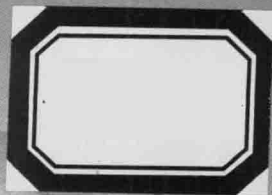


传染性法氏囊病毒的反向遗传操作研究

刘 锴 著

中国农业科学技术出版社



传染性法氏囊病毒的反向遗传操作研究

刘 锴 著

中国农业科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

传染性法氏囊病毒的反向遗传操作研究 / 刘锴著. —北京:
中国农业科学技术出版社, 2013. 9
ISBN 978 - 7 - 5116 - 1368 - 4

I. ①传… II. ①刘… III. ①鸡病 - 法氏囊病病毒 - 研究
IV. ①S858. 31

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 211908 号

责任编辑 徐 毅
责任校对 贾晓红

出 版 者 中国农业科学技术出版社
北京市中关村南大街 12 号 邮编: 100081
电 话 (010) 82106631 (编辑室) (010) 82109702 (发行部)
(010) 82109709 (读者服务部)
传 真 (010) 82106631
网 址 <http://www.castp.cn>
经 销 者 全国各地新华书店
印 刷 者 北京华正印刷有限公司
开 本 700mm × 1 000mm 1/16
印 张 10
字 数 160 千字
版 次 2013 年 9 月第 1 版 2013 年 9 月第 1 次印刷
定 价 25.00 元

————— 版权所有 · 翻印必究 —————

内容提要

传染性法氏囊病 (Infection bursal disease, IBD) 是由鸡传染性法氏囊病毒 (Infectious bursal disease virus, IBDV) 引起的鸡和火鸡的一种高度接触性传染病。这种病给世界各国的禽养殖业带来了巨大损失。自 IBDV 被发现至今新的变异株不断出现, 分子结构的改变导致病毒致病力的改变及宿主对疫苗应答的改变, 使传统的疫苗已不能控制其流行。而常规的从“性状—基因”的研究策略具有一定的局限性, 研究者不能更有针对性地、主动地对各种病毒进行研究。因此, 可以考虑反其道而为之, 即从“基因—性状”, 这样, 反向遗传操作技术 (Reverse genetics manipulation technique) 应运而生。反向遗传操作技术的诞生和运用, 开启了人们对病毒基因组进行人工操作以及详细了解病毒基因及其产物功能的大门。

本研究克隆了 IBDV B87 株的全基因组, 并对其基因组进行了详细的生物信息学分析, 结果发现了一些针对不同强弱毒力的毒株而呈规律性变化的氨基酸位点, 同时, 发现 VP2 仅是决定 IBDV 毒力的因素之一。B 节段在系统发育中要比 A 节段相对保守。结合计算机软件在 A、B 节段基因组上分别各找到一个沉默突变位点, 通过 PCR 的方法进行沉默突变, 获得了带有遗传标志的 A、B 基因组全长载体。在此基础上构建了 A、B 基因组 5' 带有 T7 转录子基因的体外转录载体和带有绿色荧光蛋白的体内转录真核表达载体。将体外转录载体转录的 RNA 与体内转录载体分别和脂质体共转染 Vero 细胞, 经多次传代“拯救”出带有遗传标记的 IBD 病毒。

中文摘要

对 RNA 病毒进行遗传拯救或构建感染性克隆已成为分子病毒学实验室进行病毒结构与功能深入研究的一条捷径。建立动物 RNA 病毒的反向遗传系统实现病毒的遗传拯救,从而可以在 DNA 水平上对 RNA 病毒进行遗传操作,为深入研究 RNA 病毒的分子生物学及病毒与宿主的相互作用提供了强有力的技术工具。

鸡传染性法氏囊病 (IBD) 是危害世界养禽业的严重传染病之一,其病原为鸡传染性法氏囊病毒 (IBDV),IBDV 是双链 RNA 病毒科 (Birnaviridae)、禽双链 RNA 病毒属 (Avibirnavirus),其基因组由 A、B 两个节段组成。本研究以 IBDV 疫苗株 B87 为模型,在克隆 IBDV B87 株全基因组 cDNA 的基础上,初步构建了 IBDV 反向遗传系统,拯救出带分子标记的 IBDV,并初步进行了 IBDV 功能学的研究。

首先建立了长距离 RT-PCR 方案快速扩增并克隆 IBDV 基因组。以 IBDV B87 细胞培养液为材料,以蛋白酶 K 和酚/氯仿提取病毒 RNA,经 LiCl 分级沉淀纯化病毒 RNA。然后用 RT-PCR 法扩增获得了 IBDV 的 A 节段序列。使用 T 载体快速克隆 PCR 产物,序列分析证实获得了 3 260bp 的 A 节段全序列 (GeneBank 登录号 DQ906921)。用类似的长距离 RT-PCR 和克隆方案获得 B87 株的 B 节段全序列 (GeneBank 登录号为 DQ906922)。

其次对 IBDV B87 株双节段全基因组进行了生物信息学分析,发现 A 节段核苷酸与哈尔滨弱毒株 Gt 高度同源,而 B 节段则与德国 P2 株百分百同源,提示 A 节段与 Gt 株发生了基因的置换或重组,而 B 节段则相对保守。

再次对 IBDV B87 株与参考毒株的 A、B 片段氨基酸序列的分析发现,VP1 有 12 个氨基酸、VP2 有 11 个氨基酸、VP3 有 3 个氨基酸以及 VP4 有 5 个氨基酸,与强毒株或弱毒株相比呈现规律性的变化,这一事实再次提示毒力可能由多基因控制。序列比较结果也进一步支持 IBDV 主要宿主保护性抗原 VP2 并非决定 IBDV 毒力的唯一因素;相对 VP2 而言,VP1、VP3、VP5 和 VP4 较保守;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。

为构建分子标记疫苗,本研究设计了一种以 PCR 为介导的定点突变方案,并在 IBDV 基因组上通过同义密码子替换来引入遗传标记。其中,A 节段 2812~2817 位置“ACGAGA”,分别编码 Thr 与 Arg 两个氨基酸,可以进行置换突变 A2815C, A2817T,使其改变为“ACGCGT”,这两个点突变在 A 节段上产生了新的 Mlu I 酶切位点。B 节段 1722~1727 位“CAGGGG”,分别编码 Gln 和 Gly 两个氨基酸,突变 A1723C, G1725C,使其改变为“CCGCGG”,这两个点突变在 B 节段上产生了新的 Sac II 酶切位点。

通过 PCR 方法在 A、B 基因组的 5'端引入 T7 启动子序列,同时,含有突变标记,以 T 载体为骨架,构建了含有突变标记和 T7 启动子序列的 B87 株基因组 cDNA 的重组子,命名为 pMD-18TSA 与 pMD-18TSB。以 pMD-18TSA 与 pMD-18TSB 为模板进行线性化,体外转录成 RNA,然后用脂质体法共转染 Vero 细胞。免疫荧光和 ELISA 分析表明,Vero 细胞具有 IBDV 蛋白及类似病毒样物质,RT-PCR 扩增出相应 A、B 节段基因组,并分别用 Mlu I 酶切 A 节段 PCR 产物和 Sac II 酶切 B 节段 PCR 产物,均获得预期结果,证实成功拯救出了带遗传标记的 IBDV,而并非野生病毒的污染,只是病毒滴度比较低,这是因为 T7 RNA 聚合酶的低保真转录造成转录物群体差异的结果,由于转录物中存在着不完整的缺陷病毒拷贝和全长转录的竞争导致被拯救病毒的感染力较低。

pEGFP-N1 真核荧光表达载体,在多克隆位点下游含有绿色荧光蛋白基因,其优点是可以直接通过荧光显微镜观察到插入的外源基因的表达情况,本试验以 pEGFP-N1 真核表达载体为骨架,构建了两种突变的含 IBDV B87 株基因组 cDNA 的重组子,命名为 pEGFP-mA 和 pEGFP-mB。脂质体介导共转染 pEGFP-mA 和 pEGFP-mB 真核表达质粒进入 Vero 细胞。直接荧光和免疫荧光分析表明重组子在 Vero 细胞得到了表达;显微镜下观察到转染质粒后的细胞形态发生变化,产生了类似野生 IBDV 感染细胞时出现的细胞病变(CPE),将上述病变细胞培养液继续传代均能出现 CPE;电子显微镜下可以看到符合 IBDV 病毒粒子结构的颗粒;提取病变细胞培养液中病毒样物质的 RNA 进行 RT-PCR,也可扩增出病毒双节段全长基因组。分别用 Mlu I 酶切 A 节段 PCR 产物以及 Sac II 酶切 B 节段 PCR 产物,均获得预期结果,进一步证实成功拯救出 IBDV。

本研究工作通过长距离 RT-PCR 方法获得 IBDV 全基因组序列;在 A、B 节段所引入的遗传标记,没有出现在目前已报道的自然界存在的野生 IBDV 序列上。因此,可以认为该方案能适用于对 IBDV 毒株进行分子标记;分别以 T7 RNA 聚合酶体外转录体系和 RNA 聚合酶 II 表达体系,作为反向遗传

系统具有直接、简易、有效、可操作性强等优点。

自主构建的 IBDV 反向遗传系统将为深入研究 IBDV 的功能基因组学、致病和变异的分子机制打下良好的基础，同时，也为研制新一代基因缺失疫苗和标记疫苗提供宝贵的技术资料。

Complete Genomic Cloning and Development in the Reverse Genetics System for IBDV B87 strain

The study of virus and its interactions with host cells and organisms has benefited greatly from the ability to engineer specific mutations into viral genomes, a technique known as reverse genetics.

Infectious bursal disease (IBD) is one of the most contagious disease of poultry industry of the world. Infectious bursal disease virus (IBDV) is the pathogen, which belongs to Birnaviridae family. To develop the reverse genetics system or so called genetic rescue techniques for IBDV, the full-length cDNA of the double segment of the chicken IBDV B87 strain was amplified and cloned by long RT-PCR. And a vaccine strain of IBDV with molecular marker was rescued by reverse genetics manipulation.

Sequence analysis showed that A segment of IBDV B87 strain was 3 260bp, and B segment was 2 827bp. And the sequence of A and B segment were submitted into GeneBank (Accession number DQ906922 and DQ906921 , respectively).

Homologous and bioinformation analysis of IBDV B87 showed that A segment of B87 has highest homologous with Harbin Gt strain, and homologous of B segment of B87 with German P2 strain was 100% , which tell us that B87 A segment may be mutated but B segment conserved. Compared with reference sequence showed that 12aa of VP1 , 11aa of VP2 , 3aa of VP3 and 5aa of VP4 changed regularly, and VP2 was not the only one gene of IBDV antigen, VP1 , VP3 , VP5 and VP4 was conserved, which showed virulence of IBDV controlled by polygene. And conserved NCR sequence of different virulence strains of IBDV showed NCR did not have direct relationship with virulence.

In order to develop molecular marker, two recombinant cDNA plasmids of B87, named pMD-18TSA and pMD-18TSB respectively, was constructed with T7 promoter upstream of each 5' NCR. And genetics marker was inserted into IBDV

using synonymous codon by PCR. A₂₈₁₅ and A₂₈₁₇ of A segment changed to C₂₈₁₅ and T₂₈₁₇ and formed a RE site of MluI, A₁₇₂₃ and G₁₇₂₅ of B segment changed to C₁₇₂₃ and C₁₇₂₅ and formed a RE site of Sac II. Then the two plasmids was linearized, transcribed in vitro and transfected into Vero cell. The results showed molecular marker vaccine of IBDV was constructed successfully, proved by ELISA, RT-PCR and restriction analysis by MluI and Sac II.

Furthermore, two recombinant plasmids of IBDV B87, named pEGFP-mA and pEGFP -1mB, was constructed with the two segment of B87 inserted into pEGFP -N1, an eukaryotic expression plasmid. Co ~ transfection of pEGFP-1mA and pEGFP -1mB with Lipofectamine into Vero cells resulted in the expression of IBDV RNA and proteins, which were confirmed by RT-PCR and immunofluorescence assay analysis. The change of cell morphology after cotransfection was similar to the situation cellular pathogenic effects (CPE). The virus-like particles can be found by electron microscopy, confirmed the rescue of IBDV. These genetic markers retained in the recovered progeny virus can be detected by RT-PCR and restriction analysis by MluI and SacII also proved the result that IBDV was rescued successfully.

Keywords: IBDV; full-length genome; reverse genetics system; rescue; infectious clone; RT-PCR; point mutant

英文缩写词表

缩写词	英文名称	中文名称
AMP	Ampicillin	氨苄西林
AMPV	Avian paramyxovirus	禽副黏病毒
bp	Base pair	碱基对
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
CAT	Chloramphenicol acetyltransferase	氯霉素乙酰转移酶
CEF	Chicken embryo fibroblast	鸡胚成纤维细胞
COS-1	African green monkey kidney	非洲绿猴肾细胞
CPE	Cytopathogenic effect	致细胞病变作用
DEPC	Dietlyl pyrocarbonate	焦碳酸二乙酸
DIP	Defective interfering particle	缺陷性干扰病毒粒子
EID ₅₀	50% egg infectious dose	半数鸡胚感染剂量
293T	Human embryo kidney	人胚胎肾细胞
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
F	Fusion protein	融合蛋白
FMDV	Foot-and-mouth disease virus	口蹄疫病毒
FITC	Fluorescein isothiocyanate	异硫氰酸荧光素
FPV	Fowlpox virus	鸡痘病毒
GFP	Green fluorescent protein	绿色荧光蛋白
GPMV	Goose paramyxovirus disease virus	鹅副黏病毒
HA	Hemagglutinin	血凝素
HDV	Hepatitis delta virus	丁型肝炎病毒

(续表)

缩写词	英文名称	中文名称
HI	Hemagglutinin inhibition	血凝抑制
HN	Hemagglutinin-neuraminidase	血凝素 - 神经氨酸酶
IBDV	Infectious bursal disease virus	传染性法氏囊病毒
ICPI	Intracerebral pathogenicity index	1 日龄雏鸡脑内接种致病指数
IFA	Indirect immunofluorescent assay	间接免疫荧光试验
IFN	Interferon	干扰素
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside	异丙基硫代半乳糖吡喃苷
IRES	Internal ribosome entry site	内部核糖体进入位点
IVPI	Intravenous pathogenicity index	6 周龄鸡静脉接种致病指数
MDCK	Madin-Darby canine kidney	犬肾细胞系
MDT	Mean death time	平均死亡时间
MOI	Multiplicity of infection	多重感染复数
mRNA	Message RNA	信使 RNA
MuV	Mumps virus	腮腺炎病毒
MV	Measles virus	麻疹病毒
NA	Neuraminidase	神经氨酸酶
NCR	Non-coding region	非编码区
NNSV	Nonsegmented negative-strand RNA	不分节段负链 RNA 病毒
NP	Nucleoprotein	核蛋白
OD	Optical density	光密度
OIE	Office international des epizooties	国际兽疫局
WHO	World organization for animal health	世界动物卫生组织
ORF	Open reading frame	开放阅读框
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链反应
PEG	Polyethylene glycol	聚乙二醇
PFU	Plaque forming unit	空斑形成单位
PolyA	Polyadenylic acid	寡聚腺苷酸

(续表)

缩写词	英文名称	中文名称
RACE	Rapid amplification of cDNA ends	末端快速扩增法
RBZ	Ribozyme	核酶
RE	Restriction enzyme	限制性内切酶
RNA	Ribonucleic acid	核糖核酸
RNasin	RNAase inhibitor	RNA 酶抑制剂
RNPs	Ribonucleoprotein complex	核糖核蛋白复合物
r/min	Revolutions per minute	转/分
RPV	Rinderpest virus	牛瘟病毒
RSV	Respiratory syncytia virus	呼吸道合胞体病毒
RT	Reverse transcription	反转录
RV	Rabies virus	狂犬病病毒
SPF	Specific pathogen free	无特定病原
TCID ₅₀	Tissue culture infective dose	组织培养半数感染剂量
Vero	African green monkey kidney	非洲绿猴肾细胞
VSV	Vesicular stomatitis virus	水泡性口炎病毒
VV	Vaccinia virus	痘苗病毒
X-gal	5-bromo-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside	5-溴-4 氯-3-吲哚- β - D-半乳糖苷

目 录

前 言	(1)
一 研究的背景及目的意义	(1)
二 拟解决问题及研究内容	(2)
三 技术路线	(3)
第一篇 文献综述	(5)
第一章 鸡传染性法氏囊病的研究进展	(7)
一、IBDV 的病原学	(8)
二、IBD 的诊断	(17)
三、病毒的变异	(21)
四、病毒的致病性	(24)
五、免疫抑制	(26)
六、传染性法氏囊病的防制	(28)
七、IBD 的治疗	(33)
第二章 RNA 病毒反向遗传操作技术研究进展	(35)
一、RNA 病毒反向遗传操作体系的逐步建立	(38)
二、从 cDNA 克隆拯救感染性病毒	(41)
三、IBDV 反向遗传系统的研究进展	(46)
四、反向遗传操作技术的应用	(50)
五、国内反向遗传操作技术的研究概况	(55)
六、反向遗传操作技术展望	(57)
第二篇 研究内容	(59)
第一章 传染性法氏囊病毒 B87 株基因组双节段的克隆	(61)
一、材料	(62)
二、方法	(63)
三、结果	(67)

四、讨论	(70)
五、小结	(71)
第二章 传染性法氏囊 B87 株全基因组生物信息学分析	(72)
一、材料	(72)
二、方法	(73)
三、结果	(74)
四、讨论	(85)
五、小结	(87)
第三章 传染性法氏囊 B87 株基因组 cDNA 序列的定点突变	(88)
一、材料	(88)
二、方法	(89)
三、结果	(93)
四、讨论	(96)
五、小结	(97)
第四章 传染性法氏囊 B87 株体外转录载体的构建及反向遗传 系统的初步建立	(98)
一、材料	(99)
二、方法	(99)
三、结果	(103)
四、小结	(109)
第五章 传染性法氏囊 B87 株体内转录载体的构建及反向 遗传系统的初步建立	(110)
一、材料	(110)
二、方法	(111)
三、结果	(114)
四、讨论	(118)
五、小结	(121)
结 论	(122)
参考文献	(123)

前 言

一 研究的背景及目的意义

传染性法氏囊病病毒 (Infectious bursal disease virus, IBDV) 自 1962 年被确认以来, 已成为危害世界养禽业最严重传染性病毒之一, 我国的养禽业也深受其害。IBDV 侵染幼鸡免疫器官-法氏囊使其产生免疫抑制, 给世界各国的禽养殖业带来了巨大损失。对其防治一直是各国研究的重点项目。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。目前, 对 IBVD 的分子生物学如复制、装配、致病机制仍然了解不足。尤其 IBVD 新的变异株不断出现, 分子结构的改变导致病毒致病力的改变及宿主对疫苗应答的改变, 使传统的疫苗已不能控制其流行。而常规的从“性状—基因”的研究策略具有一定的局限性, 研究者不能更有针对性地、主动地对各种病毒进行研究, 因此, 可以考虑反其道而为之, 即从“基因—性状”, 这样, 反向遗传操作技术 (Reverse genetics manipulation technique) 应运而生。反向遗传操作技术的诞生和运用, 开启了人们对病毒基因组进行人工操作以及详细了解病毒基因及其产物功能的大门。

建立动物 RNA 病毒的反向遗传系统实现病毒的遗传拯救, 使人们可以在 DNA 水平上对 RNA 病毒进行遗传操作, 为深入研究 RNA 病毒的分子生物学及病毒与宿主的相互作用提供了强大的技术工具。最近, 随着结构最复杂的几种动物 RNA 病毒 (流感病毒、冠状病毒和埃博拉病毒等) 可以直接通过全长 cDNA 感染性克隆而获救, 人们对病毒的分子致病机制取得了全新的认识, 例如, 日本和美国科学家阐明了香港 1997 年暴发的“禽流感事件”的分子机制。这在缺乏病毒的反向遗传系统之前是无法做到的。在此基础上, 可以研制新一代的抗病毒疫苗和构建病毒载体, 进行基因治疗, 促进医学发展。目前在国际上, 对 RNA 病毒进行遗传拯救或构建感染性克隆已经是分子病毒学实验室进行病毒结构与功能深入研究的必经之路。相比之下, 我国的 IBVD 基础研究水平仍相对薄弱, 多数工作是克隆单个基因及表

达。克隆 IBDV 双节段全基因组, 进而建立 IBDV 反向遗传系统, 为 IBDV 分子生物学研究提供一个有效的“技术平台”, 将为深入研究 IBDV 的功能基因组学、致病和变异的分子机制打下必要的基础, 还可据此研制新一代的基因缺失疫苗和标记疫苗, 这也是本研究的目的意义所在。

二 拟解决问题及研究内容

本研究是一项探索性研究, 在此前只有极少相关的实际经验可供借鉴。试验之前拟解决的关键性问题为:

首先, 要获得 IBDV 全基因组, 这是整个研究工作中最困难的地方。必须建立一套特异性好、可重复的 IBDV 全基因组扩增和克隆程序, 为后续工作打下良好的基础。

其次, 选择合适的定点突变方案。既要在 IBDV 序列上引入遗传标记使之区别于野生型原始病毒, 又要使这种方案可以普遍应用于以后的反向遗传操作。

最后, 选择一种或几种相对简易但行之有效的方法拯救出 IBDV, 建立 IBDV 反向遗传系统。为此, 作者在阅读大量文献的基础上, 总结并比较了各种代表性动物 RNA 病毒反向遗传系统的构建, 这对本试验设计有很大帮助。

基于以上的考虑, 主要进行了以下内容的研究。

(1) 用长距离 RT-PCR 方法直接克隆 IBDV 基因组 A、B 节段全长 cDNA

①进行 IBDV 的纯化及双链 RNA 基因组提取。

②计算机辅助设计用于一步扩增 IBDV 基因组全长的最适引物。

③分别一步扩增 IBDV 基因组 A、B 节段全长 cDNA。

④克隆于 T 载体, 分别测序证实。

⑤通过生物信息学方法比较分析国内外已发表的 IBDV 基因组全长序列。

(2) IBDV 反向遗传系统(感染性克隆)的建立

①在克隆的 A 节段和 B 节段 cDNA 上分别定点突变产生遗传标记, 以区别于野生型病毒的基因组。

②分别构建含有遗传标记的基因组 A、B 节段全长 cDNA 的体外转录载体和真核表达载体。

③体外转录并纯化用于转染的 RNA 和制备高纯度转染级质粒。

④脂质体介导共转染 Vero 细胞。

⑤显微镜、免疫荧光、RT-PCR 和电镜观察等方法检测重组病毒的存在并且传代, 检测引入病毒的遗传标记, 实现病毒的拯救。

二 技术路线

