

云南省一株版纳病毒的分离和鉴定

孙肖红 张晓龙 刘宇夫 王静 魏蓬 高旭 赵文 张勳 杨学兵 张乐

【摘要】 目的 对 2008 年在云南省勐腊县采集的蚊虫进行版纳病毒(BAV)分离和鉴定。方法 2008 年 7 月在勐腊县南嘎村人房和畜圈采集蚊虫标本,用细胞培养法进行虫媒病毒分离并鉴定,测定分离到的 BAV 第 5、8 及 11 节段序列,利用 MEGA4 软件进行系统进化分析。结果 共采集到蚊虫 7 种 1731 只,分离到 1 株导致 C6/36 细胞产生规律病变的分离物,经血清学和分子生物学鉴定为 BAV,系统进化分析显示第 8 节段和中国分离株关系最近,而第 11 节段和越南分离株关系最近。结论 系统进化分析提示该 BAV 毒株可能与越南分离株之间发生了基因重配。

【关键词】 版纳病毒; 序列分析

Isolation and identification of a Banna virus strain from mosquitoes in Yunnan province SUN Xiao-hong¹, ZHANG Xiao-long¹, LIU Yu-fu², WANG Jing¹, WEI Lian¹, GAO Xu¹, ZHAO Wen², ZHANG Xun³, YANG Xue-bing³, ZHANG Le¹. 1 Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100123, China; 2 Mengla Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau; 3 Yunnan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau

Corresponding author: ZHANG Le, Email: zhang0830@tom.com

This work was supported by a grant from the Governmental Public Industry Research Special for Quality Supervision, Inspection and Quarantine of China (No. 2007GYJ025)

【Abstract】 **Objective** To isolate and identify Banna virus (BAV) from mosquitoes collected in Mengla county of Yunnan province. **Methods** Mosquito samples were collected in houses and stock yards in Mengla county, 2008. Mosquitoes were homogenized and incubated onto both C6/36 and BHK21 cells. The new isolate was identified by using ELISA and RT-PCR. The sequences of segment 5, 8 and 11 of BAV were amplified by RT-PCR and determined. Phylogenetic analysis on the new BAV were performed using MEGA4 program. **Results** 1731 mosquitoes representing 7 species were collected with one strain of BAV isolated and identified. Phylogenetic analysis based on sequences of segment 8 showed the new isolate was closed to BAV strain isolated in Yunnan, but segment 11 sequence was closed to Vietnam strain. **Conclusion** Results of phylogenetic analysis implied that the BAV re-assortment might have been occurred both in Chinese and Vietnam strains.

【Key words】 Banna virus; Sequence analysis

版纳病毒(Banna virus, BAV)属于呼肠孤病毒科^[1]。BAV最早于1987年从中国云南省西双版纳州发热和无名热患者体内分离^[2],以后陆续从印度尼西亚和中国分离到。2008年越南也报道分离到多株BAV,分子特征分析显示,越南分离株和中国分离株之间可能发生了基因重配^[3]。已有研究于2008年在云南省勐腊县进行虫媒病毒调查,从三带喙库蚊中分离到1株病毒,鉴定为BAV。本研究拟对云南省勐腊县采集的蚊虫进行BAV分离和鉴定。

材料与方法

1. 蚊虫标本采集:2008年7月,在云南省勐腊县南嘎村的人房和牛棚,于夜间用诱蚊灯(湖北武汉吉星科技公司,12 V,300 mA)采集蚊虫。置-20℃冰箱内冷冻至少30 min,然后对雌蚊进行形态学分类,按蚊种分装。三带喙库蚊每100只为1组,其他蚊种50~100只为1组,不足50只的以实际数量为1组,分别置于2 ml细胞冻存管内,迅速放入液氮中保存备用。

2. 病毒分离和血清学鉴定:用组织研磨器(TissueLyser,德国Qiagen公司)在生物安全柜内将蚊虫研磨,用研磨液上清接种BHK21和C6/36细胞,进行虫媒病毒分离,具体方法按照文献进行^[4]。连续3代引起细胞病变的标本视为阳性分离物。用阳

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.06.021

基金项目:质检公益科研专项(2007GYJ025)

作者单位:100123 北京,中国检验检疫科学研究院(孙肖红、张晓龙、王静、魏蓬、高旭、张乐);勐腊出入境检验检疫局(刘宇夫、赵文);云南出入境检验检疫局(张勳、杨学兵)

通信作者:张乐, Email: zhang0830@tom.com

性分离物的细胞培养上清包被 96 孔板,用甲病毒、布尼亚病毒、黄病毒属和 BAV 多克隆抗体(中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所)进行 ELISA 检测。

3. 双链 RNA 核酸电泳试验:参照文献[5,6]方法进行,检测病毒的基因组带型。

4. 病毒分子生物学鉴定:从第 3 代病变细胞中提取总 RNA (QIAamp® Viral RNA Mini Kit, 德国 Qiagen 公司),用随机引物制备 cDNA。以 cDNA 为模板,分别用 BAV 第 5、8、11 及 12 节段引物 BAV-5 (FP: 5' -CAG CTG CAG TGG TTA TTG GA-3', RP: 5' -ACC GTG CAT CTT AAC CCT TG-3')^[3]、BAV-8 (FP: 5' -TTG CAG TCG CTG AGC TTT TA-3', RP: 5' -CGC ATT TGA TCG TAT GCT TG-3')^[3]、BAV-11 (FP: 5' -AAA CAT AAT GGC CGA TCA-3', RP: 5' -ATA GAC CCA TCA CAA AGA CG-3') 和 BAV-12-F/R^[7,8] 扩增病毒核酸。将 PCR 产物纯化后连接于 pGEM-T 载体,克隆测序。

5. 序列分析:从 GenBank 中下载中国、越南和印度尼西亚 BAV 第 5、8 及 11 节段序列(表 1),利用 MEGA4 软件绘制系统进化树(Neighbor-Joining 法)。

表 1 引用中国、越南及印度尼西亚 BAV 的毒株序列信息

毒株	来源	分离地点及年代	GenBank 序列号		
			第 5 节段	第 8 节段	第 11 节段
BANNA	人	中国, 1987	-	AF052034	AF052031
BAV-Ch	蚊虫	中国, 1985	AF549309	-	-
02VN078b	三带喙库蚊	越南, 2002	EU265699	EU265702	EU265704
02VN180b	三带喙库蚊	越南, 2002	EU265720	EU265723	EU265726
02VN018b	环带库蚊	越南, 2002	EU265687	EU265690	EU265693
02VN178b	三带喙库蚊	越南, 2002	-	EU265711	EU265714
02VN009b	环带库蚊	越南, 2002	EU265677	-	-
JKT-6423	杂鳞库蚊	印度尼西亚, 1980	AF134517	AF052017	AF052014
JKT-6969	迷走按蚊	印度尼西亚, 1981	-	AF052012	AF052009
JKT-7043	淡色按蚊	印度尼西亚, 1981	-	AF052028	AF052025

注: - : 未检索到

结 果

1. 标本采集和病毒分离:在勐腊县南嘎村共采集蚊虫 21 批,分为 7 种共 1731 只,其中三带喙库蚊数量最多(1263 只,占总数的 72.96%),其次为中华按蚊(235 只,占 13.58%)、棕头库蚊(76 只)、骚扰阿蚊(74 只)、可赫按蚊(56 只)、麻翅库蚊(15 只)和刺扰伊蚊(12 只)数量较少。在二批标本中,有 1 株(ML080776)引起 C6/36 细胞病变,主要表现为细胞圆缩、脱落,不引起 BHK21 细胞病变。其他标本均未引起 C6/36 或 BHK21 细胞病变。

2. 病毒鉴定:

(1) 抗原性鉴定:用接种 ML080776 后产生病变的 C6/36 细胞上清包被 96 孔板,ELISA 显示其与 BAV 多克隆抗体反应,与其他抗体不反应。

(2) 病毒基因组 RNA 电泳:从病变细胞上清中提取 RNA,SDS-PAGE 电泳,硝酸银染色,显色后发现基因组为 12 条带,按分子量由大到小表示为片段 1~12(S1~S12),12 条带分为 2 组(图 1,左→右),每组各有 6 条带,呈 6-6 带型。

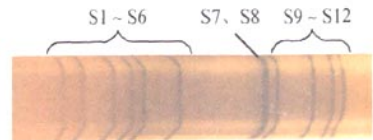
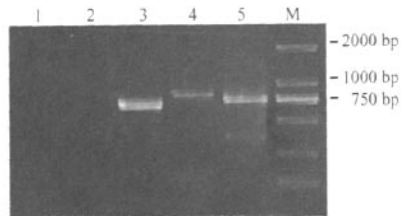


图 1 BAV 分离株的 RNA 电泳带型

(3) 分子生物学鉴定:分别用 BAV 第 5、8、11 及 12 节段引物扩增 ML080776 核酸。第 5、8 和 11 节段引物依次得到分子量约 750 bp、800 bp 和 670 bp 的产物,均与预期大小一致;第 12 节段引物未扩增出条带(图 2)。

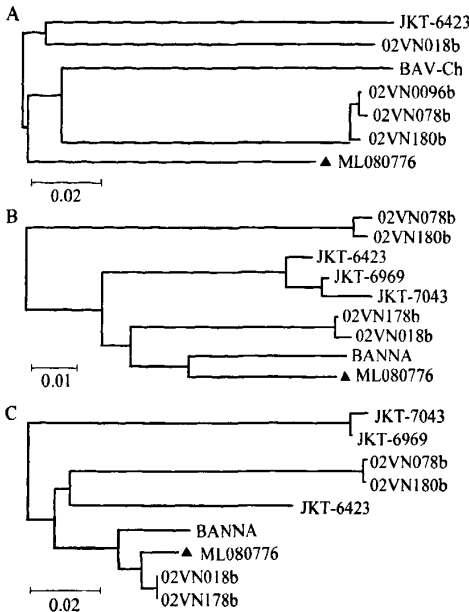


注: M: Marker; 1: 阴性对照; 2: 第 12 节段; 3: 第 11 节段; 4: 第 8 节段; 5: 第 5 节段

图 2 BAV 分离株第 5、8、11 及 12 节段核酸扩增结果

(4) 序列分析:将 ML080776 第 5、8 及 11 节段的核苷酸序列和表 1 所列的各国分离的 BAV 相应序列进行分析,分别构建系统进化树(图 3)。①基于第 5 节段核苷酸序列的进化树中,7 株病毒分为 3 个分支。ML080776 独处于一个分支;另一中国分离株 BAV-Ch 与越南 02VN078b、02VN180b 及 02VN0096b 共处一个分支;印度尼西亚(JKT-6423)与越南分离株(02VN018b)共处于一个分支(图 3A)。②在基于第 8 节段核苷酸序列的进化树中,ML080776、中国西双版纳分离株 BANNA 以及越南株 02VN018b 和 02VN178b 共处同一分支,ML080776 与 BANNA 的关系最近,02VN018b 和 02VN178b 处于相对独立的一个小分支,印度尼西亚株 JKT-6423、JKT-6969 和 JKT-7043 则形成一个独立分支(图 3B)。③基于第 11 节段序列的进化分析结果与第 8 节段相似,ML080776 和 BANNA、

02VN018b 及 02VN178b 在一个分支,但 ML080776 与 02VN018b 和 02VN178b 关系更近(图 3C)。



注:A:BAV第5节段核苷酸序列进化树;B:BAV第8节段核苷酸序列进化树;C:BAV第11节段核苷酸序列进化树

图3 基于BAV毒株核苷酸序列的系统进化分析

讨 论

通过细胞培养方法,从三带喙库蚊中分离到1个阳性分离物(ML080776),经鉴定为BAV。核酸电泳显示12条带的分布与云南省其他地区BAV分离株相似,均为6-6带型^[7]。RT-PCR鉴定中,用BAV第5、8及11节段引物均能扩增到目的条带,而第12节段却不能得到相应扩增产物。中国其他分离株应用该引物能扩增到目的片段^[8],提示该毒株第12节段核苷酸序列与中国其他分离株存在较大差异,还需要进一步研究。

基于第5、8及11节段核苷酸序列的系统进化分析显示:对于较大的第5节段,ML080776处于相对独立的1个分支;而较小的第8和11节段,ML080776均与2株越南BAV(02VN018b、02VN178b)及中国云南省分离株BANNA处于一个进化分支,尤其是第11节段的进化分析中,ML080776与越南分离株02VN018b和02VN178b进化关系最近。这一发现和2008年越南的研究结果一致^[3],越南BAV分离株在不同基因节段的系统进化分析中,与中国分离株处于不同的进化分支,提示越南和中国分离株的基因节段发生了重组。本研究结果同样显示云南省分离的BAV(ML080776)的基

因节段可能与越南分离株发生了基因重配。对于分节段的病毒,可因基因的重配而导致病毒基因型别和生物学性状出现多重改变^[3,9]。已有血清学调查结果显示,云南省不明原因脑炎患者双份血清中发现有BAV抗体效价增长4倍以上^[10],说明BAV是病毒性脑炎的原因之一,这种基因重配后的BAV与人类疾病之间的关系还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 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 Gen Virol*, 2000, 81(Pt 6): 1507-1515.
- [2] Xu PT, Wang YM, Zuo JM, et al. New orbiviruses isolated from patients with unknown fever and encephalitis in Yunnan province. *Chin J Virol*, 1990, 6(1): 27-33. (in Chinese) 徐普庭, 王逸民, 左建民, 等. 从云南省无名热患者和脑炎患者分离到新环状病毒. *病毒学报*, 1990, 6(1): 27-33.
- [3] Nabeshima T, Nga PT, Guillermo P, et al. Isolation and molecular characterization of Banna virus from mosquitoes, Vietnam. *Emerg Infect Dis*, 2008, 14(8): 1276-1279.
- [4] Sun XH, Fu SH, Zhang HL, et al. Isolation and identification of arboviruses from mosquito pools in Yunnan province. *Chin J Exp Clin Virol*, 2005, 12(4): 319-324. (in Chinese) 孙肖红, 付士红, 张海林, 等. 云南省虫媒病毒分离鉴定. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2005, 12(4): 319-324.
- [5] Zi DY, Chen BQ, Yu YX. *Arboviruses and arboviral diseases*. Kunming: Yunnan Science & Technology Press, 1995: 448-452. (in Chinese) 自登云, 陈伯权, 俞永新. *虫媒病毒与虫媒病毒病*. 昆明: 云南科技出版社, 1995: 448-452.
- [6] Lv XJ, Lv Z, Sun XH, et al. 0507JS60 virus isolated in Xinjiang was identified as Liaoning virus. *Chin J Virol*, 2008, 24(6): 319-324. (in Chinese) 吕新军, 吕志, 孙肖红, 等. 新疆分离的0507JS60鉴定为辽宁病毒. *病毒学报*, 2008, 24(6): 319-324.
- [7] Billoir F, Attoui H, Simon S, et al. Molecular diagnosis of group B Coltivirus infections. *J Virol Methods*, 1999, 81(1-2): 39-45.
- [8] Sun XH, Fu SH, Wang JL, et al. First isolation of Banna virus in northwestern part of Yunnan province. *Chin J Micro Immunol*, 2009, 29(6): 495-498. (in Chinese) 孙肖红, 付士红, 王静林, 等. 从滇西北地区首次分离到BAV. *中华微生物和免疫学杂志*, 2009, 29(6): 495-498.
- [9] Attoui H, Jaafar FM, Micco P, et al. Coltiviruses and Seadornaviruses in North American, Europe, and Asia. *Emerg Infect Dis*, 2005, 11(11): 1673-1679.
- [10] Tao SJ, Xu PT, Chen BQ, et al. The discovery of Coltivirus—a new virus caused encephalitis and unknown fever. *J Med Research*, 2006(2): 32-33. (in Chinese) 陶三菊, 徐普庭, 陈伯权, 等. 一种引起脑炎、无名热的新病毒——Colti病毒的发现. *医学研究杂志*, 2006(2): 32-33.

(收稿日期: 2009-11-16)

(本文编辑: 万玉立)