

· 论 著 ·

## 东莞市 1 例星状病毒核酸检测及分析

黄勇,黎景全,李艳芬,李宇政,陈永迪

**摘要:**目的 对星状病毒进行核酸快速诊断并对其部分核酸序列进行测序分析。方法 采用 RT-PCR、基因测序技术对标本中的核酸进行检测分析。结果 RT-PCR 结果表明标本为星状病毒阳性,对 PCR 扩增产物测序得到了 409bp 长度的 ORF2 部分基因序列,经 Blast 比对发现其为 型血清型,与北京分离的一株星状病毒序列(GenBank 号 FJ755403.1)最为相似,仅有一个 C→T 的核苷酸变异,但编码的氨基酸并无改变,均为甘氨酸(Gly)。结论 应用 PCR 技术扩增星状病毒特定片段可用于病毒的快速检测,同时对扩增产物测序还可对病毒进行分型,并了解其基因变异情况。

**关键词:**星状病毒;逆转录-多聚酶链反应;基因测序

中图分类号:R373.25 文献标识码:A 文章编号:1009-9727(2012)6-671-03

Detection and analysis of nucleic acids of an astrovirus in Dongguan City in 2010. HUANG Yong, LI Jing-quan, LI Yan-fen et al. (*Dongguan Municipal Center for Disease Control and Prevention, Dongguan 523129, Guangdong, P. R. China*)

**Abstract:** Objective To determine the genome sequence of astrovirus nucleic acid for rapid diagnosis of astrovirus infection in diarrheal children. Methods The stool samples were collected from diarrhea children and the sequence of astrovirus nucleic acids was determined by using RT-PCR method. Results The astrovirus was detected and the 409bp sequence belonged to part of ORF2 gene was detected after amplification by RT-PCR and identified to be type astrovirus and similar to the virus isolated from Beijing (GenBank number FJ755403.1) by Blast. There was only one nucleotide difference (C→T), without difference at amino acid level. Conclusions PCR technology can be used for rapid detection of astrovirus infection and genotyping of this virus.

**Key word:** Astrovirus; RT-PCR; Gene sequencing

人星状病毒(*Human Astrovirus*, HAstV)属于星状病毒科(Astroviridae)哺乳动物星状病毒属(Mamastrovirus),为无包膜单股正链 RNA 病毒,1975 年由 Appleton 和 Higgins 首次发现<sup>[1]</sup>,是儿童病毒性腹泻的主要病原体之一。成人病例主要出现在免疫功能低下病人以及养老院中的老年人群<sup>[2,3]</sup>。HAstV 经粪-口途径传播,潜伏期 1~3d,临床表现以腹泻为特征,伴呕吐、腹痛、发热等症状。

HAstV 基因组全长 6400~7300 核苷酸(nt),由 5' 非编码区(80~85nt)、三个开放阅读框架 ORF1a、ORF1b、ORF2、和 3' 非编码区(80~85nt)组成,3' 末端有一个约 30nt 的多聚腺苷酸尾。ORF1a 和 ORF1b 为高度保守区,编码蛋白酶和 RNA 多聚酶,ORF2 编码衣壳蛋白前体。目前 HAstV 划分为 8 个血清型。通过对 HAstV 基因组特定序列进行分析,可将其分为 8 个基因型,与血清型划分一致。

通过 RT-PCR 技术可方便快速的进行 HAstV 的检测。根据研究目的可设计选取不同的引物。针对

编码非结构蛋白的基因组保守区域 ORF1a 和 ORF1b<sup>[2,4-5]</sup>的引物敏感性高,可以检测到所有血清型,常用于大量标本中 HAstV 的筛查,如 Mon340/Mon348、Mon343/344 等。有些引物则针对编码衣壳蛋白的 ORF2 区域<sup>[4,6]</sup>,敏感性稍差,但可对扩增产物进行核酸序列分析来确定型别,常用的这类引物有 Mon269/Mon270、prBEG/Mon2 等。也可直接采用血清型特异性引物<sup>[4,7]</sup>(如 AST-S1~AST-S8)进行 RT-PCR,根据产物条带分子量鉴定型别。本实验采用 Mon269/Mon270 引物扩增 ORF2 基因 5' 序列对一疑似病例进行星状病毒的检测,并对扩增产物测序进行分型及分析。

## 1 材料与方法

1.1 材料 检测标本为医院某腹泻儿童病例的粪便。所用核酸提取试剂为 QIAamp Viral RNA Mini Kit, RT-PCR 试剂为 QIAGEN<sup>®</sup> OneStep RT-PCR Kit。实验用引物序列如下: Mon269 5' -CAACTCAGGAAACAGGGTGT-3' Mon270 :TCAGATGCATTGTCATTG GT-3' ,目的

作者单位:东莞市疾病预防控制中心检验科 广东 东莞 523129

作者简介:黄勇(1975~),男,硕士研究生,副主任技师,主要从事微生物检验研究。

片段大小为 449bp。

1.2 方法

1.2.1 标本处理 取 1ml 标本处理液 (含 2mM 的 L-谷氨酰胺及 5%牛血清的 MEM 液 ,7.5%NaHCO<sub>3</sub> 溶液调 PH 至 7.0), 加入 0.1g 或 100ul 粪便标本, 震荡 3 次 ,每次 10s。然后静置 10min ,再以 8 000 rpm 离心 5min 或 3 000 rpm 离心 30min ,吸取上清进行下一步试验。

1.2.2 病毒 RNA 的提取 用 QIAamp Viral RNA Mini Kit 试剂盒 按说明书提取便悬液中的病毒 RNA。

1.2.3 RT-PCR RT-PCR 反应体系 5x QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer 10μ l ;dNTP Mix (containing 10mM of each dNTP)2μ l ;QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix 2μ l ;Mon269 引物(10μ M)2μ l ;Mon270 引物(10μ M)2μ l ;模板 5μ l ;水 27μ l ;共 50μ l 反应体系。RT-PCR 循环条件如下 :50℃ 30min , 95℃ ,15min ;循环参数为 94℃ 30s ;55℃ 30s ;72℃ 60s ;35 个循环 ,再 72℃ 延伸 10 min ,4℃ 终止反应。

1.2.4 电泳 取 PCR 产物与 DNA 上样缓冲液混匀上样 ,1.5%的琼脂糖凝胶 (含有 SYBR safe DNA gel stain)100V 电泳 1h 左右。电泳结束后在凝胶图像分析仪上进行观察拍照。

1.2.5 序列测定及分析 对 PCR 扩增产物进行纯化 , 纯化试剂为 Qiagen 公司的 MinElute PCR Purification Kit ,以 Mon269/Mon270 引物和 Big Dye Terminator cycle sequencing kit V3.1 试剂盒进行荧光标记反应 ,反应条件见试剂盒说明书。标记结束后用 ABI 公司的 Xterminator 纯化试剂盒纯化 ,然后用 ABI 3130 基因分析仪测序 ,测序用 36cm 毛细管 POP7 胶 按仪器说明书进行操作。用 Lasergene7 软件对序列进行分析。

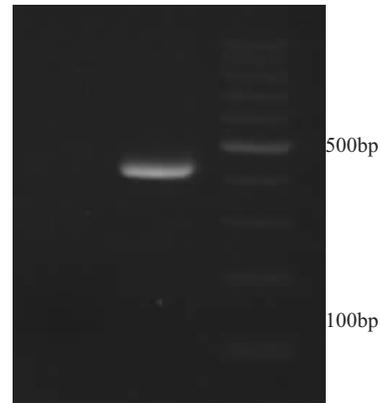
2 结果

2.1 RT-PCR 扩增结果 预期扩增片段大小为 449bp ,结果显示得到了预期大小的片段 ,见图 1。

2.2 片段测序结果 扩增片段位于 ORF2 基因前段。对 PCR 扩增产物双向测序结果进行拼接得到 409bp 长度 (不包括两侧引物)的片断 ,序列如下 :CACAG GACCAAAACCTGCGATATGTCAGAGAGCAACAGCA ACCCTTGGAACGGTCGGGTCAAACACCAGTGGCAC TACCGAGATTGAGGCGTGTATTCTCCTCAACCCTGT CCTTGTTAAGGACGCTACTGGGAGCACTCAGTTTGG CCCTGTGCAGGCGCTAGGTGCTCAGTAT TCCATGTG GAAACTGAAGTATCTGAATGTCAAACCTGACTTCTAT GGTTGGTGCCTGCTGCCGTCAATGGCACTGTCCTTAG

AGTTTCACTTAACCCTACATCTACACCGTCATCCACT AGTTGGTCAGGGTTGGGTGCACGTAAGCACCTTGAT GTTACAGTGGGTAAAAATGCAACATTTAAATTGAAA CCCTCTGACCTCGGTGGGCCTAGAGATGGCTGGTGG CTCACAAAC

从第 2 位碱基开始 ,408 个碱基共编码 136 个氨基酸 ,对应 ORF2 基因的第 75-210 位氨基酸。经 Blast 比对可知其为 1 型星状病毒 ,与北京的一株星状病毒序列(GenBank 号 FJ755403.1 ,Human astrovirus 1 Beijing/176/2006/CHN)相似性很高 ,仅有一个核苷酸差异。变异位点见序列中斜体下划线处 ,为一个 C→T 的基因变异 ,对应的是 ORF2 编码的第 187 位氨基酸的 GGC 转变为测序结果中编码第 113 氨基酸的 GGT ,密码子 GGC 与 GGT 编码的氨基酸并无改变 均为甘氨酸(Gly)。



注 :从左至右为阴性对照 ,标本 ,Marker

Note :The lanes from left to right are negative control ,specimen ,marker

图 1 星状病毒 RT-PCR 结果

Fig 1 The RT-PCR result of HAstV

3 讨论

HAstV 感染常见于秋冬季 ,多为散发 ,亦可在医院、幼儿园、老人院、学校和军队引起暴发流行。值得注意的是 ,有部分 HAstV 感染者是无症状的。有研究报告约有 2%的儿童感染后无临床症状 ,但可排毒<sup>[8]</sup>。这类感染者在病毒传播环节中更隐蔽 ,不易被察觉。

世界范围内广泛流行的 HAstV 主要是血清型 1 型。方肇寅对中国七个地区 5 岁以下儿童进行研究表明 ,星状病毒平均检出率为 5.5% ,95%患者年龄在 2 岁以下 ,91.4%为 1 型 ,还有部分为 3、5、8 型。全年都有发病 ,发病高峰主要集中在 10 月份到次年 1 月份<sup>[9]</sup>。深圳市近年婴幼儿 HAstV 感染的检出率为 7.75%<sup>[10]</sup>。

很多文献报道 HAstV 和其它病原体混合感染的现象非常普遍。巴西一项 5 岁以下儿童腹泻病原学调查发现 ,30.4%的 HAstV 病例混合感 (下转第 676 页)

- [2] Hou TW, Yin XL, Chen X, et al. Distribution of genotype of extended spectrum beta-lactamases-producing *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Chin J Lab Med 2003, 26(9): 546-548. (In Chinese)  
(侯天文, 尹晓琳, 陈兴, 等. 绿脓假单胞菌超广谱 β-内酰胺酶基因型分布[J]. 中华检验医学杂志, 2003, 26(9): 546-548.)
- [3] Wang H, Chen MJ. Carbapenemases: A bothering problem in the future [J]. CHIN J Intern Med 2003, 5(42): 354-356. (In Chinese)  
(王辉, 陈民钧. 碳青霉烯酶: 未来困扰我们的难题[J]. 中华内科杂志, 2003, 5(42): 354-356.)
- [4] Stove CK, Pham QX, Erwin AL, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: an opportunistic pathogen [J]. Nature 2000, 406(6799): 959-964.
- [5] Stokes H W, Hall R M. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons [J]. Mol Microbiol 1989, 3(12): 1669-1683.
- [6] Yang WQ, Jia WX, Yin CF, et al. Explanation and location of *Pseudomonas aeruginosa* category I-related gene [J]. Chin J Antibiotics 2007, 12(32): 12. (In Chinese)  
(杨维青, 贾文祥, 殷长甫, 等. 铜绿假单胞菌 I 类整合子相关基因的解析和定位[J]. 中国抗生素杂志, 2007, 12(32): 12)

收稿日期: 2012-03-30 编辑: 吴中华

(上接第 672 页)

染轮状、杯状和腺病毒<sup>[11]</sup>。越南的研究显示 30% 的 HAsV 患儿混合感染了轮状、诺如、札幌和腺病毒<sup>[12]</sup>。方肇寅报道的 HAsV 和轮状病毒混合感染率 5.5%~55.3%<sup>[9]</sup>。深圳市近年婴幼儿 HAsV 感染数据表明, HAsV 合并其他腹泻病毒的感染占阳性数的 59.38%, HAsV 和 RV 混合感染为主, 占 43.75%<sup>[10]</sup>。混合感染的临床症状比单纯 HAsV 感染的要严重, 而且也给原发病因的确定带来了困难。

有研究表明星状病毒 1~8 型毒株的 ORF2 基因分为两个区域, 1~415 位氨基酸为高度保守区, 415 位之后的为高变区<sup>[13]</sup>。本实验扩增区域位于 ORF2 基因的第 75~210 位氨基酸, 靠近 5' 端, 为其保守区域。与之前北京的一株星状病毒序列最为相似, 只有 1 个位点的核苷酸变异, 但由于密码子的简并性, 氨基酸并无改变。实验标本来自一位 1 岁儿童腹泻病例, 发病时间是 8 月份, 实验结果表明此病例也是一个混合感染者, 同时感染有腺病毒。这例病例的很多特征与上述文献中的报道类似。今后还将对更多腹泻病例的标本进行 HAsV 检测分析, 获取更多数据, 以便更好的反映出东莞市星状病毒感染流行的特点。

## 参考文献

- [1] Appleton H, Higgins PG. Viruses and gastroenteritis in infants [J]. Lancet 1975, 1(7919): 1297.
- [2] Guix S, Caballero S, Villena C, et al. Molecular Epidemiology of Astrovirus Infection in Barcelona Spain [J]. J Clin Microbiol 2002, 40(1): 133-139.
- [3] Marshall JA, Bruggink LD, Sturge K, et al. Molecular features of astrovirus associated with a gastroenteritis outbreak in an aged-care centre [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2007, 26(1): 67-71.
- [4] Guix S, Bosch A, Pinto RM. Human astrovirus diagnosis and typing: current and future prospects [J]. Lett Appl Microbiol 2005, 41(2): 103-105.
- [5] Belliot G, Laveran H, Monroe SS. Detection and genetic differentiation of human astroviruses: phylogenetic grouping varies by coding region [J]. Arch Virol 1997, 142(7): 1323-1334.
- [6] Noel JS, Lee TW, Kurtz JB, et al. Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing [J]. J Clin Microbiol 1995, 33(4): 797-801.
- [7] Sakamoto T, Negishi H, Wang QH. Molecular epidemiology of astroviruses in Japan from 1995 to 1998 by reverse transcription-polymerase chain reaction with serotype-specific primers (1to8) [J]. J Med Virol 2000, 61(3): 326-331.
- [8] Moser LA, Schultz-Cherry S. Pathogenesis of astrovirus infection [J]. Viral Immunol 2005, 18(1): 4-10.
- [9] Fang ZY, Sun YP, Ye XH, et al. Astrovirus infection among hospitalized children with acute diarrhea in seven regions of China, 1998-2005 [J]. Chin J Epidemiol 2006, 27(8): 673-676. (In Chinese)  
(方肇寅, 孙亚萍, 叶新华, 等. 中国七个地区 1998-2005 年急性腹泻住院患儿中星状病毒感染研究 [J]. 中华流行病学杂志, 2006, 27(8): 673-676.)
- [10] Zhang YH, Luo XF, Wang Q, et al. Analysis of astrovirus infection in 413 infants with acute diarrhea in Shenzhen City [J]. China tropical medicine 2011, 11(7): 803-805. (In Chinese)  
(张银辉, 罗小芳, 王琼, 等. 深圳地区 413 例急性腹泻婴幼儿星状病毒感染分析 [J]. 中国热带医学, 2011, 11(7): 803-805.)
- [11] Santos RA, Borges AM, da Costa PS, et al. Astrovirus infection in children living in the central west region of Brazil [J]. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007, 102(2): 209-213.
- [12] Nguyen TA, Hoang L, Pham LD, et al. Identification of human astrovirus infections among children with acute gastroenteritis in the southern part of Vietnam during 2005-2006 [J]. J Med Virol 2008, 80(2): 298-305.
- [13] Zhong JY, Zhu B, Zhou R, et al. Phylogenetic Analysis of the ORF2 Gene of Human Astrovirus [J]. J Mod Clin Med Bioeng 2006, 12(2): 129-131. (In Chinese)  
(钟家禹, 朱冰, 周荣, 等. 星状病毒 ORF2 基因的克隆及进化树分析 [J]. 现代临床医学生物工程学报, 2006, 12(2): 129-131.)

收稿日期: 2012-06-24 编辑: 符式刚