

## 羊轮状病毒 NT 株 VP1 基因的测序和分子进化分析

陈艳君<sup>1</sup>, 朱伟文<sup>2</sup>, 隋硕<sup>1</sup>, 张晓伟<sup>1\*</sup>, 胡松年<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 中国科学院北京基因组研究所重点实验室, 北京 100029)

(<sup>2</sup> 北京诺泰科华生物技术开发有限公司, 北京 100089)

**摘要** 【目的】为了研究羊轮状病毒 NT 株 VP1 基因的遗传进化规律 【方法】根据 GenBank 中相关 VP1 基因的保守序列, 设计合成引物, 扩增 NT 株 VP1 基因并进行克隆测序和序列分析。【结果】氨基酸序列比较表明 NT 株与其他毒株 VP1 基因的相似性为 77.3% ~ 98.4%, 且氨基酸突变多发生在 VP1 蛋白的非功能区。VP1 蛋白进化树表明 NT 株与牛轮状病毒处于同一进化分支, 有较近的亲缘关系。结合 26 株具有代表性的轮状病毒, 计算毒株间 VP1 基因的核苷酸和氨基酸进化距离, 并对核苷酸的同义突变率(*dS*)和非同义突变率(*dN*)进行研究, 发现 *dN/dS* 的比值小于 1, 说明同义替代是 VP1 基因在进化过程中的主要变异。【结论】本文首次对羊轮状病毒 NT 株进行了 VP1 基因的测序, 并对 VP1 基因的进化距离和进化规律进行深入探讨。

**关键词:** 羊轮状病毒 NT 株; VP1 基因; 序列联配; 进化距离

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)08-1055-08

羊轮状病毒(Ovine Rotavirus, ORV)属呼肠孤病毒科(Reoviridae)轮状病毒属(Rotavirus, RV), 能引起羊病毒性腹泻暴发流行并导致死亡, 造成巨大的经济损失。尽管羊是重要的养殖动物之一, 但目前对 ORV 的研究还相当有限。20 世纪 70 年代末, 首次从患有腹泻的羊身上分离出第一株 ORV K923 株, 并将其用于病毒致病性的研究<sup>[1]</sup>。在日本暴发性腹泻期间, 又从羊身上分离出 3 株 ORV(L-1, L-2, L-3), 并进行免疫血清学相关研究<sup>[2]</sup>。而研究较多的是 1981 年在中国青海省 RV 流行期间分离得到的羔羊轮状病毒。基因分型研究表明该病毒属于 G10H[15]型病毒<sup>[3]</sup>。通过血清型、基因型以及毒性等方面的研究, 证明该病毒是弱毒株, 适合作为亲本株用于制备基因重配抗人 RV 疫苗, 北京诺泰科华生物技术开发有限公司目前已经在国内申请相关专利。

对 RV 基因组的克隆及其结构和功能的研究表

明 RV 是无膜囊的双链 RNA 病毒, 其基因组由 11 条不连续的双链 RNA 组成, 分别编码 6 个结构蛋白(VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 和 VP7)和 5/6 个非结构蛋白(NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5/NSP6)<sup>[4-5]</sup>。根据 VP4, VP7, VP6 和 NSP4 基因分别将轮状病毒分为 28 个 P 型, 15 个 G 型, 3 个 SG 亚型和 A-F 基因型<sup>[6-7]</sup>。目前, 对于羊轮状病毒的研究也集中在这几个型基因上, 虽然这些基因能在一定程度上反映病毒株的遗传学、免疫学及流行病学等信息, 但不能完整的阐释病毒的感染、复制、宿主范围限制性和进化等一般特性, 所以有必要对 ORV 的其它基因也进行深入的研究以更好地了解它的生物学特性, 从而更全面的认识 ORV 的结构和功能, 研制出更适合于人类或其他动物的 RV 预防疫苗。

VP1 是轮状病毒 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RdRP), 是病毒的转录酶和复制酶, 在病毒的感染和复制过程中起着至关重要的作用<sup>[8]</sup>。本文首次对

\* 通信作者。Tel: +86-10-82995362; Fax: +86-10-82995373; E-mail: husun@big.ac.cn

作者简介: 陈艳君(1985-), 女, 浙江省人, 主要研究遗传学与分子生物学。E-mail: chenyj20@163.com

收稿日期: 2009-01-23; 修回日期: 2009-03-30

近年来在国内分离、鉴定并同样具有疫苗潜力的 ORV-NT 株进行了 VP1 基因的克隆测序,通过计算不同病毒 VP1 基因的核苷酸和氨基酸序列的进化距离,对 VP1 基因的遗传进化规律进行了深入的探讨。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验材料:**本实验所研究的羊轮状病毒分离自青海省 RV 流行期间一患有病毒性腹泻的羊粪便样品,由北京诺泰科华生物技术开发有限公司在猴肾细胞 MA104 中传代培养而得到。该羊轮状病毒被命名为 ORV-NT 株。

**1.1.2 主要试剂和仪器:**基因克隆质粒为 pGEM-T 载体 (Promega 公司),基因克隆用大肠杆菌 (*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$ ,由本实验室保存。反转录酶购自 Invitrogen 公司,RNeasy Mini Kit 试剂盒购自 QIAGEN 公司,Taq 酶购自大连宝生物(TaKaRa)公司,dNTP 购自 Promega 公司,RACE 试剂盒购自 CLONETECH 公司,ET Dye Terminator Kit 购自 GE healthcare 公司。

**1.1.3 引物:**下载 GenBank 数据库中相关 RV 的 VP1 序列,用 Clustal W 软件对这些序列进行多序列比对得到病毒共有的保守区,用 Oligo 软件设计 VP1 的特异引物,并由上海生物工程公司合成。引物的核苷酸序列为(由 5'  $\rightarrow$  3' 方向),P1: GCTATACAATGGGGAAGT(碱基位点 11-28)和 P2: CACATCTAAGCGCTCTAA(碱基位点 3284-3301)。

### 1.2 NT 株总 RNA 的提取

按纪绍忠报道的方法培养 ORV-NT 株<sup>[9]</sup>。使用 RNeasy Mini Kit 试剂盒提取 NT 株的 dsRNA,操作步骤按照产品说明书。

### 1.3 RT-PCR 和基因末端序列测定

NT/VP1 cDNA 的合成按 SuperScript<sup>TM</sup> II 反转录酶说明书,使用随机引物(Random primer)进行反转录转录体系 20  $\mu$ L,其中,模板 RNA 溶液 8.5  $\mu$ L,Random primer(500 ng/ $\mu$ L)2.5  $\mu$ L,5  $\times$  Buffer 4  $\mu$ L,0.1 mol/L DTT 2  $\mu$ L,dNTP(10  $\mu$ mol/L)1  $\mu$ L,SSII(200 u/ $\mu$ L)1  $\mu$ L,RNasin(40 u/ $\mu$ L)1  $\mu$ L。反应产物 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。NT/VP1 扩增体系为 25  $\mu$ L,其中 cDNA 模板 2  $\mu$ L,Primer(P1 + P2)  $\times$  10  $\mu$ mol/L)2  $\mu$ L,10  $\times$  Buffer 2.5  $\mu$ L,MgCl<sub>2</sub>(25 mmol/L)2  $\mu$ L,dNTP(2.5 mmol/L each)2  $\mu$ L,Taq(5  $\mu$ mol/L)0.5  $\mu$ L,灭菌超纯水 14  $\mu$ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,50 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min,35 个循环,

72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。反应产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

经过 PCR 方法扩增出的 VP1 基因片段,由于受序列限制无法扩增 5' 末端,我们采用 RACE 试剂盒(SMART RACE cDNA Amplification Kit)进行末端扩增。详细流程请参见试剂盒的使用说明书。

### 1.4 基因克隆和核苷酸测序

纯化后的 PCR 产物与 pGEM-T 载体连接并转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,经阳性克隆鉴定,提取质粒 DNA 进行核苷酸序列的测定。VP1 基因的核苷酸序列测定利用 ET Dye Terminator Kit 双脱氧法,经乙醇纯化后的产物用 ABI3730 测序仪进行双向测定。测序时,首先用 T7 和 SP6 引物进行测定,再根据测定结果合成新的引物,逐步完成 VP1 基因片段的序列测定。

### 1.5 序列相似性分析和进化树的构建

利用 DNASTar6.0 软件对 VP1 基因的编码区进行分析,利用 Clustal X 多序列联配程序<sup>[10]</sup>进行氨基酸序列比较,用 BioEdit 软件进行氨基酸序列相似性的计算,再用邻接法进行进化树的绘制。

### 1.6 不同 RV 病毒 VP1 基因的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列进化距离的差异比较

从 GenBank 数据库中得到 25 株具有代表性的 RV 毒株与我们所测的羊 RV 的 NT 株一起进行核苷酸序列及其推导氨基酸序列的差异比较。利用 BioEdit 软件进行序列的编辑,对比和分析。用 MEGA4.0 软件中的泊松校正方法计算氨基酸进化距离,用 Kimura-2 参数方法<sup>[11]</sup>计算核苷酸的进化距离,用 Pamilo-Bianchi-Li 方法<sup>[12]</sup>计算核苷酸非同义替代率(dN)和同义替代率(dS)。

## 2 结果

### 2.1 RT-PCR 扩增和测序结果

羊 NT 株 VP1 基因经 RT-PCR 扩增出一个约 3.3 kb 左右的目的片段,与预期结果一致。PCR 产物经过 3 次克隆和核苷酸序列测定,结果表明所克隆的 VP1 基因片段为 3302 bp,开放阅读框为 3267 bp,编码 1088 个氨基酸(aa)。序列结果已提交 GenBank,Accession No. FJ031019。

### 2.2 氨基酸序列比较和进化树分析结果

表 1 为氨基酸序列同源性比较结果,发现羊 NT 株 VP1 与其他毒株的相似性为 77.3%~98.4%。其中,与人 DRC86 株的相似性程度最高(98.4%),与羊 OVR762 株的相似性次之(98.1%);而与鸟类 RV

的 PO-13 株的相似性程度最低(77.3%)。氨基酸多序列联配结果表明,VP1 蛋白的氨基酸突变多发生在非功能区,而在 VP1 蛋白的 4 个 RNA 依赖的 RNA

聚合酶功能区(aa 位点 514-529,584-610,628-638 和 692-704)<sup>[13]</sup>的突变较少,功能区的变异情况如图 1 所示。

表 1 ORV-NT 株与其他 RV 株 VP1 基因的氨基酸序列同源性比较

Table 1 Percentages of amino acid identity of VP1 of the ORV strain NT with other group A RVs

Strain/Species	Identity/%	Accession No.	Strain/Species	Identity/%	Accession No.
OVR762/Ov	98.1	EF554148	TB-Chen/Hu	97.5	AY787653
UKtc/Bo	97.8	X55444	DS-1/Hu	97.5	DQ870505
WC3/Bo	97.3	EF560615	DRC86/Hu	98.4	DQ005125
Sun9/Bo	97.2	AB374143	Hun5/Hu	98.0	EF554104
BRV033/Bo	95.9	EF560612	HCR3A/Hu	95.0	EU 708901
SA11/Si	96.6	DQ838638	Ro1845/Hu	94.6	EU708890
RRV/Si	97.6	EF583006	30/96/La	96.7	DQ205221
TUCH/Si	95.1	EF583010	A79-10/Ca	95.0	EU708934
N155/Hu	96.7	EU200793	K10/Ca	94.7	EU708923
Dhaka6/Hu	89.8	EF560705	CU-1/Ca	94.9	EU708912
B4106/Hu	97.4	NC_007473	A131/Po	86.8	EF560618
Wa/Hu	89.8	DQ490539	PO-13/Av	77.3	AB009629
AU-1/Hu	94.8	DQ490533			

a) For each strain the following data are given :strain /origin. The host species are provided (Ov :ovine ;Bo :bovine ;Si :simian ;Hu :human ;La :lapin ;Ca :canine ;Po :porcine ;Av :avian).

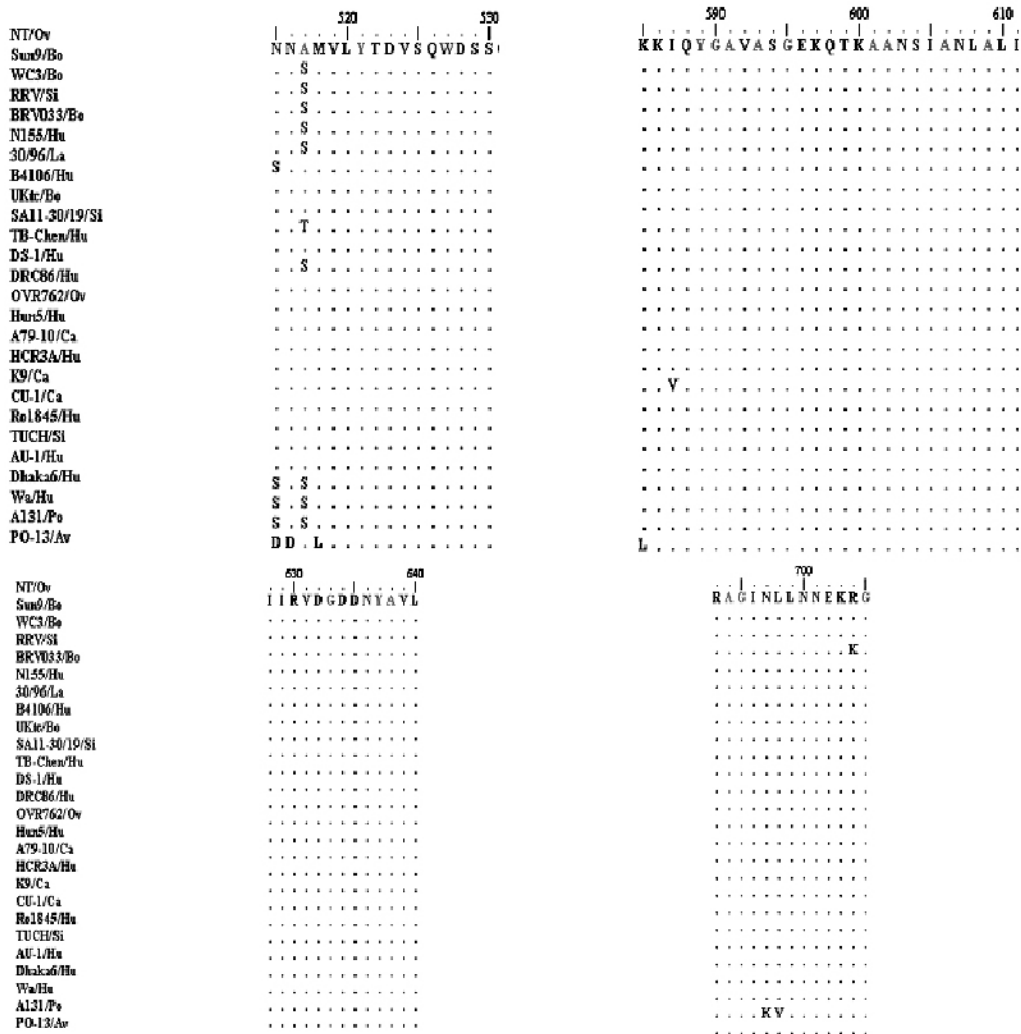


图 1 羊轮状病毒 NT 株与 A 组轮状病毒 VP1 蛋白的 4 个 RdRP 功能区氨基酸序列的比较

Fig. 1 Amino acid comparison of four putative RNA-dependent RNA polymerase motif regions of VP1 from OVR strain NT and group A RV strains.

VP1 蛋白的遗传进化树将病毒株大致分为 3 个分支:羊 NT 株与 OVR762、猿、犬、牛、兔及部分人类的 RV 病毒株处于同一个进化分支中;人 RV 的

Dhaka 和 Wa 与猪的 A131 形成另一个分支;鸟类的 PO-13 单独形成一个分支(图 2)。

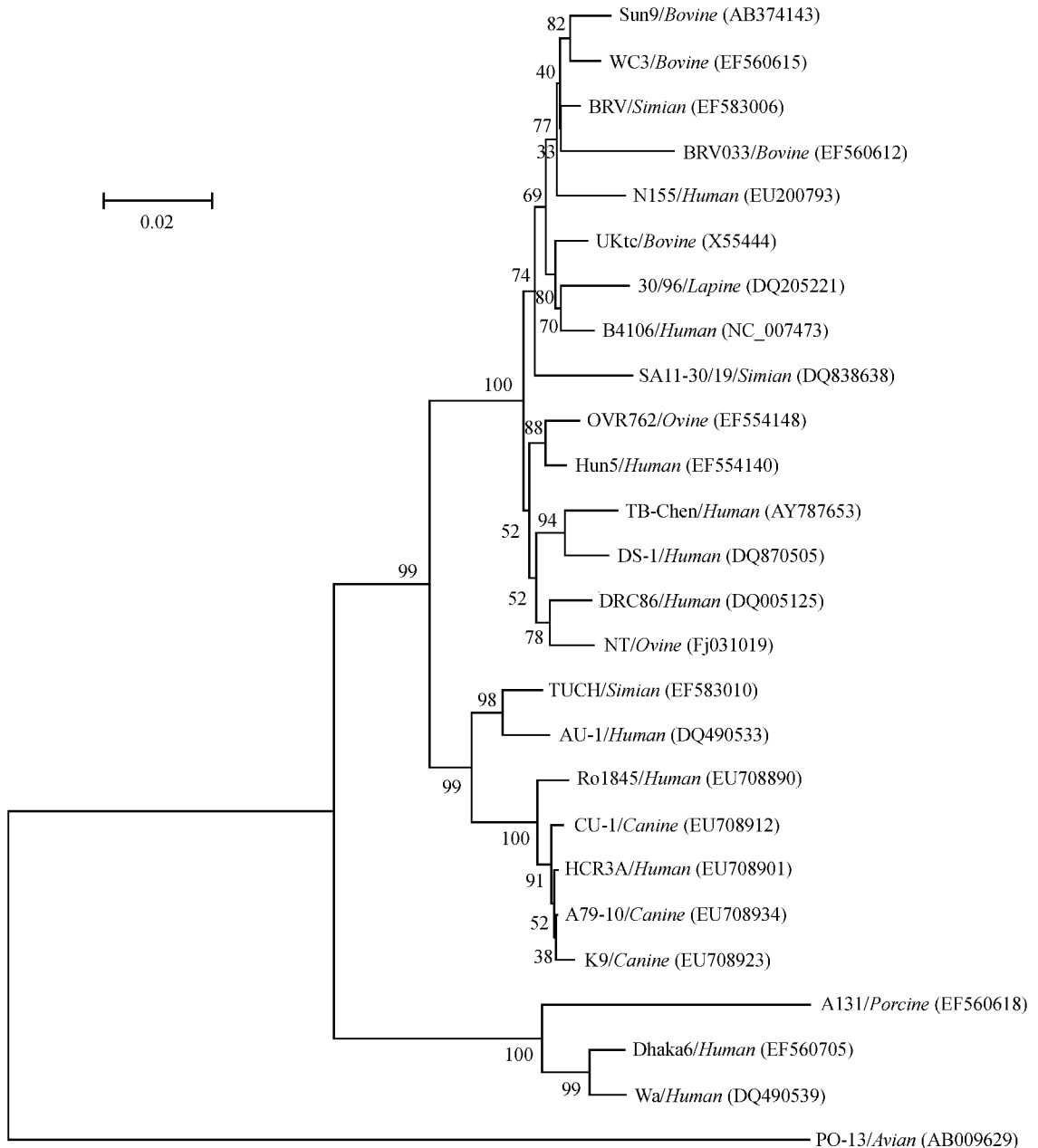


图 2 A 群轮状病毒 VP1 蛋白的进化分析

Fig.2 Phylogenetic analysis based on the amino acid sequences of VP1 of Group A rotavirus. Numbers at nodes represent percentage levels of bootstrap support based on a Neighbor-joining analysis of 5000 replicates. Accession numbers of nucleotide sequences are given in parentheses. Bar indicates 2% sequence divergence.

### 2.3 序列进化距离差异比较结果

对 26 个不同 RV 毒株的 VP1 基因的核苷酸(nt)进行 Kimura-2 距离的计算结果可以看出 VP1 基因间核苷酸进化距离在 0.012 ~ 0.393 之间(表 2),平均距离为 0.209。对 VP1 蛋白的氨基酸进行泊松校正距离的计算结果可以看出,VP1 的氨基酸进化距

离在 0.001 ~ 0.296 之间(表 3),平均距离为 0.071。以上结果说明,RV 的 VP1 基因片段的核苷酸和氨基酸进化距离的差异范围都比较大,尤其氨基酸明显。另外,核苷酸的进化距离均比氨基酸的大,说明在进化过程中同义突变率要大于非同义突变率。

对不同 RV 毒株的 VP1 基因的蛋白编码区内核

表 2 不同轮状病毒 VP1 基因核苷酸序列的进化距离

Table 2 Evolutionary distance of nucleotide sequence among VP1 genes of different RVs

Strain/Host	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
Dhaker6/Th	1																									
Wg/Th	2	0.048																								
AL31/Dc	3	0.172	0.176																							
A7910/Ca	4	0.242	0.237	0.261																						
CUJ/Ca	5	0.240	0.238	0.259	0.012																					
K10/Ca	6	0.240	0.237	0.265	0.012	0.016																				
TR3A/Th	7	0.242	0.240	0.260	0.013	0.016	0.016																			
Ro1845/Th	8	0.237	0.239	0.262	0.035	0.038	0.038	0.039																		
TUC/US	9	0.228	0.224	0.261	0.148	0.146	0.150	0.152	0.151																	
AH/Th	10	0.237	0.234	0.255	0.142	0.144	0.147	0.146	0.150	0.115																
1BClen/Hu	11	0.253	0.249	0.273	0.239	0.239	0.239	0.239	0.240	0.242	0.224	0.223														
1J51/Hu	12	0.246	0.248	0.265	0.238	0.238	0.240	0.241	0.242	0.222	0.223	0.046														
DRCS6/Hu	13	0.237	0.242	0.276	0.232	0.231	0.230	0.232	0.232	0.228	0.227	0.107	0.106													
NY/Ov	14	0.250	0.250	0.288	0.243	0.244	0.242	0.241	0.241	0.233	0.232	0.120	0.121	0.121												
OVR762/Ov	15	0.250	0.256	0.279	0.229	0.229	0.231	0.228	0.229	0.225	0.227	0.226	0.163	0.162	0.156	0.153										
1Im5/Th	16	0.253	0.253	0.285	0.230	0.234	0.232	0.229	0.233	0.236	0.224	0.154	0.150	0.149	0.150	0.102										
TRV/Si	17	0.255	0.260	0.282	0.236	0.239	0.236	0.236	0.236	0.230	0.238	0.230	0.167	0.168	0.158	0.159	0.157	0.168								
TRV033/Bo	18	0.267	0.273	0.289	0.257	0.259	0.257	0.256	0.250	0.251	0.247	0.187	0.187	0.181	0.176	0.180	0.191	0.050								
Sua9/Bo	19	0.257	0.262	0.283	0.233	0.236	0.232	0.230	0.228	0.233	0.232	0.163	0.165	0.161	0.163	0.167	0.170	0.046	0.075							
WC3/Bo	20	0.251	0.262	0.281	0.234	0.236	0.233	0.233	0.228	0.238	0.237	0.165	0.163	0.159	0.159	0.160	0.167	0.035	0.063	0.036						
Δ155/Hu	21	0.248	0.251	0.270	0.223	0.227	0.222	0.224	0.225	0.234	0.233	0.169	0.167	0.161	0.160	0.163	0.174	0.069	0.099	0.081	0.073					
30/96/La	22	0.264	0.267	0.297	0.241	0.244	0.240	0.243	0.241	0.247	0.233	0.180	0.171	0.177	0.171	0.175	0.173	0.099	0.123	0.115	0.105	0.113				
14106/Th	23	0.270	0.269	0.292	0.238	0.243	0.242	0.241	0.237	0.244	0.239	0.177	0.170	0.177	0.171	0.169	0.172	0.094	0.122	0.109	0.099	0.106	0.055			
UKce/Bo	24	0.258	0.260	0.283	0.235	0.238	0.236	0.237	0.235	0.244	0.237	0.171	0.162	0.159	0.163	0.165	0.171	0.077	0.110	0.092	0.078	0.092	0.070	0.061		
SA11/Si	25	0.253	0.250	0.284	0.243	0.246	0.242	0.242	0.243	0.237	0.241	0.169	0.170	0.164	0.170	0.168	0.164	0.166	0.185	0.170	0.163	0.158	0.174	0.171	0.166	
PO13/AV	26	0.365	0.364	0.393	0.359	0.355	0.358	0.361	0.367	0.357	0.368	0.350	0.343	0.342	0.354	0.345	0.356	0.362	0.381	0.360	0.365	0.350	0.360	0.359	0.363	0.361

a) For each strain the following data are given: strain/origin. The host species and accession numbers are provided as in the legend to Table 1.

表 3 不同轮状病毒 VPI 基因氨基酸序列的进化距离

Table 3 Evolutionary distance of amino acid sequence among VPI genes of different RVs

Strain/Host	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
<b>Thaka6/Th</b>	<b>1</b>																										
Wd/Th	2	0.013																									
A131/Lv	3	0.066	0.064																								
A7910/Ca	4	0.094	0.097	0.131																							
CU1/Ca	5	0.094	0.097	0.131	0.003																						
A10/Ca	6	0.096	0.099	0.134	0.004	0.006																					
TR3A/Th	7	0.094	0.097	0.131	0.001	0.004	0.005																				
Pol845/Th	8	0.096	0.098	0.131	0.008	0.011	0.012	0.009																			
TCU/Si	9	0.092	0.091	0.126	0.030	0.032	0.034	0.030	0.030																		
A11/Th	10	0.090	0.089	0.125	0.030	0.032	0.034	0.030	0.031	0.016																	
TB/Clnr/Hu	11	0.109	0.105	0.140	0.060	0.061	0.063	0.060	0.061	0.062	0.054																
DS1/Hu	12	0.107	0.105	0.137	0.058	0.059	0.061	0.058	0.059	0.051	0.053	0.018															
DRCS6/Hu	13	0.106	0.106	0.139	0.047	0.048	0.050	0.047	0.049	0.050	0.051	0.022	0.025														
NI/Ov	14	0.106	0.106	0.140	0.080	0.051	0.053	0.050	0.054	0.049	0.052	0.025	0.025	0.016													
OVR762/Ov	15	0.099	0.100	0.134	0.052	0.053	0.055	0.052	0.052	0.046	0.048	0.024	0.027	0.019	0.019												
Thms5/Th	16	0.105	0.103	0.136	0.052	0.053	0.055	0.052	0.054	0.048	0.049	0.024	0.023	0.018	0.020	0.010											
RRV/Si	17	0.100	0.101	0.134	0.052	0.053	0.055	0.052	0.056	0.051	0.053	0.031	0.027	0.023	0.024	0.022	0.020										
RRV033/Bo	18	0.119	0.120	0.145	0.068	0.069	0.071	0.068	0.072	0.067	0.069	0.046	0.042	0.040	0.041	0.038	0.035	0.024									
Sun9/Bo	19	0.104	0.105	0.139	0.056	0.057	0.059	0.056	0.060	0.055	0.057	0.035	0.031	0.027	0.028	0.026	0.023	0.013	0.031								
WC3/Bo	20	0.100	0.101	0.135	0.054	0.055	0.057	0.054	0.058	0.054	0.056	0.033	0.030	0.025	0.027	0.024	0.021	0.011	0.028	0.013							
N155/Hu	21	0.101	0.103	0.137	0.056	0.057	0.059	0.056	0.058	0.056	0.059	0.037	0.035	0.030	0.033	0.029	0.026	0.017	0.034	0.022	0.021						
30/96/La	22	0.102	0.101	0.138	0.060	0.061	0.062	0.060	0.061	0.054	0.052	0.033	0.032	0.033	0.033	0.029	0.026	0.021	0.039	0.027	0.024	0.032					
Bd106/Th	23	0.100	0.099	0.133	0.054	0.055	0.057	0.054	0.056	0.049	0.050	0.032	0.029	0.028	0.024	0.020	0.015	0.034	0.019	0.019	0.023	0.019					
UKce/Bo	24	0.099	0.099	0.133	0.054	0.055	0.057	0.054	0.055	0.050	0.051	0.030	0.027	0.025	0.021	0.018	0.013	0.032	0.019	0.017	0.023	0.020	0.013				
SA11/Si	25	0.105	0.103	0.135	0.064	0.065	0.067	0.064	0.066	0.059	0.061	0.037	0.033	0.034	0.031	0.028	0.026	0.042	0.032	0.030	0.034	0.036	0.029	0.029			
PO13/Av	26	0.259	0.262	0.296	0.249	0.249	0.251	0.249	0.249	0.249	0.250	0.256	0.253	0.253	0.252	0.252	0.250	0.259	0.269	0.262	0.258	0.259	0.258	0.257	0.256	0.265	

a) For each strain the following data are given: strain (origin). The host species and accession numbers are provided as in the legend to Table 1.

核苷酸自展 1000 次,进行平均同义替代率( $dS$ )和非同义替代率( $dN$ )的计算,得到  $dS$  和  $dN$  的值分别为 1.197 和 0.046, $dN/dS$  的比值为 0.038。 $dN/dS$  的比值远远小于 1,说明 RV 的 VP1 基因在进化过程中同义突变率要远远大于非同义突变率,此结果与进化距离分析所得出的结论一致。

### 3 结论

羊 NT 株 VP1 基因推导的氨基酸序列除与鸟类 RV PO-13 的氨基酸序列同源性小于 80% 以外,与哺乳动物 RV 的同源性都在 86.8% ~ 98.4%,甚至与大多数 RV 的同源性都在 95% 以上(表 1)。说明羊 NT 株 VP1 基因具有相当高的保守性,在进化过程中能稳定遗传。根据早期对轮状病毒 VP1 蛋白进化树的研究表明,哺乳动物 RV 可以分为两大分支:猪 RV(A131 株等)与人 RV(Wa-like 病毒株)形成一个分支;牛 RV(UKtc, BRV033 等)、猴 RV(SA11, TUCH 等)与人 RV(DS-1-like 病毒株)形成另一个大分支<sup>[14-15]</sup>。本实验研究结果仍可以在进化树上看到哺乳动物 RV 的两大明显分支,并且将羊(NT 和 OVR762 株)、犬和兔的 RV 也归类到牛 RV 这一分支上(图 2),说明羊 NT 株 VP1 基因与牛 RV 具有较近的进化起源关系。VP1 蛋白的进化树研究还发现,用 VP1 构建的系统进化树和用 VP2, VP3 构建的进化树非常相似<sup>[16-17]</sup>,但与其它基因片段构建的进化树差异较大。这种现象提示,虽然 RV 的基因组由 11 个不连续的 RNA 片段构成,不同基因在遗传变异上仍存在一定的内在联系;同时也表明,仅仅对 RV 的 VP4, VP7 和 NSP4 等个别基因片段的研究并不能完全阐释其遗传特征和进化规律,因此对 RV 其他基因的研究有利于更全面地认识其结构和功能,从而为 RV 疫苗的研发和优化提供更可靠的依据。

基因间进化距离的远近可以通过不同的统计方法计算核苷酸和氨基酸替代数来衡量。本研究分别采用 Kimura-2 参数法和泊松校正法来计算不同毒株 VP1 基因间的核苷酸和氨基酸进化距离。结果显示,不同 RV 毒株 VP1 基因间的核苷酸遗传差距远大于氨基酸遗传差距,说明在 RV 进化过程中 VP1 基因的核苷酸变异比氨基酸变异要快,即核苷酸的同义突变率远大于非同义突变率。在  $dN$  和  $dS$  研究中, $dN$  总是小于  $dS$  的结果也表明,同义替代是轮状病毒 VP1 基因编码区内的主要变异,与外界选择压力关系不大,即该片段在进化关系中处于负向

选择。这种 VP1 蛋白的高度保守性为 VP1 执行重要的 RNA 复制功能提供了重要的分子基础。

### 参考文献

- [1] Snodgrass DR, Herring JA, Gray EW. Experimental rotavirus infection in lambs. *Journal of Comparative Pathology*, 1976, 86: 637 - 642.
- [2] Makabe T, Komaniwa H, Kishi Y, et al. Isolation of ovine rotavirus in cell cultures. Brief report. *Archives of Virology*, 1985, 83: 123 - 127.
- [3] Shen S, Burke B, Desselberger U. Nucleotide sequences of the vp4 and vp7 genes of a chinese lamb rotavirus: Evidence for a new p type in a g10 type virus. *Virology*, 1993, 197: 497 - 500.
- [4] Ramani S, Kang G. Burden of disease & molecular epidemiology of group a rotavirus infections in india. *India Journal of Medical Research*, 2007, 125: 619 - 632.
- [5] Estes MK. Rotaviruses and their replication. Philadelphia, *Fields virology* 2004.
- [6] Martella V, Ciarlet M, Banyai K, et al. Identification of a novel vp4 genotype carried by a serotype g5 porcine rotavirus strain. *Virology* 2006, 346: 301 - 311.
- [7] Desselberger U, Iturriza-Gomara M, Gray JJ. Rotavirus epidemiology and surveillance. *Novartis Foundation Symposium* 2001, 238: 125 - 152.
- [8] Poch O, Sauvaget I, Delarue M, et al. Identification of four conserved motifs among the rna-dependent polymerase encoding elements. *Embo Journal*, 1989, 8: 3867 - 3874.
- [9] 纪绍忠, 毕焯, 杨红彦. 引起成人腹泻的新轮状病毒在原代人胚肾细胞上的培养和传代. *中华医学杂志 (Chinese Medical Journal)*, 2002, 82: 14 - 18.
- [10] Page RD. Treeview: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 1996, 12: 357 - 358.
- [11] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 1980, 16: 111 - 120.
- [12] Pamilo P, Bianchi NO. Evolution of the zfx and zfy genes: Rates and interdependence between the genes. *Molecular Biology and Evolution*, 1993, 10: 271 - 281.
- [13] Mitchell DB, Both GW. Completion of the genomic sequence of the simian rotavirus sa11: Nucleotide sequences of segments 1, 2 and 3. *Virology*, 1990, 177: 324 - 331.
- [14] Masendycz PJ, Palombo EA. Genetic relatedness of vp1 genes of australian and taiwanese rotavirus isolates. *Fems Microbiology Letters*, 2001, 198: 147 - 150.

- [ 15 ] Zao CL ,Yu WN ,Kao CL ,et al. Sequence analysis of vp1 and vp7 genes suggests occurrence of a reassortant of g2 rotavirus responsible for an epidemic of gastroenteritis. *Journal of General Virology* ,1999 ,80( Pt 6 ) :1407 – 1415.
- [ 16 ] Subodh S ,Bhan MK ,Ray P. Genetic characterization of vp3 gene of group a rotaviruses. *Virus Genes* ,2006 ,33 :143 – 145.
- [ 17 ] Varghese V ,Ghosh S ,Das S ,et al. Characterization of vp1 , vp2 and vp3 gene segments of a human rotavirus closely related to porcine strains. *Virus Genes* 2006 ,32 :241 – 247.

## Sequence and evolutionary analysis of VP1 gene of Ovine rotavirus NT

Yanjun Chen<sup>1</sup> ,Weiwen Zhu<sup>2</sup> ,Shuo Sui<sup>1</sup> ,Xiaowei Zhang<sup>1\*</sup> ,Songnian Hu<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> Key Lab of Genome Science and Information ,Beijing Institute of Genomics ,Chinese Academy of Sciences ,Beijing 100029 , China )

(<sup>2</sup> Beijing Natcare Biotech Limited Company ,Beijing 10008 ,China )

**Abstract [ Objective ]** The ovine rotavirus strain NT isolated from diarrhea lamb in China was considered as a promising vaccine strain. Based on the VP1 gene was one of the important structural proteins of rotavirus ,we studied on the evolutionary characteristics of VP1. **[ Methods ]** According to the published conservative sequences of VP1 genes ,we designed a pair of specific primers for cloning and sequencing of VP1 gene. **[ Results ]** Sequencing result showed that the VP1 gene was 3 302 bp in length and the deduced protein was 1 088 aa. Comparison of amino acid sequences revealed that the ORV-NT shared 77.3% ~ 98.4% similarities with other group A rotaviruses. Furthermore ,sequence alignment analysis manifested that amino acid variations mainly occurred in the non-functional regions of VP1 protein. Phylogenetic analysis of VP1 protein showed that the OVR-NT was grouped in the bovine rotavirus clusters ,indicating a closer relationship between them. Evolutionary distance of nucleotide sequence and amino acid sequence among VP1 genes of different rotaviruses were calculated ,respectively. Analysis of synonymous mutation rate and Non-synonymous mutation rate demonstrated that synonymous substitution was the major pattern of variation in the process of evolution. **[ Conclusion ]** This was the first report on sequencing and evolutionary distance analysis of VP1 gene of ORV-NT.

**Keywords :** Ovine rotavirus NT strain ; VP1 gene ; sequence alignment ; evolutionary distance

( 本文责编 :王晋芳 )

\* Corresponding author. Tel :+ 86-10-82995362 ;Fax :+ 86-10-82995373 ;E-mail :husn@big.ac.cn

Received 23 January 2009/ Revised 30 March 2009

### 《微生物学报》投稿方式

从 2006 年起 ,本刊采用“稿件远程处理系统” ,全面试行网上投稿、网上审稿、网上查询等方式进行工作。欢迎广大作者通过登陆本刊网站进行投稿和查询。

(1) 远程投稿 :请先登陆本刊网站 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn> ,点击“作者投稿” 。如果您是第一次通过“远程”给本刊投稿 ,请先进行“注册” ,注册成功后再进行投稿。如果曾在本刊网站投过稿 ,则可直接投稿。如果忘了用户名和密码 ,请联系本刊编辑部找回登录口令。

(2) 邮寄纸样 :所有来稿均需要邮寄 1 份纸稿和介绍信。

(3) 稿件受理费 :投稿时请随寄 100 元受理费 ,务必通过邮局汇款 ,切忌随信邮寄 !

注 :务请在汇款单上注明“第一作者姓名”和“稿件编号”。