

# 四川呼吸道合胞病毒 F 蛋白基因序列和抗原表位变异分析\*

张梦妍<sup>1,2</sup>, 廖虹瑜<sup>1</sup>, 范雪佳<sup>1</sup>, 鲁 蕾<sup>1</sup>, 裴晓方<sup>1</sup>, 许 欣<sup>1△</sup>

1. 四川大学华西公共卫生学院·华西第四医院 医学检验教研室(成都 610041); 2. 陕西省疾病预防控制中心(西安 710054)

**【摘要】** 目的 分析呼吸道合胞病毒(RSV)四川分离株 F 蛋白基因序列,探讨 F 蛋白基因和抗原表位变异情况。**方法** RT-PCR 方法扩增 F 蛋白近全长序列并测序,分析核苷酸和氨基酸变异位点,比较不同亚型和基因型间中和表位、细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)表位基因组成。**结果** 10 株 RSV F 蛋白的核苷酸和氨基酸 P-distance 分别为  $0.102 \pm 0.005$  和  $0.058 \pm 0.006$ ,中和表位 47F 和 L4 在亚型间高度保守,而 RS-348 和 7C2 在亚型内保守,CTL 表位 HLA B\*57、HLA A\*01 和 HLA Cw\*12 也是亚型内高度保守,亚型间存在个别氨基酸变异。**结论** RSV 四川分离株 F 蛋白基因保守度较高,抗原表位在亚型内保守,已在 A 亚型上识别的 CTL 表位可能在 B 亚型内不能识别。

**【关键词】** 呼吸道合胞病毒 F 蛋白 细胞毒性 T 淋巴细胞表位 中和表位

## Gene Sequence and Antigenic Epitope Variation within the F Protein of Respiratory Syncytial Virus in Sichuan, China

ZHANG Meng-yan<sup>1,2</sup>, LIAO Hong-yu<sup>1</sup>, FAN Xue-jia<sup>1</sup>, LU Lei<sup>1</sup>, PEI Xiao-fang<sup>1</sup>, XU Xin<sup>1△</sup>. 1. Department of Medical Technology, West China School of Public Health & West China Fourth Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Center for Disease Control and Prevention of Shaanxi Province, Xi'an 710054, China

△ Corresponding author, E-mail: xinXu62@163.com

**【Abstract】** **Objective** To investigate the variation of cytotoxic T-lymphocyte (CTL) and neutralizing epitopes in F protein of respiratory syncytial virus (RSV) isolated in Sichuan. **Methods** Nearly full-length of F protein gene of 10 strains of RSV isolated in Sichuan was amplified by RT-PCR and sequenced. The genetic variations, especially the CTL and neutralizing antibody epitopes within different subtypes and genotypes were analyzed and compared. **Results** The F protein of RSV is highly conserved within the two subtypes, with the P-distances of nucleotide and amino acids were  $0.102 \pm 0.005$  and  $0.058 \pm 0.006$ , respectively. Neutralizing epitopes 47F and L4 were conserved between the subtypes, but RS-348 and 7C2 were only conserved within the subtypes. CTL epitopes HLA B\*57, HLA A\*01 and HLA Cw\*12 were conserved only within subtype A. There were specific different sites between the subtypes. **Conclusion** The sequences of F protein from Sichuan RSV isolates were highly conserved, so as the epitopes on F-protein within subtypes, the identified CLT epitopes in subtype A may not be recognized in subtype B virus.

**【Key words】** Human respiratory syncytial virus F protein Cytotoxic T-lymphocyte epitope Neutralizing epitope

呼吸道合胞病毒(RSV)是婴幼儿急性下呼吸道感染的重要病因之一<sup>[1]</sup>。其 F 蛋白既介导病毒与细胞膜融合以助病毒进入细胞内,促进邻近感染细胞融合,也是细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T-lymphocyte,CTL)的靶抗原。该蛋白高度保守,A 和 B 亚型之间氨基酸同源性高达 91%,可诱导亚型之间的交叉免疫保护<sup>[2]</sup>,是亚单位疫苗和重组亚单位疫苗的研究基础。F 蛋白序列亚型之间以及相同

基因型分离株间存在个别位点的变异,这些变异是否导致 RSV 免疫逃避还未得到证明。有研究<sup>[3]</sup>比对了 10 种 G 蛋白基因型的 F 蛋白序列,发现时隔 5 年流行期的 F 蛋白依旧高度保守,变异大多发生在核苷酸水平。但是,随着 RSV G 蛋白不断演化,新 BA 基因型的出现,F 蛋白是否会受此影响而产生大的变异亟需验证。本研究选取 10 株 RSV 分离株,包含 2010 年四川地区 RSV 优势型别 GA2、GB2 和 BA 基因型,探讨 F 蛋白的基因序列和抗原表位的变异情况,分析 BA 型和 GB2 型的 F 蛋白保守性是否不同于其它 B 基因型,GA2 型 F 蛋白是否在近 5 年内发生较大变异。

\* “艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治科技”重大专项“传染病检测技术平台”项目和“云南及周边省市传染病病原谱流行规律研究”课题(No. 2009ZX10004-212)资助

△ 通讯作者, E-mail: xinXu62@163.com

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

Viral Nucleic Acid Extraction kit VR100 (Geneaid), PrimeScript<sup>®</sup> One Step RT-PCR Kit (TaKaRa), PCR 产物纯化试剂盒, pGM-T 连接试剂盒、*E. coli* DH5 $\alpha$ (天根生化科技有限公司), 引物购于 Invitrogen(上海)公司; 10 株 RSV 是由 2010 年四川大学华西妇女儿童医院住院患儿鼻咽抽吸物中分离到的病毒。

### 1.2 方法

**1.2.1 引物设计** 参照文献<sup>[4]</sup>, 扩增 F 蛋白 1~1670 bp 核苷酸序列, 引物 RSV-U: 5'-GGCAAATAACAATGGAGTTG-3'; RSV-4R: 5'-AAGAAAGATACTGATCCTG-3'; RSV-3F: 5'-TCAATGATATGCCTATAACA-3'; RSV-L: 5'-CTCAGTTGATCTTTCGTTAGTG-3'。扩增条件: 50 °C 逆转录 30 min, 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 45s, 52 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 7 min, 4 °C 保存。20 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测目的条带。

**1.2.2 序列测序** PCR 产物纯化后, 与 PGM-T 载体连接, 转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞。使用 PCR 法鉴定筛选阳性克隆, 序列测定由 Invitrogen(上海)公司完成。

**1.2.3 序列分析和抗原表位分析** 使用 BioEdit 和 Genedoc 比对序列, MEGA5.0 计算遗传距离, PAML4.4 软件包 CODEML 程序分析非同义替换率、同义替换率比值及其相关比值, ANTHEPROT 4.3 分析氨基酸序列二级结构和疏水性。比较不同序列 F 蛋白中和表位 7C2、47F、L4 和 RS-348<sup>[3]</sup>、CTL 表位(包括已确定的 CTL 限制性表位 HLA B\*57、HLA Cw\*12<sup>[5]</sup> 和 HLA A\*01<sup>[6]</sup>、实验推定但限制性未明确的 CTL 表位<sup>[6]</sup>、动物试验确定的 MHC I 类 H-2K(d)限制性 CTL 表位<sup>[7]</sup> 和 2 个 H2 限制性 Th 细胞表位<sup>[8]</sup>)氨基酸组成差异。

**1.2.4 核苷酸序列号** 四川地区 RSV 分离株 F 蛋白序列提交 GenBank 数据库, accession number 对应分离株编号 JF421560~JF421565、JF503241~JF503244。标准株 A2、CH18537 和参考株 GA2SA98V173、GB3SA98D796 序列号分别为 X02221、AY526551、D00334 和 AY526564。

## 2 结果

### 2.1 F 蛋白核苷酸和氨基酸分析

**2.1.1 核苷酸变异分析** 10 株 RSV F 蛋白核苷酸 P-distance 为 0.102 $\pm$ 0.005, A 亚型和 B 亚型分离株间分别为 0.006 $\pm$ 0.001 和 0.018 $\pm$ 0.002, 核苷酸同源性分别为 99.1%~99.8% 和 89.0%~99.6%, A 亚型 F 蛋白编码区变异度小于 B 亚型。碱基替换模型分析, 转换率高于颠换率, A 型株转换/颠换 R 之比为 1.445, B 型株转换/颠换 R 之比为 5.281。F 蛋白同义替换率高于非同义替换率, 平均 dN/dS 为 0.0849, 说明核苷酸变异主要是净化选择过程。

**2.1.2 氨基酸变异分析** 10 株 RSV F 蛋白氨基酸总体 P-distance 为 0.058 $\pm$ 0.006, A 亚型和 B 亚型分离株间分别为 0.007 $\pm$ 0.003 和 0.011 $\pm$ 0.003, 说明氨基酸变异水平低于核苷酸, 个别核苷酸的变异是沉默突变。A、B 亚型间存在特定变异的位点, 同一基因型之间有个别变异位点(附图)。

与 GA2SA98V173 株比较, 四川分离株 GA2 型 23、105、276 和 540 位氨基酸位点变异, 但均未涉及二级结构改变。与 GB3SA98V796 株比较, GB2 和 BA 型存在个别位点改变, 例如 209Q $\rightarrow$ K、278V $\rightarrow$ A 和 554N $\rightarrow$ T 等, 也都均未涉及二级结构改变。

### 2.2 F 蛋白中和表位变异分析

附图可见中和表位 47F 和 L4 在 RSV 亚型间高度保守, 但 RS-348 和 7C2 有明显的亚型差异。单克隆抗体识别的氨基酸易变位点中, 除 Sichuan/B/012703 RS-348 表位 216 位发生改变以外, 其他位点在 10 株 RSV 间高度保守。

Sichuan/B/012703 氨基酸 216 位 N $\rightarrow$ T, 这两种氨基酸都为极性中性氨基酸, 可能不会影响抗原表位的识别。

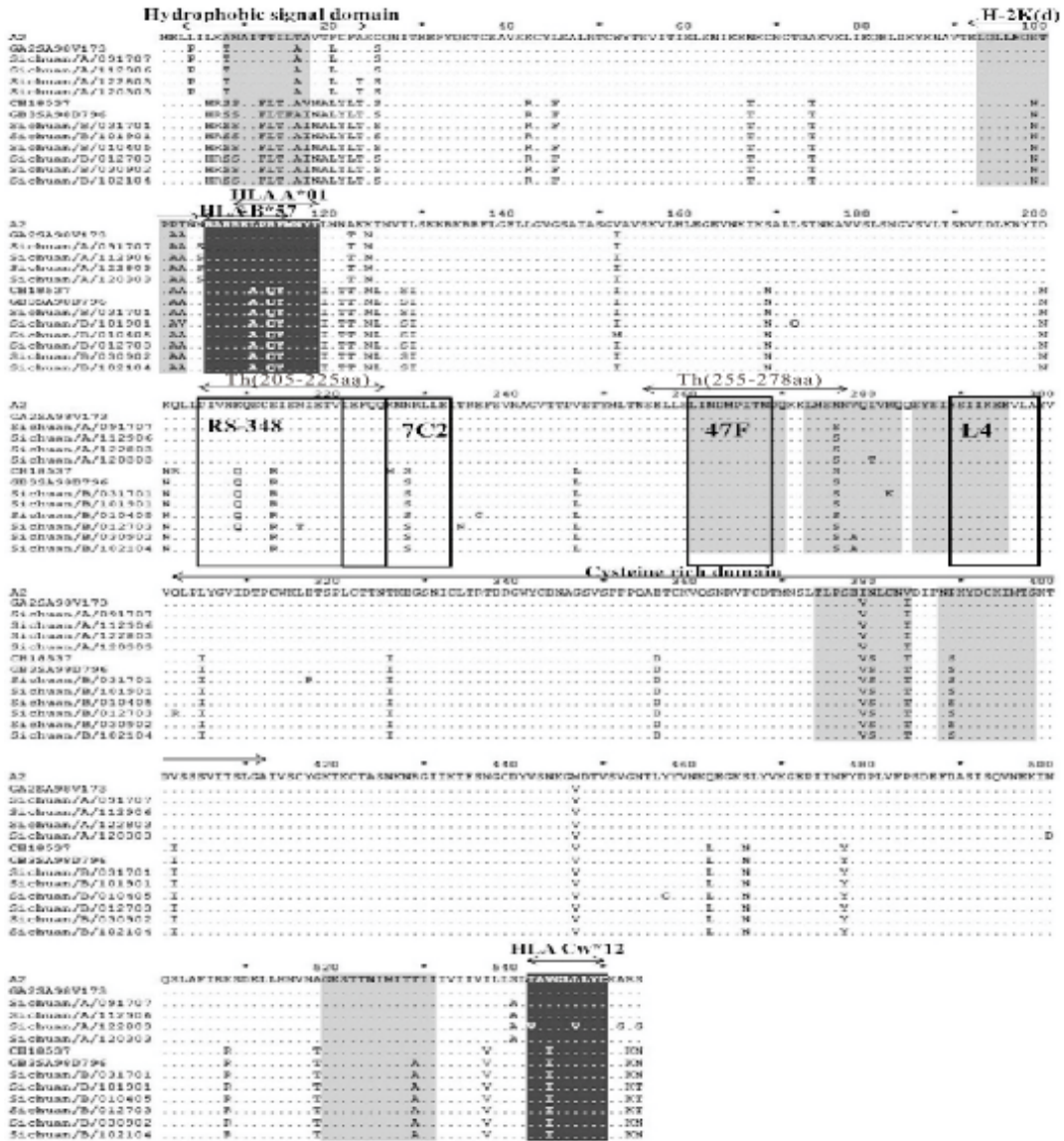
### 2.3 CTL 表位变异分析

RSV F 蛋白各 CTL 表位氨基酸比对结果见附图。HLA B\*57、HLA Cw\*12 和 HLA A\*01 限制性 CTL 表位在各亚型内高度保守。Sichuan/A/122803 株 HLA Cw\*12 表位 542 位(I $\rightarrow$ V)和 547 位(L $\rightarrow$ V)与其他 A 亚型不同, I、V 和 L 这 3 种氨基酸都为非极性氨基酸且支链亲水性, 可能不会影响抗原表位识别。B 亚型 HLA B\*57、HLA A\*01 表位有 3 个位点(111、113、114 位)与 A 亚型不同, HLA Cw\*12 表位 1 个位点(544V $\rightarrow$ I)与 A 亚型不同。

MHC I 类 H-2K(d)限制性 CTL 表位和 H2 限制性 Th 细胞表位 205~225、255~278 也存在特异的亚型和基因型间差异位点。除 GB2 型外, Th 细

胞表位 225~278 在 RSV 分离株间保守, H-2K(d) 限制性表位和 Th 细胞表位 205~225 分别有 1 和 2 个氨基酸位点在 A、B 亚型间不同。值得注意的是, GB2 型分离株 Th 细胞 205~225 表位 209 位 Q→K, 255~278 表位 278 位 V→A, 与其他 B 基因型不

同。另外, F 蛋白上 8 个推定的 CTL 表位除 Sichuan/A/120303 株 280 位出现氨基酸变异外, 在四川地区 A 亚型内高度保守。B 亚型与之相比, 除 260~270、285~295 表位氨基酸组成完全相同外, 其余表位都有 1 至 2 个氨基酸组成差异。



附图 四川地区 RSV 分离株 F 蛋白氨基酸序列和标准株 A2、参考株比对结果

Fig Amino acid alignment between the F-protein of Sichuan subtype A and B genotypes and the prototype strains indicating the position of epitopes

The putative CTL epitopes are shown in light grey. The specific F-protein CTL epitopes are shown in dark grey and indicated above the sequence. The position of a MHC class I CD8 + H-2K(d)-restricted-CTL epitope and two H-2-restricted T-helper cell epitopes are indicated above the alignment. The neutralizing epitopes are boxed

### 3 讨论

本研究结果显示四川 RSV F 蛋白保守性较高, 与文献报道的 F 蛋白基因序列研究结果相近<sup>[3,9,10]</sup>, A、B 亚型间核苷酸一致性为 90%, 氨基酸一致性为 94.2%。选择压力表明 F 蛋白变异为净化选择, 且

大多核苷酸替换为沉默突变。但是, 还是存在特异的基因型之间变异。单个氨基酸位点的变异会影响病毒的中和反应, 因此有必要分析 RSV F 蛋白氨基酸变异是否会影响中和表位和 CTL 表位的识别。

与南非分离株 F 蛋白抗原表位分析结果相同, HLA B\* 57、HLA Cw\* 12 和 HLA A\* 01 限制性

CTL表位在A亚型内保守性较高,即使1个GA2型HLA Cw\*12表位有2个位点氨基酸改变,也可能不会影响抗原表位的识别;B亚型在HLA B\*57和HLA A\*01限制性CTL表位有3个特异的氨基酸差异位点,HLA Cw\*12表位有1个。B亚型特异氨基酸位点改变可能会影响抗原表位与MHC I类分子复合物的结合。推定的CTL表位和H-2K限制性CTL表位同样在A亚型内高度保守,B亚型内有个别位点差异。推测另一亚型的再感染可能失去初次感染对F蛋白特异CTL表位的记忆。因此,在RSV疫苗研究实验中,需考虑采用哪些CTL表位来检测CTL反应。F蛋白CTL表位筛选应尽可能识别亚型间同样保守的多肽链,亚单位疫苗应同时包含A、B亚型的CTL表位。A、B亚型CTL表位的特异差异,诱发群体免疫的逃避,导致再感染发生,这可能是流行期优势型别转换的原因。

B细胞中和表位,47F和L4在亚型间高度保守,而RS-348和7C2只在A亚型内保守,B亚型有明显的氨基酸差异位点。故47F和L4可作为预防用的单克隆抗体。Th细胞表位205~225aa于四川分离株各亚型内高度保守。GB2型Th细胞255~278aa表位不同于其他分离株,278位出现了V→A替换,虽然两种氨基酸生化性质相同,但是否会影响抗原表位识别需进一步试验。

综上所述,四川RSV分离株F蛋白保守度较高,未发生阳性选择,CTL表位在各亚型内保守。A和B亚型CTL表位的特异差异可能是每年RSV流行期病毒逃逸群体免疫的又一途径。继Agenbach等<sup>[3]</sup>之后,本研究再一次分析了RSV F蛋白抗原表位和氨基酸变异情况,尤其是逐渐占B亚型优势地位的BA基因型,本研究结果为RSV的疫苗研制提供了可靠的基础资料。

## 参 考 文 献

- Mclellan JS, Correla BE, Chen M, *et al.* Design and characterization of epitope-scaffold immunogens that present the motavizumab epitope from respiratory syncytial virus. *J Mol Biol*, 2011; 409(5): 853-866.
- Fu YH, He JS, Zheng XX, *et al.* Intranasal immunization with a replication-deficient adenoviral vector expressing the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus elicits protective immunity in BALB/c mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009; 381(4): 528-532.
- Agenbach E, Tiemessen CT, Venter M. Amino acid variation within the fusion protein of respiratory syncytial virus subtype A and B strains during annual epidemics in South Africa. *Virus Genes*, 2005; 30(2): 267-278.
- Kim YK, Choi EH, Lee HJ. Genetic variability of the fusion protein and circulation patterns of genotypes of the respiratory syncytial virus. *J Med Virol*, 2007; 79(6): 820-828.
- Brandenburg AH, de Waal L, Timmerman HH, *et al.* HLA class I-restricted cytotoxic T-cell epitopes of the respiratory syncytial virus fusion protein. *J Virol*, 2000; 74(21): 10240-10244.
- Rock MT, Crowe JE. Identification of a novel human leucocyte antigen-A\*01-restricted cytotoxic T-lymphocyte epitope in the respiratory syncytial virus fusion protein. *Immunology*, 2003; 108(4): 474-480.
- Jiang S, Borthwick NJ, Morrison P, *et al.* Virus-specific CTL responses induced by an H-2Kd-restricted, motif-negative 15-mer peptide from the fusion protein of respiratory syncytial virus. *J Gen Virol*, 2002; 83(2): 429-438.
- Corvaisier C, Guillemin G, Bourgeois C, *et al.* Identification of T-cell epitopes adjacent to neutralizing antigenic domains on the fusion protein of respiratory syncytial virus. *Res Virol*, 1993; 144(2): 141-150.
- 孙晓鸥, 耿学辉, 王之梁等. 5株呼吸道合胞病毒地方株F蛋白基因序列分析. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1998; 18(4): 295-300.
- 芦起, 申昆玲, 张燕等. 北京地区呼吸道合胞病毒分离株F蛋白基因序列分析. *首都医科大学学报*, 2005; 26(5): 565-567.

(2012-08-28收稿, 2012-12-05修回)

编辑 吕熙