



蓝舌病病毒基因节段 2 与 6 的重配导致病毒血清型与增殖特性的改变

李占鸿¹ 宋子昂² 李卓然¹ 杨振兴¹ 李华春*¹ 杨恒*¹

1 云南省畜牧兽医科学院 云南省热带亚热带动物病毒病重点实验室 云南 昆明 650224

2 云南农业大学动物医学院 云南 昆明 650201

摘要:【背景】蓝舌病病毒(Bluetongue Virus, BTV)是一种侵染反刍动物的虫媒病毒,基因重配可引起病毒的快速变异。【目的】通过我国强致病性 BTV-16 型毒株与弱致病性 BTV-4 型毒株间 Seg-2 与 Seg-6 基因节段的重配,探讨病毒基因重配与表型变异之间的关系。【方法】采用全长 cDNA 扩增与高通量测序获取 BTV-16/V158 的全基因组序列,构建病毒的真核表达质粒,通过免疫荧光与 Western Blot 检测目的蛋白表达;通过 RT-PCR、体外转录与细胞转染等方法建立 BTV 反向遗传体系并获取基因重配病毒;通过蚀斑分析、增殖曲线分析与血清中和试验,比较亲本毒株与基因重配病毒在生物学特性上的差异。【结果】获取的 BTV-16/V158 毒株基因组大小为 19 186 bp,与中国和印度 BTV-16 型毒株具有最近的亲缘关系;将表达 BTV VP1、VP3 与 NS2 的真核表达质粒转染细胞,检测到目的蛋白的表达;将 BTV 的 7 种真核表达质粒与基因组 ssRNA 共转染 BHK-21 细胞,成功拯救出与亲本毒株生物学特性一致的病毒;将 BTV-16/V158 毒株的 Seg-2 与 Seg-6 替换为 BTV-4/YTS4 毒株的对应基因节段,拯救出基因重配病毒 BTV-16/V158-RG (BTV-4/S2, S6);与亲本病毒相比较,基因重配病毒在 BHK-21 细胞上形成的蚀斑变小,增殖能力减弱,血清型由 BTV-16 型转化为 BTV-4 型。【结论】建立了我国流行 BTV-16 型毒株的反向遗传体系, BTV Seg-2 与 Seg-6 的基因重配可引起病毒在细胞上增殖能力的改变与血清型改变。研究结果为 BTV 基因重配致病毒变异与新型基因工程疫苗的研究提供了基础。

关键词: 蓝舌病病毒, 反向遗传, 基因重配, VP2 与 VP5 基因, 生物学特性

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31760744, 31802177); National Special Fund for Agro-Scientific Research in the Public Interest of China (201303035); Young and Middle-Aged Academic and Technology Leader Reserve Talents Training Project of Yunnan Province (2017HB055)

*Corresponding authors: E-mail: LI Huachun: li_huachun@hotmail.com; YANG Heng: yangheng2008.cool@163.com

Received: 17-08-2020; Accepted: 13-09-2020; Published online: 23-11-2020

基金项目: 国家自然科学基金(31760744, 31802177); 国家公益性行业(农业)专项(201303035); 云南省中青年学术和技术带头人后备人才培养项目(2017HB055)

*通信作者: E-mail: 李华春: li_huachun@hotmail.com; 杨恒: yangheng2008.cool@163.com

收稿日期: 2020-08-17; 接受日期: 2020-09-13; 网络首发日期: 2020-11-23

Gene reassortment of segment 2 and 6 altered serotype and proliferation of bluetongue virus

LI Zhanhong¹ SONG Ziang² LI Zhuoran¹ YANG Zhenxing¹ LI Huachun^{*1}
YANG Heng^{*1}

1 Yunnan Tropical and Subtropical Animal Virus Disease Laboratory, Yunnan Academy of Animal Husbandry and Veterinary Sciences, Kunming, Yunnan 650224, China

2 College of Veterinary Medicine, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201, China

Abstract: [Background] Bluetongue virus (BTV) belongs to arbovirus that infects ruminants and varies frequently due to gene reassortment. [Objective] To explore the correlation of gene reassortment and phenotypic variation of BTV caused by reassortment of the Seg-2 and Seg-6 between virulent BTV-16 strain and the weakly pathogenic BTV-4 strain. [Methods] The full genome sequence of BTV-16/V158 was obtained by full-length cDNA amplification (FLAC) and next generation sequencing (NGS). Eukaryotic expression plasmids of BTV were constructed and their expressed proteins were verified through immunofluorescence assay (IFA) and Western Blot (WB). Reverse genetic system of BTV was established through RT-PCR, *in vitro* transcription and cell transfection, and reassortant BTVs were rescued using the established system. The differences in biological characteristics between parental and reassortment BTV were compared through viral plaque formation assay, proliferation curve analysis, and serum neutralization test. [Results] The genome of BTV-16/V158 strain was 19 186 bp in length, which shared the closest relationship with the Chinese and Indian BTV-16 strains. The expressions of target proteins were confirmed by IFA and WB in the cells which were transfected with eukaryotic plasmids expressed VP1, VP3 and NS2 of BTV. BTV strain, named as BTV-16/V158-RG, was successfully recovered by transfecting BHK-21 cells with BTV eukaryotic expression plasmids and genomic ssRNA, which showed consistent biological characteristics with its parental virus BTV-16/V158. Furthermore, reassortment virus, named as BTV-16/V158-RG (BTV-4/S2, S6), which carried the Seg-2 and Seg-6 genes of BTV-4 strain in a backbone of BTV-16/V158 was successfully rescued. Compared with its parent virus, BTV-16/V158-RG (BTV-4/S2, S6) showed smaller viral plaques and weak proliferation on BHK-21 cells, with its serotype converted from BTV-16 to BTV-4. [Conclusion] The reverse genetic system of Chinese BTV-16 strain was successfully established. Reassortment of the Seg-2 and Seg-6 altered the proliferation and serotype of the viruses.

Keywords: bluetongue virus, reverse genetics, reassortment, VP2 and VP5 gene, biological characteristics

蓝舌病病毒(Bluetongue Virus, BTV)感染引起的动物蓝舌病(Bluetongue, BT)是一种严重侵害反刍动物的烈性传染病,世界动物卫生组织将BT列为法定报告的动物疫病,我国也将其列为一类动物疫病^[1]。BT的流行和暴发给牛羊养殖业造成巨大的经济损失,影响畜产品正常国际贸易^[2]。2006年,非洲来源的BTV-8型毒株侵入荷兰,迅速蔓延至欧洲大部分国家,导致欧洲有记录以来最为严重的BT暴发,直接经济损失高达30亿美元^[3],该病成为国际上继口蹄疫与禽流感后备受关注的动物疫病之一。

BTV基因组大小约20 kb,由10个节段(Seg-1–Seg-10)的双链RNA(Double-Stranded RNA, dsRNA)组成,可编码7种结构蛋白(VP1–VP7)和5种非结构蛋白(NS1、NS2、NS3、NS3a与NS4)^[4]。BTV的外层衣壳由Seg-2与Seg-6编码的VP2与VP5蛋白组成,VP2蛋白介导病毒对细胞表面受体的特异吸附,参与病毒粒子从感染细胞中的释放,诱导BTV特异性中和抗体的产生,决定着病毒的血清型^[5];VP2蛋白高度变异,其氨基酸序列在不同血清型毒株间的差异在22.7%–72.9%之间^[6]。VP5蛋白变异度略低

于 VP2 蛋白, 具有细胞膜定位信号结构域, 在成熟病毒粒子的装配中起着重要作用; VP5 虽不决定 BTV 的血清型, 但可通过影响 VP2 的构象影响病毒中和抗体的产生^[7]。BTV 血清型众多, 随着 BTV-25 型-BTV-28 型的陆续发现, 病毒的血清型已由过去的 24 种(BTV-1-BTV-24)增加至 28 种(BTV-1-BTV-28)^[8-11]。

基因重配是 BTV 进化与变异的主要动力之一, 不同血清型毒株之间、弱毒疫苗株与野毒株之间、本地流行毒株与外来侵入毒株之间均可发生基因重配, 引起病毒的变异^[12]。长期以来, 由于缺乏 BTV 反向遗传技术体系, 难以系统地研究 BTV 基因重配与病毒变异之间的关系。Boyce 等^[13]建立的 BTV 反向遗传体系, 推动了 BTV 基因重配致病毒变异^[14]与新型疫苗^[15]等方面的研究。我国的 BTV 反向遗传研究起步较晚, 虽已有 BTV 反向遗传体系建立的报道^[16-17], 但使用的亲本毒株为南非参考毒株, 而且未见 BTV 基因重配与病毒变异关系的报道。我国存在多种血清型 BTV 的流行, 不同血清型毒株的致病性差异较大, 通过反向遗传技术开展我国流行 BTV 毒株基因重配的研究, 不仅有助于理解我国 BTV 毒株致病性差异的原因, 也可为 BTV 新型基因工程疫苗的研究提供基础。

2013-2017 年, 本实验室在全国 8 个省(自治区)设立的哨兵动物中相继分离出了 12 种血清型(BTV-1、BTV-2、BTV-3、BTV-4、BTV-5、BTV-7、BTV-9、BTV-12、BTV-15、BTV-16、BTV-21、BTV-24)的 BTV 共计 300 余株^[18-21]。动物感染实验结果显示, 我国的 BTV-16 型毒株在绵羊上具有较强的致病性, 而 BTV-4 型毒株的致病性较弱^[22]。Seg-2 与 Seg-6 是 BTV 基因组中变异度最大、多样性最高的 2 个基因节段, 其编码的 VP2 与 VP5 蛋白不仅决定着病毒的血清型, 也在病毒与细胞的特异性吸附、病毒粒子的组装中发挥关键作用^[5-7]。我国不同血清型 BTV 毒株间的毒力差异与 Seg-2 和 Seg-6 之间是否存在关联, 是

一个有待探索的科学问题。本研究以我国流行的 BTV-16 型毒株为起始材料, 建立 BTV 的反向遗传体系; 以 BTV-4 型毒株的 Seg-2 与 Seg-6 替换 BTV-16 型毒株对应的基因节段, 分析基因重配病毒与亲本病毒在生物学特性上的差异, 以期为理解我国不同血清型 BTV 毒力差异的分子机制与新型疫苗的研究提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 细胞、病毒、阳性血清和抗体

BHK-21 细胞(幼仓鼠肾细胞)由本实验室保存; BTV-16 型毒株(BTV-16/V158)于 2016 年分离自广西壮族自治区隆安县设立的哨兵牛, BTV-4 型毒株(BTV-4/YTS4)于 1996 年分离自云南省芒市设立的哨兵牛, 已公布全基因组序列^[23], 羊抗 BTV-4 型与 BTV-16 型毒株阳性血清, 均由实验室保存。鼠抗 BTV VP7 蛋白单克隆抗体由哈尔滨兽医研究所惠赠, 鼠抗 BTV NS2 蛋白单克隆抗体、兔抗 BTV VP1 蛋白多克隆抗体由本实验制备保存; HRP 标记羊抗鼠 IgG 二抗、HRP 标记羊抗兔 IgG 二抗、FITC 标记羊抗鼠 IgG 二抗、DyLight 594 标记的羊抗兔 IgG 二抗购自北京爱必信生物技术有限公司。

1.2 主要试剂和仪器

胎牛血清与 MEM 培养基, Gibco 公司; RNA 提取试剂 RNAiso Plus、逆转录酶、高保真 DNA 聚合酶、限制性内切酶、核糖核酸酶 S1、一步法 RT-PCR 试剂盒、高分辨率琼脂糖、DNA 纯化试剂盒、DNA Marker、RNA Marker 和同源重组克隆试剂盒, 宝生物工程(大连)有限公司; RNA 纯化试剂盒、T4 RNA Ligase I 与 RNA 体外转录试剂盒, NEB 公司; DNA 文库构建试剂盒, Illumina 公司; 真核表达质粒载体 pCI-neo, Promega 公司; 聚偏二氟乙烯(PVDF)膜、RIPA 细胞裂解液与去内毒素质粒提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 转染试剂 TransIntro EL, 北京全式金生物技术有限公司; Lipofectamine 2000, Thermo Fisher 公司。

PCR 仪, Applied Biosystems 公司; 电泳仪、核酸凝胶成像系统及核酸浓度测定仪, Bio-Rad 公司; 倒置荧光显微镜, Olympus 公司; 透射电子显微镜, HITACHI 公司。

1.3 BTV 全基因组扩增与高通量测序

将 BTV-16/V158 接种生长为单层的 BHK-21 细胞, 待出现细胞病变(Cytopathic Effect, CPE), 于 4 °C 条件下 8 000 r/min 离心 20 min 收集细胞, 使用 RNA 提取试剂 RNAiso Plus 提取细胞总 RNA^[24]。在提取的核酸中加入 S1 核酸酶, 降解宿主细胞单链 RNA (Single-Stranded RNA, ssRNA), 使用 RNA 纯化试剂盒纯化病毒基因组 dsRNA^[24]。取纯化后的病毒核酸参照 Maan 等^[25]报道的全长 cDNA 扩增技术(Full-Length Amplification of cDNAs, FLAC)进行病毒基因组 cDNA 的合成。以合成的 cDNA 为模板, 使用高保真 DNA 聚合酶进行 BTV 基因组的 PCR 扩增^[24], 电泳检测病毒基因组扩增的完整性。

纯化病毒基因组 PCR 扩增产物, 采用 DNA 文库构建试剂盒, 按说明书进行 DNA 文库的构建。将构建的文库在高通量测序(Next Generation Sequencing, NGS)平台 Illumina Novaseq 6000 上进行测序。使用 Trimmomatic 软件^[26]对获取的原始 Reads 数据进行质量控制与滤过处理, 使用 Edena (V3.131028)^[27]与 SOAPdenovo (V2.04)软件^[28]对滤过后的 Reads 进行基因组的 *de novo* 组装。使用 MEGA X 软件^[29]进行 BTV-16/V158 基因组序列的比对并构建系统发育树。

1.4 真核表达质粒的构建

根据 BTV-16/V158 毒株的全基因组序列, 设计 7 对引物(表 1)用于该毒株 Seg-1、Seg-3、Seg-4、Seg-5、Seg-7、Seg-8 和 Seg-9 等 7 个基因节段开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)的扩增。以 BTV-16/V158 基因组 dsRNA 为模板, 通过一步法 RT-PCR 进行目的基因的扩增, 将扩增的

PCR 产物进行电泳回收纯化。使用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Xba* I 对 pCI-neo 质粒进行酶切, 通过重组克隆试剂盒进行目的 DNA 片段的克隆。对构建的真核表达质粒进行测序验证, 使用去内毒素质粒提取试剂盒提取构建的真核表达质粒, -80 °C 保存备用。

1.5 BTV ssRNA 的体外转录

根据 BTV-16/V158 毒株与 BTV-4/YTS4 毒株全基因组序列设计 12 对引物(表 1), 分别用于 BTV-16/V158 毒株 Seg-1–Seg-10 和 BTV-4/YTS4 毒株 Seg-2 与 Seg-6 全长序列的 RT-PCR 扩增。上游引物序列长度在 45–47 bp 之间, 引物 5'端含有 T7 启动子序列, 紧随其后的是 22–23 bp 的 BTV 序列; 下游引物长度为 24–27 bp, 与 BTV 3'末端序列互补。

以一步法 RT-PCR 扩增 BTV-16/V158 毒株 Seg-1–Seg-10 与 BTV-4/YTS4 毒株 Seg-2 与 Seg-6 节段的全长序列, 使用 DNA 纯化试剂盒对扩增的 PCR 产物进行纯化, 测定核酸浓度。取 0.5–0.8 μg 纯化后的 BTV 各基因节段 DNA 为模板, 使用 RNA 体外转录试剂盒, 按说明书进行 BTV 各节段 ssRNA 的体外转录。使用 RNA 纯化试剂盒纯化转录的 ssRNA, 测定纯化产物的核酸浓度, 进行电泳检测, 将 ssRNA 分装后冻存于 -80 °C 备用。

1.6 免疫荧光与 Western Blot

取构建的 BTV VP1、VP7 和 NS2 蛋白真核表达质粒转染 BHK-21 细胞。转染后 24 h, 以甲醛/丙酮(1:1 体积比混合)固定转染细胞, 以 0.2% (质量体积分数)的 Triton X-100 进行细胞的透化, 使用 5%脱脂奶进行封闭。分别使用鼠抗 BTV VP7 与 NS2 蛋白的单克隆抗体, 兔抗 BTV VP1 蛋白多克隆抗体作为一抗, 以 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 或者 DyLight 594 标记的羊抗兔 IgG 作为二抗, 对转染细胞进行免疫荧光染色, 在倒置荧光显微镜下观察细胞的特异性荧光信号。

表 1 本研究中使用的引物

Table 1 The primers used in this study

引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequence (5'→3')	PCR 产物大小 PCR products size (bp)
BTV-S1/ORF-F	cactataggctagccATGGTCGCAATCACCGTGCAAG	3 909
BTV-S1/ORF-R	ccgccccggctgactTCAAACGAATTGGTTCTCGAGA	
BTV-S3/ORF-F	cactataggctagccATGGCTGCTCAGAACGAGCAAC	2 706
BTV-S3/ORF-R	ccgccccggctgactCTACACAGTCGGCGCAGCCAGC	
BTV-S4/ORF-F	cactataggctagccATGCCTGAGCCACACGCAGTAC	1 935
BTV-S4/ORF-R	ccgccccggctgactTCATAAGTGACGCAGTAATTCA	
BTV-S5/ORF-F	cactataggctagccATGGAGCGCTTTTTGAGAAAAT	1 659
BTV-S5/ORF-R	ccgccccggctgactCTAATACTCCATCCACATCTGC	
BTV-S7/ORF-F	cactataggctagccATGGACACTATCGCAGCAAGAG	1 050
BTV-S7/ORF-R	ccgccccggctgactCTACACATAAGCGGCGCGCGCG	
BTV-S8/ORF-F	cactataggctagccATGGAGCAAAAGCAACGTAAGT	1 065
BTV-S8/ORF-R	ccgccccggctgactCTAGACGCCGACCGCAATATG	
BTV-S9/ORF-F	cactataggctagccATGTCAGCTGCGATACTACTTG	993
BTV-S9/ORF-R	ccgccccggctgactTTAGAGGTGATCAATTAATGA	
BTV16-S1/RG-F	<i>GGATCC</i> <i>TAATACGACTCACTATA</i> GTTAAATGCAATGGTCGCAATC	3 944
BTV16-S1/RG-R	GTAAGTGTAATGCGGCGCTTGCTT	
BTV16-S2/RG-F	<i>GGATCC</i> <i>TAATACGACTCACTATA</i> GTTAAAAACGTTAGCCTAGAGA	2 935
BTV16-S2/RG-R	GTAAGTGTAACGCGCCCAATCC	
BTV16-S3/RG-F	<i>GGATCC</i> <i>TAATACGACTCACTATA</i> GTTAAATTTCCGTAGCTATGGC	2 772
BTV16-S3/RG-R	GTAAGTGATCCCCGCTGCCGCTA	
BTV16-S4/RG-F	<i>GGATCC</i> <i>TAATACGACTCACTATA</i> GTTAAAAATGCCTGAGCCACA	1 981
BTV16-S4/RG-R	GTAAGTTTTACATGCCCCCTCAC	
BTV16-S5/RG-F	<i>GGATCC</i> <i>TAATACGACTCACTATA</i> GTTAAAAAAGTTCTCTAGTTGG	1 764
BTV16-S5/RG-R	GTAAGTTGAAAAGTTCTAGTAGAG	
BTV16-S6/RG-F	<i>GGATCC</i> <i>TAATACGACTCACTATA</i> GTTAAAAAGATCCCTACGATTG	1 637
BTV16-S6/RG-R	GTAAGTGTAAGTCCCGAGATTACC	
BTV16-S7/RG-F	<i>GGATCC</i> <i>TAATACGACTCACTATA</i> GTTAAAAATCTCTAGAGATGGA	1 154
BTV16-S7/RG-R	GTAAGTGTAATCTTAGAGACGTATGA	
BTV16-S8/RG-F	<i>GGATCC</i> <i>TAATACGACTCACTATA</i> GTTAAAAAATCCTTGAGTCATGG	1 125
BTV16-S8/RG-R	GTAAGTGTAATAATCCCCCTAACC	
BTV16-S9/RG-F	<i>GGATCC</i> <i>TAATACGACTCACTATA</i> GTTAAAAAATCGCATATGTCAGC	1 052
BTV16-S9/RG-R	GTAAGTGTAATAATCGCACTACGTCAAG	
BTV16-S10/RG-F	<i>GGATCC</i> <i>TAATACGACTCACTATA</i> GTTAAAAAAGTGTGCGTGCCATGC	822
BTV16-S10/RG-R	GTAAGTGATAGCGCCGCACACC	
BTV4-S2/RG-F	<i>GGATCC</i> <i>TAATACGACTCACTATA</i> GTTAAAAAGAGTGTTCATCATGGA	1 638
BTV4-S2/RG-R	GTAAGTGTAAGAGGCCACCGAC	
BTV4-S6/RG-F	<i>GGATCC</i> <i>TAATACGACTCACTATA</i> GTTAAAAAAGTGTTCCTACTCGC	2 926
BTV4-S6/RG-R	ACGCAGCGGGGAGAACTTAC	

注: BTV-S1/ORF-F/R–BTV-S9/ORF-F/R 引物对分别用于 BTV-16/V158 毒株的 Seg-1、Seg-3、Seg-4、Seg-5、Seg-7、Seg-8 和 Seg-9 ORF 区的扩增; BTV16-S1/RG-F/R–BTV16-S10/RG-F/R 引物对用于 BTV-16/V158 毒株的 Seg-1–Seg-10 全长 DNA 片段扩增; BTV4-S2/RG-F/R 与 BTV4-S6/RG-F/R 分别用于 BTV-4/YTS4 毒株 Seg-2 和 Seg-6 全长 DNA 片段扩增。cactataggctagcc 与 ccgccccggctgact 为与 pCI-neo 载体质粒进行同源重组克隆的序列; ***TAATACGACTCACTATA*** 为 T7 启动子序列

Notes: Primer pairs of BTV-S1/ORF-F/R to BTV-S9/ORF-F/R were used for amplification ORF of Seg-1, Seg-3, Seg-4, Seg-5, Seg-7, Seg-8 and Seg-9 of BTV-16/V158 strain. Primer pairs of BTV16-S1/RG-F/R to BTV16-S10/RG-F/R were used for amplification full-length DNA of Seg-1–Seg-10 of BTV-16/V158 strain. BTV4-S2/RG-F/R and BTV4-S6/RG-F/R were used for amplification of Seg-2 and Seg-6 of BTV-4/YTS strain. “cactataggctagcc” and “ccgccccggctgact” indicates homologous recombination sequences which recombine with pCI-neo. ***TAATACGACTCACTATA*** indicates T7 promoter sequence

将表达 VP1、VP7 和 NS2 蛋白的真核质粒转染 BHK-21 细胞, 使用 RIPA 细胞裂解液裂解转染细胞, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液进行 SDS-PAGE 电泳, 通过半干转印, 将 PAGE 凝胶上的蛋白条带转移至 PVDF 膜, 使用 5% 脱脂奶进行封闭。以鼠抗 BTV VP7、NS2 单克隆抗体和兔抗 BTV VP1 蛋白多克隆抗体为一抗, 以 HRP 标记羊抗鼠或者羊抗兔 IgG 为二抗, 进行 PVDF 膜的孵育, 以 DAB 底物显色试剂进行显色, 分析 BTV VP7、NS2 和 VP1 蛋白的表达情况。

1.7 病毒的拯救

胰酶消化生长为单层的 BHK-21 细胞, 以含 10% 胎牛血清的 MEM 生长液重悬细胞, 调整细胞密度为 1.5×10^5 cells/mL。将细胞悬液以 1 mL/孔的量接种 12 孔细胞板, 37 °C 培养过夜。待细胞生长至 80% 汇集时, 取 1.4 中构建的 7 种 BTV 真核表达质粒按比例进行混合^[30], 使用转染试剂 TransIntro EL 进行 BHK-21 细胞的第一轮转染。

真核表达质粒转染 BHK-21 细胞后的 16–18 h, 将 1.5 中获取的 BTV Seg-1–Seg-10 ssRNA 按比例进行混合^[30], 使用脂质体转染试剂 Lipofectamine 2000 进行细胞的第二轮转染。在细胞转染后的 6 h 更换培养基, 置于 37 °C 培养。对转染后的细胞进行逐日观察, 当出现 CPE 时, 收集细胞培养上清, 置 4 °C 保存备用。

1.8 拯救病毒的基因组 dsRNA 电泳与电镜观察

按 1.3 提取并纯化拯救病毒的基因组 dsRNA, 以 1.5% 的高分辨率琼脂糖凝胶电泳观察病毒基因组 dsRNA 的电泳带型。取培养的病毒液, 以 8 000 r/min 离心 10 min, 将离心后的上清转入超速离心管中, 40 000 r/min 离心 3 h。将离心后的沉淀以适量 TNE Buffer 重悬, 置于 4 °C 过夜, 12 000 r/min 离心 5 min。取上清滴于铜网上, 以 2% 磷钨酸溶液 (pH 6.8) 进行染色, 在透射电镜下观察病毒粒子的形态。

1.9 病毒蚀斑形成与增殖曲线的测定

将病毒液进行 10 倍梯度稀释, 选择 10^{-2} – 10^{-5}

稀释度的病毒液接种 BHK-21 细胞, 37 °C 吸附 1 h 后弃去病毒液, 覆盖含 2% 胎牛血清和 1% 低熔点琼脂糖的 MEM 培养基。在感染后第 5 天, 以含 0.03% 的结晶紫进行细胞染色, 观察病毒的蚀斑形态进行蚀斑计数。

通过病毒蚀斑计数法^[31]测定病毒滴度, 将病毒液以 0.01 的感染复数 (Multiplicity of Infection, MOI) 接种 24 孔板培养的 BHK-21 细胞。在病毒感染后的 24–120 h, 间隔 24 h 收获细胞培养上清 (每个时间点重复 3 次), 暂存于 4 °C。待收集完所有时间点样品, 通过病毒蚀斑计数法测定各时间点细胞上清中的病毒含量, 绘制病毒增殖曲线。

1.10 血清中和试验

将待检病毒液 10 倍梯度稀释后接种 BHK-21 细胞, 以 Karber 法^[31]测定病毒的 $TCID_{50}$ 。在 96 孔板上采用“固定病毒-稀释血清”的方法进行微量中和试验, 测定血清对病毒的中和抗体效价, 方法简述如下: 将热灭活处理后的 BTV-16 型与 BTV-4 型阳性血清进行倍比稀释, 取 50 μ L 稀释的血清与 100 个 $TCID_{50}$ 的病毒液等体积混合, 37 °C 作用 1 h, 接种细胞并逐日观察 CPE, 以 Karber 法^[31]计算稀释血清对病毒的中和抗体效价。

1.11 重配病毒稳定性分析

将重配病毒在 BHK-21 细胞上连续盲传 5 代, 观察每代培养病毒引起细胞 CPE 的时间。取第 5 代培养的病毒按照 1.3 中介绍的方法进行病毒全基因组 PCR 扩增与 NGS 测序, 将获取的序列与亲本毒株的序列进行比对分析。

2 结果与分析

2.1 BTV 的全基因组扩增与 NGS 测序结果

提取 BTV-16/V158 病毒基因组 dsRNA, 通过 FLAC 技术^[24-25]获取了病毒全基因组 RT-PCR 扩增产物 (图 1)。NGS 测序获取了 1.2 Gb 的原始数据, 共计 19 442 536 条 Reads。数据经过滤处理后得到了 19 219 402 条 Reads (Q20, Sequencing Error Rate=0.1%), 其中 98.78% 的 Reads 被进一步组装

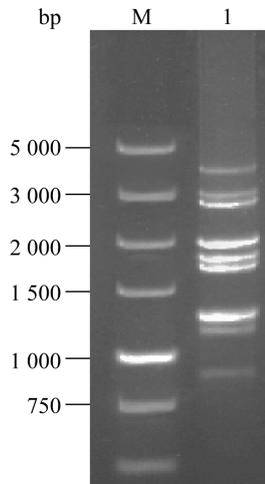


图 1 BTV-16/V158 毒株的全基因组 RT-PCR 扩增^[24-25]
Figure 1 RT-PCR amplification of the whole genomic DNA of BTV-16/V158 strain^[24-25]

注: M: DL5000 DNA 分子质量标准; 1: BTV-16/V158 毒株的全基因组扩增产物

Note: M: DNA Marker DL5000; 1: Genomic DNA amplification product of BTV-16/V158 strain

形成了 10 个 Contigs, 每个 Contig 上单碱基位点的测序深度均在 5 000–20 000 之间, 表明对 BTV-16/V158 的基因组进行了深度测序。本研究获取的 BTV-16/V158 毒株的全基因组序列已提交 GenBank, 登录号为 MH346491–MH346500。

2.2 BTV-16/V158 毒株的基因组序列分析

获取的 BTV-16/V158 基因组大小为 19 186 bp, 10 个基因节段大小在 822 (Seg-10)–3 944 bp (Seg-1) 之间, 可编码 229 个氨基酸残基的 NS3 蛋白至 1 302 个氨基酸残基的 VP1 蛋白。BTV-16/V158 毒株的 Seg-1、Seg-4、Seg-9 和 Seg-10 与中国毒株的序列相似度最高; 而 Seg-3、Seg-7 和 Seg-8 与韩国毒株相似度最高, Seg-2、Seg-5 和 Seg-6 则与日本毒株相似度最高(表 2)。将 BTV 各个基因节段的 ORF 区首尾相连, 构建的系统发生树显示, BTV-16/V158 属于东方型(Eastern)毒株, 与我国和印度分离的 BTV-16 型毒株聚为一簇(图 2), 核酸序列相似度为 91.5%与 93.4%, 氨基酸序列相似度为 97.0%与 97.6%。

2.3 BTV 真核表达质粒的构建

通过一步法 RT-PCR 扩增 BTV-16/V158 毒株的 Seg-1、Seg-3、Seg-4、Seg-5、Seg-7、Seg-8 和 Seg-9 基因节段的 ORF 区, 将其插入真核表达质粒载体 pCI-neo 中, 构建出 7 个真核表达质粒, 测序结果显示质粒构建正确, 构建的质粒分别命名为 pCI-VP1、pCI-VP3、pCI-VP4、pCI-NS1、pCI-VP7、pCI-NS2 和 pCI-VP6。

表 2 BTV-16/V158 毒株基因组序列特征

Table 2 Genomic features of BTV-16/V158 strain

基因节段(大小) Segments (size) (bp)	开放阅读框区域 ORF region	编码蛋白 (氨基酸残基数) Encoding protein (aa)	最近似的 BTV 毒株 (国家和地区, 血清型, 毒株名称) Closest BTV strain (Country and district, serotype, isolate)	序列相似度(核酸/氨基酸) Sequences identities (nt%/aa%)
Seg-1 (3 944)	12–3 917	VP1 (1 302)	中国台湾 Taiwan, China, BTV-2, KM	98.5/99.3
Seg-2 (2 935)	22–2 898	VP2 (959)	日本 Japan, BTV-16, MZ-1/C/01	98.8/99.1
Seg-3 (2 772)	18–2 720	VP3 (901)	韩国 South Korea, BTV-1, KorL83915	97.6/99.3
Seg-4 (1 981)	9–1 940	VP4 (644)	中国 China, BTV-21, 5149E	98.7/99.2
Seg-5 (1 764)	35–1 690	NS1 (552)	日本 Japan, BTV-21, TO4-3	97.5/99.8
Seg-6 (1 637)	29–1 606	VP5 (526)	日本 Japan, BTV-16, NS-1/E/02	98.6/99.6
Seg-7 (1 154)	18–1 064	VP7 (349)	韩国 South Korea, BTV-1, KorL83915	98.5/99.7
Seg-8 (1 125)	20–1 081	NS2 (354)	韩国 South Korea, BTV-3, JJBB35	97.6/96.9
Seg-9 (1 052)	16–1 005	VP6 (330)	中国 China, BTV-1, Y863	96.2/97.0
Seg-10 (822)	20–706	NS3 (229)	中国 China, BTV-15, B105/YN/1996	98.2/99.1

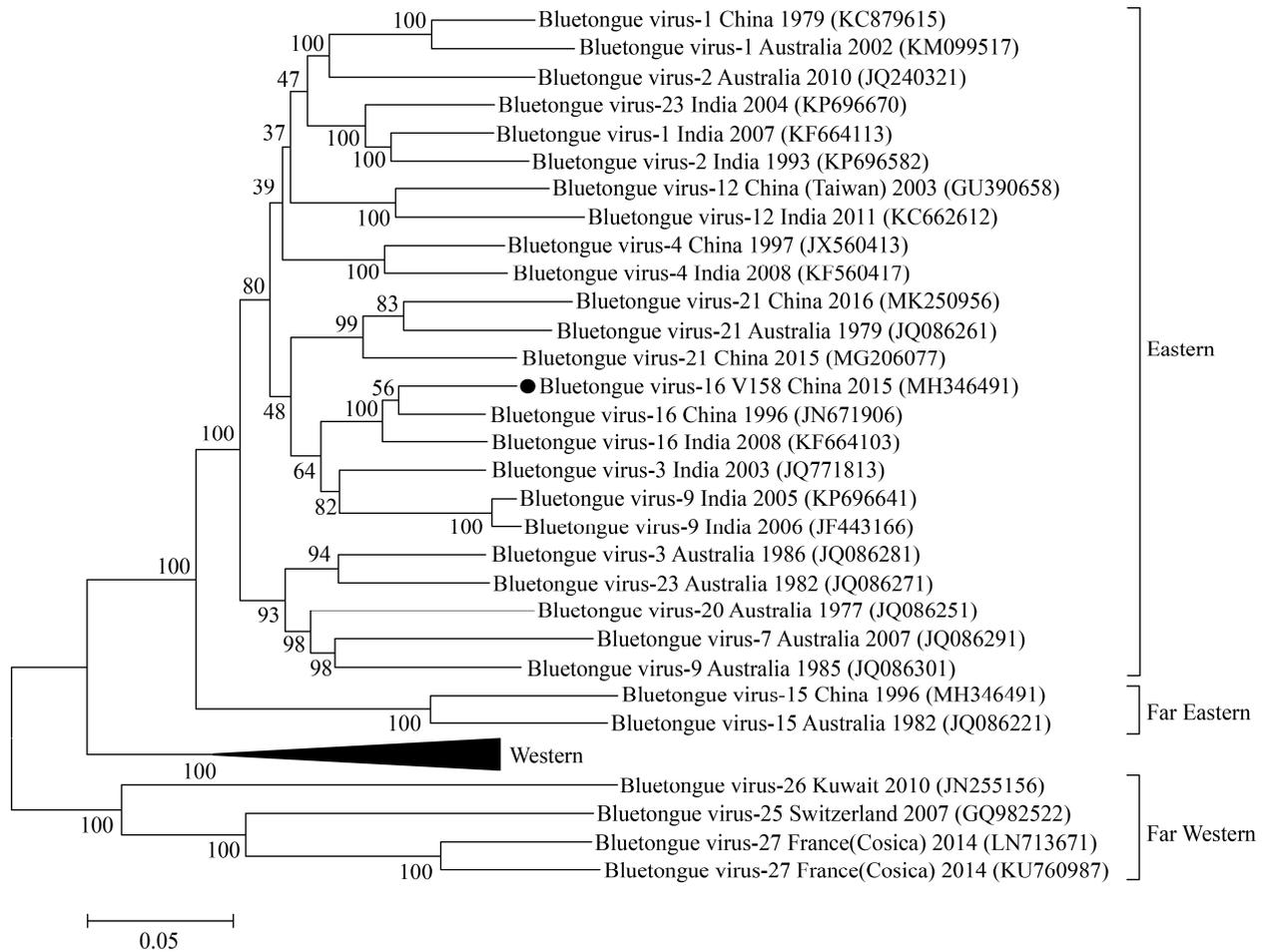


图 2 采用邻接法构建 BTV-16/V158 毒株基因组 ORF 区的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic analysis based on series-wound ORF regions of BTV-16/V158 strain with other BTV strains

注：采用邻接法进行系统发生树的构建，选择的遗传距离参数，自举检验取值 500，树枝节点的数值表示自举检验值，刻度值表示每个位点核苷酸的替代数。BTV-16/V158 毒株的序列以圆点表示，其他 BTV 毒株的序列以“BTV 血清型_分离国家_分离时间_Seg-1 GenBank 登录号”表示

Note: Phylogenetic tree was constructed with by neighbor-join (NJ) method with parameter of p distance and 500 bootstrap replicates. The numbers at the point of each branch indicate bootstrap values. Scale bar indicates number of nucleotide substitutions per site. BTV-16/V158 was depicted with a dot and other BTVs were indicated as “BTV serotype_isolated country_isolated year_Seg-1 GenBank accession number”

2.4 目的基因的表达检测

为分析构建的真核质粒能否在细胞中表达目的蛋白，选择分别表达 VP1 蛋白(RNA 依赖 RNA 聚合酶)、VP7 蛋白(内层衣壳蛋白)和 NS2 (包涵体蛋白)的 pCI-VP1、pCI-VP7 和 pCI-NS2 这 3 种质粒分别转染 BHK-21 细胞。转染细胞的免疫荧光染色结果显示，转染 pCI-VP1、pCI-VP7 和 pCI-NS2 质粒的细胞中可见特异性的红色或绿色

荧光，而转染 pCI-neo 空载体质粒细胞无任何荧光信号(图 3A)。转染细胞的 Western Blot 结果显示，pCI-VP1、pCI-VP7 和 pCI-NS2 转染后的细胞裂解样本在蛋白 Marker 的 140、40 和 35 kD 位置出现与预期大小相符的蛋白条带，而转染 pCI-neo 空载体质粒细胞在上述位置未出现特异性条带(图 3B)。以上结果表明，pCI-VP1、pCI-VP7 和 pCI-NS2 质粒在转染的 BHK-21 细胞中表达出了目的蛋白。

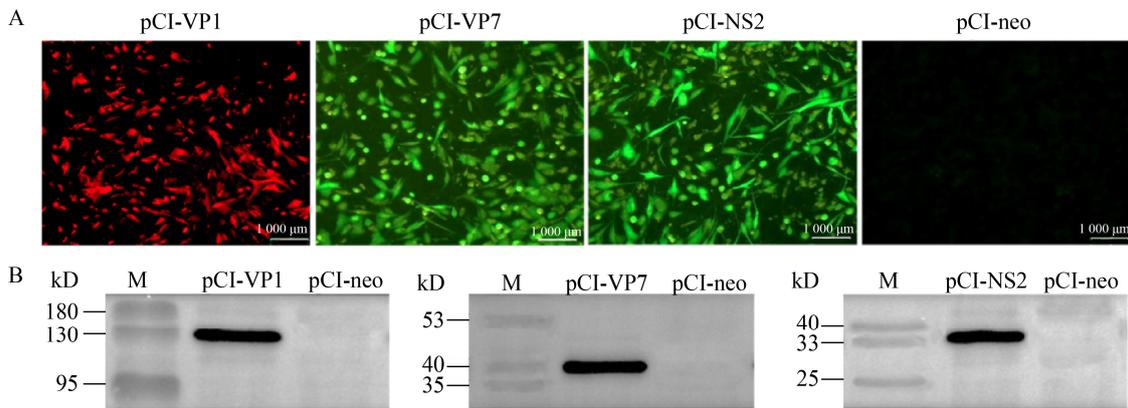


图 3 pCI-VP1、pCI-VP7 与 pCI-NS2 质粒转染 BHK-21 细胞后, 表达目的蛋白的免疫荧光(A)与 Western Blot (B) 检测

Figure 3 Detecting target proteins expressed by BHK-21 cells after transfected with plasmids PCI-VP1, PCI-VP7 and PCI-NS2 respectively by immunofluorescence (A) and Western Blot (B)

2.5 BTV ssRNA 的体外转录

通过一步法 RT-PCR 分别扩增出 BTV-16/V158 毒株 Seg-1–Seg-10 与 BTV-4/YTS4 毒株的 Seg-2 与 Seg-6 基因节段(图 4A)。由于每一 DNA 片段的 5'末端均含有 T7 启动子, 因此可作为 BTV ssRNA 体外转录的 DNA 模板。对转录产物的电泳结果显示, 转录的 12 个 BTV 基因节段 ssRNA 大小在 0.8 (Seg-10)–3.9 kb (Seg-1)之间, 与预期大小符合(图 4B)。纯化后 ssRNA 的 A_{260}/A_{280} 比值在 1.8–1.9 之间, 浓度在 380–470 ng/ μ L 之间。

2.6 BTV-16/V158 病毒的拯救与鉴定

BTV-16/V158 毒株 7 种真核表达质粒与基因组 ssRNA 转染 BHK-21 细胞后的第 6 天, 转染细胞出现明显的 CPE。收集转染细胞的上清, 接种 BHK-21 细胞, 细胞在接种后的 4 d 出现 CPE, 初步表明成功拯救出具有增殖能力的 BTV-16/V158 病毒粒子, 将反向遗传拯救的病毒命名为 BTV-16/V158-RG, 以区别于其母本病毒 BTV-16/V158。

BTV-16/V158-RG 与 BTV-16/V158 的基因组 dsRNA 在琼脂糖凝胶上产生了一致的核酸电泳带型(图 5A)。电镜下观察拯救的 BTV-16/V158-RG 病毒粒子大小约 70–80 nm, 呈现 BTV 粒子典型的

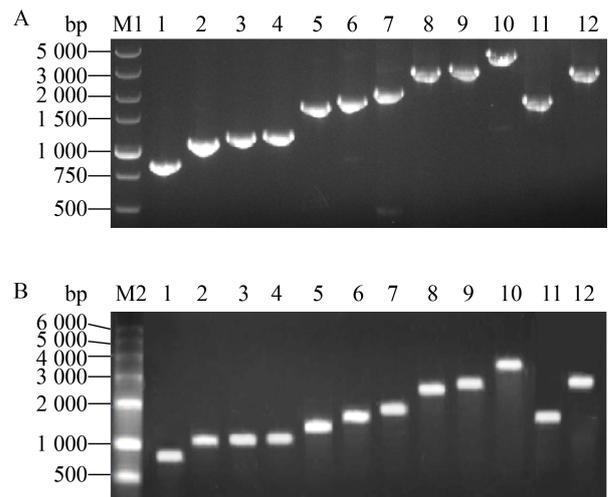


图 4 体外转录用 DNA 模板(A)与转录的 BTV ssRNA (B)电泳检测

Figure 4 Agarose electrophoresis analysis of the DNA templates used for *in vitro* transcription (A) and transcribed BTV ssRNA (B)

注: M1: DL5000 DNA 分子质量标准; M2: RNA 分子质量标准; 1–10: BTV-16/V158 毒株 Seg-10–Seg-1 DNA 模板(A)与体外转录 ssRNA (B); 11 与 12: 分别为 BTV-4/YTS4 毒株 Seg6 与 Seg2 DNA 模板(A)与体外转录 ssRNA (B)

Note: M1: DNA Marker DL5000; M2: RNA Marker; 1–10: Seg-10 to Seg-1 of BTV-16/V158 DNA templates (A) and transcribed ssRNA (B); 11 and 12: Seg-2 and Seg-6 of BTV-4/YTS4 DNA templates (A) and transcribed ssRNA (B)

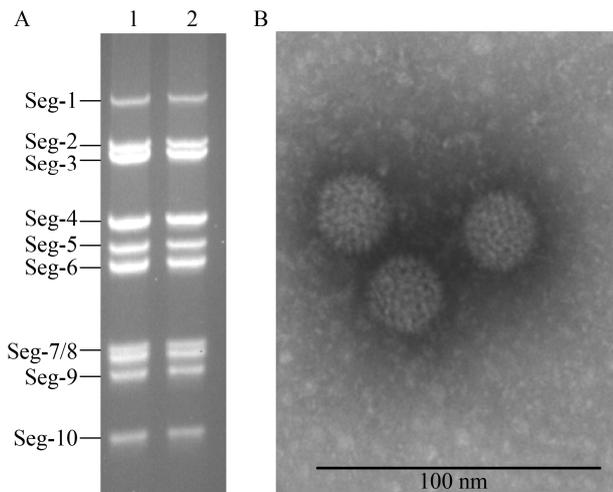


图 5 拯救 BTV16/V158-RG 的基因组 dsRNA 电泳(A)与病毒粒子的电镜观察(B)

Figure 5 Agarose gel electrophoresis analysis genome dsRNA (A) and electron micrographs observation (B) of BTV-16/V158-RG

注: 1: BTV-16/V158 基因组 dsRNA; 2: BTV-16/V158-RG 基因组 dsRNA

Note: 1: BTV-16/V158; 2: BTV-16/V158-RG

结构特征, 病毒粒子表面可见纤维状突起(图 5B)。病毒蚀斑与增殖曲线分析显示, BTV-16/V158-RG 在 BHK-21 细胞上形成的蚀斑大小和增殖特性与亲本病毒 BTV-16/V158 基本保持一致(图 6)。以上结果表明成功建立了 BTV 的反向遗传体系, 完成了 BTV-16/V158 病毒的拯救。

2.7 BTV 基因重配毒株的拯救

为分析外层衣壳蛋白编码基因重配引起 BTV 表型的变异, 以体外转录的 BTV-4/YTS4 毒株的 Seg-2 与 Seg-6 ssRNA 替代 BTV-16/V158 毒株对应节段 ssRNA, 进行病毒的拯救。在完成转染后的 6-7 d 转染细胞出现 CPE。取转染细胞上清, 在 BHK-21 细胞上培养一代。提取培养病毒的核酸, 基因组各个节段的 RT-PCR 扩增与测序结果显示, 拯救病毒的 Seg-2 和 Seg-6 与 BTV-4/YTS4 毒株的序列相似度为 100%, 而其余基因节段与 BTV-16/V158 毒株序列相似度为 100%。表明成功将 BTV-16 型毒株原有的 Seg-2 和 Seg-6 替换为 BTV-4 型毒株的 Seg-2 和 Seg-6, 将获取的基因重

配病毒命名为 BTV-16/V158-RG (BTV-4/S2, S6)。

2.8 BTV 基因重配病毒增殖特性分析

与亲本毒株 BTV-16/V158 相比, BTV-16/V158-RG (BTV-4/S2, S6)在细胞上形成的蚀斑明显偏小(图 6A)。病毒增殖曲线分析显示, 在 24-72 h, BTV-16/V158-RG (BTV-4/S2, S6)在 BHK-21 细胞上的增殖水平明显低于其亲本毒株 BTV-16/V158

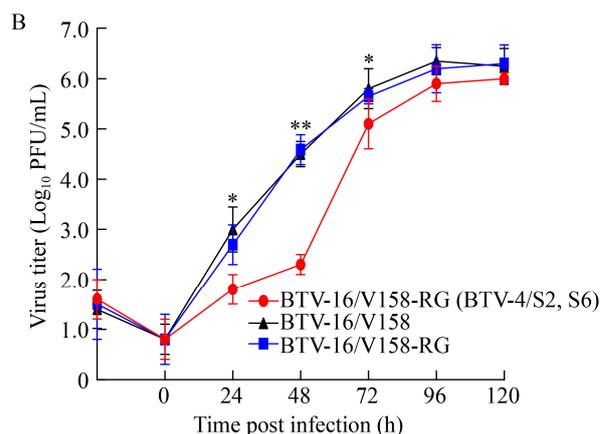
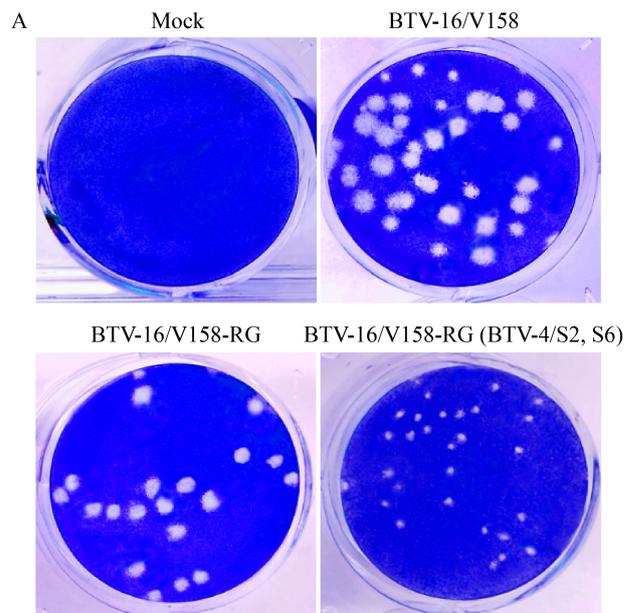


图 6 BTV-16/V158、BTV-16/V158-RG 与 BTV-16/V158-RG (BTV-4/S2, S6)病毒在 BHK-21 细胞上的蚀斑形态分析(A)与增殖曲线(B)比较

Figure 6 Compare features of plaque formation (A) and viral growth curve (B) of BTV-16/V158, BTV-16/V158-RG and BTV-16/V158-RG (BTV-4/S2, S6) in BHK-21 cells

Note: *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$

($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 在感染后的 72–120 h, 病毒增殖进入平台期, 培养上清中的基因重配病毒含量仍低于亲本毒株(图 6B)。以上结果表明 Seg-2 与 Seg-6 的基因重配导致重配毒株在细胞上的增殖能力减弱。

2.9 BTV 外层衣壳蛋白编码基因节段的替换引起 BTV 血清型改变

为分析基因重配是否引起病毒血清型的改变, 通过血清中和试验检测 BTV-16 型和 BTV-4 型阳性血清对基因重配病毒的中和活性。结果与预

期一致, 1:160 稀释的 BTV-16 型阳性血清显示了对 BTV-16/V158 的中和活性, 但 1:16 稀释的 BTV-16 型阳性血清对 BTV-16/V158-RG (BTV-4/S2, S6) 毒株也无中和活性。与此相对应, BTV-4 型阳性血清显示了对 BTV-16/V158-RG (BTV-4/S2, S6) 和 BTV-4/YTS4 型毒株的中和活性, 抗体稀释度可达到 1:320 (图 7)。实验结果表明, Seg-2 与 Seg-6 的基因重配改变了 BTV-16 型毒株对阳性血清的反应特性, 使其从 BTV-16 型转变为 BTV-4 型。

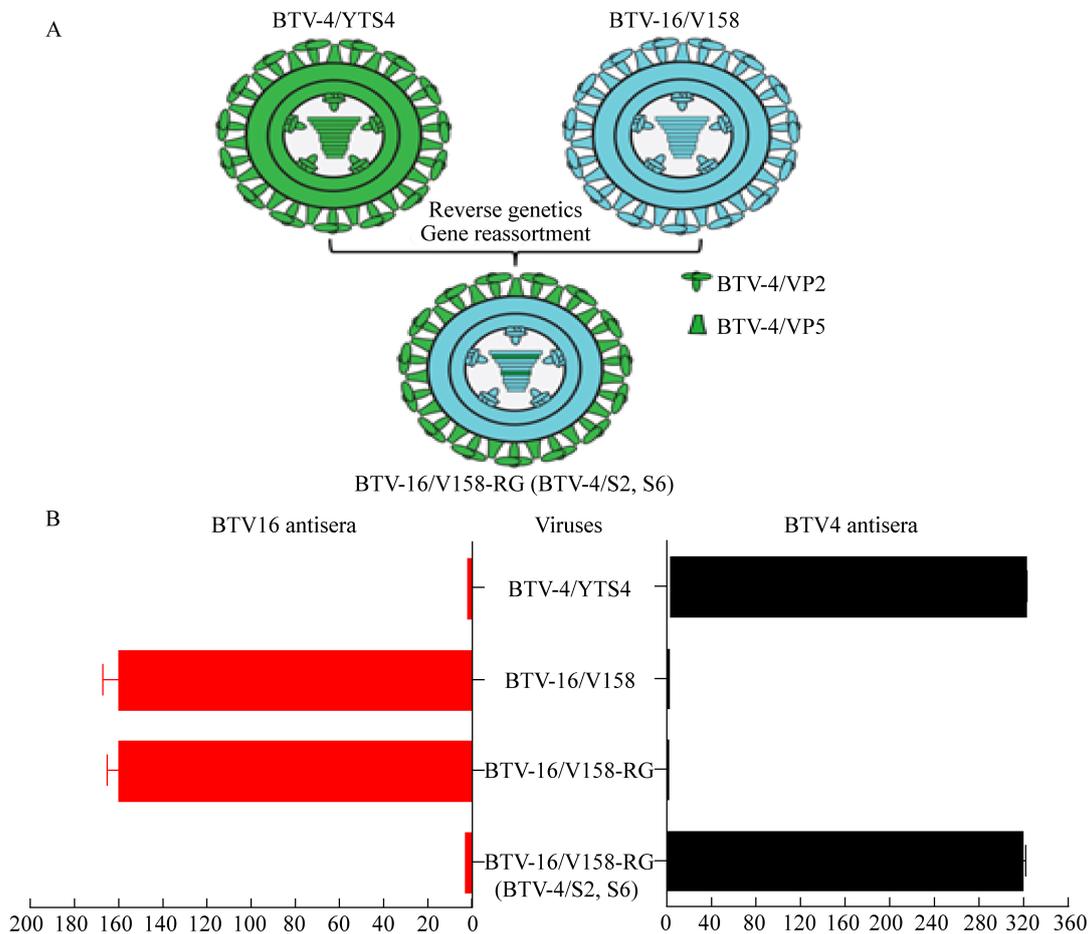


图 7 Seg-2 与 Seg-6 的基因重配引起 BTV 血清型的转变

Figure 7 Reassortment of Seg-2 and Seg-6 induced serotype transformation of BTV

注: A: 基因重配病毒 BTV-16/V158-RG (BTV-4/S2, S6) 产生示意图; B: BTV-16 型阳性血清与 BTV-4 型阳性血清对 BTV-4/YTS4、BTV-16/V158、BTV-16/V158-RG 与 BTV-16/V158-RG (BTV-4/S2, S6) 这 4 种病毒的中和活性测定

Note: A: Schematic diagram of generation recombinant BTV-16/V158-RG (BTV-4/S2, S6); B: Determination neutralization activity of antisera of BTV-16 and BTV-4 against BTV-4/YTS4, BTV-16/V158, BTV-16/V158-RG and BTV-16/V158-RG (BTV-4/S2, S6)

2.10 BTV 基因重配病毒具有良好的遗传稳定性

将 BTV-16/V158-RG (BTV-4/S2, S6) 在 BHK-21 细胞上连续盲传 5 代, 每代培养的病毒均在接种后 5 d 引起细胞出现完全 CPE。对病毒基因组进行全基因组扩增与 NGS 测序, 将获取的重配病毒基因组序列与母本毒株对应节段进行比对, 结果显示共有 5 个碱基的沉默突变, 分别出现在 Seg-2 (2 个)、Seg-7 (1 个) 和 Seg-10 (2 个) 这 3 个基因节段上, 未引起氨基酸序列的改变。

3 讨论与结论

我国目前绵羊存栏 1 亿 7 千多万只, 主要分布在我国北方地区和高寒山区。近年来, 随着全球气候变暖, 库蠓活动范围北移和向高海拔地区移动, BTV 将伴随库蠓的移动传播到我国一些温暖、潮湿的北方地区和高海拔地区^[18]。我国流行的 BTV 血清型具有高度的多样性^[18-21], 不同血清型 BTV 的致病性差异较大, BTV 的扩散以及基因重配变异毒株的出现, 可能导致绵羊的大规模发病, 给我国牛羊养殖业的健康发展带来了潜在的威胁。建立我国流行血清型 BTV 毒株的反向遗传体系, 开展 BTV 基因重配致病毒变异与新型疫苗的研究, 对我国 BT 的防控具有重要的意义。

与其他 RNA 病毒相比, 呼肠孤病毒科病毒的多层蛋白衣壳具有复杂的三维空间结构, 10-12 基因节段组成的基因组, 因此该科病毒反向遗传体系的建立难度较大, 起步也相对较晚^[32]。BTV 反向遗传体系的 2 个关键技术点是^[13,30]: (1) 提前在细胞中表达与 BTV 复制相关的 VP1、VP3、VP4、NS1、NS2、VP6 和 VP7 等蛋白, 从而在细胞中组装病毒复制起始复合物, 可大大提高 ssRNA 转染后病毒的拯救效率; (2) 在病毒各个基因组节段的 5'端引入 T7 启动子序列, 使用 T7 RNA 聚合酶进行 BTV 基因组 ssRNA 的体外转录与加帽, 获取完整的 5'端带帽子结构的 BTV 基因组 ssRNA。

在完成 BTV 的 7 种蛋白真核表达质粒的构建

后, 本实验将分别表达 BTV RNA 依赖 RNA 聚合酶(VP1 蛋白)、内层衣壳蛋白(VP7 蛋白)和包涵体蛋白(NS2 蛋白)的真核表达质粒 pCI-VP1、pCI-VP7 和 pCI-NS2 分别转染 BHK-21 细胞, 通过免疫荧光与 Western Blot, 证实了目的蛋白在细胞中的表达(图 3), 为 BTV 反向遗传体系的建立铺平了第一步。在获取 BTV 基因组 ssRNA 方面, Boyce 等使用 BTV 的全基因组克隆质粒作为体外转录的模板^[13], 研究中我们发现该过程费时费力。因此, 我们直接在 PCR 引物中引入 T7 启动子序列, 通过 RT-PCR 扩增出含 T7 启动子序列的 10 个 BTV 基因节段, 以纯化后 PCR 产物为模板(图 4A)进行体外转录, 体外转录 ssRNA 的电泳检测结果显示获取了完整的 BTV 基因组 ssRNA (图 4B), 提高了工作效率。通过 BTV 真核表达质粒与 ssRNA 对 BHK-21 细胞的 2 轮转染, 拯救出了 BTV-16 型毒株 BTV-16/V158-RG, 拯救的病毒与亲本毒株在生物学特性上保持一致(图 5、图 6), 表明我们成功建立了我国流行 BTV 毒株的反向遗传体系。

基因重配是基因组分节段病毒进化的动力之一, 在病毒的感染特性、免疫原性、致病性与传播等方面均有着深刻的影响^[12]。本研究中, 将 BTV-16 型毒株的 Seg-2 和 Seg-6 替换为 BTV-4 型毒株的对应基因节段, 拯救出基因重配病毒 BTV-16/V158-RG (BTV-4/S2, S6), 通过病毒蚀斑与病毒增殖曲线的测定, 分析基因重配病毒与亲本病毒在体外细胞感染特性上的差异。实验结果显示, BTV-16/V158-RG (BTV-4/S2, S6) 在 BHK-21 细胞上的增殖能力变弱, 表现为病毒蚀斑明显变小, 病毒的增殖曲线低于亲本病毒(图 6)。这一现象与我国 BTV-4 型毒株在绵羊上的致病性明显低于 BTV-16 型毒株相吻合。研究显示 BTV 的毒力由多个基因节段决定, 其中一个重要的基因节段为 Seg-2^[33]。结合本实验, 我们认为 BTV-4 型毒株在绵羊上致病性较弱的可能原因之一是: 该血清型 VP2 蛋白与细胞受体的亲和能力低于 BTV-16 毒

株, 导致病毒侵入细胞的能力减弱, 从而引起 BTV-4 型毒株毒力的减弱。在将来的动物试验中, 需要比较基因重配毒株与亲本毒株的感染特性与致病性差异, 才能比较全面地了解 Seg-2 和 Seg-6 与 BTV 在本体动物上致病性的关系。对上述问题的解答在理论层面上有助于理解我国不同血清型 BTV 致病性差异的原因, 在生产实际层面上可为 BTV 科学防控策略的制定提供理论依据。

BTV 的 VP2 和 VP5 蛋白决定着 BTV 的血清型与中和抗体的产生。对基因重配毒株 BTV-16/V158-RG (BTV-4/S2, S6) 的血清中和试验结果显示, BTV-16 型毒株的阳性血清已无法中和基因重配病毒, 而 BTV-4 型的阳性血清对病毒具有中和活性(图 7B), 说明 Seg-2 和 Seg-6 的基因重配引起病毒血清型的转变, 由 BTV-16 型转变为 BTV-4 型, 这与前人观察到的结果^[34]一致。本研究通过反向遗传成功完成了 BTV-16 型毒株的血清型转化, 为后继开发新型 BTV 新型疫苗奠定了基础。当面临新血清型 BTV (例如 BTV-25-BTV-28) 侵入的风险时, 我们可以通过反向遗传技术开发出针对 BTV 新血清型的灭活疫苗, 对疫病防控做出快速应对。

本研究以我国具有较强致病性的 BTV-16 型毒株(BTV-16/V158)为起始材料, 成功建立 BTV-16 型毒株的反向遗传体系; 在此基础上将 BTV-16 型毒株的 Seg-2 和 Seg-6 替换为 BTV-4 型毒株对应的基因节段, 拯救出血清型与增殖特性发生改变的基因重配病毒 BTV-16/V158-RG (BTV-4/S2, S6), 研究结果为后续在基因组层面分析我国 BTV-16 型毒株关键毒力基因以及开发基因工程疫苗提供了技术平台。

REFERENCES

- [1] Schwartz-Cornil I, Mertens PP, Contreras V, Hemati B, Pascale F, Bréard E, Mellor PS, MacLachlan NJ, Zientara S. Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity[J]. *Veterinary Research*, 2008, 39(5): 46-62
- [2] MacLachlan NJ, Drew CP, Darpel KE, Worwa G. The pathology and pathogenesis of bluetongue[J]. *Journal of Comparative Pathology*, 2009, 141(1): 1-16
- [3] Saegerman C, Berkvens D, Mellor PS. Bluetongue epidemiology in the European Union[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2008, 14(4): 539-544
- [4] Belhouchet M, Mohd Jaafar F, Firth AE, Grimes JM, Mertens PP, Attoui H. Detection of a fourth orbivirus non-structural protein[J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e25697
- [5] Bhattacharya B, Noad RJ, Roy P. Interaction between bluetongue virus outer capsid protein VP₂ and vimentin is necessary for virus egress[J]. *Virology Journal*, 2007, 4: 7.
- [6] Maan S, Maan NS, Samuel AR, Rao S, Attoui H, Mertens PP. Analysis and phylogenetic comparisons of full-length VP₂ genes of the 24 bluetongue virus serotypes[J]. *Journal of General Virology*, 2007, 88(2): 621-630
- [7] Hassan SH, Wirblich C, Forzan M, Roy P. Expression and functional characterization of bluetongue virus VP₅ protein: role in cellular permeabilization[J]. *Journal of Virology*, 2001, 75(18): 8356-8367
- [8] Hofmann MA, Renzullo S, Mader M, Chaignat V, Worwa G, Thuer B. Genetic characterization of Toggenburg orbivirus, a new bluetongue virus, from goats, Switzerland[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2008, 14(12): 1855-1861
- [9] Maan S, Maan NS, Nomikou K, Veronesi E, Bachanek-Bankowska K, Belaganahalli MN, Attoui H, Mertens PP. Complete genome characterisation of a novel 26th bluetongue virus serotype from Kuwait[J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e26147
- [10] Zientara S, Sailleau C, Viarouge C, Höper D, Beer M, Jenckel M, Hoffmann B, Romey A, Bakkali-Kassimi L, Fablet A, et al. Novel bluetongue virus in Goats, Corsica, France, 2014[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2014, 20(12): 2123-2125
- [11] Bumarov V, Golender N, Jenckel M, Wernike K, Beer M, Khinich E, Zalesky O, Erster O. Characterization of bluetongue virus serotype 28[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2020, 67(1): 171-182
- [12] Nomikou K, Hughes J, Wash R, Kellam P, Breard E, Zientara S, Palmarini M, Biek R, Mertens P. Widespread reassortment shapes the evolution and epidemiology of bluetongue virus following European invasion[J]. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(8): e1005056
- [13] Boyce M, Roy P. Recovery of infectious bluetongue virus from RNA[J]. *Journal of Virology*, 2007, 81(5): 2179-2186
- [14] Shaw AE, Ratinier M, Nunes SF, Nomikou K, Caporale M, Golder M, Allan K, Hamers C, Hudelet P, Zientara S, et al. Reassortment between two serologically unrelated bluetongue virus strains is flexible and can involve any genome segment[J]. *Journal of Virology*, 2013, 87(1): 543-557
- [15] Celma CC, Stewart M, Wernike K, Eschbaumer M, Gonzalez-Molleda L, Breard E, Schulz C, Hoffmann B, Haegeman A, De Clercq K, et al. Replication-deficient particles: new insights into the next generation of bluetongue virus vaccines[J]. *Journal of Virology*, 2017,

- 91(1): e01892-16
- [16] Yang T, Xu QY, Sun EC, Feng YF, Li JP, Sun L, Sun J, Wu DL. Establishment of a reverse genetics system for bluetongue virus[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2014, 36(2): 85-89 (in Chinese)
杨涛, 徐青元, 孙恩成, 冯瑜菲, 李俊平, 孙亮, 孙晶, 吴东来. 蓝舌病病毒反向遗传操作系统的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2014, 36(2): 85-89
- [17] Guo YZ, Sun EC, Xu QY, Bu ZG, Wu DL, Wang FL. Establishment of a ten plasmid-based reverse genetics system for bluetongue virus[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2019, 41(3): 234-238 (in Chinese)
郭运泽, 孙恩成, 徐青元, 步志高, 吴东来, 王凤龙. 蓝舌病病毒 10 质粒反向遗传操作系统的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2019, 41(3): 234-238
- [18] Yang H, Lv M, Sun MF, Lin LQ, Kou ML, Gao L, Liao DF, Xiong HL, He YW, Li HC. Complete genome sequence of the first bluetongue virus serotype 7 isolate from China: evidence for entry of African-lineage strains and reassortment between the introduced and native strains[J]. Archives of Virology, 2016, 161(1): 223-227
- [19] Yang H, Xiao L, Wang J, Meng J, Lv M, Liao D, Song J, Gao L, Xiong H, He Y, et al. Phylogenetic characterization genome segment 2 of bluetongue virus strains belonging to serotypes 5, 7 and 24 isolated for the first time in China during 2012 to 2014[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2017, 64(4): 1317-1321
- [20] Li ZH, Wang JP, Yang H, Liao DF, Song JL, Gao L, He YW, Li HC. Isolation of bluetongue virus serotype 9 strain in China for the first time[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2019, 50(2): 354-363 (in Chinese)
李占鸿, 王金萍, 杨恒, 廖德芳, 宋建领, 高林, 何于雯, 李华春. 蓝舌病病毒血清 9 型毒株在我国的首次分离[J]. 畜牧兽医学报, 2019, 50(2): 354-363
- [21] Li ZH, Xiao L, Meng JX, Kou ML, Song JL, Liao DF, Gao L, Yang H, Li HC. Isolation and identification of bluetongue virus serotype 5 strain in China[J]. Chinese Veterinary Science, 2019, 49(1): 36-43 (in Chinese)
李占鸿, 肖雷, 孟锦昕, 寇美玲, 宋建领, 廖德芳, 高林, 杨恒, 李华春. 中国蓝舌病病毒血清 5 型毒株的分离与鉴定[J]. 中国兽医科学, 2019, 49(1): 36-43
- [22] Kirkland PD, Zhang N, Hawkes RA, Li Z, Zhang F, Davis RJ, Sanders DA, Li H, Zhang K, Ben J, et al. Studies on the epidemiology of bluetongue virus in China[J]. Epidemiology and Infection, 2002, 128(2): 257-263
- [23] Yang H, Zhu JB, Li HC, Xiao L, Wang JP, Li N, Zhang NZ, Kirkland PD. Full genome sequence of bluetongue virus serotype 4 from China[J]. Journal of Virology, 2012, 86(23): 13122-13123
- [24] Yang H, Li ZH, Zhang YX, Gao L, Xie JR, Liao DF, Wu JM, Li HC. Isolation and genomic characterization of a novel orbivirus strain from the blood of cattle[J]. Chinese Journal of Virology, 2018, 34(1): 75-84 (in Chinese)
杨恒, 李占鸿, 张怡轩, 高林, 谢佳芮, 廖德芳, 吴健敏, 李华春. 牛血液中一株新型环状病毒的分离与全基因组序列分析[J]. 病毒学报, 2018, 34(1): 75-84
- [25] Maan S, Rao SJ, Maan NS, Anthony SJ, Attoui H, Samuel AR, Mertens PP. Rapid cDNA synthesis and sequencing techniques for the genetic study of bluetongue and other dsRNA viruses[J]. Journal of Virological Methods, 2007, 143(2): 132-139
- [26] Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data[J]. Bioinformatics, 2014, 30(15): 2114-2120
- [27] Hernandez D, François P, Farinelli L, Østerås M, Schrenzel J. *De novo* bacterial genome sequencing: millions of very short reads assembled on a desktop computer[J]. Genome Research, 2008, 18(5): 802-809
- [28] Luo RB, Liu BH, Xie YL, Li ZY, Huang WH, Yuan JY, He GZ, Chen YX, Pan Q, Liu YJ, et al. SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read *de novo* assembler[J]. GigaScience, 2012, 1(1): 18
- [29] Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. Molecular biology and evolution, 2018, 35(6): 1547-1549
- [30] Van Gennip RGP, Van De Water SGP, Maris-Veldhuis M, Van Rijn PA. Bluetongue viruses based on modified-live vaccine serotype 6 with exchanged outer shell proteins confer full protection in sheep against virulent BTV8[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e44619
- [31] Yin Z, Liu JH. Animal Virology[M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 1997: 239-244 (in Chinese)
殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1997: 239-244
- [32] Trask SD, Boehme KW, Dermody TS, Patton JT. Comparative analysis of *Reoviridae* reverse genetics methods[J]. Methods, 2013, 59(2): 199-206
- [33] Janowicz A, Caporale M, Shaw A, Gulletta S, Di Gialleonardo L, Ratinièr M, Palmarini M. Multiple genome segments determine virulence of bluetongue virus serotype 8[J]. Journal of Virology, 2015, 89(10): 5238-5249
- [34] Nunes SF, Hamers C, Ratinièr M, Shaw A, Brunet S, Hudelet P, Palmarini M. A synthetic biology approach for a vaccine platform against known and newly emerging serotypes of bluetongue virus[J]. Journal of Virology, 2014, 88(21): 12222-12232