

## 呼吸道合胞病毒 B 亚型分离株的 G 蛋白基因分析\*

耿学辉 王之梁 钱 渊 朱汝南 邓 洁

(首都儿科研究所 北京市感染与免疫中心实验室 北京 100020)

**提 要** 对一株长春地区 B 亚型分离株 (CC169) 的 G 蛋白基因进行了序列分析, 结果表明: 我国呼吸道合胞病毒 (RSV) 分离株 CC169 同 RSV B 亚型原型株 CH18537 的核苷酸同源性为 94%, 核苷酸的有义突变率达 65%。由核苷酸推导出氨基酸序列的同源性为 89.4%, 氨基酸的变异全部发生在胞外区, 并主要集中在一个高度保守区的两端, 胞内区和跨膜区保守不变。氨基酸的变异导致了分离株既有糖基化位点的改变, 又有蛋白长度的变异。此外还初步探讨了我国 RSV B 亚型分离株 CC169 的 G 蛋白基因同原型株之间的变异与疫苗研制中的意义。

**关键词** 呼吸道合胞病毒, G 蛋白, 核苷酸序列

**分类号** Q939.47 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)01-0023-28

呼吸道合胞病毒 (Respiratory Syncytial Virus, RSV) 属副粘病毒科, 肺炎病毒属, 是婴幼儿急性下呼吸道感染最常见的病毒病原。从本世纪 60 年代用福尔马林灭活疫苗的失败至今仍未研制出安全有效的 RSV 疫苗, 其原因主要是对 RSV 的生物学特性和感染后的免疫机理缺乏足够的认识。

RSV 为非节段性的负链 RNA 病毒。病毒核酸编码 10 个特异性蛋白, 其中两种病毒表面糖蛋白——F 蛋白和 G 蛋白是激发机体产生保护性抗体的最主要的病毒抗原<sup>[1~2]</sup>。G 蛋白是 RSV 结构蛋白中变异最显著的蛋白, RSV 两个亚型 (A 和 B) 间的抗原性和氨基酸序列的差异性主要表现在 G 蛋白上 (5% 的抗原相关性, 53% 的氨基酸同源性)<sup>[3]</sup>。不同亚型 RSV 的 G 蛋白中和抗体, 不能提供有效的亚型间交叉保护作用。儿童初感 A 亚型 RSV 后, 再次感染似对 RSV B 亚型更易感<sup>[4]</sup>。因此研究 RSV 亚型间的抗原差异性, 对于了解 RSV 反复感染的免疫反应中具有重要的意义。

在我国, 自 70 年代以来已证明 RSV 为引起婴幼儿下呼吸道感染最主要的病毒病原, 而且还是引起我国所特有的流行性喘憋性肺炎的主要病原。我们对我国部分地区不同年份 100 株 RSV 分离株的亚型检测结果证明, 我国不但有 RSV A 亚型感染, 同时还存在 B 亚型的感染<sup>[5]</sup>。对我国 8 株 RSV A 亚型分离株的 G 蛋白基因序列分析表明: 同国外 RSV 原型株比较, 我国 RSV A 亚型分离株的 G 蛋白基因无论在核苷酸序列还是在糖基化位点上, 均存在一定的变异。为深入了解我国 RSV 分离株的基因状况、变异特征, 我们对一株 B 亚型分离株 G 蛋白基因进行了序列分析。

\* 卫生部科学研究基金 (No. 96-2-239) 和北京市科技新星计划 (No. 101) 资助项目

参加本文工作的还有刘长清 (长春市儿童医院 长春 130051) 和朱宗涵 (北京市感染与免疫中心实验室 北京 100020)

收稿日期: 1997-08-14, 修回日期: 1998-06-04

## 1 材料和方法

### 1.1 毒株来源

1991 年从因下呼吸道感染在长春市儿童医院住院患儿中分离出 9 株 RSV, 经瑞典 Norrby 教授惠赠的 8 株 RSV 单克隆抗体检测<sup>[6]</sup> 8 株为 A 亚型, 1 株为 B 亚型( CC169 ), 对此株进行 G 蛋白序列分析。

### 1.2 主要试剂

M-MLV 逆转录酶、Taq DNA 聚合酶、T<sub>4</sub>DNA 多聚酶、T<sub>4</sub>DNA 连接酶、牛小肠碱性磷酸酶( CIP )、T<sub>4</sub> 多核苷酸激酶、pUC18/M13 逆转录引物和 Olig( dT )<sub>5</sub> 引物均购于 Promega 公司。限制性内切酶等购于华美公司。克隆质粒载体 pTZ18R 购于友谊公司。T<sub>7</sub>DNA 测序试剂盒购于 Shanghai Promega 公司( 含 pUC18/M13 Forward primer )。DNA 快速纯化回收试剂盒 PURIGENE 为原平生物技术有限公司产品, 低熔点琼脂糖购于 BRL 公司。

### 1.3 引物设计

参考 RSV B 亚型原型株( CH18537 株 ) 的 G 蛋白基因序列, 分别设计用于 PCR 和序列分析引物 P1、P2、P3 和 P4, 其位置和序列见表 1。

表 1 RSV( CC169 ) G 蛋白基因 PCR 扩增和序列测定的引物

Table 1 Primers used for PCR and DNA sequencing of G protein gene of RSV ( CC169 )

引物 Primers	位置 Location	序列 Sequence	功能 Function
P1	7~27	5' AATGCAACCATGTCCAAACAC3'	聚合酶链反应 PCR
P2	904~921	5' GAATAACTAAGCATGTGA3'	聚合酶链反应 PCR
P3	201~221	5' CATCTCTGCCAATCACAAAG3'	序列分析 Sequencing
P4	437~453	5' AACAGACCAACAAGCC3'	序列分析 Sequencing

### 1.4 病毒 RNA 提取、cDNA 合成、PCR 扩增、目的基因的克隆及序列测定

见文献 [7], 选取 3 个阳性克隆( 来自不同 PCR 反应 ) 进行序列测定。

## 2 结果

### 2.1 阳性克隆的鉴定

从 RSV( CC169 ) 分离株 mRNA 中经 RT-PCR 扩增得到 G 蛋白编码区 914bp 的片段, 将其插入 pTZ18R SmaI 酶切位点中, 重组质粒采用酶切和 PCR 鉴定, 筛选出阳性克隆<sup>[8]</sup>。

### 2.2 CC169 的核苷酸序列

RSV 分离株( CC169 ) 的核苷酸序列及与 A 亚型( A2 ) 和 B 亚型原型株( CH18537 ) G 蛋白 cDNA 的序列比较见图 1。因 5' 端 20 个碱基( 7~27 ) 及 3' 端 17 个碱基( 904~921 ) 为 PCR 引物区, 所以这两端的序列不能确定。CC169 同 A2 株比较, 其核苷酸的同源性为 66%。同 CH18537 的核苷酸同源性为 94%。由于 A 亚型原型株( Long 株和 A2 株 ) 间的核苷酸同源性为 96%, A2 株同 CH18537 间的核苷酸同源性为 67%<sup>[3]</sup>。说明 CC169 株属 B 亚型。在 A2 株 642 位核苷酸上, 同 CH18537 一样 CC169 有三个核苷酸( ACC ) 的框架插入。CC169 由于在 CH18537 终止密码处的核苷酸突变( 892 位 T→C ), 导致 CC169 终



	←胞内区 Cytoplasm →				
A2	---N-D---	K---R---	---LF---	-K-----V--	
CC169	MSKHKNQRTA	RTLEKTWDTL	NHLIVISSCL	YRLNLKSIQA	40
CH18537	-----	-----	-----	-----	
	←跨膜区 Transmembrane →				
A2	-T--I--		--A-----	P--AII-DAT	
CC169	I ALSVLAMII	STSLIIAAII	FIISANHKVT	LTTVTVTQTIK	80
CH18537	-----	-----	-----	-----	
	*				
A2	SQIKNTTP--	---NPQLGI-	--NPSEI-SQ	-T-IL-STT-	
CC169	NHTEKNITTY	LTQVSPERVS	PSKQPTTTPP	IHTNSATIS P	120
CH18537	-----S--	-----P--	S-----S-	-----	
	▲	▲	#		
	*				
A2	GV--TLQST-	VK--NT---Q	--PS--T--Q	-QNK--S--N	
CC169	NTKSETHYKT	AQTKGRITTP	TQTNKPSTKP	RSKNPPKPKK	160
CH18537	-----HT-	-----I--S	-----S	-----	
	C C C C				
A2	N-F-E--E-E	Y--S--S--P	T-WA---R--	NK--G--T-T	
CC169	DDYHFEVFNF	VPCGICGNNQ	LCKSICKTIP	SNKPKKKPTI	200
CH18537	-----	-----	-----	-----	
	←胞外区 Extracellular →				
A2	---K--TLK-	-K---PQT	TKS-EVP--K	--EE--IN--	239
CC169	KPTNKPPQT	TNKRDPKTLA	KTLKKETTIN	PTKKPTPKTT	240
CH18537	-----T-K-	-----P-	MP---I--	-A---L--	
	*				
A2	KTNII-TLL-	SNT-GNPEL-	S-METF---S	S-GN-SPS-V	279
CC169	EKDTSTSQST	MLDITTSKHT	IQQQSLHSTT	PENTPNSTQT	280
CH18537	-R---I----	V---I-P-Y-	-----	S---S---I	
				△	
	→				
A2	S-T--YPSQP	-SPPNTPRQ		298	
CC169	PTASEPSTSN	STQKP		295	
CH18537	-----L-	PN		292	
		△			

图2 推导出的RSV分离株(CC169)G蛋白氨基酸序列与RSV B亚型原型株(CH18537)和RSV A亚型原型株(A2)相应序列的比较

“C”表示4个保守的半胱氨酸；\*表示A2株的4个氮连接的糖基化位点；▲表示CC169和CH18537共有的氮连接糖基化位点；#表示CH18537特有的氮连接糖基化位点；△表示CC169特有的氮连接糖基化位点。

Fig. 2 Comparison of deduced amino acid sequence of G protein from strain CC169 with CH18537 and A2. Four conserved cysteine residues are indicated by “C”; Potential N-linked glycosylation sites 4 of A2 are marked with “\*”; Potential N-linked glycosylation sites in both CC169 and CH18537 are marked with “▲”; Potential N-linked glycosylation site only in CH18537 is marked with “#”; Potential N-linked glycosylation site only in CC169 is marked with “△”.

### 2.3 CC169的氨基酸序列

由核苷酸推导出的CC169核苷酸序列及同RSV A、B亚型原型株的比较见图2。同CH18537比较,CC169有57个核苷酸发生变异,导致31个氨基酸改变。在57个核苷酸突变中,有37个发生有义突变,20个为同义突变,有义突变率为65%。CC169同

CH18537 的氨基酸的同源性为 89.4% ,与 Wayne 等报道的 B 亚型分离株间 88 - 97% 的同源性基本一致 ,同 A2 的氨基酸同源性只有 52% 。而 RSV A 亚型原型株( Long 株和 A2 株 )间的氨基酸同源性为 94% ,RSV B 亚型原型株( CH18537 株和 8/60 株 )间的氨基酸同源性为 98% ,RSV A B 亚型( CH18537 和 A2 株 )间的氨基酸同源性为 53%<sup>[3,8]</sup> 进一步证明 CC169 属 RSV B 亚型。从图 2 可见 ,同 CH18537 比较 ,CC169 的氨基酸变异全部在细胞外区 ,集中在一个保守区( 151~206 )的两端。而胞内区和跨膜区无变异。胞外区的氨基酸同源性为 86.3% 。分离株在已知的所有人类和牛 RSV 中保守的 173~186 位点上的 4 个半胱氨酸残基未发生改变 ,且其外周区同样保守不变。从糖基化位点来看 ,分离株同 CH18537 株一样 ,仍有高达 30% 左右的丝氨酸和苏氨酸这种氧连接的糖基化位点。对于氮连接的糖基化位点 ,分离株保留了 CH18537 株 3 个位点中的 2 个( 81 和 86 位 ) ,而 CH18537 第 100 位上的位点 CC169 由于氨基酸 N→S 的改变缺失。而且由于突变的结果 CC169 增加了 2 个氮连接的糖基化位点( 276 和 290 位 )。

### 3 讨论

通过核苷酸及氨基酸同源性比较证明 我国长春地区 RSV 分离株 CC169 为 B 亚型。同 B 亚型原型株 CH18537 比较 ,CC169 的变异主要表现在以下几方面 ( 1 )同文献报道的相似 ,变异全部发生在细胞外区 ,胞内区和跨膜区保守<sup>[3,9]</sup>。( 2 )核苷酸的有义突变率为 65% ,远远高于 24% 的随机突变率。( 3 )由于终止密码处的核苷酸变异 ,导致 CC169 的氨基酸长度较 CH18537 多出 3 个氨基酸。( 4 )氮连接糖基化位点的改变。因此考虑 CC169 的变异可能为免疫选择压力所致。

CC169 又存在着 RSV G 蛋白共同的特点 ( 1 )具有 30% 左右的氧连接糖基化位点。( 2 )在变异较大的胞外区存在着一个以 4 个半胱氨酸( 173-186 )为中心的高度保守区( 151-206 )。

研究结果进一步阐明了 RSV 不同亚型间 G 蛋白缺乏交叉保护作用的分子生物学基础 ,提示 RSV 反复感染可能同亚型的变异有关 ,同时说明在研制有效的 RSV 疫苗时应包括 A B 亚型的 G 蛋白。此外 ,在发展我国 RSV 疫苗时应考虑选用我国的分离株。当然 ,只对一株 RSV B 亚型 G 蛋白的基因分析不能完全反映我国 RSV B 亚型 G 蛋白的基因状况和变异特征。为此 ,我们正对我国不同地区 ,不同年份的 RSV B 亚型 G 蛋白基因进行分析 ,其结果将对我国 RSV 感染的免疫预防起到积极的推动作用。

### 参 考 文 献

- [1] Taylor G ,Stott E J ,Bew B *et al.* *Immunology* ,1984 **52** :137~142.
- [2] Walsh E E ,Schlesinger J J ,Brandriss M W *et al.* *Infect Immun* ,1984 **43** :756~758.
- [3] Johnson P R ,Spriggs M K ,Olmsted R A *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* ,1987 **84** :5625~5629.
- [4] Mofson M A ,Belshe R B ,Orvell C *et al.* *J Clin Microbiol* ,1987 **25** :1535~1539.
- [5] 耿学辉 朱汝南 孙晓鸥等. 中华儿科杂志 ,1997 **35** ( 8 ) :14~16.
- [6] 杜金林 王之梁 朱汝南等. 微生物学报 ,1991 **31** ( 6 ) :488~491.
- [7] 耿学辉 王之梁 钱 渊等. 病毒学报 ,1996 **12** ( 14 ) :317~322.
- [8] Sulender W M ,Anderson K ,Wertz G W *et al.* *Virology* ,1990 **178** :195~203.

[9] Cane P A , Pringle C R. *J Virol Meth* , 1992 **40** 297-306.

## CLONING AND SEQUENCING OF cDNA FROM G PROTEIN GENE OF SUBGROUP B RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS STRAIN ISOLATED IN CHINA

Geng Xuehui Wang Zhiliang Qian Yuan Zhu Runan Deng Jie

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

**Abstract** The nucleotide sequence of the G protein gene of respiratory syncytial virus (RSV) CC169 strain isolated from China that has been identified as subgroup B with monoclonal antibodies , was determined from cDNA that had been amplified by RT-PCR and cloned into pTZ18R plasmid vector. The homology of nucleotide was 94% as compared with G protein cDNA of a RSV prototype strain (CH18537). Deduced amino acid identity of G protein was 89.4%. The amino acid changes were only in the extracellular part of the protein where there were two extensive divergent domains with a highly conserved region in between ; whereas the cytoplasmic and transmembrane domains were conserved. This study demonstrates the sequence diversity of the G protein of subgroup B RSV between a Chinese isolate and the prototype strain CH18537.

**Key words** Respiratory syncytial virus , G protein , Nucleotide sequence

### 《微生物学报》第七届编辑委员会名单

The Seventh Editorial Board of Acta Microbiologica Sinica

顾 问 (Advisor) 张树政

主 编 (Editor-in-Chief) 李季伦

副主编 (Associate Editors-in-Chief) 陆德如 朱关福 李阜棣 王敖全

编 委 (Members of the Board)

王修坦 邓子新 田 波 刘志恒 朱庆裴

孙志浩 李焕娄 陈世平 陈永青 杨苏声

周培瑾 范云六 范孝用 钱新民 钱世钧

诸葛健 徐怀恕 翟中和 谭华荣

编 辑 (Editors) 戈苏国 刘玉方