

杨宣叶,高明阳,胡欣妍,等. BVDV-2d 毒株的分离鉴定及同义密码子使用模式分析[J]. 江苏农业学报,2024,40(11):2111-2121.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2024.11.015

BVDV-2d 毒株的分离鉴定及同义密码子使用模式分析

杨宣叶^{1,2}, 高明阳^{1,2}, 胡欣妍^{1,2}, 王进千^{1,2}, 王慧慧^{1,3}, 丁玉林⁴, 曹小安³, 马晓霞^{1,2}
(1.西北民族大学生物医学研究中心/生物工程与技术国家民委重点实验室,甘肃 兰州 730030; 2.西北民族大学生命科学与工程学院,甘肃 兰州 730010; 3.中国农业科学院兰州兽医研究所动物疫病防控全国重点实验室,甘肃 兰州 730046; 4.内蒙古农业大学兽医学院动物疾病临床诊疗技术重点实验室,内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要: 本研究通过对腹泻犊牛肠道内容物中分离到的牛病毒性腹泻病毒(BVDV)毒株进行分析,首次确认该毒株为 BVDV-2d 亚型,命名为 22-Gansu-F3。通过病毒分离、鉴定及全基因组测序,本研究不仅探讨了腹泻犊牛肠道的病理变化,还分析了其同义密码子使用模式的遗传特征。结果表明,在开放阅读框中,CpG 二核苷酸的使用频率显著降低,并且在选择同义密码子的过程中,精氨酸对含 CpG 同义密码子的使用具有显著抑制作用。为了进一步明确不同功能性蛋白质编码序列的同义密码子使用模式的遗传学特征,本研究比较了不同编码序列的同义密码子使用差异,发现 N^{pro}和 NS4A 的编码区在同义密码子使用上与其他蛋白质显著不同。此外,BVDV-2d 型 22-Gansu-F3 毒株的不同蛋白质编码区在适应猪、羊和骆驼的同义密码子使用模式上表现出良好的适应性,为这些动物体内病毒蛋白的翻译提供了潜在的物质基础。本研究结果为中国 BVDV-2 型的进化动态提供了新的理论依据,并为预防该亚型成为中国主要流行亚型提供了早期预警。

关键词: 牛病毒性腹泻病毒; BVDV-2d; 病理变化; 同义密码子; 遗传

中图分类号: S852.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2024)11-2111-11

Isolation, identification and analysis of synonymous codon usage patterns of BVDV-2d strain

YANG Xuanye^{1,2}, GAO Mingyang^{1,2}, HU Xinyan^{1,2}, WANG Jinqian^{1,2}, WANG Huihui^{1,3}, DING Yulin⁴, CAO Xiaohan³, MA Xiaoxia^{1,2}

(1.Biomedical Research Center/Key Laboratory of Biotechnology and Bioengineering of State Ethnic Affairs Commission, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, China; 2.School of Life Sciences and Engineering, Northwest Minzu University, Lanzhou 730010, China; 3.State Key Laboratory for Animal Disease Control and Prevention, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China; 4.Key Laboratory of Clinical Diagnosis and Treatment Technology in Animal Disease, College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract: This study analyzed a bovine viral diarrhea virus (BVDV) strain isolated from the intestinal contents of diarrheic calves, and classified it as subtype BVDV-2d for the first time and designated it as 22-Gansu-F3. Through viral isolation, identification, and whole-genome sequencing, this study not only explored the pathological changes in the intestines of diarrheic calves, but also analyzed the genetic characteristics of their synonymous codon usage pattern. Our findings revealed a significant reduction in the usage frequency of CpG dinucleotides within open reading frames. Besides, arginine showed notable suppression of synonymous codon usage containing CpG during the selection process for synonymous codon. To elucidate the genetic features of synonymous codon usage patterns among various functional protein-coding sequences, we compared the usage differences of synonymous codons in different coding sequences and found significant differences

收稿日期:2024-04-06

基金项目:甘肃省自然科学基金项目(23JRRA715)

作者简介:杨宣叶(2001-),男,河南周口人,硕士研究生,主要从事病毒基因工程研究。(E-mail)yangxuanye2001@163.com

通讯作者:马晓霞,(E-mail)maxiaoxia956@163.com

table suppression of synonymous codon usage containing CpG during the selection process for synonymous codon. To elucidate the genetic features of synonymous codon usage patterns among various functional protein-coding sequences, we compared the usage differences of synonymous codons in different coding sequences and found significant differences

in the synonymous codon usage of the N^{pro} and NS4A encoding regions compared to other proteins. Furthermore, the different protein-coding regions of the BVDV-2d strain 22-Gansu-F3 exhibited good adaptability for synonymous codon usage pattern in pigs, sheep, and camels, and provided a potential material basis for the translation of viral proteins in these hosts. The research results offer new theoretical insights into the evolutionary dynamics of BVDV subtype 2 in China and serve as an early warning to prevent this subtype from becoming the predominant circulating subtype.

Key words: bovine viral diarrhea virus; BVDV-2d; pathological change; synonymous codon; heredity

牛病毒性腹泻病毒(BVDV)给中国养牛业造成了严重的破坏。根据侵染细胞后引起的不同的病变效应,将BVDV分为2种生物表型,即致细胞病变型(CP)和非致细胞病变型(NCP)^[1]。由于BVDV基因组的高突变率,易感动物感染后通常导致不同的临床症状^[2]。BVDV属于黄病毒科瘟病毒属的一员,拥有长度约12 kb的单股正链RNA基因组。病毒基因组编码1个开放阅读框(ORF),能够编码1个多聚蛋白质^[3],该多聚蛋白质由N^{pro}、capsid、E0、E1、E2、P7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A和NS5B组成^[4]。目前,在世界范围内已鉴定出3种BVDV基因型:BVDV-1、BVDV-2和BVDV-3(也称为HoBi样瘟病毒)^[5]。随着中国集约化养牛业的发展,BVDV感染引起的重要流行传染病越来越被重视,其中1b、1c、1m、1q、1v和2a型在中国最常见^[6-9]。

在病毒与宿主长期共同进化的过程中,BVDV进化出多种策略来逃避宿主的先天免疫和适应性免疫,从而促进病毒的生存和复制^[3,10-11]。在BVDV自身很强的遗传变异率的推动下,其基因组在同义密码子使用模式上表现出较大的遗传差异,这有助于病毒完成感染并适应宿主内环境^[3,12]。以往中国BVDV流行病学的调查结果表明,BVDV-1型感染引起的阳性牛比例较高,BVDV-2型感染引起的阳性牛比例较低^[13-15]。此外,BVDV-2型毒株也与现有的BVDV-1型疫苗株存在抗原差异。相关生物学特征可能导致BVDV-2型在基因组结构上与BVDV-1型具有不同的遗传模式,特别是在同义密码子使用模式上表现出更明显的差异^[3,7,12,16-17]。由于病毒蛋白质的同义密码子使用模式可以在很大程度上反映病毒本身对宿主适应的进化动态,对BVDV-2型不同病毒蛋白质的同义密码子使用模式的研究可以为BVDV-2型的进化途径提供新的参考。本研究成功地从有明显临床症状(急性腹泻)牛肠道内容物中分离出BVDV-2d毒株,命名为22-Gansu-F3。为

了阐明BVDV-2d型22-Gansu-F3毒株的遗传特性,本研究拟利用同义密码子使用模式相关的分析方法对分离毒株基因组中不同编码序列(N^{pro}、capsid、E0、E1、E2、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A和NS5B)进行遗传特性分析。

1 材料与方法

1.1 腹泻牛肠道组织的采集

按照《中华人民共和国动物伦理审查指南》的相关要求,并经西北民族大学生命科学与工程学院动物伦理委员会和内蒙古农业大学兽医学院动物伦理委员会批准,本研究对出现急性腹泻临床症状的犊牛尸体进行十二指肠、空肠、回肠和结肠组织样品的收集,并将收集到的组织样品放置于10%的福尔马林中性缓冲液中进行固定处理,而后通过苏木精-伊红(HE)染色进行组织病理学检测。对犊牛肠道内容物进行采集后,通过低温冷链运输至实验室,置于-80℃保存以备后续研究。

1.2 毒株的检测和亚型分类

使用TRIzol试剂(赛默飞世尔科技公司产品)从上述肠道内容物样本中提取总RNA。RNA提取后根据M-MLV逆转录酶试剂盒(宝日医生物技术有限公司产品)反转录为cDNA。利用本团队前期检测BVDV的方法^[7]对本试验中的cDNA样品进行RT-PCR特异性条带[5'非翻译区(UTR)序列区~250 bp]扩增。并对PCR结果进行测序,通过构建系统发育树进一步分析遗传分类。基于目前已经报道的不同基因亚型(BVDV1a-1u、BVDV2a-2d和BVDV3)的5'UTR序列(表1),利用MAGE 7.0软件采用统计方法(邻接进化树法)对所扩增的5'UTR序列进行基因亚型的遗传分析。

1.3 毒株的分离及毒价测定

使用10%(质量体积比)无钙镁磷酸盐缓冲液将肠道内容物进行重悬,高速离心后,用0.22 μm微滤膜过滤上清液并进行除菌。用杜氏改良Eagle

(DMEM)培养基与除菌后的上清液进行等体积混合后,将 2 mL 混合液加入汇合度约为 50% 的牛肾细胞系(MDBK)细胞培养物中,在 5% CO₂ 和 37 °C 的环境中孵育。2 h 后弃掉上清液,并用 DMEM 培养基将细胞培养物洗涤 3 次,最后加入含有 1% 血清的 DMEM 病毒维持液培养细胞 5 d。每天观察细胞病变情况,连续盲传 5 代。若犬肾细胞系(MDBK)细胞发生病变,则利用半数组织培养感染量(TCID₅₀)法进行病毒滴度检测^[18]。

表 1 用于牛病毒性腹泻病毒(BVDV)分离株基因亚型分类的 5'非翻译区(UTR)序列参考信息

Table 1 Reference information of 5' untranslated region (UTR) sequences for subtyping classification of bovine viral diarrhea virus (BVDV)

特定亚型的 5'UTR 序列	GenBank 登录号
BVDV-1a	AJ133739.1
BVDV-1b	EU224226.1
BVDV-1c	AF049221.2
BVDV-1d	EU224230.1
BVDV-1e	EU224224.1
BVDV-1f	MH753468.1
BVDV-1g	EU224236.1
BVDV-1h	EU224231.1
BVDV-1i	AF298059.1
BVDV-1j	JF759939.1
BVDV-1k	KC853440.1
BVDV-1l	MG670548.1
BVDV-1m	GU120241.1
BVDV-1n	GQ495676.1
BVDV-1o	JN248734.1
BVDV-1p	GU120246.1
BVDV-1q	JN400273.1
BVDV-1r	MG670547.1
BVDV-1s	LM994673.1
BVDV-1t	LM994674.1
BVDV-1u	KJ578848.1
BVDV-1v	KP749794.1
BVDV-1w	MN417893.1
BVDV-2a	GU395545.1
BVDV-2b	AY379547.1
BVDV-2c	AF417996.1
BVDV-2d	AF244959.1
BVDV-3	JX4691191.

1.4 分离毒株基因组测序

根据 GenBank 数据库中记录的不同 BVDV-2 毒株的全基因组序列信息,按照 BVDV 不同毒株基因组中保守区设计出能够覆盖病毒全基因组的特异性引物序列(表 2)。设计特异性引物来扩增覆盖 BVDV 分离物全基因组的重叠区域(表 2)。分别将 RT-PCR 扩增出来的特异性 PCR 产物利用 DNA 纯化方法进行提取,而后插入 pMD-18T(宝日医生物技术有限公司产品)克隆载体上构成重组载体,并将鉴定为阳性的克隆载体送擎科生物技术有限公司进行测序。利用 DNASTAR 软件中的 EdiSeq 程序进行编辑和裁剪,以组成完整的 BVDV 基因组。

表 2 针对牛病毒性腹泻病毒(BVDV)分离毒株全基因组的引物信息

Table 2 Information about primers for the whole genome of bovine viral diarrhea virus (BVDV) isolate

引物	引物序列(5'→3')	产物长度(bp)
1F	GATTGACGTTGACAAAATAT	302
1R	CTATCAGGCTGTGTCCATAACGC	
2F	TAGGGTGTAGCAGAGACCTGC	524
2R	GTATACCCATTTGAGGACTTC	
3F	CAACCAGAAGCTCCTCAAATG	759
3R	GTCCTAGCCTGTGTTACGAT	
4F	GACAGTCCTACAACCTTGACAG	2 019
4R	TATCTCCTCAGTGTTCCTC	
5F	CTGAGGAGATAGTCATGATAG	624
5R	GCAGTAGGAAGCCTGCTAAGTC	
6F	CTACTGCAATGGGCACCAACAG	309
6R	CACCTGCCACTGGCTACTGATG	
7F	GTAGCCAGTGGCAGGTGGTC	707
7R	GTCCATGATATTTACGTGGCAC	
8F	GACAAAGCTAACTGCATTCTTTG	1 301
8R	GCATTGGTGGCTACTACTAC	
9F	GCCATAGAGTCAGGTGTAACAC	1 024
9R	CATACTCCTTGACTGTTTGC	
10F	CACTCAAGGAGTATGTGGAT	955
10R	TGCAAGTTGAAGATCAAGTC	
11F	GACTTGATCTTCAACTTGCATG	1 720
11R	GTTACCTTCCACCAGCTCT	
12F	GAAGGTGAACCTTCGAAGGT	735
12R	GTCAAATAGCGGTGTTTTGC	
13F	GCTATGAGGGCAAAACACCGC	1 199
13R	TACTGTATCAGCATCAGCCTC	
14F	GTGCCAGTCAGATGGGCAGAT	782
14R	GTACTGTAAAGTTAGGCTAT	

1.5 分析分离毒株基因组的同义密码子使用遗传特征

基于分离毒株全基因组的核苷酸信息,利用相对同义密码子使用度(*RSCU*)来评估目标编码序列的同义密码子使用偏嗜性^[19]。根据用*RSCU*判定同义密码子使用偏嗜性的标准,*RSCU*越高,相应的同义密码子使用的频次越高;反之,使用频次就越低。同义密码子使用频次越高或越低均表现出明显的使用偏嗜性。为了界定 59 种同义密码子使用偏嗜的程度,将*RSCU*值大于 1.6 和小于 0.6 的同义密码子分别定义为优势密码子和劣势密码子。

分离毒株基因组中不同蛋白质编码序列,分别利用*RSCU*计算公式进行计算,并利用主成分分析法(PCA)将代表 59 个维度的 59 种同义密码子的*RSCU*数据降维后,制作 2 维散点图,进行可视化处理^[20]。2 维散点图由 PCA 获得的第 1 主成分参数(f'_1)和第 2 主成分参数(f'_2)构成,通过散点所表现出来的群体特征来展现目标编码序列在同义密码子使用模式上遗传相似性的差异。此外,采用有效密码子指数(*ENC*)分析突变压力和自然选择压力对分离毒株不同编码区同义密码子使用模式的影响程度^[21]。根据*ENC*值的值域定义,当*ENC*值为 61 时,目标编码序列的所有同义密码子使用频率是平均和随机的(同义密码子使用偏嗜性最弱);当*ENC*值为 20 时,目标序列所编码的氨基酸只选择一种特定的同义密码子来进行编码(同义密码子使用偏嗜性最强)。由编码序列密码子第 3 位的 G+C 含量(GC3)以及*ENC*值组成的散点图能更明了地展示编码序列结构与同义密码子使用偏嗜性之间的相关性。

1.6 分析分离毒株不同编码区对不同宿主同义密码子使用模式的相似度

利用同义密码子使用模式相似性指数的分析方法^[22],分析病毒基因组中不同编码序列同义密码子使用模式与目标宿主同义密码子使用模式之间的相似度。计算公式如下:

$$R(A, B) = \frac{\sum_{i=1}^{59} a_i \times b_i}{\sqrt{\sum_{i=1}^{59} a_i \times \sum_{i=1}^{59} b_i}}$$

$$D(A, B) = \frac{1 - R(A, B)}{2}$$

其中, $R(A, B)$ 反映向量 A (病毒编码序列)与向

量 B (目标宿主)在同义密码子使用模式上呈现的矢量夹角的余弦值。 a_i 代表病毒编码序列 59 个同义密码子中密码子 i 的*RSCU*值, b_i 表示目标宿主密码子 i 的*RSCU*值。 $D(A, B)$ 反映病毒编码序列与宿主在同义密码子使用模式上的相似度,即数值越小,相似度越高。此外,本研究中所涉及的宿主包括牛、羊、猪、小鼠、兔和骆驼,并且特定宿主的同义密码子使用模式可以在已报道的密码子数据中查询获得^[23]。

2 结果与分析

2.1 BVDV 毒株的分离与鉴定

利用 RT-PCR 技术可从腹泻犊牛肠道内容物中扩增出特异性 PCR 产物条带,经过测序获得其 5' UTR 的序列信息。将获得的序列信息与已知 BVDV 不同亚型 5'UTR 序列进行系统进化树分析,发现其与 BVDV-2d 亚型的遗传距离接近(图 1),将分离毒株命名为 22-Gansu-F3。该毒株能够致 MDBK 细胞发生细胞病变,使用 *TCID₅₀* 法测定毒价为 $10^{-5.125}$ /mL。

2.2 腹泻犊牛肠道组织病变检测

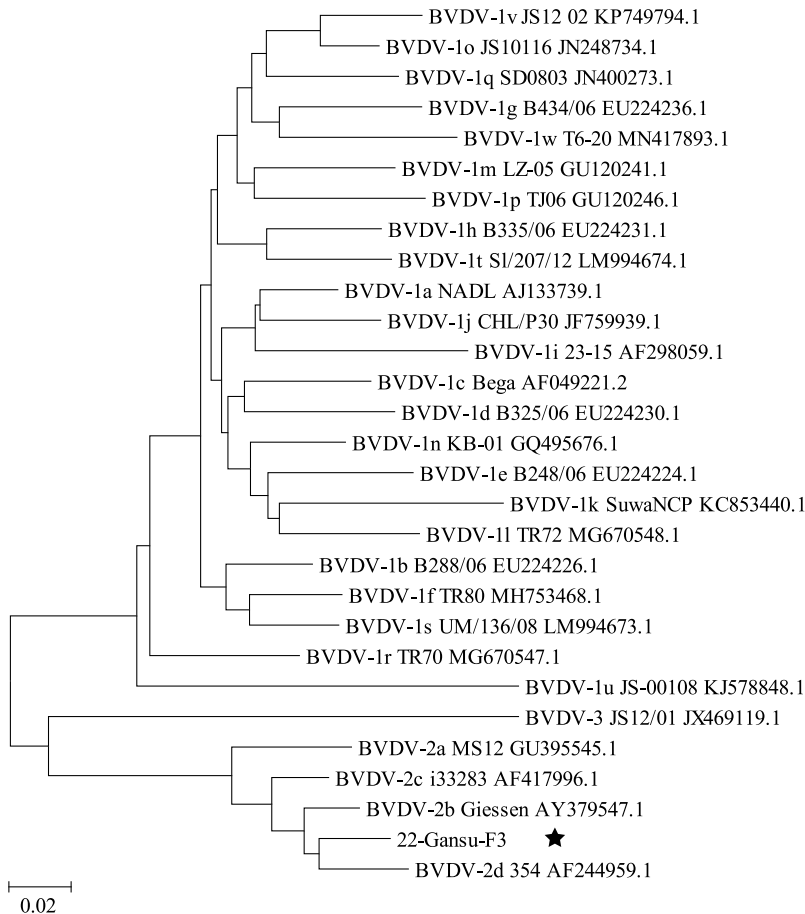
利用 HE 染色法,对所采集的腹泻犊牛不同肠道组织进行病理学分析发现,十二指肠纤维化严重,黏膜层结构被严重破坏并伴随小肠绒毛脱落(图 2A);空肠固有层大量淋巴细胞、巨噬细胞、吞噬细胞和中性粒细胞聚集(图 2B);回肠淋巴母细胞损伤导致淋巴细胞中心耗竭,肠上皮细胞肿胀、坏死、破裂(图 2C);结肠上皮细胞大量脱落坏死并且伴随纤维化(图 2D)。上述不同肠道组织的病变很可能是 22-Gansu-F3 毒株感染犊牛导致病毒性腹泻的病理原因。

2.3 BVDV-2d 型 22-Gansu-F3 毒株同义密码子使用偏嗜性

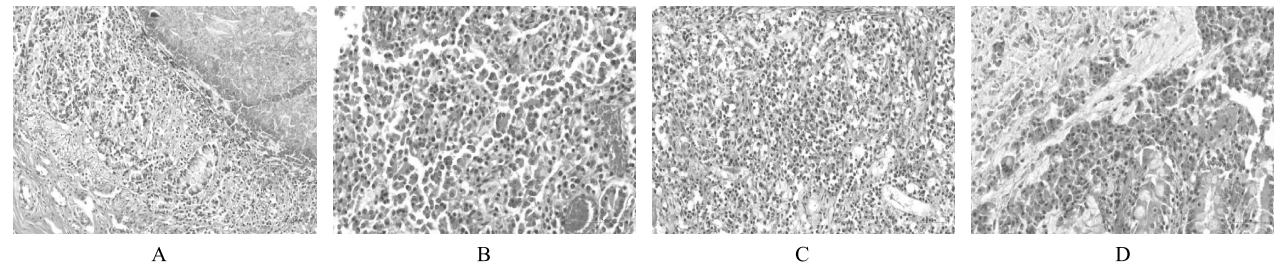
对 BVDV-2d 型 22-Gansu-F3 毒株全基因组的*RSCU*值进行计算,结果表明,59 种同义密码子使用模式具有明显的偏嗜性(表 3)。具有 2 个同义密码子的氨基酸在同义密码子使用模式中是相对较平衡的,即*RSCU*数值在 1.00 左右波动;然而具有 2 种以上同义密码子家族的氨基酸在同义密码子使用模式上表现出明显的偏嗜性。在这些具有明显使用偏嗜性的同义密码子中,使用频率偏高的同义密码子为编码丝氨酸的 AGU,编码脯氨酸的 CCA,编码苏氨

酸的 ACA, 编码精氨酸的 AGA 和 AGG; 使用频率偏低的同义密码子为编码亮氨酸的 CUU 和 CUC, 编码异亮氨酸的 AUU, 编码丝氨酸的 UCG, 编码丙氨酸的 GCG, 编码脯氨酸的 CCG, 编码苏氨酸的 ACG, 编码精氨酸的 CGU、CGC、CGA 和 CGG。从表 3 可知, 含有 CpG 二核苷酸的同义密码子的使用被相对应

编码的氨基酸显著抑制, 并且精氨酸的 6 种同义密码子 (CGU、CGC、CGA、CGG、AGA 和 AGG) 使用模式均呈现出显著的使用偏嗜性。这些结果表明 BVDV-2d 型 22-Gansu-F3 毒株基因组在同义密码子使用上受到遗传选择压力的影响。



★表示本研究分离毒株。
图1 基于牛病毒性腹泻病毒(BVDV) 5'非翻译区(UTR)构建的系统进化树
Fig.1 Phylogenetic tree constructed by 5'untranslated region (UTR) of bovine viral diarrhea virus (BVDV)



A: 十二指肠; B: 空肠; C: 回肠; D: 结肠。
图2 牛病毒性腹泻病毒(BVDV) 22-Gansu-F3对肠道不同部位的病理损伤特征
Fig.2 Pathological injury characteristics for different regions in intestine of cattle caused by bovine viral diarrhea virus (BVDV) 22-Gansu-F3

表 3 牛病毒性腹泻病毒 (BVDV) -2d 型 22-Gansu-F3 毒株基因组的相对同义密码子使用度 (RSCU)

Table 3 Relative synonymous codon usage value for the whole coding sequence of the strain 22-Gansu-F3 from bovine viral diarrhea virus (BVDV) -2d type

同义密码子 (氨基酸)	相对同义密 码子使用值	同义密码子 (氨基酸)	相对同义密 码子使用值
UUU(F)	1.10	AAU(N)	0.86
UUC(F)	0.90	AAC(N)	1.14
UUA(L)	1.06	AAA(K)	1.04
UUG(L)	1.23	AAG(K)	0.96
#CUU(L)	0.53	GAU(D)	0.91
#CUC(L)	0.58	GAC(D)	1.09
CUA(L)	1.39	GAA(E)	1.06
CUG(L)	1.20	GAG(E)	0.94
#AUU(I)	0.45	UGU(C)	0.94
AUC(I)	1.04	UGC(C)	1.06
AUA(I)	1.51	#CGU(R)	0.06
GUU(V)	0.75	#CGC(R)	0.09
GUC(V)	0.66	#CGA(R)	0.19
GUA(V)	1.30	#CGG(R)	0.19
GUG(V)	1.29	*AGA(R)	2.92
UCU(S)	0.60	*AGG(R)	2.54
UCC(S)	0.79	GGU(G)	1.02
UCA(S)	1.45	GGC(G)	0.70
#UCG(S)	0.09	GGA(G)	0.94
*AGU(S)	1.73	GGG(G)	1.33
AGC(S)	1.35	CCU(P)	0.99
GCU(A)	1.28	CCC(P)	0.84
GCC(A)	0.97	*CCA(P)	1.82
GCA(A)	1.45	#CCG(P)	0.35
#GCG(A)	0.30	ACU(T)	0.91
UAU(Y)	0.98	ACC(T)	0.87
UAC(Y)	1.02	*ACA(T)	1.67
CAU(H)	0.84	#ACG(T)	0.55
CAC(H)	1.16	CAA(Q)	1.00
		CAG(Q)	1.00

括号中字母代表氨基酸。F: 苯丙氨酸; L: 亮氨酸; I: 异亮氨酸; V: 缬氨酸; S: 丝氨酸; A: 丙氨酸; Y: 酪氨酸; H: 组氨酸; N: 天冬酰胺; K: 赖氨酸; D: 天冬氨酸; E: 谷氨酸; C: 半胱氨酸; R: 精氨酸; G: 甘氨酸; P: 脯氨酸; T: 苏氨酸; Q: 谷氨酰胺。* 表示 RSCU 过高, 大于 1.6; # 表示 RSCU 过低, 小于 0.6。

2.4 BVDV-2d 型 22-Gansu-F3 毒株不同编码序列具有不同的密码子使用偏嗜性

根据 ENC-GC3 散点图评判规则, 散点越接近期

望曲线, 则其对应的编码序列在同义密码子使用模式上越受到核苷酸突变选择压力的影响, 反之, 散点越偏离期望曲线, 则其对应的编码序列在同义密码子使用模式上越受到自然选择压力的影响^[21]。利用 ENC-GC3 散点图对 BVDV-2d 型 22-Gansu-F3 毒株不同蛋白质编码序列进行分析, 发现不同编码序列的密码子使用模式具有差异性, 并且所有编码序列的 ENC 值均位于“倒钟”形期望曲线下方 (图 3)。除了 N^{pro} 和 NS4A 编码序列外, 其余非结构蛋白质和结构蛋白质的编码序列具有相似的密码子使用偏嗜性。此外, NS4A 编码序列的密码子偏嗜性最强, 而 N^{pro} 编码序列的密码子偏嗜性最弱。这些结果均表明, 突变选择压力与自然选择压力对 BVDV-2d 型 22-Gansu-F3 毒株基因组的不同蛋白质编码序列的影响是不均一的, 且在 N^{pro} 和 NS4A 编码序列上表现得更为突出。

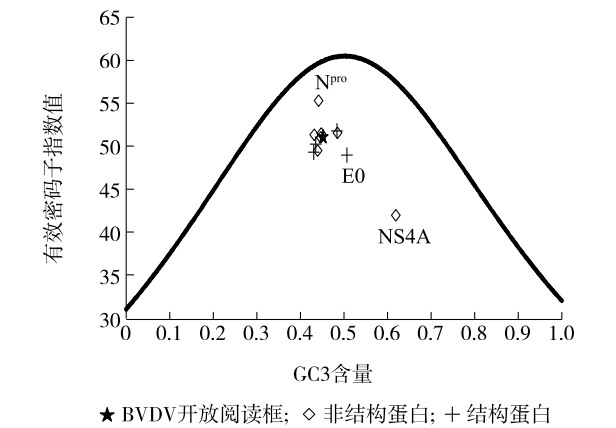
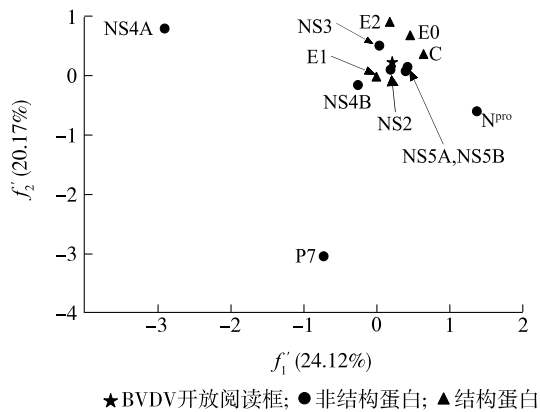


图 3 牛病毒性腹泻病毒 (BVDV) -2d 型 22-Gansu-F3 不同编码区的 ENC-GC3 散点图

Fig.3 Plot of ENC-GC3 content for different viral regions of bovine viral diarrhea virus (BVDV) -2d type 22-Gansu-F3

基于 ENC-GC3 散点图所反映出的密码子使用偏嗜性 (图 3), 进一步利用主成分分析 (PCA) 法将 BVDV-2d 型 22-Gansu-F3 毒株基因组中的不同编码序列区与开放阅读框 (ORF) 进行同义密码子使用模式遗传差异性的分析。结果 (图 4) 表明, NS2 蛋白 [第 1 主成分参数 (f_1) = 0.19, 第 2 主成分参数 (f_2) = 0.10] 与 ORF (f_1 = 0.21, f_2 = 0.22) 在同义密码子使用模式方面具有极高的相似性, 其他病毒编码序列均不同程度地与 ORF 同义密码子使用模式存在遗传差异 (图 4)。此外, NS5A (f_1 = 0.40,

$f'_2=0.08$) 和 NS5B ($f'_1=0.42$, $f'_2=0.15$) 二者在同义密码子使用模式上具有极高的遗传相似性; 而 N^{pro} ($f'_1=1.37$, $f'_2=-0.60$)、P7 ($f'_1=-0.73$, $f'_2=-3.04$)、NS3 ($f'_1=0.03$, $f'_2=0.51$)、NS4A ($f'_1=-2.91$, $f'_2=0.80$) 和 NS4B ($f'_1=-0.26$, $f'_2=-0.16$) 作为非结构蛋白质在同义密码子使用模式上表现出明显的遗传差异。与非结构蛋白质编码序列相比, 虽然 4 种结构蛋白质在同义密码子使用模式上的遗传相似性较高, 但是彼此之间也存在同义密码子使用模式上的显著遗传差异, 即 C ($f'_1=0.64$, $f'_2=0.36$)、E0 ($f'_1=0.46$, $f'_2=0.68$)、E1 ($f'_1=-0.01$, $f'_2=-0.01$) 和 E2 ($f'_1=0.18$, $f'_2=0.98$)。上述结果说明, 生物学功能在特定病毒区域的同义密码子使用模式中起着重要作用。



f'_1 : 第 1 主成分参数; f'_2 : 第 2 主成分参数。

图 4 牛病毒性腹泻病毒 (BVDV) 22-Gansu-F3 不同编码区在同义密码子使用模式上的可视化遗传特征

Fig.4 Visualization of genetic features in synonymous codon usage pattern of different coding regions of bovine viral diarrhea virus (BVDV) 22-Gansu-F3

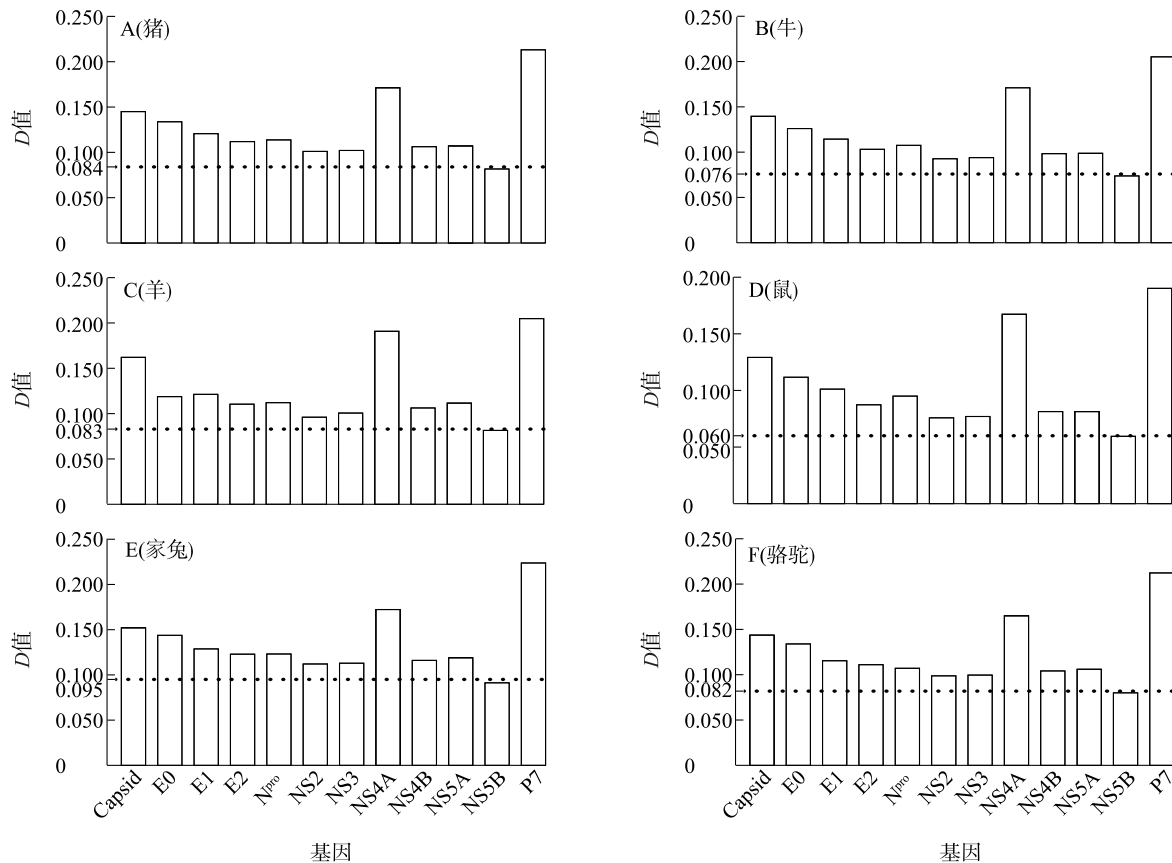
2.5 BVDV-2d 型 22-Gansu-F3 毒株不同编码区对宿主同义密码子使用模式的差异性

鉴于 BVDV-2d 型 22-Gansu-F3 毒株不同编码序列在突变选择压力与自然选择压力共同作用下所表现出来的同义密码子使用的遗传多样性, 相应的编码序列在不同宿主细胞中的翻译适应性的差异可以通过评估其与特定宿主同义密码子使用模式的相似程度来展示。如图 5 所示, BVDV-2d 型 22-Gansu-F3 毒株的 NS5B 编码区对 6 种宿主的密码子使用适应性最高, 而 P7 编码区对这些宿主的密码子使用适应性最低。除 P7 编码区外, NS4A 编码区对宿主的密码子使用适应性明显较弱。由于 BVDV-2d 型 22-

Gansu-F3 毒株是牛源病毒株, 我们建立了 BVDV 对牛密码子使用适应性相关的参考 (图 5B), 以进一步评估该毒株在密码子使用时对其他敏感宿主的适应程度。除此之外, BVDV-2d 型 22-Gansu-F3 毒株不同编码序列与猪、羊和骆驼在同义密码子使用模式的相似度方面十分接近 (图 5A、5C、5F)。此外, BVDV-2d 型 22-Gansu-F3 毒株所有蛋白质编码区域与小鼠的同义密码子使用模式的相似度是最高的 (图 5D), 而其与家兔的同义密码子使用模式的相似度最低 (图 5E)。上述病毒不同编码序列对宿主同义密码子使用模式的适应性可以为今后深入研究 BVDV-2d 型 22-Gansu-F3 在其他宿主细胞内的蛋白质表达提供一些参考依据。

3 讨论

当前中国畜禽养殖业处于高速发展的阶段, 这也为 BVDV 这种高突变率的病毒在易感动物中迅速传播以及不断产生新的突变亚型提供了极好的条件^[8,9,24-25]。针对由 BVDV 感染引起的腹泻临床病例, 最快速有效的鉴定方法就是利用 RT-PCR 扩增 5'UTR 序列, 并构建进化树分析亚型分类; 另外, 病理切片也是深入了解 BVDV 感染导致肠道病理变化最直接的手段。本研究从中国甘肃省 1 头急性腹泻犊牛中分离到 1 株 BVDV-2d 基因型的田间毒株 (22-Gansu-F3), 并且通过病理切片分析发现腹泻犊牛肠道组织的病变特征。当前, 在中国分离的 BVDV 毒株基因型主要为 1a~1d、1m~1n、1o~1q、1u、2a 和 2b^[9,26-27]。本研究在甘肃省养牛场分离并鉴定出来的 BVDV-2d 型 22-Gansu-F3 毒株是该地区首次发现的田间毒株。与一些已经分离并定型的 BVDV 田间毒株不同, 22-Gansu-F3 毒株能够引起犊牛的严重腹泻, 甚至造成犊牛死亡。这一致病特征不同于其他基因亚型 (例如 BVDV-1b 和 BVDV-1d) 对犊牛致病力轻的特征, 需防范其流行于中国不同地域^[28-29]。BVDV 感染易感动物后通常会造成动物体内淋巴细胞的极速衰竭, 最终导致患病动物免疫力降低, 加重临床症状^[30]。22-Gansu-F3 毒株侵染犊牛后可引发肠道不同部位发生病理变化, 可见空肠淋巴细胞被诱导增强, 回肠淋巴细胞耗竭。鉴于病毒作为一种必须在活细胞中进行自我复制和快速进化的生物体^[31-32], BVDV 感染可影响宿主代谢网络的正常状态及补体系统的抗病毒状态等^[33], 最终



D 值:反映病毒编码序列与宿主在同义密码子使用模式上的相似度,数值越小,相似度越高。Capsid:衣壳;NS2:非结构蛋白 2;NS3:非结构蛋白 3;NS4A:非结构蛋白 4A;NS4B:非结构蛋白 4B;NS5A:非结构蛋白 5A;NS5B:非结构蛋白 5B;其余无中文名称。

图 5 分离毒株不同编码区对于不同宿主同义密码子使用模式的适应性

Fig.5 Adaptability of different coding regions of the isolated strains to the synonymous codon usage patterns of different hosts

导致种类繁多的 BVDV 基因亚型对宿主的致病性也呈现出多样性。

此外,对分离毒株进行遗传进化的相关性分析,有助于研究被新型 BVDV 感染的犊牛器官组织发生的病理变化以及引起的特异性免疫应答。22-Gansu-F3 毒株的基因组在密码子使用模式上显著抑制了多种同义密码子的选择使用,尤其是含有 CpG 二核苷酸的同义密码子。由于 CpG 和 UpA 二核苷酸能够在一定程度上刺激宿主的免疫反应,大多数感染哺乳动物和其他脊椎动物的 RNA 病毒对 UpA 和 CpG 二核苷酸有很大的抑制作用^[34-35]。此外,CpG 二核苷酸可以显著诱导干扰素(IFN)激活的抗病毒活性^[36-37]。22-Gansu-F3 毒株低频率选择含有 CpG 二核苷酸的同义密码子,从而抑制 IFN 激活的抗病毒作用。22-Gansu-F3 毒株除了在密码子使用模式上抑制一些同义密码子外,还依赖于具有特定密码子使用模式的 N^{pro} 和 NS4A 蛋白来成功

维持其在宿主中的复制。N^{pro} 蛋白作为一种独特的蛋白酶,其在 BVDV 生命周期中发挥着多种生物学活性,例如水解酶活性和拮抗干扰素的活性等^[38-39]。NS4A 可以作为 NS3 蛋白酶辅助因子、复制酶组分和病毒粒子成熟的辅助因子^[40]。同义密码子使用模式的特殊性对目标蛋白质在翻译、空间构象形成以及生物学活性方面均具有影响力^[41]。BVDV-2d 型 22-Gansu-F3 毒株 N^{pro} 和 NS4A 蛋白同义密码子使用模式表现出来的遗传特异性与其具有多种生物学功能是相关的。除此之外,虽然与 BVDV-2d 型 22-Gansu-F3 毒株 ORF 相比,P7 编码区具有明显不同的同义密码子使用模式,但 P7 编码区在核苷酸成分限制介导的突变选择压力主导下形成的同义密码子使用模式与病毒 ORF 的使用模式相似度较高。BVDV P7 蛋白在感染性病毒颗粒的形成中起着重要作用,并协助病毒有效释放^[42]。P7 区密码子的整体使用也可能在一定程度上受到 P7

蛋白生物学功能的影响。这种遗传特征可能反映了 P7 蛋白的整体密码子使用需要适应病毒多聚蛋白质的密码子使用。除了形成不同病毒蛋白质的密码子使用模式外,这些蛋白质对宿主的密码子使用适应程度也影响其在不同源性细胞中的翻译。值得注意的是,BVDV-2d 型 22-Gansu-F3 毒株蛋白对不同宿主表现出高度的密码子使用适应能力,表明该毒株具有在上述宿主细胞中正常翻译表达的潜在能力。已有研究结果表明,BVDV-2 毒株能够采用与 BVDV-1 相似的翻译动力学在猪源细胞中正常翻译表达,并且导致猪相关组织发生病变^[43-44]。虽然尚无 BVDV-2 感染骆驼的相关报道,但是 BVDV-1 能够在骆驼体内完成复制的研究已有报道^[45]。Qi 等^[46]指出 BVDV 不同毒株对宿主的感染范围已经从牛扩大到了包括羊、猪和骆驼在内的其他偶蹄类动物。研究人员也注意到,兔子能够作为 BVDV 的一种自然疫源性中间宿主来感染野外放养的牛群,只是兔子对于 BVDV 传播流行方面的作用目前还不是很强^[47]。小鼠已经能够作为一种 BVDV 试验感染模型来研究 BVDV 感染对宿主免疫系统抗病毒方面的分子机制^[48-49]。BVDV 在小鼠体内顺利增殖的生物学特性同时也为野外啮齿类动物感染或者携带 BVDV 进而感染野外散养牛群增加了潜在风险。鉴于 BVDV2d 型 22-Gansu-F3 毒株在本研究中涉及到不同宿主的同义密码子使用模式的良好适应性,有必要加强对其传播扩散的监测,从而降低 BVDV-2d 型 22-Gansu-F3 的传播流行对易感动物健康的影响。

4 结 论

在本研究中,从具有急性腹泻症状的犊牛肠道内容物中成功分离出 1 株细胞病变型的田间毒株 BVDV-2d 型 22-Gansu-F3。5'UTR 的系统发育树分析结果显示,BVDV-2d 型 22-Gansu-F3 为中国甘肃省首次发现的 BVDV-2d 基因亚型田间毒株。虽然 BVDV-2d 型 22-Gansu-F3 不是中国主要流行的 BVDV 毒株,但该毒株可导致牛急性腹泻症状,并对牛肠道不同部位造成不同程度的病理损伤。进一步分析该毒株基因组在同义密码子使用模式方面的遗传特性,发现 BVDV-2d 型 22-Gansu-F3 对不同种属宿主表现出良好的密码子使用模式上的适应性,这有助于今后深入研究 BVDV-2 亚型毒株在不同宿主

体内复制的相关机制。同时,本研究建议将 BVDV-2d 毒株在国内的传播流行纳入监测范畴,防止其成为国内优势流行毒株。

参考文献:

- [1] RIDPATH J F. BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control[J]. *Biologicals:Journal of the International Association of Biological Standardization*, 2003, 31(2): 127-131.
- [2] LANYON S R, HILL F I, REICHEL M P, et al. Bovine viral diarrhoea: pathogenesis and diagnosis[J]. *Veterinary Journal*, 2014, 199(2): 201-209.
- [3] ZHOU J H, GAO Z L, ZHANG J, et al. Comparative the codon usage between the three main viruses in pestivirus genus and their natural susceptible livestock[J]. *Virus Genes*, 2012, 44(3): 475-481.
- [4] DENG R, BROCK K V. Molecular cloning and nucleotide sequence of a pestivirus genome, noncytopathic bovine viral diarrhoea virus strain SD-1[J]. *Virology*, 1992, 191(2): 867-869.
- [5] BAUERMANN F V, RIDPATH J F. HoBi-like viruses-the typical 'atypical bovine pestivirus' [J]. *Animal Health Research Reviews*, 2015, 16(1): 64-69.
- [6] DENG M L, JI S K, FEI W T, et al. Prevalence study and genetic typing of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in four bovine species in China[J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0121718.
- [7] WANG H H, WANG M Z, FENG X L, et al. Genetic features of bovine viral diarrhoea virus subgenotype 1c in newborn calves at nucleotide and synonymous codon usages[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2022, 9: 984962.
- [8] ZHANG K, ZHANG J Y, QIU Z Y, et al. Prevalence characteristic of BVDV in some large scale dairy farms in Western China[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2022, 9: 961337.
- [9] ZHU J, WANG C, ZHANG L N, et al. Isolation of BVDV-1a, 1m, and 1v strains from diarrheal calf in china and identification of its genome sequence and cattle virulence[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2022, 9: 1008107.
- [10] YARNALL M J, THRUSFIELD M V. Engaging veterinarians and farmers in eradicating bovine viral diarrhoea: a systematic review of economic impact[J]. *The Veterinary Record*, 2017, 181(13): 347.
- [11] EVANS C A, PINIOR B, LARSKA M, et al. Global knowledge gaps in the prevention and control of bovine viral diarrhoea (BVD) virus[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2019, 66(2): 640-652.
- [12] MA X X, MA P, CHANG Q Y, et al. The analyses of relationships among nucleotide, synonymous codon and amino acid usages for E2 gene of bovine viral diarrhoea virus[J]. *Gene*, 2018, 660: 62-67.
- [13] WANG L N, WU X M, WANG C B, et al. Origin and transmission of bovine viral diarrhoea virus type 1 in China revealed by phyl-

- odynamic analysis[J]. Research in Veterinary Science, 2020, 128: 162-169.
- [14] ZHOU Y, REN Y, DAI G, et al. Genetic characterization and clinical characteristics of bovine viral diarrhea viruses in cattle herds of Heilongjiang province, China[J]. Iranian Journal of Veterinary Research, 2022, 23(1): 69-73.
- [15] CHANG L L, QI Y P, LIU D, et al. Molecular detection and genotyping of bovine viral diarrhea virus in Western China[J]. BMC Veterinary Research, 2021, 17(1): 66.
- [16] GAO M Y, YANG X Y, WU Y H, et al. Analysis for codon usage bias in membrane anchor of nonstructural protein 5A from BVDV[J]. Journal of Basic Microbiology, 2023, 63(10): 1106-1114.
- [17] MUCCELLINI C I, SILVA JÚNIOR J V J, DE OLIVEIRA P S B, et al. Novel genomic targets for proper subtyping of bovine viral diarrhea virus 1 (BVDV-1) and BVDV-2[J]. Virus Genes, 2023, 59(6): 836-844.
- [18] MUHSEN M, AOKI H, IKEDA H, et al. Biological properties of bovine viral diarrhea virus quasispecies detected in the RK13 cell line[J]. Archives of Virology, 2013, 158(4): 753-763.
- [19] SHARP P M, LI W H. Codon usage in regulatory genes in *Escherichia coli* does not reflect selection for rare codons[J]. Nucleic Acids Research, 1986, 14(19): 7737-7749.
- [20] GUSTAFSSON C, GOVINDARAJAN S, MINSHULL J. Codon bias and heterologous protein expression[J]. Trends in Biotechnology, 2004, 22(7): 346-353.
- [21] WRIGHT F. The 'effective number of codons' used in a gene[J]. Gene, 1990, 87(1): 23-29.
- [22] ZHOU J H, ZHANG J Z, SUN D J, et al. The distribution of synonymous codon choice in the translation initiation region of dengue virus[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e77239.
- [23] NAKAMURA Y, GOJOBORI T, IKEMURA T. Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(1): 292.
- [24] DIAO N C, GONG Q L, LI J M, et al. Prevalence of bovine viral diarrhea virus (BVDV) in yaks between 1987 and 2019 in mainland China: a systematic review and meta-analysis[J]. Microbial Pathogenesis, 2020, 144: 104185.
- [25] SHAH P T, NAWAL BAHOUSSI A, AHMAD A, et al. Bovine viral diarrhea virus in China: a comparative genomic and phylogenetic analysis with complete genome sequences[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2022, 9: 992678.
- [26] YESILBAG K, ALPAY G, BECHER P. Variability and global distribution of subgenotypes of bovine viral diarrhea virus[J]. Viruses, 2017, 9(6): 128.
- [27] WANG W, SHI X C, CHEN C Y, et al. Genetic characterization of a noncytopathic bovine viral diarrhea virus 2b isolated from cattle in China[J]. Virus Genes, 2014, 49(2): 339-341.
- [28] ZHANG S Q, TAN B, DING Y L, et al. Complete genome sequence and pathogenesis of bovine viral diarrhea virus JL-1 isolate from cattle in China[J]. Virology Journal, 2014, 11: 67.
- [29] BIANCHI M V, KONRADT G, DE SOUZA S O, et al. Natural outbreak of BVDV-1d-induced mucosal disease lacking intestinal lesions[J]. Veterinary Pathology, 2017, 54(2): 242-248.
- [30] KELLING C L, STEFFEN D J, COOPER V L, et al. Effect of infection with bovine viral diarrhea virus alone, bovine rotavirus alone, or concurrent infection with both on enteric disease in gnotobiotic neonatal calves[J]. American Journal of Veterinary Research, 2002, 63(8): 1179-1186.
- [31] KOONIN E V, DOLJA V V, KRUPOVIC M. The logic of virus evolution[J]. Cell Host & Microbe, 2022, 30(7): 917-929.
- [32] SANJUÁN R, DOMINGO-CALAP P. Mechanisms of viral mutation[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2016, 73(23): 4433-4448.
- [33] LIU C, LIU Y H, LIANG L, et al. RNA-Seq based transcriptome analysis during bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection[J]. BMC Genomics, 2019, 20(1): 774.
- [34] ATKINSON N J, WITTEVELDT J, EVANS D J, et al. The influence of CpG and UpA dinucleotide frequencies on RNA virus replication and characterization of the innate cellular pathways underlying virus attenuation and enhanced replication[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(7): 4527-4545.
- [35] FROS J J, DIETRICH I, ALSHAIKHAHAMED K, et al. CpG and UpA dinucleotides in both coding and non-coding regions of echovirus 7 inhibit replication initiation post-entry[J]. eLife, 2017, 6: e29112.
- [36] MAGNUSSON M, MAGNUSSON S, VALLIN H, et al. Importance of CpG dinucleotides in activation of natural IFN- α -producing cells by a lupus-related oligodeoxynucleotide[J]. Scandinavian Journal of Immunology, 2001, 54(6): 543-550.
- [37] UCCELLINI M B, BUSCONI L, GREEN N M, et al. Autoreactive B cells discriminate CpG-rich and CpG-poor DNA and this response is modulated by IFN- α [J]. Journal of Immunology, 2008, 181(9): 5875-5884.
- [38] CHI S S, CHEN S, JIA W J, et al. Non-structural proteins of bovine viral diarrhea virus[J]. Virus Genes, 2022, 58(6): 491-500.
- [39] TAO J, LIAO J H, WANG J Y, et al. Pig BVDV-2 non-structural protein (Npro) links to cellular antiviral response *in vitro*[J]. Virus Genes, 2017, 53(2): 233-239.
- [40] FELLEBERG J, DUBRAU D, ISKEN O, et al. Packaging defects in pestiviral NS4A can be compensated by mutations in NS2 and NS3[J]. Journal of Virology, 2023, 97(9): e0057223.
- [41] ZHOU M, GUO J H, CHA J, et al. Non-optimal codon usage affects expression, structure and function of clock protein FRQ[J]. Nature, 2013, 495(7439): 111-115.
- [42] OESTRINGER B P, BOLIVAR J H, CLARIDGE J K, et al. Hepatitis C virus sequence divergence preserves p7 viroporin structural and dynamic features[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 8383.
- [43] XU X R, ZHANG Q C, YU X L, et al. Sequencing and comparative analysis of a pig bovine viral diarrhea virus genome[J]. Virus Research, 2006, 122(1/2): 164-170.

- [44] TAO J, WANG Y, WANG J, et al. Identification and genetic characterization of new bovine viral diarrhea virus genotype 2 strains in pigs isolated in China[J]. *Virus Genes*, 2013, 46(1): 81-87.
- [45] GAO S D, LUO J H, DU J Z, et al. Serological and molecular evidence for natural infection of Bactrian camels with multiple sub-genotypes of bovine viral diarrhea virus in Western China[J]. *Veterinary Microbiology*, 2013, 163(1/2): 172-176.
- [46] QI S H, WO L J, SUN C, et al. Host cell receptors implicated in the cellular tropism of BVDV[J]. *Viruses*, 2022, 14(10): 2302.
- [47] GRANT D M, DAGLEISH M P, BACHOFEN C, et al. Assessment of the rabbit as a wildlife reservoir of bovine viral diarrhea virus; serological analysis and generation of trans-placentally infected offspring[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 1000.
- [48] LIU Y, WU C H, CHEN N N, et al. PD-1 Blockade restores the proliferation of peripheral blood lymphocyte and inhibits lymphocyte apoptosis in a balb/c mouse model of CP BVDV acute infection[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 727254.
- [49] CHEN N N, JIANG D J, SHAO B H, et al. Anti-BVDV activity of traditional chinese medicine monomers targeting NS5B (RNA-dependent RNA polymerase) *in vitro* and *in vivo* [J]. *Molecules*, 2023, 28(8): 3413.

(责任编辑:陈海霞)