

2009 年云南省柯萨奇病毒 B5 分离株 A210/KM/09 全基因序列分析

刘建生 邵聪文 赵卫中 张云昆 吉玛 朱艳菊 马忠飞 马绍辉

【摘要】 目的 分析柯萨奇病毒 B5(CVB5) 云南分离株 A210/KM/09 全基因序列及其遗传特性。方法 设计针对 CVB5 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 软件分析全基因序列。结果 CVB5 A210/KM/09 全基因组核苷酸序列长度为 7 372 bp, 编码含 2 185 个氨基酸残基的多聚蛋白; A210/KM/09 全基因组核苷酸及所推导的氨基酸与 CVB5/CC10/10 同源性最高, 其同源性分别为 92.5% 和 97.3%; 而与其他 CVB5 毒株如 17Y、19CSF、20CSF、1954/85/US、2000/CSF/KOR、03001N、CoxB5/Henan/2010、CVB5/SD/09 和 Faulkner 核苷酸和氨基酸同源性分别为 80.1%~92.5% 和 95.0%~97.3%; A210/KM/09 与其他 CVB5 毒株的各区段核苷酸和氨基酸同源性分别为 75.3%~96.3% 和 85.3%~100.0%, 其中与 VP3、3D 区段核苷酸的同源性最低。基于 CVB5 全长 VP1 基因序列进行种系进化分析, 可将 CVB5 分为 A、B、C 和 D 4 个基因型, 其中 C 基因型可再分为 C1~C4 基因亚型, D 基因型可再分为 D1~D4 基因亚型。中国 CVB5 流行株主要聚集在 C4 基因亚型, 国外流行株主要聚集在 D1、C2 亚型。**结论** A210/KM/09 分离株为 C4 基因型。

【关键词】 柯萨奇 B 组 5 型病毒; 全基因组; 序列分析; 进化树图

Genomic characteristics of coxsackievirus B5 A210/KM/09 strain isolated in Yunnan, China
Liu Jiansheng, Shao Congwen, Zhao Weizhong, Zhang Yunkun, Ji Ma, Zhu Yanju, Ma Zhongfei, Ma Shaohui. Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research and Development on Severe Infectious Disease, Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Kunming 650118, China

Corresponding author: Ma Shaohui, Email: shaohuima70@hotmail.com

This work was supported by a grant from the Applied Basic Research Projects of Yunnan Province (No. 2013FZ136).

【Abstract】 **Objective** To characterize the complete genome sequence of coxsackievirus B5 (CVB5) A210/KM/09 strain which was isolated from Yunnan, China, 2009. **Methods** Eight overlapping clones covering the whole viral genome (excluding the poly-A tail) were obtained by RT-PCR and sequenced, with their nucleotide and amino acid sequences compared with other known CVB5 strains. **Results** The genome of the CVB5 A210/KM/09 strain had 7 372 nucleotides in length, and containing a 742-nt non-translated region (NTR) at the 5' end and a 98-nt NTR at the 3' end. The entire open reading frame contained 6 555 nt, encoding a 2 185-aa polyprotein. In the coding region, there appeared no nucleotide deletion or insertion, but some changes of amino acid seemed unique. Based on the complete genome sequence alignments, CVB5 isolate A210/KM/09 strain showed the highest nucleotide (92.5%) and amino acid (97.3%) identities to the CVB5/CC10/10. It also shared nucleotide (80.1%~92.5%) and amino acid (95.0%~97.3%) homology with other CVB5 strains: 17Y, 19CSF, 20CSF, 1954/85/US, 2000/CSF/KOR, 03001N, CoxB5/Henan/2010, VB5/SD/09 and Faulkner. Blast between genome fragments, A210/KM/09 showed similarity on nucleotide (80.1%~92.5%) and amino acid (95.0%~97.3%) identities with other CVB5 strains. The phylogenetic tree, constructed on the complete VP1 regions, indicated that CVB5 could be divided into genotype A, B, C and D, while Genotype C and D could be further divided into C1~C4 and D1~D4 subgenotypes. **Conclusion** A210/KM/09 and other CVB5 predominant strains isolated in China belonged to CVB5 subgenotype C4.

【Key words】 Coxsackievirus B5; Complete genome; Sequence analysis; Phylogenetic analysis

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.03.020

基金项目: 云南省应用基础研究项目 (2013FZ136)

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: 马绍辉, Email: shaohuima70@hotmail.com

柯萨奇病毒B(CVB)属于肠道病毒(EV)B群,包括CVB1~6型。近期有报道CVB5是引起手足口病的一个重要病原^[1]。美国2006—2008年监测发现, CVB5感染率为4.4%,排在EV第10位^[2];西班牙1998—2007年监测发现, CVB5感染率为4.2%,排在第6位^[3]。近年有报道CVB5可引起无菌性脑炎^[4,5],为此本研究对2009年自无菌性脑炎患儿粪便中分离的CVB5进行全基因扩增测序和分析,为相关疾病的预防控制提供实验室数据。

材料与方 法

1. 病毒来源: CVB5分离株A210/KM/09是2009年从昆明市无菌性脑炎患儿(女性,4岁7个月)粪便标本中通过RD细胞分离获得,病毒保存在中国医学科学院北京协和医学院医学生物学研究所分子流行病室。

2. 引物设计、病毒核酸RNA提取及RT-PCR:按照Axygen Body Fluid Viral DNA/RNA Miniprep Kit的说明书提取病毒RNA,保存于-70℃。根据CVB5/SD/09株(基因登录号JX276378)设计引物(表1)。采用TaKaRa公司生产的One-step RNA PCR Kit (AMV)试剂盒。分8段分别扩增:2×reaction buffer 25 μl, RT-PCR MIX 2 μl,引物F 20 pmol,引物R 20 pmol, RNA 5 μl并补加无RNA酶的水至50 μl,混匀离心后50℃反转录30 min, 94℃ 2 min, 35个循环:94℃ 0.5 min, 50℃ 0.5 min, 72℃ 1 min;最后72℃延伸10 min。

表1 CVB5全基因组扩增和测序引物

引物	序列(5'→3')	位置
B5-1F	TTAAACAGCCTGTGGGTTG	1~20
B5-1R	TTCTGCTGTGCTTCATCAT	1100~1081
B5-2F	TCTCCGTCAGCAGAGGAGTG	951~970
B5-2R	GACCAATGGGTGTAGTATT	2065~2052
B5-3F	CTGTTCAATCGAACTCAACA	1946~1963
B5-3R	CCATCATAGAACATACTATA	3037~3018
B5-4F	ACAAGGCCAGGATTCACCAG	2840~2859
B5-4R	TGGCAGTCACTGTTATTAGG	3951~3932
B5-5F	TTGTGAGCAGGTTAACCTTC	3809~3828
B5-5R	TCGATGAACTGGATGGCCTT	4924~4905
B5-6F	ATCAACATGCCATGTGAGT	4821~4820
B5-6R	AAAGTAGTGCTTGAGGAGAG	5900~5881
B5-7F	ATGTACATCCAGTAGGAC	5697~5715
B5-7R	TGTCTCTTTGTGTGAGTAAC	6701~6682
B5-8F	AACTTATACAAGACATTCCA	6489~6508
B5-8R	CCGCACCGAATGCGGAGAAT	7402~7383

3. 序列测定和数据分析:取3 μl PCR产物于1%琼脂糖胶电泳后,将大小与预期相符的特异性扩增条带送交华大基因科技(北京)股份有限公司对PCR产物进行纯化和测序(每个样品双向测3次)。利用

Mega 5.1(采用Neighbor-joining法)和Geneious软件对测序结果进行系统进化分析和核苷酸/氨基酸同源性比对,以及BLAST和SimPlot 3.5.1重组软件对序列进行重组分析^[6]。其他CVB5株的全基因序列和VP1序列从GenBank下载。

结 果

1. A210/KM/09株全基因组序列分析:将覆盖病毒基因组全长的8片段测序结果经整理校对后,拼接成一个完整序列,NCBI BLAST比对结果表明A210/KM/09株与CVB5原型株Faulkner的核苷酸序列同源性为82%。A210/KM/09株全基因组核苷酸序列长度为7372 bp,其中5'端非编码区长742 bp,病毒基因组编码区长6555个核苷酸,编码含2185个氨基酸残基的多聚蛋白。A210/KM/09株全基因组的结构符合EV特征。A210/KM/09株全基因组核苷酸及其氨基酸同源性与CVB5/CC10/10株最为同源,分别为92.5%和97.3%;而与其他CVB5病毒株如17Y、19CSF、20CSF、1954/85/UK、2000/CSF/KOR、03001N、CoxB5/Henan/2010、CVB5/SD/09和Faulkner核苷酸和氨基酸同源性分别为80.1%~92.5%和95.0%~97.3%。A210/KM/09株的全基因组序列已获得基因登录号为JX843811。

2. A210/KM/09株各区段核苷酸及其编码的氨基酸序列同源性比对:将A210/KM/09株与GenBank中其他CVB5病毒株(17Y、19CSF、20CSF、1954/85/UK、2000/CSF/KOR、03001N、CoxB5/Henan/2010、CVB5/CC10/10、CVB5/SD/09和Faulkner)全基因组序列各个区段分别比对,结果(表2)发现A210/KM/09株与其他CVB5病毒株各区段核苷酸和氨基酸同源性分别为75.3%~96.3%和85.3%~100.0%。其中与基因组区段VP3、3D的核苷酸的同源性最低。

3. CVB5种系进化分析:通过Mega 5.1软件(Neighbor-joining)对A210/KM/09株以及GenBank中其他CVB5病毒株全基因组和VP1序列进行种系进化分析。结果可见所有中国分离株包括A210/KM/09归为一独立分支(图1)。目前CVB5可形成4个大的进化分支,其中中国分离株包括A210/KM/09属于C,其中C又分为1~4亚支,大部分中国分离株为C4,印度分离株单独为一支,即C2(图2)。提示不同国家或地区以及不同时间分离到的CVB5可属于进化树上不同分支,且亲缘关系存在明显的距离。

4. CVB5基因分型:选取GenBank数据库中111株CVB5的全长VP1基因序列进行系统进化分析,

表2 A210/KM/09株与GenBank中CVB5基因组区段核苷酸(氨基酸)比对

病毒株	全基因组	5'UTR	VP4	VP3	VP2	VP1	2A	2B	2C	3A	3B	3C	3D	3'UTR
17Y	87.4 (96.2)	95.4	92.9 (93.6)	87.4 (88.7)	94.6 (98.5)	92.9 (98.6)	91.1 (96.7)	96.0 (99.0)	84.9 (98.5)	76.4 (95.5)	78.8 (95.5)	77.6 (94.5)	79.8 (96.3)	85.3
19CSF	92.0 (97.0)	95.2	93.5 (93.9)	87.8 (88.7)	93.4 (97.7)	93.5 (98.9)	91.1 (95.3)	95.6 (99.0)	87.6 (98.5)	83.5 (98.9)	86.4 (100.0)	91.3 (97.8)	95.2 (98.3)	94.6
20CSF	91.7 (97.0)	94.8	91.4 (93.6)	87.8 (88.7)	94.3 (98.9)	91.4 (93.6)	91.1 (95.3)	96.3 (99.0)	86.3 (98.5)	83.5 (100.0)	86.4 (100.0)	90.9 (96.7)	95.4 (98.5)	90.8
1954/85/UK	80.1 (95.0)	82.8	93.5 (93.9)	75.4 (87.4)	94.4 (98.9)	93.5 (98.9)	76.0 (86.0)	79.8 (94.9)	80.6 (97.3)	77.9 (96.6)	83.3 (100.0)	83.6 (97.8)	81.9 (97.2)	83.8
2000/CSF/KOR	82.6 (94.9)	87.7	92.9 (93.6)	77.9 (85.7)	94.4 (98.9)	92.9 (98.6)	77.8 (89.6)	81.5 (93.9)	86.5 (97.0)	82.0 (100.0)	81.8 (100.0)	85.4 (98.4)	80.4 (95.9)	83.8
03001N	87.4 (95.9)	95.3	93.3 (98.6)	87.0 (88.2)	93.9 (98.5)	93.3 (98.6)	90.9 (96.7)	96.0 (99.0)	85.4 (98.5)	77.9 (96.6)	80.3 (95.5)	83.4 (94.5)	80.0 (95.5)	88.0
CoxB5/Henan/2010	87.5 (95.1)	95.2	91.4 (93.6)	87.3 (85.3)	94.3 (98.9)	91.4 (93.6)	91.8 (97.3)	96.3 (98.0)	85.9 (98.5)	77.2 (96.6)	80.3 (95.5)	78.0 (95.1)	80.2 (95.7)	88.0
CVB5/CC10/10	92.5 (97.3)	95.7	94.2 (98.6)	88.0 (88.7)	94.0 (98.9)	94.2 (98.6)	90.9 (96.0)	96.3 (99.0)	87.7 (98.8)	84.6 (98.9)	83.3 (100.0)	92.7 (98.9)	96.3 (98.7)	97.3
CVB5/SD/09	88.2 (96.4)	95.4	93.4 (99.3)	86.0 (87.4)	92.8 (98.9)	93.4 (99.3)	90.2 (93.3)	91.9 (98.0)	87.3 (97.9)	79.0 (98.9)	77.1 (95.5)	83.4 (98.9)	82.6 (96.8)	86.7
Faulkner	82.2 (95.2)	82.6	81.6 (96.5)	77.1 (86.6)	82.0 (97.7)	85.6 (96.5)	77.6 (88.7)	78.8 (92.9)	82.6 (97.9)	80.5 (97.8)	81.8 (100.0)	82.5 (98.9)	81.8 (97.2)	89.2

注: 括号外数据为核苷酸, 括号内数据为氨基酸

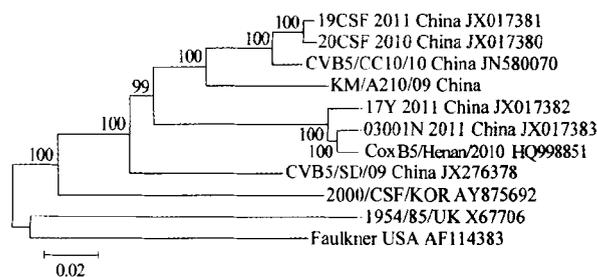


图1 CVB5全基因组核苷酸序列的种系进化分析

发现形成A、B、C和D 4个分支(图2), 对各分支间核苷酸和氨基酸同源性比对, 4个分支核苷酸的差异为14.6%~23.9%; 其中C分支又分为4个亚支(C1~C4), 核苷酸的差异为4.8%~16.4%。依据EV基因分型标准可将目前CVB5分为A、B、C和D 4个基因型^[7]。参照EV71病毒基因亚型分子分型标准, 亚型之间VP1基因核苷酸差异为4%~14%^[8], C基因型可再分为C1~C4基因亚型, D基因型可再分为D1~D4基因亚型。

对CVB5病毒株构建全长VP1核苷酸序列进化树分析, 并依此进行基因分型。结果显示A基因型仅包含CVB5原型株Faulkner(1952年分离)和Ecuador株(1974年分离); B基因型包括1996年荷兰分离株、1998年中国山东分离株、2000年韩国分离株及1970年罗马尼亚分离株; C基因型中C1亚型主要包括1982年芬兰分离株、1990年巴基斯坦分离株、1992年塔吉克斯坦分离株和2006年法国分离株, C2亚型主要包括印度分离株, C3亚型主要包括2009年中国山东分离株, C4亚型主要包括2002年中国浙江和山东分离株、2005年法国株、2005年中国山东分离株及

2010年前后中国多地[河南、吉林、云南(本研究A210/KM/09株)]分离株, D基因型主要为1970—2000年在美国、澳大利亚及欧洲各国流行的分离株^[9]。

5. A210/KM/09株重组分析: 通过NCBI BLAST比对分析基因组结构区段发现, A210/KM/09株的5'-UTR和3'-UTR与CVB5/CC10/10株同源性最高(均为96%); 2A、2B、VP1、VP2、VP3和VP4分别与CoxB5/Henan/2010、20CSF、YZ032/SD/CHN/2005、SH1和17Y株同源性最高; 2C、3A和3B与ECHO25 HN2株同源性最高(分别为89%、90%和94%), 3C和3D与CVB3 Beijing0811株同源性最高(分别为93%和98%)。通过RDP3重组软件对10株CVB5全基因组和其他两种EV血清型(CoxB3和Echo25)进行重组分析, 发现RDP、Bootscan、MaxChi、Chimaera、SiScan和3Seq分别检测出A210/KM/09株有两处重组。一处为开始断裂点在7 294, 结束断裂点为4 342(Bootscan法, $P=4.94 \times 10^{-40}$), 亲本序列为HN-2/E25和03001N/B5; 另外一处为开始断裂点在4 387, 结束断裂点为5 589(Bootscan法, $P=1.06 \times 10^{-37}$), 亲本序列为20CSF/B5和HN-2/E25。

为进一步证实重组, 利用SimPlot 3.5.1软件进行相似性分析发现(图3), A210/KM/09株约在4 500~5 500区段, 与HN-2/E25株相似性最高(约85%), 在6 250~6 500区段则与Fuyang19/CVB3株最高(约95%)。

讨论

本研究对分离自无菌性脑炎患儿的CVB5的全

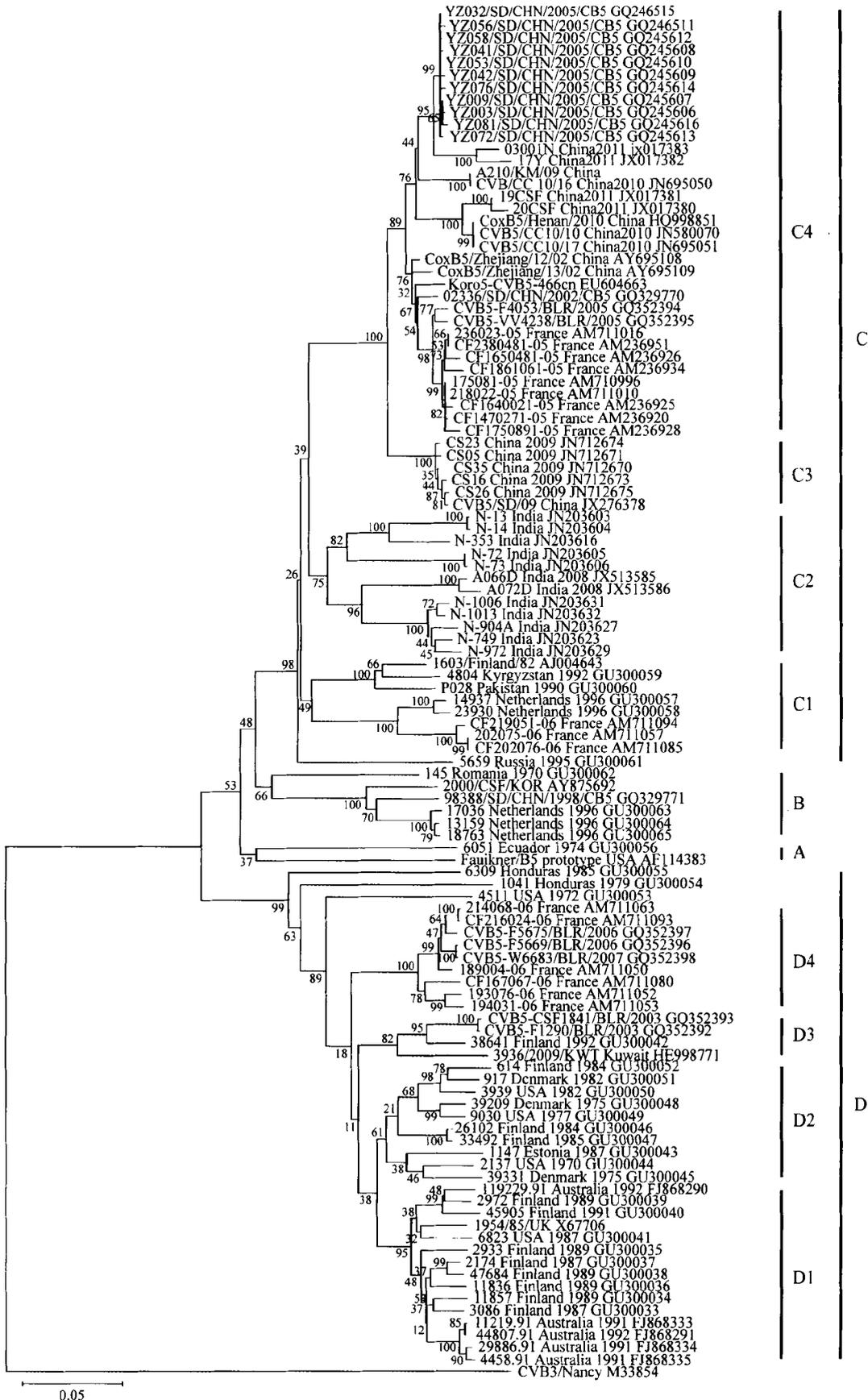


图2 CVB5 VP1 核苷酸序列的种系进化分析

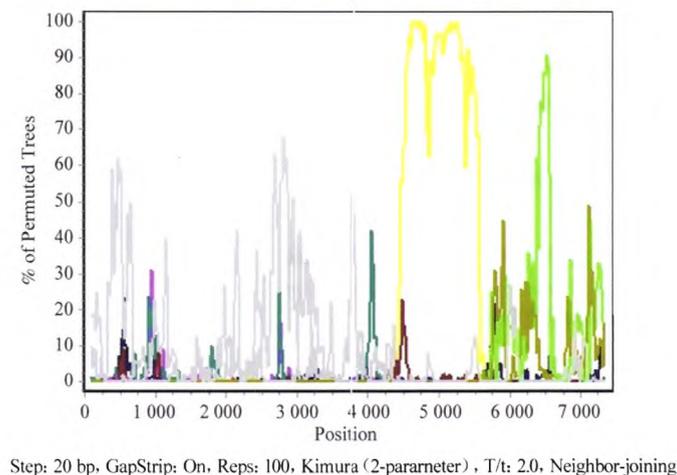
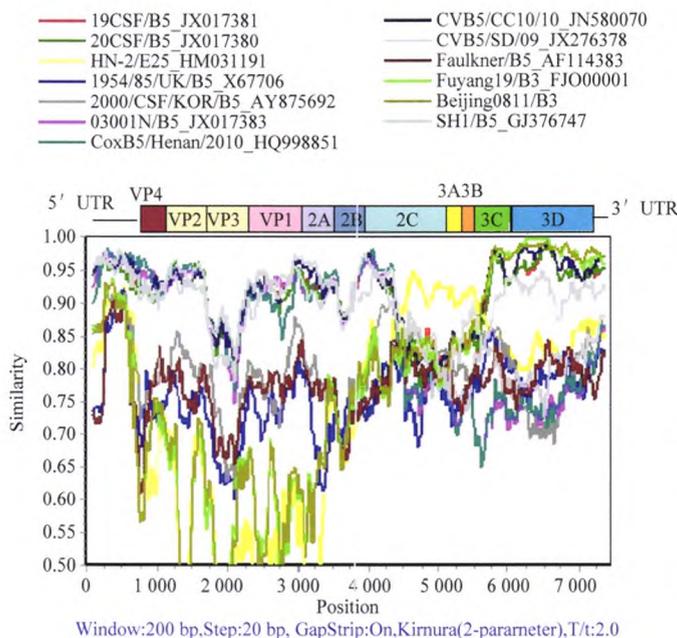


图3 A210/KM/09株与CVB5及GenBank中同源性最高的EV代表株基于病毒基因组全长序列的SimPlot相似性分析

长VP1基因序列进行系统进化分析显示, CVB5可分为4个基因型(A~D), 各基因型间核苷酸差异为14.6%~23.9%; 其中C、D基因型可各再分为4个基因亚型, 各亚型间核苷酸差异为4.8%~16.4%, 结果与文献报道一致^[4, 10]。并发现中国CVB5流行株主要聚集在C3、C4基因亚型。其中C3亚型主要包括2009年中国山东分离株; C4亚型主要包括2002年中国浙江和山东分离株、2005年中国山东分离株及2010年前后中国多地分离株; 国外流行株主要为D基因型和C2亚型。

选取GenBank数据库中所有CVB5全基因组序列, 与本研究A210/KM/09株进行全基因组序列同源性及其相似度等分析, 核苷酸和氨基酸差异分别为80.1%~92.5%和95.0%~97.3%。对基因组结构框架内各区段核苷酸及其编码的氨基酸序列比对, 表

明各区段核苷酸和氨基酸同源性分别为75.3%~96.3%和85.3%~100.0%, 其中VP3、3D区段核苷酸同源性最低。基于CVB5全基因组核苷酸序列的种系进化分析, A210/KM/09株与分离自中国大陆地区的CVB5病毒株CVB5/CC10、17Y、19CSF、20CSF、03001N、CoxB5/Henan/2010和CVB5/SD/09均属于同一遗传谱系, 且与GenBank数据库中CVB5国外分离株1954/85/UK、2000/CSF/KOR和Faulkner属不同遗传谱系; 结合VP1基因分型结果提示, CVB5可能已在我国循环流行多年, 并具有独立的进化趋势。EV普遍存在重组现象^[11, 12]。本研究采用RDP3和SimPlot 3.5.1重组软件分析, 发现A210/KM/09分离株在非结构区域有重组的可能, 但需进一步验证。

参考文献

- [1] Hu YF, Yang F, Du J, et al. Coxsackievirus B5, associated with neurological hand, foot and mouth disease, China[J]. J Infect, 2012, 65(2): 189-191.
- [2] Centers for Disease Control and Prevention(CDC). Nonpolio enterovirus and human parechovirus surveillance-United States, 2006-2008 [J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2010, 59(48): 1577-1580.
- [3] Trallero G, Avellon A, Otero A, et al. Enteroviruses in Spain over the decade 1998-2007: virological and epidemiological studies[J]. J Clin Virol, 2010, 47(2): 170-176.
- [4] Chen P, Tao Z, Song Y, et al. Coxsackievirus B5-associated aseptic meningitis outbreak in Shandong province, China in 2009[J]. J Med Virol, 2013, 85(3): 483-489.
- [5] Ma HX, Mu YJ, Li XL, et al. Identification and phylogenetic analysis of coxsackievirus B5 that caused an outbreak of viral encephalitis in Henan area [J]. Chin J Microbiol Immunol, 2012, 32(7): 610-613. (in Chinese) 马红霞, 穆玉姣, 李幸乐, 等. 引起河南省一起病毒性脑炎暴发的柯萨奇病毒B5的鉴定及其序列分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2012, 32(7): 610-613.
- [6] Ma SH, Pan Y, He CY, et al. Complete nucleotide sequence of a human coxsackievirus A16 strain KMM08 isolated in Kunming, China in 2008[J]. Chin J Epidemiol, 2012, 33(2): 370-375. (in Chinese) 马绍辉, 潘玥, 何春艳, 等. 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[J]. 中华流行病学杂志, 2012, 33(2): 370-375.
- [7] Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, et al. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification [J]. J Virol, 1999, 73(3): 1941-1948.
- [8] Chan YF, Sam IC, AbuBakar S. Phylogenetic designation of enterovirus 71 genotypes and subgenotypes using complete genome sequences[J]. Infect Genet Evol, 2010, 10(3): 404-412.
- [9] Gullberg M, Tolf C, Jonsson N, et al. Characterization of a putative ancestor of coxsackievirus B5 [J]. J Virol, 2010, 84(19): 9695-9708.
- [10] Rezig D, Fares W, Seghier M, et al. Update on molecular characterization of coxsackievirus B5 strains [J]. J Med Virol, 2011, 83(7): 1247-1254.
- [11] Papa A, Dumaidi K, Franzidou F, et al. Genetic variation of coxsackievirus B5 strains associated with aseptic meningitis in Greece[J]. Clin Microbiol Infect, 2006, 12(7): 688-691.
- [12] Han JF, Jiang T, Fan XL, et al. Recombination of human coxsackievirus B5 in hand, foot, and mouth disease patients, China [J]. Emerg Infect Dis, 2012, 18(2): 351-353.

(收稿日期: 2013-08-13)

(本文编辑: 张林东)