

猪源狂犬病病毒 N 和 G 基因的序列分析

张莹, 刘祥茵, 罗永文, 杨先峰, 黄永亮, 施赫赫,
傅秋玲, 阳佑天, 吴晓薇, 郭霄峰
(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:通过对新分离的猪源狂犬病病毒 GD-SH01 株 N 基因和 G 基因进行序列分析,解析它们与其他狂犬病病毒 N 和 G 基因的差异. 提取猪源狂犬病病毒 GD-SH01 株的总 RNA,采用 RT-PCR 的方法扩增 N 基因和 G 基因,并与 T 载体连接,克隆至大肠埃希菌 DH5 α . 测序后与国内外部分毒株的 N 基因和 G 基因进行核苷酸序列和氨基酸序列比对. 与其他毒株相比,N 基因核苷酸相似性为 84.3% ~ 98.0%;氨基酸相似性为 92.5% ~ 99.3%. G 基因核苷酸相似性为 80.4% ~ 98.2%;氨基酸相似性为 87.8% ~ 99.6%.

关键词:狂犬病病毒;核蛋白基因 N;糖蛋白基因 G;序列分析
中图分类号:S855.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2012)04-0544-06

Analysis of N and G Gene of Rabies Virus Isolated from Pig

ZHANG Ying, LIU Xiang-yin, LUO Yong-wen, YANG Xian-feng, HUANG Yong-liang,
SHI He-he, FU Qiu-ling, YANG You-tian, WU Xiao-wei, GUO Xiao-feng
(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract:To understand the difference of the nucleoprotein (N) gene and glycoprotein (G) gene between the strain of pig origin and other rabies viruses. The N and G genes of rabies virus isolated from the brain of a rabid pig in Guangdong Province were amplified by RT-PCR, cloned, sequenced and compared with the genes of other rabies virus. The results showed that the sequence of nucleotides and amino acids of N genes of GD-SH01 shared 84.3% – 98.0% and 92.5% – 99.3% similarity, and G genes of GD-SH01 shared 80.4% – 98.2% and 87.8% – 99.6% similarity, respectively, compared to other viruses.

Key words: rabies virus; nucleoprotein gene; glycoprotein gene; sequence analysis

狂犬病是由狂犬病病毒(Rabies virus, RV)引起的重要人兽共患病,能引起人和哺乳动物的急性致死性中枢神经系统疾病,病死率几乎 100%^[1]. 人和所有温血动物如狗、猫、猪、牛、马及野生动物如狼、狐、貉、臭鼬、豺、蝙蝠和啮齿类动物等,包括鸟类皆可感染. 目前关于狂犬病病毒感染其他哺乳动物的国内外报道越来越多,比如鹿、老鼠、猪等中都发现并分离了狂犬病病毒^[2-5],所以狂犬病越来越受到人们的重视.

RV 基因组为一条负链 RNA,含 5 个结构蛋白基因,即核蛋白基因(N)、基质蛋白基因(M)、磷酸化蛋白基因(P)、糖蛋白基因(G)和转录酶蛋白基因(L). 其中编码核蛋白的基因是狂犬病病毒中保守性最高的基因,N 蛋白的抗原性和 N 基因序列已作为狂犬病病毒分型和狂犬病诊断的重要依据. G 基因编码的糖蛋白是诱导动物机体产生中和抗体的主要免疫原,是疫苗研究的首选免疫基因. 此外,糖蛋白还具有血凝(HA)、细胞融合和免疫溶解(IL)作

用^[6-8]. 本研究克隆和测定了猪源狂犬病病毒 GD-SH01 广东分离株的 N 基因和 G 基因序列,并与其他狂犬病病毒进行了比较.

从猪源狂犬病病毒 GD-SH01 株 N 和 G 基因进化树和氨基酸序列分析得出不同基因型甚至同一基因型不同基因亚型之间的毒株在一些关键的氨基酸位点有所不同,所以对狂犬病病毒毒株进行基因序列分析,跟踪病毒的变异特点,是十分必要的^[9]. 同时狂犬病病毒基因的进化研究能够揭示病毒流行病学特点和规律,为有效防控狂犬病提供科学依据,为狂犬病野毒分离株的研究提供有价值的资料.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒、细胞、试验动物、质粒和菌种 街毒猪源狂犬病病毒 GD-SH01 株由华南农业大学兽医学院微生物实验室分离、鉴定并保存. 该毒株接种 6 周龄成鼠,12 d 后全部死亡. 大肠埃希菌 DH5α 菌株、仓鼠肾细胞(BHK-21)由华南农业大学兽医学院微生物实验室保存. pMD18-T Vector 为北京全氏金生物技术有限公司产品. 3 日龄 SPF 级昆明乳鼠(带母鼠),购自中山大学医学院实验动物中心.

1.1.2 主要试剂 AMV Reverse Transcriptase、RNA 酶抑制剂、4 × dNTP 为 TOYOBO 公司产品;DNA 凝胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒为天根生化科技(北京)有限公司产品;高保真 rTaq 酶、DNA Marker DL2000 为北京全氏金生物技术有限公司产品;引物由上海捷锐有限公司合成.

1.2 方法

1.2.1 PCR 引物的设计及合成 参照 NCBI 已经注册的狂犬病病毒全基因组序列(AB085828 GQ918139),通过比较 N 基因、G 基因的保守区域,用引物设计软件分别设计 N 基因和 G 基因的 2 对引物,由上海捷锐有限公司合成. N 基因的引物编号为 GP-NF1、GP-NF2、GP-NF3、GP-NF4;G 基因的引物编号为 GP-GF5、GP-GF6、GP-GF7、GP-GF8(引物详见图 1 和表 1).

1.2.2 猪源狂犬病病毒 GD-SH01 株的增殖 用 DMEM 按体积比 1:100 的比例稀释猪源狂犬病病毒,然后以微量注射器以 0.03 mL/只的剂量颅内接种 3 日龄乳鼠,同时颅内注射同剂量的 DMEM 作阴性对照. 取濒临死亡的乳鼠鼠脑,研磨后迅速置于

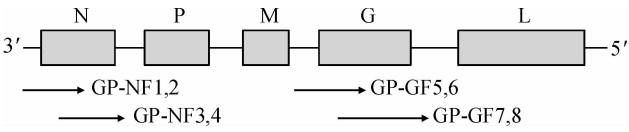


图 1 扩增 RV GD-SH01 株 N 和 G 基因的 ORF 片段的位置
Fig. 1 The amplified domain of N and G genes ORF

表 1 N、G 基因引物序列

Tab. 1 The primers used for amplification of N and G genes

引物	引物序列(5'-3')	预计范围/bp
GP-NF1	GGATCCACGCTTAACAAC	1 ~ 806
GP-NF2	ATGAACCCTGTAAACGAT	
GP-NF3	CACAGTCGTCACCGCTTAT	
GP-NF4	GAGGGAAACTTGTACTTCTTGG	
GP-GF5	ATCGCTCATCATCAGATTGCT	2 114 ~ 3 498
GP-GF6	AACTCGGACAGGTTGGTA	
GP-GF7	TATGGTCTGACATGTCTCTTC	3 440 ~ 4 995
GP-GF8	ACCGACACTTTCCTCCCTG	

-80 ℃ 条件保存备用.

1.2.3 病毒 RNA 的抽提及反转录 参照文献^[10] 用 Trizol 法提取小鼠脑组织混合悬液总 RNA,利用 AMV 反转录酶进行逆转录. 在 PCR 管中分别加入 5 × AMV Buffer 4 μL、dNTPs (10.0 mmol /L) 2 μL、RNA 酶抑制剂 0.5 μL、上游引物 2 μL、AMV 反转录酶 1 μL、模板 RNA 10.5 μL,在 42 ℃ 水浴作用 1 h,获得的 cDNA 直接用于 PCR.

1.2.4 N 和 G 基因的扩增和纯化 分别以 GP-NF1、GP-NF2 和 GP-NF3、GP-NF4 和 GP-GF5、GP-GF6 和 GP-GF7、GP-GF8 为引物,以反转录产物为模板,配制反应体系,进行 N 基因和 G 基因扩增. N 基因反应程序:94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 30 s,50 ℃ 45 s,72 ℃ 90 s、循环 30 次,最后 72 ℃ 延伸 8 min;G 基因反应程序:94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 30 s,53 ℃ 45s,72 ℃ 90 s、循环 30 次,最后 72 ℃ 延伸 8 min,PCR 产物置于 -20 ℃ 条件保存. 参照胶回收试剂盒操作手册,对扩增产物进行纯化.

1.2.5 N 和 G 基因的克隆、质粒 PCR 鉴定及序列分析 PCR 反应产物与 pMD18-T 连接后转化 DH5α 感受态细胞,挑取单菌落进行菌落 PCR 鉴定. 提取重组质粒,进行质粒 PCR 鉴定,分别将鉴定为阳性的 pMD18-T-RVN1、pMD18-T-RVN2 和 pMD18-T-RVG1、pMD18-T-RVG2 重组质粒送上海英骏生物公司测序. 利用 DNASTar 软件分析克隆片段并与 GenBank 中注

册的部分 RV 的 N 和 G 基因、氨基酸序列进行比对.

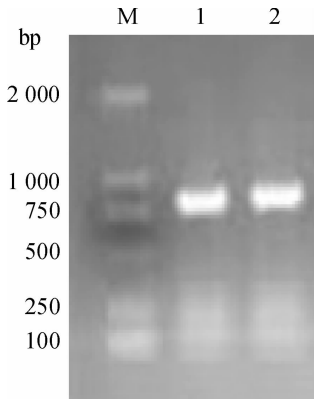
2 结果与讨论

2.1 街毒的增殖

将猪源狂犬病病毒颅内接种 3 日龄乳鼠,接种后 6~10 d 乳鼠出现典型的狂犬病神经症状,在发病后 2 d 内全身麻痹死亡,取濒临死亡或死亡鼠的脑组织,制备成乳液用于病毒核酸的抽提. 对照组正常.

2.2 猪源狂犬病病毒 N 基因和 G 基因的克隆扩增

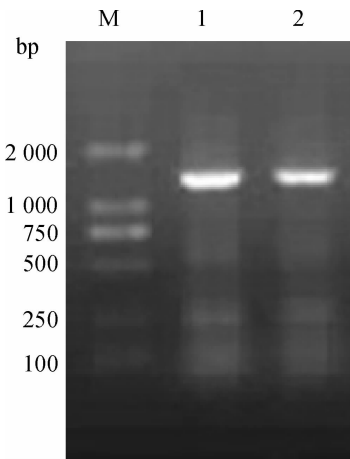
为了获得猪源狂犬病病毒 N 基因和 G 基因完整开放阅读框,以 Trizol 提取狂犬病病毒的 RNA,以之为反转录模板,应用 RT-PCR 方法分别扩增 N 基因和 G 基因. 琼脂糖凝胶电泳结果显示,扩增出与预期大小相符的特异目的带,N1 片段 806 bp(图 2)、N2 片段 1 412 bp(图 3)、G1 和 G2 片段分别为 1 384 bp 和 1 555 bp(图 4),4 条 PCR 产物的大小与理论值相符.



M:DNA marker DL2000;1,2:RT-PCR 扩增的 RVN1.

图 2 N1 片段 RT-PCR 扩增结果

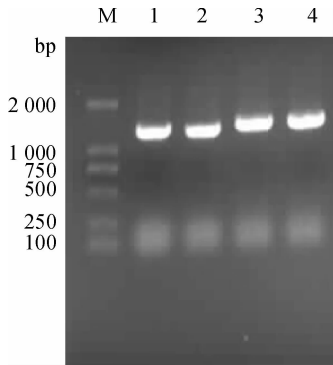
Fig. 2 RT-PCR amplification of N1 products



M:DNA Marker DL2000; 1,2:RT-PCR 扩增的 RVN2.

图 3 N2 片段 RT-PCR 扩增结果

Fig. 3 RT-PCR amplification of N2 products



M:DNA marker DL2000;1,2:RT-PCR 扩增的 RVG1;3,4:RT-PCR 扩增的 RVG2.

图 4 G1 和 G2 片段 RT-PCR 扩增结果

Fig. 4 RT-PCR amplification of G1 and G2 products

2.3 重组质粒的序列测定

分别将鉴定为阳性的重组质粒 pMD18-T-RVN1、pMD18-T-RVN2 和重组质粒 pMD18-T-RVG1、pMD18-T-RVG2 送上海英骏生物公司测序并分别拼接. 结果显示猪源狂犬病病毒 N 基因由 1 353 个碱基组成,G 基因由 1 575 个碱基组成,基因序列已提交 GenBank,注册号 JX088694.

2.4 与其他 RV 的 N 基因核苷酸序列相似性比较

猪源狂犬病病毒 GD-SH01 株 N 基因 cDNA 阅读框全长 1 353 bp,编码 450 个氨基酸. GD-SH01 株 N 基因核苷酸序列与 GenBank 中注册号为 DQ866120 广西毒株 N 基因相比核苷酸相似性最高,达到 98.0%. 与注册号为 EU311738 株 N 基因相比核苷酸相似最低,只有 84.3% (图 5).

2.5 猪源狂犬病病毒 (GD-SH01) N 基因 ORF 遗传进化树

以 DNASTar 分析狂犬病病毒 GD-SH01 株 N 基因与其他狂犬病病毒的生物进化关系(图 6),结果显示:GD-SH01 株 N 基因属于 B 组进化枝,与该组核苷酸相似性为 89.6%~98.0%;与 A 组进化枝核苷酸相似性为 85.5%~88.0%;与 C 组进化枝核苷酸相似性为 84.3%~84.9%. GD-SH01 株与广西毒株 GXSL/HN10 在同一分支枝上,证明亲缘关系较近. 该分枝又与中国疫苗株 CTN181 和湖北毒株 HBCTN7 处于另一分支.

2.6 猪源狂犬病病毒 (GD-SH01) N 蛋白氨基酸序列分析

GD-SH01 株 N 蛋白氨基酸序列在狂犬病毒演变中相对保守,各毒株间的差异较小. 从 N 蛋白氨基酸

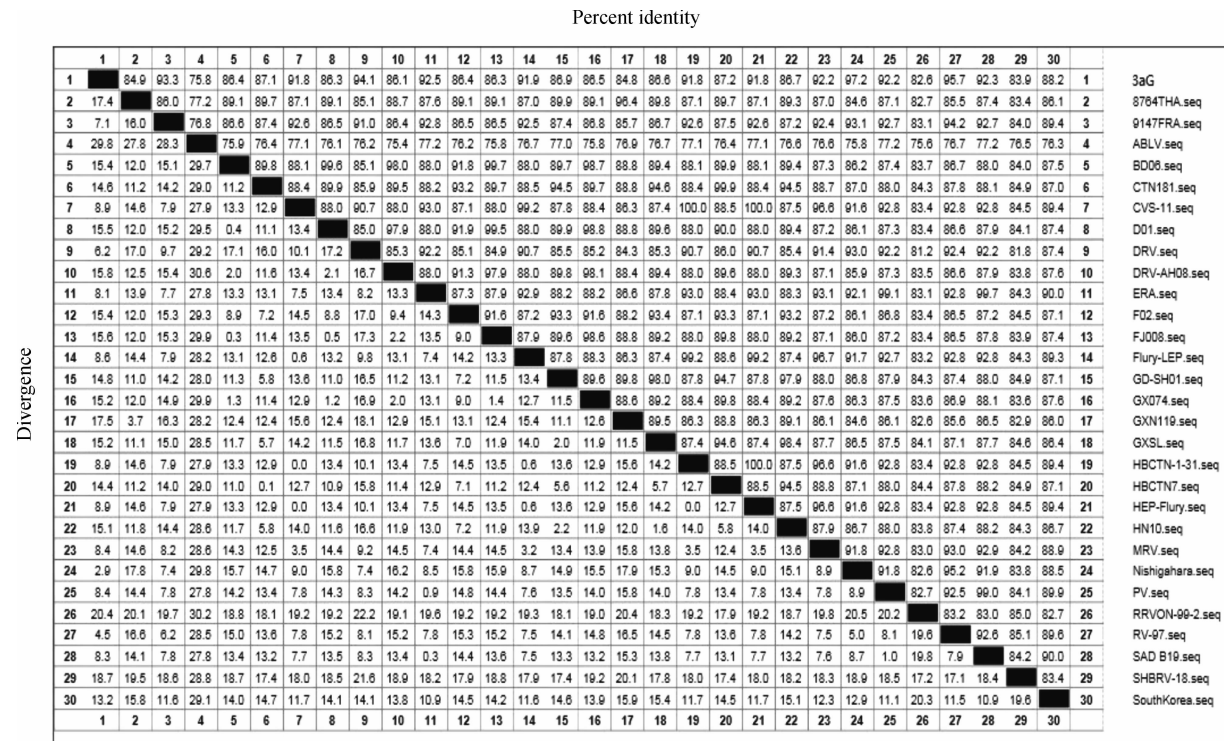


图5 N 基因核苷酸序列比对结果

Fig. 5 Percentage homology comparison of nucleotide sequence of N genes

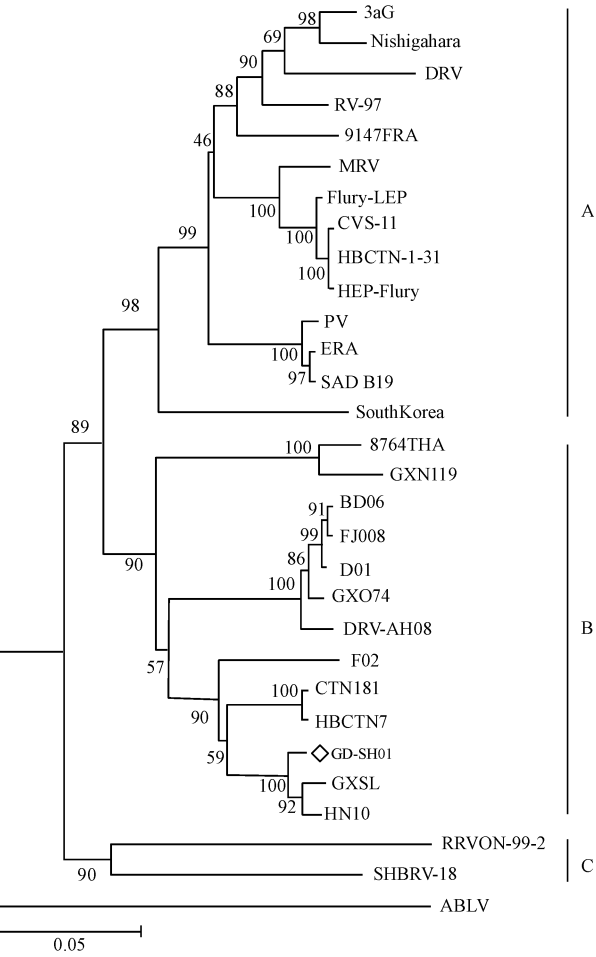


图6 N 基因 ORF 的遗传进化树

Fig. 6 The phylogenetic tree of N genes of rabies virus

序列比较分析,氨基酸相似性差异不大,表明不同地域,不同宿主分离的狂犬病病毒 N 蛋白序列高度保守.

2.7 与其他 RV 的 G 基因核苷酸序列的比较

猪源狂犬病病毒 GD-SH01 株 G 基因 cDNA 阅读框全长 1 575 bp,编码 524 个氨基酸. 本研究中所测 GD-SH01 株 G 基因核苷酸序列与 GenBank 中注册号为 DQ849071 广西毒株 G 基因相比核苷酸相似性最高,达到 98.2%. 与注册号为 AY705373 美国毒株 G 基因相比核苷酸相似性最低,只有 80.4%. GD-SH01 株 G 基因序列与江苏、湖南、湖北、江西、安徽等毒株 G 基因核苷酸相似性在 89.0% 以下. 序列差异性较大,表明 G 基因易发生变异(图 7).

2.8 猪源狂犬病病毒 GD-SH01 株 G 基因 ORF 遗传进化树

猪源狂犬病病毒 GD-SH01 株属于 A 组进化枝,与 A 组进化枝核苷酸相似性为 98.2% ~ 87.4%;与 B 组进化枝核苷酸相似性为 84.6% ~ 82.9%;与 C 组进化枝核苷酸相似性为 81.3% ~ 80.4%. GD-SH01 株与广西毒株 GX4G、HN10 毒株处于同一个分枝上,证明其亲缘关系较近. 该分枝又与中国疫苗株 CTN181 处于另一分枝,证明其亲缘关系较近. 该分枝又与中国疫苗株 CTN181 处于另一分枝. 与其他国家疫苗株 HEP-Flury、CVS-11、RV-97、PV、ERA 等处不同进化枝. GD-SH01 株在亲缘关系上与广西分离的毒株最近(图 8).

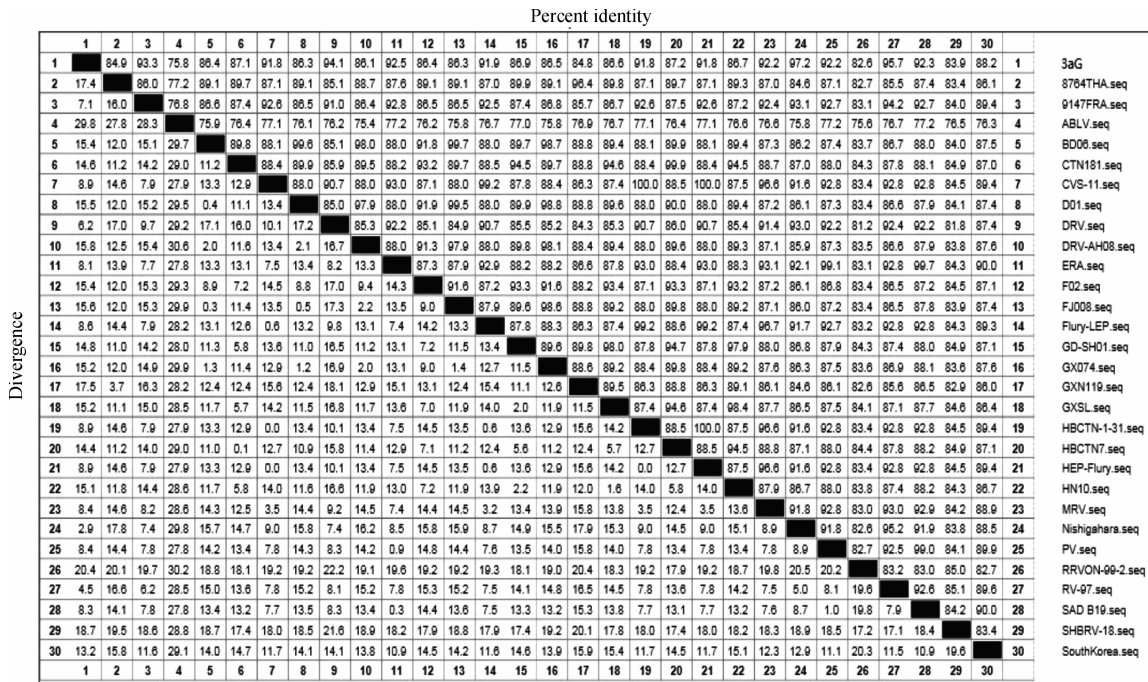


图 7 G 基因核苷酸序列比对结果

Fig. 7 Percentage homology comparison of nucleotide sequence of G genes

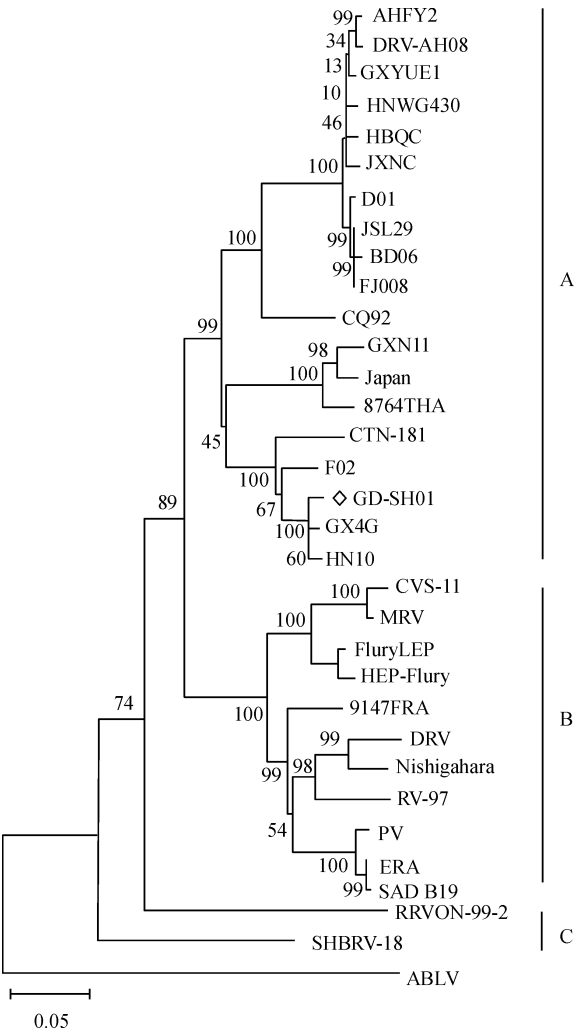


图 8 G 基因 ORF 的遗传进化树

Fig. 8 The phylogenetic tree of G genes of rabies virus

2.9 猪源狂犬病病毒 GD-SH01 株 G 蛋白氨基酸序列分析

G 蛋白是狂犬病病毒主要刺激宿主产生中和抗体的蛋白,目前明确的 G 蛋白中和抗原点有 I、II、III (即 G I、G II、G III), G I 只含有一个表位,是次要抗原位点;G II 位于 34 ~ 200 位氨基酸区段,其中含 2 个主要表位(34 ~ 42 和 198 ~ 200 区段)^[11]. 氨基酸序列比对结果显示,本文参考的 G 蛋白毒株在第 34 ~ 42 位抗原表位完全一致,在第 198 ~ 200 位氨基酸只有少数个别发生变化,说明不同狂犬病病毒毒株抗原表位 G I 无论在地域,还是宿主分布等特征几乎没有进化. G III 大致位于 330 ~ 357 区段,是最主要的抗原区,也是空间依赖性抗原位点. 氨基酸序列比对结果显示,本文参考的 G 蛋白毒株在 330 ~ 357 位抗原位点差异显著,其中与抗原关系最大的为第 333、336、339、357 位残基. GD-SH01 毒株在第 333 位与国内外疫苗毒株的氨基酸都是丝氨酸,其他毒株为谷氨酸. GD-SH01 毒株在第 336 位为组氨酸,除去 CQ92 毒株为酪氨酸之外其他毒株都与 GD-SH01 毒株氨基酸一致. GD-SH01 毒株在第 357 位与国内外疫苗毒株的氨基酸都是天冬氨酸,其他毒株为天冬酰胺.

3 讨论

狂犬病病毒几乎感染所有的温血动物,在中国发现的宿主有犬、狼、狐狸、猪、猫、鼠等动物,由于中

国尚未系统开展狂犬病的流行病学与病理学研究,目前还不清楚狂犬病宿主动物的种类到底有多少.但是感染猪并导致猪出现狂犬症状而死亡报道寥寥无几^[12-13].

本文通过对广东省四会市某猪场分离的狂犬病病毒采用 RT-PCR 的方法对 N 蛋白基因和 G 蛋白基因进行序列分析,与已经注册的我国不同省份分离的狂犬病病毒进行核苷酸序列比对,分析由于地域的不同导致狂犬病病毒基因序列不一致的可能性.狂犬病病毒可以按基因型进行分类,已显示了来自于特定地理区域的病毒分离物,都具有独特的基因序列模式.华南农业大学微生物实验室分离的狂犬病病毒 GD-SH01 株通过对 N 和 G 基因核苷酸,氨基酸序列相似性的比对,发现分离的毒株与广西毒株相似性最高,证明了不同地域也会发生相似性现象. GD-SH01 株 N 蛋白氨基酸序列在狂犬病病毒演变中相对保守,与各毒株间的差异较小,所以我们可以将 N 蛋白抗原性和 N 蛋白基因序列作为狂犬病毒属分型和狂犬病毒分组的重要依据. GD-SH01 株 G 基因与中国疫苗株 CTN181 G 基因核苷酸和氨基酸序列的相似性很高. 目前我们还需要进一步对分离的狂犬病病毒 GD-SH01 株进行其他基因的测序工作,从而进一步证明我们的设想.

参考文献:

[1] 张菲,张守峰,唐青,等. 我国狂犬病现状与防控意见[J]. 中国人兽共患病学报,2010,26(4):381-388.

[2] 甘海霞,熊毅,刘棋,等. 猪狂犬病分子生物学的快速诊断[J]. 广西农业科学,2006,37(5):594-595.

[3] 赵云蛟,钱爱东,李影,等. 狂犬病病毒鼠源野毒株糖蛋白基因序列测定及分析[J]. 吉林农业大学学报,2004,26(2):210-212.

[4] 李影,段锐,钱爱东. 鹿源狂犬病野毒 8202 株基因型的研究[J]. 经济动物学报,2005,9(4):206-208.

[5] 黄莹,赵云蛟,钱爱东. 吉林鹿源狂犬病病毒野毒株磷蛋白基因的测序及分析比较[J]. 中国兽医杂志,2007,43(7):3-6.

[6] 陶晓燕,唐青. 狂犬病病毒糖蛋白基因遗传变异研究进展[J]. 病毒学报,2011,27(2):184-188.

[7] 李江涛,殷相平,张金卫,等. 狂犬病病毒 CVS 株糖蛋白、核蛋白生物信息学分析[J]. 生物技术通报,2010(7):179-184.

[8] 李忠,丁淑军,吕慧,等. 山东省 4 株狂犬病病毒核蛋白基因序列分析[J]. 中国人兽共患病学报,2010,26(8):767-768.

[9] 赵云蛟,钱爱东. 狂犬病病毒全基因组进化研究进展[J]. 动物医学进展,2009,30(11):83-86.

[10] 邵西群,闫喜军,柴秀丽,等. 狂犬病毒 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 特产研究,2007(1):12-13.

[11] MENG Sheng-li, YAN Jia-xin, XU Ge-lin, et al. A molecular epidemiological study targeting the glycoprotein gene of rabies virus isolates from China[J]. Virus Res, 2007, 124(1/2): 125-138.

[12] JIANG Y, YU X, WANG L, et al. An outbreak of pig rabies in Hunan Province, China[J]. Epidemiol Infect, 2008, 136(4): 504-508.

[13] ZHU Y, ZHANG G, SHAO M, et al. An outbreak of sheep rabies in Shanxi Province, China[J]. Epidemiol Infect, 2011, 139(10): 1453-1456.

【责任编辑 柴 焰】

(上接第 528 页)

[13] 孙洪仁,张英俊,历卫宏,等. 北京地区紫花苜蓿建植当年的耗水系数和水分利用效率[J]. 草业学报,2007,16(1):41-46.

[14] 赵明,郭志中,王耀琳,等. 不同地下水位植物蒸腾耗水特性研究[J]. 干旱区研究,2003,20(4):286-291.

[15] 秦飞,陈平,王朋,等. 我国石灰岩地区森林培育技术研究进展[J]. 中国水土保持科学,2009,7(4):120-124.

[16] 李撰,王晓虹. 我国南方石灰岩地区植被恢复探讨[J]. 安徽农业科学,2011,39(11): 6685-6687.

[17] 冯汉华,熊育久. 广东岩溶地区石漠化现状及其综合治理措施探讨[J]. 中南林业调查规划,2011,30(1): 15-19.

[18] FARQUHAR G D, OLEARY M H, BERRY J A. On the

relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves[J]. Aust J Plant Physiol,1982,9(11):121-137.

[19] 刘宇锋,萧浪涛,童建华,等. 非直线双曲线模型在光合响应曲线数据分析中的应用[J]. 农业基础科学,2005,21(8):76-79.

[20] 招礼军. 我国北方主要造林树种耗水特性及抗旱造林技术研究[D]. 北京:北京林业大学,2003.

[21] 朱妍,李吉跃,史剑波. 北京六个绿化树种盆栽蒸腾耗水量的比较研究[J]. 北京林业大学学报,2006,20(1): 65-70.

【责任编辑 李晓卉】