了检测重组病毒的基因稳定性，将重组病毒在体外连续传代 10 代以上，用同样方法扩增基因组 A 节段和 B 节段，测序分析。

2 结果

2.1 突变位点的引入

设计一对包含引入突变位点完全互补的引物（99 U/99L），以 pUC18-GtA 为模板，进行低循环数 PCR，回收 PCR 产物，用 *Dpn* I 消化除去甲基化的模板，直接转化感受态细胞，选取若干克隆进行全长测序，选择引入突变的克隆（ATG→ATC），命名为 pUC18-mGtA99。

2.2 感染性分子克隆的构建

以 pUC18-mGtA99 为模板，三步 PCR 后引入核酶序列，获得 PCR 产物 mGtA△VP5HRT，大小为 3426 bp(图 1)，双酶切后连至真核表达质粒 pCAGG，构建重组质粒 pCAGGmGtA△VP5HRT。重组质粒经 *Cla*Ⅰ/*Kpn*Ⅰ双酶切后获得约 4740 bp 和 3420 bp 的片段，与预期大小相符（图 2）。

2.3 间接免疫荧光

分别以重组病毒 rmGt△VP5 和 rmGt 感染 CEF，以 1:100 稀释抗 IBDV-VP2 单克隆抗体和 1:100 稀释抗 IBDV-VP5 单克隆抗体为一抗检测重组病毒，结果

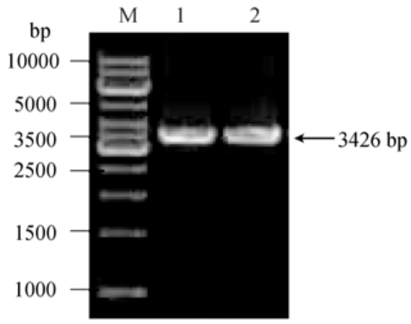

图 1 PCR 产物结果

Fig.1 Result of PCR production. M. 1 kb marker; 1, 2. PCR production.

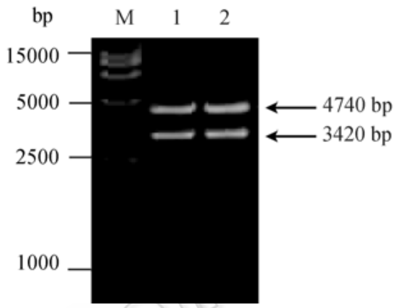

图 2 重组质粒酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid. M. DL15000; 1, 2. recombinant plasmid.

抗 IBDV-VP2 单克隆抗体检测 rmGt△VP5 和 rmGt，均出现特异性荧光（图 3-A，B），正常非感染细胞中未出现特异性荧光（图 3-C）；抗 IBDV-VP5 单克隆抗体检测两个重组病毒，仅 rmGt 感染细胞出现特异性荧光（图 3-D），而 rmGt△VP5 感染细胞和正常非感染细胞中均未出现特异性荧光（图 3-E，F），结果表明：共转染后获得重组病毒，重组病毒 rmGt△VP5 缺失表达 VP5 蛋白。

2.4 RT-PCR 检测重组病毒及其基因组的稳定性

利用 RT-PCR 扩增第四代病毒感染 CEF 总 RNA，特异性引物 up 和 down 扩增包含突变位点大小为 526 bp 片断，经测序分析：包含突变位点（ATG→ATC），结果表明：所获得重组病毒为 VP5 基因缺失的重组病毒 rmGt△VP5。为了检测重组病毒的基因稳定性，将重组病毒在体外连续传代 10 代以上，提取总 RNA，分段扩增 A 节段和 B 节段，测序结果表明：病毒基因组稳定存在，未发生任何突变。

3 讨论

IBD 于 1957 年首先发生在美国，相继流行主要养禽国家，呈世界性分布[5]，尤其是 IBDV 变异株和

journals.im.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

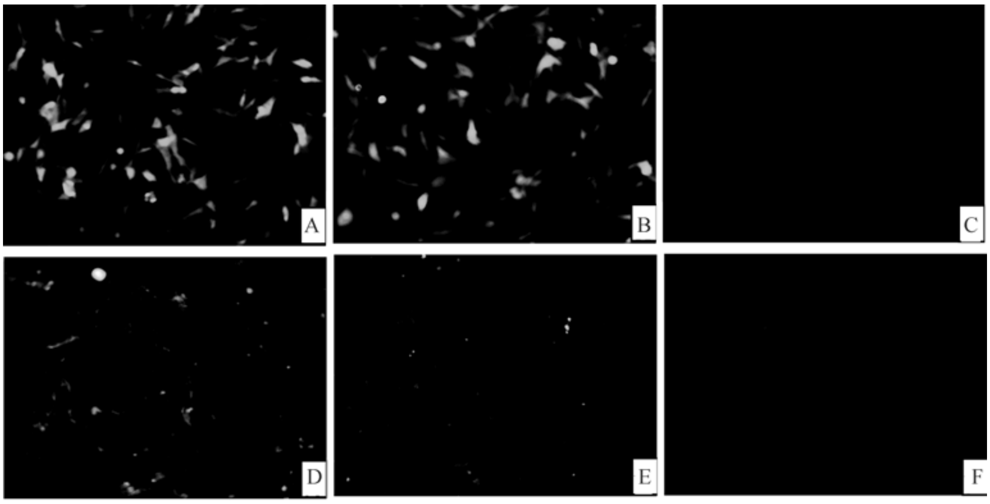

图 3　IFA 检测重组病毒

Fig. 3　IFA detecting recombinant virus. A, D: CEF infected by rmGt; B, E: CEF infected by rmGt△VP5; C,F: CEF uninfected.

IBDV 超强毒株的出现，给该病的防治带来巨大困难。因此，IBDV 也是国内外学者研究的热点，由于 IBDV 是双链双节段 RNA 病毒，其复制过程不经历 DNA 阶段，不能对其直接进行分子水平操作，严重影响了 IBDV 的基因功能和分子致病机制的研究。1981 年，Racaniello 等首次利用反向遗传操作技术获得具有感染性的人脊髓灰质炎病毒[15]，此后 RNA 病毒的研究取得巨大的进步。IBDV 由 Mundt 等于 1996 年首次拯救，随后 IBDV 基因功能、致病机制、毒力和细胞嗜性的分子基础等研究取得了较大进展[8,9,18]。

Mundt 等在大肠杆菌中表达 A 节段的小 ORF，大小为 21 kDa，并在感染 IBDV 的 CEF 中检测到该蛋白，将其命名为 VP5 蛋白[7]，随后研究者对 VP5 蛋白进行大量研究，虽然取得一定进展，但至今还不能解释 VP5 蛋白在 IBDV 的复制以及致病性中的作用具体机制。Yao 等发现 VP5 基因缺失的突变株加大接种剂量后，也不能引起法氏囊病变，认为 VP5 基因的缺失可以降低病毒的毒力，是 IBDV 缺失疫苗的重要候选基因[9]。为此，本研究利用体外定点突变技术，突变小 ORF 的起始密码子，构建 VP5 基因缺失感染性克隆，转染 DFI 细胞，拯救出缺失 VP5 基因的重组病毒 rmGt△VP5，为在体内外研究 VP5 蛋白的功能和缺失标记疫苗的研发奠定了基础。

利用反向遗传技术拯救病毒是研究 RNA 病毒的重要手段，国外构建 IBDV 的感染性克隆多是将基因组克隆在 T7 启动子下游[16,17]，需要体外转录或给转染用细胞额外提供 T7 RNA 聚合酶，比较麻烦。考虑到 IBDV 基因组较小，RNA 聚合酶Ⅱ表达系统应该更适用于 IBDV 的拯救。此外，基因组的完整性，特别是 5 末端和 3 末端完整性对病毒的拯救成败和效率有重大影响[18]，为此我们运用多重 PCR 将具有自我剪切功能的 HamRz 和 HdvRz 的 cDNA 分别引入基因组 cDNA 的两端，实现从转录水平上控制 IBDV 基因组的完整性，然后，将引入融合核酶结构的基因组插入真核表达载体 pCAGG 的 CMV 增强子和 β 肌动蛋白启动子下游，构建了 IBDV 感染性克隆 pCAGGmGtA△VP5HRT，与 B 节段的感染性克隆 pCAGGmGtBHRT 共转染 DFⅠ细胞，借助 RNA 聚合酶Ⅱ系统，成功拯救出重组 IBDV。β肌动蛋白启动子是一个较强的真核启动子，与 CMV 增强子的联合使用增强了外源基因的表达水平和提高了重组病毒的拯救效率。用抗 IBDV-VP2 特异性单克隆抗体对拯救毒进行检测，显示特异性荧光信号，表明获得重组病毒粒子，进一步利用抗 IBDV-VP5 特异性单克隆抗体检测重组病毒感染的 CEF 细胞，仅 rGt 感染细胞出现荧光信号，而本文拯救的 rmGt△VP5 未出现荧光信号，说明 rmGt△VP5 缺失表达 VP5 蛋白。病毒经过体外传代后，RT-PCR 分别扩增包含突变位点的片断和 A，B 节段，结果显示：除突变位点（ATG→ATC）外，未发生任何突变，重组病毒能够在体外稳定传代。

本研究构建拯救的 VP5 基因缺失的重组病毒 rmGt△VP5，对研究 IBDV 致病性，复制和病毒粒子的释放以及 IBDV 分子标记疫苗的研发具有重要意义。

参　考　文　献

[1]　禽病学. 苏敬良, 高福, 索勋, 主译. 第十一版. 中国农业出版, 2005, pp178–199.

[2]　Mcferran JB, Mcnvlty ER, McKillop TJ, *et al*. Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

fowl, turkey and duck: demonstration of a second serotype. *Avian Pathology*, 1980, 9: 395–404.

[3] Einem UV, Gorbalenya AE, Schirrmeier H, *et al*. VP1 of infectious bursal disease virus is an RNA-dependent RNA polymerase. *Journal of General Virology*, 2004, 85: 2221–2229.

[4] Fahey KJ, O'Donnell IJ, Azad AA. Characterization by Western blotting of the immunogens of infectious bursal disease virus. *Journal of General Virology*, 1985, 66: 1479–1488.

[5] Müller H, Islam MR, Raue R. Research on infectious bursal disease-the past, the present and the future. *Veterinary microbiology*, 2003, 97: 153–165.

[6] 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. 中国预防兽医学报(*Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*), 2005, 27(1): 25-28.

[7] Mundt E, Beyer J, Müller H. Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virus infected cells. *Journal of general virology*, 1995, 76: 437–443.

[8] Mundt E, Koliner B, Kretzschmar D. VP5 of infectious bursal disease virus is not essential for viral replication in cell culture. *Journal of virology*, 1997, 71(7): 5647–5651.

[9] Yao K, Goodwin MA, Vakharia VN, *et al*. Generation of a mutant infectious bursal disease virus that does not cause bursal lesions. *Journal of virology*, 1998, 72: 2647–2654.

[10] Yao K, Vakharia VN. Induction of apoptosis in vitro by the 17-kDa nonstructural protein of infectious bursal disease virus possible role in viral pathogenesis. *Virology*, 2001, 285: 50–58.

[11] Lombardo E, Maraver A, Espinosa L, *et al*. VP5, the nonstructural polypeptide of infectious bursal disease virus, accumulates within the host plasma membrane and induces cell lysis. *Virology*, 2000, 277: 345–357.

[12] Liu MH, Vakharia VN. Nonstructural protein of infectious bursal disease virus inhibits apoptosis at the early stage of virus infection. *Journal of virology*, 2006, 80(7): 3369–3377.

[13] Boyer J, Haenni A. Infectious transcripts and cDNA clones of RNA virus. *Virology*, 1994, 198: 415–426.

[14] Qi XL, Gao YL, Gao HL, *et al*. An improved method for infectious bursal disease virus rescun using RNA polymerase II system. *Journal of virological methods*, 2007, 142(1-2): 81–88.

[15] Racaniello VR, Baltimore D. Cloned polivirus comlementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science*, 1981, 214: 916–919.

[16] Mund E, Vakharia VN. Synthetic transcripts of double-stranded Birnavirus genome are infectious. *Pro Natl Acad Sc USA*, 1996, 93: 11131–11136.

[17] Boot HJ, Dokic K, Peeter BPH. Comparition of RNA and cDNA transfection methods for rescue of infectious bursal disease virus. *Journal of virological methods*, 2001, 97: 67–76.

[18] 黄耀伟, 李龙, 于涟. 人类及动物 RNA 病毒的反向遗传系统. 生物工程学报(*Chinese Journal of Biotechnology*), 2004, (203): 311–318.

Cloning of infectious bursal disease virus （Gt strain） lack of VP5 gene

Liting Qin, Xiaole Qi, Yulong Gao, Honglei Gao, Zhigao Bu, Xiaomei Wang *

(*Division of Avian Infectious Diseases*, *National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology*, *Harbin Veterinary Research Institute*, *Chinese Academy of Agricultural Sciences*, *Harbin* 150001, *China*)

Abstract: Infectious bursal disease virus （IBDV) belongs to genus *Avibirnavirus* of the family *Birnaviridae*. The genome of IBDV consists of two segments of double-strand RNA, which encode four structural protein VP1-VP4 and one non-structural protein VP5. **[Objective]**To study the function of VP5 of IBDV, the recombinant virus, lack of VP5 gene, was constructed and rescued by reverse genetic technique. **[Methods]** We deleted the VP5 gene （on segment A) of IBDV Gt strain by silence the start codon （ATG-ATC) using site-directed mutagenesis. The full length cDNA of segment A was flanked by hammerhead ribozyme and hepatitis delta virus ribozyme, which was introduced into an eukaryotic expression vector PCAGGS, under the strong chicken β actin promoter. The recombinant plasmid was named as pCAGGmGtA △VP5HRT. Co-transfection was carried with PCAGGmGtAdVP5HRT and PCAGGmGtBHRT in DF-I cells. **[Results]** Recombinant virus was successfully rescued, which was verified by RT-PCR and indirect immnuofluorescence assay. The rescusd virus could be a very helpful platform for further study of VP5 biological function.

Keywords: infectious bursal disease virus; viral protein 5; infectious clone; virus rescue

Supported by the Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2005CB523202)
*Corresponding author. Tel: +86-451-85935047; E-mail: xmw@hvri.ac.cn
Received: 24 June 2008/Revised: 2 September 2008

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn