

乙型脑炎病毒减毒中间株 SA₁₄-12-1-7 基因组全序列的测定

曾 明, 俞永新, 董关木, 范行良, 姚智慧, 李德富

(中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

Complete Sequence Analysis of the Full-length Genome of the Japanese Encephalitis Virus Attenuated Strain SA₁₄-12-1-7

ZENG Ming, YU Yong-xin, DONG Guan-mu, FAN Xing-liang, YAO Zhi-hui, LI De-fu
(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China)

Abstract: To sequence the full length genome of Japanese encephalitis virus attenuated strain SA₁₄-12-1-7, direct information about the genomic structure and the possible relationship to the attenuated and stability mechanism has been provided in this study. Six pairs of primers were designed according to the published sequences of SA₁₄-14-2 and SA₁₄ strains, covering full-length genome of the JEV virus. Using RT-PCR, cDNA fragments of SA₁₄-12-1-7 strain were got and cloned into pGEM-T vector, then transformed into competent TG1 hosts. The positive colonies were screened and then the inserted fragments were sequenced. The results of sequence analysis showed that genome of SA₁₄-12-1-7 strain consists of 10976 nucleotides and contains a single open reading frame of 10299 nt which encodes a polyprotein of 3432 amino acids. Compared with the published sequence of SA₁₄-14-2 and SA₁₄ strain, the homology of the nucleotide sequence and deduced amino acid sequence were all more than 99%, the mutation sites were located in different regions. In E region, 5 sites are the same as SA₁₄-14-2 and other 3 sites are the same as SA₁₄ strain. Some sites in NS3, NS5 and 3' NTR may relate with the attenuated stability. So the sequence of SA₁₄-12-1-7 strain genome is similar to the published information, several mutation sites are responsible for the attenuation of the virus and the virulence stability. The sequence analysis would aid in understanding attenuated mechanism of the vaccine.

Key words: Japanese encephalitis virus; SA₁₄-12-1-7 strain; Genome; Sequence analysis

摘要: 本研究通过对乙型脑炎活疫苗减毒过程中间株 SA₁₄-12-1-7 株进行全序列测定和分析, 进一步了解乙脑活疫苗减毒及其稳定性的分子机制。根据已发表的 SA₁₄-14-2 株及 SA₁₄ 株的序列, 设计 6 对重叠引物, 涵盖整个乙脑病毒的基因组, 通过 RT-PCR 扩增出 SA₁₄-12-1-7 株的各 cDNA 片段, 分别克隆到 pGEM-T 载体, 转化至 TG1 受体菌中, 挑取阳性克隆进行鉴定后测序。结果表明 SA₁₄-12-1-7 株基因组全序列长 10976 个核苷酸, 从 96 到 10394 为一个长开放读码框, 编码 3432 个氨基酸。与野毒株 SA₁₄ 和疫苗株 SA₁₄-14-2 的核苷酸序列和氨基酸序列相比, 同源性均在 99% 以上, 突变位点分散于各个区域, E 区有 5 个位点与疫苗株一致而与野毒株不同, 3 个位点与野毒株一致而与疫苗株不同, 推测与其容易产生回复突变、恢复毒力有关。此外, NS3、NS5 和 3' NTR 的几个位点可能与病毒毒力稳定性相关。综上所述, 乙脑病毒减毒中间株的基因组全序列基本类似于已发表的序列, 若干突变位点影响病毒的弱毒性及毒力的稳定性。全序列的测定对于研究疫苗株的减毒机理具有重要意义。

关键词: 乙型脑炎病毒; SA₁₄-12-1-7 株; 基因组; 序列分析

中图分类号: **文章标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2002)03-0206-05

流行性乙型脑炎是由流行性乙型脑炎病毒 (Japanese Encephalitis Virus) 引起的严重中枢神经

收稿日期: 2001-12-03, 修回日期: 2002-02-25

作者简介: 曾 明 (1966-), 男, 江西萍乡籍, 副研究员, 博士, 从事微生物学与免疫学研究。E-mail: zengming@263.net

系统疾病,由蚊虫传播,主要流行于东亚和东南亚各国,近年来其流行分布范围有不断扩大的趋势^[1-4]。其感染后死亡率高,预后患者会留下不同程序的后遗症,目前尚无特效的治疗方法,对蚊虫的传播控制和对易感人群的免疫接种是现阶段的主要控制手段。

目前使用的乙脑疫苗有灭活疫苗和减毒活疫苗两种。我国的乙脑减毒活疫苗株 SA₁₄-14-2 株的使用对于控制流行性乙型脑炎的发病率起到了重要作用,其安全性和有效性均已得到证实^[1-5]。目前 WHO 已推荐推广在全球使用,并已讨论通过其规程。疫苗减毒是通过病毒野毒株 SA₁₄ 在原代地鼠肾细胞上传 100 代^[6],再经空斑克隆 3 次后获得的 SA₁₄-12-1-7 株^[7],并在此基础上又经动物神经外传代和空斑多次克隆而获得稳定的减毒株 SA₁₄-14-2 株^[8]。SA₁₄-12-1-7 株的最主要的特点是,已经减毒但毒力不稳定,但鼠脑中传一代或原代地鼠肾细胞上传几代即可产生回复突变,因此,对于 SA₁₄-12-1-7 株基因组的全序列测定对揭示乙脑活疫苗减毒和稳定的相关位点具有非常重要的意义,并为进一步提高疫苗质量、防止回复突变的产生具有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 病毒及病毒 RNA 提取

减毒中间株 SA₁₄-12-1-7 株,本室保存,于 Vero 细胞上传两代。0.5mL 培养上清中加 0.5mL Trizol LS(GibcoBRL),充分混匀,室温放置 10min 后加 0.2mL 氯仿,充分震荡,室温 10min,13000rpm 离心 15min,取上清,加等体积异丙醇,室温 10min,13000rpm 离心 15min,弃上清,用 1mL 75% 乙醇洗一遍,8000rpm 离心 5min,弃上清,置室温干燥 15min,加 DEPC 处理过的水溶解病毒 RNA。

1.2 引物设计

根据国外所测乙脑病毒 SA₁₄ 和 SA₁₄-14-2 株的核苷酸序列^[9,10],设计了涵括整个病毒基因组 6 个相互重叠片段的 6 对引物,引物长度 18~21bp,扩增片段长度为 1.3~2.3kb。引物由六合通公司和生工公司合成。

1.3 逆转录及 PCR 扩增

取所提取的 RNA,加入 6 核苷酸随机引物(六合通公司),两末端片段反转录用反向引物,60℃ 水浴保温 10min 后,依次加入 RNasin(promega),5× 第一链缓冲液,dNTPs(Pharmacia),Superscript II 逆

转录酶(GibcoBRL),总体积 20μL,42℃ 保温 60min,随后 95℃ 5min,所得 cDNA 可用做 PCR 反应模板。取 cDNA,10× PCR 缓冲液,正、反向引物,dNTPs,Vent 聚合酶(Biolab),补水至总体积 50μL 进行 PCR 扩增。反应前采用热启动,即 95℃ 5min 后加入 Vent 酶。PCR 反应参数:94℃ 40s,55℃ 60s,72℃ 90s~150s,共 35 次循环,最后一次循环后 72℃ 延伸 15min。两末端片段扩增所用 cDNA 模板由下游引物和随机引物两种逆转录产物混合。

1.4 PCR 产物的克隆

PCR 扩增后用 0.5% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察 PCR 扩增结果,用 PCR 片段回收试剂盒(博大公司)回收特异的扩增片段。回收片段加 A 尾后与 pGEM-T 载体(promega)连接,TSS 法转化感受态细菌 TG1,涂布含氨苄青霉素、IPTG 和 X-gal 的 LB 平板,37℃ 培养后,挑取白色菌落用克隆筛选试剂盒(Biochain)初筛出质粒有插入片段的菌落,经 PCR 和酶切进一步鉴定后进行测序。

1.5 测序

序列测定由生工公司和博亚公司完成。

2 结果

2.1 SA₁₄-12-1-7 株基因组全序列及特点

SA₁₄-12-1-7 株基因组的克隆和序列测定策略见图 1。乙脑病毒减毒中间株 SA₁₄-12-1-7 株基因组全序列全长 10 976 个核苷酸,碱基组成:A:3 036 个(27.66%),T:2 298 个(20.94%);G:3 121 个(28.43%),C:2 521 个(22.97%)。含有一个单一开放读码框架,5' 端非编码区有 95 个核苷酸,3' 端非编码区自 10 395 起有 582 个核苷酸。开放读码框架从第 96 位开始,到 10 394 止,共 10 299 个核苷酸,编码 3 432 个氨基酸,包含按顺序排列的结构蛋白和非结构蛋白:C-PrM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5,氨基酸数分别为 127、167、500、415、164、131、619、267、137、905 个。

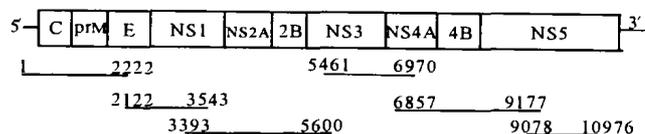


图 1 SA₁₄-12-1-7 株基因组的克隆和序列测定策略

Fig. 1 Cloning and sequencing strategy of SA₁₄-12-1-7 genomic cDNA

2.2 SA₁₄-12-1-7 株与 SA₁₄-14-2 株和 SA₁₄ 株核酸序列比较

将所测得 SA₁₄-12-1-7 株基因组核苷酸与我们所测 SA₁₄-14-2 疫苗株^[11]、日本所测 SA₁₄-14-2 株^[10]和野毒株 SA₁₄ 进行比较, 结果见表 1。与所测两 SA₁₄-14-2 株序列相比有 31 个核苷酸不同, 5' 端

非编码区、NS2B 各 1 个, NS2A 2 个, C、NS3 和 3' 端非编码区各 3 个, E、NS1 和 NS4A 各 4 个, NS5 6 个。与 SA₁₄ 株相比有 62 个核苷酸不一致, 按顺序分别为 5'NCR 2 个、C 区 4 个、E 区 16 个、NS1 区 5 个、NS2A 区 3 个、NS2B 区 1 个、NS3 区 11 个、NS4A 区 5 个、NS5 区 11 个和 3'NCR 4 个。各株之间的同源性分别为 99.6%、99.6% 和 99.4%。

表 1 SA₁₄-12-1-7 与 SA₁₄-14-2 疫苗株、野毒株 SA₁₄ 基因组核苷酸比较

Table 1 Comparison of nucleotide difference among SA₁₄-12-1-7 and wild strain SA₁₄ and SA₁₄-14-2

Nt	Region	毒株				Nt	Region	毒株			
		12-1-7	Vaccine	JEVSAA	JEVSAV			12-1-7	Vaccine	JEVSAA	JEVSAV
21	5'NCR	C	T	T	T	5634	NS3	A	A	T	A
39	5'NCR	A	A	A	T	5994	NS3	A	G	G	G
127	C	G	A	A	A	6008	NS3	T	T	T	C
292	C	C	C	C	T	6425	NS3	G	G	G	A
316	C	G	A	A	A	6634	NS4A	T	T	C	T
375	C	A	G	G	G	6728	NS4A	G	A	A	G
1017	E	A	G	G	G	6904	NS4A	C	T	T	T
1061	E	C	C	C	T	6944	NS4A	A	G	G	A
1217	E	C	C	C	T	7005	NS4A	G	A	A	A
1296	E	T	T	T	C	7121	NS4A	T	T	T	C
1389	E	A	A	A	G	7193	NS4A	T	T	T	C
1503	E	G	G	G	A	7227	NS4A	G	G	G	A
1506	E	A	G	G	A	7655	NS4	G	G	G	A
1532	E	G	A	A	A	7736	NS5	C	T	T	C
1769	E	T	T	T	G	7768	NS5	C	G	C	C
1813	E	A	T	T	A	7809	NS5	C	A	C	C
1921	E	C	T	T	C	7871	NS5	C	T	C	C
1977	E	C	C	C	T	7926	NS4	T	C	C	C
2012	E	T	C	C	C	8067	NS5	C	G	G	G
2293	E	G	G	G	A	8099	NS5	T	T	T	C
2441	E	G	A	A	G	8261	NS5	G	T	G	G
2691	NS1	A	A	A	C	8276	NS4	C	C	T	C
2843	NS1	C	C	C	T	8394	NS5	T	T	T	C
3351	NS1	G	A	A	G	8832	NS5	C	T	T	C
3516	NS1	A	A	A	C	8882	NS5	A	T	T	A
3528	NS1	G	C	C	G	8891	NS5	T	T	T	C
3530	NS1	C	T	T	T	9593	NS5	G	T	G	G
3539	NS1	A	A	A	T	9688	NS5	T	C	C	T
3599	NS1	A	A	A	G	9695	NS5	A	A	A	G
3652	NS1	C	T	T	C	9818	NS5	T	T	T	C
3677	NS1	T	T	T	C	9898	NS5	G	G	G	A
3776	NS2A	T	T	T	C	9954	NS5	G	C	G	G
3801	NS2A	T	T	T	C	9971	NS5	G	A	G	G
3929	NS2A	C	C	T	C	9978	NS5	T	C	T	T
4106	NS2A	A	G	G	A	9995	NS5	T	C	T	T
4250	NS2A	G	A	A	A	10046	NS5	A	A	A	G
4403	NS2B	G	T	T	G	10139	NS5	T	T	T	C
4408	NS2B	G	G	G	A	10217	NS5	C	C	T	T
4475	NS2B	G	C	G	G	10428	3'NC	C	C	C	T
4782	NS3	G	G	G	A	10551	3'NC	A	G	G	G
4825	NS3	A	A	A	G	10574	3'NC	C	T	C	C
4921-22	NS3	GC	GC	GC	CT	10701	3'NC	G	C	C	C
4922	NS3	C	T	T	T	10771	3'NC	A	G	G	G
5230	NS3	C	T	T	T	10781	3'NC	C	C	T	C
5234	NS3	T	T	T	C	10949	3'NC	G	C	G	G
5311	NS3	C	T	T	T	10950	3'NC	C	G	C	C

Vaccine: SA₁₄-14-2 in our study; JEVSAA: SA₁₄-14-2 in Japan; JEVSAV: SA₁₄ in Japan.

表2 SA₁₄-12-1-7 与 SA₁₄-14-2 疫苗株、野毒株 SA₁₄ 基因组推断氨基酸序列的比较Table 2 Comparison of amino acid difference among attenuated strain SA₁₄-12-1-7, vaccine SA₁₄-14-2 and their parent SA₁₄ strain

AA	nt	Region	毒株 Strains			
			12-1-7	Vaccine	JEVSAA	JEVSAV
11	127	C	S	N	N	N
66	292	C	S	S	S	L
74	316	C	R	K	K	K
94	375	C	T	A	A	A
308	1017	E	R	G	G	G
401	1296	E107	F	F	F	L
432	1389	E138	K	K	K	E
470	1503	E176	V	V	V	I
471	1506	E177	T	A	A	T
558	1769	E264	H	H	H	Q
573	1813	E279	K	M	M	K
609	1921	E315	A	V	V	A
628	1977	E334	P	P	P	S
733	2293	E439	R	R	R	K
1086	3351	NS1	G	S	S	G
1133	3493	NS1	R	M	M	R
1145	3538	NS1	D	H	H	D
1148	3539	NS1	K	K	K	N
1186	3653	NS1	A	V	V	A
1436	4403	NS2B	E	D	D	E
1438	4408	NS3B	L	F	L	L
1460	4475	NS2B	L	F	L	L
1563	4782	NS3	V	V	V	M
1577	4825	NS3	K	K	K	R
1609	4921-22	NS3	G	G	G	A
1712	5230	NS3	T	I	I	I
1739	5311	NS3	A	V	V	V
1967	5994	NS3	S	G	G	G
2180	6634	NS4A	A	V	V	V
2270	6904	NS4A	A	V	V	V
2304	7005	NS4A	V	M	M	M
2378	7227	NS4A	V	V	I	I
2558	7768	NS5	G	A	A	A
2572	7809	NS5	R	S	R	R
2611	7926	NS5	C	R	R	R
2658	8067	NS5	H	D	D	D
2722	8261	NS5	M	I	M	M
2913	8832	NS5	H	Y	Y	H
3166	9593	NS5	Q	H	Q	Q
3198	9688	NS5	V	A	A	V
3268	9898	NS5	G	G	G	D
3287	9954	NS5	A	P	A	A
3295	9978	NS5	L	V	L	L

Vaccine: SA₁₄-14-2 in our study; JEVSAA: SA₁₄-14-2 in Japan; JEVSAV: SA₁₄ in Japan.

2.3 SA₁₄-12-1-7 株与 SA₁₄-14-2 株和 SA₁₄ 株氨基酸序列比较

将根据 SA₁₄-12-1-7 株基因组推断的氨基酸序列与 SA₁₄-14-2 和 SA₁₄ 株序列进行比较, 结果见表 2。与我们所测疫苗株序列及在日本研究所发表的 SA₁₄-14-2 株相一致序列进行比较, 共有 21 个氨基酸不同, 其中 C 区 3 个, E 区 3 个, NS1 区 4 个, NS2B 区 1 个, NS3 区 3 个, NS4A 区 2 个, NS5 区 5 个。与 SA₁₄ 株序列进行比较, 共有 28 个氨基酸不同, 其中 C 区 4 个, E 区 10 个, NS1 区 1 个, NS2B 区 1 个, NS3 区 6 个, NS4A 区 3 个, NS5 区 3 个, 各株之间的同源性分别为 99.3%、99.4% 和 99.1%。

3 讨论

SA₁₄-12-1-7 株是由乙型脑炎病毒野毒株 SA₁₄ 经过在原代地鼠肾细胞上传 100 代空斑 3 次克隆后获得的减毒株, 在此基础上, 经过若干种动物体上的筛选, 获得了用于人的减毒活疫苗 SA₁₄-14-2 株, 因此, SA₁₄-12-1-7 株在减毒过程中起着非常重要的作用。SA₁₄-12-1-7 株的最主要生物学特性为减毒株, 但毒力不稳定, 容易返祖, 在鼠脑中传一代或原代地鼠肾细胞中传几代即可回复原有毒力。对于 SA₁₄-12-1-7 株基因组全序列的测定有可能阐明疫苗株减毒及其稳定性分子基础, 为现有疫苗的质量控制和新一代疫苗研制奠定基础。本研究首次对乙型脑炎减毒株 SA₁₄-12-1-7 株的基因组全序列进行测定和分析。

SA₁₄-12-1-7 株的全序列测定结果表明, 其基因组全长 10 976 个核苷酸, 序列和开放读码框架与报道的乙型脑炎病毒基本一致, 与我们所测的疫苗株 SA₁₄-14-2、日本所测的 SA₁₄-14-2 株和野毒株 SA₁₄ 株的同源性比较均在 99% 以上, 遗传学上应为同一种, 各突变位点分散于病毒基因组的各个区域, 通过比较 SA₁₄-12-1-7 减毒株、SA₁₄-14-2 疫苗株和野毒株 SA₁₄ 的序列, 希望找出与毒力、繁殖力和稳定性相关的突变位点, 从而了解病毒的减毒过程中究竟有什么基因变化。

序列比较结果表明, 从 SA₁₄ 到 SA₁₄-12-1-7 有多个位点发生突变, 导致其神经毒力的降低。其中 E 区为决定乙脑病毒毒力的主要区域, 根据文献推测与减毒关系密切的 E-138、E-176、E-315、E-439 等几个位点^[12], 其中 SA₁₄-12-1-7 株有 2 个位点发生

改变与疫苗株一致。但疫苗株中另有 2 个氨基酸 (E-177、E-279) 发生变化, 这两个位点 SA₁₄-12-1-7 株与野毒株 SA₁₄ 一致, 未发生改变, 可能与 SA₁₄-12-1-7 株毒力虽已减弱但尚不够稳定有关。

另外, 非结构蛋白氨基酸和非编码区核苷的改变也可能影响病毒的毒力和免疫性。已知黄病毒 NS1 蛋白与其免疫性相关, 而 NS3 编码病毒的蛋白酶和螺旋酶, NS5 编码依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶, 与病毒的复制有关, 属于非常保守的区域, 任何一部分的改变都可能导致复制过程的忠实性, 在本文结果中发现 NS1 区疫苗株有 5 个氨基酸改变, 而 SA₁₄-12-1-7 只有 1 个变化, 在 NS2B 和 NS5 区中疫苗株各发生 1 个或 2 个变化而 SA₁₄-12-1-7 株未变。此外, 我们对疫苗株的测序结果在 NS5 区与日本的结果有 5 个氨基酸的差异^[11], 如考虑日本的结果, 则 SA₁₄-14-2 株与 SA₁₄-12-1-7 株在 NS5 区有 7 个氨基酸的不同, 即疫苗株与野毒株比较有 7 个氨基酸位点发生改变而 SA₁₄-12-1-7 株仍保持不变, 这些结果都可能与 SA₁₄-12-1-7 株毒力不够稳定而疫苗株弱毒力十分稳定, 未发生返祖现象有关。

对病毒减毒及稳定性推测的确认有赖于进一步的功能性研究, 通过构建不同突变体或嵌合的全长基因组感染性克隆, 有可能阐明这一机制, 为研制新型疫苗的和疫苗载体奠定基础。

参考文献

- [1] Tsai T F. New initiatives for the control of Japanese encephalitis by vaccination: Minutes of a WHO/CVI meeting, Bangkok, Thailand, 13-15 October 1998[J]. *Vaccine*, 2000, 18:1-25.
- [2] Tsai T F, Chang J, Yu Y X. Japanese encephalitis vaccines[M]. In: *Vaccine*, 3rd edition, (Plotkin SA Orenstein WA eds), US, Saunders press, 1999. 672-710.
- [3] Gbler D J. Resurgent arboviral diseases as a global public health problem [A]. XIVth International Congress for Tropical Medicine and Malaria[C]. 1996. 40.
- [4] 俞永新. 流行性乙型脑炎的全球流行动态及控制策略[J]. *中国公共卫生*, 2000, 16:567.
- [5] 俞永新. 流行性乙型脑炎减毒活疫苗的研究进展[A]. 全国生物制品学研讨会论文集[C]. 1999. 7.
- [6] 俞永新, 敖坚, 雷文绪, 等. 流行性乙型脑炎病毒的变异 III: 通过地鼠肾细胞后对小白鼠及恒河猴的毒力和免疫力[J]. *微生物学报*, 1962, 8:260-269.
- [7] 李河民, 俞永新, 敖坚, 等. 流行性乙型脑炎病毒的变异 IV: SA₁₄-A 株蚀斑病毒的致病力和免疫力[J]. *微生物学报*, 1966, 12:41-49.
- [8] 俞永新, 武佩芬, 敖坚, 等. 一株免疫性进一步提高的乙脑活疫苗减毒株的选育 I: SA₁₄-14-2 弱毒株的某些生物学特性[J]. *中华微生物和免疫学杂志*, 1981, 1:88-84.
- [9] Nitayaphan S, Grant J A, Chang G J, *et al*. Nucleotide sequence of the virulent SA14 strain of Japanese encephalitis virus and its attenuated vaccine derivative, SA₁₄-14-2 [J]. *Virology*, 1990, 177:541-552.
- [10] Aihara S, Rao CM, Yu YX, *et al*. Identification of mutation that occurred on the genome of Japanese encephalitis virus during the attenuation process[J]. *Virus Genes*, 1991, 5:95-109.
- [11] 曾明, 俞永新, 董关木, 等. 乙型脑炎病毒减毒活疫苗生产株 SA₁₄-14-2 基因组全序列的测定[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2001, 21(5):535-539.
- [12] Ni H L, Chang GJ, Xie H, *et al*. Molecular basis of attenuation of neurovirulent of wild-type Japanese encephalitis virus strain SA14 [J]. *J Gen Virol*, 1995, 76:409-413.