DOI:10.3969/j.issn.1002－2694.2021.00.019

·实验研究·

云南省1株基孔肯雅毒株全基因组序列测定及特征分析

陈瑶瑶，赵晓南，孙艳红，张美玲，周洁楠

摘　要：目的　对1例缅甸输入基孔肯雅热病例血清标本进行病毒分离及全基因组测序，分析其基因特征。**方法**　采用real-time RT-PCR方法对标本进行检测，分离培养后获得毒株，对病毒核酸扩增后的产物进行全基因组测序，使用DNAStar 7.1软件对测序结果进行拼接，Mega5.0软件对序列进行比对和系统发生树构建。**结果**　病例血清标本核酸检测显示CHIKV阳性，经分离培养获得CHIKV毒株（YN0627株），全基因组测序得到其序列，YN0627全长为11 586 nt，其基因结构符合CHIKV的基因特征。系统进化分析显示，YN0627与东中南非洲遗传谱系（East，Central and South African Lineage，ECSA）的其他流行株聚集在一起，属于ECSA谱系。YN0627的编码区与参考序列相比，核苷酸同源性为85.24％～99.96％，氨基酸同源性为95.34％～99.97％，结构蛋白编码区域有28个氨基酸变异位点。**结论**　云南省输入性CHIKV-YN0627属于ECSA谱系，且观察到多个氨基酸位点突变，提示云南省应当加强对CHIKV的监测和研究。

关键词：基孔肯雅病毒（CHIKV）；病毒分离；全基因组测序；序列分析

中图分类号：R373　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1002－2694(2021)03－0221－04

Sequencing and characterization analysis of a chikungunya virus imported into Yunnan Province

CHEN Yao-yao，ZHAO Xiao-nan，SUN Yan-hong，ZHANG Mei-ling，ZHOU Jie-nan

（*Yunnan Provincial Center for Disease Control and Prevention*，*Kunming* 650022，*China*）

Abstract：We performed viral isolation and whole genome sequencing of a serum sample from an imported chikungunya case from Myanmar，and analyzed its genetic characteristics. Real-time RT-PCR was used to detect Chikungunya virus（CHIKV），and the CHIKV strain was obtained after isolation and culture. The amplified products of the CHIKV nucleic acid were whole genome sequenced，and DNAStar 7.1 and Mega5.0 software were used for sequence assembly and phylogenetic tree construction. The real-time RT-PCR results indicated CHIKV positivity in the serum specimen，and we obtained the CHIKV strain（YN0627）and whole genome sequence. The full length of YN0627 was 11586 nt，and its genetic structure was consistent with the genetic characteristics of CHIKV. Phylogenetic analysis showed that YN0627 clustered with other endemic strains of the East，Central and South African（ECSA）lineage，and belonged to the ECSA lineage. Compared with the reference sequences，the nucleotide similarity of YN0627 was 85.24％～99.96％，and the amino acid sequence similarity was 95.34％～99.97％. There were 28 amino acid mutation sites in the structural protein coding region. These results suggest that CHIKV monitoring and research should be strengthened in Yunnan province.

Keywords：Chikungunya virus（CHIKV）；virus isolation；whole genome sequence；sequence analysis

Corresponding author：Zhou Jie-nan，Email：1191087570@qq.com

基孔肯雅病毒（Chikungunya virus，CHIKV）是披膜病毒科甲病毒属的单股正链RNA病毒，主要通过白纹伊蚊和埃及伊蚊叮咬传播[1]。1952年，在坦桑尼亚首次检测到CHIKV[2]，随后在乌干达和许多其他撒哈拉以南非洲国家均发现了CHIKV，在过去的5年里，更是以惊人的速度扩散到亚洲、非洲、欧洲和美洲的100多个国家，成为日益严重的全球健康威胁[3]。1986年云南省从蝙蝠脑组织中分离出一株CHIKV毒株[4]，这是我国首次分离得到

通讯作者：周洁楠，Email：1191087570@qq.com；
ORCID:0000-0002-1517-5044
作者单位：云南省疾病预防控制中心，昆明　650022

CHIKV 毒株,2008 年在广东出现了首例输入性基孔肯雅热病例[5],随后在我国的其他地方不断出现输入性病例和本地疫情[6-8]。云南省位于中国西南边陲,与多个东南亚国家接壤,经济贸易往来及国际间旅行日益频繁,存在极大输入性风险,再加上丰富多样的气候类型,适合伊蚊生存繁殖的自然地理环境[9],云南省基孔肯雅热流行风险正在加剧。2019 年 6 月,通过流行病学调查及实验室检测,云南省确诊 1 例基孔肯雅热输入性病例,本研究通过对 CHIKV 进行分离培养和全基因组测序,分析病毒遗传进化趋势及氨基酸位点变异情况,为云南省防控基孔肯雅热提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 标本来源 2019 年 6 月 27 日采集得到 1 名缅甸仰光飞抵昆明长水机场的旅客血清,送至云南省疾病预防控制中心排查基孔肯雅热。

1.2 核酸提取及 real-time RT-PCR 检测 采用江苏硕世全自动核酸提取仪和病毒核酸提取试剂盒(货号:SDK60104)进行核酸提取,病毒核酸检测使用基孔肯雅病毒检测试剂盒(江苏硕世,货号:JC40104),具体反应体系和反应条件参照试剂盒说明书。

1.3 病毒分离培养 将患者血清接种于 80%单层非洲绿猴肾细胞(Vero 细胞)中,置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱吸附 2 h 后,加入含有 2%胎牛血清、7.5%碳酸氢钠及双抗的维持液(维持液基质 DMEM),继续放入培养箱进行培养。每日观察病变情况。收获盲传第 2 代 72 h 培养物进行后续实验。

1.4 测序引物 设计参考相关文献[8],合成基孔肯雅全基因组扩增引物,对 CHIKV 进行分段扩增,以便后续测序。引物由昆明擎科生物公司合成。

1.5 全基因组测序 使用 TAKARA One Step RT-PCR 试剂盒(货号:RR057)对病毒核酸进行扩增,反应体系:2×1 step Buffer 12.5 μL,1 step Enzyme mix 1 μL,Forward Primer(10 μmol/L)1.5 μL,Reverse Primer(10 μmol/L)1.5 μL,无酶水 6 μL,模板 2.5 μL,反应体系总体积 25 μL。反应程序:50 ℃ 30 min,94 ℃ 2 min,94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 2.5 min,共 30 个循环,72 ℃再延伸 7 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳进行检测,使用凝胶成像系统观察结果,阳性扩增产物送至昆明擎科生物公司进行测序。

1.6 序列拼接和系统进化发生树构建及分析 使用 DNAStar 7.1 软件对测序结果进行拼接,在 NCBI 上下载参考株序列,通过 Mega5.0 软件对序列进行比对和系统发生树构建。采用 Neighbor-joining 法构建进化树,bootstrap 值设置为 1 000。

2 结 果

2.1 流行病学调查 患者赵某,男,43 岁,云南人。在缅甸经商,经常往返于昆明-仰光。患者于 2019 年 1 月前往仰光,2019 年 6 月 26 日返回昆明,期间当地有蚊传疾病散发,自述有蚊虫叮咬史。

2.2 Real-time RT-PCR 检测 病例血清标本核酸检测显示 CHIKV 阳性,Ct 值为 15.73。

2.3 病毒分离鉴定 将 1 代细胞培养物接种细胞后,观察细胞病变情况,细胞逐渐融合、堆聚,在 72 h 后病变达到 80%,将细胞板置于−70 ℃冰箱。反复冻融 2 次,取 200 μL 融解后的培养物进行核酸提取及病毒核酸检测。Real-time RT-PCR 结果显示 CHIKV 阳性,Ct 值为 9.14。见图 1。

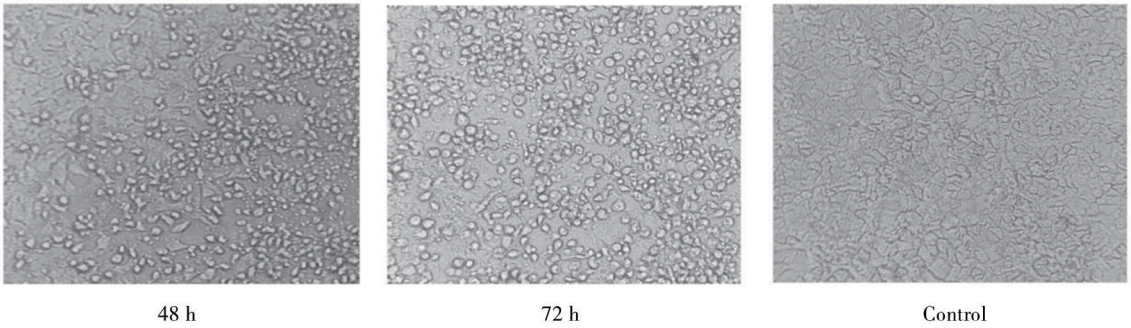


图 1 CHIKV 感染 Vero 细胞病变情况

Fig.1 Cytopathogenic effects after Vero cells infection with CHIKV

2.4 全基因组测序 对测序数据进行拼接处理后获得 CHIKV 全基因组序列,命名为 YN0627,全长为 11 586 nt,其基因结构符合 CHIKV 的基因特征,基因组内包含两个完整的编码框,分别编码 4 个非

结构蛋白（nsP1-nsP2-nsP3-nsP4）和 5 个结构蛋白（C-E3-E2-6K-E1），两个编码框之间有一个非编码的连接区，长度为 65 个核苷酸。非结构蛋白编码区共包含 7 425 个核苷酸，编码 2 474 个氨基酸；结构蛋白编码区共包含 3 747 个核苷酸，编码 1 248 个氨基酸，均不存在碱基的插入和缺失。5′端起始的 76 个核苷酸和 3′端 273 个核苷酸为非编码区。

2.5　全基因组进化分析　通过对 YN0627 的全基因组以及编码区进行 BLAST N 检索，得到序列相似度最高的均为 CHIKV。将 YN0627 的基因组编码区与选取的参考序列进行多重比对，系统进化分析显示 YN0627 与来自泰国的 MN630017、MK468801、来自中国的 MH400249、来自孟加拉的 MF773566 等毒株关系密切，并与东中南非洲遗传谱系（East, Central and South African Lineage, ECSA）的其他流行株聚集在一起，显示出紧密的进化相关性，见图 2。与 ECSA 谱系内的参考序列进行多重比对，YN0627 的编码区与参考序列相比，核苷酸同源性为 85.24%～99.96%，氨基酸同源性为 95.34%～99.97%；与非洲原型株 S27 比较，核苷酸同源性为 97.33%，氨基酸同源性为 98.53%。

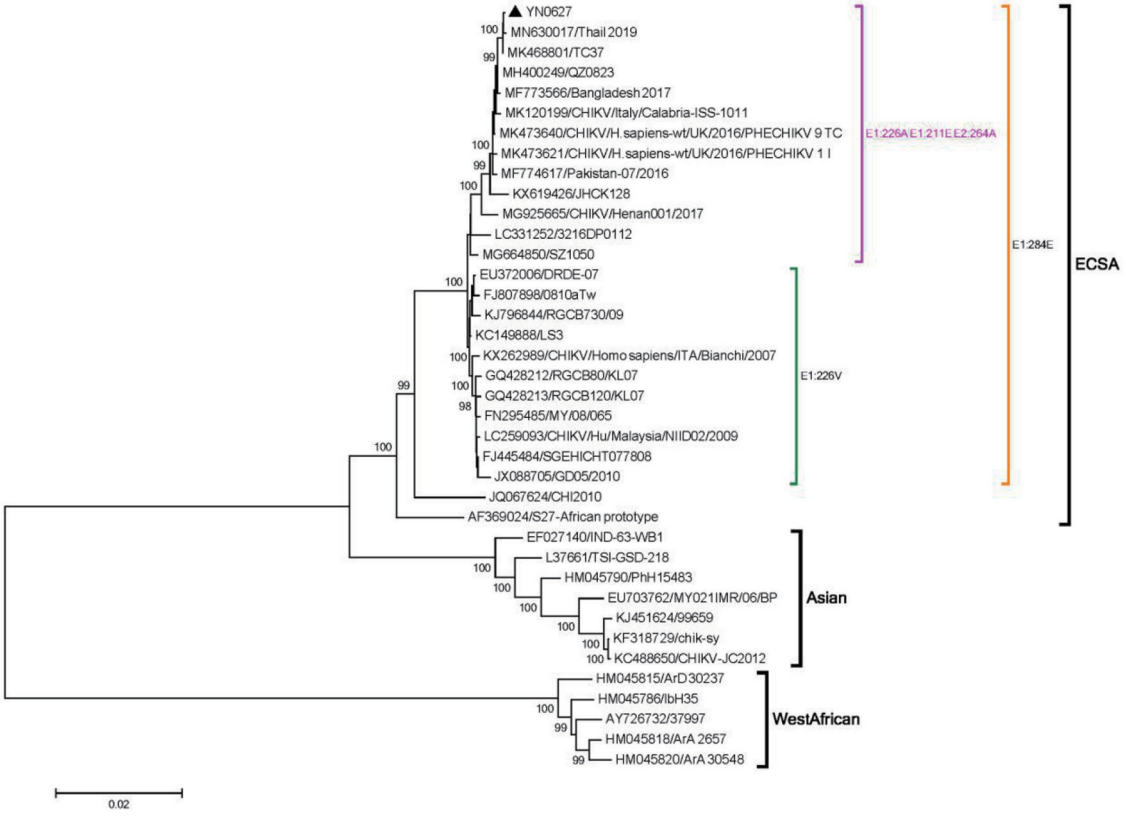


图 2　CHIKV-YN0627 系统进化树

Fig.2　Phylogeny of CHIKV-YN0627

2.6　基因位点分析　在 YN0627 的 5 个结构蛋白的编码区域中，一共观察到 28 个氨基酸变异位点。未观察到 E1 中的对白纹伊蚊的适应性突变 A226V，但是有 E1：D284E、E1：K211E、E2：V264A 和 E2：I211T 突变，其他一些位点，例如可能影响氨基酸 pH 值的 E2：K252Q[5] 没有被观察到；E2 蛋白上两个重要糖基化抗原位点 263N 和 345N 呈高度保守[10]，见表 1。

3　讨　论

系统进化分析通过不同的地理位置将 CHIKV 分为 3 个遗传谱系：东中南非洲（ESCA）谱系、亚洲（Asian）谱系和西非（West Africa）谱系。从本研究的系统进化分析结果来看，YN0627 与东南亚各国毒株关系密切，属于 ESCA 遗传谱系，与流行病学调查资料结果相一致，是来自东南亚国家缅甸的输入性病例。中国分离得到大部分基孔肯雅毒株都属于输入型的，因此国内各毒株间进化关系并不是特

表 1 CHIKV YN0627 结构蛋白氨基酸变异位点分析

Tab.1 Amino acid variation sites in the structural protein of CHIKV-YN0627

Protein	Polypeptide position	Protein position	Strians	
			S27	YN0627
C	23	23	P	S
	27	27	V	I
	63	63	K	R
	73	73	K	R
E3	284	23	I	T
E2	382	57	G	K
	399	74	I	M
	404	79	G	E
	485	160	N	T
	489	164	A	T
	506	181	L	M
	519	194	S	G
	530	205	G	S
	536	211	I	T
	589	264	V	A
	592	267	M	R
	624	299	S	N
	637	312	T	M
	669	344	A	T
	700	375	S	T
	711	386	V	A
6K	756	8	V	I
	802	54	I	V
E1	1020	211	K	E
	1078	269	M	V
	1093	284	D	E
	1126	317	I	V
	1131	322	V	A

别密切,但是我们依旧需要对该病毒进行密切关注和更加深入的研究,特别应该关注能够增强病毒毒力和适应性突变的位点。

CHIKV 共编码 4 个非结构蛋白和 5 个结构蛋白,非结构蛋白不会包装到最终病毒体中,结构蛋白才是宿主体液免疫应答和大多数疫苗的关键靶点[11],因此本研究着重对结构蛋白的氨基酸变异位点进行分析。分析结果发现 YN0627 没有 E1:A226V 的突变,而观察到了 E1:K211E、E1:D284E、E2:V264A 和 E2:I211T 突变。E1:A226V 突变在 2005 年首次被发现,该位点的突变能够提高 CHIKV 在白纹伊蚊中的适应性[12],在东南亚白纹伊蚊为优势种群的多个地区,都分离到了有 E1:A226V 突变的 CHIKV 毒株[13]。但是有研究证明,在 E1:226A 的基础上引入 E1:K211E 和 E2:V264A 的突变,能使 CHIKV 在感染埃及伊蚊 14 天后,其体内的滴度成倍数增长:在中肠中增加 13 倍,在腿和翅膀中增加 15 倍,在唾液中增加 62 倍[14]。有学者在云南省边境地州开展蚊媒媒介的相关监测和研究,结果表明,白纹伊蚊在云南省内分布广泛,但是近年来埃及伊蚊的分布区域呈现出逐渐扩大的趋势,埃及伊蚊孳生优势较白纹伊蚊明显,有取代白纹伊蚊成为优势种及不断向周边区域扩散和定殖的分布趋势[15-16],综合分离株 YN0627 中存在 E1:226A 的基础上的 E1:K211E 和 E2:V264A,文献实验数据显示这些突变能够提高 CHIKV 对埃及伊蚊的适应性,提示云南省应当加强对 CHIKV 的监测和研究。

在 YN0627 中还观察到了 E1:D284E 和 E2:I211T 突变,E1:D284E 对膜融合和病毒体的装配有很重要的作用[12]。另有研究发现,E2:I211T 突变在最近发现的 ESCA 谱系中普遍存在,这表明 E2:I211T 的突变对于 CHIKV 适应 ECSA 流行区域普遍存在的某些特定条件非常重要[17]。我们还观察到了结构蛋白上的其他变异如 C:P23S,C:V27I,E3:I23T,6K:V8I,E1:M269V 等等,但是这些位点对病毒功能的影响尚不清楚。

基于我国的基孔肯雅热疫情一直以输入性的散发病例为主,国内人群缺乏免疫力,普遍易感,且目前尚无有效的疫苗和抗病毒药物,做好对 CHIKV 感染源头的防控,即防蚊灭蚊工作至关重要。还需加强重点人群宣教,到高风险地区旅居的人应采取基本的防蚊措施,返回时如感不适,就医时应主动提供自身旅居史。同时需加强医务人员培训,提高医务人员对疾病的识别能力和对传染病的敏感性,防止本地病例的产生。

利益冲突:无

引用本文格式:陈瑶瑶,赵晓南,孙艳红,等.云南省 1 株基孔肯雅毒株全基因组序列测定及特征分析[J].中国人兽共患病学报,2021,37(3):221-224,229. DOI:10.3969/j.issn.1002-2694.2021.00.019

参考文献:

[1] Vairo F, Haider N, Kock R, et al. Chikungunya: epidemiology, pathogenesis, clinical features, management, and prevention [J]. Infect Dis Clin North Am, 2019, 33(4): 1003-1025. DOI: 10.1016/j.idc.2019.08.006

(下转第 229 页)