

浙江省不同宿主来源狂犬病病毒 N 基因分子特征分析

王晓光 雷永良 陶晓燕 李浩 申辛欣 于鹏程 尹翠萍
孟胜利 王欣莹 唐青

【摘要】 目的 测定浙江省不同宿主(人、鼬獾、犬)来源的狂犬病病毒街毒株 N 基因序列,分析病毒遗传变异特征及其与流行的关系。**方法** 采用直接免疫荧光试验和反转录聚合酶链式反应检测狂犬病病毒阳性标本 N 基因核苷酸序列,利用生物信息学软件分析基因序列和编码蛋白。**结果** 共获得浙江省 2 个人源、5 个鼬獾源和 11 个犬源狂犬病病毒街毒株 N 基因核苷酸序列,18 个核苷酸和氨基酸序列同源性在 89.7%~100.0% 和 98.4%~100.0%,N 蛋白一级结构上绝大部分为稳定区域,编码基因的核苷酸变异多为无义突变,系统发育分析显示 18 个街毒株均属于传统的基因 1 型。**结论** 浙江省不同宿主来源狂犬病病毒的流行具有地域性特征,同类宿主动物病毒株或来自同一县域/相邻县域的毒株在地理位置上最为近缘,但人源株病毒更具有复杂性。浙江省狂犬病病毒街毒株的流行具有通过犬向鼬獾和人传播,并在犬、鼬獾中跨区域循环传播的特点。

【关键词】 狂犬病病毒; 宿主动物; 基因; 序列分析

Sequencing and analysis of N gene of street rabies virus isolated from different hosts in Zhejiang province

Wang Xiaoguang¹, Lei Yongliang¹, Tao Xiaoyan², Li Hao², Shen Xinxin², Yu Pengcheng², Yin Cuiying², Meng Shengli³, Wang Xinying⁴, Tang Qing². 1 Lishui Center for Disease Control and Prevention, Zhejiang 323000, China; 2 Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention; 3 Department of Genetic Engineering, Wuhan Institute of Biologic Products; 4 Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention

Corresponding author: Tang Qing, Email: qtang04@sina.com

This work was supported by grants from the Core Technique and System Research Project of Infectious Disease Laboratory Surveillance (No. 2012ZX10004215) and the Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (No. 201103032).

【Abstract】 Objective To elucidate the characteristics of genetic variability and its relationship with prevalence, through sequencing and analysis of N gene among street rabies virus isolated from different hosts (homo sapiens, ferret badger, dog) in Zhejiang province. **Methods** Samples were screened and confirmed by direct fluorescence assay and reverse transcript PCR. Sequences were analyzed using bio-information software. **Results** Eighteen street rabies virus strains were identified, including 2 from homo sapiens, 5 from ferret badger, and 11 from dog. Similarities of N gene and N protein were calculated to be 89.7%–100.0% and 98.4%–100.0% respectively. Mutations occurred in N gene were almost non-sense mutations. In addition, Data from phylogenetic analysis showed that all these strains could be classified into traditional genotype 1. **Conclusion** The prevalence of rabies viruses among different hosts in Zhejiang province had certain regional properties. Rabies viruses isolated from the same kind of host or from the same/adjacent county/counties had the closest relationship. However, the characteristics of rabies virus prevalent in homo sapiens were somewhat complicated. In summary, the transmission of street rabies virus in Zhejiang province was from dogs to ferret badgers and homo sapiens, and the virus could circulate and cross-regional transmit among dogs and ferret badgers.

【Key words】 Rabies virus; Host; Gene; Sequencing analyses

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.07.018

基金项目: 国家科技重大专项(2012ZX10004215); 公益性行业(农业)科研专项(201103032)

作者单位: 323000 浙江省丽水市疾病预防控制中心(王晓光、雷永良); 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所(陶晓燕、李浩、申辛欣、于鹏程、尹翠萍、唐青); 武汉生物制品研究所(孟胜利); 浙江省疾病预防控制中心(王欣莹)

通信作者: 唐青, Email: qtang04@sina.com

核衣壳蛋白(NP)是狂犬病病毒RNA中最稳定和高效表达的蛋白,N蛋白基因(N基因)具有高度的保守性、一致的抗原性和群特异性的特征,不仅可用于检测狂犬病病毒感染,也可作为分子和抗原性比较的对象广泛用于狂犬病病毒的分类、分子流行病学与地域关系的研究^[1-3]。本研究测定浙江省狂犬病病毒街毒株N基因序列,对不同宿主(人、鼬獾^[4]、犬)来源的街毒株进行分子特征分析,探讨不同宿主来源狂犬病病毒的遗传变异特点及其与流行的关系。

材料与方法

1. 标本来源:18份狂犬病病毒阳性标本来自浙江省2008年2月至2013年6月间狂犬病确诊和疑似狂犬病患者的唾液及狂犬病疫区和疑似狂犬病地区伤人犬或行为表现异常的鼬獾和犬的脑组织,经过直接免疫荧光试验(DFA)检测狂犬病病毒特异性抗原和RT-PCR检测狂犬病病毒特异性核酸后获得^[4]。其中狂犬病确诊患者(农民,犬伤)唾液标本2份,分别来自台州市仙居县(P06)和绍兴市嵊州市(P07);鼬獾阳性脑组织标本5份,分别来自丽水市莲都区(F01)和杭州市淳安县(F02~F05);犬阳性脑组织标本11份,分别来自丽水市松阳县(D01、D02、D04、D06、D08~D10)、遂昌县(D03)、缙云县(D11)和景宁县(D23、D24)。结果复核及毒株分离鉴定由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所和武汉生物制品研究所完成。阳性标本100 μl(100 mg)分装至1.5 ml离心管内并加入10倍体积的RNAlater RNA Stabilization Reagent(QIAGEN,德国)以稳定标本中的RNA,冻存于-152℃低温冷冻箱(Hair)备用(可长期保存)。

2. 引物设计:根据狂犬病病毒基因1型中国疫苗株和流行株N基因序列并参考巴斯德疫苗株(strain Pasteur vaccins, PV/M13215)N基因序列,通过软件DNASTAR Lasergene® 7.1 PrimerSelect和Primer Premier 6.0设计扩增引物,N-F: ATG TAA CAC CTC TAC AAT GG; N-R: CAG TCT CYT CNG CCA TCT[Y=(C, T)],预期扩增N基因核苷酸序列片段为1 533 bp,扩增位置在55~1 587 bp(以PV为准)。

3. 基因扩增:用组织研磨仪TissueLyser LT(QIAGEN)有效破碎和均质RNAlater RNA Stabilization Reagent保存的阳性样本。唾液标本RNA提取用QIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)试剂;脑组织RNA提取用Trizol(Invitrogen,美国)试

剂。PCR扩增用One Step RNA PCR Kit(AMV)(TaKaRa,中国大连)试剂,按以下程序进行:50℃反转录30 min;94℃预变性2 min;94℃30 s、56℃30 s、72℃90 s,35个循环;72℃再延伸10 min;4℃终止反应。N基因特异性扩增产物用1% Certified Molecular Biology Agarose(BIO-RAD,美国)电泳分离鉴定,QIAquick Gel Extraction Kit(QIAGEN)切胶纯化后进行序列双向测定[生工生物工程(上海)股份有限公司]。所有操作均按照试剂说明书推荐方法进行。

4. 序列分析:测序后获得的N基因序列和引用序列(来源于GenBank)用以下生物信息学软件分析:ATGC、BioEdit和GENEDOC用于序列编辑、剪切、拼接处理;ClustalX 2.1用于比对多重序列(Multiple Sequence Alignment);DNASTAR Lasergene® 7.1 MegAlign进行序列匹配和多重比对(ClustalW方法);Mega 5.0最大似然法(Maximum Likelihood, ML, bootstrap=100)绘制系统发育树;EpiInfo™ 7中EpiMap地理信息系统(GIS)绘制分布地图。

结 果

1. N基因测序:通过测序引物双向测通后测得1 533 bp的包含狂犬病病毒N基因全长的产物序列,以PV株(M13215)N基因编码区为标准,共获得18个不同宿主来源的狂犬病病毒街毒株N基因核苷酸序列并递交GenBank(图1),其中包括2个人源序列、5个鼬獾源序列和11个犬源序列。N基因开放读码框(ORF)共1 353个核苷酸,编码450个氨基酸,与狂犬病病毒特征相符合。

2. N蛋白抗原位点分析:以PV株氨基酸序列为标准,多序列比较N蛋白18个氨基酸序列主要抗原位点的差异情况(图2),纵轴上的熵表示每一个氨基酸位点的变异度,熵的数值越高说明该位点越不稳定^[5]。18个序列中第379位(V→L)均出现差异,F01~F05第90位(T→N)、第332位(A→T)和P06第383位(D→N)发生改变。

3. 同源性分析:核苷酸序列多重比对结果显示,18个狂犬病病毒浙江株核苷酸/氨基酸序列同源性为89.7%~100.0%/98.4%~100.0%。与PV株同源性为86.6%~87.4%/96.9%~97.8%;与国内其他地区毒株同源性在84.7%~100.0%/92.2%~99.8%之间。12个犬源株序列之间核苷酸和氨基酸同源性均在99.1%~100.0%之间,同源性较高,与其他犬源株序列同源性为87.3%~100.0%/96.2%~99.8%。2

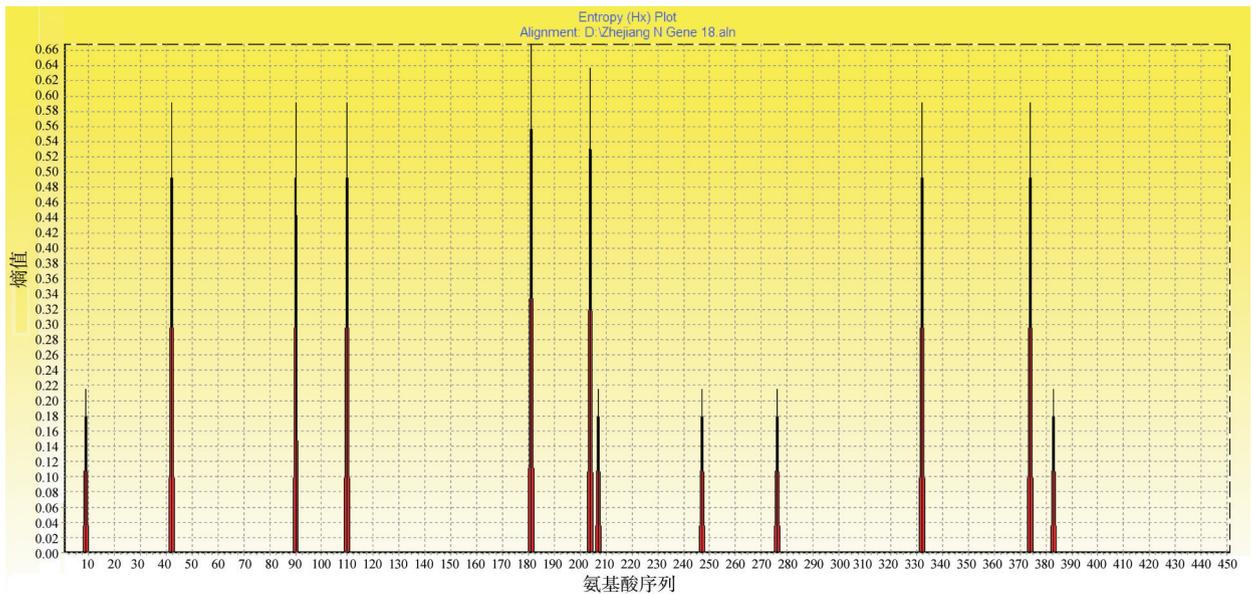


图 2 N 蛋白氨基酸序列熵分析

个人源株序列核苷酸和氨基酸同源性差异为 0.4% 和 0.2%，与其他人源株序列比较，P07 与 Hebei0(H) 差异最小(nt/aa, 0.5%/0.2%)，P06/P07 与 Wz1(H)/Wz0(H) 次之(nt/aa, 0.9% ~ 1.2%/0.3% ~ 0.7%)，P06 与 Wx0(H) 差异最大(nt/aa, 12.5%/2.4%)。5 个鼬獾源株序列核苷酸无差异，比较其他动物宿主株序列，与鼬獾源株差异最小(nt/aa, 0.3 ~ 1.0%/0.4%)，与梅花鹿、野鼠源株差异最大(nt/aa, 12.7% ~ 15.3%/2.9% ~ 7.8%)；与猪、马、鹿源株序列核苷酸和氨基酸差异在 4.2% ~ 12.7% 和 0.9% ~ 2.9% 之间。

4. 系统发育分析：浙江省 18 个不同宿主来源的街毒株均属于狂犬病病毒传统的基因 1 型 (Genotypes 1, *RABV*)，与其他 1 型序列形成独立的进化分支，人和犬源、鼬獾源病毒株分别在 I、II 分支内，与 PV 株进化距离均较远 (图 1)。13 个人、犬源株共聚类在亚分支 I a，与其他宿主动物源病毒株进化较远；2 个人源株与温州、北京、河北人源分离株进化关系最近，与江苏、湖南、四川、贵州人源分离株均较远；11 个犬源株与衢州、杭州淳安、安徽犬源株进化关系最近，并与温州人源株有着非常近的进化关系。5 个鼬獾源病毒株与浙江淳安和江西鼬獾源株共聚类为一个独立的亚分支 II b，进化关系最近；与猪、马、鹿株进化关系均较远；与野鼠、梅花鹿分离株进化关系最远。

以 PV 株为外群系统发育分析浙江省 18 个狂犬病病毒株，显示同类宿主动物病毒株进化距离均最近 (图 3B)，鼬獾、犬源株仍分布在各自独立的分支上，但人源株聚类到犬源株中，P06/P07 与 D03 的进

化关系最近，来自淳安、松阳、景宁、缙云、仙居、嵊州市 (县) (图 3A) 的毒株均聚类在相同的亚分支上。

讨 论

本研究 18 个不同宿主来源的狂犬病病毒街毒株 N 基因核苷酸序列的组成和结构均符合传统狂犬病病毒属 N 基因特征，N 蛋白一级结构上仅有个别抗原位点发生变异，其氨基酸水平均较为保守，这可能与 N 蛋白在病毒粒子中紧密结合基因组 RNA 且相互作用有关^[6]。浙江分离株 N 基因序列同源性比较结果相似，但核苷酸与氨基酸同源性有 10% 的差距，且氨基酸序列变异位点明显少于核苷酸序列，说明 N 蛋白编码基因的核苷酸变异多为无义突变。18 个 N 蛋白抗原位点变异较少，单克隆抗体研究分别定位于 358 ~ 367、76 ~ 90、313 ~ 337、359 ~ 383 位氨基酸的 4 个抗原区中仅有 NIV 抗原区 1 个位点发生改变^[7]。18 个序列中诱导产生特异性 Th 细胞，于 21 ~ 35、384 ~ 408、408 ~ 418 位氨基酸的 3 个主要表位均未见差异^[8]；具有共同的 389 位丝氨酸 (T) 磷酸化位点^[6]和受 389 位影响的 375 位次要的苏氨酸 (S) 磷酸化位点^[9]。

浙江分离株与狂犬病病毒基因 1 型代表种 N 基因遗传进化关系最近，明显区别于其他 6 个基因型。5 个鼬獾源株与杭州淳安、江西鼬獾源株以及 11 个犬源株与衢州、淳安、安徽犬源株进化关系最近，符合其地理位置分布的特点。5 个鼬獾株和野鼠、梅花鹿分离株同属野生动物街毒株，但同源性不高，进化关系最远，可能与病毒分离自不同地域、不

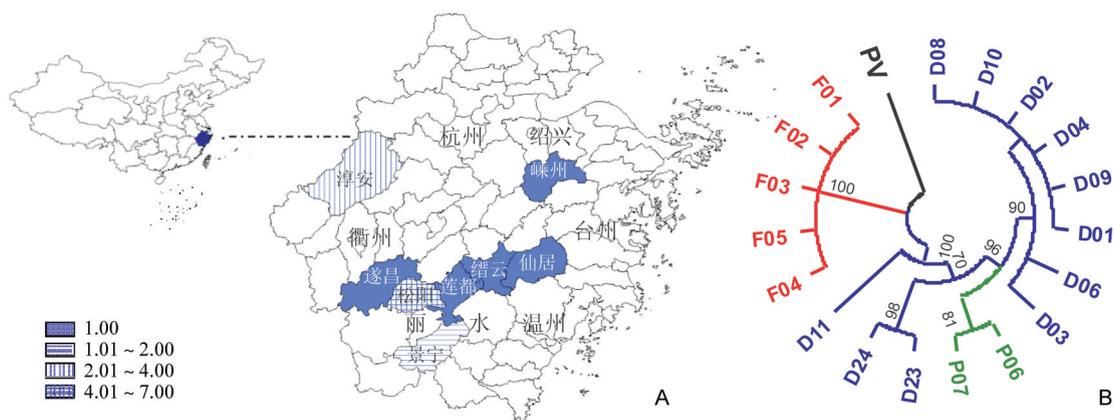


图3 浙江省18株不同宿主动物狂犬病病毒N基因系统发育分析及其地理位置分布

同宿主有关。2个人源株与鼬獾源株相距较远,与犬源株关系较为紧密,这与确诊患者有犬伤暴露史,及犬是我国狂犬病病毒的主要宿主动物,并在狂犬病的流行过程中扮演着重要的角色有关^[10]。

浙江13个人、犬源狂犬病病毒街毒株均与温州人源株有着非常近的进化关系,表明这些街毒株是目前浙江省内的优势流行株,但与北京、河北人源株较近的进化关系也显示出浙江狂犬病病毒株进化关系的复杂性。13个病毒株与其他野生宿主动物株相比在基因结构及进化关系上均存在一定差异,人、犬源分离株序列同源性均高于野生宿主动物,系统发育分析同样将其分为2个独立的亚分支,这可能是狂犬病病毒在不同地理环境下进化的结果或为其他选择性压力如适应特异性宿主所致^[11]。

浙江人、鼬獾和犬源狂犬病病毒属于同一个基因型,同类宿主动物病毒株或来自同一县域/相邻县域的病毒株其进化距离最近,在地理位置上也最为近缘,并将丽水、台州、绍兴、杭州串联成连续的区域,符合狂犬病病毒地域性流行的特点^[10]。结合浙江省境内山脉连绵的自然条件,“鼬獾-犬-农民”之间均有着较多的接触机会,其中淳安县在2002年和丽水市莲都区在2009年之前均未有鼬獾致人狂犬病的报道^[4,12],而本文2例确诊患者均为犬咬伤后发病,说明浙江省狂犬病病毒流行是通过“犬-鼬獾-人”方式传播,与狂犬病病毒成功从犬向野生动物迁移的报道一致^[13],并在犬、鼬獾中不断跨区域循环传播。

由于狂犬病病毒的宿主动物很多,野生带毒动物可使病毒在不同地域间迁移,因此病毒在野生动物中的传播变得非常重要。分析不同地域和不同宿主来源狂犬病病毒的分子特征,有助于了解不同时间、地域和宿主对狂犬病病毒演变的影响^[10],为实施野生动物免疫策略和进一步控制狂犬病病毒传播提

供技术支持。

参 考 文 献

- [1] Bourhy H, Reynes JM, Dunham EJ, et al. The origin and phylogeography of dog rabies virus [J]. *J Gen Virol*, 2008, 89 (11):2673-2681.
- [2] Jackson AC, Wunner WH. Rabies[M]. 2nd ed. Academic Press, USA, 2007.
- [3] Yang DK, Park YN, Hong GS, et al. Molecular characterization of Korean rabies virus isolates[J]. *J Vet Sci*, 2011, 12(1):57-63.
- [4] Lei YL, Wang XG, Li H, et al. New animal hosts of rabies virus in mountain areas in Zhejiang province [J]. *Chin J Epidemiol*, 2009, 30(4):344-347. (in Chinese)
雷永良, 王晓光, 李浩, 等. 浙江省山区狂犬病新宿主动物调查 [J]. *中华流行病学杂志*, 2009, 30(4):344-347.
- [5] Du J, Zhang Q, Tang Q, et al. Characterization of human rabies virus vaccine strain in China[J]. *Virus Res*, 2008, 135(2):260-266.
- [6] Yang J, Koprowski H, Dietzschold B, et al. Phosphorylation of rabies virus nucleoprotein regulates viral RNA transcription and replication by modulating leader RNA encapsidation[J]. *J Virol*, 1999, 73(2):1661-1664.
- [7] Goto H, Minamoto N, Ito H, et al. Mapping of epitopes and structural analysis of antigenic sites in the nucleoprotein of rabies virus[J]. *J Gen Virol*, 2000, 81(1):119-127.
- [8] Ertl HC, Dietzschold B, Gore M, et al. Induction of rabies virus-specific T-helper cells by synthetic peptides that carry dominant T-helper cell epitopes of the viral ribonucleoprotein[J]. *J Virol*, 1989, 63(7):2885-2892.
- [9] Kawai A, Anzai J, Honda Y, et al. Monoclonal antibody #5-2-26 recognizes the phosphatase-sensitive epitope of rabies virus nucleoprotein[J]. *Microbiol Immunol*, 1997, 41(1):33-42.
- [10] Tao XY, Tang Q, Li H, et al. Molecular epidemiology of rabies in southern People's Republic of China [J]. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15(8):1192-1198.
- [11] Zhang Y, Xiong C, Zou Y, et al. Molecular characterization of rabies virus isolates in China during 2004[J]. *Virus Res*, 2006, 121(2):179-188.
- [12] Li YX, Tian JS, Xu ZC. Rabies caused by ferret-badger's bite: investigation of 7 case[J]. *Chin J Zoonoses*, 2004, 20(12):1103. (in Chinese)
李奕新, 田建三, 徐志春. 鼬獾咬伤引发7例狂犬病[J]. *中国人兽共患病杂志*, 2004, 20(12):1103.
- [13] Páez A, Saad C, Núñez C, et al. Molecular epidemiology of rabies in northern Colombia 1994-2003. Evidence for human and fox rabies associated with dogs[J]. *Epidemiol Infect*, 2005, 133(3):529-536.

(收稿日期:2014-02-18)

(本文编辑:张林东)