

李占鸿, 谢佳芮, 杨振兴, 等. 云南省边境地区哨兵牛芒市病毒的分离与鉴定 [J]. 华南农业大学学报, 2021, 42(4): 7-16.
LI Zhanhong, XIE Jiarui, YANG Zhenxing, et al. Isolation and identification of Mangshi virus in sentinel cattle from border areas of Yunnan Province[J]. Journal of South China Agricultural University, 2021, 42(4): 7-16.

云南省边境地区哨兵牛芒市病毒的分离与鉴定

李占鸿^{1†}, 谢佳芮^{1†}, 杨振兴¹, 寇美玲¹, 李华春¹, 高翔²,
胡忠燕², 李卓然¹, 廖德芳¹, 杨恒¹

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

2 景洪市动物疫病预防控制中心, 云南 景洪 666100)

摘要:【目的】掌握云南省边境地区动物虫媒病毒的多样性分布和传播风险。【方法】在云南省景洪市设立哨兵牛3头,每周1次采血进行虫媒病毒的监测与分离。通过电镜观察、基因组琼脂糖凝胶电泳、RT-PCR与克隆测序对分离病毒进行鉴定,采用实时荧光定量RT-PCR与血清中和试验对病毒在动物上的感染进行回溯分析。【结果】2019年,在监测期第13周,从1头哨兵牛的血液中分离出1株致C6/36细胞病变的病毒(V301/YNJH/2019),电镜观察可见直径约70 nm、呈二十面体对称结构的病毒粒子,琼脂糖凝胶电泳显示病毒基因组为双链RNA,RT-PCR鉴定分离毒株为芒市病毒(MSV)。测序显示,分离毒株的基因片段Seg-4和Seg-7长度为2 055和1 122 bp,编码病毒的外层衣壳蛋白VP4(628 aa)和VP7(298 aa),基因片段Seg-2和Seg-9长度为3 055和1 076 bp,编码病毒的内层衣壳蛋白VP2(956 aa)和VP9(283 aa);分离毒株与云南省芒市分离的MSV/DH13M041毒株具有最近的亲缘关系,核酸序列相似度在97.4%(Seg-9)~98.5%(Seg-2)之间,氨基酸序列相似度在96.4%(VP9)~98.4%(VP2)之间。病毒感染的回溯分析显示,监测期的第11周,牛血液中病毒核酸检测呈阳性,病毒核酸含量在第13周达到高峰,随后快速降低,在第18周转为阴性;感染哨兵牛在监测期的第13周已产生特异性中和抗体(1:14),在第16~18周处于高峰(1:226),至监测结束的第24周降低为1:57。【结论】本文从牛体中分离到了MSV,表明牛是MSV的易感动物之一,病毒在感染牛上呈“一过性感染”的特征。研究结果为进一步开展MSV的检测诊断、流行病学调查与致病性研究奠定了基础。

关键词: 牛; 芒市病毒; 虫媒病毒; 系统发生分析; 哨兵动物; 感染特性; 回溯分析

中图分类号: S852.65

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2021)04-0007-10

Isolation and identification of Mangshi virus in sentinel cattle from border areas of Yunnan Province

LI Zhanhong^{1†}, XIE Jiarui^{1†}, YANG Zhenxing¹, KOU Meiling¹, LI Huachun¹, GAO Xiang²,
HU Zhongyan², LI Zhuoran¹, LIAO Defang¹, YANG Heng¹

(1 Yunnan Tropical and Subtropical Animal Virus Disease Laboratory, Yunnan Veterinary and Animal Science Institute, Kunming 650224, China; 2 Animal Disease Control Center of Jinghong, Jinghong 666100, China)

Abstract: 【Objective】 To analyze the diversity, dissemination risk of animal arboviruses in border areas of Yunnan Province. 【Method】 Three sentinel cattles were placed in Jinghong City, Yunnan Province and blood

收稿日期: 2020-07-09 网络首发时间: 2021-06-15 16:32:46

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20210615.1529.004.html>

作者简介: 李占鸿(1989—), 男, 助理研究员, 硕士, E-mail: dy0811zh@163.com; 谢佳芮(1990—), 女, 助理研究员, 硕士, E-mail: 349457530@qq.com; †表示同等贡献; 通信作者: 杨恒(1978—), 男, 研究员, 博士, E-mail: yangheng2008.cool@163.com; 廖德芳(1976—), 女, 研究员, 硕士, E-mail: wenjiej3@hotmail.com

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFC1200505, 2016YFD0500908); 公益性行业(农业)科研专项(201303035); 云南省中青年学术技术带头人后备人才培养项目(2017HB055)

samples were weekly collected for arboviruses monitoring and virus isolation. The isolated virus was identified through agar-gel electrophoresis, electron microscopy, RT-PCR amplification, cloning and sequencing. The infection characteristics of the virus in infected cattle were retrospectively analyzed by qRT-PCR and serum neutralizing test (SNT). 【Result】 In 2019, a virus strain (V301/YNJH/2019) which caused cytopathic effect on C6/36 cells, was isolated from blood sample collected from one of the cattle at the 13th week of monitoring period. Electron microscope observation revealed that the virions were icosahedral symmetry with a diameter of about 70 nm. The result of agar-gel electrophoresis showed that the viral genome was composed of double stranded RNA. The isolated virus was identified as Mangshi virus (MSV) by RT-PCR identification. Sequence analysis exhibited the lengths of Seg-4 and Seg-7 from the isolated virus were 2 055 and 1 122 bp respectively, encoding viral out-most shell VP4 (628 aa) and VP7 (298 aa) proteins, while Seg-2 and Seg-9 were 3 055 and 1 076 bp respectively in length encoding viral inner-core VP2 (956 aa) and VP9 (283 aa) proteins. Phylogenetic analysis showed that the isolated virus had the closest relationship with MSV/DH13M041 isolated from Mangshi of Yunnan Province, with their nucleic acid sequence similarities ranging from 97.4% (Seg-9) to 98.5% (Seg-2) and amino acid sequence similarities ranging from 96.4% (VP9) to 98.4% (VP2). Retrospective investigation results of the virus infection indicated that virus nucleic acid was first detected in the blood of the infected cattle at the 11th week of monitoring period. The virus nucleic acid in the blood reached the peak at the 13th week and dropped rapidly, becoming not detectable within 5 weeks. The results of SNT showed that neutralization antibody against V301/YNJH/2019 was first detected at the 13th week (antibody titer 1 : 14), peaked from the 16th to 18th week (antibody titer 1 : 226) and decreased to 1 : 57 when monitoring terminated at the 24th week. 【Conclusion】 The MSV isolation from cattle indicating cattle is one of the susceptible animals of MSV. In naturally infected cattle, the virus is characterized by “transient infection” with no clinical symptoms. Our study imparts a foundation for study of epidemiology, pathogenicity, and diagnostic reagents of MSV.

Key words: cattle; Mangshi virus; arboviruse; phylogenetic analysis; sentinel animal; infection characteristic; retrospective analysis

芒市病毒 (Mangshi virus, MSV) 为一种新发现的虫媒病毒, 隶属呼肠弧病毒科 Reoviridae 东南亚十二节段 RNA 病毒属 *Seadornavirus*, 病毒于 2013 年从云南省芒市采集的三带喙库蚊 *Culex tritaeniorhynchus* 中首次分离并因而得名^[1], 随后在我国广东省汕头市濠江区采集的三带喙库蚊中再次分离到 MSV^[2], 目前对该病毒在动物健康和公共卫生的危害尚不清楚。近年, 寨卡病毒^[3]、登革热病毒^[4]、非洲猪瘟病毒^[5]、非洲马瘟病毒^[6] 等新发和再发虫媒病毒给我国公共卫生安全和畜牧业生产带来了严重威胁。掌握我国新发虫媒病毒的分布、遗传特征、感染宿主动物范围与致病性等方面的信息, 对我国虫媒病毒病的防控具有重要的意义。

东南亚十二节段 RNA 病毒属为 2005 年第 8 次国际病毒分类委员会 (ICTV) 新定义的 1 个病毒属^[7], 目前该属包括了 MSV、版纳病毒 (Banna virus, BAV)、卡皮罗病毒 (Kadipiro virus, KDV) 与辽宁病毒 (Liaoning virus, LNV) 4 种病毒。1987

年从我国云南省西双版纳市出现发热与病毒性脑炎症状的患者中分离到 BAV^[8], 于 1981 年从印度尼西亚爪哇采集的褐首库蚊 *Culex fuscocephalus* 中分离到 KDV^[9], 1990 年在我国辽宁省采集的背斑伊蚊 *Aedes dorsalis* 中分离到 LNV^[10]。从牛、猪以及出现发热症状的人体上分离到 BAV^[11-12], 提示东南亚十二节段 RNA 病毒可感染人和多种动物, 对动物养殖和公共卫生安全具有潜在威胁。

MSV 病毒粒子为二十面体球形颗粒, 直径为 60~70 nm, 表面具有蛋白纤突^[2]。病毒的基因组大小为 20 622 bp, 由 12 个基因节段 (Seg-1 至 Seg-12) 的双链 RNA (Double strand RNA, dsRNA) 组成, 各基因节段大小在 788 bp (Seg-12) 至 3 740 bp (Seg-1) 之间, 可编码 VP12 (199 个氨基酸残基) 至 VP1 (1 215 个氨基酸残基) 等 12 种蛋白^[1]。目前对东南亚十二节段 RNA 病毒各基因节段编码蛋白的功能尚不完全明确, 初步认为 Seg-4 与 Seg-9 编码的 VP4 与 VP9 蛋白构成病毒的外层衣壳, Seg-2 与

Seg-7 编码的 VP2 与 VP7 蛋白构成病毒的内层衣壳, Seg-1 与 Seg-3 编码的 VP1 蛋白 (RNA 依赖 RNA 聚合酶) 与 VP3 蛋白 (鸟苷酸转移酶) 位于病毒的核心, Seg-6、Seg-8 与 Seg-12 编码 3 种非结构蛋白, 分别为 VP6(三磷酸核苷酶)、VP8(蛋白激酶) 与 VP12(双链 RNA 结合蛋白)^[13-15]。

2019 年, 我们从云南省景洪市哨兵牛的血液中分离到了 1 株病毒 (毒株号: V301/YNJH/2019), 基因组琼脂糖凝胶电泳与电镜观察显示, 病毒具有东南亚十二节段 RNA 病毒属的典型特征, 通过测定 Seg-2、Seg-4、Seg-7 与 Seg-9 全长序列确认该病毒为 MSV。对自然感染 MSV 哨兵牛血液中的病毒核酸与中和抗体回溯分析显示, 病毒在动物上呈“一过性感染”的特征, 感染动物未出现明显的临床症状。研究结果丰富了对我国流行的东南亚十二节段 RNA 病毒的认知, 为开展 MSV 的流行病学、致病性与诊断试剂的研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 细胞与毒株

白纹伊蚊细胞 (C6/36 细胞) 由云南省热带亚热带动物病毒病重点实验室保存, 细胞于 27 °C 条件下以含 10%(ρ) 胎牛血清的 DMEM 培养, 蓝舌病病毒 (Bluetongue virus, BTV) 血清 4 型毒株 (BTV-4/YTS4)^[16]、动物流行性出血病病毒 (Epizootic hemorrhagic disease virus, EHDV) 血清 10 型毒株 (EHDV-10/V277)^[17]、BAV 毒株 (BAV/SC043) 均由云南省热带亚热带动物病毒病重点实验室分离保存。

1.2 主要试剂

总 RNA 提取试剂 RNAliso-Plus、核糖核酸酶 S1、病毒 DNA/RNA 提取试剂盒、一步法 RT-PCR 试剂盒、实时荧光定量 qRT-PCR 试剂盒、DNA 胶回收纯化试剂盒、高分辨率琼脂糖等购自大连宝生物公司; Q5 超保真 DNA 聚合酶购自美国 NEB 公司; RNA 纯化试剂盒购自美国 OMEGA 公司; PLB 平末端克隆载体与大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞购自北京天根公司。

1.3 引物设计与合成

根据 GenBank 中公布的东南亚十二节段 RNA 病毒的序列, 设计 4 对引物分别用于 MSV、BAV、KDV 与 LNV 基因节段 Seg-12 的一步法 RT-PCR 扩增; 根据 MSV/DH13M041 毒株的 Seg-2、Seg-4、Seg-7 与 Seg-9 序列 (GenBank 号: KR349188、KR349190、KR349194 与 KR349195) 设

计 4 对引物用于上述 4 个基因节段全长序列的扩增; 根据 MSV/DH13M041 毒株的 Seg-12 序列 (GenBank 号: KR349197) 设计 PCR 扩增引物与 TaqMan 探针, 用于哨兵动物血液样本中 MSV 病毒核酸的 qRT-PCR 检测, 探针的 5'端标记 FAM(6-羧基荧光素) 荧光基团, 3'端标记黑淬灭基团 (Black hole quencher, BHQ1)。引物序列如表 1 所示, 由上海捷瑞公司合成。

1.4 哨兵动物的设立与血液样本的采集

2019 年 5 月, 在云南省景洪市勐罕镇 (E100°59'53", N21°54'58", 海拔 550 m) 设置 3 头年龄为 1 周岁, BTV 与 EHDV 抗体检测为阴性的云南黄牛作为虫媒病毒监测的哨兵动物。哨兵动物不使用任何疫苗与驱虫药物, 采用放牧方式进行单独饲养。5—10 月, 每周由当地职业兽医从哨兵牛上分别采集全血、肝素钠抗凝血与 EDTA 抗凝血共 3 种血液样品。将采集的血液样品保存于 4 °C 冰盒, 送至云南省热带亚热带动物病毒病重点实验室进行虫媒病毒的检测与分离。

1.5 病毒分离

取 500 μ L 采集自哨兵动物的肝素钠抗凝血, 离心收集红细胞 (Red blood cell, RBC), 以 PBS 缓冲液洗涤 RBC 1 次。加入灭菌水裂解 RBC。取 RBC 裂解液接种生长成单层的 C6/36 细胞并盲传 3~5 代。当接种细胞出现规律的细胞病变 (Cytopathic effect, CPE), 离心收集细胞上清, -80 °C 条件下冻存, 留待进一步的鉴定。

1.6 病毒基因组 dsRNA 提取与琼脂糖凝胶电泳

取病毒液接种细胞, 待细胞出现完全 CPE, 离心收集细胞沉淀。以 RNA 提取试剂 RNAliso-Plus 提取细胞总 RNA, 参照文献报道的方法^[18] 以核糖核酸酶 S1 降解宿主细胞单链 RNA (Single-strand RNA, ssRNA), 使用 RNA 纯化试剂盒进行纯化。取纯化后的病毒核酸, 以 20 g/L 的高分辨率琼脂糖凝胶电泳, 观察病毒核酸在琼脂糖凝胶上的电泳带型。

1.7 病毒的电镜观察

将冻融处理后的病毒液以 8 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 10 min, 除去细胞碎片。使用 SW40 转头, 在 Beckman 超速离心机上以 40 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 3 h。将离心后的沉淀以适量 TNE Buffer 重悬, 置于 4 °C 条件下过夜, 12 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 5 min。取超离后的病毒液滴于铜网上, 以 20 g/L 的磷钨酸溶液 (pH6.8) 进行负染, 在透射电镜 (日立 HT7800, 日本) 下观察病毒粒子的形态。

表 1 本研究中使用的引物与探针序列
Table 1 Primers and probe used in this study

病毒 ¹⁾ Virus	靶基因节段 Target gene segment	引物或探针 Primer or probe	引物序列(5'→3') Primer sequence	引物位置 Location of primer	产物大小/bp Product size	引物用途 Use of primer
MSV	Seg-12	MSV-S12-F	AGGCTCTTTGACAAC CTACGA	34~55	631	MSV 鉴定 MSV identification
		MSV-S12-R	GTCTCCGTCTGATAGT GTACTCT	645~664		
BAV	Seg-12	BAV-S12-F	TGTGAGGGTCCAAGTC ACGAC	116~136	653	BAV 鉴定 BAV identification
		BAV-S12-R	AGCATAAGAWGCATG GCGACCT	746~768		
KDV	Seg-12	KDV-S12-F	ATATCGGCTGTTTCAG CTAGTG	127~148	602	KDV 鉴定 KDV identification
		KDV-S12-R	GATCCAAAGTGGTAAC CCAAATG	706~728		
LNV	Seg-12	LNV-S12-F	GGAGGAAGAATCAAT GCCGTAG	76~97	599	LNV 鉴定 LNV identification
		LNV-S12-F	AAGTTGTGAGTGTTC TTGGTT	653~674		
MSV	Seg-2	MSV-S2-F	GTAAAGAATTATACGC TGATGACATAC	1~27	3 055	MSV Seg-2 全长序列 扩增 Full length amplification for MSV Seg-2
		MSV-S2-R	GTCGTTTTTCGAATCTT GCTAAGG	3 032~3 055		
MSV	Seg-4	MSV-S4-F	GTAAAGAATTTTATAG ATTTTTCATCATG	1~29	2 046	MSV Seg-4 全长序列 扩增 Full length amplification for MSV Seg-4
		MSV-S4-R	GTCGTTCCCTTCATGA CGTTCAT	2033~2 046		
MSV	Seg-7	MSV-S7-F	GTAAAGATTTTTCAAG GAATATTCACTGA	1~29	1 122	MSV Seg-7 全长序列 扩增 Full length amplification for MSV Seg-7
		MSV-S7-R	GTCAGTCATTCTCACG GGGTC	1 102~1 122		
MSV	Seg-9	MSV-S9-F	GTAAAGATTTTTTGTA GGAAAACATGAT	1~28	1 076	MSV Seg-9 全长序列 扩增 Full length amplification for MSV Seg-9
		MSV-S9-R	GTCGGTCATTCTTGCT CAGTG	1 056~1 076		
MSV	Seg-12	MSV-S12/YG-F	GCCAACTAAGCGTATT TACC	497~516	85	MSV qRT-PCR
		MSV-S12/YG-R	ACCACTTCGTTTGTC ATTAATAG	558~581		
		MSV-S12/Probe	CCAACAGCACCTCCTG ACCATACC	531~554		

1) MSV: 芒市病毒, BAV: 版纳病毒, KDV: 卡皮罗病毒, LNV: 辽宁病毒

1) MSV: Mangshi virus, BAV: Banna virus, KDV: Kadipiro virus, LNV: Liaoning virus

1.8 RT-PCR 扩增与克隆测序

取纯化后的病毒 dsRNA, 94 °C 变性处理 3 min, 立即冰浴, 进行 dsRNA 的解链。取变性核酸为模板, 使用表 1 中针对 MSV、BAV、KDV 与 LNV 的 Seg-12 的鉴定引物进行分离病毒的一步法 RT-PCR 扩增鉴定。

采用全长 cDNA 扩增技术 (Full length cDNA application technique, FLAC)^[19], 获取病毒基因组全长 cDNA。以合成的 cDNA 为模板, 使用表 1 中的扩增引物, 通过 Q5 高保真 DNA 聚合酶扩增分离毒株的 Seg-2、Seg-4、Seg-7 与 Seg-9 全长序列。电泳回收各个基因节段的 PCR 产物, 将回收的 DNA 片段克隆入 PLB 平末端克隆载体中, 转化大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞, 挑取单菌落进行 PCR 鉴定与测序。

1.9 序列分析与系统发生树的构建

使用 NCBI 的 ORF 分析软件 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 对获取的 Seg-2、Seg-4、Seg-7 与 Seg-9 基因节段编码氨基酸序列进行翻译。从 GenBank 上下载东南亚十二节段 RNA 病毒的序列, 使用 Mafft-win 序列比对软件^[20] 与本研究中获取的病毒序列进行比对, 使用 BioEdit 计算核酸与氨基酸序列相似度, 使用 MAGA X^[21] 以邻接法 (Neighbor-joining, NJ) 构建系统发生树, 使用遗传距离法 (Genetic distance method) 计算 *P*-distance, 自举检验值 (Bootstrap) 取 1 000。

1.10 病毒在动物上的感染特性分析

取哨兵牛上采集的 EDTA 抗凝血 50 μ L, 使用

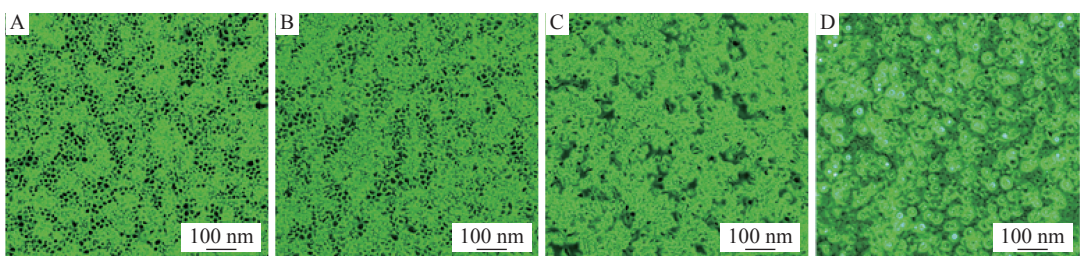
磁珠法病毒 RNA 抽提试剂盒提取核酸, 采用表 1 中 MSV 的 qRT-PCR 引物, 分析感染动物血液中病毒核酸的动态变化。qRT-PCR 反应条件为: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 34 s, 共 40 个循环, 待检血液中病毒的核酸含量以 qRT-PCR 反应产生荧光信号的循环阈值数 (Cycle threshold, Ct) 表示。

将病毒液 10 倍梯度稀释后接种 C6/36 细胞, 以 Karber 法^[22] 测定分离病毒的半数组织培养感染剂量 (Median tissue culture infective dose, TCID₅₀); 将感染动物的血清 56 °C 灭活 30 min, 倍比稀释备用。将病毒液稀释为每 50 μ L 含 100 个 TCID₅₀, 取 50 μ L 稀释的病毒液与倍比稀释的血清作用 2 h, 在 96 孔板上采用“固定病毒-稀释血清”的方法测定稀释血清对病毒的中和作用, 通过 Karber 法^[22] 计算血清中和抗体效价, 分析感染动物血清中和抗体的动态变化。

2 结果与分析

2.1 病毒的分离

2019 年 5—10 月, 3 号哨兵牛共计采集肝素钠血液、EDTA 抗凝血和血清各 24 份。将采集的肝素钠血液样本接种细胞进行病毒的盲传分离。8 月 7 日采集的血液样本在 C6/36 细胞上连续盲传 5 代后, 细胞出现规律的 CPE, 表现为接种后的细胞在 96 h 出现聚集, 120 h 后出现皱缩、脱落与裂解 (图 1)。离心收集病变 C6/36 的细胞上清, 将其命名为 V301/YNJH/2019, 进行下一步的鉴定。



A: 对照 C6/36 细胞; B-D: 分别为 V301/YNJH/2019 感染 C6/36 细胞 48、96 和 120 h

A: Control C6/36 cells; B-D: C6/36 cells inoculated with V301/YNJH/2019 for 48, 96 and 120 h respectively

图 1 V301/YNJH/2019 毒株接种 C6/36 细胞后引起的细胞病变

Fig. 1 Cytopathic effect of C6/36 cells after inoculated with V301/YNJH/2019 strain

2.2 分离病毒的基因组电泳与电镜观察结果

提取并纯化 V301/YNJH/2019、BTV-4/YTS4、EHDV-10/V277 与 BAV/SC043 毒株的核酸, 进行高分辨率琼脂糖凝胶电泳。结果显示, V301/YNJH/2019 毒株的基因组为 dsRNA, 其凝胶电泳带型特征与作为对照的东南亚十二节段 RNA 病毒 BAV/SC043 毒株接近, 而与环状病毒属病毒 BTV-4/

YTS4 和 EHDV-10/V277 毒株相差较大 (图 2A)。

通过超速离心进行病毒的富集, 电镜下观察可见 V301/YNJH/2019 的病毒粒子直径约 60~70 nm, 呈“指环状”, 病毒表面可见明显的花瓣状的突起, 与文献报道^[2] 的东南亚十二节段 RNA 病毒的病毒粒子特征接近 (图 2B)。以上结果提示 V301/YNJH/2019 毒株可能为东南亚十二节段 RNA 病毒

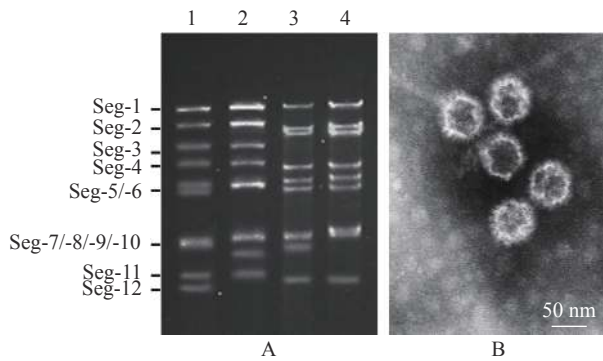


图 A 中 1~4 分别为 V301/YNJH/2019、BAV/SC043、BTV-4/YTS4 与 EHDV-10/V277 毒株纯化后的基因组 dsRNA

1-4 in figure A indicate purified genomic dsRNA of V301/YNJH/2019, BAV/SC043, BTV-4/YTS4 and EHDV-10/V277 strains respectively

图 2 V301/YNJH/2019 毒株的基因组琼脂糖凝胶电泳 (A) 与电镜观察 (B)

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis (A) and electron microscopic observation (B) of genomic dsRNA from V301/YNJH/2019 strain

的 1 个成员。

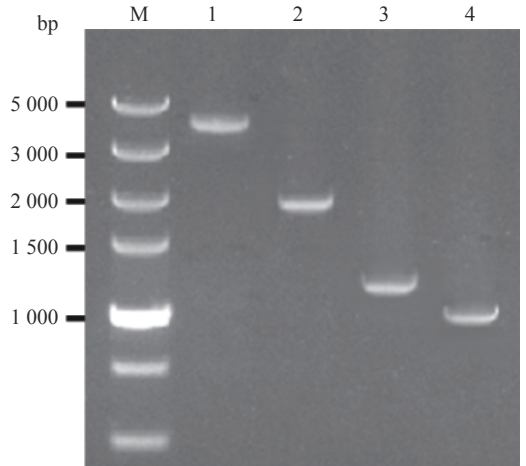
2.3 病毒的 RT-PCR 鉴定

使用表 1 中针对 MSV、BAV、KDV 与 LNVSeg-12 的特异性引物,对 V301/YNJH/2019 毒株的核酸进行一步法 RT-PCR 扩增鉴定。结果显示仅针对 MSV 的引物可扩增出符合预期大小约 600 bp 的 DNA 条带(图略)。BLAST 比对分析显示,扩增序列与 MSV 毒株 (MSV/DH13M041) 的 Seg-12/VP12 核酸与氨基酸序列相似度最高,分别为 98.4% 与 99.0%,初步表明 V301/YNJH/2019 为 MSV 的 1 个成员。

2.4 分离病毒的基因节段扩增与测序

为明确 V301/YNJH/2019 的分类地位以及与其

他东南亚十二节段 RNA 病毒之间的进化关系,对病毒的 Seg-2、Seg-4、Seg-7 与 Seg-9 共 4 个基因节段全长序列进行 RT-PCR 扩增,结果显示可扩增出大小约为 1~3 kb 的 DNA 条带(图 3)。将扩增的 DNA 片段进行克隆测序,显示获取病毒序列长度在 1076~3055 bp 之间(表 2)。



M: DNA marker DL5000, 1:Seg-2, 2:Seg-4, 3:Seg-7, 4:Seg-9

图 3 V301/YNJH/2019 毒株 4 个基因节段全长序列的 RT-PCR 扩增

Fig. 3 RT-PCR amplification products for four full length segments of V301/YNJH/2019 strain

2.5 序列分析与系统发生树构建结果

将 V301/YNJH/2019 毒株的测序结果进行 BLAST 比对与编码氨基酸预测分析,结果显示我们成功获取了 V301/YNJH/2019 毒株的 Seg-2、Seg-4、Seg-7 与 Seg-9 基因节段全长序列,4 个基因节段分别编码 956、628、314 与 283 个氨基酸残基的 VP2、VP4、VP7 与 VP9 蛋白,VP4 与 VP7 编码 MSV 的外层衣壳蛋白,而 VP2 与 VP9 编码该病毒的内层

表 2 V301/YNJH/2019 毒株 4 个基因节段以及编码蛋白的序列特征

Table 2 Characteristics of four gene segments and their encoded proteins of V301/YNJH/2019 strain

项目 Item	序列名称 Sequence name	序列长度 Sequence length	与其他东南亚十二节段 RNA 病毒的最高相似度 ¹⁾ /%				ORF 区 ORF region	UTR 区长度/bp	
			Highest sequence similarity with other <i>Seadornavirus</i>					Length of UTR	
			MSV	BAV	KDV	LNV		5' UTR	3' UTR
基因节段 Gene segment	Seg-2	3740 bp	98.5	52.1	39.3	38.9	89~2953	88	99
	Seg-4	2055 bp	98.3	42.7	45.1	52.7	27~1907	26	145
	Seg-7	1122 bp	97.7	33.0	35.0	34.0	32~922	31	197
	Seg-9	1076 bp	97.4	43.8	28.9	30.5	24~872	23	201
蛋白 Protein	VP2	956 aa	98.4	45.8	24.8	26.3			
	VP4	628 aa	98.2	31.5	32.0	47.8			
	VP7	298 aa	98.9	10.1	23.5	23.1			
	VP9	283 aa	96.4	36.1	20.0	17.9			

1) MSV: 芒市病毒, BAV: 版纳病毒, KDV: 卡皮罗病毒, LNV: 辽宁病毒

1) MSV: Mangshi virus, BAV: Banna virus, KDV: Kadipiro virus, LNV: Liaoning virus

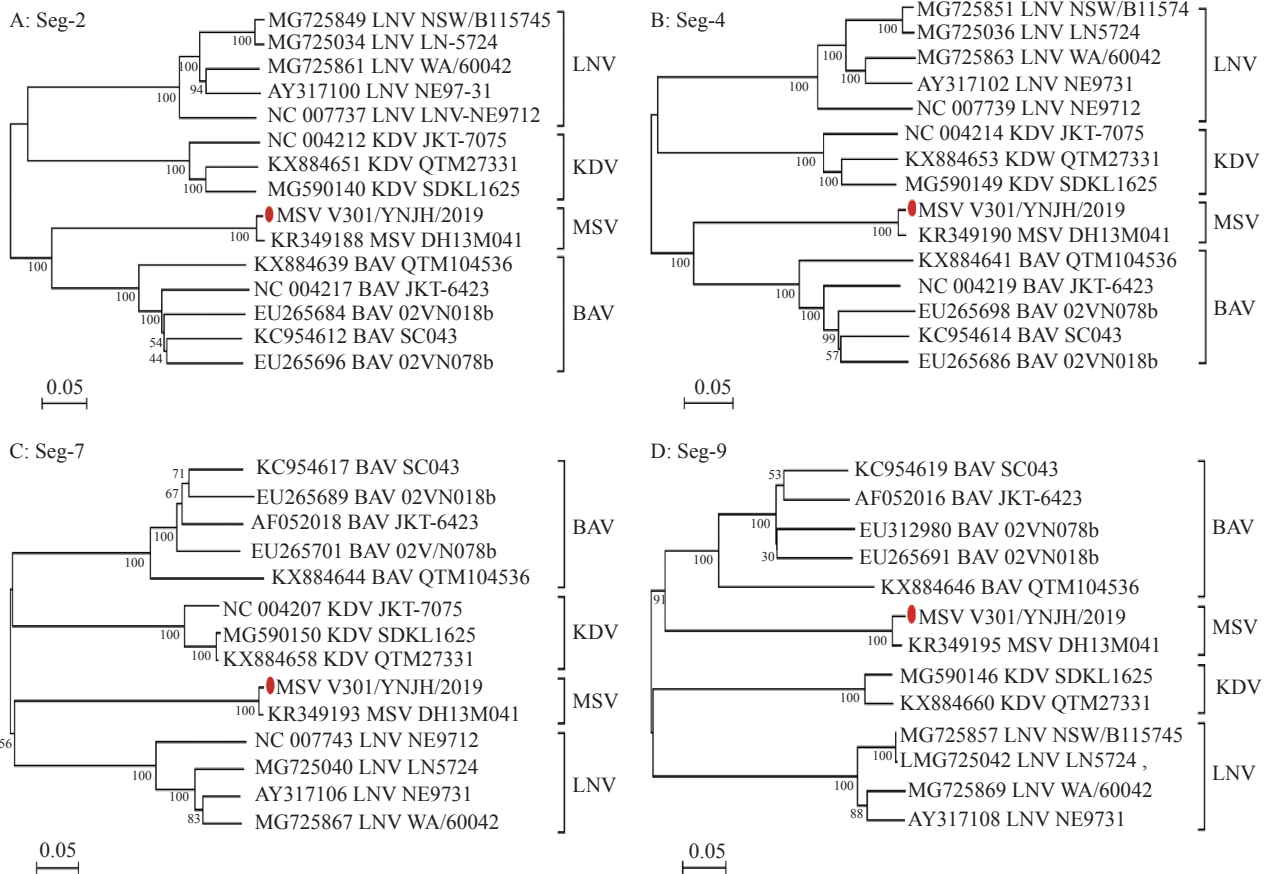
衣壳蛋白^[1]。获取的各基因节段的 5'UTR 长度均短于 3'UTR, 5'UTR 长度在 23 bp(Seg-4)~88 bp(Seg-2) 之间, 3'UTR 的长度在 99 bp(Seg-7)~201 bp(Seg-3) 之间 (表 2), 与其他东南亚十二节段 RNA 病毒上观察到的情况一致^[8-11]。各基因节段 5'UTR 与 3'UTR 末端高度保守的序列特征为: 5'-GUAAA GA.....GAC-3'。

与其他东南亚十二节段 RNA 病毒的序列比对结果显示, V301/YNJH/2019 毒株与 MSV/DH13M041 毒株具有最近的亲缘关系, Seg-2、Seg-4、Seg-7 与 Seg-9 的核酸序列相似度在 97.4% (Seg-9)~98.5%(Seg-2) 之间, 对应的氨基酸序列相似度在 96.4%(VP9)~98.4%(VP2) 之间; 与同属的 BAV、KDV 和 LNV 的序列相似度均远低于 MSV (表 2)。在构建的系统发生树上, V301/YNJH/2019 毒株的 Seg-2、Seg-4、Seg-7 与 Seg-9 分别与 MSV/DH13M041 毒株对应的基因节段聚为一簇

(图 4), 独立于 BAV、KDV 与 LNV 毒株。以上结果确证了我们从哨兵牛中分离出的病毒为 MSV, 提示 MSV 可能通过蚊科动物在动物之间进行传播; MSV 与 BAV 在系统发生树上聚为一簇, 提示 2 种病毒在进化上有着更近的亲缘关系。

2.6 感染动物血液中病毒核酸的回溯分析结果

提取整个检测期 3 号牛采集的 24 份 EDTA 抗凝血的核酸, 进行 V301/YNJH/2019 病毒核酸的 qRT-PCR 检测。在第 11 周采集的血液样本中, 可检测到 V301/YNJH/2019 的病毒核酸 (Ct=37.3), 表明病毒在该时间段内感染了哨兵牛。感染动物血液中 V301/YNJH/2019 病毒核酸含量在监测期的第 13 周处于最高水平 (Ct=32.1), 在该周采集血液中, 我们分离出了 V301/YNJH/2019 毒株。随后病毒核酸含量逐步降低, 监测期的第 18 周血液中未检测到病毒核酸 (图 5)。以上结果提示 MSV 感染牛后, 病毒血症高峰期较短, 仅维持 1 周时间, 这为我们

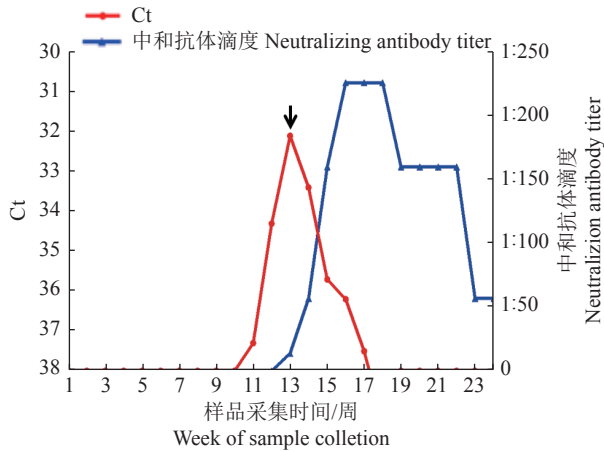


系统发生树用 MAGA X^[21] 构建, 自举检验重复 1 000 次, 树图中节点的数字表示进化分支的自举检验值; 比例尺表示每个位点核苷酸的替代数; 本研究分离的 V301/YNJH/2019 毒株以红点表示, 其他东南亚十二节段 RNA 病毒毒株以 “GenBank 登录号_病毒名称缩写_毒株名” 表示; MSV: 芒市病毒, BAV: 版纳病毒, KDV: 卡皮罗病毒, LNV: 辽宁病毒

The phylogenetic trees were constructed by MEGA X^[21] with 1 000 bootstrap replicates, and the number at the point of each branch indicates a bootstrap value; Scale bars indicate nucleic acid substitutions per site; V301/YNJH/2019 strain is depicted with a red dot and other strains of genus *Seadornavirus* are indicated as “GenBank accession number_abbreviation of virus name_name of strain”; MSV: Mangshi virus, BAV: Banna virus, KDV: Kadipiro virus, LNV: Liaoning virus

图 4 基于邻接法构建 V301/YNJH/2019 毒株 4 个基因节段的系统发生树

Fig. 4 Phylogenetic trees of four segments of V301/YNJH/2019 using Neighbor-joining method



黑色箭头表示该时间点采集的血液样品中分离出病毒

The black arrow indicates the virus was isolated from the blood sample collected at this time

图 5 自然感染 V301/YNJH/2019 毒株哨兵牛血液中病毒核酸与中和抗体监测

Fig. 5 Monitoring of viral nucleic acid and neutralization antibodies in the blood samples collected from sentinel cattle naturally infected with V301/YNJH/2019 strain

从感染 MSV 的动物上分离病毒提供了可参考的线索。

2.7 感染动物血清中和抗体的回溯分析结果

5—10 月, 3 号哨兵牛共计采集血清 24 份。V301/YNJH/2019 在 C6/36 细胞上的 TCID₅₀ 为 5.43×10^6 /mL。通过血清中和试验测定感染牛血液中病毒特异性中和抗体产生情况。结果显示在检测到病毒核酸后的第 2 周, 感染动物的血清中已可检测到特异性的中和抗体, 抗体滴度为 1:14。在病毒感染后的第 5 周, 特异性中和抗体水平到达高峰, 抗体滴度为 1:226; 抗体滴度在最高点维持 2 周后, 逐渐下降并维持在一个稳定水平, 在采血期结束, 中和抗体水平仍维持在 1:57(图 5)。

3 讨论与结论

东南亚十二节段 RNA 病毒在我国的南方与北方地区均有分布。BAV 广泛分布于我国的北京市、辽宁省、内蒙古自治区、山东省、甘肃省、山西省、江苏省、云南省与福建省^[8, 11]; KDV 于 2009 年在我国云南省采集的三带喙库蚊、中华按蚊 *Anopheles sinensis* 和骚扰阿蚊 *Armigeres subalbatus* 中首次分离^[23], 在我国山东采集的白纹伊蚊 *Aedes albopictus* 中也分离出该病毒^[24]; LNV 除在我国辽宁省首次分离外, 在我国新疆维吾尔自治区、青海省也有从蚊子中病毒分离的报道^[25]; MSV 最近在我国云南省与广东省三带喙库蚊中分离发现^[1-2],

MSV 的感染宿主动物的范围、感染特征、是否具有遗传多样性等问题仍有待研究。本研究首次报道了 MSV 在哨兵牛中的分离、鉴定与遗传进化特征, 在易感动物层面对病毒的感染特性进行了分析。以上研究结果丰富了我们对 MSV 的认知, 为开展该病毒感染宿主范围、致病性风险分析与诊断技术的研究提供了基础。

通过对分离毒株的电镜与病毒基因组琼脂糖凝胶电泳观察, 我们初步猜测分离病毒可能为东南亚十二节段 RNA 病毒, 采用东南亚十二节段 RNA 病毒特异性 RT-PCR 扩增, 基本确认 V301/YNJH/2019 毒株为 MSV 的 1 个成员。进一步需明确该毒株与其他东南亚十二节段 RNA 病毒之间的进化关系以及病毒的血清型 (或基因型) 等关键信息。东南亚十二节段 RNA 病毒的外层衣壳蛋白, 具有高度变异的特性, 可诱导特异性抗体的产生^[1, 9, 24-25]; 内层衣壳蛋白在病毒粒子的组装中发挥重要作用, 其氨基酸序列在同种病毒中具有高度保守的特性, 可作为鉴定病毒种属间进化关系的主要依据^[1, 9, 24-25]。因此我们考虑对分离毒株的 Seg-2 与 Seg-7(编码 MSV 的内层衣壳蛋白 VP2 与 VP7), Seg-4 与 Seg-9(编码 MSV 的外层衣壳蛋白 VP4 与 VP9) 进行全长测序, 从而明确 V301/YNJH/2019 在病毒分类与进化关系上的位置。更为重要的是, 我们希望知道我国流行的 MSV 是否存在其他的血清型或基因型, 这是掌握病毒多样性最为关键的信息之一。

序列分析显示, V301/YNJH/2019 毒株的 Seg-2/VP2 和 Seg-7/VP7 序列与云南省芒市分离的 MSV/DH13M04 毒株高度相似 (核酸和氨基酸序列相似度分别高于 97.7% 和 98.9%); 在 Seg-2 与 Seg-7 构建的系统发生树上, V301/YNJH/2019 毒株与 DH13M041 毒株构成了独立于其他东南亚十二节段 RNA 病毒的进化分支, 表明云南省芒市分离的 DH13M041 与景洪分离的 V301/YNJH/2019 毒株代表着 MSV 的 2 个不同毒株, 二者具有最近共有祖先 (Most recent ancestors, MRA)。V301/YNJH/2019 毒株的 Seg-4/VP4 和 Seg-9/VP9 与 DH13M041 毒株对应序列之间也高度相似, 在系统发生树上聚为一簇, 以上结果提示 V301/YNJH/2019 与 DH13M041 均属于 MSV 的同一种血清型。环状病毒属 *Obivirus* 的蓝舌病病毒 (BTV)、动物流行性出血病病毒 (EHDV) 和非洲马瘟病毒 (ASHV) 均具有众多的血清型^[6, 26-28]。东南亚十二节段 RNA 病毒属与环状病毒属病毒有着最近的亲缘关系, 但为什

么目前分离的 BAV、KDV、LNV 和 MSV 毒株中均只发现一种血清型? 通过对东南亚十二节段 RNA 病毒属与环状病毒属病毒在“病毒-媒介-感染动物”上的比较,将有助于我们理解虫媒病毒血清型多样性产生的原因。

目前仅在三带喙库蚊中分离到 MSV,该病毒感染动物宿主范围与感染特性尚不清楚。在哨兵牛上分离出 MSV 毒株,为我们通过回溯追踪分析病毒在动物上的感染特性提供了可能性。对感染 MSV 哨兵牛血液中病毒核酸的 qRT-PCR 监测结果显示,MSV 在感染动物后的第 3 周出现病毒血症高峰期,我们也在该时间点从血液样本中成功分离到病毒,随后病毒核酸含量逐步降低,5 周后血液中未检测到病毒核酸,我们试图使用其他核酸检测为阳性的血液接种细胞再次分离 MSV,但病毒分离均不成功,我们认为很可能随着感染动物体内中和抗体的产生,病毒虽然在血液中存在,但由于中和抗体与病毒粒子的结合,导致病毒的感染性大幅下降,使病毒的分离困难。对 MSV 中和抗体的监测结果显示,哨兵牛在病毒感染第 3 周已经产生中和抗体,且在随后的 2 周达到高峰,至监测期结束,血液中的中和抗体效价仍维持在 1:57 的水平,表明 MSV 感染动物后可很快激发动物的免疫应答,产生病毒特异性中和抗体,可保护动物在较长时间免受 MSV 的再次感染。

目前在 GenBank 中仅有 1 个 MSV 毒株的全基因组序列(DH13M041 毒株),在进一步的工作中,我们将完成 V301/YNJH/2019 毒株的全基因组测序,完善 MSV 的 qRT-PCR 与 RT-PCR 检测方法。我们对本研究中另外 2 头哨兵牛血液与血清样本进行了 MSV 核酸与抗体的检测,但检测结果均为阴性,对 MSV 在云南省的牛和其他家畜中的流行情况以及其他媒介昆虫是否携带 MSV 尚不明确,进一步开展家畜与媒介中 MSV 的流行病学调查研究,分析病毒感染动物范围与潜在致病性十分必要,这些研究工作将获取对 MSV 更为全面的认知。

参考文献:

- [1] WANG J L, LI H C, HE Y W, et al. Isolation and genetic characterization of Mangshi virus: A newly discovered Seadornavirus of the Reoviridae family found in Yunnan Province, China[J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0143601.
- [2] 李楠,何于雯,孟锦昕,等.广东蚊东南亚十二节段病毒

属芒市病毒的分离与鉴定[J]. *中国兽医科学*, 2020, 50(5): 582-588.

- [3] MOCHIDA G H. Zika virus: Learning from the past as we prepare for the future[J]. *The Journal of Pediatrics*, 2020, 222: 15-16.
- [4] TIAN Y S, ZHOU Y, TAKAGI T, et al. Dengue virus and its inhibitors: A brief review[J]. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2018, 66(3): 191-206.
- [5] DIXON L K, SUN H, ROBERTS H. African swine fever[J]. *Antiviral Research*, 2019, 165: 34-41.
- [6] CARPENTER S, MELLOR P S, FALL A G, et al. African horse sickness virus: history, transmission, and current status[J]. *Annual Review of Entomology*, 2017, 62: 343-358.
- [7] ATTOUI H, MOHD J F, DE LAMBALLERIE X, et al. Seadornavirus, Reoviridae[M]//FAUQUET C M, MAYO M A, MANILOFF J, et al. Eighth report of the international committee on taxonomy of viruses. London: Elsevier Academic Press, 2005: 504-510.
- [8] LIU H, LI M H, ZHAI Y G, et al. Banna virus, China, 1987—2007[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2010, 16(3): 514-517.
- [9] ATTOUI H, BILLOIR F, BIAGINI P, et al. 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]. *The Journal of General Virology*, 2000, 81(Pt 6): 1507-1515.
- [10] LU Z, LIU H, FU S, et al. Liao ning virus in China[J]. *Virology Journal*, 2011, 8(1): 282.
- [11] 刘红,梁国栋.版纳病毒及其感染[J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2010, 21(5): 502-504.
- [12] 徐丽宏,梁国栋.引起人类脑炎的新双链 RNA 病毒[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2006, 20(3): 292-294.
- [13] JAAFAR F M, ATTOUI H, MERTENS P P C, et al. Identification and functional analysis of VP3, the guanylyltransferase of Banna virus (Genus *Seadornavirus*, family Reoviridae)[J]. *The Journal of General Virology*, 2005, 86(Pt 4): 1141-1146.
- [14] MOHD J F, ATTOUI H, BAHAR M W, et al. The structure and function of the outer coat protein VP9 of Banna virus[J]. *Structure*, 2005, 13(1): 17-28.
- [15] MOITRA P. A combinatorial approach of structure-based virtual screening and molecular dynamics simulation towards the discovery of a highly selective inhibitor for VP9 coat protein of Banna virus[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2019, 86: 15-27.

- [16] YANG H, ZHU J B, LI H C, et al. Full genome sequence of bluetongue virus serotype 4 from China[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(23): 13122-13123.
- [17] 李占鸿, 肖雷, 杨振兴, 等. 牛源流行性出血病病毒 (EHDV) 血清 10 型毒株在我国的分离鉴定[J]. *病毒学报*, 2019, 35(1): 112-120.
- [18] 杨恒, 李占鸿, 张怡轩, 等. 牛血液中一株新型环状病毒的分离与全基因组序列分析[J]. *病毒学报*, 2018, 34(1): 75-84.
- [19] MAAN S, RAO S, MAAN N S, et al. Rapid cDNA synthesis and sequencing techniques for the genetic study of bluetongue and other dsRNA viruses[J]. *Journal of Virological Methods*, 2007, 143(2): 132-139.
- [20] KATOH K, ASIMENOS G, TOH H. Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2009, 537: 39-64.
- [21] KUMAR S, STECHER G, LI M, et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [22] 李占鸿, 肖雷, 孟锦昕, 等. 中国蓝舌病病毒血清 5 型毒株的分离与鉴定[J]. *中国兽医科学*, 2019, 49(1): 36-43.
- [23] ALIU Y O, NWUDE N. Veterinary pharmacology and toxicology experiments[M]. Zaria: ABU Press, 1982: 104-110.
- [24] SUN X H, MENG W S, FU S H, et al. The First report of kadipirovirus isolation in China[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2009, 25(3): 173-177.
- [25] ZHANG W, LI F, LIU A, et al. Identification and genetic analysis of Kadipiro virus isolated in Shandong Province, China[J]. *Virology Journal*, 2018, 15(1): 64.
- [26] LV X, FAUZIAH M J, SUN X, et al. Isolates of Liaoning virus from wild-caught mosquitoes in the Xinjiang Province of China in 2005[J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e37732.
- [27] BUMBAROV V, GOLENDER N, JENCKEL M, et al. Characterization of bluetongue virus serotype 28[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2020, 67(1): 171-182.
- [28] SHIRAFUJI H, KATO T, YAMAKAWA M, et al. Characterization of genome segments 2, 3 and 6 of epizootic hemorrhagic disease virus strains isolated in Japan in 1985-2013: Identification of their serotypes and geographical genetic types[J]. *Infection Genetics and Evolution*, 2017, 53: 38-46.

【责任编辑 庄 延】