

# 广东省江门地区登革病毒分离株的鉴定及结构蛋白序列分析

任瑞文 方美玉 洪文燕 黄宝明 蒋廉华 刘建伟 田小东 程刚锋

**【摘要】** 目的 对广东省江门地区 2001 年夏、秋季一批发热、出疹患者进行确诊,并从分子水平分析流行株的可能来源。方法 分别采用免疫荧光、细胞毒力、乳鼠毒力实验以及逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术进行病毒鉴定,并对其结构蛋白基因序列进行克隆、测序及同源性搜索。结果 37 份患者血清登革病毒(DV)IgM 抗体阳性率为 97%(36/37),IgG 抗体阳性率为 59%(22/37),最高抗体滴度均可达 1:640。所得病毒可致 C6/36 细胞病变,具有乳鼠神经毒力,其结构基因序列长度为 2 325 bp,编码 774 个氨基酸;与其他登革 2 型病毒株 TSV01、GD06/93、NGC、44、ThNH、04、GD08/98 及 S1 进行比较,其核酸序列同源性(%)分别为 98、96、94、94、92、92、92、91。结论 2001 年江门地区登革热流行由登革 2 型病毒感染所致,推测其可能是输入性传染。

**【关键词】** 登革病毒;病毒分离;序列分析

**Isolation, identification and sequence analyses of dengue virus type 2 strain GD19/2001** REN Rui-wen\*, FANG Mei-yu, HONG Wen-yan, HUANG Bao-ming, JIANG Lian-hua, LIU Jian-wei, TIAN Xiao-dong, CHENG Gang-feng. \*The Military Medical Institute of Guangzhou Military District, Guangzhou 510507, China

**【Abstract】 Objective** To identify the virus isolated from Jiangmen, Guangdong province and to discuss the possible origin. **Methods** Using characteristics of indirect fluorescent antibody tests (IFA), reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), mouse neurovirulence and cell culture to identify the isolated virus. According to the nature of dengue virus type 2 NGC strain, two pairs of primers were designed. The structural protein gene of isolated dengue virus type 2 strain was then amplified by RT-PCR, cloned into pMD18-T vector and sequenced. **Results** Twenty-two of 37 serum samples showed a positive reaction to dengue antibody IgG, and 36 of 37 with IgM with the highest antibody titer 1:640. Ten samples were resulted in a cytopathy on C6/36 cells and showed a neurovirulence in suckling mice when inoculated intracerebrally. The structural gene of new isolate GD19/2001 containing 2 325 nucleotides which encoded 774 amino acids. Data on nucleotide homology were 98%, 96%, 94%, 94%, 92%, 92%, 92% and 91% compared with TSV01, GD06/93, NGC and 44, ThNH81/93, 04 and GD08/98, and S1 respectively. **Conclusion** The isolated virus from Jiangmen, Guangdong province belonged to dengue virus type 2, which might come from Australia.

**【Key words】** Dengue virus; Virus isolation; Sequence analysis

2001 年 8~11 月,广东省江门地区发生一批发热、头痛、肌痛、关节痛及皮疹伴瘀斑症状的患者,为确定其致病病原,探讨其可能的传染来源,对该病进行了病原学及血清学调查研究以及进一步的分子生物学研究。调查结果报道如下。

## 材料与方 法

### 1. 材料 登革病毒(dengue virus, DV)1~4 型参

基金项目:全军医学科研“十五”计划重大课题资助项目(01Z014)

作者单位:510507 广州军区联勤部军事医学研究所微生物研究室(任瑞文、方美玉、洪文燕、蒋廉华、刘建伟、田小东、程刚锋);广东省江门市卫生防疫站(黄宝明)

考株由日本 Akira Igarashi 教授惠赠,实验用乳鼠购自广州军区军事医学研究所实验动物中心,蚊 C6/36 细胞由本所微生物室传代保存。实验中所用的反转录酶、Taq 酶、pMD18 T 载体均购自大连 TaKaRa 生物公司。

2. 病毒分离:2001 年 8~10 月,于广东省江门市和新会市登革热流行现场收集患者血清标本共 37 份,取广东简写(GD)及分离年份(2001),依次编号为 GD01/2001~GD37/2001。经 4℃ 低速离心取其上清,采用 C6/36 细胞微量法分离病毒<sup>[1]</sup>。

3. 免疫荧光试验:常规法制备抗原片,进行间接免疫荧光染色。以被检血清 1:20 稀释,荧光“++”以上判定为阳性。

4. 乳鼠毒力试验 :将接种病毒(阳性标本)后处于病变<sup>+</sup>期的 C6/36 细胞冻融 2 次经 4℃ 5 000 r/min 离心 10 min 取上清约 0.02 ml 进行乳鼠脑部注射。

5. 型别鉴定 :从细胞病变(CPE)阳性标本中随机取 3 份,提取病毒 RNA,分别用本微生物室设计的通用引物及内引物<sup>[2]</sup>进行逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR),鉴定本次病毒感染的型别。

6. 结构基因的扩增 :经鉴定为登革 2 型病毒后,用 Primer 软件,参照登革 2 型病毒新几内亚(NGC)标准株设计两对引物(表 1),选取所分离的具有乳鼠毒力的 19 号标本(GD19/2001)进行扩增,分别扩增其 E 基因及 CM 基因,用改良的碘化钠法提取病毒 RNA<sup>[2]</sup>,采用常规方法进行反转录获得其 cDNA。取 cDNA 10 μl,10×PCR 缓冲液 5 μl,正向引物、反向引物各 2 μl,dNTP 4 μl,Taq DNA 聚合酶 2 U,补充水至总体积 50 μl 进行 PCR 扩增。反应参数为:95℃ 5 min,然后 94℃ 60 s,55℃ 60 s,72℃ 90 s,共 35 次循环,最后一次循环后 72℃ 延伸 10 min。

表1 DV-2 型 RT-PCR 引物序列及位置

基因型	引物	引物位置 (bp)	引物序列 (5'~3')	扩增片段长度(bp)
E 基因	P1	926~943	GGGGTACCCTTCAA TGACAATGCGTT	1 605
	P2	2 512~2 531	GCTCTAGAGCTGGT TGGAACCTATATTG	
CM 基因	P1	30~48	CAGATTCTTTGAGG GAGC	963
	P2	977~993	GCTTCCTCCTGAAA CCC	

7. DNA 片段的克隆测序 :扩增片段经 PCR Fragment Recovery Kit 试剂盒回收后,直接与 pMD18 T 载体连接,转化 JM109 宿主菌,涂布含氨苄青霉素、IPTG 和 X-gal 的 LB 平板,37℃ 培养过夜,挑取白色菌落经 PCR 和酶切鉴定后,送往 TaKaRa 公司测序。

8. 序列同源性分析 :利用 NCBI BLASTn 对 GeneBank 基因数据库进行同源性检索。并利用 ClustalX 和 TreeView 软件绘制其与国际参考株泰国株 ThNH81/93<sup>[3]</sup>、16681<sup>[4]</sup>、NGC<sup>[5]</sup>、澳大利亚株 (TVS01)<sup>[6]</sup>、1985 年海南省流行株 04 株、1989 年海南省流行株 44 株<sup>[7]</sup>及广东分离株 GD06/93、GD08/98 的系统进化树。

9. 编码蛋白结构分析 :利用 DNASIS 2.5 软件预测其编码的氨基酸序列,并利用 ANTHEPROT 4.3 软件对其编码蛋白特性进行分析。

## 结 果

1. DV 抗体检测 :应用 DV1~4 型混合抗原片,经免疫荧光法检测全部 37 份标本,IgM 抗体阳性率为 97%(36/37),IgG 抗体阳性率为 59%(22/37),阳性样本的最高抗体滴度均可达 1:640。

2. 病毒分离 :37 份血清标本分别接种 C6/36 细胞,盲传至第 3 代后,其中 10 份标本出现细胞肿胀、融合、破裂等 CPE 现象,CPE 阳性率达 27%(10/37),10 份标本 IgM 染色均为阳性。取其中 2 份阳性标本接种 2 日龄乳鼠,持续传代后,乳鼠出现较为典型的感染症状,表现为接种后 3~4 天拒奶、双下肢麻痹、抽搐、侧卧、死亡,传至第 5 代后乳鼠规律发病。

3. 型别鉴定 :DV 通用引物及内引物 RT-PCR 扩增,分别获得 413 bp 及 189 bp 的片段,与预期结果相符,证明本次感染为登革 2 型病毒。

4. 结构蛋白基因序列测定结果 :GD19/2001 病毒结构基因在其全序列中的位置为 97~2 422 bp,我们所设计的 DV2 型结构蛋白基因引物扩增的序列完全覆盖了这一区域。测序结果表明此 DV 株结构蛋白基因序列长度为 2 325 bp,编码 774 个氨基酸。

5. 同源性检索结果 :GD19/2001 与 TSV01 株核苷酸同源性最高,达 98%。其次为与 GD06/93、NGC、44、ThNH81/93、04、GD08/98 及 S1 进行的比较,其核酸序列同源性(%)分别为 96、94、94、92、92、92、91;其相应的氨基酸序列同源性(%)分别为 98、97、97、97、96、96、95、96。用 ClustalX 软件采用 N-J 法构建其系统进化树(图 1)。

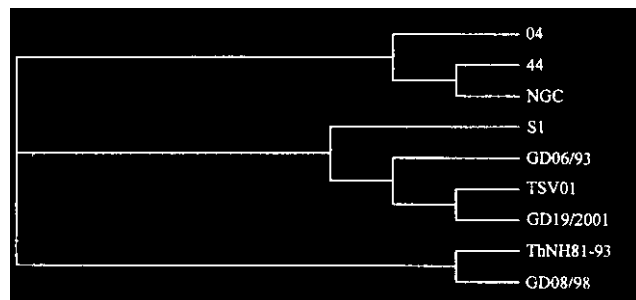


图1 DV 分离株 GD19/2001 的系统进化树

6. GD19/2001 结构基因编码蛋白的结构分析 :ANTHEPROT 4.3 分析结果显示,其编码蛋白分子量为 86、186.916 Da,其中包含三个糖基化位点:283~186(NSTS),347~350(NTTT),433~436(NDTG),它潜在的信号肽断裂位点可能存在其第 278 个氨基酸处。

## 讨 论

登革热是我国南方常见的一种虫媒病毒病,特别是近几年来连续在我国南方部分省区呈爆发性流行,对人民的身体健康及经济建设造成了很大影响,而对于我国究竟是否存在 DV 的自然疫源地目前仍无明确的结论。因此,对不同地区流行株的分离、鉴定,进而比较不同地区、不同时间 DV 流行株的遗传差异,对于了解新毒株的表性特征、追踪其地域来源以及认识登革病毒的进化过程、变化趋势具有重要的意义。比较本次分离的毒株与我们分别于 1993 年在佛山及 1998 年在南海分离到的毒株的结构基因序列发现,它们的相似性分别为 96% 及 92%,其相似性反而低于与澳大利亚分离株 TSV01 的同源性(98%),这与以前我们对广东地区不同流行株 NS1 非结构蛋白的分析结果相似<sup>[8]</sup>。据此推断此次江门地区登革热的流行可能是输入性传染。

## 参 考 文 献

- 1 方美玉,陈火胜,陈翠华,等. 逆转录-多聚酶链反应扩增黄病毒核酸的研究. 中华传染病杂志,1994,12:145.
- 2 方美玉,陈翠华,陈火胜,等. 黄病毒逆转录-聚合酶链反应检测技术的建立和应用. 中华实验和临床病毒学杂志,1997,11:267-270.
- 3 Pandey BD, Jgarashi A. Severity-related molecular differences among nineteen strains of dengue type 2 viruses. Microbiol Immunol, 2000, 44:179-188.
- 4 Block J, Gibbs AJ, Mewilliam SM, et al. NS1 gene sequences from eight dengue 2 viruses and their evolutionary relationships with other dengue 2 virus. Arch Virol, 1991, 118:209-223.
- 5 Irie K, Mohan PM, Sasaguri Y. Sequence analysis of cloned dengue virus type 2 genome (New Guinea-C strain). Gene, 1989, 75:197-211.
- 6 Johansson M, Brooks AJ, Jans DA, et al. Relationship of a dengue 2 isolate from Townsville, 1993, to international isolates. Commun. Dis Intell, 1995, 19:522-523.
- 7 赵卫,胡志军,杨敬,等. 我国 3 株登革 2 型病毒 E 基因序列测定及毒力基因位点分析. 中国人兽共患病杂志,2001,17:9-12.
- 8 方美玉,赵文忠,蒋廉华,等. 广东省登革病毒的分子流行病学研究. 中华微生物和免疫学杂志,2001,21:326-329.

(收稿日期 2002-05-10)

(本文编辑:尹廉)

## · 小辞典 ·

### 地理信息系统

杨晓红

地理信息系统(geographic information systems, GIS)是用于采集、存储、处理、分析和显示地理空间数据的计算机系统。

1. GIS 的特点 20 世纪 60 年代,加拿大的 Roger 和美国的 Duane 从不同角度提出了 GIS。1972 年第一个具有实用价值的 GIS——加拿大 GIS 投入运行和使用。GIS 技术的基础是两个成熟的软件技术:数据库管理系统(DBMS)和计算机辅助设计(CAD),并附加上对空间数据的管理和分析功能。它是将计算机化的制图系统和数据库管理系统联结起来的系统。GIS 的各种工具可以进行统计、画出缓冲区、将不同的地理对象进行拓扑叠压、从不同的地理对象中划分空间特征及根据具体的性质选择特征。与传统的主要用于数据储存、处理和检索的数据库管理系统相比, GIS 是一个空间型的信息系统,具有对空间数据的处理能力,并能将空间数据与属性数据相联结,与用于显示的计算机辅助制图(CAM)相比,它不仅具有一般的图型形式显示空间数据的能力,而且具有对图型的分析能力。

2. GIS 的组成 GIS 以计算机系统为基础,由计算机硬件、软件、数据和用户四大要素组成。计算机硬件系统包括执行程序的中央处理器(CPU)、保存数据和程序的存储设备、数据输入、显示和输出的外围设备(如显示器、打印机等)。软件是支持数据信息的采集、管理、再现和回答用户问题的计算机程

序系统。数据是系统分析和处理的对象,也是构成系统应用的基础。用户则包括系统的开发、管理和使用人员。

3. GIS 的数据 GIS 中的数据可分为空间数据和属性数据。空间数据又称地图数据、图形数据、空间信息,描述的是地理空间实体的位置、大小、形状、方向等几何特征,以及与相邻物体的拓扑关系,由点、线、面组成,如地图、工程图、规划图、航空与遥感影像等。属性数据也称属性信息,是定义空间数据或特征所表示的内容,描述该空间现象的其他特征,如地形地貌、温湿度、降雨量、土地利用、居住人口、动植物种类及其密度等。所有数据必须转换成数字化形式。

4. GIS 的功能:作为自动信息处理和分析系统, GIS 具有以下几大功能:①数据采集:主要用于获取数据,包括现成的数字化数据、人工编码、数字化地图等,并保证数据在内容上、空间上的完整性和一致性;②数据整理:包括数据核查、纠错、格式化和转换等;③数据存储:将不同来源、不同属性的数据以恰当的形式存储于数据库中,以方便查询和分析;④数据查询:以特定的请求来再现数据信息;⑤空间分析:进行数据的地理操作和转换及统计分析,如缓冲区分析、空间插值分析、叠置分析、领域分析、网络分析等;⑥结果展示:通过屏幕、打印、拷贝等形式来展示 GIS 所产生地图、图像、表格等多种形式的结果。因此,通过 GIS 能获得以下信息:对象定位、特定条件、变化趋势、空间模式及模拟结果。

(收稿日期 2002-09-29)

(本文编辑:张林东)