

河南省手足口病例肠道病毒 71 型分离株的全基因组序列分析

张绍丽 许汴利 郭万申 陈立 卫海燕 杜燕华 李幸乐

【摘要】 目的 对 2008 年河南省手足口病患者体内分离的肠道病毒 71 型(EV71)进行全基因组核苷酸序列测定。方法 采用 RT-PCR 扩增覆盖全基因组的 8 个重叠基因片段,双向测序, DNASTar 软件中的 MegAlign 等软件进行同源性分析, MEGA3 软件进行进化树分析和做图。结果 8 个重叠基因片段序列拼接得到 EV71 全基因组序列,共 7405 个核苷酸,与其他 EV71 病毒基因组构成相似,在非编码区有核苷酸的插入和缺失。同源性分析:在 P1 区, HENAN08 株与安徽株(AnhuiFY08)、深圳株(SHZH98 和 SHZH03)、浙江株(Zhejiang08)等毒株的核苷酸和氨基酸同源性分别大于 91%和 97%;与标准株(BrCr)和台湾流行株(TW2086)的核苷酸和氨基酸同源性分别大于 75%和 82%;与 Coxsackievirus A16(Cox.A16)的同源性最低,为 68.7%和 79.6%。在 P2 和 P3 区, HENAN08 株与其他国内 EV71 株的同源性均较高,而与 BrCr 以及 TW2086 的同源性低于 Cox.A16。P1 区遗传进化分析表明: HENAN08 株与 AnhuiFY08 和 Zhejiang08 的进化关系都密切,与 Cox.A16 疏远。结论 HENAN08 属 EV71 病毒的 C4 亚型,与 AnhuiFY08、Zhejiang08 和 SHZH03 进化途径类同。

【关键词】 肠道病毒 71 型; 全基因组; 序列分析

Complete genome sequencing of enterovirus 71 (EV71) HENAN08 strain isolated in Henan province ZHANG Shao-li, XU Bian-li, GUO Wan-shen, CHEN Li, WEI Hai-yan, DU Yan-hua, LI Xing-le. College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

【Abstract】 Objective To sequence the whole-genome of enterovirus 71 (EV71) strain isolated from patient with hand, foot and mouth in Henan province in 2008. Methods Eight overlapping clones covering the whole viral genome were obtained by RT-PCR and the sequences were determined by Sanger dideoxy-mediated chain termination method. Results Data it showed that the full length of enterovirus 71 (EV71) HENAN08 genome (not including Poly A tail) is 7405 bp. No deletion or insertion was detected in the coding region. There were several deletions and insertions in 5' UTR and 3' UTR regions. In P1 region, HENAN08 strain shared high homology with AnhuiFY08 strain, Zhejiang08 strain and SHZH strains (SHZH98, SHZH03) but low homology with Cox. A16. In P2 and P3 regions, HENAN08 strain shared higher nucleotide homology with Cox. A16 (81.7% and 83.7%) than that with BrCr and TW2086 strains. The phylogenetic analysis based on P1 region demonstrates that HENAN08 strain had the nearest genetic relationship with AnhuiFY and Zhejiang strains (isolated in 2008). Conclusion The HENAN08 strain might belong to the same genogroup with AnhuiFY08 and Zhejiang08 strains as C4 gene subtypes.

【Key words】 Enterovirus 71; Complete genome; Analysis of genome sequence

手足口病主要的病原体是新型肠道病毒 71 型(EV71)和柯萨奇病毒 A 组 16 型(Cox.A16)^[1,2]。其中以 EV71 为主要病原体的手足口病先后在马来西亚(1997)、中国台湾(1998)和新加坡(2000)等地引起大规模暴发,且因该病毒侵犯中枢神经系统而引起患者并发无菌性脑膜炎、脑炎、急性弛缓性麻痹、

呼吸道感染和心肌炎等症状而导致几百例病例死亡,引起世界各国关注和警惕。自 2008 年 3 月底以来,我国安徽省阜阳等地相继发生手足口病疫情,并从危重、死亡病例送检标本(肺、肠淋巴结、脑脊液、脾、胸腺、肾、脑、心、咽拭子)中分离出 EV71,判断此次疫情主要是由 EV71 感染所致^[3]。河南省与安徽省相邻,也有散发病例出现。河南省疾病预防控制中心(CDC)及所辖地区 CDC 对所报告病例均进行现场流行病学调查和标本采集,成功分离出 EV71 毒株,对分离株进行病毒全基因组核苷酸序列测定。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.09.019

作者单位: 450001 郑州大学公共卫生学院(张绍丽); 河南省疾病预防控制中心(许汴利、郭万申、卫海燕、杜燕华、李幸乐); 中国疾病预防控制中心(陈立)

材料与方 法

1. 毒株来源:待测病毒株是 2008 年河南省 CDC 分离并保存的病毒株之一,是从郑州市手足口病患儿的粪便中分离,经 ELISA 和 EV71 P1 区特异性引物的 RT-PCR 方法证实为 EV71 病毒,并经 RD 细胞扩增分离得到细胞毒 125 号 EV71 病毒株,该病毒株和 RD 细胞均由河南省 CDC 相关科室保存。

2. 实验试剂:RNA 提取试剂盒 (TIANGEN Viral RNA Mini Extraction Kit) 和 RT-PCR 试剂盒 (Quant One Step RT-PCR Kit) 均购自北京 TIANGEN BIOTECH 公司。PCR 扩增片段纯化回收采用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收法,试剂盒购自上海生工生物工程技术有限公司。其他生化试剂均为分析纯试剂。

3. 引物设计与合成:根据 GenBank 中安徽省阜阳市 2008 年新测的 3 株病毒株 (EU703812、EU703813 和 EU703814) 的序列,参考文献 [4, 5] 运用 Primer5.0 和 DNASTar 中的 MegAlign 软件设计了 8 对首尾相互重叠、覆盖全基因组的引物。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。引物序列见表 1。

位置		引物序列(5' ~ 3')
1 ~ 1193	F1	TTAAAACAGCCTGTGGGTTG
	R1	ACTTCCAGTACCATCCCTTG
1044 ~ 2241	F2	ATAGTCGGTTATGGTGAGTG
	R2	AATGAGTGTGTGATCCATGGT
2071 ~ 3281	F3	TGTTTACTGGATCCTTCATGGC
	R3	GCCAGCATAATTTGGGTTGGCT
3013 ~ 4326	F4	TGCCATTCATGTCACTGCCGA
	R4	CTAGGTACGACACATTCCCAAA
4149 ~ 5296	F5	ATCAGCAAATTTATTGATTGGCT
	R5	ATGACATACACCAACGAGACAAC
5239 ~ 6241	F6	TGCTTGTATGCAATCCATCGC
	R6	TAGCAGGCTCCTCCATGCTCAT
6003 ~ 6793	F7	ACCAAGTTAGAACCTAGTGT
	R7	CCCACCAAGCACAAATAGGTC
6640 ~ 7408	F8	AGGTTATGATGCCAGCCTTAGC
	R8	GCTATTCTGGTTATAACAAAT

4. 细胞毒总 RNA 的提取:把 EV71 病毒株经 RD 细胞扩大增殖得到的细胞毒反复冻融 3 次后,于 4℃ 2000 r/min 离心 10 min,取上清液 140 μl 按 RNA 提取试剂盒的说明书进行操作,剩余上清液放 -20℃ 以下保存备用。

5. RT-PCR 扩增覆盖全基因组的 8 条 cDNA 片段:RT-PCR 的反应体系 (50 μl):10×RT-PCR Buffer 5 μl, dNTPs 2 μl, 5×RT-PCR Enhancer 10 μl, Rnsin

0.5 μl, Hotmaster Taq Polymerase 2.5 μl, Quant Rtase 0.5 μl, Rnase-free ddH₂O 24.5 μl, Upstream primer 1 μl, Downstream primer 1 μl, Template RNA 3 μl。反应条件:50℃ 40 min, 94℃ 5 min, 94℃ 40 s, 50℃ 40 s, 65℃ 1 min, 共 35 个循环。最后在 65℃ 延伸 10 min。扩增产物用 0.5% 溴化乙锭染色, 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 回收纯化。

6. 病毒测序分型:将以上 8 对引物及回收产物送测序公司测序。所用测序仪器为 ABI PRISM 3730, 测序试剂为 BigDye terminator v3.1, 同时进行双向测定, 测序结果用 ATGC 软件进行编辑。

从 GenBank 中搜索一组序列比较接近的肠道病毒全基因组序列, 运用 Clustal (1.8) X、GeneDoc、DNASTar 软件中的 MegAlign 等软件进行序列间的核苷酸和氨基酸同源性比较, 同时用 MEGA3 软件进行进化树分析和做图。对该新型肠道病毒 EV71 毒株进行定型。

结 果

1. 病毒全基因组 cDNA 的构建和序列分析:以河南省 EV71 分离株为模板, 在预先设计的覆盖全基因组的 8 对引物作用下进行 RT-PCR 反应, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。结果表明, 病毒分离物在设计的 8 对引物的扩增后均能获得预计大小的片段。病毒全基因组分区连接如图 1。

经核苷酸序列测定发现, EV71 HENAN08 株全基因组 (未包括多聚腺苷酸尾) 长度为 7405 bp, 其中 A 占 27.01%, G 占 24.00%, T 占 24.92%, C 占 24.07%。腺嘌呤核苷酸和胸腺嘧啶核苷酸丰富 (A + T = 51.93%)。从基因组的 5' 末端开始有 742 个碱基的 5' 非编码区 (5' UTR), 与 SHZH98 株、BrCr 株、Zhejiang08 株和 TW2086 株 (743 个碱基) 不同。5' UTR 之后为 6579 bp 的编码区, 编码含 2193 个氨基酸的多聚蛋白, 其后为 84 个碱基的 3' 非编码区 (3' UTR)。与其他 EV71 毒株相比, HENAN08 株在编码区没有核苷酸的缺失和插入, 但在 5' UTR 和 3' UTR 区有缺失和插入存在。

2. 病毒基因组核苷酸同源性比较:EV71 HENAN08 株与其他 EV71 毒株及 Cox.A16 核苷酸同源性比较结果见表 2。在整个基因组, 包括 5' UTR 区、编码区 (P1、P2 和 P3) 和 3' UTR 区, 和 AnhuiFY08 株以及 Zhejiang08 株的同源性均高于 95%; 在 P1 区, HENAN08 与 AnhuiFY08、SHZH98、Zhejiang08、SHZH03 株的同源性均 >90%, 与 BrCr 和 TW2086

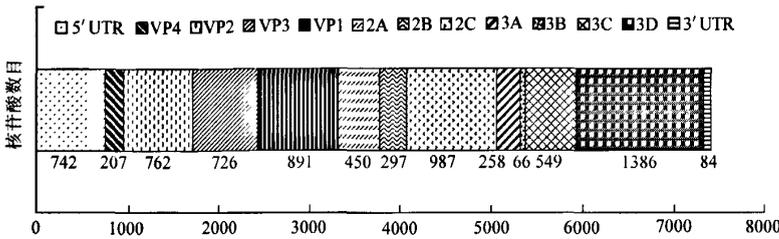


图1 HENAN08株病毒结构分区及核苷酸数目

表2 HENAN08株与其他EV71毒株核苷酸同源性比较结果(%)

病毒株	基因组	5' UTR	编码基因	P1	P2	P3	3' UTR
AnhuiFY08	97.8	98.3	97.7	97.8	97.6	97.7	97.6
SHZH98	91.7	96.0	91.3	91.6	89.9	91.9	82.4
BrCr	80.2	86.0	79.5	82.1	77.8	77.7	75.3
Zhejiang08	97.9	98.9	97.8	98.1	97.8	97.6	96.5
SHZH03	94.9	97.0	94.7	94.9	94.2	94.9	95.3
TW2086	83.0	86.9	82.5	89.9	79.3	76.5	74.1
Cox.A16	78.3	81.7	77.4	68.7	81.7	83.7	90.2

的同源性均>80%,而与Cox.A16的同源性最低(<70%);在P2和P3区,HENAN08与其他国内EV71株的同源性均较高,而与标准株BrCr以及TW2086的同源性低于Cox.A16;在5' UTR区,HENAN08与其他EV71株的同源性均较高,而与Cox.A16的同源性最低;在3' UTR区,与标准株BrCr以及TW2086的同源性最低。

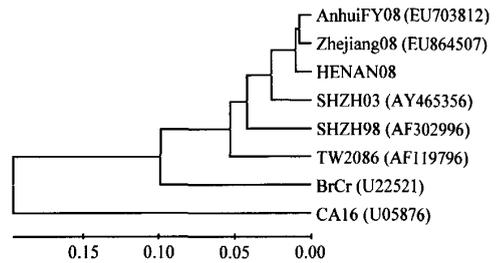
3. 病毒编码蛋白氨基酸同源性比较:由核苷酸序列推导的氨基酸序列同源性比较显示,在整个编码区EV71 HENAN08株与其他国内外EV71株的同源性均较高,与Cox.A16同源性最低;在P2和P3区,HENAN08与其他国内EV71株的同源性均较高,而与标准株BrCr以及TW2086的同源性低于Cox.A16;结构蛋白VP1区, EV71 HENAN08株与AnhuiFY08、SHZH98、标准株BrCr、Zhejiang08、SHZH03、TW2086株的同源性均>95%,与Cox.A16的同源性最低,为72.7%。结构蛋白VP4区的同源性比较都为100%(表3)。

表3 HENAN08株与其他EV71毒株氨基酸同源性比较结果(%)

病毒株	编码基因	P1	P2	P3	VP1	VP2	VP3	VP4
AnhuiFY08	99.5	99.7	99.5	99.2	99.7	99.2	100.0	100.0
SHZH98	96.0	97.2	95.5	95.0	96.6	98.0	96.3	100.0
BrCr	95.3	97.0	96.0	92.7	95.3	97.2	97.9	100.0
Zhejiang08	99.3	99.3	99.3	99.3	99.0	99.2	99.6	100.0
SHZH03	98.6	99.0	99.0	98.0	99.0	97.6	100.0	100.0
TW2086	94.8	99.0	93.1	91.5	98.3	98.8	99.6	100.0
Cox.A16	90.6	79.6	97.9	97.5	72.7	83.5	84.3	100.0

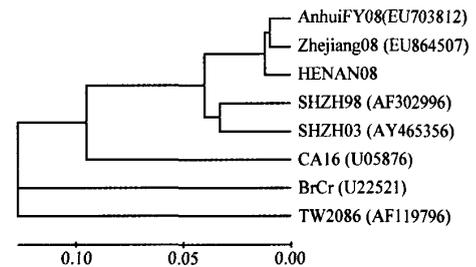
4. 病毒基因的遗传进化分析:用MAGA软件对HENAN08与取自GenBank的其他EV71毒株、

Cox.A16等进行了遗传进化分析。图2和图3显示:不论结构蛋白和非结构蛋白, HENAN08株与AnhuiFY08(EU703812)和Zhejiang08(EU864507)的进化关系都密切,与Cox.A16(U05876)在结构蛋白上进化疏远,与BrCr(U22521)以及TW2086(AF119796)在非结构蛋白上进化疏远。



注:括号内为基因登录号

图2 EV71病毒结构蛋白P1区的遗传进化分析



注:括号内为基因登录号

图3 EV71病毒非结构蛋白P2和P3区的遗传进化分析

讨论

EV71型属小RNA病毒科肠道病毒属的新型肠道病毒,基因组大约含有7408个核苷酸的单股正链RNA,从基因组的5'末端至3'末端依次排列着5' UTR、编码区1A、1B、1C、1D、2A、2B、2C、3A、3B、3C、3D、3' UTR及多聚腺苷酸尾。其中编码区编码含2193个氨基酸的多聚蛋白,多聚蛋白可进一步被水解成P1、P2、P3三个前体蛋白。P1区编码1A(多肽VP4)、1B(多肽VP2)、1C(多肽VP3)、1D(多肽VP1)4个病毒外壳蛋白,P2和P3区主要编码蛋白水解酶及RNA聚合酶,P3区在进化过程中高度保守^[6,7]。

在过去近40年的流行过程中根据VP1编码基因核苷酸序列的系统发生树, EV71逐渐分为5个独

立的基因型(A、B、C、D和E)。A基因型为EV71的原形病毒株,只包含一个单独的病毒株BrCr-USA-70;B基因型可进一步分为5个亚型(B1、B2、B3、B4、B5),主要包括美国、澳大利亚、哥伦比亚、中国大陆部分地区与台湾、部分马来西亚的病毒株;C基因型也分为4个亚型(C1、C2、C3、C4),主要包括美国、澳大利亚西部、中国大陆与台湾、加拿大和部分马来西亚的病毒株;D基因型主要包括新加坡和马来西亚的病毒株;E基因型主要为中国台湾的部分病毒株^[8]。同一基因型内,核苷酸差异 $\leq 12\%$,不同基因型之间核苷酸的差异为 $16.5\% \sim 19.7\%$,三型之间氨基酸同源性至少可达 94% 。流行病学资料表明,我国大陆地区的EV71毒株在种系进化上有较高的同源性。1987—2008年,除1997年以前极少数为C1、C3亚型外,从1998—2008年分离的EV71病毒全部属于C4亚型。本次研究结果表明,HENAN08株与2008年我国安徽分离株和浙江分离株的核苷酸和氨基酸同源性均在 90% 以上,因此可认为HENAN08株也属于C4亚型。

对与免疫源性密切相关的P1结构蛋白区遗传进化分析表明,HENAN08株与2008年安徽、浙江两省分离的EV71毒株亲缘关系最密切,而此3株又与2003年深圳市分离的EV71毒株的关系密切;同时,

该EV71分离株与Cox.A16的关系都最疏远。对非结构蛋白(P2和P3区)的遗传进化分析表明,国内EV71分离株的进化关系都密切,与Cox.A16较疏远,而与欧美流行株以及中国台湾流行株关系最远。虽然HENAN08株在非结构蛋白区与中国台湾流行株进化途径不同,但可能由于许多共同的因素如种族、生活习惯及环境等,造成其抗原性上的相似。这与以往研究相符。

参 考 文 献

- [1] Brown BA. Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998. *J Virol*, 1999, 73: 9969-9975.
- [2] Tan EL, Chow VTK, Kumarasinghe G, et al. Specific detection of enterovirus 71 directly from clinical specimens using real-time RT-PCR hybridization probe assay. *Mol Cell Probes*, 2006, 20: 135-140.
- [3] 王小华,李文琳. 小儿手足口病1602例报告. *中华流行病学杂志*, 2001, 22(4): 38.
- [4] 杨帆,金奇,何雅青,等. 肠道病毒71型中国分离株全基因组核苷酸序列分析. *中国科学*, 2001, 31(2): 163-167.
- [5] 周世力,李琳琳,何雅青,等. 我国分离的肠道病毒71型(SHZH03病毒株)全基因组核苷酸序列分析. *病毒学报*, 2004, 3(1): 7-11.
- [6] 金奇. 医学分子病毒学. 北京: 科学出版社, 2001: 606-613.
- [7] 田波,段海生,荣一兵,等. 肠道病毒71型分子流行病学研究进展. *中国病毒学*, 2004, 19(4): 426-429.
- [8] Sunita S, Vincent TK, Chow KP, et al. RT-PCR, nucleotide, amino acid and phylogenetic analyses of enterovirus type 71 strains from Asia. *J Virol Methods*, 2000, 88: 193-204.

(收稿日期: 2009-04-22)

(本文编辑: 张林东)

· 读者·作者·编者 ·

本刊对统计学方法的要求

统计学符号按GB 3358-1982《统计学名词及符号》的有关规定一律采用斜体排印,常用:①样本的算术平均数用英文小写 \bar{x} (中位数用 M);②标准差用英文小写 s ;③标准误用英文小写 s_x ;④ t 检验用英文小写 t ;⑤ F 检验用英文大写 F ;⑥卡方检验用希腊文小写 χ^2 ;⑦相关系数用英文小写 r ;⑧自由度用希腊文小写 ν ;⑨概率用英文大写 P (P 值前应给出具体检验值,如 t 值、 χ^2 值、 q 值等), P 值应给出实际数值,不宜用大于或小于表示,而用等号表示,小数点后保留3位数。

研究设计:应告知研究设计的名称和主要方法。如调查设计(分为前瞻性、回顾性还是横断面调查研究),实验设计(应告知具体的设计类型,如自身配对设计、成组设计、交叉设计、析因设计、正交设计等),临床试验设计(应告知属于第几期临床试验,采用了何种盲法措施等);主要做法应围绕4个基本原则(重复、随机、对照、均衡)概要说明,尤其要告知如何控制重要非试验因素的干扰和影响。

资料的表达与描述:用 $\bar{x} \pm s$ 表达近似服从正态分布的定量资料,用 $M(Q_n)$ 表达呈偏态分布的定量资料,用统计表时,要合理安排纵横标目,并将数据的含义表达清楚;用统计图时,所用统计图的类型应与资料性质相匹配,并使数轴上刻度值的标法符合数学原则;用相对数时,分母不宜小于20,要注意区分百分率与百分比。

统计学分析方法的选择:对于定量资料,应根据所采用的设计类型、资料具备的条件和分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用 t 检验和单因素方差分析;对于定性资料,应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备的条件及分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用 χ^2 检验。对于回归分析,应结合专业知识和散布图,选用合适的回归类型,不应盲目套用直线回归分析;对具有重复实验数据检验回归分析资料,不应简单化处理;对于多因素、多指标资料,要在一元分析的基础上,尽可能运用多元统计分析方法,以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系做出全面、合理的解释和评价。

统计结果的解释和表达:当 $P < 0.05$ (或 $P < 0.01$)时,应说对比组之间的差异具有统计学意义,而不应说对比组之间具有显著性(或非常显著性)差异;应写明所用统计分析方法的具体名称(如:成组设计资料的 t 检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的 q 检验等),统计量的具体值(如: $t = 3.45$, $\chi^2 = 4.68$, $F = 6.79$ 等);在用不等式表示 P 值的情况下,一般情况下选用 $P > 0.05$ 、 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 三种表达方式即可满足需要,无须再细分为 $P < 0.001$ 或 $P < 0.0001$ 。当涉及总体参数(如总体均数、总体率等)时,在给出显著性检验结果的同时,再给出95%可信区间。

本刊编辑部