

· 实验研究 ·

汉滩型与汉城型汉坦病毒基因重排的初步研究

康文臻 黄长形 白雪帆 杨为松 李光玉

【摘要】 目的 探讨汉坦病毒汉滩型与汉城型之间能否发生基因重排以及发生重排的频率和特点。方法 用汉坦病毒汉滩型 76-118 株与汉城型 SR-11 株混合感染 Vero E6 细胞,空斑形成试验挑取子代病毒克隆株,分型聚合酶链反应方法鉴定子代病毒基因型。结果 大部分(68.19%)子代病毒的基因组来自 7-118 株或 SR-11 株,2 株(4.55%)两型引物扩增均为阳性,2 株(4.45%)两型引物扩增均为阴性,5 株(11.36%)发生了 M 片段重排,3 株(6.82%)发生了 L 片段重排,未发现 S 片段重排,1 株 M 片段来自双亲株,1 株 S 片段为双倍体。结论 证实汉坦病毒 I 型与 II 型之间可以发生重排。

【关键词】 汉坦病毒;流行性出血热;基因重排;聚合酶链反应

A preliminary genetic reassortment between Hantaan virus and Seoul virus strains KANG Wenzhen ,HUANG Changxing ,BAI Xuefan ,YANG Weisong ,LI Guangyu . Department of Infectious Diseases ,Tangdu Hospital ,The Fourth Military Medical University ,Xi 'an 710038 ,China

【Abstract】 Objective To determine the frequency and characteristics of reassortment among Hantaan and Seoul viruses causing hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS). **Methods** Mixed infections were initiated in tissue culture , using Hantaan virus strain 76-118 and Seoul virus strain SR-11. Potential reassortant virus plaques were picked out by multiplex RT-PCR , using primers specific for individual genome segments (L M S) of each strain. **Results** Most of the progeny virus plaques (68.19% of 44) had parental genotype of 76-118 strain or SR-11 strain while 2 of 44 plaques had mixed genotypes that yielded RT-PCR bands for the same segment of both parental strains. Reassortant viruses were detected in 68.19% of 44 progeny plaques tested , involving the M and S segments. In addition , approximately 4.55% of the progeny virus plaques appeared to contain S or M segments originating from both parental virus strains , showing that they were diploid. **Conclusion** Genetic reassortment can occur between Hantaan virus and Seoul virus strains.

【Key words】 Hantavirus ; Epidemic hemorrhagic fever ; Genetic reassortment ; Polymerase chain reaction

当分节段 RNA 病毒不同亚型病毒株混合感染同一宿主或靶细胞时,可能发生基因片段的重排。这在某些病毒的进化、发病机理、流行病学上具有重要作用^[1-2]。关于自然发生及实验条件下的布尼亚病毒科病毒的基因重排已有较多报道^[3-5]。汉坦病毒属于布尼亚病毒科汉坦病毒属,其基因组由三个片段单股负链 RNA 组成,近年国外对引起肺综合征出血热的汉坦病毒的基因重排已有报道^[7-9],但迄今对引起肾综合征出血热的汉坦病毒的基因重排尚未见报道。本研究旨在探明汉坦病毒汉滩型(I 型, Hantaan virus)和汉城型(II 型, Seoul virus)之间基因片段能否重排,并为汉坦病毒基因片段与生物

学特性的关系的研究奠定基础。

材料与方法

1. 细胞与毒株:汉坦病毒 76-118 株,SR-11 株, Vero E6 细胞均由中国药品生物制品检定所提供。

2. 病毒的接种与培养:将汉坦病毒 76-118 株和 SR-11 株稀释至相同滴度,同时接种至 Vero E6 细胞,在感染病毒第 6 天后每天刮片检测病毒抗原(免疫荧光法:一抗为病人血清,二抗为荧光素标记抗人 IgG),当荧光达到+++~++++时,将细胞及上清冻融 3 次,离心取上清备用。

3. 经空斑试验分离子代病毒克隆:在 4℃ 条件下,将混种后的子代毒株做 10 倍系列稀释,选取 10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 三个稀释度接种于 6 孔板的 Vero E6 细胞单层上(0.4 ml/孔)进行空斑形成试验^[9],每个稀释度 2 孔,37℃ 吸附 1 h,加第一层琼脂培养基,第 6 天加第二层琼脂培养基(含中性红 1:300),24~48

基金项目 国家自然科学基金资助项目(39670650)

作者单位 710038 西安,第四军医大学唐都医院感染病科

h 观察空斑形成情况并用毛吸管挑取空斑,先后共挑出单个空斑 44 个。

4. 克隆株培养:将挑取的空斑分别加入 Vero E6 中培养,培养至第 7 天、第 10 天时分别刮片检测病毒抗原(免疫荧光法)。第 10 天将培养的毒株分别收获,冻融后再次接种至 Vero E6 细胞,培养至第 6 天后,每天刮片检测病毒抗原(免疫荧光法),第 8 天收获,冻融后加 20% 小牛血清, -70℃ 冻存。

5. 总 RNA 提取:700 μl Trizol(Gibco 公司产品)加 300 μl 冻存毒种,混匀后室温静置 5 min,加氯仿 200 μl,混匀后室温静置 2~3 min,12 000 r/min 4℃ 离心 15 min,移水相至新 EP 管加入 500 μl 异丙醇沉淀 RNA,混匀后室温静置 10 min,12 000 r/min 4℃ 离心 10 min 后弃上清,1 ml 75% 乙醇洗涤沉淀,7 500 r/min 4℃ 离心 5 min,室温干燥 10 min,20 μl DEPC 处理的水重溶,55~60℃ 水浴助溶。

6. RT-PCR 提取的 RNA 取 10 μl 进行 RT 反应,RT 反应用 promega 反转录试剂盒,按试剂使用说明书操作。

7. PCR:引物设计:在基因库上获取汉滩型和汉城型汉坦病毒 L、M、S 片段的基因序列,对比分析,分别设计了汉滩型和汉城型 L、M、S 片段的分型引物。R 为反转录引物,序列为 5'-TAG TAG TAG AC-3'(1~11,11 bp)。L1、M1、S1 分别为汉滩型 L、M、S 片段的上游引物,La、Ma、Sa 分别为下游引物;L2、M2、S2 分别为汉城型 L、M、S 片段的上游引物,Lb、Mb、Sb 分别为下游引物。均由上海生物技术中心合成(表 1)。

表 1 汉坦病毒汉滩型和汉城型 L、M、S 片段的 RT-PCR 引物

引物	5'→3'引物序列	产物(bp)
L1	CTG CTA CCA CAT TGT CAG	551
La	CAC TGA GAG TCA CCA TCA	
L2	CTG ATC AGC TTG ATA GCC	457
Lb	CCT CCT CAA TCC AGA ATG	
M1	GTA GTA GAC ACC GCA A	407
Ma	CCT ACT ACG GTA TGA T	
M2	TAA CCA AGG TCA TAT GGC GGA A	461
Mb	CAT TGC CGA TGT GAT GGC AG	
S1	GGC GTT GCA GTA TCT ATC	600
Sa	TGG AAG AAG CTT GCA AGG	
S2	AAC TTG CCG ACA GAT TGC	624
Sb	CAC CTT GTC TCT GTC T	

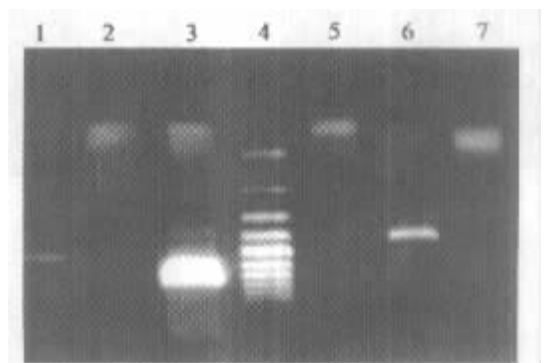
PCR 反应按标准体系进行。循环参数为:94℃ 变性 5 min 后,94℃ 1 min、55℃ 1 min、72℃ 1 min,35 个循环后,72℃ 延伸 10 min。

8. PCR 产物的鉴定:取约 10 μl PCR 产物,1.5% 的琼脂糖凝胶电泳,100 bp marker 作分子量对照,观察是否有 PCR 产物及产物带大小。

结 果

1. 克隆株的培养情况:将空斑形成试验挑选的克隆株接种至单层 Vero E6 细胞后,第 8 天、第 10 天分别用间接免疫荧光法检测病毒抗原均为阴性。传代后第 6 天开始出现阳性株,至第 8 天间接免疫荧光法检测结果 +++~++++ 6 株,++ 19 株,+ 9 株,± 8 株,阴性者 2 株。

2. 子代病毒株基因片段的鉴定:RT-PCR 产物鉴定结果发现,子代病毒 13 株(29.55%)来源于 76-118 株;17 株(38.64%)来源于 SR-11 株;5 株(11.36%)L、S 片段均来源于 76-118 株,而 M 片段来源于 SR-11 株,即发生了 M 片段重排(图 1);3 株(6.82%)M、S 片段均来源于 SR-11 株,而 L 片段来源于 76-118 株,即发生了 L 片段重排(图 2);未发现 S 片段重排;1 株 L、S 片段均来源于 SR-11 株,M 片段来自双亲;1 株 L 片段来源于 76-118 株,M 片段来源于 76-118 株,而 S 片段来自双亲,即这些片段为双倍体。



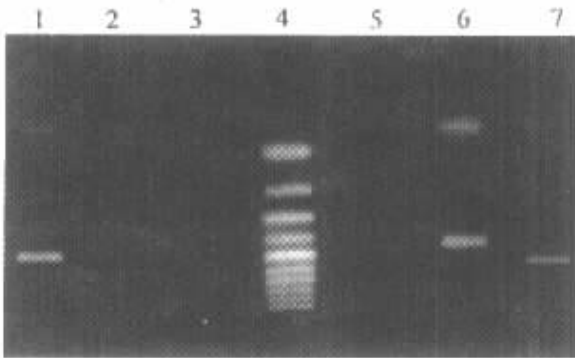
1~3 76-118 株 L、M、S 引物扩增产物,5~7 SR-11 株 L、M、S 引物扩增产物,4:100 bp 梯度 marker

图 1 子代病毒(基因型 L₇M₇S₇)RT-PCR 产物电泳结果

讨 论

发生基因重排的基本条件为:①在同一感染细胞中同时存在两种不同亚型的 RNA 分子;②两株不同病毒存在于同一地理区域。布尼亚病毒在其自然宿主体内的持续性感染创造了不同毒株共同感染的机会。大量研究表明,一些布尼亚病毒科的病毒之间可发生高频重排,基因重排在这些病毒的进化和发病机理中起重要作用,并对病毒的致病性及其

相关疾病的流行病学有重大影响^[3-6]。汉坦病毒属于布尼亚病毒科的汉坦病毒属,基因组由分节段的 RNA 组成,因此病毒基因片段之间存在着产生重排的可能。近年对于汉坦病毒基因重排的研究已见报道, Li 等^[7]和 Henderson 等^[8]通过对分离自患者和不同地区啮齿动物 SNV RNA 序列的比较表明, SNV 自然变异株中存在基因重排,重排率为 48.6%,且不同宿主来源的病毒也能发生基因重排(尽管水平低)。Luis 第一次用直接证据显示了 HV 的基因重排现象,他从经 SNV 的 NMR11 株和 CC107 株双重感染的 Vero E6 细胞,获得了 6 株重排株,且所有的重排株均包括 NMR11 的 L 片段,这说明基因重排并不是随机的^[9]。其中包括单个片段来源于不同亲代的子代重排株,认为这可能是基因重排的中间状态。但有关研究均限于引起汉坦病毒肺综合症的病毒。迄今对于引起肾综合征出血热的汉坦病毒的基因重排尚未见报道。



电泳排序同图 1

图 2 子代病毒(基因型 L₇M_sS_s)RT-PCR 产物电泳结果

我国肾综合征出血热疫区分为姬鼠型(I型)、家鼠型(II型)和混合型。血清 I 型病毒主要引起重型出血热,黑线姬鼠、大林姬鼠为疫区主要的宿主动物,代表性的毒株有 A9、陈株、A16、84Fl_i、Z10 及 H8205;血清 II 型病毒在我国主要引起轻型出血热,褐家鼠、实验用大白鼠为主要的宿主动物,代表性的毒株有 R22、L99 等。然而,近年有许多证据表明,有些病毒分离物的血清型与其宿主来源不一致,且从分子水平得到证实^[11]。并发现某些毒株用单克隆抗体、PCR 和空斑减少中和试验等分型时呈双型反应,即用血清学和单抗分析等都不能将其明确分型,推测可能是病毒在其宿主转换过程中发生了某些变异^[10-12]。本研究结合我国情况,用汉坦病毒 76-118 株与 SR-11 株共同感染 Vero E6 细胞,空斑形成试验

挑取子代克隆株,传代培养后用 PCR 方法鉴定。结果发现(表 2),大部分子代病毒(68.19%)的基因组来自 7-118 株或 SR-11 株。2 株(4.55%)汉滩型与汉城型引物扩增均为阳性,可能是由于:①挑斑或传代培养过程中感染了两种病毒;②病毒发生了基因重排或其他变异。2 株(4.45%)两型引物扩增均为阴性,这两株在 Vero E6 细胞中传代后免疫荧光检测抗原始终为阴性,故推测可能是由于:①挑斑时未挑到病毒;②传代过程中病毒死亡或病毒滴度过低;5 株(11.36%)发生了 M 片段重排,3 株(6.82%)发生了 L 片段重排,未发现 S 片段重排;1 株 M 片段来自双亲,1 株 S 片段来自双亲,即这些片段为双倍体。从而首次证实了汉坦病毒汉滩型与汉城型之间可以发生重排。不同宿主来源的毒株能够发生重排,表明自然界可能会出现新的变异毒株类型。汉坦病毒基因重排的发现使人们可以利用重排汉坦病毒研究其各基因片段对其生物学特性的影响,并为进一步了解汉坦病毒的变异规律、肾综合征出血热在我国流行趋势的预测以及汉坦病毒的基因工程疫苗和发病机制的研究提供了一定的理论依据。

表 2 用 I 和 II 分型引物鉴定空斑克隆株基因型

L	M	S	空斑数	构成比(%)
7	7	7	13	29.55
S	S	S	17	38.64
7S	7S	7S	2	4.55
-	-	-	2	4.55
7	S	7	5	11.37
7	7S	7	1	2.27
7	S	S	3	6.82
7	S	7S	1	2.27
合计			44	100.00

参 考 文 献

- Peng G, Hongo S, Kimura H, et al. Frequent occurrence of genetic reassortment between influenza C virus strains in nature. *J Gen Virol*, 1996, 77: 1489-1492.
- Gouvea V, Brantly M. Is rotavirus a population of reassortants? *Trends Microbiol*, 1995, 3: 159-162.
- Pringle CR. Genetics and genome segment reassortment. In Elliott RM, ed. *New York: The bunyaviridae*. Plenum, 1996. 189-226.
- Pringle CR, Lees JF, Clark W, et al. Genome subunit reassortment among bunyaviruses analyzed by dot hybridization using molecularly cloned complementary DNA probes. *Virology*, 1984, 135: 244-256.
- Beatty BJ, Sundin DR, Chandler LJ, et al. Evolution of bunyaviridae by genome reassortment in dually infected mosquitoes (*Aedes triseriatus*). *Science*, 1985, 230: 548-550.
- Bishop DHL. *Bunyaviridae and their replication*. Virology. New York: Raven Press, 1990. 1155-1173.
- Li D, Schmaljohn AL, Anderson K, et al. Complete nucleotide sequences

of the M and S segments of two hantavirus isolates from California: Evidence for reassortment in nature among viruses related to hantavirus pulmonary syndrome. *Virology*, 1995, 206:973-983.

- 8 Henderson WW, Monroe MC, StJeor SC, et al. Naturally occurring Sin Nombre virus genetic reassortants. *Virology*, 1995, 214:602-610.
- 9 Rodriguez LL, Owens JH, Peters CJ, et al. Genetic reassortment among viruses causing hantavirus pulmonary syndrome. *Virology*, 1998, 242:99-106.

- 10 俞永新, 罗建辉, 姚小剑, 等. 流行性出血热病毒的蚀斑形成技术. *病毒学报*, 1988, 4:162-163.
- 11 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, 10:128-134.
- 12 柯正, 宋干, 杭长寿, 等. 汉坦病毒抗原性差异及其基因分型. *病毒学报*, 1995, 11:34-39.

(收稿日期: 2001-03-27)
(本文编辑: 张林东)

· 短篇报道 ·

某部农场使用新型毒鼠盒灭鼠效果观察

张新华 景占峰

目前市场上供应的或自制的灭鼠器具, 设计上多较为简单, 功能单一, 灭鼠效果不太理想。为此我们研制了一种集毒水、毒粉、毒饵于同一载体的新型毒鼠盒, 具有防雨水、防潮、多功能、测定鼠密度等优点, 可为高效灭鼠毒饵提供最佳载体, 起到协同作用。为检验该灭鼠盒的实际灭鼠效果, 我们于 2001 年 4 月 15 日至 5 月 15 日, 在我部农场进行了灭鼠实验, 现报告如下。

1. 灭鼠场所的自然状况: 该农场驻陕西省华阴市, 南倚华山, 北临渭河, 占地 30 000 m², 其中有食堂、贮粮库、猪圈、奶牛棚等, 周围与农田、鱼塘接壤, 地理环境复杂, 属肾综合征出血热高发区。现场观察, 室内外(特别是库房内)鼠洞较多, 鼠迹明显, 工作生活场所经常被盗食、污染。粉迹法调查农场鼠密度为 43.22%。

2. 材料与与方法:

(1) 灭鼠器具: 灭鼠使用自行研制的集毒水、毒粉、毒饵于同一载体内的新型毒鼠盒(图 1)。该毒鼠盒两端各有一个出入口, 往里有一坡形的防水坡, 盒内毒粉槽、毒饵槽和毒水槽互为相通, 毒水瓶口低尾高平放在支架上, 瓶口有一带橡皮管的橡皮塞, 利用虹吸原理, 使毒水槽内液面始终保持一定的液高。

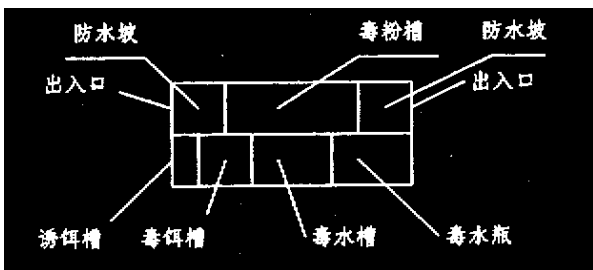


图 1 新型毒鼠盒平面结构示意图

(2) 灭鼠药品: ①毒粉(追踪粉): 每毒鼠盒使用量 10 g, 德国拜尔公司生产, 有效成分为 0.75% 的杀鼠醚; ②毒水: 每毒鼠盒使用量 1 瓶(100 ml), 原药由大连实验化工厂生产, 有效成分为 0.1% 的敌鼠钠盐; ③毒饵: 每毒鼠盒使用量 100 g, 用玉米渣 + 溴敌隆严格按说明书配制, 原药由上海泰和化工厂生产。用炒熟瓜子做诱饵, 布放在诱饵槽内。

(3) 灭鼠方法: 将毒鼠盒沿墙根或鼠道, 每 20 ~ 40 m² 布放一个, 共 180 个。每天检查老鼠入盒盗食情况(以盒内毒粉上的鼠迹为准)并及时补充毒水、毒粉、毒饵的消耗, 以第 7 天和第 30 天后分别进行两次鼠密度调查。

3. 结果和分析: 本次灭鼠共布放毒鼠盒 180 个, 经现场实验观察, 该农场的鼠密度, 由灭鼠前的 43.22% 下降到 1.29%(7 天后) 和 2.15%(30 天后), 灭鼠效果达到了 96.02% (两次灭效平均值)。证明在食源丰富、鼠粮难断、地面潮湿、且安全要求较高(不能污染粮食, 防止畜禽盗食)的特殊环境下, 用毒鼠盒灭鼠, 确能达到满意效果。该毒鼠盒既可保证灭效又可得长期巩固。分析其原因我们认为 ①与使用毒鼠盒有关, 该毒鼠盒在结构设计上巧妙合理, 它集毒水、毒粉、毒饵于同一载体内, 充分利用了鼠类喜钻洞、喜舔食的习性, 满足不同鼠类食性要求, 达到立体、高效杀灭老鼠的目的; ②本次实验于 1 个月结束时检查毒鼠盒发现, 仍有近 30% 的毒鼠盒被盗食, 说明有鼠类不断从外环境流窜至营区。而 1 个月后鼠密度调查 2.15%, 充分证明该毒鼠盒可杀灭外窜或残留的部分老鼠, 有巩固灭效的作用; ③该毒鼠盒用聚乙烯塑料制成, 具有防潮防雨防锈, 保持毒饵不发霉变质。本次灭鼠时间长达 1 个月, 期间下过小雨, 但在室内外或潮湿的地方使用的毒鼠盒中, 未发现有毒饵发霉变质的现象, 说明使用该型毒鼠盒灭鼠能充分保证毒饵的质量, 提高灭鼠效果, 且一次布毒长期有效, 减少浪费。

作者单位: 100101 北京, 解放军总装备部后勤部卫生局(张新华); 总装备部 63870 部队防疫检验所(景占峰)

(收稿日期: 2001-08-24)
(本文编辑: 张林东)