

## 赤羽病病毒核蛋白基因克隆和序列分析\*

花群义<sup>1\*\*</sup>, 张念祖<sup>2</sup>, 董俊<sup>1</sup>, 杨晶焰<sup>1</sup>, 徐自忠<sup>1</sup>, 杨云庆<sup>1</sup>

(1. 云南出入境检验检疫局技术中心 云南昆明 650228; 2. 农业部热带亚热带动物病毒学重点开放实验室, 云南昆明 650224)

Cloning and Sequence Analysis of *N* gene encoding *Akabane virus*

## Nucleotide Capsid Protein

HUA Qun-yi<sup>1\*\*</sup>, ZHANG Nian-zu<sup>2</sup>, DONG Jun<sup>1</sup>, YANG Jing-yan<sup>1</sup>, XU Zi-zhong<sup>1</sup>, YANG Yun-qin<sup>1</sup>

(1. Technology Center of Yunnan Entry-Exit Inspection and Quarantine, Kunming 650228, China; 2. The key Opening Laboratory of Tropical and Subtropical Animal Virology of Ministry of Agriculture, Kunming 650224, China)

**Abstract:** The nucleocapsid protein (N) gene of *Akabane virus* strain YN isolated from bovine was amplified by RT-PCR. The product of 696 bp fragment was obtained as expected. The amplified fragment was then cloned into the pDM18-T vector and confirmed by PCR, endonuclease analysis, and sequencing. The results demonstrated that nucleotide homology with other published AKAV N genes was between 94.2%~98.3%, and the deduced amino acid homology was between 97.6%~99.5%, respectively. Therefore, nucleotide capsid protein gene of AKAV was conserved. Phylogenetic tree constructed with 17 reference strains of 696 bp of the N gene showed that AKAV-YN strain is related to Tinaroo strain.

**Key words:** *Akabane virus*; *N* gene Cloning; Sequence analysis

**摘要:** 参考 GeneBank 发表的赤羽病病毒 (*Akabane virus*, AKAV) 的核蛋白基因 (SmRNA) 序列, 设计合成一对引物, 从分离自牛体的 AKAV BHK21 细胞培养物中提取总 RNA, 对 AKAV 核蛋白基因进行 RT-PCR 扩增, 产物经琼脂糖电泳分析, 呈现一条约 696bp 的条带, 回收纯化后, 将其克隆至 pMD18-T 质粒载体中, 然后进行核苷酸序列分析。与 GenBank 中报道的多株 AKAV 编码核衣壳蛋白 (N) 的 SmRNA 基因比较后发现, 与其它株的核苷酸的同源性为 94.2%~98.3%, 推导的氨基酸的同源性为 97.6%~100%, 证实为 AKV 的 N 基因。为生产 AKAV 特异性核蛋白抗原、免疫血清学诊断试剂的制备和分子生物学研究打下了坚实基础。

**关键词:** 赤羽病病毒; 核蛋白基因; 克隆与序列分析

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5152(2004)01-0018-04

赤羽病 (*Akabane disease*, AKA) 又名阿卡斑病, 是由赤羽病病毒 (*Akabane virus*, AKAV) 引起的牛、绵羊和山羊的一种多型性传染病。以流产、早产、死胎、畸形产为特征, 能引起先天性关节炎弯曲和水性无脑症<sup>[1]</sup>。该病于 20 世纪 30 年代在澳大利亚的牛、绵羊和山羊群中流行, 随后日本亦有报道。1972~1973 年, 在日本关东以西的牛群中发生原因不明的流产、早产、死产以及先天性关节弯曲

-积水性无脑综合征 (AH 综合征), 损失犊牛 5 万头以上<sup>[2,3]</sup>。除日本、澳大利亚以外, 以色列 (1969)、沙特阿拉伯、科威特、也门、巴林、土耳其、印度尼西亚 (1979)、韩国 (1982) 和阿拉伯联合酋长国 (1988) 等国也相继报道本病<sup>[4-7]</sup>。AKA 给畜牧业造成严重的经济损失, 是国际动物贸易中重点检疫对象。

AKAV 属于布尼安病毒科布尼安病毒属, 为负

收稿日期: 2003-07-02, 修回日期: 2003-08-20

\* 基金项目: 云南省科技攻关计划重点项目资助 (云计科技 (98) 636 号)

\*\* 通讯作者: 花群义 (1965-), 男, 云南武定籍, 高级兽医师, 博士。主要从事动物病毒分子生物学研究与应用。

Corresponding author. Tel: 0871-4613797, E-mail: CiqHua@yahoo.com.cn

链单股 RNA 病毒, 基因组 RNA 由大 (L-RNA)、中 (M-RNA)、小 (S-RNA) 三种分子组成。病毒含有三个核衣壳, 核衣壳由大量核衣壳蛋白和少量的大蛋白分别包裹大、中、小三种 RNA 而成。病毒互补的 L-mRNA 编码病毒的转录酶和复制酶 (L); M-mRNA 编码二种囊膜糖蛋白 (G1 和 G2), 分别诱导中和抗体和血凝抑制抗体的产生, M-mRNA 还编码 1 种或多种非结构蛋白; S-mRNA 编码核衣壳蛋白 (N), 在它的 5' 端有一个与 N 蛋白重叠的开放阅读框架, 编码非结构蛋白 (NSs) [8-10]。为了探讨 AKAV N 基因结构及其与功能的关系, 本文对 AKAV N 基因进行克隆和序列分析, 为今后应用 N 基因表达产物建立酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测方法和快速检测试剂盒的制备奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

AKAV-YN 分离病毒株由本室从某地牛群中分离保存。幼仓鼠肾细胞 (BHK21) 为本室保存细胞。pMD18-T 载体和 *E.coli* JM109 细菌从宝生物工程 (大连) 有限公司购买。Total RNA 提取试剂盒 Trizol Regent、TaKaRa RNA LA PCR 试剂盒、胶回收试剂盒 MinElute Gel Extraction Kit、DNA 连接试剂盒 (DNA Ligation Kit)、限制性内切酶、Taq 酶、T4DAN 连接酶购自宝生物工程 (大连) 有限公司, RNeasy Mini Kit 为基因公司产品, EZNA<sup>®</sup>Plasmid 为 Omega 公司产品, Gel Extraction Mini Kit 为 promega 产品。

### 1.2 AKAV 核蛋白基因重组质粒的构建

1.2.1 引物设计: 参照 GeneBank 上公开发表的 AKAV 核蛋白基因序列, 设计引物, 扩增长度为 696bp, 引物由宝生物工程 (大连) 有限公司合成。其核苷酸组成及其在 N 基因的位置为: 上游引物 (P<sub>1</sub>) 5' -GCA AAT CAA TTC ATT TTC AAC GAT GT-3', 在 N 基因的位置 15-40nt; 下游引物 (P<sub>2</sub>) 5' -GAT CTG AAT ACC AAA TTG AGC CAG G-3', 在 N 基因的位置 710-686nt。

1.2.2 AKAV RNA 的提取: AKAV-YN 分离病毒株接种 BHK21 传代细胞, 待细胞出现 75% CPE 以上时, 收获病毒, 冻融 2 次, 利用 Trizol Regent 按说明书从病毒细胞培养液中提取总 RNA, 取 5μL 电泳检测 RNA 质量。

1.2.3 目的片段的 RT-PCR: 以 Total RNA 5μL 为模板, P<sub>1</sub> 为引物进行反转录, 以 1μL DEPC H<sub>2</sub>O 代

替 AMV 做阴性对照。以 cDNA 为模板, P<sub>1</sub>/P<sub>2</sub> 为引物进行 PCR, 同时以阴性对照为模板, 同样条件扩增。反应体系如下: LA Buffer Mg<sup>2+</sup> 5μL、dNTP 8μL、LA Taq 酶 0.5μL、P<sub>1</sub> 0.5μL、P<sub>2</sub> 0.5μL、cDNA 5μL、dH<sub>2</sub>O up to 50μL。PCR 反应循环参数为: 94℃ 1min, 98℃ 10s, 55℃ 30s, 72℃ 1min 做 30 个循环, 然后 72℃ 延伸 10min, 最后置于 4℃, 反应结束后, 取 PCR 产物在琼脂糖上进行电泳检测。

1.2.4 目的片段克隆株的鉴定: PCR 产物在琼脂糖上进行电泳后, 切下目的条带, 用 MinElute Gel Extration Kit 试剂盒回收目的片段, 取 0.5μL 电泳检测。利用 Solution I (DNA Ligation Kit Ver.2), 取回收纯化的 PCR 目的片段 3.5μL、pMD18-T 载体 1.5μL、Solution I 5μL, 16℃ 连接 3h, 然后取 5μL 连接反应液热转化至 *E.Coli* JM109 感受态细胞, 在含有 IPTG、X-Gal 的 L-Amp 平板培养基上培养。挑取白色菌落进行小量培养, 碱裂解法提取质粒, 进行阳性克隆株的 PCR 鉴定。

1.2.5 重组质粒的酶切鉴定: 将序列测定正确的含重组质粒菌株大量培养, 用质粒提取试剂盒提取克隆质粒。根据载体和目的基因上的酶切位点, 用 *NcoI*+*EcoRV* 酶切, 电泳检测鉴别插入 AKAV-YN 分离病毒株 N 基因的克隆质粒。

### 1.3 序列测定

质粒用 RV-M/M13-47 引物进行测序。阳性克隆命名为 pAKE1-N。测序实验由宝生物工程 (大连) 有限公司完成。

## 2 结果

### 2.1 目的片段的 PCR 扩增

扩增产物分子量大小约为 0.7kb, 与预期结果相符。

### 2.2 目的片段的克隆与鉴定

将我们设计的引物, 用其中扩增强度和特异性非常好的一对引物进行 RT-PCR, 扩增片段切割下来后, 用 MinElute Gel Extration Kit 切胶回收目的片段, 连接到 pMD18-T 载体上, 转化 *E.Coli* JM109 感受态细胞, 获得含有目的基因 696bp 片段的阳性克隆。用 RV-M/M<sub>13-47</sub> 引物进行 PCR 检菌。根据 pMD18-T 载体和目的片段的酶切位点, 作限制性内切酶分析, 结果见图 1, 与目的片段和载体大小一致。

### 2.3 核苷酸序列分析

利用 RV-M/M13-47 引物进行序列测定, 所测 AKAV-YN 株 N 基因的核苷酸序列长度为 699 bp,

编码 233 个氨基酸, 具有 N 和 NSs 两个重叠的阅读框。该基因测序结果已在 GenBank 中注册 (登录号: AY383717), 经 BLAST 搜索证实为 AKAV 核蛋白基因序列。用 DNASTar 软件对测得的目的基因序列与基因库中已发表的序列进行同源性分析比较, 对其编码的蛋白质氨基酸序列进行了推测, 并绘制系统发生进化树, 见图 2。序列分析结果表明, 其核苷酸与 Tinaroo 株的同源性最高, 达 98.3%, 预测的氨基酸同源性为 99.8%。这充分表明 RT-PCR 扩增片段为特异性扩增的 AKAV N 基因片段序列, 成功构建了 AKAV-N 基因重组质粒。

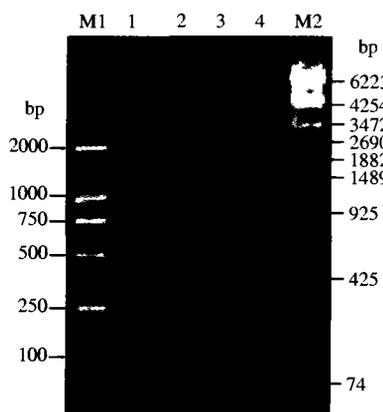


图 1 重组质粒 pAKE1-N 酶切鉴定

Fig. 1 Digestion of recombinant plasmid with *Nco*I and *Eco*RV  
M1, DL-2000 Marker; 1, Negative control; 2/3, pAKE1-N; 4, pMD18-T vector; M2,  $\lambda$ /EcoT14 I Marker.

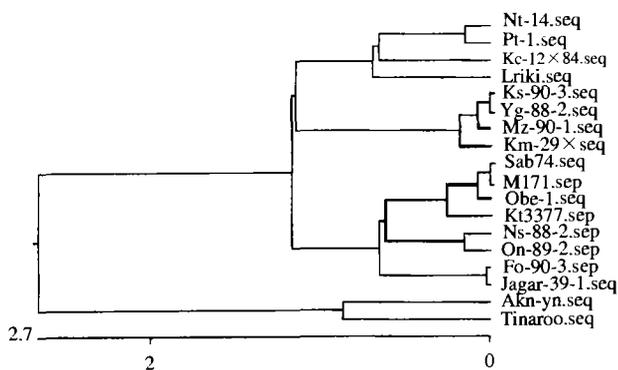


图 2 AKAV-YN 株与其它 AKAV 的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of AKAV-YN Strain and other Akabane virus

### 3 讨论

AKA 病毒基因由三个分节段的单股负链 RNA 构成; 为大(L)、中(M)、小(S)。S-RNA 编码核蛋白(N)和非结构蛋白(NS<sub>s</sub>), S-mRNA 较保守<sup>[10]</sup>, N 核蛋

白上存在抗原表位, 具有群特异性, 可刺激机体产生抗体, 通过检测核蛋白抗体来诊断此病<sup>[11,12]</sup>。M-RNA 编码两种外膜糖蛋白 G<sub>1</sub> 和 G<sub>2</sub>, M-mRNA 变异较大, 具有型特异性, G<sub>1</sub> 和 G<sub>2</sub> 分别诱导中和抗体和血凝抑制抗体的产生。国外对 AKV 糖蛋白基因的克隆和测序方面报导较多, 对核蛋白基因的克隆和测序报导较少<sup>[8]</sup>。本文对 AKAV 分离病毒株的核蛋白基因进行了克隆和核酸序列分析, 采用 RT-PCR 方法得到了 AKAV 核蛋白基因编码区的全长 cDNA 克隆。在 PCR 克隆时, 利用 *Taq* 酶在产物片段 3'-末端外加 A 的特性, 选择 pMD18-T 载体, 使该目的片段与载体连接效率大大提高, 并使筛选重组克隆时出现的假阳性大为减少, 筛选工作简捷有效, 大大提高克隆速度, 节省了试剂费用及实验时间。

对 AKV 核蛋白基因片段的 PCR 产物进行分子量大小分析时, 采用结晶紫作为染料的 PCR 产物凝胶纯化试剂, 目的 DNA 片段在可见光下清显可见, 同时避免了使用 EB 染色对 DNA 的损伤。目的基因 PCR 产物经纯化后导入 pMD18-T 载体, 获得多个重组质粒转化子, 经插入片段的酶切分析、PCR 鉴定和目的基因序列测定。确认已成功克隆获得 AKAV 核蛋白基因, 该基因由 699 个核苷酸组成, 编码由 233 个氨基酸组成的多肽。与 17 株国外病毒的目的基因核苷酸和氨基酸序列比较分析显示, 与 TIN(Tinaroo)株的同源性最高达 98.3%, 与 OBE-1 株的同源性为 95.2%, 与 Ks-90-3 株的同源性较低, 为 94.2%, 推测的氨基酸同源性为 97.6% 以上, 说明 AKAV 核蛋白基因是非常保守的。有研究者报道, OBE-1 株和 TIN 株的 SRNA 指纹图非常相似, 认为这两株病毒可能是自然发生的重组体<sup>[13]</sup>。本研究的分离病毒株是否存在类似情况, 还需进一步研究分析。该基因的成功克隆, 为进一步进行表达及应用表达产物建立 ELISA 诊断方法打下了基础。

根据绘制的物理遗传树分析显示, 可将本研究用来比较核苷酸序列的 18 株分离毒株分成三个族, 第一族包括 1982 年至 1990 从日本南岛各地分离的毒株 (如 Kc-12X84 株、Iriki 株) 以及 Nt-14 株、Pt-1 株等。第二族包括从 1974 年 AH 综合症爆发时分离的 JaGAR39 株、OBE-1 株和后来分离的 F0-90-3 株、SAB<sub>74</sub> 株、M<sub>171</sub> 株等。第三族为 AKAV-YN 株和 TIN 株病毒。这些结果说明, AKA 病毒以多系 (Multiple lineages) 进化, 也说明了抗原的多样性。由于 RNA 病毒变异较大, 在宿主体内是以一群大致相同但略有不同的病毒粒子的个体组合。所以,

在病毒群体中的各个病毒的核酸序列可能会有差异, 即相互之间存在一个“差异谱”(Variation Spectrum)。但是, 一般还是以某一种主序列为主。我们在基因克隆时, 病毒总 RNA 提取之前, 用 BKH21 细胞进行了蚀斑克隆, 以提高主序列被克隆、测定的概率, 同时也可了解该病毒在传代过程中的遗传变异程度。

### 参考文献:

- [1] Kirkland P D, Barry R D, Harper P A, *et al.* The development of *Akabane virus*-induced congenital abnormalities in cattle[J]. *Vet Rec*, 1988, 122(24): 582-586.
- [2] Lee J K, Park J S, Choi J H, *et al.* Encephalomyelitis associated with *Akabane virus* infection in adult cows[J]. *Vet Pathol*, 2002, 39(2): 269-273.
- [3] Noda Y, Yokoyama H, Katsuki T, *et al.* Demonstration of *Akabane virus* antigen using immunohistochemistry in naturally infected newborn calves[J]. *Vet Pathol*, 2001, 38(2): 216-218.
- [4] Jagoe S, Kirkland P D, Harper P A. An outbreak of *Akabane virus*-induced abnormalities in calves after agistment in an endemic region[J]. *Aust Vet J*, 1993, 70(2): 56-58.
- [5] Al-Busaigy S M, Mellor P S, Taylor W P. Prevalence of neutralising antibodies to *Akabane virus* in the Arabian peninsula[J]. *Vet Microbiol*, 1988, 17(2): 141-149.
- [6] Haughey K G, Hartley W J, Della-Porta A J, *et al.* *Akabane disease* in sheep[J]. *Aust Vet J*, 1988, 65(5): 136-140.
- [7] Taylor W P, Mellor P S. The distribution of *Akabane virus* in the Middle East[J]. *Epidemiol Infect*, 1994, 113(1): 175-185.
- [8] Chang C W, Liao Y K, S u V, *et al.* Nucleotide sequencing of S-RNA segment and sequence analysis of the nucleocapsid protein gene of the newly isolated *Akabane virus* PT-17 strain[J]. *Biochem Mol Biol Int*, 1998, 45(5): 979-987.
- [9] Akashi H, Kaku Y, Kong X G, *et al.* Sequence determination and phylogenetic analysis of the *Akabane bunyavirus* S RNA genome segment[J]. *J Gen Virol*, 1997, 78: 2847-2851.
- [10] Akashi H, Nakamura K, Murakami T. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Akabane virus* nucleoprotein gene[J]. *J Vet Med Sci*, 1997, 59(9): 837-840.
- [11] Blacksell S D, Lunt R A, White J R. Rapid identification of *Australian bunyavirus* isolates belonging to the Simbu serogroup using indirect ELISA formats[J]. *J Virol Methods*, 1997, 66(1): 123-133.
- [12] Ide S, Baba K, Tsuchimoto M, *et al.* Detection of antibodies against *Akabane virus* in bovine sera by enzyme-linked immunosorbent assay[J]. *Vet Microbiol*, 1989, 20(3): 275-280.
- [13] Akashi H, Kaku Y, Kong X, *et al.* Antigenic and genetic comparisons of Japanese and Australian *Simbu serogroup viruses*: evidence for the recovery of natural virus reassortants[J]. *Virus Res*, 1997, 50(2): 205-213.