

DOI:10.13350/j.cjpb.240505

• 论著 •

一株牛副流感病毒 3 型毒株的分离鉴定与全基因组序列分析*

吕香玉¹, 郭宇², 高登军², 萨茹拉², 林浩⁴, 刘锴^{1,3**}, 温树波^{1,3**}(1. 内蒙古民族大学动物科技学院, 内蒙古通辽 028000; 2. 内蒙古自治区动物疫病预防控制中心;
3. 内蒙古自治区肉牛疾病防控工程技术研究中心; 4. 内蒙古鹏莱农牧业有限公司)

【摘要】 目的 采集内蒙古通辽地区某牛场牛鼻拭子样品, PCR 检测鼻拭子样品中牛副流感病毒 3 型(BPIV3)感染情况, 研究阳性鼻拭子样品中 BPIV3 毒株的全长基因组和遗传进化。方法 将 PCR 检测结果呈 BPIV3 阳性且测序正确的鼻拭子样品接种至 MDBK 细胞, 连续传代 5 次, 然后通过 RT-PCR 对分离株进行鉴定, 并对其进行基因组全长测定及同源性和遗传进化分析。结果 成功分离到一株 BPIV3 毒株, PCR 检测结果为阳性, 将其命名为 NMTL-21。该毒株基因组全长为 15 454 bp, Karber 法结果测得, BPIV3 NMTL-21 的半数细胞培养物感染剂量为 10^{-7} TCID₅₀/100 μ L。基于基因组全长序列的同源性和遗传进化分析结果显示, NMTL-21 与 2015 年分离自黑龙江省大庆市的 NX49 株同源性最高, 达 99.6%; 与 2013 年分离自北京的 XJA13 株同源性为 99.5%。遗传进化分析结果显示, 该毒株为基因 C 型。结论 从病牛鼻拭子样品中成功分离到一株能够致细胞病变的 BPIV3-C 型毒株, 可为进一步开展 BPIV3 研究提供理论参考和实验材料。

【关键词】 牛副流感病毒 3 型; 分离鉴定; 遗传进化分析**【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-5234(2024)05-0520-04

[Journal of Pathogen Biology. 2024 May;19(5):520-523.]

Isolation, identification and complete genome analysis of a bovine parainfluenza virus type 3

LV Xiangyu¹, GUO Yu², GAO Dengjun², SA Rula², LIN Hao⁴, LIU Kai^{1,3}, WEN Shubo^{1,3} (1. College of Animal Science and Technology, Inner Mongolia Minzu University, Tongliao, Inner Mongolia 028000, China; 2. Inner Mongolia Autonomous Region Epidemic Prevention and Control Center; 3. Inner Mongolia Autonomous Region Beef Cattle Disease Prevention and Control Engineering Technology Research Center; 4. Inner Mongolia Penglai Agriculture and Animal Husbandry Co. LTD)*****【Abstract】** **Objective** To detect and isolate BPIV3 strains from nasal swab samples of diarrhea calves in Tongliao, Inner Mongolia by PCR and perform the complete genome sequencing and phylogenetic evolutionary tree analysis.**Methods** The nasal swab samples detected positive for BPIV3 by PCR were incubated with MDBK cells and passaged for 5 times to isolate the BPIV3 strains. Subsequently, the BPIV3 isolate was identified through PCR and the complete genome was sequenced and analyzed for phylogenetic evolutionary tree.**Results** A BPIV3 strain, designated as NMTL-21, was successfully isolated from a nasal swab of infected cattle, with a positive result in PCR testing. The total genome length of this strain is 15 454 bp. According to the Karber method, the half-maximal tissue culture infectious dose (TCID₅₀) for BPIV3 NMTL-21 isolate was determined to be 10^{-7} TCID₅₀/100 μ L. Homology and genetic evolution analysis based on the full-length genome sequence revealed that NMTL-21 shares the highest homology with the NX49 strain isolated from Daqing City, Heilongjiang Province in 2015, with a homology of 99.6%. Additionally, it exhibits 99.5% homology with the XJA13 strain isolated from Beijing in 2013. Genetic evolution analysis indicates that this strain belongs to genotype C. **Conclusion** A BPIV3 strain, classified under genotype C, was effectively isolated from a nasal swab obtained from infected cattle. This finding offers valuable theoretical insights and experimental resources for the control and development of vaccines targeting BPIV3.**【Key words】** bovine parainfluenza virus type 3; isolation and identification; phylogenetic tree analysis* **【基金项目】** 内蒙古自然科学基金项目(No. 2022LHQN03009); 内蒙古自治区青年科技英才项目(No. NJYT23095); 内蒙古自治区科技重大专项项目(No. 2021ZD001301, 2019ZD006); 内蒙古锡林郭勒盟科技计划项目(No. 202213)。** **【通讯作者】** 刘 锴, E-mail: liukai721026@163.com; 温树波, E-mail: wen0516@126.com**【作者简介】** 吕香玉(1998-), 女, 辽宁省建平人, 硕士研究生, 研究方向: 兽医微生物及分子病毒学, E-mail: xiangyulv1998@163.com

牛副流感病毒 3 型 (Bovine parainfluenza virus type 3, BPIV3) 为线性、不分节段的单股负链 RNA 病毒^[1], 属副黏病毒科、呼吸道病毒属成员^[2], 是引起牛呼吸道疾病综合征的主要病原之一。自从 1959 年 Reisinger 等^[3] 在美国首次分离到 BPIV3 以来, 英国、墨西哥、加拿大、澳大利亚、新西兰、智利和土耳其等国家陆续均出现了 BPIV3 感染的报道^[4]。我国于 2008 年首次检测到了基因 C 型 BPIV3, 随后开展了一些相关的研究^[5]。BPIV3 是一种呼吸道病原, 主要是通过载有病毒粒子的飞沫进入宿主呼吸道进行传播^[6]。

牛单独感染 BPIV3 后出现的临床症状较轻^[7]。但临床上常见该病毒与其它牛呼吸道综合症病原体混合感染, 并易继发感染巴氏杆菌、支原体等病原^[8]。BPIV3 在国内属于新发病原, 根据国内学者对 BPIV3 血清流行病学调查可知, BPIV3 已经在我国内蒙古、黑龙江、山东、河北、广西和贵州等多地存在, 血清阳性率平均为 77.96%^[9]。

2021 年 9 月, 内蒙古自治区通辽市奈曼旗某西门塔尔牛场出现咳嗽、呼吸困难等症状, 随机采集牛鼻拭子样品进行检测。在 10 份样本中检测到 2 份 BPIV3 阳性样品, 将其接种 MDBK 细胞, 分离获得一株 BPIV3。并对分离株进行了 BVDV、IBRV、BRSV、轮状病毒、冠状病毒等病毒的检测, 结果均为阴性。通过二代测序获得分离株基因组全长序列。本研究可为揭示内蒙古通辽地区 BPIV3 毒株流行特点提供理论参考。

材料与方 法

1 主要材料和试剂

肾肾细胞 (MDBK) 购自中国典型培养物保藏中心细胞库; Trizol 柱式总 RNA 提取试剂盒购自上海生工生物工程有限公司; M-MLV、RNA 酶抑制剂购自美国 Promega 公司; Primer9、dNTP 和 DNA Marker 购自日本 TaKaRa 公司; FBS (胎牛血清)、青霉素-链霉素双抗、胰酶购自美国 Hyclone 公司; PCR T3Mix 购自北京擎科生物科技有限公司。

2 方 法

2.1 引物设计与合成 根据 GenBank 上公布的 BPIV3 参考序列设计引物 BPIV3-F 和 BPIV3-R, 由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

2.2 样品 RNA 提取与 PCR 检测 将 10 份待检鼻拭子插入盛有 1 mL PBS 溶液的 1.5 mL 离心管中, 用力挤压后取 200 μ L 处理后的样品参照 TRIzol 柱式总 RNA 提取试剂盒说明书, 提取 BPIV3 病毒 RNA。然后将 RNA 反转录为 cDNA。以 cDNA 为模板, 以 BPIV3-F 和 BPIV3-R 为引物进行 PCR 扩增。PCR

反应体系 (25 μ L): 2 \times mix 12.5 μ L, ddH₂O 9.5 μ L, BPIV3-F 和 BPIV3-R 各 1 μ L, 模板 1 μ L。PCR 的反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s; 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min; 共 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。PCR 产物 4 $^{\circ}$ C 保存。将 PCR 产物交由上海生工生物工程有限公司测序, 所得序列在 NCBI 网站, 经基于局部比对算法的搜索工具 (Basic local alignment search tool, Blast) 比对。取扩增产物经 1% 凝胶电泳鉴定。

2.3 病毒的分离鉴定 将已处理好的 BPIV3 阳性标本上清液用 0.22 μ m 的滤膜过滤除菌后接种汇合度约为 90% 的单层 MDBK 细胞, 放入 37 $^{\circ}$ C 含 5% CO₂ 的细胞培养箱中孵育 2 h 后将接种液吸弃, 换成含 2% FBS 的 DMEM 细胞维持液后放细胞培养箱中继续培养, 每天观察细胞病变情况。接种 48 h 后将细胞取出, 通过 -80 $^{\circ}$ C 室温反复冻融三次后离心 8 000 r/min (离心半径 8.4 cm) 离心 5 min 去除细胞碎片, 吸取上清接种 MDBK 细胞进行下一代培养。

在传代培养的过程中, 每隔 12 h 用倒置显微镜观察 MDBK 细胞生长情况, 观察细胞是否产生细胞病变, 并且拍照记录。

2.4 分离株半数组织培养感染剂量 (Tissue culture infective dose, TCID₅₀) 测定 收获盲传过程中出现细胞病变的细胞培养液, 连续 10 倍倍比稀释, 稀释度为 10⁻¹ 至 10⁻⁸ 共计 8 个稀释度, 每个稀释度设置 8 个重复, 分别接种铺有 MDBK 细胞的 96 孔板, 同时设置阴性对照。培养 7 d 后不再有新的孔出现细胞病变, 记录发生细胞病变的孔数, 根据半数效量面积 (Karber) 法计算分离株的 TCID₅₀。

2.5 BPIV3 全基因组测序及遗传进化分析 将分离毒株交由广东美格基因科技有限公司进行二代测序, 并在 GENBANK 中进行 BLAST 比对。选取有代表性的参考株的全基因组序列, 用 DNA star 和 Mega 软件对选取的序列进行同源性和遗传进化分析。

结 果

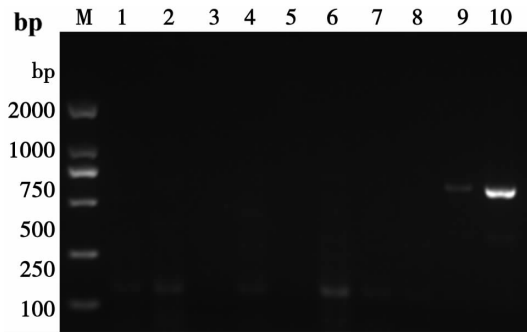
1 鼻拭子 RT-PCR 检测结果

琼脂糖凝胶电泳结果显示, 2 份样品中可检测到有与目的片段大小相符的单一一条带, Blast 比对为 BPIV3 核酸序列, 证实该鼻拭子样品为 BPIV3 阳性 (图 1)。

2 BPIV3 分离鉴定

盲传 5 代后, 倒置显微镜下观察显示, 接种 10 号鼻拭子样品的 MDBK 细胞折光性发生改变, 单层结构被破坏, 圆缩并坏死, 呈网状并形成空泡, 上清液中出现大量细胞碎片。阴性对照组细胞未出现明显变

化。表明成功分离到一株可使 MDBK 细胞发生明显细胞病变的毒株(图 2)。



M DNA 标志物(DL2000) 1 阴性对照 2~10 检测样品
图 1 BPIV3 目的基因的扩增
M DL-2000 DNA 1 Negative control 2-10 Testing samples
Fig. 1 Amplification of BPIV3 target gene

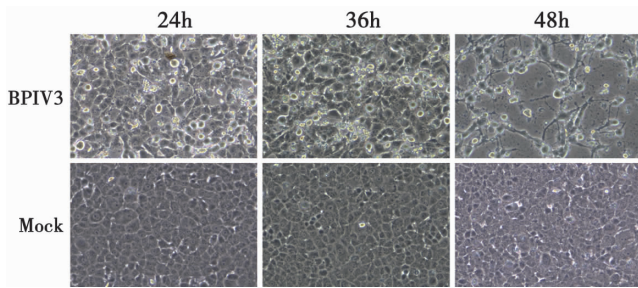
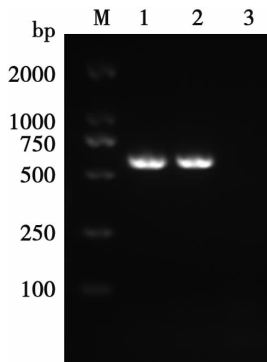


图 2 BPIV3 导致 MDBK 细胞发生细胞病变
Fig. 2 BPIV3 induces cytopathic effects in MDBK cells.

3 BPIV3 的 PCR 鉴定

收取实验组和对照组细胞样品,提取总 RNA 并反转录为 cDNA,用基因的特异性引物进行 PCR 检测。琼脂糖凝胶电泳结果显示,得到了与目的片段大小相符合的单一一条带(图 3)。将 PCR 产物测序获得的序列 BLAST 比对结果显示,BPIV3 序列与牛副流感病毒 3 型核酸序列高度同源,确定该病毒为 BPIV3,命名为 NMTL-21。



M DNA 标志物(DL2000) 1,2 接毒样本 3 阴性对照
图 3 BPIV3 病毒 PCR 鉴定
M DL-2000 DNA 1,2 Toxic cell samples 3 Negative control
Fig. 3 RT-PCR results of BPIV3

4 BPIV3 病毒滴度测定

Karber 法结果测得,BPIV3 NMTL-21 分离株的半数细胞培养物感染剂量为 10^{-7} TCID₅₀/100 μ L。

5 BPIV3 NMTL-21 同源性分析与遗传进化分析

多序列亲缘性分析结果显示,BPIV3 NMTL-21 和 11 株参考毒株同源性为 81.0%~99.6%,其中与 2015 年分离自黑龙江大庆的 NX49 株同源性最高,达 99.6%,与 2013 年分离自北京的 XJA13 株同源性为 99.5%(图 4)。

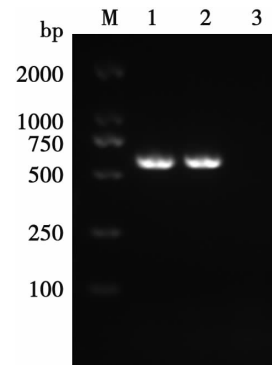


图 4 BPIV3 NMTL-21 毒株核苷酸序列同源性比对
Fig. 4 Homology comparison of nucleotide sequences of NMTL-21 strain

基于上述 11 条 BPIV3 参考毒株及 BPIV3 NMTL-21 基因组全长序列构建系统发育进化树,结果显示,分离株 BPIV3 NMTL-21 与 BPIV3-A、BPIV3-B 型均不在同一进化分支上,亲缘关系较远,但与 BPIV3-C 亚型株处于同一进化分支。因此,BPIV3 NMTL-21 为 BPIV3-C 型(图 5)。

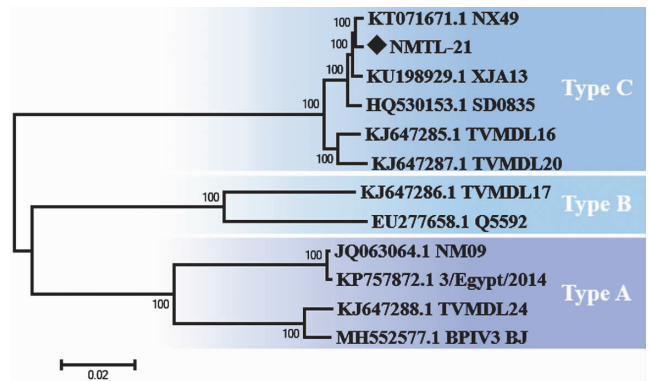


图 5 基于基因组全长序列构建的系统发生进化树
Fig. 5 phylogenetic tree analysis based on the complete genome sequence

讨论

随着世界各国牛养殖量的不断增加,国际贸易日益加强,BPIV3 已在全世界传播广泛,部分地区 BPIV3 血清阳性率可高达 73%^[10]。牛感染 BPIV3 会导致组织损伤、免疫抑制并增加对继发性细菌感染的

易感性,导致更严重的临床症状^[11]。根据流行病学调查结果显示,我国大部分地区的牛及其他易感动物均可感染 BPIV3^[12],表明 BPIV3 在我国流行形势较为严峻。尽管当前国内不乏 BPIV3 感染的相关报道,但是 BPIV3 流行毒株的基因序列信息还相对较少。分离鉴定国内的 BPIV3 流行毒株并对其进行全基因组序列分析对相关疫苗研发和制定有针对性的免疫防控策略具有重要意义。

本研究通过 PCR 从一头患呼吸道疾病牛的鼻拭子核酸样本中扩增获得 BPIV3 特异性条带,经测序分析证实该病牛感染了 BPIV3。将该鼻拭子样品接种 MDBK 细胞,盲传 5 代后出现明显细胞病变。通过 PCR 证实成功分离一株病毒株,并命名为 BPIV3 NMTL-21。经测定,该毒株基因组全长为 15 454 bp。

目前 BPIV3 流行毒株在世界范围内主要存在 3 种基因型,即 A 型、B 型和 C 型^[13]。我国国内有基因 A 型和 C 型的报道,但鲜有 B 型毒株报道。基于全长核苷酸序列同源性分析结果显示,NMTL-21 株与 NCBI 登录的 BPIV3 毒株同源性为 81.0%~99.6%,其中与 2015 年分离自黑龙江大庆的 NX49 株同源性最高,达 99.6%,与 2013 年分离自北京的 XJA13 株同源性为 99.5%。遗传进化分析显示该毒株为基因 C 型。

牛感染 BPIV3 后,在如饲养密度大等情况下会导致牛继发细菌感染或支原体感染并引起严重的肺炎,还会引起组织病理损伤和免疫抑制^[14]。病牛会出现体温升高,食欲不振,精神沉郁,咳嗽,鼻眼分泌物增多,流泪,呼吸困难等多种症状,死亡率高达 35%,严重危害全世界养牛业的经济^[15]。

本研究成功分离到一株 BPIV3-C 型毒株,并对其进行了基因组全长序列分析,该研究有助于揭示内蒙古通辽地区 BPIV3 毒株流行特点,并可为抗 BPIV3 药物和疫苗的研发提供理论基础和实验材料。

【参考文献】

(上接 519 页)

[24] Kyrgiou M, Arbyn M, Bergeron C, et al. Cervical screening: ESGO-EFC position paper of the European Society of Gynaecologic Oncology (ESGO) and the European Federation of Colposcopy (EFC) [J]. Br J Cancer, 2020, 123(4): 510-517.

[25] Santella B, Schettino MT, Franci G, et al. Microbiota and HPV: The role of viral infection on vaginal microbiota [J]. J Med Virol, 2022, 94(9): 4478-4484.

[26] 李莉, 马莹, 付玉荣, 等. 阴道微生态改变与高危型人乳头瘤病毒感染的相关性研究[J]. 解放军医学院学报, 2023, 44(3): 225-229.

[27] Tao H, Zeng D, Chen W, et al. Focused ultrasound: a novel therapy for improving vaginal microecology in patients with

[1] Mayo MA. Developments in plant virus taxonomy since the publication of the 6th ictv report international committee on taxonomy of viruses[J]. Arch Virol, 1999, 144(8): 1659-1666.

[2] Juozapaitis M, Zvirbliene A, Kucinskaite I, et al. Synthesis of recombinant human parainfluenza virus 1 and 3 nucleocapsid proteins in yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Virus Res, 2008, 133(2): 178-186.

[3] Reisinger RC, Heddleston KL, Manthei CA. A myxovirus (SF-4) associated with shipping fever of cattle [J]. J Am Vet Med Assoc, 1959, 135(3): 147-152.

[4] Battles MB, McLellan JS. Respiratory syncytial virus entry and how to block it [J]. Nat Rev Microbiol, 2019, 17(4): 233-245.

[5] Zhu YM, Shi HF, Gao YR, 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] Sattar SA, Bohl EH, Senturk M. Viral causes of bovine abortion in Ohio [J]. J Am Vet Med Assoc, 1965, 147(11): 1207-1210.

[7] Horwood PF, Mahony TJ. Multiplex real-time RT-PCR detection of three viruses associated with the bovine respiratory disease complex [J]. J Virol Method, 2011, 171(2): 360-363.

[8] Srikumaran S, Kelling CL, Ambagala A. Immune evasion by pathogens of bovine respiratory disease complex [J]. Anim Health Res Rev, 2007, 8(2): 215-229.

[9] 毕玉斌, 宋丽丽, 薛原, 等. 我国北方 4 省部分规模奶牛场牛呼吸道疾病综合征主要病原血清抗体检测 [J]. 中国动物检疫, 2020, 37(12): 9-13.

[10] Leal E, Liu C, Zhao Z, et al. Isolation of a divergent strain of bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV3) infecting cattle in China [J]. Viruses, 2019, 11(6): 489.

[11] Miles DG. Overview of the North American beef cattle industry and the incidence of bovine respiratory disease (BRD) [J]. Anim Health Res Rev, 2009, 10(2): 101-103.

[12] Ren Y, Tang C, Yue H. Prevalence and molecular characterization of bovine parainfluenza virus type 3 in cattle herds in China [J]. Animals (Basel), 2023, 13(5): 793.

[13] Newcomer BW, Neill JD, Galik PK, et al. Serologic survey for antibodies against three genotypes of bovine parainfluenza 3 virus in unvaccinated ungulates in Alabama [J]. Am J Vet Res, 2017, 78(2): 239-243.

[14] Wen YJ, Shi XC, Wang FX, et al. Phylogenetic analysis of the bovine parainfluenza virus type 3 from cattle herds revealing the existence of a genotype A strain in China [J]. Virus Genes, 2012, 45(3): 542-547.

[15] Leal E, Liu C, Zhao Z, et al. Isolation of a divergent strain of bovine parainfluenza virus type 3 (bpiv3) infecting cattle in China [J]. Viruses, 2019, 11(6): 489.

【收稿日期】 2023-11-30 【修回日期】 2024-02-16

high-risk HPV infection [J]. Int J Hyperthermia, 2023, 40(1): 2211276.

[28] 钱玉. 宫颈人乳头瘤病毒感染与阴道微生态失衡的相关性研究及中医证型分布 [D]. 新疆: 新疆医科大学, 2023.

[29] 王和舒琦, 白会会, 刘朝晖. 妇科门诊患者阴道微生态特征及其与人乳头瘤病毒感染的相关性分析 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2023, 39(2): 226-230.

[30] Sharifian K, Shoja Z, Jalilvand S. The interplay between human papillomavirus and vaginal microbiota in cervical cancer development [J]. Virol J, 2023, 20(1): 73.

【收稿日期】 2023-11-15 【修回日期】 2024-02-05