

## · 实验研究 ·

# 辽宁省葫芦岛地区鼠类汉坦病毒的分离与鉴定

屈勇刚 杨国庆 邹洋 刘根强 陈化新 张永振

**【摘要】** 目的 研究葫芦岛地区鼠类中汉坦病毒的感染流行情况以及病毒的型别。方法 采用夹夜法捕捉鼠类,间接免疫荧光法检测鼠肺中的汉坦病毒抗原,阳性较强的标本接种到 Vero E6 细胞分离病毒,RT-PCR对分离的病毒与阳性样品扩增核苷酸片段并测序,构建系统发生树进行分型与系统发生分析。结果 在 200 份鼠肺标本中共检测到 11 个样品阳性,阳性率为 5.5%。选择阳性较强的标本,接种到 Vero E6 细胞并连续传代后分离到 3 株病毒。用 S 片段(620~999 nt)与 M 片段 G1 区(180~580 nt)的核苷酸构建的系统发生树,结果表明葫芦岛分离的 3 株病毒均为 S3 亚型。用 G2 区的 2003~2302 nt 的核苷酸序列构建的系统发生树将来自不同地区的 SEO 型病毒可分为 7 个亚型,其中从葫芦岛地区分离的 3 株病毒与北京地区分离株 CP211、ch302、dc501 和山东省分离株 SD10、SD227 株的亲缘关系最近。结论 葫芦岛地区鼠类中汉坦病毒的携带率较高,主要流行 S3 亚型 SEOV。

**【关键词】** 汉坦病毒;病毒分离;逆转录-聚合酶链反应;系统发生分析

**Isolation and characterization of Hantavirus carried by rodents in Huludao, Liaoning province** QU Yong-gang\*, YANG Guo-qing, ZOU Yang, YAN Gen-qiang, CHEN Hua-xin, ZHANG Yong-zhen. \*College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832003, China  
Corresponding author: ZHANG Yong-zhen, Email: yongzhenzhang@sohu.com National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Diseases Control and Prevention, Beijing 102206, China

**【Abstract】** **Objective** To investigate the Hantavirus infection and their genotype in rodents in Huludao. **Methods** Rodents were collected from the main epidemic areas to detect antigen of Hantavirus in rat lungs by indirect immunofluorescence assay. Antigen-positive samples were inoculated onto cultures of confluent Vero E6 cells for the isolation of virus. The genotypes of viruses in all antigen-positive samples were identified by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** 200 rats were collected in the main epidemic areas, and 11 Hantavirus-positive samples were tested. The positive rate of Hantavirus in rats was 5.5%. Three strains of Hantavirus were isolated in Vero E6 cell culture. Data from the phylogenetic trees constructed by partial S segment (620-999 nt) or partial G1 segment (180-580 nt) showed that the three isolates carried by rats from Huludao were all genetic subtype SEOV 3. Furthermore, the phylogenetic tree constructed by partial G2 segment (2003-2302 nt) divided SEOV strains into 7 genetic subtypes, and the three isolates were having a closer evolutionary relationship with isolates CP211, ch302 and dc501 from Beijing, and the isolates SD10 and SD227 from Shandong. **Conclusion** Data indicated that the rate of carrying virus was high and the main genetic subtype of Hantavirus was S3 of Seoul virus in Huludao area.

**【Key words】** Hantavirus; Isolation of virus; Reverse transcriptase-polymerase chain reaction; Phylogenetic analysis

汉坦病毒(HV)属于布尼亚病毒科的汉坦病毒

基金项目:科技部科研院所社会公益研究专项资金项目(2002DIB40095);国家“十五”科技攻关课题资助项目(2003BA712A08-02)

作者单位:832003 石河子,新疆石河子大学动物科技学院(屈勇刚、刘根强);辽宁省葫芦岛市疾病预防控制中心(杨国庆);中国疾病预防控制中心传染病预防控制所(邹洋、陈化新、张永振)

通讯作者:张永振,Email: yongzhenzhang@sohu.com

属,为有囊膜的单股负链 RNA 病毒<sup>[1]</sup>。病毒基因组由大(L)、中(M)、小(S)3个基因片段组成,分别依次编码 RNA 聚合酶,2个囊膜糖蛋白(G1、G2)前体以及核蛋白。HV 有宿主动物特异性,每一型的 HV 主要由一种啮齿动物宿主携带并传播,并与宿主动物共进化<sup>[1,2]</sup>,宿主动物的种群构成决定了疫源地的类型。鼠类感染病毒后,带病毒时间较长,对

其生长与繁殖没有影响或影响很小<sup>[3]</sup>。但人类感染后能够导致两种严重的疾病:肾综合征出血热(HFRS)和HV肺综合征(HPS)。HV引发疾病的类型及其严重程度取决于病毒的型别。因此,对HV分型、阐明病毒之间的关系,揭示病毒演化规律及其防治具有重要意义。葫芦岛市是辽宁省HFRS主要疫区之一,但缺乏对啮齿类动物携带HV类型及其遗传特征的研究。在本研究中对来自葫芦岛地区鼠类样品进行了抗原检测、病毒分离及鉴定,结果报告如下。

**材料与方 法**

1. 病毒检测与分离:用间接免疫荧光法(IFA)检测。鼠肺冰冻切片,冷风吹干后用冷丙酮固定10 min,加入兔抗HV血清(本实验室制备),于37℃湿盒内反应1 h,用PBS漂洗3次后加FITC标记的抗兔IgG抗体(Sigma)。于37℃湿盒内反应1 h,用PBS漂洗3次,每次3-5 min,再用蒸馏水漂洗1次,吹干封片后在荧光显微镜下观察。

HV抗原阳性较强的鼠肺于4℃充分研磨,过滤除菌后的上清液接种于单层Vero E6细胞分离病毒<sup>[4]</sup>。Vero E6细胞来自中国药品生物制品检定所。

对细胞分离的病毒,接种于2-3日龄的昆明小鼠乳鼠脑内,以增殖病毒。小鼠发病后处死,取鼠脑抹片IFA检测,阳性鼠脑于-70℃保存备用。

2. 病毒RNA的提取:参照GIBCO/BRL公司的TRIzol RNA提取试剂使用说明书进行。取0.1 g阳性鼠肺,加入1 ml TRIzol试剂,充分研磨后-70℃过夜。取出后加氯仿200 μl,混匀静置5 min,4℃ 15 000 r/min离心5 min。取上清,加等体积的异丙醇,于-20℃放置10 min,4℃ 15 000 r/min离心10 min,弃上清,加80%乙醇1000 μl,4℃ 15 000 r/min离心10 min,弃上清,用20 μl无RNA酶的去离子水溶解,-70℃保存备用。

3. 引物的设计及合成:使用的引物见参考文献[5],用P14引物反转录cDNA,HV-SFO和HV-SRO为HV的S片段属特异引物,用作扩增S片段(584~1019 nt)的外引物,St1和St2为SEOV M片段分型引物,用作扩增G1片段(175~597 nt)的外引物。Bms1和Bms2是G2的外引物,Sms1和Sms2是G2的内引物。我们自行设计了用于扩增SEOV S片段(584~1019 nt)的内引物SEO-SF和SEO-SR以及G1片段(175~597 nt)的内引物St3

和St4。序列见表1。

4. RT-PCR及其产物的纯化和回收:使用AMV逆转录酶合成cDNA,42℃反应1 h。PCR扩增条件为94℃预变性5 min,进行如下循环:94℃ 1 min,50℃ 1 min,72℃ 3 min,共35个循环,最后一个循环于72℃延伸10 min。取2 μl RT-PCR产物为模板,用相应的内引物进行巢式PCR扩增,反应条件同上。1%琼脂糖凝胶电泳,紫外灯观察结果。切下特异分子量条带,用回收试剂盒纯化回收,收集的DNA溶于20 μl去离子水中,-20℃保存备用。

**表1 用于RT-PCR扩增的引物**

引物	序列(5'-3')	位置	片段
P14	TAGTAGTAGACTCC	1~14	M,S
HV-SFO	GGOCAGACAGCAGATTGG		S(+)
HV-SRO	AGCTCAGGATCCATGTTCATC		S(-)
SEO-SF	TGCCAAACGCCCAATCCA	584~601	S(+)
SEO-SR	GCCATCCCTCCGACAACAA	1000~1019	S(-)
St1	AGTTGGCCAAGGCTTTGCATAAA	78~101	G1(+)
St2	TTGCTGATGTGATGGCAGTCTCT	726~748	G1(-)
St3	ATTTCCCCCACTCTCATTAC	175~194	G1(+)
St4	CAAAGCATTITTCCTTCTGTCA	578~597	G1(-)
Bms1	AAAAGTAGGTGTATATCTT ACAATGTGG	1910~1939	G2(+)
Bms2	GTACAICCTGTACCIACCCC	2354~2373	G2(-)
Sms1	GTGGACTCTTCTTCTCATTATT	1936~1957	G2(+)
Sms2	TGGCAATCTGGGGGGTTGCATG	2336~2358	G2(-)

5. 核苷酸序列测定和分析:扩增核苷酸序列的测定由大连TaKaRa公司完成。使用MEGA3软件包进行系统发生分析,以邻位相连法构建系统发生树。分析采用500个多序列组(replicates)。用于比较分析的HV序列来自于GenBank,本研究使用的S片段的620~999 nt,G1区的180~580 nt以及G2区的2001~2303 nt的部分核苷酸序列见表2。

**结 果**

1. 病毒分离:共捕褐家鼠200只,HV抗原阳性11只,阳性率为5.5%。选择阳性较强的5份鼠肺,制成20%悬液接种于Vero E6细胞培养后,共分离出3株病毒(图1),病毒分别命名为HLDL12、HLDL65、HLDL78。接种于昆明小鼠乳鼠脑内传代以增殖病毒(图2),保存于-70℃冰箱及-196℃液氮中。

2. 病毒分型与系统发生树分析:用S片段620~999 nt核苷酸序列构建的系统发生树见图3。可见从葫芦岛褐家鼠分离的3株病毒均为SEO型病毒,与浙江省从褐家鼠中的分离株ZT10及Z37分在同

一支。依据国际病毒分类委员会 HV 分类标准<sup>[6]</sup>及 Wang 等<sup>[7]</sup>对中国 SEO 病毒的分型结果,3 株从葫芦岛褐家鼠中分离的病毒应为 SEO 病毒的第 3 亚型。3 株病毒在进化关系上与从韩国以及北美洲的褐家鼠中的 HV 分离株进化关系最近,但却与从我国褐家鼠中分离的 HV R22 株及从罗赛鼠中分离的 L99 株亲缘关系较远,分在不同的亚型。

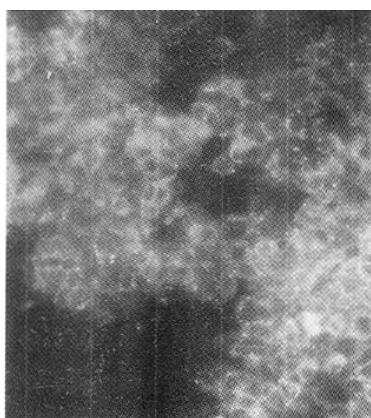


图1 HV 抗原阳性 Vero E6 细胞荧光

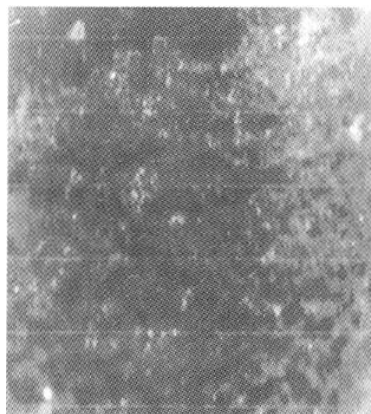


图2 HV 抗原阳性脑组织荧光

进一步用 M 基因片段的 G1 区的 180~580 nt 与 G2 区的 2003~2302 nt 的核苷酸序列进行系统发生分析,结果见图 4、5。从图 4 可知,用葫芦岛 3 株病毒的 G1 的 180~580 nt 核苷酸序列与用 S 片段的 620~999 nt 核苷酸序列构建的系统发生树基本一致,只是 3 株病毒间在此区间核苷酸同源性更大,进化距离更小。

表2 研究中用于系统发生分析的毒株及来源

血清型	病毒株	来源	国家(地区)	S(620~999)	G1(180~580)	G2(2001~2301)	
SEO	NM39	褐家鼠( <i>Rattus norvegicus</i> )	中国(内蒙古)	-	-	AB027080	
	L99	罗赛鼠( <i>Rattus losea</i> )	中国(江西)	AF288299	AF035833	AF035833	
	HB55	人(human)	中国(河南)	-	AF035832	AF035832	
	R22	褐家鼠( <i>Rattus norvegicus</i> )	中国(河南)	AF488707	AF035834	AF035834	
	Wan	人(human)	中国(江苏)	-	-	AB027081	
	J12	人(human)	中国(吉林)	-	-	AB027082	
	Henan94	褐家鼠( <i>Rattus norvegicus</i> )	中国(河南)	-	-	AB027083	
	Shanxi	褐家鼠( <i>Rattus norvegicus</i> )	中国(山西)	-	-	AB027084	
	HN71-L	褐家鼠( <i>Rattus norvegicus</i> )	中国(海南)	-	-	AB027085	
	Guang199	褐家鼠( <i>Rattus norvegicus</i> )	中国(广东)	-	-	AB027086	
	Beijing-Rn	褐家鼠( <i>Rattus norvegicus</i> )	中国(北京)	-	-	AB027087	
	c3	人(human)	中国(河北)	-	-	AB027088	
	Hebei4	黑线仓鼠( <i>Cricetulus barabensis</i> )	中国(河北)	-	-	AB027089	
	SD227	褐家鼠( <i>Rattus norvegicus</i> )	中国(山东)	-	-	AB027091	
	SD10	褐家鼠( <i>Rattus norvegicus</i> )	中国(山东)	-	-	AB027092	
	Z37	褐家鼠( <i>Rattus norvegicus</i> )	中国(浙江)	AF187082	AF190119	AF190119	
	ZT10	褐家鼠( <i>Rattus norvegicus</i> )	中国(浙江)	AY766368	DQ159911	DQ159911	
	Hubei-1	人(human)	中国(湖北)	-	-	S72343	
	80-39	褐家鼠( <i>Rattus norvegicus</i> )	韩国	AY273791	S47716	S47716	
	Tchoupitoulas	褐家鼠( <i>Rattus norvegicus</i> )	北美洲	AF329389	-	U00473	
HTN	SR11	褐家鼠( <i>Rattus norvegicus</i> )	日本	-	M34882	M34882	
	B-1	褐家鼠( <i>Rattus norvegicus</i> )	日本	-	X53861	X53861	
	Girard Point	褐家鼠( <i>Rattus norvegicus</i> )	北美洲	-	-	X53861	
	Gou3	黑鼠( <i>Rattus rattus</i> )	中国(浙江)	-	A027521	A027521	
	76-118	黑线姬鼠( <i>Apodemus agraius</i> )	韩国	M14626	M14627	M14627	
	Dobrava	黄喉姬鼠( <i>Apodemus flavicollis</i> )	斯洛文尼亚	L41916	NC005234	NC005234	
	PUU	棕背鼯( <i>Clethrionomys glareolus</i> )	俄罗斯	L11347	L08755	L08755	
	SNV	NMR-11	鹿鼠( <i>Peromyscus maniculatus</i> )	北美洲	L37904	L37903	L37903
	AND	AH1	长尾小嘴鼠( <i>Oligoryzomys longicaudatus</i> )	阿根廷	AF324902	AF324901	AF324901

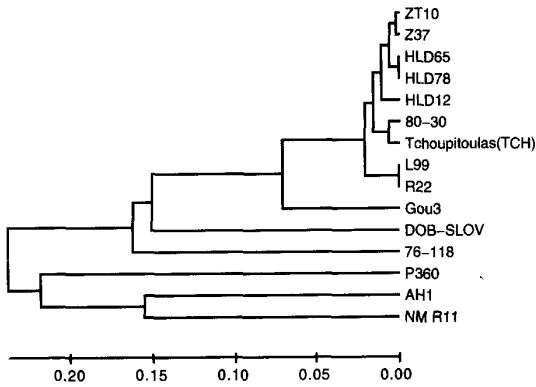


图3 SEOV 部分 S 片段核苷酸(620~999 nt) 构建系统发生树

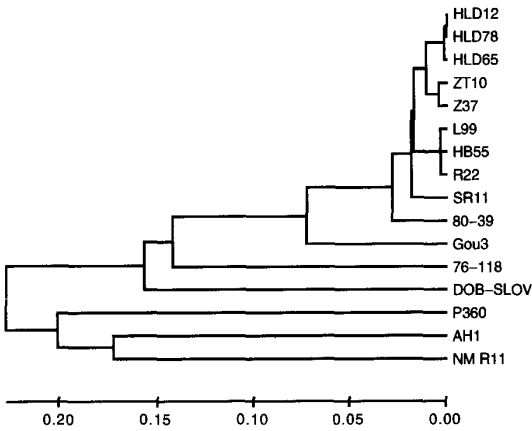


图4 SEOV 部分 M 片段核苷酸(180~580 nt) 构建系统发生树

今成功率很低<sup>[9]</sup>。在病毒分离的过程中,大部分文献的作者在接受病毒后,细胞维持的时间不超过 20 天,而我们将细胞维持培养时间尽量延长,以至于维持到 30 天,结果在第一代即可检测到阳性。细胞维持较长时间,可能为病毒提供了适应于细胞较为充分的时间,并使病毒能达到一定的载量。

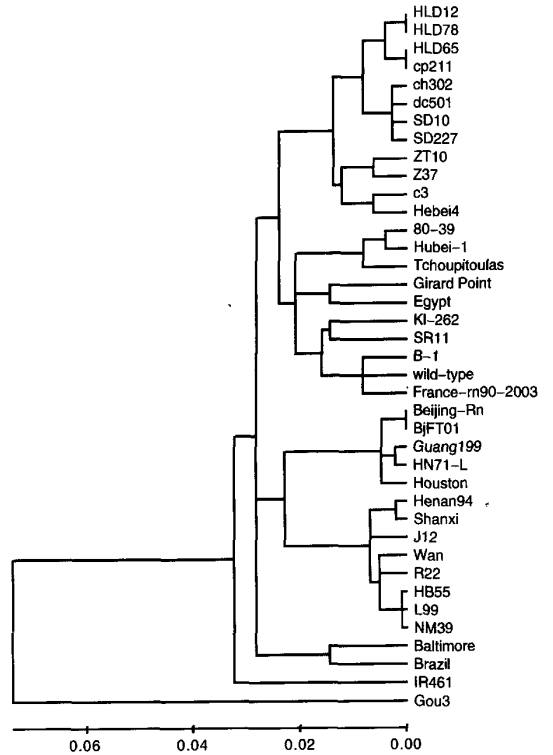


图5 SEOV 部分 M 片段核苷酸(2003~2302 nt) 构建系统发生树

从图 5 可以看出,用 G2 区 2003~2302 nt 的核苷酸序列进行系统发生分析,将来自我国不同地区的 SEOV 型病毒分为 7 个分支。同样依据国际病毒分类委员会 HV 分类标准及 Wang 等对中国 SEOV 病毒的分型结果,每一分支的病毒应为 1 个亚型。其中从葫芦岛地区分离的 3 株病毒仍与 ZT10 及 Z37 株等分在一支。然而在这一分支中,葫芦岛分离株与从北京分离株 CP211、ch302、dc501 及山东分离株 SD10、SD227 株的亲缘关系最近,与 ZT10、Z37 株,以及从河北省患者中分离的 C3 株和黑线仓鼠中分离的 Hebei4 株等另一支的亲缘关系相对较远。

### 讨 论

目前发现 HV 至少存在 20 个血清型/基因型<sup>[8]</sup>。但 HV 至今仍是最难分离的病毒之一,有的甚至在盲传若干代后也分离不到病毒,且病毒致病性越弱,就越难于分离;如 PUU 型病毒,不管是用实验动物还是用 Vero E6 细胞分离 PUU 型病毒至

S3 亚型的 SEOV 可能是我国北方褐家鼠疫区的主要亚型之一。我们根据 M 和 S 片段的核苷酸序列,与 GenBank 中所报道的 SEOV 核苷酸序列进行比较绘制系统发生树,结果发现从葫芦岛市褐家鼠中分离的 3 株病毒均为 S3 亚型。从构建的系统发生树可以看出,在我们进行系统发生分析中,除辽宁省的葫芦岛市外,北京、河北、山东、浙江省(市)均有 HV S3 亚型的分布。我们对河南省褐家鼠中 HV 进行基因分型时,也发现 S3 亚型是河南省流行的 SEOV 的主要亚型之一<sup>[10]</sup>。另外,吉林省的褐家鼠中也存在有 S3 亚型的 SEOV<sup>[11]</sup>。上述研究结果表明 SEOV 的 S3 亚型在我国的东北、华北以及华东地区分布广泛,可能是我国汉城型病毒主要流行的亚型。另外,用 G2 区 2003~2302 nt 的核苷酸序列进行系统发生分析,可将来自不同地区的 SEOV 分为 7 个亚型。这说明在 SEOV 具有遗传多样性。

因此有必要进一步研究 SEOV 的遗传多样性,及其之间的抗原性差异,为我国抗 HV 疫苗的改进提供依据。

HTN、DOB、PUU 以及 Tula 型 HV 的分布存在着地理聚集现象<sup>[7,12-14]</sup>。但本研究中,S3 亚型汉城病毒却分布广泛,没有出现地理分布上的聚集现象。S3 亚型分布广泛的原因可能与汉城型病毒进化上比较保守有关,还有可能是由于褐家鼠的主动或被动迁徙,亚种分布已较大,使得 S3 亚型分布广泛。但由于受样品数量以及系统性研究的限制,本研究还不能揭示葫芦岛地区 S3 亚型病毒的进化来源。

### 参 考 文 献

- 1 Plyusnin A, Morzunov SP. Virus evolution and genetic diversity of hantaviruses and their rodent hosts. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2001, 256:47-75.
- 2 Nichol S. Genetic analysis of hantaviruses and their host relationships. In: *Factors in the emergence and control of rodent-borne disease*. Saluzzo JF, Dodet B, eds. Paris: Elsevier, 1999. 99-109.
- 3 McCaughey C, Hart CA. Hantaviruses. *J Med Microbiol*, 2000, 49:587-599.
- 4 Schmaljohn CS, Dalrymple JM. Analysis of Hantaan virus RNA: evidence for a new genus of Bunyaviridae. *Virology*, 1983, 131:482-491.
- 5 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.
- 6 Elliott RM, Bouloy M, Calisher CH, et al. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. In: van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, et al. eds. Academic Press, San Diego, Calif, 2000. 599-621.
- 7 Wang H, Yoshimatsu K, Ebihara H, et al. Genetic diversity of hantaviruses isolated in China and characterization of novel hantaviruses isolated from *Niviventer confucianus* and *Rattus rattus*. *Virology*, 2000, 278:332-345.
- 8 Lednicky JA. Hantaviruses. A short review. *Arch Pathol Lab Med*, 2003, 127:30-35.
- 9 Lundkvist A, Wiger D, Horling J, et al. Isolation and characterization of Puumala hantavirus from Norway: evidence for a distinct phylogenetic sublineage. *J Gen Virol*, 1998, 79:2603-2614.
- 10 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, 26:578-582.
- 11 王世文,杭长寿,王华,等. 我国汉坦病毒基因型和基因亚型的分布研究. *病毒学报*, 2002, 18:211-216.
- 12 Avsic-Zupanc T, Nemirov K, Petrovec M, et al. Genetic analysis of wild-type Dobrava hantavirus in Slovenia: co-existence of two distinct genetic lineages within the same natural focus. *J Gen Virol*, 2000, 81:1747-1755.
- 13 Song JW, Baek LJ, Song KJ, et al. Characterization of Tula virus from common voles (*Microtus arvalis*) in Poland: evidence for geographic-specific phylogenetic clustering. *Virus Genes*, 2004, 29:239-247.
- 14 Horling J, Lundkvist A, Jaarola M, et al. Distribution and genetic heterogeneity of Puumala virus in Sweden. *J Gen Virol*, 1996, 77:2555-2562.

(收稿日期:2005-09-15)

(本文编辑:张林东)

## · 征 稿 启 事 ·

### 第四届环境与职业医学国际学术研讨会征文通知

第四届环境与职业医学国际学术研讨会将由环境与职业医学杂志编委会、上海市疾病预防控制中心与美国加州卫生局及昆明医学院等中美多方联合主办,将于 2006 年 10 月中旬在云南省昆明市召开。

大会主题:健康环境与和谐社会;征文内容范围:①生态环境与人类健康;②健康城市与社会和谐;③生命质量与健康指标;④工业卫生与环境化学;⑤健康危害变化趋势及环境与职业流行病学;⑥有害健康危险度评价、污染控制和防治技术;⑦毒理学研究和环境、职业医学实验检测技术;⑧室内外环境污染、公害病和环境相关疾病;⑨职业病危害因素、职业病和职业相关疾病;⑩环境基因组学、蛋白组学;⑪突发公共卫生事件与应急救援;⑫职业相关社会心理问题和环境应急心理危机;⑬环境与职业卫生事业管理;⑭公共卫生经济学与社会医学;⑮公共卫生法制与社会热点问题。

征文要求:①征文须是尚未在国内外正式期刊上发表过的科技论文,论文内容应符合上述“征文内容范围”,文责一律自负。②征文著录格式的要求同《环境与职业医学》杂志。在征文首页左上角,请以小五号黑体字注明“第四届环境与职业医学国际学术研讨会”字样,信封右上方注明“2006 国际会征文”字样。对需作幻灯片者,待大会学术委员会统一审稿后,将另行发出具体通知。愿将该征文同时向《环境与职业医学》杂志投稿者,请予附言说明。③为适应大会交流,和大会《论文集》送国际科技会议录索引(ISTP)收录的需要,要求在提交的每篇中文征文后,须附该中文全文的英文译文(至少须经 1 名专家审校)。④征文的电子版请发至 Email:JEOM2006@yahoo.com.cn 和 zazhi2@scdc.sh.cn;也可将打印稿一份(需附电子文件)寄至:200336 上海市中山西路 1380 号《环境与职业医学》杂志编辑部收。联系电话:021-62758710-1324(1326);直线及传真:021-62084529;联系人:洪琪,丁瑾瑜。⑤接收征文截止时间:2006 年 7 月 1 日(以邮戳或电子邮件为准)。

第四届环境与职业医学国际学术研讨会组委会