

蓝舌病毒分子生物学研究进展

李丛璧 方天祺

(内蒙古大学生物工程中心 呼和浩特 010021)

关键词 蓝舌病毒, 基因结构, 生物学功能

分类号 Q939.47

蓝舌病毒(BTV)是呼肠弧病毒科、环状病毒属的成员。是引起家畜和野生反刍动物蓝舌病的病原体,由昆虫传播。绵羊最易感,牛、山羊和鹿也是该病毒的携带者。该病给畜牧业造成了严重的经济损失。国外对BTV的研究起步早,80年代以来已深入到分子水平的研究上^[1]。我国自80年代初开始,对BTV的流行病学、诊断、防治研究以来,现已取得了显著进展。但是对BTV的分子生物学研究甚少,鉴于国内在BTV研究上的差距,本文对BTV研究的主要工作及进展作一综述。期望为国内BTV的研究在方法和方向上提供参考依据。

1 BTV 结构特征

电子显微技术的应用,已对BTV结构进行了广泛的研究。认为是内外双层膜、且有心的二十面体,呈对称性^[3]。用电子低温显微镜和计算机成像重建方法测定,单颗粒BTV的三维结构为3nm,左手构型的表面上的三角形样(T)数为13,直径81nm^[2]。SDS-PAGE凝胶电泳表明,BTV由10个大小不同的双链RNA(dsRNA)节段组成。分别编码7个结构多肽(Vp1—Vp7)和

3个非结构多肽(NS1—NS3)。外膜由2种主要多肽(VP2—VP5)构成,内膜由两种主要多肽(VP7和VP3)构成,内膜包围着3种少量蛋白(VP1、VP4、VP6)和基因组^[3,4]。每个病毒粒子中这些多肽的拷贝数还不清楚。与呼吸道的病毒和轮状病毒不同,BTV外壳呈絮状,与内膜连接疏松。故病毒粒子显示依赖于RNA聚合酶的活性^[4]。

2 BTV 基因组结构特征及功能

用琼脂糖凝胶电泳分离、吸附杂交、缺口转移、cDNA克隆筛选等方法,现已将BTV-10基因组片段的序列全部测定,总基因组由19218个bp组成,总分子量为 13×10^6 道尔顿。是迄今认为分子量最大的RNA病毒^[5]。聚丙烯酰胺凝胶电泳将基因组的10个基因分为3个大节段(L1-3),3个中节段(M4-6)和4个小节段(S7-10)。最大节段(L1)由3954个碱基组成,L2的碱基为2926,L3为2772,M4为2011,M5为1638;S7为

国家自然科学基金资助课题

1997-04-21收稿

1155; S8 为 1124; S9 为 1046; 最小片段 (S10) 由 822 个碱基组成。mRNA 的 5' 和 3' 末端存在非编码的保守序列。5' 末端为 GUUAAA (5' → 3')^[6] 通过血清中和试验证实, BTV 的血清型至少有 24 个^[6]。因为 BTV-10 研究的比较详尽, 其基因末端序列有一定特点。L2 和 L3 的 AUG 两侧有一致的碱基序列 A / GCCAUGG, 推测可能在复制的中间物-反意 RNA 起始过程中起作用。推测末端保守序列可能是病毒转录酶催化转录起始识别的信号, 或与 RNA 复制、核糖体和正链 mRNA 结合以及病毒组装有关^[6]。探针检测表明, BTV 基因组的 10 个片段, 在不同地区和血清型各异的情况下, RNA 序列也不尽相同^[7]。Bookin 等人用 RNA-RNA 杂交检测了 6 种不同血清型的 BTV (South Africa 1., Australia 1. Cyprus3.4, North America10 和 Australia20 型) 基因组片段 RNA 序列的同源性程度, 结果是, BTV (Cyprus) 探针既可与本身的基因组 10 个片段杂交, 也可与 BTV-1 (SA), BTV-4, BTV-10 多数基因杂交, 而与来自 Australia 的 BTV1 和 BTV20 杂交程度较低。表明 BTV3 (Cyprus) 与 Australia 株同源性程度低。进一步分析表明, BTV3 只是不与 BTV1 (SA)、BTV4、BTV10 和 BTV20 的基因 L2 和 L5 杂交, 该探针与 BTV1 (SA)、BTV4 和 BTV10 的 S7 以及 BTV20 和 BTV1 (AUS) 的 S8 杂交程度也较低。用 BTV4 做探针可与 Cyprus, Africa, North America (BTV1 (SA), BTV3, BTV10) 形成高度杂交。同样与基因组的 L2 和 M5 杂交不显著。与 BTV3 的 S7 杂交程度也较低。但是 BTV4 探针与 BTV20 的 M5 可明显杂交。用 BTV20 和 BTV10 作探针也获得类似的结果^[8]。对克隆的 BTV 单拷贝基因片段序列研究表明, BTV10 (NA) 和 BTV1 (SA) 的基因 2 (L2) 之间约 58% 的同源序列^[9], 二者的基因片段 5 (M5) 之间的同源序列约 68%。同一地区不同血清型 BTV 的基因片段 3 (L3) 约 95-98% 的同源序列。不同血清型的 L2 和 M5 同源性较低, 提示这两个基因可用于 BTV 血清特异性的检测。BTV10 内各基因碱基含量的测定还表明, 同一血清的 L2、L3、M5 和 S10G% + C% 总量变化不大^[9, 10]。根据 BTVL3 和 S7 的同源序列高于 L2 和 M5 而低于其它基因, 推论除 L2 和 M5 外, 对其它基因同源性序列的分析有助于了解同一血清型的不同地区毒株之间的差异^[8]。

3 BTV 基因产物及生物学功能

用分离的 dsRNA 基因组体外翻译, 然后根据各基因与所编码的结构蛋白和非结构蛋白的关系, 现已将各基因编码的蛋白质及其分子量和功能搞清^[4, 6]。L1 编码核心结构蛋白 (Vp1), 由 1302 个氨基酸 (aa) 组成, L2 编码外壳蛋白 (Vp2) 为血清特异性抗原, 有 966aa, L3 编码核心结构蛋白 (Vp3) 为血清组特异抗原, 有 901aa, M4 编码核心蛋白 (Vp4) 有 654aa, M5 编码外壳蛋白 (Vp5) 为型特异性抗原, 有 526aa; M6 编码非结构蛋白 (NS1), 有 552aa, S7 编码核心结构蛋白 (Vp7) 为血清组特异抗原, 有 349aa, S8 编码非结构蛋白 (NS2) 为胞浆组分, 有 357aa; S9 编码核心结构蛋白 (Vp6), 有 328aa, S10 编码非结构蛋白 (NS3), 有 229aa 组成。还有报道 BTV 的 L3 也编码 Vp2, 而 M6 也编码 Vp5^[11]。新近研究表明, Vp1、Vp4 和 Vp6 来自细胞溶解产物, 含量少, 为病毒的核心结构蛋白, Vp1 和 Vp4 分别是 BTV 指导 RNA 聚合酶和鸟苷酸转移酶的成分^[12]。Vp6 蛋白可以在体外用 S9 基因合成^[13]。发现 Vp6 在不同血清型的 BTV 中呈高度保守^[14]。SDS-PAGE 电泳可将 Vp6 分为 Vp6 和 Vp6a。研究发现从 *E. coli* 细胞溶解物中纯化的 Vp6 蛋白具有高度的免疫原性, 可诱导产生高滴度、单一特异性的多克隆抗血清。通过电泳和缺失突变分析可知, Vp6 的 C 端具核酸连接位点^[15]。推测这种连接核酸的特性可能有利于 BTV 的 10 个基因段的包装, 也可能是在干扰或降低寄主细胞代谢过程中起作用。据分析, Vp6 蛋白与甲基化酶在氨基酸残基上有 40%~45% 相似, 其序列有 20~25% 是一致的, 表明 Vp6 蛋白可能是 BTV mRNA 5' 末端甲基化酶和帽子酶的复合物成分。对 Vp6 具有 dsRNA 旋转酶活性, 在 RNA 转录和复制前解开 BTV dsRNA 双链的研究正在进行中^[16]。

Vp3 和 Vp7 是病毒核心的主要结构蛋白, 含有组特异抗原决定簇。Helen 1993 年用多基因表达载体, 共表达了 BTV 的 Vp3 和 Vp7, 获得了类核心颗粒。根据其大小 (250S)、电镜外形和化学计量法测算, 体外合成的类核心颗粒与 BTV 的核心颗粒相似。研究表明, Vp7 以三聚体形式存在于 Vp3 表面, 二者的形成相互依赖^[17]。在合成类核心颗粒时, Vp7 起关键作用, 进一步研究可知, 是 Vp7 的 C 端与类核心颗粒形成有关, 而 N 端的 11 个氨基酸残基正是狂犬病毒 G 蛋白抗原决定部位。因 Vp7 蛋白可以被狂犬病毒抗体识别^[18]。

免疫沉淀技术检测表明, 可溶性 Vp2 多肽可被来

自兔子和绵羊的中和抗体识别,从而能保护绵羊免受病毒感染。也发现,Vp2不仅参于细胞吸附反应,也参于绵羊红细胞的血凝反应^[9],Vp2有一种亲水性,与Vp3的亲水区比较,含有较多的带电氨基酸,(组氨酸284,Vp3为222),半胱氨酸含量是Vp3的3倍还多。Vp2的氨基酸序列分析表明,BTV10,11,17之间关系密切,它们的Vp2都由956个氨基酸组成,但BTV17的Vp2序列第601位残基缺失;而BTV-13和BTV-2两株与BTV-10,11,17的关系较疏远,与BTV-1关系较密切。Vp2氨基酸序列中至少有5个高变区,整个分子中也有许多明显的保守区^[4,9]。Vp5是唯一的糖基化蛋白。研究发现,糖基化在Rous肉瘤病毒中与病毒的感染性有关,在人副流感病毒中,与细胞的受体相互作用。BTV中的Vp5在病毒致病过程中,与以上提到的糖基化蛋白的作用分不开。研究发现,病毒外表面的糖蛋白与病毒侵入细胞引起机体的神经损伤有关。Vp5的其它生物学功能还不能肯定,但是在Vp2中和反应中加入表达的Vp5可增加中和免疫反应^[20]。

NS1和NS2分别由M6和S8编码。属非结构蛋白。在BTV感染的细胞中很容易检测到。二种蛋白存在于细胞浆内,通过BTV10的NS1基因表达的研究可知,NS1在昆虫细胞内呈杆状结构富含半胱氨酸、色氨酸和酪氨酸、带电氨基酸含量少。计算机分析该蛋白近C端有几个疏水氨基酸区。该蛋白的一级结构对三、四级结构的影响以及在感染细胞中形成的小管作用等有待进一步研究^[21]。通过昆虫细胞中重组病毒的研究表明,NS2是病毒编码的磷酸化蛋白,在细胞内形成包含体。肽链中苏氨酸和组氨酸含量少,C末端大量出现半胱氨酸。C端和N端均有疏水区。二级结构分析可知,NS2主要由 β 折叠组成,易与单链RNA结合,在RNA转录过程中充当凝聚作用,使10条RNA单链模板聚集在一起,促进双链RNA的合成^[22]。

由最小基因S10编码的二种非结构蛋白(NS3和NS3A),它们的结构和功能仍不甚清楚。用T7细胞质瞬时表达系统在哺乳动物细胞中表达了这两种蛋白。缺失突变表明(缺失第一个起始密码AUG),第二个起始密码负责NS3A蛋白的合成。细胞化学表明,NS3和NS3A是在合成后运输到高尔基体的成分。结论是S10基因产物是整合寄主细胞膜的糖蛋白^[23]。另据报道,这两种蛋白能和同型或异型BTV感染的羊血清发生强交

叉反应,提示,S10基因产物可能具组抗原性质^[24]。

4 现代生物技术在BTV研究上的应用

由于常规检测BTV的方法,如琼脂免疫扩散(AGID)和血清中和试验,不能检测出低水平上感染的BTV毒株。因而Anderson 1984年发展了ELISA法,用于检测早期被感染动物中的BTV抗体^[25]。但是仍缺乏高度敏感和特异性的试验对BTV抗原的检测。这些血清学技术又不能直接对组织样本(如血和精液)中的病毒的检测。而且在某些血清学试验中,BTV与动物流行性出血热病毒,环状病毒有交叉反应^[26]。故现代生物技术的应用就显得重要了。

4.1 单克隆抗体(Mcab)在BTV研究上的应用

Anderson 1984年制备了BTV特异性单克隆抗体,采用ELISA竞争法,检测BTV Vp7蛋白排除了血清学上有交叉反应的其它相关病毒。缺点是不能检测样本中早期感染或病毒本身的存在^[27]。

4.2 寡核苷酸指纹图谱分析(Oligonucleotide Fingerprinting)。

该技术是将纯化的病毒核酸用同位素标记后,降解成寡核苷酸片段之后在凝胶板中进行双向电泳,最后经放射自显影,显示出病毒的指纹图谱。可用于变异病毒株的鉴定,确定病毒基因来源。Sugiyama等1981年对BTV-10(CA),BTV-11(station)和BTV-11(Idaho)的10个dsRNA节段进行指纹图谱分析,结果表明,BTV-11(station)和BTV-11(Idaho)的S9有明显差异,其余片段基本一致,而BTV-11(Idaho)与BTV-10(CA)比较,两者S9非常相近,有32个寡核苷酸一致,差异只在于BTV-10有12个独特的寡核苷酸^[28]。Sugiyama 1982年对BTV-11与BTV-17的RNA指纹图谱比较,推论BTV-17是由BTV-11点突变的积累而产生的新血清型^[28]。

4.3 聚合酶链反应(Polymerase Chain Reaction PCR)

以BTV mRNA为模板反转录cDNA,以PCR扩增后再进行限制性酶切分析,在BTV的核酸研究、血清型分类及检测上得到了广泛的应用。Wade-Eyans, 1990年报道,用PCR直接检测样本中的BTV的方法。该法从BTV-1(SA)的基因S7入手,设计了与S7两端互补的二段20个寡核苷酸的引物,PCR扩增的DNA含有S7的2个末端区,代表了全长的cDNA,检测了不同血清型BTV的S7(AUS)、2、3、4、10、16和20)。

感染后 7d 取全血 (每毫升含血 1.6×10^3 TCID₅₀) 和 14d 取红血球 (16 TCID₅₀ / ml), 可获得阳性结果, 但是感染后 28d 取样 (< 1.6 TCID₅₀ / ml) 时, PCR 就不能检出样本中的 BTV. 认为 PCR 对 BTV S7 的检测绝对敏感, 它不仅能检出样品中 S7 dsRNA 少到 6 个分子的含量, 而且能用于分析感染过 BTV 的牛红血球和白血球. 对不同 BTV 血清型的检测, 几乎可检出 24 个血清型的差异. 建议, 这种 PCR 既可诊断, 也可用于 BTV cDNA 的合成. 研究还发现, 用改变 PCR 反应条件或设计合适引物, 可能有助于增加 PCR 诊断 BTV 的特异性^[29].

4.4 核酸的分子杂交

核酸分子杂交法测定病毒, 是用高度特异性的探针检测病毒基因组所有的核苷酸序列的方法, 将具有互补核酸链间高度亲和力的物质检出. Mertens 等人 1987 年用吸附和探针技术, 通过基因组 dsRNA 杂交, 分析了 6 种不同分离株 (BTV-1 (SA), 3, 4 (CYP), 10 (North Ameroca), 1, 20 (Austriolia)) 之间的关系. 试验的探针是 BTV-3 (cyprus). 结果表明, 这种探针对本身的 10 个基因片段和 Cypriat, African 株的大部分基因片段均可杂交, 但是与 Australia BTV-1 和 BTV-20 的基因组杂交程度较低, 表明 BTV-3 (Cyp) 与 BTV-1, 20 (AUS) 的基因间同源性低. 从 BTV-20 的 L2 和 L3 的杂交情况看, L3 可与其他血清型的探针杂交. 因而证实了 BTV 中基因 2 (L2) 具血清特异性^[17]. Mattos, 等人 1989 年报道用重组 DNA 探针进行 BTV 血清型特异性的鉴定. 制备了 BTV-17 的基因 2 (L2) 为探针, 与不同地区来源的 BTV 血清型 10, 11, 13, 17 进行点杂交, 发现这种探针只与 BTV-17 株和不同地区分离的 BTV-17 株杂交, 而与其他血清型株无杂交反应, 表明从编码 BTV 血清特异型的基因中发展的 DNA 互补探针可有效地用于鉴定血清型特异性. Squire 等人 1986 年报道来自 BTV 三个分节的探针具有不同的杂交识别能力, L2 探针只与同来源血清型的 BTV 杂交, 而 S7 探针则可与 BTV 的 5 个血清型杂交, 表明血清组特异性和型特异性诊断探针在诊断 BTV 中的用途^[30].

总之, 自 80 年代以来, 国外对 BTV 的研究, 从病毒的结构蛋白和非结构蛋白的功能、氨基酸序列结构特

征、基因组结构特征及功能基因的克隆及序列分析以及现代生物学技术在 BTV 研究和检测中的应用诸方面已在逐渐深入. 笔者认为, 应借鉴国外在 BTV 研究中的方法和经验, 对国内蓝舌病毒基因之间的关系及差异进行深入研究, 将有助于阐明病毒的遗传规律, 进行病毒分类. 对抗 BTV 的多肽基因片段的克隆, 可望生产基因工程疫苗.

参 考 文 献

- [1] Van Gijk A A. *Virology*, 1980, 104:347.
- [2] Studdert M T J. *Virology*, 1996, 29:509.
- [3] Murphy F A. *J Gen Virol*, 1971, 13:273.
- [4] Mertens P P C. *Virology*, 1984, 135:207.
- [5] Roy P. *Virus Res*, 1989, 13:179.
- [6] Rao C D. *J Virol*, 1983, 46:378.
- [7] Bodkin D K. *Virology*, 143:55.
- [8] Mertens P P C. *Virology*, 1987, 161:438.
- [9] Purdy M A. *J Virol*, 1985, 55:826.
- [10] Purdy M A. *J Gen Virol*, 1986, 67:957.
- [11] Mertens P P C. *Virology*, 1985, 140:55.
- [12] Le Blois H T. *Virology*, 1992, 189:757.
- [13] Sangar D V. *Double-strand RNA Virus*, (R. W. Compans and D. H. L. Bishop, Eds), Elsevier, New York, 1983, 183~191.
- [14] Hwang G V. *Virus Res*, 1992, 24:315.
- [15] Roy P. *J Virol*, 1990, 64:1.
- [16] Emiko H Y. *J Virol*, 1994, 68:3604.
- [17] Loudon P T. *Virology*, 1991, 180:798.
- [18] Helen L B. *J Viro*, 1993, 67:353.
- [19] Heismans H. *Double-strand RNA Viruses*, R. W. Compans (Eds) Elsevier Science Publishing, Inc. New York, 1983, 165~172.
- [20] Poy P T J. *Virus*, 1990, 64:1998.
- [21] Urakawa T. *J Virol*, 1988, 62:3918.
- [22] Thomas C P. *J Hen Virol*, 1990, 71:203.
- [23] Xiao Y W. *J Virol*, 1992, 66:7104.
- [24] French T J. *J Virol*, 1989, 63:3270.
- [25] Anderson J. *J Immunol Methods*, 1984, 74:139.
- [26] Moore D L. *Arch Ges Virusforsch*, 1972, 37:282.
- [27] Sugiyama K. *Virology*, 1981, 114:210.
- [28] Sugiyama K. *Am J Epidemiology*, 1982, 10:59.
- [29] Wade-Evans A W. *J Virol Methods*, 1990, 30:15.
- [30] Squire K R E. *Am J Vet Res*, 1986, 47(8):1785.