

## 褐家鼠携带2株汉坦病毒的遗传特征分析

王文 林献丹 郭文平 李明慧 张永振

**【摘要】 目的** 分析来自内蒙古自治区呼和浩特市和河南省杞县两地褐家鼠标本中的汉坦病毒(HV)遗传特征,研究其与已知HV及疫苗株之间的关系。**方法** 提取病毒总RNA,用反转录-聚合酶链式反应法扩增阳性标本中HV的全M、S基因片段,测序后进行序列特征和系统发生分析。**结果** 成功扩增出2株HV(NM133株和Q12株)的全M、S基因片段,并测定序列。2株病毒的S基因片段核苷酸序列全长分别为1770 nt和1772 nt,均仅有1个开放读码框(ORF),编码429个氨基酸,M基因片段核苷酸序列全长均为3654 nt,编码1133个氨基酸。2株HV与绝大部分已知的汉城病毒(SEOV)具有很高的同源性;但与汉滩病毒(HTNV)等其他型HV同源性较低。2株病毒的核蛋白、糖蛋白氨基酸序列与疫苗株Z37具有一致的二级结构。另外,在用全S和M基因片段核苷酸序列所构建的系统进化树中,2株病毒被分在SEOV的I亚型,与Hb8610、R22、HB55、L99以及K24-e7的亲缘关系最近。**结论** 2株病毒为SEOV的I亚型,与包括疫苗株Z37在内的已知SEOV具有很高的同源性和一致的二级结构,提示当前的疫苗能有效预防SEOV引起的肾综合征出血热。

**【关键词】** 汉坦病毒;汉城病毒;基因分型;遗传特征

**Genetic analysis of hantaviruses carried by *Rattus norvegicus* collected from Henan and Neimenggu provinces, China** WANG Wen<sup>1</sup>, LIN Xian-dan<sup>2</sup>, GUO Wen-ping<sup>1</sup>, LI Ming-hui<sup>3</sup>, ZHANG Yong-zhen<sup>3</sup>. 1 College of Life Science, Shihezi University, Shihezi 832003, China; 2 Zhejiang Province of Wenzhou Center for Disease Control and Prevention; 3 National Institute of Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention  
Corresponding author: ZHANG Yong-zhen, Email: yongzhenzhang@sohu.com  
This work was supported by a grant from the Chinese Ministry of Science and Technology (No. 2003BA712A08-02).

**【Abstract】 Objective** Genetic analysis was performed to infer the relationship between hantaviruses carried by *Rattus norvegicus* from Henan and Neimenggu provinces and the other known hantavirus and the vaccine strain. **Methods** Total RNA was extracted from lung tissues with Trizol reagent. The complete M and S segment sequences of strains NM133 and Q12 were amplified by RT-PCR. The purified DNA fragments were directly subjected to sequencing, and then to sequence analysis and phylogenetic analysis. **Results** The complete S segment sequences of strains NM133 and Q12 were found to be 1770 nt and 1772 nt in length respectively, with one open reading frame encoding 429 amino acids. The complete M segment sequences of both two strains are 3654 nucleotide in length encoding a protein of 1133 amino acids. The two strains shared a high degree of homology with most of known Seoul virus (SEOV) but quite different from Hantaan virus and other hantaviruses. Furthermore, the nucleoprotein and glycoprotein of the two strains had the congruent structure with the vaccine strain Z37. On the S- and M-phylogenetic trees, both strains (NM133 and Q12) were grouped into the first cluster of SEOV, and were more closely related to the strains, such as: Hb8610, R22, HB55, L99, and K24-e7. **Conclusion** Both strains (NM133 and Q12) belonged to SEOV, and sharing a high degree of homology and similar secondary structure with strains including the vaccine strains Z37, our data suggested that the present vaccine used in China could effectively prevent HFRS caused by SEOV.

**【Key words】** Hantavirus; Seoul virus; Genotyping; Genetic characteristics

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.09.017

基金项目:“十五”国家科技攻关重点项目(2003BA712A08-02)

作者单位:832003 石河子大学生命科学学院(王文、郭文平);浙江省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)

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

汉坦病毒(Hantavirus, HV)基因组由大(L)、中(M)和小(S)3个基因片段组成,分别编码依赖RNA的RNA聚合酶,糖蛋白(Gn、Gc)的前体糖蛋白(GPC)及核蛋白(NP)<sup>[1]</sup>。HV主要由啮齿类动物携带并传播给人类。人感染HV后能引起肾综合征出血热(HFRS)和汉坦病毒肺综合征(HPS)。在已查明的23个血清型/基因型HV中,汉滩病毒(Hantaan virus, HTNV)、汉城病毒(Seoul virus, SEOV)、普马拉病毒(Puumala virus, PUUV)、多不拉伐-贝尔格莱德病毒(Dobrava-Belgrade virus, DOBV)能导致人产生HFRS<sup>[2]</sup>。每一型的HV均来自一种或少数几种密切相关的啮齿动物,可能与自然宿主共进化,在地理分布上呈现出地理聚集现象,如HTNV及PUUV<sup>[3]</sup>。我国于1981年在河南与山西两省交界地区发现由SEOV引起的轻型HFRS,1982年从该地区的褐家鼠中分离到病毒<sup>[4]</sup>。随后的监测与地理流行病学研究发现,SEOV在我国地理分布广泛,几乎遍及所有的HFRS疫区<sup>[5]</sup>。用部分M基因片段进行系统发生分析发现,我国流行的SEOV能分为5个基因亚型<sup>[6]</sup>。近年来的研究表明,在SEOV的5个基因亚型中I与Ⅲ亚型分布最为广泛,并且无地理聚集现象<sup>[6-8]</sup>。为了更好阐明I基因亚型的遗传特征,本研究从内蒙古自治区呼和浩特市与河南省杞县的HV抗原阳性鼠肺中扩增到了全S、M基因片段的核苷酸序列,进行遗传特征与系统发生分析,结果报告如下。

## 材料与方法

1. 标本来源:2002年从杞县和2005年从呼和浩特市采集的褐家鼠鼠肺标本(编号为Q12和NM133),经免疫荧光检测呈HV抗原阳性。

2. 引物的合成与设计:用P14引物反转录S与M基因片段<sup>[9]</sup>,用于扩增S与M基因片段的引物见参考文献<sup>[6,9,10]</sup>。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

3. 反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR):参照Invitrogen公司的Trizol RNA提取试剂使用说明书提取病毒RNA,用P14引物及AMV反转录酶(Promega)合成cDNA,42℃反应90 min,72℃10 min灭活反转录酶。用Pr2扩增全S基因,用巢式PCR扩增全M基因片段:用M1和HV-MR及M1和SEO-MR扩增Gn片段;用M4和HV-MF及M4和SEO-MF扩增Gc片段。PCR循环参数为94℃预变性3 min,94℃变性1 min,52℃退火1 min,72℃延

伸2 min,35次循环后,72℃延伸10 min。PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳后,用TaKaRa公司的凝胶回收试剂盒(按照说明)进行回收纯化。扩增的基因片段由上海生工生物工程技术服务有限公司完成序列测定。

4. 序列特征分析:用DNASar软件中的EditSeq编辑序列,使用Protean、SignalP、TMHMM软件对基因片段核苷酸序列的疏水区、信号肽区和跨膜区进行分析。从GenBank中获取相关HV的全S与M基因片段的核苷酸序列,使用MegAlign进行核苷酸和氨基酸序列同源性比较。用PHYLP软件包进行系统发生分析,以邻位相连法(neighbor-joining method, NJ)构建系统发生树,分析采用1000个序列组(replicates)。

## 结 果

1. 序列特征分析:序列测定表明NM133株病毒的全S基因片段的共由1770个核苷酸组成,其中A+T和C+G的含量分别为58.25%、41.75%,Q12株病毒的全S片段的基因共由1772个核苷酸组成,其中A+T和C+G的含量分别为58.24%、41.76%,符合HV富含AT的特征。2株病毒的全S基因片段由3部分组成:5'非编码区(non-coding region, NCR)、开放性阅读框架(open reading frame, ORF)和3' NCR。5' NCR的长度均为42 nt, NM133株和Q12株的3' NCR分别为438 nt和440 nt; ORF位置均为43~1332 nt,共计1290个核苷酸,编码429个氨基酸组成的核蛋白。它们的S片段5'和3'末端反向互补,为布尼亚病毒科病毒的共同特征<sup>[1,9]</sup>。

2株病毒全M基因片段均含有3654 nt。NM133株病毒A+T的含量为60.72%,C+G的含量为39.28%。Q12株病毒的A+T的含量为60.45%,C+G的含量为39.55%。2株病毒的ORF位置分别为50~3451 nt和49~3450 nt,共计3402个核苷酸,编码包膜糖蛋白前体,由1133个氨基酸组成。

2. 二级结构分析:将推导的氨基酸序列进行信号肽、疏水区、抗原区、跨膜区预测,结果显示该两株病毒具有一致的二级结构(本文仅列出NM133株的二级结构)。

NM133株病毒NP氨基酸的疏水/亲水区、抗原区、表面分布区见图1A(横线上为亲水区,横线下为疏水区,显示NP亲水序列占多数)。Antigenic index分析可以看出,NP的抗原性比较强。Gn糖蛋白C-末端有两段保守序列“YRTL”和“WAASA”。基序YRTL为第613~616位aa,在Gn蛋白中高度保守,

是所有HV的组装信号,基序WAASA的位置在642~646 aa。GPC共有6个Asn(N)-糖基化位点(Asn-X-Ser/Thr)。其中5个在Gn区:Asn132、Asn233、Asn345、Asn397、Asn560;1个在Gc区:Asn926,与Z37疫苗株GPC上的糖基化位点一致<sup>[11]</sup>。GPC氨基酸的疏水/亲水区、抗原区、表面分布区见图1B。Gn糖蛋白编码区N-端有一明显短的疏水序列。亲水区、抗原区、表面分布区的氨基酸有区域重叠,并且高峰区的重叠性也较高。Gn糖蛋白信号序列是从第一位的甲硫氨酸(M)到第16位氨基酸丙氨酸(A),Gn始于第17位氨基酸L(图2A);Gc始于第647位氨基酸,其前17个氨基酸为典型的糖蛋白信

号序列(图2B),与疫苗株Z37一致<sup>[11]</sup>。Gn与Gc蛋白各有一个跨膜区(图3),为标准的I型膜蛋白,均为N-端膜外而C-端胞浆区的结构,其中624~646为Gc信号肽序列。

3. 同源性分析:Q12和NM133两株病毒的全S基因片段核苷酸同源性为99.2%、氨基酸的同源性为100%;全M基因片段的核苷酸同源性为98.9%,氨基酸的同源性为99.4%。

2株病毒的全S基因片段核苷酸序列及其编码的氨基酸序列与其他已知的SEOV的同源性分别为88.4%~99.3%和98.1%~100%。2株病毒与L99株等I亚型病毒的同源性最高,与Gou3的同源性最

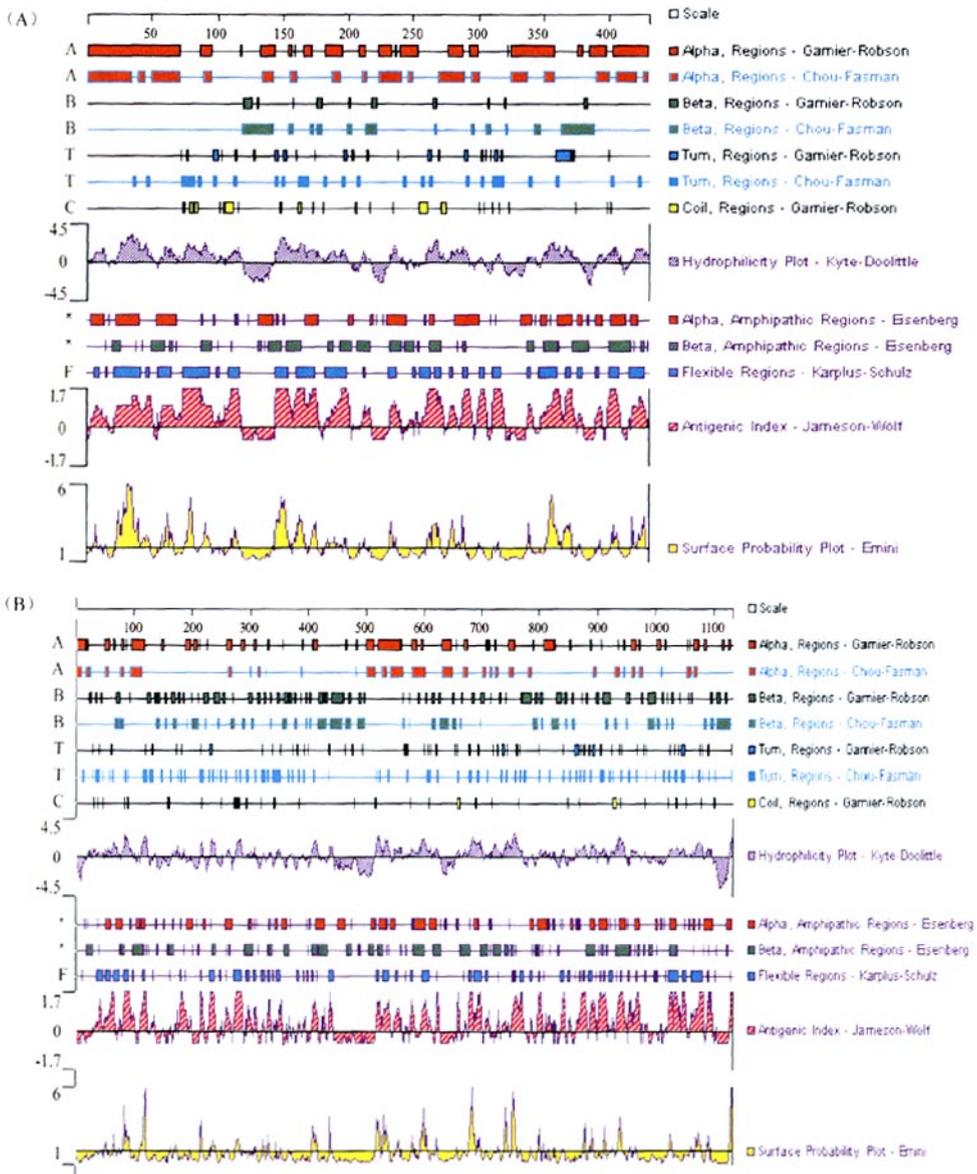


图1 NM133株NP(A)和GP(B)的二级结构、亲疏水性、抗原性分析

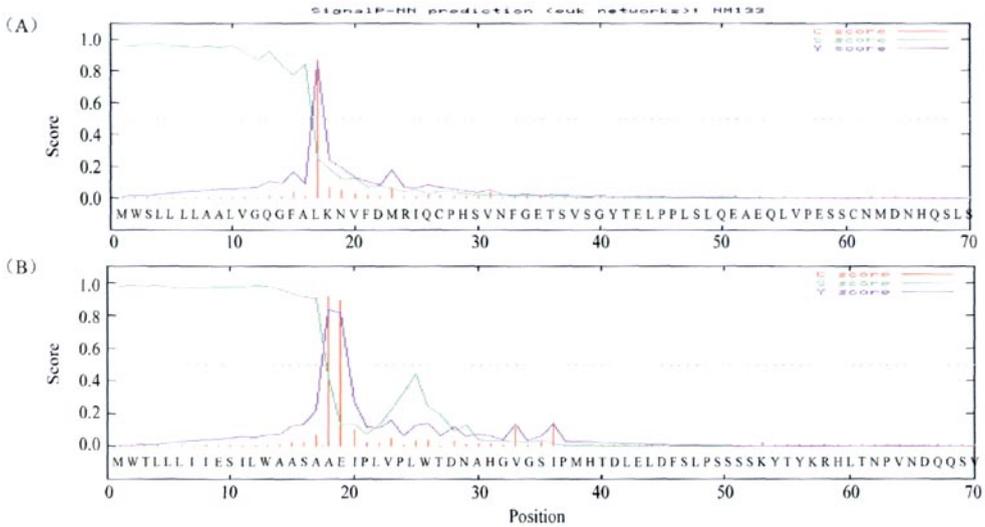


图2 NM133株 Gn(A)和Gc(B)信号肽序列的预测结果

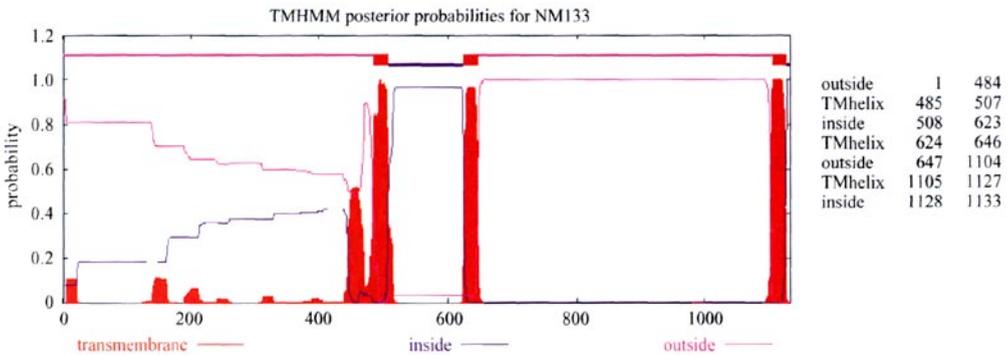
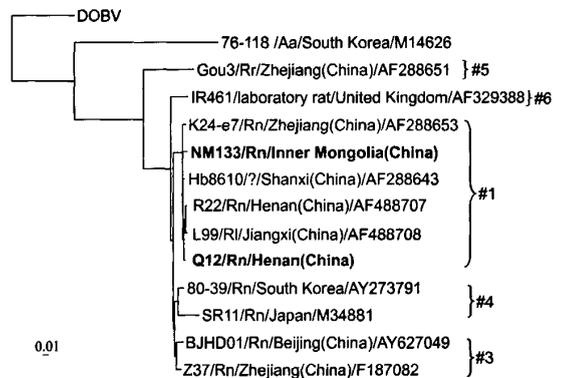


图3 NM133株GPC氨基酸序列跨膜区预测

低;与HTNV的核苷酸同源性为74.0%,氨基酸同源性均为83.4%;与DOBV的核苷酸同源性为73.3%,氨基酸同源性均为81.4%。

2株病毒的全M基因片段核苷酸序列及其编码的氨基酸序列与其他已知的SEOV的同源性分别为84.3%~99.2%和96.6%~99.6%,与L99的同源性最高,与Gou3的同源性最低。2株病毒与HTNV的核苷酸同源性分别为71.4%和71.3%,氨基酸同源性均为77.1%;与DOBV的核苷酸同源性均为70.1%,氨基酸同源性分别为77.3%和77.1%。

4. 系统发生分析:用全S、M基因片段核苷酸序列构建的系统发生树见图4、5,各亚型序号按照已有的文献进行标记<sup>[6,10]</sup>。在用全S基因片段构建的系统发生树中,SEOV的聚集形式与已报道一致<sup>[6]</sup>。用全S基因片段核苷酸构建的进化树与全M基因片段核苷酸序列构建的系统发生树基本一致。NM133和Q12两株病毒被分在SEOV的I亚型。该亚型还包括来自山西Hb8610、河南R22和HB55、江

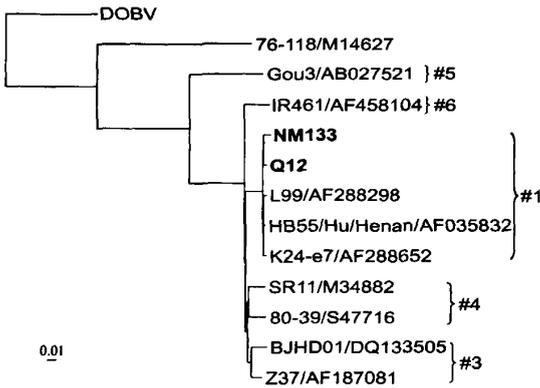


注:Aa黑线姬鼠,Rr黑家鼠,Laboratory rat实验大白鼠,Rn褐家鼠,RI罗赛鼠

图4 用S全片段序列以NJ法构建的系统发生树  
西L99及浙江K24-e7等病毒株。

### 讨论

用部分或全M基因片段可以将所有已知的SEOV分为6或7个亚型,而且呈世界性分布<sup>[6,10,12,13]</sup>。



注:Hu 病例

图 5 用 M 全片段序列以 NJ 法构建的系统发生树

我国近年来的分子流行病学研究发现, I 和 III 基因亚型的 SEOV 在我国分布最为广泛, 除 Gou3 株外, 绝大部分病毒的核苷酸和氨基酸的序列具有很高的同源性, 且无明显的地理聚集现象<sup>[7,8,12]</sup>。除 Gou3 病毒株外, NM133 和 Q12 两株病毒的全 M、S 基因片段核苷酸序与国内外已知的大部分 SEOV 具有很高的同源性, 但与其他型的 HV 的同源性较低。在用全 M 和全 S 基因片段核苷酸序列构建的系统发生树中, 2 株均位于 SEO 病毒的 I 亚型, 与来自山西 Hb8610、河南 R22 和 HB55、江西 L99 以及浙江 K24-e7 等病毒株的亲缘关系最近。这些结果表明本研究的 2 株病毒均为 I 亚型的 SEOV。尽管 2 株病毒来自相距较为遥远的两个地区, 但病毒全 S 和全 M 基因片段的核苷酸具有很高的同源性, 没有出现其他 HV 表现出的地理聚集现象<sup>[3]</sup>, 符合大部分 SEOV 的特征。造成 SEOV 不同于其他型 HV 的原因, 可能是 SEOV 的宿主动物 (褐家鼠等鼠类) 的流动性强, 容易追随人类活动迁徙, 从而造成 SEOV 的大范围播散。

将 2 株病毒的氨基酸序列进行信号肽、疏水区、抗原区、跨膜区分析, 结果显示 NM133 和 Q12 两株病毒具有高度一致的二级结构, 说明 2 株病毒具有相同抗原性。2 株病毒与疫苗株 S 基因片段的核苷酸同源性为 96%, 推导出的氨基酸同源性高达 99.5%, M 片段的核苷酸同源性为 95%, 推导出的氨基酸同源性也高达 99%。另外, 2 株病毒与疫苗株 Z37 的糖蛋白前体一样富含半胱氨酸, 具有一致的糖基化位点及二级结构<sup>[11]</sup>。因此我国目前使用的双价 HFRS 疫苗对这些流行的 SEOV 野毒株应有较好

的保护效果, 能有效防止 HFRS 爆发性流行。

### 参 考 文 献

- [1] Plyusnin A, Vapalahti O, Vaheri A. Hantaviruses: genome structure, expression and evolution. *J Gen Virol*, 1996, 77 (11) : 2677-2687.
- [2] Schmaljohn CS, Hjelle B. Hantaviruse; a global disease problem. *Emerg Infect Dis*, 1997, 3(2):95-104.
- [3] Plyusnin A, Morzunov SP. Virus evolution and genetic diversity of hantaviruses and their rodent hosts. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2001, 256:47-75.
- [4] Song G, Hang CS, Liao HX, et al. Isolation of EHF-related agent from *Rattus norvegicus* captured from patients' home in endemic area of the mild type of hemorrhagic fever. *Acta Microbiol SINICA*, 1982, 22(4):373-377. (in Chinese)  
宋干, 杭长寿, 廖化新, 等. 从轻型出血热疫区的褐家鼠分离到与流行性出血热有关的病原因子. *微生物学报*, 1982, 22(4):373-377.
- [5] Chen HX, Luo CW. Hemorrhagic fever with renal syndrome studies on the surveillance and application of vaccine. Hong Kong: Hong Kong Medical Publisher, 2001:1-163. (in Chinese)  
陈化新, 罗成旺. 肾综合征出血热监测及疫苗应用研究. 香港: 香港医药卫生出版社, 2001:1-163.
- [6] 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(2):332-345.
- [7] Sun L, Zhang YZ, Li LH, et al. Genetic subtypes and distribution of Seoul virus in Henan. *Chin J Epidemiol*, 2005, 26(8):578-582. (in Chinese)  
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(8):578-582.
- [8] Li J, Zhao ZT, Wang ZQ, et al. Nucleotide sequence characterization and phylogenetic analysis of hantaviruses isolated in Shandong province, China. *Chin Med J (Engl)*, 2007, 120(9):825-830.
- [9] Schmaljohn CS, Jennings GB, Hay J, et al. Coding strategy of the S genome segment of hantaan virus. *Virology*, 1986, 155(2):633-643.
- [10] Shi X, McCaughey C, Elliott RM. Genetic characterization of a hantavirus isolated from a laboratory-acquired infection. *J Med Virol*, 2003, 71(1):105-109.
- [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. *Virol SINICA*, 2001, 16(1):15-21. (in Chinese)  
朱函坪, 刘合宾, 姚萃萃, 等. 汉坦病毒中国疫苗株 Z37 M 片段的克隆及序列分析. *中国病毒学*, 2001, 16(1):15-21.
- [12] Zhang YZ, Xiao QY, Li MH, et al. An epidemiologic investigation of hantaviruses carried by rodent hosts in Hunan province. *Chin J Epidemiol*, 2007, 28(1):65-69. (in Chinese)  
张永振, 肖奇友, 李明慧, 等. 湖南省啮齿动物携带汉坦病毒的分子流行病学研究. *中华流行病学杂志*, 2007, 28(1):65-69.
- [13] Plyusnina A, Ibrahim IN, Winoto I, et al. Identification of Seoul hantavirus in *Rattus norvegicus* in Indonesia. *Scand J Infect Dis*, 2004, 36(5):356-359.

(收稿日期:2010-02-03)

(本文编辑:张林东)