

广州市 2010 年新发现一株基孔肯雅病毒基因特征研究

白志军 罗雷 杨智聪 狄飏 王鸣

【关键词】 基孔肯雅病毒; 序列

Determination and analysis of genomic sequences on a new emerged Chikungunya virus strain isolated in Guangzhou, 2010 Bai Zhijun, Luo Lei, Yang Zhicong, Di Biao, Wang Ming. Guangzhou Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 510440, China

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.06.033

基金项目: 国家“十二五”科技重大专项(2012ZX10004213-005); 广州市医药卫生科技项目(20131A011115, 201102A212006); 广州市科技和信息化局项目(2012Y2-00020); 广东省科学技术厅项目(2012B040304002)

作者单位: 510440 广州市疾病预防控制中心

通信作者: 狄飏, Email: biao65di@yahoo.com

Corresponding author: Di Biao, Email: biao65di@yahoo.com

This work was supported by grants from the National Science and Technology Major Project of China for “Twelfth Five-Year Plan” (No. 2012ZX1004213-005), Science and Technology Program of Guangzhou Health Department (No. 20131A011115, No. 201102A212006), Key Science Technology Brainstorm Project of Guangzhou (No. 2012Y2-00020) and Science and Technology Program of Guangdong Province (No. 2012B040304002).

【Key words】 Chikungunya virus; Sequence

基孔肯雅热(CHIK)是由CHIK病毒(CHIKV)经伊蚊传播的一种急性传染病。2010年广州市疾病预防控制中心监

测到 1 名疑似登革热发热症状的患者, 血样经实验室检测显示登革病毒核酸为阴性, CHIKV 核酸为阳性, 继而分离获得 1 株 CHIKV。采用 RT-PCR 扩增此毒株的全基因并测序, 与 GenBank 中的中国地区和全球代表株进行全基因进化分析, 以了解其序列特征和可能的传播来源。

1. 材料与与方法:

(1) 标本及试剂来源: 2010 年 6 月 25 日广州市疾病预防控制中心实验室接收广州机场检疫部门上送当日采集的疑似登革热发热患者(男, 29 岁, 尼日利亚籍, 6 月 23 日发病以发热为主, 6 月 25 日出现踝关节疼痛, 无皮疹)血清标本 1 份。PMD19-T 载体、凝胶回收试剂盒、Taq 酶、DNA 连接酶, RNA 酶购自大连宝生物科技有限公司, Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司, 一步法 RT-PCR 试剂盒购自美国 Promega 公司, 登革病毒核酸通用荧光 PCR 法测定试剂盒购自中山大学达安基因股份有限公司, CHIKV 核酸荧光 PCR 法测定试剂盒购自上海之江生物科技有限公司。

(2) 引物设计与合成: 参考 CHIKV 坦桑尼亚株(S27, GenBank 登录号: AF369024.2) 基因组序列, 用 Premier Primer 5.0 软件分别设计合成 16 对引物, 涵盖全长, 扩增片段长度为 800 ~ 1 100 bp, 引物序列见表 1, 由中国科学院北京基因组研究所合成。

(3) 病毒培养、RT-PCR 扩增及产物克隆: 取 100 μl 血清标本, 按照荧光 PCR 试剂盒说明书在美国 ABI 公司 7500 荧光定量 PCR 仪上进行登革病毒核酸和 CHIKV 核酸检测; 血清接种到 C6/36 白纹伊蚊细胞中, 29 °C 培养, 7 d 后传代, 连续传代 3 次, 取细胞培养上清液, 按照说明用 Trizol 试剂提取病毒 RNA; 用一步法 RT-PCR 试剂盒进行 RT-PCR, 产物经凝胶电泳鉴定, 阳性条带用 DNA 凝胶回收试剂盒切胶回收, 纯化物与 PMD19-T 载体连接, 转化 JM109 宿主菌 37 °C 培养过夜, 挑取白色菌落接种含 LB 培养基, 煮沸裂解; 取 1 μl 用 PCR 进行初步鉴定, 产物经凝胶电泳验证, 由中国科学院北京基因组研究所完成测序。

(4) 基因组序列同源性和进化分析: 采用 DNASTar 软件中的 Seqman 程序对测序片段进行拼接及同源性分析; 应用 MegAlign 程序将分离的广州毒株全基因序列与 GenBank 中关于我国本土分离获得的 CHIKV 进行序列碱基和氨基酸的同源性比对; 应用 Mega 5.0 软件将以上我国分离获得的毒株序列与其他作为参考的各基因型病毒株全序列(均源自 GenBank) 采用 ClustalW 方法进行多重序列比对, 构建系统进化树。

2. 结果:

(1) 标本核酸检测: 应用荧光 PCR 法对标本进行登革病毒和 CHIKV 核酸检测, 结果显示登革病毒核酸阴性

和 CHIKV 核酸阳性。

(2) C6/36 细胞分离培养病毒: 血清标本用 C6/36 细胞进行分离培养, 在第 2 和 3 次传代过程中, 均在第 4 天出现明显聚堆、多细胞融合现象。

(3) PCR 扩增全基因序列和片段克隆: PCR 产物经电泳和紫外观察, 各产物分子质量为 800 ~ 1 100 bp, 与预期相符, 回收后片段克隆到 PMD19-T 载体。各重组质粒经 PCR 鉴定后, 各筛选 1 个插入片段和预期一致的克隆提取质粒供测序使用。

(4) 序列测定、基因组特征: 将测序结果应用 Seqman 程序进行拼接, 命名为“CHI2010”(GenBank 登录号: JQ067624.1) 的 CHIKV 的全基因组长度为 11 724 nt, 5' 及 3' 端各有一非编码区, 非结构基因和结构基因位于基因组 49 ~ 7 507 nt 和 7 575 ~ 11 284 nt 之间, 结构基因和非结构基因之间有 68 nt 的连接区为非编码区, 共编码 3 722 个氨基酸。

(5) 全基因序列的同源性分析和进化分析: CHI2010 与我国发现的 CHIKV (分别来自广东省的广州、阳江、东莞的 CHIKV 代表株 SD08Pan、FD080008、FD080231、GZ0991、DG893、GD113、GD115、GD134 和浙江省宁波 CHIKV 代表株(JC2012) 进行全序列比对, 碱基(氨基酸) 序列同源性为 93.1% ~ 97.7% (97.3% ~ 98.8%), 见表 2, 同源性均较低。将 CHI2010 全基因与参比株进行分析, 可见 CHI2010 毒株属于东/中/南非基因型(ESCA) 中的中非分支; 而用于比对的广州、阳江、东莞毒株均属 ESCA 型中印度洋分支; 宁波毒株则属亚洲基因型(图 1)。进化分析发现 CHI2010 与 CAR256 毒株遗传距离最近, 全基因同源分析显示, 碱基(氨基酸) 序列同源性为 98.6% (99.6%), 同源率相对较高。

3. 讨论: CHIKV 的进化遗传学研究发现, 其基因多样性正在增加, 导致产生大量不同毒力的病毒株^[1]。有报道发现 2010 年东莞市 CHIKV 流行株存在可疑的氨基酸变异位点, 即 nsP1 (T351A)、nsP3 (P355L)、E1 (S250P) 和 E2 (H313Y) 等位点^[2], 但本研究 CHI2010 毒株与东莞株全基因序列比对分

表 1 CHIKV PCR 引物序列

编号	全长位置	正向引物(5' ~ 3')	反向引物(5' ~ 3')
1	31 ~ 922	GTTTCTTACTGCTCTACTCTG	GCACGAAACCACTGTATCAC
2	724 ~ 1 728	CCTGACGGAAGGTAGACGAG	GGTTGGGCAGTAACCTTGATAG
3	1 563 ~ 2 484	AAGCAGAGGAAGAACGAGAA	AAGGCGATCAATGCAAGTAA
4	2 015 ~ 3 043	GCCCTGAACACCGACGAAG	ATGCTCCACCTCCCCTCTCT
5	2 706 ~ 3 889	TGGACACTACAGGCTCAAC	TCGTTCACTGGTTCTATCTG
6	3 546 ~ 4 560	AAAGAATGGAATGGCTGGTT	ACTTGGGTCCGCATCTGTAT
7	4 344 ~ 5 230	GAGAAGTCGAAAGGAGGTA	GTCGCATGTCACAGTCAGGT
8	5 116 ~ 6 094	AAGCGTTGACGCAAGATAC	GTCGGTGATTTGGTATGATGAA
9	5 843 ~ 6 884	AACAGAAGCAGGTATCAGTCG	CAGCCTCTATCAAGTCCAACA
10	6 543 ~ 7 591	ATGTGAAGGTGACTCCTGGTAG	AAGTTTGGGTTGGGATGAA
11	7 276 ~ 8 371	GGCAGGTGACGAACAAGAT	ACATAACTGGGATGGCAAGA
12	7 957 ~ 8 939	GGGGACAAAGTAATGAAACC	GGGTCTGGTGAAATGG
13	8 649 ~ 9 680	CATCAGAAATGAAGCGACAG	GACAGGAGTATGAACGAGGC
14	9 404 ~ 10 366	ATCCTGACCACCAACACTC	GAGCCCTGTATGCTGATGC
15	10 113 ~ 11 147	AACGCTATCGTTGATTACAT	TCCTTCGGAGGGTGGC
16	10 958 ~ 11 782	TCAGCAAGAAAGCAAGTGT	CGGAGAATCGTGAAGAGTT

表2 广州CHIKV-CHI2010全基因核苷酸及推导氨基酸的同源性比较(%)

Table with 11 columns: Strain, CHI2010, CHIKV-JC2012, GD134, GD115, GD113, DG893, GZ0991, SD08Pan, FD080008, FD080231. Rows list various CHIKV strains and their percentage similarity to CHI2010.

注:CHI2010(2010、广州); CHIKV-JC2012(2012、宁波); GD134(2010、阳江); GD115(2010、东莞); GD113(2010、东莞); DG893(2010、东莞); GZ0991(2010、广州); SD08Pan(2008、广州); FD080008(2008、广州); FD080231(2008、广州)

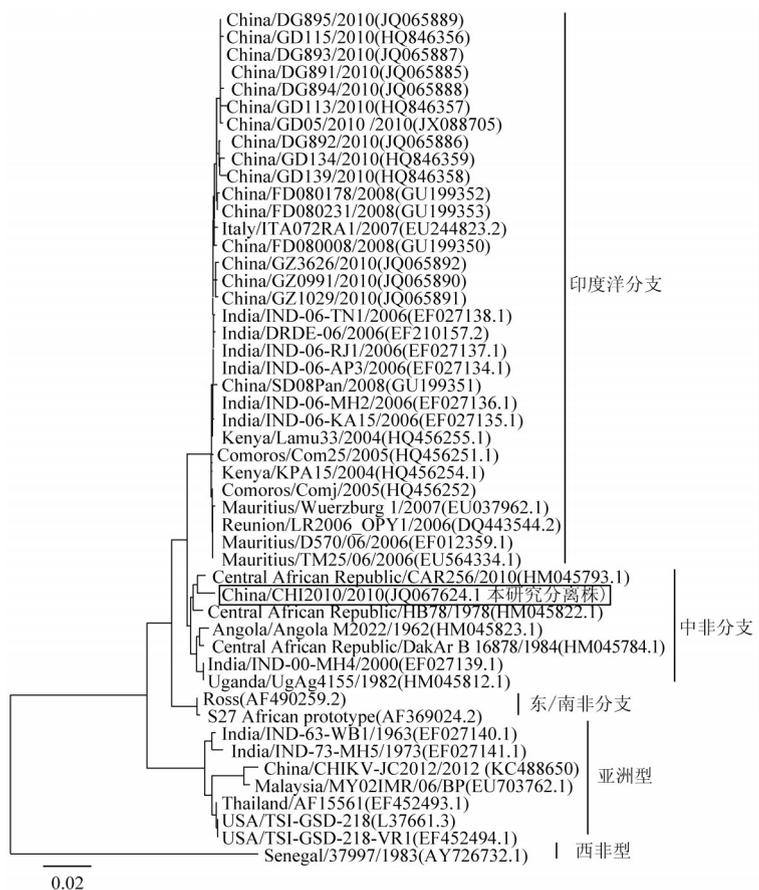


图1 基于全基因绘制的CHIKV系统进化树

析显示,CHI2010序列中未发现以上变异位点;此外,国内外学者多次报道1个重要的变异位点[3,4],即“可能导致白纹伊蚊对CHIKV高度易感,使病毒更容易感染蚊虫及更易在宿主细胞中复制的E1(A226V)”,在CHI2010株中也未发现变异,推测本研究分离的CHI2010属于人群流行中的弱毒株,不会引起疾病的大流行。

文献[5]报道,通过基因系统进化分析可将CHIKV分为3个基因型:西非型、亚洲型和ESCA型。西非型包含了全部西非的分离株;亚洲型均为亚洲分离株;东、中、南部非洲的分离株构成了ESCA型。本研究的毒株CHI2010与同年地

域相邻的广东省东莞市CHIKV流行株进行基因全序列进化分析,结果显示CHI2010与东莞流行株同属于ESCA型,却不在同一分支;CHI2010与其他国内流行株也不在同一分支。毒力位点分析研究结果也表明,相同基因型中不同分支的CHIKV流行株,其存在的氨基酸变异位点也不一定相同。

CHI2010与中非的CAR256毒株遗传距离较近,根据流行病学资料分析,CHI2010毒株来自一例从埃塞俄比亚至广州,且正处于发热状态的非洲尼日利亚籍旅客,可判定此病例并非在广州本地被感染。因此CHIKV与近年来我国的流行株传播链也不存在直接的关系,推断此病毒为非洲输入株。

参考文献

[1] Singh RK, Tiwari S, Mishra VK, et al. Molecular epidemiology of Chikungunya virus: mutation in E1 gene region [J]. J Virol Methods, 2012, 185(2): 213-220.
[2] Wu D, Zhang Y, Zhouhui Q, et al. Chikungunya virus with E1-A226V mutation causing two outbreaks in 2010, Guangdong, China [J]. Virol J, 2013, 2(10): 174.
[3] Priya R, Dhanwani R, Patro IK, et al. Differential regulation of TLR mediated innate immune response of mouse neuronal cells following infection with novel ECSA genotype of Chikungunya virus with and without E1: A226V mutation [J]. Infect Genet Evol, 2013, 20: 396-406.
[4] Arias-Goeta C, Mousson L, Rougeon F, et al. Dissemination and transmission of the E1-226V variant of chikungunya virus in Aedes albopictus are controlled at the midgut barrier level [J]. PLoS One, 2013, 8(2): e57548.
[5] Powers AM, Brault AC, Tesh RB, et al. Re-emergence of Chikungunya and o'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships [J]. J Gen Virol, 2000, 81: 471-479.

(收稿日期:2013-12-16)

(本文编辑:万玉立)