

# 牛副流感病毒 3 型毒株的分离鉴定及基因组遗传变异分析

孙明<sup>1</sup>, 李岩<sup>2</sup>, 刘巧荣<sup>1</sup>, 张鲁安<sup>2</sup>, 乔明明<sup>1</sup>, 李静<sup>2</sup>,  
邓小雨<sup>1</sup>, 冯向辉<sup>1</sup>, 刘伯华<sup>1</sup>, 陈西钊<sup>1\*</sup>

(1. 北京世纪元亨动物防疫技术有限公司, 北京 100094; 2. 新疆生产建设兵团畜牧兽医工作总站, 乌鲁木齐 830063)

[收稿日期] 2016-06-28 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 11-0017-05 [中图分类号] S852.65

**[摘要]** 从新疆地区某牛场出现发热、咳嗽等症状的多例病牛的肺组织中分离得到 3 株牛副流感病毒 3 型, 分别命名为 XJ03、XJ022、XJ023, 对其中两株病毒 XJ03 和 XJ023 的基因组进行序列测定, 测序结果显示, XJ03 和 XJ023 毒株基因组全长分别为 15474 bp (GenBank 登录号为 KU198929) 和 15475 bp, 其核苷酸同源率为 99.89%。同代表性的牛副流感病毒基因组比对发现, 与我国的山东毒株 SD0835 同源性最高为 99.3%, 均属 C 型 BPIV。在 C 型毒株中, 与南韩 12Q061 分离株 (C 型) 同源性最低为 97.5%。F、N、HN、L、P、M 蛋白基因氨基酸序列分析显示, 与 SD0835 毒株相应序列对比, 同源性分别为 99.63%、92.15%、99.48%、99.28%、98.50% 和 100%, 部分氨基酸发生了新的变异。试验结果将为今后更好地开展 BPIV3 防控奠定基础。

**[关键词]** 牛副流感病毒; 分离鉴定; 基因组分析

## Isolation, Identification and Genomic Characterization of Bovine Parainfluenza Viruses Type 3

SUN Ming<sup>1</sup>, LI Yan<sup>2</sup>, LIU Qiao-rong<sup>1</sup>, ZHANG Lu-an<sup>2</sup>, QIAO Ming-ming<sup>1</sup>, LI Jing<sup>2</sup>,  
DENG Xiao-yu<sup>1</sup>, FENG Xiang-hui<sup>1</sup>, LIU Bo-hua<sup>1</sup>, CHEN Xi-zhao<sup>1\*</sup>

(1. Beijing Anheal Laboratories Co., Ltd, Beijing 100094, China;

2. Xinjiang Production And Construction Corps, Animal Husbandry and Veterinary Work Station, Urumqi, 830063, China)

**Abstract:** Three strains of bovine parainfluenza viruses type 3 (BPIV3) were successfully isolated from lung tissues of sick cattle with symptom of fever and cough emerged at a farm in Xinjiang region, and further identified by SYBR green RT-PCR. Their genome sequences were characterized. Three isolates of BPIV3 in total were obtained and designated as XJ03, XJ022 and XJ023 respectively. Genomic characterization of the two isolate XJ03 and XJ023 showed their whole genome lengths were 15475 bp and 15477 bp respectively, and were phylogenetically most closely related to the BPIV SD0835, with 99.3% identity at nucleotide, they all belong to BIPV3 genotype C. Among isolates of BIPV3 genotype C, the isolates XJ03 and XJ023 exhibited the lowest

作者简介: 孙明, 博士, 从事分子病毒学诊断技术研究。

通讯作者: 陈西钊。E-mail: chenxizhao@anheal.com

nucleotide similarity with South Korean 12Q061 strain (97.5%). In comparison to strains SD0835, the F, N, HN, L, P and M protein of isolate XJ03 have 99.63%, 92.15%, 99.48%, 99.28%, 98.50% and 100% amino acid sequence identity to those of SD0835, respectively, and there exist several new amino acid mutations. These results would be helpful for the diagnosis and control of BPIV3.

**Key words:** bovine parainfluenza virus; isolation and identification; genomic characterization

牛副流感病毒 3 型 (Bovine Parainfluenza virus type 3, BPIV3) 为单股负链 RNA 病毒目、副黏病毒科、呼吸道病毒属成员,是引起牛呼吸道疾病综合征的重要病原之一<sup>[1-2]</sup>。1959 年 Reisinger 等在美国首次分离到 BPIV3<sup>[3]</sup>,2002 年童泽恩等在国内首次报道了疑似该病的病例<sup>[4]</sup>。目前该病毒已广泛存在于世界各国。BPIV3 感染牛可表现出从隐性感染到严重的呼吸道疾病等多种不同的临床症状,最常见的为咳嗽、发烧、鼻分泌物多。牛感染 BPIV3 后可引起组织损伤和免疫抑制,常继发细菌或支原体感染引起支气管肺炎而导致牛呼吸道疾病综合征,给养牛业带来严重危害和极大的经济损失。

BPIV3 可分为 A、B、C 三个基因型,在亚洲、澳大利亚、阿根廷、美国等国家或地区均同时存在 2 个或 3 个基因型<sup>[5-8]</sup>。我国也从黑龙江和山东分别分离到 A 型和 C 型 BPIV3<sup>[9-10]</sup>。王海勇等<sup>[11]</sup>对我国 12 个省份的牛群进行了 BPIV3 的血清学调查,总体阳性率高达 77.6%,表明 BPIV3 在我国已广泛流行,迫切需求对该病毒进行深入研究以有效防控 BPIV3 感染。

2014 年 10 月,新疆某牛场的牛群内出现咳嗽、发烧症状,初步怀疑为 BPIV3 感染,并分离获得三株 BPIV3。为进一步分析我国西北地区流行的 BPIV 的基因特征和变异特征,本研究对该分离株进行鉴定和全基因组测序,并与国内外代表性毒株基因组序列对比分析,以期为该病的流行病学、免疫预防等方面的研究提供相关参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 病料来源 采集三头疑似 BPIV3 感染病牛肺作为病毒分离的病料,编号为 03、022、023。

1.1.2 细胞和培养基 牛肾细胞 (MDBK) 为本实验室保存;DMEM 购自 GIBCO 公司;胎牛血清购自新西兰 MOREGATE。

1.1.3 主要试剂和仪器 RNA 提取试剂购自 Qiagen 公司;AMV Reverse Transcriptase、RNase inhibitor、GoTaq DNA Polymerase 购自 Promega 公司;dNTP 购自北京华美生科生物技术有限公司;Trans 2K DNA Marker 购自北京全式金生物技术有限公司;TGRADIENT PCR 仪购自 HYBAID 公司;UVI Firereader XS 凝胶成像系统购自广州市华粤瑞科科学器材有限公司。牛副流感实时荧光 RT-PCR 检测试剂盒为北京世纪元亨动物防疫技术有限公司生产。

1.1.4 软件信息 DNAMAN 6.0 汉化版,美国 Lynnon Biosoft 公司开发。

### 1.2 方法

1.2.1 病料的处理 将采集的三份牛肺分别剪碎装入无菌研磨器中研磨,加适量含青霉素、链霉素 (各 100 U/mL) 的 DMEM 培养液,研磨后于 3000 r/min 离心 10 min,取上清用 0.22 μm 滤膜过滤除菌。

1.2.2 病毒分离培养 用含 8% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养 MDBK 细胞,待细胞长至单层处于对数生长期时,接种上述处理的病料样品,37 °C 吸附 1 h,加入含 2% 胎牛血清的维持液,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 3~4 d,每天观察细胞病变 (CPE),适时传代至出现 CPE,当 80% 的细胞出现 CPE 时收毒,-80 °C 反复冻融 3 次后,4000 r/min 离心 15 min,取上清待检。

### 1.2.3 病毒鉴定

1.2.3.1 RT-PCR 鉴定 按照北京世纪元亨动物防疫技术有限公司生产的牛副流感实时荧光 RT-PCR 检测试剂盒说明书对 MDBK 细胞培养物

进行鉴定。

1.2.3.2 电镜观察 参考文献方法<sup>[12]</sup>对细胞培养液进行负染,进行电镜观察。

1.2.3.3 TCID<sub>50</sub>测定 将收获的第5代病毒上清液用不含血清的 DMEM 培养基进行稀释,每个稀释度做8个重复,每孔接种 100 μL,37 °C 孵育 2 h。吸取病毒液,用 PBS 洗一遍,每孔加 200 μL 细胞维

持液继续在 CO<sub>2</sub> 培养箱培养。每天观察记录 CPE,5 d 后判定结果,同时设阴性对照(维持液)。

1.2.3.4 血凝试验 参考文献方法<sup>[12]</sup>进行。

1.2.4 全基因组测序与分析

1.2.4.1 引物设计与合成 根据 GenBank 上发表的 BPIV3 全基因组序列设计引物(表 1),引物由上海捷瑞生物技术有限公司合成。

表 1 依据 BPIV3 基因序列设计的引物

片段	上游引物	下游引物	所在位置
BPIV3 - 1	ACCAAACAAGAGAAGAGACTTG	GTTAGAGCTGCCATTCTAGTYTC	1 ~ 960
BPIV3 - 2	TCATTTTTCAACACAATCAG	GTATGAATTCAATGATGTCGAGG	908 ~ 1890
BPIV3 - 3	AATCATGATTCTTTGGGAAGAG	CTGCAGATTGGATTACACCAAG	1832 ~ 2900
BPIV3 - 4	GGACACAGAAGAGAGCACTCGATT	GTGATTTTTACCTTTTTTCATC	2820 ~ 4430
BPIV3 - 5	ACAGCAATTGGATCAATAAC	GATTGTAAGTGCCTTCTTTCT	4282 ~ 5575
BPIV3 - 6	GGGACAATTGCGATAGGGATA	TTGCTAATGTCCCTTCTCTATT	5430 ~ 6396
BPIV3 - 7	CATTCAACAGGATTTGARGA	ATTCCTGGTCCYACTGATGG	6100 ~ 7830
BPIV3 - 8	GCATCAACAGGATTTGARGA	ATAGGAGAATTGAGRTGACATTC	7700 ~ 8780
BPIV3 - 9	GAATGTCACTCAATTCTCTAT	GTCTACCTTCTGTTTTATYCTTTCTC	8780 ~ 10360
BPIV3 - 10	TGAAAGATAAAGCATTATYCCC	TCAGACCAAAAARACACATCTAG	10120 ~ 11260
BPIV3 - 11	ATGGATGATCTDGGTCAATGA	GCCTGGTAAATACATCCAWGTA	11140 ~ 12280
BPIV3 - 12	TGATAAATGGRCCTTGAAACTCC	GATGCTATYCTGCTAAACAAC	12150 ~ 13570
BPIV3 - 13	ATGAGAGAATGGYGAATGG	CCATRTCACAATGTACTAAACC	13440 ~ 14420
BPIV3 - 14	CAACATGGATAGGRAATATGG	ACCAAACAAGAGAAAACCTCTG	14340 ~ 15475

1.2.4.2 病毒总 RNA 的提取 按照 Qiagen 的 RNA 提取试剂盒说明书进行 RNA 提取。

1.2.4.3 全基因组的扩增 用合成的 13 对引物分别进行 RT-PCR 扩增,扩增体系如下:5 × Buffer 5 μL (含 MgCl<sub>2</sub>), 2.5 mmol/L dNTPs 2 μL, 10 μmol/L 上游和下游引物 2 μL, Taq DNA 聚合酶 (5 U/μL) 1 μL, AMV 反转录酶 (10 U/μL) 0.2 μL, RNA 酶抑制剂 (40 U/μL) 0.3 μL, 无菌无核酸酶水 12.5 μL, 病毒总 RNA 2 μL。扩增程序:42 °C 60 min, 95 °C 5 min, 95 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 2 min, 35 个循环, 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳。

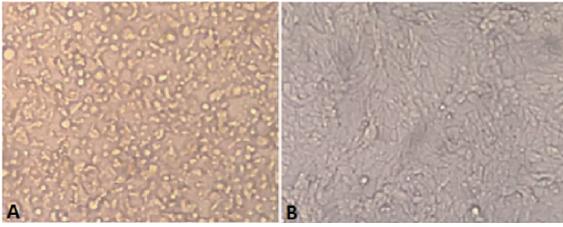
1.2.4.4 基因的测序 从琼脂糖凝胶中回收目的基因,将目的基因连接到 PMD19-T 载体,连接产物转化至 DH5α 感受态细胞,挑取单菌落接种于含氨苄青霉素 (100 μg/mL) 的 LB 液体培养基中,

37 °C 震荡培养过夜,取菌液进行 PCR 鉴定,将阳性菌液送北京美吉生物技术有限公司进行测序。根据重叠区域将各片段依次拼接,获得完整基因序列。

1.2.4.5 系统进化分析 用 DNAMAN 生物软件将获得的全基因组序列与 GenBank 上发表的 BPIV3 序列进行同源性比对分析,构建系统进化树,分析所分离毒株的遗传变异特征。

## 2 结果

2.1 病毒的分离 将 03、022、023 分别接种 MDBK, 72 h 后出现 CPE, 经传代以后出现 CPE 的时间缩短,从第 3 代开始病毒趋于稳定。病变初期细胞出现圆缩,随时间延长细胞融合更加明显,出现合胞体(图 1A)。对照组细胞培养 72h 后生长良好,未见细胞发生病变(图 1B)。将分离的病毒分别命名为 XJ03、XJ022、XJ023。

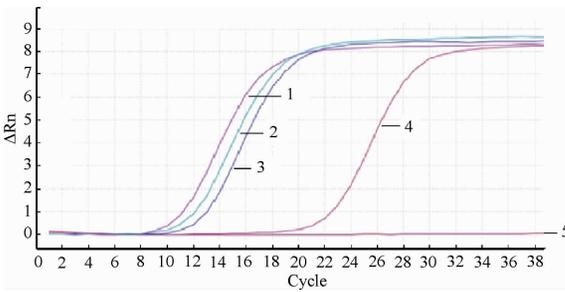


A:接毒后 72 h XJ03 株感染引起的 CPE;B:阴性对照

图 1 牛副流感病毒分离培养显微观察图(400 ×)

### 2.2 病毒鉴定

**2.2.1 RT-PCR 鉴定** 用牛副流感实时荧光 RT-PCR 检测试剂盒分别对 XJ02、XJ022、XJ023 进行鉴定,结果为阳性(图 2),表明分离的三个病毒均为 BPIV3。



1: XJ023;2: XJ03;3: XJ022;4: 阳性对照;5: 阴性对照

图 2 XJ02、XJ022、XJ023 牛副流感病毒实时荧光 RT-PCR 检测结果

**2.2.2 电镜观察** 图 3 电镜照片显示,BPIV 为圆形、椭圆形等不规则形态,有核衣壳,直径约为 150~200 nm。

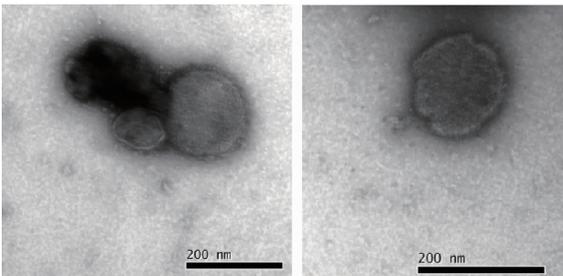


图 3 电镜下不同形态的牛副流感病毒粒子(100000 ×)

**2.2.3 TCID<sub>50</sub> 测定** 按照 Reed - Muench 算法进行计算,第 5 代细胞毒(XJ03 毒株)的病毒含量为 10<sup>7.0</sup>TCID<sub>50</sub>/mL。

**2.2.4 血凝试验** 分离的牛副流感病毒能凝集鸡和猪的红细胞,XJ03、XJ022、XJ023 三株病毒的凝集效价分别达到 32 和 128。

**2.3 基因的测序及序列分析** 经测序,XJ03 和 XJ023 的基因组全长分别为 15474 bp 和 15475 bp,应用 DNASTar 将其与有代表性的 BPIV3 进行同源性比较,结果见图 4,分离的两株 BPIV3 均与 12Q061、HS9、TVMDL16 同源性较高,与我国的山东毒株 SD0835 同源性最高,为 99.3%。以 M 基因进行系统进化分析,结果见图 5,分离的 XJ03 和 XJ023 均与 SD0835 处于同一分支,属 C 型 BPIV3。XJ03 分离株与 SD0835 毒株相比,F、N、HN、L、P 和 M 氨基酸同源性分别为 99.63%、92.15%、99.48%、99.28%、98.50% 和 100%。

		Percent Identity												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
Divergence	1	100	81.7	98.6	92.1	81.9	81.0	97.7	81.3	98.4	97.6	97.5	1	12Q061
	2	21.7	100	62.0	92.5	91.7	83.0	82.1	83.6	82.0	82.1	82.1	2	BN-1
	3	1.5	21.4	100	82.4	82.2	81.3	98.1	81.5	98.7	98.0	98.0	3	HS9
	4	21.1	8.0	20.8	100	92.2	83.6	82.4	83.9	82.5	82.4	82.4	4	Kansas 1562684
	5	21.5	9.0	21.0	8.4	100	82.6	82.1	83.3	82.2	82.2	82.2	5	NM09
	6	22.7	19.9	22.3	19.1	20.3	100	81.2	82.8	81.3	81.3	81.3	6	Q5592
	7	2.4	21.2	1.9	20.8	21.1	22.4	100	81.4	98.1	99.3	99.3	7	SD0835
	8	22.3	19.1	21.9	18.7	19.6	7.7	22.1	100	81.5	81.5	81.5	8	TVMDL15
	9	1.6	21.4	1.3	20.7	21.0	22.3	1.9	22.0	100	98.0	98.0	9	TVMDL16
	10	2.5	21.2	2.0	20.8	21.0	22.3	0.7	22.1	2.0	100	99.9	10	XJ03
	11	2.5	21.2	2.0	20.8	21.0	22.3	0.7	22.0	2.0	0.1	100	11	XJ023

图 4 XJ03 和 XJ023 与其他毒株全基因的同源性比较

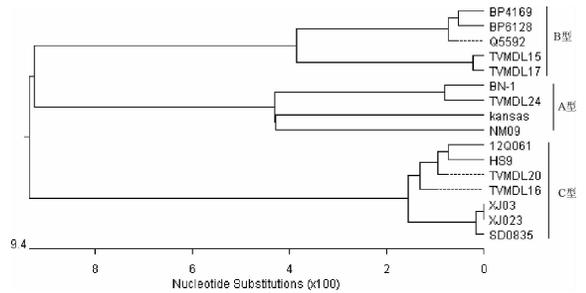


图 5 XJ03 和 XJ023 与其他 BPIV3 代表株的 M 基因系统进化分析

与 SD0835 分离株相比,F 氨基酸有 2 处发生了变异,分别为第 10 位由 T 变成了 I,第 522 位由 S 变成了 R;HN 基因有 3 处发生了变异,分别是 46 位由 T 变成了 A,59 位由 G 变成了 S,254 位由 K 变成了 R;N 基因有 8 处发生了变异,分别是 16 位由 L 变成了 I,113 位由 S 变成了 G,194 位由 Q 变成了 R,220 位由 A 变成了 S,402 位由 I 变成了 S,452 位由 V 变成了 A,465 位由 N 变成了 D;P 基因有 9 处发生了变异,分别是 45 位由 V 变成了 A,47 位由 D 变成了 V,53 位由 G 变成了 E,149 位由 T 变成 A,227 位由 Y 变成了 H,245 位由 E 变成了 D,322 位由 Y 变成了 H,329 位由 L 变成了 V,339 位由 I 变成了 V。

### 3 讨论

BPIV3 是牛呼吸道综合症(也常称为“运输热”)的主要病原之一,也是引起奶牛繁殖障碍的重要病原,是目前全世界范围内危害牛群健康的主要问题,并给养牛业带来了巨大的经济损失。本研究采用 MDBK 细胞从新疆某牛场出现发烧、咳嗽和流产的病牛肺组织中分离出 3 株牛副流感病毒。经鉴定该分离株能凝集鸡和猪的红细胞,与董秀梅报道的一致<sup>[13]</sup>。基因组测序结果显示, XJ03 和 XJ023 的基因全长分别为 15474 bp 和 15475 bp, XJ03 基因组序列已经提交到 GenBank, 登录序列号为 KU198929。

BPIV3 分 A、B、C 三个基因型, A 型 BPIV3 主要存在于北美、中国、日本。B 型 BPIV3 最初分离自澳大利亚,最近在美国、阿根廷也发现 B 型毒株; C 型 BPIV3 分布于中国、韩国、日本。之前认为美国只存在 A 型 BPIV3, John D. Neill 等通过对多个 BPIV3 美国分离株的全基因组测序及系统进化分析发现,美国也同样存在 B 型和 C 型 BPIV3。通过全基因组测序和系统进化分析,本研究从新疆牛场分离到的 XJ03 和 XJ023 均为 C 型 BPIV3, 与我国山东分离株 SD0835 同源率为 99.3%, 系统进化分析也表明所分离毒株与 SD0835 分离株最近。与 SD0835 分离株相比,除 M 蛋白外, F、HN、N、P 和 L 蛋白氨基酸均发生了新的变异,这些变异是否影响病毒毒力还需进一步研究。

John D. Neill 认为各基因型内存在潜在的亚型,并推测亚型与毒株的地域分布相关<sup>[14]</sup>。经系统进化分析,本研究分离的 XJ03 和 XJ023 与山东分离株 SD0835 形成一单独分支,与韩国分离株 12Q061、美国分离株 TVMD16 等其它 C 型 BPIV3 遗传关系较远,这与 John D. Neill 的观点相符。目前还没有证据表明不同基因型对牛的致病力是否存在差异。但不同基因型的交叉保护效果存在明显差异,如 BPIV3 NVSL 株的多抗血清对 B 型和 C 型 BPIV3 的中和效价要远远低于对 A 型 BPIV3 代表毒株 SF-4 的中和效价<sup>[14]</sup>;使用单一基因型的疫苗可能达不到理想的保护效果。因此,防控 BPIV3 的传播还需要多价疫苗的开发。

本研究分离鉴定了三株 C 型 BPIV3,并对其中的两株进行了全基因测定,为其在诊断和疫苗开发等方面的进一步研究奠定了基础。

### 参考文献:

- [1] Snowden G D, Van Vleck L D, Cundiff L V, *et al.* Bovine respiratory disease in feedlot cattle environmental, genetic, and economic factors[J]. *J Anim Sci*, 2006, 84(8): 1999-2008.
- [2] Ellis J A. Bovine parainfluenza-3 virus[J]. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2010, 26(3): 575-593.
- [3] Reisinger, R C, Heddleston, K L, Manthei, C A. Isolation of bovine parainfluenza-3 virus in chick embryos[J]. *J Am Vet Med Assoc*, 1959, 135(3): 147-152.
- [4] 童泽恩, 王锁柱, 郭殿仁, 等. 一起疑似牛副流感的诊断和治疗报告[J]. *中国动物检疫*, 2002, 19(8): 40.
- [5] Zhu Y M, Shi H F, Gao Y R, *et al.* Isolation and genetic characterization of bovine parainfluenza virus type 3 from cattle in China[J]. *Vet Microbiol*, 2011, 149(3/4): 446-451.
- [6] Horwood P F, Gravel J L, Mahony T J. Identification of two distinct bovine parainfluenza virus type 3 genotypes[J]. *J Gen Virol*, 2008, 89(7): 1643-1648.
- [7] Qiao D, Janke B H, Elankumaran S. Molecular characterization of glycoprotein genes and phylogenetic analysis of two swine paramyxoviruses isolated from United States[J]. *Virus Genes*, 2009, 39(1): 53-65.
- [8] Oem J K, Lee E Y, Lee K K, *et al.* Molecular characterization of a Korean bovine parainfluenza virus type 3 isolate[J]. *Vet Microbiol*, 2013, 162(1): 224-227.
- [9] 刘鹏, 侯喜林, 周玉龙, 等. 牛副流感病毒 3 型的分离鉴定[J]. *微生物学通报*, 2009, 36(9): 1384-1389.
- [10] 朱远茂, 蔡红, 董秀梅, 等. 我国牛副流感 3 型山东分离株的研究[C]. 第八届全国会员代表大会第十五次学术研讨会论文集 1031-1034.
- [11] 王海勇, 童钦, 王炜, 等. 我国牛副流感病毒 3 型血清学调查[J]. *中国预防兽医学报*, 2014, 36(2): 154-156.
- [12] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第二版. 北京: 科学出版社, 1999: 343-354.
- [13] 董秀梅. 牛副流感病毒 3 型山东分离株致病性研究及荧光定量 RT-PCR 的建立[D]. 北京: 中国农业科学院, 2012.
- [14] John D, Neill, Julia F, *et al.* Identification and genome characterization of genotype B and genotype C bovine parainfluenza type 3 viruses isolated in the United States[J]. *BMC Veterinary Research*, 2015, 112(11): 1-6.

(编辑:李文平)