

22-33

## 我国四株狂犬病毒糖蛋白基因序列分析和位点比较\*

Orciari, L.A

R373.9

唐青<sup>1</sup>, Lillian A Orciari<sup>2</sup>, Charles E. Rupprecht<sup>2</sup>赵秀芹<sup>1</sup>, 李志刚<sup>4</sup>, 杨为松<sup>3</sup><sup>1</sup>(北京中国预防医学科学院流行病学研究所, 北京 102206)<sup>2</sup>(美国疾病控制中心, 美国)<sup>3</sup>(第四军医大学唐都医院传染科, 西安 710038)<sup>4</sup>(宁夏自治区卫生防疫站, 银川 750004)

**摘要:**测定我国人用狂犬疫苗株(aG)、减毒株(CTN-181)及两株街毒糖蛋白(GP)基因 cDNA 的核苷酸序列及推导氨基酸序列。结果两株街毒仅相差两个碱基和一个氨基酸残基;两株街毒与 CTN 的同源性(85.9%)高于 aG 株(81.9%);聚类分析将街毒和固定毒分为两支。比较 GP 嗜神经位点的氨基酸序列与蛇神经毒素同 AChR 结合部位高度同源。被认为决定毒力的 333 位 Arg, CTN 发生了 Q 替换, 其它毒株均为 Arg333。所比较的毒株均存在 319 位糖基化位点, 此外 37 位糖基化位点也相对保守; GP 两个主要抗原表位, G II 的氨基酸构成完全一致, G III 只在一些减毒株中发生与毒力密切相关碱基的替换。

**关键词:**狂犬病毒;糖蛋白;基因;同源性;致病性;嗜神经性

**中图分类号:** R373.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2000)01-0022-12

狂犬病毒糖蛋白(GP)是嵌在病毒粒子表面形成棘状突起的结构成分,它既可以诱导宿主免疫反应产生中和抗体和刺激细胞免疫,又作为媒介使病毒吸附在宿主细胞表面进而侵入细胞,因此无论是在病毒的免疫原性或病毒的组织嗜性和毒力方面,GP 都起着决定性作用。目前一些实验室固定毒株的 GP 基因序列测定已相继完成<sup>[1,2]</sup>。我国到目前为止仅进行过广西一只疯犬分离毒株和中国人用疫苗株(3aG 和 5aG)的 GP 基因序列测定<sup>[3,4]</sup>。通过对这些毒株的序列测定和分析已知狂犬病毒 GP 基因由 1 650 个核苷酸残基组成,完整阅读框(ORF)从起始密码(ATG)到终止密码(TGA)共 1 575 个核苷酸残基,编码 524 个氨基酸。流行于不同地区、不同宿主的狂犬病毒,其 GP 基因的变异远远大于核蛋白基因。由于 GP 与狂犬病的预防和致病密切相关,我国狂犬病流行严重,宿主动物种类又多,对本国分离毒株 GP 基因的分析研究,有助于深入了解我国狂犬病毒致病和保护性免疫的机理,为此在对我国四株狂犬病毒 GP 基因序列测定的基础上进行了有关 GP 基因与致病性、免疫原性及组织嗜性关系的分析和研究。

收稿日期:1998-11-13,修回日期:1999-02-01

\* 本研究系 WHO 资助课题

作者简介:唐青(1955-),女,蒙古族,内蒙赤峰人,副研究员,医学博士,研究方向:分子病毒学。

## 1 材料与方法

**1.1 病毒** aG 为中国人用地鼠肾细胞疫苗株,因分离自北京也称北京株(PG),由中国预防医科院流研所严玉辰老师提供。CTN-181 为实验室减毒株,由中国药品生物制品检定所严子林老师提供。CNX8511 和 CNX8601 是我国宁夏省卫生防疫站收集的两例临床诊断为狂犬病的死亡病人脑组织标本,两份标本冻存于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  经多年后送至流研所经乳鼠脑传代,冷冻切片后用抗狂犬病毒荧光抗体染色鉴定为狂犬病毒并分离得到病毒,均为街毒。

**1.2 PCR 及序列反应引物** 用于 RT-PCR 和序列反应的寡核苷酸引物,通过比较已发表的 ERA 株、中国广西毒株及中国人用疫苗株的序列设计合成 P1-P4 引物,引物 941、763、93G、1444、1323、1171、989、754 由美国 CDC 提供;采用分段 PCR 和分段测序的方法对 4 株中国狂犬病毒进行 GP 基因全序列测定:

**1.3 RT-PCR** 用 RNA 分离试剂 TRI<sub>20L</sub> 分离病毒 RNA(按试剂说明书操作),用正向引物逆转录合成 cDNA 第一链,PCR 扩增 cDNA,参数如下: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  1 min 30 s,共循环 40 次。PCR 产物经低熔点胶电泳及 Wizard<sup>TM</sup> PCR Preps DNA Purification System 试剂盒纯化。

**1.4 双脱氧链末端终止法直接进行 cDNA 的核苷酸序列测定** 测定引物用与 PCR 反应相同的引物,PCR 扩增并纯化后的产物为模板,每个 PCR 产物分别用正向和反向两个引物从两个方向进行单链测序反应,序列测定用 PRISM<sup>TM</sup> Ready Reaction DyeDeoxy<sup>TM</sup> Terminator Cycle Sequencing Kit 进行。在总容量为  $20\text{ }\mu\text{L}$  的测序反应中含有: $9.5\text{ }\mu\text{L}$  Prizm Tag DyeDeoxy Terminator (包括四种末端标记有不同波长荧光物质的双脱氧核苷: $1.58\text{ }\mu\text{mol/L}$  A-DyeDeoxy,  $94.74\text{ }\mu\text{mol/L}$  T-DyeDeoxy,  $0.42\text{ }\mu\text{mol/L}$  G-DyeDeoxy,  $47.37\text{ }\mu\text{mol/L}$  C-DyeDeoxy;  $15.79\text{ }\mu\text{mol/L}$  dNTP 和  $0.42\text{ u}/\mu\text{L}$  Tag DNA 聚合酶); $2\text{ }\mu\text{L}$   $1.6\text{ pmol/L}$  引物;纯化并干燥后的 PCR 产物(cDNA)约  $1.0\text{ }\mu\text{g}$  溶于  $7\text{ }\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  中作为模板;补充  $\text{H}_2\text{O}$  至  $20\text{ }\mu\text{L}$ ,混均后在 PCR 仪上进行测序反应,反应条件: $96\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s,  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  15 s,  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  4 min,共循环 25 个周期。四种带标记的双脱氧核苷链末端终止反应均在一个反应管中进行,用 373A DNA 自动测序仪经 10~12 h 电泳后直接读取核苷酸序列。

**1.5 计算机分析** 将序列结果输入计算机,用 Winstar 软件在计算机上进行分析 and 比较。

## 2 结果

### 2.1 四株狂犬病毒 GP 基因编码区核苷酸序列和推导氨基酸的序列及其比较

计算机分析四株病毒 GP 基因 ORF,四株病毒 GP 基因编码区均从起始密码 ATG 开始,终止密码除 CTN 株为 TAA 外均为 TGA,从 ATG 到终止密码全长共 1 575 个核苷酸残基,四株病毒 GP 基因核苷酸序列见图 1。两株街毒核苷酸序列仅在 960 和 1 535 两位点相差两个碱基,与 CTN 及 aG 株相比两株街毒与 CTN 的同源性(85.9%)大于 aG 株(81.9%)。根据已

引物	PCR 和测序引物		位置和方向
	引物	序列	
Messenger sense			
941 P1MC	ACCAAGTCAGTGAGTTTCAGA	941→961	
763 P1MC	AGACTTATGGATGGAACATGG	764→784	
93GP1MC	ATTTACACGATACCAGACAA	74→93	
P1	TTATCACTTGTTTACCTCTGG	-142→-163	
P3	GACGAAATTGAGCACCTTGTTGT	859→882	
Genomic sense			
1444PR1M	ACATGTCATCCAGGAAAATTAT	1432←1444	
1323PR1M	ATTCCAACAACCTCCATATG	1213←1232	
1171PR1M	GCCGTCAGGTCCTAATATTAT	1151←1171	
989PR1M	CTGAGACGTCTGAAACTCAC	949←969	
754PR1M	AACTCCACATAAAGTTGAGTTT	734←754	
P2	CTCGTTCTGAACACCCAAA	673←691	
P4	ACCCAAGTTATCAGGAGGACC	1644←1664	