

新疆艾比湖布尼亚病毒的分离 与分子生物学鉴定

刘然 张桂林 孙响 郑重 刘晓明 赵焱 刘栓奎 党荣理 赵彤言

【摘要】 目的 发现新疆艾比湖地区潜在流行的蚊媒病毒。方法 采用接种敏感宿主细胞法分离培养病毒;利用反转录聚合酶链和序列聚类分析对病毒株种属进行分子生物学鉴定。结果 从当地优势蚊种凶小库蚊(36.6%)中分离获得一株引起BHK-21细胞病变的病毒,分子生物学鉴定表明该病毒属于布尼亚科正布尼亚属(Orthobunyavirus, Bunyaviridae)成员,暂定名为艾比湖布尼亚病毒。RT-PCR扩增进一步获得长为651 bp和980 bp的病毒基因组S、M节段的部分序列,对上述序列的比对分析显示艾比湖布尼亚病毒与分离自南非的Germiston布尼亚病毒同源关系最为接近,S节段核苷酸和氨基酸序列似然率分别为90.6%和95.0%。M节段变异性高,核苷酸和氨基酸序列似然率仅为78.6%和86.1%。结论 艾比湖布尼亚病毒是国内新发现的一株蚊媒布尼亚病毒。

【关键词】 布尼亚病毒属;蚊媒病毒;凶小库蚊;艾比湖湿地

Isolation and molecular characterization on Abbey Lake Orthobunyavirus (*Bunyaviridae*) in Xinjiang, China Liu Ran, Zhang Guilin, Sun Xiang, Zheng Zhong, Liu Xiaoming, Zhao Yan, Liu Shuankui, Dang Rongli, Zhao Tongyan. Xinjiang Military Command Area Centers for Disease Control and Prevention, Urumqi 830011, China

Corresponding author: Zhang Guilin, Email: xjglzhang@126.com

【Abstract】 Objective To monitor and discover medically important mosquito-borne viruses circulating in Xinjiang, China. **Methods** Mosquitoes were collected from Abbey Lake wetland in Bortala, in Northern Xinjiang. Viral isolates were obtained through innoculating and serial passaging into susceptible mammalian host cells (BHK-21), identified by cytopathogenic effect (CPE) observation and plaque forming assay. Genetic identification of viral isolates was conducted by RT-PCR, sequencing and phylogenetic analysis. **Results** A virus strain which causing CPE on BHK-21 cells, was isolated from the predominant *Culex modestus* (36.6%) and tentatively designated as Abbey Lake virus. Information on molecular identification revealed that Abbey Lake virus belonged to Orthobunyavirus genus within Bunyaviridae. Partial sequences (651 bp and 980 bp) of viral genomic S and M segment showed that Abbey Lake virus was phylogenetically related to Germiston virus that uniquely found in South Africa with 90.6% nucleotides and 95.0% amino acids similarities in S segment. However, viral M segment displayed much variability with 78.6% nucleotides and 86.1% amino acid similarities, suggesting a new member of Orthobunyavirus genus was discovered in the area. **Conclusion** In this study, Abbey Lake virus was isolated and characterized indicating its potential circulation nature of this newly-emerged mosquito-borne virus.

【Key words】 Bunyaviridae; Mosquito-borne viruses; *Culex modestus*; Abbey lake

新疆艾比湖湿地国家级自然保护区位于准噶尔盆地西南,是典型的湿地荒漠生态景观。湿地内栖息有鸟类、啮齿动物等160多种脊椎动物,夏秋季节蚊虫大量孳生,具备蚊传病毒(mosquito-borne virus)传播、蓄存的天然条件。本课题组曾利用高通量测序分析技术从当地库蚊种群中检测出高丰度的布尼

亚科(Bunyaviridae)病毒RNA读序(reads),提示该地区蚊虫可能携带某种布尼亚科病毒。为验证上述结果,本研究试对该种病毒进行分离培养,最终从凶小库蚊(*Culex modestus*)中分离获得1株新型布尼亚病毒。

材料与方法

1. 材料:

(1)蚊标本:于2012年8月在艾比湖湿地保护区

(东经 82°33' 47" ~ 83°53' 21", 北纬 44°31' 05" ~ 45°09' 35") 苇丛、静水附近设置 CO₂ 诱蚊灯于当日 20:00 至次日 06:00 采集蚊虫样品。经蚊虫分类鉴定后, 每 100 只库蚊为 1 份, 置于冻存管中液氮冻存, 共采集 50 份库蚊标本。

(2) 实验动物与细胞: 地鼠肾细胞系 BHK-21 (Baby hamster kidney-21) 由军事医学科学院微生物流行病学研究所病毒学专业实验室提供。2~3 日龄昆明种乳鼠由新疆医科大学实验动物中心提供。

(3) 试剂: Trizol 试剂为 Invitrogen 公司产品; 琼脂糖凝胶纯化试剂盒 QIAquick Gel Extraction Kit 为 Qiagen 公司产品; AMV 一步法 RT-PCR 试剂盒、分子 Marker 2000 为 TaKaRa 公司产品; DMEM 细胞培养基与胎牛血清为 Life technology 公司产品; 0.22 μm 滤器为 Millipore 公司产品。

(4) 引物: 布亚韦拉血清群病毒核酸鉴定使用 Lambert 和 Lanciotti^[1] 文献提供的 Bun 引物对序列, 5'-CTG CTA ACA CCA GCA GTA CTT TTG AC-3' 与 5' -TGG AGG GTA AGA CCA TCG TCA GGA ACT G-3'。艾比湖布尼亚病毒基因组 S 节段扩增引物 NP-F/R: 5' -CTT GGC TTT TAA ATG TTG GAG TTG G-3' 与 5' -TAG CCC GAT TAA TGC ACT TCT CTG-3', M 基因节段扩增 M-1F/2R: 5' -CAC TGT TGA TTG TTG CCC TTC TAA-3' 与 5' -ATT ATT TCT GCA TTT GCT GGT GTG-3'。上述扩增产物预期长度为 651 bp 与 980 bp。引物合成与测序工作均由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

2. 病毒分离及鉴定:

(1) 病毒空斑试验: 将库蚊样本经磷酸盐缓冲液漂洗 3 次, 加入 2 ml DMEM 细胞培养液反复研磨, 3 000 r/min 离心 5 min, 离心上清液经 0.22 μm 滤过后, 取 1 ml 接种 25 cm² 细胞培养瓶分种的 BHK-21 细胞, 37 °C 吸附 1 h 后弃上清, 加入含有 2% 胎牛血清 (v/v) 的 DMEM 细胞培养液 5 ml, 置 5% CO₂ 孵箱培养 3 d 以上, 利用 Olympus IX51 显微镜每日观察细胞病变现象。取病毒上清液 1 ml 按 10 倍稀释至 10⁻⁶, 取每个稀释度下病毒悬液 1 ml 接种分种于 12 空板中的 BHK-21 细胞, 吸附结束后弃上清并用含有 1.5% (m/v) 低熔点琼脂糖的 DMEM 培养液覆盖, 37 °C 培养 3 d 至空斑形成, 最后用 0.1% (m/v) 结晶紫-甲醇溶液染色观察。

(2) 病毒核酸提取与扩增: 吸取病毒细胞培养上清液 210 μl 移入灭菌 1.5 ml eppendorf 管中, 然后加入 490 μl Trizol 试剂混匀, 室温静止 15 min, 再加入

700 μl 无水乙醇。13 000 r/min 4 °C 离心 10 min, 弃上清, 待沉淀晾干后, 加入 100 μl 无核酸酶去离子水溶解。利用一步法 RT-PCR 对布尼亚病毒科成员进行核酸检测。正布尼亚病毒属 (Orthobunyavirus) 通用引物 BUN 按 Lambert 等方法扩增。病毒基因组 S、M 节段 RT-PCR 扩增方法: 反转录条件为 50 °C 反应 30 min, 95 °C 热变性 10 min; PCR 反应条件为 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 共 35 个循环, 72 °C 最终延伸 5 min。RT-PCR 阳性扩增产物经 1.5% (m/v) 琼脂糖凝胶纯化后, 交生工生物工程(上海)股份有限公司进行 Sanger 法双向测序。

(3) 病毒基因组序列比对分析: 利用 Mega 6.0 软件对扩增产物序列与布亚韦拉 (Bunyamwera) 血清群病毒序列进行 Blast 比对。采用邻位相连法 (neighbor-joining), 分别构建病毒基因组 S 与 M 节段序列的系统发育树, 确信限度估计设为 1 000 Bootstrap。将加州脑炎 (California encephalitis) 复合群中 Tahyna virus 设为组外对照 (表 1)。

结 果

1. 蚊虫分类及病毒分离: 艾比湖湿地蚊虫包括伊蚊属 6 种、库蚊属 2 种及脉毛蚊属、曼蚊属、按蚊属各 1 种, 共计 5 属 11 种。其中赫坎按蚊 (*Anophele hyrcanus*) 和凶小库蚊为优势种, 分别占蚊虫种群数量的 52.4% 和 36.6%。一组凶小库蚊样品接种 BHK-21 和 Vero 细胞, 3 d 后即能产生细胞圆缩、脱落等病变现象 (图 1)。连传 3 代以上, 细胞病变现象逐渐加强, 病变出现时间缩短至 2 d (图 2)。表明从艾比湖库蚊中分离获得一种能对哺乳动物细胞具有致病性的病毒, 暂定名为艾比湖布尼亚病毒 (Abbey Lake bunyavirus, Ab-BUNV)。

2. 病毒基因组鉴定: 为鉴定 Ab-BUNV 分子生物学特征, 首先利用 RT-PCR 对病毒核酸进行扩增并获得长度为 255 bp 的正布尼亚病毒属特异性产物, 而黄病毒属、甲病毒属病毒检测结果均为阴性。序列比对结果初步表明 Ab-BUNV 属布尼亚病毒科正布尼亚病毒属成员, 归入布亚韦拉病毒血清复合群。根据布尼亚属病毒保守序列设计引物, 通过扩增分别获得病毒基因组 S 和 M 节段的较长片段, 分别为 651 bp 与 980 bp, GenBank 登录号分别为 KJ412986 和 KJ412987。Ab-BUNV 的 S、M 节段序列与同群病毒的比对结果进一步显示, Ab-BUNV 在进化亲缘关系上仅与非洲 Germiston 布尼亚病毒最为接近 (图 3)。S 节段核苷酸序列同源性为 90.6%,

表 1 布尼亚病毒属成员

病毒	毒株	分离时间 (年)	分离地点	毒株来源	GenBank 登录号		文献
					S	M	
Abbeylake bunyavirus	-	2013	中国新疆博尔塔拉州	凶小库蚊(<i>Culex modestus</i>)	KJ412986	KJ412987	-
Germiston virus	-	1958	南非	<i>Culex (Eumelanomyia) rubinotus</i>	M19420	M21951	[4,5]
Batai virus	UgMP-6830	不详	乌干达	<i>Aedes abnormalis</i>	JX846601	JX846602	[6,7]
Ngari virus	SUD-HKV141	1988	苏丹	出血热病例	JX857322	JX857323	
Ilesha virus	ILESHA/8e	1972	塞内加尔	脑炎病例及曼氏伊蚊(<i>Aedes mcintoshi</i>)	KC608151	KC608150	[8]
Bunyamwera virus	原型	1946	乌干达	<i>Aedes</i>	NC_001927	NC_001926	[9,10]
Tensaw virus	TSV-FL06	2006	美国	<i>Anopheles crucians</i>	FJ943507	FJ943506	[11]
Cache Valley virus	WI-03BS7669/807270	2003/1995	美国	脑炎病例	DQ315775	AF186243	[12]
Cholul virus	CHLV-Mex07	2007	墨西哥	致倦库蚊(<i>Culex quinquefasciatus</i>)	EU879062	JN808310	[13]
Xingu virus	BeH388464	1987	巴西	发热病例	EU564830	-	-
Fort Sherman virus	86MSP18	1985	巴拿马	发热病例	EU564829	-	[14]
Shokwe virus	SAAr 4042	1962	南非	<i>Aedes cumminsii</i>	EU564831	-	-
Northway virus	不详/0234	不详	北美	<i>Aedes</i>	X7347	EU004188	-
Calovo virus	138-pool 468	1983	前南斯拉夫	不详	KC608157	KC608156	[15]
Kairi virus	KRIV-Mex07	2007	墨西哥	<i>Aedes</i>	EU879063	GQ118699	-
Tahyna virus	XJ0710/XJ0625	2006	中国新疆喀什	刺扰伊蚊(<i>Aedes vexan</i>)	HM243142	EU622819	[2]

列尚不清楚。表明分离自我国新疆北部的 Ab-BUNV 是布亚韦拉血清群病毒中的新成员。

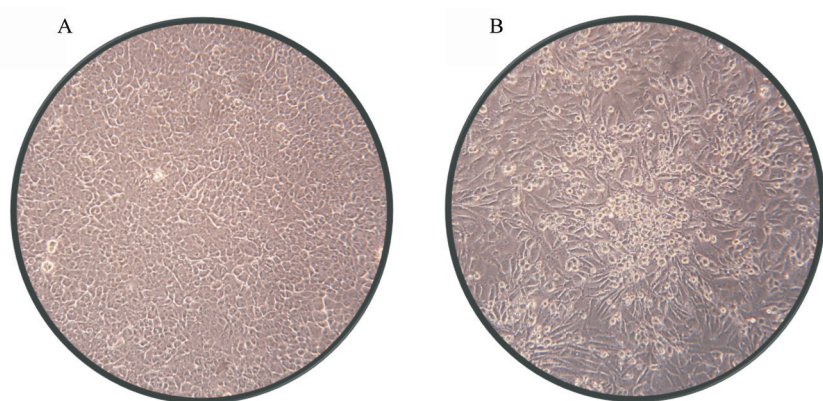
讨 论

布尼亚病毒科成员是一大群带有包膜的负链 RNA 病毒,共分为 5 个属 (*Bunyavirus*、*Nairovirus*、*Hantavirus*、*Phlebovirus* 和 *Tospovirus*)。其中布尼亚病毒属 (*Bunyavirus*) 成员数量多达 160 余种,包括 18 个血清群。例如分离自新疆喀什地区的 Tahyna 病毒属于加州脑炎血清群^[2]。而此次分离获得的 Ab-BUNV 与分离自云南地区的 Batai 病毒同属布亚韦拉血清型^[3]。

布尼亚病毒基因组由 L、M 和 S 三个节段组成,分别编码病毒的 RNA 聚合酶、包膜糖蛋白(Gn/Gc)及核衣壳蛋白。其中 M 节段核苷酸序列变异性高,也是布尼亚病毒属形成众多血清群的遗传基础。Ab-BUNV 的 M 节段序列与亲缘关

系最近的 Germiston 病毒的氨基酸序列同源性也未超过 90%^[4,5],提示 Ab-BUNV 是一种新发现的布尼亚病毒。

从 Ab-BUNV 与其他布尼亚病毒的进化亲缘关



注:A. BHK-21 正常对照; B. Ab-BUNV 感染引起的 BHK-21 病变(20×)

图 1 Ab-BUNV 的 BHK-21 细胞毒力试验结果

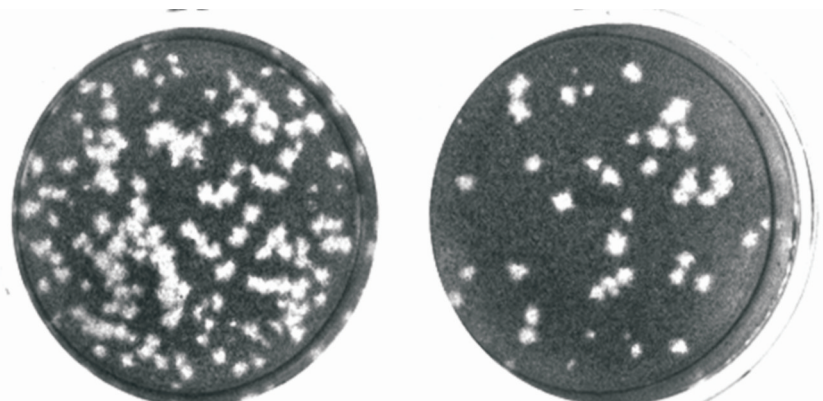
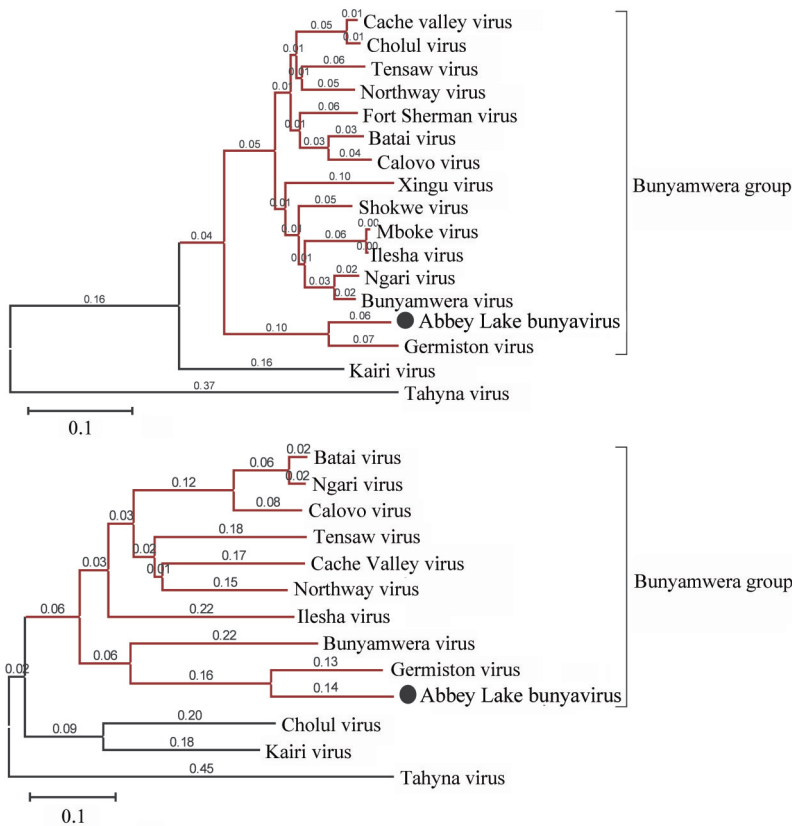


图 2 Ab-BUNV 在 BHK-21 上形成的空斑形态观察(4×)

氨基酸序列同源性为 95.0%; M 节段核苷酸序列同源性为 78.6%,氨基酸序列同源性为 86.1%。Ab-BUNV 的 S、M 节段与 Germiston 病毒同源,表明病毒基因组节段间未出现重排现象。L 节段基因序



注: ●Ab-BUNV

图3 Ab-BUNV基因组S和M基因节段序列的同源比对分析

系^[6-15],以及引起细胞病变现象均提示该病毒对人类具有潜在致病性。而目前对Ab-BUNV的生物学特性及其传播流行的规律还知之甚少,且缺乏当地人群抗体阳性率检测数据。该病毒的主要媒介——凶小库蚊多栖息于伊犁河、额尔齐斯河及额敏河流域为主的盐渍性荒漠生态景观中^[16],按蚊、库蚊和伊蚊等蚊种均可能作为布尼亚病毒的媒介生物。由此推测Ab-BUNV在新疆地区的分布范围可能不仅限于艾比湖及其周边区域,应对新疆地区蚊媒病毒开展监测。

参 考 文 献

[1] Lambert AJ, Lanciotti RS. Consensus amplification and novel multiplex sequencing method for S segment species identification of 47 viruses of the Orthobunyavirus, Phlebovirus, and Nairovirus genera of the family Bunyaviridae [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(8): 2398-2404.

[2] Lu Z, Lu XJ, Fu SH, et al. Tahyna virus and human infection, China [J]. Emerg Infect Dis, 2009, 15(2): 306-309.

[3] Fu SH, Sun XH, Wang HY, et al. Molecular biological identification of Batai virus isolated in China [J]. Chin J Exp Clin Virol, 2005, 19: 331-334. (in Chinese)

付士红, 孙肖红, 王环宇, 等. 我国首次分离巴泰病毒的分子生物学鉴定 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2005, 19: 331-334.

[4] Kokernot RH, Smithburn KC, Paterson HE, et al. Isolation of

Germiston virus, a hitherto unknown agent, from culicine mosquitoes, and a report of infection in two laboratory workers [J]. Am J Trop Med Hyg, 1960, 9: 62-69.

[5] Okuno T. Immunological studies relating two recently isolated viruses, Germiston virus from South Africa and Ilesha virus from West Africa, to the Bunyamwera group [J]. Am J Trop Med Hyg, 1961, 10: 223-226.

[6] Briese T, Bird B, Kapoor V, et al. Batai and Ngari viruses: M segment reassortment and association with severe febrile disease outbreaks in East Africa [J]. J Virol, 2006, 80(11): 5627-5630.

[7] Gerrard SR, Li L, Barrett AD, et al. Ngari virus is a Bunyamwera virus reassortant that can be associated with large outbreaks of hemorrhagic fever in Africa [J]. J Virol, 2004, 78(16): 8922-8926.

[8] Pachler K, Ruzek D, Nowotny N. Molecular characterization of the African orthobunyavirus Ilesha virus [J]. Infect Genet Evol, 2013, 20: 124-130.

[9] Dilcher M, Sall AA, Hufert FT, et al. Clarifying Bunyamwera virus riddles of the past [J]. Virus Genes, 2013, 47(1): 160-163.

[10] Elliott RM. Nucleotide sequence analysis of the small (S) RNA segment of Bunyamwera virus, the prototype of the family Bunyaviridae [J]. J Gen Virol, 1989, 70 (Pt 5): 1281-1285.

[11] Watts SL, Garcia-Maruniak A, Maruniak JE. Tensaw virus genome sequence and its relation to other Bunyaviridae [J]. Virus Genes, 2009, 39(3): 309-318.

[12] Nguyen NL, Zhao G, Hull R, et al. Cache valley virus in a patient diagnosed with aseptic meningitis [J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(6): 1966-1969.

[13] Farfan-Ale JA, Lorono-Pino MA, Garcia-Rejon JE, et al. Detection of RNA from a novel West Nile-like virus and high prevalence of an insect-specific flavivirus in mosquitoes in the Yucatan Peninsula of Mexico [J]. Am J Trop Med Hyg, 2009, 80(1): 85-95.

[14] Yandoko EN, Gribaldo S, Finance C, et al. Molecular characterization of African Orthobunyaviruses [J]. J Gen Virol, 2007, 88(Pt 6): 1761-1766.

[15] Lambert AJ, Lanciotti RS. Molecular characterization of medically important viruses of the genus Orthobunyavirus [J]. J Gen Virol, 2008, 89(Pt 10): 2580-2585.

[16] Zhang GL, Zheng Z, Dong YD, et al. Research on the population composition of mosquitoes and method of mosquitoes surveying in Beiwan area of Xinjiang, China [J]. Acta Parasitol Med Entomol Sinica, 2011, 18(2): 95-98. (in Chinese)

张桂林, 郑重, 董言德, 等. 新疆额尔齐斯河下游北湾地区蚊虫种群组成及调查方法的研究 [J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2011, 18(2): 95-98.

(收稿日期: 2014-02-14)

(本文编辑: 张林东)