

方 天,何 玲,尹德晶,等. 安卡拉病毒贵州分离株 *Fiber2* 基因的克隆及序列分析[J]. 江苏农业学报, 2022, 38(6): 1603-1611.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2022.06.019

安卡拉病毒贵州分离株 *Fiber2* 基因的克隆及序列分析

方 天¹, 何 玲¹, 尹德晶¹, 岳 筠², 朱二鹏^{1,3}, 文 明^{1,3}, 程振涛^{1,3}

(1. 贵州大学动物科学学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州省动物疫病预防控制中心, 贵州 贵阳 550008; 3. 贵州省动物疫病与兽医公共卫生重点实验室, 贵州 贵阳 550025)

摘要: *Fiber2* 蛋白是禽腺病毒血清 4 型(FAV-4, 又称安卡拉病毒)重要的免疫原蛋白, 为深入了解 FAV-4 贵州株 *Fiber2* 基因的遗传变异情况, 本研究利用 PCR 技术扩增 FAV-4 贵州晴隆株(GZ-QL) *Fiber2* 基因, 胶回收后将其连接至 pMD19-T 载体, 转化入 DH5 α 筛选阳性克隆质粒, 经质粒 PCR 及双酶切鉴定后进行 DNA 测序, 然后对测序结果进行生物信息学分析。结果显示, GZ-QL 株 *Fiber2* 基因全长为 1 440 bp, 与四川分离的 SCnj1601 强毒株、北京分离的 NVD2 强毒株 *Fiber2* 基因核苷酸同源性均为 100.0%, 与 FAV-4 经典 ON1 株 *Fiber2* 基因核苷酸同源性为 95.9%, 两者位于相同进化分支。GZ-QL *Fiber2* 蛋白共有 33 个氨基酸突变位点, 其中, 在第 11~15 位之间有 5 个氨基酸插入; 蛋白质亲水性平均值为 -0.031, 其二级结构以无规则卷曲为主(占 51.8%), 无跨膜结构域或信号肽, 抗原表位分布均匀, 预测有 8 个优势抗原表位区域, 且集中于 N 端。以上结果表明, FAV-4 贵州株 GZ-QL *Fiber2* 蛋白在禽腺病毒血清 4 型内相对保守且抗原性良好, 具备成为优势抗原的潜力。

关键词: 禽腺病毒血清 4 型; *Fiber2* 基因; 生物信息学分析

中图分类号: Q785 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2022)06-1603-09

Cloning and sequence analysis of *Fiber2* gene of Ankara virus Guizhou strain

FANG Tian¹, HE Ling¹, YIN De-jing¹, YUE Jun², ZHU Er-peng^{1,3}, WEN Ming^{1,3}, CHENG Zhen-tao^{1,3}

(1. College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. Guizhou Provincial Center for Animal Disease Control and Prevention, Guiyang 550008, China; 3. Guizhou Provincial Key Laboratory of Animal Disease and Veterinary Public Health, Guiyang 550025, China)

Abstract: *Fiber2* protein is an important immunogenic protein of fowl adenovirus serotype 4 (FAV-4, also known as Ankara virus). In order to gain deep understanding of the genetic variation of *Fiber2* gene of FAV-4 Guizhou strain, PCR technology was used to amplify the *Fiber2* gene of FAV-4 Guizhou Qinglong strain (GZ-QL). After the gene was recycled from the separation gel, it was connected into pMD19-T vector and then converted into DH5 α to screen positively cloned plasmids. After identification by plasmid PCR and dual-enzyme digestion, the DNA was sequenced, and then bioinformatic analysis of the sequencing results was conducted. The results showed that, the total length of *Fiber2* gene of GZ-QL strain was 1 440 bp, with a 100.0% nucleotide homology of *Fiber2* gene compared with *Fiber2* gene of SCnj1601 strong

strain isolated from Sichuan province and *Fiber2* gene of NVD2 strong strain isolated from Beijing City. Besides, the nucleotide homology of *Fiber2* gene between GZ-QL strain and FAV-4 classical ON1 strain was 95.9%, and the two strains were located in the same evolutionary branch. There were 33 amino acid mutation sites in sequence of GZ-QL *Fiber2* protein, and five amino acid were inserted into positions between the 11th and the 15th amino acids. The av-

收稿日期: 2022-02-24

基金项目: 贵州省科技计划项目[黔科合基础(2020)1Y409号]; 贵州省科技支撑计划项目[黔科合支撑(2021)一般161]; 贵州省优秀青年科技人才项目[黔科合平台人才(2021)5646]

作者简介: 方 天(1998-), 男, 贵州瓮安人, 硕士生研究生, 主要从事动物疫病防控研究。(E-mail)435025101@qq.com

通讯作者: 程振涛, (E-mail)chengzhentao@sohu.com

erage hydrophilicity value of GZ-QL Fiber2 protein was -0.031 and its secondary structure was dominated by random coil (accounted for 51.8%), but there was no transmembrane domain or signal peptide, and the epitope distribution was uniform, which was predicted to have eight dominant epitope regions and concentrated in the N-terminal. The above results showed that, the GZ-QL Fiber2 protein of FAdV-4 Guizhou strain is relatively conserved and has good antigenicity in fowl adenovirus serotype 4, which has the potential to be the dominant antigen.

Key words: fowl adenovirus serotype 4; *Fiber2* genes; bioinformatic analysis

安卡拉病是由安卡拉病毒感染引起的一种禽类高发疾病,最早发现于巴基斯坦卡拉奇周围区域。该病毒又称禽腺病毒血清 4 型(Fowl adenovirus serotype 4, FAdV-4),鸡感染后的特征性病变为心包积液-肝炎综合征(Hydropericardium hepatitis syndrome, HHS)^[1]。2013 年国内 FAdV-4 的感染病例开始增多,2015 年疫情迅速蔓延,在中国吉林、江苏、山东等东部地区均有发生^[2-3]。贵州省于 2016 年首次报道此病^[4],随后多地呈现局部流行。3~5 周龄的肉鸡最为易感,发病后死亡率为 30%~70%,感染鸡的日龄越大则死亡率越低^[5]。安卡拉病可通过水平传播和垂直传播 2 种方式感染健康鸡^[6],FAdV-4 能在粪便、鼻气管黏膜和肾脏中存活较长时间,其在粪便中载毒量最高,表明 FAdV-4 水平传播的主要途径为粪-口传播,其次为短距离的飞沫传播,垂直传播则是通过种蛋、鸡胚等途径传播。FAdV-4 也可与该属其他血清型病毒混合感染导致禽类发病^[7];FAdV-4 与具有免疫抑制特性的病毒(如传染性法氏囊病毒)混合感染禽类时,引起的死亡率会进一步升高^[8]。

FAdV-4 为双股线状的 DNA 病毒,无囊膜,其结构蛋白质主要包括 Penton 五邻体蛋白、Hexon 六邻体蛋白以及 Fiber1 纤突蛋白、Fiber2 纤突蛋白。Hexon 蛋白构成病毒粒子的面,Penton 蛋白构成顶,Fiber1 和 Fiber2 纤突蛋白则位于病毒粒子表面^[9]。据报道,Fiber2 蛋白具有良好的免疫原性,在介导 FAdV-4 感染宿主细胞中发挥重要作用,可以诱导机体产生中和抗体,有效刺激机体产生体液免疫^[10]。本研究拟通过对 FAdV-4 贵州株(GZ-QL) *Fiber2* 基因进行克隆与生物信息学分析,了解 FAdV-4 贵州株 *Fiber2* 基因的遗传变异情况,明确 Fiber2 蛋白相关生物学特点,为深入解析该蛋白的功能及新型疫苗研制提供一定的科学参考。

1 材料与方法

1.1 主要毒株

GZ-QL 和 DH-5 α 菌株均由贵州省动物疫病与

兽医公共卫生重点实验室保存。

1.2 主要试剂

酵母粉、胰蛋白胨购自英国 OXOID 公司;2 \times Taq PCR MasterMix、2 000 bp DNA marker、5 000 bp DNA marker、pMD19-T 载体、DNA 限制性内切酶 *Hind* III、*Xba* I 均购自宝日医生物技术(北京)有限公司;DNA 基因组小量提取试剂盒、E.Z.N.A.TM Gel Extraction Kit 胶回收试剂盒、E.Z.N.A.TM Plasmid Kit 质粒提取试剂盒购自 Omega Bio-Tek 公司。

1.3 FAdV-4 GZ-QL 株 *Fiber2* 基因扩增

1.3.1 引物设计与合成 根据 NCBI 基因库中已公布的 FAdV-4 经典株 ON1 的基因序列(登录号:GU188428),利用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计包含 *Fiber2* 全基因序列的特异性引物。*Fiber2*-F:5'-TCCTATCCCTTTTTCCTATCAG-3';*Fiber2*-R:5'-GTTTTTAGAAAGCGTAAATCTGTTG-3',预扩增片段的大小为 1 425 bp。

1.3.2 基因组 DNA 的提取 将病毒培养物分装到 1.5 ml EP 管中,8 000 r/min 离心 30 s 取上清液,使用 DNA 基因组小量提取试剂盒提取病毒 DNA,将提取的病毒 DNA 作为 PCR 扩增的模板。

1.3.3 FAdV-4 GZ-QL 株 *Fiber2* 基因的 PCR 扩增 通过普通 PCR 方法扩增 FAdV-4 *Fiber2* 基因,构建 25 μ l 反应体系,短暂离心后旋涡振荡混匀,按照以下反应条件进行 PCR 扩增:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,61 $^{\circ}$ C 退火 40 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 80 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取出 PCR 扩增产物后,转入含 Goldview I 核酸染料的 1.5% 琼脂糖凝胶中进行电泳分离,随后于凝胶成像系统中进行拍照分析。

1.4 FAdV-4 GZ-QL 株 *Fiber2* 基因克隆与测序

使用胶回收试剂盒对琼脂糖凝胶内的目的基因进行回收纯化。将目的基因连接至 pMD19-T 载体后转化入 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞,涂布 LB 固体平板后置于 37 $^{\circ}$ C 静置培养 12 h,挑取单菌落接种 LB 液体培养基,放入 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床中继续培养 12

h. 使用质粒提取试剂盒提取质粒,通过 PCR 方法,使用 pMD19 T 载体通用引物筛选阳性重组质粒;进一步使用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Hind* III 对重组质粒 pMD19 T-*Fiber2* 进行双酶切鉴定;把质粒 PCR 和双酶切鉴定结果均为阳性的重组质粒送至华大基因科技有限公司进行 DNA 测序。

1.5 FAdV-4 GZ-QL 株 *Fiber2* 基因序列分析

对测序后的基因片段进行拼接,在 NCBI 下载禽腺病毒属各血清型 *Fiber2* 基因序列,使用软件 DNASTar 将 GZ-QL *Fiber2* 基因序列与选取的各血清型参考毒株 *Fiber2* 基因进行同源性比对和系统进化树分析;进一步推导出 GZ-QL 株 *Fiber2* 蛋白的氨基酸序列,并将此序列与 ON1 弱毒株、MX-SHP95 弱毒株、四川 SCnj1601 强毒株、北京 NIVD2 强毒株 *Fiber2* 蛋白的氨基酸序列进行比对分析。各血清型 FAdV 毒株 *Fiber* 基因参考序列信息见表 1。

表 1 FAdV *Fiber* 基因参考序列

Table 1 Reference sequence of FAdV *Fiber* gene

参考株	基因库登录号	血清型
ECL0	U46933.1	FAdV-1
VR-432	NC_001720	FAdV-1
685	KT862805	FAdV-2
SR49	KT862807	FAdV-3
MX-SHP95	KP295475	FAdV-4
SCnj1601	KY927938	FAdV-4
NIVD2	MG547384	FAdV-4
ON1	GU188428	FAdV-4
340	KC493646	FAdV-5
CR119	NC_038332	FAdV-6
YR36	KT862809	FAdV-7
TR59	KT037703	FAdV-8a
764	KT037711	FAdV-8b
A-2A	AF083975	FAdV-9
KB001451	AC_000013	FAdV-9
CX-1	AF007579	FAdV-10
05-17766	JQ034220	FAdV-11
HBQ12	KM096545	FAdV-11

1.6 FAdV-4 GZ-QL 株 *Fiber2* 蛋白生物信息学分析

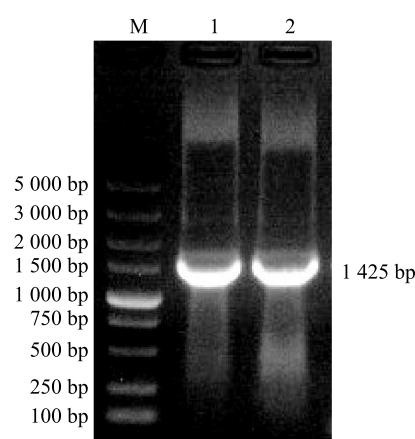
应用在线软件 ExPASy-Protparam 对 GZ-QL 株 *Fiber2* 蛋白进行理化性质及氨基酸组成分析。应用在线软件 ProtScale 对 GZ-QL *Fiber2* 蛋白进行疏水

性与亲水性分析。应用在线软件 SOPMA、Swiss-model 预测 GZ-QL *Fiber2* 蛋白的二级结构和三级结构。分别应用在线软件 TMHMM Server v.2.0 和 SignalP v3.0 对 GZ-QL *Fiber2* 蛋白进行跨膜区域和信号肽分析。应用在线软件 Protean 和 IEDB 的 Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0 抗原表位预测工具对 GZ-QL *Fiber2* 蛋白进行 B 细胞抗原表位预测和分析。

2 结果与分析

2.1 FAdV-4 GZ-QL 株 *Fiber2* 基因扩增

以 FAdV-4 GZ-QL 株的 DNA 样本为模板,以 *Fiber2*-F/*Fiber2*-R 为特异性引物进行 PCR 扩增,扩增片段进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析。结果显示,扩增出的特异性基因片段大小约为 1 425 bp,与目的片段的预期大小一致(图 1)。结果初步表明成功扩增出了 FAdV-4 GZ-QL 株 *Fiber2* 基因。



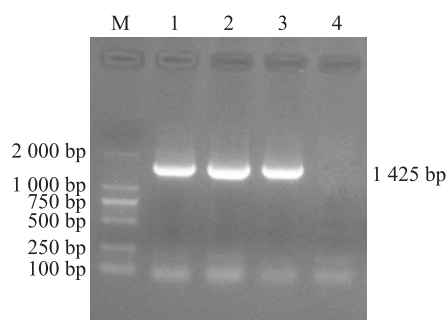
M; 5 000 bp Marker; 1~2: 扩增产物。

图 1 FAdV-4 *Fiber2* 基因 PCR 扩增结果

Fig.1 PCR amplification results of FAdV-4 *Fiber2* gene

2.2 FAdV-4 GZ-QL 株 *Fiber2* 基因重组质粒的鉴定

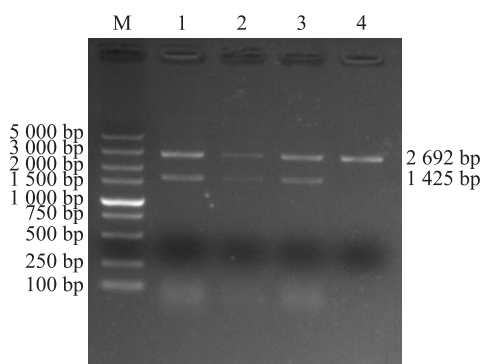
采用质粒 PCR 方法和双酶切鉴定重组质粒 pMD19 T-*Fiber2*。由图 2 可知,重组质粒 PCR 均能扩增出大小约 1 425 bp 的目的条带,而空白对照组无此条带;由图 3 可知,重组质粒经 *Xba* I 和 *Hind* III 双酶切后,均能产生与预期大小(1 425 bp)一致的目的基因条带以及对应的克隆载体片段(2 692 bp),而空载体经过相同的双酶切后只产生与预期大小(2 692 bp)一致的载体片段。结果表明,GZ-QL *Fiber2* 基因成功插入到 pMD19-T 克隆载体中。



M: 2 000 bp marker; 1~3: 重组质粒; 4: 空白对照。

图2 FAdV-4 *Fiber2* 基因重组质粒鉴定结果

Fig.2 PCR identification results of restructuring plasmid of FAdV-4 *Fiber2* gene



M: 5 000 bp marker; 1~3: 重组质粒; 4: pMD19-T。

图3 FAdV-4 *Fiber2* 基因重组质粒双酶切鉴定结果

Fig.3 Identification results of FAdV-4 *Fiber2* gene recombinant plasmid digested by double enzymes

2.3 FAdV-4 GZ-QL 株 *Fiber2* 基因同源性和系统进化树分析

将 FAdV-4 GZ-QL 株 *Fiber2* 基因序列和参考株 ON1、SCNj1601、NIVD2 等毒株 *Fiber2* 基因序列进行同源性和系统进化树分析。由图 4 可知, FAdV-4 GZ-QL 株与四川分离的 SCNj1601 强毒株、北京分离的 NIVD2 强毒株 *Fiber2* 基因核苷酸同源性均为 100.0%; 和 ON1 经典株 *Fiber2* 基因的核苷酸同源性为 95.9%; 与基因型一致的 FAdV-10CX-1 毒株同源性为 96.2%; 与剩余血清型 (FAdV-1、FAdV-2、FAdV-3、FAdV-5、FAdV-6、FAdV-7、FAdV-8a、FAdV-8b、FAdV-9、FAdV-11) 的同源性相对较低, 约为 45.9%~52.2%。由图 5 可知, FAdV-4 GZ-QL 株与四川 SCNj1601 强毒株、北京 NIVD2 强毒株位于相同进化分支; 与国外 ON1 经典株、MX-SHP95 弱毒株及血清 10 型的 CX-1 相比存在多点位氨基酸突变, 同属于一个大的进化分支, 均为 FAdV-C (基因

型); 与国内外其他血清型处于不同分支, 亲缘性较远。提示, FAdV-4 *Fiber2* 基因在本血清型内相对保守, 与其他血清型之间差异较大。

2.4 FAdV-4 GZ-QL 株 *Fiber2* 蛋白生物信息学分析

2.4.1 FAdV-4 *Fiber2* 基因推导的氨基酸序列分析

把基因测序得到的序列片段进行拼接, 获得 FAdV-4 GZ-QL 株 *Fiber2* 全基因序列, 使用软件 DNASTAR 推导氨基酸序列, 并将此序列与 ON1 弱毒株、MX-SHP95 弱毒株、四川 SCNj1601 强毒株、北京 NIVD2 强毒株氨基酸序列进行比对分析。由图 6 可知, FAdV-4 GZ-QL 株 *Fiber2* 基因编码 479 个氨基酸, 与四川 SCNj1601 强毒株、北京 NIVD2 强毒株 *Fiber2* 蛋白氨基酸序列完全一致; 但与国外 FAdV-4 ON1 弱毒株、MX-SHP95 弱毒株相比, 分别有 33 处、27 处氨基酸突变, 且在第 11~15 位氨基酸处均存在 5 个氨基酸插入。

2.4.2 FAdV-4 GZ-QL 株 *Fiber2* 蛋白理化性质分析

应用在线软件 ExPASy-Protparam 分析预测 GZ-QL 株 *Fiber2* 蛋白的理化性质及氨基酸组成。结果显示, QZ-QL *Fiber2* 基因编码序列 (CDS) 区大小为 1 440 bp, 对应编码 479 个氨基酸, 推测蛋白质相对分子质量为 50 000, 其蛋白质理论等电点为 4.376, 共有 43 个氨基酸带负电荷, 其中 29 个天冬氨酸 (Asp)、14 个谷氨酸 (Glu), 23 个氨基酸带正电荷, 其中 11 个精氨酸 (Arg)、12 个赖氨酸 (Lys), 脂肪系数为 89.31, 溶于水中的不稳定指数为 33.47 (若指数超过 40.00, 则代表不稳定), 提示该蛋白质较稳定。该蛋白质氨基酸组成中, 共含有 3 类碱性氨基酸, 其中精氨酸 11 个、组氨酸 (His) 3 个、赖氨酸 12 个, 总计 26 个, 占比为 5.4% (26/479); 含有 2 类酸性氨基酸, 其中天冬氨酸 29 个、谷氨酸 14 个, 总计 43 个, 占比为 9.0% (43/479); 进而推测 *Fiber2* 蛋白可能为酸性蛋白质。该蛋白质共含有 7 类亲水性氨基酸, 总计 200 个, 占总氨基酸的 41.8% (200/479); 共含有 8 类疏水性氨基酸, 总计 210 个, 占总氨基酸的 43.8% (210/479); 蛋白质亲水性平均值为 -0.031 (负值代表亲水, 正值代表疏水), 提示该蛋白质可能为亲水性蛋白质。同时应用 ProtScale 在线软件预测 *Fiber2* 蛋白氨基酸序列的亲/疏水性。如图 7 所示, 纵坐标分值高于 0 的部分为疏水区, 低于 0 则为亲水区, 分值绝对值越高, 对应的亲/疏水性则越强; 在 *Fiber2* 蛋白的氨基酸中, 位于 270

		同源性百分比																											
差异		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19									
	1		95.9	100.0	100.0	97.2	52.2	52.2	96.2	48.8	45.9	46.4	49.3	49.4	49.0	48.9	47.1	47.1	48.6	48.6	GZ-QL.seq								
	2	4.3		95.9	95.9	97.2	52.2	52.2	95.6	49.3	46.6	46.6	49.4	49.9	49.8	49.5	47.4	47.4	49.1	49.1	FAdV-4 ON1.seq								
	3	0	4.3		100.0	97.2	52.2	52.2	96.2	48.8	45.9	46.4	49.3	49.4	49.0	48.9	47.1	47.1	48.6	48.6	FAdV-4 SCnj1601.seq								
	4	0	4.3	0		97.2	52.2	52.2	96.2	48.8	45.9	46.4	49.3	49.4	49.0	48.9	47.1	47.1	48.6	48.6	FAdV-4 NIVD2.seq								
	5	2.9	2.9	2.9	2.9		52.5	52.5	96.3	49.1	46.4	46.7	49.4	49.4	49.4	49.0	47.2	47.2	48.9	48.9	FAdV-4 MX-SHP95.seq								
	6	77.1	77.3	77.1	77.1	76.5		100.0	51.7	43.0	44.2	42.5	44.4	43.5	43.0	43.1	43.9	43.9	43.6	43.6	FAdV-1 ECLO.seq								
	7	77.1	77.3	77.1	77.1	76.5	0		51.7	43.0	44.2	42.5	44.4	43.5	43.0	43.1	43.9	43.9	43.6	43.6	FAdV-1 VR-432.seq								
	8	3.9	4.5	3.9	3.9	3.8	78.5	100.0		47.0	44.2	42.5	44.4	43.5	43.0	43.1	43.9	43.9	43.6	43.6	FAdV-10 CX-1.seq								
	9	86.6	84.9	86.6	86.6	85.5	108.9	108.9	92.4		72.4	53.9	58.7	58.0	59.0	59.0	81.3	81.3	96.6	96.6	FAdV-2 685.seq								
	10	97.6	95.0	97.6	97.6	95.5	103.2	103.2	101.9	34.9		53.9	58.6	58.4	59.7	59.3	87.3	87.3	72.5	72.6	FAdV-3 SR49.seq								
	11	94.8	94.1	94.8	94.8	94.0	109.7	109.7	100.4	71.8	71.9		53.3	53.9	53.5	54.4	53.1	53.1	54.0	54.0	FAdV-5 340.seq								
	12	85.3	85.0	85.3	85.3	85.2	102.6	102.6	89.7	60.5	60.9	73.6		86.1	78.2	85.5	59.2	59.2	58.6	58.7	FAdV-6 CR119.seq								
	13	85.0	83.5	85.0	85.0	85.1	106.8	106.8	88.4	62.1	61.4	72.1	15.4		78.6	93.3	58.4	58.4	58.0	58.0	FAdV-7 YR36.seq								
	14	86.2	83.8	86.2	86.2	85.0	107.8	107.8	89.4	59.5	58.1	72.9	25.8	25.2		78.5	59.6	59.6	59.7	59.9	FAdV-8a TR59.seq								
	15	86.3	84.7	86.3	86.3	86.3	108.5	108.5	90.1	59.6	59.2	70.9	16.1	7.0	25.4		59.2	59.2	59.0	59.0	FAdV-8b 764.seq								
	16	92.8	91.5	92.8	92.8	92.3	104.6	104.6	98.6	21.6	14.0	74.0	59.3	61.0	58.5	59.4		100.0	82.0	82.1	FAdV-9 A-2A.seq								
	17	92.8	91.5	92.8	92.8	92.3	104.6	104.6	98.6	21.6	14.0	74.0	59.3	61.0	58.5	59.4	0		82.0	82.1	FAdV-9 KB001451.seq								
	18	87.6	85.8	87.6	87.6	86.3	105.9	105.9	93.3	3.5	34.7	71.5	60.6	62.1	57.9	59.5	20.8	20.8		99.8	FAdV-11 HBQ12.seq								
	19	87.5	85.7	87.5	87.5	86.2	105.8	105.8	93.3	3.3	34.6	71.5	60.4	62.1	57.6	59.5	20.6	20.6	0.2		FAdV-11 05-17766.seq								

图4 核苷酸序列同源性比对分析结果

Fig.4 Analysis results of nucleotide homology

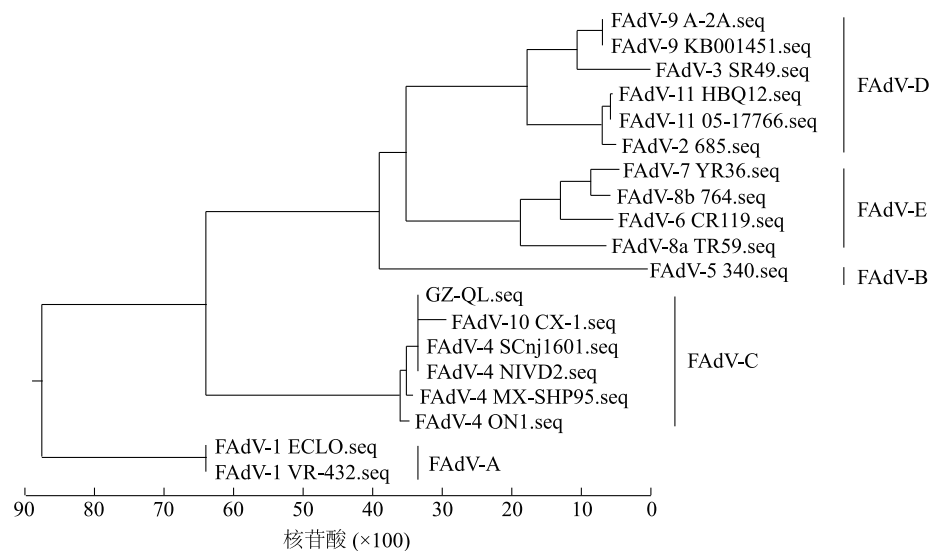


图5 系统进化树分析结果

Fig.5 Analysis results of phylogenetic tree

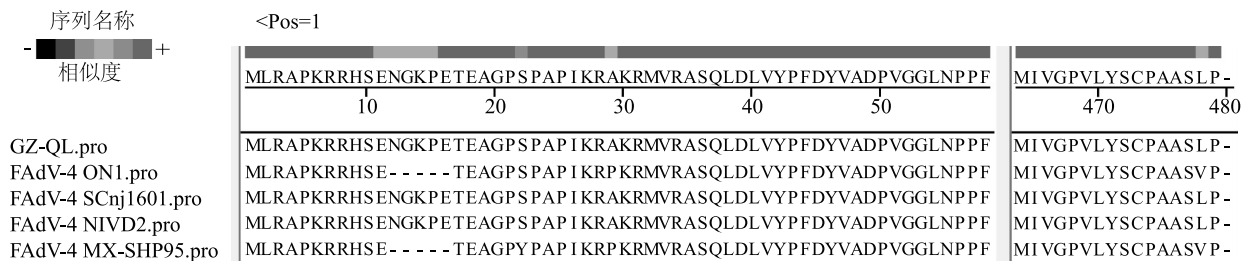


图6 推导的氨基酸序列

Fig.6 Amino acid sequences derived

位的氨基酸得分最高 (2.02), 疏水性最强; 位于第 10 位的氨基酸得分最低 (-3.13), 亲水性最强。预

测结果显示, FAdV-4 GZ-QL 株 *Fiber2* 蛋白亲水区域多于疏水区域, 表明 *Fiber2* 蛋白为亲水性蛋白质,

Fiber2 蛋白进行 B 细胞抗原表位预测和分析,主要分析其亲水性、柔韧性、抗原表位及氨基酸表面可及性。由图 12 可知,*Fiber2* 蛋白具有丰富的 B 细胞表位,且软件分析结果显示,N 端 2~38 区域拥有最高的抗原指数、柔韧性、亲水性和表面可及性,很可能是病毒粒子识别细胞膜表面受体并与之结合的区域。

进一步使用 IEDB 的 Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0 软件预测蛋白质抗原表位,结果如图 13 所示,除了较短氨基酸序列之外,GZ-QL *Fiber2* 蛋白共含有 8 个分值较高的区域,可能是该蛋白质的优势抗原表位区域。

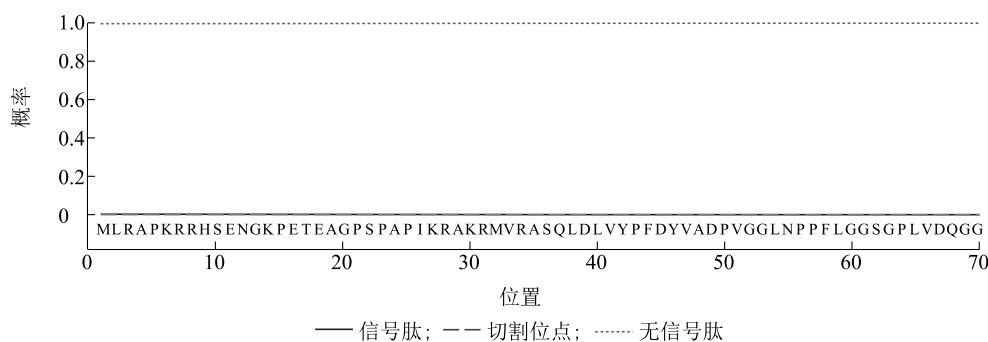


图 11 FAdV-4 *Fiber2* 蛋白信号肽预测

Fig.11 Signal peptide prediction of FAdV-4 *Fiber2* protein

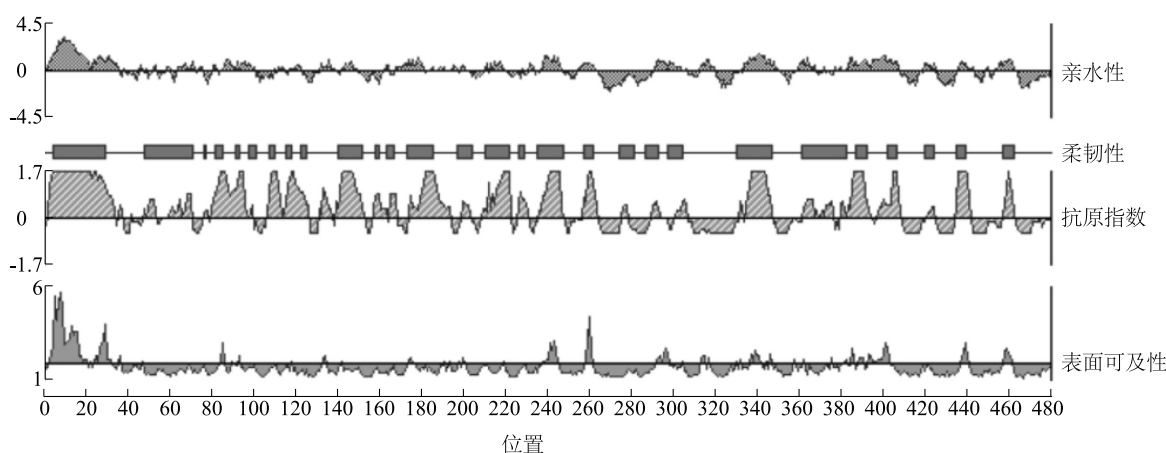


图 12 Protean 预测 *Fiber2* 蛋白 B 细胞表位参数结果

Fig.12 Results of *Fiber2* protein B cell epitope parameter predicted by Protean

3 讨论

腺病毒是一种在自然界中分布广泛、理化性质相对稳定且具有较强传染性的病原体^[11-12],国际病毒委员会于 2021 年将腺病毒科划分成 6 属 87 种^[13]。其中,禽腺病毒属病毒是禽类主要的传染病病原之一,且主要在鸡群中传播。该属相关的病毒种类非常多,不同亚群腺病毒的致病特点也存在一定的差异性。根据群特异性抗原特征将禽腺病毒分为 I 群、II 群、III 群,根据系统进化树、基因组分为 A~E 5 个基因型^[14]。本研究中的 FAdV-4 为 I 群

禽腺病毒血清 4 型,基因型为 C 型。从目前流行状况来看,FAdV-4 的致病性呈现上升趋势^[15-16]。流行病学调查结果显示,国内流行的 FAdV-4 分离株(HN、AQ、AH726、JS07 和 AH712) *Fiber2* 基因与国外早期流行毒株(JSJ13)相比,已经发生了较大变异^[17],血清型相同的毒株之间,其致病性也存在很大差异^[18]。推测 FAdV-4 在传播过程中发生了变异,导致毒力发生了变化,致病性增强。本研究发现,GZ-QL 株 *Fiber2* 蛋白氨基酸序列与国内其他地区流行毒株一致;但与国外早期流行的弱毒株(ON1、MX-SHP95)相比,GZ-QL 株 *Fiber2* 蛋白在 11

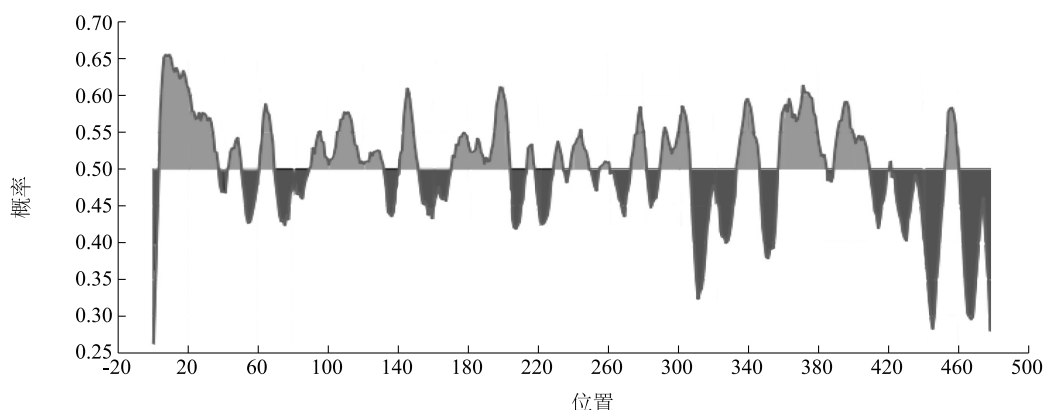


图 13 IEDB 预测 Fiber2 蛋白 B 细胞表位参数结果

Fig.13 Results of Fiber2 protein B cell epitope parameter predicted by IEDB

~15 位存在 5 个氨基酸插入,而软件分析结果显示该区域拥有最高的抗原性、柔韧性、亲水性和表面可及性,可能是病毒粒子与细胞膜上受体结合的位点,对于病毒复制过程至关重要。那么,GZ-QL 株毒性的增强是否与这 5 个氨基酸插入突变有关?本研究结果为这一推测提供了依据,但仍需要进一步验证。已有研究表明,Fiber2 蛋白和 Hexon 蛋白与 FAdV-4 的致病性有密切关系^[19],在病毒内化过程中,Fiber2 蛋白能够直接与宿主细胞膜上受体结合,从而影响病毒的致病性^[20],而 Fiber1 蛋白和 Penton 蛋白对病毒的毒力无直接影响^[21]。如果能证实 GZ-QL 株 Fiber2 蛋白 N 端这 5 个氨基酸插入突变在病毒吸附和致病过程中的作用,将会为阐释 FAdV-4 的致病机制提供更多证据。

Fiber2 蛋白为 FAdV-4 的结构蛋白,其抗原表位具有型特异性和亚属特异性,可有效诱导 B 细胞产生抗体^[22]。生物信息学软件分析结果表明,FAdV-4 贵州株 Fiber2 蛋白具有良好的抗原性,并且与国内其他地区分离株高度同源,但与 I 群其他血清型毒株核苷酸序列同源性较低,提示 Fiber2 蛋白在本血清型内相对保守,具有作为基因工程疫苗靶标蛋白质的潜力。

研究发现,将鼠伤寒沙门氏菌鞭毛蛋白基因与 FAdV-4 的 Fiber2 基因融合后进行原核表达,得到的重组蛋白质能与 FAdV-4 阳性血清发生特异性反应,且在动物试验中产生了良好的免疫保护效果^[23]。郭浩然等^[24]制备的抗 Fiber2 蛋白多克隆抗体和王萍等^[25]制备的抗 FAdV-4 Fiber2 单克隆抗体与 Fiber2 蛋白及病毒阳性血清样品结合均能产生

特异性反应,证实 Fiber2 蛋白具有良好的免疫原性和反应原性。基因序列的生物信息学分析有助于了解编码蛋白质的结构与成分,可为目的蛋白质的体外表达和后续开发利用等奠定基础。本研究通过生物信息学分析,预测了 FAdV-4 Fiber2 蛋白的理化性质和抗原表位,结果表明,Fiber2 蛋白可作为免疫抗原的候选蛋白质,研究结果为开展 FAdV-4 新型疫苗研制奠定了基础。

4 结 论

FAdV-4 贵州分离株 Fiber2 基因总长度是 1 440 bp,共编码 479 个氨基酸,与中国 SCnj1601 以及 NIVD2 株的氨基酸序列相同;与国外 MX-SHP95、ON1 经典株相比,存在多位点的氨基酸突变,属于同种的不同进化分支。Fiber2 蛋白属于亲水性蛋白质,无跨膜区和信号肽,相对保守且抗原性良好,具备成为优势抗原的潜力。

参考文献:

- [1] SCHACHNER A, MATOS M, GRAFL B, et al. Fowl adenovirus-induced diseases and strategies for their control-a review on the current global situation[J]. Avian Pathol, 2018, 47(2): 111-126.
- [2] YE J Q, LIANG G C, ZHANG J J, et al. Outbreaks of serotype 4 fowl adenovirus with novel genotype, China[J]. Emerging Microbes & Infections, 2016, 5(5): e50.
- [3] ZHANG T, JIN Q Y, DING P Y, et al. Molecular epidemiology of hydropericardium syndrome outbreak-associated serotype 4 fowl adenovirus isolates in central China[J]. Virology Journal, 2016, 13(1): 188-195.
- [4] 张云丹, 杨 源, 王 军, 等. 贵州省鸡心包积液-肝炎综合征实验室诊断与病原基因分型[J]. 畜牧与兽医, 2018, 50(10):

- 100-104.
- [5] 祝常椿,钱 焱,满成连,等. 2 株鸡源血清 4 型禽腺病毒的分离鉴定及致病性研究[J]. 中国预防兽医学报,2020,42(12): 1282-1286.
- [6] 王丽萍,李晓燕,王 敏,等. 家禽安卡拉腺病毒病的预防与治疗[J]. 黑龙江畜牧兽医,2017(4): 98-99,274.
- [7] DE LA TORRE D, NUÑEZ L F N, SANTANDER PARRA S H, et al. Molecular characterization of fowl adenovirus group I in commercial broiler chickens in Brazil[J]. Virus Disease, 2018, 29(1): 83-88.
- [8] MO K K, LYU C F, CAO S S, et al. Pathogenicity of an FAdV-4 isolate to chickens and its genomic analysis[J]. Journal of Zhejiang University-Science B, 2019, 20(9): 740-752.
- [9] WANG Z, ZHAO J. Pathogenesis of hypervirulent fowl adenovirus serotype 4; the contributions of viral and host factors[J]. Viruses, 2019, 11(8): 741-751.
- [10] PALLISTER J, WRIGHT P J, SHEPPARD M. A single gene encoding the fiber is responsible for variations in virulence in the fowl adenoviruses[J]. Journal of Virology, 1996, 70(8): 5115-5122.
- [11] 陈俊红,何 宇,祁宇晨,等. 肉鸽圆环病毒、腺病毒及疱疹病毒 I 型混合感染的多重 PCR 检测[J]. 江苏农业科学,2021,49(22): 167-171.
- [12] 史荣华,周 扬,颜彩霞,等. 1 例蛋鸡腺病毒感染的诊断及对 SPF 鸡的致病性[J]. 江苏农业科学,2020,48(6): 156-159.
- [13] BENKÖ M, AOKI K, ARNBERG N, et al. ICTV virus taxonomy profile; adenoviridae 2022[J]. Journal of General Virology, 2022, 103(3): 1721-1722.
- [14] 薛晓岩,张振兴,季 佳,等. 禽腺病毒 4 型的研究现状[J]. 动物医学进展,2022,43(4): 102-106.
- [15] 梁广成,高 巍,谢 泉,等. 一株高致病性血清 4 型禽腺病毒的分离与鉴定[J]. 中国家禽,2016,38(19): 25-28.
- [16] 申祖杰,黎世彬,林华源,等. 禽腺病毒血清 4 型广东株的分离鉴定及致病性研究[J]. 中国兽医科学, 2018,48(6): 722-728.
- [17] WANG K, SUN H W, LI Y Z, et al. Characterization and pathogenicity of fowl adenovirus serotype 4 isolated from eastern China[J]. BMC Veterinary Research, 2019, 15(1): 373-383.
- [18] NIU Y, SUN Q, ZHANG G, et al. Epidemiological investigation of outbreaks of fowl adenovirus infections in commercial chickens in China[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2018, 65(1): 121-126.
- [19] ZHANG Y H, LIU R X, TIAN K Y, et al. Fiber2 and hexon genes are closely associated with the virulence of the emerging and highly pathogenic fowl adenovirus 4[J]. Emerging Microbes & Infections, 2018, 7(1): 199-209.
- [20] WANG P, ZHANG J J, WANG W K, et al. A novel monoclonal antibody efficiently blocks the infection of serotype 4 fowl adenovirus by targeting fiber-2[J]. Veterinary Research, 2018, 49(1): 29-36.
- [21] LIU R X, ZHANG Y H, GUO H F, et al. The increased virulence of hypervirulent fowl adenovirus 4 is independent of fiber-1 and penton[J]. Research in Veterinary Science, 2020, 131: 31-37.
- [22] ZHANG J Q, WEI Y M, HUANG K, et al. Baculovirus-expressed FAdV-4 penton base protein protects chicken against hepatitis-hydropericardium syndrome[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2019, 18(11): 2598-2604.
- [23] 刘 超,侯 磊,韦 莉,等. 禽腺病毒 4 型鞭毛重组蛋白的原核表达及其免疫效果研究[J]. 中国兽医杂志,2017,53(5): 15-19.
- [24] 郭浩然,贾艳娥,吉艳红,等. 禽腺病毒 4 型 Fiber2 蛋白表达、纯化及多克隆抗体的制备[J]. 农业生物技术学报,2019, 27(10): 1804-1812.
- [25] 王 萍,王伟康,梁广成,等. 抗血清 4 型禽腺病毒纤突蛋白 2 的单克隆抗体研制及其部分特性研究[J]. 中国家禽,2017, 39(19): 27-31.

(责任编辑:陈海霞)