

人埃可病毒 20 型 KM/EV20/2010 分离株的全基因组序列分析

潘玥 邵聪文 王晓辉 朱艳菊 陈俊英 陈伟 马绍辉 刘建生

【摘要】 目的 对人埃可病毒 20 型(ECHO20)KM/EV20/2010 分离株全基因组进行序列测定,并分析其分子变异和进化特点。方法 设计针对 KM/EV20/2010 引物,提取病毒 RNA,RT-PCR 扩增和序列测定获得全基因组序列。利用 Mega 4.1、RDP3 和 SimPlot 3.5.1 软件分析全基因组序列。结果 KM/EV20/2010 病毒株基因组全长 7 395 bp 个核苷酸(nt),5'端和 3'端分别为 744 nt 和 96 nt 的非编码区,5'和 3'非编码区间为一个 6 549 nt 长的开放阅读框,编码一个含 2 183 个氨基酸的多聚蛋白,编码区内未见核苷酸的插入或缺失。与 GenBank 中现有唯一一株 ECHO20 JV-1 原型株全基因组序列相比,核苷酸同源率为 80.1%,氨基酸同源率为 96.7%;构建基于全长 VP1 基因序列的进化树图并进行基因分型分析,ECHO20 可分为 6 个基因型,中国分离株分属 III 和 IV 基因型,其中 KM/EV20/2010 属于基因型 IV,且 6 个基因型之间核苷酸的差异为 9.4%~21.7%。基于全基因组序列的种系进化分析提示 KM/EV20/2010 分离株与 ECHO20 原型株 JV-1 遗传距离很远,未与原型株 JV-1 聚簇分布,而与 ECHO30 病毒株遗传距离较近。分析发现 KM/EV20/2010 序列在非结构区可能存在重组。结论 中国 ECHO20 可分为 6 个基因型,KM/EV20/2010 分离株属于 IV 基因型。

【关键词】 埃可病毒;全基因组;序列分析

Genomic characteristics of an echovirus 20 strain (KM/EV20/2010) isolated in Kunming, Yunnan, China Pan Yue, Shao Congwen, Wang Xiaohui, Zhu Yanju, Chen Junying, Chen Wei, Ma Shaohui, Liu Jiansheng. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research & Development on Severe Infectious Disease, Kunming 650118, China

Corresponding author: Liu Jiansheng, Email: ljsh3300@163.com

This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China (No. 30471595).

【Abstract】 **Objective** To identify the complete genome sequence of an echovirus 20 isolate (KM/EV20/2010) and understand its genetic variation and evolution characteristics. **Methods** Seven overlapping clones covering the whole viral genome (excluding the poly-A tail) were obtained by RT-PCR and sequenced, and their nucleotide and amino acid sequences were aligned with other echovirus 20 isolates. Phylogenetic and pairwise alignment analyses based on genome and complete VP1 regions were conducted with software Mega 4.1, RDP3 and SimPlot 3.5.1. **Results** The genome of the echovirus strain was 7 395 nucleotides in length, and contained a 744-nt non-translated region (NTR) at the 5' end and a 96-nt NTR at the 3' end. The entire open reading frame contained 6 549 nt, encoding a 2 183-aa polyprotein. In the coding region, there was no nucleotide deletion or insertion. Based on the complete genome sequence alignments, the echovirus strain showed 80.1% nucleotide and 96.7% amino acid homology to echovirus 20 prototype JV-1 strain. The phylogenetic trees constructed on the genome and complete VP1 regions all indicated that the echovirus strain was not in one cluster with echovirus 20 prototype JV-1 strain, while had a closer relationship with echovirus 30 prototype Bastianni. Genotyping results from phylogenetic analysis showed that echovirus 20 has six genotypes. The strain used in this study belonged to genotype IV. The nucleotide divergence was 9.4%~21.7% among the 6 genotypes. The possible putative recombination was

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2015.05.019

基金项目:国家自然科学基金(30471595)

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:刘建生, Email: ljsh3300@163.com

detected in its non-coding sequence of the echovirus 20 strain used in this study. **Conclusion** Based on the bioinformatics analysis. The echovirus 20 strains isolated in China could be divided into six genotypes, and the echovirus 20 in this study belonged to genotype IV.

【Key words】 Echovirus; Complete genome; Sequence analysis

人埃可病毒20型(ECHO20)为无包膜病毒,能在恶劣的环境条件(如高盐、高pH值和37℃)下稳定存活^[1]。近年来,国内外在非脊髓灰质炎肠道病毒(NPEV)急性弛缓性麻痹(AFP)病例及环境污水中均监测到有ECHO20分离株循环流行^[2-11],但因未见有与疾病直接关联的暴发或流行,未能引起足够重视。为此本研究对前期分离自甲型肝炎患者粪便标本,经KMB17人二倍体细胞适应传代,并经微量中和试验血清型鉴定的KM/EV20/2010病毒株进行全基因组扩增测序和分析,为相关病原监测及实验室检测提供资料。

材料与方法

1. 毒株来源:KM/EV20/2010分离自与HAV混存的甲型肝炎患儿粪便标本,其分离鉴定见文献[12]。毒株保存于中国医学科学院北京协和医学院医学生物学研究所分子流行病室。

2. 病毒RNA提取、引物设计和RT-PCR:按照Axygen Body Fluid Viral DNA/RNA Miniprep Kit说明书从产生CPE的细胞培养上清中提取病毒RNA,并保存于-70℃。

根据ECHO20原型株JV-1(基因登录号:AY302546),采用Primer 5.0软件设计覆盖其全长基因组的引物对(表1)。RT-PCR采用TaKaRa公司(中国)生产的One-step RNA PCR Kit(AMV)试剂盒。分7段扩增:2×reaction buffer 25 μl, RT-PCR MIX 1 μl,引物F 10 pmol/L,引物R 10 pmol/L,病毒RNA 5 μl,用无RNA酶超纯水补足至50 μl,混匀、瞬时离心后50℃反转录30 min;94℃3 min,94℃30 s,50℃30 s,72℃1.5 min,30个循环扩增;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确认扩增片段。

3. 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(3次重复/样品)。从GenBank下载其他ECHO20及肠道病毒的全基因序列和VP1基因序列,利用Mega 5.1、BLAST和Geneious Basic 5.6.5软件分别进行系统进化分析(Neighbor-Joining方法)和核苷酸(氨基酸)同源性比对以及应用RDP3和SimPlot 3.5.1软件对ECHO20分离株KM/EV20/2010序列进行重组分析。

表1 ECHO20全基因组扩增和测序引物

基因	序列(5'→3')	编码区
E201F	TTAAAACAGCCTGTGGGTTG	1~20
E201R	TCGGGAAATTTCCACCACCA	1 200~1 181
E202F	TGAGGAGGCCACGGCGGAAG	1 081~1 100
E202R	TAGTAGGCGCACCCGAGAA	2 404~2 391
E203F	TCTTATGTATACCATGGATC	2 226~2 245
E203R	ATTTCCAAGTTGCTCCAC	3 772~3 755
E204F	GTCAGCACCACCACAGCCCA	3 447~3 466
E204R	ATTGATGGACCCTGCATTAG	4 720~4 701
E205F	CTCACTACCACCAGATCCAG	4 501~4 520
E205R	AAATTGCTGGTGTAAATAGC	5 696~5 677
E206F	ATGAATGACCAGGAAGTGGG	5 501~5 520
E206R	ACTCAGACTGGCATCATA	6 663~6 646
E207F	ACTGGTAGTGACGTTGGGTG	6 521~6 540
E207R	ACCGAATGCGGAGAATTTAC	7 428~7 409
E201R	AGGATTAGCCGCATTACG	472~455
E201F	AACTCACCAACTGTGGAG	927~944
E208F	CCTTGTTACCCAGTGAT	7 079~7 096

结果

1. RT-PCR及测序:采用特异性引物进行一步法RT-PCR,取3 μl PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳后,将符合预期大小的目的片段扩增产物送检测序,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病毒分离株与ECHO20原型株JV-1的同源性为80.0%。

2. KM/EV20/2010全基因组序列测定:KM/EV20/2010的全基因组核苷酸序列长度为7 395 bp(基因登录号:JQ801739),其中5'端非编码区(5'UTR)长744 bp,病毒基因组编码区全长6 549个核苷酸,编码一含2 183个氨基酸残基的多聚蛋白;3'端非编码区末端长96 bp。KM/EV20/2010基因组的组成和结构符合肠道病毒特征。KM/EV20/2010整个基因组的核苷酸和氨基酸与JV-1同源性最高,分别为80.1%和96.7%。

3. KM/EV20/2010各区段核苷酸序列BLAST比对:将KM/EV20/2010全基因组各区段通过PUBMED BLAST与GenBank中的序列比对(表2),发现其结构蛋白VP4、VP2、VP3和VP1与ECHO20血清型病毒株的相应基因区段同源性最高,其中VP4与ECHO20株EPSE20同源性最高,VP1与104-YN-2005AFP ECHO20株同源性最高;2A、2C、

表 2 KM/EV20/2010 分离株各基因区段在 GenBank 中同源性最高的核苷酸比对及该分离株各基因区段与 ECHO20 原型株 JV-1、ECHO30 原型株 Bastianni 核苷酸(氨基酸)比对

基因区段	血清型	病毒株	核苷酸同源性(%)	核苷酸(氨基酸)同源性(%)	
				ECHO20 JV-1	ECHO30 Bastianni
5' UTR	EV74	USA-CA75-10213	84	83.3	82.2
VP4	ECHO20	EPSE20	89	81.0(98.6)	75.2(90.0)
VP2	ECHO20	JV-1	80	80.5(96.9)	71.2(78.5)
VP3	ECHO20	JV-1	81	80.5(99.6)	69.3(71.8)
VP1	ECHO20	104-YN-2005AFP	97	80.8(98.2)	63.8(67.0)
2A	EV86	BAN00-10354	90	78.2(94.0)	77.8(94.7)
2B	ECHO30	ECV30-GX10-05	86	77.4(91.9)	78.1(93.9)
2C	ECHO7	EV7-15936-01	90	81.3(98.5)	81.4(97.9)
3A	EV88	BAN01-10398	88	77.9(94.4)	83.9(96.6)
3B	ECHO30	ECV30-GX10-05	80	78.8(100)	78.8(90.9)
3C	ECHO30	Kor08-ECV30	87	78.9(96.2)	82.5(98.4)
3D	ECHO30	EV30-14125-02	87	78.4(94.8)	84.3(97.4)
3' UTR	EV98	T92-1499	96	92.9	80.2
全基因组	ECHO20	JV-1	80	80.1(96.7)	77.0(87.5)

3A、3' UTR、5' UTR 则分别与 EV86、ECHO7、EV88、EV98、EV74 株同源性最高；而 2B、3B、3C 则与 ECHO30 株同源性最高。另外，KM/EV20/2010 分离株各基因区段与 ECHO20 原型株 JV-1、ECHO30 原型株 Bastianni 核苷酸和氨基酸进行比对(表 2)，结果在结构蛋白编码区 745 ~ 3 291，KM/EV20/2010 分离株结构蛋白 VP4、VP2、VP3 和 VP1 各基因区段的核苷酸及氨基酸与 ECHO20 原型株 JV-1 同源性均在 80% 以上；而在非结构蛋白编码区 3 292 ~ 7 293，KM/EV20/2010 分离株非结构蛋白 2B、2C、3A、3B、3C 和 3D 基因区段的核苷酸及氨基酸与 ECHO30 原型株 Bastianni 的同源性均高于 JV-1。

4. ECHO20 全基因组种系进化分析：利用 Mega 4.1 软件对 KM/EV20/2010 分离株和 GenBank 中的 ECHO20 原型株 JV-1 以及其他 ECHO 病毒型别代表株，选用 Neighbor-Joining 方法构建基于全基因组序列的进化树(图 1)。结果表明，KM/EV20/2010 分离株与 ECHO20 原型株 JV-1 遗传距离很远，而与 ECHO30 株遗传距离较近。迄今为止，GenBank 中仅有 1 株 ECHO20 全长基因病毒株，并且未与 KM/EV20/2010 聚簇分布。

5. ECHO20 基因分型：基于 ECHO20 全长 VP1 进化树图显示(图 2)，JV-1 原型株(1956 年)构成基因型 I；N-948 印度株(2011 年)形成基因型 II；99357 和 99358 中国山东分离株(1999 年)形成基因型 III；KM/EV20/2010 则与 01352 中国山东分离株

(2001 年)、94CF1666 法国分离株(1998 年)聚簇为基因型 IV；基因型 V 和 VI 主要由 2010 年和 2011 年印度分离株聚簇形成。对各基因型进行相互之间核苷酸和氨基酸同源性比对分析(表 3)，发现这 6 个基因型相互之间核苷酸的差异在 9.4% ~ 21.7%，氨基酸差异为 0% ~ 5.3%。

6. KM/EV20/2010 重组事件分析：利用 RDP3 重组软件进行 KM/EV20/2010 和 JV-1 原型株及 GenBank 中同源性最高的肠道病毒代表株基于病毒基因组全长序列的 SimPlot 相似性分析，发现 RDP、MaxChi、Chimaera 和 SiScan 3Seq 分别检测出 KM/EV20/2010 重组事件(RDP 法， $P=1.82 \times 10^{-13}$)，亲本序列为 ECHO88/BAN00-10354、JV-1、ECHO33/Toluca 和 ECHO30/GX10/05。为进一步证实重组，利用 SimPlot 3.5.1 软件进行相似性分析(图 3)，结果显示，KM/EV20/2010 在其基因组区段 821 ~ 3 321 与 JV-1 相似度在 70% 以上；在其基因组区段 3 381 ~ 7 341 则与 ECHO30、ECHO86 相似度高于 80%。

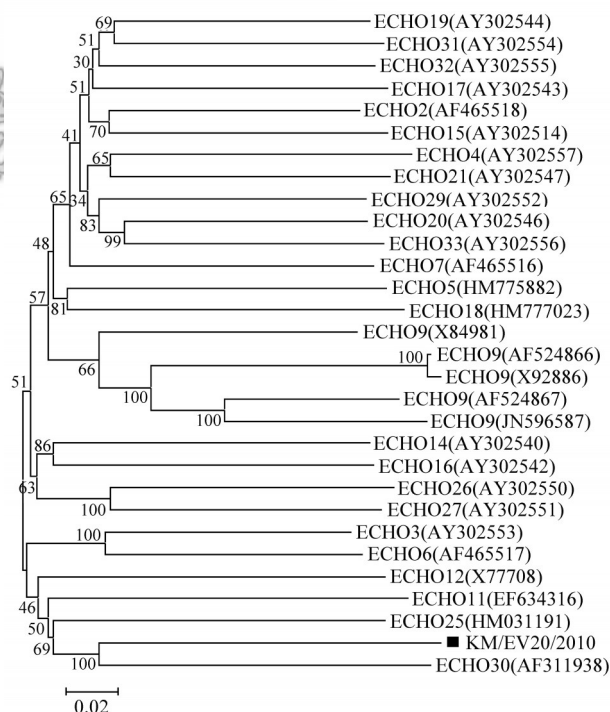


图 1 ECHO20 全基因核苷酸序列的种系进化分析

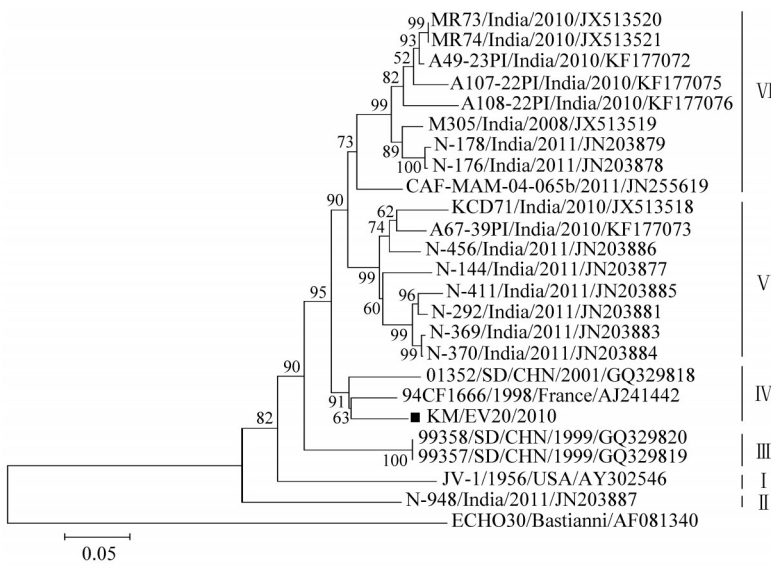


图2 ECHO20 VP1 核苷酸序列的种系进化分析

外均在 NPEV 致 AFP 病例及环境污水中监测到 ECHO20 株, 这些病毒可能在环境中以静默态循环, 在人群中未显现相关疾病暴发或流行。

肠道病毒结构蛋白 VP1 基因与人类肠道病毒血清型具有良好的遗传关联度, 是肠道病毒基因分型理想的靶标, 常用于血清型别的分子鉴定^[16]。本研究中 KM/EV20/2010 株的 VP1 序列与 2005 年分离自云南地区 104-YN-2005AFP ECHO20 株核苷酸同源性最高为 97%, 与 JV-1 原型株核苷酸、氨基酸同源性分别为 80.1% 和 96.7%, 从分子水平可鉴定为 ECHO20 基因型。

表3 ECHO20 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	VI
I		78.6	81.5 ~ 81.6	79.6 ~ 80.7	81.1 ~ 81.3	81.0 ~ 81.1
II	95.7		78.3 ~ 78.4	78.3 ~ 79.5	78.4 ~ 79.5	79.2 ~ 79.5
III	97.5 ~ 97.9	96.4 ~ 96.8		85.1 ~ 86.0	83.3 ~ 85.3	85.2 ~ 85.6
IV	97.2 ~ 98.2	96.1 ~ 97.2	98.6 ~ 99.6		87.2 ~ 89.7	87.2 ~ 89.7
V	96.4 ~ 97.5	95.4 ~ 97.2	98.2 ~ 99.6	97.9 ~ 99.3		87.8 ~ 90.6
VI	97.9 ~ 98.2	94.7 ~ 96.8	98.2 ~ 100	97.5 ~ 99.6	97.5 ~ 99.6	

注: 黑体字为核苷酸同源性(%), 其他为氨基酸同源性(%)

GenBank 中与 ECHO20 相关的序列绝大多数为结构蛋白 VP1 非完整序列, 本研究选取库中完整的结构蛋白 VP1 基因序列, 构建了基于全长 VP1 基因序列的进化树图, 并进行基因分型初步分析。结果显示, ECHO20 形成 6 个基因型, JV-1 原型株(1956 年)构成基因型 I; N-948 印度株(2011 年)形成基因型 II; 99357 和 99358 中国山东分离株(1999 年)形成基因型 III; KM/EV20/2010 则与 01352 中国山东分离株(2001 年)、94CF1666 法国分离株(1998 年)聚簇为基因型 IV; 基因型 V 和 VI 主要由 2010 年和 2011 年印度分离株聚簇形成。

讨论

ECHO20 的原型株 JV-1 于 1956 年分离自一名临床无症状儿童的粪便标本。一般认为 ECHO20 在儿童中仅引起轻度发热、出疹性疾病^[13-14]。另有报道 ECHO20 感染新生儿引致肝衰竭而死亡^[15]。国内

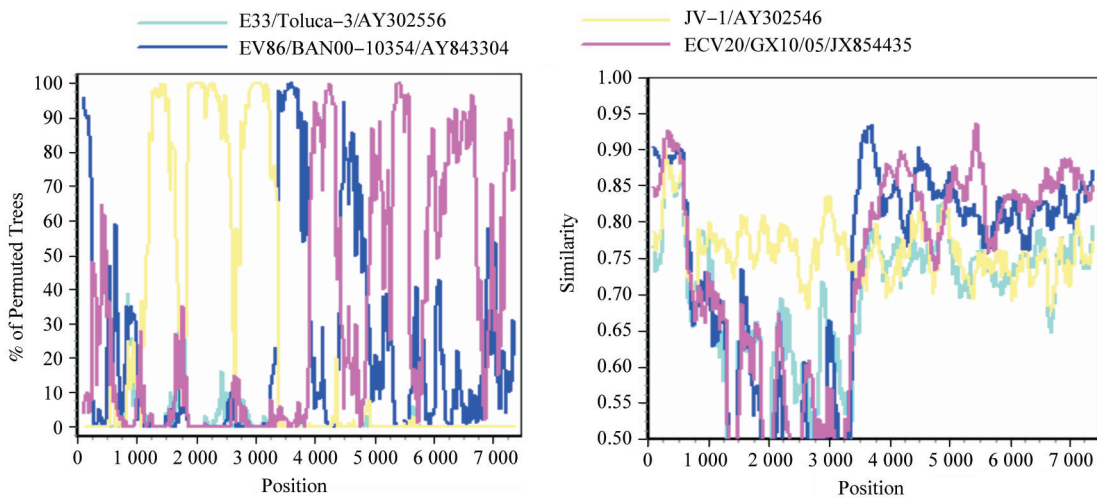


图3 KM/EV20/2010 与 JV-1 原型株及 GenBank 中同源性最高的肠道病毒代表株基于病毒基因组全长序列的 SimPlot 相似性分析

鉴于 GenBank 中仅有 ECHO20 JV-1 原型株的全长基因组序列, 选取库中 ECHO 病毒代表株的全长基因组序列, 构建了基于 ECHO 病毒全长基因序列的进化树图。结果表明, KM/EV20/2010 分离株与 ECHO20 原型株 JV-1 遗传距离很远, 未与原型株 JV-1 聚簇分布, 而与 ECHO30 病毒株遗传距离较近。该特征可能的原因: 首先, 全基因组序列比对显示, KM/EV20/2010 基因组核苷酸序列与 JV-1、ECHO30 的同源性分别为 80.1%、77.0%, 仅相差 3.1%; 其次, KM/EV20/2010 分离株结构蛋白与 JV-1 原型株的同源性高于 ECHO30 原型株 Bastianni, 而在非结构蛋白编码区, KM/EV20/2010 分离株与 ECHO30 原型株 Bastianni 同源性高于 JV-1, 但是由于结构蛋白编码基因只占整个基因组的 35%, 而非结构蛋白基因则占比超过 50%, 从而使得 KM/EV20/2010 分离株在病毒全长基因序列的进化树图上与 ECHO30 病毒株遗传距离更近。

对 KM/EV20/2010 病毒分离株进行基因重组分析, 结果显示 KM/EV20/2010 在其结构蛋白编码区 (745 ~ 3 291) 与 ECHO20 原型株相似性最高, 而在非结构蛋白编码区 (3 292 ~ 7 293) 则与 ECHO30、EV86 相似度高于 80%。可能的重组事件主要聚集发生在其基因组非结构蛋白编码区, 这与各基因区段核苷酸同源性比对结果相一致。

从时间、空间进化分布而言, 由于缺少中间过渡株, EV20 病毒分子变异和进化特征信息很单薄, 但是 KM/EV20/2010 病毒株全长基因序列的测定, 无疑可丰富 ECHO20 病毒基因组信息的多态性, 为进一步研究其遗传特性以及监测提供基础数据。

参 考 文 献

[1] Pallansch MA, Roos RP. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses [M]//Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, et al. Fields Virology. 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams & Wilkins, 2007: 839-893.

[2] Tao Z, Wang H, Liu Y, et al. Non-polio enteroviruses from acute flaccid Paralysis surveillance in Shandong province, China, 1988-2013[J]. Sci Rep, 2014, 4: 6167. doi: 10.1038/srep06167.

[3] Wang HY, Liu K, Tao ZX, et al. Genotype distribution of enterovirus group B isolated in Shandong province, China [J]. Chin J Virol, 2010, 26(5): 357-362. (in Chinese)
王海岩, 刘昆, 陶泽新, 等. 肠道病毒 B 组山东地方株的基因型分布[J]. 病毒学报, 2010, 26(5): 357-362.

[4] Chen HL, Liu Q, Wang DL, et al. Surveillance and analysis of enteroviruses in water environments in Shenzhen from 2010 to 2011[J]. Arch Virol, 2013, 158(6): 1343-1347.

[5] Dhole TN, Ayyagari A, Chowdhary R, et al. Non-polio enteroviruses in acute flaccid paralysis children of India: vital assessment before polio eradication[J]. J Paediatr Child H, 2009, 45(7/8): 409-413.

[6] Adeniji JA, Faleye TO. Isolation and identification of enteroviruses from sewage and sewage-contaminated water in Lagos, Nigeria[J]. Food Environ Virol, 2014, 6(2): 75-86.

[7] Laxmivandana R, Yergolkar P, Gopalkrishna V, et al. Characterization of the non polio enterovirus infections associated with acute flaccid paralysis in South-Western India [J]. PLoS One, 2013, 8(4): e61650. doi: 10.1371/journal.pone.0061650.

[8] Apostol LN, Suzuki A, Bautista A, et al. Detection of non-polio enteroviruses from 17 years of virological surveillance of acute flaccid paralysis in the Philippines [J]. J Med Virol, 2012, 84(4): 624-631.

[9] Khetsuriani N, Kutateladze T, Zangaladze E, et al. High degree of genetic diversity of non-polio enteroviruses identified in Georgia by environmental and clinical surveillance, 2002-2005 [J]. J Med Microbiol, 2010, 59(Pt 11): 1340-1347.

[10] Rao CD, Yergolkar P, Shankarappa KS. Antigenic diversity of enteroviruses associated with nonpolio acute flaccid paralysis, India, 2007-2009 [J]. Emerg Infect Dis, 2012, 18(11): 1833-1840.

[11] Oyero OG, Adu FD, Ayukekbong JA. Molecular characterization of diverse species enterovirus-B types from children with acute flaccid paralysis and asymptomatic children in Nigeria [J]. Virus Res, 2014, 189: 189-193.

[12] Pan Y, Shao CW, Ji M, et al. Analysis of complete VP1 nucleotide sequence of the echovirus 20 KM/EV20/2010 strain isolated from Kunming in 2010 [J]. J Patho Biol, 2014, 9(2): 97-100, 134. (in Chinese)
潘玥, 邵聪文, 吉玛, 等. ECHO20 病毒株 KM/EV20/2010 的分离鉴定及其 VP1 基因序列特征分析 [J]. 中国病原生物学杂志, 2014, 9(2): 97-100, 134.

[13] Abbasian F, Saberbaghi T, Moosapour A. Role of non-polioviruses in acute flaccid paralysis (AFP) [J]. J Gastroenterol Hepatol Res, 2012, 1(4): 44-48.

[14] Verboon-Macielek MA, Krediet TG, van Loon AM, et al. Epidemiological survey of neonatal non-polio enterovirus infection in the Netherlands [J]. J Med Virol, 2002, 66(2): 241-245.

[15] Chambon M, Delage C, Bailly JL, et al. Fatal hepatic necrosis in a neonate with echovirus 20 infection: use of the polymerase chain reaction to detect enterovirus in liver tissue [J]. Clin Infect Dis, 1997, 24(3): 523-524.

[16] Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, et al. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification [J]. J Virol, 1999, 73(3): 1941-1948.

(收稿日期: 2014-12-17)

(本文编辑: 张林东)