维普资讯 http://www.cqvip.com

第17卷 1期
2002年2月

中 国 病 毒 学
VIROLOGICA SINICA

17(1):26－29
February 2002

湖北省不同地区汉坦病毒M片段的分析研究*

侯炜[1]，杨占秋[1**]，曲虹[2]，赵旻，肖红[1]，蔡惠兰[3]

(1.武汉大学医学院病毒学研究所，湖北武汉 430071；2.华中科技大学同济医学院微生物学教研室，湖北武汉 430030；3.武汉市第三医院传染科，湖北武汉 430060)

Study on M Genomic Segment of Hantavirus Strains Isolated from Different Areas in Hubei Province

HOU Wei[1], YANG Zhan-qiu[1**], QU Hong[2], ZHAO Ming[1], XIAO Hong[1], CAI Hui-lan

(1. *Institute of Virology, Medical College of Wuhan University, Wuhan* 430071, *China*; 2. *Department of Microbiology, Tongji Medical College of Huazhong Uiversity of Science and Technology, Wuhan* 430030, *China*; 3. *Department of Infection, the Third Hospital of Wuhan, Wuhan* 430060, *China*)

Abstract: According to Genebank sofeware of HV, the type-specific primers were desisgned corresponding to the conserved sequences in the G_1 region of M genomic segment of HV. A reverse-transcription heminested polymerase chain reaction for HV was developed. Then, RT-heminested PCR was applied to type 30 strains of HV isolated from different areas in Hubei province. The results are shown that: (1) The 76/118、A_9、H-114(HTNV) and R_{22}(SEOV) Strains of HV were amplified and typed using the RT-heminested PCR. And HV RNA could only be detected by this method, but other viral RNA couldn't be detected. (2) 30 strains isolated from different areas in Hubei province were typed as HTNV amd SEOV, respectively. Those results suggested that: (1) The RT-heminested PCR was feasible for detectiong and typing HV in Hubei province. (2) Both HINV and SEOV were found in epidmic areas of HFRS in Hubei province. Distinct hantaviruses could coexist in either different or the same geographic or ecological zones in Hubei province.

Key words: Hemorrhagic fever with renal syudrome; Hantavirus; Genotype; Reverse transcriptase polymerase chain reaction

摘要：参考汉坦病毒(HV)的基因文库软件设计M片段G_1区型特异性引物，以HV 76/118、H-114、A_9及R_{22}株RNA为阳性模板，建立HV的分型方法——逆转录一半巢式聚合酶链反应(RT-heminested PCR)，对湖北省不同地区分离的30株HV进行分型。结果显示：(1)建立的RT-heminested PCR分型方法对HV两型的代表株76/118(HTN)、A_9(HTN)、H-114(HTN)及R_{22}(SEO)RNA进行了特异性扩增，其大小与理论值一致；此法只能检测HV RNA，不能检测其它病毒RNA。(2)分离于湖北省不同地区的30株HV的分型结果为汉滩型21株、汉城型9株，其中长江以南汉滩型12株、汉城型2株；长江以北汉滩型9株、汉城型7株。这表明建立的RT-heminested PCR用于HV的检测特异性好；分析湖北省不同地区分离的30株HV，显示湖北省HFRS流行为混合疫区；且在湖北地区具有一定的地理聚集性。

关键词：肾综合征出血热；汉坦病毒；基因型；逆转录——聚合酶链反应

中图分类号：R373　　**文章标识码**：A　　**文章编号**：1003-5125(2002)01-0026-04

收稿日期：2001-05-14，修回日期：2001-07-16

基金项目：国家自然科学基金资助项目(39870659)

作者简介：侯炜(1970-)，男，湖北钟祥籍，讲师，硕士生，主要从事汉坦病毒的分子流行病学研究。

** 通信作者：杨占秋(1952-)，男，湖北黄梅籍，研究员，博士生导师，主要研究方向为分子病毒学及抗病毒药物。

Correspondence author. E-mail: Yang zhan qiu@163.net

维普资讯 http://www.cqvip.com

肾综合征出血热(Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome, HFRS)是由汉坦病毒(Hantavirus, HV)引起的以发热、出血和肾脏损害为特征的自然疫源性疾病。我国是HFRS的重疫区,发病人数占世界总发病人数的90.94%,它严重威胁人体健康[1]。根据已报道的资料,应用空斑减数中和试验(PRNT)和遗传学的方法至少可将HV分为9个血清型和17个基因型别,目前我国仅有汉滩型和汉城型存在,尚未见其它型流行的报道。这说明在世界不同地区流行的HFRS HV基因特性是不同的,对HV基因片段的分析发现HV M片段保守性差[2]。了解HV M片段的核苷酸序列及其差异,使我们在分子水平认识HV抗原性差异和毒力差异以及比较不同地区HFRS流行的特点成为可能,有助于了解HFRS分布与流行的关系。本研究采用逆转录——半巢式聚合酶链反应(RT-heminested PCR)对分离自湖北省不同地区的30株HV RNA M片段进行分析,结果如下:

1 材料与方法

1.1 细胞与病毒

Vero E_6细胞由中国预防医学科学院病毒所杭长寿教授惠赠。76/118、A_9、H-114、R_{22}株为本所临床病毒室保存,另30株HV分别来源于湖北省不同地区,为本所临床病毒室分离并保存。

1.2 引物设计与合成

参考HV基因文库软件(为第四军医大学唐都医院白雪帆教授惠赠),设计HVHTN/SEO型引物,其序列及定位见表1,由上海生物工程公司合成。

1.3 病毒培养

HV毒株感染单层Vero E_6细胞,37℃吸附1h后,弃去,加含2%新生牛血清的DMEM Eagle's维持液,培养14d后经冻融3次,收集感染细胞液,用免疫荧光间接法证实抗原阳性后,用于制备阳性模板。同时以正常Vero E_6细胞,柯萨奇B组病毒1型、3型、4型(CVB_1、CVB_3、CVB_4),呼吸道合胞病毒(RSV),登革病毒作对照。

1.4 RT-heminested PCR

采用异硫氰酸胍——酚——氯仿法(简称胍酚一步法)[3]抽提HV RNA备用。逆转录cDNA合成:20μL反应体系中含5×逆转录缓冲液4μL、引物PP(2.5μmol/L)4μL、dNTPs(10mmol/L)2μL、AMV逆转录酶4U、RNasin 40U、模板RNA6μL,42℃水浴1h,后95℃ 5min变性,立即置冰浴。PCR:50μL反应体系包括10×Taq酶缓冲液5μL,dNTPs(10mmol/L)2μL、引物PP(2.5μmol/L)和PⅠ-2/PⅡ-2(5.0μ mol/L)各4μL、模板cDNA10μL、Taq酶2U。94℃变性5min,后按94℃ 45s、48℃ 45s、72℃ 60s,35次循环,72℃ 10min延伸。Heminested PCR:50μL反应体系包括10×Taq酶缓冲液5μL、dNTPs(10mmol/L)2μL、引物PⅠ-1/PⅡ-1和PⅠ-2/PⅡ-2(5.0μ mol/L)各3μL、PCR产物5μL、Taq酶2U。循环参数同上,只是循环次数为15次。

表1 引物序列及对应核苷酸的位置

Table 1 The sequence and location of primer for PCR amplification of Hantaviruses M gene

引物 Name of primers	位置 Location	方向 Sequence(5'-3')	意义 Sense	大小 Size of products(bp)
通用引物 Public Primer (PP)	1-16	CCGGATCCTAGTAGTAGACACCGC (24mer)		
汉滩型 HTN Type				
PⅠ-1	30-49	CAATCAGCAACATGGGGATA (20mer)	(+)	620
PⅠ-2	632-649	AATATCAAAGATCCCATG (18mer)	(-)	
汉城型 SEO Type				
PⅡ-1	78-101	AGTTGGCCAAGGCTTTGCATTAAA (24mer)	(+)	649
PⅡ-2	704-726	TTGCTGATGTGATGGCAGTCTCT (23mer)	(-)	

1.5 扩增产物的检测

经含溴化乙锭(EB)的1.5%琼脂糖凝胶电泳分析,紫外灯下观察结果并拍照。

2 结果

2.1 HV RT-heminested PCR分型方法的建立

用HV M片段特异性引物对两型的代表株76/118(HTN)、A_9(HTN)、H-114(HTN)及R_{22}(SEO) RNA进行扩增,结果显示特异性引物对4个毒株均可扩增出特异性片段,其大小与理论值基本一致(图1)。而用该引物对未感染的Vero E6细胞进行RT-PCR扩增,未见特异性片段。

维普资讯 http://www.cqvip.com

为确定 RT-heminested PCR 方法的特异性，同时扩增了汉滩型标准株 76/118、中国代表株 A_9、湖北代表株 H-114、汉城型中国代表株 R_{22}、登革病毒、CVB_1、CVB_3、CVB_4、RSV-RNA，并以双蒸水代替模板作对照，结果显示 HV 汉滩型引物只能扩增 76/118、A_9、H-114 株，汉城型引物只能扩增 R_{22}株，而登革病毒、CVB_1、CVB_3、CVB_4、RSV 及双蒸水分别经两型引物扩增后电泳未见特异性片段。

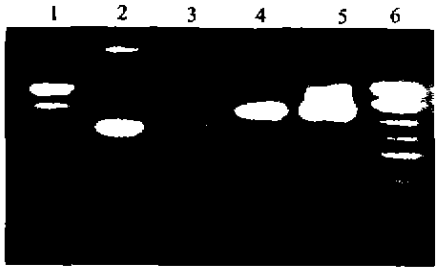

图1 汉滩型/汉城型 PCR 产物电泳图

1 与 6，PCR markers(1543、994、697、515、377、237bp)；2，76/118 株；3，湖北分离的汉滩型毒株；4，R_{22}株；5，湖北分离的汉城型毒株。

Fig.1 Electrophoresis patterns of products of Hantaviruses amplified using the type-specific oligonucleotide primer

Lane 1 and 6 are markers; lane 2 and 4 are amplified gene products of 76/118 and R_{22} Hantavirus strains respectively; Lane 3 and 5 are amplified gene products of Hantaavirus and Seoulvirus in Hubei.

2.2 湖北省不同地区 HV 的分型

用建立的 HV-heminested PCR 分型方法对分离于湖北省不同地区的 30 株 HV 进行了分型，结果

表2 湖北省不同地区分离的汉坦病毒及其分型

Table 2 The original districts and types of Hantaviruses in Hubei province

地点 Districts	毒株数 No of strain	分型 HTN	分型 SEO
武汉△ Wuhan	7	3	4
长江以南地区* South of Yangtze River	10	10	0
长江以北地区○ North of Yangtze River	13	8	5
总计 total	30	21	9

注：△武汉市武昌(长江以南)4 株，其中汉滩型和汉城型各 2 株；汉口(长江以北)3 株，其中汉滩型 1 株、汉城型 2 株；

*长江以南地区包括咸宁 4 株、鄂州 1 株、江夏 5 株；

○长江以北地区包括应城 5 株、黄陂 2 株；浠水、天门、钟祥、洪湖、麻城、蕲春各 1 株。

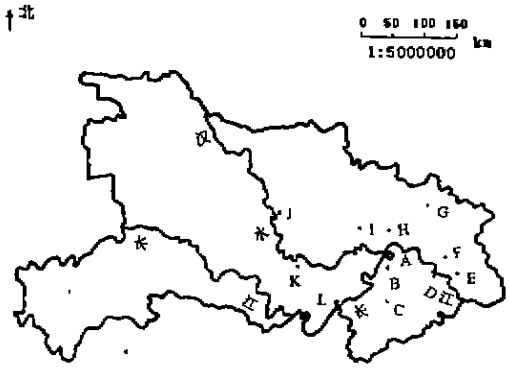

图2 湖北省汉坦病毒的分布

A，武汉(Wuhan)；B，江夏(Jiangxia)；C，咸宁(Xianning)；D，鄂州(Ezhou)；E，蕲春(Qichun)；F，浠水(Xishui)；G，麻城(Macheng)；H，黄陂(Huangpi)；I，应城(Yingcheng)；J，钟祥(Zhongxian)；K，潜江(Qianjiang)；L，洪湖(Honghu)。

Fig.2 The distribution of Hantaviruses in Hubei province

见表 2 和图 2，其中汉滩型有 21 株、汉城型有 9 株，长江以南汉滩型 12 株、汉城型 2 株；长江以北汉滩型 9 株、汉城型 7 株。

3 讨论

自 1981 年我国从黑线姬鼠中分离出汉滩型和从褐家鼠中分离到汉城型 HV 以来[4]，目前我国已分离出上百个毒株。多数人认为这些毒株分为汉滩型和汉城型，但亦有人认为存在其他型别。传统的血清学分型方法如空斑减数中和试验(PRNT)[5]，虽然对病毒分型较为可靠，但对病毒本质缺乏认识。PCR 技术的问世使对病毒的分型进入到更深入的层次。Puthavuthana 等[6]构建 5 套引物将 26 株世界不同地区 HV 分为汉滩型、汉城型、普马拉型和希望山型，其结果与血清学分型完全一致。姚智慧等[7]设计 6 对寡核苷酸引物对来自不同地区、不同宿主来源的 25 株 HV 进行分型，结果汉滩型 16 株、汉城型 7 株、普马拉型 1 株。Tang 等[8]以 76/118 株和 R_{22}株 M 片段设计两对引物通过 PCR 技术可区别我国啮齿类和食虫类宿主体内的 HV 型别，认为 PCR 技术可以区别更多来自不同宿主的 HV。柯正等[9]参照 HTN76/118 和 Seou180/39 及 R_{22}株 M 片段核苷酸序列，设计通用引物和分型引物对 B_{78}株(来自病人血清)和 R_{178}株(分离褐家鼠)进行分型，同时用 IFA 和交叉中和实验也进行分型，结果表明 B_{78}株用汉滩型和汉城型引物均能得到特异

维普资讯 http://www.cqvip.com

性扩增,而R_{178}株未见特异性扩增片段,但血清学具有双型特征,认为血清学分型同RT-PCR存在一定的差异。

我们参考HV标准株(76/118)、中国代表株(A_9、R_{22})、湖北省代表株(H-114)的M片段核苷酸序列,同时考虑到引物与靶基因互补的程序对扩增结果有很大影响,由于引物是根据每一血清型代表株的基因序列设计的,且各型特异性引物均互补于M片段的高变区,基因序列差异越小越容易被同一对互补引物所扩增,而且本实验中部分汉滩型病毒基因仅用外引物较难扩增,因此我们设计的HV分型引物及其建立的RT-heminested PCR方法对上述HV标准株、中国代表株及湖北省代表株进行了特异性地分型,并且还成功地对30株湖北不同地区的HV进行了分型,这说明我们所设计的HV型特异性引物是适合于湖北地区HV分型的。从湖北省不同地区分离的30株HV的分离地点(图2)看,HV毒株多集中于江汉平原地区,并且分离的汉滩型略多于汉城型。李十月等[10]研究江汉平原鼠间EHF感染时,认为黑线姬鼠和褐家鼠为江汉平原地区优势鼠,江汉平原地区为混合型EHF疫区。这些资料提示在不同地区HV与不同的啮齿类动物种群间有着长期的联系,也为HV与其各自的宿主之间共同进化的观点提供佐证。陈化新等[11]根据中国各省(区、市)防疫站历年的疫情资料,按年代对肾综合征出血热(HFRS)疫情进行了综合分析,指出混合型疫区主要分布在华东区和中南地区。这与我们得出的结果是一致的。有学者[11]用HI对地处长江南北两岸的EHF高发区;天门(北)与咸宁(南)的感染鼠和患者血清进行了分型研究,发现两地均为混合疫区,天门偏重野鼠型(汉滩型),咸宁偏重家鼠型(汉城型);从患者血清型看,天门以野鼠型为主(70.7%),而咸宁以家鼠型为主(59.3%),提出湖北地区长江南北EHF感染血清型别有地理上的差别。从我们的研究资料上看,湖北地区长江以南汉滩型12株、汉城型2株;长江以北汉滩型9株、汉城型7株,未显示出这种以长江为界南北分布上的差别,其原因仍待研究。

参考文献

[1] 宋干,忱长寿,廖化新,等.从轻型出血热疫区的褐家鼠分离到流行性出血热有关的病原因子[J].微生物学报,1982,22(4):373-376.

[2] 姚智慧.汉坦病毒研究进展[J].中国人畜共患病杂志,1999,15(5):75-79.

[3] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thicyanate-phenol-chloroform extraction[J]. Ana Biochem, 1987,162:156-159.

[4] Song G, Hang C S, Qui X Z, *et al*. Etiologic studies of epidemic hemorrhagic fever (hemorrhagic fever with renal syndrome) [J]. J Infect Dis, 1983,147:654-659.

[5] 俞永新,姚智慧,安琪.出血热病毒株的分型和抗原性比较的进一步研究[J].中国病毒学,7:156-159.

[6] Puthavuthana P, Lee H W, Kang C Y. Typing of Hantaviruses from five continents by polymerase chain reaction[J]. Virus Res, 1992,26:1-9

[7] 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):127-135

[8] Tang Y W, Ruo R L, Sancheza A, *et al*. Hantavirus strains isolated from rodentia and insectivora in rural China differentiated by polymerase chain reaction assay[J] Arch Virol, 1990,115:37-41.

[9] 柯正,宋干,忱长寿,等.汉坦病毒抗原性差异及其基因分型[J].病毒学报,1995,11(1):34-39.

[10] 李十月,郭毅,莫尤美,等.江汉平原鼠间流行性出血热感染研究[J].中华预防医学杂志,1997,31(1):137-139.

[11] 陈化新,丘福樽,赵秀芹,等.中国肾综合征出血热不同年代不同地区流行季节分布特点[J] 中华实验和临床病毒学杂志,1994,8(3):197-202.

[12] 李十月,杨明瑞,莫尤美,等.天门和咸宁肾综合征出血热疫区血清分型[J].中国公共卫生,1993,9(5):211-214.