

河北省2株汉城病毒的遗传特征分析

郭文平 林献丹 王文 李明慧 朱会宾 张永振

【摘要】 目的 对河北省2株汉城病毒(SEOV)进行基因分型及系统进化分析。方法 用RT-PCR法扩增SEOV Li株和LF18株的S与M全基因片段;利用DNASar软件分析S与M基因片段核苷酸序列同源性;利用Phylip软件构建系统进化树。结果 Li株与LF18株的全S基因片段均由1772个核苷酸组成,开放阅读框(ORF)的位置均为43~1332核苷酸,编码429个氨基酸的核蛋白。2株病毒的M片段全基因序列均由3653个核苷酸组成,ORF的位置均为49~3450核苷酸,编码1133个氨基酸的糖蛋白前体。2株病毒的糖蛋白前体有62个半胱氨酸残基以及6个糖基化位点。2株病毒的全S、M基因片段的核苷酸序列与包括疫苗株L99、Gou3、Z37在内的已知SEOV的同源性分别为87.6%~99.2%和83.6%~97.3%。全S和全M基因片段构建的系统进化树显示2株病毒均为SEOV第Ⅲ亚型。结论 Li株和LF18株都属于SEOV,为SEOV的第Ⅲ亚型。河北省汉坦病毒的流行毒株的遗传特征与疫苗株Z37相似。

【关键词】 汉城病毒;系统进化分析

Genetic characterization of two Seoul virus strains isolated from patients and rats in Hebei province GUO Wen-ping¹, LIN Xian-dan², WANG Wen¹, LI Ming-hui², ZHU Hui-bin¹, ZHANG Yong-zhen³. 1 College of Life Science, Shihezi University, Shihezi 832003, China; 2 Wenzhou Center for Disease Control and Prevention; 3 State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, National Institute of Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention; 4 Hebei Center for Disease Control and Prevention

Corresponding author: ZHANG Yong-zhen, Email: yongzhenzhang@sohu.com

【Abstract】 Objective Complete S and M segments of two Seoul virus (SEOV) strains were obtained to determine their genetic types and characteristics. Methods The complete S and M segments from the isolate Li and lung tissue (sample LF18) were amplified by RT-PCR. Genetic analyses were performed by using DNASar and PHYLIP program package. Results Their sequences consisted of 1772 nucleotides, and had an open reading frame (ORF, 43 to 1332 nt) encoding a nucleoprotein of 429 amino acids for both two strains. The complete M segment sequences consisted of 3653 nucleotides and had an ORF encoding a GnGc precursor of 1133 amino acids. The GnGc precursor of the two strains had 62 cysteine and 6 N-glycosylation sites. Both two strains shared a high degree of homology with other known SEOV strains including strains L99, Gou3, and vaccine strain Z37, with 87.6% to 99.2% and 83.6% to 97.3% nucleotide identities, respectively. On the S- and M- trees, the two strains LF18 and Li were grouped into the third cluster of SEOV. Conclusion Both LF18 and Li strains belonged to SEOV and shared the congruent genetic characteristics with the vaccine strains Z37. Thus, the bivalent vaccine including the strain Z37 could effectively prevent HFRS which was caused by SEOV in Hebei province.

【Key words】 Seoul virus; Phylogenetic analysis

汉坦病毒(HV)属于布尼亚病毒科的HV属,研究发现中国至少存在7个基因型^[1],至今仅发现汉滩病毒(Hantaan virus, HTNV)和汉城病毒(Seoul virus, SEOV)会引起肾综合征出血热(HFRS)^[2]。河北省自

1981年发现首例HFRS患者以来,长期的监测发现,褐家鼠携带的SEOV流行广泛,是引起HFRS的主要病原^[3,4]。为了更好地了解河北省流行的SEOV遗传特征,本研究从分离自1例HFRS患者的SEOV和1份HV抗原阳性的褐家鼠肺标本中扩增全S和M基因片段,并对这2个基因片段进行分析。

材料与方法

1. 毒株与标本来源: Li病毒株(Li株)与HV抗

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.08.019

作者单位: 832003 石河子大学生命科学学院(郭文平、王文); 温州市疾病预防控制中心(林献丹); 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所传染病预防控制国家重点实验室(李明慧、张永振); 河北省疾病预防控制中心(朱会宾)

通信作者: 张永振, Email: yongzhenzhang@sohu.com

原阳性鼠肺标本(LF18株)由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所人兽共患病室(原出血热室)保存。Li株分离自2003年张家口市张北县的HFRS患者,LF18株标本采集自廊坊市。

2. 病毒RNA的提取:参照美国Invitrogen公司的Trizol RNA提取试剂盒使用说明书提取病毒RNA。

3. RT-PCR及序列测定:引物见表1。用P14引物以及AMV反转录酶合成cDNA(42℃反应90 min, 72℃ 10 min)。用Pr2引物扩增全S基因,用巢式PCR扩增全M基因片段。用M1和G2W2及M1和SEO-G2N2扩增Gn片段;用M4和G2W1及M4和SEO-G2N1扩增Gc片段。PCR反应条件:94℃变性5 min; 94℃ 1 min, 52℃ 1 min, 72℃ 3 min, 35个循环; 72℃延伸10 min。PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳后,用日本TaKaRa公司的凝胶回收试剂盒按照说明书进行回收纯化,PCR产物由上海生工生物工程技术有限公司进行序列测定。

表1 用于RT-PCR的引物

引物名称	序列(5'~3')	参考文献
P14	TAGTAGTAGACTCC	[5]
Pr2	TTCTGCAGTAGTAGTAKRCTCCCT	[6]
M1	TTCTGCAGTAGTAGTAGACACCGCAARAGAAA	[7]
G2W2	GTACAICCTGRCCACCCC	[7]
SEO-G2N2	TGGGCAATCTGGGGGGTTGCATG	[2]
G2W1	AAAAGTAGGTGITAYATCYTIACAATGTGG	[7]
SEO-G2N1	GTGGACTCTTCTTCTCATTATT	[2]
M4	TTCTGCAGTAGTAGTAGACWCCGCARRAT	[7]

4. 系统进化分析:应用DNAStar软件对测定的序列进行拼接,并进行同源性分析;利用Phylip软件以邻位相连法构建系统进化树。分析采用1000个多序列组,用于比较分析的其他HV序列来自于GenBank,其中DOBV为Dobrava-Belgrade病毒,属于HV属(表2)。

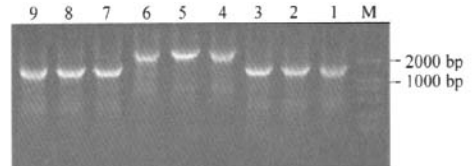
结果

1. RT-PCR扩增和产物的鉴定:从Li株和LF18株标本提取RNA,经RT-PCR扩增,分别获得了约1800 bp的全S基因片段、2300 bp的Gn基因片段以及1800 bp的Gc基因片段,与预期分子量基本一致(图1)。

2. Li株和LF18株的S与M基因片段分子生物学特征:Li株的S基因片段共有1772个核苷酸,A、G、T和C四种碱基的比例分别为31.77%、22.97%、25.96%和19.30%;LF18株的全S基因片段也由1772

表2 进化树分析所用的HTNV株及其来源

型别	病毒株	宿主	来源	地区	全S	全M
SEOV	L99	罗囊鼠	中国	江西	AF288299	AF035833
	HB55	人	中国	河南	-	AF035832
	K24-e7	褐家鼠	中国	浙江	AF288653	AF288652
	Hb8610	-	中国	山西	AF288643	-
	CUI	人	中国	河北	GQ279395	-
	SD201	褐家鼠	中国	山东	GQ279385	-
	Z37	褐家鼠	中国	浙江	AF187082	AF190119
	BjHD01	褐家鼠	中国	北京	AY627049	DQ133505
	93HBX12	褐家鼠	中国	河北	EF192308	-
	80-39	褐家鼠	韩国	-	AY273791	S47716
	Tchoupitoulas	褐家鼠	美国	-	AF329389	-
	SR11	褐家鼠	日本	-	-	M34882
	Gou3	黑家鼠	中国	浙江	AF184988	A027521
	IR461	实验大白鼠	英国	-	AF329388	AF458104
	P26	褐家鼠	中国	黑龙江	AY006465	-
HTNV	76-118	黑线姬鼠	韩国	-	M14626	Y00386
DOBV	Dobrava	黄喉姬鼠	斯洛文尼亚	-	L41916	L33685



注:M:DL2000 DNA Marker;1、4、7: L99阳性对照的Gc、Gn、S基因片段;2、5、8:Li株的Gc、Gn、S基因片段;3、6、9:LF18株的Gc、Gn、S基因片段

图1 SEOV型特异性引物反转录-巢式PCR

对2株汉城病毒标本的扩增结果

个核苷酸组成,A、G、T和C四种碱基的比例分别为31.77%、22.69%、26.35%和19.19%。2株病毒的全S基因片段开放阅读框架(ORF)的位置均位于43~1332核苷酸,由1290个核苷酸组成,编码429个氨基酸残基的核蛋白。3'非编码区(non-coding region,NCR)存在一个特殊的5'-CTA CCT CA-3'重复序列。

Li株的M基因片段共有3653个核苷酸,A、G、T和C四种碱基的比例分别为30.47%、20.78%、30.14%和18.61%;LF18株的全M基因片段也由3653个核苷酸组成,A、G、T和C四种碱基的比例分别为30.47%、20.86%、30.08%和18.59%。因此,2株病毒的S与M全基因片段都符合HV富含AT的特征。2株病毒的全M基因片段的ORF为位于49~3450核苷酸,共计3402个核苷酸,编码1133个氨基酸残基的糖蛋白前体(GPC),Gn糖蛋白C-末端642~646氨基酸处的氨基酸序列为WAASA,是GPC的翻译共切割位点,为HV一个保守的氨基酸序列。

2株病毒的GPC氨基酸序列中共有6个高甘露糖型N-联糖基化位点(Asn-X-Ser/Thr)。5个位于Gn区:Asn132、Asn233、Asn345、Asn397、Asn560;1个位于Gc区:Asn926。另外,2株病毒GPC中还有62个半胱氨酸(Cys)残基。

3. Li株和LF18株的S与M基因片段与已知HV的同源性分析:2株病毒的全S基因片段之间核苷酸同源性为97.3%,推导的氨基酸同源性为99.1%;全M基因片段的核苷酸同源性为97.1%,推导的氨基酸同源性为99.5%。2株病毒的全S基因片段核苷酸序列及其推导的氨基酸序列与其他已知的SEOV的同源性分别为87.6%~99.2%和98.4%~99.8%。其中与褐家鼠携带的BjHD01及Z37病毒株的同源性最高,而与浙江黑家鼠中分离的Gou3株同源性最低。与HTNV原型株76-118的核苷酸和氨基酸序列同源性分别为70.9%和83.7%。Li株和LF18株M片段核苷酸序列及其推导的氨基酸序列与其他已知SEOV的同源性分别为83.6%~97.3%和96.9%~99.8%。其中,Li株和LF18株与Z37及BjHD01病毒株同源性最高;与Gou3的核苷酸与氨基酸序列同源性均最低;与HTNV原型株76-118的核苷酸和氨基酸序列的同源性分别为71.2%和77.0%。

4. Li株和LF18株S和M全基因片段的系统进化分析:利用部分或全M与S基因片段,已有研究将SEOV分为6个分支(亚型)^[8]。全M基因片段核苷酸序列构建系统进化树(图2)。Li株和LF18株分在SEOV,与BjHD01和Z37等病毒分在一个分支,它们之间的同源性均>98%,共同构成了SEOV的第三亚型。用全S基因片段核苷酸序列构建的系统进化树与用全M基因片段构建的系统进化树有一致的拓扑结构(图3)。

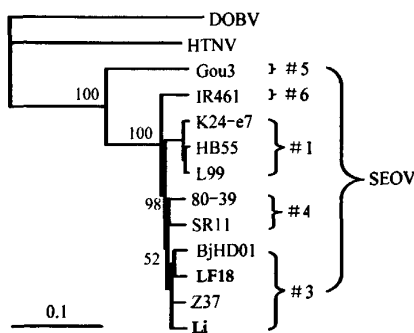


图2 Li与LF18株M片段核苷酸的系统进化树

讨 论

用部分M片段进行系统进化分析,可将中国流

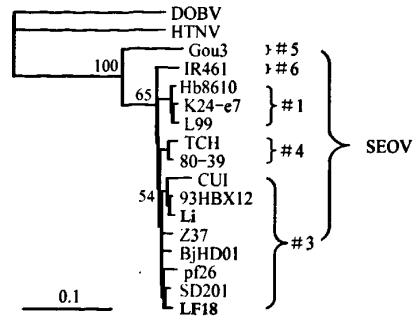


图3 Li与LF18株S片段核苷酸的系统进化树

行的SEOV分为5个亚型,但除Gou3株病毒外,绝大多数SEOV的核苷酸序列高度同源^[2]。将从Li株与LF18株扩增到的全M和S基因片段的核苷酸序列与已知的HV进行同源性分析与系统进化分析发现,除Gou3病毒株外,2株病毒与国内外已知的大部分SEOV具有高度的同源性及很近的进化关系,而其他型HV的同源性较低,进化关系较远,因此2株病毒均为SEOV。在系统进化树上,这2株病毒与93HBX12、BjHD01、CUI、pf26、Z37、SD201等处于同一分支,属于SEOV的第三亚型,与河北省HV的优势亚型一致^[3]。尤其是Li株在全S基因构建的系统进化树上与分离自河北省的93HBX12和CUI处于同一小分支,这也直接证明了由第三亚型SEOV引起的HFRS病例。

HV的糖蛋白被证实是病毒的中和抗原和血凝抗原的所在^[9],也是病毒致病性和疫苗研究的重点。HV的GPC富含Cys,其巯基形成的二硫键在维持糖蛋白空间结构中起重要作用;糖基化修饰对蛋白的高级结构折叠以及抗原性也具有重要的意义^[10]。Li株S片段核苷酸序列及其推导的氨基酸序列与疫苗株Z37的同源性分别为96.5%和99.1%;M片段核苷酸序列及其推导的氨基酸序列与疫苗株Z37的同源性分别为97.3%和99.1%。LF18株S片段核苷酸序列及其推导的氨基酸序列与疫苗株Z37的同源性分别为96.8%和99.1%;M片段核苷酸序列及其推导的氨基酸序列与疫苗株Z37的同源性分别为97.1%和99.3%。Li株与LF18株的GPC均含有62个Cys残基,并且其位点高度保守,与疫苗株Z37的Cys残基位点及数量一致^[11],这意味着两者的糖蛋白与疫苗株Z37具有相似的结构与抗原性。Li株与LF18株的GPC均含有6个糖基化位点,其位点也与疫苗株Z37的糖基化位点完全一致^[11]。这些结果表明河北省HV的流行毒株的遗传特征与疫苗株Z37一致。因此,接种包含Z37的双价HFRS疫苗应

能有效预防河北省由SEOV引起的HFRS疫情。

参 考 文 献

- [1] Zou Y, Xiao QY, Dong X, et al. Genetic analysis of hantaviruses carried by reed voles *Microtus fortis* in China. *Virus Res*, 2008, 137(1):122-128.
- [2] Wang H, Yoshimatsu K, Ebihara H. Genetic diversity of hantaviruses isolated in China and characterization of novel hantaviruses isolated from *Niviventer confucianus* and *Rattus rattus*. *Virology*, 2000, 278(2):332-345.
- [3] Li Q, Wei YM, Han ZY, et al. Genotype and sequence analysis on G2 segments of hantavirus from HFRS patients in Hebei province. *Chin J Exp Clin Virol*, 2008, 22 (1) : 15-17. (in Chinese)
李琦, 魏亚梅, 韩占英, 等. 河北省人感染汉坦病毒G2片段基因分型及序列特征分析. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2008, 22 (1):15-17.
- [4] Huang XX, Li Q, Han ZY, et al. Genotyping and sequence analysis on G2 segment of hantavirus carried by rat in Hebei province. *Chin J Exp Clin Virol*, 2009, 23 (3) : 165-167. (in Chinese)
黄晓霞, 李琦, 韩占英, 等. 河北省鼠携带汉坦病毒G2片段基因分型及序列特征分析. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2009, 23 (3):165-167.
- [5] Schmaljohn CS, Jennings GB, Hay J, et al. Coding strategy of the S genome segment of Hantaan virus. *Virology*, 1986, 155 (2) : 633-643.
- [6] Plyusnin A, Vapalahti O, Ulfves K, et al. Sequences of wild Puumala virus genes show a correlation of genetic variation with geographic origin of the strains. *J Gen Virol*, 1994, 75 (Pt 2) : 405-409.
- [7] Shi X, Liang M, Hang C, et al. Nucleotide sequence and phylogenetic analysis of the medium (M) genomic RNA segments of three hantaviruses isolated in China. *Virus Res*, 1998, 56(1):69-76.
- [8] Shi X, McCaughey C, Elliott RM. Genetic characterisation of a Hantavirus isolated from a laboratory-acquired infection. *J Med Virol*, 2003, 71(1):105-109.
- [9] Dantas JR, Okuno Y, Asada H, et al. Characterization of glycoproteins of viruses causing hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) using monoclonal antibodies. *Virology*, 1986, 151(2):379-384.
- [10] Wang JW, Zhao YJ, Song Z, et al. Research progress on structural protein of hantaan virus and biological activity of its epitope. *Mod J Animal Husbandry Veteran Med*, 2007 (4) : 60-63. (in Chinese)
王建文, 赵玉军, 宋卓, 等. 汉坦病毒结构蛋白及其表位生物学活性的研究进展. *现代畜牧兽医*, 2007(4):60-63.
- [11] Zhu HP, Liu HB, Yao PP, et al. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of the M genome segment of hantavirus Z37, a Chinese HFRS vaccine strain. *Virologica Sinica*, 2001, 16 (1) : 15-21. (in Chinese)
朱函坪, 刘合宾, 姚苹苹, 等. 汉坦病毒中国疫苗株Z37M片段的克隆及序列分析. *中国病毒学*, 2001, 16(1):15-21.

(收稿日期:2010-02-02)

(本文编辑:万玉立)

· 征 稿 通 知 ·

第九届全国环境与职业医学研究生学术研讨会征文(第一轮)

自2002年以来,由《环境与职业医学》杂志编委会与20余所高校公共卫生学院联合主办的“全国环境与职业医学研究生学术研讨会”已连续成功举办了8届,在各校研究生中产生了深刻的影响,有效地促进了相关学科的研究和发展,取得良好的社会效应。《环境与职业医学》杂志编委会与复旦大学公共卫生学院共同主办的“第九届全国环境与职业医学研究生学术研讨会”拟于2010年12月23—25日在复旦大学举行。

1. 会议主题:健康环境与低碳生活。

2. 征文内容:①环境相关疾病现状及干预研究;②生态环境健康与环境污染治理研究;③环境与职业医学相关的流行病学、卫生统计学和实验方法研究;④环境与职业危害因素的卫生毒理学研究;⑤职业病临床及其发病机制研究;⑥食品安全与卫生;⑦相关的人类后基因组学、蛋白质组学及表现遗传学研究;⑧相关的卫生经济学及技术法规研究;⑨相关的卫生信息管理学的研究;⑩其他环境与职业医学相关领域的交叉研究。

3. 征文要求:①论文须是未在国内公开发表,且具有一定创新性和学术性。②论文同时用中英文撰写,字数4 000~10 000字。提交论文一律采用电子版,WORD文本。具体要求可至<http://ldyx.chinajournal.net.cn/>查询。③论文提交均以附件形式发送至:jeom@scdc.sh.cn。邮件标题请设为:“第九届研究生研讨会征文”;欲同时向《环境与职业医学》杂志投稿者,请在邮件中说明。④征文截稿时间为2010年10月15日。

4. 联系方式:联系人(王晓宇、郭薇薇)电话:021-62758710-1322; Email: jeom@scdc.sh.cn

《环境与职业医学》杂志编委会

第九届全国环境与职业医学研究生学术研讨会筹备组