

DOI:10.3969/j.issn.1002-2694.2016.02.011

贵州遵义地区蝙蝠脑组织 BDV-P24 基因片段的检测

杨利玲,雷以会,徐平

摘要:目的 了解贵州遵义地区蝙蝠博尔纳病病毒(BDV)感染情况。**方法** 采用巢式逆转录聚合酶链反应(nRT-PCR)检测 82 例蝙蝠脑组织 BDV-P24 基因片段,阳性产物进行基因序列测定、同源性及分子系统树分析。**结果** 在 82 例蝙蝠脑组织中检测出 7 例 BDV-RNA P24 基因片段阳性,只有 5 例成功测出 BDV-P24 基因片段,与标准株马源 Strain V 相比较同源性高达 99%,出现 2 个位点的一致性沉寂突变(nt1650T~C, nt1740G-T, 突变率为 0.9%),与 H1766 比较其同源性达 97%,出现 5 个位点的一致性沉寂改变(nt1599A~G, nt1671T~C, nt1677T~C, nt1695G~A, nt1740G~T, 突变率为 2.2%),与 He/80 比较起同源性为 96%,出现 7 个位点的一致性沉寂改变(nt1566 G~A, nt1581C~T, nt1659 T~C, nt1668 A~G, nt1674 T~C, nt1695 G~A, nt1740 G~A, 突变率为 3.1%)。**结论** 贵州遵义绥阳地区蝙蝠存在 BDV 感染,与马源 Strain V 存在高度同源性,人感染 BDV 可能存在潜在的动物源性。

关键词:博尔纳病病毒;蝙蝠;nRT-PCR;P24

中图分类号:R373

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2016)02-0156-04

Borna disease virus p24 in brain tissue of bat infect in Zunyi, Guizhou Province, China

YANG Li-ling, LEI Yi-hui, XU Ping

(The Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563500, China)

Abstract: The p24 gene fragment of BDV-RNA in brain tissue of bat was detected by nested reverse transcriptase polymerase chain reaction (nRT-PCR) in Zunyi, Guizhou Province. The positive PCR products were analyzed by genetic sequence homology and molecular phylogenetic tree. Result showed that the P24 gene fragment of BDV-RNA in brain tissue from 82 bats was 7 positive. There was only 5 positive products could be successfully detected. The homology of p24 gene fragment of BDV was 99%, with 2 sites consistency silent mutation when compared with standard strain V in horse (nt1650T-C, nt1740G-T, mutation rate of 0.9%). The homology of p24 gene fragment of BDV was 97%, with 5 sites consistency silent mutation when compared with H1766 (nt1599A-G, nt1671 T-C, nt1677 T-C, nt1695 G-A, nt1740 G-T, mutation rate of 2.2%). The homology of p24 gene fragment of BDV was 96%, with 7 sites consistency silent mutation when compared with He\80 (nt1566 G-A, nt1581 C-T, nt1659 T-C, nt1668 A-G, nt1674 T-C, nt1695 G-A, nt1740 G-A, mutation rate of 3.1%). There is BDV natural infection probably originated from bat, highly homology with strain V in horse in Zunyi, Guizhou Province.

Keywords: Borna disease virus; bat; nRT-PCR; P24

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31160210)

Corresponding author: Xu Ping, Email: xuping527@vip.sina.com

博尔纳病病毒(Borna disease virus, BDV)是一种有包膜、未分节段单股负链、嗜神经性的核糖核酸病毒,是博尔纳病毒科、博尔纳病毒属家族中目前唯一的成员。最早发现于德国的 Borna 镇,在当地战马中暴发一类不明原因致死性脑炎,有学者在动物

尸体的脑组织中检测出病毒,就以该镇而命名为“博尔纳病病毒”。BDV 有着广泛的自然感染宿主,从鸟类到包括人类在内的大多数恒温哺乳动物,例如马、羊、猫、牛、犬、羊驼、狐狸、猴等^[1],国内外研究已证实马和羊为其最主要的自然感染宿主。随着科技水平的发展,发现 BDV 有着更广阔的感染动物种系,日本学者发现浣熊感染 BDV 的证据^[2],在我国重庆、宁夏、贵州以及新疆等地区已有动物脑组织和

国家自然科学基金项目(No. 31160210)资助

通讯作者:徐平;Email: xuping527@vip.sina.com

作者单位:遵义医学院第一附属医院神经内科,遵义 563500

外周血中发现感染 BDV 的相关报道。近年来研究发现在蝙蝠体内已经分离出 80 余种来源于动物且可感染人类的病原体^[3],例如狂犬病毒、乙型脑炎病毒等人兽共患病病毒,其中也包括许多新型的人兽共患病病毒,比如马来西亚暴发的尼帕病毒病、澳大利亚暴发的亨德拉病毒病以及近几年爆发较为频繁的西尼罗病毒病等均被证明蝙蝠为这些病毒的自然感染宿主。目前,国内外尚未有蝙蝠感染 BDV 的相关文献。为此,我们采用传统的 nRT-PCR 对 82 只蝙蝠的脑组织 BDV-P₂₄ 基因片段进行检测,并对 PCR 阳性产物测序,以了解遵义地区蝙蝠 BDV 自然感染状况,探讨 BDV 种系来源,并与标准株 Stain V、H1766、He/80 比较分析其同源性。实验结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 实验材料 全部 82 只蝙蝠均采自遵义地区野生蝙蝠,采集时间为 2014 年 5 月至 2014 年 9 月。从蝙蝠中采取的脑组织标本放入去酶的 1.5 mL EP 管,并立即放于 -80 °C 的超低温冰箱保存。采集过程中严格按照无菌操作收集标本,避免样品间交叉污染。

1.2 引物 根据 GenBank BDV 基因保守区第二开放阅读区(ORFII)的核苷酸序列设计 2 对引物。外引物序列长度为 512 bp,

P1: AGACACTACGACGGAACGA

P2: TGGGAGCTGGGGATAATGC。

内引物序列长度为 270 bp,

P3: GCATGATCGAGGCTGAGGAG

P4: GCAACATGGGTGCAGAGGTC,

引物由上海生工有限公司合成。

1.3 主要仪器 凝胶成像系统 Chemidoc XRS(美国应用生物系统公司)、RTC0200 DNA Engine PCR 仪、紫外分光光度计 Nanodrop 1000(基因有限公司)。

1.4 方法 全部标本均采自蝙蝠的新鲜脑组织,重量约为 110~150 mg,分装于去酶的 1.5 mL EP 管中并编号,-80 °C 超低温冰箱保存。所有仪器和试管均经过高压灭菌、去 RNA 酶处理。

1.4.1 RNA 的提取及质量检测 取 50 mg 左右的蝙蝠脑组织于已高温灭菌的玻璃匀浆管中,加入 1 mL 的 Trizol 试剂,采用灭菌后的玻璃研磨棒研磨,直至研磨为匀浆液。用 Trizol 一步法提取 RNA。提取的 RNA 样本用紫外分光光度计测定 RNA 的浓度以及 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值,以检测 RNA 的

质量,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值介于 1.8~2.1 认为提取 RNA 质量较好。将提取的 RNA 样本于 -80 °C 低温冰箱保存。

1.4.2 BDV P₂₄ 基因片段的检测 采用 nRT-PCR 方法。在进行 BDV 检测的全部环节中均设置阴性对照和阳性对照,以去酶的 DRPC 水为阴性对照以排除假阳性,同时使用 BDV 感染的 OL 细胞为阳性对照以排除假阴性(阳性对照标本为重庆医科大学所提供)。(1)RNA 逆转录成 cDNA: 将所提取的 RNA 样本放于室温中。反应体系为 10 μL: V_{RNA} = 500 ng/RNA 样本浓度, 5 × Prime Script RT Master Mix 2 μL, 去酶的 DEPC 补足 10 μL。反应条件: 37 °C 15 min, 85 °C 5 s, 4 °C 保持。(2)第 1 轮 PCR 反应体系 25 μL: 2 × GoTaq Master Mix 12.5 μL, 外上、下游引物各 1 μL, cDNA 样本 2 μL, 去酶的 ddH₂O 8.5 μL。反应条件: 预变性 95 °C 2 min, 变性 95 °C 30 s, 退火 55 °C 30 s, 延伸 72 °C 30 s, 共 22 个循环, 延伸 72 °C 5 min, 保持 4 °C 5 min。(3)第 2 轮 PCR 反应体系: 2 × GoTaq Master Mix 12.5 μL, 内上、下游引物各 1 μL, 第一轮 PCR 产物 2 μL, 去酶的 ddH₂O 8.5 μL。反应条件: 预变性 95 °C 2 min, 变性 95 °C 30 s, 退火 58 °C 30 s, 延伸 72 °C 30 s, 共 22 个循环, 延伸 72 °C 5 min, 保持 4 °C 5 min。

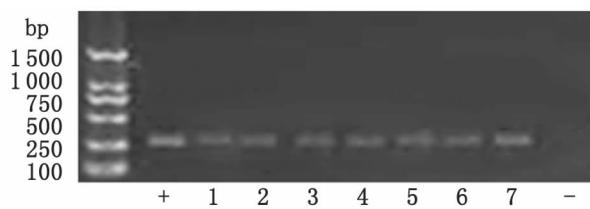
1.4.3 测序 将第 2 轮 PCR 产物进行琼脂糖电泳,并在凝胶成像系统观察结果。最后将阳性的 PCR 产物进行纯化和克隆,由英捷有限公司进行测序。

1.4.4 序列分析 登陆 NCBI, 应用 BLAST 软件, 将测序结果和 GenBank 上提供的标准株 He/80、Strain V、H1766 等进行比对分析, 使用 DNAMan8 绘制系统发生树。

2 结 果

2.1 PCR 扩增产物电泳 应用 nRT-PCR 方法对蝙蝠脑组织 BDV-P₂₄ 基因片段进行检测。1% 琼脂糖电泳有 7 份 PCR 产物大约在 250 bp 处可见明显条带, 阴性对照未出现条带。见图 1。

2.2 测序及序列分析 对 7 份 PCR 阳性产物进行纯化、测序, 仅有 5 份测序成功, 阳性率为 6.1%, 另外两份因浓度太低而未测出。登陆 NCBI 和序列比对, 阳性 PCR 产物扩增片段证实为 BDV-P₂₄ 基因片段(nt1 528~nt1 750), 蝙蝠 BDV-P₂₄ 测序结果与 GenBank 所提供的标准株的相似性达 96%~99%。与标准株马源 Strain V(GenBank 编号: AJ311521.1) 相比较同源性高达 99%, 出现 2 个位点的一致性沉



+ was positive control, - was negative control, 1-7 were test specimens.

图 1 7 例阳性 PCR 产物电泳结果。其中+为阳性对照,-为阴性对照,1-7 为实验标本

Fig. 1 Electrophoresis results of 7 positive nRT-PCR products

突变(nt1650T~C, nt1740G~T, 突变率为0.9%),与 H1766(GenBank 编号: AJ311523.1)比较其同源性达97%,出现5个位点的一致性沉寂改变

(nt1599A~G, nt1671T~C, nt1677T~C, nt1695G~A, nt1740G~T, 突变率为2.2%),与 He/80(GenBank 编号: AJ311522)比较起同源性为96%,出现7个位点的一致性沉寂改变(nt1566 G~A, nt1581C~T, nt1659 T~C, nt1668 A~G, nt1674 T~C, nt1695 G~A, nt1740 G~A, 突变率为3.1%)。

2.3 系统发生树分析 重构系统发生树发现,在核苷酸水平上可见4例蝙蝠脑组织BDV-P₂₄基因片段汇聚形成贵州独立支系,1例蝙蝠脑组织BDV-P₂₄的基因序列与精神疾病患者PBMC中BDV-P₂₄基因序列(GenBank No. L76236)形成独立支系。见图2。

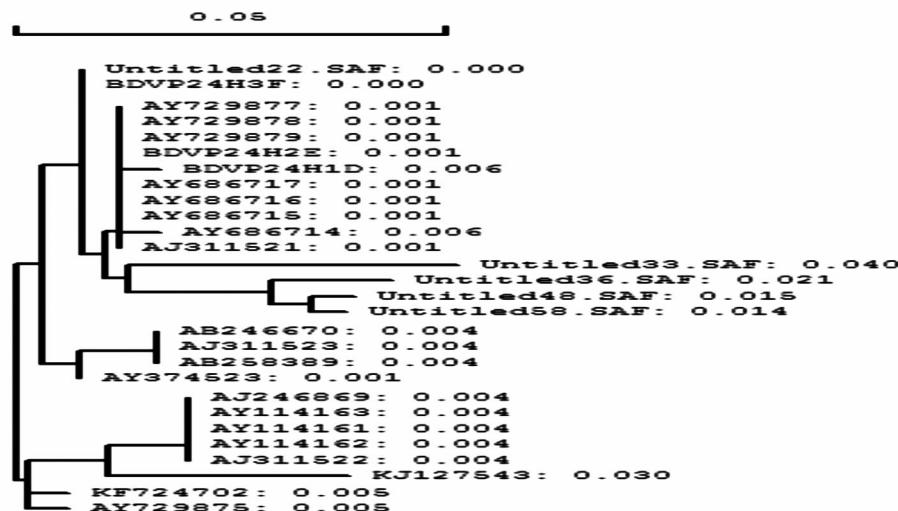


图 2 BDV 分子系统树分析
Fig. 2 Analysis of BDV molecular phylogenetic tree

3 讨 论

博尔纳病病毒(borna disease virus, BDV)为博尔纳病的病原体,博尔纳病为免疫介导的中枢的脑脊髓炎,感染动物以精神行为异常为主要临床症状,人类则表现为神经精神疾病症状。BDV是一种嗜神经的RNA病毒,感染途径可能以口、鼻、眼等处的分泌物以及血液进行传播,在自然环境中人和动物直接或间接接触被污染的食物、水而发生感染。

BDV有着广泛的自然感染宿主,国内已有许多关于BDV分子流行病学调查的相关报道。国内学者采用荧光定量结合巢式逆转录聚合酶链反应(FQ-nRT-PCR)方法对多种物种进行BDV检测。何丰^[4]检测新疆伊犁地区100只牧羊犬PBMC和脑组织中P₂₄阳性率分别为5%、9%,刘建^[5]对宁夏地区163只绵羊脑组织检测P₂₄阳性率为3.68%。本课题组前期成员王长明^[6]、刘海军^[7]采用FQ-

nRT-PC分别对贵州省以及周边地区的300只山羊和120只牛的PBMC进行检测,阳性率分别为0.67%、4.17%。Wensman^[8]发现健康猫BDV阳性率为16%(4/25)。

本研究采用巢式RT-PCR对82份蝙蝠脑组织进行BDV-P₂₄检测,发现其阳性率为6.1%,说明遵义绥阳地区存在有一定程度的BDV感染。但均高于前期成员报道遵义地区牛和山羊的BDV阳性感染率,与重庆、新疆、宁夏等地区的恒温动物的BDV阳性感染也有一定的差别,可能原因有以下几个方面:1)本实验以蝙蝠脑组织为检测对象,脑组织中BDV RNA的含量较PBMC中丰富,故本实验BDV阳性感染率较高。2)不同地区、不同物种BDV感染率不同。3)急性感染BDV后,大部分病毒颗粒被免疫系统清除,血清中仅存在少量的病毒颗粒,但在中枢神经系统中依然存在持续感染^[9]。本实验引

物设计是选取 BDV-P₂₄ 高度保守序列区,且测序结果与标准株的同源性达 96%~99%,仍存在个位点的突变,说明感染蝙蝠的 BDV 存在基因多样性。王长明曾报道遵义部分地区山羊存在 BDV 的自然感染,并且 2 头 BDV 阳性的山羊均来自绥阳地区,说明遵义绥阳地区为疫源的高风险地区,若 BD 爆发或流行,遵义绥阳地区可能为先发的流行区之一。从重构的分子系统发生树中可发现 5 例阳性标本隶属于 2 个支系。4 例蝙蝠脑组织 BDV-P₂₄ 基因片段形成贵州独立支系的可能原因:1)不同地区形成不同的 BDV 株系。2)由于自然选择对变异的作用大小不同,由该地区的 BDV 株系基因突变而成^[10]。1 例与国外精神病人单独汇聚为一株系,有较高的同源性,说明 BDV 可以在动物与动物、动物与人类之间循环传播。

综上所述,贵州省遵义地区蝙蝠存在 BDV 自然感染,人感染 BDV 存在潜在动物源性。由于标本均来自本地,并且标本数量较少,无法做出全面的解释,后续研究还需扩大标本数量并进行其它地区的分子流行病学研究,并开展本省 BDV 病毒株分离工作,为预防和控制贵州省 BDV 的流行奠下基础。

参考文献:

- [1]Kinnunen PM, Palva A, Vaheri A, et al. Epidemiology and host spectrum of Borna disease virus infections[J]. Gen Virol, 2013, 94(2): 247-262. DOI: 10.1099/vir.0.046961-0
- [2]Hagiwara K, Matoba Y, Asakawa M, et al. Borna disease virus in raccoons(*Procyon lotor*) in Japan[J]. Vet Med Sci, 2009, 71(8): 1009-1015.
- [3]Chen C, Song SP, Deng ZR, et al. Research progress in relationship between bat and the spread of the virus in China[J]. Anim Ctrl, 2013, 29(9): 988-989. (in Chinese)
- 陈晨,宋世佩,邓致荣,等.我国蝙蝠与病毒传播关系的研究进展[J].医学动物防制,2013,29(9):988-989.
- [4]He F, Feng YX, Sun HC, et al. The comparison of detection of Borna disease virus in brain tissue and peripheral blood in sheepdog[J]. Chin J Zoonoses, 2010, 26(4): 337-340. (in Chinese)
- 何丰,冯裕星,孙后超,等.牧羊犬外周血和脑组织博尔纳病病毒检测结果的比较[J].中国人兽共患病学报,2010,26(4):337-340.
- [5]Zhao L, Liu J, Wang ZH, et al. The natural infections of Borna disease virus in brain tissue of sheep in NingXia[J]. J NingXia Med Univ, 2010, 32(7): 755-758. (in Chinese)
- 赵莉,刘建,王振海,等.宁夏绵羊脑组织博尔纳病病毒的自然感染状况[J].宁夏医科大学学报,2010,32(7):755-758.
- [6]Wang CM, Xu P, Ge JJ, et al. Detection on the P₂₄ gene fragment of Borna disease virus from peripheral blood of goats in Zunyi region of Guizhou province[J]. Chin J Zoonoses, 2009, 25(2): 149-151. (in Chinese)
- 王长明,徐平,葛均江,等.贵州遵义地区山羊 Borna 病毒 P₂₄ 基因片段的检测[J].中国人兽共患病学报,2009,25(2):149-151.
- [7]Liu HJ, Wang CM, Xie TT, et al. Borna disease virus in blood of cattle infect detection in Guizhou and surrounding areas[J]. Chongqing Med J, 2011, 40(32): 3296-3299. (in Chinese)
- 刘海军,王长明,谢婷婷,等.贵州省及部分周边地区牛博尔纳病病毒感染的情况调查[J].重庆医学,2011,40(32),3296-3299.
- [8]Wensman JJ, Jaderlund KH, Gustavsson MH, et al. Markers of Borna disease virus infection in cats with staggering disease[J]. Feline Med Surg, 2012, 14 (8): 573-582. DOI: 10.1177/1098612-12446638
- [9]Ludwig H, Bode L, Gosztonyi G. Borna disease: a persistent virus infection of the central nervous system[J]. Prog Med Virol, 1988, 35: 107-151.
- [10]Kolodziejek J, Durrwald R, Herzog S, et al. Genetic clustering of Borna disease virus natural animal isolates, laboratory and vaccine strains strongly reflects their regional geographical origin[J]. Gen Virol, 2005, 86(Pt2): 385-398.

收稿日期:2015-06-08;修回日期:2015-09-22