DOI:10.15933/j.cnki.1004-3268.2010.04.030
河南农业科学

猪乙脑病毒河南分离株 CSF.ZMD-3 的分离鉴定及分子进化分析

卜　丹[1,2]，罗　俊[2]，樊剑鸣[2]，王爱萍[1*]，滕　蔓[2]，游雷鸣[2]，陈　陆[3]，张改平[2]
（1.郑州大学 生物工程系，河南 郑州 450001；2.河南省农业科学院 农业部动物免疫学重点开放实验室 河南省动物免疫学重点实验室，河南 郑州 450002；3.河南农业大学 牧医工程学院，河南 郑州 450001）

摘要：采集河南省规模化猪场流产母猪死胎脑脊液作为样本，通过细胞盲传培养分离乙型脑炎病毒流行毒株，对新分离的病毒进行分子生物学鉴定，获得1株分离株并命名为CSF.ZMD-3。DNA序列测定及比对分析该分离株与已报道毒株基因的序列同源性，确定该分离毒株为乙脑病毒。使用MEGA3.1软件对CSF.ZMD-3毒株主要结构蛋白E蛋白的基因序列进行分子进化分析，确定CSF.ZMD-3为基因Ⅲ型乙脑病毒。

关键词：乙型脑炎病毒；分离鉴定；*M*基因；*E*基因；基因进化树
中图分类号：S852.65　　文献标识码：A　　文章编号：1004-3268(2010)04-0101-04

Phylogenetic Analysis of A JEV Strain CSF.ZMD-3 Isolated from Swine in Henan Province

BU Dan[1,2], LUO Jun[1], FAN Jian-ming[1], WANG Ai-ping[1*], TENG Man[1], YOU Lei-ming[1], CHEN Lu[3], ZHANG Gai-ping[1]
(1. Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China;
2. Henan Provincial Key Laboratory of Animal Immunology, Key Laboratory of Animal Immunology of the Ministry of Agriculture, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China;
3. College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In this study, cerebrospinal fluid (CSF) of sow aborted fetus stillbirth were collected from large pig farms in Henan province, and an isolate named as CSF.ZMD-3 was obtained by inoculating PK-15 cells and identified by RT-PCR. By comparing the E gene sequence of CSF.ZMD-3 with those of previously reported JEV strains, we are sure that this isolate is a JEV strain. Using the E genes of CSF.ZMD-3 and other 18 reference strains, a phylogenetic tree was constructed by Mega 3.1 software and showed that CSF.ZMD-3 belongs to gene type Ⅲ.

Key words: Japanese encephalitis virus; Isolation and identification; *M* gene; *E* gene; Phylogenetic tree

流行性乙型脑炎(Japanese encephalitis, JE)是一种人畜共患的蚊媒病毒性疾病，具有隐性感染、散发性、季节性的特点[1]。猪是流行性乙脑病毒(Japanese encephalitis virus, JEV)在自然界中最主要的贮存、增殖宿主，在猪群中，乙型脑炎虽不具有高致死率，但它能引起母猪繁殖障碍及仔猪的死亡，对养猪业造成了巨大损失[2]。此外，猪群中的JEV感染经蚊媒传播可导致动物及人群的感染，危害到公共卫生安全。

JEV属于黄病毒科黄病毒属，是单股正链RNA

收稿日期：2009-12-15
基金项目：农业部公益性行业科研专项(200803015)；河南省公益性行业科研专项(2008-145)
作者简介：卜　丹(1985-)，女，河南邓州人，在读硕士研究生，研究方向：动物免疫学。
*通讯作者：王爱萍(1970-)，女，青海西宁人，副教授，硕士生导师，主要从事分子免疫学和动物生物技术研究。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

病毒，基因组全长约 11kb，含有 1 个开放阅读框，编码 1 个多聚前体蛋白，成熟切割后可形成 3 个结构蛋白(核衣壳蛋白 C、膜蛋白 M、囊膜蛋白 E)，7 个非结构蛋白及 2 个多肽切割片段[3]。分子流行病学调查显示，JEV 在同一地区的基因型已不是最初的 1 个地区只有 1 个基因型分布[4]，而是出现了同一地区流行不同基因型毒株的复杂状况。近年来，国内学者在乙脑不同流行区域分离毒株，进行分子流行病学研究，以了解目前自然界 JEV 的流行分布、分子进化、毒力变异等情况。本试验从河南省部分规模化猪场采集母猪流产死胎脑脊液进行 JEV 的分离及鉴定，确定病毒基因型及进化情况，为河南省猪群乙脑的防治提供相关数据和理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

母猪流产死胎脑脊液 4 份，采自河南省规模化猪场临床病例。PK15 细胞，河南省动物免疫学重点实验室保存；小牛血清，购自杭州四季青生物材料有限公司；DMEM 及 TRIzol 试剂为 Invitrogen 公司生产；细胞培养基为含 10%(体积分数)小牛血清的 DMEM，病毒维持液为含 4%(体积分数)小牛血清的 DMEM。Takara Agarose Gel DNA Purification Kit、PCR 产物克隆用载体 pMD19－T Vector、感受态细胞 JM109、M－MLV 反转录酶，均为大连宝生物工程有限公司产品；其他试剂均为分析纯。

JEV 的 *E* 基因引物对 pPET E1(5′－TTTAATTGTCTGGGAATGG－3′)和 pET E2(5′－GATGTCAATGGCACATCCAGT－3′)、*M* 基因引物对 pM1(5′－ACGTTCTTCAAGTTTACAGCA－3′)和 pM2(5′－CGCTTGGAATGCCTGGTCCG－3′)均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2 病料处理及病毒分离

取脑脊液样品，12000r/min 离心 1min，弃沉淀，上清用直径为 0.22μm 的一次性滤器过滤后，取 1mL 样品接种于生长状态良好的单层 PK15 细胞。将细胞放入 37℃的 CO_2 细胞培养箱孵育 1h，然后倒掉脑脊液，每瓶加入 10mL 病毒维持液放入培养箱，培养 4～5d 后将细胞反复冻融 3 次，并取 1mL 细胞培养液进行传代。连续盲传 3 代，收集细胞，于－80℃条件下保存备用。

1.3 病毒 RNA 提取及 RT－PCR 鉴定

按照 TRIzol 试剂说明书要求操作，提取病毒液中的 RNA，同时以 JEV SA－14 株作为阳性对照。使用 M－MLV 反转录酶及下游引物 pET E2 和 pM2 将 RNA 转录为 cDNA，反应条件为：70℃变性 10min，42℃反转录 1h，70℃ 15min 灭活 M－MLV，得到 cDNA 并以此为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应条件选择为：94℃预变性 5min；94℃变性 30s，55℃退火 30s，72℃延伸 90s，30 个循环；72℃延伸 10min。取 PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.4 基因克隆及测序

用 Takara Agarose Gel DNA Purification Kit 回收电泳鉴定的特异性产物，将回收的 DNA 片段连接至 pMD19－T Vector，然后转化 *E.coli* 感受态细胞 JM109，于氨苄抗性的 LB 平板进行菌落筛选培养。经菌落 PCR 鉴定，将包含目的片段的阳性克隆样品进行测序。处理测序结果，取 *E*、*M* 基因序列的 CDS 区，与 SA14 株进行序列对比，确定其同源性。

1.5 构建分子进化树

从 GenBank 中选择 JE 流行的多个国家和地区的 18 株病毒 *E* 基因序列(选用序列信息见表 1)，另选 1 株墨累河谷脑炎病毒株(MVEV)作为外群，采用 Shirish 建立的以 *E* 基因为基础的乙脑病毒基因的分型法，用 MEGA 3.1 构建分子进化树。

表 1 进化分析中所引用的乙脑病毒株详细信息

毒株	年份	地区	来源	GenBank 序列号
MVE-1-51	1951	澳大利亚	人脑	NC_000943
LN02-102	2002	中国辽宁	库蚊	DQ404085
LN02-104	2002	中国辽宁	淡色库蚊	DQ404086
SH03-103	2003	中国上海	三带喙库蚊	DQ404096
SH03-105	2003	中国上海	三带喙库蚊	DQ404097
YN79-Bao83	1979	中国云南	三带喙库蚊	DQ404128
JaNAr0102	2002	日本	蚊子	AY377577
HN04-11	2004	中国河南	库蚊	DQ404087
JKT5441	1981	印度尼西亚	迷走按蚊	U70406
B-1065	1983	泰国	猪血	U70388
SA-14	1960	中国山西	库蚊	AY243850
YNDL04-42	2004	中国云南	骚扰阿蚊	DQ404143
YNDL04-45	2004	中国云南	库蚊	DQ404145
YNJH04-18	2004	中国云南	库蚊	DQ404146
02-29	2002	中国福建	人类脑脊液	AY555762
02-41	2002	中国福建	人血	AY555763
JKT7003	1981	印度尼西亚	蚊子	U70408
JKT9092	1981	印度尼西亚	蚊子	U70409
FJ03-31	2003	中国福建	人血	DQ404117

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

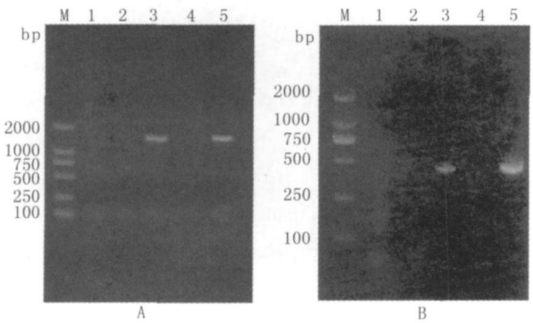
2 结果与分析

2.1 病毒分离情况

脑脊液接种细胞后，盲传第 1 代细胞在培养 3~4 d之后均出现皱缩、异常脱落现象，细胞瓶底出现大面积空斑，脱落细胞成团状漂浮，对照细胞有少量均匀的细胞脱落。盲传第 2 代细胞，各组与对照相比，从第 4 天开始出现异常脱落等病变现象，其中脑脊液 3 号样品细胞脱落较多，皱缩，出现渔网状空斑，对照细胞有少量均匀的细胞脱落。盲传第 3 代细胞与第 2 代情况相似。通过细胞异常状态观察，及与对照细胞状态的比较，可以确定接毒细胞发生了病变，脑脊液中可能存在乙脑病毒。

2.2 RT－PCR 鉴定结果

从病毒液中提取 RNA 分别进行 *E* 基因及 *M* 基因的 RT－PCR，扩增产物电泳鉴定结果见图 1。由图 1 可见，脑脊液 3 号样品分别扩增出约 1 500 bp（图 1－A）和 400bp（图 1－B）的条带，与 5 号泳道的阳性对照组扩增出的条带位置一致，均符合预期扩增大小，鉴定为 JEV 阳性。



M. Marker；1. 1 号脑脊液样品；2. 2 号脑脊液样品；3. 3 号脑脊液样品；4. 4 号脑脊液样品；5. 阳性对照

图 1 *E*、*M* 基因扩增电泳鉴定结果

2.3 JEV 分离株的序列分析及进化树的构建

将扩增的脑脊液 3 号样品的 *E*、*M* 基因片段克隆至 pMD 19－T 载体，进行菌落筛选培养及菌落 PCR 鉴定，后经上海生工生物工程技术服务有限公司测序，获得其序列数据。经序列比对，本次乙脑分离株的 *E* 基因与强毒株 SA－14 的序列同源性为 100%，*M* 基因与 SA－14 的序列同源性为 86%，可以确定此分离株为乙脑病毒，命名为 CSF. ZMD－3。将序列上传至 GenBank，*E* 基因在 GenBank 获得的登录号为 GQ336809，*M* 基因获得的登录号为 GQ336810。应用 MEGA3.1 软件将 CSF. ZMD－3 与已知毒株进行对比分析及构建进化树（图 2）。由图 2 可见，本次分离的 CSF. ZMD－3 株与基因Ⅱ型的强毒株 SA－14 位于同一进化分支上，它们与 YNDL04－42、YNDL04－45、YNJH04－18、FJ03－31、02－29、02－41 等基因Ⅱ型的毒株位于进化树同一大簇，可以确定本次的 CSF. ZMD－3 株属于基因Ⅲ型。

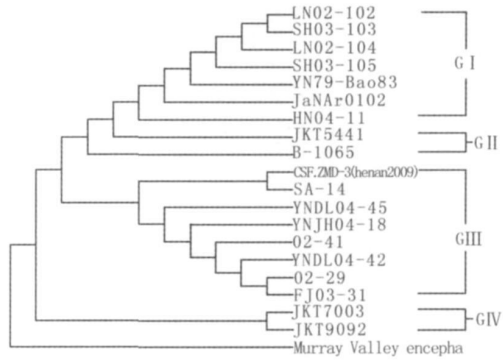


图 2 *E* 基因核苷酸序列分子进化树

3 讨论

猪作为 JEV 在自然界中最主要的贮存、增殖宿主和传染源，是 JEV 的传播、感染过程中不可忽视的一环，但是以往对于 JEV 的研究多集中于人源和蚊源病毒，对猪源 JEV 的研究相对较少。本试验选用病猪流产死胎的脑脊液作为样品，针对猪源病毒进行研究，以期增加对 JEV 病毒各方面信息的了解，及时掌握不同亚型乙脑病毒的分布变化规律，为乙型脑炎的防治工作提供数据支持。

有研究发现，同一基因型的毒株在地域上有更为紧密的联系，在同一地区分离的毒株即使年代相差很远也属于同一基因型[5]，即有明显的地域性。但是近年来，乙脑病毒基因型的分布地区有了新的变化，已不是单一地域单一基因型的情况，出现了同一地区不同基因型共同流行的复杂情况[6]。就我国来说，1979 年在云南首次分离到基因Ⅰ型乙脑病毒，1982－2005 年又先后在云南、上海、辽宁及河南等地分离到Ⅰ型乙脑病毒，同时间段亦在黑龙江、福建、云南和贵州等地分离到了Ⅱ型乙脑病毒[7]，这说明目前基因Ⅰ型和基因Ⅱ型 2 种基因型的乙脑病毒在我国同时存在，并且其在我国境内的分布区域也在发生变化，这大大增加了对乙脑防控的难度。所以对新分离毒株的基因型进行确定，有助于了解当地 JEV 的分子流行病学状况，从而进行有针对性的防控。

JEV 进化分析方法有 2 种，Chen 等[8] 依据 *M*

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

基因 240 个核苷酸进行的 JEV 基因分型和 Shirish 等[9] 依据 *E* 基因全序列进行的 JEV 基因分型。这 2 种方法在 JEV 分型中存在差异，依据 *M* 基因的 240 个核苷酸将 JEV 分成 4 个基因型，而依据 E 蛋白基因全序列将 JEV 划分成 5 个基因型。由于乙脑病毒基因组中第 456－695 位属于 *M* 区段的 240 个核苷酸的突变大多属于沉默突变，病毒在此位置受到的进化压力较小，可以反映乙脑病毒的自然进化状况[10]。但是 *M* 基因的 240 个核苷酸序列较短，分析结果存在一定程度的可变性，而 *E* 基因用于进化分析被认为具有良好的代表性，近年来成为主要的分析方法。因此，本试验以 *E* 基因全序列进行基因分型，以墨累河谷脑炎病毒 MVEV 为外群(out－group)，参照其他已知毒株的序列，采用 NJ(neighbor－joining)法构建进化树。根据生成的进化树图形可以看出，所有毒株的拓扑构型分成五大簇，分离株 CSF.ZMD－3 位于基因Ⅱ型的分支上并且有着较高的可信度。2008 年河南唐河曾分离出基因Ⅰ型的 JEV[11]，而之前河南地区 JEV 基因型以基因Ⅲ型为主[12]，本研究中分离的毒株也为基因Ⅱ型，这说明河南目前处于基因Ⅰ型和基因Ⅱ型共同流行的状态下。可据此有针对性地研究河南省现用疫苗是否可以同时覆盖这 2 个基因型的病毒株，从而进行更有力度的防控。

参考文献：

[1] 房献忠，付强，张清华，等. 猪乙型脑炎病毒的研究进展[J]. 中国畜禽种业，2008(10)：73-76.

[2] 王韦华，张旭，张彦明，等. 乙型脑炎病毒 SXBJ07 株的分离鉴定及序列分析[J]. 西北农林科技大学学报：自然科学版，2009，37(4)：843-846.

[3] Mangada M M，Takegami T. Molecular characterization of the Japanese encephalitis virus representative immunotype strain[J]. Virus Research，1999，59：101-112.

[4] Wang H Y，Takasaki T，Fu S H，*et al*. Molecular epidemiological analysis of Japanese encephalitis virus in China[J]. J Gen Virol，2007，88：885-894.

[5] Sang L Y，Seok Y K，Woo Y C，et al. Molecular characterization of the full-length genome of the Japanese encephalitis viral strain K87P39[J]. Virus Research，2003，96：129-140.

[6] 邓淑珍，张海林，李金梅，等. 流行性乙型脑炎病毒研究进展[J]. 中国热带医学，2008，8(2)：306-309.

[7] 王环宇，付士红，李晓宇，等. 我国首次分离到基因Ⅰ型乙型脑炎病毒[J]. 中华微生物学和免疫学杂志，2004，24(11)：843-849.

[8] Chen W R，Tesh R B，Rico Hesse R，*et al*. Genetic variation of Japanese encephalitis virus in nature[J]. J Gen Virol，1990，71(12)：2915-2922.

[9] Shirish P，Banerjee K. Phylogenetic analysis of the envelope gene of Japanese encephalitis virus[J]. Virus Research，1996，42：107-117.

[10] Solomon T，Ni H，Beasley D W C，*et al*. Originan evolution of Japanese encephalitis virus in South-east Asian[J]. Journal of Virology，2003，77：3091-3098.

[11] Wang H Y，Hao Z Y，Fu S H，*et al*. Isolation and identification of Japanese encephalitis virus in Tanghe County，Henan Province[J]. Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi，2008，22(2)：83-86.

[12] Pugachev K V，Guirakhoo F，Trent D W，*et al*. Traditional and novel approaches to flavivirus vaccines[J]. Int J Parasitol，2003，33(526)：567-582.

更　正

本刊 2010 年第 3 期目次中“苯与丁草胺对油麦菜生长和生理特性的影响”应为“汞与丁草胺对油麦菜生长和生理特性的影响”，特此更正。

《河南农业科学》编辑部

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net