

二株不同基因型树鼩呼肠孤病毒的分离和鉴定

刘建生¹, 陶玉芬¹, 李晓菲¹, 李超^{1Δ}, 李晓飞², 孙晓梅², 代解杰^{2*}, 刘红旗^{1*}

- (1. 中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所感染和免疫实验室, 云南 昆明 650118;
2. 中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心, 云南 昆明 650118)

【摘要】 目的 从腹泻树鼩的粪便样本中分离和鉴定病毒。**方法** 树鼩腹泻粪便样本分别接种 Vero、LLC-MK2 和 KMB17 细胞, 经连续传代, 观察记录细胞病变, 并对培养上清进行透射电镜检查、病毒 RNA-PAGE 电泳分析、轮状病毒鉴别筛查、S1 全长基因片段扩增和生物信息学分析。**结果** 树鼩腹泻粪便样品在 KMB17、Vero 和 LLC-MK2 细胞上经连续 3 次传代后, 均能产生细胞病变。经电镜检查、病毒 RNA-PAGE 电泳分析和轮状病毒鉴别筛查, 推测其为呼肠孤病毒。病毒基因组全长 S1 基因扩增、序列测定和分析结果表明, KMB17 培养上清中获得的病毒与 I 型原型株 T1L 同源性最高, 核苷酸和氨基酸同源性分别为 85% 和 90%, 因此该病毒定义为呼肠孤病毒 I 型。而 LLC-MK2 和 Vero 细胞上清中的病毒 S1 基因与 III 型原型株 T3D 核苷酸和氨基酸同源性分别为 85% 和 92%, 因此为呼肠孤病毒 III 型。**结论** 对今后树鼩和其他宿主呼肠孤病毒的分离鉴定有一定的指导意义。

【关键词】 哺乳动物呼肠孤病毒; 树鼩; 基因型; S1 基因; 血清型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015)04-0365-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.04.007

Isolation and identification of two different genotypes of *Tupaia orthoreoviruses*

LIU Jian-sheng¹, TAO Yu-fen¹, LI Xiao-fei¹, LI Chao¹, LI Xiao-fei², SUN Xiao-mei², DAI Jie-jie^{2*}, LIU Hong-qi^{1*}

- (1. Infection and Immunity Laboratory, 2. Center of Tree Shrew Resources, Institute of Medical Biology,
Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Kunming 650118, China)

【Abstract】 Objective To isolate and identify viruses from fecal samples of tree shrew with diarrhea. **Methods** Fecal sample supernatant of tree shrew with diarrhea was inoculated to three cell lines (Vero, LLC-MK2 and KMB17), and the cytopathic effects on the cells were observed. The infectious particles in the culture supernatant were further analyzed by transmission electron microscopy (TEM), genomic RNA-PAGE, rotavirus detection kit, amplification of S1 complete segment and bioinformatics analysis. **Results** Constant cytopathic effects were induced in Vero, LLC-MK2 and KMB17 cell lines after three passages of culture. The results from TEM, RNA-PAGE and rotavirus analysis indicated that they belong to reoviruses. Analysis of the S1 segments revealed that the S1 sequence from KMB17 cell culture had the highest homology with that of prototype isolate T1L (85% nucleotide homology and 90% amino acid homology), therefore this isolate was named as type I reovirus. The other two S1 sequences from LLC-MK2 and Vero cell culture were identical to have 85% nucleotide homology and 92% amino acid homology with the prototype isolate T3D, named as type III reovirus. Phylogenetic analysis indicated that the isolates in this study are evolutionally adapted to tree shrews. **Conclusions** It is the first report here that 2 genotypes of *Tupaia orthoreovirus* are isolated and identified from one fecal sample via three cell lines and viral S1-specific primers, which provides useful guidelines for the isolation and identification of other reoviruses from tree shrew or other hosts.

【基金项目】 国家科技支撑计划项目(2011BAI15B01-21); 云南省应用基础研究计划项目(2013FZ143); 中国医学科学院医学生物学研究所人才引进项目(IMB201)。

【作者简介】 刘建生(1969-), 男, 硕士, 主任技师。研究方向: 病原生物学。Email: ljsh@imbcams.com.cn; Δ 李超: 2013 级硕士生。

【通讯作者】 刘红旗, 博士。研究领域: 炎症、感染和免疫。Email: lhq@imbcams.com.cn

代解杰, 研究员。研究领域: 病原生物学。E-mail: dj@imbcams.com.cn

【Key words】 Mammalian orthoreovirus; *Tupaia*; Genotype; S1 gene; Serotype

哺乳动物呼肠孤病毒 (mammalian reovirus, MRV) 属于呼肠孤病毒科呼肠孤病毒属成员。MRV 是无包膜双链 RNA (dsRNA) 病毒, 有双层衣壳, 呈 20 面体对称结构, 基因组由 10 条独立离散的 dsRNA 组成。根据基因组电泳带型分布, 十个基因组片段分成 L (大)、M (中) 和 S (小) 三组, 其中 L 组包括 L1、L2 和 L3 三个片段, M 组包括 M1、M2 和 M3 三个片段, S 组包括 S1、S2、S3 和 S4 四个片段。片段 S1 编码蛋白 sigma1^[1], 尽管该蛋白在整个病毒粒子中仅仅含有 24 个分子, 但由于其分布在病毒粒子的表面, 因此具有很重要的作用, 如: 细胞受体的配体^[2]、血凝素^[3]、诱导中和抗体的产生^[4]、决定组织嗜性和毒力^[5,6]、介导病毒粒子与细胞微管之间的结合^[7]以及抑制宿主细胞 DNA 的合成^[8]等。该蛋白的另一个有趣的特征是, 它是唯一一个与病毒血清型特异性有关的蛋白^[9-11], 根据该蛋白可以将 MRV 分为 3 个明显不同的血清型, 而且编码该蛋白的基因 S1 在进化中起重要作用。根据血清中和试验和血凝抑制能力, 呼肠病毒属可分为 3 个血清型, 其原型株分别为 I 型 T1L、II 型 T2J、III 型 T3D^[12,13]。

MRV 最早于 1954 年从健康儿童的粪便中分离得到^[14]。迄今为止, MRV 已在许多健康或发病的哺乳动物中发现, 包括人、鼠、猫、犬、猪、牛、蝙蝠及树鼩^[15-22]等多种动物, 通常情况下, 该病毒能感染大多数哺乳动物, 但一般仅在幼体感染者中引起疾病^[13]。猴肾细胞 (Vero) 是目前分离和培养该病毒最常用的细胞。

本研究在对实验树鼩腹泻粪便样本进行病毒分离培养过程中, 同一树鼩粪便样品在不同细胞上分离获得具有不同 S1 基因片段电泳带型特征的病毒株, 并以该树鼩呼肠病毒分离株为材料, 获得了 S1 基因组片段的全长 cDNA 克隆并完成了序列测定, 生物信息学分析, 可确认该研究中实验树鼩混合感染了呼肠病毒 I 型和 III 型病毒。

1 材料与方法

1.1 标本

实验树鼩腹泻粪便样本由中国医学科学院医学

生物研究所树鼩种质资源中心采集提供。病毒保存在中国医学科学院北京协和医学院医学生物学研究所感染与免疫学研究室。

1.2 病毒分离培养

用 DMEM 基础培养基制备 10% 粪便悬液, 6137 r/min 离心 20 min 后, 上清经 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, 然后取 200 μ L 滤液分别接种至 6 孔板中已长成致密单层的 LLC-MK2、KMB17 和 Vero 细胞, 传代适应培养至第 3 代, 均产生明显的细胞病变效应。收集细胞病毒培养物, -20℃ 保存备用。

1.3 病毒电镜检查

建立稳定的细胞-病毒培养体系后, 分别收集培养上清和病毒感染的细胞进行透射电镜检查。培养上清直接镜检: 取培养上清, 3000 r/min 离心 20 min, 弃沉淀; 离心上清再经 12 000 r/min 离心 20 min, 去上清, 病毒沉淀经磷钨酸负染后电镜观察。病毒感染细胞超薄切片透射电镜观察: 收集病毒感染 3~4 d 的细胞, 1500 r/min 低速离心 15 min, 弃去上清, 加入 4℃ 预冷的 2.5% 戊二醛固定液 1 mL, 不冲散细胞团块, 进行超薄切片及透射电镜检查。

1.4 轮状病毒检测

按照 A 群轮状病毒诊断试剂盒 (胶体金法) (北京万泰生物药业有限公司) 使用说明检测病毒分离培养样品。

1.5 病毒 RNA 提取

按 Axygen Body Fluid Viral DNA/RNA Miniprep Kit 操作说明提取培养上清中病毒 RNA。用 60 μ L 无 RNA 酶的超纯水重悬。保存于 -80℃ 备用 (用于 RT-PCR 和 RNA-PAGE 电泳)。

1.6 病毒 RNA 电泳及硝酸银染色

配制聚丙烯酰胺凝胶: 10% 分离胶和 5% 浓缩胶, 病毒 RNA 上样每孔 15 μ L, 在 1 × TBE 缓冲液中, 于 90 V 电压电泳 9 h 后进行硝酸银染色分析。

1.7 引物设计及合成

依据呼肠病毒原型株 T1L 株 (GenBank 登录号 EF494445), T2J 株 (GenBank 登录号 M10261) 和 T3D 株 (GenBank 登录号 HM159619), 设计针对哺乳动物呼肠病毒基因组片段 S1 全长的引物 (表 1)。引物 Invitrogen 上海公司合成。

表 1 呼肠病毒 S1 全长基因序列引物

Tab. 1 Primers used for RT-PCR of reovirus S1 complete sequences

Name 名称	Sequences (5' → 3') 序列 (5' → 3')	Position 位置	GenBank accession No. 基因库登录号
T1F	GCT ATT CGC GCC TAT GGA T	1 - 19	EF494445
T1R	GAT GAT TGA CCC CTT GTG C	1463 - 1424	
T2F	GCT ATT CGC ACT CAT GTC G	1 - 19	M10261
T2R	GAT GAG TCG CCA CTG TGC	1442 - 1425	
T3F	GCT ATT GGT CGG ATG GAT C	1 - 19	HM159619
T3R	GAT GAA ATG CCC CAG TGC	1416 - 1309	

1.8 病毒基因组 S1 节段全长基因 RT-PCR 扩增

RT-PCR 试剂购自 TaKaRa 宝生物大连有限公司。RT 反应:在 PCR 反应管中依次加入下列成分:病毒 RNA 模板 5 μL,灭菌蒸馏水 3 μL,下游特异引物 1 μL(20 μmol/L),dNTP mix 1 μL (10 μmol/L),混匀,65℃作用 5 min,冰上急冷 2 min;再加入 5 × PrimeScript buffer 4 μL,RNase inhibitor 0.5 μL,PrimeScript Transcriptase 1 μL,灭菌蒸馏水 4.5 μL,混匀,42℃ 45 min,70℃ 15 min。PCR 反应采用 25 μL 体积体系,依次加入 TaKaRa Premix Taq 12.5 μL,上下游引物各 1 μL(20 μmol/L),病毒 cDNA 模板 5 μL,灭菌超纯水补足至 25 μL。按如下反应程序扩增:94℃ 预变性 5 min;94℃ 30 s,55℃ 40 s,72℃ 1min 40 s,进行 30 个循环;72℃ 延伸 10 min。取扩增产物 5 μL,于 1.0% 琼脂糖电泳分析。

1.9 病毒 S1 全长基因克隆

PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳,将预期目的条带胶回收,克隆到 pMD-T 载体,经蓝白斑筛选,挑取阳性克隆菌落在氨苄抗性培养基中摇菌过夜,提取质粒。鉴定阳性的质粒交由上海生工生物工程有限公司序列测定。

1.10 生物信息学分析

通过 MEGA6.0 软件中 blast 功能收集与本研究相关的序列,选择具有 S1 基因片段全长的序列用于后续分析。根据 Genbank 的信息和发表的文献所得到的信息,给每个分离株序列一个名称:血清型/分离株/分离地点/分离年代-Genbank 号(gi 号)。通过 MEGA6.0 软件中 Maximum Likelihood 方法绘制遗传发生树。

2 结果

2.1 腹泻树鼩粪便样品能引起明显的细胞病变

不同的病毒可能适应不同的细胞株,为了能够尽可能多地分离到树鼩腹泻粪便中的病毒。我们将处理后的粪便样品分别在 KMB17、Vero 和 LLC-

MK2 细胞上进行 3 次盲传后,发现 3 个细胞系均出现了明显的细胞病变(图 1)。

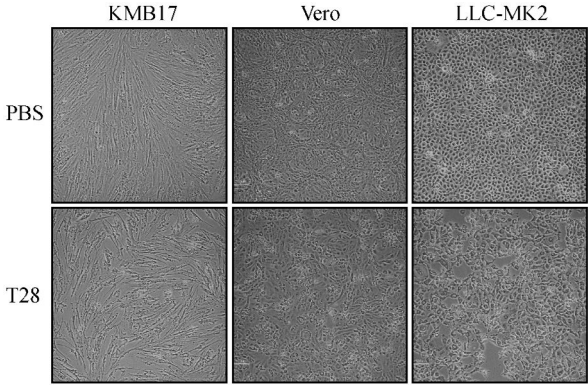


图 1 树鼩粪便 T28 致 3 种细胞病变效应

Fig. 1 Cytopathic effects of the fecal sample T28 on the three cell lines

2.2 树鼩病毒的电镜检查

为了确定细胞病变是由病毒感染所致,我们收集有细胞病变的细胞上清,浓缩,磷钨酸负染后电镜观察病毒粒子形态。如图 2A 所示,病毒粒子呈轮状,具有双层衣壳结构,直径约为 70 nm,具有呼肠孤病毒科的形态特征。感染了病毒的细胞电镜检查结果表明病毒主要在胞质内大量增殖(图 2B)。

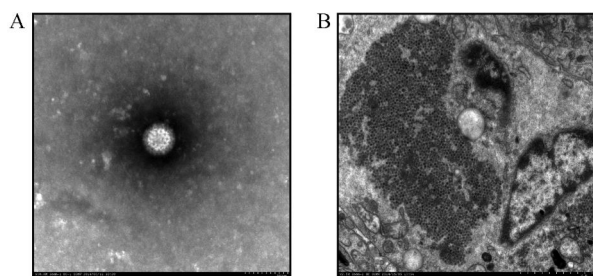
2.3 轮状病毒检测

A 群轮状病毒是临床引起腹泻的一种主要轮状病毒,而该病毒在形态和大小上与 MRV 非常相似。因此,我们用 A 群轮状病毒特异性的试剂盒检测有病变的细胞上清。结果显示 A 型轮状病毒阴性。

2.4 病毒 RNA 电泳及硝酸银染色

呼肠孤病毒科的病毒基因组为分节段 RNA,该家族成员的基因组 RNA 经 PAGE 电泳后,呈现出特异性的条带模式。因此,我们用 RNA 电泳的方法对分离到的病毒进一步鉴定。结果发现,3 种细胞分离到的病毒 RNA 都呈现出哺乳动物正呼肠孤病毒基因组 3 个 L 节段,3 个 M 节段和 4 个 S 节段的特征性模式(见图 3A)。然而,我们发现,从 3 个细胞

系中分离到的病毒基因组 RNA 的短片段 S 的 S1 节段表现出 2 种不同的迁移率, LLC-MK2 和 Vero 细胞上扩增到的病毒 S1 节段迁移率较 KMB17 细胞上的病毒的快, 这暗示该树鼩粪便样品中可能存在 2 种不同基因型的正呼肠孤病毒。



注: A. 培养上清负染(1 cm = 100 nm); B. 细胞超薄切片(1 cm = 2 μm)。

图 2 病毒感染的 KMB17 细胞及其培养上清透射电镜

Note. A. Culture supernatant by negative staining, scale bar 1 cm = 100 nm; B. Ultra-thin section of infected KMB17 cells, scale bar 1 cm = 2 μm.

Fig. 2 The viral particles in culture supernatant and in the cytoplasm of infected KMB17 cells revealed by transmission electron microscopy

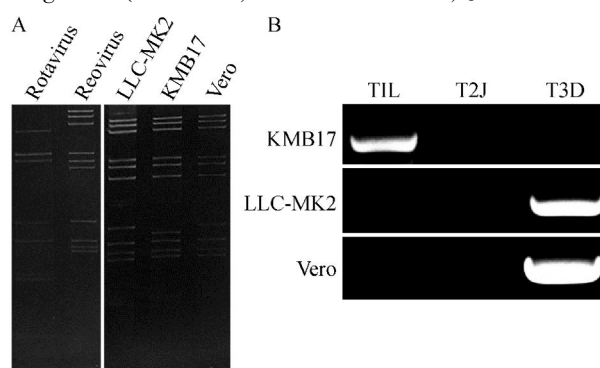
2.5 病毒 S1 全长基因 RT-PCR 扩增

为了进一步确定分离到的病毒的基因型, 根据已报道的型特异性 S1 基因节段序列设计了分别针对 I、II 和 III 型病毒的特异性引物, 对病毒基因组 RNA 进行 RT-PCR 扩增。结果发现, 只有 I 和 III 型特异性引物能扩增出预期大小的片段, 未见 II 引物扩增出的产物(图 3B)。与 RNA 的电泳结果类似, LLC-MK2 和 Vero 细胞上扩增到的病毒 RNA 只有 III 型引物能扩增得到预期大小的目的片段, 且二者的大小一致; 而 KMB17 细胞上扩增得到的病毒 RNA 只有 I 型引物能扩增得到预期大小的片段(图 3B)。这一结果不仅表明了我们从树鼩中分离到了呼肠孤病毒, 而且可能存在 2 种不同基因型。

2.6 树鼩呼肠病毒 S1 全长基因序列分析

为进一步研究分离到的树鼩呼肠孤病毒与已报道的呼肠孤病毒之间的遗传关系, 我们对扩增得到的 S1 全长基因进行克隆、测序和序列分析。结果表明, KMB17 培养上清中, 通过 I 型引物能扩增得到全长 1463 bp 的血清型别特异性 S1 基因片段, 比对结果表明, 该序列与 GenBank 中哺乳动物呼肠病毒 I 型原型株 T1L(EF494445) 同源性最高, 核苷酸序列同源性为 85%, 氨基酸序列同源性为 90%, 因此

将该病毒定型为树鼩呼肠孤病毒 I 型, 命名 T1/T28-1/*Tupaia/Kunming/2013* (GenBank, 登录号 KP185123)。LLC-MK2 和 Vero 细胞上清中的病毒, 通过 III 型引物能扩增得到 1416 bp 的 S1 全长基因, 比对结果表明, 这两株适应培养病毒 S1 基因完全同源, 与 GenBank 库中哺乳动物呼肠孤病毒 III 型原型株 T3D(HM159619) 核苷酸同源性为 85%, 氨基酸同源性为 92%, 因此该病毒定型为树鼩呼肠孤病毒 III 型, 分别命名 T3/T28-2/*Tupaia/Kunming/2013* (GenBank, 登录号 KP185124) 和 T3/T28-3/*Tupaia/Kunming/2013* (GenBank, 登录号 KP185124)。



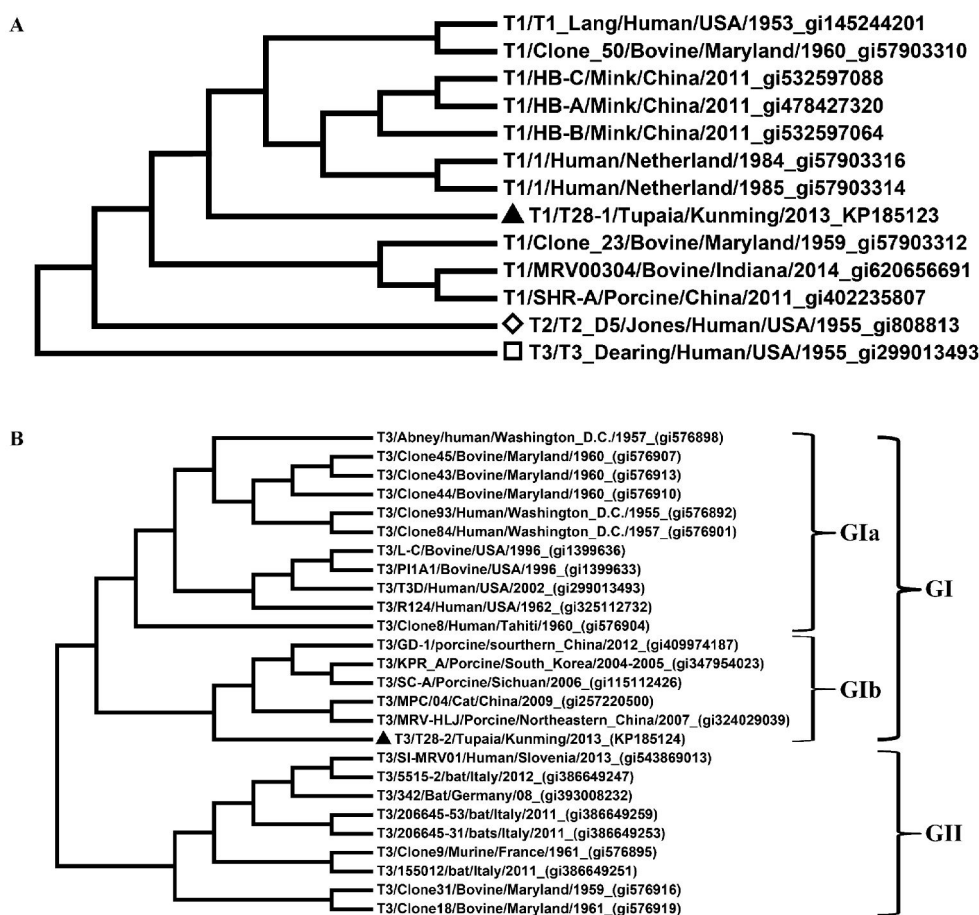
注: A. 病毒基因组 RNA 聚丙烯酰胺凝胶电泳; B. 病毒基因组 S1 片段 RT-PCR 分析。

图 3 树鼩粪便样品 T28 细胞培养上清病毒基因组分析

Note. A. RNA PAGE analysis of viral genomes; B. RT-PCR analysis of genomic S1 fragment of viruses

Fig. 3 Genomic analysis of viruses in the supernatant of *Tupaia* fecal sample T28-inoculated cells.

采用 Maximum Likelihood 方法, 对本研究获得的 2 株病毒的 S1 节段基因序列分别与 GenBank 中具有全长 S1 基因序列的哺乳动物呼肠病毒 I 型和 III 型病毒进行遗传进化分析。结果表明, 我们分离到的 I 型病毒株 T1/T28-1/*Tupaia/Kunming/2013* 单独成簇, 与 T1L 原型株和中国 2011 年雪貂分离株的关系较近, 而与 2011 年中国猪源分离株 SHR-A 遗传距离相对远一些(图 4A)。III 型病毒 S1 基因片段可以明显地分 2 个大组, 第一组(GI)分别由美国分离株(GIa)和亚洲分离株(GIb)组成, 第二组(GII)的病毒全部来自欧洲。我们分离到的 III 型病毒株 T3/T28-2/*Tupaia/Kunming/2013* 虽然与亚洲的其他分离株形成了明显的一簇, 但它也单独形成一个进化分支(图 4B)。这些结果表明我们分离到的 2 株不同基因型的 MRV 均已进化适应了树鼩宿主。



注: A. I 型病毒; B. III 型病毒; 代表本研究的分离株。

图 4 呼肠病毒 S1 基因全长核苷酸序列的种系进化分析

Note. A. Serotype I; B. Serotype III; Represents viruses isolated in this study.

Fig. 4 Phylogenetic trees based on full length of S1 nucleotide sequences of mammalian orthoreovirus

3 讨论

本研究通过 KMB17、Vero 和 LLC-MK2 三种不同的细胞系对一个腹泻树鼩的粪便样品进行病毒分离,结果发现 3 个细胞均表现不同程度的细胞病变。经透射电子显微镜观察、病毒基因组 RNA PAGE 电泳和病毒基因组 S1 片段的序列分析,证实我们从腹泻树鼩的粪便样品中分离到的是 I 型和 III 型哺乳动物正呼肠病毒。

细胞是病毒分离的常用工具,不同的细胞适合分离不同类型的病毒。Vero 细胞适于多种病毒的分离,包括:正呼肠病毒、轮状病毒、肠道病毒等。另外,同一病毒在不同细胞中复制情况可能不一样。以前报道显示通过 Vero 细胞从树鼩粪便样品中分离到正呼肠病毒^[21]。多种病毒可以引起腹泻性疾病,为了弄清可能引起树鼩腹泻的病毒,我们采用了 3 个常用于病毒分离的细胞系 KMB17、Vero 和 LLC-MK2 对粪便样品里的病毒进行扩增和鉴定,发

现了 2 种基因型正呼肠病毒存在于树鼩的腹泻样品中,其中 I 型分离株 T1/T28-1/Tupaia/Kunming/2013 能在 KMB17 细胞上适应增殖,而 III 型分离株 T3/T28-2/Tupaia/Kunming/2013 则能在 Vero、LLC-MK2 细胞上适应增殖。KMB17 细胞为人胚肺二倍体成纤维细胞,而 Vero 细胞为非洲绿猴肾上皮细胞,LLC-MK2 为猕猴肾上皮细胞,这对以后通过组织培养进行哺乳动物呼肠病毒分离鉴定和选用适宜的细胞具有指导借鉴意义。

血清中和试验和血凝抑制试验是对哺乳动物呼肠病毒 I 型、II 型和 III 型进行血清型别鉴定的传统实验方法。我们参考相关文献设计引物扩增了哺乳动物呼肠病毒型特异性抗原的编码基因 S1 片段全长,并通过克隆、测序及核苷酸同源性分析,发现我们分离到的病毒株为哺乳动物呼肠 I 型和 III 型病毒。因为 S1 蛋白是唯一一个与病毒血清型特异性有关的蛋白^[9-11],所以本研究 RT-PCR 方法对于树鼩 MRV 的血清型鉴定起非常重要的作用。

S1 基因片段有 2 个 ORFs, 编码黏附蛋白 $\sigma 1$ 和非结构蛋白 $\sigma 1s$ 。 $\sigma 1$ 蛋白呈纤维状, 其球状头部有两个独立的细胞表面受体结合区域, 分别为连接粘附分子结合域和唾液酸分子结合域^[23]。 $\sigma 1$ 蛋白是病毒黏附蛋白, 介导病毒对宿主细胞的入侵。 $\sigma 1$ 蛋白的这两个结合域, 在不同毒株之间的分布和结构不同。本实验研究中, I 型毒株与 III 型毒株之间 $\sigma 1$ 蛋白氨基酸同源性仅为 27%, 而 I 型毒株在 KMB17 人二倍体成纤维细胞上有选择性的适应生长, III 型毒株则在 Vero、LLC-MK2 猴肾上皮细胞上适应生长, 可能与它们的 S1 基因所编码的 $\sigma 1$ 病毒黏附蛋白的结构及细胞表面受体特征有关, 有待进一步的研究。

呼肠孤病毒 S1 基因片段与病毒的血清型密切相关, 本研究通过 BLAST 找到了 12 株已知的 I 型病毒 S1 基因全长序列, 分析发现我们的分离株与我国最近报道从雪貂分离到的 3 株病毒以及 T1L 型原型株关系较近, 而与中国的猪分离株关系相对较远一些。然而由于 I 型病毒的 S1 基因片段序列的数目较少, 不能发现各个分离株之间明显的关系。

综上所述, 本研究首次通过多种细胞对腹泻树鼩的粪便样品进行病毒的分离和鉴定, 并且同时获得了 I 型和 III 型的正呼肠孤病毒, 这些结果一方面为诊断树鼩的腹泻提供了强有力的证据, 然而确定哪型病毒与树鼩的腹泻有关, 还需要更深入的研究, 另一方面对于将来通过细胞培养分离鉴定正呼肠孤病毒时细胞的选择有很好的指导作用。

参 考 文 献

- [1] Gaillard RK Jr, Joklik WK. Quantitation of the relatedness of reovirus serotypes 1, 2, and 3 at the gene level [J]. *Virology*, 1982, 123(1): 152–164.
- [2] Lee PW, Hayes EC, Joklik WK. Protein sigma 1 is the reovirus cell attachment protein [J]. *Virology*, 1981, 108(1): 156–163.
- [3] Weiner HL, Ramig RF, Mustoe TA, et al. Identification of the gene coding for the hemagglutinin of reovirus [J]. *Virology*, 1978, 86(2): 581–584.
- [4] Weiner HL, Fields BN. Neutralization of reovirus: the gene responsible for the neutralization antigen [J]. *J Exp Med*, 1977, 146(5): 1305–1310.
- [5] Weiner HL, Drayna D, Averill DR, Jr., et al. Molecular basis of reovirus virulence: role of the S1 gene [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977, 74(12): 5744–5748.
- [6] Spriggs DR, Bronson RT, Fields BN. Hemagglutinin variants of reovirus type 3 have altered central nervous system tropism [J]. *Science*, 1983, 220(4596): 505–507.
- [7] Babiss LE, Luftig RB, Weatherbee JA, et al. Reovirus serotypes 1 and 3 differ in their in vitro association with microtubules [J]. *J Virol*, 1979, 30(3): 863–874.
- [8] Sharpe AH, Fields BN. Reovirus inhibition of cellular DNA synthesis: role of the S1 gene [J]. *J Virol*, 1981, 38(1): 389–392.
- [9] Lee PW, Hayes EC, Joklik WK. Characterization of anti-reovirus immunoglobulins secreted by cloned hybridoma cell lines [J]. *Virology*, 1981, 108(1): 134–146.
- [10] Hayes EC, Lee PW, Miller SE, et al. The interaction of a series of hybridoma IgGs with reovirus particles. Demonstration that the core protein lambda 2 is exposed on the particle surface [J]. *Virology*, 1981, 108(1): 147–155.
- [11] Gaillard RK, Joklik WK. The antigenic determinants of most of the proteins coded by the three serotypes of reovirus are highly conserved during evolution [J]. *Virology*, 1980, 107(2): 533–536.
- [12] 张云刘, 欧阳岁东, 童光志. 正呼肠孤病毒及其分类学依据研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2004, 25(6): 46–49.
- [13] Dermody TS, Parker J, Sherry B. Orthoreoviruses [M]; In: Knipe DM HP and Howley P (ed.) *Field Virology*, Philadelphia, PA.: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins. 2013
- [14] Ramos-Alvarez M, Sabin AB. Characteristics of poliomyelitis and other enteric viruses recovered in tissue culture from healthy American children [J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1954, 87(3): 655–661.
- [15] Chua KB, Crameri G, Hyatt A, et al. A previously unknown reovirus of bat origin is associated with an acute respiratory disease in humans [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(27): 11424–11429.
- [16] Huhtamo E, Uzategui NY, Manni T, et al. Novel orthoreovirus from diseased crow, Finland [J]. *Emerg Infect Dis*, 2007, 13(12): 1967–1969.
- [17] Du L, Lu Z, Fan Y, et al. Xi River virus, a new bat reovirus isolated in southern China [J]. *Arch Virol*, 2010, 155(8): 1295–1299.
- [18] Dai Y, Zhou Q, Zhang C, et al. Complete genome sequence of a porcine orthoreovirus from southern China [J]. *J Virol*, 2012, 86(22): 12456.
- [19] Kohl C, Lesnik R, Brinkmann A, et al. Isolation and characterization of three mammalian orthoreoviruses from European bats [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(8): 1–12.
- [20] Lelli D, Moreno A, Lavazza A, et al. Identification of Mammalian orthoreovirus type 3 in Italian bats [J]. *Zoonoses Public Health*, 2013, 60(1): 84–92.
- [21] 徐娟, 黄晓燕, 李晓飞, 等. 树鼩呼肠孤病毒的分离鉴定 [J]. *动物学研究*, 2013, 34(2): 116–120.
- [22] Anbalagan S, Spaans T, Hause BM. Genome sequence of the novel reassortant mammalian orthoreovirus strain MRV00304/13, isolated from a calf with diarrhea from the United States [J]. *Genome Announc*, 2014, 2(3): e00451–e00414.
- [23] Reiss K, Stencel JE, Liu Y, et al. The GM2 glycan serves as a functional coreceptor for serotype 1 reovirus [J]. *PLoS Pathog*, 2012, 8(12): 1–17.

[收稿日期] 2015-02-27