

汉坦病毒东方田鼠分离株 ZT10 的 M 基因序列的特性分析*

翁景清^{1**}, 谢荣辉¹, 卢亦愚¹, 姚萃萃¹, 李敏红¹, 李 婵¹,
徐 芳¹, 茅海燕¹, 朱函坪¹, 崔庆荣², 董 瑛², 朱智勇¹

(1.浙江省疾病预防控制中心, 浙江杭州, 310009; 2.浙江省天台县疾病预防控制中心, 浙江天台, 317200)

Molecular Characterization of Hantavirus Zhejiang Isolate ZT10 Strain

WENG Jing-qing^{1**}, XIE Rong-hui¹, LU Yi-yu¹, YAO Ping-ping¹, LI Min-hong¹, LI Chan¹, XU Fang¹,
MAO Hai-yan¹, ZHU Han-ping¹, CUI Qing-rong², DONG Ying², ZHU Zhi-yong¹

(1.Zhejiang Provincial Center for Disease Prevention and Control, HangZhou, 310009, China; 2.Zhejiang Provincial TanTai Center for Disease Prevention and Control, Zhejiang TanTai, 317200, China)

Abstract: The effects of the M gene on the molecular epidemiological characteristics of the Hantavirus ZT10 strain isolated from *M. arvalis* was investigated. The gene was amplified by RT-PCR and yielded the expected product of 3651 bp. The amplified fragment was then cloned into the T vector and confirmed by PCR and sequencing. Analysis of the sequence revealed that the ZT10 M segment belongs to seoul virus. The nucleotide sequence identity of this M gene with eight virus strains was 84.0%~96.3%. The identity with Hantavirus (*Prospect Hill virus*, *Tula virus*, *Khabarovsk virus*, *Isla vista virus*) isolated from *arvalis* was 57.5%~60.9%. Also, the identity with the SEO types and with the Guo3 isoated from ZheJiang province was 84.0%. Seoul virus ZT10 strain is a new specific seoul subtype virus in ZheJiang province.

Key word: Hantavirus; Genes; Sequence Analysis

摘要: 分析东方田鼠分离汉坦病毒ZT10株M基因分子特征。提取汉坦病毒ZT10株感染细胞的总RNA, 应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)扩增ZT10株M片段全基因, 克隆于T载体并测序, 对其进行序列分析。结果显示 汉坦病毒ZT10株的基因组M片段长度为3651个核苷酸, 编码1133个氨基酸。序列分析表明其为Seoul型汉坦病毒。与八株Seoul型汉坦病毒的M片段同源性为84.0%~96.3%,而与HTN型汉坦病毒的同源性则较低,与从田鼠分离的汉坦病毒(*Prospect Hill virus*, *Tula virus*, *Khabarovsk virus*, *Isla vista virus*)核苷酸同源性仅为57.5%~60.9%,且与浙江省Seoul型分离株Guo3同源性较低,表明浙江省可能存在着另一Seoul亚型的汉坦病毒。

关键词: 汉坦病毒; M基因; 序列分析

中图分类号: R373

文章标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)03-0235-03

肾综合征出血热是由汉坦病毒等引起一种自然疫源性疾病,也是一种人兽共患性疾病,在世界各大洲均有流行,至今世界各地报道的汉坦病毒至少有二十多个血清型/基因型,其中半数以上被确定对人具有致病性,一些新的汉坦病毒属成员还在不

断的发现中,汉坦病毒感染及其引起的相关疾病已成为严重的世界公共卫生问题之一^[1-4]。汉坦病毒(Hantavirus)是引起肾综合征出血热(HFRS)的病原体,属布尼亚病毒科,其基因组由大(L)、中(M)和小(S)3个基因片段的单股负链RNA组成,

收稿日期: 2005-10-08, 修回日期: 2006-01-10

* 基金项目: 浙江省自然科学基金(Y205700)

** 通讯作者: 翁景清(1957-), 男, 浙江建德籍, 副主任技师, 主要从事病毒学疾病检验与研究工作。
Corresponding author. Tel: 0571-87235036, E-mail: Jingqingw@yahoo.com.cn

分别编码多聚酶、外膜蛋白及核蛋白。为了解 ZT10 株的分子基础和遗传背景, 进一步研究病毒的毒力、抗原性和致病性的分子生物学基础, 因此本实验室克隆了汉坦病毒 ZT10 株的 S 和 M 全基因片段, 测定了核苷酸序列, 对其进行基因特性分析, 为以后的研究奠定了基础。

收稿日期: 2005-10-08, 修回日期: 2006-01-10

* 基金项目: 浙江省自然科学基金(Y205700)

** 通讯作者: 翁景清(1957-), 男, 浙江建德籍, 副主任技师, 主要从事病毒学疾病检验与研究工作. Corresponding author.
Tel: 0571-87235036, E-mail: Jingqingw@yahoo.com.cn

1 材料和方法

1.1 病毒、细胞和主要试剂

汉坦病毒ZT10株由本实验室首次分离自浙江省天台县捕获的东方田鼠。Vero E6由本实验室保存。One Tube RT-PCR试剂盒购自Takara公司, RNA提取试剂盒购自和凝胶回收试剂盒购自Qigen公司。Taq酶、M-MLV酶和质粒载体pGEM-T购自Promega公司。

1.2 病毒培养及RNA提取

病毒按常规接种Vero E6细胞。接种5-7d后, 间接免疫荧光(IFA)检查细胞感染程度。当75%以上的细胞感染时, 收集病毒。利用Rneasy Mini Kit按说明书从病毒细胞培养液中提取总RNA。

1.3 引物的设计与合成

参考已知的HTN病毒标准株76-118 M 片段核苷酸序列。设计出M片段引物P1: 5' -CCGTCGACTAGTAGTAGACTCCG-3', P2: 5' -AGTAGTAGACA CCGCAAGAT' -3, 由上海生物工程有限公司合成。

1.4 RT-PCR 和克隆

ZT10 株 M 片段全基因使用 MLV 逆转录酶(Promega), 参照说明书进行操作。PCR 循环参数为94℃预变性 2min, 94℃变性 15s, 52℃退火 30s, 72℃延伸 3min40sec, 30次循环后, 72℃延伸 10min, 最后置于 4℃。PCR 产物在琼脂糖上进行电泳后, 切下目的条带, 用胶回收试剂盒 MiniElute Gel Extraction Kit 回收目的片段。并将目的片段克隆于T载体, 并转化 DH5 α 感受态细胞, 在含有 Amp、X-gal、IPTG 的 LB 平板培养基上培养 18h。选取菌落进行小量培养, 碱裂解法提取质粒, 进行阳性克隆株的 PCR 鉴定

1.5 序列测定和分析

筛选的阳性克隆经 PCR 鉴定, 将筛选得到的阳性克隆株送上海生物工程有限公司测序, 并用DNASTAR 对其进行序列的比较及分析。

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增产物的检测

琼脂凝胶电泳结果显示: 扩增产物的分子量约3600bp。与预期扩增片段相符, 无非特异性条带出现, 表明特异性地扩增了目的基因。

2.2 ZT10 株 M 基因全序列的测定

序列测定表明(GeneBank 登录号 DQ159911), ZT10 毒株 M 片段的全基因序列共有 3651 个核苷酸, 4 种核苷酸的比例分别为 A 30.4%, G 20.9%, T 30.08%, C 18.63%, AT 含量为 60.48%, GC 含量为 39.52%。ZT10 毒株 S 片段的全基因序列共有 1753 个核苷酸。4 种核苷酸的比例分别为 A 31.66%, G 23.1%, T 26.18%, C 19.05%, GC 含量为 42.16%, AT 含量为 57.84%。

2.3 ZT10株M全序列的分析

序列分析表明 ZT10株M全基因片段只有1个开放阅读框架, 起始密码子位于第47-49位核苷酸, 终止密码子位于第3446-3448位核苷酸。共编码1133个氨基酸。ZT10株与8株SEO 型汉坦病毒M全基因片段核苷酸(80-39、B-1、Guo3、HB55、K24-V2、KI-83-262、R22和IR461)的同源性分别为96.3%、96.3%、84.0%、96.3%、96.1%、96.1%、95.7%和94.9%。与13株HTN型汉坦病毒M基因全片段核苷酸的同源性仅为70.2%~71.1%, 其编码的氨基酸与8株SEO 型汉坦病毒M蛋白的同源性为95.3%~99.5%, 与13株HTN型汉坦病毒M蛋白的同源性仅为75.9%~77.0%。而与田鼠类(草原田鼠、普通田鼠、东方田)分离到的汉坦病毒(*Prospect Hill virus*, *Tula virus*, *khabarovsk virus*, *Isla vista virus*)的核苷酸同源性仅为57.5%~60.9%(见图2)。ZT10株的G1和G2均富含半胱氨酸; 其中G1含有34个半胱氨酸, G2含有29个半胱氨酸。另外G1和G2含有潜在的天门冬酰胺糖基化位点。在G1内有5个糖基化位点, 与Seoul型汉坦病毒相比, 5个都保守, 与HTN型汉坦病毒相比, 4个保守。而G2内只有1个糖基化位点, 与HTN和Seoul型汉坦病毒相比都非常保守。

2.4 进化发生树比较分析

应用DNASTAR方法进行系统发生分析, 结果表明ZT10株属于Seoul型汉坦病毒, 而与HTN型汉坦病毒的亲缘关系较远。其中与国内标准株R22及河北分离株HB55、HB8610属于同一分枝, 而与浙江分离株Guo3则处于不同的分枝, 表明浙江省存在

着不同亚型的Seoul型汉坦病毒（见图1，2）。

3 讨论

本文对汉坦病毒新分离株 ZT10 的 M 蛋白基因进行了克隆和核酸的序列分析，设计引物采用二步法 RT-PCR 方法得到了 ZT10 M 基因的全长 cDNA，并选择 pGEM-T 载体作为克隆载体，使该目的基因与载体连接效率大为提高，并使筛选重组克隆时的假阳性大为减少，筛选工作简捷有效，大大提高克

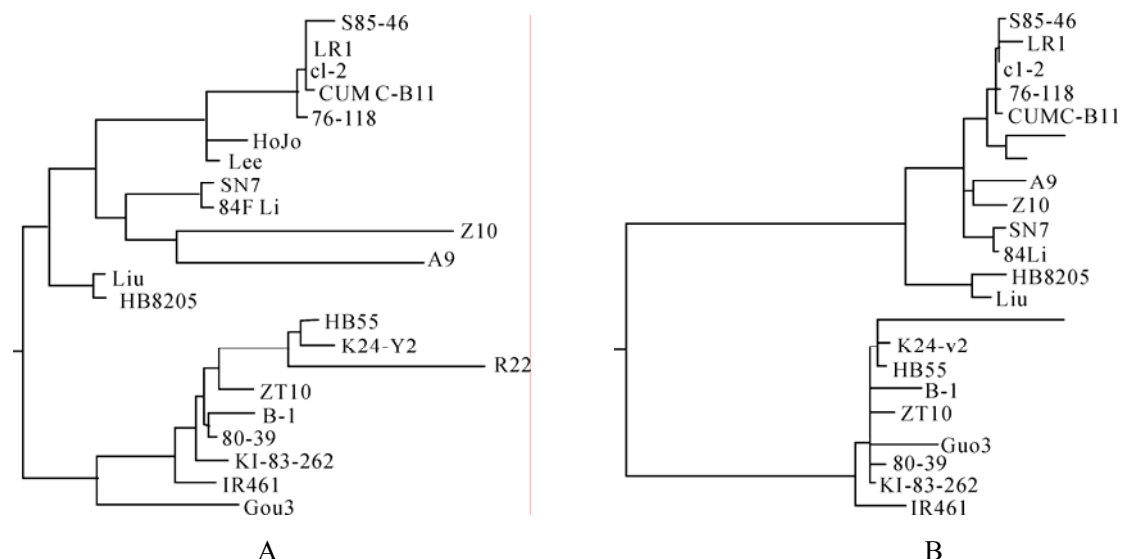


图1 ZT10株病毒和其它汉坦病毒M片段进化树分析
Fig.1 Phylogenetic tree of M segment ZT10 strain with other Hantavirus
A: nucleotide; B: amino acids

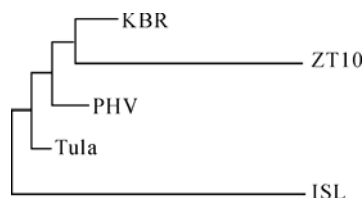


图2 ZT10株与其它从田鼠中分离到汉坦病毒M片段进化树分析
Fig.2 Phylogenetic tree of ZT10 and other hantavirus isolated from arvalis.

隆速度, 节省了试剂费用及实验时间, 为以后的研究奠定了基础。

本研究发现, ZT10株M基因是由3651个核苷酸组成, 分别编码1133个氨基酸。同已报道的汉坦病毒基因比较表明: ZT10株病毒属于Seoul型汉坦病毒; 与8株Seoul型汉坦病毒的M片段核苷酸的同源性为84.0%~96.3%, 氨基酸同源性为95.3%~99.5%; 而与其他型别的汉坦病毒同源性较远。目前研究发现汉坦病毒的3个基因片段的核苷酸变异以M片段基因的变异最为显著, 可能与M基因编码的囊膜蛋白承受的来自汉坦病毒感染宿主的免疫压力最大有关。

研究结果一般认为一个型别的汉坦病毒在一定区域只有一种主要宿主动物, 但同时也存在着病毒与宿主动物不一致而产生宿主“溢出”(spillover)的现象^[5], 因此会导致两种结果, 其一是这种感染可能只是暂时的, 很快在动物体内得以清除, 这种情况对病毒的维持和进化无意义; 其二是发生宿主转换, 即病毒能够较好地适应新的宿主动物, 并加以进化^[6]。本研究首次从从东方田鼠分离到 SEO 型汉坦病毒株

ZT10, 而前几年浙江省分离到的汉坦病毒主要来自于鼠亚科动物, 未检测到和分离来自于田鼠亚科动物的汉坦病毒, 表明浙江省内的汉坦病毒经过不断地进化有可能突破了宿主屏障, 引起了汉坦病毒在另外动物物种之间的流行和传播。与前几年浙江省分离到的 SEO 型汉坦病毒 Guo3 株的 M 全基因片段和所编码的氨基酸同源性分别只有 84.0%和 96.9%, 而 S 全基因片段和所编码的氨基酸同源性分别只有 87.9%和 97.4%, 很可能属于不同的基因亚型, 但有待进一步研究。

References

- [1] Miyamoto H H, Kariwa K, Araki K, *et al.* Serological analysis of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) patients in Far Eastern Russia and identification of the causative hantavirus genotype [J]. *Arch Virol.* 2003, 148 : 1543-1546.
- [2] Kruger D H, Ulrich R, Lundkvist A A. Hantavirus infections and their prevention [J]. *Microbes Infect.* 2001, 3 : 1129-1144.
- [3] Vapalaphti O J, Mustonen A, Lundkvist H, *et al.* Hantavirus infections in Europe [J]. *Lancet Infect Dis.* 2003, 3 : 653-661.
- [4] Mackow E R, Gavrilovskaya I N. Cellular receptors and hantavirus pathogenesis [J]. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2001, 256 : 91-115.
- [5] Mills J N, Johnson J M, Ksiazid T G, *et al.* A survey of hantavirus antibody in small mammal population in selected United States national parks [J]. *Am J Trop Med Hyg.* 1998, 58 : 525.
- [6] Chin C, Chiueh T S, Yang W C, *et al.* Hantavirus infection in Taiwan: the experience of a geographically unique area [J]. *J Med Virol.* 2000, 60 (2) : 237.