

肠道病毒 71 型北京分离株全基因组序列分析

姚昕 毛群颖 黄维金 何鹏 周诚 张卫 梁争论 李凤祥 王军志

【摘要】 目的 了解 2008 年北京地区肠道病毒 71 型(EV71)分离株的全基因组序列特点。方法 收集北京地区手足口病患儿的咽拭子样本 12 份,对其中 1 份样品 08YM-3,经 Vero 细胞分离培养,提取病毒 RNA。利用 RT-PCR 和 5'、3' RACE 扩增 EV71 全长基因。对 PCR 产物克隆和测序。利用 DNAStar 软件包的 MegAlign 进行核苷酸序列分析,构建系统进化树。结果 分离的 EV71 病毒株经过扩增后克隆得到 3 个涵盖 EV71 全基因组的阳性质粒,测序后拼接为 EV71 全基因组,命名为 BJ08 株。BJ08 的 5' 非编码区(UTR)、P1、P2、P3、3' 非编码区(UTR)和全基因组的核苷酸与 C4 亚型的参考序列同源性均最高,分别为 95.6%~96.7%、88.3%~96.1%、78.1%~94.0%、90.8%~94.6%、85.9%~94.1% 和 90.9%~93.9%。BJ08 株与其他亚型各区段的核酸同源性均低于 90%。在全基因组序列与 VP1 区构建的系统进化树中,BJ08 株均与 C4 亚型在同一分支。BJ08 株与 C4 亚型参考株 VP1 区的 6 个亚型相关氨基酸序列一致,VP1 抗原性表位(92~107aa)无变异。结论 北京 BJ08 EV71 病毒分离株为 C4 亚型。

【关键词】 肠道病毒 71 型; 基因型; 手足口病

Genetic characterization of enterovirus 71 complete genome isolated in Beijing, 2008 YAO Xin^{*}, MAO Qun-ying, HUANG Wei-jin, HE Peng, ZHOU Cheng, ZHANG Wei, LIANG Zheng-lun, LI Feng-xiang, WANG Jun-zhi. *National Institute for Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China*

Corresponding author: LIANG Zheng-lun, Email: lzlun@yahoo.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the characterization of the complete genome of EV71 in Beijing, 2008 and to provide basis for selecting appropriate virus strain to develop vaccine. **Methods** 12 throat swab samples were collected from children with hand-foot-mouth disease (HFMD). One sample named 08YM-3 was cultured and isolated in vero cells. Viral RNA was extracted and carried out by RT-PCR and 5', 3' rapid amplification of cDNA ends (RACE) to obtain the sequence from 08YM-3. PCR products were cloned and analyzed. Nucleotide identity between sequences was calculated and sequence alignments were made to generate phylogenetic trees using MegAlign in DNAStar. **Results** 3 clones were constructed that covered EV71 complete genome. Data from sequences analysis showed that this viral strain named BJ08 shared 95.6%~96.7%, 88.3%~96.1%, 78.1%~94.0%, 90.8%~94.6%, 85.9%~94.1% and 90.9%~93.9% in 5' UTR, P1, P2, P3, 3' UTR region and complete genome with C4 subtype, respectively. BJ08 showed low nucleotides identity (<90%) with other subtypes. Phylogenetic trees established from alignment of the complete genome and VP1 region indicated that BJ08 belonged to C4 subtype. BJ08 and C4 subtype strains shared the same amino acids in 6 sites in VP1 region, which were associated with EV71 subtype. There was no mutation in VP1 antigen epitope (92~107aa). **Conclusion** This BJ08 strain belonged to C4 subtype. Further study on EV71 complete genome would have great significance for vaccine research.

【Key words】 Enterovirus 71; Genotype; Hand-foot-mouth disease

肠道病毒 71 型(EV71)是手足口病的主要致病原,近年来已经在世界部分国家或地区引起爆发性流行^[1-3]。2008 年 5 月 2 日起我国卫生部已将该病纳入丙类法定传染病。目前 GenBank 数据库中已有安

徽省阜阳市、浙江、广东省等地 2008 年的 EV71 全基因组序列,本研究测定了北京地区 2008 年的 1 株 EV71 全基因组序列,现将结果报道如下。

材料与方法

1. 材料:在北京市某医院收集 12 份 2008 年手足口病患儿的咽拭子样本。实验材料:Vero 细胞(来源于本实验室)、手足口病培养基(Invitrogen 公司)、含 10% 新生牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司)、1% 双抗(华北制药有限公司)、RNA 提取试剂

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.07.022

基金项目:国家科技支撑计划(2008BAI69B01)

作者单位:100050 北京,中国药品生物制品检定所(姚昕、毛群颖、黄维金、何鹏、周诚、梁争论、李凤祥、王军志);北京市疾病预防控制中心(张 L)

姚昕与毛群颖同为第一作者

通信作者:梁争论, Email: lzlun@yahoo.com

盒(QIAGEN)、反转录试剂盒 SuperScript™ III (Invitrogen)、OligodT (Promega)、LA Taq 聚合酶 (TaKaRa)、末端转移酶(NEB)、T载体(TaKaRa)、胶回收试剂(OMEGA)、cDNA回收试剂(OMEGA);引物的合成及PCR结果测序均由上海英骏公司完成,引物序列见表1。

表1 EV71全基因组片段扩增使用的引物

扩增片段	引物	序列(5' ~ 3')
EV71中间段	上游	GCCAGTAAATTCCACCAAGGAGCACT
	下游	GGACTTGCCTGATGTTCCTCCTCAGCA
EV71 3'端	反转录	Oligo dT
	上游	CATCTACAAGCTCTTTGCAGG
	下游	Oligo dT
EV71 5'端	反转录	GGGTGCTGAAACACCATCAT
	上游	Oligo dT
	下游外	GGGTGCTGAAACACCATCAT
	下游内	GGGCACACTGTTAACTGTGAT

2. 方法:

(1)EV71的细胞培养:12份咽拭子样本进行适当处理后接种到形态良好、刚长满的单层Vero细胞上,每份样本同时接种2瓶细胞,每瓶细胞接种150 μl,35℃吸附1.5 h后,补加培养基,同时设正常细胞对照,置35℃、5%CO₂培养箱内,连续观察细胞病变(CPE)。待CPE达到+++再续传一代,待CPE再达到+++,收获培养物置于-80℃保存,即为阳性分离病毒株。如第一代接种7 d无CPE出现,则盲传一代,再连续观察7 d仍无CPE,则判为阴性。

(2)EV71的提取与扩增:将阳性病毒收获物经超声破碎离心后,用QIAGEN试剂盒提取病毒RNA,按照说明书操作;样品提取分装后存于-70℃。EV71病毒的全基因组分为3个片段扩增,分别为中间段、3'端片段和5'端片段。

①中间片段的扩增:利用随机引物,以提取的RNA为模板,按照SuperScript™ III说明书进行反转录,引物混合液为50 ng/μl的随机引物1 μl,10 mmol dNTP混合物1 μl, RNA模板7 μl,加DEPC水1 μl,总体积10 μl,置于65℃ 5 min,冰浴至少1 min。cDNA合成混合液为10×RT buffer 2 μl, 25 mmol/L MgCl₂ 4 μl, 0.1 mol/L DTT 2 μl, RNaseOUT™ (40 U/μl) 1 μl, SuperScript™ III RT (200 U/μl)。将10 μl的cDNA合成混合液加入引物混合液中,25℃ 10 min,50℃ 50 min,85℃ 5 min终止反应,置于冰上,加入1 μl RNase H,37℃ 20 min;PCR反应体系为2×buffer 25 μl, LA Taq 0.5 μl, P1 10 mmol/L, P2 1 μl, dNTP 1 μl, cDNA 2 μl, DEPC水17.5 μl, 总体积50 μl。反应条件为95℃ 5 min,94℃ 1 min,

55℃ 1 min,72℃ 4 min,共计30个循环,72℃ 10 min。

②3'末端快速扩增(3' RACE)^[4]:利用Oligo dT作为反转录引物,以提取的RNA为模板,操作步骤同前。惟一不同的是将10 μl的cDNA合成混合液加入引物混合液后,直接50℃ 50 min。PCR反应体系为2×buffer 25 μl, LA Taq 0.5 μl, P1 10 mmol/L, P2 1 μl, dNTP 1 μl, cDNA 2 μl, DEPC水17.5 μl, 总体积50 μl。反应条件:95℃ 5 min,94℃ 1 min, 55℃ 1 min,72℃ 2 min,共计30个循环,72℃ 10 min。

③5'末端快速扩增(5' RACE)^[5]:以特异引物为反转录引物,以提取的RNA为模板,操作步骤同3' RACE。将反转录得到的cDNA纯化后,使用NEB末端转移酶在cDNA的5'端加多聚A尾。PCR反应体系为10×buffer 5 μl, 2.5 mmol/L CoCl₂ 5 μl, 纯化后的cDNA 11 μl, 10 mmol/L dNAP 1 μl, 20 U/μl TdT 0.5 μl, DEPC水27.5 μl, 总体积为50 μl。反应条件为37℃ 30 min,70℃ 10 min终止反应。PCR反应:使用半巢式扩增,两轮反应条件同3' RACE的反应条件。

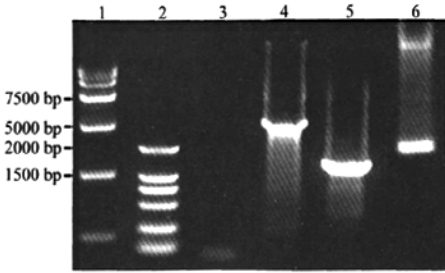
(3)克隆与序列分析:将PCR产物回收后,连接入T载体,按照载体说明书进行操作,挑选克隆经过酶切鉴定后,将阳性克隆测序,分段测序的结果拼接为EV71全基因组序列。收集GenBank中的全基因组参考序列,利用DNASar软件包的MegAlign对EV71的5' UTR、P1、P2、P3、3' UTR和全基因组进行核苷酸序列同源性分析并构建进化树。对VP1区某些重要氨基酸位点进行比对分析。12株EV71参考序列的基因型以及收录号为:A:BrCr(U22521);B2:MS-87(U22522);C1:MAL-1(DQ341385);C2:TW98(AF176044), SK(DQ341355);C3:MAL-2(DQ341367);C4:TW02(EU131776), SZ98(AF302996), SZ03(AY465365);C5:TW07-1(EU527983);B4:SIN(AF316321);B5:TW07-2(EU527985)。

结 果

1. 病毒分离培养:对12份样本分离培养,3份样品第一代CPE为+++ ,判定为阳性,其他样本无CPE发生,判定为阴性。对标本08YM-3进行Vero细胞分离,待CPE达到+++再续传一代,待CPE再达到+++ ,收获培养物置于-80℃保存,即为阳性分离病毒株。收获培养物进行EV71的全序列测定。

2. EV71分段扩增:EV71病毒的全基因组分为3个片段进行扩增,结果见图1。根据设计的引物位置, EV71的中间片段为4155 bp, EV71的5'端片段

为 1360 bp, EV71 的 3' 端片段为 2113 bp。并将目的片段与 T 载体连接, 构建 3 个阳性克隆。



注: 1: DL15000; 2: DL2000; 3: 阴性对照; 4: EV71 的中间片段; 5: EV71 的 5' 端片段; 6: EV71 的 3' 端片段

图 1 EV71 病毒基因全长分片段扩增结果

3. EV71 全基因组不同区域的核苷酸序列分析:

以上 3 个 PCR 扩增产物经过克隆后测序, 结果拼接为 EV71 病毒的全基因组, 长度为 7405 nt, 命名为 BJ08。将 BJ08 与参考序列按照不同的结构基因和功能基因以及全基因组分别进行核苷酸同源性分析。表 2 显示, 将 BJ08 与参考序列进行同源性分析发现, VP1 区 BJ08 株与 SZ98、SZ03 和 TW02 株的同源性为 92.2% ~ 94.7%。此外, 与 TW98、SK 和 MAL-1 株的同源性也达到 88.0% 以上。分析表明 C2 亚型的 TW98 与 C4 亚型的 TW02、SZ98 和 SZ03 在 VP1 区的同源性达到了 89.9% ~ 90.2%。BJ08 株在 VP3 区与 SZ98 同源性为 88.3%, 在 VP2、VP3、VP4 区与 TW02、SZ98 和 SZ03 株的同源性均在 90.0% 以上。

P2 区序列分析发现, BJ08 与 TW02、SZ98 和 SZ03 的核苷酸同源性均为 91.2% ~ 94.0%。但与 SZ98 的 2B 区, 同源性仅为 78.1%。P3 区序列分析发现, BJ08 与 TW02、SZ98 和 SZ03 的核苷酸同源性均

为 90.8% ~ 94.6% 之间。与其他参考序列的同源性较低, 同源性最低的为 BrCr 株的 3B 区, 仅为 66.7%。

肠道病毒强毒株的 5' UTR 的 4 个区域具有共同特点, BJ08 的 5' UTR 核苷酸序列分析发现, BJ08 在该 4 个区域的核苷酸保守, 475 位核苷酸为 C, 593 ~ 595 位为 AUG, 571 ~ 576 位为 AAUAAA, 565 ~ 584 位核苷酸为多嘧啶区。

病毒全基因组分析发现, BJ08 与 SZ98、SZ03 和 TW02 株的同源性为 90.9% ~ 93.9%, 与 B 基因型的病毒株同源性为 82.0% 左右, 与 A 基因型的 BrCr 同源性最低, 为 79.6%。

4. 系统进化树分析: 按照 VP1、全基因组构建进化树。

图 2 显示, BJ08 株与 C4 亚型在同一分支; 与核苷酸同源性比较的结果一致。

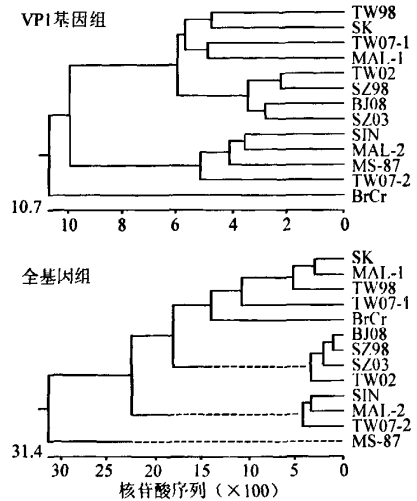


图 2 BJ08 株 EV71 病毒以 VP1 基因和全基因组为基础的进化树

表 2 BJ08 株与参考株基因亚型的核苷酸序列同源性(%)比较

基因区域	碱基数	A BrCr	B2 MS-87	B3 MAL-2	B4 SIN	B5 TW07-2	C1 MAL-1	C2 TW98	C2 SK	C4 TW02	C4 SZ98	C4 SZ03	C5 TW07-1
5' UTR	727	84.5	86.1	87.2	87.4	86.7	85.9	86.5	87.5	95.6	95.6	96.7	84.5
P1 区	VP4	207	83.8	83.8	83.3	82.8	81.9	84.8	89.2	85.3	95.1	95.6	88.2
	VP2	762	79.9	82.5	82.3	82.4	81.1	86.9	89.0	88.6	92.3	91.2	87.9
	VP3	726	82.8	82.6	81.5	81.8	81.0	88.4	90.3	89.8	94.3	88.3	85.9
	VP1	891	81.6	84.9	84.0	83.0	83.0	88.1	88.8	89.0	92.6	92.2	87.8
P2 区	2A	450	78.2	80.9	82.4	80.2	80.9	85.8	84.7	84.0	91.3	91.6	85.6
	2B	297	75.4	81.1	80.8	80.5	82.5	74.7	73.7	73.7	92.6	78.1	74.4
	2C	987	77.6	83.1	83.0	82.4	83.4	78.3	79.0	79.1	91.2	92.1	77.9
P3 区	3A	258	82.9	87.2	81.0	86.8	86.0	77.5	76.4	76.0	92.6	93.4	74.8
	3B	66	66.7	84.8	77.3	83.8	80.3	71.2	71.2	71.2	90.9	92.4	77.3
	3C	549	77.4	79.2	82.1	79.8	80.3	76.1	75.8	75.8	92.9	91.3	76.5
	3D	1386	77.6	76.3	82.9	77.6	78.1	77.6	77.3	78.6	93.4	90.8	77.3
3' UTR	90	74.1	74.1	91.8	72.9	-	78.8	72.9	75.3	94.1	85.9	-	
全基因	7420	79.6	81.7	82.9	81.5	81.7	82.1	82.9	82.7	92.7	90.9	93.9	82.0

注: BrCr 为 EV71 原始株(U22521), MS-87(U22522), TW98 为 1998 年台湾流行株(AFI76044), TW02 为 2002 年台湾流行株(EU131776), TW07-1 和 TW07-2 为台湾 2007 年流行株(EU527983, EU527985), SIN 为新加坡流行株(AFI316321), SZ98、SZ03 为深圳 1998 和 2003 年流行株(AFI302996, AY465365), SK 为韩国流行株(DQ341355), MAL-1 和 MAL-2 为马来西亚流行株(DQ341385, DQ341367); -: 表示由于 TW07 和 SIN08 两株的 3' UTR 的序列不完整, 故未对其进行核苷酸同源性分析

5. VP1 区亚型相关表位与抗原性表位的氨基酸序列分析: VP1 区存在 6 个与病毒亚型相关的氨基酸位点, 经分析发现 BJ08 与 C4 亚型的参考序列 TW02、SZ98 和 SZ03 的氨基酸组合模式相同, 均为 KADSTV。VP1 区的 92~107 位氨基酸为 EV71 特异的抗原性表位, BJ08 和 12 株参考序列在该区段的氨基酸序列高度保守, 共同序列为 EID LPL EGT TNP NGY A。

讨 论

本研究对 EV71 病毒样本 08YM-3 在 Vero 细胞上进行分离培养, 得到 1 株稳定传代的病毒株 BJ08。对 BJ08 株分 3 个片段进行扩增, 为了保证病毒基因组末端核苷酸序列的完整性, 本研究对 EV71 的 5' 和 3' 末端采用末端快速扩增 (RACE) 的方法, 得到 EV71 病毒的全基因组序列, 较其他报道的多片段扩增方法更简便^[6]。

目前划分 EV71 基因型的方法很多, 比较公认的是以 VP1 为基础的分型方法, 根据 VP1 核苷酸序列的同源性, 将 EV71 划分为 A、B、C 3 个基因型^[7], B、C 基因型又进一步划分为 B1~B5 和 C1~C5 亚型^[8,9]。我国的研究多以 VP1 进行基因型的划分。但是有研究表明, 肠道病毒间有同源重组, 并且重组位点多位于非结构编码区^[8]; VP1 的基因特点不能代表 EV71 的其他区段的基因特点, 如果仅以 VP1 作为分型的依据, 则可能忽略其他基因序列的信息。进行全基因组研究不仅可以了解其他区段的基因序列情况, 且能反映不同基因型的差别。BJ08 与 TW98、SK 和 MAL-1 的 VP1 区核酸同源性分别为 88.8%、89.0% 和 88.1%, 但全序列同源性分别为 82.9%、82.7% 和 82.1%。因此, 在进行病毒分型时, 除了参考 VP1 提供的基因信息外, 应考虑加入病毒基因组的其他区域, 如 VP4 区^[10]。

EV71 病毒 VP1 区的某些位点的氨基酸序列与病毒的基因型具有相关性。有研究对 532 株 EV71 的 VP1 区的氨基酸序列进行统计分析, 发现 6 个散在位点存在共变异现象, 分别为 43、58、164、184、240、249。这 6 个位点的变异是相互联系的, 且该 6 个位点的氨基酸组合模式与病毒的基因型相关^[11]。本研究获得的 BJ08 株与 3 株 C4 亚型的参考序列在这 6 个位点的氨基酸组合模式均为 KADSTV, 与报道结果一致。这些位点的氨基酸组合模式与病毒的亚型有一定的相关性, 是否可作为分型依据, 或是否具有其他生物学的表型特点需要进一步研究。

有研究表明, 肠道病毒的毒力与 5' 端非编码区相关^[12]。但是本研究结果显示, 所有的参考株都符合强毒株特点, 而 SZ98 和 BJ08 仅造成患者的手足口症状。因此, 这种判定方法还有待于进一步的研究确证。VP1 区的 92~107 位氨基酸为 EV71 的主要免疫表位。经过比对, 发现此区域高度保守。本研究中所克隆出的 BJ08 株, 在这个区域也是保守的, 其氨基酸序列为 EID LPLEGTTNPNGYA。因此, BJ08 株具有一定的代表性, 可进一步作为疫苗的候选或参比毒株应用。

2006—2008 年北京地区 EV71 病毒的 VP1 区序列分析表明, 北京地区近期 EV71 的主要流行株为 C4 亚型^[13]。本研究得到北京地区 1 株 C4 亚型 EV71 的全基因序列, 对病毒各区段核苷酸序列进行分析, 获得序列背景清楚的毒株 BJ08, 并构建了 3 个克隆质粒, 有助于完善我国 EV71 病毒株的基因信息; 为下一步开展灭活疫苗、减毒疫苗以及全基因组 cDNA 克隆等研究工作奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Schmidt NJ, Lennette EH, Ho HH. An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of the central nervous system. *J Infect Dis*, 1974, 129(3): 304-309.
- [2] Herrero LJ, Lee CS, Hurrelbrink RJ, et al. Molecular epidemiology of enterovirus 71 in peninsular Malaysia, 1997-2000. *Arch Virol*, 2003, 148(7): 1369-1385.
- [3] Wang JR, Tuan YC, Tsai HP, et al. Change of major genotype of enterovirus 71 in outbreaks of hand-foot-and-mouth disease in Taiwan between 1998 and 2000. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(1): 10-15.
- [4] Scotto-Lavino E, Du G, Frohman MA. 3' end cDNA amplification using classic RACE. *Nat Protoc*, 2006, 1(6): 2742-2745.
- [5] Scotto-Lavino E, Du G, Frohman MA. 5' end cDNA amplification using classic RACE. *Nat Protoc*, 2006, 1(6): 2555-2562.
- [6] 周世力, 李琳琳, 何雅青, 等. 我国分离肠道病毒 71 型 (SHZH03 病毒株) 全基因组核苷酸序列分析. *病毒学报*, 2004, 20(1): 7-11.
- [7] Brown BA, Oberste MS, Alexander JP Jr, et al. Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998. *J Virol*, 1999, 73(12): 9969-9975.
- [8] Yoke-Fun C, AbuBakar S. Phylogenetic evidence for inter-typic recombination in the emergence of human enterovirus 71 subgenotypes. *BMC Microbiol*, 2006, 6: 74.
- [9] Lin KH, Hwang KP, Ke GM, et al. Evolution of EV71 genogroup in Taiwan from 1998 to 2005: an emerging of subgenogroup C4 of EV71. *J Med Virol*, 2006, 78(2): 254-262.
- [10] Cardoso MJ, Perera D, Brown BA, et al. Molecular epidemiology of human enterovirus 71 strains and recent outbreaks in the Asia-Pacific region: comparative analysis of the VP1 and VP4 genes. *Emerg Infect Dis*, 2003, 9(4): 461-468.
- [11] 董晓楠, 应剑, 陈应华. 1970—2004 年全球肠道病毒 71 型分离株的分子流行病学分析. *科学通报*, 2007, 52(9): 1021-1027.
- [12] Aurelia A, Haller XX, Semler BL. Linker scanning mutagenesis of the internal ribosome entry site of poliovirus RNA. *J Virol*, 1992, 66(8): 5075-5086.
- [13] 李仁清, 陈丽娟, 王玉梅, 等. 北京地区 2006—2008 年肠道病毒 71 型 VP1 区基因特征分析. *中华流行病学杂志*, 2009, 30(1): 45-49.

(收稿日期: 2009-03-03)

(本文编辑: 尹廉)