

人 A 组轮状病毒北京地方株 VP4 血清型 特异片段编码基因的序列分析*

肖 玮 钱 渊

(首都儿科研究所北京市感染与免疫中心实验室 北京 100020)

摘 要 轮状病毒是引起婴幼儿严重腹泻的重要病原,其第四基因编码主要中和抗原 VP4,而 VP4 可裂解为 VP8 和 VP5 两个片段。VP8 为抗原型特异性片段。克隆并测定了具有代表性的三个轮状病毒北京株 VP4 编码基因 5' 端 (VP8+VP5 一部分)887 个核苷酸序列并据此推导出其氨基酸序列。结果表明,相同血清型的地方株和标准株之间具有高度同源性 (92%~96.6%),不同血清型间则变异较大 (70.5%~71%)。氨基酸最大变异处位于 aa84~172,并对胰酶作用位点在致病性中的可能性进行了讨论。

关键词 轮状病毒, VP4, 序列分析

分类号 R373

轮状病毒双层蛋白壳内含有 11 条双链 RNA 片段,外壳蛋白的重要成分为 VP7 与 VP4。VP7 由基因组 7、8 或 9 基因片段编码(依不同毒株),VP4 由第 4 基因片段编码,均可诱导保护性中和抗体的产生^[1]。根据 VP4 和 VP7 蛋白抗原性的不同,还可以将轮状病毒分为不同的血清型(分别为 P 血清型和 G 血清型)。并且,VP4 还与病毒的毒力有关^[2],在组织培养中与限制增殖有关^[3],决定某些轮状病毒的血凝素活性^[4],并对胰蛋白酶敏感。在胰蛋白酶的作用下,VP4 可裂解为 VP8 (28 000, aa1~240) 与 VP5 (60 000, aa 248~775) 两个片段,同时其感染性增强^[5]。关于 VP8 片段 Estes 和 Cohen、Larralde 等均认为包含了 VP4 主要抗原位点,且负责 VP4 血清特异中和反应^[6,7]。另外, Gorziglia 认为胰酶作用区在病毒的毒力方面有重要作用^[8]。

已知 A 组轮状病毒是婴幼儿严重腹泻的最主要病毒病原。然而,有研究发现部分新生儿可持续携带病毒而无明显临床症状,进一步分析发现这种现象与 VP7 的分型无关^[9]。RNA 杂交结果显示这些无症状病毒各株之间 VP4 基因明显保守^[10],更进一步深入研究发现这些无症状病毒各株之间 VP4 的血清型特异片段 VP8 以及胰酶位点及 VP5 的 N 端共 887 个碱基推导的氨基酸序列的同源性为 96% 以上,而这些毒株与引起临床症状的病毒的 VP4 的同一片段的氨基酸同源性则只有 68%~72%^[8]。VP4 具有独立的分型系统,由此可见血清型特异片段 VP8 与 VP4 血清型变化密切相关。迄今,已知有 11 个 VP4 血清型(由于 VP4 是胰酶敏感蛋白,因此以 P 表示 VP4 的型别)。其中 P1A、P1B 在世界各地及在我国流行毒株中最常

* 本项目由卫生部科研基金 1385.312 与北京市自然科学基金 91-G-117 资助。

收稿日期: 1997-01-18

见^[11,12],并且VP4为P1A型的毒株,其VP7可以是1、3、4或9型,VP4为P1B型其VP7可以是2或12型,而从无症状新生儿中分离到的轮状病毒株,无论其VP7是1、2、3或4型,其VP4均为P2型^[9]。可见VP4的一个血清型可分别与不同的VP7的血清型组合。而血清型不同的分子基础是VP4尤其是VP8片段氨基酸序列一级结构上的变异。我们选择了从北京地区检测到的三个具有不同VP4型别的轮状病毒株T65(P1A),R50(P1B),N16(P2),对其VP4基因N端的887个碱基的核苷酸序列(VP8+胰酶作用区+VP5的N端)进行测定,同时推导出其编码的氨基酸序列,和已发表的标准株序列进行比较分析。以求从VP4基因方面对我国轮状病毒的抗原变异、病毒毒力的相关基因位点及分型的分子基础作进一步的了解。从而,了解VP4的一级结构及其变异,对研制多价疫苗提供理论依据^[13]。

1 材料和方法

1.1 病毒

轮状病毒T65、R50和N16分别于1991年在本所从腹泻患儿(T65, R50)及新生儿(N16)粪便中检测到。经Northern-blot^[12]杂交鉴定,分别是VP41A、1B和2血清型。

1.2 VP4的血清型特异基因片段的克隆

1.2.1 病毒RNA提取:400 μ l 10%粪便经1% SDS 56℃作用30min,加等体积酚—氯仿抽提后用羟基磷灰石(HA)纯化病毒dsRNA^[14]。

1.2.2 逆转录—多聚酶链反应(RT-PCR):模板为上述纯化的病毒dsRNA。参照Gentsoh^[11]设计引物P1(con3)(n.t.1~17):5'-GGCTATAAAATGGCTTC-3', P2(con2)(n.t.887~868):5'-ATTTCGGACCATTTATAACC-3'。RT-PCR参照文献[14]进行。

1.2.3 克隆:用1.2%低熔点琼脂糖凝胶及NACS柱纯化PCR产物,末端用T4DNA多聚酶补齐后和质粒pTZ18R在T4DNA连接酶作用下形成环状重组质粒,转化大肠杆菌DH5 α ,用限制性内切酶EcoR I及BamHI酶切及PCR方法筛选含VP4基因插入片段的重组质粒即阳性克隆。

1.3 测序

用T7 DNA测序试剂盒按说明书进行末端终止法测序。pTZ18R上的-40与Reverse两个引物可以分别测出cDNA片段5'和3'末端序列。而其中间部分序列通过所测三株毒株共享相对保守区而自行设计的引物P3(n.t.206~223):5'-GATGGTCCTTATCAAC-3', P4(n.t.658~639):5'-CATTACACTTAGATTCTTG-3'测出。用DNASIS和PROSIS软件进行核苷酸及氨基酸序列分析。

1.4 酶和试剂

限制性内切酶及修饰酶、NACS柱均购自GIBCO BRL公司;牛小肠碱性磷酸酶(CIP)购自德国保灵曼公司;引物由上海生工生物工程有限公司合成;T7 DNA测序试剂盒购于Shanghai Promega公司; [α -³²P] dATP购自福瑞公司。

2 结果

2.1 RT-PCR扩增VP4型特异基因片段

RT-PCR产物与预期的887bp基因片段大小相符。

2.2 重组质粒的构建

887bp 的片段插入到 pTZ18R 的 Sma I 酶切位点上,用酶切及 PCR 鉴定、筛选到阳性克隆。

2.3 VP4 型特异片段 887bp 的序列测定

按 T7 DNA 测序试剂盒说明对上述阳性克隆的双链 cDNA 测序,同时推导出氨基酸序列并分别与相应标准株 Wa(P1A),DS-1(P1B),M37 (P2)的核苷酸及氨基酸序列进行比较,结果见图 1 和图 2。图 1 表明:三个地方株病毒均含 887 个碱基,第一个 ATG 均位于第 10~12 个碱基处,与标准株一致为 VP4 读码框架的起点。图 1 还表明:三个地方株之间第 1~32 个碱基均完全保守。由图 2 我们可以看出在三个毒株之间其氨基酸序列存在一些保守区和变异区。首先是在 aa 1~14 完全保守,aa 203~234,aa 247~292 高度保守。其中,第 1 与第 3 保守区分别是 VP8 与 VP5 的 N 端,而第 2 保守区位于 VP8 的 COOH 端,与 Gorziglia^[8]的结果相符。另外在 aa 60~72,aa 173~186 也为较高保守区,并且三株病毒

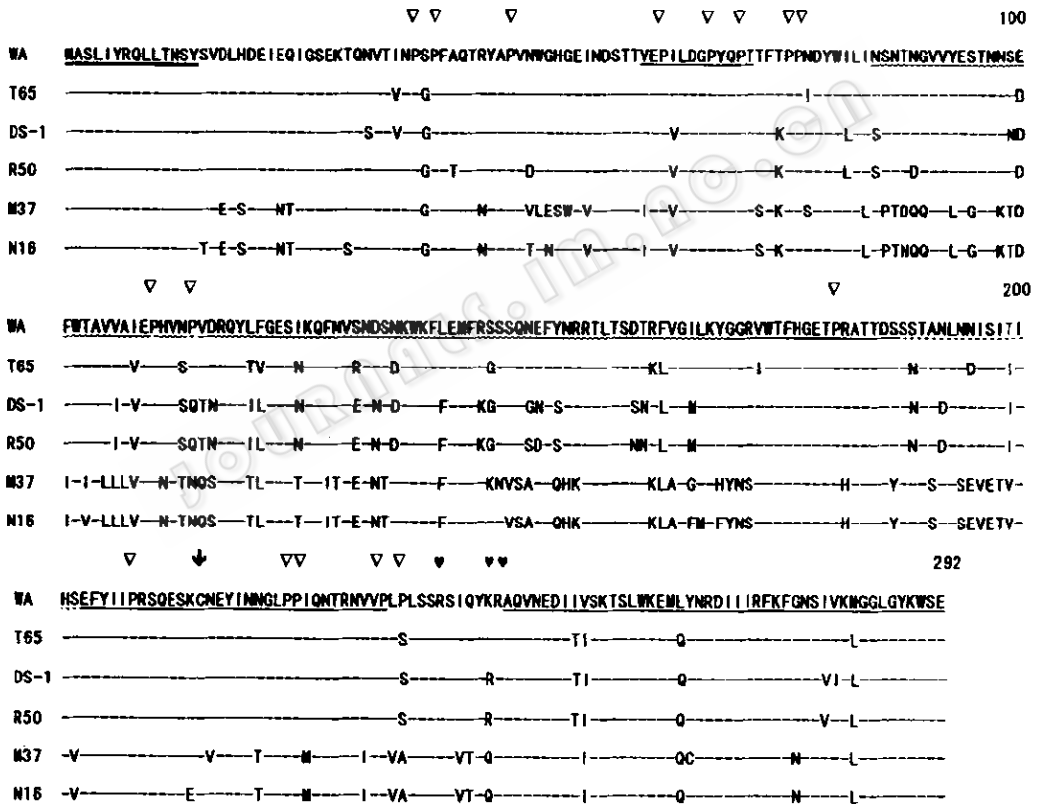


图 2 三个不同血清型轮状病毒 VP4 血清型特异基因片段 887bp 核苷酸推导的氨基酸序列比较

Fig. 2 Comparison of deduced amino acid sequences of specific fragments of VP4 genes from rotavirus strains representing three different serotypes

- 完全保守区 Region completely conserved; ~~~~~ 高度变异区 Region highly variable;
- 相对保守区 Region relatively conserved; - - - - 相对变异区 Region relatively variable;
- ♥ 胰酶作用点 Cleavage sites; ▽ 脯氨酸 Proline; ↓ 半胱氨酸 Cysteine.

与相应标准株一致均在 aa 215 处有一个与蛋白二硫键有关的半胱氨酸。同时与 VP4 构型有关的脯氨酸除在 T65 的 aa 236 处变异 (P→S) 外,三株病毒所测序列中的脯氨酸均与相应标准株一致。图 2 还显示了最大变异区在 aa 84~172。另外 aa 187~202 也相对变异较大。也与 Gorziglia^[8,20]所报道的结果一致。

三个地方株之间及与相应标准株之间的核苷酸和氨基酸的同源性见表 1。从表 1 中可以看出:我们所测三株病毒的核苷酸序列分别与其同型标准株的序列非常接近 (91.7%~95.2%),异型之间其同源性较低 (72%~72.8%)。推导的氨基酸序列与各同型标准株之间的同源性较高 (92%~96.6%),异型之间同源性较低 (70.5%~71%),两亚型之间的同源性则为 89.5%,低于同型之间而高于异型之间的同源性。

表1 轮状病毒地方株VP4基因特异片段核苷酸(右)及氨基酸(左)同源(%)

Table 1 Percentage of nucleotide (right) and amino acid (left) homologies in specific fragments of VP4s among six rotavirus strains representing three serotypes

	血清型 Serotype	Wa	DS-1	M37	T65	R50	N16
Wa	PIA	—	86.6	71.5	91.7	86.1	72.8
Ds-1	P1B	85.8	—	70.1	86.2	95.2	72.0
M37	P2	70.0	69.8	—	71.8	70.2	93.5
T65	PIA	92.0	89.8	71.5	—	86.2	73.6
R50	P1B	86.0	96.6	70.5	89.5	—	71.9
N16	P2	71.0	70.5	93.9	71.9	71.0	—

在胰酶作用区 aa 240~246, T65 与 R50 之间及与标准株之间完全同序,均在 aa 240、aa 246 处各有一个胰酶作用点精氨酸 (R),并且在 aa 245 处 T65、R50 分别与相应标准株一样是赖氨酸 (K) 或精氨酸,构成潜在胰酶作用点。而 N16 则与 M37 完全同序,在 aa 240、aa 246 处各有一精氨酸,而在 aa 245 处的胰酶作用点则消失代之为谷氨酰胺 (Q)。并且在 aa 240~246 区域有 3 个氨基酸变异 (I→V, Q→T, K→Q) [与 Wa 比较]。

3 讨论

轮状病毒的 VP4 由于能诱导产生中和抗体而形成了独立于 VP7 的分型系统,而其 5' 的特异片段 (VP8) 决定了其中和活性的特异性。本研究对三个地方株和相应标准株的 VP4 基因 5' 的 887 个核苷酸序列及由其推导的氨基酸序列进行了比较分析。结果表明,地方株的氨基酸序列分别与同型标准株比较具有高度同源性 (92%~96.6%),而不同型之间序列同源性则较低 (70.5%~71%)。轮状病毒两个毒株之间 VP4 氨基酸同源性为 89% 或 89% 以上则认为是同一 VP4 型别^[15],而 VP8 包含了 VP4 的主要抗原位点,为 VP4 的血清型特异片段^[6,7], Larralde^[7,16]报道在 VP8 亚单位 aa 84~180 区为 VP4 血清型及亚型特异位点,并认为仅对这一区域测序即可判定 VP4 的型别。而我们的测序结果也显示此区域氨基酸在不同型之间高度变异,而在同型之间高度保守 (图 2),表明此区域构成了 VP4 的中和反应抗原位点,与 Gorziglia^[8]的结果一致。Qian^[17], Taniguchi^[18]也认为这些高变区可用于 VP4 的分型及探针分析。Steele^[19]报道据 VP4 高变区核苷酸序列设计 PCR 探针以检测病毒的流行与型别分布的变化。因此 VP8 片段的一级结构变异完全可以反映 VP4 的血清

型的变异。在此,我们从VP8的一级结构证实了我们以前的分型结果,即T65为P1A,R50为P1B,N16为P2。至于T65与R50之间的同源率为89.5%,我们认为正是因为其是P1型中的两个亚型,符合我们对结果的分析。VP4与VP7作为轮状病毒的中和性抗原均可诱导保护性免疫反应,如果血清型别不同,其所诱导产生的抗体免疫活性就存在差异。因而针对某一型别轮状病毒感染有效的疫苗并不能提供对其他型别的轮状病毒感染的交叉保护作用。而VP4的一个血清型别涉及几个VP7血清型别,因此我们对不同血清型别的VP4特异基因片段进行测序研究,将对今后研制多价疫苗提供理论基础。

早在体外培养过程中就发现在胰酶存在的条件下,轮状病毒可体外生长。也有实验结果证实胰酶的存在可增强病毒的感染性^[5]。关于胰酶作用点,多报道在aa 240、aa 246,并且几乎在所有毒株中保守,aa 245位置的作用点可促进胰酶作用从而与毒力密切相关^[1,8,20]。Gorziglia^[20]认为,在aa 245处的潜在胰酶作用点与病毒的毒力有关,在本实验中毒株N16(新生儿株)与M37(新生儿株)一致均在aa 245处与其他有毒毒株不同即发生变异(K或R→Q),也支持这一观点。另外在胰酶裂解位点两侧区(5'端侧aa 224~235)和(3'端侧aa 257~271),N16和M37还与其他有毒毒株不同具有各自的保守序列,表明维系胰酶作用的空间构型。同时,在胰酶作用区N16与M37一致均与其他有毒毒株存在三个氨基酸的不同,可能也与酶作用进而与毒力有关。从这些资料的分析我们可以初步认为轮状病毒的毒力与胰酶作用区的氨基酸序列有关。但是关于病毒的毒力,Gorziglia^[8]认为还与VP4的整体结构有关。对地方株完整VP4的研究有待于作进一步的工作。

参 考 文 献

- [1] Hoshino Y, Sereno M M, Midthun K et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, **82**:8701~8704.
- [2] Offit P A, Blavat G, Greenberg H B et al. *J Virol*, 1986, **60**:46~49.
- [3] Greenberg H B, Flores J, Kalica A R et al. *J Gen Virol*, 1983, **64**:313~320.
- [4] Kalica A R, Flores J, Greenberg H B. *Virology*, 1983, **125**:194~205.
- [5] Estes M K. Rotaviruses and Their Replication. In: Fields B N et al ed. *Virology*. 3rd ed. New York: Raven Press, 1996. 1636~1638.
- [6] Estes M K, Cohen J. *Microbiol Rev*, 1989, **53**:410~449.
- [7] Larralde G, Li B, Kapikian A Z et al. *J Virol*, 1991, **65**:3213~3218.
- [8] Gorziglia M, Hoshino Y, Buckler-white A et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, **83**: 7039~7043.
- [9] Hoshino Y, Wyatt R G, Flores J et al. *J Chin Microbiol*, 1985, **21**:425~430.
- [10] Flores J, Midthun K, Hoshino Y et al. *J Virol*, 1986, **60**: 972~979.
- [11] Gentsch J R, Glass R I, Woods P et al. *J Clin Microbiol*, 1992, **30**:1365~1373.
- [12] 袁丽娟, 钱 渊, 刘 军, 等. 病毒学报, 1994, **10** (2): 136~144.
- [13] Steele A D, Van-Niekerk M C, Mphahlele M J. *J Clin Microbiol*, 1995, **33**:1516~1519.
- [14] Gouvea V, Glass R I, Woods P et al. *J Clin Microbiol*, 1990, **28**:276~282.
- [15] Gorziglia M, Larralde G, Kapikian A Z et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**:7155~7159.
- [16] Larralde G, Gorziglia M. *J Virol*, 1992, **66**:7438~7443.
- [17] Qian Y, Green K Y. *Virology*, 1991, **182**:407~412.
- [18] Taniguchi K, Nishikawa K, Urasawa T et al. *J Virol*, 1989, **63**:4101~4106.
- [19] Steele A D, Garcia D, Sears J et al. *J Clin Microbiol*, 1993, **31**:1735~1740.
- [20] Gorziglia M, Green K, Nishikawa K et al. *J Virol*, 1988, **62** (3):2978~2984.

SEQUENCE ANALYSIS OF THE SEROTYPE SPECIFIC GENE FRAGMENT OF VP4 FROM THREE ROTAVIRUS FIELD STRAINS

Xiao Wei Qian Yuan

(Capital Institute of Pediatrics, Beijing Municipal Laboratory of Infection and Immunity, Beijing 100020)

Abstract Rotaviruses are the major pathogens that cause life threatening diarrhea in young children and animals. The 4th gene encodes the nonglycosylated major neutralizing protein VP4 which can be cleaved into VP8 and VP5. The regions of the fourth genes coding for the VP8 protein, downstream cleavage site and the NH₂ terminus of VP5 from three Beijing human rotavirus field strains (T65 [P1A], R50[P1B], N16[P2]) were cloned and sequenced. Comparative analysis of the deduced amino acid sequences of these 887bp fragments from three strains indicates a high degree of homology (92%~96.6%) between field and reference strains within the same serotype and a high degree of divergence (70.5%~71%) among different serotypes. Notably, the most divergence of amino acid sequence is located in a region delimited by aa 84~172 of VP8 protein. In addition, the possibility of trypsin cleavage sites in virulence is discussed.

Key words Rotavirus, VP4, Sequence analysis