

[19] Patents Registry
The Hong Kong Special Administrative Region
香港特別行政區
專利註冊處

[11] 1068898 B
CN 1524088 B

[12]

STANDARD PATENT SPECIFICATION
標準專利說明書

[21] Application No. 申請編號
05101405.2

[51] Int.Cl.⁸ C07K

[22] Date of filing 提交日期
18.02.2005

[54] A VIRUS CAUSING RESPIRATORY TRACT ILLNESS IN SUSCEPTIBLE MAMMALS 在易感哺乳動物中引起呼吸道疾病的病毒

[30] Priority 優先權
19.01.2001 EP 01200213.5
18.10.2001 EP 01203985.5
[43] Date of publication of application 申請發表日期
06.05.2005
[45] Publication of the grant of the patent 批予專利的發表日期
02.08.2013
CN Application No. & Date 中國專利申請編號及日期
CN 02806763.0 18.01.2002
CN Publication No. & Date 中國專利申請發表編號及日期
CN 1524088 25.08.2004
Date of Grant in Designated Patent Office 指定專利當局批予專利日期
07.11.2012

[73] Proprietor 專利所有人
VIRONOVATIVE B.V.
BURGEMEESTER OUDLAAN 50
NL-3062 PA ROTTERDAM
NETHERLANDS
[72] Inventor 發明人
DE JONG, JAN, CORNELIUS
FOUCHIER, RONALDUS, ADRIANUS, MARIA
VAN DEN HOOGEN, BERNADETTA, GERARDA
OSTERHAUS, ALBERTUS, DOMINICUS, MARCELLINUS, ERASMUS
GROEN, JAN
[74] Agent and / or address for service 代理人及/或送達地址
China Patent Agent (H.K.) Ltd.
22/F, Great Eagle Centre
23 Harbour Road, Wanchai
Hong Kong
中國專利代理(香港)有限公司
香港灣仔港灣道 23 號
鷹君中心 22 樓



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1524088 B

(45) 授权公告日 2012.11.07

(21) 申请号 02806763.0

(22) 申请日 2002.01.18

(30) 优先权数据

01200213.5 2001.01.19 EP

01203985.5 2001.10.18 EP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2003.09.17

(86) PCT申请的申请数据

PCT/NL2002/000040 2002.01.18

(87) PCT申请的公布数据

W02002/057302 EN 2002.07.25

(73) 专利权人 维洛诺瓦蒂夫公司

地址 荷兰鹿特丹

(72) 发明人 J·C·德永 R·A·M·福基尔

B·G·范登霍根

A·D·M·E·奥斯特豪斯

J·格罗恩

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

司 72001

代理人 张广育

(51) Int. Cl.

C07K 14/135(2006.01)

(56) 对比文件

WO 0020600 A, 2000.04.13, 全文.

BAYON-AUBOYER M H ET AL. comparison of F-, G- and N-based RT-PCR protocols with conventional virological procedures for the detection and typing of turkey rhinotracheitis virus. 《ARCHIVES OF VIROLOGY》. 1999, 第 144 卷(第 6 期), 第 1091-1109 页.

审查员 于群

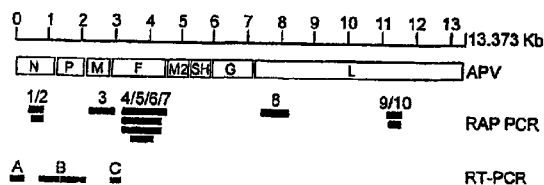
权利要求书 2 页 说明书 62 页 附图 38 页

(54) 发明名称

在易感哺乳动物中引起呼吸道疾病的病毒

(57) 摘要

本发明涉及病毒学领域。本发明提供一种分离的副粘病毒科肺病毒亚科内可鉴定为在系统发育上对应于 Metapneumovirus 及其组分的基本上为哺乳动物的负义单链 RNA 病毒 (MPV)。



1. 一种分离的负义单链 RNA 病毒哺乳动物 MPV, 所述病毒属于副粘病毒科 (Paramyxoviridae) 肺病毒亚科 (Pneumovirinae), 并且在系统发育上鉴定为相当于 Metapneumovirus 病毒属, 其中所述病毒是包含图 20-28 所示序列的 MPV 分离株 00-1 或 99-1。

2. 一种权利要求 1 的分离的负义单链 RNA 哺乳动物 metapneumovirus, 其中所述病毒的基因组包含图 6A、图 6B 或图 6C 所示的 HMPV 的核苷酸序列。

3. 权利要求 1 或 2 的病毒, 其中所述病毒是一种减毒病毒。

4. 一种免疫原性组合物, 其中所述免疫原性组合物包含权利要求 1 或 2 的病毒。

5. 权利要求 4 的免疫原性组合物, 其中所述病毒是一种减毒病毒。

6. 一种分离的核酸, 其中所述核酸编码蛋白, 所述蛋白包含图 20 所示的 MPV 分离株 00-1 或 99-1 的 N 蛋白的氨基酸序列。

7. 权利要求 6 的核酸在制备检测样品中哺乳动物 metapneumovirus 的试剂盒中的用途。

8. 权利要求 7 的用途, 其中所述哺乳动物 MPV 是人 MPV。

9. 一种载体, 所述载体包含权利要求 6 的核酸。

10. 一种宿主细胞, 所述宿主细胞包含权利要求 6 的核酸。

11. 一种抗体, 其中所述抗体特异性结合在权利要求 10 的宿主细胞中表达的病毒蛋白。

12. 权利要求 11 的抗体在制备用于检测样品中哺乳动物 metapneumovirus 的试剂盒中的用途。

13. 一种病毒分离株, 所述病毒分离株可用权利要求 6 的核酸或 11 的抗体鉴定为副粘病毒科肺病毒亚科的哺乳动物负义单链 RNA 病毒, 并且在系统发育上鉴定为相当于 Metapneumovirus 病毒属。

14. 权利要求 6 的核酸在制备用于病毒学诊断哺乳动物 MPV 感染的试剂盒中的用途。

15. 一种药用组合物, 其中所述药用组合物包含 (i) 权利要求 1 或 2 的病毒, 和 (ii) 药学上可接受的载体。

16. 一种药用组合物, 其中所述药用组合物包含编码权利要求 1 或 2 的病毒的基因组或其基因组组成部分的核酸; 其中所述核酸还编码其它病毒的序列。

17. 一种药用组合物, 其中所述药用组合物包含编码权利要求 1 或 2 的病毒的基因组或其基因组组成部分的核酸; 其中所述基因组可以缺少产生复制缺陷型病毒的病毒基因组组成部分, 并且可以含有产生减毒病毒的突变、缺失或插入。

18. 一种药用组合物, 其中所述药用组合物包含 (i) 权利要求 1 或 2 的病毒的亚单位; 和 (ii) 药学上可接受的载体。

19. 一种分离或重组的核酸或其 MPV 特异性功能片段, 其可得自权利要求 1 或 2 的病毒。

20. 一种由权利要求 19 的核酸编码的分离或重组的蛋白性分子或其 MPV 特异性功能片段。

21. 一种抗原, 所述抗原包含权利要求 20 的蛋白性分子或其 MPV 特异性功能片段。

22. 一种用于诊断 MPV 感染的诊断试剂盒, 所述试剂盒包含权利要求 1 或 2 的病毒、权

利要求 19 的核酸、权利要求 20 的蛋白性分子或其片段、权利要求 21 的抗原或权利要求 11 的抗体。

23. 权利要求 15、16、17 或 18 中任一项的药用组合物在制备用于治疗或预防 MPV 感染的药物中的用途。

24. 权利要求 15、16、17 或 18 中任一项的药用组合物在制备用于治疗或预防呼吸道疾病的药物中的用途。

25. 抗体或其片段在制备用于检测样品中哺乳动物 metapneumovirus 的试剂盒中的用途,其中抗体或其片段特异性识别权利要求 1 或 2 的病毒的蛋白。

26. 第一组的一种或多种核酸在制备用于检测样品中哺乳动物 metapneumovirus 的试剂盒中的用途,其中所述第一组的一种或多种核酸在严格条件下与编码蛋白或其片段的第二组的一种或多种核酸杂交,所述蛋白包含图 20 所示的 MPV 分离株 00-1 和 99-1 的 N 蛋白的氨基酸序列。

27. 权利要求 26 的用途,其中所述第一组的核酸长度为至少 18 个、至少 20 个、至少 23 个或至少 25 个核苷酸。

28. 嵌合 3 型副流感病毒,其包含哺乳动物 MPV 核苷酸序列,其中所述哺乳动物 MPV 核苷酸序列由权利要求 1 或 2 的病毒的基因组编码。

29. 引物在制备用于检测样品中哺乳动物 metapneumovirus 的试剂盒中的用途,其中所述引物选自引物 N3、N4、M3、M4、F7、F8、L6 和 L7。

30. 探针在制备用于检测样品中哺乳动物 metapneumovirus 的试剂盒中的用途,其中所述探针具有选自以下的核酸序列:

- (i) TGC TTG TAC TTC CCA AAG ;
- (ii) TAT TTG AAC AAA AAG TGT ;和
- (iii) TGG TGT GGG ATA TTA ACA G。

在易感哺乳动物中引起呼吸道疾病的病毒

[0001] 本发明涉及病毒学领域。

[0002] 在过去数十年中,已经鉴定了几种哺乳动物疾病的病原,尤其是呼吸道疾病(RTI)的病原,特别是人类疾病的病原⁷。哺乳动物 RTI 的经典病原是在人类(hRSV)和反刍动物如牛或绵羊(bRSV 和 / 或 oRSV)中发现的属于肺病毒属(Pneumovirus)的呼吸道合胞病毒。在人 RSV 中,利用正反交中和测定中的差异、免疫测定中 G 蛋白的反应性和 G 基因的核苷酸序列,确定了两个 hRSV 抗原性亚组。在所述亚组内,氨基酸序列显示出 94%(A 亚组)或 98%(B 亚组)同一性,而在亚组之间仅发现 53%的氨基酸序列同一性。基于单克隆抗体、RT-PCR 测定和 RNA 酶保护测定,在亚组内观察到额外的变异性。来自两个亚组的病毒都有世界范围的分布,可以在一个季节中发生。在现有免疫存在下可能发生感染,并且对于再感染,并不严格需要抗原性变异。参见例如 Sullender, W.M., Respiratory Syncytial Virus Genetic and Antigenic Diversity. Clinical Microbiology Reviews, 2000. 13(1) :p. 1-15; Collins, P.L., McIntosh, K. 和 Chanock, R.M., Respiratory syncytial virus. Fields virology, B.N. Knipe, Howley, P.M. 编著, 1996, Philadelphia: Lippincott-Raven. 1313-1351; Johnson, P.R. 等, The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987, 84(16) :p. 5625-9; Collins, P.L., The molecular Biology of Human Respiratory Syncytial Virus (RSV) of the Genus Pneumovirus, 载于 The Paramyxoviruses, D.W. Kingsbury 编著, 1991, Plenum Press: New York, p. 103-153。

[0003] 另一经典的肺病毒是小鼠肺炎病毒(PVM),一般仅在实验室小鼠中发现。然而,在哺乳动物中观察到的一定比率的疾病仍不能归因于已知的病原体。

[0004] 本发明提供一种分离的属于副粘病毒科(Paramyxoviridae)肺病毒亚科(Pneumovirinae)、可鉴定为在系统发育上对应于 Metapneumovirus 的基本上为哺乳动物的负义(negative-sense)单链 RNA 病毒(MPV)。通过测定所述病毒的核酸序列并且在系统发育分析中对其进行测试,例如其中采用 100 个引导程序和 3 个 jumble 生成最大似然进化树,并且发现在系统发育上与对应于也称为火鸡鼻气管炎病毒(TRTV)(禽鼻气管炎的病原)的禽肺病毒(APV)的基本禽病毒分离株相比,它更密切地对应于以 I-2614 保藏于巴黎 CNCM 的病毒分离株,所述病毒可鉴定为在系统发育上对应于 Metapneumovirus。对于所述系统发育分析,最有用的是获得非 MPV 的核酸序列作为外类群(outgroup),以便进行比较,一种非常有用的外类群分离株可以得自禽肺病毒血清型 C(APV-C),这例如在此中的图 5 中得到证实。

[0005] 虽然系统发育分析提供了一种鉴定病毒为 MPV 的便捷方法,但是此中也提供几种其它可能更为直接但过程略多的、用于鉴定所述病毒或得自所述病毒病毒蛋白或核酸的方法。根据经验,在用序列或保藏物与此中鉴定的分离株、病毒蛋白或核酸的比较中待鉴定病毒蛋白质或核酸的百分同源性,可以鉴定 MPV。众所周知,病毒种、尤其是 RNA 病毒种通常构成一个准种,其中所述病毒分类群(cluster)在其成员之间显示出异质性。因此,预期每个

分离株与此中提供的各种分离株之一的关系百分率可能略有差异。

[0006] 当人们希望与保藏的病毒 I-2614 进行比较时,本发明提供一种分离的属于副粘病毒科肺病毒亚科的基本上为哺乳动物的负义单链 RNA 病毒 (MPV),通过测定所述病毒的氨基酸序列,并且确定在 L 蛋白、M 蛋白、N 蛋白、P 蛋白或 F 蛋白方面,所述氨基酸序列与以 I-2614 保藏于巴黎 CNCM 的病毒分离株的氨基酸同源性的百分率基本上高于此中提供的与 APV-C 相比的百分率,所述病毒可鉴定为在系统发育上对应于 Metapneumovirus;或者,同样,提供一种分离的属于副粘病毒科肺病毒亚科的基本上为哺乳动物的负义单链 RNA 病毒 (MPV),所述病毒通过以下步骤可鉴定为在系统发育上对应于 Metapneumovirus:测定所述病毒的核酸序列,并且确定在编码 L 蛋白、M 蛋白、N 蛋白、P 蛋白或 F 蛋白的核酸方面,所述核酸序列与以 I-2614 保藏于巴黎 CNCM 的病毒分离株的核酸同一性的百分率基本上高于此中鉴定的与 APV-C 相比的百分率。

[0007] 再根据经验,当需要鉴定的分离株或者所述分离株的病毒蛋白或核酸的同源性百分率落入本文鉴定的两个组(以分离株 00-1 或 99-1 作为相应的比较分离株)各自的所述同源性百分率范围内,人们可以认为所述 MPV 属于本文鉴定的 MPV 两个血清学组之一。然而,当所述同源性百分率较小,或者更需要区别所述病毒分离株与例如 APV-C 时,则建议优选采用本文鉴定的系统发育分析。

[0008] 再者,当在测定同源性百分率时选择其它分离株时,人们应该记住,所述百分率可能略有变化。

[0009] 由于提供了这种 MPV,本发明提供用于诊断和/或治疗疾病、特别是呼吸道疾病、特别是哺乳动物疾病、更特别是人类疾病的诊断工具和方法以及治疗工具和方法。然而,由于基本上为哺乳动物的 MPV 与基本上为禽类的 APV、特别是与 APV-C 的关系虽然远,但有基因关联,本发明也提供用于诊断和治疗禽类疾病的工具和方法。在病毒学中,最好的忠告是:用对引起所述感染的所述特定病毒最具特异性的试剂,进行特定病毒感染的诊断和/或治疗。在这种情况下,这意味着,优选对 MPV 最具特异性的试剂,进行所述 MPV 感染的诊断和/或治疗。然而,这决不排除使用特异性较低却有足够交叉反应性的试剂来替代的可能性,例如因为它们更容易获得,并且足以完成眼前的任务。在此,例如提供用来源于 APV 的试剂、特别是来源于 APV-C 的试剂来进行哺乳动物 MPV 感染的病毒学和/或血清学诊断,在本文的详细描述中,例如表明,通过运用专门设计用于检测鸟类 APV 抗体的 ELISA,可以达到足够值得信赖的哺乳动物 MPV 感染的血清学诊断。用于此目的的一个特别有用的试验是设计用于检测 APV 抗体(例如血清或卵黄中)的 ELISA,这是一种市售形式,名为 APV-AbSVANOVIR[®],由 SVANOVA Biotech AB(Uppsala Science Park Gluntens SE-75183 Uppsala Sweden)生产。相反的情形也是如此,在此例如提供用来源于 MPV 的试剂来进行哺乳动物 APV 感染的病毒学和/或血清学诊断,在本文的详细描述中,例如表明,通过运用设计用于检测 MPV 抗体的 ELISA,可以达到足够值得信赖的鸟类 APV 感染的血清学诊断。考虑到抗原和抗体有锁和钥匙的关系,通过选择具有足够交叉反应性的合适抗体,可以达到对各种抗原的检测。当然,由于依赖于这种交叉反应性,所以最好在各种病毒的各种(糖)蛋白之间存在氨基酸同源性的指导下,选择所述试剂(诸如抗原或抗体),从而与最为同源的蛋白相关的试剂对于在依赖于这种交叉反应性的试验中使用将是最有用的。

[0010] 对于核酸检测,甚至更为简单的,不用根据各种病毒的异源核酸序列设计引物或

探针、并且因此不需要检测所述基本上为哺乳动物或禽类的 Metapneumoviruses 之间的差异,只要根据病毒特异性核酸序列中显示出高同源性的那些序列段设计或选择引物或探针即可。一般而言,对于核酸序列,90%或90%以上的同源性百分率可保证在运用严谨杂交条件的诊断性试验中所依靠的足够的交叉反应性。

[0011] 本发明例如提供一种病毒学诊断动物、特别是哺乳动物、更尤其是人类 MPV 感染的方法,所述方法包括通过使所述动物的样品与本发明的 MPV 特异性核酸或抗体反应,测定所述样品中病毒分离株或其组分的存在情况;本发明还提供一种血清学诊断哺乳动物 MPV 感染的方法,所述方法包括通过使所述哺乳动物的样品与本发明的 MPV 特异性蛋白性分子或其片段或抗原反应,测定所述样品中特异性针对 MPV 或其组分的抗体的存在情况。本发明还提供一种用于诊断 MPV 感染的诊断试剂盒,所述试剂盒包含本发明的 MPV、MPV 特异性核酸、蛋白性分子或其片段、抗原和/或抗体,优选包含用于检测所述 MPV、MPV 特异性核酸、蛋白性分子或其片段、抗原和/或抗体的工具,所述工具例如包含本领域使用可激发的基团,例如荧光团或酶检测系统(合适的诊断试剂盒形式的实例包括 IF、ELISA、中和测定、RT-PCR 测定)。为了确定一种尚未鉴定的病毒组分或其合成类似物例如核酸、蛋白性分子或其片段是否可以鉴定为 MPV 特异性的,只要运用例如本文提供的系统发育分析,通过与已知 MPV 序列和与已知的非 MPV 序列 APV-C 的序列同源性比较,分析(分别)所述组分的核酸序列或氨基酸序列,例如分析所述核酸或氨基酸的优选至少 10 个、更优选至少 25 个、更优选至少 40 个核苷酸或氨基酸的序列段即可。根据与所述 MPV 或非 MPV 序列的关系程度,可以鉴定所述组分或合成类似物。

[0012] 本发明也提供病毒学诊断哺乳动物 MPV 感染的方法,所述方法包括通过使所述哺乳动物的样品与来源于 APV(优选血清型 C)的交叉反应性核酸或与所述 APV 反应的交叉反应性抗体反应,测定所述样品中病毒分离株或其组分的存在情况;本发明还提供一种血清学诊断哺乳动物 MPV 感染的方法,所述方法包括通过使所述哺乳动物的样品与来源于 APV 的蛋白性分子或其片段或抗原反应,测定所述样品中也针对 APV 或其组分的交叉反应性抗体的存在情况。此外,本发明提供最初设计用于 APV 或 APV 抗体检测的诊断试剂盒在诊断 MPV 感染、特别是在检测人类中所述 MPV 感染方面的应用。

[0013] 本发明也提供病毒学诊断鸟类 APV 感染的方法,所述方法包括通过使所述鸟类的样品与来源于 MPV 的交叉反应性核酸或与所述 MPV 反应的交叉反应性抗体反应,测定所述样品中病毒分离株或其组分的存在情况;本发明还提供一种血清学诊断鸟类 APV 感染的方法,所述方法包括通过使所述鸟类的样品与来源于 MPV 的蛋白性分子或其片段或抗原反应,测定所述样品中也针对 MPV 或其组分的交叉反应性抗体的存在情况。此外,本发明提供最初设计用于 MPV 或 MPV 抗体检测的诊断试剂盒在诊断 APV 感染、特别是在检测家禽例如鸡、鸭或火鸡中所述 APV 感染方面的应用。

[0014] 正如人们所述,对于治疗,可以类似地应用所发现的交叉反应性,特别是在现有的情况下,利用不太直接的更高同源性的途径。例如,当不能得到更为同源的 MPV 疫苗时,可以用来源于 APV(优选 C 型)分离株的疫苗制剂,进行不能等待的疫苗接种,例如针对 MPV 感染的紧急疫苗接种;反之,可以考虑用来源于 MPV 的疫苗制剂,进行针对 APV 感染的疫苗接种。此外,反向基因技术使得有可能产生可用作疫苗、与待减毒至所需水平的每种相应毒株的现场分离株足够不同的嵌合 APV-MPV 病毒构建体。相似的反向基因技术将使得也有可

能产生供疫苗制剂用的嵌合副粘病毒-metapneumovirus 构建体,例如 RSV-MPV 或 PI3-MPV 构建体。这类构建体尤其可用作抵抗呼吸道疾病的联合疫苗。

[0015] 因此,本发明提供一种新型的病原-一种分离的基本上为哺乳动物的负义单链 RNA 病毒(在此也称为 MPV)及其 MPV 特异性组分或合成类似物,所述病毒属于副粘病毒科的肺病毒亚科,但不能鉴定为典型的肺病毒,而是属于 Metapneumovirus。迄今尚未发现类似 metapneumovirus 的哺乳动物病毒,即可从哺乳动物中分离的、基本上以哺乳动物作为所述病毒的天然寄主或者在所述哺乳动物中致病的 metapneumovirus。被普遍认为基本上限于以家禽作为天然寄主或者是家禽疾病的病原的 metapneumovirus,也被称为禽肺病毒。最近,描述了鸭的 APV 分离株 (FR 2801 607),进一步证明 APV 感染基本上限于作为天然寄主的鸟类。

[0016] 本发明提供分离的哺乳动物肺病毒(在此也称为 MPV),所述 MPV 包含与肺病毒属不同的基因顺序和氨基酸序列,并且是密切相关的,认为其系统发育相关性可能属于副粘病毒科肺病毒亚科中的 Metapneumovirus。虽然至今尚未从鸟类分离出 metapneumovirus,但现在表明,可以在其它动物种例如哺乳动物中,鉴定出虽然显著不同、但却相关的病毒。在此,我们表明,从人类重复地分离出 MPV,而没有关于 APV 的这类报告。此外,与 APV 不同,MPV 在鸡和火鸡中基本上不复制,或者仅很少复制,而在恒河猴中容易复制。没有发现关于 APV 在哺乳动物中复制的报道。另外,虽然针对 MPV 产生的特异性抗血清中和 MPV,但针对 APV A、B 或 C 产生的抗血清并不以相同的程度中和 MPV,这种全交叉反应性(full cross reactivity)的缺乏提供了另一个关于 MPV 是一种不同的 metapneumovirus 的证明。此外,虽然 APV 和 MPV 有相似的基因顺序,但 MPV 的 G 蛋白和 SH 蛋白与已知的 APV 的所述蛋白有明显的差异,因为它们在氨基酸水平或核酸水平上都没有显示出显著的序列同源性。根据这些蛋白中的一种或两种,可以有利地开发用于鉴别 APV 分离株和 MPV 分离株或针对这些不同病毒的抗体的诊断性测定(例如 IF、ELISA、中和测定、RT-PCR 测定)。然而,此外,得自 MPV 的更相关的 N、P、M、F 和 L 蛋白的序列信息和/或抗原性信息和与 APV 的相应蛋白的序列同源性分析,也可以用来鉴别 APV 和 MPV。例如,得自 MPV 的序列信息的系统发育分析表明,MPV 和 APV 是两类不同的病毒。特别是,系统发育进化树表明,APV 和 MPV 是两个不同的病毒谱系。我们也表明,MPV 在人群中循环了至少 50 年,因此种间传播可能至少在 50 年前发生,而不是每天的事件。由于 MPV CPE 实际上不能与由 hRSV 或 hPIV-1 在 tMK 或其它细胞培养物中引起的 CPE 区别,所以可能至今所述 MPV 仍被忽视。tMK(第三代猴肾细胞,即细胞培养物中第三次传代的 MK 细胞)由于其与原代或第二代培养物相比成本较低而优选使用。所述 CPE 以及由典型副粘病毒科的某些病毒引起的 CPE 的特征为合胞体形成,此后细胞表现出快速内部破坏,然后所述细胞与所述单层分离。所述细胞通常(但不总是)在病毒从原始物质传代三次后,在接种后第 10-14 天时表现出 CPE,比由其它病毒例如 hRSV 或 hPIV-1 引起的 CPE 略晚。

[0017] 通常,作为疾病的破坏性因子,副粘病毒每年在全世界引起许多动物和人死亡。副粘病毒科构成单分子负链 RNA 病毒目(Mononegavirales)(负义单链 RNA 病毒)的一个科,由副粘病毒亚科(Paramyxovirinae)和肺病毒亚科(Pneumovirinae)组成。后一亚科目前在分类学上分为肺病毒属(Pneumovirus)和 Metapneumovirus¹。人呼吸道合胞病毒(hRSV)-肺病毒属的典型种,是全世界婴儿和幼儿下呼吸道感染的最重要的单一病因²。肺

病毒属的其它成员包括牛和羊呼吸道合胞病毒和小鼠肺炎病毒 (PVM)。

[0018] 禽肺病毒 (APV) 也称为火鸡鼻气管炎病毒 (TRIV), 是火鸡上呼吸道感染禽类鼻气管炎的病原³, APV 是最近指定的 Metapneumovirus 的唯一成员, 正如已描述的, 至今 APV 尚未与感染相关、或者更具体地讲与哺乳动物疾病相关。APV 血清学亚组可以根据 G 糖蛋白的核苷酸序列或氨基酸序列以及运用也识别 G 糖蛋白的单克隆抗体的中和试验来鉴别。在 A、B 和 D 亚组内, G 蛋白在亚组内显示出 98.5-99.7% 的氨基酸序列同一性, 而在亚组间仅观察到 31.2-38% 的氨基酸同一性。参见例如 Collins, M. S., Gough, R. E. 和 Alexander, D. J., Antigenic differentiation of avian pneumovirus isolates using polyclonal antisera and mouse monoclonal antibodies. Avian Pathology, 1993. 22 :p. 469-479; Cook, J. K. A., Jones, B. V., Ellis, M. M., Antigenic differentiation of strains of turkey rhinotracheitis virus using monoclonal antibodies. Avian Pathology, 1993. 22 :p. 257-273; Bayon-Auboyer, M. H. 等, Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup. J Gen Virol, 2000. 81 (Pt 11) :p. 2723-33; Seal, B. S., Matrix Protein gene nucleotide and predicted amino acid sequence demonstrate that the first US avian pneumovirus isolate is distinct from European strains. Virus Res, 1998. 58 (1-2) :p. 45-52; Bayon-Auboyer, M. H. 等, Comparison of F-, G- and N-based RT-PCR protocols with conventional virological procedures for the detection and typing of turkey rhinotracheitis virus. Arch Virol, 1999, 144 (6) :p. 1091-109; Juhasz, K. 和 A. J. Easton, Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence of two distinct subgroups. J Gen Virol, 1994. 75 (Pt 11) :p. 2873-80。

[0019] 在 W000/20600 中提供了另一种 APV 血清型, W000/20600 描述了 APV Colorado 分离株, 并且用体外血清中和试验将其与已知的 APV 或 TRT 毒株进行了比较。首先, 针对识别 TRT 分离株的单特异性多克隆抗血清, 测试了所述 Colorado 分离株。所述 Colorado 分离株不被针对任何所述 TRT 毒株的单特异性抗血清中和。然而, 它被针对 A 亚组毒株产生的超免疫抗血清所中和。这种抗血清在 1 : 400 的滴度下中和所述同源病毒, 而在 1 : 80 的滴度下中和所述 Colorado 分离株。然后运用上述方法, 针对 TRT 单克隆抗体测试了所述 Colorado 分离株。在所有情况下, 交互中和效价都小于 10。针对所述 Colorado 分离株产生的单特异性抗血清也针对两个亚组的 TRT 毒株进行了测试。所测试的 TRT 毒株中没有一个是被抗所述 Colorado 分离株的抗血清中和。

[0020] APV Colorado 毒株不保护 SPF 鸡抵抗 TRT 病毒的 A 亚组或 B 亚组毒株的攻击。这些结果提示, 所述 Colorado 分离株可能是禽肺病毒的另一种血清型的首个例子, Bayon-Auboyer 等也提示了这一点 (J. Gen. Vir. 81 :2723-2733 (2000))。

[0021] 在一个优选实施方案中, 本发明提供一种在分类学上对应于 (迄今未知的哺乳动物) metapneumovirus 的分离的 MPV, 所述 MPV 包含与副粘病毒科肺病毒亚科中的肺病毒不同的基因顺序。这两个属的分类主要基于其基因构象 (gene constellation); metapneumovirus 一般缺乏非结构蛋白诸如 NS1 或 NS2 (也参见 Randhawa 等, J. Vir. 71 : 9849-9854 (1997), 并且基因顺序不同于肺病毒的基因顺序 (RSV : ' 3-NS1-NS2-N-P-M-SH-G

-F-M2-L-5', APV: '3-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5')^{4,5,6}。本发明提供的 MPV 或者在分类学上与其对应的病毒分离株基于 EM 分析,揭示为副粘病毒样颗粒。与分类一致,MPV 或在系统发育上或分类学上与其对应的病毒分离株对氯仿处理敏感;最适于在 tMK 细胞或与其功能等同的细胞上培养,并且在大多数细胞培养物中基本上是酪氨酸依赖性的。此外,典型的 CPE 以及对于最经典使用的红细胞缺乏血细胞凝集活性,提示本文提供的病毒虽然仅与经典肺病毒如 RSV 是远缘,但却是相关的。虽然大多数副粘病毒具有血细胞凝集活性,但大多数肺病毒没有所述活性¹³。依照本发明的 MPV 在编码 M2 蛋白的核酸片段中也含有第二个重叠 ORF(M2-2),与一般大多数其它肺病毒一样,诸如也在 Ahmadian 等, J. Gen. Vir. 80: 2011-2016(1999) 中所证明的。

[0022] 为了发现本发明提供的其它病毒分离株,只要测试任选得自患病动物或人的样品中肺病毒亚科病毒的存在情况,并且测试如此得到的病毒中编码(功能性)NS1 或 NS2 的基因的存在情况,或者如上所述基本上证明不同于肺病毒如 RSV 的基因顺序即可。此外,通过用得自本文提供的 MPV 分离株的核酸的交叉杂交实验,或者在运用特异性针对 MPV 分离株的单克隆抗体和/或具体来源于 MPV 分离株的抗原和/或免疫原的经典交叉血清学实验中,可以发现在系统发育上并且因此在分类上与 MPV 相对应的病毒分离株。

[0023] 当新分离的病毒包含与我们的原型 MPV 分离株足够相似的基因顺序和/或氨基酸序列,或者在结构上与其对应,并且显示出与肺病毒亚科的 Metapneumovirus 密切相关时,所述病毒在系统发育上并且因此在分类学上对应于 MPV。MPV 和同一科的任何迄今已知的其它病毒(APV C 亚型)之间有最高氨基酸序列同源性,并且在各个蛋白质水平上确定结构相关性,对于基质蛋白为 87%,对于核蛋白为 88%,对于磷蛋白为 68%,对于融合蛋白为 81%,而对于聚合酶蛋白的部分为 56-64%,这可以在将图 6 中给出的序列与其它病毒、特别是 APV-C 的序列比较时得出。分别相对于这些上述最大值有较高同源性的各个蛋白质或完整的病毒分离株,被认为在系统发育上并且因此在分类学上对应于 MPV,并且包含在结构上与图 6 所示序列对应的核酸序列。在此,本发明提供一种在系统发育上对应于所保藏的病毒的病毒。应该注意到,与其它病毒相似,在本文提供的不同分离的基本上为哺乳动物的负义单链 RNA 病毒分离株之间,发现一定程度的变异。在系统发育进化树中,根据 L、M、N 和 F 基因的部分的比较性序列分析,我们鉴定出病毒分离株的至少 2 个遗传分类群(genetic cluster)。基于所述病毒核酸序列或氨基酸序列(病毒序列)的核苷酸和氨基酸差异,以及与其它肺病毒如 RSV 相似,这些 MPV 基因型代表 MPV 亚型。在 MPV 分离株的每个遗传分类群内,发现核苷酸水平的同一性百分率对于 L 为 94-100,对于 M 为 91-100,对于 N 为 90-100,而对于 F 为 93-100,并且在氨基酸水平上,发现同一性百分率对于 L 为 91-100,对于 M 为 98-100,对于 N 为 96-100,而对于 F 为 98-100。在图 18-28 中,可以发现另一种比较。对于此中提供的、迄今已鉴定的分离的基本上为哺乳动物的负义单链 RNA 病毒(MPV 分离株)的整个组而言,核苷酸水平的最低同一性百分率,对于 L 和 M 为 81,对于 N 为 83,而对于 F 为 82。在氨基酸水平上,该百分率对于 L 和 N 为 91,对于 M 为 94,对于 F 为 95。此中提供的 MPV 分离株的病毒序列或分离的 MPV F 基因例如表现出与例如 Seal 等, Vir. Res. 66: 139147(2000) 提供的 APV-C 融合(F)基因的相应核苷酸序列或氨基酸序列有低于 81%的核苷酸序列同一性或低于 82%的氨基酸序列同一性。

[0024] 此外,此中提供的 MPV 分离株的病毒序列或分离的 MPV L 基因例如表现出与例如

Ranhawa 等, J. Gen. Vir. 77 :3047-3051 (1996) 提供的 APV-A 聚合酶基因的相应核苷酸序列或氨基酸序列有低于 61% 的核苷酸序列同一性或低于 63% 的氨基酸序列同一性。

[0025] 全世界 MPV 毒株的序列差异百分比与其它病毒类似,可能略高。因此,通过分析 9 种病毒分离株的 N、M、F 和 L ORF 中的部分核苷酸序列,鉴定了两个潜在的遗传分类群。在一个分类群内观察到 90-100% 核苷酸同一性,在分类群间观察到 81-88% 的同一性。用更多病毒分离株获得的序列信息证实存在两种基因型。作为 A 分类群原型的病毒分离株 ned/00/01 和作为 B 分类群原型的病毒分离株 ned/99/01 已经用于交叉中和测定,以测试所述基因型是否与不同的血清型或亚组相关。根据这些数据,我们总结出,表现出与分离株 I-2614 的氨基酸同源性百分率对于 L 高于 64、对于 M 高于 87、对于 N 高于 88、对于 P 高于 68、对于 F 高于 81、对于 M2-1 高于 84 或对于 M2-2 高于 58 的基本上为哺乳动物的病毒分离株,可以分类为此中提供的分离的基本上为哺乳动物的负义单链 RNA 病毒。特别是,一般在核苷酸序列水平与此中提供的一种原型 MPV 分离株的最低同一性百分率对于 L 和 M 为 81、对于 N 为 83 和 / 或对于 F 为 82 的那些病毒分离株,是此中提供的 MPV 分离株组的成员。在氨基酸水平上,这些百分率对于 L 和 N 为 91、对于 M 为 94、和 / 或对于 F 为 95。当给定病毒分离株的氨基酸序列同源性百分率对于 L 和 N 高于 90、对于 M 高于 93、或对于 F 高于 94 时,所述病毒分离株与图 5 所示的 MPV 分离株组相似。当给定病毒分离株的氨基酸序列同源性百分率对于 L 高于 94、对于 N 高于 95 或对于 M 和 F 高于 97 时,所述病毒分离株可以被鉴定为属于图 5 所示的基因型分类群之一。应该注意到,借以确定遗传分类群的这些同源性百分率与在 RSV 的相应基因的遗传分类群中发现的同源性程度相似。

[0026] 简而言之,本发明提供分离的基本上为哺乳动物的负义单链 RNA 病毒 (MPV),所述 MPV 属于副粘病毒科肺病毒亚科,并且通过测定所述病毒基因组中合适片段的核酸序列并且在系统发育进化树分析中对其进行测试,其中采用 100 个引导程序和 3 个 jumble 生成最大似然进化树,并且发现在系统发育上与对应于也称为火鸡鼻气管炎病毒 (TRTV) (禽鼻气管炎的病原) 的禽肺病毒 (APV) 的病毒分离株相比,它更密切地对应于以 I-2614 保藏于巴黎 CNCM 的病毒分离株,所述病毒可鉴定为在系统发育上对应于 Metapneumovirus。

[0027] 每种可用于这样的系统发育进化树分析的合适的核酸基因组片段,例如为此中在详细描述中公开的、生成此中图 4 或图 5 中公开的各种系统发育进化树分析的 RAP-PCR 片段 1-10 中的任一种。MPV 的核蛋白 (N)、磷蛋白 (P)、基质蛋白 (M) 和融合蛋白 (F) 基因的系统发育进化树分析揭示与主要在美国鸟类中发现的禽肺病毒 -APV C 血清型有最高程度的序列同源性。

[0028] 在一个优选实施方案中,本发明提供一种分离的基本上为哺乳动物的负义单链 RNA 病毒 (MPV),所述 MPV 属于副粘病毒科肺病毒亚科,并且通过测定所述病毒基因组中合适片段的核酸序列并且在系统发育进化树分析中对其进行测试,其中采用 100 个引导程序和 3 个 jumble 生成最大似然进化树,并且发现在系统发育上与对应于也称为火鸡鼻气管炎病毒 (TRTV) (禽鼻气管炎的病原) 的禽肺病毒 (APV) 的病毒分离株相比,它更密切地对应于以 I-2614 保藏于巴黎 CNCM 的病毒分离株,所述病毒可鉴定为在系统发育上对应于 Metapneumovirus,其中所述合适片段包含编码所述病毒的病毒蛋白的可读框。

[0029] 合适的可读框 (ORF) 包括编码 N 蛋白的 ORF。当发现所分析的 N 蛋白与分离株 I-2614 的 N 蛋白的总体氨基酸同一性至少为 91% 优选至少 95% 时,则所分析的病毒分离株

包含依照本发明的优选的 MPV 分离株。正如所表明的, MPV 基因组图谱中的第一个基因编码一种 394 个氨基酸 (aa) 的蛋白质, 并且表现出与其它肺病毒的 N 蛋白有广泛的同源性。所述 N ORF 的长度与 APV-C 的 N ORF 的长度相同 (表 5), 而小于其它副粘病毒的 N ORF 的长度 (Barr 等, 1991)。氨基酸序列的分析揭示, 与 APV-C 的同源性最高 (88%), 与其它副粘病毒仅有 7-11% 的同源性 (表 6)。

[0030] Bart 等 (1991) 鉴定出在属于单分子负链 RNA 病毒目的病毒之间有相似性的 3 个区: A、B 和 C (图 8)。虽然在病毒科内的相似性最高, 但这些区在病毒科之间是高度保守的。在所有三个区中, MPV 显示出与 APV-C 的氨基酸序列同一性为 97%, 与 APV-B 的氨基酸序列同一性为 89%, 与 APV-A 的氨基酸序列同一性为 92%, 而与 RSV 和 PVM 的氨基酸序列同一性为 66-73%。在 aa 残基 160 和 340 之间的区看来在 metapneumovirus 中是高度保守的, 在肺病毒亚科中其保守程度略低 (Miyahara 等, 1992; Li 等, 1996; Barr 等, 1991)。这与 MPV 是一种 metapneumovirus 是一致的, 这一特定区显示出与 APV C 的相似性为 99%。

[0031] 可用于系统发育分析的另一合适的可读框 (ORF) 包括编码 P 蛋白的 ORF。当发现所分析的 P 蛋白与分离株 I-2614 的 P 蛋白的总体氨基酸同一性至少为 70%、优选至少 85% 时, 则所分析的病毒分离株包含依照本发明的优选的 MPV 分离株。MPV 基因组图谱中的第二个 ORF 编码一种 294 个 aa 的蛋白质, 所述蛋白质与 APV-C 的 P 蛋白有 68% 的氨基酸序列同源性, 与 RSV 的 P 蛋白仅有 22-26% 的氨基酸序列同源性 (表 6)。MPV 的 P 基因含有一个实质上的 ORF, 并且在该方面与得自许多其它副粘病毒的 P 相似 (有关综述参见 Lamb 和 Kolakofsky, 1996; Sedlmeier 等, 1998)。与 APV A 和 B 以及 PVM 相反, 而与 RSV 和 APV-C 相似, MPV P ORF 缺乏半胱氨酸残基。Ling (1995) 提出, 在所有肺病毒中有高度相似性的一个区 (aa 185-241) 在 RNA 合成过程或者在维持核衣壳复合体结构完整性方面起作用。这一高相似性的区也存在于 MPV 中 (图 9), 尤其是当考虑到保守取代时, 显示出与 APV-C 的相似性为 100%, 与 APV-A 和 B 的相似性为 93%, 与 RSV 的相似性大约为 81%。MPV P 蛋白的 C 末端富含谷氨酸残基, 正如关于 APV 已描述的 (Ling 等, 1995)。

[0032] 可用于系统发育分析的另一合适的可读框 (ORF) 包括编码 M 蛋白的 ORF。当发现所分析的 M 蛋白与分离株 I-2614 的 M 蛋白的总体氨基酸同一性至少为 94%、优选至少 97% 时, 则所分析的病毒分离株包含依照本发明的优选的 MPV 分离株。MPV 基因组中的第三个 ORF 编码一种 254 个 aa 的蛋白质, 所述 ORF 类似其它肺病毒的 M ORF。MPV M ORF 的大小与其它 metapneumovirus 的 M ORF 的大小完全相同 (表 5), 并且显示出与 APV 基质蛋白的氨基酸序列同源性高 (76-87%), 与 RSV 和 PVM 的氨基酸序列同源性较低 (37-38%), 而与其它副粘病毒的同源性为 10% 或更低 (表 6)。Easton (1997) 比较了所有肺病毒的基质蛋白的序列, 发现残基 14-19 有一个保守的六肽, 所述六肽在 MPV 中也是保守的 (图 10)。对于 RSV、PVM 和 APV 而言, 已经鉴定出 M 主要 ORF 内或者与 M 主要 ORF 重叠的小的第二个 ORF (bRSV 中的 52 个 aa 和 51 个 aa, RSV 中的 75 个 aa, PVM 中的 46 个 aa 和 APV 中的 51 aa) (Yu 等, 1992; Easton 等, 1997; Samal 等, 1991; Satake 等, 1984)。我们注意到 MPV M ORF 中有两个小 ORF。在 M 主要 ORF 内发现一个始于核苷酸 2281 的 54 个 aa 残基的小 ORF, 发现一个始于核苷酸 2893 的与 M 主要 ORF 重叠的 33 个 aa 残基的小 ORF (数据未显示)。与 RSV 和 APV 的第二 ORF 相似, 在这些第二 ORF 和其它肺病毒的第二 ORF 之间没有显著的同源性, 并且缺乏表观的起始信号或终止信号。另外, 有关对应于 APV 和 RSV 的这些第二 ORF 的蛋白

质的合成的证据尚未有报道。

[0033] 可用于系统发育分析的另一合适的可读框 (ORF) 包括编码 F 蛋白的 ORF。当发现所分析的 F 蛋白与分离株 I-2614 的 F 蛋白的总体氨基酸同一性至少为 95%、优选至少 97% 时,则所分析的病毒分离株包含依照本发明的优选的 MPV 分离株。MPV 的 F ORF 邻近 M ORF 定位,这是 Metapneumovirus 成员的特征。MPV F 基因编码一种 539 个 aa 的蛋白质,该蛋白比 APV-C 的 F 长 2 个 aa 残基 (表 5)。氨基酸序列分析表明,与 APV-C 的同源性为 81%,与 APV-A 和 B 的同源性为 67%,与肺病毒 F 蛋白的同源性为 33-39%,而与其它副粘病毒的同源性仅有 10-18% (表 6)。在副粘病毒 F 蛋白中并且也在 MPV 中观察到的保守特征之一是半胱氨酸残基的分布 (Morrison,1988;Yu 等,1991)。metapneumovirus 在 F1 中共享 12 个半胱氨酸残基 (7 个在所有副粘病毒中是保守的),在 F2 中共享 2 个半胱氨酸残基 (1 个在所有副粘病毒中是保守的)。在 MPV F ORF 中存在的 3 个潜在的 N- 联糖基化位点中,没有一个是与 RSV 共享的,与 APV 共享 2 个所述位点 (位置 66 和 389)。MPV 的第三个特有的潜在 N- 联糖基化位点位于位置 206 (图 11)。虽然与其它副粘病毒的序列同源性低,但 MPV 的 F 蛋白表现出与关于其它副粘病毒科成员的 F 蛋白所描述的相一致的典型融合蛋白的特征 (Morrison,1988)。副粘病毒科成员的 F 蛋白作为无活性前体 (F0) 合成,被宿主细胞的蛋白酶切割,产生氨基末端 F2 亚基和大的羧基末端 F1 亚基。已提出的切割位点 (Collins 等,1996) 在副粘病毒科的所有成员中都是保守的。MPV 的所述切割位点含有残基 RQSR。两个精氨酸 (R) 残基与 APV 和 RSV 共享,但谷氨酰胺 (Q) 和丝氨酸 (S) 残基与其它副粘病毒如人副流感病毒 1 型、仙台病毒和麻疹病毒共享 (数据未显示)。F1 氨基末端的疏水性区据认为作为膜融合结构域起作用,并且在副粘病毒和麻疹病毒中显示出高序列相似性,而在肺病毒中显示出的序列相似性程度较低 (Morrison,1988)。这 26 个残基 (位置 137-163,图 11) 在 MPV 和 APV-C 之间是保守的,这与该区在 metapneumovirus 中高度保守相一致 (Naylor 等,1998;Seal 等,2000)。

[0034] 正如对于 APV 和其它副粘病毒的 F2 亚基所观察到的,与 RSV 相比,MPV 显示出缺失 22 个 aa 残基 (位置 107-128,图 11)。此外,对于 RSV 和 APV,发现信号肽和锚定结构域在亚型内保守,而在亚型间显示出高变异性 (Plows 等,1995;Naylor 等,1998)。MPV 的位于 F2 氨基末端的信号肽 (aa 10-35,图 11) 显示出与 APV-C 有一定的序列相似性 (26 个 aa 残基中的 18 个是相似的),与其它 APV 或 RSV 有较低的保守性。在 F1 羧基末端的膜锚定结构域中观察到多得多的变异性,虽然仍观察到与 APV-C 有一定的同源性。

[0035] 可用于系统发育分析的另一合适的可读框 (ORF) 包括编码 M2 蛋白的 ORF。当发现所分析的 M2 蛋白与分离株 I-2614 的 M2 蛋白的总体氨基酸同一性至少为 85%、优选至少 90% 时,则所分析的病毒分离株包含依照本发明的优选的 MPV 分离株。M2 基因是肺病毒亚科特有的,在所有肺病毒中观察到两个重叠的 ORF。第一个主要 ORF 代表 M2-1 蛋白,该蛋白增强病毒聚合酶的持续合成能力 (Collins 等,1995;Collins,1996) 和其基因间区的通读性 (Hardy 等,1998;Fearn 等,1999)。MPV 的 M2-1 基因邻近 F 基因定位,编码一种 187 个 aa 的蛋白质 (表 5),并且显示出与 APV-C 的 M2-1 的同源性最高 (84%) (表 6)。所有肺病毒 M2-1 蛋白的比较表明,在所述蛋白氨基端一半中的保守性最高 (Collins 等,1990;Zamora 等,1992;Ahmadian 等,1999),这与 MPV 显示出在该蛋白的前 80 个 aa 残基中与 APV-C 的相似性为 100% 的保守性的观察相一致 (图 12A)。MPV M2-1 蛋白含有 3 个位于前 30 个 aa 残

基内、在所有肺病毒中保守的半胱氨酸残基。这种半胱氨酸的集中在锌结合蛋白中是常见的 (Ahmadian 等, 1991 ;Cuesta 等, 2000)。

[0036] 与肺病毒 M2-1 ORF 重叠的第二 ORF (M2-2) 的位置是保守的,但在序列上不保守,所述 ORF 被认为参与病毒 RNA 复制和转录间转换的控制 (Collins 等, 1985 ;Elango 等, 1985 ;Baybutt 等, 1987 ;Collins 等, 1990 ;Ling 等, 1992 ;Zamora 等, 1992 ;Alansari 等, 1994 ;Ahmadian 等, 1999 ;Bermingham 等, 1999)。对于 MPV 而言, M2-2 ORF 始于 M2-1 ORF 中的核苷酸 512 (图 7), 这正是 APV-C 中的相同起始位置。APV-C 和 MPV 的 M2-2 ORF 的长度相同,有 71 个 aa 残基 (表 5)。MPV 和 APV-C 之间 M2-2 ORF 的序列比较 (图 12B) 表明有 56% 的氨基酸序列同源性,而在 MPV 与 APV-A 和 B 之间仅有 26-27% 的氨基酸序列同源性 (表 6)。

[0037] 可用于系统发育分析的另一合适的可读框 (ORF) 包括编码 L 蛋白的 ORF。当发现所分析的 L 蛋白与分离株 I-2614 的 L 蛋白的总体氨基酸同一性至少为 91%、优选至少 95% 时,则所分析的病毒分离株包含依照本发明的优选的 MPV 分离株。与其它负链病毒类似, MPV 基因组的最后一个 ORF 是复制转录复合物的依赖 RNA 的 RNA 聚合酶组分。MPV 的 L 基因编码一种 2005 个 aa 的蛋白质,所述蛋白质比 APV-A 的所述蛋白长 1 个残基 (表 5)。MPV 的 L 蛋白与 APV-A 有 64% 的同源性,与 RSV 有 42-44% 的同源性,而与其它副粘病毒有约 13% 的同源性 (表 6)。Poch 等 (1989 ;1990) 鉴定出非分段负链 RNA 病毒的 L 蛋白内的 6 个保守结构域,其中结构域 III 含有被认为对于聚合酶功能所必需的 4 个核心聚合酶基序。这些基序 (A、B、C 和 D) 在 MPV L 蛋白中的保守性很好:在基序 A、B 和 C 中:MPV 与所有肺病毒有 100% 的相似性,在基序 D 中,MPV 与 APV 有 100% 相似性,与 RSV 有 92% 的相似性。对于完整的结构域 III (L ORF 中的 aa 625-847), MPV 与 APV 有 83% 的同一性,与 RSV 有 67-68% 的同一性,与其它副粘病毒有 26-30% 的同一性 (图 15)。除所述聚合酶基序之外,肺病毒的 L 蛋白含有一个符合共有 ATP 结合基序 K(X)₂₁GEGAGN(X)₂₀K 的序列 (Stec, 1991)。MPV L ORF 含有一个与 APV 类似的基序,其中中间残基的距离少一个残基:K(x)₂₂GEGAGN(X)₁₉K。

[0038] 可用于系统发育分析的更为优选的合适的可读框 (ORF) 包括编码 SH 蛋白的 ORF。当发现所分析的 SH 蛋白与分离株 I-2614 的 SH 蛋白的总体氨基酸同一性至少为 30%、优选至少 50%、更优选至少 75% 时,则所分析的病毒分离株包含依照本发明的优选的 MPV 分离株。所述基因邻近 MPV 的 M2 定位,编码一种 183 个 aa 的蛋白质 (图 7)。所述核苷酸序列及其导出的氨基酸序列的分析表明,没有与其它 RNA 病毒基因或基因产物可辨别的同源性。MPV 的 SH ORF 是迄今已知的最长的 SH ORF (表 5)。所述 SH ORF 的 aa 残基的组成与 APV、RSV 和 PVM 的相当相似,具有高百分比的苏氨酸和丝氨酸 (MPV、APV、RSV A、RSV B、bRSV 和 PVM 的丝氨酸 / 苏氨酸含量分别为 22%、18%、19%、20.0%、21% 和 28%)。MPV 的 SH ORF 含有 10 个半胱氨酸残基,而 APV SH 含有 16 个半胱氨酸残基。所有肺病毒都有类似数目的潜在的 N-糖基化位点 (MPV 2、APV 1、RSV 2、bRSV 3、PVM 4)。

[0039] MPV SH 蛋白以及 APV 和 RSV 的 SH 的疏水性分布型揭示出相似的结构特征 (图 13B)。APV 和 MPV 的 SH ORF 有一个亲水性 N 末端 (aa 1-30)、一个可以充当潜在的跨膜结构域的中心疏水性结构域 (aa 30-53)、残基 160 周围的一个第二疏水性结构域和一个亲水性 C 末端。相反,RSV 的 SH 看来缺乏 APV 和 MPV ORF 的 C 端一半。在所有肺病毒的 SH 蛋白中,所述疏水性结构域都邻接多个碱性氨基酸,该碱性氨基酸在 MPV 的 SH ORF 中也存在 (aa

29 和 54)。

[0040] 可用于系统发育分析的另一个更为优选的合适的可读框 (ORF) 包括编码 G 蛋白的 ORF。当发现所分析的 G 蛋白与分离株 I-2614 的 G 蛋白的总体氨基酸同一性至少为 30%、优选至少 50%、更优选为至少 75% 时, 则所分析的病毒分离株包含依照本发明的优选的 MPV 分离株。MPV 的 G ORF 邻近 SH 基因定位, 编码一种 236 个氨基酸的蛋白质。紧接该 ORF 之后, 发现第二个小 ORF, 可能编码 68 个 aa 残基 (位置 6973-7179), 但缺乏起始密码子。在一个不同读框中的 194 个 aa 残基的第三个主要 ORF (片段 4, 图 7) 与这两个 ORF 重叠, 但也缺乏起始密码子 (核苷酸 6416-7000)。这一主要 ORF 在同一读框内后接第四个 ORF (nt 7001-7198), 可能编码 65 个 aa 残基, 但又是缺乏起始密码子。最后, 在所述第三个读框中发现一个可能的 97 个 aa 残基的 ORF (但缺乏起始密码子) (nt 6444-6737, 图 1)。与第一个 ORF 不同, 所述其它 ORF 没有表观的基因起始序列或基因终止序列 (参见下文)。虽然 236 个 aa 残基的 G ORF 可能代表 MPV 吸附蛋白的至少一部分, 但不能排除的是: 所述额外的编码序列通过某些 RNA 编辑事件而作为单独的蛋白或作为所述吸附蛋白的部分表达。应该注意到, 对于 APV 和 RSV 而言, 在所述主要 G ORF 之后没有鉴定出第二个 ORF, 但 APV 和 RSV 在 G 的主要 ORF 内都有第二个 ORF。然而, 缺乏有关这些 ORF 表达的证据, 并且在不同病毒的预测氨基酸序列之间没有同源性 (Ling 等, 1992)。MPV G 中的第二个 ORF 没有显示出其它 G 蛋白的特征, 所述额外 ORF 是否表达有待进一步研究。对于所有 4 个 ORF 的 BLAST 分析表明, 在核苷酸序列或氨基酸序列水平上与其它已知病毒基因或基因产物没有可辨别的同源性。这与发现其它 G 蛋白例如 hRSV A 和 B 的 G 蛋白 (53%) (Johnson 等, 1987) 以及与 APV A 和 B 的 G 蛋白 (38%) (Juhasz 等, 1994) 的序列同源性低相一致。而大多数所述 MPV ORF 在长度和序列上与 APV 的所述 ORF 相似, MPV 的 G ORF 比 APV 的 G ORF 小得多 (表 5)。氨基酸序列表明, 丝氨酸和苏氨酸的含量为 34%, 这甚至高于 RSV 的 32% 和 APV 的 24%。所述 G ORF 也含有 8.5% 的脯氨酸残基, 这高于 RSV 的 8% 和 APV 的 7%。APV、RSV 和 MPV 的 G 蛋白中脯氨酸残基的不寻常的丰度在粘蛋白起源的糖蛋白中也观察到, 在粘蛋白起源的糖蛋白中这是蛋白质三维结构的一个主要考虑因素 (Collins 等, 1983; Wertz 等, 1985; Jentoft, 1990)。MPV G 中的潜在 N- 联糖基化位点的数目与其它肺病毒的相似: MPV 有 5 个, 而 hRSV 有 7 个, bRSV 有 5 个, APV 有 3-5 个。

[0041] MPV G 的预测疏水性分布型揭示了与其它肺病毒相似的特征。氨基末端含有一个亲水性区, 后接一个短的疏水性区 (aa 33-53) 和一个主要为亲水性的羧基末端 (图 14B)。这种总体组构与锚定 II 型跨膜蛋白的相一致, 与 APV 和 RSV 的 G 蛋白中的这些区很好地对应。MPV 的 G ORF 仅含有 1 个半胱氨酸残基, 这与 RSV 和 APV 形成对比 (分别有 5 个和 20 个)。

[0042] 依照经典的血清学分析, 例如得自以下文献的分析: Francki, R. I. B., Fauquet, C. M., Knudson, D. L 和 Brown, F., Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the international Committee on Taxonomy of viruses. Arch Virol, 1991. Supplement 2: p. 140-144, 根据通过用动物抗血清 (在详细描述中提供的得自例如白鼬或豚鼠的抗血清) 定量中和测定的免疫学区别 (immunological distinctiveness), MPV 分离株也可被鉴定为属于本文提供的血清型。这样一种血清型或者与其它血清型没有交叉反应, 或者在两个方向上都显示出同种与异种效价之比大于 16。如果中和表明两种病毒在任

一个或两个方向上有一定程度的交叉反应（同种与异种效价之比为 8 或 16），则若存在 DNA 的显著生物物理 / 生物化学差异，就推定有血清型区别（distinctiveness）。如果中和表示两种病毒在任一个或两个方向上有不同程度的交叉反应（同种与异种效价之比小于 8），则推定所研究的分离株的血清型相同。正如所述的，在此提供一种有用的原型分离株例如分离株 I-2614，在本文也称为 MPV 分离株 00-1。

[0043] 根据 G 和 / 或 SH 蛋白的同源性，可以进一步将病毒分类为此中提供的分离的基本上为哺乳动物的负义单链 RNA 病毒。在一般 APV（从鸟类分离的）和 MPV（从人类分离的）的 N、P、M、F、M2 和 L ORF 之间存在 64-88% 的总体氨基酸序列同一性，并且在 APV 和 MPV 基因组的非编码区之间也发现有核苷酸序列同源性的情况下，发现在所述人类分离株（MPV）的所述 ORF 中的两个和其它副粘病毒的所述 ORF 中任一个之间基本上没有可辨别的氨基酸序列同源性。在所述病毒基因组中这些 ORF 的氨基酸含量、疏水性分布型和位置表明，它们代表 G 和 SH 蛋白类似物。在 APV 和 MPV 之间的序列同源性、其相似的基因组结构（3' -N-P-M-F-M2-SH-G-L-5'）以及系统发育分析，提供了有关所提出的 MPV 分类为第一种哺乳动物 metapneumovirus 的进一步证据。因此，新的 MPV 分离株可以例如如此通过以下方法来鉴定：通过病毒分离和用 tMK 或其它细胞进行特征鉴定、通过 RT-PCR 和 / 或序列分析，后接系统发育进化树分析、通过血清学技术例如病毒中和测定、间接免疫荧光测定、直接免疫荧光测定、FACs 分析或其它免疫学技术。优选这些技术针对 SH 和 / 或 G 蛋白类似物。

[0044] 例如，本发明在此提供一种鉴定此中提供的 MPV 的其它分离株的方法，所述方法包括接种基本上为 MPV 不感染或无特定病原体的豚鼠或白鼬（在详细描述中，所述动物经鼻内接种，但其它接种方式诸如肌内或皮内接种以及使用其它实验动物也是可行的）与原型分离株 I-2614 或相关分离株。在第 0 天、接种后 2 周和 3 周，从所述动物收集血清。在所述其它分离株的免疫学检测中，使用用病毒中和（VN）测定和针对相应的分离株 I-2614 的间接 IFA 测定为特异性血清转变的动物和得自所述血清转变的动物的血清。

[0045] 作为一个例子，本发明提供副粘病毒科的一个新成员 - 在人类中可能引起重症 RTI 的人 metapneumovirus 或 metapneumovirus 样病毒（由于其最终的分分类学有待病毒分类委员会的讨论，所以所述 MPV 在此例如描述为在分类学上对应于 APV）（MPV）的表征。由 MPV 引起的疾病的临床体征基本上与 hRSV 引起的体征相似，例如咳嗽、肌痛、呕吐、发热、支气管炎或肺炎、可能的结膜炎或它们的并发症。正如在 hRSV 感染的儿童、尤其是非常小的儿童中所观察到的，可能需要住院。作为一个例子，提供于 2001 年 1 月 19 日以 I-2614 保藏于巴黎巴斯德研究所（Institute Pasteur, Paris）CNCM 的 MPV 或者在系统发育上与其对应的病毒分离株。此外，本发明提供一种包含在系统发育上对应于图 6a、6b、6c 中所示的核酸序列或在结构上与其对应的核酸或功能片段的病毒。特别是，本发明提供一种病毒，所述病毒的特征在于在其中用 100 个引导程序和 3 个 jumble 生成最大似然进化树的系统发育进化树分析中测试后，发现在系统发育上对应于也称为火鸡鼻气管炎病毒（TRTV）（禽鼻气管炎的病原）的禽肺病毒（APV）的病毒分离株相比，它更密切地对应于以 I-2614 保藏于巴黎 CNCM 的病毒分离株。尤其有用的是，在所述系统发育进化树分析中用 APV-C 病毒分离株作为外类群，所述 APV-C 病毒分离株虽然基本上是非哺乳动物病毒，但却是最相关的。

[0046] 根据几个观察结果，我们提议新型人类病毒被命名为人 metapneumovirus 或

metapneumovirus 样病毒 (MPV)。EM 分析揭示出副粘病毒样颗粒。与所述分类一致的是, MPV 看来对氯仿处理敏感。MPV 最适于在 tMK 细胞上培养, 并且是酪氨酸依赖性的。由 MPV 引起的临床症状以及典型的 CPE 和缺乏血细胞凝集活性提示, 这种病毒与 hRSV 最为相关。虽然大多数副粘病毒有血细胞凝集活性, 但大多数肺病毒没有所述活性¹³。

[0047] 作为一个例子, 本发明提供先前尚未鉴定的、得自取自 28 位患有重症 RTI 的儿童鼻咽吸出物样品的副粘病毒。这些儿童的临床症状主要与 hRSV 所致的症状相似。所述患者中的 27 位是 5 岁以下的儿童, 其中一半为 1-12 个月。另一位患者为 18 岁。所有个体都患有上呼吸道疾病, 症状从咳嗽、肌痛、呕吐和发热至支气管炎和重症肺炎。这些患者中的大多数住院 1-2 周。

[0048] 得自这些患者的病毒分离株在负对比电子显微镜下具有副粘病毒的形态, 但不与针对已知的人类和动物副粘病毒的特异性抗血清反应。通过使用针对所述分离株中的 2 株产生的血清的间接免疫荧光测定 (IFA) 测定, 它们之间都密切相关。这些分离株中的 9 个的序列分析表明, 所述病毒与 APV 略微相关。基于病毒学数据、序列同源性以及基因组结构, 我们提出, 所述病毒是 Metapneumovirus 的成员。血清学调查表明, 这种病毒是相对常见的病原体, 因为在荷兰的血清阳性率接近 5 岁人群的 100%。此外, 在 1958 年从人类收集的血清中, 发现血清阳性率同样高, 表明这种病毒在人群中已经循环超过 40 年。这种建议的 Metapneumovirus 新成员的鉴定, 也为开发供诊断分析或试剂盒和疫苗用的工具和方法、或者针对病毒呼吸道感染的血清或抗体组合物、以及测试或筛选可用于 MPV 感染治疗的抗病毒药的方法创造了条件。

[0049] 在这方面, 本发明其中提供可得自本发明病毒的分离或重组的核酸或其病毒特异性功能片段。特别是, 本发明提供适用于鉴定 MPV 核酸的引物和 / 或探针。

[0050] 此外, 本发明提供一种包含本发明核酸的载体。首先, 提供载体, 例如含有 MPV 基因组 (的部分) 的质粒载体、含有 MPV 基因组 (的部分) 的病毒载体 (例如但不限于其它副粘病毒、痘苗病毒、逆转录病毒、杆状病毒)、或含有其它病毒或其它病原体的基因组 (的部分) 的 MPV。此外, 描述了关于基于两个临床参数产生重组负链病毒的多种反向遗传学技术。首先, 这种病毒的产生依赖于所述负义病毒 RNA (vRNA) 基因组的部分或全长拷贝或其互补拷贝 (cRNA) 的复制。可以从通过体外转录时产生的或者在用核酸转染时在细胞中产生的感染性病毒中, 分离这种 vRNA 或 cRNA。其次, 重组负链病毒的产生依赖于功能性聚合酶复合物。通常, 肺病毒的聚合酶复合物由 N、P、L 和可能的 M2 蛋白组成, 但不一定限于此。聚合酶复合物或其组分可以从病毒颗粒、表达一种或多种所述组分的细胞中分离, 或者通过用特定表达载体转染来产生。

[0051] 当上述 vRNA、cRNA 或者表达这些 RNA 的载体由上述聚合酶复合物复制^{16, 17, 18, 19, 20, 21, 22} 时, 可以获得 MPV 的感染性拷贝。为了产生小复制子 (minireplicons) 或者用于产生包含大多数或者完整的 MPV 基因组的全长拷贝的反向遗传学系统, 只要运用可得自例如 APV (Randhawa 等, 1997) 或 MPV 本身的 3' 端和 / 或 5' 端核酸序列即可。

[0052] 另外, 本发明提供包含本发明的核酸或载体的宿主细胞。在原核细胞中产生含有 MPV 聚合酶组分 (推测为 N、P、L 和 M2, 但不一定限于此) 的质粒或病毒载体, 以供在相关细胞类型 (细菌、昆虫细胞、真核细胞) 中表达所述组分。将在原核细胞中产生含有 MPV 基因组的全长拷贝或部分拷贝的质粒或病毒载体, 以便在体外或体内表达病毒核酸。后一类载

体可能含有供产生嵌合病毒或嵌合病毒蛋白用的其它病毒序列,可以缺乏病毒基因组的多个部分,以便产生复制缺陷型病毒,并且可以含有某些突变、缺失或插入,以便产生减毒病毒。

[0053] 可以通过依照上述的现有技术共表达所述聚合酶组分,产生 MPV 的感染性拷贝(野生型、减毒型、复制缺陷型或嵌合型)。

[0054] 另外,可以使用瞬时或稳定表达一种或多种全长或部分 MPV 蛋白的真核细胞。这类细胞可以通过转染(蛋白质或核酸载体)、感染(病毒载体)或转导(病毒载体)来制备,并且可用于上述野生型、减毒型、复制缺陷型或嵌合型病毒的互补。

[0055] 对于产生抗两种或两种以上病毒的重组疫苗而言,嵌合病毒可能特别有用^{23,24,26}。例如,可以设想,表达 RSV 的一种或多种蛋白的 MPV 病毒载体或者表达 MPV 的一种或多种蛋白的 RSV 载体,将保护接种了这类载体的个体抵抗两种病毒的感染。对于 PI3 或者其它副粘病毒,可以设想相似的方法。对于用活疫苗接种的目的,减毒型和复制缺陷型病毒可能是有用的,正如对于其它病毒所建议的^{25,26}。

[0056] 在一个优选实施方案中,本发明提供由本发明的核酸编码的蛋白性分子或 metapneumovirus 特异性病毒蛋白或其功能片段。有用的蛋白性分子例如来源于可得自本发明的病毒的任何基因或基因组片段。此中提供的这类分子或其抗原性片段,例如可用于诊断方法或试剂盒中以及用于药用组合物中,例如亚单位疫苗中。特别有用的是供作为抗原或亚单位免疫原来包括的 F、SH 和 / 或 G 蛋白或其抗原性片段,但也可以使用灭活的全病毒。特别有用的也有由供系统发育分析用的所鉴定的重组核酸片段所编码的蛋白性物质,当然优选可用于系统发育分析的 ORF、尤其是用于无论是体内(例如用于保护目的或者用于提供诊断性抗体)或体外(例如通过噬菌体展示技术或可用于产生合成抗体的另一种技术)诱发 MPV 特异性抗体的优选 ORF 范围内的那些蛋白性物质。

[0057] 在此也提供与包含本发明的蛋白性分子或其 MPV 特异性功能片段的抗原特异性反应的抗体,所述抗体为天然的多克隆抗体或单克隆抗体或者为合成的(例如(噬菌体)文库衍生的结合分子)抗体。这类抗体可用于鉴定病毒分离株为 MPV 的方法中,所述方法包括使所述病毒分离株或其组分与此中提供的抗体反应。这例如可以通过运用纯化或非纯化 MPV 或其部分(蛋白质、肽),采用 ELISA、RIA、FACS 或相似形式的抗原检测测定(Current Protocols in Immunology)来实现。另一方面,可以用受感染的细胞或细胞培养物,运用经典的免疫荧光或免疫组织化学技术鉴定病毒抗原。

[0058] 用于鉴定病毒分离株为 MPV 的其它方法包括使所述病毒分离株或其组分与本发明的病毒特异性核酸反应,特别是在所述哺乳动物病毒包括人类病毒的情况下。

[0059] 这样,本发明提供一种病毒分离株,所述病毒分离株可用本发明的方法鉴定在分类学上对应于可鉴定为可能属于副粘病毒科肺病毒亚科中 Metapneumovirus 的负义单链 RNA 病毒的哺乳动物病毒。

[0060] 所述方法可用于病毒学诊断哺乳动物 MPV 感染的方法中,所述方法例如包括通过使所述哺乳动物的样品与本发明的核酸或抗体反应,测定所述样品中病毒分离株或其组分的存在情况。在详细描述中进一步给出了实例,例如运用 PCR(或本领域众所周知的其它扩增或杂交技术)或者运用免疫荧光检测(或者本领域已知的其它免疫学技术)。

[0061] 本发明也提供一种血清学诊断哺乳动物 MPV 感染的方法,所述方法包括通过使所

述哺乳动物的样品与本发明的蛋白性分子或其片段或抗原反应,测定所述样品中特异性针对 MPV 或其组分的抗体的存在情况。

[0062] 在此提供的方法和工具,尤其可用于供通过病毒学诊断或血清学诊断来诊断 MPV 感染用的诊断试剂盒。这类试剂盒或者测定可以例如包含本发明的病毒、核酸、蛋白性分子或其片段、抗原和 / 或抗体。也提供本发明的病毒、核酸、蛋白性分子或其片段、抗原和 / 或抗体在生产药用组合物、例如用于治疗或预防 MPV 感染和 / 或用于治疗或预防呼吸道疾病、特别是人类疾病的药用组合物中的应用。所述病毒的减毒可以通过开发用于此目的的已建立的方法来实现,所述方法包括但不限于运用其它物种的相关病毒、通过实验动物连续传代和 / 或组织 / 细胞培养物、分子克隆的定点诱变和相关病毒之间基因或基因片段的交换。

[0063] 包含本发明的病毒、核酸、蛋白性分子或其片段、抗原和 / 或抗体的药用组合物,可以例如用于治疗或预防 MPV 感染和 / 或呼吸道疾病的方法中,所述方法包括给个体提供本发明的药用组合物。这在所述个体包括人类时,尤其是当所述人群不足 5 岁时最为有用,因为这样的婴儿和幼儿最可能受在此提供的人 MPV 感染。一般而言,在急性期,患者将患有其它呼吸道疾病和其它疾病素因性上呼吸道症状。也可能发生多种其它严重疾病素因性的下呼吸道疾病。

[0064] 本发明也提供获得可用于治疗呼吸道疾病的抗病毒药的方法,所述方法包括建立包含本发明病毒的细胞培养物或实验动物,用候选抗病毒药处理所述培养物或治疗所述动物,并且测定所述因子对所述病毒或其对所述培养物或动物的感染的影响。这样的抗病毒药的一个例子包括在此提供的 MPV 中和抗体或其功能组分,但也可获得其它性质的抗病毒药。本发明也提供本发明的抗病毒药在药用组合物制备中、特别是用于治疗呼吸道疾病、尤其是当由 MPV 感染引起的呼吸道疾病的药用组合物制备中的应用;以及提供包含本发明抗病毒药的、可用于治疗或预防 MPV 感染或呼吸道疾病的方法中的药用组合物,所述方法包括为个体提供这样一种药用组合物。

[0065] 在详细描述中进一步解释本发明,但本发明并不限于此。

[0066] 图面说明

[0067] 图 1A 为表 1:在分离株 00-1 和肺病毒亚科其它成员的氢基酸序列之间所发现的同源性百分率。给出了 N、P、M、F 和 L 中两个 RAP-PCR 片段 (8 和 9/10) 的氨基酸序列的百分率 ($\times 100$)。在材料和方法一节中描述了所述分析所使用的登记号。

[0068] 图 1B 为表 2:在根据年龄组分类的人群中运用免疫荧光测定和病毒中和测定所测定的 MPV 的血清阳性率。

[0069] 图 2:APV 基因组中用 RAP-PCR 和 RT-PCR 在病毒分离株 00-1 上获得的片段的位置和大小的图示。片段 1-10 运用 RAP-PCR 获得。片段 A 用 RAP-PCR 片段 1 和 2 中的一种引物和基于 APV 和 RSV 前导序列和尾随序列⁶ 的比对设计的一种引物而获得。片段 B 用在 RAP-PCR 片段 1 和 2 中以及 RAP-PCR 片段 3 中设计的引物获得。片段 C 用在 RAP-PCR 片段 3 中和 RAP-PCR 片段 4、5、6 和 7 中设计的引物获得。

[0070] 对于所有的系统发育进化树,(图 3-5)DNA 序列运用 ClustalW 软件包进行序列比对,并且用使用 100 个引导程序和 3 个 jumble 的 Phylip3.5 的 DNA-ML 软件包生成最大似然进化树¹⁵。先前已发表的用于生成系统发育进化树的序列可得自 Genbank,登记号为:对于所有 ORF:hRSV:NC001781;bRSV:NC001989;对于 F ORF:PVM, D11128;APV-A,

D00850 ;APV-B, Y14292 ;APV-C, AF187152 ;对于 N ORF :PVM, D10331 ;APV-A, U39295 ;APV-B, U39296 ;APV-C, AF176590 ;对于 M ORF :PMV, U66893 ;APV-A, X58639 ;APV-B, U37586 ;APV. C, AF262571 ;对于 P ORF :PVM, 09649 ;APV-A, U22110, APV-C, AF176591。用 APV C 毒株作为外类群,对于 9 个不同的 MPV 病毒分离株进行系统发育分析。

[0071] 图中所用的缩写 :hRSV :人 RSV ;bRSV :牛 RSV ;PVM :小鼠肺炎病毒 ;APV-A、B 和 C :禽肺病毒 A、B 和 C 型。

[0072] 图 3 :肺病毒亚科成员和病毒分离株 00-1 的 N、P、M 和 F ORF 的比较。所述序列比对显示出病毒分离株 00-1 的完整 N、P、M 和 F 蛋白和部分 L 蛋白的氨基酸序列。显示了分离株 00-1 和其它病毒之间不同的氨基酸,相同的氨基酸用句点表示,空位用破折号表示。编号对应于所述蛋白质中的氨基酸位置。所述分析所用的登记号在材料和方法一节中有描述。APV-A、B 或 C :A、B 或 C 型禽肺病毒, bRSV 或 hRSV :牛或人呼吸道合胞病毒, PVM :小鼠肺炎病毒。L8 :用 RAP-PCR 获得的位于 L 中的片段 8, L9/10 二用 RAP-PCR 获得的位于 L 中的片段 9 和 10 的共有序列。对于 P 序列比对,从 Genbank 不能得到 APV-B 序列。对于 L 序列比对,仅可得到 bRSV、hRSV 和 APV-A 的序列。

[0073] 图 4 :肺病毒亚科 (Pneumovirinae) 属成员和病毒分离株 00-1 的 N、P、M 和 F ORF 的系统发育分析。用得自以下基因的病毒序列进行系统发育分析 :F(图面 A)、N(图面 B)、M(图面 C) 和 P(图面 D)。系统发育进化树基于使用 100 个引导程序和 3 个 jumble 的最大似然分析。显示了每个进化树的代表核苷酸改变数目的刻度。

[0074] 图 5 :9 个原代 MPV 分离株和与其遗传上最为相关的 APV-C 的 F(图面 A)、N(图面 B)、M(图面 C) 和 L(图面 D)ORF 的部分的系统发育关系。系统发育进化树基于最大似然分析。显示了每个进化树的代表核苷酸改变数目的刻度。对于 APV-C 的登记号 :图面 A. D00850 ;图面 B :U39295 ;图面 C :X58639 ;以及图面 D :U65312。

[0075] 图 6A :得自 MPV 分离株 00-1 基因组 3' 末端的核苷酸序列和氨基酸序列信息。给出以下 ORF :N :核蛋白的 ORF ;P :磷蛋白的 ORF ;M :二基质蛋白的 ORF ;F :融合蛋白的 ORF ;GE :基因结束 ;GS :基因起始。

[0076] 图 6B 和 C :得自 VIII V 分离株 00-1 所得的聚合酶基因 (L) 中片段的核苷酸序列和氨基酸序列信息。所述 L 中片段的定位基于与 APV-C 的蛋白质同源性 (登记号 U65312)。已翻译的片段 8(图 6B) 位于氨基酸号 8-243, 片段 9 和 10 的共有序列 (图 6C) 位于 APV-C L ORF 的氨基酸号 1358-1464。

[0077] 图 7

[0078] MPV 分离株 00-1 的基因组图谱。在每个 ORF 之下,指示了起始密码子和终止密码子的核苷酸位置。横过的 L ORF 的双线指示缩短表示 L 基因。图谱下的三个读框指明第一 G ORF(nt 6262-6972) 和重叠的可能的第二 ORF。

[0079] 图 8 :

[0080] MPV 的核蛋白与其它肺病毒的所述蛋白的预测氨基酸序列的序列比对。由 Barr(1991) 鉴定的保守区以方框表示,并且标注 A、B 和 C。肺病毒中的保守区 (Li, 1996) 以灰色阴影显示。空位以破折号表示,句点表示与 MPV 相比相同氨基酸残基的位置。

[0081] 图 9 :

[0082] MPV 的磷蛋白与其它肺病毒的所述蛋白的氨基酸序列比较。框注了高相似性的区

(Ling, 1995), 富含谷氨酸的区以灰色阴影表示。空位以破折号表示, 句点表示与 MPV 相比相同氨基酸残基的位置。

[0083] 图 10 :

[0084] MPV 的基质蛋白与其它肺病毒的所述蛋白的推导的氨基酸序列的比较。保守的六肽序列 (Easton, 1997) 以灰色阴影表示。空位以破折号表示, 句点表示与 MPV 相比相同氨基酸残基的位置。

[0085] 图 11 :

[0086] MPV 的融合蛋白与其它肺病毒的所述蛋白的预测氨基酸序列的比对。框注了保守的半胱氨酸残基, N- 联糖基化位点以下划线表示, F0 的切割位点以双下划线表示, 融合肽、信号肽和膜锚定结构域以灰色阴影表示。空位以破折号表示, 句点表示与 MPV 相比相同氨基酸的位置。

[0087] 图 12

[0088] MPV 的 M2 ORF 与其它肺病毒的所述 ORF 的氨基酸序列的比较。M2-1ORF 的序列比对示于图面 A 中, 保守的氨基末端 (Collins, 1990 ; Zamora, 1999) 以灰色阴影表示。三个保守的半胱氨酸残基以粗体印刷并且用 # 指示。M2-2 ORF 的序列比对示于图面 B 中。空位以破折号表示, 句点表示与 MPV 相比相同氨基酸的位置。

[0089] 图 13

[0090] MPV SH ORF 的氨基酸序列分析。(A)MPV 的 SH ORF 的氨基酸序列, 丝氨酸和苏氨酸残基以灰色阴影表示, 半胱氨酸残基以粗体表示, 而疏水性区以双下划线表示。潜在的 N- 联糖基化位点以单下划线表示。数字表示邻接疏水性结构域的碱性氨基酸的位置。(B) MPV、APV-A 和 hRSV-B 的 SH 蛋白的疏水性曲线图的比对。使用 Kyte 和 Doolittle(1982) 的方法和一个 17 个氨基酸的窗。箭头表示强疏水性结构域。所述 ORF 内的位置在 X 轴上给出。

[0091] 图 14

[0092] MPV G ORF 的氨基酸序列分析。(A)MPV 的 G ORF 的氨基酸序列, 丝氨酸、苏氨酸和脯氨酸残基以灰色阴影表示, 半胱氨酸残基以粗体表示, 而疏水性区以双下划线表示。潜在的 N- 联糖基化位点以单下划线表示。(B)MPV、APV-A 和 hRSV-B 的 G 蛋白的疏水性曲线图的比对。使用 Kyte 和 Doolittle(1982) 的方法和一个 17 个氨基酸的窗。箭头表示所述疏水性区。所述 ORF 内的位置在 X 轴上给出。

[0093] 图 15

[0094] MPV 和其它副粘病毒的聚合酶基因中保守结构域的氨基酸序列的比较。显示了结构域 III, 框注了结构域 III 中的 4 个保守的聚合酶基序 (A, B, C, D) (Poch 1998, 1999)。空位以破折号表示, 句点表示与 MPV 相比相同氨基酸残基的位置。hPIV3 :3 型人副流感病毒 ; SV ; 仙台病毒 ; hPIV-2 :2 型人副流感病毒 ; NDV :新城疫病毒 ; MV :麻疹病毒 ; nipah :Nipah 病毒。

[0095] 图 16 :

[0096] MPV 和所选副粘病毒的 M2-1 和 L ORF 的系统发育分析。所述 M2-1 ORF 与肺病毒亚科 (Pneumovirinae) 属其它成员的 M2-1 ORF 进行序列比对 (A), 而所述 L ORF 与肺病毒亚科 (Pneumovirinae) 属成员以及图 15 图面说明中的所选其它副粘病毒的 L ORF 进行序

列比对 (B)。采用运用 100 个引导程序和 3 个 jumble 的最大似然分析生成系统发育进化树。显示了每个进化树的代表核苷酸改变数目的刻度。进化树中的数字代表基于所述共有序列进化树的引导程序的数值。

[0097] 图 17 :

[0098] hMPV 分离株 00-1 的非编码序列。(A) 所述 ORF 之间和基因组末端的非编码序列以正义方向表示。从左至右, 显示出所示 ORF 的终止密码子、后接非编码序列、所示后续 ORF 的基因起始信号和起始密码子。数字表示 hMPV 图谱中第一个起始密码子和终止密码子的位置。显示出与已发表的基因终止信号有相似性的序列以下划线表示, 显示出与 UAAAAAU/A/C 有相似性的序列以所述序列上的线表示。(B) hMPV 基因组末端的核苷酸序列。hMPV 基因组末端相互之间以及与 APV 的基因组末端进行序列比对。下划线的区表示 RT-PCR 测定中所使用的、基于 APV 和 RSV 的 3' 端和 5' 端序列 (Randhawa 等, 1997 ; Mink 等, 1991) 的引物序列。以粗斜体表示的核苷酸为 N 基因基因起始信号的部分。Le : 前导序列, Tr : 尾随序列。

[0099] 图 18 :

[0100] 两种原型 hMPV 分离株与 APV-A 和 APV-C 的比较 ; 编码各种病毒蛋白的核酸的 DNA 相似性矩阵。

[0101] 图 19 :

[0102] 两种原型 hMPV 分离株与 APV-A 和 APV-C 的比较 ; 各种病毒蛋白的蛋白质相似性矩阵。

[0103] 图 20 :

[0104] 两种原型 hMPV 分离株核蛋白的氨基酸序列比对

[0105] 图 21 :

[0106] 两种原型 hMPV 分离株磷蛋白的氨基酸序列比对

[0107] 图 22 :

[0108] 两种原型 hMPV 分离株基质蛋白的氨基酸序列比对

[0109] 图 23 :

[0110] 两种原型 hMPV 分离株融合蛋白的氨基酸序列比对

[0111] 图 24 :

[0112] 两种原型 hMPV 分离株 M2-1 蛋白的氨基酸序列比对

[0113] 图 25 :

[0114] 两种原型 hMPV 分离株 M2-2 蛋白的氨基酸序列比对

[0115] 图 26 :

[0116] 两种原型 hMPV 分离株短疏水性蛋白的氨基酸序列比对

[0117] 图 27 :

[0118] 两种原型 hMPV 分离株吸附糖蛋白的氨基酸序列比对

[0119] 图 28 :

[0120] 两种原型 hMPV 分离株聚合酶蛋白 N 末端的氨基酸序列比对

[0121] 图 29 : 对接种了 ned/00/01 和 / 或 ned/99/01 的 12 只豚鼠的咽喉和鼻拭抹物的 RT-PCR 分析结果。

[0122] 图 30A :用感染 ned/00/01 并且用 ned/00/01 (GP 4、5 和 6) 或 ned/99/01 (GP 1 和 3) 再感染的豚鼠针对 ned/00/01 和 ned/99/01 的 IgG 应答。

[0123] 图 30B :用感染 ned/99/01 并且用 ned/00/01 (GP 8 和 9) 或 ned/99/01 (GP 10、11、12) 再感染的豚鼠针对 ned/00/01 和 ned/99/01 的 IgG 应答。

[0124] 图 31 :ned/00/01 和 ned/99/01 ELISA 对取自用 ned/00/01 或 ned/99/01 感染的豚鼠的血清的特异性。

[0125] 图 32 :针对 3 只同种 (00-1/00-1)、2 只同种 (99-1/99-1)、2 只异种 (99-1/00-1) 和 2 只异种 (00-1/99-1) 感染豚鼠的 ned/00/01 和 ned/99/01 ELISA 的平均 IgG 应答。

[0126] 图 33 :hMPV 感染豚鼠的对 APV 抑制的平均百分率。

[0127] 图 34 :ned/00/01 和 ned/99/01 感染豚鼠针对 ned/00/01、ned/99/01 和 APV-C 的病毒中和效价。

[0128] 图 35 :对接种了 ned/00/01 (两次) 的恒河猴的喉拭抹物的 RT-PCR 测定结果。

[0129] 图 36 A (上面两幅图) :

[0130] 2 只用 ned/00/01 (再) 感染的恒河猴针对 ned/00/01 的 IgA、IgM 和 IgG 应答。

[0131] 图 36B (下图)

[0132] 2 只用 ned/00/01 感染的恒河猴针对 APV 的 IgG 应答。

[0133] 图 37 :应用 hMPV ELISA 和 APV 抑制 ELISA 检测人血清中 IgG 抗体的比较。

[0134] 详细描述

[0135] 病毒的分离和表征

[0136] 从 1980 年至 2000 年,我们发现了 28 种从重症呼吸道疾病患者中分离的尚未鉴定的病毒分离株。这 28 种尚未鉴定的病毒分离株在 tMK 细胞中生长缓慢,在 VERO 细胞和 A549 细胞中生长差,并且在 MDCK 或鸡胚成纤维细胞中不能繁殖或很少繁殖。这些病毒分离株中的大多数在 tMK 细胞上经 3 次传代后在第 10 天和第 14 天之间诱导 CPE。所述 CPE 实际上不能区别于由 hRSV 或 hPIV 在 tMK 或其它细胞培养物中引起的 CPE,特征为合胞体形成,此后细胞表现出快速的内部破坏,然后所述细胞与单层分离。所述细胞通常 (有时随后) 在病毒从原始材料传代 3 次后,在接种后第 10-14 天,显示出 CPE,比由其它病毒例如 hRSV 或 hPIV 引起的 CPE 略晚。

[0137] 我们使用受感染的 tMK 细胞的上清液进行 EM 分析,EM 分析表明存在带有 13-17 纳米短包膜突起的 150-600 纳米的副粘病毒样病毒颗粒。与有包膜病毒例如副粘病毒科的生物化学特性一致的是,标准氯仿处理或乙醚处理⁸ 导致对 tMK 细胞的感染性降低超过 10^4 TCID₅₀。病毒感染的 tMK 细胞培养上清液对火鸡、鸡和豚鼠的红细胞不表现出血细胞凝集活性。在培养期间,病毒在所测试的细胞上的复制看来是酪氨酸依赖性的。这些综合病毒学数据表明,新鉴定的病毒在分类学上分类为副粘病毒科的成员。

[0138] 我们从用所述尚未鉴定的病毒分离株中的 15 株感染的 tMK 细胞中分离出 RNA,以便使用对副粘病毒亚科 (Paramyxovirinae)⁹、hPIV-4、仙台病毒、猴病毒 5 型、新城疫病毒、麻疹病毒、hRSV 腮腺炎病毒、Nipah 病毒、Hendra 病毒、Tupaia 病毒和 Mapuera 病毒特异性的引物组,进行逆转录和聚合酶链式反应 (RT-PCR) 分析。RT-PCR 分析在低严谨性下进行,以便检测可能相关的病毒,并且用从同种病毒原液分离的 RNA 作为对照。所述可利用的对照与相应的病毒特异性引物反应阳性,新鉴定的分离株不与任何引物组反应,表明该病毒与

所测试的病毒不密切相关。

[0139] 我们使用所述病毒感染的 tMK 细胞培养上清液中的两种,经鼻腔接种豚鼠和白鼯。第 0 天、接种后 2 周和 3 周,从这些动物收集血清。所述动物没有表现出临床症状,但用病毒中和 (VN) 测定和针对所述同源病毒的间接 IFA 测定,所有动物都发生血清转变。所述血清在间接 IFA 中与上述任何已知的副粘病毒以及与 PVM 不反应。接着,我们用豚鼠和白鼯感染前和感染后血清筛选了迄今尚未鉴定的病毒分离株,通过用感染后血清进行间接 IFA 测定,其中 28 株明显为阳性,提示它们在血清学上密切相关或相同。

[0140] RAP PCR

[0141] 为了获得有关所述未知病毒分离株的序列信息,我们运用称为 RAP-PCR¹⁰ 的随机 PCR 扩增策略。为此,用其中一种病毒分离株 (分离株 00-1) 以及用作对照的 hPIV-1 感染 tMK 细胞。在两种培养物都显示出相似水平的 CPE 之后,在连续 20-60% 蔗糖梯度上纯化培养上清液中的病毒。用 EM 检查各梯度级分中的病毒样颗粒,从含有约 50% 蔗糖的级分中分离出 RNA,其中观察到核衣壳。用从两个病毒级分中分离出的等量 RNA 进行 RAP-PCR,此后将样品在 3% NuSieve 琼脂糖凝胶上并排电泳。随后从凝胶中纯化出 20 个对所述尚未鉴定的病毒特异性的差别显示的条带,在质粒 pCR2.1 (Invitrogen) 中克隆,并且用载体特异性引物测序。当我们使用这些序列来用 BLAST 软件 (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) 对 Genbank 数据库中序列进行同源性搜索时,20 个片段中的 10 个显示出与 APV/TRTV 序列相似。

[0142] 这 10 个片段位于编码核蛋白 (N; 片段 1 和 2)、基质蛋白 (M; 片段 3)、融合蛋白 (F; 片段 4、5、6、7) 和聚合酶蛋白 (L; 片段 8、9、10) 的基因中 (图 2)。我们接着基于我们的 RAP PCR 片段以及已发表的肺病毒亚科的前导序列和尾随序列⁶ 设计了 PCR 引物,以便完成所述病毒基因组 3' 端的序列信息。扩增出三个片段,其中片段 A 跨越 N 可读框 (ORF) 的最 3' 端,片段 B 跨越磷蛋白 (P) ORF,而片段 C 紧靠 M ORF 和 F ORF 之间的间隙 (图 2)。这三个片段的序列分析揭示,缺乏在病毒基因组最 3' 端的 NS1 和 NS2 ORF,并且 F ORF 紧邻 M ORF 定位。这种基因组结构类似 metapneumovirus APV 的基因组结构,这也与序列同源性一致。N、P、M 和 F ORF 的总体翻译序列显示出与肺病毒属成员平均有 30-33% 同源性,与 Metapneumovirus 成员有 66-68% 同源性。对于 SH 和 G ORF,未发现与任一上述属成员有可辨别的同源性。所发现的 N 的氨基酸同源性表明,与 hRSV 有约 40% 的同源性,与 APV-C 有 88% 的同源性,与 APV-C 在遗传上最密切相关,这例如可以通过对图 3 的氨基酸序列与其它病毒的相应 N 蛋白的氨基酸序列进行比较而得出。P 的氨基酸序列显示出与 hRSV 有约 25% 的同源性,与 APV-C 有约 66-68% 的同源性,M 显示出与 hRSV 有约 36-39% 的同源性,与 APV-C 有约 87-88% 的同源性,F 显示出与 hRSV 有约 40% 的同源性,与 APV-C 有约 81% 的同源性,M2-1 显示出与肺病毒有约 34.36% 的同源性,与 APV-C 有 84-86% 的同源性,M2-2 显示出与肺病毒有 15-17% 的同源性,与 APV-C 有 56% 的同源性,而 L 中获得的片段显示出与肺病毒平均有 44% 的同源性,与 APV-C 有 64% 的同源性。

[0143] 系统发育

[0144] 虽然用得自所述尚未鉴定的病毒分离株的核苷酸序列进行 BLAST 搜索表明,主要与肺病毒亚科成员有同源性,但基于蛋白质序列的同源性表明,与其它副粘病毒也有一定的相似性 (数据未显示)。作为所述新鉴定的病毒分离株和肺病毒亚科成员之间相关的指

示,基于这些病毒的 N、P、M 和 F ORF,构建了系统发育进化树。在所有 4 个系统发育进化树中,所述新鉴定的病毒分离株与 APV 最密切相关(图 4)。根据已经描述的 APV 的 4 种血清型¹¹,APV C 血清型 - 主要在美国鸟类中发现的 metapneumovirus,显示出与所述新鉴定的病毒最为相似。然而,应该注意到,仅可得到 APV D 血清型的部分序列信息。

[0145] 为了确定我们的各种新鉴定的病毒分离株的关系,我们基于得自 8-9 个分离株(对于 F 为 8 个,对于 N、M 和 L 为 9 个)的序列信息,构建了系统发育进化树。为此,我们采用 RT-PCR 和设计用于扩增 N、M、F 和 L ORF 中短片段的引物,随后对所述片段直接测序。也发现先前发现在血清学方面相关(参见上文)的 9 个病毒分离株在遗传上密切相关。事实上,所有 9 个分离株相互之间比与 APV 之间更为密切相关。虽然供这些系统发育进化树用的序列信息是有限的,但是看来所述 9 个分离株可以分为两组,分离株 94-1、99-1 和 99-2 分为一组,而其它 6 个分离株(94-2;93-1;93-2;93-3;93-4;00-1)分为另一组(图 5)。

[0146] 血清阳性率

[0147] 为了研究这种病毒在人群中的血清阳性率,我们通过用以所述尚未鉴定的病毒分离株之一感染的 tMK 细胞进行的间接 IFA,检验得自不同年龄段人群的血清。这种分析揭示,6-12 个月儿童中的 25%有针对该病毒的抗体,到 5 岁为止,接近 100%的儿童的血清为阳性。在通过间接 IFA 检验的总共 56 份血清样品中,用 VN 测定进行检验。对于所述样品中的 51 份样品(91%),VN 测定的结果(滴度 > 8)与用间接 IFA 获得的结果(滴度 > 32)一致。在 IFA 中发现为阳性的 4 份样品,通过 VN 检验为阴性(滴度 < 8),而一份血清在 IFA 中反应为阴性(滴度 < 32),但在 VN 检验中为阳性(滴度为 16)(表 2)。

[0148] 用 1958 年取自人类(年龄为 8-99 岁)的 72 份血清^{12,27}进行的 IFA 揭示出 100%的血清阳性率,表明所述病毒在人群中已经循环超过 40 年。另外,在 VN 测定中使用这些血清中的多份血清,以证实 IFA 数据(表 2)。

[0149] N、M、P 和 F 基因的基因分析揭示,iMPV 与最近建议的属 Metapneumovirinae 的序列同源性(平均 63%)高于与属肺炎病毒亚科(Pneumovirinae)(平均 30%)的序列同源性,因此证明与一 APV/TRTV 相似和类似的基因组结构。与 RSVs('3-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5')的基因组结构相对比,metapneumoviruses 缺乏 NS1 和 NS2 基因,并且在 M 和 L 之间的基因的定位不同('3-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5')。在我们的病毒分离株中缺乏 M 和 F 基因之间的 ORF 以及缺乏邻近 N 的 NS1 和 NS2 以及所发现的与 APV 有高氨基酸序列同源性,是提议从人类中分离的 MPV 应分类为 Metapneumovirus 的第一个哺乳动物(尤其是人类来源的)成员。

[0150] 系统发育分析揭示,从中获得序列信息的 9 个 MPV 分离株密切相关。虽然序列信息有限,但它们实际上相互之间的相关性比与任何禽 metapneumovirus 的相关性更为密切。在已经描述的 APV 的 4 种血清型中,基于 N、P、M 和 F 基因,C 血清型与 MPV 最密切相关。然而,应该注意到,从 Genbank 中仅可得到 D 血清型 F 基因的部分序列,对于 B 血清型,仅可得到 M、N 和 F 序列。我们的 MPV 分离株在系统发育进化树中形成 2 个分类群。对于 hRSV 和 APV,已经描述了不同的基因亚型和血清学亚型。目前仍不了解 MPV 分离株的所述两个遗传分类群是否代表在功能上也不同的血清学亚组。我们的血清学调查表明,MPV 是一种常见的人类病原体。从得自重症 RTT 儿童的临床样品中重复分离出这种病毒,表明 MPV 的临床和经济影响可能高。基于病毒检测和血清学的新诊断测定,将提供一种这种病毒病原体发

病率的更为详细的分析以及这种病毒病原体的临床和经济影响。

[0151] IFA 结果和 VN 结果 (5 份样品) 之间略有差异,可能是由于在所述 IFA 中仅检测 IgG 血清抗体,而 VN 测定既检测各抗体类别,也检测各抗体亚类所致,或者差异可能是由于两种测定之间灵敏度的差异所致。对于 IFA,使用 16 的截止值,而 VN 使用 8 的截止值。

[0152] 另一方面,IFA 与 VN 测定之间的差异也可能表明这种新鉴定的病毒的不同血清型之间的可能差异。由于 MPV 似乎与 APV 最密切相关,因此我们推测,所述人类病毒可能起源于鸟类。对 1958 年取自人类血清样品的分析显示,MPV 在人群中已经广泛流传超过 40 年,表明在 1958 年之前很久,必定发生了假定的动物传染病事件。

[0153] 材料和方法

[0154] 样本采集

[0155] 在过去数十年间,我们的实验室从患有 RTI 的儿童收集了鼻咽吸出物,对其常规检验了病毒的存在情况。所有鼻咽吸出物都通过采用针对流感病毒 A 和 B 型、hRSV 和人副流感病毒 (hPIV) 1-3 型的荧光标记抗体的直接免疫荧光测定 (DIF) 进行了检验。也对所述鼻咽吸出物进行了处理,以便使用快速 shell vial 技术¹⁴,对包括 VERO 细胞、第三代恒河猴肾 (tMK) 细胞、人肺内皮 (HEL) 细胞和 marbin dock 肾 (MDCK) 细胞在内的各种细胞系进行病毒分离。在传代 2-3 次后显示出细胞病变效应 (CPE) 并且在 DIF 中为阴性的样品,通过采用针对以下病毒的病毒特异性抗体的间接免疫荧光测定 (IFA) 进行测试:流感病毒 A、B 和 C 型、hRSV A 和 B 型、麻疹病毒、腮腺炎病毒、人副流感病毒 (hPIV) 1-4 型、仙台病毒、猴病毒 5 型和新城疫病毒。虽然对于许多病例而言,可以鉴定出病原,但某些样本对于所测所有这些病毒都是阴性的。

[0156] 直接免疫荧光测定 (DIF)

[0157] 依照已描述的方法^{14,15},用得自 RTI 患者的鼻咽吸出物样品来进行 DIF 和病毒分离。样品贮存于 -70°C。简而言之,鼻咽吸出物用 5mlDulbecco MEM(BioWhittaker, Walkersville,MD) 稀释,在涡旋混合器上充分混合 1 分钟。将悬浮液以 840×g 离心 10 分钟。将沉淀涂在多点 (multispot) 玻片 (Nutacon, Leimuiden, The Netherlands) 上,用上清液进行病毒分离。干燥后,将细胞在丙酮中于室温固定 1 分钟。洗涤后,玻片于 37°C 用市售的 FITC 标记的病毒特异性抗血清例如抗流感病毒 A 和 B、hRSV 和 hPIV 1-3 的病毒特异性抗血清 (Dako, Glostrup, Denmark) 保温 15 分钟。用 PBS 洗涤 3 次并且在自来水中洗涤 1 次之后,使玻片包含在甘油 /PBS 溶液 (Citifluor, UKC, Canterbury, UK) 并使其被覆盖。用 Axioscop 荧光显微镜 (Carl Zeiss B.V, Weesp, the Netherlands) 分析玻片。

[0158] 病毒分离

[0159] 为了分离病毒,将 tMK 细胞 (PIVM, Bilthoven, The Netherlands) 在带有玻片的 24 孔板 (Costar, Cambridge, UK) 中,用补充 10% 胎牛血清 (BioWhittaker, Vervier, Belgium) 的下述培养基培养。在接种之前,所述板用 PBS 洗涤,然后加入含有 Hank 氏盐的 Eagle 氏 MEM(ICN, Costamesa, CA),在所述培养基中,半升补充 0.26 克 NaHCO₃、0.025 M Hepes(Biowhittaker)、2 mM L-谷氨酰胺 (Biowhittaker)、100 单位青霉素、100 μg 链霉素 (Biowhittaker)、0.5 克乳清蛋白 (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, The Netherlands)、1.0 克 D-葡萄糖 (Merck, Amsterdam, The Netherlands)、5.0 克蛋白胨 (Oxoid, Haarlem, The Netherlands) 和 0.02% 酪氨酸 (Life Technologies, Bethesda, MD)。在所述板中一式三

份接种所述鼻咽吸出物样品的上清液,每孔 0.2ml,然后以 $840\times g$ 离心 1 小时。接种后,让所述板于 37°C 最多孵育 14 天,一周更换一次培养基,每日检查培养物的 CPE。14 天后,从第二次传代培养物中刮出细胞,然后再孵育 14 天。对于第三次传代,重复该步骤。用所述玻片如下所述通过间接 IFA 证实所述病毒的存在。

[0160] 动物免疫

[0161] 通过实验性鼻内感染在单独的加压手套箱中关养的两只无特定病原体的白鼬和两只豚鼠,产生针对所述新发现的病毒的白鼬和豚鼠特异性抗血清。2-3 周后,通过心脏穿刺,给所有动物放血,用其血清作为参比血清。如下所述,用间接 IFA 检验所述血清中所有先前描述的病毒。

[0162] 通过间接 IFA 检测抗原

[0163] 我们在含有受感染 tMK 细胞的玻片上进行间接 IFA。用 PBS 洗涤后,将玻片于 37°C 与病毒特异性抗血清一起孵育 30 分钟。我们在 DIF 中使用如上所述的针对流感病毒 A、B 和 C 型、hPIV 1-3 型和 hRSV 的单克隆抗体。对于 hPIV 4 型、腮腺炎病毒、麻疹病毒、仙台病毒、猴病毒 5 型、新城疫病毒,使用多克隆抗体 (RIVM) 以及白鼬和豚鼠参比血清。用 PBS 洗涤 3 次和用自来水洗涤 1 次后,玻片用针对第一次孵育中所用血清的第二抗体染色。对于所述多克隆抗血清的第二抗体是山羊抗白鼬 (KPL, Guilford, UK, 稀释 40 倍)、小鼠抗兔 (Dako, Glostrup, Denmark, 稀释 20 倍)、兔抗鸡 (KPL, 稀释 20 倍) 和小鼠抗豚鼠 (Dako, 稀释 20 倍)。按照关于 DIF 所述的方法处理玻片。

[0164] 通过间接 IFA 检测人抗体

[0165] 为了检测病毒特异性抗体,用冷丙酮将受感染的 tMK 细胞固定在盖玻片上,用 PBS 洗涤,然后用 1-16 稀释度的血清样品染色。随后,样品用在 PBS 中稀释 80 倍的 FITC 标记的兔抗人抗体 (Dako) 染色。如上所述处理玻片。

[0166] MPV 的病毒培养物

[0167] 在上述培养基中的 tMK 细胞亚融合单层中,接种在 24 孔板中传代 2-3 次后显示出 CPE 的样品的上清液。每日检查培养物的 CPE,一周更换一次培养基。由于 CPE 随每种分离株而不同,在第 12-14 天,使用针对所述新病毒分离株的白鼬抗体,运用间接 IFA 检验所有培养物。将阳性培养物冻融 3 次,此后通过低速离心澄清所述上清液,分成等分样品并冻存于 -70°C 。按照已描述的方法¹⁶,测定培养上清液中病毒的 50% 组织培养物感染性剂量 (TCID₅₀)。

[0168] 病毒中和测定

[0169] 用人血清和动物血清以 8 倍稀释度开始的 2 倍连续稀释液,进行 VN 测定。经稀释的血清与 100 TCID₅₀ 的病毒一起温育 1 小时,然后接种到在 96 孔板中生长的 tMK 细胞中,此后,将板以 $840\times g$ 离心。在 3 天和 6 天后更换培养基,在接种后 8 天,用针对 MPV 的白鼬抗体进行 IFA。VN 滴度被定义为导致阴性 IFA 和抑制细胞培养物中 CPE 的血清样品的最低稀释度。

[0170] 病毒表征

[0171] 按照已描述的方法^{8,14} 进行血细胞凝集测定和氯仿敏感性试验。对于 EM 分析,在微量离心机中于 4°C 以 $17000\times g$,从受感染细胞培养上清液中浓缩病毒,此后,将沉淀重悬于 PBS,用负对比 EM 检查。对于 RAP-PCR,通过在 60% 蔗糖垫层 (cussion) 上超离心

(150000×g 2 小时,4℃),从受感染的 tMK 细胞上清液浓缩病毒。60%蔗糖中间相随后用 PBS 稀释,然后铺在 20-60%连续蔗糖梯度顶部,以 275000×g 于 4℃离心 16 小时。用 EM 和聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后用银染,检查蔗糖梯度各级分中病毒样颗粒的存在情况。看来含有核衣壳的约 50%蔗糖的级分,用于 RNA 分离和 RAP-PCR。

[0172] RNA 分离

[0173] 用 High Pure RNA Isolation kit(高纯度 RNA 分离试剂盒),依照生产商的说明(Roche Diagnostics, Almere, The Netherlands),从受感染细胞培养物的上清液或蔗糖梯度级分中分离 RNA。

[0174] RT-PCR

[0175] 在附录 1 中描述了用于对已知副粘病毒进行 RT-PCR 的病毒特异性寡核苷酸序列。在含有 50mM Tris·HCl pH 8.5、50mM NaCl、4mM MgCl₂、2mM 二硫苏糖醇、dNTP 各 200 μM、10 单位重组 RNasin(Promega, Leiden, the Netherlands)、10 单位 AMV RT(Promega, Leiden, The Netherlands)、5 单位 Amplitaq Gold DNA 聚合酶(PE Biosystems, Nieuwerkerk aan de IJssel, The Netherlands)和 5 μl RNA 的 50 μl 反应物中,进行一步 RT-PCR。循环条件为 42℃ 45 min 和 95℃ 7 min 一次,95℃ 1 min、42℃ 2 min 和 72℃ 3 min 重复 40 次,以及 72℃ 10 min 一次。RAP-PCR

[0176] RAP-PCR 基本上按照已描述的方法¹⁰进行。在附录 2 中描述了所述寡核苷酸序列。对于 RT 反应,在含有 10ng/μl 寡核苷酸、10mM 二硫苏糖醇、dNTP 各 500 μM、25 mM Tris-HCl pH 8.3、75 mM KCl 和 3mM MgCl₂ 的 10 μl 反应物中含有 2 μl RNA。将反应混合物于 70℃保温 5 分钟,于 37℃保温 5 分钟,然后加入 200 单位 Superscript RT 酶(Life Technologies)。继续于 37℃保温 55 分钟,通过于 72℃保温 5 分钟终止反应。将 RT 混合物稀释,得到含有 8 ng/μl 寡核苷酸、dNTP 各 300 μM、15mM Tris-HCl pH 8.3、65 mM KCl、3.0 mM MgCl₂ 和 5 单位 Taq DNA 聚合酶(PE Biosystems)的 50 μl PCR 反应物。循环条件为 94℃ 5 min、40℃ 5 min 和 72℃ 1 min 一次,然后于 94℃ 1min、56℃ 2min 和 72℃ 1 min 重复 40 次,然后于 72℃ 5 min 一次。在 RAP-PCR 之后,用 RT-PCR 产物各 15 μl 在 3% NuSieve 琼脂糖凝胶(FMC BioProducts, Hoorhugowaard, The Netherlands)上并排电泳。用 Qiaquick Gel Extraction Kit(凝胶提取试剂盒)(Qiagen, Leusden, The Netherlands),从凝胶中纯化差别显示出对 MPV 特异性的片段,依照生产商的说明,将其克隆到 pCR2.1 载体(Invitrogen, Groningen, The Netherlands)中。

[0177] 序列分析

[0178] 在载体 pCR2.1(Invitrogen)中克隆的 RAP-PCR 产物用 M13 特异性寡核苷酸测序。用 Qiaquick Gel Extraction Kit(凝胶提取试剂盒)(Qiagen, Leusden, The Netherlands),从琼脂糖凝胶中纯化通过 RT-PCR 获得的 DNA 片段,用供 PCR 用的相同的寡核苷酸直接测序。用 Dyanamic ET terminator sequencing kit(Dyanamic ET 终止测序试剂盒)(Amersham Pharmacia Biotech, Roosendaal, The Netherlands)和 ABI 373 自动 DNA 测序仪(PE Biosystem)进行序列分析。所有技术都依照生产商的说明进行。

[0179] 通过 RT-PCR 产生 MPV 的基因组片段

[0180] 为了产生跨越 RAP-PCR 片段之间的间隙 A、B 和 C(图 2)的 PCR 片段,我们对从病毒分离株 00-1 分离的 RNA 运用如上所述的 RT-PCR 测定。使用以下引物:

[0181] 对于片段 A:设计位于前导序列中的 TR1:(5'-AAAGAATTCACGAGAAAAAACGC-3') 和设计位于所获得的 N 中 RAP-PCR 片段 3' 端的 N1(5'-CTGTGGTCTCTAGTCCCACTTC-3')。

[0182] 对于片段 B:设计位于所获得的 N 中 RAP-PCR 片段 5' 端的 N2:(5'-CATGCAAGCTTATGGGGC-3') 和设计位于所获得的 M 中 RAP-PCR 片段 3' 端的 M1:(5'-CAGAGTGGTTATTGTCAGGGT-3')。

[0183] 对于片段 C:设计位于所获得的 M 中 RAP-PCR 片段 5' 端的 M2:(5'-GTAGAACTAGGAGCATATG-3') 和设计位于所获得的 F 中 RAP-PCR 片段 3' 端的 F1:(5'-TCCCCAATGTAGATACTGCTTC-3')。

[0184] 如上所述,从凝胶中纯化所述片段、将其克隆并测序。

[0185] 用于诊断 MPV 的 RT-PCR

[0186] 为了对所述 MPV 分离株中 9 株的 N、M、F 和 LORF 的部分进行扩增和测序,我们使用引物 N3(5'-GCACTCAAGAGATACCCTAG-3') 和 N4(5'-AGACTTCTGCTTTGCTGCCTG-3'), 来扩增一个 151 个核苷酸的片段,使用 M3(5'-CCCTGACAATAACCACTCTG-3') 和 M4(5'-GCCAACTGATTGGCTGAGCTC-3') 扩增一个 252 个核苷酸的片段,使用 F7(5'-TGCACTATCTCCTCTTGGGGCTTTG-3') 和 F8(5'-TCAAAGCTGCTTGACACTGGCC-3') 扩增一个 221 个核苷酸的片段,使用 L6(5'-CATGCCCCACTATAAAAGGTCAG-3') 和 L7(5'-CACCCCAGTCTTTCTTGAAA-3') 扩增一个 173 个核苷酸的片段。如上所述进行 RT-PCR、凝胶纯化和直接测序。此外,所用的探针是:

[0187] 用于 M 的探针:5'-TGC TTG TAC TTC CCA AAG-3'

[0188] 用于 N 的探针:5'-TAT TTG AAC AAA AAG TGT-3'

[0189] 用于 L 的探针:5'-TGGTGTGGGATATTAACAG-3'

[0190] 系统发育分析

[0191] 对于所有系统发育进化树,用 ClustalW 软件包进行 DNA 序列的比对,用使用 100 个引导程序和 3 个 jumble 的 Phylip 3.5 程序的 DNA-ML 软件包¹⁵,生成最大似然进化树。用于生成系统发育进化树的先前已发表的序列可从 Genbank 获得,登记号为:对于所有 ORF:hRSV:NC001781;bRSV:NC001989;对于 F ORF:PVM,D11128;APV-A,D00850;APV-B,Y14292;APV-C,AF187152;对于 N ORF:PVM,D10331;APV-A,U39295;APV-B,U39296;APV-C,AF176590;对于 M ORF:PMV,U66893;APV-A,X58639;APV-B,U37586;APV-C,AF262571;对于 P ORF:PVM,09649;APV-A,U22110,APV-C,AF176591。用 APV C 毒株作为外类群,对所述 9 个不同的 MPV 病毒分离株进行系统发育分析。

[0192] 图中所用的缩写:hRSV:人 RSV;bRSV:牛 RSV;PVM:小鼠肺炎病毒;APV-A、B 和 C:禽肺病毒 A、B 和 C 型。

[0193] 鉴定 MPV 的方法的实施例

[0194] 样本采集

[0195] 为了发现病毒分离株,应该检查优选选自哺乳动物例如人、食肉动物(狗、猫、mustellids、海豹等)、马、反刍动物(牛、绵羊、山羊等)、猪、兔、鸟类(家禽、鸵鸟等)的鼻咽吸出物、喉和鼻拭抹物、支气管肺泡灌洗液。从鸟类,也可以检查泄殖腔拭抹物和粪便。应该收集血清,以进行免疫学测定,例如 ELISA 和病毒中和测定。

[0196] 所采集的病毒样本用 5ml Dulbecco MEM 培养基(BioWhittaker, Walkersville,

MD) 稀释,并且在涡旋混合器上充分混合 1 分钟。将悬浮液以 $840\times g$ 离心 10 分钟。对于免疫荧光技术,将沉淀涂在多点 (multispot) 玻片 (Nutacon, Leimuiden, The Netherlands) 上,而用上清液进行病毒分离。

[0197] 病毒分离

[0198] 为了分离病毒,将 tMK 细胞 (PaVM, Bilthoven, The Netherlands) 在带有玻片的 24 孔板 (Costar, Cambridge, UK) 中,用补充 10% 胎牛血清 (BioWhittaker, Vervier, Belgium) 的下述培养基培养。在接种之前,所述板用 PBS 洗涤,然后加入含有 Hank 氏盐的 Eagle 氏 MEM (ICN, Costamesa, CA),所述培养基补充 0.52 克 / 升 NaHCO_3 、0.025 M HEPES (BioWhittaker)、2 mL- 谷氨酰胺 (BioWhittaker)、200 单位 / 升青霉素、200 μg / 升链霉素 (BioWhittaker)、1 克 / 升乳清蛋白 (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, The Netherlands)、2.0 克 / 升 D- 葡萄糖 (Merck, Amsterdam, The Netherlands)、10 克 / 升蛋白胨 (Oxoid, Haarlem, The Netherlands) 和 0.02% 酪氨酸 (Life Technologies, Bethesda, MD)。在所述板中一式三份接种所述鼻咽吸出物样品的上清液,每孔 0.2 ml,然后以 $840\times g$ 离心 1 小时。接种后,让所述板于 37°C 最多孵育 14 天,一周更换一次培养基,每日检查培养物的 CPE。14 天后,从第二次传代培养物中刮出细胞,然后再孵育 14 天。对于第三次传代,重复该步骤。用所述玻片如下所述通过间接 IFA 证实所述病毒的存在。

[0199] 一般在第三次传代后,在第 8-14 天观察到 CPE,这取决于分离株。所述 CPE 实际上不能区别于由 hRSV 或 hPIV 在 tMK 或其它细胞培养物中引起的 CPE。然而, hRSV 从大约第 4 天开始诱导 CPE。CPE 的特征为合胞体形成,此后细胞表现出快速的内部破坏,然后所述细胞与单层分离。对于某些分离株,难以观察到 CPE,而用 IFA 证实这些培养物中所述病毒的存在。

[0200] MPV 的病毒培养物

[0201] 在上述培养基中的 tMK 细胞亚融合单层中,接种在 24 孔板中传代 2-3 次后显示出 CPE 的样品的上清液。每日检查培养物的 CPE,一周更换一次培养基。由于 CPE 随每种分离株而不同,在第 12-14 天,使用针对所述新病毒分离株的白鼬抗体,运用间接 IFA 检验所有培养物。将阳性培养物冻融 3 次,此后通过低速离心澄清所述上清液,分成等分样品并冻存于 -70°C 。按照本领域中所使用的、已建立的技术¹⁶,测定培养上清液中病毒的 50% 组织培养物感染性剂量 (TCID₅₀)。

[0202] 病毒表征

[0203] 按照已经很好建立并且在本领域使用的已描述的技术¹⁴,进行血细胞凝集测定和氯仿敏感性试验。对于 EM 分析,在微量离心机中于 4°C 以 $17000\times g$,从受感染细胞培养上清液中浓缩病毒,此后,将沉淀重悬于 PBS,用负对比 EM 检查。

[0204] 通过间接 IFA 检测抗原

[0205] 如上所述处理所采集的样本,将样品沉淀涂在多点 (multispot) 玻片上。干燥后,将细胞在丙酮中于室温固定 1 分钟。

[0206] 或者,在带有玻片的 24 孔载玻片 (24 well slide) 中的 tMK 细胞上培养病毒。这些玻片用 PBS 洗涤,并于室温在丙酮中固定 1 分钟。

[0207] 用 PBS 洗涤后,将玻片于 37°C 与在 PBS 中以 1 : 50-1 : 100 稀释的多克隆抗体一起孵育 30 分钟。我们用经免疫的白鼬和豚鼠获得了多克隆抗体,但这些抗体可以在各种动

物中产生,对于每种免疫,所述多克隆抗体的工作稀释度可以改变。用 PBS 洗涤 3 次和用自来水洗涤 1 次后,玻片与 FITC 标记的山羊抗白鼬抗体 (KPL, Guilford, UK, 稀释 40 倍) 一起于 37℃ 孵育 30 分钟。用 PBS 洗涤 3 次和用自来水洗涤 1 次后,使玻片包含在甘油 /PBS 溶液 (Citifluor, UKC, Canterbury, UK) 中并使其被覆盖。用 Axioscop 荧光显微镜 (Carl Zeiss B.V., Weesp, the Netherlands) 分析玻片。

[0208] 通过间接 IFA 检测人类、哺乳动物、反刍动物或其它动物的抗体

[0209] 为了检测病毒特异性抗体,用丙酮将用 MPV 感染的 tMK 细胞固定在盖玻片上 (如上所述),用 PBS 洗涤,然后与 1-16 稀释度的血清样品一起于 37℃ 孵育 30 分钟。用 PBS 洗涤 2 次和用自来水洗涤 1 次后,玻片与 FITC 标记的针对所用物种的第二抗体 (Dako) 一起于 37℃ 孵育 30 分钟。如上所述处理玻片。

[0210] 抗体可以用荧光染料直接标记,这将产生直接免疫荧光测定。FITC 可以用任何荧光染料替代。

[0211] 动物免疫

[0212] 通过实验性鼻内感染在单独的加压手套箱中关养的两只无特定病原体的白鼬和两只豚鼠,产生针对所述新发现的病毒的白鼬和豚鼠特异性抗血清。2-3 周后,通过心脏穿刺,给所述动物放血,用其血清作为参比血清。如下所述用间接 IFA,对所述血清检验所有先前描述的病毒。其它动物种也适合用于产生特异性抗体制备物,可以使用其它抗原制备物。

[0213] 病毒中和测定 (VN 测定)

[0214] 用人血清和动物血清以 8 倍稀释度开始的 2 倍连续稀释液,进行 VN 测定。经稀释的血清与 100 TCID₅₀ 的病毒一起孵育 1 小时,然后接种到在 96 孔板中生长的 tMK 细胞中,此后,将板以 840×g 离心。使用如上所述的相同培养基。在 3 天和 6 天后更换培养基,8 天后,进行 IFA (参见上文)。VN 滴度被定义为导致阴性 IFA 和抑制细胞培养物中 CPE 的血清样品的最低稀释度。

[0215] RNA 分离

[0216] 用 High Pure RNA Isolation kit (高纯度 RNA 分离试剂盒),依照生产商的说明 (Roche Diagnostics, Almere, The Netherlands),从受感染细胞培养物的上清液或蔗糖梯度级分中分离 RNA。也可以依照本领域已知的其它方法分离 RNA (Current Protocols in Molecular Biology)。

[0217] RT-PCR

[0218] 在含有 50mM Tris.HCl pH 8.5、50mM NaCl、4 mM MgCl₂、2mM 二硫苏糖醇、dNTP 各 200 μM、10 单位重组 RNasin (Promega, Leiden, the Netherlands)、10 单位 AMV RT (Promega, Leiden, The Netherlands)、5 单位 Amplitaq Gold DNA 聚合酶 (PE Biosystems, Nieuwerkerk aan de IJssel, The Netherlands) 和 5 μl RNA 的 50 μl 反应物中,进行一步 RT-PCR。循环条件为 42℃ 45 min 和 95℃ 7min 一次,95℃ 1min、42℃ 2 min 和 72℃ 3min 重复 40 次,以及 72℃ 10min 一次。

[0219] 用于诊断性 PCR 的引物:

[0220] 在核蛋白中:N3 (5' -GCACTCAAGAGATACCGTAG-3') 和 N4 (5' -AGACTTTCTGCTTTGCTGCCTG-3'),用以扩增一个 151 个核苷酸的片段。

[0221] 在基质蛋白中:M3 (5' -CCCTGACAATAACCACTCTG-3') 和 M4 (5' -GCCAACTGATTG

GCTGAGCTC-3'),用以扩增一个 252 个核苷酸的片段。

[0222] 在聚合酶蛋白中:L6(5' -CATGCCCACTATAAAAGGTCAG-3')和 L7(5' -CACCCCAGTCTTTCTTGAAA-3'),用以扩增一个 173 个核苷酸的片段。

[0223] 可以基于 MPV 的序列设计其它引物,对于特定的目的,可以使用不同的缓冲液和测定条件。

[0224] 序列分析

[0225] 用 Dyanamic ET terminator sequencing kit(Dyanamic ET 终止测序试剂盒)(Amersham Pharmacia Biotech,Roosendaal,The Netherlands)和 ABI 373 自动 DNA 测序仪(PE Biosystem)进行序列分析。所有技术都依照生产商的说明进行。PCR 片段用供 PCR 用的相同寡核苷酸直接测序,或者用 Qiaquick Gel Extraction Kit(凝胶提取试剂盒)(Qiagen,Leusden,The Netherlands),从凝胶中纯化所述片段,并且依照生产商的说明,将其克隆到 pCR2.1 载体(Invitrogen,Groningen,The Netherlands)中,随后用 M13 特异性寡核苷酸测序。

[0226] 供分析所述基因组(缺乏 NS1/NS2)3' 端用的寡核苷酸。

[0227] 基于 Randhawa(1997)发表的 hRSV 和 APV 的尾随序列和前导序列,设计引物 TR1(5' -AAAGAATTCACGAGAAAAACGC-3'),基于所获得的 N 蛋白中的序列,设计引物 N1(5' -CTGTGGTCTCTAGTCCCACTTC-3')。RT-PCR 测定和测序如上所述来进行。

[0228] 所述 RT-PCR 得到一种约 500 个碱基对的产物,该产物太小,以致于不能含有两个 ORF 的信息,这些序列的翻译并未揭示出 ORF。

[0229] 通过 ELISA 检测人类、哺乳动物、反刍动物或其它动物的抗体

[0230] 在副粘病毒科中,N 蛋白是丰度最高的蛋白质,针对这种蛋白的免疫应答在感染早期发生。由于这些原因,优选使用重组来源的所述 N 蛋白来开发用于检测抗 MPV 抗体的 ELISA 测定。适用于抗体检测的抗原包括与接触过或被 MPV 病毒感染的患者的任何 MPV 特异性抗体结合的任何 MPV 蛋白。本发明的优选抗原包括主要在接触了 MPV 的患者中引发免疫应答并因此通常最容易为患者的抗体所识别的那些抗原。特别优选的抗原包括 MPV 的 N、F 和 G 蛋白。供免疫学技术用的抗原可以是天然抗原,或者可以是其经修饰的形式。可以运用众所周知的分子生物学技术,来改变 MPV 抗原的氨基酸序列,以产生可以用于免疫学技术的经修饰形式的所述抗原。

[0231] 用于克隆基因、操作所述基因以加入到表达载体和从表达载体中取出、以及在异源宿主中表达由所述基因编码的蛋白质的方法是众所周知的,这些技术可以用来提供所述表达载体、宿主细胞以及用于在宿主中表达所克隆的编码抗原的基因,以产生供诊断测定使用的重组抗原。参见例如:Molecular cloning, A laboratory manual and Current Protoco in Molecular Biology。可以用各种各样的表达系统来产生 MPV 抗原。例如,适合于在大肠杆菌(E. coli)、枯草杆菌(B. subtilis)、酵母、昆虫细胞和哺乳动物细胞中产生蛋白质的各种各样的表达载体已有描述,可以用其中任一种,来产生适用于检测接触过 MPV 病毒的患者体内的抗 MPV 抗体的 MPV 抗原。

[0232] 杆状病毒表达系统的优点是提供蛋白的必需加工,因此优选杆状病毒表达系统。该系统利用多角体蛋白启动子来指导 MPV 抗原的表达(Matsuura 等,1987, J. Gen. Virol. 68 :1233-1250)。

[0233] 由重组杆状病毒产生的抗原可以用于各种各样的免疫学测定中,以检测患者体内的抗 MPV 抗体。已经很好确立的是,重组抗原可以用来在实际上任何的免疫测定中替代天然病毒,来检测病毒特异性抗体。这些测定包括直接测定和间接测定、夹心测定、固相测定其中例如使用板或微珠的那些固相测定、和液相测定。合适的测定包括用第一抗体和第二抗体的那些测定、以及使用抗体结合试剂例如 A 蛋白的那些测定。此外,在本发明中可以使用各种各样的检测方法,包括比色、荧光、磷光、化学发光、发光和放射性方法。

[0234] 实施例 1:采用重组 N 蛋白的间接抗 MPV IgG EIA

[0235] 可以进行采用重组 N 蛋白(用重组杆状病毒在昆虫(Sf9)细胞中产生的)作为抗原的间接 IgG EIA。对于抗原制备,用所述重组杆状病毒感染 Sf9 细胞,在感染后 3-7 天收获。细胞悬浮液在 PBS, pH7.2 中洗涤 2 次,调至 5.0×10^6 细胞/ml 的细胞密度,然后冻融 3 次。通过低速离心(500xg, 15min.) 沉淀大的细胞碎片,收集上清液,将其贮存于 -70℃ 待用。对于阴性对照抗原,类似地处理未经感染的细胞。

[0236] 用 100 μ l 冻融裂解液来包被微量滴定板,其稀释度范围为 1 : 50 至 1 : 1000。在两个复份孔中加入未经感染的细胞裂解液,用作阴性对照。在保温过夜后,用 PBS/0.05% Tween 洗板 2 次。试验血清在 ELISA 缓冲液(PBS, 补充正常山羊血清至 2%, 并且补充 0.5% 牛血清白蛋白和 0.1% 奶粉) 稀释 1 : 50 至 1 : 200, 然后将各孔于 37℃ 保温 1 小时。

[0237] 用 PBS/0.05% Tween 洗板 2 次。向各孔中加入在 ELISA 缓冲液中以 1 : 3000 至 1 : 5000 稀释的辣根过氧化物酶标记的山羊抗人(或针对其它物种)IgG, 于 37℃ 保温 1 小时。然后用 PBS/0.05% Tween 洗板 2 次, 用自来水洗板 1 次, 于室温与酶底物 TMB- 例如得自 Sigma 的 3,3', 5,5' - 四甲基联苯胺一起保温 15 分钟, 并且用 100 μ l 2M 磷酸终止反应。用自动微量滴定板读出仪, 测量 450nm 的比色读数。

[0238] 实施例 2:采用重组核蛋白的捕获抗 MPV IgM EIA

[0239] 可以采用先前 Erdman 等 (1990) J. Clin. Microb. 29 :1466-1471 描述的测定的改进测定, 进行用重组核蛋白或任何其它重组蛋白作为抗原的捕获 IgM EIA。

[0240] 向微量滴定板的各孔中, 加入亲和纯化的抗人 IgM 捕获抗体(或针对其它物种的抗体), 例如得自 Dako 的所述抗体, 浓度为每孔 0.1M 碳酸盐缓冲液 pH9.6 中的 250ng。于室温过夜保温后, 用 PBS/0.05% Tween 洗板 2 次。以三个重复孔加入 100 μ l 在 ELISA 缓冲液中以 1 : 200 至 1 : 1000 稀释的试验血清, 于 37℃ 保温 1 小时。然后用 PBS/0.05% Tween 洗板 2 次。

[0241] 所述冻融(经重组病毒感染的)Sf21 细胞裂解液在 ELISA 缓冲液中以 1 : 100 至 1 : 500 稀释, 加入至各孔中, 于 37℃ 保温 2 小时。未经感染的细胞裂解液用作阴性对照, 以两个重复孔加入。然后用 PBS/0.05% Tween 洗板 3 次, 与 100 μ l 在 ELISA 缓冲液中最适稀释度的抗 MPV 的多克隆抗体于 37℃ 一起保温 1 小时。用 PBS/0.05% Tween 洗涤 2 次后, 所述板与辣根过氧化物酶标记的第二抗体(例如兔抗白鼬)一起保温, 将所述板于 37℃ 保温 20 分钟。

[0242] 然后用 PBS/0.05% Tween 洗板 5 次, 于室温与酶底物 TMB- 例如得自“Sigma”的 3,3', 5,5' - 四甲基联苯胺一起保温 15 分钟, 并且用 100 μ l 2M 磷酸终止反应。用自动微量滴定板读出仪, 测量 450nm 的比色读数。

[0243] 用得自患有临床 MPV 病毒感染的人的急性期和恢复期血清对, 比较采用重组核蛋

白（或其它重组蛋白）以及采用 MPV 全病毒的捕获 IgM EIA 的灵敏度。通过检验得自健康人和患有其它副粘病毒感染的人的血清样本，测定重组核蛋白捕获 EIA 的特异性。

[0244] 采用通过杆状病毒表达产生的重组 MPV 融合蛋白和糖蛋白的 EIM 的可能性。

[0245] 糖蛋白 G 和 F 是 MPV 病毒体的两种跨膜包膜糖蛋白，是主要的中和保护性抗原。这些糖蛋白在载体病毒系统例如杆状病毒系统中的表达，提供了一种供用于检测 MPV 特异性抗体的测定用的重组抗原源。此外，它们与例如核蛋白联用，进一步提高了酶免疫测定在检测抗 MPV 抗体中的灵敏度。

[0246] 可以使用各种各样的其它免疫学测定 (Current Protocols in Immunology)，作为本文所述方法的替代方法。

[0247] 为了发现病毒分离株，可以检查优选但不限于得自人、食肉动物（狗、猫、海豹等）、马、反刍动物（牛、绵羊、山羊等）、猪、兔、鸟类（家禽、鸵鸟等）的鼻咽吸出物、喉和鼻拭抹物、支气管肺泡灌洗液和喉拭抹物。从鸟类，也可以检查泄殖腔和小肠拭抹物以及粪便。对于所有样品，可以进行血清学（抗体和抗原检测等）、病毒分离和核酸检测技术，来检测病毒。可以通过用纯化的 MPV 或其部分（蛋白质、肽）免疫小鼠（或其它动物），然后随后用已建立的杂交瘤技术 (Current protocols in Immunology)，产生单克隆抗体。或者，为此可以使用噬菌体展示技术 (Current protocols in Immunology)。同样，可以从受感染的人或动物，或者从经免疫的人或动物，获得多克隆抗体 (Current protocols in Immunology)。

[0248] 检测 NS1 和 NS2 蛋白是否存在，可以用采用各种各样抗体制剂的蛋白质印迹分析、IFA、免疫沉淀技术来进行。检测在病毒分离株中是否存在 NS1 和 NS2 基因或其同源物，可以用 PCR，用根据已知的 NS1 和 / 或 NS2 基因设计的引物组以及各种各样的核酸杂交技术来进行。

[0249] 为了确定 NS1 和 NS2 基因是否存在于病毒基因组的 3' 端，可以用对所述基因组的这一 3' 端特异性的引物来进行 PCR。在我们的情况下，我们使用对所述病毒基因组 3' 非翻译区特异性的一种引物和 NORF 中的一种引物。对于同一目的，可以设计其它引物。根据 PCR 产物的长度和 / 或核苷酸序列，揭示缺乏 NS1/NS2 基因。对 NS1 和 / 或 NS2 基因特异性的引物可以与对所述病毒基因组 3' 端的其它部分（例如所述非翻译区或 N、M 或 F ORF）特异性的引物联用，以达到对存在 NS1 基因或 NS2 基因的阳性鉴定。除 PCR 之外，对于相同的目的，可以使用各种各样的技术，例如分子克隆、核酸杂交。

[0250] 实施例 3：MPV 的不同血清型 / 亚组

[0251] 通过分析 9 个病毒分离株的 N、M、F 和 L ORF 中的部分核苷酸序列，鉴定出两个可能的遗传分类群。在分类群内观察到 90-100% 的核苷酸同一性，在分类群间观察到 81-88% 的同一性。用更多病毒分离株获得的序列信息，证实存在两种基因型。作为 A 分类群原型的病毒分离株 ned/00/01 和作为 B 分类群原型的病毒分离株 ned/99/01 已经用于交叉中和测定中，以测试所述基因型是否与不同的血清型或亚组相关。

[0252] 结果

[0253] 运用 RT-PCR 测定，用位于聚合酶基因中的引物，我们从鼻咽吸出物样品中鉴定出另外 30 个病毒分离株。有关这些新分离株的基质基因和聚合酶基因的部分的序列信息、以及有关先前 9 个分离株的所述序列信息，用来构建系统发育进化树（图 16）。这些进化树的分析证实存在两个遗传分类群，病毒分离株 ned/00/00-1 为 A 组的原型病毒，而病毒分离株

ned/99/01 为 B 组的原型病毒。组内的核苷酸序列同一性超过 92%，而所述分类群之间的所述同一性为 81-85%。

[0254] 已经用病毒分离株 ned/00/01 和 ned/99/01 来接种白鼬，以产生病毒特异性抗血清。这些抗血清与所述两种病毒一起用于病毒中和测定。

[0255] 表 3：

[0256] 病毒中和滴度

[0257]

	分离株 00-1	分离株 99-1
免疫前血清 白鼬 A (00-1)	12	12
白鼬 A 22 dpi (00-1)	64	12
免疫前血清 白鼬 B (99-1)	12	12
白鼬 B 22 dpi (99-1)	4	64

[0258] 对于分离株 00-1，滴度相差 32 (64/2) 倍

[0259] 对于分离株 99-1，滴度相差 16 (64/4) 倍

[0260] 另外，6 只豚鼠已经接种了任一种所述病毒 (ned/00/01 和 ned/99/01)。对鼻咽吸出物样品的 RT-PCR 测定表明，病毒从感染后第 2 天至第 10 天复制。感染后第 70 天，用或者同种病毒或者异种病毒攻击所述豚鼠，在所有 4 种情况下，都观察到了病毒的复制。

[0261] 表 4

[0262]

	第一次感染	病毒复制	第二次感染	病毒复制
豚鼠 1-3	00-1	2/3	99-1	1/2
豚鼠 4-6	00-1	3/3	00-1	1/3
豚鼠 7-9	99-1	3/3	00-1	2/2
豚鼠 10-12	99-1	3/3	99-1	1/3

[0263] 注释：对于第二次感染，不再包括豚鼠 2 和 9。

[0264] 在首次攻击后用抗血清进行的病毒中和测定显示出与用白鼬进行的 VN 测定基本相同的结果 (VN 滴度的差异 > 16 倍)。

[0265] 在该实施例中所述的结果证实存在两种基因型,它们对应于 MPV 的两个血清型,并且表明有被异种病毒和同种病毒重复感染的可能性。

[0266] 实施例 4:进一步的序列测定

[0267] 该实施例描述了对 MPV 可读框 (ORF) 序列和基因间序列以及基因组末端的部分序列的进一步分析。

[0268] MPV 的核蛋白 (N)、磷蛋白 (P)、基质蛋白 (M) 和融合蛋白 (F) 基因的序列分析揭示,与主要在美国鸟类发现的禽肺病毒 APV C 血清型的序列同源性程度最高。这些分析也揭示,缺乏位于病毒基因组 3' 端的非结构蛋白 NS1 和 NS2,并且融合蛋白紧邻基质蛋白定位。在此,我们提出 22K (M2) 蛋白、小疏水性 (SH) 蛋白、吸附 (G) 蛋白和聚合酶 (L) 蛋白基因、以及基因间区和尾随序列的序列。与先前描述的序列一起,此中提出的序列完成了 MPV 的基因组序列,但基因组末端的最后 12-15 个核苷酸除外,因而建立了 MPV 的基因组组构。MPV 基因组的序列与 APV A、B 和 C 亚型、RSV A 和 B 亚型、PVM 和其它副粘病毒的序列的并排比较,提供了有关 MPV 应分类在 Metapneumovirus 中的强有力的证据。

[0269] 结果

[0270] 序列策略

[0271] MPV 分离株 00-1 (van den Hoogen 等, 2001) 在第三代猴肾 (tMK) 细胞中繁殖,用接种后 3 周从上清液中分离的 RNA 作为供 RT-PCR 分析用的模板。根据可得到的 MPV 00-1 的部分序列信息 (van den Hoogen 等, 2001) 以及 APV 和 RSV 的前导序列和尾随序列 (Randhawa 等, 1997; Mink 等, 1991) 设计引物。最初,通过 RT-PCR 扩增产生在先前所得产物之间的、大小范围为长 500 bp 至 4 Kb 的片段,并且直接测序。随后,通过产生一系列大小范围为 500-800 bp、代表完整 MPV 基因组的重叠 RT-PCR 片段,证实所述基因组序列。对于所有 PCR 片段,对两条链直接测序,以将扩增和测序错误减至最低。用所述核苷酸序列和氨基酸序列,使用 BLAST 软件 (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST),搜索与 Genbank 数据库中序列的同源性。基于与已知病毒基因的同源性以及它们在所述基因组中的位置,指定蛋白质名称。根据这一信息,构建了 MPV 的基因组图谱 (图 7)。MPV 基因组长 13378 个核苷酸,其组构与 APV 的基因组组构相似。下面,我们提出了 MPV 的 ORF 和非编码序列与其它副粘病毒的 ORF 和非编码序列之间的比较,并且讨论了重要的相似性和差异。

[0272] 核蛋白 (N) 基因

[0273] 正如所示的,MPV 基因组图谱中的第一个基因编码一种 394 个氨基酸 (aa) 的蛋白质,并且表现出与其它肺病毒的 N 蛋白有广泛的同源性。所述 N ORF 的长度与 APV-C 的 N ORF 的长度相同 (表 5),而小于其它副粘病毒 N ORF 的长度 (Barr 等, 1991)。氨基酸序列的分析揭示,与 APV-C 的同源性最高 (88%),而与其它副粘病毒仅有 7-11% 的同源性 (表 6)。

[0274] Barr 等 (1991) 鉴定出在属于单分子负链 RNA 病毒目的病毒之间有相似性的 3 个区:A、B 和 C (图 8)。虽然在病毒科内的相似性最高,但这些区在病毒科之间是高度保守的。在所有 3 个区中,MPV 显示出与 APV-C 有 97% 氨基酸序列同一性,与 APV-B 有 89% 氨基酸序列同一性,与 APV-A 有 92% 氨基酸序列同一性,与 RSV 和 PVM 有 66-73% 氨基酸序

列同一性。氨基酸残基 160 和 340 之间的区看来在 metapneumovirus 中高度保守,在肺病毒亚科中的保守性略低 (Miyahara 等,1992 ;Li 等,1996 ;Barr 等,1991)。这与 MPV 是一种 metapneumovirus 相一致,显示出与 APV C 有 100%相似性。

[0275] 磷蛋白 (P) 基因

[0276] 所述基因组图谱中的第二个 ORF 编码一种 294 个氨基酸的蛋白质,所述蛋白质与 APV-C 的 P 蛋白有 68%的氨基酸序列同源性,与 RSV 的 P 蛋白仅有 22-26%的氨基酸序列同源性 (表 6)。MPV 的 P 基因含有一个实质上的 ORF,在这方面与得自许多其它副粘病毒的 P 相似 (有关综述参见 Lamb 和 Kolakofsky,1996 ;Sedlmeier 等,1998)。

[0277] 与 APV A 和 B 以及 PVM 相反,而与 RSV 和 APV-C 相似,MPVP ORF 缺乏半胱氨酸残基。Ling(1995) 提出,在所有肺病毒之间相似性高的一个区 (aa 185-241) 在 RNA 合成过程或者在维持核衣壳复合体的结构完整性方面起作用。这一高相似性的区也存在于 MPV 中 (图 9),尤其是当考虑到保守取代时,显示出与 APV-C 有 100%的相似性,与 APV-A 和 B 有 93%的相似性,与 RSV 有约 81%的相似性。正如关于 APV 所描述的 (Ling 等,1995),MPV P 蛋白的 C 末端富含谷氨酸残基。

[0278] 基质 (M) 蛋白基因

[0279] NIPV 基因组的第三个 ORF 编码一种 254 个氨基酸的蛋白质,类似其它肺病毒的 M ORF。MPV M ORF 与其它 met 印 neumovirus 的 MORF 的大小完全相同 (表 5),并且表现出与 APV 的基质蛋白的氨基酸序列同源性高 (78-87%),与 RSV 和 PVM 基质蛋白的同源性较低 (37-38%),而与其它副粘病毒基质蛋白的同源性为 10%或更低 (表 6)。

[0280] Easton(1997) 对所有肺病毒的基质蛋白的序列作出了比较,发现位于残基 14-19 的一个保守七肽,所述七肽在 MPV 中也是保守的 (图 10)。对于 RSV、PVM 和 APV 而言,已经鉴定出 M 主要 ORF 内或者与 M 主要 ORF 重叠的小的第二个 ORF (bRSV 中的 52 个 aa 和 51 个 aa,RSV 中的 75 个 aa,PVM 中的 46 个 aa 和 APV 中的 51 aa) (Yu 等,1992 ;Easton 等,1997 ;Samal 等,1991 ;Satake 等,1984)。我们注意到 MPV MORF 中有两个小 ORF。在 M 主要 ORF 内发现一个始于核苷酸 2281 的 54 个 aa 残基的小 ORF (片段 1,图 7),发现一个始于核苷酸 2893 的与 M 主要 ORF 重叠的 33 个 aa 残基的小 ORF (片段 2,图 7)。与 RSV 和 APV 的第二 ORF 相似,在这些第二 ORF 和其它肺病毒的第二 ORF 之间没有显著的同源性,并且缺乏表现的起始信号或终止信号。另外,有关对应于 APV 和 RSV 的这些第二 ORF 的蛋白质的合成的证据尚未有报道。

[0281] 融合蛋白 (F) 基因

[0282] MPV 的 F ORF 邻近 M ORF 定位,这是 Metapneumovirus 成员的特征。MPV 的 F 基因编码一种 539 个 aa 的蛋白质,该蛋白比 APV-C 的 F 长 2 个 aa 残基 (表 5)。氨基酸序列分析表明,与 APV-C 的同源性为 81%,与 APV-A 和 B 的同源性为 67%,与肺病毒 F 蛋白的同源性为 33-39%,而与其它副粘病毒的同源性仅有 10-18% (表 6)。在副粘病毒 F 蛋白中并且也在 MPV 中观察到的保守特征之一是半胱氨酸残基的分布 (Morrison,1988 ;Yu 等,1991)。metapneumovirus 在 F1 中共享 12 个半胱氨酸残基 (7 个在所有副粘病毒中是保守的),在 F2 中共享 2 个半胱氨酸残基 (1 个在所有副粘病毒中是保守的)。在 MPV F ORF 中存在的 3 个潜在的 N- 联糖基化位点中,没有一个是与 RSV 共享的,与 APV 共享 2 个所述位点 (位置 74 和 389)。MPV 的第三个特有的潜在 N- 联糖基化位点位于位置 206 (图 11)。

[0283] 虽然与其它副粘病毒的序列同源性低,但 MPV 的 F 蛋白表现出与关于其它副粘病毒科成员的 F 蛋白所描述的相一致的典型融合蛋白的特征 (Morrison,1988)。副粘病毒科成员的 F 蛋白作为无活性前体 (F0) 合成,被宿主细胞的蛋白酶切割,产生氨基末端 F2 亚基和大的羧基末端 F1 亚基。已提出的切割位点 (Collins 等,1996) 在副粘病毒科的所有成员中都是保守的。MPV 的所述切割位点含有残基 RQSR。两个精氨酸 (R) 残基与 APV 和 RSV 共享,但谷氨酰胺 (Q) 和丝氨酸 (S) 残基与其它副粘病毒如人副流感病毒 1 型、仙台病毒和麻疹病毒共享 (数据未显示)。

[0284] F1 氨基末端的疏水性区据认为作为膜融合结构域起作用,并且在副粘病毒和麻疹病毒中显示出高序列相似性,而在肺病毒中显示出的序列相似性程度较低 (Morrison,1988)。这 26 个残基 (位置 137-163,图 11) 在 MPV 和 APV-C 之间是保守的,这与该区在 metapneumovirus 中高度保守相一致 (Naylor 等,1998 ;Seal 等,2000)。

[0285] 正如对于 APV 和其它副粘病毒的 F2 亚基所观察到的,与 RSV 相比,MPV 显示出缺失 22 个 aa 残基 (位置 107-128,图 11)。此外,对于 RSV 和 APV,发现信号肽和锚定结构域在亚型内保守,而在亚型间显示出高变异性 (Plows 等,1995 ;Naylor 等,1998)。MPV 的位于 F2 氨基末端的信号肽 (aa 10-35,图 11) 显示出与 APV-C 有一定的序列相似性 (26 个 aa 残基中的 18 个是相似的),与其它 APV 或 RSV 有较低的保守性。在 F1 羧基末端的膜锚定结构域中观察到多得多的变异性,虽然仍观察到与 APV-C 有一定的同源性。

[0286] 22K(M2) 蛋白

[0287] M2 基因是肺病毒亚科特有的,在所有肺病毒中观察到两个重叠的 ORF。第一个主要 ORF 代表 M2-1 蛋白,该蛋白增强病毒聚合酶的持续合成能力 (Collins 等,1995 ;Collins,1996) 和其基因间区的通读性 (Hardy 等,1998 ;Feams 等,1999)。MPV 的 M2-1 基因邻近 F 基因定位,编码一种 187 个 aa 的蛋白质 (表 5),并且显示出与 APV-C 的 M2-1 的同源性最高 (84%) (表 6)。所有肺病毒 M2-1 蛋白的比较表明,在所述蛋白氨基端一半中的保守性最高 (Collins 等,1990 ;Zamora 等,1992 ;Ahmadian 等,1999),这与 MPV 显示出在该蛋白的前 80 个 aa 残基中与 APV-C 的相似性为 100% 的保守性的观察相一致 (图 12A)。MPVM2-1 蛋白含有 3 个位于前 30 个 aa 残基内、在所有肺病毒中保守的半胱氨酸残基。这种半胱氨酸的集中在锌结合蛋白中是常见的 (Ahmadian 等,1991 ;Cuesta 等,2000)。

[0288] 与肺病毒 M2-1 ORF 重叠的第二 ORF (M2-2) 的位置是保守的,但在序列上不保守,所述 ORF 被认为参与病毒 RNA 复制和转录间转换的控制 (Collins 等,1985 ;Elango 等,1985 ;Baybutt 等,1987 ;Collins 等,1990 ;Ling 等,1992 ;Zamora 等,1992 ;Alansari 等,1994 ;Ahmadian 等,1999 ;Bermingham 等,1999)。对于 MPV 而言,M2-2 ORF 始于 M2-1 ORF 中的核苷酸 512 (图 7),这正是 APV-C 中的相同起始位置。APV-C 和 MPV 的 M2-2ORF 的长度相同,有 71 个 aa 残基 (表 5)。MPV 和 APV-C 之间 M2-2ORF 的序列比较 (图 12B) 表明有 64% 的氨基酸序列同源性,而在 MPV 与 APV-A 和 B 之间仅有 44-48% 的氨基酸序列同源性 (表 6)。

[0289] 小疏水性蛋白 (SH) ORF

[0290] 所述基因邻近 MPV 的 M2 定位,可能编码一种 183 个 aa 的 SH 蛋白 (图 1 和 7)。在该 ORF 和其它 RNA 病毒基因或基因产物之间没有可辨别的序列同一性。由于在肺病毒 SH 蛋白之间的序列相似性一般都低,所以这一点并不出乎意料。hMPV 的推定 SH ORF 是迄今已

知的最长的 SH ORF (表 1)。所述 SH ORF 的 aa 组成与 APV、RSV 和 PVM 的相当相似,具有高百分比的苏氨酸和丝氨酸残基(hMPV、APV、RSVA、RSV B、bRSV 和 PVM 的丝氨酸/苏氨酸含量分别为 22%、18%、19%、20.0%、21%和 28%)。hMPV 的 SH ORF 含有 10 个半胱氨酸残基,而 APV SH 含有 16 个半胱氨酸残基。hMPV 的 SH ORF 含有 2 个潜在的 N- 联糖基化位点(aa 76 和 121),而 APV 有 1 个所述位点,RSV 有 2 个或 3 个,而 PVM 有 4 个。

[0291] 推定的 hMPV SH 蛋白以及 APV 和 RSV 的 SH 的亲水性分布型揭示出相似的特征(图 7B)。APV 和 hMPV 的 SH ORF 有一个亲水性 N 末端、一个可以充当潜在的跨膜结构域的中心疏水性结构域(对于 hMPV 为 aa 30-53)、一个第二疏水性结构域(aa 155-170)和一个亲水性 C 末端。相反,RSV 的 SH 看来缺乏 APV 和 hMPV ORF 的 C 末端部分。在所有肺病毒的 SH 蛋白中,所述疏水性结构域都邻接多个碱性氨基酸残基,该碱性氨基酸残基在 hMPV 的 SH ORF 中也存在(aa 29 和 54)。

[0292] 吸附糖蛋白(G)ORF

[0293] hMPV 的推定的 G ORF 邻近推定的 SH 基因定位,编码一种 236 个 aa 的蛋白质(nt 6262-6972,图 1)。紧接该 ORF 之后,发现第二个小 ORF,可能编码 68 个 aa 残基(nt 6973-7179),但缺乏起始密码子。在在所述第二读框中的一个 194 个 aa 残基的第三个可能的 ORF 与这两个 ORF 重叠,但也缺乏起始密码子(nt 6416-7000)。这一 ORF 在同一读框内后接一个 65 个 aa 残基的第四个可能的 ORF(nt 7001-7198),但又是缺乏起始密码子。最后,在所述第三个读框中发现一个可能的 97 个 aa 残基的 ORF(但缺乏起始密码子)(nt 6444-6737,图 1)。与第一个 ORF 不同,所述其它 ORF 没有表观的基因起始序列或基因终止序列(参见下文)。虽然 236 个 aa 的 G ORF 可能代表 hMPV 吸附蛋白的至少一部分,但不能排除的是:所述额外的编码序列通过某些 RNA 编辑事件而作为单独的蛋白或作为所述吸附蛋白的部分表达。应该注意到,对于 APV 和 RSV 而言,在所述主要 G ORF 之后没有鉴定出第二个 ORF,但 APV 和 RSV 在 G 的主要 ORF 内都有第二个 ORF。然而,缺乏有关这些 ORF 表达的证据,并且在不同病毒的预测氨基酸序列之间没有序列同一性(Ling 等,1992)。hMPV G 中的第二个 ORF 没有显示出其它 G 蛋白的特征,所述额外 ORF 是否表达有待进一步研究。

[0294] 对于所有 ORF 的 BLAST 分析表明,在核苷酸序列或氨基酸序列水平上与其它已知病毒基因或基因产物没有可辨别的序列同一性。这与发现其它 G 蛋白例如 hRSV A 和 B 的 G 蛋白(53%)(Johnson 等,1987)以及与 APV A 和 B 的 G 蛋白(38%)(Juhasz 和 Easton, 1994) 的序列同一性百分比低相一致。

[0295] 而大多数所述 hMPV ORF 在长度和序列上与 APV 的所述 ORF 相似,hMPV 的 236 个 aa 残基的推定 G ORF 比 APV 的 G ORF 小得多(表 1)。氨基酸序列表明,丝氨酸和苏氨酸的含量为 34 呢这甚至高于 RSV 的 32%和 APV 的 24%所述推定的 G ORF 也含有 8.5%的脯氨酸残基,这高于 RSV 的 8%和 APV 的 7%。APV、RSV 和 hMPV 的 G 蛋白中脯氨酸残基的不寻常的丰度在粘蛋白起源的糖蛋白中也观察到,在粘蛋白起源的糖蛋白中这是蛋白质三维结构的一个主要考虑因素(Collins 和 Wertz,1983;Wertz 等,1985;Jentoft,1990)。hMPV 的 G ORF 含有 5 个潜在 N- 联糖基化位点,而 hRSV 有 7 个,bRSV 有 5 个,APV 有 3-5 个。

[0296] hMPV G 的预测亲水性分布型揭示了与其它肺病毒相似的特征。

[0297] 氨基末端含有一个亲水性区,后接一个短的疏水性区(对于 hMPV 为 aa.33-53)和一个主要为亲水性的羧基末端(图 8B)。这种总体组构与锚定 II 型跨膜蛋白的相一致,与

APV 和 RSV 的 G 蛋白中的这些区很好地对应。hMPV 的推定 G ORF 仅含有 1 个半胱氨酸残基, 这与 RSV 和 APV 形成对比 (分别有 5 个和 20 个)。当然, 所述 G 基因内 4 个第二 ORF 中的仅 2 个 ORF 含有一个额外的半胱氨酸残基, 这 4 个可能的 ORF 显示出 12-20% 的丝氨酸和苏氨酸残基以及 6-11% 的脯氨酸残基。

[0298] 聚合酶基因 (L)

[0299] 与其它负链病毒类似, MPV 基因组的最后一个 ORF 是复制转录复合物的依赖 RNA 的 RNA 聚合酶组分。MPV 的 L 基因编码一种 2005 个 aa 的蛋白质, 所述蛋白质比 APV-A 的所述蛋白长 1 个残基 (表 5)。MPV 的 L 蛋白与 APV-A 有 61% 的同源性, 与 RSV 有 42-44% 的同源性, 而与其它副粘病毒有约 13% 的同源性 (表 6)。Poch 等 (1989 ;1990) 鉴定出非分段负链 RNA 病毒的 L 蛋白内的 6 个保守结构域, 其中结构域 III 含有被认为对于聚合酶功能所必需的 4 个核心聚合酶基序。这些基序 (A、B、C 和 D) 在 MPVL 蛋白中的保守性很好: 在基序 A、B 和 C 中: MPV 与所有肺病毒有 100% 的相似性, 在基序 D 中, MPV 与 APV 有 100% 相似性, 与 RSV 有 92% 的相似性。对于完整的结构域 III (LORF 中的 aa 627-903), MPV 与 APV 有 77% 的同一性, 与 RSV 有 61-62% 的同一性, 与其它副粘病毒有 23-27% 的同一性 (图 15)。除所述聚合酶基序之外, 肺病毒的 L 蛋白含有一个符合共有 ATP 结合基序 K(X)₂₁GEGAGN(X)₂₀K 的序列 (Stec, 1991)。MPVL ORF 含有一个与 APV 类似的基序, 其中中间残基的距离少一个残基:

[0300] K(x)₂₂GEGAGN(X)₁₉K。

[0301] 系统发育分析

[0302] 作为 MPV 和肺病毒亚科成员之间关系的一个指标, 先前已经构建了基于 N、P、M 和 F ORF 的系统发育进化树 (van den Hoogen 等, 2001), 并且揭示出 MPV 和 APV-C 之间关系密切。因为 MPV SH 和 G 基因与其它副粘病毒的所述基因的同源性低, 所以不能对于这些基因构建可靠的系统发育进化树。另外, 肺病毒属和 Metapneumovirus 的成员之间不同的基因组结构, 使得不可能基于所述完整的基因组序列生成系统发育进化树。因此, 我们除了对那些先前已发表的基因之外, 仅对 M2 基因和 L 基因构建了系统发育进化树。这两个进化树证实, 在肺病毒亚科内 APV 和 MPV 密切相关 (图 16)。

[0303] MPV 非编码序列

[0304] 副粘病毒基因组的基因接点在每个基因的起点和结尾 (基因起始信号和基因终止信号) 处含有短的高度保守的、可能在转录起始和终止中起作用的核苷酸序列 (Curran 等, 1999)。MPV 的所有基因之间的基因间序列的比较揭示出一个 N、P、M、F、M2 和 G 的基因起始信号的共有序列: GGGACAAGU (图 17A), 该序列与 metapneumovirus 的共有基因起始信号 (Ling 等, 1992 ;Yu 等, 1992 ;Li 等, 1996 ;Bayon-Auboyer 等, 2000) 相同。发现 MPV 的 SH 基因和 L 基因的基因起始信号与这一共有序列略有不同 (SH:GGGAUAAAU, L:GAGACAAAU)。对于 APV, 也发现 L 的基因起始信号与所述共有序列不同: AGGACCAAT (APV-A) (Randhawa 等, 1996) 和 GGGACCAAT (APV-D) (Bayon-Auboyer 等, 2000)。

[0305] 与 MPV 和 APV 的基因起始序列相似相比, APV 的共有基因终止序列 UAGUAAUU (Randhawa 等, 1996) 在 MPV 基因间序列中不能找到。除 G-L 基因间区之外, 在大多数基因中发现的重复序列是 UAAAAA U/A/C, 该重复序列可能起基因终止信号的作用。然而, 由于我们是对病毒 RNA 测序, 而不是对 mRNA 测序, 所以不能指定确定的基因终止信

号,因此需要进一步研究。肺病毒的基因间区在大小和序列上有所不同(Curan 等,1999;Blumberg 等,1991;Collins 等,1983)。MPV 的基因间区没有显示出与 APV 和 RSV 的基因间区有同源性,并且其大小范围为 10-228 个核苷酸(图 17B)。MPV 的 M ORF 和 F ORF 之间的基因间区含有始于主要 M ORF 的第二 ORF 的一部分(参见上文)。SH 和 G 之间的基因间区含有 192 个核苷酸,基于所有三个读框中存在许多终止密码子,看来没有编码潜力。G 和 L 之间的基因间区含有 241 个核苷酸,可能包括额外的 ORF(参见上文)。有趣的是, L ORF 的起始位于这些第二 ORF 中。而 APV 的 L 基因不在前面的 G ORF 中起始,RSV 的 L ORF 也在前面的 M2 基因内起始。在副粘病毒基因组的 3' 末端和 5' 末端,短的基因外区被称为前导序列和尾随序列,前导序列的前 12 个核苷酸和尾随序列的最后 12 个核苷酸大致互补,可能是因为它们分别含有病毒启动子的基本元件(Curran 等,1999;Blumberg 等,1991;Mink 等,1986)。MPV 和 APV 的 3' 前导序列的长度都是 41 个核苷酸,在这两种病毒的核苷酸 16 和 41 之间的区中观察到一定的同源性(26 个核苷酸中的 18 个)(图 17B)。如上所述,MPV 基因组图谱的前 15 个核苷酸基于以 APV 基因组为基础的引物序列。MPV 5' 尾随序列的长度(188 个核苷酸)类似 RSV 5' 尾随序列的大小(155 个核苷酸),这比 APV 的 5' 尾随序列(40 个核苷酸)长得多。MPV 尾随序列和 APV 尾随序列的末端 40 个核苷酸的序列比对揭示,除代表基于 APV 的基因组序列的引物序列的最末端 12 个核苷酸之外,32 个核苷酸中有 21 个有同源性。我们的序列分析揭示,在所述基因组 3' 端缺乏 NS1 和 NS2 基因,并且基因组组构类似 metapneumovirus 的组构(3' N-P-M-F-M2-SH-G-L-5')。所发现的 MPV 和 APV 基因之间的序列同源性高,进一步强调了这两种病毒之间的密切关系。对于 MPV 的 N、P、M、F、M2-1 和 M2-2 基因而言,发现与 APV-C 的总体氨基酸同源性为 79%。事实上,对于这些基因而言,APV-C 和 MPV 显示出的序列同源性在其它属的亚组之间例如 RSV-A 和 B 或者 APV-A 和 B 之间所发现的序列同源性相同的范围内。APV-C 和 MPV 的这种密切关系在系统发育分析中也观察到,系统发育分析揭示,MPV 和 APV-C 总是在同一树枝(branch)中,与包含 APV-A 和 B 的树枝分开。相同的基因组组构、序列同源性和系统发育分析都支持将 MPV 分类为 Metapneumovirus 内可从哺乳动物中分离的第一个成员。应该注意到,在 MPV 的不同病毒分离株之间所发现的在 N、M、F 和 L 基因方面的序列变异表明,可能存在不同的基因型(van den Hoogen 等,2001)。MPV 和 APV-C 之间的密切关系并未在寄主范围方面反映出,因为与 MPV 形成对比,APV 感染鸟类(van den Hoogen 等,2001)。这种寄主范围的差异可能是由于两种病毒的 SII 蛋白和 G 蛋白之间高度趋异的差异所决定。MPV 的 SII 蛋白和 G 蛋白没有显示出与任何其它病毒的 SH 蛋白和 G 蛋白有显著的氨基酸序列同源性。虽然氨基酸含量和疏水性曲线图支持将这些 ORF 确定为 SH 和 G,但需要实验数据来评价其功能。这类分析也将为这些 SH 基因和 G 基因中所述额外的重叠 ORF 的作用提供线索。另外,对 APV-C 的 SH 和 G 基因的序列分析可能使得可以更深入地了解 MPV 的 SH 蛋白和 G 蛋白的功能以及它们与 APV-C 的所述蛋白之间的关系。发现 MPV 的非编码区与 APV 的非编码区相当相似。APV 和 MPV 的 3' 前导序列和 5' 尾随序列显示出高度同源性。虽然 APV 和 MPV 的基因间区的长度不总是相同,但发现所述 ORF 中大多数的共有基因起始信号是相同的。相比之下,APV 的基因终止信号在 MPV 基因组中并未发现。虽然我们在大多数基因间区中的确发现一个重复序列(UAAAAA U/A/C),但需要对病毒 mRNA 进行序列分析,以便正式描绘那些基因终止序列。应该注意到,通过采用改良的 cDNA 末端快速扩增(RACE)方法,获得了有关 3' 最末端的 15 个核苷

酸和 5' 最末端的 12 个核苷酸的序列信息。这一技术已被其它人证明对于相关病毒是成功的 (Randhawa, J. S. 等, Rescue of synthetic minireplicons establishes the absence of the NS1 and NS2 genes from avian pneumovirus. *J. Virol.*, 71, 9849-9854 (1997); Mink, M. A., 等, Nucleotide sequences of the 3' leader and 5' trailer regions of human respiratory syncytial virus genomic RNA. *Virology* 185, 615-24 (1991))。为了测定 3' vRNA 前导序列的序列, 使用 poly-A 聚合酶将同源聚合物 A 尾加入到经纯化的 vRNA 上, 随后用 poly-T 引物和 N 基因中的引物, 通过 PCR 扩增所述前导序列。为了测定 5' vRNA 尾随序列的序列, 使用逆转录酶和 L 基因中的引物, 制备尾随序列的 cDNA 拷贝, 然后用末端转移酶, 给所述 cDNA 加上同源聚合物 dG 尾。随后, 用 poly-C 引物和 L 基因中的引物扩增所述尾随序列区。作为一种替代策略, 将 vRNA 自身相连接, 或者与合成接头连接, 此后用 L 基因和 N 基因中的引物和接头特异性引物, 扩增所述前导序列区和尾随序列区。对于 5' 尾随序列, 对纯化 vRNA 进行直接双脱氧核苷酸测序也是可行的 (Randhawa, 1997)。运用这些方法, 我们可以分析 hMPV 基因组末端的实际序列。在此提供的序列信息对于产生针对 MPV 和 MPV 感染的诊断检验、疫苗和抗病毒药具有重要性。

[0306] 材料和方法

[0307] 序列分析

[0308] 依照先前已描述的方法 (van den Hoogen 等, 2001), 将病毒分离株 00-1 在第三代猴肾细胞上繁殖到高滴度 (约 10,000 TCID₅₀/ml)。用 HighPure RNA Isolating Kit (高纯度 RNA 分离试剂盒), 依照生产商的说明 (Roch Diagnostics, Almere, The Netherlands), 从受感染细胞的上清液分离病毒 RNA。除已发表的有关 APV 和 SV 的前导序列和尾随序列的序列 (Randhawa 等, 1997; Mink 等, 1991) 之外, 基于先前已发表的序列 (vanden Hoogen 等, 2001) 设计引物, 所述引物可通过请求而得到。采用一种单管测定, 在含有 50 mM Tris pH 8.5、50 mM NaCl、4.5 mM MgCl₂、2 mM DTT、1 μM 正向引物、1 μM 反向引物、0.6 mM dNTP、20 单位 RNasin (Promega, Leiden, The Netherlands)、10 U AMV 逆转录酶 (Promega, Leiden, The Netherlands) 和 5 单位 Taq 聚合酶 (PE Applied Biosystems, Nieuwerkerk aan de IJssel, The Netherlands) 的 50 μl 总体积中, 用病毒 RNA 进行 RT-PCR 测定。逆转录于 42℃ 进行 30 分钟, 然后于 95℃ 灭活 8 分钟。如下扩增所述 cDNA: 95℃ 1 分钟、42℃ 2 分钟、72℃ 3 分钟进行 40 个循环, 最后于 72℃ 进行 10 分钟的延伸。在 1% 琼脂糖凝胶上检查之后, 用 Qiaquick Gel Extraction Kit (凝胶提取试剂盒) (Qiagen, Leusden, The Netherlands), 从凝胶中纯化 RT-PCR 产物, 然后用 Dyanamic ET terminator sequencing kit (Dyanamic ET 终止测序试剂盒) (Amersham Pharmacia Biotech, Roosendaal, The Netherlands) 和 ABI 373 自动 DNA 测序仪 (PE Applied Biosystem, Nieuwerkerk aan de IJssel, the Netherlands), 依照生产商的说明直接测序。

[0309] 用在 BioEdit version 5.0.6

[0310] (<http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/Bioedit//bioedit.html>; Hall, 1999) 的软件包中可得到 clustal 软件包, 进行序列比对。

[0311] 系统发育分析

[0312] 为了构建系统发育进化树, 用 ClustalW 软件包进行 DNA 序列的比对, 并且用使用 100 个引导程序和 3 个 jumble 的 Phylip 3.5 程序的 DNA-ML 软件包, 生成最大似然进化树。

计算用 consense 软件包 (Felsenstein, 1989) 创建的共有序列进化树的引导程序值。

[0313] MPV 基因组序列可从 Genbank 获得, 登记号为 :AF371337。此中所用的所有其它序列可从 Genbank 获得, 登记号为 :AB046218 麻疹病毒, 所有 ORF)、NC-001796 (人副流感病毒 3 型, 所有 ORF)、NC-001552 (仙台病毒, 所有 ORF)、X57559 (人副流感病毒 2 型, 所有 ORF)、NC-002617 (新城疫病毒, 所有 ORF)、NC-002728 (Nipah 病毒, 所有 ORF)、NC-001989 (bRSV, 所有 ORF)、M11486 (hRSV A, 除 L 外的所有 ORF)、NC-001803 (hRSV, L ORF)、NC-001781 (hRSV B, 所有 ORF)、D10331 (PVIM, N ORF)、U09649 (PVM, P ORF)、U66893 (PVM, M ORF)、U66893 (PVM, SH ORF)、D11130 (PVM, G ORF)、D11128 (F' ORF)。PVIM M2 ORF 取自 Ahmadian (1999)、AF176590 (APV-C, NORF)、U39295 (APV-A, N ORF)、U39296 (APV-B, N ORF)、AF262571 (APV-C, M ORF)、U37586 (APV-B, M ORF)、X58639 (APV-A, MORF、)、AF176591 (APV-C, P ORF)、AF325443 (APV-B, P ORF)、U22110 (APV-A, P ORF)、AF187152 (APV-C, F ORF)、Y14292 (APV-B, FORF、)、D00850 (APV-A, F ORF)、AF176592 (APV-C, M2 ORF)、AF35650 (APV-B, M2 ORF)、X63408 (APV-A, M2 ORF)、U65312 (APV-A, LORF)、S40185 (APV-A, SH ORF)。

[0314] 表 5:MPV 和其它副粘病毒的所述 ORF 的长度。

[0315]

	N ¹	P	M	F	M2-1	M2-2	SH	G	L
MPV	394	294	254	539	187	71	183	236	2005
APV A	391	278	254	538	186	73	174	391	2004
APV B	391	279	254	538	186	73	²	414	²
APV C	394	294	254	537	184	71	²	²	²
APV D	²	²	²	²	²	²	²	389	²
hRSV A	391	241	256	574	194	90	64	298	2165
hRSV B	391	241	249	574	195	93	65	299	2166
bRSV	391	241	256	569	186	93	81	257	2162
PVM	393	295	257	537	176	77	92	396	²
其它 ³	418-	225-	335-	539-	⁴	⁴	⁴	⁴	2183-
	542	709	393	565					2262

[0316] 脚注：

[0317] 1. 氨基酸残基的长度。

[0318] 2. 不能得到序列

[0319] 3. 其它：人副流感病毒 2 和 3 型、仙台病毒、麻疹病毒、nipah 病毒、phocine 瘟热病毒 (phocine distemper virus) 和新城疫病毒。

[0320] 4. ORF 在病毒基因组中不存在

[0321] 表 6:MPV 的 ORF 和其它副粘病毒的 ORF 之间的氨基酸序列同一性¹

[0322]

	N	P	M	F	M2-1	M2-2	L
APV A	69	55	78	67	72	26	64
APV B	69	51	76	67	71	27	- ²
APV C	88	68	87	81	84	56	- ²
hRSV A	42	24	38	34	36	18	42
hRSV B	41	23	37	33	35	19	44
bRSV	42	22	38	34	35	13	44
PVM	45	26	37	39	33	12	- ²
其它 ³	7-11	4-9	7-10	10-18	- ⁴	- ⁴	13-14

[0323] 1. 用已知的 G 和 SH 蛋白没有发现序列同源性,因此被排除。

[0324] 2. 不能得到序列。

[0325] 3. 参见表 5 中一览表脚注 3。

[0326] 4. ORF 在病毒基因组中不存在。

[0327] 参考文献

[0328] Current Protocols in Molecular Biology, volume 1-3(1994-1998)。Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. 和 Struhl, K. 编著, John Wiley and sons, Inc., USA 出版。

[0329] Current Protocols in Immunology, Volume 1-3. Coligan, J. E., Kruisbeek, A. M., Margulies, D. H., Shevach, E. M. 和 Strobe, W. 编著, John Wiley and sons, Inc., USA 出版。

[0330] Sambrook 等, Molecular cloning, a laboratory manual, second ed., vol. 1-3. (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989)。

[0331] Fields, Virology. 1996. Vol. 1-2 3rd. Edition, Fields, B. N., Knipe, D. M. 和 Howley, P. M. 编著, Lippincott-Raven, Philadelphia, USA。

[0332] 1. Pringle, C. R. Virus taxonomy at the Xith international congress of virology, Sydney, Australia 1999. Arch. Virol, 144/2, 2065-2070 (1999)。

[0333] 2. Domachowske, J. B. 和 Rosenberg, H. F. Respiratory syncytial virus infection: immune response, immunopathogenesis, and treatment (呼吸道合胞病毒感染: 免疫应答、免疫发病机理和治疗)。Clin. Microbio. Rev. 12 (2), 298-309 (1999)。综述。

[0334] 3. Gitaud, P., Bennejean, G., Guittet, M. 和 Toquin, D. Turkey rhinotracheitis in France: preliminary investigations on a ciliostatic virus (法国的火鸡鼻气管炎: 对 ciliostatic 病毒的初步研究)。Vet. Rec. 119, 606-607 (1986)。

[0335] 4. Ling, R., Easton, A. J. 和 Pringle, C. R. Sequence analysis of the 22K, SH and G genes of turkey rhinotracheitis virus and their intergenic regions reveals a gene order different from that of other pneumoviruses (火鸡鼻气管炎病毒的 22K、SH 和 G 基因及其基因间区的序列分析揭示出一种不同于其它肺病毒的基因顺序)。J. Gen.

Virol. 73, 1709-1715 (1992)。

[0336] 5. Yu, Q., Davis, P. J., Li, J. 和 Cavanagh, D. Cloning and sequencing of the matrix protein(M) gene of turkey rhinotracheitis virus reveal a gene order different from that of respiratory syncytial virus (火鸡鼻气管炎病毒基质蛋白(M) 基因的克隆和测序揭示出一种不同于呼吸道合胞病毒的基因顺序). Virology 186, 426-434 (1992)。

[0337] 6. Randhawa, J. S., Marriott, A. C., Pringle, C. R. 和 Easton, A. J. Rescue of synthetic minireplicons establishes the absence of the NS1 and NS2 genes from avian pneumovirus (合成小复制子的拯救确立了禽肺病毒缺乏 NS1 和 NS2 基因). J. Virol. 71, 9849-9854 (1997)。

[0338] 7. Evans, A. S.: Viral Infections of Humans. Epidemiology and control. 3th edn. (Evans, A. S 编著) 22-28 (Plenum Publishing Corporation, New York, 1989)。

[0339] 8. Osterhaus, A. D. M. E., Yang, H., Spijkers, H. E. M., Groen, J., Teppema, J. S. 和 van Steenis, G. The isolation and partial characterization of a highly pathogenic herpesvirus from the Harbor Seal (Phoca Vitulina) (得自 the Harbor Seal (Phoca Vitulina) 的高致病性疱疹病毒的分离和部分表征). Arch. of Virol. 86, 239-251 (1985)。

[0340] 9. K. B. Chua 等, Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus (Nipah 病毒: 一种新出现的致命性副粘病毒). Science 288, 1432-1435 (2000)。

[0341] 10. Welsh, J., Chada, K., Dalal, S. S., Cheng, R., Ralph, D. 和 McClelland, M. Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA (RNA 的任意引物 PCR 指纹分析). NAR. 20, 4965-4970 (1992)。

[0342] 11. Bayon-Auboyer, M., Arnauld, C., Toquin, D. 和 Etteradossi, N. Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-Bavian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup (两种非 A/非 B 禽肺病毒 (APV) 的 F、L 和 G 蛋白基因的核苷酸序列揭示出一个新的 APV 亚组). J. of Gen. Virol. 81, 2723-2733 (2000)。

[0343] 12. Mulder, J. 和 Masurel, N. Pre-epidemic antibody against 1957 strain of asiatic influenza in serum of older people living in The Netherlands (在荷兰生活的老人的血清中针对 1957 年亚洲流感毒株的流行前抗体). The Lancet april 19, 810-814 (1958)。

[0344] 13. Pringle, C. R., The Paramyxoviruses. 1th edn. (D. W. Kingsbury 编著) 1-39 (Plenum Press, New York, 1991)。

[0345] 14. Rothbarth, P. H., Groen, J., Bohnen, A. M., Groot, de R. 和 Osterhaus, A. D. M. E. Influenza virus serology—a comparative study (流感病毒血清学—比较性研究). J. of Virol. Methods 78, 163-169 (1999)。

[0346] 15. Braildenburg, A. H., Groen, J., Van Steensel-Moll, H. A., Claas, E. I. J. C., Rothbarth, P. H., Neijens, H. J. 和 Osterhaus, A. D. M. E. Respiratory syncytial virus specific serum antibodies in infants under six months of age: limited

serological response upon infection(6个月婴儿中的呼吸道合胞病毒特异性血清抗体:感染时有限的血清应答). J Med. Virol. 52, 97-104(1997)。

[0347] 16. Lennette, D. A. 等, Diagnostic, procedures for viral, rickettsial and chlamydial, infections. 7th edn. (Lennette, E. H., Lennette, D. 丸和 Lennette, E. T. 编著) 3-25; 37-138; 431-463; 481-494; 539-563 (American public health association, Washington, 1995)。

[0348] 15. Felsenstein, J. Department of Genetics, University of Washington. [Http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html](http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html)

[0349] 16. Schnell 等 EMBO J 13, 4195-4203, 1994

[0350] 17. Collins, P. L., Hill, M. G., Camargo, E., Grosfeld, H., Chanock, R. M. 和 Murphy, B. R. Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development (从克隆的 cDNA 产生感染性人呼吸道合胞病毒证实了得自 M2 mRNA 5' 近端可读框的转录延伸因子在基因表达中的重要作用并且提供了疫苗开发的能力). PNAS 92, 11563-11567 (1995)。

[0351] 18. Hoffmann, E., Neumann, G., Kawakami, Y., Hobom, G. 和 Webster, R. G. A DNA transfection system for generation of influenza virus from eight plasmids (得自 8 种质粒的用于产生流感病毒的 DNA 转染系统). PNAS 97, 6108-6113 (2000)。

[0352] 19. Bridgen, A., Elliot, R. M. Rescue of a segmented negative-strand virus entirely from cloned complementary DNAs (从克隆的互补 DNA 中完全拯救分段负链病毒). PNAS 93, 15400-15404 (1996)。

[0353] 20. Palese, P., Zheng, H., Engemardt, O. G., Pleschka, S. 和 Garcia-Sastre, A. Negative-strand RNA viruses: genetic engineering and applications (负链 RNA 病毒: 基因工程和应用). PNAS 93, 11354-11358 (1996)。

[0354] 21. Peeters, B. P., de Leeuw, O. S., Koch, G. 和 Gielkens, A. L. Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence (从克隆的 cDNA 拯救新城疫病毒: 融合蛋白的切割能力是毒力的主要决定因素的证据). J. Virol. 73, 5001-5009 (1999)。

[0355] 22. Durbin, A. P., Hall, S. L., Siew, J. W., Whitehead, S. S., Collins, P. L. 和 Murphy, B. R. Recovery of infectious human parainfluenza virus type 3 from cDNA (从 cDNA 回收感染性人副流感病毒 3 型). Virology 235, 323-332 (1997)。

[0356] 23. Tao, T., Durbin, A. P., Whitehead, S. S., Davoodi, F., Collins, P. L. 和 Murphy, B. R. Recovery of a fully viable chimeric human parainfluenza virus (PIV) type 3 in which the hemagglutinin-neuraminidase and fusion glycoproteins have been replaced by those of PIV type 1 (其中血细胞凝集素-神经氨酸酶和融合糖蛋白已被 PIV 1 型的血细胞凝集素-神经氨酸酶和融合糖蛋白取代的全活力嵌合人副流感病毒 (PIV) 3 型的回收). J. Virol. 72, 2955-2961 (1998)。

[0357] 24. Durbin, A. P., Skiadopoulos, M. H., McAuliffe, J. M., Riggs, J. M., Surman,

S. R., Collins, P. L. 和 Murphy, B. R. Human parainfluenza virus type 3 (PIV3) expressing the hemagglutinin protein of measles virus provides a potential method for immunization against measles virus and PIV3 in early infancy (表达麻疹病毒的血细胞凝集素蛋白的人副流感病毒 3 型 (PIV3) 提供了一种用于在婴儿中针对麻疹病毒和 PIV3 免疫的潜在方法). *J. Virol.* 74, 6821-6831 (2000)。

[0358] 25. Skiadopoulos, M. H., Durbin, A. P., Tatem, J. M., Wu, S. L., Paschalis, M., Tao, T., Collins, P. L. 和 Murphy, B. R. Three amino acid substitutions in the L protein of the human parainfluenza virus type 3 cp45 live attenuated Vaccine candidate contribute to its temperature-sensitive and attenuation phenotypes (人副流感病毒 3 型 cp45 减毒活疫苗候选物的 L 蛋白中的三个氨基酸取代导致其温度敏感和减毒表型). *J. Virol.* 72, 1762-1768 (1998)。

[0359] 26. Teng, N., Whitehead, S. S., Bermingham, A., St. Claire, M., Elkins, W. R., Murphy, B. R. 和 Collins, P. L. *J. Virol.* 74, 9317-9321 (2000)。

[0360] 27. Masurcl, N. Relation between Hong Kong virus and former human A2 isolates and the A/EQU12 virus in human sera collected before 1957 (香港病毒和先前人 A2 分离株和在 1957 年之前采集的人血清中的 A/EQU12 病毒之间的关系). *The Lancet* May 3, 907-910 (1969)。

[0361] 实施例 4 中使用的其它参考文献。

[0362] AHMADIAN, G., CHAMBERS, P. 和 EASTON, A. J. (1999). Detection and characterisation of proteins encoded by the second ORF of the M2 gene of pneumoviruses (肺病毒 M2 基因的第二个 ORF 所编码的蛋白质的检测和表征). *J Gen Virol* 80, 2011-6。

[0363] ALANSARI, H. 和 POTGIETER, L. N. (1994). Molecular cloning and sequence analysis of the phosphoprotein, nucleocapsid protein, the matrix protein and 22K(m2) protein of the ovine respiratory syncytial virus (绵羊呼吸道合胞病毒的磷蛋白、核衣壳蛋白、基质蛋白和 22K(M2) 蛋白的分子克隆和序列分析). *J Gen*, 75, 3597-601。

[0364] BARR, J., CHAMBERS, P., PRINGLE, C. R. 和 EASTON, A. J. (1991). Sequence of the major nucleocapsid protein gene of pneumonia virus of mice: sequence comparisons suggest structural homology between nucleocapsid proteins of pneumoviruses, paramyxoviruses, rhabdoviruses and filoviruses (小鼠肺炎病毒的主要核衣壳蛋白的序列: 序列比较提示在肺病毒、副粘病毒、弹状病毒和线状病毒的核衣壳蛋白之间有结构同源性). *J Gen Virol* 72, 677-85。

[0365] BAYBUTT, H. N. 和 PRINGLE, C. R. (1987). Molecular cloning and sequencing of the F and 22K membrane protein genes of the RSS-2 strain of respiratory syncytial virus (呼吸道合胞病毒的 Rss-2 毒株的 F 和 22K 膜蛋白基因的分子克隆和测序). *J Gen Virol* 68, 2789-96。

[0366] BAYON-AUBOYER, M. H., ARNAULD, C., TOUITIN, D. 和 ETERRADOSI, N. (2000). Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian

pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup (两种非 A/ 非 B 禽肺病毒 (APV) 的 F、L 和 G 蛋白基因的核苷酸序列揭示出一个新的 APV 亚组). *J Gen Virol* 81, 2723-33。

[0367] BERMINGHAM, A. 和 COLLINS, P. L. (1999). The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription (人呼吸道合胞病毒的 M2-2 蛋白是参与 RNA 复制和转录之间平衡的调节因子). *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11259-64。

[0368] BLUIVIERG, B. M., CHAN, J. 和 UDEM, S. A. (1991). Fractionation of Paramyxovirus 3' and 5' end sequences: In theory and practice (副粘病毒 3' 端和 5' 端序列的功能: 理论和实践). 载于 "the Paramyxoviruses" (D. Kingsbury 编著), pp. 235-247. Plenum, New York.

[0369] COLLINS, P. L. 和 WERTZ, G. W. (1983). cDNA cloning and transcriptional mapping of nine polyadenylated RNAs encoded by the genome of human respiratory syncytial virus (人呼吸道合胞病毒基因组所编码的 9 种聚腺苷酸化 RNA 的 cDNA 克隆和转录作图). *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 3208-12。

[0370] COLLINS, P. L. 和 WERTZ, G. W. (1985). The envelope-associated 22K protein of human respiratory syncytial virus: nucleotide SEQUENCE of the mRNA and a related polytranscript (人呼吸道合胞病毒的包膜相关 22K 蛋白: mRNA 的核苷酸序列和相关的多转录物). *J Virol* 54, 65-71.

[0371] COLLINS, P. L., DICKENS, L. E., BUCKLER-WITTE, A., OLMSTED, R. A., SPRIGGS, M. K., CAMARGO, E. 和 COELINGH, K. V. W. (1986). Nucleotide sequences for the gene junctions of human respiratory syncytial virus reveal distinctive features of intergenic structure and gene order (人呼吸道合胞病毒基因接点的核苷酸序列揭示基因间结构和基因顺序的独特特性). *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 4594-98。

[0372] COLLINS, P. L., HILL, M. G. 和 JOHNSON, P. R. (1990). The two open reading frames of the 22K mRNA of human respiratory syncytial virus: sequence comparison of antigenic subgroups A and B and expression in vitro (人呼吸道合胞病毒的 22K mRNA 的两个可读框: 抗原性亚组 A 和 B 的序列比较和体外表达). *J Gen Virol*, 71, 3015-20。

[0373] COLLINS, P. L., HILL, M. G., CAMARGO, E., GROSFELD, H., CHANOCK, R. M. 和 MURPHY, B. R. (1995). Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development (从克隆的 cDNA 产生感染性人呼吸道合胞病毒证实了得自 M2 mRNA 的 5' 近端可读框的转录延伸因子在基因表达中的重要作用并且提供了疫苗开发的能力). *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11563-7。

[0374] COLLINS, P. L., MCINTOSH, K. AND CHANOCK, R. M. (1996). "Respiratory syncytial virus." 载于: *Fields virology* (B. N. Knipe, Howley, P. M. 编著) Lippincott-Raven, Philadelphia。

[0375] COOK, J. K. (2000). Avian rhinotracheitis (禽鼻气管炎). *Rev Sci Tech* 19, 602-13。

- [0376] CLIESTA, I., GENG, X., ASENJO, A. 和 VILLANUEVA, N. (2000). Structural phosphoprotein M2-1 of the human respiratory syncytial virus is an RNA binding protein (人呼吸道合胞病毒的结构磷蛋白 M2-1 是一种 RNA 结合蛋白). *J. Gen. Virol* 74, 9858-67.
- [0377] CURRAN, J. 和 KOLAKOSKY, D. (1999). Replication of paramyxoviruses (副粘病毒的复制). *Adv. Virus Res.* 50, 403-422.
- [0378] EASTON, A. J. 和 CHAMBERS, P. (1997). Nucleotide sequence of the genes encoding the matrix and small hydrophobic proteins of pneumoviruses of mice (小鼠肺炎病毒编码基质蛋白和小疏水性蛋白的基因的核苷酸序列). *Virus Res* 48, 27-33.
- [0379] ELANGO, N., SATAKE, M. 和 VENKATESAN, S. (1985). The sequence of three respiratory syncytial virus genes encoding two nonstructural proteins and a 22K structural protein (编码两种非结构蛋白和一种 22K 结构蛋白的三个呼吸道合胞病毒基因的 mRNA 序列). *J. Virol* 55, 101-10.
- [0380] FEARN, R. 和 COLLINS, P. L. (1999). Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription (呼吸道合胞病毒的 M2-1 转录抗终止蛋白在连续转录中的作用). *J. Virol* 73, 5852-64.
- [0381] FELSENSTEIN, J. (1989). "PHYL' -Phylogeny Inference Package (Version 3.2. Cladistics 5)".
- [0382] GIRAUD, P., BENNEJEAN, G., GUITTET, M. 和 TOQUIN, D. (1986). Turkey rhinotracheitis in France: preliminary investigations on a ciliostatic virus (法国的火鸡鼻气管炎: 对 ciliostatic 病毒的初步研究). *Vet Rec* 119, 606-7.
- [0383] Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT (生物编辑: 一种用户友好的供 Windows 95/98/NT 的生物学序列比对编辑和分析程序). *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41, 95-98.
- [0384] HARDY, R. W. 和 WERTZ, G. W. (1998). The product of the respiratory syncytial virus M2 gene ORF1 enhances readthrough of intergenic junctions during viral transcription (呼吸道合胞病毒 M2 基因 ORF1 的产物增强病毒转录期间基因间接点的通透性). *J. Virol* 72, 520-6.
- [0385] HORVATH, C. M. 和 LAMB, R. A. (1992). Studies on the fusion peptide of a paramyxovirus fusion glycoprotein: roles of conserved residues in cell fusion (对副粘病毒融合糖蛋白的融合肽的研究: 保守残基在细胞融合中的作用). *J. Virol* 66, 2443-55.
- [0386] JENTOFT, N. (1990). Why are proteins O-glycosylated? (为什么蛋白质 O-糖基化?) *Trends Biochem Sci* 15, 291-4.
- [0387] JOHNSON, P. R., JR., OLIMSTED, R. A., PRINCE, G. A., MURPHY, B. R., ALLING, D. W., WALSH, E. E. 和 COLLINS, P. L. (1987). Antigenic relatedness between glycoproteins

of human respiratory syncytial virus subgroups A and B; evaluation of the contributions of F and G glycoproteins to immunity (人呼吸道合胞病毒 A 和 B 亚组的糖蛋白之间的抗原相关性 : F 和 G 糖蛋白对免疫贡献的评价). *J Virol* 61, 3163-6.

[0388] JUHASZ, K. 和 EASTON, A. J. (1994). Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups (禽肺病毒的吸附 (G) 蛋白基因中广泛的序列变异 : 关于两个不同亚组的证据). *J Gen Virol* 75, 2873-80

[0389] Kyte, J. 和 Doolittle, R. F. (1982). A Simple Method for Displaying the Hydrophobic Character of a Protein (一种用于显示蛋白质疏水特性的简单方法). *J Mol. Biol.* 157, 105-142.

[0390] LAMB, R. A. 和 KOLAKOSKY, D. (1996). "Paramyxoviridae; the Viruses and their replication (副粘病毒科 : 病毒及其复制)". 载于 : *Fields virology* (B. N. Knipe, Howley, P. M. 编著) Lippincott-Raven, Philadelphia.

[0391] LI, J., LING, R., RANDHAWA, J. S., SHAW, K., DAVIS, P. J., JUHASZ, K., PRINGLE, C. R., EASTON, A. J. 和 CAVANAGH, D. (1996). Sequence of the nucleocapsid protein gene of subgroup A and B avian pneumoviruses (A 和 B 亚组禽肺病毒的核衣壳蛋白基因的序列). *Virus Res* 41, 185-91.

[0392] LING, R., EASTON, A. J. 和 PRINGLE, C. R. (1992). Sequence analysis of the 22K, SH and G genes of turkey rhinotracheitis virus and their intergenic region reveals a gene order different from that of other pneumoviruses (火鸡鼻气管炎病毒的 22K、SH 和 G 基因及其基因间区的序列分析揭示出一种不同于其它肺病毒的基因顺序). *J Gen Virol*, 73, 1709-15.

[0393] LING, R., DAVIS, P. J., YU, Q., WOOD, C. M., PRINGLE, C. R., CAVANAGH, D. 和 EASTON, A. J. (1995). Sequence and in vitro expression of the phosphoprotein gene of avian pneumovirus (禽肺病毒的磷蛋白基因的序列和体外表达). *Virus Res* 36, 247-57.

[0394] MARRIOT, A. C., SMITH, J. M. 和 EASTON, A. (2001). Fidelity of leader and trailer sequence usage by the respiratory syncytial virus and avian pneumovirus replication complexes (呼吸道合胞病毒和禽肺病毒复制复合体的前导序列和尾随序列用法的保真度). *J. Virol.* 75, 6265-72.

[0395] MINK, M. A., STEC, D. S. 和 COLLINS, P. L. (1991). Nucleotide sequences of the 3' leader and 5' trailer regions of human respiratory syncytial virus genomic RNA (人呼吸道合胞病毒基因组 RNA 的 3' 前导序列和 5' 尾随序列区的核苷酸序列). *Virology* 185, 615-24.

[0396] MIYAHARA, K., KITADA, S., YOSHIMOTO, M., MATSUMURA, H., KAWANO, M., KOMADA, H., TSURUDOME, M., KUSAGAWA, S., NISHIO, M. 和 ITO, Y. (1992). Molecular evolution of human paramyxoviruses. Nucleotide sequence analyses of the human parainfluenza type 1 virus NP and M protein genes and construction of phylogenetic trees for all the human paramyxoviruses (人副粘病毒的分子进化。人副流感病毒 1 型 NP 和 M 蛋白基因的核苷酸序列分析和所有人副粘病毒的系统发育进化树的

构建). Arch Virol 124, 255-68。

[0397] MORRISON, T. G. (1988). Structure, function, and intracellular processing of paramyxoviruses membrane proteins(副粘病毒膜蛋白的结构、功能和细胞内加工). Virus Res 10, 113-35。

[0398] NAYLOR, C. J., BRITTON, P. 和 CAVANAGH, D. (1998). The ectodomains but not the transmembrane domains of the fusion proteins of subtypes A and B avian pneumovirus are conserved to a similar extent as those of human respiratory syncytial virus(A和B亚型禽肺病毒的融合蛋白的胞外域而不是跨膜结构域保守的程度与人呼吸道合胞病毒的保守程度相似). J Gen Virol 79, 1393-8。

[0399] PLOWS, D. J. 和 PRINGLE, C. R. (1995). Variation in the fusion glycoprotein gene of human respiratory syncytial virus subgroup A(人呼吸道合胞病毒A亚组的融合糖蛋白基因的变异). Virus Genes 11, 37-45。

[0400] POCH, O., BLUMBERG, B. M., BOUGUELERET, L. 和 TORDO, N. (1990). Sequence comparison of five polymerases(L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains(非分段负链RNA病毒的5种聚合酶(L蛋白)的序列比较:功能结构域的理论指定). J Gen Virol 71, 1153-62。

[0401] POCH, O., SAUVAGET, I., DELARUE, M. 和 TORDO, N. (1989). Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements(依赖RNA的聚合酶的编码元件中的4个保守基序的鉴定). Embo J 8, 3867-74。

[0402] RANDHAWA, J. S., MARRIOTT, A. C., PRINGLE, C. R. 和 EASTON, A. J. (1997). Rescue of synthetic minireplicons establishes the absence of the NS1 and NS2 genes from avian pneumovirus(合成小复制子的拯救确立了禽肺病毒缺乏NS1和NS2基因). J Virol 71, 9849-54。

[0403] RANDHAWA, J. S., WILSON, S. D., TOLLEY, K. P., CAVANAGH, D., PRINGLE, C. R. 和 EASTON, A. J. (1996). Nucleotide sequence of the gene encoding the viral polymerase of avian pneumovirus(禽肺病毒的编码病毒聚合酶的基因的核苷酸序列). J Gen Virol 77, 3047-51。

[0404] SAMAL, S. K. 和 ZAMORA, M. (1991). Nucleotide sequence analysis of a matrix and small hydrophobic protein dicistronic mRNA of bovine respiratory syncytial virus demonstrates extensive sequence divergence of the small hydrophobic protein from that of human respiratory syncytial virus(牛呼吸道合胞病毒的基质蛋白和小疏水性蛋白双顺反子mRNA的核苷酸序列分析证实小疏水性蛋白与人呼吸道合胞病毒的所述蛋白有广泛的序列差异). J Gen Virol 72, 1715-20。

[0405] SATAKE, M. 和 VENKATESAN, S. (1984). Nucleotide sequence of the gene encoding respiratory syncytial virus matrix protein(编码呼吸道合胞病毒基质蛋白的基因的核苷酸序列). J Virol 50, 92-9。

[0406] SEAL, B. S., SELLERS, H. S. 和 MEINERSMANN, R. J. (2000). Fusion protein predicted amino acid sequence of the first US avian pneumovirus isolate and lack of heterogeneity among other US isolates(第一个US禽肺病毒分离株的融合蛋白预测

氨基酸序列以及在其它 US 分离株中异质性的缺乏)。Virus Res 66, 139-47。

[0407] SEDLMEIER, R. 和 NEUBERT, W. J. (1998). The replicative complex of paramyxoviruses: structure and function (副粘病毒的复制复合体: 结构与功能). Adv Virus Res 50, 101-39。

[0408] STEC, D. S., HILL, M. G., 3RD 和 COLLINS, P. L. (1991). Sequence analysis of the polymerase L gene of human respiratory syncytial virus and predicted phylogeny of nonsegmented negative-strand viruses (人呼吸道合胞病毒的聚合酶 L 基因的序列分析和预测的非分段负链病毒的系统发育). Virology 183, 273-87

[0409] VAN DEN HOOGEN, B. G., DE JONG, J. C., GROEN, J., KUIKEN, T., DE GROOT, R., FOUCI-IER, R. A. 和 OSTERHAUS, A. D. (2001). A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease (一种从患有呼吸道疾病的幼儿体内分离的新发现的人肺病毒). Nat Med 7(6), 719-24。

[0410] VIRUS TAXONOMY (2000). Seventh report of the international Committee on Taxonomy of Viruses。

[0411] WERTZ, G. W., COLLINS, P. L., HUANG, Y., GRUBER, C., LEVINE, S. 和 BALL, L. A. (1985). Nucleotide sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of viral membrane protein (人呼吸道合胞病毒 G 蛋白基因的核苷酸序列揭示出一种不寻常类型的病毒膜蛋白). Proc Natl Acad Sci USA 82, 4075-9。

[0412] YU, Q., DAVIS, P. J., BARRETT, T., BINNS, M. M., BOUR. SNFL, M. E. 和 CAVANAGH, D. (1991). Deduced amino acid sequence of the fusion glycoprotein of turkey rhinotracheitis virus has greater identity with that of human respiratory syncytial virus, a pneumovirus, than that of paramyxoviruses and morbilliviruses (火鸡鼻气管炎病毒融合糖蛋白的导出氨基酸序列与人呼吸道合胞病毒 - 一种肺病毒的同源性高于与副粘病毒和麻疹病毒的同源性). J Gen Virol 72, 75-81。

[0413] YU, Q., DAVIS, P. J., LI, J. 和 CAVANAGH, D. (1992). Cloning and sequencing of the matrix protein (M) gene of turkey rhinotracheitis virus reveal a gene order different from that of respiratory syncytial virus (火鸡鼻气管炎病毒基质蛋白 (M) 基因的克隆和测序揭示出一种不同于呼吸道合胞病毒的基因顺序). Virology 186, 426-34。

[0414] ZAMORA, M. 和 SAMAL, S. K. (1992). Sequence analysis of M2 mRNA of bovine respiratory syncytial virus obtained from an F-M2 dicistronic mRNA suggests structural homology with that of human respiratory syncytial virus (得自 F-M2 双顺反子 mRNA 的牛呼吸道合胞病毒的 M2 mRNA 的序列分析提示与人呼吸道合胞病毒有结构同源性). J Gen Virol 73, 737-41。

[0415] 供 RT-PCR 检测已知副粘病毒用的引物。用于 hPIV-1 至 4、腮腺炎病毒、麻疹病毒、Tupaja 病毒、Mapuera 病毒和 Hendra 病毒的引物已在内部开发了, 并且基于可得到序列的比对。用于新城疫病毒的引物取自 Seal, J., J. 等; Clin. Microb., 2624-2630, 1995。用于 Nipah 病毒和一般副粘病毒 PCR 的引物取自: Chua, K. B. 等; Science, 288 26 May 2000

[0416]	病毒	引物	位于蛋白质
[0417]	HPIV-1	fwd 5' -TGTTGTCGAGACTATCCAA-3'	HN
[0418]		Rev 5' -TGTTG (T/A) ACCAGTTGCAGTCT-3'	
[0419]	HPIV-2	Fwd 5' -TGCTGCTTCTATTGAGAAACGCC-3' N	
[0420]		Rev 5' -GGTGAC/T TC (T/C) AATAGGGCCA-3'	
[0421]	HPIV-3	Fwd 5' -CTCAGAGTTGTCAGGATATAG-3'	HN
[0422]		Rev 5' -CTTTGGGAGTTGAACACAGTT-3'	
[0423]	HPIV-4	Fwd 5' -TTC (A/G) GTTTTAGCTGCTTACG-3' N	
[0424]		Rev 5' -AGGCAAATCTCTGGATAATGC-3'	
[0425]	腮腺炎	Fwd 5' -TCGTAACGTCTCGTGACC-3' SH	
[0426]		Rev 5' -GGAGATCTTTCTAGAGTGAG-3'	
[0427]	NDV	Fwd 5' -CCTTGGTGAiTCTATCCGIAG. 3,	F
[0428]		Rev 5' -CTGCCACTGCTAGTTGiGATAATCC. 3'	
[0429]	Tupaia	Fwd 5' -GGGCTTCTAAGCGACCCAGATCTTG-3'	N
[0430]		Rev 5' -GAATTTCTTATGGACAAGCTCTGTGC-3'	
[0431]	Mapuera	Fwd 5' -GGAGCAGGAACCTCCAAGACCTGGAG-3'	N
[0432]		Rev : 5' -GCTCAACCTCATCACATACTAACCC-3'	
[0433]	Hendra	Fwa 5' -GAGATGGGCGGGCAAGTGCGGCAACAG-3'	N
[0434]		Rev 5' -GCCTTTGCAATCAGGATCCAAATTTGGG-3'	
[0435]	Niyah	Fwd 5' -CTGCTGCAGTTCAGGAAACATCAG-3'	N
[0436]		Rev 5' -ACCGGATGTGCTUACAGAACTG-3'	
[0437]	HRSV	Fwd 5' -TTTGTATATAGGCATATCATTG-3'	F
[0438]		Rev 5' -TTAACCAGCAAAGTGTTA-3'	
[0439]	扇疹	Fwd 5' -TTAGGGCAAGAGATGGTAAGG-3'	N
[0440]		Rev 5' -TTATAACAATGATGGAGGG-3'	
[0441]	一般副粘病毒科:		
[0442]	正向	5' -CATTA AAAAGGGCACAGACGC-3'	P
[0443]	反向	5' -TGGACATTCTCCGCAGT-3'	
[0444]	用于 RAP-PCR 的引物		
[0445]	ZF1	:5' -CCCACCACCAGAGAGAAA-3'	
[0446]	ZF4	:5' -ACCACCAGAGAGAAACCC-3'	
[0447]	ZF7	:5' -ACCAGAGAGAAACCCACC-3'	
[0448]	ZF10	:5' -AGAGAGAAACCCACCACC-3'	
[0449]	ZF13	:5' -GAGAAACCCACCACCAGA-3'	
[0450]	ZF16	:5' -AAACCCACCACCAGAGAG-3'	
[0451]	CS1	:5' -GGAGGCAAGCGAAGGCAA-3'	
[0452]	CS4	:5' -GGCAAGCGAACGCAAGGA-3'	
[0453]	CS7	:5' -AAGCGAACGCAAGGAGGC-3'	
[0454]	CS10	:5' -CGAACGCAAGGAGGCAAG-3'	

[0455] CS18 :5'-ACGCAAGGAGGCAAGCGA-3'

[0456] CS16 :5'-CAAGGAGGCAAGCGAACG-3'

[0457] 对 20 种片段进行成功地纯化和测序：

[0458] 在 APV 中发现的有序列同源性的 10 种片段

[0459] 片段 1 ZF 7,335 bp N 基因

[0460] 片段 2 ZF 10,235 bp N 基因

[0461] 片段 3 ZF 10,800 bp M 基因

[0462] 片段 4 CS 1,1250 bp F 基因

[0463] 片段 5 CS 10,400 bp F 基因

[0464] 片段 6 CS 13,1450 bp F 基因

[0465] 片段 7 CS 13,750 bp F 基因

[0466] 片段 8 ZF 4,780 bp L 基因（蛋白质水平）

[0467] 片段 9 ZF 10,330 bp L 基因（蛋白质水平）

[0468] 片段 10 ZF 10,250 bp L 基因（蛋白质水平）

[0469] 用于从原型分离株 RAP-PCR 扩增核酸的引物。

[0470] 实施例 5

[0471] 对所述两种亚型的 hMPV 的进一步探索

[0472] 根据对迄今获得的 hMPV 的不同分离株的系统发育分析，鉴定了两种基因型，病毒分离株 00-1 是基因型 A 的原型，而分离株 99-1 是基因型 B 的原型。

[0473] 我们假定，所述基因型与亚型相关，并且在有先有免疫的情况下发生被得自两个亚组的病毒再感染，并且对于允许再感染而言可能并不严格需要抗原性变异。

[0474] 此外，看来 hMPV 与一种主要见于家禽的禽肺病毒密切相关。这两种病毒的核苷酸序列显示有高百分率的同源性，但 SH 蛋白和 G 蛋白除外。在此我们表明，所述病毒在主要基于核蛋白和基质蛋白的试验中交叉反应，但它们在基于吸附蛋白的试验中反应不同。病毒中和滴度的差异进一步提供了 hMPV 的两种基因型是一种病毒的两种不同的血清型、而 APV 是一种不同的病毒的证据。

[0475] 所述两种血清型之间的交叉反应和 APV 与 hMPV 之间的交叉反应方法

[0476] 用于 IgG、IgA 和 IgM 抗体检测 hMPV 的方案：

[0477] 基本上依照先前已描述的方法佩 othbarth, P. H. 等, 1999 ; Influenzavirus serology-a comparative study. J. of Vir. Memods 78(1999) 163-169), 在微量滴定板中进行对 hMPV 的间接 IgG EIA。

[0478] 简而言之，通过用 1% Triton X-100 处理使浓缩 hMPV 溶解，在通过棋盘滴定 (checkerboard titration) 测定最适工作稀释度之后，将其在 PBS 中于室温包被到微量滴定板中达 16 小时。随后，向各孔中加入 100 μ l 体积的在 EIA 缓冲液中以 1:100 稀释的人血清样品，于 37℃ 孵育 1 小时。通过加入山羊抗人 IgG 过氧化物酶缀合物 (Biosource, USA)，检测人 IgG 的结合。加入 TMB 作为底物，使板显色，测量 450nm 的 OD。结果以 OD 的 S (即信号)/N (即阴性) 之比来表示。如果 S/N 比超出阴性对照加上三倍标准之外，则认为血清为 IgG 阳性。

[0479] 通过基本上如先前已描述的捕获 EIA (Rothbarth, P. H 等, 1999 ; Influenza virus

serology-a comparative study. J. Vir. methods 78(1999)163-169), 检测血清中 IgM 和 IgA 类别的 hMPV 抗体。为了检测 IgA 和 IgM, 使用以抗人 IgM 或 IgA 特异性单克隆抗体包被的市售微量滴定板。在于 37°C 孵育 1 时之后, 将血清以 1:100 稀释, 在各孔中加入 hMPV 的最适工作稀释液 (100 μ l)。于 37°C 孵育 1 小时。洗涤后, 加入用过氧化物酶标记的多克隆抗 hMPV, 将板于 37°C 孵育 1 小时。加入 TMB 作为底物使板显色, 测量 450nm 的 OD, 结果以 OD 的 S(即信号)/N(即阴性)之比来表示。如果 S/N 比超出阴性对照加上三倍标准之外, 则认为血清为 IgG 阳性。

[0480] 用 APV 抑制测定来检测 APV 抗体。用于 APV 抑制试验的方案包括 APV-Ab SVANOVIR[®]酶免疫测定, 它由 SVANOVA Biotech AB(Uppsala Science Park Glunten SE-751 83 Uppsala Sweden) 生产。结果以 OD 的 S(即信号)/N(即阴性)之比来表示。如果 S/N 比超出阴性对照加上三倍标准之外, 则认为血清为 IgG 阳性。

[0481] 1. 豚鼠

[0482] A. 用两种 hMPV 亚型(再)感染豚鼠

[0483] 已经用病毒分离株 ned/00/01(亚型 A) 和 ned/99/01(亚型 B) 接种了每种亚型 6 只豚鼠 (guinea pig)(气管内、鼻和眼)。

[0484] 6 GP 用 hMPV 00-1(10e6, 5 TCD50) 感染

[0485] 6 GP 用 hMPV 99-1(10e4, 1 TCD50) 感染

[0486] 初次感染后 54 天, 给所述豚鼠接种同种亚型和异种亚型 (10c4TCID50/ml):

[0487] 2 只豚鼠: 第一次感染 00-1; 第二次感染 99-1(异种)

[0488] 3 只豚鼠: 第一次感染 00-1; 第二次感染 00-1(同种)

[0489] 2 只豚鼠: 第一次感染 99-1; 第二次感染 00-1(异种)

[0490] 3 只豚鼠: 第一次感染 99-1; 第二次感染 99-1(同种),

[0491] 在感染后采集了 12 天(第一次感染)或 8 天(第二次感染)的喉和鼻拭抹物, 并且通过 RT-PCR 测定, 检验了所述病毒的存在情况。

[0492] RT-PCR 测定的结果: 图 29

[0493] 结果总结: 用病毒分离株 ned/00/01 接种的豚鼠, 在感染后第 1-10 天表现出上呼吸道感染。用病毒分离株 ned/99/01 接种的豚鼠, 在感染后第 1-5 天表现出上呼吸道感染。看来被 ned/99/01 感染的严重程度低于被 ned/00/01 感染。用异种病毒第二次接种所述豚鼠, 在 4 只豚鼠的 3 只中引起再感染, 而用同种病毒第二次接种, 在 6 只豚鼠的 2 只中引起再感染。注意到在再感染的那些动物中没有临床症状或临床症状很少, 在受保护抵抗所述再感染的那些动物中没有观察到临床症状, 证明甚至用野生型病毒, 第一次感染的保护效应也是明显的, 表明有可能用异种(当然还有同种)分离株作为疫苗, 甚至有可能有未减毒形式的分离株。

[0494] hMPV 的两种亚型都能够感染豚鼠, 虽然似乎被 B 亚型(ned/99/01)感染的严重程度低于(病毒在鼻和喉中的存在时间短)被 A 亚型(ned/00/01)感染。这可能是由于 A 亚型给予的剂量较高, 或者 B 亚型的毒力较低。

[0495] 虽然先有免疫的存在并不完全保护而抵抗同种病毒以及异种病毒的再感染, 所述感染看来不太显著, 因为注意到病毒存在的时间较短, 并且并非所有动物都变为病毒阳性。

[0496] B. 被两种 hMPV 亚型感染的豚鼠的血清学

[0497] 第 0、52、70、80、90、110、126 和 160 天,从豚鼠采集血清,以 1:100 的稀释液,用针对 ned/00/01 和 ned/99/01 抗原的全病毒 ELISA 来测试。

[0498] 图 30A 和 B:每只豚鼠针对 ned/00/01 和 ned/99/01 的 IgG 应答

[0499] 图 31:ned/00/01 和 ned/99/01 ELISA 的特异性。仅使用了得自同种再感染豚鼠的数据。

[0500] 图 32:3 只同种 (00-1/00-1)、2 只同种 (99-1/99-1)、2 只异种 (99-1/00-1) 和 2 只异种 (00-1/99-1) 感染豚鼠的针对 ned/00/01 和 ned/99/01 ELISA 的平均 IgG 应答。

[0501] 结果总结:

[0502] 在对所述两种不同 EUSA 的应答方面,仅观察到较小的差异。针对 00-1 或 99-1 的全病毒 EUSA 不能用来辨别所述两种亚型。

[0503] C. 豚鼠肉针对 h VIII V 卢本的血清与 APV 抗原反应性

[0504] 已经用 APV 抑制 ELISA,测试了从所述受感染豚鼠采集的血清。

[0505] 图 33:h 脚 V 感染豚鼠的平均 APV 抑制百分率。

[0506] 结果总结:

[0507] 豚鼠针对 hMPV 产生的血清在 APV 抑制试验中反应的方式与它们在 hMPV IgG ELISA 中反应的方式相同。

[0508] 针对 ned/99/01 产生的血清显示出在 APV 抑制 ELISA 中的抑制百分率低于针对 ned/00/01 产生的血清。被 ned/99/01 感染的豚鼠的效价可能较低 (正如在 hMPV ELISA 中所见的),或者 ned/99/01 与 APV 的交叉反应低于 ned/00/01 的所述交叉反应。然而,可以用 APV-Ab 抑制 ELISA 来检测豚鼠的 hMPV 抗体。

[0509] D. 用豚鼠的针对 hMPV 产生的血清进行的病毒中和测定。

[0510] 在采用 ned/00/01、ned/99/01 和 APV-C 的病毒 (交叉) 中和测定中,使用于第 0 天、感染后第 52、70 和 80 天采集的血清。起始稀释度为 1-10,每孔用 100 TCD₅₀ 病毒。中和后,病毒附着在 tMK 细胞上,以 3500 RPM 离心 15 分钟,然后更换培养基。

[0511] APV 试验是生长 4 天,而心律 V 试验是生长 7 天。用 80%丙酮固定细胞,用以 FITC 标记的猴抗 hMPV 进行正 A。染色为阴性的孔被认为是中和效价。对于每种病毒,包括病毒原液的 10-10g 连续稀释液 (titration) 和工作溶液的 2 倍连续稀释液 (titration)。

[0512] 图 34:ned/00/01 和 ned/99/01 感染豚鼠的针对 ned/00/01、ned/99/01 和 APV-C 的病毒中和效价

[0513] 2. 恒河猴

[0514] A. 用两种 hMPV 亚型 f (再) 感染恒河猴

[0515] 用病毒分离株 ned/00/01 (亚型 A) 和 ned/99/01 (亚型 B) (1° 5 TCD₅₀) 每种亚型接种 2 只恒河猴 (气管内、鼻和眼)。第一次感染后 6 个月,给所述恒河猴第二次接种 ned/00/01。在感染后,采集了 14 天 (第一次感染) 或 8 天 (第二次感染) 的喉擦拭,并且通过 RT-PCR 测定检验了所述病毒的存在情况。

[0516] 图 35:对接种了 ned/00/01 (两次) 的恒河猴的喉拭抹物的 RT-PCR 测定结果。

[0517] 结果总结:

[0518] 接种了病毒分离株 ned/00/01 的恒河猴在感染后第 1-10 天表现出上呼吸道感染。临床症状包括化脓性鼻炎。给所述恒河猴第二次接种同种病毒,通过 PCR 证实引起了再感

染,然而没有观察到临床症状。

[0519] B. 对从 hMPV 感染的恒河猴采集的血清进行的血清学。

[0520] 从接受 ned/00/01 的恒河猴中,在第一次感染后 6 个月期间采集血清(再感染对于猴 3 而言发生在第 240 天,而对于猴 6 发生在第 239 天)。

[0521] 用血清检验针对或者 ned/00/01 或者 APV 的 IgG 抗体存在的情况,以及针对 ned/00/01 的 IgA 和 IgM 抗体存在的情况。

[0522] 结果:图 36A

[0523] 2 只用 ned/0/01(再)感染的恒河猴的针对 ned/11/01 的 IgA、IgM 和 IgG 应答。

[0524] 图 36B

[0525] 2 只用 ned/00/01 感染的恒河猴的针对 APV 的 IgG 应答。

[0526] 结果总结:

[0527] 已经用 ned/00/01 成功地感染了 2 只恒河猴,并且在有抗 ned/00/01 抗体的情况下,用同种病毒进行了再感染。IgA 和 IgM 抗体的应答显示出在第一次感染之后 IgM 抗体升高,而在再感染之后无 IgM 抗体升高。IgA 抗体仅在再感染之后可检测到,表明在第一次感染后免疫应答的直接性。恒河猴的针对 h 脚 V 所产生的血清在 APV 抑制 ELISA 中测试时表现出的应答与肋四 V IgG EUSA 相似。

[0528] 试瓷/晓诡

[0529] 用 APV 抑制 ELISA 检测恒河猴的 hMPV 抗体的灵敏度与使用 hMPV EUSA 的灵敏度相似,因此,APV 抑制 ELISA 适合于检验人样品中 hMPV 抗体的存在。

[0530] C. 使用从 hMPV 感染的恒河猴采集的血清的病毒(交叉)中和测定

[0531] 结果总结:从第 0 天至的第一次感染后第 229 天采集的血清,仅表现出针对 ned/00/01 的低病毒中和效价(0-80),在第二次感染后采集的血清表现出针对 ned/00/01 的高中和效价:> 1280。仅在第二次感染后采集的血清表现出针对 ned/99/01 的中和效价(80-640),没有一种血清中和 APV C 病毒。

[0532] 在病毒(交叉)中和测定中,APV-C 和 hMPV 之间没有交叉反应;而在一次加强所述抗体应答后,在 ned/00/01 和 ned/99/01 之间有交叉反应。

[0533] 3. 人类

[0534] 年龄小于 6 个月至大于 20 岁的患者的血清,先前已经在 IFA 测定和病毒中和测定中针对 ned/00/01 进行了测试(参见专利的表 1)。

[0535] 在此,我们已经用针对 ned/00/01 的 ELISA 检验了这些血清中的许多血清的 IgG、Igm 和 IgA 抗体的存在,并且我们用 APV 抑制 ELISA 检验了所述样品。

[0536] 结果. 图 37 应用 hMPV ELISA 知 APV 抑制 ELISA 检测人血清中 IgG 抗体的比较,在所述 IgG hMPV 试验和所述 APV-Ab 试验之间有强相关性,因此所述 APV-Ab 试验基本上能够检测人中抗 hMPV 的 IgG 抗体。

[0537] 4. 家禽

[0538] 用 APV 抑制 ELISA 以及所述 ned/00/01 ELISA,对 96 只鸡检验了针对 APV 的 IgG 抗体的存在情况。

[0539] 结果总结:hMPV ELISA 和 APV 抑制 ELISA 都检测到针对 APV 的抗体(数据未显示)。

[0540] 结果总结

[0541] 我们发现了 hMPV 的两个基因型, ned/00/01 是 A 亚组的原型, 而 ned/99/01 是 B 亚组的原型。

[0542] “依照经典血清学分析(例如已知的 Francki, R. I. B., Fauquet, C. M., Knudson, D. L 和 Brown, F., Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the international Committee on Taxonomy of Viruses. Arch Virol, 1991. Supplement 2 :p. 140-144), 根据通过用动物抗血清进行定量中和测定而确定的免疫学区别 (distinctiveness), 可以确定两个亚型。两个不同的血清型或者相互没有交叉反应, 或者表现出两个方向的同种与异种效价之比 > 16 。如果中和表明两种病毒之间在任一个方向或两个方向有一定程度的交叉反应(同种与异种效价之比为 8 或 16), 则如果存在 DNA 的显著生物物理/生物化学差异, 则推定有血清学区别 (distinctiveness)。如果中和表示两种病毒之间在任一方向或两个方向有不同程度的交叉反应(同种与异种效价之比小于 8), 则推定所研究的分离株的血清型相同。”

[0543] 对于 RSV, 已知在先有免疫存在的情况下发生再感染(同种以及异种)。用同种血清型和异种血清型的 hMPV 感染豚鼠和恒河猴表明, 对于 hMPV 的情况也是如此。另外, 针对 hMPV 的 IgA 和 IgM ELISA 揭示, IgA 抗体的反应仅在再感染后发生。针对 hMPV 或 APV 产生的血清在 APV ELISA 和 hMPV ELISA 中以同样的方式反应。根据核苷酸序列的比较, 已知所述病毒对于 N、P、M 和 F 基因显示出约 80% 的氨基酸序列同源性。在 ELISA 中, N 和 M 蛋白是引起反应的主要抗原。病毒中和测定(已知针对表面糖蛋白 G、SH 和 F 反应)表明在这两种不同血清之间有差异。虽然 APV 和 hMPV 在 ELISA 中交叉反应, 但对 hMPV 和 APV 的核苷酸序列的系统发育分析、针对所述两种不同病毒产生的血清的病毒中和效价的差异、以及宿主用法的差异再次表明, APV-C 和 hMPV 是两种不同的病毒。根据所述结果, 我们推测哺乳动物中的 hMPV 感染可能是从鸟类至哺乳动物的动物传染病事件的结果。但是, 所述病毒已经以这样一种方式(即 G 蛋白和 SH 蛋白)适应了, 使得考虑到在鸟类中存在 APV, 回复(从哺乳动物至鸟类)动物传染病事件看来是可能的。

[0544] 附录

[0545] 肺病毒的背景信息

[0546] 副粘病毒科 (Paramyxoviridae) 有两个亚科: 副粘病毒亚科 (Paramyxovirinae) 和肺病毒亚科 (Pneumovirinae)。肺病毒亚科由两个属组成: 肺病毒属 (Pneumovirus) 和 Metapneumovirus。肺病毒属有人、牛、绵羊和山羊呼吸道合胞病毒和小鼠肺炎病毒 (PVM)。Metapneumovirus 有禽肺病毒 (APV, 也称为 TRTV)。

[0547] 肺病毒亚科中属的分类基于经典的病毒特征、基因顺序和基因构象。肺病毒属病毒在副粘病毒科中是独特的, 因为在基因组 3' 端具有两个非结构蛋白 (3'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5')。相比之下, Metapneumovirus 的病毒缺乏 NS1 和 NS2 基因, 并且 M 编码区和 L 编码区之间的基因组构不同: 3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5'。

[0548] 副粘病毒亚科的所有成员都有血细胞凝集活性, 但这一功能不是肺病毒亚科的限定性特征, 在 RSV 和 APV 中无此功能, 而在 PMV 中有此功能。在副粘病毒属 (Paramyxovirus) 和腮腺炎病毒属 (rubulavirus) (副粘病毒亚科) 的成员中有神经氨酸酶活性, 但在麻疹病毒属 (Morbillivirus) (副粘病毒亚科) 以及肺病毒属和 Metapneumovirus (肺病毒亚科)

中无此活性。

[0549] 肺病毒亚科的第二个鉴别性特征是 RSV 对 mRNA 内可变 ORF 的表观有限的利用。相比之下,副粘病毒亚科的几个成员,例如仙台病毒和麻疹病毒,可利用 mRNA 中编码磷蛋白 (P) 的可变 ORF 来指导新蛋白质的合成。

[0550] 肺病毒亚科的 G 蛋白与副粘病毒亚科的 HN 蛋白或 H 蛋白没有序列相关性或结构相似性,仅为其链长的大约一半。另外,N 蛋白和 P 蛋白都比副粘病毒亚科的其对应物小,并且缺乏明确的序列同源性。大多数非分段负链 RNA 病毒有一种基质 (M) 蛋白。肺病毒亚科的成员例外,因为它们有两种这样的蛋白 -M 和 M2。M 蛋白小于其副粘病毒亚科的对应物,并且与副粘病毒亚科没有序列相关性。

[0551] 当在细胞培养物中生长时,肺病毒亚科的成员表现出典型的细胞病变效应;它们诱导细胞特征性的合胞体形成 (Col[ms,1996)。

[0552] 肺病毒亚科,肺病毒属

[0553] hRSV 是肺病毒属的代表种,并且是婴儿和幼儿期间主要且分布广的下呼吸道疾病的病因 (Selwyn,1990)。另外,hRSV 越来越被认为是其它患者群、包括无免疫应答个体和老年人中的重要病原体。RSV 也是所有年龄住院成人中社区获得性肺炎的重要病因 (Ehrlund,1991 ; Falsey,2000 ;Dowell,1996)。已经根据与单克隆抗体和多克隆抗体的反应性以及核酸序列分析,鉴定了 RSV 的两个主要抗原性类型 (A 和 B) (Anderson,1985 ;Johnson,1987 ;Sullender,2000)。具体地说,用 G 蛋白区别所述两个亚型。RSV-A 和 B 在 G 中仅有 53% 的氨基酸序列同源性,而其它蛋白在所述亚型之间显示出较高的同源性 (表 1) (Collins,1996)。

[0554] 已经描述了在免疫荧光技术 (DIF, IFA)、病毒中和测定和 ELISA 或 RT-PCR 测定中,运用单克隆抗体和多克隆抗体检测 RSV 感染 (Rothbarth,1988 ;Van Milaan,1994 ;Coggins,1998)。与 hRSV 密切相关的是牛 RSV (bRSV)、绵羊 RSV (oRSV) 和山羊 RSV (oRSV),其中对 bRSV 的研究最为广泛。基于与 hRSV 的序列同源性,反刍动物 RSV 被分类在肺病毒亚科肺病毒属中 (Collins,1996)。反刍动物 RSV 感染的诊断和分亚型基于血清学、抗原检测、病毒分离和 RT-PCR 测定的联合应用 (Uttenthal,1996 ;Valarcher,1999 ;Oberst,1993 ;Vilcek,1994)。

[0555] 已经用人抗血清和牛抗血清、单克隆抗体和 cDNA 探针,进行了对 bRSV 分子结构的几种分析。这些分析揭示,hRSV 和 bRSV 的蛋白质组成非常相似,bRSV 的基因组结构类似 hRSV 的基因组结构。对于 bRSV 和 hRSV 两者而言,G 蛋白和 F 蛋白代表主要的中和保护性抗原。G 蛋白在 hRSV 亚型之间以及在 hRSV 和 bRSV 之间高度可变 (分别为 53% 和 28%) (Prozzi,1997 ;Lerch,1990)。hRSV 和 bRSV 毒株的 F 蛋白存在相当的结构特征和抗原相关性。bRSV 的 F 蛋白显示出与 hRSV 有 80-81% 的同源性,而两个 hRSV 亚型在 F 中有 90% 的同源性 (Walravens, K. 1990)。

[0556] 基于应用 hTSV 和 bRSV 特异性单克隆抗体的研究已经提示存在不同的 bRSV 抗原亚型。A、B 和 AB 亚型根据对 G 蛋白特异性的单克隆抗体的反应模式来辨别 (Furze,1994 ;Prozzi,1997 ;Elvander,1998)。bRSV 的流行病学与 hRSV 的流行病学非常相似。在小牛中的自发感染通常与重症呼吸道体征相关,而实验性感染一般导致轻度疾病,有轻微的病理学改变 (Elvander,1996)。

[0557] 也已经从天然感染的绵羊 (oRSV) (LeaMaster,1983) 和山羊 (cRSV) (Lehmkuhl, 1980) 中分离出 RSV。这两个毒株与牛 RSV 共享 96% 的核苷酸序列,并且在抗原上交叉反应。因此,这些病毒也被分类在肺病毒属中。

[0558] 肺病毒亚科肺病毒属的一个特殊成员是小鼠肺炎病毒 (PVM)。

[0559] PVM 在实验动物群体中,特别是在包括无胸腺小鼠的那些实验动物群体中是一种常见的病原体。天然获得性感染被认为是无症状的,通过病毒在小鼠肺部传代,引起明显的疾病体征,从上呼吸道感染到致死性肺炎 (Richter,1988 ;Weir,1988)。

[0560] 对于 PVM 和 hRSV 的核衣壳蛋白 (N) 和磷蛋白 (P) 之间有限的血清学交叉反应性已有描述,但外部蛋白中没有一个显示出交叉反应性,并且所述病毒在病毒中和测定中可以相互区别开 (Chambers,1990a ;Gimenez,1984 ;Ling,1989a)。就其糖基化模式而论,PVM 的糖蛋白看来不同于其它副粘病毒的糖蛋白,而类似 RSV 的糖蛋白。然而,它们在工作上不同。与 RSV 不同,而与其它副粘病毒相似,PVM 与鼠红细胞有血细胞凝集活性,看来 G 蛋白对此负责,因为针对该蛋白的单克隆抗体抑制血细胞凝集 (Ling,1989b)。

[0561] PVM 的基因组类似 hRSV 的基因组,在其 3' 端包括两个非结构蛋白,并且有相似的基因组结构 (Chambers,1990a ;Chambers,1990b)。PVM NS1/NS2 基因的核苷酸序列与 hRSV 的所述基因的核苷酸序列没有可检测的同源性 (Chambers,1991)。PVM 的某些蛋白显示出与 hRSV 有强同源性 (N :60%,F :38-40%),而 G 明显不同 (氨基酸序列长 31%) (Barr, 1991 ;Barr,1994 ;Chambers,1992)。据报道,PVMP 基因,而不是 RSV 或 APV 的 P 基因,编码一个第二 ORF,代表一种特有的 PVM 蛋白 (Collins,1996)。新的 PVM 分离株通过病毒分离、血细胞凝集测定、病毒中和测定和各种免疫荧光技术来鉴定。

[0562] 附录的表 :肺病毒亚科肺病毒属内不同病毒之间的氨基酸同源性。

[0563]

基因	hRSV	bRSV	oRSV 对 hRSV	bRSV 对 hRSV	bRSV 对 oRSV	PVM 对 hRSV
NS1	87			68-69	89	*
NS2	92			83-84	87	*
N	96		93			60
P			81			
M	-		89			
F	89			80-81		38-40
G	53	88-100	21-29	38-41	60-62	*
M2	92		94			41
SH	76		45-50		56	
L	-					

[0564] * 无可检测的序列同源性

[0565] Metapneumovirus

[0566] 禽肺病毒 (APV) 已被鉴定是火鸡鼻气管炎的病原 (McDougall,1986 ;Collins, 1988),因此通常被称为火鸡鼻气管炎病毒 (TRTV)。所述疾病是火鸡的一种上呼吸道感染,导致高发病率和可变但常常高的死亡率。在母火鸡中,所述病毒也可以诱导产蛋量显著下降。所述病毒也可以感染鸡,但在这一物种中,该病毒作为主要病原体的作用的确不是太清楚,虽然它通常与种鸡中的肿头综合征 (swollen head syndrome) (SHS) 相关 (Cook,2000)。

所述病毒体是多态的,虽然主要为球形,大小为 70-600 nm,并且含有缢陷非分段负义 RNA 基因组的核衣壳显示出螺旋对称 (Collins,1986 ;Giraud,1986)。这种形态类似副粘病毒科的成员。对 APV 编码的蛋白和 RNA 的分析提示,在该科的两个亚科 (副粘病毒亚科和肺病毒亚科) 中,APV 最密切类似肺病毒亚科 (Collins,1988 ;Ling,1988 ;Cavanagh,1988)。

[0567] APV 没有非结构蛋白 (NS1 和 NS2),并且基因顺序 (3' -N-P-M-F-M2-SH-G-L-5') 不同于哺乳动物肺病毒例如 RSV 的基因顺序。因此,APV 最近被分类为新的属 Metapneumovirus 的代表种 (Pringle,1999)。中和模式、ELISA 和与单克隆抗体的反应性的差异已经揭示存在不同的 APV 抗原类型。G 基因的核苷酸测序使得确定了两个病毒亚型 (A 和 B),它们仅有 38% 的氨基酸同源性 (Collins,1993 ;Juhasz,1994)。从美国科罗拉多分离的一种 APV (Cook,1999) 表明出与 A 和 B 亚型病毒的交叉中和差,并且根据序列信息,被指定为一个新亚型 -C (Seal,1998 ;Seal2000)。在法国分离出两种非 A/ 非 B APV,表明它们在抗原性上不同于 A、B 和 C 亚型。根据 F、L 和 G 基因的氨基酸序列,这些病毒又被分类为一个新的亚型 -D (Bayon-Auboyer,2000)。

[0568] 通过在鸡或火鸡气管器官培养物 (TOC) 或在 Vero 细胞培养物中分离病毒,可以达到诊断 APV 感染。一般在一次或两次另外的传代之后,观察到细胞病变效应 (CPE)。这种 CPE 的特征为导致合胞体形成的分散的局限性细胞 rounding 区 (Buys,1989)。已经开发了多种血清学测定,包括巧' 和病毒中和测定。通过 ELISA 检测针对 APV 的抗体,是最常用的方法 (O' Loan,1989 ;Gulati,2000)。最近,已经用聚合酶链式反应 (PCR) 来诊断 APV 感染。可以用取自食管的拭抹物作为起始材料 (Bayon-Auboyer,1999 ;Shin,2000)。

[0569] Alansari, H 和 Potgieter, L. N. D. 1994. Nucleotide and predicted amino acid sequence analysis of the ovine respiratory syncytial virus non-structural 1C and 1B genes and the small hydrophobic protein gene (羊呼吸道合胞病毒非结构 1C 和 1B 基因以及小疏水性蛋白基因的核苷酸序列和预测氨基酸序列分析). J. Gen. Virol. 75 : 401-404.

[0570] Alansari, H., Duncan R. B., Baker, J. C 和 Potgieter, L. N. 1999. Analysis of ruminant respiratory syncytial virus isolates by RNase protection of the G glycoprotein transcripts (通过 G 糖蛋白转录物的 RNA 酶保护分析反刍动物呼吸道合胞病毒分离株). J. Vet. Diagn. Invest. 11 ;215. 20

[0571] Anderson, L. J., Hierholzer, J. C., Tsou, C., Hendry, R. M., Fernic, B. F., Stone, Y 和 McIntosh, K. 1985. Antigenic characterisation of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies (用单克隆抗体对呼吸道合胞病毒毒株进行抗原性表征). J. Inf. Dis. 151 ;626-633.

[0572] Barr, J., Chambers, Pringle, C. R., Easton, A. J. 1991. Sequence of the major nucleocapsid protein gene of pneumonia virus of mice: sequence comparisons suggest structural homology between nucleocapsid proteins of pneumoviruses, paramyxoviruses, rhabdoviruses and filoviruses (小鼠肺炎病毒的主要核衣壳蛋白基因的序列: 序列比较提示在肺病毒、副粘病毒、弹状病毒和线状病毒的核衣壳蛋白之间有结构同源性). J. Gen. Virol. 72 ;677-685.

[0573] Barr, J., Chambers, P., Harriott, P., Pringle, C. R 和 Easton, A. J. 1994. Sequence

of the phosphoprotein gene of pneumonia virus of mice: expression of multiple proteiclls from two overlapping rading frames(小鼠肺炎病毒的磷蛋白基因的序列:从两个重叠读框表达多种蛋白质). J. Virol. 68 :5330-5334.

[0574] Bayon-Auboyer, M. H. , Jestill, V. , Toquin, D. , Cherbonnel, M 和 Eterradosi, N. 1999. Comparison of F-, G-and N-based RT-PCR protocols with conventional virological procedures for the detection and typing of turkey rhinotracheitis virus(用于火鸡鼻气管炎病毒检测和分型的基于 F、G 和 N 的 RT-PCR 方案与常规病毒学方法的比较). Arch. Vir. 144 :1091-1109.

[0575] Bayon-Auboyer, M. H. , Amauld, C. , Toquin, D. 和 Eterradosi, N. 2000. Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumovimses (APV) reveal a novel APV subgroup(两种非 A/非 B 禽肺病毒 (APV) 的 F、L 和 G 蛋白基因的核苷酸序列揭示出一个新的 APV 亚组). J. Gen. Virol. 81 :2723-2733.

[0576] Buys, S. B. , Du Preez, J. H 和 Els, H. J. 1989. The isolation and attenuation of a virus causing rhinotracheitis in turkeys in South Africa(南非火鸡中引起鼻气管炎的病毒的分离和减毒). Onderstepoort. J. Vet. Res. 56 :87. 98.

[0577] Cavanagh, D 和 Barrett, T. 1988. Pneumovirus-like characteristics of the mRNA and proteins of turkey rhinotracheitis virus(火鸡鼻气管炎病毒的 mRNA 和蛋白质的肺病毒样特征). Vires Res. 11 :241-256.

[0578] Chalmers, P. , Pringle, C. R 和 Easton, A. J. 1990a. Molecular cloning of pneumonia virus of mice(小鼠肺炎病毒的分子克隆). J. Virol. 64 :1869-1872.

[0579] Chambers, P. , Matthews, D. A, Pringle, C. R 和 Easton, A. J. 1990b. The nucleotide sequences of intergenic regions between nine genes of pneumonia virus of mice establish the physical order of these genes in the viral genome(小鼠肺炎病毒的 9 个基因之间的基因间区的核苷酸序列确立了所述病毒基因组中这些基因的物理顺序). Virus Res. 18 :263-270.

[0580] Chambers, P. , Pringle, C. R 和 Easton, A. J. 1991. Genes 1 and 2 of pneumonia virus of mice encode proteins which have little homology with the 1C and 1B proteins of human respiratory syncytial virus(小鼠肺炎病毒的基因 1 和 2 编码与人类呼吸道合胞病毒的 1C 和 1B 蛋白的同源性很低的蛋白质). J. Gen. Vir. 72 :2545-2549.

[0581] Chambers, P. Pringle CR, Easton AJ. 1992. Sequence analysis of the gene encoding the fusion glycoprotein of pneumonia virus of mice suggests possible conserved secondary structure elements in paramyxovirus fusion glycoproteins(小鼠肺炎病毒编码融合糖蛋白的基因的序列分析提示在副粘病毒融合糖蛋白中有可能的保守第二结构元件). J. Gen. Virol. 73 :1717-1724.

[0582] Coggins, W. B. , Lefkowitz, E. J 和 Sullender, W. M. 1998. Genetic variability among group A and group B respiratory syncytial viruses in a children's hospital(儿童医院中 A 组和 B 组呼吸道合胞病毒中的基因变异性). J. Clin. Microbiol. 36 :3552-3557.

[0583] Collins, M. S 和 Gough, R. E. , Lister, S. A. , Chettle, N 和 Eddy, R. 1986. Further

characterisation of a virus associated with turkey rhinotracheitis (与火鸡鼻气管炎相关的病毒的进一步表征). Vet. Rec. 119 :606。

[0584] Collins, M. S 和 Gough, R. E. 1988. Characterisation of a virus associated with turkey rhinotracheitis (与火鸡鼻气管炎相关的病毒的表征). J. Gen. Virol. 69 : 909-916.

[0585] Collins, M. S., Gough, R. E. 和 Alexander, D. J. 1993. Antigenic differentiation of avian pneumovirus isolates using polyclonal antisera and mouse monoclonal antibodies (用多克隆抗血清和小鼠单克隆抗体对禽肺病毒分离株的抗原性鉴别). Avian Pathology 22 :469-479。

[0586] Collins, P. L., McIntosh, K., Chanock, R. M. 1996. Respiratory syncytial virus (呼吸道合胞病毒). P. 1313-1351. 载于: B. N. Fields, D. M. Knipe 和 P. M. Howley (编著). Fields virology, 3rd ed., vol. 1 Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa, USA。

[0587] Cook, J. K. A., Huggins, M. B., Orbell, S. J 和 Senne, D. A. 1999. Preliminary antigenic characterization of an avian pneumovirus isolated from commercial turkeys in Colorado, USA (从美国科罗拉多州商业火鸡分离的禽肺病毒的初步抗原性表征). Avian pathol. 28 :607-617。

[0588] Cook, J. K. A. 2000. Avian rhinotracheitis (禽鼻气管炎). Rev. Sci. tech. off int. Epiz. 19 :602-613。

[0589] Dowell, S. F., Anderson, L. J., Gary, H. E., Erdman, D. D., Plouffe, J. F., File, T. M., Marston, B. J 和 Breiman, R. F. 1996. Respiratory syncytial virus is an important cause of community-acquired lower respiratory infection among hospitalized adults (呼吸道合胞病毒是住院成人中社区获得性下呼吸道感染的重要病因). J. Infect. Dis. 174 :456-462。

[0590] Elvander, M. 1996. Severe respiratory disease in dairy cows caused by infection with bovine respiratory syncytial virus (由牛呼吸道合胞病毒感染引起的奶牛的重症呼吸道疾病). Vet. Rec. 138 :101-105。

[0591] Elvander, M., Vilcek, S., Baule, C., Uttenthal, A., Ballagi-Pordany, A 和 Belak, S. 1998. Genetic and antigenic analysis of the G attachment protein of bovine respiratory syncytial virus strains (牛呼吸道合胞病毒毒株的G吸附蛋白的遗传学分析和抗原性分析). J. Gen. Virol. 79 :2939-2946。

[0592] Englund, J. A., Anderson, L. J. 和 Rhame, F. S. 1991. Nosocomial transmission of respiratory syncytial virus in immunocompromised adults (呼吸道合胞病毒在无免疫应答成人中的医院传播). J. Clin. Microbiol. 29 :115-119。

[0593] Falsey, A. R 和 Walsh, E. E. 2000. Respiratory syncytial virus infection in adults (成人中的呼吸道合胞病毒感染). Clin. Microb. Rev. 13 :371-84。

[0594] Furze, J., Wertz, G., Lereh, R 和 Taylor, G. 1994. Antigenic heterogeneity of the attachment protein of bovine respiratory syncytial Virus (牛呼吸道合胞病毒吸附蛋白的抗原异质性). J. Gen. Virol. 75 :363-370。

[0595] Gimenez, H. B., Cash, P 和 Melvin, W. T. 1984. Monoclonal antibodies to

human respiratory syncytial virus and their use in comparison of different Virus isolates(抗人呼吸道合胞病毒的单克隆抗体及其在不同病毒分离株比较中的应用). J. Gen. Virol. 61:963-971.

[0596] Gulati, B. R., Cameron, K. T., Seal, B. S., Goyal, S. M., Halvorson, D. A 和 Njenga, M. K. 2000. Development of a highly sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant the matrix protein for detection of avian pneumovirus antibodies(用于检测禽肺病毒抗体的基于重组基质蛋白的高灵敏度的特异性酶联免疫吸附测定的开发). J. Clin. Microbiol. 38:4010-4.

[0597] Johnson, P. R., Spriggs M. K., Olmsted, R. A 和 Collins, P. L. 1987. The G glycoprotein of human respiratory syncytial virus subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins(人呼吸道合胞病毒 A 和 B 亚组的 G 糖蛋白: 在抗原性相关的蛋白质之间广泛的序列差异). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:5625-5629.

[0598] Juhasz, K 和 Easton, A. J. 1994. Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumoviruses: evidence for two distinct subgroups(禽肺病毒吸附 (G) 蛋白基因中广泛序列变异: 关于两个不同亚组的证据). J. Gen. Virol. 75:2873-2880.

[0599] LeaMaster, B. R., Evermann, J. F., Mueller, M. K., Prierr, M. K 和 Seldie, J. V. 1983. Serologic studies on naturally occurring respiratory syncytial virus and Haemophilus somnus infections in sheep(羊中天然存在的呼吸道合胞病毒和睡眠嗜血菌感染的血清学研究). American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians 26:265-276.

[0600] Lehmkuhl, H. D., Smith, M. H., Cutlip, R. C. 1980. Morphogenesis and structure of caprine respiratory syncytial virus(山羊呼吸道合胞病毒的形态发生和结构) Arch. Vir. 65:269-76.

[0601] Lerch, R. A., Anderson, K 和 Wertz, G. W. 1990. Nucleotide sequence analysis and expression from recombinant vectors demonstrate that the attachment protein G of bovine respiratory syncytial virus is distinct from that of human respiratory syncytial virus(核苷酸序列分析和从重组载体表达证实了牛呼吸道合胞病毒吸附蛋白 G 不同于人呼吸道合胞病毒的吸附蛋白 G). J. Virol. 64:5559-5569.

[0602] Ling, R 和 Pringle, C. R. 1988. Turkey rhinotracheitis virus: in vivo and in vitro polypeptide synthesis(火鸡鼻气管炎病毒: 体内和体外多肽合成). J. Gen. Virol. 69:917-923.

[0603] Ling, R 和 Pringle, C. R. 1989a. Polypeptides of pneumonia virus of mice. I. Immunological cross-reactions and post-translational modifications(小鼠肺炎病毒的多肽. I. 免疫交叉反应和翻译后修饰). J. Gen. Virol. 70:1427-1440.

[0604] Ling, R 和 Pringle, C. R. 1989b. Polypeptides of pneumonia virus of mice. II. Characterization of the glycoproteins(小鼠肺炎病毒的多肽. II. 糖蛋白的特征). J. Gen. Virol. 70:1441-1452.

- [0605] McDougall, J. S 和 Cook, J. K. A. 1986. Turkey rhinotracheitis; preliminary investigations (火鸡鼻气管炎: 初步研究). Vet. Rec. 118 :206-207.
- [0606] Oberst, R. D., M. P. Hays, K. J. Hennessy, L. C. Stine, J. F. Evermann, 和 Kelling, C. L. 1993. Characteristic differences in reverse transcription polymerase chain reaction products of ovine, bovine and human respiratory syncytial viruses (羊、牛和人呼吸道合胞病毒的逆转录聚合酶链式反应产物的特征性差异). J. Vet. Diagn. Investig. 5 :322-328.
- [0607] O' Loan, C. J., Allan, G., Baxter-Jones, C 和 McNulty, M. S. 1989. An improved ELISA and serum neutralisation test for the detection of turkey rhinotracheitis virus antibodies (用于检测火鸡鼻气管炎病毒抗体的改良 ELISA 试验和血清中和试验). J. Virol. Meth. 25 :271-282.
- [0608] Paccaud, M. F 和 Jacquier, C., 1970. A respiratory syncytial virus of bovine origin (牛起源的呼吸道合胞病毒). Arch. Ges. Virusforsch. 30 :327-342.
- [0609] Pringle, C. R. 1999 Virus taxonomy at the Xith international congress of virology, Sydney, Australia 1999. Arch. Virol. 144/2 :2065-2070.
- [0610] Prozzi, D., Walravens, K., Langedijk, J. P. M, Daus, F., Kramps, J. A 和 Letesson, J. J. 1997. Antigenic and molecular analysis of the variability of bovine respiratory syncytial virus G glycoprotein (牛呼吸道合胞病毒 G 糖蛋白变异性的抗原性分析和分子分析). J. Gen. Virol. 78 :359-366.
- [0611] Randhawa, J. S., Marriott, A. C., Pringle, C. R., 和 A. J. Easton 1997. Rescue of synthetic minireplicons establish the absence of the NS1 and NS2 genes from avian pneumoviruses (合成小复制子的拯救确立了禽肺病毒缺乏 NS1 和 NS2 基因). J. Virol. 71 :9849-9854.
- [0612] Richter, C. B., Thigpen, J. E., Richter, C. S 和 Mackenzie, J. M. 1988. Fatal pneumonia, with terminal emaciation in nude mice caused by pneumonia virus of mice (由小鼠肺炎病毒引起的裸鼠中伴有临终时消瘦的致死性肺炎). Lab. Anim. Sci. 38 :255-261.
- [0613] Rothbarth, P. H., Habova, J. J 和 Masurel, N. 1988. Rapid diagnosis of infections caused by respiratory syncytial virus (由呼吸道合胞病毒引起的感染的快速诊断). Infection 16 :252.
- [0614] Seal, B. S. 1998. Matrix protein gene nucleotide and predicted amino acid sequence demonstrate that the first US avian pneumovirus isolate is distinct from European strains (基质蛋白基因的核苷酸序列和预测的氨基酸序列证明第一个美国禽肺病毒分离株不同于欧洲毒株). Virus Res. 58, 45-52.
- [0615] Seal, B. S., Sellers, H. S., Meinersmann, R. J. 2000. Fusion protein predicted amino acid sequence of the first US avian pneumovirus isolate and lack of heterogeneity among other US isolates (第一个美国禽肺病毒分离株的融合蛋白的预测氨基酸序列和其它美国分离株中缺乏异质性). Virus Res. 66 :139-147.
- [0616] Selwyn, B. J. 1990. The epidemiology of acute respiratory tract infection

in young children: comparison findings from several developing countries (幼儿急性呼吸道感染的流行病学: 来自几个发展中国家的比较结果). *Rev. Infect. Dis.* 12 : S870-S888.

[0617] Shin, H. J. , Rajashekara, G. , Jirjis, F. F. , Shaw, D. P. , Goyat, S. M. , Halvorson, D. A 和 Nagaraja, K. V 2000. Specific detection of avian pneumovirus (APV) US isolates by RT-PCR (通过 RT-PCR 特异性地检测禽肺病毒 (APV) 美国分离株). *Arch. Virol.* 145 : 1239-1246.

[0618] Sullender, W. M. 2000. Respiratory syncytial virus genetic and antigenic diversity (呼吸道合胞病毒的遗传和抗原性多样性). *Clin. Microb. Rev.* 13 : 1-15.

[0619] Trudel, M. , Nadon, F. , Sinnard, C. , Belanger, F. , Alain, R. , Seguin, C 和 Lussier, G. 1989. Comparison of caprine, human and bovine strains of respiratory syncytial virus (呼吸道合胞病毒的羊、人和牛毒株的比较). *Arch. V.* 107 : 141-149.

[0620] Uttenthal, A. , Jensen, N. P. B 和 Blom, J. Y. 1996. Viral aetiology of enzootic pneumonia in Danish dairy herds, diagnostic tools and epidemiology (丹麦奶牛群中地方性肺炎的病毒病因学、诊断工具和流行病学). *Vet. Rec.* 139, 114-117.

[0621] Valarcher, J. , Bourhy, H. , Gelfi, J 和 Schelcher, F. 1999. Evaluation of a nested reverse transcription-PCR assay based on the nucleoprotein gene for diagnosis of spontaneous and experimental bovine respiratory syncytial virus infections (用于诊断自发性和实验性牛呼吸道合胞病毒感染的基于核蛋白基因的嵌套式逆转录-PCR 测定的评价). *J. Clin. Microb.* 37 : 1858-1862

[0622] Van Milaan, A. J. , Sprenger, J. J. , Rothbarth, P. H. , Brandenburg, A. H. , Masurel, N 和 Claas, E. C. 1994. Detection of respiratory syncytial virus by RNA-polymerase chain reaction and differentiation of subgroups with oligonucleotide probes (用 RNA 聚合酶链式反应检测呼吸道合胞病毒和用寡核苷酸探针鉴别亚组). *J. Med. Virol.* 44 : 80-87.

[0623] Vilcek, S, Elvander, M. , Ballagi-Pordany, A. 和 Belak, S. 1994. Development of nested PCR assays for detection of bovine respiratory syncytial virus in clinical samples (用于检测临床样品中牛呼吸道合胞病毒的嵌套式 PCR 测定的开发). *J. Clin. Microb.* 32 : 2225-2231.

[0624] Wakavens, K. , Kettmann, R. , Collard, A. , Coppe, P 和 Bumy, A. 1990. Sequence comparison between the fusion protein of human and bovine respiratory syncytial viruses (人和牛呼吸道合胞病毒的融合蛋白之间的序列比较). *J. Gen. Virol.* 71 : 3009-3014.

[0625] Weir, E. C. , Brownstein, D. G. , Smith, A. L 和 Johnson, E. A. 1988. Respiratory disease and wasting in athymic mice infected with pneumonia virus of mice (被小鼠肺炎病毒感染的无胸腺小鼠中的呼吸道疾病和消瘦病). *Lab. Anim. Sci.* 34 : 35-37.

表 1

M							
	00-1	hRSV	bRSV	PMV	APV-A	APV-C	APV-B
00-1	1,00	0,37	0,37	0,37	0,77	0,87	0,75
hRSV	---	1,00	0,91	0,41	0,37	0,37	0,37
bRSV	---	---	1,00	0,42	0,35	0,36	0,35
PMV	---	---	---	1,00	0,37	0,38	0,38
APV-A	---	---	---	---	1,00	0,78	0,89
APV-C	---	---	---	---	---	1,00	0,77
APV-B	---	---	---	---	---	---	1,00
N							
	00-1	hRSV	bRSV	PVM	APV-A	APV-C	APV-B
00-1	1,00	0,20	0,22	0,21	0,40	0,52	0,40
hRSV	---	1,00	0,59	0,30	0,18	0,21	0,18
bRSV	---	---	1,00	0,31	0,21	0,23	0,21
PVM	---	---	---	1,00	0,21	0,23	0,21
APVA	---	---	---	---	1,00	0,42	1,00
APVC	---	---	---	---	---	1,00	0,42
APVB	---	---	---	---	---	---	1,00
E							
	00-1	hRSV	bRSV	PVM	APV-A	APV-C	APV-B
00-1	1,00	0,32	0,33	0,37	0,67	0,80	0,66
hRSV	---	1,00	0,82	0,40	0,35	0,35	0,35
bRSV	---	---	1,00	0,41	0,34	0,36	0,34
PVM	---	---	---	1,00	0,38	0,38	0,39
APV-A	---	---	---	---	1,00	0,72	0,84
APV-C	---	---	---	---	---	1,00	0,72
APV-B	---	---	---	---	---	---	1,00
F							
	00-1	hRSV	bRSV	PMV	APV-A	APV-C	
00-1	1,00	0,25	0,26	0,27	0,55	0,67	
hRSV	---	1,00	0,81	0,30	0,28	0,26	
bRSV	---	---	1,00	0,29	0,28	0,26	
PMV	---	---	---	1,00	0,23	0,27	
APV-A	---	---	---	---	1,00	0,52	
APV-C	---	---	---	---	---	1,00	
L8							
	00-1	hRSV	bRSV	APV-A			
00-1	1,00	0,36	0,35	0,56			
hRSV	---	1,00	0,79	0,36			
bRSV	---	---	1,00	0,35			
APV-A	---	---	---	1,00			
L9/10							
	00-1	hRSV	bRSV	APV-A			
00-1	1,00	0,30	0,30	0,53			
hRSV	---	1,00	0,83	0,34			
bRSV	---	---	1,00	0,32			
APV-A	---	---	---	1,00			

图 1a

表 2

用免疫荧光测定和病毒中和测定测量的根据年龄组分类的人中 hMPV 的血清阳性率					
年龄(岁)	免疫荧光测定		病毒中和测定		滴度范围
	测试人数	阳性人数	测试人数	阳性人数	
< 1	20	5	12	3	16-32
1-2	20	11	13	4	16-32
2-5	20	14	8	3	16-512
5-10	20	20	4	4	32-256
10-20	20	20	4	3	32-128
> 20	20	20	4	3	32-128
8-99 ¹	72	72	11	11	16-128

¹使用 1958 年采集的血清的血清考古学分析

图 1b

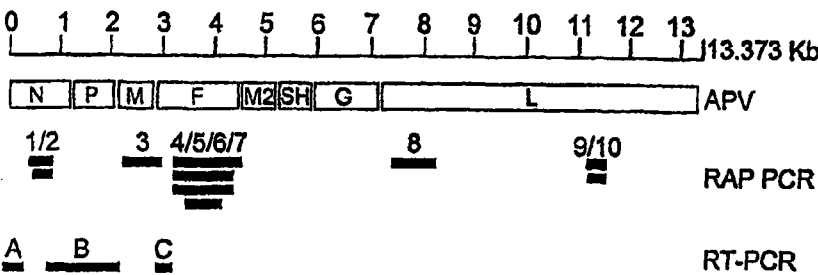


图 2

核蛋白

00-1 NP	MSIQGKHLSDLSYQHAILKESQYTIKRDVGTTTAVTSSLOQETLLCGEILYAKHADYKAREIQIYISTALGSEKVOQILRNSGSEVQVZATYSL	10
APV A	...ES.R...B.....ED.....R...A...I...E...PQVST...MV.F...T..EP...V.M.....AD.T....K.....G.H.KIVT.	10
APV B	Q.....R.VS.....T..SH...V.H..V..T..A..T....K.....A...K....	10
APV C	Q.....R.VS.....T..SH...V.H..V..T..A..T....K.....A...K....	10
BRV	.A.SKVK.N.TEN.DQL.ST.K...Q.ST.DNLDIENYDV.KHLNK...ML.ITED.NH.FTGL..ML.AMSR..R.DTIA..KDA.YQ.RANGVDVITH	10
HRV	.A.SKVK.N.TEN.DQL.SS.K...Q.ST.DNLDIENYDV.KHLNK...ML.ITED.NH.FTGL..ML.AMSR..R.DTIA..KDA.YH.KANGVDITTY	10
PVM	...CRILK.N.V.N.OSL.SMCK.SVT.ST.DV.S.SGNAM.KALARTL.ME.LTAFNRCEEV...L..RMSL..ROOSTK...EA.YN.KC.D.QKOF	10
00-1 NP	GKIQNKGGEDLQMLDINGVEKSAVEEYDQARKNATILLKESSENI PQNRPSAPDTPILLCVGALIFTRLASTIEVGLSTTVRANRVLSDALKYPR	20
APV A	SAGGSAKREV--N..D.GVO.ADOVERTT.EA.GANVR.KV-QLTK..K...L.A.V...I.....V.....AI...S.....IS....	19
APV B	..G..S...E.....R..I..V.....SAT.DN..P.....S..A.....L.....A.....N.....F....	20
APV C	..G..S...E.....R..I..V.....SAT.DN..P.....S..A.....L.....A.....N.....F....	20
BRV	RQOV.G.EKKEEV.TLVSITSEVQGN.EI.S..SYKGM...H--EVAPEY.HDS..CGM.V..A..VI...AGDS..TAVI...N..RNM..NG	19
HRV	RQOI.G.EKKEEV.TLVSITSEIQVN.EI.S..SYKGM...H--EVAPEY.HDS..CGM.V..A..VI...AGDS..TAVI...N..RNL..KG	19
PVM	TIKLG.EYKI.V...V.IDANLADLEIQ..GVV.KZ..TG-ARL.D.R.HD...CGV.V..IA..VVS...AGDS..DRVE...LN..RNM..N	19
00-1 NP	MDPKIARSEYDLFEQKVYHSLFIEYKALGSSTGSKAESLFVNIFMCAVAGQJHCRNGVIARSSNNIDHGHVSQAEKQVTEVYDLWRMGPESG	30
APV A	...R..K..FE...K...Y.N.....T...RM.....R..S.....K.....	29
APV B	I.....Y.....	30
APV C	I.....Y.....	30
BRV	LIFKD..N...EV..KYPHYDV.VHF.I.QS.TRG..RV.GI.AGL..N...V...L.K.VK...A...ME..V...EYQQL.G.A.	29
HRV	LIFKD..N...EV..KHPLIDV.VHF.I.QS.TRG..RV.GI.AGL..N...S..V...L.K.VK...A...ME..V...EYQQL.G.A.	29
PVM	.EVKQ..E.....R.P.YIDV..TP.L.QS.VRG...V.G..SGL..N...V...L.K.VK...A...ME..V...EYQQL.G.A.	29
00-1 NP	LLHLRQSPKAGLLSLANPCNFASVVLGNASGLIGMTRGVNPTLFSALSYAKSLKESNKINFSSLLTDEEKEAREHFLVSDSDNDYE	39
APV A	T.....A.....K..A..L..A.....RT.R.N...LAA...D.R...TSY.GGD.EASSIF.	39
APV B	N.....L.....A.....R.....E.....N...INEEG....	39
APV C	N.....L.....A.....R.....E.....N...INEEG....	39
BRV	FY.ILAN...S...TQF...S.....A...N.E...TFR.QD.YD..KA..EQ...NGV..Y.V.D..T..L..IKNO..VK.M--DVEL	39
HRV	FY.ILAN...S...TQF...S.....A...M.E...TFR.QD.YD..KA..EQ...NGV..Y.V.D..A..L..IKNO..EKE.--DVEL	39
PVM	FY.I.NN...S...T...T.....A.....S.K.APR.R..D..KD..ER..DN.V..Y.A.N..A..R.LISQQ..IV..TPD.DI	39

磷蛋白

00-1 P	MS-FYGGKIDLFMGNEAPKLAELF-----QMSLAKPGHRSQSIIIGEKVNTVSETLELPTISRPAKPTIPSEPKLAWTDKGGATKTEIKDAIKVNDP	91
APV-A	M..S.....M.D.Y-----R...NTSAG-GR..S..PI..IA.KVF..PLCN.TT-----SCI.PKQAFVT..K--	76
APV-C	L.....A.....R..K.I..R.T...V.D.II...V.K...KST.V.T.P.R.N..GE.POT.RSQTEE.RNEAT.	91
BRV		80
HRV	.EK.APE-----H.ED.NNK.TK.LES-----IKGKF-----ASSKDFK.DS.ISVMS	45
PVM	.EK.APE-----V.ED.N.K..E.LKHSFPSE.P.AGIPNTATHTVKAMPPILASSFK..SPKVA.NL.E..A.---PTTPPP.PPQN.EEQKESD	92
00-1 P	IEEESTEKQVLFSSDGKTPAKKLPSTNT-----KQVSTPNEP-----GKTHLEKQALDLSNNEEDAS-SSILTFES--RDTSSLSIEARLESIE	18
APV-A	--.I..IYP.LPTAFVATDTTSTSTE.AKK-----S...K.DNPKV-----EEG.E...P..DND.K.....K..A.T.....A..	16
APV-C	EDASRLY.EVFA.T.....GKETPEKF-----T.KND.S--R....ME..E.....DD...V.....K..A..L.....D	19
BRV		16
HRV	.DI.VTK.SRITSGINIIN.TSEADSTPETHONYPR.PL...KEDLTPSDNPPS..Y.ETIETT--DNH--EE.GYSY..INDQ..WDM.T...DR.D	13
PVM	VDI.TMVC..PDNPHSKKPCSDDTD.KKT--R.PH.T.VSP.EKFV.LGAS.YRETMQTF--ADGYPDEE.N.S...THQEPG.S.V.Q..DA..	18
00-1 P	EKLMSILGLIATLNATAGPTAARDGIRGAMIGVRELIADIIEA--KQKQAEH--HEEEMQNSKIGNSSVKLTAKAKELAKIVEDESTSSESSE	27
APV-A	M.K.....M.....NS.MT.--D.I.--K..DT..A..D.....L..Q.S.....S.	25
APV-C	V.....V.L.....K..AK.K.....G.....	27
BRV	X.....	26
HRV	...E...M.H..VV.S...S.....V.L...M.EK.RA..LMTNDRLA.ARLAN..SEKMA.DTSD.E..9.NETS.X.SDLL..N-----	23
PVM	...Y..I...N..IMV...T...E...L.T...EM.KSDILLVNDRIVA.EKLRD..CSRADTDOGSACY..DR.RI.D...SSNA-----	27
00-1 P	EEPQDTQNSQEDDIY---OLIM.	29
APV-A	..SCESESEDEE.S...MLDL..L	28
APV-C	..EE.EEESNPD..L.SLIM..LTKN	29
BRV		28
HRV	...SDNDLSL..---DF.	24
PVM	---EAKEDLDV...NGINF..LI	29

图 3

基质蛋白

00-1 基质	MESYLVDYQIGIPYTAAGVQDLIENDLLPASLTIHFPLQANTPEAVLLDQKLTITITLYAASQNGPILKYNASQGANFVLEKKEFNATVAXDEYS	10
APV-B	...II...V...V...NY...K...V...SS...AP...S...Q...TV...PE...V...Q...T...SA...S...S...AA...L...L...	10
APV-A	...II...V...V...SN...T...V...SS...AP...S...Q...T...PE...V...Q...A...SA...A...S...A...L...L...	10
APV-C	...V...T...V...Q...R...V...V...T...E...T...T...T...T...T...T...T...T...T...T...T...T...T...T...T...T...	10
BR5V	..T.VNKLRE.ST...YNV...DD...V.M...SSISADL.IKE.DNVN.LVRQISTLK..S.,DINRSR.VLACH.S..TIS.N.SL..R.10	10
HR5V	..T.VNKLRE.ST...YNVL...DD...V.M...SSV.ADL.IKE.ASTN.LVRQISTPK..S.R.TINRSR.VLACH.SN.IIS.N.SL..R.10	10
PVM	..A...EM.H.V...LN.V...HSANI...V.I.M...TSL.KNSVN.L.HOV.VICTQISTVN..MI..DL.SSN.GLADH.RQ.LI..II.L.DWG10	10
00-1 基质	KLEFRLKLVCEVNTVYLTGPGYQW/SKPVSSAKSVGKTHDLALCDFNLEKNTPTIAPFKSVSIKESSESATVEPAISSEADALTOKAPVAGL	20
APV-B	..D.GV...D.RA...L...I.TNMT..R...I.M.RGI...Y..A...D...G...I...R...R...20	20
APV-A	R...GT...D.RSI...L...IHTDVR...R...I..GV.I...Y..A...D...G...I...R...R...20	20
APV-C	...L.A...N...A...L...GV...Y...I...R...R...20	20
BR5V	..AY.IT.P..I.ACS..CL.VRN.LTTVKOUTMCTFNP..EI...E.ENDMTSKR.V.T.LR.INV.AKOLDSL.NIATT.FKN.I.N...I...20	20
HR5V	..AY.VT.P..I.ACS..CL.VKS.LTTVKOUTMCTFNP..EI...E.ENDMTSKR.I..TYLRPI.V.NKOLNSL.NIATT.FKN.I.N...I...20	20
PVM	NDETEVPFAFK.SFCV.LL..KN.LYTFP.ITFNP-RP..E...V.S.HNRVLSFN..V..RALY.RQGLDS..Q...DV.H.I.T.KV...19	19
00-1 基质	IMIMTMNPKGIFKGLGAGTQVIVELGAVQAESISKICKTMSKQGTNVIKSR.	25
APV-B	..LL.A...R...P...LG...N..R...I...L...K...SR	25
APV-A	..L...M...P...LG...N..R...R...GYFK-A..IC.C-YSQ.K	27
APV-C	...V...R..RN...R	25
BR5V	VLVI.VTDM..A..YIKPOS.F..D...LEK...YYVTIN.K.TA.KFSI.P...IED.	25
HR5V	VLVI.VTDM..A..YIKPOS.F..D...LEK...YYVTIN.K.TA..FSI.P...IED.	25
PVM	TLVINITST..A..L.K..S.ILA...P.LTQV.LHCVIN.K.T..S.I...SS...TSG.	25

融合蛋白

00-1 F	MSW---KVVXKSLI---TPKHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLTGWTYNVTLEVGDOENLTGADGPS---LIKTELDLTKSALRELATVSADQ	88
APV-A	..DV---RICLLIF..IS---N.SSCIQ.T.N...V.R.K...N..I.N...I..N...D...V..N...K...88	88
APV-B	..YT---LLLIY.VV---GASGKIQ.T.S...V.R.K...N..I.N...I..N...S...S..Q..Q...88	88
APV-C	...---LLNV..A---TG..E...Y..V.R...T...R...E...N..E..K...88	88
BR5V	..ATTAMGMI..SIIFISTVTHI..LQGNIT.EFYQST..AVSR...A...S.V.I.LSKIQQW.KSTD.KVK...Q..ERYNN.VV..QSLHNE10	10
HR5V	..ELLIMLSAI..LT..ALNLYL.SSQNIT.EFYQST..AVSR..F.A...S.I.I.LSNIKETK.NGTDTKVK...Q...KY.N.VT..QLIMNT10	10
PVM	...---IPGR.FLV..VIENTKPIHNT.T.K.V.ST..VE.A..K.A...HMT.NSILSQINIES.KSSN...LAH..ATYS..VD...L.SNA93	93
00-1 F	LAREEQ---IENPQSRFVLGAIAGVATAAAGVAVIAKIRLESEVTAIKNALKQNEAVSTLNGVRVLATAVREIK	16
APV-A	V.K.SR---LSS..NR...L...G..K...RM...ND..16	16
APV-B	ITK.NR---LSH.KK...T...L...G..K...L..RS...I...ND..16	16
APV-C	..K.AR---MS..NR...G..A...G..R...ND..16	16
BR5V	P.SFSRAKGIPELIHYTRNSTKAFYGLGKK.KR..L---GFL..IG---S..AS...VS.VLH..G..NK...LS..K..VS.S...S..TSK.LD..19	19
HR5V	P.ANRARREAPQVRYNTYTTIKNLWS.SKK.KR..L---GFL..G---S..IAS.I.VS.VLH..G..NK...LS..K..VS.S...S..TSK.LD..19	19
PVM	...LMSK.KK..L---GLL..LG---L...VQ...IAL.RD.VRN...VS.T..MS...KV.DD..16	16
00-1 F	DFVSKLTRAIRKNCIDIALKMAVSFSQFMRFLNVVRQFSNAGITPAISLDLNTQASLARAJSNHPISAGQIKLENHAWVRKGFGLIGVYSS	26
APV-A	E.I..K..P...Q...N...I..I..G.N...S...S.V...D.V..INR...S...S..N...I...DGT26	26
APV-B	E.I..K..P...Q...N...IR..I..G.N...S...S.V...VM..INR...S...S..N...I...GT26	26
APV-C	..I..K..P...R...S...G.Y...V...S...N...I...26	26
BR5V	NYID.E.LKQV.NKD.R.SNIZTVIE.Q.K.N.L.EIA.E.V...TPL.TML.NS..LSLND..IYND.K..SS.VOI..QOYSIMSV.KEEV29	29
HR5V	NYINQ.LPIV.QQS.R.SNIZTVIE.Q.K.S.L.EIN.E.V...V.TPL.TML.NS..LSLND..IYND.K..SS.VOI..QOYSIMSV.KEEV29	29
PVM	N.I..E.LPK..RVS..VM.ITAVIR.Q.L.K.L.E.S.E..S...L.HTV.SRM..R..TSI.GG.AV...KEI..SSK.IM..N.LAI..SS.MAT26	26
00-1 F	VIXAVQLPIFGVIDTFCNIVKAPSC---SGKKGNACLLAEQDQWYQNGSTVYYPNEKDCETRGDRVTCDAAGINVAEQSMECHINISTITNYCKVS	36
APV-A	..VY...E...R.V...L---RNE...I...A...KD...V.D.Y...LEVEQ..Y...SK...36	36
APV-B	..VY...E...R.V...L---RNE...I...A...KD...V.D.Y...SEVEQ..H...ST...36	36
APV-C	..VY...E...K...L...D...E...V.S...KE.E...A...K...36	36
BR5V	..LAY...Y...KLHYS.L.TTN.E.SNI..T.T.R...D...VSFF.QDET.KVQSNR...MNSLTPDVAL..TD.FN.K.D..IM39	39
HR5V	..LAY...Y...KLHYS.L.TTN.E.SNI..T.T.R...D...VSFF.QDET.KVQSNR...MNSLTPSEVSL..TD.FN.K.D..IM39	39
PVM	..LTYVI...L...M..D..VIRSSID---HNIADK...A.A.N...R...LS.F.SPT...IHNGVA...LKSUT.PVT.R...S.MY...D..I..35	35
00-1 F	TGNPLISMVSLPGLGACVYGVSCSIGSNRVGIKQLNKGSYITNQADTVITDNTVYQLSKVEGQHVINGRVPSSSPDVKTPEDQFNVALDQVF	46
APV-A	...V...T...G..S..ES...K...G...TH.P.NE...I...V...RT...A..VNN.N.II...46	46
APV-B	...V...T...G..S..E...K...TH.P.NE...I...I...V...RT...A..VNN.N.II...46	46
APV-C	...D.M...K...RP.G...T...K...N...IE...I...46	46
BR5V	..SKTD..SSVITSI..I.S..GKTK.TASHQR...TFEN..D.VS.KGV...SVG..L.YVN.L..KMLYV..E.IINYY..IV..S.E.DASIS..N49	49
HR5V	..SKTD..SSVITSI..I.S..GKTK.TASHQR...TFEN..D.VS.KGV...SVG..L.YVN.L..KMLYV..E.IINYY..IV..S.E.DASIS..N49	49
PVM	..SKTYV.TAV.TTM.C.S..GNN..TVIN.DK...RT.PD..H..S.KGV.R.QVG...Y...EV.KSI.VR.E.IVLYK..LS..D.K.D..IRD.E45	45
00-1 F	ESISNCALVDQSNRLS---SPKGNIGFII---VILLIYLGSTMLNVSVEIINIKMPTGAP-PELSGVITNGFIPH-N.	54
APV-A	...DR..D.I.K..DL.G---ADA.SKA.IA..-A.VVVI..IFFL.AVIYCSNRV.TKPKJYD.ATT.HSSGAV---S	53
APV-B	..VOK.ND.I.K..DL.D---IEV.S.I.AAL-A.TILV..SKLI.VGIATYV..R.AK.SKGY.KIT.QS.H.Y.S.	53
APV-C	..V.K..N.I...K..D---I...A..V...V.VL.MLAAG.G..FVV..R.AAPKT..M.MN..N.K...-F.LLKQKQKQKQK	55
BR5V	..AK.NQ.L.FTR.DEL.H---NVWG.ST.NIM.TTI..V.I.VLISL.AIGLLYC.AORT.VLTKDQ...IN.IA.S---K	57
HR5V	..K.NQ.L.FTR.DEL.H---NVWG.ST.NIM.TTI..V.I.VLISL.AIGLLYC.AORT.VLTKDQ...IN.IA.S---K	57
PVM	..H..NOTRIFFA.DQL.DISENREN.NLHST.LITLFPVM.III.AVIGFLTKVLA---HIRENK.KSRSTP.IT---VLS	53

图3(续)

L 聚合酶 RAP PCR 片段 8

00-1 片段 8	-----TNNVLPDSYLRGVISFSEINAGISCLIKRPFYLDNDAKVALENPVEHVRANAVNSKQKISDYK-----IVEFVMDME 77	
APV-A	ME-ISNESV.....V.N...I.D.Y..H..MT.....Q..PALFK.LTISRE.R-----V...LMT.K. 84	
bRSV	NDTLIHENST....T.....C..L..Y..DG.....Y.NIISRQK.L...IN..KLSIIQSFVK.NKGELGLE..TYP.SL 90	
hRSV	MDPIINGSA....T.G.....C..L..YING.....Y.NIISRQ..L...MM..KINITQSL..K.HKGEIKLE..TYP.SL 90	
00-1 片段 8	IM-KNVHSCEL---TLNQFLTASQNTSTLKNMICOWLQK-----STSDTSILSFIDVEFI----- 13	
APV-A	LL--VAAGAR---KK..KN.G...D..EV..K.VT...K.S-----Q.PGRQK.IDR.Q..NL----- 13	
bRSV	L.TY.SLSTS..ITTT..F.KIIR.AIE..DV.VYA.LNK.G..EKGKVDRC---DOTN.TLSNIVRDNLVSISDNTSTSKPINSCK 17	
hRSV	L.TY.SMT.S.QIATN...KIIR.AIE..DV.VYA.LNK.G..EKGKISNNGQDE.NSV.TTI.KDDILSAVKDNGSHLADKRSSTK 18	
00-1 片段 8	-----PSWSNWFESMTYNLNLKILFPRKEEVIRGSIIL---CASLGKLVFVSSYGCIVKSNKSKVSVFTYNOLL 20	
APV-A	-----D.LEH..DS.LI..DV.QSY.CL..SQ.SA..---RK.SLNEF.A...F...II.R..R.IC.C..... 20	
bRSV	PDQPIKTTILCKLLSSMSHP.T.LIN..NLATK..DILTQY.TN.ARNH.Y..IDT.T..EEQ.IINQ....YHK.L.KITIT....F. 26	
hRSV	QKDTIKTLLKKNLCSMSHP...LIN..NLATK..NLITQY.SN..KNH.FT.IDNOT.SGFQ.IINQ....YHKEL..ITVT....F. 27	
00-1 片段 8	TWQVLSRFNNKFCIVVSNINENQBGVLRSLN-----Q 23	
APV-A	LA.....L.V....C..SA.D.L....K.VGELIAR 24	
bRSV	IS...L.VCHIT.I..C..TLNKS....C 30	
hRSV	IS...L.VCLIT.I..C..TLNKS.... 30	

L 聚合酶 RAP-PCR 片段 9/10

00-1 片段 9/10	--KLVDKITSDDHIFSPDKIDMLTGMAMP--TIKQQTIDQ----FLNKRNYTHQNLIESLSAALAHENCGIITEQC 72	
APV-A	-F.S.R..VT....N..H..LVM..L.L..--VRSNINNN-----KPAI..F.N...IV.A.TSC..C...TV.ILET 72	
bRSV	-ICKNQCIVQK..M.L....SLSQYVELFLSNK.L.NSPHISNLVLVH.MSD..LHKQY---.TN..G..IM.IQIMK 76	
hRSV	DIKKQKQVIOK..M.L....SLTOYVELFLSNK.L.SGSKVSNLILAH.ISD...MTYI---.TN..G..IL.IQIMK 77	
00-1 片段 9/10	IENNIFKQDWDGDFISDHAFMDFKIFLCVEKIKLLC 10	
APV-A	T..S..Q.E.....T...IN.TW..MS...Y..HW 11	
bRSV	DSKG..E....E.Y.T.M.L.LNV.FDAY..Y. 11	
hRSV	DSKG..E....E.Y.T.M.DNL.V.FDAY..Y. 11	

图 3(续)

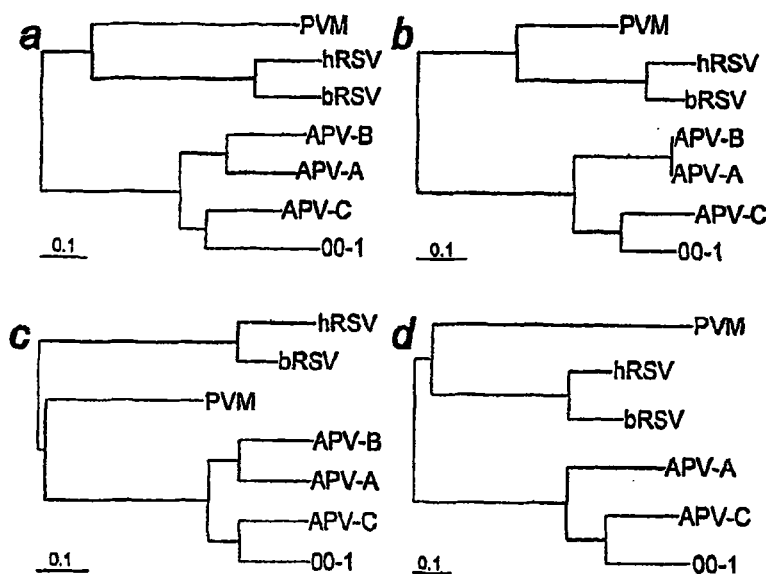


图 4

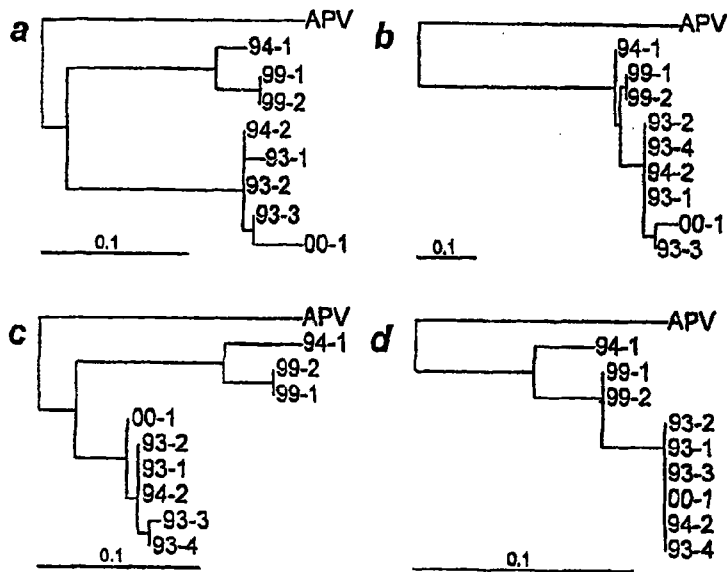


图 5

150
ACCCCTATAATTAGATCTCAAAATAATATGSSGCHAGTGAATAATGTCTCTTCAAGGGATTCACCTGAGTGTATTCATACAGCATCTCATATTAAGAAAGGTCTCAGTACAGCATATAAGAGAGGTATGCGTACACACACTCTGATGACA
300
CCCTCTCATTTGCAAGAGAAATACACTGTGTGTGTGTCAGAAATTCGTGATTCCTTAACCATCTCTACTACAAATATCTGCAAGAAATAGCAATACAAATATATAGCACACTTTAGCATCTACAGAGAGTCTCAGCAGATTTCTGAGCAACTCA
450
PPSSLOOEITLLCCIELYAKHAKADYKYYAAAEIGIOYISTATLGSERYOILRMS
GGCAGTGAAGTCCAGTTSBCTTACCAAGCATCTCTCTGSSGAAATTAAGGACAAATTAAGGACAAATTTACACATGTIMBACATACGCGGTACAGAGAGAGCTGSGTAGAGACATACAGCAAGAGCAAGCAAAACATGSCA
600
GSEYOVYLYRYSLCKIKKMKQEDLOHLOIHGVEKSVVEEIDKEARKTNH
ACCTTGCTTAAGGATCATCGATTAATCCCAAAATCABAGSECTCAGCACAGACACACCTAATCTTAATGTGTAGBTGCGTCTTAATTCACCTAACCATACCACTACCACTACAGCATACAGAGTGGGCTGAGMBACACACACCTAGAGG
750
TTLKSSGMPOMORPSAPOTPIILLCYGALFFKLASTIEVCLERTYR
GCTAACCGTGTACTAAGTAGTSCACTAGAGATACCTTAGATAGGACATACCAAGCATCTCTATACCTAATTTGACAAAAGCTGTATACACAGAGTGTGTCTATGAGTATGSCAAAGCATTTAGSCTCATCTCTACA
900
ATAHRYLSALAKRYPRMDIPKIAKRSFYOLFEOKVTHRSLFIEYCKALGSSST
GGGACGAAAGCAGAAAGCTATTTGTAAATATTCATGCGACCTTATGCGGCGGTCAACATCTAGGTTGCGGCGGTTCAGCAGCTATCCAGCATATATGTTAGGACATATATCTGCTCAAGCTTGAGTTAAACAGCTGACA
1050
GQSKAESLFFYNIFNOATYAGOTNLRLWGVIARSSNIMHLGHVSVGAELKQVT
BAAGCTATGACTGTGTGTGAGAAATGSSGCTGAAITGSGACTCTACATTAAGGCAAGGCGCAAAAGTGCATGTATCATACGCAACTCTGCCAAGTGTGTCTGCGAAATGCTTCAGCTTAGGCATAATCGST
1200
EYVOLVREHSPESGLHLHRDSPKAGLGLSLANCPMFASVYVLCMAAGCLQIG
TGTGTATGAGGAGAGTACCAAGCAGAAATTTTTCAGCAGCTGMAAGTTATTCGCAAAAGTTTGAGAGAGCAATTAATAATTTCTCTCATAGGCTTACAGATAGAGAGAGAAAGGCTTGCAGACATTTCTTAATTTGTAGT
1350
MYRCRVPTLEFSAAESYAKSLKESWKINFSGLGLTDECKEAEHFLNVG
GACGACAGCTCAAAATGATTAAGCTAATTAAGAAAGTGGGCAAGTCAAAATGTCCTTGAAGCAAAAGATATCTTTCATGAGTATGAAGCAAAATAGCAGAGCTTTCCAGAAATCTATAGCAAAACGCTGCTATAA
1500
OOSGNDYE. ~~XXXXXXXXXXXX~~ NSFP ECKDILFNCHNEAAKLAELAFQKSLRKPCHK
GACTCAATCTATATAGGCAAAAGTCACTATATGCAAAAGTTCGAACTACTATCTAGAGCTGCAAAAGCACTACCTCTGACAGCAAAAGTTAGCATGACAGATAGAGTGGGCAAGCAAAAGTTCGAACTGAAATAGAG
1650
RRSSSISIEKYNYSEYLEPTIIRPAKPTIPSEPKLAWTDKGBATEIK
AGAGCATCAAAAGTCAATGCAATGCAAGAGAGCTCTACGAGAGAGAGTTCACCTCTAGCTATGSSAAAGCTCTGAGAGAGAGCTGCAAGCACTACAGCAAAAGAGAGCTTTCTATTACGCAAAATGACAG
1800
OAIKYNDPIEEESTYKKVLPSSDGKTPAEKKLPSTNTXKXVSFTFMEP
GGAATATAGAAAGTGGAAAGATGCTTAGATTTCTCTAGTATGAGAGAGAGTGAAGATCTTCAATTCCTTTGAGAGAGAGAGTACTTCACTATAGCATTCAGGCAAGTTCGAACTGAAATAGAGAGAGATTA
1950
CKRYTKLEKDALDLSDNEEEEAESSILTFEERDTISLSIEARLESEKEL
GCACTGATATTAGGCTATTAAGACACTCAACTTTCCTACAGCAGGACCCACAGCAGCAGAGATGGAATCAGAGATGCAATGATTTGGCTTAGAGAGAGATTAATAGCAGCATATAAGGAGAGCTTAAAGGAGAGCAGCAAGTCA
2100
SMILSLRLYNIAATACPTAARDQIRDAHIGVNEELIADIREAKKAEH
TGAGAGAGAGATGATCAAGCTCAAAAGTGTGTGTAAATTTACAGAAAGCAAGAGCTCTACAAATTTGTTAGATGMAAGCTAGAGCTCTACAAATTTGTTAGATGMAAGCTTTCATTACGCAAAATGACAG
EENRORSKICNCYKLT EKAKELNKIVOE STGSESEEEEPKDTDBH

图 6A

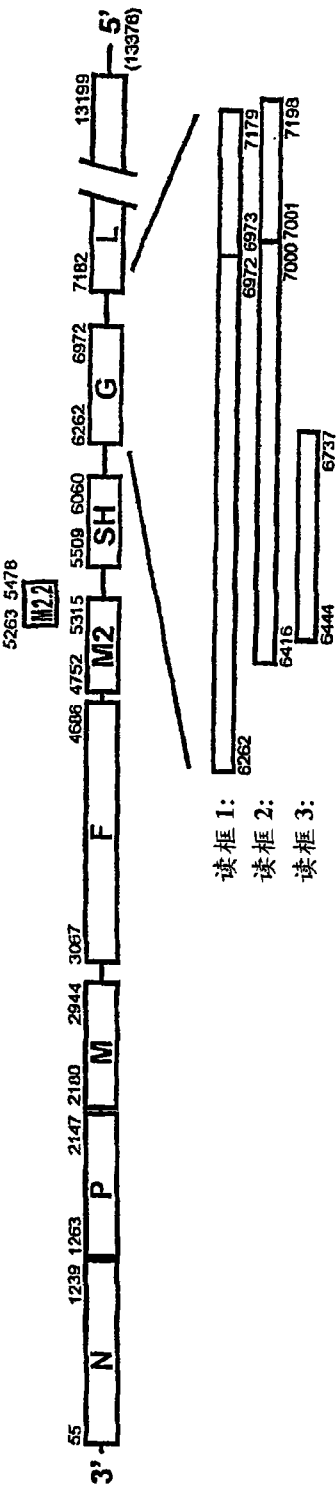


图 7

50
HMPV MSLOGIHLSLSYKHAILKESQYTIKRDVGTITAVTFSSLOQEITLLCGE
APVCQ.....R.VS.....
APVB ...ES.R...E.....D.....R...A...I...E...PKVST...M
APVA ...ES.R...E.....ED.....R...A...I...E...PQVST...M
HRSVA .A.SKVK.N.TLN.DQL.SS.K...Q.ST.DSIDTPNYDV.KH.NK...M
HRSVB .A.SKVK.N.TLN.DQL.SS.K...Q.ST.DNIDTPNYDV.KHLNK...M
BRSV .A.SKVK.N.TFN.DQL.ST.K...Q.ST.DNIDIFNYDV.KHLNK...M
PVM ...DRLK.N.V.N.DSL.SNCK.SVT.ST.DV.S.SGHAM.KALARTL.M
100
HMPV ILYAKHADYKYAAEIGIQYISTALGSEVQOILRNSGSEVQVVLTRYSL
APVCT..SH...V.M..V..T..A..T...K.....A...K....
APVB ..F.....EP..QV.M.....ADKT....KS.....G.M.KIVT..
APVA V.F...T..EP...V.M.....AD.T...K.....G.M.KIVT..
HRSVA L.ITED.NH.FTGL..ML.AMSR..R.DTIK...DA.YH.KANGVDVTTH
HRSVB L.ITED.NH.FTGL..ML.AMSR..R.DTIK...KDA.YH.KANGVDITTY
BRSV L.ITED.NH.FTGL..ML.AMSR..R.DTLK...KDA.YQ.RANGVDVITH
PVM F.LTAFNRCEV....L..AMSL..RDDSIK...EA.YN.KC.D.QLKDF
150
HMPV GXIKNNKGELOMLDIHGVEKSWVEEIDKEARKTMATLLKSSGNIPQNG
APVC ..G..S...E.....R..I..V.....SAT.DN..P....
APVB PAEGPIR--KREV.N..DIGPA.ADNVERT..E..SLMV..K-AQ..K..
APVA SAEGSVR--KREV.N..D.GVG.ADDVERTT.EA.GAMVR.K-VQLTK..
HRSVA RQDI.G.EMKFEV.TLASLTTEIQIN.EI.S..SYKIM...M-.EVAPEY
HRSVB RQDI.G.EMKFEV.TLSLTSEIQVN.EI.S..SYKIM...M-.EVAPEY
BRSV RQDV.G.EMKFEV.TLVSLTSEVQGN.EI.S..SYKIM...M-.EVAPEY
PVM TIKLQG.EYKI.V...V.IDAANLADLEIQ..GVV.KE..TG-ARL.D.R
200
HMPV RPSAPDTPHLLCVGALFETKSTIEVGLTTEVETANRMLSDALKRYR
APVC ...S..A...I.....A.....N....F..
APVB K...L.A.V...I.....V.....AI..S.....IS...
APVA K...L.A.V...I.....V.....AI..S.....IS...
HRSVA .HDS..CGM.I..IA..VI...AGDRS..TAVI...N..KNEM...KG
HRSVB .HDS..CGM.I..IA..VI...AGDRS..TAVI...N..KNEI...KG
BRSV .HDS..CGM.V...A..VI...AGDRS..TAVI...N..RNEM...KG
PVM .HD...CGV.V...IA..VVS...AGDRS..DAVE...LN..KAEKA...N
250
HMPV MDYKTBSEKOLFEKQVHRSCTEPAVLCSSSTKSSKSSSEHNEBNG
APVC I.....Y.....
APVB ...R..K..FE...K...Y.N.....T.S..RM.....
APVA ...R..K..FE...K...Y.N.....T...RM.....
HRSVA LLPKD..N...EV..KHEHFDIV.VHF.I.QS.TRG..RV.GI.AGL..N
HRSVB LIPKD..N...EV..KHEHFDIV.VHF.I.QS.TRG..RV.GI.AGL..N
BRSV LIPKD..N...EV..KYPHYIDV.VHF.I.QS.TRG..RV.GI.AGL..N
PVM .EVKQ..E.....R..P.YIDV..TF.L.QS.VRG...V.G..SGL..N
300
HMPV AYAGQOTMLRWGVFARSSNNIMGHVAVADKRYTEVYDNRHMPESG
APVCR..V.....R..S.....K.....
APVBR..S.....K.....
APVAV.....L.K.VK.....A...ME..V...EYAKL.G.A..
HRSVAS..V.....L.K.VK.....A...ME..V...EYAKL.G.A..
HRSVBV.....L.K.VK.....A...ME..V...EYAKL.G.A..
BRSVV.....L.K.VK.....A...ME..V...EYAKL.G.A..
PVMV.....L.K.VK.....A...ME..V...EYAKO.G.A..
350
HMPV THTLRQSPKEGLISANGPNEASVTEGASGGYCHYRGRVPNTLFS
APVCN.....L.....A..
APVBTS.....A.....K..A..L..
APVAT.....A.....K..A..L..
HRSVA FY.I.LNN..S...TQF..H.S...A...M.E...TPR.QD.YD.
HRSVB FY.I.LNN..S...TQF..S...A...M.E...TPR.QD.YD.
BRSV FY.I.LNN..S...TQF..S...A...M.E...TPR.QD.YD.
PVM FY.I.LNN..S...T...T...A...S.K.APR.R...D.
395
HMPV AESYAKSLKESNKNINFSSGLTDEEKEAAEHFLNVSDDS-QNDYE
APVCR.....E.....N..INEEG-....
APVBR.....LAA.....ED.R...TSY.GGDE.K-SQKF..
APVART.R.N...LAA.....D.R...TSY.GGD.ER-SSKF..
HRSVA .KA..EQ...NGV..Y.V.D..A..L..IK.Q..PK.N--DVEL-
HRSVB .KA..EQ...NGV..Y.V.D..A..L..IKNQ..PKE.--DVEL-
BRSV .KA..EQ...NGV..Y.V.D..T..L..IKNQ..PK.N--DVEL-
PVM .KD..ER..DM.V..Y.A.N..A..R.LISQQ..IV..TPDD.I-

图 8

图 9

```

50
HMPV MESYLVDITYGGIETAAVQVDLIEKOLLPASLTWFPPLFOANTFFPAVLDD
APVC .....V.....T.V...Q...R.V.V...T...T...E
APVB .....II.....V.....V...NN..K..V.....SS..AP....
APVA .....II.....V.....SN..T..V.....SS..AP....
HRSVA ..T.VNKLHE.ST.....YNVL...DD.....V.M..SSM.ADL.IK
HRSVB ..T.VNKLHE.ST.....YNVL...DD.....V.M..SSV.ADL.IK
BRSV ..T.VNKLHE.ST.....YNV...DD.....V.M..SSISADL.IK
PVM ..A...EM.H.V.....LN.V..HSANI...V.I.M..TSL.KNSVM.
100
HMPV QLKLTITTTLYAASONGRILKVNASAGGAAMSVLPKKFEVNATVALDEYS
APVC .....T.....A.....S.D.S.S...D...
APVB .....S...Q.TV.PE..V.Q...T.....A.....S.S.AA.....
APVA .....S...Q.T..PE..V.Q...A.....A.....A.S.A.....
HRSVA E..ANVN.LVKQISTPK..S.R.MINSRS.VLAQM.S..TIC.N.S...R.
HRSVB E..ASIN.LVKQISTPK..S.R.TINSRS.VLAQM.SN.IIS.N.S...R.
BRSV E..INVN.LVKQISTLK..S..IMINSRS.VLAQM.S..TIS.N.S...R.
PVM L.HDV.VICTQISTVH..MI..DL.SSN.GLATH.RQ.LI..II...DWG
150
HMPV KLEFDKLTVCVXTVYLTTNKPYGMVSKFVSSAKSVGKXTHDLIALCDFM
APVC .....L.A.....N..A.....L
APVB ...D.GV....D.RA....L.....I.TNMNT..R.....I
APVA R...GT...D.RSI....L.....IMTDVR...R.....I
HRSVA ..AY.VT.P..I.ACS..CL.SKN.LTTVKDLTHKTLNP...I...E.E
HRSVB ..AY.VT.P..I.ACS..CL.VKS.LTTVKDLTHKTFNP..EI...E.E
BRSV ..AY.IT.P..I.ACS..CL.VKN.LTTVKDLTHKTFNP..EI...E.E
PVM NMDYEVPAFDK.SFCV..IL..KN.LYTVP.ITP-TNRP..E...V.S.H
200
HMPV DLEKNTEVTIPAFIKSVSISESATVEAARISSEADQALTOAKIAPYAGL
APVC ....GV.....Y.....G....I...R.....
APVB .M.RGI.....Y..A...D.....G....I...R.....
APVA .I..GV.I...Y..A...D.....G....I...R.....
HRSVA NIVTSKK.I..TYLR.I.VNKDLN.L.NITTT.FKN.I.N...I..S..
HRSVB NIMTSKR.I..TYLR.I.VNKDLN.L.NIATT.FKN.I.N...I....
BRSV NIMTSKR.V..T.LR.INV.AKDLSL.NIATT.FKN.I.N...I....
PVM NRVTLKSFN..V..RALY.RQOGLDS..Q....DV.H.I.T.RV.....
250
HMPV IMINTMNNPKGIFKKLGAGTQVIVELGAYVQAESISKICKTWSHQTRYV
APVC .....V.....R..RN.....
APVB .LL.A.....R.....P.....LG.....N..R...I
APVA .L.....M.....P.....LG.....N..R....
HRSVA LLVI.VTDN..A..YIKPQS.F..D....LEK...YYVTN.K.TA..FA
HRSVB VLVI.VTDN..A..YIKPQS.F..D....LEK...YYVTN.K.TA..FS
BRSV VLVI.VTDN..A..YIKPQS.F..D....LEK...YYVTN.K.TA..KFS
PVM TLVINITST..A..L.K..S..ILA...P.LTQV.LHDVIMN.K.T..S.I
258
HMPV LKSR----
APVC ....----
APVB ....----
APVA .R..----
HRSVA I..PMED--
HRSVB I..PLED--
BRSV I..PIED--
PVM ...SSTSG

```

图 10

信号肽		100
HMPV	-----MSMKVLIIFSLIIPQHLKESYLEESCTITEGYLSVLRTGHTNVFTLEVGDVENICADGPS---	LIKTELDLTKSALRELRTVSADQ
APVC	-----LLLV.AA.TG.E-----Y.V.R.-----T.-----R.---E.---N.---E.---K.---	
APVB	-----YL.LLL.IY.VVGASGKIQT.S-----V.R.K.-----N.I.N.---I.---S.---S.---Q.N.---Q.---	
APVA	-----DVRICLLLF.ISN.SSCIQ.T.N-----V.R.K.-----N.I.N.---I.---D.---V.---N.---K.---	
HRSVA	MELLILKANALITILTITAVTFCFASGONIT.EFYQST.AVSK.A.A.A.A.S.I.I.LSNIKENH	NGTDAKVK...Q...KY.N.VT..QLLMQST
HRSVB	MELLILKALIAIFTLA.NA.YL.SSONIT.EFYQST.AVSR.F.A.A.A.S.I.I.LSNIKETH	NGTDTKVK...Q...KY.N.VT..QLLMQST
BRSV	MATTAMMII.IIFISTYVTH.LCQNI.EFYQST.AVSR.A.A.A.A.S.V.I.LSKIQKN	KSTD.KVK...Q...ERYNN.VV..QSLHQNE
PVM	-----MIFGRIFLVLLV..NTKPIKENT.T.K.Y.ST.VE.A.K.A.A.A.MMT.MSIKLSQINIES	KSSN.---LAH..AIYS.VD...I.SN-
融合结构域		200
HMPV	LAREEQ-----IENPRGSRFVZGAIALGVATAAAVTAQVATKIRLESEVTAIKNAKKTNBAVSTLNGVRLATAVRELK	
APVC	..K.AR-----MS.-----G.A.---G.---R.-----ND..	
APVB	ITK.NR-----LSH.KK-----T.-----L.-----G.K.---L.---S.-----ND..	
APVA	V.K.SR-----LSS.KH-----L.-----L.-----G.K.---R.N.-----ND..	
HRSVA	PPTNNRARELPFRFMYTLNNAKNTVTLSSK.KK.LG--FL..G--S.IAS..VS.VLH..G.NR..S.LS.K.VS.S..S.TSK.LD..	
HRSVB	P.ANNRAREAPQMYTITNITKHLNVS.SKK.KK.LG--FL..G--S.IAS.I.VS.VLH..G.NK...LS.K.VS.S..S.TSK.LD..	
BRSV	P.SFSRAKRGIPELIHYTEASTKKFYGLMGKK.KK.LG--FL..IG--S..AS..VS.VLH..G.NK...LS.K.VS.S..S.TSK.LD..	
PVM	-----ALKSK..KK.LG--LI..LG--.....L..VQ....IAL.RD.VRN....VS.T..MS....KV.DD..	
		300
HMPV	DFYSKHLTRAINKNDIADLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSONAGITPAISLDLMTDAELARAVSNMFTSAGQIKHLENRRAMVRKGFGLIGVSS	
APVC	..I..K..P...R...S.....G.Y.....V.....S...N.....I.....	
APVB	E.I..K..P...Q...IR..I..G.N.....S...S.V.....VK.INR...S...S...N.....GT	
APVA	E.I..K..P...Q...N..I..I..G.N.....S...S.V.....D..V..INR...S...S...N.....DGT	
HRSVA	NYID.Q.LPIV..QS.S.SNIETVIE.Q.K.N.L.EIT.E.V...V.TPV.TYML.NS..LSLIND..ITND.K...SN.VQI..QQSYSIMSIIKEEV	
HRSVB	NYINNO.LPIV..QS.S.SNIETVIE.Q.K.S.L.EIN.E.V...V.TPL.TYML.NS..LSLIND..ITND.K...SS.VQI..QQSYSIMSIIKEEV	
BRSV	NYID.E.LPOV.NEDR.SNIETVIE.Q.K.N.L.EIA.E.V...V.TPL.TYML.NS..LSLIND..ITND.K...SS.VQI..QQSYSIMSIIKEEV	
PVM	N.I..E.LPK..RVS..VH.ITAVIR.Q.L.K.L.E.S.E.S...L.HTV.SFML..R..TSI.GG.AV...KEI..SSK.IM..N.LAI.GS.NADT	
		400
HMPV	VIYMVOLPIEGVIDTECHIVKAAPSFG--KKGNYSCLIREDGQWCONAGSTUYYPNEKICETRAGDKVCDTAAGINVAEQSKENIYISTNTHKVS	
APVC	..V.I.....K...I...--D.....E.....V.S.....KE.E...R...K....	
APVB	..V.....E...R.V...R.H--ERES.....T...A...D...V.D.Y.....SEVEK...H...ST....	
APVA	..V.....E...R.V...R.H--E.....T...A...D...V.D.Y.....LEVEK...Y...SK....	
HRSVA	LA.V...LY.....KLTS.I.TTNT.E.SNI..T.T.R...D...VSFF.QAET.KVQSNR...MNSLTLPSEINI..VD.FNPK.I..IM	
HRSVB	LA.V...Y.....KLTS.I.TTNI.E.SNI..T.T.R...D...VSFF.QADT.KVQSNR...MNSLTLPSEVSI..TD.FNSK.I..IM	
BRSV	LA.V...Y.....KLTS.I.TTON.E.SNI..T.T.R...D...VSFF.QTET.KVQSNR...MNSLTLPDVENI..TD.FN.K.I..IM	
PVM	LV.VI...L...M...I..VIRSSIQHN--IACK..A.A.N...H...LS.F.SPT..IHNGYA...LKSILT.PVT.R...S.MY...I..I.	
		500
HMPV	TCRHPISKVALSPGLALVFCIKGVSIGISNRVGIKQLNKCEBYITNQDADTVTIDNTVYQLSKYEGEQHYIKGRFVSSSEDFYKFFEDQFNVALDQVF	
APVC	D.M.....K...RP.G...S.....T...K...N...IE.....I.....	
APVB	V.....T...G...S...E...K...FH.P.NE...I...I...V...RT...A...VMN.N.LL.....	
APVA	V.....T...G...S...E...K...FH.P.NE...I...I...V...RT...A...VMN.N.LL.....	
HRSVA	SKTDV.SSVITS...I.G.GKTH.TASNKNR...TFSN..D.VS.KGV...SVG..L.YVN.Q.KSLYV..E.IINFY..LV..S.E.DASIS..N	
HRSVB	SKTD.SSVITS...I.S.GKTH.TASNKNR...TFSN..D.VS.KGV...SVG..L.YVN.L.KNLYV..E.IINY..LV..S.E.DASIS..N	
BRSV	SKTD.SSVITS...I.S.GKTH.TASNKNR...TFSN..D.VS.KGV...SVG..L.YVN.L.KALY...E.IINY..LV..S.E.DASIA..N	
PVM	SKTYV.TAV.TTM.C.S.GHN..VIN.DK...RT.PD..R..S.KGV.R.QVG...Y...EV.KSI.VR.E.LVLKY...LS..D.K.D..IRD.E	
膜锚定		583
HMPV	ESIENSOALVDQSNRISSAE---KGNTGTFIVILLIIVLGSIMLVSVIHKTKKPTG---AP-PELSGVTNNGFIPHN	
APVC	..V.K..N.I...K..D.I.---A.A.V..V..VL.HLAAG.G..FVV..R.AAPK---F..M.MN..N.K...--	
APVB	..VOK.KD.I.K..DL.DIEV---S.I.AALA.TILV..SHLI.VGIATYVV..R.AK.S---NGY.KTT.QS.M.Y.S--	
APVA	..DR..D.I.K..DL.GADA---SKA.IA.A.VVLVT..YFPL.AVIYCSRV..TKPK---RDY.ATT.HSSMAYVS--	
HRSVA	.K.NO.L.FIRK.DEL.HNVN--AG.ST.NIM.TT.I.VIIVILLS.IA.GLLLYCKARS.P-VTLSDQ...IN.IA.SN--	
HRSVB	.K.NO.L.FIRK.DEL.HNVN--TG.ST.NIM.TT.I.VIIVILLS.IA.GLLLYCKA.N.P-VTLSDQ...IN.IA.SK--	
BRSV	AK.NO.L.FIRK.DEL.H.VD--VG.ST.NVV.TT.I.VIIVVILM.IA.GLLFYCKT.S.P-IMLGDQ...IN.LS.SK--	
PVM	H..NOTRTFFKA.DQL.DLS.NREN.NENKSY.LTT.LF.VMLII.NAVIGF.LY.VL.MIRDNKLKSKSTP.L.VLS----	

图 11

A

50
 HMPV MSKAPCKMWRCKGNGESCKTWNHNSWNPBYLILRSNYLNLQLEPNA
 APVCL.....
 APVB ..GRN..R..T..R.....S.T.....HV..V.A..M...V...
 APVA ...RN..R..I.....S.T.....HV..V.A..M.....
 HRSVA ...RN...F.I..H.LN.KR.H.S...FE..PHA..V.Q.FM..RI.KSM
 HRSVB ...RN...F.I..H.LN.RR.HYS...FE..PHA..V.Q.FM..KI.KSM
 BRSV ...RN...I..H.LN.KK.H.S...FE..PHA..V.Q.FM..KI.KSM
 PVM ...VR...F..Q.F.S..RN..YS.K..E..LKT.ML.Q..M..RIY.FL

100
 HMPV TRAMPGLSIIISAGREPRTOPEVLTSTNVWQGYIDDNQSITKAAACYSLH
 APVC ..S-....L.....D.....N...N.EN...ST...Y
 APVB ..T-....L.....A....N..EG.AT...S.....Y
 APVA ..T-....L.....A....N..EG.TT...S.....Y
 HRSVA ..KSI.T..E...AEL...EEYA..VVG.LES..GSINN...QS..VAMS
 HRSVB ..KSI.T..E...AEL...EEYA..IVG.LES..GSINN...QS..VAMS
 BRSV ...NN.T..E...AEL...EEYA..VIG.LES.LGSINN...QS..VAMS
 PVM .TNT.AI.DV..FDAPO..AEYA..TIG.LKS.LEKTNN...SI..G..I

150
 HMPV NIIKQLOEVEVRQARDNKLSDSKHVALHNLVLSYMEMS-KTPASLINNLK
 APVCTD.....VD.....
 APVBND.KS...LMVD.P.....ID...-N..N...S..
 APVAND.KTS..SM.E.P.....I...VD...-N.....S..
 HRSVA KLLTE.NSDDIKKL...EELN.PKIRVY.T.I..I.SNR.NNKQT.HL..
 HRSVB KLLIEINSDDIKKL...EEP.N.PKIRVY.T.I..I.SNR.NNKQT.HL..
 BRSV KLLAEINNDIKRL.NKEVPT.PKIRIY.T.I..I.DSNKRNKQT.HL..
 PVM TVLQN.DVGL.I...SNTE.TNYLRSC.TI...IDKIL.K-RQI.HI..

195
 HMPV RLPREKLLKLAKLIIDLSAGAE--NDSSYALQDSESTNQVQ---
 APVC K..K.....E...V...-...TA.M...ANSD-----
 APVB ...K.....I..Q...S.GE.AN.NT..KGD.S.-----
 APVAI..LQ...P.SD.A.GNT..KGD.N.-----
 HRSVA ...ADV...TI.NTL.IHKSITIN.PKESTVS.TNDHAKQNDTT-
 HRSVB ...ADV...TI.NTL.IHKSIIIS.PKESTVN.QNDQTKNNDITG
 BRSV ...ADV...TI.NT..IHNEINGN.QGDIIIVNEQNE-----
 PVM ...VGV.CN.IQSV.SIEEKINSSMKTE-----

B

50
 HMPV -----MTLHMP-CKTVKALIKS-----EHGPVFITIEVDDMIW
 APVC -----...QL...I.QT...G-----LI.LKMKL...V.
 APVB -----PIVI...R.T.V.R.N-----TL.VCLFKRTYEHN.I
 APVA -----PVVI...RR.T.I...N-----AL.LCMVRKIY.YS.A
 HRSVA MTMPKIMILPDKY...SITSI..TSRCRVTMYNQKNTLY.NONNPNNHMY
 HRSVB MTKPKIMILPDKY...SISSI..SSESHATFNHKNILQ.NHNHL.NHQR
 BRSV MNNSNIIIFPEKY...SISSL...NENDVIVLSHONVLDYLOFQYPCNMY
 PVM MQSDPICHLRGEDKFFYENRM.RLPKYYPAILHRMYIIRVNRNLTDOGS

97
 HMPV THKDLKEA---L---SDGIVKSHTNIYNCYLENIEIIYVKAYLS---
 APVC .KNE.VDI---I---TE...V.A..FK.R..D.....TF.----
 APVB NLG..I.E---V---ARM.IID.I.RKQ.NECKRDFEF.AV.T.YT--
 APVA SWS..I.E---V---ANMVLID.I.RKQ.VECRKDFEF.TAI.T.YN--
 HRSVA SPNQTFNE---IHWT.QELIDTIQ.FLOHLGIIED.YTIYILV.---
 HRSVB LLNNIFDE---IHWT.PKNLLDATQQFLOHLNIPED.YTIYILV.---
 BRSV SQNHMLDD---IYWT.QELIEDVLK.LHLSGIS.SKYVIYVIVL---
 PVM GPSTIID.GKSVVWNRVDVIACVKEALC.IEFSWNNQVIIDFDYSQAR

图 12

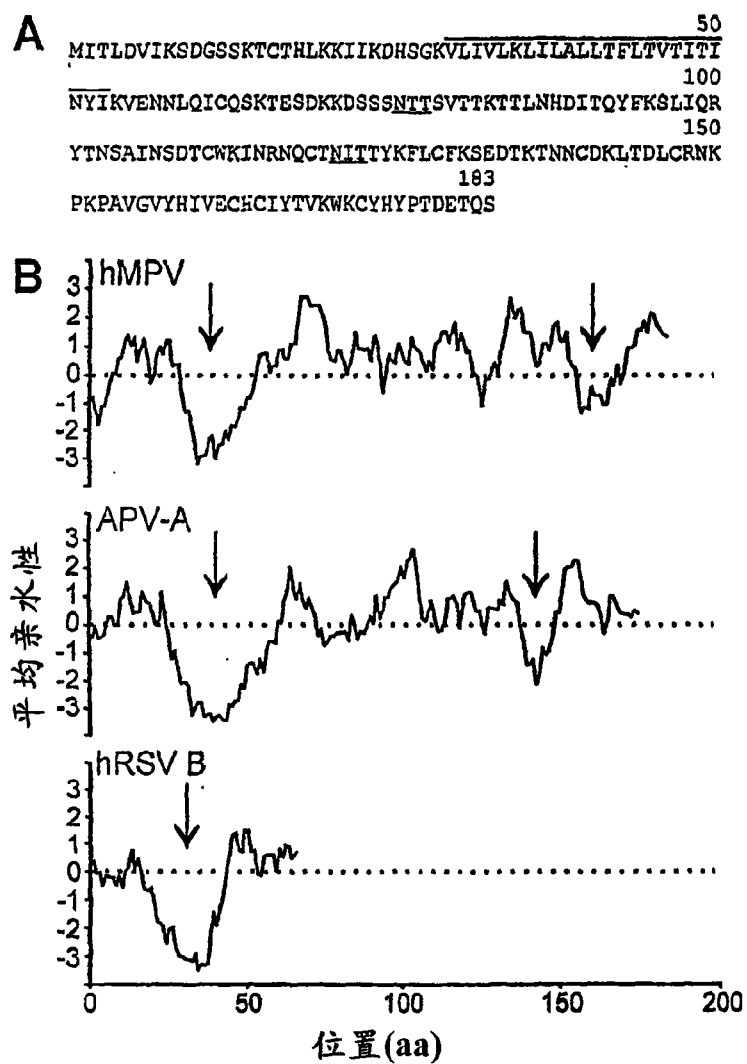


图 13

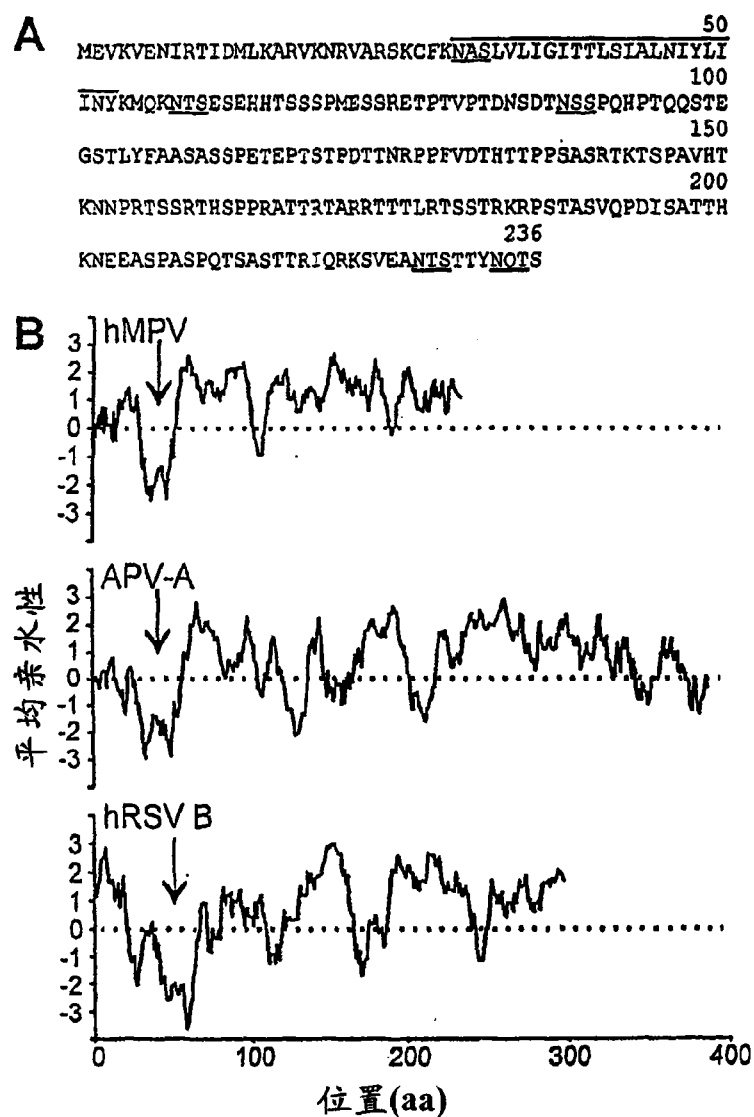


图 14

A 674

HMPV NYIARASIVTDLSEKFNQAEYETTAICADVADLHGTSLEFCWLHLIVPM
 APVASV.....T.SS
 HRSVA ...SKQ...I.....SC..S..L....V....F....AI.H
 HRSVB ...SKQ...I.....SC..S..L....V....S....TI.L
 BRSV ...SKQ...I.....SC..S..L....V....S....TI.F
 HPIV2 FELSAQF.T...A.YCLNW...Q.IIHF.ATLNRMY.VPH..E.I..RLIR
 NDV RRRVATF.T...Q.YCLNW...Q.IKLF.HAINQ.M.LPHF.E.I..RLMD
 SV YETLSQFLT...K.YCLNW...F.S..LFGQRCN.IF.FKTF.N.M.PVLEK
 HPIV3 YETVSCFLT...K.YCLNW...S..LFGTCNQIF.LNK..N...PRLEG
 MV YETVS.F.T...K.YCLNW...ISLF.QRLN.IY.LP.F.Q...KRLET
 NIPAH FDTVS.FLT...K..CLNW...SM..F.ERL..IY.LPGF.N.M.KRLEK

B 723

HMPV TTMICAYRHAPPETKG-EYDIDKIEEQSLYRYHMGGIEGWQCKLWTMEA
 APVAT.....D.G.-I....Q.P.....F.....M....
 HRSVA V.I..T.....YIRDHIV.LNNVD.....I..
 HRSVB V.I..T.....FI.DKVVNLNEVD.....I..
 BRSV A.V..T.....YIRNHIT.LN.VD.....I..
 HPIV2 S.LYVGDPFN..AATD-AF.L..VLNGHIFIVSK-....L..M...IS
 NDV ...FVGDPFN..SDPT-DC.LSRVPNDIYIVSAR....L.....IS
 SV C.IYVGDPYC.VADRM-HRQLODHADSCIFHNPR....Y.....LIS
 HPIV3 S.IYVGDPYC..SD.E-HISLEDHPDSCFYVHNPR....F.....LIS
 MV SVLYVSDP.C..DLDA-HIPLY.VENDQIFIK.P.....Y.....IST
 NIPAH SVIIV.DFNC..NIDK-HMELE.TP.DIIFIH.PK.....YS..T..IAT

C 772

HMPV ISLLDVVSVKTRCQMTSLNGDNQSDVSKFVKLSEG-LDEVKADYSLAV
 APVARN.V.L.....R.TGA-QT.IQ.....I
 HRSVA ...LI.L.GKFSI.A.I.....I....R.M.-QTHAQ...L..L
 HRSVB ...LI.L.GKFSI.A.I.....I....R.I.-QTHAQ...L..L
 BRSV ...LI.L.GKFSI.A.I.....I....I.N.-QTHAQ...L..L
 HPIV2 ..VILS.AESKTRVM.MVQ...A.A.TTR.FR.LPSIQKKELA.AASK
 NDV .AAIQLAARSH.RVPCMVQ...V.A.TRE.RSDDSPENVLTQLHOASD
 SV ..AHLAA.RVGVRVSAHVQ...A.A.TSR.EVAQTYKQKKNHV.EEIT
 HPIV3 ..AHLAA.RIGVRV.AMVQ...A.A.TTR.PNNYDYRIKKEIV.KDV.
 MV .PY.YLAAYESGVRI.P.VQ...T.A.T.R.PSTWFPYNLKKREARVTR
 NIPAH .PE.FLSAYE.NTRIPAI.VQ...E..AITOK.HENLPYKVKKEICAKO.Q

D 822

HMPV KMLKEIRDAYRNIGHKLKEGETYISRDLQFISKVISEGVHPTPIKKIL
 APVA ...TAV...Y.....V.....M..T.....Y.AA...V.
 HRSVA NS..LLYKE.AG.....GT.....M..M..T..HN..YY.AS...V.
 HRSVB NS..LLYKE.AG.....GT.....M..M..T..HN..YY.AS...V.
 BRSV .S..LLYKE.AS.....GT.....M..M..T..HN..YY.AS...V.
 HPIV2 LFERL.ANNYGL..Q..AQ..I..STFFIY..RVFYQ.RILTOAL.NPS
 NDV NFF..LHVNHL...N..DR..IR.DTFFIY..R.FKD.AILSQVL.NSS
 SV RYFGAL.HVMFD...E..LN..I..SKMFIY..R.YYD.KIL.QCL.AIT
 HPIV3 RFFDSL.EVMDOL..E..LN..I..SKMFIY..R.YYD.RIL.QAL.AIS
 MV DYFVIL.QRLHD...H..AN..IV.SHFFVY..G.YYD.LLVQSGL.S.A
 NIPAH LYFERL.MNL.AL..N..AT..I..TH.FIY..K..HYD.AVLSQL.SMS

847

HMPV RVGFWINTILODIKTSAESIGSLCQ
 APVAM.A.....
 HRSVAF.V.L.....T.
 HRSVBF.V.L.....T.
 BRSVF.V.M.....T.
 HPIV2 KLCLTADVLGECTQA.CSNSATTIM
 NDV KLVLVSGDLSNTVM.CAN.A.TVA
 SV .CVF.SE.LV.ENRSACSN.STSIA
 HPIV3 .CVF.SE.VI.ETRSASSNLATSEA
 MV .CVF.SE..V.ETRAACSN.ATTMA
 NIPAH .CCF.SE.LV.ETRSACSN.STTIA

图 15

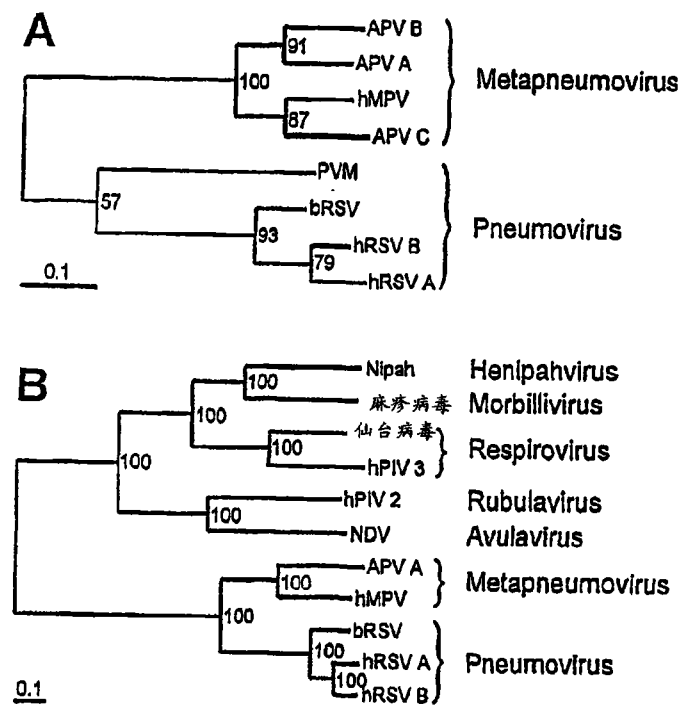


图 16

hnpw Le: 3' UGCUUUUUUUUGCGCAUUAUUUAUCUAGAAGGUUUUUUUUAU-ACCC
|||||
apv Le: 3' UGCUUUUUUUUGCGCA-UAGTUCGCFCAGAGAUUUUUUUUAUTACC

17

两个原型 hMPV 分离株与 APV-A 和 APV-C 的比较

DNA 相似性矩阵

<u>N</u>	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,862	0,757	0,660
99-1	---	1,000	0,757	0,663
APVC	---	---	1,000	0,656
APVA	---	---	---	1,000

<u>P</u>	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,811	0,677	0,588
99-1	---	1,000	0,674	0,593
APVC	---	---	1,000	0,584
APVA	---	---	---	1,000

<u>M</u>	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,865	0,766	0,695
99-1	---	1,000	0,773	0,707
APVC	---	---	1,000	0,705
APVA	---	---	---	1,000

<u>F</u>	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,838	0,706	0,662
99-1	---	1,000	0,716	0,655
APVC	---	---	1,000	0,685
APVA	---	---	---	1,000

<u>M2-1</u>	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,863	0,764	0,668
99-1	---	1,000	0,744	0,657
APVC	---	---	1,000	0,670
APVA	---	---	---	1,000

<u>M2-2</u>	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,861	0,648	0,486
99-1	---	1,000	0,675	0,486
APVC	---	---	1,000	0,463
APVA	---	---	---	1,000

<u>SH</u>	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,688	N.A.	0,421
99-1	---	1,000	N.A.	0,380
APVC	---	---	N.A.	N.A.
APVA	---	---	---	1,000

<u>G</u>	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,543	N.A.	0,262
99-1	---	1,000	N.A.	0,263
APVC	---	---	N.A.	N.A.
APVA	---	---	---	1,000

图 18a

<u>5'L</u>	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,835	N.A.	0,596
99-1	---	1,000	N.A.	0,605
APVC	---	---	N.A.	N.A.
APVA	---	---	---	1,000

5'L： 仅可得到 99-1 的前 1500 个氨基酸残基。
N.A.： 不能得到序列。

图 18b

蛋白质相似性矩阵

<u>N</u> 00-1	99-1	APVC	APVA	
00-1	1,000	0,949	0,880 0,685	
99-1	---	1,000	0,883 0,682	
APVC	---	---	1,000 0,700	
APVA	---	---	---	1,000

<u>P</u> 00-1.	99-1	APVC	APVA	
00-1	1,000	0,860	0,683 0,552	
99-1	---	1,000	0,676 0,549	
APVC	---	---	1,000 0,528	
APVA	---	---	---	1,000

<u>M</u> 00-1	99-1	APVC	APVA	
00-1	1,000	0,976	0,874	0,775
99-1	---	1,000	0,874	0,763
APVC	---	---	1,000	0,775
APVA	---	---	---	1,000

<u>F</u> 00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,938	0,810 0,677
99-1	---	1,000	0,803 0,674
APVC	---	---	1,000 0,719
APVA	---	---	---
			1,000

<u>M2-1</u>	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,946	0,844	0,719
99-1	---	1,000	0,834	0,703
APVC	---	---	1,000	0,704
APVA	---	---	---	1,000

<u>M2-2</u>	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,901	0,563	0,246
99-1	---	1,000	0,577	0,232
APVC	---	---	1,000	0,191
APVA	---	---	---	1,000

<u>SH</u>	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,570	N.A.	0,178
99-1	---	1,000	N.A.	0,162
APVC	---	---	N.A.	N.A.
APVA	---	---	---	1,000

G 00-1	99-1	APVC	APVA	
00-1	1,000	0,326	N.A.	0,094
99-1	---	1,000	N.A.	0,107
APVC	---	---	N.A.	N.A.
APVA	---	---	---	1,000

<u>5'L</u>	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,921	N.A.	0,600
99-1	---	1,000	N.A.	0,594
APVC	---	---	N.A.	N.A.
APVA	---	---	---	1,000

5'L: 仅可得到 99-1 的前 500 个核苷酸。
N.A.: 不能得到序列。

图 19

两个原型 hMPV 分离株的氨基酸序列比对

核蛋白(N)

	10	20	30	40	50	60
00-1	MSLQGIHLS	DL SYKHAIL	KESQYTI	KRDVGTT	AVTPSSL	QQEITLL
99-1	MSLQGIHLS	DL SYKHAIL	KESQYTI	KRDVGTT	AVTPSSL	QQEITLL
	70	80	90	100	110	120
00-1	YAAEIGIQYI	STALGSE	RVQQIL	RNSGSE	VQVVL	TRTYSL
99-1	YAAEIGIQYI	CTALGSE	RVQQIL	RNSGSE	VQVVL	TKTYSL
	130	140	150	160	170	180
00-1	KSWVEEID	KEARKTM	ITLLKE	SSGNIP	QNRPSA	PDTPII
99-1	KSWIEEID	KEARKTM	ITLLKE	SSGNIP	QNRPSA	PDTPII
	190	200	210	220	230	240
00-1	ETTVRRAN	RVLSDA	LKRYPR	MDIPKI	ARSFYD	LFEQKV
99-1	ETTVRRAN	RVLSDA	LKRYPR	IDIPKI	ARSFYE	LFEQKV
	250	260	270	280	290	300
00-1	ESLFEVNI	FMQAYG	AGQTML	RWGVIA	RSSNNI	MLGHVS
99-1	ESLFEVNI	FMQAYG	AGQTLL	RWGVIA	RSSNNI	MLGHVS
	310	320	330	340	350	360
00-1	LLHLRQSP	KAGLLS	LANCPN	FASVVL	GNASGL	GIIGMY
99-1	LLHLRQSP	KAGLLS	LANCPN	FASVVL	GNASGL	GIIGMY
	370	380	390			
00-1	SNKINFSS	LGLTDE	EKEAAE	HFLNVS	DSQND	YE 394
99-1	SNKINFSS	LGLTDE	EKEAAE	HFLNMS	DNQDD	YE 394

图 20

磷蛋白(P)

```

      10      20      30      40      50      60
00-1  ....|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
99-1  MSFPEGKDILFMGNEAAKLAEAFQKSLRKGHGKRSQSIIGKQVNTVSETLELPTISRPAK 60
      70      80      90     100     110     120
00-1  ....|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
99-1  MSFPEGKDILFMGNEAAKIAEAFQKSLKSGHKRTQSIVGEKVNTISETLELPTISKPAR 60
      130     140     150     160     170     180
00-1  ....|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
99-1  PTIPSEPKLAWTDKGGATKTEIKQATKVMDPPIEEEESTEKKVLPSSDGKTPAEKKLKPST 120
      190     200     210     220     230     240
00-1  ....|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
99-1  SSTLLEPKLAWADNSGITKITEKPAKTTDPVEEEETNEKKVLPSSDGKTPAEKKSKFST 120
      250     260     270     280     290
00-1  ....|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
99-1  NTKKKVSFTTNEPGKYTKLEKDALDLLSDNEEEDAESSILTFEERDTSSLSIEARLESIE 180
      190     200     210     220     230     240
00-1  ....|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
99-1  SVTKKKVSFTSNEPGKYTKLEKDALDLLSDNEEEDAESSILTFEEKDTSSLSIEARLESIE 180
      250     260     270     280     290
00-1  ....|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
99-1  EKLSMILGLLRTLNIATAGPTAARDGIRDAMIGVREELIADIIEAKGKAAEMMEEEMSQ 240
      250     260     270     280     290
00-1  ....|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
99-1  EKLSMILGLLRTLNIATAGPTAARDGIRDAMIGIREELIAEIIKEAKGKAAEMMEEEMNQ 240
      250     260     270     280     290
00-1  ....|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
99-1  RSKIGNGSVKLTEKAKELNKIVEDESTSGESEEEEEPKDTQDNSQEDDIYQLIM 294
      250     260     270     280     290
00-1  ....|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
99-1  RSKIGNGSVKLTEKAKELNKIVEDESTSGESEEEEEPKETQDNNOGEDDIYQLIM 294

```

图 21

基质蛋白(M)

	10	20	30	40	50	60	
							
00-1	MESYLVDITYQGIPYTAAVQVDLIEKDLPASLTIWFPLFQANTPPAVLLDQLKTLTITTL						60
99-1	MESYLVDITYQGIPYTAAVQVDLVEKDLPASLTIWFPLFQANTPPAVLLDQLKTLTITTL						60
	70	80	90	100	110	120	
							
00-1	YAASQNGPILKVNASQAAMSVPKKFEVNATVALDEYSKLEFDKLTVCVKTVYLT						120
99-1	YAASQNGPILKVNASQAAMSVPKKFEVNATVALDEYSKLEFDKLTVCVKTVYLT						120
	130	140	150	160	170	180	
							
00-1	KPYGMVSKFVSSAKSVGKKTHDLIALCDFMDLEKNIPVTIPAFIKSVSIKESATVEAA						180
99-1	KPYGMVSKFVSSAKSVGKKTHDLIALCDFMDLEKNIPVTIPAFIKSVSIKESATVEAA						180
	190	200	210	220	230	240	
							
00-1	ISSEADQALTQAKIAPYAGLIMIMTMNPKGIFKKLGAGTQVIVELGAYVQAESISKICK						240
99-1	ISSEADQALTQAKIAPYAGLIMIMTMNPKGIFKKLGAGTQVIVELGAYVQAESISRICK						240
	250						
							
00-1	TWSHQGTRYVLKSR						254
99-1	SWSHQGTRYVLKSR						254

图 22

融合蛋白(F)

```

      10      20      30      40      50      60
00-1  ....|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
99-1  MSWKVVIHESLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTC 60

      70      80      90     100     110     120
00-1  ADGPSLIKTELDTKSALRELRTVSADQLAREEQIENPROSRFVLGAIALGVATAAAVTA 120
99-1  ADGPSLIKTELDTKSALRELKTVSADQLAREEQIENPROSRFVLGAIALGVATAAAVTA 120

     130     140     150     160     170     180
00-1  GVAIAKTIRLESEVNAIKNALKKTNEAVSTLGNQVRLATAVRELKDFVSKNLTSAINKN 180
99-1  GIAIAKTIRLESEVNAIKGALKQTNEAVSTLGNQVRLATAVRELKEFVSKNLTSAINRN 180

     190     200     210     220     230     240
00-1  KCDIADLKMVVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAISLDLMTDAELARAVSNMPTSAGO 240
99-1  KCDIADLKMVVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAISLDLMTDAELARAVSYMPTSAGO 240

     250     260     270     280     290     300
00-1  IKLMLENRAMVRRKGFGFLIGVYGSSVIYMQVLPFVGVIDTPCWIVKAAPSCSGKKNYA 300
99-1  IKLMLENRAMVRRKGFGFLIGVYGSSVIYMQVLPFVGVIDTPCWIKAAPSCSGKKNYA 300

     310     320     330     340     350     360
00-1  CLLREDQGWYCNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYP 360
99-1  CLLREDQGWYCKNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSRECNINISTTNYP 360

     370     380     390     400     410     420
00-1  CKVSTGRHPISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNVVGIIKQLKGCSTYITNQDADTVTI 420
99-1  CKVSTGRHPISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNVVGIIKQLKGCSTYITNQDADTVTI 420

     430     440     450     460     470     480
00-1  DNTVYQLSKVEGEQHVIGRPVSSSFDPVKFPEDQFNVALDQVFESIENSQALVDQSNRI 480
99-1  DNTVYQLSKVEGEQHVIGRPVSSSFDPVKFPEDQFNVALDQVFESIENSQALVDQSNKI 480

     490     500     510     520     530
00-1  LSSAEKGNTGFIIIVILVAVLGSMTMIVSVFIIKKTKKPTGAPPELNGVTNNGFIPHN 539
99-1  LNSAEKGNTGFIIIVILVAVLGSMTMISVSIIIKKTRKPTGAPPELNGVTNNGFIPHS 539

```

图 23

22K 蛋白(M2-1)

```

      10      20      30      40      50      60
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
00-1 MSRKAPCKYEVRGKCNRGSECKFNHNYWSWPDRLIRSNYLLNQLLRNTDRADGLSIIS 60
99-1 MSRKAPCKYEVRGKCNRGSDCKFNHNYWSWPDRLIRSNYLLNQLLRNTDKADGLSIIS 60

      70      80      90     100     110     120
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
00-1 GAGREDRTQDFVLGSTNVVQGYIDDNQSIITKAAACYSYLHNIKQLQETEVQRQARDNKLS 120
99-1 GAGREDRTQDFVLGSTNVVQGYIDDNQGITKAAACYSYLHNIKQLQETEVQRQARDNKLS 120

     130     140     150     160     170     180
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
00-1 SKHVALHNLVLSYMEMSKTPASLINNLKRLPREKLKKLAKLIIDLSAGENDSSYALQDS 180
99-1 SKHVALHNLILSYMEMSKTPASLINNLKRLPREKLKKLARLIIDLSAGENDSSYALQDS 180

    ....|..
00-1 ESTNQVQ 187
99-1 ESTNQVQ 187

```

图 24

M2-2 蛋白(M2-2)

```

      10      20      30      40      50      60
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
00-1 MTLHMPCKTVKALIKCSEHGPFVITIEVDDMIWTHKDLKEALSDGIVKSHTNIYNCYLEN 60
99-1 MTLHMPCKTVKALIKCSKHGPKFITIEVDDMIWTHKELKEALSDGIVKSHTNIYSCYLEN 60

      70
    ....|....|..
00-1 IEIIYVKAYLS 71
99-1 IEIIYVKIYLS 71

```

图 25

短疏水性蛋白(SH)

	10	20	30	40	50	60																																																							
00-1																																																													
	M	I	T	L	D	V	I	K	S	D	G	S	S	K	T	C	T	H	L	K	K	I	I	K	D	H	S	G	K	V	L	I	L	K	L	I	L	A	L	L	T	F	F	T	V	T	I	T	I	N	Y	I	K	V	E	N	N	L	Q	60	
99-1	M	K	T	L	D	V	I	K	S	D	G	S	S	E	T	C	N	Q	L	K	K	I	I	K	K	H	S	G	K	V	L	I	L	K	L	I	L	A	L	L	T	F	F	T	A	T	I	T	V	N	Y	I	K	V	E	N	N	L	Q	60	
	70	80	90	100	110	120																																																							
00-1																																																													
	I	C	Q	S	K	T	E	S	D	K	K	D	S	S	N	T	T	S	V	T	T	K	T	T	L	N	H	D	I	T	O	Y	E	K	S	L	I	Q	R	Y	T	N	S	A	I	N	-	S	D	T	C	W	K	I	N	R	N	Q	119		
99-1	A	C	Q	P	K	N	E	S	D	K	K	V	T	K	P	N	T	T	S	T	T	I	R	P	T	E	D	P	I	V	V	H	L	K	E	L	I	Q	R	H	T	N	S	V	T	K	D	S	D	T	C	W	R	I	H	K	N	Q	120		
	130	140	150	160	170	180																																																							
00-1																																																													
	T	N	I	T	T	Y	K	F	L	C	E	K	S	E	D	I	K	T	N	N	C	D	K	L	T	D	L	C	R	N	K	P	R	P	A	V	G	V	Y	H	I	V	E	C	H	C	I	Y	T	V	K	W	K	C	Y	H	Y	P	T	D	179
99-1	T	N	I	K	I	Y	K	F	L	C	S	G	F	T	N	S	K	G	T	D	C	E	E	P	T	A	L	C	D	K	K	L	K	T	I	V	E	K	H	R	K	A	E	C	H	C	L	H	T	E	W	G	C	L	H	P	---	177			
00-1																																																													
	E	T	Q	S	183																																																								
99-1	----																																																												
	177																																																												

图 26

吸附糖蛋白(G)

	10	20	30	40	50	60																																																						
00-1																																																												
	M	E	V	K	V	E	N	I	R	T	I	D	M	L	K	A	R	V	K	N	R	V	A	R	S	K	C	F	K	N	A	S	L	V	L	I	G	I	T	L	S	I	A	L	N	I	Y	L	I	N	Y	K	M	Q	K	N	T	S	60	
99-1	M	E	V	R	V	E	N	I	R	A	I	D	M	L	K	A	K	I	K	N	R	I	R	S	S	R	C	Y	R	N	A	T	L	I	L	I	G	L	T	A	L	S	M	A	L	N	I	F	L	I	D	H	A	T	L	R	N	M	I	60
	70	80	90	100	110	120																																																						
00-1																																																												
	E	S	E	H	T	S	S	S	P	M	E	S	S	R	E	T	P	T	V	P	T	O	N	S	D	T	N	S	S	P	Q	H	P	T	Q	O	S	T	E	G	S	T	L	Y	E	A	A	S	A	S	S	E	E	T	E	F	T	S	T	120
99-1	K	T	E	N	C	A	N	M	P	S	A	E	P	S	K	K	T	P	M	T	S	T	A	G	E	N	T	K	E	N	P	Q	A	T	Q	T	T	E	N	S	T	S	P	V	A	T	P	E	G	H	P	Y	T	G	T	T	Q	T	120	
	130	140	150	160	170	180																																																						
00-1																																																												
	P	D	T	T	N	R	P	P	F	V	D	T	H	T	P	P	S	A	S	R	T	K	T	S	P	A	V	H	T	K	N	N	R	T	S	S	R	T	H	S	P	P	R	A	T	T	R	T	A	R	R	T	T	L	R	T	S	180		
99-1	S	D	T	T	A	P	Q	O	T	T	D	K	H	T	A	P	L	K	S	T	N	E	O	I	T	O	T	T	T	E	K	K	T	I	R	A	T	T	O	K	R	E	K	G	K	E	N	T	O	T	T	S	T	A	A	T	O	T	180	
	190	200	210	220	230																																																							
00-1																																																												
	S	T	R	K	R	P	S	T	A	S	V	Q	P	D	I	S	A	T	T	H	K	N	E	E	A	S	P	A	S	P	Q	T	S	A	S	T	T	R	I	Q	R	K	S	V	E	A	N	T	S	T	T	Y	N	Q	T	S	236			
99-1	N	T	T	N	Q	I	R	N	A	S	E	T	-----	I	T	T	S	D	R	P	R	T	D	T	T	T	Q	S	S	E	Q	T	T	R	A	T	D	P	S	S	P	P	H	A	-----	224														

图 27

聚合酶蛋白(L)的 N 末端

	10	20	30	40	50	60	
00-1	MDP	IN	ESTVN	VYLP	DSY	LKGVIS	FSETNAIGSCLLKRPYLKNDNTAKVAIENPVIEHVRL 60
99-1	MDF	EC	ESTVN	VYLP	DSY	LKGVIS	FSETNAIGSCLLKRPYLKNDNTAKVAIENPVIEHVRL 60
	70	80	90	100	110	120	
00-1	KNAV	NS	KMKIS	SDYK	IVEP	VNMQ	HEIMKNVHSCELTLLKQFLTRSKNISTLKLNMICDWLQ 120
99-1	RNAV	TK	KMKIS	SDYK	VVEP	VNMQ	HEIMKNIHSCELTLLKQFLTRSKNISSSLKLNMICDWLQ 120
	130	140	150	160	170	180	
00-1	LKST	SDDT	SILS	FIDV	EFIP	SWVSN	WFSNWYNLNLKLEFRKEEVIRTGSILCRSLGKLV 180
99-1	LKST	SDDT	SILS	FIDV	EFIP	SWVSN	WFSNWYNLNLKLEFRKEEVIRTGSILCRSLGKLV 180
	190	200	210	220	230	240	
00-1	FVV	SSYG	CIVK	SNKSK	RVSF	FTYN	QLLTWKDVMLSRFNANFCIWVSNSLNENQEGGLGRLS 240
99-1	FIV	SSYG	CVVK	SNKSK	RVSF	FTYN	QLLTWKDVMLSRFNANFCIWVSNNLNKNQEGGLGRLS 240
	250	260	270	280	290	300	
00-1	NLQ	GILT	NKLY	ETVD	YMLSL	CCNEG	FSLVKEFEFGFIMSEILRITEHAQFSTRFRNTLLNG 300
99-1	NLQ	GILT	NKLY	ETVD	YMLSL	CCNEG	FSLVKEFEFGFIMSEILRITEHAQFSTRFRNTLLNG 300
	310	320	330	340	350	360	
00-1	LTD	QLT	KLK	KNR	SRV	IGT	VLENNDYPMYEVVLKLLGDTLRSIKLLINKNLNAAELYI 360
99-1	LTE	QLS	VLK	AKNR	SRV	IGT	VLENNDYPMYEVVLKLLGDTLRSIKLLINKNLNAAELYI 360
	370	380	390	400	410	420	
00-1	FRIF	GH	PMV	DER	DAM	DAV	KLNNETIKILRDES
99-1	FRIF	GH	PMV	DER	DAM	DAV	KLNNETIKILRDES
	430	440	450	460	470	480	
00-1	LKVL	SKRW	MYF	KA	SYPS	QLELS	QDFLELA
99-1	LKVL	SKRW	MYF	KA	SYPS	QLELS	QDFLELA
	490						
00-1	KRLI	WSV	YPK	NYL	PE	IKN	499
99-1	KKLI	WSV	YPK	NYL	PE	IKN	499

图 28

+ = 阳性; - = 阴性; T = 喉拭抹物; NO = 鼻拭抹物; T = 未作; ? = 不确定; D = 死亡; 0-12: 感染后的天数。仅对鼻拭抹物测试了第二次感染。

nr	第一次 感染	拭抹物	0	1	2	3	4	5	8	10	11	12	第二次感染	0	1	2	3	4	5
1	00-1	T	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	99-1	N	N	N	N	N	N
		NO	-	+	+	+	+	+	N	+	-	-		-	-	-	-	-	-
2	00-1	T	-	+	+	+	+	+	-	-	-	D		N	N	N	N	N	N
		NO		+	+	+	+	+	N	+	-	D		-	-	-	-	-	-
3	00-1	T	-	-	?	-	-	-	-	-	-	N	99-1	N	N	?	N	N	N
		NO		+	?	?		-	N	-	-	-		-	-	?	+	+	-
4	00-1	T	-	+	+	+	+	+	-	?	-	N	00-1	N	N	N	N	N	N
		NO	-	+	+	+	+	+	N	?	-	-		-	-	-	+	-	-
5	00-1	T	-	?	+	+	+	+	+	+	-	N	00-1	N	N	N	N	N	N
		NO		+	+	+	+	+	N	+	-	-		-	-	-	-	-	-
6	00-1	T	-	-	+	+	+	+	-	+	-	N	00-1	N	N	N	N	N	N
		NO	-	+	+	+	+	+	N	+	+	?		-	-	-	-	-	-
7	99-1	T	-	-	-	+	+	-	+	D	-	-		N	N	N	N	N	N
		NO	-	-	-	+	+	+	N	D	-	-		-	-	-	-	-	-
8	99-1	T	-	-	+	+	-	-	-	-	-	N	00-1	N	N	N	N	N	N
		NO	-	?	-	+	+	?	N	-	-	-		-	-	+	+	+	+
9	99-1	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	00-1	N	N	N	N	N	N
		NO	-	-	-	-	+	+	N	-	-	-		-	?	+	+	-	-
10	99-1	T	-	-	-	+	+	-	-	-	-	N	99-1	N	N	N	N	N	N
		NO	-	+	+	+	+	+	N	-	-	-		-	-	-	-	-	-
11	99-1	T	-	-	+	+	+	-	-	-	-	N	99-1	N	N	N	N	N	N
		NO	-	+	?	+	+	+	N	-	-	-		-	-	-	+	-	-
12	99-1	T	-	-	+	+	?	-	-	-	-	N	99-1	N	N	N	N	N	N
		NO	-	+	+	+	+	+	N	-	-	-		-	-	-	-	-	-

图 29

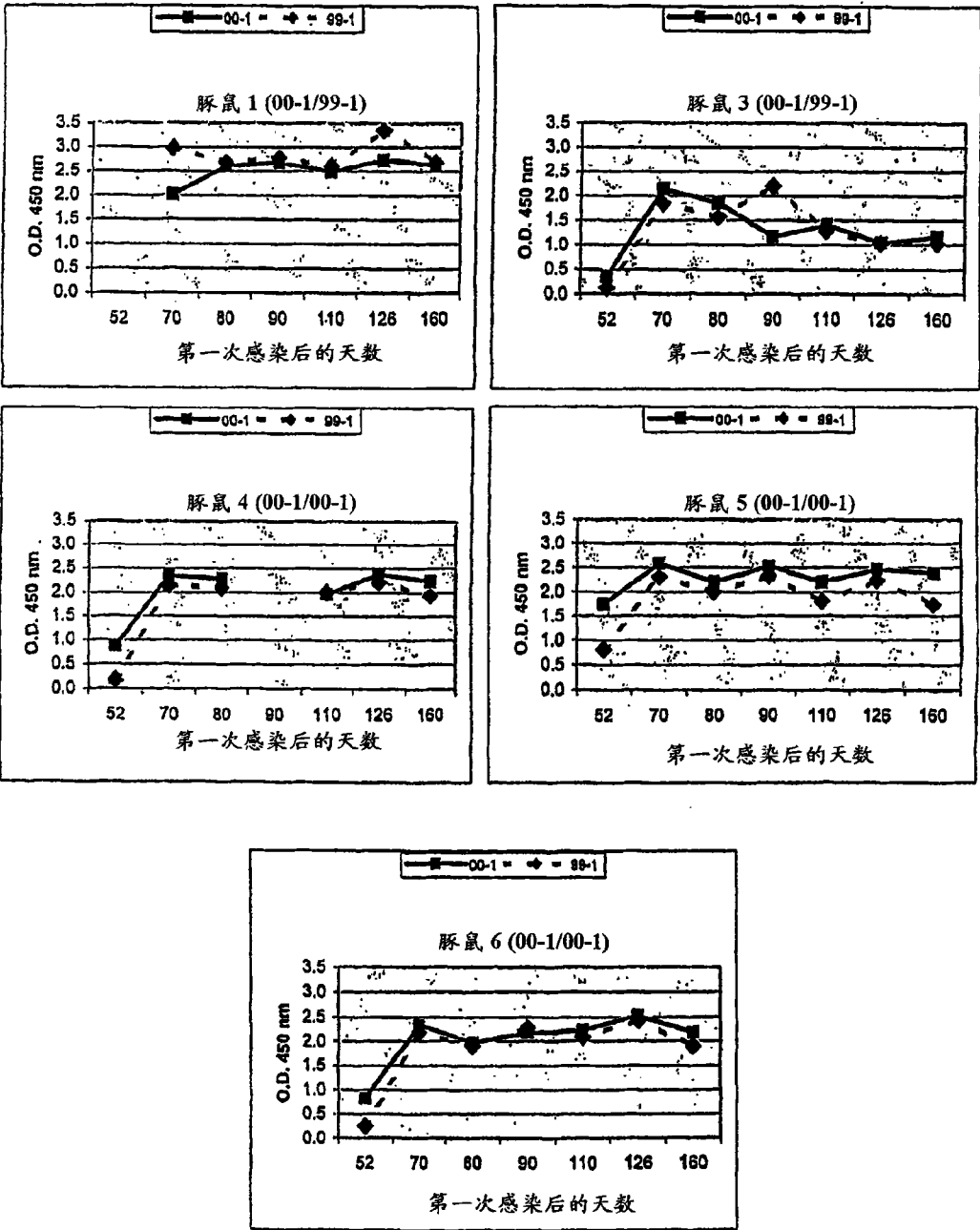


图 30A

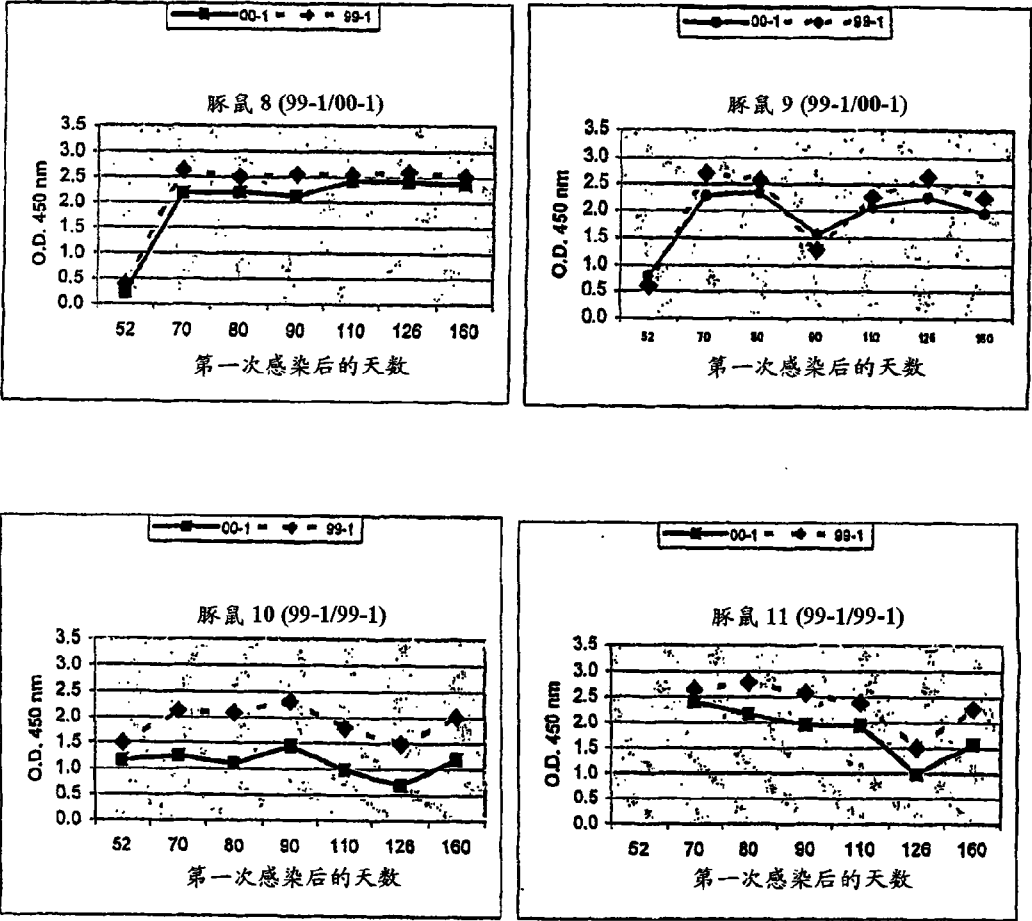


图 30B

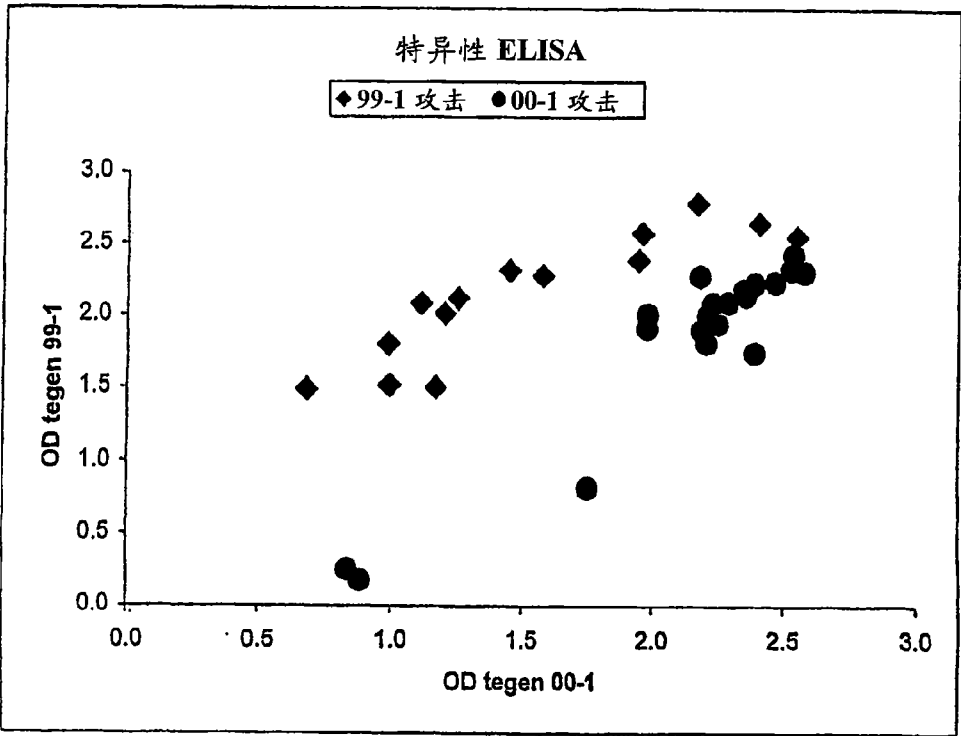


图 31

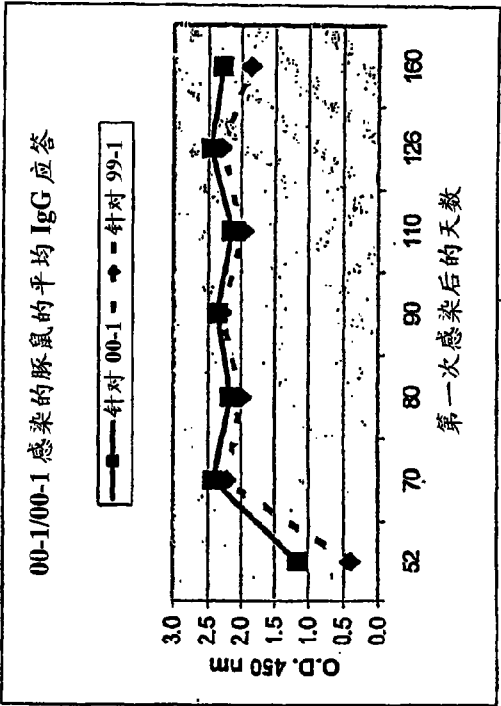
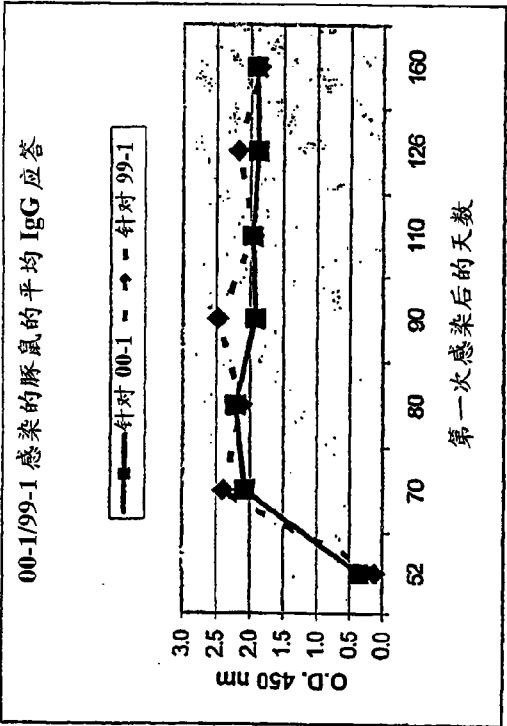
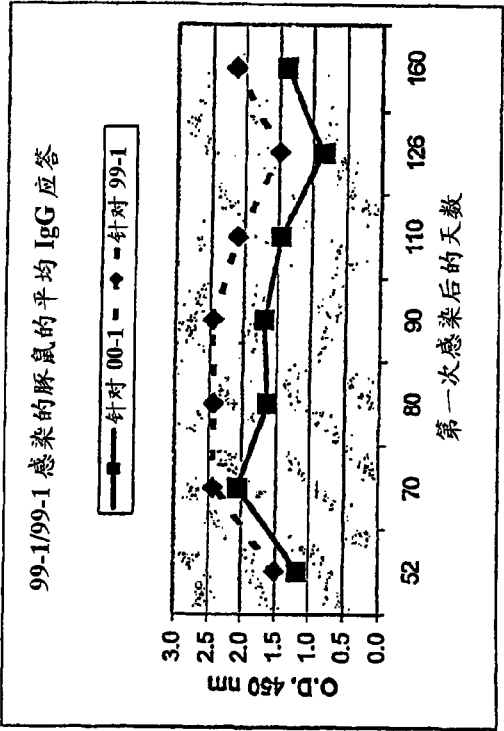
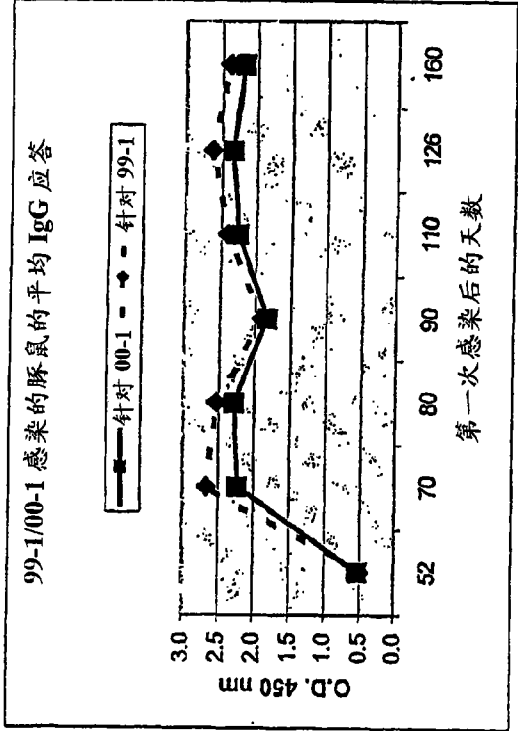


图 32

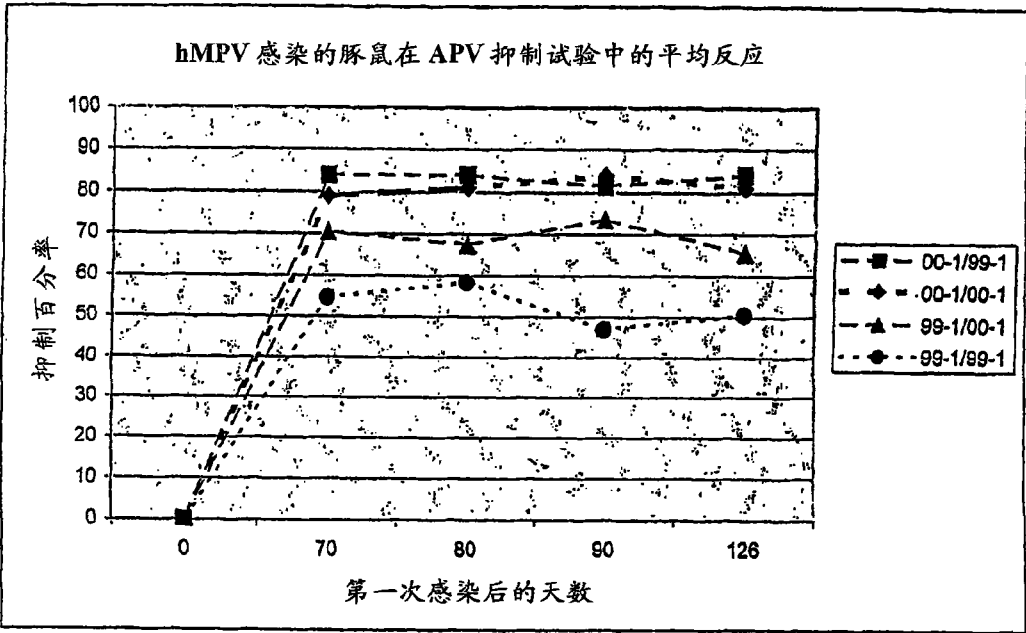


图 33

	针对 00-1	针对 99-1	针对 APV-C
用 00-1 感染 1 次			
用 00-1 感染 2 次			
用 99-1 感染 1 次			
用 00-1 感染 2 次			

图 34

+ = 阳性; - = 阴性; N = 未作; ? = 不确定; 0-10: 感染后的天数

nr	第一次感染	0	2	3	4	5	6	7	8	9	11	第二次感染	0	1	2	3	4	5	7	10
3	00-1	-	-	-	+	+	+	+	+	N	-		-	+	+	+	+	-	?	-
6	00-1	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-		-	+	+	+	+	+	-	-

图 35

图 36A

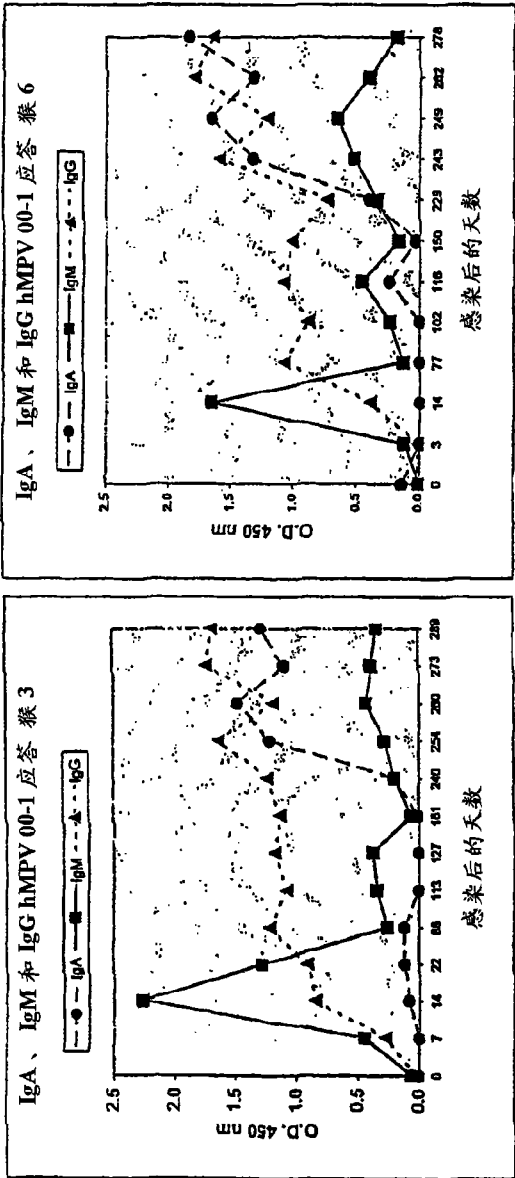
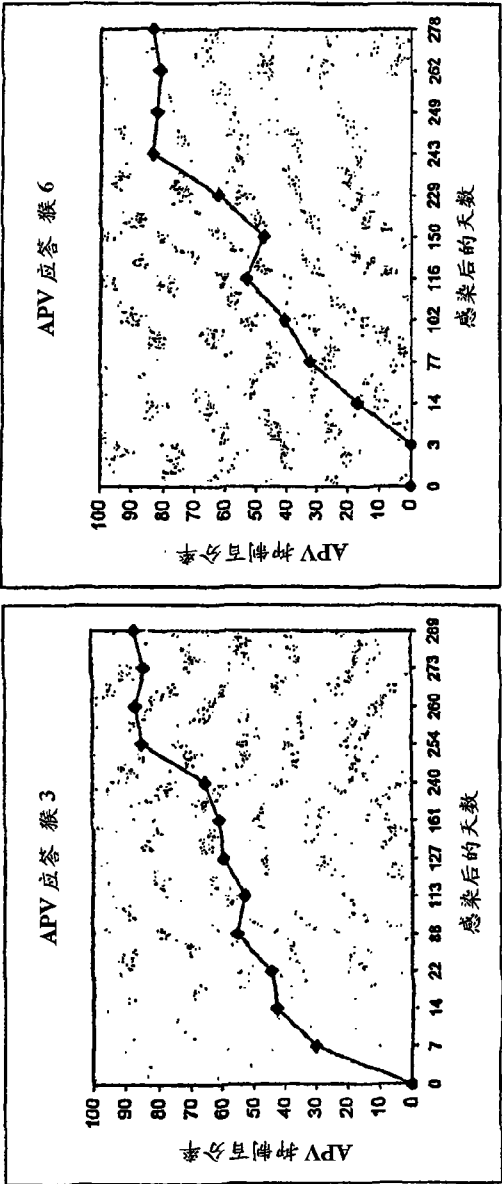


图 36B



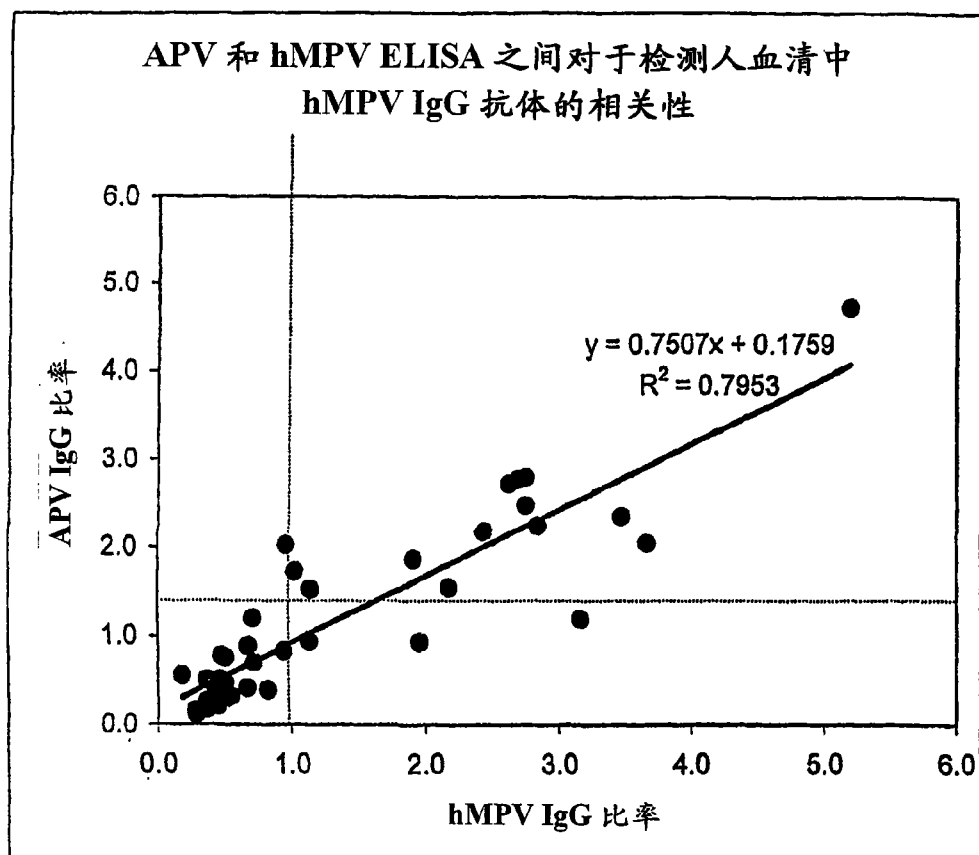


图 37