

中国部分地区蝙蝠携带病毒的宏基因组学分析

杨凡力^{1,2}, 王意银³, 郑文成⁴, 何彪², 江廷磊⁵, 李莹莹², 夏乐乐², 冯焱², 范泉水³, 涂长春²

1 吉林大学畜牧兽医学院, 吉林 长春 130062

2 军事医学科学院军事兽医研究所, 吉林 长春 130122

3 成都军区疾病预防控制中心, 昆明 云南 650118

4 湖南省动物卫生监督所, 长沙 湖南 410007

5 东北师范大学吉林省动物资源保护与利用重点实验室, 吉林 长春 130024

杨凡力, 王意银, 郑文成, 等. 中国部分地区蝙蝠携带病毒的宏基因组学分析. 生物工程学报, 2013, 29(5): 586-600.
Yang FL, Wang YY, Zheng WC, et al. Metagenomic analysis of bat virome in several regions of China. Chin J Biotech, 2013, 29(5): 586-600.

摘 要: 蝙蝠携带有 60 多种病毒, 其中许多对人有高度致病性。为了解中国蝙蝠携带病毒的自然本底、蝙蝠病毒的多样性和挖掘潜在的病毒病原, 通过基于 Solexa 高通量测序的病毒宏基因组学技术对从吉林、云南、湖南采集的蝙蝠组织进行病毒组学研究, 获得了 11 644 232 条读长 (Reads), 并拼接出 44 872 条重叠序列 (Contig)。通过核酸序列注释发现, 其中 8.2% (4 002/44 872) 的重叠序列与病毒相关, 能进一步注释到 36 个病毒科, 包括 19 种脊椎动物病毒、6 种植物病毒、4 种昆虫病毒和 4 种噬菌体。通过对重叠序列的遗传进化分析、多序列比对显示, 被注释为细小病毒、腺联病毒、博卡病毒、腺病毒、小双节 RNA 病毒等的重叠序列与已知病毒相似, 部分序列却又呈现出明显的序列差异。通过对腺病毒和博卡病毒进一步的 PCR 扩增证实了此研究方法可靠。旨在了解我国蝙蝠携带病毒组的构成, 对建立高效的野生动物源人兽共患病的监测方法提供参考。

关键词: 病毒宏基因组学, 蝙蝠, 病毒组, 高通量测序

Received: December 19, 2012; **Accepted:** March 5, 2013

Supported by: NSFC-Yunnan Province Joint Fund (No. U1036601).

Corresponding author: Changchun Tu. Tel/Fax: +86-431-86985862; E-mail: changchun_tu@hotmail.com

NSFC 云南省联合基金 (No. U1036601) 资助。

网络出版时间: 2013-04-10

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20130410.1005.003.html>

Metagenomic analysis of bat virome in several Chinese regions

Fanli Yang^{1,2}, Yiyin Wang³, Wencheng Zheng⁴, Biao He², Tinglei Jiang⁵, Yingying Li²,
Lele Xia², Ye Feng², Quanshui Fan³, and Changchun Tu²

¹ College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, Jilin, China

² Institute of Military Veterinary, Academy of Military Medical Sciences, Changchun 130122, Jilin, China

³ Center for Disease Control and Prevention, Chengdu Military Region of PLA, Kunming 650118, Yunnan, China

⁴ The Animal Health Inspection of Hunan Province, Changsha 410007, Hu'nan, China

⁵ Jilin Key Laboratory of Animal Resource Conservation and Utilization, Northeast Normal University, Changchun 130024, Jilin, China

Abstract: Bats are important reservoir animals and more than 60 viruses have been identified in bats with many of them highly pathogenic to human. In order to understand the natural background, genetic diversity of bat viruses in China and discover potential viral pathogens, Solexa sequencing based viral metagenomics focusing on bats tissues was established and to analyze the virome of bats collected from Jilin, Yunnan and Hunan province. By Solexa sequencing, 116 442 324 useful reads were obtained and assembled into 4 872 contigs, of which 8.2% (4 002/4 4872) were annotated to 36 viral families, including 19 vertebrate virus families, 6 plant virus families, 4 insect virus families and 4 phages. Further contigs analyses showed that some adenovirus, bocavirus, picobirnavirus, parvovirus contigs sequences were similar with known viruses. However, part of them shared limited identities to these viruses implying the discovery of new viruses. Moreover, PCR validation of adenovirus and bocavirus confirmed the results obtained by viral metagenomics. This study aimed to understand bat virome in China by viral metagenomics and could be helpful to establish effective surveillance on wildlife-associate zoonoses.

Keywords: viral metagenomic, bat, virome, next-generation sequencing

蝙蝠属于翼手目 (Chiroptera), 是仅次于啮齿类的第二大哺乳动物, 占全球哺乳动物种类的 20%, 且分布广泛, 除南北极外全球各个地区均有蝙蝠的存在^[1]。近年来在蝙蝠体内发现的病毒逐渐增多, 至 2007 年为止, 至少从蝙蝠体内检测或分离到 60 多种病毒, 其中包括一些致病性病毒, 如埃博拉病毒 (Ebola virus)、亨德拉尼帕病毒 (Henipaviruses)、马尔堡病毒 (Marburg virus)、SARS 冠状病毒 (SARS coronavirus)、狂犬病病毒 (Rabies virus) 以及狂犬病相关病毒 (Lyssavirus) 等^[2]。最近, Bokeloh 和 Shimoni 蝙蝠病毒、圆环病毒 (Circovirus)、博卡病毒 (Bocavirus)、呼肠孤病毒 (Retrovirus)、星状病毒

(Astrovirus) 和松湾病毒 (Cedar virus) 作为新病毒在蝙蝠体内发现^[3-8]。2002 年 SARS 冠状病毒疫情爆发, 造成全球 8 000 多人感染, 至少 800 人死亡^[9]。研究表明我国的菊头蝠携带有 SRAS 样冠状病毒 (SARS-like coronavirus), 很可能是 SARS 样冠状病毒的自然宿主^[10]。近期研究者又在加纳和欧洲的蝙蝠体内发现了与 2012 年在中东地区引起 2 人死亡的人 β 冠状病毒 2cEMC/2012 (Human betacoronavirus 2cEMC/2012) 接近的 β 冠状病毒^[11]。因此, 蝙蝠作为巨大的病毒贮存库越来越受到关注。我国自上世纪 80 年代开展蝙蝠病毒研究以来, 至少从蝙蝠体内检测或分离到 16 种病毒, 包括基孔肯雅病毒 (Chikungunya

virus)、罗斯河病毒 (Ross River virus)、乙型脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV)、呼肠孤病毒和腺病毒 (Adenovirus)^[6,12-15]。

我国蝙蝠有 7 科 30 属 120 种, 分布广泛, 多集中在华中、华南、西南等人口密集且气候湿润温热的地方^[16]。因此应全面掌握我国蝙蝠携带病毒的自然本底以预防新发和再发人兽共患病。传统的病毒病原生态学研究方法, 如细胞分离、核酸检测、血清学试验等都有一定的局限性。近年来基于高通量测序的病毒宏基因组学方法已经成为一个高效的工具用于对自然环境^[17-18]、人^[19]和动物^[20-21]的病毒组学分析。目前采用病毒宏基因组学研究蝙蝠病毒在全球已有 4 则报道^[22-25], 他们对蝙蝠粪便的病毒组研究在一定程度上反映了蝙蝠携带病毒的多样性, 提供了有价值的信息, 但目前对蝙蝠病毒的研究并不充分。为了建立蝙蝠病毒宏基因组学研究方法、丰富我国蝙蝠携带病毒的数据库, 本研究自 2008 年至 2010 年从我国三地采集到 4 种共 241 只蝙蝠样品, 通过病毒宏基因组学对这些蝙蝠的肠道和肺脏组织进行病毒组学分析, 发现了细小病毒 (Parvovirus)、博卡病毒、小双节 RNA 病毒 (Picobirnavirus)、腺病毒等病毒的序列, 描绘了上述蝙蝠组织样本携带病毒的情况, 并通过对博卡病毒和腺病毒的 PCR 验证, 进一步证实了这些病毒的存在, 为蝙蝠病毒的病原生态学研究提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2008 年至 2010 年共采集了 4 种 241 只蝙蝠。2008 年 12 月在云南省靠近缅甸边境的拉

波寨采集到 180 只亚洲长翼蝠 *Miniopterus fuliginosus*; 2010 年 9 月在吉林省长春市一座公寓顶层采集到 31 只萨氏伏翼 *Hypsugo savii* 和 4 只东方蝙蝠 *Vespertilio sinensis*; 2010 年 12 月在湖南省慈利县采集到 26 只大蹄蝠 *Hipposideros armiger*。经形态学鉴定蝙蝠种类后立即解剖, 将肠道 (含内容物)、肺脏分别取出装入 2 mL 冻存管, 保存于-80℃。此研究严格按照军事医学科学院军事兽医研究所动物福利委员会相关规定执行。

1.2 试剂及材料

反转录酶 (SuperScriptIII Reverse Transcriptase)、DNA 聚合酶 (Accuprime Taq DNA Polymerase)、RNA 酶抑制剂 (RNaseOUT) 购自 Invitrogen 公司; 核酸外切酶 (Exonuclease I)、碱性磷酸酶 (Shrimp alkaline phosphatase)、TRIzol (Total RNA 提取试剂) 购自宝生物 (大连) 公司; QIAquick PCR Purification Kit 购自 QIAGEN 公司; DNA 酶 (Turbo DNase) 购自 Ambion 公司; 核酸酶 (Benzonase Nuclease) 购自 Novagen 公司; DNA 聚合酶 Klenow 片段购自 NEB 公司; 0.22 μm 针头滤器和 Pellicon II 膜包购自 Millipore 公司; SM 缓冲液 (50 mmol/L Tris, 10 mmol/L MgSO₄, 0.1 mol/L NaCl, pH 7.5); DNA 提取试剂盒购自 QIAGEN 公司; PCR 反应液购自天根生物公司。

1.3 样品制备

在生物二级安全柜内将吉林采集的 35 只蝙蝠和湖南采集的 26 只蝙蝠的肺脏和肠道样本每只各取大约 0.1 g, 云南采集的 180 只蝙蝠随机挑选出 40 只蝙蝠的肺脏和肠道各取大约 0.1 g 混合。不同采集地点混合成 1 组, 共 3 组 (云南组

名称为 pool-1; 湖南组为 pool-2; 吉林组为 pool-3)。每一个组按 1: 10 (*W/V*) 加入无菌 SM 缓冲液, 用 Waring 组织研磨仪磨碎; 研磨液于 4 °C、10 000 r/min 离心 30 min; 上清液先后用 0.45 μ m 和 0.22 μ m 孔径的 Pellicon II 膜包滤掉组织碎片、细菌和其他杂质; 滤液使用截留分子量为 100 kDa 的 Pellicon II 浓缩膜包进行浓缩; 浓缩液用 Beckman 超速离心机 SW55Ti 转头 45 000 r/min 离心 2 h; 沉淀用 SM 缓冲液悬浮并使用 0.22 μ m 针头滤器过滤; 为降低游离核酸污染, 每 116 μ L 的滤过液添加 14 U 的 DNA 酶 (Turbo DNase)、25 U 的核酸酶 (Benzonase Nuclease)、20 U 的核酸外切酶 (RNase I) 以及 10 \times Turbo DNase 缓冲液在 37 °C 消化 1 h; 随后用 TRIzol 提取核酸 (包括 RNA 和 DNA), 并溶解于 20 μ L 的无 RNA 酶的水中。

1.4 反转录及随机 PCR

每组分别将 8 μ L 上述病毒核酸加入 1 μ L 二甲亚砜 (DMSO) 和 1 μ L 50 μ mol/L 的带有 20 bp 锚定序列的 6mer 随机引物 (pool-1: 5'-GCCGAGCTCTGCAGATATC-3'; pool-2: 5'-GTATCGCTGGACACTGGAC-3'; pool-3: 5'-CGCATTGGTCGGCACTTGG-3')。于 72 °C 作用 5 min, 然后立即冰浴 2 min; 加入 1 μ L DTT、1 μ L dNTP mixture (10 mmol/L)、20 U RNaseOUT、4 μ L 5 \times 缓冲液、200 U Superscript III 和 ddH₂O, 25 °C 反应 10 min, 50 °C 反应 50 min 合成 cDNA, 85 °C 10 min 灭活反转录酶。加入 5 U DNA 聚合酶 Klenow 片段 37 °C 反应 60 min 合成双链 cDNA 并 75 °C 灭活 10 min, 随后在此体系中加入 2 U 碱性磷酸酶 (Shrimp

alkaline phosphatase) 和 2.5 U 核酸外切酶 (Exonuclease I) 于 37 °C 反应 60 min, 除去多余的引物和游离的核苷酸, 并 75 °C 灭活 10 min。然后取 10 μ L 上述模板, 加入 2 μ L 10 μ mol/L 锚定序列引物 (pool-1: 5'-GCCGAGCTCTGCAGATATC-3'; pool-2: 5'-GTATCGCTGGACACTGGAC-3'; pool-3: 5'-CGCATTGGTCGGCACTTGGT-3')、5 μ L 10 \times AccuPrime buffer I、1 μ L DNA 聚合酶 (Accuprime Taq DNA Polymerase) 及 ddH₂O, 共 50 μ L 体系进行不依赖序列的单引物扩增 (Sequence-independent single primer amplification, SISPA): 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 68 °C 1 min, 35 个循环。扩增产物使用 QIAquick PCR Purification Kit 试剂盒纯化并溶于 50 μ L 的 TE 缓冲液中。

1.5 Solexa 高通量测序

纯化后的 PCR 产物送华大基因公司 (深圳) 进行 Solexa 高通量测序。将 3 组样品混合后使用超声法打断到 180 bp 左右, 末端分别加上接头, 通过接头 PCR 将 DNA 片段连接到芯片上形成“桥” (Bridge) 并制成文库, 随后应用 4 种荧光标记的核苷酸通过桥式 PCR (Bridge PCR) 进行边合成边测序 (Sequencing By Synthesis, SBS), 获得原始读长数据, 去掉长度 < 100 bp 的读长和锚定引物序列, 通过 SOAPdenovo 软件拼接成重叠序列 (Contig), 随后进行数据库比对分析。首先将获得的重叠序列使用 BLASTn 和 BLASTx 在 GenBank 的非冗余核苷酸序列数据库 (Nonredundant database) 中进行比对, 将 E value < 10⁻³ 的序列作为有意义的序列, 然后按照注释到的物种信息去掉细菌及真核类序列, 余

下的病毒相关序列通过系统进化分析和多序列比对进行鉴定。

1.6 病毒样序列分析

根据 BLAST 注释信息,挑选 E value 较小且同源性较高的病毒样重叠序列使用 DNASTar 编辑,整理后用 MEGA5.0^[26]软件进行系统发生分析,进化树选择基于 Maximum Composite Likelihood 算法的邻接法 (Neighbor-joining method, NJ), Bootstrap 检验设定为 1 000 个重复。使用 DNASTar 软件包的 MegAlign 软件对部分低同源性的病毒样序列和 GenBank 中参考序列的氨基酸序列进行多序列比对,从而进行人工辅助鉴定。

1.7 PCR 检测验证博卡病毒和腺病毒

使用博卡病毒和腺病毒序列信息,分别设计了套式 PCR 对这两种病毒进行验证。通过 GenBank 下载博卡病毒参考序列,使用 Primer Premier 5.0 软件设计检测博卡病毒的简并引物。腺病毒的检测引物参考已发表的文献^[15]。使用 QIAGEN 的 DNA 提取试剂盒对保存的蝙蝠组织样品 (肠道和肺脏) 单样提取 DNA, DNA 提取后进行 PCR 检测。PCR 反应体系为: PCR 反应液 (天根) 25 μL 、ddH₂O 19 μL 、上游引物 (10 pmol/ μL) 2 μL 、下游引物 (10 pmol/ μL) 2 μL 、DNA 模板 2 μL 。PCR 温度条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、53 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 外套反应和内套反应各 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。PCR 产物经电泳鉴定为阳性后,送吉林库美基因公司测序。将获得的序列构建系统进化树,方法与重叠序列建树方法一致。

2 结果

2.1 测序 DNA 样品的制备

经过病毒纯化、核酸提取后使用 ND1000 核酸蛋白紫外定量检测仪对 3 组样品的核酸浓度进行定量。所提取 RNA 和 DNA 总浓度均高于 200 ng/ μL 。经过反转录和不依赖序列的单引物扩增,产物条带为抹带,分布于 2 000 bp 以内,主要集中在 100 bp 至 500 bp 的区域 (图 1)。3 组的 PCR 产物经纯化回收后经 ND1000 核酸蛋白紫外定量检测仪测定 260/280 吸光值比在 1.8 至 2.0 之间,样品浓度 > 800 ng/ μL 。符合 Solexa 测序的要求。

2.2 Solexa 测序结果

通过高通量测序,获得了 11 644 232 个读长,并进一步拼接成 48 872 个重叠序列,平均长度为 136.7 bp。与 NCBI 病毒数据库比对,4 002 条重叠序列注释为病毒,占有重叠序列的 8.2%,其中 2 310 条可注释到 36 个不同的病毒科,另

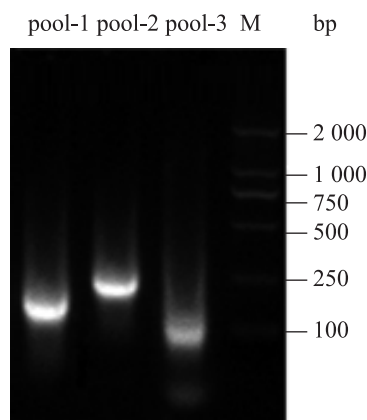


图 1 不依赖序列的单引物扩增结果

Fig. 1 Sequence-independent single primer amplification results of viral nucleic acids. M: DNA marker.

1 692 条重叠序列被定义为疑似病毒序列但未被分类。在这 36 个科中, 44.6% (1 030/2 310) 的序列与 19 个脊椎动物病毒科相关, 包括腺病毒科 (*Adenoviridae*)、疱疹病毒科 (*Herpesviridae*)、乳头瘤病毒科 (*Papillomaviridae*)、细小病毒科 (*Parvoviridae*)、圆环病毒科 (*Circoviridae*)、冠状病毒科 (*Coronaviridae*)、小双节 RNA 病毒科 (*Picobirnaviridae*)、小 RNA 病毒科 (*Picornaviridae*)等; 昆虫病毒相关序列占到了 6.9 % (160/2310), 包括囊泡病毒科 (*Ascoviridae*)、杆状病毒科 (*Baculoviridae*)、多 DNA 病毒科 (*Polydnaviridae*)、布尼亚病毒科 (*Bunyaviridae*) 4 个科; 植物病毒序列占 1.8%

(41/2310) 包括花椰菜花叶病毒科 (*Caulimoviridae*) 等 6 个科; 另外, 还有 43.0% (993/2310) 的序列与噬菌体相关, 包括长尾噬菌体科 (*Siphoviridae*)、短尾噬菌体科 (*Podoviridae*) 等 4 个科 (图 2)。在脊椎动物病毒序列中, 腺病毒、圆环病毒、腺联病毒 (Adeno-associated viruses, AAV)、博卡病毒、细小病毒、小双节 RNA 病毒的序列在 GenBank 中能找到较好的比对结果, 即 $E\ value < 10^{-20}$, 比对得分 > 100 , 且核苷酸或氨基酸序列与已知序列同源性在 60% 至 98%, 经遗传进化分析和分子生物学鉴定后可以确认为已知病毒和新发现的病毒序列; 而疱疹病毒、乳头瘤病毒、冠状病

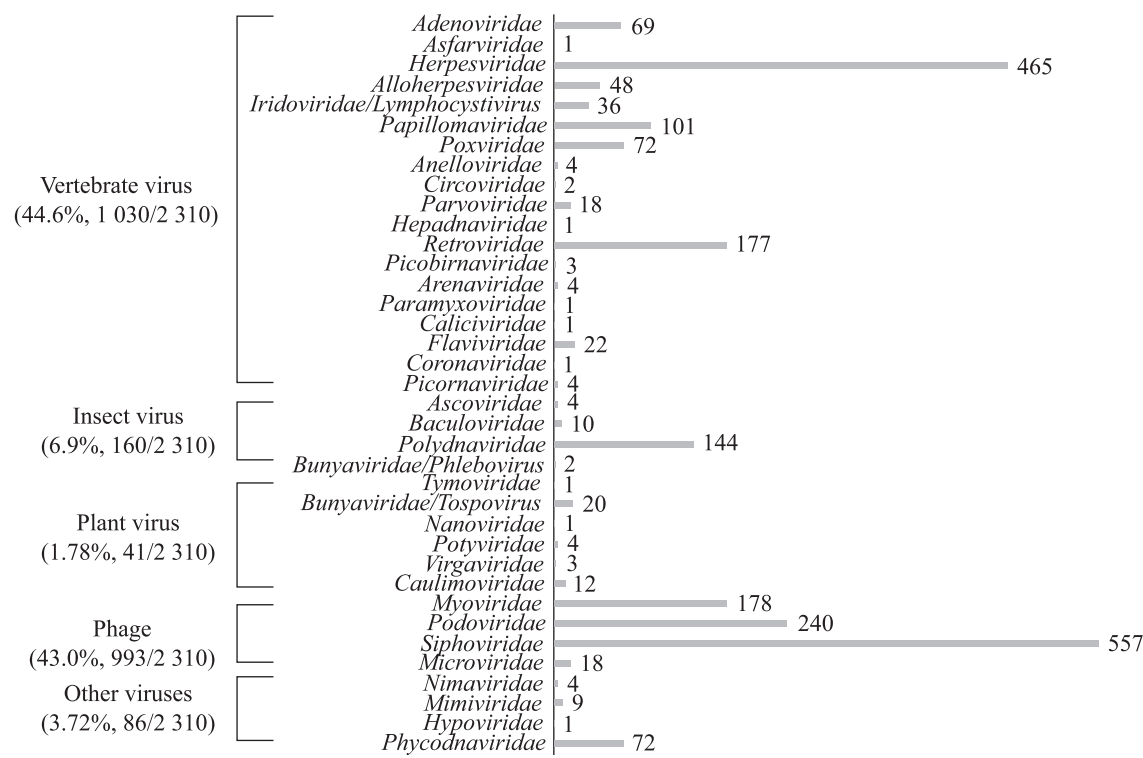


图 2 Solexa 高通量测序获得的重叠序列注释

Fig. 2 Annotation of Solexa contigs. The numbers and percentages of each virus species were labeled on left. The figure on right is the number of the contigs, which are classified into 36 viral families.

毒等相关序列的很大一部分无论是核酸序列还是氨基酸序列与现有序列同源性低于 60%，且 E value 在 10^{-2} ~ 10^{-5} 之间，目前可将其定义为新病毒相关序列。

2.3 细小病毒 (Parvovirus, PV) 重叠序列鉴定

本研究有 2 条重叠序列注释到细小病毒属 (Parvovirus)。其中一条为 291 nt 的 *NSI* 基因片段。通过与 GenBank 数据库 BLASTx 比对，发现与之同源性最高的为小鼠微小病毒 (Mice minute virus)，局部有 70% 的氨基酸同源性；另一条重叠序列为 114 nt 的 *VPI* 基因片段，与小鼠微小病毒有 74% 的氨基酸序列同源性。使用相对较长的 291 nt 的重叠序列 (*BtPV-0866*) 构建的系统进化树。选取细小病毒属的代表序列作为参

考序列的同时用腺联病毒 2 型 (AAV-2) 作为外群对照。进化树显示 *BtPV-0866* 处在细小病毒属的外围，形成一个独立分支 (图 3A)。根据核苷酸序列推导的氨基酸序列长度为 95 个残基，与小鼠微小病毒该区域氨基酸同源性为 56% (图 3B)。利用氨基酸序列进行多序列比对发现，*BtPV-0866* 在保守基序处与参考序列完全相同，如 N 端第 6~13 位的 DQKKGKSK、第 31~48 位仅有 2 个残基的区别，在第 66~80 位区域变异较大，与参考序列仅有一个残基相同；而作为外群对照的 AAV-2 氨基酸序列仅在少数位点与细小病毒属基序相同。根据核苷酸序列和氨基酸序列的鉴定，认为所获得的重叠序列来自新的细小病毒。

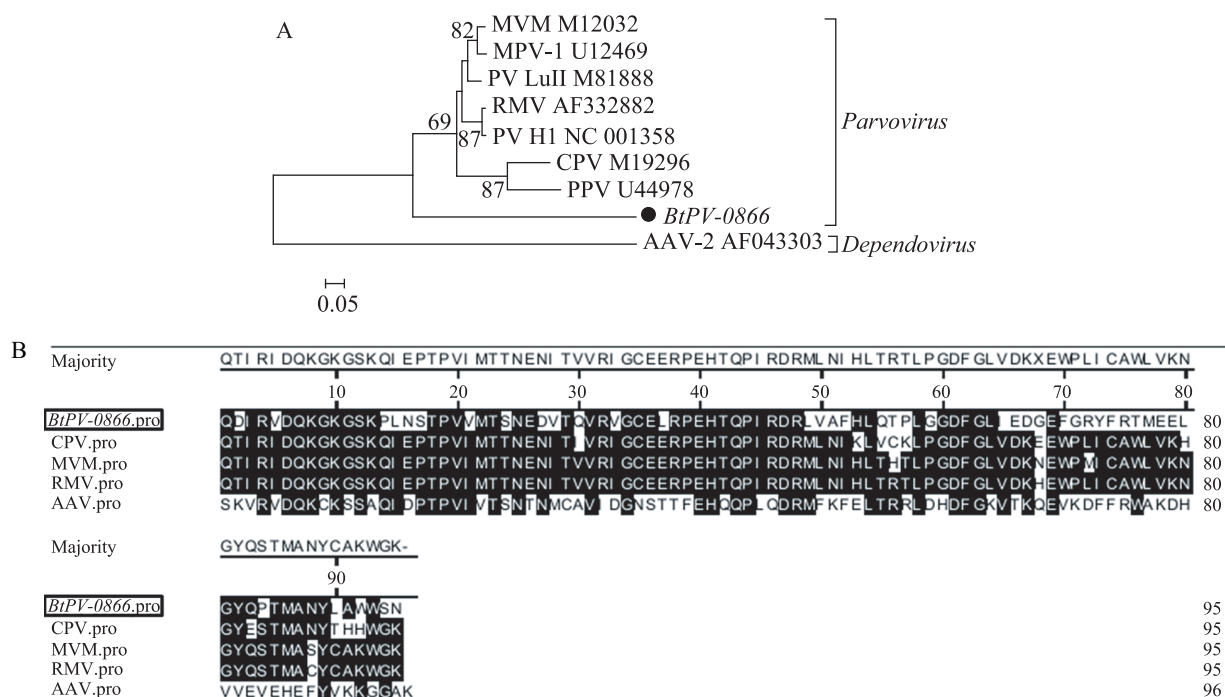


图 3 细小病毒重叠序列鉴定

Fig. 3 Characterization of PV-like contigs. (A) Phylogenetical analysis of PV-like contig *BtPV-0866* with reference sequences based on about 290 nt *NSI* gene. (B) Multiple sequences alignment of deduced amino acid sequences of parvovirus *NSI*. The black boxed aa sequence is majority sequence.

2.4 腺联病毒 (Adeno-associated viruses, AAV) 重叠序列鉴定

之前的研究已在棕果蝠、菊头蝠、鼠耳蝠等蝙蝠粪便内检测到 AAV。本研究中共 11 条重叠序列被注释到依赖病毒属 (*Dependovirus*), 其中 7 条 (长度在 108~318 nt 之间) 与在云南省的大足鼠耳蝠粪便中发现的蝙蝠腺联病毒 YNM 株 (BtAAV-YNM)^[27] 在 6 个不同的区域有 78%~95% 的核苷酸同源性 (图 4A)。如 168 nt 的重叠序列 *BtAAV-0854* 与 BtAAV-YNM 的 *Rep* 基因具有高达

95% 的核苷酸同源性, 而 192 nt 的 *BtAAV-2413* 与 BtAAV-YNM 的 *Cap* 基因具有高达 90% 的核苷酸同源性。其余 4 条重叠序列与 GenBank 数据库中的 AAV 序列有 46%~60% 的核苷酸同源性, 说明还存在其他与已知的 AAV 遗传距离较大的病毒。对裁剪后 150 nt 的 *Cap* 基因序列 *BtAAV-2143* 和 *BtAAV-3759* 的遗传进化分析显示 *BtAAV-2143* 与 BtAdV-YNM 处于同一分支, 遗传距离较近; 而 *BtAAV-3759* 独立成为一个分支, 与 AAV 代表株遗传距离较大, 属于依赖病毒属

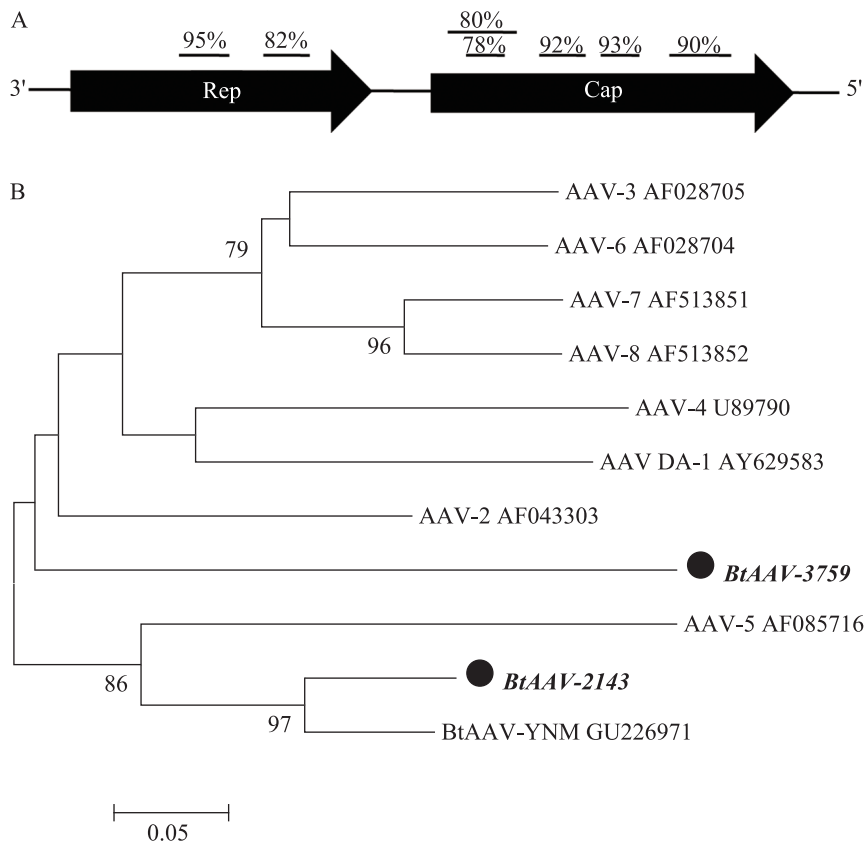


图 4 腺联病毒重叠序列鉴定

Fig. 4 Characterization of AAV-like contigs. (A) Sequence comparison of AAV-like contigs with BtAAV-YNM. The percentages above bars are similarity of contigs with BtAAV-YNM. (B) Phylogenetical analysis of AAV-like contigs with reference sequences based on 150 nt *Cap* gene.

一个新的种 (图 4B)。综合对 11 条疑似 AAV 重叠序列的分析, 虽无法确定这 11 条重叠序列来自多少株病毒, 但可以确定至少有 1 株与 BtAAV-YNM 同源性较高的 AAV 和 1 株与已知的病毒株变异较大的 AAV 存在这批蝙蝠样本中。

2.5 小双节 RNA 病毒 (Picobirnavirus, PBV) 重叠序列鉴定

本研究获得的 3 条 PBV 相关的重叠序列, 1 条位于第一节段与兔小双节 RNA 病毒 (Rabbit

picobirnavirus) 具有 50% 的核苷酸同源性。另外两条位于第二节段, 与人小双节 RNA 病毒 (Human PBV GPBV11) 分别有 61% 和 63% 的核苷酸同源性。通过重叠序列 *BtPBV-1798* 与其他来源的 PBV 第二节段 (编码 *RdRp*) 303 bp 局部序列的进化分析显示出与现有的 PBV 中的 Human PBV GPBV11 相对距离较近, 处于一个进化分支上 (图 5A)。将核苷酸序列翻译为 97 个残基, 与 Human PBV GPBV11 同源性为 55%。多

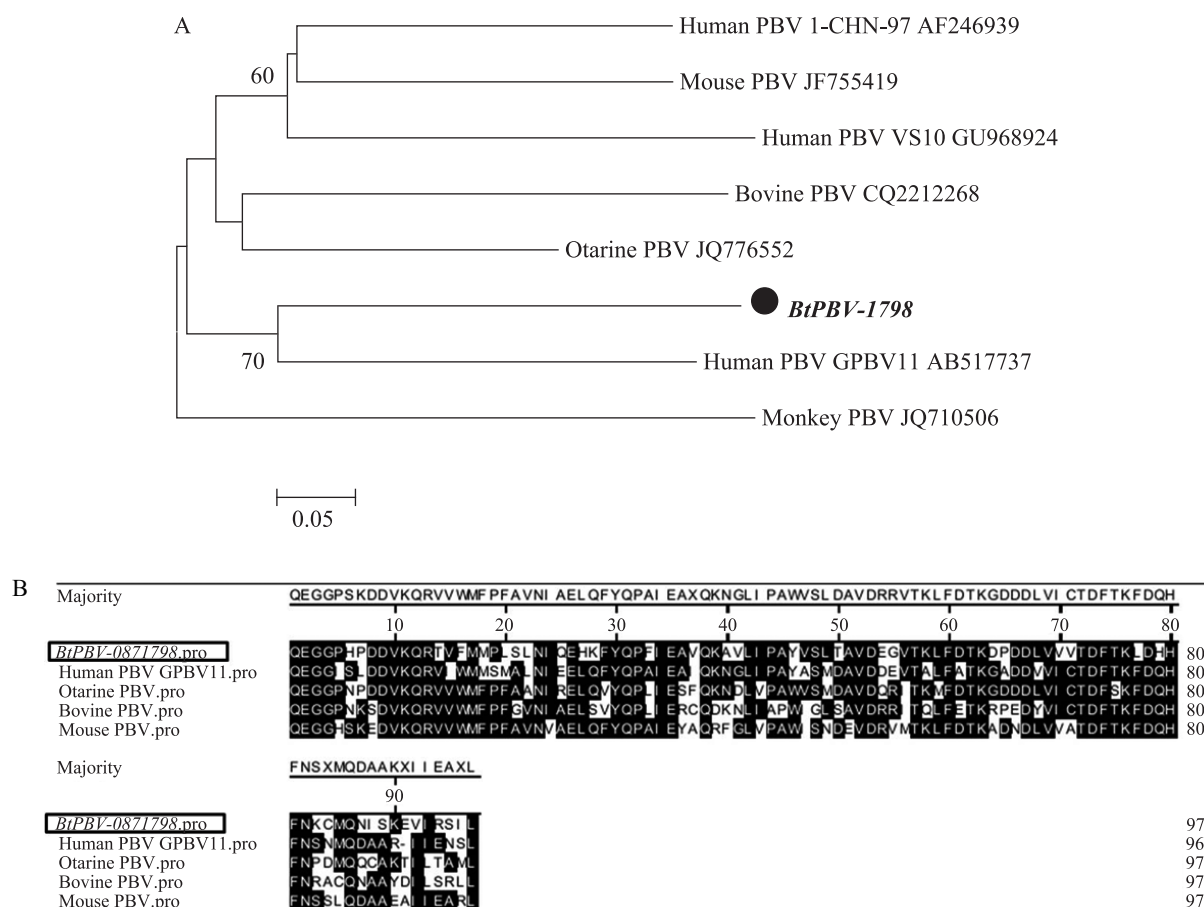


图 5 小双节 RNA 病毒重叠序列鉴定

Fig. 5 Characterization of PBV-like contig. (A) Phylogenetical analysis of PBV-like contigs with reference sequences based on 303 nt *RdRp* gene. (B) Multiple sequence alignment of deduced amino acid sequences of PBV. The black boxed aa sequence is majority sequence. The motif QEGGP, DDVKQR, FYQP, TDFTK and HFN are conservative.

序列比对显示该残基序列与参考序列具有共同的保守残基,如位于序列 N 端的 QEGGP、DDVKQR 和序列中部的 AVD、FYQP、TDFTK、HFN 等保守基序。而在氨基酸序列变异较大的区域,如 37 至 49 位和第 84 至 96 位残基,重叠序列以及其他参考序列相互之间均有较大的变异(图 5B)。

2.6 博卡病毒 (bocavirus, BoCV) 重叠序列鉴定及 PCR 验证

本研究发现了一条重叠序列注释到细小病毒科的博卡病毒属 (*Bocavirus*)。BLAST 比对发现这条序列位于博卡病毒 *NP1* 基因,与 CnMV 核苷酸同源性最高,为 62%。通过 PCR 扩增博卡病毒 588 nt 的 VP1 部分片段,在云南的亚洲长翼蝠肠道样品中检测出 2 份阳性样品(图 6A)。经测序两样品之间同源性 100%,为同一毒株,暂命名为 Bat bocavirus YNMI-1 (GenBank Accession No. KC172378)。该序列与 CnMV 有 55% 的氨基酸同源性。PCR 扩增序列与参考序列进行系统进化分析显示所获得的 Bat bocavirus YNMI-1 序列与 CnMV、海狮博卡病毒 (Sea lion BoCV)、猫博卡病毒 (FBoCV) 处于同一个进化分支,但在这个进化分支上 Bat bocavirus YNMI-1 和另外 3 株病毒有相对较大进化距离。YNMI-1 与此前在海南鼠耳蝠体内发现的 1 株蝙蝠博卡病毒 (Myotis BoCV-1) 处在不同的进化分支且仅有 56% 的核苷酸同源性(图 6B),说明两株蝙蝠博卡病毒无直接的进化关系即蝙蝠博卡病毒具有基因多样性。利用翻译的氨基酸序列与参考序列进行多序列比对显示,本研究所扩增的 DNA 片段序列中部在标尺的第 46~68 位 (HVR1)、84~133 位 (HVR2)、179~194 位 (HVR3)

存在 3 个高度变异区,序列之间无论是氨基酸的种类还是长度都有很大差异。YNMI-1 在 HVR1 区域相比 Sea lion BoCV 和 FBoCV 缺失了 6 个氨基酸残基;在 HVR2 和 HVR3 区域,YNMI-1 相对于主要序列分别额外插入了 8 个和 5 个氨基酸残基(图 6C)。YNMI-1 在中部的保守基序如标尺标记的 69~82 位与主序列仅有 1 个残基的差别,在 137~147 位残基完全相同。

2.7 腺病毒 (Adenovirus, AdV) 重叠序列鉴定及 PCR 验证

本研究有 69 条重叠序列注释为哺乳动物腺病毒属 (*Mastadenovirus*)。BLAST 比对发现这些序列都属于哺乳动物腺病毒的 *hexon*、*polymerase*、*penton*、*pX*、*pVI* 等基因。其中 3 条重叠序列与 GenBank 中西班牙的一株腺病毒 Has070613-2 *pol* 基因或 *hexon* 基因有分别高达 98%、96% 和 91% 的核苷酸同源性。体现了同一蝙蝠腺病毒毒株分布的广泛性。其余重叠序列与已知的腺病毒序列同源性均低于 83%。

通过套式 PCR 扩增腺病毒 270 nt *pol* 基因检测,从湖南的样品中检测出一份腺病毒阳性样品(图 7A),暂命名为 bat adenovirus HNH1-1 (GenBank Accession No. KC171020)。经比对与犬腺病毒 (CAdV) 和猪腺病毒 A (PAdV-A) 具有 71% 的核苷酸同源性,与蝙蝠腺病毒 A (BtAdV-A) 和蝙蝠腺病毒 B (BtAdV-B) 具有 70% 的核苷酸同源性。系统进化分析显示 BtAdV-HNH1-1 属于哺乳动物腺病毒与 CAdV、BtAdV-A、BtAdV-B、PAdV-A 处在同一个大的分支,相对与犬腺病毒距离最近(图 7B)。由于扩增片段较短,新发现的蝙蝠腺病毒与其他蝙蝠腺病毒的进化关系还有待进一步研究。

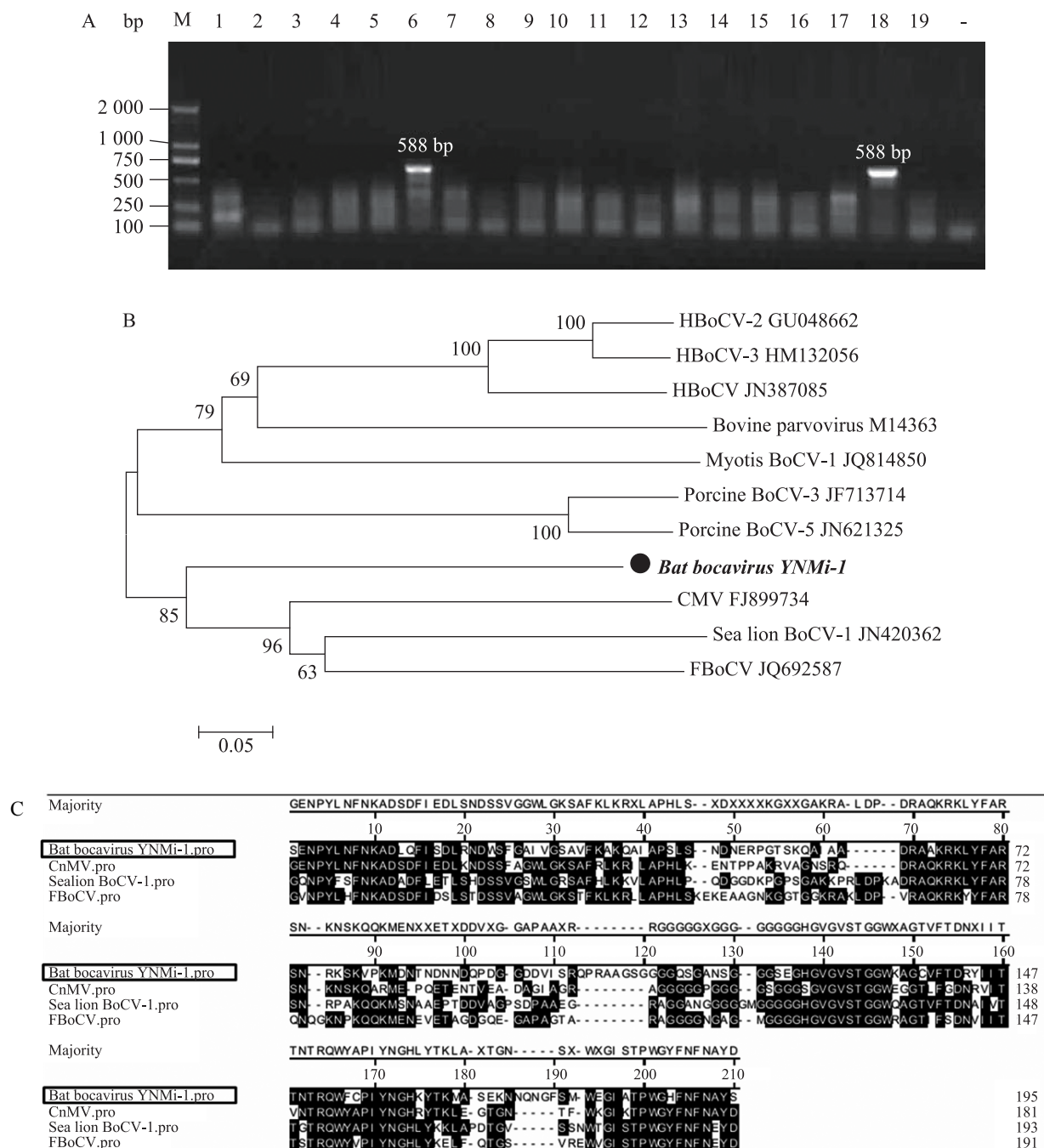


图6 博卡病毒 PCR 扩增和序列鉴定

Fig. 6 Characterization of bocavirus amplicon. (A) The result of bocavirus PCR amplification. M: DNA marker DL2000; lane 1 to 19 represent samples; lane 20: ddH₂O. (B) About 585 nt VP1 gene-based phylogenetical analysis of bocavirus PCR amplicon with reference. (C) Multiple sequences alignment of deduced amino acid sequences of bocavirus. The black boxed aa sequence is majority sequence.

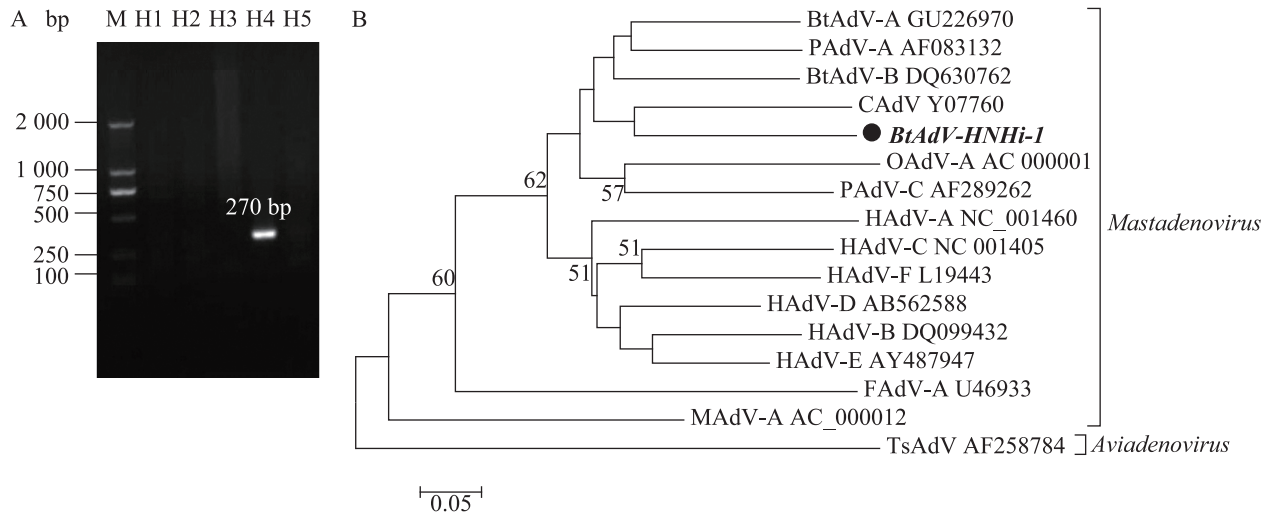


图 7 腺病毒 PCR 扩增和序列鉴定

Fig. 7 Characterization of adenovirus amplicon. (A) The result of adenovirus PCR amplification. (B) Phylogenetical analysis of adenovirus PCR amplicon compared with reference sequences based on about 270 nt hexon gene.

3 讨论

随着人类活动区域的不断扩大,蝙蝠的生存空间遭到侵占,创造了更多蝙蝠与人类接触的机会,使得许多高致病性的病毒由蝙蝠传播给人类或家畜。发现蝙蝠携带的高致病性病毒和新型病毒、监控蝙蝠病毒变异,已成为人们进行蝙蝠病毒流行病学研究的重要内容。病毒宏基因组学技术在这一领域的研究中效率最高、覆盖的病毒面最广。目前病毒宏基因组学不仅已用于水体、土壤等无机环境,也在人、浣熊、火鸡、海龟等动物携带病毒的研究中展现出明显优势,其获得的结果系统地描绘了它们的病毒组^[28]。本研究通过建立组织病毒宏基因组学方法,对蝙蝠的呼吸系统和消化系统(包括内容物)两类组织进行病毒组学研究。通过 Solxa 测序和生物信息学注释获得的病毒相关重叠序列占总数的 8.2%,而之前的病毒宏基因组研究病毒序列占总序列数的

0.1%~58% 不等^[22-25]。并且注释为病毒的丰度与前面 4 份蝙蝠病毒宏基因组研究结果也有差异,首先在本研究中噬菌体占了 43.0%,属于仅次于脊椎动物病毒的第二大类的病毒,在以前美国和我国的一例研究结果显示噬菌体的序列在多个混样(pool)中数量居第一或第二^[22,24];其次,脊椎动物病毒所占比例最大,高达 44.6%,而之前美国和我国的蝙蝠粪便病毒组研究结果显示的脊椎动物病毒含量相对较少,甚至低于 10%。而本研究中的昆虫病毒和植物病毒序列数量较少,而在之前的中国蝙蝠粪便的病毒组研究中昆虫病毒占第二位置^[24]。这些区别可能是因为我们所处理的肠道和肺脏组织相对较多而粪便含量少,而之前的研究集中在蝙蝠排出的粪便,而昆虫病毒和植物病毒恰恰只存在于蝙蝠的粪便中,并不在蝙蝠体内细胞中增殖。

本研究尝试利用加在随机引物前端的锚定引物序列的差异对湖南、云南、吉林三地的蝙蝠

病毒进行分组,但由于在测序时使用超声法将 DNA 打断到 180 bp 左右,我们所扩增的 DNA 产物长度大于 500 bp 的 DNA 片段被打断后,随机 PCR 产物中间部分序列丢失了锚定引物序列信息,无法完成分组,故本次高通量测序结果做数据处理时放弃了对蝙蝠病毒进行地域上的分组。但病毒株的地理信息我们仍然可以从后续的 PCR 验证中获得。在以后的研究中,可以通过凝胶回收 300 bp 以内的随机 PCR 产物进行高通量测序来解决这一问题,从而对不同组样品的测序结果进行区分。

疱疹病毒 (Herpesviruses)、乳头瘤病毒 (Papillomaviruses) 等相关序列与已知病毒有着低于 60% 甚至更低的同源性,这些低同源性的序列可能源自一些我们尚不知道的病毒,相信随着病毒数据库的不断完善,这些类似病毒序列将被注释到。还有其他一些重叠序列,如牛病毒性腹泻病病毒 (BVDV),所获得重叠序列虽然与 BVDV 具有高达 90% 以上的同源性,但同时与动物染色体上的一段基因序列也有着很高的同源性。这可能反映了病毒基因能整合到某些宿主基因组中,这也是 Cui 等能从蝙蝠脑组织的转录组中发现反转录病毒的原因^[29]。

本研究发现的病毒包括细小病毒、博卡病毒、小双节 RNA 病毒、腺病毒和腺联病毒等。博卡病毒属于细小病毒亚科,博卡病毒属,目前国际病毒分类命名委员会 (ICTV) 规定该属仅有两个种:牛细小病毒 (Bovine parvovirus, BPV) 和犬微小病毒 (Canine minute virus, CnMV)^[30],近年来博卡病毒的宿主范围从牛、犬扩大到了人、猩猩、猪、海狮、蝙蝠等动物。人博卡病毒能造成儿童的呼吸道感染^[31]、胃肠炎和腹泻^[32];

猪博卡病毒则在呼吸道感染的仔猪体内有较高阳性率^[33],因此该病毒具有公共卫生意义。小双节 RNA 病毒科目前只有小双节 RNA 病毒属 (*Picobirnavirus*),成员为具有两个节段的双链 RNA 病毒,人的小双节 RNA 病毒常在腹泻病人的粪便中发现,在家畜、禽类、自然环境中也能检测到 PBV^[34]。腺病毒科包含 5 个属,均为无囊膜的双链 DNA 病毒,感染谱广泛,能在几乎所有种类的脊椎动物体内发现^[35]。其中人腺病毒的一些血清型能造成呼吸道感染和流行性结膜炎^[36-37]。本研究通过建立组织病毒宏基因组学方法,对我国三地蝙蝠组织病毒组进行研究,并对一部分结果进行了系统进化分析、多序列比对以及 PCR 检验。其中一些序列无论核苷酸序列的同源性、序列的遗传距离还是推导氨基酸序列的特征都支持这些序列可能是新病毒,如细小病毒、博卡病毒、腺病毒、小双节 RNA 病毒、圆环病毒等。还有一些序列与已知病毒序列有高于 90% 的同源性,如腺联病毒、辣椒温和斑点病毒、部分腺病毒以及多种噬菌体等。本研究未发现该地区蝙蝠携带有埃博拉病毒、尼帕病毒、SARS 冠状病毒等已知对人具有高致病性的病毒,但我们不应放松对新发和再发蝙蝠源人兽共患病的监测。我国蝙蝠分布广泛、种类众多,全面地研究我国不同地区的蝙蝠病毒组为防控蝙蝠将病毒传播给人类提供了重要信息。

REFERENCES

- [1] Teeling EC, Springer MS, Madsen O, et al. A molecular phylogeny for bats illuminates biogeography and the fossil record. *Science*, 2005, 307: 580-584.
- [2] Calisher CH, Childs JE, Field HE, et al. Bats:

- important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin Microbiol Rev*, 2006, 19: 531–545.
- [3] Freuling CM., Beer M, Conraths FJ, et al. Novel lyssavirus in Natterer's bat, Germany. *Emerg Infect Dis*, 2011, 17: 1519–1522.
- [4] Kuzmin IV, Mayer AE, Niezgodna M, et al. Shimoni bat virus, a new representative of the *Lyssavirus* genus. *Virus Res*, 2010, 149: 197–210.
- [5] Ge X, Li J, Peng C, et al. Genetic diversity of novel circular ssDNA viruses in bats in China. *J Gen Virol*, 2011, 92: 2646–2653.
- [6] Du L, Lu Z, Fan Y, et al. Xi River virus, a new bat reovirus isolated in southern China. *Arch Virol*, 2010, 155: 1295–1299.
- [7] Chu DK, Poon LL, Guan Y, et al. Novel astroviruses in insectivorous bats. *J Virol*, 2008, 82: 9107–9114.
- [8] Marsh GA, de Jong C, Barr JA, et al. Cedar virus: a novel Henipavirus isolated from Australian bats. *PLoS Pathog*, 2012, 8: e1002836.
- [9] Shi Z, Hu Z. A review of studies on animal reservoirs of the SARS coronavirus. *Virus Res*, 2008, 133: 74–87.
- [10] Li W, Shi Z, Yu M, et al. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science*, 2005, 310: 676–679.
- [11] Augustina A, Heather J, Baldwin, et al. Human betacoronavirus 2c EMC/2012-related Viruses in Bats, Ghana and Europe. *Emerg Infect Dis*, 2013, 19: 456–459.
- [12] Zhang HL, Shi HF, Liu LH, et al. Isolation of chikungunya virus from bat in Yunnan province and serological investigations. *Chin J Virol*, 1989, 5(1): 31–36 (in Chinese).
张海林, 施华芳, 刘丽华, 等. 从云南省蝙蝠中分离基孔肯亚病毒及血清抗体调查. *病毒学报*, 1989, 5(1): 31–36.
- [13] Zhao CS, Jiang LH, Yu XL, et al. Isolation of Ross River Virus and its Antibody Prevalance in Hainan Province. *Chin J Vet Sci*, 1997, 17(3): 241–243 (in Chinese).
赵春生, 蒋廉华, 余兴龙, 等. 从海南省蝙蝠脑中分离出 1 株罗斯河病毒及其血清抗体调查. *中国兽医学报*, 1997, 17(3): 421–423.
- [14] Zhang HL, Zhang YZ, Huang WL, et al. Isolation of Japanese encephalitis virus from brain tissue of bat in Yunnan province. *Virol Sin*, 2001, 16(1): 74–77 (in Chinese).
张海林, 张云智, 黄文丽, 等. 从云南省蝙蝠脑组织中分离出乙型脑炎病毒. *中国病毒学*, 2001, 16(1): 74–77.
- [15] Li Y, Ge X, Zhang H, et al. Host range, prevalence, and genetic diversity of adenoviruses in bats. *J Virol*, 2010, 84: 3889–3897.
- [16] Wang X, Qi D, Hu J. Recent researches on Chiroptera in China. *Sichuan J Zool*, 2004, 23(2): 153–157 (in Chinese).
王晓琴, 齐敦武, 胡锦涛. 中国翼手目研究进展. *四川动物*, 2004, 23(2): 153–157.
- [17] Djikeng A, Kuzmickas R, Anderson NG, et al. Metagenomic analysis of RNA viruses in a fresh water lake. *PLoS ONE*, 2009, 4: e7264.
- [18] Schoenfeld T, Patterson M, Richardson PM, et al. Assembly of viral metagenomes from yellowstone hot springs. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74: 4164–4174.
- [19] Tang P, Chiu C. Metagenomics for the discovery of novel human viruses. *Future Microbiol*, 2010, 5: 177–189.
- [20] Lu J, Domingo JS. Turkey fecal microbial community structure and functional gene diversity revealed by 16S rRNA gene and metagenomic sequences. *J Microbiol*, 2008, 46: 469–477.
- [21] Day JM, Ballard LL, Duke MV, et al. Metagenomic analysis of the turkey gut RNA virus community. *Virol J*, 2010, 7: 313.
- [22] Donaldson EF, Haskew AN, Gates JE, et al. Metagenomic analysis of the viromes of three North American bat species: viral diversity among different bat species that share a common habitat. *J Virol*, 2010, 84: 13004–13018.
- [23] Li L, Victoria JG, Wang C, et al. Bat guano virome: predominance of dietary viruses from insects and plants plus novel mammalian viruses. *J Virol*, 2010,

- 84: 6955–6965.
- [24] Ge X, Li Y, Yang X, et al. Metagenomic analysis of viruses from bat fecal samples reveals many novel viruses in insectivorous bats in China. *J Virol*, 2012, 86: 4620–4630.
- [25] Wu Z, Ren X, Yang L, et al. Virome analysis for identification of novel Mammalian viruses in bat species from Chinese provinces. *J Virol*, 2012, 86: 10999–11012.
- [26] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*, 2011, 28: 2731–2739.
- [27] Li Y, Ge X, Hon CC, et al. Prevalence and genetic diversity of adeno-associated viruses in bats from China. *J Gen Virol*, 2010, 91: 2601–2609.
- [28] He B, Tu CC. The advances and applications of viral metagenomics. *Acta Vet et Zoo Sin*, 2012, 43(12): 1865–1870 (in Chinese).
何彪, 涂长春. 病毒宏基因组学的研究现状及应用. *畜牧兽医学报*, 2012, 43(12): 1865–1870.
- [29] Cui J, Tachedjian M, Wang L, et al. Discovery of retroviral homologs in bats: implications for the origin of mammalian gammaretroviruses. *J Virol*, 2012, 86: 4288–4293.
- [30] International Committee on Taxonomy of Viruses. Master, Species, List 2011 v2. [EB/OL]. [2012-12-15] <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?bhcp=1>
- [31] Allander T, Tammi MT, Eriksson M, et al. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 12891–12896.
- [32] Campe H, Hartberger C, Sing A. Role of human bocavirus infections in outbreaks of gastroenteritis. *J Clin Virol*, 2008, 43: 340–342.
- [33] Zhai S, Yue C, Wei Z, et al. High prevalence of a novel porcine bocavirus in weanling piglets with respiratory tract symptoms in China. *Arch Virol*, 2010, 155: 1313–1317.
- [34] Ganesh B, Banyai K, Martella V, et al. Picobirnavirus infections: viral persistence and zoonotic potential. *Rev Med Virol*, 2012, 22: 245–256.
- [35] Benko M, Harrach B. Molecular evolution of adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2003, 272: 3–35.
- [36] McNeill KM, Ridgely Benton F, Monteith SC, et al. Epidemic spread of adenovirus type 4-associated acute respiratory disease between U.S. Army installations. *Emerg Infect Dis*, 2000, 6: 415–419.
- [37] Jawetz E. The story of shipyard eye. *Br Med J*, 1959, 1: 873–876.

(本文责编 郝丽芳)