

中国宿主动物中 Amur 汉坦病毒 M 片段全基因序列分析

郭卫东 张文义 江佳富 池海谊 王文瑞 王中元 金鹰 杨红 方立群 曹务春

【摘要】 目的 测定中国宿主动物中 Amur 病毒 M 片段全基因序列,以了解其分子特征。方法 设计特异的 PCR 引物,用 RT-PCR 法分段扩增 JilinAP06 株 M 片段全长,PCR 产物经克隆后进行序列测定,然后进行系统发育分析和重组分析。结果 JilinAP06 株 M 片段全基因序列共 3615 个核苷酸,A+T 含量为 59.3%,G+C 含量为 40.7%,包含 1 个单一的开放读码框架,其最大读码框架从 41~3448,由 3408 个核苷酸组成,共编码 1135 个氨基酸。序列同源分析表明,JilinAP06 株与中国的人源 Amur HV 株同源率为 96.0%~97.8%,与韩国大林姬鼠来源的 Soochong HV 同源率为 85.6%~86.7%,与 HTNV 原型株 76-118 同源率仅为 79.5%,而与其他各型病毒间的同源率均低于 79.0%。氨基酸同源分析,其氨基酸序列与中国的人源株 Amur HV 同源率为 98.1%~98.4%,与韩国大林姬鼠来源的 Soochong HV 同源率为 96.4%~97.0%,与 HTNV 原型株 76-118 同源率为 91.7%,而与其他各型病毒间的同源率均低于 92.0%。系统发育分析结果显示,JilinAP06 与 Amur 病毒构成一个相对独立的分支。结论 从中国宿主动物中获得了 Amur HV 的 M 片段全基因序列。

【关键词】 汉坦病毒; Amur 病毒; M 片段; 序列分析

Complete sequence of the M segment of Amur virus in rodent from China GUO Wei-dong*, ZHANG Wen-yi, JIANG Jia-fu, CHI Hai-yi, WANG Wen-rui, WANG Zhong-yuan, JIN Ying, YANG Hong, FANG Li-qun, CAO Wu-chun. Inner Mongolia Autonomous Region Center for Disease Control and Prevention, Huhehaote 010031, China

Corresponding author: CAO Wu-chun, Email: Caowc@nic.bmi.ac.cn State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Academy of Military Medical Science Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China

【Abstract】 Objective To study the complete sequence of M segment of Amur virus in rodents and to explore their molecular characteristics. Methods Complete M segment of Amur virus in rodent from China was amplified by RT-PCR. The purified PCR product was cloned into pGEM-T Easy vector and then sequenced. Phylogenetic analysis on multiple nucleotide sequences was performed with the Tree PUZZLE and DNASTar software. Results The full-length of its M gene comprised of 3615 nucleotides with one open reading frame (ORF) including 3408 nucleotides and encoding a protein which comprised 1135 amino acids. The ORF was located at bases 41 to 3448. The phylogenetic analysis of JilinAP06 with other hantaviruses revealed that the complete sequence of M segment of JilinAP06 strain was closely related to those Amur viruses such as B78 strain, Liu strain and H5 strain were all from the patients. The complete sequence of M segment of JilinAP06 had only 79.5% identities with the nucleotide sequence of HTNV strain 76-118. Conclusion The complete sequence on M segment of Amur virus in rodent was first time identified in this country.

【Key words】 Hantavirus; Amur virus; M segment; Sequence analysis

汉坦病毒(HV)在自然界主要存在于以鼠类为主的啮齿动物体内;长期以来我国仅证实汉滩型

(HTNV)和汉城型(SEOV)HV的流行^[1],2003年在东北棕背鼯中发现普马拉型HV的存在^[2]。最近证实我国东北地区大林姬鼠携带 Amur HV,并对其 S 片段的全基因序列进行测定和分析^[3]。为进一步了解我国大林姬鼠所携带 Amur HV 的分子生物学特征及流行病学意义,对其 M 片段的全基因进行了扩增,从宿主动物中获得了 Amur HV 的 M 片段的全基因序列,并与已报告的人源 Amur HV 及其他 HV 毒株序列进行了分析比较。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.010.017

基金项目:国家杰出青年基金(30725032);国家自然科学基金(30590374,30700682);传染病重大专项基金(2008ZX10004-012)

作者单位:010031 呼和浩特,内蒙古自治区疾病预防控制中心(郭卫东、王文瑞);军事医学科学院微生物流行病研究所病原微生物安全国家重点实验室(张文义、江佳富、杨红、方立群、曹务春);呼和浩特市第一医院(池海谊);黑龙江省韦河林业局卫生防疫站(王中元、金鹰)

郭卫东、张文义同为第一作者

通信作者:曹务春, Email: Caowc@nic.bmi.ac.cn

材料与amp;方法

1. 标本来源及生境: 阳性大林姬鼠(命名为 JilinAP06)是 2006 年 5 月军事医学科学院微生物流行病学研究所在吉林省琿春市敬信镇阔混交林区现场调查时捕获, 现场无菌剪取肺脏组织, 低温储运, 回到实验室于液氮中保存, 供进一步研究。标本采集地点位于吉林省东南部, 其东部与俄罗斯的远东地区接壤, 其南部以图们江为界与朝鲜相望, 属于东北界东北区长白山地亞区。该地点位于北纬 42°38.894', 东经 130°28.385', 海拔 85.6 m, 气候属于半湿润季风气候区, 年平均气温 2.3 ~ 3.9℃, 平均降雨量为 530 mm, 平均相对湿度为 67%, 无霜期约 150 d。

2. 总 RNA 提取: 采用 Trizol®试剂(Invitrogen 公司)从肺组织细胞中提取总 RNA, 按照说明书操作。

3. 引物设计与合成: 根据参考文献设计 M 片段分型引物 HMF1958 5' - GAA TCC ATA CTG TGG GCT GCA AGT GC-3', HMR2340 5' -GGA TTA CAA CCC C AG CTC GTC TC-3'^[4], 确定 HV 基因型别后, 再参考已知的人源 Amur HV B78 株和 Liu 株 M 片段全基因核苷酸序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物进行分段扩增获得 M 片段全基因核苷酸序列, 引物序列及位置如表 1, 所有引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

表 1 用于扩增 M 片段基因使用的引物序列及位置

引物名称	序列(5' ~ 3')	长度 (bp)	位置 (bp)
M1F	TAGTAGTAGACTCCGCAAAGAAAG	25	1 ~ 25
M1R	AAAAGGCAACTAAACTCAGTGTATC	25	989 ~ 965
M2F	CCTCTATTCATTGTAGGCCTGC	25	909 ~ 933
M2R	CCTACTCCGTGAGCGTTATCAITCC	25	2034 ~ 2010
M3F	TGCCAAGTGTCAATTATGAAAGGGAT	25	2284 ~ 2308
M3R	ATAGCCGATGTCTGTAAACCAACTT	25	2976 ~ 2952
M4F	TGCAACTACTCCTGTCTGTG	20	2734 ~ 2753
M4R	TAGTAGTAGACTCCGCAAGAT	21	3615 ~ 3595

4. RT-PCR 与克隆: 使用 HV 属特异性引物 P14, 采用 AMV 反转录酶(Promega 公司)进行反转录合成 cDNA, 然后用 EX Taq(TaKaRa 公司)分段进行 PCR, 扩增条件为: 94℃ 4 min, 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 2 min, 38 个循环后 72℃ 延伸 7 min。用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 采用 QIA quick Gel Extraction Kit(QIAGEN 公司)切胶纯化 PCR 产物。PCR 产物纯化后克隆于 Promega 公司的 pGEM-T Easy 载体, 转化 DH5α 宿主菌, 用蓝白斑进行筛选鉴定。

5. DNA 序列测定和分析: 克隆产物经 PCR 鉴定

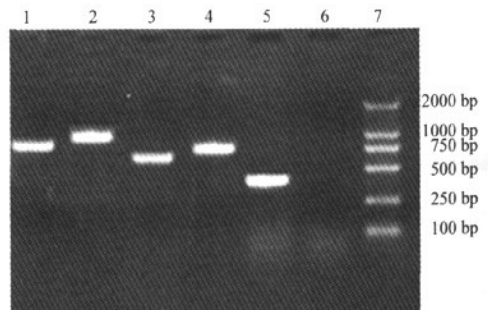
后, 用 T7 和 SP6 通用引物在 ABIP RISM™ 3730 测序仪上(上海英骏生物技术有限公司)进行序列测定。获得序列片段通过 MEGA 3.1 软件进行序列拼接而获得全序(5' 和 3' 端的序列以引物代替), 所得序列用 DNAStar 软件与 GenBank 已知序列进行同源性比较分析(表 2), 使用 Tree PUZZLE (version 5.2) 软件构建系统发育树, 分析过程选用 Maximum Likelihood 法。以 JilinAP06 作为参考株序列, 用 SimPlot 软件进行序列的重组分析^[5]。

表 2 研究用毒株注册序列号 and 来源

毒株名称	GenBank 注册序列号	毒株来源
JilinAP06	EF371454	吉林
B78	AB127994	山东
H5	AB127993	黑龙江
Liu	AF288648	山东
H8205	AB030232	黑龙江
A9	AF035831	江苏
84FLi	AF366569	陕西
76-118	M14627	韩国
SN7	AF288656	四川
SOO-1	AY675353	韩国
SOO-2	DQ056293	韩国
SOO-3	DQ056294	韩国
SOO-4	DQ056295	韩国
Q32	DQ371905	贵州
Z10	AF184987	浙江
Lee	D00377	韩国
Bao14	AB127995	黑龙江
CJilin93	AY748307	吉林

结果

1. RT-PCR 扩增产物的检测: 1.2% 琼脂糖凝胶电泳结果显示, 各次 PCR 扩增产物与预期扩增片段相符, 无非特异性条带出现, 表明特异性地扩增了目的片段(图 1)。



注: 1 ~ 4: M1 ~ 4 片段; 5: M 分型引物扩增片段; 6: 阴性对照; 7: Marker DL2000

图 1 M 片段全长分段 PCR 扩增产物电泳结果

2. JilinAP06 株 M 片段全基因序列测定与分析: JilinAP06 株 M 片段的全基因序列共有 3615 个核苷

酸, 4种核苷酸的比例分别为 A 29.5%、G 21.4%、T 29.8%、C 19.3%, A+T 含量为 59.3%、G+C 含量为 40.7%。其最大读码框架从 41~3448, 核苷酸共编码 1135 个氨基酸, 起始密码子为 ATG, 终止密码子为 TAG。JilinAP06 株 M 片段的全基因序列及其推导的氨基酸序列在 GenBank 中的注册号为 EF371454。

3. JilinAP06 株 M 片段全基因序列与其他 HV 的比较: 应用 Hein 方法将 JilinAP06 株 M 片段全基因序列与 GenBank 中已报道的 HV M 片段全基因序列进行序列同源性分析, Jilin AP06 株与我国的 Amur HV 人源株同源性为 96.0%~97.8%, 与韩国大林姬鼠源的 Soochong HV 同源性为 85.6%~86.7%, 与 HTNV 原型株 76-118 同源性仅为 79.5%, 而其他各型 HV 间的同源性均低于 79.0%。JilinAP06 株与各型病毒同源性比较分析结果见表 3。

4. 推导的 M 片段氨基酸序列与其他 HV 的比较: JilinAP06 株 M 片段全基因推导的氨基酸序列与 GenBank 中已报道的 HV M 片段全基因推导的氨基酸序列进行序列同源性分析, 其推导的氨基酸序列与我国的 Amur HV 人源株同源性为 98.1%~98.4%, 与韩国大林姬鼠源的 Soochong HV 同源性为 96.4%~97.0%, 与 HTNV 原型株 76-118 同源性为 91.7%, 而其他各型病毒间的同源性均低于 92.0%。JilinAP06 株与各型病毒同源性比较分析结果见表 3。在与其他汉坦病毒比较时发现 JilinAP06

株有 6 个特异的氨基酸位点(表 4)。

5. 系统发育分析与重组分析: 基于 M 片段全基因核苷酸序列构建系统发育树(图 2)显示, JilinAP06 与我国一些病例分离株构成一个分歧相对较大的独立支系, 接着该分支与韩国最近刚分离到的 Soochong virus 亲缘关系更近, 与其他汉滩型病毒的各个亚型病毒株种系距离较远。通过对 JilinAP06 M 片段全基因序列用 Simplot 软件分析发现 JilinAP06 并没有发生自然重组(图 3)。

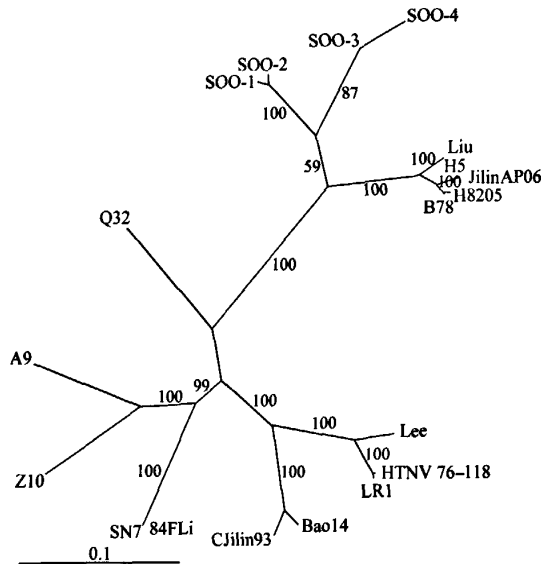


图 2 基于 M 片段全基因核苷酸序列构建系统发育树

表 3 JilinAP06 株 M 片段与其他 HV 核苷酸和推导的氨基酸同源性比较

Table with 19 columns (Virus strains) and 19 rows (Comparison values). The diagonal represents 100% identity. The table shows high similarity between JilinAP06 and other strains like H5, H8205, and B78, and lower similarity with HTNV 76-118 and other distant strains.

注:右上方为核苷酸序列的同源性,左下方为推导的氨基酸序列的同源性

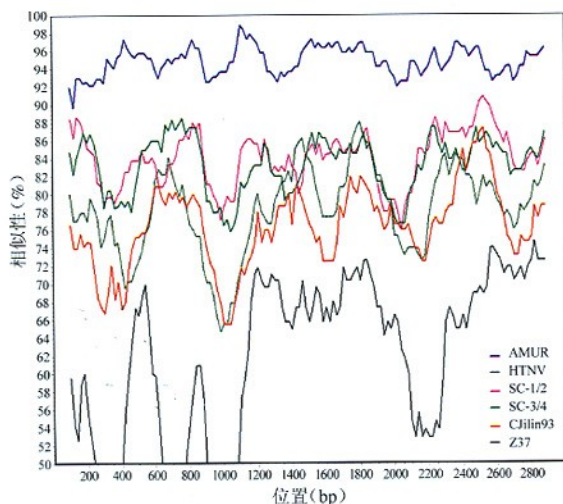


图3 JilinAP06株与其他HV参考株重组分析结果

表4 JilinAP06株与其他HV M片段氨基酸的差异

位置	JilinAP06	其他HV	位置	JilinAP06	其他HV
426	K	R	641	L	S
428	N	D	649	F	S
473	K	E	765	S	C

讨论

Amur HV是Yashina等^[6]近年来从俄罗斯远东地区大林姬鼠和患者血清中检测到的一种HV,并根据其地理起源命名为Amur病毒;其序列特征、进化分析及抗原性分析都显示与已有的HV型别有所不同。同时,Lokugamage等^[7]对我国的病例分离株(H5、B78、H8205等)进行了准确的分型鉴定,最终定为Amur HV。这说明HV在自然界中已经存在,只是在近几年人们才认识到这型病毒的宿主。直到2006年才发现我国大林姬鼠携带Amur HV,并初步分析了其分子生物学特征^[3]。但现有的分析主要基于M片段G2蛋白的232 bp的核苷酸序列^[7],至今尚未有从宿主动物中获得M片段全基因组序列的报道。所以,本研究率先对宿主来源的Amur HV的M片段全基因组序列进行扩增和序列测定,为进一步了解我国宿主动物中Amur HV的基因组结构、生物学特征及致病机制奠定了基础。

经过比较分析,JilinAP06株的M片段全基因组序列由3615个核苷酸组成,单一读码框编码1135个氨基酸。JilinAP06株与我国的人源Amur HV核苷酸序列同源性最高(96.0%~97.8%),而与其他HTNV的同源性在80%左右。同时,JilinAP06株的M片段的全基因组序列推导的氨基酸序列与我国人源Amur HV株同源性最高(98.1%~98.4%),与韩国大林姬

鼠源的Soochong HV同源性次之(96.4%~97.0%),而与其他各型病毒间的同源性均低于92.0%。而且在分析氨基酸序列时,我们发现JilinAP06株M片段全基因组序列推导的氨基酸有6个特有的氨基酸,由于至今无法获得其他地区宿主来源的Amur HV的M片段全基因组的序列数据,这些氨基酸是JilinAP06株还是大林姬鼠携带的Amur HV特有的氨基酸,有待于进一步研究证实。系统发育分析结果显示JilinAP06与我国一些病例分离株构成一个分歧相对较大的独立支系,而且节点支持值都很高(100%)。重组分析显示JilinAP06并没有与其HV发生自然重组。根据这些结果和国际病毒命名委员会关于新型HV的划分标准^[7],即①具有独特的生态学位置;②与其他HV N蛋白氨基酸序列和GPC(G₁、G₂蛋白前体)氨基酸序列相比至少有7%的不同;③能与其他HV通过双向交叉中和试验且存在4倍的差异;④与其他HV没有基因重排的迹象。本研究支持Lokugamage等^[8]将Amur HV作为一种不同于HTNV的新型HV的提议。另外,建议加强对该型病毒的在我国分布及其相关研究,为准确地进行该型病毒的分子诊断、制定更具针对性预防控制措施提供科学依据。

参考文献

- [1] 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(3):211-216.
- [2] 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,2003,17(1):55-57.
- [3] 张文艺,江伟富,姚昆,等.中国大林姬鼠中Amur类汉坦病毒的发现及其分子特征分析.中华流行病学杂志,2007,28(5):482-486.
- [4] 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.
- [5] Ray SC. 2002. SimPlot for Windows (version 2.5). Baltimore MD, US. <http://sray.med.som.jhmi.edu/RaySoft/SimPlot>.
- [6] Yashina L, Mishin V, Zdanovskaya N, et al. A newly discovered variant of a hantavirus in *Apodemus peninsulae*, Far Eastern Russia. Emerg Infect Dis, 2001, 7:912.
- [7] Lokugamage K, Kariwa H, Lokugamage N, et al. Genetic and antigenic characterization of the Amur virus associated with hemorrhagic fever with renal. Virus Res, 2004, 101:127-134.
- [8] Lokugamage K, Kariwa H, Hayasaka D, et al. Genetic characterization of hantaviruses transmitted by the Korean field mouse (*Apodemus peninsulae*), Far East Russia. Emerg Infect Dis, 2002, 8:768-776.

(收稿日期:2009-03-20)

(本文编辑:尹廉)