

浙江省蚊虫中乙型脑炎病毒的分离及鉴定

谢荣辉 付士红 程胤凯 徐芳 姚莘莘 翁景清 朱函坪 张意坚 朱智勇

【摘要】 目的 对 2007 年浙江省采集的蚊虫标本进行病毒分离与鉴定。方法 2007 年在浙江省采集蚊虫标本,用金黄地鼠肾细胞(BHK-21)分离病毒,对新分离的病毒进行血清学和分子生物学鉴定。结果采集到 4735 只蚊虫,分离到 2 株致 BHK-21 细胞病变的病毒,经免疫荧光和 RT-PCR 试验鉴定为乙型脑炎病毒(JEV),利用病毒 PrM 区段进行基因分型分析,新分离的 2 株病毒属于基因 I 型 JEV。对这 2 株病毒的 E 基因区段进行分析,核苷酸和氨基酸的同源性分别为 99.0% 和 98.8%。与疫苗株 SA14-14-2 相比,核苷酸同源性在 87.7%,氨基酸同源性在 96.4% 以上,共有 14 个共同的氨基酸位点差异。结论 在浙江省采集的蚊虫标本中分离到 2 株病毒,经鉴定为基因 I 型 JEV,是浙江省近年来首次分离。

【关键词】 乙型脑炎病毒;病毒分离;序列分析

Isolation and identification of Japanese encephalitis virus from mosquitoes in Zhejiang province XIE Rong-hui*, FU Shi-hong, CHENG Yin-kai, XU Fang, YAO Ping-ping, WENG Jing-qing, ZHU Han-ping, ZHANG Yi-jian, ZHU Zhi-yong. *Key Laboratory of Vaccine Against Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome, Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310051, China

【Abstract】 Objective To study the situation of arboviruses carried by mosquitoes in Zhejiang province. **Methods** Mosquitoes were collected from Zhejiang province in 2007. Virus strains were isolated by the inoculation of homogenates of the mosquitoes onto BHK-21 cell line. The isolated strains were identified by serological (IFA) and molecular methods (RT-PCR). **Results** Two strains were isolated from mosquitoes causing cytopathogenic effect (CPE) in BHK-21 cells. Results from serological tests showed that both of the two strains were positive for the antibody to Japanese encephalitis virus (JEV). PrM and E gene were then cloned and sequenced. Results from the phylogenetic analysis showed that the isolates belonged to genotype I JEV while through sequence analysis it showed that the homology of nucleotide sequences and amino acid sequences between the two strains were 99.0% and 98.8% respectively. Compared with the JEV vaccine strain SA14-14-2 and two strains, the homology of nucleotide sequences was up to 87.7% and homology of amino acid sequences was up to 96.4%. When comparing with the vaccine strain SA14-14-2, there were 14 common amino acid variations in all the two strains. **Conclusion** Two strains of JEV were isolated from mosquitoes collected in Zhejiang province which was the first isolation of genotype I JEV in the province in recent years.

【Key words】 Japanese encephalitis virus; Isolation of virus; Sequence analysis

乙型脑炎病毒(JEV)是目前为止证实我国存在与流行的四种虫媒病毒之一^[1]。虽然许多学者对 JEV 进行了大量研究,尤其是 1980 年代末国内广泛接种乙型脑炎(乙脑)疫苗,其发病率大幅度降低。但近年来由于新分离的 JEV 较少,而对于新分离病毒株的分子生物学研究更少,尤其在浙江省近年来

没有分离到 JEV,为更好的研究乙脑在浙江省的流行状况,本研究从 2007 年在浙江省内采集的蚊虫标本中分离 JEV 并进行血清学和分子生物学鉴定。

材料与方 法

1. 标本来源:2007 年 6-8 月在浙江省仙居县和富阳市人房及猪舍中采集蚊虫标本共 4735 只,包括三带喙库蚊、淡色库蚊和中华按蚊等。剔除雄蚊分类后将标本分装入冻存管,登记编号保存于 -80℃ 冰箱。

2. 细胞和培养液:金黄地鼠肾细胞(BHK-21)由

基金项目:浙江省医药卫生科学研究基金资助项目(2008B39)

作者单位:310051 杭州,浙江省疾病预防控制中心出血热重点实验室(谢荣辉、程胤凯、徐芳、姚莘莘、翁景清、朱函坪、朱智勇);中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所(付士红);浙江省仙居县疾病预防控制中心(张意坚)

中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所提供, 细胞培养采用 MEM 基础培养基, 加 10% 胎牛血清作生长液, 维持液含 1% 的胎牛血清。

3. 标本研磨与接种: 从 -80°C 取出冻存管, 将蚊虫倒入研磨器中, 加入 1 ml 含 400 U 双抗的 MEM 液反复研磨至组织碎片基本消失为止。将研磨液吸入离心管, 平衡后于 4°C 12 000 r/min 离心 15 min。取 0.3 ml 上清液接种于 BHK-21 细胞中, 置于 37°C , 5% CO_2 培养箱中吸附 1 h 后弃去接种液体, 加入细胞维持液, 置于 37°C , 5% CO_2 培养箱中继续培养, 逐日观察细胞病变, 在 BHK-21 细胞中盲传 3 代, 无病变者弃去。

4. 免疫荧光试验: 病毒感染细胞后, 待细胞出现病变(++~+++), 将细胞吹下, 1000 r/min 离心 5 min, PBS 洗细胞 2 次, 重悬细胞后均匀地涂在载玻片上制成病毒抗原片, 同时设正常细胞对照。晾干后丙酮固定 8 min。抗原片晾干后用蒸馏水洗 1 次, 晾干后加乙脑单克隆抗体置 37°C 湿盒温育 45 min, 用 PBS 振荡洗涤 3 次, 每次 5 min。待晾干后加 FITC 标记的羊抗鼠 IgG, 置 37°C 湿盒温育 45 min, 用 PBS 振荡洗涤 3 次, 每次 5 min。晾干后用 90% 甘油封片, 荧光显微镜下观察。

5. RT-PCR 检测 JEV: 用试剂盒(Qigene 公司)按说明书提取感染病毒第三代细胞的总 RNA。用 TaKaRa 公司 One Step RNA PCR Kit 进行一步法 RT-PCR。反应体系: $10\times$ buffer 5 μl , MgCl_2 (25 mmol/L) 10 μl , 上游引物: 5'-CGT TCT TCA AGT TTA CAG CAT TAG C-3' 1 μl , 下游引物: 5'-CCY RTG TTY CTG CCA AGC ATC CAM CC-3' 1 μl , dNTP Mixture (各 10 mmol/L) 5 μl , RNase Inhibitor (40 U/ μl) 1 μl , AMV 逆转录酶 1 μl , Taq 酶 1 μl , RNA 模板 10 μl , 去离子水 15 μl 。充分混匀。 50°C 反转录 30 min, 94°C 预变性 2 min, 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 1 min, 35 个循环, 72°C 延伸 10 min。1% 琼脂糖电泳检查扩增条带。

6. 病毒 PrM 和 E 基因区段的 PCR 扩增及同源分析: 用试剂盒(Qigene 公司)按说明书提取感染病毒第三代细胞的总 RNA。根据已发表的 JEV 基因序列合成引物: P1: 5'-CGT TCT TCA AGT TTA CAG CAT TAG C-3' 1 μl , P2: 5'-TTA AGC ATG CAC ATT GGT CGC TAA-3', 利用下游引物 P2 以病毒基因组 RNA 为模板进行 RT。反应条件如下: 全基因使用 MLV 逆转录酶, 参照说明书进行操作。

PCR 循环参数为 94°C 预变性 2 min, 94°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 2 min, 30 次循环后, 72°C 延伸 10 min。1% 琼脂糖电泳检查扩增条带, 用 TaKaRa Agarose DNA Purification Kit 纯化扩增产物并克隆入 T 载体送至上海生工生物工程技术服务有限公司测序。用 Clustal X 和 DNASTAR 软件进行核苷酸和氨基酸序列分析。

结 果

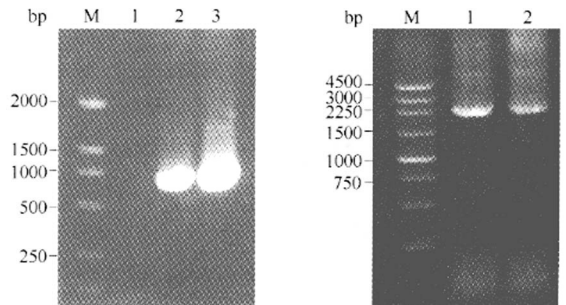
1. 标本采集: 在浙江省仙居县和富阳市人房及猪舍采集蚊虫标本共 4735 只, 包括三带喙库蚊、淡色库蚊和中华按蚊等, 其中以中华按蚊、淡色库蚊为主。

2. 病毒分离: 将采集的标本按照采集地点和蚊种分 40 批进行研磨, 离心后上清液接种于 BHK-21 细胞, 结果分离到 2 株病毒, 分别命名为 XJP613 和 XJ69。这 2 株病毒可在 BHK-21 细胞中获得稳定传代, 细胞病变主要表现为细胞聚集、圆缩并逐渐开始脱落。

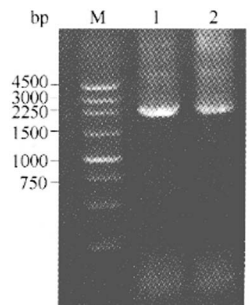
3. 免疫荧光试验: 用 JEV 单克隆抗体同新分离的病毒进行间接免疫荧光试验。观察到新分离的病毒均能与 JEV 单克隆抗体起反应。新分离病毒感染的细胞质内可能观察到黄绿色特异性荧光颗粒; 而正常细胞则未见荧光颗粒, 表明新分离的病毒为 JEV。

4. RT-PCR 鉴定分离毒株: 使用 JEV PrM 基因特异扩增引物对 2 个病毒株进行 PCR 扩增, 结果发现 XJP613 和 XJ69 均可获得约 674 bp 的扩增片段(图 1), 提示分离毒株为 JEV。

5. 病毒 PrM 和 E 基因区段的 RT-PCR 扩增: 利用上游引物与下游引物通过 RT-PCR 扩增, 2 株病毒 XJP613 和 XJ69 均可扩增出单一长度约为 2200 bp 的片段(图 2)。



注: M: Marker (DL 2000); 1: 阴性对照; 2: XJ69; 3: XJP613



注: M: Marker (250 bp); 1: XJP613; 2: XJ69

图1 RT-PCR 检测 JEV 图2 JEV PrM-E 基因扩增

6. 新分离病毒株的序列分析:采用 Chen 等^[2,3]建立的基因分型方法对新分离的 JEV 进行基因分型鉴定,选择病毒基因组 456~695 位,属于 PrM 区的 240 个核苷酸序列作为基因分型的基础。从系统发生树可以推测,新分离的 2 株 JEV 同 Ishikawa 株, K94P05 株同属于基因 I 型(图 3)。

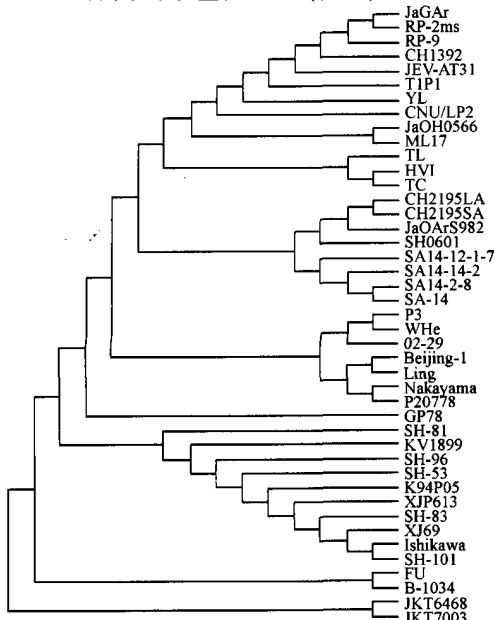


图3 XJ69 和 XJP613 PrM 基因核苷酸序列系统发生树分析

7. 新分离病毒 E 基因核苷酸及氨基酸分析:采用减毒活疫苗株 SA14-14-2 为标准,对新分离的 XJP613、XJ69 的 E 区段核苷酸及氨基酸进行分析。结果显示:2 株病毒之间核苷酸的同源性为 99.0%, 氨基酸同源性为 98.8%; 其与疫苗株之间核苷酸同源性为 87.7%, 氨基酸同源性分别为 96.8% 和 96.4%(表 1)。新分离 2 株 JEV 与减毒活疫苗 SA14-14-2 存在 14 个共同的氨基酸位点差异,分别

位于 Domain I 区的 E-138、E-176、E-177 位, Domain II 区的 E-107、E-129、E-222、E-244、E-264、E-279 位, Domain III 区的 E-315、E-327、E-366, 还有 2 个位于这 3 个活性区外的 E-439 和 E-447, 而影响 JEV 侵入力和毒力的 E52、E270 和 E138 位均未改变(图 4)。此次新分离的 XJ69 与辽宁省分离的基因 I 型病毒 LN02-102 和上海地区首次分离的基因 I 型病毒 SH-53 的核苷酸同源性分别为 98.1% 和 99.1%, 氨基酸同源性分别为 98.8% 和 99.2%。XJP613 与 LN02-102 和 SH-53 的核苷酸同源性分别为 98.0% 和 99.1%, 氨基酸同源性分别为 99.2% 和 99.6%(表 1)。

表1 浙江省新分离 JEV(XJP613、XJ69)E 基因核苷酸和氨基酸与其他地区 JEV 的同源性(%)比较

病毒株	SA14-14-2	XJ69	XJP613	LN02-102	SH-53
SA14-14-2	-	87.70	87.70	87.50	87.90
XJ69	96.40	-	99.00	98.10	99.10
XJP613	96.80	98.80	-	98.00	99.10
LN02-102	96.80	98.80	99.20	-	98.50
SH-53	97.20	99.20	99.60	99.60	-

讨论

2006 年 6-8 月在浙江省采集的 4735 只蚊虫标本中分离到 2 株病毒, 分别命名为 XJ69 和 XJP613, 经 RT-PCR 和 IFA 鉴定为 JEV。这 2 株病毒分别分离自浙江省仙居县的淡色库蚊和三带喙库蚊。资料显示, 我国的 JEV 最主要传播媒介为三带喙库蚊, 本次研究所采集标本中该蚊种数量较少, 但分离到 1 株病毒, 表明该蚊种可能在当地具有较高的带病毒率。而淡色库蚊在本次的采集标本所占数量较多, 亦分离到 JEV, 提示该蚊种可能在当地 JEV

1	FNCLGMGNRD FIEGASGATW VDLVLEGDSC LTIMANDKPT LDVRMINIEA SQAELVRSYC YHASVTDIST VARCPPTGEE HNEKRADSSY VCKGGFTDRG	SA14-14-2
1	XJ69
1	XJP613
101	WNGCGGFFGK GSIDTCAKFS CTSKAIGRTI QPENIKYKVGII FVHGTTTSE NHGNYSAQVG ASQAAKFTVT PNPASVALKL GDYGEVTLDC EPRSGLNTEA	SA14-14-2
101L.....N.....M.....E.....R.....IT.....	XJ69
101L.....S.....M.....E.....K.....IT.....	XJP613
201	FYVMTVGSKS FLVHREWFHD LALPWTSPSS TAWRNRELLM EFEGAHATKQ SVVALGSGQEG GLHHLALAGAI VVEYSSSVML TSGHLKCRLLK MDKLALKGTT	SA14-14-2
201S.....E.....R.....Q.....K.....L.....C.....	XJ69
201S.....E.....Q.....V.....R.....	XJP613
301	YGMCTEKFSF AKNPVDTGHG TVVIELSYSG SDGPKIPIV SVASLNDMTP VGRLVTVNPF VATSSANSKV LVEMEPFFGD SYIVVGRGDK QINHHWHKAG	SA14-14-2
301A.....T.....V.....S.....	XJ69
301A.....T.....A.....S.....	XJP613
401	STLGKAFSTT LKGAQRALAL GDTAWDFGSI GGVFNSIGRA VHQVFGDAFR TLFGGMSWIT QGLMGLALLW MGVNARDRSI ALAFLATGGV LVFLATNVHA	SA14-14-2
401K.....G.....	XJ69
401K.....G.....	XJP613

图4 浙江省分离的 JEV 与疫苗株 E 蛋白氨基酸序列比较

的传播中起重要的作用。

采用 Chen 等学者建立的基因分型方法对 JEV 进行基因分型,可分为 I ~ IV 4 个基因型别。研究显示,同一基因型的毒株具有明显的地域性,以往我国大陆地区分离到 JEV 都属于基因 III 型^[4]。而本研究从 2007 年浙江省仙居县采集的蚊虫标本中新分离到的 2 株 JEV 都属于基因 I 型,是继 2001 年上海地区和 2006 年辽宁地区发现基因 I 型 JEV 后^[4,5],再次在我国大陆地区发现基因 I 型 JEV,也是浙江省近 10 年来首次分离到基因 I 型病毒,提示基因 I 型 JEV 在我国部分地区存在,我国 JEV 基因型有了新的变化。浙江省以前尚未分离到 JEV,目前缺少相应病毒株有关基因 I 型 JEV 何时在浙江省内出现的相关资料。

通过 JEV E 基因序列比较发现,新分离株与疫苗株 SA14-14-2 在核苷酸序列上的差异较大,而氨基酸同源性较高,表明新分离病毒株多数核苷酸差异中氨基酸编码的第三位属于沉默突变,未引起氨基酸变化。研究表明 JEV E 蛋白存在着 3 个活性结构域,决定着病毒毒力和免疫原性等。新分离病毒与减毒活疫苗株 SA14-14-2 的 3 个结构域进行比对发现,新分离 2 株病毒与疫苗株在结构域 I 有 3 处共同的氨基酸差异,结构域 II 有 6 处共同的氨基酸差异,结构域 III 有 3 处共同的氨基酸差异。目前对抗原中和表位的研究主要集中于结构域 III,研究表明结构域 III 的中和位点则主要集中在 E337~345、E377~382 和 E397~403 三个区域内,在这一区域内发生的变异会导致抗原性的改变,甚至影响

抗原与中和抗体的结合反应^[6]。通过序列对比和分析,XJP613 株在该区和疫苗株完全一致,而 XJ69 在 E343 位则发生了变异,其抗原性是否发生改变及其对中和抗体结合反应是否具有影响还有待于进一步研究。以往有多位学者在对 JEV 的减毒机制进行研究时认为:E138 位谷氨酸替换成赖氨酸后病毒的毒力会显著下降^[7],但本研究中分离的 2 株 JEV 在此位点均未发生改变。

参 考 文 献

- [1] 王环宇,梁国栋. 我国虫媒病毒研究 10 年回顾. 中国公共卫生, 2003, 19: 473-476.
- [2] Chen WR, Tesh RB, Rico-Hesse R. Genetic variation of Japanese encephalitis virus in nature. J Gen Virol, 1990, 71 (Pt 12): 2915-2922.
- [3] Chen WR, Rico-Hesse R, Tesh RB. A new genotype of Japanese encephalitis virus from Indonesia. Am J Trop Med Hyg, 1992, 47 (1): 61-69.
- [4] 王俊文,付士红,王环宇,等. 辽宁省乙脑病毒的分离与鉴定. 中华实验和临床病毒学杂志, 2006, 30: 61-65.
- [5] 王环宇,付士红,李晓宇,等. 我国首次分离到基因 I 型乙脑病毒. 中华微生物学和免疫学杂志, 2004, 24: 843-849.
- [6] Wu SC, Lin CW. Neutralizing peptide ligands selected from phage displayed libraries mimic the conformational epitope on domain III of the Japanese encephalitis virus envelope protein. Virus Res, 2001, 76(1): 59-69.
- [7] Ni H, Chang GJ, Xie H, et al. Molecular basis of attenuation of neurovirulence of wild-type Japanese encephalitis virus strain SA14. J Gen Virol, 1995, 76(Pt 2): 409-413.

(收稿日期: 2008-01-04)

(本文编辑: 张林东)

· 消息 ·

本刊 2008 年开始实行网上在线投稿

《中华流行病学杂志》自 2008 年 1 月 1 日起启动网上投稿平台。投稿网址: <http://zhxb.medline.org.cn> 各位作者可登录此网站注册后即可在线投稿。单位介绍信请从邮局寄出,来稿需付稿件处理费 20 元/篇(邮局汇款),凡未寄单位介绍信和稿件处理费者,本刊将对文稿不再做进一步处理,视为退稿。新的网上投稿平台可以做到:①投稿过程一步到位,稿件处理进程一目了然;②随时在线查询稿件处理情况;③缩短稿件处理时滞;④避免稿件寄失,退修后作者修回不及时,编辑部送审时间过长等弊端。

本刊编辑部