

· 实验室研究 ·

霍乱毒素 B 亚单位与志贺毒素 2B 亚单位融合表达及抗原性检测

李振军 孙强正 景怀琦 徐建国

【摘要】 目的 克隆表达出血性大肠埃希菌(EHEC)O157:H7 志贺毒素 2B 亚单位(Stx2B)与霍乱毒素 B 亚单位(CTB)的融合蛋白(CTB-Stx2B),并检测其抗原性和与神经节苷脂(GM1)结合能力。**方法** 设计引物扩增融合蛋白 CTB-Stx2B 的编码基因 *ctb-stx2b*, T-A 克隆测序验证后克隆入原核表达质粒 pET30a(+)C, 构建表达质粒 pET30a(+)-*ctb-stx2b*, 转化 *E. coli* BL21(DE3), IPTG 诱导表达、纯化, 获得目的蛋白 CTB-Stx2B, SDS-PAGE 和 Western-blot 检测其抗原性和形成五聚体的能力; GM1-ELISA 法检测其与 GM1 结合能力。**结果** 扩增出约 750 bp 的目的片段, 测序鉴定与设计序列一致; 原核表达质粒 pET30a(+)-*ctb-stx2b* 转化 *E. coli* BL21(DE3) 后, 经酶切和 PCR 扩增鉴定正确; IPTG 诱导后 SDS-PAGE 初步测定 CTB-Stx2B 单体的相对分子质量 (M_r) 约为 20×10^3 ; Western-blot 检测 CTB-Stx2B 能与 CTB 单克隆抗体结合, 纯化产物经复性后大多以五聚体形式存在; ELISA 检测 CTB-Stx2B 具有结合 GM1 活性。**结论** 成功克隆、表达了融合蛋白 CTB-Stx2B; 表达的蛋白具有良好的 CTB 抗原性和 GM1 结合能力。

【关键词】 肠出血性大肠埃希菌 O157:H7; 志贺毒素 2B 亚单位; 霍乱毒素 B 亚单位; 抗原性

Clone and express *ctb-stx2b* fusion gene in *Enterohemorrhagic escherichia coli* O157:H7 Shiga toxin 2B subunit and V cholera toxin B subunit and the detection of their immunogenicity LI Zhen-jun, SUN Qiang-zheng, JING Huai-qi, XU Jian-guo. *State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China*

Corresponding author: XU Jian-guo, Email: xujianguo@icdc.cn

【Abstract】 Objective To clone and express the fusion gene encoding *Enterohemorrhagic escherichia coli* O157:H7 (EHEC O157:H7) Shiga toxin 2B subunit (Stx2B) and vibrio cholera toxin B subunit (CTB) as well as to detect the immunogenicity and GM1-binding ability of fusion protein. **Methods** To design a primer to amplify *stx2b* gene and *ctb-stx2b* fusion gene encoding Stx2B and CTB-Stx2B respectively and to clone the genes into express plasmid pET30a(+)C in order to construct pET30a-*ctb-stx2b* after T-A sequencing was varified, then to transform constructed plasmid into *E. coli* BL21 (DE3) induced by IPTG and purified by a purify kit and to detect molecular weight and immunogenicity by SDS-PAGE and Western-blot. **Results** The amplified *ctb-stx2b* fragments appeared to be 750 bp and gene sequence was identical to designed sequence. The prokaryotic expression system pET30a-*ctb-stx2b*/BL21 could express protein weight about $M_r 20 \times 10^3$ and the expressed protein could react to CTB monoclonal anti-body. The fusion protein CTB-Stx2B could bind GM1. **Conclusion** CTB-Stx2B had successfully been expressed in prokaryotic while the expressed protein had good immunogenicity and GM1-Binding ability. This study provided information on further EHEC O157:H7 vaccine research.

【Key words】 *Enterohemorrhagic escherichia coli* O157:H7; Shiga toxin 2B subunit; Cholera toxin B subunit; Immunogenicity

出血性大肠埃希菌(EHEC)O157:H7 是引起人出血性结肠炎的主要病原菌,可引发溶血性尿毒综合征(HUS)及血栓性血小板减少紫癜(TTP)等严重并发症^[1,2];而多数 EHEC O157:H7 产生志贺毒

素 2(Stx2)^[3]。研究表明,克隆表达的 Stx2B 亚单位无毒,具有良好的免疫保护性,可作为疫苗的免疫抗原。霍乱毒素(CT)是引起腹泻的主要作用物质,其 B 亚单位(CTB)没有毒性,是霍乱弧菌主要的保护性抗原,能刺激血液和肠道产生特异性保护抗体;另外 CTB 是有效的免疫载体和免疫佐剂,可介导携带的靶抗原进入与肠黏膜有关的免疫途径及增强与

作者单位: 102206 北京, 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所传染病预防控制国家重点实验室

通讯作者: 徐建国, Email: xujianguo@icdc.cn

其融合的抗原分子的抗原反应性^[4,5]。本文利用原核表达系统克隆、表达 EHEC O157:H7 的 Stx2B 和 CTB 融合蛋白 CTB-Stx2B, 并对其抗原性和与神经节苷脂 (GM1) 结合能力进行了初步研究, 为研制 EHEC O157:H7 和霍乱联合疫苗提供参考依据。

材料与方 法

1. 菌株及质粒: EHEC O157:H7、霍乱弧菌 O139、受体菌 *E. coli* DH5 α 及 *E. coli* BL21(DE3) 为本研究室保存; 质粒 pET30a(+)C 由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所基因室惠赠; 克隆载体 pMD18 T 购自大连 TaKaRa 公司。

2. 试剂: 限制性内切酶 Hind III、EcoR I、TaqDNA 聚合酶购自华美公司; T₄DNA 连接酶由美国 Promeg 公司提供; 质粒抽提试剂盒、DNA 回收纯化试剂盒为上海生工生物工程技术有限公司产品; 兔抗-CTB、蛋白纯化试剂盒 (His. Bind protein purification Kit) 购自美国 Novagen 公司; HRP 标记的羊抗兔为北京华美公司产品; 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成; 其他化学试剂均为分析纯。

3. 目的基因 *ctb-stx2b* 的扩增: 根据 GenBank 公布的 EHEC O157:H7 的 *stx2b* 基因核苷酸序列 (accession number: NC 000902) 和霍乱弧菌 O139 *ctb* 基因核苷酸序列 (accession: X76390) 设计引物 (表 1), 以 EHEC O157:H7 和霍乱弧菌 O139 染色体为模板, 分别扩增 *ctb* (引物对 1、2) 和 *stx2b* (引物对 3、4)。扩增产物经纯化后, 以 Kpn I 酶切, T₄ 连接酶连接, 取 1 μ l 连接产物为模板, 以引物对 1、4 扩增 *ctb-stx2b* 融合片段。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 7 min, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 31 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

表 1 目的基因扩增所用引物

基因	引物序列 (5'~3')	酶切位点	扩增长度 (bp)
<i>ctb</i>	1:GGCGAATTCACACCTCAAATATTACTG	EcoR I	326
	2:GCGGTACCATGTGCCATACTAAATGCG	Kpn I	
<i>stx2b</i>	3:GCGGTACCAAGAAGATGTTTATGGCG	Kpn I	460
	4:GCAAGCTTAACCCGTGTCGATAATGAATC	Hind III	
<i>ctb-stx2b</i>	1:GGCGAATTCACACCTCAAATATTACTG	EcoR I	778
	4:GCAAGCTTAACCCGTGTCGATAATGAATC	Hind III	

4. 重组表达质粒的构建、转化与鉴定: PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳回收并纯化, 克隆入

pMD 18T 载体, 转化感受态受体菌 *E. coli* DH5 α 中, 在含有氨苄 (100 μ g/ml) 及 XGal/IPTG 的 LB 琼脂平板上 37 $^{\circ}$ C 过夜培养, 挑取白色菌落送上海生工生物工程技术有限公司测序。从测序正确的克隆子提取质粒, 以 Hind III 和 EcoR I 双酶切, 酶切产物经琼脂糖凝胶电泳, 回收目的片段并纯化, 与同样酶切的表达质粒 pET30a(+)C 连接, 连接产物转化感受态细胞 BL21(DE3), 在含有 50 μ g/ml 卡那霉素的平板上筛选阳性克隆子, 提取质粒进行 PCR 扩增鉴定和 Hind III 和 EcoR I 双酶切鉴定。

5. 目的蛋白的诱导表达及检测: 将重组菌和 pET30a(+)C/BL21 接种于含有卡那霉素的 LB 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养至吸光度值 (A) 约为 0.6 时加入诱导剂 IPTG (1 mmol/L), 继续培养 4 h, 取 100 μ l 菌液 4000 r/min 离心收集菌体, 进行全菌 15% 胶 SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色初步测定目标蛋白的表达率和相对分子质量 (M_r)。

6. 表达蛋白的纯化和复性: 基因工程菌的培养和诱导同上文。收集 100 ml 诱导后重组菌菌体, 在冰浴中超声波破碎细胞, 12 000 r/min 离心, 分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE。表达蛋白纯化按试剂盒操作说明进行。沉淀用含 2 mol/L 尿素的 PBS (137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 4.3 mmol/L Na₂HPO₄·7H₂O, 1.4 mmol/L KH₂PO₄) 及 PBS 洗涤 2 次, 离心收集沉淀。洗涤后的包涵体溶解在裂解缓冲液 (8 mol/L 尿素, 0.1 mol/L NaH₂PO₄, 0.01 mol/L Tris, pH 值 8.0), 离心, 取上清过柱, 洗涤缓冲液清洗, 最后以含不同浓度咪唑 (10~100 mmol/L) 的洗脱缓冲液洗脱融合蛋白。洗脱的融合蛋白用超滤离心管浓缩、去除尿素、复性, 最后溶解在 PBS (pH 值 7.4) 溶液中, 进行蛋白定量。

7. 融合蛋白的 CTB 抗原性检测: 将上述诱导和未诱导的菌体样品进行 SDS-PAGE, 采用半干式转移仪进行转印, 针对 CTB 蛋白, 以兔源抗 CTB 单克隆抗体为一抗, 以辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 为第二抗体, 以 4-氯-1 萘酚 (4-CN) 作为显色反应底物, 进行蛋白质印迹检测。

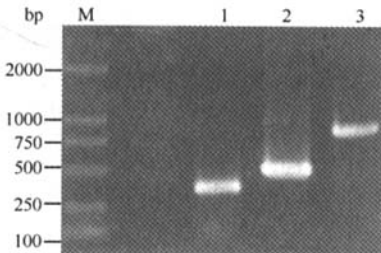
8. 融合蛋白形成五聚体及与 GM1 结合能力检测: 复性的融合蛋白与 1/5 的 5 \times SDS 上样缓冲液混合, 加热 5 min 后或不加热直接上样, 用 15% SDS-PAGE 电泳进行分析; 另外, 蛋白电泳后, 采用半干式转移进行转印, 以兔源抗 CT 抗体为第一抗体, 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 为第二抗体, 进行

蛋白质印迹检测。

利用 GM1-ELISA 方法测定加热和不加热的融合蛋白与 GM1 的结合能力。用每孔 100 μl 含 GM1 2 μg 的碳酸盐缓冲液 (35 mmol/L NaHCO₃, 15 mmol/L Na₂CO₃) 包被 96 孔酶联板, 4℃ 过夜, PBST(含 0.1% Tween-20 的 PBS 溶液) 洗涤 3 次, 用 10% 胎牛血清 37℃ 封闭 2 h, 每孔加入含 20 ng 纯化的融合蛋白, 37℃ 保温 2 h。PBST 洗涤后, 加兔源抗 CTB 抗体, 37℃ 保温 2 h。PBST 洗涤 3 次后, 加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG, 37℃ 保温 1 h; 洗涤后加入 100 μl 底物 (400 mg/L 邻苯二胺, 0.2% H₂O₂ 和 0.1 mol/L 磷酸-柠檬酸缓冲液, pH 值 5.0), 用等体积 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 测紫外吸光度值(A₄₉₀), 以 PBS 为阴性对照。

结 果

1. 目的基因扩增、克隆和重组表达质粒的构建: *ctb*、*stx2b* 基因片段经 PCR 扩增和 1% 琼脂糖电泳检测, 所得产物片段分别为 308 bp 和 443 bp, 符合预期片段长度。将扩增产物 *ctb* 和 *stx2b* 酶切后连接, 以连接产物为模板扩增 *ctb-stx2b* 片段, 经琼脂糖电泳检测, 所得产物片段约为 750 bp, 符合预期片段长度(图 1)。目的基因经 T-A 克隆测序, 融合基因 *ctb-stx2b* 与设计完全吻合。从测序正确的克隆子提取质粒, 酶切、回收目的基因条带, 克隆到表达载体 pET30a(+) C 中, 构建重组表达质粒 pET30a(+)-*ctb-stx2b*, 转化 BL21(DE3)。经 PCR 扩增和酶切鉴定, 在 750 bp 位置有相应的条带, 表明重组表达质粒构建成功, 获得含有重组质粒的工程菌(图 2)。

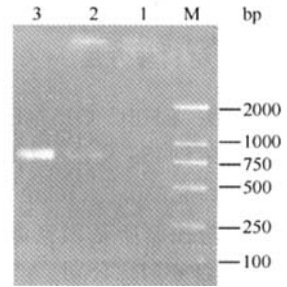


注: M: Marker DL2000; 1: *ctb*; 2: *stx2b*; 3: *ctb-stx2b*

图 1 PCR 扩增产物电泳结果

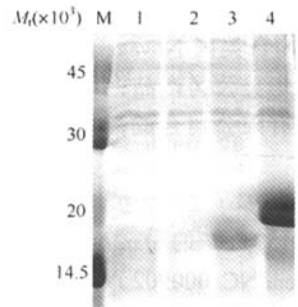
2. 基因重组菌的诱导表达及融合蛋白鉴定: 收集诱导前后的重组菌和空载体菌菌体进行 SDS-PAGE, 结果如图 3 所示。诱导后的重组菌与诱导后的空载体菌及未诱导的重组菌比较, 在 M_r 为

20 × 10³ 左右位置有明显增加的蛋白条带, 证实所构建的基因重组菌能够被诱导表达外源蛋白, 诱导表达蛋白约占细菌总蛋白的 40% ~ 60%, M_r 约为 20 × 10³ 左右, 与预期蛋白大小吻合。



注: M: Marker DL2000; 1: pET30a-*ctb-stx2b* 质粒; 2: pET30a-*ctb-stx2b* 质粒 HindIII、EcoRI 酶切产物; 3: *ctb-stx2b* 扩增产物

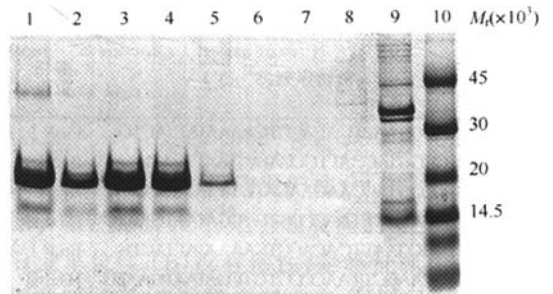
图 2 重组质粒 pET30a-*ctb-stx2b* 酶切及 PCR 扩增电泳结果



注: M: 蛋白分子 Marker; 1: pET30a/BL21 诱导后; 2: pET30a-stx2b/BL21(未诱导); 3: pET30a-*ctb*/BL21 诱导 4 h 后; 4: pET30a-*ctb-stx2b*/BL21 诱导 4 h 后

图 3 SDS-PAGE 检测融合蛋白表达

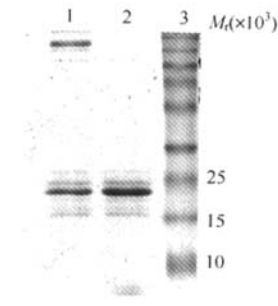
3. 表达蛋白的纯化: 收集诱导后重组菌菌体, 超声破碎进行蛋白纯化。结果显示, 在咪唑浓度为 40 ~ 100 mmol/L 时, 洗脱效率最高(图 4)。



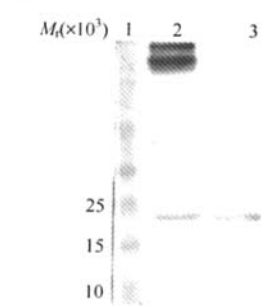
注: 1~8: 不同浓度的咪唑洗脱液洗脱效果, 咪唑浓度分别为 100、80、50、40、30、20、15、10 mmol/L; 9: 诱导前; 10: Marker

图 4 不同咪唑浓度的洗脱缓冲液洗脱效果观察(SDS-PAGE)

4. 融合蛋白五聚体形成能力检测: 纯化蛋白与蛋白上样缓冲液混合, 直接上样或沸水浴后上样, 结果融合蛋白沸水浴后, 只在 M_r 为 20×10^3 左右出现一条蛋白带; 而未煮过的融合蛋白分别在 M_r 为 20×10^3 和 100×10^3 左右出现两条蛋白带; 免疫杂交结果也出现同样的结果。结果提示, 部分表达的融合蛋白能够形成具有活性的五聚体 (M_r 为 100×10^3 左右), 经与蛋白上样缓冲液混合加热后, 五聚体间的二硫键被破坏, 五聚体解体形成单体 (M_r 20×10^3), 见图 5、6。



注: 1: 融合蛋白 (未煮过);
2: 融合蛋白 (煮过); 3: Marker
图5 加热与未加热融合
蛋白 SDS-PAGE



注: 1: Marker; 2: 融合蛋白
(未煮过); 3: 融合蛋白 (煮过)
图6 加热与未加热融合
蛋白的免疫印迹分析

5. 融合蛋白 GM1 结合活性的检测: 为检测表达的融合蛋白是否能够形成五聚体及形成的五聚体与 GM1 的结合能力, 将纯化蛋白加热煮过后, 与未煮蛋白样品一起进行 GM1-ELISA。结果发现未加热样品 A_{490} /阴性对照样品 $A_{490} \geq 2.0$, 而加热样品 A_{490} /阴性对照样品 $A_{490} < 2.0$ 。五聚体形式的 CTB 能够与 GM1 结合, 进而与抗体发生反应; 而单体形式却不能与 GM1 结合。GM1-ELISA 结果进一步证实表达的融合蛋白能够形成五聚体, 而且形成的五聚体具有活性, 能够与 GM1 结合。

讨 论

EHEC O157:H7 自 1982 年被确认为致病菌以来, 在世界各地多次引发大规模的暴发或流行。我国江苏、安徽省曾于 1999 年发生 EHEC O157:H7 感染性腹泻的大规模暴发, 死亡 170 余人^[6]。由于 EHEC O157:H7 的感染具有爆发性流行的趋势、很强的致病性与致死性以及抗生素治疗可加剧病情的危险性等特点, 疫苗研究就显得尤为重要^[7]; 但至今

尚无可用于人或易感动物的疫苗研制成功。早期疫苗研究的抗原选择集中于细菌脂多糖^[7,8], 而该菌脂多糖所诱生的抗体可类似抗生素促使 EHEC O157:H7 释放致死性志贺毒素。其他保护性抗原亚单位包括 Intimin、Stx1B 及 EHEC O157:H7 溶血素 (Hly) 也未能进入实质性的疫苗研究。在 EHEC O157:H7 的致病机理中, Stx2 因其能引起 HUS 和 TTP 等严重的并发症而成为疫苗的候选抗原, 其中只有黏附作用而没有毒性的 B 亚单位是研究的热点。Stx2B 与真核细胞上的球状三糖基神经酰胺 (Gb3) 或球状四糖基神经酰胺 (Gb4) 黏附, 介导 A 亚基进入细胞^[9], 是已知最小的具有识别并结合受体能力的亚单位在制造疫苗方面有很大的安全优势^[10], 但因其免疫原性较低, 单个亚单位抗原所产生的免疫保护作用有限, 难以有效预防病菌的感染, 因此, 通过 Stx2B 与载体或佐剂融合来提高 Stx2B 的抗原性和免疫原性, 是一种很好的思路。

CTB 不但是很好的霍乱疫苗抗原, 而且具有载体蛋白和免疫佐剂的作用, 能显著提高交联或融合蛋白的免疫原性。目前为止, 已经有很多 CTB 融合蛋白表达。刘相国等^[11] 构建 CTB 与乙肝病毒表面抗原 a 表位的融合基因, 并在原核表达系统中获得以包涵体形式的高效表达。表达产物能够像 CTB 那样形成五聚体, 以腹腔注射、灌胃、鼻饲形式免疫小鼠均能产生抗 HBsAg 抗体。米凯霞等^[12] 表达了 CTB-CS3 融合蛋白, CTB 增强 CS3 的免疫强度。

本研究在 CTB 基因的 C 端融合 Stx2B 成熟肽的编码基因, 构建了原核表达系统, 经诱导后实现了融合蛋白的高效表达 (表达目的蛋白约占总蛋白 90% 以上)。经免疫印迹检测, 表达的融合蛋白能与 CTB 单克隆抗体反应, 展示良好的抗原性; 融合蛋白具有与 GM1 结合的能力, 表明融合蛋白能以五聚体的形式存在, 五聚体形式的融合蛋白可通过 CTB 与 GM1 结合, 介导融合蛋白的摄入、传递。本文为 CTB-Stx2B 双价疫苗的研究进行了初步实验, 但融合蛋白是否具有良好 Stx2B 抗原性、是否具有 CTB 和 Stx2B 免疫反应性, 需要进一步的实验来验证。

参 考 文 献

- [1] Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N Engl J Med, 1983, 308:681-685.
- [2] Bell BP, Griffin PM, Lozano P, et al. Predictors of hemolytic uremic syndrome in children during a large outbreak of *Escherichia coli* O157 infections. Pediatrics, 1997, 100(1):E12.
- [3] Paola M, George M, Randy JR, et al. Immunoprophylactic potential of

cloned Shiga toxin 2B subunit. *J Infect Dis*, 2001, 183:435-443.

[4] Gonzalea RA, Sanchez J, Holmgren J, et al. Immunological characterization of a rotavirus neutralizing epitope fused to the cholera toxin B subunit. *Gene*, 1993, 133:227.

[5] Czerkinsky C, Russek MW, Lycke N, et al. Oral administration of a streptococcal antigen coupled to cholera toxin B subunit evokes strong antibody responses in salivary glands and extramucosal tissues. *Infect Immun*, 1989, 57(4):1072.

[6] 徐建国, 程伯颀, 冯丽萍, 等. 肠出血性大肠埃希菌 O157:H7 引起的溶血性尿毒综合征患者血清抗体调查. *中华流行病学杂志*, 2002, 23(2):114-118.

[7] Konadu EY, Donohue Rolfe A, Calderwood SB, et al. Syntheses and immunologic properties of *Escherichia coli* O157 O-specific polysaccharide and Shiga toxin 1 B subunit conjugates in mice. *Infect Immun*, 1999, 67(11):6191-6193.

[8] Konadu EY, Robbins JB, Shiloach J, et al. Preparation, characterization, and immunological properties in mice of *Escherichia coli* O157 O-specific polysaccharide protein conjugate vaccines. *Infect Immun*, 1994, 62(11):5048-5054.

[9] 周志江. 肠出血性大肠杆菌 O157. 北京: 军事医学科学出版社, 2002:50-51.

[10] 徐建国. 分子医学细菌学. 北京: 科学出版社, 2000:108-109.

[11] 刘相国, 杨恭, 邱并生, 等. 乙肝表面抗原 a 表位黏膜疫苗的构建及免疫原性检测. *微生物学报*, 2001, 41:625-629.

[12] 米凯霞, 张兆山, 方荣祥, 等. CTB/CS3 融合蛋白与 GM1 结合能力和免疫原性的分析. *生物化学与生物物理进展*, 2003, 30:278-284.

(收稿日期:2007-10-11)
(本文编辑:尹廉)

· 疾病控制 ·

福建省诺如病毒腹泻暴发的流行病学研究

吴冰珊 谢剑锋 沈晓娜 王美爱 靳森 段招军

对福建省三个地区出现的四起疑似诺如病毒腹泻暴发事件进行了流行病学调查,并对分离病毒进行核苷酸序列对比与分析。

1. 材料与与方法:从具有典型临床症状的腹泻患者中采集 53 份粪便标本。采用 ELISA 检测轮状病毒、诺如病毒、星状病毒和腺病毒抗原。粪便标本提取病毒核酸,取部分 RNA 进行反转录,扩增人类杯状病毒(HuCV)基因。PCR 产物胶回收纯化后,分别克隆至 pGEM-T Easy 载体,转化至 DH5α 宿主菌,通过蓝白斑筛选和酶切鉴定,阳性克隆送 TaKaRa 公司测序。全部核苷酸及氨基酸序列分析和同源性比较利用 ClustalX 和 DNASTar 软件完成;诺如病毒参考序列来自 GenBank。

2. 结果:ELISA 检测,从 53 份粪便标本检出轮状病毒 1 份,诺如病毒 22 份,总阳性率为 41.5%,未检出星状病毒和腺病毒。采用 HuCV 引物 H289/290 对 53 份粪便标本进行 RT-PCR 检测, HuCV 阳性标本共 30 份,总阳性率为 56.6%。选择 10 株 HuCV 阳性标本进行 PCR 产物的克隆和测序。对去除引物后的 DNA 片段(274 bp)进行序列分析(图 1)。10 株 HuCV 均为诺如病毒 GII-4 型,彼此同源性为 96.9%~100%,产物序列核苷酸距离接近。

3. 讨论:结果表明诺如病毒是引起福建省病毒性腹泻暴发的主要病原体。四起暴发在流行病学上有其共同特点:①每起疫情病例呈人群聚集性,水源共用,生活密切接触;②首发病例为腹胀、恶心、腹泻水样便、呕吐等症状;③未出现重症患者;④病例发生冬末春初季节。这与 Anthony 等^[1]的研究一致。但这四起暴发的病例年龄分布存在差异;两起暴发病例以老年人为主,另两起以青壮年为主。本研究检测这四

起病毒性腹泻的病原基因比对于属于“GII-4”基因型诺如病毒,虽然在地区来源有一定的跨度,但核苷酸序列同源性差异不大(96.9%~100%)。与 GenBank 中的日本 Nijmegen、Kobe 和荷兰 Den Haag 病毒参考株同源性最接近(98.5%);表明与全球 2006 年末、2007 年初引发的诺如病毒属于同一基因型,基因进化地域来源相近;也与我国 GII-4 优势株流行相同^[2]。

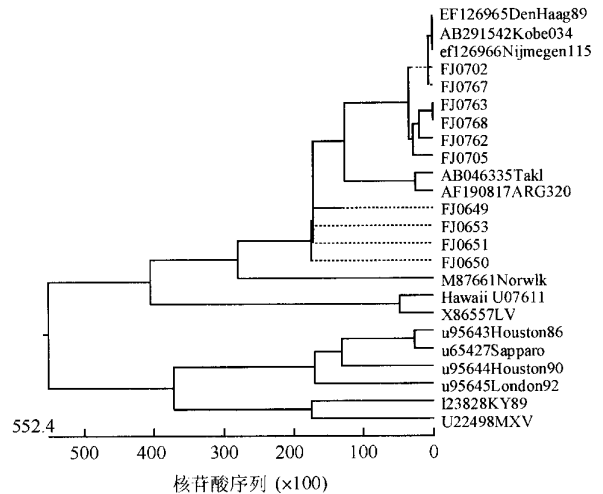


图1 福建省分离的 10 株 HuCV 与 14 株 HuCV 参考株 RDRP 基因区核苷酸序列种系进化树

参 考 文 献

[1] Anthony W, Mounts, Tamie Ando, et al. Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses. *J Infect Dis*, 2000, 181 Suppl:S284-287.

[2] 谢华萍, 方肇寅, 王光, 等. 长春市儿童医院 1998-2001 年婴幼儿杯状病毒腹泻流行病学研究. *病毒学报*, 2002, 18:322-328.

(收稿日期:2007-10-18)
(本文编辑:尹廉)

作者单位:350001 福州,福建省疾病预防控制中心病毒科(吴冰珊、谢剑锋、沈晓娜、王美爱);中国疾病预防控制中心病毒预防控制所腹泻室(靳森、段招军)