

# 中国7个地区诺如病毒G II .4/Sydney 2012变异株分析

买欢 高燕 潘孝本 韩进超 丛旭 魏来

**【摘要】** 目的 分析2012—2013年冬季中国地区诺如病毒新流行株G II .4/Sydney 2012的衣壳蛋白区核苷酸与氨基酸变异特点。方法 对已获得的22份2012—2013年冬季北京地区G II .4/Sydney 2012株进行全衣壳蛋白区基因扩增。从GenBank检索中国其他地区的G II .4/Sydney 2012株衣壳蛋白区核苷酸序列。对获得的G II .4/Sydney 2012株的衣壳蛋白区核苷酸及氨基酸序列与往年G II .4流行株进行系谱分析。结果 获得中国7个地区(北京、上海、江苏、湖州、荆州、香港和台湾)的G II .4/Sydney 2012株资料共38份(至少包含完整VP1核苷酸序列)。G II .4/Sydney 2012株之间VP1核苷酸差异为0.1%~3.3%,氨基酸差异为0~3.1%。系谱分析发现G II .4/Sydney 2012株与Apeldoorn 2008和New Orleans 2009起自共同的分支。中国和悉尼G II .4/Sydney 2012代表株的A、D、E抗原表位氨基酸序列组合有两种:TSRN-GTT-SNT和TSRN-STT-SNT。结论 G II .4/Sydney 2012株已在中国多个地区出现,各地区病毒株同源性较高。G II .4/Sydney 2012株的抗原表位氨基酸组合发生明显改变。

**【关键词】** 诺如病毒; G II .4基因型; 变异株; 衣壳蛋白基因

**Study on norovirus G II .4/Sydney 2012 variant in China** Mai Huan<sup>1</sup>, Gao Yan<sup>1</sup>, Pan Xiaoben<sup>2</sup>, Han Jinchao<sup>2</sup>, Cong Xu<sup>2</sup>, Wei Lai<sup>1</sup>. 1 Department of Infectious Diseases, 2 Institute of Hepatology, People's Hospital, Peking University, Beijing 100044, China  
Corresponding author: Gao Yan, Email: gaoyan6384@163.com

**【Abstract】 Objective** To study the nucleotide and amino acid sequences of norovirus G II .4/Sydney 2012 variants, in China. **Methods** Twenty-two stool specimens, confirmed as G II .4/Sydney 2012- positive were collected from Beijing in the winter of 2012-2013. RT-PCR was performed to target the complete capsid gene. G II .4/Sydney 2012 strains from other regions in China were searched and obtained from the GenBank. Nucleotide and amino acid sequences of G II .4/Sydney 2012 strains were analyzed, using the CLUSTAL X (Version 1.83) and followed by phylogenetic analysis using Mega version 5.1. **Results** The complete major capsid nucleotide sequences of thirty-eight G II .4/Sydney 2012 strains from seven regions in China were obtained. The VP1 nucleotide and amino acid sequences diversity were 0.1%-3.3% and 0-3.1%, respectively. Result from phylogenetic analysis demonstrated that the G II .4/Sydney 2012 variant shared a common ancestor with both the dominant norovirus G II .4 variants Apeldoorn 2008 and the New Orleans 2009. G II .4/Sydney 2012 variants appeared to have had two A/D/E site combinations at the amino acid level, TSRN-GTT-SNT and TSRN-STT-SNT. **Conclusion** G II .4/Sydney 2012 variant had been circulating in many regions in China. There seemed a high nucleotide and amino acid identity among G II .4/Sydney 2012 strains collected from China. G II .4/Sydney 2012 variants showed different A/D/E site combination from other pandemic G II .4 variants.

**【Key words】** Norovirus; G II .4 genotype; Variant; Capsid gene

诺如病毒(NoV)是世界范围内暴发性或散发性胃肠炎最常见的病原体之一<sup>[1-3]</sup>。其中G II .4型最常见的基因型,约占暴发疫情的60%~80%,且每2~3年出现新变异株<sup>[4]</sup>。2012年多个国家(英国、荷兰、

日本、澳大利亚、法国、新西兰和美国)监测系统表明NoV疫情较往年有所增加<sup>[5,6]</sup>,且与一种G II .4新变异株-G II .4/Sydney 2012有关<sup>[5-7]</sup>。目前有限的监测数据表明G II .4/Sydney 2012株很有可能成为继New Orleans 2009株后新的流行株,引起世界范围的NoV大流行。本研究先期报道G II .4/Sydney 2012株是北京地区2012—2013年冬季散发性NoV胃肠炎的优势株<sup>[8]</sup>,其他地区(香港、上海等)也相继

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.02.012

作者单位: 100044 北京大学人民医院感染科(买欢、高燕、魏来), 肝病研究所(潘孝本、韩进超、丛旭)

通信作者: 高燕, Email: gaoyan6384@163.com

发现了G II.4/Sydney 2012株的流行<sup>[9,10]</sup>。为此本研究分析2012年后我国7个地区(北京、上海、江苏、湖州、荆州、香港、台湾)发现的G II.4/Sydney 2012株的核苷酸和氨基酸序列,以了解新流行株在我国的基因组特点及在G II.4型谱系中的变异特征。

### 资料与方法

1. 标本来源:来自前期研究采自2012年11月至2013年3月北京大学人民医院感染科肠道门诊171份急性腹泻患者粪便标本,其中26份经RT-PCR检测NoV阳性<sup>[8]</sup>。经衣壳蛋白C区序列比对获得G II.4/Sydney 2012病毒株阳性粪便标本22份。本研究遵守赫尔辛基宣言的伦理学标准并通过北京大学人民医院伦理委员会审批。

2. 核苷酸序列扩增和测序:将G II.4/Sydney 2012阳性粪便标本分装至含PBS(pH 7.4)溶液的离心管内,制成10%粪便悬浊液。采用QIAamp Viral RNA Mini试剂盒(Qiagen, Hilden, Germany),按照说明书方法提取病毒RNA。采用反转录酶Superscript III™和引物VN<sub>3</sub>T<sub>20</sub>反转录cDNA,反应条件为55℃ 100 min, 99℃ 5 min。PCR采用引物COG2F和VN<sub>3</sub>T<sub>20</sub>,使用Platinum Taq DNA聚合酶进行全衣壳蛋白区核苷酸序列扩增,反应条件为93℃ 3 min, (93℃ 15 s, 62℃ 3 min, 72℃ 30 s) × 35, 72℃ 15 min。

PCR产物交英潍捷基(上海)贸易有限公司正向测序,测序和扩增引物见表1。使用Seqman v8.0软件(Lasergene, Madison, WI)对测序结果进行拼接,使用Mega 5.1软件对核苷酸序列比对修剪,获得全衣壳蛋白区核苷酸序列。

3. VP1核苷酸序列系谱分析:为了分析我国G II.4/Sydney 2012株的分子生物学特点,从

GenBank获得22份(截止2013年12月12日)有完整VP1序列的中国其他地区G II.4/Sydney 2012株,并以1974—2012年世界范围内流行的G II.4病毒株作为参考株。使用Mega 5.1软件对核苷酸序列比对,采用最大似然法构建进化树,对核苷酸序列重复抽样,bootstrap值为1 000。

4. VP1与VP2氨基酸序列突变位点分析:挑选我国G II.4/Sydney 2012代表株12株(KC456070、KC456073、KC577175、KC473544、KC473546、KF306214、KC175323、KC631827、KC517370、KC517364、PKUPH-19/Beijing/Nov-2012和PKUPH-160/Beijing/Mar-2013)和10株(KC577175、KF306214、KC175323、KC631827、KC517370、KC517364、KC517361、KC517378、PKUPH-19/Beijing/Nov-2012和PKUPH-160/Beijing/Mar-2013),分别与往年G II.4代表株[Camberwell 1994 (AF145896), US95/96 1997 (AY741811), Farmington Hills 2002 (AY502023), Hunter 2004 (DQ078814), 2006a (EF187497), 2006b (EF684915), Apeldoorn 2008 (HQ009513), New Orleans 2009 (GQ845367), Sydney 2012 (JX459908、JX459907)]进行VP1和VP2氨基酸序列比对(使用Clustal W软件),导入Excel分析氨基酸变异。

### 结 果

1. G II.4/Sydney 2012株:22份证实有G II.4/Sydney 2012株的北京地区标本中,有16份成功获得全衣壳蛋白核苷酸序列。从GenBank检索到2012年1月1日至2013年12月12日中国6个地区(上海、江苏、湖州、荆州、香港和台湾)发现的G II.4/Sydney 2012株(至少有完整VP1核苷酸序列)共22份。

2. 系谱分析:将38株中国地区G II.4/Sydney 2012株与1974—2012年其他G II.4流行株进行VP1核苷酸序列分析(图1)。结果表明,中国的G II.4/Sydney 2012株与JX459908的核苷酸差异为0.7%~2.3%,氨基酸差异为0.4%~2.0%。来自中国7个地区的G II.4/Sydney 2012株之间VP1核苷酸差异为0.1%~3.3%,氨基酸差异为0~3.1%。G II.4/Sydney 2012株由往年G II.4流行株进化而来,

表1 本研究中用于全衣壳蛋白区VP核苷酸序列扩增和测序的引物

引物	序列(5'~3') <sup>a</sup>	方向	核苷酸位置 <sup>b</sup>	用途
COG2F	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	正向	5003	扩增、测序
87-2.F	CCAGGTGAAATACTATGGAG	正向	5298	测序
161.W1F	TTCTAGTGCCACCCACAGTT	正向	5725	测序
7.W1F	AAGAAATCCCAGCCCTCTA	正向	6028	测序
4.W1F	GGAAGATTCAAGGCGTGCTC	正向	6067	测序
161.W2F	TGCAGTACTTCTACCAAGAG	正向	6457	测序
5.W2F	GGGGCCATCAACCAAAAAGT	正向	6785	测序
4.W2F	AATTGCAACAAGCATCCTTC	正向	6825	测序
1610.W3F	CAACGAGACTTGGTTCTACA	正向	7230	测序
VN <sub>3</sub> T <sub>20</sub>	GAGTGACCGCGCCGC-(T <sub>20</sub> )	反向	多聚A尾	扩增

注:<sup>a</sup> 简并碱基有N(A、C、T或G),B(C、G或T),R(A或G)和Y(T或C);<sup>b</sup> 引物核苷酸位置是相对于参考株G II.4/Farmington Hills 2002(GenBank登录号为AY502023)

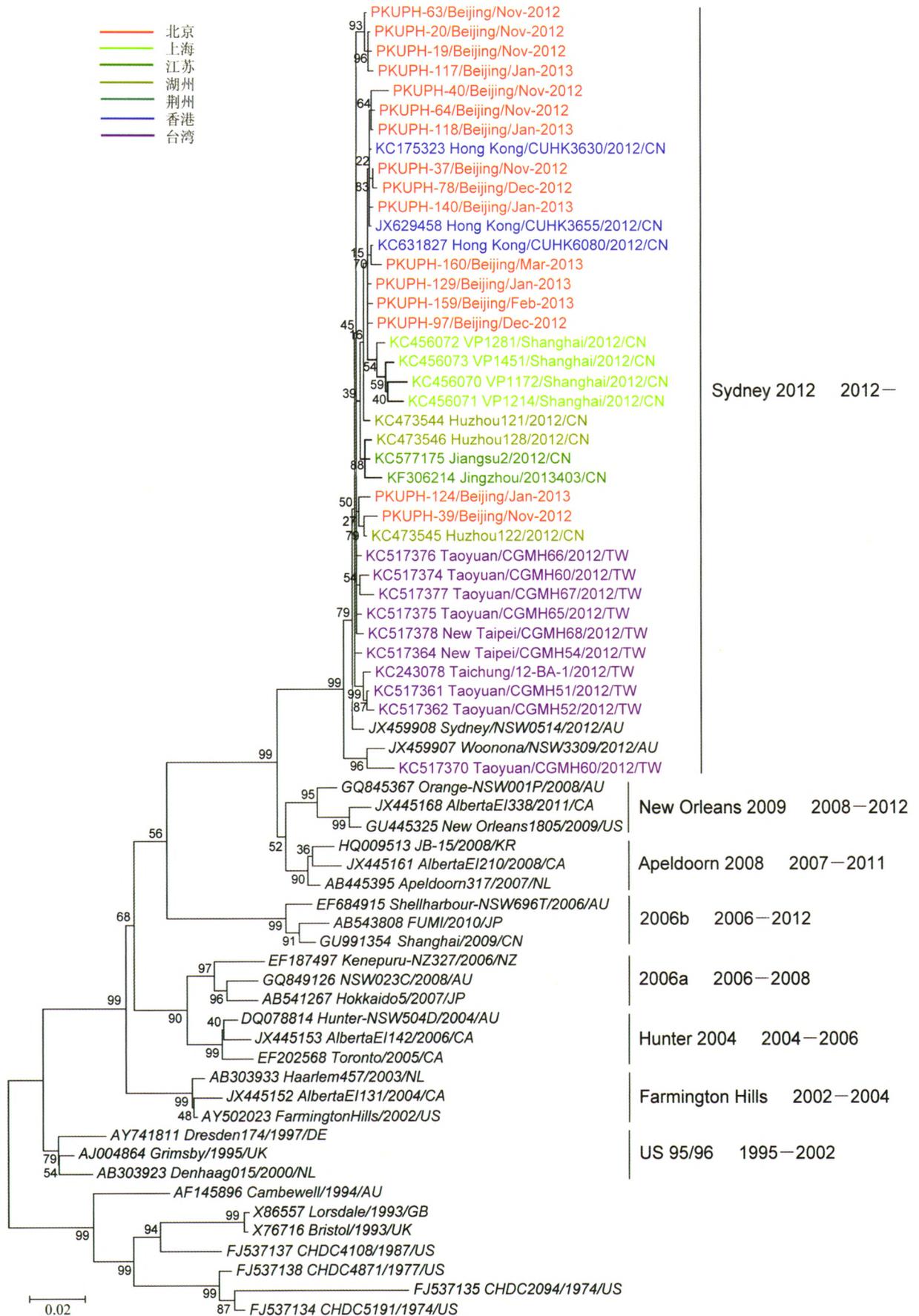


图1 中国7个地区的G II.4/Sydney 2012株与1974—2012年G II.4流行株的VP1核苷酸序列(1 623 bp)系谱分析

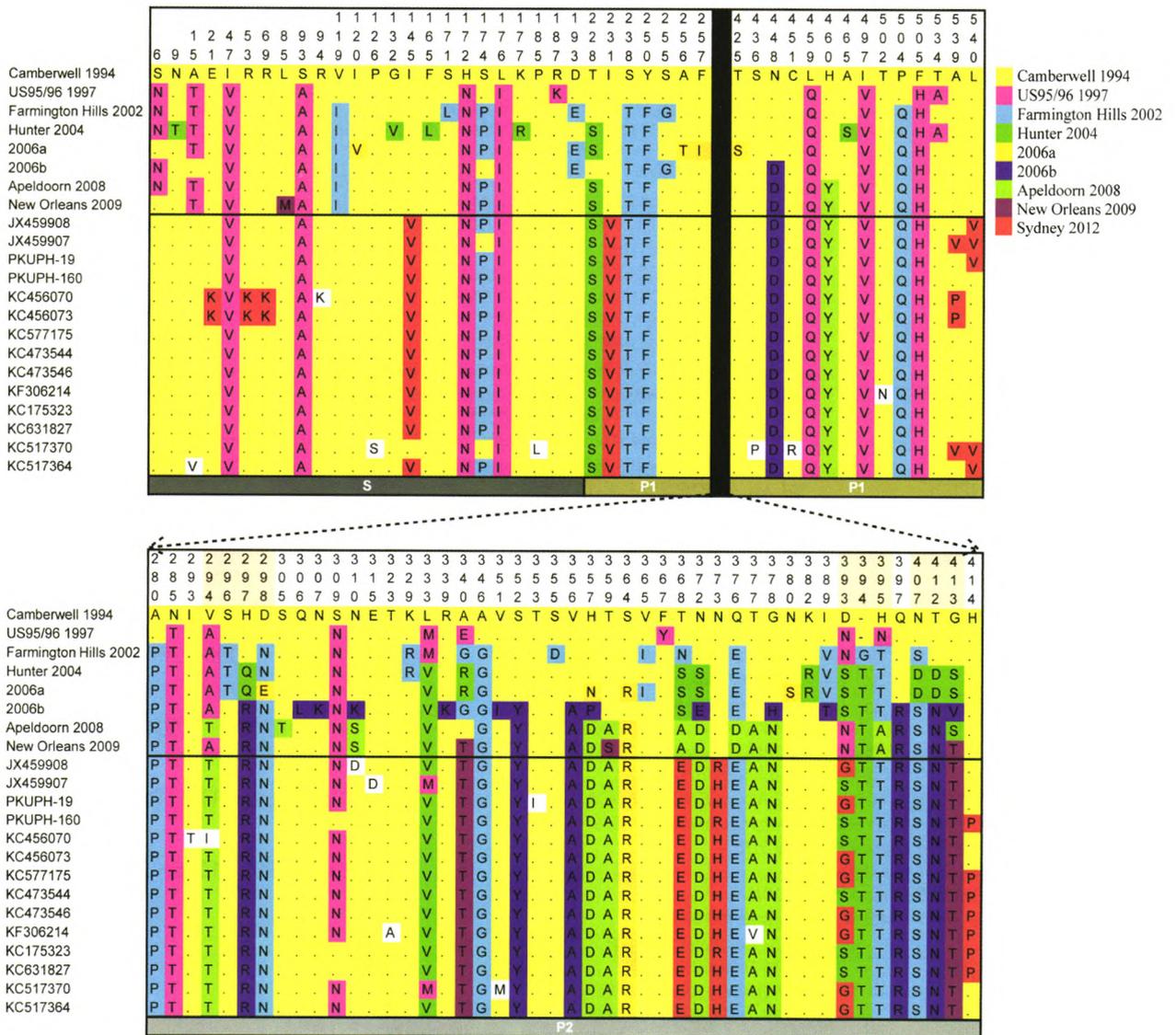
与 Apeldoorn 2008 和 New Orleans 2009 起自共同的分支, Sydney 2012 (JX459908) 与 Apeldoorn 2008 (HQ009513)、New Orleans 2009 (GQ845367) 的核苷酸同源性分别为 95.4% 和 95.3%, 氨基酸同源性分别为 97.2% 和 97.4%。

3. VP1 和 VP2 氨基酸序列中的突变: 将来自中国和悉尼的 G II.4/Sydney 2012 株与 1994—2012 年其他 G II.4 流行株进行 VP1 氨基酸序列比对, 共检测到 91 个发生非同义突变的位点, 占 VP1 序列 540 个氨基酸残基的 16.9% (图 2), 其中 50.5% (46/91) 的位点在 P2 区。G II.4/Sydney 2012 株有 13 个新出现的非同义突变 (仅 1 次的突变除外), 其中 P2 区有 5 个 (38.5%, 5/13) 突变。A 位 (294、296~298)、D 位 (393~395) 和 E 位 (407、412~413) 是 NoV 的重要抗

原表位, 可见随时间推移, G II.4 流行株在这 3 个表位的氨基酸序列不断发生改变。G II.4/Sydney 2012 株在 A、D 和 E 位的氨基酸序列分别为 TSRN、GTT/STT 和 SNT。来自中国和悉尼的 G II.4/Sydney 2012 株与 1994—2012 年其他 G II.4 流行株进行 VP2 氨基酸序列比对, 共检测到 71 个发生非同义突变的位点, 占 VP2 序列 268 个氨基酸残基的 26.5% (图 3)。G II.4/Sydney 2012 株有 6 个新出现的非同义突变 (仅 1 次的突变除外)。

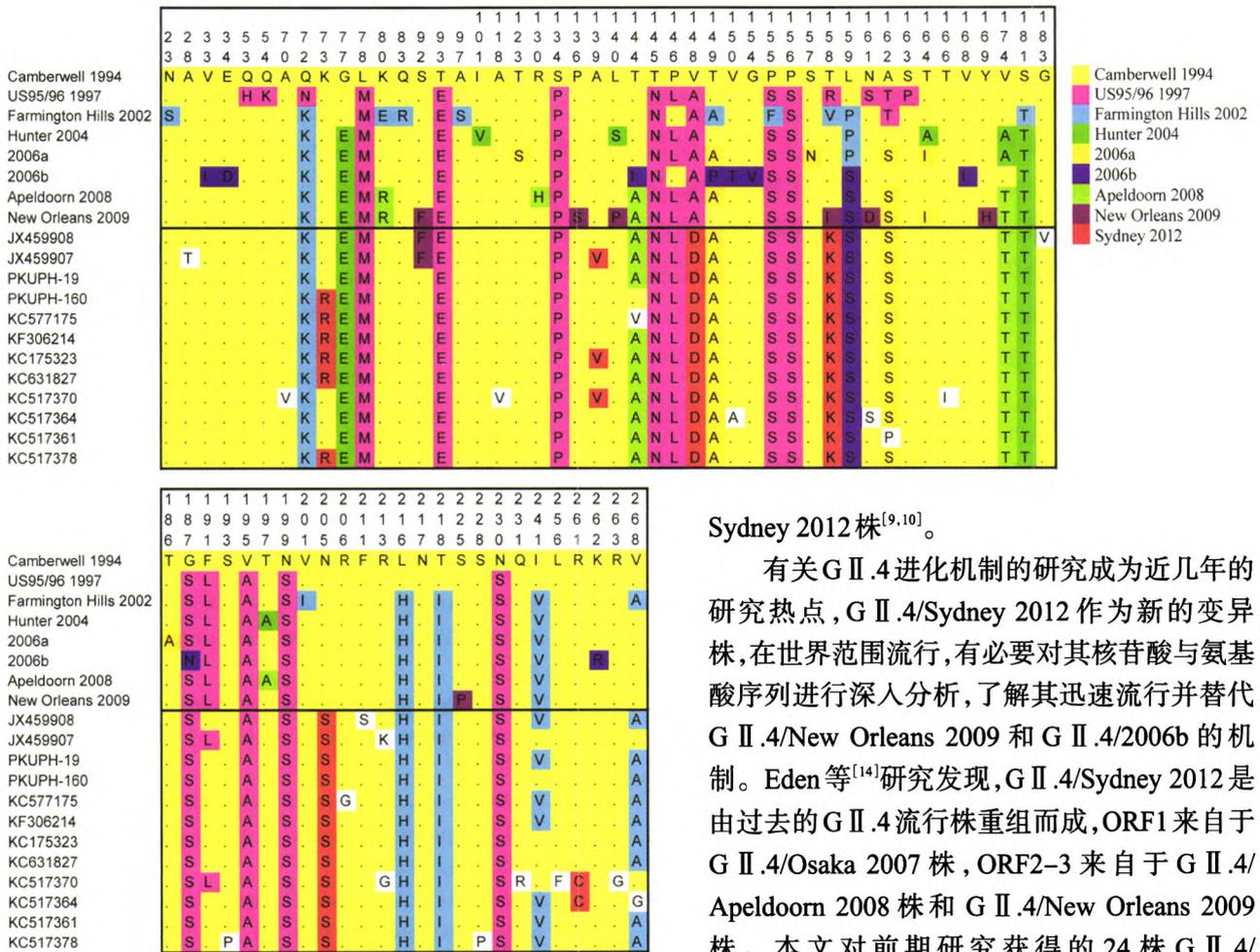
### 讨 论

过去 20 年间, NoV 至少造成 4 次世界范围的大流行, 依时间顺序分别是 US95/96 (1995—1996 年)、Farmington Hills (2002 年)、Hunter (2004 年)、2006b



注: 白色表示在 G II.4/Sydney 2012 病毒株中仅出现一次的非同义突变; 浅粉色表示重要抗原表位 A 位 (294、296~298)、D 位 (393~395) 和 E 位 (407、412~413)

图 2 1994—2013 年 G II.4 病毒株 VP1 区的氨基酸变异



注:同图2

图3 1994—2013年G II.4病毒株VP2区的氨基酸变异

株(2006年)<sup>[11]</sup>。2009年一种G II.4/2006变异株——G II.4/New Orleans 2009株逐渐代替G II.4/2006b成为流行株。2009年10月G II.4/New Orleans 2009开始出现并迅速流行,在11月占CaliciNet记录NoV疫情约56%,而G II.4/2006b株仍以低水平流行<sup>[11]</sup>。2012年3月出现一种新的G II.4变异株——G II.4/Sydney 2012,并报道于2012—2013年冬季在欧洲多个国家及日本、美国等疫情多由G II.4/Sydney 2012变异株引起。丹麦一项研究发现,在当地G II.4/Sydney 2012株自2012年1月开始出现,引起少数疫情,在10月后G II.4/Sydney 2012株相关疫情数快速增加并成为优势株<sup>[12]</sup>。本文前期研究中发现,2012—2013年冬季G II.4/Sydney 2012株已在北京地区流行,占散发性成人NoV腹泻的近85%<sup>[8]</sup>。桑少伟等<sup>[13]</sup>报道2009年4月至2011年11月北京地区急性NoV腹泻的流行株为G II.4/2006b和G II.4/2006a,表明G II.4/Sydney 2012株在2012年开始在北京地区流行,并在2012—2013年冬季成为NoV最主要的流行株。香港、上海等地也检测出G II.4/

Sydney 2012株<sup>[9,10]</sup>。

有关G II.4进化机制的研究成为近几年的研究热点,G II.4/Sydney 2012作为新的变异株,在世界范围流行,有必要对其核苷酸与氨基酸序列进行深入分析,了解其迅速流行并替代G II.4/New Orleans 2009和G II.4/2006b的机制。Eden等<sup>[14]</sup>研究发现,G II.4/Sydney 2012是由过去的G II.4流行株重组而成,ORF1来自于G II.4/Osaka 2007株,ORF2-3来自于G II.4/Apeldoorn 2008株和G II.4/New Orleans 2009株。本文对前期研究获得的24株G II.4/Sydney 2012病毒株进行衣壳蛋白区扩增和测序,共得到16株的全衣壳蛋白核苷酸序列。目前从GenBank获得中国其他地区(上海、江苏、湖州、荆州、香港和台湾)检测到的G II.4/Sydney 2012株22份。从中可见近20年来G II.4型流行株VP1区核苷酸序列随时间的变异和进化,G II.4/Sydney 2012株可能由G II.4/Apeldoorn 2008和G II.4/New Orleans 2009共同变异而来。来自中国7个地区的G II.4/Sydney 2012株之间VP1核苷酸差异为0.1%~3.3%,氨基酸差异为0%~3.1%,说明中国各地区的G II.4/Sydney 2012株同源性较高。

本研究在氨基酸水平上对新出现及往年的G II.4流行株的VP1和VP2区的多样性进行分析,VP1区中50.5%(46/91)的非同义突变位点在P2区,说明P2区更易产生非同义突变。Lindesmith等<sup>[11,15-17]</sup>长期研究发现P2区中的A位(294、296~298)、D位(393~395)和E位(407、412~413)是NoV的主要抗原表位,在NoV的抗原性和宿主结合模式上起着决定性的作用。图2发现中国和悉尼的G II.4/Sydney 2012代表株的A、D、E抗原表位的氨基酸序列组合有两种:TSRN-GTT-SNT和

TSRN-STT-SNT。GTT为G II.4/Sydney 2012株主要的D位氨基酸序列,而STT在2004—2007年(Hunter 2004、2006a和2006b流行期间)已经成为主要的D位氨基酸序列<sup>[18]</sup>。A位和E位分别与Apeldoorn 2008和New Orleans 2009有相同的氨基酸序列。说明G II.4/Sydney 2012代表株的抗原表位氨基酸序列组合发生明显改变,可能是该病毒株迅速流行并引起NoV疫情增加的原因。

#### 参 考 文 献

- [1] Atmar RL. Noroviruses — State of the Art[J]. Food Environ Virol, 2010, 2(3): 117–126.
- [2] Lopman B, Zambon M, Brown DW. The evolution of norovirus, the “gastric flu”[J]. PLoS Med, 2008, 5(2): e42.
- [3] Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, et al. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis [J]. Emerg Infect Dis, 2008, 14(8): 1224–1231.
- [4] Yang Y, Xia M, Tan M, et al. Genetic and phenotypic characterization of G II.4 noroviruses that circulated during 1987 to 2008 [J]. J Virol, 2010, 84(18): 9595–9607.
- [5] van Beek J, Ambert-Balay K, Botteldoorn N, et al. Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012 [J]. Euro Surveill, 2013, 18(1): 8–9.
- [6] Centers for Disease Control and Prevention. Emergence of new strain G II.4 Sydney—United States, 2012 [J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2013, 62(3): 55.
- [7] Bennett S, Maclean A, Miller R, et al. Increased norovirus activity in Scotland in 2012 is associated with the emergence of a new norovirus G II.4 variant [J]. Euro Surveill, 2013, 18(2): pii= 20349.
- [8] Mai H, Jin M, Guo X, et al. Clinical and epidemiologic characteristics of norovirus G II.4 Sydney during winter 2012–13 in Beijing, China following its global emergence [J]. PLoS One, 2013, 8(8): e71483.
- [9] Chan MC, Chan PK. Complete genome sequence of a novel recombinant human norovirus genogroup II genotype 4 strain associated with an epidemic during summer of 2012 in Hong Kong [J]. Genome Announc, 2013, 1(1): e00140–12.
- [10] Shen Z, Qian F, Li Y, et al. Novel norovirus G II.4 variant, Shanghai, China, 2012 [J]. Emerg Infect Dis, 2013, 19(8): 1337–1339.
- [11] Lindesmith LC, Costantini V, Swanstrom J, et al. Emergence of a norovirus G II.4 strain correlates with changes in evolving blockade epitopes [J]. J Virol, 2013, 87(5): 2803–2813.
- [12] Fonager J, Hindbaek L, Fischer T. Rapid emergence and antigenic diversification of the norovirus 2012 Sydney variant in Denmark, October to December, 2012 [J]. Euro Surveill, 2013, 18(9): pii= 20506.
- [13] Sang SW, Zhao ZT, Suo JJ, et al. Study on the molecular epidemiological characteristics of norovirus in acute gastroenteritis of Beijing [J]. Chin J Epidemiol, 2013, 34(3): 263–266. (in Chinese)  
桑少伟, 赵仲堂, 索继江, 等. 北京地区急性胃肠炎患者诺如病毒分子流行病学调查 [J]. 中华流行病学杂志, 2013, 34(3): 263–266.
- [14] Eden JS, Tanaka MM, Boni MF, et al. Recombination within the pandemic norovirus G II.4 lineage [J]. J Virol, 2013, 87(11): 6270–6282.
- [15] Lindesmith LC, Donaldson EF, Lobue AD, et al. Mechanisms of G II.4 norovirus persistence in human populations [J]. PLoS Med, 2008, 5(2): e31.
- [16] Lindesmith LC, Donaldson EF, Baric RS. Norovirus G II.4 strain antigenic variation [J]. J Virol, 2011, 85(1): 231–242.
- [17] Lindesmith LC, Beltramello M, Donaldson EF, et al. Immunogenetic mechanisms driving norovirus G II.4 antigenic variation [J]. PLoS Pathog, 2012, 8(5): e1002705.
- [18] Zakikhany K, Allen DJ, Brown D, et al. Molecular evolution of G II.4 norovirus strains [J]. PLoS One, 2012, 7(7): e41625.

(收稿日期:2013-08-19)

(本文编辑:张林东)

## · 书 讯 ·

### 《社会心理流行病学》现已出版

由山西医科大学曲成毅教授主编的《社会心理流行病学》一书已由人民卫生出版社出版发行。本书是我国首部关于社会心理流行病学研究方法的专著,分上下两篇。上篇重点介绍基本原理和方法,包括人群调查研究设计(现场观察、现场调查、档案研究、分析性研究、实验研究等)、问卷及量表的编制技术、心理现象的测量及生物学指标(分子生物学、电生理、代谢、内分泌等)、资料分析方法(通径分析、潜变量交互作用分析、支持向量机模型分析等);下篇介绍具有代表性的社会心理流行病学研究成果,包括突发事件与心理应激、认知障碍、抑郁、自杀、成瘾、暴力、性心理、职业压力等。力图以通俗易懂的方式突出这一学科领域思维和方法的特色,实际工作者带着这本书就能在现场开展有关社会心理流行病学领域的研究。本书的读者应当具有基本流行病学理论知识,主要读者群是医学、心理学、社会学、人口学及其他相关学科教学、科研人员及基层实践人员,相关领域的研究生和本科生会对本书更感兴趣。