

## 浙江省 SARS 冠状病毒分离与系统进化树分析

李兰娟<sup>1</sup>, 卢亦愚<sup>2\*\*</sup>, 翁景清<sup>2</sup>, 严菊英<sup>2</sup>, 吴南屏<sup>1</sup>, 沃健儿<sup>1</sup>, 史雯<sup>2</sup>,  
龚黎明<sup>2</sup>, 朱函坪<sup>2</sup>, 葛琼<sup>2</sup>, 李敏红<sup>2</sup>, 陆群英<sup>2</sup>, 程苏云<sup>2</sup>, 张严峻<sup>2</sup>,  
姚莘莘<sup>2</sup>, 梅玲玲<sup>2</sup>, 王志刚<sup>2</sup>, 冯燕<sup>2</sup>, 茅海燕<sup>2</sup>

(1. 浙江大学医学院, 浙江杭州, 310009; 2. 浙江省疾病预防控制中心, 浙江杭州 310009)

## Phylogenetic Analysis of SARS-Coronavirus Isolated from Zhejiang Province

LI Lan-juan<sup>1</sup>, LU Yi-yu<sup>2\*\*</sup>, WENG Jing-qing<sup>2</sup>, YAN Ju-ying<sup>2</sup>, WU Nan-ping<sup>1</sup>, WO Jian-er<sup>1</sup>, SHI Wen<sup>2</sup>,  
GONG Li-ming<sup>2</sup>, ZHU Han-ping<sup>2</sup>, GE Qiong<sup>2</sup>, LI Min-hong<sup>2</sup>, LU Qun-ying<sup>2</sup>, CHENG Su-yun<sup>2</sup>,  
ZHANG Yan-jun<sup>2</sup>, YAO Ping-ping<sup>2</sup>, MEI Ling-ling<sup>2</sup>, WANG Zhi-gang<sup>2</sup>, FEN Yan<sup>2</sup>, MAO Hai-yan<sup>2</sup>

(1. Medical College of Zhejiang University, Hangzhou 310009, China; 2. Zhejiang Center for Disease Prevention and Control, Hangzhou 310009, China)

**Abstract:** Clinical specimens of throat washings were obtained from three patients with severe acute respiratory syndrome(SARS) in Zhejiang province and treated with Vero, RD, VeroE6 and Hep-2 cell lines for virus isolation. The cytopathic effect (CPE) was detected in Vero and RD cell lines after clinical specimens had been inoculated for three days. SARS-coronavirus RVA was extracted from supernatant of cell culture and RT-PCR was performed using SARS-coronavirus specific primers. Two strains of SARS-coronavirus were isolated from three clinical samples, which were identified by gene sequence. The complete genome sequence of one strain of SARS-coronavirus was determined and analysed by phylogenetic tree. SARS-coronavirus isolated from the patients with SARS in Zhejiang province was almost homological to Singapore Sin2774 and Taiwan TW1.

**Key words:** SARS; Virus isolation; Sequence; Phylogenetic tree

**摘要:** 从浙江省 3 例 SARS 患者中收集含漱液标本, 经处理后接种 Vero、RD、VeroE6 和 Hep-2 细胞进行病毒分离, 培养 3d 后在 Vero 和 RD 细胞中可观察到细胞病变。从细胞培养上清中提取病毒核酸, 用 SARS 冠状病毒特异性引物进行 RT-PCR, 并经测序证实从 3 份临床样本中分离到 2 株 SARS 冠状病毒株。对其中 1 株病毒的基因组进行了全序列测定并作系统进化树分析显示浙江省 SARS 冠状病毒株与新加坡 2774 株和台湾 TW1 株最为接近。

**关键词:** SARS; 病毒分离; 序列; 系统进化树

中图分类号: R511

文章标识码: A

文章编号: 1003-5152(2004)01-0014-04

传染性非典型肺炎 (Severe acute respiratory syndrome SARS) 是一种新发的急性呼吸道传染病, 该病传染性强, 死亡率达 10% 左右, 在我国局部地区流行数个月来, 给人民生活与经济建设带来了巨大的损失。今年 4 月中旬, 浙江省首次出现 3 例 SARS 患者, 我们采集了患者含漱液, 在 P3 级生物安全实验室内进行病毒分离, 获得 2 株 SARS 冠

状病毒株, 对分离毒株采用 RT-PCR 方法扩增出特异性核酸片段, 作序列测定加以确认后, 对其中 1 株进一步作了全序列测定, 现将结果报导如下:

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

在浙江省首次发生 3 例 SARS 临床诊断病例当

收稿日期: 2003-08-19, 修回日期: 2003-11-03

作者简介: 李兰娟 (1947-), 女, 浙江籍, 教授, 博士生导师, 主要从事传染病病毒学研究。

\*\* 通讯作者: 卢亦愚 (1948-), 男, 浙江籍, 主任技师, 从事病毒学研究。

Corresponding author. Tel: 0571-87046224-3115, E-mail: lyy283@hotmail.com

天, 取 6 mL 无菌生理盐水让患者在喉深部反复含漱后获得, 带冰运送, 将含漱液置 $-80^{\circ}\text{C}$ 保存。SARS 病毒分离采用的 Vero 与 VeroE6 细胞株由卫生部药品生物制品检定所提供, 在本实验室分别传至 140 代与 42 代; Hep-2 与 RD 细胞株由国家脊灰实验室提供, 在本实验室均传至 27 代。细胞培养采用美国 GIBCO 公司的 MEM 培养基, SARS 病毒 RNA 提取采用德国 QIAGEN 公司的 RNeasy Mini Kit, 病毒核酸片段扩增, 采用 TaKaRa 公司的 RT-PCR Kit 进行。

### 1.2 病毒分离

SARS 患者标本的 SARS 病毒分离, 均在 P3 级生物安全实验室中进行。待 Vero、RD、VeroE6、Hep-2 细胞长成单层后, 接种患者含漱液标本 1 mL, 置  $36.5^{\circ}\text{C}$  培养, 每天观察细胞病变 (CPE)。培养数天后, 当 CPE 达 +++~++++, 收取细胞液, 置  $-80^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.3 电镜观察

将 SARS 病毒感染细胞上清, 与 8% 左右的戊二醛溶液等量混合, 固定 24h 后, 进行负染, 在电镜下观察病毒形态。

### 1.4 间接免疫荧光法检测 SARS 冠状病毒

将 SARS 病毒感染的 Vero 细胞滴在载玻片上制成抗原片, 将 SARS 患者血清稀释后滴在抗原片上,  $37^{\circ}\text{C}$  孵育 30min 后, 再与 FITC 荧光标记的羊抗人 IgG 反应并置荧光显微镜下观察。

### 1.5 病毒核酸提取

采用 QIAGEN 公司 RNeasy Mini Kit, 吸取细胞培养液 200  $\mu\text{L}$ , 按试剂盒操作说明书进行 RNA 提取, 最后将 RNA 溶于 30  $\mu\text{L}$  洗脱液中。

### 1.6 SARS 病毒核酸检测

以 WHO 推荐的: BNIoutS/BNoutAs: sense primer 5' ATG AAT TAC CAA GTC AAT GGT TAC 3', antisense primer 5' CAT AAC CAG TCG GTA CAG CTA C3' 作为 SARS 病毒核酸扩增引物, 应用 Roche 公司 Titan™ one Tube RT-PCR System 试剂盒进行 RT-PCR, 扩增产物 190 bp。

### 1.7 核酸测序

SARS 病毒特异性核酸片段序列测定, 委托上海申友公司完成, SARS 病毒株基因组全序列测定, 由中国军事医学科学院协助完成。

### 1.8 系统进化树分析

SARS 冠状病毒株基因序列从美国 GenBank 上下载, 采用 Phylip 9.6 软件进行分析, 建立系统进化树。

## 2 结果

### 2.1 病毒分离

我们对 3 例 SARS 患者的含漱液作了病毒分离, 在 VeroE6 与 Hep-2 细胞上未观察到细胞病变 (CPE), 而在 Vero 细胞与 RD 细胞上标本接种 3d 后出现了细胞圆缩, 脱落等 CPE 现象, 接种 4d 后 CPE 达 +++~++++, 见图 1。电镜下可见典型的冠状病毒颗粒, 见图 2。

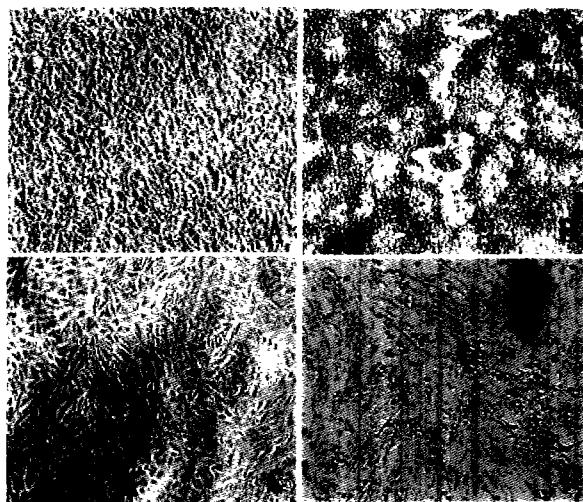


图 1 RD 和 Vero 细胞感染 SARS 病毒后的细胞形态  
Fig.1 CPE of RD and Vero cell lines caused by SARS-coronavirus

A, RD cell line for control; B, CPE of RD cell line caused by SARS-coronavirus; C, Vero cell line for control; D, CPE of Vero cell line caused by SARS-coronavirus.



图 2 SARS 冠状病毒的电镜照片  
Fig.2 SARS-coronavirus investigated by electron microscope

### 2.2 间接免疫荧光法检测 SARS 冠状病毒抗原

荧光显微镜下 Vero 细胞浆中可见有特异性的荧光颗粒, 见图 3。

### 2.3 RT-PCR 检测 SARS 冠状病毒特异性核酸

除了 SARS 病毒外, 其他病毒也可在 RD 与 Vero

细胞上引起 CPE 现象, 为了进一步进行确认, 我们提取病变细胞上清液中的病毒核酸进行特异性扩增, 可清晰见到 SARS 病毒核酸 190bp 的特异性片段。见图 4。

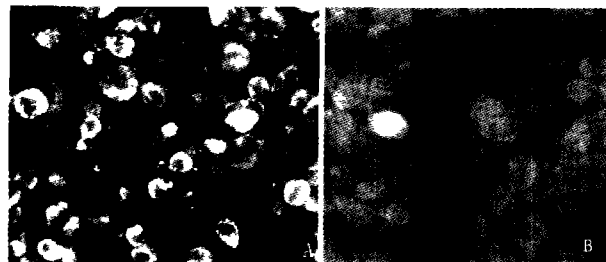


图 3 间接免疫荧光实验结果

Fig.3 Result of indirect immunofluorescence test

A, Vero cell line infected with SARS-coronavirus; B, Vero cell line for negative control.

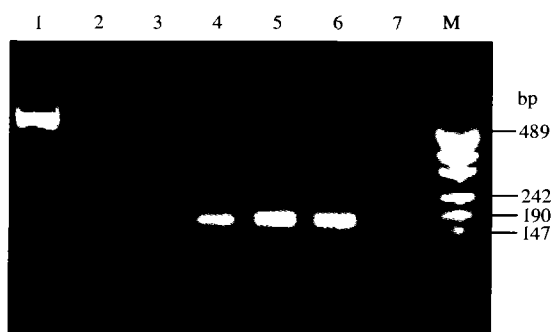


图 4 SARS 病毒 RT-PCR 扩增结果

Fig.4 Results of RT-PCR for SARS-coronavirus

1, Positive control for RT-PCR reactive system (amplification of fragment of A3 influenza virus); 2, Supernate of cell culture for control; 3, Supernate of cell culture without CPE; 4, Supernate of RD cell of sample A; 5, Supernate of Vero cell of sample A; 6, Supernate of Vero cell of sample B; 7, Negative control for RT-PCR reactive system; M, Marker23 (PUC 19 DNA/MSPI).

## 2.4 SARS 核酸片段序列测定与比较

对 A 标本 190bp 扩增产物作核苷酸序列测定结果与 2003 年 4 月 16 日由加拿大测定并在美国 GenBank 上登录的 SARS 冠状病毒株 (TOR2) 该区域的碱基在 Blast 上进行比较, 同源性 100%。

在此基础上, 我们对从 A 标本中分离到的 SARS 病毒株 (ZJ01), 进行全基因组序列测定, 由中国军事医学科学院协助完成, 并在美国 GenBank 上登录, 登录号为 AY297028。

## 2.5 系统进化树分析

对 ZJ01 的氨基酸序列与 GenBank 上登录的部分 SARS 冠状病毒的氨基酸序列用 Phylip 9.6 软件

进行比对, 建立系统进化树, 从浙江省 SARS 患者中分离的 SARS 冠状病毒与新加坡 Sin2774 株和台湾 TW1 株最为接近, 见图 5。

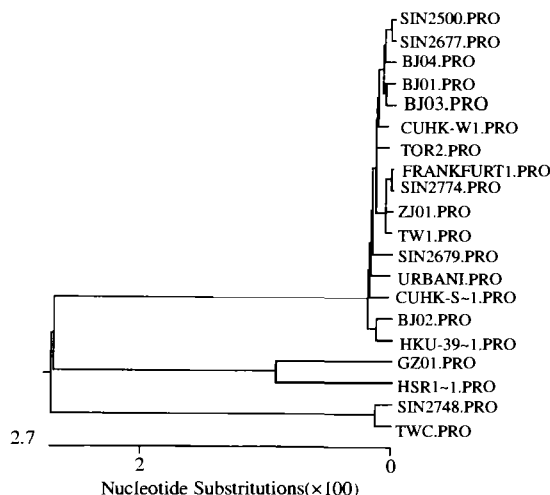


图 5 浙江省 SARS 冠状病毒分离株的系统进化树分析

Fig.5 Analysis of phylogenetic tree of ZJ01 SARS-coronavirus

SARS-coronavirus strains and their GenBank accession: SIN2500 (AY283794), SIN2677 (AY283795), BJ04 (AY279364), BJ01 (AY278488), BJ03 (AY278490), CUHK-W1 (AY278554), TOR2 (AY274119), FRANKFURT1 (AY291315), SIN2774 (AY283798), ZJ01 (AY297028), TW1 (AY291451), SIN2679 (AY283796), URBANI (AY278741), CUHK-S-1 (AY282752), BJ02 (AY278487), HKU-39-1 (AY278491), GZ01 (AY278489), HSR1-1 (AY323977), SIN2784 (AY283797), TWC (AY321118).

## 3 讨论

传染性非典型肺炎是一种新发的传染病, 在病原学上至今尚处于探索阶段, 在 SARS 病毒的分离上, 按 WHO 的资料, 大都推荐 VeroE6 细胞为首选细胞株, 国内也有报导在 Hep-2 细胞上成功分离到 SARS 病毒<sup>[1,2]</sup>。本实验室采用了 Vero, VeroE6, RD 与 Hep-2 四种细胞同时对患者含漱液进行病毒分离, 但仅在 Vero 与 RD 细胞上出现了 CPE 现象, 而其他二种细胞上并无 CPE 现象, 与他人的结果不完全一致, 这种在 SARS 病毒分离上敏感细胞的差异, 是由于细胞株的来源不同, 或在传代中发生了变异, 还是病毒株的性状有所差异, 原因尚不清楚<sup>[2]</sup>。值得说明的是对收获的一代 SARS 毒株, 再次接种 Vero 与 VeroE6 细胞时, 在 VeroE6 细胞上出现的 CPE 现象, 反而较 Vero 细胞早一天左右, 这究竟是由于初代与次代病毒株之间感染性的差异还是由其它原因所引起, 也待进一步探讨。

有关 SARS 病毒分离标本的来源, 国外报导,

以采用气管吸引液,痰,粪便与尸体组织的较多<sup>[3,4]</sup>。但上述标本的采集不及含漱液方便、及时。本实验室根据以往从事呼吸道病毒分离的经验,认为 SARS 这种通过呼吸道气溶胶传播的疾病,在含漱液中会有大量的病毒粒子存在。只要注意采集方法,同样会有很高的分离率<sup>[5]</sup>。本实验室采用 6mL 生理盐水,让患者在喉部深处尽可能长时间地含漱,以确保标本质量。本次采用了上述方法,获得了较好的结果,从 3 例患者中分离到 2 株 SARS 病毒株,并经 RT-PCR 方法与序列测定加以证实。

需要说明的是经细胞培养增殖的病毒量相当大,按照上述方法从发生 CPE 的 200 $\mu$ L 细胞培养上清中提取 SARS 病毒 RNA,得到 30 $\mu$ L RNA 提取液,经稀释 10 万倍后仍可在 RT-PCR 反应中得到清晰的特异性片段,故病毒分离必须在 P3 实验室内进行,并注意操作安全。

从系统进化树上可以看出,我省分离的 SARS 冠状病毒 ZJ01 株的蛋白序列与新加坡 2774 株和台湾株 TW1 株最为接近,离北京 SARS 冠状病毒分离株相对稍远一些。而我省首发的 3 例 SARS 病例,

是由北京的亲属发病传播而来。我们从系统进化树中可看出新加坡的几株 SARS 病毒间也有类似情况, SIN2748、SIN2679、SIN2774 与 SIN2500 间均存在一定距离,这可能是由于病毒在传播复制过程中受不同外界条件影响而发生了变异,需进行进一步的研究。

## 参考文献

- [1] 贺雄,沈壮,宁芳,等.北京市首例输入性传染性非典型肺炎家族内传播的流行病学分析[J].中华流行病学杂志,2003,24(7):557-560.
- [2] 祝文明,秦鄂德,王翠娥,等.非典型肺炎病例标本中新型冠状病毒的分离与鉴定[J].中国生物工程杂志,2003,23(4):106-112.
- [3] Chim S S, Lo Y M. Coronavirus genomic-sequence variations and the epidemiology of the severe acute respiratory syndrome[J]. N Engl J Med. 2003, 349(2): 187-188.
- [4] Azek T G, Erdman D, Goldsmith C S, *et al.* A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome[J]. N Engl J Med. 2003, 348(20): 1953-1966.
- [5] 李兰娟.传染性非典型肺炎[M].杭州:浙江省科学技术出版社,2003.36-37.