

# 一起家庭聚集性麻疹爆发的病原基因型鉴定与分析

高赛珍\*，谢颖，欧慧，吴衍恒，王翠玲，朱远峰，罗小铭

广东省中山市疾病预防控制中心，邮编：528403

**【摘要】目的：**对2014年4月中山市一起麻疹家庭聚集性爆发的病原，进行基因型别鉴定与分子特征分析，了解中山市流行麻疹野病毒的基因型。**方法：**采集了3份病人的急性期咽拭子，通过RT-PCR和基因测序技术获取麻疹核蛋白基因碳末端450个核苷酸片段，分析基因型别及分子特征，并与WHO建议的参考株及沪191疫苗株进行比对，采用Neighbor-Joining方法构建麻疹核蛋白核苷酸序列系统发育树。**结果：**3份病例样本的核蛋白碳末端序列核苷酸同源性和为100%，均为H1型。样本序列与沪疫苗株191的核苷酸同源性为92%，氨基酸同源性为88%；与WHO参考株（Hunan,CH/93/7-AF045212）同源性为97%，氨基酸同源性为95%，且产生6个氨基酸替换，其中第84个位点由丙氨酸替代为丝氨酸，蛋白质极性发生改变。**结论：**引起此次家庭聚集性爆发的麻疹病毒为同一来源，基因型别为H1型；病毒出现了新的氨基酸位点突变，需进一步监测与跟踪。

**【关键词】**麻疹病毒；基因测序；N基因；分子特征；

## Genotype identification and molecular characterization analysis of a family cluster of measles virus

GAO Shai-zhen, XIE Ying, OU Hui, WU Yanheng, WANG Cuiling, ZHU Yuanfeng, LUO Xiaoming

(ZhongShan Center for Disease Control and Prevention, ZhongShan, 528400, GuangDong, China)

**[Abstract] Objective:** The purpose of this study is to genetically identify and characterize the wild type measles virus that responsible for the family measles outbreak at Zhongshan city, in April, 2014. **Methods:** Pharyngeal swabs from 3 patients of acute phase were collected. The nucleocapsid (N) gene (450 bp) was measured by RT-PCR and sequenced. The genotype and molecular characteristics of the nucleocapsid fragment was then analyzed and compared with both WHO reference strain (Human,CH/93/7-AF045212) and Shanghai 191 strain. Phylogenetic distance between the measles virus in this study and the reference strains were evaluated by generating the phylogenetic tree using the neighbor-joining method. **Results:** Nucleocapsid sequences of the 3 patients had 100% similarity and phylogenetically associated with H1 type. When comparing the nucleocapsid virus in this study with the WHO reference strain and Shanghai 191 strain, 97% and 92% nucleotide similarities, and 95% and 88% amino acid similarities were found, respectively. In addition, 6 amino acids mutation were found including 1 serine substitution by alanine at the 84th locus, causing protein polarity change. **Conclusion:** 3 nucleocapsid virus samples in this study had the same phylogenetic origin and associated with H1 type. Mutations of amino acid at new sites were identified which highlighted the needs for further attention.

中山市科技局医学科研立项课题：（20113A100）。E-mail: [HYPERLINK "mailto:hengfeng@21cn.com"1979750869@qq.com](mailto:hengfeng@21cn.com)—

中山市科技局医学科研立项课题：（20113A100）。E-mail: [1979750869@qq.com](mailto:1979750869@qq.com)。

**[Key words]**measles virus; gene sequencing; nucleocapsid (N) genes; molecular characterization

麻疹是由麻疹病毒感染引起的一种传染性极强,以发热、出疹和呼吸道卡他症状为主要临床表现的传染病。麻疹病毒属于副黏病毒科麻疹病毒属,球形或丝形,直径约120~250 nm,负链RNA,不分节段,基因组全长约16 kb,基因组有N、P、M、F、H、L 6个基因,分别编码6个结构和功能蛋白。麻疹病毒核苷酸变异主要发生在核蛋白基因(N)和血凝素蛋白基因(HA)。麻疹病毒仅有一个血清型,但通过分子生物学手段可将麻疹病毒划分为A-H共8个基因组,23个基因型<sup>[1-2]</sup>。麻疹病毒的基因定型可通过HA全长编码序列或N基因的碳末端450个核苷酸序列来进行。

2014年4月中山市某镇发生一起麻疹聚集性爆发疫情。为了解该次疫情麻疹病原的基因型别及其N基因的变异情况,初步确定病毒的来源及传播途径,本研究对该次疫情中获得的麻疹病毒毒株的N基因碳末端450bp序列进行了序列测定及分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本来源

本研究所用咽拭子样本,采集于2014年4月发生于中山市某镇的麻疹聚集性爆发疫情。本次聚集性爆发疫情中,首例患者为卢某某(女,5个月),于2014年3月30日发病;4月11日,患者母亲梁某某(31岁)及患者姐姐卢某某(10岁)同时发病,4月16日,患者父亲卢某某(36岁)开始发病。对其中3例患者急症期内的咽拭子样本用于核酸检测及序列测定,分别命名为14ZSDF00A,14ZSDF00B,14ZSDF00C。

### 1.2 试剂及仪器

病毒RNA提取试剂为Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit (Promega, USA);核酸扩增(RT-PCR)试剂为PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver.2 (大连宝生物),PCR仪为ABI Fast 7500 real-time PCR system。获得目标产物后,交由华大基因广州分公司进行测序。

## 1.3 方法

### 1.3.1 咽拭子样品总RNA提取

咽拭子样本4000 rpm离心1 min,取上清200 μL按试剂盒说明书提取总RNA,于-20℃保存备用。

### 1.3.2 N基因碳末端核苷酸片段扩增

参照文献设计上游引物 p1:5'-TAA CAA TGA TGG AGG GTA GG-3', 下游引物为 p2: 5'-TGG AGC TAT GCC ATG GGA GT-3', 由华大基因公司合成。使用 TAKARA 一步法试剂盒 (PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver.2) 进行 PCR 实验, PCR 反应条件如下: 50 °C 30 min, 95 °C 5 min; 94 °C 30 sec, 50 °C 30 sec, 72 °C 30 sec, 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 保存。结束后于 1.5 % 琼脂糖电泳。

### 1.3.3 核苷酸序列分析

根据 WHO 提供的方法, 用 MEGA 5.0 软件将 N 基因碳末端 450 bp 序列与 Genbank 中的 8 个基因组、23 个基因型的代表序列进行分析比对, 构建系统发育树, 获得毒株的 N 基因序列分型。并对比其氨基酸变化情况。

## 3 结果

3.1 RT-PCR 结果: 3 份采集于急性期患者的咽拭子样本经 RT-PCR 扩增, 琼脂糖电泳鉴定, 均获得大小约 450 bp 的预期片段。

3.2 对从三份咽拭子样本 (14ZSDF00A, 14ZSDF00B, 14ZSDF00C) 获得 N 基因碳末端 450 bp 序列进行对比, 其序列同源性的为 100%, 450 bp 序列完全一致。仅取一条 (14ZSDF00A) 登陆至 GenBank, 获取登陆号: KJ994347。

3.3 使用 MEGA 5.0, 对麻疹病毒 23 个基因型的代表毒株以及本次爆发疫情中 3 份样本构建系统发育树 (图 1)。系统发育树显示, 此次爆发疫情获得到的麻疹病毒序列与 Hunan, CH/93/7 (WHO 推荐的 H1 参考株, GenBank 序列号为 AF045212) 属于同一组, 为 H1 基因型。

3.4 核酸及氨基酸序列比对结果显示: 本次疫情获得的麻疹病毒序列与沪疫苗株 191 的核苷酸同源性为 92%, 氨基酸同源性为 88%; 与 WHO 参考株 (Hunan, CH/93/7-AF045212) 同源性为 97%, 氨基酸同源性为 95%。其中相对于 WHO 参考株, 此次麻疹病毒序列分别在 47 位 (S-G), 82 位 (G-S), 84 位 (A-S), 109 位 (E-D), 122 位 (K-R) 130 位 (P-L) 氨基酸发生变异 (表 1)。

表 1: 中山市 MV 病原与 WHO 参考株 (Hunan, CH/93/7) 氨基酸替代分析

麻疹病原	N 基因氨基酸位置					
	47	82	84	109	122	130
Hunan, CH/93/7	G	S	S	D	R	L
分离株 14ZSDF00A	S	G	A	E	K	P

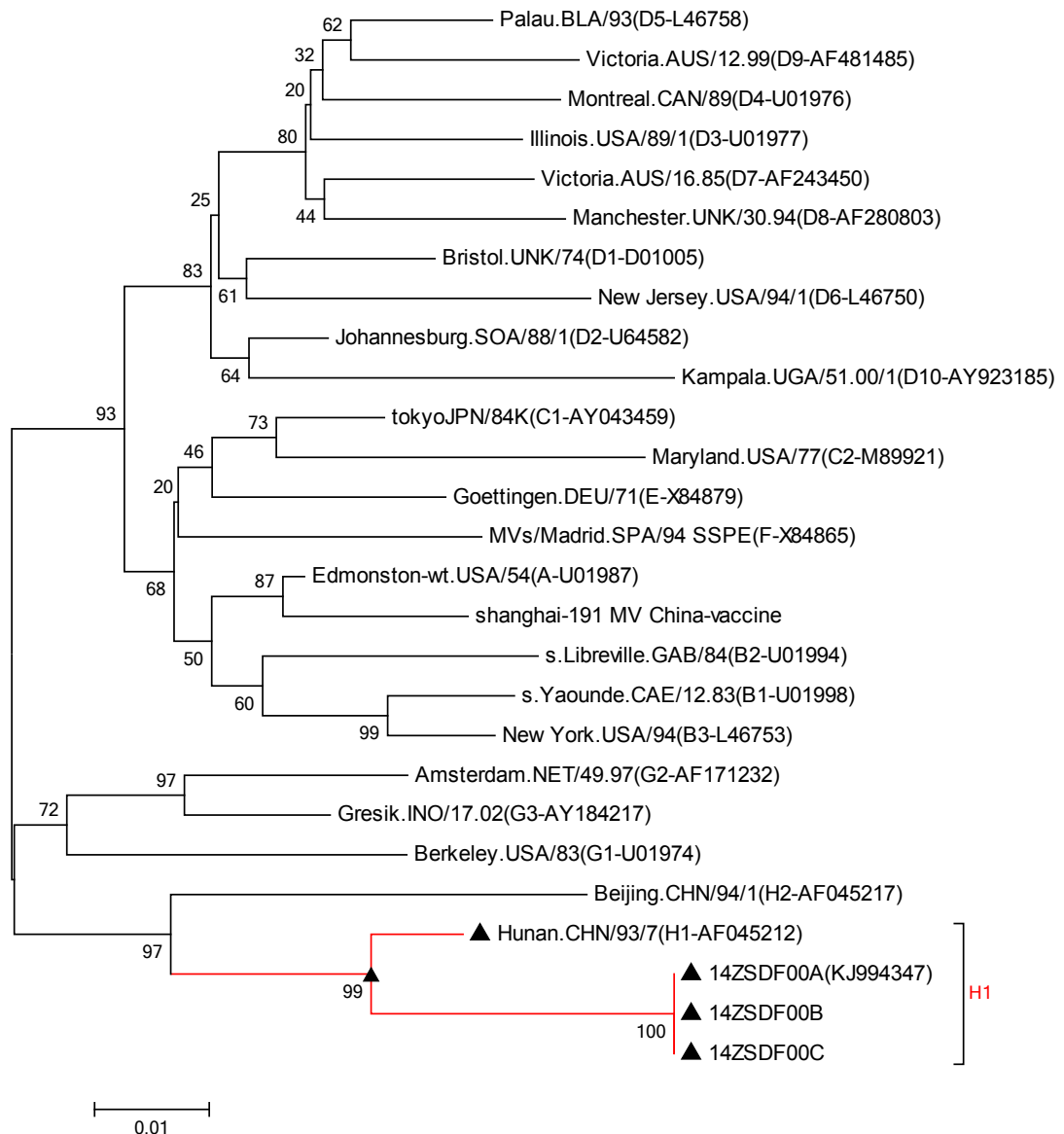


图 1：基于麻疹病毒 N 基因碳末端 450bp 序列应用 Neighbor-Joining 法构建的系统发育树

#### 4 讨论

三份咽拭子样本（14ZSDF00A, 14ZSDF00B, 14ZSDF00C）的麻疹病毒 N 基因碳末端 450 bp 序列同源性的 100%，从分子生物学方面证明此次爆发疫情的感染源相同；并且三份咽拭子样本中的麻疹病毒与沪 191 疫苗株核酸序列同源性仅为 92%，属不同组的不同基因型，排除疫苗株感染的可能。该三份咽拭子样本中的麻疹病毒与 Hunan, CHN/93/7 株序列同源性为 97%，且落在同一个系统发育簇中（图 1）。1998 年，许文波等<sup>[4]</sup>通过对中国麻疹病毒流行株进行分子生物学分析，发现我国流行株与其他国家流行株在基因型上存在差异。同年，WHO 根据中国科学家研究成果<sup>[4]</sup>，重新划分了麻疹病的基因型，新增了 H 基因型”；2001 年 WHO 又将 H 基因型分为两个亚型，分别为 H1 基因型（Hunan,

CH/93/7 为代表株)和 H2 基因型 (China94\_1 为其代表株)。因此根据以上数据及毒株基因系统发育关系 (图 1), 此次爆发疫情分离的三例患者的麻疹病原为同一来源, 属 H1 型。这一结果, 与近年来全国及广东省监测结果<sup>[5-8]</sup>一致。

据相关研究, 麻疹核心蛋白基因序列中 3 个抗原决定簇主要存在于 122-150、457-476、519-525 的氨基酸序列<sup>[9-11]</sup>, 此次爆发样本核蛋白碳末端的 150 个氨基酸中出现 6 个新的氨基酸替换位点, 其中第 84 个位点发生变异, 由丙氨酸替代为丝氨酸, 蛋白由疏水性变成亲水性。而此位点刚好在第三个抗原决定簇附近, 此变异是否会影响病毒抗原和致病力, 尚需深入研究。

2009 年中山市实施麻疹疫苗强化接种, 麻疹发病率得到有效控制, 但麻疹在局部地区仍然呈现散发流行状态。目前我市对麻疹病例的调查和监测, 绝大部分只局限于血清学、临床流行病学水平, 因此有必要在我市开展麻疹病例的分子流行病学调查, 以此获得我市麻疹病毒的基因型别, 确定优势基因型并从分子水平揭示麻疹病毒的起源地和传播途径。这对我市科学修订或制定麻疹强化控制和消除策略具有重要意义。

#### [参考文献]

- [1]WHO. Update of the nomenclature for describing the genetic characteristics of wild-type measles viruses: new genotypes and reference strains [J]. Wkly Epidemiol Rec, 2003, 78(27): 229-232.
- [2]WHO. Global measles and rubella laboratory network-update [J]. Wkly Epidemiol Rec, 2005, 80(44):384-388.
- [3] 姬奕昕. 麻疹病毒新基因型和麻疹病毒基因型在全球分布的最新研究[J]. 中国计划免疫, 2006, 12(2) :156-157.
- [4]许文波. 麻疹病毒的分子流行病学[J].中国计划免疫, 2001, 7(1):54-59
- [5]鄢心革,柯昌文,罗耀星,等.广东省流行麻疹野病毒的核蛋白基因序列分析[J]. 中国计划免疫, 2003, 9( 2) : 101- 104.
- [6]刘冷,郑焕英,郭雪,等.广东省2005—2007年麻疹病原学监测[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2008, 22( 6):406-408
- [7]王叶子,吴晓冰,刘金祥,等. 东莞市长安镇2004-2010年麻疹流行特征分析及消除麻疹措施评价[J]. 实用预防医学, 2012, 19(07):1012-1014
- [8]刘卫民,何梅英,马茂. 深圳市罗湖区1990-2011年麻疹流行病学特征及防控措施分析[J]. 实用预防医学,2012, 19(10):1483-1485
- [9] Buckland R1, Giraudon P, Wild F. Expression of measles virus nucleoprotein in Escherichia coli: use of deletion mutants to locate the antigenic sites [J]. J Gen Virol, 1989, 70: 435- 441

- [10] Nanan R, Carstens C, Kreth HW. Demonstration of virus-specific CD8<sup>+</sup> memory T cells in measles-seropositive individuals by in vitro peptide stimulation [J]. Clin Exp Immunol, 1995, 102(1): 40- 45
- [11] Marttila J, Ilonen J, Norrby E, *et al.* Characterization of T cell epitopes in measles virus nucleoprotein [ J]. J Gen Virol, 1999, 80(7):1609- 1615.