

SARS冠状病毒S2基因变异性分析

严重急性呼吸综合征(SARS)又称传染性非典型肺炎,是一种新发现的传染病,其病原体为SARS冠状病毒(SARS-CoV) [1]。SARS-CoV S2基因全长1 605 bp, S2蛋白在病毒与宿主细胞的融合、病毒的出芽、胞外分泌以及介导细胞免疫等方面具有重要作用[2]。本研究对SARS-CoV GD322株S2基因测序,并收集早、中、晚期不同地区流行株的S2基因序列,利用生物信息学软件,分析了S2基因的变异规律。

1 材料与方法

1.1 SARS-CoV GD322株S2基因序列测定

根据GenBank提供的SARS-CoV BJ01株基因组全序列(AY278488),利用Lasergene -Primer Select软件设计引物。上游引物序列是“5'-CCT GTTTC-TATG GCTAAAACC -3'”;下游引物序列是5'-CTG-GCTGTGCAGTAATTGATC -3'。由上海博亚生物技术有限公司合成。采用RNeasy Mini Kit(QIAGEN公司),SARS-CoV GD322(广东地区SARS流行早期分离株[4]) Vero E6细胞培养上清中提取RNA。

提取RNA后立即进行逆转录。总体积20 μ l,其中RNase Inhibitor(TaKaRa) 1 μ l 20 mmol/L的dNTPs 1 μ l、AMV (TaKaRa)1 μ l、5 \times 缓冲液4 μ l、下游引物ST25240 1 μ l、水2 μ l、RNA模板10 μ l。反应条件:42 $^{\circ}$ C 1 h, 95 $^{\circ}$ C 5 min。

使用TaKaRa公司ExTaq酶进行PCR反应。反应液包括:2.5 mmol的dNTPs 3 μ l、10 \times PCR buffer 3 μ l、上游引物1 μ l、下游引物1 μ l、ExTaq 0.5 μ l、cDNA模板5 μ l、水16.5 μ l,总体积30 μ l。反应条件:94 $^{\circ}$ C, 2 min; 94 $^{\circ}$ C, 30 s, 55 $^{\circ}$ C, 1 min, 72 $^{\circ}$ C, 2 min, 30个循环; 72 $^{\circ}$ C 8 min, 4 $^{\circ}$ C保存。

使用申能博采公司DNA纯化试剂盒回收PCR产物,将回收产物与Promega公司的pGEM-T载体连接,4 $^{\circ}$ C放置12 h。将重组载体转化DH5 α 感受态细胞,于含氨苄青霉素的固体LB培养基上37 $^{\circ}$ C培养16 h,利用X-Gal和IPTG筛选阳性重组克隆。获得的阳性克隆菌分别经PCR和双酶切初步鉴定,送TaKaRa公司测序。

1.2 序列分析

采用DNAMAN软件对测序结果与BJ01株对应基因核苷酸序列进行同源性比较。另从GenBank下载11株不同时期、不同地点,并在流行过程中有联系的SARS-CoV的全基因组序列,分别输入Lasergene软件包中的Editseq软件中。截取S2基因片段,翻译成氨基酸序列,利用Clustal X软件分析不同毒株间S2蛋白氨基酸序列差异。使用TreeView软件构建系统进化树。

1.3 T细胞抗原表位预测

在Internet网数据库(http://bimas.dcr.t.nih.gov/molbio/hla_bind)中对GD322株S2蛋白的氨基酸序列进行T细胞抗原表位预测。

2 结果

2.1 S2基因扩增结果

从GD322株Vero E6细胞培养上清中提取RNA,用设计的引物进行RT-PCR,经7%琼脂糖凝胶电泳可见一约1 620 bp的片段,与预计的S2基因大小相符(图1)。



图1 RT-PCR法扩增 SARS-CoV GD322 S2基因
 Fig.1 RT-PCR amplified S2 gene of SARS-CoV GD322
 M: DNA Marker DL2000; Lane 1: Amplified S2 gene from SARS-CoV GD322 isolate

2.2 S2基因克隆

将上述PCR产物纯化回收后，与pGEM-T载体连接，转化DH5 α 感受态细胞，利用蓝白斑菌落筛选阳性重组克隆。对阳性克隆质粒进行PCR和双酶切初步鉴定，PCR产物经琼脂糖凝胶电泳分析大小约1 620 bp，阳性克隆质粒双酶切后有两条带，一条大小约1 620 bp，另一条约3 000 bp左右(图2)。

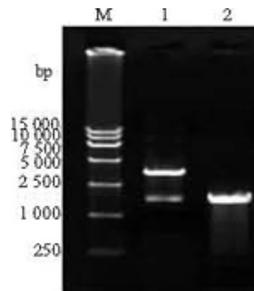


图 2 SARS-CoV GD322 S2基因重组克隆的鉴定
 Fig.2 Identification of recombinant clone of SARS-CoV GD322 S2 gene
 M: DNA Marker DL15000; Lane 1: pGEM-T S2 recombinant plasmid after double digestion by EcoRI/XhoI; Lane 2: Identification by PCR

2.3 序列测定及分析

测序结果表明，所获基因与BJ01株S2基因核苷酸序列同源性达99.6%。将其和另外11株不同时期不同地区分离的SARS-CoV S2基因进行核酸和氨基酸比对(表1)。发现与GD322株相比，11株S2基因突变位点有12个，其中非同义突变8个。所有的11株在相同的变异分别是106(D-N)、139(I-V)、231(L-F)和332(K-Q)。有3株第57位氨基酸变异(Y-D)，分别是早期分离株GD01、GZ02、GZ50。有1株427位氨基酸变异(L-F)，是中期分离株HZS2-C。

表 1 11株 SARS-CoV 与 GD322 株 S2 蛋白核酸和氨基酸序列比较
Tab.1 Comparison of the nucleic acid and amino acid sequences of GD322 S2 protein with those of another 11 SARS-CoVs

SARS-CoV isolates	Mutation of S2 gene	Mutation of S2 protein	Origin of isolation	Phase*
GD322			Guangzhou	E
GD01	120(A-T) 169(T-G) 217(C-T)244(C-T) 316(G-A) 415(A-G)691(C-T) 912(T-C) 944(A-C)	57(Y-D) 70(P-S) 106(D-N) 139(I-V) 231(L-F) 332(K-Q)	Zhongshan	E
GZ02	120(A-T) 169(T-G) 244(C-T)316(G-A) 415(A-G) 691(C-T)912(T-C)944(A-C) 1323(A-G)	57(Y-D) 106(D-N)139(I-V) 231(L-F) 332(K-Q) 442(K-E)	Shenzhen	E
GZ50	120(A-T) 169(T-G) 244(C-T)316(G-A) 415(A-G) 691(C-T)944(A-C)	57(Y-D) 106(D-N)139(I-V) 231(L-F) 332(K-Q)	Guangzhou	E
BJ01	120(A-T) 217(C-T) 244(C-T)316(G-A) 415(A-G) 691(C-T)944(A-C)	106(D-N)139(I-V) 231(L-F) 332(K-Q)	Beijing	M
HZS2-Cc	120(A-T) 217(C-T) 244(C-T)316(G-A) 415(A-G) 691(C-T)944(A-C)1279(C-T)	106(D-N)139(I-V) 231(L-F) 332(K-Q) 427(L-F)	Guangdong	M
CUHK-W1	120(A-T) 217(C-T) 244(C-T)316(G-A) 415(A-G) 691(C-T) 332(K-Q)944(A-C)	106(D-N)139(I-V) 231(L-F)	Hongkong	M
TOR2	120(A-T) 217(C-T) 244(C-T)316(G-A) 415(A-G) 691(C-T)944(A-C)1342(A-G)	106(D-N)139(I-V) 231(L-F) 332(K-Q)	Toronto	L
PUMC01	120(A-T) 217(C-T) 244(C-T)316(G-A) 415(A-G) 691(C-T)944(A-C)	106(D-N)139(I-V) 231(L-F) 332(K-Q)	Beijing	L
Sin2500	120(A-T) 217(C-T) 244(C-T)316(G-A) 415(A-G) 691(C-T)944(A-C)	106(D-N)139(I-V) 231(L-F) 332(K-Q)	Singapore	L
TaiwanTC1	120(A-T) 217(C-T) 244(C-T)316(G-A) 415(A-G) 691(C-T)944(A-C)	106(D-N)139(I-V) 231(L-F) 332(K-Q)	Taiwan	L
CUHK-AG01	120(A-T) 217(C-T) 244(C-T)316(G-A) 415(A-G) 691(C-T)944(A-C)	106(D-N)139(I-V) 231(L-F) 332(K-Q)	Hongkong	L

*E: Early stage of SARS epidemic; M: Intermediate stage of SARS epidemic; L: Late stage of SARS epidemic

2.4 系统进化树分析

使用Clustal X软件对12株不同时期不同地区分离的SARS-CoV S2基因进行比对分析, 并使用TreeView软件构建系统进化树(图3)。早期分离株GD322、GZ50、GD01、GZ02之间存在的差异大于0.3%, 中期分离株BJ01、CUHK-W1、HZS2-Cc之间的差异小于0.1%, 晚期分离株同部分中期分离株之间的差异小于0.1%。

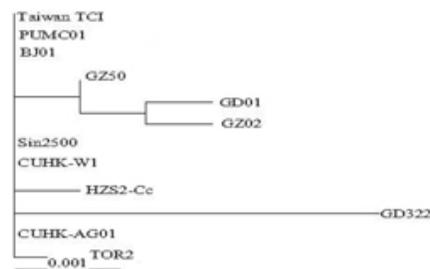


图 3 系统进化树分析
 Fig.3 Analysis of phyletic evolution

2.5 T细胞表位预测

通过Internet网数据库对GD322株S2蛋白氨基酸序列进行T细胞抗原表位预测。结果发现, 只存在一处T细胞抗原表位的改变。早期分离株GD01、GZ02、GZ50第57位氨基酸为D, 其余各株均为Y, 该氨基酸的改变引起T细胞抗原表位B_3501的改变。

3 讨论

SARS-CoV是一种新型冠状病毒。各国多个实验室相继从病人标本中分离出SARS-CoV, 并对基因序列进行测定[3]。S蛋白在病毒侵入宿主细胞时发挥重要作用。可分为S1和S2两部分[4], 其中S1识别敏感细胞表面的受体, S2介导病毒包膜与宿主细胞膜融合。通过对包括本实验室分离的GD322株在内的12株SARS-CoV S2基因进行同源性比较和系统进化树的分析, 发现S2蛋白在SARS流行早期各功能域均有非同义突变, 但总体而言S2基因的变异早期仅有12个碱基, 中期S2基因间的差异只有2个碱基, 晚期的S2基因同源性则高达99.9%。可见S2基因早期变异明显, 中晚期则变异很小。

系统进化树的分析可将不同流行时期和不同流行地域的毒株进行分类。第一类为早期广东省境内流行的SARS分离株GD322、

GZ50、GD01、GZ02，它们之间的非同义突变有7个，占所有非同义突变的78%。相近地区的早期流行分离株变异很大，其共同特点是57位氨基酸的变异(Y-D)。从T细胞抗原表位分析可以看出，57位氨基酸(Y-D)的变异是唯一对T细胞抗原产生影响的位点。该突变可能有利于SARS-CoV适应人体环境。第二类是由广州传播至香港Hotel M，再传播至多伦多的HZS2-Cc、TOR2分离株[5][6]，这二株之间的变异小于0.05%。第三类是从世界各地分离的晚期SARS-CoV BJ01、CUHK-W1、PUMC01、Sin2500、TaiwanTC1、CUHK-AG01。这些毒株之间没有差异，说明随着时间的推移，SARS-CoV S2蛋白趋于稳定。

对普通冠状病毒S蛋白的研究发现，尽管S2蛋白只是组成S蛋白柄的亚单位，并不参与病毒与受体最初的识别，但是，在S2蛋白上具有介导病毒与宿主细胞膜融合的亮氨酸拉链结构。在体内及体外试验中，识别冠状病毒S2蛋白的抗体都可以阻断病毒与宿主细胞的融合，使病毒不能感染细胞，是一种具有中和活性的抗体[7]。从T细胞抗原表位分析看出，57位氨基酸变异(Y-D)对T细胞抗原表位产生影响。研究发现，T细胞抗原表位B₃₅₀₁结构的精细差别影响MHC I类分子与CD8⁺的T细胞的结合[8]。S2蛋白某个碱基的突变就有可能改变病毒对宿主细胞的侵袭能力[9]。同时S2蛋白在病毒进化的后期非常稳定，是抗病毒药物及疫苗研制的理想靶位。

参考文献:

- [1]Ksiazek TG, Erdoman D, Goldsmith CS, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome[J]. N Engl J Med, 2003, 348(20): 1953-66.
- [2]Krueger DK, Kelly SM, Lewicki DN, et al. Variations in disparate re-gions of the murine coronavirus spike protein impact, the initiation of membrane fusion[J]. J Virol, 2001, 75(6): 2792-802.
- [3]Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, et al. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome[J]. Science, 2003, 300(5624): 1394-9.
- [4]Marra MA, Jones SJ, Astell CR, et al. The genome sequence of the SARS associated coronavirus[J]. Science, 2003, 300(5624): 1399-404.
- [5]He JF, Peng GW, Min J, et al. Molecular evolution of the SARS coronavirus during the course of the SARS epidemic in China[J]. Science, 2004, 303(5664): 1666-9.
- [6]Yeh SH, Wang HY, Tsai CY, et al. Characterization of sever acute respiratory syndrome coronavirus genomes in Taiwan: molecular epidemiology and genome evolution[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(8): 2542-7.
- [7]Fagchi F. The S2 subunit of the murine coronavirus spike protein is not involved in receptor binding [J]. J Virol, 1995, 69(10): 7260-3.
- [8]Gao GF, Willcox BE, Wyer JR, et al. Classical and nonclassical class I major histocompatibility complex molecules exhibit subtle confor-mational differences that affect binding to CD8alpha[J]. J Biol Chem, 2000, 275(20): 15232-8.
- [9]Guan Y, Zheng BJ, He YQ, et al. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China[J]. Science, 2003, 302(5643): 276-8.