

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.10.01

整合 REV LTR 的自然重组马立克氏病毒 GX0101 的全基因组序列分析

周忠文¹, 苏 帅^{1*}, 崔 宁², 孙 鹏¹, 孙淑红¹, 崔治中¹

(1. 山东农业大学动物科技学院, 山东泰安 271018; 2. 山东省农科院, 济南 250100)

[收稿日期] 2017-06-29 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 10-0001-10 [中图分类号] S852.6

[摘 要] GX0101 是一株整合禽网状内皮组织增生症病毒 (REV) 长末端重复序列 (LTR) 的重组马立克氏病病毒 (MDV)。基于 MDV GX0101 的细菌人工染色体感染性克隆利用高通量测序技术完成了对其全基因组的序列分析。GX0101 全基因组长 178101 bp, 其基因组的 TRL、UL、IRL、IRS、US 和 TRS 区分别长 12758 bp、113572 bp、12741 bp、12700 bp、11695 bp、13134 bp。与 Md5 不同, GX0101 含有一个 *sorf2* 基因。同时, GX0101 全基因组含有一个 REV LTR 重组片段, 位于其基因组 US 区的 *sorf1* 中, *sorf2* 基因前 267 bp 碱基处。通过与已发表的近 10 株 MDV 的比较, 发现 GX0101 与英国分离株 C12/130 的两个不同毒力的感染性克隆 pC12/130-10 和 pC12/130-15 同源性最高。GX0101 的全基因组序列的比较分析, 有助于进一步阐明 MDV 致病性、传播性相关的基因, 也有助于揭示不同地域间 MDV 的遗传变异和演化关系。

[关键词] REV LTR; 重组 MDV; 感染性克隆; 高通量测序; 全基因组

Genomic Sequence Analysis of a Field Marek's Disease Virus Strain GX0101 with a Reticuloendotheliosis Virus Terminal Repeat Long Insert

ZHOU Zhong-wen¹, SU Shuai^{1*}, CUI Ning², SUN Peng¹, SUN Shu-hong¹, CUI Zhi-zhong¹

(1. Animal Science and Technology College, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China;

2. Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China)

Corresponding author: SU Shuai, E-mail: ssu6307@163.com

Abstract: GX0101 is a recombinant Marek's disease virus (MDV) field strain with one reticuloendotheliosis virus (REV) long terminal repeat (LTR) insert. Based on the purified plasmid DNA of GX0101 bacterial artificial chromosome (BAC) infectious clone, the complete genome of GX0101 was sequenced and analyzed using high throughput sequencing technology. The complete genome sequence of GX0101 is 178101 bp in length. The terminal repeat long (TRL), unique long (UL), internal repeat long (IRL), internal repeat short (IRS), unique short (US), and terminal repeat short (TRS) regions were 12758 bp, 113572 bp, 12741 bp, 12700 bp, 11695 bp and 13134 bp, respectively. The GX0101 genome contains only one *sorf2* gene, which is different from

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31402235)

作者简介: 周忠文, 硕士, 从事分子病毒学研究。

通讯作者: 苏 帅。E-mail: ssu6307@163.com

Md5. GX0101 contains a REV LTR insert located in sorf1 gene of US region, at a site 267 bp upstream of the sorf2 gene in the genome. Among the 10 recently reported MDV strains, whole genome of GX0101 shows the highest identity to two BAC clones PC12130-10 and PC12130-15 of United Kingdom strain C12130 with different virulence. Analysis of the complete sequence of GX0101 will be useful on both studies of gene functions related to pathogenicity or transmission ability, and evolutionary relationships of MDVs in different geographical areas.

Key words: REV LTR; recombinant MDV; infectious clone; high throughput sequencing; complete genome

马立克氏病是由马立克氏病毒 (Marek's disease virus, MDV) 引起的鸡的肿瘤病, 可以通过空气、鸡只的相互接触传播^[1-2]。MDV 属于 α 疱疹病毒, 分为 3 个血清型, 一般认为血清 I 型病毒有致病性, 可引起 T 细胞淋巴瘤以及其他病变。血清 II 型与 III 型病毒没有致病性^[3-4]。虽然三个血清型基因组结构相似, 都是由线性双股 DNA 组成, 但是基因组成上差别很大, 与 MD 致病性相关的基因至今还不是十分明确^[5-7]。

GX0101 是在中国广西省分离到一株自然重组进禽网状内皮组织增生症病毒 (Reticuloendotheliosis virus, REV) 长末端重复序列 (Long terminal repeat, LTR) 的重组 MDV, 属于 MDV 超强毒, 毒力强于 MDV 强毒国际参考株 GA 株, 弱于 MDV 超强毒国际参考株 Md5 株, 但是横向传播能力强于 Md5 株^[8-10]。利用细菌人工染色体技术构建 GX0101 的感性克隆, 敲除 GX0101 基因组的 REV LTR 片段, 证实 REV LTR 片段的插入显著提高 GX0101 的横向传播能力^[11-12]。敲除 GX0101 的致肿瘤基因 meq 后, GX0101 Δ meq 完全丧失致病性, 并且能够提供比 MDV 商品化疫苗 CVI988/Rispens 更好的保护效果^[13-14]。与缺失 meq 基因的重组 MDV rMd5 Δ meq 不同, GX0101 Δ meq 丧失免疫抑制并且在鸡体内能够稳定的复制。RM1 是由 MDV 与 REV 在细胞上共培养产生的含有 REV LTR 片段的重组 MDV, 其毒力已被致弱, 对鸡没有致肿瘤性, 而 GX0101 属于超强毒, 具有较高的致肿瘤率^[15-16]。为了进一步分析引起 MDV 生物学活性差异相关的基因, 本文利用高通量测序技术完成了对 MDV GX0101 的细菌人工染色体感染性克隆全基因组的序列分析。

1 材料与方法

1.1 细胞及病毒来源 9~10 日龄 SPF 鸡胚购自济南斯帕法斯家禽有限公司, 实验室常规方法制备成鸡胚层纤维细胞 (Chicken embryo fibroblasts, CEF)。MDV GX0101 由本实验室在中国广西省分离^[8], GX0101 感染性克隆 GX0101-BAC 由本实验室制备并保存^[11]。

1.2 主要试剂 高保真 Taq 酶 (包括 PCR 反应所需 buffer)、dNTP、常用限制性内切酶、pMD18-T 连接试剂盒等购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 凝胶回收试剂盒 (D2500-01)、质粒提取试剂盒 (D6943-01) 均购自美国 OMEGA 公司; Trans2K DNA Marker、Trans15K DNA Marker 购于北京全式金生物技术有限公司。MDV BAC 质粒大量提取试剂盒 (Plasmid Maxi Kit) 购自德国 QIAGEN 公司。

1.3 GX0101 感染性克隆 GX0101-BAC 质粒的制备按照 QIAGEN Plasmid maxi kit (Cat. No.12163) 操作说明大量制备含有 GX0101 全基因组的感染性克隆 GX0101-BAC 质粒, 操作保证质粒 DNA 的完整性。

1.4 GX0101 感染性克隆 GX0101-BAC 的测序 将 40.0 μ g 的 GX0101-BAC (200 ng/ μ L) 由基于焦磷酸测序原理的 Genome Sequencer 20 FLX System (454 Life Science Corporation) 平台进行商业化测序 (上海美吉生物医药科技有限公司)。具体试验流程如下: 首先通过高压氮气将基因组雾化成约 300~800 bp 的片段, 然后利用 T4 DNA 聚合酶和 T4 核苷酸激酶在 DNA 片断的 5' 端加上磷酸基团, 3' 端变成平端, 分别和长 44 个碱基衔接子 (adaptor) 进行平端连接。将分离到的含有衔接子的 DNA 片段与磁珠结合, 每一个磁珠都被油水混合的小滴包被, 因此可以独立的进行一个片段的扩增, 而没有其他片段扩增的影响。经过这种平行扩增后, 每个

磁珠都有成千上万个相同的基因拷贝。将磁珠富集后加入 40×75 mm PicoTiter Plate 板进行测序。

对于重复序列以及其他不确定序列的验证均由多次单独的 PCR 克隆测序验证。PCR 以亲本病毒 GX0101 感染的 CEF 细胞 DNA 为模板,PCR 产物均连接到 pMD18-T(大连宝生物工程有限公司)载体由 ABI-3730 XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA)测序分析。

1.5 GX0101 的全基因组序列分析 利用 DNASTAR、NCBI 上的 blastP 和 PsiBlast、MultAlin、MEGA 3.1 等其他工具对 GX0101 基因组序列进行分析。用于同 GX0101 进行基因组比对的其他 MDV 毒株 (Md5、814、PC12/130-10、PC12/130-15、CVI988、GA、RB1B)基因组序列均由 NCBI 获取。

2 结 果

2.1 GX0101 的基因组结构以及与其他不同株 MDV 的系统进化关系 GX0101 全基因组的拼接来自 Genome Sequencer 20 FLX System 平台的 13596 个读长(平均每个长 378 bp),最终的测序深度是 28 倍。GX0101 全基因组长 178101bp (GeneBank NO. JX844666),包括构建 GX0101 感染性克隆缺失的部分 US2 基因的序列(以亲本病毒 GX0101 感染的 CEF 细胞 DNA 为模板进行 PCR 扩

增测序后补齐),碱基组成的鸟嘌呤和胞嘧啶(G+C)占 44%。整个基因组由长末端重复区(terminal repeat long region, TRL)、长独特区(unique long region, UL)、内部长重复区(internal repeat long region, IRL)、内部短重复区(internal repeat short region, IRS)、短独特区(unique short region, US)和短末端重复区(terminal repeat short region, TRS)组成。其中,长末端重复区长 12758 bp,在基因组位于 1#~12758#;长独特区长 113572 bp,位于 12759#~126330#;内部长重复区长 12741 bp,位于 126331#~139071#;内部短重复区长 12700 bp,位于 139833#~152532#;短独特区长 11695 bp,位于 152533#~164227#;短末端重复区长 13134 bp,位于 164228#~177361#,包括近 200 个开放阅读框,2 个拷贝的 132 bp 的重复片段。GX0101 与其他毒株基因组不同区域的比较见表 1(其中 IRL/IRS 和 TRS 区为了比较的方便加入了基因组中的 α 序列)。系统进化树表明,GX0101 与来自英国的超强毒 C12/130 的两个不同致病性的感染性克隆 pC12/130-10 和 pC12/130-15 具有比较近的进化关系。584Ap80 是将特超强毒 584A 在细胞传 80 代,通过动物实验明确证实毒力致弱的病毒,与 GX0101 也有比较近的进化关系(图 1)。

表 1 GX0101 与其他 MDV 不同基因组结构间的比较

Tab 1 Comparison of length in different genomic regions of GX0101 and other 9 MDV strains

Strain	Pathotype	Accession #	TRL	UL	IRL/IRS	US	TRS	Total length
GX0101 ^a	vv	JX844666	12758	113572	26202	11695 ^b	13874	178101
pC12/130-10 ^a	vv	FJ436096	12851	114016	25975	11158 ^b	13118	177118
pC12/130-15a	m	FJ436097	12852	113523	26506	11154 ^b	13659	177694
584Ap80 ^a	?	EU627065	18034	113283	26025	10655 ^b	11426	179434
CU-2	v	EU499381	13288	113500	25830	11651	12653	176922
RB-1B ^a	vv	EF523390	13903	113610	26133	11714 ^c	12184	177544
CVI988 ^a	m	DQ530348	14476	113490	26639	11651 ^c	12055	178311
Md5	vv	AF243438	14028	113563	26207	10847	13229	177874
Md11 ^a	vv	AY510475	13545	113509	26721	10879 ^d	13978 ^e	178632
GA	v	AF147806	12548 ^f	113508	24704	11160	12121	174077

In order to define and characterize the repeat regions in the GX0101 genome, the sequences and copy numbers of the 132 bp repeats in each long repeat (TRL and IRL) and the a-like sequences at the IRL/IRS and TRS/TRL junctions needed to be determined. m; mild; v; virulent; vv; very virulent; vv+; very virulent plus. a; Sequences of BAC constructs. b; Length includes 616 bp of the US2 gene missing in the BAC construct. c; Length includes 813 bp of the US2 gene missing in the BAC construct. d; Calculated length includes 1207 bp of the gD gene missing in the BAC construct. e; Md11 BAC construct contains a large deletion in the TRS region. This number represents an estimation of the length. f; The a-like sequence was not determined for the sequence in GenBank.

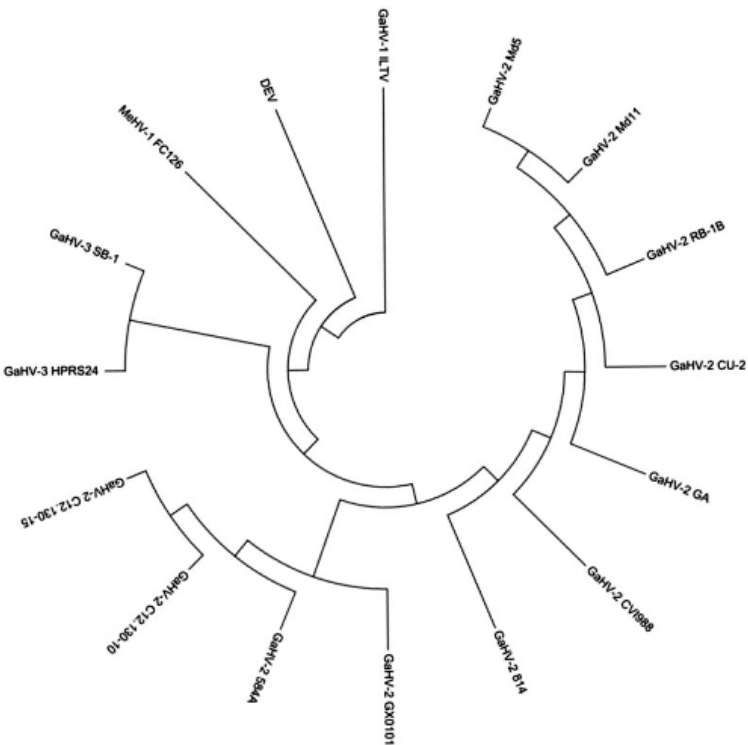


图 1 GX0101 与其他 I 型 MDV 的系统进化树

Fig 1 Unrooted phylogenetic tree of MDV-1 genomes GX0101 and others

* Alignments and tree drawing were done using the MAFFT program

2.2 GX0101 的基因组中的 REV LTR 重组片段
通过全基因组测序,证实 GX0101 全基因组中仅含有一个长 538 bp 的 REV LTR 片段,位于基因组短独特区 sorf2 基因上游 267 bp 的 sorf1 基因中(图 2)。REV LTR 整合片段位于 GX0101 基因组的 152721#~153258#碱基位点(相当于Md5的153175#~153176#)。与细胞培养过程中 REV 与 MDV 共感染产生的重组 MDV RM1 不同,RM1 中的 REV LTR 片段位于

其基因组 IRS 区,在其基因组中 sorf1 上游 832 bp 处,sorf2 基因上游 1163 bp 处(相当于 GX0101 基因组的 151736#~151737#)。RM1 随着在细胞上传代,在其基因组的 TRS 区插入另一相同的 REV LTR 片段。相比,GX0101 整合的 REV-LTR 具有良好的稳定性,经过在细胞、鸡体内多次传代依然保持唯一性。

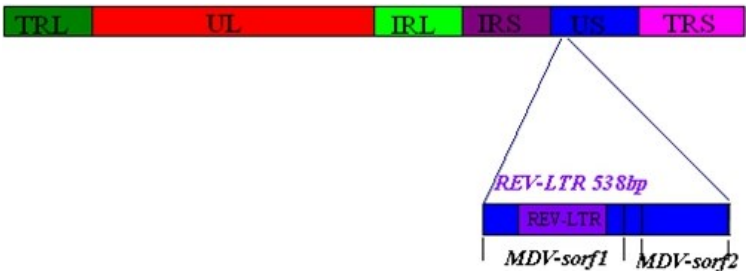


图 2 REV LTR 重组片段在 GX0101 基因组中的位置示意图

Fig 2 Sketch map of REV LTR fragments in GX0101 genome

2.3 GX0101 与其他 MDV 毒株相比基因组中的缺失片段 pC12/130-10 与 pC12/130-15 是来自 MDV 超强毒 C12/130 的两个感染性克隆,通过两个感染性克隆的全基因组比较,发现 pC12/130-10 的 71.4~72.2 开放阅读框有一增加的 494 bp 的碱

基,其他 I 型 MDV 毒株无论疫苗株还是致病株都没有这一片段。GX0101 作为超强毒其基因组也没有这一 494 bp 的片段(图 3),但是在这一 71.4~72.2 开放阅读框间的序列与 pC12/130-15 存在 100%的同源性,其他均没有如此高的同源性。

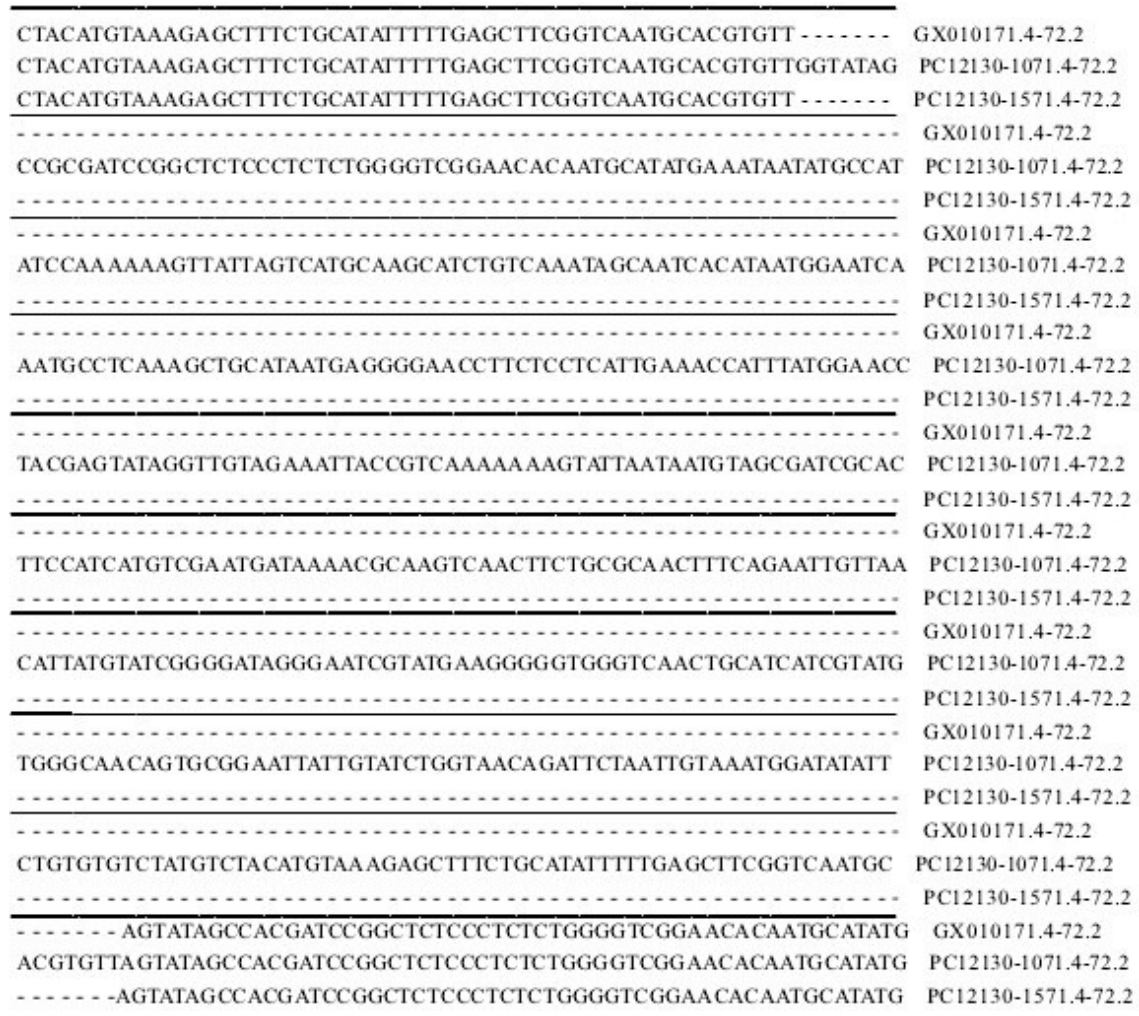


图 3 GX0101 基因组中 494 bp 碱基缺失示意图
Fig 3 Diagram of 494 bp base deletion in GX0101 genome

GX0101 基因组的 US 区(相对于 Md5 的 164032#~164519#处)与 Md5、Md11、RB1B、CU2、584A、CVI988/Rispens 毒株相比缺少 486 bp 碱基(图 4),但是与 GA、814、pC12/130-10、pC12/130-15 等毒株一样,并且通过同源性比较发现这一缺失区两端序列与 pC12/130-10、pC12/130-15 具有 100%同源性。虽然这一缺失与病毒致病性的相关性还不明确,但是可以推测这种独特的基因组结构

使得 sorf1 基因完全位于基因组的 US 区。自然重组的 REV-LTR 之所以能够稳定的插入这一位点,而并没有随着病毒复制产生另一 REV LTR 片段,依然保持良好的稳定性,与这一独特结构密切相关。
GX0101 US 区与 TRS 区连接处与 GA、814、pC12/130-10、pC12/130-15 等毒株一样,与 Md5 相比缺少 830 bp 碱基(图 5),但是 GX0101、pC12/130-10 属于超强毒,GA 属于强毒,pC12/130-15

属于弱毒,而 814 株属于疫苗毒,因此这种碱基的缺失与病毒致病性以及稳定性间的关系将是进一步研究的重点。尽管 RB1B、CU2、584A、CVI988/

Rispens 毒株与 Md5 相比也有碱基的缺失,但是可以看出这五株 MDV 的缺失显然与 GX0101、GA、814 等五株不同。

362	TGCTTTATATIGGGACAAACCACTCGCACAAGCTCATCAACACATCCACTCTTGCTATTAATTC	548A-US
362	TGCTTTATATIGGGACAAACCACTCGCACAAGCTCATCAACACATCCACTCT- - - - -	814-US
362	TGCTTTATATIGGGACAAACCACTCGCACAAGCTCATCAACACATCCACTCTTGCTATTAATTC	CU2-US
362	TGCTTTATATIGGGACAAACCACTCGCACAAGCTCATCAACACATCCACTCTTGCTATTAATTC	CVI98-US
362	TGCTTTATATIGGGACAAACCACTCGCACAAGCTCATCAACACATCCACTCT- -T - - - -	GA-US
362	TGCTTTATATIGGGACAAACCACTCGCACAAGCTCATCAACACATCCACTCT- - - - -	GX0101-US
362	TGCTTTATATIGGGACAAACCACTCGCACAAGCTCATCAACACATCCACTCTTGCTATTAATTC	MD5-US
362	TGCTTTATATIGGGACAAACCACTCGCACAAGCTCATCAACACATCCACTCTTGCTATTAATTC	MD11-US
362	TGCTTTATATIGGGACAAACCACTCGCACAAGCTCATCAACACATCCACTCT- - - - -	PC12130-10-US
362	TGCTTTATATIGGGACAAACCACTCGCACAAGCTCATCAACACATCCACTCT- - - - -	PC12130-15-US
362	TGCTTTATATIGGGACAAACCACTCGCACAAGCTCATCAACACATCCACTCTTGCTATTAATTC	RB1B-US
452	AACACTCATATTAAGGGGAGAAATAAATATGATGGCGATCATATTTTATIGAGATCCGAA	548A-US
414	- - - - -	814-US
452	AACACTCATATTAAGGGGAGAAATAAATATGATGGCGATCATATTTTATIGAGATCCGAA	CU2-US
452	AACACTCATATTAAGGGGAGAAATAAATATGATGGCGATCATATTTTATIGAGATCCGAA	CVI98-US
415	- - - - -	GA-US
414	- - - - -	GX0101-US
452	AACACTCATATTAAGGGGAGAAATAAATATGATGGCGATCATATTTTATIGAGATCCGAA	MD5-US
452	AACACTCATATTAAGGGGAGAAATAAATATGATGGCGATCATATTTTATIGAGATCCGAA	MD11-US
414	- - - - -	PC12130-10-US
414	- - - - -	PC12130-15-US
452	AACACTCATATTAAGGGGAGAAATAAATATGATGGCGATCATATTTTATIGAGATCCGAA	RB1B-US
541	AGCACCTGCAACATGTGGTTTATCGATTTCGGGAAAGAATAGTGAACCAITGCTCCGAGCAGT	548A-US
414	- - - - -	814-US
541	AGCACCTGCAACATGTGGTTTATCGATTTCGGGAAAGAATAGTGAACCAITGCTCCGAGCAGT	CU2-US
541	AGCACCTGCAACATGTGGTTTATCGATTTCGGGAAAGAATAGTGAACCAITGCTCCGAGCAGT	CVI98-US
415	- - - - -	GA-US
414	- - - - -	GX0101-US
541	AGCACCTGCAACATGTGGTTTATCGATTTCGGGAAAGAATAGTGAACCAITGCTCCGAGCAGT	MD5-US
541	AGCACCTGCAACATGTGGTTTATCGATTTCGGGAAAGAATAGTGAACCAITGCTCCGAGCAGT	MD11-US
414	- - - - -	PC12130-10-US
414	- - - - -	PC12130-15-US
541	AGCACCTGCAACATGTGGTTTATCGATTTCGGGAAAGAATAGTGAACCAITGCTCCGAGCAGT	RB1B-US
631	CGAAATATATCTCATAGAACTCTTCTTAAACTGACGAGGATTTTCCATCTTCTAGAGCCTTGC	548A-US
414	- - - - -	814-US
631	CGAAATATATCTCATAGAACTCTTCTTAAACTGACGAGGATTTTCCATCTTCTTAGAGCCTTGC	CU2-US
631	CGAAATATATCTCATAGAACTCTTCTTAAACTGACGAGGATTTTCCATCTTCTTAGAGCCTTGC	CVI98-US
415	- - - - -	GA-US
414	- - - - -	GX0101-US
631	CGAAATATATCTCATAGAACTCTTCTTAAACTGACGAGGATTTTCCATCTTCTTAGAGCCTTGC	MD5-US
631	CGAAATATATCTCATAGAACTCTTCTTAAACTGACGAGGATTTTCCATCTTCTTAGAGCCTTGC	MD11-US
414	- - - - -	PC12130-10-US
414	- - - - -	PC12130-15-US
631	CGAAATATATCTCATAGAACTCTTCTTAAACTGACGAGGATTTTCCATCTTCTTAGAGCCTTGC	RB1B-US
721	CAACGGCCAGGGACGGGCAATCGCGATACATTTACGCAATGGATCCATGTCCCTTGGAGT	548A-US
414	- - - - -	814-US
721	CAACGGCCAGGGACGGGCAATCGCGATACATTTACGCAATGGATCCATGTCCCTTGGAGT	CU2-US
721	CAACGGCCAGGGACGGGCAATCGCGATACATTTACGCAATGGATCCATGTCCCTTGGAGT	CVI98-US
415	- - - - -	GA-US
414	- - - - -	GX0101-US
721	CAACGGCCAGGGACGGGCAATCGCGATACATTTACGCAATGGATCCATGTCCCTTGGAGT	MD5-US
721	CAACGGCCAGGGACGGGCAATCGCGATACATTTACGCAATGGATCCATGTCCCTTGGAGT	MD11-US
414	- - - - -	PC12130-10-US
414	- - - - -	PC12130-15-US
721	CAACGGCCAGGGACGGGCAATCGCGATACATTTACGCAATGGATCCATGTCCCTTGGAGT	RB1B-US
811	AATTTTCGTCAGCACATAGCTAAATGAAATTAATCTACATCGAGCTTAATTCGTGGAACATACAAC	548A-US
414	- - - - -	814-US
811	AATTTTCGTCAGCACATAGCTAAATGAAATTAATCTACATCGAGCTTAATTCGTGGAACATACAAC	CU2-US
811	AATTTTCGTCAGCACATAGCTAAATGAAATTAATCTACATCGAGCTTAATTCGTGGAACATACAAC	CVI98-US
415	- - - - -	GA-US
414	- - - - -	GX0101-US
811	AATTTTCGTCAGCACATAGCTAAATGAAATTAATCTACATCGAGCTTAATTCGTGGAACATACAAC	MD5-US
811	AATTTTCGTCAGCACATAGCTAAATGAAATTAATCTACATCGAGCTTAATTCGTGGAACATACAAC	MD11-US
414	- - - - -	PC12130-10-US
414	- - - - -	PC12130-15-US
811	AATTTTCGTCAGCACATAGCTAAATGAAATTAATCTACATCGAGCTTAATTCGTGGAACATACAAC	RB1B-US
901	GGACAGCTTCATGTGAATAAACTGTAAATCAATC	548A-US
415	GGACAGCTTCATGTGAATAAACTGTAAATCAATC	814-US
901	GGACAGCTTCATGTGAATAAACTGTAAATCAATC	CU2-US
901	GGACAGCTTCATGTGAATAAACTGTAAATCAATC	CVI98-US
416	GGACAGCTTCATGTGAATAAACTGTAAATCAATC	GA-US
415	GGACAGCTTCATGTGAATAAACTGTAAATCAATC	GX0101-US
901	GGACAGCTTCATGTGAATAAACTGTAAATCAATC	MD5-US
901	GGACAGCTTCATGTGAATAAACTGTAAATCAATC	MD11-US
415	GGACAGCTTCATGTGAATAAACTGTAAATCAATC	PC12130-10-US
415	GGACAGCTTCATGTGAATAAACTGTAAATCAATC	PC12130-15-US
901	GGACAGCTTCATGTGAATAAACTGTAAATCAATC	RB1B-US

图 4 GX0101 US 区与其他 MDV 毒株相比缺失序列的示意图

Fig 4 Diagram of missing sequence in GX0101 US region compared with other MDV strains

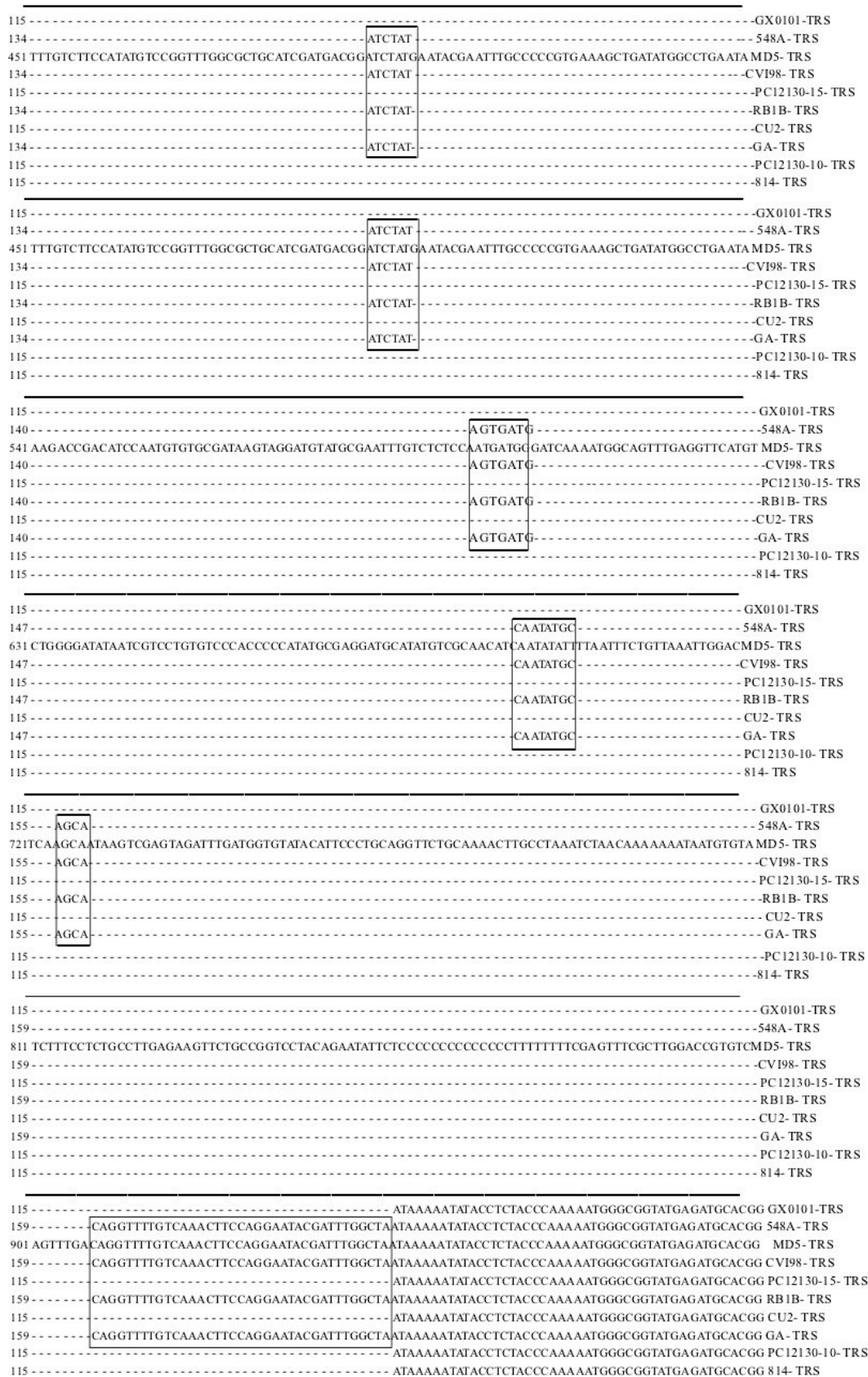


图 5 GX0101 US 区/TRS 连接处缺失序列的示意图

Fig 5 Diagram of missing sequence in the junction of US region and TRS region in GX0101

2.4 GX0101 与其他 MDV 毒株相比基因组中的增加片段 GX0101 基因组中 TRS 区的 MDV97.3~97.6 开放阅读框中,有 5 个连续的 217 bp 碱基的重复,其他不同毒株虽然也含有不同拷贝数的重复,但是没有 GX0101 数目多。同样在 GX0101 基因组的 IRS 区的 86.2~86.4 开放阅读框中,存在 3 个相同的 217 bp 的重复序列,其他 MDV 相比仅含有 1~2 拷贝的重复。

3 讨论

自 2000 年 Lee 等发表 GA 株 I 型 MDV (MDV1) 全基因组序列以来,已有 10 多株 I 型 MDV 完成了全基因组的序列比较、分析,它们分别属于弱毒疫苗株、强毒、超强毒和特超强毒等不同的致病型^[17-19]。GX0101 作为自然重组 MDV,其致病性、横向传播性以及相关基因片段的功能已经进行了大量的研究^[20-22]。为了进一步分析 GX0101 基因组结构,我们在 GX0101 的感染性克隆质粒的基础上,利用高通量测序的方法完成了对其全基因组的测序分析 (GeneBank NO. JX844666),GX0101 基因组全长 178101 bp,其基因组的 TRL 区、UL 区、IRL 区、IRS 区、US 区和 TRS 区分别长 12758 bp、113572 bp、12741 bp、12700 bp、11695 bp、13134 bp。基因组含有两个拷贝的 132 bp 重复片段。

GX0101 基因组中含有唯一的 REV LTR 插入片段位于 US 区 sorf2 基因上游 267 bp 的 sorf1 基因中。另一细胞培养上 MDV 与 REV 共感染产生的重组毒 RM1 中的 REV LTR 片段位于其基因组的 IRS 区,在其基因组中 sorf1 上游 832 bp 处,sorf2 基因上游 1163 bp 处,并且随着病毒的复制在其基因组的 TRS 区出现另外一 REV LTR 片段^[15]。如果将 RM1 中的 REV LTR 片段插入 rMd5 基因组中相似的位置,拯救的重组病毒在细胞培养上能够稳定遗传但在鸡体内不能稳定存在,在传代过程中容易失去插入的 REV LTR 片段^[23-24]。相反,GX0101 在鸡体内即使经过 20 代传代其基因组中的 REV LTR 片段依然能够稳定存在。即使将 ALV 的 LTR 插入 GX0101 相同的位置,ALV LTR 依然能够在病毒的基因组中稳定存在,随着病毒在鸡体内的复制而复

制^[25]。从病毒基因组复制的角度思考,由于 GX0101 独特的基因组结构,sorf1 基因位于其短独特区,使得 REV LTR 整合进 sorf1 基因后能够稳定存在,重组 MDV GX0101 具有较强的稳定性。最终由于 REV LTR 重组片段的影响提高病毒的横向传播能力,使其具有一定的流行优势,在鸡群中被分离出来。

GX0101 株 MDV 与其他 10 株 MDV 的全基因组序列比较显示出一个有趣的现象,即从中国分离到的 GX0101 与英国分离株 C12/130 株的两个独立的 BAC 克隆 pC12/130-10 和 pC12/130-15 病毒序列的同源性最高^[26-27]。除了 GX0101 具有这一特有的 REV LTR 插入片段外,在经比较的 190 个 ORFs (Open reading frames) 中不同毒株间发生不同程度变异的有 77 个。在这 77 个 ORFs 中,GX0101 与这两个克隆呈 100% 同源的 ORF 分别有 50 个和 47 个,而与 RB1B、Md5、GA、814 和 CVI988 等毒株却只有 7~27 个 ORFs 呈现 100% 同源性。pC12/130-10、pC12/130-15 虽然是来自 C12/130 的两个感染性克隆,但是致病性却截然不同,pC12/130-10 属于超强毒,而 pC12/130-15 属于弱毒。通过两个感染性克隆的全基因组比较,发现 pC12/130-10 的 71.4~72.2 开放阅读框有一增加的 494 bp 的基因片段,而 GX0101 等其他不同致病性 MDV 基因组没有,为了继续分析这一片段在 MDV 致病性的作用,我们将进一步利用同源重组技术将其插入 GX0101 相似位置,分析重组病毒的复制能力、致病性等生物学活性。因此,对超强毒 GX0101 及 pC12/130-10、pC12/130-15 序列差异的比较为进一步分析病毒的基因功能奠定基础。

除此之外,在 GX0101 基因组 TRS 区的 97.3~97.6 开放阅读框中有 5 个连续的 217 bp 重复片段,在 IRS 区的 86.2~86.4 开放阅读框有 3 个重复的 217 bp 的重复片段,其余 MDV 无论在 TRS 区还是 IRS 区均没有如此多的连续重复。虽然这段序列编码的还只是其功能不清的一个“hypothetical protein”,但作为带有最多拷贝数的毒株,进一步分析该重复性片段与 GX0101 生物学特性间的关系的

是有意义的。GX0101 US 区与 TRS 区连接处与 GA、814、pC12/130-10、pC12/130-15 等毒株一样,与 Md5 相比缺少 830 bp,但 GX0101、pC12/130-10 属于超强毒,GA 属于强毒,pC12/130-15 属于弱毒,而 814 株属于疫苗毒,因此这种碱基的缺失与病毒致病性以及稳定性间的关系将是进一步研究的重点。

鉴于 GX0101 在致病性、横向传播性及基因组结构上的特性,对 GX0101 的全基因组序列的比较分析,既有助于阐明与 MDV 致病性、传播性相关的基因,也有助于揭示不同地域间 MDV 的遗传变异和演化关系。

参考文献:

- [1] Biggs P M, Purchase H G, Bee B R, *et al.* Preliminary report on acute Marek's disease (fowl paralysis) in Great Britain[J]. *Vet Rec*, 1965, 77(45):1339-1340.
- [2] Witter R L. Increased virulence of Marek's disease virus field isolates[J]. *Avian Dis*, 1997, 41(1): 149-163.
- [3] Schat K A, Calnek B W. Characterization of an apparently non-oncogenic Marek's disease virus[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1978, 60(5): 1075-1082.
- [4] Witter R L, Schat K A. Marek's disease in diseases of poultry [M]. Iowa State University Press, Ames, Iowa. 2003.
- [5] Lee L F, Wu P, Sui D, *et al.* The complete unique long sequence and the overall genomic organization of the GA strain of Marek's disease virus[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(11): 6091-6096.
- [6] Spatz S J, Zhao Y, Petherbridge L, *et al.* Comparative sequence analysis of a highly oncogenic but horizontal spread-defective clone of Marek's disease virus[J]. *Virus Genes*, 2007, 35(3): 753-766.
- [7] Tulman E R, Afonso C L, Lu Z, *et al.* The genome of a very virulent Marek's disease virus[J]. *J Virol*, 2000, 74(17): 7980-7988.
- [8] Cui Z, Zhuang G, Xu X, *et al.* Molecular and biological characterization of a Marek's disease virus field strain with reticuloendotheliosis virus LTR insert[J]. *Virus Genes*, 2010, 40(2): 236-243.
- [9] 许晓云,孙爱军,崔言顺,等. 带有 REV-LTR 片段的马立克氏病毒重组野毒株与超强毒株致病性和横向传播性比较[J]. *微生物学报*, 2009, 49(4): 540-543.
- Xu X Y, Sun A J, Cui Y S, *et al.* Comparison of pathogenicity and horizontal transmission ability between recombinant Marek's disease virus field strain with REV-LTR and a very virulent reference strain[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49(4): 0540-0543.
- [10] Zhang Z, Cui Z. Isolation of recombinant field strains of Marek's disease virus integration with reticuloendotheliosis virus genome fragments[J]. *Sci China C Life Sci*, 2005, 48(1): 81-88.
- [11] 孙爱军, Petherbridge L, Zhao Y, 等. 带有 REV-LTR 片段的 MDV 野毒株 GX0101 BAC 克隆的构建及拯救病毒的致病性分析[J]. *科学通报*, 2009, 54(11): 1541-1546.
Sun A J, Petherbridge L, Zhao Y, *et al.* A BAC clone of MDV strain GX0101 with REV-LTR integration retained its pathogenicity[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2009, 54(11): 1541-1546.
- [12] Sun A, Xu X, Petherbridge L, *et al.* Functional evaluation of the role of reticuloendotheliosis virus long terminal repeat (LTR) integrated into the genome of a field strain of Marek's disease virus[J]. *Virology*, 2010, 397(2): 270-276.
- [13] Li Y, Sun A, Su S, *et al.* Deletion of the Meq gene significantly decreases immunosuppression in chickens caused by pathogenic Marek's disease virus[J]. *Virol J*, 2011, 8:2. doi: 10.1186/1743-422X-8-2.
- [14] 苏帅,李延鹏,孙爱军,等. 敲除 meq 的鸡马立克氏病毒强毒株对超强毒的免疫保护作用[J]. *微生物学报*, 2010, 50(3): 380-386.
Su S, Li Y P, Sun A J, *et al.* Protective immunity of a meq-deleted Marek's disease virus against very virulent virus challenge in chickens[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(3): 380-386.
- [15] Isfort R, Jones D, Kost R, *et al.* Retrovirus insertion into herpesvirus *in vitro* and *in vivo*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(3): 991-995.
- [16] Isfort R, Witter R, Kung H J. Retrovirus insertion into herpesvirus[J]. *Trends Microbiol*, 1994, 2(5): 174-177.
- [17] Spatz S J, Petherbridge L, Zhao Y, *et al.* Comparative full-length sequence analysis of oncogenic and vaccine (Rispens) strains of Marek's disease virus[J]. *J Gen Virol*, 2007, 88(4): 1080-1096.
- [18] Spatz S J, Rue C A. Sequence determination of a mildly virulent strain (CU-2) of Gallid herpesvirus type 2 using 454 pyrosequencing[J]. *Virus Genes*, 2008, 36(3): 479-489.
- [19] Zhang F, Liu C, Zhang Y, *et al.* Comparative full-length sequence analysis of Marek's disease virus vaccine strain 814[J]. *Arch Virol*, 2012, 157(1): 177-183.

- [20] Su S, Cui N, Zhou Y, *et al.* A recombinant field strain of Marek's disease (MD) virus with reticuloendotheliosis virus long terminal repeat insert lacking the meq gene as a vaccine against MD[J]. *Vaccine*, 2015, 33(5): 596–603.
- [21] Teng M, Yu Z H, Sun A J, *et al.* The significance of the individual Meq-clustered miRNAs of Marek's disease virus in oncogenesis[J]. *J Gen Virol*, 2015, 96(3): 637–649.
- [22] Yu Z H, Teng M, Sun A J, *et al.* Virus-encoded miR-155 ortholog is an important potential regulator but not essential for the development of lymphomas induced by very virulent Marek's disease virus[J]. *Virology*, 2014, 448: 55–64.
- [23] Kim T, Mays J, Fadly A, *et al.* Artificially inserting a reticuloendotheliosis virus long terminal repeat into a bacterial artificial chromosome clone of Marek's disease virus (MDV) alters expression of nearby MDV genes[J]. *Virus Genes*, 2011, 42(3): 369–376.
- [24] Mays J K, Silva R F, Kim T, *et al.* Insertion of reticuloendotheliosis virus long terminal repeat into a bacterial artificial chromosome clone of a very virulent Marek's disease virus alters its pathogenicity[J]. *Avian Pathol*, 2012, 41(3): 259–265.
- [25] Sun P, Cui N, Su S, *et al.* Influence of avian leukosis virus long terminal repeat on biological activities of Marek's disease virus[J]. *Avian Pathol*, 2015, 44(4): 278–286.
- [26] Barrow A, Venugopal K. Molecular characteristics of very virulent European MDV isolates[J]. *Acta Virol*, 1999, 43(2–3): 90–93.
- [27] Spatz S J, Smith L P, Baigent S J, *et al.* Genotypic characterization of two bacterial artificial chromosome clones derived from a single DNA source of the very virulent gallid herpesvirus-2 strain C12/130[J]. *J Gen Virol*, 2011, 92(7): 1500–1507.

(编辑:李文平)