

# PCR-测序法对啮齿类动物汉坦病毒的 检测和基因分型

戴方伟<sup>1</sup>, 宋晓明<sup>2</sup>, 卢领群<sup>1</sup>, 周莎桑<sup>1</sup>, 萨晓婴<sup>1</sup>, 吕宇<sup>1</sup>, 应华忠<sup>1</sup>

(1 浙江省医学科学院实验动物中心, 杭州 310013; 2 杭州师范大学实验动物中心, 杭州 310036)

**【摘要】** 目的 探讨 PCR-测序法在啮齿类动物汉坦病毒临床检测中的应用价值。方法 以 Genbank 7 种血清亚型 24 株汉坦病毒代表性毒株为基础, 从病毒基因 S 片段序列设计引物, 采用邻位相连法进行系统进化分析, 以该方法对浙江省近年从野生啮齿类动物中临床分离的汉坦病毒毒株进行分型鉴定。结果 所建系统发育树将所分析的毒株分为 5 个区域, 引起 HFRS 的四种血清型具有较稳定的拓扑结构, 且能与引起 HPS 的血清型进行区分。11 株实验毒株进行 PCR 扩增和测序, 结果表明该引物具有高度的敏感性和特异性, 其中 9 株浙江省分离的血清型未知毒株的系统发育分析发现其包含引起 HFRS 的 3 株 HTN 和 1 株 SEO 血清型, 其他 5 株属两种未知血清型。讨论 所建立的 PCR-测序法具有用于临床检测汉坦病毒的价值。

**【关键词】** 汉坦病毒; 啮齿动物; 测序; 分型

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 03-0044-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.03.000

## PCR sequencing for detection and gene typing of hantavirus isolated from rodents

DAI Fang-wei<sup>1</sup>, SONG Xiao-ming<sup>2</sup>, LU Ling-qun<sup>1</sup>, ZHOU Sa-sang<sup>1</sup>, SA Xiao-yin<sup>1</sup>, LV Yu<sup>1</sup>, YING Hua-zhong<sup>1</sup>

(1. Center of Laboratory Animals, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China;  
2. Center of Laboratory Animals, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036)

**【Abstract】 Objective** To evaluate the application value of PCR-sequencing in clinical detection of hantavirus in rodents. **Methods** Based on 7 subtypes and 24 strains of representative hantavirus strains downloaded from Genbank, the virus S gene fragments were used for primer design and neighbor joining method was applied for phylogenetic analysis. Thereafter, we identified hantavirus strains isolated from wild rodents in recent years in Zhejiang Province by this method. **Results** The 24 analyzed strains were divided into 5 regions in the phylogenetic tree. Four of them with topology structure were more stable. Eleven strains of the virus were amplified by PCR and sequenced, and the results showed that the primers were with high sensitivity and specificity. Three HTN strains and 1 strain of serotype SEO were distinguished from 9 strains of unknown strains isolated in Zhejiang Province. We also found that 5 strains of hantavirus belonging to two unknown serotypes. **Discussion** Our results suggest that the PCR-sequencing method proposed in this study can be used for clinical detection of hantavirus.

**【Key words】** Hantavirus; Rodent animals; Sequencing; Gene typing

汉坦病毒 (Hantavirus, HV) 属布尼亚病毒科, 是一种有包膜分节段的负链 RNA 病毒, 包括引起汉坦病毒肾综合征出血热 (HFRS) 的汉坦型、汉城型、普马拉型等, 以及引起汉坦病毒肺综合征 (HPS) 的

**【基金项目】** 科技部“十二五”科技支撑计划项目子项目 (2013BAK11B01-41), 浙江省医药卫生科技计划项目 (2011RCB001), 浙江省科技计划项目 (2012C37097, 2011F30009, 2013F10071)。

**【作者简介】** 戴方伟 (1978 -), 女, 助理研究员, 从事实验动物生物净化与病原监测等研究工作。E-mail: fangweidai@126.com

**【通讯作者】** 萨晓婴。E-mail: saxiaoyin@163.com

纽约型、无名型等,在我国以汉坦型和汉城型为主要流行株<sup>[1]</sup>。自然宿主以小型啮齿动物为主,并由啮齿类动物传染给人类,引起 HFRS 或 HPS 等<sup>[2]</sup>,因此从事实验动物生产及科学研究人员存在接触携带 HV 的宿主动物及其排泄物、污染的尘埃等而被感染的风险。由于 HV 引发疾病的类型及其严重程度取决于病毒的型别,对汉坦病毒株的分型,以及阐明病毒之间的关系对 HV 病原防治具有重要的意义<sup>[3-4]</sup>。

实验动物汉坦病毒的检测有血清检测和基因检测两种,目前血清检测是汉坦病毒检测的主要方法。该法虽能用于汉坦病毒分型,但存在实验周期长、工作量大等问题。已有研究表明,依据 M 基因片段上部分核苷酸序列构建系统发生树,分型结果与血清学分型结果一致<sup>[5]</sup>。基于病毒基因序列数据分析不但能对病毒进行基因分型,而且也能较好地反映病毒间的系统发生关系。本研究根据 GenBank 中部分有代表性的毒株基因 S 片段序列设计引物,采

用邻位相连法进行系统进化分析,以此方法对浙江省近年从野生啮齿类动物中临床分离的汉坦病毒株进行分型鉴定,旨在探讨适合实验动物汉坦病毒基因分型和种系发生重建的分子生物学方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

RNA 提取试剂盒 RNeasy Mini Kit 购自美国 Qiagen 公司;克隆载体、T4 连接酶、M-MLV 逆转录酶、DNA Taq 酶、聚合酶链反应(PCR)相关试剂、琼脂糖凝胶纯化试剂盒及质粒 DNA 纯化试剂盒购自日本 TaKaRa 中国分公司。引物合成由上海生工生物工程公司完成。HV 直接荧光抗血清和 HV 单克隆荧光抗体均由浙江省肾综合征出血热重点实验室提供。

### 1.2 分析用汉坦病毒株

24 株 HV 代表株序列下载自 Genbank 数据库,包括 7 种血清亚型,详细信息见表 1<sup>[5]</sup>。

表 1 24 株 HV 代表株的信息

Tab.1 The information of 24 representative hantavirus strains

血清型 Serotypes	毒株 Strains	宿主 Host	分离地区 Isolated area	基因序列索引号 GenBank ID
HTN	76-118	Aa 黑线姬鼠	韩国 South Korea	M14626
	A16	Aa 黑线姬鼠	中国 China	AF288646
	C1-2	Aa 黑线姬鼠	中国 China	D25533
	NC167	Nc 社鼠	中国 China	AB027523
	Z10	Hu 人	中国 China	AF184987
	SEO	Gou3	Rr 黑鼠	中国 China
K24-V2		Rn 褐家鼠	中国 China	AF288655
L99		Rl 黄毛鼠	中国 China	AF488708
R22		Rn 褐家鼠	中国 China	AF488707
SR11		Rn 褐家鼠	日本 Japan	M34881
DOB	160V	Aa 黑线姬鼠	爱沙尼亚 Estonia	AJ009773
	Dobrava	Af 黄喉姬鼠	斯洛文尼亚 Slovenia	L41916
PUU	Cg-13891	Hu 人	法国 France	U22423
	Cg-Erft	Cg 欧洲棕背鼠平	德国 Germany	AJ238779
	K27	Cg 欧洲棕背鼠平	俄罗斯 Russia	L08804
	Vranica	Cg 欧洲棕背鼠平	德国 Germany	U14137
AND	AH1	Ol 长尾矮小稻鼠	阿根廷 Argentina	AF324902
	C9717869	Ol 长尾矮小稻鼠	智利 Chill	NC_003466
	Of22819	Of 金黄小嘴鼠	阿根廷 Argentina	AF482714
BAY	Bayou	Hu 人	美国 USA	L36929
SNV	NMH10	Hu 人	美国 USA	L25784
	NMR11	Pm 鹿鼠	美国 USA	L37904
	CC74	Pm 鹿鼠	美国 USA	L33816
	CC107	Pm 鹿鼠	美国 USA	L33683

Note: Aa; *Apodemus agraius*, Nc; *Niviventer confucianus*, Hu; Human, Rr; *Rattus rattus*, Rn; *Rattus norvegicus*, Rl; *Rattus losea*, Af; *Apodemus flavicollis*, Cg; *Clethrionomys glareolus*, Ol; *Oligoryzomys longicaudatus*, Of; *Oligoryzomys flavescens*, Pm; *Peromyscus maniculatus*.

本研究选取 11 株 HV 实验毒株进行系统分析, 这 11 株 HV 实验毒株分别为:天 77-2、游 10-31、

泉 547、龙泉、游 10-30、R88、N1、N2、N3 以及 1 株汉城病毒标准株 N4 (UR, SEO 血清型) 和 1 株 HV 标准株 T8 (76-118, HTN 血清型)。上述实验毒株中, N4 和 T8 为阳性对照, 同时采用了肺 440、肺

473、471、97 这 4 个临床检测阴性样本的 DNA 作为阴性对照。所有病毒 DNA 样本及血清学鉴定信息均由浙江省肾综合征出血热重点实验室提供。毒株信息详见表 2。

表 2 研究中用于系统发生分析的 HV 株鉴定及其来源信息

Tab. 2 Identification and sources of hantavirus used for the phylogenetic analysis in the present study

毒株号 Strains	直接荧光抗体 Direct fluorescent antibody reaction	特异单抗 Monoclonal antibody reaction		宿主 Host	地区 Area	年份 Year
		HTN	SEO			
肺 440 Lung 440	-	ND	ND	黑线姬鼠 <i>Apodemus agrarius</i>	龙游 Longyou	2010
肺 473 Lung 473	-	ND	ND	黑线姬鼠 <i>Apodemus agrarius</i>	龙泉 Longquan	2010
471	-	ND	ND	黑线姬鼠 <i>Apodemus agrarius</i>	庆元 Qingyuan	2010
97	—	ND	ND	黑线姬鼠 <i>Apodemus agrarius</i>	天台 Tiantai	2010
天 77-2 Tian 77-2	+	ND	ND	黑线姬鼠 <i>Apodemus agrarius</i>	天台 Tiantai	2010
游 10-31 You 10-31	+	ND	ND	黑线姬鼠 <i>Apodemus agrarius</i>	龙游 Longyou	2010
泉 547 Quan 547	+	ND	ND	黑线姬鼠 <i>Apodemus agrarius</i>	龙泉 Longquan	2010
龙泉 Longyou	+	ND	ND	黑线姬鼠 <i>Apodemus agrarius</i>	龙泉 Longquan	2010
游 10-30 You 10-30	+	ND	ND	黑线姬鼠 <i>Apodemus agrarius</i>	龙游 Longyou	2010
R88	+	ND	ND	黑线姬鼠 <i>Apodemus agrarius</i>	庆元 Qingyuan	2007
T8 (76-118, HTN)	+	+	—	黑线姬鼠 <i>Apodemus agrarius</i>	韩国 South Korea	1976
N1	+	ND	ND	褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	建德 Jiande	2001
N2	+	ND	ND	褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	天台 Tiantai	2004
N3	+	ND	ND	东方田鼠 <i>Microtus fortis</i>	天台 Tiantai	2004
N4 (UR, SEO)	+	-	+	褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	韩国 South Korea	1980

备注:“-”表示阴性结果,“+”表示阳性结果,“ND”表示未做检查。

Note:“-” means a negative result;“+” means a positive result;“ND” means sample not detected.

### 1.3 引物设计

S 片段的扩增引物参考已知 HV 株的核苷酸序列,本实验室自行设计并由上海生物工程公司合成,引物序列为上游引物:ATTAGCCCWGTCATGAGT-GT,下游引物:CTTTGACTCYTTTGKYTCCA,扩增产物长度 201 bp。

### 1.4 RT-PCR 扩增

利用引物对上述病毒株进行 RT-PCR 扩增,PCR 产物的克隆及筛选方法见文献<sup>[6]</sup>。具体步骤

如下:

#### 1.4.1 提取病毒总 RNA

根据 Qiagen 的 RNA 提取试剂盒说明书操作。

#### 1.4.2 反转录

以提取的 RNA 为模板进行反转录,反转录体系为:模板 RNA (约 500 ng) 1  $\mu$ L, Random primers (25  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, DEPC 水 4  $\mu$ L; 70 $^{\circ}$ C 保温 10 min, 迅速置冰浴 2 min; 再加入: 5  $\times$  MMLV buffer 2  $\mu$ L, dNTP mix (10 mmol/L) 0.5  $\mu$ L, RNase inhibitor (40

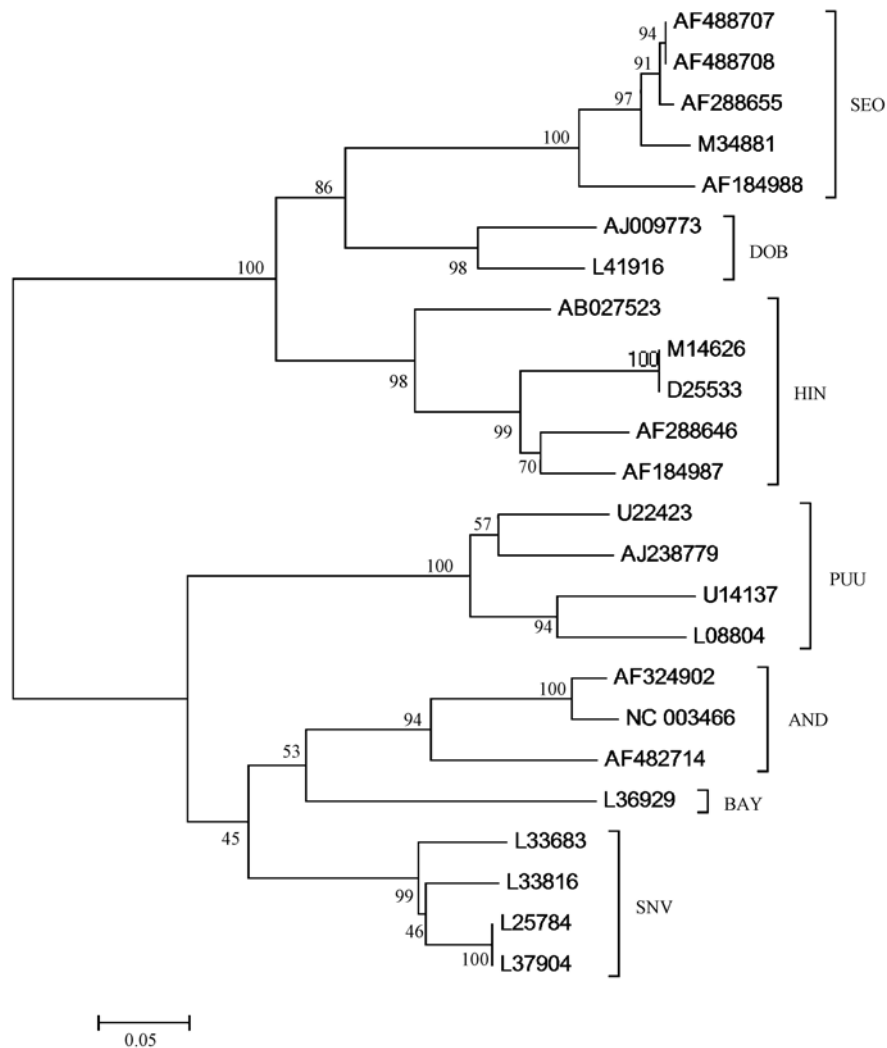


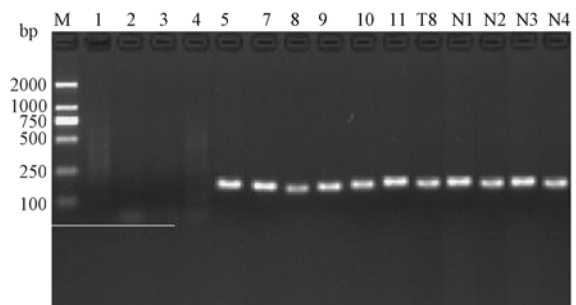
图 1 24 株 HV 代表株 S 片段引物设计区基因的分型结果

Fig. 1 Genotyping results of S segments of 24 representative strains of hantavirus

U/ $\mu$ L) 0.25  $\mu$ L, RTase MMLV (200 U/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L, DEPC 水 0.75  $\mu$ L; 总体积为 10  $\mu$ L。反应条件为: 30 $^{\circ}$ C 保温 10 min, 42 $^{\circ}$ C 1 h, 70 $^{\circ}$ C 15 min。反应结束后, 迅速置于冰上冷却, -20 $^{\circ}$ C 保存备用(以上所有操作均在冰上进行), 获得 cDNA。

1.4.3 PCR 扩增

以反转录获得的 cDNA 为模板, 利用上述设计的引物进行 PCR 扩增, 反应体系为: 模板 0.5  $\mu$ L, 10  $\times$  PCR buffer (含  $Mg^{2+}$ ) 2  $\mu$ L,  $MgCl_2$  (终浓度 2.5 mmol/L) 2  $\mu$ L, dNTP (终浓度 75  $\mu$ mol/L) 0.15  $\mu$ L, Taq 酶 (0.75 U) 0.15  $\mu$ L, 正反向引物 (终浓度 0.25  $\mu$ mol/L) 各 0.5  $\mu$ L, DEPC 水补足至 20  $\mu$ L 体系。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 扩增 30 个循环。PCR 产物电泳验证后, 回收目的片段。



注: M 为 DNA Marker DL2000, 1~4 分别为肺 440、肺 473、471、97 阴性对照扩增产物, 5、7~11、T8、N1~4 分别为天 77-2、游 10-31、泉 547、龙泉、游 10-30、R88、T8 及 N1-4 的 PCR 产物。

图 2 各病毒样本的 PCR 产物电泳图

Note: Lane M represents DNA marker; Lanes 1-4 represent lung 440, lung 473, 471 and 97; Lanes 5, 7-11 and T8, N1-4 represent the positive products from Tian 77-2, You 10-31, Quan 547, Longyou, You 10-30, R88, T8 and N1-4, respectively.

Fig. 2 Electrophoresis map of PCR products from virus samples isolated from wild rodents in Zhejiang Province

### 1.5 核苷酸序列测定和分析

核苷酸序列测定由上海生物工程公司完成,将测定的序列结果应用 DNA STAR 软件(SeqMan)进行拼接,应用 CLUSTALW 软件进行多序列联配,并 MEGA 4.0 软件包进行系统发生分析,以邻位相连

法(neighbor-joining, NJ)构建系统发生树。

## 2 结果

### 2.1 利用目标序列构建代表株的系统发育树

24 株 HV 代表株的 S 片段序列均来自 Gen-

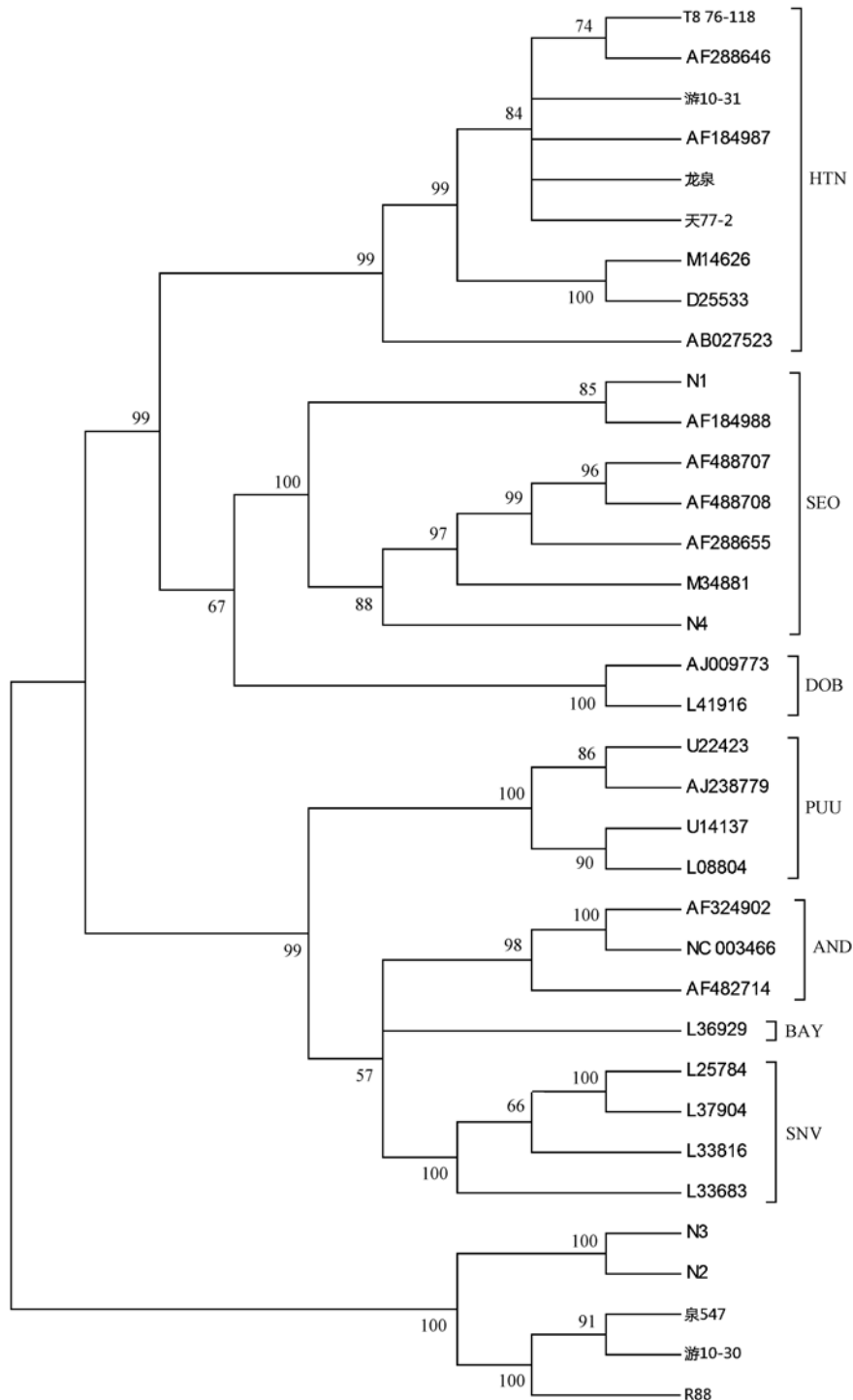


图 3 24 株 HV 代表株和 11 株实验毒株 S 片段引物设计区基因的分型结果

Fig. 3 Genotyping results of S segments of 24 representative strains and 11 wild-isolated strains of hantavirus

bank, 通过 BLASTN 确定目标序列区域, 经多序列联配后, 通过 MEGA 软件构建系统发育树 (NJ 法)。该系统发育树将所分析的毒株分为 5 个区域, 即引起肾综合征出血热 HTN、SEO、DOB、PUU 血清型、以及引起汉坦病毒肺综合征的 Sin Nombre 血清族 (AND, BAY, SNV) (图 1)。引起 HFRS 的四种血清型具有较稳定的拓扑结构, 且能与引起 HPS 的血清型进行区分。其中 PUU 血清型的毒株与引起 HPS 的 HV 具有更近的进化距离。引起 HPS 的三种血清型亲缘关系较近, 其中 AND 血清型与 BAY 和 SNV 的差异较大, 而后二者虽然形成较独立的分区, 但自展值较小 ( $<50$ )。

## 2.2 实验毒株的检测和系统发育分析

利用本文设计的引物对实验毒株进行 PCR 扩增。结果发现该引物在 11 株实验毒株 (含阳性对照 T8 和 N4) 中扩增结果均为阳性, 且产物大小与目标区域一致, 而阴性对照组中没有条带 (图 2)。由此表明本引物对 HV 的检测具有很好的敏感性和特异性。PCR 产物随后进行测序和拼接, 并加入 24 株代表株的序列进行系统发育树的构建 (图 3)。结果表明系统发育分析将已知血清型的 T8 毒株分为 HTN 分支, N4 毒株分为 SEO 血清型, 另外 9 株血清型不明的毒株分为 4 个血清型, 其中天 77-2、游 10-31 和龙泉为 HTN 血清型, N1 为 SEO 血清型; 而其余 5 个毒株则形成较为独立的两个分支, 即 (N2, N3) 和 (泉 547, 游 10-30, R88), 这两个分支之间亲缘关系较近, 且与本文选取的 5 个代表性血清型具有较大的差异。

## 3 讨论

PCR 技术具有周期短, 耗费少且敏感性、特异性高等优点, 在临床检验和生物安全等领域的应用越来越广泛。国外大型实验动物机构在实施实验动物质量监测和病原体诊断中, 均将基于 PCR 的分子生物学检测方法作为首选手段。在 HV 的检测中, PCR 方法可比血清学抗体方法早 5~15 d 检测到阳性结果<sup>[7]</sup>。本文报道了针对 HV S 片段进行检测的引物, 系统发育分析表明该引物的目标区域可对已知的代表株进行准确的分型。此前的研究报道 S 片段构建的进化树不能准确区分 SEO 和 DOB 两种血清型<sup>[5]</sup>。本文的分析观察到 SEO 和 DOB 血清型有

更近的亲缘关系, 但目标片段的系统发育分析能对其进行较好的分类。

本文同时利用所设计引物对浙江省现有的 11 株 HV 进行了分型检测, 结果表明该引物具有高度的敏感性和特异性, 提示其具有用以临床检测 HV 的价值。由于 HV 的自然宿主主要是小型啮齿类动物, 经由排泄物、唾液、直接接触或虫媒等传染人, 因此对啮齿类动物的 HV 进行快速检测和分型将有助于 HV 流行病学调查和感染控制等后续处置工作。本研究所使用毒株均为浙江省各地近几年从野生啮齿类动物上分离的临床毒株, 具有一定的地域代表性。对其中 9 株啮齿类动物分离获得的血清型未知毒株的系统发育分析发现其包含引起 HFRS 的 HTN (3 株) 和 SEO (1 株) 血清型, 其他 5 株 HV 属于两种未知血清型。下一步我们将对这 5 株病毒株进行全基因组的分型测序, 以探讨说明是否存在毒株变异的情况。

## 参 考 文 献

- [1] Kramski M, Meisel H, Klempa B, et al. Detection and typing of human pathogenic hantaviruses by real-time reverse transcription-PCR and pyrosequencing[J]. *Clin Chem*, 2007, 53(11):1899-1905.
- [2] Ramsden C, Melo FL, Figueiredo LM, et al. High rates of molecular evolution in hantaviruses[J]. *Molec Biol Evol*, 2008, 25(7):488-492.
- [3] Jonsson CB, Figueiredo LTM, Vapalahti O. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2010, 23(2):412-441.
- [4] Escadafal C, Avšič Županc T, Vapalahti O, et al. Second external quality assurance study for the serological diagnosis of hantaviruses in Europe[J]. *Plos Negl Trop Dis*, 2012, 6(4):e1607.
- [5] 张永振, 屈勇刚, 杨东明, 等. 汉坦病毒系统分析及其基因分型的研究[J]. *中国人兽共患病学报*, 2006, 22(3):193-197.
- [6] 姚莘莘, 徐芳, 朱函坪, 等. 浙江省丽水地区 2 株汉坦病毒分离株的型别鉴定和基因差异研究[J]. *中华流行病学杂志*, 2009, 30(2):175-178.
- [7] Vaheri A, Vapalahti O, Plyusnin A. How to diagnose hantavirus infections and detect them in rodents and insectivores[J]. *Rev Med Virol*, 2008, 18(4):277-288.

[收稿日期] 2013-11-26