

# 1株驴源狂犬病毒的分离鉴定及N、G基因序列分析

解庭波 俞华 吴杰 黄思佳 徐葛林 严家新 余滨 周敦金

**【摘要】** 目的 对武汉市汉南区新分离的1株驴源狂犬病毒(RABV)街毒株的N、G基因进行遗传学分析,比较其与近年来湖北省及周边地区分离的代表性街毒株以及人用和兽用狂犬病疫苗病毒株之间的差异。方法 以直接免疫荧光法检测驴脑组织中的RABV,并将驴脑海马组织研磨后接种乳鼠,观察其发病情况,采用双抗体夹心ELISA法检测驴脑组织及发病乳鼠脑组织悬液中的RABV,然后提取发病乳鼠脑组织RNA,利用RT-PCR扩增RABV的N、G基因,测序后进行遗传学分析。结果 在驴脑组织及发病乳鼠脑组织中检出RABV,该病毒株与近年来湖北省及周边地区分离的代表性街毒株以及国内外人用和兽用狂犬病疫苗病毒株相比,N、G基因核苷酸序列的同源性分别为85.7%~99.1%和82.2%~99.7%,推导的氨基酸序列同源性分别为95.6%~99.8%和87.8%~99.4%,与国内分离街毒株核苷酸和氨基酸的同源性高于疫苗株,且与国内疫苗株CTN-181的同源性要高于国外疫苗株。结论 该病毒株鉴定为驴源RABV,与湖北省及周边地区分离的代表性街毒株及中国人用狂犬病疫苗株CTN-181处于同一个亚群,有较近的系统进化关系。

**【关键词】** 狂犬病毒;遗传特征;驴

**Identification and sequential analysis on rabies virus isolated from a donkey** XIE Ting-bo<sup>1</sup>, YU Hua<sup>2</sup>, WU Jie<sup>1</sup>, HUANG Si-jia<sup>1</sup>, XU Ge-lin<sup>1</sup>, YAN Jia-xin<sup>1</sup>, YU Bin<sup>3</sup>, ZHOU Dun-jin<sup>3</sup>. 1 Center for Rabies Diagnosis, Wuhan Institute of Biological Products, Wuhan 430060, China; 2 Hannan District Center for Disease Control and Prevention of Wuhan; 3 Wuhan Center for Disease Control and Prevention. Corresponding author: ZHOU Dun-jin, Email: zdj@whcdc.org

This work was supported by a grant from the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2007AA02Z402).

**【Abstract】** Objective To identify and analyze the genetic characteristics of nucleoprotein (N) and glycoprotein (G) genes of rabies virus (RABV) isolated from a donkey in Wuhan. N gene and G gene of the virus were compared with other representative street strains isolated around Hubei areas as well as the vaccine strains used in China and abroad. Methods RABV in brain tissue of a donkey was detected by direct immunofluorescent method and then inoculated in suckling mice to observe the incidence of rabies. Brain samples of the donkey and infected suckling mice were detected by ELISA. The N gene and G gene fragment of the isolated RABV were amplified by RT-PCR and cloned into pMD18-T vector for sequencing and genetic analysis. Results RABVs were detected in both donkey brain and suckling mice brain samples. The N gene and G gene nucleotide homology of RABV isolated from the donkey with other representative street strains found around Hubei areas as well as vaccine strains used in China and abroad were 85.7%–99.1% and 82.2%–99.7%, and the deduced amino acid identity were 95.6%–99.8% and 87.8%–99.4%, respectively. Conclusion Novel RABV was successfully identified and isolated from a donkey and showed close relationship to the representative street strains found around Hubei areas as well as vaccine strains used in China through genetic analysis.

**【Key words】** Rabies virus; Genetic characteristics; Donkey

狂犬病毒(RABV)感染谱较宽,几乎可以感染

所有哺乳动物,其自然宿主为野生动物<sup>[1]</sup>。家犬是中国RABV主要宿主和传染源<sup>[2,3]</sup>。本研究于2011年9月17日采集武汉市汉南区1头伤人驴的脑组织样本,通过直接免疫荧光法(DFA)和双抗体夹心ELISA检出RABV,并对其N、G基因进行序列测定和分析,与近年在湖北省及周边地区分离的代表性

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2012.06.013

基金项目:国家高技术研究发展计划(863计划)(2007AA02Z402)

作者单位:430060 武汉生物制品研究所狂犬病检测中心(解庭波、吴杰、黄思佳、徐葛林、严家新);武汉市汉南区疾病预防控制中心(俞华);武汉市疾病预防控制中心(余滨、周敦金)

通信作者:周敦金, Email: zdj@whcdc.org

街毒株、国内外人用及兽用疫苗株的N、G基因序列进行比较,分析其在遗传特征上的差异。

### 材料与方 法

1. 研究对象、主要试剂及实验动物:武汉市汉南区1头伤人驴,经武汉市汉南区疾病预防控制中心工作人员取样后送武汉生物制品研究所狂犬病检测中心检测,样品编号为db。RABV抗原检测试剂盒(双抗体夹心ELISA)由武汉生物制品研究所狂犬病检测中心提供,异硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗RABV核蛋白单克隆抗体购于美国Millipore公司,TRIzol试剂购自美国Invitrogen公司,MMLV反转录酶和pMD18-T载体试剂盒为宝生物工程(大连)有限公司产品,Go Taq Green Mix DNA聚合酶购于美国Promega公司,凝胶回收试剂盒QIAquick Gel Extraction Kit购于德国Qiagen公司。1日龄昆明乳鼠由武汉生物制品研究所动物实验中心提供。

2. 引物设计:参考GenBank中收录的多株RABV序列,针对N、G基因的编码区分别设计上、下游引物:N<sub>F</sub>:ATG TAA CAC CCC TAC AAT GG, N<sub>R</sub>:CAG TCT CCT CAG CCA TCT C(扩增区域55~1586 bp;预期长度1532 bp);G<sub>F</sub>:CAT CCC TCA AAA GAC TTA AGG, G<sub>R</sub>:GAT GTG ATC TTC GGG ACT(扩增区域3293~4936 bp;预期长度1644 bp),引物由南京金斯瑞公司合成。

3. DFA检测RABV抗原及传代:①DFA检测:取驴脑组织海马部位在载玻片上印片,冷丙酮室温固定30 min,干燥后加入1:60稀释的FITC标记的抗RABV核蛋白单克隆抗体,37℃湿盒孵育1 h, PBS漂洗3次,晾干后加1滴60%甘油,用盖玻片封片,于荧光显微镜下观察。②RABV传代:取驴脑组织海马回部位0.3 g,加入含青霉素(500 U/ml)及链霉素(2 mg/ml)的PBS(pH 7.4),研磨制备成10%的脑悬液,颅内接种1日龄昆明乳鼠10只,每只10 μl,连续21 d观察乳鼠发病情况。

4. 双抗体夹心ELISA检测RABV抗原:用RABV抗原检测试剂盒检测驴脑组织及上述接种驴脑海马组织悬液后发病的乳鼠脑组织悬液中的RABV抗原,具体步骤参照文献[4]。在阴性对照孔A450值<0.1、阳性对照A450值>0.5的条件下,以样品A450值>0.4判定为RABV抗原阳性。

5. 病毒RNA提取:将上述接种驴脑海马组织悬液后发病的乳鼠拉颈处死,无菌取脑组织100 mg,先加入0.2 ml TRIzol充分研磨后补加TRIzol至1 ml,

振荡混合均匀,室温静置5 min。加入氯仿200 μl,振荡混匀后室温静置5 min;4℃ 13 000 r/min离心15 min;将上清小心转入新的1.5 ml离心管,加入等体积的异丙醇,轻柔混匀后置-20℃ 1 h。4℃ 13 000 r/min离心10 min后弃上清,加入1 ml现配制的75%冰乙醇,在振荡器上振荡悬浮沉淀,4℃ 12 000 r/min离心10 min;小心弃上清,超净台内吹干,加30 μl DEPC处理水溶解RNA样品。

6. 反转录及N、G基因扩增:以病毒RNA为模板,pd(N)<sub>1</sub>为引物,反转录合成病毒基因组cDNA,然后扩增N、G基因。PCR反应体系:Go Taq Green Mix 25 μl,去离子水21 μl,cDNA模板2 μl,N、G上、下游引物(10 μmol/L)各1 μl。PCR反应条件:94℃预变性5 min;94℃ 30 s,54℃ 30 s,72℃ 2 min,30个循环;72℃延伸10 min。扩增产物经1%凝胶电泳鉴定,然后用凝胶回收试剂盒QIAquick Gel Extraction Kit回收。回收产物与pMD18-T载体连接,转化DH5α感受态细胞,筛选鉴定阳性克隆,然后提取质粒,送南京金斯瑞公司进行序列测定。利用ATGC软件对测序结果进行拼接和手工校对;利用BioEdit软件对序列进行剪切、拼接;使用DNAStar软件包中的MegAlign模块对基因所编码的氨基酸进行比对分析;最后与以往在湖北省及周边地区分离的代表性街毒株及人用和兽用疫苗株(表1)的N、G基因序列进行比对,比对使用ClustalX 1.83软件;用MEGA 4.1软件以Kimura two-parameter模型邻位相连接法(NJ)构建系统进化树(Bootstrap=1000)。

### 结 果

1. DFA检测RABV抗原:驴脑组织样本的印片经FITC标记的抗RABV核蛋白单克隆抗体染色后,可见绿色荧光颗粒,呈不同形状和大小(图1),表明驴脑组织样本中含有RABV,该驴感染RABV。

2. 双抗体夹心ELISA检测RABV抗原:驴脑组织样本A450值为0.518,在乳鼠脑组织传代后样本A450值为2.901,表明该样本为RABV抗原阳性,且在乳鼠脑组织中传代后病毒量增加。

3. 病毒传代:将从驴脑中分离的RABV接种1日龄昆明乳鼠后,小鼠11 d后开始表现出狂犬病症状,并于发病后3~4 d内全部死亡。

4. 驴源RABV N和G基因扩增:N和G基因RT-PCR扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测,在1532 bp和1644 bp处分别可见特异性条带,大小均与预期一致(图2)。

表 1 本研究中参考的狂犬病街毒株及疫苗株

病毒株	宿主/用途	分离地	分离时间 (年)	GenBank 序列号	
				N	G
CVS-11	标准攻击毒株	法国	1882	GQ918139	GQ918139
ERA	兽用疫苗株	美国	1935	EF206707	EF206707
SAD B19	人用疫苗株	美国	1935	M31046	M31046
RC-HL	人用疫苗株	日本		AB009663	AB009663
HEP-Flury	人用/兽用疫苗株	美国	1939	AB085828	AB085828
PV	人用疫苗株	法国	1882	M13215	M13215
CTN-181	人用疫苗株	中国山东	1956	EF564174	EF564174
HN10	犬	中国湖南	2007	EU643590	EU643590
HN06	犬	中国湖北武汉	2005		DQ849062
WH5	犬	中国湖北武汉	2005	EU159380	DQ849061
QC	人	中国湖北蕲春	2006	EU159377	DQ849063
hubei070308	牛	中国湖北	2007	EF611081	
WHqs	犬	中国湖北武汉	2007		FJ602454
WHWD	犬	中国湖北武汉	2007		FJ602455
WHyf	犬	中国湖北武汉	2007		FJ602456
98GF01	犬	中国广西凤山	1998	-	-
09AF40	犬	中国安徽阜阳	2009	-	-
10WH07	犬	中国湖北武汉	2010	-	-
09SJ01	犬	中国四川剑阁	2009	-	-
10AF49	犬	中国安徽阜阳	2010	-	-
09ZN01	犬	中国浙江宁波	2009	-	-
10GZ01	犬	中国贵州紫云	2010	-	-

注: -: 序列待发表

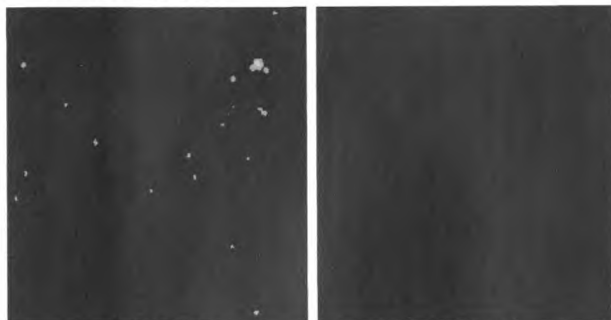
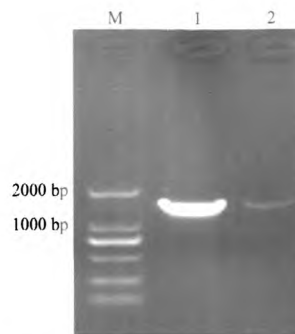


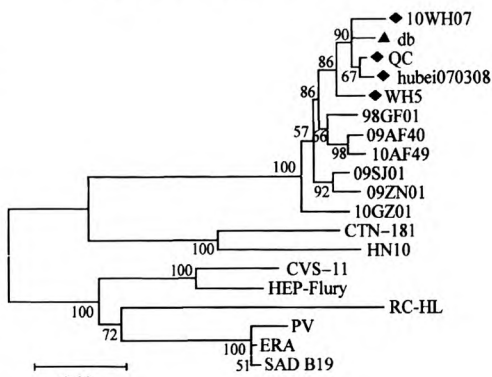
图 1 驴脑组织样本 RABV DFA 检测结果 (×40)

5. 驴源 RABV N 基因的序列分析: N 基因开放阅读框(ORF)全长为 1353 bp, 编码 450 个氨基酸的核蛋白。该病毒株与近年在湖北省及周边地区分离的代表性街毒株 N 基因核苷酸序列及推导的氨基酸序列的同源性分别为 89.0% ~ 99.1% 和 98.9% ~ 99.8%, 与国内外人用和兽用疫苗株 N 基因核苷酸序列及推导的氨基酸序列同源性分别为 85.7% ~ 89.4% 和 95.6% ~ 98.9%。与国内分离街毒株的核苷酸和氨基酸序列的同源性要略高于疫苗株。利用核苷酸序列推导的氨基酸序列构建进化树(图 3), 结果显示 N 基因与国内分离的代表性街毒株以及中国人用狂犬病疫苗株 CTN-181 有着较近的系统进化关系, 与近几年在武汉市分离的街毒株亲缘关系更近, 处于同一个亚群, 而国外病毒株和疫苗株处于另外一个亚群。



注: M: DL2000 Marker; 1: N 基因; 2: G 基因

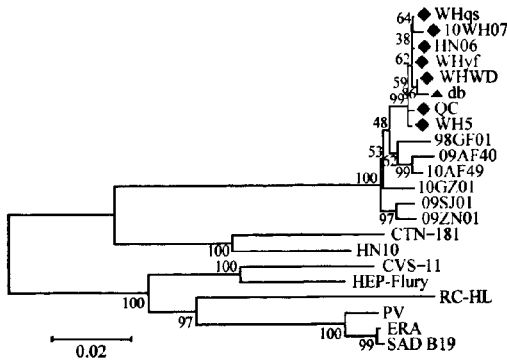
图 2 驴源 RABV N、G 基因 PCR 扩增



注: ◆湖北省分离株; ▲本研究分离株

图 3 驴源 RABV N 基因系统进化树

6. 驴源 RABV G 基因的序列分析: G 基因 ORF 全长为 1575 bp, 编码 524 个氨基酸的糖蛋白前体, 前面有 19 个氨基酸的信号肽(SP), 成熟的糖蛋白由 505 个氨基酸残基组成, 分为 3 个结构域: 439 个氨基酸组成的膜外区(1 ~ 439aa)、22 个氨基酸组成的跨膜区(440 ~ 461aa)和 44 个氨基酸组成膜内区(462 ~ 505aa)。该病毒株与近年在湖北省及周边地区分离的代表性街毒株 G 基因核苷酸序列及推导的氨基酸序列的同源性分别为 87.9% ~ 99.7% 和 95.0% ~ 99.4%, 与国内外人用和兽用疫苗株 G 基因核苷酸序列及推导的氨基酸序列的同源性分别为 82.2% ~ 87.0% 和 87.8% ~ 93.5%。与国内分离街毒株核苷酸和氨基酸的同源性要高于疫苗株, 且与国内疫苗株 CTN-181 的同源性要高于国外疫苗株。利用核苷酸序列推导的氨基酸序列构建进化树(图 4), 结果显示, 驴源 RABV G 基因与近年国内分离代表性街毒株以及中国人用狂犬病疫苗株 CTN-181 有着较近的系统进化关系, 与近几年在武汉市分离街毒株亲缘关系更近, 处于同一个亚群, 国外的病毒株和疫苗株处于另外一个亚群。



注: 同图 3

图 4 驴源 RABV G 基因系统进化树

### 讨论

DFA 是 WHO 推荐的实验室检测狂犬病的标准方法<sup>[5]</sup>, RABV 的 N 基因高度保守, N 蛋白为病毒中最稳定的蛋白, 可作为诊断抗原<sup>[6]</sup>。双抗体夹心 ELISA 以核蛋白单克隆抗体为基础, 具有较高的敏感度, 该方法具有操作简便, 广泛用于狂犬病的辅助诊断。徐葛林等<sup>[7]</sup>曾用双抗体夹心 ELISA 对数百份动物狂犬病标本进行检测, 其特异度和敏感度分别达到 99.3% 和 97.6%。这两种方法对于疑似狂犬病死亡的法医学案例具有良好的应用价值<sup>[8]</sup>。本研究采用 DFA 和双抗体夹心 ELISA 相结合对驴脑组织样本进行 RABV 鉴定以增加实验室诊断的准确性。

RABV N 基因常用于基因分型及分子流行病学研究<sup>[9]</sup>。而 G 蛋白是 RABV 中唯一的保护性抗原, 能诱导机体产生抗 RABV 的中和抗体, 保护机体抵抗病毒感染<sup>[10]</sup>。N、G 基因一直是研究的热点, 本研究对其进行扩增、序列测定并进行分子遗传学分析, 结果发现, 该病毒株与国内分离街毒株以及国内使用的疫苗株 CTN-181 在核苷酸和氨基酸的同源性较高, 系统进化关系也较近, 处于同一个亚群。提示采用 CTN-181 疫苗株生产的狂犬病疫苗能有效预防中国狂犬病的流行<sup>[11]</sup>。本次分离的驴源街毒株与近几年在湖北省武汉市分离街毒株亲缘关系最近, 表明狂犬病街毒株存在着一定地域性聚集的特点, 与以往研究相符。有研究表明 RABV 存在着跨地域、跨宿主传播的现象<sup>[12]</sup>, 这一结论有待进一步扩大狂犬病流行病学调查范围来判定。

虽然犬一直是中国 RABV 的主要传染源和储存宿主, 但是近年来家养动物以及野生动物致人感染狂犬病的报道逐步增多。中国已从野生动物狼、貂、熊、野猪、鹿、兔和家畜牛、羊和马中检测出 RABV<sup>[13]</sup>。最

近, 又有家养动物水牛感染狂犬病的报道<sup>[14]</sup>。

本研究为国内首次从驴中分离 RABV, 初步考虑该驴可能是被 RABV 感染犬或其他野生动物咬伤所致。在驴中检测到 RABV 有助于对驴及其他家养动物作为 RABV 传染源和储存宿主的进一步研究, 同时应扩大家养动物的监控范围。

### 参考文献

- [1] Cisterna D, Bonaventura R, Caillou S, et al. Antigenic and molecular characterization of rabies virus in Argentina. *Virus Res*, 2005, 109 (2): 139-147.
- [2] WHO. WHO expert consultation on rabies. *World Health Organ Tech Rep Ser*, 2005, 931: 1-88.
- [3] Song M, Tang Q, Xu Z, et al. Analysis on the factors related to rabies epidemic in China, in 2005. *Chin J Epidemiol*, 2006, 21 (11): 956-959. (in Chinese)  
宋森, 唐青, 许真, 等. 中国 2005 年狂犬病流行相关因素分析. *中华流行病学杂志*, 2006, 21 (11): 956-959.
- [4] Meng SL, Liu H, Hu DL, et al. Rabies street strain G gene sequence analysis, Fuyang city, Anhui province. *Chin Trop Med*, 2009, 9 (10): 1966-1968. (in Chinese)  
孟胜利, 刘红, 胡岱霖, 等. 安徽省阜阳市狂犬病街毒株 G 基因序列分析. *中国热带医学*, 2009, 9 (10): 1966-1968.
- [5] Rudd RJ, Smith JS, Yager PA, et al. A need for standardized rabies-virus diagnostic procedures: effect of cover-glass mountant on the reliability of antigen detection by the fluorescent antibody test. *Virus Res*, 2005, 111 (1): 83-88.
- [6] Wu X, Gong X, Foley HD, et al. Both viral transcription and replication are reduced when the rabies virus nucleoprotein is not phosphorylated. *J Virol*, 2002, 76 (9): 4153.
- [7] Xu GL, Wu J, Wu TC, et al. Investigation of the rabies virus carried by healthy dogs of the Guangxi region with a variety of methods. *Chin J Zoonoses*, 1999, 9 (3): 108-109. (in Chinese)  
徐葛林, 吴杰, 吴泰才, 等. 多种方法对广西地区健康犬带狂犬病毒的调查. *中国人兽共患病杂志*, 1999, 9 (3): 108-109.
- [8] Sun LJ, Xu GL, Wang HL, et al. Application of immunofluorescence and sandwich ELISA with double antibodies in detection of human rabies. *J Forensic Med*, 2007, 23 (6): 411-413. (in Chinese)  
孙来晶, 徐葛林, 王华林, 等. 免疫荧光及双抗体夹心 ELISA 在人狂犬病检测中的应用. *法医学杂志*, 2007, 23 (6): 411-413.
- [9] David D, Yakobson B, Smith JS, et al. Molecular epidemiology of rabies virus isolates from Israel and other middle- and near-eastern countries. *J Clin Microbiol*, 2000, 38 (2): 755-762.
- [10] Dietzschold B, Schnell M, Koprowski H. Pathogenesis of rabies. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2005, 292: 45-56.
- [11] Meng SL, Xu GL, Ming PG, et al. Sequences determination and analysis of the rabies virus nucleoprotein and glycoprotein genes in CTN-1 strain of eight generations. *Chin J Zoonoses*, 2007, 23 (4): 327-332. (in Chinese)  
孟胜利, 徐葛林, 明平刚, 等. 狂犬病疫苗毒株 CTN-1 八代次 N 和 G 基因序列测定及分析. *中国人兽共患病学报*, 2007, 23 (4): 327-332.
- [12] Meng SL, Xu GL, Cheng MR, et al. Analysis of genetic diversity of rabies virus isolates in China. *Chin J Biologicals*, 2010, 23 (5): 449-454. (in Chinese)  
孟胜利, 徐葛林, 程满荣, 等. 中国狂犬病毒遗传多样性分析. *中国生物制品学杂志*, 2010, 23 (5): 449-454.
- [13] Yu YX. *Rabies and Rabies Vaccine*. Beijing: China Medical Science Press, 2009: 359. (in Chinese)  
俞永新. 狂犬病和狂犬病疫苗. 北京: 中国医药科技出版社, 2009: 359.
- [14] Zhang KS, Guo JH, Xu ZF, et al. Diagnosis and molecular characterization of rabies virus from a buffalo in China: a case report. *Viol J*, 2011, 8: 101-105.

(收稿日期: 2012-01-15)

(本文编辑: 万玉立)