

肾综合征出血热疫苗候选毒株 A16 株的分子特性

姚智慧¹,董关木¹,俞永新¹,贾克丽²,严玉辰²

(1. 中国药品生物制品检定所,北京 100050; 2. 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所,北京 102206)

Molecular Characteristics of the Seed Virus of HFRS Candidate Vaccine A16 Strain

YAO Zhi-hui¹, DONG Guan-mu¹, YU Yong-xin¹, JIA Ke-li², YAN Yu-chen²

(1. National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China;

2. Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Preventive Medical Academy of Sciences, Beijing 102296, China)

Abstract: For further studying on the molecular characteristics of A16 strain, which is the seed virus of HFRS candidate vaccine, the M and S segments of A16 strain were amplified by RT-PCR and then sequenced respectively. Sequence assay showed that M segment of A16 strain contained 3615 nucleotides, encoding 1133 amino acids, and S segment of A16 strain contained 1770 nucleotides, encoding 429 amino acids. The homology of M segment of A16 strain's nucleotide sequences and induced amino acid sequences with that of other HTN type virus varied from 75.7% to 90.3% and 85.9% to 97.1% respectively. Namely, the mutation of M segment of A16 strain's nucleotide sequence and amino acid sequence with that of other HTN type virus varied from 9.7% to 24.3% and 2.9% to 14.1% respectively. Like M segment, the homology of S segment of A16 strain's nucleotide sequences and induced amino acid sequences with that of other HTN type virus varied from 76.0% to 90.0% and 92.1% to 97.7%, and 67.0% to 67.7% and 81.7% to 82.6% with that of SEO type virus respectively. The result showed that A16 strain was one subtype strain of HTN type virus.

Key words: Hemorrhagic fever with renal syndrome vaccine; A16 strain, M&S segment, Sequence analysis, Phylogenetic tree, Subtype

摘要: 为研究肾综合征出血热疫苗候选毒株 A16 株的分子基础,应用 RT-PCR 方法扩增并测定了 A16 株的 M 和 S 片段的序列,结果 A16 株 M 片段的全基因序列共 3615 个核苷酸,编码 1133 个氨基酸。S 片段的全基因序列共 1770 个核苷酸,编码 429 个氨基酸。A16 株 M 片段核苷酸全基因序列及其推导的氨基酸与 HTN 型毒株同源率为 75.5%~90.3% 和 85.9%~97.1%,即 A16 与 HTN 同型毒株间的差异高达 9.7%~24.3% 和 2.9%~14.1%,而与 SEO 型的同源率比较,核苷酸和氨基酸分别仅为 70.2%~70.8% 和 73.4%~76.7%。S 片段的序列同源率与 M 片段的结果相类似,即核苷酸和氨基酸的同源率与 HTN 型毒株分别为 76.0%~90% 和 92.1%~97.7%,与 SEO 型为 67.0%~67.7% 和 81.7%~82.6%。结果显示,A16 株虽然属于 HTN 型,但该毒株为 HTN 型病毒的新亚型病毒株。

关键词: 肾综合征出血热疫苗; A16 株; M 和 S 片段; 序列分析; 系统发生树; 亚型

中图分类号: R692 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2001)04-0315-06

收稿日期: 2001-01-09, 修回日期: 2001-04-23

作者简介: 姚智慧(1965-), 男, 山西省籍, 副研究员, 主要研究虫媒类病毒的生物学特性、分子生物学基础、预防用疫苗及其质量控制方法等。E-mail: zhyao@ht.rol.cn.net

GenBank 注册号: AF288645, AF288646

肾综合征出血热临床上以发烧,出血和肾损害为主要特征,每年在欧洲和亚洲有近10万病例发生,其病原为汉坦病毒。疫苗预防是目前唯一有效的控制手段,目前我国已研制成功和正在研究的有多种类型的灭活疫苗,鸡胚细胞灭活疫苗是由中国预防医学科学院流行病学和微生物学研究所研制,应用A16株为疫苗毒株。A16毒株分离自陕西省西安市长安区黑线姬鼠肺^[1],交叉中和试验和单克隆反应结果证实A16毒株具有较好的抗原性和免疫原性,抗原决定簇较完全^[2,3],纯毒试验和空斑减少中和试验分型和PCR分型结果均证实为HTN型病毒^[4,5],制备的鸡胚细胞疫苗对同型病毒具有良好的保护,经国家药品监督管理局批准进行II期临床观察。为了解A16株病毒的分子基础,我们克隆了A16株病毒的M和S片段全基因,并将序列的结果与汉坦病毒的国内流行毒株进行了分析比较。

1 材料和方法

1.1 乳鼠、细胞和毒株

毒株传代用乳鼠来自我所实验动物室,Vero-E6细胞来自ATCC。A16毒株分离自陕西省西安市长安区黑线姬鼠肺^[1],小白鼠乳鼠脑内传代和Vero-E6细胞传代保存,本研究为SM15E1(乳鼠脑15代及Vero-E6细胞1代)。

1.2 试剂

细胞培养用试剂为GIBCO BRL产品,T载体,连接酶和INVaF'宿主菌株为Invitrogen产品,随机引物为Amessarin公司产品,逆载录酶和PCR相关试剂及质粒DNA纯化试剂盒购于Promega公司。

1.3 引物的设计与合成

M片段引物P1(5'-TAGTAGTAGACTCCDCAA-3'),P3(5'-ATCCTCTGGGCTGCAAGTG-3'),P4(5'-TAGTAGTAGACTCCGCAAGAT-3')参见文献^[6,7],HG2R1(5'-TGAACTAGCTGGGGTTG-3')参见文献^[8],参考已知的Hantaan病毒标准株76-118的S片段核苷酸序列^[9],设计用于扩增S片段的一对引物S1(5'-TAGTAGTAGACTCCCTAAAGA-3'),S2(5'-TAGTAGTAGTATGCTCCCTAA-3'),由GIBCO BRL公司合成。

1.4 病毒RNA的提取,RT-PCR和产物的克隆和

筛选

病毒感染Vero-E6细胞7-10d左右,病毒滴度近 10^7 CCID₅₀/mL,用GIBCO BRL公司的Trizol总RNA提取试剂盒提取感染病毒的细胞总RNA,溶于无RNase的水中。用随机引物和AMV逆转录酶合成cDNA,分别用P1P2和P3P4,S1S2进行一次35个循环的PCR。将PCR产物克隆于T载体,转化DH5α宿主菌,用蓝白斑进行筛选鉴定。

1.5 DNA序列测定,拼接和分析比较

酶切和PCR鉴定正确的克隆经柱纯化后,用T7和M13公用引物和Perkin Elmer(PE)公司的BigDye™测序试剂盒反应后,在ABI PRISM™377 DNA测序仪进行序列测定。测定的结果应用DNASTAR软件拼接,并应用J.Hein方法将M和S片段全基因序列测定结果分别与GenBank中HTN型和SEO型病毒的M和S全基因序列进行比较,同时绘出相应的系统发生树。

2 结果

2.1 A16株M片段的全基因序列及其编码的氨基酸

序列测定表明A16毒株M片段的全基因序列共3615个核苷酸,四种核苷酸的比例分别为A30.44%,T30.14%,G20.72%,C18.70%,GC含量为39.42%,AT含量为60.58%。推导出其最大读码框架从41到3448,共编码1133个氨基酸。(图1,Genbank注册号为AF288645。)

2.2 A16毒株S片段的全基因序列及其编码的氨基酸

序列测定表明A16毒株S片段的全基因序列共1770个核苷酸,四种核苷酸的比例分别为A31.40%,G26.05%,T22.79%,C19.77%,GC含量为45.8139.42%,AT含量为54.19。推导出其最大读码框架从37到1326,共编码429个氨基酸。(图2,Genban注册号为AF288646。)

2.3 A16毒株M片段与HTN型和SEO型同源性比较

A16株M片段核苷酸全基因和氨基酸与HTN型12株和SEO型5株病毒的同源性比较,见表1。

TAGTAGTACTCCGCAAAAGAAAGCAGTTAATCAGCAACATGGGTTTATGGAAGTGGCTAAATAATGGCCGTTTGGTGTGGCCATGTTTGCOCATAGGAATGTATATG 110
M G L W K W L I M A V L V W P C F A L R N V Y
ACATGAAGATTGAATGCCCCATACAGTCAATTTGGGGAAAACAGTGTGGTGGGATGTGGAGCTACGGCTATGCCAATCGCTGACATCACTCAGATGATGCCAGAG 220
D M K I E C P H T V N F G E N S V V G Y V E L P P M P I A D I T Q M M P E
AGCTCTTGCAGCATGGATAACACCAATCTCTAAACACAATCACAAAGTACACCAAGTGAAGTGGAGAAAAGAGGCTGACCAAGCAGCTCAAGCCAAACCTCCTTTGA 330
S S C S M D N H Q S L N T I T K Y T Q V S W R K K A D Q A Q S S Q T S F E
GACAGTTCTTCCGAGGTGGACTTAAAGGAACCTGTGTATTAAGCACAAGATGATAGAGGATCCTATCGCAGCCGTAGATCAATAATCTGTGTATGATCTTTCATGCA 440
T Y S S E V D F K G T C V L K H K M I E D S Y R S R R S I I C Y D L S C
ATAGTACATCTGTAAAGCCTACCCCTTATCTAATTGTGCCTGTGCATGCCTGTAACTGATGAAGAGCTGCCTAATAGCATTAAGCCCTATAGAGTTCAAGTGTCTAT 550
N S T F C K P T L Y L I V P V H A C N M M K S C L I A L G P Y R V Q V V Y
GAGAGGACATACTGTATGTAGGGGTCTTCTAGAAGAAAATGCTTTGTACCAGACCAGAGTGTGTGAGCATTAATAAACATGGCATATTTGATATTGCAAGTGTCCA 660
E R T Y C M S G V L L E G K C F V P D Q S V V S I I K H G I F D I A S V H
TATTGTGTGCTTTTGTGCAATCAAGGGCAGTACATAAAATCCTTGAACAAGTTAAAAATCATTGAACTAACATGCAATGATGACTGATTAATAGATTCAAGGGT 770
I V C F V A I K G S T Y K I L E Q V K K S F E L T C N D T D N K I Q G
ATTATATATGTCTTGGGAGGGAATCAGCACCCATATATGTGCCAACCTTGTGACTTCAGGTCAATGGAGGCTTTTGGTGGATTTTAAGTCCCCACAGGGGAA 880
Y Y I C L V G G N S A P I Y V P T L D D F R S M E A F A G I F K S P H G E
GATCACGACCTGCAGGGGAGGAAGTAGCCTCTTATTCATTGTAGGGCTTGCATGCAAAAGTACCCACAGTGCAGTGCAGATACACTGGGTTAGTGGCTTTTC 990
D M D L A G E E V A S Y S I V G P A N A K V P H S A S A D T L G L Y A F S
AGGAATCCCATCTACTGATCCTCAGTGTCTCAGCAGGACTACAGATGCCCTGTATGTCTTAGCCAGGTTCTTCCACAACATAAACAGCAGGATGTGATAAAA 1100
G I P S Y S S F S V L T G S T D A R H V F S P G F F P Q L N Q T R C K
CTGCCATAACATTAACCTGGACAGGAATGATTGACTACTGGTATTATGAGCAGTACACCTTGCACCTGTCTTCTGTGTTTGTGCGGTCTGGTGCCTCTGTGAA 1210
T A I P L T W T G M I D L P G Y Y E A V H P C T V F C V L S G P G A S C E
GCATTTTCAGAAAGGGGATCTTAAATAAATCTCCCATGTGTAGTCTCAAAGCAAAATCGCTTAGGTCATCAAAGCAACAAGTAACTTTGTTGTCAAAGAGT 1320
A F S E G I F N I T S P M L C L V S K Q N R F R S S K Q Q V N F V C Q R Y
AGATATGGATTTGTGTCTATTGTAATGGGCAAAAGAAATTAATAAACAATCTAGTAAATGGCCAAATGATATATAACAATAAACAGCTTATTTCATTGCTT 1430
D M D I V V Y C N G Q K K V I L T K T L V I G Q C I Y T I T S L F S L L
CTGGTGTGCACATCTATTGCTGTAGAACCTGTGTCTCTGGCTTCCAGCGTGGGCTACAGCTGCTTGTCTGTAACATTTTGTCTTGGCTGGGTTTAAATCACTGCA 1540
P G V A H S I A V E L C V P G F H G W A T A A L L V T F C F G W V L I P A
GTCAACCTTGTGATTAACAATTTTAAAGTTTATGCAAAACATCTCCATACAAAGCAATCAGGAAAATCGGCTCAAGTCAGTTTGAAGAAAATCAAGGAAGATTTGA 1650
V T L V I L T I L K F I A N I F H T S N Q E N R L K S V L K K I K E E F E
GAAGACTAAAGGCTCCATGGTGTGGCATGTGTAAATATGAATGTGAGACATATAAAGAGTGAAGGCACATGGAGTATCATGTCTCAATCTCAATGCCATACTGCT 1760
K T K G S M V C D V C K Y E C E T Y K E L K A H G V S C P Q S Q C P Y C
TCACCCACTGTGAGCTACAGAAGCAGCAATTTCAAGCCCACTACAAAGTATGCCAAGTCACTCATAGATTTCCGGGATGATTTAAAGAAAACAGTGCACCCCAAAATTTT 1870
F T H C E P T E A A F Q A H Y K V C V T G T H R F R D D L K K T Y P Q N F
ACACCAGCTGTATCGTACCTTGAATCTGTTAGATATAAAGCCGATGTACATCTCACAAATGTGGGTATTTTGTGATCTGGAATCCATTTTATGGGCTGCAAG 1980
T P G C Y R T L N L F R Y K S R C Y I F T M W V F L L I L E S I L W A A S
TGCTTCTGAAACCCCTTAACCCCTATTTGGAATGATAATGCTCAGCGAGTAGGATCTATCCCGATGCACACAGACCTTGAATTAGATTTTTCCTGACATCTAGCTCTA 2090
A S E T P L T P I W N D N A H G V G S I P M H T D L E L D F S L T S S
AGTACATCTCGAAGGAACTCACAACCCCTTGAAGGAGCTCAAGCAGTAGATCTTCATATTGAGTTAGCTGAACAGACCATAGGTTGATAGAGTGTGAGTGTGGG 2200
K Y T Y R R K L T N P L E E T Q A V D L H I E L A E Q T I G V D Y H A L G
CATTTGGTTGACGGCCGCTTAAATCTAAAGACCTCCTTTCAATGTTATGGTGCATGCACAAGATGAATACCCATGGCATACCCGAAAATGCCATTACGAAGAGATTA 2310
H W F D G R L N L K T S F H C Y G A C T K Y E Y P W H T A K C H Y E R D Y
TCAGTATGAACAAGTGTAAACCATCAGACTGCCCTGGAGTAGGTACAGCTGTACAGCATGTGGATTATACCTTGACCAACTAAAACCTGTTGGTAGTGCAT 2420
Q Y E T S W G C N P S D C P G V G T C T A C G L Y L D Q K K T Y P Q N F
ACAAGATTATCACAATCAGATATAGCAGGAGGTTTGTGTCCAGTTTGGTGAAGAAAACCTTGTAAAGTTATTGATATGAATGACTGCTTTGTGTCTAGACATGTAATA 2530
Y K I I T I R Y S R R V C V Q F G E E N L C K V I D M N D C F V S R H V K
GTGTGCATAATTGGTACAGTTTCTAAGTTTCTCAAGGTGATACACTATTGTTCTTGGACCCTTGGAGTGGTCTAATATTCAAGCACTGGTGCACATCTACATG 2640
V C I I G T V S K F S Q G D T L L F G P L E G G G L I F K H W C T S T C
CCAGTTTGGTGACCTGTGATATAATGAGTCCGAGAGATAAAGGATTTCTATGTCTGAAATCCAGGCACTTTAGGAAAAGTGCATTTTGTACTACCCCTCTCT 2750
Q F G D P G D I M S P R D K G F L C P E F P G S F R K K C N F A T T P L
GTGAGTATGATGGAATATGATCTCAGGTTATAAGAAAGTAAAGGCAACATGATTTCTTTCAATCATTCAATACAAGCACCATGCTTTTACTGATGAGCGAATTGAA 2860
C E Y D G N H I S G Y K K V M A T I D S F Q S F N T S T M H F T D E R I E
TGGAAAGATCTGATGGAATGTTACGGGATCATATAAATATTTAGTAACAAGGATATAGACTTTGATAACCTTGGAGAAAACCTTGCAAAATGGCTTGCAGAACATC 2970
W K D P D G M L R D H I N I L V T K D I D F D N L G E N P C K I G L Q T S
CTCCATTGAAGGAGCATGGGCTCTGGTGTGGTTTACACTCACAATGTTAGTATCATTAAACAGAAATGCCCTACTTTTCTAACTCAATTAAGGCTTGTGACAAGCTA 3080
S I E G A W G S G V G F T L T C L V S L T E C P T F L T S I K A C D K A
TCTGTTATGGTGCAGAGTGTACCCTAACAGAGGGCAGAAATACAGTTAAAGTATCAGGGAAGGGTGGACATAGTGGATCAACATTTAAGTGTCTGTGACGAGAAGT 3190
I C Y G A E S V T L T R G Q N T V K V S M K G G H S G S T F K C H G E D
TGTTCACAGACTGGGCTTACTGCTGCACCTCACCTTGATAAAGTCAATGGAATCTGAAATGAAAATAGCAAGGATATGATGATGGGCTCCACAGTGTGGAT 3300
C S Q T G L H A A A P H L D K V N G I S E I E N S K V Y D D G A P Q C G I
AAAATGTTGGTTGTAATACTGGGAGTGGATTTAGGAATCTTATGTTGCAACTGGATGTGCTCATTGTACTCTGTATTCCTGCTATTCTCAATGGTATTGCTTA 3410
K C W F Y K S G E W I S G I F S G N W I V L I V L C V F L L F S L V L L
GTGCTCTTGTCTGTAAGAAAGCATAAAAATCATAGCTAGTACTTACTGTATTATTAATATGTACAGCCTTAACATATATATAATTTGTATATTTATTACT 3520
S V L C P V R K H K K S
CTATCAACACACTAAAAAATAGTAGCTGTCTAACCATTTAACTAGATTTCTCTCTGTATGATGCTTAAACATCTTGGGAGTCTACTACTA 3615

图 1 A16 株 M 片段的全基因序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 1 Complete nucleotide and deduced amino acid sequences of M segment of A16 strain

TAGTAGTAGACTCCCTAAAGAGCTACTATAACAACGATGGCAACTATGGAGGAATGCAGAGGAAATCAATGCCCATGAAGGCCAACTGGTGATAGCECA 100
M A T M E E L Q R E I N A H E G Q L V I A
GGCAGAAGGTGAGGGATGCAGAAAAACAATATGAGAAGGATCCAGATGAACTGAACAAGAGAGCATTAAACAGACAGGGAAGGGCTTGCAGCATCAATCCA 200
R Q K V R D A E K Q Y E K D P D E L N K R A L T D R E G L A A S I Q
GGCCAAGATTGATGAACGAAAAGGCGACTAGCCGATAGGATTGCAACTGGAAAAAACCTTGGAAAGGAACAGGATCCCACTGGAGTAGAACCTGGAGAC 300
A K I D E L K R Q L A D R I A T G K N L G K E Q D P T G V E P G D
CATCTAAAAGAGAGATCAATGCTCAGTTATGGAAATGATTGGACTTGAACCATCTGGATATTGATGAGCCTACTGGCCAGACTGCAGACTGGCTTAGTA 400
H L K E R S M L S Y G N V L D L N H L D I D E P T G Q T A D W L S
TTGTTATATATCTGACATCTTTTGTGTCGCCGATCTTCTGAAGGCTTATATATGCTCACAACAAGAGGAAGGCAGACAAACAAAGATAACAAGGGGAC 500
I V I Y L T S F V V P I L L K A L Y M L T T R G R Q T T K D N K G T
CAGGATTGATTCAGGATGACAGCTCTTTGAGGATGTTAACGGGATTCGAAAGCCAAAGCATCTATATGTGCTCTGCCAATGCCAATCAAGCATG 600
R I R F K D D S S F E D V N G I R K P K H L Y V S L P N A Q S S M
AAGGCAGAAGAGATCACACAGTAGGTACAGAACAGCAATCTGTGGACTCTATCTGCACAGATCAAAGCCAGACAAATGATTAGCCCTGTGATGAGTG 700
K A E E I T P R Y R T A I C G L Y P A Q I K A R Q M I S P V M S
TAATTGGATTTTTGGCGCTGGCAAAGATTGGAGTGACCGTATTGAACAGTGGTAAAGTGAACCTTGAAGCTACTCCCGGACACAGCAGCAGTAAAGCCT 800
V I G F L A L A K D W S D R I E Q W L S E P C K L L P D T A A V S L
TCATGGAGGCCCTGCAACAAACAGGATTAACCTACGGCAGCGCCAGGTGGCACTGGTAAATGGAACAAAGAAATCAAAGGCCATACGCTCAACATGCT 900
H G G P A T N R Q R P Q V A L G N M E T K E S K A I R Q H A
GAATCTGCAGGTTGCAGCATGTTGAGGATATTGAGTCAACATCATCGATATGGGTTTTTGGCGGACACAAATCGCTGTCACCGACATGCCTGTTTA 1000
E S A G C S N V E D I E S P S S I W V F A G A P N R C P P T C L F
TTGCAGGATTGCTGAACTGGCCGATTCTCTCCATTTACAGGACATGCGAAACACAATTATGGCCTCAAAGACAGTGGGAACATCTGAGGAAAAGCT 1100
I A G I A E L G A F F S I L Q D M R N T I M A S K T V G T S E E K L
ACGGAAGAAATCATCTTCTATCAGTCTTATCTCAGGCGAACCAATCAATGGGAATACAACCTGGACAAAGAATCATAGTGTCTCTTTATGGTTGCCCTGG 1200
R K K S S F Y Q S Y L R R T Q S M G I Q L D Q R I I V L F M V A W
GGTAAAGAGGCTGTGGATAATTTCCACCTGGAGATGATATGGATCTGTGCTAAGGACATTGGCACAAGCCTGATTGATGTAAGTGAAGGAAATCT 1300
G K E A V D N F H L G D D M D P V L R T L A Q S L I D V K V K E I
CTAACCAAGAGCCTTTAAAACATAATAGTGAATGTATAACCCCTTATTATGTAATCATATATACTACTGAATCATTATCAATCATATTTACACTATTA 1400
S N Q E P L K L
TTATCAGGGGAATCATCATATCAGGATGGGTACATTTATGGTGGGAATCATTATCAAAGGTGGGTGAGTTAATCCGTTGCCGGTGGGTTTAGGTT 1500
CAGGCTGCCCTAAGTAGCCCTTTTGTATATATGGATGTAGATTTCAATTTGGCTTAAACTAATTTTGCTCTTTCTCTCTTCTCTGCTCTCTGCTG 1600
TTACTAACCAACAACATCTACCTCAACACAAAACATCTCAACCTAACCTACCTCATTAGCTTGCTCCTTGATTGTCTTTTTAGGGAGCATACTACTACTA 1700

图 2 A16 株 S 片段的全基因序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 2 Complete nucleotide and deduced amino acid sequences of S segment of A16 strain

表 1 A16 株 M 片段核苷酸和氨基酸与 HTN 和 SEO 病毒的同源比较

Table 1 Homology of complete M segment sequences of A16 strain with that of HTN&SEO virus

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1 A16-M	***	81.2	81.2	80.6	90.3	75.7	80.8	80.7	80.7	80.4	80.7	70.7	70.8	70.5	70.2	70.4	
2 A9-M	92.1	***	99.5	87.3	79.9	76.8	84.7	84.6	84.6	83.6	84.1	70.8	71.0	70.6	70.2	70.5	
3 HV114-M	92.1	98.7	***	87.4	79.9	76.8	84.7	84.7	84.7	84.6	83.6	84.1	70.8	70.9	70.6	70.2	70.5
4 Z10-M	92.1	96.0	96.0	***	79.6	76.6	84.1	84.0	84.0	83.9	83.6	83.9	70.8	70.4	70.8	70.5	70.6
5 Jn1-M	97.1	91.3	91.2	91.5	***	75.4	79.5	79.4	79.4	79.4	79.0	79.4	70.3	70.6	70.6	70.2	70.7
6 An09-M	85.9	85.8	85.7	85.8	85.8	***	76.3	76.2	76.2	76.1	75.6	75.8	71.7	71.9	71.5	71.1	71.8
7 76118-M	93.0	95.4	95.4	95.1	92.1	86.4	***	99.8	99.8	99.6	94.7	95.0	71.3	71.8	71.1	70.6	71.6
8 cl-1-M	93.1	95.4	95.4	94.9	92.2	86.3	99.5	***	99.9	99.7	94.7	95.1	71.2	71.8	71.0	70.5	71.6
9 cl-2-M	93.0	95.3	95.3	94.8	92.1	86.2	99.4	99.9	***	99.7	94.7	95.1	71.2	71.7	71.0	70.5	71.6
10 LR1-M	92.7	95.0	95.0	94.5	91.8	86.0	99.0	99.6	99.5	***	94.5	94.9	71.1	71.6	70.8	70.3	71.5
11 Hojo-M	92.5	94.4	94.4	94.2	91.2	85.2	97.5	97.5	97.4	97.1	***	98.4	70.8	71.1	70.7	70.2	71.0
12 Lee-M	93.0	95.1	95.1	94.7	92.1	85.7	98.2	98.2	98.2	97.8	98.6	***	71.0	71.1	70.9	70.4	71.3
13 Seoul8039-M	76.7	76.5	76.5	76.5	76.9	77.2	77.2	77.2	77.1	76.7	76.3	76.6	***	96.1	95.5	94.9	84.2
14 SR-11-M	76.6	76.5	76.5	76.5	76.7	77.2	77.1	77.0	76.9	76.5	76.1	76.5	98.9	***	95.4	94.9	84.3
15 L99-M	76.4	76.1	76.1	76.5	76.5	76.9	77.0	76.9	76.8	76.5	76.0	76.4	98.1	98.4	***	99.2	84.4
16 R22-M	73.4	72.9	72.9	73.3	73.4	73.8	73.8	73.7	73.6	73.3	72.9	73.3	95.0	95.2	95.8	***	83.9
17 Gou3-M	76.4	76.8	76.8	76.5	76.5	77.3	77.3	77.2	77.2	76.8	76.7	77.0	96.8	96.9	96.6	93.2	***

Notes: Homology of nucleotide sequences in upper triangle, homology of amino acids sequences in lower triangle

2.4 A16 毒株 S 片段与 HTN 型和 SEO 型同源性比较

A16 株 S 片段核苷酸全基因和氨基酸与 HTN 型 9 株和 SEO 型 4 株病毒的同源性比较,见表 2。

表 2 A16 株 S 片段核苷酸和氨基酸与 HTN 和 SEO 病毒的同源性比较

Table 2 Homology of complete S segment sequences of A16 strain with that of HTN&SEO virus

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 A16-S	***	90.0	85.8	76.0	87.1	87.1	87.1	86.4	87.8	67.7	67.7	67.2	67.2
2 Z10-S	97.7	***	85.6	76.1	87.5	87.4	87.3	86.8	87.8	67.7	68.2	67.5	66.7
3 Jnl-S	96.5	97.0	***	75.7	85.2	85.1	85.0	84.4	85.8	67.1	68.1	67.6	66.0
4 Ah09-S	92.1	91.9	92.3	***	75.2	75.3	75.2	74.7	75.4	68.0	68.6	68.1	66.5
5 76-118-S	97.0	97.2	96.5	93.0	***	99.7	99.7	98.9	90.6	67.5	68.6	68.0	66.4
6 c1-1-S	97.0	96.8	96.1	93.0	99.1	***	99.9	99.1	90.5	67.5	68.5	68.0	66.5
7 c1-2-S	97.0	96.8	96.1	93.0	99.1	100.0	***	99.1	90.5	67.5	68.4	68.0	66.4
8 LR1-S	96.8	96.5	95.8	92.8	98.8	99.8	99.8	***	89.7	67.4	68.4	68.0	66.5
9 Htn261-s	97.4	97.2	96.5	92.3	98.1	98.1	98.1	98.1	***	67.3	68.4	67.9	66.1
10 SR-11-S	81.7	81.2	81.4	83.3	82.4	82.4	82.4	82.1	81.7	***	95.4	95.0	86.6
11 L99-S	82.4	82.4	82.6	84.0	83.5	83.1	83.1	82.8	82.4	97.7	***	99.0	87.1
12 R22-S	82.6	82.1	82.4	84.2	83.3	83.3	83.3	83.1	82.6	97.9	99.3	***	86.8
13 Gou3-S	81.9	81.4	81.7	83.5	82.6	82.6	82.6	82.4	81.9	97.4	98.1	98.4	***

Notes: Homology of nucleotide sequences in upper triangle, homology of amino acids sequences in lower triangle

2.5 进化发生树比较分析

应用 DNASTAR 软件的系统发生分析方法分别 绘出了基于 M 和 S 片段核苷酸及推导氨基酸的系 统发生树,图 3,4,5,6。

应用 DNASTAR 软件的系统发生分析方法分别

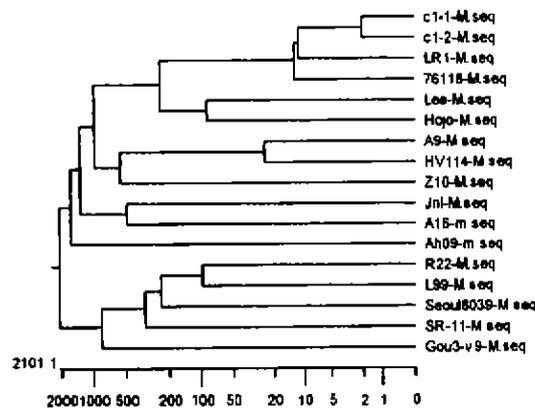


图 3 A16 株病毒 M 片段全基因的系统发生树

Fig.3 Phylogenetic tree of A16 strain M segment nucleotide acids

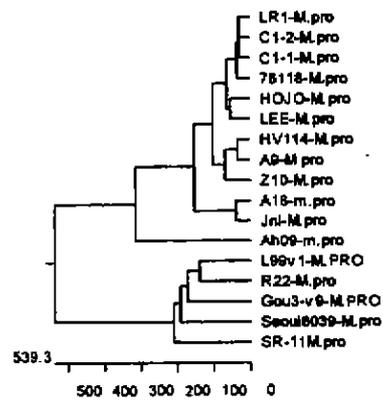


图 4 A16 株病毒 M 片段氨基酸的系统发生树

Fig.4 Phylogenetic tree of A16 strain M segment amino acids

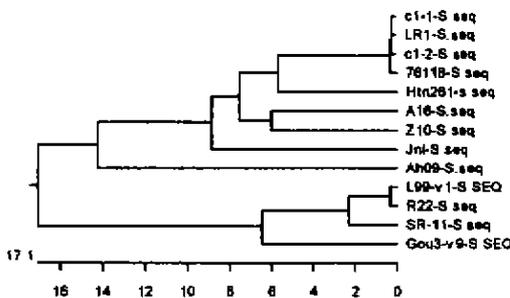


图 5 A16 株病毒 S 片段全基因的系统发生树

Fig.5 Phylogenetic tree of A16 strain S segment nucleotide acids

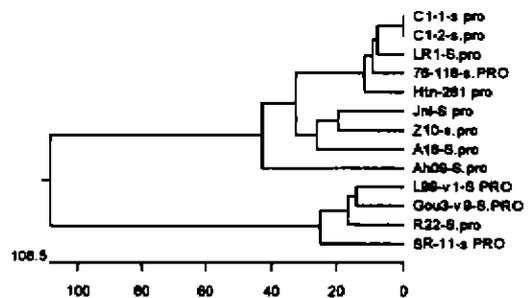


图 6 A16 株病毒 S 片段氨基酸的系统发生树

Fig.4 Phylogenetic tree of A16 strain S segment amino acids

3 讨论

序列分析结果 A16 毒株 M 片段的全基因序列共 3 653 个核苷酸,编码 1 133 个氨基酸,S 片段的全基因序列共 1 770 个核苷酸,编码 429 个氨基酸,为研究 A16 株生物学特性提供了分子依据。

A16 毒株的序列测定结果同汉坦病毒同源性比较表明,A16 毒株与 HTN 型病毒同源性较高,而与 SEO 型病毒同源性较低,因此 A16 毒株为 HTN 型病毒株,这与空斑减少中和试验的分型结果完全一致^[4]。

我们在应用空斑减少中和试验比较肾综合征出血热不同毒株的抗原性发现,虽然同型毒株间一般相互中和反应较好,但也有例外,其中 A9 株与 76118、Chen 株的效价接近,但与 A16、LR1 则相差较大,认为可能同型中存在亚型^[3]。本研究 A16 株与 HTN 毒株间的同源性比较表明 A16 毒株的 M 片段与 A9、LR1 和 76118 均相差高达 9.3%~18.8%,S 片段与 LR1 和 76118 也相差 12.9%~13.6%,表明 A16 株与这些毒株均属于不同的 HTN 型亚型毒株,A16 株是不同于以往所发现的所有亚型毒株的新的 HTN 型亚型株^[10],从而从分子的角度解释了生物学方法分析的结果。系统发生分析的结果也证实了这一结果。

M 和 S 片段的核苷酸同源性比较还发现,A16 毒株与山东分离株 JNL 的 S 片段差异高达 14.2%,与其 M 片段差异为 9.7%,A16 毒株与 Z10 株的结果正相反,与 Z10 的 M 片段差异高达 19.4%,S 片段差异仅为 10%,而其他毒株 M 和 S 片段变异程度相接近,因此我们认为汉坦病毒 HTN 型在进化过程中可以是单一片段的变异也可以是全基因各个片段的同步突变。

虽然在克隆中应用了已知的引物,但由于汉坦病毒末端序列高度保守,误差对序列的同源性比较

结果的影响可以忽略,分别用去除引物序列和 ORF 区序列的比较与全基因的结果类似。A16 株病毒 M 和 S 片段与国内分离的 HTN 型病毒株差异较大,其中与安徽分离株 AH09 核苷酸的差异高达 24.3%,S 片段达 24%,氨基酸的差异 M 也高达 14.1%,S 为 7.9%,国内其他疫苗株也存在这样的问题,因此我们应当加强对地方流行株与疫苗株交叉保护的研究,以指导疫苗实际应用;在疫苗研究中考考虑加入新亚型毒株制备多价疫苗以便于更有效的控制肾综合征出血热疾病的流行。

参考文献

- [1] 贾克丽,严玉辰.用小鼠乳鼠直接分离肾综合征出血热病毒[J].中国鼠类防治杂志,1987 出血热专辑:9-11.
- [2] 严玉辰,刘学礼,贾克丽,等.肾综合征出血热病毒灭活疫苗的研究,1.疫苗毒株选择的研究[J].安徽医学院学报,1985,20(2):1-3.
- [3] 俞永新,安祺,姚智慧,等.用空斑减少中和试验比较流行性出血热不同毒株的抗原性[J].中华微生物学和免疫学杂志,1991,11(3):162-164.
- [4] 俞永新,姚智慧,安祺,等.应用空斑减少中和试验对我国流行性出血热病毒进行血清学分型[J].病毒学报,1991,7(1):18-22.
- [5] 姚智慧,俞永新.应用聚合酶链反应对我国不同来源肾综合征出血热病毒的型别分析[J].病毒学报,1994,10(2):128-135.
- [6] 姚智慧,董关木,俞永新,等.肾综合征出血热病毒 Gou3 株 M 片段的分子特性及序列的比较分析[J].病毒学报,1999,15(3):199-204.
- [7] Yoo D W, Kang C Y. Nucleotide sequence of the M segment of the genomic RNA of Hantaan virus 76-118[J]. Nucleic Acids Res. 1987, 15(15), 6299-6300.
- [8] Xiao S Y, Chu Y K, Knauer F K, et al. Comparison of hantavirus isolates using a genus - reactive primer pair polymerase chain reaction [J]. J Virol, 1992, 73: 567-573.
- [9] Schmaljohn C S, Jennings G B, Hay J, et al. Coding strategy of the S genome segment of Hantaan virus. [J] J Virol, 1986, 155: 633-643.
- [10] 姚智慧,董关木,俞永新,等.汉坦病毒 Z10 株 M 片段全基因序列分析[J].中华微生物学和免疫学杂志,2000,20:531-535.