

汉坦病毒四川分离株 S85-46 的遗传学特征

姚智慧 董关木 张佳珂 俞永新 刘学成 刘文雪 张灵麟 阎侗有

【摘要】 目的 了解汉坦病毒四川分离株 S85-46 株分子流行病学特征。方法 将特异性引物从 S85-46 病毒感染细胞 PCR 扩增的产物克隆于 T 载体 ,正确的克隆纯化后测序 ,应用 DNASTAR 软件比较分析。结果 S85-46 株 M 片段与 HTN 型毒株同源率为 84.1%~99.7% ,而与 SEO 型毒株同源率仅为 70.4%~70.9% ,表明 S85-46 毒株属 HTN 型。核苷酸同源性比较显示 ,S85-46 与韩国分离的 76-118 株高度同源 ,而与国内一些 HTN 型病毒差异较大 ,而且同一地区的毒株也可以差异很大。S 片段全基因序列同源性比较也支持以上的观点。结论 不同地区汉坦病毒的流行株基因序列可以高度同源。

【关键词】 汉坦病毒 ;遗传学特征 ;序列测定

Analysis on the genetics of Hantavirus S85-46 isolated from Sichuan province YAO Zhihui* , DONG Guanmu , ZHANG Jiako , et al. *National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products , Beijing 100050 , China

【Abstract】 **Objective** To understand the molecular and epidemic characteristics of Hantavirus S85-46 isolated from Sichuan province. **Methods** RT-PCR products were amplified from S85-46 virus infected cells , cloned into T vector , sequenced and analyzed using DNASTAR software. **Results** The homology of M segment of S85-46 strain and HTN type strain varied from 84.1%-99.7% , compared to 70.4%-70.9% with SEO strains. This result indicated that S85-46 strain belonged to hantavirus. The nucleotide sequence analyses indicated that S85-46 strain , LR1 strain and 76-118 strain were highly homologous. The two latter strains were isolated from Shaanxi province of China and South Korea respectively , which were far from Sichuan province of China. The nucleotide sequence analyses of S segment was similar to M segment. **Conclusion** The epidemic strains isolated from different regions may have been highly homologous.

【Key words】 Hantavirus ; Genetics analysis ; Sequencing

汉坦病毒属于布尼亚病毒科汉坦病毒属 ,在临床上引起肾综合征出血热和汉坦病毒肺综合征。引起肾综合征出血热的汉坦病毒是单股负链 RNA 病毒 ,含有 L、M、S 3 个基因片段 ,长度分别为 6.5 kb、3.6 kb、1.7 kb ,分别编码病毒依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶(L)、包膜糖蛋白(G1 和 G2)和病毒核壳蛋白(NP)。S85-46 毒株分离自四川省邻水县中射(鼠勾)^[1] ,应用聚合酶链反应(PCR)和单克隆抗体抗原性分析确定其为典型的 HTN 型病毒^[2,3]。为进一步了解 S85-46 毒株的分子结构特性 ,了解其流行病学意义 ,我们应用基因扩增克隆的方法对该毒株的 M 和 S 片段的全基因序列进行测定 ,并将序列测定的结果与汉坦病毒的国内外分离毒株进行了同源

性比较。

材料和方法

1. 细胞和毒株 :Vero-E6 细胞来自 ATCC。S85-46 毒株分离自四川省邻水县中射(鼠勾)^[1] ,由四川省卫生防疫站提供 ,经 Vero-E6 细胞传代用于本研究。

2. 引物的设计与合成 :参考已知的汉滩病毒标准株 76-118 及 L、M 和 S 的核苷酸序列^[4,5] ,设计并由 GIBCO BRL 公司合成用于扩增 M 片段的 2 对引物(P1 :5'-TAGTAGTAGACTCCGCAA-3' , P2 :5'-AGATCTGTATGCATAGGAAC-3' , P3 :5'-ATCC TCTGGGCTGCAAGTG-3' , P4 :5'-TAGTAGTAG ACTCCGCAAGAT-3')和用于扩增 S 片段的一对引物(S1 :5'-TAGTAGTAGACTCCCTAAAGA-3' , S2 :5'-TAGTAGTAGTATGCTCCCTAA-3') ,用于

作者单位 :100050 北京 中国药品生物制品检定所疫苗一室(姚智慧、董关木、俞永新、刘文雪) ;四川省卫生防疫站病毒科(张佳珂、刘学成、张灵麟、阎侗有)

对各片段的 PCR 扩增。

3. 病毒 RNA 的提取和逆转录 PCR(RT-PCR) : 病毒感染 Vero-E6 细胞后 37℃ 培养 10 d 左右 ,病毒滴度近 10^7 CCID₅₀/ml ,用 GIBCO BRL 公司的 Trizol 总 RNA 提取试剂盒 ,提取感染病毒的总细胞 RNA ,逆转录酶合成第一链 cDNA 后进行 35 个循环的 PCR ,最后延伸 10 min。

4. 目的基因的克隆和筛选 :将 PCR 产物纯化后克隆于 Invitrogen 公司的 T 载体 ,转化 INV F 宿主菌 ,按蓝白斑进行筛选 ,经酶切和 PCR 鉴定后用于序列测定。

5. DNA 序列测定 :正确的克隆柱纯化后 ,用 T7 和 M13 公用引物和 Perkin Elmer 公司的 BigDye™ 测序试剂盒反应后 ,在 ABI PRISM™ 377 DNA 测序仪进行序列测定。

6. 序列的拼接和分析比较 :测定的结果应用 DNASTAR 软件进行序列的拼接 ,切除引物衔接部分的序列 ,应用距离引物较远的部分作为正确的序列 ,拼接后确保读码框架的正确性 ,如拼接后读码不能正确选择新的克隆即重新测序。所测序列结果同 GenBank 所报告汉坦病毒 M 和 S 的全长基因序列应用 DNASTAR 软件进行比较分析。

结 果

1. M 和 S 片段核苷酸序列及其编码的氨基酸 : 序列测定表明 S85-46 病毒株 M 片段的全基因序列共 3 618 个核苷酸 ,四种核苷酸的比例分别为 A 30.46% ,T 29.58% ,G 22.12% ,C 17.84% ,GC 含量为 39.96% ,AT 含量为 60.04%。其最大读码框架 46~3 453 ,共编码 1 135 个氨基酸。S85-46 毒株 M 片段的全基因及其推导的编码氨基酸序列

GenBank 注册号为 AF288658。

S 片段的全基因序列共 1 698 个核苷酸 ,四种核苷酸所占比例分别为 A 31.40% ,T 23.49% ,G 25.97% ,C 19.15% ,GC 含量为 45.12% ,AT 含量为 54.88%。最大读码框架 37~1 326 ,共编码 429 个氨基酸。S 片段的全基因及其推导的编码氨基酸序列 GenBank 注册号为 AF288659。

2. S85-46 株核苷酸序列及其推导的氨基酸序列与其他汉坦病毒的比较 :应用 Hein 方法与已报告全基因序列的汉坦病毒同源性比较 ,表明 S85-46 株 M 片段与 HTN 型毒株同源性为 84.1%~99.7% ,而与 SEO 毒株同源率仅为 70.4%~70.9% ,据此 S85-46 毒株属 HTN 型。核苷酸同源性比较显示 ,S85-46 株 M 片段与 LR1 株和国外 HTN 型标准毒株 76-118 株高度同源 ,同源率高达 99.7% ,属同一亚型 ,而与国内一些 HTN 型病毒差异较大 ,如与 A9、HV114 序列差异可以高达 15.3%~15.9%。氨基酸同源性比较表明 ,国外分离株的同源性明显高于 S85-46、LR1 毒株(表 1)。

S 片段全基因序列同源性比较也支持以上的观点 ,S85-46 与 LR1 和 76-118 间的同源率高达 99.3%~99.5% ,而与国内一些毒株同源型差别却高达 13.3%~13.7% ,与 SEO 型毒株的同源性较低为 72.4%~73.1%。

讨 论

本研究的序列同源性比较结果表明 ,S85-46 株 M 和 S 片段全基因序列与国外 HTN 型毒株和我国陕西分离株 LR1 株高度同源 ,属同一亚型 ,而与国内一些其他 HTN 型病毒差异较大。S85-46 分离自四川省 ,LR1 病毒分离自陕西省 ,与几千里外的韩

表1 S85-46 株与国内外 HTN 型毒株 M 片段的同源性(%)比较

序号	毒 株	分离地区	毒 株 序 号									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	S85-46-M	中国四川	—	99.7	99.7	94.6	95.0	84.1	84.7	84.8	70.4	70.9
2	76-118-M	韩 国	99.2	—	99.6	94.7	95.1	84.2	84.8	84.9	70.5	71.0
3	LR1-M	中国陕西	99.3	99.0	—	94.5	94.9	84.1	84.7	84.8	70.4	70.8
4	Hojo-M	韩 国	97.3	97.5	97.1	—	98.4	83.7	83.7	83.7	70.0	70.2
5	Lee-M	韩 国	98.0	98.2	97.8	98.6	—	84.1	84.3	84.3	70.3	70.4
6	Z10-M	中国浙江	94.6	95.1	94.5	94.2	94.7	—	87.4	87.5	70.2	69.9
7	A9-M	中国江苏	95.2	95.4	95.0	94.4	95.1	96.0	—	99.5	70.3	70.3
8	HV114-M	中国湖北	95.2	95.4	95.0	94.4	95.1	96.0	98.7	—	70.3	70.3
9	Seoul8039-M	韩 国	76.9	77.2	76.7	76.3	76.6	76.5	76.5	76.5	—	96.1
10	SR-11-M	日 本	77.1	76.5	76.1	76.5	76.5	76.5	76.5	76.5	98.9	—

注 :黑体字为核苷酸序列同源性比较 ,白体字为氨基酸同源性比较

国毒株相近而与邻近地区的毒株反而差别较大,我们推测由于该毒株传入这一地区后动物宿主处于相对稳定,病毒未经过自然界中不同种动物之间的传播之故。在我们此次研究中发现的现象在我国的不同地区的流行毒株也存在,例如 A9 毒株和 HV114 毒株,分别由不同的实验室在不同地区分离并在不同的实验室完成序列测定,但 A9 和 HV114 株 M 片段的同源率却高达 99.6%,韩国分离株 Hojo 和 Lee 株的同源率为 98.2%,然而 A9 和 HV114、Hojo 和 Lee、S85-46 和 LR1 及 76-118 毒株这三组互相间的差异可高至 5%~16%。这些结果提示,我国汉坦病毒不同地区流行株可以跨地区跳跃式存在。本研究中四川分离株 S85-46 与远距离的陕西分离株和韩国分离株高度同源,而同一地区的毒株却差异很大。

参 考 文 献

- 1 阎侗有, Groen G, McCormick JB. 亚欧美洲汉坦病毒代表株的单克隆抗体反应模式. 预防医学情报, 1987, 3:94-96.
- 2 姚智慧, 俞永新. 应用聚合酶链反应对我国不同来源肾综合征出血热病毒的型别分析. 病毒学报, 1994, 10:128-135.
- 3 梁米芳, 宋干, 邱会玲, 等. 用单克隆抗体对我国不同来源流行性出血热病毒的抗原性分析. 中华实验和临床病毒学杂志, 1990, 4:1-54.
- 4 Yoo DW, Kang CY. Nucleotide sequence of the M segment of the genomic RNA of Hantaan virus 76-118. Nucleic Acids Res, 1987, 15:6299-6300.
- 5 Schmaljohn CS, Jennings GB, Hay J, et al. Coding strategy of the S genome segment of Hantaan virus. J Virol, 1986, 155:633-643.

(收稿日期: 2001-02-02)

(本文编辑: 张林东)

· 短篇报道 ·

甘肃省兰州地区新生儿甲状腺功能减低的筛查

陈雪红 马冬梅 钟甘平

甘肃省是地方性甲状腺肿的高发区,为了解新生儿甲状腺功能减低(甲减)在人群中的分布情况,我们对 1996~1999 年在我院出生的新生儿进行了筛查。

1. 研究对象与方法:

(1)研究对象:凡是 1996~1999 年在我院出生的新生儿均为筛查对象,共计 8 896 例。经询问其母亲均无甲状腺疾病及内分泌系统疾病(其中 5 例曾患甲状腺功能亢进(甲亢)已治愈)。产妇中 22.8% 来自市区, 50.8% 来自郊区, 26.3% 来自较远地、县; 1/3 有职业, 2/3 是农村妇女。20% 为初中以上文化程度, 75% 为初中以下文化程度, 5% 是文盲。

(2)方法:①标本收集和处理:对出生 24~72 h 的新生儿,在足跟采集血样。用专用滤纸接触血滴,每个血斑直径>8 mm,连续采集血斑 4 个。血斑滤纸片放置室温自然干燥后,放置 4℃ 冰箱保存,待集中测定;②检测方法:采用免疫放射分析法(IRMA)检测 T_4 和促甲状腺素(TSH)。由天津 DPC 公司提供新生儿-TSH、新生儿- T_4 试剂盒;③确诊标准:纸片法 T_4 正常值为 91~190 nmol/L; TSH 正常值为 0.9~8.1 mU/L。 T_4 <70 nmol/L 以下, TSH>15 mU/L 以上,为甲减筛查阳性。初查阳性者用剩余血斑复查,结果仍异常者,让其父母带孩子来院复查。静脉采血 4 ml 重新测定血清中的 T_4 和 TSH,血清 T_4 正常值为 73~162 nmol/L; TSH 正常值

马冬梅) 泌尿外科(钟甘平)

为 0.5~6.9 mU/L。连续测定 2 次,其结果与筛查相吻合即可确诊。

2. 结果:筛查 8 896 例新生儿中,以 T_4 降低、TSH 增高为初查阳性,共有 23 例,阳性率为 0.25%。复查后只有 9 例阳性,均招回抽血复查,同时结合临床症状和体征,最后确诊为新生儿甲减的 4 例,发病率为 4.4/万。无 1 例甲亢检出。

3. 讨论:新生儿甲减是儿科常见病,是引起小儿生长迟缓、智力发育障碍的重要原因。该病发病率各地报道一般为 1/4 000~1/6 000 不等。主要病因是胎儿时期碘缺乏,还可因母亲妊娠期间摄取大量碘剂或抗甲亢药物等,造成胎儿甲状腺组织发育异常。我们筛查 8 896 例新生儿中,先天性甲减发病率高于文献报道的比例,考虑甘肃省是缺碘地区,也是新生儿甲减的高发区。确诊的 4 例甲减新生儿,其母亲均来自较边远农村,文化程度很低,几乎不食含碘食品。因此,患儿发病的原因主要是碘缺乏为主,胎儿在母体内与母亲竞争碘的吸收和利用过程中,明显处于劣势而引起碘缺乏。严重者甲状腺功能不能代偿到正常时,可出现甲减。4 例患儿经及时治疗,并随访 1~2 年,目前均发育正常,智力中等。由此可见,广泛实行新生儿甲状腺功能筛查是非常重要的。同时认为有必要给碘缺乏严重地区的孕妇适当补碘,以防止和减少因碘缺乏致新生儿甲减的发生。

(收稿日期: 2001-06-04)

(本文编辑: 段江娟)