

蓝舌病毒野毒株及疫苗株 S10 基因多态性分析研究

张以芳¹ 张念祖^{2*} 刘建平¹ 朱建波² 殷震³

(¹ 云南农业大学动物科技学院 昆明 650201)

(² 农业部热带亚热带动物病毒学重点开放实验室 昆明 650224)

(³ 解放军军需大学军事兽医研究所 长春 130062)

摘要 对中国蓝舌病毒 1 株疫苗株、31 株野毒株及 1 株南非毒株进行测序。结果揭示 33 株毒株 S10 基因核苷酸长度均为 822bp, S10 基因为基因内基因, 其核苷酸链的第 20~22 和 59~61 位有两个起始密码子, 共有终止子在 707~709 位, 预测编码 NS3 和 NS3A 两种蛋白; 32 株中国毒株间核苷酸差异 0~107 个, 同源性 86%~100%; NS3 蛋白氨基酸差异 0~10 个, 同源性 95.6%~100%。测序毒株与 GenBank 中 9 株其它毒株比较, 建立的 S10 基因系统发生树, 将蓝舌病毒分为 China group 和 US group 两大基因群, 两大群的同源性为 85%; US group 包括美国 8 株及南非 1 株毒株; China group 包括中国 32 株及澳大利亚 1 株毒株, 说明蓝舌病毒 S10 基因分群与毒株的地理区域来源有关。在国内首次进行了全国较大范围内蓝舌病毒分子流行病学调查, 揭示了我国蓝舌病毒毒株的遗传多样性。

关键词 蓝舌病毒, S10 基因, 系统进化, 基因多态性

中图分类号 S852.65 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2003)06-0698-08

蓝舌病毒(Bluetongue disease virus, BTV)是呼肠孤病毒科环状病毒属的成员, 是引起反刍动物蓝舌病的病原, 国际兽医局(OIE)将蓝舌病列为 A 类动物疫病, 我国规定为一类动物传染病^{1,2}。BTV 基因组由 10 个 RNA 节段组成, 分别编码 7 种结构多肽(VP1~VP7)和 3 种非结构多肽(NS1~NS3), S10 基因为基因内基因, 编码的 NS3 和 NS3A 两种蛋白质, 定位于感染细胞的表面, 与 BTV 粒子从细胞中释放有关。保守性的 S10 片段序列分析常可揭示毒株的地理起源, 作为动物蓝舌病区域分子流行病学研究主要的片段³⁻⁵。

全球 BTV 已知有 24 个血清型, 型与型之间不能交互免疫。我国自张念祖等^{2,6}在云南首次分离 BTV 以来, 经鉴定存在 BTV-1、2、3、4、12、15、16 等 7 个血清型, 其中 BTV-1 型和 BTV-16 型曾在发病绵羊体内分离获得, 是主要的致病血清型。本研究对我国 BTV 野毒株及疫苗株分子流行病学进行了研究。

1 材料和方法

1.1 病毒

30 株野毒株、1 株驯化株(VacF17)、1 株疫苗株(VacF45)、2 株南非毒株为云南动物病

基金项目:九五“国家重点攻关项目”畜禽疫病监测及防治技术(9605020103);中国澳大利亚国际合作项目“中国蓝舌病流行病学及控制研究”(ACIAR 9301)

* 通讯作者。Tel:86-871-5017702; Fax:86-871-5017702; E-mail:ytsavdl@public.km.yn.cn

作者简介:张以芳(1963-),男,云南省曲靖市人,教授,博士,主要从事动物微生物学及免疫学研究。E-mail:zy-fkm@yahoo.com.cn

收稿日期:2003-04-20, 修回日期:2003-07-04

毒病重点实验室及国家动物外来病诊断实验室(YTSAVDL)保存^[2,6],对照毒株及国外参考毒株序列来自 GenBank 数据库,基本情况见表 1 和表 2。

表 1 BTV 毒株的来源、血清型及基本特性

Table 1 Origin and basic characteristic of the sequence BTV strain

Virus	Serotype	Location(State/County)	Date of isolation	Host	Gene group
V71	4	YN/Shizong16	1996	Cattle	China2
V77	16	YN/Eshan13	1996	Cattle	China2
V101	1	YN/Eshan 2	96 - 07	Cattle	China1
V116	1	YN/Eshan 8	96 - 07	Cattle	China1
V133	1	YN/Eshan 12	96 - 07	Cattle	China1
V142	1	YN/Eshan 14	96 - 09	Cattle	China1
V163	1	YN/Eshan 8	96 - 07	Cattle	China1
V176	1	YN/Eshan 2	96 - 08	Cattle	China1
V187	1	YN/Eshan 10	96 - 07	Cattle	China2
V190	1	YN/Eshan 2	96 - 08	Cattle	China1
V210	1	YN/Eshan 3	96 - 07	Cattle	China1
V251	1	YN/Jinghong8	96 - 10	Bufflo	China1
V254	1	YN/Jinghong 7	96 - 10	Cattle	China1
V255	1	South Africa	89 - 06	Sheep	US1
V257	16	South Africa	84 - 09	Sheep	
V507	1	YN/Eshan 2	96 - 07	Cattle	China1
V522	12	YN/Dehong15	1996	Cattle	China1
V528	1	Shanxi-1	98 - 03	Sheep	China2
V530	16	Hubei	98 - 03	Sheep	China1
V616	1	YN/Dehong15	97 - 08	Buffalo	China1
V634	1	YN/ES17	97 - 09	Buffalo	China1
V654	1	Sichuan	98 - 12	Sheep	China1
V658	1	Sichuan	98 - 12	Sheep	China1
V663	12	YN/Yanshan40	98 - 12	Goat	China1
V665	1	YN/Yanshan 64	98 - 12	Goat	China2
V668	1	YN/Yanshan 166	98 - 12	Goat	
VacF45	1	V658		Sheep	China2
Y863	1	YN/Shizong	1986	Goat	China2
V349	3	YN/Eshan	1996	Cow	China2
V413	4	YN/Dehong	1996	Cow	China2
V440	2	YN/Jinghong	1996	Cow	China2
V442	12	YN/Jinghong	1996	Cow	China1
V447	15	YN/Eshan	1996	Cow	China2
SW	16	Wuxi	1988	Sheep	China2

表 2 BTV 国外参考对照毒株血清型及基本特性

Table 2 Origin and basic characteristic of the reference BTV strains(from GenBank)

Virus	Serotype	Location	Accession numbers	Gene group
Aus1	1	Australia	D00253	China2
us2atcc	2	US	AF134230	US1
10B90z	10	US	AF044384	US2
11B80z	11	US	AF044702	US2
Btv13	13	US	AF044374	US1
17B81y	17	US	AF044707	US2
Vav10	10	US	AF044707	US1
Vac11	11	US	AF044377	US1
Vac17	17	US	AF044378	US1

1.2 试剂

TRIzol 试剂为 GibcoBRL 公司产品, One Step RNA PCR Kit 和 Premix Taq Kit 为大连宝生物公司产品, Gel Extract Kit 为上海华舜公司产品, Thermo sequenase cy5 dye terminator kit 为 Amersham pharmacia 公司产品。BHK-21 引自中国科学院昆明动物研究所。

1.3 引物设计

参考已发表的 BTV 核酸序列资料^[3], 设计合成 1 对 RT-PCR 扩增引物(A 和 B)及 1 对测序引物(C 和 D), 由大连宝生物工程公司合成。

A : 5' GTTAAAAAGTGTGCGCTGYCA 3' (1 ~ 20) ; B : 5' GTAAGTGTRTAGYRYCGC 3' (822 ~ 804) ;
C : 5' GCTGCATTTCGCATCGTACGC 3' (245 ~ 264) ; D : 5' GTAAAAACTCATYCTCACYGG 3' (660 ~ 639) 。 (注 : Y = C + T , R = A + G)

1.4 病毒培养和 RNA 提取

病毒用 BHK-21 细胞培养, 收集病变细胞, 用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 进行琼脂糖凝胶电泳或 SDS-PAGE 检查。

1.5 PCR 扩增

样品总 RNA 2 μ g, 加去离子甲酰胺 1 μ L, 95 $^{\circ}$ C 加热 5min, 使双链 RNA 变性。用 One Step RNA PCR Kit 进行 RT-PCR, 反应条件为 45 $^{\circ}$ C 反转录 50min, 94 $^{\circ}$ C 2min 灭活反转录酶; 94 $^{\circ}$ C 40s, 55 $^{\circ}$ C 40s, 72 $^{\circ}$ C 60s, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 7min。再用 Premix Taq Kit 进行 PCR, 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 1min, 95 $^{\circ}$ C 30s, 58 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 80s, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 7min。PCR 产物用 Gel Extract Kit 纯化。

1.6 核酸序列测定和分析

以纯化的 PCR 产物为模板, 用 Thermo sequenase cy5 dye terminator kit 准备测序反应。每个反应大约用 200ng cDNA 和 20 pmol 引物, 测序反应的条件同 PCR 扩增条件。用 AL-Express II DNA 分析仪进行电泳和数据收集, 并按说明书操作编辑测序资料。序列测定工作在 YTSAVDL 完成。应用 DNASIS、PROSIS 和 PHYLP--KITSCH 分析软件进行核苷酸序列和氨基酸序列分析比较, 构建遗传发育树。

2 结果

2.1 病毒总 RNA 提取

由 BTV 感染 BHK21 细胞提取的总 RNA,经琼脂糖电泳及 SDS-PAGE 检测,见病毒 RNA 为 10 个节段,呈 3-3-3-1 带型。

2.2 RT-PCR 扩增和产物鉴定

用提取总 RNA 进行 RT-PCR 的扩增产物,经琼脂糖电泳,可见 750 ~ 1000 bp 的片段,与预计所需的 820 bp 相符合。回收的 PCR 产物取样 1 μ L 在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳,加 5 μ L Marker 作为参照(每条 Marker 带 DNA 量为 50 ng)纯化样品无非特异性片段,纯化的特异性 PCR 产物(DNA)浓度在 5 ng/ μ L 以上时,测序效果较好。

2.3 核酸测序

采用双脱氧 DNA 末端终止法,两条引物双向测序,获得 32 株中国 BTV 毒株 S10 基因核苷酸序列。序列分析表明,所有毒株 S10 基因核苷酸长度为 822bp(包括引物),核苷酸链中有两个起始密码子(核苷酸 20 ~ 22 和 59 ~ 61),共有 1 个终止子 TGA 或 TAA(核苷酸 707 ~ 709),预测编码两种蛋白(NS3 和 NS3A),NS3 长度 229 个氨基酸,NS3A 蛋白基因为基因内基因,NS3A 起始于 NS3 蛋白的第 14 个氨基酸,长度为 216 个氨基酸。

2.4 基因分群或系统发育树分析

采用 PHYLIP 软件包中的 DNADIST、KITSCH 程序,计算出所测毒株的核酸距离矩阵,再根据此矩阵,用 KITSCH 程序构建了遗传发育树(图 1)。根据 BTV 的 S10 基因分群及生态分布,所绘制的遗传发育树将 BTV 分为 China Group 和 US Group 两大基因群,两群间的同源性为 85%,说明 BTV 毒株的基因分群存在地域分布差异性。US Group 包括美国 BTV2、10、11、13、17 等 5 型代表毒株(毒株号为 us2atcc、10B90z、11B80z、Btv-13、17B81y)及美国 BTV10、11、17 等 3 株弱毒疫苗株(毒株号 Vac11、Vac13、Vac17);试验测序的 1 株南非毒株(V255)。China Group 包括所有中国 32 株及澳大利亚 1 株毒株,可分为 Subgroup China I 和 Subgroup China II 两个亚群,其同源性为 95%,China I 亚群包括 1 株驯化毒株(VacF17) 1 株 BTV16 型毒株(V530) 3 株 BTV12 型毒株(V663、V552、V442)及 15 株 BTV1 型毒株(毒株号 V210、V101、V133、V142、V634、V654、V252、V176、V116、V507、V251、V190、V163、V616、V658)。China II 亚群包括 1 株疫苗株(VacF45) 1 株澳大利亚毒株(Aus1) 1 株 BTV2 型毒株(V440) 1 株 BTV3 型毒株(V349) 2 株 BTV4 型毒株(V413、V71) 1 株 BTV15 型(V447) 2 株 BTV16 型(V77、SW)及 4 株 BTV1 型毒株(V665、V528、Y863、V187)。

2.5 同源性分析

同源性比较,32 株中国 BTV 毒株间同源性 86% ~ 100%(核苷酸差异为 0 ~ 107 个),NS3/NS3A 蛋白同源性 95% ~ 100%(氨基酸差异为 0 ~ 10 个)。

从血清型看,21 株 BTV-1 型毒株核苷酸同源性 85% ~ 100%,分布在不同的亚群中,差异较大 3 株 BTV-16 型毒株(V77、V530 与 SW)同源性 91% ~ 92%,分布在不同的亚群 2 株 BTV-2 型毒株(V71 与 V413)核苷酸同源性 99%,分布在同一亚群同一谱系 3 株 BTV-12 型毒株(V442、V522 与 V663)同源性 99%,分布在同一亚群同一谱系,相同血清型毒株被划分在不同的基因群,说明 S10 基因系统发生分析与毒株的血清型无关。中国 BTV 不同血清型代表毒株 S10 差异及同源性见表 3。

表 3 中国 BTV 不同血清型代表毒株 S10 差异及同源性比较

Table 3 The comparisons of nucleotide and amino acid differences from different serotype representative virus

Serotype	BTV-1	BTV-2	BTV-3	BTV-4	BTV12	BTV15	BTV16
Virus	V658	V440	V349	V71	V522	V447	V530
V658		53 93.2%	65 91.7%	74 89.6%	40 94.9%	107 86.4%	48 93.9%
V440	4 98.2%		20 97.5%	29 96.3%	60 92.4%	102 87.0%	67 91.5%
V349	4 98.2%	1 99.5%		27 96.6%	67 91.5%	97 87.6%	74 90.6%
V71	7 96.9%	5 97.8%	3 98.7%		70 91.1%	107 86.4%	74 90.1%
V522	5 97.8%	5 97.8%	5 97.8%	7 96.9%		105 86.6%	9 98.9%
V447	5 97.8%	2 99.1%	3 98.7%	7 96.9%	5 97.8%		107 86.4%
V530	10 95.6%	6 97.4%	7 96.9%	7 96.9%	3 98.7%	8 96.5%	

The nucleotide difference and the percentage of identity were on the right-upper section. The amino acid difference and the percentage of identity were on left-down section.

表 4 不同地区来源 BTV 代表毒株差异比较

Table 4 The comparisons of nucleotide and amino acid differences from various geographic region representative virus

Region	South Africa	US	Australia	Sichuan	Shanxi	Hubei	Wuxi	Yunnan
Virus	V255	10B90z	Aus1	V658	V528	V530	SW	Y863
V255		142 80.9%	128 82.8%	121 83.6%	119 84.0%	133 82.1%	119 84.0%	121 83.8%
10b90z	14 93.9%		136 81.7%	146 80.4%	135 81.9%	146 80.4%	135 81.9%	137 81.6%
Aus1	6 97.4%	15 93.4%		70 90.6%	56 92.5%	74 90.0%	54 92.8%	50 93.3%
V658	6 97.4%	15 93.4%	6 97.4%		61 91.8%	48 93.6%	65 91.3%	51 93.2%
V528	5 97.8%	14 93.9%	5 97.8%	7 96.9%		66 91.1%	40 94.6%	26 96.5%
V530	8 96.5%	18 92.1%	11 95.2%	10 95.6%	9 96.1%		76 89.8%	62 91.7%
SW	4 98.2%	12 94.8%	3 98.7%	5 97.8%	2 99.1%	9 96.1%		39 94.8%
Y863	7 96.9%	14 93.9%	4 98.2%	7 96.9%	4 98.2%	10 95.6%	1 99.6%	

从地区来源看,中国 BTV 毒株间 核苷酸同源性 86.4%(云南景洪 V440 与湖北 V530 毒株最大核苷酸差异 107 个),NS3 蛋白同源性 95.6%(四川 V658 与湖北 V530 毒株最大氨基酸差异 10 个)。2 个四川毒株 V654 与 V658 核苷酸同源性 96%。26 株云南毒株核苷酸同源性 91%~100%。差异最大毒株均出现在两个不同省区之间,再次说明了 S10 基因与毒株地域分布的特征性。不同地区来源 BTV 代表毒株同源性 & 差异比较见表 4。

从分离时间及驯化代次看,分离年代最早 Y863(1979)毒株与近 3 年分离毒株核苷酸同源性 85%~96%。原始株 V658 与鸡胚驯化 17 代毒株 VacF17 核苷酸同源性 96%,与驯化 45 代的疫苗株 VacF45 核苷酸同源性 89%。说明野毒株在自然进化或鸡胚传代培育驯化中均发生遗传变异。中国 BTV 不同分离时间或驯化代次代表毒株差异比较见表 5。

从分离动物种类来源看,3 株水牛毒株(V251、V616 与 V634)核苷酸同源性 97%~99%。3 株山羊毒株(V663、V665 与 V668)核苷酸同源性 91%。5 株绵羊毒株(V528、V530、V654、V658 及 SW)核苷酸同源性 91%~98%。5 株奶牛毒株(V349、V413、V440、V442、V447)同源性为 85%~97%。14 株黄牛毒株同源性为 91%~100%。其中在同一次流行期间,3 株从云南峨山黄牛分离毒株(V116、V176、V507)核苷酸同源为 100%,说明 BTV 毒株在同一次流行期间有一定的稳定性。

表 5 中国 BTV 不同驯化代次或分离时间代表毒株差异比较

Table 5 The comparisons of nucleotide and amino acid differences from the year of isolation and times of attenuation

Year or training times	1986	1988	1996	1997	1998	17th times	45th times
Virus	Y863	SW	V101	V616	V658*	VacF17	VacF45
Y863		39 94.8%	56 92.5%	66 91.1%	51 93.2%	63 91.5%	91 87.8%
SW	2 99.1%		67 91.0%	79 89.4%	65 91.3%	74 90.1%	98 86.8%
V101	6 97.4%	4 98.2%		27 96.4%	33 95.6%	25 96.6%	70 90.6%
V616	16 93.0%	14 93.9%	13 94.3%		35 95.3%	21 97.2%	74 90.1%
V658	6 97.4%	5 97.8%	4 98.2%	13 94.3%		30 96.0%	78 89.5%
Vac F17*	9 96.1%	7 96.6%	5 97.8%	12 94.4%	4 98.2%		61 91.3%
Vac F45*	399 83.0%	37 83.8%	36 84.3%	45 80.3%	37 83.8%	39 83.0%	

* VacF17 and VacF45 were originated from V658. The nucleotide difference and the percentage of identity were on the right-upper section. The amino acid difference and the percentage of identity were on left-down section.

3 讨论

以基因测序为基础的系统树分析是分子流行病学研究的基本方法,已广泛用于分析病毒和细菌等病原微生物不同毒株的遗传关系。Pierce(1998)基于 S10 片段分析,把美国

BTV 原始株、弱毒疫苗株及 20 株野毒株分为两个基因群,并证明在 1953 ~ 1990 年间可能出现过 BTV 毒株的群内重组^[3]。Bonneau 对美国 5 个型和中国 7 个型代表毒株进行序列分析比较,提示基因分群与毒株地理来源有关系,并提出了用 PHYLIP.FITCH 软件进行 S10 基因分群的可信度^[5]。本研究用 PHYLIP.KITSCH 软件进行 S10 基因系统分析,将 42 株 BTV 毒株分为 China Group 和 US Group 两大基因群,确定两群间的同源性是 85%。并首次将中国 BTV 毒株分为两个基因亚群,研究说明 S10 基因分群与毒株地理区域来源明显相关,与毒株血清型及宿主来源无关。

参 考 文 献

- [1] 殷 震,刘景华,主编. 动物病毒学. 第二版. 北京:科学技术出版社,1997:549.
- [2] Zhang N, Maclachlan K R, Bonneau J, *et al.* Identification of seven serotypes of bluetongue virus from the People 's Republic of China. *Veterinary Record*, 1999, **145** :427 ~ 429.
- [3] Pierce C M, Balasuriya U B R, MacLachlan N J. Phylogenetic analysis of the S10 gene of field and laboratory strains of bluetongue virus from the United States. *Virus Research*, 1998, **55** (1) :15 ~ 27.
- [4] Poly R. Towards the Control of Emerging Bluetongue Disease. London :Oxford Virology Publication, 1991:1 ~ 71.
- [5] Bonneau K R, Nianzu Z, Jianbo Z, *et al.* Sequence comparison of the L2 and S10 genes of bluetongue disease virus from the United States and the People 's Republic of China. *Virus Research*, 1999, **61** :153 ~ 160.
- [6] Zhang N, Maclachlan K R, Bonneau J, *et al.* Identification of seven serotypes of bluetongue virus from the People 's Republic of China. *Veterinary Record*, 1999, **145** :427 ~ 429.

Genetic Diversity Analysis of the S10 Gene of Field and Vaccine Strains of Bluetongue Virus

Zhang Yifang¹ Zhang Nianzu^{2*} Liu Jianping¹ Zhu Jianbo² Yin Zhen³

(¹ College of Animal Science and Technique, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

(² Yunnan Tropical and Subtropical Animal Virus Disease Laboratory, Kunming 650223, China)

(³ The Military Veterinary Institute, Quartermaster University of People 's Liberation Army, Changchun 130062, China)

Abstract :S10 gene sequences of 1 attenuated vaccine strain and 31 Chinese field isolates & 1 South Africa strain of BTV were determined. The results revealed that all 33 S10 gene segments have 822 nucleotides in length with two in-frame initiation codons (nucleotides 20 to 22 and 59 to 61) and a common termination codon (nucleotides 707 to 709), which encodes two proteins (NS3 and NS3A). Nucleotide difference in the sequence of all S10 gene were from zero to 107 bp (86.4% ~ 100% identity). NS3/NS3A protein showed a light difference from zero to 10 amino acid (95.6% ~ 100% identity). Phylogenetic analysis of the S10 gene of above strains sequenced and 9 other strains from GenBank, segregated the Chinese viruses into a monophyletic group distinct from US viruses; Nucleotide identity was 85% between China Group and US group. The various Chinese isolates segregated into two phyletic subgroups based on S10 gene sequences. The clustering of viruses was dependent of geographical origin, and independent of host species of isolation, serotype & year of isolation.

Key words :Bluetongue virus, Genetic diversity, S10 gene