

伊犁河谷地区牛病毒性腹泻病毒基因型鉴定与分析

王传锋 (伊犁职业技术学院, 新疆伊宁 835000)

摘要 为摸清伊犁河谷地区牛场牛病毒性腹泻病毒(BVDV)感染的病毒基因型,利用 BVDV 基因组 5'端非翻译区(5'-UTR)通用型引物,采用一步法 RT-PCR 对疑似感染样品进行基因扩增、序列测定与比对分析以及遗传进化树构建。结果显示:12 份疑似样品中,有 1 份样品 PCR 扩增结果呈阳性,基因型鉴定为 BVDV2 型。该研究表明伊犁河谷规模化牛场内存在 BVDV2 型感染,为该地区规模化牛场病毒性腹泻病的防控提供了理论依据。

关键词 伊犁河谷;BVDV;基因型;鉴定
中图分类号 S852.65⁺3 **文献标识码** A
文章编号 0517-6611(2021)04-0082-03
doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2021.04.021



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Genotype Identification and Analysis of Bovine Viral Diarrhea Virus in Yili Valley Area

WANG Chuan-feng (Yili Vocational and Technical College, Yining, Xinjiang 835000)

Abstract In order to find out the genotype of BVDV infection in cattle farms in Yili Valley area, using a universal primer for the 5'-UTR of the BVDV genome, gene amplification, sequencing and blasting, phylogenetic tree construction were conducted on suspected infection samples by one-step RT-PCR. The results showed that 1 of 12 suspected samples was PCR positive, and the genotype was identified as BVDV2. The results of the study indicated that there was BVDV2 infection in large-scale cattle farms in the Yili Valley, which provided theoretical basis for the prevention and control of BVD in large-scale cattle farms in this area.

Key words Yili Valley; BVDV; Genotype; Identification

牛病毒性腹泻病毒(bovine viral diarrhea virus, BVDV)属于黄病毒科瘟病毒属,主要引起牛病毒性腹泻^[1]。依据 BVDV 保守端基因 5'-UTR 序列的差异性,可将病毒分为 2 种基因型,即 BVDV1 和 BVDV2。其中,国内外已对 BVDV1 进行了广泛研究,许多经典菌株和常见的疫苗菌株都属于该基因型。BVDV1 型感染牛常常表现出发热、腹泻和黏膜溃烂等症状;BVDV2 型感染牛通常发病较急,临床表现主要为高热、下痢、血小板减少症、黏膜出血、呼吸困难并伴有流产和高死亡率^[2]。感染 BVDV 的患畜,病毒存在于血清、冻精和胚胎中,以此为原料生产的生物制品将会给牛场和生物制品制造企业造成巨大的经济损失。Olafson 等^[3]首次在感染牛肠道及排泄物中发现 BVDV。目前,该疾病在世界范围内流行,尤其是在发达国家规模化牛场中。近年来,新疆牛病毒性腹泻病的流行形式也发生了一定的变化,由原来较多见的隐性感染和散发病例演变为现今的地方性流行和暴发,加上 BVDV 基因型的多样性、免疫耐受性以及患畜体内产生的持续性感染给防控该病带来了一定的困难。笔者采用一步法 RT-PCR 技术从采集的疑似病料(肛拭子)中扩增目的片段,并进行 BVDV 基因分型鉴定,以期掌握伊犁河谷地区规模化牛场 BVDV 流行株的基因型,分析此基因型与国内外其他地区 BVDV 病毒株之间的关系,为防控该病提供一定的理论参考。

1 材料与方法

1.1 样品来源 伊犁河谷地区部分规模化牛场,采集疑似犊牛腹泻样品(肛拭子)共 12 份,置于-20℃冰箱中保存备用。

基金项目 新疆维吾尔自治区高校科研计划项目(XJEDU2016S094)。
作者简介 王传锋(1982—),男,安徽淮南人,副教授,硕士,从事预防兽医学研究。
收稿日期 2020-06-30

1.2 主要试剂与仪器设备

1.2.1 主要试剂。RNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒均购自北京鼎国生物科技有限公司;高纯质粒小量制备试剂盒购自百泰克生物技术(北京)有限公司;PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit 生物制剂购自 TaKaRa 生物工程有限公司。

1.2.2 主要仪器与设备。PCR 扩增仪(型号 T100,美国 Bio-Rad 公司);全自动凝胶成像系统(型号 K8300,南京世研仪器设备有限公司);凝胶电泳仪(型号 DYCP-44N,北京六一生物科技有限公司);电泳仪电源(DYY-5D 型,北京六一生物科技有限公司);低温高速离心机(型号 5418R,德国 Eppendorf 公司)。

1.3 引物 根据已知牛病毒性腹泻病毒 5'-UTR 特异性通用型引物扩增目的基因,预估扩增片段大小为 267 bp,引物由北京鼎国生物科技有限公司合成。上游引物(5'-UTR-F)为 5'-CCTAGCCATGCCCTTAGTAGGACT-3',下游引物(5'-UTR-R)为 5'-GGAAGTCCATGTGCCATGTACA-3'。

1.4 BVDV 参考毒株 试验所用参考株序列均来源于 GenBank 数据库,具体如表 1 所示。

1.5 总 RNA 提取 参照 RNA 提取试剂盒使用说明书中的方法对 12 份检测样品进行总 RNA 提取。

1.6 一步法 RT-PCR 扩增 以疑似样品中提取的总 RNA 为模板,根据 PrimeScript™ OneStep RT-PCR Kit 试剂盒使用说明书进行 RT-PCR 扩增。具体反应体系如下:总 RNA 模板 10 μL,5'-UTR-F 1 μL,5'-UTR-R 1 μL,PrimeScript 1 Step Enzyme Mix 2 μL,2×1 Step Buffer 25 μL,RNase Free ddH₂O 11 μL,总体积为 50 μL。具体 RT-PCR 反应条件如下:50℃ 30 min;94℃ 5 min,95℃ 35 s,56℃ 35 s,72℃ 30 s,共 32 个循环;72℃ 延伸 10 min。最后,将 RT-PCR 扩

增产物置于 1.0% 琼脂糖凝胶中进行电泳,并观察电泳结果。

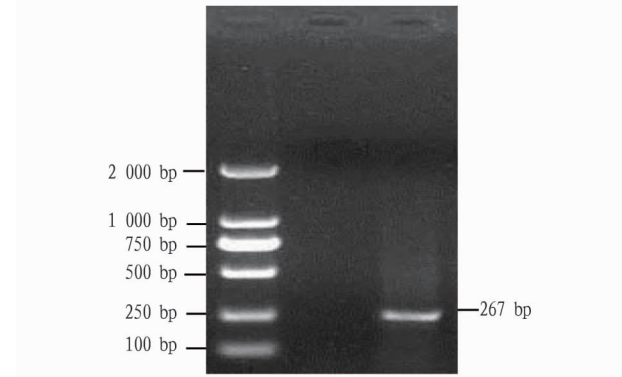
表 1 参考毒株
Table 1 Reference strains

登录号 Login ID	年份 Year	国家/地区 Country/Region	命名 Name	毒株 Strain	基因型 Genotype	种属 Species
FJ387317.1	2009	美国	BVDV1-8070606	8070606(B)	BVDV1b	牛
EU159702.1	2010	中国新疆玛纳斯	BVDV-XJMNS	CXJMNS	BVDV1a	牛
LT901731.1	2017	英国	BVDV1-MRI1368	MRI1368	BVDV1b	牛
EU555287.1	2008	中国新疆石河子	BVDV-LTY	LTY	BVDV1c	牛
MH753465.1	2012	土耳其	BVDV1-TR81	TR81	BVDV1b	牛
FJ493477.1	1998	澳大利亚	BVDV1-P-AT	P-AT	BVDV1b	牛
MK381384.1	2018	波兰	BVDV1-208-KT/18	208-KT/18	BVDV1b	牛
LT902255.1	2017	英国	BVDV1b-MRI2027	MRI2027	BVDV1b	牛
KY865359.1	2016	中国黑龙江	BVDV1-DZ-2	DZ-2	BVDV1b	牛
FJ527854.1	2004	中国新疆	BVDV-XJ04	XJ-04	BVDV2	牛
KC596020.1	2013	美国	BVDV2-125c	125c	BVDV1	牛
AF091605.1	1998	英国	BVDV-OregonC24V	Oregon C24V	BVDV1	牛
JQ679447.1	2005	印度	BVDV1-S-11580	S-11580	BVDV1	牛
KF925505	2013	中国北京	BVDV-BJ1305	BJ1305	BVDV1	牛
GU395526.1	2006	美国	BVDV1-MS1	MS1	BVDV1b	牛
KY985210.1	2015	巴西	BVDV1-92SV1003	92sv1003	BVDV1	牛
KF856288.1	2013	中国新疆	BVDV1-XJ	XJ	BVDV1	牛
KF856287.1	2012	中国新疆	BVDV2-ShaWan	ShaWan	BVDV1	牛
FJ387276.1	2005	美国	BVDV1-Dorado	Dorado	BVDV1b	牛

1.7 目的基因的克隆与序列测定 收集凝胶电泳目的条带,利用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒对目的片段进行纯化,将纯化后的目的基因与 pMD18-T 载体进行连接,并转化至 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞。对重组质粒进行培养,挑取白色菌落开展 PCR 鉴定。用高纯质粒小量制备试剂盒提取重组质粒 DNA,经酶切鉴定后将阳性重组质粒 DNA 送交北京鼎国生物科技有限公司进行测序。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 扩增结果 对 RT-PCR 扩增产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示 12 份疑似样品中有 1 份样品扩增出约 267 bp 的条带,与预期的目的基因大小相符(图 1)。



注:M.DNA Marker D2000;1.阴性对照;2.检测样品
Note:M.DNA Marker D2000;1.Negative control;2.Detected samples

图 1 RT-PCR 扩增结果

Fig.1 RT-PCR amplification results

2.2 核苷酸序列同源性比较 将获得的目的基因测序结果与 GenBank 数据库中的参考毒株进行 BLAST 比对分析,结果显示测序基因序列属于 BVDV,命名为 BVDV-YL1。将 BVDV-YL1 与 19 个参考株进行核苷酸同源性比较(图 2),

结果显示 BVDV-YL1 与中国新疆 XJ04 株和 BVDV2-125C 株核苷酸同源性分别为 96.4%和 96.0%,与 BVDV1 参考株核苷酸同源性为 37.6%~77.9%。测序结果表明,BVDV-YL1 属于 BVDV2 型毒株。

2.3 BVDV-YL1 基因遗传进化树分析 根据 BVDV 的 5'-UTR 基因核苷酸序列同源性分析,构建 BVDV-YL1 遗传进化树(图 3)。结果显示,BVDV-YL1 毒株与中国新疆 XJ04 株和 BVDV2-125C 株亲缘性较近,同属 BVDV2 型。

3 讨论

BVDV1 型和 BVDV2 型的同源性约 60%。其中,BVDV1 可分为 18 个基因亚型(BVDV1a~BVDV1r)^[4],BVDV2 可分为 BVDV2a、BVDV2b、BVDV2c 和 BVDV2d 四种亚型^[5]。基于 RNA 病毒具有较高的基因突变性,BVDV 基因的更多新亚型将被发现。结果显示,病毒的亚型与流行区域密切相关。比如,BVDV 在欧洲主要以 BVDV1a、BVDV1b、BVDV1d、BVDV1e、BVDV1f 等多种亚型和 BVDV2 型为主^[6],在北美国国家主要以 BVDV1b 和 BVDV2a 型为主,日本主要以 BVDV1a 型的形式存在^[7]。在国内,1980 年李佑民等^[8]首次从流产的胎儿脾脏中分离到 BVDV,经鉴定为 1b 亚型。目前,我国主要存在 BVDV1a、BVDV1b、BVDV1c 和 BVDV2 型。1991 年刘崇向等^[9]首次在羔羊腹泻病料中检测到 BVDV。王青青等^[10]在新疆南疆地区规模化奶牛场内检测到 BVDV1c 的感染。蔡元庆等^[11]在新疆石河子和伊犁地区对疑似患畜新鲜粪便检测发现存在 BVDV1 感染。王龙等^[12]采用 RT-PCR 方法从新疆 16 个不同地区的 21 份样品中检测到 17 株为 BVDV1 型,4 株为 BVDV2 型。李娜等^[13]在新疆石河子地区 64 份牛全血样品进行 BVDV 检测,发现全部样品均为 BVDV-1b 感染。目前,相关研究人员已在新疆牛场中检测到 BVDV1b、BVDV2、BVDV1c、BVDV1q、BVDV1f 和 BVDV1 型未知亚型,从而证实了 BVDV 在新疆范围内流行的多样性

