维普资讯 http://www.cqvip.com

第17卷 3期
2002年8月

中 国 病 毒 学
VIROLOGICA SINICA

17(3):195－197
August 2002

汉坦病毒基因组G1区部分酶切位点的研究*

熊莉娟，罗端德，曾令兰，蔡淑清
(华中科技大学同济医学院附属协和医院传染科，湖北 武汉 430022)

Study on the Endonuclease Site of G1 Region of Hantavirus Genome

XIONG Li-juan, LUO Duan-de, ZENG Ling-lan, CAI Shu-qing
(*Department of Infectious Diseases, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Technology and Science. Wuhan* 430022, *China*)

Abstract: Typing RT-PCR was used to amplify hantaviruses genome from peripheral blood samples of 34 patients with hemorrhagic fever with renal syndrome hospitalized in Wuhan. The products contained within G1 gene of M segment, were digested with *Hin*c II and *Sac* I respectively, thereby, hantavirus could be typed into HTN and SEO. The results of RFLP-PCR were highly consistent with typing RT-PCR, and furthermore, RFLP-PCR could quickly screen the variant strain with gene mutation at the restriction site of *Hin*c II or *Sac*I.

Key words: Hantavirus; Virus typing; RFLP

摘要：用分型RT－PCR方法对34份武汉地区肾综合征出血热患者外周血标本扩增，扩增的目的片段为汉坦病毒M片段G1基因部分序列，应用*Hin*c Ⅱ和*Sac* Ⅰ两种限制性内切酶消化扩增产物，可将汉坦病毒区分为HTN型和SEO型，结果与分型PCR有很高的一致性，并可迅速筛查在*Hin*c Ⅱ和*Sac* Ⅰ酶切位点有基因变异的变异株。

关键词：汉坦病毒；病毒分型；限制性内切酶
中图分类号：R679　　**文章标识码**：A　　**文章编号**：1003-5125(2002)03-0195-03

肾综合征出血热(hemorrhagic fever with renal syndrome, HFRS)病毒属布尼亚病毒科汉坦病毒(Hanta virus, HV)属，是一单链负性RNA病毒，含L、M、S三个基因片段。据空斑减少中和试验(plaque reduction neutralization test, PRNT)等血清学试验和核苷酸序列检测表明汉坦病毒至少有16种血清型或基因型，其抗原性和基因序列均明显不同[1]，引起的临床症状轻重不一。我国流行的二种HV血清型为HTN型(Ⅰ型)和SEO型(Ⅱ型)，在动物宿主、流行特征和临床症状轻重方面均有明显差异，HTN型常引起严重的少尿，肾功衰和出血，死亡率高达5%～15%，而SEO型的临床表现较温和，故尽早鉴别哪种型别的病毒感染对于治疗和预后有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 研究对象

34份HFRS患者外周血标本于1998年11月至2000年1月采自武汉地区医院的住院患者，均在病程7 d以内采血，其中发热期17例，休克期8例，少尿期9例；男性23例，女性11例，年龄29－58岁，平均42岁；重型和危重型7例，中型12例，轻型15例。均按1996年国家卫生部颁发的流行性出血热诊断标准进行诊断。

1.2 间接免疫荧光实验(Indirect Immunofluorescent Assay, IFA)

按常规方法进行。羊抗鼠IgG-FITC购自SABC，鼠抗人NP由武汉大学医学院病毒研究所杨占秋教授惠赠。

收稿日期：2001-10-26，修回日期：2002-01-11
* 基金项目：国家卫生部立项课题(96-2-116)
作者简介：熊莉娟(1971-)，女，江西省南昌籍，医学博士，主治医生，从事传染病的研究。E－mail: kljxiong@wh.hb.public.com

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.3 总RNA的抽提

TRIzol试剂购自GIBCO/ BRL，按说明书进行操作。

1.4 汉坦病毒部分G1基因的分型RT-PCR

PCR分型引物由GIBCO BRL合成，其序列及位置见下表。合成的目的片段为汉坦病毒M片段G1基因部分序列。

Primer	Position	Product	Sence
Type I(HTN)			
P1:5′-CAATCAGCAACATGGGGATA-3′	30－49		+
P2:5′-AATATCAAAGATCCCATG-3′	648－631	619	－
Type II(SEO)			
P3:5′-AGTTGGCCAAGGCTTTGCATT-3′	78－98	671	+
P4:5′-TTGCTGATGTGATGGCAGTCTCT-3′	748－726		－

1.4.1 cDNA的合成 取上述制备的RNA，分为2份分别加入逆转录引物P1或P3 50pmol，70℃水浴变性5min立即冰浴，短暂离心混匀后加入M-MLV 5×缓冲液5μL，10mmol/L dNTPs 2.5μL，Rnasin 24U(华美生物工程公司)，M-MLV200U(Promega公司)，DEPC处理的三蒸水加至25μL，混匀后于42℃温育1h，低温保存。

1.4.2 PCR扩增 取cDNA 5μL加入P1，P2或P3，P4各50pmol，5mmol/L dNTPs 4.5μL，10×缓冲液10μL，25mmol/L $MgCl_2$ 6μL，Taq酶3U，石蜡油50μL，加三蒸水至100μL，95℃预变性5min，加酶后进行30个循环：95℃变性1min，55℃退火1min，72℃延伸1min，末次72℃延伸7min。取PCR产物10μL在1.5%琼脂糖凝胶电泳，溴化乙锭染色观察。

1.5 PCR产物的纯化

DNA快速纯化回收试剂盒购自北京原平皓公司，按说明书进行操作。

1.6 限制性内切酶反应

*Hin*c II，*Sac*I购自华美生物工程公司。酶切反应体系：纯化DNA 10μL(0.2～1μg)，10×缓冲液2μL，20 U/μL *Hin*c II或*Sac* I 1μL，加三蒸水至20μL，稍离心混合，5 000r/min数秒，37℃水浴12h，取10μL于1.5%琼脂糖凝胶电泳。

1.7 测序

由上海博亚(bioasia)公司测序，测序结果用DNASIS软件分析。

2 结果

2.1 IFA确证实验

34例临床诊断的HFRS患者外周血单个核细胞均检出HV特异性抗原(见图1)，感染HV的阳性细胞表现为细胞膜内点状绿色荧光。

图1 感染细胞中病毒抗原的荧光检测

Fig.1 The results of IFA

2.2 型特异性引物PCR扩增结果

用I型和II型引物分别对34份临床诊断及IFA确证的HFRS患者血标本，4份正常人血标本，HV114株和R22株进行RT-PCR扩增，结果34份患者血标本中I型为14份(41%)，II型为18份(53%)，2份扩增结果为阴性(6%)，正常人血标本(阴性对照)不能被任何一型引物扩增，HV114株仅可被I型引物扩增，R22株仅能被II型引物扩增。I型和II型PCR产物均为单一的核酸条带，分子量分别为619bp和671bp，与理论值相符(见图2)。

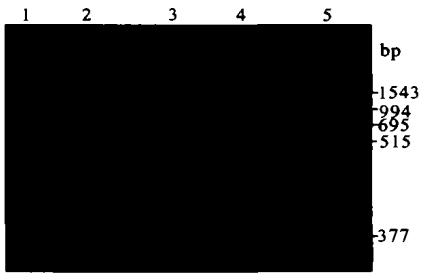

图2 用型特异性引物进行RT－PCR扩增的结果

1，I型产物；2，II型产物；3，HV114株；4，R22株；5，PCR markers。

Fig.2 RT-PCR typing products

1，HTN strain by p1 and p2；2，SEO strain by p3 and p4；3，HV114 strain by p1 and p2；4，R22 strain by p3 and p4；5，PCR markers.

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.3 限制性内切酶分析

PCR 产物分别经 *Sac* I 和 *Hin*c II 二种限制性内切酶酶切分析,结果 14 份 I 型扩增产物均可被 *Hin*c II 切成 321bp 和 298bp 二条带,而不能被 *Sac* I 切开, 18 份 II 型扩增产物大部分(17/18)可被 *Sac* I 切成 523bp 和 148bp 的二条带,不能被 *Hin*c II 切开,其中 1 份用二种酶均不能切开(见图 3)。

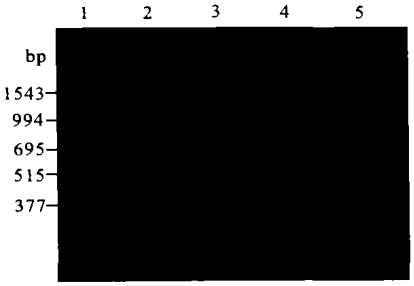

图 3 PCR-RFLP 产物的琼脂糖凝胶电泳

1,PCR markers; 2, I 型产物被 *Hin*c Ⅱ酶切(321, 298 bp); 3, I 型产物不能被 *Sac* Ii 酶切;4, II 型产物不能被 *Hin*c II 酶切;5, II 型产物被 *Sac* II 酶切。

Fig.3 PCR-RFLP products

1, PCR markers; 2, Digested products of type I by *Hin*c Ⅱ (321, 298 bp);3, Type I products can't be digested by *Sac* I; 4, Type II products can't be digested by *Hin*c II;5, Digested products of type II by *Sac* I (523, 148bp).

2.4 测序结果

选取 II 型 PCR 产物中酶切异常标本进行测序,发现其在 *Sac* I 酶切位点(220 - 225:gagctc)的 224 位存在 t→g 的变异。

3 讨论

病毒的基因分型对于治疗和预后,汉坦病毒的分子流行病学调查,尤其是在混合疫区的流行病学研究和疫苗合理使用具有很重要意义。目前传统的血清学分型方法主要是空斑减少中和实验,但存在操作繁琐、周期长等缺点,难以推广。IFA、ELISA 等血清学方法灵敏性差,且不能达到早期诊断和分型的目的。RT-PCR 方法则克服了上述缺点,快速,易于操作,在抗体出现之前或发病后 2 周细胞培养阴性时可作出诊断,故具有很高的敏感性和特异性,其早期诊断率远远高于常规的免疫学检测方法,且其分型结果与血清学方法有良好的一致性[2]。本研究引物设计参考 Puthavathana 等[3]的方法,设计了二对型特异性引物,分别与 I 型和 II 型病毒的 M 片段互补, 34 份 HFRS 患者血清经分型 RT-PCR 扩增,其中 14 份为 I 型,18 份为 II 型,扩增阳性率为 94%(32/34)。二份阴性扩增结果的可能原因为:a.血中病毒滴度太低,RT-PCR 未能检测出;b.可能在与引物互补的序列区域变异较大,致扩增结果为阴性;c.可能存在不能被本研究所用 I、II 型型特异性引物扩增的能引起 HFRS 的新型 HV。

用限制性内切酶分析 PCR 产物易于区分这二型病毒,如果不存在相关酶切位点的变异,同型病毒内不同毒株亚型的酶切产物是相同的,该法可快速筛选有酶切位点变异的突变株,然而 PCR-RFLP 只能检测导致相应酶切位点的变异,故它在筛查突变的应用方面受到一定的限制。本研究扩增的目的片段中 I 型仅含 1 个 *Hin*c Ⅱ位点,不含 *Sac* I 位点,II 型 PCR 产物则相反。用 *Hin*c Ⅱ和 *Sac* I 二种内切酶消化 PCR 产物,大部份均与预期结果相吻合,其中仅 1 份 II 型产物不能被二种酶切开,测序发现此毒株 *Sac* I 酶切位点有变异,致 *Sac* I 酶切位点消失,从而不能被 *Sac* I 消化成预期的 2 个片段。

参考文献

[1] Plyusnin A, Vapalahti O, Lundkvist A, *et al*. Isolation of a newly recognized hantavirus carried by Siberian lemmings [J]. Lancet, 1996,347: 1835 - 1836.

[2] Liang M F, Li D X, Xiao Sy, *et al*. Antigenic and molecular characterization of hantavirus isolates from China[J]. Virus Res, 1994,31:219.

[3] Puthavathana P, Lee H W, Kang C Y, *et al*. Typing of hantaviruses from five continents by polymerase chain reaction[J]. Virus Res, 1992,26:1 - 14.