

2008 年柯萨奇病毒 A 组 16 型昆明分离株 KMM08 全基因组序列分析

马绍辉 潘玥 何春艳 陈俊英 施海晶 孙强明 李琦涵

【摘要】 目的 分析柯萨奇病毒 A 组 16 型(CA16)昆明分离株 KMM08 全基因序列, 了解其遗传特性。方法 设计针对 CA16 引物, 提取病毒 RNA, RT-PCR 扩增和产物直接测序获得序列。利用 Mega 4.1, RDP3 和 SimPlot 3.5.1 等软件分析全基因组序列。结果 获得 KMM08 全基因组核苷酸序列长度为 7409 bp, 编码含 2193 个氨基酸残基的多聚蛋白; 与其他 CA16 参考株核苷酸和氨基酸同源性分别为 79.0% ~ 98.2% 和 94.5% ~ 99.3%, 其中 SZ-HK08-3 与国际标准株 G10 核苷酸和氨基酸同源性分别 79.1% 和 94.8%; 而与肠道病毒 71 型(EV71)标准株 BrCr 同源性分别为 78.7% 和 89.0%。在各个区段上, KMM08 与 SZ-HK08-3 的核苷酸和氨基酸同源性分别为 97.0% ~ 99.0% 和 98.0% ~ 100.0%, 同源性最高; 与 G10 的核苷酸和氨基酸同源性分别为 74.2% ~ 86.9% 和 90.9% ~ 97.0%; 与 EV71 BrCr 核苷酸和氨基酸同源性分别在 65.0% ~ 84.9% 和 71.0% ~ 95.2%。进化分析发现 KMM08 属于 B 基因型的一个分支。RDP3 和 SimPlot 3.5.1 软件分析发现 Tainan-5079-98 序列发现重组信号, 而 KMM08 未发现。结论 KMM08 分离株为 B 基因型; CA16 与 EV71 在非结构区发生重组。

【关键词】 柯萨奇病毒 A 组 16 型; 全基因组; 序列分析

Complete nucleotide sequence of a human coxsackievirus A16 strain KMM08 isolated in Kunming, China in 2008 MA Shao-hui, PAN Yue, HE Chun-yan, CHEN Jun-ying, SHI Hai-jing, SUN Qiang-ming, LI Qi-han. Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research & Development on Severe Infectious Disease, Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Kunming 650118, China

Corresponding author: LI Qi-han, Email: qihanli@21cn.com

This work was supported by a grant from the National Science and Technology Major Projects of China (No. 2008ZX10004-014).

【Abstract】 Objective To describe the genetic characterization of complete genome from a human coxsackievirus A16 (CA16) strain KMM08, isolated in Yunnan, China, in 2008. **Methods** By using RT-PCR, the seven fragments contained about 1000 nucleotides in the complete genome were sequenced. The sequences were aligned with other enterovirus sequences downloaded from GenBank using Mega 4.1, RDP3 and SimPlot 3.5.1 software. **Results** As in other human enterovirus, its genome was 7409 nucleotides in length, encoding for 2193 amino acids. KMM08 strain was closely related to other reference strains of B genotype. In the complete genome, the homology of nucleotide and amino acid among the eleven CA16 isolated strains were 79.0%–98.2% and 94.5%–99.3%, respectively. The rates of homology were 79.1% and 94.8% when comparing with that of G10 strains and 78.7% and 89.0% comparing with that of BrCr strains, respectively. SZ-HK08-3 strain had high homology when compared to other strains. In different segment of genome, the rates of homology were 97.0%–99.0% and 98.0%–100.0% when compared with that of SZ-HK08-3 strains, respectively. The rates of homology were 74.2%–86.9% and 90.9%–97.0% when compared with that of G10 strains, respectively and were 65.0%–84.9% and 71.0%–95.2% when compared with that of BrCr strains. Data from Phylogenetic analysis showed that KMM08 belong to genotype B. The putative recombinant Tainan-5079-98 was detected positive with RDP3 and SimPlot 3.5.1. **Conclusion** KMM08 strains isolated in Yunnan in 2008 belonged to B genotype of coxsackievirus A16. The possible occurrence of inter-typic recombination would involve EV71 and CA16.

【Key words】 Coxsackievirus A16; Complete genome; Sequence analysis

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2012.02.021

基金项目: 国家重大科技专项(2008ZX10004-014)

作者单位: 650118 昆明, 中国医学科学院北京协和医学院医学生物学研究所 云南省重大传染病疫苗研发重点实验室

通信作者: 李琦涵, Email: qihanli@21cn.com

肠道病毒 71 型(EV71)和柯萨奇病毒 A 组 16 型(CA16)是手足口病主要病原体。但后者感染在临床上难与其他病原体引起的手足口病区别,通常还与其他病原体同时传播,由于所致症状相对较轻,常被忽视^[1,2]。因此,对 CA16 全基因序列的测定和分析,有利于进一步研究我国 CA16 的遗传特性以及为手足口病的预防控制提供实验室资料。

材料与方法

1. 标本及病毒分离提取:粪便标本采自 2008 年昆明市儿童医院手足口病患者, -70 °C 保存。采用组织培养法,取粪便标本 1 g,加入 5 ml 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)制成悬液,3000 r/min,离心 30 min,用 0.45 μl 滤器除菌过滤,接种已长成致密单层的 Vero 细胞,细胞培养严格按 WHO 分离肠道病毒规程操作,于 37 °C 培养,培养液为含 10% 小牛血清的 MEM。观察细胞病变(CPE),如果无 CPE,盲传 3 代后如再无 CPE 出现,判为阴性。按 Axygen Body Fluid Viral DNA/RNA Miniprep Kit 操作说明提取病毒 RNA。用 60 μl 无 RNA 酶的纯水重悬。保存于 -80 °C。

2. RT-PCR:采用日本 TaKaRa 公司生产的 One-step RNA PCR Kit (AMV) 试剂盒。分 7 段分别扩增:2× reaction buffer 25 μl, RT-PCR MIX 1 μl,引物 F 20 pmol/L,引物 R 20 pmol/L, RNA 10 μl 加水至 50 μl,混匀离心后 50 °C 反转录 40 min,按 94 °C 5 min,94 °C 0.5 min,52 °C 0.5 min,72 °C 1 min,30 个循环;72 °C 延伸 10 min。取扩增产物 5 μl,用 1.0% 琼脂糖电泳,根据 Marker 位置对扩增片段进行确认。引物设计参考文献[3],并根据 shzh00-1(基因登录号 AY790926)设计引物(表 1)。

表 1 CA16 全基因组扩增和测序引物

| 引物 | 序列(5' ~ 3') | 位点 |
|--------|---------------------------|-------------|
| Ca161F | TTAAAACAGCCTGTGGTGTTC | 1 ~ 23 |
| Ca161R | CAAGATTTAGTGTCTAGCGTG | 1164 ~ 1144 |
| Ca162F | GAAGCAGCTAACATAGTTATAGCCT | 1031 ~ 1055 |
| Ca162R | ACATGAATGTCACCTCCAATG | 2075 ~ 2055 |
| Ca163F | AGGTACTACACCCAGTGGTCAG | 2030 ~ 2051 |
| Ca163R | GCAAGGTGCCGATTCACTACCCT | 3399 ~ 3377 |
| Ca164F | TAGCATTAGGACAGTAGGGACC | 3139 ~ 3159 |
| Ca164R | GAGGCAGCAGACTGTTCAAGAT | 4284 ~ 4263 |
| Ca165F | GCAAAAAGGGCTTGAGTGGAT | 4121 ~ 4140 |
| Ca165R | TCCACATTGGTCGGTGTCTTCT | 5220 ~ 5200 |
| Ca166F | AGTGTAGATAGCGAGGAGGTTCC | 5144 ~ 5165 |
| Ca166R | CCTCCAGGTATTCAGTGCCATA | 6263 ~ 6242 |
| Ca167F | CCAAGTATGTGGGAAACACC | 6117 ~ 6136 |
| Ca167R | TGCTATTCTGTTATAAC | 7410 ~ 7392 |

3. 序列测定和数据分析:扩增阳性的 PCR 产物由北京三博生物技术有限公司纯化和序列测定(每个标本测 3 次)。其他 CA16 的全基因序列和 VP1 序列从 NCBI 的基因数据库(GenBank)下载(表 2),通过 Mega 4.1 软件对测序结果进行分析处理。按 RDP3 重组软件的操作说明书设置(<30 序列,采用“internal and external references”)检测其重组事件。该软件含 7 个算法(RDP、Bootscan、GENECONV、MaxChi、Chimaera、SiScan 和 3Seq),其优点是设定参数后,可一次性对数据集扫描,因而适用于高通量筛选。为获得可信的重组结果,将 7 种重组检测方法中有 3 种检测出重组事件者被认为可能的重组子^[4]。与 RDP 3 软件相比,SimPlot 3.5.1 软件主要是基于相似性原理进行重组鉴定,不适用于大规模样品的重组检测,但可对上述 7 种算法给出亲代序列的重组事件,以进一步采用相似性原理验证其结果并确定重组断裂点^[5]。

结 果

1. 病毒分离:将用 PCR 方法直接从 2008 年临床标本(粪便)鉴定为 CA16 的 10 份手足口病患者的标本,分别接种 Vero 细胞后,培养分离到 1 株阳性分离物,命名为 KMM08,并收集上清,保存于 -70 °C。

2. RT-PCR 产物确定及测序:采用特异性引物做一步法 RT-PCR,产物取 5 μl 1% 琼脂糖凝胶电泳后大小与所设计一致。将扩增出的特异性核酸片段测序,将 7 段序列拼接成一个完整序列。结果与 CA16 标准株 G10 序列同源为 79.1%。

3. KMM08 全基因组序列测定及分析:经过测序、序列拼接和分析,获得 KMM08 的全基因组核苷酸序列长度为 7409 bp,其中 5' 端非编码区(5' UTR)长 745 bp,病毒基因组编码区全长 6582 个核苷酸,编码含 2193 个氨基酸残基的多聚蛋白;3' 端非编码区末端长 83 bp。KMM08 基因组的组成和结构符合肠道病毒特征。从表 3 可见,与 SZ-HK08-3 最为同源,整个基因组的核苷酸和氨基酸同源性分别为 98.2% 和 99.3%;与 CA16 其他株 FY18、human enterovirus A 和国际标准株 G10 核苷酸和氨基酸同源性分别 79.0% ~ 79.1% 和 94.5% ~ 94.8%;与 shzh00-1、GZ08、shzh05-1、SZ-HK08-7、Tainan-5079-98 和 XM-CA16-3560 的核苷酸和氨基酸同源性分别为 91.7% ~ 93.8% 和 98.1% ~ 99.0%;而与 EV71 标准株 BrCr 比较,核苷酸和氨基酸同源性分别为 78.7% 和 89.0%。另外从 12 株核苷酸序列间进化分歧的评

表 2 本研究所用的核酸序列信息

| 分离株 | 全基因组 | VP1 | 3D | 国家/地区 | 分离时间(年) |
|---------------------|----------|----------|----------|-------|---------|
| BrCr | U22521 | U22521 | U22521 | 美国 | 1970 |
| G10 | U05876 | U05876 | U05876 | 芬兰 | 1994 |
| FY18 | EU812514 | EU812514 | EU812514 | 中国安徽 | 2008 |
| human enterovirus A | NC001612 | NC001612 | NC001612 | 芬兰 | 1994 |
| GZ08 | FJ198212 | FJ198212 | FJ198212 | 中国广东 | 2008 |
| shzh00-1 | AY790926 | AY790926 | AY790926 | 中国广东 | 2000 |
| shzh05-1 | EU262658 | EU262658 | EU262658 | 中国广东 | 2005 |
| SZ-HK08-3 | GQ279368 | GQ279368 | GQ279368 | 中国广东 | 2008 |
| SZ-HK08-7 | GQ279371 | HQ269389 | HQ269389 | 中国广东 | 2008 |
| Tainan-5079-98 | AF177911 | AF177911 | AF177911 | 中国台湾 | 1998 |
| XM-CA16-3560 | HQ269389 | HQ269389 | HQ269389 | 中国福建 | 2006 |
| 99.132.2264 | - | GU142869 | - | 澳大利亚 | 1999 |
| 05.194.4135 | - | FJ868280 | - | 澳大利亚 | 2005 |
| UM17115-MAL-00 | - | AM292484 | - | 马来西亚 | 2000 |
| Ts1-2000-THA-00 | - | AM292477 | - | 泰国 | 2000 |
| 1931-Yamagata-2010 | - | AB634452 | - | 日本 | 2010 |
| 1173-Yamagata-2010 | - | AB634434 | - | 日本 | 2010 |
| Siriraj07-TH-02 | - | GQ184132 | - | 中国台湾 | 2002 |
| QH0558T-QH-CHN-2008 | - | GQ429276 | - | 中国青海 | 2008 |
| QH0557T-QH-CHN-2008 | - | GQ429275 | - | 中国青海 | 2008 |
| GS0430F-GS-CHN-2008 | - | GQ429263 | - | 中国甘肃 | 2008 |
| GS0429V-GS-CHN-2008 | - | GQ429262 | - | 中国甘肃 | 2008 |
| NM0710-NM-CHN-2007 | - | GQ429241 | - | 中国内蒙古 | 2007 |
| TC-21F-SD-CHN-2007 | - | GQ429229 | - | 中国山东 | 2007 |
| TC-11F-SD-CHN-2007 | - | GQ429227 | - | 中国山东 | 2007 |
| BJ03-ZDP | - | AY821798 | - | 中国北京 | 2003 |
| 1018T-VNM-05 | - | AM292441 | - | 越南 | 2005 |
| 5338-SA-03 | - | AM292443 | - | 沙特阿拉伯 | 2003 |

注:除 BrCr 血清型为 EV71 外,其余为 CA16

表 3 KMM08 株与其他 CA16 分离株的核苷酸(氨基酸)同源性比较

| 毒株 | 全基因 | 5' UTR | VP1 | VP2 | VP3 | VP4 | 2A | 2B | 2C | 3A | 3B | 3C | 3D | 3' UTR |
|---------------------|-------------|--------|--------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|--------|
| BrCr | 78.7 (89.0) | 84.2 | 65.0 (71.0) | 71.8 (85.2) | 71.4 (83.9) | 72.0 (78.3) | 80.7 (94.0) | 83.2 (92.9) | 85.0 (96.6) | 84.9 (95.3) | 81.8 (90.9) | 83.2 (95.1) | 83.2 (95.2) | 95.1 |
| G10 | 79.1 (94.8) | 86.9 | 76.8 (92.3) | 77.3 (94.8) | 78.6 (94.6) | 82.1 (100.0) | 80.7 (96.0) | 76.8 (94.9) | 80.9 (97.6) | 80.3 (93.0) | 74.2 (90.9) | 74.5 (95.1) | 77.7 (93.7) | 81.7 |
| FY18 | 79.0 (94.5) | 86.7 | 76.4 (90.9) | 77.3 (94.8) | 78.6 (94.2) | 82.1 (100.0) | 80.7 (96.0) | 76.8 (94.9) | 80.9 (97.6) | 80.3 (93.0) | 74.2 (90.9) | 74.3 (94.5) | 77.7 (93.7) | 81.7 |
| human enterovirus A | 79.1 (94.8) | 86.9 | 76.8 (92.3) | 77.3 (94.8) | 78.6 (94.6) | 82.1 (100.0) | 80.7 (96.0) | 76.8 (94.9) | 80.9 (97.6) | 80.3 (93.0) | 74.2 (90.9) | 74.5 (95.1) | 77.7 (93.7) | 81.7 |
| GZ08 | 92.5 (98.8) | 94.9 | 92.8 (100.0) | 90.4 (99.2) | 92.1 (99.6) | 94.2 (98.6) | 92.4 (98.7) | 94.9 (97.0) | 93.8 (98.8) | 93.8 (95.3) | 83.3 (100.0) | 92.0 (97.8) | 92.3 (98.7) | 95.1 |
| shzh00-1 | 93.1 (98.1) | 95.8 | 93.9 (99.7) | 91.8 (98.4) | 93.0 (99.6) | 93.2 (100.0) | 92.7 (97.3) | 94.3 (98.0) | 93.5 (99.1) | 93.4 (95.3) | 87.9 (100.0) | 92.9 (98.4) | 91.6 (95.9) | 95.1 |
| shzh05-1 | 92.3 (98.6) | 94.5 | 92.9 (100.0) | 90.7 (98.8) | 92.3 (98.8) | 92.3 (98.6) | 91.3 (97.3) | 93.9 (97.0) | 91.5 (98.8) | 91.5 (95.3) | 90.9 (100.0) | 90.3 (98.4) | 92.9 (98.7) | 96.3 |
| SZ-HK08-3 | 98.2 (99.3) | 98.3 | 99.0 (100.0) | 97.7 (99.2) | 98.8 (99.6) | 97.6 (100.0) | 97.8 (98.7) | 97.0 (98.0) | 98.6 (99.4) | 98.8 (97.7) | 97.0 (100.0) | 97.6 (99.5) | 97.9 (99.8) | 98.8 |
| SZ-HK08-7 | 92.3 (98.7) | 95.4 | 93.2 (100.0) | 92.2 (98.8) | 91.6 (99.6) | 93.7 (100.0) | 91.3 (98.0) | 93.3 (97.0) | 91.9 (99.1) | 89.6 (94.2) | 86.4 (100.0) | 91.1 (97.8) | 91.6 (98.1) | 95.1 |
| Tainan-5079-98 | 93.8 (99.0) | 95.3 | 95.2 (99.7) | 92.4 (98.4) | 93.6 (99.6) | 93.2 (100.0) | 93.6 (98.0) | 93.6 (98.0) | 93.6 (99.4) | 93.4 (95.3) | 89.4 (100.0) | 93.3 (98.4) | 94.0 (99.4) | 96.3 |
| XM-CA16-3560 | 91.7 (98.7) | 95.0 | 92.6 (99.7) | 91.4 (99.2) | 92.0 (99.6) | 93.2 (100.0) | 91.1 (97.3) | 92.3 (99.0) | 92.1 (99.1) | 89.2 (94.2) | 86.4 (100.0) | 91.1 (98.4) | 91.3 (98.1) | 92.7 |

注:数据为核苷酸(氨基酸)同源性(%);VP1~VP4 为结构区,2A~3D 为非结构区

价也证实此结果(表 4)。CA16 KMM08 的基因组序列已提交至 GenBank, 基因登记号为 HQ423141。

4. KMM08 各区段核苷酸及编码氨基酸序列同源性比较: 将 KMM08 与 GenBank 中所有 CA16 全基因组序列的各区段分别比较, 同时选择 EV71 国际标准株 BrCr 作为参照, 发现 KMM08 与 SZ-HK08-3 各区段的核苷酸及氨基酸同源性均为最高, 分别为 97.0%~99.0% 和 98.0%~100.0%, 其中 3 个区域 VP1、VP4、3B 与 SZ-HK08-3 的氨基酸同源性为 100.0%(表 3); 与 shzh00-1、GZ08、shzh05-1、SZ-HK08-7、Tainan-5079-98 和 XM-CA16-3560 的各区段核苷酸和氨基酸同源性分别超过 90.0% 和 97.0%; 与 FY18、human enterovirus A 和国际标准株 G10 各区段核苷酸和氨基酸同源性分别低于 82.0% 和 97.0%; KMM08 与 BrCr 的 3' UTR 区同源性为 95.1%, 其他区域的核苷酸同源性 with BrCr 在 65.0%~84.9% 之间, 与 BrCr 各区域的氨基酸同源性为 71.0%~95.2%。KMM08 与 EV71 BrCr 株非结构蛋白的核苷酸同源性均高于或等于 FY18、human enterovirus A 和国际标准株 G10, 而结构蛋白则低于这 3 株。

表4 12株序列之间进化分歧的评价(距离和标准误)

| 病毒株 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1 (BrCr) | | 0.01 | 0.06 | 0.06 | 0.04 | 0.05 | 0.05 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.04 |
| 2 (G10) | 0.21 | | 0.00 | 0.00 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.04 | 0.05 | 0.05 |
| 3 (human enterovirus A) | 0.21 | 0.00 | | 0.00 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.04 | 0.05 | 0.05 |
| 4 (FY18) | 0.21 | 0.00 | 0.00 | | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 |
| 5 (XM-CA16-3560) | 0.17 | 0.17 | 0.17 | 0.17 | | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| 6 (GZ08) | 0.17 | 0.17 | 0.17 | 0.17 | 0.04 | | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| 7 (KMM08) | 0.17 | 0.17 | 0.17 | 0.17 | 0.06 | 0.05 | | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| 8 (shzh00-1) | 0.17 | 0.17 | 0.17 | 0.17 | 0.04 | 0.03 | 0.05 | | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| 9 (shzh05-1) | 0.17 | 0.17 | 0.17 | 0.17 | 0.04 | 0.04 | 0.05 | 0.03 | | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| 10 (SZ-HK08-3) | 0.17 | 0.16 | 0.16 | 0.17 | 0.06 | 0.05 | 0.01 | 0.05 | 0.05 | | 0.01 | 0.01 |
| 11 (SZ-HK08-7) | 0.17 | 0.17 | 0.17 | 0.17 | 0.01 | 0.04 | 0.05 | 0.04 | 0.04 | 0.06 | | 0.01 |
| 12 (Tainan-5079-98) | 0.17 | 0.17 | 0.17 | 0.17 | 0.04 | 0.03 | 0.04 | 0.02 | 0.03 | 0.04 | 0.04 | |

5. 种系进化分析:利用Mega 4.1软件对KMM08和GenBank中的11株CA16以及1株EV71标准株BrCr,采用Neighbor-joining方法分别基于全基因组和VP1序列进行种系进化分析。结果与基于VP1和全基因组序列进行的种系进化分析结果相似,KMM08与shzh00-1、GZ08、shzh05-1、SZ-HK08-3、SZ-HK08-7、Tainan-5079-98和XM-CA16-3560的关系较近,属于进化树上的一个分支;与FY18、human enterovirus A和G10相对较远,构成另一个相对独立的分支;对于BrCr则更远,为另一分支(图1、2)。从图2还可见,不同国家或地区包括我国不同省份分离到的CA16均属于进化树上的一个分支,而沙特阿拉伯分离株5338-SA-03构成另一个相对独立的分支。由此可认为KMM08属于B基因型,不同国家或地区分离株之间亲缘关系存在明显的差异。另外,基于全基因序列的Bootstrap值均大于67%,而基于VP1基因有一半低于60%。这提示基于全基因序列种系进化分析更理想。同时由基于3D基因序列种系进化分析可见,BrCr与CA16的B基因型属于进化树上的一个大分支的2个分支,而A基因型为另一个独立分支(图3)。说明BrCr与CA16的B基因型在3D基因上的关系比A基因型近。

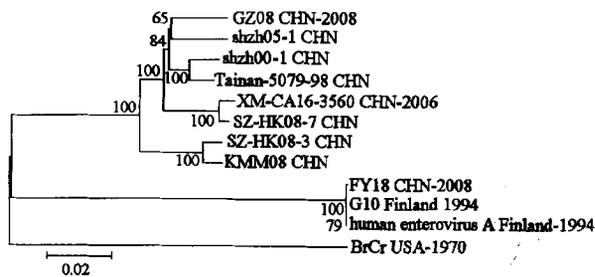


图1 CA16全基因核苷酸序列的种系进化分析

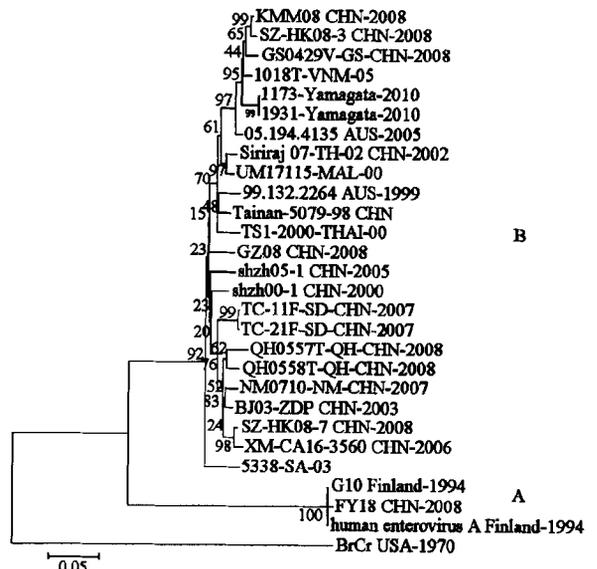


图2 CA16 VP1核苷酸序列的种系进化分析

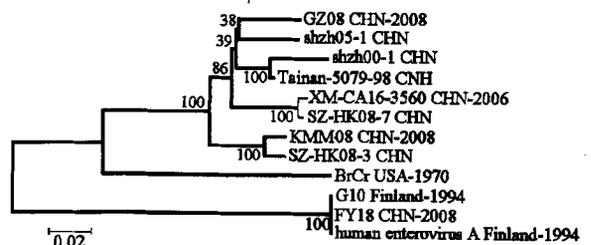
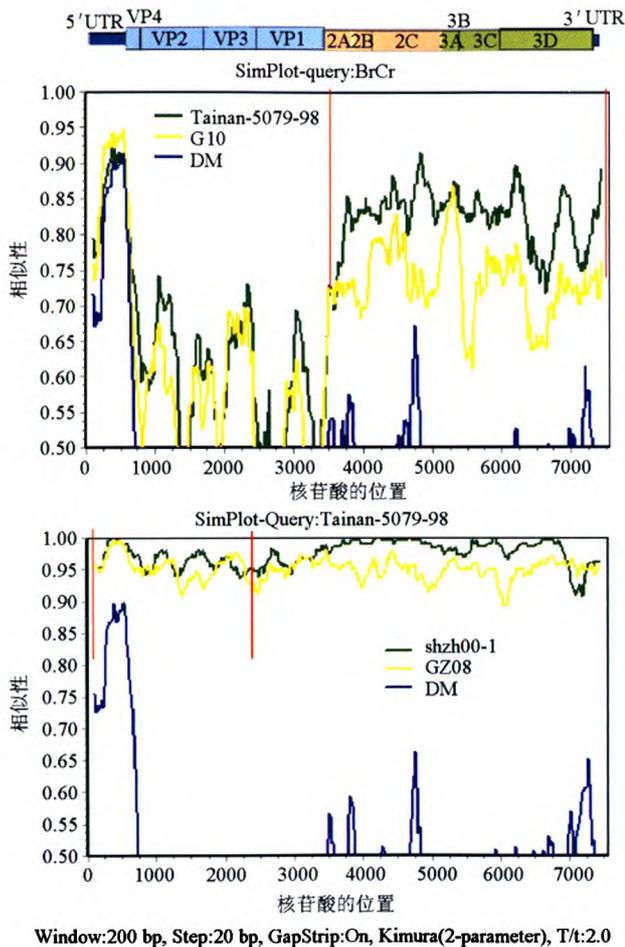


图3 CA16 3D核苷酸序列的种系进化分析

6. KMM08重组事件分析:利用RDP3重组软件对11株CA16全基因组和BrCr株进行重组分析,结果发现Bootscan、MaxChi、Chimaera、SiScan和3Seq分别检测出BrCr和Tainan-5079-98序列在3571~7408之间(非结构区)存在重组(Bootscan法, $P=8.45 \times 10^{-04}$),亲本序列为Tainan-5079-98和G10;MaxChi、Chimaera和3Seq法检测出Tainan-5079-98

和 shzh00-1 在 115 ~ 2536 之间存在重组, 亲本序列为 shzh00-1 和 GZ08, 但 Bootscan 法未检测出; 而 KMM08 株序列未检测到重组信号。为进一步证实重组, 以重组子序列, 其两个亲本序列和外群序列 (DM 株, AF524867) 为对象利用 SimPlot 3.5.1 软件进行相似性分析, 发现针对 BrCr 有明确的重组信号, 且相似性分析得到的重组断点基本与 RDP3 一致 (在非结构区域), 而 Tainan-5079-98 序列所得重组信号不明确 (图 4)。



注: 2条亲代序列(绿和黄色), 1条外群序列(蓝色)。采用 200 bp 窗口, 每步为 20 bp 进行比较, 100 次自展, Kimura 双参数模型; 红线竖线是 RDP3 检测到的重组断点, 竖线间的部分为重组片段

图 4 重组子序列 BrCr 和 Tainan-5079-98 及其母序列的相似性分析

讨 论

自 2008 年以来, 手足口病发病率已经成为我国丙类传染病的首位。由于我国各年份引起手足口病的主要病原体有所不同, 如 2008 年和 2009 年以 EV71 流行为主, 2010 年以 CA16 流行为主, 而 2011

年又以 EV71 流行为主。而在云南省, 2010 年 70% 的病例是 CA16 引起、30% 由 EV71 引起, 2011 年由 EV71 引起的病例占 70% 以上^[6]。国外监测数据也表明 CA16 引起的手足口病有逐年增加趋势, 每隔一定时间就出现一次高峰^[7]。因此, 通过 KMM08 株全基因组的测序和分析以了解我国流行的 CA16 以及与其他肠道病毒间的进化关系具有重要的意义。

通过对目前所有 CA16 全基因组的核苷酸和氨基酸同源性比较, 发现 KMM08 株与 SZ-HK08-3 株各个区段的核苷酸及氨基酸同源性均为最高, 提示二者之间的亲缘关系最近; 而不同地区或不同时间分离的 CA16 毒株其核苷酸和氨基酸也不同, 提示不同地域或时间分离的病毒株存在差异。

肠道病毒的基因组具有较高突变率和重组率, 是最易重组的病毒之一。资料表明, 从亚太区的手足口病暴发患儿中分离到的 EV71 亚基因型 B3、C2 和 C4 株的非结构区域存在重组^[8-10]。而 CA16 与 EV71 在其基因组中的非结构区域也存在重组^[8]。因而, 肠道病毒分子流行病学调查不能仅依赖于 VP1 基因, 而采用全基因组测序又不现实。目前有学者建议将 VP1 基因(分型)和非结构区域的 3D 基因(监控重组事件)结合在一起, 能更准确分析肠道病毒的进化^[11]。

本研究以 CA16 3D 基因构建进化树和序列分析发现, 除 CA16 A 基因型外, BrCr 与 CA16 B 基因型的亲缘关系较近, 可能存在重组; BrCr 与 CA16 B 基因型的核苷酸和氨基酸同源性也高于 A 基因型。进一步通过 RDP3 重组软件和 SimPlot 3.5.1 软件分析, KMM08 株未发现重组, 而 CA16 Tainan-5079-98 株与 EV71 原型株 BrCr 可能在非结构区域存在重组, 这与文献报道一致^[8], 但该推测尚需进一步实验证据证明。另外, EV71 B3 基因亚型存在 CA16 3'UTR 特征^[12]。因此, CA16 和 EV71 可能存在普遍重组现象, 而重组可能是导致 CA16 或 EV71 感染暴发的原因之一。

CA16 通常不引起严重的中枢神经相关疾病, 但也有报道可导致脑炎。有学者认为, 具有神经毒力的 CA16 可能是 CA16 与 EV71 重组而获得^[4]。EV71 具有高度的嗜神经性, 与同属的脊髓灰质炎病毒相似, 其感染除引起手足口病和疱疹性咽峡炎外, 还可导致中枢系统疾病。早期的研究者受脊髓灰质炎病毒的启发, 推测在 EV71 的 5'-NTR 和 VP1 序列中可能存在神经毒力决定簇, 但至今未找到确切证据^[13]。最近研究发现 EV71 病毒依赖 RNA 的 RNA 聚合酶

(3D^{pol})区的氨基酸对改变 EV71 毒力非常重要,如 Chang 等^[14]通过对不同毒力的 EV71 病毒株的序列分析发现,毒力强的为 Val²⁶⁴,而弱的为 Ile²⁶⁴[而该位点位于病毒依赖 RNA 的 RNA 聚合酶(3D^{pol}) 锌指区];Kung 等^[15]也发现 1 株温度敏感表型 EV71 的 3D^{pol}上 Thr²⁵¹位氨基酸能导致减毒。通过分析发现 CA16 A 基因型和 BrCr 株在 3D^{pol}上为 Leu²⁵¹,其他分离株为 Val²⁵¹;所有 CA16 3D^{pol}的第 264 均为 Val。而本研究 KMM08 分离株是从 1 例症状较轻患者分离到,其毒力位点还有待进一步研究。

鉴于目前 GenBank 上 CA16 毒株全基因序列资料较少,而本研究只对本地区的 1 株 CA16 全基因序列进行分析,不利于从不同致病力毒株之间找到其基因组的差异,因此开展对 CA16 的监测工作特别是全基因序列的测定和分析,有助于不同地区间进行比较和分析,对阐明 CA16 在我国的起源、流行及其毒力和进化具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Wang CY, Li LF, Wu MH, et al. Fatal coxsackievirus A16 infection. *Pediatr Infect Dis J*, 2004, 23(3): 275-276.
- [2] Goto K, Sanefuji M, Kusuhara K, et al. Rhombencephalitis and coxsackievirus A16. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15(10): 1689-1691.
- [3] Li LL, He YQ, Zhu JP, et al. Complete genome analysis of coxsackievirus A16 SHZH00-1 strain isolated from the mainland of China. *Chin J Virol*, 2005, 21(3): 217-222. (in Chinese)
李琳琳,何雅晴,朱俊萍,等.柯萨奇病毒 A 组 16 型中国分离株 (Cox. A16 SHZH00-1) 全基因组序列测定及分析. *病毒学报*, 2005, 21(3): 217-222.
- [4] van der Sanden S, van Eck J, Martin DP, et al. Detection of recombination breakpoints in the genomes of human enterovirus 71 strains isolated in the Netherlands in epidemic and non-epidemic years, 1963-2010. *Infect Genet Evol*, 2011, 11(5): 886-894.
- [5] Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, et al. Full length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol*, 1999, 73(1): 152-160.
- [6] [http://www.yncdc.cn/list.aspx? varCattyID=0103](http://www.yncdc.cn/list.aspx?varCattyID=0103).
- [7] Hosoya M, Kawasaki Y, Sato M, et al. Genetic diversity of coxsackievirus A16 associated with hand, foot, and mouth disease epidemics in Japan from 1983 to 2003. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(1): 112-120.
- [8] Yoke-Fun C, AbuBakar S. Phylogenetic evidence for inter-typic recombination in the emergence of human enterovirus 71 subgenotypes. *BMC Microbiol*, 2006, 74(6): 1-11.
- [9] Zhang Y, Zhu Z, Yang W, et al. An emerging recombinant human enterovirus 71 responsible for the 2008 outbreak of hand foot and mouth disease in Fuyang city of China. *Virology*, 2010, 94(7): 1-9.
- [10] Mirand A, Schuffenecker I, Henquell C, et al. Phylogenetic evidence for a recent spread of two populations of human enterovirus 71 in European countries. *J Gen Virol*, 2010, 91(Pt 9): 2263-2277.
- [11] Chan YF, Sam IC, AbuBakar S. Phylogenetic designation of enterovirus 71 genotypes and subgenotypes using complete genome sequences. *Infect Genet Evol*, 2010, 10(3): 404-412.
- [12] Zhou F, Kong F, Wang B, et al. Molecular characterization of enterovirus 71 and coxsackievirus A16 using the 5' untranslated region and VP1 region. *J Med Microbiol*, 2011, 60(Pt 3): 349-358.
- [13] Solomon T, Lewthwaite P, Perera D, et al. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71. *Lancet Infect Dis*, 2010, 10(11): 778-790.
- [14] Chang GH, Lin L, Luo YJ, et al. Sequence analysis of six enterovirus 71 strains with different virulences in humans. *Virus Res*, 2010, 151(1): 66-73.
- [15] Kung YH, Huang SW, Kuo PH, et al. Introduction of a strong temperature-sensitive phenotype into enterovirus 71 by altering an amino acid of virus 3D polymerase. *Virology*, 2010, 396(1): 1-9.

(收稿日期: 2011-07-12)

(本文编辑: 张林东)