

快速获取 55 型腺病毒基因组序列的方法

刘媛¹ 王文博² 邹自英¹ 冯子良² 范泉水^{2*} 熊杰^{1*}

(1. 成都军区总医院检验科 四川 成都 610083)

(2. 成都军区疾病预防控制中心 四川 成都 610021)

摘要:【目的】建立快速获取 55 型腺病毒的全长基因组序列的方法。【方法】根据 55 型腺病毒的基因组特点,设计覆盖 55 型腺病毒基因组序列的 12 对引物,分别以 55 型腺病毒 DNA 为模板,扩增得到 12 个 PCR 产物,通过对 12 个 PCR 产物测序及序列拼接,获得 55 型腺病毒的全长基因组序列。【结果】从本院急性上呼吸道感染者咽拭子标本中分离得到一株 55 型腺病毒毒株 SF04/SC/2016,以其 DNA 为模板扩增成功获得 12 个 PCR 产物,对其进行测序,并对 12 段序列进行拼接得到 55 型腺病毒的全长基因组序列,与已报到的各型腺病毒序列进行比对,采用邻位相连法构建系统发育进化树,所得序列与 55 型腺病毒处于同一分支,进一步确认该病原体为 55 型腺病毒。【结论】研究公布的序列和方法,能够实现更方便对腺病毒的快速测序,为揭示 55 型腺病毒的进化特点及制订疾病防控策略提供了有效手段。

关键词: 55 型腺病毒,病原分离,全基因测序,序列拼接

Rapid acquisition of complete viral genome sequence of human adenovirus type 55

LIU Yuan¹ WANG Wen-Bo² ZOU Zi-Ying¹ FENG Zi-Liang²
FAN Quan-Shui^{2*} XIONG Jie^{1*}

(1. Department of Clinical Laboratory, Chengdu Military General Hospital, Chengdu, Sichuan 610083, China)

(2. Center for Disease Control and Prevention of Chengdu Military Region, Chengdu, Sichuan 610021, China)

Abstract: [Objective] To build a simple method for rapidly obtaining the full-length genome sequence of adenovirus type 55 (HAdV-55). [Methods] 12 pairs of primers were designed which covered the whole genome sequence of HAdV-55. HAdV-55 DNA was used as the template for PCR

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 81301445); The 12th Five Years Major Special Projects of Chinese PLA (No. AWS11L009); PLA Medical Science Youth Training Project (No. 14QNP057); Open Research Fund Program of Shanghai Key Laboratory of Medical Biodefense (No. SKLM1401)

*Corresponding authors: FAN Quan-Shui: Tel: 86-28-86598501; E-mail: 13888254888@126.com
XIONG Jie: Tel: 86-28-86570510; E-mail: xiongjie1969@126.com

Received: February 24, 2017; Accepted: May 05, 2017; Published online (www.cnki.net): May 17, 2017

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(No. 81301445); 全军后勤“十二五”重大专项(No. AWS11L009); 全军医学科技青年培育项目(No. 14QNP057); 上海市医学生物防护重点实验室开放课题(No. SKLM1401)

*通讯作者: 范泉水: Tel: 86-28-86598501; E-mail: 13888254888@126.com

熊杰: Tel: 86-28-86570510; E-mail: xiongjie1969@126.com

收稿日期: 2017-02-24; 接受日期: 2017-05-05; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-05-17

and twelve PCR products were obtained, which were sequenced respectively. Resulting sequences were assembled together and then the whole gene sequence was obtained. **[Results]** A strain of HAdV-55 (SF04/SC/2016) was isolated from throat swab specimens of a patient with acute upper respiratory tract infection. Twelve PCR products and their sequences were obtained. The sequences were assembled which yield the full-length genomic sequence. Sequence analysis was performed between this HAdV-55 strain and previous reported HAdV-55 virus in China. Phylogenetic tree was constructed by neighbor-joining method and this virus is in the same branch with previous reported HAdV-55 strains, which confirmed that this pathogen is HAdV-55. **[Conclusion]** The primer sequences and methods published in this study could facilitate the rapid sequencing of adenovirus, which will be contribute to reveal the evolutionary characteristics of HAdV-55 and the prevention and control of adenovirus type 55 related disease.

Keywords: Adenovirus type 55, Pathogen isolation, Whole genome sequencing, Sequence assembly

人腺病毒(Human adenovirus, HAdV)是一类无包膜的双链 DNA 病毒, 分为 A-G 7 个血清学组, 其中 B 组腺病毒感染目前已成为急性呼吸系统疾病的重要因素。B 组又可分为 B1 和 B2 亚组, B1 主要包括 3、7、16、21、51 型; B2 包括 14、34、35 及 55 型。近年来, HAdV-55 在成人特别是学校和军队特殊人群中引起日益频繁的急性呼吸道传染病流行^[1-4]。Cao 等^[2]认为腺病毒 55 型是成人社区获得性肺炎的重要病因之一。Lu 等^[1]在 2009-2012 年收集重庆地区急性呼吸道感染住院儿童鼻咽分泌物标本, 在 2 234 例标本中检出 191 例腺病毒(8.55%), 6 例为 HAdV-55, 占 3.1%, 提示 HAdV-55 也是引起儿童急性呼吸道感染的主要病原体之一。

55 型腺病毒在中国最早发生于 2006 年 3-4 月中国陕西岐山县, 毒株为 QS-DLL。当时根据其六邻体高变区序列与已公布序列的比较, 认为该病原体为 HAdV-11a, 杨朝辉在其 2009 年的硕士毕业论文中^[5]利用 100 多条引物, 通过 PCR 测序的方法获取了 QS-DLL 的全基因核酸序列, QS-DLL 分离株的核酸序列除了 DNA 多聚酶、pVI 和 pTP, 其余序列与 14 型腺病毒的原型株(AY803294)有着最高的一致性(>98.3%)。2010 年, 我国和国外的研究人员重新对这次疫情的病毒进行鉴定, 通过生物信息学分析发现, 该病毒是基于 HAdV-B14 型基因组骨架嵌合 HAdV-B11 型 Hexon 部分片段的重组新病毒, 因此被命名为 HAdV-55 型^[6]。之后, HAdV-55 感染的疫情在我国时有发生。

因此腺病毒基因组序列的获取不仅能够更准确地鉴定病毒, 还为病毒变异特点、流行规律及发现新病毒提供了有效手段。然而腺病毒全基因序列的获取方法一直比较困难。Liu 等^[7]将 55 型腺病毒分离株基因组分为 73 个片段进行 PCR 扩增, PCR 产物纯化后测序, 经校对和拼接后, 获得 HAdV-55 Y16 株基因序列, 然而该方法操作复杂繁琐, 易出错。为进一步优化 55 型腺病毒基因组序列获取方法, 本研究通过分析 55 型腺病毒的基因序列, 设计 12 对引物, 扩增 12 个基因片段, 全覆盖 55 型腺病毒整个基因组, 通过序列拼接获取其基因组序列。本研究采用的方法具有流程简单、经济高效等优点, 将为 55 型腺病毒序列进化分析提供有力手段。

1 材料与方法

1.1 实验材料、主要试剂和仪器

人喉癌上皮细胞 HEp-2 由中国科学院细胞库提供, 由本实验室保存培养。咽试纸标本采集自本院急性上呼吸道感染病例。GIBCO 胎牛血清、DMEM、青/链霉素、Invitrogen PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit 购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 引物和 PCR 用高保真 DNA 聚合酶 I5-MIX 购自成都擎科梓熙生物技术有限公司; 生化试剂购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

台式离心机购自德国 Eppendorf 公司; GeneAmp 9700 型 PCR 仪购自美国 ABI 公司; 电泳设备购自

美国 Bio-Rad 公司。

1.2 细胞培养与病原分离

HEp-2 细胞培养于含 10%胎牛血清、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素和 100 U/mL 青霉素的 DMEM 培养液，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养。

在 BSL-2 实验室接种 HEp-2 细胞于 6 孔板内，接种密度 0.5×10^6 个/孔，培养 24 h，弃去原培养基，PBS 洗细胞 3 次，每孔加入 2 mL 的 2%的 DMEM 培养基，并加入确诊患者的咽拭子标本 150 μL ，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱内培养并逐日观察细胞病变 (Cytopathogenic effect, CPE) 情况，当 75% 以上的细胞出现典型 CPE 时，收集细胞上清，分装保存。

1.3 病毒 DNA 提取

采用 Invitrogen PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit 提取上述病毒分离液的腺病毒 DNA，具体操作参照说明书进行。

1.4 聚合酶链反应(Polymerase chain reaction, PCR)

以提取的腺病毒 DNA 为模板，PCR 反应扩增 HAdV-55 的目的基因。PCR 反应体系(50 μL): 0.2 U/ μL I5-MIX 25 μL ，0.5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 上、下游引物各 1 μL ，灭菌水 21 μL ，50 ng/ μL 模板 DNA 2 μL ，混匀。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 98 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。PCR 产物利用 1% 琼脂糖凝胶电泳判断结果。PCR 阳性产物交由成都擎科梓熙生物技术有限公司进行测序。

1.5 序列分析

用生物信息学分析软件 MEGA 6.06 对获得的腺病毒基因组序列进行分析和标注，分析完成后序列提交至 GenBank 数据库。

2 结果与分析

2.1 HAdV-55 病毒株的分离鉴定

本研究利用腺病毒敏感细胞系人喉癌细胞 HEp-2 分离腺病毒。标本接种后逐日观察细胞状态，接种后第 2 天，部分细胞开始肿大、圆缩、脱落，少数细胞出现死亡。接种后第 4 天，细胞出现明显的 CPE，75% 以上的细胞死亡。收集接种细胞上清，离心并过滤，获得 HAdV-55 病毒株，将其命名为 SF04/SC/2016 株。图 1 为咽拭子接种不同时间点 HEp-2 细胞生长状况。

2.2 HAdV-55 的全基因序列扩增

抽提 SF04/SC/2016 病毒株的 DNA，对其进行分段 PCR 扩增，分段策略及对应的 PCR 扩增引物和测序引物如表 1 所示，PCR 反应体系和反应条件如 1.4 所述，PCR 产物电泳如图 2 所示，产物 5、6、10 和 11 出现非特异性扩增条带，其余片段特异性较好。切胶回收正确大小的 PCR 产物并测序，12 个片段序列拼接后最终获得 SF04/SC/2016 病毒株的全基因序列，病毒基因全长 34 755 bp，提交至 GenBank 数据库，获得基因登录号 KY002684。

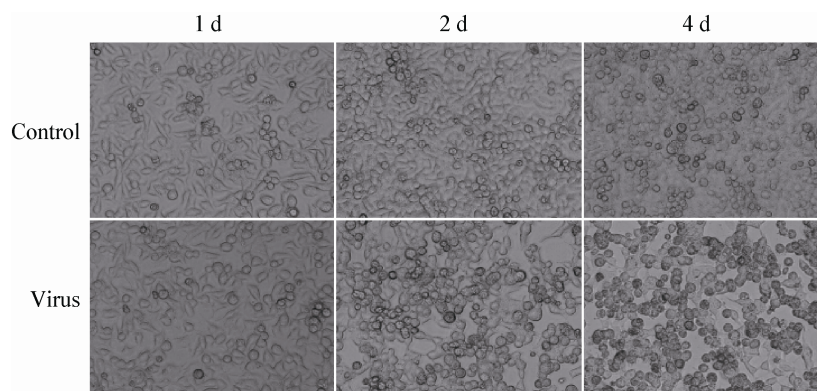


图 1 HAdV-55 病毒株的分离培养(100 \times)

Figure 1 Isolation of HAdV-55 strains (100 \times)

表 1 HAdV-55 全长基因 PCR 扩增引物
Table 1 PCR primers for HAdV-55 genome DNA

Products	Forward primers (5'→3')	Reverse primers (5'→3')	Length (bp)
1	TTTGGGGGTGGAGTGTTTTGC	AGTGCGGGCAATAACCAAATGAT	3 231
2	ATTTGCGGTGCTCCGATGAG	GGACCCAGGTCACGTGAAATAC	2 933
3	CATCACACCTGAGCGAGGTT	TCTGGGCGATGTCAGCGAAAT	3 402
4	CATCACACCTGAGCGAGGTT	ATCAGTCTCAACGCACTCAAAAAGT	3 442
5	CAGATGAGGCCGGACTGGTATAC	GTGACATCTGAGGTGGTGAGCAAT	2 834
6	CGATGTATCTGGAGGAACGGAC	AAGTAACTCAGCGTCGACGCAC	3 488
7	TGCTTTTAATTAATATGGAGTAGC	AGGAACATGCAGCAGAAAAGT	3 408
8	TTCTAACACCTGCTACCTTTTTGAT	ACAGCGGGTATGCAAAGTGT	2 969
9	CTTGGAAGAGGTTCCAAAATCT	TGGAIACCTCTGCCTCTGATTAC	2 780
10	TACTTTTGAACAGTCAGCTCTTAC	TTTCTAAGGTGTTCTGGTGGAGTA	3 227
11	CAACTTCTAGACTGGATCCTTGTG	TCTTCCCTCTCCTCTCTGCT	3 526
12	AACCTTGTCAATGGAGTTGCTTC	GTTGCAAGTTAAGCGGATGTGAC	1 718

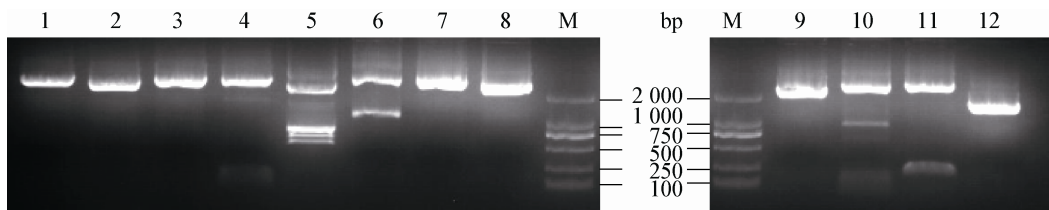


图 2 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测

Figure 2 Detection of PCR products by 1% agarose gel electrophoresis

注: M: DNA marker 2000; 1-12: 12 个 PCR 产物。

Note: M: Molecular weight marker 2000; 1-12: Twelve PCR products.

2.3 序列比对

为进一步分析鉴定该病毒,从 GenBank 下载不同基因型人腺病毒基因组 DNA 序列,采用邻位相连法(Neighbor-Joining)构建系统发育进化树,通过自举分析(Bootstrap)进行置信度检测,自举数据集为 1 000 次。结果如图 3 所示,本研究中获取的腺病毒基因组 DNA 与已报道的 55 型腺病毒处于同一分支上,更进一步明确该病原体为 55 型腺病毒。

3 结论与讨论

杨朝辉在其 2009 年的硕士毕业论文中^[5]报道了 2006 年 3-4 月中国陕西岐山县腺病毒暴发毒株(QS-DLL 株)的特点。当时认为此次暴发的病原体为

HAdV-11a。然而 QS-DLL 分离株的核酸序列除了 DNA 多聚酶、pVI 和 pTP,与腺病毒 14 型的原型株(AY803294)有着最高的一致性(>98.3%)。近几年, HAdV-55 感染的疫情在我国时有发生,而且多发生在营区、学校等场所。

2014 年 1 月 Cao 等^[2]发表了由我国北京多家单位联合进行的临床研究,结果显示,成人腺病毒肺炎流行有明显季节性,多在每年的 2-3 月份流感流行后期发生。HAdV-55 肺炎患者较其他型别腺病毒肺炎患者年龄平均高约 10 岁,且其肺炎严重程度评分(PSI)高于其他型别腺病毒肺炎患者。提示腺病毒 55 型是成人社区获得性肺炎的重要病因之一。

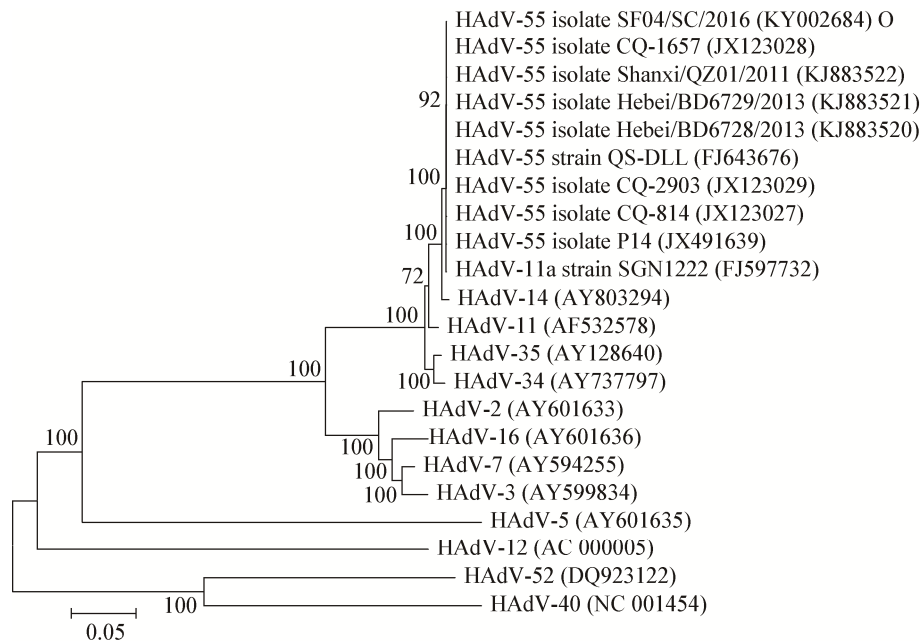


图3 腺病毒基因组 DNA 系统发育进化树构建

Figure 3 Construction of phylogenetic tree based on human adenovirus genomic DNA

注：括号中的数字表示 GenBank 中序列号；树各分支上的数值为次自举检验得到的该分支的支持百分数；标尺表示 5% 的序列分歧度；O：本研究获取的序列。

Note: Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar: 5% Sequence divergence. O: The sequence obtained in this study.

张志强等^[8]回顾分析了 2012 年 4-5 月解放军总医院收治的 11 例成人 55 型腺病毒重症肺炎患者的临床诊治资料，发现 55 型腺病毒引起的成人重症肺炎临床症状较重，除高热、咳嗽等呼吸系统症状外，还伴发腹泻、精神症状等肺外表现。其中 6 例重症肺炎患者胸部 CT 以多肺叶受累的肺大片实变为主要特征，并可出现空洞、纵隔气肿、皮下积气等^[9]。2016 年 1 月-2 月，西藏拉萨驻地部队发生 HAdV-55 感染的疫情^[10]，这是 55 型腺病毒第一次在高原地区暴发大规模感染的疫情。

因此，不论是社区还是部队，55 型腺病毒都已成为引起呼吸道感染的重要病原体之一，对我国暴发的腺病毒毒株进行基因组测序，有助于了解该病毒的进化特点和流行趋势，有助于对 55 型腺病毒的预防和控制。然而之前关于腺病毒基因组序列获取的研究中，其方法都比较复杂^[5,7]。因此本研究通过分析 55 型腺病毒的基因组序列，在相对保守区

域设计引物，采用 12 个基因片段 PCR 测序拼接的方法，结果表明本研究所采用的方法能够快速准确的获得腺病毒全基因序列，为今后 55 型腺病毒的研究提供参考。

另外近年来随着测序技术的不断发展，尤其是第三代测序技术，即高通量测序(Next generation sequencing, NGS, 又叫“下一代测序”)，具有速度快、读长长、可直接测甲基化的 DNA 序列、不需要 PCR 扩增、无碱基偏好、通量高等优点，同时也存在准确率、依赖酶活性等缺陷。由于分离培养得到的腺病毒是细胞产生 CPE 后释放的病毒颗粒，伴随病毒颗粒释放的还有细胞本身大量的 DNA，第三代测序无法准确区分病原体 DNA 和细胞自身 DNA。另外，在序列精度方面，二代测序优于三代。因此对于基因组不是特别庞大的腺病毒来说，利用分片段 PCR 扩增并测序的方法，优于第三代测序技术。但对于较大基因组的获取，如细菌、真菌基因

组, 以及新发未知病原体的快速鉴定, 第三代测序技术具有非常明显的优势。

参考文献

- [1] Lu QB, Tong YG, Wo Y, et al. Epidemiology of human adenovirus and molecular characterization of human adenovirus 55 in China, 2009-2012[J]. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 2014, 8(3): 302-308
- [2] Cao B, Huang GH, Pu ZH, et al. Emergence of community-acquired adenovirus type 55 as a cause of community-onset pneumonia[J]. *Chest*, 2014, 145(1): 79-86
- [3] Sun B, He HY, Wang Z, et al. Emergent severe acute respiratory distress syndrome caused by adenovirus type 55 in immunocompetent adults in 2013: a prospective observational study[J]. *Critical Care*, 2014, 18(4): 456
- [4] Li XY, Mei K, Xu S, et al. An outbreak of acute respiratory disease in China caused by human adenovirus type B55 in a physical training facility[J]. *International Journal of Infectious Diseases*, 2014, 28: 117-122
- [5] Yang CH. The complete genome sequencing and relative analyses on the human adenovirus serotype 11a[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Lanzhou University, 2009 (in Chinese)
杨朝辉. 人腺病毒 11a 型的全基因组序列测定及分析研究[D]. 兰州: 兰州大学硕士学位论文, 2009
- [6] Walsh MP, Seto J, Jones MS, et al. Computational analysis identifies human adenovirus type 55 as a re-emergent acute respiratory disease pathogen[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010, 48(3): 991-993
- [7] Liu J, Nian QG, Zhang Y, et al. *In vitro* characterization of human adenovirus type 55 in comparison with its parental adenoviruses, types 11 and 14[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e100665
- [8] Zhang ZQ, Zhai YZ, Chen X, et al. Diagnosis and treatment of 11 cases of severe human adenovirus type 55 pneumonia[J]. *Chinese General Practice*, 2013, 15(35): 4200-4203 (in Chinese)
张志强, 翟永志, 陈歆, 等. 成人腺病毒 B 组 55 型重症肺炎 11 例诊治分析[J]. *中国全科医学*, 2013, 15(35): 4200-4203
- [9] Zhao CH, Zhang ZQ, Zhai YZ, et al. Clinical characteristics of severe human adenovirus type 55 pneumonia[J]. *Academic Journal of Chinese PLA Medical School*, 2014, 35(7): 663-666 (in Chinese)
赵春洪, 张志强, 翟永志, 等. 青壮年腺病毒 B 组 55 型重症肺炎临床特征分析[J]. *解放军医学院学报*, 2014, 35(7): 663-666
- [10] Zhao RC, Gao WW. Analysis of 92 adult cases infected by human adenovirus type 55[J]. *Military Medical Journal of South China*, 2016, 30(7): 470-471 (in Chinese)
赵瑞臣, 高文文. 高原 92 例成人 B 组 55 型腺病毒感染治疗浅析[J]. *华南国防医学杂志*, 2016, 30(7): 470-471



征订启事

欢迎订阅 《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于 1974 年, 月刊, 是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办, 国内外公开发行, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、微生物蛋白质组、微生物功能基因组、微生物工程与药物等领域的最新研究成果, 产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究改革等。

本刊为中文核心期刊。曾获国家优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 北京优秀科技期刊奖, 被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

据中国科学技术信息研究所信息统计, 本刊 2012、2013、2014、2015 年以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一名而连续 4 年获得“百种中国杰出学术期刊奖”, 并入选 300 种“中国精品科技期刊”, 成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。2014 年获得中国科学院科技期刊三等出版基金资助; 2015 年获得中国科协精品科技期刊工程项目资助。

欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买, 2018 年每册定价 80 元, 全年 960 元, 我们免邮费寄刊。

邮购地址: (100101)北京朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: M413