

番鸭呼肠孤病毒 YB 株 σ NS 基因的克隆和序列分析

吴异健^{1,2}, 王 劭¹, 黄一帆^{1,2}, 吴宝成^{1,2*}

(1. 福建农林大学 动物科学学院 福建 福州 350002; 2. 福建农林大学 动物保健研究所 福建 福州 350002)

摘要: 参考 GenBank 鸡正呼肠孤病毒 (*Avian reovirus*, ARV) 和番鸭呼肠孤病毒 (*Muscovy duck reovirus*, DRV) σ 非结构蛋白 (σ NS) 基因序列设计合成 1 对引物, 对番鸭呼肠孤病毒 YB (DRV-YB) 株 σ NS 基因进行 RT-PCR 扩增, 克隆到 pMD18-T 载体中, 并对克隆产物进行 PCR 鉴定和测序; DRV-YB 株编码 σ NS 的基因全长为 1 191 bp, 其 5' 和 3' 端具有典型的禽正呼肠孤病毒的特征, 开放阅读框从 24~1 127 位碱基, 编码 367 个氨基酸残基。DRV-YB 株与法国番鸭呼肠孤病毒 89026 (DRV-89026) 株和鸡呼肠孤病毒 S1133 (ARV-S1133) 株 σ NS 基因核苷酸同源性分别为 87.3% 和 76.5%; 推导氨基酸同源性分别为 94.8% 和 90.5%。进化树分析表明 DRV-YB 株 σ NS 与 DRV-89026 株亲缘关系较近, 处在番鸭呼肠孤病毒的分支上。分析发现 DRV-YB 株 S 组基因大小和编码蛋白与法国番鸭呼肠孤病毒 89026、89330 株 S 组一致, 具有法国番鸭呼肠孤病毒 89026、89330 株 S 组的特征, 而与 ARVS1133、176 等鸡源呼肠孤病毒差异较大。表明不同禽正呼肠孤病毒株 S 组基因的大小和编码同一蛋白的等位基因呈现多态性, 自然界中禽正呼肠孤病毒不同毒株之间存在基因交换和基因重组现象。

关键词: 番鸭呼肠孤病毒; σ NS 基因; 克隆; 序列分析

中图分类号: S852.65+9.4 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2011)01-0128-09

Cloning and Sequence Analysis of the σ NS Gene of Muscovy Duck Reovirus YB Strain

WU Yi-jian^{1,2}, WANG Shao¹, HUANG Yi-fan^{1,2}, WU Bao-cheng^{1,2*}

(1. College of Animal Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Institute of Animal Health, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: The σ NS gene of muscovy duck reovirus YB (DRV-YB) was amplified by RT-PCR with oligonucleotide primers, which were designed based on previously reported σ NS sequences of avian and muscovy duck reoviruses in the GenBank. The PCR product was cloned into the pMD18-T vector and confirmed by PCR and sequencing analyses. The results show that the σ NS gene of DRV-YB contains 1 191 bp, with conserved 5' and 3' terminal motifs typical of avian reoviruses. It contains one open reading frame from nt 24 to nt 1 127, which encodes a protein of 367 amino acids. Further nucleotide and amino acid sequence alignments among DRV-YB, DRV-89026, and ARV-S1133 indicate that the σ NS nucleotide sequence of DRV-YB is 87.3% and 76.5% homologous to the corresponding genes in DRV-89026 and ARV-S1133, while the deduced amino acid sequence of DRV-YB is 94.8% and 90.5% homologous to DRV-89026 and ARV-S1133,

收稿日期: 2010-09-09 修回日期: 2010-10-26

基金项目: 福建省自然科学基金重大项目 (2002F003)

作者简介: 吴异健 (1971—) 男, 博士生, 主要从事兽医微生物学研究, E-mail: nldwj@163.com; * 通讯作者: 吴宝成, 研究员。

respectively. Phylogenetic analysis shows that the σ NS genes of DRV - YB and DRV - 89026 are closely related to and fall into the same evolutionary cluster. DRV - YB and DRV - 89026 as well as DRV - 89330 share the same characteristics of S - class genes, with the same gene length and encoded proteins. However, the genome organization of DRV - YB is dramatically different from those of ARV - S1133 and ARV - 176, which are strains from chicken. The results suggest that the S - class genes exhibit polymorphism in the length of gene segments and encoded proteins among different *Avian orthoreovirus* strains. This polymorphism may reflect exchange and recombination of gene segments among different *Avian orthoreovirus* strains in nature.

Key words: muscovy duck reovirus; σ NS gene; cloning; sequence analysis

番鸭呼肠孤病毒(Muscovy duck reovirus, DRV) 是番鸭“花肝病”的病原, 属于呼肠孤病毒科(Reoviridae) 正呼肠孤病毒属(*Orthoreovirus*) 禽正呼肠孤病毒(*Avian orthoreovirus*) 成员, 该组成员可感染鸡、鸭、鹅、火鸡等多种禽类^[1], 并能不同禽种之间互相传播。禽正呼肠孤病毒基因组为 10 个节段的双股 RNA, 根据核酸电泳迁移率的不同, 可以分成 3 组: 3 个大基因节段(L1、L2、L3), 3 个中基因节段(M1、M2、M3), 4 个小基因节段(S1、S2、S3、S4)^[2]。目前已经得到鉴定的蛋白有 15 个, 与病毒基因的大(L)、中(M)、小(S) 3 组相对应, 其病毒蛋白也相应分为 λ 组(λ A, λ B, λ C); μ 组(μ A, μ B, μ BC, μ BN, μ NS, μ NSC); σ 组(σ A, σ B, σ C, σ NS 和 P10, P17)^[3-5]。这 15 个蛋白中, 有 10 个结构蛋白(λ A, λ B, λ C, μ A, μ B, μ BC, μ BN, σ A, σ B, σ C) 和 5 个非结构蛋白(μ NS, μ NSC, σ NS, P10, P17)。其中结构蛋白中 μ B, μ BC, μ BN, σ B, σ C 为外壳蛋白; λ A, λ B, μ A, σ A 是内核蛋白; σ C 从内核延伸到外壳^[3, 6-7]。 σ NS 是一种较小的病毒非结构蛋白, 能非特异性地与 ssRNA 结合, 在病毒组装的早期起重要作用^[8-12]。本研究对分离自发病番鸭的呼肠孤病毒 DRV - YB 株 σ NS 基因进行了扩增、克隆和序列测定, 分析番鸭呼肠孤病毒的 σ NS 基因分子结构特点和遗传演变, 为我国番鸭呼肠孤病毒分子流行病学研究积累资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 病毒和番鸭种蛋 番鸭呼肠孤病毒 YB 株由福建农林大学动物保健研究所保存; 番鸭种蛋购自呼肠孤病毒阴性种鸭场, 由福建农林大学动物保健研究所孵化; 番鸭胚成纤维细胞, 按常规方法制备。

1.1.2 菌株、质粒、工具酶与试剂 大肠杆菌 JM109 株、质粒 pMD18 - T、Trizol's RNA 抽提试剂盒、连接试剂盒、RT - PCR 试剂盒、LB 培养基、琼脂糖、X - gal、IPTG 分别购自 Invitrogen 和大连宝生物工程公司。其它试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 病毒培养和 RNA 提取

DRV - YB 经 8 日龄番鸭呼肠孤病毒阴性鸭胚卵黄囊接种, 37 °C 孵育 72 h, 收集尿囊液和胚体匀浆悬液。收获的 DRV - YB 株的培养液冻融 3 次, 取 250 μ L 细胞悬液于一个 1.5 mL eppendorf 管中, 按 Trizol's RNA 抽提试剂盒说明书进行。提取的病毒 RNA 溶于 50 μ L 经 DEPC 处理的水中, -70 °C 保存备用。

1.3 引物设计与合成

参照 GenBank 中禽正呼肠孤病毒鸡源美国分离株(ARV - S1133) 和法国番鸭分离株(DRV - 89026) σ NS 基因全长序列, 用 Oligo 4 软件在基因 5' 端和 3' 端的非编码区内分别设计上游引物和下游引物, 具体引物序列如下: P1: 5' - GCTTTTGTGATCCTTGTGCAG - 3'; P2: 5' - GATGAGTAAGAGTCCAAAGTCG - 3'。引物由上海博亚生物技术有限公司合成, 用 TE 缓冲液配制成适当浓度, 贮存于 -20 °C 冰箱, 备用。

1.4 σ NS 蛋白基因的克隆

1.4.1 病毒 RNA 反转录和 PCR 扩增 取病毒 RNA 悬液 9 μ L, 加入 P1 和 P2(20 pmol) 各 1 μ L, 混匀, 100 °C 水浴 5 min 后, 冰浴。在冰浴上依次加入 5 \times 反转录 Buffer 4 μ L、0.1 mol/L DTT 2 μ L、2.5 mmol/L dNTP(Mixture) 2 μ L、RNase Inhibiter 1 μ L、AMV Reverse transcriptase (10 U) 1 μ L, 37 °C 水浴 1~2 h, 再 95 °C 作用 5 min 灭活反转录酶。然后在 PCR 管中依次加入 10 \times PCR buffer 5 μ L、cDNA 2.5 μ L、10 mmol/L dNTP(Mixture) 2 μ L、Primer P1(20 pmol) 0.5 μ L、Primer P2(20 pmol) 0.5 μ L 和 Taq DNA polymerase

0.5 μL ,最后用无菌水补足反应体系至 50 μL 。在 PTC-100 型上进行基因扩增。即先 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min 后,然后按 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min、55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min 的参数进行 35 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 10 min。

1.4.2 PCR 产物的回收和纯化 PCR 产物在 10 g/L 琼脂糖凝胶上电泳,然后用小量柱式 DNA 回收试剂盒纯化回收 DNA,具体操作按说明进行。取 2 μL 收集管中液体(DNA 片段)在 10 g/L 琼脂糖凝胶上电泳检查结果,其余 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.4.3 感受态细胞的制备 按文献介绍的氯化钙法制备感受态细胞,最后加入无菌甘油至终浓度为 15%,混匀后分装为 200 μL /管,-70 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.4.4 连接与转化 在 10 μL 的反应体系中直接加入纯化的 PCR 产物 4.5 μL 、pMD18-T 载体 0.5 μL 与连接液 5 μL ,16 $^{\circ}\text{C}$ 连接 1 h 以上。取感受态细胞 200 μL 经冰浴融化后,同时将 10 μL 连接产物全量转入感受态细胞,冰浴 30 min 42 $^{\circ}\text{C}$ 热休克 1 min,再冰浴 1~2 min,然后加入 1 mL 不含 Amp 的 LB 液体培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养 45 min(160~220 r/min),800 r/min 离心 30 s。吸弃上清,余下约 170 μL 培养物,加入 20 μL X-gal(20 mg/mL)、4 μL IPTG(200 mg/mL),重悬后涂布于含 Amp 的 LB 平板,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。次日挑取白色单菌落小量培养。

1.4.5 质粒 DNA 的提取 在 LB 平板上随机挑选了单个白色菌落接种于 3 mL 含 Amp 的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养过夜。取 1.5 mL 培养液于微量离心管中,按碱裂解法进行小量制备。最后用含 RNA 酶(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 TE 溶液(10 mmol/L Tris-HCl,1 mmol/L EDTA,pH 8.0)50 μL 溶解沉淀,37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 10 min;同时取 2 μL 提取物进行琼脂糖凝胶电泳分析,其余 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存。

1.4.6 重组质粒的鉴定 小量法提取的质粒 DNA 经 100 倍稀释后取 1 μL ,依次加入 10 \times PCR buffer 5 μL 、10 mmol/L dNTP(Mixture) 3 μL 、Primer P1(20 pmol) 0.5 μL 、Primer P2(20 pmol) 0.5 μL 和 *Taq* DNA polymerase 1 U,最后用无菌水补足反应体系至 50 μL 。按 1.4.1 的 PCR 条件进行扩增,扩增后的 PCR 产物在 10 g/L 琼脂糖凝胶上电泳检查结果。经 PCR 初步鉴定后,分别提取阳性菌落的重组质粒送大连宝生物工程有限公司测序。

1.5 序列测定和比较分析

利用 Sangers 双脱氧末端终止法对初步鉴定为阳性质粒进行测序,并用 DNASTar 和 Anthepro 等分析软件对目的序列与 DRV-89026、DRV-C4、ARV-S1133、ARV-176 等禽源呼肠孤病毒 σNS 基因核苷酸序列及其推导的氨基酸序列进行比较分析。

2 结果与分析

2.1 YB- σNS 全基因 RT-PCR 扩增、克隆与鉴定

用 Trizol's RNA 抽提试剂盒提取 DRV-YB 株 RNA,经 RT-PCR 扩增获得大小约为 1.3 kb 的特异性片段(图 1),与预期产物的大小相符。

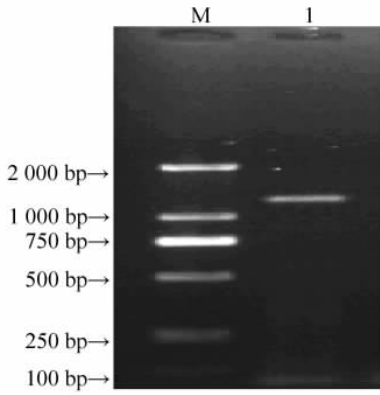
将该片段克隆至 pMD18-T,转化大肠杆菌 JM109 株,小量法提取的质粒 DNA 用 Primer P1 和 P2 PCR 扩增后电泳检查,获得的特异性片段预期相符合,鉴定结果见图 2。

2.2 YB- σNS 全基因序列测定结果与比较

DRV-YB 株 σNS 的编码基因全长为 1 191 bp,编码区从 24 位至第 1 127 核苷酸,编码 367 个氨基酸残基。与数据库中禽正呼肠孤病毒 σNS 的编码基因比较(图 3),其 5' 末端非编码区有 33 个核苷酸序列非常保守;3' 末端非编码区鸭源呼肠孤病毒有 64 个核苷酸,而鸡源呼肠孤病毒有 65 个核苷酸,两者 3' 末端非编码区有 7 个核苷酸的差异:与鸡源呼肠病毒株 S1133、176、1733 等相比在非编码区 3' 末端第 6 位碱基 T \rightarrow C,第 22 位碱基 G \rightarrow A,第 31 位碱基 C \rightarrow A,第 32 位碱基 A \rightarrow G,第 38 位碱基 C \rightarrow 缺失,第 39 位碱基 T \rightarrow G,第 50 位碱基 C \rightarrow T。

2.3 YB- σNS 基因编码氨基酸序列分析与比较

用 Antheprot 2000 V6.0 蛋白分析软件对禽正呼肠孤病毒 σNS 核苷酸序列推导的氨基酸序列进行分析。预测 σNS 蛋白的抗原性、疏水性、亲水性、跨膜性及易溶性等理化性质,结果显示 σNS 蛋白无跨

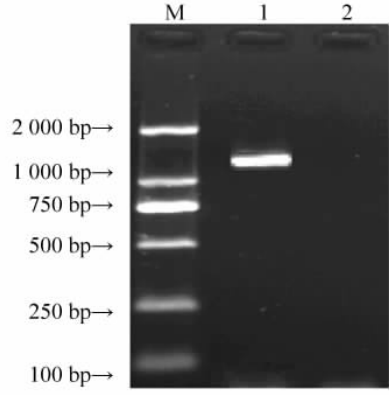


M: DNA Marker (2 000 bp) ;
1: YB 株 σ NS 基因的 PCR 扩增结果。

M: DNA Marker DL 2 000; 1. Amplification of σ NS gene from MDRV - YB by PCR.

图 1 PCR 产物电泳结果

Fig. 1 Electrophoretogram of PCR products



M: DNA Marker (DL 2 000) ; 1: 重组质粒 PCR 扩增结果; 2: pMD18 - T 空白对照。

M: DNA Marker DL 2 000; 1. Recombinant plasmid identified by PCR; 2. Empty plasmid control.

图 2 重组质粒 PCR 鉴定结果

Fig. 2 PCR identification of recombinant plasmids

Majority	GCTTTTTCAGTCCCTGTGTCAGCCATGGACAACACCGTGGTGTGGAGTTTCCCGCAACACATCCGGCCAGCTGGTCAGACACTTTTAGGAATTCTA											
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100		
YB (S2)	CG.....	C.....	100	
89026(S3)	T.....	T.....	TT.....	TA.....	C. A.	A. .	100
176(S4)	A. . C.	100
S1133(S4)	GC.....	A. . C.	93
Majority	TTTACTCCGATGTAATATTTTACAGCTGATGGTCGTAATGCCACGAAGCGGTACAAATCTCACATTCCTTTCCTTTCCTGCTGCTGTCGATGCCTGCTCTCT											
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200		
YB (S3)	C.....	C. . C. . C. .	C.....	C.....	C.....	T.....	A. . G. . . .	C.	T. . T. . . .	G	200
89026(S3)	C.....	C. CC. . C. .	C.....	A. . A. . C. .	G.	T.	A. . A. . . .	CA.	C.	G	200
176(S4)	A.	C.	A.	C.	A. . C. . . .	A.	G.	A. . G. . .	200
S1133(S4)	A.	C.	A.	C.	A. . C. . . .	A.	G.	A. . G. . .	193
Majority	CTTGCTGCTCACTGTGCTGATAGGACTCTTCGCCGTGACAACGTGAACAGATTCTTACTCGTGAATTTGCCATTTTCCTCGGATCTCATCAACTATGCTC											
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300		
YB (S2)	.. C.	G. . T. . C.	C. . GA. C. .	C. . G. . . .	C.	A. . C. . CC. A. .	C. . C.	300	
89026(S3)	.. C.	T. G. . G. .	C.	C. . A. C. .	G.	T. . CC. A. .	T.	300	
176(S4)	C.	A. . C.	AC.	T. A.	A. .	300
S1133(S4)	C.	A. . C.	AC.	A.	C. . A. .	293
Majority	ACCATGTGAATTCATCCTCCCTTACTACTTCTCAGGGTGTGCAAGCGGCTCGTTTTGTAGCTCAAGTTTATGGTGAACAAGTCCCGTTCGATCACATTTA											
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400		
YB (S3)	C.	C.	T.	C.	CC.	G.	G.	C.	400
89026(S3)	C. . G.	C. . C. . . .	C.	T.	C. . C. . CC.	G. . G. . C.	T.	T.	C.	400
176(S4)	C.	A.	C.	A. . C.	G.	G.	A.	400
S1133(S4)	C.	A.	C.	A. . C.	G.	G.	A.	393
Majority	TCCTTCTGGTCTGCGACTTACTGCTGCTGCTATCGCCAATGCTATTTCTCGGCTTATGGCTGGCTTTGCTGCTGTAAGGTGATGATTTGCTCCG											
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500		
YB (S2)	C. . G. . . .	C.	A.	T. C. . . .	G.	G.	C.	G. AA.	CA. G. . A	500
89026(S3)	C. . A. . C.	C. . C.	C.	C.	G. . T.	G. AG.	CA. A. . A	500
176(S4)	A.	A.	A.	CA.	A.	C.	500
S1133(S4)	A.	A.	A.	CA.	A.	C.	493
Majority	AGTGGCTCTATTGACTACCTTGCTGCTGATCTGGTCGGGTATAAGTTTGTGCTGCTTACATGCTTGATATGGTGGATGGTGGTCTCTCAGATTGTGTGC											
	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600		
YB (S3)	. C.	A.	T. . T. . .	C. . C. . . .	C.	CT.	C.	G.	A. . T. . A. . C.	600
89026(S3)	. CC. . . .	T. G. . C.	C. . T. . . .	C. . A. . . .	T.	A. . T. . . .	G.	G. . C. . . .	A.	600
176(S4)	C.	C. . A.	C.	C.	A.	CC. . . .	600
S1133(S4)	C.	C. . A.	C.	C.	A.	CC. . . .	593

Majority	CGTCTCATACCGTAGAGGAGATGTTGACCAACACCGGGTTGCTGAATTCGATTGATGCTTCATTGGTATCGAATCGCGGAGTGATCAACGGATGACTCG										
	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700	
YB (S3)	.TC...	C..T..C.....	C.....	TC.....	G....C.....	G..C..C.....	TAAA..C.....	C....G..			700
89026(S3)	.CC....C.....	T.....	T.....	T..GC.....	G.....	C..C..T.....	CAAG.....	C..G..C....	G..		700
176(S4)	A..A.....	A.....	C.....	G.....	A.....					700
S1133(S4)	A..A.....	A.....	C.....	G.....	A.....					693
Majority	TGATGCTGCTGAGATGAGTTCCTCTCAATGAGCTGAGGATCATGATCAGCGTGGTCGTATGCCTTGAAGATCATGCTGCCTATGATGGCGGCG										
	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800	
YB (S3)	C.....	C.....	C.....	G...A...C..G..C....	G.....	G.....	G.....	G.....	G.....	C...	800
89026(S3)	C.....	C.....	C.....	G...A..C..C..A..T....	A.....	G.....	T.....	C....			800
176(S4)	C..C.....	A.....	A..A.....	A..A.....	A..G.....	C.....				800
S1133(S4)	C..C.....	A.....	A..A.....	A..A.....	A..G.....	C.....				793
Majority	CAATGAAGTTGAGTTGACGCGCTGGCGGACGAGCGTACTGAGTCTCAGGCTAATGCTCACGTTACATCCTTCGGTTCGCGTTTGTAAATCAGATGT										
	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	
YB (S3)	...C...	AACC.....	A...C...C.....	C.....	C.....	T..C..G.....	C..C.....				900
89026(S3)	A..C....A....	TT...T..T....	C.....	C.....	T.....	C..C.....				900
176(S4)	G.....	A..A..T....	A..C....A.....							900
S1133(S4)	G.....	A..A....	A..C....A.....							893
Majority	CGCGCTTGTCTCTATTGATCGTGAATTGATGGAAGTGGCTTCTCTCAAGGAACAGGGCTTCGCCATGAATCCGGTTCAGATGCATCTAAGTGGTC										
	910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000	
YB (S3)	.A.....	G..C..C.....	C.....	C.....	G.....	T....C..C.....	G.....	C..A.....			1000
89026(S3)	...T....	G..CG..C....	C....A.....	C.....	C.....	A..T....	G.....	C....C..A....			1000
176(S4)	C..A.....	C.....	C.....							1000
S1133(S4)	C..A.....	C.....	C.....							983
Majority	GTTTATACGCTGTTCTGGTCTGCTGCTTCCCTTTGCGGGTGCCCGTTTGAATCCGGAATGTAATTGGATGATCCGTTGAGGGTGACCAGCGCTGCTG										
	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100	
YB (S3)	..C...TA..A..C.....	A..G..G....	GG.....	TA.....	G.....	A..C.....	A.....	G...A.....			1100
89026(S3)	T..C...CA..A..G.....	C..A..A..G....	GG.....	A.....	G..G..T..A....	A..C....A..T.....	A.....				1100
176(S4)	.C.G.....	C..C..A....	C..A....	A.....	C.....	A.....	A.....				1100
S1133(S4)	.C.G.....	C..C..A....	C..A....	A.....	C.....	A.....	A.....				1093
Majority	TCTGTCTCTCCAGCTAGGATGGCGTACACGGGACCCATGGTGTGGGTGAGGGGCTGCCACGCCCTCTGCCCGACTTGGACTCTTATTATC										
	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190		
YB (S3)	G -.....	A.....	A.....	C.....						1191
89026(S3)	G -.....	A.....	A.....	C.....						1191
176(S4)	C.....	A.....								1192
S1133(S4)	C.....	A.....								1185

图 3 DRV - YB 株 σ_{NS} 基因核苷酸序列分析与比较

Fig. 3 Alignment of the σ_{NS} gene sequence

膜区 拥有较多的疏水区和抗原位点。用 GOR I 方法预测二级结构 结果显示在 DRV - YB 株 σ_{NS} 蛋白结构中有其有 35% 的 α - 螺旋(其中约有 65% 的 α - 螺旋分布于 C - 端的第 197 - 313 aa); 26% 的 α - 折叠; 17% 的 α - 转角和 22% 的无规则卷曲。进一步用 DNASTAR 分析软件分析 DRV - YB 株和数据库中禽正呼肠孤病毒 σ_{NS} 推导的氨基酸序列 ,发现主要有以下特点: 从 N - 端到 C - 端散布大量的正电荷碱性氨基酸和负电荷碱性氨基酸 ,N 末端 6 - 80 和 219 - 365 富含正电荷碱性氨基酸 ,中间 153 - 242 和 C 末端的 264 - 274、299 - 311 富含负电荷碱性氨基酸 ,特别是 6、11、29、37、46、68、80、224、235、252、263、288、320、365 位碱性氨基酸和 67、81、87、169、185、198、211、216、227、230、238、243、246、266、273、299、321、345 位酸性氨基酸在比较的呼肠孤病毒中(包括禽和哺乳动物呼肠孤病毒 ,资料未显示) 保守或被同属性的氨基酸替换。

DRV - YB 株 σ_{NS} 蛋白理论分子量为 40 430. 13 kD ,蛋白等电点(PI) 为 7. 875; 信号肽搜索发现 , σ_{NS} 蛋白均都在第 62 - 67 aa 内有一个明显的信号肽。因此 ,确定 σ_{NS} 蛋白为一种分泌蛋白; Prosite 搜索 σ_{NS} 蛋白潜在的 Motif 位点 ,发现 YB 株有 4 个 N - 糖基化潜在位点(N - glycosylation site) ,4 个蛋白激酶 C 磷酸化潜在位点(Protein kinase C phosphorylation site) ,3 个酪氨酸激酶(CK2) 磷酸化潜在位点(Casein kinase II phosphorylation site) 和 6 个豆蔻酸潜在位点(N - myristoylation site) ,还有 1 个 CAP - Gly

domain signature 位于第 332 - 342 aa。YB 株与 89026 株相比,多一个第 31 - 34 aa 位的 N - 糖基化潜在位点、多一个第 322 - 234 aa 位的蛋白激酶 C 磷酸化潜在位点。

用 DNASTAR 分析软件分析比较 σ NS 核苷酸序列推导的氨基酸序列,结果表明(图 4) 3 个毒株 σ NS 基因编码的蛋白氨基酸序列大小一致,均为 367 个氨基酸,其中,DRV - YB 株与法国番鸭源 89026 株的 σ NS 氨基酸序列有 18 个氨基酸位点的差别,与鸡源 ARV - 176 株的 σ NS 氨基酸序列有 34 个氨基酸位点的差别。比较 13 株不同禽种来源的呼肠孤病毒 σ NS 推导的氨基酸序列,发现 σ NS 蛋白的 N - 端前 14 个氨基酸非常保守,为 MDNTRVGVSRNTS。

Majority	MDNTRVGVSRNTSGAAGQTLFRNFYLLRCNISADGRNATKAVQSHFPFLSRAVRCLSPLAAHCADRTLRRDNVKNILTR								
	10	20	30	40	50	60	70	80	
YB V..... Y.....								80
89026 V..... I. K. L..... T..... Y..... T.....								80
176 Q.....								80
S1133 P..... Q.....								80
Majority	DLPFSSDLINYAHHVNSSLLTTSQGVVEAARLVAQVYGEQVFPFDHIYPSGSATYCPGAIANAISRLMAGFVPPQEGDDFAPS								
	90	100	110	120	130	140	150	160	
YB P..... S. V..... T. T								160
89026 P..... H..... T. T								160
176	E..... T..... L..... R.....								160
S1133	E..... T..... I..... R.....								160
Majority	GPIDYLAADLVAYKFVLPYMLDMVDGRPQIVLPSHTVEEMLTNTGLLNAIDASFCIEAKSDQRMTRDAAEMSSRSLNELE								
	170	180	190	200	210	220	230	240	
YB S..... P..... S.....								240
89026	. S..... P..... S.....								240
176 L..... S. S..... R.....								240
S1133 L..... S. S..... R.....								240
Majority	DHDQRCRMPWKIMLAMMAAQLKVELDALADERTESQANAHVTSFGSRLFNQMSAFVTIDRELMELALLIKEQGFAMNPGQ								
	250	260	270	280	290	300	310	320	
YB	N. EH..... T. N..... P.....								320
89026	N. EH..... L..... PV.....								320
176 V.....								320
S1133								320
Majority	IASKWSLIRRS GAARSLAGARLEIRNGNWMIREGDQTLTLLSVSPARMA								
		330	340	350	360				
YB	V..... S..... V..... R.....								367
89026 S..... L.....								367
176 PT. P. S.....								367
S1133 PT. P. S.....								367

图 4 DRV - YB 株 σ NS 基因推导氨基酸序列分析与比较

Fig. 4 Alignment of amino acid sequence of the σ NS genes

2.4 YB - σ NS 全基因核苷酸序列和氨基酸序列同源性比较

应用 DNASTar 分析软件,将本研究 DRV - YB 株 σ NS 编码基因与 GenBank 上的 DRV - 89026 株 (AJ133122)、DRV - C4 株 (DQ066922)、DRV - S14 株 (DQ066923)、ARV - 138 株 (AF059725)、ARV - 176 株 (AF059724)、ARV - 1733 株 (AY303992)、ARV - Chink Vac 株、ARV - HC/China 株 (EF122835)、ARV - R2/TW 株 (AF294778)、ARV - S1133 株 (EF122838) 及火鸡分离株 MO/SEP - 816/05 株 (EU400279) 相应的基因进行核苷酸序列及推导氨基酸序列同源性比较(表 1) 结果显示: DRV - YB 株与 DRV - 89026 株 σ NS 核苷酸同源性为 88.4%,与 ARV - S1133 的同源性为 79.5%; DRV - YB 株与 DRV - 89026 株 σ NS 推导氨基酸同源性为 95.1%,与 ARV - S1133 同源性为 90.8%。总体上看,DRV - YB 与鸭源呼肠孤病毒 σ NS 全基因的核苷酸同源性为 83.8% ~ 98.8%,与鸡源呼肠孤病毒的同源性为 78.7% ~ 79.5%。

表1 σ NS 蛋白基因核苷酸序列和氨基酸序列同源性

Tab.1 The homologous comparison of σ NS nucleotide sequences and deduced amino acids sequences of muscovy duck reovirus strains with the reference strains

毒株 Strains	138	176	1733	89026	C4	ChickVac	HC/ China	R2/TW	S14	S1133	MO/SEP-816	YB
138	***	82.1	82.4	78.5	80.0	81.4	77.4	79.8	80.2	82.2	79.3	79.4
176	93.8	***	99.7	77.7	79.8	99.3	77.1	80.0	80.0	99.6	79.3	79.6
1733	94.0	99.7	***	77.8	79.9	99.5	77.4	80.3	80.1	99.8	79.4	79.6
89026	89.9	90.2	90.5	***	88.5	77.1	83.8	78.6	88.7	77.7	77.7	88.4
C4	92.7	92.4	92.7	96.2	***	79.4	84.6	79.5	99.7	79.7	78.6	98.5
ChickVac	93.8	99.5	99.7	90.2	92.4	***	77.3	80.3	79.5	99.4	79.4	79.0
HC/China	90.4	90.2	90.4	94.1	97.2	90.2	***	78.3	84.3	77.2	77.3	83.8
R2/TW	91.8	94.0	94.3	89.1	92.1	94.0	90.4	***	79.5	80.1	80.0	79.0
S14	92.7	92.4	92.7	96.2	100	92.4	97.2	92.1	***	79.9	78.7	98.8
S1133	93.8	99.6	99.7	90.2	92.4	99.5	90.2	94.0	92.4	***	79.3	79.5
MO/SEP-816	92.7	92.1	92.4	89.1	91.6	92.1	90.2	91.3	91.6	92.1	***	78.7
YB	91.0	90.8	91.0	95.1	98.4	90.8	95.5	90.5	98.4	90.8	89.9	***

右上方为核苷酸同源率;左下方为氨基酸同源率。

Homologous rates of nucleotide were presented in the upper triangle of the table , and homologous rates of deduced amino acid in the lower.

2.5 YB- σ NS 蛋白全基因核苷酸序列和氨基酸序列进化树分析

利用 DNASTAR 生物软件中的 MegAlign Jotun Hein 方法对 GenBank 数据库中主要禽源呼肠孤病毒的 σ NS 基因进行分析并绘制遗传进化树(图5),结果发现:DRV-YB 株和 11 株参考禽源呼肠孤病毒大致可分为两个大的分支——鸡源呼肠孤病毒和鸭源呼肠孤病毒,本研究中的 DRV-YB 株处在鸭源呼肠孤病毒的分支上。DRV-YB 株与国内分离的 DRV-C4 株、DRV-S14 株遗传距离最近,其次是法国 DRV-89026 株;同时分析显示鸡源分离的 ARV-138 株与其他鸡源呼肠孤病毒株遗传距离较远,却与鸭源呼肠孤病毒关系更近。

对推导的 σ NS 氨基酸序列进行分析并绘制遗传进化树(图6),发现 12 株病毒 σ NS 氨基酸序列与核苷酸序列的遗传进化树在局部有一定的差异,ARV-176 处在鸡源呼肠孤病毒分支上,遗传进化树呈典型的鸡源分支和鸭源分支;同时分析结果也显示鸡源分离的 ARV-138 株、火鸡分离的 MO/SEP-816/05 株 σ NS 氨基酸序列却与鸡源呼肠孤病毒株遗传距离较近,与鸭源呼肠孤病毒关系较远。这进一步说明,不同禽种来源的呼肠孤病毒基因序列存在明显的多变性和多态性。

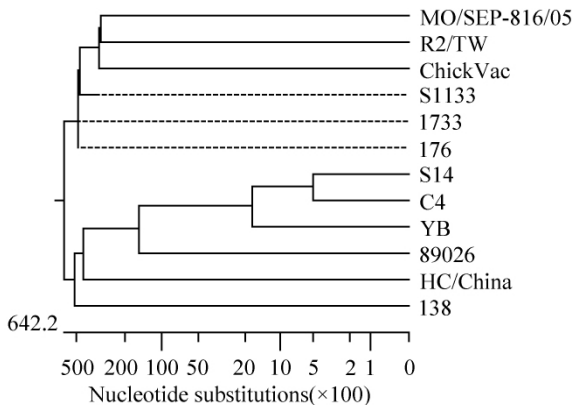


图5 σ NS 全基因核苷酸序列进化树

Fig.5 Phylogenetic tree based on the nucleotide whole sequence of the σ NS gene

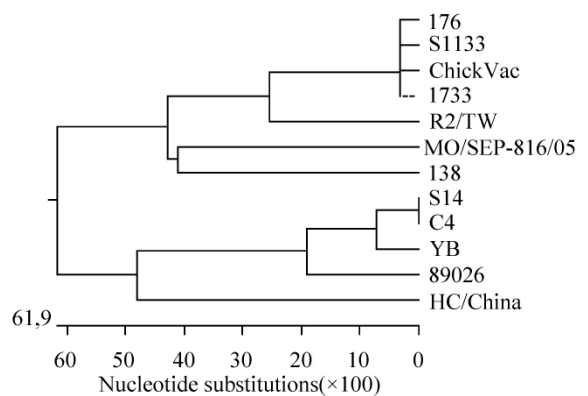


图6 σ NS 基因推导氨基酸序列进化树

Fig.6 Phylogenetic tree based on the deduced amino acids sequence of the σ NS gene

3 讨论

与所有禽类呼肠孤病毒相似,DRV-YB 株 σ NS 核苷酸序列的 5' 末端和 3' 末端都有特异的保守碱

基 5' 末端为 5' - GCTTTTT 3' 末端为 TACTCATC - 3' ^[13-14] (鸡源为 TATTTCATC - 3')。禽正呼肠孤病毒的 5' 末端前 34 个核苷酸保守, 而 3' 末端非编码区, 若分为鸡源和鸭源呼肠孤病毒, 则鸡源呼肠孤病毒(S1133、176、1733、138 等) 65 个核苷酸和鸭源呼肠孤病毒(89026、YB、C4、S14 等) 64 个核苷酸都保守。在分析的禽正呼肠孤病毒中, 3' 末端非编码区的碱基序列可将鸡源和鸭源呼肠孤病毒区分开。但该序列的不同是否是鸡源和鸭源呼肠孤病毒区分的标记还有待于大量病毒测序结果加以证实。

呼肠孤病毒的 σ NS 是个较小的病毒非结构蛋白, 与病毒 mRNA 的组装、基因组复制及病毒形态发生有一定关系。Gillian 等 ^[15] 研究发现, σ NS 的 N - 端前 11 个氨基酸残基可形成两亲性的 α - 螺旋结构, 分析认为该结构对 ssRNA 的结合及核蛋白复合物的形成起着重要的作用。Gillian 等 ^[16] 研究表明, σ NS 能与 RNA 和 DNA 结合, 结合能力上 RNA 比 DNA 强, 单链核酸比双链核酸强, 这种结合不需要 ATP 水解, 可被 MgCl₂ 抑制, 其功能类似于单链 DNA 结合蛋白在基因组 DNA 复制中的作用。Miller 等 ^[17] 进一步研究发现当 μ NS 蛋白单独表达时, μ NS 可形成形态一致的包涵体——被认为是“病毒复制的工厂”; 当 σ NS 蛋白单独表达时, σ NS 无规律散布在细胞中; σ NS 和 μ NS 共表达时, σ NS 则分布在 μ NS 形成的包涵体中, 用 RNase 处理免疫共沉淀物, 则 σ NS 从 μ NS 形成的包涵体中分离, 表明 σ NS 和 μ NS 是通过 RNA 结合。Touris Otero F 等 ^[18] 发现 σ NS 还与 μ NS 蛋白共同作用侵入被感染细胞, 提高或补充 μ NS 的活性, 但目前 σ NS 在病毒复制过程中的作用机制尚未明确。Fernando 等 ^[19] 研究发现纯化的 σ NS 以二聚体或三聚体的形式存在, 结合 RNA 的最小长度在 10 ~ 20 nt, 且没有序列偏好性, 认为与 RNA 的结合能力依赖于 σ NS 构象。本研究分析 σ NS 基因推导的氨基酸序列, 未发现有可能与核酸结合的序列, 但其保守的酸、碱性氨基酸位点和二级结构有助于形成特定的结构域或构象, 并可能通过构象的变化选择性地聚集 ssRNA, 此对禽类呼肠孤病毒复制的起始可能起着重要作用。

根据试验和查询相关资料, 我们发现禽正呼肠孤病毒不同分离株编码 σ N 蛋白的氨基酸残基数和编码基因核苷酸数量相同(鸭源比鸡源毒株少 1 核苷酸), 但在电泳图谱却表现出明显的多态性, 如鸡源 ARV - 176 株 σ NS 蛋白由 S4(1 192 bp) 基因编码。Kuntz - Simon 等 ^[12] 用 Northern 杂交分析 DRV - 89026、89330 株 S 组各片段精确的电泳迁移率, 结果显示 DRV - 89026 株 σ NS 蛋白由 S3(1 991 bp) 基因编码(表 2); 而 DRV - 89330 株编码 σ B 蛋白的基因片段在电泳图谱中出现在 S3, 也就是说, DRV - 89330 株 S2、S3 片段在电泳中的迁移位置与 DRV - 89026 株的 S2、S3 正好相反。目前, 在 GenBank 数据库中尚未发表 DRV - 89330 株 σ NS 蛋白编码基因 S2 的序列。本试验结果表明, YB 株编码 σ NS 蛋白基因与 DRV - 89026 株 S3 基因大小一致, 核苷酸序列和编码氨基酸序列同源性分别为 88.4% 和 95.1%; 同时也与鸡源 ARV - 176 株 S4 基因阅读框大小一致, 核苷酸序列和编码氨基酸序列同源性分别为 79.6% 和 90.8% (表 1)。

表 2 禽正呼肠孤病毒 σ NS 蛋白编码基因比较
Tab. 2 Comparison of σ NS protein - coding genes

毒株 Strain	基因组片段 Genome segment	登录号 Accession number	碱基数 Base pair	开放阅读框 ORFs	推导蛋白质序列 Deduced protein	
					氨基酸残基数 Residues	编码蛋白 Identification
YB	S3	*	1191	24 - 1127	367	σ NS
89330	S3	AJ133122	1191	24 - 1127	367	σ NS
176	S4	AF059724	1192	24 - 1127	367	σ NS
S1133	S4	AOU95952	1185	17 - 1120	36	σ NS

* 本题课题组克隆测序。

Our research group cloned and sequenced.

对分离自不同禽种来源的呼肠孤病毒基因序列存在明显的多变性和多态性的原因, 我们分析是多方面因素综合作用的结果。首先, 禽源呼肠孤病毒基因组为分节段 dsRNA, 当 2 种不同基因型的病毒株同时感染同一个体时往往会出现基因交换或和基因重组现象, 重组率高达 3% ~ 5% ^[20]。此外, 我国南方鸡、鸭混养的现象比较普遍, 也给不同禽种来源的禽正呼肠孤病毒株之间的基因频繁重组提供了条

件;虽然不同病毒株编码同一蛋白的基因核苷酸数量一致,但由于各病毒株之间核苷酸组成的差异导致的电荷也不同,再加上操作人员的手法差异,同样也会造成该类病毒基因型的电泳多态性。最终可能导致不同病毒株编码同一蛋白的基因片段在电泳条带中的顺序发生互换^[8]。本课题组通过试验已验证禽正呼肠孤病毒不同基因型的病毒体外同时感染禽胚成纤维细胞时,可导致子代病毒基因重组(基因重配)的现象,基因重组后的病毒更易适应宿主体系。这一现象也提示在使用弱毒活苗防控病毒为分节段基因组的传染病时,在疫苗毒与野毒基因之间有发生基因重组的可能,导致疫情复杂化,加大疫病控制的难度。

参考文献:

- [1]张忠信,王瑶.病毒分类学[M].北京:高等教育出版社,2006:117-120.
- [2]殷震,刘景华.动物病毒学[M].2版.北京:科学出版社,1997:538-548.
- [3]秦宇,韦平,谢芝勋.禽呼肠病毒主要蛋白的研究进展[J].动物医学进展,2005,26(2):18-21.
- [4]Shapouri M R S, Marieme K, Micheline L, et al. Cloning, sequencing and expression of the S1 gene of avian reovirus[J]. J Gen Virol, 1995, 76(Pt6): 1515-1520.
- [5]Shmulevitz M, Duncan R. A new class of fusion-associated small transmembrane (FAST) proteins encoded by the non-enveloped fusogenic reoviruses[J]. The EMBO Journal, 2000, 19: 902-912.
- [6]Gustavo B, Lucía L, Martínez-Costas J, et al. Modification of late membrane permeability in avian reovirus-infected cells[J]. J Biol Chem, 2002, 277(20): 17789-17796.
- [7]Yin H S, Su Y P, Lee L H, et al. Evidence of nucleotidyl phosphatase activity associated with core protein σ A of avian reovirus S1133[J]. Virology, 2002, 293(2): 379-385.
- [8]刘文兴,王劲,吴宝成.禽类呼肠孤病毒的分子生物学[J].福建畜牧兽医,2004,26(1):10-12.
- [9]Michael A Richardson, Yasuhiro F. Nucleotide sequence of reovirus genome segment S3, encoding non-structural protein sigma NS[J]. Nucleic Acids Res, 1983, 11(18): 6399-6407.
- [10]Yin H S, Lee L H. Identification and characterization of RNA-binding activities of avian reovirus non-structural protein sigma NS[J]. J Gen Virol, 1998, 79(Pt 6): 1411-1413.
- [11]Becker M M, Goral M I, Hazelton P R, et al. Reovirus sigma protein is required for nucleation of viral assembly complexes and formation of viral inclusions[J]. J Virol, 2001, 75(3): 1459-1475.
- [12]Kuntz-Simon G, Le Gall-Recole G, De Boisseson C, et al. Muscovy duck reovirus sigmaC protein is atypically encoded by the smallest genome segment[J]. J Gen Virol, 2002, 83(Pt5): 1189-1200.
- [13]张云,刘明,欧阳岁东等.正呼肠孤病毒及其的分类学依据研究进展[J].动物医学进展,2004,25(6):46-49.
- [14]Fauquet C M, Mayo M A, Maniloff J, et al. Virus Taxonomy (Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses) [M]. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005: 455-465.
- [15]Gillian A L, Nibert M L. Amino terminus of reovirus nonstructural protein NS is important for ssRNA binding and nucleoprotein complex formation[J]. Virology, 1998, 240(1): 1-11.
- [16]Gillian A L, Livny J, Schiff LA, et al. Reovirus protein sigma NS binds in multiple copies to single-stranded RNA and shares properties with single-stranded DNA binding proteins[J]. J Virol, 2000, 74(13): 5939-5948.
- [17]Miller C L, Broering T J, Parker J S, et al. Reovirus sigma NS protein localizes to inclusions through an association requiring the mu NS amino terminus[J]. J Virol, 2003, 77(8): 4566-4576.
- [18]Touris-Otero F, Martínez-Costas J, Vakharia V N, et al. Avian reovirus nonstructural protein sigma NS forms viroplasm-like inclusions and recruits protein sigma NS to these structures[J]. Virology, 2004, 319(1): 94-106.
- [19]Touris-Otero F, Martínez-Costas J, Vakharia V N, et al. Characterization of the nucleic acid-binding activity of the avian reovirus nonstructural protein σ NS[J]. J Gen Virol, 2005, 86(4): 1159-1169.
- [20]徐耀先,周晓峰,刘立德.分子病毒学[M].武汉:湖北科学技术出版社,2000:269-275.