

兔出血症病毒(RHDV)WHNRH 株的分离鉴定 及基因组全序列的测定与分析

李建文¹, 王红宁^{1,2*}, 田 浪¹, 黄 勇¹, 张夏兰¹

(¹ 四川农业大学动物科技学院 动物预防医学生物工程实验室 雅安 625014)

(² 四川大学“985 工程”西南资源环境与灾害防治科技创新平台 成都 610065)

摘 要: 从发病长毛兔中分离鉴定了兔病毒性出血症病毒 WHNRH 株。参考 GenBank 中已登录的 RHDV 毒株序列对 RHDV WHNRH 分离株进行了全基因组序列测定与分析。设计 5 对扩增区段相互重叠的 RHDV 特异性引物, 扩增除 5' 和 3' 末端以外的序列, 采用设计锚引物的 5' RACE 方法以及针对 RHDV 3' 末端的 polyA 结构设计引物获得了 RHDV WHNRH 株的 5' 和 3' 末端序列。胶回收各 PCR 产物, 连接 pMD 18-T 克隆载体, 测得 RHDV WHNRH 分离株的基因组全长为 7437n(不包括 polyA), 与 GenBank 公布的全部共 6 株 RHDV 全基因序列进行同源性比较分析, 同源性在 89.0% ~ 97.1% 之间, ORF1 同源性为 89.0% ~ 97.1%, 编码氨基酸序列的同源性为 95.2% ~ 98.7%; ORF2 的核苷酸序列同源性为 92.1% ~ 97.7%, 编码氨基酸序列的同源性为 94.1% ~ 96.6%。

关键词: 分离鉴定; 兔出血症病毒; 全基因组测序; WHNRH

中图分类号: S85 文献标识码: A 文章编号: D001-6209(2006)05-0720-06

兔病毒性出血症(Viral haemorrhagic disease of rabbits, VHD), 又名兔瘟, 是由兔出血症病毒(Rabbithemorrhagic disease virus, RHDV)引起的一种高度接触传染性、急性、致死性传染病。该病自 1984 年春于我国江苏无锡、江阴等地首先暴发^[1], 然后迅速流行蔓延到世界各地^[2,3]。RHDV 为单股正义 RNA^[4]病毒, 国际病毒分类委员会于 2000 年将其确定为新成立的杯状病毒科兔病毒属的代表种。自兔病毒性出血症从我国首次爆发的 20 多年来, 我国迄今还没有 RHDV 全基因组序列测定的详细报道, 本研究在分离鉴定 RHDV 的基础上, 采用 RT-PCR 方法对分离到的病毒进行部分重叠的分段克隆, 得到涵盖 RHDV 的全基因组的重组质粒, 并对其序列进行测定和拼接, 得到其全基因组序列, 弥补我国 RHDV 的基因组数据及分子流行病学研究方面的不足。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒毒株和菌株等 病料为四川雅安某长毛兔场的病死兔, 以青年和成年兔为主, 发病率 20%, 死亡率 80%, 可能与兔场的免疫不齐有关。临床表

现为精神委顿, 呼吸急促, 死前有哀鸣、兴奋、挣扎等神经症状, 偶见鼻孔出血, 一般在出现症状后 6 ~ 8h 内死亡, 用抗生素治疗无效, 病死兔角弓反张, 剖解可见气管环出血, 肝出血且质脆, 脾出血肿大, 肺出血, 肾出血, 无菌采集未经抗生素治疗的病死兔的心、肝、脾、肺、肾、淋巴结经涂片及细菌培养检验均为阴性, 怀疑为兔病毒性出血症。人“O”红细胞由雅安市血站提供, 兔出血症高免血清(HI $\geq$ 1:1280)由扬州大学畜牧兽医教研室惠赠, 健康成年家兔(RHDV 抗体阴性)由本校实验动物饲养中心提供。大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109 工程菌株由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器: 反转录酶 AMV, dNTP, pMD18-T 克隆载体, T4 RNA 连接酶, RNasin, DNA Ligation Kit Ver. 2 及 DNA 胶回收试剂盒购自大连 TaKaRa 公司; Taq plus DNA 聚合酶, X-gal, IPTG 和 Marker VII 购自博瑞克生物技术公司; Viral RNA/DNA Mini Kit 购自上海华舜生物工程公司; 琼脂糖和 Gold view 核酸染料购自赛百胜公司, 其它试剂均为国产分析纯级产品。TGL-16B 台式高速离心机为湘仪离心仪器有限公司产品; PCR 仪为德国 BIOMETRA 产品; 电泳槽和凝胶成像系统为 BIO-RAD 公司产品;

* 通讯作者。Tel 86-835-2886083; E-mail: whongning@163.com

作者简介: 李建文(1976 -) 男, 四川乐山人, 博士研究生, 主要从事动物营养和畜禽传染病研究。E-mail: ljianwen258@yahoo.com.cn

收稿日期: 2005-11-23; 接受日期: 2006-02-13; 修回日期: 2006-04-03

超净工作台为浙江安泰公司产品,微量加样器购自 Eppendorf 公司,Eppendorf 管,PCR 管及 tip 头等耗材均购自成都天泰公司。

1.2 病料处理和病毒分离

无菌采集、称量病死兔肝组织,研磨,用 pH 7.2 的 PBS 液配成 1:4(W:V)悬液,-20℃反复冻融 3 次,经 4000r/min 离心 30min,取上清液,经 220nm 微孔滤膜过滤后作为待检样品液,于-80℃保存。取待检样品液接种 3 只敏感成年家兔,每只肌肉注射 2mL,同时设健康兔肝悬液及生理盐水阴性对照,取发病死亡兔的肝脏涂片及细菌检验为阴性,经处理后,再传 3 代,兔发病及死亡情况呈稳定的规律性,取第 4 代死亡的兔肝脏按上述方法处理为粗提病毒液,作实验材料,于-80℃保存。

1.3 病毒鉴定

1.3.1 血凝(HA)和血凝抑制(HI)试验:取粗提病毒液,按常规方法进行 HA 和 HI 试验^[5]。

1.3.2 琼脂扩散(AGP)试验:取粗提病毒液,按文献[6]的方法进行。

1.3.3 电镜检测:取冻存的粗提病毒液,参考盛祖恬等^[7]的方法纯化病毒,用 2% 磷钨酸(PTA)负染,

电镜观察。

1.3.4 RT-PCR 鉴定:参考 GenBank 中登录的 RHDV 全序列,采用 DNASTAR 的 megalign 程序进行序列比对,找到序列保守区设计特异性引物,上游引物:5'-GTGATGATTAGAGCCCCCT-3';下游引物:5'-GTATTACTACGATCACATCAATTACA-3',预期扩增片段长度为 1302bp,按常规 RT-PCR 程序进行扩增,琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 结果。将符合预期长度的 PCR 产物经 T 载体克隆后送大连宝生物工程有限公司测序。

1.4 RHDV 的基因组全长序列测定

1.4.1 基因组内侧序列的引物设计:参考 GenBank 中已登录的 RHDV 全基因组序列(V351(U549831) \ SI(U29514) \ FRQ(NC001543) \ Iowa2000(AF258618) \ BS89(X87607)及 CI(AY523410))采用 DNASTAR 的 megalign 程序对这些序列进行比对,找到 RHDV 的保守区,在相对比较保守的区段采用 Primer Premier5.0 软件设计 5 对引物(表 1,不包括获取基因组 5'和 3'末端引物),扩增片段之间部分重叠,连接后可以覆盖除基因组末端序列之外的全基因组。引物由大连 TaRaKa 公司合成。

表 1 RHDV 全基因组非末端扩增引物

Table 1 The non-terminal primers used for amplification of RHDV genomic RNA			
Forward prime(5'~3')	Reverse prime(5'~3')	Position	Expected product size/bp
P11 :GACAAATGTGGCAAATGGCTT	P12 :CGTATTGGGCGTCTGGGTAG	190 ~ 2206	2017
P21 :GACAAGTTGGTGAAGTCTCAGGT	P22 :AGTGTTTCTTGATGCCATAGGT	2065 ~ 3578	1514
P31 :ATGCTCACCCTACTGACCTCT	P32 :TCATCGGAGTCATGGCATAAC	3447 ~ 4852	1406
P41 :CCCTTCACTTCGGTCATCAACTC	P42 :AACTGGGTCGTGAGGAGGC	4693 ~ 6045	1353
P51 :GTGATGATTAGAGCCCCCT	P52 :GTATTACTACGATCACATCAATTACA	5974 ~ 7275	1302

1.4.2 基因组内侧序列的 RT-PCR:按两步法进行常规 RT-PCR 反应。RT 引物采用 Oligo dT-Adaptor Primer,按 AMV 反转录酶使用说明进行 RT 反应,产物于-20℃冻存储备用;PCR 反应体系参考 Taq plus DNA 聚合酶的产品使用说明,反应程序按常规 PCR 程序进行,因引物不同对延伸时间和退火温度进行调整。

1.4.3 基因组 5'末端序列的获取(RACE):按引物设计一般原则先设计一条随机锚引物,再根据锚引物设计其最佳配对引物,5'RACE 下游引物针对基因组 5'端 300bp 左右处的保守序列进行设计。5'RACE 的锚引物 Anchor:5'-CCTGACGCATCCAGAATCGGAGGTGAAG-3'(5'端磷酸化);与锚引物配对的上游引物 5R1:5'-CACAGGCAAGCAGGTCCAAAC-3',5'-RACE下游引物 5R2:5'-ACCTCCGATTCTGGATGC

GT-3',5'RACE RT 引物:5'-GAAGTCTTTCCTGTCCGCG-3',PCR 产物长度为 330bp。按常规方法进行 RT 反应。取 RT 产物 20μL,5×RNase Buffer 15μL,ddH₂O 40μL,RNase 1μL,30℃反应 1h。在上述反应液中加入 100μL TE,500μL 无水乙醇,均匀混合后在-80℃放置 15min 进行乙醇沉淀,12000r/min 离心 10min,去上清,加入 500μL 70%的乙醇,12000r/min 离心 5min,去上清,沉淀干燥。向干燥后的乙醇沉淀物(单链 cDNA)中加入 10×T4 RNA 连接酶缓冲液 4μL,锚引物(60μmol/L)6μL,ddH₂O 9μL 的混合液溶解 cDNA,加入 1μL T4 RNA 连接酶、20μL 40% PEG 6000 均匀混合。16℃反应 18h。按常规方法进行 PCR 反应。

1.4.4 基因组 3'末端序列(不含 polyA)的获取:针对 RHDV 3'端的 polyA 结构,设计 3'端上游引物

R31 :5'-AGGCTTTGGAGAATGGGTTGGTT-3',下游引物 R32 5'-CGAGGTGCGGTTTTTTTTTTTTT-3',RT 引物采用 Oligo dT-Adaptor Primer,PCR 产物长度为 330bp,按两步法进行常规 RT-PCR。RT 和 PCR 反应体系同上。

1.4.5 PCR 产物的回收和 T 载体克隆子的构建 按胶回收 PCR 产物,采用 DNA 连接试剂盒将 PCR 产物与 pMD 18-T 克隆载体连接,通过 PCR 方法鉴定筛选出阳性克隆子。

1.4.6 序列测定与分析 将各片段的阳性克隆送大连 TaKaRa 公司测序。采用 DNASTAR 的 megalign 程序对各片段的测序结果进行拼接,并将该结果与国际基因库(GenBank)中已登录的全部 6 株 RHDV 全基因组序列 V351(U549831) SD(Z29514) FRG(NC 001543) Iowa2000(AF258618) BS89(X87607)及 CD(AY523410)株序列进行同源性比较分析。为避免 *Taq* 酶可能出现的碱基掺入错误,确保全基因序列的真实性和正确性,本研究采用了保真度高的 *Taq* plus DNA 聚合酶进行扩增,每个测序片段选 3 个阳性克隆进行序列测定,综合多次测序结果获得各片段的序列。

2 结果

2.1 RHDV 的分离鉴定

2.1.1 敏感兔接种实验 试验兔于接种后 16~36h 全部死亡,症状如前所述,对照兔全部存活,症状与兔病毒性出血症相符。

2.1.2 HA 和 HI 试验 HA 试验测得粗提病毒液的血凝效价为 1:1024,该样品液能够凝集人的“O”型红细胞,该血凝特性能被兔病毒性出血症高免血清特异性的抑制,初步判断该样品液中含有兔病毒性出血症病毒。

2.1.3 琼脂扩散(AGP)试验 采用琼脂扩散试验可见明显的沉淀线。

2.1.4 电镜观察 电镜下可见 40nm 左右的病毒粒子(图 1),存在形态完整的实心粒子和病毒空壳,基本判定已经分离到兔病毒性出血症病毒。

2.1.5 RT-PCR 扩增结果 RT-PCR 扩增出约 1300bp 的条带,与预期片段大小相符(该片段即全基因组测序的 P5,图略),将该 PCR 产物克隆测序,并与 GenBank 登录的 RHDV 序列进行同源性分析,同源性可达 91.5%~97.2%,可判定本研究分离到 RHDV,命名为 WHNRH 株。

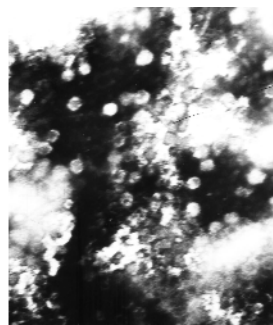


图 1 纯化病毒负染电镜图片(120000×)

Fig.1 The electron microscope photo of negative-staining purified RHDV (120000×).

2.2 全基因组 RT-PCR 扩增结果

2.2.1 基因组内侧片段 RT-PCR 扩增结果 内侧片段各段扩增产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳结果见图 2 5 个 PCR 扩增产物均与预期片段大小相符,分别为约 2000bp、1500bp、1400bp、1350bp 和 1300bp。

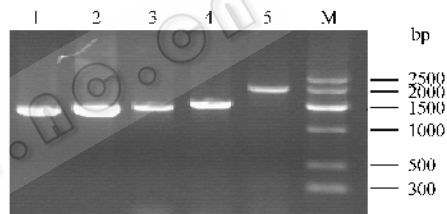


图 2 基因组内侧片段的 RT-PCR 结果

Fig.2 RT-PCR result of inside fragments of the genome. 1. P1; 2. P2; 3. P3; 4. P4; 5. P5; M. Marker VII.

2.2.2 基因组 5'和 3'末端的获取结果 5'和 3'末端扩增产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析表明,均扩增出了与预期 330bp 的片段大小相符的电泳条带。

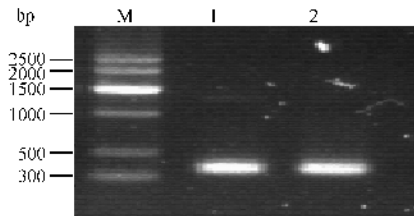


图 3 基因组 5'和 3'末端的 RT-PCR 结果

Fig.3 RT-PCR result of the 5'and 3'terminus of the genome. M. Marker VII; 1. The amplified product of 5'terminus 2. The amplified product of 3'terminus.

2.2.3 基因组测序结果及序列分析 RHDV WHNRH 的全基因组序列已经提交国际基因库(GenBank),序列登录号为 DQ280493。RHDV WHNRH 株的全基因组为 7437bp,与 GenBank 公布的全部共 6 株 RHDV 全基因组序列 V351(U549831) SD(Z29514) FRG(NC 001543) Iowa2000(AF258618) BS89(X87607)及 CD(AY523410)的基因组序列长度

相同,进行同源性比较分析,同源性在 89.0% ~ 97.1%之间。分子进化树分析表明(图 4),WHNRH 株与 CD 株和 Iowa2000 的亲源关系较近,按进化树分析可以归入一个亚群。其余 4 株均为欧洲分离株,可归入另一个亚群。由于目前 GenBank 中登录

的 RHDV 全基因组序列数量较少,作者对几乎所有已登录的 VP60 基因序列进行了进化树分析(图 5),结果发现 RHDV 按 VP60 的基因序列可以将目前世界上现有的 RHDV 大致分为 3 个大的亚群。

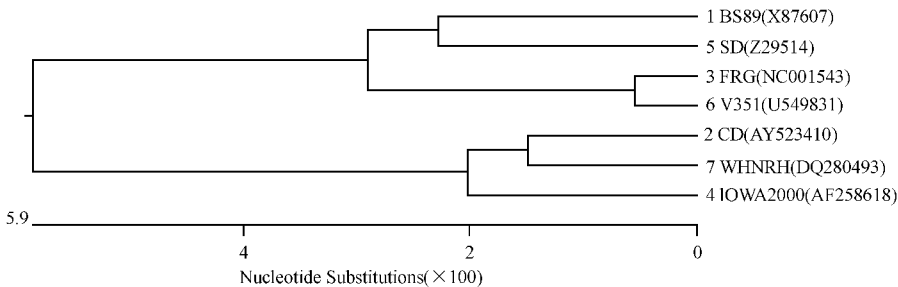


图 4 RHDV 全基因组分子进化树

Fig. 4 The phylogenetic tree of all full-sequenced RHDV strains.

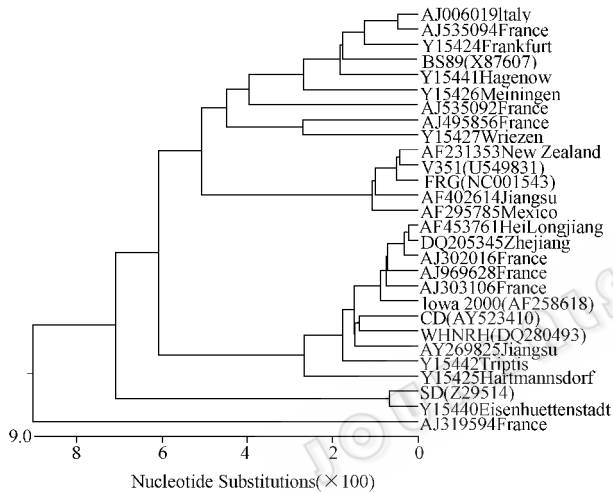


图 5 GenBank 登录的 VP60 基因的分子进化树

Fig.5 The phylogenetic tree of RHDV strains.

3 讨论

本研究成功分离了 RHDV WHNRH 株,并对其全基因组序列进行了测定。该序列是迄今登录 GenBank 的第七株 RHDV 全基因组序列,本研究丰富了 RHDV 的分子流行病学资料。

RHDV 的基因组含 7437 个核苷酸,基因组和亚基因组的 5'端与 VPg 共价结合,3'端为 polyA 结构^[8-11];基因组 RNA 含两个开放阅读框^[12],10 ~ 7044bp 为 ORF1,约占整个基因组的 94%,编码含 2344 个氨基酸的多聚蛋白,该蛋白通过病毒编码的 3C 样蛋白酶加工成成熟的病毒蛋白^[13-16];7025 ~ 7378bp 为 ORF2,与 ORF1 有 20 个核苷酸的重叠,但其阅读框架发生了 -1 个碱基的移码,编码由 177 个氨基酸组成的小结构蛋白 VP10^[12]。1 ~ 9bp 和

7378 ~ 7437bp 分别为 RHDV 基因组的 5'和 3'端非编码区(NTR);RHDV 还含有 2.2kb 的亚基因组^[8,9]。RHDV ORF1 编码多聚蛋白的顺序为 :NH-p16-p23-2C 解旋酶-p30-VPg-3C 样蛋白酶-3D RNA 依赖的 RNA 聚合酶-衣壳蛋白 VP60-COOH,然后由 3C 蛋白酶进行翻译后的加工^[13]。VP60 与诱导抗病毒感染的免疫反应直接相关,可通过对基因组 RNA 编码多聚蛋白前体的加工或对亚基因组的翻译来实现^[9,15],后者是构成成熟病毒粒子结构蛋白的主要途径^[12]。VPg 蛋白是 RHDV 的 RNA 聚合酶合成正股 RNA 时的起始引物^[17]。ORF2 编码小结构蛋白 VP10,可能在基因组 RNA 的包装中发挥作用^[18]。

与已经报道的 RHDV 全基因组序列相同,WHNRH 株的不包括 polyA 的基因组全长 7437bp。在 RHD 爆发以前 RHDV 以无致病性的形式在兔体内存在了数百年^[19],结合序列分析的结果可发现 RHDV 的基因组序列进化上比较保守,可能所有编码蛋白均为病毒存活所必需,基因组任何较大的变异均为无效变异,作者发现 ORF1 的氨基酸序列同源性(其中的 P16 除外)均大大高于相应核苷酸序列的同源性,暗示突变主要发生在密码子的摆动位点上。通过对 ORF 编码氨基酸序列的分析表明,WHNRH 株的 ORF1 编码的 10 个氨基酸与其它毒株完全不同;ORF2 存在 2 个氨基酸的不同,表明 WHNRH 株自身也在缓慢进化。参考前人的研究结果^[20]将 WHNRH 株与其它 GenBank 中的 RHDV 全基因组序列分段进行序列比对表明,对 ORF1 编码多聚蛋白进行加工的 3C 样蛋白酶的氨基酸序列保守性最高,其次是 3D RNA 依赖的 RNA 聚合酶和 2C

解旋酶,这可能与其重要的功能有关;1~9bp和7378~7437bp分别为RHDV基因组的5'和3'端非编码区(NTR),5'非编码区仅CD(AY523410)株的第7位由G突变成A;3'端非编码区核酸同源性为93.2%~96.6%。除BS89(X87607)株的718位为Asp外所有RHDV毒株在3C蛋白酶切割多聚蛋白的4个EG二肽键位点^[18]均未发生变异;作者还发现多聚蛋白在相同的位点大多突变成相同的氨基酸,可能也暗示RHDV对变异的耐受范围非常窄。

作者对几乎所有已登录的VP60基因序列进行了进化树分析的结果表明,国内的RHDV主要位于3个亚群的其中2个亚群,几乎所有的亚群在欧洲都存在,这可能与RHDV的非致病形式最初存在于欧洲有关^[19],虽然RHDV在进化上比较保守,但仍处于缓慢进化中。虽然依据衣壳蛋白VP60的基因序列可以大致对RHDV进行分群,不过目前的研究表明RHDV的血清型比较单一,有人对分离自健康和典型病死兔的RHDV的衣壳蛋白部分序列进行比较,没有发现二者存在显著差异^[19]。迄今还没有RHDV毒力基因的相关研究报道,不过有报道从意大利商品兔中分离到一株非致病性的RHDV的变种(Rabbit calicivirus,RCV),该病毒可诱导免疫反应,抵御致病性RHDV的攻击^[21],这为今后RHDV毒力基因的研究提供了一条途径。WHNRH株全基因组序列的测定为今后RHDV全长cDNA克隆的构建以及从分子水平研究致病机制等方面的研究奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] 刘胜江,薛华平,浦伯清等.兔的一种新病毒病-兔病毒性出血症.畜牧与兽医,1984,16(6):253-255.
- [2] Nowotny N,Bascunana CR,Ballagi-Pordany A, et al. Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease and European brown hare syndrome viruses by comparison of sequences from the capsid protein gene. Archives of Virology, 1997, 142(4):657-673.
- [3] Ohlinger VF, Haas B, Meyers G, et al. Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease. Journal of Virology, 1990, 64(7):3331-3336.
- [4] Cubbitt D,Bradley DW,Carter MJ, et al. Family Caliciviridae. Archives of Virology, 1995, 140(Suppl.):359-363.
- [5] 林治涌.兔瘟血凝及血凝抑制试验操作方法.畜牧兽医杂志, 1995, 14(2):53-55.
- [6] 罗满林.应用琼脂扩散法诊断兔瘟.动物检疫,1989,1:7-8.
- [7] 盛祖恬,周明龙.兔出血症病毒提纯和多肽的比较研究.畜牧兽医学报,1994,25(4):380-383.

- [8] Meyers G, Wirblich C, Thiel HJ. Rabbit hemorrhagic disease virus. Molecular cloning and nucleotide sequencing of a calicivirus genome. Virology, 1991, 184(2):664-676.
- [9] Meyers G, Wirblich C, Thiel HJ. Genomic and subgenomic RNAs of rabbit hemorrhagic disease virus are both protein-linked and packaged into particles. Virology, 1991, 184(2):677-689.
- [10] Boga JA, Casais R, Marin MS, et al. Molecular cloning, sequencing and expression in Escherichia coli of the capsid protein gene from rabbit haemorrhagic disease virus (Spanish isolate AST). Journal of General Virology, 1994, 75:2409-2413.
- [11] Rasschaert D, Huguet S, Madelaine MF, et al. Sequence and genomic organization of a rabbit hemorrhagic disease virus isolated from a wild rabbit. Virus Genes, 1995, 9(2):121-132.
- [12] Wirblich C, Thiel HJ, Meyers G. Genetic map of the calicivirus rabbit hemorrhagic disease virus as deduced from in vitro translation studies. Journal of Virology, 1996, 70(11):7974-7983.
- [13] Alonso JM, Casais R, Boga JA, et al. Processing of rabbit hemorrhagic disease virus polypeptide. Journal of Virology, 1996, 70(2):1261-1265.
- [14] Boniotti B, Wirblich C, Sibilia M, et al. Identification and characterization of a 3C-like protease from rabbit hemorrhagic disease virus, a calicivirus. Journal of Virology, 1994, 68(10):6487-6495.
- [15] Parra F, Boga AJ, Marin MS, et al. The amino terminal sequence of VP60 from rabbit hemorrhagic diseases virus supports its putative subgenomic origin. Virus Research, 1993, 27:219-228.
- [16] Wirblich C, Sibilia M, Broniotti ME, et al. 3C-Like Protease of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus: Identification of cleavage sites in the ORF1 polypeptide and analysis of cleavage specificity. Journal of Virology, 1995, 69(11):7159-7168.
- [17] Thumfart JO, Meyers G. Rabbit Hemorrhagic Disease Virus: Identification of a cleavage site in the viral polypeptide that is not processed by the known calicivirus protease. Virology, 2002, 304:352-363.
- [18] Joubert P, Pautigny C, Madelaine MF, et al. Identification of a new cleavage site of the 3C-like protease of rabbit haemorrhagic disease virus. Journal of General Virology, 2000, 81:481-488.
- [19] Moss SR, Turner SL, Trout RC, et al. Molecular epidemiology of Rabbit haemorrhagic disease virus. Journal of General Virology, 2002, 83:2461-2467.
- [20] Meyers G, Wirblich C, Thiel HJ, et al. Rabbit hemorrhagic disease virus: Genome organization and polypeptide processing of a calicivirus studied after transient expression of cDNA constructs. Virology, 2000, 276(2):349-363.
- [21] Capucci L, Fusi P, Lavazza A. Detection and preliminary characterization of a new rabbit calicivirus related to rabbit hemorrhagic disease virus but nonpathogenic. Journal of Virology, 1996, 70(12):8614-8623.

Isolation ,identification and genome sequenceing of a Rabbit hemorrhagic disease virus strain WHNRH

LI Jian-wen¹ ,WANG Hong-ning^{1 2*} ,TIAN Lang¹ ,HUANG Yong¹ ,ZHANG Xia-lan¹

(¹ Bioengineering Laboratory of Animal Preventive Medicine , College of Animal Science and Technology ,Sichuan Agricultural University , Ya 'an 625014 , China)

(² 985 Project " Innovation Platform of the Southwest Resources ,Environments and Disasters Prevention of Sichuan University ,Chengdu 610065 ,China)

Abstract :The rabbit hemorrhagic disease virus(RHDV) is a single-stranded positive-sense RNA virus of the family Caliciviridae with a high morbidity and mortality rates of about 90% in adult rabbits. A strain of rabbit hemorrhagic disease virus named WHNRH was isolated and identified in the research. The genome of WHNRH was then sequenced. Primers were designed referring to the genome sequences of RHDV published in GenBank and a RACE was applied to get the 5' terminus sequences. The other terminus sequences of WHNRH was acquired referring to the genome's polyA structure of RHDV. The genome was amplified with RT-PCR. All the RT-PCR products were cloned into the pMD18-T vector and sequenced. The sequencing result indicated that the complete genome of RHDV isolated strain WHNRH was composed of 7437nt (not including polyA of 3' terminus) , the identities were between 89.4% and 97.1% compared with the published genome sequences of six RHDV strains. The ORF1 of the genome of WHNRH was between 10nt and 7044nt and a polypeptide with 2344 amino acids was coded ,the identities of nucleotide and amino acids sequences were 89.1% ~ 96.1% and 96.0% ~ 98.4% respectively compared with the six published RHDV strains. The ORF2 of the genome of WHNRH was between 7025nt and 7378nt and a polypeptide with 177 amino acids was coded , the identities of nucleotide and amino acids sequences were all between 92.1% and 96.9% compared with the six published RHDV strains.

Keywords : Isolation and identification ,Rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) ;WHNRH ;Genome sequencing

* Corresponding author. Tel 86-835-2886083 ; E-mail : whongning@163.com

Received 23 November 2005/Accepted :13 February 2006/Revised 3 April 2006