

乙型脑炎病毒野毒株及其不同株减毒株 E 蛋白基因序列比较

范行良, 俞永新**, 李德富, 姚智慧

(中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

Comparison of Nucleotide and Deduced Amino Acid Sequences of E Protein Gene of the Wild-Type Japanese Encephalitis Virus Strain SA14 and Its Different Attenuated Derivatives

FAN Xing-liang, YU Yong-xin **, LI De-fu, YAO Zhi-hui

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China)

Abstract: For understanding the mechanism of neurovirulence attenuation of the Japanese encephalitis virus (JEV), nucleotides of the E coding region of five JE strains, one wild and four attenuated viruses, were amplified by PCR and sequenced. A comparison of the five sequences indicated that there were totally twelve nucleotides and eight amino acid differences between the vaccine strain SA₁₄-14-2 (PHK-8) and its parent SA14, in which three amino acids (E-107, E-176, E-439) were different between SA14 and SA₁₄-12-1-7, and other three amino acids (E-138, E-279, E-315) were different between SA₁₄-12-1-7 and SA₁₄-9-7 as well as SA₁₄-5-3. The SA₁₄-12-1-7 strain showed low neurovirulence but unstable, whereas all the other attenuated strains showed high stability of attenuation. Our results suggest that the mutations of E-176 (Ile→Val), E-439 (Lys→Arg) and E-107 (Leu→Phe) may contribute for the attenuation of neuroinvasion and neurovirulence and the mutations of E-138, E-279, E-315 may contribute to the attenuation of the neurovirulence and its stability.

Key words: Different attenuated JEV strains; Neurovirulence; E gene, Stability of neurovirulence

摘要: 为了解乙脑减毒活疫苗株 SA₁₄-14-2 的神经毒力减毒机制, 用 RT-PCR 方法分别扩增不同减毒程度毒株的 E 基因, 克隆、测序, 继而对各毒株序列进行比较。结果表明 SA₁₄ 强毒株与 SA₁₄-12-1-7 株间只有 3 个氨基酸发生改变 (E-107, E-176, E-439), SA₁₄-12-1-7 与 SA₁₄-9-7 和 SA₁₄-5-3 株间有另 3 个氨基酸发生改变 (E-138, E-279, E-315)。SA₁₄-9-7 株与 SA₁₄-5-3 株只有一个核苷酸 NT-405 不同, 但未引起氨基酸改变。SA₁₄-14-2 疫苗株除保留 SA₁₄-12-1-7 和 SA₁₄-9-7 所改变的 6 个氨基酸外, 另有 2 个氨基酸发生了改变 (E-177, E-264), 共计在 E 区共发生 8 个氨基酸的替代。SA₁₄-12-1-7 株的低神经毒力很不稳定而其余各株的弱毒特征很稳定。因此, E-176 (Ile→Val), E-439 (Lys→Arg) 和 E-107 (Leu→Phe) 可能与神经外和神经内毒力减弱有关。E-138 (Gul→Lys), E-315 (Ala→Val) 和 E-279 (Lys→Met) 的突变可能与神经毒力的减弱和稳定性相关。

关键词: 流行性乙型脑炎不同减毒株; 神经毒力; EG 基因; 毒力稳定性

中图分类号: R511 **文章标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2002)03-0216-05

流行性乙型脑炎病毒 (JEV) 为一正链 RNA 病毒, 基因组全长 10 976 个核苷酸, 除 5' 端 95 个核苷酸和 3' 端 585 个核苷酸为非编码区外, 其余 10 296 个核苷酸形成单一开放阅读框架 (ORF), 编码一个

收稿日期: 2001-12-28, 修回日期: 2002-02-25

作者简介: 范行良 (1970-), 男, 助理研究员, 硕士, 研究方向为分子免疫学和病毒学。

** 通讯作者: 俞永新 (-), 男, 研究员, 中国工程院院士, 研究方向为病毒学及生物制品学。Correspondence author.

3 432 个氨基酸的多蛋白前体。这个多蛋白前体经酶切后即形成 3 个结构蛋白(依次为 C、prM/M、E)和 7 非结构蛋白(依次为 NS1、NS2a、NS2b、NS3、NS4a、NS4b 和 NS5)。流行性乙型脑炎病毒的毒力、免疫原性、细胞嗜性等主要由结构蛋白,特别是 E 蛋白决定的^[1]。

为了进一步阐明乙脑病毒弱毒株 SA₁₄-14-2 减毒的分子基础,本试验对其减毒过程中不同减毒程度的另 4 株减毒株的 E 基因逐一进行序列分析,为确定乙脑病毒毒力相关位点提供更多的线索。

1 材料与方法

1.1 材料

流行性乙型脑炎病毒株强毒 SA₁₄, 鼠脑 13 代;流行性乙型脑炎减毒株 SA₁₄-12-1-7 地鼠肾细胞 6 代(HK₆);SA₁₄-9-7 株 HK₆, SA₁₄-5-3 株 HK₃, 流行性乙型脑炎病毒弱毒活疫苗株 SA₁₄-14-2 HK₈ 等均由本室保存。Vero 细胞和 BHK₂₁ 细胞为本室保存。本试验所用 SPF 小鼠及乳鼠由检定所动物繁育场提供。AMV 逆转录酶, T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司。Taq PlusI 酶购自上海生工公司。

根据已发表的序列用计算机(Oligo 5.0)辅助设计针对 E 基因的引物。上游引物(954-974):5'-CT-GTTGGTTCGCTCCGGCTTA-3', 下游引物(2547-2566):5'-TCCACCCAGGCTTCCACGTC-3'。目的基因长度为 1 613bp, 由赛百盛公司合成。

1.2 方法

1.2.1 病毒增殖 将单层形态良好的 Vero 细胞接种乙脑病毒, 37℃ 吸附 1h, 加入 10mL 细胞培养液, 37℃ 孵箱培养, 每天观察细胞病变。待细胞病变明显时收获病毒, 分装小份, 冻存于 -70℃。细胞可用于提取 RNA, 进行 PCR 扩增。

1.2.2 病毒滴度及毒力测定 按文献介绍的方法进行病毒滴度和小鼠脑内毒力测定^[2,3]。

1.2.3 RNA 的提取 采用异硫氰酸胍一步裂解法提取细胞总 RNA。

1.2.4 RT-PCR 在 0.5mL 管中, 依次加入下列各液, 充分混匀: 10 × buffer 2μL, MgCl₂ (25mmol/L) 4μL, dNTP(10mmol/L) 2μL, Rnasin 1μL, 随机引物(40pmol/μL) 1μL, 模板 RNA 10μL, AMV 0.5μL。42℃, 45min。99℃, 5min, 冰浴 5min。依次加入 MgCl₂, 25mmol/L 2μL, 10 × buffer 3μL, 上下游引物(10pmol/μL) 各 5μL, 无菌水 14μL, Taq PlusI 酶

1μL。94℃, 50s; 55℃, 50s; 72℃, 1min30s。35 个循环。72℃ 延伸 15min。PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 用博大公司玻璃奶试剂盒进行常规纯化。

1.2.5 感受态细菌的制备 以 Inv α F 菌为宿主菌, 用 CaCl₂ 法常规制备感受态菌。

1.2.6 连接 向 0.5mL 离心管中依次加入 5μL 蒸馏水, 1μL 10 × buffer, 2μL PCR 2.1 载体(Invitrogen 公司), 1μL PCR 产物, 1μL T4DNA 连接酶。12℃ 恒温反应 4-12h。

1.2.7 转化 常规方法将连接产物转化入宿主菌 Inv α F, 37℃ 培养过夜。通过蓝白斑, 氨苄抗性, 酶切及 PCR 筛选阳性质粒。

1.2.8 序列测定 由六合通公司用双脱氧法测定。

2 结果

2.1 不同毒株的毒力和稳定性

不同毒株对 10-12 克小鼠的脑内和腹腔毒力见表 1。

表 1 乙脑强毒和不同弱毒株的毒力和稳定性

Table 1 The neuro-attenuation and its stability of JE wild and its different attenuated virus strains

毒株名称 Virus strain	滴度 LogPFU/mL	毒力 Virulence		LogLD ₅₀ /0.03mL ^a
		IC	IP	
SA ₁₄	6.46	7.33*	3.77**	ND
SA ₁₄ -12-1-7	6.62	5/10***	0/10	6.0
SA ₁₄ -5-3	6.47	0/10	0/10	<1.0
SA ₁₄ -14-2	7.17	0/10	0/10	<1.0

注: * LogLD₅₀/0.03mL, ** LogLD₅₀/0.3mL, *** 死亡只数/试验只数(No. Survivor/No. Tested); IC, 脑内; IP, 腹腔内; a, 乳鼠脑内回传代 1 代(Virulence after one IC passage in suckling mice)。

表 1 结果表明 SA₁₄-12-1-7 的脑内毒力已明显下降, 但很不稳定。通过乳鼠脑内 1 代后, 毒力即回升至接近其母株 SA₁₄ 的毒力水平, 而 SA₁₄-5-3 株和 SA₁₄-14-2 疫苗株则不但毒力很低, 而且无返祖现象。该结果与以往报道一致^[2,3]。

2.2 不同毒株的 E 区核苷酸序列测定及相应的氨基酸序列

用 RT-PCR 的方法分别对 5 株乙脑病毒 E 基因进行扩增, 克隆, 测序, 并用计算机进行了序列比较。结果显示: E 基因全长 1 500bp, 编码 500 个氨基酸。各毒株的核苷酸及氨基酸序列基本稳定, 从野毒株 SA₁₄ 到 SA₁₄-14-2 疫苗株(PHK8 代)有 12 个

碱基和8个氨基酸发生了改变(见表2,表3)。

流行性乙型脑炎野毒株 SA₁₄与减毒株 SA₁₄-12-1-7 间有7个核苷酸发生了变异(NT-1061, NT-1115, NT-1296, NT-1503, NT-2186, NT-2293, NT-2441),并导致了3个氨基酸发生了改变,分别为 E-107(L→F), E-176(I→V), E-439(K→R)。由核苷酸变异的情况可以看出,在7个变异位点中,位于5'端的3个位点均为 T-C 变异,后4个位点均为 A-G 变异,即都是嘧啶碱嘧啶碱或嘌呤碱-嘌呤碱之间的互变。

自 SA₁₄-12-1-7 株至 SA₁₄-9-7 株又发生4个核苷酸突变(NT-1382, NT-1389, NT-1813, NT-

1921),导致3个氨基酸发生了改变:E-138(E→K), E-279(K→M), E-315(A→V)即由 SA₁₄ 原株至 SA₁₄-9-7 发生11个核苷酸和6个氨基酸的替代。

SA₁₄-9-7 株与 SA₁₄-5-3 株间有一个核苷酸 NT-1382 发生回复突变至原株和 SA₁₄-12-7 株。从表2中可以看出,这一突变并未引起所编码氨基酸的改变。

SA₁₄-14-2 疫苗株除保持 SA₁₄-5-3 株10个核苷酸突变外,另外发生2个独特的核苷酸突变(NT-1506, NT-1769),相应的氨基酸也发生了改变:E-177(T→A), E-264(Q→H)。因此与 SA₁₄ 原株比较共产生12个核苷酸,8个氨基酸的变化。

表2 各减毒毒株突变核苷酸

Table 2 Comparison of nucleotide differences in E coding region between JE wild-type and four strains of attenuated JE viruses

核苷酸位点 Location of nt	SA ₁₄ (M ₁₃ V ₂)	SA ₁₄ -12-1-7 (HK ₆ V ₂)	SA ₁₄ -9-7 (HK ₆ V ₂)	SA ₁₄ -5-3 (HK ₃ V ₂)	SA ₁₄ -14-2 (HK ₈ V ₂)
1061 ³	T(GAT)	C(GAC)	C(GAC)	C(GAC)	C(GAC)
1115 ³	C(ATC)	T(ATT)	T(ATT)	T(ATT)	T(ATT)
1296 ¹	C(CTT)	T(TTT)	T(TTT)	T(TTT)	T(TTT)
1382 ³	C(ATC)	C(ATC)	T(ATT)	C(ATC)	C(ATC)
1389 ¹	G(GAA)	G(GAA)	A(AAA)	A(AAA)	A(AAA)
1503 ¹	A(ATA)	G(GTA)	G(GTA)	G(GTA)	G(GTA)
1506 ¹	A(ACC)	A(ACC)	A(ACC)	A(ACC)	G(GCC)
1769 ³	G(CAG)	G(CAG)	G(CAG)	G(CAG)	T(CAT)
1813 ²	A(AAG)	A(AAG)	T(ATG)	T(ATG)	T(ATG)
1921 ²	C(GCG)	C(GCG)	T(GTG)	T(GTG)	T(GTG)
2186 ³	A(CTA)	G(CTG)	G(CTG)	G(CTG)	G(CTG)
2293 ²	A(AAA)	G(AGA)	G(AGA)	G(AGA)	G(AGA)
2441 ³	G(GGG)	A(GGA)	A(GGA)	A(GGA)	A(GGA)

注:核苷酸右上角标出的是突变核苷酸在密码子中所处的位置。

Note: 1, 2 and 3 represent the location of nucleotide codon, respectively.

表3 各毒株氨基酸突变

Table 3 Comparison of amino acid differences in E coding region between JE wild-type and four strains of attenuated JE viruses

核苷酸位点 Location of nt	氨基酸位点 Location of aa	SA ₁₄ (M ₁₃ V ₂)	SA ₁₄ -12-1-7 (HK ₆ V ₂)	SA ₁₄ -9-7 (HK ₆ V ₂)	SA ₁₄ -5-3 (HK ₃ V ₂)	SA ₁₄ -14-2 (HK ₈ V ₂)
1296 ¹	E-107	L(Leu)	F(PHE)	F(PHE)	F(PHE)	F(PHE)
1389 ¹	E-138	E(Glu)	E(Glu)	K(LYS)	K(LYS)	K(LYS)
1503 ¹	E-176	I(Ile)	V(VAL)	V(VAL)	V(VAL)	V(VAL)
1506 ¹	E-177	T(Thr)	T(Thr)	T(Thr)	T(Thr)	A(ALA)
1769 ³	E-264	Q(Gln)	Q(Gln)	Q(Gln)	Q(Gln)	H(HIS)
1813 ²	E-279	K(Lys)	K(Lys)	M(MET)	M(MET)	M(MET)
1921 ²	E-315	A(Ala)	A(Ala)	V(VAL)	V(VAL)	V(VAL)
2293 ²	E-439	K(Lys)	R(ARG)	R(ARG)	R(ARG)	R(ARG)

3 讨论

3.1 流行性乙型脑炎病毒各毒株毒力及其稳定性比较

流行性乙型脑炎的毒力可分为神经内毒力和神经外毒力。神经外毒力是指病毒在外周组织复制,导致病毒血症,并侵入中枢神经系统的能力。神经内毒力是指病毒直接感染中枢神经系统并引起脑炎的能力。流行性乙型脑炎不同毒株之间具有不同的神经内和神经外毒力。

SA14 株乙脑病毒减毒过程大致为:SA14 野毒株乙脑病毒鼠脑内传 11 代,在 PHK 细胞中传 100 代,再经 3 次空斑纯化,筛选出减毒株 SA₁₄-12-1-7。SA₁₄-12-1-7 经小鼠腹腔和皮下各 1 代,蚀斑纯化 5 次,得到 SA₁₄-9-7 株。后者经地鼠口服传 6 代,蚀斑纯化 2 次得到 SA₁₄-5-3 株。将 SA₁₄-5-3 株在乳鼠皮下传 5 代,蚀斑纯化 2 次后得到 SA₁₄-14-2^[2]。

根据已有资料,从 SA14 到 SA₁₄-12-1-7,神经外毒力已丧失,神经内毒力已有明显下降,但减毒不稳定,在乳鼠脑内回传 1 代,脑内毒力明显升高,LogLD₅₀ 高达 6.0。SA₁₄-12-1-7 至 SA₁₄-9-7 是弱毒力稳定的关键阶段。用 SA₁₄-9-7 株进行小鼠脑内接种,小鼠全部存活,而且乳鼠脑内回传一代仍无或仅个别小鼠死亡,说明减毒彻底。此阶段后,毒力一直稳定在较低的水平,在之后的各种传代过程中未发生毒力恢复。说明这个阶段与毒力相关的重要基因位点发生了突变,且此突变保持到了 SA₁₄-14-2。

3.2 毒力与基因变异的关系

流行性乙型脑炎病毒的 E 蛋白包裹于乙脑病毒表面,与多种重要的生物学活性密切相关。最近通过对乙脑印度株^[4]和森林脑炎^[5]的研究表明,与流行性乙型脑炎病毒毒力相关的位点可能集中于 3 个区域:①第 III 结构域的远侧面。此处有一类似 IgC 的结构,可能与病毒的吸附有关;②第 II 结构域的底部。此处可能具有 PH 依赖的融合活性;③第 I/III 结构域交界处与 cd 环相对的区域。此外,少数第 I 结构域氨基酸的突变可能导致病毒毒力的改变,如糖基化位点 E-154^[5,6]。

3.3 本文结果与以往结果的比较

野毒株 SA14 与 SA₁₄-14-2 疫苗株共发生 12 个核苷酸和 8 个氨基酸的改变,与 Aihara 的测序结果比较,在核苷酸序列上有二位点(1115 和 2186)不一致,这二个核苷酸的改变未引起氨基酸变化^[7]。因

此氨基酸的变化与 Aihara 的报告完全一致。但与 Ni 等的报告有较多的不一致^[8,9],这可能因为其所用的毒株不是 SA₁₄-14-2 原毒株,而是经过狗肾细胞再传 9 代后的毒种。

3.4 SA14 株与 SA₁₄-12-1-7 株 E 基因的比较

野毒株 SA14 与减毒株 SA₁₄-12-1-7 共有 7 个核苷酸和 3 个氨基酸(E-107, E-176, E-439)发生了改变。其共同作用的结果使乙脑病毒毒力减弱。

E-107 由亮氨酸(Leu)变为异亮氨酸(Phe),是非极性氨基酸之间的改变,疏水性有所升高。但此位点在另一减毒株 SA₁₄-2-8 和野毒株中一样,都为 Leu,其变化可能与毒力关系不大。E-439 由带正电荷的赖氨酸(Lys)变为所有氨基酸中正电荷性最强的精氨酸(Arg)。从 DNASTAR 分析结果可以看出,此位点的改变使 α 螺旋和 β 转角趋势有所减弱。E-176 由异亮氨酸(Ile)变为缬氨酸(Val),疏水性略有降低。因此分析在此减毒过程中,E-176 和 E-439 在所有已知相关减毒株中都发生了相同的突变,其突变可能与神经外毒力消失和神经内毒力明显下降有关^[8-10]。

3.5 SA₁₄-12-1-7 与 SA₁₄-9-7 株 E 基因的比较

乙脑病毒 SA₁₄-12-1-7 与 SA₁₄-9-7 株 4 个核苷酸不同,又发生 3 个氨基酸的突变,E-138(E→K),E-279(K→M),E-315(A→V)。E-138 位于第 II 结构域的底部。由于这是由一个酸性氨基酸(Glu)变为了一个碱性氨基酸(Lys),氨基酸的极性发生了明显的改变,从而使原本相吸的分子变为相斥,原本相斥的分子相互吸引,所以可能对 E 蛋白的二级结构乃至三级结构产生影响。从 DNASTAR 分析结果可以看出,由于此氨基酸的替代新产生了一个 β 折叠和 β 转角,进一步证明了这种推测。此变化位点距 E 蛋白的糖基化位点仅 166p,从 E 蛋白的空间构象上可以看到,由于有一个折叠的存在,使 E-138 与糖基化位点 E-154 更为接近,因此新生成的 β 折叠和 β 转角是否会对糖基化位点造成影响,值得进一步探讨。乙脑病毒进入宿主细胞是通过受体介导的胞饮作用。Sumiyoshi 等用建立感染性 cDNA 克隆型间嵌合体的方法证明了乙脑病毒 E-138 的突变可以改变乙脑病毒与 BHK₂₁ 细胞 57kDa 蛋白的结合能力,并对小鼠脑内感染丧失致病力,这说明此位点与受体结合和膜融合等生物活性密切相关^[11]。

E-279 由带正荷的赖氨酸(Lys)变为非极性的蛋氨酸(Met),导致了此处 α 螺旋、 β 转角倾向的减

弱,并更容易产生 β 折叠和无规则卷曲。这可能对E蛋白的结构产生了一定的影响。

E-315由丙氨酸(Ala)变为缬氨酸(Val),疏水性有所增高,并使此处的无规则卷曲变为 β 转角,E-315在所有已知的乙脑病毒野毒株中都是保守的,提示此位点与毒力减弱也有相关。

因此,这三个氨基酸的改变可能对乙脑病毒神经内毒力的减弱和稳定最为关键。此外,与SA₁₄株至SA₁₄-12-1-7株减毒过程相比,错义突变率由50%上升至75%,说明存在一定的选择性压力。

3.6 SA₁₄-14-2疫苗株与SA₁₄-9-7株E基因的比较

如上所述,SA₁₄-9-7株已经是弱毒稳定的毒株,基因比较结果表明SA₁₄-14-2株的E基因除1个回复突变外全部保留了SA₁₄-9-7株基因的特点,另外又发生2个基因和2个氨基酸E-177(T→A),E-264(Q→H)的突变。这二个突变基因与试验中所有弱毒株和文献报道的SA₁₄-14-2/PDK株,SA₁₄-2-8以及SA14强毒株都不相同,是SA₁₄-14-2所特有的。已知SA₁₄-14-2株的免疫原性明显高于SA₁₄-9-7株,与这二个氨基酸变化是否有关有待进一步研究。

参考文献

- [1] 白登云,陈伯权,俞永新.虫媒病毒与虫媒病毒病[M].昆明:云南科技出版社,1995.
- [2] 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.1.SA14-14-2弱毒株某些生物学特性[J].中华微生物和免疫学杂志,1981,1:77-84.
- [3] 俞永新,敖坚,朱荫耕,等.流行性乙型脑炎病毒的变异V.活疫苗弱毒株的生物学特性[J].微生物学报,1973,13:16-24.
- [4] Kolaskar A S, Kulkarni-Kale U. Prediction of three-dimensional structure and mapping of conformational epitopes of envelope glycoprotein of Japanese encephalitis virus[J]. *Virology*, 1999, 261:31-42.
- [5] Rey F A, Heinz F X, Mandl C, *et al.* The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2A resolution[J]. *Nature*, 1995, 375:291-298.
- [6] Kawano H, Rostapshov V, Rosen L, *et al.* Genetic determinations of Dengue type 4 virus neurovirulence for mice[J]. *Virus Research*, 1993, 67:6567-6575.
- [7] Aihara S, Rao C M, Yu Y X, *et al.* Identification of mutations that occurred on the genome of Japanese encephalitis virus during the attenuation process[J]. *Virus Genes*, 1991, 5:95-109.
- [8] Haolin Ni, Burns N J, Chang G J, *et al.* Comparison of nucleotide and deduced of the 5' non-coding region and structural protein genes of the wide-type Japanese encephalitis virus strain SA14 and its attenuated vaccine derivatives[J]. *J Gen Virol*, 1994, 75:1505-1510.
- [9] Haolin Ni, Gwong-Jen Chang, Xie H, *et al.* Molecular basis of attenuation neurovirulence of wild-type Japanese encephalitis virus strain SA14[J]. *J Gen Virol*, 1995, 76:409-413.
- [10] Mangada M N M, Takegami T T. Molecular characterization of the Japanese encephalitis virus representative immunotype strain. JaGAx01[J]. *Virus Research*, 1999, 59:101-112.
- [11] Suniyoshi H, Tignor G H, Shope R E. Characterization of a highly attenuated Japanese encephalitis virus generated from molecularly cloned cDNA[J]. *J Infect Dis*, 1995, 171:1141-1151.