

传染性法氏囊病超强毒山东分离株 SD0210 的致弱研究*

崔言顺^{1,2}, 李建亮², 刘星火², 姜世金², 孙淑红², 崔治中², 张彦明^{1**}

(1 西北农林科技大学动物科技学院, 陕西杨凌, 712100; 2 山东农业大学动物科技学院, 山东泰安, 271018)

Attenuation of a Highly Virulent Strain SD0210 of Infectious Bursal Disease Virus

CUI Yan-shun^{1,2}, LI Jian-liang², LIU Xing-huo², JIANG Shi-jin², SUN Shu-hong², CUI Zhi-zhong²,
ZHANG Yan-ming^{1**}

(1. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; 2. College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

Abstract: A very virulent strain SD0210 of Infectious bursal disease virus (vvIBDV) was adapted to chicken embryo fibroblast cell (CEF) after propagating in SPF chicken embryo for 10 generations and CEF for 18 generations. The test of pathogenicity, virulent stability and immunogenicity in chickens showed that the cell-adapted virus kept the immunogenicity of paternal virus, while its virulence did not reverse. The change pattern of deduced amino acid sequences in VP2 hyper-variable region during the adaptation to CEF and transform from high pathogenicity to low pathogenicity has been obtained. When the virus was passed to the 18th generation, it began to adapt CEF and cause cell pathological effect (CPE). To 21th generation, the virus still kept its paternal immunogenicity and had no pathogenicity to SPF chickens even it was propagated to 15th generation in SPF chicken bodies.

Key words: Very virulent Infectious bursal disease virus(vvIBDV); Attenuation; *vp2* gene

摘要: 本研究将鸡传染性法氏囊病超强毒(vvIBDV)SD0210株经SPF鸡胚培育及鸡胚成纤维细胞(CEF)传代培养, 获得了对CEF适应的细胞毒, 并对细胞毒进行了致病性、回归动物的稳定性试验及免疫原性方面的试验, 结果表明已成功获得了具有高免疫原性且安全无毒力返强的致弱株, 并初步揭示了vvIBDV在适应细胞、从超强毒力向弱毒力转化过程中, VP2高变区氨基酸序列的变化情况。SD0210株培养至18代开始适应细胞, 出现细胞病变。21代细胞毒已对SPF鸡失去了致病性, 在鸡体内连续传代15代毒力不返强, 而且具有较高的免疫原性。

关键词: 鸡传染性法氏囊病超强毒; 传代致弱; VP2基因

中图分类号: S931.7

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2005)04-0408-05

鸡传染性法氏囊病超强毒(very virulent infectious bursal disease Virus, vvIBDV)的出现, 是近20年来鸡传染性法氏囊病(Infectious Bursal Disease, IBD)免疫失败的主要原因, 控制该病的当务之急是寻找合适的可以制作疫苗的毒株, 了解病毒变异的规律及确定超强毒株的分子标记。VP2高变区位于Acc I和Spe I两个酶切位点之间, 包括206~350位共145个氨基酸残基, 大量数据证明, VP2是该病毒的主要结构蛋白和宿主保护性抗原,

VP2高变区参与形成一个构象依赖性抗原表位。此外, VP2也与细胞凋亡有关^[1~6], *vp2*基因的变化是影响病毒毒力的主要因素之一, 因此*vp2*成为研究vvIBDV毒力相关基因的首选。我们从国内分离鉴定了vvIBDV SD0210株, 将其通过SPF鸡胚和鸡胚成纤维细胞(CEF)传代驯化, 经序列分析和动物实验, 表明已得到致弱株。那么超强毒致弱过程中病毒本身发生了哪些变化? 是否存在渐变规律? 致弱株是否稳定? 因此我们选取SD0210原代毒、

收稿日期: 2005-02-24, 修回日期: 2005-05-17

* 基金项目: 国家自然科学基金重点项目资助课题(39893290#-4)。

作者简介: 崔言顺(1959-), 男, 山东莱芜籍, 教授, 博士研究生, 主要从事分子病原学与兽医公共卫生学研究。Tel: 0538-6677898

** 通讯作者: 张彦明(1956-), 男, 陕西渭南籍, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事分子病原学与兽医公共卫生学研究。

Corresponding author: Tel: 029-87092040 E-mail: ylzhangyanming@163.net

其致病株和部分中间代次毒株进行了致病性实验和毒力返强实验,并做了 *vp2* 高变区基因序列的分析比较,旨在从分子水平揭示 IBDV 毒力变异的规律。

1 材料和方法

1.1 病毒

vvIBDV SD 0210 株为国内分离的超强毒株,本实验室已经对该病毒的致病性、抗原性、VP2 高变区的基因进行了系统的分析和鉴定,该病毒可以引起 4 周龄的 SPF 鸡 80% 以上的高死亡率,对 4 周龄 SPF 鸡 LD₅₀ 为 10^{5.6}/0.2 mL,同 vvIBDV HK46 株 VP2 高变区氨基酸序列同源性高达 99.5%。

法氏囊组织的处理参照相关文献^[7]进行,取按上法得到的上清,参照文献^[8]将 IBDVSD0210 株在鸡胚增殖,共传 10 代。取第 10 代胚毒,经适当处理后接种 24h-36h 长成单层的 CEF,按常规方法将 IBDVSD0210 株在细胞上培养直至病毒适应细胞、引起病变后,再传几代。

1.2 SPF 鸡胚和 SPF 鸡

SPF 鸡胚购自济南 SPAFAS 实验室,SPF 鸡购自山东省农科院家禽研究所实验鸡场。

1.3 原始囊毒及不同代次细胞毒致病性的测定

选取 vvIBDV SD0210 株原代毒、细胞 17 代毒(C17)、细胞 18 代毒(C18)、细胞 20 代毒(C20)、细胞 21 代毒(C21)、细胞 25 代毒(C25)6 组进行攻毒,同时设一健康对照组。每组 25 只 4 周龄 SPF 鸡,接种病毒剂量为 2 000EID₅₀/只。攻毒后连续观察 7d,记录感染鸡的临床变化,7d 后剖杀,观察病理变化,采集法氏囊,测其重量,计算囊重比。囊重比计算公式如下:

$$\text{囊重比} = (\text{法氏囊重} / \text{体重}) \times 100\%$$

1.4 细胞适应毒的遗传稳定性试验

将 C21、C25 分别经点眼、口服途径接种 14 日龄 SPF 鸡,接种量为 0.2 mL/只(20 000TCID₅₀/mL),每组 5 只,并设空白对照组,隔离饲养,至 72 h 剖杀;称取鸡体重、法氏囊重,计算囊指数,并检查法氏囊病变。取部分法氏囊做病理组织学检查,另一部分法氏囊用生理盐水研磨成 1:3 的组织乳剂,-40℃ 反复冻融 3 次,4 000r/min 离心 15min,取上清液继续接种 SPF 鸡,接种量仍为 0.2 mL,如此反复在鸡体上连续传 15 代。囊指数计算公式如下:

囊指数(BBIX) = 试验鸡囊重比/空白对照组鸡囊重比

当 BBIX < 0.7 时,判为法氏囊萎缩。

1.5 弱毒株的免疫原性试验

分 C21、B87 两个免疫大组,同时设立强毒对照

和健康对照组,其中 C21 设 15 000TCID₅₀/mL、20 000TCID₅₀/mL、50 000TCID₅₀/mL、75 000TCID₅₀/mL 4 个不同免疫剂量的分组,B87 按推荐剂量免疫。所有免疫组于 14 日龄首免,每个剂量免疫 30 只,至 28 日龄所有免疫组分别各取 15 只,以同首次免疫相同的方式进行免疫。所有免疫组于首次免疫后 14、21d,二免后 12d,各组分别取 5 只鸡用 GX8/99 株 vvIBDV 攻毒,攻毒后 5d 扑杀,检查法氏囊病变,计算病理保护率,病理保护率计算公式如下:

$$\text{病理保护率} = (\text{攻毒鸡群中未发生病理损伤的鸡数} / \text{攻毒鸡总数量}) \times 100\%$$

1.6 VP2 高变区扩增

参照陈士友^[9]的方法对 vvIBDV SD0210 株原代毒、细胞 17 代毒(C17)、细胞 18 代毒(C18)、细胞 20 代毒(C20)、细胞 21 代毒(C21)、细胞 25 代毒(C25)进行核酸提取。参照已发表序列设计一对特异性引物,按常规程序对以上 6 个代次病毒进行 *vp2* 基因扩增,同时设未接种 IBDV 细胞培养液作阴性对照。具体引物序列如下:上游引物 P1:5'-T CACCGTCCTCAGCTTAC-3',对应于 ORFA-1 第 495 到 512 位核苷酸,长 18bp;下游引物 P2:5'-T CAGGATTTGGGATCAGC-3',互补于 ORFA-1 第 1120 到 1137 位核苷酸,长 18bp。以 P1、P2 为引物,所得扩增产物应为 643bp。

1.7 序列测定和比较

按常规方法进行连接、转化、质粒提取,以 *EcoR* I + *Pst* I 进行双酶切鉴定。选取经双酶切鉴定后的阳性克隆,进行序列的测定,DNA 序列测定由上海博亚生物技术有限公司完成,采用 DNASTAR 软件对各代次毒进行序列比较分析。

2 结果

2.1 病毒的传代驯化

vvIBDV SD0210 株在 CEF 盲传 18 代后,开始适应细胞,引起细胞病变,细胞圆缩、折光性增强,细胞脱落,呈拉网状。

2.2 原始囊毒及不同代次细胞毒致病性实验

vvIBDV SD0210 株原代毒对 4 周龄 SPF 鸡的致死率为 80%,存活鸡囊重比与 C17、C18、C20、C21、C25 对照组的囊重比差异极显著;细胞 17、18、20 代毒仍有一定的致病性,存活鸡囊重比与原代毒差异显著。而细胞 21、25 代毒不引起鸡的死亡,各脏器无明显病变;接种 3d 法氏囊与健康对照组无差异;接种 7d,法氏囊无损伤性变化,结果见表 1。

表 1 vvIBDV SD0210 株不同代次细胞毒对 4 周龄 SPF 鸡上的致病性试验

Table 1 Mortality of SPF chickens caused by different generations of cell-adapted viruses of vvIBDV SD0210 strain at the age of 28 days

Strains	Age of chicken schall enged(Days)	Virus dose	Total	Mortality (%)	Bursa/body weight(%)	
					Dead	Killed
SD0210	28	1 000ELD ₅₀ /mL	25	80	0.318±0.075(n=20)	0.249±0.067(n=5)
C17	28	10 000TCID ₅₀ /mL	25	40	0.321±0.066(n=10)	0.270±0.084(n=15)
C18	28	10 000 TCID ₅₀ /mL	25	32	0.342±0.064(n=8)	0.275±0.077(n=16)
C20	28	10 000TCID ₅₀ /mL	25	16	0.486±0.068(n=4)	0.332±0.064(n=21)
C21	28	10 000TCID ₅₀ /mL	25	0		0.579±0.071(n=25)
C25	28	10 000TCID ₅₀ /mL	25	0		0.582±0.080(n=25)

Note: The mean bursa/body weight of 35-day SPF chickens is 0.590±0.081(n=10).

2.3 致弱株的稳定性试验

vvIBDV SD0210 株 C21 接种 SPF 鸡后,15 代内均未引起临床发病和死亡,未见明显的组织学病理变化,囊重比也与对照组无明显差异。抗原的阳性率可以反映病毒的增殖情况,利用琼脂免疫扩散试验检测各回归代的 IBDV 及抗体,第 1 代、第 2 代抗原(IBDV)、抗体检测全部为阳性,第 3 代抗原检出阳性率为 3/5,抗体检出阳性率为 2/5;第 4 代时,抗原检出为 1/5,抗体检出为 1/5,第 5 代以后抗原抗体检测均为阴性。这表明 C21 在回归 SPF 鸡的过程中,所检出的 IBDV 逐渐消失;所引起的法氏囊病变逐渐轻微,直至不引起病理损伤,经过 15 代的回归试验,病毒毒力不返强,致弱株的毒力稳定性较好,稳定性试验结果见表 2。

表 2 vvIBDV SD0210 株 C21 回归 SPF 鸡的稳定性试验
Table2 Virulent stability on SPF chickens of C21 of vvIB-DV SD0210 strain

Generation	Ag(%)	Ab(%)	Index of bursa		Histopa- thology
			Fabricus		
1	100	100	0.99		No
2	100	100	1.01		No
3	60	40	1.03		No
4	20	20	1.01		No
5~15	0	0	1.02		No

2.4 致弱株的免疫原性和最佳免疫剂量

就 C21 弱毒株疫苗而言,3000TCID₅₀ 的免疫剂量一免后 14、21d,二免后 12d 攻毒时,法氏囊病理保护率分别为 60%、80%、80%;5000TCID₅₀ 的免疫剂量不论是一免还是二免均可提供 100% 的保护率;B87 疫苗免疫组,按推荐剂量免疫,攻毒后法氏囊病理保护率分别为 60%、70%,vvIBDV SD0210 株 C21 弱毒株的一次免疫的免疫原性要优于目前生产上使用的 B87 疫苗。10 000TCID₅₀、15 000TCID₅₀ 也可提供 80%~100% 的保护率。5 000TCID₅₀ 的免疫剂量为该弱毒株的最佳免疫剂量。

2.5 VP2 高变区的氨基酸序列比较

电泳结果表明,vvIBDV SD0210 株各代细胞毒经 RT-PCR 均得到了与预计大小一致(643bp)的特异 DNA 片段,而单纯细胞培养液未扩增出相应的片段;酶切鉴定证实已得到预期大小的阳性克隆,见图 1;测序分析的结果表明,在细胞传代的过程中,VP2 基因高变区部分氨基酸发生了替换(图 2)。从图 2 可以看出,vvIBDV SD0210 株第 17 代细胞毒,其 VP2 基因与原始毒相比,有 8 处氨基酸发生了替代:222 位(A→P)、242 位(I→V)、256 位(I→V)、260 位(T→H)、270 位(A→T)、294 位(I→L)、299 位(S→N)、330 位(S→R),至 18 代细胞适应毒 284 位(A→T),至 20 代,253 位(Q→H),21 代之后的 VP2 高变区氨基酸序列不再发生变化,与 D78 疫苗只有一个氨基酸的差异。这表明随着在细胞传代代次的增加,传代毒 VP2 高变区与野毒株相比序列变异越来越大,而与 D78 株同源性则越来越高,综合动物试验可以看出传代毒随传代代次的增加致病性越来越弱。

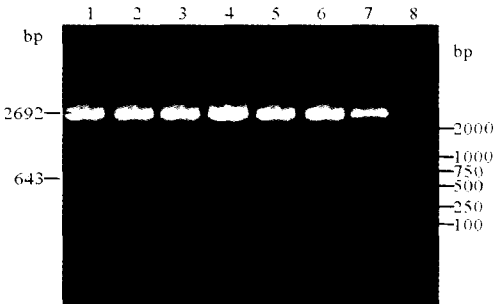


图 1 vvIBDV SD0210 株各代次毒重组质粒的双酶切鉴定
Fig.1 Identification of recombinant plasmids of different generations of cell-adapted virus of vvIBDV SD0210 strain

1.control; 2. recombinant plasmid of the first buasal virus; 3. recombinant plasmid of17th generation of virus; 4. recombinant plasmid of 18th generation of virus; 5. recombinant plasmid of 20th generation of virus; 6. recombinant plasmid of21st generation of virus; 7. recombinant plasmid of 25th of virus generation; 8. maker DL2 000.

193	222	242	253256 260	270272	279	284	
MVATCDSSDRPRVYITITAADDYQFSSQYQAGGV	TITLFSANIDAITSLSIGGELVFQTSVQGLILGATIY	LIGFDGTAVTTRAVAADNGLTAG					SD0210
-----P-----V-----V-----H-----T-----							HK46
-----P-----V-----V-----H-----T-----T-----							C17
-----P-----V-----H-----V-----H-----T-----T-----							C18
-----P-----V-----H-----V-----H-----T-----N-----T-----							C20
-----P-----V-----H-----V-----H-----T-----N-----T-----							C21
-----P-----V-----H-----V-----H-----T-----N-----T-----							C25
-----P-----V-----H-----V-----H-----T-----I-----N-----T-----							D78
286	294	299	330			377	
TDNLLMPFNIVIPTSEIIQPIITSIKLEIVTSKSGQAGDQMSWSASGS	LAVTIHGGNYPGALRPVILVAYERVATG	SWIVAGVSNFELIPNP					SD0210
-----L-----N-----R-----							HK46
-----L-----N-----R-----							C17
-----L-----N-----R-----							C18
-----L-----N-----R-----							C20
-----L-----N-----R-----							C21
-----L-----N-----R-----							C25
-----L-----N-----R-----							D78

图2 vvIBDVSD0210 株不同代次细胞毒与 HK46 株、D78 株 VP2 高变区氨基酸序列比较

Fig. 2 The comparison of deduced VP2 amino acids sequences of 5 generations of cell-adapted viruses of vvIBDV SD0210 strain and HK46 strain, D78 strain

3 讨论

I 型 IBDV 野毒株尤其是 vvIBDV 毒株的一个特征是它不能在细胞上生长,要适应细胞,它必须在细胞或鸡胚上盲传几代,使其对鸡的毒力减弱^[10,11],这一特性可用于 IBDV 活疫苗株的培育。本实验通过 SPF 鸡胚的快速培育和在 CEF 上的传代培养,成功地将 vvIBDV SD0210 野毒株致弱,在 SPF 鸡连续回归 15 代实验表明,致弱株对鸡已无致病性,无毒性返强,而且具有较高的免疫原性,证实为一稳定的弱毒株,可以作为一种疫苗来源。

VP2 高变区究竟是致病性相关的标志还是强毒株或超强毒株在演化系谱中的一种分子标志,至今没有统一的观点。长期以来,不同学者都试图根据研究来阐明 VP2 高变区的碱基或氨基酸变异与致病性或其它生物学特性的关系^[12,13]。本实验通过测定不同致病性的几代细胞毒的 VP2 高变区序列,发现其致病性的变化,确实伴随着 VP2 基因的改变,细胞毒 VP2 高变区内氨基酸序列同原始囊毒的同源性越高,致病性越强。曹永长等认为 vvIBDV 在 VP2 基因高变区具有几个重要的特征^[14,15]:首先,在 249 和 254 位上的氨基酸分别为 Q 和 G,而非 K 和 S,从而保证其抗原性不发生变异;其次,七肽区保持 SWSASGS 不变,且 279 和 284 位分别为 D 和 A,而非 N 和 T,这是 IBDV 毒株具有致病力的必要条件;第三,在 222、294 和 299 位上具有三个特征的氨基酸,分别为 A、I、S。这三个氨基酸使超强毒的亲水性发生变化,从而使毒力增强。本实

验中,在 17 代甚至更早的几代,富含丝氨酸的七肽区中 S→R,17 代以后的细胞毒致病性都有所减弱,可能是与此氨基酸的变化有关,细胞毒 17 代与 18 代 VP2 序列仅有 1 个氨基酸的差异,即在 284 位,17 代为 A,而 18 代为 T,可以推测,此位点的氨基酸,可能是和 IBDV 与 CEF 特异受体的亲和能力,即 IBDV 的细胞的适应性有关。20 代时,253 位由 Q 到 H,而此时细胞的复制能力增强,并且毒力明显下降,它可能也与 IBDV 的毒力、细胞嗜性、致病性密切相关。对于 253 位和 284 位的氨基酸突变,国外一些学者也做了相似的推测^[16,18]。至 21 代,279 位(D→N),vvIBDV 的特征氨基酸都发生了突变,而和疫苗株 D78 仅有一个氨基酸的差异,同时毒株已失去了致病性,而且具有较高的免疫原性,至 25 代序列不再发生变化,这证明 vvIBDV 在适应细胞致弱培养的过程中,伴随着 VP2 基因有规律的变化。在适应细胞后的几代毒,VP2 可变区上几个氨基酸较之原始毒发生了很多替换,导致了其对细胞培养适应性的改变,尽管这些研究结果也许可以表明 VP2 在决定毒力上存在的一些可能的作用,但它可能只限于细胞的嗜性方面,因为 VP2 适应其靶细胞的每一次改进都可能提高感染性。

在病毒结合能力水平上研究感染,对理解病毒与宿主细胞相互作用和由此导致的致病作用非常重要。鉴于适应毒株的 5' 和 3' 端的完整序列未完全确定,每个突变对致弱的意义有待进一步研究。VP2 可能不是决定毒力的唯一因素,其致病性多基因调控的可能性更大,IBDV 全基因序列的测定或

许能提供更具有说服力的证据,本实验室正在进一步进行此方面的研究。

参考文献

- [1] Lana D P, Beisel C E, Silva R F. Genetic mechanisms of antigenic variation in infectious bursal disease virus: analysis of a naturally occurring variant virus[J]. *Virus Genes*. 1992, 6: 247-259.
- [2] Kibenge F S, Jackwood D J. Nucleotide sequence analysis of genome segment A of infectious bursal disease virus [J]. *J Gen Virol*. 1990, 71: 569-577.
- [3] Bayliss C D, Spies K A. Comparison of the sequence of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2 [J]. *J Gen Virol*, 1990, 71: 1303-1312.
- [4] Yamaguchi T K, Iwata M, Kobayashi, *et al*. Epitope mapping of capsid proteins VP2 and VP3 of infectious bursal disease virus [J]. *Arch Virol*. 1996, 141: 1493-1507.
- [5] Schnitzler D, Bernstein F, Muller H, *et al*. The genetic basis for the antigenicity of the VP2 protein of the infectious bursal disease virus [J]. *J Gen Virol*. 1993, 74: 1563-1571.
- [6] Dormitorio T, Giambrone J, Duck L. Sequence comparisons of the variable VP2 region of eight infectious bursal disease virus isolates [J]. *Avian Dis*. 1997, 41: 36-44.
- [7] 孙淑红, 崔治中, 丁家波. 传染性法氏囊病毒野毒株的致病性及其 VP2 基因比较 [J]. *中国病毒学*, 2004, 19 (3): 245-249.
- [8] 朱瑞良. 鸡传染性法氏囊病毒超强毒株细胞克隆化毒在回鸡过程中致病性 VP2 基因变异比较 [D]. 扬州: 扬州大学, 2003.
- [9] 陈士友. 传染性法氏囊病毒分子生物学研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 1993.
- [10] 孙建和, 陆苹. 超强毒型鸡传染性法氏囊病—回顾与思考 [J]. *中国兽医学报*, 2002, 22(5): 525-528.
- [11] To H, Yamaguchi T, Nguyen N T, *et al*. Sequence comparison of the VP2 variable region of infectious bursal disease virus isolated from Vietnam [J]. *Veter Med Sci*, 1999, 61: 429-432.
- [12] Yamaguchi T, Ogawa M, *et al*. Sequence and phylogenetic analysis of highly virulent infectious bursal disease virus [J]. *Arch Virol*, 1997, 142: 1441-1458.
- [13] Thierry P van den Berg. Acute infectious bursal disease in poultry: A review [J]. *Avian Pathology*, 2000, 29: 175-194.
- [14] 曹永长, 毕英佐, 梁志清, 等. 超强 IBDV 毒株寄主保护性抗原的分子特征 [J]. *中国兽医学报*, 1998, 18(6): 521-526.
- [15] Cao Y C, Yeung W S, Law M B, *et al*. Molecular characterizations of seven Chinese isolates of infectious bursal disease virus: classical, very virulent and variant strains [J]. *Avian Dis*, 1998, 42: 340-351.
- [16] Jackwood D J, Byerley E H, Sommer S E. Use of a genetic marker for wild-type potentially pathogenic infectious bursal disease virus [J]. *Avian Dis*. 2001, 45(2): 701-705.
- [17] Yamaguchi T, Setiyono A. Infectious bursal disease live vaccine: change in the virus population during serial passage in chicken embryo fibroblast cell [J]. *Avian Dis*. 2000, 44(2): 284-290.
- [18] Van Loon A, Haas N, Zeyda I, *et al*. Alteration of amino acids in VP2 of very virulent infectious bursal disease virus results in tissue culture adaptation and attenuation in chicken [J]. *J Gen Virol*, 2002, 83: 121-129.