梅花鹿源 BVDV NS_{2-3} 基因重要区的克隆与序列分析*

温铁锋, 郜玉钢, 王树志, 杜 锐
(吉林农业大学 中药材学院, 吉林 长春 130118)

[摘 要] 根据牛病毒性腹泻病毒(BVDV)NADL 株的序列设计并合成 1 对引物, 对从吉林不同地区分离的 4 株梅花鹿源 BVDV (CCSYD 株、CCJYD 株、CCKCD 株和 JLCYD 株)的 NS_{2-3} 基因进行 RT-PCR 扩增, 并对扩增的片段进行序列分析。结果表明, 国内梅花鹿源 BVDV CCSYD 株属基因 1b 亚型, CCJYD 株、CCKCD 株和 JLCYD 株属基因型待定。

[关键词] 梅花鹿; 牛病毒性腹泻病毒; NS_{2-3} 基因; 序列分析
[中图分类号] S852.65+9.6 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2006)01-0093-04

牛病毒性腹泻病毒(BVDV)与猪瘟病毒(HCV)和羊边界病病毒(BDV)同属黄病毒科瘟病毒属。牛病毒性腹泻病(BVD)呈世界性分布, 在许多养牛业发达的国家尤为严重。国内自 1983 年李佑民首先从牛流产胎儿脾脏中分离出 BVDV (长春 184 株)以来, 几乎各地都有该病的报道[1-8]。BVDV 除引起牛感染发病外, 还可引起羊、猪及许多野生动物感染[9-13]。据 Doyle 等[14]报道, 在调查的 45 种野生反刍动物中, 32 种野生动物 BVDV 血清中和抗体阳性, 鹿科动物的血清中和抗体阳性率达 28%。王新平证实我国鹿群存在不同程度的 BVDV 感染[12]。杜锐等[15-16]的调查结果显示, 国内幼鹿群中 BVDV 感染率达 60%～86.7%, 并在鹿腹泻粪样中查到了 BVDV 粒子。BVDV 基因组长度为 12.3～12.5 kb, 有一个大的开放阅读框架, 编码约 4 000 个氨基酸的多聚蛋白, 其基因序列为: 5′-P_{20}-P_{14}-gP_{48}-gP_{25}-gP_{53}-NS_{2-3} (NS_2/NS_3)-P_{10}-P_{30}-P_{133} (P58/P75)-3′, 其中 P_{14}(C), gP_{48}(E_0), gP_{25}(E_1)和 gP_{53}(E_2)为病毒结构蛋白基因[17]。由于有外源基因的插入, NS_{2-3} 基因区域是目前研究 BVDV 基因分型和致病机理的极其重要的区域。目前, 国内对梅花鹿源 BVDV 的基因分型工作尚未见报道。为了探索梅花鹿源的 BVDV 基因型的差异, 作者开展了梅花鹿源 BVDV NS_{2-3} 基因区的克隆与序列分析研究, 以期为阐明梅花鹿 BVDV 的致病机理及防治该病奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 梅花鹿源毒株和细胞株 CCSYD 株分离于长春双阳地区流产梅花鹿胎儿的肝脏; CCJYD 株、CCKCD 株和 JLCYD 株, 分别分离于长春净月地区、长春宽城地区和吉林昌邑地区患顽固性腹泻的梅花鹿幼鹿的粪便中, 上述 4 株梅花鹿源 BVDV 分离株均为 CP 生物型; MDBK 细胞和 BVDV 的 $C_{24}V$ 标准株均购自中国兽药监察所。

1.1.2 试 剂 RNA 提取剂 Tripure, 反转录酶 *AMV*, Ex*Taq* 和 *Taq* 酶, DL 2000 Mark 和 DL 15000 Mark, dNTP, RNA 酶抑制剂, pMD18-T 载体, T_4 DNA Ligase 酶, *Hin*dⅢ和 *Bam*HⅠ酶, 均购于大连宝生物技术公司; JM 109 感受态大肠杆菌、LB 培养基、质粒提取试剂盒、电泳药品, 均购自北京鼎国生物技术有限公司; 1640 营养液和维特洁回收试剂盒购于宝泰克生物技术公司。

1.2 方 法

1.2.1 病毒的培养和浓缩 在 100 倍稀释的病毒液中按其 1/10 体积量接种长满单层的 MDBK 细胞, 37 ℃感作吸附 1 h, 加含体积分数 2% 胎牛血清的 1640 维持液(胎牛血清为 BVDV 抗体阴性且不

* [收稿日期] 2005-09-14
[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30300256); 吉林省科技发展计划项目(20030552-2)
[作者简介] 温铁锋(1960-), 男, 吉林前郭人, 讲师, 主要从事经济动物疾病研究。
[通讯作者] 杜 锐(1971-), 男, 吉林前郭人, 副教授, 硕士生导师, 主要从事经济动物疾病研究。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

含BVDV), 37 ℃培养 72 h, 将出现细胞病变的病毒细胞培养物反复冻融 3 次, 5 000 r/min 离心 15 min 以除去细胞碎片, 上清液 30 000 r/min 离心 45 min, 沉淀加原病毒液量 1% (体积分数)的 1640 液制备成病毒浓缩液。

1.2.2 引物的设计与合成 根据NADL 株的 NS_{2-3}基因序列, 用 Primer 5.0 软件辅助设计了 1 对引物, 上、下游引物分别设有 *Hin*dⅢ和 *Bam*HⅠ酶切位点。引物的序列及其在NADL 株的位置分别为: 上游 5′GCA AGC TTA GGA GGA ATC TAC GG (4 764～4 779), 下游 5′TAG GAT CCA CCC AAG ATG TTC (5 419～5 399)。引物序列分别位于NADL 株外源插入序列位点(5 152～5 153)的两侧, 理论计算NADL 株扩增出的片段长应为 672 bp, 而NCP 毒株和无外源序列插入的CP 毒株扩增出的片段长应为 402 bp。引物由大连宝生物技术公司合成。

1.2.3 病毒总RNA 的提取 取 250 μL 浓缩病毒液, 按 Tripue 试剂盒上的方法提取病毒总RNA。

1.2.4 反转录 取RNA 提取液 4 μL, 70 ℃水浴 5 min, 再依次加入 RNA 酶抑制剂 1 μL, 5 倍反转录缓冲液 5 μL, dNTP 2 μL, 特异性下游引物 2 μL, 反转录酶 1 μL, 高压灭菌去离子水 14 μL, 42 ℃反应 1 h。

1.2.5 PCR 扩增 取反转录产物 5 μL, 100 ℃变性 5 min, 再依次加入 10 倍 PCR 缓冲液 5 μL, dNTP 2 μL, 特异性上、下游引物各 2 μL, RNA 酶抑制剂 2 μL, $MgCl_2$ 4 μL, 高压灭菌去离子水 26 μL, 液体石蜡 50 μL。95 ℃变性 8 min, 冰浴后加 DNA 聚合酶 1 μL。置 PCR 仪中, 选择以下循环参数: 94 ℃预变性 60 s; 56 ℃退火 60 s, 72 ℃延伸 60 s, 35 个循环; 最后 72 ℃延伸 10 min。取 PCR 产物 6 μL, 与上样缓冲液 1 μL 混匀后, 在 10 g/L 琼脂糖凝胶上电泳, 检测 PCR 产物。

1.2.6 cDNA 片段的克隆与鉴定 将 1.2.5 中扩增的产物用维特洁试剂盒纯化回收后, 再与 pMD18-T 载体连接, 构建 T/NS_{2-3}克隆质粒。按常规方法提取质粒, 重组质粒进行酶切和 PCR 鉴定, 鉴定为阳性时, 送阳性克隆菌到大连宝生物公司测序。

1.2.7 序列分析 应用DNA Star 计算机软件, 将测出的核苷酸序列与已经发表的BVDV 毒株的相应序列用DNA Star 软件进行对比分析, 并对推导的不同株的氨基酸序列进行同源性比较。

2 结果与分析

2.1 4 株梅花鹿源毒株的RT-PCR 扩增、克隆和鉴定结果

4 株梅花鹿源毒株均经RT-PCR 扩增出 1 条约 402 bp 的片段(图 1)。重组 T/NS_{2-3}质粒经 PCR 扩增、酶切均得到 1 条约 402 bp 的片段, 与预计结果相符, 表明获得的重组子是正确的(图 2、图 3)。

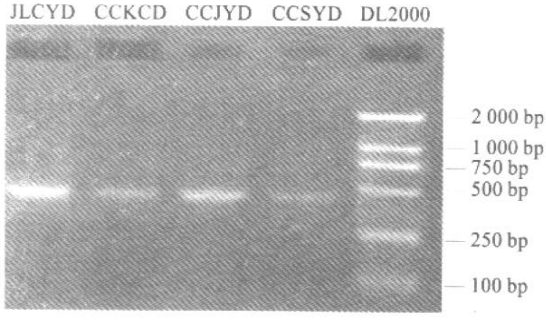

图 1 4 株梅花鹿源毒株 NS_{2-3}基因的 RT-PCR 结果

Fig. 1 Results of the NS_{2-3} gene of CCSYD, CCTYD, CCKCD and JLCYD amplification products by RT-PCR

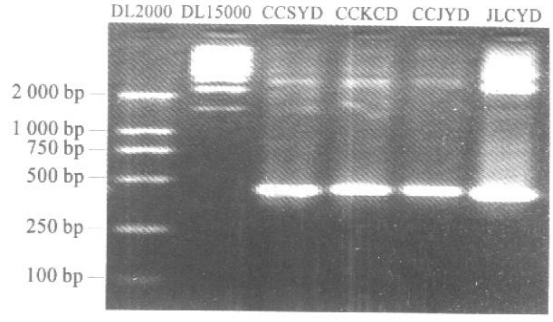

图 2 4 株梅花鹿源毒株的 T/NS_{2-3} 质粒 PCR 电泳鉴定结果

Fig. 2 Identification of T/NS_{2-3} plasmid of CSYD, CCTYD, CCKCD and JLCYD with PCR

2.2 4 株梅花鹿源毒株的核苷酸序列分析结果

CCSYD 株NS_{2-3}扩增区核苷酸序列与BVDV 其他株的同源性依次为: 184 株 99.3%, H 株 96.6%, ZM 95 株 98%, OSLOSS 株 94.9%, Draper 株 92.6%, ILLC 株 92.4%, SNC 株 91.1%, YAK 株 82.3%, D 株 83.0%, 3142 株 84.8%, 3887 株 84.3%, C24V 株 83.2%, NADL 株 83.4%, SD1 株 83%, Singer 株 82.8%, 06-APR-1993 株 77.0%, NY-1 株 75.8%, CCKCD 株 42.3%, CCJYD 株 42.3%, JLCYD 株 42.5%。可见, CCSYD 株与另外

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3 个梅花鹿源毒株之间的核苷酸序列存在着较大差异, 同源性只有 42.3%～42.5%。CCJYD 株、CCKCD 株和 JLCYD 株之间的核苷酸序列同源性则高达99.6%～100%。CCJYD 株、CCKCD 株和JLCYD 株与其他BVDV 株NS2-3重要区核苷酸序列的同源性也在 42.5% 以下。CCSYD 分离株与国外的 ILLC 株、Y546 株、Draper 株、SNC 株及国内的 184 株、ZM 95 株、H 株和OSLOSS 株遗传距离较近, 与国外的C24V 株、NADL 株、R1935 株、SD-1 株及国内的D 株和 Yak 株遗传距离较远, 应为 Ⅰb 基因亚型。

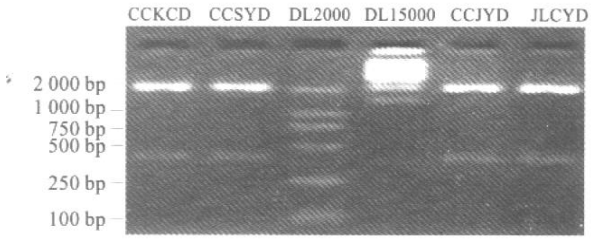

图 3　4 株梅花鹿源毒株的 T/NS2-3 质粒酶切鉴定结果

Fig. 3　Identification of T/NS2-3 plasmid of CCSYD, CCTYD, CCKCD and JLCYD with restriction enzyme digestion

2.3　4 株梅花鹿源毒株的氨基酸序列分析结果

CCSYD 株NS2-3扩增区氨基酸序列与BVDV 其他株的同源性依次为: 184 株 99.4%, H 株 94.5%, ZM 95 株 95.7%, OSLOSS 株 93.3%, Draper 株 93.9%, ILLC 株 93.3%, SNC 株92.0%, YAK 株 88.3%, D 株 90.2%, 3142 株92.0%, 3887 株 89.0%, C24V 株 86.5%, NADL 株88.3%, SD1 株 90.8%, Singer 株 87.1%, 06-APR-1993 株82.8%, NY-1 株 72.4%, CCKCD 株28.2%, CCJYD 株 28.2%, JLCYD 株 28.2%。氨基酸的序列分析结果表明, CCSYD 株的NS2-3重要区蛋白质由 18 个强碱性氨基酸(K, R), 11 个强酸性氨基酸(D, E), 37 个疏水性氨基酸(A, J, L, F, W, V), 28 个极性氨基酸(N, C, Q, S, T, Y)等 116 个氨基酸构成。

3　讨　论

CCSYD 株BVDV 在NS2-3区域中, 既无外源序列的插入, 也无基因重组、重排或缺失, 但存在某些核苷酸的替换, 而另外 3 株则有 47 bp 的外源插入序列和基因重排。表明病毒的致细胞病变作用除与外源序列的插入及基因重组、重排或缺失有关外, 可能还存在其他机制。

CCJYD 株、CCKCD 株和JLCYD 株与CCSYD 株间的核苷酸序列存在着较大差异, 同源性只有 42.3%～42.5%, 与其他BVDV 株NS2-3重要区核苷酸序列的同源性也在 42.5% 以下, 而他们之间核苷酸序列的同源性却高达 99.6%～100%, 说明 CCJYD 株、CCKCD 株和JLCYD 株不存在地域性差别, 其原因有待于进一步研究。该结果表明, 吉林和长春某些鹿场鹿发生的流产和顽固性腹泻病可能与BVDV 感染有关。

根据瘟病毒 5′端非编码区的序列分析, 将BVDV 分为 2 个基因型, 即Ⅰ型和Ⅱ型, 基因Ⅰ型中又分Ⅰa(如 NADL 和 SD1 株)和Ⅰb(如 OSLOSS 株) 2 个基因亚型, 并且证实近年来发生在北美等地的一种以血小板破坏和出血为特征的BVD 新病型多由基因Ⅱ型BVDV 引起[10-11]。作者对国内不同地区分离的BVDV 株NS2-3蛋白编码区的部分序列进行了分析, 结果证实国内毒株存在 2 个基因型和 1 个待定的基因型。其中CCSYD 株、184 株、H 株、ZM 95 株的核苷酸序列与OSLOSS 株的同源性较高, 为Ⅰb 基因亚型; 而D 株、Kak 株与 NADL 株和 SD1 株的同源性较高, 为Ⅰa 基因亚型; CCJYD 株、CCKCD 株、JLCYD 株的基因型待定。所分离的国内 4 个毒株在基因型上与国外报道的基因Ⅱ型不同, 表明目前国内所流行的BVD 可能不是由基因Ⅱ型BVDV 引起的[6]。

[参考文献]

[1]　李佑民, 刘振润, 武银莲, 等. 牛病毒性腹泻-粘膜病毒株(长春 184)的分离与鉴定[J]. 中国人民解放军兽医大学学报, 1983, 3(2): 113-119.

[2]　石世匡. 从新西兰进口冷冻精液中分离出牛病毒性腹泻粘膜病病毒[J]. 兽医药品通讯, 1987(1): 7-9.

[3]　孙颖杰, 袁文泽, 徐景清, 等. 进口西德西门达尔牛BVD-MD4952 病毒的分离与鉴定[J]. 中国畜禽传染病, 1990, 51(2): 5-9.

[4]　糜克永, 丁肖泉、王　蔷, 等. 内蒙古奶牛BVDV 的分离鉴定[J]. 病毒学杂志, 1987(1): 69-74.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

[5] 洛桑列措, 索 巴, 张兹钧, 等. 西藏牦牛病毒性腹泻/粘膜病病毒的分离和鉴定[J]. 中国兽医科技, 1991(1): 32-33.
[6] 陈茂盛, 寇改霞, 蒋宏伟, 等. 乳牛病毒性腹泻- 粘膜病分离毒的鉴定[J]. 中国兽医科技, 1998, 28(8): 42-43.
[7] 申之义. 牛病毒性腹泻- 粘膜病病毒的分离鉴定[J]. 中国兽医杂志, 1993(3): 7-8.
[8] 刘善艺, 茹仙古丽. 牛病毒性腹泻- 粘膜病病毒的分离鉴定[J]. 中国畜禽传染病, 1996, 86(1): 17-20.
[9] Wensvoort G, Terpstra C. Production of monoclonal antibodies against swine fever virus and their use in laboratory diagnosis[J]. Veterinary Microbiology, 1986, 12: 101-108.
[10] Wensvoort G, Terpstra C. Bovine viral diarrhea virus infections in piglets born to sows vaccinated against swine fever with a contaminated vaccines[J]. Res Vet Sci, 1988, 45: 143-148.
[11] 王新平, 刘 工, 宣 华, 等. 绵羊感染牛病毒性腹泻病毒的调查研究[J]. 兽医大学学报, 1993, 13(3): 219-221.
[12] 王新平, 宣 华, 朱维正, 等. 鹿感染牛病毒性腹泻- 粘膜病病毒的调查[J]. 中国畜禽传染病, 1995(4): 41-42.
[13] 王新平, 任文陟, 朱维正, 等. 双抗体夹心 ELISA 检测牛病毒性腹泻病毒抗原的研究[J]. 中国兽医学报, 1995, 15(3): 246-249.
[14] Doyle L G, Heuschele W P. Bovine Viral diarrhea virus infection in captive exotic ruminants[J]. T Am Vet Med Assoc, 1983, 183: 1257-1259.
[15] 杜 锐, 王新平, 宣 华, 等. 从幼鹿顽固性腹泻病料中检出牛病毒性腹泻- 粘膜病病毒[J]. 经济动物学报, 1998, 2(1): 41-43.
[16] 杜 锐, 杜 威, 王树志. 粘膜病病毒感染幼鹿的病原流行病学调查[J]. 吉林农业大学学报, 2000, 22(3): 89-91.
[17] 殷 震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第 2 版. 北京: 科学技术出版社, 1997.

Cloning and sequencing of NS_{2-3} of BVDV on sika deer

WEN Tie-feng, GAO Yu-gang, WANG Shu-zhi, DU Rui

(*College of Chinese Medicine Material, Jilin Agricultural University, Changchun, Jinlin* 130118, *China*)

Abstract: A pair of primers were designed and synthesized according to nucleotide sequence of NADL BVDV. Exogenous sequence insertion domain of NS_{2-3} of CCSYD, CCTYD, CCKCD and JLCYD isolated from different districts of Jilin province was amplified by using RT-PCR. The amplified fragments were cloned and sequenced. Results show that CCSYD strain of BVDV in our country belongs to subtype Ⅰb, but CCJYD, CCKCD, JLYD belong to some unknown gene types.

Key words: sika deer; bovine viral diarrhea virus; NS_{2-3} gene; sequence analysis

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net