

李伟豪,王帅涛,常洪涛,等. 鸡传染性支气管炎病毒 ck/CH/HN/1205 株的分离鉴定及 *SI* 基因的分子特征[J]. 江苏农业科学,2013,41(6):168-171.

鸡传染性支气管炎病毒 ck/CH/HN/1205 株的分离鉴定及 *SI* 基因的分子特征

李伟豪,王帅涛,常洪涛,刘红英,王川庆,赵 军,王新卫

(河南农业大学牧医工程学院,河南郑州 450002)

摘要:2012 年 3 月从河南省某疑似患鸡传染性支气管炎鸡场中分离到 1 株鸡传染性支气管炎病毒,通过鸡胚矮小化试验、鸡红细胞凝集试验、干扰新城疫病毒增殖试验、动物回归试验和 RT-PCR 试验对该毒株进行了鉴定,并对分离株的 *SI* 基因进行序列分析。结果显示:该毒株能使鸡胚形成典型的“侏儒胚”;病毒尿囊液经胰酶处理后可凝集鸡红细胞,效价达 2^8 ;病毒能够显著干扰鸡新城疫病毒 LaSota 株在鸡胚中的增殖;病毒可致使 15 日龄 SPF 雏鸡出现典型的鸡传染性支气管炎病变。其 *SI* 基因全长为 1 620 bp,与 GenBank 中已经发表的部分国内外毒株 *SI* 基因的核苷酸同源性在 75.6%~99.1% 之间;系统进化分析显示,分离株属于 QX-like 基因型,与疫苗株 H120、W93 的核苷酸序列同源性仅为 78.5% 和 78.3%,亲缘关系较远。

关键词:鸡传染性支气管炎病毒;分离鉴定;*SI* 基因;遗传进化分析

中图分类号: S852.65⁺7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)06-0168-04

鸡传染性支气管炎(avain infectious bronchitis, IB)是由鸡传染性支气管炎病毒(avain infectious bronchitis virus, IBV)引起的鸡的一种急性、高度接触性传染病^[1],常给鸡养殖企业带来巨大经济损失。目前主要采用疫苗接种的方法来预防该病,但 IBV 的 RNA 聚合酶缺乏校正能力,使得 IBV 极易发生点突变,基因缺失、插入和重组等,进而导致 IBV 的变异,血清型众多^[2-3]。据报道,全世界已有 30 多个血清型,不同血清型或变异株之间交叉免疫性很低^[4]。目前,我国多个血清型/基因型的 IBV 毒株流行,但是国内广泛使用的疫苗属于马赛诸塞型(简称 Mass-type)毒株,包括 H120、H52、W93、D41 等,这就导致即使在免疫良好的情况下,鸡群依然会受 IBV 变异株的威胁。显然,在实际生产中加强 IB 的监测,以及进行 IBV 的分子流行病学等研究对于防控该病具有实际指导意义。IBV 的基因组为线状不分节段的单股正链 RNA,

其核酸有感染性,基因组大小约为 27.6 kb,该病毒含有 4 种结构蛋白,即膜蛋白(membrane, M)、小膜蛋白(small envelope, E)、核蛋白(nucleocapsid, N)和纤突蛋白(spike, S)。IBV 表面的纤突结构由 S 蛋白构成,翻译后的 S 蛋白前体蛋白在跨膜时变为 2 个蛋白亚单位,分别是 N 端的 S1 蛋白和 C 端的 S2 蛋白。S1 蛋白是 IBV 的主要免疫原蛋白,激发机体产生病毒中和(virus neutralization, VN)抗体和血凝抑制(haemagglutination inhibition, HI)抗体,病毒的组织嗜性和毒力与 S1 蛋白 N 端相关^[5-6]。S1 蛋白也是 IBV 抗原性发生变更的主要部位,因此, *SI* 基因及其编码蛋白是 IBV 研究的热点。本研究对采自河南南阳某鸡场疑似感染 IBV 鸡群的病料进行病毒分离鉴定,并对其 *SI* 基因进行测序及遗传进化分析,以了解 IBV 河南流行株的病原生物学特性、分子流行病学特征,为该病的防控奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

病料采自河南南阳某鸡场疑似感染 IBV 鸡群具有特征病变的病死鸡肾脏, -70℃ 保存;10 日龄健康鸡胚和雏鸡均购自郑州市瑞祥孵化厂;新城疫病毒(NDV) LaSota 疫苗株为笔者所在实验室保存毒株; *Taq* DNA 聚合酶、pMD18-T 载

营养学报,2005(1):1-3.

[4] 瞿颂义,郑天珍,李 伟. 缩胆囊素和促胰液素对豚鼠离体胃平滑肌运动的作用[J]. 生理学报,1995,47(3):305-309.

[5] Gregory P C, Miller S J. Influence of duodenal digesta composition on abomasal outflow, motility and small intestinal transit time in sheep [J]. J Physiol, 1989, 413:415-431.

[6] Forbes J M, Barrio J P. Abdominal chemo- and mechanosensitivity in ruminants and its role in the control of food intake[J]. Exp Physiol, 1992, 77(1):27-50.

收稿日期:2012-11-05

基金项目:国家农业科技成果转化资金(编号:2011GB2D000007)。

作者简介:李伟豪(1985—),男,河南襄城人,硕士,主要从事动物传染防治研究。E-mail:liweihao918@163.com。

通信作者:王新卫,副教授,主要从事动物传染病学与免疫学研究。E-mail:xinweicli@126.com。

奶牛真胃中不同 VFA 种类和浓度对抑制真胃平滑肌的收缩强度影响不同。

参考文献:

[1] 徐占云,秦睿玲,李继连. 奶牛皱胃异位发病因素的调查[J]. 中国兽医杂志,2008,44(3):68-70.

[2] Geishauser T, Duffield L. Prevention and prediction of displaced abomasums in dairy cows[J]. Bovine Pract, 2000, 34:51-55.

[3] 郭冬生,彭小兰. 反刍动物挥发性脂肪酸消化代谢规律刍议[J].

体、dNTPs 等由大连宝生物工程有限公司生产;病毒 RNA 提取试剂 Trizol Reagent 为美国 Invitrogen 公司产品;RNA 水解酶抑制剂、鼠白血病毒反转录酶 (M-MLV) 均为 Promega 公司产品;DNA 回收试剂盒由北京百泰克生物工程有限公司生产;其余常用化学试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 病料的处理 无菌取病料,剪碎,按 1 g : 5 mL 加入灭菌的 PBS (pH 值 7.2),在研钵中充分研磨,研磨后的病料冻融 3 次后 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液加入青霉素、链霉素使其终浓度为 2 000 U/mL,4 ℃ 感作 1 h。

1.2.2 鸡胚接种 取 10 日龄健康鸡胚,用碘酊消毒气室,并用乙醇脱碘,取处理好的病料上清液接种鸡胚尿囊腔,0.2 mL/胚,同样的方法用 PBS 接种阴性对照组鸡胚,接种后将鸡胚置 37 ℃ 温箱继续孵育。每 4 h 观察鸡胚 1 次,弃掉 24 h 内的死胚,96 h 后收取死胚和部分活胚尿囊液冻存于 -20 ℃ 冰箱备用,其余活胚继续孵育至 18 日龄。详细记录鸡胚发育情况。

1.2.3 半数鸡胚感染量 (EID₅₀) 的测定 将分离毒株第 5 代 (E₅ 代) 病毒尿囊液按 10 ~ 10¹⁰ 倍比稀释,每个稀释度接种 5 枚 10 日龄健康鸡胚,每胚 0.1 mL,另外留 5 枚不接种作为对照组。置 37 ℃ 继续孵化,弃去 24 h 内死亡的鸡胚,每 8 h 照胚 1 次,共观察 144 h。记录鸡胚死亡和发育情况,按 Reed - Muench 方法计算 EID₅₀。

1.2.4 干扰新城疫病毒复制试验 将 10 日龄健康鸡胚分为 5 组,每组 5 枚,A 组经尿囊腔接种 IBV 分离株 E₅ 代尿囊液,0.2 mL/胚;B 组经尿囊腔接种分离株 E₅ 代病毒液 (0.2 mL/胚),10 h 后接种 NDV LaSota 弱毒株,0.2 mL/胚;C 组同时接种 E₅ 代尿囊液和 NDV LaSota 弱毒株,剂量均为 0.2 mL/胚;D 组单独接种 NDV LaSota 弱毒株,0.2 mL/胚;E 组接种无菌生理盐水作为对照,0.2 mL/胚。以上各组鸡胚在 37 ℃ 孵育 72 h 后,无菌收取尿囊液,按常规方法分别测定各组 NDV 的血凝 (HA) 滴度。

1.2.5 病毒红细胞凝集活性 取 E₅ 代鸡胚尿囊液,8 000 r/min 离心 10 min,取上清分成 2 份,1 份用 1% 胰酶 37 ℃ 处理 3 h,1 份不作处理,按常规微量法测定血凝滴度^[7],以出现 50% 凝集的病毒最大稀释倍数为样品的血凝滴度。

1.2.6 动物回归试验 用 EID₅₀ 为 10^{5.8}/0.1 mL 的分离株 E₅ 代尿囊液对 10 羽饲养于负压隔离器的 15 日龄健康非免疫雏鸡进行滴鼻点眼攻毒,0.1 mL/羽,同时设立阴性对照组隔离饲养。每天观察试验鸡的临床症状,连续观察 10 d,对死亡鸡和临床症状明显的鸡进行剖检。

1.2.7 引物设计 根据已发表的 IBV 基因组全序列 (NC001451),利用 Premier 5.0 设计 1 对扩增 IBV S1 基因的特异性引物,预期扩增片段为 1 819 bp,包含 S1 基因全长。上游引物 P1: 5' - GTTACTGTAAAGAGATGTTGG - 3' (21 bp),下游引物 P2: 5' - CGCGTTTGTATGTAATCATC - 3' (20 bp)。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2.8 S1 基因扩增与克隆 (1) 参照 Trizol Reagent 说明书提取基因组 RNA,并用 30 μL 质量体积比为 0.1% 的 DEPC (焦碳酸二乙酯) 溶解, -20 ℃ 保存备用。(2) 以所提取的病毒 RNA 为模板进行 RT-PCR 扩增。反转录 20 μL 体系:

4 μL M-MLV RT 5 × buffer,1 μL 引物 P2 (20 pmol/μL),1 μL dNTP (10 mmol/L),1 μL M-MLV,1 μL RNA 酶抑制剂,RNA 模板 13 μL。反转录反应条件:42 ℃ 1 h,95 ℃ 5 min 进行反转录。PCR 扩增 50 μL 体系:28.5 μL 去离子水,5 μL 10 × PCR 缓冲液,5 μL Mg²⁺ (25 mmol/L),1 μL dNTPs (10 mmol/L),1 μL 上游引物 P1 (20 pmol/μL),1 μL 下游引物 P2 (20 pmol/μL),Taq DNA 聚合酶 0.5 μL,8 μL 反转录产物。PCR 反应条件:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,50.5 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 45 s,共循环 32 次;最后 72 ℃ 延伸 10 min。(3) 对 PCR 产物进行凝胶电泳检测,用凝胶回收试剂盒纯化回收阳性目的条带。将胶回收纯化 DNA 连接到 pMD18-T 载体,转化 DH5α 感受态细胞,筛选阳性菌株扩大培养,然后提取质粒并以其为模版进行 PCR 扩增及电泳,进一步鉴定。

1.2.9 S1 基因序列测定与进化分析 取鉴定为阳性的菌液送交上海生工生物工程技术服务有限公司测序,将其序列与已公布的 IBV S1 基因序列进行比对,证明其为 IBV S1 基因序列后再提交 GenBank。应用 Mega4.0、DNASTar 软件对分离毒株与 GenBank 中已经发表的部分国内外代表性毒株及部分国内外常用疫苗毒株 S1 基因序列进行遗传进化分析,构建分子遗传进化树。本研究中参考的 IBV 毒株及其 S1 基因 GenBank 登录号分别为: H120 (M21970)、H52 (AF352315)、W93 (AY84282)、M41 (X04722)、LX4 (AY189157)、Holte (L18988)、QX (AF193423)、Q1 (AF286302)、Gray (L14069)、Beaudette (M95169)、HN99 (AY775551)、T (AY775779)、N1 (U29522)、Ark99 (L10384)、JAAS (AY839140)、D41 (AF036937)、Jin-13 (GU455379)、YI (HM034813)、HN/HL (FJ599752)、HN/SG (GQ154654)、WAL (HM034814)、XP/1/09 (GU455380)、XP/3 (GU455381)、ck/CH/LHB/100908 (JF330853)、ZJ971 (AF352311)、SDWF0608 (EU930429)、TW1171/92 (DQ646406)、TW97-4 (AY296742)。

2 结果与分析

2.1 鸡胚接种结果及半数鸡胚感染量 (EID₅₀)

与对照组相比,病料上清接种鸡胚 48 h 后鸡胚生命活动开始减弱,96 h 收获尿囊液时可见尿囊膜增厚,尿囊液浑浊,胚胎表面有白色絮状物沉积,胚体发育不良。培养至 18 日龄时胚体卷曲成团,胚体表面有点状出血,呈典型的“侏儒胚” (图 1),剖检鸡胚,发现中肾肿大,有尿酸盐沉积白点。从第

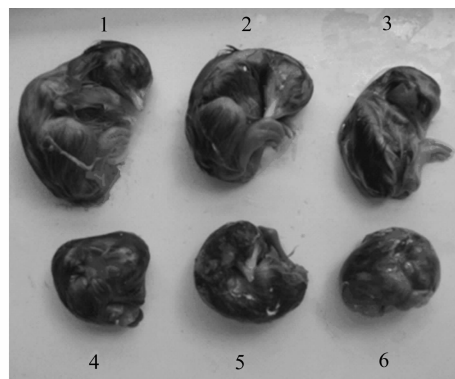


图 1 18 日龄正常鸡胚 (1、2、3) 和 18 日龄感染鸡胚 (4、5、6)

3 代开始,鸡胚出现死亡。在鸡胚上连续传代 5 次,得到病毒尿囊液 $E_1 \sim E_5$ 。 EID_{50} 测定结果显示, E_5 代鸡胚尿囊液的 EID_{50} 为 $10^{5.8}/0.1\text{ mL}$ 。

2.2 干扰新城疫病毒复制试验结果

收获的 A 组和 E 组尿囊液的 HA 滴度均为 0;B 组尿囊液 HA 平均滴度为 2^3 ;C 组尿囊液 HA 平均滴度为 2^8 ;D 组尿囊液 HA 平均滴度为 2^9 。可见分离株对新城疫病毒的增殖产生了干扰作用。

2.3 病毒红细胞凝集活性

E_5 代尿囊液经胰酶处理前不能凝集鸡红细胞,而经胰酶处理后的 E_5 代尿囊液能够凝集鸡红细胞,结果显示尿囊液血凝滴度为 2^8 。

2.4 动物回归试验结果

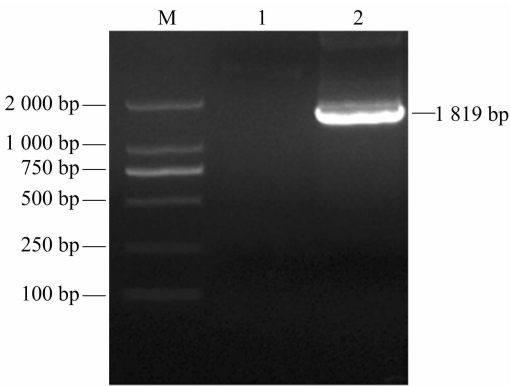
鸡群在攻毒后 3 d 开始出现临床症状,5 d 出现病鸡死亡,8 d 病鸡症状开始减轻;发病率为 100%,死亡率为 20%。发病鸡表现出精神沉郁、呆立不动、缩颈、羽毛蓬乱、呼吸困难、拉稀等临床症状。死亡鸡的肾脏肿大、苍白、外观呈现典型的“花斑肾”,气管有卡他性炎症。对照组鸡群未表现出肉眼可见的临床症状,无死亡,表明该分离株有较强致病性。

2.5 分离株 S1 基因的扩增与序列

利用引物 P1 和 P2 成功扩增出分离株的 S1 基因(图 2),结果与预期片段大小一致。对经 PCR 鉴定为阳性的重组质粒进行测序,其序列结果经 BLAST 比对确定为 IBV 的 S1 基因,将分离毒株命名为 ck/CH/HN/1205,其 S1 基因序列提交 GenBank,序列登录号为 JX569792。

2.6 分离株 ck/CH/HN/1205 的 S1 基因分析

运用 DNASTar 软件对测序结果进行分析,显示分离株 ck/CH/HN/1205 的 S1 基因片段大小为 1 620 bp(从起始密



M—marker DL2000; 1—阴性对照; 2—ck/CH/HN/1205
图2 IBV分离株S1基因的RT-PCR鉴定

码子 ATG 到 S 前体蛋白裂解位点),编码 540 个氨基酸。推导的氨基酸序列表明,分离株 ck/CH/HN/1205 的蛋白裂解识别位点序列为 HRRR。

ck/CH/HN/1205 株与 GenBank 上 28 株国内外不同地区毒株的 S1 基因比较,核苷酸同源性在 75.6% ~ 99.1% 之间,推导的氨基酸同源性在 72.4% ~ 98.1% 之间,其中 ck/CH/HN/1205 株与 ck/CH/LHB/100908 株核苷酸同源性最高,为 99.1%,氨基酸同源性 98.1%。ck/CH/HN/1205 株与国外分离毒株及国内外常用的疫苗株核苷酸序列同源性较低,与 H120、M41 和 Beaudette 等 Mass 型参考株 S1 基因同源性分别为 78.5%、78.2%、78.2%。ck/CH/HN/1205 株与 H120 株相比,其 S1 基因普遍存在碱基突变、缺失和插入等变异情况。

用 Mega 4.0 进行遗传进化分析,可见 ck/CH/HN/1205 株与 28 株参考病毒株分为 6 个群(图 3):H120、M41 株及腺

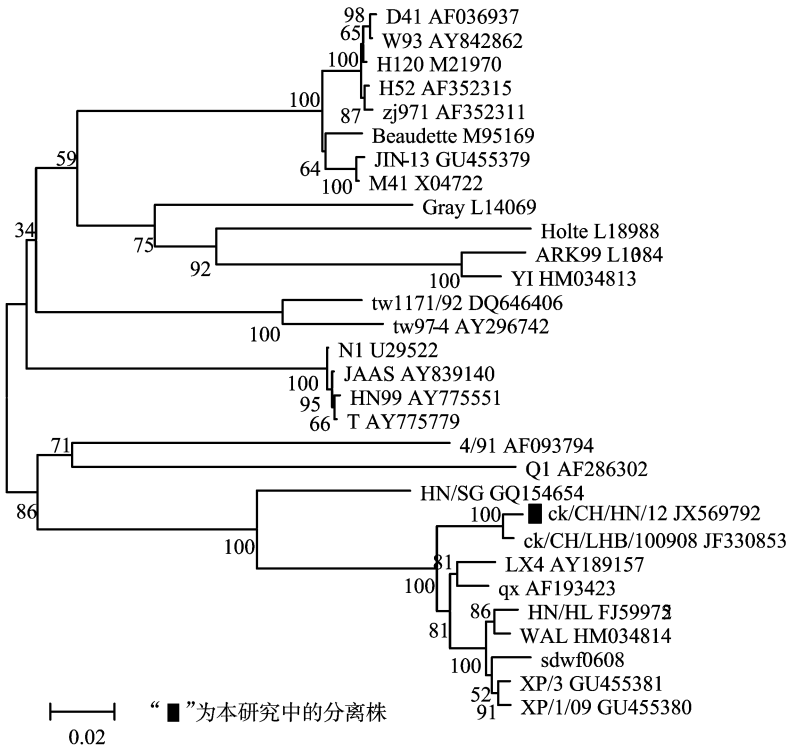


图3 基于IBV S1基因核苷酸序列的遗传进化分析

胃型分离株 ZJ971 株等组成 I 群;肾型分离株 ARK99 株、Holte 株等组成 II 群;2 株台湾分离株 tw1171/92 和 tw97-4 组成 III 群;澳大利亚 T 株、河南肾型分离株 HN99 等组成 IV 群;英国分离株 4/91 与中国腺胃型分离株 Q1 组成 V 群;ck/CH/HN/1205 株与山东 QX 株、河北 ck/CH/LHB/100908 株、山东 SDWF0608 株、新疆 LX4 株、河南 XP/3 株等组成 VI 群。

3 小结与讨论

随着分子生物学技术的发展,IBV 基因型划分得到广泛应用,近年来已成为主流的 IBV 分型方法,与血清学分型相比,该方法具有简便、快捷的优点,而且与血清学分型对应关系良好^[4]。目前,国内数个科研团队使用 SI 基因分型的方法对 IBV 进行基因分型研究,发现国内存在多种基因型毒株同时流行的现象^[8-11]。本研究中的几株河南流行毒株(Jin-13、YI、HN99、HN/SG、ck/CH/HN/1205、HN/HL、WAL、XP/3、XP/1/09)属于多个不同的进化群,多数流行株与疫苗株 H120 代表的 Mass 型疫苗株的亲缘关系较远,这表明在河南地区存在流行多个基因型毒株的现象。笔者分离的 ck/CH/HN/1205 株与所选取的几株河南分离株在系统进化上属于 QX-like 型,与国内 50% 以上的分离株属于 QX-like 型的报道一致^[4],这表明目前河南地区传染性支气管炎病毒基因型变异的复杂性和多态性,给生产上防控 IB 带来一定困难。如笔者临床实践以及临床发病资料也证实现有的呼吸型疫苗株似乎已不能对鸡群产生完全有效的保护。

当前,IB 仍是困扰我国养鸡业发展的重要疫病之一,临床发病普遍。目前国内使用活疫苗的基因型多为 I 群(Mass-type),但是据本研究和近年来国内的一些研究报道^[4,8-13],Mass-type 毒株只占国内分离毒株的一部分,大部分分离毒株与其遗传距离较远。Mass-type 基因型的疫苗已经不能对当前流行的其他基因型毒株产生完全的免疫保护^[14],这也就不难解释本研究中的发病鸡场即使进行过系统的传染性支气管炎疫苗免疫,但是仍然感染鸡传染性支气管炎的现象。因此,研发具有地方特点的针对性疫苗显得尤为必要。目前,国外 Geerligs 等利用传代致弱的 QX-like 基因型弱毒株对鸡免疫,具有良好的免疫保护效果,能抵挡同基因型病毒的感染^[15]。国内 Liu 等通过传代将 ck/CH/LDL/97 I 株人为致弱获得弱毒株,该弱毒株能够对同基因型病毒和部分异基因型病毒产生良好免疫保护作用^[16-17]。笔者分离的 ck/CH/HN/1205 株可用做自家疫苗种毒株,是否具有地域代表性并用于疫苗毒候选株,尚需对其免疫原性与反应原性等生物学特性深入研究。

鉴于 IBV 基因组变异迅速、血清型较多,而且在实际生产中存在许多影响因素,这就需要对 IBV 的分子流行病学进行调查分析,掌握其 SI 基因分子流行病学特征,研究其抗原发生变异的分子机制,了解各个地区流行毒株的基因型,为针对性地选择 IB 疫苗进行疾病防控或研制适合本地区的新型 IB 疫苗提供依据,减小养殖业损失。

参考文献:

[1] Saif Y M. 禽病学[M]. 11 版. 苏敬良. 译. 北京:中国农业出版社,2005:108-130.

- [2] 殷 震,刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京:科学技术出版社,1997:675-681.
- [3] Pohuang T, Chansiripomchai N, Tawatsin A, et al. Detection and molecular characterization of infectious bronchitis virus isolated from recent outbreaks in broiler flocks in Thailand[J]. Vet Sci, 2009, 10(3): 219-223.
- [4] 刘胜旺. 我国鸡传染性支气管炎流行现状及原因分析[J]. 中国家禽, 2010, 32(16): 5-9.
- [5] Cavanagh D, Davis P J, Darbyshire J H, et al. Corona-virus IBV: viral retaining spike glycopolyptide S2 but not S1 is unable to induce virus-neutralizing or haemagglutination-inhibiting antibody, or induce chicken tracheal protection[J]. J Gen Virol 1986, 67: 1435-1442.
- [6] Kwon H M, Jackwood M W. Molecular cloning and sequence comparison of the SI glycoprotein of the Gray and JMK strains of avian infectious bronchitis virus[J]. Virus Genes, 1995, 9(3): 219-229.
- [7] 贺秀媛, 刘胜旺, 壬 玮, 等. 我国鸡传染性支气管炎病毒地方分离株生物学特性的研究[J]. 中国预防兽医学报, 2002, 24(4): 349-353.
- [8] Ji J, Xie J, Chen F, et al. Phylogenetic distribution and predominant genotype of the avian infectious bronchitis virus in China during 2008-2009[J]. Virol J, 2011, 8(1): 184.
- [9] Han Z, Sun C, Yan B, et al. A 15-year analysis of molecular epidemiology of avian infectious bronchitis coronavirus in China[J]. Infect Genet Evol, 2011, 11(1): 190-200.
- [10] Zou N L, Zhao F F, Wang Y P, et al. Genetic analysis revealed LX4 genotype strains of avian infectious bronchitis virus became predominant in recent years in Sichuan area, China[J]. Virus Genes, 2010, 41(2): 202-209.
- [11] Sun C, Han Z, Ma H, et al. Phylogenetic analysis of infectious bronchitis coronaviruses newly isolated in China, and pathogenicity and evaluation of protection induced by Massachusetts serotype H120 vaccine against QX-like strains[J]. Avian Pathol, 2011, 40(1): 43-54.
- [12] 王秀英, 韦 平, 陈秋英, 等. 鸡传染性支气管炎病毒广西分离株血清型的分析[J]. 中国兽医学报, 2010, 30(2): 183-185.
- [13] 磨美兰, 李 孟, 韦 平, 等. 鸡传染性支气管炎病毒广西流行株 3 种主要结构蛋白基因的遗传变异分析[J]. 畜牧兽医学报, 2010, 41(9): 1138-1146.
- [14] 张小荣, 程小果, 张建军, 等. H120 活疫苗对部分基因型传染性支气管炎病毒的免疫保护效力[J]. 扬州大学学报: 农业与生命科学版, 2011, 32(3): 1-5.
- [15] Geerligs H J, Boelm G J, Meinders C A, et al. Efficacy and safety of an attenuated live QX-like infectious bronchitis virus strain as a vaccine for chickens[J]. Avian Pathol, 2011, 40(1): 93-102.
- [16] Liu S, Zhang X, Wang Y, et al. Evaluation of the protection conferred by commercial vaccines and attenuated heterologous isolates in China against the CK/CH/LDL/971 strain of infectious bronchitis coronavirus[J]. Vet J, 2007, 179(1): 130-136.
- [17] Liu S, Han Z, Chen J, et al. SI gene sequence heterogeneity of a pathogenic infectious bronchitis virus strain and its embryo-passaged, attenuated derivatives[J]. Avian Pathol, 2007, 36(3): 231-234.