

鸡传染性法氏囊炎病毒分子生物学进展

赵轶暹 黄海波 郑明

(中国兽药监察所,北京 100081)

1 简介

鸡传染性法氏囊炎病毒 Infectious Bursal Disease Virus (IBDV)可引起鸡的急性传染病,感染雏鸡法氏囊组织,杀伤B淋巴细胞,其它淋巴组织亦受到不同程度的侵害。IBDV 流行毒株毒力各异,轻者抑制生长,重则致死。由于淋巴组织病变导致免疫抑制,使感染鸡群对其它传染病的免疫接种失败,往往死于并发症。

IBDV 被归为双节核酸病毒属 (Birnaviridae),具有双节段双股 RNA 基因组,二十面体对称,无囊膜单一衣壳的病毒粒子,直径 $60 \pm 5\text{nm}$ 。同属成员还有鲑鱼的传染性胰腺坏死病毒 (IPNV),二瓣软体动物 (bivalve mollusks) 红贝 (tellina) 病毒和果蝇 X 病毒 (DVX)。IPNV 是此属病毒的代表株。

IBDV 分为两个型,仅 I 型毒对鸡致病, I 型与 II 型之间无交叉保护性。除大小两段 RNA 组成病毒基因组外,IBDV 由四种主要结构蛋白构成。其中,VP1 为病毒自身编码的依赖 RNA 的 RNA 多聚酶,VP4 为病毒自身蛋白酶,VP2 和 VP3 是主要衣壳蛋白,占病毒蛋白总量的 90%。VP2 是病毒主要保护性抗原,具有型特异性;VP3 为群特异性抗原。

近年来由免疫接种后发病的鸡体内分离到许多疫苗株不能保护的变异株,甚至有超强毒株出现。为此世界各国广泛开展了 IBDV 的研究。其中分子生物学方面的深入研究向人们揭示了 IBDV 在病毒学上的特点,以及病毒变异机制等重要问题。

2 基因组结构

IBDV 分子生物学研究的突破在于对病毒基因组核酸序列测定和分析。迄今已有 5 株 I

型 IBDV 大片段 RNA、1 株 II 型大片段 RNA、1 株小片段 RNA 的序列被测定。

IBDV I 型大片段 RNA 长约 3400 个碱基对,有一个大开放阅读框架 (ORF) 编码 VP2-VP4-VP3 的聚合蛋白 (106—108ku)。体外及活体中均很难观察到此蛋白,说明其加工在翻译过程中很快完成了。除此 ORF 之外,在 IBDV 大片段 5' 非编码区还存在编码十二个氨基酸残基的 ORF1 和可编码 17ku 蛋白的 ORF2。已发现不同的 IBDV 毒株均存在这两个 ORF,但研究中却检测不到相应的多肽。根据 Kozak 提出的真核生物 mRNA 多肽合成的起始规则,应是位于其后的聚合蛋白的起始位点才是高效表达的起始子。故一般认为这两个 ORF 最多是以极低效率表达的 (图 1)。

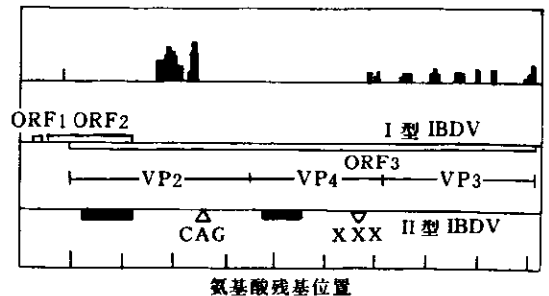


图 1 I 型 IBDV 大片段的同源性、三个 ORF 以及 II 型与 I 型的差异

不同毒株来源的 I 型大片段 RNA 的序列被用做聚合蛋白氨基酸序列同源性的比较。比较后发现,在氨基酸残基 220—330 之间有一高变区,型特异性的病毒中和性单克隆抗体与这

一区域亲和。进一步的研究显示,该区域有两个强的亲水区,发生在亲水区的一个氨基酸残基的替换即可以使疫苗的免疫不能够保护变异株。对各种变异株这一区域序列变化的研究亦显示,IBDV 抗原性的漂变有着时间上与地域上极强的相关性。

一株Ⅱ型 IBDV 的大片段 RNA 序列亦用来与 I 型做对比,其差别主要是Ⅱ型 IBDV 在 VP2 的近 C 端增加一个三联密码子 CAG 以及 VP4 的近 C 端有一个三联密码子的缺失。除此之外,在氨基酸残基 47—64,即 VP2 N 端约 1/3 处,I 型与Ⅱ型毒的同源性较差;VP4 的 N 端只有 44% 的同源性。VP3 的同源性较高,且抗原决定簇区域变化较小。由其它病毒变异与致病性的研究经验出发,I 型与Ⅱ型 IBDV 在 VP2 及 VP4 上的差异可能与宿主细胞的特异性有关(I 型毒是由火鸡体分离到)。

IBDV 基因组 RNA 的序列亦揭示出在大片段 ssRNA 5' 端和 3' 端可能存在二级结构。此类结构可能同病毒 RNA 多聚酶(VP1)对病毒基因组 RNA 的特异性识别有关。另外,二级结构的存在可能会使病毒 mRNA 抵抗细胞 RNA 酶的降解,对多肽合成的起始和终止亦有一定的意义。IBDV5' 端结构较松散,Ⅱ型较 I 型主要差别在于 A-T 碱基对的增减。由于 cDNA 合成技术上的原因,在Ⅱ型和多数 I 型 IBDV 大片段 RNA 序列上尚未发现 3' 端的二级结构,亦可能由于此原因,在 IBDV 小片段 dsRNA 序列中尚未发现末端二级结构。

I 型 IBDV 小片段 dsRNA 长约 2900 个碱基对,有一个 ORF 编码病毒自身的依赖 RNA 的 RNA 多聚酶(VP1),在 5' 非编码区亦有一个 AUG 起到对 ORF 起始位点的增强作用。Kozak 提出的真核生物 mRNA 表达起始的共同序列(Kozak consensus sequence)为典型的 GCC A/GCC AUG G,小片段 dsRNA 的 ORF 起始位点这一序列为 GCC ACC AUG A,大片段 dsRNA 大 ORF 这一序列为 GCA GCA AUG A,均与 Kozak 共同序

列符合较好。依据 Kozak 的分析,+4 位的 A 占 700 种真核 mRNA 起始位点的 23%,在 IBDV 的基因组中+4 位的 A 而不是 G 可能与病毒对宿主细胞蛋白表达系统的特异性适应有关。

在 VP1 氨基酸序列 C 末端发现有可能的核酸结合位点,此位点对 VP1 作为 RNA 多聚酶的活性至关重要。在 VP3 的靠近 C 端亦发现类似结构,同其它核酸结合蛋白有一定的同源。此发现对病毒的结构以及 VP3 的生物学功能均有一定的意义。

在体外表达 IBDV 基因组大片段的研究中,经过大 ORF 起始位点后的移码突变试验,发现有一适应于 *E. coli* 的内源起始密码子 GGAGnnnnnn 的存在。这一结构在病毒的复制周期中不起作用,但在不同 IBDV 大片段内是保守的。其存在原因尚不清楚。

3 病毒的繁殖过程

3.1 病毒感染

VP2 和 VP3 构成了 IBDV 的主要蛋白成份,在感染过程中必然有重要作用。VP2 及 VP3 特异性的单克隆抗体被用来做病毒感染 Vero 细胞的试验。研究结果显示抗 VP3 单抗可以大大降低病毒与 Vero 细胞结合,而抗 VP2 的单抗则无此效果。这说明病毒的细胞识别位点在 VP3 上。但在病毒结合上 Vero 之后,抗 VP2 单抗仍可以使细胞噬斑数大大降低,说明 VP2 的确是主要保护性抗原。研究者提出,抗 VP2 抗体的作用或许是阻止病毒进入细胞或脱衣壳。但对 VP1 的研究说明,病毒不需脱衣壳即可进行转录与复制。二十面体无囊膜病毒,如小 RNA 病毒的病毒中和性抗体是通过封闭细胞识别位点来实现中和病毒的作用的,而抗 IBDV VP3 的单抗对病毒只有很低的中和效力。

3.2 病毒 RNA 的合成与复制

已证明 VP1 是病毒自身编码的依赖 RNA 的 RNA 多聚酶。这一特点在双节核酸病毒中广泛存在。IBDV 与 IPNV 的 VP1 基本生化特性见表 1。多聚酶进行 RNA 的合成无需对

病毒粒子进行预处理,说明病毒进入宿主细胞后不必脱衣壳即可以启动转录与复制,同呼肠孤病毒类似。在体外 VP1 可以同病毒基因组 dsRNA 两末端紧密地亲合,同时也有自身聚集的特性。在电镜下可以见到由 VP1 及 dsRNA 组成的花样结构。除非以蛋白酶 K 消化,在 SDS 溶液中加热处理不能破坏这一结构。VP1 与 dsRNA 可能构成了病毒粒子的核心,其亲合能力可能与基因组核酸片段末端二级结构有关。

表 1 IBDV 与 IPNV 的 RNA 多聚酶特性比较

VP1	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	K ⁺ Na ⁺	最适条件	
				℃	pH
IBDV	无	必需	增强	40	8.5
IPNV	无	必需	抑制	30	7.5

IBDV 的复制机制是半保留复制,即取代一条链的复制。由于病毒 mRNA 即为子代病毒基因组 RNA,半保留复制成为 IBDV 高突变率的主要原因。在 IBDV 感染细胞中发现三种 RNA(表 2),无论哪一种形式的 RNA 均无 5' 帽子和 3' polyA,类似小 RNA 病毒,IPNV 中亦有相同情况。IBDV 的 24s ssRNA 可以经 PAGE 电泳分为两条带,显示在 RNA 转录及表达的过程中正负链即同时存在了,进而说明双节核酸病毒的复制可能与大多数双链 RNA 病毒不同。这也是 IBDV 突变率较高的原因之一。

表 2 IBDV 感染细胞内检测到的三种 RNA

RNA	特 性
缓慢泳动的 RNA 成份	转录中间体-模板 RNA 与其转录产物的复合体
24s ssRNA	病毒 mRNA-对 RNA 酶敏感并结合有核糖体,经 PAGE 电泳可分为两条带
14s dsRNA	病毒 RNA-解聚后可形成 24s ssRNA

3.3 病毒蛋白的合成

IBDV 病毒蛋白合成后还需要后加工过程

(图 2),但成熟病毒蛋白无糖基化。在 *E. coli* 中表达的 VP2 免疫原性很差,可见 VP2 的后加工过程对 VP2 的结构形成之重要性。经一系列始自大片段两端的缺失突变在 *E. coli* 中的表达试验,证明 VP4 是病毒编码的蛋白酶,参与了 VPX 与 VP4 及 VP4 与 VP3 之间的切割过程。另外,放射性标记的病毒蛋白合成试验显示 VP2 在细胞内不能积累,说明 VP2 的成熟是在 VPX 被转运到细胞表面或在病毒粒子的装配过程中实现的。类似特征在小 RNA 病毒装配过程中存在。

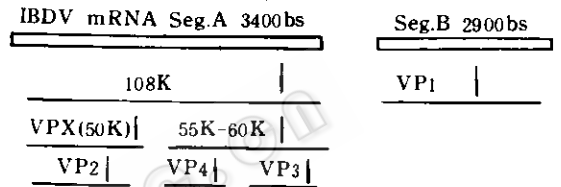


图 2 IBDV 蛋白质合成及加工的大致过程

用电镜观察 IBDV 病毒粒子时一般会发现不完整病毒粒子,表现为形状不规则的二十面体,毒粒中央染色深,似空病毒颗粒,没有感染性。研究证明,此类病毒颗粒有足够的病毒基因组 dsRNA,没有 VP1,以大量的 VPX 取代了 VP2。而感染性病毒粒子中无 VPX,只有少量 VP2 的加工中间产物。

IBDV 感染后并不阻断宿主细胞蛋白合成,这给病毒蛋白质合成的研究带来了一定的困难。毒种不同及培育细胞的差异均会造成检测到病毒蛋白分子量的变化。病毒提纯及蛋白质电泳技术上的原因,判断分子量的人为因素,亦是造成这种差异的原因。

3.4 病毒粒子可能的结构

小 RNA 病毒的细胞识别位点是由几种病毒外壳蛋白包围而成的凹陷结构,这种结构可用做 IBDV 细胞识别位点的参考模式。因为研究中观察不到 VP2 与 VP3 形成病毒衣壳亚单位,而 IBDV 病毒粒子为致密排列的衣壳粒子构成二十面体。因此推测,VP3 可能形成内衣壳,由 VP3 上的核酸结合位点亲合基因组 dsRNA,并在外层 VP2 的排列缝隙中部分暴

露,进而构成细胞识别位点,同时使完整病毒粒子的VP3具有免疫活性。

4 重组疫苗

随着IBDV分子生物学研究的深入,进行了各种重组疫苗的尝试。由于VP2是病毒主要保护性抗原,各类重组疫苗均为VP2的亚单位苗。以下是研究进行得比较完整的三个例子:

4.1 重组亚单位油乳剂苗:IBDV基因组大片段及VP2编码片段整合入铜离子诱导表达载体后转入酵母。表达的病毒蛋白由酵母中抽提后制成油乳剂苗。免疫鸡可受到完全的被动保护,免疫后可获得高滴度血清抗体。

4.2 cDNA 禽痘病毒疫苗:VP2编码片段插入整合质粒同改造的禽痘病毒重组,鸡免疫重组后攻毒。免疫鸡可以受到保护避免死亡,但法氏囊组织仍受到损害,且血清抗体滴度较低。

4.3 杆状病毒表达载体苗:VP2编码片段整合入杆状病毒后,将表达的蛋白抽提出来制成佐剂苗。鸡免疫后攻毒,保护率79%,血清抗体滴度较低。

IBDV只感染雏鸡,其保护机制为体液免疫,有效的方法是通过高免卵黄中的母源抗体保护孵化后的仔鸡。重组活疫苗在免疫途径和免疫程序上都有一定的问题。所有使用IBDV VP2制的亚单位苗都不能解决变异株的问题。在制备过程中手续繁琐成本高,效果也不优于传统苗。今后生物工程疫苗要重点探讨的问题是如何针对各种变异株提供广泛保护。

5 未来的重点研究方向

虽然IBDV的分子生物学研究已向前迈进了一大步,但为了彻底查明IBDV致病的原因

并最终找到解决IBDV突变株的有效方法,仍有很多工作要做:

1. 基因组末端的二级结构是否广泛存在? 同病毒的复制繁殖有什么关系?
2. VP2在病毒感染过程中有什么作用? 抗VP2抗体如何起到中和病毒的作用?
3. 细胞上病毒的受体是什么? 有哪些细胞因素参与了病毒的作用?
4. 病毒是如何复制的?

参 考 文 献

- [1] Azad A A, N M Mckern, I G Macreadie, *et al. Vaccine*, 1991, 9: 715~722.
- [2] Bayliss C D, R W Peters, J K A Cook, *et al. Arch Virol*, 1991, 120: 193~205.
- [3] Bayliss C D, Spies U, Shaw K, *et al. J Gen Virol*, 1990, 71: 1303~1312.
- [4] K J Fahey, A J Chapman, I G Macreadie, *et al. Avian Pathol*, 1991, 20: 447~460.
- [5] Jagadish M N, Staton V J, Hudson P J, *et al. J Virol*, 1988, 62: 1084~1087.
- [6] Kibenge F S B, A S Dhillon, R G Russell. *J Gen Virol*, 1990, 69: 1757~1775.
- [7] Kibenge F S B, Jackwood D J, Mercado C C. *J Gen Virol*, 1990, 71: 569~577.
- [8] Kibenge F S B, Mckenna P K, Dybing J K, *et al. Virol*, 1991, 184: 437~440.
- [9] Kozak M. *Nucl Acids Res*, 1987, 15(2): 8125~8132.
- [10] Lan G Macreadie, Azad A A. *Virol*, 1991, 184(2): 773~776.
- [11] Morgan M M. *Virol*, 1988, 163: 240~242.
- [12] Muller H, Nitschke R. *Virol*, 1987, 159: 174~177.
- [13] Reddy S K, A Silim, M J H Ratcliffe. *Arch Virol*, 1992, 127: 209~222.
- [14] Schnitzler D, Bernstein F, Muller H, *et al. J Gen Virol*, 1993, 74: 1563~1571.
- [15] Snyder D B, V N Vakharia, P K Savage. *Arch Virol*, 1992, 127: 89~101.
- [16] Wickner R B. *J Biochem*, 1993, 268(6): 3797~3800.