

深圳市一起肠道病毒 71 型引发手足口病流行的基因型别分析

何雅青 杨洪 李琳琳 谭洁 周丽 毛丽莎 阳帆 刘建军 吕星

【摘要】 目的 对 2004 年深圳市一起肠道病毒 71 型(EV71)引发手足口病流行的基因型别分析。方法 用 EV71 型特异性引物进行 RT-PCR, 并对 EV71 的 VP1 和 VP4 基因进行克隆, 所得的序列与 EV71 型 A、B、C 基因型代表株的核苷酸序列用 TreeView 和 PHYLIP 软件(3.6b)进行系统进化分析。结果 4 株病毒与 C 基因型代表株比较接近, VP1 区核苷酸同源性在 87.8%~92.0% 之间, VP4 区核苷酸同源性在 85.9%~87.4% 之间; 与 A、B 基因型代表株比较差异较大, VP1 区核苷酸同源性为 81.9%~84.2%, VP4 区为 80.6%~85.0%; 4 株病毒 VP1 核苷酸同源性为 94.1%~99.8%, VP4 同源性为 100%, 组成一个独立的小分支。结论 对 EV71 的 VP1 和 VP4 区进行基因进化分析, 可得出类似的结果, 4 株 EV71 深圳流行株可命名为 C4 亚型。

【关键词】 肠道病毒 71 型; 手足口病; 基因型分析

Genotype analysis of enterovirus type 71 detected from patients with hand-foot-mouth disease in Shenzhen
HE Ya-qing, YANG Hong, LI Lin-lin, TAN Jie, ZHOU Li, MAO Li-sha, YANG Fan, LIU Jian-jun, LV Xing. Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518020, China

【Abstract】 **Objective** To carry out genotype analysis of enterovirus type 71, detected from hand-foot-mouth disease patients in Shenzhen in 2004. **Methods** All samples were tested by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) using EV71 specific primer. The VP1 and VP4 of EV71 were cloned and sequenced. A phylogenetic tree was constructed by comparing the sequences with genogroups A, B and C genotypes using TreeView and PHYLIP software(3.6b). **Results** The VP1 nucleotide sequence of 4 strains isolated from Shenzhen shared 87.8%-92.0% identity with genogroup C, while the homogeneity of the VP4 nucleotide sequence was between 85.9%-87.4%. The homogeneity of the VP1 nucleotide sequence with genotypes A and B was between 81.9%-84.2% and was 80.6%-85.0% with VP4. Among the 4 strains, the homogeneity of the VP1 nucleotide sequence was between 94.1%-99.8% and was 100% with VP4 which formed a small group and could denominate EV71 genotype C4. **Conclusion** Similar results were obtained from phylogenetic analysis of EV71 based on VP1 and VP4 nucleotide sequence. The four EV71 strains causing epidemic in Shenzhen could be named as C4 subgroups.

【Key words】 Enterovirus type 71; Hand-foot-mouth disease; Genotype analysis

肠道病毒 71 型(EV71)是引起手足口病的重要病原。手足口病一年四季均可发病, 夏秋季易于流行, 托幼机构是主要发病场所。本研究对 2004 年 5-6 月深圳市某幼儿园发生一起 EV71 引起手足口病暴发的病原进行检测, 并对其中 4 株病毒进行核苷酸序列测定和比较分析。

材料与方法

1. 对象与标本: 2004 年 5-6 月深圳市某幼儿园

作者单位: 518020 深圳市疾病预防控制中心(何雅青、杨洪、谭洁、周丽、毛丽莎、阳帆、刘建军、吕星), 病毒基因工程国家重点实验室(李琳琳)

发生一起手足口病的暴发, 症状以手掌、口腔黏膜、足底、臀部出现疱疹为主, 无中枢神经系统合并症, 发病年龄为 3~6 岁, 共有 24 例发病, 发病率为 3.5% (24/690)。于 6 月 13-25 日采集该幼儿园手足口病患儿童粪便标本 13 份, 每份标本约 10 g, 检测后置于 -80℃ 保存。

2. 标准毒株: EV71 的标准毒株采用 EV71-SHZH98, 其全基因组已提交国际核酸与蛋白数据库(GenBank, 接收号码为 AF302996)。

3. RNA 提取: 用 Roche High Pure viral RNA Kit 试剂盒提取, 取绿豆粒大小的粪便标本, 加 TE 500 μl 制成 10%~20% 的悬液, 8000 r/min 离心 5 min; 取 200 μl 标本上清加 400 μl 结合液, 混合均

匀,加入纯化过滤管中,10 000 r/min离心15 s;弃去过滤液,换一新的收集管,加入500 μ l inhibitor removal buffer,10 000 r/min离心1 min;弃去过滤液,换一新的收集管,加入450 μ l洗液,10 000 r/min离心1 min;重洗一次;最后13 000 r/min离心10 s,弃去残余的洗液;去掉收集管,换一个干净的无RNA的1.5 ml Eppendorf 离心管,用50 μ l洗脱液加入过滤管中,10 000 r/min离心1 min,将提取的RNA移到一个新的离心管中。

4. cDNA的合成:以提取的病毒RNA为模板,应用随机引物在M-MLV反转录酶的作用下反转录获得病毒基因组cDNA,反应条件为65 $^{\circ}$ C 5 min,加入反转录酶后25 $^{\circ}$ C 孵育10 min,42 $^{\circ}$ C 延伸1 h,70 $^{\circ}$ C 变性10 min。

5. RT-PCR:以病毒RNA为模板,用随机引物,经AMV反转录酶42 $^{\circ}$ C反转录30 min,94 $^{\circ}$ C变性3 min后进行PCR,Taq DNA聚合酶(均为Boehringer Mannheim公司产品)进行RT-PCR反应。反应条件为94 $^{\circ}$ C预变性5 min;94 $^{\circ}$ C变性45 s,50 $^{\circ}$ C退火45 s,72 $^{\circ}$ C延伸1 min,34个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10 min;用EV71特异性引物进行扩增,PCR后,用1.5%的琼脂糖凝胶电泳分析结果,特异性片段长度为507 bp。

6. 病毒VP1和VP4基因的克隆:采用DNAStar中的MegAlign软件合成3对病毒特异性引物(表1),引物的序列按BrCr(U22521),SHZH9(AF302996),TW2086(AF119796),SIN5666(AF352027)中的保守序列来设计,引物的位置以标准株BrCr为准。以病毒基因组RNA为模板在AMV反转录酶和Taq DNA聚合酶(均为Promega公司产品)作用下进行RT-PCR反应。PCR反应条件为:94 $^{\circ}$ C 1 min,50 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1.5 min,35个循环。PCR扩增的特异性片段经1%琼脂糖凝胶电泳分离,回收纯化(QIAGEN)后分别克隆至pGEM-T Easy载体(Promega)。重组克隆经限制性内切酶(Promega)鉴定。

表1 EV71-VP1、VP4区基因扩增引物

核苷酸数量	引物
1~1194	F1:TTAAAACAGCTGTGGGTTG R1:ACTTCCAGTACCATCCCTTG
2071~3281	F2:TGTTCACTGGGTCTTTATGGC R2:ACCAGCATAAATTTGGGTTGGCT
3013~4326	F3:TACCATTATGTACCTGCGA R3:CTAGATACGACACATTCCTCAA

7. DNA序列测定和分析:以T7和SP6为通用引物,按照Taq DyeDeoxyTM Terminator Cycle Sequence Kit(ABI公司)所提供的条件进行荧光素标记的DNA序列测定反应。反应产物通过Centri-Sep Spin Columns(Princeton Separations公司)去除未掺入的ddNTP后,在ABI373A型DNA序列自动分析仪上进行测定。全部DNA序列及由ORFs所推导的氨基酸序列的排列分析和同源性比较等工作均利用DNAStar和BioEdit软件完成,EV71病毒的参比序列取自GenBank。

结 果

1. RT-PCR检测EV71:采用EV71特异性引物对13份标本进行RT-PCR,有9份标本扩增出507 bp的特异性条带,其中04-J38、04-J39、04-J40和04-J42等4份标本特异性条带强,其余标本的特异性条带较弱,EV71阳性率为63.23%。

2. 4株病毒VP1区核苷酸及氨基酸序列和相关序列的比较分析:04-J38、04-J39、04-J40、04-J42病毒VP1区核苷酸同源性为94.1%~99.8%,氨基酸的同源性为96.9%~100%。与A基因型(BrCr)核苷酸同源性为81.9%~82.2%,氨基酸的同源性为93.9%~94.6%;与B1、B2、B3、B4亚型核苷酸同源性在83.0%~84.2%之间,氨基酸的同源性在96.2%~97.9%之间;与C1、C2、C3亚型核苷酸同源性在87.8%~92.0%之间,氨基酸的同源性为97.9%~99.6%之间,与C4亚型的中国深圳株SHZH98、SHZH03、浙江株ZJ-1-03、重庆株CQ03-1和上海代表株比较接近,核苷酸同源性为94.1%~95.6%,氨基酸的同源性为96.9%~100%,说明本次4株病毒均为C4亚型。

4株病毒核苷酸序列比较显示,04-J38与04-J39相差2个核苷酸,与04-J40均相差1个核苷酸,04-J42与04-J40相差3个核苷酸。04-J39与04-J40氨基酸序列完全相同,与04-J38相差1个氨基酸,与04-J42相差2个氨基酸。

04-J38第172位氨基酸发生突变,由谷氨酰胺变为X,04-J42第41位和287位氨基酸发生突变,分别由T变为丝氨酸和T变为丙氨酸。

3. 4株病毒VP4区核苷酸及氨基酸序列和相关序列的比较分析:4株病毒VP4区核苷酸序列完全相同,与CA16-G10核苷酸同源性为68.5%,与A基因型核苷酸同源性为82.1%;与B1、B2、B3、B4亚

表2 4 株 EV71 与不同基因型代表株核苷酸及氨基酸同源性分析(%)

基因型	A	B1	B2	B3	B4	C1	C2	C3	C4
04-J38	82.1 ^a	83.6	84.0	83.5	83.0~83.7	88.1~91.8	91.2~91.6	89.5~89.7	94.5~95.5
	94.6 ^b	96.6	97.3	97.3	96.9~97.6	98.6~99.3	98.3~98.9	98.3~98.9	97.3~99.6
04-J39	82.1	83.8	84.2	83.7	83.2~83.9	88.3~92.0	91.2~91.6	89.5~89.7	94.6~95.5
	94.6	96.9	97.6	97.6	97.3~97.9	98.9~99.6	98.6~99.3	98.6~99.3	97.6~100.0
04-J40	82.2	83.7	84.1	83.6	83.1~83.8	88.2~91.9	91.3~91.8	89.6~89.8	94.5~95.6
	94.6	96.9	97.6	97.6	97.3~97.9	98.9~99.6	98.6~99.3	98.6~99.3	97.6~100.0
04-J42	81.9	83.6	84.0	83.5	83.0~83.7	87.8~91.5	91.0~91.4	89.5~89.7	94.1~95.2
	93.9	96.2	96.9	96.9	96.9~97.3	98.3~98.9	97.9~98.6	97.9~98.6	96.9~99.3

注：^a 该行为核苷酸同源性；^b 该行为氨基酸同源性

型核苷酸同源性在80.6%~85.0%之间,与 C1、C2、C3 亚型同源性在85.9%~87.4%之间。与 CA16 氨基酸的同源性为78.2%,与 A、B、C 基因型代表株氨基酸的同源性为 100%。

4. VP1 基因进化分析: 图 1 是根据 VP1 区核苷酸序列的系统进化分析,得到树状图;图 1 显示, EV71 深圳流行株和各基因型的代表株在系统进化树上聚集为 A、B、C 三个分支,与 Brown 的传统分型相符。深圳流行株与 A、B 基因型不同,与 C 基因型距离较近,因此,流行株为 C 基因型。深圳 4 株流行株与 C1、C2、C3 亚型不同,与中国深圳株 SHZH98、SHZH03、浙江株 ZJ-1-03、重庆株 CQ03-1 和上海株 SHH02-6 在进化树上形成一个相对独立的分支,被定为 C4 亚型。

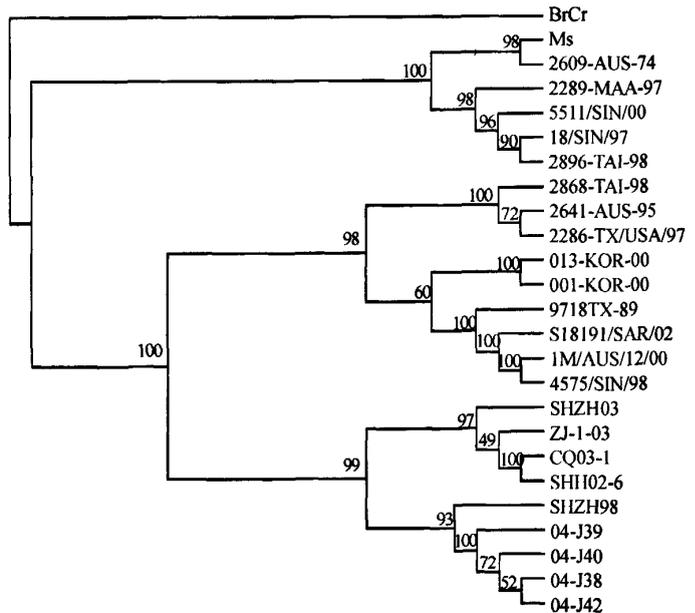
5. VP4 基因进化分析: 图 2 是根据 VP4 区核苷酸序列的系统进化分析,得到树状图;图 2 显示, EV71 深圳流行株与 C16-G10 亲缘关系较远,与各基因型的代表株在系统进化树上聚集为 A、B、C 三个分支,深圳流行株与 A、B 基因型不同,与 C 基因型距离较近,4 株流行株为 C 基因型,且 4 株流行株与 C1、C2、C3 亚型不同,在进化树上形成一个相对独立的分支。

讨 论

近年来,手足口病在亚洲的流行呈上升趋势^[1,2],在我国的一些省份都曾出现过手足口病的流行,其主要病原为柯萨奇 A16 和 EV71 等肠道病毒^[3-5]。目前,世界上几起严重的手足口病暴发或流行均由 EV71 引起,由

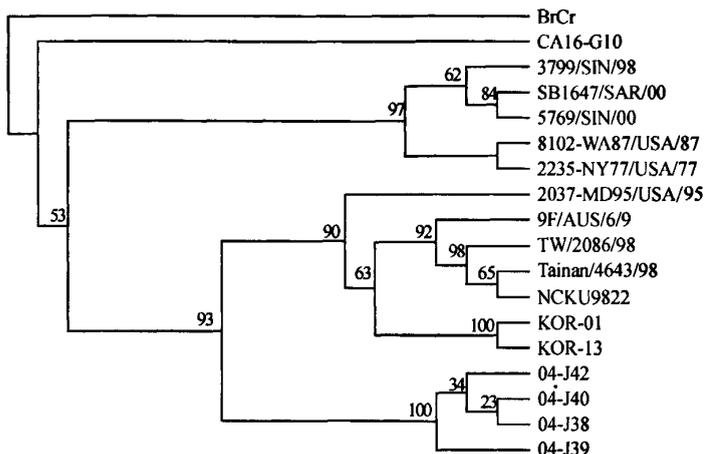
EV71 引起的手足口病多伴有神经系统并发症,因此,需要引起足够的重视。根据 EV71 的 VP1 和 VP4 基因序列变异情况, EV71 分为三个不同的基因型: A、B、C 型,其中 B 和 C 型又可以分为 B1、B2、B3、B4 和 C1、C2、C3 亚型^[2,6,7]。

VP1 区是编码衣壳蛋白,是主要表面抗原的决定区,是 EV 分型的主要区域。4 株病毒的 VP1 区基因全长 891 bp,与相关的 EV71 比较,与中国深圳株 SHZH98、SHZH03、浙江株、重庆株和上海株的同



注: A: BrCr(U22521); B1: 2609-AUS-74 (AF135886); B2: Ms(U22521); B3: 2289-MAA-97; B4: 18/SIN/97(AF251359); 5511/SIN/00(AF376121); 2896-TAI-98; C1: S18191/SAR/02 (AY189154); 1M/AUS/12/00 (AF376098); 4575/SIN/98 (AY125986); 9718-TX-89; C2: 2641-AUS-95, 2286-TX/USA/97 (AF135941), 2868-TAI-98; C3: 001-KOR-00 (AY125966); 013-KOR-00 (AY125976); C4: CQ03-1 (AY547501), SHH02-6 (AY547499), ZJ-1-03 (AY905614)

图1 VP1 区的基因进化分析



注: CA16-G10 (NC001612); A: BrCr (U22521); B1: 2235-NY77/USA/77 (AY123953); B2: 8102-WA87/USA/87 (AY123957); B3: 3799/SIN/98 (AY125985); B4: SB1647/SAR/00 (AY126004); 5769/SIN/00 (AY125992); C1: 2037-MD95/USA/95 (AY123948); C2: NCKU9822 (AF136379); TW/2086/98 (AF119796); Tainan/4643/98 (AF304458); C3: 001-KOR-00 (AY125966); 013-KOR-00 (AY125976)

图2 VP4 区的基因进化分析

源性较高(94.1%~95.6%),与 A 基因型脑炎分离株(BrCr 株)同源性较低,在 81.9%~82.2% 之间,与 B 基因型核苷酸同源性在 83.0%~84.2% 之间;氨基酸的同源性也高于 A 和 B 基因型。基因进化分析显示,深圳 4 株流行株与 BrCr 和 B 基因型亲缘关系较远,与中国深圳株 SHZH98、SHZH03、浙江株 ZJ-1-03、重庆株 CQ03-1 和上海株 SHH02-6 亲缘关系较近,形成一个相对独立的中国大陆 C4 亚型分支。

VP4 区核苷酸序列比较显示,4 株病毒与 CA16-G10 核苷酸同源性低,只有 68.5%,与 A、B 基因型核苷酸同源性在 80.6%~85.0% 之间,与 C1、C2、C3 亚型同源性在 85.9%~87.4% 之间。基因进化分析显示, EV71 深圳流行株与 CA16-G10 亲缘关系较远,与 A、B 基因型不同,与 C1、C2、C3 亚型

距离较近,且在进化树上形成一个相对独立的分支。

综上所述,本研究通过对 VP1 和 VP4 基因进化分析,可得出类似的结果,与美国、新加坡、马来西亚、韩国、中国台湾 EV71 流行株不同,4 株 EV71 深圳流行株为一个独立的分支——C4 亚型,至于其基因变化与致病性的关系以及病毒毒力之间的相关性的关系还有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Lin TY, Chang LY, Hsia SH, et al. The 1998 enterovirus 71 outbreak in Taiwan: pathogenesis and management. *Clin Infect Dis*, 2002, 34 Suppl 2: S52-57.

[2] McMinn P, Lindsay K, Perera D, et al. Phylogenetic analysis of enterovirus 71 strains isolated during linked epidemics in Malaysia, Singapore, and Western Australia. *J Virol*, 2001, 75(16): 7732-7738.

[3] 何雅青, 杨帆, 李良成, 等. 我国深圳地区手足口病患者肠道病毒 71 型的分离与鉴定. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1999, 13(1): 83-84.

[4] 崔爱利, 许文波, 李秀珠, 等. 肠道病毒 71 型的 RT-PCR 诊断及基因特征. *病毒学报*, 2004, 2(20): 160-165.

[5] 陈立, 李秀珠, 张礼璧, 等. 一起引发手足口病流行的肠道病毒 71 型的分子特征. *中国计划免疫*, 2003, 9(5): 283-287.

[6] Shih SR, Ho MS, Lin KH, et al. Genetic analysis of enterovirus 71 isolated from fatal and non-fatal cases of hand, foot, and mouth disease during an epidemic in Taiwan, 1998. *Virus Res*, 2000, 68(2): 127-136.

[7] Brown BA, Oberste MS, Alexander JP Jr, et al. Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998. *J Virol*, 1999, 73(12): 9969-9975.

(收稿日期: 2008-03-26)

(本文编辑: 尹廉)