

# 重庆地区婴幼儿轮状病毒腹泻 VP7 型别分析

张静 王宁遂 邓兵 朱静

**【摘要】** 目的 研究重庆地区 1998~2000 年度秋冬季婴幼儿轮状病毒腹泻分子流行病学。方法 采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)扩增婴幼儿腹泻便样中的编码轮状病毒 VP7 蛋白的全基因片段(1 062 bp),再用巢式-聚合酶链反应(net-PCR)对扩增得到的 VP7 基因进行分型。同时利用核苷酸序列分析方法进行分型。结果 在 1998~1999 年度 130 例婴幼儿腹泻便样中 VP7 基因阳性者 50 例(38.46%),其中 G1 型占 88%(44/50),G3 型占 8%(4/50),混合型占 4%(2/50)均为 G1 + G3 型,而 1999~2000 年度轮状病毒流行季节采集的 112 份标本中 VP7 基因扩增阳性者 38 例(33.93%),其中 G3 型占 78.95%(30/38),G1 型占 13.16%(5/38),混合型占 7.89%(3/38),均为 G1 + G3 型。核苷酸序列分型结果与 PCR 分型结果一致。结论 重庆地区 1998~1999 年度轮状病毒流行季节中流行的轮状病毒以 G1 型为主,而 1999~2000 年度轮状病毒流行季节中 G3 型为主,在连续两年的监测中出现轮状病毒血清型的转变。

**【关键词】** 轮状病毒;婴幼儿腹泻;VP7 型别;聚合酶链反应

**VP7 typing of rotavirus from children with diarrhea in Chongqing Region** ZHANG Jing, WANG Ningsui, DENG Bing, et al. Chongqing Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China

**【Abstract】 Objective** To study VP7 type of rotavirus from children with diarrhea in Chongqing area from 1998 to 2000. **Methods** Double-strand RNA of rotavirus extracted from stool samples was used as the template for reverse transcription of gene VP7, which was followed by nested PCR for VP7 typing. Nucleotide sequence analysis was used for VP7 typing. **Results** Among the 130 fecal specimens from pediatric patients with acute gastroenteritis during the epidemic season of 1998-1999, fifty specimens (38.46%) were identified as rotavirus-positive by RT-PCR. Of these, serotype G1 was found to be largely predominant and accounted for 88% (44/50), while serotype G3 accounted for 8% (4/50), coinfection of G1 and G3 accounted for 4% (2/50) respectively. While during the next epidemic season from 1999 to 2000, thirty-eight (33.93%) rotavirus positive specimens were detected from 112 stool samples by RT-PCR. Serotype G3 increased significantly-up to 78.95% (30/38) and became the most prevalent serotype in that season. It was found that only 13.16% (5/38) were serotype G1, 7.89% (3/38) were G1 and G3 mixture. The nucleotide sequence analysis results agreed with the RT-PCR typing assay. **Conclusions** Serotype G1 and G3 were the prevalent VP7 types in Chongqing, China from 1998 to 2000. A shift from G1 to G3 was observed in the last two successive epidemic seasons of rotavirus epidemics.

**【Key words】** Rotavirus; Infantile diarrhea; VP7 type; Polymerase chain reaction(PCR)

A 组轮状病毒是引起全世界婴幼儿严重胃肠炎的主要病因,每年可导致发展中国家 60 万~87 万例死亡,目前尚无特效治疗方法,故疫苗被认为是控制轮状病毒感染的最大希望<sup>[1]</sup>。然而,疫苗的研制必须建立在了解本地区轮状病毒感染的分子流行病学的基础上,我们采用巢式-聚合酶链反应(net-

PCR)及核苷酸序列测定方法分析婴幼儿轮状病毒腹泻 VP7 型别,从而对重庆地区婴幼儿轮状病毒腹泻分子流行病学进行研究。

## 材料和方法

1. 轮状病毒标本:收集 1998 年 12 月至 1999 年 1 月及 1999 年 12 月至 2000 年 1 月重庆医科大学附属儿童医院门诊及住院的婴幼儿腹泻便样标本,提取病毒 RNA, -20℃ 冻存备用。

作者单位 400014 重庆医科大学附属儿童医院血液遗传二室

张静,女,重庆人,在读博士研究生。1997 年 7 月毕业于重庆医科大学儿科系,获学士学位;1997 年 9 月于重庆医科大学攻读儿科分子生物学专业硕士学位,1999 年攻读博士学位。

2. 病毒 RNA 提取 :取粪便标本上清 400  $\mu$ l 加入 100  $\mu$ l 5 $\times$  TES, 再加入 60  $\mu$ g 蛋白酶 K 及 50  $\mu$ l 10% 十二烷基磺酸钠, 于 55 $^{\circ}$ C 作用 1 h, 用酚/氯仿 (v/v = 1) 抽提, 异丙醇沉淀 RNA。

3. 引物 本研究采用 net-PCR 进行血清型分析。第一次扩增采用编码 VP7 基因两端的保守序列设计引物 (Beg9 + End9), 经逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 扩增出基因的全长序列 (1 062 bp); 第二次扩增时, 正链引物根据报道的核苷酸序列高变区 (这些高变区在同一血清型中保守, 在不同血清型间高度变异) 设计型特异性引物 (aAT8, aBT1, aCT2, aDT4, aET3, aFT9), 负链引物选择 3' 端保守的共同引物 (RVG9), 根据扩增产物片段长度的不同来区别不同血清型。具体引物序列参见表 1<sup>[2]</sup>。

表 1 PCR 扩增所用的寡核苷酸引物

引物名称	序列 (5' - 3')	位置	分型
Beg9	GGCTTTAAAAGAGAGAATTCGCTCTGG	1 ~ 28	-
End9	GGTCACATCATACAATTTCTAATCTAAG	1 062 ~ 1 036	-
RVG9	GGTCACATCATACAATTTCT	1 062 ~ 1 044	-
aAT8	GTCACACCAATTTGTAAATTCG	178 ~ 198	G8
aBT1	CAAGTACTCAAATCAATGATGG	314 ~ 335	G1
aCT2	CAATGATATTAACACATTTTCTGTG	411 ~ 435	G2
aDT4	CGTTTCTGGTGAGGAGTTG	480 ~ 498	G3
aET3	CGTTTGAAGAAGTTGCAACAG	689 ~ 709	G4
aFT9	CTAGATGTAACTACAACACTAC	757 ~ 776	G9

4. PCR :第一次扩增的 RT-PCR 反应体系为 : 10 $\times$  PCR 缓冲液 5  $\mu$ l, DMSO 液 7% (v/v), dNTPs 200  $\mu$ mol/L, 上下游引物 (Beg9 和 End9) 各 50  $\mu$ mol/L (终浓度), DTT 2  $\mu$ l 样品 RNA 1 ~ 5  $\mu$ g, 加 DEPC 水至总体积 50  $\mu$ l, 离心混匀, 封盖 50  $\mu$ l 石蜡油, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min 后迅速冰浴, 然后加入 AMT 逆转录酶 10 U 和 Taq 酶 2 U, 置 42 $^{\circ}$ C 逆转录 30 min 94 $^{\circ}$ C 加热 5 min 后进行 PCR, 30 个循环 (94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min) 结束后, 72 $^{\circ}$ C 再延长 7 min。二次扩增时, 取第一次扩增产物 2  $\mu$ g, 10 $\times$  PCR 缓冲液 5  $\mu$ l, DMSO 液 7% (v/v), dNTPs 200  $\mu$ mol/L, 6 个分型引物和 1 个下游公共引物各 50  $\mu$ mol/L (终浓度), Taq 酶 2 U, 加 DEPC 水至总体积 50  $\mu$ l, 离心混匀, 封盖 50  $\mu$ l 石蜡油, PCR 30 个循环。放大产物经 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, EB 染色, 紫外光观察及照相。

5. 核苷酸序列分析 :利用 ABI377 全自动基因分析仪 (上海生工公司) 对 RT-PCR 扩增的 VP7 基

因全长 cDNA 直接进行核苷酸序列测定。

## 结 果

由 6 个分型引物及公共引物扩增出以下不同长度的条带 :749、652、374、583、885 及 306 bp 分别对应 VP7 基因的 1、2、3、4、8、9 型。取自重庆地区 1998 ~ 1999 年度轮状病毒流行季节的 130 例婴幼儿腹泻便样标本, 检出轮状病毒阳性标本 50 例, 其中 G1 型占 88% (44/50), G3 型占 8% (4/50), 混合型占 4% (2/50) 均为 G1 + G3 型; 而从 1999 ~ 2000 年度轮状病毒流行季节采集的 112 例标本中扩增出 38 例 VP7 基因阳性 (33.93%), 其中 G3 型占 78.95% (30/38), G1 型占 13.16% (5/38), 混合型占 7.89% (3/38) 均为 G1 + G3 型 (表 2)。

表 2 1998 ~ 2000 年度重庆地区致婴幼儿腹泻轮状病毒 VP7 分型结果

血清型	不同流行季节不同型别病毒株数 (构成比%)	
	1998 ~ 1999 年	1999 ~ 2000 年
G1	44 (88.00)	5 (13.16)
G3	4 (8.00)	30 (78.95)
G1 + G3	48 (100.00)	35 (78.95)
合 计	50 (100.00)	38 (100.00)

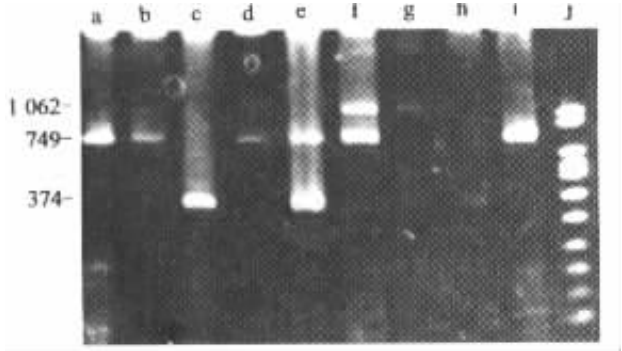
在过去连续两年的流行病学监测中可以发现有明显的轮状病毒血清型的转变, 即由 1998 ~ 1999 年度 G1 型为主的流行株转变为次年以 G3 型轮状病毒为主的流行。

本研究采用核苷酸序列分析对轮状病毒进行分型, 即对本地区分离的轮状病毒株 VP7 全长 cDNA 进行核苷酸序列测定 (图 1), 将推导出的氨基酸序列与参考株进行比较, 以确定其型别。通过序列比对分析发现, 分离的第 43 号标本序列与 YO 株 (G3 型) 具有高度同源性, 两者核苷酸及氨基酸同源性均为 96.55%, 此病毒株与其他血清型参考株的核苷酸及氨基酸同源性较低, 仅达 60.92% ~ 77.01% 和 51.72% ~ 79.31%, 存在较大变异 (图 2)。而 RT-PCR 分型结果提示第 43 号标本为 G3 血清型。

## 讨 论

轮状病毒属呼肠弧病毒科, 为双链 RNA (dsRNA) 病毒。它具有两个外壳蛋白: VP7 和 VP4, 二者独立产生中和抗体。根据 VP7 和 VP4 抗原特异性的不同, 可将轮状病毒分为不同血清型 (G 和 P 血清型)。迄今为止, 在人群中已发现 14 种不

同 G 血清型和 9 种 P 血清型<sup>[3]</sup>。而致人胃肠炎的轮状病毒以 G1 ~ G4 型为主,在发展中国家不仅检出了大多数异常株型,而且混合感染较为突出<sup>[4]</sup>。由第 7、8 或 9 基因片段编码(因不同病毒株有所不同)的糖蛋白 VP7 是主要的型特异性中和抗原,可刺激机体产生保护性中和抗体。



a b d f i 为 G1 血清型(749 bp) c h 为 G3 血清型(374 bp) e 为 G1 与 G3 混合型 g 为 VP7 全长 cDNA(1 062 bp) j 为分子量标准(pUC Mix Marker: 116 883 692 501 489 404 331 242 190 147 111)

图 1 轮状病毒标本经 RT-PCR 分型结果

轮状病毒感染作为婴幼儿腹泻最主要的病因,目前尚无特效治疗方法,且改善食品、水源、卫生条件对于控制其感染所起的作用甚小,因此疫苗研制无疑是一个很好的对策。而一种有效的疫苗必须与流行地区病毒株具有相同的抗原性<sup>[5]</sup>,这样才能刺激机体对流行毒株型特异性免疫保护。VP7 作为主要的型特异性抗原,其 G 血清型的确定在疫苗评估和流行病学监测中的地位显得尤为突出。本研究采用 net-PCR 和核苷酸序列分析方法对轮状病毒的 VP7 型别进行分析,结果表明,重庆地区 1998 ~ 1999 年度轮状病毒季节中流行的轮状病毒以 G1 型为主(占 88%),而 1999 ~ 2000 年度轮状病毒流行季节中流行的轮状病毒以 G3 型为主(占 78.95%),这一结果与中国其他地区的监测结果并不完全符合(后者以 G1 和 G2 型流行为主)<sup>[6,7]</sup>。由此证实了从一特定地区得到的资料不足以代表整个国家所流行的轮状病毒类型的观点,同样报道见于英国及日本<sup>[8,9]</sup>。因此,我们需要在全国设立多个实验室,以监测在整个环境中所传播的轮状病毒类型<sup>[8]</sup>。

aa. 87-101(核苷酸序列 307-351)

	Thr Glu Ala Ala Thr Glu Ile Asn Asp Asn Ser Trp Lys Asp Thr
No. 43	ACT GAA GCA GCA ACA GAA ATA AAT GAT AAT TCA TGG AAG GAT ACA
	Thr Glu Ala Ser Thr Gln Ile Asn Asp Gly Asp Trp Lys Asp Ser
Wa(G1)	ACT GAA GCA AGT ACT CAA ATC AAT GAT GGT GAC TGG AAA GAC TCA
	Ala Glu Ala Lys Asn Glu Ile Ser Asp Asp Glu Trp Glu Asn Thr
HU-5(G2)	GCA GAA GCT AAA AAT GAG ATT TCA GAT GAT GAA TGG GAA AAT ACT
	Thr Glu Ala Ala Thr Glu Ile Asn Asp Asn Ser Trp Glu Asp Thr
YQ(G3)	ACT GAA GCA GCA ACA GAA ATA AAT GAT AAT TCA TGG GAG GAT ACA
	Ser Glu Ala Pro Thr Gln Ile Ser Asp Asn Glu Trp Lys Asp Thr
VA75(G4)	TCT GAG GCT CCA ACT CAA ATT AGT GAT AAC GAA TGG AAA GAT ACA
	Leu Glu Ala Glu Thr Glu Ile Ala Asp Ser Trp Trp Lys Asp Thr
69M(G8)	CTA GAA GCA GAG ACA GAG ATA GCA GAT AGT TGG TGG AAG GAT ACT
	Pro Glu Ala Ser Thr Gln Ile Gly Asp Thr Glu Trp Lys Asp Thr
WI6I(G9)	CCT GAA GCA TCA ACT CAA ATT GGA GAT ACA GAA TGG AAA GAC ACT

aa. 208-211(核苷酸序列 670-711)

	Leu Thr Thr Asp Thr Asn Thr Phe Glu Glu Val Ala Thr Ala
No. 43	CTA ACA ACT GAT ACA AAC ACG TTT GAA GAA GTT GCA ACA GCT
	Gln Thr Thr Asn Val Asp Ser Phe Glu Met Ile Ala Glu Asn
Wa(G1)	CAA ACA ACA AAC GTA GAC TCA TTT GAA ATG ATT GCT GAG AAT
	Lys Thr Thr Asp Val Asn Thr Phe Glu Ile Val Ala Ser Ser
HU-5(G2)	AAA ACT ACG GAT GTA AAC ACA TTT GAG ATT GTT GCG TCG TCT
	Leu Thr Thr Asp Thr Asn Thr Phe Glu Glu Val Ala Thr Ala
YQ(G3)	CTA ACT ACT GAT ACA AAC ACG TTC GAA GAA GTT GCA ACA GCT
	Gln Thr Thr Asn Val Ala Thr Phe Glu Met Val Ala Asp Ser
VA75(G4)	CAA ACA ACG AAT GTA GCT ACT TTT GAA ATG GTG GCT GAC AGT
	Leu Thr Thr Asp Thr Thr Thr Phe Glu Glu Val Ala Thr Ala
69M(G8)	CTT ACC ACG GAT ACT ACA ACT TTT GAA GAA GTT GCA ACA GCT
	Thr Thr Thr Asn Thr Ala Thr Phe Glu Glu Val Ala Ala Ser
WI6I(G9)	ACA ACT ACA AAT ACA GCA ACA TTT GAG GAA GTG GCC GCA AGT

No. 43 为重庆地区 1998 ~ 2000 年度分离的轮状病毒株; Wa(G1)、HU-5(G2)、YQ(G3)、VA75(G4)、69M(G8)、WI6I(G9) 为参考株

图 2 轮状病毒株 VP7 两个氨基酸区域(aa87-101、208-211)及相应核苷酸序列比较

本研究采用核苷酸序列测定方法对轮状病毒进行分型。以往研究表明轮状病毒 VP7 氨基酸序列中存在 6 个血清型特异性区域,即 A ~ F 区:aa. 39 ~ 50, 87 ~ 101, 120 ~ 130, 143 ~ 152, 208 ~ 221, 233 ~ 242。这些区域在同一血清型轮状病毒中保守,在不同血清型间高度变异<sup>[10]</sup>。其中 B、D、E 区被认为与中和抗原决定簇位点形成有关。Green 等<sup>[10]</sup>利用 B 区及 E 区(aa. 87 ~ 101, 208 ~ 221, 分别对应核苷酸 307 ~ 351, 670 ~ 711)氨基酸序列同源性分析来确定轮状病毒血清型。即野生分离株与已知型别的参考株进行比对,如果以上两区总的氨基酸序列同源性大于 85% 则该病毒株可判定与参考株为同一血清型<sup>[11]</sup>。在本研究中分离的第 43 号标本与 YO 株(G3 型)氨基酸同源性达 96.55%,提示此标本可判断为 G3 型,这与 PCR 分型结果一致。

在连续两年的监测中出现了轮状病毒血清型的转变,即由 1998 ~ 1999 年度 G1 型为主的流行株转变为次年以 G3 型轮状病毒为主的流行。其他国家也有类似报道,如芬兰在 1988 ~ 1990 年间出现 G1 到 G4 血清型的转变<sup>[12]</sup>,而 G1 至 G2 型的转变见于澳大利亚<sup>[13]</sup>。以上这些纵向研究提示主要流行的血清型可以发生突然转变。因此,我们必须意识到对轮状病毒的流行进行长期监测的重要性。

整个实验中我们未能发现除 G1 和 G3 型以外的常见血清型(G2、G4)及易出现于发展中国家的异常血清型,这可能与样本量偏少有关。但我们在研究中发现了数例混合感染(均为 G1 + G3 型),提示发展中国家轮状病毒流行的复杂性。

#### 参 考 文 献

- 1 Kirkwood CD, Gentsch JR, Hoshino Y, et al. Genetic and antigenic characterization of a serotype P[6]G9 human rotavirus

strain isolated in the United States. *Virology*, 1999, 256:45-53.

- 2 Gouvea V, Glass RI, Woods PA, et al. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol*, 1990, 28:276-282.
- 3 Geentsch JR, Woods PA, Ramachandran M, et al. Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: Implications for vaccine development. *J Infect Dis*, 1996, 174(suppl 1):s30-s36.
- 4 Wu HX, Taniguchi K, Urasana T, et al. Serological and genomic characterization of human rotavirus detected in China. *J Med Virol*, 1998, 55:168-176.
- 5 Tabassum S, Shears P, Hart CA. Genomic characterization of rotavirus strains obtained from hospitalized children with diarrhea in Bangladesh. *J Med Virol*, 1994, 43:50-56.
- 6 袁丽娟, 钱渊, 刘军, 等. 北京等我国四个地区婴幼儿腹泻轮状病毒 VP4 和 VP7 型别的研究. *病毒学报*, 1994, 10:136-144.
- 7 方肇寅, 晋圣瑾, 秦树民, 等. PCR 方法用于我国 A 组轮状病毒的分型研究. *病毒学报*, 1994, 10:316-321.
- 8 Noel JS, Beards GM, Cubitt WD. Epidemiological survey of human rotavirus serotypes and electropherotypes in young children admitted to two children's hospitals in Northeast London from 1984 to 1990. *J Clin Microbiol*, 1991, 29:2213-2219.
- 9 Urasawa S, Urasawa T, Taniguchi K, et al. Survey of human rotavirus serotypes in different locales in Japan by enzyme-linked immunosorbent assay with monoclonal antibodies. *J Infect Dis*, 1989, 160:44-51.
- 10 Green KY, Midthun K, Gorziglia M, et al. Comparison of the amino acid sequences of the major neutralization protein of the four human rotavirus serotypes. *Virology*, 1987, 168:429-433.
- 11 Green KY, Sears JF, Taniguchi K, et al. Prediction of human rotavirus serotype by nucleotide sequence analysis of the VP7 protein gene. *J Virol*, 1988, 62:1819-1823.
- 12 Maunula L, Bonsdorff CH. Rotavirus serotypes and electropherotypes in Finland from 1986 to 1990. *Arch Virol*, 1995, 140:877-890.
- 13 Bishop RF, Unicomb LE, Barnes GL. Epidemiology of rotavirus serotypes in Melbourne, Australia, from 1973 to 1989. *J Clin Microbiol*, 1991, 29:862-868.

(收稿日期 2000-10-28)

(本文编辑:张林东)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 论著稿中摘要的书写

论著稿需附中、英文摘要,内容包括目的、方法、结果(应给出主要数据)、结论四部分,各部分冠以相应的标题,采用第三人称撰写,不用“本文”、“作者”等主语。考虑到我国读者可参考中文原著资料,为节省篇幅,中文摘要可简略些(200 字左右),英文摘要则相对具体些(400 个实词左右)。英文摘要尚应包括文题、作者姓名(汉语拼音)、单位名称、单位所在城市名、邮政编码及国名。作者应列出前 3 位,3 位以上加“et al.”;作者不属同一单位时,在第一作者姓名右上角加“\*”,同时在单位名称首字母左上角加“\*”。例如 ZHU Biao\*, WU Nanping, QIANG Laiying et al. \*Department of Infections Diseases, The First Hospital of Zhejiang University, Hangzhou 310003, China