

# 浙江省 1999—2008 年麻疹病毒流行株磷蛋白基因变异研究

钟淑玲 冯燕 徐昌平 徐琦 卢亦愚

**【摘要】** 目的 了解浙江省麻疹病毒流行株磷蛋白(P)基因变异规律。方法 采用 RT-PCR 方法扩增 1999—2008 年浙江省麻疹病毒流行株 P 基因全序列,进行序列测定,并与疫苗株 Shanghai191 及其他麻疹流行株进行比较。结果 1999—2008 年浙江省各流行株与疫苗株 Shanghai191 之间存在 59~75 个核苷酸的变异(变异率 3.9%~4.9%),导致 36~42 个氨基酸变异(变异率 7.1%~8.3%),它们在二级结构上也存在一定的差异。P 基因系统进化树显示,其基因分型结果与 WHO 推荐的核蛋白(N)基因分型结果基本一致。P 蛋白氨基酸的平均变异率要大于主要抗原基因 N 和 H 基因。结论 1999—2008 年浙江省麻疹病毒流行株与疫苗株 Shanghai191 的 P 基因存在较大差异。

**【关键词】** 麻疹病毒;磷蛋白;核酸序列;变异

**Genetic variation of phosphoprotein (P) gene from measles epidemic strains in Zhejiang province** ZHONG Shu-ling, FENG Yan, XU Chang-ping, XU Qi, LU Yi-yu. Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Key Laboratory of Emergence Detection for Public Health of Zhejiang Province, Hangzhou 310051, China

Corresponding author: LU Yi-yu, Email: luyiyuzjh@yahoo.com.cn

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation (No. 30771903) and Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (No. Y206307, 2091178).

**【Abstract】** **Objective** To investigate the genetic characteristics and variation within the phosphoprotein (P) gene of measles epidemic strains circulated in Zhejiang province. **Methods** The whole sequence of P gene of the epidemic strains related to Zhejiang Measles virus during 1999 to 2008 was amplified, using the RT-PCR Assay. PCR products were sequenced and compared with the sequences of measles vaccine and other epidemic strains. **Results** Totally, 1524 nucleotides were sequenced from each epidemic strain and 507 amino acids were derived correspondingly. Compared with the vaccine strain, there were 59-75 nucleotides (divergent ratios were 3.9%-4.9%) mutated from the epidemic strains, which were isolated during 1999 to 2008 and causing mutation on 36-42 amino acid (divergent ratios were 7.1%-8.3%). Changes were also observed on the secondary structure. The phylogenetic tree, constructed based on the sequences of P gene, was similar to that based on the N gene, recommended by WHO. In addition, the average divergent ratio of P protein was greater than the ratio occurred on the N and H genes. **Conclusion** The variation within the P gene between the vaccine and epidemic strains circulated in Zhejiang province during 1999 to 2008 was significant.

**【Key words】** Measles virus; Phosphoprotein; Nucleotide sequences; Variation

麻疹病毒分成 8 个基因组(A~H)23 个基因型<sup>[1]</sup>。目前,麻疹病毒的分子流行病学研究主要集中在核蛋白(N)和血凝素(H)蛋白上,麻疹病毒流行株的 P 基因也存在着较大的变异<sup>[2,3]</sup>,为深入了解麻

疹病毒流行株 P 基因的特性和变异状况,本研究选取 1999—2008 年浙江省麻疹病毒流行代表株,进行了 P 基因的全序列测定,并与相关毒株进行比较分析。

## 材料与方法

1. 病毒株:麻疹病毒分离株为 1999—2008 年从浙江省各地市疾病预防控制中心送检的疑似麻疹患者含漱液、咽拭子标本中分离得到,于-80℃保存。

2. 麻疹病毒 RNA 提取:采用 RNeasy Mini 试剂盒(德国 Qiagen 公司)对上述各年的麻疹流行株进

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.08.017

基金项目:国家自然科学基金(30771903);浙江省自然科学基金(Y206307, 2091178)

作者单位:310051 杭州,浙江省疾病预防控制中心 浙江省公共卫生应急检测关键技术重点实验室

通信作者:卢亦愚, Email: luyiyuzjh@yahoo.com.cn

行病毒RNA提取,按照试剂盒说明书进行操作。

3. RT-PCR和全序列测定:采用日本 TaKaRa 公司的 One Step RNA PCR 试剂盒进行P基因的全序列扩增,反应条件参见文献[2],RT-PCR扩增产物送南京金思特公司纯化测序。

4. 核酸序列分析:除麻疹病毒分离株的P、N和H基因序列(进行测序)外,疫苗株 Shanghai191<sup>[2]</sup>(GenBank号:EU435017)、Hunan/93/7(GenBank号:EU090820)以及麻疹病毒P、N和H基因分型参考株序列均由NCBI的GenBank上获取。采用生物学软件 DNAMAN 进行序列的拼接及比对;BioEdit Sequence Alignment Editor software 进行氨基酸推导以及同源性比较,MEGA 3.1 软件进行系统树的构建,二级结构的模拟采用 Genetyx 软件进行。

5. Ka/Ks值的计算:Ka/Ks值表示病毒的某个结构基因在进化过程中受到的选择压力,其中Ka为编码序列每个碱基的异义突变率(nonsynonymous substitution rate),Ks为同义突变率(synonymous substitution rate),Ka/Ks比值>1,表明该基因受到正向选择压力<sup>[4]</sup>,采用Paml生物软件进行Ka/Ks值的计算。

结 果

1. 麻疹病毒流行株与疫苗株P基因核苷酸与氨基酸序列分析:本研究所选择的麻疹病毒流行株P基因全长均为1524核苷酸,编码507个氨基酸,未发生核苷酸插入或缺失。1993、1999以及2005—2008年的麻疹流行株(Hunan/93/7、Zhejiang/99/6、Zhejiang/05/2、Zhejiang/06/5、Zhejiang/07/4 和

Zhejiang/08/8)与60年代分离的疫苗株 Shanghai191 比较,分别存在59、59、74、62、69、75个核苷酸的变异(变异率为3.9%、3.9%、4.9%、4.1%、4.1%、4.9%),导致了37、36、41、41、37、42个氨基酸的变异(变异率为7.3%、7.1%、8.1%、8.1%、7.3%、8.3%)(表1、2)。

与疫苗株 Shanghai191 比较,1993—2008年麻疹流行株在P蛋白氨基酸水平上存在27个位点的共同变异。与1993年流行株Hunan/93/7相比,1999年流行株Zhejiang/99/6发生了第79、92、100、195、222、225、264、293以及459位上的9个氨基酸改变;与Zhejiang/99/6相比,2006年流行株Zhejiang/06/5又在第79、146、160、293、390与422位上发生了6个氨基酸位点的改变;而与Zhejiang/06/5相比,2008年流行株Zhejiang/08/9又在第66、160、256、260、264、283、390、422和479位上发生了9个氨基酸的变异。

2. 麻疹P蛋白变异与N、H蛋白变异间的差异:1965—2008年,麻疹病毒流行株的P蛋白氨基酸变异个数达42,变异率为8.3%,其中1965—1993年,麻疹病毒流行株与Shanghai191疫苗株之间P蛋白氨基酸的变异达37个,变异率为7.3%。1993—2008年的麻疹病毒流行株与疫苗株Shanghai191相比,P蛋白与N、H蛋白,在核苷酸水平上,平均变异率N>H>P,其中P基因和H基因的变异率相近;而在氨基酸水平上,P>H>N,且P基因的平均变异率要远高于H基因(表2)。

计算各个基因的非同义替换率(Ka)与同义替换率(Ks)的比值,结果表明:P基因的Ka/Ks=0.56;N基因的Ka/Ks=0.09;H基因的Ka/Ks=0.12,表明P基因在进化过程中受到了较H和N基因更大的选

表1 1999—2008年浙江省麻疹流行株与疫苗株P蛋白氨基酸序列比较

毒株名称	氨基酸位点																											
	25	30	51	54	65	66	71	79	82	83	86	89	90	91	92	97	100	102	109	111	121	132	137	140	141	146	160	195
Shanghai191	G	E	G	K	L	S	T	R	G	P	I	D	A	E	T	P	L	A	C	Y	K	Q	G	T	L	N	T	R
Hunan/93/7	S	G	K	E	F	.	A	.	.	S	S	N	T	.	I	S	.	.	R	H	E	R	D	A	F	.	.	K
Zhejiang/99/6	S	G	K	E	F	.	A	C	.	S	S	N	T	.	V	S	P	.	R	H	E	R	D	A	F	.	.	.
Zhejiang/05/2	S	G	K	E	F	T	A	.	R	S	S	N	T	.	V	S	P	.	R	H	E	R	D	.	F	.	.	K
Zhejiang/06/5	S	G	K	E	F	.	A	.	.	S	S	N	T	.	V	S	P	.	R	H	E	R	D	A	F	D	P	K
Zhejiang/07/4	S	G	K	E	F	.	A	.	.	S	S	.	T	G	V	S	P	.	R	H	E	R	D	A	F	.	.	K
Zhejiang/07/8	S	G	K	E	F	.	A	.	.	S	S	N	T	.	V	S	P	.	R	H	E	R	D	A	F	.	.	K
Zhejiang/08/8	S	G	K	E	F	T	A	.	.	S	S	N	T	.	V	S	P	.	R	H	E	R	D	A	F	.	.	K
Zhejiang/08/9	S	G	K	E	F	T	A	.	.	S	S	N	T	.	V	S	P	.	R	H	E	R	D	A	F	D	.	K

毒株名称	氨基酸位点																									
	203	204	219	220	222	225	256	257	260	263	264	265	275	282	283	293	295	377	382	390	419	422	446	457	459	474
Shanghai191	F	P	G	R	S	G	R	K	S	S	G	P	C	I	Q	I	P	L	N	I	L	M	G	A	E	R
Hunan/93/7	L	S	S	.	N	E	.	R	.	L	.	F	.	.	V	Q	F	S	.	P	.	V	S	I	D	.
Zhejiang/99/6	L	S	S	.	.	.	R	.	L	E	.	F	.	.	Q	F	S	.	P	.	V	S	T	D	.	
Zhejiang/05/2	L	S	S	.	.	Q	R	L	L	.	F	.	P	V	Q	F	S	.	P	.	V	S	T	D	.	
Zhejiang/06/5	L	S	S	.	.	.	R	.	L	E	.	F	.	.	V	Q	F	S	L	P	V	V	S	T	D	.
Zhejiang/07/4	L	S	S	.	.	.	R	.	L	E	.	F	.	.	V	Q	F	G	.	P	.	V	S	T	D	.
Zhejiang/07/8	L	S	S	.	.	.	R	.	L	E	.	F	.	.	V	Q	F	S	.	S	.	V	S	T	D	.
Zhejiang/08/8	L	S	S	.	.	Q	R	L	L	.	F	.	P	V	Q	F	S	.	P	.	V	S	T	D	S	
Zhejiang/08/9	L	S	S	.	.	Q	R	L	L	.	F	.	P	V	Q	F	S	.	P	.	V	S	T	D	S	

表2 1999—2008年浙江省麻疹流行株P、N和H基因(编码的氨基酸)的变异比较

年份	毒株名	P基因		N基因		H基因	
		变异数	变异率(%)	变异数	变异率(%)	变异数	变异率(%)
1965	Shanghai191	0(0)	0.0(0)	0(0)	0.0(0)	0(0)	0.0(0)
1993	Hunan/93/7	59(37)	3.9(7.3)	79(18)	5.0(3.4)	80(20)	4.3(3.2)
1999	Zhejiang/99/6	59(36)	3.9(7.1)	81(21)	5.1(4.0)	87(26)	4.7(4.2)
2005	Zhejiang/05/2	74(41)	4.9(8.1)	89(22)	5.6(4.2)	93(27)	5.0(4.4)
2006	Zhejiang/06/5	62(41)	4.1(8.1)	85(19)	5.4(3.6)	94(29)	5.1(4.7)
2007	Zhejiang/07/4	69(37)	4.1(7.3)	81(21)	5.6(4.0)	94(27)	5.1(4.4)
2008	Zhejiang/08/8	75(42)	4.9(8.3)	86(21)	5.4(4.0)	100(29)	5.4(4.7)
均值( $\bar{x}$ )	-	66.1(39.1)	4.3(7.7)	84.6(20.2)	5.4(3.8)	91.3(26.3)	4.9(4.3)

择性压力。

3. 麻疹P蛋白的二级结构分析:选择疫苗株 Shanghai191 和 Zhejiang/08/8 进行P蛋白二级结构的模拟和比较,结果显示流行株与疫苗株P蛋白在二级结构上存在明显差异。与疫苗株 Shanghai191 的P蛋白二级结构相比较,Zhejiang/08/8 株在第121、133、155、193、241、283等许多位点的氨基酸都出现了 $\alpha$ 螺旋与 $\beta$ 折叠之间的相互转变(图1)。

4. 麻疹流行株P蛋白的糖基化位点分析:对麻疹病毒P蛋白氨基酸序列进行糖基化位点分析,结果显示疫苗株 Shanghai191 存在2个糖基化位点(NES<sub>146-148</sub>、NIS<sub>357-359</sub>),1993年流行株 Hunan/93/7 共有4个糖基化位点,即增加了NLS<sub>202-204</sub>和NTS<sub>222-224</sub>。1999、2005、2007年流行株与2008年流行株 Zhejiang/08/8 均有3个糖基化位点,与疫苗株 Shanghai191 比较增加了NLS<sub>202-204</sub>,即第203、204位

氨基酸的变异(F→L, P→S)导致新的糖基化位点的出现。2006年流行株 Zhejiang/06/5 和2008年流行株 Zhejiang/08/9 仅有2个糖基化位点,与疫苗株 Shanghai191 相比,增加了1个糖基化位点(NLS<sub>202-204</sub>),丧失了1个糖基化位点(NES<sub>146-148</sub>),即第146位N→D的变异导致该位点原有糖基化位点的缺失(表3)。

表3 1999—2008年浙江省麻疹流行株与疫苗株P蛋白的糖基化位点比较

麻疹毒株	糖基化位点				合计
	146 ~ 148	202 ~ 204	222 ~ 224	357 ~ 359	
Shanghai191	+	-	-	+	2
Hunan/93/7	+	+	+	+	4
Zhejiang/99/6	+	+	-	+	3
Zhejiang/05/2	+	+	-	+	3
Zhejiang/06/5	-	+	-	+	2
Zhejiang/07/4	+	+	-	+	3
Zhejiang/07/8	+	+	-	+	3
Zhejiang/08/8	+	+	-	+	3
Zhejiang/08/9	-	+	-	+	2

注:“+”表示存在该糖基化位点,“-”表示缺失该糖基化位点

5. 麻疹P基因分型与N基因分型比较:通过P基因和N基因构建的系统进化树(图2)比较,结果显示除在E、C2基因型上略有差异外,P基因分型与N基因分型结果具有良好的相似。

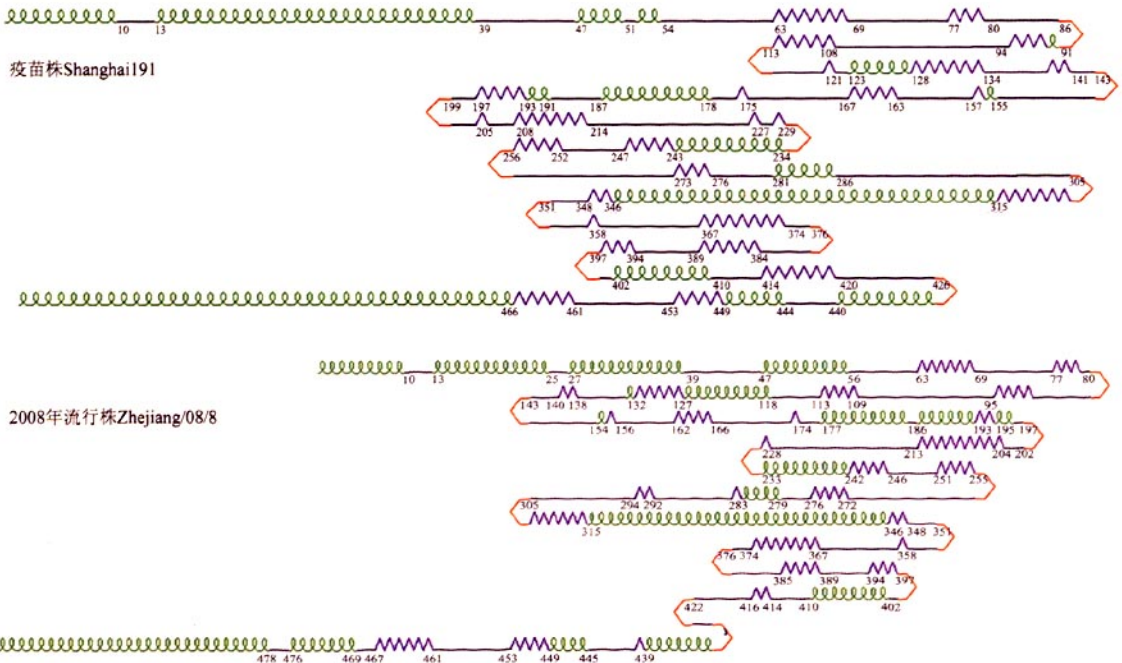


图1 疫苗株 Shanghai191 及浙江省2008年麻疹流行株 Zhejiang/08/8 的P蛋白二级结构模拟

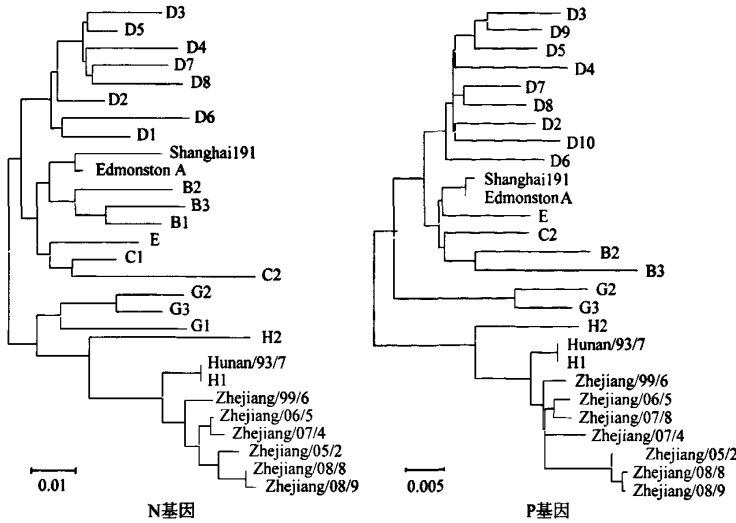


图2 麻疹病毒N基因及P基因系统进化树

讨论

本研究选取1999—2008年浙江省麻疹病毒流行株与疫苗株Shanghai191以及其他麻疹病毒流行株的P基因全序列进行了比较,结果显示,与Shanghai191疫苗株相比,麻疹流行株的P基因的变异在逐渐增加,1993年麻疹流行株P基因的核苷酸变异率为3.9%,而2008年流行株的核苷酸变异率达4.9%。此外,出现在2005年流行株第66、256、260、264、283号位上的氨基酸突变(S→T, R→Q, S→L, E→G, Q→P),在2008年的流行株上重复出现,从P基因变化上也提示此类麻疹流行株在我国不同地区间存在着循环流行。

模拟的P蛋白二级结构表明,2008年的麻疹流行株P蛋白与疫苗株相比,许多位点发生了α螺旋,β折叠与β转角的变化,这种变化将导致P蛋白肽链方向的变化,这些变化是否会影响到P蛋白的生物学功能目前尚不清楚。

从P蛋白与N蛋白的基因分型和进化特征的相似性分析,麻疹病毒在进化过程中,随着N基因分化的同时,P基因也出现了相似的分化。此外,麻疹病毒P、N和H蛋白的比较结果显示,在核苷酸水平上,P基因的平均变异率小于H基因,而在氨基酸水平上P蛋白的平均变异率却远远大于N、H蛋白,且N蛋白的氨基酸变异率最小,这与Bankamp等<sup>[5]</sup>报道的结果不同,在N基因的变异率研究上,Bankamp选择N基因C末端易变的450个核苷酸,而本研究选择N基因的全基因序列,并认为在基因的变异分析上,选择全序列应该更具有客观性。另一方面,在基

因的随机突变中,非同义替换率与同义替换率的出现概率是相似的,二者的比应≤1,而当变异受到宿主或免疫压力时,基因的突变往往是非同义的替换更多,此时的非同义替换与同义替换的比值应>1。本研究中P基因的Ka/Ks值为0.56,这一结果与Nei<sup>[4]</sup>的研究(Ka/Ks值为0.43)相似。但是,Nei认为P基因中P/C基因的Ka/Ks值为1.53,表明其受到一定的正向选择压力,可能是由于该基因为重叠基因,存在多个开放编码框并具有易曲性,导致Ks的减小<sup>[4]</sup>。但也有学者认为,在麻疹病毒感染后,宿主天然免疫反应迅速启动清除病毒,而P蛋白中断了I型干扰素的Jak/STAT信号转导途径,导致麻疹病毒发展了多种策略来逃避,从而使P蛋白受到了一定的免疫压力<sup>[6]</sup>。

因此,当前在麻疹病毒的变异研究中,除了众所关注的H与N基因以外,开展对麻疹病毒所有基因中氨基酸变异率最大的P基因的研究,不仅可以为麻疹病毒流行株的变异监测提供参考,对疫苗时代麻疹流行特征的研究与新一代麻疹疫苗的开发,都具有十分重要的意义。

参考文献

- [1] Feng DJ. Progress in molecular epidemiology of measles virus. Prog in Microbiol Immunol, 2008, 36(1): 71-76. (in Chinese) 冯德杰. 麻疹病毒分子流行病学研究进展. 微生物学免疫学进展, 2008, 36(1): 71-76.
- [2] Yu J, Wang HL, Chen S, et al. Sequencing of measles vaccine strain Shanghai-191 genome and comparative analysis of nucleotide sequences between vaccine and wild-type strains in China. Chin J Microbiol Immunol, 2008, 28(7): 624-628. (in Chinese) 于洁, 王海龙, 陈实, 等. 麻疹疫苗株S-191全基因序列测定及与流行株进化关系的初步研究. 中华微生物学和免疫学杂志, 2008, 28(7): 624-628.
- [3] Xu CP, Yan JY, Feng Y, et al. Comparative analysis of measles genome between vaccine strain and wild-type strain in Zhejiang province of China. Chin J Preven Med, 2009, 43(8): 723-726. (in Chinese) 徐昌平, 严菊英, 冯燕, 等. 2005年浙江麻疹流行株与疫苗株基因组比较分析. 中华预防医学杂志, 2009, 43(8): 723-726.
- [4] Nei M. Selectionism and neutralism in molecular evolution. Mol Biol Evol, 2005, 22(12): 2318-2342.
- [5] Bankamp B, Lopareva EN, Kremer JR, et al. Genetic variability and mRNA editing frequencies of the phosphoprotein genes of wild-type measles viruses. J Virol, 2008, 135(2): 298-306.
- [6] Devaux P, von Messling V, Songsungthong W, et al. Tyrosine 110 in the measles virus phosphoprotein is required to block STAT1 phosphorylation. J Virol, 2007, 360(1): 72-83.

(收稿日期: 2010-01-20)

(本文编辑: 万玉立)