

羊口疮病毒农安分离株的分离鉴定及 Orf059(F1L)基因的序列分析

苏高莉,赵 魁,孙秀萍,何 叶,周 平,潘 伟,包英夫,李吉达,宋德光*,高 丰*
(吉林大学 畜牧兽医学院,吉林 长春 130062)

摘要:利用初生胎羊鼻甲骨(Primary ovine fetal turbinate,OFTu)细胞从送检的疑似“口疮”症状的病羊唇部痂皮中分离获得1株病毒,用PCR检测、电镜负染观察及理化性质测定等方法对该分离株病毒进行鉴定,证实该分离株为羊传染性脓疱病毒(Orf virus,ORFV),命名为(Orf virus Jilin-Nongan,ORFV JL-NA株)。对ORFV JL-NA分离株Orf059(F1L)基因进行克隆、测序并对测序结果进行序列分析。结果显示,获得的ORFV JL-NA分离株Orf059(F1L)基因序列长为994 bp,编码329个氨基酸,与ORFV-D1701株、ORFV-Jilin株、ORFV-NZ2株、ORFV-20株、ORFV-7株、ORFV-C2株、ORFV-IA82株、ORFV-SA00株、ORFV-mi90株、ORFV-torino株、ORFV-Shanxi株核苷酸序列同源性分别为96.4%、97.3%、99.1%、98.7%、99.0%、97.5%、98.4%、97.2%、97.4%、96.9%和96.8%。遗传进化树结果显示,ORFV JL-NA分离株与意大利ORFV-7毒株的亲缘关系较近,表明不同地区分离株的Orf059(F1L)基因差异不大。

关键词:羊传染性脓疱病毒;分离鉴定;Orf059(F1L)基因;序列分析

中图分类号:S852.654

文献标志码:A

文章编号:1005-4545(2013)01-0004-05

Identification of an Orf virus isolated from sheep herd in Nongan district and sequence analysis of Orf059(F1L) gene

SU Gao-li,ZHAO Kui,SUN Xiu-ping,HE Ye,ZHOU Ping,PAN Wei,BAO Ying-fu,LI Ji-da,
SONG De-guang*,GAO Feng* (College of Animal Science and Veterinary Medicine,Jilin
University,Changchun 130062,China)

Abstract:An Orf virus isolate,named as Orf virus Jilin-Nongan(ORFV JL-NA isolate),was obtained from scab materials of lambs with clinical sore mouth symptom by passaging in primary ovine fetal turbinate (OFTu) cells. The virus was identified as Orf virus based on morphology, physicochemical property and PCR. The Orf059(F1L) gene was sequenced and analyzed. The length of Orf059(F1L) gene was 994bp,which encoded a protein of 329 amino acids. The Orf059(F1L) gene of the ORFV JL-NA isolate shared a nucleotide identity of 96.4%,97.3%,99.1%,98.7%,99.0%,97.5%,98.4%,97.2%,97.4%,96.9% and 96.8% with those of ORFV strains ORFV-D1701,ORFV-Jilin,ORFV-NZ2,ORFV-20,ORFV-7,ORFV-C2,ORFV-IA82,ORFV-SA00,ORFV-mi90,ORFV-torino and ORFV-Shanxi,respectively. The results of the phylogenetic tree analysis indicated that there was a close genetic relationship between ORFV JL-NA isolate and strain ORFV-7. These results indicated the difference in the Orf059(F1L) gene was not obvious in the different isolates.

Key words:Orf virus;isolation and identification;Orf059(F1L) gene;sequence analysis

* Corresponding author

收稿日期:2012-11-05

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31101785);吉林省世行贷款农产品质量安全项目(2011-Y20);吉林省科技厅重点计划发展项目(20080217);吉林大学基本科研业务费平台基地建设(450060326051)

作者简介:苏高莉(1986-),女,硕士。

* 通讯作者

羊口疮病毒(Orf virus,ORFV)属于痘病毒科、副痘病毒属^[1]。羊口疮,又叫羊接触传染性脓疱性皮炎,是一种遍布世界的病毒性疾病,主要感染小反刍动物如山羊和绵羊,偶尔也感染其他野生反刍动物如鹿、麝牛等^[2],以羔羊最为易感。常引起群体发病,尤其是密集的羊群^[3-5]。其临床特征是在唇部、

舌、鼻端、乳房等部位形成丘疹、水疱、脓疱和痂皮^[3]。且主要引起皮肤和黏膜的增生性病变^[6]。此外,本病也是一种人兽共患传染病,通过直接接触传染^[7]。据报道,该病发病率接近 50%,敏感羊群的发病率则可接近 90%,因此该病一旦发生,在给养羊业造成巨大经济损失的同时也直接威胁着人类的健康^[8]。近些年不断有报道称发现有新的物种感染该病毒,这暗示 ORFV 感染宿主范围存在扩大化的趋势^[9],同时 ORFV 具有免疫逃避能力,可重复感染同一宿主^[10]。因此该病的发生应引起人们的高度重视。

Orf059(F1L)基因位于 ORFV 基因组中部^[11],中间区域基因相对保守^[12]。其可以编码具有肝素结合活性的蛋白,这种蛋白能够与大多数哺乳动物细胞表面表达的硫酸乙酰肝素(Heparan sulfate, HS)受体结合,鉴于此认为该蛋白在病毒的吸附和侵入过程中起着重要作用^[13]。39 000 蛋白是由 ORFV 基因组上的 Orf059(F1L)基因编码产生的,且 39 000 抗原多肽作为病毒表面微管的组成成分之一,很有可能与诱导宿主产生中和抗体有关^[14]。2011 年 9 月,农安县一养羊户送检 1 只疑似羊口疮的 3 月龄羔羊,为了查明病因,本试验首先对研磨病料进行初步的 PCR 鉴定,并通过克隆 ORFV 农安分离株(ORFV JL-NA 株)的 Orf059(F1L)基因和测序结果分析,以了解 ORFV JL-NA 分离株 Orf059(F1L)基因的分子特性及其编码蛋白的功能,为羊传染性脓疱病致病机制的研究、诊断与防治等提供重要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料 OFTu 细胞由吉林大学病理解剖实验室保存;2 只 2 月龄小尾寒羊,由吉林大学实验动物中心提供;*E. coli* DH5 α 由吉林大学病理解剖实验室保存;pMD18-T 载体、DNA 限制性内切酶 HindⅢ和 EcoR I、rTaq DNA 聚合酶等购自大连宝生物工程有限公司;UNIQ-10 柱式病毒基因组抽提试剂盒、质粒提取试剂盒购自上海生工生物工程有限公司;DNA 胶回收试剂盒购自长春百奥生物技术有限公司。

1.2 病料处理 取患病羔羊唇部痂皮,用石英砂对其进行充分研磨,制成 1 : 10 PBS(0.01 mol/L, pH7.2)悬液,3 000 r/min 离心 30 min,收集上清,按照 20%的比例加入 1×10^4 IU/mL 双抗(青链霉素),4℃感作过夜,-20℃冻存。

1.3 病毒分离 取 1.2 中的病料处理上清液 1 mL

接种于生长良好的 OFTu 细胞,37℃吸附 2 h,中间每隔 20 min 轻摇细胞瓶,吸附完成后弃去上清液,加入含 2%胎牛血清的 MEM 细胞维持液,静置培养于 37℃、5%CO₂细胞培养箱。同时设立正常细胞对照组。以后逐天观察细胞病变效应(CPE),如果在接种病料后 4~5 d 内细胞没有出现病变那么就连续盲传 3 代,若传至第 5 代还没有出现病变则可视为阴性,但如果 80%以上细胞出现变圆、收缩、脱落以及拉网等病变现象时立即收毒,反复冻融 3 次后,保存于-80℃。

1.4 常规病毒学鉴定

1.4.1 形态学鉴定 收集出现典型 CPE 的细胞培养物,反复冻融 3 次,3 000 r/min 离心 20 min,含有病毒的上清经 1%磷钨酸溶液负染,负染后电镜观察。

1.4.2 病毒理化特性试验 鉴定分离毒株的理化性质。病毒液经 50℃水浴 30 min 处理进行病毒耐热性试验;病毒液经 5%氯仿和 20%乙醚处理进行脂溶剂敏感性试验;病毒液经 5-IUDR 处理进行病毒核酸类型鉴定试验。并且设立正常对照组。用 OFTu 细胞在 96 孔板上测定其病毒的 TCID₅₀。

1.4.3 动物回归试验 40 000 r/min 超速离心 3 h 纯化收集的细胞病毒液,在 1 只 2 月龄试验羊的口腔黏膜划痕接种纯化病毒液,每只接种 0.5 mL,同时设正常对照组,对照组以同样的方法接种无菌 PBS 0.5 mL。接种后每天对接种部位进行病变观察。

1.5 病毒 DNA 的抽提及 PCR 扩增 利用 UNIQ-10 柱式病毒基因组抽提试剂盒由接毒细胞中抽提病毒 DNA,具体操作按照抽提试剂盒说明书进行。以抽取的病毒基因组 DNA 为模板,并参考文献[15],设计合成 1 对引物(上游引物序列 P1 为:5'-CAAGCTTGCCACCATGGATCCACCCGAAATC-3',划线处为 HindⅢ酶切位点,下游引物序列 P2 为:5'-CGAATTCTCACACGATGGCCGTGACC-3',划线处为 EcoR I 酶切位点),用于扩增分离株的 Orf059(F1L)基因片段,引物由上海生工生物工程有限公司合成。采用 25 μ L 的 PCR 反应体系:2.25 μ L 灭菌水,12.5 μ L 2 $\times$ GC Buffer I,4 μ L dNTPs (2 mmol/L),P1、P2(25 μ mol/L)各 0.5 μ L,模板 5 μ L,rTaq 酶 0.25 μ L。

反应条件为:95℃ 预变性 150 s;95℃ 45 s,60℃ 45 s,72℃ 150 s,30 个循环;72℃ 总延伸 10 min。取 5 μ L PCR 产物于 1%琼脂糖凝胶上进行电泳,观察 PCR 扩增结果。

1.6 Orf059(F1L)基因的克隆与测序 将PCR产物用DNA凝胶回收试剂盒回收纯化,将纯化回收的目的片段与pMD18-T载体进行连接,16℃连接过夜。将连接产物转化到DH5 α 感受态细胞,涂布于含1‰Amp的LB固体培养基,37℃培养后,挑取可能插入目的片段的单个白色菌落,接种于含1‰Amp的LB液体培养基中,37℃摇床160 r/min培养过夜,用质粒DNA小量试剂盒提取质粒,酶切鉴定筛选阳性质粒菌种,送上海生工生物工程有限公司测序。同时对培养后的菌液用原设计引物进行PCR鉴定。

1.7 测序结果分析 对获得的ORFV JL-NA分离株Orf059(F1L)基因的测序结果,应用DNASar软件进行生物信息学分析(包括核苷酸同源性、遗传进化树等)。

2 结果

2.1 感染羊临床症状观察 送检患病羔羊极度消瘦、精神沉郁、被毛粗糙无光泽,且在患病羊的上下唇、口角以及鼻孔等部位见有大小不等的脓疱,并有大面积黑褐色痂块形成,非常坚硬。除去硬痂后露出凸凹不平锯齿状的肉芽组织,很容易出血,压力之有脓汁排出。

2.2 病毒分离 应用OFTu细胞从患病羔羊唇部痂皮中分离获得1株ORFV,命名为Orf virus Jilin-Nongan(ORFV JL-NA株)。ORFV JL-NA分离株接种前4代细胞上的CPE不太明显,盲传至第5代时细胞出现变圆、收缩和聚堆等现象,随着连续的传代,细胞病变越来越明显,可见明显的“拉网状病变”(图1A)。对照组则呈正常细胞形态(图1B)。

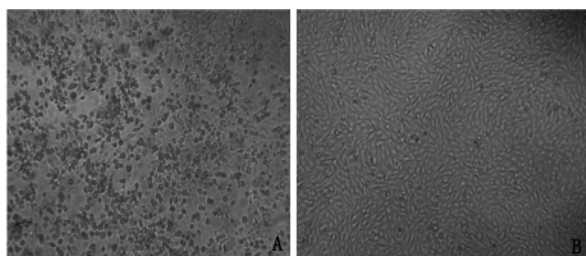


图1 接种ORFV JL-NA株后发生病变的OFTu细胞
A. 病变OFTu细胞; B. 正常OFTu细胞

2.3 常规病毒学鉴定结果

2.3.1 电镜观察结果 通过电镜观察可见典型的痘病毒粒子,病毒粒子外观呈椭圆形,有囊膜,病毒粒子表面有绳索样结构缠绕(图2)。

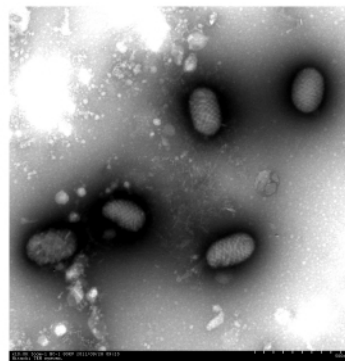


图2 电镜负染观察结果(40 000×)

2.3.2 理化学特性鉴定结果 50℃水浴、5%氯仿、20%乙醚、5-IUDR分别处理ORFV JL-NA分离株的细胞毒后,其TCID₅₀分别为 103.2×10^{-2} 、0、0、 102.5×10^{-2} ,正常对照组的TCID₅₀为 $104.67 \times 10^{-2}/100 \mu\text{L}$ 。

2.3.3 动物回归试验 0.5 mL纯化病毒液划痕接种于1只2月龄试验羊,接种后1周在其口角、唇部等部位出现丘疹、脓疱(图3),以后逐渐结痂愈合;同时对照组未见任何病变。

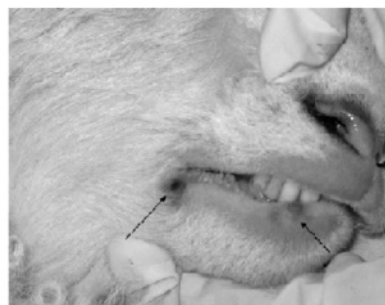


图3 感染羔羊唇部脓疱

2.4 Orf059(F1L)基因的扩增和克隆 以抽提的ORFV JL-NA分离株的病毒基因组DNA为模板进行PCR扩增,获得片段大小为1 031 bp的扩增产物,与预期的DNA片段长度相符(图4)。

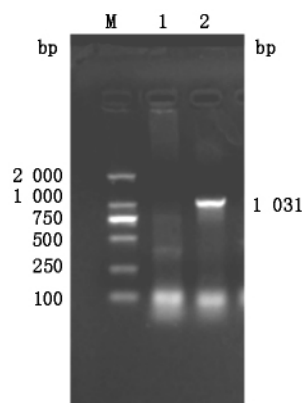


图4 ORFV JL-NA分离株Orf059(F1L)基因的PCR扩增产物 M. DL2000 DNA Marker; 1. 阴性对照; 2. 基因PCR产物

2.5 重组质粒筛选与鉴定 重组质粒利用原设计引物扩增出 1 031 bp 大小的特异片段,经 BamH I 和 HindⅢ 双酶切鉴定得到同样相应大小的目的条带,表明目的片段已经成功插入到 pMD18-T 载体中,即所选质粒为阳性克隆(图 5)。

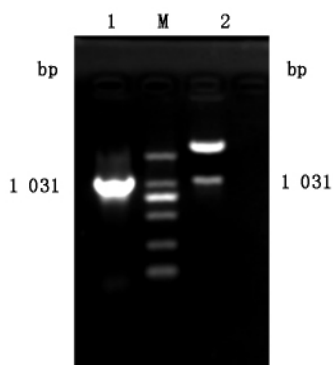


图 5 重组质粒鉴定结果 1. 重组质粒 PCR 产物; M. DL2000 DNA Marker; 2. 重组质粒双酶切结果

2.6 序列测定及其编码氨基酸序列 将鉴定的阳性质粒送上海生工生物工程有限公司进行序列测定,并对测序所得结果应用 DNASTar 软件进行拼接,获得 ORFV JL-NA 分离株 Orf059(F1L)基因序列长为 994 bp,编码 329 个氨基酸。

2.7 Orf059(F1L)基因片段的核苷酸同源性分析

选取 GenBank 中公布的 ORFV 的 11 个不同毒株(表 1),利用 DNASTar 软件,将 ORFV JL-NA 分离株 Orf059(F1L)的测序结果同这 11 个参考毒株进行核苷酸同源性分析(图 6)。分析结果表明,ORFV JL-NA 分离株 Orf059(F1L)与 ORFV-D1701 株、ORFV-Jilin 株、ORFV-NZ2 株、ORFV-20 株、ORFV-7 株、ORFV-C2 株、ORFV-IA82 株、ORFV-SA00 株、ORFV-mi90 株、ORFV-torino 株、ORFV-Shanxi 株核苷酸同源性分别为 96.4%、97.3%、99.1%、98.7%、99.0%、97.5%、98.4%、97.2%、97.4%、96.9%和 96.8%。

表 1 ORFV 参考毒株 Orf059(F1L)基因的相关信息

分离株	GenBank 登录号	宿主
ORFV-D1701(D1701)	HM133903	绵羊
ORFV-Jilin(Jilin)	FJ808075	绵羊
ORFV-NZ2(NZ2)	AF097215	绵羊
ORFV-OV/20(Ov-20)	AY040085	绵羊
ORFV-OV/7(Ov-7)	AY040084	绵羊
ORFV-OV/C2(Ov-c2)	AY040083	绵羊
ORFV-IA82(Ov-IA82)	AY386263	绵羊
ORFV-SA00(Ov-SA00)	AY386264	山羊
ORFV-OV/mi-90(Ov-mi90)	AY040082	羚羊
ORFV-OV/Torino(Ov-torino)	AY040081	羚羊
ORFV-Shanxi(Shanxi)	HQ221964	山羊

Percent Identity												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1		98.4	97.6	96.4	97.7	97.5	97.7	97.1	96.5	97.6	97.4	95.9
2	1.8		98.1	97.3	97.9	98.0	98.5	97.6	96.7	98.4	97.5	96.5
3	2.3	1.9		99.1	99.2	99.3	98.1	99.2	97.5	98.0	97.3	96.9
4	3.0	2.2	0.9		98.7	99.0	97.5	98.4	97.2	97.4	96.9	96.8
5	2.3	1.9	0.7	1.3		99.1	97.9	98.9	97.7	97.8	97.3	96.9
6	2.4	2.0	0.7	1.0	0.8		98.0	98.9	97.4	97.8	97.4	96.8
7	2.4	1.8	1.9	2.6	2.0	2.0		97.6	96.5	99.9	97.2	96.5
8	2.4	1.9	0.8	1.5	1.1	1.1	2.3		97.1	97.5	97.2	96.7
9	4.1	3.3	3.1	3.6	3.1	3.0	3.6	3.3		96.4	96.1	97.4
10	2.5	1.9	2.0	2.7	2.1	2.1	0.1	2.4	3.7		97.1	96.5
11	2.9	2.6	2.7	3.2	2.7	2.6	2.9	2.7	4.0	3.0		95.1
12	4.2	3.5	3.4	3.8	3.5	3.3	3.7	3.4	2.7	3.7	4.8	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

图 6 ORFV JL-NA 分离株与 ORFV 参考毒株 Orf059(F1L)基因核苷酸同源性分析

2.8 Orf059(F1L)基因遗传进化树 将分离株 ORFV JL-NA 的 Orf059(F1L)基因的测序结果与国内外发表的 ORFV 不同毒株相应片段进行序列比较分析,利用 DNASTar 软件计算遗传距离,根据遗传距离绘制遗传进化树(图 7)。Orf059(F1L)基因遗传进化树结果显示,ORFV JL-NA 分离株与意大利 ORFV-7 毒株的亲缘关系较近。

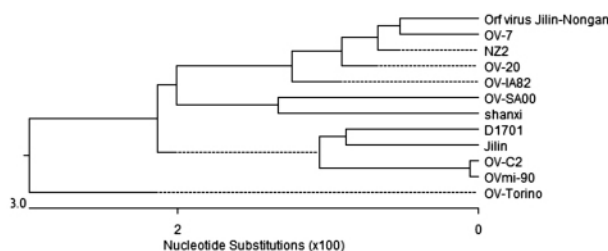


图 7 ORFV JL-NA 分离株 Orf059(F1L)基因进化树分析

3 讨论

本试验根据送检病羊所表现的典型临床症状,可初步诊断为“羊口疮”;为进一步进行确诊,结合 PCR 检测、病毒分离、电镜负染、动物回归试验以及理化性质测定等方法进行了系统的检测分析,病料痂皮样本的 PCR 扩增结果显示,获得与预期目的基因大小一致的条带;将经感作处理的病料研磨上清接种单层 OFTu 细胞,在盲传 5 代后细胞出现有典型的 CPE;电镜负染观察可见有典型的痘病毒粒子,与 ORFV 的形态学一致^[16],这表明我们从送检病羊痂皮中成功分离获得 1 株羊传染性脓疱病病毒,命名为 Orf virus Jilin-Nongan。综合分析以上结果,证实了该起病例为 ORFV 感染所致。

Orf059(F1L)基因编码的 39 000 蛋白是病毒囊膜的主要成分之一,能够参与病毒的吸附、侵入和成熟过程,此外,该蛋白还具有良好的免疫原性,能够

诱导机体产生中和抗体,在消除病毒感染过程中起到重要作用^[17]。因此,该基因的微小变化均有可能改变该病毒的某些生物学特性,例如致病性、免疫原性等。本试验将 ORFV JL-NA 分离株的 Orf059 (F1L)基因序列与国内外发表的 ORFV 不同毒株相应的核苷酸序列进行同源性比较,不同分离株 Orf059(F1L)基因的同源性为 96.4%~99.1%,其中与新西兰 ORFV-NZ2 株的同源性最高(为 99.1%),这表明不同毒株的 Orf059(F1L)基因高度保守。遗传进化分析结果表明,ORFV JL-NA 分离株的 Orf059(F1L)基因序列与意大利 OV-7 分离株亲缘关系较近,处于同一遗传进化分支;与 2008 年本实验室分离自吉林长春的 ORFV(ORFV-Jilin)分离株相比,其形成一独立的进化分支,这表明 Orf059(F1L)基因虽然高度保守,但在遗传上仍存在一定差异,这种差异可能是由于病毒在进化过程中的变异所致,然而这种差异是否影响其生物学特性还需要进行进一步的深入研究和分析。

目前,羊口疮普遍存在于饲养绵羊和山羊的国家,是羊群中常见的疫病之一,由于 ORFV 抵抗力强,羊群一旦被感染则不易清除,可持续危害羊群多年,该病的发生给养羊业造成严重的经济损失^[10]。目前,对该病的发病机制尚还不清楚,因此对 Orf059(F1L)基因及其编码蛋白的研究将不仅有助于阐明 ORFV 的致病机制,而且将为羊传染性脓疱病的预防和治疗措施的制定提供重要的理论依据。

参考文献:

- [1] Becher P, Konig M, Muller G, et al. Characterization of sealpox virus, a separate member of the parapoxviruses[J]. Arch Virol, 2002, 147: 1133-1140.
- [2] 张海瑞. 羊口疮病毒的分离鉴定及其 ELISA 检测方法的建立[D]. 甘肃 兰州: 中国农业科学院兰州兽医研究所, 2011.
- [3] 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所. 动物传染病学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 363-365.
- [4] 丁再隶, 何家惠, 刘立仁. 羊传染性脓疱皮炎在江苏的首次确诊[J]. 畜牧与兽医, 1992(2): 76-76.
- [5] 颜新敏, 储岳峰, 吴国华, 等. 山羊痘、羊口疮及山羊传染性胸膜肺炎混合感染的检测与分析[J]. 中国兽医学报, 2011, 31(6): 809-813.
- [6] De la Concha-Bermejillo A, Guo J, Zhang Z, et al. Severe persistent off in young goats[J]. JVDI, 2003, 15: 423-431.
- [7] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 977-980.
- [8] Mazur C, Machado R D. Detection of contagious pustular dermatitis virus of goats in severe outbreak[J]. Vet Rec, 1989, 125: 419-420.
- [9] Cargnelutti J F, Masuda E K, Martins M, et al. Virological and clinico-pathological features of orf virus infection in experimentally infected rabbits and mice[J]. Microb Pathog, 2011, 50: 56-62.
- [10] Haig D M, McInnes C J. Immunity and counter-immunity during infection with the parapoxvirus orf virus[J]. Virus Res, 2002, 88: 3-16.
- [11] Czerny C P, Waldmann R, Scheubeck T. Identification of three distinct antigenic sites in parapoxvirus[J]. Arch Virol, 1997, 142: 807-821.
- [12] Gubser C, Hue S, Kellam P, et al. Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis[J]. J Virol, 2004, 85(1): 105-117.
- [13] Scagliarini A, Gallina L, Dal Pozzo F, et al. Heparin binding activity of orf virus F1L protein[J]. Virus Res, 2004, 105(2): 107-112.
- [14] 赵魁, 贺文琦, 高丰. 羊传染性脓疱皮炎病毒研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2008, 3(11): 133-136.
- [15] 赵魁. 羊传染性脓疱病毒重组 DNA 疫苗的构建与实验免疫研究[D]. 吉林 长春: 吉林大学, 2010.
- [16] 何水林, 陈杰, 蔡玉书. 羊口疮病毒的分离与鉴定[J]. 中国兽医科技, 2002, 32(9): 22-23.
- [17] Gallian L, Scagliarini A, Ciulli S. Cloning and expression of orf virus F1L gene possible use as a subunit vaccine[J]. Vet Res Commun, 2002, 28: 291-293.