# 中国农业科学院 博士学位论文

# 犬蝠源呼肠孤病毒的分离鉴定 及其生物学特性的研究

Isolation and Characteristics of a Reovirus from Short-nosed Fruit Bats (*Cynopterus Sphinx*)

- 博 士 研 究 生: 冉旭华
- 指 导 教 师:孔宪刚 研究员
- 申请学位类别:农学博士
- 专 业:预防兽医学
- 研 究 方 向:动物病毒分子生物学 及分子免疫学
- 培 养 单 位:中国农业科学院研究生院 哈尔滨兽医研究所

### 提交日期 2006年6月

# Chinese Academy of Agricultural Sciences Ph.D Dissertation

Isolation and Characteristics of a Reovirus from Short-nosed Fruit Bats (*Cynopterus Sphinx*)

> Ph.D Candidate : RAN Xuhua
> Advisor : Prof. KONG Xiangang
> Major : Preventive Veterinary Medicine
> Specialty : Molecular Biology and Molecular Immunology of Animal Virus

Chinese Academy of Agricultural Sciences

**June 2006** 

# 独创性声明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成 果。尽我所知,除了文中特别加以标注和致谢的地方外,论文中不包含其他人已经发 表或撰写过的研究成果,也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证 书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了 明确的说明并表示了谢意。

研究生签名:

时间: 年 月 日

## 关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定,即:中国农业科 学院有权保留送交论文的复印件和磁盘,允许论文被查阅和借阅,可以采用影印、缩 印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不 同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

 论文作者签名:
 时间:
 年
 月
 日

 导师签名:
 时间:
 年
 月
 日

# 论文评阅人、答辩委员名单

论文题目	犬蝠源呼肠孤病毒的分离鉴定及其生物学特性的研究						
论文作者	冉旭华	指导教师	孔宪刚	培养单位	哈尔滨兽医研究所		

	姓名	职称职务	导师类别	单位	专业	
	李一经	教授	博士导师	东北农业大学	预防兽医	
评   阅   人	李景鹏	教授	博士导师	东北农业大学	基因工程	
	于力	研究员	博士导师	哈尔滨兽医研究所	预防兽医	
答辩 主席	涂长春	教授	博士导师	军事医学科学院 军事兽医研究所	预防兽医	
	扈荣良	教授	博士导师	军事医学科学院 军事兽医研究所	预防兽医	
	王洪彬	教授	博士导师	东北农业大学	临床兽医	
答	童光志	研究员	博士导师	哈尔滨兽医研究所	预防兽医	
辩 委	步志高	研究员	博士导师	哈尔滨兽医研究所	预防兽医	
员	相文华	研究员	博士导师	哈尔滨兽医研究所	预防兽医	
	周建华	研究员	博士导师	哈尔滨兽医研究所	预防兽医	
答辩时间与地址		2006-6-15 哈尔滨兽医研究所学术报告厅				
记录人员		高玉龙				

## 摘 要

将 30 份广东省韶关市送检的野生犬蝠样品, 研磨后接种 Vero-E6 细胞,从中分离到 2 株病毒。 其中一株在 Vero-E6 细胞上盲传至第 4 代开始出现细胞病变,表现为细胞内颗粒增多,细胞收缩、 变圆,最后细胞从瓶壁脱落。反复冻融 3 次后,收集细胞及培养液,电镜观察发现,病毒粒子无 囊膜,有双层衣壳,呈正二十面体对称,将病毒命名为 Bat/China/2003 (B/03)。红细胞凝集试验 表明该病毒能凝集健康人 O 型血红细胞,不能凝集 SPF 鸡、实验用普通级牛、大鼠和豚鼠的红 细胞。理化特性试验表明该病毒对氯仿有抵抗力;能耐受 pH3.0 的酸性环境;50 水浴 1 h 病毒 丧失感染能力;1M Mgcl<sub>2</sub> 能提高病毒对热的抵抗力,增强病毒的活性。病毒基因组经琼脂糖凝胶 电泳分大、中、小 3 个区段。用哺乳动物呼肠孤病毒(mammalian orthoreovirus, MRV)特异性引 物进行反转录-聚合酶链式反应(Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR),扩增得 到了预期大小的片段。测序结果经 NCBI BLAST 分析表明,与呼肠孤病毒科正呼肠孤病毒属的 Ndelle virus (NDEV)核苷酸同源性最高为 91.2%。用 DNAMAN Multiple Alignment 进行序列同 源性分析,与 MRV 血清 1、2、3 型的代表株 T1L、T2J、T3D 的核苷酸同源性分别为 89.9%、76.9%、 89.9%。以上结果证明该病毒为呼肠孤病毒科的成员。

采用 RT-PCR 方法,测定犬蝠源呼肠孤病毒 B/03 株全基因组 10 个基因节段完整 ORF 序列。 使用分子生物学软件对其核苷酸和氨基酸序列进行同源性分析,绘制系统发生进化树,并分析各 基因编码产物的功能区与结构域,从而预测各蛋白的功能。根据 B/03 株编码的蛋白和呼肠孤病 毒科其它成员编码蛋白的比较结果推测,B/03 株的 L1、L2、L3、M1、M2、S1、S2、S4 基因分 别编码病毒的结构蛋白  $\lambda$ 3、 $\lambda$ 2、 $\lambda$ 1、 $\mu$ 2、 $\mu$ 1、 $\sigma$ 1、 $\sigma$ 2、 $\sigma$ 3, 而 M3、S1、S3 基因编码病毒的非 结构蛋白  $\mu$ NS、 $\sigma$ IS、 $\sigma$ NS(S1 基因编码两种蛋白,结构蛋白  $\sigma$ 1 和非结构蛋白  $\sigma$ IS)。

对功能性结构域的分析表明,  $\lambda$ 3 蛋白氨基酸序列中含有 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)的保守区,推测是病毒的 RdRp。 $\lambda$ 2 蛋白有鸟苷转移 酶和甲基化酶的活性区,推测可能在病毒复制时 mRNA 的帽化过程中起作用。 $\lambda$ 1 蛋白的 N-未端 发现了锌指结构和 RNA 螺旋酶的保守区,推测  $\lambda$ 1 蛋白具有 dsRNA 连接活性和 ATPase 活性。 $\mu$ 2 蛋白含有两个 NTP-binding 基序,这表明它可能具有核苷三磷酸酶活性。 $\mu$ 1 蛋白的 C-末端有 4 个大的亲水区,都位于蛋白的表面,可能形成环和折叠,而且抗原性较高,推测有可能引起宿主 细胞的免疫反应。 $\sigma$ 1 蛋白的 N-末端有一个连续的能形成 alpha-helical coiled coils 结构的七肽重复 序列(*a-b-c-d-e-f-g*)<sub>n</sub>,该区域可能与病毒的血凝活性有关。同时还发现, $\sigma$ 1 蛋白有 4 个潜在的糖 基化位点,推测  $\sigma$ 1 蛋白可能是糖基化的蛋白,与病毒的吸附有关。 $\sigma$ 2 蛋白的 C-末端有一个双亲 性的  $\alpha$ -螺旋,它与大肠杆菌的 DNA 依赖性 RNA 聚合酶的  $\beta$  亚基非常相似,推测具有 dsRNA 连 接活性。 $\sigma$ 3 蛋白的 N-末端有锌指结构域,C-末端有 dsRNA 连接区。 $\mu$ NS 蛋白的 C-末端发现了 七肽重复序列能形成 alpha-helical coiled coils 结构,推测这种结构有利于该蛋白与细胞骨架的连 接。在  $\mu$ NS 蛋白的 N-末端还发现了 ATPase 的保守区,预示其可能具有 ATPase 活性。 $\sigma$ IS 蛋白 富含碱性氨基酸和  $\alpha$ -螺旋,有一个潜在的糖基化位点,但其功能尚不清楚。 $\sigma$ NS 蛋白富含 Cys 残基和  $\alpha$ -螺旋,推测可能具有 ssRNA 连接活性。 犬蝠源呼肠孤病毒 B/03 株 L1 基因编码的 RdRp 与呼肠孤病毒科正呼肠孤病毒属的 RdRp 同 源性较高(91.9%~98.2%),由此推测 B/03 株属于呼肠孤病毒科正呼肠孤病毒属。B/03 株各基因 编码的蛋白与正呼肠孤病毒属的其他成员进行同源性分析的结果表明,B/03 株与 MRV 氨基酸同 源性最高,系统发生进化树也表明 B/03 株的各基因与 MRV 属于同一个群。与已报道的从蝙蝠体 内分离的正呼肠孤病毒不在同一群。由此可以初步推断,犬蝠源呼肠孤病毒 B/03 株属呼肠孤病 毒科,正呼肠孤病毒属,哺乳动物正呼肠孤病毒。S1 基因编码病毒的型特异性抗原,系统发生进 化树表明,B/03 株的 S1 基因与 MRV 血清 1 型的进化关系最近。但仅据此推断 B/03 株的血清型 尚不足够,还有待于进一步的研究。

犬蝠源呼肠孤病毒 B/03 株各基因的序列比较结果表明, B/03 株各基因节段与不同呼肠孤病 毒毒株同源性相近,由此推测该毒株可能是在自然感染过程中经长期的重配形成的。

关键记词 犬蝠 呼肠孤病毒 分离鉴定 生物学特性 序列测定与分析 蛋白功能进化分析

### Abstract

Wild short-nosed fruit bats samples from Shaoguan City Guangdong Province were scrunched and inoculated in Vero-E6 cells. Two virus strains were isolated. One virus isolated from short-nosed fruit bats didn't caused cytopathic effects (CPE) until fourth-passaged on Vero-E6 cells. Infected cells emerged granulating, shrinking, rounding and falling off. After three times freeze-thaw, cells and culture medium were harvested for electron microscopy. Virus particles were nonenveloped, double capsid and icosahedral symmetry. This virus was designated Bat/China/2003(B/03). Hemagglutination test indicated that the virus could agglutinate healthy human type O red cells, but could not agglutinate the red cells of SPF chicken, experimental common bovine, rat and guinea pig red cells. This virus is tolerant to chloroform treatment and pH3.0. Virus loses infectivity in water bath 50 1 h. 1M Mgcl<sub>2</sub> can enhance resistance of virus to heat treatment and increase infectivity. Nucleic acid electrophoresis on agarose gels suggested that the genome of this virus was divided into large, medium and small parts. Specific primers according to mammalian reovirus were used for Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). Appropriate specific products were amplified by RT-PCR. NCBI BLAST analysis indicated that this segment shared the highest identity with Ndelle virus who was a member of the genus Orthoreovirus, and the homology was 91.2%. DNAMAN Multiple Alignment analysis of nucleotide sequences with mammalian reovirus serotype 1(T1L), 2(T2J) and 3(T3D) found that homologies were 89.9%, 76.9% and 89.9%, respectively. So we can deduce this virus is a member of the virus family Reoviridae.

We determinated the sequences of reovirus B/03 strain isolated from short-nosed fruit bats. Integrated sequences of 10 ORFs were determinated by RT-PCR. Molecular biological softwares were used to analyse homologies of nucleotide sequences and amino acid sequences, drawing phylogenetic tree, analyzing fuctional and structural domains of each protein encoding by virus genes, and then predicting function of each protein. Comparison results of proteins of B/03 strain with those of other members in the family *Reoviridae* suggested that L1, L2, L3, M1, M2, S1, S2 and S4 encoded viral structural protein  $\lambda 3$ ,  $\lambda 2$ ,  $\lambda 1$ ,  $\mu 2$ ,  $\mu 1$ ,  $\sigma 1$ ,  $\sigma 2$  and  $\sigma 3$ , respectively. M3, S1 and S3 encoded viral nonstructural protein  $\mu$ NS,  $\sigma 1$ S and  $\sigma$ NS, respectively(S1 encoded two proteins, structural protein  $\sigma 1$ S).

Analysis of the functional and structural domains suggested that  $\lambda 3$  protein contained conserved domain of RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), which confirmed that  $\lambda 3$  was RdRp.  $\lambda 2$  protein included the activity domains of guanylytransferase and methyltransferase, deducing  $\lambda 2$  was important for capping of mRNA during virus replication. We found Zinc finger domain and activity domain of RNA helicase in amino-terminal of  $\lambda 1$  protein, which predicted that  $\lambda 1$  protein could bind dsRNA and possessed ATPase activity.  $\mu 2$  protein included two NTP-binding motifs that maybe possessed nucleotide triphosphatase function. There were four hydrophilicity domains in carboxy-terminal of  $\mu 1$ protein predicted to occur in loops or turns at the surface of the protein. These regions may important for the host immune response to this protein.  $\sigma 1$  protein had a hepta peptide repeat pattern  $(a-b-c-d-e-f-g)_n$ , which can form  $\alpha$ -helical coiled-coil structure, it maybe important to heamagglutinin. There were four potential glycosylation sites in  $\sigma 1$  protein, which suggested that  $\sigma 1$  maybe a glycoprotein. Carboxy-terminal of  $\sigma 2$  protein had an amphipathic  $\alpha$ -helix similar to the E. coli DNA-dependent RNA polymerase  $\beta$  subunit, predicting  $\sigma 2$  protein maybe can bind to dsRNA.  $\sigma 3$  protein had Zinc finger domain at amino-terminal and dsRNA binding domain at carboxy-terminal. We found a hepta peptide repeat pattern  $(a-b-c-d-e-f-g)_n$  that can form  $\alpha$ -helical coiled-coil structure at carboxy-terminal of  $\mu$ NS protein, which maybe important for binding cell skeletons. There was also a conserved domain of ATPase at amino-terminal of  $\mu$ NS protein, which suggested that this protein may have ATPase activity.  $\sigma 1$ S protein had many basic amino acids,  $\alpha$ -helix and a glycosylation site, but its function is unclear.  $\sigma$ NS protein was abundant to Cys and  $\alpha$ -helix, it was predicted to bind ssRNA<sub>o</sub>

The  $\lambda$ 3 protein (RdRp) of B/03 strain shared the highest identity with the virus of family *Reoviridae*, genus *Orthoreovirus* (91.9%~98.2%). On the basis of this result, we concluded that B/03 strain should belong to *Reoviridae*, genus *Orthoreovirus*. Comparing the proteins of B/03 strain with those of other members in the genus *Orthoreovirus*, we found that B/03 strain shared the highest identity with mammalian orthoreovirus (MRV). Phylogenetic tree suggested that genes of B/03 strain belonged to the MRV species, not belonging to orthoreovirus isolated from bats. We suggested that the reovirus B/03 strain isolated from short-noseed fruit bats should be classified into family *Reoviridae*, genus *Orthoreovirus* and mammalian orthoreovirus species. S1 gene encoded type sepecific antigen protein. Phylogenetic tree suggested that S1 gene of B/03 strain may belong to MRV serotype 1. While we still need more evidence to classify B/03 strain to serotype 1.

Sequences comparison of B/03 strain suggested that different segments shared the higest identify with different reovirus strains. It is suggested that this virus may emerge from reassortment during long term nature infection.

**Key words**: short-nosed fruit bats, reovirus, isolation, identification, characteristics, sequence determination and analysis, protein function, phylogenetic analysis.

目录	
第一章 绪论	1
1.1 呼肠孤病毒的宿主范围及其引起的疾病	
1.1.1 呼肠孤病毒的宿主范围	1
1.1.2 呼肠孤病毒引起的人类疾病	2
1.1.3 呼肠孤病毒引起的动物疾病	4
1.2 呼肠孤病毒的形态结构	4
1.3 呼肠孤病毒的生物学特性	
1.4 呼肠孤病毒的检测方法及分类学依据	7
1.5 呼肠孤病毒的分子生物学特性	9
1.5.1 呼肠孤病毒编码的结构蛋白及其功能	9
1.5.2 呼肠孤病毒编码的非结构蛋白及其功能	
1.5.3 存在的问题及展望	
1.6 蝙蝠携带病毒的研究概况	16
1.6.1 国外对蝙蝠携带病毒的研究概况	
1.6.2 国内对蝙蝠携带病毒的研究概况	17
1.7 本研究的意义	17
第二章 犬蝠源呼肠孤病毒的分离鉴定	
2.1 材料与方法	
2.1.1 细胞、培养基和血清	
2.1.2 载体和受体菌	
2.1.3 实验动物	
2.1.4 工具酶和主要试剂	
2.1.5 主要仪器设备	
2.1.6 引物	
2.1.7 样品的处理与病毒分离	
2.1.8 电镜观察	

2.1.9 红细胞凝集试验	
2.1.10 氯仿敏感试验	
2.1.11 耐酸性试验	
2.1.12 耐热试验	
2.1.13 Mgcl2稳定试验	
2.1.14 病毒核酸提取	21
2.1.15 核酸电泳	21
2.1.16 套式 RT-PCR	21
2.1.17 PCR 产物的回收纯化	21
2.1.18 大肠杆菌感受态细胞的制备	
2.1.19 PCR 产物的连接与转化	
2.1.20 质粒提取与鉴定	
2.1.21 序列测定及分析	23
2.2 结果	
2.2.1 病毒的 CPE 特征	
2.2.2 电镜观察结果	23
2.2.3 红细胞凝集试验	24
2.2.4 理化特性试验	24
2.2.5 核酸电泳结果	24
2.2.6 RT-PCR 结果	24
2.2.7 测序结果与同源性分析	
2.3 讨论	
第三章 犬蝠源呼肠孤病毒全基因组序列的测定与分析	
3.1 材料与方法	
3.1.1 材料	
3.1.2 方法	
3.2 结果	
3.2.1 L1 基因	29

3.2.2 L2 基因	
3.2.3 L3 基因	40
3.2.4 M1 基因	
3.2.5 M2 基因	46
3.2.6 M3 基因	49
3.2.7 S1 基因	
3.2.8 S2 基因	59
3.2.9 S3 基因	63
3.2.10 S4 基因	67
3.2.11 小结	68
3.3 讨论	71
3.3.1 犬蝠源呼肠孤病毒 B/03 株的同源性分析	71
3.3.2 犬蝠源呼肠孤病毒 B/03 株编码蛋白的功能分析	72
3.3.3 犬蝠源呼肠孤病毒 B/03 株的分类学地位	75
3.3.4 呼肠孤病毒的遗传演化分析	76
第四章 结论	
参考文献	
致 谢	
作者简历	

### 英文缩略表

英文缩写	英文全称	中文名称
ARV	Avian orthoreovirus	禽正呼肠孤病毒
ARV-A	Aquareovirus A	水生呼肠孤病毒甲型
BRV	Baboon orthoreovirus	狒狒正呼肠孤病毒
BTV	Bluetongue virus	蓝舌病毒
BV	Banna virus	版纳病毒
CPV-I	Cypovirus I	质型多角体病毒 I 型
CSV	Chum salmon reovirus	马苏大麻哈鱼呼肠孤病毒
CTFV	Colorado tick fever virus	科州蜱传热病毒
FDV	Fiji disease virus	斐济病病毒
GCHV	Grass carp hemorrhagic virus	草鱼出血症病毒
GCRV	Grass carp reovirus	草鱼呼肠孤病毒
GIRV	Golden ide reovirus	金体美洲圆腹雅罗鱼呼肠孤病毒
GPRV	Guppy reovirus	孔雀鱼呼肠孤病毒
GRV	Goose Reovirus	鹅呼肠孤病毒
GSRV	Golden shiner reovirus	金体美洲鳊鱼呼肠孤病毒
ISVP	Intermediate Subviral Particles	中间亚病毒颗粒
MDRV	Muscovy Reovius	番鸭呼肠孤病毒
MRV	Mammalian orthoreovirus	哺乳动物正呼肠孤病毒
NBV	Nelson Bay orthoreovirus	纳尔逊海湾正呼肠孤病毒
NDEV	Ndelle virus	Ndelle 病毒
PKR	dsRNA-dependent protein kinase	双链 RNA 依赖性蛋白激酶
RdRp	RNA-dependent RNA polymerase,	RNA 依赖性 RNA 聚合酶
Reovirus	Respiratory enteric orphan virus	呼肠孤病毒
RRV	Reptilian orthoreovirus	爬虫正呼肠孤病毒
RV-A	RotavirusA	轮状病毒甲型
SBRV	Striped bass reovirus	纹斑鲈鱼呼肠孤病毒
TRV	Threadfin reovirus	四指马鲅鱼呼肠孤病毒
WTV	Wound tumor virus	伤瘤病毒

### 第一章 绪论

在病毒界中,根据遗传信息载体的不同分为 DNA 病毒和 RNA 病毒,根据其结构形式不同又可分为双链(ds)病毒和单链(ss)病毒。其中 dsRNA 病毒由于其特有的遗传信息载体形式,不 仅在生物学、病原学和病理学等方面具有独特的研究价值,而且在揭示生命基本现象、研究生命 起源和遗传进化等方面也是一个不容忽视的领域。因此这一类病毒逐渐成为更多研究者所关心的 焦点。作为 dsRNA 病毒的代表——呼肠孤病毒科(*Reoviridae*)更是研究的热点。

呼肠孤病毒科成员的宿主范围非常广泛,包括脊椎动物、节肢动物、水生动物和植物等。2005 年9月,国际病毒分类委员会(ICTV)第八次报告(Fauquet et al, 2005)将呼肠孤病毒科分为 12个属:正呼肠孤病毒属(Orthoreovirus)、环状病毒属(Orbivirus)、轮状病毒属(Rotavirus)、 科州蜱传热病毒属(Coltivirus)、水生呼肠孤病毒属(Aquareovirus)、质型多角体病毒属 (Cypovirus)、斐济病毒属(Fijivirus)、植物呼肠孤病毒属(Phytorevirus)、稻病毒属(Oryzavirus)、 虫源呼肠孤病毒属(Idnoreovirus)、东南亚十二节段病毒属(Seadornavirus)和苍蝇呼肠孤病毒 属(Mycoreovirus)(见表 1-1)。其中正呼肠孤病毒属、环状病毒属、轮状病毒属、科州蜱传热病 毒属和水生呼肠孤病毒属是重要的动物病毒。

正呼肠孤病毒属是呼肠孤病毒科的代表属,包括代表种哺乳动物正呼肠孤病毒(Mammalian orthoreovirus, MRV)以及禽正呼肠孤病毒(Avian orthoreovirus, ARV)、狒狒正呼肠孤病毒(Baboon orthoreovirus, BRV)、纳尔逊海湾正呼肠孤病毒(Nelson Bay orthoreovirus, NBV)和爬虫正呼肠孤病毒(Reptilian orthoreovirus, RRV)(Fauquet et al, 2005)。下面就以MRV为例,介绍呼肠孤病毒引起的疾病以及该病毒的生物学与分子生物学特性。

MRV 病毒粒子大约 75-80 nm, 近似球形, 无囊膜, 有双层衣壳,呈正二十面体对称。基因 组由 10 条线性 dsRNA 组成 根据大小分为 3 个群 即 3 个大的基因节段 L1(3854bp), L2(3916bp), L3(3896bp), 3 个中的基因节段 M1(2304bp), M2(2203bp), M3(2235bp)和 4 个小的基因 节段 S1(1416bp), S2(1331bp), S3(1198bp), S4(1196bp), 10 个基因节段编码 11 种蛋白, 其中 8 种为结构蛋白, 3 种为非结构蛋白(McCrae et al, 1978),

#### 1.1 呼肠孤病毒的宿主范围及其引起的疾病

#### 1.1.1 呼肠孤病毒的宿主范围

在病毒界中,宿主范围涉及到了动物和植物的只有呼肠孤病毒科和弹状病毒科。呼肠孤病毒 的宿主范围非常广泛,除人以外,还可以从多种动物(如鼠、猫、犬、猪、马、牛、羊、绵羊、 貂、猕猴、长尾猴、黑猩猩、狒狒、蛇、禽类、昆虫和蝙蝠等)体内分离到(殷震,1997)。实际 上,几乎可以从所有哺乳动物的体内检测到呼肠孤病毒的抗体。此外,呼肠孤病毒在饮用水、贮 存水、未处理的污水中的分离率也很高(Spinner et al, 2001),这可能是呼肠孤病毒广泛感染人和 动物的原因之一。

#### 表 1-1 呼肠孤病毒科的分类

Table 1-1 Classification of Reoviridae

属(Genes)	代表种(Type Species)	宿主(Host)
正呼肠孤病毒属	哺乳动物正呼肠孤病毒	脊椎动物
(Orthoreovirus)	(Mammalian orthoreovirus, MRV)	(Vertebrates)
环状病毒属	蓝舌病毒	脊椎动物、节肢动物
(Orbivirus)	(Bluetongue virus, BTV)	(Vertebrates, arthropes)
轮状病毒属	轮状病毒甲型	哺乳动物、鸟类
(Rotavirus)	(RotavirusA, RV-A)	(mammals, birds)
科州蜱传热病毒属	科州蜱传热病毒	脊椎动物、节肢动物
(Coltivirus)	(Colorado tick fever virus, CTFV)	(Vertebrates, arthropes)
水生呼肠孤病毒属	水生呼肠孤病毒甲型	水生动物
(Aquareovirus)	(Aquareovirus A, ARV-A)	(Aquatic amimals)
质型多角体病毒属	质型多角体病毒Ⅰ型	昆虫
(Cypovirus)	(Cypovirus I, CPV- I)	(Insects)
斐济病毒属	斐济病病毒	显花植物、飞虱
(Fijivirus)	(Fiji disease virus, FDV)	(Flowerers, planthoppers)
植物呼肠孤病毒属	伤瘤病毒	显花植物、叶蝉
(Phytorevirus)	(Wound tumor virus, WTV)	(Flowerers, leafhoppers)
稻病毒属	水稻粗糙矮化病毒	显花植物、飞虱
(Oryzavirus)	(Rice ragged stunt virus, RRSV)	(Flowerers, planthoppers)
虫源呼肠孤病毒属	虫源呼肠孤病毒 I 型	昆虫
(Idnoreovirus)	(Idnoreovirus I, IRV- I)	(Insects)
东南亚十二节段病毒属	版纳病毒	脊椎动物、节肢动物
(Seadornavirus)	(Banna virus, BV)	(Vertebrates, arthropes)
苍蝇呼肠孤病毒属	苍蝇呼肠孤病毒I	蝇
(Mycoreovirus)	(Mycoreovirus I, MRV-I)	(Fly)

#### 1.1.2 呼肠孤病毒引起的人类疾病

呼肠孤病毒(Reovirus)是 1954年由 Sabin、Ramos-Alvarez等从健康儿童的呼吸道与胃肠道中分离得到的,最初认为该病毒与任何疾病都不相关,因此将其命名为呼吸道(Respiratory)肠道(enteric)孤儿(orphan)病毒。取3个英文单词的词头,缩写为——呼肠孤病毒(Reovirus)。

人们对呼肠孤病毒致病性的认识经历了一个较长的历程。在发现初期,呼肠孤病毒被认为不 具有任何致病性,因此才有孤儿病毒之称。随后的研究发现,呼肠孤病毒也有一定的病原性,一 些成员还是某些特定疾病的病原体。该病毒常栖息于呼吸道和胃肠道,可以从具有上呼吸道症状 的病人、下呼吸道症状的病人、胃肠炎症状的病人、出疹病人、中枢神经系统症状的病人、肝炎 症状的病人,甚至肿瘤病人体内分离到。可能与发热、发疹、咽充血、上呼吸道感染、下呼吸道 感染、脂肪痢、胃肠炎、心肌炎、角膜炎、结膜炎、肝炎、脑炎等疾病相关。虽然还不能最后确 定呼肠孤病毒与人类疾病的关系,但是呼肠孤病毒在致病过程中至少起到了辅助或促进作用,这 是不容忽视的。

人主要感染呼肠孤病毒血清1型和血清3型,感染后多数人呈现无症状或轻微症状经过,少数人会出现呼吸道(肺炎、闭塞性细支气管炎伴机化性肺炎)(Bellum et al, 1997; Majeski et al, 2003) 胃肠道(腹泻、婴儿胆管闭塞)(Tyler et al, 1998)和神经系统(脑炎、脑膜炎)(Tyler et al, 2004; Hermann et al, 2004)疾病,只有极少数的人出现严重的并发症。

呼肠孤病毒感染引起的呼吸道疾病主要包括肺炎和闭塞性细支气管炎伴机化性肺炎 (Bronchiolitisobliterans organizing pneumonia, BOOP)(Bellum et al, 1997; Majeski et al, 2003)。 1967 年 Tillotson 报道了1 例患有弥漫性肺炎的病例,患病女孩发病初期主要表现为发热、咳嗽、 流鼻涕,并且出现不典型的斑丘疹,后呼吸困难,胸片显示为弥漫性肺炎,发病后 15 天死亡。 在患儿的肺、肾上腺、肝脏、脾脏、肾脏、淋巴结、心脏、脑组织及血液中均检测到了血清 3 型 呼肠孤病毒。呼肠孤病毒引起的胃肠道症状主要表现为轻度腹泻,腹泻的症状可单独出现,也可 与上呼吸道症状同时出现。此外,多数引起胆道闭锁的疾病都与呼肠孤病毒感染有关,55%患有 肝外胆道闭锁(Extrahepaticbiliary atresia, EHBA)和78%患有胆总管囊肿(Choledochal cysts, CDC) 的患者肝组织或胆道组织中,可检测到呼肠孤病毒的 RNA(Tyler et al, 1998)。呼肠孤病毒引起 的人类神经系统疾病主要包括脑炎和脑膜炎。通过对 3 种血清型呼肠孤病毒的研究发现,血清 1 型呼肠孤病毒一般不感染神经细胞,但是可引起脑室管膜炎和脑水肿;血清 2 型呼肠孤病毒可引 起脑炎;血清 3 型呼肠孤病毒感染神经细胞,能引起致死性脑炎。

自 20 世纪 70 年代到 20 世纪末, 我国未有过自呼吸道标本中分离到呼肠孤病毒的报道, 但 国外文献曾报道呼肠孤病毒可引起动物严重呼吸窘迫综合征和肺纤维化(Bellum et al, 1997; Majeski et al, 2003)。2003 年中国大陆和世界上其它的国家、地区爆发了严重急性呼吸综合征 (servere acute respiratory syndrome, SARS), 国际卫生组织已宣布其病原为一种新型的冠状病毒 ——SARS-CoV。但是, SARS 的病原体可能不只一种。我国学者从 SARS 患者的尸检肺组织内 分离到了呼肠孤病毒(Duan et al, 2003), 而且在电镜下同一个细胞中观察到 SARS-CoV 和呼肠 孤病毒同时存在,表明这两种病毒存在共感染的可能性(左庭婷等, 2003; 杨怡等, 2003)。从 SARS 患者体内分离到的呼肠孤病毒没有血凝性(杨怡等, 2005),这说明所分离的呼肠孤病毒的生物学 特性与已报道的呼肠孤病毒有所不同,因此可能是一种新型的呼肠孤病毒。而且,从患者体内分 离到的呼肠孤病毒感染猴后能引起与 SARS 患者相似的临床神经症状(朱虹等, 2003),这可能是 病毒感染中枢神经系统引起的(朱虹等, 2004; 何诚等, 2004)。这些现象再次提示:确定呼肠孤病 毒与冠状病毒之间的关系以及他们在 SARS 疫情中的作用具有重要的意义。以上这些发现都表明 呼肠孤病毒与人类疾病关系密切,必须予以重视。

#### 1.1.3 呼肠孤病毒引起的动物疾病

一般认为除了感染啮齿类动物外,MRV 通常不引起明显的疾病,特别是对成年动物的致病 性较弱。啮齿类动物如鼠,对3个血清型的呼肠孤病毒都很敏感,感染后常引起较为严重的疾病, 表现为肝炎、脑炎和脊髓炎。其他哺乳动物感染呼肠孤病毒后常呈无症状经过。从马、牛、绵羊、 犬、猫体内能分离到3个血清型的呼肠孤病毒,牛、犬以1型为主,马、绵羊、猫以3型为主。 呼肠孤病毒能引起一些动物出现神经系统疾病,如猴脑水肿,狗脑炎及猫运动共济失调等,但较 为少见。鸡呼肠孤病毒可以导致鸡病毒性关节炎和吸收障碍综合症(Clarke et al, 2005)。番鸭呼 肠孤病毒能引起雏番鸭坏死性肝炎(Marius et al, 1988)。此外,近几年来从野生动物,如蛇 (Lamirande et al, 1999)、狒狒(Leland et al, 2000)、蝙蝠(Pritchard et al, 2005)等体内也分离到 了呼肠孤病毒。

#### 1.2 呼肠孤病毒的形态结构

呼肠孤病毒粒子在电镜下呈现典型的 5 3 2 的二十面体结构,病毒粒子的核心是由基因组 核酸及与其密切连接的内衣壳构成,外面包裹着外衣壳,但没有囊膜。内衣壳与外衣壳呈同心圆 排列,完整的病毒粒子直径约 75 nm,病毒核心直径约 52 nm (如图 1-1)。使用低温电镜、三维 重构映像分析以及 X 射线晶体衍射进行研究,发现呼肠孤病毒外衣壳按不完全的 T=13 对称排列, 病毒内层衣壳按 T=1 或 T=2 对称排列 (Reinisch et al, 2000; Shaw et al, 1996; Grimes et al, 1998)。 近年来的观察发现,有些呼肠孤病毒科成员的蛋白衣壳不是双层的,而是三层。因此,有学者建 议将呼肠孤病毒科根据病毒衣壳的结构划分为 2 大类(Mertens et al, 2000):完整的病毒(或核心) 在 5 次对称轴的 12 个顶部有钉状突起物的为第 1 类(或称粗糙型),如正呼肠孤病毒属 (*Orthoreovirus*)、 我济病毒属(*Fijivirus*)、 质型多角体病毒属(*Cypovirus*)、水生呼肠孤病毒属 (*Aquareovirus*)、稻病毒属(*Oryzavirus*)等;在 5 次对称轴上无任何突起或衣壳表面相对光滑 的呼肠孤病毒为第 2 类,如环状病毒属(*Orbivirus*)、轮状病毒属(*Rotavirus*)、植物呼肠孤病毒 属(*Phytoreovirus*)和科州蜱传热病毒属(*Coltivirus*)等(方勤等,2003)。



图 1-1 呼肠孤病毒形态 <u>www.kuleuven.ac.be/ rega/mvr/pictures/reovirus.jpg</u> Fig.1-1 Morphology of Revirus. <u>www.kuleuven.ac.be/ rega/mvr/pictures/reovirus.jpg</u>

呼肠孤病毒的8个结构蛋白组成内、外衣壳,包裹10条dsRNA基因组,形成完整的病毒粒子。 除了呼肠孤病毒完整的病毒粒子外,在感染细胞内还会产生2种天然的亚病毒颗粒,一种是中间 亚病毒颗粒(intermediate subviral particles, ISVPs),另一种是病毒核心(core)(见图1-2 a)。体 外实验表明,用蛋白酶处理纯化的病毒粒子,能够模仿体内环境形成这两种亚病毒颗粒(Farsetta et al, 2000; Coombs et al, 1998)。很多有关呼肠孤病毒粒子的形态和各结构蛋白在病毒粒子中定位 的研究都是通过比较这3种病毒颗粒进行的。





图1-2 MRV血清1型(T1L)的结构.(a)完整病毒粒子;ISVP;核心。(b)T1L基因组各节段PAGE电泳模拟图。(c) 病毒粒子;ISVP;核心SDS-PAGE电泳模拟图。每个蛋白与(b)中的基因对应。注意在完整病毒粒子转变为ISVP时 3蛋白水解,而µ1裂解为和。当ISVP转变为核心时,1、和降解。与MRV同源的ARV结构蛋白标于右 侧括号内。(d)病毒粒子、ISVP、核心的组成图。各蛋白的颜色与(c)中的对应。

Fig 1-2 Structure of Reovirus Serotype 1 Lang (T1L). (a) Electron micrographs of the reovirus virion (virus), the intermediate subviral particle (ISVP), and the core. (b) Cartoon of genome profile of T1L in polyacrylamide gel Gene segments (L1–S4) are indicated on the left. (c) Cartoon of protein profiles of virus, ISVP and core in sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel. Each protein is encoded by the indicated gene segment in (b) (arrows). Note that protein  $\sigma 3$  is removed from particles, and protein  $\mu 1$  is cleaved into peptides  $\delta$  and  $\Phi$ , when the virion is converted into the ISVP. Peptides  $\sigma 1$ ,  $\delta$  and  $\Phi$  are removed when the ISVP is converted into the core. Identification of known cognate avian reovirus proteins are indicated in parentheses to the right of the mammalian reovirus protein names. (d) Composite cartoon of reovirus virion, ISVP and core. Proteins are colour-coded to facilitate their identification in (c).

最内层的衣壳又叫做核心,由五种结构蛋白组装而成,MRV的这五种蛋白分别 $\lambda$ 1、 $\lambda$ 2、 $\lambda$ 3、 $\mu$ 2、 $\sigma$ 2。通过电子冰冻显微镜和X射线晶体衍射分析可以确定病毒核心的组成方式(Dryden et al, 1993; Reinisch et al, 2000)。观察结果表明, $\lambda$ 1蛋白有120个拷贝,形成60个不对称的二聚体,构成一个薄的T=1的正二十面体衣壳,包裹着病毒的基因组。150个 $\sigma$ 2蛋白的球形单体装饰在 $\lambda$ 1衣壳的外表面,起到支撑衣壳的作用。 $\lambda$ 2蛋白的60个拷贝,形成12个5聚体,位于 $\lambda$ 1衣壳的12个五倍体轴的顶端,形成约8 nm的通道,并向外延伸形成约9 nm的突起(见图1-3)。另外的两个内衣壳蛋白( $\lambda$ 3和 $\mu$ 2),分别是RNA依赖性RNA聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase,RdRp)和RdRp的协同因子,它们可能定位于核心衣壳之下(Dryden et al, 1998)。完整的病毒核心具有转录活性,在病毒复制过程中产生mRNA。最近有关ARV的结构研究表明,它与MRV结构相似。ARV结构蛋白与MRV结构蛋白的对应情况(见图1-2 b, c)。

其余的 3 个结构蛋白 ( $\mu$ 1、 $\sigma$ 1、 $\sigma$ 3 ) 组成病毒的外衣壳包裹着内衣壳。MRV 外衣壳蛋白  $\mu$ 1 有 600 个拷贝, 位于内衣壳表面, 同时 600 个  $\sigma$ 3 蛋白与其相互交错形成外衣壳的二十面体骨架。 尔后,  $\sigma$ 1 蛋白的 36 个拷贝, 组成 12 个三聚体, 位于  $\lambda$ 2 通道上, 有证据表明  $\sigma$ 1 蛋白不是一定位 于  $\lambda$ 2 通道的顶点 (Larson et al, 1994)。外衣壳的功能主要是病毒对细胞受体的识别、吸附、感染 和病毒遗传信息的传递。在病毒侵入时, 完整的病毒颗粒转变为 ISVPs, 然后是核心。ISVPs 没 有  $\sigma$ 3 蛋白, 直径大于 80 nm,  $\mu$ 1 蛋白裂解为  $\delta$  和  $\Phi$ , 另外  $\sigma$ 1 蛋白形态改变。T1L 的  $\sigma$ 1 三聚体 展现棒棒糖 (lollipop)形状。N-末端的纤维状卷曲螺旋部分进入到  $\lambda$ 2 通道内, 而 C-末端的球形 头部延伸 40 nm (见图 1-2 a, d)。这种构象的改变有利于病毒的吸附与感染。从 ISVPs 转变为核 心的过程中  $\delta$ 、 $\Phi$  和  $\sigma$ 1 水解, 暴露出裸露的内衣壳。



图 1-3 呼肠孤病毒核心 A:www.chess.cornell.edu/.../ images/image7.gif;B:www.cgl.ucsf.edu/.../ capsids /1ej6-to-scale.jpg

Fig1-3 Core of Revirus.A:www.chess.cornell.edu/.../ images/image7.gif;B:www.cgl.ucsf.edu/.../ capsids/1ej6-to-scale.jpg

#### 1.3 呼肠孤病毒的生物学特性

呼肠孤病毒没有囊膜,不含糖类与脂质,对乙醚、氯仿等有机溶剂有较强的抵抗力。能在 pH3.0 ~9.0 的广泛酸碱范围内保持稳定。在室温条件下,能耐 1%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、3%福尔马林、5%来苏儿和 1% 石炭酸 1 小时,但在 95%的乙醇、苯酚中则失去活性,过碘酸盐能快速杀死呼肠孤病毒,紫外线 也可以灭活病毒。呼肠孤病毒对热比较稳定,不同血清型的毒株对热的稳定性稍有差别,血清 2

型抗热能力比血清 1 型与 3 型强。1~2 mol/L Mgcl<sub>2</sub> 对呼肠孤病毒有保护作用,在 2mol/L 的 Mgcl<sub>2</sub> 中 50~55 加热 5~15 分钟,能明显的提高正呼肠孤病毒的感染性,且不影响血凝滴度(黄桢祥, 1990)。这是因为去除外衣壳或改变外衣壳结构利于病毒的感染。

MRV 根据红细胞凝集活性分为三种血清型:血清1型(T1L,Long)血清2型(T2J,Jone) 和血清3型(T3D,Dearing;T3A,Abney)。3个血清型的病毒均能凝集人的"O"型血红细胞,血 清3型还能凝集牛的红细胞。红细胞凝集现象在4~37 的条件下都能发生。红细胞凝集活性对温 度的稳定性以血清2型最好,1型次之,3型最差,保存温度以21 最宜。56 加热能使呼肠孤 病毒快速丧失红细胞凝集活性,但如果有 Mg<sup>2+</sup>存在稳定性增强。分离自猪的病毒株常可凝集猪的 红细胞,但不能凝集豚鼠和鸡的红细胞。乙醚不能破坏呼肠孤病毒的红细胞凝集性和感染性,氯 仿能破坏红细胞凝集性但不影响其感染能力。呼肠孤病毒的红细胞凝集性可被特异性抗血清抑 制,因此可以用红细胞凝集抑制试验检测抗体或用已知抗体鉴定病毒(殷震等,1997)。禽的呼肠 孤病毒不具有红细胞凝集性。此外,在人、鼠、豚鼠、兔、猴、猩猩、马、牛、猪、狗等动物血 清中有针对呼肠孤病毒红细胞凝集素的非特异性抑制物,应通过白陶土等处理去除,以免影响试 验结果。

呼肠孤病毒可以在很多种类的培养细胞中增殖,包括原代猴肾细胞、人胚肾细胞、豚鼠肾细胞、猪肾细胞、猫肾细胞、狗肾细胞、羊肾细胞、牛肾细胞、L细胞、HeLa细胞和 Vero细胞等。 感染后 7~14 天出现细胞病变,主要是在感染细胞内形成嗜伊红性胞浆内包涵体。这些包涵体主 要形成于细胞核附近的胞浆内。电子显微镜观察发现包涵体内既有完整的病毒粒子也有不完整的 病毒粒子。这些病毒粒子经常呈结晶状排列,并常连接于微管上。呼肠孤病毒的典型细胞病变是 细胞颗粒性变,细胞变圆,收缩,脱落。如果感染的剂量小,细胞病变难与细胞退化性变化区别。 实验室经常使用猴肾细胞及原代人胚肾细胞分离病毒,呼肠孤病毒在猴肾细胞和L细胞上能形成 空斑。ARV 可以在鸡胚组织细胞上繁殖,并引起感染细胞融合,还能形成浆内包涵体。研究表明, 目前正呼肠孤病毒属的成员除 MRV 外都能诱导感染细胞融合。

#### 1.4 呼肠孤病毒的检测方法及分类学依据

电镜法(EM):因为呼肠孤病毒在电子显微镜下具有独特的形态特征,经磷戊酸负染后直接 观察的电镜法(DEM)是检查粪便中及组织培养细胞中病毒的最简单和最可信的方法。粪便提取 液、细胞培养悬液经超速离心浓缩后可提高检出率(Abramowitz et al, 1987)。

聚丙烯酰胺凝胶电泳法 (PAGE): 此法特异性很性强。根据呼肠孤病毒 dsRNA 基因组分 10 个节段的特征,不但能够判断阳性结果,还可根据显示的特殊电泳图谱,鉴别人和动物的呼肠孤 病毒,发现新的呼肠孤病毒,还能研究呼肠孤病毒的基因变异。这些结果是电镜法和 ELISA 法所 不能提供的。此法所需设备和操作较简单,可同时检测大量样品。但在操作中应注意妥善保存标 本,避免反复冻融,所用的器材和试剂应防止 RNA 酶污染,防止因病毒 RNA 降解而造成假阴性 结果 (Loh et al, 1968)。

分子生物学方法:随着分子生物学技术的不断发展,核酸探针杂交、RT-PCR等技术也开始应用于呼肠孤病毒的检测。国外已有用RT-PCR方法从地下水(Martinson et al, 2003)人(Hermann

et al, 2004) 禽(Caterina et al, 2004) 水生动物(Seng et al, 2004)及细胞培养物(Leary et al, 2002) 等样品中检测到呼肠孤病毒的报道,并发展了RT-PCR检测呼肠孤病毒的技术。而国内用RT-PCR 方法检测呼肠孤病毒的报道一般局限于致病性较强的禽呼肠孤病毒(廖敏等, 2003; 谢芝勋等, 2001; 谢芝勋等, 2003) 和草鱼呼肠孤病毒(方勤等, 2003)。

除以上的最为简单有效的方法之外,还有传统的血清学诊断方法,如红细胞凝集实验、红细胞凝集抑制试验、补体结合试验、中和试验、免疫扩散试验等,其中以红细胞凝集抑制试验最常用,此外 ELISA 方法的使用也很广泛 (Chen et al, 2004; Liu et al, 2002)。

亚群 (subgroup)	种(Species)		
	Mammalian orthoreovirus 1		
哺乳动物正呼肠孤病毒	Mammalian orthoreovirus 2		
(Mammalian orthoreovirus MRV)	Mammalian orthoreovirus 3		
	Mammalian orthoreovirus 4 Ndelle virus		
	SARS orthoreovirus GD-2003		
會正哑跖孤病害	Avian reovirus		
南止町加加州中 (Avian orthoreovirus APV)	Muscovy duck reovirus		
(Avian ormoreovirus, Arv)	Goose reovirus		
狒狒正呼肠孤病毒	Baoon reovirus		
(Baboon orthoreovirus, BRV)			
纳尔逊海湾正呼肠孤病毒	Nelson Bay Virus (flying fox)		
(Nelson Bay orthoreovirus, NBV)	Pulau Reovirus (flying fox)		
爬虫正呼肠孤病毒	Snake reovirus		
(Reptilian orthoreovirus, RRV)	Python reovirus		

Table 1-2 Classification of Orthoreovirus

表 1-2 正呼肠孤病毒属的分类

由于呼肠孤病毒的宿主范围非常广泛,所以在分类时首先考虑到的是宿主,尔后是生物学特性。现已发现的正呼肠孤病毒属根据宿主范围及生物学特性可分为 MRV、ARV、BRV、NBV、 RRV 5 个亚群(见表 1-2)。各亚群之间在生物学特性上具有较大的差异。例如 MRV 3 个血清型 的原型株都具有血凝性,而新近从 SARS 患者体内分离的呼肠孤病毒 GD-2003 则没有,ARV 也 没有。此外,ARV 能够引起感染细胞的融合,MRV 却不能,但同是从哺乳动物体内分离的 BRV、 NBV 却与 ARV 相同能引起细胞融合(Ducan et al, 1995)。因此,曾有学者建议按照融合能力将 正呼肠孤病毒分为融合基因正呼肠孤病毒(MRV)与非融合基因正呼肠孤病毒(ARV、BRV、 NBV、RRV )。目前融合基因和非融合基因正呼肠孤病毒间、MRV 与 ARV 间的进化关系及差异 程度还没有完全弄清。融合基因和非融合基因正呼肠孤病毒抗原分析表明 ARV、MRV 和 BRV 含 有有限的保守位点,并且代表不同的正呼肠孤病毒基因群。

总之,正呼肠孤病毒属的分类至少要考虑到以下几个方面:宿主范围、组织嗜性、致病性、 诱导感染细胞融合的能力、核酸电泳的迁移型、红细胞凝集能力、聚合酶的氨基酸序列同源性、 主要结构蛋白(尤其是内衣壳蛋白)氨基酸序列差异(Van et al, 1990; Van et al, 1997; Mayo et al, 1996)。

#### 1.5 呼肠孤病毒的分子生物学特性

呼肠孤病毒的基因组是分节段的 dsRNA,在证明呼肠孤病毒的基因组是由若干条 dsRNA 组成之后,又相继从脊椎动物、无脊椎动物、高等植物、细菌和真菌等宿主体内发现了 60 种以上的 dsRNA 病毒(其形态结构与生物学特性不尽一致),这引起了病毒学工作者对 dsRNA 病毒的极大兴趣。呼肠孤病毒的基因组是 dsRNA 这一重要发现,第一次说明了 dsRNA 可作为稳定的生命形式存在于自然界中。

MRV 基因组具有 10 个基因节段,根据大小分为 3 个群,即 3 个大的基因节段 L1、L2、L3,3 个中的基因节段 M1、M2、M3 和 4 个小的基因节段 S1、S2、S3 和 S4。其中+ssRNA 的 5'端都具有帽子结构,而且每个 dsRNA 节段的 3'均暴露出羟基,这种 dsRNA 节段能够抵抗单链特异的核酸酶 S1 的降解作用。SDS-PAGE 电泳分析发现 10 个基因阶段编码 11 种蛋白,其中 8 种结构蛋白,3 种非结构蛋白,结构蛋白除了参与构成病毒粒子外,还与病毒感染的起始及病毒的转录和复制密切相关。在呼肠孤病毒各基因表达的过程中,每个基因转录成全长的 mRNA,这些基因节段的大小与他们所编码的蛋白基本上是一致的,蛋白的翻译通常是由第一个 AUG 起始的,但是 S1 基因 mRNA 则从两个不同部位的起始密码子 AUG 开始翻译,编码合成相互重叠的  $\sigma$ I(较大,结构蛋白)和  $\sigma$ IS(较小,非结构蛋白)。此外,M3 基因也可以编码二种蛋白  $\mu$ NS 和  $\mu$ NSC,后者是由  $\mu$ NS ORF 内的第 2 个 AUG 起始合成的。

呼肠孤病毒每个基因的 5' 端和 3' 端都有一段小的非翻译区 (nontranslation region, NTR)。 其中 5' 端非翻译区的长度在 12 个碱基 (呼肠孤病毒血清 3 型 T3D 株的 S1 基因) 至 32 个碱基 (T3D 的 S4 基因)之间。3' 端的非翻译区在 32 个碱基 (T3D 的 L1 基因) 至 184 个碱基 (T3D 的 L3 基因)之间。呼肠孤病毒基因组的非翻译区具有多方面的生物学,如涉及到 mRNA 包装, 病毒 RNA 聚合酶的识别,以及作为正链、负链 RNA 合成起始的信号序列。呼肠孤病毒基因组的 非翻译区还影响了病毒翻译的效率。此外呼肠孤病毒所有基因 5' 端都有 5'-GCUA 保守序列,3' 端都有 UCAUC-3' 保守序列 (徐耀先等,2002)。

呼肠孤病毒各基因的特性及其编码的蛋白功能见表 1-3。

#### 1.5.1 呼肠孤病毒编码的结构蛋白及其功能

λ1 蛋白:由 L3 基因编码。该蛋白是内衣壳的主要组分,与内衣壳的 σ2、λ2 和 λ3 蛋白以及 外衣壳的 μ1 蛋白相互作用。λ1 蛋白在靠近 N-末端有一个核苷酸结合基序和一个锌指基序,印记 试验显示  $\lambda$ 1 蛋白可以结合 Zn<sup>2+</sup>, 推测  $\lambda$ 1 蛋白的锌指基序可能与其结合 dsRNA 有关。 $\lambda$ 1 蛋白还 具有转录相关的酶活性。研究还发现  $\lambda$ 1 蛋白具有 ATP 酶活性,它具有 ATP 酶的基序,但它的活 性受温度、pH 值和二价阳离子浓度的影响。这种 ATP 酶的活性在完整病毒粒子和感染性 ISVP 中被隐藏,但在外衣壳蛋白 μ1 被蛋白酶降解后激活,这表明  $\lambda$ 1 蛋白的 ATP 酶活性是在 μ1 蛋白 的调控下发挥作用的 (Noble et al, 1997)。

 $\lambda 2$  蛋白:由L2 基因编码。 $\lambda 2$  蛋白是内衣壳蛋白的一种组分,它能同外衣壳的  $\sigma 1$ 、 $\sigma 3$  以及 内衣壳的  $\lambda 1$ 、 $\lambda 3$  相互作用,起着连接内外衣壳的作用。 $\lambda 2$  蛋白有 60 个拷贝,形成 12 个五聚体, 形成通道,构成核心的突起,是病毒复制时 mRNA 或+ssRNA 进入细胞质的通道。一些 L2 基因 的 ts 突变体,在非允许温度条件下虽然也能够形成核心样病毒颗粒,但不能产生完整的病毒粒子, 这表明  $\lambda 2$  蛋白对外衣壳的组装起着重要的作用。生化分析显示,呼肠孤病毒  $\lambda 2$  蛋白有鸟苷转移 酶的活性,能把 GMP 转换为 GTP 形成 GpppG,或者把 GDP 转换为 GpppG,使 5'-pp-末端的 RNA 形成 GpppG-caps,因此  $\lambda 2$  蛋白是呼肠孤病毒的帽化酶,能将病毒正链转录本帽化。但它既 不需要 5'-ppG-末端的底物,也不形成甲基化的帽结构。这可能是病毒核心中其他组分的功能(Mao et al, 1991)。 $\lambda 2$  蛋白的 RNA 帽化酶活性位点区和它与其他蛋白相互作用的区域较为保守(Breun et al, 2001)。

 $\lambda$ 3 蛋白:是L1 基因的编码产物。 $\lambda$ 3 蛋白是内衣壳的次要组分,推测它定位在病毒核心中。  $\lambda$ 3 蛋白除了与内衣壳蛋白  $\lambda$ 1、 $\lambda$ 2 和外衣壳蛋白  $\mu$ 2 相互作用以外,还是一种病毒的转录酶,含有 病毒 RNA 聚合酶所具有的 GDD 基序,推测它是呼肠孤病毒 RdRp 的活性中心。用痘苗病毒做载 体进行转染试验表明, $\lambda$ 3 蛋白具有 poly(C)依赖性的 poly(G)聚合酶活性。高纯度的  $\lambda$ 3 蛋白, 虽然不能将呼肠孤病毒 dsRNA 转录为 ssRNA,或将呼肠孤病毒正链 RNA 转录为负链 RNA,但 是却能将 poly(C)转录为 poly(G),尤其是在 Mn<sup>2+</sup>存在条件下(Starnes et al, 1993)。 $\lambda$ 3 蛋白 与  $\lambda$ 1 蛋白或(和) $\lambda$ 2 蛋白形成的复合体,能与特异性抗血清反应,但是这些复合体同  $\lambda$ 3 蛋白一 样都不能转录 ds或 ssRNA。 $\lambda$ 3 蛋白与呼肠孤病毒的其他蛋白或细胞的蛋白结合组成完全的 RdRp, 才能发挥活性,其中  $\lambda$ 3 蛋白为病毒 RNA 聚合酶的活性亚基。由于编码  $\lambda$ 3 蛋白的 L1 基因较为保 守,因此常作为 RT-PCR 鉴定用区域。而且  $\lambda$ 3 蛋白的氨基酸序列同源性分析也是呼肠孤病毒分类 的一个重要依据。

μ1 蛋白:由 M2 基因编码。μ1 蛋白是外衣壳蛋白的主要组分,与内衣壳蛋白 λ1、λ2 和外衣 壳蛋白 σ3 相互作用。其氨基端被豆蔻酸所修饰,这与呼肠孤病毒粒子侵入有关。μ1 蛋白经蛋白 酶切割产生 4.2 kD 的氨基端片段 μ1N 和 72 kD 的羧基端片段 μ1C,其切割位点在 μ1 第 42 位与 43 位氨基酸残基之间。在呼肠孤病毒粒子的外衣壳中,μ1 大多以 μ1C 形式存在。当呼肠孤病毒 经口进入胃肠道时,存在于肠腔中的胰凝乳蛋白酶和胰蛋白酶对 μ1 或 μ1C 产生进一步的切割, 其中胰凝乳蛋白酶的切割位点在 581 和 582 位氨基酸残基之间 胰蛋白酶切割位点则在 584 与 585 位氨基酸残基之间。μ1 经切割产生氨基端酸性的 μ1δ(μ1N+δ)片段和羧基端碱性的 Φ 片段,μ1C 形成 δ 片段和 Φ 片段。在 ISVPs 中存在有一定量的 δ 和 Φ 片段,Φ 片段可能同病毒穿透细胞膜 密切相关。在感染细胞的胞质中,90%的 M2 基因编码 μ1 蛋白,而 95%的 μ1 蛋白通过 μ1C 片段 与 σ3 蛋白结合构成蛋白复合物。M2 基因在不同的呼肠孤病毒毒株中是高度保守的,遗传分析显 示 μ1 蛋白具有多方面的生物学功能。首先,μ1 蛋白在病毒与细胞膜相互作用中发挥重要的作用

(Lucia et al, 1993), 参与病毒粒子和 ISVPs 穿透细胞膜。另一方面具有转录酶活性。 $\mu$ 1 蛋白甚 至还与病毒粒子外壳的稳定性有关。最近的研究显示, $\mu$ 1 蛋白自身催化裂解,产生的 $\mu$ 1N 和 $\mu$ 1C 蛋白,这一过程虽然不是外衣壳装配所必需的,但对病毒粒子的感染性影响很大。这表明衣壳蛋 白自溶,疏水性多肽释放,是无囊膜动物病毒进行膜渗透的一个普遍机制(Odegard et al, 2004), 研究发现, $\mu$ 1 蛋白和  $\sigma$ 3 蛋白与呼肠孤病毒 T3A 株引起的新生小鼠的肝胆管疾病有关(Derrien et al, 2003)。

μ2 蛋白:由 M1 基因编码的 μ2 蛋白是内衣壳的次要成分,它不存在于病毒的核心中,但能 与 λ3 蛋白相互作用,起到支撑内衣壳的作用。根据 M1 基因缺失的 ts 突变体失去 dsRNA 结合能 力推测,μ2 蛋白可能在病毒早期组装或 RNA 复制方面起作用。μ2 蛋白还可能是一种病毒致细胞 病变效应的调节蛋白,与呼肠孤病毒感染引起的新生小鼠心肌炎有关。最近的研究发现 MRV 纯 化的 μ2 蛋白自身就是一个二价阳离子依赖性的核苷三磷酸酶,在体内与微管和非结构蛋白 μNS 相连,在体外与 λ3 蛋白反应,而且 λ3 蛋白的出现适度的刺激了 μ2 蛋白的核苷三磷酸酶活性。λ3蛋白是 RdRp 的活性中心,而 μ2 蛋白是 RdRp 的辅助因子。这些发现证实 μ2 蛋白是 MRV 核心 的一个酶组分,在病毒 mRNA 的合成过程中发挥重要作用(Kim et al, 2004)。由于 μ2 蛋白在 SDS-PAGE 电泳时出现异常现象,抵抗埃德曼降解(Edman degradation)的特征,所以曾一度被 认为不是从第一个起始密码子开始翻译的,然而研究证实 M1 基因的转录起始位点在第一个 AUG 密码子处,但氨基末端的甲硫氨酸残基被去除,下一个氨基酸(丙氨酸)翻译后乙酰化修饰 (Swanson et al, 2002)。

σ1 蛋白:由 S1 基因编码。σ1 蛋白是病毒粒子外衣壳的组分,是呼肠孤病毒的吸附蛋白,同 时又是一种血凝素蛋白(hemagglutinin,HA),能诱导机体产生中和性保护抗体和血凝抑制抗性。 σ1 蛋白与内衣壳蛋白  $\lambda$ 2 和外衣壳蛋白  $\sigma$ 3 相互作用。σ1 蛋白是以三聚物的形式出现在完整病毒 粒子和 ISVPs 中的,呈高度伸展的构型,以带有头尾的长纤维形状突出于病毒核心粒子表面。σ1 蛋白氨基端的尾部是由 α-螺旋卷曲和 β-折叠交替形成的;羧基端头部是由短的 α-螺旋、β-折叠以 及无规则线团构成的结构复杂的球形。σ1 蛋白的头部负责与敏感细胞的受体结合,但是 σ1 单聚 体有很强的蛋白酶活性,不能结合于细胞受体,只有当其寡聚化时其头部才能与细胞受体结合。 σ1 蛋白尾部的 α-螺旋卷曲是其寡聚化的决定因素。编码 σ1 蛋白的 S1 基因是一个多顺反子基因, 有关其跨序列进行转录的机制仍不十分清楚(Shmulevitz et al, 2002)。虽然 σ1 蛋白仅占病毒颗粒 的 2%,而且在细胞中的合成量也很少,但它是一种细胞受体连接蛋白,具有决定病毒组织嗜性, 引起特异性的抗病毒免疫反应的作用(Shahi et al, 2001)。最近的一项研究发现,MRV T1 体内选 择性吸附于 M 细胞这一过程涉及到了 σ1 蛋白与甘油共轭(glycoconjugates)之间的相互作用 (Helander et al, 2003)。还有一点必须说明的是,ARV、BRV,以及新发现的 BRV 和 RRV 都有 引起感染细胞融合的能力,目前认为这种能力与 MRV σ1 蛋白的同源体有关(Shmulevitz et al, 2004; Tsukamoto et al, 1999)。

 $\sigma 2$  蛋白:是 S2 基因的编码产物。σ2 蛋白与 λ1 蛋白和 μ2 蛋白相互作用形成内衣壳,它对呼肠孤病毒 dsRNA 的亲和力较差。序列分析表明,σ2 蛋白包含两个功能区,并且还有一个双亲性的 α-螺旋与大肠杆菌 DNA 依赖性 RNA 聚合酶的 β 亚基相似。S2 基因的 ts 突变体在非允许温度下表现为 RNA 合成缺陷,而且仅产生中空的外衣壳,这表明 σ2 蛋白可在病毒粒子形态发生过程

中起作用 (Wiener et al, 1989)。

 $\sigma$ 3 蛋白:由 S4 基因编码的 σ3 蛋白是外衣壳的主要组分,与μ1 蛋白(μlN 和μlC)共同组 成外衣壳。研究结果表明,σ3 蛋白决定了病毒粒子对加热和 SDS 变性作用的抗性,因此 σ3 蛋白 能增强呼肠孤病毒粒子的稳定性,提高病毒胞外的生存能力。当呼肠孤病毒侵入细胞时,最外面 的衣壳蛋白 σ3 和μl 经蛋白水解,形成 ISVPs,而后脱衣壳成为具有转录活性的核心颗粒。动力 学研究表明,先是 σ3 蛋白具有结合病毒 mRNA 的能力。生化分析表明 σ3 蛋白以序列不依赖的方 式结合 dsRNA,其结合作用的活性域定位在 σ3 蛋白的羧基端。与λ1 蛋白一样,σ3 蛋白还是一 种锌指结合蛋白,其锌指基序和结合锌的活性域定位于氨基端,而且 σ3 蛋白的氨基端是乙酰化 的(Mendez et al, 2003)。σ3 蛋白的 Zn<sup>2+</sup>结合功能域能够使蛋白易于折叠,并且使之易于与μ1 蛋 白结合。σ3 蛋白还能调节病毒基因的转录和翻译。dsRNA 可以激活 dsRNA 依赖性蛋白激酶 (dsRNA-dependent protein kinase, PKR),被激活的 PKR 可以催化转录起始因子 eIF-2α 的磷酸化, 导致蛋白质合成抑制,而当呼肠孤病毒 σ3 蛋白结合 dsRNA 时,dsRNA 就失去了对 PKR 的激活, 于是 eIF-2α 进入 eIF2α.GTP.Met-tRNAi 复合物的循环中,继续维持病毒蛋白翻译的起始过程。

#### 1.5.2 呼肠孤病毒编码的非结构蛋白及其功能

μNS 蛋白:由 M3 基因编码。在感染细胞中, M3 基因节段编码两种基因产物 μNS 和 μNSC。 μNSC 是由第二个 AUG (in-frame AUG) 起始翻译的,所以μNSC 仅在氨基端比μNS 少 40 个氨 基酸残基。µNS和µNSC的羧基末端形成 alpha-helical coiled coils的结构,尤其是 coiled-coil dimers, 因而 μNS 能够结合细胞骨架,与病毒结构锚定有关(McCutcheon et al, 1999)。感染 MRV 的细胞 内出现胞质内包涵体,是病毒复制和装配的场所,又叫做病毒工厂。有研究表明当仅有 uNS 表达 时形成球状包涵体,当μNS和μ2共表达时形成丝状包涵体(μ2蛋白与微管相连)。在形成球状 包涵体的细胞内,当病毒蛋白  $\lambda$ 1、 $\lambda$ 2 和 σ2 与  $\mu$ NS 共表达时这几种蛋白就能定位于包涵体内,如 独自表达则广泛分布于胞质内。而在形成丝状包涵体的细胞内 μNS 的前 40 个氨基酸残基是与 μ2 蛋白相连所必需的,只有当病毒蛋白与 μNS 和 μ2 共表达时才能定位于病毒工厂,否则在胞质内 呈现广泛的分布。病毒蛋白 μNS 和 μ2 在将病毒及细胞的成分募集到病毒工厂这一过程中发挥着 主要而特有的作用 (Broering et al, 2004)。 μNS 蛋白的前 40 个氨基酸对于与 μ2 蛋白的共定位是 必需的 , 但是对包涵体形成则是非必需的。μNS 蛋白的 1 到 40 个氨基酸与绿色荧光蛋白融合后 , 有效的和 μ2 蛋白共定位,但不形成包涵体,这表明 μNS 蛋白和 μNSC 蛋白功能不同。μNS 蛋白 形成包涵体的能力和它与 μ2 蛋白在转染细胞中共定位的能力表明:μNS 蛋白在形成病毒工厂的 过程中发挥关键的作用 (Broering et al, 2002)。ARV 的 M3 基因编码非结构蛋白  $\mu$ C, 它能使  $\sigma$ NS 蛋白进入包涵体 (Touris et al, 2004), 这点与 MRV 的 μNS 蛋白相似。

σ1S 蛋白:由 S1 基因编码,又叫 P14 蛋白。是一种碱性蛋白,氨基端有一组碱性氨基酸残 基是高度保守的。具有结合核苷酸的活性。目前,有关 σ1S 蛋白是均匀的分布在被感染细胞的胞 质和胞核中,还是仅分布于胞质中仍处于争论之中。在哺乳动物细胞中,单独表达 σ1S 蛋白或与 σ1 蛋白共同表达,都不改变细胞 DNA 复制的动力学。但如果在感染细胞中过度表达 σ1S 蛋白则 可能对细胞病变以及细胞 DNA 合成产生潜在的影响。已有研究表明,呼肠孤病毒 T1L 与 T3D 诱

导感染细胞凋亡的能力不同主要是由 S1 基因决定的 ,虽然  $\sigma$ 1 蛋白在此过程中的作用大  $\sigma$ 1S 蛋白 , 但  $\sigma$ 1S 蛋白可能也发挥一定的作用 (Tyler et al, 1995 ).

σNS 蛋白:由 S3 基因编码的非结构蛋白。该蛋白富含 Cys 残基,并且多肽序列中有 α-螺旋。 σNS 蛋白对 ssRNA(包括 mRNA)有很强的亲和力。翻译后不久的 σNS 蛋白可以单独或与 σ3 蛋 白一起结合 mRNA。在呼肠孤病毒形态发生过程中,σNS 结合 ssRNA 的活性可能与病毒 mRNA 与其它蛋白结合为复合物有关。S3 基因的 ts 突变体,在非允许温度下 RNA 合成受到抑制。据报 道,一些包含 σNS 蛋白的病毒粒子具有 poly (C)依赖性的 RNA 聚合酶的活性,但有人认为这 种活性归因于相同病毒粒子中存在有  $\lambda$ 3 蛋白的缘故。序列分析表明,呼肠孤病毒的 S3 基因在进 化上与宿主物种、地理区域、分离的时间无关 (Goral et al, 1996)。

#### 1.5.3 存在的问题及展望

呼肠孤病毒的基因组结构复杂,核苷酸序列常因基因漂移、转移和重配而不同,造成呼肠孤 病毒变异的多样性。尽管对呼肠孤病毒结构及其蛋白的功能有了一定程度的了解,但现有的结果 还不足以阐明呼肠孤病毒在行使侵染时各蛋白之间的相互联系,以及病毒转录、复制与翻译的调 控机理。随着对呼肠孤病毒结构的深入了解,以及对呼肠孤病毒各基因表达系统和感染性分子克 隆的研究将逐一阐明病毒侵染与复制的大分子动态过程。

呼肠孤病毒的蛋白复杂多样, σ1 蛋白决定血清型, λ2 蛋白和 σ3 蛋白决定群特异性, 而且不 同血清型之间的免疫交叉性很差,这给呼肠孤病毒免疫及疫苗研制带来了困难。目前虽然有获得 了融合蛋白的报道,但由于抗原决定簇的构象性,所获得的融合蛋白效果并不理想。因此如何制 备高效的具有适宜构象的融合蛋白,还有待进一步研究。从 SARS 患者体内分离到呼肠孤病毒使 人们意识到了呼肠孤病毒与 SARS-CoV 协同感染的可能性,同时也存在呼肠孤病毒与其它病毒共 感染的可能性。

此外,呼肠孤病毒在早期转录时由外衣壳蛋白 σ3 调控的 dsRNA-PKR 反应,具有抑制肿瘤的 作用。这一重大发现,预示着研究以呼肠孤病毒为代表的 dsRNA 病毒不仅具有重大的理论意义, 而且在基因治疗方面具有潜在的应用前景。目前用于裂癌的主要是 MRV T3 Dearing( Norman et al, 2000)。80%以上的不同来源的人肿瘤细胞系均能被感染,不管是否存在免疫能力,呼肠孤病毒均 能够消除体内肿瘤。呼肠孤病毒作为裂癌制剂与化疗药物联合治疗癌症还未见报道,但它作为免 疫疗法与化疗药物 BCNU 联合治疗癌症已有报道。呼肠孤病毒在 Ras 信号途径活化的细胞内能够 特异地复制,因此它作为裂癌剂抵抗多种癌症是可行的(Mundschau et al, 2004)。而且动物试验 已取得了一定的成功,为进入临床试验打下基础,目前利用呼肠孤病毒治疗癌症的 期临床实验 正在进行。

#### 中国农业科学院博士学位论文

#### 表 1-3 呼肠孤病毒各基因的特性及编码的蛋白功能(T3D)

Table 1-3 Gene Characteristics and Protein Fuction (T3D)

基因	长度	蛋白	氨基酸	分子质量	位置	拷贝数	功能
(gene)	(size)	(protein)	(amino acids)	(KDa)	(location)	(copy number)	(function)
L1	3854	λ3	1267	142	Core	12	RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)
L2	3916	λ2	1290	145	Core	60	核心突起(Core spike)
							鸟苷转移酶(Guanylyltransferase)
							甲基转移酶(Methyltransferase)
							参与病毒 mRNA 的合成和病毒外衣壳的装配
L3	3896	λ1	1275	143	Core	120	主要的核心衣壳组分(Major core capsid component)
							连接dsRNA(Bind dsRNA)
							锌金属蛋白(Zinc metalloprotein)
							三磷酸核苷酶(ATPase activity)
M1	2304	μ2	736	83	Core	20	RdRp辅助因子(RdRp cofactor)
							连接dsRNA(Bind dsRNA)
							核苷三磷酸水解酶(Nucleotide triphosphatase)
							诱导干扰素(Induces interferon)
							能够影响包涵体的形态、并可以与细胞骨架相互作用。
M2	2203	μ1	708	76	Outer capsid	600	主要的外衣壳蛋白(Major outer capsid protein)
							具有转录活性(Involved in transcription activation)
							参与穿过细胞膜屏障(Involved in penetration into cells)
							μ1 蛋白能与 σ3 形成多聚体在病毒进入细胞的过程中 μ1 蛋白裂解为
							μlC (72 kDa)和 μlN(4 kDa),尔后 μlC 又继续裂解为 δ 和 Φ。

中国农业科子阮博士子位化义
---------------

基因	长度	蛋白	氨基酸	大小	位置	拷贝数	功能
(gene)	(size)	(protein)	(amino acids)	(KDa)	(location)	(copy number)	(function)
M3	2235	μNS	719	80	Nonstructural		连接ssRNA(Bind ssRNA)
							参与病毒装配(Involved in assortment)
							参与二级转录(Involved in secondary transcription)
							主要决定包涵体的形成,能够与μ2和σNS蛋白相互作用,其确切功
							能目前还不十分清楚。
<b>S</b> 1	1416	σ1	455	49	Outer capsid	36	细胞黏附蛋白(Cell attachment protein)
							病毒血凝素蛋白(Haemagglutinin)
							决定病毒组织嗜性和传播(Determines tissue tropism and spread)
							决定病毒血清型(Serotypic determinant)
							σ1 为型特异性的抗原,能够诱导凋亡。
		σls	120	14	Nonstructural		σls 蛋白能够阻断细胞生长周期。
S2	1331	σ2	418	47	Core	150	主要的核心衣壳组分(Major core capsid component)
							能够与 dsRNA 结合(Bind dsRNA)但结合力较弱。
S3	1198	σNS	366	41	Nonstructural		ssRNA结合(Bind ssRNA)
							$\sigma NS$ 蛋白能够与 $\mu NS$ 共同作用参与包涵体的形成,将病毒蛋白募集
							到包涵体内。
S4	1196	σ3	365	41	Outer capsid	600	主要的外衣壳蛋白(Major outer capsid component)
							锌金属蛋白(Zinc metalloprotein)、
							连接dsRNA(Bind dsRNA)
							与 μ1C 形成多聚体,能够控制翻译,病毒入侵时被蛋白酶水解。

#### 1.6 蝙蝠携带病毒的研究概况

蝙蝠是哺乳动物中仅次于啮齿目的第二大类群,也是除人类外,分布范围最广泛的哺乳动物 类群,有很强的飞行能力,其中一些种类的蝙蝠还有迁徙的习性,与人类接触较为密切,是多种 人兽共患疾病病毒的储存宿主。迄今为止,在蝙蝠体内已分离到了 80 多种病毒。目前研究发现, 25 个能够感染脊椎动物的病毒科中有 10 个科和蝙蝠有关,其中包括 1 个 DNA 病毒科疱疹病毒 科(*Herpesviridae*)和9个 RNA 病毒科,黄病毒科(*Flaviviridae*)、披膜病毒科(*Togaviridae*)、 布尼亚病毒科(*Bunyaviridae*)、弹状病毒科(*Rhabdoviridae*)、沙粒病毒科(*Arenaviridae*)、副粘 病毒科(*Paramyxoviridae*)、正粘病毒科(*Orthomyxoviridae*)、冠形病毒科(*Coronaviridae*)和呼 肠孤病毒科(*Reoviridae*)(张树义等,2003)。

现已证实,蝙蝠在病毒携带与传播中发挥重要的作用,但究竟是哪些种类的蝙蝠带有病毒, 却很难有精确的统计。根据 1970 年以来的资料进行初步统计,结果表明,携带有病毒的蝙蝠主 要集中在狐蝠科、叶口蝠科、犬吻蝠科、蝙蝠科、菊头蝠科和鞘尾蝠科,而其中狐蝠科蝙蝠携带 病毒的种类最多(李文东等,2004)。狐蝠因喜食水果又称果蝠,近年来爆发的亨德拉病毒、尼巴 病毒、梅南高病毒等都与它相关。

在发现蝙蝠携带病毒以后,人类采取了很多种方法来防止蝙蝠对病毒的传播,其中很可能由 于采取的方法不当而对蝙蝠物种的保护构成了潜在的威胁。一些动物保护生物学家认为,病毒可 能是引起蝙蝠种群密度下降的一个主要原因。许多研究者认为环境质量的下降、森林的砍伐、外 来动植物的入侵导致蝙蝠的栖息地受到侵袭,蝙蝠开始寻找新的栖息场所,从而增加了蝙蝠与人 类的接触,导致新病毒病的暴发(李志峰等,2005)。因此,无论是从人类健康的角度,还是蝙蝠 保护的角度,研究蝙蝠携带的病毒、可能的传播途径、潜在的危害性以及蝙蝠与病毒的关系具有 重要的意义。

#### 1.6.1 国外对蝙蝠携带病毒的研究概况

近 10 年来国外的研究表明,一些新病毒病的暴发,老病毒病的重返都与蝙蝠有关。自 1994 年以来,澳大利亚、马来西亚等地连续发生多起人兽共患病的传播,致病性微生物是以往未发现 的新病毒,研究结果表明果蝠是这些病毒的自然宿主。包括 1994 年澳大利亚爆发的亨德拉病毒 (Hendra virus, HEV)(Murray et al, 1995; Douglas et al, 1997), 1997 年澳大利亚爆发的梅南高病 毒(Menangle virus, MENV)(Philbey et al, 1998; Kirkland,2001), 1998 年马来西亚爆发的尼巴病 毒(Nipah virus, NIV)(Chua et al, 2000; Yob et al, 2001; Chua et al, 2002)以及 Tioman 病毒(Tioman virus, TIV)(Chua et al, 2001),这些病毒病的暴发都与果蝠有着密切的联系。老病毒病的重返表 现最明显的是狂犬病毒(Rabies virus, RV),人类因被带毒蝙蝠袭击引起感染的事件时有发生 (Fraser et al, 1996)。

蝙蝠仿佛是一个天然的病毒库,在过去的 50 年里,国外从各种蝙蝠体内分离到多种病毒, 其中包括弹状病毒科的狂犬病毒(King et al, 1990)和狂犬病相关病毒(Shope et al, 1982) 黄病 毒科(Flaviviridae),布尼病毒科(Bunyaviridae),披膜病毒科(Alphaviridae)的部分成员(Karabatsos

et al, 1969) 呼肠孤病毒科(*Reoviridae*)(Gard et al, 1970) 沙粒病毒科(*Arenaviridae*)(Downs et al, 1963) 疱疹病毒科(*Herpesvirida*)(Warrilow et al, 2003)的成员。这些病毒中的相当一部 分属于人兽共患病病毒,它们的分布和扩散可能远比人们估计的要广泛得多,蝙蝠携带的病毒已 对动物和人类的健康构成了威胁。

#### 1.6.2 国内对蝙蝠携带病毒的研究概况

据最近的报道,我国大约有120种蝙蝠,其中11种为果蝠,它们分别是:棕果蝠、抱尾果蝠、 球果蝠、大长舌果蝠、安氏长舌果蝠、琉球狐蝠、泰国狐蝠、马来大狐蝠、印度大狐蝠、犬蝠(又 名短吻果蝠)和短耳犬蝠(王应祥,2003),主要栖息于云南、广东、广西和海南等省。果蝠主要 采集水果为食,与人类接触较多。

我国对蝙蝠的研究工作起步较晚,对其生态学、行为学研究还不够深入,特别是对其体内携 带什么病毒,以及病毒和蝙蝠的生态学关系研究较少,对蝙蝠与人类疾病之间的关系研究的更少。 迄今为止,我国对蝙蝠携带病毒的研究有以下几个发现:从蝙蝠体内分离到了罗斯河病毒(Ross River virus, RR)(赵春生等,1997)、乙型脑炎病毒(Japanese encephalitis virus, JEV)(黄文丽等, 2000;张海林等,1990;张海林等,2001;袁庆虹等,1996)、基孔肯雅病毒(Chikungunya virus, CHIKV)(张海林等,1989;董必军等,1993)和森林脑炎病毒(Russian spring summer encephalitis, RSSE)(杨蓝萍等,1993)。虽然到目前为止,我国从蝙蝠体内仅分离到了这4种病毒,但这并不 足以说明我国蝙蝠不携带其它病毒,更何况世界上流行的其他病毒很有可能传播到我国。所以, 我国应尽快开展有关蝙蝠携带病毒的研究。

人类新现病毒性疾病与蝙蝠的关系密切决不是偶然现象,其间的物种进化、亲缘关系、环境 因素的相互作用急需研究阐明。自SARS爆发以来,在世界范围内已有数千人感染,数百人死亡, 尽管对其病原休的鉴定方面还有不同的看法,但很多人怀疑病原体来自于野生动物。蝙蝠作为多 种人兽共患病病毒的自然宿主,曾在多起传染病的流行中扮演了重要的角色,目前尽快开展蝙蝠 的病原监测工作已迫在眉睫。

综上所述,加强蝙蝠携带病毒的研究,对预防某些病毒病的暴发,保护人类健康以及保护蝙 蝠均具有重要的意义。因而,我们应紧密跟踪目前蝙蝠和病毒的研究动态,加强动物学家与病毒 学家的合作,查清蝙蝠携带的病毒的种类和携带病毒的蝙蝠种类,从而有效的预防蝙蝠作为病毒 宿主可能导致的疾病传播。

#### 1.7 本研究的意义

本实验从野生犬蝠体内分离到了呼肠孤病毒,针对其生物学与分子生物学特性进行研究,完成了犬蝠源呼肠孤病毒全基因组 10 个基因节段完整 ORF 的序列测定,并利用相关的分子生物学软件对其核苷酸与氨基酸序列进行同源性分析,绘制系统发生进化树,通过对各基因编码产物的功能区与结构域的分析预测各蛋白的功能,揭示了犬蝠源呼肠孤病毒与其他正呼肠孤病毒属成员的同源性关系,以及其在呼肠孤病毒科的分类与进化中所处的地位。本实验对犬蝠源呼肠孤病毒形态结构、生物学特性、理化性质、基因组结构进行了研究;对其编码蛋白功能、系统进化、同

源性进行了分析。为该病毒的分类、进化、蛋白质空间结构和功能研究奠定了基础。

呼肠孤病毒是人畜疾病的一个重要的病原体。本研究是我国首次从野生动物体内分离到呼肠 孤病毒,根据其各基因节段与不同呼肠孤病毒毒株同源性相近(尤其是人和鼠的呼肠孤病毒), 推测该毒株可能是在自然感染过程中经长期的重配形成的,对研究呼肠孤病毒的遗传进化具有重 要的意义。

而且,本研究是国内首次从蝙蝠体内分离到呼肠孤病毒,为我国蝙蝠携带的病毒增加了一个 新例。对开展蝙蝠的病原监测,有效的预防蝙蝠作为病毒宿主可能导致的疾病传播具有重要的意 义。

### 第二章 犬蝠源呼肠孤病毒的分离鉴定

#### 2.1 材料与方法

#### 2.1.1 细胞、培养基和血清

Vero-E6 细胞由本实验室保存; DMEM 培养基购自 Sigma 公司; 犊牛血清购自上海赛达公司。

#### 2.1.2 载体和受体菌

pMD18-T 载体购自宝生物工程(大连)有限公司;受体菌大肠杆菌 TG1 由本课题组制备、保存。

#### 2.1.3 实验动物

SPF 鸡,实验用普通级牛、大鼠和豚鼠由哈尔滨兽医研究所实验动物中心提供。

#### 2.1.4 工具酶和主要试剂

鼠源反转录酶 (RevertAid<sup>TM</sup> M-MuLV Reverse Transcriptase) 购自 MBI Fermentas; RNA 酶抑 制剂(Ribonuclease inhibitor)、TRIzol RNA 提取试剂盒购自 Invitrogen 公司;柱式 DNA 胶回收试 剂盒购自上海生工生物工程技术服务有限公司;特异性引物由上海生工生物工程技术服务有限公 司合成; *Ex Taq* DNA 聚合酶和 DNA Marker (DL2000) 购自宝生物工程(大连)有限公司。其余 实验用试剂均为国产分析纯。

#### 2.1.5 主要仪器设备

电热恒温水浴锅(DK-8D型,上海精宏实验设备有限公司);低温台式高速离心机(Allegra TM 21R centrifuge,美国 Beckman 公司);PCR 仪(Gene Amp PCR System 2400 型,美国 PERKIN-ELMER 公司);紫外凝胶成像仪(Image Master VDS,瑞典 Pharmacia 公司);制冰机 (SIM-F124,SANYO);紫外分析仪(JY02 型,北京君意机电技术公司);电热恒温培养箱 (HENGZI,上海跃进医疗器械厂);高压锅(LABAUTOCLAVE S/N ZY0302,SANYO);旋涡 混合器(QL-901,江苏海门麒麟医用仪器厂);直流电泳仪(DYY-,北京六一仪器厂);电子 天平(AE240,Mettler);生物安全 级操作柜(LABLONCO PURIRIER);空气浴震荡器(HZQ-C 型,哈尔滨东联电子有限公司)。

#### 2.1.6 引物

参照报道(Leary et al, 2002)合成呼肠孤病毒鉴定用套式 RT-PCR 引物。L1e/L1f 引物对扩增 呼肠孤病毒 L1 基因约 454bp 的片段,而 L1g/L1h 引物对扩增呼肠孤病毒 L1 基因约 348bp 的片段 (引物序列见表 3-1)。

#### 2.1.7 样品的处理与病毒分离

取保存于-20 的犬蝠样品,研磨后离心取上清。加入双抗(青霉素终浓度 100 U/ml,链霉 素终浓度 100 μg/ml)处理 4 h 后接种于 Vero-E6 细胞,37 培养 10 天,反复冻融 3 次,收集细 胞及培养液,再接种于 Vero-E6 细胞。盲传至出现细胞病变,冻融 3 次,收集细胞及培养液,-20 保存备用。

#### 2.1.8 电镜观察

将感染的 Vero-E6 细胞反复冻融 3 次, 5 000 rpm 离心 5 min。取上清,加入等体积的戊二醛, 37 作用 2 h,灭活病毒。13 000 rpm 离心 30 min。收集沉淀,用 0.5%磷钨酸染色 1 min 左右, 在电镜下观察。

#### 2.1.9 红细胞凝集试验

采集健康人"O"型血和 SPF 鸡,实验用普通级牛、大鼠、豚鼠的血液,按常规方法制备 1% 红细胞悬液。外周血红细胞制备的具体步骤如下:取外周血 2 ml,1 500 rpm 离心 5 min,轻轻吸 出上层的血清和中间层的白细胞;用灭菌生理盐水洗涤 2~3 次,每次以 1 500 rpm,离心 5 min; 将沉积的红细胞用灭菌生理盐水配成 1%红细胞悬液。于4 、室温、37 条件下分别进行红细胞 凝集试验,测定红细胞凝集价。

#### 2.1.10 氯仿敏感试验

将病毒悬液 2 000 rpm 离心 15 min, 取上清 0.8 ml, 加入 0.2 ml 氯仿, 震荡 10 min, 4 过夜。 另取 0.8 ml 同样浓度的病毒液加入 0.2 ml PBS, 4 过夜, 作为对照。分别测定试验组与对照组 TCID<sub>50</sub>, 比较差异, 如试验组病毒滴度降低 2 个对数以上, 说明氯仿处理组明显受到抑制, 待测 样品对氯仿敏感。

2.1.11 耐酸性试验

用 pH3.0 的 PBS 将病毒悬液稀释 10 倍作为试验组,用 pH7.2 的 PBS 将病毒悬液稀释 10 倍 作为对照组。室温放置 1 h,用 NaOH 校正试验组的 pH 值至 7.2。测定试验组与对照组的 TCID<sub>50</sub>, 比较差异,如试验组病毒滴度降低 2 个对数以上,说明病毒对酸敏感。

#### 2.1.12 耐热试验

将病毒悬液 50 水浴 1 h 作为试验组, 取同样浓度的病毒悬液 4 放置 1 h, 作为对照, 分别 测定其 TCID<sub>50</sub>, 比较差异, 如试验组病毒滴度降低 2 个对数以上, 说明病毒对热敏感。

#### 2.1.13 Mgcl₂稳定试验

取病毒悬液与 2M Mgcl<sub>2</sub>等量混合,同时取相同浓度的病毒液与灭菌蒸馏水等量混合,作为

对照组,而后同样置于 50 水浴 1 h。取出后测定 TCID<sub>50</sub>,比较差异,如试验组病毒滴度高于对 照组 2 个对数以上,说明 Mgcl<sub>2</sub> 对病毒有保护力。

#### 2.1.14 病毒核酸提取

用 TRIzol RNA 提取试剂盒提取病毒基因组 RNA(Liu et al, 2005)。取 200 μl 病毒液加入 400 μl TRIzol 试剂, 剧烈振荡 1 min, 室温静置 10 min; 加入氯仿 400 μl 后再剧烈振荡 1 min, 室温静置 10 min; 13 000 rpm 离心 10 min, 取上清置于用 DEPC 处理的离心管中, 再加入 1 ml 的异丙醇, 混匀后置于-20 沉淀 1 h; 4 13 000 rpm 离心 10 min; 弃上清, 干燥后加入 DEPC 处理的 dd H<sub>2</sub>O 将管底的 RNA 沉淀完全溶解。

#### 2.1.15 核酸电泳

参照报道(田静等, 1999), 略有改动, 用 2%琼脂糖凝胶 60 mA 电泳 90 min。

#### 2.1.16 套式 RT-PCR

#### 2.1.16.1 RT (Reverse transcription)

取 RNA,参照 MBI Fermentas 的使用说明书进行反转录:采用 20 µl 的反转录(RT)体系, 在反应管中加入 2 µl 模板 RNA, 2 µl 下游引物,70 5 min,冰上 2 min;再加入 5×reverse transcription reaction buffer 4 µl, 2.5 mM dNTP 8 µl, Ribonuclease inhibitor 1 µl (20U),补水至 19 µl,低速离心数秒混匀,37 5 min;最后加入 1 µl (200U) MuLV 反转录酶,混匀,42 水浴 2 h;70 10 min 终止反应。

#### 2.1.16.2 PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction)

取上述 cDNA 进行 PCR 扩增。反应体系如下: 10×PCR Buffer 2.5 μl, 2.5 mM dNTP 2 μl, 引物 1 μl(上下游引物各 0.5 μl), cDNA 1 μl, *Ex Taq*DNA 聚合酶 1.25 U, 补水至 25 μl。PCR 反应条件为: 95 变性 5 min; 94 30 sec, 50 30 sec, 72 30 sec, 30 个循环; 72 延伸 10 min。 取 5μl PCR 产物琼脂糖凝胶电泳,紫外观察。将 L1e/L1f 的 PCR 产物稀释 100 倍, 取 1 μl 为模板, 用 L1g/L1h 进行扩增,反应条件及体系同上。

#### 2.1.17 PCR 产物的回收纯化

用上海生工生物工程技术服务有限公司的 DNA 胶回收试剂盒对 PCR 产物进行纯化回收。具体步骤如下:(1)将 50 μl 大量扩增的 PCR 产物用 1 ml 的无水乙醇沉淀 30 min,12 000 rpm 离心 10 min,弃上清,晾干,加入 30 μl ddH<sub>2</sub>O 溶解沉淀,琼脂糖凝胶电泳。(2)在紫外观察箱内, 用干净的刀片切取含有目的基因的琼脂糖凝胶块,置于 1.5 ml 离心管中。(3)按 450 μl /100 mg 的比例加入 Binding buffer,置 55 水浴中 10 min,每 2 min 颠倒混匀一次,使琼脂糖凝胶块完全 融化。(4)将融化后的琼脂糖凝胶移入吸附柱,室温静置 2 min,8 000 rpm 离心 1 min,倒掉收 集管中的液体,将吸附柱重置于收集管中。(5)加入 450 μl Washing solution,8000 rpm 离心 1 min, 倒掉收集管中的液体,将吸附柱重置于收集管中。(6)重复步骤(5)一次。(7)12000 rpm 离 心 1 min,将吸附柱放入灭菌的 1.5 ml 离心管内,在吸附膜中央加入预热至 55 的 Solution buffer 30μl,55 水浴中静置 3~4 min,室温 12000 rpm 离心 1 min。(8)弃去吸附柱,取回收产物 2 μl 电泳,4 保存备用。

#### 2.1.18 大肠杆菌感受态细胞的制备

参照报道(Chung et al, 1989)的方法,制备大肠杆菌 TG1 感受态细胞。具体步骤如下:取-70 保存的大肠杆菌 TG1,划线接种于 LB 培养平板,37 过夜培养。从平板上挑取单个菌落接种于含有 5 ml LB 液体培养基的试管中,37 震荡过夜培养。取 0.5 ml 菌液转接到一个含有 50 ml LB 液体培养基的锥形瓶内,37 震荡培养 2-3 h,确保 OD600 0.5,细胞数务必 10<sup>8</sup>/ml。然后,4 2 500 rpm 离心 15 分钟,弃上清,加入 1/10 体积(5 ml)的冰冷的 TSS 缓冲液,轻轻悬浮细胞,放置于冰上。分装细胞,每 100 μl 一份,置-70 保存备用,即为感受态细胞。可进行质粒转化检测转化效率。

2.1.19 PCR 产物的连接与转化

连接:参照 pMD18-T 载体使用说明书,依次加入 4 μl 纯化的 PCR 产物、5 μl 2×binding Buffer 缓冲液和 1 μl pMD18-T 载体,混匀后置于 16 水浴中,过夜连接。

转化:取大肠杆菌感受态细胞 TG1 100 µl,融化后置于冰上,加入连接产物,轻轻混匀后, 冰浴 30 min。将转化体系移入 42 水浴中,热休克 1 min,冰浴 2 min。加入 800 µl 预热至 37 的 SOC 液体培养基,37 震荡培养 1 h。将培养物以 3 500 rpm 离心 3 min,在无菌条件下弃掉大 部分上清,再将沉淀混匀,均匀涂布于含有氨苄青霉素(60 µg/ml)的 LB 琼脂培养板上。倒置 平皿,于 37 温箱中静置培养 8~12 h。

2.1.20 质粒提取与鉴定

#### 2.1.20.1 碱裂解法提取质粒

参照《分子克隆实验指南》所述的碱裂解法小剂量提取质粒(Sambrook et al, 2002)。具体操 作步骤如下(1)随机挑取琼脂板上的白色单个菌落,分别接种到2ml含有氨苄青霉素(60 µg/ml) 的LB液体培养基中,37 震荡过夜培养。(2)取1.5ml细菌培养物,加入离心管中,4 12000 rpm离心1min,弃上清,尽可能除去残留的培养基。(3)将细菌沉淀重悬于100µl冰预冷的溶 液中,在旋涡震荡器上混匀。(4)加入200µl新配置的溶液,轻轻混匀,冰上放置3~5min。 (5)加入150µl用冰预冷的溶液,温和混匀,冰上放置3~5min。(6)4 12000 rpm离心5min, 取上清加入等体积的酚:氯仿(1:1,V/V),震荡混匀后,4 12000 rpm离心5min,将上层水 相吸入另一个离心管内。(7)加入2.5倍体积的冰预冷的无水乙醇,震荡混匀,-20 放置30min, 沉淀质粒DNA。(8)4 13000 rpm离心10min,弃上清,再用70%无水乙醇洗涤2次。(9)4 13000 rpm离心10min,弃上清,倒置晾干,加入30µl含RNA酶(20µg/ml)的TE缓冲液, 37 水浴消化1h,琼脂糖凝胶电泳,-20 保存备用。

#### 2.1.20.2 重组质粒的 PCR 鉴定

将所提取的质粒 DNA 在 0.8%琼脂糖凝胶上进行电泳,根据质粒 DNA 条带的大小,挑选疑 似阳性的重组质粒,用 PCR 方法进行鉴定,取4 μl 质粒 DNA 的 PCR 产物,0.8%琼脂糖凝胶电 泳,分析结果。

2.1.21 序列测定及分析

取阳性菌委托上海生工生物工程技术服务有限公司进行核苷酸序列测定。将测序结果用 NCBI BLAST 进行分析,选取同源性较高的序列作为参考毒株,用 DNAMAN Multiple Alignment (Version 5.2.2)进行同源性分析。

#### 2.2 结果

#### 2.2.1 病毒的 CPE 特征

病毒在 Vero-E6 细胞上盲传至第 4 代开始出现细胞病变。感染后第 3 天细胞出现颗粒增多,细胞逐渐收缩、变圆、折光度增加,第 5 天细胞开始脱落(见图 2-1)。



图 2-1 细胞病变 A:正常细胞; B:感染的细胞出现颗粒增多、细胞收缩、变圆、脱落 Fig.2-1 CPE A: mock infected cells; B: Infected cells emerged granulating, shrinking, rounding and falling.

#### 2.2.2 电镜观察结果

0.5%磷钨酸负染,电镜观察发现,该病毒具有呼肠孤病毒科病毒的形态特征,无囊膜,有双 层衣壳,呈正 20 面体对称(见图 2-2)。



图 2-2 病毒粒子形态 Fig.2-2 Morphology of virus.

2.2.3 红细胞凝集试验

该病毒在 4 、室温和 37 条件下都能够凝集健康人 O 型血红细胞,红细胞凝集价为 6log2。 不能凝集鸡、牛、大鼠和豚鼠的红细胞。

2.2.4 理化特性试验

该病毒对氯仿有抵抗力、能耐受 pH3.0 的酸性环境、50 水浴 1 h 病毒丧失感染能力、1M Mgcl<sub>2</sub> 能提高病毒对热的抵抗力,增强病毒的活性。

2.2.5 核酸电泳结果

将提取的病毒核酸在 2%琼脂糖凝胶上电泳,发现基因组呈区段性的排列,分大、中、小 3 个区段(见图 2-3)。



图 2-3 核酸电泳图 Fig.2-3 Electrophoetic analysis of virus nucleic acid.

#### 2.2.6 RT-PCR 结果

以 cDNA 为模板, L1e/L1f 为引物扩增得到预期的 454bp 的片段。之后将 PCR 产物稀释 100 倍作为模版, L1g/L1h 为引物, 扩增到 348bp 的片段(见图 2-4)。


图 2-4 RT-PCR 电泳图 M: DNA marker (DL2000); 1: L1e/L1f PCR 产物(454bp); 2: L1g/L1h PCR 产物(348bp)。 Fig.2-4 Electrophoregram of RT-PCR. M: DNA marker (DL2000); 1: Product of L1e/L1f PCR (454bp); 2: Product of L1g/L1h PCR (348bp).

## 2.2.7 测序结果与同源性分析

L1e/L1f PCR 产物序列测定结果见图 2-5,呼肠孤病毒参考毒株及同源性比较见表 2-1。NCBI BLAST 结果表明,该片段与呼肠孤病毒科正呼肠孤病毒属的 Ndelle virus (NDEV)的核苷酸同 源性最高,为 91.2%;氨基酸同源性为 98.7%。选取核苷酸同源性较高的序列用 DNAMAN Multiple Alignment (Version 5.2.2)进行同源性分析,结果表明该片段与人、鼠和牛的呼肠孤病毒同源性 较高(核苷酸同源性 76.9%~91.2%,氨基酸同源性 95.4%~100%),与水生呼肠孤病毒同源性较低 (核苷酸同源性 47.4%~50.9%,氨基酸同源性 51.7%)。



#### 图 2-5 测序结果 (引物序列下划线)。

Fig.2-5 Nucleotides Sequence (The primers sequences are underlined).

# 2.3 讨论

迄今为止在蝙蝠体内已分离到 80 多种病毒,蝙蝠是多种人畜共患病病毒的自然宿主(李文 东等, 2004; Li et al, 2005)。近年来一些新病毒病的暴发和老病毒病的重返都与蝙蝠有关。我国 有关蝙蝠携带病毒的研究较少,从蝙蝠体内只分离到了罗斯河病毒(赵春生等, 1997)、乙型脑 炎病毒(黄文丽等, 2000)、基孔肯雅病毒(张海林等, 1989)和森林脑炎病毒(杨蓝萍等, 1993)。 本研究首次报道从野生犬蝠(*Cynopterus sphinx*, short-nosed fruit bats)体内分离到呼肠孤病毒。 为我国蝙蝠携带的病毒增加了一个新例。对开展蝙蝠的病原监测,有效的预防蝙蝠作为病毒宿主 可能导致的疾病传播具有重要的意义。 呼肠孤病毒在自然界中广泛存在,几乎可以从所有哺乳动物体内检测到呼肠孤病毒的抗体。 现已证实呼肠孤病毒与许多人畜疾病有关,2003 年左庭婷等又发现呼肠孤病毒可能与非典型性肺 炎 SARS 相关(左庭婷等,2003)。在本实验中,通过生物学与分子生物学的方法鉴定了一株源 于犬蝠的病毒是呼肠孤病毒科成员。该病毒中等大小、无囊膜、有双层衣壳、呈正二十面体对称, 具有呼肠孤病毒科(*Reoviridae*)成员的形态特征。感染 Vero-E6 细胞后,产生细胞病变,细胞内 颗粒增多、收缩、变圆、脱落,但没有出现细胞融合,这与 MRV 引起的细胞病变相似。红细胞 凝集试验发现这株病毒能凝集健康人 O 型血红细胞,不能凝集 SPF 鸡、实验用普通级牛、大鼠 和豚鼠的红细胞,这与 MRV 血清 1 型的血凝谱相近。理化特性试验表明该病毒对氯仿有抵抗力、 能耐受 pH3.0 的酸性环境、50 水浴 1 h 病毒丧失感染能力、1M Mgcl<sub>2</sub> 能提高病毒对热的抵抗力, 增强病毒的活性。此外,该病毒基因组核酸电泳呈现 3 个区段。以上结果均符合已报道的呼肠孤 病毒的生物学特征(黄帧祥,1990)。

为了进一步的从分子水平上确定该病毒是呼肠孤病毒科成员,我们根据报道(Leary et al, 2002)合成了 MRV 特异性引物。经 RT-PCR 扩增出特异的片段,测序结果 NCBI BLAST 分析表 明该片段与呼肠孤病毒科正呼肠孤病毒属的 NDEV 核苷酸同源性最高,可达到 91.2%;氨基酸同 源性为 98.7%。NDEV 是 1974 年从鼠的肝和脑中分离的正呼肠孤病毒属成员,其血清型尚未最 后确定,有学者建议将其划分为 MRV 血清 4 型(Zeller et al, 1989; Attoui et al, 2001)。选取同源 性较高的序列用 DNAMAN Multiple Alignment (Version 5.2.2)进行同源性分析,结果表明该片段 与 MRV 血清 1、2、3 型的代表株 T1L、T2J、T3D 的核苷酸同源性分别为 89.9%、76.9%、89.9%, 氨基酸同源性为 100%、95.4%、98%。从同源性上来看,该片段与人、鼠和牛的呼肠孤病毒同源 性较高(核苷酸同源性 76.9%~91.2%,氨基酸同源性 95.4%~100%),与水生呼肠孤病毒同源性较 低(核苷酸同源性 47.4%~50.9%,氨基酸同源性 51.7%)。基因分析结果从分子水平上进一步证明 了新分离的这株病毒是呼肠孤病毒科成员,将其命名为 Bat/China/2003 (B/03)。

# 表 2-1 实验一序列分析用呼肠孤病毒毒株及同源性

Table 2-1 Reovirus strains used for assay and homology

	分离地	血清型	宿主	时间	GenBank 收录号	同源性〕	同源性 Homology	
Virus strain	Country	Serotype	Host	time	GenBank	核苷酸	氨基酸	
					accession no.	nucleotide	amino acid	
T1/Human/Ohio/Lang/1953(T1L/53)	USA	1	Human	1953	M24734	89.9%	100%	
T1/Human/Washington, D.C/clone 62/1957(T1C62/57)	USA	1	Human	1957	AY007411	88.8%	99.2%	
T1/Human/Washington, D.C/clone 63/1957(T1C63/57)	USA	1	Human	1957	AY007414	88.8%	99.2%	
T1/Human/Washington, D.C/clone 15/1958(T1C15/58)	USA	1	Human	1958	AY007398	89.6%	100%	
T1/Human/Mexico/clone 1/1959(T1C1/59)	Mexico	1	Human	1959	AY007400	89.6%	100%	
T1/Human/Washington, D.C/clone 11/1959(T1C11/59)	USA	1	Human	1959	AY007415	88.5%	100%	
T1/Human/Netherlands/1/1967(T1Neth/67)	Netherlands	1	Human	1967	AY007385	86.3%	99.2%	
T1/Human/Netherlands/1/1984(T1Neth/84)	Netherlands	1	Human	1984	AY007395	91.0%	100%	
T1/Human/Netherlands/1/1985(T1Neth/85)	Netherlands	1	Human	1985	AY007421	89.9%	100%	
T2/Human/Ohio/Jones/1955(T2J/55)	USA	2	Human	1955	M31057	76.9%	95.4%	
T2/Human/Netherlands/1/1973(T2Neth/73)	Netherlands	2	Human	1973	AY007422	89.3%	99.2%	
T2/Human/ Netherlands/1/1984(T2Neth/84)	Netherlands	2	Human	1984	AY007423	89.9%	100%	
T2/Human/Tokyo/1/1990(T2Tokyo/90)	Japan	2	Human	1990	AY007394	89.0%	98.3%	
T3/Human/Ohio/Dearing/1955(T3D/55)	USA	3	Human	1955	M31058	89.9%	98.0%	
T3/Human/Washington, D.C/clone 93/1955(T3C93/55)	USA	3	Human	1955	AY007421	90.4%	100%	
T3/Human/Washington, D.C/Abney/1957(T3A/57)	USA	3	Human	1957	AY007396	90.7%	99.2%	

中国农业科学院博士学位论文					第二章	犬蝠源呼肠孤病	病毒的分离鉴定
T3/Human/Washington, D.C/clone 84/1957(T3C84/57)	USA	3	Human	1957	AY007419	90.4%	100%
T3/Human/Tahiti/clone 8/1960(T3C8/60)	France	3	Human	1960	AY007393	86.6%	99.2%
T3/Human/Netherlands/1/1983(T3Neth/83)	Netherlands	3	Human	1983	AY007416	87.1%	100%
T1/Bovine/Maryland/clone 22/1959(T1C22/59)	USA	1	Bovine	1959	AY007408	88.8%	99.2%
T1/Bovine/Maryland/clone 16/1960(T1C16/60)	USA	1	Bovine	1960	AY007399	89.6%	100%
T3/Bovine/Maryland/clone 43/1960(T3C43/60)	USA	3	Bovine	1960	AY007397	90.4%	99.2%
T3/Bovine/Maryland/clone 18/1961(T3C18/61)	USA	3	Bovine	1961	AY007409	88.8%	99.2%
T3/Murine/France/clone 9/1961(T3C9/61)	France	3	Murine	1961	AY007384	85.8%	99.2%
Ndelle virus/Mus musculoides/Cameroon/1974(NDV)	Cameroon		Mus musculoides	1974	AF368033	91.2%	98.7%
Golden ide reovirus(GIRV)	Germany		Golden ide	1999	AF450323	50.9%	51.7%
Golden shiner reovirus(GSRV)	USA		Golden shiner	1979	AF403399	47.4%	51.7%

# 

# 第三章 犬蝠源呼肠孤病毒全基因组序列的测定与分析

# 3.1 材料与方法

#### 3.1.1 材料

病毒毒株为第二章中分离的 Bat/China/2003 (B/03)。其它实验用载体、受体菌、工具酶、主要试剂和仪器设备等同第二章。所用引物的序列及其出处见表 3-1。

## 3.1.2 方法

根据 GenBank 收录的呼肠孤病毒 10 个基因的参考序列及文献报道,设计合成特异性引物, 采用各种 RT-PCR 方法(targeted gene walking PCR,套式 PCR,半套式 PCR,Touchdown PCR) 扩增呼肠孤病毒基因组的各基因。RT、PCR、PCR 产物的回收纯化、与 pMD18-T 载体连接、大 肠杆菌 TG1 感受态细胞的制备、转化、阳性质粒的筛选鉴定以及 PCR 产物的序列测定同第二章。 利用 DNAStar (Version 5.0.1)软件中的 Seqman 拼接测序结果,得到各基因完整的开放阅读框序 列。通过 NCBI BLAST 分析,选取同源性较高的序列作为参考,与测序结果一起进行分析。应用 DNAStar MegAlign 进行核苷酸与氨基酸同源性比较,绘制系统发生进化树。用 DNAStar Protean (Version 5.0.1)分子生物学软件分析各蛋白结构域和功能区,预测各蛋白的功能。确定该病毒在 分类学上的地位及与其他 MRV 的进化关系,并推测呼肠孤病毒分子重配和抗原变异的规律。

因本研究所得序列尚未公开发表,所以序列测定结果未列出。

## 3.2 结果

## 3.2.1 L1 基因

#### 3.2.1.1 L1 基因 RT-PCR 扩增

呼肠孤病毒的 L1 基因全长约 3854bp,将其分成覆盖全长的 5 段进行扩增,跟据参考序列(文献),设计(合成)特异性引物 L1a/L1b、L1c/L1d、L1e/L1f、L1i/L1j和 L1k/L11进行 RT-PCR 扩增(参考序列、文献及引物序列见表 3-1)。扩增得到了预期大小的片段(见图 3-1)。

#### 3.2.1.2 L1 基因测序结果与同源性分析

用 DNAStar (Version 5.0.1)软件中的 Seqman 拼接各测序结果,扩得的 L1 基因全长 3831bp, 包括一个完整的开放阅读框 3804bp,编码 1267 个氨基酸残基。将此开放阅读框的核苷酸序列进 行 NCBI BLAST 分析,结果表明该片段与呼肠孤病毒科正呼肠孤病毒属的 NDEV 核苷酸同源性 最高,而后依次是 MRV T1、T3、T2。NDEV 是 1974 年从鼠的肝和脑中分离的正呼肠孤病毒属 成员,有学者将其归类为 MRV 血清 4 型 (Attoui et al, 2001)。氨基酸序列 NCBI BLAST 分析表 明,同源性由高至低依次是 T1、T3、NDEV、T2。并发现 B/03 株 L1 基因的氨基酸序列与水生 呼肠孤病毒 segment 2 编码的 VP2 蛋白 (RdRp)同源性较高。

# 表 3-1 扩增用 RT-PCR 引物

# Table 3-1 Primer for RT-PCR

基因	引物	起点	注释	序列	参考文献或参考序列
(gene)	(primer)	(start)	(note)	(sequence)	(references or sequences )
	Lla	9	Upper	5'-TTC CAC GAC AAT GTC ATC CA -3'	This Study.
	L1b	1019	Lower	5'-AGT TCG CGC GCT TTC TTA TC -3'	NC_004271
	L1c	951	Upper	5'-GGGAGTCATGCCATTGTCCA -3'	NC_004272
	L1d	1964	Lower	5'-TGAATCATGTTCTGCATTCC -3'	NC_004282
	Lle	1886	Upper	5'-CTG CAT CCA TTG TAA ATG ACG AGT C -3'	
т 1	L1f	2339	Lower	5'-GCT ATG TCA TAT TTC CAT CCG AAT TC -3'	L
LI	L1g	1930	Upper	5'-GCT AGG CCG ATA TCG GGA ATG CAG -3'	Leary et al, 2002
	L1h	2278	Lower	5'-CTT GAG ATT AGC TCT AGC ATC TTC TG -3'	
	L1i	2212	Upper	5'-CCAAGGTGACGACGGACTGA -3'	This Study.
	L1j	2901	Lower	5'-CGCTCGTCCAGATTTCGTAG -3'	NC_004271
	L1k	2806	Upper	5'-AAC GCA GAT TAT CGC AGG TG -3'	NC_004272
	L11	3839	Lower	5'-CAC GAC CCA TGG TAG ACT CA -3'	NC_004282
	L2a	13	Upper	5'-ATG GCG AAC GTY(T/C) TGG GGR(A/G) GTG AG -3'	This Study.
1.2	L2b	817	Lower	5'-GGA CGT TGG CTG AGA ATT GCT CTA -3'	NC_004259
L2	L2c	735	Upper	5'-GGT CAG Y(T/C)GC R(A/G)CC TCC TTA TATT -3'	NC_004260
	L2d	1684	Lower	5'-CAC CAC GGG CAA CAT CAT AAC -3'	NC_004275

# 表 3-1 扩增用 RT-PCR 引物

Table 3-1 Primer for RT-PCR

基因	引物	起点	注释	序列	参考文献或参考序列
(gene)	(primer)	(start)	(note)	(sequence)	(references or sequences )
	L2e	1577	Upper	5'-CCG TTA GTC ATA GAG CCC TGG ATT -3'	AF378004
	L2f	2681	Lower	5'-CGG CCC CCA AAG ACA ACA TA -3'	AF378006
1.2	L2g	2578	Upper	5'-CAG CCG AGT GGM(A/C) TGY(T/C) TGG AA -3'	AF378009
L2	L2h	3346	Lower	5'-CTG GAT TAG CGT TAG ACC CGA C -3'	AF378010
	L2i	3301	Upper	5'-GGA ATC TAY(C/T) ACM (A/C) ATG CAG GC -3'	AF378007
	L2j	3895	Lower	5'-GAG GGA CRR(A/G) TGA GTT ACA GAG G -3'	AF378008
	L3a	13	Upper	5'-GAT GAA GCG GAT TCC AAG GA -3'	
	L3b	1148	Lower	5'-AAA ACC CCG TGT GCC TAT TC -3'	
L3	L3c L3d L3e L3f L3g L3h	1054 2179 2125 3489 3439 3901	Upper Lower Upper Lower 测序引物 Upper Lower	5'-GGG GGC TAA TCC GCT AAT GTT -3' 5'-GCG CCA TAA CGA ATC TGA GAG -3' 5'-GTG GGC TGA AAT TAT TCA TAG ATA CTG G -3' 5'-GCA TTA GCG TAC TGA CGT GGA TCA TA -3' 5'-GAT TGA AAA CTT CTG CTG TC -3' 5'-CGC TTA CCC ATA CAT GCT GC -3' 5'-GAT GAA TCG GCC CAA CTA GC -3'	This Study. NC_004255 NC_004256 NC_004274
M1	M1a M1b	1 1485	Upper Lower	5'-GCT ATT CGC GGT CAT GGC -3' 5'-CCT GTC ATC ATG CGG AAT GAG -3'	This Study. NC_004261, NC_004254

# 表 3-1 扩增用 RT-PCR 引物

# Table 3-1 Primer for RT-PCR

基因	引物	起点	注释	序列	参考文献或参考序列
(gene)	(primer)	(start)	(note)	(sequence)	(references or sequences )
	M1c	1382	Upper	5'-GAG CAK(T/G) GCG GTT ATG GAR(G/A) AT -3'	NC_004280
M1	M1d	1764	Lower	5'-TGC GCR(G/A) CTA GTR(A/G) GCA TAC AT -3'	AY428872
111	M1e	1590	Upper	5'-CAT TCG CTC ATG CCG ATA GTG -3'	AY428874
	M1f	2304	Lower	5'-GAT GAA GCG CGT ACG TAG TCT TAG -3'	AY551083
	M2a	2	Upper	5'-GCT AAT CTG CTG ACC GTC ACT C -3'	
	M2b	2199	Lower	5'-TGT GCC TGC ATC CCT TAA CC -3'	
M2			测序引物	5'-ATT CAA TCG TGA GTT CCT TGA C -3'	Chandran et al, 2002
			测序引物	5'-TAT TCG CAC ACC ATA TCC -3'	
			测序引物	5'-GGA CAT AGT TAA CCA CCG TGG C -3'	
	M3a	1	Upper	5'-GCG GTC GGT CGA CGC TAA AGT GAC CGT GGT CAT GGC TTC ATT CAA GGG -3'	
	M3b	2241	Lower	5'-GCA GGG GAT CCG ATG AAT GGG GGT CGG GAA GGC TTA AGG G -3'	
M3			测序引物	5'-CAT AAT TTC TCT TCT CAC GTC G -3'	Broering et al, 2000
			测序引物	5'-CCT ATT AGA TTG CCT CCC C -3'	
			测序引物	5'-ATA CGA CAT GCG CTG TTC AG -3'	
<b>C</b> 1	S1a	9	Upper	5'-CGC CTA TGG ATG CAT CTC TCA -3'	This Study. NC_004267
51	S1b	400	Lower	5'-CAA AGT GGA TGT TCG TCC AGT GA -3'	NC_004264, NC_004277

# 表 3-1 扩增用 RT-PCR 引物

# Table 3-1 Primer for RT-PCR

基因	引物	起点	注释	序列	参考文献或参考序列
(gene)	(primer)	(start)	(note)	(sequence)	(references or sequences )
<b>C</b> 1	S1c	340	Upper	5'-ACC ACG AGT TGA CAG TCT GGA T -3'	AY862133, AY862136
51	S1d	1436	Lower	5'-CGC GCT AGA TTC ACC TCA CAT T -3'	AY862134, AY862138
	S2a	1	Upper	5'-GCT ATT CGC TGG TCA GTT ATG GC -3'	This Study. NC_004268
62	S2b	1331	Lower	5'-GAT GAA TGT GTG GTC AGT CGT GAG -3'	NC_004263, NC_004279
52			测序引物	5'-GTG ATG ATT ACC CGT TCT TAG C -3'	L19766, L19765, L19770
			测序引物	5'-TCA ATG TCG AGC TTA GGA TCA G -3'	L19768, L19769
	S3a	1	Upper	5'-GCT AAA GTC ACA CCT GTC GTC GTC -3'	This Study. NC_004266
62	S3b	1198	Lower	5'-GAT GAT TAG GCG TCA CCC ACC AC -3'	NC_004269, NC_004283
55			测序引物	5'-TCA CTT GCT AGA CTG TTC AC -3'	U35351、52、48、46、59、
					58、62、49、55、54
	S4a	1	Upper	5'-GCG AAT TCG CTA TTT TTG CCT CTT CCC AGA -3'	
S4	S4b	1215	Lower	5'-CAT GCC TGC AGA TGA ATG AAG CCT GTC CCA CGT C -3'	Mochow et al, 2001
			测序引物	5'-TGC TGT CTT TTG TCG CTC -3'	



图 3-1 L1 基因 RT-PCR 电泳图 M DNA marker(DL2000);1 :L1e/L1f PCR 产物(454bp); 2:L1i/L1j PCR 产物(691bp); 3:L1c/L1d PCR 产物(1014bp); 4:L1a/L1b PCR 产物(1011bp); 5:L1k/L11 PCR 产物(1034bp)。

Fig.3-1 Electrophoregram of L1 gene RT-PCR. M: DNA marker(DL2000); 1: Product of L1e/L1f PCR(454 bp); 2: Product of L1i/L1j PCR (691bp); 3: Product of L1c/L1d PCR (1014bp); 4: Product of L1a/L1b PCR (1011bp) ; 5: Product of L1k/L11 PCR (1034bp).

选取同源性较高的序列(见表 3-2)用 DNAStar MegAlign(Version 5.0.1)中的 Clustal V method 进行同源性分析(见表 3-3),结果表明该片段与 NDEV 的核苷酸同源性最高为 77.3%,氨基酸同 源性为 97.8%。与 MRV 血清 1、2、3 型的代表株 T1L、T2J、T3D 的核苷酸同源性分别为 77.0%、68.1%、76.5%,氨基酸同源性为 98.2%、91.9%、98.0%。从同源性上来看,B/03 株 L1 基因与人 和鼠的呼肠孤病毒同源性较高(核苷酸同源性 68.1%~77.3%,氨基酸同源性 91.9%~98.2%),与 水生呼肠孤病毒同源性较低(核苷酸同源性 35.3%~46.2%,氨基酸同源性 38.6%~51.7%)。用 DNAStar MegAlign 绘制系统发生进化树,结果表明 B/03 株 L1 基因与 MRV 属同一群(见图 3-2)。

#### 表 3-2 L1 基因序列分析参考毒株

Table 3-2 Reovirus strains used for assay of L1 gene

毒株	简写	GenBank 收录号	参考文献		
Virus strain	Abbreviation	GenBank accession no.	Reference(s)		
T1/Human/Ohio/Lang/1953	MRV T1	NC_004271	Wiener et al, 1989		
T2/Human/Ohio/Jones/1955	MRV T2	NC_004272	Wiener et al, 1989		
T3/Human/Ohio/Dearing/1955	MRV T3	NC_004282	Wiener et al, 1989		
Ndelle virus	NDEV	AF368033	Attoui et al, 2001		
Grass carp hemorrhagic virus	GCHV	AF284502	Unpublished		
Grass carp reovirus	GCRV	AF260512	Fang et al, 2000		
Golden shiner reovirus	GSRV	AF403399	Attoui et al, 2002;		
			Attoui et al, 2005		
Golden ide reovirus	GIRV	AF450323	Attoui et al, 2002		
Striped bass reovirus	SBRV	AF450318	Attoui et al, 2002		
Chum salmon reovirus	CSV	AF418295	Winton et al, 1987		



# 图 3-2 L1 基因进化树

Fig.3-2 Phylogenetic tree of L1 gene

表 3-3 L1 基因同源性比较	(左下为氨基酸右上为核苷酸)
------------------	----------------

	B/03	NDEV	MRV T1	MRV T2	MRV T3	SBRV	GCHV	GCRV	GIRV	GSRV	CSV
B/03		77.3	77.0	68.1	76.5	43.4	35.5	35.6	46.2	35.3	37.0
NDEV	97.8		76.7	68.8	75.7	43.4	35.6	35.0	45.2	34.4	36.4
MRV T1	98.2	97.3		68.0	80.1	42.0	36.9	37.0	45.4	36.9	36.2
MRV T2	91.9	91.2	91.6		68.2	41.3	36.7	36.7	47.4	36.9	35.6
MRV T3	98.0	97.2	98.2	91.9		41.3	35.5	35.6	44.1	36.5	35.6
SBRV	47.4	47.5	47.7	46.6	47.0		56.1	56.6	57.7	55.8	75.4
GCHV	39.8	40.0	40.0	40.3	39.8	62.5		79.7	67.4	77.4	51.0
GCRV	40.2	40.3	40.4	40.7	40.2	63.5	98.7		68.1	77.5	51.4
GIRV	51.7	52.2	52.2	52.6	51.7	64.8	79.3	81.1		68.0	55.8
GSRV	40.4	40.5	40.5	40.8	40.4	63.5	97.9	98.8	81.1		51.3
CSV	38.6	38.8	38.7	38.2	38.4	93.8	57.1	57.7	64.6	57.7	

Table 3-3 Homology of L1 gene

#### 3.2.1.3 L1 基因编码蛋白的功能

根据 L1 基因测序结果推导出的氨基酸序列含有 1267 个氨基酸残基。同源性与 MRV L1 基因 编码的 λ3 蛋白最高 (91.9%~98.2%),从而推测 L1 基因编码 RdRp,是病毒的转录/复制酶。对功 能性结构域的分析表明,其氨基酸序列中含有 RNA 聚合酶上游结构域 (DXXXXD,585~590 位氨基酸残基之间), RNA 聚合酶结构域 (GDD,Gly 甘氨酸-Asp 天冬氨酸-Asp 天冬氨酸, 733~735 位氨基酸残基之间)和 RNA 聚合酶下游结构域 (EXXKXY,780~785 位氨基酸残基 之间)(Poch et al, 1989; Bruenn, 1991)。据此可以推测 B/03 株的 L1 基因编码产物具有 RNA 聚 合酶活性,可能是该病毒的 RdRp。根据国际病毒分类委员会第八次报告(Fauquet et al, 2005), 呼肠孤病毒科 RdRp 的氨基酸序列同源性是划分呼肠孤病毒属的主要依据,由此可以初步推测犬 蝠源呼肠孤病毒 B/03 株属于正呼肠孤病毒属。

## 3.2.2 L2 基因

## 3.2.2.1 L2 基因 RT-PCR 扩增

呼肠孤病毒的 L2 基因全长约 3916bp,将其分成覆盖全长的 5 段进行扩增,根据参考序列设 计特异性引物 L2a/L2b、L2c/L2d、L2e/L2f、L2g/L2h 和 L2i/L2j 进行 RT-PCR 扩增(参考序列及 引物序列见表 3-1)。扩增得到了预期大小的片段(见图 3-3)。



图 3-3 L2 基因 RT-PCR 电泳图 M DNA marker(DL2000);1 :L2a/L2b PCR 产物(805bp); 2:L2c/L2d PCR 产物(769bp); 3:L2e/L2f PCR 产物(1105bp); 4:L2g/L2h PCR 产物(950bp); 5:L2i/L2j PCR 产物(595bp)。

Fig.3-3 Electrophoregram of L2 gene RT-PCR. M: DNA marker(DL2000); 1: Product of L2a/L2b PCR(805bp); 2: Product of L2c/L2d PCR (769bp); 3: Product of L2e/L2f PCR (1105bp); 4: Product of L2g/L2h PCR (950bp); 5: Product of L2i/L2j PCR (595bp).

#### 3.2.2.2 L2 基因测序结果与同源性分析

用 DNAStar (Version 5.0.1)软件中的 Seqman 拼接各测序结果,扩得的 L2 基因全长 3883bp, 包括一个完整的开放阅读框 3870bp,编码 1289 个氨基酸残基。将此开放阅读框的核苷酸序列进 行 NCBI BLAST 分析,结果表明该片段与 MRV 三个血清型的同源性较高,同源性由高至低依次 是 T1、T3、T2。氨基酸序列 NCBI BLAST 分析结果与核苷酸相似。并发现 B/03 株 L2 基因的氨 基酸序列与 ARV L3 基因编码的 λC 蛋白 (鸟苷转移酶)和水生呼肠孤病毒 segment 1 编码的 VP1

#### 蛋白(鸟苷转移酶)具有一定的同源性。

选取同源性较高的序列(见表 3-4)用 DNAStar MegAlign(Version 5.0.1)中的 Clustal V method 进行同源性分析(见表 3-5),结果表明该片段与 MRV 血清 1、2、3 型的代表株 T1L、T2J、T3D 的核苷酸同源性分别为 66.8%、69.4%、76.0%,氨基酸同源性为 92.5%、86.4%、97.5%。从同源 性上来看,该片段与人、牛、鼠、猿的呼肠孤病毒同源性较高(核苷酸同源性 66.6%~76.2%,氨 基酸同源性 86.4%~97.9%),与 ARV 同源性较低(核苷酸同源性 28.2%~28.7%,氨基酸同源性 25.0~25.3%)、与水生呼肠孤病毒的同源性也较低(核苷酸同源性 26.7%~27.3%;氨基酸同源性 22.0%~24.8%)。用 DNAStar MegAlign 绘制系统发生进化树,结果表明 B/03 株 L2 基因与 MRV 属同一群(见图 3-4)。

毒株	简写	GenBank 收录号	参考文献
Virus strain	Abbreviation	GenBank accession no.	Reference
T1/Human/Ohio/Lang/1953	MRV T1	NC_004259	Breun et al, 2001
T2/Human/Ohio/Jones/1955	MRV T2	NC_004260	Breun et al, 2001
T3/Human/Ohio/Dearing/1955	MRV T3	NC_004275	Seliger et al, 1987
T1/Human/Netherlands/1/1985	T1Neth/85	AF378004	Breun et al, 2001
T2/Simian/Maryland/1958	T2SV59/58	AF378006	Breun et al, 2001
T3/Human/Washington,D.C/Abney/	T3C87/57	AF378009	Breun et al, 2001
clone87/1957			
T3/Human/Washington,D.C/Hall/	T3C93/55	AF378010	Breun et al, 2001
clone93/1955			
T3/Murine/France/clone 9/1961	T3C9/61	AF378007	Breun et al, 2001
T3/Bovine/Maryland/clone18/ 1961	T3C18/61	AF378008	Breun et al, 2001
Grass carp reovirus	GCRV	AF260511	Fang et al, 2000
Golden shiner reovirus	GSRV	AF403398	Attoui et al, 2002
Chum salmon reovirus	CSV	AF418294	Winton et al, 1987
ARV 601G	ARV 601G	AY652699	Unpublished
ARV S1133	ARV S1133	AY652693	Unpublished
ARV 918	ARV 918	AY652700	Unpublished
ARV 916	ARV 916	AY652701	Unpublished

#### 表 3-4 L2 基因序列分析参考毒株

Table 3-4 Reovirus strains used for assay of L2 gene

# 3.2.2.3 L2 基因编码蛋白的功能

根据L2基因测序结果推导出的氨基酸序列含有1289个氨基酸残基。同源性与MRV L2基因编码的λ2蛋白最高(86.4%~97.9%),从而推测L2基因编码产物可能具有鸟苷转移酶和甲基转移酶的活性。对功能性结构域的分析表明,氨基酸序列中含有1个鸟苷转移酶和2个甲基转移酶的活性位

点区。鸟苷转移酶活性区位于2~380位氨基酸残基之间(Luongo et al, 2000; Reinisch et al, 2000); 2个甲基转移酶活性区分别位于434~691位氨基酸残基和840~1002位氨基酸残基之间(Luongo et al, 1998; Koonin, 1993)。此外,还发现在C-末端有两个GTP-binding蛋白的基序,分别是位于893~899 位氨基酸残基处的GAAAAGK和位于1029~1032位氨基酸残基处的EKQG(Dever et al, 1987)。据 此可以初步推测, B/03株的L2基因编码产物可能具有鸟苷转移酶和甲基转移酶活性。







Fig.3-4 Phylogenetic tree of L2 gene

# 第三章 犬蝠源呼肠孤病毒全基因组序列测定及分析

# 表 3-5 L2 基因同源性比较(左下为氨基酸右上为核苷酸)

Table 3-5 Homology of L2 gene

	B/03	T3C9/61	T1Neth/85	MRV T1	MRV T2	T2SV59/58	T3C18/61	MRV T3	T3C93/55	T3C87/57	GCRV	GSRV	CSV	ARV 601G	ARV 916	ARV 918	ARV S1133
B/03		66.7	74.4	66.8	69.4	73.7	66.6	76.0	76.2	66.6	27.3	26.7	27.3	28.3	28.7	28.7	28.2
T3C9/61	93.3		68.7	78.0	68.6	74.2	77.0	69.2	68.4	77.0	27.1	27.3	25.3	27.5	27.6	27.9	27.1
T1Neth/85	97.9	92.8		67.1	68.6	68.5	69.0	75.9	76.6	69.0	27.1	27.3	26.6	28.6	28.9	29.2	28.5
MRV T1	92.5	98.7	92.4		68.3	74.8	81.4	68.9	68.8	81.4	26.7	26.7	25.5	27.7	27.7	27.7	27.4
MRV T2	86.4	87.0	86.0	86.7		68.9	68.1	69.9	70.4	68.1	26.2	26.1	26.2	28.5	27.9	28.4	28.7
T2SV59/58	93.6	98.0	93.1	97.4	87.6		73.7	69.8	67.9	73.7	27.1	21.8	25.5	28.0	27.1	27.8	28.3
T3C18/61	92.4	98.4	92.3	99.7	86.7	97.1		69.3	69.8	80.6	27.0	26.9	25.4	27.9	27.9	27.9	27.4
MRV T3	97.5	93.3	97.1	92.7	86.4	93.5	92.6		79.4	68.4	27.1	26.9	26.7	27.8	28.7	28.3	27.4
T3C93/55	97.5	93.1	96.9	92.7	86.4	93.3	92.6	98.7		69.8	27.1	27.0	26.6	28.1	28.9	28.3	27.5
T3C87/57	92.4	98.4	92.9	99.7	86.7	97.4	99.9	92.6	92.6		27.0	26.9	25.4	27.9	27.9	27.9	27.4
GCRV	24.8	24.6	24.8	24.7	24.5	24.3	24.7	24.7	24.8	24.7		75.2	39.3	25.1	23.6	25.0	23.2
GSRV	24.8	24.6	24.8	24.7	24.5	24.3	24.7	24.7	24.8	24.7	98.8		39.1	24.2	24.4	23.2	23.4
CSV	22.0	21.9	22.0	21.9	21.5	21.9	21.9	21.8	21.9	21.9	42.6	42.7		24.9	25.9	24.9	23.8
ARV 601G	25.0	25.0	25.2	25.4	25.0	25.0	25.4	25.3	25.1	25.4	20.0	20.1	20.6		70.0	76.4	75.5
ARV 916	25.2	25.0	25.4	25.2	25.0	25.0	25.2	25.2	25.3	25.2	20.3	20.4	21.2	93.7		69.6	70.6
ARV 918	25.3	25.0	25.3	25.3	25.1	25.0	25.5	25.3	25.3	25.5	21.1	20.2	20.4	98.3	97.9		77.4
ARV S1133	25.0	24.8	25.1	25.2	25.0	24.7	25.3	25.3	25.4	25.3	20.0	20.1	20.7	98.1	93.5	98.1	

### 3.2.3 L3 基因

#### 3.2.3.1 L3 基因 RT-PCR 扩增

呼肠孤病毒的 L3 基因全长约 3896bp,将其分成覆盖全长的 4 段进行扩增,跟据参考序列设计特异性引物 L3a/L3b、L3c/L3d、L3e/L3f 和 L3g/L3h 进行 RT-PCR 扩增(参考序列及引物序列 见表 3-1)。扩增得到了预期大小的片段(见图 3-5)。



图 3-5 L3 基因 RT-PCR 电泳图 M:DNA marker (DL2000); 1:L3a/L3b PCR 产物(1136bp); 2:L3c/L3d PCR 产物 (1126bp); 3:L3e/L3f PCR 产物(1365bp); 4:L3g/L3h PCR 产物(463bp)。

Fig.3-5 Electrophoregram of L3 gene RT-PCR. M: DNA marker(DL2000); 1: Product of L3a/L3b PCR(1136bp); 2: Product of L3c/L3d PCR (1126bp); 3: Product of L3e/L3f PCR (1365bp); 4: Product of L3g/L3h PCR (463bp)

#### 3.2.3.2 L3 基因测序结果与同源性分析

用 DNAStar (Version 5.0.1)软件中的 Seqman 拼接各测序结果,扩得的 L3 基因全长 3889bp,包括一个完整的开放阅读框 3828bp,编码 1275 个氨基酸残基。将此开放阅读框的核苷酸序列进行 NCBI BLAST 分析,结果表明该片段与 MRV 三个血清型的同源性较高,同源性由高至低依次 是 T1、T3、T2。氨基酸序列 NCBI BLAST 分析结果与核苷酸相似。并发现 B/03 株 L3 基因的氨基酸序列与 ARV L1 基因编码的 λA 蛋白和水生呼肠孤病毒 segment 3 编码的 VP3 蛋白具有一定的同源性。

选取同源性较高的序列(见表 3-6)用 DNAStar MegAlign中的 Clustal V method 进行同源性 分析(见表 3-7),结果表明该片段与 MRV 血清 1、2、3型的代表株 T1L、T2J、T3D 的核苷酸同 源性分别为 76.5%、70.8%、75.3%,氨基酸同源性为 98.9%、95.9%、98.7%。与 SARS 患者体内 分离的呼肠孤病毒 GD-2003 株的核苷酸同源性为 82.8%,氨基酸同源性为 89.7%。从同源性上来 看,该片段与人的呼肠孤病毒同源性较高(核苷酸同源性 70.8%~82.8%,氨基酸同源性 89.7%~98.9%),与 ARV 同源性较低(核苷酸同源性 36.8%~38.7%,氨基酸同源性 41.8%~42.1%) 与水生呼肠孤病毒的同源性也较低(核苷酸同源性 28.9%~31.7%;氨基酸同源性 41.8%~42.1%) 用 DNAStar MegAlign 绘制系统发生进化树,结果表明 B/03 株 L3 基因与 MRV 属于同一群,而 且与从 SARS 患者体内分离的 GD-2003 株同属于一个群(见图 3-6)。

40

## 表 3-6 L3 基因序列分析参考毒株

Table 3-6 Reovirus strains used for assay of L3 gene

毒株	简写	GenBank 收录号	参考文献
Virus strain	Abbreviation	GenBank accession no.	Reference
T1/Human/Ohio/Lang/1953	MRV T1	NC_004255	Harrison et al, 1999
T2/Human/Ohio/Jones/1955	MRV T2	NC_004256	Harrison et al, 1999
T3/Human/Ohio/Dearing/1955	MRV T3	NC_004274	Harrison et al, 1999
SARS orthoreovirus GD-2003	GD-2003	AY335546	Duan et al, 2003
Grass carp hemorrhagic virus	GCHV	AF284503	Unpublished
Grass carp reovirus	GCRV	AF260513	Fang et al, 2000
Golden shiner reovirus	GSRV	AF403400	Attoui et al, 2002
Striped bass reovirus	SBRV	AF450319	Attoui et al, 2002
Chum salmon reovirus	CSV	AF418296	Winton et al, 1987
ARV S1133	ARV S1133	AY641735	Unpublished
ARV 918	ARV 918	AY641738	Unpublished
ARV 916	ARV 916	AY641737	Unpublished
ARV 601G	ARV 601G	AY641736	Unpublished





Fig.3-6 Phylogenetic tree of L3 gene

#### 3.2.3.3 L3 基因编码蛋白的功能

根据 L3 基因测序结果推导出的氨基酸序列含有 1275 个氨基酸残基。同源性与 MRV L3 基因 编码的 λ1 蛋白最高 (89.7%~98.9%),从而推测 L3 基因的编码产物可能具有 ATP 酶活性和锌指 结构。对功能性结构域的分析结果表明,氨基酸序列的 N-末端有 6 个 RNA 螺旋酶的保守基序 (Bisaillon et al, 1997): KGKSSGKG (9~16 位氨基酸残基), DEAD (100~103 位氨基酸残 基), EAT (156~158 位氨基酸残基), FISS (223~226 位氨基酸残基), VRGAN (346~350 位氨基酸残基), NRVGR (429~433 位氨基酸残基)。而且,在 N-末端还发现了锌指基序 CCHH (183C、186C、203H、206H)(Bartlett et al, 1988; Schiff et al, 1988; Dermody et al, 1991; Lemay et al, 1994)。此外,N-末端的 345~349 位氨基酸残基处发现了的 SVRGA 基序,据报道它能稳定 C-末端,增强其对胰凝乳蛋白酶的稳定性(Dryden et al, 1998)。根据以上结果,可以推测 B/03 株的 L3 基因编码产物具有 ATP 酶活性、RNA 螺旋酶活性和锌指结构。

							- 65 -	- 0-	-					
	B/03	MRV T1	MRV T2	MRV T3	GD-2003	GCHV	GCRV	GSRV	CSV	SBRV	ARV S1133	ARV 916	ARV 918	ARV 601G
B/03		75.6	70.8	75.3	82.8	30.7	30.8	30.2	28.9	31.7	38.7	37.3	36.8	38.5
MRV T1	98.9		69.4	80.6	89.9	30.2	30.1	30.0	29.5	30.1	38.2	37.9	37.4	38.3
MRV T2	95.9	95.5		68.8	74.3	31.2	31.2	30.9	27.9	30.1	38.3	38.3	38.2	37.9
MRV T3	98.7	99.2	95.5		91.0	30.0	29.9	30.1	29.4	31.0	38.0	37.8	37.0	38.1
GD-2003	89.7	87.6	86.5	86.5		27.6	28.4	26.9	37.3	23.9	39.2	36.9	35.4	35.1
GCHV	30.6	30.6	30.9	30.5	23.6		81.5	77.0	47.2	54.1	29.9	29.9	29.3	29.3
GCRV	30.6	30.5	30.9	30.5	23.6	98.9		77.7	47.4	54.8	29.9	29.7	29.2	29.3
GSRV	30.6	30.6	30.9	30.5	22.5	98.1	99.1		46.6	55.5	30.5	30.6	29.4	30.2
CSV	26.6	26.6	26.7	26.5	30.3	46.8	47.4	47.2		74.5	28.8	27.6	28.0	28.5
SBRV	32.7	32.7	32.7	32.7	14.6	60.2	60.9	60.9	82.7		32.6	32.4	31.9	35.1
ARV S1133	42.1	41.9	41.8	41.9	30.3	29.5	29.6	29.5	25.4	32.2		76.1	74.8	73.6
ARV 916	41.8	41.9	41.8	41.8	29.2	29.6	29.6	29.5	24.9	32.3	97.4		73.6	73.7
ARV 918	41.9	42.0	41.8	41.9	30.3	29.5	29.5	29.4	24.9	32.0	96.7	97.6		73.2
ARV 601G	41.9	42.0	41.8	41.9	29.2	29.5	29.5	29.4	25.2	32.2	97.0	98.3	97.9	

表 3-7 L3 基因同源性比较(左下为氨基酸右上为核苷酸) Table 3-7 Homology of L3 gene

# 3.2.4 M1 基因

#### 3.2.4.1 M1 基因 RT-PCR 扩增

呼肠孤病毒的 M1 基因全长约 2304bp,将其分成覆盖全长的 3 段进行扩增,根据参考序列设计特异性引物 M1a/M1b、M1c/M1d 和 M1e/M1f进行 RT-PCR 扩增(参考序列及引物序列见表 3-1)。

#### 扩增得到了预期大小的片段(见图 3-7)。



图 3-7 M1 基因 RT-PCR 电泳图 M:DNA marker (DL1000);1:M1a/M1b PCR 产物(1486bp);2:M1c/M1d PCR 产物 (383bp);3:M1e/M1f PCR 产物(715bp)。

Fig.3-7 Electrophoregram of M1 gene RT-PCR. M: DNA marker(DL1000); 1: Product of M1a/M1b PCR(1486bp); 2: Product of M1c/M1d PCR(383bp); 3: Product of M1e/M1f PCR(715bp).

#### 3.2.4.2 M1 基因测序结果与同源性分析

用 DNAStar( Version 5.0.1)软件中的 Seqman 拼接各测序结果,扩得的 M1 基因全长 2304bp, 包括一个完整的开放阅读框 2211bp,编码 736 个氨基酸残基。将此开放阅读框的核苷酸序列进行 NCBI BLAST 分析,结果表明该片段与 MRV 三个血清型的同源性较高,同源性由高至低依次是 T1、T3、T2。氨基酸序列 NCBI BLAST 分析结果与核苷酸相似。并发现 B/03 株 M1 基因的氨基 酸序列与 ARV M1 基因编码的 μA 蛋白和水生呼肠孤病毒 segment 5 编码的 VP5 蛋白具有一定的 同源性。

选取同源性较高的序列(见表 3-8)用 DNAStar MegAlign中的 Clustal V method 进行同源性 分析(见表 3-9),结果表明该片段与 MRV 血清 1、2、3型的代表株 T1L、T2J、T3D 的核苷酸同 源性分别为 95.6%、65.7%、94.9%,氨基酸同源性为 99.1%、80.5%、98.4%。从同源性上来看, 该片段与人和猿的呼肠孤病毒同源性较高(核苷酸同源性 65.7%~96.2%,氨基酸同源性 80.5%~99.1%),与 ARV 同源性较低(核苷酸同源性 27.4%~30.4%,氨基酸同源性 23.2%~26.2%) 与水生呼肠孤病毒的同源性也较低(核苷酸同源性 21.6%~25.4%;氨基酸同源性 17.1%~19.5%)。 用 DNAStar MegAlign 绘制系统发生进化树,结果表明 B/03 株 M1 基因与 MRV 属同一群(见图 3-8)。

# 3.2.4.3 M1 基因编码蛋白的功能

根据M1基因测序结果推导出的氨基酸序列含有736个氨基酸残基。同源性与MRV M1基因编码的μ2蛋白最高(80.5%~99.1%),从而推测M1基因编码产物可能具有核苷三磷酸酶活性。对功能性结构域的分析表明,氨基酸序列中含有两个NTP-binding基序:GAVLPKGSFKS(410~420位氨基酸残基);DEVG(446~449位氨基酸残基)(Kim et al, 2004; Noble et al, 1997),据此推测B/03 株M1基因编码产物可能具有核苷三磷酸酶活性。μ2蛋白还决定呼肠孤病毒形成的包涵体的形态,不同血清型包涵体的形态不同,血清1型是纤维状,血清3型是球状。重配实验表明,M1基因单基因替换即可导致包涵体形态的改变,包涵体形态由μ2蛋白的一个氨基酸决定,即208位Pro/Ser,

# 血清1型208 Pro形成纤维状的包涵体,血清3型208 Ser形成球状包涵体(Parker et al, 2002)。B/03 株的M1基因推导出的氨基酸序列208位是Pro,据此初步推测B/03的M1基因可能与血清1型相近。 表 3-8 M1 基因序列分析参考毒株

毒株	简写	GenBank 收录号	参考文献
Virus strain	Abbreviation	GenBank accession no.	Reference
T1/Human/Ohio/Lang/1953	MRV T1	NC_004261	Parker et al, 2002
T2/Human/Ohio/Jones/1955	MRV T2	NC_004254	Unpublished
T3/Human/Ohio/Dearing/1955	MRV T3	NC_004280	Wiener et al, 1989
T1/Human/Netherlands/1984	T1Neth/84	AY428872	Yin et al, 2004
T2/Simian/Maryland/1958	T2SV59/58	AY428874	Yin et al, 2004
T3/Human/Washington, DC/Clone12/1957	T3C12/57	AY551083	Yin et al, 2004
Grass carp hemorrhagic virus	GCHV	AF251262	Unpublished
Grass carp reovirus	GCRV	AF403391	Attoui et al, 2002
Golden shiner reovirus	GSRV	AF403402	Attoui et al, 2002
Golden ide reovirus	GIRV	AF450324	Attoui et al, 2002
ARV S1133	ARV S1133	AY639610	Unpublished
ARV 918	ARV 918	AY639617	Unpublished
ARV 916SI	ARV 916SI	AY639616	Unpublished
ARV 601G	ARV 601G	AY639614	Unpublished

Table 3-8 Reovirus strains used for assay of M1gene





Fig.3-8 Phylogenetic tree of M1 gene

# 第三章 犬蝠源呼肠孤病毒全基因组序列测定及分析

						Table 3-9	9 Homolog	gy of M1 g	ene						
	B/03	MRV T1	T1Neth/84	MRV T2	T2SV59/58	MRV T3	T3C12/57	GCHV	GCRV	GSRV	GIRV	ARV S1133	ARV 916SI	ARV 918	ARV 601G
B/03		95.6	96.2	65.7	87.9	94.9	95.0	24.3	25.4	21.6	24.7	29.0	30.4	27.4	29.1
MRV T1	99.1		96.1	66.6	89.1	97.8	97.8	22.2	22.3	22.6	24.8	28.6	30.0	27.3	30.3
T1Neth/84	98.4	98.4		65.6	88.4	95.9	95.6	22.8	22.8	22.8	24.6	29.6	30.6	27.6	28.5
MRV T2	80.5	80.9	80.1		66.6	65.7	65.8	24.2	24.6	23.0	23.7	28.7	28.2	28.4	27.3
T2SV59/58	95.9	96.1	95.5	81.4		88.4	88.5	23.1	23.2	22.9	24.1	28.8	28.1	27.5	28.0
MRV T3	98.4	98.6	97.7	79.9	95.4		99.7	22.3	22.3	22.3	24.4	29.6	30.3	27.4	30.1
T3C12/57	98.5	98.8	97.8	80.1	95.5	99.5		22.1	22.2	22.1	24.2	29.7	30.3	27.5	30.2
GCHV	19.1	18.9	19.5	18.1	18.9	18.9	18.8		99.7	90.9	49.6	23.5	24.3	23.8	23.5
GCRV	19.5	19.3	19.9	18.5	19.3	19.3	19.2	99.3		91.0	49.7	23.5	24.3	23.8	23.5
GSRV	19.3	18.9	19.5	18.4	18.7	19.2	19.1	96.6	96.8		49.8	24.0	24.1	24.1	23.8
GIRV	17.1	17.1	17.4	17.4	17.4	17.3	17.1	56.4	56.7	56.5		23.4	23.3	23.7	23.6
ARV S1133	23.2	26.2	23.1	24.8	23.1	25.8	25.8	16.7	17.0	17.1	18.5		88.4	89.1	90.7
ARV 916SI	26.2	26.2	26.2	24.7	23.1	26.1	26.1	17.1	17.3	17.1	18.1	97.0		87.0	87.8
ARV 918	26.1	26.2	26.1	25.0	22.9	26.1	26.1	17.3	17.4	17.6	18.4	97.8	97.0		88.3
ARV 601G	26.1	26.2	26.1	24.8	23.1	26.1	26.1	17.0	17.1	17.3	18.4	98.1	97.4	97.8	

# 表 3-9 M1 基因同源性比较(左下为氨基酸右上为核苷酸)

## 3.2.5 M2 基因

#### 3.2.5.1 M2 基因 RT-PCR 扩增

呼肠孤病毒的 M2 基因全长约 2203bp,根据报道(Chandran et al, 2002)合成特异性引物 M2a/M2b 进行 RT-PCR 扩增(引物序列见表 3-1)。扩增得到了预期大小的片段(见图 3-9)。



图 3-9 M2 基因 RT-PCR 电泳图 M:DNA marker (DL2000); 1:M2a/M2b PCR 产物(2198bp) Fig.3-9 Electrophoregram of M2 gene RT-PCR. M:DNA marker(DL2000); 1: Product of M2a/M2b PCR(2198bp)

#### 3.2.5.2 M2 基因测序结果与同源性分析

用 DNAStar( Version 5.0.1)软件中的 Seqman 拼接各测序结果,扩得的 M2 基因全长 2198bp, 包括一个完整的开放阅读框 2127bp 编码 708 个氨基酸。将此开放阅读框的核苷酸序列进行 NCBI BLAST 分析,结果表明该片段与 MRV T3 同源性最高,而后同源性由高至低依次是 NDEV、T1、 T2。氨基酸序列 NCBI BLAST 分析结果与核苷酸相似。并发现 B/03 株 M2 基因的氨基酸序列与 ARV M2 基因编码的 μB 蛋白和水生呼肠孤病毒 segment 6 编码的 VP4 蛋白具有一定的同源性。

选取同源性较高的序列(见表 3-10)用 DNAStar 软件中的 MegAlign Clustal V method 进行同 源性分析(见表 3-11),结果表明该片段与 MRV 血清 1、2、3 型的代表株 T1L、T2J、T3D 的核 苷酸同源性分别为 84.2%、74.2%、89.0%,氨基酸同源性为 98.3%、97.6%、97.5%。与 NDEV 的 核苷酸同源性为 88.6%,氨基酸同源性为 98.4%。从同源性上来看,该片段与人和鼠的呼肠孤病 毒同源性较高(核苷酸同源性 74.2%~90.0%,氨基酸同源性 97.5%~98.7%),与 ARV 同源性较低 (核苷酸同源性 40.2%~40.6%,氨基酸同源性 43.6%~44.3%),与水生呼肠孤病毒的同源性也较 低(核苷酸同源性 22.8%~27.4%;氨基酸同源性 21.7%~23.7%)。用 DNAStar MegAlign 绘制系统 发生进化树,结果表明 B/03 株 M2 基因与 MRV 属同一群(见图 3-10)。

## 3.2.5.3 M2 基因编码蛋白的功能

根据M2基因测序结果推导出的氨基酸序列含有708个氨基酸残基。同源性与MRV M2基因编码的μ1蛋白最高(97.5%~98.7%),μ1蛋白是外衣壳蛋白的主要组分,参与病毒入侵,能够自身催化裂解,产生μ1C蛋白,μ1C蛋白在病毒入侵脱衣壳的过程中水解为δ和Φ。对功能性结构域的分析结果表明,氨基酸序列中含有μ1蛋白裂解为μ1C的保守位点42~43位氨基酸残基之间,及其位于43~47位氨基酸残基的PGGVP保守序列(Pett et al, 1973)。而且,在581、586和602位氨基酸残基处发现了胰凝乳蛋白酶切割位点,推测其中的一个可能是μ1C切割为δ和Φ的位点(Jayasuriya et al, 1988)。此外,用DNAStar Protean中的Hydropathy-Kyte Doolittle method和Surface Probability-Emini

## 表 3-10 M2 基因序列分析参考毒株

Table 3-10 Reovirus strains used for assay of M2 gene

毒株	简写	GenBank 收录号	参考文献
Virus strain	Abbreviation	GenBank accession no.	Reference
T1/Human/Ohio/Lang/1953	MRV T1	NC_004262	Chandran et al, 1999
T2/Human/Ohio/Jones/1955	MRV T2	NC_004270	Wiener et al, 1988
T3/Human/Ohio/Dearing/1955	MRV T3	NC_004278	Tarlow et al, 1988
Ndelle virus	NDEV	AF368034	Attoui et al, 2001
T3/Mouse/ Dearing	T3D	M20161	Jayasuriya et al, 1988
T3/Human/Abney	T3A	U24260	Hooper et al, 1995
Grass carp hemorrhagic virus	GCHV	AF239175	Qiu et al, 2001
Grass carp reovirus	GCRV	AF403392	Attoui et al, 2002
Golden shiner reovirus	GSRV	AF403403	Attoui et al, 2002
Guppy reovirus	GPRV	AY235427	Seng et al, 2004
Threadfin reovirus	TRV	AY235428	Seng et al, 2004
ARV S1133	ARV S1133	AY635934	Unpublished
ARV 916SI	ARV 916SI	AY635943	Unpublished
ARV 918	ARV 918	AY635945	Unpublished
ARV 601G	ARV 601G	AY635941	Unpublished



Fig.3-10 Phylogenetic tree of M2 gene

# 第三章 犬蝠源呼肠孤病毒全基因组序列测定及分析

						Tabl	e 3-11 Ho	mology of	M2 gene							
	B/03	MRV T1	MRV T2	MRV T3	T3A	T3D	NDEV	GCHV	GCRV	GSRV	GPRV	TRV	ARV S1133	ARV 916SI	ARV 918	ARV 601G
B/03		84.2	74.2	89.0	90.0	89.5	88.6	26.8	27.0	27.4	23.8	22.8	40.3	40.3	40.2	40.6
MRV T1	98.3		74.7	83.9	84.9	84.1	83.8	26.4	26.3	26.6	26.5	22.6	41.0	42.3	40.1	42.2
MRV T2	97.6	97.3		73.9	74.3	74.0	73.7	27.9	27.9	27.5	24.5	24.1	41.1	40.3	40.2	40.8
MRV T3	97.5	96.8	95.8		97.9	99.2	90.6	25.6	25.4	26.0	27.3	25.6	41.1	41.4	41.2	41.1
T3A	98.7	98.0	97.0	98.3		98.1	91.1	26.7	25.3	26.9	26.6	26.4	41.4	41.8	41.4	41.4
T3D	98.3	97.6	96.6	98.7	99.2		90.9	25.0	24.8	25.1	26.8	25.4	41.3	41.6	41.3	41.3
NDEV	98.4	98.0	97.0	97.2	98.4	98.0		24.8	26.0	26.6	26.1	23.4	41.1	41.9	41.5	41.7
GCHV	23.7	23.4	23.7	23.3	23.4	23.6	23.7		99.5	93.6	47.7	46.8	25.1	25.0	25.7	25.6
GCRV	23.7	23.4	23.7	23.3	23.4	23.6	23.7	99.2		93.8	47.5	46.9	27.1	26.3	25.6	25.5
GSRV	23.7	23.4	23.7	23.3	23.4	23.6	23.7	98.8	99.1		47.3	47.4	25.5	26.8	27.6	25.8
GPRV	23.3	23.0	23.0	23.3	23.3	23.3	23.0	52.5	52.8	52.8		97.1	25.6	25.6	26.4	26.0
TRV	21.7	21.6	21.9	21.6	21.6	21.7	21.7	51.2	51.5	51.3	99.1		24.4	23.1	23.3	23.1
ARV S1133	44.0	44.2	44.2	43.6	44.0	43.9	43.9	22.2	22.3	22.3	22.6	18.7		71.8	71.2	71.8
ARV 916SI	43.6	47.3	43.9	43.3	43.6	43.6	43.4	22.0	22.2	22.2	20.8	20.3	88.6		71.0	93.4
ARV 918	44.3	44.5	44.8	43.3	44.6	44.5	44.3	22.0	22.2	22.2	20.1	19.6	85.5	87.6		71.3
ARV 601G	43.6	43.7	43.9	43.3	43.6	43.4	43.4	21.7	21.9	21.9	20.8	20.0	89.2	97.5	87.9	

# 表 3-11 M2 基因同源性比较 ( 左下为氨基酸右上为核苷酸 )

method 分析发现在氨基酸序列的 C-末端有 4 个较大的亲水区:分别位于 383~398 位氨基酸残基 之间、450~465 位氨基酸残基之间、553~565 位氨基酸残基之间、684~698 位氨基酸残基之间。 分析表明,这4个亲水区位于蛋白的表面,推测能够形成环和折叠区,与该蛋白和其他病毒蛋白 的相互作用有关。同时 Antigenicity Jameson-Wolf method 分析发现这4 个区域的抗原性较高,推 测可能引起宿主细胞对该蛋白的免疫反应。N-末端的疏水区较多,较大的有3 个分别位于 31~50 位氨基酸残基之间、261~273 位氨基酸残基之间、296~316 位氨基酸残基之间,推测这些疏水区 与病毒的侵入有关 (Sturzenbecker et al, 1987)。

3.2.6 M3 基因

#### 3.2.6.1 M3 基因 RT-PCR 扩增

呼肠孤病毒的 M3 基因全长约 2235bp,根据报道(Broering et al, 2000)合成特异性引物 M3a/M3b 进行 RT-PCR 扩增(引物序列见表 3-1)。扩增得到了预期大小的片段(见图 3-11)。



图 3-11 M3 基因 RT-PCR 电泳图 M:DNA marker(DL2000); 1:M3a/M3b PCR 产物(2265bp) Fig.3-11 Electrophoregram of M3 gene RT-PCR. M:DNA marker(DL2000); 1: Product of M3a/M3b PCR(2265bp)

#### 3.2.6.2 M3 基因测序结果与同源性分析

用 DNAStar( Version 5.0.1)软件中的 Seqman 拼接各测序结果,扩得的 M3 基因全长 2265bp, 包括一个完整的开放阅读框 2166bp,编码 721 个氨基酸残基。将此开放阅读框的核苷酸序列进行 NCBI BLAST 分析,结果表明该片段与 MRV 三个血清型的同源性较高,同源性由高至低依次是 T1、T3、T2。氨基酸序列 NCBI BLAST 分析结果与核苷酸相似。并发现 B/03 株 M3 基因的氨基 酸序列与 ARV M3 基因编码的 μC 蛋白和水生呼肠孤病毒 segment 4 编码的 NS1 蛋白具有一定的 同源性。

选取同源性较高的序列(见表 3-12)用 DNAStar MegAlign 中的 Clustal V method 进行同源性 分析(见表 3-13),结果表明该片段与 MRV 血清 1、2、3 型的代表株 T1L、T2J、T3D 的核苷酸 同源性分别为 84.6%、65.8%、84.0%,氨基酸同源性为 96.0%、82.8%、94.2%。从同源性上来看, 该片段与人的呼肠孤病毒同源性较高(核苷酸同源性 65.8%~84.6%,氨基酸同源性 82.8%~96.0%), 与 ARV 同源性较低(核苷酸同源性 20.0%~23.0%,氨基酸同源性 17.5%~17.8%)、与 MDRV 的 同源性和 ARV 近似(核苷酸同源性 22.2%,氨基酸同源性 17.7%),与水生呼肠孤病毒的同源性 也较低(核苷酸同源性 19.2%~20.4%;氨基酸同源性 11.8%~12.0%)。用 DNAStar MegAlign 绘制 系统发生进化树,结果表明 B/03 株 M3 基因与 MRV 属同一群(见图 3-12)。

## 表 3-12 M3 基因序列分析参考毒株

Table 3-12 Reovirus strains used for assay of M3 gene

毒株	简写	GenBank 收录号	参考文献			
Virus strain	Abbreviation	GenBank accession no.	Reference			
T1/Human/Ohio/Lang/1953	MRV T1	NC_004257	McCutcheon et al, 1999			
T2/Human/Ohio/Jones/1955	MRV T2	NC_004258	McCutcheon et al, 1999			
T3/Human/Ohio/Dearing/1955	MRV T3	NC_004281	Wiener et al, 1989			
Grass carp reovirus	GCRV	AF403390	Attoui et al, 2002			
Golden shiner reovirus	GSRV	AF403401	Attoui et al, 2002			
ARV S1133	ARV S1133	AY573904	Unpublished			
ARV 916SI	ARV 916SI	AY573910	Unpublished			
ARV 918	ARV 918	AY573911	Unpublished			
ARV 601G	ARV 601G	AY573908	Unpublished			
Muscovy duck reovirus	MDRV	AJ293969	Unpublished			





图 3-12 M3 基因进化树

Fig.3-12 Phylogenetic tree of M3 gene

#### 3.2.6.3 M3 基因编码蛋白的功能

根据M3基因测序结果推导出的氨基酸序列含有721个氨基酸残基。同源性与MRV M3 基因编码的μNS蛋白最高(82.8%~96.0%)。M3基因编码两种蛋白μNS和μNSC,两者拥有同样的C-末端,只是N-末端相差40个氨基酸残基。μNS蛋白与细胞骨架连接,在病毒复制过程中将病毒蛋白募集到病毒工厂(Broering et al, 2002; Miller et al, 2003)。对功能性结构域的分析结果表明,在氨基酸序列的C-末端具有形成alpha-helical coiled coils结构的七肽重复序列(a-b-c-d-e-f-g)<sub>n</sub>,其中a和d是疏水性氨基酸(McCutcheon et at, 1999; Lupas et al, 1997)。主要位于478~506位氨基酸残基之间、518~561位氨基酸残基之间和620~692位氨基酸残基之间(见表3-14)。用DNAStar Protean (Version 5.0.1)中的Secondary Structure-Delèage & Roux method进行分析,结果表明该蛋白富含α-螺旋(约占90%)。Secondary Structure-Coiled Coil method分析发现了coiled coils结构,位于532~565位氨基酸残基之间和620~672位氨基酸残基之间,与上述的七肽重复序列基本相符。而且,在665、669位氨基酸残基处有一个"stutter",推测能形成coiled coils结构是μNS蛋白与细胞骨架相互作用,从而发挥其生物学功能的关键。

此外 M3 基因氨基酸序列 NCBI BLAST 分析发现 N-末端 479~685 位氨基酸残基和 494~679 位氨基酸残基具有公认的 ATPase 的保守区。迄今为止没有 μNS 或 μNSC 蛋白具有 ATPase 活性 的报道, μNS 或 μNSC 蛋白是否具有 ATPase 活性还有待于进一步的研究。

					2	55	8				
	B/03	MRV T1	MRV T2	MRV T3	GCRV	GSRV	ARV S1133	ARV 916SI	ARV 918	ARV 601G	MDRV
B/03		84.3	65.8	84.0	19.2	20.4	23.0	22.7	20.0	22.7	22.2
MRV T1	96.0		66.8	86.2	18.9	19.5	23.6	21.2	20.5	22.4	23.0
MRV T2	82.8	82.8		65.3	21.1	20.4	21.3	22.3	22.1	21.9	22.7
MRV T3	94.2	93.8	81.8		19.1	19.9	22.0	20.8	20.8	22.4	22.5
GCRV	11.8	11.6	12.2	11.1		96.2	21.4	21.1	22.2	21.0	23.1
GSRV	12.0	12.0	12.3	11.4	98.4		20.9	21.6	21.1	19.7	22.7
ARV S1133	17.8	17.1	17.5	15.1	14.3	14.0		78.4	78.2	88.7	67.5
ARV 916SI	17.5	17.1	14.6	17.5	14.5	14.3	90.4		95.0	77.5	67.0
ARV 918	17.5	17.3	14.8	17.0	14.6	14.5	89.9	97.2		75.0	67.4
ARV 601G	17.5	17.3	15.4	17.8	14.5	14.3	95.4	90.4	89.9		66.8
MDRV	17.7	17.7	15.2	15.7	14.3	14.1	80.7	81.6	82.3	80.3	

表 3-13 M3 基因同源性比较(左下为氨基酸右上为核苷酸)

Table 3-13 Homology of M3 gene

		1	1 1			, ,	
а	b	С	d	е	f	g	氨基酸位点
	Ile I	Lys K	Leu L	Gln Q	Leu L	Asp D	
Ala A	Ser S	Arg R	Gln Q	Cys C	His H	Glu E	
Cys C	Pro P	Val V	Leu L	Gln Q	Gln Q	Lys K	478~506
Val V	Val V	Glu E	Leu L	Glu E	Lys K	Gln Q	
Ile I	Ile I						
					Met M	Ala A	
Leu L	Gln Q	Pro P	Leu L	Leu L	Ser S	Gln Q	
Leu L	Arg R	Glu E	Leu L	Ser S	Gly G	Glu E	
Val V	Thr T	Arg R	Leu L	Gln Q	Met M	Glu E	518~561
Leu L	Ser S	Arg R	Ala A	Gln Q	Ser S	Leu L	
Asn N	Ala A	Gln Q	Leu L	Glu E	Ala A	Asp D	
Val V	Lys K	Ser S	Ala A	Gln Q	Ser S	Cys C	
				Gln Q	Thr T	Val V	
Ile I	Asp D	Asp D	Leu L	Thr T	Gln Q	Met M	
Asn N	Gly G	Lys K	Gln Q	Ala A	Arg R	Glu E	
Ile I	Thr T	Glu E	Leu L	Arg R	Glu E	Ser S	
Ala A	Glu E	Asn N	Tyr Y	Glu E	Lys K	Gln Q	
Ile I	Ala A	Glu E	Leu L	Val V	Ser S	Thr T	620-692
Ile I	Thr T	Gln Q	Asn N	Gln Q	Thr T	Thr T	020-092
			Tyr Y	Gln Q	Gln Q	Glu E	
Leu L	Gln Q	Ala A	Leu L	Val V	Ala A	Lys K	
Asn N	Val V	Glu E	Leu L	Asp D	Thr T	Leu L	
Asn N	Gln Q	Arg R	Gln Q	Ala A	Lys K	Ser S	
Leu L	Arg R	Ile I					

Table 3-14 Heptad-repeat pattern of µNS protein encoded by M3 gene

注:a、d是疏水性氨基酸的是七肽重复序列

# 3.2.7 S1 基因

## 3.2.7.1 S1 基因 RT-PCR 扩增

呼肠孤病毒的 S1 基因全长约 1416bp,将其分成覆盖全长的 2 段进行扩增,根据参考序列设 计特异性引物 S1a/S1b 和 S1c/S1d 进行 RT-PCR 扩增(参考序列及引物序列见表 3-1)。扩增得到 了预期大小的片段(见图 3-13)。



图 3-13 S1 基因 RT-PCR 电泳图 M: DNA marker (DL2000); 1:S1a/S1b PCR 产物(392bp);2:S1c/S1d PCR 产物(1097bp). Fig.3-13 Electrophoregram of S1 gene RT-PCR. M: DNA marker(DL2000); 1: Product of S1a/S1b PCR(392bp); 2: Product of S1c/S1d PCR (1097bp).

#### 3.2.7.2 S1 基因测序结果与同源性分析

用 DNAStar (Version 5.0.1)软件中的 Seqman 拼接测序结果,扩得的 S1 基因全长 1428bp, 包括一个完整的开放阅读框 1413bp,编码一个 470 个氨基酸残基的大蛋白  $\sigma$ 1,还有一个 199 个 氨基酸残基的小蛋白  $\sigma$ 1S。将  $\sigma$ 1、 $\sigma$ 1S 的核苷酸序列进行 NCBI BLAST 分析,结果表明仅与 MRV T1 的同源性较高。 $\sigma$ 1 蛋白氨基酸序列 NCBI BLAST 分析结果表明,同源性由高至低依次是 MRV T1、T2、T3、NDEV,并发现与 ARV、MDRV S1 基因编码的细胞吸附蛋白  $\sigma$ C 具有一定的同源 性。而  $\sigma$ 1S 蛋白氨基酸序列 NCBI BLAST 分析结果表明,仅与 MRV T1 S1 基因编码的非结构蛋 白  $\sigma$ 1S 同源性较高。

选取同源性较高的序列( $\sigma$ 1 见表 3-15; $\sigma$ 1S 见表 3-17)用 DNAStar MegAlign 中的 Clustal V method 进行同源性比较。 $\sigma$ 1 同源性分析结果(见表 3-16)表明,与 MRV T1 的同源性最高(核 苷酸同源性 68.2%~86.3%,氨基酸同源性 77.7%~90.0%),而后依次是 T2(核苷酸同源性 45.8%~48.3%,氨基酸同源性 42.0%~51.1%),T3(核苷酸同源性 24.0%~26.1%,氨基酸同源性 19.5%~20.8%)。与 NDEV(鼠)、NBV(蝙蝠)、PRV(蝙蝠)、BRV(狒狒)、RRV(蟒)、ARV(禽)、MDRV(番鸭)和 GRV(鹅)的细胞吸附蛋白同源性都很低。 $\sigma$ 1S 的同源性比较结果表 明与 MRV T1 同源性较高(核苷酸同源性 90.8%,氨基酸同源性 88.3%)(见表 3-18)。用 DNAStar MegAlign 绘制系统发生进化树,结果表明 B/03 株  $\sigma$ 1、 $\sigma$ 1S 与 MRV T1 属同一群( $\sigma$ 1 见图 3-14; $\sigma$ 1S 见图 3-15)。

#### 3.2.7.3 S1 基因编码蛋白的功能

根据 S1 基因测序结果推导出的氨基酸序列含有 470 个氨基酸残基。包括两个蛋白  $\sigma$ 1 和  $\sigma$ 1S, 同源性与 MRV T1 S1 基因的编码产物最高。 $\sigma$ 1 蛋白氨基酸序列 NCBI BLAST 分析发现,N-末端 具有公认的呼肠孤病毒  $\sigma$ 1 ( $\sigma$ C)保守区。 $\sigma$ 1 蛋白分析结果表明,N-末端有一个长的连续的能形 成 alpha-helical coiled coils 结构的七肽重复序列 (*a-b-c-d-e-f-g*)<sub>n</sub>,其中 *a* 和 *d* 是疏水性氨基酸 (McCutcheon et at, 1999;Lupas et al, 1997),位于 28~125 位氨基酸残基之间,约占 N-末端的 1/3 (见表 3-19)。用 DNAStar Protean (Version 5.0.1)中的 Secondary Structure-Coiled Coil method 进 行分析,发现了 coiled coils 结构,位于 22~76 位氨基酸残基和 119~177 位氨基酸残基之间,与七 肽重复序列区相近。用 Antigenicity Jameson-Wolf method 进行分析,发现 N-末端与 Coiled Coil 结构对应处的抗原性很高,据此初步推测七肽重复序列形成的 alpha-helical coiled coils 结构可能

53

与  $\sigma$ 1 蛋白血凝活性有关 (Bassel et al, 1985)。另外,在  $\sigma$ 1 蛋白内发现了 4 个潜在的糖基化位点 (N-X-T/S)分别位于: 21~23 位氨基酸残基, 121~123 位氨基酸残基, 205~207 位氨基酸残基和 353~355 位氨基酸残基。这表明  $\sigma$ 1 蛋白可能是一种糖基化蛋白,推测其中的一个或多个糖基化位 点可能与病毒吸附有关 (Nagata et al, 1984)。S1 基因编码的另一个蛋白  $\sigma$ 1S 的分析表明,富含碱 性氨基酸,富含  $\alpha$ -螺旋,也有一个糖基化位点(13~15 位氨基酸残基),但其功能尚不清楚。

# 表 3-15 S1 基因 σ1 序列分析参考毒株

Table 3-15 Reovirus strains used for assay of S1 gene  $\sigma$ 1

毒株	简写	GenBank 收录号	参考文献			
Virus strain	Abbreviation	GenBank accession no.	Reference			
T1/Human/Ohio/Lang/1953	MRV T1	NC_004267	Munemitsu et al, 1986			
T2/Human/Ohio/Jones/1955	MRV T2	NC_004264	Cashdollar et al, 1985			
T3/Human/Ohio/Dearing/1955	MRV T3	NC_004277	Cashdollar et al, 1985			
T1/bovine/Maryland/Clone50/1960	T1C50/60	AY862133	Campbell et al, 2005			
T1/Human/Netherlands/1/1984	T1Neth/84	AY862136	Campbell et al, 2005			
T1/bovine/Maryland/Clone23/1959	T1C23/59	AY862134	Campbell et al, 2005			
T2/human/Netherlands/1/1984	T2Neth/84	AY862138	Campbell et al, 2005			
T2/Winnipeg/ Canada	T2/W	DQ220017	Unpublished			
T2/Human/BYD1/China	T2/BYD1	DQ312301	Unpublished			
T3/Bovine/Maryland/clone 45/1960	T3C45/60	L37680	Dermody et al, 1990			
T3/Human/Washington D.C/Abney/	T3C87/57	L37677	Dermody et al, 1990			
clone87/1957						
T3/Human/Tahiti/ clone 8/1960	T3C8/60	L37679	Dermody et al, 1990			
T3/Bovine/Maryland/clone 18/1961	T3C18/61	L37684	Dermody et al, 1990			
T3/Murine/France/clone 9/1961	T3C9/61	L37676	Dermody et al, 1990			
T3/Human/Colorado/1996	T3/96	AY302467	Tyler et al, 2004			
Ndelle virus	NDEV	AF368035	Attoui et al, 2001			
Nelson bay reovirus	NBV	AF218360	Shmulevitz et al, 2002			
Pulau Reovirus	PRV	AY357730	Pritchard et al, 2006			
Baboon reovirus	BRV	AF406787	Dawe et al, 2002			
Reptilian reovirus	RRV	AY238887	Duncan et al, 2004			
ARV S1133	ARV S1133	AF330703	Bodelon et al, 2001			
ARV 916	ARV 916	AF297214	Unpublished			
ARV 918	ARV 918	AF297215	Unpublished			
ARV 601G	ARV 601G	AF297217	Unpublished			
Muscovy duck reovirus YJL	MDRV/ YJL	DQ191363	Wang et al, 2005			
Muscovy duck reovirus C4	MDRV/ C4	DQ066924	Direct Submission			
Goose reovirus D14/99	GRV D14/99	AJ717735	Banyai et al, 2005			





Fig.3-14 Phylogenetic tree of S1 gene  $\sigma 1$ 

# 第三章 犬蝠源呼肠孤病毒全基因组序列测定及分析

# 表 3-16 S1 基因 σ1 同源性比较(左下为氨基酸右上为核苷酸)

Table 3-16 Homology of S1 gene  $\sigma$ 1

	B/03	T1C23/59	T1C50/60	T1Neth/84	MRV T1	T2/BYD1	T2Neth/84	MRV T2	T2/W	T3C45/60	T3C18/61	T3/96	MRV T3	T3C8/60	T3C87/57	T3C9/61	NDEV	NBV	PRV	BRV	RRV	ARV S1133	ARV 916	ARV 918	ARV 601G	MDRV/ C4	MDRV/YJL	GRVD14/99
B/03		68.2	85.2	84.9	86.3	48.3	47.9	45.8	47.9	25.8	24.7	24.0	25.4	24.2	25.6	26.1	25.6	20.2	21.8	27.0	21.4	20.5	21.0	20.8	19.1	20.0	21.0	21.3
T1C23/59	77.7		67.1	69.6	67.3	47.2	47.0	43.9	46.9	24.7	23.5	25.6	25.1	26.6	24.5	23.2	23.0	21.2	20.4	27.5	22.3	21.5	20.6	21.7	20.3	20.6	22.5	21.7
T1C50/60	87.9	74.5		89.2	95.8	47.2	48.3	46.5	47.4	23.8	23.0	23.4	23.5	23.6	23.9	25.4	26.4	22.8	20.0	23.7	21.2	21.3	21.7	22.0	20.3	21.0	21.3	20.9
T1Neth/84	90.0	76.4	93.2		91.3	47.8	48.7	46.0	48.4	24.3	24.6	26.3	24.6	23.5	24.3	23.8	26.4	22.7	21.1	25.6	22.1	21.5	21.4	22.2	20.4	20.9	21.5	21.5
MRV T1	88.1	73.7	93.1	94.5		45.9	45.4	45.2	46.0	23.7	24.4	24.9	24.8	23.5	25.3	23.5	24.3	21.4	21.6	26.5	20.8	22.5	22.0	21.3	19.0	21.5	22.8	20.5
T2/BYD1	51.1	49.6	51.3	52.6	47.0		57.8	49.9	56.8	26.0	25.8	24.9	25.6	26.8	25.4	27.6	26.8	21.9	20.1	23.5	22.5	19.7	20.2	21.3	22.6	21.0	21.8	19.8
T2Neth/84	48.8	49.0	49.7	50.5	45.3	63.6		52.4	94.2	25.3	26.4	26.3	25.4	24.3	25.0	25.0	26.2	22.4	21.8	24.6	22.5	22.6	21.7	22.0	21.1	21.0	22.7	22.3
MRV T2	42.0	42.2	40.5	42.0	40.8	50.5	50.7		51.6	26.8	26.9	27.8	27.4	25.5	26.6	26.4	26.1	21.7	21.1	22.5	23.4	20.6	22.3	22.4	20.9	20.5	20.4	19.9
T2/W	47.3	47.1	47.8	48.7	46.5	61.2	91.7	51.2		21.7	28.1	25.5	27.6	24.6	26.9	26.6	25.1	22.7	20.7	24.6	22.8	22.6	22.3	22.9	22.1	22.7	21.8	19.8
T3C45/60	20.6	20.2	21.7	22.1	21.2	22.1	22.1	20.2	20.8		76.6	65.4	98.1	82.1	99.0	78.2	63.6	20.4	22.3	21.1	20.6	22.3	22.0	22.5	22.2	21.2	22.3	21.0
T3C18/61	19.5	20.0	21.1	21.1	20.5	23.0	22.4	19.2	21.4	86.2		63.9	76.7	76.8	76.7	89.8	65.3	23.9	20.5	24.2	22.5	19.7	21.4	20.6	22.8	20.5	19.0	21.3
T3/96	20.2	20.0	21.7	21.9	21.2	24.3	21.5	21.5	22.3	74.1	73.7		65.4	63.9	65.4	64.5	62.9	22.2	20.6	24.6	21.0	20.6	22.8	19.6	21.7	21.5	20.8	21.8
MRV T3	20.8	20.0	21.9	22.1	21.2	22.6	22.6	20.5	21.0	98.0	86.8	74.1		82.3	98.2	78.1	64.2	20.6	20.4	22.3	22.3	21.4	21.8	22.0	23.4	21.5	21.2	20.7
T3C8/60	19.5	19.3	20.4	21.1	20.0	22.1	21.7	19.5	20.3	90.4	87.5	74.3	91.0		82.3	77.4	63.9	21.0	23.4	21.4	20.8	20.1	22.1	22.7	21.5	20.1	20.1	18.9
T3C87/57	20.4	20.0	21.5	21.9	21.0	22.6	22.4	20.0	20.8	98.5	86.6	74.6	98.5	90.8		77.7	63.9	21.5	21.2	21.8	22.2	22.1	21.0	22.0	23.3	21.5	22.1	21.4
T3C9/61	20.8	20.8	21.5	21.7	20.8	22.6	21.7	19.8	21.0	86.0	92.8	74.3	86.2	87.3	86.0		65.1	24.3	20.9	24.2	20.7	19.8	22.8	21.8	21.1	20.0	19.7	20.3
NDEV	20.5	19.1	21.6	21.4	20.5	21.0	20.5	19.2	19.6	67.0	67.2	61.5	67.2	68.6	67.0	66.5		22.1	21.1	24.2	21.2	21.1	20.4	19.7	22.5	21.0	21.3	22.3
NBV	16.0	16.4	16.7	16.4	16.7	15.1	15.1	14.8	15.7	15.4	15.4	15.1	16.0	15.1	16.0	16.7	15.4		38.9	24.9	21.9	27.8	28.7	26.7	29.6	24.3	27.7	22.2
PRV	14.0	13.1	13.7	14.6	13.4	14.6	16.8	14.6	16.8	13.4	15.2	15.5	14.6	17.7	14.3	16.5	13.4	38.3		23.2	20.8	27.3	27.2	22.8	26.0	22.7	27.2	19.9
BRV	12.7	13.4	14.1	14.1	13.4	13.4	12.0	13.4	12.7	12.7	12.7	12.7	12.0	13.4	12.7	13.4	13.4	13.4	12.0		23.9	21.6	23.0	23.9	23.7	22.8	21.8	21.8
RRV	14.6	14.9	14.0	14.6	14.3	15.1	14.3	14.3	13.7	13.7	13.7	16.0	13.7	14.0	13.7	15.1	13.4	13.9	14.9	14.1		23.2	20.6	20.8	21.6	20.9	23.1	20.4
ARV S1133	15.0	14.7	13.8	14.7	15.3	17.7	19.0	13.8	19.0	15.3	15.9	14.7	15.3	15.0	16.2	14.1	14.4	23.1	22.3	14.1	16.5		51.4	45.6	72.6	24.2	99.8	23.7
ARV 916	16.8	16.5	14.7	15.0	16.2	15.3	15.3	14.7	15.6	17.7	15.3	16.2	17.1	15.9	18.0	15.0	15.9	25.6	22.3	15.5	13.5	57.5		49.7	52.6	25.9	51.5	25.4
ARV 918	15.3	15.6	14.7	15.3	15.0	15.6	16.2	14.4	16.2	14.7	17.1	14.1	14.4	14.4	14.7	15.3	13.8	22.8	21.1	12.7	15.0	48.3	50.8		45.3	22.6	25.4	23.4
ARV 601G	14.4	15.0	15.3	15.6	15.3	17.7	16.8	13.5	15.9	16.2	15.3	15.3	15.9	16.2	15.9	14.7	14.7	25.3	22.0	14.8	16.8	74.6	57.5	48.3		25.1	27.5	24.9
MDRV/ C4	15.9	13.7	14.4	14.4	14.8	14.1	15.2	16.7	14.8	15.2	13.7	13.0	14.8	15.6	15.2	14.1	14.4	16.3	17.0	11.3	16.3	21.9	21.9	23.0	22.6		23.5	88.5
MDRV/ YJL	14.7	14.7	13.8	14.7	15.3	17.4	18.7	13.5	18.7	15.9	13.5	15.3	15.3	15.0	16.2	14.1	14.4	23.1	22.0	14.1	16.2	99.4	57.5	48.0	74.3	21.5		23.0
GRV D14/99	14.2	13.9	14.2	14.2	13.5	14.2	16.1	16.5	14.6	15.4	13.9	15.4	15.0	15.0	15.4	14.6	14.2	14.6	16.5	11.3	15.7	20.2	21.7	23.6	20.2	90.3	19.9	

## 表 3-17 S1 基因 σ1S 序列分析参考毒株

Table 3-17 Reovirus strains used for assay of S1 gene  $\sigma 1S$ 

毒株	简写	GenBank 收录号	参考文献
Virus strain	Abbreviation	GenBank accession no.	Reference
T1/Human/Ohio/Lang/1953	MRV T1	NC_004267	Munemitsu et al, 1986
T2/Human/Ohio/Jones/1955	MRV T2	NC_004264	Cashdollar et al, 1985
T3/Bovine/Maryland/clone 31/1959	T3C31/59	L37683	Dermody et al, 1990
T3/Bovine/Maryland/clone 43/1960	T3C43/60	L37682	Dermody et al, 1990
T3/Bovine/Maryland/clone 18/1961	T3C18/61	L37684	Dermody et al, 1990
T3/Human/Tahiti/ clone 8/1960	T3C8/60	L37679	Dermody et al, 1990
T3/Human/Washington D.C/clone93/1955	T3C93/55	L37675	Dermody et al, 1990
T3/Murine/France/clone 9/1961	T3C9/61	L37676	Dermody et al, 1990



Nucleotide Substitutions (x100)

## 图 3-15 S1 基因 σ1S 进化树

Fig.3-15 Phylogenetic tree of S1 gene  $\sigma$ 1S

	B/03	MRV T1	MRV T2	T3C31/59	T3C43/60	T3C18/61	T3C8/60	T3C93/55	T3C9/61
B/03		90.8	49.7	28.9	30.3	28.3	28.6	29.2	28.9
MRV T1	88.3		45.8	26.4	28.6	27.5	26.5	28.1	26.1
MRV T2	37.5	36.7		32.8	33.1	28.9	32.8	32.8	30.6
T3C31/59	17.5	16.7	23.1		85.7	94.5	84.8	85.1	93.9
T3C43/60	18.3	17.5	22.3	79.3		82.6	88.4	99.4	84.0
T3C18/61	18.3	18.3	21.5	87.6	71.9		83.2	82.1	93.4
T3C8/60	17.5	15.0	17.4	78.5	79.3	73.6		87.9	84.0
T3C93/55	18.3	17.5	22.3	79.3	99.2	71.9	79.3		83.5
T3C9/61	18.3	16.7	22.3	86.8	76.0	86.0	76.9	76.0	

# 表 3-18 S1 基因 σ1S 同源性比较(左下为氨基酸右上为核苷酸)

Table	3-18	Homo	logy (	of S1	gene	σ1S
raore	5 10	1101110	v <sub>b</sub> ,		Serie	0.0

# 表3-19 1蛋白的七肽重复序列

## Table 3-19 heptad-repeat pattern of $\sigma 1$ protein

а	b	С	d	е	f	g	氨基酸位点
Ile I	Glu E	Glu E	Ile I	Lys K	Lys K	Gln Q	28-34
Val V	Lys K	Ile I	Asn N	Ala A	Asp D	Asp D	35-41
Ile I	Arg R	Ala A	Ala A	Asn N	Thr T	Lys K	42-48
Leu L	Asp D	Gly G	Leu L	Ala A	Arg R	Gln Q	49-55
Ile I	Val V	Asp D	Ile I	Ser S	Asn N	Ser S	56-62
Val V	Ser S	Thr T	Ile I	Glu E	Ser S	Arg R	63-69
Leu L	Gly G	Glu E	Met M	Asp D	Asn N	Arg R	70-76
Phe F	Val V	Gly G	Ile I	Ser S	Asn N	Gln Q	77-83
Ile I	Thr T	Gln Q	Leu L	Ser S	Asn N	Ser S	84-90
Val V	Ser S	Gln Q	Asn N	Thr T	Gln Q	Gly G	91-97
Ile I	Ser S	Ser S	Leu L	Gly G	Asp D	Arg R	98-104
Val V	Asn N	Ala A	Ile I	Glu E	Pro P	Arg R	105-111
Val V	Asp D	Ser S	Leu L	Asp D	Thr T	Val V	112-118
Ala A	Ala A	Asn N	Leu L	Thr T	Gly G	Arg R	119-125

注: a、d是疏水性氨基酸的是七肽重复序列

## 3.2.8 S2 基因

### 3.2.8.1 S2 基因 RT-PCR 扩增

呼肠孤病毒的 S2 基因全长约 1331bp 根据参考序列设计特异性引物 S2a/S2b 进行 RT-PCR 扩增(参考序列及引物序列见表 3-1)。扩增得到了预期大小的片段(见图 3-16)。



图 3-16 S2 基因 RT-PCR 电泳图 M:DNA marker(DL2000); 1:S2a/S2b PCR 产物(1331bp). Fig.3-8 Electrophoregram of S2 gene RT-PCR. M: DNA marker(DL2000); 1: Product of S2a/S2b PCR(1331bp).

#### 3.2.8.2 S2 基因测序结果与同源性分析

用 DNAStar (Version 5.0.1)软件中的 Seqman 拼接各测序结果,扩得的 S2 基因全长 1331bp, 包括一个完整的开放阅读框 1257bp,编码 418 个氨基酸残基。将此开放阅读框的核苷酸序列进行 NCBI BLAST 分析,结果表明与 MRV 同源性较高,同源性由高至低依次是 T1、NDEV、T3、T2。 氨基酸序列 NCBI BLAST 分析结果与核苷酸相似。并发现与 ARV、MDRV、GRV S2 基因编码的  $\sigma$ A 蛋白,水生呼肠孤病毒 segment 8 编码的 VP6 蛋白, NBV、PRV S2 基因编码的  $\sigma$ 1 蛋白, BRV S1 基因编码的  $\sigma$ 1 蛋白具有一定的同源性。

选取同源性较高的序列(见表 3-20)用 DNAStar MegAlign 中的 Clustal V method 进行同源性 分析(见表 3-21)。结果表明与 MRV 血清 1、2、3 型的代表株 T1L、T2J、T3D 的核苷酸同源性 分别为 85.3%、73.0%、83.1%,氨基酸同源性为 94.3%、92.6%、97.1%。从同源性上来看,与人、 牛、鼠和从 SARS 患者体内分离的呼肠孤病毒 GD-2003 同源性较高(核苷酸同源性 72.6%~85.4%, 氨基酸同源性 92.6%~97.9%)。与同样从蝙蝠体内分离的呼肠孤病毒 NBV、PRV 的同源性却较低 (核苷酸同源性 30.7%、29.0%;氨基酸同源性 27.1%、27.6%)。与 BRV(狒狒)、ARV(禽)、 MDRV(番鸭)、GRV(鹅)和水生呼肠孤病毒的同源性也很低。用 DNAStar MegAlign 绘制系统 发生进化树,结果表明 B/03 株 S2 基因与 3 个血清型的 MRV、NDEV 和 GD-2003 在同一群,与 从蝙蝠分离的 NBV 和 PRV 不在同一群(见图 3-17)。

#### 3.2.8.3 S2 基因编码蛋白的功能

根据S2基因测序结果推导出的氨基酸序列含有418个氨基酸残基。同源性与MRV S2基因编码的σ2蛋白最高(92.6%~97.9%)。DNAStar Protean Hydropathy Kyte-Doolittle method分析结果表明,该蛋白C-末端约1/4(314~409位氨基酸残基),是一个大的亲水区,用Secondary Structure Delèage & Roux method 进行结构预测,表明该区域形成α-螺旋和β-转角结构,尤其是在349~376位氨基酸 残基处有一个大的α-螺旋区。Surface Probability-Emini method分析结果表明,此处有2个区域可能 暴露于蛋白表面:363~372位氨基酸残基,375~386位氨基酸残基。推测可能与σ2蛋白和其它病毒 蛋白的相互作用有关(Chapell et al, 1994)。此外,354~374位氨基酸残基处的序列与大肠杆菌DNA 依赖性RNA聚合酶的β亚基非常相似,这可能决定了S2基因的dsRNA连接活性(Dermody et al, 1991)。

#### 表 3-20 S2 基因序列分析参考毒株

Table 3-20 Reovirus strains used for assay of S2

毒株	简写	GenBank 收录号	参考文献
Virus strain	Abbreviation	GenBank accession no.	Reference
T1/Human/Ohio/Lang/1953	MRV T1	NC_004268	George et al, 1987
T2/Human/Ohio/Jones/1955	MRV T2	NC_004263	Dermody et al, 1991
T3/Human/Ohio/Dearing/1955	MRV T3	NC_004279	Wiener et al, 1989
T1/Bovine/Maryland/clone 49/1960	T1C49/60	L19766	Chapell et al, 1994
T1/Human/Washington D.C/clone11/ 1959	T1C11/59	L19765	Chapell et al, 1994
T2/T2W/Winnipeg	T2W	DQ220020	Unpublished
T3/Bovine/Maryland/clone 18/1961	T3C18/61	L19770	Chapell et al, 1994
T3/Human/Tahiti/clone 8/1960	T3C8/60	L19768	Chapell et al, 1994
T3/Murine/France/clone 9/1961	T3C9/61	L19769	Chapell et al, 1994
SARS orthoreovirus GD-2003	GD-2003	AY335545	Duan et al, 2003
Ndelle virus	NDEV	AF368036	Attoui et al, 2001
Nelson bay reovirus	NBV	AF059718	Duncan et al, 1999
Pulau Reovirus	PRV	AY357731	Pritchard et al, 2006
Baboon reovirus	BRV	AF059719	Duncan et al, 1999
ARV S1133	ARV S1133	AF104311	Yin et al, 2000
ARV 916	ARV 916	AF294764	Liu et al, 2001
ARV 918	ARV 918	AF294766	Liu et al, 2001
ARV 601G	ARV 601G	AF311322	Liu et al, 2001
Muscovy duck reovirus YJL	MDRV/ YJL	DQ198857	Unpublished
Muscovy duck reovirus C4	MDRV/ C4	AY962265	Direct Submission
Goose reovirus GXR	GRV/GXR	AY962264	Direct Submission
Grass carp reovirus	GCRV	AF259053	Unpublished
Golden shiner reovirus	GSRV	NC_005173	Attoui et al, 2002
Chum salmon reovirus	CSV	NC_007588	Winton et al, 1987
Striped bass reovirus	SBRV	AF450321	Attoui et al, 2002


中国农业科学院博士学位论文

Fig.3-17 Phylogenetic tree of S2 gene

第三章 犬蝠源呼肠孤病毒全基因组序列测定及分析

## 中国农业科学院博士学位论文

# 第三章 犬蝠源呼肠孤病毒全基因组序列测定及分析

# 表 3-21 S2 基因同源性比较(左下为氨基酸右上为核苷酸)

Table 3-21 Homology of S2 gene

	B/03	MRV T1	T1C49/60	T1C11/59	MRV T2	T2W	MRV T3	T3C18/61	T3C8/60	T3C9/61	GD-2003	NDEV	NBV	PRV	BRV	ARV S1133	ARV 916	ARV 918	ARV 601G	MDRV/ YJL	MDRV/ C4	GRV/GXR	GCRV	GSRV	CSV	SBRV
B/03		85.3	84.7	85.4	73.0	72.6	83.1	85.0	84.9	84.5	81.9	83.5	30.7	29.0	27.8	29.3	28.5	28.9	29.3	29.5	31.2	30.8	22.2	21.4	24.2	24.2
MRV T1	94 3		96.6	95.9	75.3	73.1	83.5	95.8	90.0	83.9	84.4	82.9	32.7	31.8	29.9	31.0	30.6	30.8	29.8	31.2	30.6	29.8	21.5	23.7	24.0	25.4
T1C49/60	97.6	94.9		98.2	74.8	75.1	84.6	98.0	90.8	84.2	83.8	84.1	31.9	31.6	28.3	29.6	29.7	29.5	28.6	30.0	30.8	29.8	22.5	23.6	23.5	23.8
T1C11/59	97.9	94.9	99.0		74.1	75.1	84.4	99.0	90.8	84.7	84.1	84.2	32.2	31.7	28.3	29.3	29.4	28.9	28.4	29.6	30.2	29.3	21.1	23.8	23.4	23.8
MRV T2	92.6	91.7	93.8	94.0		73.5	74.7	74.0	73.9	71.4	66.2	73.4	31.7	30.0	27.5	29.1	28.9	28.6	29.9	28.8	29.9	28.8	22.4	24.4	24.2	25.1
T2W	93.1	91.1	94.3	94.5	92.6		73.0	74.9	74.4	73.7	68.1	73.9	29.9	28.8	28.5	29.3	30.4	29.0	30.3	29.7	30.3	30.2	21.2	23.5	22.3	23.4
MRV T3	97.1	95.2	98.3	98.6	93.8	94.7		83.8	83.1	84.6	84.1	83.3	32.5	32.6	27.9	29.6	29.7	29.3	29.5	29.9	30.3	32.0	19.7	22.6	25.1	24.6
T3C18/61	97.6	94.9	98.6	99.3	93.6	94.3	98.3		90.5	83.9	83.8	83.9	31.7	31.3	28.3	29.7	29.6	29.3	28.9	29.9	30.6	29.6	20.8	23.8	23.4	23.6
T3C8/60	97.6	94.9	98.3	98.6	93.3	94.0	98.1	98.1		84.2	83.4	83.0	31.7	30.5	28.3	29.1	30.5	28.9	29.5	29.3	31.8	30.2	21.9	23.2	24.3	24.3
T3C9/61	96.4	94.3	97.6	98.3	93.1	94.3	97.6	97.9	97.4		80.9	85.0	32.0	29.9	28.7	29.8	29.1	29.7	29.7	29.9	31.9	31.3	21.2	23.7	23.7	25.3
GD-2003	97.2	97.2	98.1	98.1	91.5	90.6	98.1	98.1	97.2	97.2		81.2	30.3	30.6	29.4	26.6	25.3	25.9	28.7	27.5	29.4	26.9	21.6	26.6	25.0	23.1
NDEV	95.7	93.5	96.9	97.1	92.6	93.8	96.9	96.7	96.7	96.2	96.2		30.6	29.9	27.2	29.2	27.8	29.0	28.6	29.3	31.5	30.2	19.7	23.6	25.0	23.4
NBV	27.1	28.9	27.8	27.8	27.8	27.8	27.8	27.8	28.1	27.3	28.3	28.1		85.6	30.3	51.9	51.3	51.9	52.3	51.6	52.5	53.3	23.2	22.4	23.0	24.3
PRV	27.6	28.9	27.8	27.8	27.8	27.8	27.8	27.8	28.1	27.3	28.3	28.1	96.9		30.4	51.6	52.7	50.9	52.5	51.5	49.2	51.1	21.8	22.0	22.1	24.2
BRV	25.8	27.4	26.3	26.3	26.3	24.4	24.6	26.1	26.1	26.3	25.5	26.1	30.7	30.2		28.0	28.7	27.8	28.1	27.2	29.5	28.3	20.4	21.0	20.5	22.8
ARV S1133	26.6	28.9	26.9	27.1	27.3	27.1	27.1	27.1	27.3	27.3	27.4	27.1	60.0	59.5	28.5		86.3	96.8	87.1	98.6	71.0	71.4	21.0	23.6	25.7	22.2
ARV 916	26.6	28.9	26.9	27.1	27.3	27.3	27.1	27.1	27.3	27.3	26.4	27.1	60.0	59.5	28.3	96.2		87.9	93.0	86.0	73.6	74.7	22.5	23.4	25.5	22.4
ARV 918	26.1	28.3	26.4	26.6	26.9	26.9	26.6	26.6	26.9	26.9	26.4	26.6	59.5	59.0	28.3	97.8	96.9		88.5	96.6	71.4	71.7	20.9	23.8	25.5	22.5
ARV 601G	26.6	28.9	26.9	27.1	27.3	27.3	27.1	27.1	27.3	27.3	27.4	27.1	60.7	60.2	28.7	96.9	97.8	97.1		87.1	72.5	73.2	23.6	24.1	24.9	22.5
MDRV/ YJL	26.6	28.9	26.9	27.1	27.3	27.3	27.1	27.1	27.3	27.3	27.4	27.1	59.7	59.2	28.3	97.1	95.9	97.4	96.4		70.8	71.4	20.6	23.5	25.3	22.6
MDRV/ C4	28.4	29.1	28.7	29.1	29.1	28.7	29.1	29.1	29.1	29.1	24.5	29.1	59.9	59.6	29.4	88.3	90.1	89.4	90.1	87.9		98.5	21.8	24.3	23.1	20.9
GRV/GXR	26.6	27.6	27.1	27.6	28.1	27.1	27.6	27.6	27.6	28.1	25.5	27.1	60.3	60.3	28.1	88.9	91.5	89.9	91.5	89.4	99.0		22.9	23.1	21.1	21.1
GCRV	14.6	14.6	14.9	14.9	14.9	14.9	14.9	14.6	14.9	15.1	17.0	14.6	14.9	14.9	12.9	14.9	14.4	14.6	14.6	14.9	14.9	14.1		91.1	40.9	38.7
GSRV	17.7	18.5	17.9	17.9	18.4	18.2	17.7	17.7	17.9	18.2	17.0	17.7	17.9	17.4	15.7	17.7	17.4	17.4	17.4	17.7	18.4	15.6	75.1		44.0	43.3
CSV	18.7	20.5	18.4	18.7	18.9	18.7	18.4	18.4	18.9	19.1	20.8	17.9	15.8	16.1	16.2	16.3	16.1	16.1	16.1	16.3	17.4	14.6	33.2	44.1		74.5
SBRV	17.9	20.2	18.2	18.4	18.4	18.7	18.4	18.2	18.4	18.7	18.9	17.9	16.8	16.5	15.9	15.6	15.6	15.3	15.3	15.8	17.7	15.1	33.4	43.8	86.6	

## 3.2.9 S3 基因

#### 3.2.9.1 S3 基因 RT-PCR 扩增

呼肠孤病毒的 S3 基因全长约 1198bp 根据参考序列设计特异性引物 S3a/S3b 进行 RT-PCR 扩增(参考序列及引物序列见表 3-1)。扩增得到了预期大小的片段(见图 3-18)。



图 3-18 S3 基因 RT-PCR 电泳图 M: DNA marker (DL2000); 1:S3a/S32b PCR 产物(1198bp) Fig.3-18 Electrophoregram of S3 gene RT-PCR. M: DNA marker(DL2000); 1: Product of S3a/S3b PCR(1198bp)

#### 3.2.9.2 S3 基因测序结果与同源性分析

用 DNAStar (Version 5.0.1)软件中的 Seqman 拼接各测序结果,扩得的 S3 基因全长 1198bp, 包括一个完整的开放阅读框 1101bp 编码 366 个氨基酸。将此开放阅读框的核苷酸序列进行 NCBI BLAST 分析,结果表明该片段与 MRV 三个血清型的同源性较高,同源性由高至低依次 T2、T1、 T3。氨基酸序列 NCBI BLAST 分析结果与核苷酸相似。并发现 B/03 株 S3 基因的氨基酸序列与 ARV、MDRV S4 基因编码的 σNS 蛋白, NBV、PRV、BRV S3 基因编码的 σNS 蛋白具有一定的 同源性。

选取同源性较高的序列(见表 3-22)用 DNAStar MegAlign 中的 Clustal V method 进行同源性 分析(见表 3-23),结果表明该片段与 MRV 血清 1、2、3 型的代表株 T1L、T2J、T3D 的核苷酸 同源性分别为 89.8%、69.4%、83.2%,氨基酸同源性为 96.5%、85.6%、96.2%。从同源性上来看, 该片段与人、牛、猫、鼠和猿的呼肠孤病毒同源性较高(核苷酸同源性 69.4%~97.7%,氨基酸同 源性 85.6%~98.1%),与同样从蝙蝠体内分离的呼肠孤病毒 NBV、PRV 的同源性却较低(核苷酸 同源性 24.6%、24.5%;氨基酸同源性 19.6%、19.6%)。与 BRV(狒狒) ARV(禽)和 MDRV (番鸭)的同源性都较低。用 DNAStar MegAlign 绘制系统发生进化树,结果表明 B/03 株 S3 基 因与 MRV 在同一群,与从蝙蝠分离的 NBV 和 PRV 不在同一群(见图 3-19)。

#### 3.2.9.3 S3 基因编码蛋白的功能

根据S3基因测序结果推导出的氨基酸序列含有366个氨基酸残基。同源性与MRV S3基因编码的非结构蛋白σNS最高(85.6%~98.1%)。DNAStar(Version 5.0.1) Protean Secondary Structure Delèage & Roux method分析结果表明,氨基酸序列二级结构中富含α-螺旋,尤其是在C-末端有一个大的α-螺旋区(225~336位氨基酸残基),在这个大的α-螺旋后是一个转角(337位氨基酸残基)。 而后又连着一个α-螺旋(338~359位氨基酸残基)。σNS蛋白是所有S-Class蛋白中含α-螺旋最多的。 现已知道, σNS蛋白具有与ssRNA连接的活性(Huismans et al, 1976), 但是其序列中没有发现 ssRNA连接基序(Swanson et al, 1987), 推测σNS连接ssRNA可能是非序列依赖性的。那么, σNS 蛋白如此多的α-螺旋结构是否在其功能上具有作用还有待进一步的研究。

毒株	简写	GenBank 收录号	参考文献
Virus strain	Abbreviation	GenBank accession no.	Reference
T1/Human/Ohio/Lang/1953	MRV T1	NC_004266	George et al, 1986
T2/Human/Ohio/Jones/1955	MRV T2	NC_004269	Wiener et al, 1987
T3/Human/Ohio/Dearing/1955	MRV T3	NC_004283	Richardson et al, 1983
T1/Human/Netherlands/1/1967	T1Neth/67	U35351	Goral et al, 1996
T1/Human/Netherlands/1/1984	T1Neth/84	U35348	Goral et al, 1996
T1/Human/Netherlands/1/1985	T1Neth/85	U35346	Goral et al, 1996
T1/Human/Washington	T1C11/59	U35359	Goral et al, 1996
D.C/clone11/1959			
T2/Human/Netherlands/1/1973	T2Neth/73	U35350	Goral et al, 1996
T2/Human/Tokyo/1/1990	T2Tokyo/90	U35360	Goral et al, 1996
T2/Simian/Maryland/SV59/1958	T2SV59/58	U35361	Goral et al, 1996
T2/T2W/Winnipeg	T2W	DQ220018	Unpublished
T3/Bovine/Maryland/clone18/1961	T3C18/61	U35358	Goral et al, 1996
T3/Feline/California/Cornell/1968	T3F/68	U35362	Goral et al, 1996
T3/Human/Netherlands/1/1983	T3Neth/83	U35349	Goral et al, 1996
T3/Human/Tahiti/clone8/1960	T3C8/60	U35355	Goral et al, 1996
T3/Human/Washington	T3C84/57	U35354	Goral et al, 1996
D.C/clone84/1957			
T3/Murine/France/clone9/1961	T3C9/61	U35352	Goral et al, 1996
Nelson bay reovirus	NBV	AF059726	Duncan et al, 1999
Pulau Reovirus	PRV	AY357732	Pritchard et al, 2006
Baboon reovirus	BRV	AF059727	Duncan et al, 1999
ARV S1133	ARV S1133	U95952	Direct Submission
ARV 916	ARV 916	AF294774	Unpublished
ARV 918	ARV 918	AF294775	Unpublished
ARV 601G	ARV 601G	AY008385	Unpublished
Muscovy duck reovirus YJL	MDRV/ YJL	DQ198858	Unpublished
Muscovy duck reovirus C4	MDRV/ C4	DO066922	Direct Submission

表 3-22 S3 基因序列分析参考毒株

Table 3-22 Reovirus strains used for assay of S3





Fig.3-19 Phylogenetic tree of S3 gene

## 中国农业科学院博士学位论文

# 第三章 犬蝠源呼肠孤病毒全基因组序列测定及分析

# 表 3-23 S3 基因同源性比较(左下为氨基酸右上为核苷酸)

Table 3-23 Homology of S3 gene

	B/03	MRV T1	T1Neth/ 67	T1Neth/ 84	T1Neth/ 85	T1C11/59	MRV T2	T2Neth/ 73	T2Tokyo/ 90	T2SV59/ 58	T2W	MRV T3	T3C18/61	T3F/68	T3Neth/ 83	T3C8/60	T3C84/57	T3C9/61	NBV	PRV	BRV	ARV S1133	ARV 916	ARV 918	ARV 601G	MDRV/ YJL	MDRV/ C4
B/03		89.8	82.8	97.6	96.6	89.4	69.4	97.7	96.4	89.7	72.1	83.2	89.6	89.7	82.7	83.2	82.8	83.2	24.6	24.5	25.2	26.1	25.2	25.8	26.4	26.2	25.3
MRV T1	96.5		85.5	90.4	90.6	97.0	66.8	90.7	90.0	94.7	71.9	84.9	97.5	96.9	85.3	84.2	83.8	85.7	23.3	23.4	23.8	25.8	25.4	24.8	26.2	26.0	25.6
T1Neth/67	97.0	97.3		83.7	83.0	84.0	67.9	83.7	83.0	85.6	72.5	91.7	84.2	85.0	97.9	87.3	91.1	98.5	24.2	22.7	23.5	25.1	25.7	26.1	25.4	25.2	24.9
T1Neth/84	98.1	97.3	97.8		97.2	90.0	69.1	98.5	96.9	90.2	72.9	84.3	90.3	90.5	83.8	83.7	83.7	84.1	25.1	24.3	25.3	26.0	24.6	25.4	26.2	26.0	25.5
T1Neth/85	98.1	97.5	97.0	98.4		90.3	68.9	97.6	98.8	90.1	73.4	83.9	90.6	90.6	83.7	83.7	83.6	83.7	24.7	23.6	25.3	25.3	25.1	25.8	25.2	25.4	25.2
T1C11/59	96.7	97.3	96.2	97.5	97.8		67.1	90.3	89.6	94.2	72.4	83.7	98.7	96.5	84.2	83.8	82.5	83.9	23.8	22.8	25.1	26.2	25.3	24.4	26.6	26.5	26.4
MRV T2	85.6	85.8	85.8	85.6	86.1	85.6		69.0	68.9	67.3	67.3	68.2	67.2	67.4	67.8	68.4	68.3	67.7	26.1	27.7	24.9	25.6	25.9	25.8	25.4	25.9	26.4
T2Neth/73	97.5	97.5	97.0	98.4	98.6	97.8	85.6		97.3	91.0	72.5	84.7	90.6	90.8	83.8	84.2	84.1	84.1	24.8	25.3	25.2	26.1	24.8	25.7	26.5	26.0	25.1
T2Tokyo/90	97.5	96.7	96.5	97.8	98.9	97.0	85.3	97.8		89.2	73.3	83.7	89.9	90.0	83.7	83.6	83.7	83.5	24.4	25.0	24.8	25.9	25.4	26.3	26.2	25.9	25.3
T2SV59/58	96.7	96.7	96.2	97.5	97.8	97.0	85.8	97.8	97.0		71.3	85.0	94.6	94.8	85.5	84.6	84.0	85.5	23.6	23.6	23.9	24.3	25.0	24.9	25.8	24.3	25.2
T2W	87.7	87.5	88.6	88.3	88.0	87.2	84.7	87.5	87.7	87.7		71.0	72.2	71.3	71.7	72.0	71.2	72.8	27.0	29.3	25.6	25.4	26.3	26.9	27.1	25.6	26.6
MRV T3	96.2	97.0	97.8	97.3	97.3	96.5	85.8	97.3	96.5	96.5	87.5		84.3	84.8	91.3	87.3	98.9	91.7	23.8	23.1	23.4	26.2	25.2	25.2	27.0	26.1	24.7
T3C18/61	97.3	97.8	96.7	98.1	98.4	98.6	86.1	98.4	97.5	97.5	87.7	97.0		97.0	84.2	84.7	83.2	84.3	23.9	23.3	24.1	26.3	25.2	24.5	26.9	26.4	25.7
T3F/68	97.3	97.8	97.0	98.1	98.4	98.1	85.8	98.4	97.5	97.5	87.5	97.3	98.6		85.2	84.8	83.8	85.3	22.8	22.5	23.9	25.9	26.2	25.6	27.5	26.1	26.7
T3Neth/83	97.0	97.3	99.2	97.8	97.0	96.2	85.8	97.0	96.5	96.2	88.6	97.8	96.7	97.0		87.6	90.6	97.8	23.2	22.5	22.9	25.2	26.3	26.4	25.9	25.2	24.8
T3C8/60	95.9	95.9	96.5	97.0	97.5	96.2	85.0	97.0	97.0	96.2	87.5	96.7	96.7	97.0	96.5		86.6	87.4	23.4	23.0	25.3	25.8	26.2	27.2	26.0	25.4	25.3
T3C84/57	96.5	96.7	97.5	97.0	97.5	96.2	86.1	97.0	96.7	96.2	87.7	99.5	96.7	97.0	97.5	96.5		91.3	23.8	23.6	22.6	25.9	25.1	25.2	27.4	25.7	24.5
T3C9/61	97.0	97.8	99.2	97.8	97.0	96.2	86.1	97.0	96.5	96.2	88.8	97.8	96.7	97.0	99.2	96.5	97.5		24.0	22.8	23.9	25.2	25.8	25.9	25.2	25.3	25.5
NBV	19.6	19.3	19.3	19.3	19.3	19.3	19.9	19.6	19.3	19.6	19.1	19.3	19.6	19.3	19.6	18.8	19.3	19.3		87.0	24.8	43.3	43.4	43.8	43.1	43.1	42.8
PRV	19.6	19.6	19.6	19.6	19.3	19.6	20.7	19.6	19.1	19.6	19.6	19.6	19.9	19.6	19.9	19.1	19.6	19.6	96.7		24.8	42.2	44.1	44.1	43.2	42.0	43.1
BRV	19.5	18.6	18.9	18.9	19.2	18.9	18.1	18.6	19.2	17.8	18.9	18.6	19.2	18.6	18.9	19.8	18.6	18.6	21.8	21.5		28.6	25.6	28.1	27.0	28.1	27.3
ARV S1133	19.9	19.9	19.6	19.9	19.6	20.2	21.0	19.9	19.9	19.6	19.9	19.6	20.2	19.9	19.9	19.6	19.6	19.9	46.7	47.3	22.0		78.9	79.1	82.5	99.4	77.1
ARV 916	19.6	19.9	19.6	19.9	19.6	19.9	20.7	19.9	19.9	19.6	20.2	19.6	19.9	19.9	19.9	19.3	19.6	19.9	47.3	47.6	23.2	93.5		95.3	78.3	79.0	76.9
ARV 918	20.2	20.2	19.9	20.2	19.9	20.2	21.0	20.2	20.2	19.9	19.9	19.9	20.2	20.2	20.2	19.6	19.9	20.2	47.0	47.3	22.0	93.5	97.8		77.4	79.3	76.0
ARV 601G	19.6	19.6	19.3	19.6	19.3	19.9	21.0	19.6	19.6	19.3	19.3	19.3	19.9	19.6	19.6	19.3	19.3	19.6	47.3	47.8	22.9	94.3	92.4	92.9		82.7	77.0
MDRV/YJL	19.9	19.9	19.6	19.9	19.6	20.2	21.0	19.9	19.9	19.6	19.9	19.6	20.2	19.9	19.9	19.6	19.6	19.9	46.5	47.0	22.0	99.2	93.5	93.5	94.3		77.3
MDRV/ C4	20.7	20.4	20.2	20.7	20.4	21.0	21.8	20.7	20.7	20.4	19.9	20.4	21.0	20.7	20.4	20.4	20.4	20.4	47.6	47.3	22.0	92.1	91.8	91.8	92.7	92.1	

## 3.2.10 S4 基因

#### 3.2.10.1 S4 基因 RT-PCR 扩增

呼肠孤病毒的 S4 基因全长约 1196bp,参照文献 Mochow et al, 2001)合成特异性引物 S4a/S4b 进行 RT-PCR 扩增(引物序列见表 3-1)。扩增得到了预期大小的片段(见图 3-20)。



图 3-20 S4 基因 RT-PCR 电泳图 M:DNA marker(DL2000); 1:S4a/S4b PCR 产物(1215bp) Fig.3-20 Electrophoregram of S4 gene RT-PCR. M: DNA marker(DL2000); 1: Product of S4a/S4b PCR(1215bp)

Μ

#### 3.2.10.2 S4 基因测序结果与同源性分析

用 DNAStar (Version 5.0.1)软件中的 Seqman 拼接各测序结果,扩得的 S4 基因全长 1215bp, 包括一个完整的开放阅读框 1098bp,编码 365 个氨基酸残基。将此开放阅读框的核苷酸序列进行 NCBI BLAST 分析,结果表明该片段与 MRV 三个血清型和 NDEV 的同源性较高。氨基酸序列 NCBI BLAST 分析结果与核苷酸相似。并发现 B/03 株 S4 基因的氨基酸序列与 ARV、MDRV、 GRV S3 基因编码的  $\sigma$ B 蛋白, NBV、PRV S4 基因编码的  $\sigma$ 2 蛋白, BRV S2 基因编码的  $\sigma$ 2 蛋白 具有一定的同源性。

选取同源性较高的序列(见表 3-24)用 DNAStar MegAlign 中的 Clustal V method 进行同源性 分析(见表 3-25),结果表明该片段与 MRV 血清 1、2、3 型的代表株 T1L、T2J、T3D 的核苷酸 同源性分别为 85.7%、75.5%、86.2%,氨基酸同源性为 94.8%、89.9%、94.8%。从同源性上来看, 该片段与人、牛、鼠和从 SARS 患者体内分离的呼肠孤病毒 BYD1 的同源性较高(核苷酸同源性 71.3%~92.2%,氨基酸同源性 84.2%~96.7%),与同样从蝙蝠体内分离的呼肠孤病毒 NBV、PRV 的同源性却较低(核苷酸同源性 22.1%、23.2%;氨基酸同源性 14.4%、14.1%),与 BRV(狒狒) RRV(蟒) ARV(禽) TRV(火鸡) MDRV(番鸭)和 GRV(鹅)的同源性都较低。用 DNAStar MegAlign 绘制系统发生进化树,结果表明 B/03 株 S4 基因与 MRV 在同一群,与从蝙蝠分离的 NBV 和 PRV 不在同一群(见图 3-21)。

#### 3.2.10.3 S4 基因编码蛋白的功能

根据S4基因测序结果推导出的氨基酸序列含有365个氨基酸残基。同源性与MRV S4 基因编码的 $\sigma$ 3蛋白最高(84.2%~96.7%)。氨基酸序列分析发现,N-末端有典型的锌指基序CCHH,位于 51~73位氨基酸残基之间(<u>CMHCLSVVGSLQRKLKHLPHHRC</u>)(Mabrouk et al, 1994; Seliger et al, 1992)。而在C-末端则发现了两个dsRNA连接区KGRAYRK(234~241位氨基酸残基)和KLKTV RK (291~297位氨基酸残基)(St Johnston et al, 1992; Miller et al, 1992)。与已报道的MRV  $\sigma$ 3蛋白具

## 有dsRNA连接活性和锌指结构相符。同源性分析表明锌指区与dsRNA连接区的序列高度保守。

#### 表 3-24 S4 基因序列分析参考毒株

毒株	简写	GenBank 收录号	参考文献
Virus strain	Abbreviation	GenBank accession no.	Reference
T1/Human/Ohio/Lang/1953	MRV T1	NC_004265	Atwater et al, 1986
T2/Human/Ohio/Jones/1955	MRV T2	NC_004273	Seliger et al, 1992
T3/Human/Ohio/Dearing/1955	MRV T3	NC_004276	Giantini et al, 1984
T1//Bovine/MaryLand/Clone50/1960	T1C50/60	U15079	Kedl et al, 1995
T1/Human/WashingtonD.C/Clone151958	T1C15/58	U15073	Kedl et al, 1995
T2/Human/BYD1	T2 BYD1	DQ318037	Unpublished
T2 T2W Winnipeg	T2W	DQ220019	Unpublished
T3/Bovine/MaryLand/Clone18/1961	T3C18/61	U15074	Kedl et al, 1995
T3/Bovine/MaryLand/Clone31/1959	T3C31/59	U15076	Kedl et al, 1995
T3/Human/Tahiti/Clone8/1960	T3C8/60	U15082	Kedl et al, 1995
T3/Human/WashingtonD.C/clone93/1957	T3C93/57	U15083	Kedl et al, 1995
T3/Murine/France/Clone9/1961	T3C9/61	U15084	Kedl et al, 1995
Ndelle virus	NDEV	AF368037	Attoui et al, 2001
Nelson bay reovirus	NBV	AF059722	Duncan et al, 1999
Pulau Reovirus	PRV	AY357733	Pritchard et al, 2006
Baboon reovirus	BRV	AF059723	Duncan et al, 1999
Reptilian reovirus python	RRV	AY238886	Duncan et al, 2004
ARV S1133	ARV S1133	U20642	Yin et al, 1997
ARV 916	ARV 916	AY008383	Unpublished
ARV 918	ARV 918	AF301473	Unpublished
ARV 601G	ARV 601G	AY008384	Unpublished
Turkey reovirus TX99 USA Texas	TRV TX99	AY444910	Sellers et al, 2004
Muscovy duck reovirus YJL	MDRV/ YJL	DQ198855	Unpublished
Muscovy duck reovirus 89026	MDRV/89026	AJ006476	Le Gall-Recule et al, 1999
Goose reovirus D15/ 99	GRV D15/99	AY114138	Direct Submission

Table 3-24 Reovirus strains used for assay of S4

# 3.2.11 小结

本研究完成了犬蝠源呼肠孤病毒 Bat/China/2003 (B/03)株全基因组 10 个基因节段完整 ORF 的序列克隆、测定与分析,并根据核苷酸序列推导出氨基酸序列,用分子生物学软件分析其结构 域与功能区,预测其编码蛋白的功能。这是首次对蝙蝠中分离的呼肠孤病毒,进行全基因组 10 个基因节段完整 ORF 的测序与分析。B/03 株各基因及其编码蛋白的功能预测见表 3-26。



图 3-21 S4 基因进化树

Fig.3-21 Phylogenetic tree of S4 gene

## 中国农业科学院博士学位论文

# 第三章 犬蝠源呼肠孤病毒全基因组序列测定及分析

# 表 3-25 S4 基因同源性比较(左下为氨基酸右上为核苷酸)

Table 3-25 Homology of S4 gene

	B/03	MRV T1	T1C50/60	T1C15/58	MRV T2	T2 BYD1	T2W	MRV T3	T3C18/61	T3C31/59	T3C8/60	T3C93/57	T3C9/61	NDEV	NBV	PRV	BRV	RRV	ARV S1133	ARV 916	ARV 918	ARV 601G	TRV TX99	MDRV/ YJL	MDRV/ 89026	GRV D15/99
B/03		85.7	92.0	85.7	75.5	82.6	71.3	86.2	92.2	85.9	87.2	92.1	82.9	89.5	22.1	23.2	22.5	23.1	23.4	22.6	22.5	23.6	25.2	23.3	22.6	20.3
MRV T1	94.8		86.1	99.6	74.8	83.0	70.9	92.6	85.6	92.6	89.0	87.2	83.7	83.5	23.4	19.8	22.3	22.7	22.0	20.4	23.2	22.9	24.0	22.1	25.3	20.4
T1C50/60	95.6	95.4		86.1	75.9	83.0	69.9	86.4	98.8	86.1	86.2	96.9	82.1	89.4	22.7	22.0	22.0	22.5	23.3	22.2	22.8	23.5	24.6	22.9	24.0	23.2
T1C15/58	94.5	98.9	95.1		74.5	82.9	70.8	92.7	85.6	92.7	88.8	87.2	83.7	83.6	22.9	22.2	22.2	22.7	22.0	20.5	23.4	22.6	23.8	22.1	25.1	19.4
MRV T2	89.9	90.2	90.7	89.9		75.0	71.9	73.2	75.7	74.4	75.1	75.1	75.4	75.8	24.3	23.3	22.3	23.6	24.6	24.9	24.6	24.9	24.3	23.3	22.7	24.2
T2 BYD1	94.5	94.5	95.4	94.3	89.3		72.5	83.9	82.8	83.4	82.7	82.8	83.1	81.0	21.6	22.2	23.0	22.9	22.5	22.5	21.9	21.7	22.0	22.5	24.4	23.8
T2W	84.2	85.2	84.7	84.7	84.7	85.5		71.4	70.2	71.9	69.9	70.2	72.1	69.8	20.9	22.7	20.5	20.5	21.9	21.3	25.0	21.7	19.6	21.9	22.3	19.7
MRV T3	94.8	96.4	95.4	96.2	89.3	94.5	84.2		86.1	94.4	89.3	87.1	83.7	83.8	21.6	21.2	21.9	23.1	24.0	22.3	23.4	23.0	24.9	23.0	24.0	21.9
T3C18/61	96.2	95.9	98.6	95.6	91.3	95.6	85.2	95.9		85.8	85.7	96.9	81.9	89.0	22.3	22.2	21.7	22.2	23.3	22.7	22.2	23.5	23.2	23.0	24.5	22.0
T3C31/59	95.1	96.4	95.6	96.7	90.4	94.8	84.7	96.2	96.2		89.3	86.8	83.6	83.0	22.0	23.5	23.1	20.9	22.3	22.0	23.5	22.5	24.6	22.6	23.8	22.5
T3C8/60	96.7	96.2	96.7	95.9	91.0	95.9	85.5	96.2	97.3	96.4		86.2	83.2	85.4	22.5	23.8	22.7	23.9	22.6	21.4	21.9	23.2	24.1	22.4	23.2	20.7
T3C93/57	96.4	96.7	98.4	96.4	91.5	95.9	85.5	96.2	98.9	96.4	97.5		82.8	89.5	22.8	22.8	21.6	21.9	23.4	22.5	22.9	23.0	23.9	23.1	24.4	23.7
T3C9/61	94.3	95.4	95.1	95.1	89.9	94.3	85.2	95.4	95.6	95.6	95.6	95.9		80.6	22.2	24.6	22.0	22.7	22.7	22.5	22.1	23.6	23.1	22.7	25.0	22.7
NDEV	94.2	94.2	94.2	93.9	89.4	93.6	83.0	94.2	94.7	94.2	96.4	95.0	93.6		22.2	19.7	22.0	22.1	22.1	22.2	23.8	23.3	24.5	22.3	26.0	22.0
NBV	14.4	15.5	15.5	15.7	15.5	15.2	13.0	15.5	15.2	15.5	15.2	15.5	14.6	15.3		78.8	22.7	24.9	34.5	33.6	34.4	33.4	34.5	34.4	31.9	29.0
PRV	14.1	14.9	15.2	15.2	14.1	14.9	12.7	14.9	14.9	15.5	14.6	15.2	14.9	14.5	88.4		23.6	24.8	34.2	33.4	33.7	32.7	34.6	34.1	32.7	29.7
BRV	13.4	13.4	13.7	13.7	13.1	13.7	12.0	13.9	13.7	13.7	13.7	13.7	13.4	13.1	15.7	16.0		25.9	25.9	25.1	25.7	25.2	24.7	25.6	25.2	25.0
RRV	12.6	12.8	12.8	13.1	13.1	12.8	12.3	13.4	12.6	13.4	12.8	12.6	13.4	12.8	18.8	17.1	19.8		26.4	26.7	26.7	27.8	27.0	26.5	27.6	27.1
ARV S1133	14.8	15.6	15.6	15.6	15.3	15.3	13.4	15.3	15.3	15.3	15.3	15.3	15.6	15.9	33.4	33.1	17.1	22.0		90.6	90.9	91.7	65.8	99.3	53.6	50.1
ARV 916	14.8	15.6	15.6	15.6	15.6	15.3	13.7	15.3	15.3	15.3	15.0	15.3	15.6	15.9	33.4	32.9	16.8	22.6	95.9		96.6	93.6	64.9	90.3	54.6	51.5
ARV 918	15.3	16.1	16.1	16.1	15.6	15.8	13.7	15.8	15.8	15.8	15.6	15.8	16.1	16.4	33.7	33.4	16.8	22.3	96.2	98.1		94.0	65.1	90.6	54.7	51.9
ARV 601G	15.0	15.8	15.8	15.8	15.0	15.6	13.4	15.6	15.6	15.6	15.3	15.6	15.8	16.2	33.4	32.6	17.1	22.8	95.7	96.7	97.0		64.5	91.5	53.7	51.8
TRV TX99	14.2	14.2	14.8	14.8	14.8	14.8	12.6	14.2	14.8	14.5	13.9	14.8	14.5	15.0	34.0	32.6	16.6	22.0	79.1	78.5	78.3	78.5		66.5	56.3	53.5
MDRV/ YJL	15.3	16.1	16.1	16.1	15.6	15.8	13.9	15.8	15.8	15.8	15.6	15.8	16.1	16.4	33.1	32.9	17.4	22.6	98.4	95.7	95.9	95.4	79.9		53.9	50.5
MDRV/89026	15.0	15.0	14.8	15.0	15.3	14.8	15.0	14.5	14.8	15.6	14.5	14.8	14.5	15.3	29.6	28.5	17.9	21.5	60.6	61.4	61.1	60.9	61.7	60.9		91.8
GRV D15/99	13.1	13.7	13.7	13.4	14.5	13.4	13.7	13.7	13.4	13.7	13.7	13.7	13.4	14.0	26.2	25.0	16.3	21.5	57.0	57.8	57.6	57.3	58.7	57.6	92.2	

表:	3-26	B/03	株各基因及编码蛋白的功能
----	------	------	--------------

radie b = 0 dened and enedaded proteinb ranetion of b, ob buan	Table 3	-26	Genes	and	encoded	proteins	function	of B/03	strain
--	---------	-----	-------	-----	---------	----------	----------	---------	--------

基因	ORF Size	G+C	编码产物	氨基酸	蛋白大小	预测的功能
(gene)	(bp)	(%)	(protein)	(aa)	(KDa)	Predicted function
L1	3804	45.82	λ3	1267	142.3	RdRp
L2	3870	46.38	λ2	1289	143.7	鸟苷转移酶、甲基转移酶
L3	3829	47.34	λ1	1275	141.7	ATPase、锌指
M1	2211	44.19	μ2	736	83.1	核苷三磷酸酶、包涵体形成
M2	2127	48.33	μ1	708	76.2	病毒侵入
M3	2166	47.69	μNS	721	80.3	与细胞骨架相连、病毒装配
<b>S</b> 1	1413	44.80	σ1	470	51.5	细胞吸附蛋白、血凝素
	360	44.44	σ1S	119	14.0	未知
S2	1257	48.13	σ2	418	47.1	dsRNA 连接
S3	1101	47.05	σNS	366	41.1	ssRNA 连接
S4	1098	46.81	σ3	365	41.1	dsRNA 连接、锌指

# 3.3 讨论

### 3.3.1 犬蝠源呼肠孤病毒 B/03 株的同源性分析

犬蝠源呼肠孤病毒 B/03 株的基因组分 10 个节段,即3 个大的基因节段 L1、L2、L3,3 个中 的基因节段 M1、M2、M3 和4 个小的基因节段 S1、S2、S3、S4。序列分析表明,这些基因节段 的大小与他们编码的蛋白基本上是一致的,蛋白的翻译通常是由第一个 AUG 起始。但是 S1 基因 是一个双顺反子基因,由两个不同编码框的起始密码子 AUG 开始翻译,编码合成两个蛋白。此 外,M3 基因也可以编码二种蛋白 μNS 和 μNSC,后者是由 μNS ORF 内的第 2 个 AUG 起始合成 的。核苷酸与氨基酸序列同源性分析表明,B/03 株的 10 个基因节段及其编码的产物与 MRV,尤 其是人和鼠的呼肠孤病毒同源性较高。

B/03 株 L-Class 的 3 个基因 L1、L2、L3 的核苷酸序列 NCBI BLAST 分析结果表明,与 MRV 3 个血清型的同源性由高至低依次是 T1>T3>T2。MRV L1 基因只有 4 个已发表的完整的 ORF 序 列,DNAStar MegAlign Clustal V method 分析表明,B/03 株的 L1 基因与 NDEV 的同源性最高。 L2 基因与人、牛、鼠、猿的呼肠孤病毒同源性较高。L3 基因与从 SARS 患者体内分离的呼肠孤 病毒 GD-2003 株的同源性最高。总之,B/03 株 L-Class 基因与 MRV 同源性较高,与禽和水生呼 肠孤病毒同源性较低(见表 3-3、3-5、3-7)。此外,L-Class 基因同源性分析还发现,与 MRV 的 同源性 L3 基因最高、L1 基因次之(L1 基因与水生呼病毒的同源性比 L2 和 L3 基因高)、最后是 L2 基因。这可能是因为 L3 基因编码的  $\lambda$ 1 蛋白构成病毒内衣壳的正二十面体框架,位于病毒内 部,受到的来自外界的影响小,变异发生机率小。L1 基因编码的  $\lambda$ 1 蛋白是病毒的 RdRp,作为 病毒的转录/复制酶也具有较高的保守性。而 L2 基因编码的  $\lambda$ 2 蛋白则是内衣壳与外衣壳连接的 通道,所以保守性比 L1 和 L3 基因低。 B/03 株 M-Class 的 3 个基因 M1、M2、M3 的核苷酸序列 NCBI BLAST 分析结果表明,M1、 M3 基因与 MRV 三个血清型的同源性由高至低依次是 T1>T3>T2。而 M2 则是 T3>T1>T2。DNAStar MegAlign Clustal V method 分析表明,B/03 株 M-Class 基因与 MRV (M1 人、猿,M2 人、鼠, M3 人)的同源性较高,与禽和水生呼肠孤病毒同源性较低。而且,与 MRV 的同源性 M1 基因最 高,M2 基因次之,M3 基因最低(见表 3-9、3-11、3-13)。这可能是因为 M1 基因编码的 μ2 蛋 白是内衣壳蛋白,保守性较高,而 M2 基因编码的 μ1 蛋白是与病毒侵入有关的外衣壳蛋白,受 到外界选择性压力较大,易于变异。

B/03 株 S-Class 的 4 个基因 S1、S2、S3、S4 的同源性分析结果表明,S1 基因仅与 MRV T1 的同源性较高,MRV T2 次之,与 MRV T3、NDEV、NBV、PRV、BRV、RRV、ARV、MDRV 和 GRV 的同源性都很低。这可能是由于 S1 基因编码的是病毒的外衣壳蛋白  $\sigma$ 1,是血凝素蛋白, 也是病毒的细胞吸附蛋白,决定了病毒的血清型、组织嗜性与宿主范围,变异较大。S2 基因与 MRV 的同源性由高至低依次是 T1、NDEV、T3、T2。与人、牛、鼠和从 SARS 患者体内分离的 呼肠孤病毒 GD-2003 同源性较高。与同样从蝙蝠体内分离的呼肠孤病毒 NBV、PRV 的同源性却 很低。与 BRV、ARV、MDRV、GRV 和水生呼肠孤病毒的同源性也很低。S3、S4 基因的同源性 分析结果与 S2 较为相似。总之,B/03 株 S-Class 的 4 个基因中,S1 基因仅与 MRV T1 同源性较 高,而 S2、S3、S4 与 MRV 同源性都较高,但与蝙蝠中分离的呼肠孤病毒 NBV、PRV 的同源性 较低,与其他正呼肠孤病毒属成员和水生呼肠孤病毒属成员的同源性也很低(见表 3-16、3-18、 3-21、3-23、3-25)。此外,B/03 株 S-Class 各基因的同源性分析还发现,与 MRV 的同源性 S2 基 因最高、S4 基因次之、最后是 S1 基因(S3 基因编码非结构蛋白),这可能与其编码产物在病毒 粒子中的定位有关,编码内衣壳蛋白的基因比编码外衣壳蛋白的基因保守。

B/03株的核苷酸与氨基酸序列同源性分析发现,与NDEV已报道L1、M2、S1、S2、S4节段 同源性较高。NDEV是从鼠体内分离的呼肠孤病毒,它与MRV 3个血清型的序列同源性都较高, 但是中和试验的结果表明,它不属于已知的3个血清型,有学者建议将其划分为MRV 4型(Attoui et al, 2001),B/03株与NDEV的关系还有待进一步的研究。此外,还发现B/03株与已报道的SARS 患者体内分离的呼肠孤病毒GD-2003株的L3、S2基因(部分序列)和BYD1株的S4基因同源性较 高,进一步的确定他们之间的关系还需要GD-2003株和BYD1株更多的序列信息。

综上所述, 犬蝠源呼肠孤病毒 B/03 株的 10 个基因及其编码的蛋白, 与呼肠孤病毒科正呼肠 孤病毒属的 MRV 同源性最高, 与呼肠孤病毒科正呼肠孤病毒属的其他成员(包括 ARV、MDRV、 GRV、BRV、RRV 和两株从蝙蝠中分离的正呼肠孤病毒 NBV、PRV)和水生呼肠孤病毒属的成 员具有一定的同源性, 但比较低。由此可以从分子水平上初步推断犬蝠源呼肠孤病毒 B/03 株属 于呼肠孤病毒科正呼肠孤病毒属。

## 3.3.2 犬蝠源呼肠孤病毒 B/03 株编码蛋白的功能分析

氨基酸同源性分析表明,犬蝠源呼肠孤病毒 B/03 株与 MRV 同源性较高。根据 B/03 株编码 产物和呼肠孤病毒科成员编码产物的比较结果推测,B/03 株的 L1、L2、L3、M1、M2、S1、S2、 S4 基因分别编码病毒的结构蛋白 λ3、λ2、λ1、μ2、μ1、σ1、σ2、σ3, 而 M3、S1、S3 基因编码

病毒的非结构蛋白  $\mu NS$ 、 $\sigma IS$ 、 $\sigma NS$ 。

MRV λ3 蛋白具有 RdRp 活性(Wiener et al, 1989)。本研究中发现 B/03 株 L1 基因编码的 λ3 蛋白含有 RNA 聚合酶上游结构域 (DXXXXD, 585~590 位氨基酸残基), RNA 聚合酶结构域

(GDD, 733~735 位氨基酸残基)和 RNA 聚合酶下游结构域 (EXXKXY, 780~785 位氨基酸残基)(Poch et al, 1989; Bruenn, 1991)。这进一步的证明了 B/03 株 λ3 蛋白具有 RdRp 活性。 作为 dsRNA 病毒的转录/复制酶 λ3 蛋白在呼肠孤病毒科各属之间是最保守的,序列同源性分析也 表明,上述 3 个区域在 MRV 和水生呼肠孤病毒之间是完全保守的。

据报道MRV λ2蛋白是病毒的内衣壳蛋白,以五聚体的形式形成连接内外衣壳的约8 nm的通 道,具有鸟苷转移酶和甲基转移酶的活性(Luongo et al, 2000; Reinisch et al, 2000)。本研究中发 现,B/03株L2基因编码的λ2蛋白氨基酸序列中有1个鸟苷转移酶活性区,位于2~380位氨基酸残基 之间,2个甲基转移酶活性区位于434~691和840~1002位氨基酸残基之间。同时,在λ2蛋白C-末端 还发现了两个GTP-binding蛋白基序GAAAAGK(893~899位氨基酸残基)和EKQG(1029~1032 位氨基酸残基)。据此可以推测,B/03株λ2蛋白具有鸟苷转移酶和甲基转移酶活性,是病毒的RNA 帽化酶,在病毒复制时mRNA的帽化过程中发挥作用。

MRV  $\lambda 1$  蛋白具有锌指结构和 ATPase 活性 (Bisaillon et al., 1997; Lemay et al,1994), 是病毒 内衣壳的主要组成成分, 能够与内衣壳蛋白  $\mu 2$ 、 $\sigma 2$  相互作用,还能与病毒 dsRNA 连接。本研究 中发现,B/03 株 L3 基因编码的  $\lambda 1$  蛋白 N-末端有锌指基序 Cys2/His2(183C、186C、203H、206H), 这可能与该蛋白和其他病毒蛋白的连接相关。 $\lambda 1$  蛋白 N-末端还有 6 个 RNA 螺旋酶的保守基序: KGKSSGKG,DEAD,EAT,FISS、VRGAN 和 NRVGR。这进一步的证明了 B/03 株  $\lambda 1$  蛋白具 有 ATP 酶活性和 RNA 螺旋酶活性,还可能与连接 dsRNA 有关。此外,作为病毒内衣壳的主要 组分  $\lambda 1$  蛋白比较稳定,不易被蛋白酶降解, $\lambda 1$  蛋白的稳定性对于病毒核心的牢固是非常重要的。 序列分析发现 N-末端有 SVRGA 保守基序,能稳定 C-末端,在增强  $\lambda 1$  蛋白对胰凝乳蛋白酶的稳 定性上发挥作用(Dryden et al, 1998)。

MRV  $\mu$ 2蛋白是病毒的内衣壳蛋白,与 $\lambda$ 1蛋白相连,起到稳定内衣壳的作用,是RdRp的辅助 因子。 $\mu$ 2蛋白具有核苷三磷酸酶活性(Noble et al, 1997),还具有RNA连接活性。本研究中发现, B/03株的 $\mu$ 2蛋白含有两个NTP-binding基序:一个是410~420位氨基酸残基处的GAVLPKGSFKS, 另一个是446~449位氨基酸残基处的DEVG(Kim et al, 2004),据此可以推测B/03株 $\mu$ 2蛋白可能具 有核苷三磷酸酶活性。用DNAStar Protean(Version5.0.1)软件中的Hydropathy-Kyte Doolittle method、Surface Probability-Emini method和Antigenicity Jameson-Wolf method分析表明,在 $\mu$ 2蛋白 的N-末端85~125位氨基酸残基处发现了一个较大的亲水区,该区域的抗原性较高,并具有两个较 大的可位于蛋白表面的区域。Secondary Structure -Delèage & Roux method分析表明,该区域形成 了一个螺旋-环-螺旋区,这可能与其具有RNA连接活性有关。此外, $\mu$ 2蛋白还是呼肠孤病毒的微 管相关蛋白,决定呼肠孤病毒形成的包涵体的形态。不同血清型的呼肠孤病毒包涵体的形态不同, 208位Pro/Ser能决定包涵体的形态(Parker et al, 2002),血清1型是纤维状(208Pro),血清3型是 球状(208Ser)。根据B/03株的M1基因推导出的氨基酸序列208位是Pro,据此初步推测这株病毒 的M1基因与MRV T1相近。

MRV µ1 蛋白是病毒主要的外衣壳蛋白,与病毒的穿膜和转录起始有关 (Lucia et al, 1993)。 µ1 蛋白在完整病毒粒子内以 µ1/µ1C 形式存在,当完整病毒粒子转变为 ISVPs 时被蛋白酶降解为  $\delta 和 \Phi$ ,在 ISVPs 转变为核心时全部降解。本研究在 B/03 株 µ1 蛋白中发现了其裂解为 µ1C 及  $\delta$ 、  $\Phi$  蛋白的裂解位点。并发现在 µ1 蛋白的 C-末端有 4 个较大的亲水区 383~398、450~465、553~565、 684~698 位氨基酸残基。用 DNAStar Protean 中的 Hydropathy-Kyte Doolittle method 和 Surface Probability-Emini method 分析,结果表明这 4 个亲水区都位于蛋白的表面,推测能形成环和折叠 结构,与 µ1 蛋白和其他病毒蛋白的相互作用有关。同时还发现这 4 个区域的抗原性都较高,推 测可能引起宿主细胞的免疫反应。此外,µ1 蛋白 N-末端的疏水区较多,较大的有 3 个 31~50 位 氨基酸残基、261~273 位氨基酸残基、296~316 位氨基酸残基,推测这些疏水区可能与病毒的侵 入有关 (Sturzenbecker et al, 1987)。

MRV µNS 蛋白是非结构蛋白,是病毒的细胞骨架相关蛋白,在病毒复制过程能将新合成的 病毒结构蛋白募集到病毒工厂,可能与病毒的装配及二级转录有关(Miller et al, 2003)。本研究 中发现,B/03 株的 µNS 蛋白富含  $\alpha$ -螺旋,C-末端具有七肽重复序列(*a-b-c-d-e-f-g*)<sub>n</sub>,其中 *a* 和 *d* 是疏水性氨基酸(McCutcheon et at, 1999;Lupas et al, 1997),这种序列能形成 alpha-helical coiled coils 结构。Secondary Structure-Coiled Coil method 分析确实发现了 coiled coils 结构,位于 532~565 位氨基酸残基和 620~672 位氨基酸残基之间,与七肽重复序列位置基本相符。由此推测,七肽重 复序列形成 alpha-helical coiled coils 结构是 µNS 蛋白与细胞骨架相连的关键。此外,氨基酸序列 NCBI BLAST 分析发现,N-末端 479~685 位氨基酸残基和 494~679 位氨基酸残基具有公认的 ATPase 的保守区。但迄今为止还没有 µNS 蛋白具有 ATPase 活性的报道 µNS 蛋白是否发挥 ATPase 活性还有待于进一步的研究。

MRV  $\sigma$ 1 蛋白是病毒的血凝素蛋白和细胞吸附蛋白,决定呼肠孤病毒的血清型、组织嗜性及 宿主范围(Nagata et al, 1984; Bassel et al, 1985),还能引起特异性的抗病毒免疫反应(Shahi et al, 2001),本研究中发现,B/03 株 S1 基因编码的 $\sigma$ 1 蛋白 N-末端有一个长的连续的能形成 alpha-helical coiled coils 结构的七肽重复序列(*a-b-c-d-e-f-g*)<sub>n</sub>,位于 28~125 位氨基酸残基之间(约占 N-末端 的 1/3),用 DNAStar Protean(Version 5.0.1)中的 Secondary Structure-Coiled Coil method 进行分 析,确实发现了 coiled coils 结构,位于 22~76 位氨基酸残基和 119~177 位氨基酸残基之间,此处 的抗原性也很高。据此初步推测,七肽重复序列形成的 alpha-helical coiled coils 结构可能与  $\sigma$ 1 蛋 白血凝活性有关(Bassel et al, 1985),但也有可能与  $\sigma$ 1 蛋白的寡聚化有关,因为只有形成 3 聚体 后  $\sigma$ 1 蛋白才能发挥其生物学的活性。另外,在  $\sigma$ 1 蛋白的氨基酸序列中还发现了 4 个潜在的糖基 化位点(N-X-T/S),分别位于:21~23 位氨基酸残基,121~123 位氨基酸残基,205~207 位氨基 酸残基和 353~355 位氨基酸残基。由此推测  $\sigma$ 1 蛋白可能是一种糖基化蛋白,其中的一个或多个 糖基化位点可能与病毒和细胞的吸附有关,这与已报道的 MRV T3 有 3 个潜在的糖基化位点略有 差异(Nagata et al, 1984)。S1 基因编码的另一个蛋白  $\sigma$ 1S 功能尚不清楚。

MRV σ2蛋白是病毒的内衣壳蛋白,位于λ1蛋白构成的内衣壳骨架外侧,能够与dsRNA连接, 但效率不高,σ2蛋白在病毒转录、复制中的功能还不十分清楚。本研究中发现,B/03株σ2蛋白的 C-末端约1/4(314~409位氨基酸残基),是一个大的疏水区,形成α-螺旋和β-转角结构,尤其是在 349~376位氨基酸残基处有一个大的α-螺旋区。Surface Probability-Emini method分析结果表明,此

处有2个区域可能暴露于蛋白表面:363~372位氨基酸残基、375~386位氨基酸残基,推测可能与 $\sigma2$ 蛋白和 $\lambda$ 1蛋白的相互作用有关(Chapell et al, 1994)。此外, 354~374氨基酸残基处的序列与大肠 杆菌DNA依赖性RNA聚合酶的 $\beta$ 亚基非常相似,这可能决定了S2基因的dsRNA连接活性(Dermody et al, 1991)。

MRV  $\sigma$ NS 蛋白是由 S3 基因编码的非结构蛋白,对 ssRNA(包括 mRNA)有很强的亲和力, 在呼肠孤病毒形态发生过程中,可能与介导病毒 mRNA 和其它蛋白(病毒或细胞的蛋白)结合 为复合物有关。本研究中发现,B/03 株  $\sigma$ NS 蛋白氨基酸序列中富含 Cys 残基,二级结构中有很 多  $\alpha$ -螺旋,  $\sigma$ NS 蛋白是呼肠孤病毒 S-Class 蛋白中含  $\alpha$ -螺旋最多的。用 DNAStar Protean (Version 5.0.1)中的 Secondary Structure -Delèage & Roux method 分析表明,  $\sigma$ NS 蛋白的 C-末端有一个大 的  $\alpha$ -螺旋区(225~336 位氨基酸残基),在这个大的  $\alpha$ -螺旋后是一个转角(337 位氨基酸残基)而 后又连着一个  $\alpha$ -螺旋(338~359 位氨基酸残基)。现已证实,  $\sigma$ NS 蛋白具有与 ssRNA 连接的活性 (Huismans et al, 1976),但是其序列中没有发现 ssRNA 连接基序(Swanson et al, 1987),推测  $\sigma$ NS 蛋白连接 ssRNA 可能是非序列依赖性的。那么  $\sigma$ NS 蛋白如此多的  $\alpha$ -螺旋结构是否在其功能上具 有作用,这还有待于进一步的研究。

MRV  $\sigma$ 3蛋白是外衣壳的主要组分,决定了病毒粒子对外界不利因素的稳定性,具有dsRNA 连接活性和锌指结构。 $\sigma$ 3蛋白的Zn<sup>2+</sup>结合功能区能够使蛋白易于折叠,便于与µ1蛋白结合。 $\sigma$ 3蛋 白dsRNA连接活性可以激活dsRNA依赖性的蛋白激酶(PKR),调节病毒基因的转录和翻译。本 研究发现,B/03株S4基因编码的 $\sigma$ 3蛋白N-末端有典型的锌指基序Cys2/His2,位于51~73位氨基酸 残基之间(<u>CMHCLSVVGSLQR KLKHLPHHRC</u>)(Mabrouk et al, 1994; Seliger et al, 1992)。而在 C-末端则发现了两个dsRNA连接位点,分别是KGRAYIK(234~241位氨基酸残基)和KLKTVRK (291~297位氨基酸残基)(St Johnston et al, 1992; Miller et al, 1992)。这进一步的证明了B/03株 $\sigma$ 3 蛋白具有锌指结构和dsRNA连接活性。

## 3.3.3 犬蝠源呼肠孤病毒 B/03 株的分类学地位

呼肠孤病毒科是 dsRNA 病毒的代表,其成员广泛侵染自然界中各种生物有机体,包括脊椎动物、无脊椎动物、植物和微生物。病毒基因组由 10~12 个分节段的 dsRNA 组成。2005 年 9 月, 国际病毒分类委员会(ICTV)第八次报告(Fauquet et al, 2005)将呼肠孤病毒科分为 12 个属(见 表 1-1)。正呼肠孤病毒属是呼肠孤病毒科的代表属,基因组由 10 条 dsRNA 组成,分 3 个区段, 包括 MRV(T1、T2、T3、NDEV、SARS orthoreovirus GD-2003)、ARV(ARV、MDRV、GRV)、 NBV(NBV、PRV)、BRV 和 RRV(见表 1-2)。

犬蝠源呼肠孤病毒 B/03 株核酸电泳发现,基因组呈区段性的排列,分大、中、小3个区段, 基因组片段的数目虽然为病毒的分类提供了重要的依据,但是并不充分。本研究完成了犬蝠源呼 肠孤病毒 B/03 株全基因组 10 个基因节段完整 ORF 的序列测定与分析,有利于分析 B/03 株与呼 肠孤病毒科其它成员的进化关系,以确定其分类学地位。

B/03 株的 λ3 蛋白含有呼肠孤病毒 RdRp 基序 GDD, 是病毒的 RdRp。同源性分析表明, B/03 株 λ3 蛋白与呼肠孤病毒科正呼肠孤病毒属同源性最高(91.9%~98.2%)。在呼肠孤病毒科中,同

一属的病毒 RdRp 氨基酸序列同源性大于 20% (Attoui et al, 2000)。因此,证实了 B/03 株属于呼 肠孤病毒科正呼肠孤病毒属。此外, B/03 株 RdRp 与水生呼肠孤病毒 RdRp 的氨基酸序列同源性 也高于 20% (38.6%~51.7%),但显著低于与正呼肠孤病毒属 RdRp 氨基酸序列的同源性,这说明 了 B/03 株与正呼肠孤病毒的进化关系比水生呼肠孤病毒的近。

B/03 株各基因编码的蛋白与正呼肠孤病毒属的其他成员进行同源性分析的结果表明,与 MRV(T1、T2、T3、NDEV、SARS orthoreovirus GD-2003)具有较高的氨基酸同源性。与ARV (ARV、MDRV、GRV)、NBV、PRV、BRV、RRV 的氨基酸同源性较低。系统发生进化树也 表明 B/03 株的各基因与 MRV 属于同一个群。与已报道的从蝙蝠中分离的正呼肠孤病毒 NBV、 PRV 不在同一群。由此可以初步将犬蝠源呼肠孤病毒 B/03 株归类为呼肠孤病毒科,正呼肠孤病 毒属,哺乳动物正呼肠孤病毒。

S1 基因编码 MRV 的型特异性抗原蛋白,同源性分析表明 S1 基因是 MRV 各基因中变异最大的,各血清型之间的核苷酸与氨基酸序列同源性较低,同一血清型间的差异也比较大。B/03 株 S1 基因的系统发生进化树表明,与血清 1 型的进化关系最近。同源性分析也表明与 MRV T1 的同 源性最高(核苷酸同源性 68.2%~86.3%,氨基酸同源性 77.7%~90.0%),而后依次是 T2(核苷酸 同源性 45.8%~48.3%,氨基酸同源性 42.0%~51.1%),T3(核苷酸同源性 24.0%~26.1%,氨基酸 同源性 19.5%~20.8%),与 NDEV(核苷酸同源性 25.6%,氨基酸同源性 20.5%)的同源性也很低。由此推测,B/03 株的 S1 基因与目前已知的 MRV 分离株差异较大,有可能是 T1 的一个独立分支。然而,仅通过 S1 基因同源性分析进行 MRV 的分型是不准确的。例如,NDEV S1 基因与 MRV 3 个血清型的同源性比较发现,与 T3 的同源性较高(核苷酸同源性 62.9%~65.3%,氨基酸同源性 61.5%~68.6%),曾因此推测 NDEV 是 MRV T3 的一个独立分支,但是中和试验的结果却表明与 MRV 3 个血清型都没有中和反应,从而推测 NDEV 是 MRV 的一个新的血清型 MRV T4(Attoui et al, 2001)。所以要确定 B/03 株的血清型还需要进一步的研究。

综上所述,犬蝠源呼肠孤病毒 B/03 株属呼肠孤病毒科,正呼肠孤病毒属,哺乳动物正呼肠 孤病毒,其血清型还有待于进一步研究确定。

### 3.3.4 呼肠孤病毒的遗传演化分析

呼肠孤病毒的基因组是分节段的dsRNA,在自然条件下,易发生病毒核酸间的交换——重配 (reassortment)。当两株呼肠孤病毒同时感染一个细胞时,它们的基因组中有一个或几个节段发 生交换,而且发生频率高达3%~10%。呼肠孤病毒的不同变种混合感染时,可以产生5种不同重配 的子代。呼肠孤病毒与其他病毒一样,通过遗传来繁衍后代,保持物种的稳定性。由于呼肠孤病 毒复制周期短,因而病毒在复制过程中的变异率较高,导致了病毒的适应性好,生存力强,这可 能是呼肠孤病毒在自然界中广泛存在的主要原因之一。

MRV的宿主范围广泛,能感染大多数的哺乳动物,是研究病毒与宿主之间关系和基因组分节 段病毒进化的良好模型。已有研究证实MRV的一些基因在自然条件下发生重配,重配是驱动呼肠 孤病毒进化的主要动力之一(Joklik et al, 1995)。本研究的同源性分析结果与系统发生进化树表 明,呼肠孤病毒S-Class基因的重配现象较明显,这可能是因为已报道的L-Class和M-Class基因的 序列较少,用于进行病毒的重配与进化研究较为受限。

本研究发现 MRV S1、S2、S3、S4 基因具有各自独立的的进化史,这进一步的证实了呼肠孤病毒在自然界中存在重配现象(Goral et al, 1996; Kedl et al, 1995)。同时还发现 MRV S1、S2、S3、S4 基因在进化上与宿主物种、地理区域、分离的时间无关,这与已有的报道相符(Goral et al, 1996; Dermody et al, 1990)。同源性分析发现,从不同宿主体内分离的 MRV 的 S2、S3、S4 基因具有较高的保守性,这表明呼肠孤病毒已适应了哺乳动物,并已达到了进化的平衡,即呼肠孤病毒的几种等位片段(allele)几率相等的分配到各毒株中。从而推测呼肠孤病毒重配较频繁,因为没有发现某一等位片段具有选择优势。MRV 各基因的遗传变异与其编码的蛋白在病毒粒子中的定位相关,即编码外衣壳蛋白的基因变异较大、而编码内衣壳蛋白的基因变异较小。这是外衣壳蛋白受到更多的外界因素影响的结果。而 S1 基因编码病毒的 σ1 蛋白,带有主要的中和反应决定簇,在免疫选择压力下保守性较低,并据此将 MRV 分成了 3 个血清型。

犬蝠源呼肠孤病毒 B/03 株的同源性分析表明,L1 基因与 NDEV(鼠)同源性最高(77.3%), L2 基因与 T3C93/55(人)同源性最高(76.2%) L3 基因与 SARS 患者体内分离的 GD-2003(人) 同源性最高(82.8%) M1 基因与 T1Neth/84(人)同源性最高(96.2%) M2 基因与 T3A(人) 同源性最高(90.0%) M3 基因与 MRV T1(人)同源性最高(84.3%) S1 基因与 MRV T1(人) 同源性最高(86.3%) S2 基因与 T1C11/59(人)同源性最高(84.5%) S3 基因与 T2Neth/73(人) 同源性最高(97.7%) S4 基因与 T3C18/61(牛)同源性最高(92.2%)。由此推测,犬蝠源呼肠 孤病毒 B/03 株可能是在自然感染过程中经长期的重配形成的一株病毒。

本实验完成了犬蝠源呼肠孤病毒 B/03 株全基因组 10 个基因节段完整 ORF 的序列测定,并 利用相关的分子生物学软件对其核苷酸与氨基酸序列进行同源性分析,绘制系统发生进化树,通 过对各基因编码产物的功能区与结构域的分析预测各蛋白的功能,揭示了犬蝠源呼肠孤病毒与其 他正呼肠孤病毒属成员的同源性关系,以及其在呼肠孤病毒科的分类与进化中所处的地位。本实 验对犬蝠源呼肠孤病毒基因组进行了研究;对其编码蛋白功能、系统进化、同源性进行了分析。 为该病毒的分类、进化、蛋白质空间结构和功能研究奠定了基础。

呼肠孤病毒是人畜疾病的一个重要的病原体,而犬蝠源呼肠孤病毒 B/03 株是我国首次报道的从野生动物体内分离到呼肠孤病毒,根据其各基因节段与不同呼肠孤病毒毒株同源性相近(尤 其是人和鼠的呼肠孤病毒),推测该毒株可能是在自然感染过程中经长期的重配形成的,对研究 呼肠孤病毒的遗传进化具有重要的意义。

# 第四章 结论

- 本研究从野生犬蝠样品中分离到呼肠孤病毒,证明了犬蝠可以携带呼肠孤病毒。这是国内首次从蝙蝠体内分离到呼肠孤病毒,为我国蝙蝠携带的病毒增加了一个新例。
- 2.测定犬蝠源呼肠孤病毒 B/03 株全基因组 10 个基因节段完整 ORF 的序列。核苷酸和推导的氨基酸序列同源性分析表明 B/03 株与 MRV 同源性最高(尤其是人和鼠的呼肠孤病毒);系统进化树显示 B/03 株各基因与 MRV 亲缘关系最近。根据呼肠孤病毒的分类学依据以及遗传衍化分析结果,确定犬蝠源呼肠孤病毒 B/03 株属呼肠孤病毒科,正呼肠孤病毒属,哺乳动物正呼肠孤病毒,但有关其血清型还有待进一步的研究确定。
- 3.系统发育进化表明,MRV存在基因重配现象。犬蝠源呼肠孤病毒 B/03 株各基因的序列比较 结果表明,各基因节段与不同呼肠孤病毒毒株同源性相近,该毒株可能是在自然感染过程中 经长期的重配形成的。

## 参考文献

- 董必军,陈文州,李秀维,刘红兵,陈玉本,阚飙,邝继琛.首次从海南岛蚊虫和蝙蝠中 分离出两株基孔肯雅病毒,中国媒介生物学及控制杂志,1993,4(3):205-208.
- 方勤, 丁清泉, 汪亚平, 朱作言. 草鱼呼肠病毒 RNA 聚合酶基因的表达与产物纯化. 中 国病毒学, 2003, 18(2): 169-173.
- 3. 方勤, 朱作言. 呼肠孤病毒结构与功能研究进展. 病毒学报, 2003, 19(4): 381-384.
- 何诚,朱虹,何君,左庭婷,雷鸣,檀华,甘永华,黄如统,端青.新分离呼肠病毒 BYD1
  株实验感染食蟹猴的病理学改变及发病机制.军事医学科学院院刊,2004,27(6): 404-405.
- 5. 黄文丽,张海林,龚鹤琴,张云智,米竹青,王静林.云南蝙蝠血液乙型脑炎病毒分离物 的研究.中国媒介生物学及控制杂志,2000,11(1):48-50.
- 6. 黄桢祥. 医学病毒学基础及实验技术. 北京: 科学出版社, 1990: 249-256.
- 李文东,梁国栋,梁冰,胡志红,石正丽,张树义. 蝙蝠携带病毒的研究进展. 中国病毒 学, 2004, 19(4): 418-425.
- 李志峰,陈清,俞守义.果蝠与人类(新现)病毒性疾病.中国人兽共患病杂志,2005,21(1): 79-82.
- 廖敏,谢芝勋,谢志勤,刘加波,庞耀珊,邓显文,唐小飞,何竞铭.一步法 RT-PCR 检 测禽呼肠病毒的研究.中国预防兽医学报,2003,25(1):53-55.
- 10. 萨姆布鲁克. 分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社, 2002, 第三版.
- 11. 田静, 邹桂平, 方勤. 草鱼出血病病毒基因组的 cDNA 合成、克隆及部分序列分析. 中国 病毒学, 1999, 14(1): 87-92.
- 12. 王应祥. 中国哺乳动物种和亚种分类名录与分布大全. 北京: 中国林业出版社, 2003, 27-29.
- 13. 谢芝勋, 刘加波, 廖敏, 庞耀珊, 谢志勤, 邓显文, 李康然, 唐小飞, 何竞铭. 反转录聚合 酶链反应和核酸探针检测禽呼肠病毒研究的概述. 广西畜牧兽医, 2003, 19(5): 195-198.
- 14. 谢芝勋, 刘加波, 庞耀珊, 谢志勤, 邓显文. 应用半套式聚合酶链反应检测禽呼肠病毒 S1 基因的研究. 中国兽医杂志, 2001, 37(3): 6-8.
- 15. 徐耀先, 周晓峰, 刘立德. 分子病毒学. 湖北: 科学技术出版社, 2002.
- 16. 杨蓝萍, 张天寿, 袁晓平, 自登云. 从云南蝙蝠及牛蜱中分离出两株森林脑炎病毒. 中国 人兽共患病杂志, 1993, 9(1): 22-23.
- 17. 杨怡, 陈德蕙, 端青, 朱虹, 郎振为, 孟忻, 张德添, 张飒. 呼肠孤病毒与 SARS 相关的形态学依据. 军事医学科学院院刊, 2005, 20(2): 105-108.
- 18. 杨怡, 李卫华, 端青, 朱虹, 郎振为, 孟忻, 张德添, 何昆, 周涛, 张飒, 陈德蕙. 再次从 SARS 患者肺组织中分离与检出呼肠病毒. 军事医学科学院院刊, 2003, 27(4): 1.
- 19. 殷震, 刘景华. 动物病毒学. 北京: 科学出版社, 1997, 538-558.
- 20. 袁庆虹, 刘行知, 李兆样, 自登云, 杨灿辉, 石学雷, 李炎, 李庭芬. 从云南省宾川县蝙蝠体内分离到乙型脑炎病毒. 地方病通报, 1996, 11(2): 45-46.

- 张海林,施华芳,刘丽华,俞永新,自登云,李兆祥,张天寿,崔五全,王志伟,国正鸣, 李新年,甲利.从云南省蝙蝠中分离基孔肯雅病毒及血清抗体调查.病毒学报,1989, 5(1):31-36.
- 22. 张海林, 施华芳, 米竹青, 龚正达, 国正鸣, 李兆祥, 自登云, 甲利, 刀红兵, 李新年, 戴祥明. 蝙蝠自然感染乙型脑炎病毒的研究. 病毒学报, 1990, 6(3): 269-271.
- 23. 张海林, 张云智, 黄文丽, 米竹青, 龚鹤琴, 王静林. 从云南省蝙蝠脑组织中分离出乙型 脑炎病毒. 中国病毒学, 2001, 16(1): 74-77.
- 24. 张树义, 贾广乐, 吴庭鹤. 果蝠——多种人兽共患病病毒的自然宿主. 科学通报, 2003, 48(11): 1109-1112.
- 25. 赵春生, 蒋廉华, 余兴龙, 陈唯军, 饶颐年, 陆振豸. 从海南省蝙蝠脑中分离出 1 株罗斯 河病毒及其血清抗体调查. 中国兽医学报, 1997, 17 (3): 241-243.
- 26. 朱虹, 何君, 何诚, 甘永华, 黄如统, 端青. 新分离呼肠病毒的致病性及其与 SARS 相关 性的实验动物研究. 军事医学科学院院刊, 2004, 28(3): 295-297.
- 27. 朱虹, 裴杰萍, 端青. 呼肠病毒的致病机制及诱导免疫作用的研究进展. 军事医学科学 院院刊, 2004, 28(2): 171-173.
- 朱虹, 左庭婷, 何君, 甘永华, 檀华, 张浩杰, 宋立华, 黄如统, 周育森, 端青. 新分离呼 肠病毒 BYD1 株实验感染食蟹猴动物模型的初步建立. 军事医学科学院院刊, 2003, 27(5): 327-329.
- 29. 左庭婷, 檀华, 何君, 朱虹, 张浩杰, 宋立华, 黄如统, 端青. 从 SARS 患者标本中分离的呼肠病毒的分离及鉴定. 军事医学科学院院刊, 2003, 27(4): 241-243.
- Abramowitz A, Arad G, Livni N, Morag A, Tamir I. Rapid isolation and identification of reovirus-3. J Virol Methods, 1987, 17(3-4): 319-323.
- 31. Attoui H, Biagini P, Stirling J, Mertens PP, Cantaloube JF, Meyer A, de Micco P, de Lamballerie X. Sequence characterization of Ndelle virus genome segments 1, 5, 7, 8, and 10: evidence for reassignment to the genus Orthoreovirus, family Reoviridae. Biochemical and Biophysical Research Communication, 2001, 287(2): 583-588.
- 32. Attoui H, Billoir F, Biagini P, Micco P, Lamballerie X. Complete sequence determination and genetic analysis of Banna virus and Kadipiro virus: proposal for assignment to a new genus (Seadornavirus) within the family Reoviridae. J Gen Virol, 2000, 81(6): 1507-1515.
- 33. Attoui H, Fang Q, Jaafar FM, Cantaloube JF, Biagini P, De Micco P, De Lamballerie X. Common evolutionary origin of aquareoviruses and orthoreoviruses revealed by genome characterization of Golden shiner reovirus, Grass carp reovirus, Striped bass reovirus and golden ide reovirus(genus Aquareovirus, family Reoviridae). J Gen Virol, 2002, 83(8): 1941-1951.
- 34. Attoui H, Mohd Jaafar F, Belhouchet M, Biagini P, Cantaloube JF, de Micco P, de Lamballerie X. Expansion of family Reoviridae to include nine-segmented dsRNA viruses: Isolation and characterization of a new virus designated aedes pseudoscutellaris reovirus assigned to a proposed genus (Dinovernavirus). Virology, 2005, 343(2): 212-223.

- 35. Atwater JA, Munemitsu SM, Samuel CE. Biosynthesis of reovirus-specified polypeptides. Molecular cDNA cloning and nucleotide sequence of the reovirus serotype 1 Lang strain s4 mRNA which encodes the major capsid surface polypeptide sigma 3. Biochem Biophys Res Commun, 1986, 136(1): 183-192.
- 36. Banyai K, Palya V, Benko M, Bene J, Havasi V, Melegh B, Szucs G. The goose reovirus genome segment encoding the minor outer capsid protein, sigma1/sigmaC, is bicistronic and shares structural similarities with its counterpart in Muscovy duck reovirus. Virus Genes, 2005, 31(3): 285-291.
- 37. Bartlett JA, Joklik WK. The sequence of the reovirus serotype 3 L3 genome segment which encodes the major core protein lambda 1. Virology, 1988, 167(1): 31-37.
- 38. Bassel-Duby R, Jayasuriya A, Chatterjee D, Sonenberg N, Maizel JV, Fields BN. Sequence of reovirus haemagglutinin predicts a coiled-coil structure. Nature, 1985, 315 (6018): 421-423.
- Bellum SC, Dove D, Harley RA, Greene WB, Judson MA, London L, London SD. Respiratory reovirus 1/L induction of intraluminal fibrosis. A model for the study of bronchiolitis obliterans organizing pneumonia. American Journal of Pathology, 1997, 150(6): 2243-2254.
- Bisaillon M, Bergeron J, Lemay G. Characterization of the nucleoside triphosphate phosphohydrolase and helicase activities of reovirus λ1 protein. J Biol Chem, 1997, 272(29): 18298-18303.
- 41. Bodelon G, Labrada L, Martinez-Costas J, Benavente J. The avian reovirus genome segment S1 is a functionally tricistronicgene that expresses one structural and two nonstructural proteinsin infected cells. Virology, 2001, 290(2): 181-191.
- 42. Breun LA, Broering TJ, McCutcheon AM, Harrison SJ, Luongo CL, Nibert ML. Mammalian reovirus L2 gene and lambda2 core spike protein sequences and whole-genome comparisons of reoviruses type 1 Lang, type 2 Jones, and type 3 Dearing. Virology, 2001, 287(2): 333-348.
- 43. Broering TJ, Kim J, Miller CL, Piggott CD, Dinoso JB, Nibert ML, Parker JS. Reovirus nonstructural protein mu NS recruits viral core surface proteins and entering core particles to factory-like inclusions. J Virol, 2004, 78(4): 1882-1892.
- Broering TJ, McCutcheon AM, Centonze VE, Nibert ML. Reovirus nonstructural protein muNS binds to core particles but does not inhibit their transcription and capping activities. J Virol, 2000, 74(12): 5516-5524.
- 45. Broering TJ, Parker JS, Joyce PL, Kim J, Nibert ML. Mammalian reovirus nonstructural protein microNS forms large inclusions and colocalizes with reovirus microtubule-associated protein micro2 in transfected cells. J Virol, 2002, 76(16): 8285-8297.
- Brown JH, Cohen C, Parry DA. Heptad breaks in a-helical coiled coils: Stutters and stammers. Proteins, 1996, 26(2): 134-145.
- 47. Bruenn JA. Relationships among the positive strand and double-strand RNA viruses as viewed through their RNA-dependent RNA polymerases. Nucleic Acids Res, 1991, 19(2):

217-226.

- 48. Campbell JA, Schelling P, Wetzel JD, Johnson EM, Forrest JC, Wilson GA, Aurrand-Lions M, Imhof BA, Stehle T, Dermody TS. Junctional adhesion molecule a serves as a receptor for prototype and field-isolate strains of Mammalian reovirus. J Virol, 2005, 79(13): 7967-7978.
- 49. Cashdollar LW, Chmelo RA, Wiener JR, Joklik WK. Sequences of the S1 genes of the three serotypes of reovirus. Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82(1):24-28.
- Caterina KM, Frasca S Jr, Girshick T, Khan MI. Development of a multiplex PCR for detection of avian adenovirus, avian reovirus, infectious bursal disease virus, and chicken anemia virus. Mol Cell Probes, 2004, 18(5): 293-298.
- Chandran K, Walker SB, Chen Y, Contreras CM, Schiff LA, Baker TS, Nibert ML. In vitro recoating of reovirus cores with baculovirus-expressed outer-capsid proteins mu1 and sigma3. J Virol, 1999, 73(5): 3941-3950.
- 52. Chapell JD, Goral MI, Rodgers SE, de Pamphilis CW, Dermody TS. Sequence diversity within the reovirus S2 gene: reovirus genes reassort in nature, and their termini are predicted to form a panhandle motif. J Virol, 1994, 68(2):750-756.
- 53. Chen PN, Liu HJ, Shien JH, Lee LH. Antibody responses against avian reovirus nonstructural protein sigmaNS in experimentally virus-infected chickens monitored by a monoclonal antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay. Res Vet Sci, 2004, 76(3): 219-225.
- 54. Chua KB, Bellini WJ, Rota PA, Harcourt BH, Tamin A, Lam SK, Ksiazek TG, Rollin PE, Zaki SR, Shieh W, Goldsmith CS, Gubler DJ, Roehrig JT, Eaton B, Gould AR, Olson J, Field H, Daniels P, Ling AE, Peters CJ, Anderson LJ, Mahy BW. Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. Science, 2000, 288(5470): 1432-1435.
- 55. Chua KB, Koh CL, Hooi PS, Wee KF, Khong JH, Chua BH, Chan YP, Lim ME, Lam SK. Isolation of Nipah virus from Malaysian Island flying-foxes. Microbes Infect, 2002, 4(2): 145-151.
- Chua KB, Wang LF, Lam SK, Crameri G, Yu M, Wise T, Boyle D, Hyatt AD, Eaton BT. Tioman virus, a novel paramyxovirus isolated from fruit bats in Malaysia. Virology, 2001, 283(2): 215-229.
- 57. Chung CT, Niemela SL, Miller RH. One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86(7): 2172-2175.
- 58. Clarke P, Debiasi RL, Goody R, Hoyt CC, Richardson-Burns S, Tyler KL.Mechanisms of reovirus-induced cell death and tissue injury: role of apoptosis and virus-induced perturbation of host-cell signaling and transcription factor activation. Viral Immunol, 2005, 18(1): 89-115.
- 59. Coombs KM. Stoichiometry of reovirus structural proteins in virus, ISVP, and core particles. Virology, 1998, 243(1): 218-228.
- 60. Dawe S, Boutilier J, Duncan R. Identification and characterization of a baboon reovirus-specific nonstructural protein encoded by the bicistronic s4 genome segment.

Virology, 2002, 304(1): 44-52.

- 61. Dawe S, Duncan R. The S4 genome segment of baboon reovirus is bicistronic and encodes a novel fusion-associated small transmembrane protein. J Virol, 2002, 76(5): 2131-2140.
- 62. Dermody TS, Nibert ML, Bassel-Duby, R. Fields, BN. Sequence diversity in S1 genes and S1 translation products of 11 serotype 3 reovirus strains. J Virol, 1990, 64 (10): 4842-4850.
- 63. Dermody TS, Schiff LA, Nibert ML, Coombs KM, Fields BN. The S2 gene nucleotide sequences of prototype strains of the three reovirus serotypes: characterization of reovirus core protein sigma 2. J Virol, 1991, 65(11): 5721-5731.
- 64. Derrien M, Hooper JW, Fields BN. The M2 gene segment is involved in the capacity of reovirus type 3Abney to induce the oily fur syndrome in neonatal mice, a S1 gene segment-associated phenotype. Virology, 2003, 305(1): 25-30.
- 65. Dever TE, Glynias M, Merrick WC. GTP-binding domain: three consensus sequence elements with distinct spacing. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84(7): 1814-1818.
- 66. Douglas I C, Baldock F C , Black P. Outbreak investigation of an emerging disease (equine morbillivirus). Epidem. Sante. Anim. Proc. of 8th ISVEE conference. Paris, 1997, 4: 81-83.
- Downs WG, Anderson CR, Spence L, Aitken THG, Greenhall AH. Tacaribe virus, a new agent isolated from Artibeus bats and mosquitoes in Trinidad, West Indies. Am J Trop Mcd Hyg, 1963, 12(4): 640-646.
- 68. Dryden KA, Farsetta DL, Wang G, Keegan JM, Fields BN, Baker TS, Nibert ML. Internal structures containing transcriptase-related proteins in top component particles of mammalian orthoreovirus. Virology, 1998, 245(1): 33-46.
- 69. Dryden KA, Wang G, Yeager M, Nibert ML, Coombs KM, Furlong DB, Fields BN, Baker TS. Early steps in reovirusinfection are associated with dramatic changes in supramolecular structure and protein conformation. Analysis of virions and subviral particles by cryoelectron microscopy and image reconstruction. Journal of Cell Biology, 1993, 122(5): 1023-1041.
- 70. Duan Q, Zhu H, Yang Y, Li W H, Zhou Y S, He J, He K, Zhang H, Zhou T, Song L H, Gan Y H, Tan H, Jin B F, Li H Y, Zuo T T, Chen D H, Zhang X M. Reovirus, isolated from SARS patients. Chinese Science Bulletin, 2003, 48(13): 1293-1296.
- 71. Ducan R, Murphy FA, Mirkovi R. Characterization of a novel syncytium inducing baboon reovirus. Virology, 1995, 212(2): 752-756.
- 72. Duncan R, Corcoran J, Shou J, Stoltz D. Reptilian reovirus: a new fusogenic orthoreovirus species. Virology, 2004, 319(1): 131-140.
- Duncan R. Extensive sequence divergence and phylogenetic relationships between the fusogenic and nonfusogenic orthoreoviruses: a species proposal. Virology, 1999, 260(2): 316-328.
- 74. Fang Q, Attoui H, Cantaloube JF, Biagini P, Zhu Z, de Micco P, de Lamballerie X. Sequence of genome segments 1, 2, and 3 of the grass carp reovirus (Genus Aquareovirus, family Reoviridae) Biochem. Biophys Res Commun, 2000, 274(3): 762-766.

- 75. Farsetta DL, Chandran K, Nibert ML. Transcriptional activities of reovirus RNA polymerase in recoated cores. Initiation and elongation are regulated by separate mechanisms. J Biol Chem, 2000, 275(50): 39693-39701.
- 76. Fauquet C M, Mayo M A, Maniloff J, et al. Virus Taxonomys, 8<sup>th</sup> Report of ICTV. Elsevier Academic Press, 2005.
- Fout GS, Martinson BC, Moyer MW, Dahling DR. A multiplex reverse transcription-PCR method for detection of human enteric viruses in groundwater. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(6): 3158-3164.
- Fraser GC, Hooper PT, Lunt RA, Gould AR, Gleeson LJ, Hyatt AD, Russell GM, Kattenbelt JA. Encephalitis caused by a Lyssavirus in fruit bats in Australia. Emerg Infect Dis, 1996, 2(4): 327-331.
- 79. Gard G, Compans RW. Structure and cytopathic effects of Nelson Bay virus. J Virol, 1970, 6(1): 100-106.
- George CX, Atwater JA, Samuel CE. Biosynthesis of reovirus-specified polypeptides. Molecular cDNA cloning and nucleotide sequence of the reovirus serotype 1 Lang strain s3 mRNA which encodes the nonstructural RNA-binding protein sigma NS. Biochem Biophys Res Commun, 1986, 139(2): 845-851.
- 81. George CX, Crowe A, Munemitsu SM, Atwater JA, Samuel CE. Biosynthesis of reovirus-specified polypeptides. Molecular cDNA cloning and nucleotide sequence of the reovirus serotype 1 Lang strain s2 mRNA which encodes the virion core polypeptide sigma 2. Biochem Biophys Res Commun, 1987, 147(3): 1153-1161.
- Giantini M, Seliger LS, Furuichi Y, Shatkin AJ. Reovirus type 3 genome segment S4: nucleotide sequence of the gene encoding a major virion surface protein. J Virol, 1984, 52(3): 984-987.
- Goral MI, Mochow-Grundy M, Dermody TS. Sequence diversity within the reovirus S3 gene: reoviruses evolve independently of host species, geographic locale, and date of isolation. Virology, 1996, 216(1): 265-271.
- 84. Grimes JM, Burroughs JN, Gouet P, Diprose JM, Malby R, Zientara S, Mertens PP, Stuart DI. The atomic structure of the bluetongue virus core. Nature, 1998, 395(6701): 470-478.
- Harrison SJ, Farsetta DL, Kim J, Noble S, Broering TJ, Nibert ML. Mammalian reovirus L3 gene sequences and evidence for a distinct amino-terminal region of the lambda1 protein. Virology, 1999, 258(1): 54-64.
- 86. Helander A, Silvey KJ, Mantis NJ, Hutchings AB, Chandran K, Lucas WT, Nibert ML, Neutra MR. The viral sigma1 protein and glycoconjugates containing alpha2-3-linked sialic acid are involved in type 1 reovirus adherence to M cell apical surfaces. J Virol, 2003, 77(14): 7964-7977.
- 87. Hermann L, Embree J, Hazelton P, Wells B, Coombs RT. Reovirus type 2 isolated from cerebrospinal fluid. Pediatric Infectious Disease Journal, 2004, 23(4): 373-375.

- Hooper JW. Analysis of the mechanism of reovirus entry into cells. Thesis Microbiology and Molecular Genetics. Harvard Medical School. 1995.
- 89. Huismans H, Joklik WK. Reovirus-coded polypeptides in infected cells: Isolation of two native monomeric polypeptides with affinity for single-stranded and double-stranded RNA, respectively. Virology, 1976, 70(2): 411-424.
- Jayasuriya AK, Nibert ML, Fields BN. Complete nucleotide sequence of the M2 gene segment of reovirus type 3 dearing and analysis of its protein product mu 1. Virology, 1988, 163(2): 591-602.
- 91. Joklik WK, Roner MR. What reassorts when reovirus genome segments reassort? J Biol Chem, 1995, 270(9): 4181-4184.
- 92. Karabatsos N. Characterization of viruses isolated from bats. Arn J Trop Med Hyg, 1969, 18(5): 803-810.
- Kedl R, Schmechel S, Schiff L. Comparative sequence analysis of the reovirus S4 genes from 13 serotype 1 and serotype 3 field isolates. J Virol, 1995, 69(1): 552-559.
- 94. Kim J, Parker JS, Murray KE, Nibert ML. Nucleoside and RNA triphosphatase activities of orthoreovirus transcriptase cofactor mu2. J Biol Chem, 2004, 279(6): 4394-4403.
- 95. King A, Davies P, Lawrie A. The rabies viruses of Bats. Vet Microbiol, 1990, 23(1-4): 165-174.
- 96. Kirkland PD, Love RJ, Philbey AW, Ross AD, Davis RJ, Hart KG. Epidemiology and control of Menangle virus in pigs. Aust Vet J, 2001, 79(3): 199-206.
- 97. Koonin EV. Computer-assisted identification of a putative methyltransferase domain in NS5 protein of flaviviruses and lamda 2 protein of reovirus. J Gen Virol, 1993, 74(4): 733-740.
- Lamirande EW, Nichols DK, Owens JW, Gaskin JM, Jacobson ER. Isolation and experimental transmission of a reovirus pathogenic in ratsnakes (Elaphe species). Virus Research, 1999, 63(1-2): 135-141.
- 99. Larson SM, Antczak JB, Joklik WK. Reovirus exists in the form of 13 particle species that differ in their content of protein σ1. Virology, 1994, 201(2): 303-311.
- 100. Le Gall-Recule G, Cherbonnel M, Arnauld C, Blanchard P, Jestin A, Jestin V. Molecular characterization and expression of the S3 gene of Muscovy duck reovirus strain 89026. J Gen Virol, 1999, 80(1): 195-203.
- 101. Leary TP, Erker JC, Chalmers ML, Wetzel JD, Desai SM, Mushahwar IK, Dermody TS. Detection of reovirus by reverse transcription-polymerase chain reaction using primers corresponding to conserved regions of the viral L1 genome segment. J Virol Methods, 2002, 104(2): 161-165.
- 102. Leland MM, Hubbard GB, Sentmore HT 3rd, Soike KF, Hilliard JK. Outbreak of Orthoreovirus-induced meningoencephalomyelitis in baboons. Comparative Medicine, 2000, 50(2): 199-205.
- 103. Lemay G, Danis C. Reovirus 11 protein: Affinity for double stranded nucleic acids by a small

amino-terminal region of the protein independent from the zinc finger motif. J Gen Virol, 1994, 75(11): 3261-3266.

- 104. Li W, Shi Z, Yu M, Ren W, Smith C, Epstein JH, Wang H, Crameri G, Hu Z, Zhang H, Zhang J, McEachern J, Field H, Daszak P, Eaton BT, Zhang S, Wang LF. Bats Are Natural Reservoirs of SARS-Like Coronaviruses. Science, 2005, 310(5748): 676-679.
- 105. Liu HJ, Huang PH. Sequence and phylogenetic analysis of the sigmaA-encoding gene of avian reovirus. J Virol Methods, 2001, 98(2): 99-107.
- 106. Liu HJ, Kuo LC, Hu YC, Liao MH, Lien YY. Development of an ELISA for detection of antibodies to avian reovirus in chickens. J Virol Methods, 2002, 102(1-2): 129-138.
- 107. Liu S, Chen J, Chen J, Kong X, Shao Y, Han Z, Feng L, Cai X, Gu S, Liu M. Isolation of avian infectious bronchitis coronavirus from domestic peafowl (Pavo cristatus) and teal (Anas). Journal of General Virology, 2005, 86(3): 719-725.
- 108. Loh PC, Shatkin AJ. Structural protein of Reoviruses. Journal of virology, 1968, 2(11): 1353-1359.
- 109. Lucia-Jandris P, Hooper JW, Fields BN. Reovirus M2 gene is associated with chromium release from mouse L cells. J Virol, 1993, 67(9): 5339-5345.
- 110. Luongo CL, Contreras CM, Farsetta DL, Nibert ML. Binding site for S-adenosyl-L-methionine in a central region of mammalian reovirus lambda2 protein. Evidence for activities in mRNA cap methylation. J Biol Chem, 1998, 273(37): 23773-23780.
- 111. Luongo CL, Reinisch KM, Harrison SC, Nibert ML. Identification of the guanylyltransferase region and active site in reovirus mRNA capping protein lambda2. J Biol Chem, 2000, 275(4): 2804-2810.
- 112. Lupas A. Predicting coiled-coil regions in proteins. Curr Opin Struct Biol, 1997, 7(3): 388-393.
- 113. Mabrouk T, Lemay G. Mutations in a CCHC zinc-binding motif of the reovirus  $\sigma$ 3 protein decrease its intracellular stability. J Virol, 1994, 68(8): 5287–5290.
- 114. Majeski EI, Paintlia MK, Lopez AD, Harley RA, London SD, London L. Respiratory reovirus 1/L induction of intraluminal fibrosis, a model of bronchiolitis obliterans organizing pneumonia, is dependent on T lymphocytes. American Journal of Pathology, 2003, 163(4): 1467-1479.
- 115. Mao ZX, Joklik WK. Isolation and enzymatic characterization of protein lambda 2, the reovirus guanylyltransferase. Virology, 1991, 185(1): 377-386.
- 116. Marius Jestin V, Lagadic M, Le Menec Y, Bennejean G. Histological data associated with muscovy duck reovirus infection. The Veterinary Record, 1988, 123(1): 32-33.
- 117. Mayo M A. Recent revisions of the rules of rules of virus classification and nomenclature. Arch Virol, 1996, 141(12): 2479-2484.
- 118. McCrae MA, Joklik WK. The nature of the polypeptide encoded by each of the 10 double-stranded RNA segments of reovirus type 3. Virology, 1978, 89(2): 578-593.

- 119. McCutcheon AM, Broering TJ, Nibert ML. Mammalian reovirus M3 gene sequences and conservation of coiled-coil motifs near the carboxyl terminus of the microNS protein. Virology, 1999, 264(1): 16-24.
- 120. Mendez II, She YM, Ens W, Coombs KM. Digestion pattern of reovirus outer capsid protein sigma3 determined by mass spectrometry. Virology, 2003, 311(2): 289-304.
- 121. Mertens PPC, Arella M, Attoui H, et al. Reoviridae. In Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses. Academic Press, 2000.
- 122. Miller CL, Broering TJ, Parker JSL, Arnold MM, Nibert ML. Reovirus sigma NS protein localizes to inclusions through an association requiring the mu NS amino terminus. J Virol, 2003, 77(8): 4566–4576.
- 123. Miller JE, Samuel CE. Proteolytic cleavage of the reovirus sigma 3 protein results in enhanced double-stranded RNA-binding activity: identification of a repeated basic amino acid motif within the C-terminal binding region. J Virol, 1992, 66(9): 5347–5356.
- 124. Mochow-Grundy M, Dermody TS. The reovirus S4 gene 3' nontranslated region contains a translational operator sequence. J Virol, 2001, 75(14): 6517-6526.
- 125. Mundschau LJ, Faller DV. Endogenous inhibitors of the dsRNA -dependent eIF 2 alpha protein kinase PKR in normal and ras- transformed cells. Biochimie, 1994, 76(8): 792-800.
- 126. Munemitsu SM, Atwater JA. Samuel CE. Biosynthesis of reovirus-specified polypeptides. Molecular cDNA cloning and nucleotide sequence of the reovirus serotype 1 Lang strain bicistronic s1 mRNA which encodes the minor capsid polypeptide sigma 1 and the nonstructural polypeptide sigma 1NS. Biochem Biophys Res Commun, 1986, 140(2): 508-514.
- 127. Murray K, Rogers R, Selvey L, Selleck P, Hyatt A, Gould A, Gleeson L, Hooper P, Westbury H. A novel morbillivirus pneumonia of horses and its transmission to humans. Emerg Infect Dis, 1995, 1(1): 31-33.
- 128. Nagata L, Masri SA, Mah DC, Lee PW. Molecular cloning and sequencing of the reovirus (serotype 3) S1 gene which encodes the viral cell attachment protein sigma 1. Nucleic Acids Res, 1984, 12(22): 8699-8710.
- 129. Noble S, Nibert ML. Characterization of an ATPase activity in reovirus cores and its genetic association with core-shell protein lambda1. J Virol, 1997, 71(3): 2182-2191.
- 130. Noble S, Nibert ML. Core protein mu2 is a second determinant of nucleoside triphosphatase activities by reovirus cores. J Virol, 1997, 71(10): 7728-7735.
- 131. Norman KL, Lee PWK. Reovirus as a novel oncolytic agent. J Clin Inv, 2000, 105(8): 1035-1038.
- 132. Odegard AL, Chandran K, Zhang X, Parker JS, Baker TS, Nibert ML. Putative autocleavage of outer capsid protein micro1, allowing release of myristoylated peptide micro1N during particle uncoating, is critical for cell entry by reovirus. J Virol, 2004, 78(16): 8732-8745.
- 133. Parker JS, Broering TJ, Kim J, Higgins DE, Nibert ML. Reovirus core protein mu2

determines the filamentous morphology of viral inclusion bodies by interacting with and stabilizing microtubules. J Virol, 2002, 76(9): 4483-4496.

- 134. Pett DM, Vanaman TC, Joklik WK. Studies on the amino and carboxyl terminal amino acid sequences of reovirus capsid polypeptides. Virology, 1973, 52(1): 174-186.
- 135. Philbey AW, Kirkland PD, Ross AD, Davis RJ, Gleeson AB, Love RJ, Daniels PW, Gould AR, Hyatt AD. An apparently new virus (family Paramyxoviridae) infectious for pigs, humans, and fruit bats. Emerg Infect Dis, 1998, 4(2): 269-271.
- 136. Poch O, Sauvaget I, Delarue M, Tordo N. Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. EMBO J, 1989, 8(12): 3867-3874.
- 137. Pritchard LI, Chua KB, Cummins D, Hyatt A, Crameri G, Eaton BT, Wang LF. Pulau virus; a new member of the Nelson Bay orthoreovirus species isolated from fruit bats in Malaysia. Arch Virol, 2006, 151(2): 229-239.
- 138. Qiu T, Lu RH, Zhang J, Zhu ZY. Molecular characterization and expression of the M6 gene of grass carp hemorrhage virus (GCHV), an aquareovirus. Arch Virol, 2001, 146(7): 1391-1397.
- 139. Reinisch KM, Nibert ML Harrison SC. Structure of the reovirus core at 3.6A° resolution. Nature, 2000, 404(6781): 960-967.
- 140. Richardson MA, Furuichi Y. Nucleotide sequence of reovirus genome segment S3, encoding non-structural protein sigma NS. Nucleic Acids Res, 1983, 11(18): 6399-6408.
- 141. Schiff LA, Nibert ML, M. S. Co, E. G. Brown, and B. N. Fields. Distinct binding sites for zinc and double-stranded RNA in the reovirus outer capsid protein sigma 3. Mol Cell Biol, 1988, 8(1): 273-283.
- 142. Seliger LS, Giantini M, Shatkin AJ. Translational effects and sequence comparisons of the three serotypes of the reovirus S4 gene. Virology, 1992, 187(1): 202-210.
- 143. Seliger LS, Zheng K, Shatkin AJ. Complete nucleotide sequence of reovirus L2 gene and deduced amino acid sequence of viral mRNA guanylyltransferase. J Biol Chem, 1987, 262(34): 16289-16293.
- 144. Sellers HS, Linnemann EG, Pereira L, Kapczynski DR. Phylogenetic Analysis of the Sigma 2 Protein Gene of Turkey Reoviruses. Avian Dis, 2004, 48(3): 651-657.
- 145. Seng EK, Fang Q, Lam TJ, Sin YM. Development of a rapid, sensitive and specific diagnostic assay for fish Aquareovirus based on RT-PCR. J Virol Methods, 2004, 118(2): 111-122.
- 146. Shahi S, Shanmugasundaram GK, Banerjea AC. Ribozymes that cleave reovirus genome segment S1 also protect cells from pathogenesis caused by reovirus infection. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(7): 4101-4106.
- 147. Shaw AL, Samal SK, Subramanian K, Prasad BV. The structure of aquareovirus shows how the different geometries of the two layers of the capsid are reconciled to provide symmetrical interactions and stabilization. Structure, 1996, 4(8): 957-967.
- 148. Shmulevitz M, Epand RF, Epand RM, Duncan R. Structural and functional properties of an unusual internal fusion peptide in a nonenveloped virus membrane fusion protein. J Virol,

2004, 78(6): 2808-2818.

- 149. Shmulevitz M, Yameen Z, Dawe S, Shou J, O'Hara D, Holmes I, Duncan R. Sequential partially overlapping gene arrangement in the tricistronic S1 genome segments of avian reovirus and Nelson Bay reovirus: implications for translation initiation. J Virol, 2002, 76(2): 609-618.
- 150. Shope RE. Rabies-related viruses. Yale J Biol Med, 1982, 55(3-4): 271-275.
- 151. Spinner ML, Di Giovanni GD. Detection and identification of mammalian reoviruses in surface water by combined cell culture and reverse transcription-PCR. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(7): 3016-3020.
- 152. St Johnston D, Brown NH, Gall JG, Jantsch M. A conserved double-stranded RNA binding domain. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(52): 10979–10983.
- 153. Starnes MC, Joklik WK. Reovirus protein lambda 3 is a poly(C)-dependent poly(G) polymerase. Virology, 1993, 193(1): 356-366.
- 154. Sturzenbecker LJ, Nibert M, Furlong D, Fields BN. Intracellular digestion of reovirus particles requires a low pH and is an essential step in the life-cycle of the virus. Viral, 1987, 61(8): 2351-2361.
- 155. Swanson MI, She YM, Ens W, Brown EG, Coombs KM. Mammalian reovirus core protein micro 2 initiates at the first start codon and is acetylated. Rapid Commun Mass Spectrom, 2002, 16(24): 2317-2324.
- 156. Swanson MS, Nakagawa TY, Levan K, Dreyfuss G. Primary structure of human nuclear ribonucleoprotein particle C proteins: Conservation of sequence and domain structures in heterogeneous nuclear RNA, mRNA, and pre-rRNA-binding proteins. Mol Cell Biol, 1987, 7(1): 1731-1739.
- 157. Tarlow O, McCorquodale JG, McCrae MA. Molecular cloning and sequencing of the gene (M2) encoding the major virion structural protein (mu 1-mu 1C) of serotypes 1 and 3 of mammalian reovirus. Virology, 1988, 164(1): 141-146.
- 158. Touris-Otero F, Martinez-Costas J, Vakharia VN, Benavente J. Avian reovirus nonstructural protein microNS forms viroplasm-like inclusions and recruits protein sigmaNS to these structures. Virology, 2004, 319(1): 94-106.
- 159. Tsukamoto Y, Kotani T, Kohama K, Sakuma S, Sasaki F. Nuclear proliferation in syncytia during avian reovirus replication. Can J Vet Res, 1999, 63(4): 282-283.
- 160. Tyler KL, Barton ES, Ibach ML, Robinson C, Campbell JA, O'Donnell SM, Valyi-Nagy T, Clarke P, Wetzel JD, Dermody TS. Isolation and molecular characterization of a novel type 3 reovirus from a child with meningitis. Journal of Infectious Diseases, 2004, 189(9): 1664-1675.
- 161. Tyler KL, Sokol RJ, Oberhaus SM, Le M, Karrer FM, Narkewicz MR, Tyson RW, Murphy JR, Low R, Brown WR. Detection of reovirus RNA in hepatobiliary tissues from patients with extrahepatic biliary atresia and choledochal cysts. Hepatology, 1998, 27(6): 1475-1482.

- 162. Tyler KL, Squier MK, Rodgers SE, Schneider BE, Oberhaus SM, Grdina TA, Cohen JJ, Dermody TS. Differences in the capacity of reovirus strains to induce apoptosis are determined by the viral attachment protein sigma 1. J Virol, 1995, 69(11): 6972-6979.
- 163. Van Regenmortel MH, Bishop DHL, Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Calisher CH. Guidelines to the demacation of virus species. Arch Virol, 1997, 142(7): 1505-1518.
- 164. Van Regenmortel MH. Virus species, a much overlooked but essential concept in virus classification. Intervirology, 1990, 31(5):241-254.
- 165. Wang S, Deng GH, Wu YJ, Wu BC, Chen HL. Complete cDNA sequences analysis of the S1 genes of the avian (muscovy duck) reovirus isolates in China. Chin J Prev Vet Med, 2005, 27(2): 105-111.
- 166. Warrilow D, Harrower B, Smith IL, Field H, Taylor R, Walker C, Smith GA. Public health surveillance for Australian bat lyssavirus in Queensland, Australia, 2000-2001. Emerg Infect Dis, 2003, 9(2): 262-264.
- 167. Wiener JR, Bartlett JA, Joklik WK. The sequences of reovirus serotype 3 genome segments M1 and M3 encoding the minor protein mu 2 and the major nonstructural protein mu NS, respectively. Virology, 1989, 169(2): 293-304.
- 168. Wiener JR, Joklik WK. Comparison of the reovirus serotype 1, 2, and 3 S3 genome segments encoding the nonstructural protein sigma NS. Virology, 1987, 161(2): 332-339.
- 169. Wiener JR, Joklik WK. Evolution of reovirus genes: a comparison of serotype 1, 2, and 3 M2 genome segments, which encode the major structural capsid protein mu 1C. Virology, 1988, 163(2): 603-613.
- 170. Wiener JR, Joklik WK. The sequences of the reovirus serotype 1, 2, and 3 L1 genome segments and analysis of the mode of divergence of the reovirus serotypes. Virology, 1989, 169(1): 194-203.
- 171. Wiener JR., McLaughlin T, Joklik WK. The sequences of the S2 genome segments of reovirus serotype 3 and of the dsRNA-negative mutant ts447. Virology, 1989, 170(1): 340-341.
- 172. Winton JR, Lannan CN, Fryer JL, Hedrick RP, Meyers TR, Plumb JA, Yamamoto T. Morphological and biochemical properties of four members of a novel group of reoviruses isolated from aquatic animals. J Gen Virol, 1987, 68(2): 353-364.
- 173. Yin HS, Shieh HK, Lee LH. Characterization of the double-stranded RNA genome segment S3 of avian reovirus. J Virol Methods, 1997, 67(1): 93-101.
- 174. Yin HS, Shien JH, Lee LH. Synthesis in Escherichia coli of avian reovirus core protein sigmaA and its dsRNA-binding activity. Virology, 2000, 266(1): 33-41.
- 175. Yin P, Keirstead ND, Broering TJ, Arnold MM, Parker JS, Nibert ML, Coombs KM. Comparisons of the M1 genome segments and encoded mu2 proteins of different reovirus isolates. Virol J, 2004, 1: 6.
- 176. Yob JM, Field H, Rashdi AM, Morrissy C, van der Heide B, Rota P, bin Adzhar A, White J, Daniels P, Jamaluddin A, Ksiazek T. Nipah virus infection in bats (order Chiroptera) in

peninsular Malaysia. Emerg Infect Dis, 2001, 7(3): 439-441.

177. Zeller HG, Karabatsos N, Calisher CH, Digoutte JP, Cropp CB, Murphy FA, Shope RE. Electron microscopic and antigenic studies of uncharacterized viruses. III. Evidence suggesting the placement of viruses in the family Reoviridae. Archives of Virology, 1989, 109(3-4): 253-261.

# 致 谢

本研究是在导师孔宪刚研究员和指导老师刘胜旺研究员的悉心指导下完成的。导师以严谨治 学、躬身求实的科研作风、开拓创新的科研精神给我树立了良好的榜样,使我在学习中受益匪浅。 导师严格的要求,使我养成了精益求精、勤俭节约的习惯;导师不断给予的鼓励及无微不至的关 怀,激励我在求知的道路上奋发前进。在导师那里我学到的不仅是实验技能和科研思维方式,更 重要的是做人、做事的方法与道理。导师在学习,工作和生活等各个方面都给予了无微不至的关 心和帮助,在此论文完成之际,向两位老师致以最诚挚的敬意和由衷的感谢!

感谢农业部动物疫病调查组采集并提供的动物(犬蝠)样品!

感谢禽病室邵昱昊老师、韩宗玺老师、高玉梅女士在学习、实验和生活中给予的帮助。

感谢黑龙江省疾病控制中心陈露菲老师在学习、实验和生活中给与的帮助。

感谢哈尔滨兽医研究所韩凌霞副研究员、张云副研究员、王春来老师、涂亚斌老师和流感中 心邓国华副研究员在实验过程中给予的帮助。

感谢科研处王笑梅研究员、马云燕研究员、孙百明老师的关心和帮助。

向与我共同在哈尔滨兽医研究所禽病室学习过的刘怀然博士、郭宏博士、陈淑红博士、刘家 森博士、李慧昕博士、王芳博士、海岗博士、侯秋莲硕士、周玉长硕士、于茂荣硕士、张庆霞硕 士、刘昕硕士、王静硕士、聂磊硕士、高亚东硕士、安瑞硕士、金标硕士、马亚珍硕士、龚利洋 硕士致以真诚的谢意;向兽医生物技术国家重点实验室第四研究室的闻晓波博士以及我的同学贺 云霞博士、耿庆华博士、刘燕博士、周洁博士表示感谢,感谢他们在生活、学习中给予的帮助和 提出的有益建议。

向中国农业科学院研究生院的所有领导和老师们致以真诚的感谢!

感激我的父母和亲人多年来在学习和生活上给予的关心、支持和鼓励!

最后,向给予我关心、支持和帮助的所有老师、同学及亲友们致以深深的谢意!

本研究受以下课题资助:

- 1. 国家重点基础研究发展计划(973计划),新发传染病病原体分离·鉴定技术的前期探索研究 (2005CB522905)。
- 2. 农业部"动物冠状病毒疫源调查"专项。

# 作者简历

冉旭华,女,汉族,1978年9月18日出生于黑龙江省呼兰县。1996年9月,考入黑龙江八 一农垦大学动物科技学院,就读于动物医学系,2000年6月获农学学士学位。2000年9月考入 黑龙江八一农垦大学动物科技学院,就读于动物医学系预防兽医学专业,攻读硕士学位,主要从 事鸡新城疫病毒诱导鸡胚成纤维细胞凋亡的研究。2003年6月获农学硕士学位。2003年9月考 入中国农业科学院研究生院,就读于哈尔滨兽医研究所,攻读博士学位。主要研究课题为:犬蝠 源呼肠病毒的分离鉴定及生物学与分子生物学特性研究。

#### 发表文章情况

冉旭华, 崔玉东, 朴范泽. 病毒感染与细胞凋亡. 动物医学进展, 2003, 24(4): 22-25.

冉旭华, 崔玉东. 影响MHC- 隔室抗原加工和完整不变式链降解的因素. 国外医学·免疫学 分册, 2003, 26(2): 99-101.

崔玉东, 冉旭华. NDV 通过 Caspases-depended 途径诱导鸡胚成纤维细胞凋亡. 中国兽医学报, 已接收.

冉旭华, 邵昱昊, 韩宗玺, 陈露菲, 孔宪刚, 刘胜旺. 犬蝠源呼肠病毒的分离与鉴定. 中国预防兽医学报, 已接收.

冉旭华, 邵昱昊, 韩宗玺, 陈露菲, 孔宪刚, 刘胜旺. 犬蝠源呼肠病毒的分离与鉴定. 中国人 畜共患病学术研讨会论文集, 中国, 北京, 2006: 124-129.