

1995 ~ 1997 年中国部分地区麻疹病毒流行株基因型分析

孙英杰¹ Li Jin² 葛力³

摘要 本文报道以反转录二步多聚酶链反应方法(RT-PCR)直接测定麻疹病人唾液、尿液标本中的麻疹病毒(MV)血凝基因(H)、核衣壳基因(N)。以 RT-PCR 产物纯化后进行 MV 450nt H、282nt N 基因核苷酸片段测序分析, 测序结果一致表明, 1995 ~ 1997 年期间中国部分地区 MV 流行株存在两种基因型。其中一种基因型只发现 1 株, 与 EDw 54 株相同, 另一种基因型占流行株的绝大多数(称新基因型), 与其它国家以前报道的 MV 流行株基因型的 N 基因最大差异为 15.4% 与 EDw 54、疫苗株相差 8.8%; H 基因最大差异是 10.8%。

关键词 麻疹病毒 RT-PCR 序列分析

Genetic Analysis of Wild Type Measles Viruses Circulating in China During 1995-1997 Sun Yingjie^{*}, Li Jin, Ge Li. ^{*}Liaoning Provincial Anti-Epidemic and Health Station Shenyang, China 110005

Abstract To investigate the molecular epidemiology of measles virus (MV) in China, sequence analysis of MV was performed based on a 282-nt region of the nucleoprotein (N) gene and a 450-nt region of hemagglutinin (H) gene by direct sequencing of RT-PCR amplicons obtained from clinical specimens. Results revealed that one MV strain belonged to ED-like genotype and remainder strains were clustered into a new genotype which was distinct from Chinese vaccine strains and MV strains circulating in other countries as previously described representing a new genotype. There was up to 15.4% divergence in the nt-282 N gene and 10.8% divergence in the nt-450 H gene between the new genotype and other genotypes.

Key words Measles virus RT-PCR Sequence analysis

麻疹病毒自 1954 年首次分离成功后 (Edmoston-54 株, 简称 EDw 54), 40 多年来一直认为 MV 为单一血清型, 但是近年来随着分子生物学技术的发展, 对 MV-RNA 的研究有所进展。目前, 美国、英国等国家已发现 MV 流行株有不同的基因型^[1~6], 特别是 Rota PA (1995)^[3] 报道了美国及世界各国 1988 ~ 1995 年期间 MV 基因型有 6 种; Jin L (1997)^[5] 报道了英国 1992 ~ 1995 年期间 MV 流行株基因型有 3 种。为了解中国 MV 流行株基因型, 1995 ~ 1997 年期间我们采集

辽宁省 7 个市及来自河南、河北两省的麻疹病人急性期的唾液、尿液标本以 RT-PCR 方法直接测定 MV-RNA。PCR 产物纯化后进行 MV-H、N 基因核苷酸片段测序分析, 基因分型。

材料和方法

一、标本: 1995 ~ 1997 年期间采集辽宁省盘锦、沈阳等 7 个市及来自河南(郑州)、河北(石家庄)的麻疹病人急性期的唾液 46 份、尿液 32 份、血清 46 份。标本采集后置 -20℃ 保存备用, 血清用于抗 MV-IgM 检测, 尿液和唾液用于 MV-RNA 检测。

二、抗 MV-IgM 测定: 使用中国药品生物制品检定所生产的抗 MV-IgM ELISA

1 辽宁省卫生防疫站 沈阳 110005

2 Enteric Respiratory Virus Laboratory Central Public Health Laboratory

3 辽宁省大连市卫生防疫站

试剂盒, 具体方法按说明进行。

三、RT-PCR 引物: 研究所用 MV-H、N 基因引物均由 Central Public Health Laboratory UK (CPHL, UK) 提供, 其结构如下: H1(+7844) 5'ACATCAATCAGAGGTC AATTC3', H2R(-8414) 5'AGCATGTCTC CATTGCAACT3', H3(+7852) 5'CAGAG GTCAATTCTCAAACA 3', H4R(-8404) 5'CATTCGCAACTTGTTCATCTG 3'; N1(+1304-1323)5'TGCATACTACTGAG GACAA3', N2R(-1694-1674)5'TCT CGCACCTAGTCTAGAA3', N3(+1324-1341) 5'ATCAGTAGAGCGGTTGGA3', N4R(-1641-1624) 5'GTCTGAGCCTT GTTCTTC3'。

四、参考病毒株: EDw54 野毒株, Mor(为国外疫苗株), Chang China57、94 为辽宁现用长春麻疹疫苗毒株。上述病毒基因序列来自基因库, 其他国家的 MV 流行株基因序列有的来自基因库, 有的来自 CPHL, UK。

五、MV-RNA 提取方法: 采用 Boom 等(1990)报道的硫氰酸胍-石英硅粉方法^[7]。

cDNA 合成、RT-PCR 二步法、MV-H、N 基因核苷酸片段序列测定、核苷酸序列分析方法均按 Jin L 使用的方法(1997、1996)^[5、8]。

结 果

一、抗 MV-IgM ELISA 结果: 46 例疑似麻疹病人中, 37 例抗 MV-IgM ELISA 阳性, 8 例阴性, 1 份未检测。8 份抗 MV-IgM 阴性中有 3 份 RT-PCR MV-RNA 阳性, 此 3 例可能由于采血时间距发病时间很短的原因, 所以抗 MV-IgM ELISA 阴性。

二、MV-H、N 基因核苷酸片段 RT-PCR 结果: 采集的 46 份唾液, MV-H、N 基因 RT-PCR 31 份阳性; 32 份尿液 19 份阳性。MV-H、N 基因 PCR 产物分别是 552bp, 317bp 大小核苷酸片段。

三、MV-N 基因核苷酸片段测序分析

结果: 1995~1997 年期间的 MV 流行株按年份、地区、流行特征选 10 株 N 基因测序分析(282nt nt1235-1516)。结果: SY2 China97 株(发病前、后未注射麻疹减毒活疫苗)与 EDw54 野毒株完全相同, 与疫苗株(Chang China57、94)在此片段只有一个核苷酸与其不同, 是 A 到 C 的改变。其余 9 株测序结果也不同于 Jin L(1997)^[5] 报道的英国(I-III)及 Rima 等(1995)^[9] 报道的其他国家 MV 流行株(A-G)基因型, 所以本文称之新基因型。无根基因树分析图形看 SY2 China97 株分在 ED-like 组, 其它 9 株在新基因型组见图 1。MV-N 基因 C 末端氨基酸测定分析也同样显示此结果, SY2 China97 株与 EDw54 株相同, 其余 9 株均有 8AA 不同于 EDw54 株和疫苗株, 个别 MV 株另外还有 1-4AA 的改变。

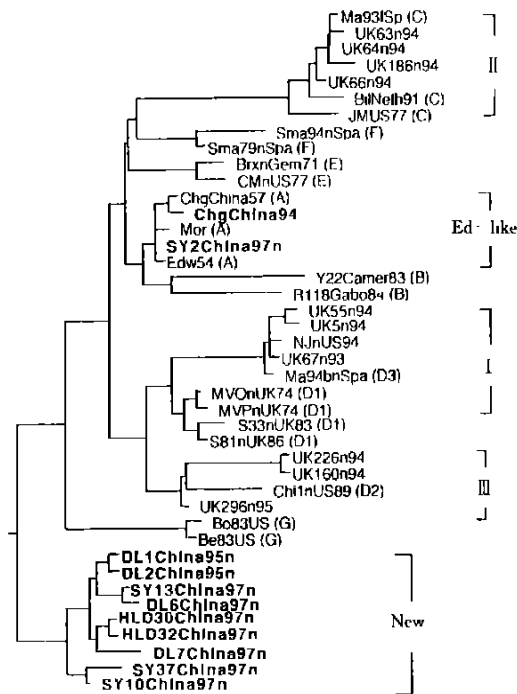


图 1 中国 MV 流行株(新基因型)与国外报道的 MV 基因型在 N 基因 nt 1235-1516 序列的基因关系: 无根树形使用 NDAStar Package 中分组程序绘制, 括号内 A-G 是 Rima 等 1997 年设定的基因型, UK MV 株来源参考 Jin 1997 的报道。

另外计算机分析中国 MV 流行株 N 基因核苷酸片段序列与 EDw54 株、疫苗株及其它国家其它基因型核苷酸片段的百分差异看, SY2 China97 与 EDw54 株相差为零, 与疫苗株相差 0.4%, 其余 9 株(新基因型)与疫苗株和 EDw54 株相差 7.1%~8.8%, 与其它国家其它基因型最大差异为 15.4%, 中国 MV 新基因型内之间相差 0%~3.7%。还可以看出同一爆发点的 DL1 Ch95n、

DL2 Ch95n 及 HLD30 China97n、HLD32 China97n 的基因序列完全相同。

四、MV-H 基因(450nt nt628-1080)核苷酸片段序列测序分析结果: 按 N 基因选择毒株条件取 18 株 H 基因 RT-PCR 阳性株, 做 450nt 片段测序分析, 结果同样显示 SY2 China97 为 ED-like 组基因型, 其它 17 株均属新基因型, 与其它国家报道的 MV 流行株 450nt H 基因无根基因树形见图 2。

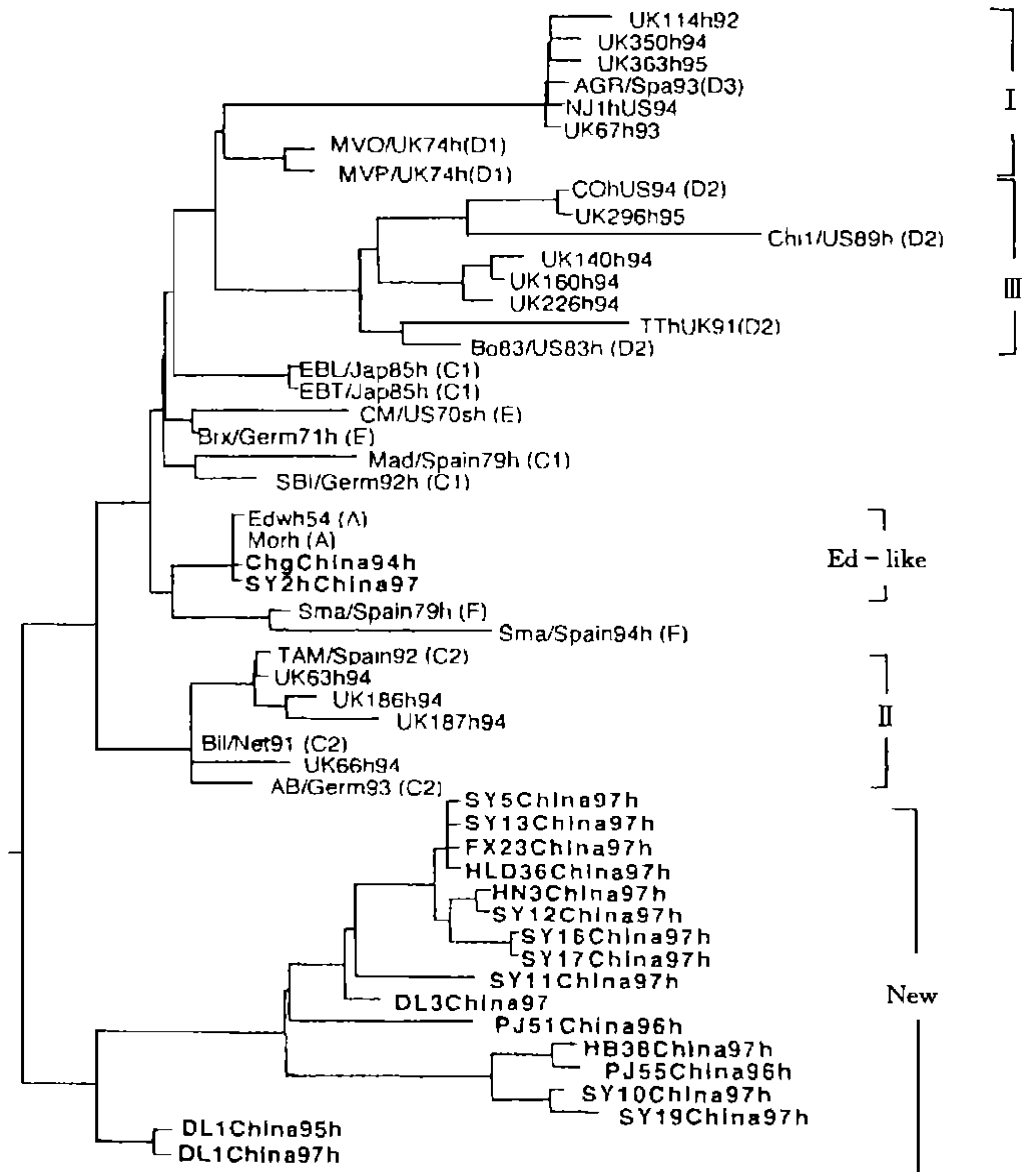


图 2 中国 MV 流行株(新基因型)与国外报道的基因型在 H 基因 nt 628-1080 序列的基因关系: 无根树形使用 NDAStar Package 中分组程序绘制, 括号内 A-F 是 Rima 等 1997 年设定的基因型, UK MV 株来源参考 Jin 1997 的报道。

从核苷酸百分差异分析看, SY2 China97 株与 EDw54、疫苗株完全相同, 其它 17 株与其相差 3.4%~7.6%, 17 株之间相差 0%~7.3%。同样显示同一爆发点 MV 毒株 SY16 China97、SY17 China97 H 基因片段序列完全相同。还可证明辽宁省 1997 年阜新 MV 流行株(FX23 China97)、沈阳、葫芦岛市 MV 流行株(SY5、13 China97; HLD36 China97)H 基因序列相同; 河南省(HN3 China97)MV 流行株与沈阳(SY12 China97)MV 流行株也相同; 河北省的 HB38 China97 MV 流行株 H 基因序列与辽宁、河南省的 MV 流行株核苷酸百分差异较大(6.3%~7.6%)。盘锦的 PJ51、PJ55 China97 MV 流行株为同一地区同一时间不同爆发点的 MV 流行株, 核苷酸序列也有所不同。

讨 论

1. MV-N、H 基因核苷酸片段序列分析(282nt 450nt)结果表明基因型相一致, 说明本研究选用的 MV-H、N 基因引物可以用作 MV 基因型分析。另外证明用 RT-PCR 方法测定麻疹病人急性期唾液、尿液样品中的 MV-RNA 是一种快速的 MV 病原学诊断方法。RT-PCR 产物纯化后进行核苷酸片段测序, MV 基因型分析也是一种快速、简便的方法。

2. 1995~1997 年期间, 辽宁、河南、河北省的 MV 流行株有两种基因型, 其中一种为 ED-like 型, 占流行株的少数, 只发现 1 株; 另一种基因型(新基因型)占流行株的绝大多数, 并与 CDC 所做的中国 1993、1994 年湖南、北京、山东 MV 流行株基因型相一致。

3. MV-N、H 两种基因核苷酸片段测序分析还证明: 中国 1995~1997 年期间部分地

区流行的 MV 野毒株基因型不同于 1954 年首次分离的 EDw 54 野毒株和现用的疫苗株, MV-N 基因各基因型之间的核苷酸百分差异较 H 基因大, 此结果与国外报道的结果相一致^[1]。

参 考 文 献

- 1 Kreis Stephanie Whistler Toni. Rapid identification of measles virus strains by heteroduplex mobility assay. *Virus Research*, 1997, 47:197-203.
- 2 Tamin Azaibi, Rota PA, Wang Zhongde, et al. Antigenic Analysis of current wild type and vaccine strains of the measles virus. *J Infect Dis*, 1994, 170:795-799.
- 3 Rota PA, Rota Jennifer S, Bellini William J. Molecular Epidemiology of measles virus. *J Virology*, 1995, 6:379-386.
- 4 Rota JS, Heath JL, Rota PA, et al. Molecular epidemiology of measles virus identification of pathway of transmission and the implication for measles elimination. *J Infect Dis*, 1996, 173:32-37.
- 5 Jin L, Brown DWG, Ramsay MEB, et al. The diversity of measles virus in the United Kingdom, 1992-1995. *J General Virology*, 1997, 78:1287-1294.
- 6 Kobune F, Sakata H, Sugiura A. Mammoset lymphoblastoid cell as a sensitive host for isolation of measles virus. *J Virology*, 1990, 64:700-705.
- 7 Boom R, Sol CJA, Salimans HMM, et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clinical Microbiology*, 1990, 28:495-503.
- 8 Jin L, Richards A, Brown DWG. Development of a dual target PCR for detection and characterization of measles virus in clinical specimens. *Molecular and Cellular Probes*, 1996, 10:191-200.
- 9 Rima BK, Earle JAP, Yeo RP, et al. Temporal and geographical distribution of measles virus genotype. *J General Virology*, 1995, 76:1173-1180.
- 10 唐凌云(综述). 麻疹病毒分子流行病学. *中国计划免疫*, 1998, 4:49-52.

(收稿: 1998-07-20 修回: 1998-08-04)