- 6 Ruggli N, Tratschin J-D, Mittelholzer C, et al. Nucleotide sequence of classical swine fever virus strain Alfort/187 and transcription of infectious RNA from stably cloned full-length cDNA. *J Virol*, 1996, 70(6): 3478~3487
- 7 Rijnbrand R, van der Straaten T, van Rijn P A, et al. Internal entry of ribosome is directed by the 5' noncoding region of classical swine fever virus and is dependent on the presence of an RNA pseudoknot upstream of the initiation codon. *J Virol*, 1997, 71(1): 451~457
- 8 Xu J, Mendez E, Caron P R, et al. Bovine viral diarrhea virus NS3 serine proteinase: polypeptide cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication. *J Virol*, 1997, 71(7): 5312~5322
- 9 Wang J F, Zhang C Y, Fu L Z, et al. Molecular cloning and nucleotide sequence of hog cholera virus lapinized Chinese strain. *Wuhan University J Natural Sciences*, 1998, 3(4): 499~503

(1998-12-23 收稿, 1999-06-23 收修改稿)

鸡痘病毒 282E₄ 株基因组 7.3 kb *Bam*H^{iv} 片段的序列测定与分析

金宁一 郭志儒 罗 坤 石 毅 殷 震

(解放军农牧大学军事兽医研究所, 长春 130062)

摘要 对经亚克隆后的鸡痘病毒(fowlpox virus, FPV) 282E₄ 株 7.3 kb *Bam*H^{iv}片段, 用 ABI 377DNA 测序仪荧光标记法进行了序列测定, 并应用 DNAsis 软件同 GenBank 中已知的 FPV 序列和痘苗病毒(vaccinia virus, VV) Copenhagen 株的全序列进行了同源性比较, 发现与鸡痘病毒 Munich HP-438 株 11.2 kb *Bam*H^{iv}片段的序列同源。此外, 对所测序列的开放读码框架(open reading frames, ORFs)所编码的氨基酸序列同上述 VV 株中所有 ORF 的氨基酸序列进行了同源性比较, 并对各 ORF 编码蛋白的信号肽、跨膜区的存在与否进行了分析。

关键词 鸡痘病毒 基因组片段 序列分析 开放读码框架

FPV 是目前所知的最大的动物病毒。由于同广泛开发应用的 VV 载体相比具有宿主特异、安全以及能在哺乳动物体内引起流产感染等特点, 已成为目前国内外研究的热点。FPV 基因组约 300 kb, 其中存在许多病毒本身复制的非必需区(nonessential region, NER), 并预计可容纳远不止 25 kb 的外源基因。这就可以用来研究和开发基因工程多价/联疫苗和非复制型病毒载体, 用于禽类和其他动物乃至人类某些疾病的防治。但 FPV 基因组全序列的测定尚未见报道, 到目前为止只了解 TK 基因及其侧翼^[1~3]、DNA 聚合酶^[4]、11.2 kb *Bam*H^{iv}片段^[5]、10.3 kb *Hind*Ⅲ片段^[6]、6.2 kb *Bam*H^{iv}片段^[7]、1.5 kb *Cla*I片段^[8]、与 VV p37K 同源的 p43K 基因^[9]、3.1 kb *Hind*Ⅲ-*Bgl*Ⅱ片段^[10]、4b 基因^[11]、*Eco*R^{iv}L 片段^[12]以及与 VV 的 D6 至 A1 相对应区^[13]等基因序列, 这就使得定向克隆 NER 存在许多困难。我国 FPV 282E₄ 疫苗株经多年的应用证明安全、稳定、免疫效果好, 作为重组疫苗的载体, 有较好的开发前景。因此, 本实验室构建了我国 FPV 282E₄ 株的 *Bam*H^{iv}部分基因文库^[14], 并对文库中的 7.3 kb *Bam*H^{iv}片段进行了非必需区鉴定^[15]。我们在此基础上测定了其序列, 为利用这一片段构建重组病毒载体表

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb1999-44-17-1826>

达外源基因提供了准确的背景材料.

1 材料与方法

()实验材料. 测序用质粒模板 pUFa, pUFc, KSfb 和 pUFd 由 7.3 kb *Bam*H iv片段经亚克隆后得到. 引物由大连宝生物工程公司合成. 其名称、序列如下:

M13-47: 5' CGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC-3',

RV-M: 5'-GAGCGGATAACAATTTACACAGG-3',

F1: 5'-GCCGTTACAGATTTACAGA-3',

F2: 5'-GTAGAAAATGCGTGCGTTA-3',

R1: 5'-TTGCTAAAGTACGGAACGC-3'.

()质粒的转化、提取和酶切鉴定. 参见文献[16]介绍的方法.

()核苷酸序列测定与分析. 首先分别以 pUFa, pUFc, pUFd, KSfb 质粒为模板, 按厂商推荐的反应条件, 用通用引物 M13-47 和 RV-M 各进行 1 个测序反应, 用测序仪读取序列, 然后根据测得的序列人工合成新的引物, 采用 DNA 步移法(DNA-walking)继续测未知序列, 直至测完. 把测得的序列输入计算机, 用 DNAsis 软件(Version 7.0)分析.

2 实验结果

经核苷酸序列测定, 7.3 kb *Bam*H iv片段共 7 394 bp, 其序列及预测的 ORF 见图 1. 其中存在 11 个 ORF, 且 ORF 之间有部分或完全重叠现象. 各 ORF 的大小、位置及所编码多肽的部分特性见表 1. 大部分 ORF 上游序列富含 A:T, 有痘苗病毒启动子的特征. 该序列中各 ORF 之间存在几个不编码的区域. 经在 GenBank 核酸序列库中搜索后, 发现该序列与 Munich HP-438 株 1 个 11.2 kb 的 *Bam*H iv片段同源. 经比较分析, 该序列 1~ 3 000 和 3 001~ 6 218 bp 同英国 HP-438 分离株 1~ 2 998 和 2 999~ 6 220 bp 的同源性高达 99.6% 和 99.7%, 即除 2 385 和 2 681 bp 处各插入 1 个 A, 3 088 bp 处插入 AAC, 40 和 1 350 bp 处由 T 突变为 A, 379 和 5 100 bp

表 1 片段中各开放读码框架(ORF)的位置、大小及编码多肽的某些特性分析

ORF	转录位点/bp		氨基酸数	分子量/ku	信号肽	跨膜区预测	糖基化位点	
	起始	终止						
1	416	1 672	418	48.0	-	-	154~ 156 257~ 259	155~ 157 393~ 395
2	82	882	266	29.7	-	-	21~ 23	193~ 195
3	1 416	1 871	151	18.0	-	-	32~ 34	64~ 66
4	3 336	3 782	148	16.5	-	-	-	
5	4 175	4 597	140	16.5	-	-	37~ 39	
6	2 252	2 569	105	12.5	-	-	-	
7	2 362	2 670	102	12.1	-	-	53~ 55	
8	935	1 216	93	10.7	-	-	-	
9	2 166	2 432	88	10.4	-	9~ 42	66~ 68	71~ 73
10	3 674	3 928	84	9.1	-	-	60~ 62	
11	2 084	2 302	72	8.40	-	-	16~ 18	45~ 47

1 GGATCGGACG CGGCTGCCAA GACCTTTATA CCGGACTCTC GTTCTACTGG ACGAAGCGGG
61 AGATTAAAG CATGGCTGA CGTATAGTCG AGGACGCGCT CGGTAAATAA TTGATTATAT
121 TTTCAGTTTT AAAAATTAAT TTATATATGA CTCAATATOC TTATATAGAA TTATTTTATC
181 TCTTCTGATA TACGTTAGGT AGATGCGGTT CAAATAATAA AATATCTGAT CAGCTTTTTA
241 TCGCGGTGTT ACGTTATTAT AATAGATAAT AGAAATAAAC GTTAAATAAT TAATTAATTA
301 TCTTTTCAGT TGTAAATAT ATCTAGTTT TATAAGCGTT ATTCAATAT ATAAATATA
361 AAACTAAAT CGTATTAGT ATGATGCTAC GCGGTCATT TAACAATTT ACGCGATGGA
[ORF1] M E
421 GTTCAGTTGT ACGGGAACATA ATAACAGTT GCGGCTTAC AGATTACAG AAACGCGTTT
F S C T G T N N Q L A V H R F T E Y R P
481 TACATCTTTC AAAAAGAAC TTITAGTTAA TTAGGAATA AGTACTTAA ATGATATAAA
T S F K K E L L V N L G I S D L N D I K
541 AAACATATGC GAGGATTCTA AATATTCTT TCGGAAAG AGAAGGAGC TCTTAAGTAT
N I C E D S K I F F P E K R T E L S I
601 TAAAGATGCT AAATCTAAAC AATAGTTT CGAAAGCTCC CTAAAGGATG ACTTGCTTAA
K D R K S K Q I V F E N S L N D D L L K
661 AAAATACAC GCTTGTATCT ATGATGAAT AAGTACGGA GTAGATCCG TTACCGTAGA
K L H A L I Y D E L S T V V D S V T V E
721 GAATACCGTT ACATTGATTA TGTATGAAA AGGAGATTAC TTTCGAGGC ATAGAGATT
N T V T L I M V E K G D Y F A R H T D F
781 TAGTACGTC TTTTCTAAA ACATAATAT CGTTCAOCTG CTCTATATTT TCGAACAACC
S T V F S K N I C V H L L L Y L E Q P
841 AGAAGCGGA GGTGAACGG TTATATATAT CGATAATAT ACGTCAGTGA AATTAATAAC
E T G G E T V I Y I D N N T S V K L K T
901 AGATCATCTA TTGATAAAA CTATAGAACT TGAAGTATT ACGTTGAAA GCGGTAGAAA
D H L F D K T I E H E S I T V E S G R K
961 ATGCGTGGCG TTATTGCGAT TCTACTAGA AAAAAGTTA TCGCGCTCAA CAAGCGTAAT
C V A L F D V L L E K K L S A S T N V I
1021 AGGTAGCATA GAATACTTAG GTAAAAAAT AAATTATAT GACAGAGAAA ATGACTTCA
G S I E Y L F K K I N L Y D R E N D L Q
1081 GTTGTGTTAT TGTGATATGG TAATAGAAAG AATGACAGAA GATAAAGAT ATAGCCTAGG
L C Y C D M V I E R M T E D K E Y S L G
1141 AATGATATCT GATAGATGCT GTAGATGAT AAAATCTCAT CATAACGCTA GTATTGTTAG
M I S D R S G R C I K S H H N G S I V R
1201 ATACCGTAAA GAAGATATCT GATCTTTTGA TGTCTATGT ATATATAACA TGAATGAAT
Y R K E E Y G S F D A L C I Y N M N E V
1261 CGATGAATTT TGACTGGTG ATAGAAACA TATTATATG TCTACTATTG ATAAAAAAC
D E I W T G D K K H I I W S T I D K K T
1321 AGGAACGCTT TTTATCTA TAGATCTGCT ACTTACGAA AAGTTAAAG CTATTCTTTC
G T S F I P I D P A L Y E K L K A I S S
1381 TAAGAGCAT AAAGATACA AGATTGAG AGGTTTGT AATAGCAGAA CGGATATAT
K E H K E Y K D L R G F C N S R T E Y I
1441 TTGTGTTG GTATCTAAGT ACTATTGCA CTACTACAT AAAACAGATT TAATACCGA
C C S V S K Y Y F D L P T K T D L I H E
1501 GGTGATTAAT TCTATGAT ATGATACTAA GTCAGTGGT ACACCGACT GGTATATCT
V I N S I D Y D T K S Y G T P D W Y T L
1561 GCGTATAGAA GTTAACAAA CTATCTAGG TAATATGCT TACGAGAGT TATTATAT
P I E V K Q T I L G N M S Y E E L F N I
1621 AGTAAGAGT AATATAGCT TTGAAGAGA CAATGAATAT GCGTGTGATT AACATTAATG
V R G N I A L E D N E Y G C D *
1681 GTAATCTTT TCTAAAACT AATCTCAAGT ATTGTTACA AGCGACTGAA GTAATAGTTT
1741 TAGCAATAA ATACCTTTAC TGTGTTCTT ACAATGAAA TTATGCTGTA ACATAGAGTA
1801 AGGATATATT TATTAAATG TTACATCTTT CGAAGAGCTT TGATCGTATG ATAAATATT
1861 ACATCTGCTC TACTTATTAT ACATAAGAAA ATTGCTATT TATTGATGCG CCGTATAAAT
1921 CGTGTTTAAA GTATACAAAG GACGCTATT TCCAAAAAT CTGCGCGTGT TAAGCGATTA
1981 AAATCTACAT GAAATATCT CTAAACTTT ATTCTACGT ATACAAACA ACAGACTGAT
2041 TTTATATATT ACGAATAACT ATTTCITAGT GTTTTTTATA TAGATGCTAT ACAGTGTTT
[ORF11] M L Y S V P
2101 TACGCGTATA TACAAATAC GGAATAATA TAAACAGAA ATGATTCTGG CAATATACGA
T R I Y K I R K N C T G E M I L A I Y D
2161 CTGCAATGCC TATATTGTA AAAAACAGG TATCGAAGT ATCTTGTTAC GCGATAGCG
C N A Y I V K K T G I G S I L L R D N G
[ORF9] M P I L L K K Q V S E V S C Y A I T
2221 TACTAGGAAT ACTATGCTTA ATATTATTA CGATCTAGT AGTCGTAAACA TCGAATAGGT
T R N T M L N I Y D T S R N M Q M V
V L G I L C L I L P T I L V V Y T C K W
2281 ATTACGCGTT TCGGACTTT AGCAAGGTAT GTCTGATGA GTGATAGGA TATAATAGTA
L R Y S V L *
Y Y A F P Y F S K V C P D E W I G Y N S
2341 AATGCTACTA CTTACTATC AATGAACATA ATTGGAATGA TAGCAAAAA ACTATGCGAT
K C Y Y F T I N E T N W N D S K K T M R
[ORF7] M K L I G M I A K K L C D
2401 GTTATGGAAT CTTCATGAT AAGGTCGAT AACATAGAAA CTCTAAATTT CGTGTCCGA
C Y G F F I D K V R *
Y M D S S L I R F D N I E T L N F V S R
2461 TACGTAAGG GTAGTACTG GATAGACATA AATCAAAATA GAAAAATCC GGTATTAAAT
Y G K G S Y W I D I N Q N R K I P G I N
2521 TTCTCACTAT ATTATGAACA AGCGGTTAAT GATATTGTC TATTATTGA CACGAGTAAC
F S L Y Y B Q G V N D I C L L F D T S N
2581 ATTATCGAAA TGCTTGAT ATTTCAAGAA AAAACGATAT GTGTAAAGA AGATAGATAC
I I E M S C I G H E K T I C V K E D R Y
2641 ACCGATTGGT ATCCGAATA CATGCGTTAG ATTACTACC TATTTTTTA TACAATAGTA
T H W Y T E Y M R *
2701 TTITGTACGT TCTGTAAAC AGAAAATCCG TATAGTTTAT ATTITTAATC AAAGTAATAA
2761 CGAATATCTC GATGTCAGT ATAAACGAG ATTCTAGATA TTAATTTCTC AACGTACGTC
2821 ATTTGCACTC CTGAGATGA TACTTTGCTA TTTTATTATA CCGTAGTCTA TACAAACACT
2881 ACAAGTTAA ACGAAGTAAA ATTATTGATT CGTGTATTAT ATTTCAGCAC AGTAGTACTC
2941 ACTATCTTCG TTTAAATCTA ATAAACGCGC CTITGAACA TTTTGTGCT AGATAATAAT
3001 ACGTTATTAT TACTACTACC TGTATTCTT CTAATCTTTA AGGTGTGCTA ACGATATATC
3061 ACGGGAATTA AAGGTTATTA GTAGTGTAT AACACAACA TAATAATAGC ACATCTGTAT
3121 ATTTATATAC CTCTGAGTA CATAAAAATA ATATGTTTTG ATAAACGTA AATCAATAAG
3181 TGTATAGAGT ATATTCTCT TTAATGAAGA AATAGGACGT AATGTCTAAA TCAGATTAT
3241 ATTCGCGAAA ATATTTTCT TAGATGATA TGTAGTTAA ATTACGTGAT TATATTATA
3301 GTATCTGCT TACTTAAACA TTATATAGTA ATTATATCT AACCGATCTT AACACTCCG
3361 TACAAAGAGG TATGCGGCA TCTGCGAGT ATTGTGATT TCGTATTAG ATATGTGAAT
3421 ATAGTTATCT ACTAAGCGGA CTTCCTCCA ATTTACAAAG CTCTAAGGAA AAAAAATAA
3481 ATAATACTAC CAGGTCTCT TTTAAGAGT TAATATTTA CTGCGAGGTA TCGATATACA
3541 TACAATTCTA TATAATTAG TTAATCGCTT TTAAGCGGCA TAAGTCTAGC TATAATGCT
* G Q F I G L F L P I K T Q V D
3601 TTGTTTAAGT AACTATGCTT GGAATATCC TAAAAATAGC GGAATTTTG TTGTAGGTC
A V L F N F P V N A K V I P I X K I G D
3661 GCGTACTAGG AACATGAAG ATAGCTGCGC TTITACGATA GGAATTTTCT TTATCGGCT
[ORF10] M K G T P A F T I G I F F I P S
T T C L E T V S A A E T G Y E D V K I V
3721 TGTATGCTAT AATTCGGTAA CACTAGCTGC TTGATTCG TATTCATCTA CTTTATCAC
V V H N S V T L A A S V P Y S S F T I T
S K Q R I N G I R L T X T D S I C Y L E
3781 AGATTTTTGC CTGATATTAC CTATCTCAA AGTTTGTGA TCGATATAC CTACTAATTC
D F C L I L P I L K Y F V S D I P T N S
G S K F L D N C G M H I L A D K L D V D
3841 ACCTGACITG AATAGATCAT TACATCCAT ATGGAATTAG CCGTCTTCA AGTCTACGTC
P D L N R S L H P I W I S A S F K S T S
D E L E F K P L Y L V I E K L T M D K K
3901 ATCTCTAAT TCGAATTAG GTAAATAAG AACTATTTCT TTCAAGTCA TATCTTTTT
S S N S N L G K *
S I I K N I N K G N N L S D V V G L I S
3961 AGATTATATT TTATTGATAT TCTACCGTT ATTAGAGAA TCAACTACTC CTAATAAGA
F T N F N R L C I L K L M [ORF4]
4021 AAAAGTATA AAATTACGTA AACATATTAG TTTTAACATC TTTTATTG TTTATATAT
4081 AAATCTATAT CGTAAGAAA TATAGTTCTC TTAATTGAGC TTTATTAGGA AATAAATAG
4141 ACATATTGAT ATACACCTTA GATACTTAAT TAAATGGAT AGAAACATTA ATTACCAGA
[ORF5] M D R N I N L P E
4201 AGAAGAGCTT AAATATATAA AAGATGTTC CGAAGTCTT TATTTATCC AGCGGAGAG
E E L K Y I K E C T T E Y L V L P Q P T R
4261 AATGATATA ATCGGTGTTA TGAATGATAG CGATATTCT TGAATGAAA ATCTCATCAT
M D I I G Y M N D S D I S W N E N L I I
4321 TCTATGCTG GAGATGCTA AGATTATGT GTACGAGAT AGACTCTAT ACAAGTAGC
L M S E S G K I Y V Y D D E A L Y K V A
4381 GGAATCTATG GAAGATGCT CTGAATAGG ACTTATTAT CTAGGAATG AAGTTATCA
D T M E E F S E I G L I N L G N E V Y H
4441 TTGTAGAGAG GATATAAAC CTCTCCCGA AGAGGATAGG GATAAGGATG AGTATATAAT
C R E D I K P L P E E D R D K D E Y I M
4501 GAAGATAGG GAAAAAGCA GGAAGCTTAT AGATAATCA CAAAAGATT TTGAGGCCAT
K I R E K A R E L I D N S Q K D F E A I
4561 TCTAGATCT TTGAGATAA AACATGTATC AATTATAGTA TATAATATA GGTAGCAAAA
L D S L E N K H V S I *
4621 TACGTATGCT CGTGTACGCT TATGATTITT TTTATTGGA TTAATAAGA TACGTAGAT
4681 AATAGCGAG TAGCTTCTGT ATCCGCGCG GTTATTACTT TTAGTAATCT ATTAACACTC
4741 TTTTATCTCT ATTATTAAGT TAGTCATACC CAGGAATATA TATTCATAAA AACACTCTCC
* K L K T L E E K L C K
4801 TCTCAGATT TCTCCGTA AATFATTACT TTAATTGTT TAACTCTCT TTTAAACATT
N E E K L A L L Q I R I T E I Y R S Y I
4861 TATTTCTCT TTGAGAGCT AAAAGTTGA TTTAATTTT CGTTATATAC CTACTATAAA
N D I I K Y Q N K L Q D V I M C L E K I
4921 TATTATCTAT AATTATTAT TGGTCTTAA GTTATGCTAC TATCATACAT AATCTTTTA
E Q R Y K E D L E K L I S N C K I D I E
4981 TCTCTTGGG ATATTTTTCA TCGAGTTCTT TTAGAATACT ATTACACTTT ATATCAATTT
S K I E K I N S D Y E E N I T K I F D S
5041 CTGATTTTAT TTCTTTTAT TTACTATCAT ATTCTTCAIT TATTGTTTT ATGAATCAC
M V S G L A K N N R R I M [ORF6]
5101 TCAATGACT TCCAAGAGCT TTATTATCC TACGTATTAT CATTITAAAA ATCTAAATTA
5161 TTGTTTATTA TATTACATA TGTATAAAC ATTATTTTTA AGTATTGCCA ATTAATAAAT
5221 ATAGTTTATC ACGATCATCT GAAGTATCTT ATCATCCCGC GGAATAATTT TATATTATG

图1 7.3 kb *Bam*H IV片段的核苷酸序列及开放读码框架(ORF)分析

```

5281 TATATTGGT TTATTACGTG CGTAGATTGA GAATCTTTAT TCACAACCGA TTATTGTGTT
5341 GATAGTATAT AATATTAAAA CAATGGAGTT TTAAGCTCTA CCAGAAGATA TCATTAAAGTA
5401 TAGCGTTCTA TATGATCTAA AACATGTATA TTGACCTAG TCATAATAGC ATTTTACCA
5461 TTTTGTGTTA TATTGCTAGC TCATCTATAC GTAACCTTAT GGTTCATTAG CTATCTCATG
      * M N N D D N L L I I E K L Q D M L S
5521 TAACACATA TTGTATCATC CGTTTACAGC TATTATTCTT TTTAACTGAT CCATTAAACT
      K K H I L E Y E L Q Y S D Q I Y S N Y F
5581 TTTTATTATG ATTAGCTCAT ATTCTAATG ATAAGAATCT TGTATGTAAC TATTATATAA
      K V V K L S F L P S I W H S I H L I L D
5641 CTTTACTACC TTCAAGAAA ATAGAGGAGA AATCCAATGT GAAATATGTA ATATAAGGTC
      R H V Y L E S T E S Y S V V N L V I G R
5701 GCGGTGGAGC TACAATTCAC TTGTTTCGCT GTAAGATACC ACATTTAATA CTATTCOCCT
      Y D Y Y D N C S R N I R D L E N I L E Y
5761 ATAATCGTAG TAGTCATTGC ATGATCTATT TATCTGTCTT AATTCATTTA TTAATCTCAT
      S S E K S M W D L I D R G R S S C L A T
5821 CGAGGACTCC TTACTACTCC AATCTAATAT ATCTCTCTCT CTAGAAGTAC ATACCTTGT
      A N I Y E N E K M M I I E I D E Y S L X
5881 AGCATTATGT TATTCTATT CTTCATCAT AATAATTTCT ATATCTCTGT AACTTAGCTT
      C F N N N I S E V K I E M [ORF3]
5941 ACAAAAGTTA TTATTGATCG ATTCTACTTT GATTTCATA TTGAATAATT GTTATAAGCT
6001 GGAATACAAA TACTTAATTT TCATAATTTG TTAATAACCT AAATATTGTT ATTTCTCTAT
6061 AAAAACCA CA TACAAAACT ATTACATTA TTATCCAGA CAATAGATTA TGTATTITTT
      *
6121 GCGATCGGTA CAAGCAAGTG TTATAAGCA AGTAAATCTG GCTCGAATT CAACATAATC
      K W L M V A K E E S R Y N C R K C P I
6181 ACTTCCACAA CATAACCGCT TTCTCTCCG AGATACGAC ATTACATCTT TTACAGAAAA
      D I W R G K L P Y I K V T D G E Y A C L
6241 TATCAATCCA CCTTCCCTTC AAAAGTAGA TTTTACAGT ATCCCTCTCT ACAGCAGAGA
      Q K P A T F N I N K I I Q L T F C G D E
6301 GCTGTTTAGG AGCGGTAAAG TTATATTTT TTATGATCTG TAATGTAAAA CAACCATCT
      T R G N Q Y N L P D L A S A L I S K M S
6361 CTGTAGGACC GTTTGTGATA TTCAAAGGAT CTAAAGCGGA TGCCAGAATA CTTTTCATCG
      E Q G I Y R V K P K L Y M [ORF8]
6421 ACTCTTGACC TATGTATCTT ACTTTAAAA CCAGCACCAT AATGGATATA TGTAAAGTTC
      * N Q S H Q I S N
6481 AGGTCAGGCT CGCTAGGCAT TTAGTCTGTT TTTCAATTT GTGAATGTTG TATGAATTTG
      S I I S L D T N D L L L V I Q N K I E I
6541 CTGATTATAC TAAGATCTGT GTTATCTAAA AGTAATACTA TTTGTTCTT TATCTCTATG
      P L M D W L R N E L R S N I T Y L A V D
6601 GGCACATAT CTATAAAGT ATTTCCAGC CTGAGTTAA TTGTATAAGC AUCGATCT
      L C K R L N W A S N I A N Q L L S K Y I
6661 AAACATTTTC TTAATTCAT TGTGAATTT ATAGCATTTT GCAATAACGA TTTGTAAATA
      P F S S I N I S S F K D N T V L R S L F
6721 CGGAAGACG AAATATTAAT AGAAGTGAAT TTGTCATTTG TTACTAACCT TGATAGGAAT
      K J N S T T I P I D L S Y R N S I R I E
6781 TTTATATTAC TTGTAGTTAT AAATATATCC AATGAATAC TATTACTAAT TGTATTCTT
      K M R K L E I E C S T K I N Q L L K D N
6841 TTCTCTCTTT TCAGTCTCAT TTCACATGAT GTTTTAATGT TTTGTAGCAA CTATCGTTT
      R I L E M N I G S G P M N R G D L I S F
6901 CTATTAAATT CCATATTAAT CCGGAGGCTT GGCATATTTT TACCATCTAA TACTACTAAA
      D Q L V V Y P I I Y E A S L R S K L I A
6961 TTTTGTAAAC CTACGTAAGG AATTATGAT TCAGCTGATA ACCTAGACTT TAAATAGCG
      N K L P T Y G Y L N I T N P N A G K E L
7021 TTCTTCAGCG GTGTATAACC GTATAAATTA ATGATATTAG GATTAGCGCC TTCTCTAAT
      L L K Y I E P H H V G N D L P T S G I I
7081 AATAATTAA CTATTTCGGG ATGATGTACT CCGTTATCTA AGGGAGTACT TCATATTATC
      K D K A D I S V G Y S L L L N V Y D V S
7141 TTGCTCTTTG CATCAATAGA TACTCCGTAA GAAAGAAGCA GATTTCAGAC ATCCAGCGAA
      G Y A A A N H L P T Y G H I N S I N P D
7201 CGGTATCGCG CGGCATTATG TAAAGGCGTA TATCCGTGGA TATTAGAGAT ATTAGGATCT
      A G K E I L L K S I D K N G C A H M [ORF2]
7261 GCTCTTTCT CTATCAGTAA TTTGCTAATA TCTTGTTC CACAGCGTG CATTAAAGGA
7321 GTCCTCTCTA TGTGTCTTT TATATCCAGC GATGAACCGT ATGAAATTA CCGATTAAAC
7381 GTTCAACGG ATCC

```

图1(续)

处由T突变为G, 1 568和4 518 bp处由C突变为G, 2 162 bp处由C突变为T, 4 675 bp处由G突变为T, 5 728 bp处由C突变为A外, 其余均完全一致。但6 221~7 394 bp同英国HP-438分离株5 996~7 384 bp的同源性仅为46.7%(图2)。与痘苗病毒Copenhagen株基因组全序列^[17]进行同源性分析, 未发现任何有意义的结果。同时我们对11个ORF同痘苗病毒Copenhagen株基因组中所有ORF进行了氨基酸的最大同源性分析, 结果发现ORF1编码的418个氨基酸同C10L有相对较高的同源性, 这同Tomley等人^[5]报道的结果基本一致。

3 讨论

FPV基因组为双股线性DNA, 不具感染性。FPV基因组结构与痘苗病毒基因组具有相似性, 其基因组中间部分的核苷酸序列比较保守, 而不同毒株的基因组在其两端的长度和序列上存在着较大的差异。一般认为, 基因组内部结构保守区的DNA序列编码一些与DNA复制、转录和增殖等有关的重要酶类, 而其两端的侧翼区与病毒毒力、宿主范围相关, 其结构随着毒株的不同来源甚至同一来源的不同的传代方式而不同^[18~20]。与Hp-438株11.2 kb *Bam*H IV片段在其基因组的位置相比, 该7.3 kb *Bam*H IV片段也应位于282E₄株基因组的近末端部位。该片段1~6 220 bp与Hp-438株相应部位同源性达99%以上, 而6 221~7 394 bp与Hp-438株11.2 kb *Bam*H IV片段相应部位同源性仅为46.7%, 这与痘病毒基因组末端变异较大相一致。研究发现, FPV与VV具有相似的启动子结构, 正痘病毒属和禽痘病毒属成员之间的启动子可被各自的RNA聚合酶所识别。本序列中部分ORF的上游序列具有痘苗病毒启动子的特征, 因此我们可以根据痘苗病毒早、晚期强启动子的特征筛选该片段中的强启动子, 进而构建FPV表达载体。

此外, 根据Scott等人^[17]对早期、早/晚期和晚期表达ORF的划分原则我们对7 394 bp中的ORF进行了分析, 认为ORF2, ORF9和ORF10为早期表达的ORF, ORF1和ORF6为早/晚期

6010	6020	6030	6040	6050	6060		6730	6740	6750	6760	6770	6780
HP-438	GGATACAAATCTTAATTTTCATAATTTGTTAATAACCTAAATATTTGTAATTTCTCTAT					HP-438	TGTAATAGGGAAGACGAAATATTAATAGAACTGAATTTGTCATTTGT-TACTAACCTT					
282E4	GGATACAAATCTTAATTTTCATAATTTGTTAATAACCTAAATATTTGTAATTTCTCTAT					282E4	TCAAGCTCTTTATTGCTATATATTCAGATATGTTGTAATTTATTTGTTGGGTAAACAA					
	6000 6010 6020 6030 6040 6050						6710 6720 6730 6740 6750 6760					
	6070 6080 6090 6100 6110 6120						6790 6800 6810 6820 6830 6840					
HP-438	AAAACCACATACAAAATCTTTACATTATTATCCAGACAATAGATTATGGTATTTTT					HP-438	GATACGAATTTTATATTACTTGT-AGTTATAAATATATCCAAATGAATACCT-ATT-ACTA					
282E4	AAAACCACATACAAAATCTTTACATTATTATCCAGACAATAGATTATGGTATTTTT					282E4	TTCCATTTTGTTCATCACCAGTAATTTTTCATCTATAACTCGCATCGGTGATCAATA					
	6060 6070 6080 6090 6100 6110						6770 6780 6790 6800 6810 6820					
	6130 6140 6150 6160 6170 6180						6850 6860 6870 6880 6890 6900					
HP-438	GGGATCGGTACAAGCAAGTGTATAAAGCAAGTAAATCTGGCCTCGAATTCAACATAATC					HP-438	-ATTCTGATTTCTTTCAT-CTTTTCAGTTCTATTTCACATGATGTTTAAATGTTTGTGA					
282E4	GGGATCGGTACAAGCAAGTGTATAAAGCAAGTAAATCTGGCCTCGAATTCAACATAATC					282E4	GCTTCGGCTCTTTCGGATGCCGTGTCG-CAAATCTTTTAATAGATATTTGTAGAAATA					
	6120 6130 6140 6150 6160 6170						6830 6840 6850 6860 6870 6880					
	6190 6200 6210 6220 6230 6240						6910 6920 6930 6940 6950 6960					
HP-438	A-CTTCCACACATAACCGCTTTC-TCTCCGAAGA-TCGGACATTACATCTTTTACAGA					HP-438	GCACTTATCGTTCTTCTTATTAATTCATATTAATCCCGAGCCTGGCATAATTTCTACCAT					
282E4	ACCTTCCACACATAACCGCTTTC-TCTCCGAAGA-TCGGACATTACATCTTTTACAGA					282E4	TGCGATTATC-ATACAGACCTAAT-ATTTTCTAGAATGTTTGCCTAATATGTTCTCAT					
	6180 6190 6200 6210 6220 6230						6890 6900 6910 6920 6930 6940					
	6250 6260 6270 6280 6290 6300						6970 6980 6990 7000 7010 7020					
HP-438	AAATATCAATCCACCTCCCTTCAAAAGTAGATTTTACAGTATCCCTTCTACAG-CA					HP-438	CTAATATACTAAATCTTGAACACTACGTAAGGAATTATGTA--TTGGCTGATAAC-C					
282E4	AGTATTACTAGTCGTTGAAATAAGATGTAGAATTGCCATTATATTATAATTAGTCA					282E4	CAAGATTTTGGATGGTTTAAACACAGGTCCAGAAATGTTGTAAGTTCTGATGCTTTCCG					
	6240 6250 6260 6270 6280 6290						6950 6960 6970 6980 6990 7000					
	6310 6320 6330 6340 6350 6360						7030 7040 7050 7060 7070 7080					
HP-438	CAGAGCTGTTTA--GGAGCGGTAAAGTTTATATTTTATGATCTGTAATGTAAACAAC					HP-438	T-AGACTTAAAGATAGCCTTCTTCAGCGGTGTATAACCGTATAAATTAATGGTATTAGGA					
282E4	CTTATTGTTTATTTTATGATACAGCTCTATCTTCTTTACATCATAG-GCAATATT					282E4	TGTTATTCTCTTAATTCAATTTTACATTTTCAAATACATCTTTAAACGACTTTTGC					
	6300 6310 6320 6330 6340 6350						7010 7020 7030 7040 7050 7060					
	6370 6380 6390 6400 6410 6420						7090 7100 7110 7120 7130 7140					
HP-438	CATCTCTGT-ACGGCGCTTTGATAATT-CAAAGATCTAAAGCGATGCCAGATACT					HP-438	T--TAGCGCTTCTCTAATAATAATTAACTATTTCGG--GATGATGACTCGGTTATC					
282E4	TATCATATATCAGCAATAACAGATATTATATATGTTTAAATAACGGCTTTTA-CGTTTT					282E4	TGTTAATGACTGTCATGTTCTGGAAATCTTTATCCGATGATATTGTAATTGTATAT-					
	6360 6370 6380 6390 6400 6410						7060 7070 7080 7090 7100 7110					
	6430 6440 6450 6460 6470 6480						7150 7160 7170 7180 7190 7200					
HP-438	TTTCATCGACTCTTGACCTATGATCTTACTTTAAAAACAGCACCATAATGGATATATG					HP-438	TAAGGGAGTACTTCTATTTATCTTGTCTTTCATCAATAGATACTCCGTAAGAAAGAAG					
282E4	ATTGATTAAAGAC--GA-CACGGTAACAAAATAATATCTTATATTGTACT--ACATA-G					282E4	TGTCTTAATGCTATGTCGGCTATCAGCATATCCAGGATTCAGATTCTG-GATTGTATC					
	6420 6430 6440 6450 6460 6470						7120 7130 7140 7150 7160 7170					
	6490 6500 6510 6520 6530 6540						7210 7220 7230 7240 7250 7260					
HP-438	TAAGATTGAGTCAAGCTGCTAGGCTAGGCTAGGCTAGGCTAGGCTAGGCTAGGCTAGG					HP-438	CAGATTTACGA-CATGACGGAACCGTATGCCGGCGCATATGTAAGGCGGTATA-TCCG					
282E4	TTAGCAAAATATCTATTAGAATACTTGTGTTG-CCTATGTTTACTTCTAT-ATTGCTATA					282E4	CATATTACAGATCATCTCTAAAGTTGTGTG-TTCTTCATT-CATCAGGGTAACACAATG					
	6480 6490 6500 6510 6520 6530						7180 7190 7200 7210 7220 7230					
	6550 6560 6570 6580 6590 6600						7270 7280 7290 7300 7310 7320					
HP-438	TGGAATTGCTGATTATACTAAGATCTGTGTTATCAAAAGTAATACTATTGGTCTTTA					HP-438	TGGATATTAGAG-ATAATTAGCATGCG-TCCTTCTCTATCAGTAATTTGCTAATATCCT					
282E4	TAAGACTTATCACCTTCAATATTTCTGTTTGTACCATATTCATGACTAGATTTTCTATA					282E4	TTACTATCAGCGCTCTCTTGAGAAACATGCTTACCATATCTATTGTTGTTTGTATA					
	6540 6550 6560 6570 6580 6590						7240 7250 7260 7270 7280 7290					
	6610 6620 6630 6640 6650 6660						7330 7340 7350 7360 7370 7380					
HP-438	TCTCTATGGGCAACATATCCATAAAGTATTTCCAGCCTTGAGTTAAATGTATAAAGAG					HP-438	TGTTTCCACA-CGCGTGCATTAAAGGAGTCTCTCTATGTTGTTTATATCCAGGGAT					
282E4	TCAAAATATATATTAGTATATAAATAATTTTATTCATAGATGTGA--TGTCAA--G					282E4	CGGTAGCACATCGCTGCACAGGGCTTTTCTGAAATAGTCAATGTTTCTCGCGAA					
	6600 6610 6620 6630 6640 6650						7300 7310 7320 7330 7340 7350					
	6670 6680 6690 6700 6710 6720						7390 7400 7410 7420					
HP-438	CGACATCTAAACATTTTCTTAAATTCATTGCTGAATTTATAGCATTTTGAATAAGATT					HP-438	GAACCGTATGAATTAAGCATTAAACAGTTTCAACGGATCC					
282E4	CTCTTTATGCTATATATTCAGT--ATGTTGTATTT---TATTTCATAGATCGGATG					282E4	TCTAGCAACATCCTGCATCTCTGTGCTCTCTTGTCTCAT					
	6660 6670 6680 6690 6700 6710											
	7360 7370 7380 7390											

图2 282E₄株 7.3kb *Bam*H iv片段 6 000~ 7 394 bp 核苷酸序列 HP-438 株 FPV 11.2 kb 中相应序列

同源性比较

表达 ORF。我们在对 ORF 命名时虽然参照国外同类研究的原则,但由于目前所用的软件和我们现有的方法有限,并不能依据 VV 和已报道的 FPV 蛋白的编码偏性来对 7 394 bp 中 11 个 ORF 进行命名。

致谢 本工作为国家“八六三”计划(批准号:101-05-03-1)资助项目。

参 考 文 献

- 1 Boyle D B, Coupar B E H, Gibbs A J, et al. Fowlpox virus thymidine kinase: nucleotide sequence and relationships with other thymidine kinases. *Virology*, 1987, 156: 355~ 365
- 2 Binns M M, Tomley F M, Campbell J, et al. Comparison of a conserved region in fowlpox virus and vaccinia virus genomes and the translocation of the fowlpox virus thymidine kinase gene. *J Gen Virol*, 1988, 69: 1275~ 1283
- 3 顾万钧, 金宁一, 殷 震. 鸡痘病毒 282E₄ 株 2.2 kb TK 基因序列分析. *中国兽医学报*, 1995, 15(1): 43~ 48
- 4 Binns M M, Stenzler L, Tomley F M, et al. Identification by a random sequencing strategy of the fowlpox virus DNA polymerase gene, its nucleotide sequence and comparison with other viral DNA polymerase. *Nucleic Acids Research*, 1987, 15: 6563~ 6573
- 5 Tomley F, Binns M, Campbell J, et al. Sequence analysis of an 11.2 kilobase, near-terminal, *Bam*H IV fragment of fowlpox virus. *J Gen Virol*. 1988. 69: 1025~ 1040
- 6 Tartaglia J, Winslow J, Goebel D, et al. Nucleotide sequence analysis of a 10.5 kbp *Hind* III fragment of fowlpox virus; relatedness to the central portion of the vaccinia virus *Hind* III region. *J Virol*, 1990, 71: 1517~ 1524
- 7 Campbell J I A, Binns M M, Tomley F M, et al. Tandem repeated sequences within the terminal region of the fowlpox virus genome. *J Gen Virol*, 1989, 70: 145~ 154
- 8 Kumar S, Boyle D B. Mapping of a major early/late gene of fowlpox virus. *Virus Res*, 1990, 15: 175~ 186
- 9 Calvert J G, Ogawa R, Yanagida N, et al. Identification and functional analysis of the fowlpox virus homolog of the vaccinia virus p37k major envelope antigen gene. *Virology*, 1992, 191: 783~ 792
- 10 Ogawa R, Calvert J G, Yanagida N, et al. Insertional inactivation of a fowlpox virus homologue of the vaccinia virus F12L gene inhibits the release of enveloped virions. *J Gen Virol*, 1993, 74: 55~ 64
- 11 Binns M M, Boursnell M E G, Tomley F M, et al. Analysis of the fowlpox virus gene encoding the 4b core polypeptide and demonstration that it possesses efficient promoter sequences. *Virology*, 1989, 170: 288~ 291
- 12 Zantinge J L, Krell P J, Derbyshire J B, et al. Partial transcriptional mapping of the fowlpox virus genome and analysis of the *Eco*R I fragment. *J Gen Virol*, 1996, 77: 603~ 614
- 13 Binns M M, Brittan B S, Masan C, et al. Analysis of the fowlpox virus genome region corresponding to the vaccinia virus D6 to A1: location of, and variation in, non-essential genes in poxviruses. *J Gen Virol*, 1990, 71: 2873~ 2881
- 14 顾万钧, 王淑敏, 金宁一, 等. 鸡痘病毒 282E₄ 株基因组 *Bam*H IV片段的克隆及酶切图谱分析. *吉林农业大学学报*, 1995, 17(3): 1~ 8
- 15 顾万钧, 金宁一, 周复春, 等. 鸡痘病毒 282E₄ 株基因组 7.3 kb *Bam*H IV非必需片段的酶谱分析和鉴定. *中国兽医学报*, 1995, 15(2): 193~ 194
- 16 Sambrook F, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 17 Scott J G, Gerard P J, Marion E P, et al. The complete DNA sequence of vaccinia virus. *Virology*, 1990, 179: 247~ 266
- 18 Nazerian K. Structural analysis of unstable intermediate and stable forms of recombinant fowlpox virus. *J Gen Virol*, 1991, 72: 2791~ 2795
- 19 Fatkunmbi O O, Read W M. Evaluation of a commercial modified live fowlpox vaccine for the control of "variant" fowlpox virus infections. *Avian Dis*, 1996, 40(3): 582~ 587
- 20 Mishra S S, Mallick B B. Comparative immunological and genomic characterization of fowlpox virus isolates. *Indian J Exp*, 1996, 34(1): 11~ 17

(1998-10-24 收稿, 1999-03-09 收修改稿)