

黑蜂王台病毒中国 BQCV-JL1 株 5'UTR 的序列分析*

杨倩^{1,2**} 张健³ 宋战昀^{1***} 郑言¹ 王向辉¹
隋佳辰¹ 王振国¹ 牟峻¹

(1. 吉林出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 长春 130062; 2. 吉林农业大学, 长春 130118;
3. 长春生物制品研究所有限责任公司, 长春 130062)

摘要 蜜蜂黑蜂王台病毒 (Black queen cell virus, BQCV) 是引起蜜蜂黑蜂王台病的病原体, 主要感染蜜蜂蜂王幼虫。BQCV 基因组为单正链 RNA, 包括 5'端的 ORF 1 和 3'端的 ORF 2 两个开放阅读框。分别编码非结构蛋白和结构蛋白。本实验室首次成功分离鉴定得到中国首株 BQCV 毒株, 命名为中国 BQCV-JL1 株。该株全长为 8 358 nt。【目的】 本文主要研究该株核苷酸序列位置为 1~1 124 nt 的片段, 该段序列的 1~545 nt 为该毒株的 5'UTR 区域。【方法】 通过 Blast 及 DNASTar 等软件对核苷酸及氨基酸序列进行分析。【结果】 5'UTR 区域的同源性为 94%~99%, 为高度保守序列。【结论】 经 Mega5 软件作多重序列对比分析得知, 该中国 BQCV-JL1 株的 5'UTR 区域与其他毒株差异性很大, 经分析推断原因为碱基的缺失与碱基置换。

关键词 BQCV, 5'UTR, RT-PCR, 序列分析, 进化树分析

Analysis of the sequence of the 5'UTR region of the Chinese black queen cell virus-JL1

YANG Qian^{1,2**} ZHANG Jian³ SONG Zhan-Yun^{1***} ZHENG Yan¹ WANG Xiang-Hui¹
SUI Jia-Chen¹ WANG Zhen-Guo¹ MOU Jun¹

(1. Center of Technology, Jilin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Changchun 130062, China;
2. Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 3. Changchun Institute of Biological Products Company Limited,
Changchun 130062, China)

Abstract Black queen cell virus (BQCV) is a pathogen that mainly infects the queen bee larvae. The BQCV genome has a single positive-stranded RNA and two open reading frames (ORF); ORF 1 at the 5' end and ORF 2 at the 3' end, encoding non-structural, and structural, proteins respectively. Our laboratory has successfully isolated and identified the first BQCV strain in China, named Chinese BQCV-JL1 strain, which consists of 8 358 nucleotides. 【Objectives】 To characterize BQCV nucleotide sequences between 1 nt and 1 124 nt, and specifically the fragment containing the 5'UTR region (1-545 nt). 【Methods】 Nucleotide and amino acid sequences were analyzed using Blast and DNASTar software. 【Results】 The 5'UTR region is highly conserved with homology between 94% and 99%. 【Conclusion】 Mega5 software for multiple sequence alignment analysis shows that the Chinese BQCV-JL1 strain is very different from other BQCV strains. We infer that this is because of base deletion and base replacement.

Key words BQCV, 5'UTR, RT-PCR, sequence analysis, phylogenetic tree

* 资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金项目 (31001065); 国家质检总局科技计划项目 (2013IK033)

**第一作者 First author, E-mail: yangqian_0429@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: zhanyun-song@163.com

收稿日期 Received: 2014-11-25, 接受日期 Accepted: 2015-03-12

蜜蜂黑蜂王台病是由黑蜂王台病毒 (Black queen cell virus, BQCV) 引起的蜜蜂蜂王幼虫病, 主要症状为导致患病蜂王幼虫体色变黄, 表皮逐渐硬化呈囊状; 发病蜂蛹体色变暗, 死亡迅速; 受感染的蜂王体色先变为灰白色, 然后变黑, 甚至可导致王台内壁变成棕色或黑色。BQCV 不仅影响蜜蜂的形态, 也会影响蜜蜂的生理及行为, 最终导致整个蜂群死亡。1977 年 Bailey 和 Woods 首次发现并命名其为 BQCV。最新研究发现, BQCV 能在世界范围内的不同蜜蜂种间甚至是非膜翅类昆虫种属间广泛传播, 尤其是在西方蜜蜂 *Apis mellifera* Linnaeus 蜂群中, 是感染率最高的蜜蜂病毒病之一 (Tentcheva *et al.*, 2004; Berényi *et al.*, 2006; Baker and Schroeder, 2008; Kajobe *et al.*, 2010)。

BQCV 在分类上属于类小核糖核酸病毒 (Picorna-like viruses), 双顺反子病毒科 (Dicistroviridae), 蟋蟀麻痹病毒属 (*Cripavirus*) (Mayo, 2002), 病毒粒子为无囊膜、直径为 30 nm 的正二十面体。Leat 等 (2000) 首次测定了 BQCV 全基因组序列, 截止目前共完成 6 株 BQCV 全基因组序列测定。病毒基因组为单正链 RNA, 包括 ORF 1 和 ORF 2 两个开放阅读框。5'端的阅读框 (ORF 1) 编码复制酶蛋白, ORF1 可编码 3 种蛋白, 分别是解旋酶、3C 样半胱氨酸蛋白酶和 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RdRp)。ORF1 和 ORF2 之间存在一个非编码区, 为内部核糖体进入位点 (IRES), 可促进 ORF2 的翻译起始。ORF2 编码 4 个衣壳蛋白, 其分子量分别为 34、32、29 和 6 ku。在基因组的 5'端和 3'端分别为 5'端非翻译区 (5'UTR) 和 3'端非翻译区 (3'UTR)。

本实验室首次成功分离鉴定得到新的 BQCV 毒株, 为中国首株 BQCV 毒株, 命名为中国 BQCV-JL1 株。该株全长为 8 358 nt。将该全基因组序列重新分段设计 10 对引物, 尽量在各段片段中包含基因功能区。本研究为选取该毒株第一段引物序列合成的片段, 位于核苷酸序列位置为 1~1 124 nt, 该段序列的 1~545 nt 为该毒

株的 5'UTR 区域。本文将该段序列通过 Blast 对比发现, 共显示 7 段序列, 该 7 段序列中有 6 株序列为全基因组序列, 说明世界范围内针对 BQCV 的 5'UTR 区域的研究甚少。而该 5'UTR 区域序列 Blast 结果显示同源性的 94%~99%, 说明该段序列高度保守。

1 材料与方法

1.1 材料

蜜蜂病料来自中国吉林省蜂场, 为高加索蜜蜂 (*Apis mellifera caucasica*) 与意大利蜜蜂 (*Apis mellifera ligustica*) 的杂交品种, 眼观可见蜜蜂蜂体颜色变暗变黑。

1.2 主要试剂及仪器

Ex Taq DNA 聚合酶、dNTP (各 2.5 mmol/L)、10×Ex Taq Buffer 缓冲液、PMD-18T 载体、DL 2000 DNA Marker、焦炭酸二乙酯 (DEPC)、Prime Script 1st Strand cDNA Synthesis Kit、TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 等购自 TaKaRa 宝生物工程 (大连) 有限公司, 核酸提取试剂盒 (磁珠法) (Ex-RNA/DNA 病毒 2.0) 购自西安天隆科技有限公司。

PCR 扩增仪 (Biometra Tgradient-96, 德国 Biometra 公司)、高速冷冻离心机 (SIGMA3K30, 德国西格玛公司)、核酸蛋白分析仪 (Gene Spec V, Hitachi NaKa Instruments Co., Ltd. 日本)、电泳仪 (SA-VANT PS500A 美国)、凝胶成像系统 (Kodak EDAS290, 美国柯达公司)、生化恒温培养箱、微量移液器 (0.1~1 000 μ L B10HIT, 芬兰)、恒温水浴锅、磁珠核酸提取仪 (TIANLONG NP968, 西安天隆科技有限公司) 等。

1.3 引物设计与合成

本实验室对中国 BQCV-JL1 株基因组全长分段设计引物, 该段序列位于全长的第 1 对引物处, 位于核苷酸序列的 1~1 124 nt, 设计的一对寡核苷酸引物, P1: 5'-CGG ACG TCG TTA ACT

CTA -3'和 P2 : 5'- AGATATGAGAAAGAAAATA GCA -3', 该段序列为包含 BQCV 毒株的 5'UTR 区域的片段, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.4 病毒 RNA 提取

取蜜蜂病料放置于 10 mL 灭菌离心管中, 加入 5 mL 无菌 PBS 研磨。研磨后的匀浆液 14 000 r/min, 4 ℃ 离心 30 min, 取初步离心后的上清液 200 μ L 加入到核酸提取试剂盒中, 依照产品说明书加样和操作, 并将其放入磁珠核酸提取仪中 36 min 后回收 RNA。将提取的总 RNA 放入超低温冰箱 (- 80 ℃) 保存备用。

1.5 RT-PCR 扩增

用 Prime Script 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) 合成 cDNA, 操作按说明书进行。PCR 反应是在 PCR 扩增仪中进行的。反应条件: 95 ℃ 预变性 5 min, 一个循环; 95 ℃ 变性 1 min, 55 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 1 min, 30 个循环; 72 ℃ , 10 min 一个循环; 最后设置温度维持在 4 ℃ 。

1.6 目的基因的克隆

PCR 扩增的产物经琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶成像系统成像, 检测其片段的大小。目标条带切割下来后, 用 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0 回收试剂盒进行回收。回收片段与 pMD18-T Vector 载体连接。重组克隆经蓝白斑筛选和酶切鉴定后送大连宝生物技术有限公司进行测序。

1.7 测序及序列分析

序列在 National centre for biotechnology information (NCBI) 的 GenBank 上用 Basic local alignment search tool (Blast) 进行鉴定及比对, 并用 DNASTar 及 Mega5 (Tamura *et al.*, 2011) 软件进行序列分析。

1.8 BQCV 进化树的构建及分析

对中国 BQCV-JL1 株与 GenBank 上公布的 6

株 BQCV 毒株全基因组序列 BQCV South Africa (AF 183905) \ BQCV South Korea (JX 149531) \ BQCV Hungary-10 (EF 517515) \ BQCV Poland-4 (EF 517519) \ BQCV Poland-5 (EF 517520) 及 BQCV Poland-6 (EF 517521), 以及一株 BQCV Austria-5 (EF517505) 进行对比分析。用 DNASTar 软件做核苷酸序列的残基化分析及使用邻接法 (Neighbor-joining method) 构建进化树。用 Mega5 分析软件中的 Clustal W 程序进行多重序列对齐分析, 对比序列差异性。

2 结果与分析

2.1 pMD-18T-BQCV-JL1-1 双酶切鉴定结果

用中国 BQCV-JL1 株全基因组序列的第一段序列引物 P1 和 P2 对病料进行 RT-PCR 检测、克隆及质粒双酶切鉴定, 经与 pMD-18T 载体相连接, 克隆表达的质粒命名为 pMD-18T-BQCV-JL1-1, 结果如图 1 所示。

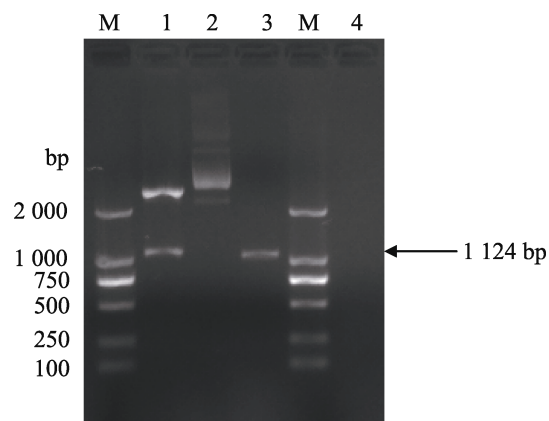


图 1 *pMD-18T-BQCV-JL1-1* 双酶切鉴定结果

Fig. 1 Identification results of cloning plasmid *pMD-18T-BQCV-JL1-1* by enzyme digestion

M: DL 2 000 DNA marker; 1: 酶切位点为 *EcoR* 和 *BamH* 的双酶切产物; 2: *pMD-18T-BQCV-JL1-1* 质粒; 3: RT-PCR 产物; 4: PCR 空白对照。

M: DL 2000 DNA marker; 1: Double enzyme digestion products of BQCV, the restriction sites are *EcoR* and *BamH*; 2: Plasmid named *pMD-18T-BQCV-JL1-1*; 3: RT-PCR product; 4: PCR blank control.

2.2 BQCV PCR 产物序列作进化树分析

对上述 PCR 产物进行序列测定, 通过 Blast 功能与 Genbank 上公布的其他对应位置的序列进行同源性比较结果显示, 同源性为 86%~93%。通过 DNASTAR 软件的残基化分析功能对该段序列作进一步分析, 得到相同结果, 具体结果如图 2 所示。

将中国 BQCV-JL1 株全基因组序列第一段引物作 PCR 合成的产物同 GenBank 上公布的其他 7 株序列 (6 株全基因组序列和 1 株奥地利序列) 共同构建进化树, 如图 3 所示, 国家名称后

显示各序列的 GenBank 登录号。

在 NCBI 上的 Blast 上的对比结果显示: 中国 BQCV-JL1 株与韩国毒株 (South Korea, JX149531) 的同源性最高, 93%, 残基化分析结果显示, 同源性为 93.1%, 进化树分析结果显示, 中国 BQCV-JL1 株与韩国毒株在同一进化树分枝中, 亲缘关系最近。3 种方法得出相同的结果, 均表明中国 BQCV-JL1 株与韩国毒株的同源性最高, 亲缘关系最近。

2.3 BQCV 的 5'UTR 区域的基因序列残基化分析

作者在另一文中对该实验室分离鉴定到的

Percent identity									
	1	2	3	4	5	6	7	8	
1		91.7	98.1	89.3	93.0	95.1	86.5	94.8	1 奥地利-5 (EF517505).seq
2	8.9		92.1	89.3	90.8	91.7	86.8	93.1	2 中国 JL1 (KP119603).seq
3	1.9	8.4		90.3	94.1	95.8	87.7	95.1	3 匈牙利-10 (EF517515).seq
4	11.6	11.6	10.5		94.4	92.2	89.2	89.0	4 波兰-4 (EF517519).seq
5	7.3	9.9	6.2	5.8		97.1	88.0	91.1	5 波兰-5 (EF517520).seq
6	5.1	8.9	4.3	8.3	2.9		87.3	93.0	6 波兰-6 (EF517521).seq
7	15.0	14.7	13.6	11.7	13.2	14.1		87.1	7 南非 (AF183905).seq
8	5.5	7.3	5.2	12.1	9.5	7.4	14.3		8 韩国 (JX149531).seq
	1	2	3	4	5	6	7	8	

图 2 BQCV PCR 产物同源性比较结果

Fig. 2 BQCV PCR product homology comparison results

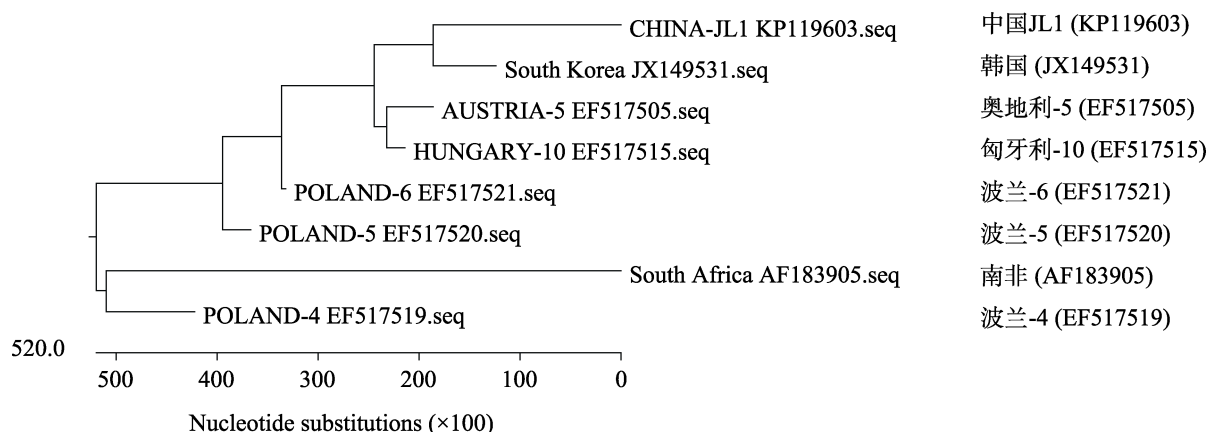


图 3 BQCV 基因序列进化树分析结果

Fig. 3 Phylogenetic tree showing BQCV isolates from China and other countries

中国 BQCV-JL1 株作全基因组序列分析,通过分析得知,该株 5'UTR 区域位于核苷酸序列的 1~545 nt,选取该段序列通过 Blast 进行对比分析,序列同源性为 94%~99%。通过 DNASTar 软件的残基化分析功能对该段序列作进一步分析,得到相同结果,具体结果如图 4 所示。

2.4 BQCV 的 5'UTR 区域的氨基酸序列分析

通过 DNASTar 软件 Megalign 程序分析中国 BQCV-JL1 株的 5'UTR 区域与其他 7 株毒株的对应区域翻译成氨基酸序列的同源性,如图 5 所示,结果显示出与其他 7 株的明显差异。阴影部分即表示差异性,非阴影部分表示序列一致性。

Percent identity									
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Divergence	1	96.7	98.9	97.6	97.8	98.7	94.5	96.9	1 奥地利-5 (EF517505)-5'UTR.seq
	2	3.4	97.1	97.2	97.1	97.6	94.0	99.1	2 中国JL1 (KP119603) -5'UTR.seq
	3	1.1	3.0	98.4	98.5	99.1	95.1	97.6	3 匈牙利-10 (EF517515) -5'UTR.seq
	4	2.4	2.8	1.7	99.5	98.5	94.3	97.1	4 波兰-4 (EF517519) -5'UTR.seq
	5	2.2	3.0	1.5	0.6	98.7	94.9	96.9	5 波兰-5 (EF517520) -5'UTR.seq
	6	1.3	2.4	0.9	1.5	1.3	94.5	97.4	6 波兰-6 (EF517521) -5'UTR.seq
	7	5.7	6.3	5.1	5.9	5.3	5.7	94.2	7 南非 (AF183905) -5'UTR.seq
	8	3.2	0.9	2.4	3.0	3.2	2.6	6.1	8 韩国 (JX149531) -5'UTR.seq
	1	2	3	4	5	6	7	8	

图 4 BQCV 的 5'UTR 区域同源性比较结果

Fig. 4 BQCV encode 5'UTR region homology comparison results

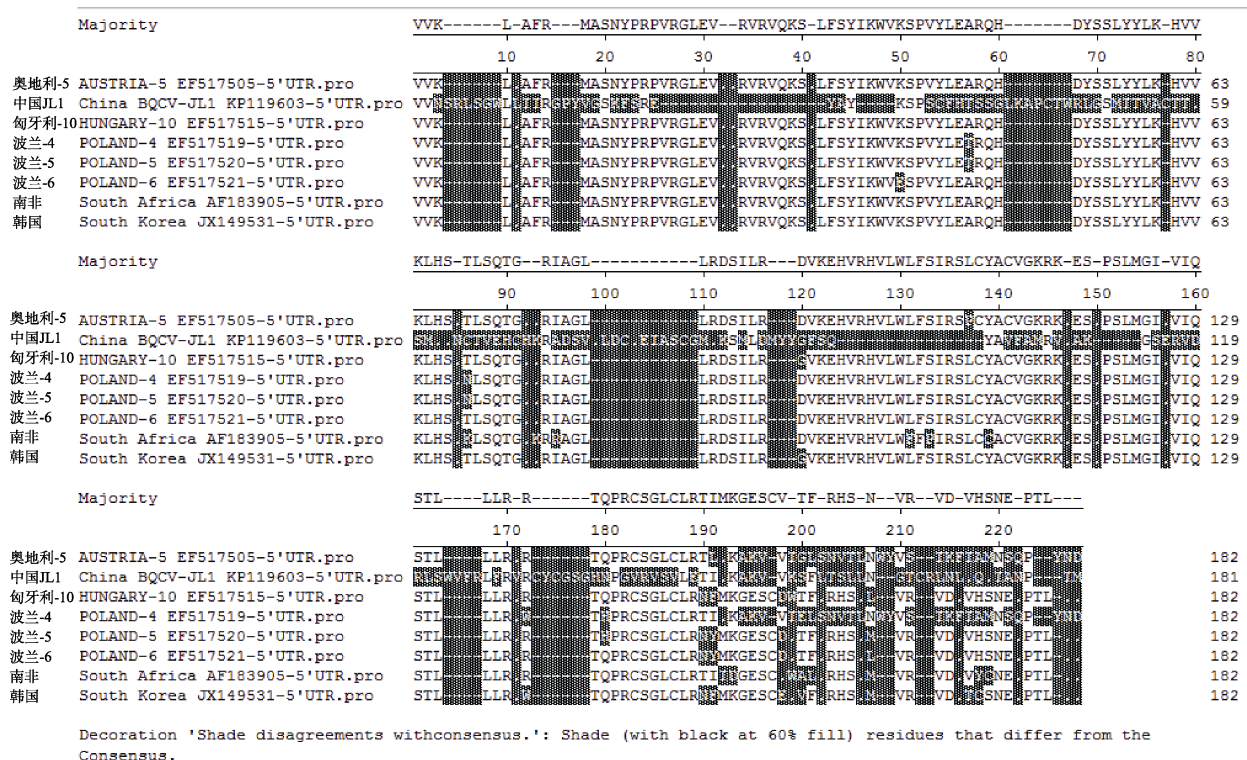


图 5 BQCV 的 5'UTR 区域的氨基酸序列分析结果

Fig. 5 The amino acid sequence analysis of the BQCV 5'UTR region

可以看出,中国 JL1 株与其他 7 株仅在氨基酸序列位置 1、2、10、14、20、24、28、29、30、31、50、73、92、94、103、104、109、114、127、129、131、140、147、149、150、152、156、159、165、179 这 30 个位置与其他株存在序列一致性,而氨基酸序列长度为 181 aa,所以说中国 JL1 株与其他各株差异性大。

3 讨论

BQCV 病毒基因组为单正链 RNA,包括 ORF 1 和 ORF 2 两个开放阅读框。5'端的开放阅读框(ORF 1)编码复制酶蛋白。ORF1 和 ORF2 之间存在一个非编码区,为内部核糖体进入位点(IRES),可促进 ORF2 的翻译起始。ORF2 编码 4 个衣壳蛋白。在基因组的 5'端和 3'端分别为 5'端非翻译区(5'UTR)和 3'端非翻译区(3'UTR)。

本实验室首次分离并测定了中国首株 BQCV 毒株——中国 BQCV-JL1 株的全基因组序列,全长为 8 358 nt。本研究为选取该毒株核苷酸序列位置为 1~1 124 nt 的片段作 PCR、克隆及测序,再通过 DNASTar 软件作序列分析。经 NCBI 上面的 Blast 功能作对比发现,该段片段的序列同源性为 86%~93%。并发现对比结果只有 7 株序列,而其中 6 株为 BQCV 的全基因组序列。通过 DNASTar 软件的残基化分析功能及构建进化树功能对该片段作进一步的序列分析,结果显示,同源性为 86.8%~93.1%,与 Blast 的结果吻合。进化树分析显示,与韩国株的亲缘关系最为接近。

本人在另一文中对本实验室分离鉴定到的中国 BQCV-JL1 株的全基因组序列做过分析。分析表明该基因组全长为 8 358 nt,在核苷酸序列位置为 1~545 nt,为该株的 5'UTR 区域。该 5'UTR 区域恰好包含在这个片段之中。将该段片段测序后的结果只截取 1~545 nt 的序列,作进一步序列比对分析。通过 Blast 对比发现,同源性为 94%~99%,说明该段序列高度保守。Blast 对比结果显示的 7 株序列,除 6 株全基因组序列

外,仅 1 株奥地利-5(EF517505)向 GenBank 提交的序列包含 5'UTR 区域,并与该中国 BQCV-JL1 株的 5'UTR 区域序列同源性较高,说明世界范围内针对 BQCV 的 5'UTR 区域的研究甚少。通过 DNASTar 软件的残基化分析功能作进一步分析发现,序列同源性为 94%~99.1%,与 Blast 结果一致,且高度保守。通过 DNASTar 软件的氨基酸序列分析发现,该中国 BQCV-JL1 株的 5'UTR 区域与其他 7 株序列有明显差异。通过 Mega5 软件的 Clustal W 程序进行多重序列对齐分析,对比核苷酸序列差异性。结果发现几处明显差异:在位置 9 nt 处,该中国 BQCV-JL1 株的 5'UTR 区域序列上没有碱基,而其他 7 株在该位置上为碱基 A;在位置 472 nt 处,该中国 BQCV-JL1 株的 5'UTR 区域序列上没有碱基,而其他 7 株在该位置上为碱基 T;在位置 153 nt 处,该中国 BQCV-JL1 株的 5'UTR 区域序列上为碱基 T,而其他 7 株在该位置上为碱基 C;在位置 354 nt 和 409 nt 处,该中国 BQCV-JL1 株的 5'UTR 区域序列与波兰-4 株及韩国株上的碱基为 T,而其他 5 株在该位置上为碱基 C;在位置 476 nt 处,该中国 BQCV-JL1 株的 5'UTR 区域序列与韩国株上为碱基 T,而其他 6 株在该位置上为碱基 C;在位置 515 nt 处,该中国 BQCV-JL1 株的 5'UTR 区域序列与韩国株上为碱基 C,而其他 6 株在该位置上为碱基 T。由于单个碱基在对应位置上的缺失,导致每连续的 3 碱基翻译成的氨基酸序列有明显差异。通过氨基酸序列的分析结果作初步推断,该中国 BQCV-JL1 株的 5'UTR 区域存在碱基缺失及碱基置换的现象,这种现象在物种系统进化过程中是较常出现的现象。当我们通过 Blast 的简单对比,仅能看出同源性高低,而这种现象并不影响同源性,只能通过软件作多重序列对比分析,才能发现碱基间的具体差异。但仍与韩国株有共同区别于其他株的碱基,说明与韩国株亲缘关系较近。符合进化树分析结果。综上所述,该中国 BQCV-JL1 株的进化起源为韩国株,符合地理起源。

参考文献 (References)

- Bailey L, Woods RD, 1977. Two more small RNA viruses from honey bees and further observations on sacbrood and acute bee-paralysis viruses. *J. Gen. Virol.*, 37: 175–182.
- Baker AC, Schroeder DC, 2008. Occurrence and genetic analysis of picorna-like viruses infecting worker bees of *Apis mellifera* L. populations in Devon, South West England. *J. Invert. Pathol.*, 98(2): 239–242.
- Berényi O, Bakonyi T, Derakhshifar I, Köglberger H, Nowotny N, 2006. Occurrence of six honeybee viruses in diseased Austrian apiaries. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(4): 2414–2420.
- Kajobe R, Marris G, Budge G, Laurenson L, Cordoni G, Jones B, Wilkins S, Cuthbertson AG, Brown MA, 2010. First molecular detection of a viral pathogen in Ugandan honey bees. *J. Invertebr. Pathol.*, 104(2): 153–156.
- Leat N, Ball B, Govan V, Davison S, 2000. Analysis of the complete genome sequence of black queen-cell virus, a picorna-like virus of honey bees. *J. Gen. Virol.*, 81(8): 2111–2119.
- Mayo MA, 2002. Virus taxonomy-Houston. *Arch. Virol.*, 147(5): 1071–1076.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28(10): 2731–2739.
- Tentcheva D, Gauthier L, Zappulla N, Dainat B, Cousserans F, Colin ME, Bergoin M, 2004. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructum* populations in France. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(12): 7185–7191.