

· 疾病控制 ·

内蒙古地区 2010 年柯萨奇病毒 A 组 16 型 VP1 区序列测定及系统进化分析

海岩 王文瑞 郭卫东 李昕 武珊 李慧

【关键词】 手足口病; 柯萨奇病毒 A 组 16 型; VP1 序列分析; B1 亚型

Sequence phylogenetic analysis based on VP1 gene of coxsackievirus A16 strains isolated in Inner Mongolia, China HAI Yan¹, WANG Wen-rui¹, GUO Wei-dong¹, LI Xin¹, WU Shan², LI Hui¹. 1 Inner Mongolia Center for Disease Control and Prevention, Hohhot 010031, China; 2 Alxan Center for Disease Control and Prevention

Corresponding author: WANG Wen-rui, Email: wr821@163.com

This work was supported by a grant from the Health Department of the Inner Mongolia Autonomous Region Medical and Health Research Program (No. 2010016)

【Key words】 Hand-foot-mouth disease; Coxsackievirus A16 strains; VP1 sequence analysis; B1 subtypes

分析测定 2010 年自内蒙古地区分离的柯萨奇病毒 A 组 16 型(CoxA16)毒株 VP1 区序列及其基因型, 为研究内蒙古地区 CoxA16 的流行、进化、变异积累资料。

1. 材料与方法:

(1)病毒株: 来自 2010 年内蒙古地区手足口病临床诊断病例标本中分离的毒株 A023/NMG/CHN/10(来源: 呼和浩特市)、B003/NMG/CHN/10(来源: 包头市)、B098/NMG/CHN/10(来源: 包头市)、K065/NMG/CHN/10(来源: 鄂尔多斯市)、C012/NMG/CHN/10(来源: 乌海市)、H004/NMG/CHN/10(来源: 锡林浩特市)、H027/NMG/CHN/10(来源: 锡林浩特市)、L020/NMG/CHN/10(来源: 巴彦淖尔市)、D047/NMG/CHN/10(来源: 赤峰市)和 J011/NMG/CHN/10(来源: 乌兰察布市), 共 10 株。

(2)研究方法: 根据 QIAamp Viral RNA Mini Kit 说明书提取病毒核酸。CoxA16 VP1 区核苷酸序列扩增按照 One-step RT-PCR Kit (CatNo: 210212)说明书操作。上下引物序列^[1]: CoxA16 VP1-S: 5'-ATT GGT GCT CCC ACT ACA GC-3'; CoxA16 VP1-A: 5'-GCT GTC CTC CCA CAC AAG AT-3'。使用 1.5% 的琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行电泳分

析。序列测定由上海英骏 (Invitrogen) 生物技术有限公司完成。获得的序列资料使用 Chromas 软件进行整理拼接, 获得的 VP1 区核苷酸序列同源性并通过 BLAST 程序分析、评价、判定; 多序列比对排列和邻接法 (Neighbor-Joining) 构建系统发生树, 使用 Mega 4.1 软件分析。

2. 结果:

(1)CoxA16 VP1 区基因特征分析: 将 10 株 CoxA16 分离株分别与 GenBank 中检索到的国内外部分 CoxA16 各基因型与基因亚型的 VP1 区进行核苷酸同源性比对, 与 1951 年南非分离的国际标准株即 CoxA16 原始株 G-10 (A 亚型) 的核苷酸同源性 66.6% ~ 67.4% (表 1), 与 2008 年我国安徽阜阳分离的 FY18 (A 亚型) 核苷酸同源性只有 65.3% ~ 66.6%, 与 1998、2002 年马来西亚分离株 SB1660、S70382 (B2 亚型)、2000 年我国深圳分离株 SHZH00 (B2 亚型) 的核苷酸同源性 87.1% ~ 88.7%, 其中 2 株与 2005 年澳大利亚分离株 0033 (B1a 亚型)、2004 年我国深圳分离株 SHZH04 (B1a 亚型)、2009 年我国山东分离株 LC0017 (B1a 亚型) 核苷酸同源性较高 94.8% ~ 96.7%, 其他 8 株与 2003 年北京分离株 BJ03-ZDP

表 1 用于进化树分析的 CoxA16 毒株全长 VP1 基因核苷酸参考序列

序列	分离年代	分离地	GenBank 索取号	亚型
G-10	1951	South Africa(SAF)	U05876	A
FY18	2008	China(CHN)(Fuyang)	EU812514	A
0001	1999	Perth, Western Australia(AUS)	AM292434	B1a
UM17115	2000	Peninsular Malaysia(MAL)	AM292484	B1a
EV4-5-HOKM	2002	Peninsular Malaysia(MAL)	AM292453	B1a
0033	2005	Perth, Western Australia(AUS)	AM292435	B1a
SHZH04-J31	2004	China(CHN)(Shenzhen)	AY821796	B1a
LC0017F	2009	China(CHN)(Shandong)	GQ253389	B1a
MY823-3	1997	Sarawak, Malaysia(SAR)	AM292433	B1a
TSI-2000	2000	Tailand(THAI)	AM292477	B1a
5079	1998	Taiwan(TWN)	AF177911	B1a
GZ08	2008	China(CHN)(Guangzhou)	FJ198212	B1a
SHZH05-1	2005	China(CHN)(Shenzhen)	EU262658	B1a
SHZH01-69	2001	China(CHN)(Shenzhen)	AY895111	B1a
SHZH02	2002	China(CHN)(Shenzhen)	AY895110	B1a
BJ03-ZDP	2003	China(CHN)(Beijing)	AY821798	B1b
QH0194T	2008	China(CHN)(Qinghai)	GQ429265	B1b
S70382	1998	Sarawak, Malaysia(SAR)	AM292461	B2
SB1660	2002	Sarawak, Malaysia(SAR)	Am292465	B2
SHZH00	2000	China(CHN)(Shenzhen)	AY895127	B2

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.05.028

基金项目: 内蒙古自治区卫生厅医疗卫生科研计划(2010016)

作者单位: 010031 呼和浩特, 内蒙古自治区疾病预防控制中心(海岩、王文瑞、郭卫东、李昕、李慧); 阿拉善盟疾病预防控制中心(武珊)

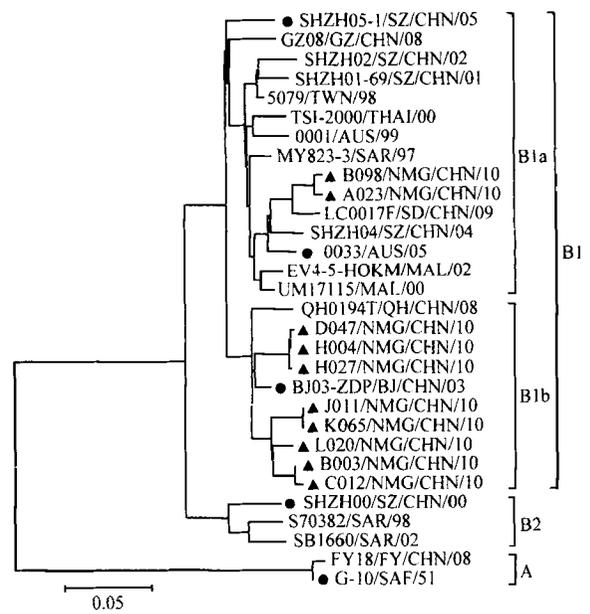
通信作者: 王文瑞, Email: wr821@163.com

(B1b亚型)、2008年青海分离株QH0194T(B1b亚型)核苷酸同源性较高94.4%~97.0%。

(2)CoxA16 VP1 区系统进化亲缘关系分析:应用Mega 4.0软件中Neighbor-Joining方法对2010年内蒙古地区10株CoxA16分离株和20株GenBank中的代表株基于VP1全基因序列构建系统进化树进行分析。由图1显示,10株内蒙古地区分离株与A基因群存在明显差异,均属于B基因群,10株全部集中于B1基因亚型,且明显分为两簇,分属B1a和B1b进化支。2株(A023/NMG/CHN/10; B098/NMG/CHN/10)属于B1a分支,同时还包括1998年的台湾株、2002年的马来西亚株、2005年的澳大利亚株,以及2001—2009年山东株、广州株和深圳株。B1b包括本次分离的8株(B003/NMG/CHN/10; C012/NMG/CHN/10; D047/NMG/CHN/10; H004/NMG/CHN/10; H027/NMG/CHN/10; J011/NMG/CHN/10; K065/NMG/CHN/10; L010/NMG/CHN/10)和2003年北京株、2008年青海株。

(3)内蒙古分离株CoxA16 VP1区核苷酸同源性:对2010年内蒙古地区10株CoxA16分离株进行VP1区核苷酸序列测定和分析。结果显示10株CoxA16分离株的VP1段核苷酸同源性为90.3%~99.9%。其中2株(A023/NMG/CHN/10; B098/NMG/CHN/10)核苷酸同源性较高,为99.1%,其余8株(B003/NMG/CHN/10; C012/NMG/CHN/10; D047/NMG/CHN/10; H004/NMG/CHN/10; H027/NMG/CHN/10; J011/NMG/CHN/10; K065/NMG/CHN/10; L010/NMG/CHN/10)显示较高的同源性,为90.3%~99.9%。

3. 讨论:Li等^[2]2005年报道CoxA16分为A、B、C三个遗传谱系;2007年Perera等^[3]报道将CoxA16分为A、B两个基因群,B基因群又分为B1和B2亚型,其中B2基因亚型为早期流行的CoxA16的分离株,并逐渐被近期的优势株B1基因亚型所取代。Zhang等^[4]报道B1亚型进一步分为B1a、B1b、B1c分支。本研究参考以上分型方法。研究中对10株来自内蒙古地区CoxA16毒株的VP1序列区间进行序列测定和分析,并结合系统进化树分析表明,10株分离株分别明显属于B1a和B1b两进化分支。其中呼和浩特分离株(A023/NMG/CHN/10)和包头分离株(B098/NMG/CHN/10)属于B1a分支,该分支还包括了与2005年澳大利亚分离株0033、2004年深圳分离株SHZH04、2009年山东分离株LC0017等;其余分别来源于包头、乌海、赤峰、锡林浩特、乌兰察布、鄂尔多斯、巴彦淖尔市(B003/NMG/CHN/10; C012/NMG/CHN/10; D047/NMG/CHN/10; H004/NMG/CHN/10; H027/NMG/CHN/10; J011/NMG/CHN/10; K065/NMG/CHN/10; L010/NMG/CHN/10)的8株属于B1b分支,与2003年北京分离株、2008年青海分离株同属一支。本研究结果提示2010年内蒙古地区



注:●各基因型代表株;▲10株内蒙古分离株

图1 2010年10株内蒙古分离株和20株各基因型代表株CoxA16 VP1段系统进化分析

CoxA16的分离株均为B1基因亚型,与我国其他省市以及周边国家和地区呈共同进化,且在内蒙古地区广泛分布。

参 考 文 献

[1] Wei CD, Li LL, He YQ, et al. Sequencing and phylogenetic analysis of partial VP1 gene of coxsackievirus A16 strains isolated in China from 1999 to 2004. *Chin J Virol*, 2005, 21(3): 223-227. (in Chinese)
 卫灿东,李琳琳,何雅晴,等.中国柯萨奇病毒A组16型部分VP1区序列测定及系统进化分析. *病毒学报*, 2005, 21(3): 223-227.

[2] Li L, He Y, Yang H, et al. Genetic characteristics of human enterovirus 71 and coxsackievirus A16 circulating from 1999 to 2004 in Shenzhen, People's Republic of China. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(8): 3835-3839.

[3] Perera D, Yusof MA, Podin Y, et al. Molecular phylogeny of modern coxsackievirus A16. *Arch Virol*, 2007, 152(6): 1201-1208.

[4] Zhang Y, Wang D, Yan D, et al. Molecular evidence of persistent epidemic and evolution of subgenotype B1 coxsackievirus A16-associated hand, foot, and mouth disease in China. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(2): 619-622.

(收稿日期:2012-11-29)

(本文编辑:张林东)