

to promote HIV/AIDS prevention in different ethnic cultural groups of China. *AIDS Care*, 2005, 17(7): 874-891.

[2] Yang Y, Wu CL, Liu P, et al. Situation of casual sexual behaviors and geographic sexual networks among Yi ethnic villagers in one county of Liangshan prefecture. *Prev Med Inform*, 2012, 28(3): 184-186. (in Chinese)

杨义, 吴春霖, 刘鹏, 等. 凉山州某县彝族村民偶遇性行为现状及其地理网络分析. *预防医学情报杂志*, 2012, 28(3): 184-186.

[3] West China School of Public Health, Sichuan University. Comprehensive assessment report of the AIDS prevention work in Sichuan Province. Chengdu: West China School of Public Health, Sichuan

University, 2010. (in Chinese)

四川大学华西公共卫生学院. 四川省艾滋病防治工作综合评估报告. 成都: 四川大学华西公共卫生学院, 2010.

[4] Yang Y, Wu CL, Liu P, et al. Analysis of an investigation of casual sexual behaviors among Yi ethnic villagers in one county in Liangshan of Sichuan province. *Med Soc*, 2011, 24(1): 41-44. (in Chinese)

杨义, 吴春霖, 刘鹏, 等. 四川省凉山州某县彝族村民偶遇性行为调查. *医学与社会*, 2011, 24(1): 41-44.

(收稿日期: 2012-05-19)
(本文编辑: 卢亮平)

1 株柯萨奇病毒A6型河南分离株全基因序列特征分析

许玉玲 黄学勇 卫海燕 王卫华 许汴利

【关键词】 柯萨奇病毒A6型; 全基因序列

Analysis on genomic characteristics of coxsackie virus A6 strains isolated from Henan province XU Yu-ling¹, HUANG Xue-yong¹, WEI Hai-yan¹, WANG Wei-hua², XU Bian-li¹. 1 Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Henan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Zhengzhou 450016, China; 2 Jiaozuo Center for Disease Control and Prevention

Corresponding author: XU Bian-li, Email: xubl@hncdc.com.cn
This work was supported by a grant from the Henan Medical Science and Technique Foundation (No. 2011020175).

【Key words】 Coxsackievirus A6; Complete genome sequence

柯萨奇病毒A6(CVA6)属于肠道病毒A组成员, 主要引起疱疹性咽峡炎, 也可引起手足口病。2011年河南地区从手足口病患者粪便标本中分离到1株CVA6, 为了解其基因特征, 本研究对分离的CVA6毒株进行全基因序列测定。

1. 材料与方法: 待测毒株为2011年河南省疾病预防控制中心传染病预防控制所实验室分离并鉴定的毒株, 命名HN421。引物设计: 根据原型株Gdula (AY421764) 和日本毒株Shizuoka 18 (AB678778) 序列, 设计10对首尾相互重叠、覆盖全基因的引物(表1)。RNA提取及反转录: 将毒株接种于RD细胞, 待病变达到75%时收获毒株, 用美国Qiagen公司的Rneasy mini试剂盒提取RNA, 用大连宝生物公司的PrimeScript 1-Strand cDNA Synthesis试剂盒反转录cDNA, 所有操作均按说明书进行。PCR扩增及测序: PCR反应体系50 μl, 10 × buffer 5 μl, dNTP混合物4 μl, 0.4 μl Taq酶,

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2012.11.025

基金项目: 河南省医学科技攻关项目(2011020175)

作者单位: 450016 郑州, 河南省疾病预防控制中心传染病预防控制所(许玉玲、黄学勇、卫海燕、许汴利); 焦作市疾病预防控制中心(王卫华)

通信作者: 许汴利, Email: xubl@hncdc.com.cn

表1 CVA6全基因扩增引物

引物名称	序列(5' ~ 3')	位置	产物长度(bp)
CVA6-1F	TTAAAA CAG CCT GTG GGT T	1 ~ 19	
CVA6-1R	GAAACA CGG ACACCC AAA GTA GT	549 ~ 571	571
CVA6-2F	GGT GCG AAG AGT CTA TTG AGC	421 ~ 441	
CVA6-2R	GCT GTA GCG TCC GTA GAA GG	1081 ~ 1100	680
CVA6-3F	ACC ATC ACC ACC CAA GAG G	1018 ~ 1036	
CVA6-3R	AAG TTC TTT TGT GCT GCT CCA	2367 ~ 2387	1370
CVA6-4F	TGG TAC CAG ACC AAC TTC GTA GTA CC	2305 ~ 2330	
CVA6-4R	TAG GGT AAC CAT CATAAA ACC A	3034 ~ 3055	750
CVA6-5F	ATG TAT GTA CCA CCA GGA GCC CC	2887 ~ 2909	
CVA6-5R	AGC CCC GGA TTG TTG GCC	3367 ~ 3384	497
CVA6-6F	CAA GCA TAA CCA CCA CGG AT	3299 ~ 3318	
CVA6-6R	GGT TCA ATA CGG TGT TTG CTC T	4448 ~ 4469	1170
CVA6-7F	TGG GAA CGT GTC GTA CCT C	4335 ~ 4353	
CVA6-7R	CTT TGG ACT TCC TGT CTC TCA	4979 ~ 4999	664
CVA6-8F	CTC GGT AGA TTG GAC GCT G	4876 ~ 4894	
CVA6-8R	TGC TCC ACC CAA ATT GTC TTT CC	5545 ~ 5567	690
CVA6-9F	CTC AAG AAG CCT ATC CTC CG	5380 ~ 5399	
CVA6-9R	CCG AAA GTC ATC CTG AGA TAG ACT G	6515 ~ 6539	1100
CVA6-10F	GCA AGC CCT GTT CTC TAA GTA	6129 ~ 6149	
CVA6-10R	GCT ATT CTG GTT ATA CAA AT T	7413 ~ 7434	1300

cDNA 2 μl, 上下游引物(25 μmol/L)各1 μl。反应条件: 95 °C 3 min; 94 °C 45 s, 50 °C 35 s, 72 °C, 80 s, 35个循环; 72 °C 10 min。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定, 纯化后送南京金斯瑞测序。生物信息学分析: 使用DNASar软件中的Seqman对所有测序结果进行拼接, 得到HN421。从GenBank选取同源性较高的肠道病毒A组原型株基因序列, 用DNASar中的Megaline进行同源性比较, 用Clustal X 1.83软件对各型病毒的5' UTR、P1、P2和P3区域进行比对, Mega 4.0软件构建进化树。

2. 结果: HN421是1条单股正链RNA, 全长7434 bp, 全

基因分3个区,747 bp的5'非编码区(5' UTR),6606 bp的编码区(CDS),81 bp的3' UTR。HN421的基因特征为AT含量丰富,占52.2%。与原型株Gdula和日本株Shizuoka 18全基因序列核苷酸同源性分别为80.9%、88.7%,与其他型HEVA病毒全基因核苷酸同源性为73.6%~78.0%(表2)。5'和3' UTR:与原型株Gdula相比,5' UTR核苷酸同源性最高,为88.6%,3' UTR核苷酸同源性84.0%;与日本株Shizuoka 18相比,5'和3' UTR核苷酸同源性分别为93.4%、93.8%。与其他型HEVA病毒相比,5' UTR核苷酸同源性为80.9%~87.6%,3' UTR核苷酸同源性为80.2%~95.1%,各型病毒间两端的非编码区均相对保守。CDS特征:与原型株相比,HN421整个编码区氨基酸差异为4.6%,核苷酸差异为20.5%。结构蛋

白各编码区核苷酸差异为17.2%~21.3%,其中VP4变异最大,氨基酸差异为11.6%,VP1、VP2和VP3氨基酸差异均小于4.9%。P2、P3核苷酸差异分别为20.5%、23.4%。与其他型HEVA相比,CDS编码的核苷酸差异为23.0%~27.9%,结构蛋白编码区核苷酸差异为26.1%~48.4%;P2、P3核苷酸差异分别为17.8%~21.8%、16.3%~23.4%。5' UTR、P1、P2、P3的遗传进化树(图1)显示,HN421的P1进化树与CA10处于同一分支,和P2、P3的进化树并不完全一致;HN421在P2、P3区与日本株处于同一分支,和原型株距离较远,与CA4、CA5和CA16处于一个大分支上。5' UTR、P1、P2和P3各区的进化树不完全一致,说明各区的进化速度并不同步。HN421所测全基因序列已提交GenBank,所得序列号JQ964234。

表2 HN421株与其他型HEVA毒株同源性(%)比较

毒株	全序	5'UTR	CDS	P1	VP4	VP2	VP3	VP1	P2	P3	3'UTR
AY421764(CA6)	80.9	88.6	79.5(95.4)	82.1(95.4)	78.7(88.4)	82.8(96.5)	82.4(96.2)	81.6(95.1)	79.5(97.1)	76.6(94.3)	84.0
AB678778(CA6)	88.7	93.4	88.1(97.5)	90.4(98.1)	88.4(94.2)	90.0(98.4)	91.4(98.8)	90.4(98.0)	88.6(97.8)	85.0(96.8)	93.8
U22521(EV71)	73.6	84.1	72.1(82.9)	66.0(71.7)	65.1(68.1)	68.1(72.0)	65.0(72.9)	51.6(56.6)	78.4(95.8)	76.6(92.7)	80.2
U05876(CA16)	77.1	87.6	75.7(84.9)	65.3(71.0)	61.8(71.0)	65.5(71.7)	64.4(70.8)	55.8(58.2)	82.2(96.9)	83.6(96.8)	91.4
AY421760(CA2)	74.9	80.9	73.7(86.2)	69.7(78.4)	70.0(81.2)	68.1(75.3)	70.4(80.8)	59.0(61.4)	78.3(95.8)	77.2(94.6)	82.7
AY421762(CA4)	78.0	85.1	77.0(88.3)	71.4(82.1)	72.0(76.8)	72.0(73.7)	69.7(82.1)	53.7(62.0)	81.8(97.1)	83.7(96.8)	95.1
AY421763(CA5)	76.4	82.2	75.0(85.8)	69.0(74.8)	68.6(71.0)	67.6(83.6)	69.0(77.1)	61.1(61.5)	81.1(96.7)	79.0(95.1)	81.5
AY421765(CA7)	74.5	83.6	73.0(83.8)	68.5(73.6)	73.9(84.0)	66.4(73.2)	67.5(71.7)	55.3(53.4)	79.2(95.7)	76.8(93.6)	81.5
AY421766(CA8)	75.6	81.8	74.6(87.2)	71.3(80.0)	72.0(85.5)	71.5(78.8)	70.7(79.6)	60.5(65.0)	78.7(96.2)	78.0(94.3)	80.2
AY421767(CA10)	75.3	84.4	74.1(86.6)	71.2(80.3)	70.5(84.1)	69.9(79.6)	71.4(80.0)	59.8(61.7)	78.2(95.8)	77.0(94.4)	82.7
AY421766(CA12)	74.9	84.8	73.5(85.3)	67.6(75.5)	71.0(82.6)	66.8(72.5)	67.6(76.7)	57.2(57.8)	78.7(96.4)	77.5(94.4)	82.7

注:括号外数据为核苷酸同源性,括号内数据为氨基酸同源性

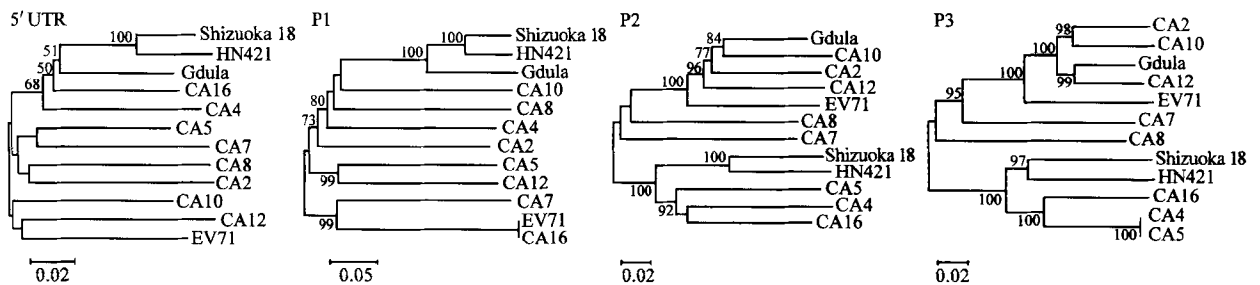


图1 HN421全基因序列的5' UTR、P1、P2、P3区进化分析

3. 讨论:肠道病毒基因组中衣壳蛋白编码区域较易发生变异,尤其VP1编码的改变影响病毒的毒力,有研究表明,基因重组已成为肠道病毒进化的主要机制^[1]。有研究报道CA6原型株与CA10、CA12在P2、P3区域存在基因重组^[2],HN421各区进化树显示在P2、P3区与CA16、CA4、CA5亲缘关系更近。虽然HN421和CA10的P1区核苷酸差异为28.8%,但在进化上处于同一分支,提示HN421与CA10可能有着共同的进化演变历程。近几年在西班牙、芬兰、中国台湾、日本等国家均出现CVA6引起的手足口病暴发,该病毒引起的手足口病常与脱甲症关联^[3,4]。目前尚无对CVA6进行基因分型的报道,需对该病毒做进一步研究。

参 考 文 献

[1] Oberste MS, Peñaranda S, Pallansch MA. RNA recombination

plays a major role in genomic change during circulation of coxsackie B viruses. *J Virol*, 2004, 78(6):2948-2955.

[2] Oberste MS, Peñaranda S, Maher K, et al. Complete genome sequences of all members of the species human enterovirus A. *J Gen Virol*, 2004, 85 (Pt 6): 1597-1607.

[3] Fujimoto T, Lizuka S, Enomoto M, et al. Hand, foot, and mouth disease caused by coxsackievirus A6, Japan, 2011. *Emerg Infect Dis*, 2012, 18(2):337-339.

[4] Wei SH, Huang YP, Liu MC, et al. An outbreak of coxsackievirus A6 hand, foot and mouth disease associated with onychomadesis in Taiwan, 2010. *BMC Infect Dis*, 2011, 11:346-351.

(收稿日期:2012-05-21)

(本文编辑:卢亮平)