

# 内蒙古牙克石地区莫氏田鼠携带汉坦病毒的遗传特征分析

从美丽 郭文平 王剑波 王文 周润宏 李明慧 张居农 张永振

**【摘要】** 目的 分析内蒙古牙克石地区莫氏田鼠携带汉坦病毒(HV)的遗传特征及其与汉滩病毒(HTNV)和汉城病毒(SEOV)型HV之间的关系,确定哈巴罗夫斯克病毒(KHAV)的自然宿主。方法 采用RT-PCR检测HV核酸,特异性引物扩增S、M基因并测序及进行序列分析。结果 共捕获52只莫氏田鼠,其中5只为HV核酸阳性,带毒率为9.62%。经PCR扩增,5份HV阳性样本获得全S基因片段,2份阳性样本全M基因片段;S基因片段由1848~1861 bp组成,M基因片段由3662 bp组成。核苷酸序列同源性分析显示,病毒与KHAV具有高度同源性(S基因片段为92.5%~96.4%,M基因片段为88.9%~95.4%),与其他型HV的差异较大。将核蛋白(NP)和糖蛋白(GP)氨基酸序列与HTNV和SEOV进行比较,NP具有一致的二级结构,GP存在明显的差异。用全S与全M的核苷酸序列构建系统进化树,这些病毒均与KHAV聚集在一起,构成一个独立的分支。KHAV分为2个小分支,核苷酸差异>5.3%。结论 内蒙古牙克石地区存在KHAV的流行,莫氏田鼠是KHAV的自然宿主。

**【关键词】** 汉坦病毒;哈巴罗夫斯克病毒;莫氏田鼠;系统进化分析

**Genetic characteristics of hantaviruses carried by *Microtus maximowiczii* in Yakeshi of Inner Mongolia, China** CONG Mei-li<sup>1,2</sup>, GUO Wen-ping<sup>2</sup>, WANG Jian-bo<sup>3</sup>, WANG Wen<sup>2</sup>, ZHOU Run-hong<sup>2</sup>, LI Ming-hui<sup>2</sup>, ZHANG Ju-nong<sup>1</sup>, ZHANG Yong-zhen<sup>2</sup>. 1 College of Animal Science, Shihezi University, Shihezi 832003, China; 2 State Key Laboratory for Infectious Diseases Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention; 3 Hulunbeier Center for Disease Control and Prevention  
Corresponding author: ZHANG Yong-zhen, Email: yongzhenzhang@sohu.com  
This work was supported by a grant from the State Key Laboratory for Infectious Diseases Control and Prevention of China (No. 2011SKLID101).

**【Abstract】** Objective To analyze the viral genetic characteristics of hantaviruses carried by *Microtus maximowiczii* in Yakeshi of Inner Mongolia Autonomous Region and its relationship with Hantaan virus (HTNV) and Seoul virus (SEOV) viruses as well as to identify the natural host of Khabarovsk virus (KHAV). Methods HV specific RNAs were detected by RT-PCR. Complete S and M segment were amplified from the RNA-positive samples. Phylogenetic analysis were performed to estimate the genetic characterization and the relationship with other hantaviruses. Results Fifty two *Microtus maximowiczii* voles were captured in Yakeshi areas. Of those voles, hanta-viral RNA was tested positive in 5 samples (9.62%). Complete S and M segments sequences were obtained from 5 and 2 lung samples, respectively. The complete S segment was consisted of 1848 to 1861 bp, and the M segment consisted of 3662 bp. These viruses were closely related to each other with 92.5%~96.4% for the S segment sequences and 88.9%~95.4% for the M segment sequences. They shared a higher identity with KHAV found previously in Yakeshi and KHAV of Russia. However, they were obviously different from the other hantavirus species. The 5 strains had the consistent secondary structure of nucleocapsid protein (NP) and glycoprotein (GP). When further comparing their secondary structures with those of HTNV and SEOV, our results indicated that there were no obvious differences in NP between KHAV and both HNTV, SEOV but with obvious difference in GP. Based on the S and M segment sequences, phylogenetic analyses revealed that these 5 strains clustered together with KHAV and formed a distinct lineage. Furthermore, all known KHAV strains could be divided into two small

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2012.08.017

基金项目: 传染病预防控制国家重点实验室重点项目(2011SKLID101)

作者单位: 832003 新疆石河子大学动物科技学院(从美丽、张居农); 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(从美丽、郭文平、王文、周润宏、李明慧、张永振); 内蒙古呼伦贝尔疾病预防控制中心(王剑波)

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

branches with a nucleotide divergence more than 5.3%. **Conclusion** Our research data revealed that KHAV was highly endemic among *Microtus maximowiczii* in Yakeshi area which supported the notion that *Microtus maximowiczii* had been the natural host of KHAV in the area.

**【Key words】** Hantavirus; Khabarovsk virus; *Microtus maximowiczii*; Phylogenetic analysis

汉坦病毒(HV)存在 23 个血清型/基因型<sup>[1]</sup>。我国已发现的 HV 有汉滩病毒(HTNV)、汉城病毒(SEOV)、大别山病毒(DBSV)<sup>[2]</sup>、北海道病毒(HOKV)<sup>[3]</sup>、哈巴罗夫斯克病毒(KHAV)<sup>[4]</sup>、符拉迪沃斯托克病毒(VLAV)<sup>[4]</sup>、沅江病毒(YUJV)<sup>[5]</sup>、潞西病毒(LXV)<sup>[6]</sup>和索托帕拉雅病毒(TPMV)<sup>[7]</sup>等。KHAV 最早发现于俄罗斯远东哈巴罗夫斯克地区捕获的东方田鼠<sup>[8]</sup>;近些年有研究在我国内蒙古牙克石地区捕获的莫氏田鼠中分离到 KHAV,并提出莫氏田鼠是 KHAV 的自然宿主<sup>[9]</sup>。为进一步了解 KHAV 在牙克石地区的流行,并确定其自然宿主,本研究在该地区采集莫氏田鼠,进行 HV 检测,分析其遗传特征。

### 材料与方法

1. 样本来源:2006—2007 年在牙克石地区采用夹夜法捕鼠,经形态学鉴定后,无菌条件下解剖取其肺脏,装入冻存管,置液氮罐中保存待检。

#### 2. 研究方法:

(1)病毒 RNA 的提取:参照美国 Invitrogen 公司的 TRIzol 试剂说明书提取鼠肺组织总 RNA,保存于 -80 °C 备用。

(2)RT-PCR 检测及片段扩增:参照文献[10]将上述 RNA 反转录为 cDNA,然后扩增 HV L 片段<sup>[11]</sup>、S 片段<sup>[12]</sup>;HV M 片段由 Gn 和 Gc 构成,Gn 片段结合文献[9,13]中的引物及自行设计的引物进行扩增:PR1-1:5'-TTT AAR CAA TGG TGY ACW ACH AC-3'、PR9-1:5'-CCA TGR AGA CCA GGA ACA CA-3'、MR2200:5'-TCT GCA TGG ATT ACT TGC CTT T-3'以及 MR2000:5'-TGC ACT TGC AGC CCA AAT GA-3';Gc 引物参照文献[8,9]。引物由上海生工生物技术有限公司合成。序列测定由北京擎科新业生物技术有限公司完成。

(3)核苷酸序列分析和系统进化树分析:使用 DNASTar 软件包进行序列编辑及同源性分析,用 Clustal X 软件转换序列格式,使用 Protean、SignalIP 4.0、TMHMM v.2.0 软件对基因片段的疏水区、抗原区、信号肽区和跨膜区进行预测。用 MrBayes v3.1.2 软件构建系统进化树(用于分析的其他 HV 序列来自 GenBank,见表 1)。

表 1 用于构建系统进化树的 HV 毒株及来源

病毒	宿主	来源	GenBank 号	
			S	M
TPMV	臭鼬	印度	NC_010704	NC_010708
HTNV	黑线姬鼠	韩国	NC_005218	NC_005219
SEOV	褐家鼠	韩国	NC_005236	NC_005237
DBSV	社鼠	中国	AB027523	AB027115
ASV	大林姬鼠	韩国	AY675349	AY675353
SAAV	黑线姬鼠	丹麦	AJ616854	-
DOBV	黄喉姬鼠	巴尔干地区	NC_005233	NC_005234
THAIV	板齿鼠	泰国	AB186420	L08756
SNV	鹿鼠	美国	NC_005216	NC_005215
ANDV	长尾米鼠	阿根廷	NC_003466	NC_003467
PUUV	棕背鼯	欧洲	NC_005224	NC_005223
TOPV	旅鼠	西伯利亚	AJ011646	AJ011647
TULV	普通田鼠	欧洲	NC_005227	NC_005228
VLAV	东方田鼠	俄罗斯远东	AB011630	-
KHAV/MF43	东方田鼠	俄罗斯远东	U35255	AJ011648
Fusong-Mf-682	东方田鼠	中国	EU072480	EU072488
Yakeshi-Mm-59	莫氏田鼠	中国	EU072483	EU072489
Yakeshi-Mm-31	莫氏田鼠	中国	EU072482	-
Yakeshi-Mm-182	莫氏田鼠	中国	EU072484	-

### 结 果

1. HV 检测:共捕获莫氏田鼠 52 只,用 HV 特异性引物检测其肺脏,从 5 份样本中获得部分 L 片段,病毒携带率为 9.62%。从 5 份 L 片段阳性样本中获得 5 个全 S 基因片段(Yakeshi-Mm-29、Yakeshi-Mm-65、Yakeshi-Mm-67、Yakeshi-Mm-131 和 Yakeshi-Mm-137);2 份 L 片段阳性样本中获得全 M 基因(Yakeshi-Mm-29 和 Yakeshi-Mm-65),另外 3 份阳性样本只获得 Gc 片段。

2. S 与 M 片段遗传特征分析:5 株病毒的 S 基因片段全长为 1848 ~ 1861 bp,包含 51 ~ 54 bp 的 5' 非编码区(5' UTR)、1302 bp 的开放读码框(ORF)和 494 ~ 508 bp 的 3' UTR。A、T、C、G 各碱基的含量分别为 31.66% ~ 32.04%、27.19% ~ 27.31%、20.05% ~ 20.41% 和 20.59% ~ 20.85%,AT 含量为 58.82% ~ 59.35%,CG 含量为 40.65% ~ 41.18%,符合 HV 核苷酸序列富含 AT 的特征。

2 株病毒的全 M 片段由 3662 bp 组成,包含 40 bp 的 5' UTR、187 bp 的 3' UTR 及 3435 bp 的 ORF。A、T、C、G 的含量分别为 31.53% ~ 31.68%、29.41% ~ 29.76%、17.69% ~ 18.00% 和 20.92% ~ 21.02%,AT 含

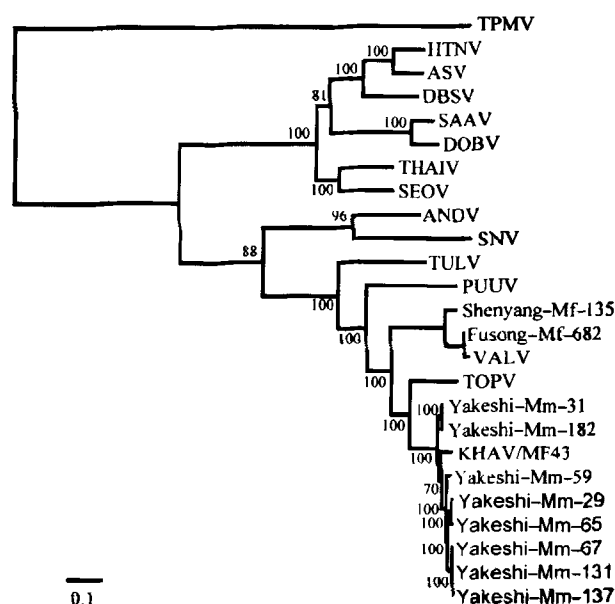
量为 61.09% ~ 61.29%, CG 含量为 38.71% ~ 38.91%, 符合 HV 核苷酸序列富含 AT 的特征。2 株病毒的全 M 基因片段编码 1144 个氨基酸的糖蛋白前体 (GPC), 在 Gn 糖蛋白末端 650 ~ 654 处的氨基酸序列为 WAASA, 构成 GPC 的共翻译切割位点, 是 HV 的保守氨基酸序列。

3. HV 二级结构预测及比较: 对推导出的氨基酸序列进行疏水区、抗原区、信号肽和跨膜区的预测, 结果显示 5 株病毒具有一致的二级结构 (以 Yakeshi-Mm-29 毒株作为代表进行后续分析)。用 Protean 软件对 Yakeshi-Mm-29 病毒株核蛋白 (NP)、糖蛋白 (GP) 的疏水区、抗原区进行分析, 结果显示 NP、GP 的亲水区、抗原区氨基酸位置有重叠, 高峰区重叠性较高; GP 蛋白 N-端有一明显的疏水序列, NP 亲水序列占多数, 结合抗原区的分析可以看出 NP 蛋白含有较多的抗原指数较高区域, 提示 NP 的抗原性较强。与 HTNV 和 SEOV 型 HV 进行比较, 二级结构存在明显差异; Yakeshi-Mm-29 毒株 NP 蛋白含有较多的  $\beta$  折叠, 无规则卷曲结构较少, 疏水区与抗原区结构基本一致, 没有明显差异; GP 蛋白 20 ~ 50 位、1026 ~ 1064 位氨基酸处各有一明显的疏水区, 抗原指数值较低, HTNV 和 SEOV 型 HV 相对应区域的抗原指数值则较高; 367 ~ 401 位氨基酸处有一明显的亲水区, 相对应区域的抗原指数值明显高于 HTNV 和 SEOV 型 HV。

用 SignalP 4.0 软件分析 Yakeshi-Mm-29 毒株的氨基酸序列, 显示 Gn 信号肽序列为 1 ~ 21 位氨基酸、氨基酸序列始于第 22 位氨基酸 Arg, Gc 始于第 655 位氨基酸 Glu, 635 ~ 654 位的氨基酸序列为 Gc 的信号肽序列。用 TMHMM v.2.0 软件对 GP 的跨膜区进行预测, 结果显示 Gn、Gc 蛋白各有一个跨膜区, 均为 N-末端位于膜外、C-末端位于胞浆区的结构, 为标准的 I 型膜蛋白。结果显示, Yakeshi-Mm-29 毒株的信号肽序列及跨膜区与 HTNV 和 SEOV 型 HV 一致, 符合 HV 属病毒的结构特征。

4. S 与 M 基因片段的同源性分析和系统进化分析: 5 株病毒全 S 基因核苷酸序列之间的同源性为 97.1% ~ 99.2%, 与 KHAV 类病毒株同源性为 92.5% ~ 96.4%; 与以前在该地区分离的 KHAV 株 Yakeshi-Mm-59 同源性最高 (95.9% ~ 96.4%), 与 Yakeshi-Mm-31 和 Yakeshi-Mm-182 同源性次之 (94.2% ~ 94.7%)<sup>[12]</sup>; 与 KHAV 的原型株 MF43 同源性为 92.5% ~ 93.4%<sup>[11]</sup>; 与 TOPV 和 VLAV 的同源性分别为 79.6% ~ 80.7%、79.7% ~ 80.1%; 而与其他基

因型 HV 株的核苷酸序列差异较大 (>21.5%)。用 5 株病毒全 S 基因片段构建系统进化树 (图 1), 结果显示本研究分离病毒与从俄罗斯远东地区分离的 KHAV 原型株 MF43 以及以前从牙克石地区莫氏田鼠中分离的病毒株 Yakeshi-Mm-59 处在同一分支, 具备 KHAV 的遗传特征。



注: 黑体为本研究分离株

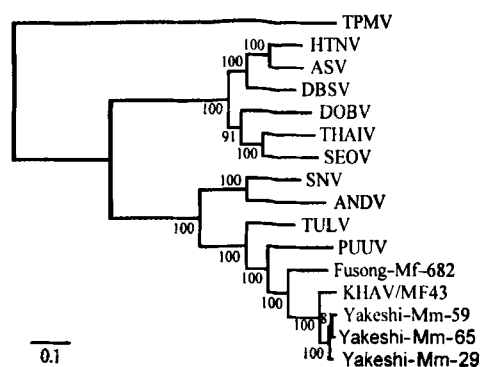
图 1 HV 全 S 核苷酸序列系统进化树

2 株病毒全 M 基因片段核苷酸序列之间的同源性为 95.4%, 与 KHAV 类病毒株的同源性为 88.9% ~ 95.4%, 其中与 Yakeshi-Mm-59 的同源性最高 (94.6% ~ 95.4%)、与 KHAV 原型株 MF43 同源性次之 (88.9% ~ 89.2%)、与 VLAV 型病毒株 Fusong-Mf-682 的同源性较低 (78.9% ~ 79.0%), 与其他基因型 HV 株的序列差异较大 (>25.2%)。全 M 基因片段核苷酸序列构建系统进化树 (图 2), 与全 S 基因片段核苷酸序列构建的系统进化树有一致的拓扑结构, 莫氏田鼠所携带的病毒与 KHAV 类病毒株处在同一分支, 其中与 Yakeshi-Mm-59 毒株的亲缘关系最近, 其次为 KHAV 原型株 MF43, 表明这 2 株病毒的 M 基因片段也具备 KHAV 的遗传特征。

### 讨 论

HV 与宿主动物之间存在共进化, 一种 HV 由 1 种或少数几种关系密切的宿主动物携带<sup>[14]</sup>。Horling 等<sup>[8]</sup>于 1996 年在俄罗斯远东地区的东方田鼠中发现 KHAV, 认为其宿主为东方田鼠。已有研究在内蒙古牙克石地区的莫氏田鼠中发现了该病毒<sup>[4,9]</sup>。

为了进一步证实 KHAV 在牙克石地区的流行以



注:同图 1

图 2 HV 全 M 核苷酸序列系统进化树

及确定其宿主,对该地区莫氏田鼠中的 HV 进行研究。本研究发现牙克石地区莫氏田鼠携带的病毒全 S 和全 M 核苷酸序列与之前在该地区分离的毒株 Yakeshi-Mm-59 同源性最高,分别为 95.9%~96.4% 和 94.6%~95.4%;其次与俄罗斯远东地区发现的 KHAV 原型株 MF43 同源性较高<sup>[8]</sup>。用全 S 与全 M 基因片段核苷酸构建系统进化树,结果显示,所有已知的 KHAV 类病毒株可以分成二个小的分支,分支之间的核苷酸差异 > 5.3%。已有研究从牙克石地区分离的病毒株 Yakeshi-Mm-31 和 Yakeshi-Mm-182 位于一个小分支;本研究分离的 5 株病毒 Yakeshi-Mm-29、Yakeshi-Mm-65、Yakeshi-Mm-67、Yakeshi-Mm-131 和 Yakeshi-Mm-137 与 KHAV 原型株 MF43 以及 Yakeshi-Mm-59 株位于另一个小分支;与 Yakeshi-Mm-59 病毒株亲缘关系最近,与俄罗斯远东地区发现的 KHAV 原型株 MF43 亲缘关系稍远。按照国际病毒分类与命名委员会的分类标准<sup>[1]</sup>,本研究发现莫氏田鼠携带的 HV 为 KHAV,莫氏田鼠是 KHAV 的自然宿主。

Yakeshi-Mm-29 毒株与 HTNV 和 SEOV 型 HV 进行同源性分析显示,核苷酸差异 > 43.8%,推导出的氨基酸序列最高同源性也仅为 63.7%。将 Yakeshi-Mm-29 毒株的 NP、GP 氨基酸序列进行疏水区、抗原区、信号肽和跨膜区与 HTNV 和 SEOV 进行比较,显示 Yakeshi-Mm-29 株 NP 含有较多的  $\beta$  折叠和相对较少的无规则卷曲;亲水区与抗原区氨基酸位置区域有重叠,但结构基本一致,无明显差异。GP 亲水区变化较大,相对应的抗原区域抗原性也存在较大差异。Hopp<sup>[15]</sup> 提出亲疏水性的改变将导致毒株抗原性的改变。包膜 GP 含有中和抗原决定簇,可刺激诱导机体产生中和抗体,是诱发宿主抗病毒免疫的主要保护性抗原。由于我国目前使用的肾综合征出血热疫苗是针对 HTNV 和 SEOV 型 HV,在本

研究结果中 Yakeshi-Mm-29 株和 HTNV、SEOV 核苷酸、氨基酸序列差异较大,且在抗原性和二级结构上存在明显差别,理论上认为目前使用的疫苗可能不能很好地预防 KHAV 感染。

KHAV 引起的 HFRS 临床表现较轻,病死率较低,导致临床诊断率较低。在本研究中,牙克石地区莫氏田鼠病毒携带率较高,为 9.62%;而遗传特征分析以及二级结构的预测结果均显示目前使用的疫苗不能很好地预防 KHAV 感染。因此,有必要加强对 KHAV 感染的监测。

## 参 考 文 献

- [1] Plyusnin A, Beaty BJ, Elliott RM, et al. *Bunyaviridae*/King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, et al. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier Academic Press, 2011: 693-709.
- [2] 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.
- [3] Wang MR, Wang W, Lin XD, et al. Investigation on the natural infectious status of hantaviruses among small mammals in Longquan city, Zhejiang province. *Chin J Epidemiol*, 2011, 32(6): 598-601. (in Chinese)  
王淼岩, 王文, 林献丹, 等. 浙江省龙泉市汉坦病毒宿主动物自然感染状况研究. *中华流行病学杂志*, 2011, 32(6): 598-601.
- [4] Zou Y, Xiao QY, Dong X, et al. Genetic analysis of hantaviruses carried by reed voles *Microtus fortis* in China. *Virus Res*, 2008, 137: 122-128.
- [5] Zhang YZ, Zou Y, Fu ZF, et al. Hantavirus infections in humans and animals, China. *Emerg Infect Dis*, 2010, 16(8): 1195-1203.
- [6] Zhang Y, Yuan J, Yang X, et al. A novel hantavirus detected in Yunnan red-backed vole (*Eothenomys miletus*) in China. *J Gen Virol*, 2011, 92: 1454-1457.
- [7] Guo WP, Lin XD, Wang W, et al. A new subtype of Thottapalayam virus carried by the Asian house shrew (*Suncus murinus*) in China. *Infect Genet Evol*, 2011, 11: 1862-1867.
- [8] Horling J, Chizhikov V, Lundkvist A, et al. Khabarovsk virus: a phylogenetically and serologically distinct hantavirus isolated from *Microtus fortis* trapped in far-east Russia. *J Gen Virol*, 1996, 77: 687-694.
- [9] Zou Y, Wang JB, Hasen GW, et al. Isolation and genetic characterization of hantaviruses carried by *Microtus voles* in China. *J Med Virol*, 2008, 80: 680-688.
- [10] Schmaljohn CS, Jennings GB, Hay J, et al. Coding strategy of the S genome segment of Hantaan virus. *Virology*, 1986, 155(2): 633-643.
- [11] Klempa B, Fichet-Calvet E, Lecompte E, et al. Hantavirus in African wood mouse, Guinea. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12: 838-840.
- [12] Plyusnin A, Vapalahti O, Ulfvies K, et al. Sequences of wild Puumala virus genes show a correlation of genetic variation with geographic origin of the strains. *J Gen Virol*, 1994, 75: 405-409.
- [13] Plyusnin A, Cheng Y, Lehvaslaiho H, et al. Unique and conserved features of Tula hantavirus M gene encoding envelope glycoproteins G1 and G2. *Virus Genes*, 1996, 12: 2257-2263.
- [14] Plyusnin A, Vapalahti O, Vaheri A. Hantaviruses: genome structure expression and evolution. *J Gen Virol*, 1996, 77: 2677-2687.
- [15] Hopp TP. Use of hydrophilicity plotting procedures to identify protein antigenic segments and other interaction sites. *Methods Enzymol*, 1989, 178: 571-585.

(收稿日期: 2012-04-05)

(本文编辑: 万玉立)