

北京地区 2007 - 2008 年 G9 型 A 组人轮状病毒 VP7 和 VP4 基因分析

董慧瑾 钱渊 张又 赵林清 朱汝南 陈冬梅 刘立颖

【摘要】 目的 了解北京地区 2007 - 2008 年检测到的 G9 型 A 组人轮状病毒外壳蛋白 VP7 和 VP4 的基因特征。方法 选取经过轮状病毒核酸杂交方法检测为 G9 型轮状病毒的 12 份儿童腹泻患儿的粪便标本,应用针对 VP7 全长基因的特异引物对进行 RT-PCR 扩增,对所获得的 VP7 全长基因进行克隆和测序,将所获得的序列与 GenBank 中的 G9 型原型病毒株和近期流行株的 VP7 基因进行序列和种系进化分析;经巢式 PCR 对 G9 型的 VP4 进行 P 基因分型。结果 12 株 G9 型轮状病毒经 VP7 基因的序列比较分析得到确认。P 基因分型结果显示北京地区近年来存在 G9P[8]和 G9P[6]型两种组合的轮状病毒感染。序列和种系进化分析发现北京 G9 型株 VP7 基因与世界范围内近期流行的 G9 型株一样都属于进化分支 III,彼此间的核苷酸和氨基酸同源性较高,而与国内最早报道的 G9 型 T203 进化关系较远,且北京 G9P[8]和 G9P[6]型株分别与国内近期报道的新疆 G9P[8]和 G9P[6]型株及相应的武汉 G9 型株 VP7 基因,在氨基酸位点上存在一些共同的氨基酸残基取代。结论 北京地区近年存在 G9P[8]和 G9P[6]两种不同基因组合的 G9 型轮状病毒感染,需要进一步加强对 G9 型轮状病毒的分子流行病学监测。

【关键词】 G9 型轮状病毒; 基因型; 序列分析

Analysis on VP7 and VP4 genes of human rotavirus G9 identified from children with diarrhea in Beijing, from 2007 to 2008 DONG Hui-jin, QIAN Yuan, ZHANG You, ZHAO Lin-qing, ZHU Ru-nan, CHEN Dong-mei, LIU Li-ying. Laboratory of Virology, Beijing Municipal Laboratory of Infection and Immunity, Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020, China
Corresponding author: QIAN Yuan, Email: yqianbjc@263.net

【Abstract】 Objective To characterize the outer capsid protein VP7 and VP4 encoding genes of human rotavirus G9 strains detected in Beijing, from 2007 to 2008. **Methods** Full length of VP7 genes of G9 rotaviruses from 12 fecal specimens previously detected by dot-blot hybridization assay were amplified by RT-PCR and sequenced after being cloned into T vector. The sequences of these VP7s were compared to VP7 genes of rotavirus G9 prototype strains and recently circulating strains around the world. VP4 genes of these 12 G9 strains were amplified by nested-PCR for P genotyping. **Results** Sequence analysis for the full length of VP7 genes from these 12 specimens confirmed that they were G9 rotaviruses. P genotyping for VP4 genes revealed that both P[8]G9 and P[6]G9 were circulating in Beijing in the last 2 years. Sequence and phylogenetic analysis demonstrated that VP7 genes of G9 strains from Beijing in this study were clustered in the lineage III which resembled the G9 strains circulating in other places around the world, indicated by high identities of nucleotide and deduced amino acid sequences and were distant with the first reported G9 strain T203 identified in China in 1994. It was found that there were some consistent amino acid substitutes at the corresponding positions among VP7s from these 12 specimens and from Xinjiang and Wuhan, both in G9P[8] and G9P[6] strains. **Conclusion** The rotavirus G9 strains both in combination of G9P[8] and G9P[6] were circulating in Beijing in the past years. It seemed that rotavirus G9 should be included in the list of surveillance for rotavirus in China.

【Key words】 Rotavirus G9; Genotype; Sequence analysis

A 组人轮状病毒(human rotavirus, HRV)是引起婴幼儿重症腹泻最主要的病原。目前依据 HRV 主

要外壳蛋白 VP7 (glycoprotein, G) 和 VP4 (protease-sensitive, P) 利用 RT-PCR 和核酸序列分析方法至少已鉴定出 16 个 G 和 28 个 P 基因型^[1]。HRV 疫苗主要是针对 5 种主要的优势流行型别株(G1 ~ G4 和 P[8])来预防 HRV 感染,但随着近年来 G9 型

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.11.022

作者单位: 100020 北京, 首都儿科研究所病毒研究室, 北京市感染与免疫中心实验室

通信作者: 钱渊, Email: yqianbjc@263.net

HRV 成为全球第五常见优势流行型别, 已经将 G9 型病毒株加入到全球常规的 HRV 流行株的监测中^[2]。国内自钱渊等³ 1994 年首次报道第一例 G9 型 HRV 感染以来, 监测资料表明我国存在 G9 型 HRV, 虽没有成为优势流行株^[4], 但是近年来检出的 G9 型病毒株有增长趋势, 检出的地域范围也在扩大^[5-7]。为更好地了解我国 G9 型 HRV 感染的流行情况及其基因进化, 选取部分本研究室前期工作中经打点杂交方法检出的 G9 型 HRV 进行 VP7 全基因序列测定和比较分析, 并对该病毒株 VP7(G) 和 VP4(P) 基因型的组合进行初步研究。

材料与方法

1. G9 型 HRV 阳性标本: 本研究室前期工作中在对 2007 - 2008 年首都儿科研究所附属儿童医院 244 份经抗原检测为 HRV 阳性住院腹泻患儿粪便标本进行打点杂交 G 型别分析, 发现 G9 型 2007 年 2 份、2008 年 43 份, 共有 45 份 (18.4%)。为明确北京地区 G9 型 HRV 是否已成为优势流行株, 查阅和分析了这些 G9 型阳性患儿的病历, 发现仅 4 例为社区感染, 其他可能为院内感染 (另文待发表)。本次研究选用 12 份经打点杂交检测为 G9 型 HRV 阳性的粪便标本进行 VP7 全基因序列测定和比较分析, 其中取自 2007 年的 2 份, 2008 年的 10 份, 确定为社区感染的共 3 份, 标本编号分别为 CR3598、CR4916 和 CR5456。

2. G9 型 HRV 外壳蛋白 VP7 全基因的克隆和测序: 使用 Trizol 提取粪便中的病毒 RNA, 用 HRV 的 VP7 全基因特异性引物对 (Beg9/End9) 进行 RT-PCR 扩增 VP7 全基因^[8], PCR 产物经使用 EasyPure Quick Gel Extraction Kit (北京全式金生物技术有限公司) 纯化后, 与 pBS-T II 载体快速连接转化大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞, 用氨苄抗性和蓝白斑筛选阳性克隆并经 PCR 验证后进行测序。AMV Reverse Transcriptase 购自 Promega 公司, Platinum[®] TaqDNA Polymerase 购自 Invitrogen 公司, pBS-T II 快速克隆试剂盒为 TIANGEN 公司产品。

3. G9 型 HRV 的 P 基因分型: 用 HRV 的 VP4 基因特异性引物对 (Con3/Con2) 及其分型引物 (1T1/2T1/3T1/4T1/5T1) 对提取的病毒 RNA 进行 RT-PCR 和巢式 PCR, VP4 基因特异引物、分型引物序列及 PCR 反应条件见参考文献 [9]。随意各选 1 ~ 2 份经 PCR 分型为不同 P 基因型别的标本, 使用引物对 (Con3/Con2)^[9] 进行 PCR 扩增, 扩增产物直接测序, 通过核苷酸序列分析验证 VP4 基因巢式 PCR 分型

结果的可靠性。序列测定均由上海英俊生物技术有限公司完成。

4. 序列比较分析: 将所测得的序列与 GenBank 收入的国内外 G9 原型株及近期流行株进行比较, 序列比较和种系进化分析使用 BLAST (NCBI) 软件和 DNASTar 软件中的 EditSeq 及 Megalign。

结 果

1. G9 型 HRV 的 P 基因分型: VP4 基因 P 基因分型结果显示 12 份 G9 型 HRV 中有 3 份为 P[6] 型, 其余均为 P[8] 型。1 份 P[6] (CR4916) 和 2 份 P[8] (CR3598, CR5269) 的 VP4 基因扩增产物经测序和 BLAST 软件网上比对, 并用 DNASTar 软件进行序列分析, 与 VP4 基因巢式 PCR 分型结果相符。

2. G9 型 VP7 基因测序及序列分析: 12 株 G9 型 VP7 基因测序结果与 BLAST 软件网上比对, 确定为 HRV G9 型 VP7 基因。G9 型 VP7 基因均含有一个大的开放阅读框架 (open reading frame, ORF), 编码一个长为 326 个氨基酸的蛋白质; 但是这 12 株的 VP7 全基因的核苷酸长度不尽相同, 其中 3 株 (CR5317、CR5332 和 CR5364) 的基因全长为 1061 bp, 同北京地区首例 G9 株 T203 的 VP7 全基因长度相同^[10], 其余 9 株 VP7 基因全长均为 1062 bp。彼此间核苷酸和氨基酸同源性分别为 97.0% ~ 99.8% 和 96.3% ~ 99.7%, 同国内近期报道 4 例感染儿童的武汉 G9 型株^[7] 的核苷酸和氨基酸同源性为 97.4% ~ 99.3% 和 96.3% ~ 99.7%, 同新疆 G9 型株⁷ 部分核苷酸及所推导的氨基酸同源性为 97.5% ~ 99.9% 和 97.9% ~ 100%。本研究中 12 株 G9 型 VP7 基因根据 ORF 推导的 326 个氨基酸在 67 ~ 71 位处均具有潜在的 N-连接糖基化位点, 它们和 GenBank 中参比 G9 型株 VP7 基因推导的氨基酸序列比较见图 1。北京 G9P[8] 株在 aa8 (T→A)、aa65 (T→A) 两位点与国内近期报道的新疆 G9P[8] 株 (XJ05-117、XJ05-56)、武汉 G9 株 (E205、Z386) 之间存在一致的氨基酸取代, 并且同 GenBank 中参比的 G9 型株相比所有 2008 年北京 G9P[8] 株在 aa232 (G→S) 及 aa300 (V→I) 位点存在一致的残基取代; 本研究中所有的 G9P[6] 株在 aa280 位点 (Q→K) 及 Clark 等^[11] 报道的抗原决定簇 F 区 aa234 位点 (N→D) 存在一致的氨基酸变化, 并在 aa29 (A→V)、aa70 (S→L)、aa278 (A→T, 新疆 G9P[6] 株在此位点已无序列) 等位点与新疆 G9P[6] 株 (XJ04-652、XJ05-80)、武汉 G9 株 (E192、E664) 存在一致的氨基酸残基变化。国内近期出现的这些 G9

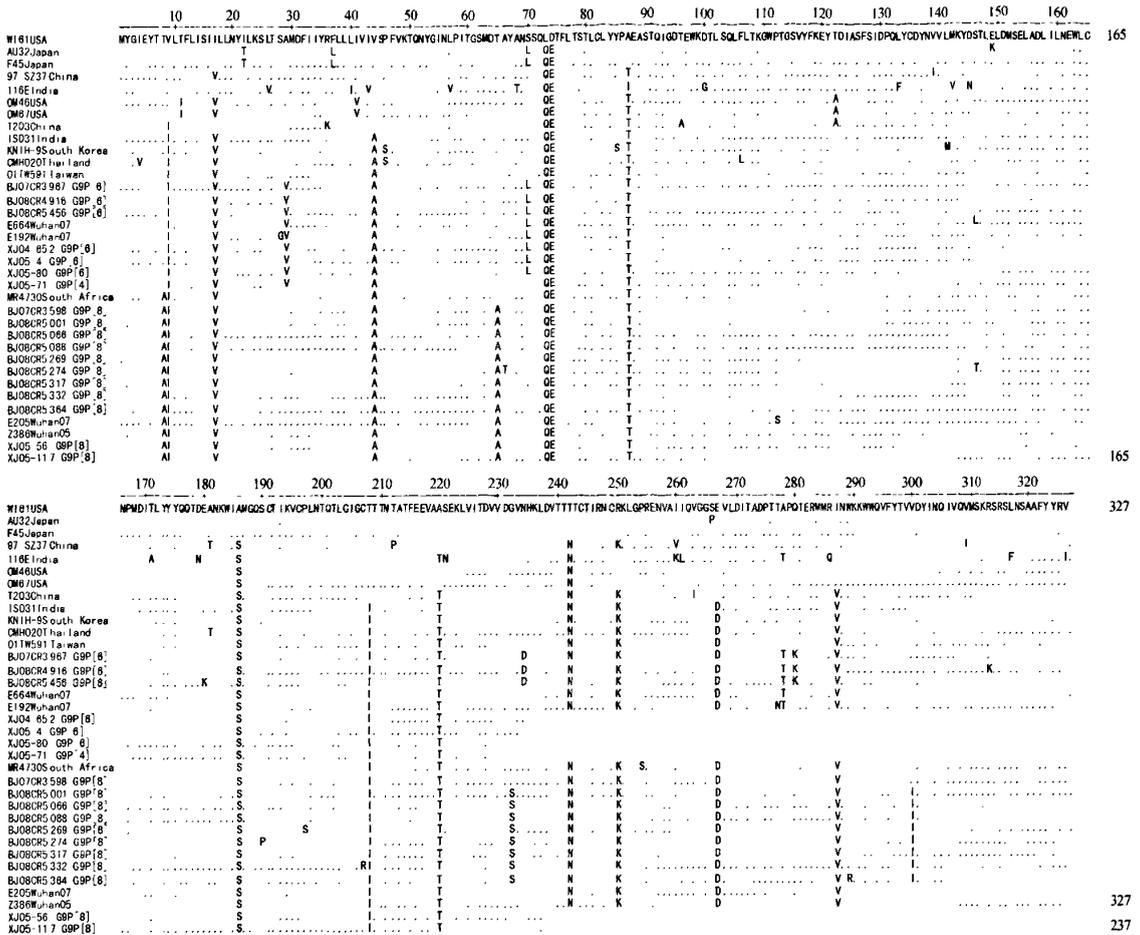


图1 北京 G9 株同 GenBank 中参比的 G9 株 VP7 基因推导的氨基酸序列比较

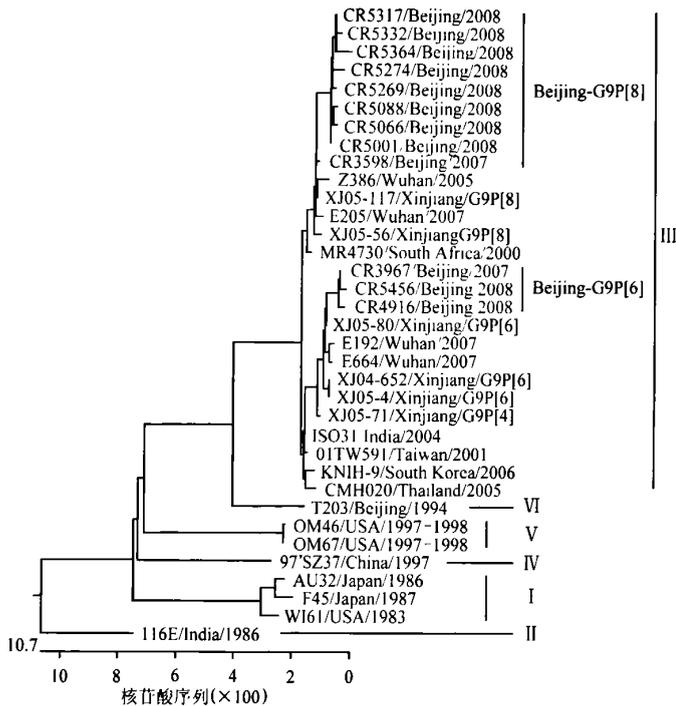
型 HRV 特征性的氨基酸残基变化是否与 G9 型 HRV 外壳蛋白 VP7 的抗原性及基因进化相关,有待进一步研究。

3. 北京 G9 株 VP7 基因进化分析:世界范围内流行的 G9 型 VP7 基因过去划分为 3 大进化分支^[12],最新的 G9 型 VP7 基因种系进化分析确定为 6 大进化分支及若干亚支^[13, 14]。12 株北京 G9 型株与 GenBank 中 G9 原型株及近期流行株的系统进化树如图 2。分析结果显示本研究中 12 株 G9 型株 VP7 基因与世界各地近期出现的 G9 型株一样都属于进化分支 III。北京 G9P[6] 株与新疆 G9P[6] 株及武汉 G9 株 E192、E664 处在同一小进化簇内,同印度株 ISO-31 进化关系较近;而北京 G9P[8] 株与新疆 G9P[8] 株及武汉 G9 株 Z386、E205 处在同一小进化簇内,同南非株 MR4730 进化关系较近。国内已报道的卢龙 G9P[8] 株 (GenBank 中无序列)同南非株 MR4730 也处于同一分支内,亲缘关系最近^[5]。系统进化树显示国内近期现已报道的 G9 株同我国最

早的 G9 株 T203 和早期 G9 株 97'SZ37 相距较远。本研究 G9 型株同 GenBank 中各进化分支参比代表株 VP7 基因核苷酸和氨基酸同源性比较见表 1。由表 1 可见:与北京地区 1994 年首次发现的 G9 型株 T203 (进化分支 VI)核苷酸同源性为 93.8%~94.9%,同国内早期分离的 G9 株 97'SZ37 (进化分支 IV)核苷酸同源性为 89.5%~90.6%,同国外 G9 原型株 WI61 (进化分支 I)的核苷酸同源性为 88.8%~89.4%,而同印度 G9 原型株 116E (进化分支 II)核苷酸同源性为 87.7%~88.5%。Phan 等^[13]提出 G9 型株 VP7 基因在同一进化分支内核苷酸变异率 < 5%,同源性在 96%~100% 之间,但在不同分支间核苷酸变异较大,在 5%~14% 之间,本次研究的北京 G9 型株与世界各地处于同一分支和不同分支间的 G9 株 VP7 基因的核苷酸同源性比较也显示了此特点。

讨 论

自 1983 年首次报道美国费城 G9 型 HRV 感染住



注:系统进化树显示 6 大进化分支。本研究参比的 G9 株在 GenBank 中基因序列号: WI61(AB180969), F45(AB180970), AU32(AB045372), OM46(AJ49118), OM67(AJ491179), 97'SZ37(AF260959), T203(AY003871), MR4730(AY262749), 01TW591(DQ490173), KNIH-9(DQ990318), CMH020(GQ149704), ISO31(DQ117937), XJ05-80(EU144083), XJ04-652(EU144087), XJ05-71(EU144101), E192(EU708592), E664(EU708600), E205(EU708591), Z386(EU708593), XJ05-56(EU144093), XJ05-117(EU144098)

图 2 12 株北京 G9 株同 GenBank 中 G9 型轮状病毒参比株 VP7 基因的系统进化分析

表 1 本研究中 G9 株同 GenBank 中各进化分支参比代表株 VP7 基因核苷酸和氨基酸同源性比较

编号	WI61	116E	OM67	T203	97'SZ37	CR3598	CR3967	CR4916	CR5001	CR5066	CR5088	CR5269	CR5274	CR5317	CR5332	CR5364	CR5456
WI61		89.4	89.4	89.4	91.0	89.9	89.0	88.8	89.3	89.2	89.2	89.2	88.9	89.2	89.2	89.3	88.8
116E	92.4		89.5	88.6	89.7	88.3	88.5	88.3	87.9	87.9	87.7	87.9	87.7	87.9	87.9	87.9	88.3
OM67	96.9	92.4		90.4	90.9	90.1	89.5	89.5	89.7	89.7	89.7	89.5	89.3	89.5	89.3	89.1	89.4
T203	95.7	91.7	96.6		90.6	94.9	94.3	94.2	94.3	94.2	94.2	94.3	94.1	94.3	94.3	93.8	94.2
97'SZ37	96.0	91.7	96.9	95.7		90.6	89.7	89.5	90.0	89.8	89.8	89.8	89.5	89.9	89.9	89.5	89.5
CR3598	95.1	91.1	96.0	96.6	95.7		98.1	97.9	99.4	99.2	99.2	99.2	99.0	99.2	99.1	98.7	97.9
CR3967	94.2	90.8	95.1	95.7	94.8	97.6		99.8	97.7	97.6	97.6	97.6	97.3	97.7	97.5	97.2	99.8
CR4916	93.9	90.5	94.8	95.4	94.5	97.2	99.4		97.7	97.6	97.6	97.6	97.3	97.7	97.5	97.2	99.6
CR5001	94.5	90.5	95.4	96.0	95.1	99.1	96.9	96.6		99.8	99.8	99.8	99.5	99.8	99.6	99.2	97.6
CR5066	94.5	90.5	95.4	96.0	95.1	99.1	96.9	96.6	97.7		99.8	99.6	99.3	99.6	99.4	99.1	97.4
CR5088	94.5	90.5	95.4	96.0	95.1	99.1	96.9	96.6	97.7	99.7		99.6	99.3	99.6	99.4	99.1	97.4
CR5269	94.2	90.2	95.1	95.7	94.8	98.8	96.6	96.3	99.4	99.4	99.4		99.5	99.8	99.6	99.2	97.4
CR5274	93.6	89.6	94.5	95.1	94.2	98.2	96.0	95.7	98.8	98.8	98.8	98.5		99.5	99.3	99.0	97.1
CR5317	94.5	90.5	95.4	96.0	95.1	99.1	96.9	96.6	99.7	99.7	99.7	99.4	98.8		99.8	99.4	97.5
CR5332	94.2	90.2	95.1	95.7	94.8	98.8	96.6	96.3	99.4	99.4	99.4	99.1	98.5	99.4		99.2	97.4
CR5364	94.2	90.2	95.1	95.7	94.8	98.8	96.6	96.3	99.4	99.4	99.4	99.1	98.5	99.4	99.1		97.0
CR5456	93.9	90.5	94.8	95.4	94.5	97.2	99.4	99.1	96.6	99.6	96.6	96.3	95.7	96.6	96.3	96.3	

注:表中黑体字为核苷酸同源性(%),白体字为氨基酸同源性(%)

院患儿以来^[11],在很长一段时间内 G9 型 HRV 被认为是一个罕见的型别。但是近年来,越来越多的报道显示 G9 型 HRV 已成为继 G1~G4 血清型之后全球第五个常见的优势流行型别,因此对 G9 型株的监测已被加入到全球 HRV 流行株的常规监测中^[2]。中国香港^[15]、台湾^[16]地区及日本^[17]和印度^[18]等国家都已相继报道 G9 型 HRV 成为重要的流行株,而国内自北京地区 1994 年检测到首例 G9 型 HRV 后^[3],1998-2004 年国内 9 个地区的 G9 型 HRV 分子流行病学调查显示,G9 型株并未成为优势流行株,仅在昆明、兰州、长春及河北卢龙等地检测到,北京、郑州、杭州、福州及广州等地未检测到 G9 型株^[4],而我国新疆在 1999-2005 年间也检测出 G9 型 HRV 感染的存在^[6]。武汉市 2004 年检出首例 G9 型病毒株,随后在 2005、2006 及 2007 年武汉市也发现了 G9 型 HRV 的感染^[7]。本研究室在建立地高辛标记 HRV5 种型别(G1~G4, G9)VP7 基因探针打点杂交方法及应用过程中检出 G9 型 HRV,这是北京地区继 1994 年检测到 G9 型 HRV 以来再次检出 G9 型株,说明近年来北京地区存在 G9 型 HRV 的感染。国

内 G9 型 HRV 流行扩大的趋势表明,在我国开展 G9 型毒株的常规监测对调查其在我国的流行趋势及其防治研究具有重要意义。

从确定 G 血清型 VP7 基因的种系进化分析看,本研究中的北京 G9 型株同国内近期报道的武汉和新疆 G9 型株彼此同源性高都属于进化分支 III (昆明、兰州、长春及河北卢龙 G9 型病毒株在 GenBank 中无序列),同国内早期 G9 株 T203、97'SZ37 进化关系较远。章青等^[4]对我国 9 个地区 1998 - 2004 年 G9 型 HRV 分子流行分析显示:1998 - 2000 年以 P[8]G9 株流行为主,而 2001 年后以 P[6]G9 株为主。对本研究 2007 - 2008 年发现的 G9 型株 P 基因分型结果显示,北京地区同时存在 P[8]G9 和 P[6]G9 的流行。通过对 HRV 打点杂交检测到的 G9 型 HRV 标本来源进行分析,发现仅一例社区感染是 G9P[8]型,为 2007 年标本;另两例社区感染发生在 2008 年,为 G9P[6]型病毒株感染,2007 年另一例为 G9P[6]型,但对患儿病历分析,提示为院内感染,表明北京地区在 2007 年或之前同样也存在 G9P[6]型病毒株的社区感染。除了国内近期报道的新疆 G9 株存在 G9P[8]和 G9P[6]型株的流行外,从系统进化树看,国内近期报道的武汉 G9 株也同时存在 G9P[8]和 G9P[6]型的流行。序列比较也显示:北京 G9P[8]和 G9P[6]株分别与国内近期报道的新疆 G9P[8]和 G9P[6]株及对应的 4 例感染儿童的武汉 G9 株^[7]在由 VP7 基因推导的氨基酸序列上分别存在一些相同的氨基酸变化,其中两处发生在 Laird 等^[12]报道的 VP7 蛋白中和抗原决定簇 D 区,为 aa65 (T→A, G9P[8])和 aa70 (S→L, G9P[6])位。国内近期报道的 G9P[8]和 G9P[6]型 HRV 外壳蛋白 VP7 分别一致的氨基酸变化对 HRV 感染毒力及其 VP7 基因进化和抗原性的影响,尚有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Honma S, Chizhikov V, Santos N, et al. Development and validation of DNA microarray for genotyping group A rotavirus VP4 (P[4], P[6], P[8], P[9], and P[14]) and VP7 (G1 to G6, G8 to G10, and G12) genes. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(8): 2641-2648.
- [2] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Rotavirus surveillance — worldwide, 2001-2008. *MMWR*, 2008, 57(46): 1255-1257.

- [3] 钱渊, 袁丽娟, 熊朝晖, 等. 在我国腹泻患儿中发现 G9 型轮状病毒感染. *病毒学报*, 1994, 9: 263-266.
- [4] 章青, 王端可, 叶新华, 等. 中国 1998 - 2004 年 G9 型轮状病毒分子流行病学研究. *中国计划免疫*, 2006, 12(6): 476-479.
- [5] 李丹地, 崔淑娟, 章青, 等. G9 型人 A 组轮状病毒 LL52696 与 LL52727 株的主要基因及其编码蛋白特征的分析. *病毒学报*, 2008, 24(2): 144-147.
- [6] Rahman M, Yang XL, Sun H, et al. Emerging G9 rotavirus strains in the northwest of China. *Virus Res*, 2008, 137(1): 157-162.
- [7] Wang YH, Kobayashi N, Zhou X, et al. Phylogenetic analysis of rotaviruses with predominant G3 and emerging G9 genotypes from adults and children in Wuhan, China. *J Med Virol*, 2009, 81: 382-389.
- [8] Gouvea V, Glass RI, Woods P, et al. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol*, 1990, 28: 276-282.
- [9] Gentsch JR, Glass RI, Woods P, et al. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 1992, 30: 1365-1373.
- [10] 李国华, 靖宇, 钱渊. 我国 G9 型轮状病毒 VP7 编码基因的序列分析. *病毒学报*, 1997, 13(4): 377-381.
- [11] Clark HF, Hoshino Y, Bell LM, et al. Rotavirus isolate WI61 representing a presumptive new human serotype. *J Clin Microbiol*, 1987, 25(9): 1757-1762.
- [12] Laird AR, Gentsch JR, Hoshino Y, et al. Characterization of serotype G9 rotavirus strains isolated in the United States and India from 1993-2001. *J Clin Microbiol*, 2003, 41: 3100-3111.
- [13] Phan TG, Okitsu S, Maneekarn N, et al. Genetic heterogeneity, evolution and recombination in emerging G9 rotaviruses. *Infect Genet Evol*, 2007, 7: 656-663.
- [14] Martinez-Lasoa J, Romána A, Head J, et al. Phylogeny of G9 rotavirus genotype: a possible explanation of its origin and evolution. *J Clin Virol*, 2009, 44(1): 52-57.
- [15] Lo JY, Szeto KC, Tsang DN, et al. Changing epidemiology of rotavirus G-types circulating in Hong Kong, China. *J Med Virol*, 2005, 75(1): 170-173.
- [16] Lin YP, Chang SY, Kao CL, et al. Molecular epidemiology of G9 rotaviruses in Taiwan between 2000 and 2002. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(10): 3686-3694.
- [17] Yoshinaga M, Phan TG, Nguyen TA, et al. Changing distribution of group A rotavirus G-types and genetic analysis of G9 circulating in Japan. *Arch Virol*, 2006, 151: 183-192.
- [18] Samajdar S, Ghosha S, Chawla-Sarkara M, et al. Increase in prevalence of human group A rotavirus G9 strains as an important VP7 genotype among children in eastern India. *J Clin Virol*, 2008, 43: 334-339.

(收稿日期: 2009-06-30)

(本文编辑: 张林东)