

对我国部分 I 型脊髓灰质炎病毒的分子流行病学分析

刘红梅 郭存三 魏文杰 董 明

摘要 作者用 PCR、点杂交方法和核苷酸序列分析验证了 1988 年流行于山东和 1990 年流行于新疆的 I 型脊灰病毒为野毒株，它们 VP1 - 2A 区 150 个核苷酸序列与 Sabin I 疫苗株的差异率 $\geq 16.7\%$ 。而 3 株新疆株之间在此区域内的核苷酸差异率 $\leq 2.67\%$ ，编码的氨基酸序列完全相同。山东株在此区域与新疆株核苷酸序列的差异率达 14.0% ~ 15.33%，并且有一个氨基酸不同。提示山东株与新疆株属不同的野毒基因型。

关键词 脊髓灰质炎病毒 聚合酶链式反应 点杂交 DNA 序列测定

Studies on the Molecular Epidemiology of Poliovirus Type 1 in China Liu Hong-mei, Guo Cun-san, Wei Wen-jie, et al. *Sino-Danish Biomedical Postgraduate Training Center, National Vaccine and Serum Institute, Beijing 100024*

Abstract A strain of poliovirus type 1 isolated from an endemic in Shandong Province in 1988 and three strains of poliovirus type 1 isolated from an endemic in Xinjiang in 1990 were analysed by dot blot hybridization with Sabin I specific probe and PCR amplification with Sabin I specific primers. They were proved to be non-Sabin-like poliovirus. The nucleotide sequences of VP1 - 2A junction region of four poliovirus type 1 isolates were analysed. It was found that the nucleotide diversity of four isolates with Sabin I was equal to or greater than 16.7%. This finding proved that they were wild polioviruses and greatly different from Sabin I. It was also found that the nucleotide sequence diversity among three strains from Xinjiang was very small (less than 2.6%) with identical amino acid sequences. This indicated that the three Xinjiang strains belonged to the same genotype. While the difference of Shandong strain from the three Xinjiang strains was between 14.0% to 15.33% in nucleotide sequence and 2.0% to 4.0% in amino acids. This indicated that Shandong strain was apparently different from three Xinjiang strains and it belonged to another wild genotype which had a different history of evolution.

Key words Poliovirus PCR Dot blot hybridization DNA sequencing

脊髓灰质炎(以下简称脊灰)是一种严重危害儿童健康的传染病。WHO 要求到 2000 年在全球消灭由脊灰野毒株引起的麻痹型病例。因此鉴定从临床病例中分离到的脊灰病毒是疫苗株还是野毒株，以及鉴定不同年代、不同地区流行的野毒株的基因型及地理分布特点等具有非常重要的流行病学意义。笔者应用 PCR 技术和点杂交方法对我国四株 I 型脊灰病毒分离株进行了检测，并对它们的 VP1 - 2A 区的部

分核苷酸序列进行了测定，明确了它们在流行病学上的关系。

材料及方法

一、细胞及病毒株：Vero 细胞由本所麻疹室提供，Sabin I 由本所脊灰疫苗室提供。I 型脊灰流行株 P1/SD/12/88、P1/XJ/3/90、P1/XJ/34/90 和 P1/XJ/38/90 从麻痹型脊灰病人分离获得，分别由中国预防医学科学院病毒学研究所诊断室、山东省卫生防疫站和新疆维吾尔自治区卫生防疫站提供。以上病毒接种于

Vero 细胞培养, CPE 出现时收获病毒, -20℃ 保存。

二、引物及探针: PCR 引物为 Primer - 1 (2584~2601) TCCACTGGCTTCAGTGTT 和 Primer - 2 (2502~2523) AGGTCAGATGCTT GAAAGC^[1]。杂交探针为 Probe (2535~2565) CGTTGCCGCCACCGTTCACGGACTGT G, 用 Dig - dUTP 标记。以上引物及探针由中国预防医学科学院病毒学研究所诊断室提供。VP1 - 2A 区测序引物为 Primer 2A (3508~3572) AAGAGGTCTCTATTCCACAT, 在中国科学院微生物所合成。

三、逆转录 - PCR 鉴定脊灰病毒分离株: 用 Sabin I 特异性的 PCR 引物对 Sabin I 及四株 I 型脊灰病毒分离株进行逆转录 - PCR 检测, 方法参见文献^[2,3]。AMV 逆转录酶、Taq 酶购自 Promega。

四、点杂交法鉴定脊灰病毒分离株: 用 Dig - dUTP 标记的 Sabin I 特异性的杂交探针对 Sabin I 及四株 I 型脊灰病毒进行点杂交检测, 具体方法参见文献^[4]及 Dig - DNA 标记及检测试剂盒说明书。

五、VP1 - 2A 区部分核苷酸序列的测定: 根据 Rico - Hess 等^[5,6]方法纯化脊灰病毒, 提取病毒 RNA。以病毒 RNA 为模板, 用逆转录酶催化末端双脱氧终止反应, 具体操作按逆转录测序试剂盒说明书进行。用 [α -³⁵S] - dATP (DuPont, 1 250 μ ci/mmol) 标记。测序反应物在含 7mmol/L 尿素的 8% 聚丙烯酰胺凝胶中电泳后经放射自显影, 在 X 光片上直接阅读核苷酸序列。

结 果

一、PCR 法和点杂交法鉴定脊灰病毒分离株: 用 Sabin I 特异性的 PCR 引物扩增 Sabin I 为阳性, 产物为一条带约 97bp, 与理论值相符。Vero 细胞阴性对照及 4 株 I 型脊灰病毒分离株为阴性。地高辛标记的 Sabin I 特异性的杂交探针对脊灰病毒进行点杂交, 结果显示 Sabin I 为阳性, 而 Vero 细胞对照及 4 株 I 型脊灰病毒分离株均为阴性。以上两个结果均提示 4 株 I 型脊灰病毒分离株为非疫苗株来源。

二、VP1 - 2A 区部分核苷酸序列及氨基酸推导系列: Sabin I 及 4 株 I 型脊灰病毒分离株 VP1 - 2A 区的 150 个核苷酸序列的测定结果见附图。根据核苷酸序列推导出的氨基酸序列, Sabin I 与 4 株脊灰分离株的氨基酸差异数为 1~2 个。

三、各毒株核苷酸及氨基酸序列同源性比较: 比较 Sabin I、P1/SD/12/88、P1/XJ/3/90、P1/XJ/34/90 和 P1/XJ/38/90 在 VP1 - 2A 连接区的核苷酸序列及推导氨基酸序列的同源性, 结果见附表。发现此区域内 4 株 I 型脊灰病毒分离株与 Sabin I 核苷酸序列的差异达 16.0%~16.7%, 氨基酸的差异率达 2.0%~4.0%, 进一步证明了此 4 株 I 型脊灰病毒流行株是与 Sabin I 差异很大的野毒株。还发现 3 株新疆株在此区域内仅有 1~4 个核苷酸不同, 差异率仅为 0.67%~2.67%, 氨基酸序列完全相同。表明

3296

Sabin I	CCACCGAGGGCAGUGGCGUACUACGGCCCUGGAGUGGAUUACAAGGAUGGUACGGCUUACACCCUCUCCACCAAG
P1/SD/12/88	-A-----U-----U-A-C-----C-----A-U-C-C-----U-A-
P1/XJ/3/90	--U----A-----A-U-U-A-----C-----C-----U-C-C-----U-C
P1/XJ/34/90	-U----A-----A-U-A-----C-----C-----U-C-C-----U-C
P1/XJ/38/90	-U----A-----A-U-U-A-----C-----C-----U-C-C-----U-C

3445

Sabin I	GAUCUGACCACAUUAUGGAUUCGGACACCAAAACAAAGCGGUGUACACUGCAGGUACAAAUUUGCAACUACCAU
P1/SD/12/88	-U-----GC-U-----G-U-----A-----U-----G-C-U---U-C
P1/XJ/3/90	-----G-C-C-U-G-G-----A-----C-G-----U-U-----
P1/XJ/34/90	-----C-C-U-G-G-----A-----C-G-C-U-U-C
P1/XJ/38/90	-----C-C-U-G-G-----A-----C-G-C-U-U-C

附图 我国 4 株 I 型脊灰病毒分离株与 Sabin I 在 VP1 - 2A 区的核苷酸序列比较

此 3 株病毒属于同一个野毒基因型。山东株与 3 株新疆株相比核苷酸差异达 14.0% ~ 15.33%，氨基酸变异率为 2.0%，表明此山东株与新疆株属于不同的野毒基因型。

讨 论

脊灰病毒疫苗株和野毒株的核苷酸序列在不同的区域其差异率不同。在 VP1 区 5' 端第 7 ~ 96 位核苷酸区域和 VP1 - 2A 连接区，两者差异较大^[7]，这是自然界长期进化的结果。用这些区域的特异性的 PCR 引物和杂交探针，可以分析脊灰病毒分离株与疫苗株或特异基因型野毒株之间在流行病学上的相关性。

附表 Sabin I 和我国 4 株 I 型脊髓灰质炎病毒分离株在 VP1 - 2A 连接区的核苷酸及推导氨基酸序列的同源性比较 (%)

病毒株	Sabin I	PI/SD/12/88	PI/XJ/3/90	PI/XJ/34/90	PI/XJ/38/90
Sabin I	83.33	84	84	83.33	
PI/SD/12/88	98	84.67	85.33	86.00	
PI/XJ/3/90	96	98	97.31	98.67	
PI/XJ/34/90	96	98	100	99.33	
PI/XJ/38/90	96	98	100	100	

注：表内空格往右为各病毒间在 VP1 - 2A 区核苷酸序列的同源性，空格往左为推导氨基酸序列的同源性

脊灰病毒减毒活疫苗通常不在与免疫接种者密切接触的人群之外传播，所以 Sabin I 株很少有机会发生大的基因改变^[8]，因此 Sabin I 株特异性 PCR 引物和杂交探针可用于对全世界各地疫苗相关株的识别。核苷酸序列分析法用于鉴别疫苗株和野毒株比其它方法更为直接和准确，还可以为核苷酸杂交探针、PCR 引物的设计提供依据。

4 株流行株与 Sabin I 相比在 VP1 - 2A 区的 150 个核苷酸序列差异数为 24 ~ 25 个，其变异率达 16.0% ~ 16.7%；氨基酸差异数为 1 ~ 2 个，其变异率为 2.0% ~ 4.0%。这证明了此 4 株脊灰病毒分离株是与 Sabin I 差异很大的野毒株。从序列分析的结果还看出，野毒株与 Sabin I 的核苷酸差异大多数发生在第三个密码子上，为同义突变，一般不引起氨基酸的变异。野毒株在长期的进化过程中，同义密码子的累计突变导致氨基酸的变异，此 4 株 I 型脊

灰流行株在 VP1 - 2A 区的第二个密码子 UUC 中的两个碱基发生取代变为 CUU，编码的氨基酸残基由苯丙氨酸(Phe)变为亮氨酸(Leu)。

3 株新疆株之间在 VP1 - 2A 区域内仅有 1 ~ 4 个核苷酸差异，差异率不超过 2.67%，氨基酸序列完全相同，这说明此 3 株病毒属于同一个野毒基因型。它们均是从 1990 年新疆的脊灰流行中分离得到的，所以它们的流行病学关系非常密切。山东株在 VP1 - 2A 区内与 3 株新疆株相比核苷酸差异率达 14.0% ~ 15.33%，并且有一个氨基酸不同。这说明山东株与 3 株新疆株属于不同的野毒基因型，与 3 株新疆株之间的流行病学关系较远，它可能于 1988 年在山东地区流行。这也证明我国存在不同基因型的脊灰病毒野毒株。

参 考 文 献

- Nomoto A, Omata T, Toyoda H, et al. Complete nucleotide sequence of the attenuated poliovirus Sabin I strain genome. Proc Natl Acad Sci USA, 1982, 79: 5793.
- Yang CF, De L, Holloway BP, et al. Detection and identification of vaccine - related polioviruses by the polymerase chain reaction. Virus Res, 1991, 20: 150.
- 马静雅, 张礼壁, 刘永军. 聚合酶链式反应(PCR)用于脊髓灰质炎病毒诊断和定型的实验研究. 病毒学报, 1991, 7: 164.
- da Silva EE, Pallansch MA, Holloway BP, et al. Oligonucleotide probe for the specific detection of the wild poliovirus type 1 and 3 endemic to Brazil. Intervirology, 1990, 32: 149.
- Rico - Hess R, Pallansch MA, Nottay BK, et al. Geographic distribution of wild poliovirus type 1 genotypes. Virology, 1987, 160: 311.
- Huovilainen, Kinnunen L, Ferguson M, et al. Antigenic variation among 173 strains of type 3 poliovirus isolated in Finland during the 1984 to 1985 outbreak. J Gen Virol, 1988, 69: 1941.
- Hogle JM, Chow M, Filman DJ. Three - dimensional structure of poliovirus at 2.9A resolution. Science, 1985, 229: 1358.
- Benyesh - Melnick M, Melnick JL, Rawls WE, et al. Studies of the immunogenicity, communicability and genetic stability of oral poliovaccine administered during the winter. Am J Epidemiol, 1967, 86: 112.

(收稿: 1997-02-24 修回: 1997-03-21)