

## 论著·基础研究

## 柯萨奇病毒 B5 基因组进化存在结构蛋白编码区 VP4 的重组\*

答 嶸<sup>1</sup>, 王 伟<sup>2△</sup>

(西安交通大学第一附属医院:1. 检验科;2. 神经外科, 陕西西安 710061)

**摘要: 目的** 重组是肠道病毒进化的重要机制, 大多数重组事件发生在包括 P2 和 P3 的肠道病毒的非编码区中, 但是在埃可病毒 30 株中首次发现了作为蛋白质编码区的 VP4 区域中的重组, 本研究旨在探讨柯萨奇病毒 B5(CVB5) 中是否存在类似的重组事件。**方法** 从 GenBank 中检索 CVB5 的核苷酸序列, 分别在 5'UTR 和 VP1 区域中进行系统发育分析。此外, 跨越 5'UTR-VP4-5'VP2 的部分基因组用于检测重组并使用序列相似性作图(Similarity plot)来分析重组体。**结果** 5'UTR 和 VP1 系统发育树显示 5'UTR 和 VP1 之间有 4 个病毒株位于不同簇中, 表明这些病毒株中存在重组事件。Similarity plot 分析表明, CVB5 AY875692 的 5'UTR-VP4-5'VP2 区域存在交叉, 序列分析证明 VP4 区域存在重组位点。**结论** CVB5 在 VP4 区域具有重组事件, 表明结构蛋白编码区亦可作为 CVB5 重组的候选基因位点。

**关键词:** 柯萨奇病毒 B5; 基因重组; 系统发育分析

**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2019.23.001

**中图法分类号:** R446.5; Q933

**文章编号:** 1673-4130(2019)23-2817-05

**文献标识码:** A

## Recombination event in VP4 gene region of coxsackievirus B5 during evolution\*

DA Rong<sup>1</sup>, WANG Wei<sup>2△</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710061, China)

**Abstract: Objective** Recombination is the import mechanism during the evolution of enterovirus and most recombination events were reported occurring in non-coding region in enterovirus including P2 and P3, but the recombination in VP4 region which is the protein encoding region has been determined in Echovirus 30 strains. This study aim to explore whether the similar recombination event exists in coxsackievirus B5 (CVB5). **Methods** The previously sequenced nucleotide sequences were retrieved from GenBank and phylogenetic analysis was used in 5'UTR and VP1 region, respectively. Furthermore, the partial genome spanning 5'UTR-VP4-5'end VP2 were used to detect the recombination and the recombinant were analyzed by using similarity plot analysis. **Results** The incongruence between phylogenies of 5'UTR and VP1 region showed 4 strains in different clusters between 5'UTR and VP1, which indicated there were recombination events in those virus strains. The similarity plot analysis showed there was cross in 5'UTR-VP4-5'end VP2 region of CVB5 AY875692, and the sequence analysis proved the recombination existed in VP4 region. **Conclusion** The recombination event in VP4 region suggested the structure protein coding region also can be a candidate locus in recombination of CVB5.

**Key words:** Coxsackievirus B5; recombination; phylogeny

柯萨奇病毒 B5(CVB5) 是小核糖核酸病毒科中肠病毒属的成员, 并且已鉴定出 4 种不同的血清型(A~D)<sup>[1]</sup>。CVB5 与心肌炎和脑炎具有密切关系<sup>[2-5]</sup>, 因此了解 CVB5 进化的机制将改善相关疾病的控制。

CVB5 是单正链 RNA 病毒, 基因组长 7.3 kb, 包含 5'UTR 和 3'UTR, P1、P2 和 P3, 衣壳蛋白 VP1~4 由 P1 区域编码。最初在脊髓灰质炎病毒中发现了重组, 并且已经提出并通过体外研究证明了复制(模板

\* 基金项目: 陕西省自然科学基础研究计划项目一般项目(面上)(2019JM-445); 西安交通大学第一附属医院新医疗新技术项目(XJYFY-2016j5)。

作者简介: 答嵘, 女, 副主任技师, 主要从事临床微生物学研究。△ 通信作者, E-mail: wei\_wangdoc@xjtu.edu.cn。

本文引用格式: 答嵘, 王伟. 柯萨奇病毒 B5 基因组进化存在结构蛋白编码区 VP4 的重组[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(23): 2817-2821.

转换)和非复制(链断裂和重新连接)机制<sup>[6-7]</sup>。对已经测序的肠道病毒完整基因组序列的分析表明,重组在非脊髓灰质炎肠道病毒的进化中亦具有重要意义<sup>[8-10]</sup>。对 CVB5 的研究表明,重组可能发生在 2C 结构域内<sup>[11]</sup>,这与肠道病毒重组热点首选在非编码基因组区域一致。然而,最近的一项研究表明,在埃可病毒 30 的 VP4 区域中存在重组基因位点,这是第一次在肠道病毒的蛋白质编码区中发现重组事件<sup>[12]</sup>,为了阐明 CVB5 中是否存在这种现象,本研究通过分析 GenBank 数据库中已测序的 CVB5 基因组序列以研究在蛋白编码基因组区域例如 VP4 中是否存在类似的重组事件。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 本研究使用的多个已报道的 CVB5 病毒分离株的 5' UTR 和 VP1 核苷酸序列在 GenBank 中以 FASTA 格式检索。每个病毒分离株都标记了登录号、位置和分离年份。这些序列用于通过最大似然法确定 5' UTR 和 VP1 区域的系统发育和通过序列相似性作图(Similarity plot)分析重组事件。

## 1.2 方法

**1.2.1 5'UTR 与 VP1 进化分析** 共检索到 53 个 CVB5 同时含有 5' UTR 和 VP1 核苷酸序列,HE998771 序列因为在其 5' UTR 区域中仅有 198 nt 用于比对,故未纳入本研究分析。其他 52 个序列使用 Clustal W 进行多序列比对。对于 5' UTR 和 VP1,根据 AF114383 的序列,所选区域跨越 468 nt 至 742 nt 和 2 447 nt 至 3 295 nt。通过使用基于 Tamura-Nei 模型的最大似然法推断进化<sup>[13]</sup>。在分支旁显示了相关分类群聚集在一起的树的百分比。通过将 Neighbor-Join 和 BioNJ 算法应用于使用最大复合似然(MCL)方法估计的成对距离矩阵,然后选择具有优越对数似然值的拓扑,自动获得用于启发式搜索的初始树。树按比例绘制,分支长度以每个位点的取代数测量。该分析涉及 52 个核苷酸序列。所有包含缺口和缺失数据的位置都被消除。进化分析使用 MEGA X 中构建<sup>[14]</sup>。

**1.2.2 基因重组的检测** 长度为 845 nt 的亚基因组序列(根据 AF114383.1 从 257 nt 到 1 101 nt)覆盖部分 5' UTR(257 nt 至 742 nt),VP4(743 nt 至 949 nt)和 VP2 的 5' 端来自所有可用的 32 个 CVB5 序列的(950 nt 至 1 101 nt)用于检测重组事件。SimPlot 软件(3.5 版本)用于查询序列和基于 5' UTR 和 VP1 簇分组的不同簇中的其他序列之间的相似性图和步进扫描分析,使用 200 nt 的滑动窗口大小和 20 nt 的步长<sup>[15]</sup>。

**1.2.3 基因重组的分析** 为了确认重组事件,序列 480 nt(长度为 625 nt 至 1 104 nt,根据 AY875692.1)

覆盖部分 5' UTR(625 nt 至 745 nt),VP4(746 nt 至 952 nt)和 5' VP2 的末端(953 nt 至 1104 nt)用于与相关 CVB5 进行重组分析。此外,笔者使用 Nucleotide BLAST 程序(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)搜索了 AY875692.1 的 5' UTR(625 nt 至 745 nt)和 VP2(953 nt 至 1104 nt)在 GenBank 中最匹配的核苷酸序列,其中 JX976772.1/Shandong/2010 和 KT285000.1/Hong Kong/1972 是与 AY875692.1 最相似的序列用于进行重组分析。

## 2 结 果

**2.1 VP1 进化分析** 将基于 CVB5 的 VP1 区序列构建的系统发育树聚类成 3 组,其进一步聚类成 16 个谱系(a 至 p)。每个谱系包含 1 个或多个病毒分离株,并用相同形状和颜色的相同符号标记。第 1 组仅包含 1 个谱系作为 a;第 2 组包含 8 个谱系,包括 b 至 i;其他谱系包括 j 至 p 构成第 3 组。几乎所有来自亚洲地区的病毒分离株(除了病毒分离株 KP233830 和病毒分离株 KT285018)聚集在第 2 组中,而来自欧洲、美洲和澳大利亚地区的大多数病毒分离株聚集到第 3 组。大多数具有相似分离时间的病毒分离株聚集成相同的谱系。基于 VP1 的系统发育树见图 1。

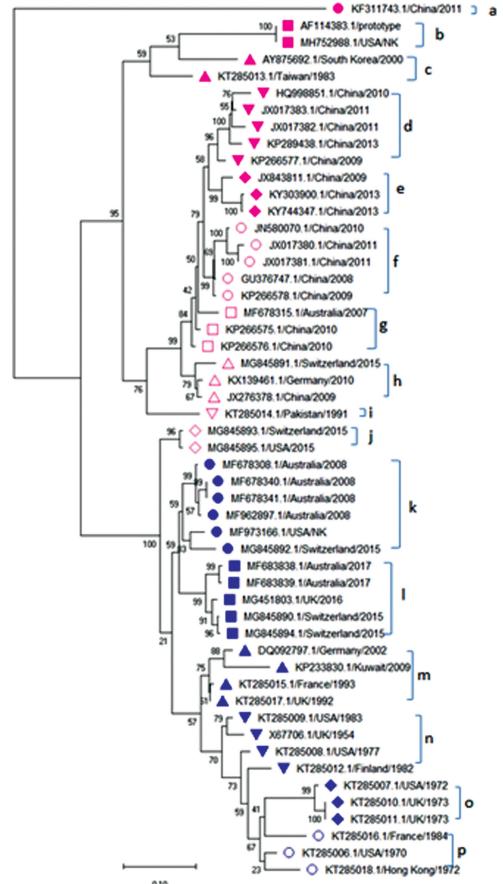


图 1 CVB5 VP1 区的系统发育分析树

**2.2 5'UTR 进化分析** 用于 VP1 系统发育分析的相同病毒分离株同时用于 5' UTR 区域分析,见图 2。树被标记为与 VP1 树中的谱系一致。该树可分为 2

个分支,4 个病毒分离株包括 AY875692、MG845892、KF311743 和 MG845891, 改变了谱系分布。谱系 a 和 b 与谱系 j~p 聚类, 但 MG845892 与谱系 h 反向聚类。此外, 病毒分离株 AY875692 显示出与谱系 c 分开的簇。其他谱系显示出与 VP1 树相似的分布。

**2.3 基因重组检测** 通过 Similarity plot 进一步分析了 5'UTR 和 VP1 的系统发育树的上述不一致的重组事件。使用亚基因组跨部分 5'UTR-VP4-5'VP2 来检测重组事件, 病毒分离株 KF311743. 1/China/2011 的序列与 5'UTR 区域的其他谱系高度相似, VP4 区域有明显的相似性降低, VP2 区域相似性低。AY875692. 1/Korea/2000 与 j\_MG845895. 1/USA/2015 的 5'UTR 和 MG845892. 1/Switzerland/2015 病毒株 VP2 的 5'末端具有更高的相似性(图 3b)。MG845891. 1/Switzerland/2015 和 MG845892. 1/Switzerland/2015 的另一序列的图均显示这些病毒分离株聚集成 3 组, 并且在具有较低相似性的组中 5'UTR-VP4 连接处的深度下降(图 3c 和 3d)。

**2.4 基因重组分析** 为了阐明病毒分离株 AY875692. 1/Korea/2000 的 VP4 区域中的重组事件, 进行序列分析, 基因组区域覆盖部分 5'UTR(625 nt 至 745 nt)、VP4(746 nt 至 952 nt)和具有相关序列的 VP2 的 5'末端(953 nt 至 1 104 nt)。病毒分离株序列与 5'UTR 中的 MG845893. 1/Switzerland/2015 和 VP2 的 5'末端的 MG845892. 1/Switzerland/2015 高度相似。这 3 个核苷酸序列之间的比较显示可能的重组基因座是 803 nt 和 804 nt, 见图 4。JX976772. 1/Shandong/2010 和 KT285000. 1/Hong Kong/1972

13

的两个病毒分离株匹配部分 5'UTR 和 5'end VP2 核苷酸序列, 相似性分别是 93% (E 值: 4e-40) 和 92% (E 值: 3e-52), 见图 5。这 3 个核苷酸序列之间的比较显示可能的重组基因座是 873 nt 和 874 nt。可能的 2 个重组位点均位于 VP4 区域。

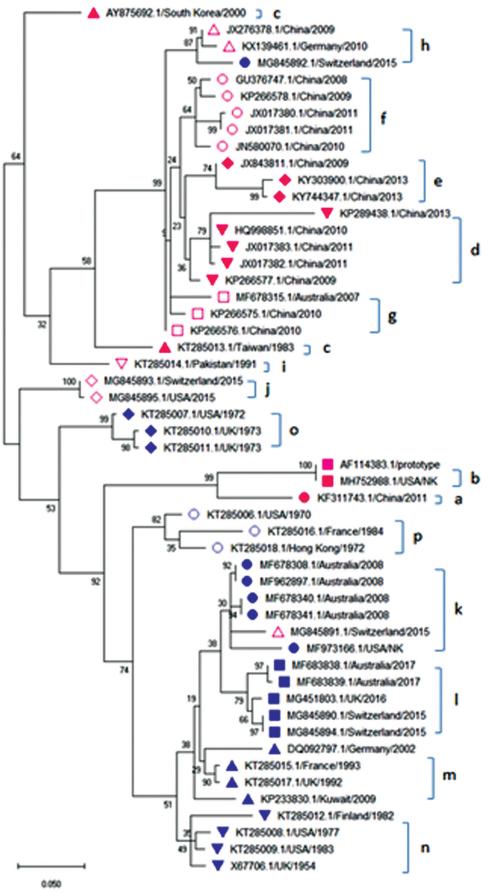
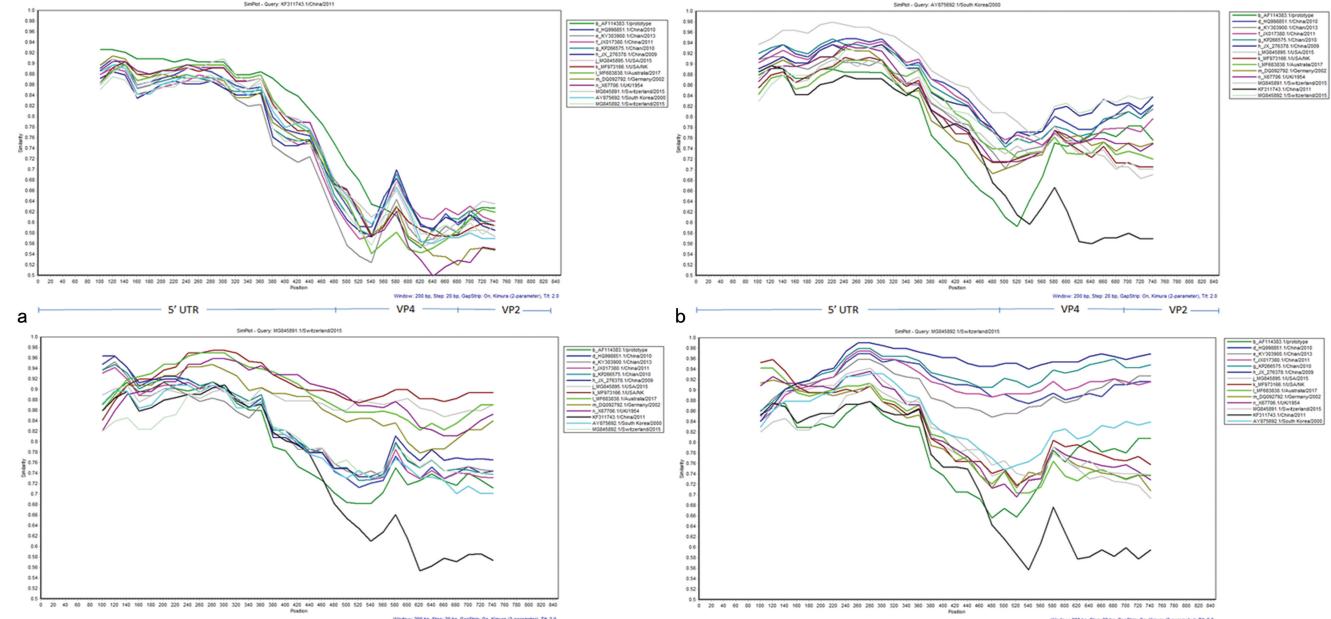


图 2 CVB5 5'UTR 区的系统发育分析树



注: a 为 KF311743. 1/China/2011; b 为 AY875692. 1/Korea/2000; c 为 MG845891. 1/Switzerland/2015; d 为 MG845892. 1/Switzerland/2015

图 3 Similarity plot 分析

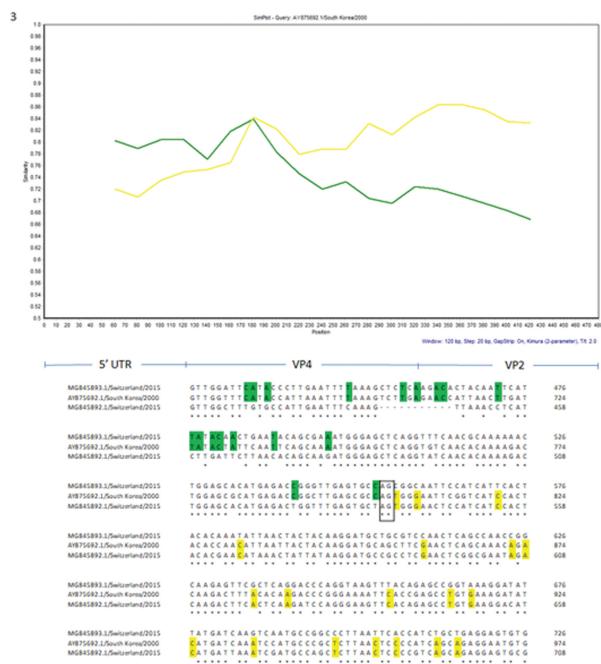


图 4 AY875692.1 /Korea/ 2000 与其他 CVB5 的重组分析



图 5 AY875692.1 /Korea/ 2000 与其他肠道病毒的重组分析

### 3 讨 论

肠道病毒通过突变和重组实现自身进化,但由于缺乏校对活性而且每个新合成的基因组中几乎有1个突变,误插入率一直很高<sup>[16]</sup>。VP1和5'UTR的系统发育树均显示从同一大陆收集的病毒分离株大多数都有聚集到同一组的趋势,但收集年份比收集的病毒分离株的国家更重要,而那些相似时期的病毒分离

株倾向于集群成同一个世系。此前的系统发育分析也表明,在不同年份分离的希腊病毒分离株之间存在25%的差异,这表明肠道病毒类型随时间演变而不是地理分布<sup>[3]</sup>。本研究中的趋势与上述结果类似,支持分离时间在肠道病毒进化中起关键作用,可能原因是肠道病毒总是作为准种存在<sup>[17]</sup>。

通过比较系统发育,VP1和5'UTR的树不一致表明CVB5病毒分离株中两个区域之间可能的重组。肠道病毒基因组的不同部分可能因其独特的作用而独立发展,5'UTR含有起始位点和内部核糖体进入位点,而在P1区内编码的衣壳负责病毒进入宿主细胞和组织嗜性。此外,衣壳也是宿主免疫应答的重要靶标<sup>[18]</sup>。造成不一致谱系的4个病毒分离株使用亚基因组序列跨越部分5'UTR-VP4-5'VP2进行Similarity plot分析,发现在病毒分离株AY875692.1 /Korea/ 2000中发生重组。然而,病毒分离株KF311743.1/China/2011是一种独特的病毒分离株,BLAST比对后GenBank中没有病毒分离株序列与其VP1区域相似。在5'UTR和VP1树中具有不一致谱系的另外两个病毒分离株均来自瑞士的未处理污水,但在Similarity plot分析中未显示重组。

因为只有不超过0.01%的肠道病毒能够被分离获取,所以很难系统地研究肠道病毒的进化<sup>[19]</sup>。可获得的数据表明重组通常发生在B组肠道病毒的基因组中的几个基因区域<sup>[20]</sup>。并且作为HEV-B的成员,在通过系统发育分析证实的CVB5基因型C的进化研究中,其基因组中频繁重组<sup>[21]</sup>。CVB5病毒分离株AY875692.1 /Korea/ 2000的重组发生在VP4区域。Similarity plot分析表明,5'UTR的JX976772.1 /Shandong/2010和VP2的5'端的KT28000.1 /Hong Kong/ 1972均具有高于0.9的相似值,这表明这两个病毒分离株可能是这种重组的供体。该研究中的重要性是重组发生在P1区域,其是CVB5的衣壳编码区,尽管先前的报道表明在除P1区域之外的所有基因组区域中检测到重组断裂点<sup>[10]</sup>。此外,本研究的结果表明,CVB5病毒分离株AY875692.1 /Korea/ 2000是埃可病毒25和猪水疱病病毒的接受者,但是基因组非结构区域内的重组不同(P2和P3),他们仅在同一物种的成员中被观察到<sup>[19]</sup>。肠道病毒衣壳蛋白暴露在病毒体表面,但是VP4蛋白排列在衣壳内部,提示本研究中观察到的VP4区域中的重组对于依赖于VP1蛋白的功能影响很小。

### 4 结 论

5'UTR和VP1之间的进化不一致,以及详细的系统发育分析表明,VP4作为结构蛋白编码区可能是CVB5进化过程中的候选重组基因座。

## 参考文献

- [1] OBERSTE M S, MAHER K, KILPATRICK D R, 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.
- [2] OKONKO I O, ADEBIYI A A, OGAH O S, et al. Enteroviruses as a possible cause of hypertension, dilated cardiomyopathy (DCM) and hypertensive heart failure (HHF) in South western Nigeria[J]. *Afr Health Sci*, 2013, 13(4): 1098-1106.
- [3] PAPA A, DUMAIDI K, FRANZIDOU F, et al. Genetic variation of coxsackie virus B5 strains associated with aseptic meningitis in Greece[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2006, 12(7): 688-691.
- [4] CHEN P, TAO Z X, SONG Y Y, et al. A coxsackievirus B5-associated aseptic meningitis outbreak in Shandong Province, China in 2009[J]. *J Med Virol*, 2013, 85(3): 483-489.
- [5] HU Y F, ZHAO R, XUE Y, et al. Full genome sequence of a novel coxsackievirus B5 strain isolated from neurological hand, foot, and mouth disease patients in China [J]. *J Virol*, 2012, 86(20): 11408-11409.
- [6] GMYL A P, BELOUSOV E V, MASLOVA S V, et al. Nonreplicative RNA recombination in poliovirus[J]. *J Virol*, 1999, 73(11): 8958-8965.
- [7] KIRKEGAARD K, BALTIMORE D. The mechanism of RNA recombination in poliovirus[J]. *Cell*, 1986, 47(3): 433-443.
- [8] ANDERSSON P, EDMAN K, LINDBERG A M. Molecular analysis of the echovirus 18 prototype: evidence of interserotypic recombination with echovirus 9[J]. *Virus Res*, 2002, 85(1): 71-83.
- [9] OPRISAN G, COMBIESCU M, GUILLOT S, et al. Natural genetic recombination between co-circulating heterotypic enteroviruses[J]. *J Gen Virol*, 2002, 83(Pt 9): 2193-2200.
- [10] SANTTI J, HYYPIA T, KINNUNEN L, et al. Evidence of recombination among enteroviruses[J]. *J Virol*, 1999, 73(10): 8741-8749.
- [11] HAN J F, JIANG T, FAN X L, et al. Recombination of human coxsackievirus B5 in hand, foot, and mouth disease patients, China[J]. *Emerg Infect Dis*, 2012, 18(2): 351-353.
- [12] KYRIAKOPOULOU Z, AMOUTZIAS G D, DIMITRIOU T G, et al. Intra- and inter-serotypic recombinations in the 5' UTR-VP4 region of Echovirus 30 strains[J]. *Arch Virol*, 2018, 163(2): 365-375.
- [13] TAMURA K, NEI M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees[J]. *Mol Biol Evol*, 1993, 10(3): 512-526.
- [14] KUMAR S, STECHER G, LI M, et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. *Mol Biol Evol*, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [15] LOLE K S, BOLLINGER R C, PARANJAPE R S, et al. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination[J]. *J Virol*, 1999, 73(1): 152-160.
- [16] DRAKE JW. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90(9): 4171-4175.
- [17] HOLLAND J, DOMINGO E. Origin and evolution of viruses[J]. *Virus Genes*, 1998, 16(1): 13-21.
- [18] EVANS DJ, ALMOND JW. Cell receptors for picornaviruses as determinants of cell tropism and pathogenesis[J]. *Trends Microbiol*, 1998, 6(5): 198-202.
- [19] OBERSTE MS, MAHER K, PALLANSCH MA. Evidence for frequent recombination within species human enterovirus B based on complete genomic sequences of all thirty-seven serotypes[J]. *J Virol*, 2004, 78(2): 855-867.
- [20] LINDBERG A M, ANDERSSON P, SAVOLAINEN C, et al. Evolution of the genome of Human enterovirus B: incongruence between phylogenies of the VP1 and 3CD regions indicates frequent recombination within the species [J]. *J Gen Virol*, 2003, 84(Pt 5): 1223-1235.
- [21] SHEN H X. Recombination analysis of coxsackievirus B5 genogroup C[J]. *Arch Virol*, 2018, 163(2): 539-544.

(收稿日期:2019-03-18 修回日期:2019-06-02)