

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.25.006

PCR 检测贵州遵义地区蝙蝠 BDV-P40 基因片段及同源性分析

雷以会,徐平,杨利玲

(遵义医学院附属医院神经内科,贵州遵义 563000)

[摘要] **目的** 探讨贵州遵义地区蝙蝠是否存在博尔纳病毒(BDV)自然感染,分析比较其与国外标准株的同源性。**方法** 采用实时定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 82 只蝙蝠额颞叶脑组织中 BDV-P40 基因片段,将阳性扩增产物测序,与国外标准株比较同源性。**结果** 蝙蝠额颞叶脑组织中 BDV-P40 基因片段阳性率为 12.2%(10/82)。贵州遵义地区蝙蝠自然感染的 BDV-P40 核苷酸序列与标准株 Strain V 和 H1766 同源性均为 96.2%,与 He/80 比对同源性为 94.9%,所编码的氨基酸无改变。**结论** 贵州遵义地区蝙蝠存在 BDV 自然感染,该地区 BDV-P40 核苷酸序列与 Strain V 和 H1766 存在高度同源性,人感染 BDV 可能为动物源性。

[关键词] 博尔纳病毒;实时定量逆转录-聚合酶链式反应;蝙蝠;BDV-P40 基因片段

[中图分类号] R741.02

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)25-3475-03

PCR detection on the P40 gene fragment of borna disease virus in bats and its homology analysis in Zunyi area of Guizhou province

Lei Yihui, Xu Ping, Yang Liling

(Department of Neurology Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate whether the bat in Zunyi region of Guizhou province exist Borna disease virus(BDV) natural infection, and to explore the homology with the foreign standard virus strains. **Methods** BDV-P40 in frontal and temporal lobe brain tissue of 82 bats were detected with real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), the BDV-P40 positive samples were sequenced and compared with the foreign standard virus strains. **Results** The BDV-P40 positive rate was 12.2%(10/82) in frontal and temporal lobe brain tissue of bats. After sequence comparison, BDV-p40 fragment of the nucleotide sequence in Strain V, H1766 showed 96.2% homology, He/80 exhibited 94.9% homology, but there were no change in the encoding amino acid residues. **Conclusion** The bats in Zunyi region of Guizhou province exist latent infection of BDV, and the positive BDV-P40 nucleotide sequence is highly homologous with strain V and H1766, human infection with BDV may be a source of animals.

[Key words] borna disease virus; real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction; bat; P40 gene fragment of BDV

1885 年,在德国 Saxony 州 Borna 镇的战斗中爆发流行一种以精神、行为异常为特征的致死性脑炎,此病被命名为博尔纳病(borna disease, BD),随后研究者在病马脑组织中分离出了致病病原体,并命名为博尔纳病毒(BDV)。由于受到地域的限制和典型病例的消失, BDV 很长一段时间未受到科学界的重视。以往,学者们认为 BDV 仅局限于德国和瑞士的地方流行区的畜牧场动物和部分野生动物。但随着科学技术的不断进步,研究发现 BDV 具有广泛宿主范围,除了马、羊,在大鼠、沙鼠、骆驼、恒河猴、鹿、马、牛、猫、山羊、兔、绵羊、狗、羊驼、小鼠等中也均发现存在 BDV 自然感染,由此可以推断 BDV 可以感染包括人在内的所有恒温动物^[1]。20 年来的研究发现, BDV 广泛存在于人类疾病中,如精神分裂症、病毒性脑炎、多发性硬化等,同时越来越多的国家及地区也检出该病毒, BDV 引发了科学界的重视^[2]。

课题组成员前期工作中用巢式逆转录 PCR(fluorescence quantitative nested polymerase chain reaction, FQ-nRT-PCR)检测贵州及周边地区的山羊、牛的外周血淋巴细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)中 BDV-P24 基因片段,阳性率分别为 0.67%、4.17%,说明该地区存在 BDV 自然感染。有研究证实,蝙蝠是狂犬病毒、尼帕病毒、亨德拉病毒等多种病毒的潜在宿主,可以成为一些人畜共患病的传播媒介^[3-4]。由于蝙蝠具有长距离飞行的能力,部分还具有迁徙性,可能会促进病毒传播,造成病毒的爆发流行。

蝙蝠是否也是 BDV 的自然感染宿主之一,目前国内外尚无相关报道。本实验采用实时定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)对蝙蝠额颞叶脑组织 BDV-P40 基因片段进行检测,对阳性产物进行测序,与国外的标准株进行比对分析,分析贵州省 BDV 的流行病学特征及变异,为进一步研究打下基础。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 实验动物 82 只蝙蝠来源于贵州省遵义市(未对蝙蝠的种类、雌雄及年龄等作区分),采集时间为 2014 年 5~9 月。每只取同侧新鲜额颞叶脑组织约 250 mg,分装在去 RNA 酶的 EP 管中,置于-80℃冰箱保存。

1.1.2 主要试剂 Trizol RNA 提取试剂购自上海 Intron; PCR 试剂盒购自美国 Promega; BDV-P40 引物由重庆医科大学神经科学研究中心提供,序列见表 1。

表 1 BDV-P40 引物序列

引物	序列(5'-3')	扩增长度(bp)
上游引物	GGTTTAAAACATGATGGCAGCCTTA	78
下游引物	GTGGATTAAACATCTGGAGTAGTGTAGC	

1.1.3 主要仪器 分光光度计 NanoDrop ND-1000 购自美国 Thermo 公司; PTC-200 DNA Engine Cycler, Rotor Gene 6000 series Software 1.7 购自澳大利亚 Corbett Research 公司; Chemidoc XRS 凝胶成像系统购自美国 Bio-Rad 公司; 去 RNA

酶硅化耗材购自美国 Axygen 公司。

1.2 方法

1.2.1 脑组织 RNA 提取 吸取 1 mL Trizol 加入去 RNA 酶的 EP 管中,取蝙蝠脑组织 100 mg 置入其中,研磨脑组织至匀浆液,再加入氯仿 200 μ L,剧烈振荡 15 s,静置 5 min,12 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min,取上清液。加入等体积的异丙醇混匀后静置 10 min,12 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min,弃上清液。晾干后加入 1 mL 75% 的乙醇洗涤沉淀 2 次,12 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min,弃上清液控干后溶解于适量的 DEPC 水中,所提取的 RNA 在分光光度计下测 $OD_{260/280}$ 值及浓度,选取 10 个样本 RNA,采用 1% 琼脂糖凝胶电泳,观察样本 RNA 的完整性,分装并保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱。

1.2.2 RNA 逆转录 5 \times PrimeScript RT Master Mix 4 μ L,根据不同样本的 RNA 浓度计算 RNA 的加样量(VRNA=500 ng/CRNA),加 DEPC 水至 20 μ L。反应条件:37 $^{\circ}$ C 15 min,85 $^{\circ}$ C 5 s。cDNA 保存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱。

1.2.3 RT-PCR 检测 BDV-P40 基因片段 GoTaq[®] qPCR Master Mix(2 \times)10.0 μ L、P40 上游引物 0.4 μ L、P40 下游引物 0.4 μ L、DEPC 7.2 μ L、cDNA 2.0 μ L,充分混匀后在荧光定量 PCR 仪上进行扩增。反应条件:95 $^{\circ}$ C 5 min;95 $^{\circ}$ C 10 s,58 $^{\circ}$ C 45 s,循环 45 次。每次反应均做无模板对照,排除假阳性,同时以 BDV 阳性的 cDNA(由重庆医科大学神经科学研究中心提供)做阳性对照,排除假阴性结果。

1.2.4 RT-PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳 30 min,凝胶成像系统观察结果,将目的条带处于 78 bp 处的标本视为阳性,将阳性标本送往上海英俊生物公司纯化、克隆及测序。

1.3 分析 将测序结果与国外标准株 Strain V、H1766 和 He/80 进行同源性分析比较。

2 结果

2.1 RNA 纯度和完整性检测 82 只标本所测得的 OD 值在 1.89~2.08,说明纯度较好;1% 琼脂糖凝胶电泳观察到 3 个条带,分别为 28S、18S、5S,其中 28S 条带的亮度是 18S 的 2 倍,说明 RNA 完整性较好,可以用于后续研究。

2.2 RT-PCR 检测 BDV-P40 基因片段 采用 RT-PCR 对蝙蝠脑组织中 BDV-P40 基因片段进行检测,结果发现 10 只标本为阳性,阳性率为 12.2%(图 1)。阳性标本 1% 琼脂糖凝胶电泳,样本目的条带与阳性对照在同一位置(图 2)。

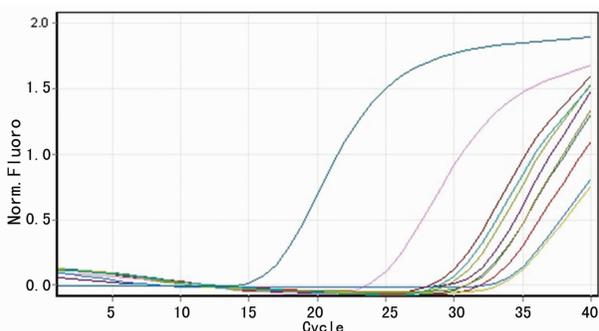
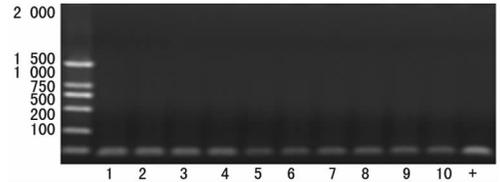


图 1 RT-PCR 检测蝙蝠脑组织 BDV-P40 基因片段阳性标本

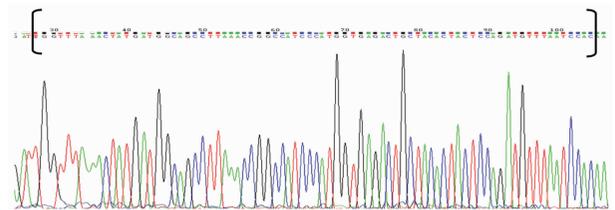
2.3 阳性 PCR 产物的测序结果及同源性的分析 将蝙蝠 BDV-P40 阳性标本的测序结果输入美国国立生物技术信息中心(NCBI)系统进行比较分析,证实本次实验所扩增的片段为 BDV-P40(nt548-625)的基因片段,与人类基因组及其他病毒基因无同源性。BDV-P40 阳性标本测序结果与 Strain V 和

H1766 的同源性均为 96.2%,有 3 个位点出现一致性沉默突变(nt548G>T,nt550T>G,nt553A>T),突变率为 3.8%,但所编码的氨基酸无改变;与 He/80 比对同源性为 94.9%,有 4 个位点出现一致性沉默突变(nt548G>T,nt550T>G,nt553A>T,nt609T>C),突变率为 5.1%。虽然贵州遵义地区蝙蝠脑组织中的 BDV-P40 基因片段与国外标准株比对存在碱基突变,但所编码的氨基酸无改变,见图 2~4。



1~10:阳性标本;+:阳性对照。

图 2 阳性标本 1% 琼脂糖凝胶电泳



□:BDV-P40 阳性 PCR 产物核苷酸序列。

图 3 蝙蝠脑组织中检测出的 BDV-P40 cDNA 克隆核苷酸序列测序结果

Strain V (核苷酸序列号: AJ311521.1)

GGTTTAAAACCTATGATGGCAGCCTTAAACCGGCCATCCCATGGTGAGACT
GCTACACTACTCCAGATGTTTAATCCAC

He80 (核苷酸序列号: AJ311522.1)

GGTTTAAAACCTATGATGGCAGCCTTAAACCGGCCATCCCATGGTGAGACT
GCTACACTACTCCAGATGTTTAATCCAC

H1766 (核苷酸序列号: AJ311523.1)

GGTTTAAAACCTATGATGGCAGCCTTAAACCGGCCATCCCATGGTGAGACT
GCTACACTACTCCAGATGTTTAATCCAC

蝙蝠

TGGTTTAAAACCTATGATGGCAGCCTTAAACCGGCCATCCCATGGTGAGACT
GCTACACTACTCCAGATGTTTAATCCAC

Strain V、He/80、H1766 和本次实验所扩增的 BDV-P40 基因片段编码的氨基酸均为: TMMAALNRPSHGETATLLQMFNP

红色标示:突变碱基。

图 4 蝙蝠脑组织经 PCR 扩增后目的基因片段序列测定结果与 BDV Strain V、He/80、H1766 核苷酸序列及氨基酸序列比较

3 讨论

BDV 为未分段的单分子负链 RNA 病毒,直径为 90 nm,为封套状、球形的感染颗粒^[5]。BDV 有 6 个开放阅读框,至少能够指导编码 6 种病毒蛋白,包括核蛋白、磷蛋白、基质蛋白、糖蛋白、非糖基化的特殊蛋白和 RNA 依赖的 RNA 聚合酶^[6]。其中编码 P24、P40 的序列较为保守、变异性小,从而成为检测 BDV-RNA 的特异性标志物。其中 BDV-P40 核酸及核蛋白在被感染细胞中含量较为丰富,且 BDV-P40 基因片段的特异性高,变异程度最小,为检测 BDV 自然感染的重要依据之一^[7]。

BDV 是一种非细胞溶解性、严格嗜神经性病毒,容易造成中枢神经系统的持续感染。BDV 也是惟一在细胞核内复制的单分子负链 RNA 病毒,从而对于 BDV 感染诊断的金标准是在脑组织中分离出该病毒。但在实际工作中脑组织来源较少,且操作复杂、成功率低,使得此项工作无法顺利开展。何丰

等^[8]采用 FQ-nRT-PCR 法对新疆伊犁地区牧羊犬的脑组织及 PBMC BDV 进行检测,其中脑组织 BDV 阳性率为 9%,PBMC 阳性率为 5%,虽然脑组织 BDV 阳性率高于外周血,但差异无统计学意义($P>0.05$)。Nakamura 等^[9]从 1 例精神分裂症患者脑组织中分离出了 BDV,但该患者 PBMC 中并未检出 BDV 核酸,故外周血中 BDV 核酸阴性并不能完全排除患者存在 BDV 感染。

冰岛是一个对动物进出口要求非常严格的国家,检测范围包括 BDV,但 Bjornsdottir 等^[10]首次在该地区马群中发现 BDV 相关抗体,推测出现这种现象可能的原因是迁徙的候鸟。最近有学者在美国的加拿大鹅中体内分离得出 1 株新的 BDV 序列,推测此类迁徙的水鸟能长距离携带该病毒^[11]。也有人提出,沿迁徙候鸟路径分布的马厩中的马有较高的 BDV 检出率^[12]。据统计蝙蝠体内可分离出 80 多种病毒,且蝙蝠种类繁多,在自然界分布广泛,喜群居、寿命长、善飞行等特点为病毒传播创造便利,蝙蝠在新发病毒传播及流行中起着重要作用。而随着人类城市的不断扩张,越来越多蝙蝠可长期定居于城市中,人们与蝙蝠的接触也逐渐增多,由此带来公共卫生问题不得不引起关注。

本研究采用 RT-PCR 检测组 82 只蝙蝠脑组织 BDV-P40 阳性率为 12.2%。BDV-P40 PCR 阳性产物测序与国外标准株 Strain V、H1766 比对同源率为 96.2%,有 3 个位点发生碱基互换(nt548G>T,nt550T>G,nt553A>T);与 He/80 比对同源率为 94.9%,有 4 个位点发生碱基互换(nt548G>T,nt550T>G,nt553A>T,nt609T>C)。本研究证实了贵州遵义地区蝙蝠存在 BDV 自然感染,该地区感染的 BDV-P40 核苷酸序列与 Strain V、H1766 存在高度同源性。BDV 是一种特殊的 RNA 病毒,其 RNA 具有高度保守性,从而保证了遗传的稳定性。蝙蝠脑组织中检出的 BDV-P40 基因片段虽存在部分碱基突变,但所编码的氨基酸序列未发生改变。

新型病毒的不断爆发流行,无疑给经济建设及社会安宁带来了严重的影响。近来的中东呼吸综合征,因其致死率高于非典型肺炎(SARS),引起了人们极度的恐慌,同时也敲响了世界必须对新发病毒感染性疾病的进行实时监控的警钟。本研究证实了贵州地区蝙蝠存在 BDV 自然感染,但因缺乏从该地区动物或人脑组织分离出来的病毒株,对该地区蝙蝠自然感染 BDV 的来源尚无法做全面的解释。因此,尚需做进一步的调查研究,揭示该地区 BDV 的流行病学特征,为防止 BDV 的爆发流行打下基础。

参考文献

[1] Lipkin WI, Briese T, Hornig M. Borna disease virus - Fact

and fantasy[J]. *Virus Res*, 2011, 162(1/2): 162-172.

[2] Bechter K. Updating the mild encephalitis hypothesis of schizophrenia[J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2013, 42(S1): 71-91.

[3] Sendow I, Ratnawati A, Taylor T, et al. Nipah virus in the fruit bat pteropus vampyrus in sumatera, Indonesia[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e69544.

[4] Field H, De Jong C, Melville D, et al. Hendra virus infection dynamics in Australian fruit Bats[J]. *PLoS One*, 2011, 6(12): e28678.

[5] Kinnunen PM, Palva A, Vaheri A, et al. Epidemiology and host spectrum of Borna disease virus infections[J]. *J Gen Virol*, 2013, 94(Pt 2): 247-262.

[6] Schindler AR, Vogtlin A, Hilbe M, et al. Reverse transcription real-time PCR assays for detection and quantification of Borna disease virus in diseased hosts[J]. *Mol Cell Probes*, 2007, 21(1): 47-55.

[7] Watanabe M, Zhong Q, Kobayashi T, et al. Molecular ratio between borna disease viral-p40 and -p24 proteins in infected cells determined by quantitative antigen capture ELISA[J]. *Microbiol Immunol*, 2000, 44(9): 765-772.

[8] 何丰, 冯裕星, 孙后超, 等. 牧羊犬外周血和脑组织博纳纳病毒检测结果的比较[J]. *中国人兽共患病学报*, 2010, 26(4): 337-340.

[9] Nakamura Y, Takahashi H, Shoya Y, et al. Isolation of borna disease virus from human brain tissue[J]. *J Virol*, 2000, 74(10): 4601-4611.

[10] Bjornsdottir S, Agustsdottir E, Blomstrom AL, et al. Serological markers of Bornavirus infection found in horses in Iceland[J]. *Acta Vet Scand*, 2013, 55(1): 77.

[11] Payne S, Covalada L, Guo JH, et al. Detection and characterization of a distinct bornavirus lineage from healthy Canada geese (*branta canadensis*) [J]. *J Virol*, 2011, 85(22): 12053-12056.

[12] Pitlik S, Teplitsky V, Richt JA, et al. Increased prevalence of Borna disease virus elisa and immunofluorescent antibodies in horses from farms situated along the paths of migratory birds[J]. *Israel J Veterinary Med*, 2003, 58(2): 80-85.

(收稿日期: 2016-03-18 修回日期: 2016-06-06)

(上接第 3474 页)

河南中医, 2015, 35(5): 1188-1190.

[9] Zhi DL, Xiang PL, Wei JZ, et al. Curcumin induces apoptosis in breast cancer cells and inhibits tumor growth in vitro and in vivo[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(6): 2818-2824.

[10] Chang YJ, Huang CY, Hung CS, et al. GRP78 mediates the therapeutic efficacy of curcumin on colon cancer[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(2): 633-641.

[11] Loana V. Inflammasome caspase[J]. *Nature Immunol*,

2012, 13(4): 358.

[12] Xin MW, Hui M, Jiao L, et al. Dynamic change of SGK expression and its role in neuron apoptosis after traumatic brain injury[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 6(7): 1282-1293.

[13] 詹启敏, 陈杰. 细胞周期与肿瘤转化医学[J]. *中国肿瘤临床*, 2014, 41(1): 1-7.

(收稿日期: 2016-03-11 修回日期: 2016-05-21)