

1 株猪源基因 I 型乙型脑炎病毒的分离鉴定及遗传进化分析

侯力丹¹ 王文涛² 曹胜波² 黄少梅^{2,3*}

1. 中国兽医药品监察所, 北京 100081;

2. 华中农业大学动物医学院, 武汉 430070;

3. 武汉科前生物股份有限公司, 武汉 430070

摘要 乙型脑炎是由日本乙型脑炎病毒引起的急性、自然疫源性蚊媒传播人兽共患传染病。猪是 JEV 最重要的宿主, 监测和预防猪乙脑的发生对于人乙脑的防控具有重要意义。本研究通过 RT-PCR、细胞接种、乳鼠脑内接种、电镜观察等方法, 从广西某猪场的猪脑组织样品中分离了 1 株乙型脑炎病毒, 命名为 GX1209。全基因组测序结果表明, 该毒株基因组为 10 965 bp。系统进化分析表明该毒株属基因 I 型, 与基因 I 型 XJ69 毒株核苷酸和氨基酸同源性最高, 达到 99%, 而与 SA14、SA14-14-2、P3 等 III 型毒株的氨基酸同源性分别为 98%、97%、98%。

关键词 猪乙型脑炎病毒; 基因型; 分离鉴定; 遗传进化

乙型脑炎(Japanese encephalitis, JE, 简称乙脑)是由日本乙型脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV)引起的一种急性、自然疫源性蚊媒传播的人兽共患传染病。该病于 1871 年首先报道于日本, 并命名为日本脑炎。1935 年人类首次从临床病例中成功分离出乙脑病毒中山株 (Nakayama strain)^[1]。JEV 属于黄病毒科黄病毒属, 基因组为单股正链 RNA, 全长约为 11 kb。全长基因组由 5' 端非编码区、3' 端非编码区和单一的开放阅读框(ORF)组成, 共编码 3 个结构蛋白(C、prM/M、E)和 7 个非结构蛋白(NS1、NS2、NS3、NS4a、NS4b、NS5)^[2]。

JEV 感染谱较广。自然情况下, 鸟类、蝙蝠、马、牛、人等均可感染^[3]。对人而言, 大部分感染者呈隐性感染, 但少数患者会出现严重的脑炎症状, 表现为神经麻痹、痉挛性瘫痪、小脑共济失调等神经症状^[4-5]。同时, JEV 感染可以导致母猪流产、产死胎、木乃伊胎, 公猪睾丸炎, 新生仔猪脑炎, 育肥猪持续高热, 给养猪业造成重大经济损失^[6]。此外, 猪是 JEV 主要的储存宿主, 是人的乙脑重要传染源, 因

此, 猪群中 JEV 流行与分布, 不仅对养猪业危害巨大, 而且还对人类健康构成严重威胁。

JEV 只有一个血清型。根据其 c/prM 和 E 蛋白的序列可以将其分为 5 个基因型, 其中基因 I、II、III 型是其主要基因型, IV 型和 V 型分别分布于印度尼西亚东部和马来西亚^[7]。20 世纪 90 年代, 基因 III 型在世界流行最为广泛, 但近年来中国、日本、韩国、泰国、越南等亚洲国家基因 I 型的报道逐渐增多^[8-9]。以往的研究资料显示, 我国猪群中 JEV 大多数为基因 III 型, 但近 10 年来, 从猪群中分离鉴定出 I 型 JEV 的相关报道也逐渐增多^[10], 说明 JEV 在不同宿主中流行的优势血清型正在发生改变。

本研究针对广西某猪场母猪流产、新生仔猪脑炎疫情, 通过 RT-PCR、细胞接种和乳鼠脑内接种等方法, 从新生仔猪脑组织中分离鉴定了 1 株乙脑病毒。在此基础上, 通过全基因组序列测定与遗传进化分析, 证实了该分离毒株属于基因 I 型 JEV。从而为进一步了解基因 I 型毒株在猪群中的流行分布及研制基于基因 I 型的 JEV 疫苗研究奠定了基础。

收稿日期: 2016-08-08

基金项目: 农业公益性行业专项(201203082)、农业部 948(2011-G24)

* 通讯作者

侯力丹, 女, 1989 年生, 硕士, 研究实习员, 研究方向: 病毒类生物制品检验。

1 材料与方法

1.1 主要材料

乙脑病毒 SA14-14-2 株、JEV E 蛋白单克隆抗体及 BHK-21 细胞均为本实验室保存。

昆明鼠购自湖北省疾病预防控制中心；pEASYTM-T1 克隆载体及大肠杆菌 Trance5 α 购自北京全式金生物技术有限公司；LA Taq 酶、限制性内切酶、dNTPs、T4 DNA 连接酶、T4 DNA 聚合酶购自大连 TaKaRa 公司；反转录试剂盒购自 TOYOBO 公司；DNA 回收试剂盒等均购自天根生化科技(北京)有限公司；FITC 标记羊抗小鼠 IgG 购自 invitrogen 公司；DMEM 培养基购自 Thermo 公司；无内毒素高纯质粒提取试剂盒购自 Omega 公司；青-链霉素购自 Sigma 公司；胎牛血清购自 Gibco 公司。

1.2 临床病料的处理

从广西南宁某猪场采集发病并具有典型神经症状的新生仔猪中采集脑组织 3~4 g, 放入匀浆器中, 加入无菌 PBS 进行反复研磨, 直至研磨成均匀浆液。随后在匀浆液中加入 1% 的青霉素-链霉素, 并进行分装, -80 °C 冻融 3 次后, 4 °C 12 000 r/min 离心 5 min, 收集上清, 用 0.22 μm 的滤器过滤细菌, 于 -80 °C 保存备用。

1.3 RT-PCR 检测

从病料组织中提取总 RNA 并反转录为 cDNA, 针对 JEV 的 E 基因设计 1 对特异性引物(上游引物 P1: TTTAATTGTCTGGGAATGGGC; 下游引物为 P2: AGCATGCACATTGCTCGCT AA) 进行 PCR 扩增(目的片段大小为 1 500 bp), 通过琼脂糖凝胶电泳检测, 并对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶回收纯化并连接到 pEASY-T1 载体, 采用双酶切鉴定质粒正确后送生工生物工程(上海)有限公司测序。

1.4 乳鼠脑内接种

将病料无菌过滤后, 接种至出生 3 日龄以内的乳鼠脑内, 接种剂量为 20 μL/只。每日观察乳鼠症状。接种 3 日后, 待乳鼠出现典型神经症状后收集乳鼠脑组织, 进行反复冻融和匀浆过滤处理, 于 -80 °C 保存备用。

1.5 细胞接种

将 BHK-21 细胞接种上述乳鼠脑内增殖的病毒液, 置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱中吸附 1 h, 弃去细胞上清, 补加含 10% FBS 和 1% 青霉素-链霉素的

DMEM 培养基, 继续在 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养, 同时设置正常细胞对照组, 每日观察细胞病变情况。待 85% 以上的细胞出现细胞病变时, 冻融细胞 2 次, 将其用 0.22 μm 细菌滤器过滤后接种细胞, 依次传代 5 次。利用空斑实验, 测定分离毒株的病毒滴度。

1.6 间接免疫荧光实验

将上述分离的病毒、SA14-14-2 毒株分别接种 BHK-21 细胞。48 h 后, 用 JEV E 蛋白单克隆抗体作为一抗, 以绿色荧光标记的羊抗小鼠 IgG 抗体作为二抗, 进行间接免疫荧光实验。

1.7 电镜观察

利用 BHK-21 细胞大量增殖上述分离病毒, 然后经超速梯度离心后负染, 通过电子显微镜观察病毒粒子。

表 1 乙脑病毒全基因组分段扩增引物

引物名称	目的	引物序列(5'-3')	扩增位置 /bp
S1	P1Sa	AGAAGTTTATCTGTGTGGAC	1-845
S1	P1Rb	TTCATGAGGTATCGCGTG	1-845
S2	P2S	ACTGCTGGTGGCACAATC	674-1 625
S2	P2R	TCCCTATGGACTAAGAATGACT	674-1 625
S3	P3S	CTATCACGCTTCAGTCAC	1 157-2 100
S3	P3R	CATCTCAACCAGCACCTT	1 157-2 100
S4	P4S	ATGGACAAACTGGCTCTG	1 844-2 972
S4	P4R	GTTGATGTGATGCCGAAG	1 844-2 972
S5	P5S	AACACCAGATGTGGGAAT	2 669-3 644
S5	P5R	ACCGCAGGAATCGTCAAT	2 669-3 644
S6	P6S	GTTCTCTACCGCCTTTAC	3 425-4 591
S6	P6R	GACTGAGCCAATAGCCAA	3 425-4 591
S7	P7S	GAAGAAGAAAGGAGCCGT	4 107-5 190
S7	P7R	CAGGTCCAGCACAGTCAT	4 107-5 190
S8	P8S	CTGGGGTAGTGTGAAGGA	4 812-5 836
S8	P8R	CAGTGGTGATGACAAAAGT	4 812-5 836
S9	P9S	TTTCCCGACTCAAATGCC	5 584-6 563
S9	P9R	GCTGTTGGCACCAGATAC	5 584-6 563
S10	P10S	TTTGATGGACCACGCACA	6 301-7 486
S10	P10R	CATTGGGGTTGACGAGAA	6 301-7 486
S11	P11S	CGGGTTCGCTGTTTGTCT	7 139-8 094
S11	P11R	AGGCTCCGAGGTTTGTA	7 139-8 094
S12	P12S	CATTGCCTGGACTCTCAT	7 629-8 771
S12	P12R	GCCTTCGTGTCAACTTTC	7 629-8 771
S13	P13S	GCATCCATAACCGAACTTG	8 574-9 424
S13	P13R	TGACCTTGACCACTTTGT	8 574-9 424
S14	P14S	GAAAGGCTAAAGGGACTA	9 080-10 086
S14	P14R	GTGTATTGACCAGGATGT	9 080-10 086
S15	P15S	TTCTCAACGCAATGTCG	9 729-10 964
S15	P15R	AGATCCTGTGTTCTTCCT	9 729-10 964

1.8 全基因组克隆

通过对病毒基因型的初步分析,根据与其亲缘关系最近的毒株序列设计引物(表 1),并对分离到的病毒进行全基因组分段扩增。将扩增片段回收并连接到 pEASY-T1 载体上,酶切鉴定正确后送生物工程(上海)有限公司测序。

1.9 JEV 分离毒株全基因组遗传进化分析

根据测序结果,经 BLAST 进行比较分析,利用

DNA STAR 软件对全基因组的核苷酸和氨基酸与其他毒株进行比较,并采用 MEGA5.0 软件与文献报道的相关 JEV 毒株分析绘制遗传进化树,37 株参考毒株背景信息见表 2。

2 结 果

2.1 病料 RT-PCR 检测

利用 JEV 的 E 基因特异性引物对临床病料

表 2 乙脑病毒参考毒株背景资料

编号	基因型	毒株名称	分离年份	分离地区	来源	GenBank 编号
1	I	K94P05	1994	Korea	Mosquito	AF045551
2	I	KV1899	1999	Korea	Pig	AY316157
3	I	Ishikawa	1998	Japan	Mosquito	AB051292
4	I	JEV/sw/Mie/41/2002	2002	Japan	Pig	AB241119
5	I	JEV/sw/Mie/40/2004	2004	Japan	Pig	AB241118
6	I	SC04-17	2004	China	Mosquito	GU187972
7	I	HEN0701	2007	China	Pig	FJ495189
8	I	XJ69	2007	China	Mosquito	EU880214
9	I	XJP613	2007	China	Mosquito	EU693899
10	I	SH17M-07	2007	China	Mosquito	EU429297
11	I	XJ61	2008	China	Pig	GU556217
12	I	GX0519	2005	China	Mosquito	JN381835
13	I	GX0523/44	2005	China	Mosquito	JN381832
14	I	BL06-50	2006	China	Mosquito	JF706270
15	I	BL06-54	2006	China	Mosquito	JF706271
16	I	SX09S-01	2009	China	Pig	HQ893545
17	II	FU	1995	Australia	Human	AF217620
18	III	Vellore P20778	1958	India	Human	AF080251
19	III	GP78	1978	India	Human	AF075723
20	III	14178	2001	India	Human	EF623987
21	III	04940-4	2002	India	Mosquito	EF623989
22	III	57434	2005	India	Human	EF623988
23	III	Nakayama	1935	Japan	Human	EF571853
24	III	JaGArS982	1959	Japan	Mosquito	AF069076
25	III	JaGAr01	1966	Japan	Human	AY508813
26	III	JaOH0566	1982	Japan	Mosquito	M18370
27	III	K87P39	1987	Korea	Mosquito	AY585242
28	III	P3	1949	China	Human	U47032
29	III	Beijing-1	1949	China	Human	L48961
30	III	SA14-14-2	1954	China	Vaccine strain	AF315119
31	III	HW	1988	China	Pig	AY849939
32	III	WHe	1988	China	Pig	EF107523
33	III	SH0601	2006	China	Pig	EF543861
34	III	Ling	1965	Taiwan	Human	L78128
35	III	ch1392	1990	Taiwan	Mosquito	AF254452
36	III	TIP1	1997	Taiwan	Mosquito	AF254453
37	IV	JKT6468	1981	Indonesia	Mosquito	AY184212

RNA 进行 RT-PCR 检测, 可获得长度为 1 500 bp 大小的目的片段, 初步表明该临床病料为乙脑阳性 (图 1)。将 RT-PCR 产物克隆至 T 载体后经测序分析, 确定扩增片段为 JEV 的 E 基因序列。

2.2 病毒分离

将猪脑组织匀浆液接种于 3 日龄乳鼠, 72 h 后可见乳鼠出现扎堆、昏迷、抽搐等典型神经症状。待乳鼠濒死时收集乳鼠脑组织, 经匀浆、冻融、过滤后接种 BHK-21 细胞。48 h 后可见 BHK-21 细胞出现细胞萎缩、变圆等明显的细胞病变现象 (图 2B), 而正常对照组细胞形态正常 (图 2A)。将出现细胞病变的细胞收集后, 继续接种正常 BHK-21 细胞, 盲传 5 代。然后, 利用空斑纯化, 分离得到病毒, 并将该毒株命名为 GX1209。利用空斑实验, 测定分离毒株的增殖滴度。然后, 将该病毒分别以 1 MOI、0.1 MOI 和 0.01 MOI 接种于 BHK-21 细胞, 每隔 6 h 收集病毒, 测定不同感染剂量接种 BHK-21 细胞后, GX1209 在不同时间点的病毒滴度。结果表明, 无论感染剂量高低, 60 h 左右时, 病毒在细胞中的相对增殖滴度都达到最高。其中, MOI=1 时, 病毒增殖滴度最高可以达到 3×10^9 pfu/mL (图 3)。

2.3 间接免疫荧光鉴定

为进一步确定分离毒株为 JEV, 将上述 GX1209 毒株、SA14-14-2 毒株分别感染 BHK-21 细胞, 48 h 后用 JEV E 蛋白单克隆抗体作为一抗, 以羊抗小鼠 FITC-IgG 为二抗进行间接免疫荧光实验。

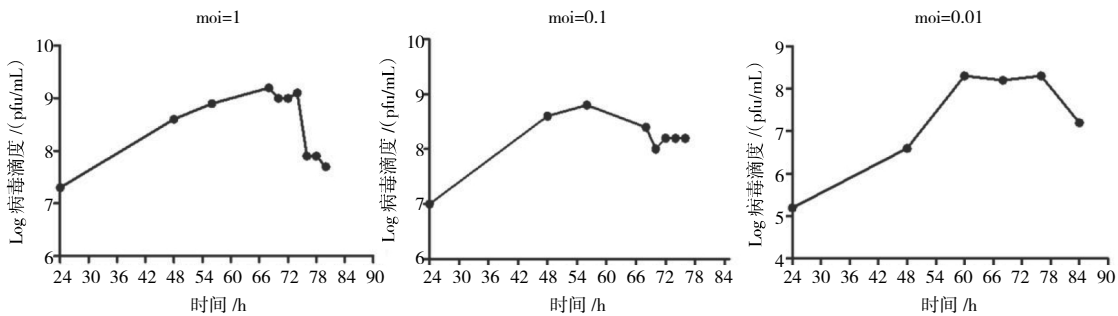
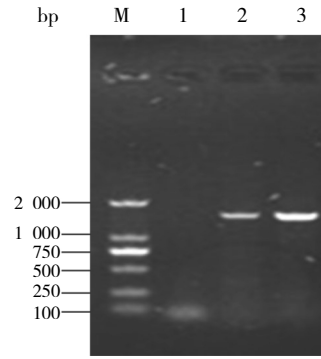


图 3 不同剂量广西分离株病毒在 BHK-21 细胞中的病毒滴度



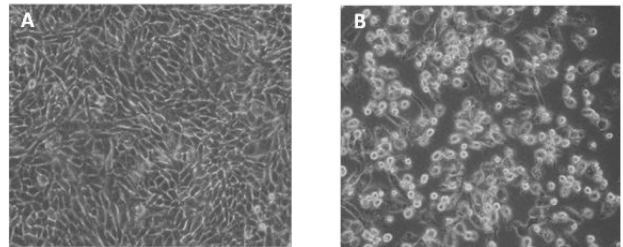
A: 接种 SA-14-14-2 毒株的 BHK-21 细胞阳性对照; B: 正常 BHK-21 细胞对照; C: 接种 GX1209 病毒的 BHK-21 细胞

图 4 分离株的间接免疫荧光检测结果



M: DNA marker DL 2000; 1: 阴性对照; 2: 阳性对照; 3: 猪脑被检样品

图 1 猪脑组织的 RT-PCR 检测结果



A: 正常 BHK-21 细胞对照; B: 感染 DX1209 病毒的 BHK-21 细胞

图 2 广西分离株在 BHK-21 细胞中的增殖 (100 ×)

结果表明分离毒株 GX1209 和阳性对照 SA14-14-2 毒株感染组细胞均有特异性绿色荧光, 而对照细胞无荧光, 进一步确定分离株为 JEV (图 4)。

2.4 分离毒株的病毒粒子电镜观察

将上述分离毒株在 BHK-21 细胞中进行大量增殖, 经密度超速离心后, 负染, 利用电子显微镜观察病毒粒子。如图 5 所示, 在电镜下, 可见直径约 40 nm 的病毒粒子, 与 JEV 病毒粒子大小一致。

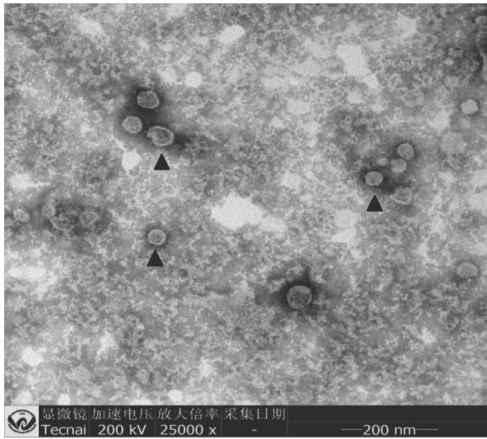


图 5 电子显微镜下的分离株病毒粒子照片

2.5 分离毒株的全基因组克隆与遗传进化分析

根据设计的引物,分 15 段扩增 GX1209 株的全基因组,然后将各片段分别测序后拼接结果显示:GX201209 株基因组全长为 1 095 bp,5'-UTR 为 96 bp,3'-UTR 为 570 bp,ORF 为 10 299 bp。遗传进化分析表明:GX201209 株属于基因 I 型病毒(图 6),与从新疆淡色库蚊分离的基因 I 型 XJ69 毒株核苷酸和氨基酸同源性最高,均达到 99%;与从广西三

带喙库蚊分离的基因 I 型毒株 BL06-50、BL06-54、GX0523/44、GX0519 的核苷酸同源性为 98%、氨基酸同源性为 99%;与基因 III 型毒株 SA14、SA14-14-2、P3 的核苷酸同源性为 89%、氨基酸同源性分别为 98%、97%、98%(表 3)。

表 3 分离毒株与其他 JEV 毒株同源性的比较结果

毒株名称	GenBank 编号	核苷酸同源性 /%	氨基酸同源性 /%
GX0519	JN381835	98	99
GX0523/44	JN381832	98	99
BL06-50	JF706270	98	99
BL06-54	JF706271	98	99
XJ69	EU880214	99	99
SA14	M55506	89	98
SA14-14-2	AF315119	89	97
P3	U47032	89	98

3 讨论

乙脑在东南亚、西太平洋、中国以及印度均有流行,并且我国是乙脑的主要流行区。目前我国除青海省外其他各省均有乙脑的报道^[1]。受气候、温度、

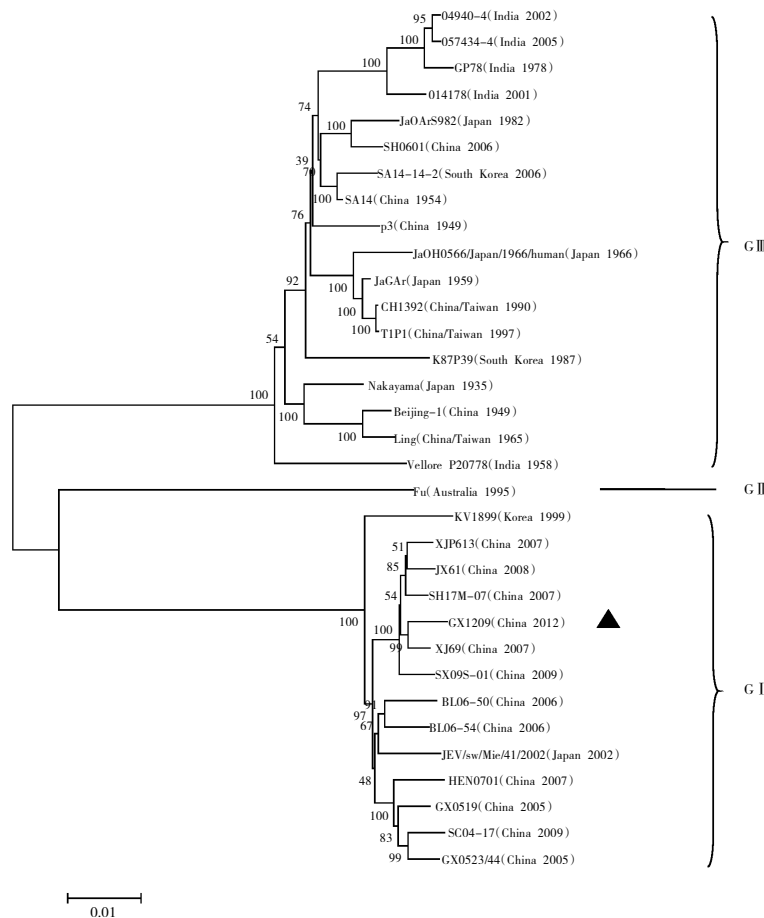


图 6 GX1209 毒株全基因组遗传进化树分析

地形的影响,加之适宜蚊媒滋生等因素的影响,广西地区一直是乙脑流行的高发区,每年都有乙脑散发或流行。根据广西全区 1960–2010 年乙脑疫情的资料显示,50 年来全区的乙脑病例是 65 384 例,死亡 11 875 例,年均发病率为 3.38/10 万,年均死亡率为 0.61/10 万,病死率为 18.16%^[12]。

本研究从广西南宁某猪场中采集发病的阳性仔猪脑组织病料,并从中分离到 1 株猪源基因 I 型乙脑病毒,命名为 GX1209。设计并完成了 GX1209 株全基因组序列的测定,其基因组全长为 10 965 bp,同源性和遗传进化树分析结果表明该毒株与基因 I 型 XJ69 毒株的遗传亲缘性较近,而与之之前报道过的广西其他乙脑毒株氨基酸同源性也较高。

人群的发病情况与猪的感染分布有相关性,乙脑在人群中流行之前,会先在猪群中发生,而且感染率高达 100%。乙脑病毒在感染猪后,在猪的血液内浓度大,病毒血症持续时间长,而感染人体却有相反的反应。猪作为乙脑的重要传染源和宿主,与人、蚊子共同构成了链状传播的途径。因此,研究猪源乙型脑炎对于乙脑的防控具有重要意义。

乙脑病毒的基因型及其流行与分布情况一直倍受关注。我国对于 I 型毒株的报道最早出现在 20 世纪 80 年代以前,随后基因 I 型的流行范围逐步扩大,并伴随着基因 III 型数量的下降。研究发现,当基因 III 型处于主要流行期时,该基因型的遗传差异度已经达到了最高点^[13]。2009 年,我国报道了从云南病人体内分离到基因 I 型的乙脑毒株,但综合目前国内外报道,从人分离到的病毒仍以基因 III 型为主^[14,16]。而从蚊子和猪分离到的乙脑病毒,既有基因 I 型也有基因 III 型,且基因 I 型的出现时间要晚于基因 III 型,但近年来报道的从蚊子和猪中分离的乙脑病毒大多为基因 I 型毒株,说明蚊子和猪中流行的优势基因型可能正从基因 III 型向基因 I 型转变。

乙脑疫苗预防该病可以得到明显的效果。当前,我国人和动物使用的疫苗均是基于基因 III 毒株研制生产的。尽管有研究表明目前的基因 III 型疫苗对基因 I 型和 III 型强毒株均有较好的保护力,但随着基因 I 型毒株分布逐步增多,研制基于基因 I 型毒株的乙脑新型疫苗也越来越引起人们的关注^[15]。

参 考 文 献

- [1] VANDENHURK A F, RITCHIE S A, MACKENZIE J S. Ecology and geographical expansion of Japanese encephalitis virus [J]. *Annu Rev Entomol*, 2009(54):17–35.
- [2] CHEN Y Y, FAN Y C, TU W C, et al. Japanese encephalitis virus genotype replacement, Taiwan, 2009–2010 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2011, 17(12):2354–2356.
- [3] CAMPBELL G L, HILLS S L, FISCHER M, et al. Estimated global incidence of Japanese encephalitis: a systematic review [J]. *B World Health Organ*, 2011, 89(10):766–774.
- [4] GERMAN A C, MYINT K S, MAI N T, et al. A preliminary neuropathological study of Japanese encephalitis in humans and a mouse model [J]. *Philos T R Soc B*, 2006, 100(12):1135–1145.
- [5] YASUI K. Neuropathogenesis of Japanese encephalitis virus [J]. *J Neurovirol*, 2002(8):112–114.
- [6] Solomon T, NI H, Beasley D W, et al. Origin and evolution of Japanese encephalitis virus in southeast Asia [J]. *J Virol*, 2003, 77(5):3091–3098.
- [7] UCHIL P D, SATCHIDANANDAM V. Phylogenetic analysis of Japanese encephalitis virus: envelope gene based analysis reveals a fifth genotype, geographic clustering, and multiple introductions of the virus into the Indian subcontinent [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2001, 65(3):242–251.
- [8] NGA P T, DEL CARMEN PARQUET M, CUONG V D, et al. Shift in Japanese encephalitis virus (JEV) genotype circulating in northern Vietnam: implications for frequent introductions of JEV from Southeast Asia to East Asia [J]. *J Gen Virol*, 2004, 85(6):1625–1631.
- [9] NITATPATTANA N, DUPOT-PERES A, GOUILH M A, et al. Change in Japanese encephalitis virus distribution, Thailand [J]. *Emerg Infect Dis*, 2008, 14(11):1762–1765.
- [10] 秦毅斌, 何颖, 何莘萍, 等. 广西猪乙型脑炎血清流行病学调查分析 [J]. *南方农业学报*, 2011, 42(6):668–671.
- [11] CAO Q S, LI X M, ZHU Q Y, et al. Isolation and molecular characterization of genotype I Japanese encephalitis virus, SX09S-01, from pigs in China [J]. *Virol J*, 2011, (8):472.
- [12] 梁能秀, 谭毅, 黎学铭, 等. 广西流行性乙型脑炎 50 年流行趋势分析 [J]. *热带医学杂志*, 2012, 12(1):19–21.
- [13] PAN X L, LIU H, WANG H Y, et al. Emergence of genotype I of Japanese encephalitis virus as the dominant genotype in Asia [J]. *J Virol*, 2011, 85(19):9847–9853.
- [14] 袁军, 付士红, 张海林, 等. 云南省脑炎病人脑脊液中检测到基因 I 和 III 型流行性乙型脑炎病毒 [J]. *中国病毒病杂志*, 2014, 4(3):187–191.
- [15] BEASLEY D W, LEWTHWAITE P, SOLOMON T. Current use and development of vaccines for Japanese encephalitis [J]. *Expert Opin Biol Th*, 2008, 8(1):95–106.