

浙江省 2005 年麻疹病毒流行株基因特性分析

冯燕 严菊英 卢亦愚 史雯 茅海燕 周敏 余蓓蓓

【摘要】 目的 分析浙江省 2005 年麻疹病毒流行株的基因特性。方法 对暴发疫情中分离的 4 株麻疹病毒采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)扩增血凝素蛋白(H)和核蛋白(N)基因,纯化产物进行核苷酸序列测定。结果 浙江省 2005 年分离到的 4 株麻疹病毒流行株均为麻疹 H1 基因型,属于中国麻疹病毒优势基因型。各分离株之间 H 基因氨基酸同源率为 99.2%~99.7%,N 基因氨基酸同源率为 99.8%;与中国疫苗株沪 191 株的 H 基因和 N 基因比较,其氨基酸水平上的同源性分别为 95.2%~95.5%和 95.5%。结论 浙江省 2005 年分离到的麻疹病毒流行株属于同一性状毒株,均为 H1 基因型;与中国疫苗株沪 191 株相比较,两者在基因特性上存在明显差异。

【关键词】 麻疹病毒;基因型别;核苷酸序列

Analysis on the genetic characteristics of the wide-type measles virus circulating in Zhejiang province in 2005 FENG Yan, YAN Ju-ying, LU Yi-yu, SHI Wen, MAO Hai-yan, ZHOU Min, YU Bei-bei. Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310009, China

【Abstract】 **Objective** To study the genetic characteristics of measles viruses circulating in Zhejiang province in 2005. **Methods** 4 groups of measles viruses isolated in outbreaks and the H and N gene were amplified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). PCR products were purified, sequenced and data was analyzed. **Results** All of the 4 measles isolates belonged to genotype H1 which had been a main genotype containing all of the isolates in China. The isolates shared 99.2%-99.7% identity of amino acid sequence on H and 99.8% identity of amino acid sequence on N gene. When comparing to the China vaccine strain (Shanghai 191), there were 95.2%-95.5% homogeneties and 95.5% homogeneties on H and N gene respectively. **Conclusion** Data from phylogenic trees of H and N gene revealed that the wide-type measles viruses circulating in Zhejiang province in 2005 all belonged to genotype H1. There were obvious differences on genetic characteristics between the isolates and the genotype A (Shanghai 191).

【Key words】 Measles virus; Genotype; Nucleic acid sequence

2005 年初,浙江省 1-3 月共计报告麻疹病例数千例,这种麻疹发病率的上升在全国其他省份也均有出现。为了从分子水平分析本次浙江省麻疹流行的病原学因素,我们采集了部分暴发疫情标本,进行病毒分离,并对毒株最容易变异的血凝素蛋白(H)和核蛋白(N)基因进行了序列测定,对当前麻疹流行株的基因型和变异状况作了分析。

材料与与方法

1. 病毒来源:对浙江省 3 个地市 2005 年 3 月的麻疹暴发疫情患者含漱液标本,接种 B95a 细胞,进行病毒分离,取阳性分离物 -80℃ 保存^[1]。

2. 引物:针对麻疹病毒 H、N 基因设计序列测定

引物。H 基因上游引物为 MV-H1: 5'-GCA TCA AGC CCA CCT GAA AT-3'; 下游引物为 MV-H2: 5'-ACA GAT AGC GAG TCC ATA AC-3', 扩增片段长为 2069 bp。N 基因上游引物为 MV-N1: 5'-AGC AGG ATT AGG GAT ATC CGA GAT -3'; 下游引物为 MV-N2: 5'-CGG CCT CTC GCA CCT AGT CTA G-3', 扩增片段长为 1613 bp。

3. 核酸的提取:采用德国 QIAGEN 公司 Reansy Mini Kit 试剂盒提取病毒 RNA,操作按照试剂盒说明书进行。

4. H、N 基因扩增:采用宝生物公司的 TaKaRa RT-PCR 试剂盒,分别进行 RT 和 PCR 扩增。反应条件按照试剂盒说明书进行。

5. 序列测定和数据分析:使用 Big Dye™ Terminate V3.0 Cycle Sequencing Kit 对 PCR 产物

测序,纯化产物在 ABI-3100 Avant 测序仪上自动完成序列测定和校对分析。

结 果

1. H 基因核苷酸序列:分离到 4 株麻疹病毒(浙江 05-2、浙江 05-7、浙江 05-8、浙江 05-10),对 H 基因序列进行测定,GenBank 登录号分别为 DQ011608、DQ011609、DQ011610、DQ011611。4 株麻疹病毒 H 基因长度均为 1854 bp,未发现核苷酸的插入和缺失,毒株之间核苷酸同源性为 99.5%~99.9%;与沪 191 株比较,核苷酸同源性为 94.5%~94.8%。

由 H 基因核苷酸序列推导的 H 蛋白氨基酸数均为 617,其 240 位 Ser 变为 Asn,导致 238 位上一个潜在的糖基化位点的缺失。毒株间氨基酸同源性为 99.2%~99.7%;与疫苗株沪 191 株比较,二者在氨基酸水平上的同源性为 95.2%~95.5%;与浙江省近年分离株(浙江 99-1、浙江 02-2)在氨基酸水平上的同源性为 98.9%~99.5%(图 1)。

2. 麻疹病毒 N 基因核苷酸序列测定:对其中的 2 株麻疹毒株(浙江 05-7、浙江 05-10)进行 N 基因全基因序列测定,GenBank 登录号为 DQ011612、DQ011613。由此推导出 N 蛋白氨基酸数均为 525;毒株间氨基酸同源性 99.8%;与疫苗株沪 191 之间氨基酸同源性为 95.5%;与浙江省近年的麻疹分离

株(浙江 99-1、浙江 02-2、浙江 03-3、浙江 03-7)之间氨基酸同源性为 97.7%~98.9%(图 2)。

对 2 株麻疹毒株 N 基因 C 末端 456 个核苷酸序列,即 151 个氨基酸序列分析表明:序列完全相同,与 2003 年的毒株也完全一致,但与浙江省 1999 年分离到的野毒株存在一定的差异;而与疫苗株沪 191 比较,在氨基酸水平上的差异达到 12%。

3. H 基因系统进化树分析:将分离到的 4 株麻疹毒株与不同基因型的其他麻疹参考株,用 Mega2 软件分析,建立基因系统进化树(图 3)。

4. N 基因的系统进化树分析:将分离到的麻疹毒株与疫苗株沪 191 和早年的标准株 Edmonston 株等,用 Mega2 软件建立系统进化树(图 4)。

讨 论

麻疹病毒是单股负链核糖核酸病毒,具有 6 个结构基因,其中 H 基因和 N 基因在麻疹病毒感染过程中都起着非常重要的作用。近年来的研究发现,当前自然界流行的麻疹病毒株的基因特性发生了一定的变异,特别是 H 和 N 蛋白基因的变化最大,其核苷酸差异达 7%左右^[2-4]。

本研究对 2005 年浙江省 4 株麻疹病毒流行株进行 H 基因全序列分析,与以 Edm 为代表的具有 5 个 N 型糖基化位点的 A 基因型比较,本次分离的麻

毒株	3	18	46	133	140	149	211	240	243	264	276	280	282	288	303	359	364	397	405	420	421	423	447	476	478	481	484	493	506	546	562	576	609	613	614	
Shanghai 191	P	P	F	L	I	D	G	S	R	G	L	V	N	M	E	A	K	P	N	T	V	L	N	F	V	Y	N	D	D	S	V	K	T	G	T	
Edmonston	.	.	S	F	.	.	S	N	T	.	G	G
Zhejiang99-1	.	S	.	F	.	N	S	N	G	.	F	I	K	.	G	T	N	L	S	A	A	P	.	L	.	N	T	.	G	.	T	R	N	E	A	
Zhejiang02-2	.	S	.	F	.	N	S	N	G	.	F	I	K	I	G	T	N	L	S	A	A	P	.	L	.	N	T	.	G	.	T	R	N	E	A	
Zhejiang05-2	L	S	.	F	.	N	S	N	G	.	F	I	K	.	G	T	N	.	S	A	A	P	.	L	.	N	T	N	G	.	T	R	N	E	A	
zhejiang05-7	.	S	.	F	.	N	S	N	G	.	F	T	K	.	G	T	N	.	S	A	A	P	H	L	.	N	T	N	G	.	T	R	N	E	A	
Zhejiang05-8	L	S	.	F	.	N	S	N	G	.	F	T	K	.	G	T	N	A	S	A	A	P	.	L	.	N	T	N	G	.	T	R	N	E	A	
Zhejiang05-10	L	S	.	F	V	N	S	N	G	A	F	T	K	.	G	T	N	.	S	A	A	P	.	L	.	N	T	N	G	.	T	R	D	E	A	

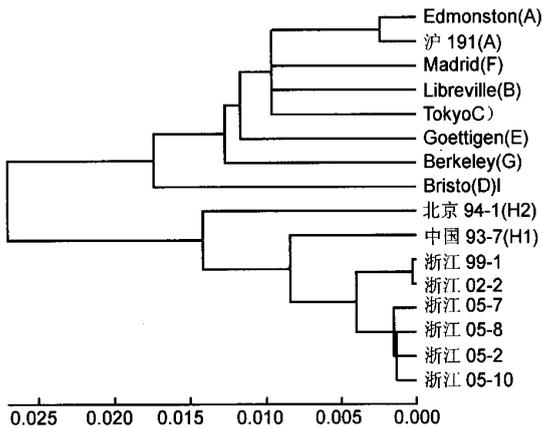
BioEdit7.0 构建 H 蛋白氨基酸序列比较图。参比序列 GenBank 登录号:U03669(Edmonston)、U03663(沪 191)、AY556537(浙江 99-1)、AY556538(浙江 02-2)

图1 2005 年浙江省麻疹流行株与其他麻疹毒株的血凝素蛋白氨基酸序列比较

毒株	4	5	50	137	139	144	148	154	328	329	405	406	422	431	434	447	450	451	453	455	457	459	462	464	470	473	479	481	484	497	505	509	512	516	518	522	
Shanghai 191	L	L	R	I	S	F	G	D	S	Y	K	I	G	R	G	A	S	Y	E	G	S	A	A	A	G	L	T	S	D	R	S	G	T	I	Y	N	
Edmonston	E	S
China93-7	.	.	.	S	G	.	E	.	.	.	R	T	.	G	S	T	N	S	.	.	.	S	.	S	P	S	Y	.	L	.	.	R	.	D	.	.	
Beijing94-1	.	.	.	S	G	S	E	.	.	H	R	.	G	V	.	.	P	.	N	T	V	V	S	P	S	Y	.	L	S	.	R	.	D	.	.		
Zhejiang99-1	.	.	K	S	G	.	E	N	W	.	R	T	.	G	.	T	N	S	S	P	S	Y	E	.	L	.	A	R	.	D	.	
Zhejiang03-3	.	.	S	G	.	E	.	.	.	R	T	.	G	.	T	N	S	.	E	S	P	S	Y	E	.	L	.	.	R	F	D	.	
Zhejiang05-7	P	F	.	S	G	.	E	.	.	R	T	S	G	.	T	N	S	K	S	P	S	Y	E	.	L	.	.	R	F	D	.	
Zhejiang05-10	P	F	.	S	G	.	E	.	.	R	T	S	G	.	T	N	S	D	S	P	S	Y	E	.	L	.	.	R	F	D	.	

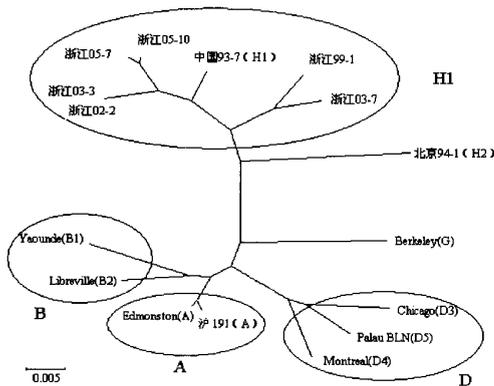
BioEdit7.0 构建 N 蛋白氨基酸序列比较图。参比序列 GenBank 登录号:U03664(沪 191)、Edmonston(U01987)、AF045212(中国 93-7)、AF045217(北京 94-1)、AY556539(浙江 99-1)、AY556541(浙江 03-3)

图2 2005 年浙江省麻疹流行株与其他麻疹毒株的核蛋白氨基酸序列比较



Mega2, Neighbor-Joining 法构建系统进化树。参比序列 GenBank 登录号为: U03669 (Edmonston)、AF079551 (Libreville)、AY047365 (Tokyo)、Z80805 (Bristol)、Z80797 (Goettingen)、Z80830 (Madrid)、AF079553 (Berkeley)、AF045201 (中国 93-7)、AF045203 (北京 94-1)、U03663 (沪 191)、AY556537 (浙江 99-1)、AY556538 (浙江 02-2)

图3 2005 年浙江省麻疹流行株与其他毒株的血凝素基因系统进化树



Mega2, Neighbor-Joining 法构建系统进化树。参比序列中沪 191、Edmonston GenBank 登录号分别为 U03664、U01987; Libreville、Yaounde 登录号分别为 U01994、U01998; Montreal、Chicago、Palau、BLN 登录号分别为 U01976、U01977、AF079555; Berkeley 登录号为 U01974; 中国 93-7、北京 94-1 登录号分别为 AF045212、AF045217; 浙江 99-1、浙江 02-2、浙江 03-3、浙江 03-7 为登录号分别为 AY556539、AY556540、AY556541、AY556542

图4 2005 年浙江省麻疹流行株与其他麻疹参考株的核蛋白基因系统进化树

疹流行株在 238 位氨基酸上均出现了一个糖基化位点的缺失, 可能导致 H 蛋白相对分子量的改变^[4,5]。与中国疫苗株沪 191 比较, 2005 年麻疹流行株在氨基酸水平上的同源性仅为 94.5%~94.8%, 低于近几年浙江麻疹流行株与中国疫苗株沪 191 在氨基酸

水平上的同源性, 提示浙江省麻疹毒株的 H 基因变异正在逐年累积, 这对当前麻疹疫苗沪 191 免疫效果可能产生一定程度的影响。

麻疹病毒 N 基因羧基末端 450 个核苷酸是麻疹病毒基因变异最大的区域, WHO 将其序列作为划分病毒基因型别的依据。本研究对 2005 年麻疹流行株进行 N 基因序列测定, 并与国内外的各类麻疹毒株进行比较, 结果表明浙江省分离的麻疹流行株, 仍属于中国麻疹的优势型 H1 基因型, 型内毒株之间变异 < 1%^[6], 但在 N 基因羧基末端 151 个氨基酸上, 与沪 191 疫苗株相比较, 变异已达 18 个氨基酸, 差异达到 12%。

当前麻疹流行株基因特性的变化是否导致病毒抗原性的变异, 并影响到沪 191 疫苗的免疫保护作用等问题已引起人们的普遍关注。本研究组曾对沪 191 株、Edm 株以及我省 2003 年分离的麻疹流行株分别制备免疫血清, 进行各毒株间的交叉中和试验, 结果表明当前流行株与沪 191 株之间的抗原比差异达 3~7 倍^[7], 提示当前麻疹流行株与疫苗株在抗原性上存在一定的差异, 这也与基因特性分析结果一致。针对上述基因特性分析结果, 我们将从分子生物学和免疫学两方面, 对浙江省近年麻疹流行株进行进一步的研究。

参 考 文 献

- 1 WHO. Manual for the laboratory Diagnosis of Measles virus Infection. December, 1999.
- 2 许文波, 朱贞, 张珍英, 等. 麻疹野病毒 H1 基因型在中国流行的分析. 中国计划免疫, 2003, 2: 1-8.
- 3 陈志慧. 麻疹病毒流行株基因变化与现行疫苗的预防效果. 中国计划免疫, 2003, 2: 47-51.
- 4 Kobune F, Funatn M, Takahashi H, et al. Characterization of measles viruses isolated after measles vaccination. Vaccine, 1995, 13: 370-372.
- 5 Hu A, Cattaneo R, Schwartz S, et al. Role of N-linked oligosaccharide chains in the processing and antigenicity of measles virus haemagglutinin protein. J Gen Virol, 1994, 75: 1043-1052.
- 6 Xu WB, Tamin A, Rota JS, et al. New genetic group of measles viruses isolated in People's Republic of China. Virus Reseach, 1998, 54: 147-156.
- 7 张建华, 卢亦愚, 严菊英, 等. 麻疹病毒抗原性变异及免疫保护效果研究. 中国公共卫生, 2003, 19: 935-937.

(收稿日期: 2005-06-09)

(本文编辑: 孙强正)