

2009 年云南省柯萨奇病毒 B3 型分离株 A103/KM/09 全基因序列分析

杨卉娟 刘建生 张云昆 马忠飞 赵卫中 潘玥 陈俊英 邵聪文 马绍辉

【摘要】 目的 分析 2009 年云南省脑炎患儿粪便标本分离的柯萨奇病毒 B3 型分离株 A103/KM/09 全基因序列, 了解其遗传特性。方法 设计针对柯萨奇病毒 B3 型引物, 提取病毒 RNA、RT-PCR 扩增和产物直接测序获得全基因组序列, 利用 Geneious 和 Mega 5.05 软件进行核苷酸、氨基酸序列比对及其系统进化分析, 应用 RDP 3 和 SimPlot 3.5.1 重组软件对序列进行重组分析。结果 该分离株全基因组核苷酸序列长度为 7389 bp。其核苷酸和氨基酸序列与其原型株 Nancy 的同源性分别为 81.0% 和 95.7%; 与其他柯萨奇病毒 B3 型毒株的各片段核苷酸和氨基酸同源性分别为 81.0% ~ 88.0% 和 95.7% ~ 98.0%; 进化分析发现 CVB3 可分为 5 个分支 (I ~ V), 核苷酸之间的差异为 16.2% ~ 24.3%; 中国分离株属 V 分支, 又可分为 A ~ D 亚分支, 核苷酸之间的差异为 4.3% ~ 11.4%。并发现 A103/KM/09 株基因序列在非结构区可能存在重组事件。结论 柯萨奇病毒 B3 型分为 5 个基因型, 云南分离株 A103/KM/09 属于 V-D 亚型, 而中国分离株已经发生一定进化。

【关键词】 柯萨奇病毒 B3 型; 全基因序列; 序列分析

Complete nucleotide sequence of a human coxsackievirus B3 strain A103/KM/09 isolated in Yunnan province, 2009 YANG Hui-juan, LIU Jian-sheng, ZHANG Yun-kun, MA Zhong-fei, ZHAO Wei-zhong, PAN Yue, CHEN Jun-ying, SHAO Cong-wen, MA Shao-hui. Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research and Development on Severe Infectious Disease, Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Kunming 650118, China

Corresponding author: MA Shao-hui, Email: shaohuima70@hotmail.com

This work was supported by a grant from the Applied Basic Research Projects of Yunnan Province (No. 2013FZ136).

【Abstract】 Objective To analyze the genetic characterization of the complete genome from a human coxsackievirus B3 strain A103/KM/09 isolated in Yunnan province, 2009. **Methods** By using RT-PCR, all the eight fragments which containing about 1000 nucleotides and covering full viral genome, were sequenced. By using Mega 5.05, Geneious, RDP 3 and SimPlot 3.5.1 software, sequences were aligned with other enterovirus reference sequences. Phylogenetic and recombination analysis were also carried out. **Results** The A103/KM/09 isolate genome showed 7389 nucleotides in length, encoding for 2185 amino acids. In the complete genome, the homology of nucleotide and amino acid among the seven coxsackievirus B3 isolates were 81.0%–88.0% and 95.7%–98.0%, respectively. There appeared 81.0% and 95.7% homology when compared with that of Nancy prototype strain. Results from the Phylogenetic analysis showed that the coxsackievirus B3 formed five distinct clades, I – V. Nucleotide divergence rates between clades were 16.2%–24.3%. The A103/KM/09 strain belonged to clade V. Clade V was further divided into four sub-clades, A–D. The nucleotide divergence between sub-clades was 4.3%–11.4%. Putative recombinant event for A103/KM/09 was detected. **Conclusion** All coxsackievirus B3 isolates could be divided into five clades, with A103/KM/09 strain belonged to Clade V–D. Evolution of coxsackievirus B3 had occurred in China.

【Key words】 Coxsackievirus B3; Complete genome; Sequence analysis

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.012.012

基金项目: 云南省应用基础研究项目 (2013FZ136)

作者单位: 650118 昆明, 中国医学科学院北京协和医学院医学生物学研究所 云南省重大传染病疫苗研发重点实验室

通信作者: 马绍辉, Email: shaohuima70@hotmail.com

柯萨奇病毒 B 组(CVB)有 6 个血清型(CVB1 ~ 6),按目前划分均属于人类肠道病毒 B 群,是引起人类病毒性心肌炎和无菌性脑炎等疾病的主要病原体,其中 CVB3 又是主要病原之一^[1,2]。为此本研究对 2009 年从云南省一名无菌性脑炎患儿粪便标本中分离到的 CVB3 云南分离株 A103/KM/09 全基因组测序,并与 GenBank 中国以及其他国家和地区的 CVB3VP1 基因及其全基因组序列进行比较和分析,了解引起我国无菌性脑炎暴发或散发的 CVB3 遗传特性,为病毒性脑炎的防控提供实验室数据。

材料与方 法

1. 病毒来源:CVB3 分离株 A103/KM/09 是 2009 年从昆明市无菌性脑炎患儿(4 岁零 5 个月男性)粪便中分离。病毒保存在中国医学科学院北京协和医学院医学微生物学研究所分子流行病室。

2. 研究方法:

(1)病毒 RNA 提取:按照 Axygen Body Fluid viral DNA/RNA Miniprep Kit 的说明书操作提取病毒 RNA。病毒 RNA 保存于 -70 ℃。

(2)引物设计:根据 Fuyang19(基因登录号 FJ000001)设计引物(表 1)。

表 1 CVB3 全基因组扩增和测序引物

引物	序列(5'→3')	位置
B3-1F	TTAAAACAGCCTGTGGGTTGC	1~21
B3-1R	TCCCACAACCACGTTTGCGCA	1051~1031
B3-2F	TCAAATTCAGCGACCAGACA	855~874
B3-2R	TCACCGGTATCTTCATCTCTG	1851~1830
B3-3F	AGGCCTCCAACAATGAACAC	1740~1760
B3-3R	CTCATACTCAGTGAAGTAGAC	2694~2674
B3-4F	GTCCCAGGAGACACCATGC	2582~2601
B3-4R	TCTGCCAATCAGTGTGTGTTG	3384~3364
B3-5F	AACCCAGTGGAGTGACAACAA	3245~3265
B3-5R	GGTTCAATACGGCATTGGAC	4406~4386
B3-6F	GTGCACCATCCCAGAGTGATC	4242~4260
B3-6R	AAACCATAGTCTGTGACCTG	5744~5725
B3-7F	GCTGAACTCAACCGGAATG	5583~5602
B3-7R	CGATGTAATTTGTCTCTTTGTG	6711~6788
B3-8F	AATGAGGCAGACATTTGGTAA	6463~6483
B3-8R	CCGCACCGAATGCGGAGAATTA	7399~7388

(3)RT-PCR:采用 TaKaRa 公司(中国)生产的 One-step RNA PCR Kit(AMV)试剂盒。分 8 段分别扩增:2×reaction buffer 25 μl,RT-PCR MIX 1 μl,引物 F 20 pmol/L,引物 R 20 pmol/L,RNA 10 μl 加水至 50 μl,混匀离心后 50 ℃ 反转录 30 min,94 ℃ 2 min,按 94 ℃ 0.3 min,50 ℃ 0.3 min,72 ℃ 1.5 min,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。然后取扩增产物 3 μl,

1.0%琼脂糖电泳,根据 DL2000 Marker 对扩增片段进行确认。

(4)序列测定和数据分析:由华大基因科技股份有限公司(北京)对扩增产物进行纯化和测序(每个样品测 3 次)。其他 CVB3 的全基因序列和 VP1 基因序列从 GenBank 下载,然后利用 Mega 5.05 和 Geneious Basic 5.6.5 软件分别对其进行系统进化分析(Neighbor-joining 方法)和核苷酸(氨基酸)同源性比对以及应用 RDP3、BLAST 和 SimPlot 3.5.1 软件对 CVB3 分离株 A103/KM/09 序列进行重组分析^[3]。

结 果

1. RT-PCR 产物及测序:采用特异性引物作一步法 RT-PCR,取 3 μl PCR 产物在 1%琼脂糖凝胶电泳后,将片段与目的片段大小一样的产物测序。然后将各片段拼接成一个完整序列。通过核苷酸的同源性分析发现该株与 CVB3 原型株 Nancy 的同源性为 81.0%。

2. 基因测序和分析:A103/KM/09 的全基因组核苷酸序列长度为 7389 bp(基因登录号:JQ801739),其中 5' 端非编码区(5' UTR)长 742 bp,病毒基因组编码区全长 6555 个核苷酸,编码一含 2185 个氨基酸残基的多聚蛋白;3' 端非编码区末端长 96 bp。A103/KM/09 基因组的组成和结构符合肠道病毒特征。A103/KM/09 整个基因组的核苷酸和氨基酸同源性与其他 CVB3 毒株如 Nancy、Woodruff variant、GA、Beijing0811、GZ803 和 CVB3-MCH 核苷酸和氨基酸同源性分别为 81.0%~87.4%和 95.7%~97.8%。

3. 核苷酸和氨基酸序列同源性比对:将 A103/KM/09 与 GenBank 中其他 CVB3 毒株 Nancy、Woodruff variant、GA、Beijing0811、GZ803 和 CVB3-MCH 全基因组序列的各个区段分别加以比较,结果发现 A103/KM/09 与其他 CVB3 毒株的各段核苷酸和氨基酸同源性分别为 60.0%~91.9%和 91.9%~99.6%。其中与 3D 的核苷酸的同源性最低(表 2)。

表 2 CVB3 各基因型之间 VP1 区核苷酸和氨基酸序列同源性分析(%)

基因型	I	II	III	IV	V
I		81.5~82.2	77.8~79.1	75.6~77.8	77.3~78.1
II	95.4~96.8		78.0~79.8	76.8~79.5	79.4~81.5
III	93.3~94.8	93.3~94.7		79.9~83.3	79.7~83.8
IV	87.8~95.8	88.7~95.4	88.4~95.4		79.5~83.0
V	95.4~97.5	96.1~96.8	95.1~96.5	89.4~97.5	

注:黑体字为核苷酸同源性分析,白体字为氨基酸同源性分析

4. CVB3 种系进化分析:通过 Mega 5.05 软件 (Neighbor-joining) 对 A103/KM/09 以及 GenBank 中其他 CVB3 毒株的全基因组和 VP1 序列进行种系进化分析 (图 1、2)。CVB3 分成 4 个进化分支, 中国株归为一支。在图 2 中, 目前 CVB3 可形成 5 个进化分支, 中国株主要又可分为 4 支即 1994 年只有 94196/SD/CHN/1994/CB3 一株, 1990 - 1994 年有 93010/SD/CHN/1993 和 90052/SD/CHN/1990 两株, 其余为 1996 - 2002 年和 2002 - 2009 年, 其中 A103/KM/09 属于 2002 - 2009 年进化树上的一个分支; 国外主要分为 1970 - 1987 年和 1997 - 2005 年两支, 印度株单独为一支。提示不同国家或地区以及不同的时间分离到的 CVB3 可属于进化树上不同分支, 且其间的亲缘关系存在明显的距离。

5. CVB3 基因分型:通过对 36 株 CVB3 的全长 VP1 基因序列系统进化分析, 发现 36 株 CVB3 可形成 5 个分支即 I、II、III、IV 和 V (图 2), 并且对其相互之间核苷酸和氨基酸同源性比对分析 (表 2), 发现这 5 个分支相互之间核苷酸的差异在 16.2% ~ 24.3%。在 V 分支内又可分为 4 个亚支即 A ~ D, 其相互之间核苷酸的差异在 4.3% ~ 11.4% (表 3), 其中基因型 V - A 只有 94196/SD/CHN/1994/CB3 一株; V - B 基因亚型有 2 株即 93010/SD/CHN/1993 和 90052/SD/CHN/1990。按照肠道病毒不同基因型之间 VP1 基因差异 > 15%, 即可分为不同的基因型, 因此可将目前 CVB3 分为 5 个基因型。EV71 亚型之间的差异为 4% ~ 14%, 因而中国 CVB3 流行株又可分为 4 个基因

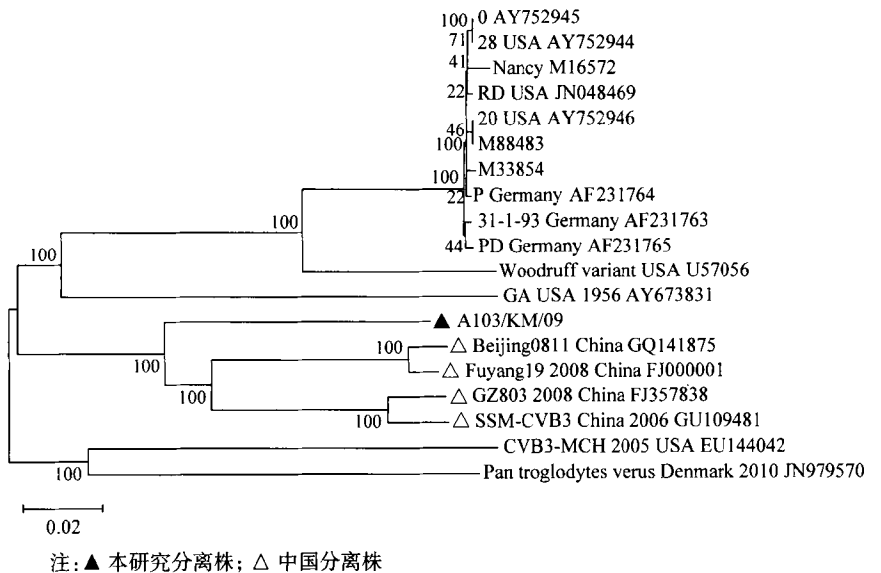


图 1 CVB3 全基因组核苷酸序列的种系进化分析

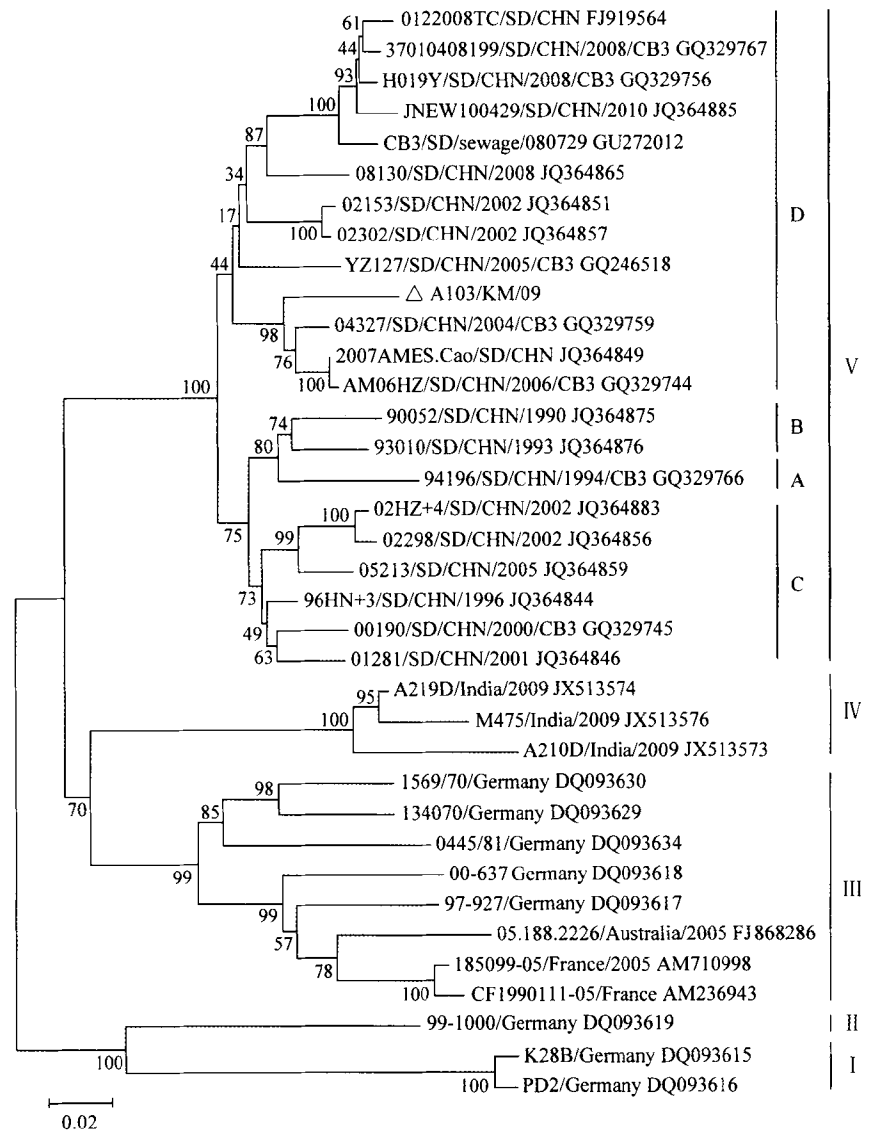


图 2 CVB3 VP1 核苷酸序列的种系进化分析

表3 CVB3 V 基因型之间 VP1 区核苷酸和氨基酸序列同源性分析(%)

基因亚型	V-A	V-B	V-C	V-D
V-A		92.7 ~ 93.1	90.0 ~ 93.4	88.6 ~ 90.7
V-B	98.9 ~ 99.6		91.4 ~ 95.4	88.8 ~ 92.6
V-C	96.3 ~ 99.5	97.5 ~ 99.7		89.4 ~ 95.7
V-D	95.5 ~ 98.7	94.5 ~ 97.1	94.6 ~ 99.1	

注:同表2

亚型。

6. A103/KM/09 重组事件分析:利用RDP3 重组软件对 3 株 CVB3 全基因组和其他 3 种肠道病毒血清型 (Echo30/Zhejiang/17/03/CSF、Echo6/Hokkaido.JPN/19724/2011 和 Enterovirus Yanbian 96-83csf) 进行重组分析,发现 RDP、MaxChi、Chimaera 和 SiScan 3Seq 分别检测出 A103/KM/09 重组 (RDP 法, $P=1.48 \times 10^{-3}$), 亲本序列为 Enterovirus Yanbian 96-83csf、Echo6/Hokkaido.JPN/19724/2011 和 Fuyang19。

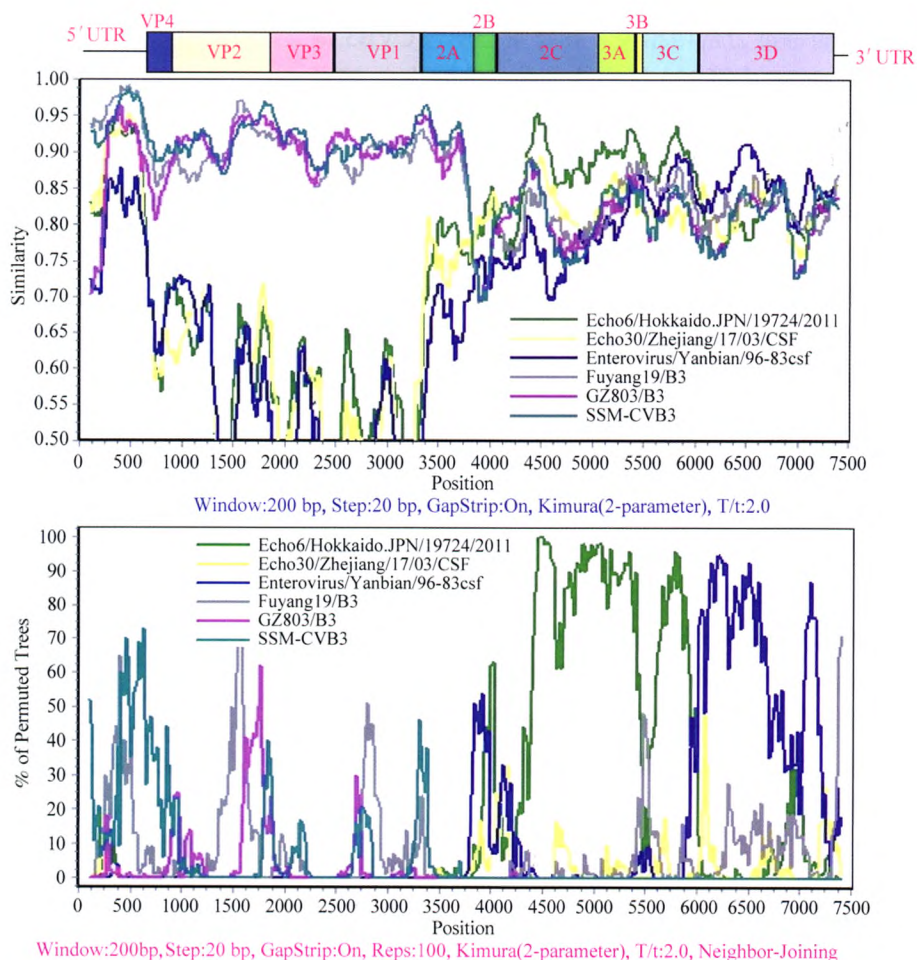
为进一步证实重组,利用 SimPlot 3.5.1 软件进行相似性分析发现(图3),大约在 4500~6000 区段,与 Echo6 / Hokkaido. JPN / 19724/2011 显示出约 80% 的相似性;在 6000~6750 区段则与 Enterovirus Yanbian 96-83csf 有约 80% 的相似性。另外,通过 BLAST 比对分析各片段发现, A103/KM/09 的 5' -UTR 和 3' -UTR 与 CVB3Fuyang19 株最同源(分别为 95% 和 88%); 2A、VP3 和 VP4 与 CVB3 SSM-CVB3 株最同源(分别为 94%、93% 和 92%), 2B 与 E6SD11CHN 最同源(86%), 2C、3A 和 3C 与 Echo6/Hokkaido.JPN/19724/2011 最同源(分别为 88%、91% 和 90%), 3B 和 VP2 与 GZ803 最同源(分别为 91% 和 98%), 3D 与 Enterovirus Yanbian 96-83csf 最同源(86%), VP1 与 CVB3 177/

2008TC/SD/CHN 株最同源(98%)。

讨 论

CVB3 根据 VP1 基因分为 I、II、III、IV 和 V 5 个基因型,其中 III 又分为 III-A 和 III-B, V 又分为 V-A 和 V-B^[4]。而 Tao 等^[5]将 CVB3 分为 A、B、C 和 D, D 又分 D1、D2 和 D3。根据 EV71 基因型的划分标准,各基因型之间 VP1 的差异一般为 15%~20%^[6]。经 CVB3VP1 全基因序列的种系进化和核苷酸差异分析发现 CVB3 可簇集成的 5 个分支,且其相互之间核苷酸的差异均 >15%。以往文献仅依据 VP1 部分基因序列,而本研究根据 VP1 全基因序列,两者获得结果基本一致。根据 EV71 亚型划分标准^[7],可将所有 CVB3 中国株分成 A、B、C 和 D 亚型,目前流行的主要为 V-D 亚型。

通过对 CVB3 全基因组的核苷酸和氨基酸同源性比较,发现 A103/KM/09 株与其他 CVB3 毒株各区段的核苷酸及氨基酸同源性普遍不高,但是可以看



注:采用 200 bp 窗口,每步为 20 bp 进行比较,100 次自展, Kimura 双参数模型。横坐标代表核苷酸的位置;纵坐标代表序列的相似性(上)或置换树的百分数(下)

图3 肠道病毒 B 群全基因组的 SimPlot 和 Bootscanning

出同属相同进化分支的 CVB3 毒株的结构区同源性高;不同国家或者相同国家在不同时间或相同时间分离的毒株其核苷酸和氨基酸序列也存在差异,这提示不同地域或时间分离的病毒株已经发生一定的进化。本研究表明中国大陆 CVB3 分离株分属不同分支,其核苷酸和氨基酸之间存在一定差异,我国目前主要聚集在 V-D 亚型,同样提示中国流行株已经发生一定进化。

Schmidtke 等^[8]认为 VP1 蛋白中的 78K、80A、91A 和 92I 能够诱使原代人细胞裂解。而 A103/KM/09 却为 78E、80E、91V 和 92V,是否能使相应细胞发生改变需进一步证实。另外,柯萨奇病毒-腺病毒受体(CDR)为所有 CVB 最初进入细胞的受体^[9], CVB3-RD 株与 CDR 的结合需要 VP3-234Q 和 VP2-138D 参与^[10],而 A103/KM/09 的 VP3-234D 和 VP2-138D,其中 VP3-234Q 变为 D 是否影响该病毒与 CDR 的结合,同样需要验证。

CVB 是引起 20% ~ 25% 心肌炎的主要病原体^[11]。分析 CVB35'-NTR 特定核苷酸的变异,发现可能与病毒毒力密切相关。如将嗜心肌性 CVB3 毒株的 5'-NTR 内第 234 位的核苷酸 U 突变为 C,该毒株对小鼠致心肌毒性明显减弱^[12]。Knowlton 等^[13]将嗜心肌的 CVB3/H3 毒株编码 VP2 蛋白 165N 变为 165D,导致病毒的心肌毒力明显减弱。而 A103/KM/09 的 5'-NTR 的第 234 位核苷酸为 C,在 VP2 第 165 位氨基酸为 N。另外,A103/KM/09 分离株是从一名无菌性脑炎患儿的粪便中分离,未对其心肌进行相关的检测,因此关于该分离株是否具有心肌毒性有待动物实验证实。

肠道病毒存在重组现象,而常发生在病毒基因组的非结构区^[14,15]。通过 RDP3 重组软件和 SimPlot 3.5.1 软件分析,初步认为 A103/KM/09 株有重组的可能,且通过 BLAST 比对,进一步发现其 2B 与 E6SD11CHN 最同源(86%),2C、3A 和 3C 与 Echo6/Hokkaido.JPN/19724/2011 最同源(分别为 88%、91% 和 90%),3D 与 Enterovirus Yanbian 96-83csf 最同源(86%)。提示 A103/KM/09 存在重组可能,但仍需进一步验证。

参 考 文 献

- [1] Cihakova D, Rose NR. Pathogenesis of myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Adv Immunol*, 2008, 99: 95-114.
- [2] Wong AH, Lau CS, Cheng PK, et al. Coxsackievirus B3-associated aseptic meningitis: an emerging infection in Hong

Kong. *J Med Virol*, 2011, 83(3): 483-489.

- [3] Ma SH, Pan Y, He CY, et al. Complete nucleotide sequence of a human coxsackievirus A16 strain KMM08 isolated in Kunming, China in 2008. *Chin J Epidemiol*, 2012, 33(2): 220-225. (in Chinese)
马绍辉,潘玥,何春艳,等. 2008 年柯萨奇病毒 A 组 16 型昆明分离株 KMM08 的全基因组序列分析. *中华流行病学杂志*, 2012, 33(2): 220-225.
- [4] Chu PY, Ke GM, Chen YS, et al. Molecular epidemiology of coxsackievirus B3. *Infect Genet Evol*, 2010, 10(6): 777-784.
- [5] Tao Z, Song Y, Li Y, et al. Coxsackievirus B3, Shandong province, China, 1990-2010. *Emerg Infect Dis*, 2012, 18(11): 1865-1867.
- [6] Chan YF, Sam IC, AbuBakar S, et al. Phylogenetic designation of enterovirus 71 genotypes and subgenotypes using complete genome sequences. *Infect Genet Evol*, 2010, 10(3): 404-412.
- [7] Bible JM, Pantelidis P, Chan PK, et al. Genetic evolution of enterovirus 71: epidemiological and pathological implications. *Rev Med Virol*, 2007, 17(6): 371-379.
- [8] Schmidtke M, Selinka HC, Heim A, et al. Attachment of coxsackievirus B3 variants to various cell lines: mapping of phenotypic differences to capsid protein VP1. *Virology*, 2000, 275(1): 77-88.
- [9] Martino TA, Petric M, Weingartl H, et al. The coxsackie-adenovirus receptor (CAR) is used by reference strains and clinical isolates representing all six serotypes of coxsackievirus group B and by swine vesicular disease virus. *Virology*, 2000, 271(1): 99-108.
- [10] Pan J, Narayanan B, Shah S, et al. Single amino acid changes in the virus capsid permit coxsackievirus B3 to bind decay-accelerating factor. *J Virol*, 2011, 85(14): 7436-7443.
- [11] Kim KS, Hufnagel G, Chapman NM, et al. The group B coxsackieviruses and myocarditis. *Rev Med Virol*, 2001, 11(6): 355-368.
- [12] Tu Z, Chapman NM, Hufnagel G, et al. The cardiovirulent phenotype of coxsackievirus B3 is determined at a single site in the genomic 5' nontranslated region. *J Virol*, 1995, 69(8): 4607-4618.
- [13] Knowlton KU, Jeon ES, Berkley N, et al. A mutation in the puff region of VP2 attenuates the myocarditic phenotype of an infectious cDNA of the Woodruff variant of coxsackievirus B3. *J Virol*, 1996, 70(11): 7811-7818.
- [14] Oberste MS, Maher K, Pallansch MA, et al. Evidence for frequent recombination within species human enterovirus B based on complete genomic sequences of all thirty-seven serotypes. *J Virol*, 2004, 78(2): 855-867.
- [15] Lukashov AN, Lashkevich VA, Ivanova OE, et al. Recombination in circulating human enterovirus B: independent evolution of structural and non-structural genome regions. *J Gen Virol*, 2005, 86(Pt 12): 3281-3290.

(收稿日期: 2013-08-01)

(本文编辑: 张林东)