

牦牛星状病毒的 RT-PCR 检测方法的 建立和变异分析

陈曦, 汤承, 张斌, 宋志刚, 周芳, 岳华*

(西南民族大学生命科学与技术学院, 成都 610041)

摘要: 近期作者实验室从腹泻牦牛粪便样本中鉴定出一种新型星状病毒(AstV)——牦牛 AstV, 本研究旨在建立检测牦牛 AstV 的 RT-PCR 方法。首先设计引物扩增牦牛 AstV 630 bp 的 *ORF2* 基因片段, 进行序列分析; 在此基础上设计检测引物, 建立检测牦牛 AstV 的 RT-PCR 方法。结果显示, 从 20 份牦牛腹泻粪便中扩增出 13 个牦牛 AstV *ORF2* 基因片段, 核苷酸相似性为 99.3%~100%, 而与牛肠源星状病毒(BAstV)*ORF2* 基因的相似性仅为 59.5%~80.8%; 所建立的 RT-PCR 方法只扩增牦牛 AstV 的特异片段, 对 BAstV 和其他无关病原无扩增; 对病毒核酸的最低检测限为 $57.3 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 比较试验表明, 所建立的 RT-PCR 方法对牦牛 AstV 的检出率明显优于现有检测 BAstV 的 RT-PCR 方法。其对牦牛腹泻与健康粪便样本中牦牛 AstV 的检出率分别为 55.5% (76/137) 和 7.7% (2/26) ($P < 0.01$)。试验结果表明, 扩增的 *ORF2* 基因片段的核苷酸序列在牦牛 AstV 毒株间高度保守, 但相对于 BAstV 变异大; 基于该序列建立的检测牦牛 AstV 的 RT-PCR 方法特异性好, 灵敏度高, 稳定性好, 为牦牛 AstV 的检测和流行病学调查提供了有力工具; 同时, 本试验结果也提示牦牛 AstV 与牦牛腹泻有联系。

关键词: 牦牛; 星状病毒; RT-PCR; *ORF2* 基因; 遗传变异

中图分类号: S852.653

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2016)06-1287-06

Development of an RT-PCR Assay and Variation Analysis for Yak Astrovirus

CHEN Xi, TANG Cheng, ZHANG Bin, SONG Zhi-gang, ZHOU Fang, YUE Hua*

(College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China)

Abstract: Recently, our laboratory identified a novel astrovirus from fecal samples of diarrheic yak, the aim of this study was to develop an RT-PCR assay for detecting the novel yak astrovirus (yak AstV). Firstly, one pair primers were designed to amplify *ORF2* gene fragments (630 bp in length) of yak AstV. By sequence analysis, one pair primers of RT-PCR assay were then designed for detecting yak AstV. We obtained 13 *ORF2* gene fragments from 20 fecal samples of diarrheic yak, which shared a homology of 99.3%-100% within fragments, but only a homology of 59.5%-80.8% with bovine astrovirus (BAstV). The RT-PCR assay developed in this study was specific to yak astrovirus, no amplifying for BAstV and other pathogens tested in this study. The detection limit of viral nucleic acid of the assay was $57.3 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. The assay was significantly better in detecting yak AstV compared to the other two reported assays for detecting bovine astrovirus. The detecting results of clinical samples by this assay showed that the positive rates of yak AstV were 55.5% (76/137) in diarrheic fecal samples and 7.7% (2/26) in healthy fecal samples. Compared to healthy samples, yak AstV was significantly more prevalent in diarrheic fecal samples ($P <$

收稿日期: 2015-10-30

基金项目: “十二五”高技术研究发展计划(863计划)课题(2012AA101304); 四川省科技计划项目青年基金(2014JQ0044); 四川省教育厅创新团队(13TD0057); 西南民族大学研究生创新型科研项目(CX2015SZ067)

作者简介: 陈曦(1990-), 女, 河南睢县人, 硕士生, 主要从事动物病原分子生物学研究, E-mail: 792875776@qq.com

* 通信作者: 岳华, 博士, 教授, Tel: +86-28-85528276, Fax: +86-28-85522727, E-mail: yhua900@163.com

0.01)。In conclusion, *ORF2* gene sequences of yak AstV cloned in this study varied a lot compared with those of BAstV, but were highly conserved within yak AstV species. Thus, the RT-PCR for detecting yak AstV based on the *ORF2* sequences of yak AstV greatly improved the detection rate of yak AstV, providing a useful tool for detection of this novel virus and epidemiological investigation. Meanwhile, the results of this study indicated that yak AstV might be associated with diarrhea in yak calves.

Key words: yak; astrovirus; RT-PCR assay; *ORF2* gene; genetic variation

牛星状病毒 (bovine astrovirus, BAstV) 是于 1978 年从英国 7 日龄犊牛腹泻粪便中首次分离并命名的, 由于该病毒感染 SPF 牛后未引起腹泻症状, 被认为是无致病性的^[1]。然而, 1984 年 G. N. Woode 等的研究发现 BAstV 分离株 US1 接种 SPF 牛后虽然不能引起临床症状, 但能够引起牛回肠圆顶上皮细胞中的 M 细胞发生病变, 并且粪便颜色由棕变黄; 同时, 该研究还表明 BAstV 单独存在时不能导致牛发生腹泻症状, 但与其他病毒 (如轮状病毒、冠状病毒等) 混合感染时引起的临床症状更加严重^[2]。近年的流行病学资料也表明, BAstV 与犊牛腹泻有联系^[3-5]。

最近, 作者实验室采用宏病毒组技术首次从腹泻犊牛粪便样本中鉴定出 AstV, 并获得了一株犊牛 AstV 的基因组序列, 与肠源 BAstV 的核苷酸序列相似性为 46.4%~66.2%, 其中 *ORF1a*、*ORF1b* 和 *ORF2* 与肠源 BAstV 的相应核苷酸序列相似性分别为 61.7%~78.8%、74.4%~87.0% 和 40.6%~57.4%; 而氨基酸序列的相似性分别为 71.7%~91.6%、86.3%~96.4% 和 50.2%~64.2%^[6]。该毒株的 *ORF2* 基因发生了基因重组现象, 推导的重组位点位于核苷酸序列的 804 bp 处, 序列分析显示 1—804 bp 片段与 BAstV B76-HK 的相似性最高, 而 805 bp 以后的片段与鹿 AstV CCAstV 株的同源关系最近, 是一种新型 AstV^[6]。本研究的目的是建立检测犊牛 AstV 的 RT-PCR 方法, 并且对 2014—2015 年四川省阿坝州的 137 份腹泻犊牛粪便样本和 26 份健康犊牛粪便样本进行检测。

1 材料与方法

1.1 病毒(菌)株与临床样本

犊牛 AstV 核酸样本为宏病毒组测序证实的阳性样本; 用于特异性验证的病毒(菌)株和核酸样本: 犊牛源轮状病毒 (bovine rotavirus, BRV, swun0105)、犊牛源牛病毒性腹泻-黏膜病病毒 (bovine viral

diarrhea virus, BVDV, swun0603)、犊牛源肠炎病毒 (bovine enterovirus, BEV, swun0510)、犊牛源 K99 大肠杆菌 (swun4025)、犊牛源都柏林沙门菌 (swun3736)、犊牛源产气荚膜梭菌 (swun2930)、犊牛源空肠弯曲杆菌 (swun1639); BAstV、犊牛源冠状病毒 (bovine coronavirus, BCV)、犊牛源细小病毒、犊牛源 Kobu 病毒核酸样本以及犊牛源艾美尔球虫、犊牛源瑞氏隐孢子虫的 DNA 样本由本实验室保存。临床样本为 2014 年 7 月和 2015 年 6 月从四川省阿坝州采集的 163 份犊牛 (≤3 月龄) 粪便样本, 其中腹泻粪便样本 137 份, 分别来自 12 个牧场; 健康粪便样本 26 份, 来自于同地区未发生腹泻性疾病的 4 个牧场, 保存在 -80 °C。

1.2 主要试剂及仪器

TRIzol™ Reagent、Primescript™、PMD19-T 载体均购自 TaKaRa 公司; DNA Marker、大肠杆菌 DH5α 感受态细胞、DNA 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司产品; 凝胶成像系统 Doc2000 (Bio-Rad 公司, 美国); 紫外分光光度计 Cary50Probe (Vatian 公司, 美国); 高速冷冻离心机 (Eppendorf 公司, 德国)。

1.3 引物设计与合成

本研究在对前期获得的宏病毒组数据和犊牛 AstV S8 株基因组序列 (KM822593) 分析的基础上^[6], 采用 Primer 5.0 引物设计软件设计引物 (P1、P2): F: 5'-TCTTTGGAGGGGAGGACC-3', R: 5'-ATCCCCCTTGGTGTGGT-3', 扩增长度为 630 bp 的犊牛 AstV *ORF2* 基因片段, 该片段位于 *ORF2* 基因的 1—630 bp 处。从 20 份犊牛腹泻粪便样本中扩增目的片段并测序, 应用 MEGA5.1 和 MegAlign 序列分析软件进行序列分析和遗传进化分析。

特异性检测犊牛 AstV 的 RT-PCR 的引物 (P3、P4) 设计根据上述序列分析的结果, 选取保守序列设计特异性检测犊牛 AstV 的引物, 引物信息

见表 1, 扩增位于牦牛 AstV *ORF2* 基因 77—421 bp 的长度为 345 bp 的目的片段, 引物由大连宝生物工

程有限公司合成。

表 1 三种 RT-PCR 方法的引物信息

Table 1 Primer information for three kinds of RT-PCR assay

检测方法 Detection method	靶基因 Target gene	引物序列 Sequence	引物来源 Origin
1	<i>ORF2</i>	F: 5'-CAGCAGCAGAGGAGGAAGAGA-3' R: 5'-CGAAACAGCACTGGCACCC-3'	本研究
2	<i>ORF1b</i>	F: 5'-GTGTTTGGCATGTGGGTYAARCC-3' R: 5'-RTCVYYBKTTGGTGGT-3'	[3]
3	<i>ORF1b</i>	F: 5'-GAYTGGACBCGHTWTGATGG-3' R: 5'-KYTTRACCCACATNCCAA-3'	[7]

1.4 核酸的提取与 cDNA 合成

将临床粪便样本与 PBS(1:5) 充分重悬混匀, -80 °C 冰箱中反复冻融 3 次, 3 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 弃沉淀, 再以 12 000 r · min⁻¹ 离心 30 min, 取上清, 然后按照 TRIzol Reagent 说明书提取总 RNA, 并按照反转录试剂盒说明书合成 cDNA, -20 °C 保存备用。细菌 DNA 采用酚—氯仿法提取, -20 °C 保存备用。

1.5 牦牛 AstV 阳性标准品的制备

以牦牛 AstV cDNA 为模板, 加入 P3、P4 引物扩增牦牛 AstV 的 *ORF2* 基因 345 bp 的片段, PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 用胶回收试剂盒回收目的片段, 将其克隆至 pMD19-T 载体, 并转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 筛选出阳性克隆接入含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C 培养 8 h, 用质粒提取试剂盒提取重组质粒, 送擎科生物有限公司测序。测序正确的阳性质粒作为 AstV 阳性标准品, 核酸蛋白检测仪测定其浓度。

1.6 反应体系及条件的优化

采用 25 μ L 体系(预混酶 12.5 μ L, 牦牛 AstV 阳性标准品 2 μ L, ddH₂O 补足至 25 μ L), 对退火温度从 50~60 °C 进行优化, 再以优化的退火温度对引物浓度 10 μ mol · μ L⁻¹ (0.1~1.0 μ L) 进行优化。

1.7 敏感性测定

将牦牛 AstV 阳性标准品 10 倍递增稀释后作为模板(1 \times 10⁰、1 \times 10⁻¹~1 \times 10⁻⁸), 用建立的 RT-PCR 进行检测, 确定其检测限。

1.8 特异性评价

用建立的 RT-PCR 对“1.1”中特异性检测待检

病原的核酸样本进行检测, 并设立标准阳性样本和阴性对照, 以评价该方法的特异性。

1.9 稳定性评价

用建立的 RT-PCR 对 3 个阳性模板进行 3 次重复检测, 以评价方法的稳定性。

1.10 与现有检测 BAstV 的 RT-PCR 方法的比较

采用本试验中建立的 RT-PCR 方法和现有的 2 种检测 BAstV 的 RT-PCR 方法(表 1)同时对 54 份牦牛腹泻粪便样本及 80 份肉牛腹泻样本进行检测, 比较这三种方法的检出率。

1.11 临床样本检测与统计学分析

采用建立的 RT-PCR 方法对上述 137 份腹泻粪便样本和 26 份健康粪便样本进行检测, 随机选取 10 份阳性样本测序验证; 分别统计, 牦牛 AstV 在腹泻粪便样本和健康粪便样本的检出率, 应用 SPSS 软件对检测结果产生的差异进行显著性分析。

2 结果

2.1 牦牛 AstV *ORF2* 基因片段序列的克隆及系统发育分析

从 20 份腹泻粪便样本中扩增出 13 个牦牛 AstV *ORF2* 基因片段, 长度为 630 bp, 毒株间的相似性为 99.2%~100%, 这一结果表明牦牛 AstV *ORF2* 基因的 1—630 bp 区域高度保守, 具备作为检测牦牛 AstV 分子检测靶点的潜力。将扩增的牦牛 AstV *ORF2* 基因片段与已报道的 BAstV 毒株进行核苷酸同源性分析发现, 牦牛 AstV *ORF2* 与牛肠源 BAstV 毒株的相似性为 59.5%~80.8%。牦牛 AstV 与牛肠源和呼吸道源 BAstV 之间的遗

传距离相对较近,但也存在明显的遗传距离,且所有牦牛 AstV 单独聚成一支(图 1)。

2.2 牦牛 AstV 检测引物的特异性

采用自行设计的引物对牦牛 AstV 核酸阳性样本进行 PCR 扩增,获得的目的片段大小与预期结果一致。测序结果证明目的片段长度为 345 bp,为牦牛 AstV 的特异性序列,与牦牛 AstV ORF2 基因序列的相似性为 100%。

2.3 优化的 RT-PCR 反应体系及条件

优化的反应体系:预混酶 12.5 μL ,上下游引物 P3、P4 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 0.5 μL , cDNA 2 μL , ddH₂O 补足 25 μL 。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

2.4 特异性

该方法能从牦牛 AstV 阳性核酸样本中检出目的基因片段,对 BAsV 阳性核酸样本无扩增,对其他无关病原不扩增。可见,本研究建立的 RT-PCR 只适合牦牛 AstV 的检测,而不能用于 BAsV 的检测。

2.5 敏感性

牦牛 AstV 阳性标准品的浓度为 57.3 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 敏感性检测结果显示, 1×10^{-6} 稀释度阳性标准品仍可见目的条带,对 AstV 的核酸最低检测限为 57.3 $\text{fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

2.6 稳定性

对同一模板的 3 次重复检测结果一致,证明该方法具有良好的稳定性和重复性。

2.7 三种 RT-PCR 检测方法的比较

三种检测方法的引物信息见表 1。

检测方法 1~3 对 54 份牦牛腹泻粪便样本中牦牛 AstV 检测的阳性率分别为 70.4%、0、29.6%,可见作者所建立的 RT-PCR 方法对牦牛 AstV 的检测效率明显优于现有的 2 种检测 BAsV 的 RT-PCR 方法。三种方法对 80 份肉牛腹泻粪便样本中 BAsV 检测的阳性率分别为 0、0、8.7%,进一步证明本试验建立的 RT-PCR 方法只适用于牦牛 AstV 的检测。对方法 2 不能检出 BAsV 原因的分析发现,该文献报道的下游引物是错误的。

2.8 临床样本检测

利用作者建立的 RT-PCR 方法从 137 份腹泻牦牛粪便和 26 份健康牦牛粪便中分别检出 76 份和 2 份阳性样本,对随机挑选 10 份阳性样本 PCR 产物测序结果证实为牦牛 AstV 特异片段。腹泻牦牛

牛粪便样本中牦牛 AstV 的携带率为 55.5%,显著高于健康牦牛粪便中的携带率 7.7% ($P < 0.01$),表明 AstV 感染可能与牦牛腹泻有联系。

3 讨论

近年来,关于 BAsV 感染的流行病学及病原遗传变异的研究逐年增加^[3,5,7-8]。作者最近利用二代测序技术首次从牦牛腹泻粪便样本中鉴定出 AstV,是一种新型 AstV^[6],采用现有的两种检测 BAsV 的 RT-PCR 方法^[3,7]对阳性样本却不能检出。因此,有必要建立检测牦牛 AstV 的 RT-PCR 方法。有资料表明, AstV ORF2 基因的前段区域在种内是高度保守的^[9-11]。因此,为筛选分子检测靶点,作者对 13 株牦牛 AstV ORF2 1—630 bp 的基因片段进行了克隆测序,结果显示该区域核苷酸序列在牦牛 AstV 种内也是高度保守的。基于该序列保守区域设计了检测引物,成功建立了检测牦牛 AstV 的 RT-PCR 方法,具有特异性强、敏感度高、稳定性好的特点,为牦牛 AstV 的病原检测及病原流行病学调查提供了可靠手段。由于该方法是基于牦牛 AstV ORF2 基因保守序列建成的,而本试验获得的牦牛 AstV ORF2 基因片段与 BAsV 的核苷酸相似性仅为 59.5%~80.8%,点突变很多。这可能是该方法不能对 BAsV 阳性模板及牛腹泻粪便中 BAsV 阳性样本检出的原因。因此,本试验建立的 RT-PCR 方法只适用于牦牛 AstV 的检测。在后续研究中,可进一步研究建立检测牦牛 AstV 和 BAsV 的双重 RT-PCR 及通用型 RT-PCR,以满足不同研究的需要。

现有两种检测 BAsV 的 RT-PCR 方法对临床样本中牦牛 AstV 的检出率显著低于本研究建立的 RT-PCR 方法,分析其原因可能有两个:一是核苷酸序列变异。现有的检测 BAsV 的 RT-PCR 引物的靶基因都是 ORF1b,而牦牛 AstV 的 ORF1b 的核苷酸序列与已知的 BAsV 的 ORF1b 的序列差异大,相似性仅为 74.4%~87%,且核苷酸序列中存在很多点突变^[6],这可能是主要原因;二是现有的两种 PCR 方法为解决 BAsV 的 ORF1b 核苷酸序列的点突变,均采用了简并引物^[3,7],而简并引物会影响 PCR 检测的灵敏度^[12]。实际上,作者用本研究建立的方法和文献^[7]的方法检测均为阳性的样本,进行了灵敏度比较,结果前者的灵敏度较后者高 100 倍。

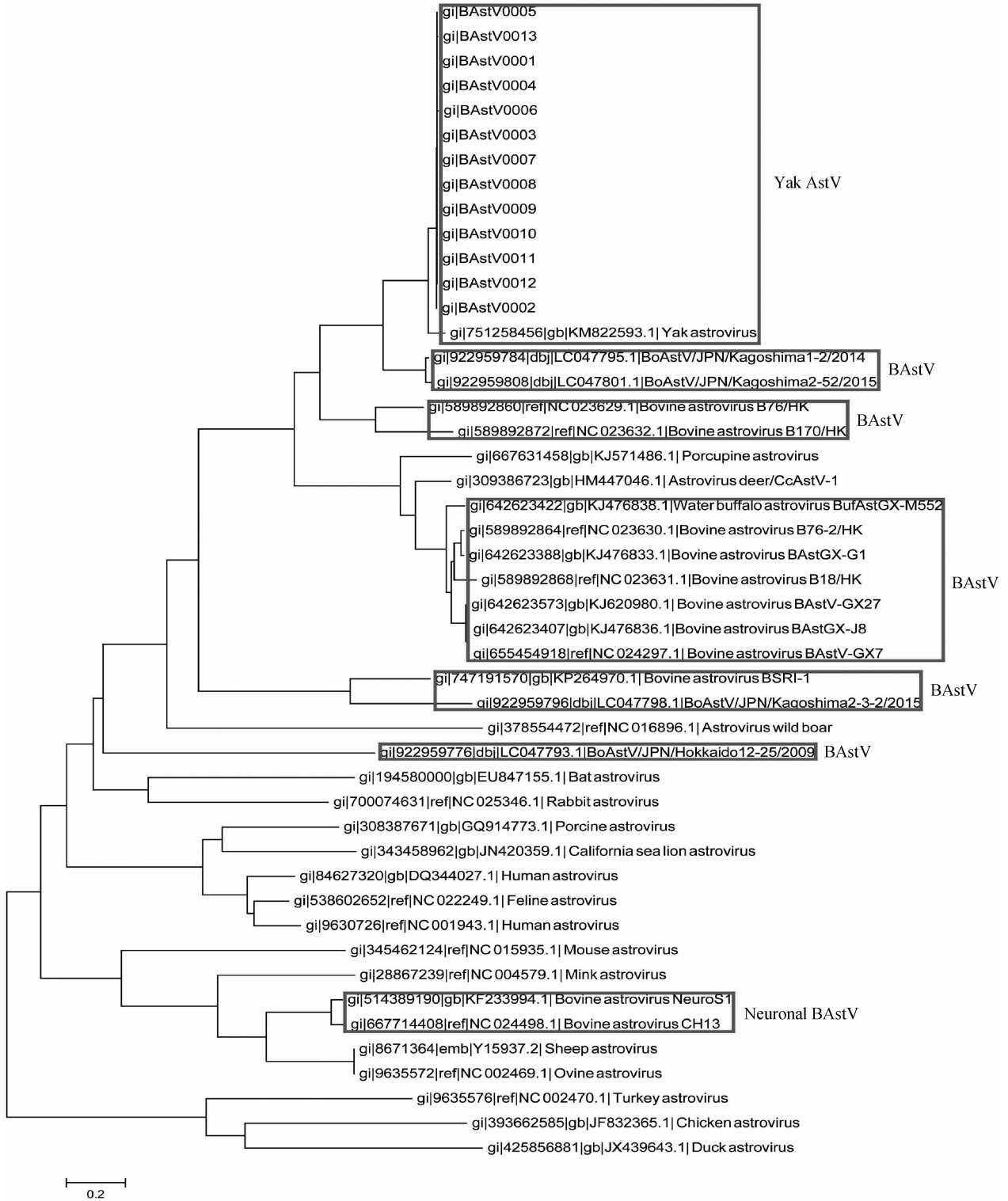


图 1 牦牛 AstV ORF2 基因片段的邻近法进化树

Fig. 1 Neighbor-joining consensus tree for partial ORF2 gene fragment of yak AstV

J. K. Oem 等和 M. Candido 等的流行病学调查表明,BAstV 与犊牛腹泻有关^[3,5], 作者的检测结果也提示牦牛 AstV 可能与犊牦牛腹泻有联系。然而,C. P. Sharp 等对新西兰牛的群体研究发现,

BAstV 在犊牛体内的检出率虽然高于成年牛,但认为 BAstV 并不是导致犊牛腹泻的主要病原^[13]。鉴于牦牛 AstV 在犊牦牛腹泻粪便中有很高的检出率,有必要进一步确定其在牦牛腹泻的作用。

参考文献(References):

- [1] WOODE G N, BRIDGER J C, MED J. Microbiol[M]. 1978(11):441-452.
- [2] WOODE G N, POHLENZ J F, GOURLEY N E, et al. Astrovirus and Breda virus infections of dome cell epithelium of bovine ileum [J]. *J Clin Microbiol*, 1984, 19(5):623-630.
- [3] OEM J K, AN D J. Phylogenetic analysis of bovine astrovirus in Korean cattle [J]. *Virus Genes*, 2014, 48(2):372-375.
- [4] ALFRED N, LIU H, LI M L, et al. Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of diverse bovine astroviruses associated with diarrhea in cattle and water buffalo calves in China [J]. *J Vet Med Sci*, 2015, 77(6):643-651.
- [5] CANDIDO M, ALENCAR A L, ALMEIDA-QUEIROZ S R, et al. Molecular detection and phylogenetic analysis of bovine astrovirus in Brazil [J]. *Arch Virol*, 2015, 160(6):1519-1525.
- [6] CHEN X, ZHANG B, YUE H, et al. A novel astrovirus species in the gut of yaks with diarrhea in the Qinghai Tibetan plateau, 2013 [J]. *J Gen Virol*, 2015. doi:10.1099/jgv.0.000303.
- [7] TSE H, CHAN W M, TSOI H W, et al. Rediscovery and genomic characterization of bovine astroviruses [J]. *J Gen Virol*, 2011, 92(Pt 8):1888-1898.
- [8] NAGAI M, OMATSU T, AOKI H, et al. Full genome analysis of bovine astrovirus from fecal samples of cattle in Japan; identification of possible interspecies transmission of bovine astrovirus [J]. *Arch Virol*, 2015, 160(10):2491-2501.
- [9] JONASSEN C M, JONASSEN T O, SAIF Y M, et al. Comparison of capsid sequences from human and animal astroviruses [J]. *J Gen Virol*, 2001, 82(Pt 5):1061-1067.
- [10] WANG Q H, KAKIZAWA J, WEN L Y, et al. Genetic analysis of the capsid region of astroviruses [J]. *J Med Virol*, 2001, 64(3):245-255.
- [11] WILLCOCKS M M, CARTER M J. Identification and sequence determination of the capsid protein gene of human astrovirus serotype 1 [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1993, 114(1):1-7.
- [12] ISERTE J A, STEPHAN B I, GOÑI S E, et al. Family-specific degenerate primer design; A tool to design consensus degenerated oligonucleotides [J]. *Biotechnol Res Int*, 2013, 2013:383646.
- [13] SHARP C P, GREGORY W F, MASON C, et al. High prevalence and diversity of bovine astroviruses in the faeces of healthy and diarrhoeic calves in South West Scotland [J]. *Vet Microbiol*, 2015, 178(1-2):70-76.

(编辑 白永平)