

寇美玲, 孟锦昕, 苗海生, 等. 中国帕利亚姆血清群中山病毒的分离及全基因组序列分析 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (7): 65-71.

KOU M L, MENG J X, MIAO H S, et al. Isolation and complete genome characterization of Chuzan virus from Palyam serogroup in China [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (7): 65-71.

中国帕利亚姆血清群中山病毒的分离及全基因组序列分析

寇美玲, 孟锦昕, 苗海生, 李乐, 谢佳芮, 高林,
廖德芳, 李华春*, 宋建领*

(云南省畜牧兽医科学院云南省热带亚热带动物病毒病重点实验室, 云南 昆明 650224)

摘要: 旨在获取中国帕利亚姆血清群中山病毒 (Chuzan virus, CHUV) 毒株的全基因组序列并分析其遗传特征。应用 BHK-21、Vero、MDBK 细胞对云南省江城县采集的 152 份健康黄牛血液样品盲传分离病毒, 针对出现细胞病变样品, 采用 CHUV VP7 蛋白基因片段进行 RT-PCR 扩增和测序, 并对阳性样品进行全长扩增及高通量测序, 获得的全基因组序列进行遗传进化分析。结果: 1 份血液样品可致 BHK 21、Vero、MDBK 细胞病变; 病毒基因组为 10 节段的“3-3-3-1”带型; 病毒基因全长 18 914 bp, 各基因节段长度在 728 bp (Seg-10) ~3 930 bp (Seg-1) 之间, 编码 6 072 个氨基酸残基, 编码蛋白在 211 (NS3 蛋白) ~1 295 (VP1 蛋白) 个氨基酸残基之间; 通过对保守基因 Seg-1、Seg-3、Seg-7 的核苷酸系统发育分析, 显示与中国本土 CHUV 亲缘关系最近, 为 98.17%~99.65%, 形成一簇; 变异基因 Seg-2 的核苷酸序列同样与中国本土 CHUV 毒株相似度最近, 为 98.76%~99.57%。本研究表明中国 CHUV 毒株的 Seg-1、Seg-3 和 Seg-7 形成了独特的地域型, 为深入揭示我国 CHUV 的致病性和病原学特征提供了基础数据。

关键词: 中山病毒; 分离; 全基因组测序; 序列分析; 帕利亚姆血清群病毒

中图分类号: S855.3 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)07-0065-07

Isolation and complete genome characterization of Chuzan virus from Palyam serogroup in China

KOU Meiling, MENG Jinxin, MIAO Haisheng, LI Le, XIE Jiarui, GAO Lin,
LIAO Defang, LI Huachun*, SONG Jianling*

(Yunnan Tropical and Subtropical Animal Virus Disease Laboratory, Yunnan Animal Science and Veterinary Institute, Kunming 650224, China)

Abstract: The aims of the present study were to obtain the complete genome sequence of a Chuzan virus (CHUV) strain isolated from Palyam serogroup and to analyze its genetic characteristics. BHK21, Vero, MDBK cells were used to isolate virus from the blood samples of healthy cattle collected in Jiangcheng county, Yunnan Province. Then, RT-PCR amplification and sequencing of CHUV VP7 protein gene fragments were performed on the samples with cellular lesions. Next, full-length amplification and Next Generation Sequencing (NGS) were performed on the positive samples, and the whole genome sequence obtained was analyzed for genetic evolution. Finally, a full-length complementary-DNA copy of the genome was amplified and sequenced. The results showed that one sample of CPE were found in BHK 21, Vero and MDBK cells. Agarose-gel electrophoresis indicated a genome consisting of 10 segments of double-stranded RNA molecules that demonstrated a 3-3-3-1 pattern. The size of the virus genome was 18 914 bp and consisted of 10 genes from 3 930 bp (Seg-1) to 728 bp (Seg-10) and encoded 6 072 amino acid residues, with a protein size ranging of Seg-1, Seg-3 and from 211 (NS3 protein) to 1 295 (VP1 protein) aminoacid residues. Phylogenetic analysis of Seg-7 showed that they were most closely related to CHUV in China (98.17%~99.65%), and formed a cluster of its own. The phylogenetic analysis of Seg-2 showed that the similarity of the Seg-2 strain to the CHUV strain in China was 98.76%~99.57%. The Seg-1, Seg-3 and Seg-7 of CHUV strains in China had formed unique geographic types. These results suggested that the CHUV strain was special in evolution. This study provided basic data for further research on the pathogenicity of

收稿日期: 2023-06-26; 修回日期: 2024-04-30

基金项目: 云南省热带亚热带动物病毒病重点实验室自主研究课题 (2022RW004); 公益性行业 (农业) 科研专项 (201303035)

第一作者: 寇美玲, 女, 硕士, 副研究员

* 通信作者: 李华春, 博士, 研究员, 研究方向为动物病毒学, E-mail: lihuachun@hotmail.com; 宋建领, 硕士, 研究员, 研究方向为动物病毒学, E-mail: jianlingsong@hotmail.com。

CHUV in our country and the technology for detection of its pathogens.

Keywords: Chuzan virus; isolation; complete genome sequencing; sequence analysis; Palyam serogroup virus

虫媒病毒涉及 14 个病毒科约 500 多种病毒，其中呼肠孤病毒科 (*Reoviridae*) 严重危害牛羊健康。中山病毒 (Chuzan virus, CHUV) 归类于呼肠孤病毒科环状病毒属 (*Orbivirus*) 帕利亚姆血清群病毒 (Palyam serogroup virus, PALV)。环状病毒属病毒呈全球分布，尤其在亚洲、欧洲、非洲等地区分布广泛^[1-2]。环状病毒属基因组均由 10 个节段双链 RNA 组成，大小 18~20 kb，可编码 VP1~VP7 结构蛋白及 NS1~NS3 非结构蛋白^[3]。Seg-1 编码的 VP1 蛋白在环状病毒属病毒中高度保守，用于新毒株的鉴定及作为检测方法建立的参考基因^[4]。VP3 与 VP7 蛋白共同构成内层衣壳，具有高度保守的特性，其中 VP7 蛋白免疫原性强，是鉴别病毒血清群的主要抗原位点^[5]。VP5 和 VP2 蛋白构成外层衣壳，其中病毒血清型由 VP2 决定，高度变异^[4]。

CHUV 因首次于日本中山镇发现，故命名为中山病毒，主要引起妊娠母牛流产、侵害犊牛中枢神经系统等症状^[6]，给牛、羊养殖业带来严重损失^[3,7]。2014 年我国首次从云南分离到 CHUV^[8]。本研究从黄牛血液中获得 1 株 CHUV 毒株，将其命名为 PE10848，通过全长扩增及高通量测序的方法，对全基因组序列进行分析，以期对 CHUV 的研究及诊断试剂开发等提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

金黄地鼠肾细胞 (BHK-21)、非洲绿猴肾细胞

(Vero)、牛肾细胞 (MDBK) 为本实验室保存；MEM 培养基购自 Gibco 公司；RNA 提取试剂盒、T4 RNA 连接酶、RNase 抑制酶、RNase H 酶、PrimeScript II 逆转录酶、DNA 胶回收试剂盒、PrimeSTAR GXL DNA 试剂盒均购自 TaKaRa 公司 (大连)；Monarch RNA Cleanup Kit 购自 NEB 公司 (美国)。

1.2 病毒分离

2017 年 5—10 月，采集江城县黄牛肝素钠抗凝血样品 152 份。取 100 μ L 血样于 1.5 mL 离心管中，加入 1 mL PBS，1 500 r/min 离心 10 min，弃去上清液，操作 2~3 次。取 900 μ L 无菌双蒸水于上述处理的血液样品中，涡旋混匀；取 100 μ L 处理血样接种 BHK-21、Vero 和 MDBK 这 3 种不同的细胞瓶 (25 cm³)，存放于 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱，病毒与细胞孵育 1 h 后取出，加入含 1% 血清的 MEM 维持液，再次存放于 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱，逐日观察细胞病变情况 (cytopathic effect, CPE)，盲传 3 代，收获病毒并冻存于 -80 $^{\circ}$ C 备用。

1.3 RNA 提取

取出冻存的病毒分离物，75 cm² 的细胞瓶中培养一代，收获培养物。参照 RNA 提取试剂盒说明从病毒液中提取获得总 RNA。

1.4 引物合成

参照 Maan 等^[9]报道的引物序列，引物由上海生物工程有限公司合成 (表 1)。

表 1 引物信息

引物名称	引物序列 (5'→3')	退火温度/ $^{\circ}$ C
Anchor primer	GACCTCTGAGGATTCTAAAC/iSp9/TCCAGTTAGAATCC	84
5-15-1	GAGGGATCCAGTTTGAATCCTCAGAGGTC	65.3

注：iSp9 为 C9 磷酸亚胺间隔子 (C9 phosphoramidite spacer)。

1.5 病毒基因组 dsRNA 的纯化

采用核糖核酸酶 S1 降解的方式获得高纯度的病毒基因组 dsRNA。方法如下：加入 90 μ L ddH₂O 溶解核酸，10 μ L 核糖核酸酶 S1 buffer 和 2 μ L 核糖核酸酶 S1 (180 U/ μ L)，37 $^{\circ}$ C 保温 30 min，纯化参照 Monarch RNA Cleanup Kit 说明书。

1.6 病毒基因组的扩增

全基因组 cDNA 的扩增参照 Wang 等^[10]报道的病毒全长 cDNA 扩增技术进行。5 μ L cDNA 为模板 (已

做变性、复性处理)，加入 PrimeSTAR GXL DNA 试剂盒内试剂和 5-15-1 引物 (表 1)，按照说明书进行 PCR 扩增。程序如下：94 $^{\circ}$ C 3 min；94 $^{\circ}$ C 30 s，60 $^{\circ}$ C 30 s，68 $^{\circ}$ C 4 min，30 个循环。反应结束后，取 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳 (1.5% 琼脂糖凝胶，90 V 电压)，检测病毒基因组扩增的完整程度。

1.7 高通量测序技术测序

DNA 纯化试剂盒对扩增的 CHUV 基因组 DNA 产物进行纯化。纯化后样品由广东美格基因科技有限公

司进行高通量测序技术测序。

1.8 病毒序列分析与系统发育树构建

使用 Clustal X (version 1.8) 和 MegAlign (DNASstar) 软件进行序列比对和相似性分析。利用 Mega 6.0 软件完成基于 Neighbour-joining (NJ) 方法的系统发育树绘制, Bootstrap 值为 1 000。

2 结果

2.1 病毒分离

从云南省江城县采集的 1 份黄牛血液中分离到 1 株可致 BHK-21、Vero 和 MDBK 细胞病变的病毒分离物, 感染 96 h 后, 镜下观察细胞出现融合、空泡化及呈现网状等典型的细胞病变 (图 1), 命名 PE10848。

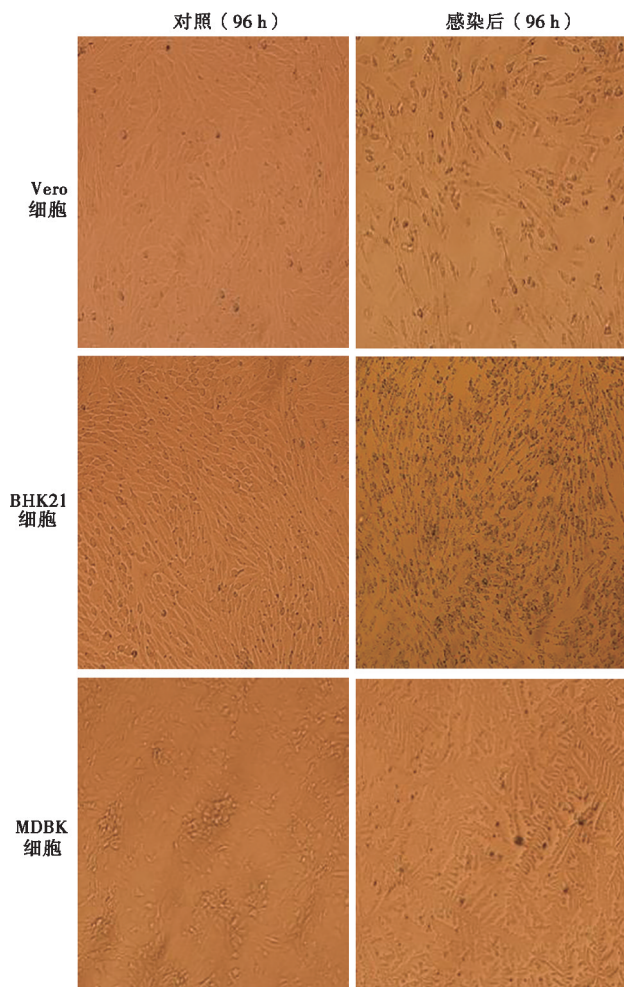
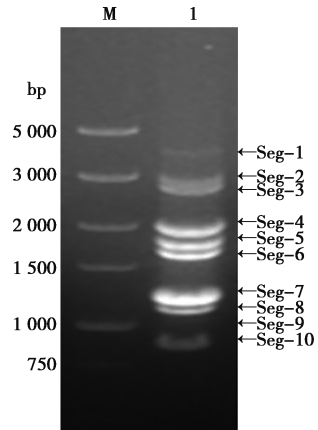


图 1 PE10848 感染 Vero、BHK 21 和 MDBK 细胞引起的 CPE (20×)

2.2 病毒基因组的电泳分析

1.5% 的高分辨率琼脂糖凝胶电泳验证 PE10848

病毒基因组。电泳结果显示, PE10848 是 10 节段的 dsRNA 病毒, 呈现 “3-3-3-1” 带型特征 (图 2), 与已报道的 CHUV 电泳带型接近^[10], 提示该毒株可能为 CHUV。



M. DNA Marker DL5000; 1. PE10848 毒株基因组。

图 2 PE10848 毒株基因组 dsRNA 电泳特征

2.3 病毒基因组序列特征

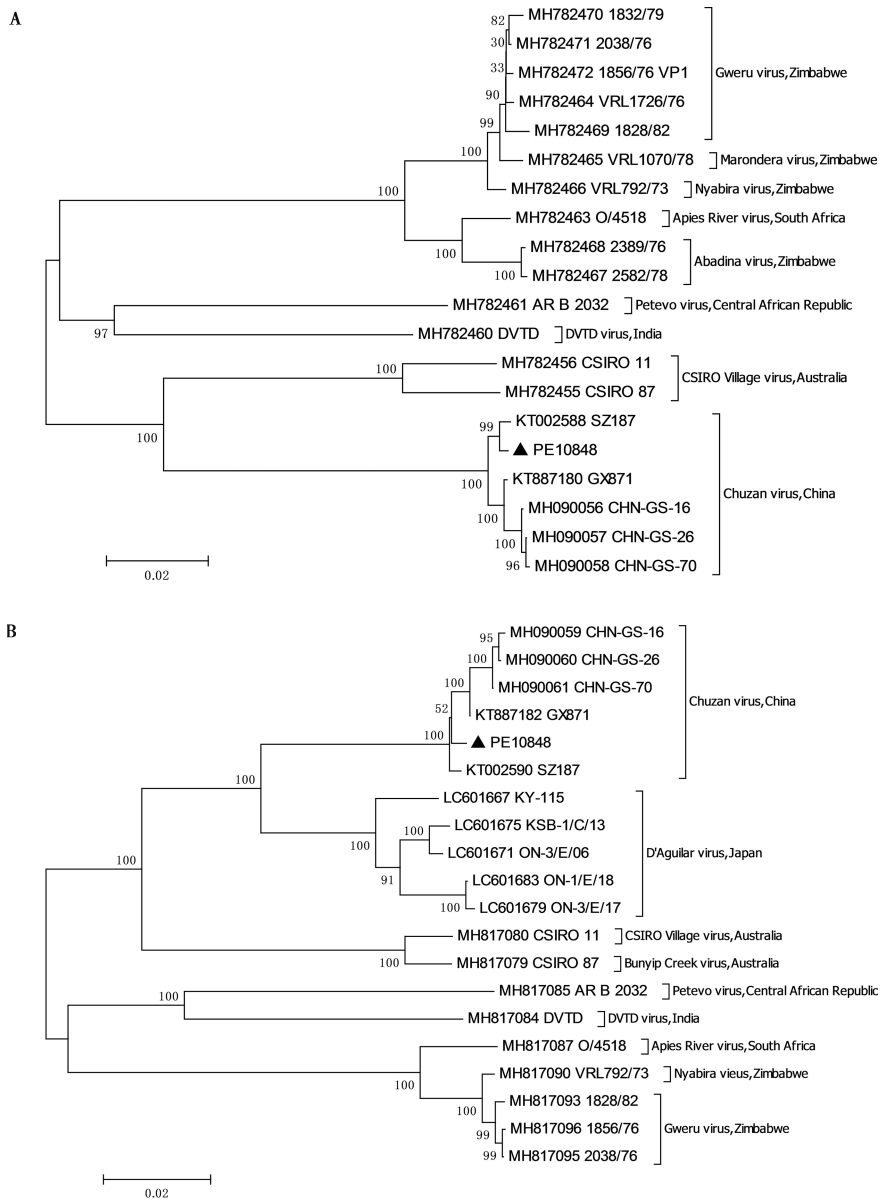
PE10848 毒株全基因组测序结果显示 (表 2), 病毒全长 18 914 bp, 病毒由 10 个基因组节段构成 Seg-1 (3 930 bp) ~ Seg-10 (728 bp), 编码蛋白的氨基酸残基数在 211 (NS3 蛋白) ~ 1 295 (VP1 蛋白) 之间, G+C 量为 41.37%, 总编码 6 072 个氨基酸残基。10 个基因节段在 5' 端和 3' 端均有 6 个高度保守的核苷酸, 与大多数的环状病毒相似, 具有 5'-GU...AC-3' 序列特征。

2.4 保守蛋白基因 (Seg-1、Seg-3 与 Seg-7) 系统发育树分析

PE10848 毒株 Seg-1 (VP1)、Seg-3 (VP3) 与 Seg-7 (VP7) 与 PALV 参考毒株构建的系统发育树见图 3、4。PE10848 与中国本土的其他 CHUV 毒株聚为一簇, 形成一个独立的进化分支, 相似度分别为 98.69% ~ 99.62%, 98.74% ~ 99.5% 和 98.17% ~ 99.65%; 与 PALV 其他毒株的相似度分别在 81.90% ~ 88.17%, 83.63% ~ 92.9% 和 86.36% ~ 98.08%, 表明 PE10848 与 CHUV 具有更近的亲缘关系, 提示该毒株为 CHUV 毒株。

表 2 PE10848 毒株基因组结构和特征

基因片段	编码蛋白	长度/bp	蛋白大小/aa	G+C 含量/%	5'NCR 长度/bp	3'NCR 长度/bp	5'和 3'末端序列
Seg-1	VP1	3 930	1 295	38.4	22	20	GUUAAAAU...CACUUAC
Seg-2	VP2	3 055	1 002	38.2	9	32	GUUAAAA...CACUUAC
Seg-3	VP3	2 774	904	39.4	8	46	GUUAAAAU...CACUUAC
Seg-4	VP4	1 967	640	38.4	9	35	GUUAAAA...AACUUAC
Seg-5	NS1	1 764	545	37.9	35	90	GUUAAAA...AACUUAC
Seg-6	VP5	1 610	521	40.4	20	23	GUUAAAA...ACCUUAC
Seg-7	VP7	1 151	348	44.7	18	85	GUUAAAA...CACUUAC
Seg-8	NS2	1 058	333	40.3	20	36	GUUAAAA...CACUUAC
Seg-9	VP6	877	273	41.4	19	39	GUUAAAA...AACUUAC
Seg-10	NS3	728	211	40.5	18	73	GUUAAAA...CACUUAC
合计		18 914	6 072	41.37	178	479	GUUAAAAU...C/ACUUAC



注：▲为本试验分离株。下同。

图 3 PE10848 毒株与帕里亚姆血清群毒株的 Seg-1 (A) 和 Seg-3 (B) 系统发育树

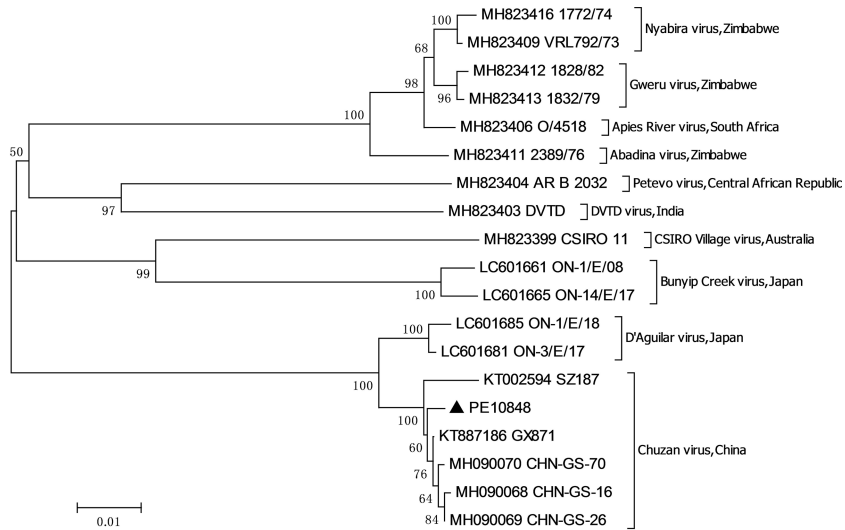


图4 PE10848 毒株与帕里亚姆血清群毒株的 Seg-7 系统发育树

2.5 外壳蛋白基因 (Seg-2 与 Seg-6) 系统发育树分析

PE10848 毒株外层衣壳蛋白 VP2 (Seg-2) 和 VP5 (Seg-6) 序列构建的系统发育树见图 5、6, 显示了与 VP1、VP3 和 VP7 等系统发育树相似的拓扑结构, VP2 和 VP5 与中国本土 CHUV 毒株聚为一个进化分支, 相似度分别在 98.76% ~ 99.57% 和 97.91% ~ 99.60%; 与 PALV 其他毒株的相似度分别在 80.40% ~ 88.42% 和 85.99% ~ 97.91%; 亚洲 PALV 的 VP2 序列在系统发育树上聚为一个大的进化分支均; VP2 和 VP5 均与津巴布韦毒株的相似度较低, 与亚洲国家印度、日本的毒株的相似度较高。

2.6 其他基因系统发育树分析

PE10848 毒株与 CHUV 其他结构蛋白 VP4、VP6

(Seg-4、Seg-9) 和非结构蛋白 NS1、NS2、NS3 (Seg-5、Seg-8、Seg-10) 的序列进行比较分析。结果显示, PE10848 毒株与云南的 1 株 CHUV 毒株 (SZ187) 和广西毒株 (GX871) 核苷酸的序列相似度较高, 分别为 98.98% ~ 99.54% (Seg-4), 99.09% ~ 99.66% (Seg-9), 99.32% ~ 99.65% (Seg-5), 99.34% (Seg-8) 和 99.31% (Seg-10); 与 PALV 其他毒株的相似度分别在 83.33% ~ 95.52% (Seg-4), 88.14% ~ 95.21% (Seg-9), 84.00% ~ 97.85% (Seg-5), 81.29% ~ 93.74% (Seg-8) 和 82.83% ~ 90.66% (Seg-10)。

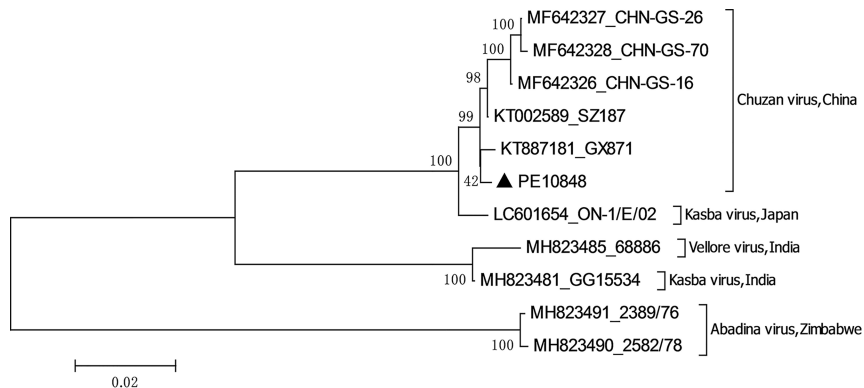


图5 PE10848 毒株与帕里亚姆血清群毒株的 Seg-2 系统发育树

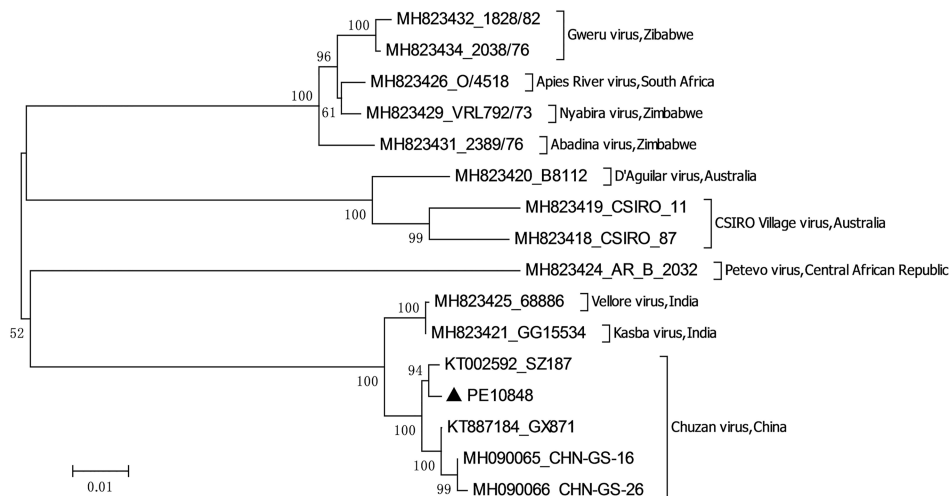


图6 PE10848 毒株与帕里亚姆血清群毒株的 Seg-6 系统发育树

3 讨论

近年来,受气候变化影响,气温普遍升高,导致各类虫媒病毒不断涌现,对畜牧业生产和人类健康构成严重威胁^[11]。2013—2014年云南本地连续2年分离到CHUV^[12-13],2016年青藏高原牦牛血液中检测到CHUV核酸阳性^[10],此后,吉林、辽宁、云南等中国12个省区血清学调查中发现有CHUV抗体阳性^[14],说明CHUV在我国已呈现广泛区域感染。CHUV属于环状病毒属毒株,可通过基因组片段的重组、核苷酸同源性、保守末端核苷酸序列等多种参数的分析进行该属毒株的鉴别^[1,15]。本研究对PE10848毒株的全长cDNA基因组进行琼脂糖凝胶电泳、核苷酸同源性、末端核苷酸序列等分析,明确了PE10848毒株的遗传背景和分类地位。病毒基因组信息显示出Seg-2(3 055 bp)与Seg-3(2 774 bp),Seg-5(1 bp)与Seg-6(1 610 bp),Seg-7(1 151 bp)与Seg-8(1 058 bp)等这些核苷酸的序列长度较为相近,因而在电泳时不易分离;1.5%的琼脂糖凝胶分析显示,PE10848毒株由10个基因片段组成,其中Seg-2和Seg-3,Seg-7和Seg-8共同迁移,带型呈现典型的“3-3-3-1”,以上这些均符合环状病毒属毒株基因片的特征,该属毒株基因片段大小和分子量相似,电泳时均具有一致迁移模式^[1]。这些特点与已报道的CHUV毒株相似,提示了PE10848可能是1株CHUV。

本研究样品采自云南普洱江城,位于西南边陲,平均气温高,湿度大,为各类虫媒病毒病的高发地区^[16-17]。曾有报道该地区CHUV血清学调查抗体阳性率在71.0%以上^[14],表明江城这个地区具有一

定地域代表性。该地区的特殊地理位置,与相邻的东南亚国家缺乏自然屏障,一旦疫情发生,可能威胁到我国境内,此次CHUV的分离,对边境地区疫病的防控及风险提示具有一定的意义。

CHUV属于环状病毒属,目前相关研究极少,其蛋白结构和功能类似于该属其他病毒。RNA依赖性RNA聚合酶蛋白(VP1)、病毒颗粒的内层蛋白VP3、VP7高度保守,对这3种核苷酸序列比较与系统发育分析,可作为对新分离的环状病毒鉴定和分类的判定依据^[4]。本研究中,PE10848与其他CHUV毒株的上述3个基因核苷酸序列的相似度大于98.69%(VP1),98.74%(VP3)和98.17%(VP7)。有研究表明,同一种环状病毒的这3种蛋白的相似度均大于73.0%,本研究的3个基因的相似度均超过标准,再次提示PE10848可能是1株CHUV。PE10848与中国本土的其他CHUV毒株聚为一簇,形成一个独立的进化分支,印证了相关研究,体现病毒的地域特征^[18]。

环状病毒外壳蛋白VP2与病毒的中和抗原变异有关,核苷酸序列相似度和大小高度变异^[4];外壳蛋白VP5相较于VP2,变异程度要小,但不同血清型之间也存在高度变异情况。将本研究中的分离毒株PE10848与PALV不同毒株外壳蛋白VP2、VP5比较,相似度在80.40%~88.42%和85.99%~97.91%;与中国本土报道的CHUV毒株进行相似度比较,发现它们在系统发育树上形成一簇,提示该毒株为中国地区流行的CHUV毒株。目前,对该病毒缺乏深入研究,后续将进一步开展致病性、感染性等相关研究工作。

综上,通过对PE10848毒株的全基因组测序和

系统发育分析,更深入地了解我国 CHUV 的遗传进化特征,为后续进一步掌握和研究 CHUV 病原学特点提供了重要试验数据。

参考文献:

- [1] ATTOUI H, MERTENS P P C, BECNEL J, et al. Order reoviridae [M] //KING A M Q, ADAMS M J, LEFKOWITZ E J. Carsterns EB virus taxonomy: IX-th report of the international committee on taxonomy of viruses. London: Elsevier Press, 2011: 541-637.
- [2] LI C X, GUO X X, DENG Y Q, et al. Vector competence and transovarial transmission of two aedes aegypti strains to Zika virus [J]. Emerg Microbes Infect, 2017, 6 (4): e23.
- [3] YAMAKAWA M, KUBO M, FURUUCHI S. Molecular analysis of the genome of Chuzan virus, a member of the Palyam serogroup viruses, and its phylogenetic relationships to other orbiviruses [J]. Journal of General Virology, 1990, 80 (4): 937-941.
- [4] BELAGANAHALLI M N, MAAN S, MAAN N S, et al. Genetic characterization of the tick-borne orbiviruses [J]. Viruses, 2015, 7 (5): 2185-2209.
- [5] GUMM I D, NEWMAN J F. The preparation of purified bluetongue virus group antigen for use as a diagnostic reagent [J]. Archives of Virology, 1982, 72 (1/2): 83-93.
- [6] MIURA Y, GOTO Y, KUBO M, et al. Pathogenicity of chuzan virus, a new member of the Palyam subgroup of genus orbivirus for cattle [J]. The Japanese Journal of Veterinary Science, 1988, 50 (3): 632-637.
- [7] MIURA Y, GOTO Y, KUBO M, et al. Isolation of Chuzan virus, a new member of the Palyam subgroup of the genus orbivirus, from cattle and culicoides oxytoma in Japan [J]. American Journal of Veterinary Research, 1988, 49 (12): 2022-2025.
- [8] YANG H, XIAO L, MENG J, et al. Complete genome sequence of a Chuzan virus strain isolated for the first time in mainland China [J]. Archives of Virology, 2016, 161 (4): 1073-1077.
- [9] MAAN S, RAO S, MAAN N S, et al. Rapid cDNA synthesis and sequencing techniques for the genetic study of bluetongue and other dsRNA viruses [J]. Journal of Virological Methods, 2007, 143 (2): 132.
- [10] WANG M, WANG Y, BALOCH A R, et al. Chuzan virus in yaks, Qinghai-Tibetan plateau, China [J]. Emerging Infectious Diseases, 2018, 24 (12): 2371-2373.
- [11] SAEGERMAN C, BERKVEN D, MELLOR P S. Bluetongue epidemiology in the European Union [J]. Emerging Infectious Diseases, 2008, 14 (4): 539-544.
- [12] 杨恒,肖雷,李华春,等. 2012—2016年中国南方地区帕利亚姆血清群病毒的分离与序列特征分析 [J]. 畜牧兽医学报, 2018, 49 (4): 761-770.
- [13] 朱沛,孟锦昕,李华春,等. 云南省中山病毒的分离鉴定 [J]. 中国兽医学报, 2020, 40 (8): 1443-1448.
- [14] 杨振兴,朱沛,李华春,等. 我国牛羊中山病血清学调查 [J]. 中国预防兽医学报, 2019, 50 (8): 1715-1722.
- [15] ATTOUI M, MAAN S S, ANTHONY S J, et al. Bluetongue virus, other orbiviruses and other reoviruses: their relationships and taxonomy [M] //MELLOR P S, BAYLISM, MERTENS P C. Bluetongue monograph. London: Elsevier/Academic Press, 2009: 523-552.
- [16] 寇美玲,李乐,李华春,等. 云南江城蓝舌病病毒 16 型毒株分离鉴定及其 L2 基因序列分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45 (11): 56-66.
- [17] 寇美玲,谢佳芮,李乐,等. 云南景洪帕利亚姆亚群达圭勒病毒的分离与鉴定 [J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48 (6): 271-279.
- [18] ATTOUI H, STIRLING J M, MUNDERLOH U G, et al. Complete sequence characterization of the genome of the St Croix River virus, a new orbivirus isolated from cells of Ixodes scapularis [J]. Journal of General Virology, 2001, 82 (Pt 4): 795-804.