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):221－225
August 2002

汉滩病毒西安分离株84FLi的L片段核苷酸序列测定以及分析

李新红[1],杨为松[1],杭长寿[1],白雪帆[1],马本江[2],黄长形[1],李光玉[1],张 岩[1]
(1.第四军医大学唐都医院全军感染病中心,陕西西安 710038;2.中国预防医学科学院病毒学研究所,北京 100052)

Sequence Analysis of Complete L Segment of 84FLi, a Hantann Virus Isolated from Xi'an

Li Xin-hong[1], YANG Wei-song[1], HANG Chang-shou[2], BAI Xue-fan[1], MA Ben-jiang[2], HUANG Chang-xing[1], LI Guang-yu[1], ZHANG Yan[1]
(1. *Infectious Diseases Center of P. L. A, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an* 710038, *China*;
2. *Institute of Virology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing* 100052, *China*)

Abstract: In order to study the nucleotide sequence of L segment of Hantaan virus strain 84FLi, the cDNA of L segment was amplified fragment by fragment by RT-PCR. The purified PCR products were sequenced directly or cloned into pMD18-T vector and then sequenced. The L genome segment is 6533 nucleotides in length with a predicated region(from 38 to 6493) encoding 2151 amino acids. The entire sequence composition was A33.39%, C16.43%, G20.74%, T29.44%, and the GC and AT contents were 37.17 and 62.83%. Homology analysis showed that the homologies of 84FLi L segment nucleotide sequence with HTN isolates especially Chinese isolates were higher than those of other Hantavirus. It showed 83.7% homology with HTN foreign standard strain 76-118, while the amino acid homology between the two strains was 97.5%. The result suggested that 84FLi strain was one of the Hantann virus, and highly related to other Chinese Hantaan virus isolates.

Key words: Hantavirus; 84FLi strain; L segment; Sequence analysis; Phyologenetic tree

摘要: 采用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR),分节段扩增汉滩病毒84FLi株的L基因片段cDNA,纯化的PCR产物片段直接用于序列测定或克隆入pND18-T载体中进行测序。结果表明,84FLi株的L片段cDNA由6533个核苷酸组成,四种核苷酸的比例分别为A33.39%,C16.43%,G20.74%,T29.44%。GC含量为37.17%,AT含量为62.83%。推导出的最大开放读码框架为从38到6493,共编码2151个氨基酸。序列同源性分析表明,84FLi株核苷酸与HTN型国际标准毒株76-118的同源性为83.7%,差异性为18.8%;而与中国株A9的同源性高达97.6%,差异性仅为2.4%。与SEO型代表Seoul80-39的同源性为75.2%,66.1%～66.5%。L片段的氨基酸比较分析表明,L片段与HTN型间的同源性为97.5%～98.0%,而与SEO型的同源性为83.5%～85.5%。与PUC、TUL、SN和AND等其它型汉滩病毒的同源性仅为68.6%～69.6%。结果表明84FLi株属于HTN型,并与分离自国内的HTN型病毒高度同源。

关键词: 汉滩病毒84FLi株;L片段;序列测定;系统发生树
中图分类号: R512.8 **文章标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2002)03-0221-05

汉滩病毒(Hantaan virus, HV)属于布尼亚病毒科汉坦病毒属(Hantavirus),是由啮齿类动物携带,在宿主动物中产生非致病性持续感染,可通过病毒污染的啮齿类动物排泄的气溶胶等多种途径感染人类。人类感染可引起肾综合征出血热(Henorrhagic Fever with Renal Syndrome, HFRS)和汉滩病毒肺综

收稿日期:2002-01-04,修回日期:2002-02-08
作者简介:李新红(1970-),女,新疆乌鲁木齐籍,博士,讲师,研究方向为肾综合征出血热诊治。E-mail:xinhong_Li@yahoo.com

维普资讯 http://www.cqvip.com

合征(Hantavirus Pulmonary Syndrome, HPS)。病毒的基因组是一个单链含大(L)、中(M)、和小(S)三个基因片段的负链RNA,编码的结构蛋白分别为L蛋白(即依赖RNA的RNA多聚酶、包膜糖蛋白(G1和G2)和核衣壳蛋白(NP)[1,2]。其中,L片段最长并且是最难测序的片段,其编码的L蛋白是汉滩病毒多聚酶,与病毒RNA复制和转录酶的作用有关[3]。因此,测定L片段的核苷酸序列将有助于了解病毒核酸的复制和转录过程。84FLi株是杨为松等[4]于1984年从肾综合征出血热患者流产胎儿肝脏分离的毒株,经交叉空斑减少中和试验和M片段部分基因序列分析鉴定为汉滩病毒型(Hantaan virus, HTNV)[5],该毒株是中国预防医学科学院病毒学研究所研制的双价灭活疫苗(I型)的生产株,所制备的疫苗已被批准正式生产。

1 材料与方法

1.1 病毒及RNA提取

汉滩病毒84FLi株系由杨为松等从流产儿肝脏中分离[4],由病毒所保存。cDNA合成试剂盒及E-LONGASE DNA聚合酶购自GIBCO BRL公司。病毒常规接种Vero细胞,培养增殖。用IFA法检测细胞感染程度。待细胞荧光出现75%～100%细胞有感染病毒颗粒时收获病毒,用于提取病毒RNA。病毒感染细胞总RNA的提取按照GIBCO BRL公司的TRIZOL试剂盒操作说明进行。

1.2 引物设计及合成

参照汉滩病毒国际标准毒株76-118的L的核苷酸序列[6]设计用于PCR扩增的引物(见下表),由大连TaKaRa公司和上海BioAsia公司合成。其中,部分引物由病毒所的李德新研究员提供。

Primer	Sequence(5′-3′)	Location (bp)	Segment sense
S1	GGGAATTCGAGATAGTGTAGTAGTA	1－8	LMS(＋)
L817R	CACTGCTGTACCTTTTACTTC	839－818	L(－)
PLU687	TAAGCACACACAAGAATCAG	687－706	L(＋)
21R	GAAGGGTAAATTCCACTTGCACC	2145－2123	L(－)
PLU1965	TGATAGAGAAGTTGTTTGAG	1965－1984	L(＋)
A2F	ACTACAGCATGGCATATAGG	1447－1466	L(＋)
B3R	ATAAACAAGGCATCATCTG	3345－3327	L(－)
B3F	TGTATGTTAGTGCAGATGC	2937－2955	L(＋)
23R	ATGAGAAGATTGTCTCTGCC	4179－4160	L(－)
PLU4036	CGGAAAGGTACAATGGAAGA	4036－4055	L(＋)
24F	ACATTTTCTAAAGAGTATGC	4406－4425	L(＋)
C3R	TTGCTTACTGCATCTACTGC	5666－5645	L(－)
C3F	CAGGTAAGCAGTATGATGCA	5154－5157	L(＋)
437R	TAGTAGTAGGCTCCGAGA	6533－6525	L(－)

1.3 cDNA合成及PCR扩增和克隆

以PCR扩增正向引物S1作为反转录引物,采用Super scrip™ II逆转录酶合成cDNA第一链。以cDNA为模板,分节段扩增L基因片段。PCR产物于1%琼脂糖凝胶上电泳分离,用QIAGEN公司的快速凝胶提取试剂盒纯化。纯化片段直接用于序列测定或克隆入宝生物公司的pMD18-T载体中。克隆用PCR方法和酶切方法进行初步筛选。

1.4 核苷酸序列测定及分析

序列测定在ABI PRISMTM 377XL DNA自动测序仪上进行,由大连TaKaRa公司和上海BioAsia公司完成。用DNAstar和Clustlw软件进行核苷酸序列和氨基酸序列的同源性和系统发生分析。汉滩病毒参比序列来自GenBank,如下表所示:

Virus	Type	Source	GenBank Accession Number
76-118	HTN	Korea	X55901
A9	HTN	China	AF293665
cl-1	HTN	Japan	D25528
cl-2	HTN	Japan	D25531
LR1	HTN	China	AF288292
Z10	HTN	China	AF189155
L99	SEO	China	AF288297
Seou180-39	SEO	Korea	X56492
Z37	SEO	China	AF285266
Sotkamo	PUU	Finland	Z66548
CG1820	PUU	Russia	M63194
Moravia	TUL	Gzech Republic	AJ005637
Chile-9717869	AND	Argentina	AF291704
Convict Creek107 virus	AND	Argentina	AF425256
NMR11	SN	USA	L37902
NMH10	SN	USA	L37901

2 结果

2.1 汉滩病毒84FLi株的L片段全基因序列及其所编码的氨基酸

测序结果表明84FLi株的L片段的全基因序列共6 533个核苷酸,四种核苷酸的比例分别为A 33.39%,C 16.43%,G 20.74%,T 29.44%。GC含量为37.17%,AT含量为62.83%。推导出的最大开放读码框为从38到6 493,共编码2 151个氨基酸。L片段的全基因序列及其推导的编码氨基酸序列GenBank注册号为AF336826。

2.2 84FLi株的L片段核苷酸序列及氨基酸序列与其他汉坦病毒的同源性及差异性比较

84FLi株L片段的核苷酸序列与其它Hantavirus的同源性比较结果见表1,与HTN型国际标

维普资讯 http://www.cqvip.com

准毒株76-118的同源性为83.7%,差异性为18.8%;而与中国株A9的同源性高达97.6%,差异性仅为2.4%。与SEO型代表株Seoul80-39的同源性为75.2%,与中国株L99的同源性为75.3%。与PUU、SN、AND和TUL等其它型汉滩病毒的同源性为66.1%~66.6%。L片段的氨基酸比较(见表2)分析表明,L片段与HTN型间的同源性为97.5%~98.0%,而与SEO型的同源性为85.3%~85.5%。与PUU、TUL、SN和AND等其它型汉坦病毒的同源性仅为68.6%~69.6%。

2.3 系统发生树分析

应用Jotun Hein[7]和Clustal W[8]等方法构建出汉坦病毒L片段核苷酸和氨基酸的系统发生树,见图1。从基于L片段核苷酸序列绘制的系统发生树来看,HTN型可分为两个分支,84FLi株与另外两个中国毒株和Z10株在同一支上,其它韩国和日本毒株以及LR1株在另一支中,这与L片段氨基酸系统发生树结果一致。

表1　84FLi株L片段与16株汉坦病毒核苷酸同源性比较分析

Table 1　Comparison of L segment of 84FLi strain nucleotide sequence homology with 16 Hantaviruses

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
1		97.6	86.4	83.7	83.7	83.7	75.3	75.2	75.1	66.6	66.3	66.3	66.3	66.3	66.1	66.1	66.1	84FLiL
2	2.4		85.3	83.5	83.6	83.6	83.6	74.5	74.4	74.3	66.1	66.5	66.0	65.6	65.5	65.8	65.7	A9L
3	15.4	16.8		83.5	83.7	83.7	83.7	75.0	74.8	74.5	66.3	65.9	66.1	65.8	65.9	66.0	66.0	Z10L
4	18.9	19.0	19.1		99.6	99.6	99.6	73.9	74.1	74.0	65.9	66.2	66.0	65.4	65.9	65.7	65.7	LR1L
5	18.8	19.0	19.1	0.4		99.9	99.8	73.9	74.2	74.1	66.0	66.2	66.0	65.4	66.0	65.7	65.7	76-118L
6	18.8	19.0	18.9	0.4	0.1		100.0	74.0	74.2	74.1	66.0	66.2	66.0	65.4	66.0	65.7	65.7	cl-2L
7	18.8	18.9	18.8	0.4	0.2	0.0		74.0	74.2	74.1	66.0	66.2	66.0	65.4	65.9	65.7	65.7	cl-1L
8	30.3	31.5	30.7	32.5	32.4	32.4	32.3		95.9	95.7	66.7	66.0	66.9	66.1	66.0	66.5	66.5	L99L
9	30.4	31.7	31.1	32.1	32.0	32.0	32.0	4.3		96.2	66.8	66.3	66.9	66.1	66.0	66.5	66.5	Seoul80-39L
10	30.5	31.8	31.5	32.2	32.1	32.1	32.1	4.4	3.9		66.7	66.5	66.9	66.2	66.2	66.6	66.6	Z37L
11	44.7	45.6	45.0	45.8	45.6	45.6	45.6	44.4	44.2	44.3		86.4	72.0	75.1	71.7	71.1	71.0	SotkamoL
12	45.1	46.4	459	45.3	45.2	45.3	45.3	45.6	45.1	44.7	17.6		70.9	74.9	71.3	71.0	71.0	CG1820L
13	45.1	45.6	45.5	45.7	45.6	45.6	45.6	43.9	44.0	43.9	35.3	37.2		71.5	74.8	88.0	88.0	Convict Creek107L
14	45.2	46.4	46.0	46.9	46.8	46.8	46.7	45.5	45.5	45.3	30.6	30.8	36.1		71.8	71.5	71.5	MoraviaL
15	45.3	46.5	45.7	45.8	45.7	45.7	45.7	45.6	45.5	45.3	35.8	36.5	31.0	35.8		75.3	75.3	Chile-9717869L
16	45.5	46.2	45.6	46.2	46.1	46.1	46.1	44.7	44.8	44.5	36.9	37.0	13.5	36.1	30.3		100.0	NM H10L
17	45.5	46.2	45.7	46.2	46.2	46.2	46.2	44.7	44.8	44.6	36.9	37.1	13.4	36.2	30.2	0.0		NMR11L

表2　84FLi株L片段与16株汉坦病毒氨基酸同源性比较分析

Table 2　Comparison of L segment of 84FLi strain amino acid sequence homology with 16 Hantaviruses

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
1		97.6	98.0	97.2	97.5	97.5	97.5	85.5	85.3	85.4	69.5	69.6	69.2	68.6	68.7	69.2	69.2	84FLiL
2	2.4		96.1	95.4	95.6	95.6	95.6	83.9	83.7	83.8	68.1	68.2	68.0	67.3	67.3	67.9	67.9	A9L
3	2.0	4.0		96.9	97.3	97.3	97.3	85.6	85.4	85.6	69.5	69.4	69.3	68.7	68.8	69.2	6.92	Z10L
4	2.8	4.8	3.2		99.3	99.3	99.3	84.9	84.7	84.9	68.9	68.9	69.1	68.3	68.6	69.1	69.1	LR1L
5	2.6	4.5	2.8	0.7		99.7	99.7	85.3	85.0	85.2	69.1	69.1	69.3	68.5	68.8	69.2	69.2	76-118L
6	2.6	4.5	2.8	0.7	0.3		100.0	85.3	85.0	85.2	69.1	69.1	69.3	68.5	68.7	69.2	69.2	cl-2L
7	2.6	4.5	2.8	0.7	0.3	0.0		85.3	85.0	85.2	69.1	69.1	69.3	68.5	68.7	69.2	69.2	cl-1L
8	16.2	18.1	16.0	16.9	16.4	16.4	16.4		99.1	99.3	68.7	68.6	69.2	69.0	68.3	69.2	69.2	L99L
9	16.4	18.4	16.3	17.1	16.7	16.7	16.7	0.9		99.2	68.8	68.7	69.2	68.9	68.2	69.2	69.2	Seoul80-39L
10	16.3	18.3	16.0	17.0	16.6	16.6	16.6	0.7	0.8		68.9	68.8	69.3	69.1	68.4	69.3	69.3	Z37L
11	39.1	41.4	39.1	40.2	39.8	39.8	39.8	40.4	40.3	40.1		97.3	78.0	85.2	77.4	78.1	78.1	SotkamoL
12	39.0	41.3	39.2	40.1	39.7	39.7	39.7	40.5	40.5	40.2	2.8		78.2	85.6	77.5	78.1	78.1	CG1820L
13	39.5	41.6	39.4	39.7	39.4	39.5	39.5	39.5	39.5	39.4	26.1	25.9		78.6	86.7	99.1	99.1	Convict Creek
14	40.5	42.8	40.5	41.2	40.8	40.8	40.8	39.9	40.1	39.8	16.5	16.1	25.3		78.3	78.7	78.7	MoraviaL
15	40.4	42.8	40.3	40.6	40.3	40.4	40.4	41.2	41.3	40.9	26.9	26.8	14.7	25.7		86.8	86.8	Chile-971786L
16	39.6	41.7	39.5	39.8	39.5	39.6	39.6	39.6	39.6	39.5	26.0	26.0	0.9	25.1	14.6		100.0	NM R11L
17	39.6	41.7	39.5	39.8	39.5	39.6	39.6	39.6	39.6	39.5	26.0	26.0	0.9	25.1	14.6	0.0		NM H10L

维普资讯 http://www.cqvip.com

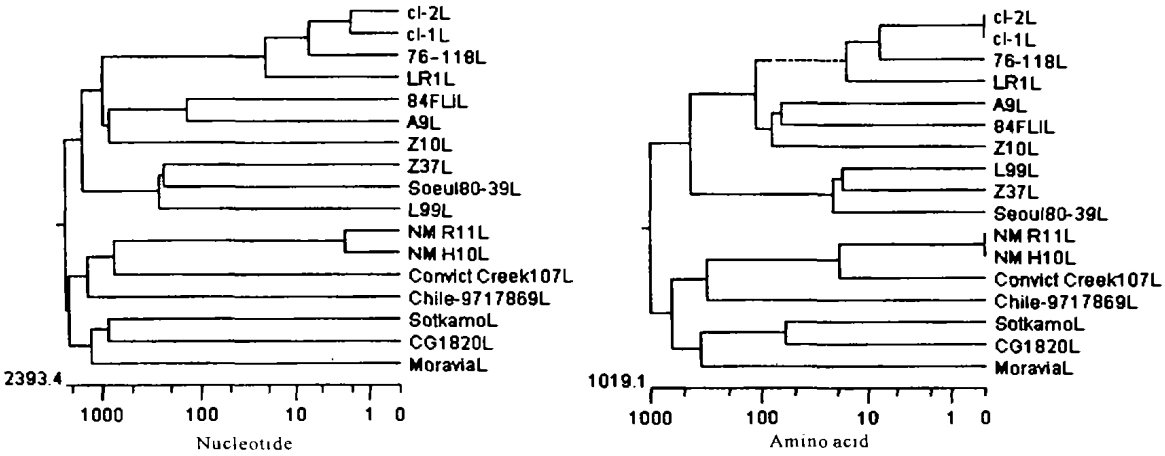

图1 汉坦病毒L片段基因序列的系统发生树

Fig.1 Phylogenetic analysis of L segment of Hanta virus 84FLi strain

3 讨论

迄今为止,国内外已有大量的汉坦病毒核苷酸序列被发表。我国是世界上受汉坦病毒危害最重的国家,因此测定我国流行的汉坦病毒毒株的序列,了解其分子基础及发病机理,将有助于防治汉坦病毒。汉滩病毒84FLi株分离自胎儿肝脏[4],是在Vero细胞上适应传代后从16株汉坦病毒中选育出的汉坦病毒疫苗候选株[9]。具有适应性好、繁殖力强、免疫原性好和抗原性好等优点,应用交叉空斑减少中和试验(Cross plaque reduction neurtralization test, cross-PRNT)对其抗原性的血清学分析以及用M片段1984至2316位间的333bp核苷酸区域序列系统发生树比较分析,结果表明:84FLi株与HTN型毒株间同源性较高,属于HTN型病毒[5]。

本研究测定了汉滩病毒疫苗株84FLi株L片段的全基因序列,其长度为6 533个核苷酸,AT含量比较丰富(62.83%),符合汉坦病毒的特征。推导出的最大开放读码框为从38到6 493,其编码2 151个氨基酸。L片段5′和3′端非编码区的长度分别是37和40个核苷酸。序列同源性分析表明:84FLi株与分离自国内的HTNV同源性较高。汉坦病毒L片段较同种病毒的M和S片段更保守,同型病毒L片段之间同源性较高,HTN型病毒之间的同源性为83.7%~100%,而SEO型更加保守,同源性为95.7%~96.2%。应用生物软件对病毒基因的核苷酸和氨基酸序列进行配对比较分析,可了解各毒株之间的亲源关系和进化规律,并绘制相应的种系发生树。通过对GenBank中17株汉坦病毒的L片段序列进行分析比较,构建了种系发生树,84FLi株与其它中国毒株亲源关系接近,而与韩国和日本的毒株距离较远,说明地域对汉坦病毒的进化有一定的影响。HTN型和SEO型在同一个分支中,PUU、TUL、SN和AND等其它型在同一个分支中。

反向遗传学技术是近年来应用于分节段、负链RNA病毒的一种基因操作技术。该技术是将病毒RNA逆转录成cDNA,由含病毒基因组cDNA的质粒获取RNA病毒的一项技术。这不仅为病毒的基因表达分析和进一步研究病毒复制以及转录过程开辟了新途径,而且为将病毒应用于基因工程疫苗和基因治疗铺平了道路[10,11]。汉坦病毒是负链、分节段的RNA病毒,利用反向遗传学技术可在DNA水平上对其基因组进行人工操作,以达到改造病毒基因组、了解基因及其产物功能的目的。本研究测定了汉坦病毒疫苗株84FLi的L片段全基因组序列,下一步可构建病毒基因组全长cDNA克隆,为进一步研究病毒基因组功能以及病毒的复制和转录等奠定基础。

参考文献

[1] Schmaljohn CS, Hasty SE, Dalrymple JM, *et al*. Antigenic and geneitc properties of viruses linked to hemorrhagic fever with renal syndrome[J]. Science, 1985, 227:1041-1044.

[2] Elliott LH, Kiley MP, McCormick JB. Hantaan virus: identification of virion proteins[J]. J Gen Virol, 1984, 65:1285-1293.

[3] Kukkonen SK, Vaheri A, Plyusnin A. Completion of the Tula han-

维普资讯 http://www.cqvip.com

tavirus genome sequence properties of the L segment and heterogeneity found in the 3′termini of S and L genome RNAs[J]. J Gen Virol, 1998, 79:2615 - 2622.

[4] 杨为松,白宪光,张文彬.流行性出血热病毒经人体胎盘传播及其在人胎部分脏器定位的研究[J].中国公共卫生,1987,6:85 - 89.

[5] Liang MF, Li DX, Xiao SY, *et al*. Antigenic and molecular characterization of hantavirus isolates form China[J]. Virus Research, 1994, 31:219 - 233.

[6] Schmaljohn CS. Nucleotide sequence of the L segment of Hantaan virus[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18:6728.

[7] Bucka-Lassen K, Caprani O, Hein J. Combining many multiple alignments in one improved alignment[J]. Bioinformatics. 1999, 15:122 - 130.

[8] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progessive multiple sequence aligment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice[J]. Nucleic Acids Res. 1994, 22:4673 - 4680.

[9] 解燕乡,马本江,杭长寿.汉坦病毒在 Vero 细胞上的适应传代及疫苗候选株的选育[J].中华微生物和免疫学杂志,2000,20:527 - 530.

[10] Conzelmann KK. Nonsegmented negative-strand RNA viruses genetics and manipulation of viral genomes[J]. Annu Rev Genet, 1998, 32:123 - 162.

[11] Robert A, and Rose J. Recovery of negative-strand RNA viruses from plasmid DNAs: A positive approach to a negative field[J]. Virology, 1998, 247:1 - 6.

欢迎订阅《长江流域资源与环境》

《长江流域资源与环境》由中国科学院资源环境科学与技术局和中国科学院武汉文献情报中心联合主办,科学出版社出版。它是全国唯一一份专门研究长江流域各种资源的开发利用保护与生态环境的综合性学术刊物,是中国科技论文统计源期刊,全国中文核心期刊,中国科学引文索引源期刊。它立足长江流域,面向国内外,围绕长江流域资源与生态环境重大问题,报道流域资源与生态环境科学研究成果、资源综合开发利用与生态环境保护工作经验,介绍国内外江河流域开发整治和环境保护的最新成就。主要栏目有:资源环境与社会可持续发展;自然资源;农业发展;生态环境;自然灾害;学术讨论·决策建议;动态信息。对从事资源与环境研究,以及广大农业、林业、气象、能源、水利、土地管理、旅游、经济、人口、生物、地理等学科部门的科技人员、决策与管理人员、高等院校师生都有参考价值。

本刊由邮局统一发行。邮发代号:38-311。如有漏订者,可直接汇款到编辑部补订。银行汇款请寄:中国科学院武汉文献情况中心 85493892261014638 建行何办科代 854938。本刊为双月刊,每期 96 页,全年定价 60 元(含邮费)。编辑部地址:武汉市武昌小洪山西区 25 号,邮政编码:430071,电话:(027)87869181,电子信箱:editoffi@public.wh.hb.cn