

实验用小型猪乙型脑炎病毒的分离鉴定

王 吉,付 瑞,李晓波,王淑菁,巩 薇,卫 礼,岳秉飞*,贺争鸣*

(中国食品药品检定研究院国家实验动物微生物遗传检测中心,北京 100050)

【摘要】 目的 了解小型猪感染乙型脑炎病毒株的特点。**方法** 猪脑组织经过处理,接种 BHK₂₁ 细胞,进行病毒培养、间接免疫荧光试验、中和试验、电镜观察,及通过逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)扩增新分离毒株 E 区段和 PrM 区段核苷酸序列,测序后进行基因型鉴定。**结果** 25 只猪脑组织接种 BHK₂₁ 细胞,有 3 个组织处理液能使 BHK₂₁ 细胞发生圆缩、集聚等病变;3 个组织接种的 BHK₂₁ 病变细胞滴片进行免疫荧光试验,均产生强绿色荧光反应;中和实验结果显示 3 株新分离株中和效价均为 1:64;电镜下可见直径 40nm 左右球型病毒粒子;RT-PCR 产物测序结果与疫苗株 E 区段核苷酸比较同源性均为 95%;3 株新分离株均为 GIII 型乙脑病毒。**结论** 实验表明小型猪场存在乙型脑炎病毒感染,为 GIII 型乙型脑炎病毒。

【关键词】 乙型脑炎病毒;分离;鉴定

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 03-0057-06

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2017. 03. 011

Isolation and identification of Japanese encephalitis virus in the experimental minipigs

WANG Ji, FU Rui, LI Xiao-bo, WANG Shu-jing, GONG Wei,
WEI Li, YUE Bing-fei*, HE Zheng-ming*

(National Institutes for Food and Drug Control, National Center for Quality of Laboratory Animals, Beijing 100050, China)

【Abstract】 Objective To understand the characteristics of minipigs infected with Japanese encephalitis virus (JEV). **Methods** After the brain tissues were treated, the pig brain tissue treatment solution was inoculated with BHK21 cells. Then, virus culture, indirect immunofluorescence assay, neutralization test, electron microscopic observation, and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) amplification of the new isolate E segment and PrM segment nucleotide sequence were performed and the genotype was identified. **Results** BHK21 cells were inoculated into 25 pigbrain tissues. Among them, three tissue-treated fluid could induce shrinkage and aggregation of BHK21 cells, and immunofluorescence staining showed strong green fluorescence response. The results of neutralization test showed that the neutralization titer of these three new isolates was 1:64, and the size of the virus particles was about 40nm under the electron microscope. The homology of both RT-PCR product sequencing results and E-segment of vaccine strain were 95%. Three new isolates were type GIII JEV. **Conclusion** The results of this study demonstrate that there is G III type Japanese encephalitis virus infection in the minipig farm.

【Key words】 Japanese encephalitis virus, JEV; Isolation; Identification

[作者简介] 王吉(1974-),女,副研究员,从事微生物学和免疫学研究。Email:wj_nd_jds@sina.com

[通讯作者] 岳秉飞(1960-),男,研究员,研究方向:实验动物学。Email:y6784@126.com

贺争鸣(1957-),男,研究员,研究方向:微生物学和免疫学。E-mail:zhengminghe57@163.com

流行性乙型脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV) 属于黄病毒科 (Flaviviridae) 黄病毒属 (Flavivirus) 成员, 乙型脑炎病毒基因为单股正链 RNA, 病毒颗粒呈球形, 有包膜, 直径 40 ~ 60nm, 病毒粒子呈 20 面体对称^[1-4]。由乙型脑炎病毒引起的流行性脑炎简称乙脑, 乙脑是一种人畜共患的自然疫源性疾​​病, 是以中枢神经系统损害为主的急性传染病, 带毒猪是本病的主要传染源^[4,5]。因此防治乙脑不仅可以减少养猪业的损失, 并通过猪的免疫预防, 可控制本病在猪及人群中的流行。

我国于 1949 年在北京首次分离到乙脑病毒, 随后在其他地区也相继分离到该病毒^[6]。乙脑主要流行于亚洲国家及地区, 近年来流行区域不断扩大, 已经扩展到澳大利亚、韩国、泰国、印度尼西亚的爪哇、俄罗斯西伯利亚的滨海地区等相继有乙脑的报道。我国除新疆、西藏、青海省外, 其余各省均有发病流行, 是严重危害公众健康的重要传染病, 乙脑已成为世界关注的公共卫生问题之一^[1,6-9]。国内外对 JEV 的研究较多, 在我国也从多个省份通过不同途径分离得到 JEV, 但从猪脑中分离到 JEV 的报道还不多^[5], 尤其是从小型猪脑中分离 JEV 目前还没有报道。为了解北京小型猪感染 JEV 的特征, 加强小型猪的免疫预防, 本研究从北京市某小型猪场的 3 头猪脑组织中分离到的 3 株乙型脑炎病毒, 并进行形态学、血清学和分子生物学鉴定, 现报告如下。

1 材料和方法

1.1 主要材料

DMEM 培养基: HyClone 公司产品; 胎牛血清: 杭州四季青公司产品; 免疫荧光素 (山羊抗猪 IgG-FITC): KPL 公司产品; 猪抗 JEV 血清及猪阴性血清: 中国动物疫病预防控制中心兽医诊断室提供; 细胞固定液: 中国农业大学生命科学研究电镜室提供; 乳仓鼠肾细胞 (Baby Hamster Syrian Kidney, BHK₂₁)。BHK₂₁ 细胞: 本室冻存; JEV 毒株 (Nakayama-NIH)、兔抗 JEV 标准阳性对照血清: 由本院病毒一室提供; 25 只猪脑组织: 北京某小型猪场提供的 -70℃ 冻存脑组织; RNA 快速提取试剂盒: 购自德国 Qiagen 公司; Taq HS 酶、脱氧核糖核苷三磷酸 (deoxy-ribonucleoside triphosphate, dNTP)、10 × PCR buffer、100bp DNA marker: 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司; PCR 仪: 美国 Bio-Rad 公司

MYCYCLER; 核酸琼脂糖凝胶电泳仪: 美国 Bio-Rad 公司 PwerPac Basic; 凝胶成像分析仪: 美国 Kodak 公司 GL212Pro; DNA 序列分析软件: DNA Star MegAlign 软件。

1.2 方法

1.2.1 病毒的分离

取的 25 个冻存的猪脑组织 (编号为 1 ~ 25), 无菌条件下用 PBS 研磨, 经 1000 r/min 离心 10 min, 除菌过滤。

将样品处理液接种长满单层的 BHK₂₁ 细胞, 置于 37℃ 体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养, 每天观察细胞病变, 并记录结果。每隔 2 ~ 3 d 换液 1 次, 10 d 后如出现致细胞病变效应 (cytopathic effect, CPE) 则进行盲传, 盲传至 3 代仍无 CPE 出现, 则视为分离阴性。出现 CPE 的细胞, 待 CPE 达到 80% ~ 90% 收冻。冻融 3 次后继续传代, 传至 3 代, 仍有 CPE 出现, 则视为分离阳性^[10-12]。

1.2.2 免疫荧光试验

将连续传至第 3 代的细胞滴片, 与 1:10 稀释的猪 JEV 阴性血清和猪 JEV 阳性血清进行免疫荧光试验。同时设正常 BHK₂₁ 细胞片和 JEV 感染 BHK₂₁ 细胞片作为阴性抗原片和阳性抗原片对照。在阴性抗原对照和阳性抗原对照成立的条件下, 样品片与 JEV 阴性血清和 JEV 阳性血清均无绿色荧光反应, 该样品判为 JEV 阴性; 样品片与 JEV 阴性血清无绿色荧光反应, 与 JEV 阳性血清有绿色荧光反应, 该样品判为 JEV 阳性。

1.2.3 中和试验

用兔抗 JEV 标准阳性血清和细胞维持液分别与 JEV 细胞毒 (JEV 感染 BHK₂₁ 细胞毒)、与经细胞试验和免疫荧光试验检测 JEV 阳性的 3 只猪脑组织接种的 P5 代 BHK₂₁ 细胞毒, 以 1:2 ~ 1:512 混合, 37℃ 作用 30 min 后, 接种 BHK₂₁ 细胞。同时设 JEV 标准毒株对照和正常 BHK₂₁ 对照, 每天观察细胞病变, 连续观察 7d 并记录结果。

1.2.4 病毒形态的鉴定

将细胞试验分离阳性的样品细胞毒继续接种 BHK₂₁ 细胞, 待细胞病变达 80% ~ 90% 时, 将细胞瓶内液体弃掉, 加入 0.25% 胰酶进行消化。用 PBS 将分散的细胞吹打悬浮于灭菌离心管中, 1000 r/min 离心 10 min 后, 弃上清; 将细胞用 PBS 再次悬浮, 1000 r/min 离心 10 min 后, 弃上清, 用细胞固定液将细胞悬浮, 准备用透射电镜鉴定病毒形态。电镜图片委托

中国农业大学生命科学研究院电镜室制作。

1.2.5 乙脑病毒分离株 E 基因和 PrM 基因的 RT-PCR 扩增

(1)引物设计

表 1 用于扩增 E 基因和 PrM 基因的引物序列及位置

Tab.1 Primer sequence and position used for amplification of the E & PrM genes

编号 Code	序列 Sequences	位置/bp Location	长度/nt Length
E1-F	5-’GAGCCAAGGAGTGGACTAAAC-3’	1548	197
E1-R	5-’CAAGAGCAACAACGGACTC-3’	1744	
PrM1-F	5-’TTTCGTGCTGGCTCTTATC-3’	230	519
PrM1-R	5-’CTGCTTCGCTTGAATGCCTGG-3’	748	

(2)病毒分离株 RNA 的提取

3 株乙脑病毒分离株、JEV 标准株、正常 BHK₂₁ 细胞,各取 0.3 mL 模板,按 QIAGEN 试剂盒说明书的操作步骤提取病毒 RNA。

(3)反转录

反转录体系为:5 × RNA PCR buffer 2.5 μL、dNTPsmixture 2.5 μL、RNase free dH₂O 9.5 μL、随机引物 1 μL、RNase inhibitor 1 μL、AMV 反转录酶 0.5 μL、病毒 RNA 8 μL,反应条件为:37℃ 90 min、42℃ 15 min、95℃ 5 min。

(4)PCR 产物的扩增

以 E1 引物及 PrM1 引物,对分离株分别进行 E 基因和 PrM 基因扩增。利用 Taq 酶进行 PCR,其反应体系为:10 × buffer 2.5 μL, dNTP (mmol) 2.5 μL,上下游引物 (E1-F/E1-R 或 PrM1-F/PrM1-R) 各 1 μL, cDNA 产物 2.5 μL, Taq 酶 0.5 μL,加去离子水总体积为 25 μL,混匀后进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为:94℃ 预变性 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 35 个循环;最后 72 延伸 5 min。

(5)PCR 扩增产物的鉴定

反应结束后,取 5 μL PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,观察扩增结果。将电泳结果阳性的 PCR 产物送上海生物工程技术服务有限公司测序。测序结果与 Genbank 中 JEV 核酸序列进行比对,从分子的角度来验证分离株是否是 JEV。

1.2.6 乙脑分离株 E 基因的核苷酸同源性分析

利用 Chen 等建立的乙脑病毒基因分型方法,选择乙脑病毒 E 区的部分核苷酸序列,对 3 株分离株与已知的 23 株乙脑病毒代表株序列一起进行核苷酸同源性分析,构建乙型脑炎病毒遗传进化树^[8,9,13]。

参考 GenBank 中已发表的乙脑病毒核苷酸序列,采用 Primer 5.0 软件进行引物设计,其中 E1-F/E1-R 用于扩增 E 基因, PrM1-F/PrM1-R 用于扩增 PrM 基因,引物的序列和位置见表 1。

2 结果

2.1 病毒的分离

25 个猪脑组织接种 BHK₂₁ 细胞,有 3 个脑组织 (编号分别为 3、12、23) 接种的 BHK₂₁ 细胞 72 h 之内发生明显 CPE,而且 CPE 达到 80% 以上,病变细胞表现圆缩,形成空斑。其他 22 个猪脑接种的 BHK₂₁ 细胞盲传 3 代后,均无 CPE 出现,视为分离阴性。

2.2 病毒的鉴定

2.2.1 免疫荧光试验

取 25 个猪脑组织接种的 BHK₂₁ 细胞滴片做免疫荧光试验,有 3、12、23 号脑组织出现强绿色荧光反应,其他 22 个脑组织无绿色荧光反应。

2.2.2 中和试验

3、12、23 号脑组织感染细胞毒与兔抗 JEV 标准阳性血清反应的中和效价均为 1:64。

2.2.3 病毒形态的鉴定

电镜下可见正常细胞内无病毒颗粒出现,核膜完整,见图 5。感染细胞核膜已被破坏,病毒颗粒有规律的排列在细胞核膜周围,病毒颗粒呈圆形,外周有囊膜和纤维突起,直径 40 nm 左右,见图 6。所分离到的 3 株病毒分别命名为 JDY1、JDY2、JDY3。

2.2.4 分离株部分核苷酸的鉴定

(1)病毒分离株 RNA 的提取

3 株乙脑分离株、JEV 标准株、正常 BHK₂₁ 细胞,按试剂盒说明书的操作步骤提取病毒 3 μL。

(2)乙脑病毒分离株 E 基因和 PrM 基因的 RT-PCR 扩增及鉴定

电泳结果显示,3 株分离株均能扩增到约 197 bp E 基因和 519 bp PrM 基因的目的条带,电泳结果见图 7 和图 8。扩增到的 E 基因和 PrM 基因测序结果与 Genbank JEV 序列比较,同源性均在 95% ~ 98% 之间。



图 1 正常 BHK₂₁ 细胞
Fig.1 Normal BHK₂₁ cells

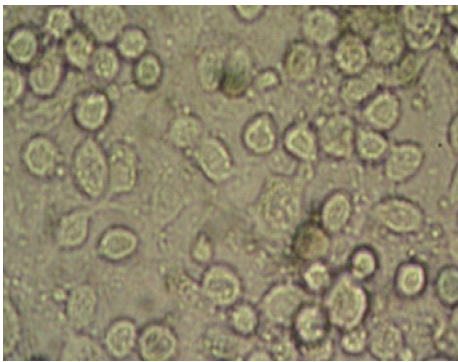


图 2 3 号脑组织感染 BHK₂₁ 细胞
Fig.2 Virus-infected BHK₂₁ cells in the No 3 brain tissue

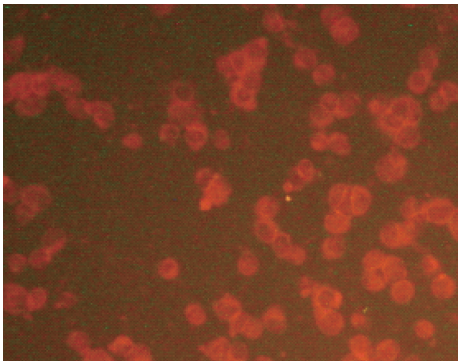


图 3 3 号脑组织感染 BHK₂₁ 细胞与阴性血清反应
Fig.3 Virus infected BHK₂₁ cells in the No 3 brain tissueshow negative serum reaction.

(3) 乙脑分离株的基因分型

3 株分离株与 Beijing-1、GB30、Nakayama、SA14-14-2 等 23 株乙型脑炎病毒参考序列的 E 基因核苷酸进行同源性分析,结果显示核苷酸同源性为 95%~99%。3 株分离株比较,JDY1 和 JDY2 核苷酸同源性为 99%,JDY1 和 JDY3 核苷酸同源性为 97%,JDY2 和 JDY3 核苷酸同源性为 97%。3 株分离株与疫苗株 SA14-14-2 核苷酸同源性均为 95%。

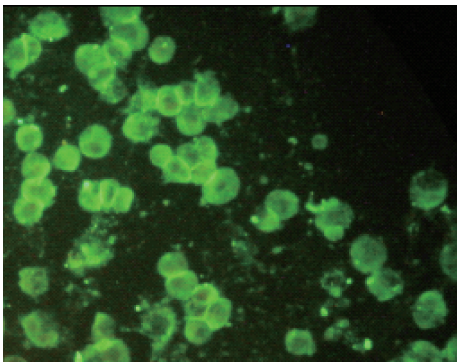


图 4 3 号脑组织感染 BHK₂₁ 细胞与阳性血清反应
Fig.4 Virus-infected BHK₂₁ cells in the No 3 brain tissueshow positive serum reaction.

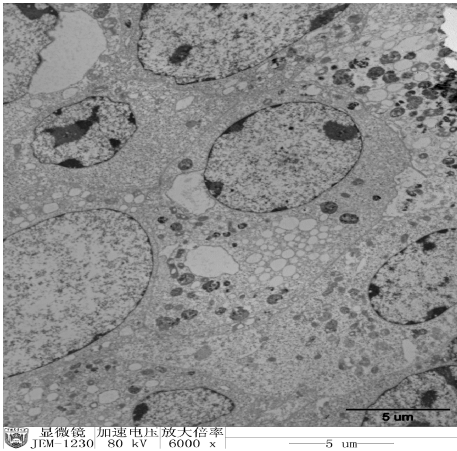


图 5 正常 BHK₂₁ 细胞在电镜下的形态
Fig.5 Ultrastructure of normal BHK₂₁ cells

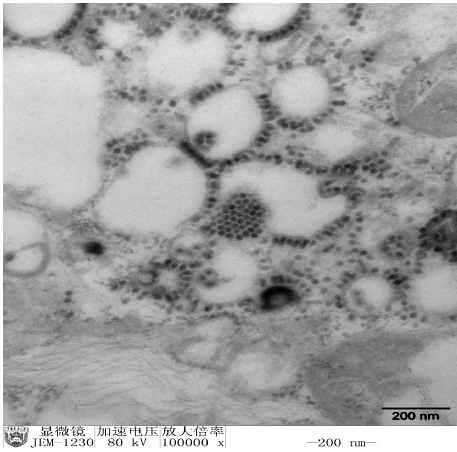
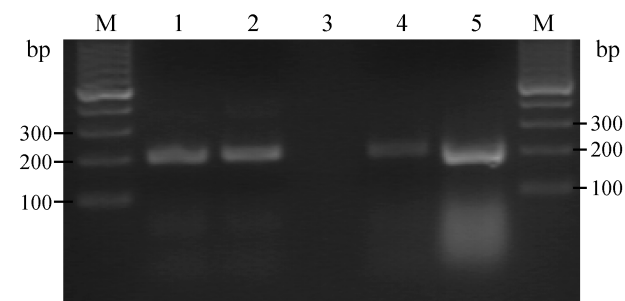


图 6 病毒分离株感染 BHK₂₁ 细胞在电镜下的形态
Fig.6 Ultrastructural morphology of virus-infected BHK₂₁ cells

遗传进化树分析结果(见图 9)显示,本次分离的 3 株新分离株 JDY1、JDY2、JDY3 与 Beijing-1 株亲缘关系最近,3 株分离株均为 G Ⅲ 型乙型脑炎病毒。

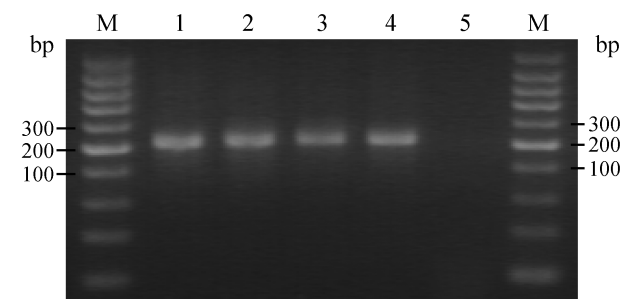


注:M;100 bp DNA Mark;1:JDY1;2:JDY2;
3:正常;BHK₂₁ 细胞;4:JDY3;5:JEV。

图 7 3 株分离株 E 基因扩增电泳结果

Note. M: 100 bp DNA marker; 1: JDY1; 2: JDY2;
3: Normal BHK₂₁ cells; 4: JDY3; 5: JEV.

Fig. 7 Electrophoresis results of *E* gene amplification of 3 isolates



注:M;100 bp DNA Mark;1:JEV;2:JDY1;3:JDY2;
4:JDY3;5:正常 BHK₂₁ 细胞。

图 8 3 株分离株 PrM 基因扩增电泳结果

Note. M: 100 bp DNA marker; 1: JEV; 2: JDY1;
3: JDY2; 4: JDY3; 5: Normal BHK₂₁ cells.

Fig. 8 Electrophoresis results of *PrM* gene amplification of 3 isolates

3 讨论

随着生物、医学等学科不断发展,实验用小型猪的应用越来越广泛。近年来我国实验用小型猪的开发利用也在逐年递增,但大部分小型猪为开放饲养,很难避免由蚊虫传播感染疾病,同时 JEV 对猪的感染也会对实验人员和饲养人员造成潜在威胁,尤其是乙型脑炎病毒。因此实验用小型猪 JEV 预防控制也受到相关部门的重视。本实验用于鉴定的 25 只小型猪是用于制定北京市小型猪地方标准做本底筛查样本小型猪的一部分,在样本采集之前没有接种过 JEV 疫苗。实验室同时对包括被鉴定的 25 只猪在内的共 60 只小型猪进行 JEV 血清抗体筛查,ELISA 和 IFA 检测结果显示 60 只小型猪 JEV 抗体阳性率分别 26.7% 和 28.3%^[3,4],与文献

报道相符(20%~30%)^[12]。被鉴定的 25 只小型猪 ELISA 和 IFA 检测 JEV 抗体阳性率均为 24.0% (6/25)。虽然胡燕等(2006)和杨欣艳等(2007)分别通过血清学方法对北京小型猪感染 JEV 进行了报道,但并没有对病毒进行分离鉴定^[14,15]。本实验通过病毒分离鉴定和抗体检测说明北京小型猪确实存在 JEV 的感染,同时实验也为北京市小型猪地方标准的修订及其不断完善提供了科学的参考数据。北京市于 2011 年发布了地方标准《实验用小型猪微生物学等级及监测》,将乙型脑炎病毒作为普通级小型猪必须检测项目^[15],但并没有对普通级小型猪是否进行 JEV 免疫接种提出要求,只是要求接种疫苗的普通级小型猪在疫苗接种有效期内群体免疫合格率达到 70% 以上^[16]。实际通过本实验室近几年对北京市小型猪 JEV 的检测,还有部分猪场没有定期接种 JEV 疫苗或者没有完全按 JEV 免疫接种程序进行接种。定期按免疫程序接种疫苗的猪场,免疫合格率基本均能达到 70% 以上。通过本实验及文献^[14]和文献^[15],建议猪场对普通级小型猪进行 JEV 疫苗的免疫接种,既能保障猪群免受 JEV 感染,也能保障饲养人员与实验人员的安全。

实验采用 BHK₂₁ 细胞培养法从 25 个小型猪脑组织中分离出 3 株疑似为 JEV 的毒株,根据细胞病变情况,说明能分离到活的病毒;3 株分离株病变细胞滴片与 JEV 抗血清能够产生强绿色免疫荧光反应;3 株分离株细胞毒能中和 JEV 标准抗血清,中和效价均为 1:64;3 株分离株经扫描电镜形态鉴定,为直径约为 40nm 的有囊膜病毒,符合 JEV 特征;经 E 基因和 Prm 基因部分核酸序列分析,与 GenBank 中 JEV 核苷酸同源性为 95%~99%。充分证明分离到的 3 株猪源病毒为 JEV。

本实验是国内首次从小型猪种群中分离到 JEV。通过部分核苷酸序列分析,JDY1、JDY2、JDY3 与 Beijing-1 核苷酸同源性分别为 98%、98% 和 97%,与 SA14-14-2 疫苗株核苷酸同源性均为 95%。通过 E 基因遗传进化树分析 3 株分离株均为 GIII JEV。

通过农业部批准 SA14-14-2 减毒疫苗可用于猪乙型脑炎病毒的预防接种^[17],足见国家对预防猪乙型脑炎病毒感染的重视。实验通过对分离到得北京猪源 JEV 的初步鉴定,证明近年在北京流行的仍然为与 SA14-14-2 减毒株亲缘关系很近的 GIII JEV。进一步证明 SA14-14-2 疫苗可以用于猪感染

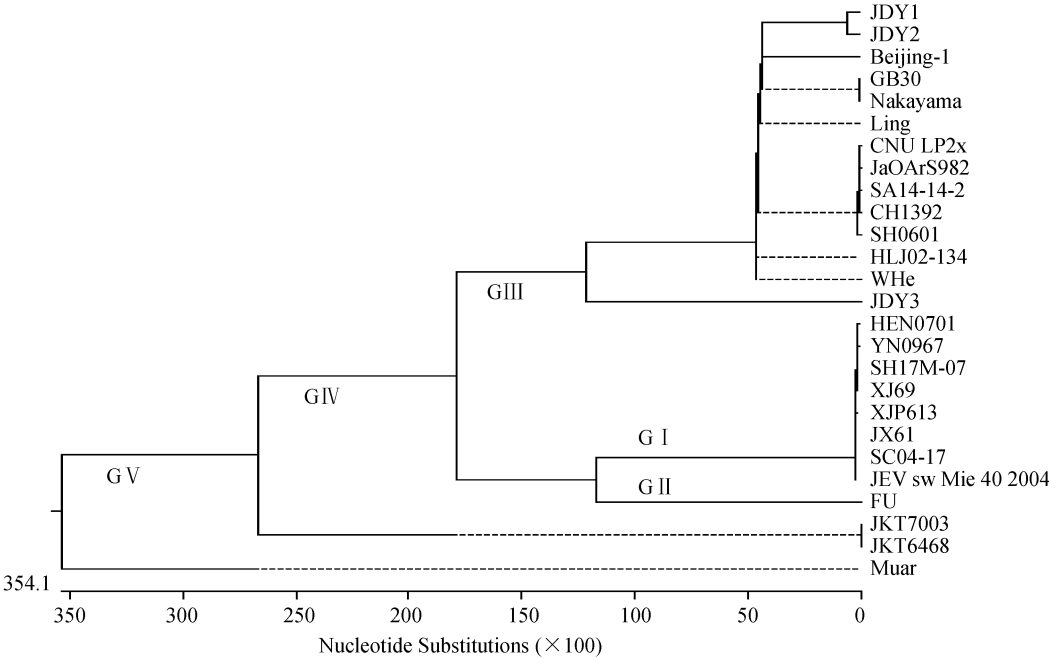


图 9 3 株新分离乙脑病毒 E 基因系统进化树分析

Fig. 9 Phylogenetic analysis of JEV E gene of three newly isolated strains

JEV 的预防接种,不仅对从源头上控制饲养人员和实验人员 JEV 的感染很有意义,而且对养猪业的发展也很有意义。

参考文献:

[1] 周雅娴,张建琼. 乙型脑炎病毒侵染细胞机制的研究进展 [J]. 病毒学报, 2014, 30(2): 188 – 191.

[2] 王吉,卫礼,巩薇,等. 乙型脑炎病毒(JEV)单克隆抗体的制备及初步应用[J]. 实验动物科学与管理, 2006, 23(3): 1 – 4.

[3] 王吉,卫礼,巩薇,等. 乙型脑炎病毒(JEV)ELISA 检测方法的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(8): 56 – 59.

[4] 王吉,卫礼,岳秉飞,等. 乙型脑炎病毒(JEV)IFA 检测方法的建立[J]. 实验动物科学, 2010, 27(4): 1 – 5.

[5] 郑浩,张建武,袁世山. 猪源乙型脑炎病毒的分离鉴定及其 E 基因分析[J]. 中国兽医科学, 2009, 39(6): 476 – 482.

[6] 李晓宇,宋宏,付士红,等. 中国流行性乙型脑炎病毒分子生物学特性研究[J]. 病毒学报, 2004, 20(3): 200 – 209.

[7] KhatunS, NaraS, Tripathi V, et al. Development of ELISA for measurement of progesterone employing 17-alpha-OH-P-HRP as enzyme label[J]. J Immunoassay Immunochem, 2009, 30(2): 186 – 196.

[8] 李茂宁,秦毅斌,卢冰霞,等. 广西猪乙型脑炎病毒的分离及初步鉴定[J]. 南方农业学报, 2011, 42(9): 1151 – 1156.

[9] 袁磊,郑文亚,贾静,等. 两株乙型脑炎病毒的分离鉴定与生物学特性研究 [J]. 中国兽医科学, 2011, 41(11): 1134 – 1139.

[10] 蔡雨函,周远成,朱玲,等. 3 株猪源乙型脑炎病毒的分离鉴定及增值特性[J]. 中国兽医学报, 2014, 34(6): 915 – 922.

[11] 郑浩,孙春清,袁世山. 猪源乙型脑炎病毒 HEN0701 株全基因组的分子特征 [J]. 中国兽医科学, 2011, 41(5): 441 – 447.

[12] 张永欣,符芳,宋淑萍,等. 中国东北地区 3 株日本脑炎病毒株的分离鉴定及基因分型[J]. 东北农业大学学报, 2009, 40(6): 73 – 78.

[13] Topno R, Khan SA, Chowdhury P, et al. Pharmacodynamics of aminoglycosides and tetracycline derivatives against Japanese encephalitis virus[J]. Asian Pac J Trop Med. 2016, 9(3):241 – 246.

[14] 胡燕,杨欣艳,王传彬,等. 我国实验用小型猪三个种群微生物感染状况调查[J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(10): 599 – 602.

[15] 杨欣艳,胡燕,王传彬,等. 国内不同地区实验用小型猪种群微生物感染状况调查[J]. 实验动物科学, 2007, 24(1): 21 – 24

[16] 北京市地方标准,实验用小型猪微生物学等级及监测[S]. DB11/T 828.1 – 2011: 1 – 3.

[17] 尹成杰,于康震,贾幼陵,等.《中华人民共和国兽药典》[S]. 2010 版三部,猪乙型脑炎活疫苗: 75 – 76.

[修回日期]2016 – 07 – 25