

# 2008年和2010年肠道病毒71型广州分离株全基因组序列分析

钟家禹 朱冰 华亮 王长兵 邝璐 谢嘉慧 陈翊

**【摘要】** 目的 研究2008年和2010年广州地区手足口病患者中肠道病毒71型(EV71)病毒全基因组序列的基因型与变异特点。方法 参照GenBank上EV71深圳株SHZH03(AY465356)基因组设计分段扩增引物,进行RT-PCR分段扩增EV71病毒基因组,PCR产物直接进行序列测定,用Clustal W/X、DNASTAR、MEGA 4.1等软件分析基因组序列。结果 克隆9株广州株EV71,病毒全基因组全长序列均为7405 bp,提交到GenBank上的序列号为HQ456305、HQ456306、HQ456307、HQ456308、HQ456309、HQ456310、HQ456311、HQ456312、HQ456313。将9株广州株EV71与EV71的A、B3、B4、B5、C1、C2、C3、C4型及阜阳株全基因组核苷酸序列进行Clustal W比较,发现与C4a型阜阳株等同源性为98%~99%,与C4b同源性为91%~93%,与C1~C3同源性为82%~83%,与B3~B5同源性为81%~83%,与A型同源性为80%。将9株广州分离株EV71的VP1基因与EV71病毒A、B、C型进行Clustal W比较,同样是与C4a为98%~99%,与C4b同源性为92%~94%,与C1~C3的同源性为88%~89%,与B1~B5型同源性为83%~84%,与A型同源性为81%~82%。将9株广州株与EV71的A、B、C型VP1基因氨基酸序列进行Clustal W比对,发现VP1基因22位点的谷氨酰胺转变为组氨酸(Q→H),聚合蛋白中213位点(S→T)和1764位点(V→I)也发生了氨基酸的点突变,P的213位点属于VP2基因,1764位点属于3D基因。结论 2008年和2010年分离的9株广州株EV71属于C4a型,与阜阳株同源性为98%~99%,VP1基因22位点发生了点突变,聚合蛋白中213位点和1764位点也发生了氨基酸的点突变。

**【关键词】** 肠道病毒71; 基因组; 序列分析; 点突变

**Complete genomic sequence analysis on human enterovirus 71 strain in Guangzhou, in 2008 and 2010** ZHONG Jia-yu, ZHU Bing, HUA Liang, WANG Chang-bing, KUANG Lu, XIE Jia-hui, CHEN Yi. Central Laboratory, Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou 510120, China

Corresponding author: ZHU Bing, Email: zhubing0327@yahoo.com.cn

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 30972630) and Guangdong Natural Science Foundation (No. 10151012001000002).

**【Abstract】 Objective** To study the genomic genotypes and variation of human enterovirus 71 (EV71) infected infants in Guangzhou city, in 2008 and 2010. **Methods** Primers were designed on the basis of the genomic sequence of EV71 SHZH03 strain (AY465356) in the GenBank, and EV71 genome amplified by RT-PCR. PCR-products were directly sequenced and the genomic nucleotide sequences were analyzed with the programs of Clustal W/X, DNASTAR and MEGA 4.1. **Results** 9 strains of EV71 genome appeared to be 7405 bp in length. The genomic sequences of EV71 Guangzhou strains were compared with those of EV71 in GenBank, which revealed that the homology with EV71 genotype C4a Fuyang strains ranged between 98%–99%. Homology with genotype C4b were 92%–94%, with genotypes C1, C2, C3 as 82%–83%, with genotypes B3, B4, B5 as 81%–83% and the homology with genotype A was 80%. When compared the VP1 genes of EV71 Guangzhou strains with genotypes A, B, C virus, we revealed that the highest homology was also with genotype C4a. When compared the VP1 amino acid sequences of EV71 Guangzhou strains with genotype A, B, C virus by Clustal W program, the results revealed that the amino acid residue Q at position 22 in VP1 gene was transformed to H, while 213 (S→T) and 1764 (V→I) mutations in polyprotein were

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.07.015

基金项目: 国家自然科学基金(30972630); 广东省自然科学基金(10151012001000002)

作者单位: 510120 广州市妇女儿童医疗中心中心实验室

通信作者: 朱冰, Email: zhubing0327@yahoo.com.cn

discovered. **Conclusion** Data from the sequences and phylogenetics analysis on those Guangzhou strains in 2008 and 2010 revealed that those isolates belong to genotype C4a, with the homology with Fuyang strains as 98%–99%. Mutation of amino acid residue H at position 22 in VP1 gene was discovered and the neutralizing antibody of EV71 might have been conversed by this residue. 213(S→T) and 1764(V→I) mutations in polyprotein were also discovered.

**【Key words】** Enterovirus 71; Genome; Sequence analysis; Point mutation

2008年3月安徽省阜阳地区暴发手足口病,4月底广州地区接着暴发,随后该病波及全国,发病快且发病重。手足口病的主要病原是肠道病毒71型(EV71)。2008年和2009年以EV71感染为主的手足口病在多个省市流行,并导致479名儿童死亡<sup>[1]</sup>。在2008年暴发期间病原学检测发现EV71占该病原的26.98%,EV71占检测到EV阳性的63.6%<sup>[2]</sup>,而2010年监测到的EV71与2008年相似。为了解自2008年起引起手足口病主要病原EV71的流行类型及变异特点,对2008年和2010年广州地区EV71分离株进行全基因组克隆与分析,并探讨其变异状况。

**材料与方法**

1. 标本:2008年和2010年同一时期(5—8月)从广州市儿童医院住院患者分别采集4份和5份咽拭子标本。

2. 方法:

(1)病毒RNA的提取:取250 μl咽拭子标本,用TaKaRa公司的病毒RNA纯化试剂盒提取病毒RNA,按试剂盒说明书操作,最后溶于30 μl灭菌蒸馏水。病毒RNA提取纯化试剂盒、RNA反转录试剂盒和高保真Taq DNA聚合酶均购自TaKaRa公司。其他试剂均为分析纯试剂。

(2)反转录反应:以提取的病毒RNA为模板,取5 μl RNA在随机引物及AMV反转录酶作用下进行反转录获得病毒基因组cDNA,反应条件为30℃孵育10 min,42℃延伸30 min,99℃5 min,5℃5 min,以10 μl反应体系进行反转录,具体操作按TaKaRa公司的RNA PCR Kit进行。

(3)病毒基因组的扩增:参照EV71(SHZH03<sup>[3]</sup>:AY465356)全基因组序列,自行设计了6对引物(表1),覆盖EV71的全长基因组序列。取3 μl反转录好的病毒cDNA为模板,以25 μl反应体系进行PCR反应,分段扩增病毒基因组全长。PCR反应条件为94℃预变性2 min,94℃变性45 s,54℃退火45 s,72℃延伸90 s,34个循环,72℃延伸10 min。PCR结束后,扩增的特异性片段经1%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

(4)DNA序列测定和分析:扩增后的目的片

段送Invitrogen公司测序,在ABI3730型DNA序列自动分析仪上测定,全部核苷酸及氨基酸序列分析和相似性比较用Clustal W/X、DNASTAR、MEGA 4.1等软件完成。

**结 果**

1. EV71全基因组克隆与序列测定:将2008年和2010年的标本分段扩增,获得9株EV71全基因组序列片段,经测序、序列拼接和分析,获得的EV71全基因组核苷酸序列均为7405 bp,9株病毒序列提交到GenBank(2008年4份标本为gz08-831、gz08-530、gz08-522、gz08-520,GenBank序列号对应为HQ456309、HQ456310、HQ456311、HQ456312;2010年5份标本为gz2010-156、gz2010-134、gz2010-120、gz2010-118、gz2010-95,GenBank序列号对应为HQ456305、HQ456306、HQ456307、HQ456308、HQ456313)。

2. EV71基因组全序列比较、病毒基因组类型确定和基因组进化树分析:将9株广州分离株EV71与EV71的A、B3~B5、C1~C4型及阜阳株全基因组核苷酸序列进行Clustal W比较,发现与C4型同源性最高(其中与C4a同源性为98%~99%,与C4b同源性为91%~93%),与C1~C3同源性为82%~83%,与B3~B5同源性为81%~83%,与A型同源性为80%(表2)。9株EV71和阜阳分离株及EV71的A、B3~B5、C1~C4型用NJ(neighbor joining)方法(采用MEGA 4.1软件),构建EV71全基因组进化树(图1),可见9株广州分离株与C4a型的2008年阜阳、深圳等地分离株分在一组<sup>[4]</sup>,与C4b组明显分为两组。因此本研究分离的EV71株为C4a型。

3. EV71的VP1基因同源性比较及进化树分析:

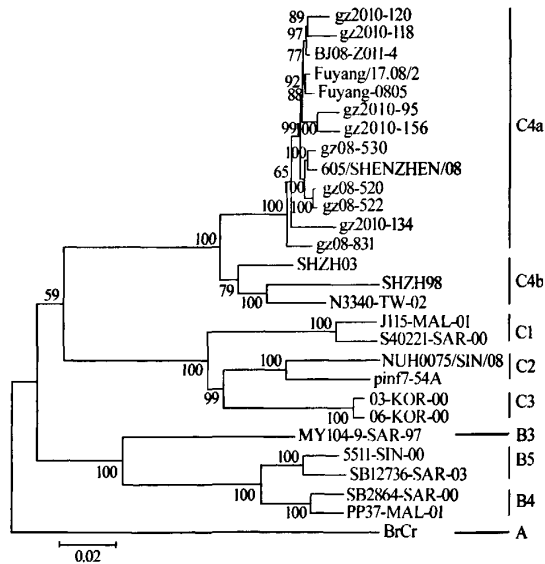
表1 扩增EV71全基因组的PCR引物

PCR引物	核苷酸序列	引物(5' - 3')	
		正义	反义
1	001 ~ 650	ttaaacagctgtgggtgcaccca	ggatggccaatccaatgctatattgta
2	508 ~ 2056	gtagtgtgtcgtaacgggcaactc	ccagtgaaatgaaagtgactcca
3	1875 ~ 3285	gtcaacaatgtaccacgaatgcca	gactggcaccagttggttaattgga
4	3146 ~ 4746	gactgtaggaacctccaagtcgaagta	actgttgacctatgatgttactggc
5	4518 ~ 6777	gataagtaccactccagtgtgtactc	tgaggccattccaccaagcacacaata
6	6621 ~ 7405	ctctttgcctttgactactcaggttatga	ttgctattctggttataacaattacc

表2 广州分离株与EV71的A、B3~B5、C1~C4型全基因组同源性比较

	C4a		C4b		C3	C2	C1	B3	B4	B5	A
gz120	gz530	Fuyang	SHZH03	SHZH98	03-KOR	NUH	J115	MY-104	SB	5511	BrCr
gz120	98	98	93	91	83	82	82	83	81	82	80
gz530		99	94	91	83	82	82	83	82	82	80
Fuyang			94	91	83	82	82	83	82	82	80
SHZH03				93	82	82	82	83	82	82	79
SHZH98					82	81	82	82	82	82	80
03-KOR						89	89	80	80	80	79
NUH							88	80	80	80	79
J115								80	80	80	79
MY-104									87	88	80
SB										95	80
5511											80
BrCr											

注: Fuyang为Fuyang, Anhui.P.R.C/17.08/2(EU703813); 03-KOR为03-KOR-00; NUH为NUH0075/SIN/08; J115为J115-MAL-01; MY-104为MY104-9-SAR-97; SB为SB2864-SAR-00; 5511为5511-SIN-00

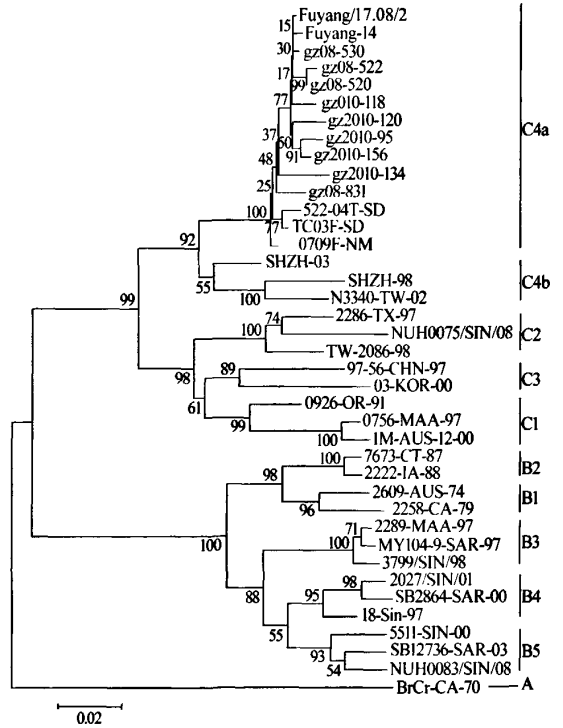


注: 以MEGA 4.1软件, 采用NJ方法构建进化树  
图1 9株广州分离株和阜阳株与EV71的A、B、C基因型构建的全基因组进化树

VP1基因是EV71的主要功能基因, 全长为891 bp, 将9株广州分离株EV71的VP1基因与2007年山东株、2007年内蒙古株、2008年阜阳株、2008年深圳株及EV71的A、B、C型其他株的VP1基因进行同源性比较, 发现与A型同源性为81%, 与B1~B5型同源性为83%~84%, 与C1~C3的同源性为88%~89%, 与C4b的SHZH98、SHZH03的同源性分别为92%和94%, 与2007年山东株及内蒙古株的同源性为97%~98%, 与2008年深圳株及阜阳株为98%~99%, 本研究的9株病毒株之间的同源性为97%~99%。

从构建EV71 A、B1~B5、C1~C4型的VP1基因进化树可以发现, 9株广州分离株与2007年山东、内蒙古及2008年阜阳等地的病毒株分在同一

组, 关系密切, 与C4b组的SHZH03等株也相处较近, 关系相对密切(图2)。



注: 以MEGA 4.1软件, 采用NJ方法构建进化树  
图2 9株广州分离株和阜阳株与EV71病毒A、B、C基因型构建的VP1进化树

4. EV71病毒VP1基因氨基酸的点突变与同源性分析: 将9株广州分离株与1株2007年内蒙古株、2株2007年山东株、1株2009年上海株、1株2008年深圳株、1株2008年广东株、2株2008年阜阳株及EV71病毒A、B、C型的VP1基因氨基酸进行Clustal W比对, 发现VP1基因的22位置有了明显变化, 发现谷氨酰胺转变为组氨酸的氨基酸点突变(Q→H)。由

图 3 可见在 22 位置上由最初的 A 型 BrCr 病毒株脯氨酸转变 B、C1 ~ C3、C4b 型的谷氨酰胺(P→Q),再由谷氨酰胺转变为组氨酸(Q→H),其中该位点上组氨酸的突变从 2007 年山东株及内蒙古株就开始了,到 2008 年及 2010 年有更多资料进一步证实该位点变化的延续。2008—2010 年在该位置上病毒的氨基酸均是组氨酸。

5. EV71 病毒聚合蛋白中其他氨基酸点突变分析:对 9 株广州分离株与 EV71 的 A、B、C 基因型聚合蛋白(polyprotein)氨基酸进行比对,发现 2008 年暴发的手足口病 EV71 在聚合蛋白的 213(S→T)和 1764(V→I)位置发生了氨基酸的点突变,这两个点突变均为 2008 年暴发后才形成的(图 4A)。聚合蛋白的 213 位置是在 VP2 基因,1764 位置是在 3D 基因。聚合蛋白 1487 和 1597 两个位点也发生了明显突变,2008 年暴发后分离的病毒株在这两个位置出现了新氨基酸,但这两个位点中有 1~2 株病毒会沿用以前的氨基酸(图 4B),聚合蛋白中的 1487 位由 T 变为 A,1597 位的由 V 变为 I,这两个位点分别属于 2C 和 3B 基因。

### 讨 论

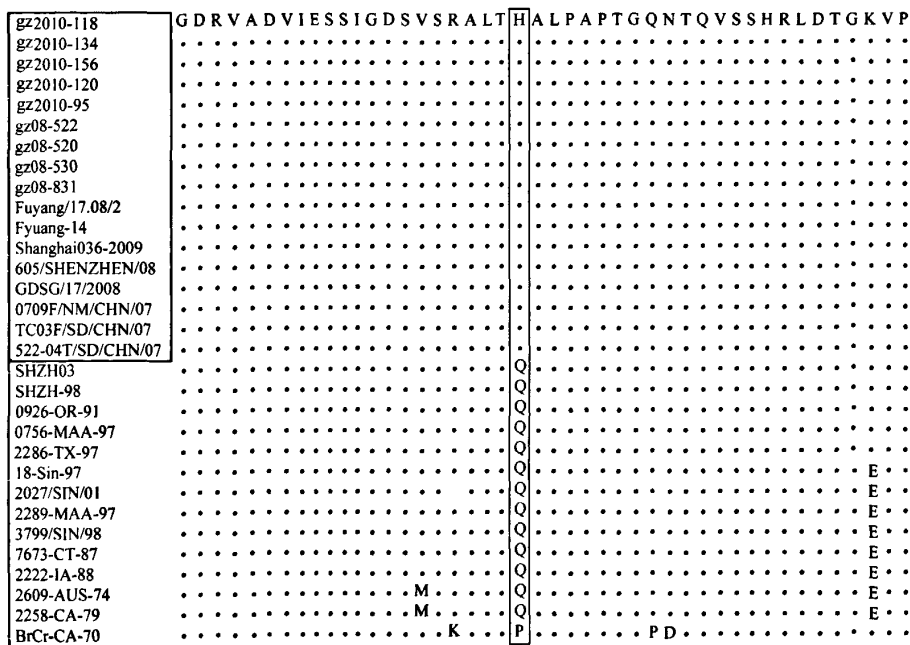
依据 EV71 病毒衣壳蛋白 VP1 核苷酸序列的差异,可将 EV71 分为 A、B、C 3 个基因型。其中 A 型只有一种病毒株,就是 EV71 原型株 BrCr-CA-70,

B、C 型都可以进一步分为 5 个亚型<sup>[5,6]</sup>,分别为 B1 ~ B5 和 C1 ~ C5,其中 C4 还可进一步分为 C4a 和 C4b 组<sup>[4]</sup>。十多年前在中国大陆曾出现过 C4 亚型,如属 C4b 的深圳株 SHZH-CHN-98 在 1998 年曾有出现,之后的 1998—2004 年都是以 C4b 为主要的流行株,2004 年后逐渐被 C4a 取代<sup>[7,8]</sup>,其中 2007 年在山东及内蒙古地区检测到 C4a 亚型<sup>[8]</sup>,2008 年的手足口病暴发也是以 C4a 亚型为主要流行株<sup>[4]</sup>,2010 年检测到的也是以 C4a 为主要的流行株。

2008 年和 2010 年广州分离的 9 株 EV71 病毒全基因组核苷酸序列,与之前所有型别的全基因组比较有较大差异,与同源性最近的 C4b 为 91%~94%,而与其他型别不足 83%。核苷酸序列的差异可能是造成 2008 年手足口病暴发主要原因。而进行全基因组的氨基酸序列比对发现变化并不大,与 A 型为 94%,而与 B 型、C1 ~ C4b 同源性为 95%~98%,与 C4b 型中的 2 株 SHZH98、SHZH03 同源性分别为 95%和 98%。整体氨基酸变异不大,但个别氨基酸残基却发生了重要变异(图 3、4)。对 9 株广州株 EV71 病毒全基因组构建系统发育树,发现与阜阳株属于一组,关系密切。

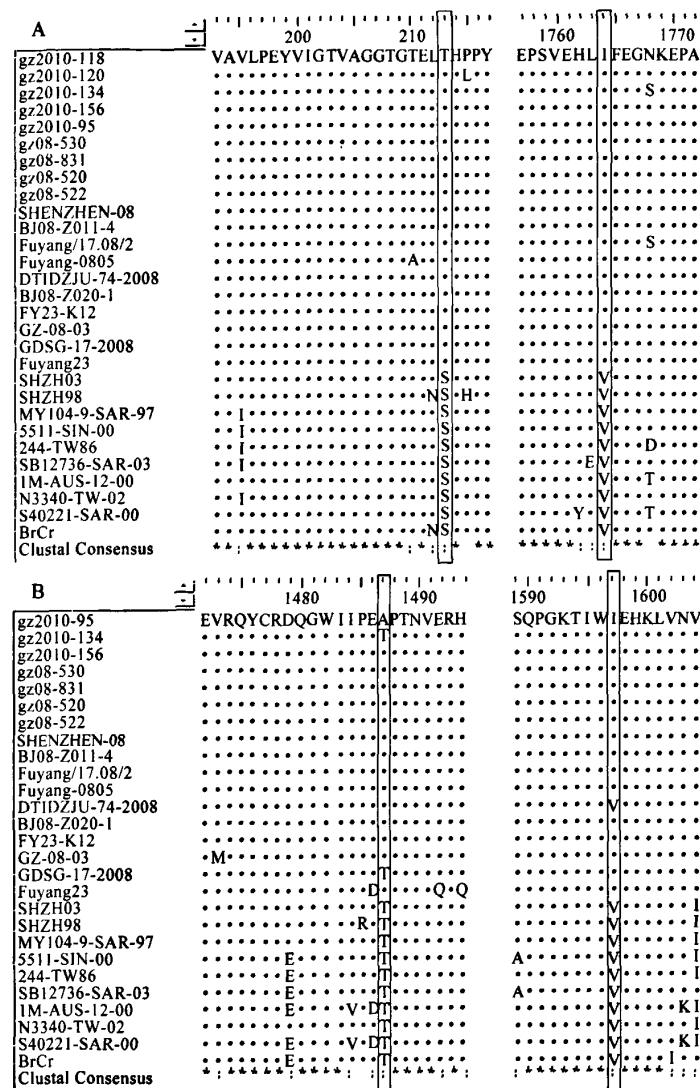
2008 年手足口病疫情发病快且发病重,但其主要病原 EV71 的病毒全基因组氨基酸序列与之前型别同源性高,整体差异不大,因此病毒基因组的个别氨基酸残基变异可能是病毒高致病性的重要因素之一。

经氨基酸序列比对,发现几个位点上氨基酸的突变,如 VP1 基因上的 22 位点,由 A 型的脯氨酸到 B 型、C1 ~ C3、C4b 型的谷氨酰胺<sup>[5]</sup>,再到目前 C4a 型的组氨酸,之前的 C4b 型也是谷氨酰胺,如 C4b 型的 2 株深圳株(SHZH98、SHZH03)VP1 基因检测到的 EV71 基因 22 位点为谷氨酰胺,而目前所有发现的 C4a



注:由 A 型 BrCr 病毒株脯氨酸转变到谷氨酰胺(P→Q),再由谷氨酰胺转变为组氨酸(Q→H)

图 3 VP1 基因 22 位点上的氨基酸突变



注: A: 213 位点突变 S→T, 1764 位点突变 V→I; B: 1487 位点突变 T→A, 1597 位点突变 V→I

图 4 EV71 聚合蛋白中氨基酸的点突变

型在该位点都是组氨酸,包括 2007 年在山东和内蒙古地区手足口病局部暴发时检测到的 3 株病毒(522-04T/SD/CHN/07、TC03F/SD/CHN/07 和 0709F/NM/CHN/07)。VP1 基因 22 位点上的变化是病毒为适应环境而产生的突变,因为 VP1 基因是 EV71 病毒产生中和抗体的主要基因,主要的中和抗原决定簇都集中在 VP1 基因,22 位点是在抗原表位上,具有抗原性<sup>[5]</sup>,而该位点突变是否是引起 2008 年手足口病暴发的重要原因之一,还需要更多资料进一步证实。EV71 聚合蛋白可水解为 P1、P2、P3 前体蛋白,其中 P1 前体蛋白可进一步水解为 VP1、VP2、VP3 和 VP4 蛋白,P2、P3 前体蛋白编码 7 个非结构蛋白(2A、2B、2C、3A、VPg、3C、3D)。对聚合蛋白进行氨基酸

序列比对,发现除 VP1 基因 22 位外,还有 4 个位点也发生明显变化,这 4 个位点属于不同的基因。聚合蛋白中 213T 和 1764I 位置的氨基酸发生了明显突变(图 4A),2008 年暴发后分离的病毒株在这 2 个位置都是沿用了突变后的氨基酸,其中 213 位点属于 VP2 基因,VP2 基因与中和抗体的形成相关,而 1764 位点属于 3D 基因。其中聚合蛋白 1487 和 1597 这两个位点也是发生了明显突变(分别为 T→A 和 V→I,图 4B),该两位点分别属于 2C 和 3B 基因。聚合蛋白中突变的位点分别属于不同的基因,对整个病毒的结构可能产生较大影响,在 C4a 型中绝大部分病毒株是沿用了突变后的新氨基酸,说明 EV71 病毒进化过程中在这几个位点上氨基酸从突变到稳定,而这几个位点是否影响病毒结构的变化,还需要进一步研究。

参 考 文 献

[1] Yang XH, Yan YS, He AH, et al. Construction of a full-length infectious cDNA clone of enterovirus 71 (EV71). *Chin J Zoonoses*, 2010, 26(5): 413-416. (in Chinese)  
 杨秀惠,严延生,何爱华,等. 肠道病毒 71 型(EV71)感染性克隆的构建. *中国人兽共患病学报*, 2010, 26(5): 413-416.  
 [2] Zhu B, Zhong JY, Xia HM, et al. Pathogen analysis of hand, foot and mouth disease cause in Guangzhou in 2008. *Chin J Pediatr*, 2010, 48(2): 127-130. (in Chinese)  
 朱冰,钟家禹,夏慧敏,等. 2008 年广州地区手足口病的病原学研究. *中华儿科杂志*, 2010, 48(2): 127-130.  
 [3] Zhou SL, Ai XW, Dong CY. Evolution analysis of structural protein of enterovirus 71 SHZH03 strain. *J Pub Health Prev Med*, 2007, 18(1): 18-20. (in Chinese)  
 周世力,艾晓武,董长垣. 肠道病毒 71 型 SHZH03 结构蛋白基因的遗传进化分析. *公共卫生与预防医学*, 2007, 18(1): 18-20.  
 [4] Zhang Y, Zhu Z, Yang WZ, et al. An emerging recombinant human enterovirus 71 responsible for the 2008 outbreak of hand foot and mouth disease in Fuyang city of China. *Virology*, 2010, 7: 94.  
 [5] Yu HY, Chen W, Chang HW, et al. Genetic analysis of the VP1 region of enterovirus 71 reveals the emergence of genotype A in central China in 2008. *Virus Genes*, 2010, 41: 1-4.  
 [6] Sabine van der Sanden, Harrie van der Avoort, Philippe Lemey, et al. Evolutionary trajectory of the VP1 gene of human enterovirus 71 genogroup B and C virus. *J Gen Virol*, 2010, 91: 1949-1958.  
 [7] Shan J, Li X, Tang Z, et al. Molecular epidemiology of enterovirus 71 in Jiangsu province from 2008 to 2009. *Chin J Zoonoses*, 2010, 26(10): 979-985. (in Chinese)  
 单军,李显,唐震,等. 2008-2009 年江苏省肠道病毒 71 型分子流行病学研究. *中国人兽共患病学报*, 2010, 26(10): 979-985.  
 [8] Zhang Y, Tan XJ, Wang HY, et al. An outbreak of hand, foot, and mouth disease associated with subgenotype C4 of human enterovirus 71 in Shandong, China. *J Clin Virol*, 2009, 44: 262-267.

(收稿日期: 2011-01-26)  
 (本文编辑: 张林东)