

· 实验研究 ·

人巨细胞病毒 UL134 基因在临床低传代分离株的多态性研究

马艳萍, 阮强, 何蓉, 齐莹, 孙峥嵘, 吉耀华, 黄郁晶, 刘庆, 陈淑荣, 王继东

(中国医科大学附属第二医院病毒研究室, 辽宁 沈阳 110004)

[摘要] **目的** 人巨细胞病毒(HCMV)呈现一定的基因多态性。病毒的致病性可能与不同分离株的基因变化有关。HCMV Toledo 株和其他低传代临床分离株基因组 UL/b'区中发现的 19 个基因(UL133-UL151)可能在病毒潜伏、复制、逃避机体免疫和不同组织细胞嗜性等方面起重要作用。该文研究 HCMV 不同临床分离株 UL134 基因及其编码蛋白氨基酸序列的多态性,分析这种多态性与人巨细胞病毒感染引起的各种疾病之间的关系,提供了 HCMV 基因多态性的一项基本数据。**方法** 对荧光定量 PCR 方法检测 HCMV-DNA 阳性的 32 株临床低传代分离株进行 UL134 基因全序列 PCR 扩增、测序及分析。**结果** 32 株临床低传代分离株 UL134 基因 PCR 扩增均阳性。与 Toledo 株比较,临床分离株 UL134 基因核苷酸和预测编码蛋白质的氨基酸序列较保守,同源性分别为 96.4% ~ 98.3% 和 92.7% ~ 94.9%,但预测编码蛋白质新增一个 SUL 位点。**结论** 与 Toledo 株比较,临床分离株 UL134 基因比较保守,但仍具有一定的多态性,未发现 UL134 基因与 HCMV 致病性之间的本质联系。

[中国当代儿科杂志,2007,9(6):583-586]

[关键词] 人巨细胞病毒;UL134;多态性

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2007)06-0583-04

Polymorphism of human cytomegalovirus UL134 gene in low-passage clinical isolates

MA Yan-Ping, RUAN Qiang, HE Rong, QI Ying, SUN Zheng-Rong, JI Yao-Hua, HUANG Yu-Jing, LIU Qing, CHEN Shu-Rong, WANG Ji-Dong. Virology Laboratory, Second Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China (Ruan Q, Email: ruanq@cmu2h.com)

Abstract: Objective Human cytomegalovirus (HCMV) displays genetic polymorphisms. Nineteen open reading frames (ORFs, UL133-UL151) found in the Toledo strain of HCMV and other low-passage clinical isolates may be essential for viral infection. This study aimed to analyze the polymorphism of HCMV UL134 gene in clinical isolates and explore the relationship between the polymorphism and HCMV infection. **Methods** PCR was performed to amplify entire UL134 region in 32 clinical isolates, which had been proven as HCMV-DNA positive by FQ-PCR. PCR products were sequenced. **Results** All of the 32 isolates were amplified and sequenced successfully. HCMV UL134 gene was highly conserved in the clinical isolates. UL134 ORF and its predicted protein in the clinical strains displayed 96.4% - 98.3% nucleotide identity and 92.7% - 94.9% amino acid identity respectively compared to those in the Toledo strain. A new posttranslational modification site, sulfationcamp (SUL) site, was found in UL134 protein of all of the clinical isolates except 35j. **Conclusions** HCMV UL134 gene in clinical isolates was highly conserved. No substantial relation was found between UL134 gene and HCMV infectious diseases. [Chin J Contemp Pediatr, 2007, 9 (6):583-586]

Key words: Human cytomegalovirus; UL134; Polymorphism

人巨细胞病毒(HCMV)属于 β -疱疹病毒亚科,人群中大多数呈现不显性感染或潜伏感染。在孕妇,原发或复发感染均可引起新生儿宫内感染或围生期感染,可导致新生儿黄疸、先天性巨结肠、小头畸形、智力低下和发育迟缓等^[1-4]。HCMV感染人体多种器官和组织,可能与不同临床分离株基因及其编码产物的多态性有关^[5-7]。

人巨细胞病毒是双链线状 DNA 病毒,基因组全

长 230 ~ 235 kb,约含有 200 多个开放读码框架(open reading frame, ORF)^[8,9],由长独特序列(UL),短独特序列(US)两个片段组成,两片段均被一对方向倒置的重复序列夹在中间。实验室株 AD169 的全部基因组测序工作已经完成(GenBank, X17403)^[8]。1996 年 Cha 等^[10]在低传代分离株 Toledo 的基因组 UL/b'区中发现 19 个 ORF,分别命名为 UL133 ~ UL151,在 AD169 株中不存在。这 19 个

[收稿日期]2007-01-16;[修回日期]2007-04-14

[基金项目]国家自然科学基金资助(30170986)。

[作者简介]马艳萍,女,硕士,助理研究员。主攻方向:分子病毒学。

[通讯作者]阮强,研究员,硕士生导师,中国医科大学第二临床学院病毒研究室,邮编:110004。

基因可能在病毒潜伏、复制、逃避机体免疫和不同组织细胞嗜性等方面起重要作用。本文应用 PCR 和 DNA 测序的方法,研究了不同临床分离株 UL134 基因编码序列及其编码蛋白氨基酸序列的多态性,并分析这种多态性与不同疾病发生之间的关系。

1 材料与方法

1.1 标本来源

32 株低传代临床分离株均来自中国医科大学附属第二医院 1988 ~ 1993 年住院患儿,年龄 < 14 个月,其中来自于黄疸患儿(J)分离株 20 株,来自小头畸形患儿(M)分离株 7 株,来自先天性巨结肠患儿(C)分离株 5 株。标本取自 HCMV 分离实验, -70℃ 保存。2000 年应用荧光定量 PCR 方法^[11] 检测 HCMV-DNA,结果均为阳性。

1.2 实验方法

1.2.1 标本处理 取 HCMV 低传代分离株细胞培养上清液与等量裂解液(华美生物工程公司),煮沸 15 min,作为扩增模板。

1.2.2 引物设计 按照 Toledo 株序列,应用引物设计软件 primer premier 5.0 设计用于扩增 HCMV UL134 基因的全序列引物,上游引物 5' ACAGGGT-GATCTGCGAGATAG3', 下游引物 5' GGCAC-CACGCTTATCAGAA3'。部分分离株进行巢式 PCR 扩增,内侧引物同上,外侧上游引物 5' GTTACAAG-GAGACGATGATTTACG3', 下游引物 5' AGGCAC-CACGCTTATCAGAAG 3'。引物合成由北京奥科公司完成。引物也用于 UL134 基因测序。

1.2.3 PCR 扩增 应用全序列引物扩增 UL134 基因全序列。rTaq 酶、10 × Buffer、dNTP mixture 为 TakaRa 公司产品。制备反应体系如下: Buffer 5 μL, dNTP mixture 2.5 μL, 上下游引物各 1 μL, rTaq 酶 2 U, 模板 3.5 μL, 用双蒸水补至总反应体积 50 μL。PCR 循环条件预变性 95℃ 4 min; 变性 96℃ 45 s, 退火 50℃ 1 min, 延伸 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。巢式 PCR 循环条件内侧和外侧均为预变性 95℃ 4 min; 变性 95℃ 45 s, 退火 50℃ 1 min, 延伸 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后,紫外检测仪下观察扩增结果。

1.2.4 凝胶回收 测序前所有扩增产物应用 TakaRa 公司的 PCR Fragment Recovery kit 切胶回收目的 DNA 片段,以去除非特异产物带的干扰。

1.2.5 PCR 扩增阳性标本测序 使用 PCR 扩增

的上游引物对目的基因进行测序。由上海联合基因公司完成。

1.2.6 序列分析 应用生物信息学软件 DNA-Club、BioEdit、Genedoc、DNASis、DNASStar 等完成。

1.2.7 序列提交 用 Sequin 软件向 GenBank 提交整理后的 HCMV UL134 ORF 序列。

2 实验结果

2.1 HCMV UL134 基因 PCR 扩增结果

对 32 株低传代临床分离株进行 HCMV UL134 全序列 PCR 扩增,其中黄疸 20 株,小头畸形 7 株,巨结肠 5 株。总阳性率为 100%。9 个分离株应用普通 PCR 扩增阴性,进行巢式 PCR 扩增,均为阳性。32 株均完成了 HCMV UL134 基因全序列测定,并被 Genbank 收录,序列号为 AY692248-AY692261, AY743667-AY743674, AY779032-AY779041。

2.2 临床分离株 HCMV UL134 基因序列多态性及其编码蛋白分析

2.2.1 HCMV UL134 基因核苷酸和氨基酸序列分析 以 Toledo 株作为参考株,应用 Bioedit 软件进行临床低传代分离株 UL134 基因核苷酸和编码蛋白的氨基酸序列线性化比较,结果表明,临床低传代分离株 UL134 基因 DNA 序列比较保守,变异以核苷酸替换为主。除 39j 和 45j 外,其他分离株在 Toledo 株核苷酸位点 268 ~ 279 之间分别发生了 3 或 6 个核苷酸的插入或缺失,但并未造成移码突变。Toledo 株 UL134 ORF 长度为 528bp,预测编码 176 个氨基酸的蛋白质。临床低传代分离株 UL134ORF 核苷酸和编码蛋白质的氨基酸变化见表 1。临床分离株 UL134ORF 核苷酸和编码蛋白质氨基酸与 Toledo 株进行同源性比较,分别为 96.4% ~ 98.3% 和 92.7% ~ 94.9%。其中 3 株先天性巨结肠分离株(27 c、28 c 和 29 c)的 UL134 基因核苷酸及其编码蛋白质氨基酸之间的同源性达 100%。

2.2.2 编码蛋白质性质、二级结构及重要功能位点预测 应用 protean 软件进行预测,临床分离株 UL134 基因预测编码蛋白质分子量约为 19 kD,等电点为 11.49 ~ 11.76,均为碱性蛋白质。蛋白质的氨基端为亲水区,可能位于蛋白质空间结构表面,羧基端为疏水区,可能位于蛋白质空间结构内部。在预测的蛋白质二级结构中有多个 α 螺旋结构,其中位于氨基酸位置约 30 位、70 位和羧基端的 α 螺旋结构位于蛋白质的疏水区(见图 1)。

表1 临床低传代分离株 UL134ORF 核苷酸和氨基酸变化

临床分离株	核苷酸变化		氨基酸变化		ORF 长度 (bp)	预测编码 蛋白质长度(aa)
	核苷酸插入	核苷酸缺失	氨基酸插入	氨基酸缺失		
39j 45j	—	—	—	—	528	176
27c 28c 29c	—	GCT(268 ~ 270 位)	—	丙氨酸(90 位)	525	175
13j	GCTGTT(271 ~ 272 位)	—	丙氨酸、缬氨酸(91 位)	—	534	178
3j 68j	GTT(271 ~ 272 位)	TGT(276 ~ 278 位)	缬氨酸(91 位)	缬氨酸(94 位)	528	176
11j	TGT(278 ~ 279 位)	—	缬氨酸(93 位)	—	531	177
56j	GCT(271 ~ 279 位)	—	丙氨酸(91 位)	—	531	177
其他	GTT(271 ~ 279 位)	—	缬氨酸(91 位)	—	531	177

注:临床低传代分离株核苷酸和氨基酸的变化位置均以 Toledo 株为参考株,并在括号内标注。

应用 DNAsis 软件进行二级结构预测,27 c、28 c 和 29 c 与 Toledo 株比较,预测编码蛋白质在氨基酸序列 110 ~ 120 之间缺少一个转角,使羧基端形成方向相反的空间构象。其余分离株预测编码蛋白质的二级结构与 Toledo 株相似。

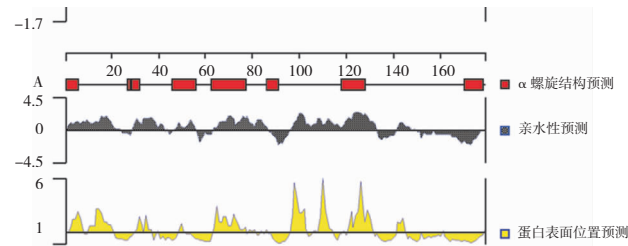


图1 HCMV UL134 基因预测编码蛋白质 α 螺旋结构、亲水性和蛋白表面位置预测

应用 Genedoc 软件和 Prosite 数据库预测编码产物的翻译后修饰位点,结果表明,Toledo 株 UL134 基因预测编码蛋白质中只有蛋白激酶 C 磷酸化位点(PKC)。与 Toledo 株比较,临床分离株 PKC 位点在氨基酸序列第 77 ~ 79 位、83 ~ 85 位和 142 ~ 144 位保守,但在另外的 3 个位置发生变异,包括全部先天性巨结肠分离株和部分黄疸及小头畸形分离株在氨基酸序列第 63 ~ 65 位出现 PKC 位点的缺失;上述分离株和另外 3 个分离株(56j、45j、39j)在氨基酸序列第 103 ~ 105 位新增一个 PKC 位点;在前两处位点未发生变异的分离株中,除 8j 外,均在氨基酸序列第 124 ~ 126 位新增一个 PKC 位点;18 m 在氨基酸序列第 112 ~ 114 也新增一个 PKC 位点。另外,除 35j 外的所有临床分离株均在氨基酸序列第 127 ~ 130 位新增一个硫酸化位点(SUL)。

3 讨论

人巨细胞病毒在体内可以感染多种器官和细胞,特别是先天感染可造成多系统损害。HCMV 感染的不同临床表现,一方面可能与宿主的免疫状态

有关,另一方面也可能与不同临床分离株基因及其编码产物多态性可能引起的不同组织嗜性有关。1996 年,Cha 等^[10]发现 Toledo 株大约有 19 个 ORF (UL133 ~ UL151)在实验室株 AD169 中不存在,却广泛存在于低传代的临床分离株中。这些基因的编码产物可能与 HCMV 的致病性有关。有关这一区域的基因多态性已经有多篇报道^[12 ~ 30]。例如,UL144 基因表现出显著的多态性^[18 ~ 27]。不同研究人员对 UL144 的基因分型基本一致。UL146 基因呈现更为复杂的多态性^[28 ~ 31]。

本文主要探讨 UL134 基因在临床患儿低传代分离株中的多态性及其与病毒临床致病性的关系。对 32 株临床低传代分离株与 Toledo 株 UL134 基因进行核苷酸和编码蛋白质氨基酸的线性化比较,分析结果表明,UL134 基因及其产物在核苷酸和氨基酸水平的同源性分别在 96% 和 92% 以上。说明 UL134 基因在先天性 HCMV 感染临床分离株中较保守。

先天性巨结肠分离株 27c、28c 和 29c 的 UL134 基因核苷酸和编码蛋白质的氨基酸序列完全相同。并且,这 3 个分离株的 UL134 基因预测编码蛋白质形成了与 Toledo 株和其他临床分离株不同二级结构。我们推测,这种独特的核苷酸序列和二级结构可能与 HCMV 先天感染引起胎儿先天性巨结肠的致病性之间存在一定的联系。

与 Toledo 株比较,由于核苷酸的突变导致编码蛋白质氨基酸的变异,从而使临床分离株 UL134 基因预测编码蛋白质的部分重要功能位点发生变异。如部分分离株 PKC 位点在氨基酸序列第 63 ~ 65, 101 ~ 103 和 122 ~ 124 位出现新增和缺失,并且在这些变化中,巨结肠分离株的改变均一致。提示我们这种变异可能与 HCMV 临床致病性有关。另外,除 35j 外的所有临床分离株在氨基酸序列第 127 ~ 130 位均较 Toledo 株新增一个 SUL 位点,根据 protean 软件的蛋白亲水性和结构分析,该位点位于蛋白

质的高极性的亲水性区域和蛋白质表面部位。推测该位点可能是临床分离株 UL134 基因编码蛋白质较 Toledo 株新增的蛋白质作用位点,可能与 HCMV UL134 蛋白的生物学特性有关。

本研究揭示了 HCMV UL134 基因的部分特征,然而要得到其全部的特征需要更多的数据。本研究中有限的证据表明在先天感染的 HCMV 分离株中 UL134 基因相对保守。为探讨 UL134 基因与更广泛的 HCMV 感染疾病之间的关系,则需要来更多来自于无症状感染患儿及免疫耐受患者的分离株标本。

[参 考 文 献]

[1] Chou S, Lurain NS, Weinberg A, Cai GY, Sharma PL, Crumpacker CS. Interstrain variation in the human cytomegalovirus DNA polymerase sequence and its effect on genotypic diagnosis of antiviral drug resistance. *Adult AIDS Clinical Trials Group CMV Laboratories*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43(6):1500-1502.

[2] Tam PK, Quint WG, van Velzen D. Hirschsprung's disease: a viral etiology? [J]. *Pediatr Pathol*, 1992, 2(6):807-810.

[3] Macris MP, Nahmias AJ, Bailey PD, Lee FK, Visintine AM, Brann AW. Electron microscopy in the routine screening of newborns with congenital cytomegalovirus infection[J]. *J Virol Methods*, 1981, 2(6): 315-320.

[4] Demmler GJ. Infectious Diseases Society of America and Centers for Disease Control Summary of a workshop on surveillance for congenital cytomegalovirus disease [J]. *Rev Infect Dis*, 1991, 13(2): 315-329.

[5] Chou S, Dennison KM. Analysis of interstrain variation in cytomegalovirus glycoprotein B sequences encoding neutralization-related epitopes[J]. *J Infect Dis*, 1991, 163(6):1229-1234.

[6] Fries BC, Chou S, Boeckh M, Torok-Storb B. Frequency distribution of cytomegalovirus envelope glycoprotein genotypes in bone marrow transplant recipients[J]. *J Infect Dis*, 1994, 169(4): 769-774.

[7] Torok-Storb B, Boeckh M, Hoy C, Leisenring W, Myerson D, Gooley T. Association of specific cytomegalovirus genotypes with death from myelosuppression after marrow transplantation [J]. *Blood*, 1997, 90(5):2097-2102.

[8] Chee MS, Bankier AT, Beck S, Bohni R, Brown CM, Cerny R, et al. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1990, 154:125-169.

[9] Mocarski ES, Courcelle CT. Cytomegaloviruses and their replication[M]. // Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins Publishers, 2001, 2629-2673.

[10] Cha TA, Tom E, Kemble GW, Duke GM, Mocarski ES, Spaete RR. Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains[J]. *J Virol*, 1996, 70(1): 78-83.

[11] 何蓉, 刘兰青, 吕绳敏, 阮强. 荧光定量 PCR 方法检测婴儿尿液中人类巨细胞病毒基因的含量[J]. *中华儿科杂志*, 2001, 39(12):739-742.

[12] 吉耀华, 阮强, 卢颖, 齐莹, 何蓉, 刘庆, 等. 人巨细胞病毒 UL148 基因在临床低传代分离株中的多态性研究[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2004, 18(2):154-157.

[13] 阮强, 卢颖, 何蓉, 吉耀华, 齐莹, 刘庆, 等. 人巨细胞病毒 UL136 基因在临床低传代分离株中多态性分析[J]. *中华微生物学和*

免疫学杂志, 2003, 23(9):686-690.

[14] 吉耀华, 阮强, 何蓉, 齐莹, 马艳平, 孙峥嵘, 等. 人巨细胞病毒 UL149 基因在临床低传代分离株中的多态性研究[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2004, 24(12):977-980.

[15] Ying Q, Mao ZQ, Ruan Q, He R, Ma YP, Sun ZR, et al. Human cytomegalovirus (HCMV) UL139 open reading frame: Sequence variants are clustered into three major genotypes [J]. *J Med Virol*, 2006, 78(4):517-722.

[16] He R, Ruan Q, Qi Y, Ma YP, Huang YJ, Sun ZR, et al. Sequence variability of human cytomegalovirus UL143 in low-passage clinical isolates[J]. *Chin Med J*, 2006, 119(5):397-402.

[17] Ma YP, Ruan Q, He R, Qi Y, Sun ZR, Ji YH, et al. Sequence variability of the human cytomegalovirus UL141 open reading frame in clinical strains[J]. *Arch Virol*, 2006, 151(4):827-835.

[18] Lurain NS, Kapell KS, Huang DD, Short JA, Paintsil J, Winkfield E, et al. Human cytomegalovirus UL144 open reading frame: sequence hytervariability in low-passage clinical isolates [J]. *J Virol*, 1999, 73(12): 10040-10050.

[19] Benedict CA, Butrovich KD, Lurain NS, Corbeil J, Rooney I, Schneider P, et al. Cutting edge: a novel viral TNF receptor superfamily member in virulent strains of human cytomegalovirus [J]. *J Immunol*, 1999, 162(12):6967-6970.

[20] Bale JF Jr, Petheram SJ, Robertson M, Murph JR, Demmler G. Human cytomegalovirus a sequence and UL144 variability in strains from infected children[J]. *J Med Virol*, 2001, 65(1):90-96.

[21] Arav-Boger R, Willoughby RE, Pass RF, Zong JC, Jang WJ, Al-cendor D, et al. Polymorphisms of the cytomegalovirus (CMV)-encoded tumor necrosis factor-alpha and beta-chemokine receptors in congenital CMV disease [J]. *J Infect Dis*, 2002, 186(8): 1057-1064.

[22] Picone O, Costa JM, Chaix ML, Ville Y, Rouzioux C, Leruez-Ville M. Human cytomegalovirus UL144 gene polymorphisms in congenital infections[J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(1):25-29.

[23] Tanaka K, Numazaki K, Tsutsumi H. Human cytomegalovirus genetic variability in strains isolated from Japanese children during 1983-2003[J]. *J Med Virol*, 2005, 76(3):356-360.

[24] Murayama T, Takegoshi M, Tanuma J, Eizuru Y. Analysis of human cytomegalovirus UL144 variability in low-passage clinical isolates in Japan[J]. *Intervirology*, 2005, 48(2-3):201-206.

[25] 何蓉, 阮强, 刘兰青, 吕绳敏, 吉耀华, 刘庆, 等. HMA-SSCP 方法研究人类巨细胞病毒 UL144 基因在临床低传代分离株中的多态性[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2006, 20(1):20-22.

[26] Mao ZQ, He R, Sun M, Qi Y, Huang YJ, Ruan Q. The relationship between polymorphisms of HCMV UL144 ORF and clinical manifestations in 73 strains with congenital and/or perinatal HCMV infection[J]. *Arch Virol*, 2007, 152(1):115-124.

[27] Hassan-Walker AF, Okwuadi S, Lee L, Griffiths PD, Emery VC. Sequence variability of the alpha chemokine UL146 from clinical strains of human cytomegalovirus [J]. *J Med Virol*, 2004, 74(4):573-579.

[28] He R, Ruan Q, Qi Y, Ma YP, Huang YJ, Sun ZR, et al. Sequence variability of human cytomegalovirus UL146 and UL147 genes in low-passage clinical isolates[J]. *Intervirology*, 2006, 49(4):215-223.

[29] Arav-Boger R, Foster CB, Zong JC, Pass RF. Human cytomegalovirus-encoded alpha-chemokines exhibit high sequence variability in congenitally infected newborns [J]. *J Infect Dis*, 2006, 193(6):788-91.

[30] Lurain NS, Fox AM, Lichy HM, Borade SM, Ware CF, Huang DD, et al. Analysis of the human cytomegalovirus genomic region from UL146 through UL147A reveals sequence hypervariability, genotypic stability, and overlapping transcripts [J]. *Virol J*, 2006, 1(12):3-4.

(本文编辑:吉耕中)