

## 两株诺瓦克样病毒新亚型的鉴定

戴迎春<sup>1</sup>, 聂军<sup>1</sup>, 刘翼<sup>1</sup>, 李志峰<sup>1</sup>, 白杨<sup>2</sup>, 李建栋<sup>1</sup>, 俞守义<sup>1</sup>, 江熙<sup>2</sup>(<sup>1</sup>第一军医大学流行病学教研室, 广东广州 510515; <sup>2</sup>辛辛那提儿科研究中心, 辛辛那提, 美国)

**摘要:**目的 对在广州检出的人类杯状病毒(HuCVs)毒株进行分子生物学鉴定, 以确定其是否为新亚型。方法 选择检出的 HuCVs 进行克隆、转化和序列分析, 使用 PHYLIP 进行核酸序列同源性比较, 经 Treeview1.5 绘制进化树。结果 206 份病毒性腹泻标本检出 HuCVs 18 份, 检出率为 8.74%(18/206), 经序列分析证实均为 NVs G II 毒株。任选其中 6 株进行 PCR 产物的克隆和测序, 与 GenBank 中的参考株比较并绘制遗传进化树, 其中 HuCV/NVG II 003/2003/CHN(32282)、HuCV/NVG II 004/2003/CHN(32283)与基因文库中病毒的最高同源性分别为 83%和 87%。结论 广州存在其他国家或地区没有报道过的诺瓦克样病毒新亚型毒株。

**关键词:**人类杯状病毒; 诺瓦克样病毒; 基因亚型; 腹泻

中图分类号: R373 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2004)09-1016-03

### Identification of two new strains of norovirus in Guangzhou

DAI Ying-chun<sup>1</sup>, NIE Jun<sup>1</sup>, LIU Yi<sup>1</sup>, LI Zhi-feng<sup>1</sup>, BAI Yang<sup>2</sup>, LI Jian-dong<sup>1</sup>, YU Shou-yi<sup>1</sup>, JIANG Xi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Epidemiology, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China; <sup>2</sup>Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH 45229-3039, USA

**Abstract: Objective** To identify the molecular biological characteristics of human caliciviruses (HuCVs) and new strains of norovirus (NV) detected in Guangdong Province. **Methods** HuCVs were detected from the stool specimens by reverse transcription-PCR (RT-PCR), and the PCR products were cloned, transformed, and blasted with Genbank. The nucleotide sequence homology was also evaluated with PHYLIP package, and the phylogenetic tree was generated by Treeview. **Results** HuCVs were detected from 18 out of 206 stool specimens from children with viral diarrhea (8.74%), which were all confirmed subsequently as NVs. Two strains HuCV/NVG II 003/2003/CHN(32282) and HuCV/NVG II 004/2003/CHN(32283) from the selected 6 NVs strain were identified as new NV strains. **Conclusion** New NV strains in consistency with the blood-type distribution of Chinese are present in Guangzhou, which have not been reported in other countries.

**Key words:** human caliciviruses; norovirus; sub-genotype; diarrhea

诺瓦克样病毒(NLVs)是引起成人和儿童非菌性急性胃肠炎的重要病原体, 它与札幌样病毒(SLVs)合称人类杯状病毒(HuCVs)<sup>[1]</sup>。随着分子生物学技术的发展和检测手段的进步, HuCVs 对人类的危害性正逐渐被全面、系统地认识, 美国疾病控制中心曾经估计, 在美国 96%的非细菌胃肠炎暴发与 NLVs 有关<sup>[2]</sup>。有研究认为病原微生物会以不同的亚型适应具有不同遗传和生物特征的人群<sup>[3]</sup>, 东方中国人的遗传和生物特征与西方人存在明显的不同。因此, 理论上中国应该存在与自己国家人群遗传和生物特征相适应的 HuCVs 病毒亚型。基于以上可能, 本研究对在广州儿童中进行 HuCVs 感染情况研究中检出的部分 HuCVs 毒株进行了分析<sup>[4]</sup>, 以确定其是否为新的基因

亚型, 并为进一步研究其感染与中国人生物特征的关系奠定基础。

#### 1 对象与方法

##### 1.1 对象

2003 年在广州南方医院收集婴幼儿病毒性腹泻标本 206 份。用兰州生物制品研究所生产的轮状病毒 ELISA 检测试剂盒检测, 轮状病毒阴性者进行 RT-PCR 以检测 HuCVs。

##### 1.2 方法

1.2.1 毒株 阳性对照为 EP20020005 Musgrove, 由荷兰国立公共卫生和环境研究院 Erwin Duizer 博士惠赠。

1.2.2 病毒 RNA 提取 取约 1 g 粪便样品加 Hanks 液 10 ml (含庆大霉素 8 000 U), 并彻底震荡使之悬浮, 4 ℃ 3 000 r/min 离心 20 min, 取上清并保存在 -70 ℃ 冰箱中备用。病毒核酸提取用 Trizol (Gibco 方法) 从 100 μl 粪便悬液中提取、纯化待检标本中的 RNA, RNA 保存于 -70 ℃。

收稿日期: 2004-04-22

基金项目: 广东省医学科研基金(A2003420)

Supported by Medical Research Foundation of Guangdong Province (A2003420)

作者简介: 戴迎春(1979-), 女, 第一军医大学在读硕士研究生, 电话: 020-61648311, E-mail: yingchun78@hotmail.com

1.2.3 反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 HuCVs RT-PCR 分别采用两组针对 RNA 聚合酶 (RDRP)区设计的引物,第 1 组 Jiang's 引物 P289A/P290A 序列(表 1)<sup>[5]</sup>。NLVs 的 PCR 产物大小为 319 bp,而 SLVs 的 PCR 产物大小为 331 bp。因两者的扩增产物大小接近,在电泳中不易区别,故采用针对 NLVs 的第 2 组 Koopmans 引物 JV13I/JV12Y 序列(表 2)<sup>[6]</sup>,得到 327 bp 的扩增产物。PCR 产物采用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳,相对分子质量标准采用大连宝生物 100 bp DNA Ladder Marker。

表 1 用于 HuCVs PCR 扩增的寡核苷酸引物  
P289A/P290A

Tab.1 Oligonucleotide primers P289A/P290A for detecting HuCVs

Primer	Sequence	Location	Polarity
P289H	5'-TGACGATTTTCATCATCACCATA-3'	4865-4886	-
P289I	5'-TGACGATTTTCATCATCCCGTA-3'	4865-4886	-
P290H	5'-GATTACTCCAGGTGGGACTCCAC-3'	4568-4590	+
P290I	5'-GATTACTCCAGGTGGGACTCAAC-3'	4568-4590	+
P290J	5'-GATTACTCCAGGTGGGATTCAAC-3'	4568-4590	+
P290K	5'-GATTACTCCAGGTGGGATTCCAC-3'	4568-4590	+

表 2 用于 NLVs PCR 扩增的寡核苷酸引物  
JV13I/JV12Y

Tab.2 Oligonucleotide primers JV13I/JV12Y for detecting NLVs

Primer	Sequence	Location	Polarity
JV12Y	5'-ATACCACTATGATGCAGAYTA-3'	4858-4878	-
JV13I	5'-TCATCATCACCATAGAAIGAG-3'	4552-4572	+

1.2.4 测序 将 PCR 产物用 DNA 快速纯化试剂盒(鼎国公司)纯化后,插入 DNA 克隆入质粒 pGEM-T (Promega)后,转化进入大肠杆菌 DH5a 感受态细胞,扩增后质粒 DNA 经 1%琼脂糖凝胶电泳和限制性酶切筛选,PCR 鉴定阳性的克隆用通用引物 T7 和 SP6 测序。

1.2.5 序列分析比较 序列分析软件为 WINDNANESIS2.5,序列排队用 CLUSTALX,使用 PHYLIP 进行核苷酸序列同源性比较,用 Treeview1.5 绘制进化树。对库比较使用 BLASTN 软件,参考序列均来源于 GenBank。其中新亚型鉴定由美国辛辛那提州儿科研究中心完成。

## 2 结果

### 2.1 HuCVs 的检出率

206 份标本中,轮状病毒阳性 134 份,阴性 72 份。72 份阴性标本用 P289A/P290A 引物检测 18 份

扩增出目的片段,HuCVs 检出率为 8.74%(18/206)。再用 JV13I/JV12Y 引物该 18 份标本亦扩增出目的片段,测序结果均证实为 NLVs。

### 2.2 HuCVs 阳性株序列

从检测出的 HuCVs 阳性标本中选择 6 株进行了 PCR 产物的克隆和测序,将引物序列去除后与参考株比较绘制遗传进化树。6 株 HuCVs 分别命名为:HuCV/NVG II 001/2003/CHN (32278),HuCV/NVG II 002/2003/CHN (32280),HuCV/NVG II 003/2003/CHN (32282),HuCV/NVG II 004/2003/CHN (32283),HuCV/NVG II 005/2003/CHN (32284),HuCV/NVG II 006/2003/CHN (32285),序列见图 1。

### 2.3 新亚型与 GenBank 所有 HuCVs 序列同源性比较

遗传进化分析表明其中一株(32283)与其同源性最高的 Lordsdale virus 同源性仅为 87%,而另一株(32282)与其同源性最高的 Lordsdale virus 及 Hawaii virus 的同源性均仅为 81%~83%,该 2 株 HuCVs 不同于目前存在的亚型,可以定义为新的亚型<sup>[7]</sup>。此外,其中新亚型 32282 与 32283 之间的同源性仅为 75%(图 2)。

## 3 讨论

HuCVs 是世界范围内最常见的引起人类非菌性胃肠炎的病原微生物之一,以往的研究证实 HuCVs 中的 NLVs 是急性腹泻爆发的主要病原。上世纪 90 年代以来,逐渐确定了 HuCVs 在散发性腹泻中的病原作用,并证实 HuCVs 同样是散发性急性腹泻的重要病原,在很多国家其作用仅次于轮状病毒。

有研究证明 NLVs 感染剂量较低 (<100 病毒颗粒),但有些志愿者实验显示,即使在高浓度病毒攻击时(>108 病毒颗粒)某些志愿者仍未感染,而且这种现象与受试者的免疫因素无关<sup>[8,9]</sup>。2002 年 Hutson 等<sup>[10]</sup>通过研究首次提出 NLV 感染与 ABO 血型有联系的假设,Marionneau 等<sup>[3]</sup>在兔出血热病毒(一种动物杯状病毒)能够结合兔上皮细胞 H2 型组织血型抗原的启发下,成功地证实了人类诺瓦克样病毒的一种亚型(rNV)能够与 secretor 个体的 H1 和 / 或 H(3/4)结合。人类在进化的过程中以其生物的多样化(如血型的多样化,包括 ABO 血型、Lewis 血型等)来适应微生物世界的同时,微生物也在以其多样化的表型适应人类世界。由此类推,由于人类血型的多样化,可能还存在多种与不同血型结合方式的新的诺瓦克样病毒亚型,事实上目前国外研究已经证实了存在 6 种与不同血型结合的诺瓦克样病毒亚型<sup>[11,12]</sup>。这些发现将为现代人群流行病学研究、传染病发病机制和疾病防治研究注入新的理念和思路,即同一病原微生物会以不同的

32278p289hic

TAATCNTCAAGGTTNGNGTTGATTACTCCAGGTGGGATTNCACGCAGCAGCGGGCAGTGTGGCAGCAGCACTTGAGATCATGGTGAGGTTCTCTGCTGAACCACAGTTA  
GCACAAATAGTGGCTGAGGACCTGCTAGCACCAAGTGTGGTTGATGTGGTGACTTCAAGATCACCATCAATGAAGGCCTACCTTCTGGTGTGCCTTGACCTCACAGTG  
GAACTCCATTGCCACTGGTTGCTTACCTTGTGTGCCCTTTNCTGAAGTGACAGGACTAGGGCCCTGACATCATAACAAGCAATTNCCANATTCNC

32280p289hic

TGATTACTCCAGGTGGGATTNCACGCAGCAGCGGGCAGTGTGGCAGCAGCACTTGAGATCATGGTGAGGTTCTCTGCTGAACCACAGTTAGCACAAATAGTGGCTGAGG  
ACCTGCTAGCACCAAGTGTGGTTGATGTGGTGACTTCAAGATCACCATCAATGAAGGCCTACCTTCTGGTGTGCCTTGACCTCACAGTGAAGTCCATTGCCACTGG  
TTGCTTACCTTGTGTGCCCTTTCTGAAGTGACAGGACTAGGTCCCAACATCATAAANCCAC

32282p289hic

GGGTGATTCAAGATTCAATCAACGAGGGGTTACCCTCTGGTGTACCTTGACCTCACNATGGANCTCCATTGCCNCTGGCTCCTCACACTATGTGCACTGTGCAAGT  
CACAGATCTGTCCCGACATNACCANN

32283p289hic

TCAGTTGATTACTCCAGGTGGGATTNCACACAACAGAGAGCTGTGTTGGCAGCAGCTCTAGAAATCATGGTTAAATTCTCCTCAGAACCACATTGGCTCAGGTGGTCGC  
AGAAGACCTTCTTCTCCTAGCGTGGTGGACGTGGGTGACTTCGAATATCAATCAACGAGGGTCTCCCTCTGGGGTGCCCTGCACCTCCAATGGAAGTCCATCGCCC  
ACTGGCTTCTCACTCTACTGTGCGCTGTGCGAAGTTACAAATGCTGTACCNNATCATCATAACATAC

32284p289hic

ACAACAGAGAGCTGTGTTGGCAGCAGCTCTAGAAATCATGGTTAAATTCTCCTCAGAACCACATTGGCCAGGTAGTCGCAGAAGACCTTCTTCTCCTAGCGTGGTGG  
ATGTGGTGACTTCAATATCAATCAACGAGGGTCTCCCTCTGGGGTACNTGCACCTCCAATGGAAGTCCATNGCCACTGGCTTCTCACTCTCTGTGCGCTNNAC  
NAAGTTACAAATCTGTCCCNACATCATAAGGCT

32285p289hic

GNNTGATTACTCCAGGTGGGATTNCACGCAGCAGCGGGCAGTGTGGCAGCAGCACTTGAGATCATGGTGAGGTTCTCTGCTGAACCACAGCTAGCACAAATAGTGGCTG  
AGGACCTGCTAGCACCAAGTGTGGTTGATGTGGTGACTTCAAGATCACCATCAATGAAGGCCTACCTTCTGGTGTGCCTTGACCTCACAGTGAAGTCCATTGCCAC  
TGGTTGCTAACCTTGTGTGCCCTTTCTGAGGTGACAGGAAGTCCAGCCGACATCATAACAAGCTAATNCCA

图 1 6 株 HuCVs 的 RNA 聚合酶核苷酸序列

Fig.1 RNA polymerase sequence of 6 HuCVs strains

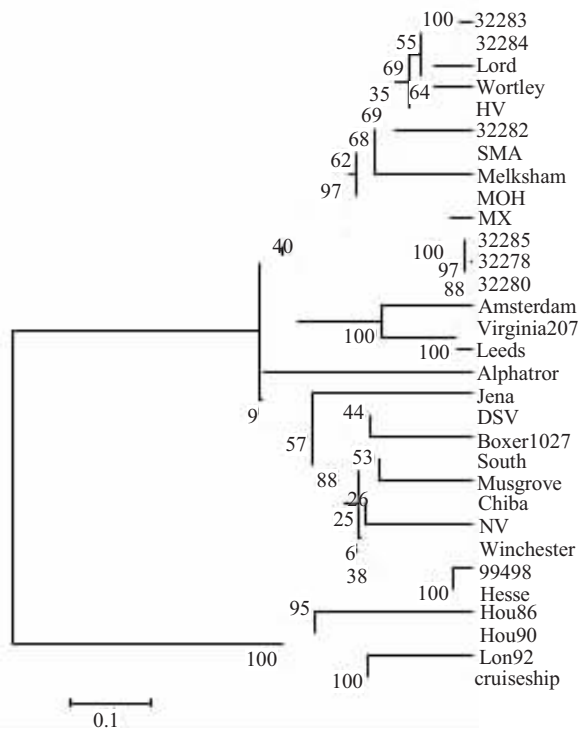


图 2 NLVs 聚酶区(nt4591-4864)核苷酸序列遗传进化树

Fig.2 Phylogenetic tree of the sequence (nt 4591-4864) of NLV RNA polymerase region

亚型适应具有不同生物特征的人群。

我国人群血型的分布特征明显不同于西方国家。在我国 ABO 血型分布为 :A 型 28.95%、B 型 28.32%、O 型 33.8%、AB 型 8.5%，而白种人 ABO 血型分布为 A 型为 30%、B 型为 5%、O 型为 60%、AB 型为 5%。可以看出我国人群的 B 型血比例明显高于美国和欧洲等以白种人为主的西方国家，而 O 型血比例则明显低于美国和欧洲等以白种人为主的西方国家。这一不同也许导致诺瓦克样病毒亚型的不同，即我国可能存在着不同于其他国家流行毒株的新病毒亚型。由于 HuCVs 是根据病毒 RNA 聚合酶或衣壳蛋白区核苷酸和氨基酸序列的同源性比较来进行分型或亚型的鉴定<sup>[1,13]</sup>。故在本研究中,对检测出的 NLVs 的 RNA 聚合酶区(nt4591-4864)核苷酸序列进行了克隆、测序及遗传进化分析鉴定,并经美国辛辛那提州儿科研究中心鉴定,其中两株 32283 株与 GenBank 中登录毒株同源性最高的 Lordsdale 病毒的同源性仅为 87%。而 32282 株与其同源性最高的 Lordsdale 病毒及 Hawaii 病毒的同源性也仅为 81%~83%,32282 株与 32283 株之间的同源性仅为 75%。该两株 HuCVs 不同于目前公布的 HuCVs 毒株的亚

(下转 1022 页)

- 198-201.
- [2] 徐小平, 李开宗, 窦科峰, 等. 辅酶 I 对缺血再灌注损伤诱导 L02 肝细胞凋亡的影响[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(6): 512-4.  
Xu XP, Li KZ, Dou KF, *et al.* Effect of coenzyme I on apoptosis of liver cell line L02 induced by ischemia-reperfusion injury[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(6): 512-4.
- [3] 王晓琳, 刘荣, 董晓军, 等. 大鼠肝缺血再灌注后急性肺损伤实验研究[J]. 解放军医学杂志, 2002, 27(3): 231-3.  
Wang XL, Liu R, Dong XJ, *et al.* Study of acute lung injury after liver ischemia reperfusion[J]. Med J Chin PLA, 2002, 27(3): 231-3.
- [4] Fondevila C, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW, *et al.* Hepatic ischemia-reperfusion injury- a fresh look[J]. Exp Mol Pathol, 2003, 74(2):86-93.
- [5] Cruz RJ, de Figueiredo LF, Braz JL, *et al.* Systemic and regional effects of supraceliac aortic occlusion during experimental hepatic vascular exclusion[J]. Am J Surg, 2003, 185(4): 388-93.
- [6] 熊成龙, 吴在德, 陈孝平, 等. 常温肝脏缺血再灌注损伤防治的实验研究[J]. 中国病理生理杂志, 1998, 14(1): 35-8.  
Xiong CL, Wu ZD, Chen XP, *et al.* An experimental study on prevention of liver injury during normothermic ischemia and reperfusion[J]. Chin J Pathophysiol, 1998, 14(1): 35-8.
- [7] 王成友, 倪勇, 何海萍, 等. 常温下肝脏缺血/再灌注损伤及其机制的实验研究[J]. 中国基层医药, 2003, 10(3): 196-7.  
Wang CY, Ni Y, He HP, *et al.* Experimental study of injure and its mechanism in the ischemia and reperfusion period in rabbit liver [J]. Chin J Pri Med Pharm, 2003, 10(3): 196-7.
- [8] Ohkohchi N. Mechanisms of preservation and ischemic/reperfusion injury in liver transplantation[J]. Transplant Proc, 2002, 34(7): 2670-3.
- [9] Kang KJ. Mechanism of hepatic ischemia/reperfusion injury and protection against reperfusion injury[J]. Transplant Proc, 2002, 34(7): 2659-61.
- [10] Weinbroum AA, Shapira I, Abraham RB, *et al.* Mannitol dose-dependently attenuates lung reperfusion injury following liver ischemia reperfusion: a dose-response study in an isolated perfused double-organ model[J]. Lung, 2002, 180(6): 327-38.
- [11] 褚延魁, 马庆久, 刘维, 等. 肝硬化鼠肝缺血再灌注胃粘膜病理损伤的研究[J]. 肝胆外科杂志, 2003, 11(1): 70-1.  
Chu YK, Ma QJ, Liu W, *et al.* Pathomorphological change in gastric mucosa after liver ischemia reperfusion in cirrhotic rats [J]. J Hepatobil Surg, 2003, 11(1): 70-1.
- [12] 蔡宏波, 吕新生, 王志明, 等. 肝脏手术中肝门阻断对肺脏影响的实验研究[J]. 中华肝胆外科杂志, 2000, 6(5): 377-9.  
Cai HB, Lu XS, Wang ZM, *et al.* Influence of hepatic inflow occlusion on postoperative lung injury in rabbits[J]. Chin J Hepatobiliary Surg, 2000, 6(5): 377-9.

(上接 1018 页)

型, 即 HuCV/NVG II003/2003/CHN(32282)和 HuCV/NVG II 004/2003/CHN(32283) 可以定义为 NVs 新亚型, 证实了我国存在 NLVs 新亚型。该 2 株新亚型 NLVs 的病原学、生物学特点及与组织血型抗原结合特征有待于进一步研究加以探讨。

致谢: 本实验得到南方医院儿科姚英民教授的大力协助, 深表感谢。

#### 参考文献:

- [1] Green KY, Chanock RM. Taxonomy of the caliciviruses[J]. J Infect Dis, 2000, 181 (S2): S322-30.
- [2] Mead PS, Slutsker L, Griffin PM, *et al.* Food-related illness and death in the united states reply to dr. hedberg [J]. Emerg Infect Dis, 1999, 5(6): 841-2.
- [3] Marionneau S, Ruvoen N, Le Mouillac-Vaidye B, *et al.* Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals[J]. Gastroenterology, 122(7): 1967-77.
- [4] 戴迎春, 聂军, 刘翼, 等. 广州地区人类杯状病毒感染的初步研究[J]. 第一军医大学学报, 2004, 24(3): 296-9.  
Dai YC, Nie J, Liu Y, *et al.* Fundamental study of human calicivirus infection in Guangzhou[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2004, 24(3): 296-9.
- [5] Jiang X, Huang PW, Zhong WM, *et al.* Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR[J]. J Virol Methods, 1999, 83(1-2): 145-54.
- [6] Vennema H, de Bruin E, Koopmans M. Rational optimization of generic primers used for Norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction[J]. J Clin Virol, 2002, 25 (2): 233-5.
- [7] Green KY, Ando T, Balayan MS, *et al.* Taxonomy of the caliciviruses[J]. J Infect Dis, 2000, 181 (S2): S322-30.
- [8] Lopman BA, Brown DW, Koopmans M. Human caliciviruses in Europe. J Clin Virol, 2002, 24(2): 136-60.
- [9] Graham DY, Jiang X, Tanaka T, *et al.* Norwalk virus infection of volunteers: new insights based on improved assays[J]. J Infect Dis, 1994, 170(1): 34-43.
- [10] Hutson AM, Atmar RL, Graham DY, *et al.* Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type[J]. J Infect Dis, 2002, 185(9): 1335-7.
- [11] Lindesmith L, Moe C, Marionneau S, *et al.* Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection[J]. Nat Med, 2003, 9(5): 548-53.
- [12] Huang P, Farkas T, Marionneau S, *et al.* Noroviruses bind to human ABO, Lewis, and secretor histo-blood group antigens: identification of 4 distinct strain-specific patterns[J]. J Infect Dis, 2003, 188(1): 19-31.
- [13] 金奇, 毕胜利, 陈继明, 等. 医学分子病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 565-7.