

# 两种用于鉴别山羊痘病毒和绵羊痘病毒方法的应用与比较研究

颜新敏,张 强,吴国华,李 健,朱海霞

(中国农业科学院 兰州兽医研究所,家畜疫病病原生物学国家重点实验室,农业部畜禽病毒学开放实验室,甘肃 兰州 730046)

**摘要:**为探讨鉴别山羊痘病毒和绵羊痘病毒的分子生物学方法,对实验室分离保存的 3 株山羊痘病毒和 2 株绵羊痘病毒进行 *p32* 基因和 *GpCR* 基因扩增、克隆及序列分析。将获得的 *p32* 基因序列与 GenBank 上登陆的羊痘病毒 *p32* 基因进行 *Hinf* 酶切位点分析表明,所有绵羊痘病毒 *p32* 基因在 391 bp 和 691 bp 处存在 2 处酶切位点,而山羊痘病毒仅在 688 bp 处存在 1 个酶切位点。将获得的 *GpCR* 基因序列与 GenBank 上登录的 31 条相应序列进行系统进化树分析发现,根据 *GpCR* 基因序列信息可将绵羊痘病毒和山羊痘病毒分成两个独立的进化分枝。这些结果表明,利用 *p32* 基因的 *Hinf* 酶切位点信息和对 *GpCR* 基因进行分子进化分析可鉴别山羊痘病毒和绵羊痘病毒,*p32* 基因和 *GpCR* 基因可作为鉴别绵羊痘病毒和山羊痘病毒的特异性标记基因。

**关键词:** *p32* 基因; *GpCR* 基因;山羊痘病毒;绵羊痘病毒;鉴别

**中图分类号:** S432 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2009)06-0050-04

## Comparative Analysis on the Methodologies for Discrimination between Goatpoxvirus and Sheeppoxvirus

YAN Xin-min, ZHANG Qiang, WU Guo-hua, LI Jian, ZHU Hai-xia

(1. Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture, State Key Laboratory of Veterinary Biological  
Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Lanzhou 730046, China)

**Abstract:** To evaluate the methodology for Discrimination of *goatpoxvirus* (GPV) and *sheeppoxvirus* (SPV), the *p32* genes and G-protein-coupled chemokine receptor (*GpCR*) genes amplified from 3 strains of SPV and 2 strains of GPV which isolated from the field samples were sequenced and compared with the corresponding sequences deposited in GenBank. Comparison of *Hinf* restriction enzyme sites of *p32* genes showed that there are 2 sites located in 391 bp and 691 bp among all the SPV strains, and 1 site in 688 bp among GPV strains, respectively. Cladogram generated by sequence comparison with *GpCR* genes showed that the SPV and GPV belongs to the two different branches. The results indicated that the both genes, *p32* and *GpCR*, can be the candidates for development of methodologies for discrimination of GPV and SPV.

**Key words:** *p32* gene; *GpCR* gene; GPV; SPV; Discrimination

山羊痘和绵羊痘是由山羊痘病毒 (*Goatpoxvirus*, GPV) 和绵羊痘病毒 (*Sheeppoxvirus*, SPV) 引起的羊的重要传染病,以体温升高、全身性丘疹或结节、水疱、内脏痘性病变、乃至死亡为特征,是世界动物卫生组织(OIE)规定的法定报告传染病<sup>[1]</sup>。通常情况下,SPV 和 GPV 具有较强的宿主嗜性,但有试验表明这两种病毒也可发生宿主嗜性改变,引起交叉感染<sup>[2]</sup>,继而可能导致错误的临床诊断和获得不准确的流行病学信息,不利于对该病的有效防控。对羊痘病毒

分离株进行准确的种属鉴别有助于解决生产中遇到的这个问题,但 SPV 和 GPV 之间抗原性具有明显交叉,用血清学方法很难区别开来,需通过分子生物学方法进行鉴别<sup>[3]</sup>。

SPV 和 GPV 均属于羊痘病毒属 (*Capripox virus*, CPV),基因序列同源性达到 96%~97%,仅在基因组末端的某些毒力基因和宿主嗜性功能基因上存在一定程度的序列差异<sup>[4]</sup>。*p32* 蛋白是羊痘病毒属所共有的特异性囊膜蛋白,包含一个重要的抗原决定

收稿日期:2009-10-11

基金项目:甘肃省重大科技专项(092NKDA032);国家科技支撑计划项目(2006BAD06A11;2006BAD06A17)

作者简介:颜新敏(1976-),女,湖南祁阳人,助理研究员,硕士,主要从事动物病毒分子生物学研究。

位点<sup>[5]</sup>, Madhusudan 等<sup>[6]</sup>利用 *p32* 基因酶切分析可将实验室分离的羊痘病毒区别开来, 但也有人认为该方法存在争议<sup>[7]</sup>。G 蛋白趋化因子偶联受体 (*G-protein coupled chemokine receptor*, GPCR) 属于趋化因子家族, 在病毒感染宿主后, 可影响宿主的免疫反应, 可能与病毒宿主嗜性有关, Le Goff 等<sup>[8]</sup>以 *GpCR* 基因为靶基因进行序列比对分析, 可用于鉴别 GPV、SPV 和牛皮肤疙瘩病病毒 (*Lumpy skin disease virus*, LSDV)。

为探讨这两种方法鉴定 GPV 和 SPV 的可靠性并对笔者实验室分别从山羊和绵羊上分离的 2 株 GPV 和 3 株 SPV 进行分子生物学鉴定和分析, 本研究将这 5 株 CPV 的 *p32* 基因和 *GpCR* 基因进行了克隆、测序, 并与 GenBank 上已发表不同宿主来源 CPV 的 *p32* 基因和 *GpCR* 基因进行了生物信息学比较分析, 现将结果报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

3 株绵羊痘皮肤病料 (HC、JC、ZY 株) 和 2 株山羊痘皮肤病料 (ZM、HLJ 株), 本实验室分离保存。病毒 DNA 提取试剂盒、TaKaRa LA PCR TM Kit Ver. 2.1 试剂盒、凝胶回收试剂盒、pMD18-T simple 载体、内切酶和 *Taq* 酶购自大连宝生物公司, 其他试剂均为国产试剂。

### 1.2 引物的设计与合成

参照 GenBank 上发表的羊痘病毒 *p32* 和 *GpCR* 基因全序列设计引物。*p32* 基因引物序列为 P1: 5'-ATG GCA GAT ATC CCA TTA-3', P2: 5'-CTC ATT GGT GGT CGG ATT-3', 扩增目的片段长度约为 1 006 bp; *GpCR* 引物序列为 G1: 5'-ATG AAT TAT ACT CTT AGT ACA GIT A-3', G2: 5'-TTT ATC CAA TGC TAA TAC TAC CAG-3', 扩增目的片段长度为 1 125 bp。引物由大连宝生物公司合成。

### 1.3 病毒 DNA 的提取和目的基因扩增

将病料皮肤组织分别称重、剪碎, 加入灭菌石英砂、双抗, 在碾钵中碾磨, 用 pH 7.2 0.05 mol/L 的 PBS 1:10 稀释 (g/mL), 4℃ 冰箱过夜浸毒后, 4 000 r/min 离心 10 min, 收集上清。按照说明书用病毒 DNA 提取试剂盒提取病毒 DNA。以提取的病毒 DNA 为模板, 用 LA PCR 试剂盒分别扩增目的基因片段。*p32* 基因扩增条件为: 95℃ 变性 5 min 后, 按 95℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 90 s 进行 35 个循环, 然后 72℃ 延伸 10 min; *GpCR* 基因扩增条件是: 95℃ 变

性 5 min 后, 按 95℃ 1 min, 56℃ 1 min, 72℃ 1 min 进行 35 个循环, 然后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳分析。

### 1.4 目的基因的克隆和鉴定

琼脂凝胶电泳后分别切下目标大小条带, 用凝胶回收试剂盒进行纯化。将纯化的目的基因片段连接到 pMD18-T simple 载体中, 按照试剂盒说明书将连接产物转化到 DH5 感受态细胞中。阳性克隆的筛选和 PCR 鉴定均按照常规方法进行。将鉴定到的 *GpCR* 基因阳性质粒和 *p32* 基因阳性质粒送至大连宝生物公司进行序列测定。

### 1.5 *p32* 基因 *Hinf* 酶切位点分析与 PCR 产物酶切

用 MapDraw 软件对 GenBank 上发表的不同宿主来源的 17 株 CPV 和本试验中克隆的 5 株 CPV 的 *p32* 基因进行 *Hinf* 酶切位点分析。并对本试验中扩增的 5 株 CPV 的 *p32* 基因产物用 *Hinf* 在 20 μL 体系中酶切 3 h 后, 进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳观察结果。

### 1.6 *GpCR* 基因系统进化树分析

利用 MegAlign 软件对本试验中获得的 5 株 CPV 的 *GpCR* 基因和 GenBank 上已发表的 31 株不同宿主来源 CPV 的 *GpCR* 基因构建系统进化树, 进行分子进化分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 目的基因 PCR 扩增和克隆

从 3 株绵羊痘病料和 2 株山羊痘病料中均可特异性扩增出长度为 1 125 bp 的 *GpCR* 基因和 1 006 bp 的 *p32* 基因, 而空白对照不能扩增出相应的条带。切下目的片段纯化后连接到 pMD18-T simple 载体中并转化 DH5 感受态细胞, 提取阳性克隆质粒进行凝胶电泳和 PCR 鉴定, 分别获得了上述 5 株 CPV 的 *GpCR* 基因克隆和 *p32* 基因克隆。

### 2.2 *p32* 基因 *Hinf* 酶切位点分析与 PCR 产物酶切

不同宿主来源 CPV *p32* 基因 *Hinf* 酶切位点分析可知, 山羊来源的 CPV, 包括本实验室保存的 ZM 株和 HLJ 株, 其 *p32* 基因均只有 1 个 *Hinf* 酶切位点; 而绵羊来源的 CPV, 包括本实验室保存的 HC、JC 和 ZY 株, 其 *p32* 基因均有 2 个 *Hinf* 酶切位点。将本试验中扩增的 5 株 CPV 的 *p32* 基因产物经 *Hinf* 酶切, 3 株 SPV 能切出 3 条条带, 大小分别为 391, 300 bp 和 311; 2 株 GPV 能产生 2 个片段, 大小分别为 688 bp 和 311 bp, 与序列酶切图谱分析结果相一致。

表 1 羊痘病毒 p32 基因 Hinf 酶切图谱分析

Tab. 1 Hinf restriction endonuclease analysis of capripoxvirus s p32 gene					
序列号 Sequence	宿主来源 Host source	Hinf 酶切位 点个数 和位置 Number and Site	序列号 Sequence	宿主来源 Host source	Hinf 酶切位 点个数 和位置 Number and site
AY159333	Goat	1 (688 bp)	AY368684	Sheep	2 (281 bp、691 bp)
AY382869	Goat	1 (688 bp)	EU314721	Sheep	2 (281 bp、691 bp)
EF514890	Goat	1 (688 bp)	EU359381	Sheep	2 (281 bp、691 bp)
EF522182	Goat	1 (688 bp)	F748487	Sheep	2 (281 bp、691 bp)
EF522181	Goat	1 (688 bp)	EU8359381	Sheep	2 (281 bp、691 bp)
F748488	Goat	1 (688 bp)	F748487	Sheep	2 (281 bp、691 bp)
EU625263	Goat	1 (688 bp)	F882029	Sheep	2 (281 bp、691 bp)
EU625262	Goat	1 (688 bp)	p32- HC	Sheep	2 (281 bp、691 bp)
EF514891	Goat	1 (688 bp)	p32-JC	Sheep	2 (281 bp、691 bp)
EF514892	Goat	1 (688 bp)	p32- ZY	Sheep	2 (281 bp、691 bp)
P32- ZM	Goat	1 (688 bp)			
P32- HLJ	Goat	1 (688 bp)			

注：. GPV p32 基因有 1 个 Hinf 酶切位点,经酶切后能切出 2 条特异性条带；. SPV p32 基因有 2 个 Hinf 酶切位点,经酶切后能切出 3 条特异性条带,酶切位点位置是指在 p32 基因上的碱基位置。

Note：. p32 gene of GPV exists 1 Hinf enzyme digestion site ,and it can be digested in to 2 special bands with Hinf；. p32 gene of SPV exists 2 Hinf exyme digestion site ,and it can be digested into 3 special bands with Hinf。

2.3 GpCR 基因系统进化树分析

根据 GpCR 基因构建的进化树结果见图 1。从图 1 可以看出,该进化树有 2 个主进化分枝,本实验室保存的 3 株 SPV 和 GenBank 中登录的其他 SPV 在系统发生树上位于同一分枝,且 3 株又位于同一亚

枝,表明亲缘关系更近,可能来自相同的祖先毒株。与 SPV 分离株相似,实验室保存的 2 株 GPV 与 GenBank 中登录的其他 GPV 也处于系统发生树上同一分枝,且这 2 株相对于其他国家毒株亲缘关系更近。

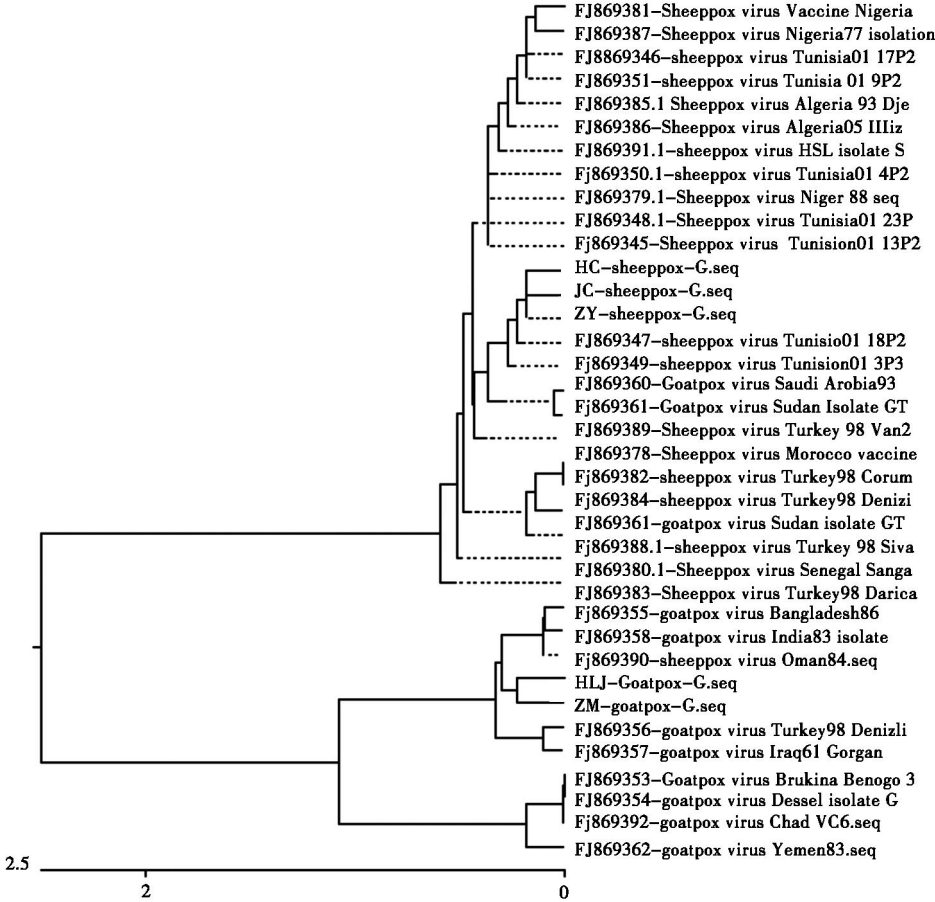


图 1 SPV、GPV 的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of SPV and GPV

### 3 讨论

一般来说,SPV、GPV 具有较严格的宿主嗜性,但一些研究表明,两种病毒均有一些毒株具有较强的异质性,能够发生宿主嗜性改变,可能引起羊痘的流行病学分析,GPV 感染绵羊等。那么,如果出现这种宿主嗜性改变的情况,将对准确了解疾病流行病学信息、进而制定有效防控措施产生干扰。尽管 CPV 成员间具有交叉抗原,可提供部分交叉保护,但也已有报道表明某些分离株对其他成员的攻击并无保护作用<sup>[9]</sup>。因此,准确鉴定分离株种属和弄清其来源将有助于羊痘的流行病学分析,具有重要意义。

p32 是 CPV 特异性的病毒囊膜蛋白,p32 基因非常稳定,在 CPV 的鉴定中占有重要的位置。序列分析表明<sup>[10]</sup>,GPV 的 p32 基因由 969 个碱基组成,编码 323 个氨基酸;SPV 的 p32 则由 972 个碱基组成,编码 324 个氨基酸。酶切图谱分析表明 GPV p32 在第 688 bp 处存在 1 个 *Hinf* (GATC) 位点,可以将 p32 切成大小为 688 bp 和 281 bp 的 2 个片段;SPV p32 则在 391 bp 和 691 bp 处存在 2 个 *Hinf* 位点,可以将 p32 切成大小为 391,300 和 281 bp 的 3 各片段。其原因是 SPV p32 的 395 位碱基是 C,而 GPV 的相应位置上是 T,因而通过 *Hinf* 酶切 p32 基因可以将 SPV 和 GPV 区别开来。我们将 GenBank 上登录的 17 株 CPV p32 基因和实验室分离保存的 5 株 CPV 的 p32 基因进行酶切图谱比较分析,所有的 GPV p32 只有 1 个 *Hinf* 酶切位点,而 SPV p32 具有 2 个 *Hinf* 酶切位点,与此前 Madhusudan 等<sup>[6]</sup>人的报道一致。将实验室保存的 5 株 CPV p32 基因扩增产物进行酶切电泳分析,结果与序列酶切图谱分析结果和临床宿主来源一致,3 株 SPV 均产生 3 条特异性条带,2 株 GPV 各产生 2 条特异性条带。

编码 GpCR 蛋白的基因由 1 125 个核苷酸组成,编码 375 个氨基酸。核苷酸序列比对结果表明 SPV 不同毒株间 GpCR 同源性在 99.5 % ~ 99.8 %,GPV 不同毒株之间 GpCR 同源性在 98.5 % ~ 99.8 %,而 GPV 和 SPV 之间 GpCR 同源性仅能达到 94.5 % ~ 95.3 %,通过绘制 GpCR 基因系统进化树发现,该进化树具有 GPV 和 SPV 两个分枝,可以方便地将 GPV 和 SPV 区别开来。本试验中从山羊分离的 2 株 GPV 正处于 GPV 分枝,从绵羊分离的 3 株 SPV 也正处于 SPV 分枝,表明 GpCR 基因也可用于对 CPV 分离株进行种属鉴定。

GpCR 与 CPV 的宿主嗜性有关,可通过该蛋白基因信息对病毒进行追根溯源。从图 4 绘制的 GpCR

进化树上观察到这样一个现象,1 株沙特阿拉伯 GPV 分离株 (GenBank No. :FJ869360) 和 1 株苏丹 GPV 分离株 (GenBank No. :FJ869361) 位于 SPV 分枝上,1 株阿曼 SPV 分离株 (GenBank No. :FJ869390) 出现在 GPV 进化分枝上。这提示沙特阿拉伯和苏丹 GPV 毒株最初可能是来自于绵羊,而阿曼 SPV 毒株则来自于山羊。这种现象与 Le Goff 等<sup>[8]</sup>对多株不同来源 CPV 的 GpCR 基因进行同源性比较发现的结果一致,他们发现分离自绵羊的一株 SPV 疫苗株 KS1 位于 LSDV 进化分枝,1 株山羊痘弱毒疫苗株处于 SPV 分枝上。这从分子水平证明 CPV 可发生宿主嗜性的改变,SPV、GPV 甚至 LSDV 之间可发生交叉感染。这同时表明仅通过临床宿主难以鉴别 GPV 和 SPV,必须结合上述分子生物学方法进行准确鉴定。

综上所述,p32 和 GpCR 基因均可作为鉴别 GPV 和 SPV 的特异性标记基因。从方法上看,利用 *Hinf* 对 CPV 分离株 p32 基因进行酶切可快速鉴定其种属,不需进行序列测定和分析,节省时间且操作简单,适合于快速鉴定。但该方法以酶切位点为基础,有其局限性,单个碱基变化即可导致该酶切位点消失或发生位置变化,如 Bhanuprakash 等<sup>[7]</sup>曾报道用该方法并不能将他们实验室分离的 GPV 和 SPV 区别开来。因此,实际应用时可先以 *Hinf* 酶切 p32 基因进行鉴定,但当产生难以解释的酶切结果时,应结合对 GpCR 基因进行分子进化分析的结果综合判断。

#### 参考文献:

- [1] 殷震,刘景华.动物病毒学[M].第2版.北京:科学出版社,1997:960-965.
- [2] Rao T V, Bandyopadhyay S K. A comprehensive review of goat pox and sheep pox and their diagnosis [J]. Animal Health Research Review, 2000, 1(2): 127-136.
- [3] Altinel C. Studies on the blood chemistry of sheep infected with or vaccinated against sheep poxvirus [J]. Pendik Veterinary Mikrobiyol-Derg, 1993, 24(2): 203-129.
- [4] Tulman E R, Afonso C L. The genomes of sheep pox and goat pox [J]. Journal of Virology, 2002, 6(12): 6054-6061.
- [5] Carn V M, Kitching R P, Hammond J M, et al. Use of a recombinant antigen in an indirect ELISA for detecting bovine antibody to capripox virus [J]. Journal Virology Methods, 1994, 49(2): 285-294.
- [6] Madhusudan H, Bimalendu M, Prabhakar A T, et al. Differentiation of sheep pox and goat pox by sequence analysis and PCR-RFLP of p32 gene [J]. Virus Gene, 2004, 29(1): 73-80.
- [7] Bhanuprakash V, Indrani B K, Hosamani M, et al. The current status of sheep Pox disease [J]. Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases, 2006, 29(2): 27-60.
- [8] Le Goff C, Lamien C E, Fakhfakh E, et al. Capripox GpCR protein-coupled chemokine receptor, a host-range gene suitable for virus-animal origin discrimination [J]. Journal of General Virology, 2009, 4(1): 32-26.
- [9] Mondal B, Hosamani M, Dutta T K, et al. An outbreak of sheep pox on a sheep breeding farm in Jammu, India [J]. Revue Science et Technique, 2004, 23(3): 943-949.
- [10] Black D N, Hammond J M, Kitching R P. Genomic relationship between capripox virus [J]. Virus Research, 1986, 5: 277-292.