

汉坦病毒中国疫苗株 Z37M 片段的克隆及序列分析

朱函坪, 刘合宾, 姚苹苹, 朱智勇

(浙江省疾病预防控制中心, 肾综合征出血热重点实验室, 浙江杭州市 310009)

Molecular Cloning and Nucleotide Sequence Analysis of the M Genome Segment of Hantavirus Z37, a Chinese HFRS Vaccine Strain

ZHU Han-ping, LIU He-bin, YAO Ping-ping, ZHU Zhi-yong

(Zhejiang Provincial Key laboratory of HFRS,

Zhejiang Provincial Center for Disease Prevention and Control, Hangzhou 310009, China)

Abstract: One of the strain of bivalent HFRS vaccine, Z37 strain was isolated from *Rattus norvegicus* and identified as SEO virus by serological test. The M segment cDNA of Hantavirus Z37 strain was obtained by reverse transcription and polymerase chain reaction, subsequently cloned into pGEM-T vector. The sequence of positive recombinants was determined by the method of dideoxy chain termination, which revealed that the M genomic segment is 3651 nucleotide in length with a predicated long open reading frame encoding a protein of 1133 amino acids. Comparison with HNT type (76-118, A9, HV-114 strains) indicated that there were 71.8%~72.1% homology at the nucleotide level, 76.2~76.7% homology at the amino acid level. Comparison with SEO type (R22, L99, 80-39 strains) showed 95.3~96.1 homology at the nucleotide level, 95.3~99.2% homology at the amino acid level. The results of nucleotide and amino acid comparison indicated that Z37 strain is SEO viruses in molecular level.

Key words: Hantavirus; Z37 strain; M genome segment; Sequencing

摘要: 汉坦病毒 Z37 株是从褐家鼠体内分离到的, 用于生产双价肾综合征出血热疫苗的病毒毒株之一, 血清分型为 SEO 型。利用 RT-PCR 方法扩增 Z37 株 M 基因片段 cDNA, 克隆入质粒载体, 进行核苷酸序列测定及分析。Z37 株 M 基因片段由 3651 个核苷酸组成, 只有一个开放读码框架, 共编码 1133 个氨基酸。与 HTN 型病毒 (76-118、A9、HV-114) 的核苷酸和氨基酸同源性分别为 71.8%~72.1%、76.2%~76.7%, 与 SEO 型 (R22、L99、80-39) 的核苷酸和氨基酸同源性分别为 95.3%~96.1%、95.3%~98.9%。这一结果的获得进一步从分子水平确定了 Z37 株的型别, 并为研制 M 基因片段重组疫苗打下基础。

关键词: 汉坦病毒; Z37 株; M 片段; 序列测定

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2001)01-0015-07

汉坦病毒 (Hantavirus) 是引起肾综合征出血热 (HFRS) 的病原体, 属布尼亚病毒科, 自 1976 年分离到该病毒以来, 已知它至少有 8 个血清型, 我国至少存在 2 个血清型, 即 HTN 型 (姬鼠型) 和 SEO 型 (家鼠型)。Z37 株病毒是我中心 1989 年从褐家鼠体内分离到, 后经酶选育出的一株具有血凝滴度

高、抗原性强等特点的病毒株^[1], 并与 HNT 型病毒 Z10 株^[2]一起联合制备的双价疫苗已正式上市^[3], 目前该疫苗已接种 300 余万人份, 在控制本病的流行中起了很好的作用, 是重要的中国疫苗株。

该病毒基因组含大 (L)、中 (M) 和小 (S) 3 个基因片段的单链负链 RNA, 分别编码多聚酶、外膜糖

蛋白 G1 和 G2 及核蛋白, 作为双价流行性出血热灭活疫苗的主要毒株 Z37 的基因结构, 尚未见报道, 对该毒株进行核酸序列分析, 不但进一步证实了它生物学的血清型别为 SEO 型, 而且为基因工程疫苗的研制, 具有重要的意义。本文应用 RT-PCR 方法扩增 Z37 株全长 M 基因片段 cDNA, 分别克隆入 pGEM-T 质粒载体后, 进行核苷酸序列测定, 并与 HTN 型、SEO 型病毒进行分析比较。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

逆转录酶 M-MLV 和总 RNA 提取试剂液 (Trizol reagent) 购自 GIBCO 公司, Taq 酶及质粒载体 pGEM-T 购自 Promega 公司, 限制性内切酶购自 Fermentas 公司, Agrose 胶提取试剂盒 (Sliver Beads Exact) 购自上海生工。

1.2 病毒与细胞

Z37 毒株由本实验室保存, 沙鼠肾细胞由本实验室制备。将 Z37 毒株接种沙鼠肾单层细胞, 转瓶培养 6 d, 病毒滴度达 $10^{7.5}/1.0$ mL, 收获病毒培养上清液, 用于 RNA 的提取。

1.3 RNA 的提取

按 GIBCO 公司的总 RNA 提取试剂液操作说明进行病毒 RNA 的提取, 溶于 DEPC 水备用。

1.4 反转录与 PCR 扩增

1.4.1 引物设计 参考国内标准株 R22^[4] 病毒 M 片段核苷酸序列设计引物两对。P1, 5'-ccgtcgactagtagtagactccg-3'; P2, 5'-atcttctctgaatcggtgg-3'; P3, 5'-caagagaaccgattcaaaagcc-3'; P (1), 5'-ccgtcgactagtagtagactccg-3'。

1.4.2 cDNA 扩增: 在引物 P1、P3, 和 M-MLV 反转录酶作用下分二段合成 cDNA, 然后分别用 P1、P2 和 P3、P(1) 进行 PCR 扩增, 条件为 94℃ 60 s,

52℃ 60 s, 72℃ 120 s, 30 个循环。

1.4.3 目的片段的克隆和筛选: 用 Agrose 胶提取试剂盒提取目的片段, 分别克隆入 pGEM-T 质粒载体, 转化 *E. coli* DH5 α , 经含氨苄青霉素、X-gal 和 IPTG 的培养基筛选, 煮沸法提取质粒, 酶切鉴定重组子。

1.5 核苷酸序列测定

每个片段分别选 2 个阳性重组子 pGEMg1、pGEMg2, 在 ABI 自动测序仪从正反两个方向分别进行测序, 将得到的全长核苷酸序列与 BLAST 数据库查对, 并与 HNT 型及 SEO 型病毒进行比较。

2 结果

2.1 PCR 扩增产物的检测

在琼脂糖凝胶电泳检查 PCR 扩增产物, 以 λ DNA Marker (*EcoRI/HindIII*) 为标准, 产物分子量分别在 1.6 kb、2.1 kb 左右, 与期望的扩增片段相符, 将重组子 pGEMg1、pGEMg2 进行酶切和 PCR 鉴定, 结果与期望一致, 初步判定为特异性扩增。

2.2 Z37 株 M 片段的全基因序列及编码氨基酸

Z37 株 M 片段由 3 651 个核苷酸组成, 只有一个开放读码框架, 起始密码子位于第 47 至 49 位核苷酸, 终止密码子位于第 3 446 至 3 448 位核苷酸, 共编码 1 133 个氨基酸, 其碱基组成为 A: 30.4%, G: 21.0%, C: 18.6%, T: 30.0%, 3' 与 5' 端 17 个碱基互补, 符合该病毒 A、T 丰富及两端互补的特点 (图 1)。

Z37 株 M 基因片段编码前体糖蛋白, 随后进一步演变为成熟的 G1、G2 糖蛋白, G1 蛋白始于第 18 位氨基酸, G2 蛋白始于第 647 位氨基酸。G1 和 G2 上分别有 5 个和 1 个潜在的与天门冬酰胺相连的糖基化点 (Asn-X-Ser/Thr), 见图 2。

2.3 Z37 株与 SEO 型和 HNT 型的 M 片段核苷酸及编码氨基酸的同源性比较

Z37 株 M 片段与 SEO 型病毒 R22、L99、80-39

表 1 Z37 与 SEO 型及 HTN 型 M 片段核苷酸及编码氨基酸的同源性比较

Table 1 Comparison of nucleotide and amino acid sequence homology of M segment of Z37 strain with SEO and HNT types

毒株 Virus Strain	核苷酸个数 Length of nucleotide	核苷酸同源性 Nucleotide homology (%)	氨基酸个数 Amino acid number	氨基酸同源性 Amino acid homology (%)
76-118	3616	71.8	1135	76.7
A9	3616	72.0	1139	76.2
HV-114	3616	72.1	1135	76.2
R22	3656	95.3	1134	95.3
L99	3652	95.7	1133	98.9
80-39	3651	96.1	1133	94.8
Z37	3651	100	1133	100

```

1 TAGTAGTAGA CTCGCAAGA AACAGCAGTT AAATAACAGC AAGATCATGT GGAATTTGCT ATTACTGACC GCTTTAGTTG GCCAABGCTT TGCATTAATA
101 AATGTGTTTG ACATGAGAAT TCAGTGTCCG CACTCAGTCA ACTTTGGGGA AAGAAGTGTG TCAGGCTATA CAGAATGCC AGCACTGTCA TTACAGGAGG
201 CAGAAGAGCT AGTCCAGAG AGCTCATGCA ACATGGACAA CCACCAATCA CTCTCAACAA TAAATAAATT AACTAAGGTA ATATGGGGA AAAAAGCAAA
301 TCAGGAATCA GCAAAACGAG ATTCAATTGA AGTGTGGAG AGTGAAGTCA GCTTTAAAGG GTTGTGTATG TTAAGCATA GAATGTTGA AGAGTCATAT
401 AGAAAGAGGA GATCAGTAAT GTGTATGAT CTAGCCTGTA ATAGTACATT TTGTAAAGCA ACTGTTTACA TGATTGTTCC TATACATGCA TGCAACATGA
501 TGAAGAGCTG TTTGATTGGC GTTGGTCCGT ATAGAATCCA GGTGTGTAT GAAAGGACAT ACTGCCACTAC AGGTATATTG ACAGAAAGAA AGTGTCTTGT
601 CCGGACAAAG GCTGTTGTGA GTGCATTGAA GAGAGGCATG TATGCCATAG CAAGCATAGA GACAATCTGC TTTTATTTC ATCAGAAAGG GAATACATAT
701 AAGATAGTGA CTCCATCAG ATCAGCAATG GGCTCCAAAT GTAATAATAC AGATACTAAA GTTCAGGGAT ATTATATGTG TATTATTGTT GGAAGCTGTG
801 CCGCTGTATA TCCCTCTGCT GGTGAAGACT TTAGGCAAT GAGGTTTTT TGTGGGATTA TTACTGACC GCATGAGAA GACCATGACC TCCCTGGGA
901 AGAAATCGCA ACATACGAGA TTTGAGGGCA GATAGAGGCA AAAATCCCTC ATACAGTAAG CTCTAAAAAC TTAAGATTGA CTGGTTTTCG AGGTATTGCA
1001 TCATACTCAT CAAGTAGTAT ATTGGCTGCT TCAGAAAGATG GTGCTTTTAT ATTTAGTCTT GGTTTATTTC CTAAGCTAAA TCAGTCAGTC TGTGATAACA
1101 ATCCAGTCCG TTTAATGTGG AGGGCCATAA TTGATTTAAC GGGATACTAT GAGGCAGTCC ATCCGTGCAA TGTATTCTGT GTCTTATCAG GACCAAGTGC
1201 TTCATGTGAA GCGTTTTGAG AAGGAGGTAT TTTCAATATT ACTTCTCCAA TGTGTCTGCT GTCTAAGCAA AATAGTTTTA GAGGAGCTGA GCAGCAGATC
1301 AGCTTTATCT GCCAAGGGGT CGATATGGAT ATTATAGTGT ACTGTAATGG TCAAAAAAAG ACAATCGTAA GAAAAAGATT AGTTATAGGT CAATGCATTT
1401 ATACTATTAC AAGTCTCTTT TCACGTGTGC CAGGGGTTGC CGATTCTATT GCTATTGAGT TGTGTGTCC AGGTTTTCAT GCGTGGGCA CAGCTGCACCT
1501 TTTGATCAGA TTTTGGTTTG GCTGGGATT AATGCTGGA TGTACATTAG GTATTCTCTT AGTTCTCAAG TTTTGTGCAA ATATGCTTCA TACAAGCAAT
1601 CAAGAGAATC GATTCAAAGC CATTCTACGG AAAATAAAGG AGGAGTTTGA AAAACAAGG GGTTCGATGG TTTGTGAGAT CTGTAACTAC GAGTGTGAAA
1701 CATTAAAGGA ATTGAAAGGA CATAATCTAT CATGTGTGA AGGGAGTGC CCATATTGCT TTACCCACTG TGAACCGACA GAAACTGCAA TTCAGGCACA
1801 TTACAAAGTG TGTCAAGCCA CTCACCGATT CAGAGAAGAT TTAATAAAGA CTGTAACCTC TCAAAATATT GGACCCAGCT GTTACCGAAC ATTGAATCTT
1901 TTCAGGTATA AAGTAGGTTG TTATATTCTG ACAATGTGGA CTCTTCTGCT CATTATTGAA TCCATCTCTT GGGCAGCAAG TGCAGCAGAA ATCCCGCTTG
2001 TCCGTCTGTG GACAGATAAT GCTCATGGCG TTGGGAGTGT TCGTATGAT ACAGATGTTG AATTAGACTT TCGTTTGGCA TCTAGTTCTA AGTACACATA
2101 TAAAGACAT GTTACAAAGC CAGTTAATGA GCAACAGAGT GTCTCATTGC ATATAGAAAT TGAAGTCAA GGCATTGGTG CTGATGTTCA TCATGTTGGG
2201 CATTGGTATG ATGCAAGGTT GAACCTAAAA ACTTCAATTC ACTGCTADGG TGCCCTGACA AAATACCAAT ATCCGTGGCA CACCAGCAAAA TGTCAATTTG
2301 AGAAAGATTA TGAGTATGAA AATAGTTGGG CATGCAACCC CCGAGATTGC CGAGGGTTG GTACAGTTG TACTGCTTGT GGATTATATG TAGATCAATT
2401 GAAGCGGTA GGAACAGGCT TCAAAATTAT AAGTGAAGA TACAGTAGAA AAGTGTGCTT GCAGTTTGGT GAAGAATACC TTTGTAAGC AATTGATATG
2501 AATGATTGCT TTTGACTAG GCATGCCAAA ATATGTATAA TTGGACTGT ATCTAAGTTT TCTCAAGGTG ACACAGTACT ATTTCTTGGG CCCATGGAAG
2601 GAGTGGTAT AATCTTAAA CACTGTTGTA CATCTACCTG TCAGTTTGGG GACCCTGGTG ATGTTATGGG TCCAAAAGAT AAACCATTTA TTTGCCCTGA
2701 ATTCGACGG CAATTGAGGA AGAAATGTAA TTTGGCAGA ACTGCAGTTT GTGAATATGA TGGBAACATT ATTTGAGGCT ATAGAAAGT TGTGAAACA
2801 ATTGATCTT TCCAATCATT TAACACAAGC AATATACACT TCACATGTA GAGAATTGAA TGGAGAGACC CTGATGATAT GCTTCGGAT CATATTAATA
2901 TTTTATTTC TAAAGATATT GATTTGAAA ATATGGCCA GAATCCTTGT AAAGTAGGGC TCCAGGCAGC AAACATAGAA GGTGCTTGGG GTTCAGGTGT
3001 CGGTTTACA CTCACATGCC AGGTGTCTCT CACAGAATGC CCAACATCTC TCAGGTCAAT AAAGGCTGTG GACATGGCAA TTTGTTATGG TGCAGAAAGT
3101 GTACACTGT CAGGAGGCA AAATACTGTC AAAATTACCG GAAAGGTTGG CCATAGTGGT TCTTCAATTA AAGCTGTCA TGGGAAGAA TGTTCATCAA
3201 CTGGCTTCA AGCCAGTCCA CCACATCTGG ATAAGGTCAA TGTATCTCT GAGTTAGAAA ACCAGAAAGT TTATGATGAT GGTGCACCTG AATGTGGCAT
3301 TACTTGTGG TTTAAAAAAT CAGGTGAATG GGTATGGGT ATAATCAATG GGAAGTGGT TGTGCTAATT GTTTTGTGTG TCCCTGCTCT CTTTTCTCTT
3401 ATGCTGTTGA GATCTTGTG TCGTGTAGA AAGCATAAAA AATCATAAAT CTTGGCTATC AATCTTAAAC TCATGTATTA AGCTTTAAAC ACTTTACCAT
3501 TAAAACTTA ACCTGCTCT AATATCTGAC AACTAAGTTT TATTTTATT TTTATATGGA TTAATTACTA AAAAAAATAC TCTCTCTAT CTCCCAATGT
3601 TTTATTGATT CACCGGGGTG TTTCTTGGC ATCCTGGGA GTCTACTACT A

```

图 1 Z37 株 M 片段全部结构区基因序列

Fig. 1 Nucleotide sequence of entire M segment gene of Z37 strain

的核苷酸同源性分别为 95.3%、95.7%、96.1%、推导氨基酸的同源性为 95.3%、98.9%、98.8%；Z37 株 M 片段与 HNT 型病毒 76-118、A9、HV-114 的核苷酸同源性分别为 71.8%、72%、72.1%，推导氨基

酸的同源性为 76.7%、76.2%、76.2%。（见表 1）；G1 中的 5 个糖基化位点，全部与 SEO 型 R22、L99、80-39 保守，与 HTN 型 76-118、A9、HV-114 有 4 个保守。在 G2 中只有一个糖基化位点，7 株病毒全部

	>G1	
Z17	M--WSLLLLAALYGGQFALKVDFMRTIQCPHSVNFGETSVSGYTELPPSLQEAQELVPESSONMDNHQSLSTINKLTKVYWRKKANQESANQSFVESEVSPKGLCM	108
L94	M--WSLLLLAALYGGQFALKVDFMRTIQCPHSVNFGETSVSGYTELPPSLQEAQELVPESSONMDNHQSLSTINKLTKVYWRKKANQELANQSFVESEVSPKGLCM	108
8039	M--WSLLLLAALYGGQFALKVDFMRTIQCPHSVNFGETSVSGYTELPPSLQEAQELVPESSONMDNHQSLSTINKLTKVYWRKKANQESANQSFVEMSEVSPKGLCM	108
R22	M--WSLLLLAALYGGQFALKVDFMRTIQCPHSVNFGETSVSGYTELPPSLQEAQELVPESSONMDNHQSLSTINKLTKVYWRKKANQESANQSFVESEVSPKGLCM	108
76118	MGLWKLVMASLWVPAYLTLRNAYDMKTECPHTVSFGNSYIGVYELPPTPLADTQMVPESSONMDNHQSLNTITRYTQVSWRKGADQASQNSFVAVAEVDLKGTCTV	110
A9	MGLWKLVMASLWVPAYLTLRNAYDMKTECPHTVSFGNSYIGVYELPPTPLADTQMVPESSONMDNHQSLNTITRYTQVSWRKGADQASQNSFVAVAEVDLKGTCTV	110
HV114	MGLWKLVMASLWVPAYLTLRNAYDMKTECPHTVSFGNSYIGVYELPPTPLADTQMVPESSONMDNHQSLNTITRYTQVSWRKGADQASQNSFVAVAEVDLKGTCTV	110
	* * * * *	
Z17	I KHRMVEESYRNRSSVICYDLACNSTFLKPTVYMTYPIHACNMMSCLTGLGPRYIQVYVYERTYCTTGLTEGKCFVPDKAVYSALKRQWYALASLETICFFIHKQNTY	218
L94	LKHRMVEESYRNRSSVICYDLACNSTFLKPTVYMTYPIHACNMMSCLTGLGPRYIQVYVYERTYCTTGLTEGKCFVPDKAVYSALKRQWYALASLETICFFIHKQNTY	218
8039	LKHRMVEESYRNRSSVICYDLACNSTFLKPTVYMTYPIHACNMMSCLTGLGPRYIQVYVYERTYCTTGLTEGKCFVPDKAVYSALKRQWYALASLETICFFIHKQNTY	218
R22	I KHRMVEESYRNRSSVICYDLACNSTFLKPTVYMTYPIHACNMMSCLTGLGPRYIQVYVYERTYCTTGLTEGKCFVPDKAVYSALKRQWYALASLETICFFIHKQNTY	218
76118	I KHRMVEESYRNRSSVICYDLACNSTFLKPTVYMTYPIHACNMMSCLTGLGPRYIQVYVYERTYCTTGLTEGKCFVPDKAVYSALKRQWYALASLETICFFIHKQNTY	220
A9	LKHRMVEESYRNRSSVICYDLACNSTFLKPTVYMTYPIHACNMMSCLTGLGPRYIQVYVYERTYCTTGLTEGKCFVPDKAVYSALKRQWYALASLETICFFIHKQNTY	220
HV114	LKHRMVEESYRNRSSVICYDLACNSTFLKPTVYMTYPIHACNMMSCLTGLGPRYIQVYVYERTYCTTGLTEGKCFVPDKAVYSALKRQWYALASLETICFFIHKQNTY	220
	** * **	
Z17	KTYVATISAMGSKQNTDTRVQGYIUCIGNSAPYYAPAGEDFRAMEVFSGITSPIKGDHDLPGFEIATYQISQTEAKIPHTVSSKALKLITAFAGIPSYSSSTIIAA	328
L94	KTYVATISAMGSKQNTDTRVQGYIUCIGNSAPYYAPAGEDFRAMEVFSGITSPIKGDHDLPGFEIATYQISQTEAKIPHTVSSKALKLITAFAGIPSYSSSTIIAA	328
8039	KTYVATISAMGSKQNTDTRVQGYIUCIGNSAPYYAPAGEDFRAMEVFSGITSPIKGDHDLPGFEIATYQISQTEAKIPHTVSSKALKLITAFAGIPSYSSSTIIAA	328
R22	KTYVATISAMGSKQNTDTRVQGYIUCIGNSAPYYAPAGEDFRAMEVFSGITSPIKGDHDLPGFEIATYQISQTEAKIPHTVSSKALKLITAFAGIPSYSSSTIIAA	328
76118	KTYVATISAMGSKQNTDTRVQGYIUCIGNSAPYYAPAGEDFRAMEVFSGITSPIKGDHDLPGFEIATYQISQTEAKIPHTVSSKALKLITAFAGIPSYSSSTIIAA	330
A9	KTYVATISAMGSKQNTDTRVQGYIUCIGNSAPYYAPAGEDFRAMEVFSGITSPIKGDHDLPGFEIATYQISQTEAKIPHTVSSKALKLITAFAGIPSYSSSTIIAA	330
HV114	KTYVATISAMGSKQNTDTRVQGYIUCIGNSAPYYAPAGEDFRAMEVFSGITSPIKGDHDLPGFEIATYQISQTEAKIPHTVSSKALKLITAFAGIPSYSSSTIIAA	330
	** * **	
Z17	SEGRFTSPGLFPLNINCDNNALPLIWRGIDLHYEAVHPCVYVCLSGPAGASCEAFSEGGIFNITSPMCLVSKQNRFRAAEQIISFCURVMDIIVYVNGARK	438
L94	SEGRFTSPGLFPLNINCDNNALPLIWRGIDLHYEAVHPCVYVCLSGPAGASCEAFSEGGIFNITSPMCLVSKQNRFRAAEQIISFCURVMDIIVYVNGARK	438
8039	SEGRFTSPGLFPLNINCDNNALPLIWRGIDLHYEAVHPCVYVCLSGPAGASCEAFSEGGIFNITSPMCLVSKQNRFRAAEQIISFCURVMDIIVYVNGARK	438
R22	SEGRFTSPGLFPLNINCDNNALPLIWRGIDLHYEAVHPCVYVCLSGPAGASCEAFSEGGIFNITSPMCLVSKQNRFRAAEQIISFCURVMDIIVYVNGARK	438
76118	SIAKRFVSNGLFPLNINCDNNALPLIWRGIDLHYEAVHPCVYVCLSGPAGASCEAFSEGGIFNITSPMCLVSKQNRFRLEQQVNFVCLQRVMDIIVYVNGARK	440
A9	SIAKRFVSNGLFPLNINCDNNALPLIWRGIDLHYEAVHPCVYVCLSGPAGASCEAFSEGGIFNITSPMCLVSKQNRFRLEQQVNFVCLQRVMDIIVYVNGARK	440
HV114	SIAKRFVSNGLFPLNINCDNNALPLIWRGIDLHYEAVHPCVYVCLSGPAGASCEAFSEGGIFNITSPMCLVSKQNRFRLEQQVNFVCLQRVMDIIVYVNGARK	440
	* * * * *	
Z17	VILIKTVIHAQYIYIISLNLIPYVMSIAHILVPGHIGWAIAALITFCFGWVLPACTLAHLYVIRFFANGLTSMQNRKAKIIRKIKIEFEKIKGSMVCLDYKY	548
L94	VILIKTVIHAQYIYIISLNLIPYVMSIAHILVPGHIGWAIAALITFCFGWVLPACTLAHLYVIRFFANGLTSMQNRKAKIIRKIKIEFEKIKGSMVCLDYKY	548
8039	VILIKTVIHAQYIYIISLNLIPYVMSIAHILVPGHIGWAIAALITFCFGWVLPACTLAHLYVIRFFANGLTSMQNRKAKIIRKIKIEFEKIKGSMVCLDYKY	548
R22	VILIKTVIHAQYIYIISLNLIPYVMSIAHILVPGHIGWAIAALITFCFGWVLPACTLAHLYVIRFFANGLTSMQNRKAKIIRKIKIEFEKIKGSMVCLDYKY	548
76118	VILIKTVIHAQYIYIISLNLIPYVMSIAHILVPGHIGWAIAALITFCFGWVLPACTLAHLYVIRFFANGLTSMQNRKAKIIRKIKIEFEKIKGSMVCLDYKY	550
A9	VILIKTVIHAQYIYIISLNLIPYVMSIAHILVPGHIGWAIAALITFCFGWVLPACTLAHLYVIRFFANGLTSMQNRKAKIIRKIKIEFEKIKGSMVCLDYKY	550
HV114	VILIKTVIHAQYIYIISLNLIPYVMSIAHILVPGHIGWAIAALITFCFGWVLPACTLAHLYVIRFFANGLTSMQNRKAKIIRKIKIEFEKIKGSMVCLDYKY	550
	** * **	
Z17	FCFLKRLKAIKISVQGLPYCFIKLPTIATIQAHYKVCATIRIREDLKRIVIPQNGPCYPIHLFRYKSRCYITMWFLLIESTHWAASAAEIPLVPLWTDN	658
L94	FCFLKRLKAIKISVQGLPYCFIKLPTIATIQAHYKVCATIRIREDLKRIVIPQNGPCYPIHLFRYKSRCYITMWFLLIESTHWAASAAEIPLVPLWTDN	658
8039	FCFLKRLKAIKISVQGLPYCFIKLPTIATIQAHYKVCATIRIREDLKRIVIPQNGPCYPIHLFRYKSRCYITMWFLLIESTHWAASAAEIPLVPLWTDN	658
R22	FCFLKRLKAIKISVQGLPYCFIKLPTIATIQAHYKVCATIRIREDLKRIVIPQNGPCYPIHLFRYKSRCYITMWFLLIESTHWAASAAEIPLVPLWTDN	658
76118	FCFLKRLKAIKISVQGLPYCFIKLPTIATIQAHYKVCATIRIREDLKRIVIPQNGPCYPIHLFRYKSRCYITMWFLLIESTHWAASAAEIPLVPLWTDN	660
A9	FCFLKRLKAIKISVQGLPYCFIKLPTIATIQAHYKVCATIRIREDLKRIVIPQNGPCYPIHLFRYKSRCYITMWFLLIESTHWAASAAEIPLVPLWTDN	660
HV114	FCFLKRLKAIKISVQGLPYCFIKLPTIATIQAHYKVCATIRIREDLKRIVIPQNGPCYPIHLFRYKSRCYITMWFLLIESTHWAASAAEIPLVPLWTDN	660
	** * **	
Z17	MRVGSVPMHIEELIISLSSSKYTKRRIENPNDQGSVSIHIEIESQGLADVYHILGHWYDARLNKTSIFHCYGCIRYQYVHTAKCHIEKDYIYENSWACNPPD	767
L94	MRVGSVPMHIEELIISLSSSKYTKRRIENPNDQGSVSIHIEIESQGLADVYHILGHWYDARLNKTSIFHCYGCIRYQYVHTAKCHIEKDYIYENSWACNPPD	767
8039	MRVGSVPMHIEELIISLSSSKYTKRRIENPNDQGSVSIHIEIESQGLADVYHILGHWYDARLNKTSIFHCYGCIRYQYVHTAKCHIEKDYIYENSWACNPPD	767
R22	MRVGSVPMHIEELIISLSSSKYTKRRIENPNDQGSVSIHIEIESQGLADVYHILGHWYDARLNKTSIFHCYGCIRYQYVHTAKCHIEKDYIYENSWACNPPD	768
76118	MRVGSVPMHIEELIISLSSSKYTKRRIENPNDQGSVSIHIEIESQGLADVYHILGHWYDARLNKTSIFHCYGCIRYQYVHTAKCHIEKDYIYENSWACNPPD	769
A9	MRVGSVPMHIEELIISLSSSKYTKRRIENPNDQGSVSIHIEIESQGLADVYHILGHWYDARLNKTSIFHCYGCIRYQYVHTAKCHIEKDYIYENSWACNPPD	769
HV114	MRVGSVPMHIEELIISLSSSKYTKRRIENPNDQGSVSIHIEIESQGLADVYHILGHWYDARLNKTSIFHCYGCIRYQYVHTAKCHIEKDYIYENSWACNPPD	769
	** * **	



图 2 Z37、199、80-39、R22、76-118、A9 和 HV-114 病毒 M 片段 G1 和 G2 蛋白氨基酸序列比较
方框表示糖基化位点，“*”表示完全保守，“.”表示高度保守。

Fig. 2 Comparison of the predicted amino acid sequences between Z37, L99, 80-39, R22, 76-118, A9 and HV-114
"Box" indicate the glycosylation sites, "*" indicate perfectly conserved, "." indicate well conserved.

保守(见图 2), 其亲疏水基团分布也表现出很高的相似性(见图 3)。

3 讨论

以往对汉坦病毒的型别大都是通过血清学方法来确定, 由于这类病毒的结构相似, 存在着交叉反应, 导致血清学鉴定的局限性, 影响对它的正确鉴定, 因此, 通过对病毒基因序列的测定和分析, 可进一步确证它的型别。

通过对 Z37 株的 M 基因片段的测序, 并与部份 SEO 型和 HTN 型病毒的核苷酸及编码氨基酸同源性比较发现, Z37 株 M 基因片段与 SEO 型(R22、L99、80-39)病毒的 M 基因片段, 无论从核苷酸序列

和推导氨基酸序列的同源性, 远远高于同 HTN 型病毒(76-118、A9、HV-114)的 M 基因片段; Z37 株 M 片段的 6 个糖基化位点, 全部与 SEO 型 R22、L99、80-39 保守, 与 HTN 型 76-118、A9、HV-114 只有 5 个保守, 基于以上两点, 在分子水平上证实 Z37 株为 SEO 型病毒。

汉坦病毒 M 基因片段编码的糖蛋白, 被证实是病毒的中和抗原和血凝抗原的所在^[5,6], 也是病毒致病性和疫苗研究的重点。Z37 株作为生产 HFRS 灭活疫苗的毒株, 其接种人体后的抗体阳转率为 90% 以上, 是良好的疫苗株。国内外已开展利用汉坦病毒 M 基因片段进行体外表达的工作^[7,8], 但表达的结果均不理想。本研究获得的疫苗株 Z37 的

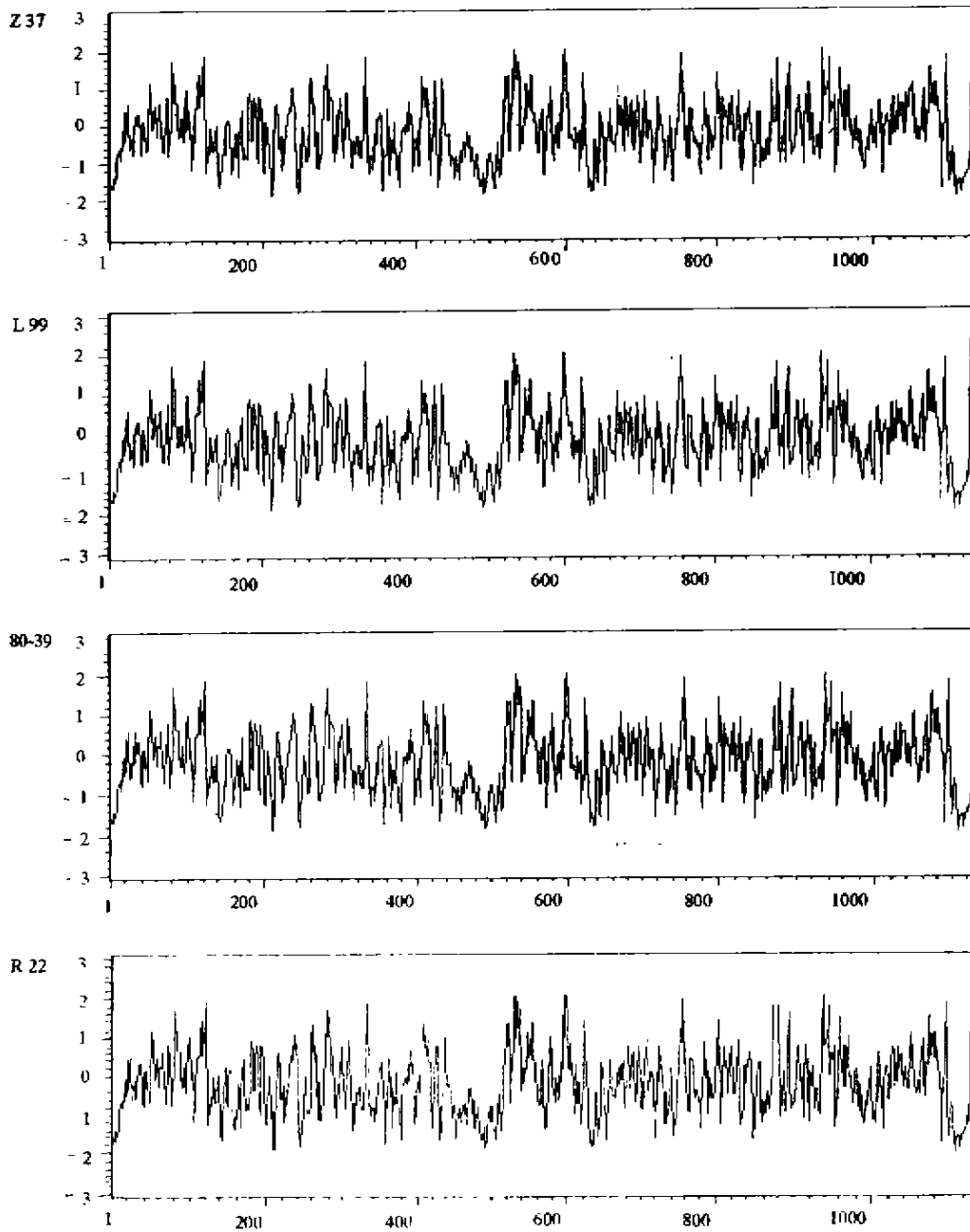


图3 Z37、L99、80-39和R22氨基酸亲疏水性图形
零上为亲水基团,零下为疏水基团

Fig 3 Hydropathic plots of amino acids predicted from Z37、L99、80-39 and R22 M segments
Hydrophilic residues appear above the line and hydrophobic residues below the line.

M基因片段,为进一步研究 HFRS 基因疫苗提供了重要的后备毒株。

参考文献

- [1] 朱智勇,李敏红,李岩金,等.肾综合征出血热灭活疫苗毒种的选育及其生物学特性的研究[J].中国生物制品学杂志,1998,11(1):3-5.
- [2] 朱智勇,傅桂明,翁景清,等.自出血热病人分离到一株EHF病毒的特性[J].浙江医学,1984,6(6):1-3.
- [3] 朱智勇,李岩金,陆群英,等.双价肾综合征出血热沙鼠肾细胞灭活疫苗免疫效果观察[J].中国媒介生物学及控制杂志,1997,8(5):377-380.
- [4] Xu, X., Ruo S Y., Tang YW, *et al.* Molecular characterization and expression of glycoprotein gene of Hantavirus R22 strain iso-

- lated of *Rattus norvegicus* in China[J]. *Virus Research*, 1991, 21: 35-52.
- [5] Dantas JR, Jr, Okuno Y, Asala H, *et al.* Characterization of glycoproteins of viruses causing hemorrhagic fever with renal syndrome using monoclonal antibody[J]. *Virology*, 1986, 151: 379-384.
- [6] Arikawa J, Schmaljohn AL, Dalrymple LM, *et al.* Characterization of hantaan viruses envelope glycoprotein antigenic determinants defined by monoclonal antibodies[J]. *J Gen Virol*, 1989, 70: 615-624.
- [7] 石晓宏, 杭长寿, 宋干, 等. 汉滩病毒包膜糖蛋白 G1 和 G2 重组杆状病毒表达载体的构建与表达及其免疫原性[J]. *病毒学报*, 1995; 11(3): 208-213.
- [8] 黄长形, 杨为松, 杭长寿, 等. 用不同载体在大肠杆菌中表达汉滩病毒囊膜糖蛋白 G1 和 G2[J]. *中国病毒学*, 1997, 12(4): 322-328.

(上接第 14 页)

2.1.8 文章首页地脚处:

收稿日期: , 修回日期: (由本刊填写)

* 基金项目: 基金名称 1(编号); 基金名称 2(编号)。

作者简介: 作者(出生年, 如 XXXX-), 性别(民族, 汉族不写), 籍贯(如 XX 省 XX 籍), 职称, 学位, 从事专业。

** 通讯作者简介(同作者简介)及相关内容(可增加电话、电传和电子信箱)。

2.1.9 文章内标题层次的标号采用阿拉伯数字分级编号法, 一级通常为“1 材料和方法”, “2 结果”, “3 讨论”; 二级为 1.1、1.2……, 三级为 1.1.1、1.1.2……。

2.1.10 参考文献集中附于文后, 综述附文献一般不超过 50 篇, 研究报告不超过 30 篇, 请勿引用未公开发表的文献。

2.2 综述的各级标题可由作者自定。其题名、作者、单位、脚注、参考文献等要求同上。

2.3 简报不要求撰写摘要, “材料和方法”、“结果”和“讨论”可不另列标题。

3 文稿撰写要求

3.1 文稿用计算机打印, 字体请勿小于 5 号字。行间要留适当行距以便修改。文中大小写、正斜体、上下角、以及希腊文、罗马数字均应打印清楚。

3.2 使用法定的计量单位。如: 分子量用 *Mr*; 溶液浓度单位不用 M、N 而用 mol/L; 体积单位不用 l 而用 L (ml、 μ l 分别应为 mL、 μ L); 时间单位用 s、min、h、d 分别表示秒、分、小时和天数; 离心机转速用 r/min 取代 rpm, 或用 g(离心力)表示。

3.3 蛋白质和核酸名称的英文缩写一律用正体, 首字母大写或全部大写; 限制性内切酶的前 3 个字母用斜体, 基因座名称的英文缩写一律用斜体。

3.4 图和表格

3.4.1 图片(照片)一式 2 份, 至少 1 份是原件。图片尺寸不宜过大或过小, 除序列图(宽度 < 15cm)外, 一般图的宽度控制在 7.5cm 以内, 务必排列紧凑整齐。文稿中应留出插图的适当位置, 先见文, 后见图, 不要集中在文后, 且需标出中英文图题和图注。照片要求清晰匀称, 反差适中, 没有折痕, 插图需用硫酸纸或高级白纸黑墨描绘, 线条粗细均匀, 倍率适中, 蛋白质和核酸结构序列图用激光打印机打印, 要求字迹清晰、规范, 以供直接制版。

3.4.2 表格请用三线表, 不用竖线和斜线, 表题和说明要简单明了, 置于表格上方, 并有中英文对照,

4 参考文献著录格式

4.1 本刊参考文献采用顺序编码制, 作者应在引文相应处右上角用 [] 注明引用文献序号, 序号以文中出现先后编排。

(下转第 77 页)