

# 从贵州白纹伊蚊体内分离到一株 2 型登革病毒

舒莉萍 左 丽\* 郝 牧 赵 星

( 贵阳医学院免疫学教研室 贵阳 550004 )

摘 要 :从贵州省独山县麻尾镇白纹伊蚊标本中分离到一株病毒 ,用抗 DEN 1-4 型单克隆抗体经间接免疫荧光法和 RT-PCR 产物酶切分型鉴定为 DEN-2 ,并对其 NS1 和 E 基因 RT-PCR 产物进行部分基因序列测定 ,与 DEN-2 NGC 株比较 ,麻尾株的 NS1 基因区有 7 个碱基发生点突变 ,E 基因区有 1 个碱基的插入 ,两个序列被 GenBank 收录 ,编号分别为 AY277402、AY278226 ,麻尾分离株与其他 9 株 DEN-2 型病毒进行系统发育关系的分析 ,结果显示与 D2-43 株系统进化关系最近 ,证明贵州省存在 DEN 感染的自然循环。

关键词 :贵州 ,白纹伊蚊 ,登革病毒

中图分类号 :R373.33 文献标识码 :A 文章编号 :1001-6209 ( 2004 ) 02-0153-04

登革病毒( Dengue Virus ,DEN )是经白纹伊蚊( *Aedes albopictus* )及埃及伊蚊( *Aedes aegypti* )传播的黄病毒属( *Flaviviridae* )病毒家族的成员。DEN 感染人类不仅可引起登革热( Dengue fever ,DF ) ,还可引起登革出血热( Dengue hemorrhagic fever ,DHF )和登革休克综合征( Dengue shock syndrome ,DSS )。近年来 ,DEN 感染引起人类疾病的发病率在全球范围呈逐年上升趋势 ,尤其在热带、亚热带地区 ,并且流行区域正在逐渐扩大 ,已成为世界上分布广、发病率高、危害较大的一种虫媒病毒性疾病 ,成为全球性重要公共卫生问题<sup>[1,2]</sup>。

媒介蚊虫传播 DEN 的研究是预防 DEN 感染的基础。白纹伊蚊是 DEN 的主要传播媒介 ,也是 DEN 的自然宿主。据报道 ,不同地理株白纹伊蚊对 DEN 均易感<sup>[3]</sup> ,白纹伊蚊通过吸食患登革病毒血症病人的血液而被感染 ,病毒可在蚊体内增殖 ,感染蚊经叮咬吸血 ,能将 DEN 传播给健康人群<sup>[4]</sup>。白纹伊蚊的分布、密度及带毒率与 DEN 感染的爆发流行有密切关系 ,对白纹伊蚊进行有效的监测和控制是预防 DEN 感染流行的主要手段<sup>[5,6]</sup>。贵州白纹伊蚊分布密度较高 ,已从近 40 个县采集到标本<sup>[7]</sup>。目前贵州虽然没有 DEN 感染疫情的报道 ,但并不能说明贵州白纹伊蚊体内不存在 DEN。本研究采集贵州省 9 个地(州)市共计 18 个县(区)白纹伊蚊幼虫标本 ,从细胞、分子水平进行贵州省白纹伊蚊 DEN 带毒情况的调查 ,旨在对预防贵州省 DEN 的感染提供科学依

据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 标本来源和制备 :于 2001、2002 年夏季分别采集贵州省 9 个地(州)市共计 18 个县(区)(表 1)白纹伊蚊幼虫标本 ,每个县(区)选择 3 个或 3 个以上的采样点。

表 1 贵州省白纹伊蚊采样点分布表

Table 1 Sampling sites for *Aedes albopictus* in Guizhou province

District of Guizhou Province	Sampling sites
Guiyang	Guiyang, Qingzheng
Zunyi	Zunyi, Suiyang
Bijie	Bijie, Dafang
Liupanshui	Shuicheng, Liuzhi
Anshun	Anshun, Zhenning
Qianxinan	Xingyi, Anlong
Qiannan	Mawei, Libo
Qiandongnan	Kaili, Zhenyuan
Tongren	Tongren, Yuping

1.1.2 毒株 :DEN1-4 型国际参考株均购于中国预防科学院流行病研究所。

1.1.3 细胞株 :白纹伊蚊传代细胞( C6/36 细胞 )由中山大学医学院微生物学教研室郭辉玉、江丽芳教授惠赠 ,28℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下常规传代培养。

基金项目 :国家自然科学基金项目( 39960001 )

\* 通讯作者。Tel 86-851-6908028 E-mail :zuoligymc@163.com

作者简介 :舒莉萍( 1974 - ) ,女 ,四川人 ,讲师 ,硕士 ,主要从事分子病毒免疫学研究。E-mail :gyslp-456@163.com

收稿日期 :2003-06-20 ,修回日期 :2003-10-16

**1.1.4 主要试剂**:羊抗人 IgG 抗体-FITC 和羊抗鼠 IgG 抗体-FITC 购于北京邦定生物制品公司;鼠抗登革病毒 1-4 型 McAb 由中山大学医学院微生物学教研室郭辉玉、江丽芳教授惠赠;AMV Reverse Transcriptase、RNasin 购于北京华美生物制品有限公司;dNTPs、*Taq* DNA Polymerase、限制性内切酶 *Mav* I 和 *Hinf* I 购于深圳晶美生物制品有限公司。

**1.2 白纹伊蚊的饲养和标本制备**

白纹伊蚊标本饲养在温度  $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $75\% \pm 5\%$ 、光照 14h/天的养蚊室。取 8~10 日龄成蚊 20 只/组,制备为 1/5 稀释蚊悬液<sup>[8]</sup>。

**1.3 病毒分离**

将上述蚊悬液稀释为 1/20、1/40,分别接种于 1 日龄 C6/36 单层细胞,每个稀释度 3 孔,密切观察 CPE,同时设阳性对照、空白细胞对照。

**1.4 细胞片的制作**

待上述病毒分离中 CPE 达 ++,用“L”型小棒刮下 C6/36 细胞,2000r/min 离心后,制成细胞悬液,Hanks'液洗涤 3 次,制成细胞片,冷丙酮固定,-20℃保存备用。

**1.5 间接免疫荧光法检测 DEN 抗原**

用抗 DEN1-4 型 McAb 常规间接免疫荧光法鉴定病毒,同时设置阳性对照(不同型别 DEN 国际参考株感染 C6/36 细胞后制备的细胞片)、阴性对照(一抗用正常人血清)、空白对照(未感染 DEN 的 C6/36 细胞抗原片)。

**1.6 RT-PCR**

**1.6.1 引物**:根据 DEN 的非结构蛋白 NS1 区核苷酸序列,合成一对 DEN1~4 型通用引物,P+:5'-GACATGGGGTATTAAAT-3',P-:5'-TCCATCCCATACCAGCA-3',扩增序列长度均为 413bp,根据限制酶谱分析,用 *Mav* I 限制性内切酶酶切 PCR 产物可形成不同酶切片段(表 2)进行分型。参照文献[9],合成一对 DEN-2 包膜蛋白 E 基因区特异性引物,P+:5'-ATGCGTTGCATAGGAATATC-3',P-:5'-CCATGTTTTCCTGTGTCATT-3',扩增片段为 476bp,*Hinf* I 限制性内切酶可将该目的片段酶切为 211、265bp 的片段。

表 2 *Mav* I 对 DEN NS1 基因片段的酶切图谱  
Table 2 The lengths of restriction fragments for DEN NS1 gene with *Mav* I

Types	<i>Mav</i> I /bp
DEN-1	64,121,228
DEN-2	185,228
DEN-3	200,213
DEN-4	413

**1.6.2 RNA 的提取**:碘化钠-异硫氰酸胍-氯仿法<sup>[10]</sup>。

**1.6.3 RT-PCR**:RT 25μL 总体积中含 10μL RNA,1U AMV,20U RNasin,25μmol/L dNTPs,5×RT Buffer,6.3μmol/L 下游引物,RT 的反应条件为 42℃,60min。PCR 50μL 总体积中含 10μL 模板 cDNA,引物各 6.3μmol/L,10×PCR Buffer,25μmol/L dNTPs,5U *Taq* DNA 聚合酶;PCR 反应条件为:93℃ 预变性 1min 40s,93℃ 40s,55℃ 45s,72℃ 1min,30 次循环,72℃ 后延伸 10min。

**1.7 系统发育分析**

用测序所知核苷酸序列与在 GenBank 中选取的 9 株较完整的 DEN-2 型 E、NS1 基因区核酸序列资料进行多组核酸序列相似性比较。将核苷酸序列用 ClustalX 1.8 软件进行序列同源性比较;用 PHYLIP 软件绘制系统发生树。

**2 结果**

**2.1 病毒分离**

将贵州省 9 个地(州)市共计 18 个县(区)不同地方株白纹伊蚊标本接种于 1 日龄 C6/36 单层细胞。其中,独山县麻尾镇地方株接种细胞,盲传一代后出现明显 CPE(图 1);其它白纹伊蚊地方株标本接种 C6/36 细胞常规盲传 3 代仍未出现明显 CPE,即未分离到病毒。

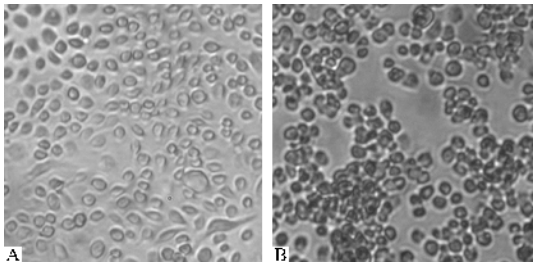


图 1 蚊悬液接种 C6/36 细胞分离 DEN 的细胞病变(400×)  
Fig.1 Photomicrograph about the cytopathic effect of C6/36 cells caused by DEN in the *Aedes albopictus* suspension(400×)  
A. C6/36 cells; B. CPE(Mawei).

**2.2 间接免疫荧光法鉴定 DEN**

分别用抗 DEN1-4 型的 McAb 常规间接免疫荧光法鉴定白纹伊蚊麻尾株所致 C6/36 CPE 的细胞片,用抗 DEN-2 McAb 染色,细胞浆中可见黄绿色特异性荧光(图 2);将抗 DEN-1、3、4 型的 McAb 染色未见阳性反应,证实为 DEN-2。

**2.3 白纹伊蚊麻尾株 RT-PCR 扩增**

用 DEN NS1 区通用引物经 RT-PCR 检测白纹伊蚊麻尾株,其和阳性对照 DEN-2 的扩增

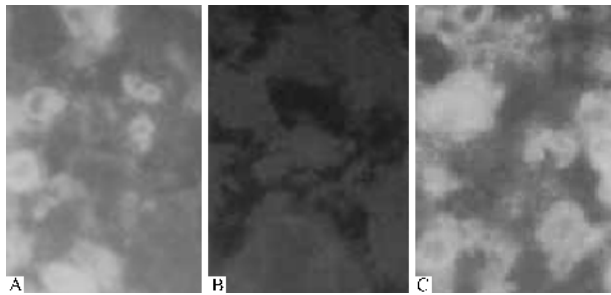


图 2 间接免疫荧光法鉴定 DEN(200 × )

Fig.2 Identification of DEN by indirect immuno-Fluorescence techniques(200 × )

A. Positive control ;B. Negative control ;

C. Mawei strain( identified with McAb against DEN-2 ).

产物在 400 ~ 500bp 范围内均见到位置相同的一条条带 ,与预期的 413bp 相符 ,空白对照未见任何条带 ,该 RT-PCR 扩增的阳性产物 ,用 *Mav* I 限制性内切酶酶切 ,麻尾株样本经酶切后得到两条水解片段 ,分别位于 100 ~ 200bp、200 ~ 300bp 范围内 ,与 DEN-2 酶切为 185、228bp 两条水解片段相符 ,从而判断为 DEN-2 型病毒。

用 DEN-2 E 基因区特异性引物经 RT-PCR 扩增麻尾株蚊虫样本 ,在 400 ~ 500bp 范围内可见到一条条带 ,与阳性对照 DEN-2 NGC 株出现的条带位置相同 ,与预期的 476bp 相符 ,而空白对照未见到任何条带 ,用 *Hinf* I 限制性内切酶酶切该 RT-PCR 产物 ,得

到两条水解片段 ,均位于 200 ~ 300bp 范围内 ,与预期 DEN-2 酶切为 211、265bp 两条水解片段相符 ,进一步证实麻尾株为 DEN-2 型。

2.4 PCR 产物基因序列测定

麻尾分离株( MDEN-2 )和 DEN-2 NGC 株 NS1 区和 E 基因区 RT-PCR 扩增产物分别委托大连宝生物工程有限公司和上海联合基因科技有限公司进行纯化并测序 ,其中 DEN-2 NGC 株 NS1 和 E 基因区测序结果与 GenBank 提供的核苷酸序列一致。从测序结果进行两株病毒的比较分析 ,MDEN-2 NS1 区共有 7 个位点发生点突变 ,分别位于该段序列的第 3、9、94、121、289、304、405 位点 ,二株病毒的 NS1 基因部分序列同源性的 98.31% ;MDEN-2 的 E 基因在该段序列第 471 ~ 472 位间插入 1 个碱基 ,而两株病毒的 E 基因部分序列同源性为 99.79% ;MDEN-2 的 NS1 和 E 区的核苷酸序列已在 GenBank 中注册 ,序列登录号分别为 AY277402、AY278226。

2.5 系统发生树的构建

将麻尾分离株所测的 E、NS1 核苷酸序列与 GenBank 中选取的 9 株 DEN-2 型序列进行同源性分析 ,构建进化树( 图 3 ) ,从系统发生树中可见 , MDEN-2 与 16681 株、NGC 株、D2-43 位于相近的分支 ,其中与 1987 年广西流行株 D2-43 株系统进化关系最近。

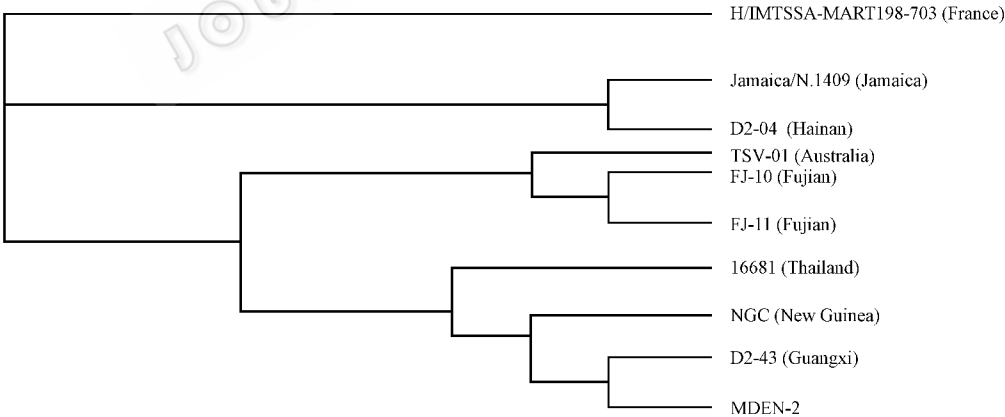


图 3 DEN-2 E、NS1 基因区核酸序列相似性比较示意图

Fig.3 The nucleotide sequence of DEN-2 E and NS1 gene were aligned

3 讨论

目前认为 DEN 的主要传播媒介为埃及伊蚊( *Aedes aegypti* )和白纹伊蚊( *Aedes albopictus* )<sup>[11,12]</sup>。埃及伊蚊主要分布于我国北纬 22°以南的地区 ,白纹伊蚊则分布于北纬 41°8'以南的地区。我国目前 DF 流行地区均处于北纬 23°5'以南的热带及临近热带

的亚热带地区<sup>[13]</sup> ,这些地区一年四季适宜蚊媒生长繁殖 ,造成 DEN 易于存在及其感染的流行。贵州省位于北纬 24°38' ~ 29°14'之间 ,故无埃及伊蚊分布 ,但有白纹伊蚊的广泛分布。白纹伊蚊的分布及带毒率与 DEN 的流行有着密切关系<sup>[14,15]</sup> ,虽然贵州没有 DEN 感染的疫情报道 ,但并不能说明贵州省白纹伊蚊不存在 DEN 的感染。因此 ,进行贵州省自然界白

纹伊蚊体内 DEN 带毒情况的调查,对于预防贵州省 DEN 感染的流行有重要意义。

本研究通过采集贵州省 9 个地(州)市共计 18 个县(区)白纹伊蚊地方株,进行 DEN 抗原、核酸的检测以及病毒分离,分离到一株 DEN,用抗 DEN 1-4 型 McAb 经间接免疫荧光法和 RT-PCR 产物酶切鉴定分型为 DEN-2 型。从病原学上证实贵州省自然界白纹伊蚊体内存在 DEN,贵州存在 DEN 的自然循环,具备引起本病流行的条件,为贵州省对 DEN 感染的防治提供了科学依据。

DEN 属 RNA 病毒,缺乏精确的复制校正系统,较 DNA 病毒更容易发生变异。本研究选取编码与病毒复制有关的 NS1 蛋白的基因和重要结构蛋白 E 蛋白的基因,将从贵州麻尾镇白纹伊蚊标本中分离的 DEN-2 所测定的核苷酸序列与 GenBank 和文献提供的其它 9 株 DEN-2 E、NS1 基因区序列进行比较分析,构建了它们之间的系统进化树。证明麻尾株与 D2-43 株(1987 年广西分离株)的系统发育关系最近。麻尾镇位于独山县南部,东经 107°25' 北纬 25°20',位踞黔桂边境,为黔桂铁路、黔桂公路交通要站,广西是 DF 流行区域,而作为黔桂交通咽喉重地的麻尾镇,有可能发生 DEN 传入,但需获得更多、更全的基因组序列资料才能明确该毒株的来源。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Thein S, Aung M M, Shew T N, *et al.* Risk faction in dengue shock syndrome. *Am J Trop Med Hyg*, 1997 **56** ( 5 ) 556 – 572.
- [ 2 ] Guzman M G, Kouri G. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis*, 2002 **2**

( 1 ) 33 – 42.

- [ 3 ] Bennett K E, Olson K E, Munoz Mde L, *et al.* Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and the United States. *Am J Trop Med Hyg*, 2002 **67** ( 1 ) 85 – 92.
- [ 4 ] Teixeira Mda G, Barreto M L, Costa Mda C, *et al.* Dynamics of dengue virus circulation: a silent epidemic in a complex urban area. *Trop Med Int Health*, 2002 **7** ( 9 ) 757 – 762.
- [ 5 ] Da Fonseca B A, Fonseca S N. Dengue virus infections. *Curr Opin Pediatr*, 2002 **14** ( 1 ) 67 – 71.
- [ 6 ] Tauli P L. Urbanization and dengue ecology. *Cad Saude Publica*, 2001 **17** Suppl 99 – 102.
- [ 7 ] 陈汉彬. 贵州蚊类志. 贵阳: 贵州省人民出版社, 1987, 121 – 123.
- [ 8 ] 杨佩英, 秦鄂德. 登革热和登革出血热-基础理论与实验技术. 北京: 人民军医出版社, 1999, 153.
- [ 9 ] Markoff L J. Development of cross-reactive antibodies to plasminogen during the immune response to Dengue virus infection. *J Infect Dis*, 1991 **164** 294 – 298.
- [ 10 ] 杨占秋, 余宏. 临床病毒学. 北京: 中国医药科技出版社, 2000 375.
- [ 11 ] Olson K E, Adelman Z N, Travanty E A, *et al.* Developing arbovirus resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol*, 2002 **32** ( 10 ) : 1333 – 1343.
- [ 12 ] Castleberry J S, Mahon C R. Dengue fever in the Western Hemisphere. *Clin Lab Sci*, 2003 **16** ( 1 ) 34 – 38.
- [ 13 ] 张海林, 自登云, 龚正达. 云南省登革热流行病学调查分析. 地方病通报, 1999, **14** ( 3 ) 50 – 53.
- [ 14 ] Chung Y K, Pang F Y. Dengue virus infection rate in field populations of female *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Singapore. *Trop Med Int Health*, 2002 **7** ( 4 ) 322 – 330.
- [ 15 ] Teixeira Mda G, Barreto M L, Costa Mda C, *et al.* Dynamics of dengue virus circulation: a silent epidemic in a complex urban area. *Trop Med Int Health*, 2002 **7** ( 9 ) 757 – 762.

## Isolation Identification and Phylogenetic Analysis of A New Dengue Virus Strain from Field *Aedes albopictus* in Mawei Town

SHU Li-Ping ZUO Li\* HAO Mu ZHAO Xing

( Department of Immunology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China )

**Abstract**: One new strain of dengue virus was isolated from field *Aedes albopictus* in Mawei town of Guizhou Province. It was identified as dengue virus 2 type by IFA with monoclonal antibody against dengue virus 1-4 types and RT-PCR. The E and NS1 share gene of the new strain were sequenced. Seven point mutations of NS1 gene and one base insertion of E gene were found, comparing with DEN-2 NGC strain. This different sequence were accepted by GenBank. The accession number of NS1, E gene were AY277402, AY278226, respectively. A phylogenetic tree was constructed by comparing with the published E, NS1 gene sequence from nine strains of dengue virus 2 type. These findings highlighted the existence of a silent epidemic in Guizhou. Dengue virus 2 type Mawei strain is more related to D2-43 than others.

**Key words**: Guizhou, *Aedes albopictus*, Dengue virus

Foundation item: Chinese National Natural Science Foundation ( 39960001 )

\* Corresponding author. Tel 86-851-6908028; E-mail zuoligymc@163.com

Received date 06-20-2003