

狂犬病毒分离株 N 基因的分析

江 飙, 刘晓慧, 陈 晶, 孙招金, 郭霄峰

(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:运用 RT-PCR 和动物接种的方法从广东省东莞市正常犬只的唾液中分离获得 1 株狂犬病毒, 编号为 GD33. 为了解析该毒株与兽用狂犬病弱毒疫苗的关系, 对该分离株的 N 基因进行了克隆和测序, 并将 N 基因的序列与 GeneBank 上已发表的狂犬病毒 N 基因核苷酸和推导的氨基酸序列进行比较. 结果发现: 该分离株仅能引起乳鼠发病, 对 6 周龄成鼠无致病性, 说明该毒株不是强毒. 该分离株 N 基因与弱毒疫苗 HEP-Flury N 基因的相似性最高, 达 99.7%, 并且同处系统发育树的最近分枝. 因此, 推测该分离株源自接种的弱毒疫苗.

关键词:狂犬病毒; 弱毒疫苗; N 基因; 克隆; 序列分析

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2009)04-0119-03

Analysis of Nucleoprotein Genes of Isolated Strain of Rabies Virus

JIANG Biao, LIU Xiao-hui, CHEN Jin, SUN Zhao-jin, GUO Xiao-feng

(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: A rabies virus strain designated GD33 was isolated and identified by mice inoculation and RT-PCR. To analyze the relationship between the isolated strain and the attenuated rabies virus vaccine strain for domestic dog, the N gene of the isolated strain was cloned and sequenced. The sequences of nucleotide and the deduced amino acid of the N gene were compared with that of other rabies virus strains published. The results indicated that the isolated strain was an attenuated rabies virus because it killed only suckling mice and was apathogenic to six-week-old adult mice. The homology of N gene between GD33 strain and the attenuated HEP-Flury strain was 99.7% and both strains were on the same branch of phylogenetic tree. Therefore, they speculated that the isolated strain was originated from the attenuated vaccine strain.

Key words: rabies virus; attenuated vaccine; N gene; cloning; sequence analysis

狂犬病(Rabies)是由狂犬病毒(Rabies virus, RV)引起, 严重侵害中枢神经系统的一种人兽共患传染病, 感染谱包括人和部分温血动物^[1]. 该病公元前 2300 年就已有记载^[2]. 但由于防疫等问题, 目前全世界每年仍有 50 000 余人死于该病, 亚洲及非洲尤其严重. WHO 认为犬的免疫率达到 70% 即可形成狂犬病的免疫屏障, 不至于发生狂犬病的流行^[3]. N 基因是狂犬病毒基因组的重要基因, 在病毒的复制

过程中起着重要作用. 该基因高度保守, 是病毒鉴定的主要靶基因, 也是狂犬病毒生物型分类的重要依据^[4]. 本研究通过分析一分离株的 N 基因, 试图解析弱毒疫苗与正常犬唾液带毒的关系.

1 材料与方法

1.1 材料

来自广东省东莞市 1 只已接种兽用狂犬病弱毒

收稿日期: 2008-10-30

作者简介: 江 飙(1985—), 男, 硕士研究生; 通讯作者: 郭霄峰(1963—), 男, 教授, 博士, E-mail: xfguo@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(30671565); 科技部微生物资源平台项目(2005DKA21205-9); 广东省自然科学基金团队项目(5200638)

疫苗且临床表现正常的犬的唾液,采集于2004年.

1.2 小鼠

SPF级乳鼠(<3 d)及SPF级成鼠(>6周),购自南方医科大学实验动物中心.

1.3 主要试剂

Trizol、DNA Marker DL2000 购自天根生化科技(北京)有限公司,反转录酶、*rTaq* 酶、dNTP、pMD18-T载体购自大连宝生物工程有限公司,基因工程菌 *Escherichia coli* DH5 α 为华南农业大学兽医学院微生物与免疫教研室保存.

1.4 引物

检测引物根据周萍等^[5]报道的方法设计,RV1: 5'-AGTCTGTATAGGTTGAGC-3'; RV2: 5'-GATGAAATAAGAGTGAGG-3'. N基因ORF框克隆引物则根据GenBank报道的狂犬病毒序列设计,共2对,RV3: 5'-TTCCTATAGTCACGCTTAACAA-3', RV4: 5'-GATGAAATAAGAGTGAGG-3'; RV5: 5'-AGTCTGTATAGGTTGAGC-3'; RV6: 5'-TCCTCTCCTTCATCCATC-3'.

1.5 病毒RNA的抽提及反转录

根据周萍等^[5]报道的方法进行.反转录引物为RV1、RV3和RV5.

1.6 PCR反应

鉴定样品的PCR条件为94℃预变性5 min,94℃30 s,50℃30 s,72℃30 s,30个循环,72℃延伸10 min.扩增N基因ORF框的PCR条件为94℃预变性5 min,94℃30 s,46℃30 s,72℃1.5 min,30个循环,72℃延伸10 min.

1.7 动物试验

将PCR检测为阳性的唾液材料用Hanks液稀释5倍,加入青霉素(100 U/mL)、链霉素(100 U/mL),8 000 r/min离心5~10 min,颅内接种10只乳鼠与5只成鼠,25 μ L/只.取同窝乳鼠3只、成鼠2只接种同剂量Hanks液作为阴性对照.观察试验鼠的发病死亡情况.无菌取发病濒死期鼠脑组织,置于甘油生理盐水中-70℃保存备用.

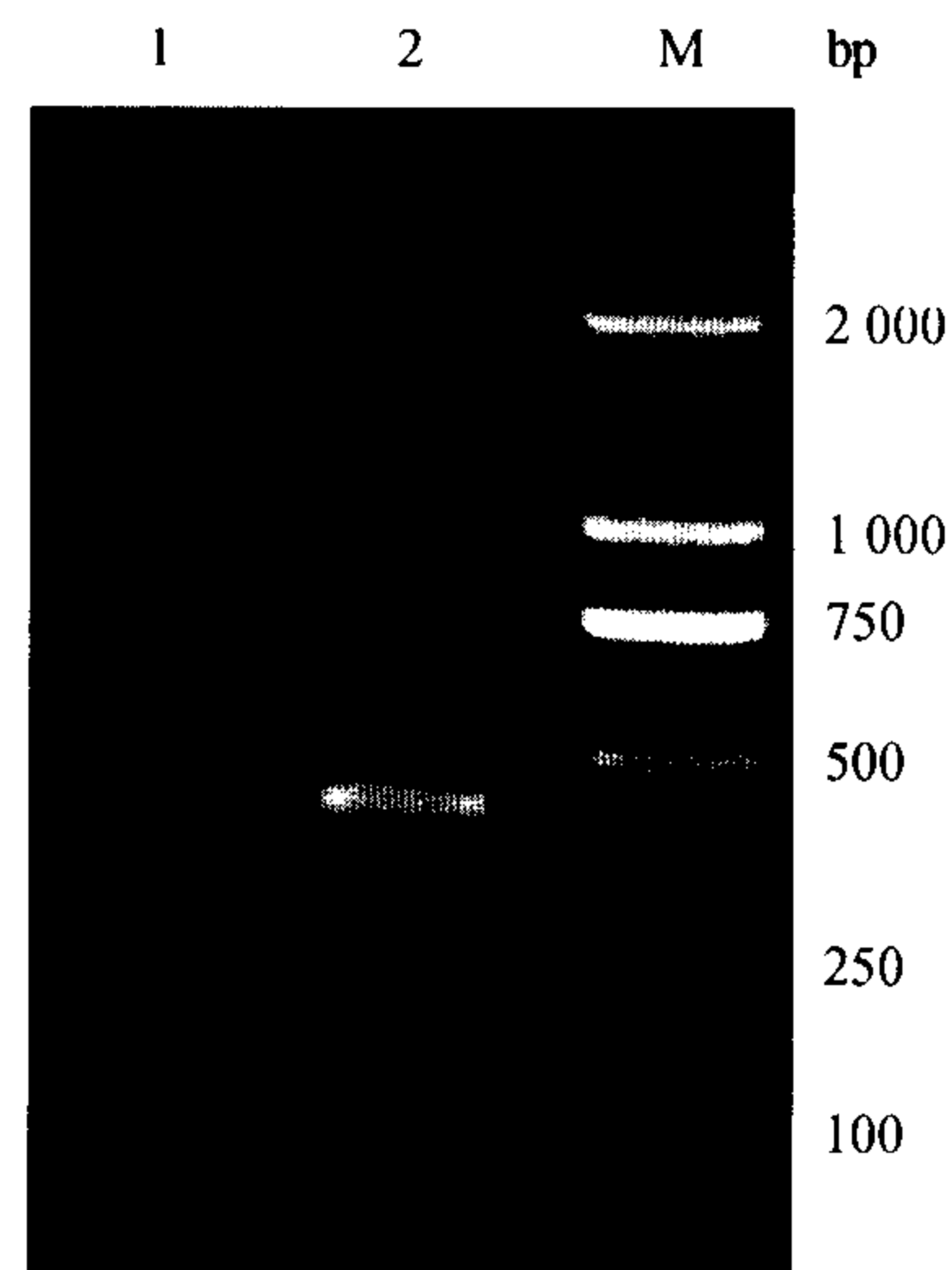
1.8 N基因的ORF框的克隆与测序

琼脂糖凝胶回收PCR反应产物,纯化后克隆入pMD18-T载体,转化*E. coli* DH5 α 感受态细胞,经菌液PCR快速鉴定获得含重组子的阳性菌落,送至Invitrogen公司测定克隆片段序列.借助DNASar软件分析克隆片段及与GenBank中收录的部分狂犬病毒株N基因ORF片段及其编码氨基酸的相似性.

2 结果

2.1 犬唾液中狂犬病毒鉴定

以RV1、RV2引物对犬唾液进行检测,得到的扩增片段与预期片段424 bp大小一致,表明该唾液样品狂犬病毒阳性,将此分离株命名为GD33,结果见图1.



1:阴性对照;2:样品(GD33);M:DNA Marker DL2000

图1 唾液中狂犬病毒的RT-PCR检测

Fig. 1 Detection of rabies virus in saliva by RT-PCR

2.2 乳鼠脑内接种试验

乳鼠在接种后2~3 d,10只均出现典型的狂犬病神经症状,主要表现为消瘦、颤抖、后肢麻痹、共济失调和衰竭等,发病后第2 d全身麻痹死亡.对照组表现正常.

2.3 成鼠接种试验

成鼠接种后25 d仍表现正常,5只均未出现任何神经症状.对照组表现正常.

2.4 N基因的ORF框克隆与测序

使用设计的引物进行RT-PCR后克隆测序,获得2条长度分别为942和1 271 bp的序列.对这2条序列分析后进行拼接,获得N基因的ORF框序列.将其核苷酸及推定氨基酸序列与GeneBank上相关狂犬病毒毒株已发表的部分核苷酸和推定氨基酸序列对比.比对后发现,该分离株N基因ORF序列与鸡胚减毒株HEP-Flury、FluryLEP核苷酸的相似性分别达到99.7%和99.0%,与CHVC06的相似性为98.8%;而推导的氨基酸序列与这三者的相似性分别为99.3%、99.1%和98.7%.与固定毒株PV、CVS等相比,核苷酸的相似性在92%,氨基酸相似性为

98%左右. 与泰国、伊朗、印度及其他亚洲国家、周边国家俄罗斯的部分狂犬病毒毒株相比较,核苷酸相似性为86%~92%,氨基酸相似性则为97%~98%.

将 GD33 毒株 N 基因与其他毒株进行比较,建立遗传进化树. 结果(图 2)显示, GD33 与 HEP-Flury 同在一个分支上,关系最近,说明该分离株与 HEP-Flury 在系统发育上亲缘关系非常接近.

将 GD33 与 HEP-Flury 进行核苷酸的差异性比较发现,在 99~405 bp 间仅有 1 个碱基的变异,即 377 bp 处由 G 代替了 HEP-Flury 株的 T,并且为无意义突变,如图 3 所示.

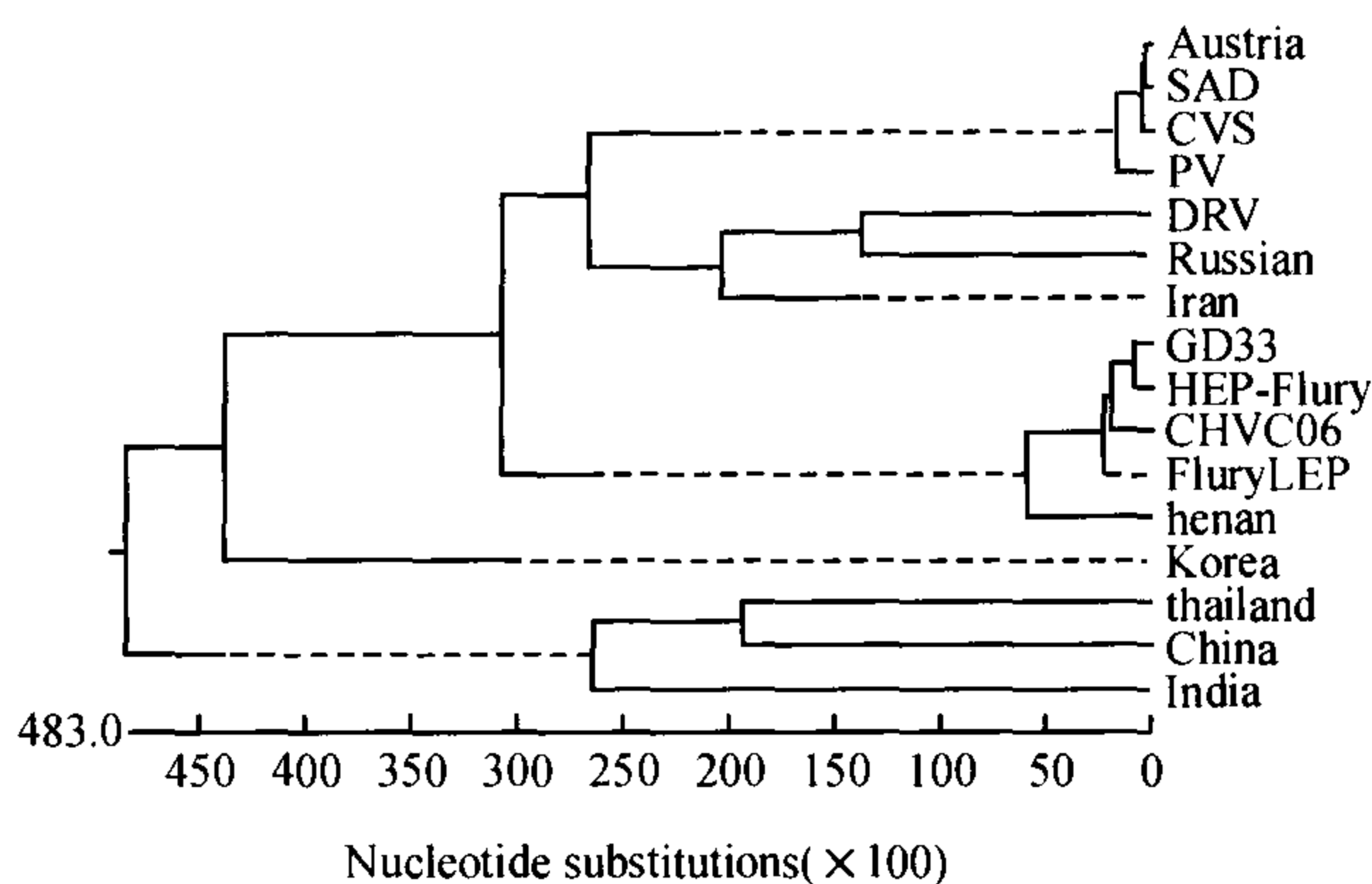


图 2 N 基因的遗传进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of N gene

AATTGGGCTCTGACAGGAGGCAGGGAAGTGAACAAGGGACCCCACTG GD33
 AATTGGGCTCTGACAGGAGGCATGGAACTGACAAGGGACCCCACTG HEP-Flury

图 3 GD33 株 N 基因突变位点

Fig. 3 Mutation site of N gene of GD33 strain

3 讨论

狂犬病毒各毒株间的 N 基因高度保守,是病毒分型的重要依据. 研究发现,不同基因型之间 N 基因核苷酸序列和氨基酸序列的相似性分别小于 79.8% 和 93.3%,同一基因型不同毒株之间核苷酸的平均差异是 9.6%^[6],其变异主要分布在 99~405 bp 以及 1 080~1 278 bp^[8]. 而比较后发现 GD33 与 HEP-Flury 在这些区域内没有产生氨基酸的突变. 本研究的唾液样品采集于已注射国产兽用狂犬病弱毒疫苗的犬,从中分离的狂犬病毒 GD33 N 基因与弱毒疫苗 HEP-Flury 株的相似性最大,为 99.7%. 在系统发育树上还发现,分离株的 N 基因与 HEP-Flury 株的 N 基因同属一个最低层次的分枝. 分离株 GD33 接种乳鼠后 2~3 d 发病并在发病第 2 d 死亡,而接种成鼠后不发病(25 d 仍正常),表明该分离株并非强毒株. 因此,我们推测该分离株源自已接种的弱毒疫苗,也可解释为何我国健康犬狂犬病毒的分离率偏高.

参考文献:

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京:科学出版社,1997:779-783.
- [2] STEELE J H, FERNANDEZ P J. The Natural history of rabies[M]. 2nd ed. Boca Raton, USA: CRC Press, 1996:1-26.
- [3] MESLIN F X, KAPLAN M M, KOPROWSKI H. Laboratory techniques in rabies [M]. 14th ed. Geneva: World Health Organization, 1996:13-16.
- [4] 罗廷荣,南松剑,余克伦. 广西狂犬病野毒株 N 和 G 基因的克隆与序列分析[J]. 中国预防兽医学报, 2005, 27(4):245-249.
- [5] 周萍. 狂犬病毒 RT-PCR 和荧光定量 PCR 检测方法的建立[D]. 广州:华南农业大学兽医学院, 2007.
- [6] BOURY H, KISSI B, TORDO N, et al. Molecular diversity of the *Lyssavirus* genus[J]. Virology, 1993, 19(4):70-81.

【责任编辑 柴 焰】