

学校编码: 10384
学号: 21620131152630

分类号 _____ 密级 _____
UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

2011-2015 年重庆地区轮状病毒分子流行病学调查

The molecular epidemiology of rotavirus circulating in
Chongqing, 2011-2015

曾渊君

指导教师姓名: 李少伟 教授

葛胜祥 副教授

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2017 年 4 月

论文答辩时间: 2017 年 5 月

学位授予日期: 2017 年 6 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2017 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 2020 年 6 月 10 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月

目录	
摘要	I
Abstract	II
缩略词	III
第一章 前言	1
1 轮状病毒概况	1
2 轮状病毒基因组、蛋白与结构	2
3 轮状病毒的分类	4
4 轮状病毒的流行病学	6
5 轮状病毒遗传多样性的机制	12
6 轮状病毒的检测、治疗与预防	14
7 本研究的目的是和意义	18
第二章 材料与方法	20
1 主要仪器	20
2 主要试剂	20
3 常用溶液的配制	21
3.1 PBS (PH7.4) 溶液	21
3.2 DEPC 水	21
3.3 琼脂糖凝胶电泳相关试剂	21
4 标本来源	21
5 方法	22
5.1 样品处理	22
5.2 轮状病毒的胶体金检测	22
5.3 轮状病毒 G 基因型与 P 基因型的 PCR 检测.....	23
5.4 轮状病毒全基因组扩增	25
5.5 测序结果分析	28

6 统计分析	29
第三章 结果与分析	30
1 轮状病毒的流行病学特征	30
1.1 人群的一般特征	30
1.2 轮状病毒腹泻患儿的临床症状	34
2 轮状病毒的基因型分布及其趋势变化的研究	35
2.1 轮状病毒 G 基因型分型	35
2.2 轮状病毒的 P 基因型分型	39
2.3 轮状病毒腹泻的 G 基因型和 P 基因型的组合关系	41
3 G9 型轮状病毒的基因亚型分析	42
3.1 G9 型轮状病毒的 VP7 基因型亚型分析	42
3.2 G9P[8]型轮状病毒的 VP4 基因型亚型分析	45
3.3 G9P[8]型轮状病毒的 G-lineage 与 P[8]-lineage 组合的分析	46
3.4 G9P[8]型轮状病毒与上市疫苗的同源性分析	46
4 G9P[8]型 RV 的全基因组分析	48
4.1 VP7 核苷酸序列分析	48
4.2 VP4 核苷酸序列分析	51
4.3 VP6 核苷酸序列分析	51
4.4 VP1-VP3 核苷酸序列分析	52
4.5 NSP4 核苷酸序列分析	53
4.6 NSP1-NSP3 和 NSP5 核苷酸序列分析	53
5 稀有基因型 G1P[4]的全基因序列分析	66
5.1 RotaC 网站在线分型	66
5.2 序列同源性分析	66
5.3 进化树分析	66
5.4 Simplot 分析基因重配情况	74

第四章 讨论.....	75
1 轮状病毒的流行病学特征为制定免疫策略提供科学依据.....	75
2 全面系统监测轮状病毒流行情况的必要性.....	76
3 RT-PCR 检测方法的优势与不足.....	78
4 G9P[8]型 RV 的全基因组分析.....	78
5 轮状病毒存在多基因重配现象.....	79
第五章 总结与展望.....	80
参考文献.....	81
致 谢.....	94
附 录.....	95

Content

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	II
Abbreviations	III
Chapter 1 Introduction.....	1
1 Rotavirus	1
2 The genome and protein of rotaviurs.....	2
3 Classification of rotavirus	4
4 Epidemiology of rotavirus.....	6
5 The mechaism of rotaviurs genetic diversity.....	12
6 Detection, treatment and prevention of rotavirus	14
7 The purpose and significance of this study.....	18
Charpter 2 Materials and Methods	20
1 The main instrument	20
2 Major reagents	20
3 Preparation of common solutions.....	21
3.1 PBS (PH7.4)	21
3.2 DEPC-treated water	21
3.3 Reagents of agaose gel electrophoresis	21
4 Object of study	21
5 Methods	22
5.1 Sample processing	22
5.2 Colloidal gold detection.....	22
5.3 G or P genotype determinated by RT-PCR	23
5.4 Full genomic analysis of rotaviurs.....	25
5.5 Analysis of sequene.....	28
6 Statistical Analysis	29
Charpter 3 Results and Analysis	30
1 The status of rotavius infetion	30

1.1 The general characteristics of rotavirus diarrhe.....	30
1.2 Clinical symptoms of children infected with rotavirus.....	34
2 The prevalence of G/P genotype	35
2.1 G-genotype	35
2.2 P-genotype	39
2.3 G-P combination.....	41
3 The subgenotypic lineage of G9P[8] GARV	42
3.1 Subgenotypic lineage of VP7	42
3.2 Subgenotypic lineage of VP4	45
3.3 The combination of G-lineage and P[8]-lineage	46
3.3 Alignment of amino acid between G9P[8] and three vaccine strains ..	46
4 Full genomic analysis of G9P[8] GARV	48
4.1 Nucleotide sequence analysis of VP7.....	48
4.2 Nucleotide sequence analysis of VP4.....	51
4.3 Nucleotide sequence analysis of VP6.....	51
4.4 Nucleotide sequence analysis of VP1-VP3	52
4.5 Nucleotide sequence analysis of NSP4.....	53
4.6 Nucleotide sequence analysis of NSP1-NSP3, NSP5.....	53
5 Whole-genomic analysis of rare G1P[4] GARV	66
5.1 Genotyping by RotaC	66
5.2 Analysis of sequence homology	66
5.3 Phylogenetic tree analysis.....	66
5.4 Reassortment analysis by Simplot.....	74
Chapter 4 Dissicusion	75
1 Epidemiological features provide scientific basis for immunization strategy.....	75
2 The necessity to monitor the epidemiological of rotavirus	76
3 The advantages and disadvantages of RT-PCR	78
4 Full genomic analysis of G9P[8]	79
5 Fulle genomic analysis of G1P[4]	79

Charpter 5 Sunmary and Scope	80
Reference	81
Acknowledgement.....	94
Appendix.....	95

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

A 组轮状病毒 (Rotavirus) 是引起全球婴幼儿严重腹泻的主要病因, 95% 的儿童在 5 岁以前都感染过轮状病毒, 造成了巨大的经济和社会负担。目前尚无特效药物治疗轮状病毒引起的婴幼儿腹泻, 疫苗接种是预防和控制轮状病毒感染的有效方法。轮状病毒的流行具有明显的地域性, 且主要流行毒株随着时间的推移而不断变化。轮状病毒流行病学监测对于了解轮状病毒的进化以及研发高效的轮状病毒疫苗具有重要的指导意义。

本研究收集了 2011-2015 年重庆医科大学附属儿童医院门诊就诊的 5 岁以下婴幼儿腹泻标本 2236 份, 其中轮状病毒是导致腹泻的主要病原体之一, 轮状病毒阳性病例占有所有腹泻病例的 30.46%。681 例轮状病毒阳性的患者中, 12-24 月龄儿童的轮状病毒检出率最高 (42.32%), 2 岁以内儿童 608 名, 占全部轮状病毒腹泻患儿的 89.28%。轮状病毒在全年呈散发存在, 以秋冬季节为多, 在每年的 10 月份至次年一月份检出率较高, 占全部轮状病毒腹泻患儿的 83.36% (587/681)。2011-2015 年重庆地区优势流行 G 基因型发生了从 G1 到 G9 的转变, P 基因型则相对比较稳定, 一直以 P[8] 基因型为主。基因型组合主要以 G9P[8] (43.53%) 为主, 其次为 G1P[8] (30.21%), G3P[8] (16.70%) 和 G2P[4] (6.19%)。在 681 份标本中, 未发现人源毒株与动物源毒株的基因重配现象, 但是, 通过全基因组测序发现一例目前尚未报道的罕见的三基因重配毒株, 其全基因序列分型结果: G1-P[4]-I2-R1-C1-M1-A2-N2-T1-E1-H1, 进化树和 simplot 软件分析表明该毒株可能来源于 Wa-like 与 DS-1like 毒株的重配。

综上所述, 中国大陆地区轮状病毒的流行复杂多变, 应继续加强轮状病毒感染的监测, 为研制和引进疫苗提供背景资料, 为轮状病毒肠炎防治策略的制定提供参考依据。

关键词: 轮状病毒; 流行病学; G9P[8]; G1P[4]; 疫苗; 腹泻

Abstract

Group A rotavirus is one of the major causes of acute viral gastroenteritis in infants and young children worldwide, 95% of children were infected with rotavirus before the age of five, leading to serious social and economic burden. There is no specific treatment for rotavirus diarrhea, vaccination is the most efficient methods to prevent and control rotavirus infection. The prevalence of rotavirus was obvious regional, the main epidemic strains are changing over time. The epidemiological surveillance of rotavirus is important for understanding the evolution of rotavirus and the development of highly efficient rotavirus vaccines.

In the present study, a total of 2236 diarrhea samples were collected, RV was confirmed in 681(30.46%) out of 2236, 388 cases were male and 293 cases were female. Among the 681 patients, the highest rate of rotavirus detection was 42.32% in children aged 12-24 months. Children under 2 years account for 89.28% of all rotavirus diarrhea. Rotavirus was prevalence from October to January. The predominate G-genotype shift from G1 to G9 in 2011-2015, while P[8] was always the main P-genotype. G9P[8] was the most common G/P combinations, follow by G1P[8], G3P[8] and G2P[4]. There is no reassortment between human rotavirus and other animal rotavirus among 681 rotavirus-positive sample. However, using whole genomic analysis, we investigated 1 rare G1P[4] human rotavirus strains, the genotype constellations G1P[4] has been designated I2-R1-C1-M1-A2-N2-T1-E1-H1. Results suggest multiple segments reassortment between Wa-like and DS-1-like strains.

In summary, the epidemiology of rotavirus in Chongqing is complicated and changeable; we should strengthened the monitor of rotavirus infection to provide reference for the development and introduction of vaccine.

Key words: rotavirus; molecular epidemiology; G9P [8]; G1P [4]; vaccine; diarrhea

缩略词

英文缩写	英文全称	中文全称
RV	rotavirus	轮状病毒
bp	base pair	碱基对
aa	amino-acid	氨基酸
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
ds-RNA	double-single ribonucleic acid	双链核糖核苷酸
c DNA	complementary deoxynucleic acid	互补脱氧核糖核苷酸
dd H ₂ O	double distillation water	双蒸水
PBS	phosphate buffer saline	磷酸盐缓冲液
rpm	revolutions per minute	每分钟转速
DEPC	diethyl pyrocarbonate	焦炭酸二乙酯
DMSO	dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
DNA	deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核苷酸
EDTA	Ethylen diaminetetracetic acid	乙二胺四乙酸
min	minute	分钟
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
RT-PCR	reverse transcription PCR	逆转录 PCR
Taq	thermos-aquaticus DNA polymerase	耐热的 DNA 聚合酶
d NTP	deoxyribonucleoside triphosphate	脱氧核糖核苷三磷酸
G _{NT}	G-nontypable	G 未分型
P _{NT}	P-nontypable	P 未分型
VP	Viral proteins	病毒蛋白
NSP	Non-structural protein	非结构蛋白

PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
ELISA	Enzyme-linked immune sorbent assay	酶联免疫吸附法
DLP	Double-layered particle	双层颗粒
TLP	Triple-layered particle	三层颗粒

厦门大学博硕士论文摘要库

第一章 前言

A 组轮状病毒(Rotavirus, RV)是导致全球婴幼儿腹泻的主要病原体之一^[1], 世界范围内每年大约有 200,000-453000 个婴幼儿因 RV 腹泻死亡, 95%的儿童在 5 岁以前都感染过 RV^[2,3]。1963 年, Adams 和 Kraft 在腹泻小鼠的肠组织切片中首次观察到轮状病毒颗粒^[4], 因其形似车轮而得名。几十年来, 各国科学家对轮状病毒进行了大量研究, 在其感染、致病、复制、免疫保护机制等方面取得较多的进展, 为轮状病毒的预防和治疗奠定坚实的理论基础。经过多年研究, 目前已获批准上市的疫苗有默克的 Rotateq, 葛兰素史克的 Rotarix 以及兰州生物制品所的羊减毒活疫苗 LLR 罗特威^[5], 这些疫苗在致病率较高的欠发达地区的保护效果较差, 这可能与世界范围内轮状病毒流行的多样性、复杂性有关^[6]。因此全面的检测和了解轮状病毒的流行病学规律、流行毒株等的特点和变化可以为研制和开发新的轮状病毒疫苗提供背景资料, 同时也可为疫苗免疫效果评价提供基础信息。

1 轮状病毒概况

轮状病毒(Rotavirus, RV)属于呼肠孤病毒科, 轮状病毒属, 为 20 面体无包膜球状颗粒, 直径约为 70-75nm^[7]。完整病毒颗粒(triple-layer-particle, TLP)主要包含三层衣壳结构(内层, 中间层, 外层), 从内到外依次由 VP2, VP6 和 VP7 组成, 表面光滑, 可见刺突状突起。缺失外层衣壳的病毒颗粒(double-layer-particle, DLP)直径为 60nm, 表面较粗糙, 且不具感染性(图 1-1)。

轮状病毒的性质比较稳定, 对乙醚、氯仿、超声处理、反复冻融等不敏感, 在自然环境中可存活数月, 但是对 EDTA 等螯合剂较为敏感, 容易失去外壳而使其丧失感染性。

2 轮状病毒基因组、蛋白与结构

2.1 轮状病毒的基因组

轮状病毒的基因组由 11 条不连续的、分节段的双链 RNA 组成,大小从 667bp-3302bp 不等,位于病毒核心衣壳的内部。聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 可以对其基因组 RNA 进行分离。根据轮状病毒基因组的电泳图谱不同可以区别不同的组别, A 组轮状病毒基因组是典型的 4: 2: 3: 2 型电泳图谱 (图 1-2)。

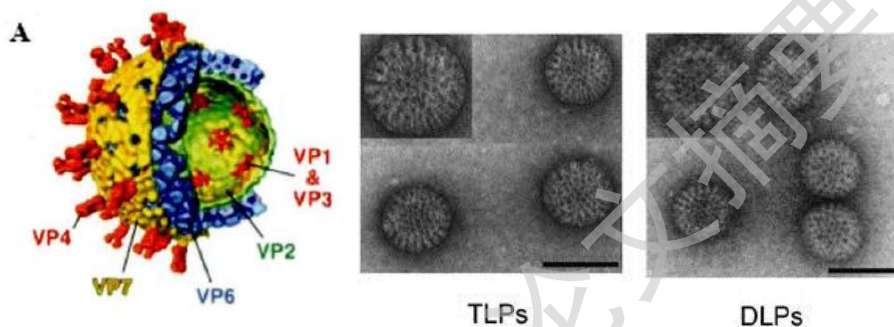


图 1-1. 轮状病毒结构示意图及其电镜照片^[8,9]

Fig1-1. The schematic of rotavirus and EM of TLPs or DLPs

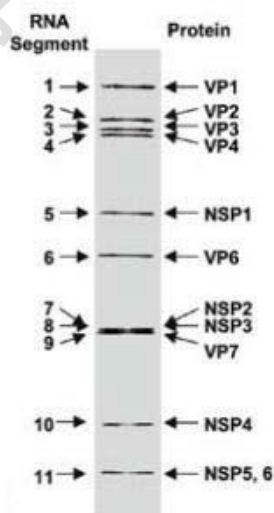


图 1-2 轮状病毒基因组 PAGE 电泳图及其对应编码的蛋白^[7]

Fig 1-2 the genome and protein of rotavirus

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库