

兔出血症病毒浙江分离株核衣壳蛋白基因的克隆及遗传变异分析

朱金梅¹, 刘光清², 倪 征², 云 涛², 余 斌², 张森涛¹

(1 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100; 2 浙江省农业科学院 病毒学与生物技术研究所, 浙江 杭州 310021)

[摘要] **【目的】**探讨兔出血症病毒的遗传变异情况, 为兔病毒性出血症的防治提供理论资料。**【方法】**对1989~2006年7株兔病毒性出血症病毒(RHDV)浙江分离株的核衣壳蛋白基因(VP60)进行了克隆与测序, 同时利用分子生物学软件将其与国内外RHDV的基因组序列进行了比对和分析, 并绘制了系统发生树。**【结果】**此7株RHDV的VP60基因均由1740个核苷酸组成, 编码580个氨基酸, 其与参考序列之间的氨基酸同源性为94.0%~99.8%; 系统发生树分析显示, 所选的RHDV分离株可分为2个基因群, 每个基因群又可分为两个亚群, 其中中国分离株主要位于C亚群, 与欧洲分离株的遗传距离较近, 基因群之间的遗传距离有逐渐加大的趋势。**【结论】**RHDV在长期流行与演化过程中存在一定的遗传变异趋势。

[关键词] 兔病毒性出血症病毒; 衣壳蛋白基因; 系统发生树

[中图分类号] S858.291; S852.65

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2008)01-0028-05

Sequencing and analyzing of the capsid protein gene of seven rabbit Haemorrhagic disease virus(RHDV) isolated from Zhejiang

ZHU Jin-mei¹, NI Zheng², YUN Tao², YU Bin², ZHANG Miao-tao¹, LIU Guang-qing²

(1 College of Veterinary Medicine, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Research Institute of Virology & Biotechnology Ministry, Zhejiang Academy of Agriculture Sciences, Hangzhou, Zhejiang 310021, China)

Abstract: **【Objective】**In order to study the genetic variation of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV), and to provide some useful data to make efficient controlling measures. **【Method】**The capsid protein gene(VP60) of seven RHDV isolated from Zhejiang were sequenced. **【Result】**The nucleotide sequence of the gene was 1740nt in length, encoding a protein of 580aa. The VP60 gene of the seven strains shared high sequence homology (from 94.0% to 99.8%) with those of the reference strains; all the RHDV isolates could be divided into two genetic groups (G_I and G_{II}), which can be divided into two subgroups(A and B; C and D), respectively. Most of Chinese strains located in C subgroup, and showed closer genetic relation with some European strains. Besides, the phylogenetic tree also indicated that RHDV have evolved into different extents. **【Conclusion】**RHDV may exist genetic variation during its epidemic and evolution.

Key words: Rabbit haemorrhagic disease virus; capsid protein gene; phylogenetic tree

兔病毒性出血症(Rabbit hemorrhagic disease, RHD)是由兔病毒性出血症病毒(Rabbit hemor-

rhagic disease virus, RHDV)引起的兔的一种急性、高度致死性传染病。1984年该病首先在我国江

* [收稿日期] 2007-01-12

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30670074); 浙江省自然科学基金项目(Y305047)

[作者简介] 朱金梅(1981-), 女, 湖北荆门人, 在读硕士, 主要从事动物病毒分子生物学研究。E-mail: zhujinmei0041@163.com

[通讯作者] 张森涛(1963-), 男, 陕西礼泉人, 副教授, 博士, 主要从事动物病毒分子生物学研究。E-mail: zmt6371@yahoo.com.cn

苏省无锡、江阴爆发,随后迅速在全世界范围内广泛流行,该病致病率可达 90%,致死率可达 100%,感染病兔多在 48~72 h 内死亡,给养兔业造成了巨大的经济损失,并且严重威胁着濒临灭绝的野兔品种^[1]。该病的病原是一种 RNA 病毒^[2],其是否同其他 RNA 病毒,如禽流感病毒、口蹄疫病毒等一样,在长期与宿主和环境相互作用的过程中,为了生存发展而存在遗传变异现象,其遗传变异趋势如何,这些问题的解决对于研发更为有效的 RHD 疫苗,及时调整 RHD 的防控措施等均具有非常重要的意义。

国外已有关于 RHDV 分子流行病学方面的研究报道^[3-7]。如 Gall 等^[8]曾对法国 1993~2000 年的 104 株 RHDV 分离株进行了系统发生树分析,其研究结果显示,RHDV 不同分离株之间存在不同程度的变异现象,而且 RHDV 基因群的划分与毒株分离年份之间存在一定关系,推测 RHDV 有进一步变异的可能。Moss 等^[9]通过对英国 1955~1964 年保存的 RHDV 的回顾性调查分析发现,RHDV 可能在整个欧洲已经流行了几个世纪,但是其又是如何从非致病性病毒演变为高致病性病毒,并突然在世界范围内爆发,至今尚是未解之迷。有人对阿拉伯半岛的 RHDV 分离株(沙特阿拉伯分离株和巴林分离株)与中国及欧洲的 RHDV 分离株进行了系统发生树分析,发现 RHDV 沙特阿拉伯分离株与中国的 RHDV 具有较近的亲缘关系,推测沙特阿拉伯分离株可能是从中国 RHDV 演变而来,但是 RHDV 巴林分离株却与中国分离株处于截然不同的基因群,表现出较远的亲缘关系,提示在阿拉伯半岛的家兔及野兔群中同时流行着两种 RHDV^[10]。以上研究成果提示,RHDV 病毒表现出复杂的遗传变异特

征,但目前国内尚无关于 RHDV 分子流行病学及遗传变异方面研究的报道。为此,本研究拟对浙江省农科院动物病毒实验室保存的 1989~2006 年的 RHDV 病料进行分子流行病学研究和分析,以期了解我国 RHDV 的遗传变异规律及发展趋势。

1 材料与方法

1.1 材 料

1989~2006 年采自浙江省各地方的 7 份 RHDV (ZJ1989, ZJ1990, ZJ1994, DQ841704, ZJ1998, ZJ2000, ZJ2006)病料兔肝组织、大肠杆菌 DH5 α ,由浙江省农业科学院动物病毒学实验室保存;鼠源反转录酶 Reverse Transcriptase M-MLV (RNaseH⁻)、克隆载体 PMD18-T、Ex-TaqDNA 聚合酶、DNA Marker 和 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit,均购自宝生物工程(大连)有限公司,UNIQ-10 柱式 TRIzol 总 RNA 提取试剂盒,购自上海生工生物工程技术有限公司;其他试剂均为分析纯。

1.2 引物设计与合成

利用 DNASTar 和 Oligo4. 1 引物设计软件,根据参考毒株 Czech351 (GenBank 登录号:U54983) 的基因序列,设计扩增 RHDV 核衣壳蛋白基因的引物(上游引物(P₁): 5'-AGTTACGATGCT-GCTAGAAAG-3',下游引物(P₂): 5'-GCAAGTC-CCAATCCGATGAAT-3'),并由大连宝生物工程

1.3 参考毒株

本研究中所使用的参考毒株序列资料引自 GenBank,其分离株及序列登录号见表 1。

表 1 参考毒株序列资料

Table 1 Information of published RHDV sequence							
分离物 Isolates	来源 Origin	年份 Year	登录号 GenBank	分离物 Isolates	来源 Origin	年份 Year	登录号 GenBank
CD/China	China	2004	AY523410	Wriezen	Germany	1997	Y15427
FRG	English	2000	NC_001543	Triptis	Germany	1997	Y15442
00-13	France	2002	AJ495856	Czech351	Australia	1996	U54983
00-08	Frencce	2001	AJ319594	Haute-Saone	America	1996	U49726
TP	China	2001	AF453761	MC-89	Spain	1996	L48547
Iowa2000	America	2000	AF258618	Italy95	Italy	1995	X87607
New Zealand	New Zealand	2000	AF231353-1	AST/89	Spain	1993	Z24757
00-Reu	English	1999	AJ303106	SD	France	1993	Z29514
99-05	Frencce	1999	AJ302016	Mexico89	Mexico	1989	AF295785
Rainham	Italy	1998	AJ006019	NJ85	China	1985	AY269825
Hartmansdorf	Germany	1997	Y15425	WX84	China	1984	AF402614

1.4 RHDV 浙江分离株 RNA 的提取

取实验室保存的 RHD 病死兔肝组织,用 UNIQ-10 柱式 TRIzol 总 RNA 提取试剂盒提取病毒 RNA,具体操作参照说明书进行。

1.5 RHDV 浙江分离株 RNA 的 RT-PCR 扩增

反转录反应体系 20 μL :病毒 RNA 10 μL , $5\times$ M-MLV Buffer 4.0 μL ,dNTP (10 mmol/L) 1.0 μL ,RNase inhibitor(20 U/ μL) 0.5 μL ,特异性下游引物(50 pmol/ μL) 1.0 μL ,M-MLV (10 U) 1.0 μL ,DEPC 补足体积至 20 μL 。反应条件:70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min,移入 42 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴箱中保温 1 h,然后在冰中冷却 2 min,即获得 cDNA 第一链。

PCR 扩增的反应体系 50 μL : $10\times$ PCR Buffer (含 Mg^{2+}) 5.0 μL ,dNTP (2.5 mmol/L) 4.0 μL ,*Taq* 聚合酶 (5 U/ μL) 0.3 μL ,上、下游引物 (50 pmol/ μL) 各 1.0 μL ,Template cDNA 2.5 μL ,ddH₂O 36.2 μL 。PCR 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。反应结束后,取 2 μL PCR 产物进行 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳,于凝胶成像仪下观察并记录结果。

1.6 RHDV 浙江分离株核衣壳蛋白基因的克隆与鉴定

PCR 产物按 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit 说明的方法进行纯化回收,回收后的 PCR 产物与 PMD18-T 载体进行连接,连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,涂板后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 12 h,长出单克隆后经 PCR 扩增法筛选出阳性克隆,送交宝生物工程(大连)有限公司进行核苷酸序列测定。

1.7 RHDV 浙江分离株的遗传变异分析

应用 DNASTar 软件包中的 MegAlign 程序,对 RHDV 参考毒株的核衣壳蛋白基因序列进行多序列比对,同时根据其遗传距离绘制系统进化树,然后根据以上信息对 RHDV 的遗传变异性进行分析。

2 结果与分析

2.1 RHDV 浙江分离株核衣壳蛋白基因的克隆与鉴定

对提取的 7 株 RHDV 浙江分离株 RNA 进行 RT-PCR 扩增,通过琼脂糖凝胶电泳可见扩增条带与预期扩增片段大小一致,均为 1 740 bp(图 1)。测序结果表明,分离的 7 株 RHDV 的核衣壳蛋白基因核苷酸序列长度均为 1 740 bp,编码 580 个氨基酸

残基。

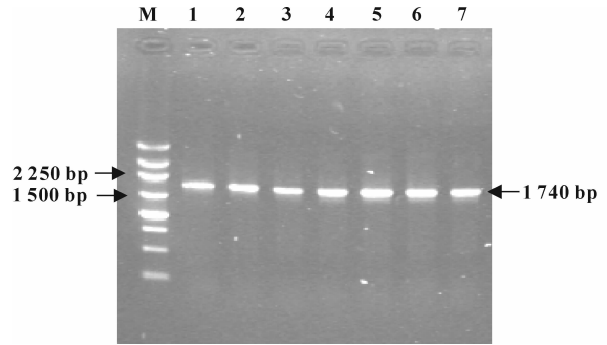


图 1 RHDV 核衣壳蛋白基因的 PCR 产物

M. 250 bp Marker;1~7. PCR 产物

Fig.1 PCR product of RHDV capsid protein gene

M. 250 bp Marker;1~7. PCR products

2.2 RHDV 浙江分离株核衣壳蛋白基因与国内其他毒株的同源性分析

同源性分析结果表明,分离自浙江的 7 株 RHDV (ZJ1989, ZJ1990, ZJ1994, DQ841704, ZJ1998, ZJ2000, ZJ2006) 与国内报道的其他 5 株 RHDV (CD 株 (AY523410)、TP/2001 株 (AF453761)、NJ/85 株 (AY269825)、WX/84 株 (AF402614)) 核衣壳蛋白基因核苷酸的同源性为 92.5%~100%,核衣壳蛋白氨基酸的同源性为 94.8%~100%;国内 RHDV 分离株与 19 株国外 RHDV 分离株的核衣壳蛋白基因核苷酸的同源性为 90.4%~98.3%,核衣壳蛋白氨基酸的同源性为 94.1%~99.7%。

2.3 RHDV 核衣壳蛋白基因的进化树分析

系统进化树分析结果(图 2)显示,浙江省的 RHDV 与所选用的 RHDV 参考毒株,可被分为 2 个明显的基因群 G_I 和 G_{II} ,其中 G_I 可细分为 A 和 B 2 个亚群, G_{II} 可进一步划分为 C 和 D 2 个亚群。从系统发生树(图 2)中可以看出,RHDV 各分离株没有地域或时间特征,而是在谱系中相互交叉存在。总的来说,RHDV 中国分离株主要分布在 G_{II} 的 C 亚群中,包括 5 个 RHDV 浙江分离株和中国早期毒株 CD 株、TP 株,提示中国 RHDV 各分离株之间具有较近的亲缘关系。 G_{II} 的 D 亚群则主要为一些欧洲分离株,也有美国分离株和中国早期的分离株。本试验中分离的另 2 个分离株(ZJ1994 株和 ZJ1989 株)及中国最早报道的 WX/84 株却处在相隔较远的 G_I 中的 B 亚群。

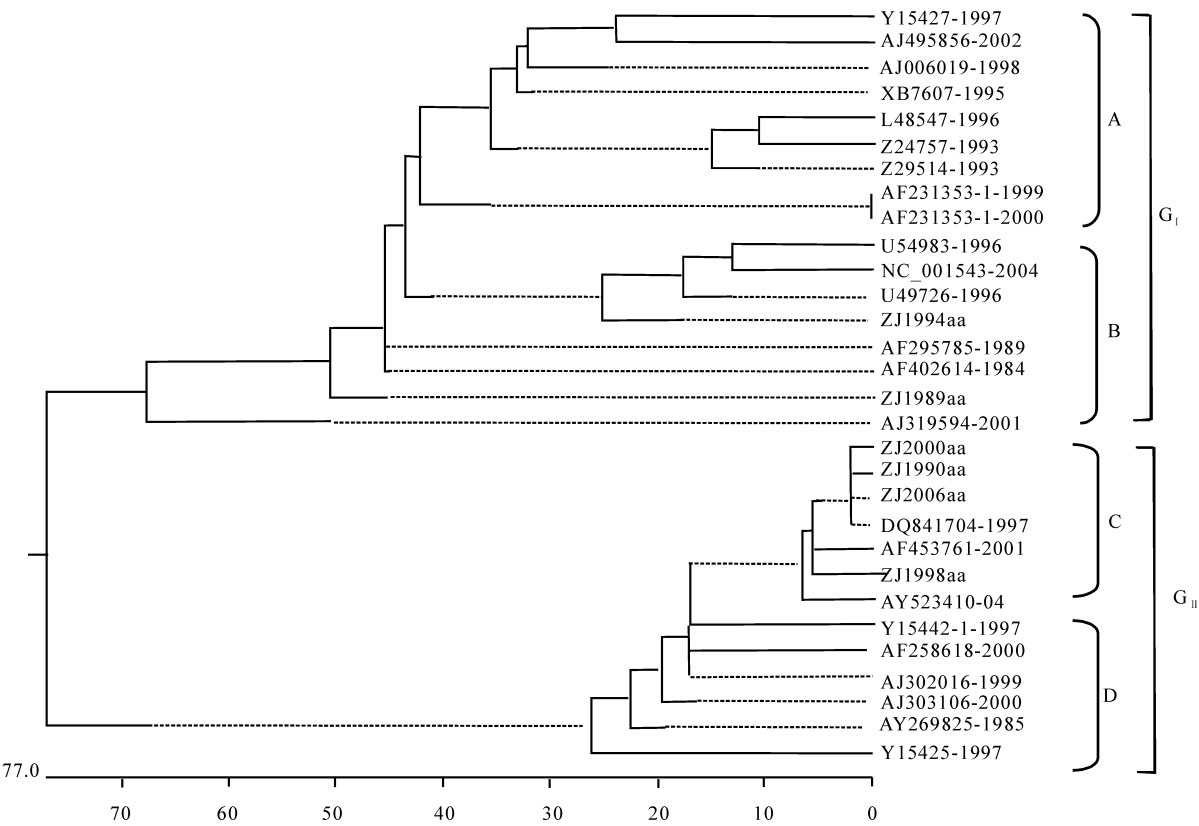


图 2 RHDV 核衣壳蛋白基因的系统进化发生树分析
Fig. 2 Phylogenetic tree analysis of RHDV capsid protein gene

3 讨 论

本试验对保存的 1989~2006 年的 7 株浙江 RHDV 核衣壳蛋白(VP60)基因进行了序列测定和比对,探讨了其遗传变异情况,同时与国内外的 RHDV 分离株进行了遗传演化分析,结果表明,所有 RHDV 分离株核衣壳蛋白的基因序列均具有 90%以上的同源性。作为 RHDV 的主要结构基因,VP60 基因在高抗体水平等环境选择压力下,应该是很容易发生变异的区域。而 RHDV 在过去的 20 多年间,仍然能保持如此高的序列同源性,这的确令人迷惑。很多学者对此的解释是:RHDV 是一种急性、高度致死性病毒,在兔体内停留的时间较短,没有足够的时间让病毒发生一些有利于进化的变异。但是也有很多学者认为该解释还有待证实^[11]。

本试验对 RHDV 系统进化的分析发现,中国的 RHDV 与欧洲株具有较近的亲缘关系;从进化树上还可以看出,虽然 RHDV 是一种比较保守的病毒,但随着年代的延长,似乎也有逐渐变异的趋势,尤其是近年来所分离的 RHDV,其所处位置越来越远离于国外分离株和国内早先报道的 NJ/85 株和 WX/

84 株。

通过对国内外 RHDV 分离株基因组序列的分析,有助于研究 RHDV 的起源与分子流行态势等,这也是人们一直关注的问题。在 1984 年中国首次爆发 RHD 以前,人们对该病一无所知,于是有人假定 RHD 来自中国^[12]。然而,越来越多的血清学和分子生物学证据表明,该假设值得质疑^[13]。例如 1990 年,Rodak 等^[14]在首次爆发 RHD 12 年前的欧洲所保存的兔血清中检测到了 RHDV 的抗体,他们认为这应该与强毒株的感染有关,即 RHDV 在中国爆发 RHD 以前的欧洲就已经存在,然而当时兔群中并没有爆发 RHD。目前关于 RHDV 的起源问题,还没有统一的定论,但有一点很值得关注,即现在流行的高致病性 RHDV 很可能是由非致病性的 RHDV 变异而来的^[15-16],导致其发生剧烈变异而获得强致病性的原因,以及其变异机制与近年变异速度放慢的原因,都是亟需研究的问题。

〔参考文献〕

[1] 刘光清,张玉颖,云 涛,等.兔病毒性出血症基因组 3'端非编码区的分子克隆及生物信息学分析[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2006,34(3):15-20.

Liu G Q,Zhang Y Y,Yun T,et al. Cloning and analyzing of the secondary structure of 3' un-coding region of RHDV[J]. Journal of NWSUAF;Natural Science Edition,2006,34(3):15-20. (in Chinese)

[2] 杜念兴,徐为燕,刘胜江. 一种新病毒——兔出血症病毒的鉴定初报[J]. 病毒学报,1986,2(2):146-152.

Du N X,Xu W Y,Liu S J. A new virus—Identification of rabbit hemorrhagic disease[J]. Virol,1986,2(2):146-152. (in Chinese)

[3] Lawson M. Rabbit virus threatens ecology after leaping the fence [J]. Nature,1995,378;531.

[4] Meyers G. Translation of the minor capsid protein of a calicivirus is initiated by a novel termination-dependet reinitiation mechanism[J]. J Biol Chem,2003,278;34051-34060.

[5] Pennisi E. Rampaging rabbit virus-again[J]. Science,1997,277;1441.

[6] Cubbitt D,Bradley D W,Carter M J,et al. 1995 family caliciviridae[J]. Arch Virol,1995,10;359-363.

[7] 刘光清,倪 征,张玉颖,等. 兔病毒性出血病毒 JX/97 株衣壳蛋白基因的序列测定与分析[J]. 农业生物技术学报,2006,14(2):191-196.

Liu G Q,Ni Z,Zhang Y Y,et al. Sequencing and analyzing of the capsid protein gene of rabbit hemorrhagic disease JX/97 [J]. Journal of Agri Bio-tec,2006,14(2):191-196.

[8] Gall G L,Zwingelstein F,Laurent S,et al. Phylogenetic annalysis of rabbit haemorrhagic disease virus in France between 1993 and 2000,and the characterisation of RHDV antigenic variants [J]. Arch Virol,2003,148;65-81.

[9] Moss S R,Turner R C,Trout P J,et al. Molecular epidemiology of rabbit haemorrhagic disease virus[J]. Journal of General Virology,2002,83;2461-2467.

[10] Ohlinger V F,Hass B,Meyers G,et al. Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease[J]. J Virol,1991,64;3331-3336.

[11] Morales M,Barcena J,Ramirez M A,et al. Torres. Synthesis in vitro of rabbit hemorrhagic disease virus subgenomic RNA by intenal initiation on (-) sense genomic RNA [J]. Biol Chem,2004,279;17013-17018.

[12] Farnos O,Boue O,Parra F. High-level expression and immunogenic properties of the recombinant rabbit hemorrhagic disease virus VP60 capsid protein obtained in pichia pastoris [J]. Journal of Biotechnology,2005,117(3):215-224.

[13] Forrester N,Trout R,Turner S. Unravelling the paradox of rabbit haemorrhagic disease virus emergence, using phylogenetic analysis; possibke implications for rabbit conservation strategies[J]. Biological Conservation,2006,131;296-306.

[14] Rodak L,Smid B,Valicek L,et al. Enzyme-linked immunosorbent assay of antibodies to rabbit haemorrhagic disease virus and determination of its major structural proteins[J]. Journal of General Virology,1990,71;1075-1080.

[15] Mitro S,Krauss H. Rabbit hemorrhagic diseasa: a review with special reference to its epizootiology[J]. Eur J Epidemiol,1993,9: 70-78.

[16] Nowotny N,Ros B C,Ballagi P A,et al. Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease and European brown hare syndrome viruses by comparison of sequences from the capsid protein gene[J]. Arch Virol,1997,142;657-673.