

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.06.0661

寨卡病毒基因序列分析及核酸检测方法

狄弘玮^{1△}, 彭浩然^{1△}, 朱善邦², 朱诗应¹, 戚中田¹, 唐海琳¹, 赵平^{1*}

1. 第二军医大学热带医学与公共卫生学系生物防御教研室, 上海市医学生物防护重点实验室, 上海 200433

2. 第二军医大学学员旅学员 7 队, 上海 200433

[摘要] **目的** 分析寨卡病毒基因组序列特征, 建立寨卡病毒的核酸检测方法。**方法** 构建 81 种虫媒传播黄病毒和寨卡病毒的系统进化树, 比较寨卡病毒与登革病毒 4 型、日本脑炎病毒的核酸和氨基酸序列差异, 分析亚洲型和非洲型寨卡病毒基因变异位点, 尤其是中国的 4 株输入性寨卡病毒基因序列。通过比较亚洲型和非洲型寨卡病毒全基因组核酸序列, 设计一组寨卡病毒实时荧光定量 PCR 检测的引物和探针, 并检测其敏感性与特异性。**结果** 81 种虫媒传播黄病毒中, 寨卡病毒与 Spondweni、Kedougou 病毒同源性最近。全基因组核酸序列比较结果显示寨卡病毒与登革病毒 4 型的同源性比日本脑炎病毒更近, 而氨基酸序列比较结果显示寨卡病毒与日本脑炎病毒的同源性更近。与传统亚洲型寨卡病毒比较, 广东 GD01 株有 5 个氨基酸突变位点, 广东 GDZ16001 株有 3 个, 浙江 ZJ03 株有 6 个, 赣县 VE Ganxian 株有 33 个。所设计的 PCR 引物和探针对待质粒标准品检测呈阳性, 检测下限为 100 拷贝/mL, 对细胞培养的寨卡病毒 RNA 检测呈阳性, 而对登革病毒 1~4 型和日本脑炎病毒检测呈阴性。**结论** 寨卡病毒与 Spondweni 病毒同源性最近, 赣县 VE Ganxian 株的高变异显示寨卡病毒正在快速变异。本研究设计的 PCR 引物和探针可用于亚洲型和非洲型寨卡病毒株检测, 具有较高的敏感性和特异性。

[关键词] 寨卡病毒; 病毒基因组; RNA 序列分析; 核酸检测; 亚洲

[中图分类号] R 373.9

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2016)06-0661-07

Zika virus: genome sequence analysis and nucleic acid detection methods

DI Hong-wei^{1△}, PENG Hao-ran^{1△}, ZHU Shan-bang², ZHU Shi-ying¹, QI Zhong-tian¹, TANG Hai-lin¹, ZHAO Ping^{1*}

1. Department of Biological Defense (Microbiology), Shanghai Key Laboratory of Medical Biodefence, Faculty of Tropical Medicine and Public Health, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. The 7th Team of Student Brigade, Administration Office for Undergraduate Students, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To analyze the genome sequence characteristics of Zika virus and to develop nucleic acid detection methods for Zika virus. **Methods** The phylogenetic tree of 81 kinds of Flavivirus was constructed. The differences of nucleotide and amino acid sequence among Zika virus, type 4 dengue and Japanese encephalitis virus (JEV) were analyzed and compared. The gene mutated sites of Asian and African Zika virus, especially four Zika virus strains from China, were analyzed. A set of primers and probes of real-time quantitative PCR for Zika virus were designed after comparing the genome sequences of Asian and African Zika virus. **Results** Spondweni and Kedougou viruses were the closest homologously to Zika virus among 81 kinds of Flavivirus. Comparison of full genomic nucleic acid sequence showed that Zika virus was closer to type 4 dengue virus than JEV, whereas comparison of amino acid yielded an opposite result. Compared with traditional Asian type Zika virus, Guangdong GD01 strains had 5 amino acid mutated sites, Zhejiang ZJ03 strains had 6 mutated sites, and VE Ganxian strains had 33 mutated sites. Detection of designed PCR primers and probes for plasmid RNA was positive, with the lower limit of detection being 100 copies/mL and Zika virus RNA was detected to be positive, type 1-4 dengue virus and Japanese encephalitis virus being negative. **Conclusion** Zika virus and Spondweni virus are the closest homologously. The high mutation character of VE

[收稿日期] 2016-04-01 **[接受日期]** 2016-05-11

[基金项目] 上海市卫生与计划生育委员会课题(20154Y125), 上海市公共卫生三年行动计划重点学科建设项目(15GWZK0103). Supported by Program of Shanghai Health and Family Planning Commission (20154Y125) and Key Discipline Project of Shanghai Public Health 3-Year Action Plan (15GWZK0103).

[作者简介] 狄弘玮, 硕士生. E-mail: dihongwei7@163.com; 彭浩然, 博士生. E-mail: phran@126.com

△共同第一作者 (Co-first authors).

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81870998, E-mail: pnzhao@163.com

Ganxian strains indicates that Zika might evolve fast. PCR primers and probes designed in this paper can be used for Asian and African type Zika virus detection, with relatively higher sensitivity and specificity.

[Key words] Zika virus; viral genome; RNA sequence analysis; nucleic acid detection; Asia

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(6): 661-667]

寨卡病毒(Zika virus)为单正链 RNA 病毒,是黄病毒科黄病毒属成员,基因组由 10 794 个核苷酸组成(MR 766, NC_012532),编码 3 个结构基因(核衣壳蛋白 C、膜蛋白 M 和包膜蛋白 E)和 7 个非结构基因(NS1、NS2a、NS2b、NS3、NS4a、NS4b 和 NS5)。寨卡病毒最早于 1947 年从乌干达维多利亚湖附近的寨卡森林中一只发热的恒河猴身上分离出来^[1],然后于 1953 年在同样地域从非洲伊蚊(*Aedes africanus*)中再次分离得到,接着在多种蚊子中先后分离出寨卡病毒;与登革热、黄热病、圣路易斯脑炎、西尼罗河脑炎和日本脑炎病毒等黄病毒属病毒一样,寨卡病毒主要通过蚊子传播^[2-3]。1964 年,乌干达报道了首例寨卡病毒感染人病例,患者出现发热、皮疹、关节和肌肉疼痛、头痛及眶周疼痛^[4]。血清学显示寨卡病毒在多个亚洲国家广泛分布^[5]。寨卡病毒首次的人群中大规模爆发发生在 2007 年的西太平洋密克罗尼西亚联邦(Federated States of Micronesia)的雅浦及周围岛屿,约 5 000 人感染^[6],而此前总共只有 14 例报道;接着在 2013—2014 年南太平洋的法属波利尼西亚(French Polynesia)发生更大规模的爆发(约 3.2 万人感染^[7]);2015 年 5 月在巴西确诊出首例寨卡病毒感染患者^[8],截至 2016 年 2 月 29 日,巴西约有 44 万至 130 万感染病例;42 个国家有寨卡病毒感染疫情报道,其中 23 个属美洲国家。自 2016 年 2 月 9 日中国内地确诊首例输入性寨卡病毒感染病例以来,截至 3 月 30 日一共确诊了 13 例,其中江西省 1 例、广东省 8 例、浙江省 4 例。在巴西,研究人员发现寨卡病毒感染可能与小头畸形有关^[9-12]。现已在羊水、胎儿脑组织中检测到寨卡病毒,细胞实验也证实寨卡病毒可感染与胎儿脑发育相关的神经干细胞,寨卡病毒和小头症及罕见疾病格林-巴利综合征相关的证据越来越多^[13]。但由于寨卡病毒最近几年才发生大规模爆发,之前并未引起人们的重视,目前对寨卡病毒的认识还很缺乏,开发寨卡病毒感染早期诊断技术对我国寨卡病毒防控,尤其对于育龄妇女有效预防新生儿小头畸形具有重要意义。

本研究分析了寨卡病毒基因的序列特点,在此基础上建立了基于反转录-实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)的寨卡病毒核酸检测方法。RT-qPCR 是快

速、特异和高敏感性的检测方法,适用于寨卡病毒感染早期检测,然而到目前为止,只有 2 篇 RT-qPCR 文章聚焦于密克罗尼西亚寨卡病毒检测^[14-15],没有完全覆盖寨卡病毒的遗传和地域多样性。本研究设计的引物和探针能够检测非洲和亚洲型寨卡病毒毒株。

1 材料和方法

1.1 虫媒传播黄病毒及寨卡病毒系统进化树的构建 使用最大似然法构建虫媒传播黄病毒和寨卡病毒系统进化树,病毒株间的距离使用位点替换/总位点评估^[16]。使用 Neighbor-Join 和 BioNJ 算法计算进化树分支,多次计算统计分支生成概率,评估进化树分支可信度。所有计算使用 MEGA7 软件完成^[17],用于系统进化树构建的虫媒传播黄病毒毒株基因组序列(GenBank ID)见表 1。

1.2 引物和探针设计 从 NCBI 数据库中获得有全基因组序列的寨卡病毒毒株 25 株,去掉同源性近的 14 株,选择有地区代表性的 11 株寨卡病毒毒株筛选保守序列。利用 Clustal W 程序进行比对获得保守序列^[18],利用 Primer Express 软件进行引物和探针设计^[19],探针 5'端设计有荧光报告基团 FAM,3'端基因为 BHQ。

1.3 病毒 RNA 提取和 RT-qPCR 细胞培养的寨卡病毒 SZ01 株(GenBank No. KU866423)由军事医学科学院微生物与流行病学研究所秦成峰研究员馈赠。参照 Invitrogen 病毒核酸提取试剂盒(cat: 12280050)说明书提取寨卡病毒、登革病毒和日本脑炎病毒 RNA。用 ABI 公司的 One step plus 型 PCR 仪进行 RT-qPCR 检测,采用 TaKaRa PCR 扩增试剂,20 μ L 体系(10 μ L Mixture, 0.4 μ L ROX 染料,正、反向引物各 0.4 μ L,探针 0.8 μ L,7.2 μ L 无 RNA 酶水,0.8 μ L 模板)。反应条件:第一阶段 42 $^{\circ}$ C 5 min,95 $^{\circ}$ C 10 s;第二阶段(40 个循环)95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 34 s。

1.4 敏感性和特异性检测 利用细胞培养的寨卡病毒和含检测靶基因的质粒标准品对引物和探针的敏感性进行评估。质粒标准品是通过将合成的寨卡病毒 NS2E 基因序列(97 bp)插入载体 pUC19 而获得,用紫外分光光度法检测质粒浓度。为评估引物

和探针的检测最低拷贝数,将质粒(浓度 2.1×10^{10} 拷贝/mL)以 10 倍梯度稀释为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 共 10 个浓

度梯度分别检测。利用细胞培养的登革病毒 1~4 型和日本脑炎病毒评估引物和探针的特异性。

表 1 黄病毒系统发生树构建所用的病毒株

Tab 1 Flavivirus virus strains used for phylogenetic tree

Virus	GenBank ID	Virus	GenBank ID	Virus	GenBank ID
Alkhurma virus	JF416950	Yaounde virus	EU082199	Stratford virus	KM225263
Deer tick virus	AF311056	Bagaza virus	NC_012534	Spondweni virus	NC_029055
Gadgets gully virus	DQ235145	Baiyangdian virus	JF312912	Zika virus	NC_012532
Kadam virus	DQ235146	Duck egg drop syndrome virus	JQ920421	Aedes flavivirus	NC_012932
Karshi virus	DQ462443	Israel turkey meningoencephalomyelitis virus	KC734551	Cell fusing agent virus	NC_001564
Langat virus	NC_003690	Nhumirim virus	NC_024017	Chaoyang virus	NC_017086
Louping ill virus	KT224354	Ntaya virus	NC_018705	Culex flavivirus	AB701775
Omsk hemorrhagic fever virus	NC_005062	Tembusu virus	KM066945	Donggang virus	NC_016997
Powassan virus	KJ746872	Banzi virus	DQ859056	Hanko virus	JQ268258
Royal farm virus	DQ235149	Bouboui virus	DQ859057	Ilomantsi virus	NC_024805
Tick-borne encephalitis virus	JN003208	Edge Hill virus	DQ859060	Kamiti River virus	NC_005064
Turkish sheep encephalitis virus	DQ235151	Jugra virus	DQ859066	Lammi virus	FJ606789
Kama virus	NC_023439	Saboya virus	DQ859062	Nakiwogo virus	GQ165809
Meaban virus	DQ235144	Sepik virus	NC_008719	Nounané virus	EU159426
Saumarez reef virus	DQ235150	Uganda S virus	DQ859065	Nienokoue virus	NC_024299
Tyulenyi virus	NC_023424	Wesselsbron virus	NC_012735	Palm Creek virus	KC505248
Bussuquara virus	NC_009026	Yellow fever virus	FJ654700	Quang binh virus	NC_012671
Cacipacore virus	NC_026623	Aroa virus	KF917535	Tamana bat virus	AF346759
Koutango virus	EU082200	Iguape virus	AY632538	Entebbe bat virus	NC_008718
Ilheus virus	NC_009028	Dengue virus 1	AF180818	Sokoluk virus	NC_026624
Japanese encephalitis virus	KF667322	Dengue virus 2	AF038403	Yokose virus	NC_005039
Murray valley encephalitis virus	NC_000943	Dengue virus 3	AY744683	Apoi virus	NC_003676
Alfuy virus	AY898809	Dengue virus 4	KJ596658	Jutiapa virus	NC_026620
Rocio virus	AY632542	Kedougou virus	NC_012533	Modoc virus	NC_003635
St. Louis encephalitis virus	NC_007580	Kokobera virus	NC_009029	Montana myotis leukoencephalitis virus	NC_004119
Usutu virus	NC_006551	New Mapoon virus	KC788512	Rio Bravo virus	NC_003675
West Nile virus	GQ903680	Kyasanur forest disease virus	JF416958	Soybean cyst nematode virus 5	NC_024077

2 结果

2.1 寨卡病毒与其他虫媒传播黄病毒序列比较 图1A 是 81 种虫媒传播黄病毒的进化树,最顶层是 2 个大分支,一个分支以日本脑炎、Ntaya、Aroa、登革病毒等构成的蚊传播(mosquito-borne)组成;另一分支比较杂乱,包括蜱传播(tick-borne)、未知传播媒介和部分未知节肢动物宿主的蚊传播黄病毒。寨卡病毒属于蚊传播黄病毒分支,与 Spondweni、Kedougou 病毒同源性最近,其次是登革病毒。寨卡病毒与 Spondweni 病毒的基因 C、M、E、NS2a、NS2b、NS3、NS4a、P2k、NS4b 和 NS5 氨基酸序列同源性分别为 65.57%、63.69%、

71.80%、73.58%、59.73%、76.15%、80.55%、75.82%、79.44%和 77.85%,而与登革病毒 4 型的同源性分别为 39.34%、45.24%、55.40%、53.98%、25.22%、38.46%、66.61%、43.14%、49.19%和 67.66%。

登革病毒和日本脑炎病毒是目前研究较成熟的虫媒病毒,本研究寨卡病毒与登革病毒 4 型、日本脑炎病毒的全基因组核酸和氨基酸序列进行比较。全基因组核酸序列比较结果显示,寨卡病毒、登革病毒 4 型和日本脑炎病毒都一致的核酸位点为 4 463 个,占总数的 43.14%。寨卡病毒与登革病毒 4 型、日本脑炎病毒相同的核酸位点分别为 6 139 和 6 017 个,占总数的 59.34%和 58.16%;寨卡病毒与

登革病毒 4 型的同源性略高于日本脑炎病毒(图 1B)。氨基酸序列比较结果显示,寨卡病毒、登革病毒 4 型和日本脑炎病毒都一致的氨基酸位点为 1 460 个,占氨基酸总数的 42.44%。寨卡病毒与登革病毒 4 型、日本脑炎病毒相同的氨基酸位点分别为 1 920 和 1 936 个,占氨基酸总数的 55.81%和 56.28%;寨卡病毒与日本脑炎病毒的同源性略高于登革病毒 4 型(图 1C)。进一步对单个基因分析,寨卡病毒的 *C*、*E*、*NS1*、*NS3*、*NS4a* 和 *NS5* 基因与日本脑炎病毒同源性更高,而 *M*、*NS2a*、*NS2b* 和

NS4b 与登革病毒同源性更高。3 种病毒公共部分的核酸或氨基酸位点(图 1B、1C d 区)可能决定着三者共有的生物学特性,如蚊传播。而寨卡病毒与登革病毒共有部分的核酸或氨基酸位点(b 区)可能决定着两者特有的生物学特性,如伊蚊传播、诱发皮疹等;g 区的核酸或氨基酸位点可能决定寨卡病毒与日本脑炎病毒特有的生物学特性,如对神经细胞敏感等;a、c 和 f 区则分别是登革病毒、寨卡病毒与日本脑炎病毒三者各自特有的生物学特性。

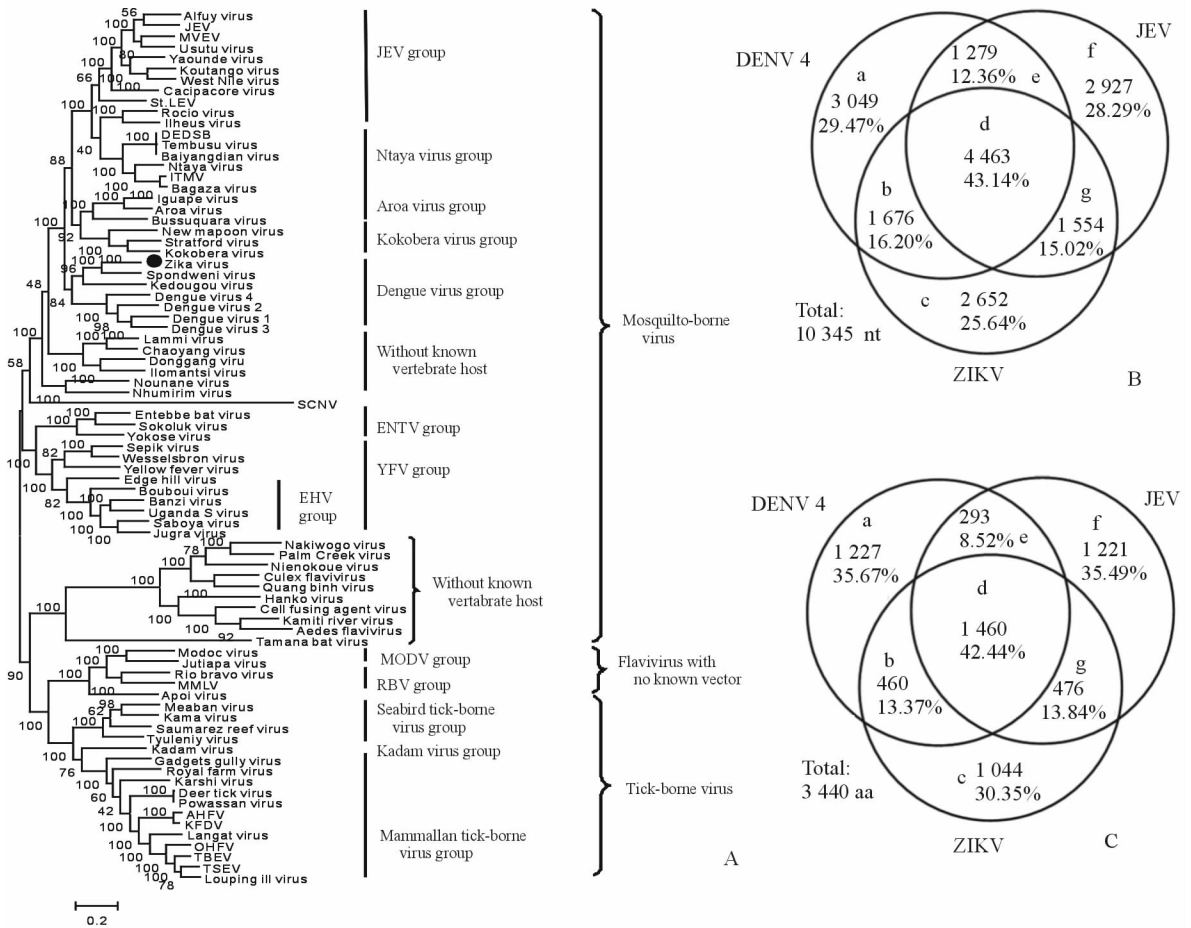


图 1 虫媒传播黄病毒进化树(A)和寨卡病毒、登革病毒 4 型、日本脑炎病毒核酸(B)及氨基酸(C)序列比较

Fig 1 Phylogenetic tree of the genus Flavivirus (A) and nucleic acid (B), and amino acid (C)

overlaps of complete genome of ZIKV, DENV 4 and JEV

The tree was constructed by the neighbor-joining method of MEGA using nucleotide sequence of complete genome. Each number at nodes is the percentage of 500 bootstrap replicate support; confidence probability are higher as shown in the tree node. Vertical length is arbitrary. Scale is the percentage of genetic distance. Zika virus is marked using solid circular. ZIKV: Zika virus; DENV: Dengue virus; JEV: Japanese encephalitis virus

2.2 寨卡病毒的进化及变异特征 寨卡病毒进化树分成明显的 2 个大分支,分别对应亚洲型和非洲型(图 2A)。寨卡病毒亚洲型与非洲型存在 82 个氨基酸差异位点,其中 *PrM* 基因氨基酸位点突变率最高(6.45%),包膜基因 *EP* (1.00%) 和 *NS4a* (0.67%) 最保守。变异氨基酸位点见表 2,其中每

个位点的左侧为亚洲型氨基酸,右侧为非洲型。

NCBI 核酸数据库中可获得我国研究人员提交的 4 株寨卡病毒全基因组序列,都属于亚洲型。广东 GD01、GDZ16001 毒株序列接近,只存在 8 个核酸差异位点,与巴西(KU365778)和波多黎各(KU501215)病毒株同源性最高。广东 GD01 株相

比以往亚洲型毒株存在 5 个氨基酸位点变化 (D107E、D445G、I1285V、T2749I 和 V2787A), 而广东 GDZ16001 株有 3 个氨基酸位点差异, 与广东 GD01 株的 1285、2749 和 2787 位点变异完全相同。浙江 ZJ03 毒株和 2013 年在波利尼西亚爆发的毒株同源性最高, 与该患者在前往萨摩亚旅行时被感染的事实吻合, 该毒株相比以往亚洲型毒株存在 6 个氨基酸位点变化 (S109N、K709R、R1118Q、

V2634M、N3144S 和 K3190R)。赣县 VE Ganxian 株与 2014 年海地 (Haiti) 株同源性最近, 但已存在较高突变, 相比以往亚洲型和非洲型毒株其氨基酸变异位点高达 33 个, 占寨卡病毒总氨基酸数的 0.96%。图 2B 展示了赣县株与其他亚洲株、非洲株在 33 个变异位点的氨基酸情况, 在这 33 个位点中, 赣县株的位点特异。

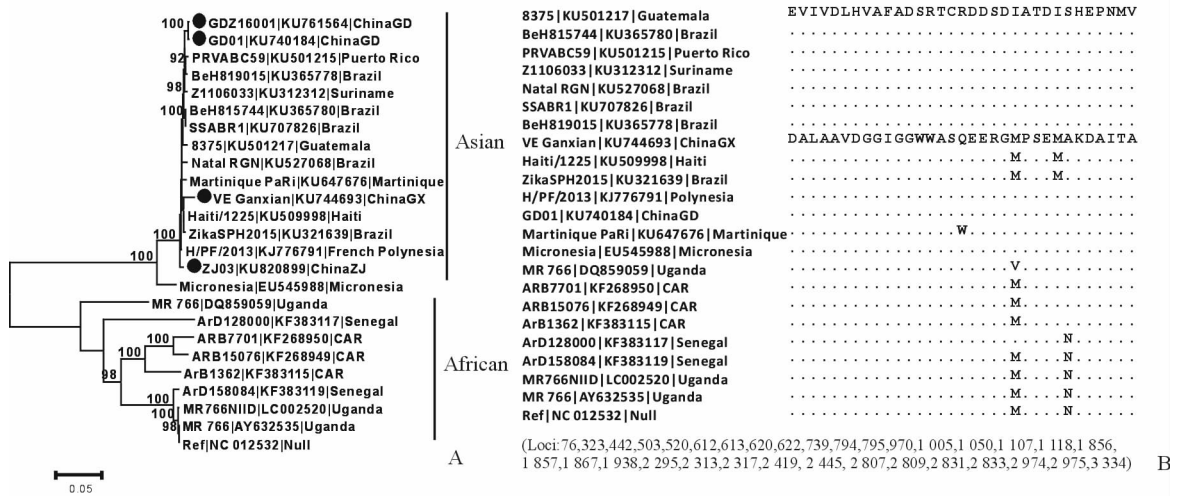


图 2 寨卡病毒系统进化树 (A) 及我国江西赣县株氨基酸序列变异位点 (B)

Fig 2 Zika virus phylogenetic tree (A) and the variability of VE Ganxian Zika virus (B)

The tree was constructed by the neighbor-joining method of MEGA using amino acid sequence of complete genome. Each number at nodes is the percentage of 500 bootstrap replicate support; confidence probability higher than 85% are shown in the nodes. Vertical length is arbitrary. Scale is the percentage of genetic distance. Four solid circles indicate the virus strains from China. Dots indicate identity with the consensus sequence on the top of the alignment

表 2 寨卡病毒亚洲型相比非洲型的氨基酸突变位点

Tab 2 The variability of amino acid mutations in Asian and African Zika virus

Gene	Amino acid mutations	Mutations/total	Percentage(%)
C	N25S, L27F, R101F, I110V, I113V	5/122	4.10
PrM	I125V, S139N, R143E, A148P, V153M, H157Y	6/93	6.45
M	K246R, V262A	2/75	2.67
EP	I410A, I446T, V459I, F575S, V607I	5/500	1.00
NS1	D683E, V727A, F728L, V763M, T777M, M785L, E846D, K863R, A988V, V1030I, V1058M	11/352	3.13
NS2a	M1180T, V1204A, V1226I, A1289V, A1297T, I/V1354L	6/226	2.65
NS2b	E1461D, A1477T	2/130	1.54
NS3	A1558S, L1594H, K1671R, K1717T, N1902H, I1909V, M1974L, K2085R, Y2086H	9/617	1.46
NS4a	L2123F	1/150	0.67
NS4b	N2280S, I2282L, A2283S, M2295I, L2318F, M2367I, I2449V, V2453I, L2455S	9/251	3.59
NS5	V2598I, M2634V, T2679A, M2715L, I2749T, A2787V, K/R2800N, V2842I, N2896S, R2909H, H2969Q, I3039V, N3044S, A3046I, K3050R, K3065R, E3080K, V3089I, G3107K, K3161R, P3162S, R3167N, S3223D, A3304S, M3333V, D3387N	26/903	2.88

Left: Asian Zika virus; Right: African Zika virus

2.3 RT-qPCR 引物和探针设计 比较 11 株寨卡病毒毒株 (8 株亚洲型和 3 株非洲型), 选择保守序列, 获得 1 组引物和探针 (Zika-3990F: 5'-CCA CGC ACT GAT AAC AT-3', Zika-4068R: 5'-AAG

TAG CAA GGC CTG CTC T-3', Zika-4021probe: 5'-FAM-TGG CTG CTC TRA CAC CAC T-BHQ-3'), 位于 NS2a 基因。正、反向引物和探针与 Spondweni 病毒、登革病毒 1~4 型序列都存在很高

的差异(图3),表明设计的引物和探针均具有特异性。

2.4 RT-qPCR检测方法的敏感性和特异性 对各稀释梯度的标准品(最高浓度 2.1×10^9 拷贝/mL)进行 RT-qPCR 检测,前8个浓度检测结果为阳性;

后2个梯度质粒样本检测 Ct 值大于 35,认为阴性。对 Ct 值和质粒拷贝浓度进行拟合,获得标准曲线(图4),检测限约 100 拷贝/mL。模拟寨卡病毒血清样本检测为阳性,登革病毒 1~4 型和日本脑炎病毒检测均为阴性,表明该检测方法具有很高的特异性。

	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Probe (5'-3')
PRVABC59/KU501215/Puerto Rico	CCACGCACCTGATAACAT	AGAGCAGGCCTTGCTACTT	TGGCTGCTCTGACACCACT
BeH819015/KU365778/Brazil
Z1106033/KU312312/Suriname
8375/KU501217/Guatemala
Natal RGN/KU527068/Brazil
Haiti_1225_2014/KU509998/Haiti
Martinique/KU647676/Martinique
H_PF_2013/KJ776791/French Polynesia
ArD128000/KF383117/Senegal
ARB7701/KF268950.1/Central African Republic
ARB1362/KF383115/Central African Republic
Spondweni virus/DQ859064/South Africa
Kedougou virus/AY632540/Senegal
Dengue virus 4/KJ596658/Brazil
Dengue virus 2/KF479233/China
Dengue virus 3/AY744683/French Polynesia
Dengue virus 1/KM204119/Hawaii

图3 寨卡病毒核酸检测引物和探针序列

Fig 3 Primers and probe of Zika virus

Alignment of the designed primers and probe with multiple Zika virus, Spondweni, Kedougou and Dengue virus 1-4 strain sequences. Dots indicate identity with the consensus sequence on the top of the alignment

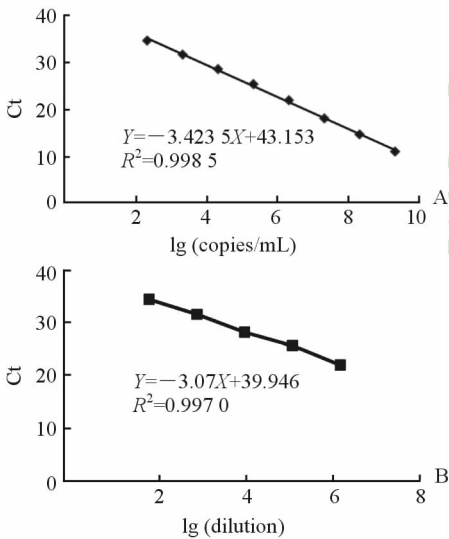


图4 寨卡病毒核酸定量 PCR 检测标准曲线

Fig 4 Standard curve of RT-qPCR for the nucleic acid detection for Zika virus

A: Standard curve for Zika virus cDNA plasmid dilution series; B: Standard curve obtained with 10-fold serial dilutions of Zika virus RNA. Ct: Threshold cycles

3 讨论

目前有关寨卡病毒病原学研究的报道较少,通过与其他虫媒传播黄病毒的基因序列比较可在一定程度推测寨卡病毒的生物学特性。本研究首先构建

了 81 种虫媒传播黄病毒的系统发生树,明确了寨卡病毒同源性最近的病毒,并重点比较了寨卡病毒与登革病毒 4 型、日本脑炎病毒的基因组序列差异。Kuno 等^[20]最早对虫媒传播黄病毒系统进化进行研究,并构建了 71 株虫媒传播黄病毒的系统进化树,结果显示 Kedougou 病毒为独立一株,与寨卡病毒遗传距离较远;而寨卡病毒与日本脑炎病毒同源性更近,与登革病毒遗传距离较远,与本研究结果存在一定差别。分析产生差异的原因可能是 Kuno 等^[20]构建系统发生树采用的是 NS5 基因,寨卡病毒 NS5 基因与日本脑炎病毒氨基酸相同位点的百分比为 68.55%,而与登革病毒为 67.66%。本研究结果显示由于寨卡病毒与登革病毒、日本脑炎病毒的遗传差异比较接近,以不同的基因、核酸或蛋白质序列构建系统进化树都可能产生不同结果。但可以明确的一点是,日本脑炎病毒和登革病毒之间的遗传距离是寨卡病毒、登革病毒和日本脑炎病毒三者之间最远的。

截至 2016 年 3 月 30 日,中国共检测出 13 例寨卡病毒感染病例,对最早发现的 4 株寨卡病毒毒株进行了全基因组测序,结果发现广东 GD01 和 GDZ16001 毒株之间存在 8 个核酸位点差异,与以往亚洲型毒株相比 GDZ16001 株存在 3 个氨基酸变异,而 GD01 株有 5 个氨基酸位点变异,其中 3 个与 GDZ16001 株的氨基酸变异位点相同,表明 GD01 很可能是由 GDZ16001 变异产生。浙江 ZJ01 株有 6

个氨基酸变异位点,且与广东株的5个位点完全不同,是由2013年波利尼西亚毒株变异而来,与当前南美正流行的毒株也不同,表明萨摩亚寨卡病毒流行跟南美流行是独立发生的。广东毒株和赣县毒株的感染患者都是来自委内瑞拉的工作人员,说明委内瑞拉已存在氨基酸序列差异较大的毒株。相比亚洲和波利尼西亚毒株,江西赣县株与2013年在南美爆发的多个毒株同源性更近,表明赣县株是南美毒株变异的结果。相比2007年亚洲型毒株对非洲型毒株的仅仅82个变异位点,赣县株高达33个氨基酸位点的突变表明最近3年寨卡病毒在南美正经历快速变异。寨卡病毒在人群中的大规模爆发正加速寨卡病毒的变异以更好地适应新宿主,其变异位点的功能值得重点关注。但寨卡病毒本身变异是否为本次寨卡病毒大爆发的原因,或其引发原因是否为拉美地区自然环境,均还未知。

本研究设计的RT-qPCR引物和探针具有更高的通用性,与登革病毒1~4型和日本脑炎病毒无交叉,能高灵敏地检测出细胞培养的寨卡病毒,为寨卡病毒感染的诊断提供了一种有效方法。

[参考文献]

- [1] DICK G W, KITCHEN S F, HADDOW A J. Zika virus, I. Isolations and serological specificity[J]. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1952, 46: 509-520.
- [2] MARCHETTE N J, GARCIA R, RUDNICK A. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 1969, 18: 411-415.
- [3] BOORMAN J P, PORTERFIELD J S. A simple technique for infection of mosquitoes with viruses; transmission of Zika virus[J]. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1956, 50: 238-242.
- [4] SIMPSON D I. Zika virus infection in man[J]. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1964, 58: 335-338.
- [5] SALUZZO J F, IVANOFF B, LANGUILLAT G, GEORGES A J. [Serological survey for arbovirus antibodies in the human and simian populations of the South-East of Gabon (author's transl)] [J]. *Bull Soc Pathol Exot Filiales*, 1982, 75: 262-266.
- [6] DUFFY M R, CHEN T H, HANCOCK W T, POWERS A M, KOOL J L, LANCIOTTI R S, et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia[J]. *N Engl J Med*, 2009, 360: 2536-2543.
- [7] CAO-LORMEAU V M, ROCHE C, TEISSIER A, ROBIN E, BERRY A L, MALLETT H P, et al. Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2014, 20: 1085-1086.
- [8] CAMPOS G S, BANDEIRA A C, SARDI S I. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil[J]. *Emerg Infect Dis*, 2015, 21: 1885-1886.
- [9] HEYMAN D L, HODGSON A, SALL A A, FREEDMAN D O, STAPLES J E, ALTHABE F, et al. Zika virus and microcephaly: why is this situation a PHEIC? [J]. *Lancet*, 2016, 387: 719-721.
- [10] LIUZZI G, PURO V, VAIRO F, NICASTRI E, CAPOBIANCHI M R, DI CARO A, et al. Zika virus and microcephaly: is the correlation, causal or coincidental? [J]. *New Microbiol*, 2016, 39: 83-85.
- [11] MARRS C, OLSON G, SAADE G, HANKINS G, WEN T, PATEL J, et al. Zika virus and pregnancy: a review of the literature and clinical considerations[J]. *Am J Perinatol*, 2016, 33: 625-639.
- [12] RUBIN E J, GREENE M F, BADEN L R. Zika virus and microcephaly[J]. *N Engl J Med*, 2016, 374: 984-985.
- [13] ROZÉ B, NAJIOULLAH F, FERGÉ J L, APETSE K, BROUSTE Y, CESAIRE R, et al. Zika virus detection in urine from patients with Guillain-Barre Syndrome on Martinique, January 2016 [J]. *Euro Surveill*, 2016, 21.
- [14] FAYE O, DIALLO D, DIALLO M, WEIDMANN M, SALL A A. Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught mosquitoes [J]. *Virology*, 2013, 10: 311.
- [15] LANCIOTTI R S, KOSOY O L, LAVEN J J, VELEZ J O, LAMBERT A J, JOHNSON A J, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2008, 14: 1232-1239.
- [16] 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: 512-526.
- [17] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, FILIPSKI A, KUMAR S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2013, 30: 2725-2729.
- [18] LARKIN M A, BLACKSHIELDS G, BROWN N P, CHENNA R, MCGETTIGAN P A, MCWILLIAM H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0 [J]. *Bioinformatics*, 2007, 23: 2947-2948.
- [19] YOON J R, LAIBLE P D, GU M, SCOTT H N, COLLART F R. Express primer tool for high-throughput gene cloning and expression [J]. *Biotechniques*, 2002, 33: 1328-1333.
- [20] KUNO G, CHANG G J, TSUCHIYA K R, KARABATSOS N, CROPP C B. Phylogeny of the genus *Flavivirus* [J]. *J Virol*, 1998, 72: 73-83.