

浙江省丽水地区 2 株汉坦病毒分离株的 型别鉴定和基因差异研究

姚萃萃 朱函坪 徐芳 王志刚 梅玲玲 雷永良 谢荣辉 王复魁
朱智勇 邓小昭 张云

【摘要】 目的 从浙江省丽水地区肾综合征出血热(HFRS)疫区阳性鼠肺标本中分离汉坦病毒(HV),并对丽水分离株进行分子生物学鉴定,分析M和S片段基因序列以确定毒株的型别和基因差异程度。方法 收集宿主动物标本,采用直接免疫荧光检测鼠肺标本HV抗原。将HV抗原阳性的鼠肺标本接种Vero-E6细胞,分离HV。提取病毒总RNA,应用反转录聚合酶链反应(RT-PCR)扩增病毒M和S基因全片段,克隆入质粒载体,纯化后测定序列,并同HV其他病毒株进行比较。结果 成功分离到2株HV,扩增出2株病毒的M和S全片段并测定了序列,经对核苷酸序列分析表明,2株病毒与现有的HTNV有最高的同源性,均为HTNV,但与国内外其他的HTNV核苷酸差异高达13.4%~20.7%和10.3%~16.1%。用M和S片段核苷酸序列所构建的系统进化树显示,2毒株分在HTNV发生群,与HTNV的Z10、A9、Z5病毒株亲缘关系最近,但独自构成一进化支。结论 浙江丽水分离株可以定型为HTN型病毒,与国内外其他的HTN型病毒基因差异较大。

【关键词】 肾综合征出血热; 汉坦病毒; 基因型; 系统发生分析

Study on the difference of genes and the type identification of hantavirus from Lishui, Zhejiang province
YAO Ping-ping*, ZHU Han-ping, XU Fang, WANG Zhi-gang, MEI Ling-ling, LEI Yong-liang, XIE Rong-hui,
WANG Fu-su, ZHU Zhi-yong, DENG Xiao-zhao, ZHANG Yun. *Zhejiang Center for Disease Control and
Prevention, Hangzhou 310051, China

【Abstract】 **Objective** To isolate hantavirus from Lishui county — one of the epidemic regions for hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS), in Zhejiang province, and to identify the serotype and molecular/biological characteristics of a new HTN subtype hantavirus (HV) strains, hopefully to provide evidence for HFRS prevention and therapy. **Methods** Data on the host animals was collected from Lishui, Zhejiang province in 2007. Direct immunofluorescence assay was adopted to determine HFRS antigens and the lung tissues from HV infected Vero-E6 cells for HV isolation, then total RNA was extracted from Hantavirus Lishui strains and amplified by RT-PCR. M, S segments of strains genome were also cloned and sequenced and compared with those of other strains of HV. **Results** 2 strains virus (ZLS6-11 and ZLS-12) were successfully isolated from 7 positive lung samples of mice and were identified as HTNV by anti-McAb and phylogenetic analysis. With sequence comparison, we found that 2 strains with complete M and S segment had higher homology with HTN-type strains than with other types of HV, but 13.4%–20.7% and 10.3%–16.1% of the genes were found which were different from HTNV. The phylogenetic trees constructed by complete S and M segment showed that ZLS6-11 and ZLS-12 strains were located in HTNV group, and structured independent embranchment. **Conclusion** ZLS6-11 and ZLS-12 Strains were believed to belong to HTN-type and phylogenetically different from the HTNV.

【Key words】 Hemorrhagic fever with renal syndrome; Hantavirus; Genotype; Phylogenetic analysis

汉坦病毒(HV)属于布尼亚病毒科汉坦病毒属,基因结构分为大(L)、中(M)、小(S)3个片段,分别

编码病毒的RNA聚合酶、糖蛋白(GP)G1和G2以及核衣壳蛋白(NP)^[1]。HV的宿主是啮齿类动物,传播给人类后导致肾综合征出血热(HFRS)和汉坦病毒肺综合征(HPS)。HFRS的病原主要有汉滩型(HTN)、汉城型(SEO)、多布拉型(DOB)、普马拉型(PUU)等^[2,3];我国是HFRS流行的主要地区,以HTN型和SEO型病毒为主要流行株;HTNV可分为9个亚型,SEOV可分为4~6个亚型^[1]。丽水市为HFRS

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.02.019

基金项目:国家“863”科技攻关计划资助项目(2007AA02Z465);全军“十一五”科技攻关计划资助项目(06G65)

作者单位:310051 杭州,浙江省疾病预防控制中心(姚萃萃、朱函坪、徐芳、王志刚、梅玲玲、谢荣辉、王复魁、朱智勇);浙江省丽水市疾病预防控制中心(雷永良);南京军区军事医学研究所(邓小昭、张云)

疫区,近年来宿主动物带病毒率居高不下,由于不同血清型/基因型的 HV 有着不同的原始宿主,其防控措施及对人类的致病性也各有不同,因此于 2007 年对该地区的啮齿类动物进行抗原检测,将分离到的 HV 应用 PCR 方法克隆病毒株的 M 和 S 全片段的基因,并进行基因序列比较分析。

材料与方法

1. 主要试剂:HV 直接荧光血清为本实验室制备;Vero-E6 细胞引进自中国药品生物制品检定所出血热室;HV 单克隆荧光血清抗体购自第四军医大学;RNA 提取试剂盒 Rneasy Mini Kit 购自美国 Qiagen 公司;克隆载体、T4 连接酶、RT-PCR 相关试剂、Agrose 胶纯化试剂盒及质粒 DNA 纯化试剂盒购自日本 TaKaRa 中国分公司。

2. 鼠肺标本:在丽水地区 HFRS 监测点,采用 5 m 夹夜法捕鼠,晚放晨取,将捕获的鼠类经分类鉴定和登记后,无菌解剖采集鼠肺标本,共采集 136 份。

3. 抗原检测:采用直接免疫荧光法(FAT)。将采集的鼠肺标本在无菌条件下分切,制成 4~10 μm 厚的冷冻切片,丙酮固定 10 min 后吹干。玻片上滴加用伊文思兰-PBS 稀释的 HV 直接荧光血清 15 μl/孔,置湿盒内 37℃ 水浴 50 min。反应后的玻片用 pH 值 7.2 0.01 mol/L PBS 振荡轻洗 3 次,每次 3~5 min,吹干,封片,荧光显微镜观察结果。

4. HV 分离:将 HV 抗原阳性的鼠肺标本用生理盐水冲洗 2 次后,每份加 4~5 ml PBS,用组织研磨器研磨,2000 r/min 离心 15 min,取上清液无菌过滤,接种长成单层的 Vero-E6 细胞,3 d 后换液,8~10 d 刮取少量细胞,FAT 检查细胞感染 HV 情况,阴性的盲传 3 代。

5. HV 单克隆抗体分型:分离到的 HV 利用 HV 单克隆荧光血清抗体,采用 FAT 鉴定病毒型别:刮取少量 HV 感染的 Vero-E6 细胞,滴加到 12 孔的载玻片上,风干后丙酮固定 10 min 吹干,分别滴加 HTN 型、SEO 型 HV 单克隆荧光抗体,37℃ 水浴 50 min,经荧光显微镜检查来确定型别。

6. 引物的设计与合成:参考已知汉坦病毒株 S 片段和 M 片段核苷酸序列,自行设计并合成反转录引物 P1:5'-TAG TAG TAG ACT CC-3' 和用于扩增 M 片段的一对引物 M1:5'-TAG TAG TAG ACT CCG CAA AAG-3', M2:5'-TAG TAG TAG ACT CCG CAA GAT-3'; 扩增 S 片段的一对引物 S1:5'-TAG TAG TAG ACT CCC TAA AGA-3', S2:5'-

AAG TAG TAG TAT GCT CCC TAA-3', 引物由上海生物工程公司合成。

7. 病毒 RNA 的提取和 RT-PCR:按 Qiagen 公司的 RNA 提取试剂盒操作说明进行病毒 RNA 提取。在引物 P1 和 M-MLV 反转录酶作用下合成 cDNA,然后分别用 S1、S2 和 M1、M2 进行 PCR 扩增。S 基因扩增的条件为 95℃ 180 s, 94℃ 60 s, 55℃ 60 s, 72℃ 90 s, 30 个循环, 72℃ 延长 10 min; M 基因扩增的条件为 95℃ 180 s, 94℃ 60 s, 55℃ 60 s, 72℃ 180 s, 30 个循环, 72℃ 延长 10 min。

8. PCR 产物的克隆及筛选:用 Agrose 胶提取试剂盒分别提取 S、M 基因的扩增片段,克隆入 pMD19-T 质粒载体,转化 *E.coli* DH5α,涂布于含氨苄西林、X-gal 和 IPTG 的固体培养基平板上,蓝白斑筛选重组菌,碱法提取质粒。

9. 核苷酸序列测定和分析:核苷酸序列测定委托上海生物工程公司完成,将测定的序列结果应用 DNA Star 软件(SeqMan)进行拼接,得到全长 S、M 基因的核苷酸序列,应用 MEGA 4.0 和 DNA STAR 软件包进行系统发生分析,以邻位相连法(NJ)构建系统发生树,确定病毒的型别和基因差异程度。分析采用 1000 多个序列组。用于比较分析的 HV 序列来自于 GenBank,见表 1。

结 果

1. 鼠种构成:共捕获鼠形动物 136 只,分 7 个鼠种,褐家鼠、黑线姬鼠、黄胸鼠、黄毛鼠、臭鼯鼠、沟鼠、刺毛灰鼠,以黑线姬鼠为优势鼠种。

2. HV 抗原检测:鼠肺标本冷冻切片做直接免疫荧光检测 HV 抗原 136 份,阳性 7 份,阳性率为 5.14%;7 份病毒抗原阳性的鼠肺标本,其中 6 份来自黑线姬鼠,1 份来自沟鼠。

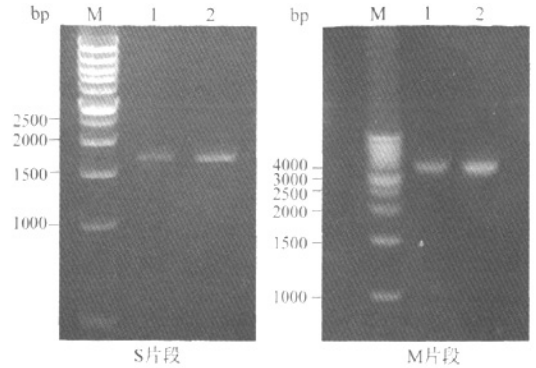
3. HV 分离:取丽水的 7 份 HV 抗原阳性的鼠肺标本研磨、离心、过滤后接种长成单层的 Vero-E6 细胞,经盲传后成功分离到 2 株病毒,命名为 ZLS6-11 和 ZLS-12,均从室外的黑线姬鼠的鼠肺标本分离得到。

4. HV 单克隆抗体分型:分离到的 2 株 HV 利用 HV 单克隆荧光血清抗体,采用 FAT 鉴定病毒型别,结果 2 株病毒均为 HTN 型。

5. HV 的 RT-PCR:采用 RT-PCR 方法,从病毒细胞培养物提取 RNA,经 PCR 扩增,分别获得了 3616 bp(M)和 1700 bp(S)大小的片段(图 1),与预计的扩增片段大小一致,将这 2 个片段分别克隆到

表 1 研究中用于系统发生分析毒株及来源

HVN 型	毒株	宿主	来源	地区	GenBank	
					M	S
HTNV	76-118	黑线姬鼠	韩国		M14627	M14626
	Bao14	黑线姬鼠	中国	黑龙江	AB127995	AB127998
	Q32	黑线姬鼠	中国	贵州	DQ371905	AB027097
	Z10	人	中国	浙江	AF276987	AF184987
	A9	黑线姬鼠	中国	江苏	AF035831	AF329390
	Liu	人	中国	山东	AF288648	AF288649
	cl-1	-	日本	-	D25529	D25530
	cl-2	-	日本	-	D25532	D25533
	LR1	-	中国	-	AF288293	AF288294
	SN7	社鼠	中国	四川	AF288656	AF288657
	A16	黑线姬鼠	中国	陕西	AF288645	AF288646
	Z5	黑线姬鼠	中国	浙江	EU074224	EF103195
	84FLi	人	中国	陕西	AF345636	AY017064
	TJJ16	社鼠	中国	天津	EU074672	AY839871
	JilinAP06	大林姬鼠	中国	吉林	EF371454	EF121324
	SC-1	大林姬鼠	韩国	-	AY675353	AY675349
	B78	人	中国	山东	AB127994	AB127997
SEOV	Gou3	褐家鼠	中国	浙江	AF145977	AF184988
	ZT71	褐家鼠	中国	浙江	EF117248	AY750171
	L99	罗赛鼠	中国	江西	AF035833	AF488708
	R22	褐家鼠	中国	河南	S68035	AF488707
	80-39	褐家鼠	韩国	-	S47716	AY273791
	BjHD01	-	中国	-	DQ133505	AY627049
	ZT10	东方田鼠	中国	浙江	DQ159911	AY766368
	K24-v2	-	中国	浙江	AF288654	AF288655
	K24-e7	-	中国	浙江	AF288652	AF288653
	SR-11	褐家鼠	日本	-	M34882	M34881
	Z37	褐家鼠	中国	浙江	AF190119	AF187082
DOBV	Dobrava	黄吼姬鼠	斯洛文尼亚	-	L33685	L41916
PUUV	P360	棕背鼯	俄罗斯	-	L08755	L11347
SNV	NMR-11	鹿鼠	美国	-	NC005228	NC005227
KBRV	MF-43	东方田鼠	俄罗斯	-	AJ011648	U35255



注: M: DNA 标准分子质量; 1: ZLS6-11 PCR 扩增产物; 2: ZLS-12 PCR 扩增产物

图 1 ZLS6-11、ZLS-12 的 S 片段和 M 片段 PCR 扩增条带

低,为 56.9% ~ 70.4%。

8. ZLS6-11 和 ZLS-12 毒株 S 片段同源性分析: ZLS6-11 和 ZLS-12 毒株 S 全片段的核苷酸序列同源性为 99.8%,与 HTNV 国际标准株 76-118 株的同源性为 86.9%,与 HTNV 的同源性为 83.9% ~ 89.7%,与 SEOV 的同源性为 72.7% ~ 74.0%,与 HV 其他各型代表株的同源性更低,为 48.6% ~ 60.6%。

S 片段同源性分析支持 M 片段分析的结果。从 M 和 S 片段分析可以确定 ZLS6-11 和 ZLS-12 毒株为 HTNV,但是与 HTNV 基因存在较大差异。

9. 系统发生分析: 用 M 和 S 全片段核苷酸序列构建的进化树见图 2 和图 3。ZLS6-11 和 ZLS-12 分在 HTNV 发生群,但独自构成一进化支,与 Z10、Z5、A9 病毒株的同源性最高,分别为 86.2% ~ 86.6% 和 89.1% ~ 89.7%,在系统发生树上亲缘关系最近。S 片段与 SN7、84FLi 亲缘关系较近,同源性较高,为 89.0% ~ 89.2%。

2 株病毒 M 和 S 全片段核苷酸序列构建的进化树显示相一致,ZLS6-11 和 ZLS-12 病毒为 HTNV,但与国内外其他 HTNV 基因存在较大的差异,M 和 S 片段核苷酸差异为 13.4% ~ 20.7% 和 10.3% ~ 16.1%。

讨 论

丽水地区属浙江省的偏远山林地区,为浙江省 HFRS 疫区,2007 年浙江省 HFRS 监测点宿主动物带毒率为 2.9%,而丽水地区宿主动物带毒率高达 5.14%,为 HFRS 在该区暴发及流行埋下隐患。鉴于此,为了更好地了解丽水地区啮齿类宿主动物中 HV 流行的类型,2007 年对该地区的 HV 抗原阳性的鼠肺标本进行了病毒分离、基因分型及系统发生分

pMD19-T 载体,并测定其序列。

6. ZLS6-11 和 ZLS-12 毒株 M 和 S 片段全长基因序列: ZLS6-11 和 ZLS-12 株的 M 片段的全基因序列均为 3616 个核苷酸,最大读码框架均从 41 到 3448,均编码 1136 个氨基酸;S 片段的全基因序列均为 1700 个核苷酸,最大读码框架均从 37 到 1326,均编码 430 个氨基酸。

7. ZLS6-11 和 ZLS-12 毒株 M 片段同源性分析: ZLS6-11 和 ZLS-12 毒株 M 全片段的核苷酸序列同源性为 99.8%,与 HTNV 国际标准株 76-118 株的同源性为 84.0% ~ 84.1%,与 HTNV 浙江分离株 Z10 和 Z5 株的同源性为 86.5% ~ 86.6%,与 HTNV 的同源性为 79.3% ~ 86.6%,与 SEOV 的同源性为 70.5% ~ 71.5%,与 HV 其他各型代表株的同源性更

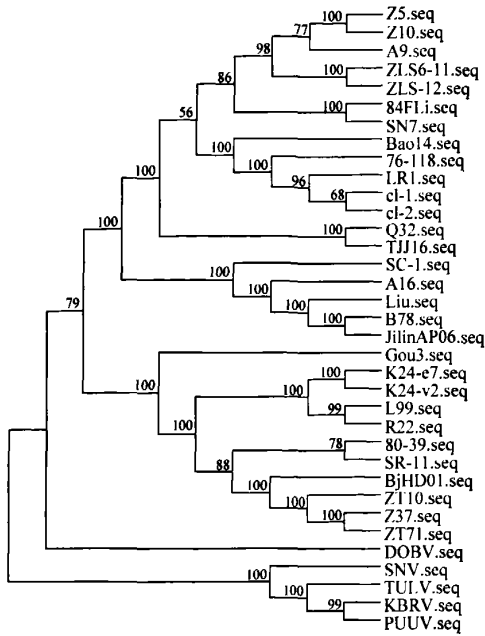


图2 ZLS6-11和ZLS-12株M片段核苷酸系统发生树

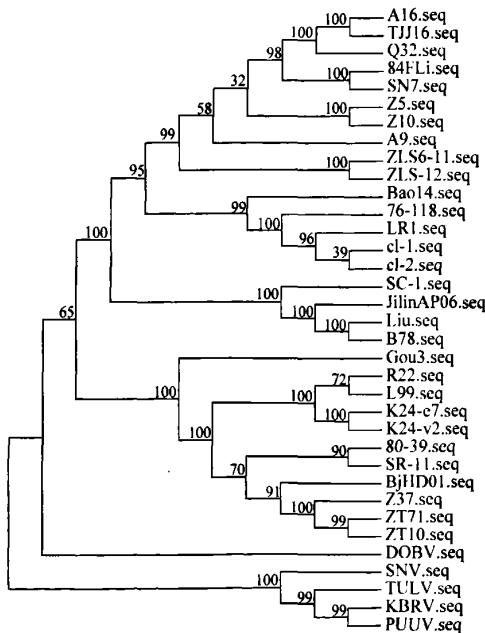


图3 ZLS6-11和ZLS-12株S片段核苷酸系统发生树

析。结果ZLS6-11和ZLS-12株M和S片段序列,与已报告的HV各型代表株的M和S全片段序列进行了比较分析,证明与HTN型接近,与其他各型病毒则相距较远,确定为HTN型毒株。这与我们利用HV的HTN型和SEO型单克隆荧光血清抗体鉴定病毒株的型别结果相一致。

ZLS6-11和ZLS-12株分枝与HTN型接近,确定

为HTN型毒株。但ZLS6-11和ZLS-12株与已报告的HTN型毒株M和S全基因序列差异分别为13.4%~20.7%和10.3%~16.1%,虽然与HTNV的Z10、Z5、A9亲缘关系最近,同源性最高,但M和S基因差异也高达13.4%~13.8%和10.3%~10.9%,与国际标准株76-118差异为15.9%~16.0%和13.1%,根据近年国际病毒分类委员会对HV型的界定标准,ZLS6-11和ZLS-12株可能为HTNV的特殊亚型。

HV有相对严格的宿主动物特异性,宿主动物的种群构成决定了疫源地的类型,ZLS6-11和ZLS-12均分离自黑线姬鼠,2株病毒基因高度同源,显示同一地区相近鼠种携带同一亚型的HV。7份HV抗原阳性的鼠肺标本6份来自黑线姬鼠、1份来自沟鼠,而且当地鼠种70%为黑线姬鼠,表明黑线姬鼠为丽水地区流行HFRS的主要宿主动物,具有明显的地理聚集现象及对宿主的相对选择性^[4,5]。

本研究所引用的Z10毒株也是本实验室分离的HV,为目前HFRS沙鼠肾细胞灭活疫苗株^[6],Z10毒株为已报道HTN型的新亚型病毒^[7],而本研究的ZLS6-11和ZLS-12毒株,其M和S片段全基因序列与Z10毒株的同源性最近,但彼此间的核苷酸差异也分别高达13.4%和10.3%~10.5%。由此推断在浙江省存在基因差异较大的HTN型病毒的HFRS自然疫源地,存在造成爆发性流行的可能,因此应当引起足够的重视,进一步加大监测力度。

参 考 文 献

- [1] Elliott LH, Schmaljohn CS, Collet MS. Bunyaviridae genome structure and gene expression. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1991, 169:91-141.
- [2] Khaiboullina SF, Morzunov SP, St Jeor SC. Hantaviruses: molecular biology, evolution and pathogenesis. *Curr Mol Med*, 2005, 5:773-790.
- [3] 刘刚,李川,扈光伟,等.在中国发现普马拉型汉坦病毒. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2002, 16(4):55-57.
- [4] Plyusnin A, Morzunov SP. Virus evolution and genetic diversity of hantaviruses and their rodent hosts. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2001, 256:47-75.
- [5] 孙黎,张永振,李林红,等.河南省Ⅱ型汉坦病毒基因亚型及其分布的研究. *中华流行病学杂志*, 2005, 26(8):578-582.
- [6] 姚萃萃,刘合宾,朱函坪,等.汉坦病毒中国疫苗株Z10核蛋白免疫原性的研究. *中华流行病学杂志*, 2001, 22(5):400.
- [7] 姚智慧,俞永新,董关木,等.汉坦病毒Z10株全基因序列的测定及分析. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2001, 15(2):112-115.

(收稿日期:2008-06-13)

(本文编辑:尹廉)