单位代码：84501
学　　号：b8450112001

博士学位论文

蝙蝠宿主中新病毒发现及蝙蝠冠状病毒HKU9受体的探索

研 究 生：黄灿平

培养单位：中国疾控中心病毒病所

导　　师：高 福 研究员

副 导 师：舒跃龙 研究员

专　　业：免疫学

2016年

中国疾病预防控制中心

CHINESE CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

单位代码：84501

密　　级：公开

博士学位论文

蝙蝠宿主中新病毒发现及蝙蝠冠状病毒 HKU9 受体的探索

作者姓名：黄灿平

指导教师：高福　研究员

中国疾病预防控制中心

学位类别：医学博士

学科专业：免疫学

学位授予单位：中国疾病预防控制中心

2016 年 6 月

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

DISSERTATION FOR DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY

Novel Virus Discovery in Bat and the Exploration of Receptor of Bat Coronavirus HKU9

By

CANPING HUANG

A Dissertation Submitted to

Chinese Center for Disease Control and Prevention

In partial fulfillment of the requirement

For the degree of

Doctor of Philosophy

National Institute for Viral Disease Control and Prevention,

Chinese Center for Disease Control and Prevention

June, 2016

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本学位论文不包含任何其他个人或集体已经发表或未发表的成果、数据或撰写过的科研成果，也不包含为获得任何教育机构的学位或证书已使用过的材料。对本论文所涉及的研究工作做出贡献的其他个人和集体，均已在文中以明确方式标明。

申请学位的论文与资料若有不实之处，本人愿承担一切责任。

学位论文作者签名：

2016 年 6 月 20 日

学位论文使用授权声明

本人完全了解中国疾病预防控制中心关于提交、保存和使用学位论文的规定。同意研究所保存或向国家有关部门或机构送交论文的纸制版和电子版，允许论文被查阅和借阅；论文保存单位及借阅人有义务保护论文作者及单位的知识产权。本论文的成果归中国疾病预防控制中心所有；本人离所后发表、使用本学位论文或与本论文直接相关的学术成果时，第一署名单位仍然为中国疾病预防控制中心。

（保密论文在解密后遵守此规定）

作者签名：　　日期：2017 年 5 月 24 日

导师签名：高福　　日期：2017 年 5 月 24 日

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

目 录

中文摘要 1
Abstract 3
缩略词表 7
引 言 9
第一部分 研究内容 11
第一章 果蝠冠状病毒 GCCDC1 鉴定及其特征性 p10 基因的起源和功能研究 13
1.1 材料和方法 15
1.1.1 实验材料 15
1.1.2 实验方法 18
1.2 结果 29
1.2.1 蝙蝠样本检测 29
1.2.2 细胞培养与病毒分离 29
1.2.3 病毒命名及全基因组测序 29
1.2.4 病毒全基因组分析 30
1.2.5 进化分析 36
1.2.6 呼肠孤病毒 p10 基因重组到 Ro-BatCoV GCCDC1 基因组中的证据 39
1.2.7 Ro-BatCoV GCCDC1 亚基因组结构 42
1.2.8 p10 基因是一个功能基因 44
1.3 讨论 48
第二章 蝙蝠冠状病毒 HKU9 spike 蛋白推测的受体结合结构域：Beta 冠状病毒受体结合基序的进化 53
2.1 材料和方法 55
2.1.1 实验材料 55
2.1.2 主要实验仪器 56
2.1.3 实验方法 57
2.2 结果 61
2.2.1 HKU9-RBD 的表达与纯化 61
2.2.2 HKU9 Spike 蛋白结构特征及 HKU9-RBD 序列特点 62
2.2.3 HKU9-RBD 与 SARS-CoV 及 MERS-CoV 受体的结合情况 63
2.2.4 HKU9-RBD 晶体生长条件 66
2.2.5 重原子结合试验 66
2.2.6 HKU9-RBD 晶体结构 66
2.2.7 Beta 冠状病毒中 RBD 核心亚结构域的结构保守性 68
2.2.8 同源相互作用模式将外部亚结构域锚定在核心亚结构域上 69
2.3 讨论 72
第三章 云南省墨江哈尼族自治县废弃矿洞中不明原因重症肺炎事件病原学初步调查 75
3.1 材料和方法 76
3.1.1 试剂和材料 76
3.1.2 样本采集 76
3.1.3 样本处理 76
3.1.4 核酸提取 76

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3.1.5 引物设计 77
3.1.6 样本检测 78
3.1.7 序列同源与进化分析 78
3.2 结果 78
3.2.1 样本检测 78
3.2.2 序列同源与进化分析 80
3.3 讨论 82
第二部分 文献综述 85
第四章 新发动物源性病原及其对人类的致病性 87
第一节 新发传染病概念及分类 87
第二节 近 30 年来出现的新发传染病 87
第三节 新发传染病频发的生态和环境因素 90
第四节 野生动物在新发传染病跨物种传播中的作用 94
第五章 蝙蝠与新发传染病 99
第一节 流感和冠状病毒的跨物种传播 99
第二节 蝙蝠的生物学和生态学特性 100
第三节 蝙蝠体内携带的重要病原 104
第四节 蝙蝠在疾病根除计划中的作用 106
第六章 新病毒发现技术 109
第一节 病毒发现的传统方法和技术 109
第二节 新病毒发现的分子生物学技术 111
简并引物 PCR 检测技术 112
差减杂交技术 115
DNA 酶处理-序列非依赖性单引物扩增技术（DNase-SISPA） 116
以 cDNA 扩增片段长度多态性为基础的病毒发现（VIDISCA） 117
第三节 宏基因组学和新一代测序技术 119
参考文献 121
全文总结 137
文章发表 139
致 谢 140

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

中文摘要

传染病的暴发（outbreak）和流行（pandemic）严重威胁着人类的健康和生存。在全球化（globalization）和工业化（industralization）背景下，疾病的传播和流行异常迅速。而新病原出现的速度也似乎超过了过去的任何时期。

野生动物在人兽共患病（zoonosis）的发生、传播和流行中发挥重要作用。对野生动物所携带病原进行检测、分离与鉴定以及论证其与疾病的相关性，成为当前传染病研究的一个新的热点。

随着技术的发展，现代分子生物学方法在病原的发现和鉴定中发挥越来越重要的作用。以宏基因组学（metagenomics）和新一代测序技术（next-generation seqeuncing, NGS）等为代表的分子生物学方法能够从样本中直接分析 DNA 或 RNA 遗传物质，在病原鉴定中非常适用。

2002 年和 2012 年分别暴发的严重急性呼吸综合征冠状病毒（SARS-CoV）和中东呼吸综合征冠状病毒（MERS-CoV），促使广大研究者密切关注冠状病毒的生物多样性、基因组学和跨物种传播的可能性，尤其是来源于蝙蝠（第二大哺乳动物群体）的冠状病毒。目前已知蝙蝠携带有多种多样的病原体，因此在新发人畜共患病和跨物种传播疾病的监测中，蝙蝠是优先关注的对象。

本研究通过泛冠状病毒 RT-PCR 筛选（pan-coronaviral screening）和新一代测序技术，从棕果蝠（*Rousettus leschenaulti*）的直肠拭子样本中鉴定出一种新型蝙蝠冠状病毒，将其命名为果蝠冠状病毒 GCCDC1（Rousettus bat coronavirus GCCDC1, Ro-BatCoV GCCDC1）。Ro-BatCoV GCCDC1 在基因组结构和组成上与果蝠冠状病毒 HKU9（Ro-BatCoV HKU9）类似，但是序列和进化分析表明 Ro-BatCoV GCCDC1 是一种新型蝙蝠冠状病毒。更为引人注意的是，在病毒基因组的 3'末端整合有一个独特的基因——p10 基因，这个基因在所有已知的冠状病毒中都找不到同源序列，序列和进化分析表明可能来源于一个古老的蝙蝠正呼肠孤病毒。亚基因组 mRNA 和细胞水平试验表明 Ro-BatCoV GCCDC1 的 p10 基因与正呼肠孤病毒的 p10 基因一样是一个功能基因。在病毒复制周期中，p10 基因可能能够促进病毒在细胞与细胞之间转移。这株病毒的发现是单股正链 RNA

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

病毒与双股分节段的RNA病毒之间跨科重组的第一次报道。对该冠状病毒的进一步研究能够深入了解病毒间异源重组的机制。

蝙蝠冠状病毒HKU9（Ro-BatCoV HKU9）是一种重要的Beta冠状病毒，系统进化上与 MERS-CoV 隶属于同一个属。对蝙蝠进行监测的数据表明 BatCoV HKU9在蝙蝠群体中广泛流行，因此有必要对这个病毒跨越种间屏障的潜在可能性进行研究。冠状病毒spike蛋白中的受体结合结构域（Receptor binding domain，RBD）识别宿主受体以介导病毒侵入，因此是决定病毒趋向性和传播能力的关键因子。本研究中，通过一系列生物物理和晶体学方法对 BatCoV HKU9 假定的Spike蛋白RBD进行了研究。表面等离子体共振结果表明HKU9-RBD既不结合SARS-CoV 的受体血管紧张素转化酶 2（Angiotensin-Converting Enzyme 2，ACE2），也不结合MERS-CoV的受体CD26。我们进一步解析了HKU9-RBD的分子结构，分析显示该分子结构由一个核心和一个外部亚结构域组成。核心亚结构域的折叠形式与其他Beta冠状病毒RBD的相似，而外部亚结构域在结构上具有独特的特点，仅由一个单一的螺旋组成，这一结构解释了 HKU9-RBD 不与ACE2和CD26结合的原因。通过比较目前已知的所有Beta冠状病毒RBD结构，我们进一步提出同源的亚结构域插入结合模式，核心亚结构域和外部亚结构域通过这一模式锚定在一起。通过对HKU9-RBD的结构解析及其与其他Beta冠状病毒的RBD比较，对于阐明Beta冠状病毒受体结合特性及进化规律具有重要参考价值，对于评价HKU9病毒的跨种传播潜力具有重要提示作用。

关键词：新发传染病；果蝠冠状病毒 GCCDC1；异源跨科重组；融合相关小跨膜蛋白（FAST）；亚基因组 mRNA；

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Abstract

The outbreak and pandemic of infectious diseases have presented as greatest threat to public health. Under the background of globalization and industralization, pathogens quickly spread all over the world wherever they outbreak. Meanwhile, in recent decades, the rate of occurrence of novel pathogens also seems to exceed any other time in the past.

Wildlife plays an important role in the emerging and spreading of zoonoses. Current researches in the public health community give rise more concerns on the detection, isolation and identification of pathogens that wild animals harbor, and the relationship with diseases.

The modern molecular biology methods have played a vital role in the clinical detection and identification of pathogens. Metagenomics and next-generation sequencing (NGS) focus on the direct analyses of genetic materials (DNA or RNA) from clinical samples. The advances in technologies play an increasingly important role in the rapid detection and identification of pathogens and further for the prevention and control of diseases.

The outbreak of severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) in 2002 and the Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) in 2012 aroused immense attention to biodiversity, genomics and the possibility of cross-species transmission of coronavirus, especially the coronaviruses from bats, the second largest group of mammals. Bats are particularly notable in this respect because they are known to harbor a diverse range of pathogens, and are known to be reservoir hosts of human coronavirus 229E and SARS-CoV, and are closely related to MERS-CoV. As a consequence, bats have been prioritized for surveillance of emerging zoonotic diseases.

In the current study, we identified a novel coronavirus, provisionally designated Rousettus bat coronavirus GCCDC1 (Ro-BatCoV GCCDC1), in the rectal swab

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

samples from *Rousettus leschenaulti* bats by using pan-coronavirus RT-PCR and next-generation sequencing. Although the virus is similar to Rousettus bat coronavirus HKU9 (Ro-BatCoV HKU9) in genome characteristics, it is sufficiently distinct to be classified as a new species according to the criteria defined by the International Committee of Taxonomy of Viruses (ICTV). More striking was that Ro-BatCoV GCCDC1 contained a unique gene integrated into the 3'-end of the genome that has no homologs in any known coronavirus, but which sequence and phylogeny analyses indicated most likely originated from the p10 gene of a bat orthoreovirus. Subgenomic mRNA and cellular-level findings demonstrated that the p10 gene is functional and may induce the formation of cell syncytia. This is the first report of heterologous inter-family recombination between a single-stranded, positive-sense RNA virus and a double-stranded segmented RNA virus, and as such provides insights into the fundamental mechanisms of viral evolution.

Bat coronavirus (BatCoV) HKU9 is an important betacoronavirus (BetaCoV) that is phylogenetically affiliated to the same genus as MERS-CoV. The bat-surveillance data indicated that BatCoV HKU9 has been widely spreading and circulating in bats. This highlights the necessity of characterizing the virus for its potential of cross-species transmision. The receptor binding domain (RBD) of the coronavirus spike (S) recognizes host receptors to mediate virus entry and is therefore a key factor determining the viral tropism and transmission capacity. In this study, the putative S RBD of BatCoV HKU9 (HKU9-RBD), which is homologous to other BetaCoV RBDs that have been structurally and functionally defined, was characterized via a series of biophysical and crystallographic methods. By surface plasmon resonance, we demonstrated that HKU9-RBD binds to neither the SARS-CoV receptor of ACE2 (Angiotensin-Converting Enzyme 2) nor the MERS-CoV receptor of CD26. We further solved the atomic structure of HKU9-RBD, which is expectedly composed of a core and an external subdomain. The core subdomain fold resembles those of other BetaCoV RBDs; whereas the external subdomain is structurally unique with a single helix, explaining the inertness of

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

HKU9-RBD to react with either ACE2 or CD26. Via comparison of thus-far available RBD structures, we further proposed a homologous inter-subdomain binding mode in BetaCoV RBDs that anchors the core subdomain to the external subdomain. The revealed RBD features would shed light on the BetaCoV evolution route.

Keyword: Emerging infectious disease, Rousettus Bat Coronavirus GCCDC1, heterologous inter-family recombination, fusion-association small transmembrane (FAST) protein, subgenomic mRNA

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

缩略词表

英文缩写	英文全称	中文译名
EID	Emerging Infectious Diseases	新发传染病
MERS-CoV	Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus	中东呼吸综合征冠状病毒
HTLV	Human T-lymphotropic virus	人类嗜 T 细胞病毒
HPS	Hantavirus Pulmonary Syndrome	汉坦病毒肺综合征
HIV/AIDS	Human Immunodeficiency virus/Acquired Immune Deficiency Syndrome	人类免疫缺陷病毒/获得性免疫缺陷综合征
CCH	Crimean-Congo Hemorrhagic Fever virus	克什米尔-刚果出血热病毒
FPLV	Feline Panleukopenia virus	猫泛白血球减少症病毒
CPV	Canine Parvovirus	犬细小病毒
VEEV	Venezuelan Equine Encephalitis virus	委内瑞拉马脑炎病毒
ENSO	El Niño-Southern Oscillation	厄尔尼诺-南方振荡
DPP4	Dipeptidyl Peptidase-4	二肽基肽酶 4
DBatVir	The Database of Bat-associated viruses	蝙蝠相关病毒数据库
NGS	Next-generation sequencing	新一代测序
HCV	Human Hepatitis C virus	丙型肝炎病毒
RDA	Representative Display Assay	代表性差异分析
DNase-SISPA	DNase-Sequence-Independent Single-Primer Amplification	DNA 酶处理-序列非依赖性单引物扩增技术
VIDISCA	Virus Discovery Based on cDNA-Amplified Fragment Length Polymorphism	cDNA 扩增片段长度多态性为基础的病毒发现
BatCoV HKU9	Bat Coronavirus HKU9	蝙蝠冠状病毒 HKU9
BEVS	Baculovirus Expression Vector System	杆状病毒表达系统
SPR	Surface Plasmon Resonance	表面等离子共振
HRP	Horseradish Peroxidase	辣根过氧化物酶
BatCoV HKU4	Bat Coronavirus HKU4	蝙蝠冠状病毒 HKU4

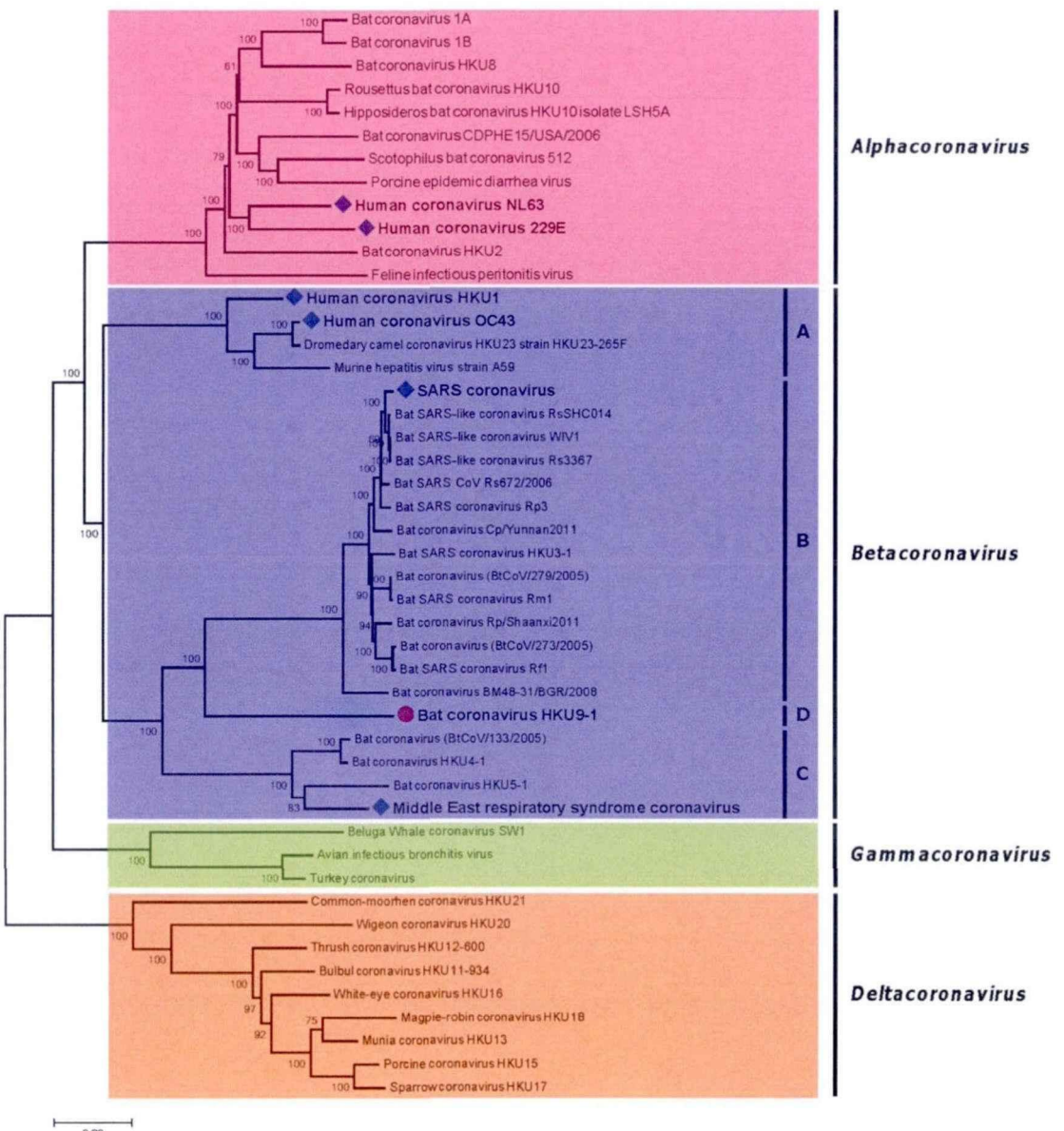
(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Sf9	Spodoptera frugiperda cell	草地贪夜蛾细胞
NTD	N Terminal Domain	N 末端结构域
Ro-BatCoV GCCDC1	Rousettus Bat Coronavirus GCCDC1	果蝠冠状病毒 GCCDC1
FAST	Fusion-associated Small Transmembrane	融合相关小跨膜蛋白
MHV	Mouse Hepatitis virus	鼠肝炎病毒
PEDV	Porcine Epidemic Diarrhea virus	猪流行性腹泻病毒
FCoV	Feline Coronavirus	猫冠状病毒
HCoV-229E	Human Coronavirus 229E	人冠状病毒 229E
HCoV-OC43	Human Coronavirus OC43	人冠状病毒 OC43
sgRNA	subgenomic RNA	亚基因组 RNA
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin	钥孔血蓝蛋白
L-TRS	Leader TRS	先导 TRS
B-TRS	Body TRS	单个基因 TRS
BroV	Broome Reovirus	broome 呼肠孤病毒
RRV	Reptilian Reovirus	爬行动物呼肠孤病毒
BRV	Baboon Orthoreovirus	狒狒呼肠孤病毒
CIAV	Chicken Infectious Anemia virus	鸡传染性贫血病毒
BPCV1	Bandicoot Papillomatosis Carcinomatosis virus type 1	袋狸乳头瘤癌病病毒 1 型
MDV	Marek's Disease virus	马立克氏病病毒
FPV	Fowlpox virus	禽痘病毒
qRT-PCR	quantification Real-time Polymerase Chain Reaction	实时定量聚合酶链式反应
RBD	Receptor Binding Domain	受体结合结构域
SARS-CoV	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus	严重急性呼吸综合征冠状病毒

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

引　言

冠状病毒是有囊膜的单股正链非节段的 RNA 病毒。根据国际病毒分类委员会当前的命名法则，冠状病毒科分为 4 个属，即 Alpha、Beta、Gamma（分别对应于以前的 1、2 和 3 群）和 Delta 冠状病毒属。同时，Beta 冠状病毒属在进化上又可进一步分为 A、B、C 和 D 4 个不同的群（如图所示）。



冠状病毒在自然界中广泛存在，能够引起鸟类、动物和人类感染，引起不同严重程度的呼吸道、胃肠道、泌尿生殖道、肝脏和神经系统疾病，或不表现出临床症状。自 1937 年从鸡体内分离得到的第一个动物冠状病毒——传染性支气管炎病毒，研究人员相继鉴定出各种各样的哺乳动物和人类冠状病毒。迄今，从野

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

鸟、蝙蝠、人类和其他动物中分离鉴定到的冠状病毒累计至少有 90 种。其中，至少有 6 种可以感染人类并导致疾病。在这些冠状病毒中，Beta 冠状病毒由于其致病能力和跨物种传播的潜力尤为突出，多次造成全球范围内人类感染的大流行。2002～2003 年，一种代表性的 Beta 冠状病毒——SARS 冠状病毒（SARS-CoV），首先在中国出现并迅速向其他国家蔓延，至少造成 8000 人感染和 800 人死亡。2012 年，另一种 Beta 冠状病毒——MERS 冠状病毒（MERS-CoV），首先在沙特阿拉伯出现。尽管全球范围内努力控制 MERS 冠状病毒的传播，该病毒仍然在中东、欧洲、北美和亚洲等多个国家扩散。直至 2014 年 7 月 3 日，共造成 941 例感染和 347 例死亡。同时，2006 年香港大学袁国勇及其同事在一个呼吸道疾病的病人中鉴定出一种能够引起人类感染的冠状病毒——HCoV HKU1。这些意想不到的因 Beta 冠状病毒所引起的疫情暴发给全球公共卫生带来严重威胁。

值得注意的是，目前的证据表明大部分（即使不是所有）人类冠状病毒来源于蝙蝠。2013 年，Ge 等从云南省中华菊头蝠的粪便样本中分离到一株活的 SARS 样冠状病毒（bat SL-CoV-WIV1）。这项研究是迄今 SARS 冠状病毒来源于蝙蝠的最强证据，并且研究结果证明 SARS 冠状病毒在跨物种感染中无需中间宿主。而多层次的证据表明单峰驼在 MERS 冠状病毒的传播中，可能是作为中间宿主而存在，蝙蝠可能是 MERS 冠状病毒的自然宿主。因此，在新发人兽共患病和跨物种传播疾病的监测中，蝙蝠是优先关注的对象。蝙蝠携带的冠状病毒所造成的突发感染促使病毒学家将研究重点放在蝙蝠冠状病毒生物多样性和基因组上。

同样从上图可以看出，Beta 冠状病毒的 4 个群中，A、B、C 3 个群中均有病毒成员能够引起人类疾病。唯独 D 群中的蝙蝠冠状病毒 HKU9 是否具有感染人的潜在可能性，目前尚未可知。从系统进化上看，BatCoV HKU9 与 SARS-CoV 相对较为接近。BatCoV HKU9 是一种重要的 Beta 冠状病毒，对蝙蝠进行监测的数据表明 BatCoV HKU9 在蝙蝠群体中广泛流行。因此，有必要对这个病毒跨越种间屏障的潜在可能性进行研究。

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

第一部分 研究内容

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

第一章 果蝠冠状病毒 GCCDC1 鉴定及其特征性 p10 基因的起源和功能研究

冠状病毒是有囊膜的单股正链非节段的 RNA 病毒，基因组大小介于 26～32 kb 之间，是 RNA 病毒中基因组最大的一种[1]。根据国际病毒分类委员会当前的命名法则，冠状病毒科分为 4 个属，即 Alpha、Beta、Gamma（分别对应于以前的 1、2 和 3 群）和 Delta 冠状病毒属[2-5]。同时，Beta 冠状病毒属在进化上又可进一步分为 A、B、C 和 D 共 4 个不同的群[2]。

冠状病毒基因组复制和 RNA 合成的机制非常独特，包括聚合酶跳跃（polymerase jumping）、模板选择（template selection）和不连续延伸（discontinuous extension）[6-9]。因此，冠状病毒重组和突变的频率很高，以适应新的宿主和生态位（ecological niche）[10, 11]。通过对相关的冠状病毒基因组序列进行仔细审查，可以发现重组热点散布于整个基因组中[12]。不同冠状病毒的 spike 基因之间的重组，能够转变病毒粒子表面蛋白的抗原性，从而为病毒的免疫逃避（immune escape）提供有效策略。而基因组 3'末端存在一些调节序列（regulatory sequence）和附加基因（accessory gene），在这个区域的重组，能够改变病毒的复制能力[13]。在 ORF1ab 和 spike 基因之间、spike 基因与 E 基因之间，以及基因组的其他区域，能够发现其他的重组位点。重组是冠状病毒的一个有效的遗传工具，以确保冠状病毒的遗传稳定性和多态性[13]。

冠状病毒是自然界中广泛存在的病毒之一。冠状病毒能够感染很多种动物，引起不同严重程度的呼吸道、胃肠道、泌尿生殖道、肝脏和神经系统疾病，或不表现出临床症状。传染性支气管炎（Infectious bronchitis virus，IBV）是 1937 年从鸡体内分离得到的第一个动物冠状病毒[14]。随后，研究人员相继鉴定出各种各样的哺乳动物和人类冠状病毒，如鼠肝炎病毒（Murine hepatitis virus, MHV）、猪流行性腹泻病毒（Porcine epidemic diarrhea virus，PEDV）、猫冠状病毒（Feline coronavirus，FCoV）、人冠状病毒 229E（Human coronavirus 229E，HCoV-229E）和人冠状病毒 OC43（Human coronavirus OC43，HCoV-OC43）等[15-18]。2003 年严重急性呼吸道综合症（Severe acute respiratory syndrome，SARS）暴发之前，

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

公共卫生界很少注意冠状病毒科成员，因为它们（HCoV-229E 和 HCoV-OC43）仅引起人类温和的呼吸道疾病。严重急性呼吸道综合症在中国首次出现，并迅速向 29 个国家和地区扩散，在世界范围内感染了 8096 人并导致 774 人死亡（致死率为 9.5%）[19]。SARS 冠状病毒的爆发，及其对全球医学和公共卫生的巨大影响，激发了研究人员对冠状病毒和相关研究的广泛关注，特别是冠状病毒的生物多态性、基因组学和跨物种传播的可能性及机制等。迄今为止，从野鸟、蝙蝠、人类和其他动物中分离鉴定到的冠状病毒累计至少有 90 种。在这些病毒中，某些冠状病毒在核苷酸和氨基酸序列上表现出显著的多态性，表明存在不同的基因型，如人冠状病毒 HKU1（HCoV-HKU1）、蝙蝠冠状病毒 HKU3（Rh-BatCoV-HKU3）和蝙蝠冠状病毒 HKU9（Ro-BatCoV HKU9）等。

在所有分离或鉴定的冠状病毒中，至少有 6 种可以感染人类并导致疾病。目前的证据表明，大部分（即使不是所有）人类冠状病毒来源于蝙蝠。分子钟（molecular clock）分析表明 HCoV-229E 和 GhanaBt-CoVGrp1 具有共同的祖先，早在 1686–1800 ad 存在于非洲蹄蝠中[20, 21]。2013 年，Ge 等从云南省中华菊头蝠的粪便样本中分离到一株活的 SARS 样冠状病毒（bat SL-CoV-WIV1）。这项研究是迄今 SARS 冠状病毒来源于蝙蝠的最强证据，并且研究结果证明 SARS 冠状病毒在跨物种感染中无需中间宿主[22]。2012 年，另一种新型冠状病毒，中东呼吸综合征冠状病毒（Middle East respiratory syndrome coronavirus，MERS-CoV）在沙特阿拉伯爆发[23-25]。多层次的证据表明单峰驼仅仅是作为中间宿主而存在，而蝙蝠可能是 MERS 冠状病毒的自然宿主[26-38]。蝙蝠携带的冠状病毒所造成的突发感染促使病毒学家将研究重点放在蝙蝠冠状病毒生物多样性和基因组上。迄今，从不同种类和地理位置的蝙蝠中至少分离或鉴定出 39 种冠状病毒。

本研究中，我们从云南西双版纳采集的蝙蝠样本中鉴定出一种新型冠状病毒，并暂时将之命名为果蝠冠状病毒 GCCDC1（Rousettus bat coronavirus GCCDC1, Ro-BatCoV GCCDC1）。基因组序列分析表明，Ro-BatCoV GCCDC1 是 Beta 冠状病毒属 D 群中的一个新成员，与果蝠冠状病毒 HKU9（Ro-BatCoV HKU9）在基因组结构和组成上具有相似的特点。有意思的是，在 Ro-BatCoV GCCDC1 基因组 3'末端，N 基因下游相邻位置上有一个独特的 p10 基因。序列和功能分析表明 Ro-BatCoV GCCDC1 的 p10 基因来源于膜融合正呼肠孤病毒，

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

细胞水平上的研究结果表明该基因与膜融合正呼肠孤病毒的 p10 基因在合胞体形成中发挥相同的作用。因此，我们推测 Ro-BatCoV GCCDC1 是由一个古老的冠状病毒和一个膜融合正呼肠孤病毒在远古时期混合感染了单一细胞产生的重组病毒。鉴于冠状病毒是单股正链非节段的 RNA 病毒，而膜融合正呼肠孤病毒是双股分节段的 RNA 病毒，这两种病毒之间的重组事件在自然界中非常罕见。因此，我们的发现是单股和双股 RNA 病毒之间跨科重组的第一次报道，在病毒学中具有突出的理论意义。

1.1 材料和方法

1.1.1 实验材料

1.1.1.1 酶及主要试剂

1) 核酸提取试剂盒：RNeasy Mini Kit（德国 Qiagen）

2) 反转录酶：SuperScript III Reverse Transcriptase（Cat. No. 18080-093，美国 Invitrogen）

3) 聚合酶：Taq DNA polymerase（Takara，日本）

4) 5'-RACE 试剂盒：5'-Full RACE Kit（Code No. 6107，日本 Takara）

5) DNA 回收试剂盒：天根 DNA 回收试剂盒

6) 质粒提取试剂盒：天根小量质粒提取试剂盒

7) 病毒运输液：Earle's balanced salt solution (美国 Invitrogen)，5% BSA，50000 μg/ml 万古霉素，50000 μg/ml 丁胺卡那霉素，10000 units/ml 制霉菌素

8) 引物：由擎科新业和北京华大公司合成。

1.1.1.2 主要仪器

1) 小型台式离心机（美国Thermo Scientific）

2) PCR仪：Bio-Rad，东胜创新

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3) Biofuge 台式冷冻高速离心机（德国Heraeus）

4) 高速冷冻离心机（日本himac CR 21G）、

5) -20℃低温冷柜（德国SIEMENS）

6) -80℃低温冷柜（德国Heraeus）

7) BL310赛多利斯电子天平（德国Sartorius）

8) 电子天平（上海HENGPING JA31002）

9) pH酸度计（美国HANNA HI 223）

10) 凝胶成像系统（美国Bio-RAD）

11) 恒压恒流电泳仪（美国Bio-RAD）

12) 超净工作台（北京哈东联）

13) 高压灭菌锅（日本TOMY Autoclave SS-325）

14) 紫外分光光度计（日本HITACHI V-1800）

15) MilliQ plus超纯水系统（美国Millipore）

16) 恒温水浴锅（北京精科华瑞）

17) DYYIII-31A 型电泳槽（北京六一仪器厂）

1.1.1.3 主要溶液配制

1) 5×甲酚红 PCR 上样缓冲液：0.04%甲酚红，60%蔗糖

先配制 5 ×甲酚红 PCR 上样缓冲液。甲酚红在 60%的蔗糖中很难溶解，需要加热后，再过夜搅拌。可配成 500 mL，分装到 50 mL 离心管中，存放于 4℃。如果是直接用作 PCR 产物上样缓冲液，最好是过滤一下。如果用来配制如下的 2 × PCR Mix，可暂不过滤。

2) 2 × PCR Mix 配制

10 × Buffer	10 mL
dNTP (2.5 mM)	8 mL

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

DMSO	5 mL
5 × 甲酚红 PCR 上样缓冲液	20 mL
PCR 水	7 mL
	50 mL

配制好之后，以 0.22 μM（油性）小滤器过滤，再进行分装，每管 1 mL 冻存于-20℃备用。

3) LB 培养基 (1 L)

胰蛋白胨	10 g
酵母提取物	5 g
NaCl	10 g

加入 900 mL 去离子水，摇动容器直至溶质溶解，用 5 M NaOH 调 pH 至 7.0，定容至 1 L，高压灭菌，4℃存。

4) LB 固体培养基：

胰蛋白胨	1% (W/V)
酵母提取物	0.5% (W/V)
NaCl	1% (W/V)
琼脂粉	1.5% (W/V)

5) Amp (氨苄青霉素钠盐) 贮存液 (100 mg/mL)

溶解 1 g 氨苄青霉素于 10 mL 灭菌水，过滤除菌，-20℃分装备用。使用时 100 mL 培养液中加 100 μL (即 1:1000 倍稀释)，最终浓度为 100 μg/mL。

6) 0.1 M $CaCl_2$：0.55 g $CaCl_2$ 溶于 50 mL 蒸馏水中，高压灭菌。

7) IPTG (异丙基硫代-β-D-半乳糖苷)

在 8 mL 蒸馏水中溶解 2 g IPTG 后，定容至 10 mL，0.22 μm 过滤除菌，分装成 1 mL，-20℃保存。

1.1.1.4 常用设计分析软件

1) 序列比对和分析：ClustalX 2.1、DNAStar 12.0、Vector NTI 11.5、Geneious R9、CLC Genomics Workbench 8。

2) 引物设计：Primer Premier 5。

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3) 进化分析：MEGA7、PhyML。

4) 图片编辑处理软件：Adobe Photoshop CS6。

1.1.2 实验方法

1.1.2.1 引物设计

我们从 GenBank 中下载了冠状病毒的全部序列，尤其是全基因组序列。将 ORF1ab 中的 RdRp 序列提取出来后，去除重复和测序质量不好的序列（如序列中存在 N 及其他的简并碱基）；将核苷酸序列翻译成氨基酸序列后，进一步去除重复序列，最后保留大约 400 条氨基酸序列，经比对后从中找出最为保守的氨基酸基序，手工设计简并的通用引物（设计方法见第六章），经合成后用于样本中冠状病毒的筛查。

1.1.2.2 样本采集

在当地疾控中心工作人员和村民的协助下，我们在云南西双版纳地区的某个山洞里捕获了大约 300 只蝙蝠，经物种鉴定为棕果蝠。其中，200 只蝙蝠解剖后采集了肺脏、肝脏、肠道组织和肛拭子，部分蝙蝠采集了脑部组织，另有 100 只蝙蝠仅采集了肛拭子。所有组织分别存放于 2 mL 细胞冻存管中，肛拭子浸泡于 1.5 mL 含有多种抗生素（50000 μg/ml 万古霉素, 50000 μg/ml 丁胺卡那霉素, 10000 units/ml 制霉菌素）和 5% BSA 的病毒运输液中。所有标本分类包装在纱布袋中后立即存放于液氮，并经干冰运输寄送回实验室，存放于-80℃低温冰箱中，直至需要检测时取出。本研究通过了中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所的伦理及动物福利和使用委员会的审查。

1.1.2.3 RNA 提取

使用 Qiagen 核酸提取试剂盒按照说明书中介绍的方法进行核酸提取：1）将冻存于-80℃低温冰箱中的肛拭子样本取出后，按照顺序排列好，置于 4℃冰箱中过夜解冻；2）在超净台中小心取出冻存管中的棉拭子，取 100 μL 肛拭子样本加入到 600 μL 病毒裂解液中充分裂解，随后加入 700 μL 70%的乙醇终止裂解反应；3）将病毒裂解液分两次结合到微量吸附柱中，每次 700 μL，以 12000 g 短暂离心；4）以 70%的乙醇洗涤两次后，将微量吸附柱置于干净的收集管中以 12000 g

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

离心 2 分钟，去除残余的乙醇；5）将吸附柱置于 1.5 mL 离心管中，加入 60 μL 无 RNA 酶的去离子水，室温放置 2 分钟，充分溶解，最后 12000 g 离心 2 分钟洗脱 RNA；6）提取的 RNA 经测定浓度后立即用于下一步反转录试验或存放于 -80℃低温冰箱中。

1.1.2.4 反转录

以 Invitrogen 公司的 SuperScript III Reverse Transpritase（Cat. No. 18080-093）或其他公司的类似产品，按照操作手册中的步骤进行。

1) 反转录体系准备：

10 mM dNTP Mix	1 μL
Random primers	1 μL
总 RNA	8 μL
	共 **10** μL

2) 65℃ 5 分钟加热混合物，然后于冰上放置至少 1 min。

3) 取出 PCR 管，短暂离心后加入如下试剂：

10 × RT buffer	2 μL
25 mM $MgCl_2$	4 μL
0.1 M DTT	2 μL
RNaseOUT™ (40 U/μL)	1 μL
SuperScript® III RT (200 U/μL)	1 μL

4) 轻柔混合反应体系，25℃ 5 分钟。

5) 50℃ 60 分钟，进行反转录反应。

6) 70℃ 15 分钟灭活。

1.1.2.5 半巢式 PCR 检测

1) 第一轮 PCR

反应体系：

2 × PCR Mix	10 μL
引物 panCoVs-OF	1.2 μL
引物 panCoVs-OR	1.2 μL
cDNA	2 μL

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

rTaq	0.6 μL
H_2O	5 μL
总体积	**20** μL

反应条件：

95℃	10 min	
94℃	1 min	5 个循环
44℃	1 min	
72℃	1 min	
94℃	1 min	30 个循环
54℃	1 min	
72℃	1 min	
72℃	5 min	
4℃	~	

2) 第二轮 PCR

反应体系：

2 × PCR Mix	10 μL
引物 panCoVs-IF	1.2 μL
引物 panCoVs-OR	1.2 μL
第一轮产物	5 μL
rTaq	0.6 μL
H_2O	2 μL
总体积	**20** μL

反应条件：

95℃	10 min	
94℃	1 min	5 个循环
48℃	1 min	
72℃	1 min	
94℃	1 min	30 个循环
58℃	1 min	
72℃	1 min	
72℃	5 min	
4℃	~	

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

第一轮和第二轮 PCR 产物经凝胶电泳确认后，如果扩增片段大小与预期相符，即可将 PCR 产物送公司进行测序。

表 1.1 冠状病毒通用引物及测序引物

引物		序列
检测	panCoVs-OF	5'-TGTTATTGGAACCACGAAGTTYTAYGGNGGNTG-3'
	panCoVs-IF	5'-GTTTTGTTCTTATGGGTTGGGATTAYCCNAARTGYGA-3'
	panCoVs-OR	5'-TAGTAGCATCTCCGCTGCTAGTNCCNCCNGGYTT-3'
测序	panCorona-seq-1F	5'-TGTTATTGGAACCACGAAG-3'
	panCorona-seq-2F	5'-CTTATGGGTTGGGATTA-3'
	panCorona-seq-R	5'-GCATCTCCGCTGCTAGT-3'

1.1.2.6 片段延伸及分析

将返回的 PCR 产物测序结果提交到 GenBank 中以 tblastx 进行比对分析，经确认测得的序列与 Ro-BatCoV HKU9 同源性最高；将 Ro-BatCoV HKU9 全基因组序列共 8 条全部下载，经比对后按照文献的方法以测得的序列为中心往两端延伸进行引物设计，以扩增 RdRp 中 816 bp 的序列，测序后并做进一步分析，经初步确认这株病毒为新型冠状病毒，并暂时将之命名为 Rousettus bat Coronavirus GCCDC1（Ro-BatCoV GCCDC1）。

1.1.2.7 新一代测序（Next-generation sequencing，NGS）

经确认为新型冠状病毒的样本（样本号为 345 和 356）重新提取核酸后，将核酸寄送至深圳华大基因研究院，采用 Ion Proton 平台进行新一代测序（Next-generation sequencing，NGS）。新一代测序得到的原始数据，以 Ro-BatCoV HKU9 为参考序列进行拼接，得到部分位置上存在 gap 的近似全长基因组序列。

1.1.2.8 Gap 修补与序列校正

以得到的近似全长基因组序列为模板进行引物设计，将 346 和 356 号样本 RNA 反转录后进行 PCR 扩增，扩增产物进行 Sanger 测序以补齐所有 gap，并对 NGS 测序得到的所有碱基逐一校对以修正其中可能存在的错误。引物序列如下：

表 1.2 gap 修补与序列校正引物

引物名称	引物序列	引物名称	引物序列
CoV-GW-01OF	TCTACCGTCTTGCTAATG	CoV-GW-08OF	ATCCTGTCTTCTTTGCTCT

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

CoV-GW-01OR	TGNGCWGGRTCRCCDACA	CoV-GW-08OR	TGTCGTCACCCACTACTC
CoV-GW-01IF	CGGTGGCGGGTTTTATGTTA	CoV-GW-08IF	CTTGTCTACACTATGGCACTG
CoV-GW-01IR	TCATARTTAGTRCACATRCT	CoV-GW-08IR	GTCTTAACAGCATTTTCCTC
CoV-GW-N02OF	TAAACGAGTYMGGGGTWC	CoV-GW-09OF	ATGGTTAGGTGCTGATGA
CoV-GW-N02OR	AGCCTCAGACATAAAGAC	CoV-GW-09OR	GCGTTTATAGCCTTGTTA
CoV-GW-N02IF	TTTGTHGTWAARCGCCATAC	CoV-GW-09IF	GCTCAGGATGGCATTCTACA
CoV-GW-N02IR	GTGCTTCCGCAGATAGTTGT	CoV-GW-09IR	AGCTTGGTCGGAAACAAGTC
CoV-GW-03OF	GCTTTTGTTACTAATGTTG	CoV-GW-10OF	TTATGGGTGGGTTCCTGT
CoV-GW-03OR	RGCNACVGGYAAYTCACC	CoV-GW-10OR	TCTTGAATAGAGCTGTTTGTC
CoV-GW-03IF	ATTGTACTACCCATCTGCTA	CoV-GW-10IF	GTTGACAGAAGTCCGAGCAT
CoV-GW-03IR1	KVMACATTRCARTTCCARAA	CoV-GW-10IR	CTCCACTGTGAAACCAAATA
CoV-GW-03IF	ATTGTACTACCCATCTGCTA	CoV-GW-11OF	TGTCACAGTGGGTTTCGT
CoV-GW-03IR2	TTRCCTAYATAHCCCCAYTG	CoV-GW-11OR	GCAAGGACCATCTTTTCAA
CoV-GW-S04OF	TTTAGTGTTGACCCTGAAGC	CoV-GW-11IF	AGACTCACTAACTGGGAAAT
CoV-GW-S04OR	GTATCTCGCAGTTGTTGTTGT	CoV-GW-11IR	GTAGAAATGATAGGACAAGC
CoV-GW-S04IF	TGTAGATGCCACATTGAGC	CoV-GW- 14OF	TGTATCCTGCTGTTCGTG
CoV-GW-S04IR	GTCAGCCATAGTGTATTTAG	CoV-GW- 14OR	CTGCTTTGTAACCTTCTGAG
CoV-GW-04OF	TGCACRTGTTAYTTYGGTGT	CoV-GW- 14IF	TCCTAAGCCATCCGAGCAAC
CoV-GW-04OR	TTGAGTATCTCGCAGTTGT	CoV-GW- 14IR	GACCAAATAAGCCATCCAAG
CoV-GW-04IF1	TTATGARTATGTCGTTAGYTC	CoV-GW-15OF	TAARCAYAATTGGAATTG
CoV-GW-04IR	ACGCTGCCGTGAGATGTGAG	CoV-GW-15OR	AWAYTTRTTAGCAAARCA
CoV-GW-04IF2	TCWTGGCAGGCRCTTATGYTWAA	CoV-GW- 16OF	CAGAATGTTTCYTGGTWTG
CoV-GW-04IR	ACGCTGCCGTGAGATGTGAG	CoV-GW-16OR	GCCTAATTATAGCGAGTG
CoV-GW-05OF	CATTGAGTACCCCATTATCT	CoV-GW-16IF	TGGGTKGGTGAAGADGGTGC
CoV-GW-05OR	AGTDSTATTACGCCARAA	CoV-GW-16OR	GCCTAATTATAGCGAGTG
CoV-GW-05IF	GCTATAAGAGTTCCTGGCGTTG	CoV-GW-18OF	TGCGTCTCCTACTGCTTTTA
CoV-GW-05IR	TCDGCACTCCAIGARTGYTC	CoV-GW-18OR	GCCTCTTAGGGTCCTTTCAC
CoV-GW-06OF	ATTTTAGTAGCGATGTGG	CoV-S1-OF	ATTCAGCACTAACCATAA
CoV-GW-06OR	TCAGAGCCTTAATGGTAG	CoV-S1-OR	CTAGACAGCCCATAAGAC
CoV-GW-06IF	TTGCGATGGTTTATGTAGTAG	CoV-S1-IF	CGATTTACAGCGATTCTCAC
CoV-GW-06IR	AGTGTTATTTTCCAGGATGCT	CoV-S1-IR	TTACCAATAGGCATTTCACA
CoV-GW-07OF	CCAGTAGCCTTAGATTTGA	CoV-S2-OF	CAAAGGCTAACGATACAC
CoV-GW-07OR	TGTTTTGGGATTTGTAGC	CoV-S2-OR	TTACAAAAGACACCACGA
CoV-GW-07IF	TTCAAGTGCGTAATGGCTATGT	CoV-S2-IF	GTGTCAGTGCCCATTTCAGT
CoV-GW-07IR	CAGCGTGGTGGTTGGTAGAT	CoV-S2-IR	CGCAAAGTTGTCAGCAGTAG

1.1.2.9 3'-RACE 和 5'-RACE

通过将 8 株 BatCoV HKU9、4 株 BatCoV HKU4 和 4 株 BatCoV HKU5 全基因组序列比对后进行上游引物设计（CoV-N3R-OF），并与 OligodT 组合后 PCR 扩增 Ro-BatCoV GCCDC1 基因组 3'末端序列，将获得的片段进行测序，在测得的序列的基础上重新设计特异性引物（CoV-N3R-OR1 和 CoV-N3R-OR2），以对

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

其他样本（尤其是 346 和 356 样本）中的冠状病毒 3'末端进行扩增并测序。

表 1.3 3'-RACE 引物

引物名称	引物序列
CoV-N3R-OF	TATTGCCTGGTGTCTATCCC
CoV-N3R-OR1	TTTTTTTTTTTTGCAAATCCT
CoV-N3R-OR2	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTGC

从 NGS 拼接的数据看，检测到的新型冠状病毒 5'末端序列不完整。我们根据已经测得的序列设计下游特异性引物（CoV-5Race-OR 和 CoV-5Race-IR），使用 Takara 公司的 5'-RACE 试剂盒，按照试剂盒说明书对基因组 5'末端进行快速扩增。356 号样本的 5'末端成功扩增，得到的片段克隆到 pMD18-T 载体中后进行测序。所用引物序列如下：

表 1.4 5'RACE 引物

引物名称	引物序列	
5' RACE Outer Primer	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA	试剂盒
CoV-5Race-OR	ACAAATGTATTGCGGTGGTT	
5' RACE Inner Primer	CGCGGATCCACAGCCTACTGATGATCAGTCGATG	
CoV-5Race-IR	GAGTACCGCCACGACCGAAG	试剂盒

1.1.2.10 序列分析和注释

得到病毒的全基因组序列并将全部碱基逐一仔细校对之后，需要对整个基因组序列进行注释。首先我们将 Ro-BatCoV GCCDC1 346 和 356 基因组与 8 株 BatCoV HKU9 全基因组序列进行比对，将 ORF1ab、S、NS3、E、M 和 N 各开放阅读框在基因组中所处的位置分别标示出来。因 CCDC1 346 和 356 基因组 3'末端与 BatCoV HKU9 基因组 3'末端存在较大差异，经序列比对并在 Genbank 上进一步比对之后，对这部分的各 ORF 分别标示为 NS7a、NS7b 和 NS7c。其中，N 基因和 NS7a 基因之间存在一个独特的基因，经 tblastx 比对之后发现与正呼肠孤病毒的 p10 基因存在一定同源性，暂时将之命名为 p10 基因。

随后，将 Ro-BatCoV GCCDC1 346 和 356 基因组序列与 SARS-CoV、HCoV-HKU1、IBV、Turkey coronavirus （TCoV）、Bovine coronavirus （BCoV）、MHV 和 PEDV 全基因组序列比对，根据 3C-like protease 和 papan-like protease 等蛋白酶识别的特征序列，将 ORF1ab 中所编码的 16 个非结构蛋白所处的位置

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

分别标示出来，并标示出病毒基因组的 5'UTR 和 3'UTR 序列。同时，根据 Beta 冠状病毒属成员尤其 SARS-CoV 前导序列（Leader sequence）和各基因间的转录调节序列（transcription regulatory sequence，TRS），将 Ro-BatCoV GCCDC1 346 和 356 前导序列和各基因之间的 TRS 分别标示出来。

1.1.2.11 p10 基因旁侧序列重新扩增及测序

因 Ro-BatCoV GCCDC1 基因组中存在一个未知来源的 p10 基因，经序列分析这个基因可能来自于正呼肠孤病毒。为了明确是否存在 PCR 扩增或序列拼接出现错误的可能，我们根据这个 p10 基因的旁侧序列重新设计了引物，对冠状病毒检测呈阳性的 33 份样本重新 PCR 扩增并进行测序分析，以鉴定片段的连续性和 p10 基因的存在与否。同时，重点扩增 346 和 356 这两份样本，将扩增得到的 PCR 产物克隆到 pMD18-T 载体中后进行测序。所用的引物序列如下：

表 1.5 p10 基因连续性和完整性及旁侧序列鉴定引物

引物名称	引物序列
CoV-Indels-1OF	TAAACTAGGCACTGACGACC
CoV-Indels-1OR	GAAATGCGGGATAGACACC
CoV-Indels-1IF	ACCTGGCTTAACTATCGTGG
CoV-Indels-1IR	TATGCAGCGGACTACATTCG
CoV-Indels-2OF	GACCTGAGATTTGAGGGTT
CoV-Indels-2OR	GCAGTAGGAGACGCATAGTT
CoV-Indels-2IF	GCGAAGACGGGGATACAATCG
CoV-Indels-2IR	GTCTGACAGCCGCCGACAATA

经过两轮 PCR 扩增之后，片段 1 扩增的长度应为 1860 bp，理论上应该覆盖部分 N 基因、全部 p10 基因、NS7a 基因、NS7b 基因和部分 NS7c 基因；片段 2 扩增长度应为 2110 bp，理论上应该覆盖 M 基因末端、全部 N 基因、p10 基因及大部分 NS7a 基因。

1.1.2.12 亚基因组扩增及测序

鉴于冠状病毒在其生活周期中，能够通过不连续的转录方式合成一组嵌套（nested）的亚基因组 RNA（subgenomic RNA，sgRNA）以使基因组 3'端基因得到表达。在这组亚基因组 RNA 中，5'末端约 80 bp 的序列一致，均来源于病毒基因组 5'末端的前导序列。因此，我们根据冠状病毒亚基因组形成的机制，绘

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

制出 Ro-BatCoV GCCDC1 的 9 个亚基因组结构图。然后，根据基因组和亚基因组的前导序列设计上游引物，以 3'端基因序列为基础设计下游引物，进行 PCR 扩增，并对扩增产物进行测序，以检测样本中 Ro-BatCoV GCCDC1 亚基因组的存在情况。所用引物序列如下：

表 1.6 亚基因组扩增与鉴定引物

引物名称	引物序列
TRS-5UTR-OF	GCGTGCGTGCAATCAACT
TRS-5UTR-IF	GATTCGTCTTGTACGATTCAC
TRS-S-OR	CAAGGAGCCCGTCAAAGA
TRS-S-IR	AGCGGTACTGAGACATAGGTAG
TRS-NS3-OR	TCTGTCCAGCAGCAAAATAG
TRS-NS3-IR	ACCGCAAAGTTGTCAGCAGT
TRS-E-OR	TAGTAGCTCTTCCTGTTCG
TRS-E-IR	TGTTGGCTTACACACTGAGG
TRS-M-OR	AACCCTCAAATCTCAGGTCA
TRS-M-IR	GCCACATAATGGACGAGATA
TRS-N-OR	CAGCCTGCGGTGGTAAAT
TRS-N-IR	CATAGCGACCAGTCCCAGT
TRS-p10-OR	CGCGTGGTCAAAGAAATAAG
TRS-p10-IR	GGTAGGTCTTCTTCGCTTGG
TRS-NS7a-OR	AGCGTAAAGCCGCTGGTG
TRS-NS7a-IR	CAACCTGCTCCAGACCACAT
TRS-NS7b-OR	CCTAGCAACGCGACCCTC
TRS-NS7b-IR	TCTTACTCCCTCCAACTTCAC
TRS-NS7c-OR	TTCATGGGTGGCTCTTCC
TRS-NS7c-IR	AACTAAAAGGTAGGGTTTATGG

PCR 扩增时，如果第一轮能够扩增出预期大小的条带，即直接进行 Sanger 测序并同时克隆后测序；如果第一轮扩增不理想，则进行第二轮扩增后再进行测序。

1.1.2.13 冠状病毒来源与正呼肠孤病毒来源 p10 基因和蛋白比较

我们将同一样本中同时得到的 Ro-BatCoV GCCDC1 p10 基因和正呼肠孤病毒 p10 基因，与 GenBank 中能够找到的其他正呼肠孤病毒 p10 基因在核苷酸和氨基酸水平上进行比较，以分析相互之间的同源性及重要氨基酸位点的变异。

1.1.2.14 Ro-BatCoV GCCDC1 p10 基因的克隆及 p10 亚基因组构建

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

我们根据推测和测序得到的 p10 亚基因组结构，人工拼接构建出一个 p10 亚基因组，克隆到 pcDNA3.0 衍生载体中。重组质粒转染到细胞中后，反转录得到的 mRNA 将与病毒自然感染细胞产生的 p10 亚基因组完全一致。

1.1.2.15 p10 蛋白抗血清制备

我们使用 PFAM[39]和 InterProScan[40]对 Ro-BatCoV GCCDC1 p10 蛋白所属的蛋白家族进行预测，使用 TMHMM[41]、TMpred 和 PredictProtein[42]进行跨膜结构域预测。胞外结构域（从第 2 个到第 37 个氨基酸）和胞质结构域（胞内的 33 个氨基酸）多肽经人工合成后，分别与钥孔血蓝蛋白（KLH，keyhole limpet hemocyanin）耦联，并与佐剂混合。混合好后的抗原对小鼠后腿肌肉内注射，每条肽免疫 5 只小鼠，每只小鼠免疫 20 μg 偶联的多肽，14 天后以相同的肽进行加强免疫，加强免疫后 7 天捕杀小鼠，收集血液以分离血清。血清中抗体滴度以 ELISA 方法测定。

表 1.7 p10 合成多肽

合成肽名称	合成肽序列
GCCDC1-p10N	GDCNGMWSIFGSTNCNSAKNTAGGNLEATNVLITYG
GCCDC1-p10C	KFKASQAKKTYRKELISLTTRQIYAPPREISHV

1.1.2.16 合胞体形成试验

在感染了禽类或蝙蝠来源的正呼肠孤病毒的细胞中，合胞体的形成依赖于 p10 蛋白，p10 蛋白由基因组 S1 片段的第一个 ORF 所编码。以前的研究证明 p10 蛋白的氨基酸残基可以分为绝对保守、高度保守、中度保守和不保守的氨基酸。序列和进化分析表明 Ro-BatCoV GCCDC1 的 p10 基因是一个正呼肠孤病毒来源的基因。同时，可比较的序列分析表明即使 Ro-BatCoV GCCDC1 的 p10 蛋白的重要氨基酸和基序的主体依然存在，但是在所有 28 个所谓的绝对保守氨基酸中，存在 8 个氨基酸的差异（包括两个氨基酸缺失）。因此，有必要研究在 Ro-BatCoV GCCDC1 的生活周期中，p10 基因所发挥的潜在作用。

为了研究 Ro-BatCoV GCCDC1 编码的 p10 蛋白是否与其他的禽类和蝙蝠来源的正呼肠孤病毒编码的 p10 蛋白一样发挥相同的作用，我们将 p10 基因克隆到 pCAGGS 载体中。重组质粒经 PEI 转染到 BHK-21 细胞中，分别于 24、36 和 48

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

小时通过 Wright-Giemsa 染色的方法和间接免疫荧光试验，对细胞与细胞之间的融合进行观察，以观察合胞体形成与否。同时，将 Pulau 病毒（一种蝙蝠正呼肠孤病毒[43]）的 p10 基因克隆到 pCAGGS 载体中，转染到细胞中以作为阳性对照。以 pCAGGS 空载体转染的细胞作为阴性对照。

不同来源的基因组中，包括人类、动物、细菌甚至病毒，整合有一些假基因或沉默基因。换而言之，这些基因可能在生活周期中不转录或不表达。前面的试验证明在 Ro-BatCoV GCCDC1 的复制周期中，p10 基因能够从基因组中转录，检测到的 p10 亚基因组 RNA 是明显的信号。然而，由于我们暂时没有分离到病毒，目前没有有效的手段去判断 p10 基因能否表达。因此，我们将推测得到的 p10 亚基因组克隆到 pcDNA3.0 衍生载体中。理论上，重组质粒转染细胞中后转录出的 mRNA，与病毒感染细胞中的 p10 亚基因组 mRNA 完全一致。同样按照上面描述的方法，将重组质粒转染到 BHK-21 中后，采用 Wright-Giemsa 染色的方法和间接免疫荧光试验，对细胞合胞体形成情况进行观察。Pulau 病毒 p10 基因重组质粒转染后的细胞仍然用作阳性对照，以 pcDNA3.0 空载体转染的细胞作为阴性对照。

1.1.2.17 Ro-BatCoV GCCDC1 病毒 p10 蛋白突变分析

由于 Ro-BatCoV GCCDC1 的 p10 蛋白是在有囊膜病毒中的第一次报道，我们试图如以前报道中呼肠孤病毒的 p10 蛋白一样确定 Ro-BatCoV GCCDC1 病毒 p10 蛋白中的关键氨基酸[44, 45]。在合胞体形成试验中，6 个不同的突变体质粒均以聚乙亚胺（PEI）转染 6 孔板中的 BHK-21 单层细胞，每种质粒转染两孔，每孔转染 2 微克质粒，同时以野生型的 p10 作为阳性对照，pCAGGS 空载体作为阴性对照。孵育 5 小时后更换成含 10%胎牛血清的 DMEM 完全培养基继续培养。转染的细胞在指定的时间（24、36 和 48 小时）以多聚甲醛固定，用 Wright-Giemsa 染色，对合胞体形成情况进行观察。

1.1.2.18 进化分析

为了确定 Ro-BatCoV GCCDC1 在冠状病毒中的进化关系和分类地位，我们选择 RdRp，spike 和 N 蛋白进行分析。对于冠状病毒而言，p10 基因是一个“外来”基因。目前除了 Ro-BatCoV GCCDC1，在其他的冠状病毒中没有发现相关基

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

因，而序列分析表明 Ro-BatCoV GCCDC1 p10 基因与禽类和蝙蝠来源的正呼肠孤病毒的 p10 基因同源。因此，对 Ro-BatCoV GCCDC1 的 p10 蛋白同样进行进化分析。进化树构建首先使用 MUSCLE 软件进行序列比对，然后用 GBlocks 软件从比对的蛋白序列中提取保守结构域，使用 ProtTest 软件进行模型计算[46]，最后使用 PhyML 软件包以最大似然法进行构建[47]，模型选择为 LG+G，Bootstrap 值设定为 1000。最后，进化树以 FigTree 和 MEGA7 进行显示和注释[48]。

1.1.2.19 病毒培养

冠状病毒检测呈阳性的肛拭子悬浮液，高速离心之后取上清，以 DMEM（含 2 倍工作浓度的抗生素）5 倍稀释后接种到前一天铺设的 24 孔 Vero E6、BHK-21、MDCK、A549、HEp-2 和蝙蝠细胞株的单层细胞上，孵育 1 小时后更换成含 2% FBS 的 DMEM 新鲜培养基，维持培养 3 天。每天观察细胞状态和可能的病变情况。每个样本盲传三代。每代培养物收获后重新接种到新准备的单层细胞上，继续培养。同时，取收获的培养上清和细胞沉淀，分别提取核酸，以通用引物对可能存在的病毒复制进行检测。

1.1.2.20 正呼肠孤病毒病毒分离、检测及 p10 基因扩增

我们将 33 份冠状病毒检测呈阳性的样本接种 CaCO-2 细胞（人结肠直肠腺癌细胞），尝试进行冠状病毒分离。同时使用冠状病毒和正呼肠孤病毒通用引物检测病毒在细胞中的增殖情况。盲传三代之后，正呼肠孤病毒检测呈阳性的样本，进一步使用正呼肠孤 p10 基因引物进行扩增，以检测和鉴定 p10 基因的存在与否。正呼肠孤病毒通用引物和 p10 基因扩增所用引物分别如下：

表 1.8 p10 基因扩增与鉴定引物

引物名称	引物序列
OrthoReo-OF	CBATYATGCCNHTDAAYGT
OrthoReo-OR	CCRTCRTCNCCYTGRCANA
OrthoReo-IF	AGYGCNGTNATYGARAARGT
OrthoReo-IR	TCCATCATNGTRCTRTTRTTNGC
Orthoreo-p10-1F	TCGTGCTGCTTATTTTTGTTC TYRDKTGTCGMTATG
Orthoreo-p10-1R	AGGATGGTCTAGTGGGATGTC NACRTTRATRTARTA
Orthoreo-p10-2F	TCGTGCTGCTTATTTTTGTTC
Orthoreo-p10-2R	AGGATGGTCTAGTGGGATGTC

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2 结果

1.2.1 蝙蝠样本检测

本研究中，我们采用半巢式 PCR 总共检测了 118 份棕果蝠肛拭子样本，PCR 扩增的是 RdRp 基因中最保守的区域。第一轮 PCR 检测，31 份（26%）样本呈冠状病毒阳性，而第二轮 PCR 能检测出 47（40%）份阳性样本。对扩增得到的 PCR 产物直接进行 Sanger 测序。测序结果经 tblastx 比对，很明确这些序列是冠状病毒序列，与 Beta 冠状病毒属 D 群中的棕果蝠冠状病毒 HKU9（Ro-BatCoV HKU9）最为接近。

1.2.2 细胞培养与病毒分离

冠状病毒检测呈阳性的肛拭子悬液样本，我们尝试用多种细胞系对这株冠状病毒进行分离，包括 Vero E6、BHK-21、MDCK、A549、HEp-2、CaCo-2 和蝙蝠细胞系，病毒分离结果显示不成功。单层细胞用阳性样本接种后，盲传三代，在细胞系上没有检测到明显的细胞病变。同时，对每代的培养上清和细胞均进行收集，然后使用针对 RdRp 基因的特异性引物进行 RT-PCR，以检测细胞培养中病毒复制与否。很遗憾，结果同样为阴性。

1.2.3 病毒命名及全基因组测序

从 346 和 356 原始样本中重新提取的 RNA，使用 Ion Proton 平台进行二代测序，得到近似全长基因组序列。根据以往文献中提供的简洁方法[49]对 RdRp 部分序列（一个 816bp 的片段）进行序列分析，结果表明这株病毒可能是一种新型冠状病毒。因此，暂时将之命名为棕果蝠冠状病毒 GCCDC1（Ro-BatCoV GCCDC1）346 株和 356 株。

进一步，我们使用一整套涵盖整个病毒基因组的引物进行扩增，并采用 Sanger 双脱氧法进行测序，将 Ro-BatCoV GCCDC1 346 株和 356 株基因组序列中存在的 gap 补齐，同时对二代测序拼接得到的全基因组中的每一个碱基进行确认和校正，尤其是 NGS 数据中那些信息比较模糊的碱基。最后，采用 5'-和 3'-末端快速扩增得到 Ro-BatCoV GCCDC1 356 株基因组的 5'和 3'-末端。不巧的是，

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Ro-BatCoV GCCDC1 346 株基因组 5'末端扩增不成功。因此，下面的分析仅集中在 Ro-BatCoV GCCDC1 356 株的全基因组上。

1.2.4 病毒全基因组分析

除了 3'末端的 poly A 尾，Ro-BatCoV GCCDC1 基因组包含 30,129 个碱基，G/C 含量为 45.4%。基因组序列比对进一步证明 Ro-BatCoV GCCDC1 与 Ro-BatCoV HKU9s 在进化上更为接近，核苷酸同源性为 66.6% - 67.4%。同时，从序列比对和注释上可以看出 Ro-BatCoV GCCDC1 在基因组组成和结构上与蝙蝠冠状病毒 Ro-BatCoV HKU9 相似。主要开放阅读框（ORF）的数量和顺序上均为：5'- replicase ORF1ab - spike - NS3 - envelope (E) - membrane (M) - nucleocapsid - (N) - 3'，紧接着是编码非结构蛋白的辅助基因（**图 1.1**）。

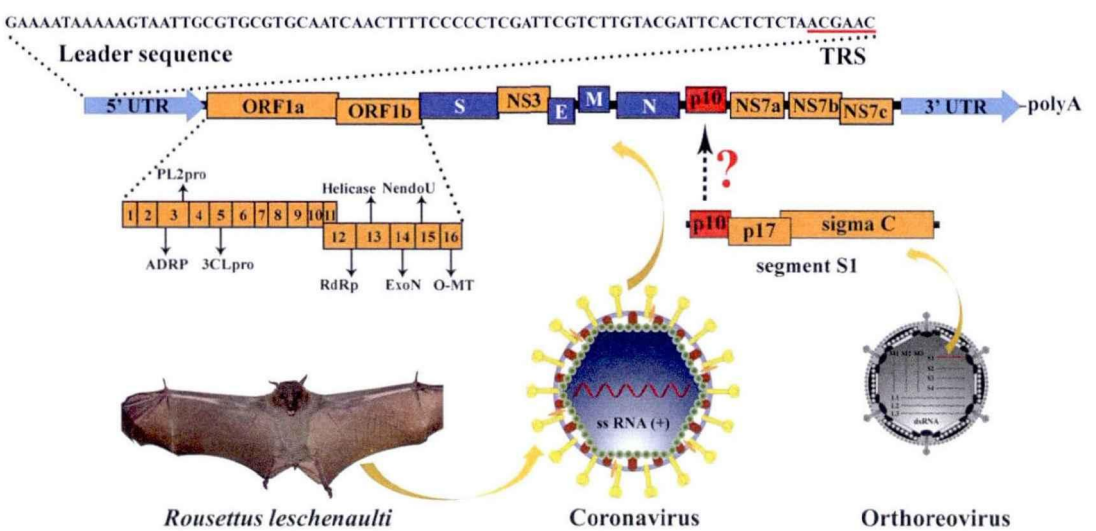


图 1.1 蝙蝠冠状病毒 Ro-BatCoV GCCDC1 基因组组成。非结构基因和推测的成熟结构蛋白、结构基因、5'-和 3'-UTR 分别以黄色、深蓝色和浅蓝色标示。特征性 p10 基因以红色表示。p10 基因的潜在来源以虚箭头和问号标示。先导序列（leader sequence）和先导转录调节序列（TRS）直接以核苷酸表示。蝙蝠（*Rousettus leschenaulti*，棕果蝠）用来表示 Ro-BatCoVGCCDC1 发现的物种来源。冠状病毒（coronavirus）粒子用来说明本研究中发现的病毒。正呼肠孤病毒粒子（orthoreovirus）和基因组的 S1 片段用来演示 p10 的可能来源。

在 Beta 冠状病毒属所有成员中，第一次是在 Ro-BatCoV HKU9 中发现 N 基因下游存在编码非结构蛋白的辅助基因，随后在其他蝙蝠冠状病毒，如肯尼亚棕果蝠冠状病毒（Ro-BatCoV Kenya）、肯尼亚黄毛果蝠冠状病毒（Ei-BatCoV Kenya）、菲律宾蝙蝠冠状病毒（BatCoV Philippines）等的基因组 3'末端同样发现存在编码非结构蛋白的辅助基因。Ro-BatCoV HKU9 基因组的这个区域存在两

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

个开放阅读框：NS7a 和 NS7b；Ro-BatCoV Kenya 和 Ei-BatCoV Kenya 的这个区域存在两个阅读框：ORFx 和 ORFy；而在 BatCoV Philippines 的这个区域，存在三个阅读框，分别命名为 NS7a、NS7b 和 NS7c。然而，和这些冠状病毒不同，Ro-BatCoV GCCDC1 基因组对应的区域中，基因组成很复杂，很明显在这个区域上存在 4 个开放阅读框。Blastx 搜索结果表明，从第二到第四个开放阅读框编码的非结构蛋白在氨基酸水平上与上述蝙蝠冠状病毒存在一定的同源性（**表 1.9**）。因此，这三个开放阅读框按照传统的规则分别命名为 NS7a、NS7b 和 NS7c。Ro-BatCoV GCCDC1 基因组中，或许最与众不同的特点是在 N 基因和 NS7a 基因之间，存在一个 276 个核苷酸的完整 ORF。与前面描述的 NS7a、NS7b 和 NS7c 不同，通过 blast 与 GenBank 数据库比对，在目前所有已知的冠状病毒中，找不到这个阅读框的同源序列。但是，令人惊奇的是，这个小的阅读框所编码的蛋白与禽类或蝙蝠来源的膜融合正呼肠孤病毒基因组 S1 片段的第一个阅读框编码的 p10 蛋白有 30%～54.9%的氨基酸同源性，而膜融合正呼肠孤病毒是属于呼肠孤病毒科的双链 RNA 病毒。因此，根据编码蛋白的分子量，暂时将这个阅读框标记为 p10。

表 1.9 Ro-BatCoV GCCDC1 与 Ro-BatCoV HKU9 及其他相关冠状病毒基因组 3'末端辅助基因比较

		Ro-BatCoV GCCDC1 strain 356 (identities/cover)		
		NS7a	**NS7b**	**NS7c**
Ro-BatCoV HKU9-1	NS7a	40% (87%)		
	NS7b			53% (99%)
Ro-BatCoV HKU9-2	NS7a			
	NS7b			30% (90%)
Ro-BatCoV HKU9-3	NS7a		33% (90%)	
	NS7b			32% (99%)
Ro-BatCoV HKU9-4	NS7a		32% (91%)	
	NS7b			32% (95%)
Ro-BatCoV HKU9-5-1	NS7a			
	NS7b			
Ro-BatCoV HKU9-5-2	NS7a			
	NS7b			
Ro-BatCoV HKU9-10-1	NS7a		33% (90%)	
	NS7b			32% (99%)
Ro-BatCoV HKU9-10-2	NS7a		42% (91%)	
	NS7b			36% (99%)

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Ei-BatCoV Kenya	ORF7x			
	ORF7y			29% (85%)
Ro-BatCoV Kenya	ORF7x	40% (87%)		
	ORF7y			52% (99%)
BatCoV Philippines	NS7a		35% (88%)	
	NS7b			
	NS7c			29% (85%)

Ro-BatCoV HKU9 和 BatCoV Philippines 的 N 基因下游，有两个 ORF，分别命名为 NS7a 和 NS7b，Ei-BatCoV Kenya 和 Ro-BatCoV Kenya 的 N 基因下游的两个 ORF 分别命名为 NS7x 和 NS7y。Ro-BatCoV GCCDC1 的 N 基因下游有 4 个 ORF，其中 ORF2~4 根据序列同源性和传统的命名方法，分别命名为 NS7a、NS7b 和 NS7c。氨基酸同源性通过 blastp 确定。本分析中使用的病毒序列分别为：Ro-BatCoV HKU9: Rousettus bat coronavirus HKU9 (NC_009021, EF065514, EF065515, EF065516, HM211098, HM211099, HM211100, HM211101); BatCoV philippines: Bat coronavirus Philippines/Diliman1525G2/2008 (AB543561); Ei-BatCoV Kenya: Eidolon bat coronavirus/Kenya/KY24/2006 (HQ728482); Ro-BatCoV Kenya: Rousettus bat coronavirus/Kenya/KY06/2006 (HQ728483).

通过与 Ro-BatCoV HKU9 基因组进行比对，并根据 Beta 冠状病毒转录调节序列（TRS，transcription regulatory sequence）的共有核心序列信息，对 Ro-BatCoV GCCDC1 的各个开放阅读框、先导序列（leader sequence）、先导 TRS（L-TRS，leader TRS）和单个基因的 TRS（B-TRS，body TRS），以及这些元件在基因组中所处的位置进行了预测和标示。氨基酸序列分析表明 Ro-BatCoV GCCDC1 的 replicase、S、E、M 和 N 蛋白与 Ro-BatCoV HKU9 基因组编码的相应蛋白具有很高的同源性，而与 SARS-CoV、SARSr-Rh-BatCoV HKU3、MERS-CoV、BatCoV HKU4 和 BatCoV HKU5 编码的相关蛋白的同源性较低（**表 1.10**）。由于在 SARS-CoV、BatCoV HKU3、MERS-CoV、BatCoV HKU4 和 BatCoV HKU5 基因组中不存在 NS3 编码基因，因此在这个蛋白上不存在可比性。值得注意的是，与 Ro-BatCoV HKU9 相比较，Ro-BatCoV GCCDC1 的 N 蛋白是 3'末端截短的（下面将提供进一步的信息）。在 Ro-BatCoV GCCDC1 和 Ro-BatCoV HU9 基因组中，某些 ORF 与前面的 ORF 存在部分重叠，如 spike 基因与前面 ORF1ab 重叠，但是其他的 ORF 可能不重叠。这导致每个 ORF 的 TRS 所处的位置，以及 TRS 核心序列与起始密码子之间的距离不一样。有些 TRS 位于上游 ORF 内部，而其他的位于基因间隔序列之间（intergenic sequence）。Ro-BatCoV GCCDC1 的 TRS 核心序列是 5'-ACGAAC-3'，与 SARS-CoV 和 Bat-SARS-CoV HKU3（B 群）、Bat-CoV HKU4 和 Bat-CoV HKU5（C 群），以及 Bat-CoV HKU9（D 群）的 TRS

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

核心序列一致。根据 TRS 的位置，相应地很容易鉴定出先导序列位于基因组 1～78 核苷酸碱基（**图 1.1**）。同样值得注意的是，p10 基因的 TRS 位置很特别，并且与共有核心序列比较，存在一个核苷酸的差异（**表 1.10**）。虽然在 N 基因和 p10 基因之间存在 35 个核苷酸的间隔序列，p10 的 TRS 依然延伸到 N 基因的编码序列之中，与 p10 基因的起始密码子之间间隔了 97 个碱基（**表 1.10**）。

通过进一步比对 Ro-BatCoV GCCDC1、SARS-CoV、HCoV-HKU1、IBV、TCoV、BCoV、MHV 和 PEDV 的全基因组序列，能够预测 ORF1a 和 ORF1b 之间的核糖体移码位点（frame shift site）。同时，根据 3CLpro 和 PLpro 的识别模式和剪切位点，能够预测复制酶中 nsp1～nsp16 共 16 个非结构蛋白的大小及其在基因组中的位置（**表 1.11**）。以前的研究表明，3CLpro 的特异性剪切位点的 P1 位置，仅由谷氨酰胺（Q）残基占据。然而，在 Ro-BatCoV GCCDC1 基因组的 12642 位置上，显而易见是一个 T 而不是 A 或 G，这一位置上的核苷酸突变导致一个错义突变，使得谷氨酰胺变成了组氨酸。更有意思的是，在这个位点的上下游序列中（-273～+192），未出现编码谷氨酰胺的密码子。同样的情形在 Ro-BatCoV HKU9 基因组的对应区域中也可以观察到。因此，数据表明在这一区域中 LH|AG 是 3CLpro 潜在的替代剪切位点，从而将复制酶剪切成 NSP9 和 NPS10 非结构蛋白。相似的现象在 NSP10 与 NSP12 之间的剪切位点上也可以看到，CAG 密码子突变成 CAC，从而导致 Q 转变成 H。

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1.10 Ro-BatCoV GCCDC1 与 Ro-BatCoV HKU9、SARS-CoV、BatCoV HKU3、MERS-CoV、BatCoV HKU4 和 BatCoV HKU5 基因组中编码序列、转录调节序列比较

ORFs	核苷酸起止位置	蛋白大小(aa)	氨基酸同源性(%)[a] Ro-BatCoV GCCDC1 *vs*						前导 TRS 和基因间 TRS[b]	TRS 与 ATG 间距离
			HKU9s[c]	SARS-CoV[d]	HKU3s[e]	MERS-CoV[f]	HKU4s[g]	HKU5s[h]		
ORF 1ab	235-21155	6973	74.6 - 75.4	47.1	47.3 - 47.4	46.3	45.7 - 45.8	46.1 - 46.2	TCTA**ACGAAC**TTAA	156
Spike	21121-24993	1290	58.8 - 66.4	32.1	31.3 - 31.4	27.9	28.4 – 28.6	27.7 – 27.8	CTGA**ACGAAC**TAGT	42
NS3[i]	24990-25676	228	48.9 - 50.7	*NA*	*NA*	*NA*	*NA*	*NA*	GAAA**ACGAAC**GGCA	3
E	25676-25906	76	61.8 - 69.7	32.9	32.9	23.7	26.3	26.3	GATG**TCGAAC**TGTG	4
M	25914-26579	221	75.6 -80.5	43.2	42.3 -42.7	41.1	41.1	43.6	TCTA**ACGAAC**AGGA	27
N	26627-27958	443	68.0 - 71.7	39.1	39.5 -40.0	41.7	41.4 - 41.7	38.4 – 38.7	GGAA**ACGAAC**CTAT	5
p10[j]	27994-29269	91	*NA*	*NA*	*NA*	*NA*	*NA*	*NA*	AATG**ACAAAC**CCAA	97
NS7a[k]	28287-28850	187	40	*NA*	*NA*	*NA*	*NA*	*NA*	TCTA**ACGAAC**TCAT	5
NS7b[l]	28863-29444	193	32 - 42	*NA*	*NA*	*NA*	*NA*	*NA*	TCTA**ACGAAC**TATG	1
NS7c[m]	29444-29893	149	30 - 53	*NA*	*NA*	*NA*	*NA*	*NA*	GTAG**ACGAAC**TTTG	4

a：按照文献中介绍的方法[29]，使用 MEGA6[50]软件以 pairwise deletion 方法计算；b：下横线和粗体表示 TRS 核心序列中保守的核苷酸；c：使用的病毒序列为 NC_009021、EF065514、EF065515、EF065516、HM211098、HM211099、HM211100、HM211101；d：使用的病毒序列为 NC_004718；e：使用的病毒序列为 DQ022305、DQ084199、DQ084200、GQ153539、GQ153540、GQ153541、GQ153542、GQ153543、GQ153544、GQ153545、GQ153546、GQ153547、GQ153548；f：使用的病毒序列为 NC_019843；g：使用的病毒序列为 NC_009019、EF065506、EF065507、EF065508；h：使用的病毒序列为 NC_009020、EF065510、EF065511、EF065512；i：Ro-BatCoV GCCDC1、Ro-BatCoV HKU9、SARS-CoV、BatCoV HKU3、MERS-CoV、BatCoV HKU4 和 BatCoV HKU5 基因组中，S 和 E 基因间组成差异较大，在这个区域的 ORF 没有可比性；j：p10 基因是 Ro-BatCoV GCCDC1 的特有基因，在 Ro-BatCoV HKU9、SARS-CoV、BatCoV HKU3、MERS-CoV、BatCoV HKU4 和 BatCoV HKU5 基因组中没有同源序列；k：Ro-BatCoV GCCDC1 的 NS7a 蛋白与 Bat coronavirus HKU9-1 的 NS7a 蛋白的氨基酸同源性为 40%(87%覆盖)，与表中其他冠状病毒的 ORF 没有可比性；l：Ro-BatCoV GCCDC1 的 NS7b 蛋白与蝙蝠冠状病毒 HKU9-3，HKU9-4，HKU9-10-1，HKU9-10-2 的 NS7a 蛋白的氨基酸同源性为 32% - 42% (88% - 91%覆盖)；m：Ro-BatCoV GCCDC1 的 NS7c 蛋白与蝙蝠冠状病毒 HKU9-1，HKU9-2，HKU9-3，HKU9-4，HKU9-10-1，HKU9-10-2 NS7b 蛋白的氨基酸同源性为 30% - 53%（90% - 99%覆盖）。

表 1.11 Ro-BatCoV GCCDC1 中 pp1a/pp1ab 蛋白剪切位点预测 [a]

NSP	ORF1a/ORF1b 氨基酸位置	蛋白大小(aa)	剪切位点 C-末端	功能 [b]
NSP1	M^{1}-G^{174}	174	RG|GN	未知
NSP2	G^{175}-G^{772}	598	GG|GK	未知
NSP3	G^{773}-G^{2653}	1881	VG|GN	ADRP, PL2 pro
NSP4	G^{2654}-Q^{3147}	494	LQ|AG	Hydrophobic domain
NSP5	A^{3148}-Q^{3453}	306	LQ|SR	3CL pro
NSP6	S^{3454}-Q^{3741}	288	IQ|SN	Hydrophobic domain
NSP7	S^{3742}-Q^{3824}	83	LQ|AV	未知
NSP8	A^{3825}-Q^{4024}	200	LQ|NN	Primase
NSP9	N^{4025}-H^{4136}	112	**LH|AG**	未知
NSP10	A^{4137}-H^{4275}	139	**LH|AN**	未知
NSP11	A^{4276}-S^{4289}	14		未知(ORF1a 末端短肽)
NSP12	A^{4276}-Q^{5207}	932	LQ|SV	RdRp
NSP13	S^{5207}-Q^{5808}	601	TQ|SA	HEL, NTPase
NSP14	S^{5809}-Q^{6338}	530	LQ|SL	ExoN, NMT
NSP15	S^{6339}-Q^{6680}	342	LQ|SK	NendoU
NSP16	S^{6681}-V^{6973}	293		O-MT

a：本分析中使用的病毒序列为 SARS-CoV，NC_004718；HCoV HKU1，NC_006577；IBV，NC_001451；TCoV，NC_010800；BCoV，NC_003045；MHV，NC_001846 和 PEDV，NC_003436；b：ADRP，ADP-ribose 1-phosphatase；PL2pro，papain-like protease 2；3CL pro，coronavirus nsp5 protease；HEL，helicase；NTPase，nucleoside triphosphatase；ExoN，exoribonuclease；NMT，N7 methyltransferase；NendoU，endoribonuclease；OMT，2'-O-methyltransferase。

根据国际病毒分类委员会定义的冠状病毒分类标准[1, 29]，选取复制酶中 7 个独立的保守结构域后与其他 Beta 冠状病毒相应的保守结构域进行序列比对，氨基酸同源性显示在**表 1.12** 中。将这 7 个结构域串联在一起作进一步氨基酸同源分析，结果表明 Ro-BatCoV GCCDC1 与 Ro-BatCoV HKU9 之间这些结构域的氨基酸同源性为 84.4%～84.8%，明显低于 90%的门槛值（**表 1.12**）。因此，数据表明，本研究中鉴定到的 Ro-BatCoV GCCDC1 在 Beta 冠状病毒中，明显是一种新型冠状病毒。

表 1.12 Replicase 中 7 个保守的结构域的氨基酸同源性比较及 Ro-BatCoV GCCDC1 物种定义

Coronavirus CCDC1 strain 356	amino acid identity (%)[a]					
	HKU9s[b]	SARS-CoV[c]	HKU3s[d]	MERS-CoV[e]	HKU4s[f]	HKU5s[g]
ADRP	65.8 - 68.3	48.8	49.4 - 50.0	45.0	42.5 - 43.1	39.4

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

NSP5 (3CL pro)	83.3 - 84.3	52.3	52.0 - 52.3	49.2	49.8	49.5 - 49.8
NSP12 (RdRp)	89.8 - 90.3	72.3	72.3 - 72.4	69.7	70.1 - 70.2	70.5 - 70.6
NSP13 (Hel, NTPase)	90.8 - 91.5	73.7	73.7 - 74.0	72.7	73.1	72.9 - 73.1
NSP14 (ExoN, NMT)	82.1 - 82.8	61.4	61.8 - 62.1	61.1	60.1	60.7
NSP15 (NendoU)	70.9 - 73.3	49.7	49.4 - 49.7	46.6	46.0	47.5 - 47.8
NSP16 (OMT)	80.1 - 84.2	63.8	63.1 - 63.5	61.8	62.1	62.5
Concatenated domains	84.4 - 84.8	64.4	64.4 - 64.6	62.4	62.3 - 62.4	62.5 - 62.6

a：按照文献中所作的介绍[29]，使用 MEGA6[50]软件采用 pairwise deletion 方法计算氨基酸同源性；**b**：使用的病毒序列为 NC_009021、EF065514、EF065515、EF065516、HM211098、HM211099、HM211100、HM211101；**c**：使用的病毒序列为 NC_004718；**d**：使用的病毒序列为 DQ022305、DQ084199、DQ084200、GQ153539、GQ153540、GQ153541、GQ153542、GQ153543、GQ153544、GQ153545、GQ153546、GQ153547、GQ153548；**e**：使用的病毒序列为 NC_019843；**f**：使用的病毒序列为 NC_009019、EF065506、EF065507、EF065508；**g**：使用的病毒序列为 NC_009020、EF065510、EF065511、EF065512。

1.2.5 进化分析

为了确定 Ro-BatCoV GCCDC1 在冠状病毒中的进化位置，以 RdRp、spike 和 N 蛋白序列为基础构建了系统进化树。鉴于 p10 基因是冠状病毒中的一个“外来”基因，目前除了本研究中的 Ro-BatCoV GCCDC1，在其他冠状病毒中没有发现相关序列。然而，序列分析表明 Ro-BatCoV GCCDC1 的 p10 基因与禽类和蝙蝠来源的正呼肠孤病毒的 p10 基因同源。因此，我们从 Genbank 中提取所有能够得到的 p10 蛋白序列并构建了进化树。从构建的 RdRp、Spike 和 N 蛋白进化树上来看，Ro-BatCoV GCCDC1、Ei-BatCoV Kenya、Ro-BatCoV Kenya 和 Ro-BatCoV HKU9 同属于 Beta 冠状病毒属中 D 群成员。相对于 Ei-BatCoV Kenya 占据一个独立的进化枝（clade），Ro-BatCoV GCCDC1、Ro-BatCoV Kenya 和 Ro-BatCoV HKU9 会聚于另外一个进化枝上，共有一个单一进化源祖先。同时，从进化树中可以看出 Ro-BatCoV GCCDC1 与 Ro-BatCoV Kenya 和 Ro-BatCoV HKU9 相分离，形成独立的谱系（lineage）（**图 1.2**）。最后，Ro-BatCoV GCCDC1 最突出的一个特点是在基因组 3’末端，N 基因的下游旁侧，存在一个 p10 基因。系统进化分析表明，p10 与蝙蝠来源的正呼肠孤病毒同源蛋白更为接近，而不是禽类来源的正呼肠孤病毒同源基因，这一结果与我们发现 Ro-BatCoV GCCDC1 的宿主是一致的（**图 1.3**）。

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

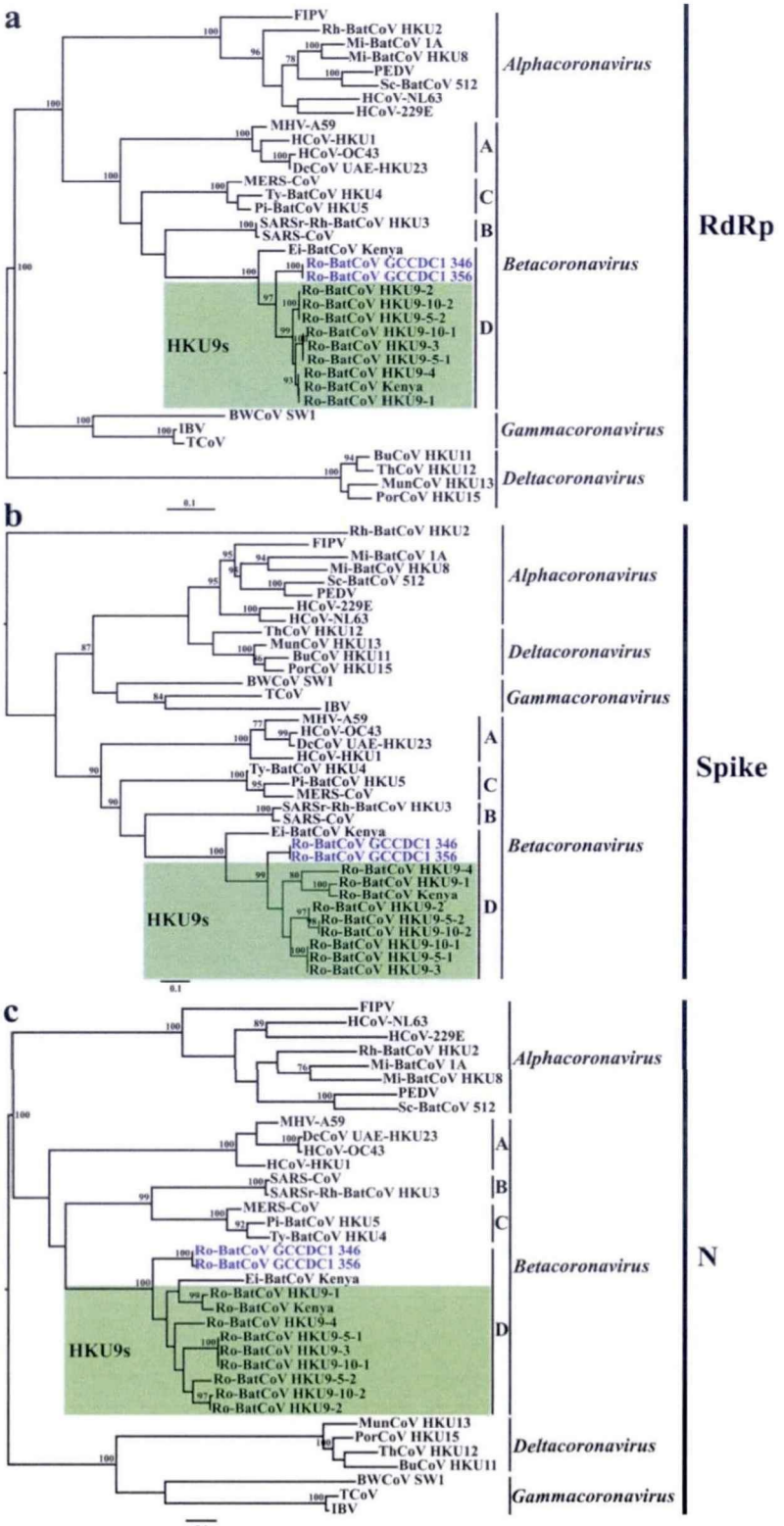


图 1.2 Ro-BatCoV GCCDC1 系统发育分析。进化树以最大似然法通过 PhyML 软件包进行构建。每个进化树以各自的模型构建，模型的选择基于 ProtTest 计算的结果（LG+G，不同蛋白取不同的 G 值）。在树的每个节点上显示 Bootstrap 值。进化树构建中所使用的序列分别为：Beluga Whale coronavirus SW1 (BWCoV SW1): NC_010646; Avian infectious bronchitis virus (IBV): NC_001451;Turkey coronavirus (TCoV): NC_010800; Feline infectious peritonitis

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

virus (FIPV): NC_002306; Bat coronavirus 1A (Mi-BatCoV 1A): NC_010437; Bat coronavirus HKU8 (Mi-BatCoV HKU8): NC_010438; Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV): NC_003436; Scotophilus bat coronavirus 512 (Sc-BatCoV 512): NC_009657; Human coronavirus NL63 (HCoV-NL63): NC_005831; Human coronavirus 229E (HCoV-229E): NC_002645; Bat coronavirus HKU2 (Rh-BatCoV HKU2): NC_009988; Murine hepatitis virus strain A59 (MHV): NC_001846; Human coronavirus HKU1 (HCoV-HKU1): NC_006577; Dromedary camel coronavirus HKU23 strain HKU23-265F (DcCoV UAE-HKU23): KF906249; Human coronavirus OC43 (HCoV-OC43): NC_005147; Bat coronavirus HKU4-1 (Ty-BatCoV HKU4): NC_009019; Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): NC_019843; Bat coronavirus HKU5-1 (Pi-BatCoV HKU5): NC_009020; Bat SARS coronavirus HKU3-1 (SARSr-Rh-BatCoV HKU3): DQ022305; SARS coronavirus (SARS-CoV): NC_004718; Eidolon bat coronavirus/Kenya/KY24/2006 (Ei-BatCoV Kenya): HQ728482; Bat coronavirus HKU9-10-2 (Ro-BatCoV HKU9-10-2): HM211101; Bat coronavirus HKU9-5-2 (Ro-BatCoV HKU9-5-2): HM211099; Bat coronavirus HKU9-2 (Ro-BatCoV HKU9-2): EF065514; Bat coronavirus HKU9-3 (Ro-BatCoV HKU9-3): EF065515; Bat coronavirus HKU9-5-1 (Ro-BatCoV HKU9-5-1): HM211098; Bat coronavirus HKU9-10-1 (Ro-BatCoV HKU9-10-1): HM211100; Bat coronavirus HKU9-4 (Ro-BatCoV HKU9-4): EF065516; Rousettus bat coronavirus/Kenya/KY06/2006 (Ro-BatCoV Kenya): HQ728483; Bat coronavirus HKU9-1 (Ro-BatCoV HKU9-1): NC_009021; Bulbul coronavirus HKU11-934 (BuCoV HKU11): FJ376619; Thrush coronavirus HKU12-600 (ThCoV HKU12): NC_011549; Munia coronavirus HKU13 (MunCoV HKU13): NC_011550; Porcine coronavirus HKU15 (PorCoV HKU15): NC_016990.

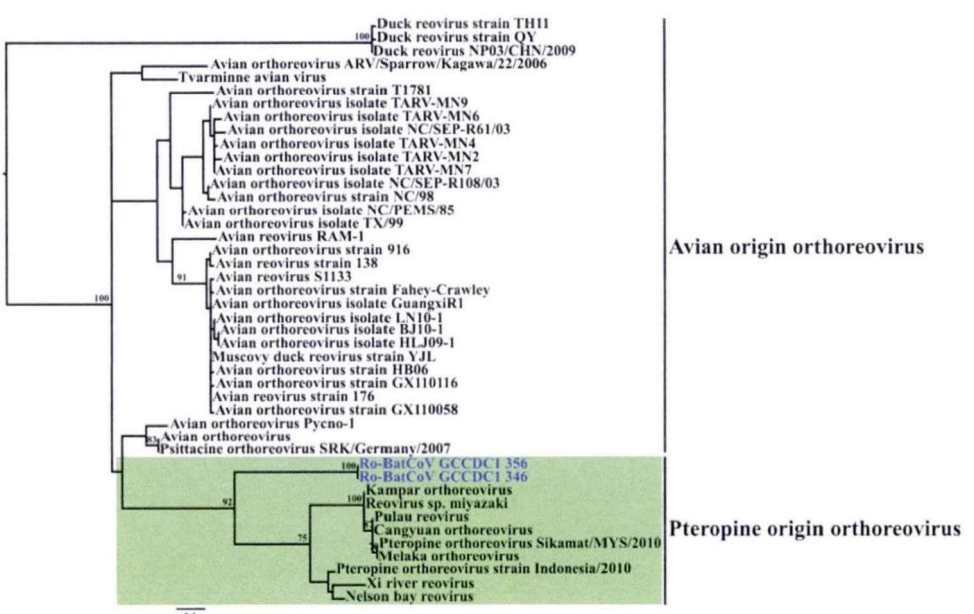


图 1.3 Ro-BatCoV GCCDC1 和呼肠孤来源的 p10 基因编码蛋白进化分析。进化树以最大似然法通过 PhyML 软件包进行构建，模型的选择基于 ProtTest 计算的结果（LG+G）。在树的每个节点上显示 Bootstrap 值。进化树构建中所使用的序列分别为：Duck reovirus strain 091: JX478256; Duck reovirus strain TH11: KC493571; Duck reovirus strain QY: KF689545; Avian reovirus strain 176: AF218358; Avian orthoreovirus strain HB06: EU526387; Avian orthoreovirus strain GX110116: KF741752; Avian orthoreovirus strain GX110058: KF741742; Avian reovirus strain S1133: AF330703; Muscovy duck reovirus strain YJL: DQ191363; Avian orthoreovirus

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

isolate GuangxiR1: KC183744; Avian orthoreovirus strain 916: AY436604; Avian reovirus strain 138: AF218359; Orthoreovirus: OTOSIGMA; Avian orthoreovirus strain NC/98: DQ995806; Avian orthoreovirus isolate NC/SEP-R108/03: DQ996606; Avian orthoreovirus isolate NC/SEP-R61/03: DQ996608; Avian orthoreovirus isolate TARV-MN2: KF872233; Avian orthoreovirus isolate TARV-MN4: KF872235; Avian orthoreovirus isolate TARV-MN7: KF872239; Avian orthoreovirus isolate TARV-MN6: KF872237; Avian orthoreovirus isolate TARV-MN3: KF872234; Avian orthoreovirus isolate NC/PEMS/85: DQ996607; Avian orthoreovirus isolate TX/99: DQ996610; Avian orthoreovirus strain T1781: KC865792; Avian orthoreovirus: AB914766; Psittacine orthoreovirus SRK/Germany/2007: EU252582; Avian orthoreovirus: HM222974; Tvarminne avian virus: KF692095; Reovirus sp. Miyazaki: AB521793; Pulau reovirus: AY357730; Cangyuan orthoreovirus strain Cangyuan: NC_025806; Pteropine orthoreovirus Sikamat/MYS/2010: JF811580; Melaka orthoreovirus: NC_020448; Kampar orthoreovirus: EU448334; Nelson bay reovirus: AF218360; Pteropine orthoreovirus strain Indonesia/2010: KM279386; Xi river reovirus: GU188274.

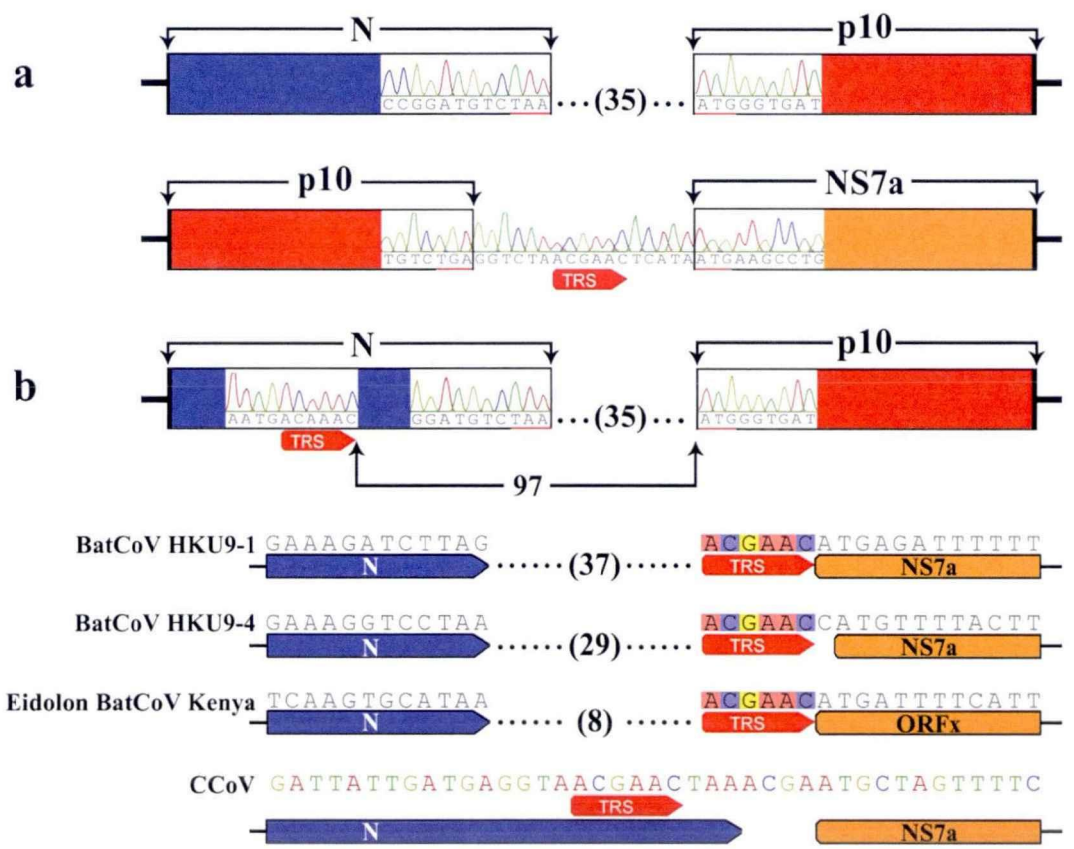
1.2.6 呼肠孤病毒 p10 基因重组到 Ro-BatCoV GCCDC1 基因组中的证据

如前所述，冠状病毒是无节段的、单股正链 RNA 病毒，而呼肠孤病毒是有节段双股 RNA 病毒[1]。正呼肠孤病毒相关基因插入到冠状病毒的基因组中，这一现象在自然界中非常罕见。任何关于是否存在 DNA 聚合酶错误扩增或 NGS 数据不精确拼接的怀疑都是合理和谨慎的。因此，我们进一步仔细审查了 NGS 原始数据，将那些在序列上游覆盖 N 基因和 p10 基因连接处，下游覆盖 p10 基因和 NS7a 基因连接处的所有读长（Reads）都提取出来，并 mapping 到全基因组中（**图 1.4**）。

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

图 1.4 p10 基因旁侧序列连续性与完整性。从 NGS 原始数据中，将所有与 p10 序列相关的 Reads 提取出来，然后 map 到全基因组中，可以清晰地看到在 p10 上有，有一系列 Reads 覆盖 N 基因和 p10 基因的连接处；同样，在 p10 基因的下游，可以看到一系列 Reads 覆盖 p10 基因和 NS7a 的连接处。说明 p10 基因是基因组中的插入基因。

同时，我们设计了两对特异性引物以确认 p10 基因上下游序列的完整性和连续性。琼脂糖凝胶电泳结果显示 PCR 产物是完整的片段，与预期的长度相符。扩展产物随后克隆到 pMD18-T 载体中，并对重组质粒进行测序。序列分析结果表明，这些测得的序列与 NGS 数据及之前确认试验中 sanger 测序的结果一致。如测序峰图中显示，测得的序列连续地从 N 基因延伸、基因间隔序列、整个 p10 基因、然后跨过基因间隔序列和 TRS，最后进入 NS7a 基因（**图 1.5 a**）。同时，如果**图 1.5 b** 中显示的，p10 的 TRS 位于 N 基因的编码序列中，核心序列为 5'-ACAAAC -3'，其中一个碱基与很多冠状病毒的 TRS 共有核心序列存在一个核苷酸的差异。p10 基因的 TRS 与起始密码子之间的间隔序列为 97 个氨基酸，比先导 TRS 和 ORF1ab 之间的间隔序列短，但是比其他所有基因之前的间隔序列要长。序列分析进一步表明 N 基因下游基因的 TRS 所在的位置存在一定的差异（**图 1.6**）。



(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

图 1.5 重组的 p10 基因及其 TRS 鉴定。a) **"外来"p10 基因的确认。**获得的序列涵盖了上游 N 基因和 p10 基因之间的连接点，下游 p10 基因和 NS7a 基因之间的连接点，直接以测序峰图显示。N 基因和 p10 基因之间的间隔序列长度以数字表示；基因间隔序列中，NS7a 基因的 TRS 以红色箭头标记。b) **p10 基因的 TRS 鉴定。**N 基因编码序列中 p10 基因的 TRS 序列直接以测序峰图标示。p10 基因起始密码子与 TRS 之间的距离以数字表示。N 基因及其下游基因之间的间隔序列，以数字表示。N 基因的下游基因的 TRS 以红色箭头标示。

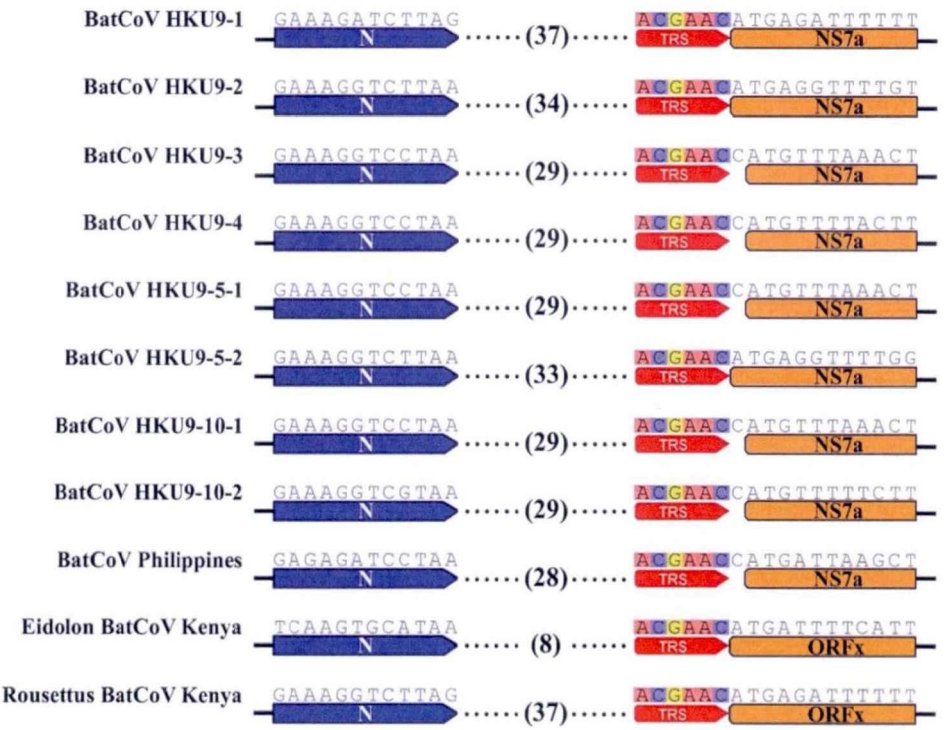
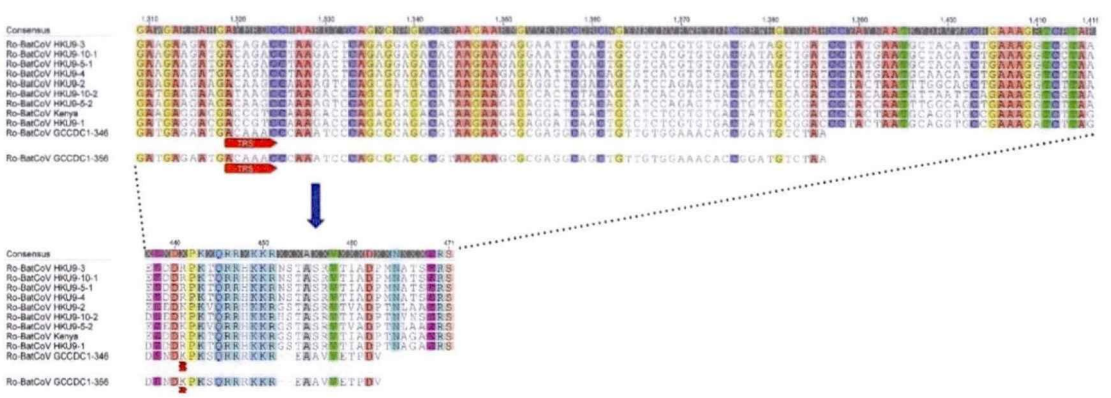


图 1.6 各病毒基因组中 N 基因下游基因间隔序列的长度及下游基因 TRS 的位置。N 表示为 nucleocapsid 基因，TRS 为转录调节序列（transcription regulatory sequence），N 和 TRS 之间的数字为间隔序列的长度。

值得注意的是，Ro-BatCoV GCCDC1 的 N 基因 3'末端是截短的（**图 1.7**）。"外来"p10 基因的插入破坏了 N 基因的开放阅读框，导致在 3'末端截短了 8 个氨基酸，同时在邻近区域缺失两个氨基酸。



(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

图 1.7 N 基因 C 末端核苷酸和氨基酸序列比对。结果可见 Ro-BatCoV GCCDC1 的 N 基因 3'末端是截短的。

1.2.7 Ro-BatCoV GCCDC1 亚基因组结构

在冠状病毒的复制周期中，有一个重要特点是形成巢式亚基因组 mRNAs。以前的研究证明亚基因组 mRNA 的合成通过模板转换和不连续延伸的机制来进行，而这一机制依赖于先导 TRS 和内部 TRS 之间、以及 TRS 旁侧序列之间的一定程度的同源性[7]。本研究中，我们已经将 Ro-BatCoV GCCDC1 的先导 TRS 和内部 TRS 在基因组中的位置标示出来（**图 1.8 a**）。

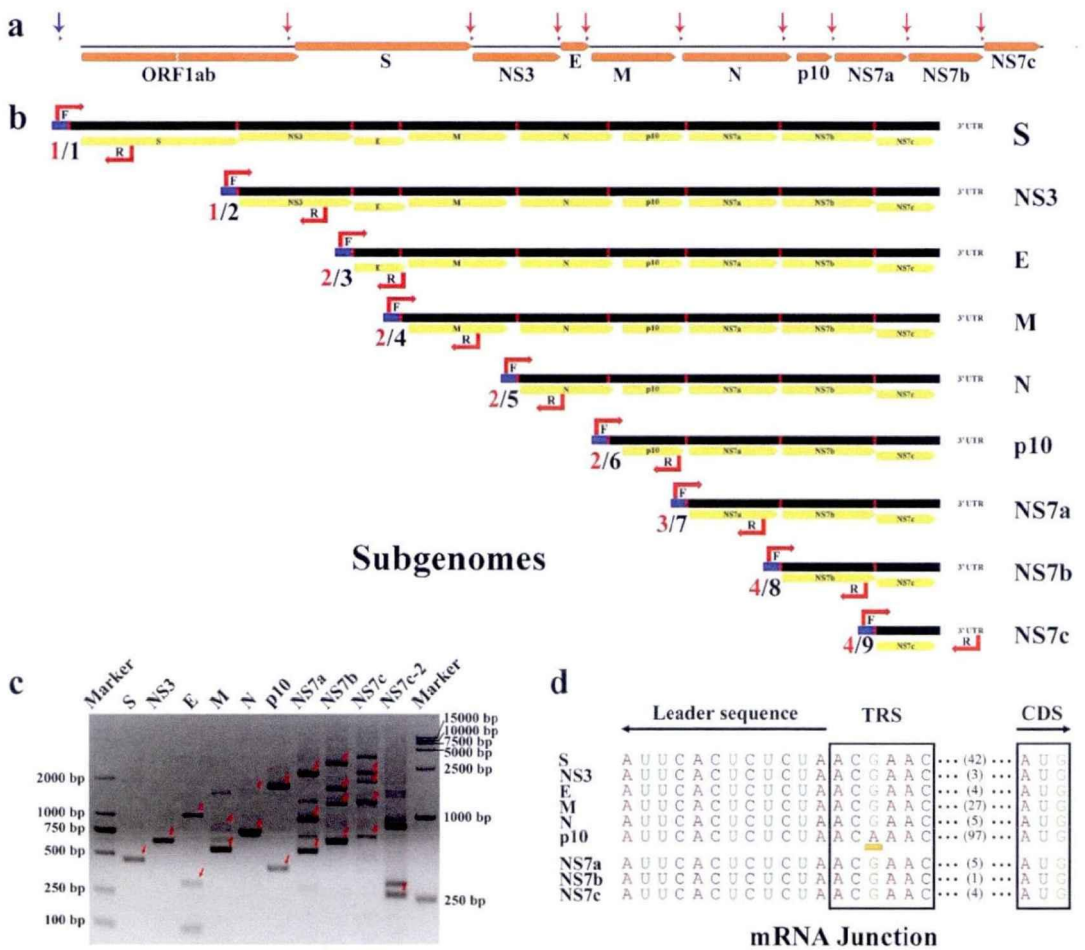


图 1.8 Ro-BatCoV GCCDC1 亚基因组结构。a) Ro-BatCoV GCCDC1 基因组图示。基因组以黑色线条表示。ORFs、5'-UTR 和 3'-UTR 分别以黄色和灰白色箭头表示。 Leader TRS 和各基因 TRS 以红色小三角标示。Leader TRS 和各基因 TRS 在基因组中的位置分别以蓝色和红色箭头标示。b) 可能的转录的亚基因组 mRNA 结构。亚基因组以黑色长方形表示，前导序列以蓝色方盒表示。正向和反向引物的位置分别以 F 和 R 标示。在每个亚基因组 mRNA 前有两个数字。斜线右侧的黑色数字表示用这对引物理论上能扩增得到的片段数，而斜线左侧的红色数字表示在这个试验中实际得到的片段数，对应于琼脂糖凝胶上每个泳道上的红色箭头标示的条带数。c) 亚基因组 mRNA PCR 产物琼脂糖凝胶电泳。每条泳道中最下面一条以

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

红色箭头标示的条带为每个亚基因组 mRNA 特异扩增的条带。其他标示出来的条带为图 5.3b 中这条亚基因组 mRNA 之上的亚基因组 mRNA 扩增产物。d) 检测得到的亚基因组 mRNA 中 mRNA 的连接处信息。TRSs 和融合位点以黑色方框突出标示。p10 基因 TRS 与其他 TRS 之间的偏差以黄色方块突出。图中对前导序列和 CDS 分别进行了标示。基因间隔序列直接以数值表示。

自然界中，动物宿主的呼吸道或消化道内容物中可能存在大量所谓的"过路病毒（passenger virus）"或"旁观者病毒（bystander virus）"。在这些样本中，尤其是在胃肠道样本中发现某些病毒的核酸片段，并不代表样本采集的动物是这些病毒的储存宿主（reservoir）。相反，这些片段很可能来自于动物摄入但是没有消化完全的食物。从目前的知识看，尚未有直接证据表明冠状病毒能否作为过路病毒或旁观者病毒而存在。然而，从相反的角度来看，如果能从样本中检测到亚基因组 mRNA，很显然这将是冠状病毒在宿主中复制的强有力证据。因此，我们根据 TRS 和 Ro-BatCoV GCCDC1 的转录机制，描绘了 Ro-BatCoV GCCDC1 的 9 个亚基因组，包括 S、NS3、 E、M、N、p10、NS7a、NS7b 和 NS7c，每个亚基因组 5'端包含一个共有的先导序列（**图 1.8 b**）。同时，设计了一套引物以探究肛拭子样本中这些亚基因组 mRNA 可能存在的情况。上游引物设计在共有先导序列上，而下游引物设计在各自的基因上或位于基因的下游（**图 1.8 b**）。将扩增得到的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳，如图所示，最下面以红色箭头标记的条带为特异性针对每个亚基因组 mRNA，并且与期望长度相符。而其他额外扩增的条带同样与理论上相兼容。如同 E 基因泳道中显示的一样，上面的条带表示 NS3 亚基因组在这个 PCR 反应中同时被扩增了出来。S 亚基因组的扩增情形有些复杂。因为整个 ORF1ab 片段太长（21449 bp），受这个试验中使用的 DNA 聚合酶扩增效率的限制，使用针对先导序列和 S 基因的引物，ORF1ab 亚基因组的扩增不可能成功。每个泳道上最下面的条带经克隆后测序，而其他条带纯化之后直接测序。由于 NS7c 亚基因组的特异性扩增产物没有成功克隆到载体中，因此第一轮 PCR 产物作为巢式 PCR 第二轮反应的模板重新扩增，PCR 产物如同图中所示，确认后克隆到载体中并进行测序（**图 1.8 c**）。测序结果表明样本中的 L-TRS 和 B-TRS 的共有核心序列、先导序列和内部融合位点（fusion site），以及亚基因组 mRNA 的合成模式，与理论预测及**图 1.8 b** 中所演示的完全相符，尤其是 p10 基因的 B-TRS 及其亚基因组（**图 1.8 d 和图 1.9**）。因此，样本中 p10 亚基因组的存在证明 p10 基因是 Ro-BatCoV GCCDC1 基因组中的一个完整基因。

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

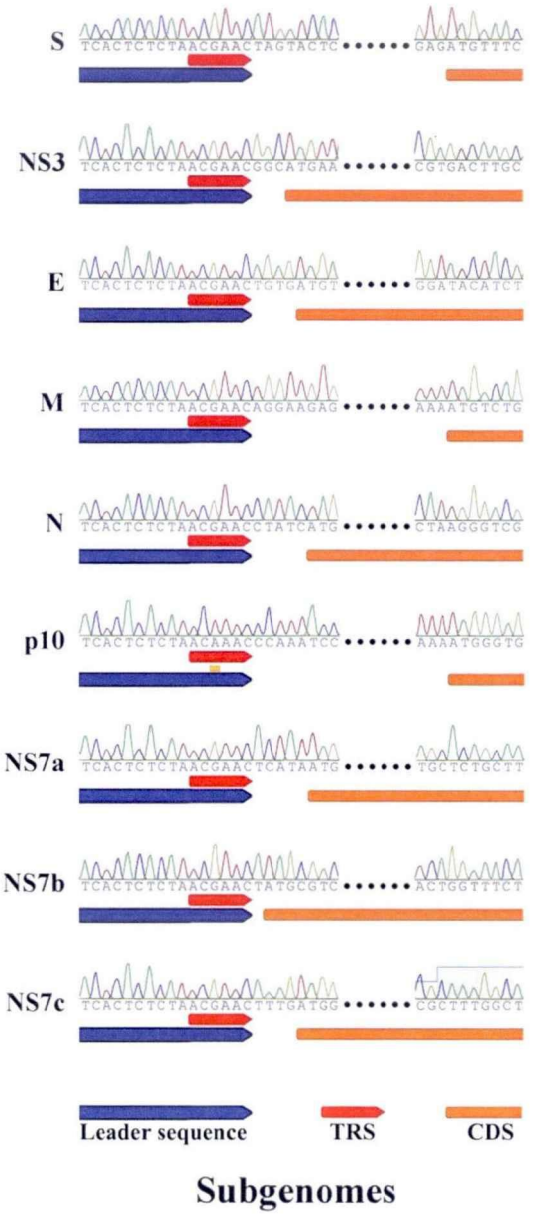


图 1.9 亚基因组测序图。从图中可以看出各亚基因中的 fusion site 和 TRS 序列及位置。图中黑色圆点表示省略的序列。

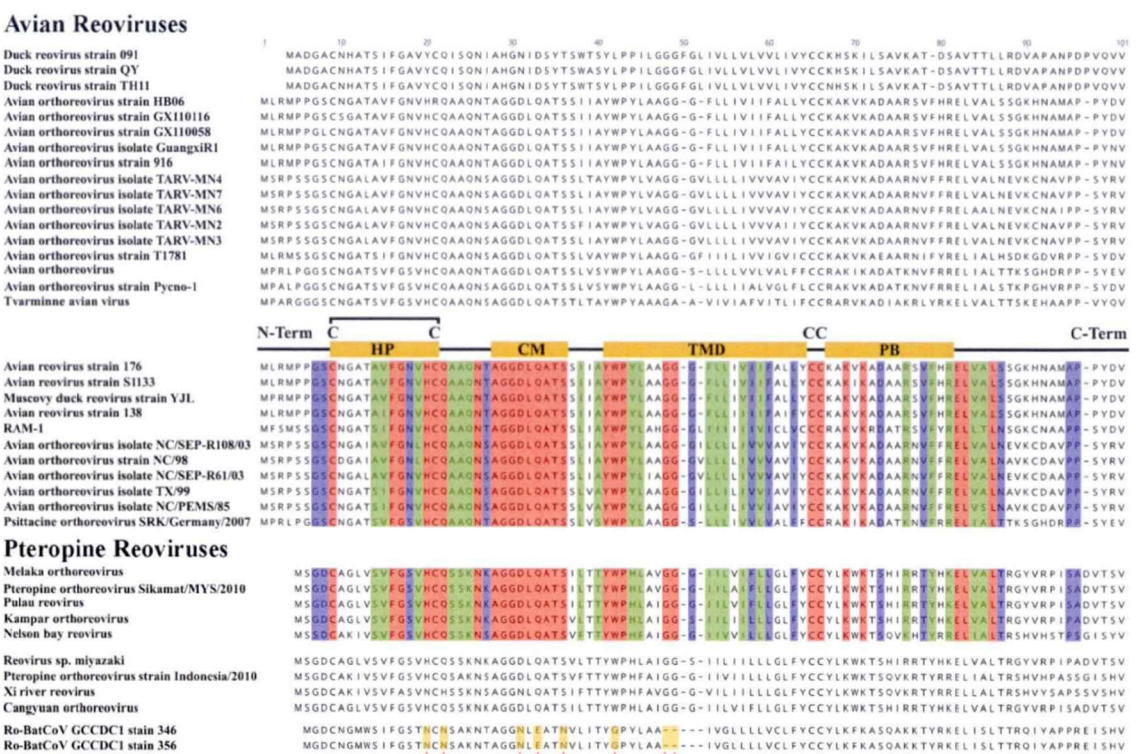
1.2.8 p10 基因是一个功能基因

如同上面提到的一样，正呼肠孤病毒是分节段的双股 RNA 病毒，基因组中包含 10 个独立的片段。根据病毒感染时细胞能否形成合胞体，正呼肠孤病毒可以分为膜融合正呼肠孤病毒和非膜融合正呼肠孤病毒[51]。禽类和蝙蝠来源的正呼肠孤病毒，broome 呼肠孤病毒（broome reovirus，BroV）、爬行动物呼肠孤病毒（reptilian reovirus，RRV）、树蝰呼肠孤病毒（bush viper reovirus）和狒狒呼肠孤病毒（baboon orthoreovirus，BRV）属于膜融合正呼肠孤病毒，而哺乳动物呼

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

肠孤病毒，包括新近发现的食虫蝠哺乳动物呼肠孤病毒，猪呼肠孤病毒等属于非膜融合正呼肠孤病毒。在禽类和蝙蝠来源的正呼肠孤病毒中，合胞体的形成依赖于 S1 片段第一个 ORF 编码的蛋白，称为 p10。

以前的研究证明，来源于禽类和蝙蝠正呼肠孤病毒的 p10 蛋白中的氨基酸残基可分为绝对保守、高度保守、中度保守和不保守氨基酸[52]。前面的序列分析表明 Ro-BatCoV GCCDC1 的 p10 基因是一个正呼肠孤病毒相关基因。然而，蛋白序列比对显示，与禽类和蝙蝠来源的正呼肠孤病毒的 p10 蛋白比较，Ro-BatCoV GCCDC1 的 p10 蛋白中，即使重要氨基酸和基序的主要部分仍然保留，在 28 个所谓的绝对保守的氨基酸中，有 8 个氨基酸存在差异（包括 2 个氨基酸的缺失）。其他次要的氨基酸未予考虑（**图 1.10**）。鉴于此，有必要研究 Ro-BatCoV GCCDC1 的 p10 基因是否与禽类和蝙蝠正呼肠孤病毒的同源基因一样发挥相同的作用。将 Ro-BatCoV GCCDC1 的 p10 基因克隆到 pCAGGS 载体（**图 1.11 a**）并将重组质粒转染到 BHK-21 细胞后，Wright-Giemsa 和免疫荧光染色可以观察到细胞合胞体形成[53]（**图 1.11 b**）。因此，结果表明保守氨基酸的改变不影响 Ro-BatCoV GCCDC1 的 p10 基因合胞体形成能力（**图 1.11 b**）。同时，试验结果表明 p10 基因中绝对保守氨基酸的保守性并不绝对。



(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

图 1.10 不同宿主病毒来源的 p10 蛋白氨基酸序列比对。胞外结构域（ectodomain）中的基序：HP：疏水块（hydrophobic patch）；CM：保守基序（conserved motif）；胞内结构域（endodomain）：PB：多聚碱性氨基酸（polybasic）；中间的跨膜结构域（transmembrane domain）分别以黄色方块标示。4 个保守的半胱氨酸残基都已标示出来。胞外结构域中的两个半胱氨酸形成分子内二硫键。Ro-BatCoV GCCDC1 病毒 p10 蛋白中与呼肠孤病毒 p10 蛋白中绝对保守氨基酸不同的氨基酸，以红色星号标示。

不同来源的基因组，包括人类、动物、细菌和病毒，整合有某些假基因或沉默基因[54]。换而言之，这些基因在生命周期中可能不被转录或翻译。前面的试验结果证明 p10 基因在 Ro-BatCoV GCCDC1 的复制周期中，能从基因组中转录，检测到的 p10 亚基因组是明显的信号。然而，由于病毒分离暂时不成功，目前尚无有效措施去判断 p10 基因能否表达。因此，我们人工构建了一个质粒，重组质粒转染细胞后转录出的 mRNA 与 Ro-BatCoV GCCDC1 感染的宿主细胞中的 p10 亚基因组 mRNA 一致（**图 1.11 c**）。当将质粒转染到 BHK-21 细胞中后，使用 Wright-Giemsa 和免疫荧光染色，再一次观察到合胞体形成（**图 1.11 d**）。因此，间接证据表明 p10 基因是 Ro-BatCoV GCCDC1 复制周期中的功能基因。

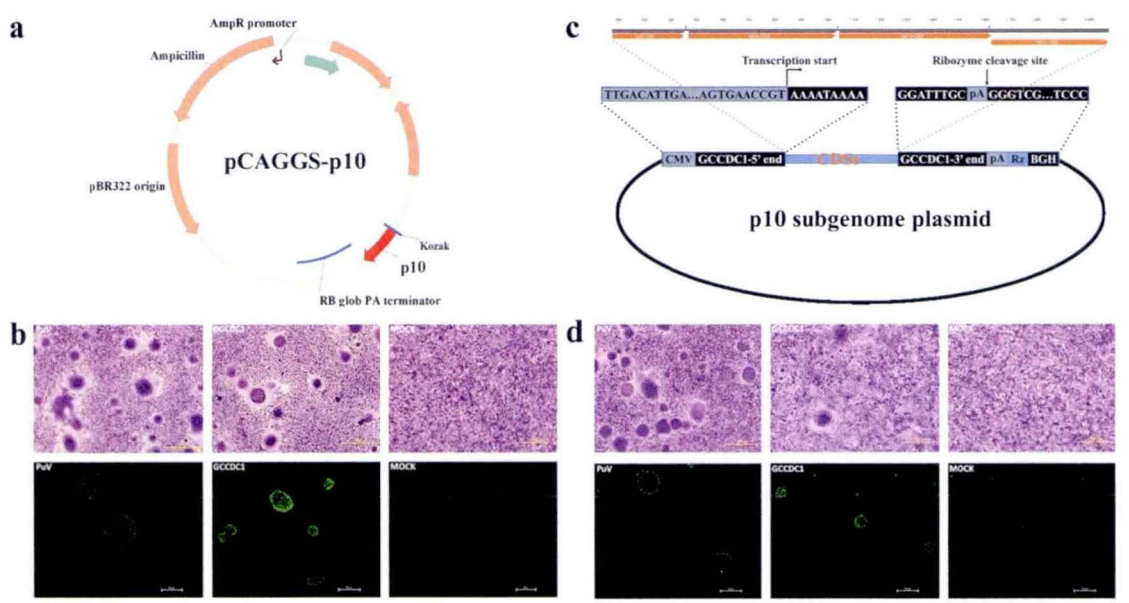


图 1.11 Ro-BatCoV GCCDC1 p10 基因合胞体形成和功能分析。a) 以 pCAGGS 载体为基础的 p10 基因瞬时表达质粒的构建。b) p10 瞬时表达和合胞体形成。上：BHK-21 细胞中转染了 Pulau 病毒 p10 基因重组质粒、Ro-BatCoV GCCDC1 p10 基因重组质粒和空 pCAGGS 载体后，以 Wright-Giemsa 染色观察合胞体的形成；下：BHK-21 细胞以上述同样的方法转染了质粒后，间接免疫荧光观察合胞体的形成。c) p10 基因亚基因组构建。推测的 p10 亚基因组构建到 pcDNA3.0 衍生载体中，重组质粒转染到细胞中后，能够转录出 p10 亚基因组 mRNA。d) 重组 p10 亚基因组质粒转染、p10 基因表达和合胞体形成。上：BHK-21 细胞中转染了 Pulau 病毒 p10 基因重组质粒、Ro-BatCoV GCCDC1 p10 亚基因组重组质粒和空 pcDNA3.0 载体后，

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

以 Wright-Giemsa 染色观察合胞体的形成；下：BHK-21 细胞以上述同样的方法转染了质粒后，间接免疫荧光观察合胞体的形成。（Wright-Giemsa 染色：染色的单层细胞以 Olympus IX51FL+DP70 显微镜观察和进行图片拍摄，放大倍数为 100×，比例尺为 200 μm；间接免疫荧光染色：染色的单层细胞以 Nikon DIAPHOT-TMD 显微镜观察和进行图片拍摄，放大倍数为 200×，比例尺为 50 μm）。

同时，值得注意的是，以 Ro-BatCoV GCCDC1 p10 蛋白的抗体对转染了 Pulauvirus p10 基因的 BHK-21 细胞进行染色，能观察到形成的合胞体，结果表明针对 Ro-BatCoV GCCDC1 p10 蛋白的抗体与 Pulau virus p10 蛋白有交叉反应。序列分析和抗原性预测结果表明，两种来源的 p10 蛋白存在相似的抗原表位（**图 1.12**）。因此，抗体染色和合胞体形成进一步证明 Ro-BatCoV GCCDC1 的 p10 基因来源于一株古老的正呼肠孤病毒。

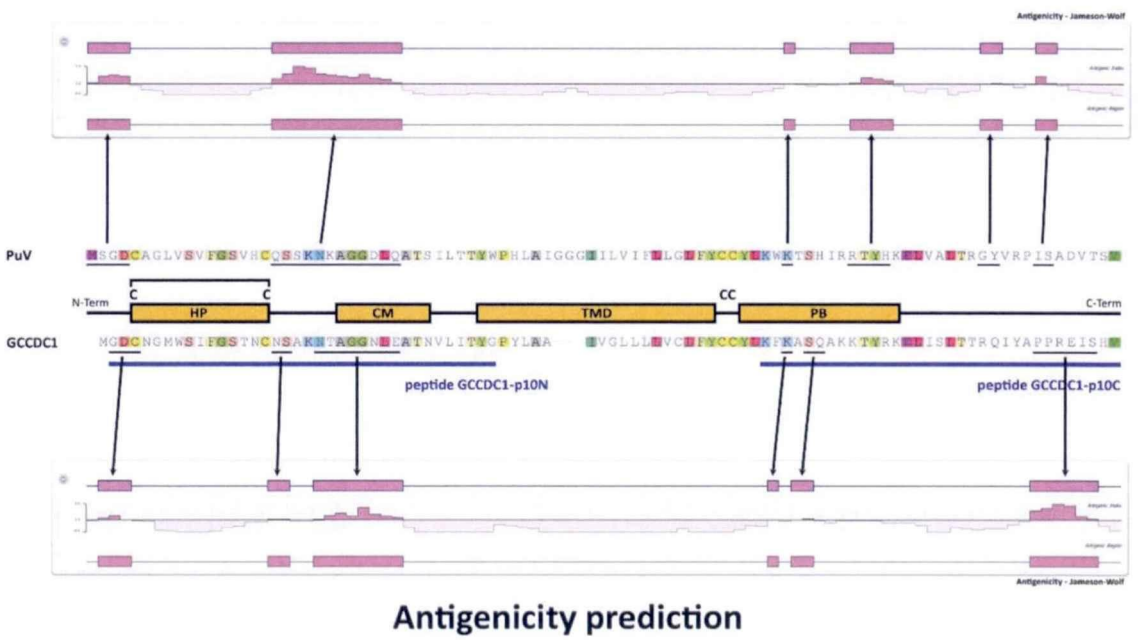


图 1.12 Ro-BatCoV GCCDC1 与 Pulau virus p10 基因序列比对及抗原性分析。胞外结构域（ectodomain）中的基序：HP：疏水块（hydrophobic patch）；CM：保守基序（conserved motif）；胞内结构域（endodomain）：PB：多聚碱性氨基酸（polybasic）；中间的跨膜结构域（transmembrane domain）分别以黄色方块标示。4 个保守的半胱氨酸残基都已标示出来。胞外结构域中的两个半胱氨酸形成分子内二硫键。各箭头指向的暗红色方块为 p10 蛋白中可能的抗原表位。

由于 Ro-BatCoV GCCDC1 的 p10 蛋白是在有囊膜病毒中的第一次报道，我们对 Ro-BatCoV GCCDC1 病毒 p10 蛋白中的保守氨基酸进行了突变，以确定这些氨基酸是否如同以前的报道中呼肠孤病毒 p10 蛋白中的相应氨基酸一样在细胞与细胞融合及合胞体形成中发挥重要作用[44, 45]。值得注意的是，所有这些 p10

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

蛋白的突变体，在 BHK-21 细胞中均不能形成合胞体（**图 1.13**），这一结果与以前正呼肠孤病毒 p10 蛋白突变体试验中观察到的现象相一致。结果表明，Ro-BatCoV GCCDC1 病毒的p10蛋白在功能上与FAST蛋白一样依赖于传统上保守的结构域[44, 45]。

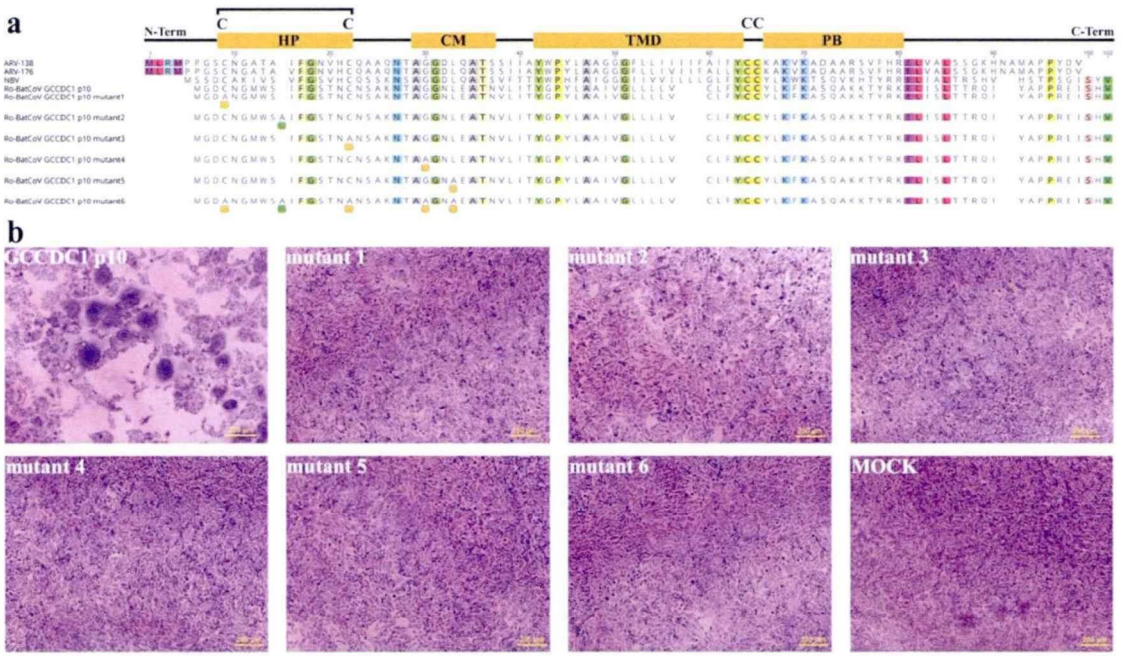


图 1.13 Ro-BatCoV GCCDC1 病毒 p10 蛋白的膜融合功能依赖于传统的保守氨基酸。a）p10 蛋白组成及突变体。替换和插入的氨基酸分别以黄色和绿色方块标示。胞外结构域（ectodomain）中的基序：HP：疏水块（hydrophobic patch）；CM：保守基序（conserved motif）；胞内结构域（endodomain）：PB：多聚碱性氨基酸（polybasic）；中间的跨膜结构域（transmembrane domain）分别以黄色方块标示。4 个保守的半胱氨酸残基都已标示出来。胞外结构域中的两个半胱氨酸形成分子内二硫键。b）瞬时表达及和合胞体形成。BHK-21 单层细胞分别以重组的野生型 p10 基因、6 个不同的突变体和 pCAGGS 空载体转染。（Wright-Giemsa 染色：染色的单层细胞以 Olympus IX51FL+DP70 显微镜观察和进行图片拍摄，放大倍数为 100×，比例尺为 200 μm）

1.3 讨论

以前发现的冠状病毒只引起人类温和的呼吸道疾病，因此在公共卫生中通常受到忽视。2002 年 SARS-CoV[15-18]和 2012 年 MERS-CoV[23-25]的爆发，引起研究人员对冠状病毒生物多样性、自然宿主和潜在致病性的研究的极大兴趣。因此，越来越多的冠状病毒从人类和各种各样的动物中鉴定或分离出来，尤其是在蝙蝠群体中。本研究中，我们从棕果蝠中鉴定到一株冠状病毒，这株病毒属于 Beta 冠状病毒 D 群成员，基因组组成和结构上与 Ro-BatCoV HKU9 相似。根据国际

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

病毒分类委员会的标准[1]，Ro-BatCoV GCCDC1 很明显是一种新型冠状病毒。系统进化分析进一步证明 Ro-BatCoV GCCDC1 有别于 Ro-BatCoV HKU9 和其他相关的冠状病毒。然而，Ro-BatCoV GCCDC1 最突出的特点是在基因组的 3'末端编码一个 p10 蛋白，这个 p10 蛋白从各个方面来看是从正呼肠孤病毒获得的一个功能。

重组是冠状病毒进化和多样性的一个重要策略。在冠状病毒 RNA 复制中，同源重组事件频繁发生[55, 56]。然而，目前记录在案的异源重组方面值得注意的实例，仅存在于带有 HE 基因的 Beta 冠状病毒 A 群成员中[54, 57]。HE 基因序列和进化分析表明，这些冠状病毒可能是一个古老的冠状病毒与 C 型流感病毒在混合感染时 RNA 重组的结果（C 型流感是一种基因组分节段的负链 RNA 病毒）。另有观点认为冠状病毒的 HE 基因可能是从宿主 RNA 中捕捉到的[58]。已经报道的其他罕见的跨科之间的重组，包括鸡传染性贫血病毒（chicken infectious anemia virus，CIAV）[59]，袋狸乳头瘤癌病病毒 1 型（bandicoot papillomatosis carcinomatosis virus type 1，BPCV1）[60]，以及马立克氏病病毒（Marek's disease virus，MDV）和禽痘病毒（fowlpox virus，FPV）与各种禽反转录病毒之间的重组病毒。本研究中，序列、系统进化和功能分析证明 Ro-BatCoV GCCDC1 的 p10 基因来源于一个古老的正呼肠孤病毒。Ro-BatCoV GCCDC1 和正呼肠孤病毒的 p10 基因之间的分歧，可能是随着各自的病毒独立进化轨迹的结果。鉴于此，我们的研究是第一次观察到单股正链 RNA 病毒和双股分节段的 RNA 病毒之间的跨科重组。但是目前，尚未有关于重组发生的直接的明确证据，因此从现有的重组机制上还很难进行解释。

膜融合和非膜融合正呼肠孤病毒之间最显著的区别，在于是否存在基因组的 S1 片段编码的小蛋白，这个蛋白称为膜相关小跨膜蛋白（fusion-association small transmembrane protein, FAST）。如同以前的综述文章中所描述的，FAST 蛋白是唯一已知的非囊膜呼肠孤病毒融合蛋白，能够介导细胞-细胞（而不是病毒-细胞之间的膜融合），并诱导合胞体形成[51]。值得注意的是，合胞体形成能够提高病毒在细胞之间的扩散[61]。因此，FAST 蛋白是膜融合正呼肠孤病毒的毒力因子。目前，整个 FAST 家族有 6 个成员，包括禽类和蝙蝠来源的正呼肠孤病毒编码的 p10 蛋白，布鲁姆病毒（broome virus）、爬行动物呼肠孤病毒（reptilian reovirus）

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

和树蝰呼肠孤病毒（bush viper reovirus）、狒狒正呼肠孤病毒（baboon orthoreovirus）分别编码的 p13、p14 和 p15 蛋白，以及水生呼肠孤病毒（aquareoviruses）编码的 p16 和 p22 蛋白。有趣的是，本研究中，我们从新鉴定到的有囊膜的冠状病毒 Ro-BatCoV GCCDC1 基因组中发现了一个特别的 p10 基因。据我们所知，这是第一次发现有囊膜病毒编码 FAST 蛋白，可以暂时将之定义为 FAST 家族中的第七个成员。

通常，重组病毒会从病毒居群（population）中丢失，除非获得的遗传性状能提高病毒的复制能力或在某些微环境中的适应性[58]。与非膜融合正呼肠孤病毒比较（如哺乳动物正呼肠孤病毒），以前报道膜融合正呼肠孤病毒感染人时，能够引起严重肺炎[62-64]，进一步暗示 p10 是一个重要的致病因子。遗憾的是，本研究中从细胞培养上未能成功分离 Ro-BatCoV GCCDC1 病毒。因此，很难确定 p10 基因在 Ro-BatCoV GCCDC1 生活周期中的作用。但是，细胞水平上的功能分析表明，冠状病毒 p10 基因与那些正呼肠孤病毒一样，可以在转染的细胞中诱导合胞体形成，因此可能对病毒在细胞与细胞之间的扩散有利。故此，我们能够假设 p10 蛋白能够提高 Ro-BatCoV GCCDC1 的传播潜力。然而，毒力是一个双刃剑。如果一个毒力过强的病原将其所侵染的宿主全部杀死，对病毒居群本身的存续反而是不利的。Ro-BatCoV GCCDC1 通过获得 p10 基因的增强了自身的毒力，因此可以推测 Ro-BatCoV GCCDC1 中具有一个必不可少的有效的措施以降低病毒的复制能力，这从复制酶聚蛋白（冠状病毒的一个多功能蛋白）的自身蛋白酶剪切上可以得到一些提示。在 Ro-BatCoV GCCDC1 ORF1ab 编码的复制酶蛋白序列中，NSP9/NSP10 和 NSP10/NSP12 两个 3CLpro 剪切位点的 P1 位置，从常规的 Q 突变成了 H，不可避免地损害了蛋白裂解效率和 NSP9、NSP10 及 NSP12 的释放。由于 NSP12 是一种典型的 RNA 聚合酶和复制转录复合物（RTC）的核心，而 NSP10 通常起到分子开关的作用，与其他多种 NSP 蛋白相互作用形成复合物，因此通过降低这些关键原件的剪切和释放，Ro-BatCoV GCCDC1 的复制能力可能会受到抑制。当然，因为从样本中未能分离到病毒，目前还没有直接的证据。但是，有趣的是，在 HCoV HKU1 和 HCoV NL63 的复制酶聚蛋白中的，NSP13/NSP14 剪切位点上可以观察到相似的情形。为了证实上述假设，下一步研究的重点应当放在病毒分离、感染性克隆的构建、p10 基因的敲除和/或剪切位

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

点回复突变后对 Ro-BatCoV GCCDC1 的毒力和致病性的影响上。

系统进化上不同的病毒种类或毒株，可以在某些蝙蝠群体中共同流行（co-circulating）[65-68]。当不同的病毒在单一宿主的同一组织或细胞中感染时，共感染（co-infection）使得病毒重组（recombination）成为可能。在这项研究中，虽然 Ro-BatCoV GCCDC1 病毒分离失败，但是我们从 5 份直肠样本（样本号为 54、322、356、375 和 400）中成功地分离到一株正呼肠孤病毒变异株。之前的试验中，已经确认所有这些样本为 Ro-BatCoV GCCDC1 阳性，并且已经对 Ro-BatCoV GCCDC1 冠状病毒特异性的 p10 基因进行鉴定和测序。对这些样本中的正呼肠孤病毒 p10 基因，随之进行了扩增以直接测序。序列分析表明，这两种病毒虽然在同一个宿主中共感染，但是它们各自携带的 p10 基因存在差异，进一步暗示 p10 基因是随着各自的病毒在独立的轨迹上进化。此外，以前有研究报道表明 2003 年 SARS 爆发时，从同一个病人中分离到哺乳动物正呼肠孤病毒（非膜融合正呼肠孤病毒）[69]。冠状病毒和呼肠孤病毒共感染现象，Ro-BatCoV GCCDC1 重组病毒的发现，引起了对远古（?）重组事件发生的兴趣。将来的研究应当放在共感染试验上，在某些蝙蝠细胞系上使用一株与 Ro-BatCoV GCCDC1 或 Ro-BatCoV HKU9 类似的冠状病毒及本研究中分离到的正呼肠孤病毒进行重组试验。重组事件的重现将为揭示冠状病毒异源重组的微妙机制提供机会。

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

第二章 蝙蝠冠状病毒 HKU9 spike 蛋白推测的受体结合结构域：Beta 冠状病毒受体结合基序的进化

冠状病毒是一种大的有囊膜的正链 RNA 病毒，在自然界中广泛存在，能够引起鸟类、动物和人类感染[1]。分类学上，这些病毒隶属于尼多病毒目冠状病毒科[1, 2]。自 20 世纪 30 年代从鸡体内分离到第一种冠状病毒——传染性支气管炎病毒[70]，目前可以将冠状病毒已经分为 4 个属，即 Alpha、Beta、Gamma[2]和 Delta 冠状病毒属[4, 5]。在这些冠状病毒中，Beta 冠状病毒由于其致病能力和跨物种传播的潜力尤为突出，多次造成全球范围内人类感染的大流行[19, 71]，并且在许多种类的蝙蝠中广泛存在和传播[5, 26, 72, 73]，因此医学和公共卫生界对这类病毒极其关注。2002～2003 年，一种代表性的 Beta 冠状病毒——SARS 冠状病毒，首先在中国出现并迅速向其他国家蔓延[15-18]，至少造成 8000 人感染和 800 人死亡[19]。2012 年，另一种 Beta 冠状病毒——MERS 冠状病毒[23]首先在沙特阿拉伯出现[24, 25]。尽管全球范围内努力控制 MERS 冠状病毒的传播，该病毒仍然在中东、欧洲、北美和亚洲等多个国家扩散。目前至少造成 941 例感染和 347 例死亡[71]。同时，2006 年香港大学袁国勇及其同事在一个呼吸道疾病的病人中鉴定出一种能够引起人类感染的冠状病毒：HCoV HKU1[74]。这些意想不到的因 Beta 冠状病毒所引起的疫情暴发给全球公共卫生带来严重威胁，并导致巨大的社会经济学破坏。

系统进化上，Beta 冠状病毒可进一步划分为 A、B、C 和 D 共 4 个群[1, 2]。SARS 冠状病毒是一种典型的 B 群成员，而 MERS 冠状病毒归属于 C 群[75]。尽管隶属于不同的群，这两种冠状病毒可能具有相似的跨物种传播路线：从各自的自然宿主跳跃到一个适应性的中间宿主，最后感染人类。目前的证据很清楚地表明 SARS 冠状病毒来源于蝙蝠[22, 72, 76]，经在果子狸中适应后[77]，因与人类密切接触而感染人类。同样，有证据表明导致 MERS 流行的中间宿主是骆驼[35, 78]，但是鉴于 MERS 冠状病毒与其他许多蝙蝠来源的冠状病毒（如 BatCoV HKU4、HKU5[26, 27]和那些在中东、非洲、欧洲及亚洲分离鉴定到的病毒[28-33]）在进化上关系非常密切，普遍认为当前 MERS 的流行是 Beta 冠状病毒中另一个从蝙蝠到人类的跨物种传播事件。值得注意的是，最近两个独立的研究报道，BatCoV

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

HKU4 能够识别 MERS 冠状病毒的受体 CD26[36]以作为其侵入细胞的功能性受体[37, 38]，表明 BatCoV HKU4 具备感染人类的潜在适应性。Beta 冠状病毒中持续发生这些不可预知的跨越种间屏障的事件，促使我们将重点集中在针对这个属的其他成员的研究上，以揭示这类病毒与跨物种传播相关的特点。

冠状病毒的 Spike（S）蛋白，位于病毒粒子的囊膜表面，功能上介导受体识别和膜融合[1]，因此是决定病毒特定物种趋向性的关键因素。在大多数情况下，冠状病毒的 S 蛋白能够被剪切成 S1 和 S2 亚单位，具有受体结合能力的部分位于 S1 亚单位中[1]。Beta 冠状病毒直接参与受体识别的受体结合结构域通常位于 S1 蛋白的 C 末端，如 SARS 冠状病毒[79]、MERS 冠状病毒[80, 81]和 BatCoV HKU4 等[37]。在某些罕见情况下，如鼠肝炎病毒 MHV 的 RBD 经鉴定位于 S1 的 N 端部分[82]。我们以前的研究证明 MERS 冠状病毒的 RBD 结构具有一定的特点，是一个由核心和外部亚结构域组成的相对独立的实体[80]。从拓扑结构上看，外部亚结构域是在核心亚结构域的两个折叠所形成的支架中插入的一个结构域，表现为一个扁平的 4 股折叠形成的 β 片层与 CD26 受体相互接触[80]。在 SARS 冠状病毒 RBD 中，核心和外部亚结构域具有类似的拓扑排列，形成结构上的功能单位以识别受体[79]。然而，SARS 冠状病毒 RBD 在外部亚结构域上相对比较独特，是一个以回环为主的表面折叠以识别人类 ACE2 分子作为其功能受体[83]。这些现象表明，Beta 冠状病毒的这个同源 RBD 区域是该群病毒成员在受体适应和跨物种传播中的决定因素。

蝙蝠冠状病毒 HKU9（BatCoV HKU9）是一种典型的 D 群 Beta 冠状病毒[73]，该病毒于 2007 首次在蝙蝠中发现[73]。虽然目前该病毒尚未分离成功，但是在很多种类的蝙蝠中都能检测到 BatCoV HKU9 的基因组[68, 84-86]。虽然研究人员对其跨物种传播的可能性存在一定的担忧，但是 BatCoV HKU9 的 S 蛋白尤其是同源 RBD 区域的特点仍然未知，而这将是理解蝙蝠冠状病毒 HKU9 致病性的必不可少的步骤。此外，HKU9-RBD 的原子结构也应该是整个 Beta 冠状病毒属进化拼图中的一个有机部分。值得注意的是，MERS 和 SARS 冠状病毒 RBD 具有共同的保守核心结构，但是表面折叠不一样以识别不同的受体[79, 80]。Beta 冠状病毒的序列特点表明亚结构域的这种排布方式可能存在于整个 Beta 冠状病毒属中，而与病毒种类无关。在针对 BatCoV HKU4 的研究中，我们得到的数据进一步支

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

持这一概念，BatCoV HKU4 的 RBD 结构与 MERS RBD 的结构相当一致[37]。在当前这项研究中，我们报告了 HKU9-RBD 的结构和功能特点。与预期的一样，解析的结构中包含一个核心亚结构域，这个结构域与其他已经解析的 Beta 冠状病毒 RBD 结构中的一样。同时还存在一个外部亚结构域，而这个外部结构域主要由一个 alpha 螺旋组成。这个独特的结构特点充分解释了在表面等离子体共振试验中 BatCoV HKU9 的 RBD 不与人的 CD26 和 ACE2 结合的原因之所在。通过比较目前能够得到的所有 RBD 结构，我们进一步揭示外部亚结构域锚定到核心亚结构域中的相互作用的详细模式，而这种相互作用在所有 Beta 冠状病毒 RBD 中具有相似的模式。我们相信，在 Beta 冠状病毒进化中所保留下来的，除了核心亚结构域折叠上的保守性，核心/外部亚结构域之间的相互作用模式则代表了 S 蛋白中另一种结构特点。因此，我们的研究进一步支持这一概念：Beta 冠状病毒 S 蛋白起源于共同的祖先，而 RBD 外部结构域上的进化呈现分歧以适应不同的受体，因此为潜在的跨物种传播作好准备。

2.1 材料和方法

2.1.1 实验材料

2.1.1.1 细胞系、菌株及载体

pFastBac™1 质粒、MAX Efficiency® DH10BAC™ Competent *E. coli* 感受态细胞、昆虫细胞系 Sf9、Sf21 细胞和 High 5 细胞均购自 Invitrogen 公司。

2.1.1.2 本文中所用到的主要生化试剂及耗材

表 2.1 主要生化试剂及耗材列表

试剂名称	公司	用途
PfuDNA 聚合酶及 buffer、TaqDNA 聚合酶及 buffer、dNTP	TaKaRa	PCR 扩增
DNA 产物纯化回收试剂盒	TIANGEN	DNA 产物回收
限制性内切酶	TaKaRa	酶切
T4 DNA ligase	TaKaRa	DNA 连接
胰蛋白胨、酵母提取物	OXOID	大肠杆菌培养
质粒小量快速提取试剂盒	TIANGEN	质粒提取
DL2000 Marker、1kb lader DNA Marker、λDNA/	TaKaRa	鉴定核酸分子量

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Hind III DNA Marker		
Ampicilin 氨苄青霉素	中诺药业	抗性筛选
Kanamycin 卡那霉素	Sigma	抗性筛选
Gentamicin 庆大霉素	Amresco	抗性筛选
Tetracycline 四环素	Amresco	抗性筛选
Bluo-Gal	Invitrogen	蓝白斑鉴定
IPTG	BD	蓝白斑鉴定
Insect-Xpress medium	Lonza	昆虫细胞培养
Fungizone® Antimycotic，liquid	Invitrogen	抗真菌
Penicillin-Streptomycin，liquid	Invitrogen	抗细菌
Cellfectin® II Reagent	Invitrogen	细胞转染
Grace's Insect Cell Culture Medium，Unsupplemented	Invitrogen	细胞转染
SDS-PAGE 低分子量标准蛋白	上海生工	鉴定蛋白分子量
预染蛋白 Marker	Fermentas	Western 条带指示剂
小鼠抗 His 单抗	康为世纪	Western 一抗
辣根过氧化物酶（HRP）偶联的羊抗鼠 IgG	Santa cruz	Western 二抗
SuperSignal® West Pico Chemiluminescent substrate	Thermo	Western blot 显色
Hybond ECL Nitrocellulose Membrance 硝酸纤维素膜	Amersham	Western 转膜用
镍亲和层析柱 HisTrap HP	GE healthcare	亲和层析
分子筛 Supperdex ™200 10/30GL	GE healthcare	凝胶层析
超滤浓缩管（Millipore Centricon ）	Millipore	蛋白浓缩
BCA Protein Assay Kit	Pierce	蛋白浓度测定
蛋白结晶试剂盒	Hampton、MD	晶体筛选及优化
细胞培养板/盘	Corning	细胞培养

2.1.2 主要实验仪器

表 2.2 主要实验仪器列表

仪器名称	公司
基因扩增仪	Bio-Rad；东胜创新
生物安全柜（BHC-1360II）	北京东联哈尔仪器制造有限公司
超净工作台	北京半导体设备一厂
CO_2 恒温培养箱	Thermo scientific
立柜式摇床	北京东联哈尔仪器制造有限公司
4℃冷库（Cold Room）	自建
AKTA FPLC/Purifier/Explorer 蛋白纯化仪	GE healthcare
抽滤装置	Vacuubrand
BL310 赛多利斯电子天平	Sartorius
pH 计	Mettler
37℃恒温培养箱	Heraeus

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

常温离心机	Thermo，Beckman
-80℃低温冰箱	Heraeus
高速冷冻离心机	Thermo，Beckman
高压灭菌锅	TOMY SS-325
电热恒温水浴锅	上海博迅实业有限公司医疗设备厂
涡旋混合器	Scientific industries
MilliQ plus 超纯水系统	Millipore
凝胶成像系统	Bio-Rad
脱色摇床	江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司
电泳成套设备	Bio-Rad
电磁炉	美的
显微镜	Olympus
酶标仪	MDS
晶体柜	SANYO

2.1.3 实验方法

2.1.3.1 质粒构建

本试验中，对商品化的pFastBac1 载体进行了改造，在载体中插入了一个gp67 N 末端信号肽编码序列[87]。然后，将需要表达的 HKU9-RBD（对应于 S 蛋白的 S355-N521 位置，GenBank：EF065513），MERS-RBD（对应于 S 蛋白的 E367-Y606 位置，GenBank：JX869050），SARS-RBD（应于 S 蛋白的 R306-F527 位置，GenBank：NC_004718），人 CD26（对应于 S39-P766 位置，GenBank：NP_001926）和人 ACE2（对应于 S19-D615 位置，GenBank：BAJ21180）分别通过 EcoRI 和 XhoI 酶切位点构建到改造后的 pFastBac1 载体中。在每个蛋白的 C 末端，融合了一个 6×HIS 标签，以方便后续的蛋白纯化。为了制备与鼠 IgG Fc 片段（mFc）融合的蛋白，MERS-RBD、SARS-RBD 和 HKU9-RBD 的编码序列与 mFc 的序列进行融合，然后分别克隆到 pCAGGS 载体中。

2.1.3.2 蛋白表达与纯化

根据指导手册，通过 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统制备用于晶体和 SPR 分析的蛋白。简而言之，经测序确认后的质粒转化到 DH10 Bac 感受态细胞中，以重组产生 Bacmid。经篮白斑筛选鉴定出阳性的重组 Bacmid 后，提取 Bacmid 并转染到 sf9 细胞中，制备杆状病毒种毒。Sf9 细胞进一步用来增殖杆状病毒，最后用 High 5 细胞来表达蛋白。

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

感染了病毒的 High 5 细胞，48 小时后收获。每种蛋白各接种和收获了 4 升 High 5 细胞培养物。细胞培养物以 6500 转/分钟（rpm）离心 90 分钟取上清以去除细胞碎片。收集的上清经 0.22μm 滤膜抽滤后，过夜挂 HisTrapHp 柱 (GE Healthcare)。对于 MERS-RBD、SARS-RBD、人 CD26 和人 ACE2，HisTrapHp 柱中结合的蛋白以含咪唑的 20 mM Tris-盐酸和 150 mM 氯化钠的缓冲液（pH 8.0）进行洗脱，咪唑浓度分别为 20 mM、50 mM、300 mM 和 1M。洗脱物以 SDS-PAGE 确定之后，将 300 mM 咪唑的洗脱物汇集起来浓缩后以 Superdex® 200 柱（GE Healthcare）进一步纯化。对于 HKU9-RBD 蛋白，由于 HKU9-RBD 的等电点经预测为 pH 8.1，因此结合的蛋白以含咪唑的 20 mM HEPES 和 150 mM 氯化钠的缓冲液（pH 7.0）进行洗脱，咪唑浓度分别为 20 mM、50 mM、300 mM 和 1M。洗脱物经 SDS-PAGE 确定后，将 50 mM 和 300 mM 咪唑的洗脱物分别汇集于 10Kd 的透析袋中，于 5 升 20 mM HEPES 和 150 mM 氯化钠的缓冲液（pH 7.0）中过夜透析。透析物浓缩后以 Superdex® 200 柱（GE Healthcare）进一步纯化。每种蛋白各自保存在用来纯化该种蛋白的缓冲液中。

为了在哺乳动物细胞表达系统中制备mFc融合蛋白，重组的pCAGGS质粒经Sanger测序确认后，以EndoFree质粒大提试剂盒（北京天根）进行质粒提取。提取的质粒以PEI（Polysciences公司）转染293T细胞，每个T75细胞培养盘中转染50 μg质粒。质粒转染混合物在细胞上孵育5小时后，弃去细胞培养液，转染的细胞以PBS洗涤两次，然后以新鲜的不含血清的培养基代替。转染后的细胞维持3天，无菌收获上清并补加等量的不含血清的培养液，继续维持4天。每个蛋白两次收获的上清汇集在一起，使用浓缩杯进行浓缩，然后加入2倍体积20 mM的磷酸钠（trisodium phosphate pH 7.0，以磷酸调节pH值）。混合物过夜流过5毫升的HiTrap Protein A HP预装柱（GE Healthcare）以结合目的蛋白。结合了蛋白的HiTrap Protein A 柱以20mM的磷酸钠去除杂蛋白后，以100 mM 的甘氨酸（glycine pH 3.0，以盐酸调节pH值）洗脱目的蛋白，每个洗脱物Eppendorf管中均预先加入100或200微升1 M Tris-HCl（pH 9.0，以盐酸调节pH值）。每管洗脱物经SDS-PAGE确认后，将含有目的蛋白的部分汇集在一起并进行浓缩，浓缩后的蛋白经缓冲液交换存放在PBS（pH 7.0）中以用于进一步的试验。

2.1.3.3 表面等离子共振试验

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

BIAcore 试验在 25℃条件下使用 BIAcore® 3000 机器或 BIAcore T100 和 CM5 芯片（GE Healthcare）进行。对于所有的试验，均使用 HBS-EP 缓冲液（10 mM HEPES，pH 7.4，150 mM NaCl, 加入 Tween 20 至终浓度 0.005%），试验中用到的所有缓冲液，需要预先进行超声以去除气泡。实验之前，将所有蛋白提前置换到 HBS-EP 缓冲液中。

首先，昆虫细胞中表达的 HKU9-RBD、MERS-RBD 和 SARS-RBD 蛋白在 BIAcore 3000 机器上进行表面等离子共振试验（SPR）试验。本实验中，牛血清白蛋白（BSA）作为阴性对照，HKU9-RBD、MERS-RBD 和 SARS-RBD 分别固定到 CM5 芯片上，每个通道固定 1000 个反应单位（RU，response units）。然后，人 CD26 和 ACE2 蛋白，以梯度浓度（Gradient concentrations）流过芯片表面。其中，人 CD26 蛋白依次流过的浓度为：0，19.5～5000 nM；人 ACE2 蛋白依次流过的浓度为：0, 39～625 nM。每次循环之后，芯片表面以 10 mM 的氢氧化钠进行短暂处理，以对芯片进行再生。蛋白之间的解离常数（Kd 值）以 BIAcore 软件中的 BIA evaluation 软件进行分析。

为了排除 HKU9-RBD 在低 pH 下 CM5 芯片表面固定时可能造成的蛋白失活（nonfunctional 或 inactivated），或者在昆虫表达系统中蛋白上丢失了某些重要的翻译后修饰这些可能性，我们在哺乳动物细胞系统中表达纯化了 mFc 融合的 HKU9-RBD、MERS-RBD 和 SARS-RBD 蛋白，并在 BIAcore T100 机器上使用捕获表面等离子共振方法（captured SPR method）对 HKU9-RBD 与 CD26 或 ACE2 的结合能力进行了测试。CM5 芯片首先用抗鼠的抗体在 FC1 和 FC2 通道上进行固定，然后在 FC2 通道上注入 mFc 融合的 RBD 蛋白以进行捕获，而 FC1 通道用作对照。随后，注入人 CD26 或人 ACE2 蛋白以检测其结合反应。固定的抗鼠抗体以 10 mM 的甘氨酸（pH 1.7）（GE Healthcare）进行再生。

2.1.3.4 晶体生长

蛋白结晶试验以坐滴液相扩散法进行。1 μL 蛋白与 1 μL 池液混合后，与 200 μL 池液进行气相平衡，静置于 4℃单晶培养间。初筛以商业化的结晶试剂盒进行。最终得到的可衍射的 HKU9-RBD 晶体是在 0.1 M 柠檬酸三钠、pH 7.0、12% PEG 20,000 的条件下生长，蛋白浓度为 2.2 mg/mL。衍生的晶体通过含有 1 mM

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

KAuBr4•2H2O（溴金酸钾）的池液中 4 °C 浸泡 48 小时得到。

2.1.3.5 数据收集和结构解析

在防冻液（含有 20% v/v 甘油的池液）中短暂浸泡之后，所有晶体于液氮中快速冷却。原始晶体（波长：1.03906 Å）和金原子衍生晶体（波长：1.03906 Å）的衍射数据均在上海同步辐射光源 BL17U 生物大分子晶体学光束线站收集。所有数据均以 HKL2000 软件包进行处理[88]。

HKU9-RBD 结构通过 SAD 进行解析。根据 Au-SAD 数据通过 SHELXD[89] 确定了金原子的位置后，对确定的位置进行优化，并以 PHASER 软件包[90]的 phasing 模块对相位进行计算。进一步采用电子云密度图对真实的空间位置进行约束[91]。通过 PHENIX 软件包中的 Autobuild 构建初始模型[92]。其他丢失的残基通过 COOT 手工添加[93]。最终的模型使用 PHENIX 软件包中的 phenix.refine 采用能量最小化、等向性优化和溶剂模拟进行优化[92]。最终模型的立体化学质量采用 PROCHECKT 进行评估[94]。表 1.1 中列出了数据收集和优化统计数据。所有结构图以 PyMol 软件生成（http://www.pymol.org）。

表 2.3 数据收集和优化统计

	HKU9-RBD (Protein Data Bank entry 5GYQ)	Au derivative HKU9-RBD
	Data collection	
Space group	P21	P1
Wavelength	1.03906	1.03906
Unit cell dimensions		
a, b, c (Å)	42.7, 36.0, 62.9	36.0, 46.6, 57.3
α, β, γ (deg)	90.0, 102.7, 90.0	80.4, 88.8, 88.5
Resolution[a] (Å)	50.00–2.10 (2.18–2.10)	50.00–2.48 (2.57–2.48)
No. of observed reflections	101588	52401
Completeness (%)	97.1 (80.7)	97.7 (96.9)
Redundancy	9.4 (9.4)	4.1 (3.7)
R_{merge}[b] (%)	6.1 (15.4)	9.2 (39.0)
I/σI	34.023 (12.057)	16.960 (4.637)
$CC_{1/2}$	0.998 (0.988)	0.986 (0.915)
	Refinement	
Resolution (Å)	41.7–2.10	
No. of reflections	10811	
Completeness for range (%)	97.0	
Rwork/Rfree[c]	0.1700/0.2006	

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

No. of atoms	
protein	1367
water	128
B factor (Å^2)	
protein	28.7
water	34.1
Root-mean-square deviation	
bond lengths (Å)	0.003
bond angles (deg)	0.820
Ramachandran plot[d] (%)	
favored	94.64
allowed	5.36
outliers	0.00

[a] 括号中给出最外层分辨率的数值；

[b] $R_{merge}=\Sigma_i\Sigma_{hkl}|I_i-\langle I\rangle|/\Sigma_i\Sigma_{hkl}I_i$, I_i 指的是观察密度而<I>指的是多种测量方法的平均密度；

[c] $R_{work}=\Sigma||F_o|-|F_c||/\Sigma|F_o|$, F_o 和 F_c 分别指的是数据和模型中的结构因子振幅。Rfree 是 R 因子的一个子集（5%），对优化计算前被选择的，并没有包括在优化中；

[d] Ramachandran plots 使用 PROCHECK 程序生成。

2.2 结果

2.2.1 HKU9-RBD 的表达与纯化

过夜结合 Histrap HP 的 HKU9-RBD 蛋白，以不同咪唑浓度的缓冲液（20 mM HEPES，150 mM NaCl，pH 7.0）从 Histrap HP 洗脱下来，结果如**图 2.1**。

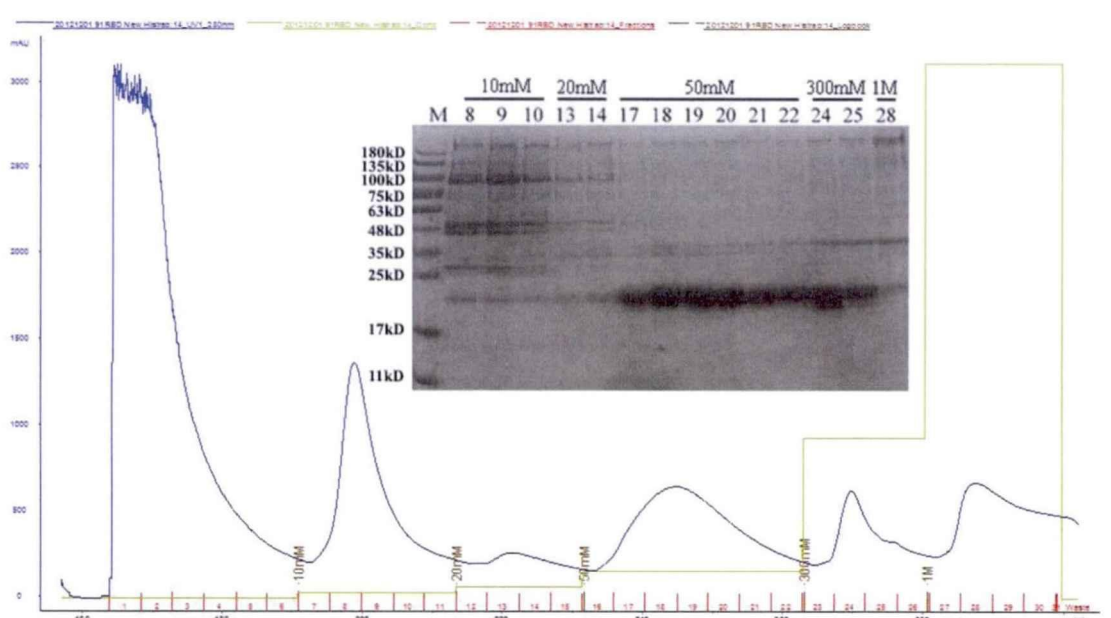


图 2.1 HKU9-RBD 蛋白 Histrap HP 纯化及 SDA-PAGE 电泳鉴定。Histrap 中结合的蛋白分别以 10 mM、20 mM、50 mM、300 mM 和 1 M 咪唑浓度的缓冲液（20 mM HEPES，150 mM

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

NaCl，pH 7.0）进行洗脱。蛋白质分子量标准为：180 kD、135 kD、100 kD、75 kD、63 kD、48 kD、35 kD、25 kD、17 kD 和 11 kD。

50 mM 和 300 mM 咪唑的洗脱物汇集后上 Superdex 200 pg 层析柱进行纯化，结果如**图 2.2**。从 SDS-PAGE 结果看，纯化出来的蛋白较纯，无需离子交换进一步纯化，可直接用作后续试验。

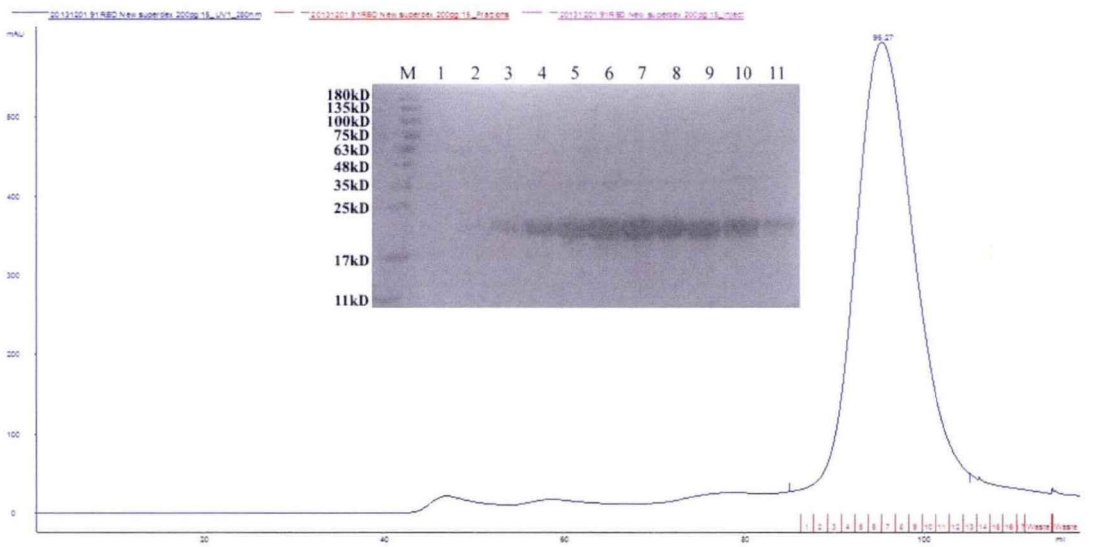


图 2.2 HKU9-RBD 蛋白 Superdex 200 pg 纯化及 SDA-PAGE 电泳鉴定。从 Superdex 200 pg 层析柱中出峰后的样品，每管均进行收集，并进行 SDS-PAGE 电泳鉴定。所使用的蛋白质分子量标准为：180 kD、135 kD、100 kD、75 kD、63 kD、48 kD、35 kD、25 kD、17 kD 和 11 kD。

2.2.2 HKU9 Spike 蛋白结构特征及 HKU9-RBD 序列特点

通过一系列的生物信息学方法，我们对 BatCoV HKU9 的 S 蛋白序列特点进行了分析。BatCoV HKU9 的 S 蛋白全长为 1274 氨基酸，具有冠状病毒 S 蛋白的典型特点（如在 S2 亚单位中，存在特征性的 7 个氨基酸的重复序列 1 和 2），但是预测到将 S 蛋白剪切加工为 S1/S2 亚单位的 furin 类蛋白酶剪切位点。通过比较全长 S 蛋白，可以发现 BatCoV HKU9 与其他 Beta 冠状病毒的 S 蛋白的氨基酸同源性相当有限（与 MERS-CoV S、HKU4 S 和 SARS-CoV S 的同源性分别为 27.9%、28.0%和 30.4%）。然而，如**图 2.3** 中所示，我们可以通过核心亚结构域中的特征性半胱氨酸残基对 RBD 所在的区域进行推断。在目前所有能够得到的 RBD 结构中[37, 79, 80, 95]，这些半胱氨酸残基能形成 3 个保守的二硫键以稳定核心的折叠。HKU9-RBD 位于 S 蛋白中 355～521 残基之间的区域。同其他 RBD 序列比较，HKU9-RBD 在核心亚结构域的长度上与其他 RBD 的核心亚结构域基本

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

匹配，但是外部亚结构域大大缩短了。

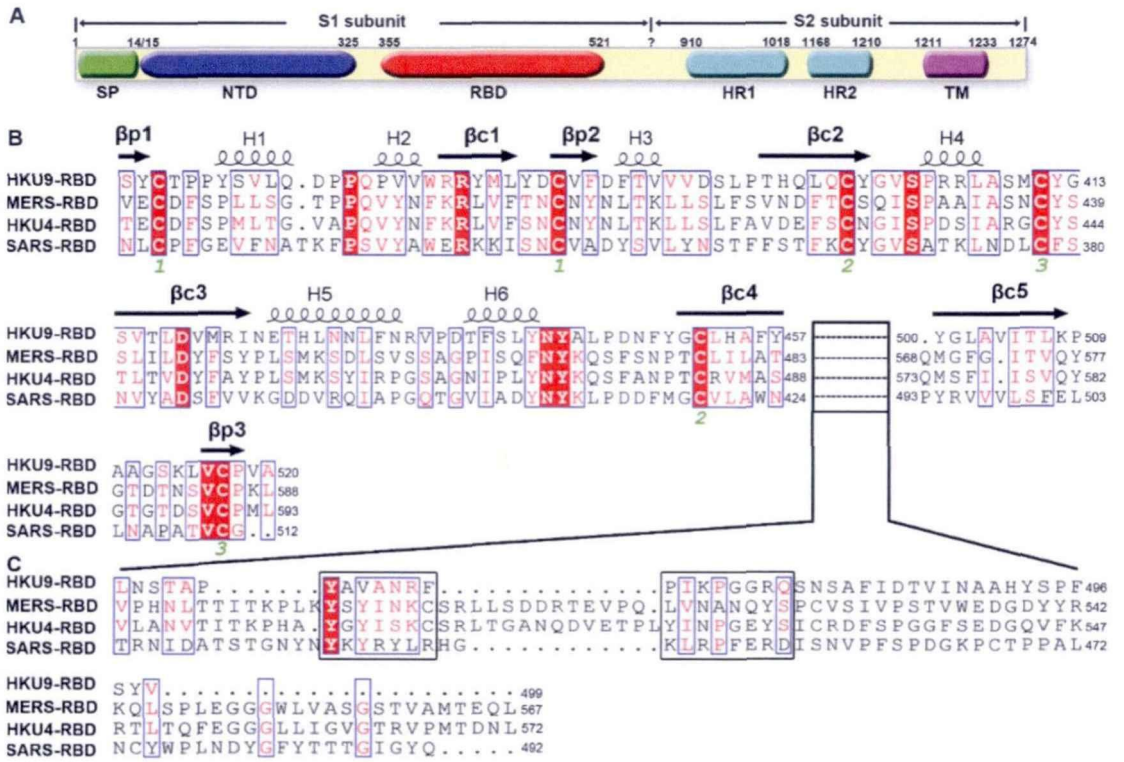


图 2.3 HKU9-RBD 序列特点。(A) BatCoV HKU9 S 蛋白结构模式图。结构域元件通过序列比对或生物信息学预测来确定。信号肽(SP)、跨膜结构域(TM)与七个氨基酸的重复单元 1 和 2（HR1 和 HR2）分别通过 SignalP 4.0 服务器、TMHMM 服务器和 Learncoil-VMF 程序进行预测；N 末端结构域（NTD）和 RBD 分别通过与鼠肝炎病毒 S 蛋白 NTD 和 MERS-RBD 序列比对推导得到。S1/S2 之间 furin 样蛋白酶潜在剪切位点未能确定，因此以问号标记。(B, C) HKU9-RBD、SARS-RBD、MERS-RBD 和 HKU4-RBD 序列以结构为基础的比对。箭头和螺旋线分别表示片层和螺旋。这些二级结构如图 2.3 中阐明的一样进行标记。结构中形成 3 个二硫键的保守半胱氨酸以阿拉伯数字 1～3 标记。4 个 RBD 结构中核心亚结构域保守，但是外部亚结构域在结构上不相关。因此我们将序列分别表示出来。将外部亚结构域锚定到核心亚结构域上的两个元件以黑色方盒进行突出标示。**(B)核心亚结构域序列。(C)外部亚结构域序列。**

2.2.3 HKU9-RBD 与 SARS-CoV 及 MERS-CoV 受体的结合情况

为了检测 HKU9-RBD 能否与 SARS-CoV 的受体 ACE2[83]或 MERS-CoV 的受体 CD26[36]反应，我们在昆虫细胞中分别制备了 HKU9-RBD 和受体胞外结构域，并对这些蛋白进一步纯化。然后以固定 RBD 蛋白、流过 ACE2 或 CD26 的方式通过表面等离子共振试验（SPR BIAcore）鉴定配体/受体之间的相互作用。与以前研究中报道的类似[37, 80]，我们能够观察到 SARS-RBD 与 ACE2 之间结合（KD = 0.265 μM）（**图 2.4 A**），MERS-RBD 与 CD26 之间结合（KD = 52.8 nM）(**图 2.4**

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

B)。结合动力学证实了我们测试系统是完善的。然而，在同样的条件下，HKU9-RBD 与 ACE2（**图 2.4 C**）和 CD26（**图 2.4 D**）均不作用。为了排除 HKU9-RBD 在低 pH 下 CM5 芯片表面固定时可能造成的蛋白失活(nonfunctional 或 inactivated)，或者在昆虫表达系统中蛋白上丢失了某些重要的翻译后修饰这些可能性，我们在哺乳动物细胞系统中表达纯化了 mFc 融合的 HKU9-RBD、MERS-RBD 和 SARS-RBD 蛋白，并在 BIAcore T100 机器上使用捕获表面等离子共振方法（captured SPR method）对其与 CD26 或 ACE2 的结合能力进行了测试。在同样的条件下，未能检测到 mFc 融合的 HKU9-RBD 蛋白与 ACE2 或 CD26 之间的结合反应（**图 2.4 G**），而 mFc 融合的 SARS-RBD 能够很好地结合 ACE2（**图 2.4 E**），mFc 融合的 MERS-RBD 能够很好地结合 CD26（**图 2.4 F**）。因此，我们可以推定 BatCoV HKU9 既不利用 SARS-CoV 的受体，也不利用 MERS-CoV 的受体侵入细胞。更确切地说，BatCoV HKU9 必然利用一个独特的细胞受体进入细胞，只是这个受体尚未为可知。

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

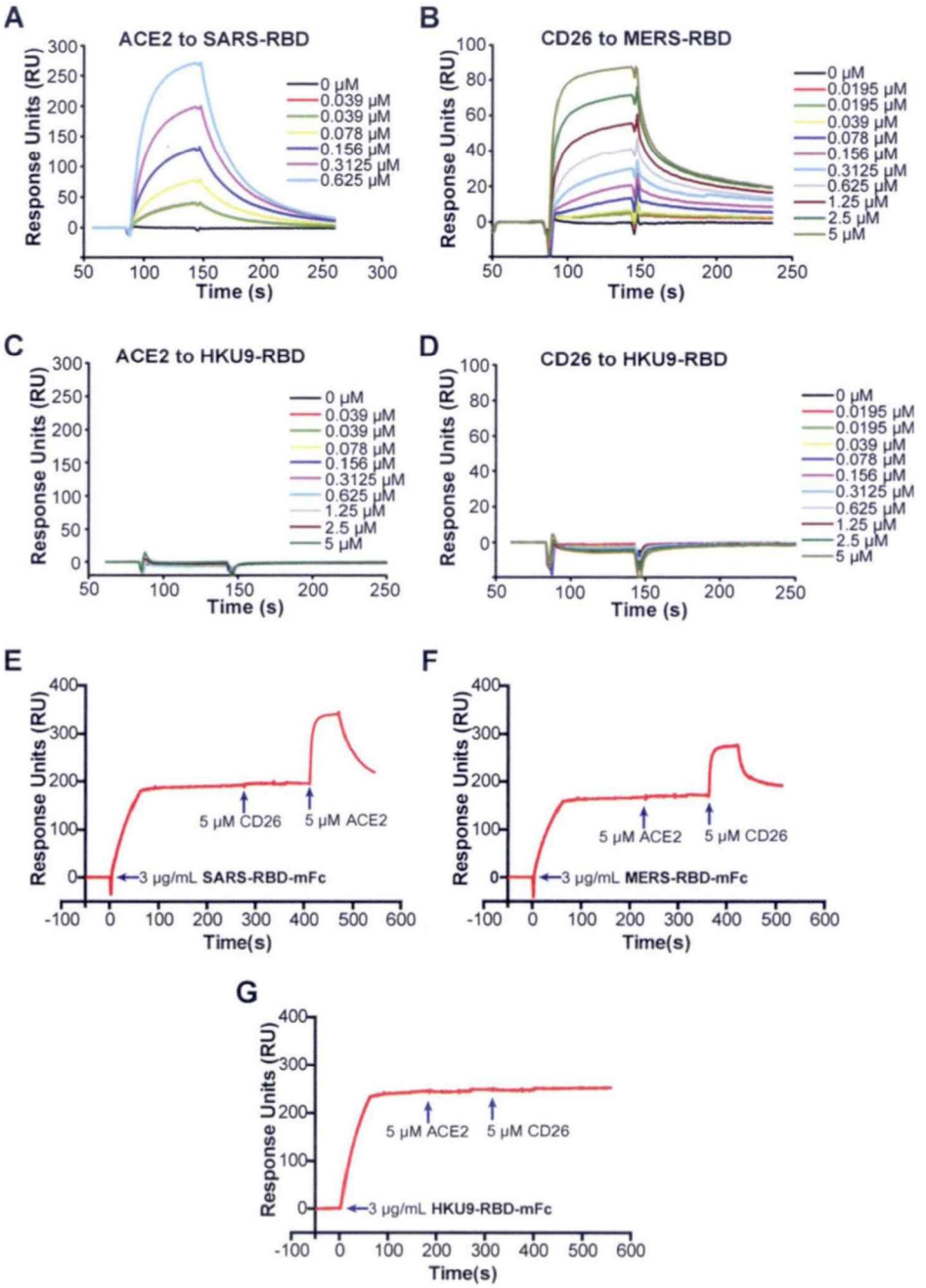


图 2.4 表面等离子共振试验（SPR）鉴定 HKU9-RBD 的特性。RBD 蛋白以昆虫细胞表达系统进行表达，在 BIAcore 3000R 系统上 RBD 蛋白固定在 CM5 芯片上，以梯度浓度的人 ACE2 或 CD26 进行结合测试。图中显示了记录的动力学属性：（A）人 ACE2 与 SARS-RBD；（B）人 CD26 与 MERS-RBD；（C）人 ACE2 与 HKU9-RBD；（D）人 CD26 与 HKU9-RBD。图中可清晰地显示 HKU9-RBD 既不结合 ACE2，也不结合 CD26。而 SARS-RBD 和 MERS-RBD 能够结合各自的受体。随后，我们在哺乳动物细胞（293T）系统中表达和纯化了 mFc 融合的 HKU9-RBD 蛋白，并在 BIAcore T100 上使用捕获 SPR 的方法测试 HKU9-RBD 与 CD26 或 ACE2 的结合能力。抗鼠抗体固定在 CM5 芯片上并对 mFc 融合的 RBD 蛋白进行捕获（3 μg/mL 60 秒），然后进行人 ACE2 或 CD26 结合试验：（E）mFc 融合的 SARS-RBD（SARS-RBD-mFc）不结合 CD26 但是能很好地结合 ACE2；（F）mFc 融合的 MERS-RBD（MERS-RBD-mFc）不结合 ACE2 但是能很好地结合 CD26；（G）mFc 融合的 HKU9-RBD(HKU9-RBD-mFc)既不结合 ACE2 也不结合 CD26。

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2.4 HKU9-RBD 晶体生长条件

我们使用了尽可能多的试剂盒对 HKU9-RBD 晶体的生长条件进行了筛选。结果发现在 4℃，Crystal Screen 2 试剂盒#28 溶液中，晶体生长较好，#28 溶液所包含的成分为 1.6 M 柠檬酸钠，pH 为 6.5。但是晶体生长条件需要进一步优化。最终得到的可衍射的 HKU9-RBD 晶体是在 0.1 M 柠檬酸三钠、pH 7.0、12% PEG 20,000 的条件下生长，蛋白浓度为 2.2 mg/mL。

2.2.5 重原子结合试验

由于 HKU9-RBD 氨基酸序列上与目前已知的所有冠状病毒的 RBD 的同源性很低（＜30%），难以对收集到的 HKU9-RBD 衍射数据进行解析。因此，需要将 HKU9-RBD 晶体与重原子结合，以确定相位。HKU9-RBD 与重原子结合的情况如**图 2.5** 所示。

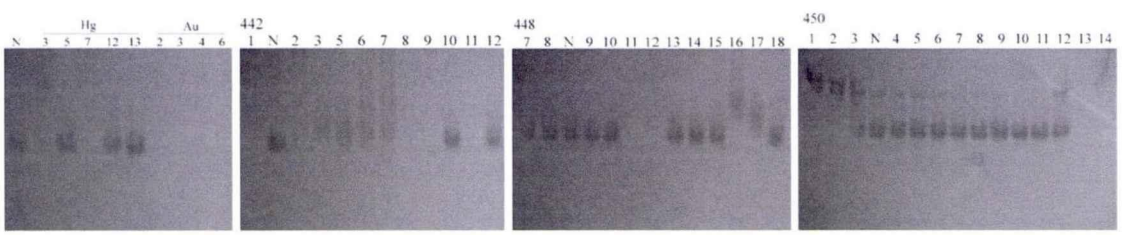


图 2.5 HKU9-RBD 晶体重原子结合试验。Hg、Au、442、448 和 450 为不同的重金属试剂，各图片中的数字编号为不同的试剂条件，N 为未加重金属试剂的原始蛋白样品。

结果可见，可结合重原子有 Hg：3、7；Au：2、3、4、6；442：8、9、11；448：11、12、16；450：2。因此，后续试验中我们选择了 Au 2 进行重原子结合。

2.2.6 HKU9-RBD 晶体结构

为了了解 HKU9-RBD 的结构特点，我们采用晶体学方法对其进行了研究。通过对 HKU9-RBD 蛋白进行表达和结晶，我们成功得到 HKU9-RBD 蛋白晶体，收集到一套 2.1Å 的数据，并通过单波长反常散射法对结构进行了解析。解析的结构，其 R_{work} 和 R_{free} 值分别为 0.1772 和 0.2198，在晶体不对称单位中包含有一个单一的分子。从电子密度上可清晰地看到 176 个连续的 HKU9-RBD 残基，即从 S355 残基到 A520 残基，这些氨基酸折叠成一个紧凑的结构。如同其他 RBD 结构一样，这个紧凑的结构进一步可以分为两个亚结构域[37, 79, 80]。核心亚结构域由 8 个 β 折叠和 6 个螺旋（α 或 3_{10}）组成。5 个长的折叠（βc1-βc5）以反平

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

行方式排列，组成核心亚结构域的核心-中心（core-center）。这个 core-center 片层进一步被表面的螺旋和回环包裹。值得注意的是这 6 个螺旋（H1-H6）散在分布于两个片层表面，因此导致核心亚结构域在整体上呈球状折叠。在 core-center 片层的一个侧面，外部亚结构域如同一个帽子覆盖在核心亚结构域上；而在远端对面的一边，三个小的折叠组成一个平行的核心-外周（core-peripheral），使得 HKU9-RBD 的 N 末端和 C 末端充分接近。与预期的一样，特征性的半胱氨酸残基在核心亚结构域中形成三个二硫键，进一步从内部稳定了核心结构。在这三个二硫键中，两个（C357/C381 和 C411/C517）位于核心-外周（core-peripheral）中，有助于 RBD-末端的取向；一个（C399/C452）位于 core-center 中，连接 βc2 和 βc4 折叠。总体而言，在结构中观察到的核心亚结构域的残基边界与从序列比对结果中推导出来的相当一致。

HKU9-RBD 外部结构域由 L458 到 V499 共 42 个残基组成。这些氨基酸从 core-center 片层的 βc4 折叠延伸出来，首先以回环的形式沿着核心亚结构域延伸形成一个夹子样结构，然后折叠回来形成一个溶剂暴露的 α 螺旋，最后继续往前进入核心 βc5 折叠。我们观察到的这个 HKU9-RBD 表面结构与 SARS-RBD 和 MERS-RBD 中的结构差异非常显著，SARS-RBD 和 MERS-RBD 中的外部结构域完全没有任何螺旋成份[79, 80]。HKU9-RBD 独特的表面折叠能够很好地解释为什么其不与 ACE2 或 CD26 结合。

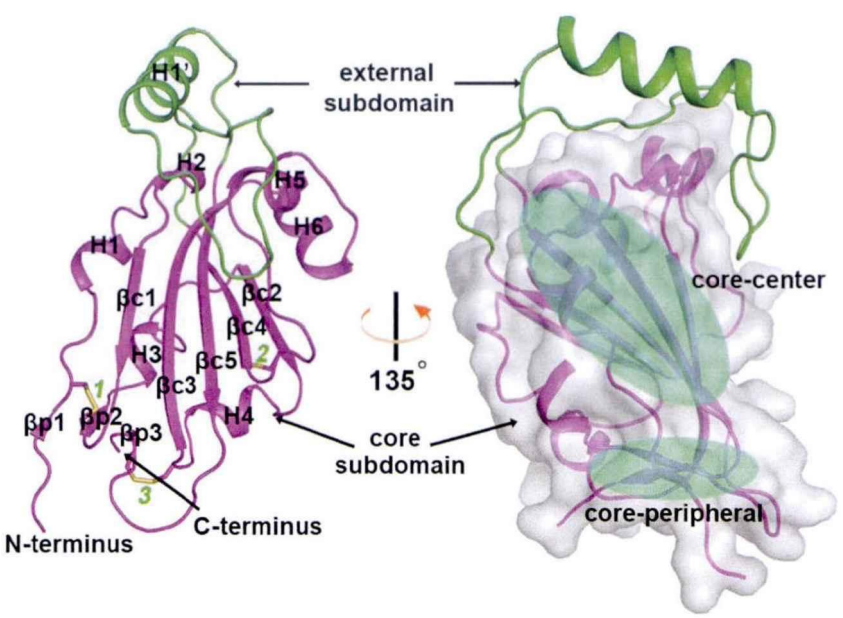


图 2.6 HKU9-RBD 晶体结构。核心和外部亚结构域分别以品红色和绿色表示。核心亚结构

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

域进一步分为中心区域（核心-中心）和外周区域（核心-外周），在图中均做了突出显示。核心-中心的片层和螺旋分别标记为βc1-βc5和H1-H6；而核心-外周的片层标记为βp1-βp3。二硫键和RBD的末端均做了标记。在图中右侧，核心亚结构域以表面显示的方式呈现出来，以突出外部亚结构域在顶部位置如同一个帽子。

2.2.7 Beta冠状病毒中RBD核心亚结构域的结构保守性

此前已经相继报道了三种 Beta 冠状病毒的 RBD 结构，包括一种 B 群（SARS-RBD [79]）和两种 C 群（MERS-RBD [80]和 HKU4-RBD [37]）冠状病毒的 RBD 结构。这些结构表明在 Beta 冠状病毒的核心折叠中存在一个种间保守的结构[80]。BatCoV HKU9 是 Beta 冠状病毒 D 亚群中的一个代表性成员[73]。因此，我们将目前已知的 RBD 结构与本研究中解析的 HKU9-RBD 结构进行了比较。与预期一样，核心亚结构域具有很高程度的相似性。对核心结构域进行叠合，均方根方差值（RMSD）在 0.66 到 2.82 Å 之间，表明在四种 RBD 中核心折叠相当一致，虽然在这个区域序列同源性很低。在 core-center 片层中我们可以看到最为保守的部分，由 5 个折叠所形成的支架元件和单一的折叠间二硫键在所有结构中总是存在。然而，在 core-peripheral 区域，我们能够注意到构成折叠的部分存在一些细小的差异。在 HKU9-RBD 中，包含了 3 个短的 β 折叠，排列成一个小的平行 β 片层；在 SARS-RBD 和 MERS-RBD 中保留了两个这样的折叠；而 HKU4-RBD 中在这个区域缺乏任何可检测到的折叠元件。尽管折叠的方式存在差别，RBD 的 core-peripherals 表现出相似的方向性和同样的排列组合以使其 N 末端与 C 末端结构域充分接近。core-peripheral 中，另外的特点在于这个区域存在两个二硫键，结构和拓扑上这两个二硫键在这四个 RBD 结构中均保守。

相对于核心的保守性，这 4 种 RBD 的外部亚结构域在结构上存在分歧。HKU9-RBD 的表面区域是一个单一的 H1'螺旋；而在 SARS-RBD 中以回环为主，但是包含两个额外的小的 β 折叠；MERS-RBD 和 HKU4-RBD 的外部亚结构域相互之间很类似，主要是由 4 个 β 折叠组成的刚性 β 片层。在这些外部亚结构域中，尽管存在结构上的不相关性，但是拓扑上很明显是等同的，都是在两个 core-center 折叠中插入了一个结构域。

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

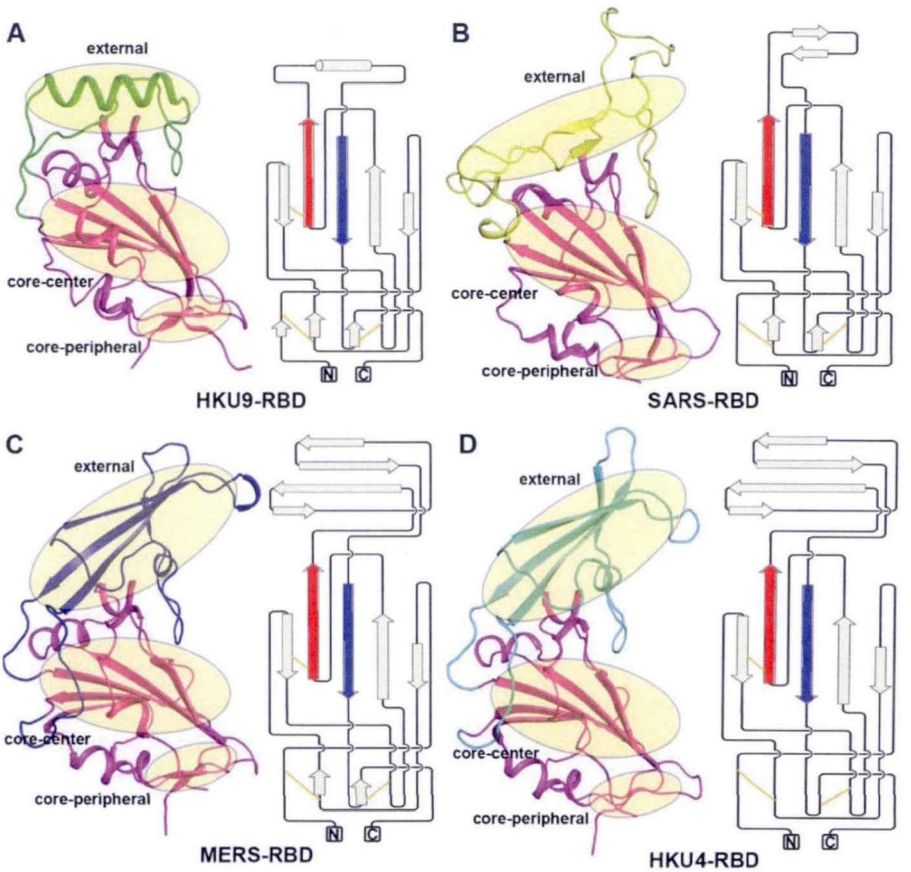


图 2.7 所有 Beta 冠状病毒 RBD 拓扑结构比较。包括 HKU9-RBD, SARS-RBD, MERS-RBD 和 HKU4-RBD 共 4 个结构，以相似的方向并且平行地展示。在核心-中央、核心-外周和外部亚结构域，黄色圈出突出显示这些结构域。同时，对全部 4 种 RBD 结构中的核心-中央和核心-外周片层以及外部元件的拓扑排列均进行了描画。

2.2.8 同源相互作用模式将外部亚结构域锚定在核心亚结构域上

通过对所有能够得到的 RBD 结构进行叠合，在外部亚结构域中我们意想不到地发现了两个主要元件，这两个元件能够很好地比对重叠在一起。第一个元件横跨 7 个氨基酸残基（HKU9-RBD：Y464-F470，SARS-RBD：Y438-R444，MERS-RBD：Y497-C503，HKU4-RBD：Y501-C507），然后沿着核心亚结构域表面向前延伸，嵌入在 H2 和 H6 螺旋之间。第二个元件包含 8 个氨基酸（HKU9-RBD：P471-Q478，SARS-RBD：K447-D454，MERS-RBD：L517-S524 和 HKU4-RBD：Y522-S529），以一个弯曲的回环延伸，覆盖在核心亚结构域的 H6 螺旋上。有意思的是，这两个元件以马鞍状跨于核心螺旋之上，将外部亚结构域锚定在核心亚结构域上。因此，我们有必要对这个核心/外部结构域交界处的氨基酸之间相互作用的细节作进一步探究。

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

我们对这两个元件中的每一个残基的侧链方向和亚结构域之间的相互作用进行了仔细观察。为了方便分析和比较，对这两个元件中的氨基酸都指定了一个位置标记（元件 1 中的氨基酸分别以 a-g 标记，元件 2 中的氨基酸分别以 a-h 标记）。在元件 1 中，所有 4 种 RBD 中的 a 残基都是一个不变的酪氨酸。这个氨基酸将其庞大的侧链指向核心亚结构域，提供很强的疏水接触。HKU9-RBD 在这个位置上存在一个额外的侧链 H 键。b 残基远离核心表面向外延伸，这个位置的氨基酸保守性很低。但是这个残基总是通过提供一个主链 H 键促成亚结构域的锚定。在 b 残基之后，氨基酸在 c 位置上更好的面向核心，而在 d 位置上与核心表面平行伸展。在这两个位置上，能各自观察到多个范德华接触和保守的主链 H 键。在 SARS-RBD 中，能看到细微的差异，c 残基往外延伸至庞大的溶剂区。元件 1 中剩余的三个 e、f 和 g 位置上的氨基酸，远离核心亚结构域并且完全暴露于溶剂中，因此对核心/表面之间的相互作用所起的作用很小。

在元件 2 中，a 和 d 残基方向上与核心亚结构域表面平行。这一构型允许氨基酸提供非极性的范德华接触以加强核心/外部亚结构域之间的结合。d 位置上的氨基酸具有一定程度的保守性，在这个位置上脯氨酸更为有利，以方便回环转角。在这两个位置之后，b 和 e 将它们的侧链插入到核心亚结构域的两个表面口袋中。在 b 位置上，通常保守性地为疏水性并且侧链是中等大小的氨基酸（Val/Ile/Leu）。这个残基容纳在浅的非极性口袋中，产生强的堆积力以结合核心和外部亚结构域。此外，这个残基同时为亚结构域的结合提供一个主链 H 键。对于 e 残基，容纳其的口袋深而且大，因此在这个位置上的残基变化较大（在 HKU9-RBD 和 HKU4-RBD 上是 Gly，在 SARS-RBD 上是 Phe，而在 MERS-RBD 是 Asn）。在 4 种 RBD 中，这个 e 残基总是通过主链原子与核心亚结构域形成 H 键，但是也可能提供侧链 H 键相互作用（如在 MERS-RBD 中）或多个范德华接触（在 SARS-RBD 中）。在这个区域中 g 残基位置上，能够进一步观察到额外的核心/表面相互作用，残基方向上与核心亚结构域平行或指向核心亚结构域，因此通过疏水性或侧链 H 键相互作用促成亚结构域之间的结合。同样让人感兴趣的是，在元件 2 中上述这些重要的表面残基经常由位置 c、f 和 h 的氨基酸残基穿插相间，而 c、f 和 h 位置上的氨基酸是溶剂暴露的并且很少与核心结构域相互作用。

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

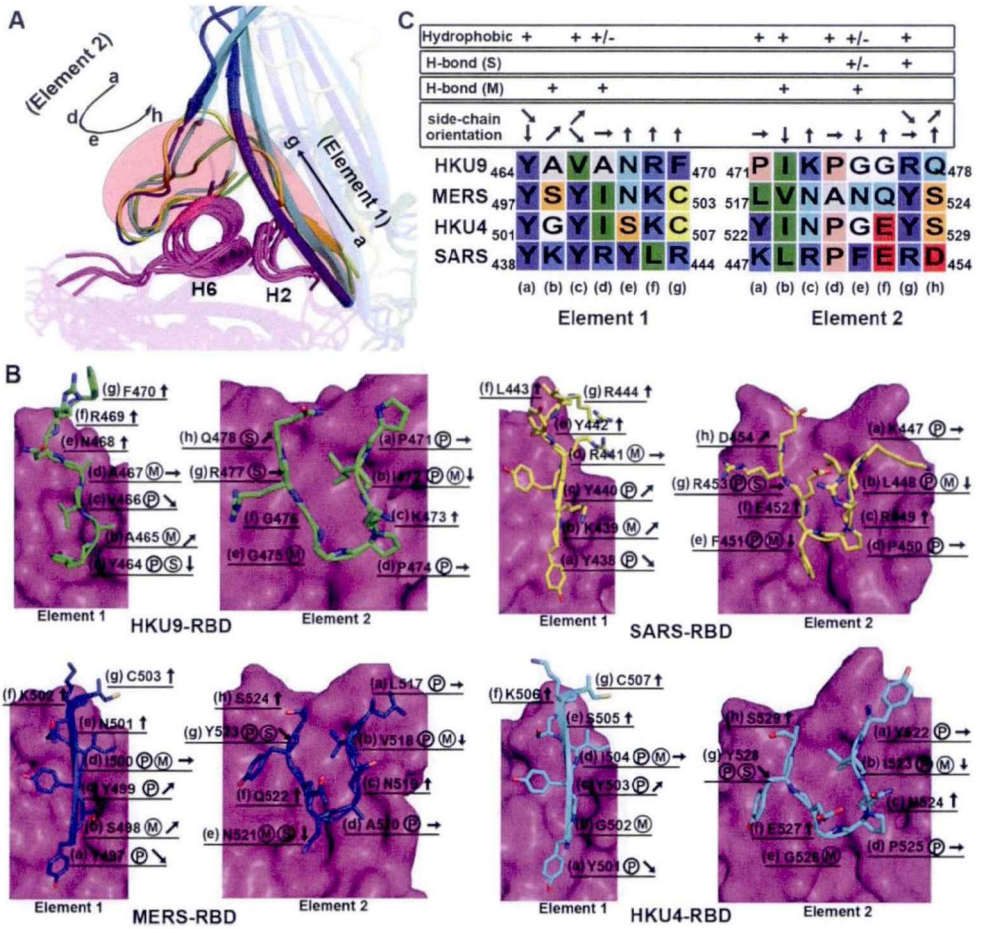


图 2.8 同源亚结构域间氨基酸的相互作用促使外部亚结构域锚定于核心亚结构域。(A) Beta 冠状病毒 RBD 结构之间的叠合（HKU9-RBD 为绿色，SARS-RBD 为黄色， MERS-RBD 为蓝色，HKU4-RBD 为青色)显示结构上能够很好的重叠，突出显示出外部元件。这两个元件中，元件 1（element 1）和元件 2（element 2）分别有 7 个和 8 个氨基酸,在亚结构域间相互作用中，主要参与核心亚结构域的 H2 和 H6 螺旋。为了方便比较，元件中残基依照顺序各自分配给一个位置标记（a-g 用于元件 1，a-h 元件 2。(B）元件中残基的特性及在亚结构域间结合所起的作用。两个外部元件以 cartoon 的形式展示，而核心亚结构域以 surface 方式显示。在每个位置上，每个残基以各自位置、氨基酸名称和编号、相互作用的模式/方式以及侧链方向的方式来标记。对于相互作用模式，疏水或范德华力相互作用以圆圈 P 表示，侧链氢键以圆圈 S 表示，而主链氢键以圆圈 M 表示。侧链方向以箭头表示。(C）对（B）中的亚结构域间的相互作用进行总结。对 4 种 RBD 中元件的序列进行比对并列举出来。“+”表示某种相互作用类型在这个位置上通常能够观察到，“+/-”表示相互作用方式对某些 RBD 是特定的，而不是存在于所有 4 中 RBD 结构中。箭头标示出侧链的方向。

总之，四个冠状 RBD 结构在亚结构域之间的结合上呈现出同源的氨基酸相互作用模式。这种结合主要依赖于外部亚结构域上的两个元件，这两个元件在这些结构中的走向相似。尽管这些元件在序列上保守性较低，但是大部分情况下，在每个位置上的氨基酸残基的侧链走向和相互作用模式（疏水性、范德华或氢键接触）是相似或同源的。

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.3 讨论

大量证据表明，蝙蝠是自然界中新型冠状病毒及冠状病毒基因的最大的遗传库。大部分 Beta 冠状病毒从来源上都可追溯至蝙蝠，如最近有研究在中华菊头蝠上分离到一株活的 SARS 样冠状病毒，这株病毒能够利用 SARS 冠状病毒的 ACE2 受体以侵入细胞[22]，因此为追溯引起人类感染的 SARS 冠状病毒的来源提供了最强有力的证据。此外，两项研究报道在蝙蝠体内鉴定出的基因片段与 MERS 冠状病毒的几乎一致[28, 31]，暗示 MERS 冠状病毒可能也是来源于蝙蝠。值得注意的是，最近的研究报道表明 BatCoV HKU4 通过识别 CD26 分子适应性地结合人类细胞[37]。因此，所有这些证据表明，为其他不可预知的蝙蝠来源的 Beta 冠状病毒可能发生的跨物种传播事件做好准备，是一个很迫切的问题。BatCoV HKU9 是一种重要的 D 群 Beta 冠状病毒[73]，并且已经证明在很多不同种类的蝙蝠中广泛存在和流行[68, 84-86]。鉴于冠状病毒 S 蛋白的 RBD 在跨越物种屏障过程中所起的决定性作用（如同在其他冠状病毒中结构上所阐明的一样[37, 79, 80]），我们从结构和功能特点上对同源的 BatCoV HKU9 的 S 蛋白 RBD 进行了描述。从解析的结构中我们可以看出存在一个核心亚结构域，这个结构域与 SARS、MERS 和 HKU4-RBD 中观察到的一致，但是存在一个仅由一个螺旋组成的独特的外部亚结构域。由于 RBD 外部亚结构域包含了与受体相互作用的关键基序（即受体结合基序，RBM），因此 HKU9-RBD 独特的表面折叠与我们的功能数据是完全一致的，表现为 HKU9-RBD 与 ACE2 和 CD26 受体不反应。至于哪一种宿主分子能够作为 HKU9-RBD 侵入细胞的功能性受体，有待于进一步研究。然而，考虑到 HKU9-RBD 外部亚结构域中的单一螺旋元件，我们可以推断 RBM 应该位于螺旋中溶剂能够进入的一侧，这为将来进行受体的鉴定提供方便。

值得注意的是，冠状病毒的 RBD 不是必须位于 S1 亚单位的 C 末端部分。以前的结构和突变分析数据表明，MHV 的 S 蛋白 RBD 位于 S1 亚单位的 N 末端[82, 96]。然而，由于大多数冠状病毒的 RBD 位于 S1 亚单位的 C 末端，如 SARS-CoV[79]、MERS-CoV[80]、batCoV HKU4[37]、人冠状病毒 NL63[97]和传染性胃肠炎病毒[98]等，当前的数据似乎倾向于 C-RBD[37, 79, 80]比 N-RBD 作为受体结合实体更具有优势。有意思的是，目前所有 Beta 冠状病毒 C-RBD 结构中，其 N

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

末端和 C 末端扭转着固定在相同的一侧，与外部亚结构域所处的位置相反。这种排列方式导致 S1 亚单位的 N 末端在空间上位于 C 末端的下面，从而突出了 C-RBD 远离病毒包膜以便于与受体反式相互作用。我们的结构研究表明，HKU9-RBD 保留相同的特性，因此具有更好的机会以作为真正的受体结合实体。

通过与 SARS-RBD、MERS-RBD 和 HKU4-RBD 这些已知的结构进行比较[37, 79, 80]，HKU9-RBD 在表面折叠上与这些结构有差异，但是保留了相似的核心亚结构域结构。最保守的部分位于 core-center 片层，由 5 个反平行的折叠组成，功能上作为核心亚结构域的支架。空间和结构上，这个片层在所有 RBD 结构中都很保守。另外的保守元件包括 core-center 螺旋和 core-peripheral。然而，这些元件在二级元件组成上可能发生变化，如最近 HKU4-RBD[37]的结构研究表明，其 N 末端大部分没有折叠成如同 SARS- RBD[79]和 MERS-RBD[80]中观察到的特征性螺旋。对于 core-peripheral，折叠的数量在不同的结构中存在变化，如 HKU4-RBD 没有折叠，而 HKU9-RBD 中存在 3 个折叠。这对 RBD 二级元件的命名增加了相当大的复杂性。如果将结构上变化显著的外部亚结构域同时考虑进去，情形将更糟糕。因此，我们建议对 core-center 中的折叠和螺旋分别命名为 βcs (βc1-βc5) 和 Hs (H1, H2… 等)，core-peripheral 中的折叠命名为 βps (βp1, βp2…等)，而表面元件命名为 H's (H1', H2'… 等)或 β's (β1', β2'… 等)。这种命名策略能够方便同源 RBD 结构之间进行比较，并且能够反应外部亚结构域在拓扑上是在两个对等的 core-center 折叠之间插入的一个亚结构域。

RNA 病毒漫长的进化史、高突变率和大量的人工遗传，给病毒的起源研究带来很大的困惑。由于病毒表面蛋白常处于巨大的进化压力之下，如果从这些蛋白来追踪病毒的进化痕迹将更加困难。然而，四级结构上的进化记录可能比氨基酸序列上的更为保守。在 Beta 冠状病毒中，不同群成员间 S 蛋白 RBD 序列同源性相当有限。然而，在 Beta 冠状病毒 RBD 结构中存在几个保守的特点：1）保守的 core-center 作为核心亚结构域的支架；2）相似的 core-peripheral，RBD 末端扭结接近；3）相似的拓扑排列，外部亚结构域插入在两个核心折叠之间；4）亚结构域之间的结合模式具有一定同源性，将外部结构域锚定在核心亚结构域间。这些特点表明 S 蛋白具有共同的祖先，然后发散性地进化为不同的种类。在进化过程中，核心亚结构域在所有结构中均保留，而外部结构域折叠成不同的结

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

构以结合不同的受体。同样值得注意的是，在 Beta 冠状病毒 B、C 和 D 群成员中上述核心特点在结构上已经得到验证，但是目前尚未有 A 亚群病毒在这方面的数据。因此，未来有必要对 A 亚群成员中的对应的 S 蛋白 RBD 结构进行研究。

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

第三章 云南省墨江哈尼族自治县废弃矿洞中不明原因重症肺炎事件病原学初步调查

重症肺炎是一种肺部感染所引起的严重甚至致死性的疾病，通常病情进展迅速，病死率高达 30%～50%。

引起重症肺炎的病因很复杂，主要涉及细菌、真菌和病毒等。其中，细菌包括肺炎链球菌（*Streptococcus* pneumoniae）、嗜肺军团菌（*Legionella* pneumophila）、肺炎支原体（*Mycoplasma* pneumoniae）、肺炎克雷伯杆菌（*Klebsiella* pneumoniae）、铜绿假单胞杆菌（*Pseudomonas* aeruginosa）和流感嗜血菌（*Haemophilus* parainfluenzae）等；真菌有肺组织胞浆菌（*Histoplasma* capsulatum）等；而常见的引起重症肺炎的病毒有严重急性呼吸道综合征冠状病毒（Severe acute respiratory syndrome coronavirus，SARS-CoV）、中东呼吸道综合征冠状病毒（Middle East respiratory syndrome coronavirus，MERS-CoV）、人冠状病毒 NL63（Human coronavirus NL63，HCoV-NL63）、人冠状病毒 HKU1（Human coronavirus HKU1，HCoV-HKU1）、流感病毒（Influenza virus）、腺病毒（Adenovirus）、呼吸道合胞病毒（Respiratory syncytia virus，RSV）、人博卡病毒（Human Bocavirus，HBoV)和人偏肺病毒(Human metapneumovirus，hMPV)等。近年来报道的蝙蝠携带的正呼肠孤病毒（Orthoreovirus）如 Melaka virus[62]和 Kampar virus[63]，引起人类感染导致的重症肺炎，同样不容小视。而免疫缺陷疾病导致肺部合并感染其他病原之后，即使这类病原通常是低致病甚至非致病的，也可能引起重症肺炎。

细菌和真菌的检测，通常可以通过扩增基因组中保守的 16sRNA 和 18sRNA 来进行，或者通过针对某种细菌或真菌的特异性方法进行检测，从而对引起疾病的病因进行初步判断。然而，引起重症肺炎的病毒种类繁多，除了同一病毒科或病毒属成员，病毒之间一般不存在共有的保守序列。因此，只能依赖于单个病毒的检测。临床上因检测能力的局限，通常短时间内很难对病因进行确诊。

2012 年 4 月，云南省墨江哈尼族自治县的一个矿工群体在重新清理废弃的铜矿时暴发重症肺炎，其中 6 人感染，3 人死亡。引起这次暴发的原因至今尚未明了。2014 年 10 月，我们在这个废弃的矿洞中捕捉了 87 蝙蝠和 1 只大鼠，采

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

集了各种组织脏器样本，并对其中可能携带的病原进行了检测。

3.1 材料和方法

3.1.1 试剂和材料

使用的试剂、材料和仪器，同第一章。

3.1.2 样本采集

在云南省疾病预防控制中心和当地疾控中心工作人员的协助下，我们在云南省墨江哈尼族自治县通关镇的一个废弃铜矿里（N 23°10′36″ E 101°21′28″）捕获了 87 只蝙蝠，其中 84 只为中华菊头蝠（*Rhinolophus* sinicus），3 只为亚洲长翼蝠（*Miniopterus* fuliginosus）。当天晚上在山洞里设置捕鼠器，第二天捕获一只野鼠。所有蝙蝠处死后采集了肠道、肺脏、肝脏和脾脏组织。由于蝙蝠体型较小，未能采集肛拭子。捕获的野鼠作同样处理。所有组织分别存放于 2 mL 细胞冻存管中，所有标本分类包装在纱布袋中后立即存放于液氮，运送至云南省疾病预防控制中心实验室，直至需要检测时取出。本研究通过了中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所和云南省疾病预防控制中心的伦理和动物福利和使用委员会的审查。

3.1.3 样本处理

将样本分批从液氮中取出，取出后按照编号排列好，解冻之后取适量组织在灭菌的手工玻璃碾磨器中碾磨。整个碾磨过程在冰上进行，碾磨时先加入少量含有抗生素（50000 μg/mL 万古霉素，50000 μg/mL 丁胺卡那霉素，10000 units/mL 制霉菌素）的培养基，充分碾磨之后，将培养基补充至 1 毫升，转移到灭菌离心管中，4℃高速离心 10 分钟，小心吸取上清转移至新的离心管中。取上清液 100 μL 用于核酸提取，剩余的立即放入-80℃低温冰箱中保存。

3.1.4 核酸提取

使用 Qiagen 核酸提取试剂盒，按照说明书中介绍的方法进行核酸提取，具体步骤同第二章。提取好的核酸立即用于反转录试验或冻存于-80℃低温冰箱中。

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3.1.5 引物设计

我们从 GenBank 中下载了星状病毒科（*Astroviridae*）、博卡病毒属（*Bocavirus*）、冠状病毒亚科（*Coronavirinae*）、丝状病毒科（*Filoviridae*）、甲型流感病毒（Influenza virus A）、亨尼帕病毒属（*Henipavirus*）、麻疹病毒属（*Morbillivirus*）和腮腺炎病毒属（*Rubullavirus*）的所有序列，根据氨基酸序列中最保守的部分进行简并引物设计；同时下载了正呼肠孤病毒属（*Orthoreovirus*）的所有序列，经序列比对后找出核苷酸序列中最保守部分，进行引物设计。基于氨基酸和核苷酸保守序列的简并设计方法参照第六章。设计完成的引物序列如下。

表 3.1 Pan-viral 筛选简并引物

Primers	Primer Sequences	Degeneracy	Length
panAsts-PM-OF	ATTTGACTGGACCCGCTATGAYGGNACNATHCC	96	OF+OR=433
panAsts-PM-OR	ACTTTGACCTTCTCAGGCTTAACCCACATNCCRAA	8	
panAsts-PM-IF	GTTT AGTCACCCAGCAGAAACGAGGNAAYCCNWSNGG	512	IF+OR =268
panAsts-PM-OR	ACTTTGACCTTCTCAGGCTTAACCCACATNCCRAA	8	
panBoVs-PM-OF	GCTTTACAGCTTTTGTTGATTCARGGNTAYAAYCC	32	OF+OR=512
panBoVs-PM-OR	CTGCAATCTCAGTAGCAGTGATYTCNCCRAANGT	64	
panBoVs-PM-IF	GTTTCGGGAAACAAAACACTGTCTGCTTYTAYGGNCCNGC	64	IF+IR=131
panBoVs-PM-IR2	GTTTCGTTAAAGACAAATCCCTTGTTTAGATGRTTNACRCANCC	64	
panCoVs-OF	TGTTATTGGAACCACGAAGTTYTAYGGNGGNTG	64	OF+OR=299
panCoVs-OR	TAGTAGCATCTCCGCTGCTAGTNCCNCCNGGYTT		
panCoVs-IF	GTTTTGTTCTTATGGGTTGGGATTAYCCNAARTGYGA	32	IF+OR=228
panCoVs-OR	TAGTAGCATCTCCGCTGCTAGTNCCNCCNGGYTT	128	
panFilo-OF	AATTATAAGTGATTTAAGTATHTTYATHAARGA	36	OF+OR=985
panFilo-OR	AAAATAAATGAACCCTGAATGNACRAANGTYTC	64	
panFilo-IF	GTTT AGCTAAAGCATTCCCTAGTAAYATGATGGTNGT	8	IF+IR=501bp
panFilo-IR	GTTT TAGAGTTGTTATACATTGATTRTCNCCCATNAC	32	
AIV-PB1-1OF2	ATCTGGACTCCCAGTTGGAGGNAAYGARAARAA	32	OF+OR=535
AIV-PB1-1OR2	ATCATCGGAGGATTGGAGTCCRTCCCACCARHA	12	
AIV-PB1-1IF	GTTTTTCTTTCACAATCACTGGAGAYAAYACNAARTG	32	IF+IR=362
AIV-PB1-1IR	TGTACTTAGCATGTTGAACATNCCCATCATCAT	4	
panHenipa-OF	CATGTACATGATTTGCTAT GGNTTYGTNGARGA	4	OF+OR=865
panHenipa-OR	CCCTGTGTTGTCAATGAACACRTCRTCRTADAT	24	
panHenipa-OF	CATGTACATGATTTGCTATGGNTTYGTNGARGA	4	OF+IR=754
panHenipa-IR	GTTT AGTCAGTCTGTTGAGCCAAGGRTTDATRTCNAT	12	
panMorbilli-OF	GTTT AACAGGGAGTGTCTTCAACGCNAAYCARGTNTG	4	OF+OR=372
panMorbilli-OR	GTTT ACCAAGTGCAAAAACCAGGCCCATYTTYTCDAT	4	

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

panRubula-OF	TGAAGATCTCAGCATATTCATGAARGAYAARGC	8	OF+OR=853
panRubula-OR	CCATAATTTTTGACATAAACCYTCDATNCCNCC	6	
panRubula-IF	GTTT TTGTGCATCTTACTCTCTCAARGARAARGARAT	16	IF+IR=498
panRubula-IR	GTTT GCTTCGCATTAGCCTTAAATGDATCCAYTCRAA	12	
OrthoReo-OF	CBATYATGCCNHTDAAYGT	432	OF+OR=628
OrthoReo-OR	CCRTCRTCNCCYTGRCANA	256	
OrthoReo-IF	AGYGCNGTNATYGARAARGT	256	IF+IR=419
OrthoReo-IR	TCCATCATNGTRCTRTTRTTNGC	128	

说明：引物合成时将所有的 N 替换成 I（次黄嘌呤），能够降低引物的简并率，从而提高扩增效率和检出率。

3.1.6 样本检测

提取的核酸经反转录后得到的 cDNA 立即进行 PCR 反应。鉴于需要检测的病毒较多，实验室中没有足够的机器同时运行，因此 PCR 反应体系中添加一定量的优化试剂以使 PCR 反应能适应更宽的退火温度范围。我们一般是添加 5%的 DMSO，第一轮 PCR 时，先进行 5 个循环，退火温度为 44℃，然后进行 30 个循环，退火温度为 54℃。第二轮 PCR 时，先进行 5 个循环，退火温度为 48℃，然后进行 30 个循环，退火温度为 58℃。第一轮 PCR 后，如果得到的条带与预期相符，即可送交公司进行测序。如果第一轮 PCR 未见预期条带扩增，则取第一轮的 PCR 产物 5 μL 作为第二轮反应的模板，继续扩增。扩增得到的条带如果与预期大小相符，同样送交测序公司进行序列测定。

所有阳性样本均需经过独立的重复试验以避免假阳性。

3.1.7 序列同源与进化分析

测得的序列首先通过 Blastn 进行比对，以确定序列是否为目标病毒的序列。确定之后，从 GenBank 中下载相关病毒序列进行同源性分析。最后，进行进化分析。序列比对使用 ClustalW 进行，进化树构建使用 MEGA7 软件以 Neighbor-Joining 法建树，Bootstrap 值设定为 1000。

3.2 结果

3.2.1 样本检测

PCR 检测与测序结果表明，2 份样本呈冠状病毒阳性：一份为中华菊头蝠肠

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

道样本（109-2），另一份为长翼蝠脾脏样本（101-4x）（**图 3.1**）。

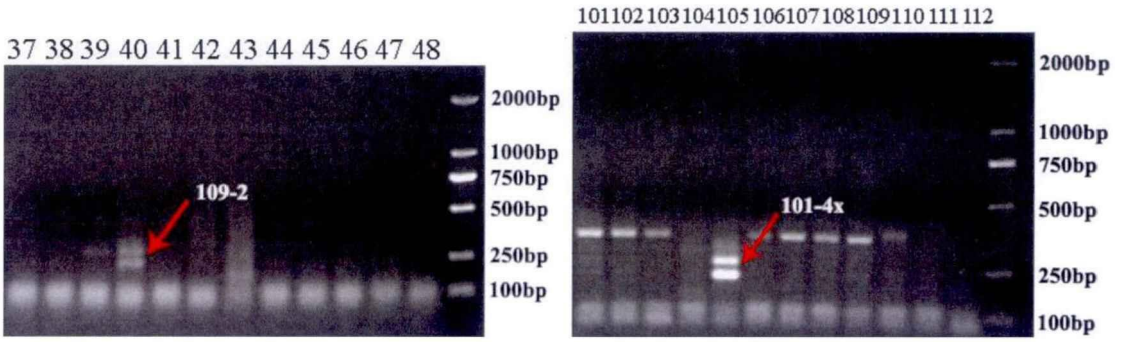


图 3.1 冠状病毒检测及琼脂糖凝胶电泳鉴定。图片上方的数字为试验中的顺序号；109-2 和 101-4x 分别为样本编号；红色箭头指示出与预期大小相符的阳性条带。DNA 分子量标准为：2000 bp、1000 bp、750 bp、500 bp、250 bp 和 100 bp。

2 份样本呈博卡病毒阳性：分别为中华菊头蝠肝脏和肺脏样本 1 份（B13-3），和中华菊头蝠脾脏样本 1 份（B122-4）（**图 3.2**）。

图 3.2 博卡病毒检测及琼脂糖凝胶电泳鉴定。图片上方的数字为试验中的顺序号；B13-3 和 122-4 分别为样本编号；红色箭头指示出与预期大小相符的阳性条带。DNA 分子量标准为：2000 bp、1000 bp、750 bp、500 bp、250 bp 和 100 bp。

11 份样本呈星状病毒阳性：分别为中华菊头蝠肠道样本 5 份（B110-2、B135-2、B12-2、B124-2 和 B129-2）；肝脏和肺脏样本 3 份（B12-3、B124-3 和 B43-3）和脾脏样本 1 份（B124-4）（**图 3.3**）。

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

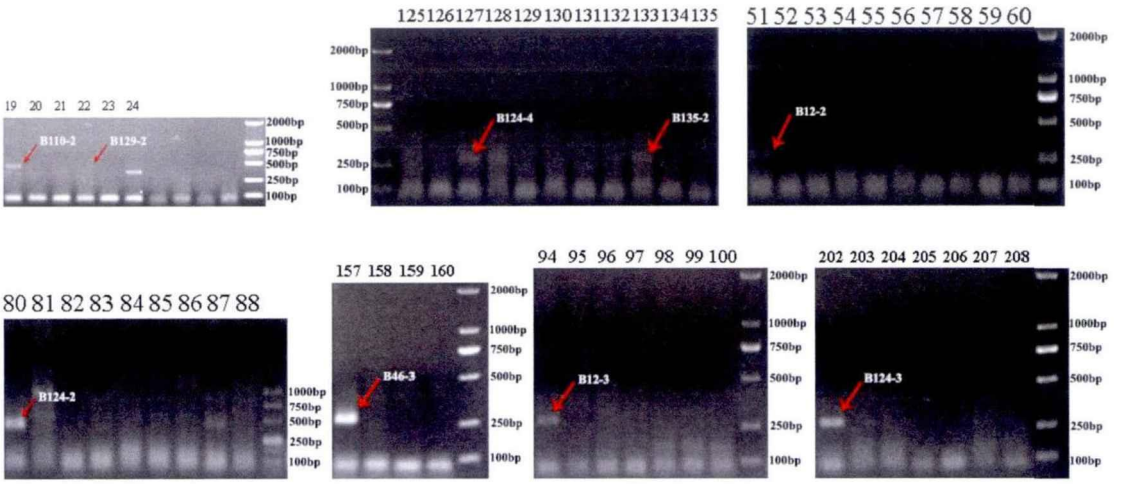


图 3.3 星状病毒检测及琼脂糖凝胶电泳鉴定。图片上方的数字为试验中的顺序号；B110-2、B135-2、B12-2、B124-2、B129-2、B12-3、B124-3、B43-3 和 B124-4 分别为样本编号；红色箭头指示出与预期大小相符的阳性条带。DNA 分子量标准为：2000 bp、1000 bp、750 bp、500 bp、250 bp 和 100 bp。

3.2.2 序列同源与进化分析

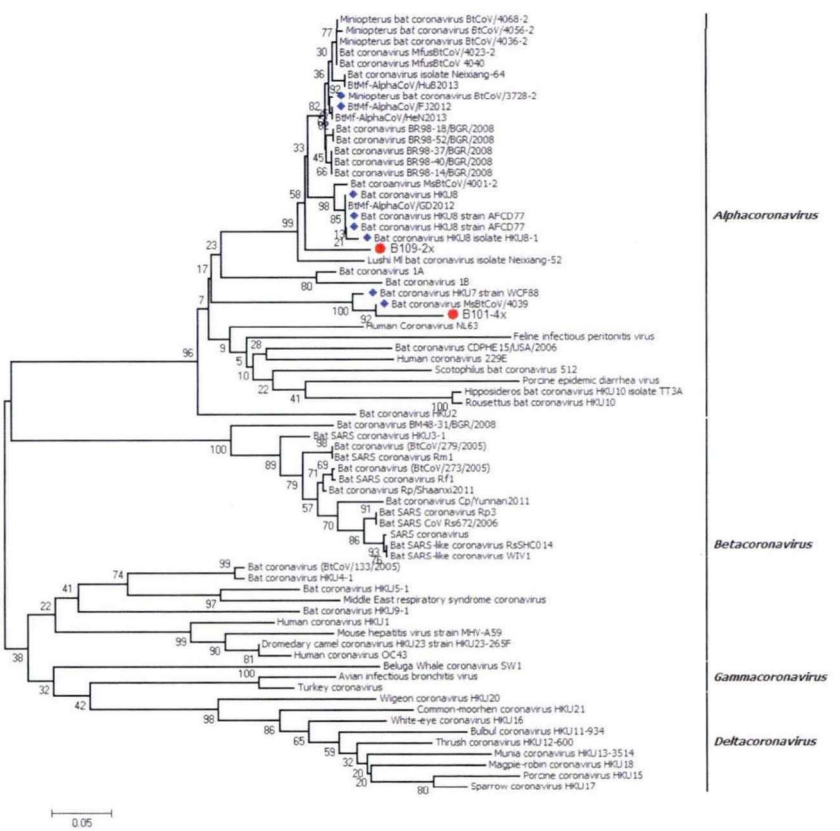


图 3.4 冠状病毒系统进化分析。红色圆点表示本研究中检测到的冠状病毒，蓝色棱形为进化上相近的冠状病毒。进化树以 MEGA7 软件采用 Neighbor-joining 方法构建，bootstrap 值为 1000。

序列比对与同源性分析结果显示 101-4x 与 Bat coronavirus MsBtCoV/4039

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

（KU343194）和 Bat coronavirus HKU7 strain WCF88（DQ666339）的同源性较高，分别为 94.9%和 92.6%；同样，109-2 与 BtMf-AlphaCoV/FJ2012（KJ473799）、Miniopterus bat coronavirus BtCoV/3728-2（KP876522）和 Bat coronavirus HKU8（NC_010438）的同源性较高，分别为 92.6%、92.5%和 91.2%。进化分析结果进一步显示 101-4x 和 109-2x 与这些冠状病毒分离株在系统进化上较为接近（**图 3.4**）。

序列同源性结果显示 B13-3 和 B122-4 之间的同源性为 100%，而与其他所有已知的不同宿主来源的博卡病毒的同源性最高为 80.3%（Porcine bocavirus isolate swBoV CH437：KF360033），表明 B13-3 和 B122-4 可能为同一毒株，并且可能是一种新型博卡病毒。鉴于扩增和测序得到的有效序列较短（130 bp），包含的有效信息较少，因此在构建进化树时节点之间的 bootstrap 值不甚理想（**图 3.5**）。后续试验需要进一步对这两株病毒进行扩增，并进行序列和进化分析。

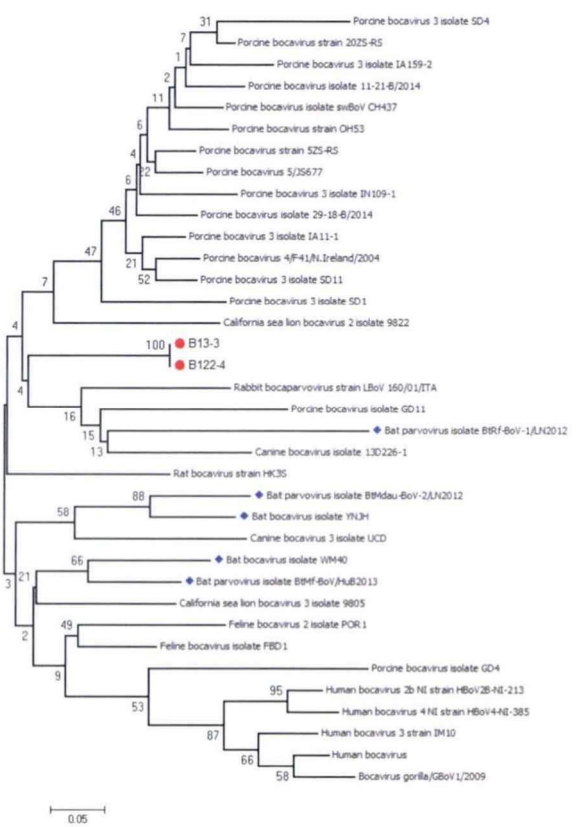


图 3.5 博卡病毒系统进化分析。红色圆点表示本研究中检测到的博卡病毒，蓝色棱形为进化上相近的蝙蝠博卡病毒。进化树以 MEGA7 软件采用 Neighbor-joining 方法构建，bootstrap 值为 1000。

同样，序列同源性结果显示 B12-2、B12-3、B124-2、B124-3、B124-4、B129-2

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

为同一毒株，B46-3、B110-2、B135-2 分别为独立的毒株（**图 3.6**）。而与其他宿主来源的星状病毒序列比对，这几个毒株可能为新型星状病毒。系统进化分析进一步证实了这一结论。值得注意的是，本试验中扩增的序列片段较短（～280 bp），进化树中很过节点的 bootstrap 值偏低，因此后续试验中往两侧延伸扩增，以提供足够的序列信息并做进一步的进化分析。

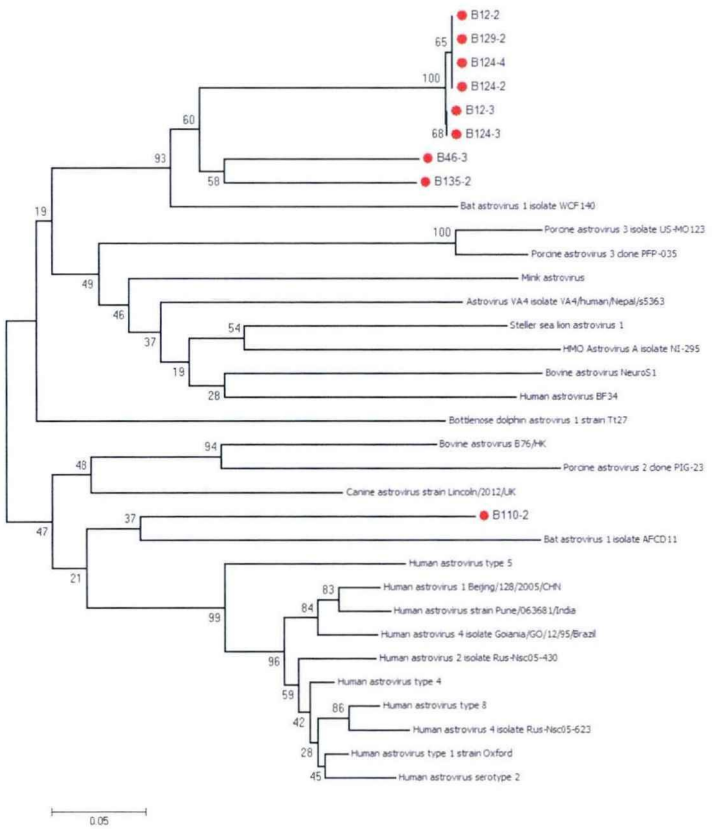


图 3.6 *星状病毒系统进化分析。红色圆点表示本研究中检测到的星状病毒。进化树以* MEGA7 *软件采用* Neighbor-joining *方法构建，* bootstrap *值为* 1000。

3.3 讨论

2012 年 11 月，云南省墨江哈尼族自治县通关镇的一个废弃的铜矿矿洞中，矿工群体中暴发重症肺炎疫情。其中 6 人感染，共造成 3 人死亡。中国疾病预防控制中心、云南省疾病预防控制中心以及其他医疗机构和相关科研单位采集了病人以及矿洞中蝙蝠、老鼠和环境等样本并进行病原检测和病因分析。4 名患者咽拭子和全血标本中，SARS 冠状病毒、流行性出血热、登革热（1-4 型）、乙型脑炎及黄病毒、甲病毒病原核酸检测均为阴性（成都军区疾病预防控制中心）；4 名病例和 4 名曾经进入矿洞但未发病人员的血标本检测结果无异常发现（广东钟

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

南山实验室）；对矿洞内蝙蝠进行解剖，对蝙蝠粪便进行检测，均未发现异常（中国科学院武汉病毒学研究所）；4 名病例血液标本检测结果显示：4 人均携带 SARS 病毒 IgG 抗体，其中出院 2 人的抗体水平较高，住院 2 人的抗体水平较低（中国科学院武汉病毒学研究所）。时隔半年之后，金奇实验室再次进入该矿洞采集蝙蝠和野鼠样本并进行病原检测，从野鼠样本中，得到一株 Henipa-like virus 基因组全长序列[99]。但是，该病毒与这次疫情暴发之间的相关性，并未得到论证。因此，造成此次疫情暴发的病因尚未明了，虽经多方努力，迄今成了一桩不了了之的悬案。

2014 年 10 月，我们在这个山洞中采集了 87 只蝙蝠和 1 只野鼠，解剖后对各种脏器组织进行检测。从结果看，两份样本为冠状病毒阳性，分别为 BatCoV HKU7 和 BatCoV HKU8，这两种冠状病毒目前尚未有感染人的病例报道[65, 100]。根据文献初步推测，受体也不是常见的 SARS-CoV 的 ACE2 和 MERS-CoV 的 CD26 受体，可能是 APN（Aminopeptidase N）受体。另有两例为博卡病毒阳性，而博卡病毒最初是从儿童重症肺炎样本中发现。同时，9 份样本为星状病毒阳性。星状病毒是一种常见的消化道病原，目前没有任何证据表明星状病毒与肺炎或者呼吸道疾病相关。因此，所发现的病毒与这起疫情暴发是否存在相关性，同样需要做很多的后续工作来进行论证。

对于我们实验室而言，病原的快速检测还处于探索阶段，平台建立尚未完善。目前，只设计了针对 10 个科或属的通用引物，未来需要设计更多的通用引物并在实践中尝试和强化，以期涵盖尽可能多的病毒范围实现突发疫情中的快速反应。

墨江县废弃矿洞中疫情暴发，有一个细节值得我们注意。在此次疫情之前，曾有多人多次进出这个废弃矿洞，但是未有疫情发生。这种现象提示我们，有必要对某些特定的生态环境进行跨年或长期的监测，以了解特定环境或动物群体中病原的变异和进化，以及这些变化可能造成的跨物种传播。

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

第二部分 文献综述

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

第四章 新发动物源性病原及其对人类的致病性

传染病（Infectious disease）是由病原微生物（细菌、病毒、真菌和寄生虫等）引起的具有传染性的一类疾病。在人类社会的发展进程中，传染病的暴发（outbreak）和流行（pandemic）严重威胁着人类的健康和生存以及人类文明的繁衍和传承。据世界卫生组织（WHO）在其发表的《1996 年世界卫生报告：抵御疾病，促进发展》中公布的数据可以看出，1995 年全球死亡的 5200 万人中，有 1700 万人死于各类传染病，约占死亡总人数的 33%[101]。世界卫生组织 2004 年的统计数据表明，全球 5800 万死亡人数中，仍然有 950 万例由传染性疾病所引起的[102]。因此，传染病仍然是一个重要的公共卫生问题。

在全球化（globalization）和工业化（industralization）背景下，跨国旅行和商务活动、国际贸易等大幅度增加，促使传染病传播的速度比历史上任何时候都要快，并且跨地域传播的范围也比历史上任何时期都要广。

第一节 新发传染病概念及分类

传染病不仅传播速度快，而且新病原出现的速度也似乎超过了过去的任何时期。新发传染病的不断出现给人类带来了新的严重威胁，在发病率（morbidity）、死亡率（mortality）和经济负担（economic burden）上造成了沉重的代价，这种状况在发展中国家和欠发达地区表现得尤为显著[103]。目前，新发传染病已经导致全球约 1200 万人死亡[103]。根据世界卫生组织的定义，新发传染病指的是最近在人群中的发病率上升，或在不久的将来发病率有上升威胁的传染性疾病，同时还包括那些在新的地理区域出现或发病率突然上升的传染病[103]。新发传染病可以分为以下几种：1）最近在发病率（incidence）、发病的地理范围（geograph）或宿主范围（host range）上大大增加的疾病；2）已知病原新的变异株（new variants）所引起的疾病；3）在人群中新出现的疾病；4）在人群中早已存在，但是以前因技术手段的局限未能检测到病原或被忽视的一类疾病。

第二节 近 30 年来出现的新发传染病

自 1980 年以来，全球出现的新发病病原约有 90 多种，并以每年新增一种或

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

多种的态势发展，仅 1996 年就发现了 8 种之多（**表 4.1**）[104-107]。同时，从表 4.1 可以看出，新发传染病的病原组成非常复杂，有细菌（包括立克次体、螺旋体和无形体）和真菌、病毒（包括朊病毒），还有原生动物（Protozoa）和寄生虫等。而病毒性新病原多达 64 种（**图 4.1**）。其中，主要的病毒性新病原包括 HIV、丙型肝炎病毒、埃博拉病毒、尼帕病毒、SARS 冠状病毒等。

表 4.1 1980 年以来新发现的感染人类的病原（以第一次报道的年份排列）

年份	病原	病毒科	年份	病原	病毒科	年份	病原	病毒科
2014	parrot adenovirus	adeno	1996	*Metorchis conjunctus*		1989	*Corynebacterium amycolatum*	
	phlebovirus	bunya		Juquitiba virus	bunya	1988	Picobirnavirus	birna
2013	H7N9 influenza virus	paramyxo		*Ehrlichia canis*			Barmah Forest virus	toga
	Novel cowpox	poxvirus		BSE agent		1987	Suid herpevirus 1	herpes
2012	MERS-CoV	Corona		Australian bat lyssavirus	rhabdo		Sealpox virus	pox
2011	SFTS virus[108]	bunya		Andes virus	bunya		Dhori virus	orthomyxo
	Iquitos Virus	bunya	1995	New York virus	bunya	1986	Rotavirus C	reo
2010	Titi monkey adenovirus	adeno		Hepatitis G virus	flavi		Kokobera virus	flavi
2009	Lujo virus	Arena		Côte d'Ivoire Ebola virus	filo		Kasokero virus	bunya
2007	Ki virus	polyoma		Black creek canal virus	bunya		HIV 2	retro
	Wu virus	polyoma		Bayou virus	bunya		Human herpesvirus 6	herpes
	Melaka virus	reo	1994	Sabia virus	arena			
2005	Human T-lymphotropic virus 4	retro		Human herpesvirus 8	herpes		European bat lyssavirus 2	rhabdo
	Human T-lymphotropic virus 3	retro		Human herpesvirus 7	herpes		*Cyclospora cayetanensis*	
	Human Coronavirus HKU1	corona				1985	*Pleistophora ronneafiei*	
	Human bocavirus	parvo		Hendra virus	paramyxo		*Enterocytozoon bieneusi*	
	Human Parvovirus 4[109]	parvo		*Anaplasma phagocytophila*			Borna disease virus	borna
2004	Human Coronavirus NL63	corona	1993	Sin Nombre virus	bunya	1984	*Scedosporium prolificans*	

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

	Nam Dinh virus	Mesoni		*Gymnophalloides seoi*			Rotavirus B	reo
2003	SARS coronavirus	corona		*Encephalitozoon intestinalis*			Human torovirus	corona
2002	Cryptosporidium hominis			*Bartonella elizabethae*		1983	HIV 1	retro
2001	Cryptosporidium felis		1992	Dobrava-Belgrade virus	bunya		Human adenovirus F	adeno
	Human metapneumovirus	paramyxo		*Bartonella henselae*			Hepatitis E virus	NA
	Baboon cytomegalovirus	herpes	1991	*Nosema ocularum*			*Helicobacter pylori*	
2000	Whitewater Arroyo virus	arena		Guanarito virus	arena		*Capnocytophaga canimorsus*	
1999	TT virus	circo		*Encephalitozoon hellem*			Candiru virus	bunya
	Nipah virus	paramyxo		*Ehrlichia chaffeensis*		1982	Seoul virus	bunya
	Ehrlichia ewingii		1990	*Vittaforma corneae*			HTLV 2	retro
	Brachiola algerae			Trubanaman virus	bunya		*Borrelia burgdorferi*	
1998	Trachipleistophora anthropophthera			Semliki Forest virus	toga	1981	*Microsporidian africanum*	
	Menangle virus	paramyxo		Reston Ebola virus	filo	1980	Puumala virus	bunya
	Brachiola vesicularum			Gan gan virus	bunya		HTLV 1	retro
1997	Laguna Negra virus	bunya		Banna virus	reo			
	Bartonella clarridgeiae		1989	Hepatitis C virus	flavi			
1996	Usutu virus	flavi		European bat lyssavirus 1	rhabdo			
	Trachipleistophora hominis							

说明：（1）数据主要来源于文献[104-107]，并进行了适当修改和补充；（2）新病原的选择参照文献 6 的要求和标准，除 SFTS virus 外，未包括节肢动物为储存宿主和传播媒介的病原；（3）对病毒性病原及其所属的科进行了标注；（4）布尼亚病毒白蛉属新亚种发现于 2009 年，文献报道于 2011 年[108]；（5）人细小病毒 4 型发现于 2004 年，文献报道于 2005 年[109]。

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

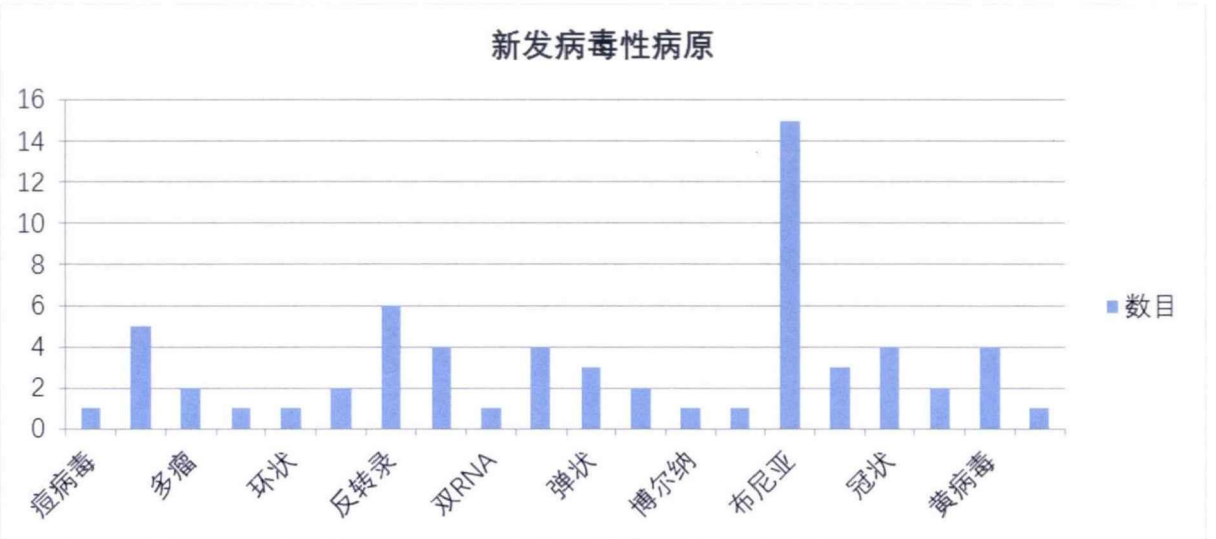


图 4.1 新发病毒性病原组成

说明：（1）双链 DNA 病毒 9 种（包括痘病毒、疱疹病毒、多瘤病毒和腺病毒）；单链 DNA 病毒 3 种（包括环病毒和细小病毒）；反转录病毒 6 种；双链 RNA 病毒 5 种（包括呼肠孤病毒和双 RNA 病毒）；单股负链 RNA 病毒 29 种（包括副粘病毒、弹状病毒、丝状病毒、博尔纳病毒、正粘病毒、布尼亚病毒和沙粒病毒），其中布尼亚病毒多达 15 种；单股负链 RNA 病毒 11 种（包括冠状病毒、披膜病毒、黄病毒和戊型肝炎病毒）；（2）戊型肝炎病毒尚未划归任何病毒科；（3）图中未列入朊病毒。

第三节 新发传染病频发的生态和环境因素

如此众多的新病原不断涌现，其原因是多方面的，既有病原和宿主等内在因素的驱动，比如病毒与宿主之间的相互作用（interaction）[110]和共进化（virus-host coevolution）[111, 112]等；同时还有气候、环境，甚至人类的行为、习惯等外部因素的驱使。病毒，尤其是 RNA 病毒，在其自身生活周期中通常会自发地产生基因突变（包括插入、缺失、转换和颠换等）。这些基因突变累积到一定程度，其抗原性就会发生改变，从而产生新的变异株，如流感病毒的抗原漂移（antigen drift）和 HIV 的遗传变异。而药物、抗生素和疫苗的使用或宿主免疫系统的选择压力，能够加快病原的基因突变和新变异株的产生。病毒之间还可以通过基因组片段的重组（recombination）或重配（reassortment）交换遗传信息。在共感染（co-infection）或超感染（superinfection）时，两种或多种病毒同时感染一个宿主细胞为病毒之间遗传信息的交换提供了机会，HIV 的 B/C 重组株[113]和流感病毒的抗原转换（antigen shift）[114]是最典型的例证。此外，病毒与细胞基因组之间也存在遗传信息的交换，许多病毒基因组中都存在与宿主高度同源的序列，如

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

某些病毒携带的癌基因（oncogene）与细胞基因组中的原癌基因（proto-oncogene）高度同源，某些病毒编码的细胞因子（cell factor）及其受体的模拟分子，这些均可视为病毒-宿主共进化的结果。

自然界中，产生一个全新的病毒往往是不"经济"的，也极其罕见。新病毒基本上是从感染另一种宿主的病毒演化而来。病毒的跨物种传播（interspecies transmission），可能因气候因素而导致。媒介生物性疾病（vector-borne disease，又称虫媒传染病）的流行与气候变化有密切关系[115]。全球气候变暖（global climate change）改变了虫媒的地区分布，可使原本没有传染病的地区出现新的疫情，如登革热的传播[116-118]及西尼罗河病毒的迁移（translocation）[119, 120]。气候的变化，还可以影响啮齿类动物的繁殖率（reproduction rate）、死亡率（mortality）和群体数量。1993/1994 和 1998/1999 年间美国南部汉坦病毒肺综合征（Hantavirus pulmonary syndrome，HPS）的暴发，据推测和厄尔尼诺-南方振荡现象（El Niño-Southern Oscillation，ENSO）有关。ENSO 带来的丰富降雨加快了植被的生长，为啮齿类动物提供了丰富的食物，从而增加了啮齿类动物的群体密度（population density），进而增加了汉坦病毒传播给人的可能性[121, 122]。另外，暴雪、洪水、海平面升高等对自然疫源地的破坏，可使水源性传染病等的发生率升高和*播散*。

造成生态环境和动物栖息地破坏的，不仅有极端的气候条件，同时还有人为的因素，如垦荒和农业集约化（intensive agriculture）、野生动物的捕食等人类的侵入和都市化（urbanization）。1998 年，马来西亚暴发的尼帕病毒（Nipha virus）疫情，是由于垦荒和养殖场的建立，侵入了食果蝙蝠的栖息地（habitat），病毒从食果蝙蝠跳跃到猪，然后由猪感染饲养工人从而引起流行[123, 124]。人类和热带丛林中野生动物的频繁接触，也增加了新发传染病出现的风险[125-127]。通过猎人、村民、矿工、林产品采集者和游客等，人类入侵到以前从未触及的地理区域，加强了与其中自由生活的动物的接触。马尔堡和埃博拉病毒暴发的不时出现，就是人类与未知的宿主物种密切接触的结果[128]。有研究表明，HIV 可能是 SIVcpz 于 1930 年从黑猩猩（chimpanzee）传染给人类，进而在全世界蔓延[129]。SIVcpz 跨物种跳跃的发生，正是由于人类捕食丛林野食（Bushmeat）将之带出非洲丛林而造成的恶果[130-132]。而 2003 年果子狸所携带的冠状病毒导致 SARS 的暴发流

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

行，更是给我们带来了沉痛而又深刻的教训[18, 133, 134]。

如上所述，新病原产生的原因非常复杂。但是在探究新发传染病的起源与传播时，应当将病原、宿主和环境当作一个生态上的连续统一体进行考量（**图 4.2**）[135]。新发传染病的出现与一系列潜在的偶然因素有关，包括在宿主和病原统一体中，野生动物、家养动物和人类之间以及他们与病原的相互作用。很少有疾病仅仅感染一个群体，宿主群体之间的相互影响、病毒与宿主之间复杂的进化关系，为病毒突破物种屏障和新发传染病的出现提供了条件。这方面的实例有很多，如犬瘟热从家养动物传播给野生动物，猫细小病毒跳跃到犬进而在野生犬科动物中的流行；莱姆病、汉坦病毒、埃博拉病毒和亨德拉病毒等从野生动物传染给人类；流行性乙型脑炎、流感等从家养动物传染给人；而狂犬病，在野生动物、家养动物和人类均有不同程度的流行。[135]

一个“新”的病原要突破物种屏障（species barrier），并在新物种中引起流行，虽然与潜在的偶然因素有关，但更是一系列事件和因素累积的必然结果。其中，储存宿主和“受体”物种（recipient species）的群体密度（population density）以及他/它们之间的接触频率（contact frequency）是影响跨物种传播的生态学上的重要参数。换而言之，只有当病原达到一定的丰度（abundance）时，才能“侵袭”新的物种，并在一定群体的新物种中适应（adaptation），最后可能引起流行（**图 4.3**）。而病毒的丰度则和储存宿主的群体大小和密度、迁移（mobility）、迁徙（migratory）和社会行为（影响储存宿主之间的接触频率）等有关。前面所叙述的汉坦病毒肺综合征病毒就是对这一模型的很好的阐释。而禽流感、猪流感等引起人类的感染，更是高密度的宿主群体及人与禽和猪之间高频率的接触的结果。

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

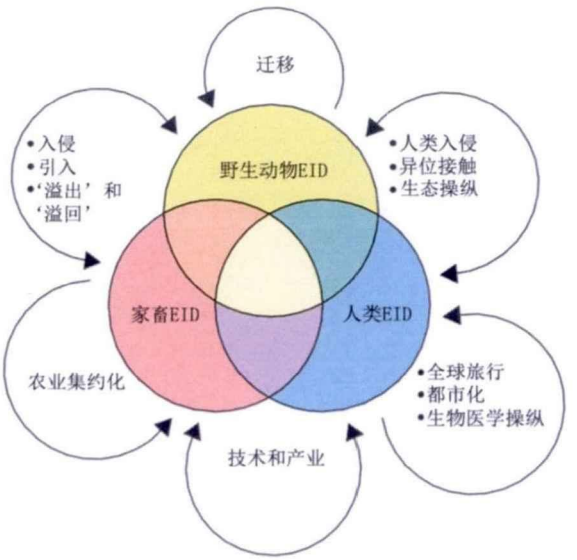


图 4.2 宿主-病原生态统一体[135]

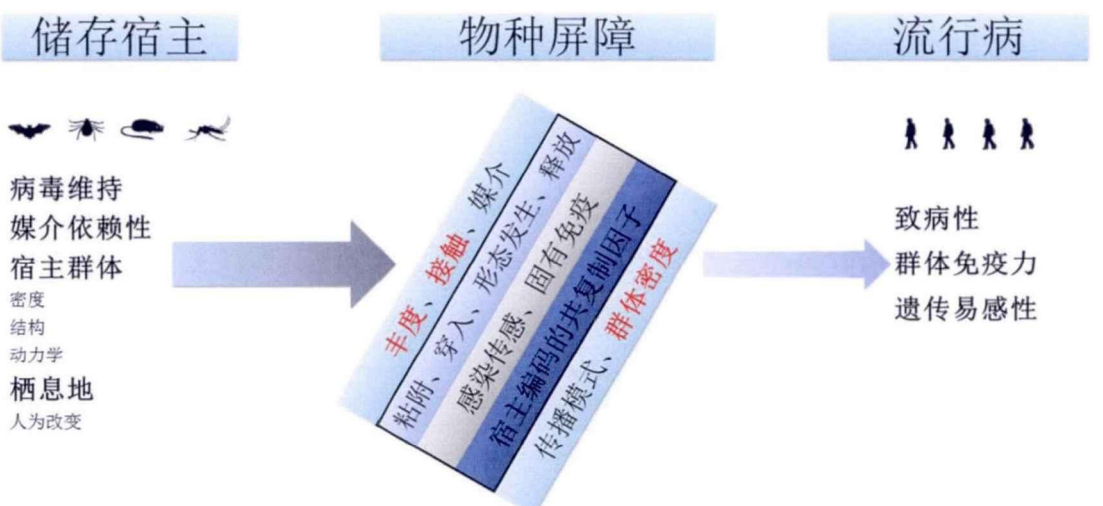


图 4.3 病原跨物种传播模式图。（1）图片来源于 http://www.virology-bonn.de/并进行了翻译和编辑；（2）"接触"：可指与动物的直接接触，如被咬伤等，也可指摄入动物排泄物污染的食物，还包括吸入含有病原的气溶胶等；（3）中间黑框部分图示的是病毒的复制周期和在新物种体内适应的过程。

跨越了物种屏障的病原要造成在人群中的流行，还与病原的致病力和传播模式、群体密度和免疫力以及群体易感性等因素有关（**图 4.3**）。有学者对病原跨物种传播的各个阶段（或称水平）描绘了一个更为详尽而直观的模型（**图 4.4**）[105, 136, 137]。

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

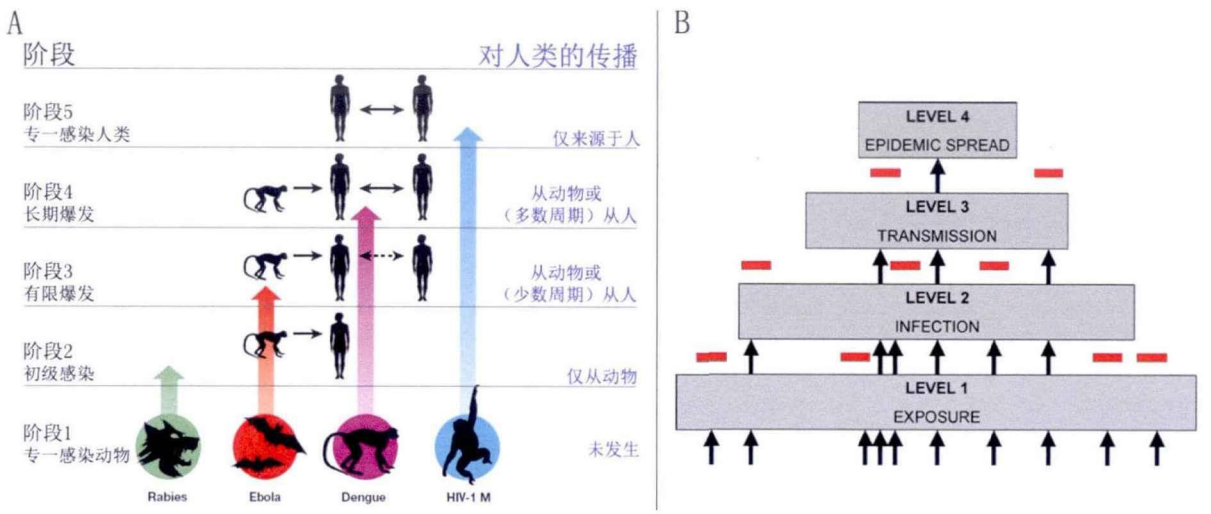


图 4.4 病原跨物种传播金字塔形图

说明：（1）图 4.4A 和 4.4 B 分别来源于文献[136]和[105]；（2）图 4.4 B 实际上是文献[105]对文献[136]的引用，从另一种形式来描述图 4.4 A；(3)图 4.4 B 中红色方块指生态学屏障(ecological barriers)。

诚然，诸如 HIV/AIDS、乙型肝炎病毒等（处于阶段 5）已经在人类流行并造成严重公共卫生问题的病原，始终是我们医疗卫生系统研究和防控的重点。但是，对于兔热病杆菌（土拉弗氏菌）、布氏罗得西亚锥虫（引起东非睡眠病）、尼帕病毒和西尼罗河病毒等(处于阶段 2)，鼠疫耶尔森氏菌、克氏锥虫(引起 Chagas disease，查加斯病)、埃博拉病毒、马尔堡病毒和猴痘病毒等（处于阶段 3），黄热病、登革热、布氏冈比亚锥虫（引起西非睡眠病）等（处于阶段 4）所有这些以及其他被忽视的病原，同样不容小觑。下一个带来灾难性爆发和流行的人类疾病，或许就是来源于这些病原。

第四节 野生动物在新发传染病跨物种传播中的作用

近年来，埃博拉、西尼罗河热、严重急性呼吸道综合征（SARS）和高致病性禽流感等一系列突出的公共卫生事件的发生表明，以野生动物为储存宿主（reservoir）的人兽共患病（zoonosis），不仅威胁着野生动物自身的生存，而且严重威胁人类的健康。野生动物在人兽共患病的发生、传播和流行中的作用，日益引起人们的关注与重视。对野生动物所携带病原的检测、分离与鉴定以及与疾病的相关性论证，成为当前研究的一个新的热点。

有学者对 1940～2004 年间全球的 335 例新发传染病进行了分析，发现 60.3%

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的新发传染病是由人兽共患病病原（zoonotic pathogens）造成，其中 71.8%的病原来自野生动物[138]。通过对表 1 中的病原进行详细分析，同样可以发现 80%的病原来源于动物。另有部分文献综述对感染人类的动物病毒[135, 139]以及目前已经明确的跨宿主传播（species jump）的病毒进行了分析（**表 4.2**）[105, 140-145]，结果表明人兽共患病原和一系列宿主载体（carriers）相关，包括有蹄动物、食肉动物、啮齿动物、蝙蝠、非人灵长类动物、鸟类和有袋动物等。特别是那些主要分布在高原、热带等特殊气候地理环境的某些重要野生动物，可携带和传播烈性和已知的重要病原体，造成重大公共卫生问题。

表 4.2 跨越了物种屏障并引起流行的病原

病原	原始宿主	新宿主	年份	地点
Australian bat lyssavirus	Fruit bats	Humans	1996	
Bacillius anthracis	Cattle		2001	USA
Borna disease virus	Horses			
Borrelia burgdorferi	Deer, mice		Endemic	USA
BSE/vCJD	Lopathies Cattle	Humans	1996	UK
Calicivirus	Swine, cattle			
Canine influenza virus	Horses	Dogs		
Novel cowpox	Cows	Human	2013	Georgia
FPLV/CPV	Cats or similar carnivores	Dogs	1970s	
Canine/Phocine distempervirus	Canids	Harp seals	1988	
	Harp seals	Harbour seals	Harbour seals1988	
Caninedistempervirus	Dogs	Lions	1994	
	Sledgedogs?	Crab-eatingseals	1955	
	Dogs/wildcanids?	LakeBaikalseals	1987/1988	
	Dogs/wildcanids?	Caspianseaseals	2000(disease)	
	Dogs/wildcanids?	Giant Panda	2014	China
Cantalago virus	Cattle			
Corynebacterium diphtheriae	Domestic herbivores?			
CCH	Sheep, hare		1994	Bulgaria
Dengue fever virus	Old World primates	Humans		
Ebola virus	Monkeys	Humans	1976	Sudan/DRC
			1995	DRC
			1996	Gabon
			2000	Uganda
Escherichia coli O157:H7	Cattle		1996	UK

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

FPLV/CPV	Cats	Dogs	1978	
H5N1 influenza A	Chickens	Humans	1997	
Hendra virus	Fruit bats	Humans/horses/Tree shrew	1994	Australia
Hepatitis B virus	Apes			
Hepatitis E virus	Deer	Humans	2003	
HEV	Swine			
HIV-1	Old World primates, chimpanzees	Humans	1930s	Global
HIV-2	Sooty mangabey			
Influenza A subtype pdmH1N1	Pig		2009	Northern Mexico
Influenza H5N1	Duck, quail		1997	Hong Kong
Influenza H7N9	Chicken	Human	2013	Mainland China
Influenza virus	Water birds	Humans, pigs, horses	~1910-1916; ~1957; ~1968	
Lassa fever virus	Rodent		1977	Liberia/Sierra Leone
Marburg virus	Monkey	Chimpanzees and humans	1975	Germany
Measles virus	Cattle/dog/Sheep/goat?	Humans		
Menangle virus	Fruit bats	Pigs, human	1997	
MERS Coronavirus	Fruit bats	Camel, human	2012	Saudi Arabia
Metapneumovirus	Birds			
Monkeypox	Rodent/Prairie dogs	Humans	2003	USA
Mumps virus	Mammals (pigs?)			
Myxoma virus	Brush rabbits and Brazilian rabbits	European rabbits	1950s	
Nipah virus	Fruit bats	Humans (via pigs, or direct bat-to-human contact)	1998	Malaysia
Parrot adenovirus	Parrot	Human	2014	Hong Kong
Plasmodium falciparum	Birds?			
Plasmodium vivax	Asian macaques			
Rickettsia prowazeckii	Rodents			
Rinderpest	Eurasian cattle	African ruminants	Late 1800s	
Rotavirus	Swine, cattle			
Sabia virus	Unknown		1994	Brazil
SARS coronavirus	Bats/Palm civets/raccoon dog		2003	Viet Nam, China, Singapore, Thailand, Canada
Sin Nombre virus	Rodent		1993	USA

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

SIVcpz/HIV-1	Chimpanzee	Human	1983	
SIVmac/HIV-2	Macaques	Human	1986	
Smallpox	Cattle/camels?	Human		
Titi monkey adenovirus	Monkey	Human	2010	USA
Toxocara canis	Dog		Sporadic	Worldwide
Trypanosoma brucei subspp.	Wild ruminants			
Variola virus	Ruminants (camels?)			
VEEV	Horse		1995	Mexico
West Nile virus	Bird		1999	USA
Yellow fever virus	African primates		Endemic	Africa
Yersinia pestis	Rodents		1994	India

说明：（1）数据来源于文献 6 和 40-45，并进行了适当整理；（2）CCH：Crimean-Congo hemorrhagic fever virus；FPLV：Feline Panleukopenia virus；CPV：Canine Parvovirus; VEEV: Venezuelan equine encephalitis virus；DRC：Democratic Republic Of Congo；（3）新宿主中空缺未填写部分，均指"人类"（humans）。

综上所述，随着全球化和工业化发展、气候和环境的恶化，新发传染病的不断出现所带来的公共卫生问题日益凸显。因此，针对新发传染病的监测和控制变得极为重要。鉴于新发传染病病原组成纷繁复杂，影响新病原出现的因素和机制变化多样；同时，我国幅员广阔且境内野生动物资源丰富，自然储存宿主种类繁多，动物源性病原体的携带情况非常复杂，给我们的疾病预防控制工作带来严峻挑战。因此，尽早研究和探索野生动物携带的病原体及其致病性，探究病原的传播媒介和传播链，阐明病毒跨种间感染与致病的分子基础，可为应对、预防和控制未来可能发生的动物源新发传染病，提供理论和技术支持。

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

第五章 蝙蝠与新发传染病

新发传染病（Emerging infectious diseases）相关病原在全球范围内不断出现，严重威胁着人类健康，并给公共卫生造成了沉重的代价[146]。1980 年以来，新出现的病原体至少有 90 多种，并以每年新增多种的态势发展[138, 147]。

新发传染病的发生，通常是感染一种宿主的病原突破了物种屏障（species barrier），跳跃到另一种宿主或群体中并引起感染。促使病原跨物种传播的因素主要分为自然环境因素和人为因素两大类[105, 140, 148]。首先，媒介生物性疾病（vector-borne disease，又称虫媒传染病）的流行与气候变化的关系非常密切[115]。全球气候变暖改变了虫媒的地区分布，可使原本没有某些传染病的地区出现新的疫情，如登革热的传播[116-118]及西尼罗河病毒的迁移等[119, 120]。气候的变化同时可以影响啮齿类动物的繁殖率、死亡率、群体数量和密度。研究表明1993-1994和1998-1999年间美国南部汉坦病毒肺综合征的暴发与厄尔尼诺-南方振荡现象（El Niño-Southern Oscillation，ENSO）有关。ENSO带来的丰富降雨加快了植被的生长，为啮齿类动物提供了丰富的食物，从而增加了啮齿类动物的群体密度，进而增加了汉坦病毒传播给人的可能性[121, 122]。其次，在人为因素中，垦荒和农业集约化、野生动物的捕食等人类的侵入及都市化，造成生态环境和动物栖息地的破坏，同样能够引起病原的跨物种传播和新发传染病的发生。1998年，马来西亚暴发的尼帕病毒（Nipah virus）感染，是由于垦荒和养殖场的建立，侵入了食果蝙蝠的栖息地，病毒从食果蝙蝠跳跃到猪，进而感染饲养工人而引起的流行[123, 124]。人类与热带丛林中野生动物的频繁接触，也增加了新发传染病出现的风险[125-127]。通过猎人、村民、矿工、林产品采集者和游客等，人类侵入到以前未曾触及的地理区域，加强了与其中自由生活的动物的接触。马尔堡和埃博拉病毒出血热的不时暴发，就是人类与未知的宿主物种密切接触的结果[128]。人免疫缺陷病毒（HIV）可能是猿猴免疫缺陷病毒（SIV）于1930年左右从黑猩猩（chimpanzee）传染给人类，进而逐渐在全世界蔓延[129]。

第一节 流感和冠状病毒的跨物种传播

流感病毒和冠状病毒是两种典型的跨物种传播病原体。特别是进入二十一世

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

纪以来，这两种病毒不论是在我国还是在全球范围内都曾引起人际感染的爆发甚至大流行，对其监测的意义比较重大。两种病毒的宿主范围都非常广泛，野生动物、家养动物和人类均能感染和发病。

流感病毒是一种多节段的RNA 病毒，变异快，不同物种来源的病毒之间的重组/重配现象频繁发生。研究表明，流感大流行通常与动物流感病毒有着密切关系。引起1918年“西班牙大流感”的H1N1流感病毒来源于欧亚大陆的禽流感病毒，该病毒的8个片段全部是禽源[149]；造成1957年“亚洲大流感”以及1968年“香港流感”的流感病毒的部分基因片段都是来自于水禽[150, 151]。2009年以来引起全球流感大流行的的甲型H1N1流感病毒的部分基因则是由猪源、禽源及人源流感病毒重配的新型流感病毒，其PB2和PA基因来源于北美禽流感病毒，PB1 基因源于人H3N2流感病毒，HA、NP和NS基因源于经典的猪流感病毒，NA和M基因则源于欧洲“禽样”猪流感病毒[152-154]。

和流感病毒不同，冠状病毒的跨物种传播在动物群体中并不多见。但是，从动物冠状病毒跨物种引起的人类感染往往是高致病性的。目前发现感染人类的冠状病毒229E、OC43、NL63、HKU1、SARS-CoV、人类肠道冠状病毒4408以及最近发现的MERS-CoV中，相当一部分为跨物种传播疾病。2002～2003年SARS冠状病毒暴发引起的严重急性呼吸道综合征在全球29个国家和地区造成8422个病例并造成916人死亡。最初的研究表明SARS冠状病毒是由果子狸传播给人类的。然而，对饲养的和野生的果子狸的研究，结果显示果子狸并非 SARS 冠状病毒的自然宿主。在SARS冠状病毒的传播中，果子狸可能仅作为中间宿主而存在，或称之为病毒增强宿主。2012年9月报道的中东呼吸道综合症，是由MERS冠状病毒引起。研究表明MERS冠状病毒在骆驼体内同样能够检测到，骆驼也可能是作为中间宿主在病毒的传播中发挥作用。最近研究证实MERS冠状病毒利用在哺乳动物中非常保守的DPP4（又称为CD26）作为功能性受体。另有研究证明MERS 冠状病毒能够感染一系列哺乳动物细胞，如人类、猪、猴子和蝙蝠等物种来源的细胞，表明MERS冠状病毒容易在不同物种之间进行传播。

第二节 蝙蝠的生物学和生态学特性

野生动物在跨物种传播疾病的发生、传播和流行中的作用日益引起人们的关

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

注与重视。有研究对1940～2004年间全球的335种新发传染病进行分析，发现其中71.8%新发传染病的病原来自野生动物[138]。对感染人类的动物病毒[135, 155]以及目前已经明确的跨宿主传播（species jump）的病毒进行的研究[105, 140-145]表明人兽共患病病原与一系列宿主载体（carriers）相关，包括有蹄动物、肉食动物、啮齿动物、蝙蝠、非人灵长类动物、鸟类和有袋动物等。其中，已知有三个目的动物最常将病原传播给人类，即蝙蝠、啮齿类动物和非人灵长类动物。

蝙蝠隶属于翼手目（Chiroptera），是唯一一类具有飞行能力的哺乳类动物。蝙蝠种类极其丰富，世界范围内存在的蝙蝠约有1240种，占现存的哺乳动物种类的20%[146]，是仅次于啮齿动物的第二大哺乳动物群体。翼手目进一步分为大蝙蝠亚目（*Megachiroptera*）和小蝙蝠亚目（*Microchiroptera*），又称为食果蝠和食虫蝠，共有19个科175个属。大蝙蝠亚目只有狐蝠科一个科，我国有1科5属7种；小蝙蝠亚目包括18个科，我国有6科24属100多种[156]。

表 5.1 蝙蝠种类、分布和食性

科（种类数目）	分布	食性
斯氏鼠耳蝠科（2）	南非	昆虫
凹脸蝠科（1）	泰国、缅甸	昆虫、蜘蛛
鞘尾蝠科（54）	遍布于热带	昆虫、间或水果
烟蝠科（2）	新热带区	昆虫
蹄蝠科（9）	旧热带区和亚热带	昆虫
假吸血蝠科（5）	旧热带区	节肢动物和小型脊椎动物
长翼蝠科（29）	旧热带区和亚热带	昆虫
犬吻蝠科（113）	遍布于热带	昆虫
髯蝠科（10）	新热带区	昆虫
短尾蝠科（2）	新西兰	昆虫和其他节肢动物；花蜜或水果
吸足蝠科（2）	马达加斯加	昆虫
长腿蝠科（12）	新热带区	昆虫
兔唇蝠科（2）	新热带区	昆虫；鱼
夜凹脸蝠科（16）	旧热带区	昆虫、蜘蛛、蝎子；鱼
叶口蝠科（204）	新热带区	动物和植物
狐蝠科（198）	旧热带区和亚热带	水果、花蜜、花粉
菊头蝠科（97）	旧热带区和亚热带	昆虫
鼠尾蝠科（6）	旧热带区	昆虫
盘翼蝠科（5）	新热带区	昆虫
蝙蝠科（455）	世界各地	昆虫和其他节肢动物；鱼；小鸟

蝙蝠是最古老的哺乳动物之一，现存最早的化石可将蝙蝠的起源追溯至5250

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

万年前（Mya，million years ago）[157]，在大多数现代哺乳动物演化之前，蝙蝠就已经进化出多个种属[158]。与其他类群的哺乳动物比较，蝙蝠在长期的进化过程中生物学特征上仅有很少的改变[159]。通过对哺乳动物基因组中的插入逆转录子（retroposon）进行分析[160]，以及对蝙蝠与其他多种动物的基因和蛋白序列进行比对和系统进化分析，表明蝙蝠和马亲缘关系最为接近，可能起源于同一个最近的祖先[161]。

蝙蝠的分布极为广泛，是除人类外分布范围最广的哺乳动物类群。大多数种类的蝙蝠生活在热带和亚热带地区。蝙蝠既栖息于自然环境，也可寄居于人造环境，大致可以分为洞穴型、房屋型和树栖型3类。在所有蝙蝠中，超过一半种类的蝙蝠专门或随机地以植物（树林、竹林、灌木等）作为栖息处（roosting sites），其他的则栖居于山洞、岩缝、矿井、坟地、桥梁、房屋及各种人工建筑物等[162]。因采食、产仔、冬眠以及躲避天敌的捕食等需要，蝙蝠对栖息处的忠诚度较低（roost fidelity），不同种类的蝙蝠，在不同季节里会选择不同的栖息地[163]。蝙蝠属群居动物，多种蝙蝠混居在一起比较常见。群居蝙蝠密度往往很大，如得克萨斯州南部的一个洞穴中，墨西哥无尾蝠（*Tadarida brasiliensis mexicana*）在产仔高峰时，约有2千万只蝙蝠聚集在一起，每平米个体数量达2700只[164]。

蝙蝠的食性广泛，大致有食虫性、食肉性、食鱼性、食血性和食果性等5类。大蝙蝠体型较大，主要取食水果，故又称食果蝠；小蝙蝠体型较小，身体结构特化，大部分以捕食昆虫为主，又称食虫蝠。许多种类的蝙蝠在季节性迁徙时会进行长距离的飞行。据报道，新西兰的一种小红狐蝠（*Pteropus scapulatus*）可以飞行320 公里；印度狐蝠（*Pteropus giganteus*）的飞行距离可达2000公里[165]。

某些温带蝙蝠的一个重要特征是它们能够具有蛰眠和冬眠能力，在夏天或气温较高的时候能进入短暂的日蛰眠(daily torpor)而在冬季进入季节性冬眠状态。在蛰眠和冬眠期间，体温最低能够下降至2～5℃，基础代谢率维持在很低水平以节约能量。哺乳动物中，平均寿命与代谢率/体重的比值之间存在相关关系，但蝙蝠是例外。在同等大小、体重的哺乳动物中，蝙蝠比大多数其他的哺乳动物的平均寿命要长。小蝙蝠亚目中有许多小的温带蝙蝠种群，其个体寿命超过25年。有记录的最长寿的是一种小棕蝠，寿命长达35年。

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

对蝙蝠的免疫系统目前尚不完全清楚。蝙蝠作为最早演化的哺乳动物之一，它们的先天和获得性免疫反应与目前已经进行了广泛研究的啮齿类和灵长类动物的免疫反应可能存在重要差异。能够引起研究者极大兴趣的一个领域是冬眠或蛰眠时的免疫状态的变化。针对其他哺乳动物的研究表明，冬眠能同时影响先天和获得性免疫系统。据认为，蝙蝠的免疫功能在休眠期间也减弱了。冬眠期间明显的免疫抑制，在宿主的能量保存方面可能是有益的。同时，由于大多数病毒在低温下不能充分复制，建立生产性感染的机会很小。目前，蝙蝠免疫学的研究重点大多集中在与人类或小鼠基因的同源基因上，这些基因在先天免疫中的重要性已经明了，包括干扰素[166-168]、细胞因子[169]、Toll样受体[170]以及STAT1分子[171]等基因。也有对抗体基因的基本结构和功能进行了研究[172]。有研究表明蝙蝠的免疫反应与那些在蝙蝠之后进化的哺乳动物的免疫反应有一些相似之处。例如，已经从大的食果蝙蝠（*Artibeus lituratus*）的血清中纯化出免疫球蛋白G（IgG抗体），IgA和IgM[173]。在印度狐蝠（*Pteropus giganteus*）骨髓中鉴定出巨噬细胞、B-和T-淋巴细胞样细胞以及表达表面Ig的细胞。结果表明，在蝙蝠和其他哺乳动物中，淋巴发育通常是相似的[174, 175]。虽然和其他的哺乳动物比较，在这些研究的蝙蝠基因中，某些基因存在细微的差别，但是其生物学意义有待阐明。

综上所述，蝙蝠具有一些独特的生物学和生态学特征，而这些特征决定了它们是自然界中很多病毒的理想的储存宿主：1）蝙蝠是最古老的哺乳动物，在蝙蝠体内进化的病毒可以利用高度保守的细胞受体，增强其传播病毒到其他哺乳动物的能力；2）蝙蝠是除人类外分布范围最广的哺乳动物类群，遍布世界各地。因此，为病毒的存在提供了一个很大的"滋生地"。栖息地多样，食性复杂，为了采食可以飞行很长的距离，并且某些蝙蝠物种能够迁移数百公里到越冬或冬眠的场所。因此，蝙蝠有更多的机会与不同地理位置的其他动物物种及人类进行直接或间接接触，从而提高了病毒的跨种间传播的机会。3）多种蝙蝠群居现象很常见，种群规模大，高密度的种群有利于病毒在不同蝙蝠个体之间传播，从而促使病毒在整个种群中持续存留，同时又可持续排毒。4）蝙蝠具有超长寿命，某些种类的寿命长达25-35年，有助于慢性持续性感染的传播。某些蝙蝠物种具有在冬天冬眠（hibernation），或者其他季节进入日蛰眠（daily torpor）的能力，以降低能量的消耗。体温和代谢速率的降低，使得蝙蝠体内病毒的增殖变得比较缓慢，

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

并且机体不会针对病毒产生剧烈的免疫反应，从而延缓了病毒从蝙蝠种群中清除的速度。

第三节 蝙蝠体内携带的重要病原

早在20世纪20年代，在南美洲和中美洲蝙蝠体内鉴定出狂犬病毒，研究者们就开始意识到蝙蝠可能是某些感染人类的病毒的储存宿主。随后，越来越多的病原发现具有蝙蝠疫源性，其中备受瞩目的有亨德拉病毒、尼帕病毒、丝状病毒（埃博拉和马尔堡病毒）和SARS冠状病毒等。随着病毒检测技术的提高，最近20年内，新发现的蝙蝠源性病毒的数量大大增加。目前在蝙蝠组织中分离或检测到的病毒至少有173种，分属于28个不同的病毒科（**表5.2**），其中至少61种是人兽共患病毒[176, 177]。

表 5.2 蝙蝠体内分离到的病毒

病毒科	数量
腺病毒科（*Adenoviridae*）	3
沙粒病毒科（*Arenaviridae*）	1
星状病毒科（*Astroviridae*）	Many
博尔纳病毒科（*Bornaviridae*）	1
布尼亚病毒科（*Bunyaviridae*）	22
杯状病毒科（*Caliciviridae*）	1
圆环病毒科（*Circoviridae*）	Many
冠状病毒科（*Coronaviridae*）	32
双顺反子病毒科（*Dicistroviridae*）	1
丝状病毒科（*Filoviridae*）	3
黄病毒科（*Flaviviridae*）	24
嗜肝病毒种（*Hepadnaviridae*）	5
肝炎病毒科（*Hepeviridae*）	1
疱疹病毒科（*Herpesviridae*）	Many
野田病毒科（*Nodaviridae*）	1
正粘病毒科（*Orthomyxoviridae*）	2
乳头瘤病毒科（*Papillomaviridae*）	2
副粘病毒科（*Paramyxoviridae*）	15
细小病毒科（*Parvoviridae*）	4
小双节段 RNA 病毒科（*Picobirnaviridae*）	1
小 RNA 病毒科（*Picornaviridae*）	6
多瘤病毒科（*Polyomaviridae*）	1
痘病毒科（*Poxviridae*）	2

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

呼肠孤病毒科（*Reoviridae*）	14
逆转录病毒科（*Retroviridae*）	3
弹状病毒科（*Rhabdoviridae*）	18
披膜病毒科（*Togaviridae*）	6
全病毒科（*Totiviridae*）	1

说明： 1）数据来源：The Database of Bat-associated Viruses (DBatVir)；2）统计数字不完全精确。

虽然目前研究认为水禽是A型流感病毒主要的自然储存宿主，但近年来蝙蝠体内检测到流感病毒亦受到人们的重视[178]。1979年，俄国文献报道从哈萨克斯坦褐山蝠中分离到流感病毒A/H3N2[179]。1981年，血清学证据表明印度境内多种蝙蝠感染A/H3N2流感病毒[180]。这些结果表明蝙蝠可能对流感病毒易感，但是流行病学研究中通常不将其作为自然界中一个有意义的储存宿主来考虑。然而，2009年，Tong等在危地马拉的一种食果的黄肩蝠（*Sturnira lilium*）体内检测到了一种新型流感样病毒，并将其命名为H17N10，该流感样病毒所有8个基因片段与目前已知的A型流感基因片段都存在明显差异[181]。2013年，Tong等再次在秘鲁的扁吻美洲果蝠（*Artibeus planirostris*）中发现一种新的流感样病毒H18N11，基于重组H18蛋白的血清学检测证据表明秘鲁境内多种蝙蝠感染了H18N11流感样病毒。对这两个亚型流感病毒进行深度分析表明流感样病毒在蝙蝠体内已经进行了长期的进化[182]，同时也说明蝙蝠如果水禽一样，在自然界中作为流感病毒的潜在宿主而存在。最近有研究利用重组H1～H18血凝素蛋白芯片对100份2009年～2010年间在加纳采集的黄毛果蝠（*Eidolon helvum*）血清进行筛查，初步结果表明30%的受检血清呈H9甲型流感阳性，部分血清与H8和H12亚型具有一定程度的交叉反应。鉴于H9流感病毒可引起人类感染，因此蝙蝠在流感流行中的作用和地位，值得我们进一步关注。

近年来，新型冠状病毒的爆发和流行也使得人们认识到蝙蝠可能作为某些感染人类的冠状病毒的自然宿主具有重要意义。目前，大量的研究证据表明，感染人类的所有冠状病毒229E、OC43、NL63、HKU1、SARS-CoV、人类肠道冠状病毒4408以及最近发现的MERS-CoV可能均来源于蝙蝠。对SARS冠状病毒的溯源性研究表明其最可能的潜在宿主是菊头蝠属蝙蝠[72, 76]。在对SARS冠状病毒溯源的研究中，广泛多样性的SARS-like冠状病毒在不同地域的不同蝙蝠群体中相继发现，系统发育分析表明这些病毒分布在不同的蝙蝠进化群/系中[86, 183, 184]。

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2013年，Ge等的研究为中华菊头蝠（菊头蝠科）作为SARS冠状病毒在自然界中的储存宿主提供了强有力的证据，并且证明在SARS冠状病毒的传播中，无需中间宿主的存在[22]。而同一种类的蝙蝠中混合感染两种不同冠状病毒现象的存在，为重组病毒的产生和冠状病毒多样性提供了生态基础[185]。2012年，中东国家暴发的人感染新型冠状病毒病例证实为MERS冠状病毒感染引起的，系统进化分析表明MERS冠状病毒属于Beta冠状病毒属，与感染扁颅蝠（*Tylonycteris pachypus*）的蝙蝠冠状病毒HKU4和感染伏翼蝠（*Pipistrellus pipistrellus*）的HKU5极为相似[27, 186]。最近，从南非蝙蝠（蝙蝠科）的粪便中鉴定出一株高度相似的MERS 样冠状病毒[28]，而对沙特的蝙蝠样本进行筛查和分析，其中一只蝙蝠样本中的病毒基因片段与来源于病人的病毒基因片段的同源性为100%[31]。这些证据表明蝙蝠也可能是MERS冠状病毒的自然宿主之一。目前的研究结果显示，蝙蝠冠状病毒的多样性比其他动物冠状病毒更为广泛。因此有必要对我国蝙蝠可能携带的冠状病毒以及流感样病毒进行系统检测和进化分析，了解蝙蝠作为相关病毒自然宿主的潜在地位。

第四节 蝙蝠在疾病根除计划中的作用

作为多种疾病的自然宿主，蝙蝠是否可能作为人类疾病根除计划中的潜在残留的疾病库，有必要对其进行监测。1980年，世界卫生组织宣布在全球范围内根除天花（eradication），这是人类历史上第一个根除的疾病。天花的根除，为全球的公共卫生事业带来深远的影响和实践意义。借鉴于天花根除的经验，世界卫生组织正在全球范围内努力根除脊髓灰质炎和麦地那龙线虫病（又称为几内亚线虫病，dracunculiasis/Guinea worm disease）。2008年，卡特中心国际疾病根除工作组（WHO的一个下属组织）宣布了另外5种潜在可根除的（potential eradicable）疾病，以及9种不能根除、但是疾病或发病条件的某些方面可被消除（elimination）的疾病。其中，由病毒引起的有麻疹、腮腺炎、风疹、乙型肝炎和狂犬病。脊髓灰质炎病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒和风疹病毒具有一些共同特点：1)无动物宿主，感染与发病仅限于人类；2)血清型单一；3)疫苗稳定有效。因此，具备根除的前提条件。而乙型肝炎和狂犬病，因传播途径特殊，并且疫苗可靠有效。因此，在一定国家和地域范围内可被消除。

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

但是，在制定疾病根除/消除策略和计划时，必须考虑到另外两个方面的因素：1)自然界非宿主动物中，是否存在相关病毒；2)疾病根除/消除之后（post-eradication），是否会发生动物相关病毒跨物种感染人类。而蝙蝠极有可能是这些病毒或相关病毒的在自然界中的储存宿主。2012年，Drexler等通过二代测序，在蝙蝠体内发现了几种未知的麻疹病毒。22只非洲黄毛果蝠的脾脏样本中，21只检测呈阳性高浓度的麻疹相关病毒[187]。这些蝙蝠相关麻疹病毒（morbilli-related virus）是否具备感染人类及其他物种的能力，还有待确定。同时，在这项研究中，从狐蝠和食虫蝙蝠的脾脏中鉴定出一种病毒，通过对其进行全基因测序和序列分析，表明这株病毒与人腮腺炎病毒高度相似（90%以上），是同一种病毒。对蝙蝠血清进行免疫荧光和交叉反应试验检测，结果表明这株蝙蝠相关腮腺炎病毒与人类腮腺炎病毒可能属于同一个血清型[187]。对于乙型肝炎病毒,2013年He等通过病毒宏基因组学方法，在缅甸蝙蝠体内发现了一种新的肝炎病毒，并通过负染电镜方法在蝙蝠肝脏组织中观察到肝炎病毒粒子。基因组测序发现该病毒与已知的人类乙肝病毒同源性约为64%[188]。同样是在2013年，Drexler等对11个科54个种的蝙蝠的3080份样本（来源于7个国家）进行筛查，在10份巴拿马和加蓬蝙蝠样本中分离到3种嗜肝DNA病毒。一系列试验表明，这些病毒在蝙蝠体内具有肝脏组织趋向性，并且能够与人类乙肝病毒抗血清进行交叉反应。全基因组测序和进化分析，结果表明这些病毒与感染人类的乙型肝炎病毒具有共同的进化祖先[189]。同时,蝙蝠也是狂犬病病毒的自然宿主[190]，吸血蝙蝠咬伤和狂犬病之间的相关性已经明确。因蝙蝠咬伤所引起的狂犬病发作和死亡，在南北美、欧洲、澳洲和非洲时有发生，尤其是在乡村地区。因此，在蝙蝠群体以及疑似其他动物群体中对这些病毒进行筛查，对疾病根除计划的有效实施具有重要意义。

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

第六章 新病毒发现技术

上个世纪，传统的病毒学方法在病毒发现和病原鉴定中作出了显著贡献，如以组织细胞培养（tissue/cell culture）、电镜形态学（electronic microscopy）、血清学和免疫学为基础的方法。随着技术的发展，现代分子生物学方法如聚合酶链式反应（PCR）、差减杂交（subtractive hybridisation techniques）和芯片分析（microarray）等在临床病毒实践中发挥着越来越重要的作用。新出现的以宏基因组学（metagenomics）为基础的方法能够从临床样本中直接分析 DNA 或 RNA 遗传物质，从而避免了繁琐而费时的组织培养和基因克隆，也无需预先知道病原的背景信息，因此在病原鉴定中非常适用。近些年问世的新一代测序技术（Next-generation seqeuncing，NGS），极大地提高了测序的速度和效率，推动了病毒诊断的宏基因组方法在临床中的广泛应用。技术的进步，在病原的快速诊断和疾病的预防控制中发挥越来越重要的作用。

第一节 病毒发现的传统方法和技术

1907 年解剖学家 Ross Harrison 发明了组织培养技术，随后 Karl Landsteiner 和 Erwin Popper 于 1909 年利用该技术在动物细胞中成功增殖脊髓灰质炎病毒（Poliovirus）[191]。在病毒学发展前期，用于病毒检测和发现的有效手段不多，许多病毒都是通过组织细胞培养的方法来发现。然而，一个多世纪以来，病毒培养仍然是病毒发现的金标准[192]。

在新病毒发现研究中，组织和细胞培养是获得活病毒的唯一途径。病毒培养物的获得能便于对这些病毒进行形态学和生物学特性等方面进行研究，包括生长动力学、细胞和组织特异性、受体利用、血清学特性、宿主范围、致病机制和动物模型等，这些研究在疾病因果关系的追溯和论证中能提供很大帮助。同时，如果病毒培养成功，能对诊断技术的建立和完善，以及灭活或减毒疫苗的研发提供支撑[193]。

尽管病毒培养方法具有很多优势，但是仍然有其局限性。这种局限性在丙型肝炎病毒（Human hepatitis C virus，HCV）的发现上得以充分体现[194]。虽然 HCV 的核酸首次于 1989 年在血液样本中发现，但是直至十多年后才最终在细胞上培

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

养成功[193]。新检测到或新发现的病毒，因其生长条件未知，要想将病毒中样本中分离培养出来，往往只能采取不断尝试的方法对其进行培养。培养成功与否，面临的挑战在于能否找到容许病毒侵入和复制的合适细胞系。通常前者需要适当的受体和/或辅助受体，而后者需要适当的宿主因子以支持病毒的转录、复制、装配和释放等[195]，并且在病毒培养的过程中，胞内不能有限制因子存在。

机体在病毒感染时，在不同的组织器官上能表现出某些临床症状，这些表观症状对选择哪些种类的细胞系进行病毒分离具有一定的指导意义[196]。但是实际操作过程中，应当将样本接种尽可能多的细胞系。通常我们至少选择 6 种以上来源于不同组织器官的细胞，并选择尽可能宽的宿主范围[196]。针对某个特定的病毒进行分离时，有时即使偶然选择了适当受体和辅助受体的易感细胞，新病毒的分离可能同样受限于许多其它理化因素，如病毒和细胞表面不理想的静电相互作用，活病毒在体外可能无法粘附细胞并进一步结合细胞表面受体[196, 197]。这个问题通常可以通过对接种物使用阳离子脂质体和聚合物等进行预处理来加以克服。多个实验室的经验证明这种方法能够提高某些病毒的感染性、CPE 和病毒蚀斑的大小[196, 198, 199]。

在病毒分离试验中，对样本进行胰酶处理，或者在培养的过程中添加一定浓度的胰酶是我们经常需要考虑的问题。甲苯磺酰-苯丙氨酸氯甲基酮（Tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone，TPCK）处理后的胰酶能够防止自身降解。TPCK 处理的胰酶能够对病毒表面糖蛋白进行水解剪切并使其激活，从而极大提高它们在体外的感染性[196]。对于某些 RNA 病毒而言，病毒表面糖蛋白的剪切是它们进行细胞结合和融合的先决条件，如冠状病毒粒子表面的 spike 蛋白需要剪切成 S1 和 S2 亚单位之后才具有侵染力。近年来美国和中国大陆流行的一株新的猪流行性腹泻病毒（Porcine deltacoronavirus）在猪群中造成严重疾病。在分离这株病毒时，通常需要使用 TPCK-胰酶对样本进行预处理[200, 201]。同样，在分离流感病毒的某些毒株时，通常也需要在培养基中添加一定浓度的胰酶[202, 203]。

值得注意的是，固有免疫应答（innate immune response）的诱导和激活，阻碍了病毒在胞内的转录、复制和/或蛋白合成，是造成病毒培养难以成功的障碍。解决这一问题只能依赖于某些细胞系的使用，使这些先天免疫因子得以抑制，如

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

vero 细胞是干扰素缺陷的，感染了病毒的 vero 细胞不会分泌 alpha 和 Beta 干扰素，因此适合用于许多病毒的分离培养[204]。为了能够实现更多的病毒在细胞上分离，未来可以尝试建立更多的功能缺陷的细胞系。

鉴于难以找到合适的培养条件，目前 99%的微生物（包括细菌、病毒和真菌等）在体外难以培养增殖。3D 细胞培养（3 Dimension Cell Culture）是近年来发展起来的一种新型组织细胞培养技术，能够在形态和功能上模拟组织细胞在体内的自然生长和分化环境，使培养的细胞在体外呈现空间立体方式生长，形成类似于体内的组织结构。3D 细胞培养可用于难培养病毒的体外扩增，同时也可为研究病毒与细胞、病毒与宿主间的相互作用机制提供便利[205]。国内外有实验室通过 3D 细胞培养技术在体外成功增殖引起呼吸道感染的人博卡病毒（Human bocavirus）和人冠状病毒 HKU1（Human coronavirus HKU1）等。

当在细胞培养中所有尝试和努力均告失败时，进行病毒增殖唯一可能的途径是动物接种（animal inoculation），比较常见的是裸鼠脑内接种。动物接种具有一定的优于细胞培养的优点：1）不需要复杂的仪器设备；2）能够模拟自然感染途径；3)技术简单并且容易成功。在一个易于操作和控制的动物模型(animal model)中，如果病毒能够感染，并且接种的病毒能在该动物机体内进行有效复制，针对该病毒感染、物种和组织趋向性以及病毒致病性等方面的研究就可以很容易进行[193]。

第二节 新病毒发现的分子生物学技术

随着聚合酶链式反应（PCR）及重组 DNA 技术的出现，各种不同的病毒发现的分子技术得以广泛应用，包括 cDNA 克隆、简并引物 PCR（Degenerate PCR Assay）、基因芯片、差减杂交和代表性差异分析（Representative Display Assay，RDA）、DNA 酶处理-序列非依赖性单引物扩增技术（DNase-sequence-independent single-primer Amplification，DNase-SISPA）和 cDNA 扩增片段长度多态性为基础的病毒发现（Virus Discovery Based on cDNA-Amplified Fragment Length Polymorphism，VIDISCA）等。普通和简并引物 PCR 及基因芯片等方法简单而敏感，但是依赖于已知的核酸序列，仅能鉴定那些与已知病毒密切相关的病毒；差减杂交不依赖于序列，但是技术上非常繁琐；DNase-SISPA 和 VIDISCA 同样

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

不依赖于已知序列，随机扩增后可辅以克隆后测序，一定程度上受限于测序深度，但是经证明在某些高度差异的病毒的发现中行之有效。

简并引物 PCR 检测技术

在扩增和鉴定与已知蛋白相关的蛋白编码基因时，简并引物 PCR 检测技术得到了广泛应用，例如鉴定某一蛋白家族中的新成员或来源于不同物种的、功能上同源的基因时，经常会用到这一技术。在新病毒发现过程中，这一技术也可用于检测在进化上与已知病毒相关的新病毒基因组。因此，在鉴定某一病毒科、亚科或者属中的新成员时，简并引物 PCR 检测技术非常实用。

简并引物 PCR 检测技术使用的是混合引物，这些引物主要针对病毒编码基因中最为保守的氨基酸基序（conserved motif），包含了这些基序所对应的大部分或所有的核苷酸序列。设计简并 PCR 试验时，第一步是要明确在某一病毒科或属的所有成员中均保守的蛋白，这一步需要有病毒学知识和经验上的积累，必须充分了解这个病毒科成员所编码基因的属性。明确了保守蛋白后，需要对所有能够得到的氨基酸序列进行比对，并鉴定出序列中的保守模块（block），通常保守的五肽（pentapeptide）在简并引物设计中非常理想。简并的核苷酸序列是从氨基酸序列中反译（back translate）得到的，包含了编码五肽的所有可能的序列。在设计简并引物时，有一个参数不可忽略--简并率（degeneracy，引物混合物中不同引物的数量）。简并率依赖于每个氨基酸的密码子（codon）数量。甲硫氨酸和色氨酸只有一个密码子，而亮氨酸、丝氨酸和精氨酸有 6 个密码子。因此，引物设计时优先选择含有甲硫氨酸或色氨酸的保守肽，而不是含有亮氨酸、丝氨酸和精氨酸的序列。简并引物 PCR 的敏感性（sensitivity）与引物的简并率成反比，因此为了保证 PCR 具有足够的灵敏度，引物的简并率应尽可能小于 128。

为了增加 PCR 扩增效率，设计简并引物时需要在引物的 5'-末端加上一个非简并的夹板序列（clamp sequence），这样有助于引物与反应过程中产生的 PCR 产物进行退火结合。夹板序列的设计通常有两种不同的策略，使用在线软件 CODEHOP 进行设计时，依据靶标序列（target sequence）旁侧的氨基酸序列进行简并[206, 207]；而我们手工设计简并引物时，夹板序列来源于病毒基因中相应位置上的核苷酸共有序列（consensus sequence），并对个别位置上的碱基根据需要

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

进行调整，以保证合理的较高的引物 Tm 值。由于夹板序列与病毒基因组模板同样具有一定的同源性，在 PCR 反应开始的几个循环，能够稳定引物的结合。第一轮 PCR 以较低的退火温度进行以使简并序列与模板充分退火结合，随后提高退火温度以方便 PCR 产物的特异性扩增。

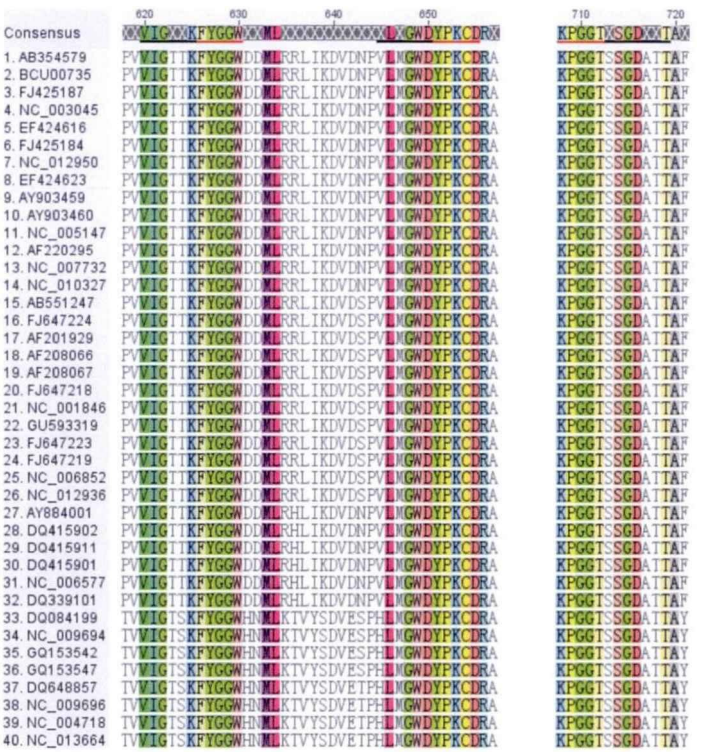


图 6.1 基于 RdRp 蛋白序列的冠状病毒简并引物设计

我们实验室主要对蝙蝠、鸟类、老鼠以及医院呼吸科临床样本进行病毒/病原检测和鉴定，试图从中发现新的病毒。因此，目前我们设计了腺病毒（Adenovirus）、星状病毒（Astrovirus）、博卡病毒（Bocavirus）、流感病毒（Influenza virus）、冠状病毒（Coronavirus）、丝状病毒（Filovirus）、Henipah 病毒（Henipavirus）、麻疹病毒（Morbillivirus）、风疹病毒（Rubulavirus）和正呼肠孤病毒（Orthoreovirus）等 10 种病毒科或属的简并引物。随着以后工作的开展，将对其他病毒科的简并引物进行逐渐补充。图 6.1 和表 6.1 是我们根据冠状病毒 RdRp 序列通过简并策略设计的通用引物，通过这套引物进行半巢式 PCR（semi-nested PCR），理论上可以检测所有的冠状病毒（当然包括未知的冠状病毒）。目前，我们使用这套引物已经从蝙蝠样本中发现了一株新型冠状病毒。

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 6.1 冠状病毒科特异性简并引物

引物名称	引物序列	简并率	G+C	Tm	扩增长度
panCoVs-OF	TGTTATTGGAACCACGAAGTTYTAYGGNGGNTG	64	42.1	51.3	OF + OR = 299
panCoVs-IF	GTTT TGTTCTTATGGGTTGGGATTAYCCNAARTGYGA	32	42.1	52.3	IF + OR = 228
panCoVs-OR	TAGTAGCATCTCCGCTGCTAGTNCCNCCNGGYTT	128	52.6	53.4	

使用通用引物对样本进行检测以发现新病毒，另外一个途径是找到某个病毒科成员中最保守蛋白的基因序列，通过直接对核苷酸序列进行比对，从中找出最保守的区域（consensus sequence）并进行引物设计，以用于 PCR 检测和新病毒鉴定。同样，我们实验室通过这种方法在蝙蝠样本细胞培养上清中检测到一种正呼肠孤病毒变异株。

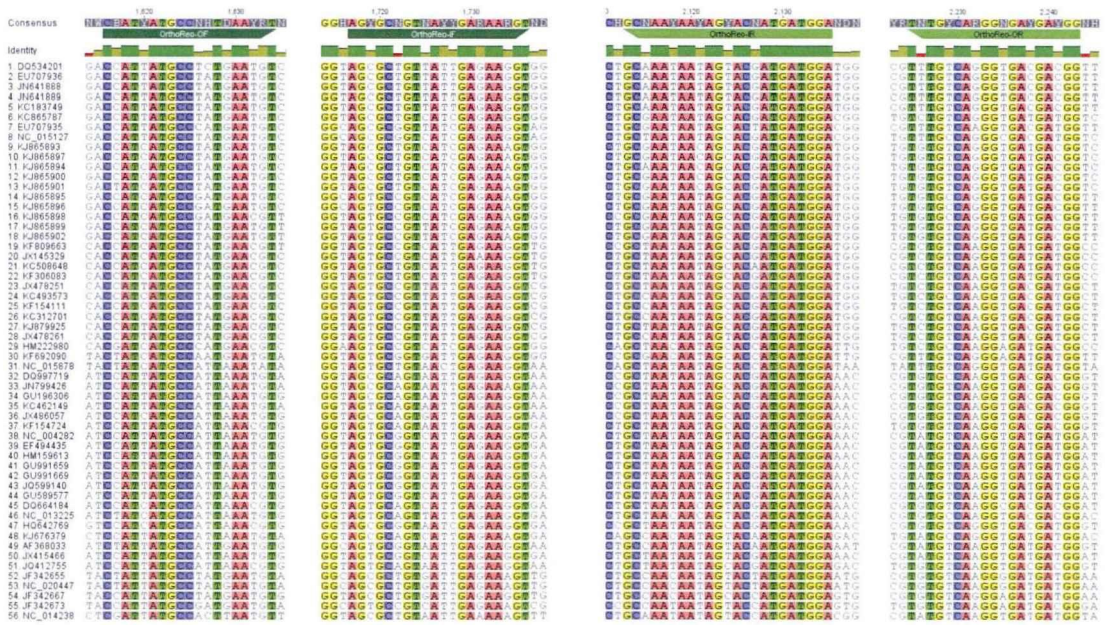


图 6.2 基于 L2 基因的正呼肠孤病毒通用引物设计

表 6.2 正呼肠孤病毒属特异性通用引物

引物名称	引物序列	简并率	G+C	Tm	扩增长度
OrthoReo-OF	CBATYATGCCNHTDAAYGT	432	41.2		**OF + OR = 628**
OrthoReo-OR	CCRTCRTCNCCYTGRCANA	256	57.9		
OrthoReo-IF	AGYGCNGTNATYGARAARGT	256	45		**IF + IR = 419**
OrthoReo-IR	TCCATCATNGTRCTRTTRTTNGC	128	41.3		

通过这两种方法设计的引物进行病毒检测，具有敏感、通用和易于操作等优

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

点，可用于样本的批量筛选。但缺点在于对可能检测分析的病原要有足够的背景知识，相关病毒要有足够的序列信息。

差减杂交技术

两份核酸样品之间的可以采用差异差减杂交技术来比较。由于病毒感染后，病毒所携带的核酸会在感染细胞中复制，因此，通过比较感染和未感染细胞中核酸的差异，就可以对病毒进行检测和分析。差减杂交技术可以用来检测 DNA 和 RNA 病毒。与简并引物 PCR 检测技术相比较，这种技术操作起来很困难也很繁琐，但是其优点在于扩增所使用的引物针对的是已知的接头序列，不需要预先知道所检测病原的背景知识[208, 209]。

差减杂交技术在实施过程中需要用到两种不同的样本：测试样本（tester sample）和驱动样本（driver sample）[208]。测试样本中可能包含我们感兴趣的靶序列。测试样本和驱动样本之间进行杂交，使核酸互补链之间进行退火，然后通过各种策略将测试样本中的单链分子或样本内部的杂交子拯救出来，最后通过 PCR 的方法扩增和富集（图 6.3）[210]。驱动样本和测试样本之间必须尽可能紧密匹配，以减少核酸组成的差异。对于使用 DNA 样品进行差减杂交，驱动样本应当来自同一个群体的非感染个体；而在 cDNA 差减杂交中，驱动样本应当和测试样本来自相同细胞类型（在分化的同一阶段）。当核酸的复杂程度低和杂交反应接近完成时，差减杂交的效果最好。体液（如血清）和细胞培养上清，是用于病毒发现的复杂程度最低的样本[208]。

在使用差减杂交的方法筛查蝙蝠样本中存在的新病毒时，我们必须意识到虽然蝙蝠携带了许多不同的病毒，例如 SARS-like 冠状病毒和丝状病毒等，但是由于蝙蝠免疫系统的独特性，这些病毒对蝙蝠并不具有致病性，表观上无法区分感染和未感染个体。所以在选择驱动样本时必须慎重，否则根本无法达到预期的结果，反而徒费人力物力。

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

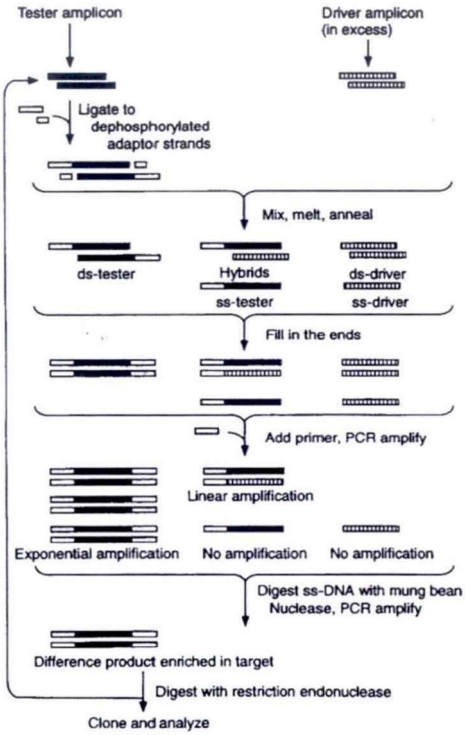


图 6.3 差减杂交技术[210]

DNA 酶处理-序列非依赖性单引物扩增技术（DNase-SISPA）

除非是样本采集时病人处于病毒血症期，通常情况下，血清或血浆（serum/plasma）样本中所包含的病毒拷贝数非常低，因此从这类样本中检测或鉴定新的病毒基因组会存在相当大的技术挑战。2001 年，Tobias Allander 及其同事开创了一种新的病毒检测技术——DNA 酶处理-序列非依赖性单引物扩增技术（DNase-sequence-independent single-primer amplification，DNase-SISPA），并在牛的血清中克隆到两种新的牛细小病毒[211]。DNase-SISPA 技术的主要依据是病毒基因组通常被保护在蛋白衣壳和脂质囊膜中免受 DNA 酶的降解。因此，在提取核酸之前，滤过后的样本使用 DNA 酶预先处理以选择性地降解宿主或环境 DNA，随后将之用于 DNA 提取。提取后的 DNA 以限制性内切酶消化并用接头进行连接，然后使用特异性针对接头序列的单引物进行扩增。最后使用琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行分析，并将目的条带进行克隆和测序。DNase-SISPA 技术非常敏感，能够检测到每毫升样本中少于 10^6 拷贝的病毒基因组。因此，一经出现即为全世界许多实验室所采用，并相继发现了人博卡病毒 2 型[212]、人细小病毒 4 型[109]和猪细小病毒 4 型[213]等。另有实验室对 DNase-SISPA 进行了改进，替

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

代性地使用简并寡核苷酸引物（DOP-Primer）或随机引物（如图 6.4）[214, 215]，而不是人工接头；或者在 PCR 扩增之后，直接将 PCR 产物进行 454 测序，而不是进行繁琐而费时的片段克隆[216]。这些替代方案很大程度上提高了新病毒发现的效率。

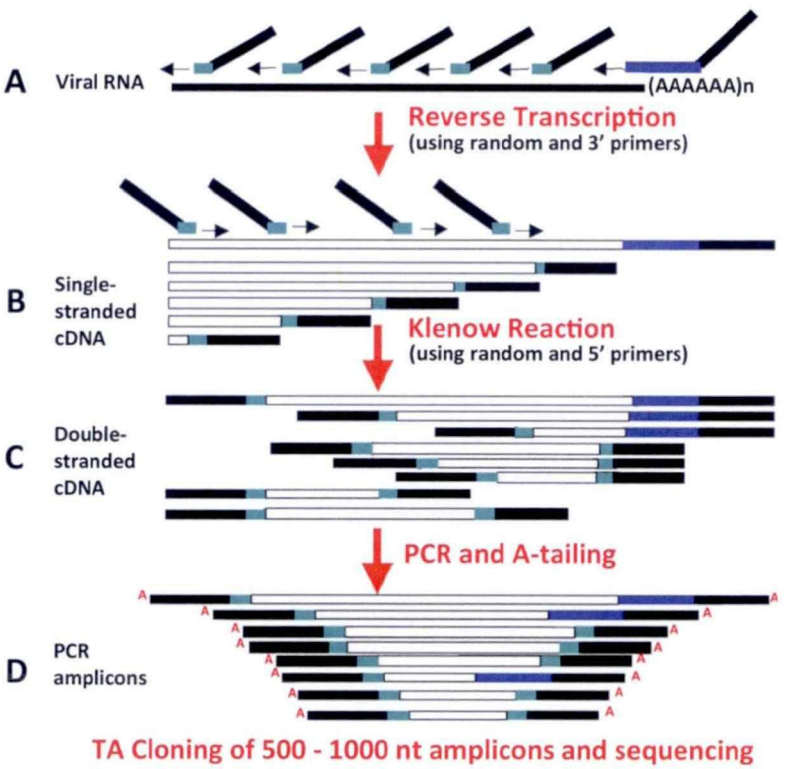


图 6.4 基于随机引物的 Dnase-SISPA 技术[214]

以 cDNA 扩增片段长度多态性为基础的病毒发现（VIDISCA）

以 cDNA 扩增片段长度多态性为基础的病毒发现是 2004 年 Ben Berkhout 及其同事开发的一种新的病毒发现方法，具有简单而易于使用、快速而高效等特点[217]。能够对血清/血浆或病毒培养上清等样本中的 RNA 和 DNA 病毒进行大规模的筛查，检测的 DNA 病毒的临界值为 10^5 拷贝，而 RNA 病毒的临界值为 10^6 拷贝。通过使用 VIDISCA 技术，Berkhout 及其同事从 CPE 阳性的 LLC-MK2 细胞培养上清中鉴定出一种新的人类冠状病毒，HCoV-NL63[217, 218]。

VIDISCA 的主要特点是不需要预先知道基因组序列及相关的背景知识，某些限制性内切酶酶切位点的存在及接头的利用足以保证 PCR 扩增的顺利进行[219]。与 DNase-SISPA 技术一样，VIDISCA 技术需要对样本核酸进行选择性富集，

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

包括高速离心以去除细胞碎片及线粒体 DNA，核酸提取前对样本进行 DNA 酶处理以降解宿主基因组 DNA，使用样品自身的 RNA 酶降解 RNA，而病毒核酸特异性地保护在病毒粒子中。提取的核酸经合成为双链 DNA（dsDNA）后使用双限制性酶处理（HinP1-I 和 Mse-I 等这类在大部分病毒核酸序列中都存在的限制性内切酶），并与人工合成的寡核苷酸接头连接。随后进行两轮 PCR 反应，第一轮使用特异性针对已知的接头序列的引物，第二轮引物与第一轮引物一致，但是在往 3'端往推测的病毒核酸序列延伸了一个碱基以进行选择性扩增（图 6.5）[217]，因此在这一步 PCR 扩增中使用了 16 种引物组合。PCR 产物使用琼脂糖凝胶电泳进行分析。在整个实验过程中，每个样本需要与代表性的阴性样本（阴性血清、血浆或非感染的培养上清）进行比较，以鉴定阳性样本或感染材料中的特异条带，最后对这些条带进行测序分析。VIDISCA 技术和 454 等新一代测序技术联合起来使用，能够对 PCR 产物进行深度分析[220, 221]。

由于 VIDISCA 技术是基于普通的限制性内切酶酶切位点的存在，扩增具有可重复性（重复样本中能扩增出相同的片段）并且具有物种特异性，PCR 产物能够与背景扩增区分开来；同时，VIDISCA 技术是相对高通量的，在每个 VIDISCA 循环中能够测试多份样本（大约 10 份）。因此该技术在组织、血清、呼吸道和消化道及细胞培养物等样本的新病毒发现中得到了广泛应用。

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

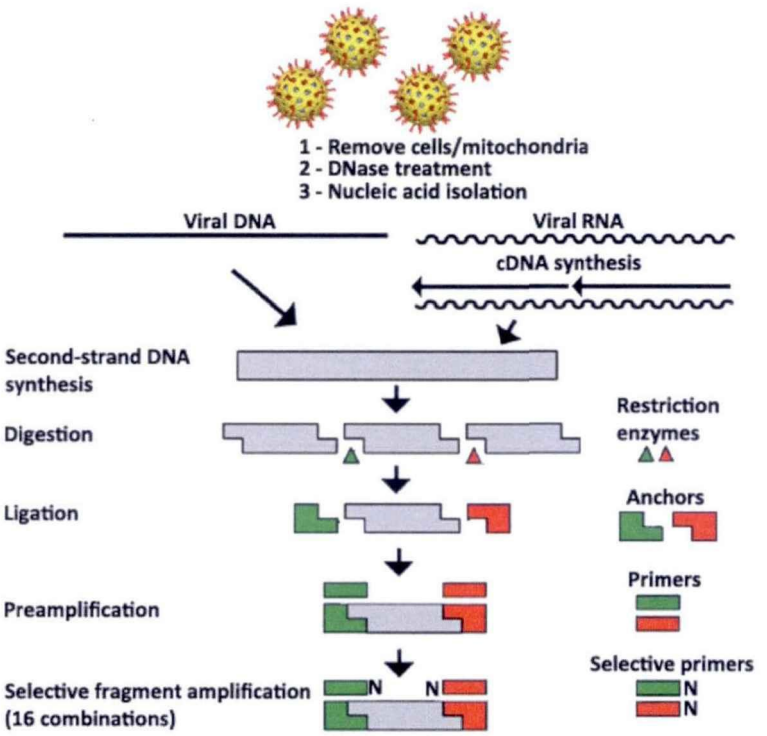


图 6.5 VIDISCA 技术示意图[217]

第三节 宏基因组学和新一代测序技术

宏基因组学（metagenomics）又称为环境基因组学或群落基因组学[222]。在微生物（细菌、病毒和真菌等）研究领域，99%的微生物到目前为止是难以培养的。因此，传统方法对环境或某一群体中存在的微生物进行研究存在很大的技术障碍。不同于以往的微生物学分析手段，宏基因组学是直接研究自然状态下微生物群落的技术。其优点在于不依赖于培养并且也是序列非依赖的，受试对象或样本中无需任何特定基因的存在。通过分析环境样本中的遗传成份，对代谢特性进行鉴定、确定生物表征及发现新的抗生素和酶等。宏基因组学作为一种研究微生物种群生态分布、群体遗传特征和基因间相互作用的技术，探讨在各种环境条件下微生物间相互作用和微生物与周围环境间相互影响的规律，促使我们能够更加客观而全面地认识微生物世界。目前，宏基因组学的研究和应用的范围很广，包括海洋环境研究、植物和农业生物技术、人类遗传学和人类疾病的诊断等。

早期的宏基因组学应用主要依赖于 shotgun 文库（shotgun library）的建立，并使用 Sanger 双脱氧测序法对总 DNA 成份进行直接测序。shotgun 文库的建立，

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

涉及到样本 DNA 的剪切（shearing）、克隆（cloning）和筛选（screening），相对比较费时，因此一定程度上限制了宏基因组学的应用。新一代测序平台的发展，样品制备的过程和文库建立得到了简化，并结合了快速、自动化和高通量（High-throughput）等各方面的优点，从而将测序能力提高了百倍甚至百万倍，也因此推动了宏基因组学的快速发展[223]。

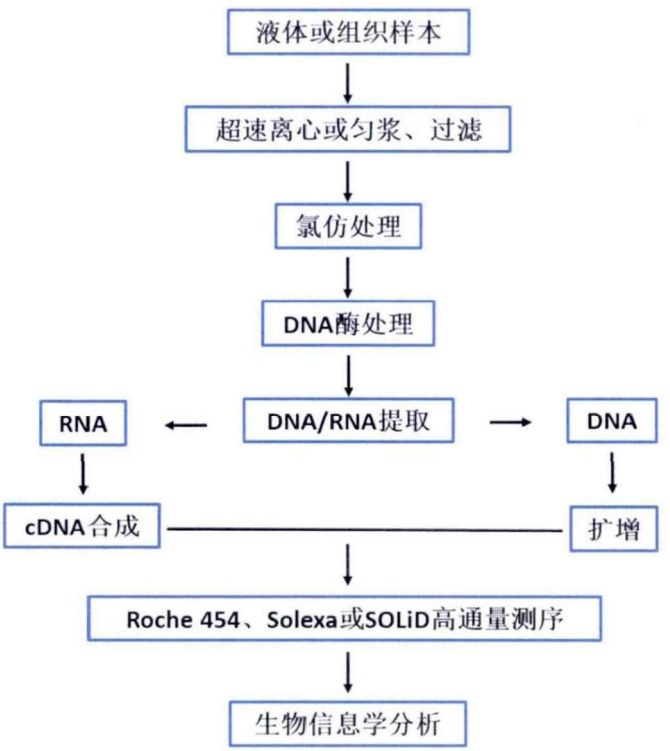


图 6.6 宏基因组学分析流程[223]

一个宏基因组分析流程通常包含三个基本步骤：1）样本准备；2）高通量测序；3）生物信息学分析。如图 6.6 所示[223]。目前有几种商业化的高通量测序平台可供选择，不同的平台采用不同的测序原理，具有不同的测序速度、价格和读长，如表 3。宏基因组学发展的瓶颈就在于后期数据分析。大部分研究人员不具有足够的计算资源（往往需要大型服务器或计算机集群），也不具备生物信息学方面的背景知识和数据分析的能力，面对海量数据时往往感到无所适从。因此，在高通量测序获得宏基因组数据后，需要有专业人员对数据进行解读和分析，否则将沦为一个基因组收集者（genome collector）[224]。

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

参考文献

1. Knipe DM, Howley PM. 2013. *Fields virology*. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health. 2 volumes pp.
2. International Committee on Taxonomy of Viruses., King AMQ. 2012. *Virus taxonomy : classification and nomenclature of viruses : ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London ; Waltham, MA: Academic Press. x, 1327 p. pp.
3. Woo PC, Huang Y, Lau SK, Yuen KY. 2010. Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. *Viruses* 2: 1804-1820
4. Woo PC, Lau SK, Lam CS, Lai KK, Huang Y, Lee P, Luk GS, Dyrting KC, Chan KH, Yuen KY. 2009. Comparative analysis of complete genome sequences of three avian coronaviruses reveals a novel group 3c coronavirus. *J Virol* 83: 908-917
5. Woo PC, Lau SK, Lam CS, Lau CC, Tsang AK, Lau JH, Bai R, Teng JL, Tsang CC, Wang M, Zheng BJ, Chan KH, Yuen KY. 2012. Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. *J Virol* 86: 3995-4008
6. Lai MM, Baric RS, Makino S, Keck JG, Egbert J, Leibowitz JL, Stohlman SA. 1985. Recombination between nonsegmented RNA genomes of murine coronaviruses. *J Virol* 56: 449-456
7. Fields BN, Knipe DM, Howley PM. 2007. *Fields virology*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins
8. Spaan W, Delius H, Skinner M, Armstrong J, Rottier P, Smeekens S, van der Zeijst BA, Siddell SG. 1983. Coronavirus mRNA synthesis involves fusion of non-contiguous sequences. *EMBO J* 2: 1839-1844
9. Sawicki SG, Sawicki DL. 1995. Coronaviruses use discontinuous extension for synthesis of subgenome-length negative strands. *Adv Exp Med Biol* 380: 499-506
10. Keck JG, Stohlman SA, Soe LH, Makino S, Lai MM. 1987. Multiple recombination sites at the 5'-end of murine coronavirus RNA. *Virology* 156: 331-341
11. Woo PC, Lau SK, Yip CC, Huang Y, Tsoi HW, Chan KH, Yuen KY. 2006. Comparative analysis of 22 coronavirus HKU1 genomes reveals a novel genotype and evidence of natural recombination in coronavirus HKU1. *J Virol* 80: 7136-7145
12. Woo PC, Lau SK, Huang Y, Yuen KY. 2009. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Exp Biol Med (Maywood)* 234: 1117-1127
13. Lai MM. 1996. *Recombination in large RNA viruses: coronaviruses*. Presented at seminars in VIROLOGY
14. Beaudette F, Hudson C. 1937. Cultivation of the virus of infectious bronchitis. *J Am Vet Med Assoc* 90: 51-60
15. Fouchier RA, Kuiken T, Schutten M, van Amerongen G, van Doornum GJ, van den Hoogen BG, Peiris M, Lim W, Stohr K, Osterhaus AD. 2003. Aetiology: Koch's postulates fulfilled for SARS virus. *Nature* 423: 240
16. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, Tong S, Urbani C, Comer JA, Lim W, Rollin PE, Dowell SF, Ling AE, Humphrey CD, Shieh WJ, Guarner J,

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Paddock CD, Rota P, Fields B, DeRisi J, Yang JY, Cox N, Hughes JM, LeDuc JW, Bellini WJ, Anderson LJ, Group SW. 2003. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 348: 1953-1966

17. Drosten C, Gunther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt HR, Becker S, Rabenau H, Panning M, Kolesnikova L, Fouchier RA, Berger A, Burguiere AM, Cinatl J, Eickmann M, Escriou N, Grywna K, Kramme S, Manuguerra JC, Muller S, Rickerts V, Sturmer M, Vieth S, Klenk HD, Osterhaus AD, Schmitz H, Doerr HW. 2003. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 348: 1967-1976
18. Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, Nix WA, Campagnoli R, Icenogle JP, Penaranda S, Bankamp B, Maher K, Chen MH, Tong S, Tamin A, Lowe L, Frace M, DeRisi JL, Chen Q, Wang D, Erdman DD, Peret TC, Burns C, Ksiazek TG, Rollin PE, Sanchez A, Liffick S, Holloway B, Limor J, McCaustland K, Olsen-Rasmussen M, Fouchier R, Gunther S, Osterhaus AD, Drosten C, Pallansch MA, Anderson LJ, Bellini WJ. 2003. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* 300: 1394-1399
19. Weinstein RA. 2004. Planning for epidemics--the lessons of SARS. *N Engl J Med* 350: 2332-2334
20. Pfefferle S, Oppong S, Drexler JF, Gloza-Rausch F, Ipsen A, Seebens A, Muller MA, Annan A, Vallo P, Adu-Sarkodie Y, Kruppa TF, Drosten C. 2009. Distant relatives of severe acute respiratory syndrome coronavirus and close relatives of human coronavirus 229E in bats, Ghana. *Emerg Infect Dis* 15: 1377-1384
21. Corman VM, Baldwin HJ, Tateno AF, Zerbinati RM, Annan A, Owusu M, Nkrumah EE, Maganga GD, Oppong S, Adu-Sarkodie Y, Vallo P, da Silva Filho LV, Leroy EM, Thiel V, van der Hoek L, Poon LL, Tschapka M, Drosten C, Drexler JF. 2015. Evidence for an Ancestral Association of Human Coronavirus 229E with Bats. *J Virol* 89: 11858-11870
22. Ge XY, Li JL, Yang XL, Chmura AA, Zhu G, Epstein JH, Mazet JK, Hu B, Zhang W, Peng C, Zhang YJ, Luo CM, Tan B, Wang N, Zhu Y, Crameri G, Zhang SY, Wang LF, Daszak P, Shi ZL. 2013. Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature* 503: 535-538
23. de Groot RJ, Baker SC, Baric RS, Brown CS, Drosten C, Enjuanes L, Fouchier RA, Galiano M, Gorbalenya AE, Memish ZA, Perlman S, Poon LL, Snijder EJ, Stephens GM, Woo PC, Zaki AM, Zambon M, Ziebuhr J. 2013. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group. *J Virol* 87: 7790-7792
24. Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA. 2012. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med* 367: 1814-1820
25. Bermingham A, Chand MA, Brown CS, Aarons E, Tong C, Langrish C, Hoschler K, Brown K, Galiano M, Myers R, Pebody RG, Green HK, Boddington NL, Gopal R, Price N, Newsholme W, Drosten C, Fouchier RA, Zambon M. 2012. Severe respiratory illness caused by a novel coronavirus, in a patient transferred to the United Kingdom from the Middle East, September 2012. *Euro Surveill* 17: 20290

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

26. Woo PC, Lau SK, Li KS, Poon RW, Wong BH, Tsoi HW, Yip BC, Huang Y, Chan KH, Yuen KY. 2006. Molecular diversity of coronaviruses in bats. *Virology* 351: 180-187
27. Lau SK, Li KS, Tsang AK, Lam CS, Ahmed S, Chen H, Chan KH, Woo PC, Yuen KY. 2013. Genetic characterization of Betacoronavirus lineage C viruses in bats reveals marked sequence divergence in the spike protein of pipistrellus bat coronavirus HKU5 in Japanese pipistrelle: implications for the origin of the novel Middle East respiratory syndrome coronavirus. *J Virol* 87: 8638-8650
28. Ithete NL, Stoffberg S, Corman VM, Cottontail VM, Richards LR, Schoeman MC, Drosten C, Drexler JF, Preiser W. 2013. Close relative of human Middle East respiratory syndrome coronavirus in bat, South Africa. *Emerg Infect Dis* 19: 1697-1699
29. Corman VM, Ithete NL, Richards LR, Schoeman MC, Preiser W, Drosten C, Drexler JF. 2014. Rooting the phylogenetic tree of middle East respiratory syndrome coronavirus by characterization of a conspecific virus from an African bat. *J Virol* 88: 11297-11303
30. Yang L, Wu Z, Ren X, Yang F, Zhang J, He G, Dong J, Sun L, Zhu Y, Zhang S, Jin Q. 2014. MERS-related betacoronavirus in Vespertilio superans bats, China. *Emerg Infect Dis* 20: 1260-1262
31. Memish ZA, Mishra N, Olival KJ, Fagbo SF, Kapoor V, Epstein JH, Alhakeem R, Durosinloun A, Al Asmari M, Islam A, Kapoor A, Briese T, Daszak P, Al Rabeeah AA, Lipkin WI. 2013. Middle East respiratory syndrome coronavirus in bats, Saudi Arabia. *Emerg Infect Dis* 19: 1819-1823
32. De Benedictis P, Marciano S, Scaravelli D, Priori P, Zecchin B, Capua I, Monne I, Cattoli G. 2014. Alpha and lineage C betaCoV infections in Italian bats. *Virus Genes* 48: 366-371
33. Annan A, Baldwin HJ, Corman VM, Klose SM, Owusu M, Nkrumah EE, Badu EK, Anti P, Agbenyega O, Meyer B, Oppong S, Sarkodie YA, Kalko EK, Lina PH, Godlevska EV, Reusken C, Seebens A, Gloza-Rausch F, Vallo P, Tschapka M, Drosten C, Drexler JF. 2013. Human betacoronavirus 2c EMC/2012-related viruses in bats, Ghana and Europe. *Emerg Infect Dis* 19: 456-459
34. Madani TA, Azhar EI, Hashem AM. 2014. Evidence for camel-to-human transmission of MERS coronavirus. *N Engl J Med* 371: 1360
35. Reusken CB, Haagmans BL, Muller MA, Gutierrez C, Godeke GJ, Meyer B, Muth D, Raj VS, Smits-De Vries L, Corman VM, Drexler JF, Smits SL, El Tahir YE, De Sousa R, van Beek J, Nowotny N, van Maanen K, Hidalgo-Hermoso E, Bosch BJ, Rottier P, Osterhaus A, Gortazar-Schmidt C, Drosten C, Koopmans MP. 2013. Middle East respiratory syndrome coronavirus neutralising serum antibodies in dromedary camels: a comparative serological study. *Lancet Infect Dis* 13: 859-866
36. Raj VS, Mou H, Smits SL, Dekkers DH, Muller MA, Dijkman R, Muth D, Demmers JA, Zaki A, Fouchier RA, Thiel V, Drosten C, Rottier PJ, Osterhaus AD, Bosch BJ, Haagmans BL. 2013. Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature* 495: 251-254

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

37. Wang Q, Qi J, Yuan Y, Xuan Y, Han P, Wan Y, Ji W, Li Y, Wu Y, Wang J, Iwamoto A, Woo PC, Yuen KY, Yan J, Lu G, Gao GF. 2014. Bat origins of MERS-CoV supported by bat coronavirus HKU4 usage of human receptor CD26. *Cell Host Microbe* 16: 328-337
38. Yang Y, Du L, Liu C, Wang L, Ma C, Tang J, Baric RS, Jiang S, Li F. 2014. Receptor usage and cell entry of bat coronavirus HKU4 provide insight into bat-to-human transmission of MERS coronavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 12516-12521
39. Finn RD, Bateman A, Clements J, Coggill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Heger A, Hetherington K, Holm L, Mistry J, Sonnhammer EL, Tate J, Punta M. 2014. Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res* 42: D222-230
40. Jones P, Binns D, Chang HY, Fraser M, Li W, McAnulla C, McWilliam H, Maslen J, Mitchell A, Nuka G, Pesseat S, Quinn AF, Sangrador-Vegas A, Scheremetjew M, Yong SY, Lopez R, Hunter S. 2014. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics* 30: 1236-1240
41. Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 305: 567-580
42. Rost B, Yachdav G, Liu J. 2004. The PredictProtein server. *Nucleic Acids Res* 32: W321-326
43. Pritchard LI, Chua KB, Cummins D, Hyatt A, Crameri G, Eaton BT, Wang LF. 2006. Pulau virus; a new member of the Nelson Bay orthoreovirus species isolated from fruit bats in Malaysia. *Arch Virol* 151: 229-239
44. Shmulevitz M, Epand RF, Epand RM, Duncan R. 2004. Structural and functional properties of an unusual internal fusion peptide in a nonenveloped virus membrane fusion protein. *J Virol* 78: 2808-2818
45. Barry C, Key T, Haddad R, Duncan R. 2010. Features of a spatially constrained cystine loop in the p10 FAST protein ectodomain define a new class of viral fusion peptides. *J Biol Chem* 285: 16424-16433
46. Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2011. ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 27: 1164-1165
47. Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* 59: 307-321
48. Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*
49. Drexler JF, Gloza-Rausch F, Glende J, Corman VM, Muth D, Goettsche M, Seebens A, Niedrig M, Pfefferle S, Yordanov S, Zhelyazkov L, Hermanns U, Vallo P, Lukashev A, Muller MA, Deng H, Herrler G, Drosten C. 2010. Genomic characterization of severe acute respiratory syndrome-related coronavirus in European bats and classification of coronaviruses based on partial RNA-dependent RNA polymerase gene sequences. *J Virol* 84: 11336-11349
50. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30: 2725-2729
51. Ciechonska M, Duncan R. 2014. Reovirus FAST proteins: virus-encoded cellular fusogens. *Trends Microbiol* 22: 715-724

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

52. Key T, Duncan R. 2014. A compact, multifunctional fusion module directs cholesterol-dependent homomultimerization and syncytiogenic efficiency of reovirus p10 FAST proteins. *PLoS Pathog* 10: e1004023
53. Shmulevitz M, Duncan R. 2000. A new class of fusion-associated small transmembrane (FAST) proteins encoded by the non-enveloped fusogenic reoviruses. *EMBO J* 19: 902-912
54. Luytjes W, Bredenbeek PJ, Noten AF, Horzinek MC, Spaan WJ. 1988. Sequence of mouse hepatitis virus A59 mRNA 2: indications for RNA recombination between coronaviruses and influenza C virus. *Virology* 166: 415-422
55. Terada Y, Matsui N, Noguchi K, Kuwata R, Shimoda H, Soma T, Mochizuki M, Maeda K. 2014. Emergence of pathogenic coronaviruses in cats by homologous recombination between feline and canine coronaviruses. 9: e106534
56. Stavrinides J, Guttman DS. 2004. Mosaic evolution of the severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Virol* 78: 76-82
57. Zhang XM, Kousoulas KG, Storz J. 1992. The hemagglutinin/esterase gene of human coronavirus strain OC43: phylogenetic relationships to bovine and murine coronaviruses and influenza C virus. *Virology* 186: 318-323
58. Cornelissen LA, Wierda CM, van der Meer FJ, Herrewegh AA, Horzinek MC, Egberink HF, de Groot RJ. 1997. Hemagglutinin-esterase, a novel structural protein of torovirus. *J Virol* 71: 5277-5286
59. Gibbs MJ, Weiller GF. 1999. Evidence that a plant virus switched hosts to infect a vertebrate and then recombined with a vertebrate-infecting virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 8022-8027
60. Woolford L, Rector A, Van Ranst M, Ducki A, Bennett MD, Nicholls PK, Warren KS, Swan RA, Wilcox GE, O'Hara AJ. 2007. A novel virus detected in papillomas and carcinomas of the endangered western barred bandicoot (Perameles bougainville) exhibits genomic features of both the Papillomaviridae and Polyomaviridae. *J Virol* 81: 13280-13290
61. Brown CW, Stephenson KB, Hanson S, Kucharczyk M, Duncan R, Bell JC, Lichty BD. 2009. The p14 FAST protein of reptilian reovirus increases vesicular stomatitis virus neuropathogenesis. *J Virol* 83: 552-561
62. Chua KB, Crameri G, Hyatt A, Yu M, Tompang MR, Rosli J, McEachern J, Crameri S, Kumarasamy V, Eaton BT, Wang LF. 2007. A previously unknown reovirus of bat origin is associated with an acute respiratory disease in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 11424-11429
63. Chua KB, Voon K, Crameri G, Tan HS, Rosli J, McEachern JA, Suluraju S, Yu M, Wang LF. 2008. Identification and characterization of a new orthoreovirus from patients with acute respiratory infections. *PLoS One* 3: e3803
64. Cheng P, Lau CS, Lai A, Ho E, Leung P, Chan F, Wong A, Lim W. 2009. A novel reovirus isolated from a patient with acute respiratory disease. *J Clin Virol* 45: 79-80
65. Chu DK, Peiris JS, Chen H, Guan Y, Poon LL. 2008. Genomic characterizations of bat coronaviruses (1A, 1B and HKU8) and evidence for co-infections in Miniopterus bats. *J Gen Virol* 89: 1282-1287

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

66. Conrardy C, Tao Y, Kuzmin IV, Niezgoda M. 2014. Molecular detection of adenoviruses, rhabdoviruses, and paramyxoviruses in bats from Kenya. 91: 258-266
67. Baker KS, Todd S, Marsh G, Fernandez-Loras A, Suu-Ire R, Wood JL, Wang LF, Murcia PR, Cunningham AA. 2012. Co-circulation of diverse paramyxoviruses in an urban African fruit bat population. *J Gen Virol* 93: 850-856
68. Lau SK, Poon RW, Wong BH, Wang M, Huang Y, Xu H, Guo R, Li KS, Gao K, Chan KH, Zheng BJ, Woo PC, Yuen KY. 2010. Coexistence of different genotypes in the same bat and serological characterization of Rousettus bat coronavirus HKU9 belonging to a novel Betacoronavirus subgroup. *J Virol* 84: 11385-11394
69. Duan Q, Zhu H, Yang Y, Li W, Zhou Y, He J, He K, Zhang H, Zhou T, Song L. 2003. Reovirus, isolated from SARS patients. *Chinese science bulletin* 48: 1293-1296
70. Schalk AF, Hawn MC. 1931. An apparently new respiratory disease in baby chicks. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 78: 413-422
71. Organization WH. 2014. Global Alert and Response (GAR): MERS-CoV summary updates. http://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/archive_updates/en/
72. Li W, Shi Z, Yu M, Ren W, Smith C, Epstein JH, Wang H, Crameri G, Hu Z, Zhang H, Zhang J, McEachern J, Field H, Daszak P, Eaton BT, Zhang S, Wang LF. 2005. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science* 310: 676-679
73. Woo PC, Wang M, Lau SK, Xu H, Poon RW, Guo R, Wong BH, Gao K, Tsoi HW, Huang Y, Li KS, Lam CS, Chan KH, Zheng BJ, Yuen KY. 2007. Comparative analysis of twelve genomes of three novel group 2c and group 2d coronaviruses reveals unique group and subgroup features. *J Virol* 81: 1574-1585
74. Woo PC, Lau SK, Chu CM, Chan KH, Tsoi HW, Huang Y, Wong BH, Poon RW, Cai JJ, Luk WK, Poon LL, Wong SS, Guan Y, Peiris JS, Yuen KY. 2005. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol* 79: 884-895
75. Lu G, Liu D. 2012. SARS-like virus in the Middle East: a truly bat-related coronavirus causing human diseases. *Protein Cell* 3: 803-805
76. Lau SK, Woo PC, Li KS, Huang Y, Tsoi HW, Wong BH, Wong SS, Leung SY, Chan KH, Yuen KY. 2005. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 14040-14045
77. Song HD, Tu CC, Zhang GW, Wang SY, Zheng K, Lei LC, Chen QX, Gao YW, Zhou HQ, Xiang H, Zheng HJ, Chern SW, Cheng F, Pan CM, Xuan H, Chen SJ, Luo HM, Zhou DH, Liu YF, He JF, Qin PZ, Li LH, Ren YQ, Liang WJ, Yu YD, Anderson L, Wang M, Xu RH, Wu XW, Zheng HY, Chen JD, Liang G, Gao Y, Liao M, Fang L, Jiang LY, Li H, Chen F, Di B, He LJ, Lin JY, Tong S, Kong X, Du L, Hao P, Tang H, Bernini A, Yu XJ, Spiga O, Guo ZM, Pan HY, He WZ, Manuguerra JC, Fontanet A, Danchin A, Niccolai N, Li YX, Wu CI, Zhao GP. 2005. Cross-host evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus in palm civet and human. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 2430-2435
78. Azhar EI, El-Kafrawy SA, Farraj SA, Hassan AM, Al-Saeed MS, Hashem AM, Madani TA. 2014. Evidence for camel-to-human transmission of MERS coronavirus. *N Engl J Med* 370: 2499-2505

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

79. Li F, Li W, Farzan M, Harrison SC. 2005. Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor. *Science* 309: 1864-1868

80. Lu G, Hu Y, Wang Q, Qi J, Gao F, Li Y, Zhang Y, Zhang W, Yuan Y, Bao J, Zhang B, Shi Y, Yan J, Gao GF. 2013. Molecular basis of binding between novel human coronavirus MERS-CoV and its receptor CD26. *Nature* 500: 227-231

81. Wang N, Shi X, Jiang L, Zhang S, Wang D, Tong P, Guo D, Fu L, Cui Y, Liu X, Arledge KC, Chen YH, Zhang L, Wang X. 2013. Structure of MERS-CoV spike receptor-binding domain complexed with human receptor DPP4. *Cell Res* 23: 986-993

82. Peng G, Sun D, Rajashankar KR, Qian Z, Holmes KV, Li F. 2011. Crystal structure of mouse coronavirus receptor-binding domain complexed with its murine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 10696-10701

83. Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, Somasundaran M, Sullivan JL, Luzuriaga K, Greenough TC, Choe H, Farzan M. 2003. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 426: 450-454

84. Ge X, Li Y, Yang X, Zhang H, Zhou P, Zhang Y, Shi Z. 2012. Metagenomic analysis of viruses from bat fecal samples reveals many novel viruses in insectivorous bats in China. *J Virol* 86: 4620-4630

85. Tao Y, Tang K, Shi M, Conrardy C, Li KS, Lau SK, Anderson LJ, Tong S. 2012. Genomic characterization of seven distinct bat coronaviruses in Kenya. *Virus Res* 167: 67-73

86. Tong S, Conrardy C, Ruone S, Kuzmin IV, Guo X, Tao Y, Niezgoda M, Haynes L, Agwanda B, Breiman RF, Anderson LJ, Rupprecht CE. 2009. Detection of novel SARS-like and other coronaviruses in bats from Kenya. *Emerg Infect Dis* 15: 482-485

87. Zhang W, Qi J, Shi Y, Li Q, Gao F, Sun Y, Lu X, Lu Q, Vavricka CJ, Liu D, Yan J, Gao GF. 2010. Crystal structure of the swine-origin A (H1N1)-2009 influenza A virus hemagglutinin (HA) reveals similar antigenicity to that of the 1918 pandemic virus. *Protein Cell* 1: 459-467

88. Otwinowski Z, Minor W. 1997. Processing of X-ray diffraction data. *Methods enzymol* 276: 307-326

89. Uson I, Sheldrick GM. 1999. Advances in direct methods for protein crystallography. *Curr Opin Struct Biol* 9: 643-648

90. Read RJ. 2001. Pushing the boundaries of molecular replacement with maximum likelihood. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57: 1373-1382

91. Cowtan KD, Zhang KY. 1999. Density modification for macromolecular phase improvement. *Prog Biophys Mol Biol* 72: 245-270

92. Adams PD, Afonine PV, Bunkoczi G, Chen VB, Davis IW, Echols N, Headd JJ, Hung LW, Kapral GJ, Grosse-Kunstleve RW, McCoy AJ, Moriarty NW, Oeffner R, Read RJ, Richardson DC, Richardson JS, Terwilliger TC, Zwart PH. 2010. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66: 213-221

93. Emsley P, Cowtan K. 2004. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60: 2126-2132

94. Laskowski RA, Macarthur MW, Moss DS, Thornton JM. 1993. Procheck - a Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures. *Journal of Applied Crystallography* 26: 283-291

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

95. Chen Y, Rajashankar KR, Yang Y, Agnihothram SS, Liu C, Lin YL, Baric RS, Li F. 2013. Crystal structure of the receptor-binding domain from newly emerged Middle East respiratory syndrome coronavirus. *J Virol* 87: 10777-10783

96. Kubo H, Yamada YK, Taguchi F. 1994. Localization of neutralizing epitopes and the receptor-binding site within the amino-terminal 330 amino acids of the murine coronavirus spike protein. *J Virol* 68: 5403-5410

97. Wu K, Li W, Peng G, Li F. 2009. Crystal structure of NL63 respiratory coronavirus receptor-binding domain complexed with its human receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 19970-19974

98. Reguera J, Santiago C, Mudgal G, Ordono D, Enjuanes L, Casasnovas JM. 2012. Structural bases of coronavirus attachment to host aminopeptidase N and its inhibition by neutralizing antibodies. *PLoS Pathog* 8: e1002859

99. Wu Z, Yang L, Yang F, Ren X, Jiang J, Dong J, Sun L, Zhu Y, Zhou H, Jin Q. 2014. Novel Henipa-like virus, Mojiang Paramyxovirus, in rats, China, 2012. *Emerg Infect Dis* 20: 1064-1066

100. Chu DK, Poon LL, Chan KH, Chen H, Guan Y, Yuen KY, Peiris JS. 2006. Coronaviruses in bent-winged bats (Miniopterus spp.). *J Gen Virol* 87: 2461-2466

101. WHO. 1996. *The World Health Report 1996: Fighting Disease, Fostering Development*: World Health Organization. 143 pp.

102. WHO. 2004. *The global burden of disease: 2004 update*: World Health Organization. 146 pp.

103. WHO. 2005. *Combating emerging infectious diseases in the South east Asian region*: World Health Organization. 39 pp.

104. Institute of Medicine (U.S.). Committee on Achieving Sustainable Global Capacity for Surveillance and Response to Emerging Diseases of Zoonotic Origin., Keusch G. 2009. *Sustaining global surveillance and response to emerging zoonotic diseases*. Washington, DC: National Academies Press. xxv, 312 p. pp.

105. Woolhouse M, Gaunt E. 2007. Ecological origins of novel human pathogens. *Crit Rev Microbiol* 33: 231-242

106. Woolhouse ME, Howey R, Gaunt E, Reilly L, Chase-Topping M, Savill N. 2008. Temporal trends in the discovery of human viruses. *Proc Biol Sci* 275: 2111-2115

107. 2010. *The Merck Veterinary Manual*. Whitehouse Station, NJ: Merck & Co., Inc.

108. Yu XJ, Liang MF, Zhang SY, Liu Y, Li JD, Sun YL, Zhang L, Zhang QF, Popov VL, Li C, Qu J, Li Q, Zhang YP, Hai R, Wu W, Wang Q, Zhan FX, Wang XJ, Kan B, Wang SW, Wan KL, Jing HQ, Lu JX, Yin WW, Zhou H, Guan XH, Liu JF, Bi ZQ, Liu GH, Ren J, Wang H, Zhao Z, Song JD, He JR, Wan T, Zhang JS, Fu XP, Sun LN, Dong XP, Feng ZJ, Yang WZ, Hong T, Zhang Y, Walker DH, Wang Y, Li DX. 2011. Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China. *N Engl J Med* 364: 1523-1532

109. Jones MS, Kapoor A, Lukashov VV, Simmonds P, Hecht F, Delwart E. 2005. New DNA viruses identified in patients with acute viral infection syndrome. *J Virol* 79: 8230-8236

110. Schneider WL, Roossinck MJ. 2001. Genetic diversity in RNA virus quasispecies is controlled by host-virus interactions. *J Virol* 75: 6566-6571

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

111. Lobo FP, Mota BE, Pena SD, Azevedo V, Macedo AM, Tauch A, Machado CR, Franco GR. 2009. Virus-host coevolution: common patterns of nucleotide motif usage in Flaviviridae and their hosts. *PLoS One* 4: e6282

112. Best SM, Kerr PJ. 2000. Coevolution of host and virus: the pathogenesis of virulent and attenuated strains of myxoma virus in resistant and susceptible European rabbits. *Virology* 267: 36-48

113. Shao Y, Zhao F, Yang W. 1999. [The identification of recombinant HIV-1 strains in IDUs in southwest and northwest China]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 13: 109-112

114. Babakir-Mina M, Dimonte S, Perno CF, Ciotti M. 2009. Origin of the 2009 Mexico influenza virus: a comparative phylogenetic analysis of the principal external antigens and matrix protein. *Arch Virol* 154: 1349-1352

115. Reiter P. 2001. Climate change and mosquito-borne disease. *Environ Health Perspect* 109 Suppl 1: 141-161

116. Higa Y. 2011. Dengue Vectors and their Spatial Distribution. *Trop Med Health* 39: 17-27

117. Rezza G. 2012. Aedes albopictus and the reemergence of Dengue. *BMC Public Health* 12: 72

118. Barrera R. 2011. Spatial stability of adult Aedes aegypti populations. *Am J Trop Med Hyg* 85: 1087-1092

119. Lanciotti RS, Roehrig JT, Deubel V, Smith J, Parker M, Steele K, Crise B, Volpe KE, Crabtree MB, Scherret JH, Hall RA, MacKenzie JS, Cropp CB, Panigrahy B, Ostlund E, Schmitt B, Malkinson M, Banet C, Weissman J, Komar N, Savage HM, Stone W, McNamara T, Gubler DJ. 1999. Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Science* 286: 2333-2337

120. Rappole JH, Derrickson SR, Hubalek Z. 2000. Migratory birds and spread of West Nile virus in the Western Hemisphere. *Emerg Infect Dis* 6: 319-328

121. Hjelle B, Glass GE. 2000. Outbreak of hantavirus infection in the Four Corners region of the United States in the wake of the 1997-1998 El Nino-southern oscillation. *J Infect Dis* 181: 1569-1573

122. Engelthaler DM, Mosley DG, Cheek JE, Levy CE, Komatsu KK, Ettestad P, Davis T, Tanda DT, Miller L, Frampton JW, Porter R, Bryan RT. 1999. Climatic and environmental patterns associated with hantavirus pulmonary syndrome, Four Corners region, United States. *Emerg Infect Dis* 5: 87-94

123. Chua KB, Bellini WJ, Rota PA, Harcourt BH, Tamin A, Lam SK, Ksiazek TG, Rollin PE, Zaki SR, Shieh W, Goldsmith CS, Gubler DJ, Roehrig JT, Eaton B, Gould AR, Olson J, Field H, Daniels P, Ling AE, Peters CJ, Anderson LJ, Mahy BW. 2000. Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. *Science* 288: 1432-1435

124. Enserink M. 2000. Emerging diseases. Malaysian researchers trace Nipah virus outbreak to bats. *Science* 289: 518-519

125. Morse SS. 1995. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* 1: 7-15

126. Church DL. 2004. Major factors affecting the emergence and re-emergence of infectious diseases. *Clin Lab Med* 24: 559-586, v

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

127. Wolfe ND, Escalante AA, Karesh WB, Kilbourn A, Spielman A, Lal AA. 1998. Wild primate populations in emerging infectious disease research: the missing link? *Emerg Infect Dis* 4: 149-158

128. Borchert M, Boelaert M, Sleurs H, Muyembe-Tamfum JJ, Pirard P, Colebunders R, Van der Stuyft P, van der Groen G. 2000. Viewpoint: filovirus haemorrhagic fever outbreaks: much ado about nothing? *Trop Med Int Health* 5: 318-324

129. Salemi M, Strimmer K, Hall WW, Duffy M, Delaporte E, Mboup S, Peeters M, Vandamme AM. 2001. Dating the common ancestor of SIVcpz and HIV-1 group M and the origin of HIV-1 subtypes using a new method to uncover clock-like molecular evolution. *FASEB J* 15: 276-278

130. Sequeira S. 2001. Tracking down the origins of HIV. *Trends Neurosci* 24: 78

131. Hillis DM. 2000. AIDS. Origins of HIV. *Science* 288: 1757-1759

132. Sharp PM, Hahn BH. 2011. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1: a006841

133. Peiris JS, Lai ST, Poon LL, Guan Y, Yam LY, Lim W, Nicholls J, Yee WK, Yan WW, Cheung MT, Cheng VC, Chan KH, Tsang DN, Yung RW, Ng TK, Yuen KY. 2003. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 361: 1319-1325

134. Marra MA, Jones SJ, Astell CR, Holt RA, Brooks-Wilson A, Butterfield YS, Khattra J, Asano JK, Barber SA, Chan SY, Cloutier A, Coughlin SM, Freeman D, Girn N, Griffith OL, Leach SR, Mayo M, McDonald H, Montgomery SB, Pandoh PK, Petrescu AS, Robertson AG, Schein JE, Siddiqui A, Smailus DE, Stott JM, Yang GS, Plummer F, Andonov A, Artsob H, Bastien N, Bernard K, Booth TF, Bowness D, Czub M, Drebot M, Fernando L, Flick R, Garbutt M, Gray M, Grolla A, Jones S, Feldmann H, Meyers A, Kabani A, Li Y, Normand S, Stroher U, Tipples GA, Tyler S, Vogrig R, Ward D, Watson B, Brunham RC, Krajden M, Petric M, Skowronski DM, Upton C, Roper RL. 2003. The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science* 300: 1399-1404

135. Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. 2000. Emerging infectious diseases of wildlife--threats to biodiversity and human health. *Science* 287: 443-449

136. Wolfe ND, Dunavan CP, Diamond J. 2007. Origins of major human infectious diseases. *Nature* 447: 279-283

137. Lloyd-Smith JO, George D, Pepin KM, Pitzer VE, Pulliam JR, Dobson AP, Hudson PJ, Grenfell BT. 2009. Epidemic dynamics at the human-animal interface. *Science* 326: 1362-1367

138. Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, Daszak P. 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451: 990-993

139. Nel LH, Weyer J. 2007. Animal Viruses Pathogenic for Humans. *eLS*

140. Parrish CR, Holmes EC, Morens DM, Park EC, Burke DS, Calisher CH, Laughlin CA, Saif LJ, Daszak P. 2008. Cross-species virus transmission and the emergence of new epidemic diseases. *Microbiol Mol Biol Rev* 72: 457-470

141. Flanagan ML, Parrish CR, Cobey S, Glass GE, Bush RM, Leighton TJ. 2012. Anticipating the species jump: surveillance for emerging viral threats. *Zoonoses Public Health* 59: 155-163

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

142. Woolhouse ME, Haydon DT, Antia R. 2005. Emerging pathogens: the epidemiology and evolution of species jumps. *Trends Ecol Evol* 20: 238-244
143. Breithaupt H. 2003. Fierce creatures. Zoonoses, diseases that jump from animals to humans, are a growing health problem around the world. Understanding their causes and their effects on humans have therefore become an important topic for global public health. *EMBO Rep* 4: 921-924
144. Cleaveland S, Haydon DT, Taylor L. 2007. Overviews of pathogen emergence: which pathogens emerge, when and why? *Curr Top Microbiol Immunol* 315: 85-111
145. Rübsamen-Waigmann H. 2003. *Viral infections and treatment*. New York: Marcel Dekker. xiv, 752 pp.
146. WHO. 2005. *Combating emerging infectious diseases in the South east Asian region*: World Health Organization
147. WHO. 2007. World Health Report 2007: A Safer Future: Global Public Health Security in the 21st century. World Health Organization
148. Keesing F, Belden LK, Daszak P, Dobson A, Harvell CD, Holt RD, Hudson P, Jolles A, Jones KE, Mitchell CE, Myers SS, Bogich T, Ostfeld RS. 2010. Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. *Nature* 468: 647-652
149. Taubenberger JK. 2006. The origin and virulence of the 1918 "Spanish" influenza virus. *Proc Am Philos Soc* 150: 86-112
150. Scholtissek C, Rohde W, Von Hoyningen V, Rott R. 1978. On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2. *Virology* 87: 13-20
151. Kawaoka Y, Krauss S, Webster RG. 1989. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J Virol* 63: 4603-4608
152. Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A, Sessions WM, Xu X, Skepner E, Deyde V, Okomo-Adhiambo M, Gubareva L, Barnes J, Smith CB, Emery SL, Hillman MJ, Rivailler P, Smagala J, de Graaf M, Burke DF, Fouchier RA, Pappas C, Alpuche-Aranda CM, Lopez-Gatell H, Olivera H, Lopez I, Myers CA, Faix D, Blair PJ, Yu C, Keene KM, Dotson PD, Jr., Boxrud D, Sambol AR, Abid SH, St George K, Bannerman T, Moore AL, Stringer DJ, Blevins P, Demmler-Harrison GJ, Ginsberg M, Kriner P, Waterman S, Smole S, Guevara HF, Belongia EA, Clark PA, Beatrice ST, Donis R, Katz J, Finelli L, Bridges CB, Shaw M, Jernigan DB, Uyeki TM, Smith DJ, Klimov AI, Cox NJ. 2009. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* 325: 197-201
153. Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. 2009. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* 459: 931-939
154. Gao GF, Sun Y. 2010. It is not just AIV: from avian to swine-origin influenza virus. *Sci China Life Sci* 53: 151-153
155. Nel LH, Weyer J. 2001. Animal Viruses Pathogenic for Humans. In *eLS*: John Wiley & Sons, Ltd
156. Wang Y. 2003. A complete checklist of mammal species and subspecies in China: a taxonomic and geographic reference. pp. 41-46: 北京: 中国林业出版社
157. Simmons NB, Seymour KL, Habersetzer J, Gunnell GF. 2008. Primitive Early Eocene bat from Wyoming and the evolution of flight and echolocation. *Nature* 451: 818-821

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

158. Teeling EC, Springer MS, Madsen O, Bates P, O'Brien S J, Murphy WJ. 2005. A molecular phylogeny for bats illuminates biogeography and the fossil record. *Science* 307: 580-584

159. Hill JE, Smith JD. 1984. *Bats : a natural history*. Austin: University of Texas Press. 243 p. pp.

160. Nishihara H, Hasegawa M, Okada N. 2006. Pegasoferae, an unexpected mammalian clade revealed by tracking ancient retroposon insertions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 9929-9934

161. Zhang G, Cowled C, Shi Z, Huang Z, Bishop-Lilly KA, Fang X, Wynne JW, Xiong Z, Baker ML, Zhao W, Tachedjian M, Zhu Y, Zhou P, Jiang X, Ng J, Yang L, Wu L, Xiao J, Feng Y, Chen Y, Sun X, Zhang Y, Marsh GA, Crameri G, Broder CC, Frey KG, Wang LF, Wang J. 2013. Comparative analysis of bat genomes provides insight into the evolution of flight and immunity. *Science* 339: 456-460

162. Kunz TH, Fenton MB. 2003. *Bat ecology*. Chicago, Ill.: University of Chicago Press. xix, 779 p. pp.

163. Roberts BJ, Catterall CP, Eby P, Kanowski J. 2012. Long-distance and frequent movements of the flying-fox Pteropus poliocephalus: implications for management. *PLoS One* 7: e42532

164. Betke M, Hirsh DE, Makris NC, McCracken GF, Procopio M, Hristov NI, Tang S, Bagchi A, Reichard JD, Horn JW. 2008. Thermal imaging reveals significantly smaller Brazilian free-tailed bat colonies than previously estimated. *Journal of Mammalogy* 89: 18-24

165. Nowak RM, Walker EP. 1994. *Walker's bats of the world*. Baltimore: Johns Hopkins University Press. 287 p. pp.

166. Omatsu T, Bak EJ, Ishii Y, Kyuwa S, Tohya Y, Akashi H, Yoshikawa Y. 2008. Induction and sequencing of Rousette bat interferon alpha and beta genes. *Vet Immunol Immunopathol* 124: 169-176

167. He G, He B, Racey PA, Cui J. 2010. Positive selection of the bat interferon alpha gene family. *Biochem Genet* 48: 840-846

168. Kepler TB, Sample C, Hudak K, Roach J, Haines A, Walsh A, Ramsburg EA. 2010. Chiropteran types I and II interferon genes inferred from genome sequencing traces by a statistical gene-family assembler. *BMC Genomics* 11: 444

169. Omatsu T, Nishimura Y, Bak EJ, Ishii Y, Tohya Y, Kyuwa S, Akashi H, Yoshikawa Y. 2006. Molecular cloning and sequencing of the cDNA encoding the bat CD4. *Vet Immunol Immunopathol* 111: 309-313

170. Cowled C, Baker M, Tachedjian M, Zhou P, Bulach D, Wang LF. 2011. Molecular characterisation of Toll-like receptors in the black flying fox Pteropus alecto. *Dev Comp Immunol* 35: 7-18

171. Fujii H, Watanabe S, Yamane D, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Kato K, Tohya Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y, Akashi H. 2010. Functional analysis of Rousettus aegyptiacus "signal transducer and activator of transcription 1" (STAT1). *Dev Comp Immunol* 34: 598-602

172. Baker ML, Tachedjian M, Wang LF. 2010. Immunoglobulin heavy chain diversity in Pteropid bats: evidence for a diverse and highly specific antigen binding repertoire. *Immunogenetics* 62: 173-184

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

173. McMurray DN, Stroud J, Murphy JJ, Carlomagno MA, Greer DL. 1982. Role of immunoglobulin classes in experimental histoplasmosis in bats. *Dev Comp Immunol* 6: 557-567

174. Chakravarty AK, Sarkar SK. 1994. Immunofluorescence analysis of immunoglobulin bearing lymphocytes in the Indian fruit bat: Pteropus giganteus. *Lymphology* 27: 97-104

175. Sarkar SK, Chakravarty AK. 1991. Analysis of immunocompetent cells in the bat, Pteropus giganteus: isolation and scanning electron microscopic characterization. *Dev Comp Immunol* 15: 423-430

176. Luis AD, Hayman DT, O'Shea TJ, Cryan PM, Gilbert AT, Pulliam JR, Mills JN, Timonin ME, Willis CK, Cunningham AA, Fooks AR, Rupprecht CE, Wood JL, Webb CT. 2013. A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special? *Proc Biol Sci* 280: 20122753

177. Calisher CH, Childs JE, Field HE, Holmes KV, Schountz T. 2006. Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin Microbiol Rev* 19: 531-545

178. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 56: 152-179

179. L'Vov D K, Easterday B, Hinshow W, Dandurov Iu V, Arkhipov PN. 1979. [Isolation of strains of the Hong Kong complex (H3N2) influenza virus from Nyctalus noctula bats in Kazakhstan]. *Vopr Virusol*: 338-341

180. Kelkar SD, Kadam SS, Banerjee K. 1981. Haemagglutination inhibition antibodies against influenza virus in bats. *Indian J Med Res* 74: 147-152

181. Tong S, Li Y, Rivailler P, Conrardy C, Castillo DA, Chen LM, Recuenco S, Ellison JA, Davis CT, York IA, Turmelle AS, Moran D, Rogers S, Shi M, Tao Y, Weil MR, Tang K, Rowe LA, Sammons S, Xu X, Frace M, Lindblade KA, Cox NJ, Anderson LJ, Rupprecht CE, Donis RO. 2012. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 4269-4274

182. Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, Yang H, Chen X, Recuenco S, Gomez J, Chen LM, Johnson A, Tao Y, Dreyfus C, Yu W, McBride R, Carney PJ, Gilbert AT, Chang J, Guo Z, Davis CT, Paulson JC, Stevens J, Rupprecht CE, Holmes EC, Wilson IA, Donis RO. 2013. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog* 9: e1003657

183. Gloza-Rausch F, Ipsen A, Seebens A, Gottsche M, Panning M, Drexler JF, Petersen N, Annan A, Grywna K, Muller M, Pfefferle S, Drosten C. 2008. Detection and prevalence patterns of group I coronaviruses in bats, northern Germany. *Emerg Infect Dis* 14: 626-631

184. Dominguez SR, O'Shea TJ, Oko LM, Holmes KV. 2007. Detection of group 1 coronaviruses in bats in North America. *Emerg Infect Dis* 13: 1295-1300

185. Lau SK, Li KS, Huang Y, Shek CT, Tse H, Wang M, Choi GK, Xu H, Lam CS, Guo R, Chan KH, Zheng BJ, Woo PC, Yuen KY. 2010. Ecoepidemiology and complete genome comparison of different strains of severe acute respiratory syndrome-related Rhinolophus bat coronavirus in China reveal bats as a reservoir for acute, self-limiting infection that allows recombination events. *J Virol* 84: 2808-2819

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

186. van Boheemen S, de Graaf M, Lauber C, Bestebroer TM, Raj VS, Zaki AM, Osterhaus AD, Haagmans BL, Gorbalenya AE, Snijder EJ, Fouchier RA. 2012. Genomic characterization of a newly discovered coronavirus associated with acute respiratory distress syndrome in humans. *MBio* 3

187. Drexler JF, Corman VM, Muller MA, Maganga GD, Vallo P, Binger T, Gloza-Rausch F, Rasche A, Yordanov S, Seebens A, Oppong S, Adu Sarkodie Y, Pongombo C, Lukashev AN, Schmidt-Chanasit J, Stocker A, Carneiro AJ, Erbar S, Maisner A, Fronhoffs F, Buettner R, Kalko EK, Kruppa T, Franke CR, Kallies R, Yandoko ER, Herrler G, Reusken C, Hassanin A, Kruger DH, Matthee S, Ulrich RG, Leroy EM, Drosten C. 2012. Bats host major mammalian paramyxoviruses. *Nat Commun* 3: 796

188. He B, Fan Q, Yang F, Hu T, Qiu W, Feng Y, Li Z, Li Y, Zhang F, Guo H, Zou X, Tu C. 2013. Hepatitis virus in long-fingered bats, Myanmar. *Emerg Infect Dis* 19: 638-640

189. Drexler JF, Geipel A, Konig A, Corman VM, van Riel D, Leijten LM, Bremer CM, Rasche A, Cottontail VM, Maganga GD, Schlegel M, Muller MA, Adam A, Klose SM, Carneiro AJ, Stocker A, Franke CR, Gloza-Rausch F, Geyer J, Annan A, Adu-Sarkodie Y, Oppong S, Binger T, Vallo P, Tschapka M, Ulrich RG, Gerlich WH, Leroy E, Kuiken T, Glebe D, Drosten C. 2013. Bats carry pathogenic hepadnaviruses antigenically related to hepatitis B virus and capable of infecting human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 16151-16156

190. Badrane H, Tordo N. 2001. Host switching in Lyssavirus history from the Chiroptera to the Carnivora orders. *J Virol* 75: 8096-8104

191. Eggers HJ. 1999. Milestones in early poliomyelitis research (1840 to 1949). *J Virol* 73: 4533-4535

192. Leland DS, Ginocchio CC. 2007. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Clin Microbiol Rev* 20: 49-78

193. Kapoor A, Lipkin WI. 2014. Virus discovery in the 21st century. *eLS*

194. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244: 359-362

195. Ren RB, Costantini F, Gorgacz EJ, Lee JJ, Racaniello VR. 1990. Transgenic mice expressing a human poliovirus receptor: a new model for poliomyelitis. *Cell* 63: 353-362

196. Sridhar S, To KK, Chan JF, Lau SK, Woo PC, Yuen KY. 2015. A systematic approach to novel virus discovery in emerging infectious disease outbreaks. *J Mol Diagn* 17: 230-241

197. Hughes JH. 1993. Physical and chemical methods for enhancing rapid detection of viruses and other agents. *Clin Microbiol Rev* 6: 150-175

198. Pagano JS, Vaheri A. 1965. Enhancement of infectivity of poliovirus RNA with diethylaminoethyl-dextran (DEAE-D). *Arch Gesamte Virusforsch* 17: 456-464

199. Konopka K. 2003. Enhancement of retroviral transduction by cationic liposomes. *Methods Enzymol* 373: 493-506

200. Crawford K, Lager K, Miller L, Opriessnig T, Gerber P, Hesse R. 2015. Evaluation of porcine epidemic diarrhea virus transmission and the immune response in growing pigs. *Vet Res* 46: 49

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

201. Makadiya N, Brownlie R, van den Hurk J, Berube N, Allan B, Gerdts V, Zakhartchouk A. 2016. S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein as a vaccine antigen. *Virol J* 13: 57

202. Chaipan C, Kobasa D, Bertram S, Glowacka I, Steffen I, Tsegaye TS, Takeda M, Bugge TH, Kim S, Park Y, Marzi A, Pohlmann S. 2009. Proteolytic activation of the 1918 influenza virus hemagglutinin. *J Virol* 83: 3200-3211

203. Ilyushina NA, Ikizler MR, Kawaoka Y, Rudenko LG, Treanor JJ, Subbarao K, Wright PF. 2012. Comparative study of influenza virus replication in MDCK cells and in primary cells derived from adenoids and airway epithelium. *J Virol* 86: 11725-11734

204. Desmyter J, Melnick JL, Rawls WE. 1968. Defectiveness of interferon production and of rubella virus interference in a line of African green monkey kidney cells (Vero). *J Virol* 2: 955-961

205. Haycock JW. 2011. *3D cell culture : methods and protocols*. New York: Humana Press/Springer. xi, 343 p. pp.

206. Staheli JP, Boyce R, Kovarik D, Rose TM. 2011. CODEHOP PCR and CODEHOP PCR primer design. *Methods Mol Biol* 687: 57-73

207. Rose TM, Henikoff JG, Henikoff S. 2003. CODEHOP (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design. *Nucleic Acids Res* 31: 3763-3766

208. Jarrett RF, Johnson D, Wilson KS, Gallagher A. 2006. Molecular methods for virus discovery. *Dev Biol (Basel)* 123: 77-88; discussion 119-132

209. Winstanley C. 2002. Spot the difference: applications of subtractive hybridisation to the study of bacterial pathogens. *J Med Microbiol* 51: 459-467

210. Lisitsyn N, Lisitsyn N, Wigler M. 1993. Cloning the differences between two complex genomes. *Science* 259: 946-951

211. Allander T, Emerson SU, Engle RE, Purcell RH, Bukh J. 2001. A virus discovery method incorporating DNase treatment and its application to the identification of two bovine parvovirus species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 11609-11614

212. Kapoor A, Slikas E, Simmonds P, Chieochansin T, Naeem A, Shaukat S, Alam MM, Sharif S, Angez M, Zaidi S, Delwart E. 2009. A newly identified bocavirus species in human stool. *J Infect Dis* 199: 196-200

213. Cheung AK, Wu G, Wang D, Bayles DO, Lager KM, Vincent AL. 2010. Identification and molecular cloning of a novel porcine parvovirus. *Arch Virol* 155: 801-806

214. Djikeng A, Halpin R, Kuzmickas R, Depasse J, Feldblyum J, Sengamalay N, Afonso C, Zhang X, Anderson NG, Ghedin E, Spiro DJ. 2008. Viral genome sequencing by random priming methods. *BMC Genomics* 9: 5

215. Arthur JL, Higgins GD, Davidson GP, Givney RC, Ratcliff RM. 2009. A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children. *PLoS Pathog* 5: e1000391

216. Blomstrom AL, Belak S, Fossum C, McKillen J, Allan G, Wallgren P, Berg M. 2009. Detection of a novel porcine boca-like virus in the background of porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome. *Virus Res* 146: 125-129

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

217. van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJ, Wolthers KC, Wertheim-van Dillen PM, Kaandorp J, Spaargaren J, Berkhout B. 2004. Identification of a new human coronavirus. *Nat Med* 10: 368-373

218. Fouchier RA, Hartwig NG, Bestebroer TM, Niemeyer B, de Jong JC, Simon JH, Osterhaus AD. 2004. A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 6212-6216

219. Pyrc K, Jebbink MF, Berkhout B, van der Hoek L. 2008. Detection of new viruses by VIDISCA. Virus discovery based on cDNA-amplified fragment length polymorphism. *Methods Mol Biol* 454: 73-89

220. van der Heijden M, de Vries M, van Steenbeek FG, Favier RP, Deijs M, Brinkhof B, Rothuizen J, van der Hoek L, Penning LC. 2012. Sequence-independent VIDISCA-454 technique to discover new viruses in canine livers. *J Virol Methods* 185: 152-155

221. Jazaeri Farsani SM, Oude Munnink BB, Canuti M, Deijs M, Cotten M, Jebbink MF, Verhoeven J, Kellam P, Loens K, Goossens H, Ieven M, van der Hoek L. 2015. Identification of a novel human rhinovirus C type by antibody capture VIDISCA-454. *Viruses* 7: 239-251

222. Handelsman J. 2004. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev* 68: 669-685

223. Mokili JL, Rohwer F, Dutilh BE. 2012. Metagenomics and future perspectives in virus discovery. *Curr Opin Virol* 2: 63-77

224. Canuti M, van der Hoek L. 2014. Virus discovery: are we scientists or genome collectors? *Trends Microbiol* 22: 229-231

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

全文总结

传染病疫情暴发时，公共卫生领域科研人员需要对引起疫情暴发的病因进行快速鉴定，从而为疾病预防控制提供关键信息和技术支撑。因此，病原的快速检测和鉴定在公共卫生领域中意义重大。基于简并引物 PCR 的 Pan-viral screening 是一种快速诊断技术。我们实验室目前已经设计了 10 种病毒科或属的通用引物，使用这些引物，我们从蝙蝠样本中已经发现了一株新型冠状病毒、一株博卡病毒、四株星状病毒和一株正呼肠孤病毒变异株。未来将设计更多病毒科或属的通用引物，以期涵盖更广的病毒范围进行病毒检测和新病毒发现。

重组现象在冠状病毒成员中很普遍，也是冠状病毒产生遗传多样性的重要机制。然而，迄今为止所有已经报道的重组事件均发生在相关病毒序列的同源重组上。本研究中，我们发现了一株新型蝙蝠冠状病毒，其基因组序列中插入了一个功能性的 p10 基因。多方面的证据表明这个 p10 基因可能来源于一个古老的无囊膜的正呼肠孤病毒。这是融合相关小跨膜（fusion-associated small transmembrane，FAST）蛋白在有囊膜病毒中的第一次报道，同时也是单股正链 RNA 病毒与双股有节段的 RNA 病毒之间重组的第一次报道。这些发现将进一步揭示病毒进化的微妙机制，并且可能为理解冠状病毒异源重组过程提供重要信息。

冠状病毒基因组复制和 RNA 合成的机制非常独特，亚基因组形成是冠状病毒病毒复制的一个重要标志。本研究中，我们通过直接检测样本中的亚基因组来判断研究的冠状病毒在宿主组织细胞中是否复制，以及判断特定的基因在病毒生活周期中是否转录。同时，通过人工构建亚基因组的方法验证特定基因的功能。这是我们在冠状病毒研究方法上的一点创新。

SARS-CoV 和 MERS-CoV 是两种代表性的跨越了种间屏障并引起人类感染的 Beta 冠状病毒。此外，最近的研究结果表明，另外一种 Beta 冠状病毒 BatCoV HKU4 已经适应性地结合人类细胞。因此，对其他流行的 Beta 冠状病毒跨物种传播的可能性进行研究，是当前一个急切的议题。BatCoV HKU9 同样是一种 Beta 冠状病毒，在蝙蝠中经常检测到的。本研究中，我们解析了 BatCoV HKU9 假定的受体结合结构域的结构并对其功能特点进行了鉴定，这一结构域在其他 Beta 冠状病毒中经证实是受体识别和跨物种传播的关键因子。从解析的 BatCoV

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

HKU9 RBD 结构我们可以观察到，BatCoV HKU9 RBD 结构与其他的 Beta 冠状病毒 RBD 结构一样存在一个保守的核心亚结构域，同时还存在一个结构上独特的外部亚结构域。在目前所有已知的冠状病毒 RBD 结构中，我们进一步揭示亚结构域之间的氨基酸相互作用模式是同源的。这个特点从进化上揭示了 Beta 冠状病毒 spike 蛋白和它们在宿主受体使用上的多态性。

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

文章发表

1. **Huang C**, Qi J, Lu GW, Wang Q, Yuan Y, Wu Y, Zhang Y, Yan J, Gao GF. Putative Receptor-binding Domain of Bat-derived Coronavirus HKU9 Spike Protein: Evolution of Betacoronavirus Receptor Binding Motifs. **Biochemistry**. DOI: 10.1021/acs.biochem.6b00790

2. **Huang C**, Liu WJ, Xu W, Jin T, Zhao Y, Song J, et al. (2016) A Bat-Derived Putative Cross-Family Recombinant Coronavirus with a Reovirus Gene. **PLoS Pathog** 12(9): e1005883. doi:10.1371/journal.ppat.1005883.

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

致　谢

时光如白驹过隙，转眼间我的博士生涯即将结束。漫漫求学路，南京、北京，国内、国外，一路走来，酸甜苦辣个中滋味，感触良深。值此博士论文即将完稿之际，回首自己曾经走过的路，满怀感恩之心谨向给予我指导和帮助的老师、同学和朋友们，以及一直支持我的家人表达诚挚的谢意。

首先，要感谢我的导师高福教授。四年来高老师对我的谆谆教导，无数次的启发、鼓励和宽容，令我终生难忘。高老师对科学问题超乎寻常的敏感性和前瞻性，雷厉风行的工作作风，严谨的治学态度和坚持不懈的科学精神，渊博的学识和诲人不倦的高尚师德，永远是我学习的榜样。

感谢我的大学老师——南京农业大学的毛卫华老师，在最关键的时候，帮我解决了一个大麻烦。感谢我的硕士导师姜平教授曾经的教导，感谢蔡宝祥教授、张振兴教授和郑明球教授、Dr. Vikram Misra、Dr. Andrew Potter 和 Dr. Volker Gerdts 的授业解惑和启智明心。

感谢在异国他乡时，刘永庆老师、王道毅博士、炎斌博士、黄彦云博士、冯斯竞、吴中勤师姐和朱建中师兄，还有我最亲爱的同学 Iran Yousefei 给予的无私帮助。

感谢陈继明师兄、范伟兴老师、魏荣师兄、张永强师弟和刘朔师妹，尤其是田莉莉师妹，在我最艰难的时候施以援手。感谢我的大学同学们，心智成熟的那几年，我们一起成长，感谢你们二十年来的支持和鼓励。

感谢在京的乡亲黄前松、黄前柏和大哥黄敬平；初中和高中同学费久佳、李儒天、徐新创、汪承义、向杰和王利青；大学铁哥们王卓和胥哲；硕士同学周雪媚、李霆、张彦明、杨仁全、黄耀凌、尤华和路复员；师妹张海凤和王永霞；特别是以前的同事和朋友：李丹地博士、徐子乾、郝彦玲博士、王芙、党雪芹、欧阳晶博士、王刚博士和吴小兵教授。生活在同一座城市，有你们的问候和关心，让我感觉不是孤身一人在奋斗。

感谢我的博士同学们：郭小娟、朱闻斐、高燕、陈利娜、颜晨、李金松、刘洋、杨扬、谢兴旺、许松涛、李茂中（病毒所）；张帆、欧阳一非、韩海红、卢

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

士军、任向楠、云春凤、沈海涛、李晨汐、赵凯、刘辉（营养所）；刘莎、申小娜、李辞修、王艳、刘杰、桑少伟、张烁、李马超（传染病所）；刘慧鑫、李兰花、金艳涛、齐金蕾、高志云、韦华冕、付晓静、赵海、焦洋、姚文荣、何璇（艾滋病中心）；邱侠、张哲、李坤、张宝莹、武云云、张烁（环境、辐射、职卫所）；李洪兴（改水中心）；尹德卢、余建兴（中心）。尤其是病毒所的同学，有幸与你们相识。同学三年，一起上课、开题、中期考核、预答辩，一起开心地聊天、发牢骚、聚餐，这份情谊，让人难以忘怀。

感谢 10 多年前一起“玩”检索的兄弟们：房云海博士、朱培元博士、曹云飞博士、蒋柳明、洪旭光博士、陈雄、周迎春、李纲、辛志宏博士和陆建伟老师。那时候积累的文献检索技巧和大学图书馆密码，真的是受益终生。

感谢当年在 Biolover 和“医网琴声”网站上结识的战友：张林升大哥、郭兴中大哥、孟建雄老师、茅翔老师、何有裕博士、李欣、王征博士、李云峰博士、张柯博士、黄志、陈小华博士、刘枫博士、肖高铿博士和李启辉。虽然有些兄弟姐妹迄今尚未谋面，但是志同道合的一帮朋友在网站上和微信群里一起探讨专业技术、最新进展以及各种专业软件的用途用法，那种意气相投，没有掺杂任何功利的交流，算是人生的一大快事。

感谢严景华老师在试验上的指导和帮助，感谢严老师为实验室付出的辛勤和汗水。感谢齐建勋老师在晶体收集和结构解析中做出的辛勤工作。感谢王奇慧、李燕、张艳芳和张蔚老师在我试验进展艰难的时候，百忙之中给予的帮助。感谢王亮博士和刘翟教授在进化分析上提供的帮助。感谢逯光文教授、施一教授和 Dr. Edward C. Holmes 在论文写作上给予的巨大帮助。感谢吴燕、马素芳、吴莹、袁菲、白玉、闫群、程蒙、李雪、闫红梅、郭翠艳、黄晓萍、马兰清、赵欣、仝舟、璩骁、李世华、戴连攀、谭曙光和毕钰海等老师和工作人员，是你们辛勤的工作，为我们实验室创造了一个良好的工作环境。感谢中国疾控中心病毒病所实验室刘军、赵洪兰和王月等老师和工作人员的支持，感谢纪伟、全传松、徐子乾、贾浩、刘科芳等师妹师弟一起在实验室里奋战。感谢病毒病所洪涛院士实验室宋敬东博士、邹小辉博士、郭小娟博士和屈建国老师在试剂及荧光显微镜的使用上提供的无私帮助。感谢云南省疾病预防控制中心徐闻所长、李洪老师、周永明、

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

向以斌和宁德明老师，勐腊县疾病预防控制中心刘华兴主任和文红华科长，浙江省疾病预防控制中心张严峻所长、颜浩博士和楼秀玉师妹，在采样时提供的协助。

感谢王寒师妹、张水军师弟、宋豪师弟、彭如超师弟、刘建伟师弟、朱耀华师弟、杨顼师弟、徐坤师弟、Qari、王飞同学、李安同学和肖进同学，还有病毒所的蓝佳明师妹和郭小娟同学，很多时候在一起，吃的是饭，聊的是心情，试验探讨才是副产品。

感谢赵敏、袁圆、张贺林、徐颖、许晓莹、仝娇、段文倩、忤丽丽、杨文蔚、赵振楠、崔樱子、李玲慧、王敏、高璟、冯磊、张潇、宛玉花、温春霞、陈丹青、庞立丽、刘建伟、殷立伟、张常、江海海、苏朝、刘升、李海峰、尚子方、朱腾飞、宋健、张文亮、王旭东、牛灵、Joel Haywood、Yemi Oladejo、Joseph Obameso、Moki、杨化冰、张浩、李俊甫、胡旭乐、杨凡力、万涛、Christopher John Vavricka、Boris Tefsen、刘庆浩、刘文波、郝海邦等众多师弟师妹和同学们在试验中的陪伴和帮助，我们相聚在实验室这个大家庭，共同学习和生活，总是那么地欢乐。

最后感谢我的父母和亲人，前岳父岳母和外公外婆，你们的理解和支持，永远是我前进的动力！

黄灿平

2016年4月18日

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net