

牛轮状病毒的分离及其 RT-PCR 鉴定

姜向阳, 邓小敏, 王晶钰*, 王学艳, 罗 艳

(西北农林科技大学动物科技学院, 陕西杨凌 712100)

摘 要: 采用 MA104 细胞从疑似轮状病毒腹泻犊牛粪样中进行轮状病毒分离, 盲传 4 代后接种细胞出现明显细胞病变(CPE), 对分离病毒进行核酸聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电泳条带为 4:2:3:2 型, 具备典型 A 群轮状病毒特征。依据 NCBI 等登录的牛轮状病毒的 VP1 基因序列设计一对引物, 对其 VP1 基因进行克隆及序列分析, 结果分离毒与国外牛轮状病毒分离株 RF 的核苷酸同源性为 98.9%, 与 UK 的核苷酸同源性为 91.5%, 证明分离毒株是一株牛轮状病毒。

关键词: 轮状病毒; 细胞培养; VP1 基因; MA104 细胞

中图分类号: S852.65⁺3

文献标识码: A

文章编号: 1004-1389(2007)04-0191-04

Isolation of Bovine Rotavirus and Identification by Using RT-PCR

JIANG Xiang-yang, DENG Xiao-min, WANG Jing-yu*, WANG Xue-yan and LUO Yan

(College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract: One strain of bovine rotavirus was isolated from excrement of calf by using MA104 cell, and produced obvious cytopathic effects after fostering 4 times. RNA of isolated virus was analysed by PAGE and was type of 4:2:3:2, which belonged to rotavirus A type. A pair of primers were designed to clone VP1 gene according to sequences of bovine rotavirus in NCBI. The results showed that nucleotides sequence of VP1 shared 98.9% with RF isolated strain, 91.5% with UK.

Key words: Rotavirus; Cell culture; VP1 gene; MA104 cell

轮状病毒(Rotavirus, RV)属于呼肠孤病毒科(Reoviridae)轮状病毒属(Rotavirus),是各种幼龄动物非细菌性腹泻的主要病原之一^[1,4]。1968年由Mebus等在美国阿拉斯加州一农场犊牛腹泻病例中分离到,随后许多国家都有牛轮状病毒感染的报道。我国亦有牛感染轮状病毒的报道。轮状病毒主要感染1~7日龄的犊牛,可引起犊牛消化道机能紊乱临床上以呕吐、腹泻、脱水和酸碱平衡紊乱为特征。感染牛常发生死亡,病死率可达50%。据报道英国犊牛轮状病毒腹泻的发病率为60%~80%,死亡率为0%~50%^[1]。本项研究采用MA104(恒河猴胎肾传代细胞系)细胞系,从疑似感染轮状病毒腹泻犊牛粪便样品中分离到一株病毒,并运用RT-PCR对其VP1基

因进行了克隆表达,并进行了序列测定,以期为我国奶牛轮状病毒的诊断和防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 病料

采集于某公司第一奶牛场犊牛腹泻病料。

1.2 主要仪器

二氧化碳培养箱(日本三洋)、组织培养倒置显微镜(重庆普光)、PCR仪(MJ公司)、3K-18高速台式冷冻离心机(Singma公司)等。

1.3 主要试剂

DMEM培养基、胎牛血清,购于杭州四季青生物有限公司;胰酶、Trizol试剂盒,Ribonuclease inhibitor购自美国Invitrogen公司;胶回收(小

收稿日期:2006-11-17 修回日期:2007-03-10

基金项目:陕西省科技攻关项目(2005K01-G20-02)。

作者简介:姜向阳(1980—),男,山东青岛人,在读硕士,主要从事动物传染病研究。E-mail:xiangyang0108@163.com

*通讯作者:王晶钰(1964—),男,陕西乾县人,硕士生导师,主要从事预防兽医学研究。E-mail:wjygyu2004@126.com

量)试剂盒,上海华舜生物工程有限公司产品;反转录酶、RNA 酶抑制剂、*Taq* DNA 聚合酶、*Bam*H I 和 *Hind* III 限制性内切酶, dNTPs、DNA Marker(DL2000)均购自大连宝生物工程有限公司;DEPC 为 Amresco 产品;EB、琼脂糖等购自上海生工生物有限公司,细胞生长液(含 10%胎牛血清,100 U/mL 青霉素,100 μ g/mL 链霉素)、维持液(不含胎牛血清,100 U/mL 青霉素,100 μ g/mL 链霉素、终浓度 20 μ g/mL 胰酶)。其它试剂为国产分析纯。

1.4 宿主菌与载体

DH5 α 宿主菌,由西北农林科技大学预防兽医实验室保存。pMD-18T 克隆载体试剂盒购自大连宝生物工程有限公司。

1.5 病料处理及接种

将犊牛腹泻粪便样品用 pH 7.4 的 PBS 稀释成 10%的悬液,3 000 r/min 4℃离心 20 min,取上清,加入青霉素(1 000 U/mL)、链霉素(1 000 μ g/mL),将病料与 20 μ g/mL 的胰酶按 1:1 混合,37℃处理 1 h,接种于生长良好的 MA 104 单层细胞,细胞用 PBS 清洗两次,加入原生长液 1/10 的病料上清液,37℃吸附 1 h,其间摇匀 3 次,加入维持液,37℃5%的 CO₂ 培养,逐日观察,48~72 h 为一个传代周期。传代前培养物冻融 3 次,与 20 μ g/mL 胰酶按 1:1 混合,进行盲传,连续几次,待细胞出现 CPE 达 70%收毒。

1.6 病毒核酸提取

按 Trizol 试剂盒说明书的方法,直接从细胞培养物中提取病毒基因组 RNA,取 200 μ L 病毒液,加入 1 000 μ L Trizol,上下颠倒混匀,室温下孵育 5 min;加入 200 μ L 三氯甲烷,上下颠倒混匀,室温静置 2~3 min,于 4℃以下 11 500 r/min 离心 15 min;小心将上层液体移到另一用 DEPC 处理的 1.5 mL Eppendorf 管中,加入 500 μ L 异丙醇,颠倒混匀,室温放置 15 min;于 4℃下以 11 500 r/min 离心 15 min,弃上清,用 DEPC 处理 H₂O 配制的 75%乙醇(-20℃预冷)沉淀一次,4℃下以 7 400 r/min 离心 5 min;弃上清,瞬时离心吸弃液体后室温干燥得到病毒 RNA,加入 30 μ L DEPC 处理水和 1 μ L RNA 酶抑制剂立即进行反转录或置-20℃保存备用。

1.7 病毒基因组的 PAGE 电泳

取核酸样品 20 μ L 与 30 μ L 上样缓冲液混匀后置于 90℃水浴中,加热 2 min,随后点样。电

泳电压 300 V,电泳 1 h 后,用 10%乙醇,0.5%乙酸固定 15 min,纯净水洗涤 2 次;0.1%硝酸银染色 20 min,纯净水洗涤 2 次;2.0%氢氧化钠溶液,0.5%甲醛溶液染色观察,直到出现清晰的条带为止。

1.8 RV VP1 基因的 RT-PCR

1.8.1 引物设计 依据 NCBI 登录的 RV 的 VP1 基因保守区设计引物,上游引物:5',AGAATTTCCGTTTGGCTA3';下游引物:5'-CG-GTCACATCATACAACCTCT3',由上海生工合成。

1.8.2 VP1 基因的反转录及 PCR 扩增 取 11 μ L 溶解的 RNA,加 1 μ L 下游引物 65℃作用 10 min,冰浴 5 min,再加入 5×AMV Buffer 4 μ L,AMV 1 μ L,Ribonuclease inhibitor 1 μ L,dNTPs 2 μ L,混匀 42℃1 h,95℃10 min 得到 cDNA。再以 cDNA 为 PCR 扩增模板,反应体系为 50 μ L:cDNA 模板 4 μ L,ExTaq 10×缓冲液 5 μ L,dNTP 4 μ L,上下游引物各 1 μ L,ExTaq DNA 聚合酶 1 μ L,用灭菌超纯水补至 50 μ L。扩增反应热循环参数为:95℃5 min,94℃60 s,52℃60 s,72℃80 s,34 个循环;72℃延伸 10 min。

1.8.3 RT-PCR 产物的纯化回收 将 RT-PCR 产物在 10 g/L 琼脂糖凝胶中电泳,标准分子量为 DL-2000,切下目的条带,用凝胶回收纯化试剂盒回收目的片断,-20℃保存备用。

1.8.4 RT-PCR 产物与 T 载体连接 取回收的 RT-PCR 产物 4 μ L,pMD18-T 载体 1 μ L,Ligation Solution I 5 μ L 于 PCR 管中混匀,16℃反应过夜。

1.8.5 连接产物的转化与重组质粒的鉴定 取连接产物 10 μ L 转化 DH5 α 感受态细胞,挑选白色阳性菌落,在含有氨苄的 LB 培养基中培养,采用碱裂解法小量提取质粒,用 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行双酶切鉴定。

1.8.6 序列测定 将筛选的阳性克隆质粒送上海生工有限公司进行测序。

2 结果与分析

2.1 病毒的分离培养

病料接种 MA104 细胞,盲传 4 代开始出现细胞病变(CPE),CPE 表现为细胞变圆,融合缩小,细胞界限不清晰,继而细胞大量脱落死亡(图 1)。而正常细胞形成致密单层排列,呈三角形,圆形等

排列(图 2)。

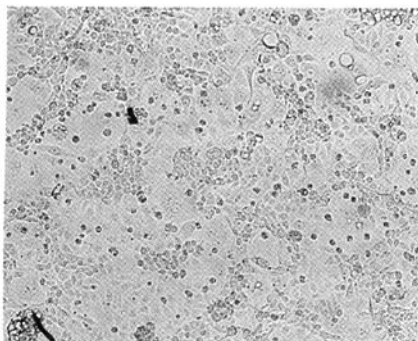


图 1 病变细胞(100×)

Fig. 1 Cytopathic effect on MA104 cell(100×)

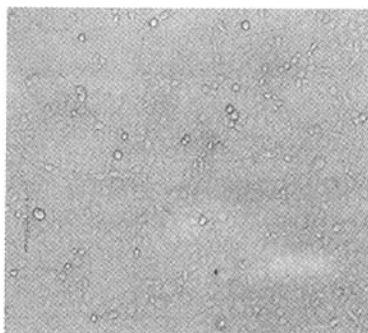


图 2 正常细胞(100×)

Fig. 2 Normal MA104 cell(100×)

2.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

聚丙烯酰胺凝胶电泳结果显示病毒核酸为典型的 A 群轮状病毒电泳型(4:2:3:2),结果见图 3。

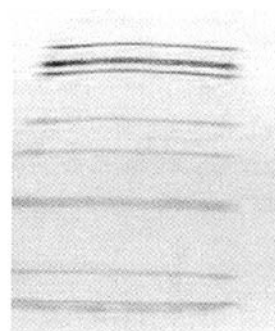
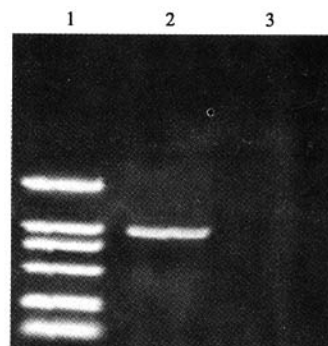


图 3 病毒核酸聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig. 3 Polyacrylamide gel electrophoresis of viral nucleic acid



1. 为 DL-2000 marker; 2. 为扩增产物 Amplification product; 3. 为阴性对照 Negative control

图 4 扩增片断电泳图

Fig. 4 Electropherogram of amplification part

2.3 RT-PCR 结果

1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,长度约为 950 bp,与预期结果相符(图 4)。

AGAATTTCCGTTTGGCTAAAATATATTCGTGGTCATTTACGTCGGATT
CAGGAAACAGAAAATGTTGGACGCCGCACTAGATCAATTGAAAACCTG
AGTATACAGAAGATGTAGATGACGAAATGTATCGAGAATACACAATGC
TAATAAGAGATGAAGTTGTGAAAATGCTTGAGGAACCAAGTAAAGCATG
ATGACCATTTGTTACAGGATTCTGAATTGGCTGGTTTACTATCGATGTC
ATCAGCGTCGAATGGTGAATCAAGACAACATAAAATTTGGTAGAAAGAC
AATTTTTTCGACTAAAAAGAATATGCATGTAATGGATGACATGGCTAAT
GGAAGATACACACCAGGCATAATACCACCAGTGAATGTCGATAAACCG
ATACCATTAGGAAGGAGAGATGTACCAGGAAGACGGACTAGAATAATA
TTTATCTTACCATATGAATATTTTCATAGCACACATGCTGTAGTTGAAAA
AATGCTAATTTACGCGAAACATACTAGAGAATATGCTGAATTCTACTCA
CAGTCAAATCAGTTATTGTCTTATGGCGATGTTACACGCTTTTTATCTAA
TAACCTATGGTACTATATACAGACGTGTCCCAGTGGGACTCATCTCAA
CACAATACGCAGCCATTTAGGAAAAGGATAATTATGGGATTGGACATGC
TAGCCAATATGACTAATGATGCTAGAGTTATCCAGACGCTGAACCTATAI
AAACAGACGCAAATTAATCTAATGGATTTCATACGTTCAAATACCAGATG
GTAATGTTATTAAGAAGATACAATATGGGGCTGTAGCGTCAGGAGAGA
AGCAGACGAAAGCAGCGAATTCAATAGCAAATTTAGCACTGATTAAAA
CGGTTTTATCACGCATTTCTAACAAATATTCATTTCGCGACGAAGATAATA
AGAGTTGTATGATGTGACCG

2.4 VP1 基因序列分析

对阳性质粒经上海生工测序,共扩增 946 bp,通过运用 DNASTar 软件分析,与 Genbank 中登陆的牛轮状病毒分离株 RF 的核苷酸同源性为 98.9%,与分离株 UK 的核苷酸同源性为 91.5%。序列如上(下划线部分为引物序列)。

3 讨论

轮状病毒是引起幼龄动物病毒性腹泻的病原之一^[4],栾婧婧^[2]等对犊牛腹泻病料在 MA104 上盲传 4 代后也出现细胞病变,分离到牛轮状病毒。苏小庚^[3]等对犊牛腹泻病料在 Ma145 细胞上盲传 4 代后出现细胞病变,分离到一株牛轮状病毒。本项研究采用 MA104 细胞系对牛轮状病毒进行了分离鉴定,经过盲传 4 代后,细胞出现 CPE,细胞病变表现为肿大、变圆、脱落,有时出现融合及拉网现象,直接从犊牛腹泻粪样中分离到牛轮状病毒。实验发现轮状病毒 VP4 基因能够抑制病毒在 MA104 细胞上生长,但是 VP4 基因对胰酶敏感,通过胰酶可使 VP4 基因特异性裂解为 VP5 和 VP8,从而使病毒具有感染性,容易在细胞上生长^[1,4]。

轮状病毒的核酸为双链 RNA,由 11 个基因片段组成^[5]。根据轮状病毒电泳图型和群特异性抗原特征可将轮状病毒分为 A~G 7 个群。病毒基因组电泳图型上可以看出,分离毒属 A 群轮状病毒^[1,5]。其 VP1 基因由基因片段 1 所编码,分

子量 125 ku,由 1088 个 AA 组成^[6]。VP1 基因与 Genbank 目前已发布的序列相比,核苷酸同源性较高,存在个别碱基的改变,其中分离株 721~750,931~945 位置的碱基与 UK 株存在很大的差异,软件分析发现可导致蛋白翻译的改变。对于该毒株其他主要结构基因的序列分析,以及该毒株的血清型及其在我国牛群中的感染情况,发病情况正在进一步研究中。

参考文献:

- [1] 殷 震,刘景华. 动物病毒学(第 2 版) [M]. 北京:科学出版社,1997. 456~466.
- [2] 栾婧婧,杨少华,张维军,等. 半巢式 RT-PCR 快速检测犊牛轮状病毒方法的建立[J]. 中国人畜共患病学报, 2006, 22(7): 671~673.
- [3] 苏小庚,吴周良,王正秀,等. 犊牛轮状病毒的分离鉴定[J]. 河北农业大学学报, 2005, 28(4): 93~97.
- [4] Hardy M E, Woode G N, Xu Z, *et al.* Comparative Amino Acid Sequence Analysis of VP4 for VP7 Serotype 6 Bovine Rotavirus Strains NCDV, B641, and UK[J]. *Journal of virology*, 1991, 65(10): 5535~5538.
- [5] Chih-Ling Zao, Wan-Nien Yu, Chuan-Liang Kao, *et al.* Sequence analysis of VP1 and VP7 genes suggests occurrence of a reassortant of G2 rotavirus responsible for an epidemic gastroenteritis [J]. *Journal of General Virology*, 1999, 80: 1407~1415.
- [6] Valenzuela S, Pizarro J, Sandino A M, *et al.* Photoaffinity Labeling of Rotavirus VP1 with 8-Azido-ATP; Identification of the Viral RNA Polymerase[J]. *Journal of Virology*, 1991, 65(7): 3964~3967.

牛轮状病毒的分离及其RT-PCR鉴定

作者: [姜向阳](#), [邓小敏](#), [王晶钰](#), [王学艳](#), [罗艳](#), [JIANG Xiang-yang](#), [DENG Xiao-min](#),
[WANG Jing-yu](#), [WANG Xue-yan](#), [LUO Yan](#)
作者单位: [西北农林科技大学动物科技学院, 陕西杨凌, 712100](#)
刊名: [西北农业学报](#) 
英文刊名: [ACTA AGRICULTURAE BOREALI-OccIDENTALIS SINICA](#)
年, 卷(期): 2007, 16(4)
被引用次数: 1次

参考文献(6条)

1. 殷震;刘景华 [动物病毒学](#) 1997
2. 栾婧婧, 杨少华, 张维军, 高运东, 仲跻峰, 赵宏坤 [半巢式RT-PCR快速检测犊牛轮状病毒方法的建立](#)[期刊论文]-[中国人兽共患病学报](#) 2006(7)
3. 苏小庚, 吴周良, 王正秀, 孙继国, 王爱华, 陈龙宾, 秦建华 [犊牛轮状病毒的分离鉴定](#)[期刊论文]-[河北农业大学学报](#) 2005(4)
4. Hardy M E;Woode G N;Xu Z [Comparative Amino Acid Sequence Analysis of VP4 for VP7 Serotype 6 Bovine Rotavirus Strains NCDV, B641, and UK](#) 1991(10)
5. Chih-Ling Zao;Wan-Nien Yu;Chuan-Liang Kao [Sequence analysis of VP1 and VP7 genes suggests occurrence of a reassortant of G2 rotavirus responsible for an epidemic gastroenteritis](#) 1999
6. Valenzuela S;Pizarro J;Sandino A M [Photoaffinity Labeling of Rotavirus VP1 with 8-Azido-ATP:Identification of the Viral RNA Polymerase](#) 1991(07)

本文读者也读过(9条)

1. [谢金鑫](#), [侯喜林](#), [董华兴](#), [柳强](#), [张佩鑫](#), [刘鹏](#), [侯美如](#), [Xie Jinxin](#), [Hou Xilin](#), [Dong Huaxing](#), [Liu Qiang](#), [Zhang Peixing](#), [Liu Peng](#), [Hou Meiru](#) [新生牛轮状病毒的分离及其基因型鉴定](#)[期刊论文]-[黑龙江八一农垦大学学报](#) 2010, 22(5)
2. [南晓伟](#), [杨少华](#), [高运东](#), [王长法](#), [杨宏军](#), [刘晓](#), [仲跻峰](#), [申之义](#), [何洪彬](#) [牛A组轮状病毒VP4全基因的克隆与原核表达](#)[会议论文]-2009
3. [李晓琳](#), [蒋立虹](#), [孟明耀](#), [庞伟](#), [王萍](#), [李亚雄](#), [陈智豫](#), [刘建生](#), [侯宗柳](#), [LI Xiao-Lin](#), [JIANG Li-Hong](#), [MENG Ming-Yao](#), [PANG Wei](#), [WANG Ping](#), [LI Ya-Xiong](#), [CHEN Zhi-Yu](#), [LIU Jian-Sheng](#), [HOU Zong-Liu](#) [人轮状病毒NSP4蛋白131和133位氨基酸变异对毒力影响的研究](#)[期刊论文]-[中国免疫学杂志](#)2007, 23(4)
4. [裴银辉](#), [吴景华](#), [苏兆林](#), [马立人](#) [轮状病毒分离与培养方法的建立](#)[期刊论文]-[华北煤炭医学院学报](#)2007, 9(1)
5. [张二芹](#), [马强](#), [王会岩](#), [闫明田](#), [ZHANG Er-qin](#), [MA Qiang](#), [WANG Hui-yan](#), [YAN Ming-tian](#) [猪轮状病毒VP6基因的原核表达载体构建和表达](#)[期刊论文]-[河南农业科学](#)2008(5)
6. [陈淑红](#), [李一经](#), [师东方](#) [猪轮状病毒地方株JL94株VP6基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达](#)[期刊论文]-[畜牧兽医学报](#)2004, 35(4)
7. [栾婧婧](#), [杨少华](#), [马广强](#), [高运东](#), [仲跻峰](#), [赵宏坤](#), [LUAN Jing-jing](#), [YANG Shao-hua](#), [MA Guang-qiang](#), [GAO Yun-dong](#), [ZHONG Qi-feng](#), [ZHAO Hong-kun](#) [新分离牛轮状病毒及其血清型的研究](#)[期刊论文]-[家畜生态学报](#)2006, 27(6)
8. [庞伟](#), [黄永坤](#), [孟明耀](#), [王萍](#), [刘建生](#), [徐冬蕾](#), [戚勤](#), [侯宗柳](#), [PANG Wei](#), [HUANG Yongkun](#), [MENG Mingyao](#), [WANG Ping](#), [LIU Jiansheng](#), [XU Donglei](#), [QI Qin](#), [HOU Zongliu](#) [两株Wa株人源轮状病毒NSP4蛋白的表达及其致ICR小鼠腹泻的毒力比较](#)[期刊论文]-[医学分子生物学杂志](#)2005, 2(2)
9. [招丽娟](#), [程安春](#), [汪铭书](#), [袁桂萍](#), [贾仁勇](#), [周登春](#), [葛茵](#), [孙涛](#), [陈孝跃](#), [ZHAO Li-chan](#), [CHENG An-chun](#), [WANG Ming-shu](#), [YUAN Gui-ping](#), [JIA Ren-yong](#), [ZHOU Deng-chun](#), [GE Han](#), [SUN Tao](#), [CHEN Xiao-yue](#) [鸭瘟病毒dUTPase基因克隆、](#)

引证文献(1条)

1. 王志丹, 杨少华, 高运东, 宋玲玲, 刘晓, 王立群, 何洪彬 我国牛轮状病毒的分离鉴定和疫苗研究进展[期刊论文]-家畜生态学报 2010(03)

引用本文格式: 姜向阳, 邓小敏, 王晶钰, 王学艳, 罗艳, JIANG Xiang-yang, DENG Xiao-min, WANG Jing-yu, WANG Xue-yan, LUO Yan 牛轮状病毒的分离及其RT-PCR鉴定[期刊论文]-西北农业学报 2007(4)