

## 汉坦病毒的基因分型及其序列分析

孙永涛 白雪帆 杨为松 黄长彤 周永兴 R373.32

(第四军医大学唐都医院传染科, 西安 710038)

**A** **摘要** 为了探讨从核苷酸水平对汉坦病毒进行分型, 设计两对型特异性引物, 采用反转录和聚合酶链式反应(RT-PCR), 对亚太地区 18 株汉坦病毒进行了扩增鉴定, 并对其中 7 株汉坦病毒的 PCR 产物进行了测序分析。PCR 的分型结果表明, I 型引物只能扩增血清 I 型病毒的 cDNA; II 型引物也只能扩增血清 II 型病毒, 其间无交叉反应。采用巢式 PCR 和限制性内切酶验证了 PCR 产物的特异性。序列分析结果表明, R36M 片段 G1 区的核苷酸序列与血清 I 型病毒代表株 76-118 的同源性为 78.4%, 而与血清 II 型病毒 R22 的同源性为 68.1%; R36 与汉坦病毒序列同源性的成对比较结果也表明, R36 与血清 I 型病毒的同源性均高于血清 II 型病毒; Leakey 虽然能被 II 型引物扩增, 但其序列与血清 II 型病毒 R22 的同源性仅为 44.9%, 故不属于血清 II 型病毒。上述研究结果表明, 反转录聚合酶链反应能对多数汉坦病毒准确分型, 但最终结果尚有赖于序列分析。

**关键词** 肾综合征出血热, 汉坦病毒, 基因分型, 序列分析

肾综合征出血热(HFRS)是由布尼亚病毒科汉坦病毒属(Hantavirus)中的某些病毒引起的一类急性传染病。根据空斑减少中和试验(PRNT)等血清学试验和病毒核苷酸序列研究表明, 汉坦病毒至少有 8 种抗原性基因型明显不同的病毒型别<sup>[1-2]</sup>。在我国主要存在两种临床表现、动物宿主及流行特征截然不同的血清型别, 即血清 I 型(HTN)和血清 II 型(SEO)。近年来, 国内学者采用血清学方法和基因分型方法对国内外多株汉坦病毒进行分型研究<sup>[3-8]</sup>, 均显示出良好的一致性; 但个别汉坦病毒毒株的分型结果却报道不相一致<sup>[6-7]</sup>。为此, 我们采用汉坦病毒 M 片段特异性核苷酸分型引物, 对 18 株汉坦病毒进行反转录和聚合酶链式反应(RT-PCR)扩增鉴定, 并对扩增产物进行序列测定和分析, 现将结果报告如下。

## 材料与amp;方法

- 1 病毒及其培养** Vero-E6 细胞和 18 株汉坦病毒株, 除 84-FLi 为本室分离外, 其余均引自中国预防医学科学院病毒学研究所, 病毒名称和来源详见表 1。分别将毒株接种于长成单层的 Vero-E6 细胞, 37℃ 吸附 2 h 后加维持液, 视 pH 值变化常规换液。种毒 7-10 d 后作间接免疫荧光检查, 荧光强度达 ++++ 时, 将细胞消化洗涤后, -70℃ 冻存, 备统一提取总 RNA。
- 2 总 RNA 提取** 采用 Promega 公司总 RNA 提取试剂盒, 用异硫氰酸胍:酚:氯仿一步法提取细胞总 RNA, 具体步骤参照文献<sup>[9]</sup>。
- 3 引物设计与合成** 参照文献<sup>[10-11]</sup>设计合成引物, 引物 B1, B4, B5, B6 均与汉坦病毒 M 片段互补, 引物 B7, B8, B9 均与汉坦病毒 R22 株 M 片段互补, 其相应的位置及序列详见表 2。所有引物均由中国科学院微生物研究所合成。

表1 毒株名称及其来源

Tab 1 The name and origin of Hantavirus strain

毒株 Virus strain	来源 Origin	地区 Districts	血清型别 Serological type
76-118	黑线姬鼠 <i>Apodemus agrarius</i>	汉城 Seoul	HTN
A9	黑线姬鼠 <i>Apodemus agrarius</i>	江苏 Jiangsu	HTN
H1	病人血液 Patient's blood	朝鲜 Korea	HTN
JR	黑线姬鼠 <i>Apodemus agrarius</i>	吉林 Jilin	HTN
A537	黑线姬鼠 <i>Apodemus agrarius</i>	福建 Fujian	HTN
Chen	病人血液 Patient's blood	安徽 Anhui	HTN
84-FLi	胎儿肝脏 Fetal liver	陕西 Shanxi	HTN
A96	黑线姬鼠 <i>Apodemus agrarius</i>	安徽 Anhui	HTN
Maaji	黑线姬鼠 <i>Apodemus agrarius</i>	汉城 Seoul	HTN
R36	褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	山东 Shandong	HTN
SR-11	褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	日本 Japan	SEO
R22	褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	河南 Henan	SEO
Seoul	褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	汉城 Seoul	SEO
L99	罗赛鼠 <i>Rattus losea</i>	江西 Jiangxi	SEO
HB55	病人血液 Patient's blood	河南 Henan	SEO
GP	褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	美国 USA	SEO
Hu-I	病人血液 Patient's blood	湖北 Hubei	SEO
Leakey	小家鼠 <i>Mus musculus</i>	美国 USA	?

表2 寡核苷酸引物序列

Tab 2 The sequence of oligonucleotide primers

引物序列 Primer sequence	极性 Sense	大小 Length	位置 Position
B1 5'-CCGGATCCTAGTAGTAGACACCGC-3'	(+)	24 mer	M 1-16
B4 5'-CAATCAGCAACATGGGGATA-3'	(+)	20 mer	M 30-49
B5 5'-AATATCAAAGATCCCATG-3'	(-)	18 mer	M 648-631
B6 5'-ATACCCAAGTAAGTTGGAGAGG-3'	(+)	22 mer	M 269-290
B7 5'-AGTTGGCCAAGGCTTTGCATT-3'	(+)	21 mer	M 78-101
B8 5'-TTGCTGATGTGATGGCAGTCTCT-3'	(-)	23 mer	M 748-726
B9 5'-TAACCAAGGTCGTATGCCGAAA-3'	(+)	22 mer	M 271-292

\*B1 引物 5'端含有一酶切位点 Primer B1 includes one restriction enzyme site

4 cDNA 合成及 cDNA 扩增 首先用引物 B1 反转录合成 cDNA 第一链,再分别用 I 型引物 B4、B5 和 II 型引物 B7、B8 扩增 cDNA,具体操作参照文献<sup>[9]</sup>介绍方法进行。

#### 5 PCR 扩增产物的特异性鉴定

5.1 限制性内切酶分析 PCR 扩增产物直接用于限制性内切酶分析。血清 I 型病毒的扩增产物用 Hinc II、Hae III 酶切;血清 II 型病毒的扩增产物用 EcoR I、Sac I 酶切;1U/ul, 37℃ 水浴 2 h。

5.2 巢式 PCR 扩增鉴定 取第一次 PCR 扩增产物 0.5 μL,血清 I 型用 B5、B6 引物再次扩增;血清 II 型用 B8、B9 再次扩增,试验步骤同前。

5.3 PCR 扩增产物的序列测定及分析 将 PCR 扩增产物用 PCR Preps DNA 纯化系统纯化后,采用 Applied Biosystems 自动测序。血清 I 型产物的测序引物为 B6,血清 II 型产物的测序引物为 B9。序列分析及同源性比较采用 DNASIS 软件,在计算机上进行。

## 结 果

### 1 18株汉坦病毒毒株的PCR分型检测

PCR检测能将上述18株病毒分为两型。B4、B5引物能扩增76-118等10株血清I型病毒的cDNA,其产物的大小约600bp;而扩增其余毒株的结果呈阴性。B7、B8引物能扩增SR-11等另外8株病毒的cDNA,扩增产物的大小约670bp,但B7、B8不能扩增血清I型病毒的cDNA,上述结果除Leakey毒株外,均与血清分型结果相吻合,并与国内梁米芳<sup>[6]</sup>等采用单克隆抗体的分型结果一致。

### 2 限制性内切酶分析

用限制性内切酶消化PCR产物后电泳观察,10株血清I型病毒的靶基因均能被Hinc II、Hae III消化,并产生与预期大小相吻合的特异性片段。而血清II型病毒的扩增产物用EcoR I、Sac I消化后,也能产生特异性的酶切片段。

### 3 巢式PCR的扩增鉴定

以第一次PCR扩增产物为模板,B5、B6或B8、B9为引物,进行第二次PCR。结果B5、B6能再次扩增血清I型病毒的靶DNA,其产物大小约400bp,与理论值完全一致。B8、B9引物也能再次扩增SR-11等血清II型病毒的靶DNA,所见片段的大小约470bp。

### 4 对R36、A9、Maaji、H1、L99、GP、Leakey等七株病毒的M片段G1区进行测序

测序结果与发表的汉坦病毒的序列<sup>[10~11]</sup>进行了配对比较,结果见表3。R36的基因分型结果国内不太一致<sup>[6~7]</sup>,本实验测得R36与HTN 76-118M片段的同源率为78.4%,与R22M片段的同源率为68.1%,其核苷酸的序列比较详见图1和图2。

表3 汉坦病毒毒株间的同源性成对比较(%)

Tab 3 Sequence similarities between Hantavirus isolates (%)

毒株号 No. virus isolate	核苷酸同源性成对比较(%) Nucleotide homologies from pairwise comparison(%)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 R36	100	78.4	94.9	77.3	76.3	68.1	71.1	68.9	67.7	48.3
2 76-118		100.0	81.8	92.4	88.5	60.2	70.9	66.0	63.4	46.1
3 A9			100.0	77.2	79.7	65.4	71.1	66.8	68.2	47.9
4 Maaji				100.0	84.0	60.3	67.6	65.2	65.7	46.9
5 H1					100.0	61.6	66.9	64.8	64.3	43.4
6 R22						100.0	89.6	72.9	70.8	44.9
7 SR-11							100.0	78.6	81.7	55.8
8 L99								100.0	79.8	57.7
9 GP									100.0	54.0
10 Leakey										100.0

## 讨 论

自1981年我国从黑线姬鼠中分离出血清I型汉坦病毒和从褐家鼠中分离到血清II型病毒以来,目前我国已分离出上百个毒株。传统的分型方法多根据宿主来源和不同的血清学方法分型,主要有血凝抑制试验,免疫荧光技术(IFA)和空斑减少中和试验(PRNT)等,这些方法在不同程度上均存在操作繁琐和费时等缺点,故国内外学者纷纷采用PCR基因分型方法对汉

78.4% identity in 315 bp overlap

```

R36M.SEQ      10      20      30      40      50
               CTGAGGGGCAAGGCAGCCAGAA-TCATTTGAAGCAGTGTCTGCTGAAGTTGACCTCAAAG
HTNVMB.SEQ    300     310     320     330     340     350
               ATCACTCACAGTCTAGTCAAAATTCATTTGACACAGTGTCCACTGAAGTTGACTTGAAAG
R36M.SEQ      60      70      80      90     100     110
               GAACTTGCTGTGTTAAAGCATAAAATGTTAGAAGAGTCATACCGCAGCAGAAAATCAATAG
HTNVMB.SEQ    360     370     380     390     400     410
               GAAGATGCTGTTCTAAAAACAAAAATGGTGAAGAATCATACCGTAGTAGGAAATCAGTAA
R36M.SEQ      120     130     140     150     160     170
               CTTGTTATGACCTCTCTTGTAATAGTACCTATGCAAGCCTACCCCTGTATATGATTGTGC
HTNVMB.SEQ    420     430     440     450     460     470
               CCTGTTACGACCTGTCTTGCAATAGCACTTACTGCAAGCCAAGACTATACATGATTGTAC
R36M.SEQ      180     190     200     210     220     230
               CAATCCATCCATGCAATATGATGAAAAGTTGTTTACTTG-ACTAGGGCCCCACAGGGTCC
HTNVMB.SEQ    480     490     500     510     520     530
               CAATTATCCATGCAATATGATGAAAAGCTGTTTATTGATTGCGATTGGACCATACAGACTAC
R36M.SEQ      240     250     260     270     280     290
               AAGTGGTCTATGAAAGAACCTACTG-ATCACAGGGGT-CTGATCGAAGGAAAATG-TTTG
HTNVMB.SEQ    540     550     560     570     580     590
               AGCTGTTTATGAGAGAAGTTACTGTATGACAGGAGTCTGATTGAAGGAAAATGCTTTG
R36M.SEQ      300     310
               GTCCAGACCAAAGTGTCCG
HTNVMB.SEQ    600     610
               TCCAGATCAAAGTGTGGT
    
```

图 1 R36 与 HTN76-118M 片段的核苷酸序列及同源性

Fig 1 The sequence similarity between R36 and 76-118

68.1% identity in 248 bp overlap

```

R36M.SEQ      10      20      30      40      50      60
               CTGAGGGGGAAGGCAGCCAGAATGATTTGAAGCAGTGTCTGCTGAAGTTGACCTCAAAGG
R22VM.SEQ     340     350     360     370     380     390
               CAGAAFTATTGAAGTTGTGGAGACCGAAGTCAAGCTTTAAGGGTTATGTATGTAAGCAT
R36M.SEQ      70      80      90     100     110     120
               AACTTGCTGTGTTAAACCATAAAATGTTAGAAGAGTCATACCGCAGCAGAAAATCAATAGC
R22VM.SEQ     400     410     420     430     440     450
               AGAATCGTTGAAAGACCATATAGAAAACAGAAGA-TCATATAGAAAACAGAAGATCTGTAAT
R36M.SEQ      130     140     150     160     170     180
               TTGTTATGACCTCTCTTGTAATACTACCTATTGCAAGCCTACCCCTGTATATGATTGTGCC
R22VM.SEQ     460     470     480     490     500     510
               CTGTTATGATCTAGCCTGTAATAGT-CATTCTATAAGCC-ACTGTTTACATGATTGTCTT
R36M.SEQ      190     200     210     220     230
               AATCCAT-GCATGCAA-TATGATGAAAAGTTGTTT-ACTTGACTAGGCCCCACAGGGTCC
R22VM.SEQ     520     530     540     550     560     570
               ATACCATGGCTTGCAACGATGATGAAAAGTTGTTGATTGGCCTTGATCCGTACAGAAAT
R36M.SEQ      240     250     260     270     280     290
               CAAGTGGTCTATGAAAGAACCTACTG-ATCACAGGGGTCTGATCGAAGGAAAATGTTTGG
R22VM.SEQ     580     590     600     610     620     630
               CAGGTTGCTATGAAAGGACATACTGCACTACCGGTATATTGCAGAA-GAAAATGTTTGG
R36M.SEQ      300     310
               TCCAGACCAAAGTGTCCG
R22VM.SEQ     640
               TCCCGACAAGGCTCTTG
    
```

图 2 R36 与 SEO R22 M 片段的核苷酸序列及同源性

Fig 2 The sequence similarity between R36 and R22

坦病毒进行分型研究,其分型结果与血清学方法呈现出良好的一致性<sup>[3-8]</sup>。本实验结果表明,用PCR技术进行汉坦病毒的基因分型,不仅具有高度的特异性和可重复性,而且可以在较短的时间内获得实验结果。

汉坦病毒R36株自山东褐家鼠中分离。梁米芳等<sup>[6]</sup>证实其为血清I型病毒,也有学者<sup>[7]</sup>采用基因分型方法认为其为血清II型病毒。我们设计两对型特异性引物,采用RT-PCR扩增鉴定R36株的基因型别,结果R36株与B4、B5血清I型引物的扩增结果呈阳性,而不能被血清II型引物所扩增,其反应性与A9、Marji和H1等血清I型病毒的结果相一致,提示R36株为血清I型病毒。R36株的序列分析资料表明,R36M片段G1区的核苷酸序列与血清I型病毒代表株76-118的同源性为78.4%,而与血清II型病毒R22的同源性为68.1%;R36与汉坦病毒序列同源性的成对比较结果也表明,R36与血清I型病毒的同源性均高于血清II型病毒,故从核苷酸水平证实R36为血清I型病毒。

值得注意的是本研究中Leakey虽然能被II型引物扩增,但其序列与血清II型病毒R22的同源性仅为44.9%,故不属于血清II型病毒。国外学者在从事同类研究时发现Leakey能同时被SEO型和PUU型特异性引物所扩增<sup>[3]</sup>,推测可能与病毒在培养时发生交叉污染、宿主动物的双重感染或SEO型与PUU型发生自然重组有关;后经空斑纯化和序列分析证实<sup>[12]</sup>,Leakey与PUU血清型代表株Häl Inäs B1的序列同源性为80.4%,故认为Leakey毒株可能是被SEO型病毒污染所致。上述研究结果表明,反转录聚合酶链反应能对多数汉坦病毒准确分型,但最终结果尚有赖于序列分析;该项研究为从核苷酸水平对汉坦病毒的准确分型,提供了理论依据。

### 参 考 文 献

- 1 Xiao S Y, Spik K W, Li D X *et al.* Nucleotide and deduced amino acid sequences of the M and S genome segments of two puumala virus isolates from Russia. *Virus Res*, 1993, 30:97~103
- 2 Spiropoulou C F, Morzunov S, Feldmann H *et al.* Genome structure and variability of a virus causing hantavirus pulmonary syndrome. *Virology*. 1994, 200:715~723
- 3 Puthavathana P, Lee H W, Kang C Y *et al.* Typing of hantaviruses from five continents by polymerase chain reaction. *Virus Research*, 1992, 26:1~14
- 4 Liang M F, Li D X, Xiao S Y *et al.* Antigenic and molecular characterization of hantavirus isolates from China. *Virus Research*. 1994, 31:219~233
- 5 俞永新,姚智慧,安祺等.应用空斑减少中和试验法对我国流行性出血热病毒进行血清学分型. *病毒学报*, 1991, 7(1):18~22
- 6 梁米芳,宋干,霍子威等.流行性出血热病毒分型诊断试剂盒的建立及其在抗原分析中的应用. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1992, 6(2):152~155
- 7 李盈盈,杭长寿,刘旭等.聚合酶链式反应技术在肾综合征出血热病毒基因分型中的应用. *中华实验和临床病毒学杂志* 1994, 8(1):20~25
- 8 姚智慧,俞永新.应用聚合酶链式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(2):128~134
- 9 孙永涛,白雪帆,黄长形等.RT-PCR, ELISA和IFA技术应用于汉坦病毒检测的比较. *第四军医大学学报* 1995, 16(4):291~293
- 10 Schmaljohn C S, Schmaljohn A L, Dalrymple J M *et al.* Hantaan virus M RNA: coding strategy, nucleotide sequence, and gene order. *Virology*. 1987, 157:31~39

- 11 石立成, 杭长寿, 李德新等. 流行性出血热病毒 R22 株 M 片段克隆及序列分析. 病毒学报, 1991, 7(4): 295~302
- 12 Puthavathana P, Dobbs M, Baek L J *et al.* Comparison of nucleotide sequences among hantavirus belonging to the same serotype: an analysis of amplified DNA by thermal cycle sequencing. Virus Research, 1993, 30: 161~169

## Genomic Typing and Sequence Analysis of Hantavirus

Sun Yongtao Bai Xuefan Yang Weisong Huang Changxing Zhou Yongxing

(*Department of Infectious Diseases, Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710038*)

The present study reports the use of reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) for typing 18 independently isolated Hantaviruses from Asia-Pacific area by 2 sets of type-specific primers and the sequence analysis. The results of PCR showed that Hantaan specific primers could amplify all 10 isolates in the Hantaan serotype, while Seoul specific primers were reactive to all 7 isolates in Seoul serotype and Leakey. No cross-reaction was observed in the experiment. The PCR products were analysed by nested PCR and restriction endonuclease digestion for further confirmation. The sequence analysis of PCR products revealed that the sequence similarities of R36 between 76-118 and R22 were 78.4% and 68.1%, respectively. In addition, a pairwise comparison of sequence homology revealed that R36 shares a higher degree of sequence homology with isolates in Hantaan serotype than those in Seoul serotype. Leakey could be amplified by Seoul specific primers, but it did not belong to the Seoul serotype because of its lower degree of sequence homology among the members of Seoul serotype. The experiment suggested that RT-PCR is useful for the genomic typing of the most Hantavirus strains, but sometimes sequence analysis is needed for further confirmation.

**Key words** Hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS), Hantavirus, Genomic typing