

# 一例输入性鼠类携带汉坦病毒的分子遗传学分析

胡群<sup>1</sup>, 郑剑宁<sup>2</sup>, 马思杰<sup>1</sup>, 裘炯良<sup>3</sup>, 童淑梅<sup>1</sup>, 雷磊<sup>1</sup>, 吴薇<sup>2</sup>

1 大榭出入境检验检疫局, 浙江 宁波 315812; 2 北仑出入境检验检疫局; 3 宁波出入境检验检疫局

**摘要:** **目的** 对 1 例在境外输入褐家鼠中分离的汉坦病毒 DX1101 株进行分子遗传学特征分析。**方法** 剖取鼠肺组织, 提取病毒 RNA, 用简并 RT-PCR 和巢式 RT-PCR 分别扩增汉坦病毒 L 基因和 M 基因片段, 对扩增产物测序并构建系统发生树进行分型与系统发生分析。**结果** 2 个基因的扩增片段序列同源性系统发生树分析均显示该病毒株为汉城型汉坦病毒; M 基因的系统进化树显示与英国分离株 IR461 基因距离最为接近。**结论** 证实入境集装箱中截获的鼠类携带汉坦病毒, 加强入境集装箱的卫生检疫有重要意义。

**关键词:** 汉坦病毒; 输入性; 遗传学分析

中图分类号: R373.3 文献标志码: A 文章编号: 1003-4692(2013)01-0024-04

## Molecular genetic analysis of a Hantavirus strain isolated from an imported rat

HU Qun<sup>1</sup>, ZHENG Jian-ning<sup>2</sup>, MA Si-jie<sup>1</sup>, QIU Jiong-liang<sup>3</sup>, TONG Shu-mei<sup>1</sup>, LEI Lei<sup>1</sup>, WU Wei<sup>2</sup>

1 Daxie Exit-Entry Inspection and Quarantine Bureau, Ningbo 315812, Zhejiang Province, China; 2 Beilun Exit-Entry Inspection and Quarantine Bureau; 3 Ningbo Exit-Entry Inspection and Quarantine Bureau

Supported by the Science Project of AQSIQ (No. 2012IK233)

**Abstract:** **Objective** To analyze the molecular genetic characteristics of Hantavirus strain DX1101 isolated from the imported *Rattus norvegicus*. **Methods** We separated the rat lung, extracted virus RNA, and then used codehop RT-PCR to amplify L gene segment of Hantavirus and nested RT-PCR for M gene segment. The obtained products were then sequenced and analysed by phylogenetic tree. **Results** Homological and phylogenetic analysis of the two gene amplification products showed that the Hantavirus strain belongs to genetic subtype SEOV. The phylogenetic tree of M gene showed that the strain is genetically closest to the strain IR461 found in England. **Conclusion** This study identified Hantavirus in *R. norvegicus* seized from inboard containers. Therefore, it is of great significance to enhance the quarantine of inboard containers.

**Key words:** Hantavirus; Imported rat; Molecular genetic analysis

随着国际交往的增加,特别是国际贸易的发展,医学媒介生物及其携带的病原体可以通过进出口交通工具、货物及包装传入或输出<sup>[1-2]</sup>。汉坦病毒(Hantavirus, HV)是引起肾综合征出血热(HFRS)的病原体,主要宿主为啮齿动物,其感染后无临床症状,生长繁殖也不受影响,并能长时间携带并排出病毒,是人感染 HV 的主要传染源<sup>[3]</sup>。HV 流行范围广泛、危害严重,已经成为一个全球性的公共卫生问题<sup>[4-5]</sup>。防止 HV 通过入境鼠类携带传入我国,是国境卫生检疫工作的重要内容之一。

2011 年 12 月 11 日,宁波出入境检验检疫局卫生检疫工作人员从欧洲某国进境装载废物原料的集装箱

中发现自毙鼠 1 只,经鉴定为雌性褐家鼠(*Rattus norvegicus*),取样后,送往大榭口岸公共卫生实验室进行可能携带的病原体检测,经检测为 HV 阳性,属浙江省首例。为进一步掌握该病原体的遗传学信息,对该病毒 DX1101 株进行了分子遗传学研究。

### 1 材料与方法

**1.1 主要试剂** RNA 提取试剂盒和一步法 RT-PCR 试剂盒购自 Qiagen 公司,AMV 反转录酶、5×AMV 反转录缓冲液、RNA 酶抑制剂、Taq DNA 聚合酶、10×PCR buffer、MgCl<sub>2</sub>、dNTP、琼脂糖、5×TBE 电泳缓冲液、6×Loading buffer 溶液均购自上海生工生物工程技术服务有限公司。

**1.2 样品来源** 从欧洲某国进境装载废物原料的集装箱中发现自毙鼠 1 只,经分类鉴定为雌性褐家鼠,无

基金项目:国家质检总局科技项目(2012IK233)

作者简介:胡群(1977-),男,硕士,高级工程师,主要从事口岸病原学分子检测研究。Email: nbhuqun@sina.com

菌解剖取其肺脏,置-80℃保存待检。

1.3 病毒 RNA 制备 参照 RNA 提取试剂盒使用说明书提取病毒 RNA。用 40 μl 无 RNA 酶的超纯水溶解,置-80℃保存备用。

1.4 引物设计与合成 简并 RT-PCR 引物设计,为采用 CODEHOP 软件,依据汉坦病毒属 L 基因所设计适

用于对 HV 群所含病毒的简并引物,设计引物为 G1: 5' -GCA ACA GCA ACT GGT TTC ART AYT AYA C-3'; G2: 5' - CTT CTT CAT TCA TAT TTC CAT GCA RNC CYT TYT C -3'。巢式 RT-PCR 引物见参考文献 [6],序列见表 1。引物均由上海英骏生物技术有限公司合成。

表 1 用于巢式 RT-PCR 扩增引物  
Table 1 Primers for nested RT-PCR

引物	序列(5'~3')	位置	片段
P14	TAGTAGTAGACTCC	1~14	LMS
通用外引物	AAAGTAGGTGITAYATCYTIACAATGTGG	1910~1939	M(+)
(Htnty1/2)	GTACA ICCTGTRCCIACCCC	2373~2354	M(-)
汉滩型引物	GAATCGATACTGTGGCGCAAGTGC	1958~1984	M(+)
(Htm1/2)	GGATTAGAACCCAGCTCGTCTC	2318~2340	M(-)
汉城型引物	GTGGACT CTTCTTCTCATTATT	1936~1957	M(+)
(Seo1/2)	TGGGCAATCTGGGGGTGCATG	2331~2353	M(-)

1.5 简并 RT-PCR 反应体系和反应程序 一步 RT-PCR 反应体系为 50 μl, RNase Free Water 20.2 μl, 5× RT-PCR buffer 10 μl, 10 mmol/L dNTP Mixture 2 μl, Enzyme Mix 2 μl, Ribonuclease Inhibitor 1 μl, 20 μmol/L 上下游引物 G1、G2 各 2.4 μl, RNA 模板 10 μl。反应程序为 60℃ 1 min, 42℃ 10 min, 50℃ 30 min, 95℃ 15 min。反转录结束后, 94℃ 30 s, 52℃ 30 s, 72℃ 1 min, 35 个循环, 72℃ 7 min, 4℃ 保存。

1.6 巢式 RT-PCR 反应体系和反应程序 使用 AMV 反转录酶合成 cDNA, RNA 10 μl 加入引物 P14 2 μl, 72℃ 10 min, 然后依次加入 5× AMV buffer 4 μl, 10 U/μl AMV 反转录酶 1 μl, 10 mmol/L 的 dNTP 1 μl, RNase Inhibitor 0.5 μl, DEPC 水 1.5 μl 42℃ 反应 1 h, 72℃ 反应 10 min。采用巢式 RT-PCR 法, 以通用外引物扩增 M 片段, 10× PCR 扩增缓冲液 2.5 μl, 25 mmol/L 的 MgCl<sub>2</sub> 1.5 μl, 10 mmol/L 的 dNTP 0.5 μl, 25 μmol/L 的引物 Htnty1/2 各 0.5 μl, 5 U/μl Taq DNA 聚合酶 0.5 μl, cDNA 模板 2.5 μl, 无菌双蒸水 16.5 μl, 扩增条件: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 1 min, 扩增 30 个循环, 72℃ 延伸 10 min。再用分型引物进行再次扩增, 反应体系与通用外引物扩增反应一致, 模板为第一步 PCR 扩增产物 2.5 μl。PCR 反应条件为 95℃ 预变性 5 min, 进行如下循环: 95℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min, 共 35 个循环; 最后于 72℃ 延伸 10 min。

1.7 PCR 扩增产物检测、测序与分析 PCR 扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯观察结果。切下扩增条带, 用胶回收试剂盒纯化后, 送上海英骏生物技术有限公司测序, 用 Mega 5.0 软件进行系统发生分析, 以邻位相连法 (Neighbor-joining) 构建系统发生树, 分析用 500 次往返 (replicate)。基因距离计算采用

Nucleotide: Kimura 2-parameter 方法, 并采用 Bootstrap 方法分析毒株间序列基因平均距离及标准误。用于比较的 HV 序列来源于 GenBank (表 2)。

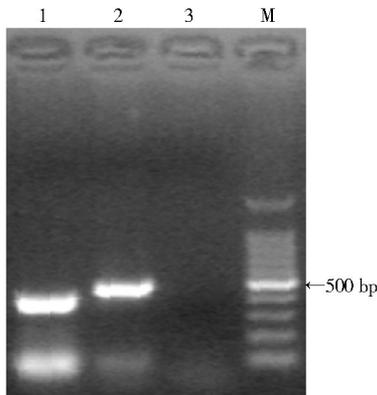
表 2 HV 毒株及来源  
Table 2 Hantavirus strains and their sources

型	毒株	来源	GenBank 位点	
			M 基因	L 基因
SEOV	GM04-38	中国山东	DQ469397.1	基因库无数据
	Z37	中国浙江	AF190119.1	AF285266.1
	ZB8	中国山东	DQ469396.1	基因库无数据
	80-39	韩国	S47716.1	X56492.1
	BjHD01	中国北京	DQ133505.1	基因库无数据
	Gou3-e5	中国浙江	AF288650.1	基因库无数据
	K24-e7	中国浙江	AF288652.1	基因库无数据
	KF-V2	中国浙江	AF288654.1	基因库无数据
	Gou3	中国浙江	AF145977.2	基因库无数据
	HB55	中国河南	AF035832.1	基因库无数据
	IR461	英国	AF458104.1	基因库无数据
	L99	中国江西	AF288298.1	AF288297.1
	ZT71	中国浙江	EF117248.1	EF190551.1
	ZT10	中国浙江	DQ159911.1	EF581094.1
	HTNV	76-118	韩国	M14627
C1-2		日本	D25532	D25531.1
C1-1		日本	D25529	D25528.1
NC167		中国安徽	AB027115	DQ989237
Q32		中国贵州	DQ371905.1	DQ371906.1
84Flu		中国西安	AF366569.1	AF336826.1
LR1		中国陕西	AF288293.1	AF288292.1
DOBV Saaremaa virus		爱沙尼亚	特异性引物不扩增	AJ410618.2
PUUV Kazan		俄罗斯	特异性引物不扩增	EF405801.1
THOV VRC-66412	印度	特异性引物不扩增	EU001330.1	
ANDV Maporal virus	委内瑞拉	特异性引物不扩增	EU788002.1	

## 2 结果

2.1 RT-PCR 扩增产物检测 根据扩增产物琼脂糖凝

胶电泳图显示(图 1),L 基因简并 RT-PCR 反应获得的扩增产物,大小约 478 bp, M 基因巢式 RT-PCR 汉城型(SEO)特异性引物反应获得的扩增产物,大小约 413 bp, 汉滩型(HTN)特异性引物反应未获得扩增片段。通过巢式 RT-PCR 反应可知为 SEOV。



注: 1. M 基因巢式 RT-PCR SEO 特异性引物反应获得的扩增产物,大小约 413 bp; 2. L 基因简并 RT-PCR 反应获得的扩增产物,大小约 478 bp; 3. HTN 特异性引物反应未获得扩增片段; M. 100 bp DNA Ladder Marker

图 1 HV DX1101 株简并 RT-PCR 与巢式 RT-PCR 电泳图

Figure 1 Electrophoresis results of Hantavirus DX1101 based on codehop RT-PCR and nested RT-PCR

2.2 HV L 基因扩增序列的测定与分析 将 DX1101 病毒简并引物 L 基因扩增产物序列与 GenBank 数据库相对应 5 株汉城病毒(Seoul virus, SEOV)、7 株汉滩病毒(Hantaan virus, HTNV)、1 株多不拉伐病毒(Dobraba virus, DOBV)、1 株普马拉病毒(Puumala virus, PUUV)、1 株索托帕拉雅病毒(Thottapalayam virus, THOV)、1 株安第斯病毒(Andes virus, ANDV)相对应 L 基因序列片段进行比较,并分析同源性,从系统发生树(图 2)及毒株基因距离(表 3)可知:病毒 DX1101 与 5 株 SEOV 基因距离最为接近,基因距离为 0.049~0.070,与 7 株 HTNV 基因距离为 0.271~0.292,与 DOBV、PUUV、KBRV、ANDV 毒株基因距离分别为 0.325、0.344、0.528 和 0.376。由此判断 DX1101 属于 SEO HV。

2.3 HV M 基因扩增序列的测定与分析 将 DX1101 病毒巢式 RT-PCR SEO 特异性引物 M 基因扩增产物序列与 GenBank 数据库相对应 14 株 SEOV、7 株 HTNV 相对应 M 基因序列片段进行比较,并分析同源性,从系统发生树(图 3)及毒株基因距离(表 4)可知:DX1101 病毒与不同 SEOV 株的基因距离为 0.073~0.315,其中与英国流行株 IR461 的遗传距离最为接近,系统进化树显示为同一分支;与不同 HTNV 株的基因距离为 1.095~1.231。同样可以判断 DX1101 属于 SEO HV。

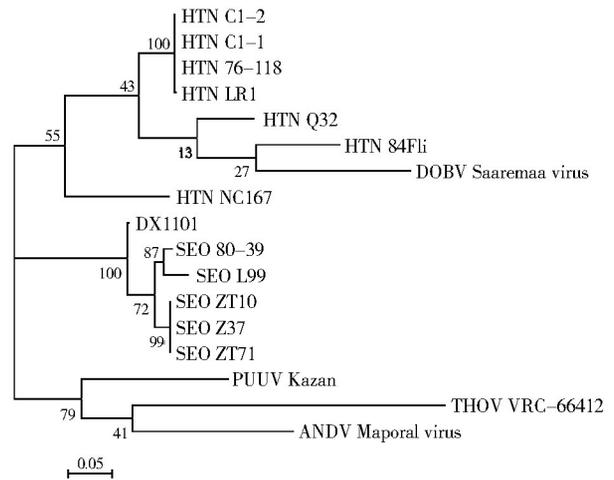


图 2 不同基因型 HV L 基因简并 PCR 扩增产物构建的系统发生树

Figure 2 Phylogenetic tree made from codehop PCR products of different types of Hantavirus L genes

表 3 DX1101 病毒与不同 HV 间 L 基因距离及标准误分析

Table 3 Genetic distances between DX1101 and different Hantavirus strains in terms of L gene and their standard errors

型	毒株	基因距离	标准误
SEOV	Z37	0.049	0.011
	80-39	0.052	0.012
	L99	0.070	0.014
	ZT71	0.049	0.011
	ZT10	0.049	0.011
HTNV	76-118	0.288	0.042
	C1-2	0.288	0.042
	C1-1	0.288	0.042
	NC167	0.271	0.038
	Q32	0.286	0.042
	84Fli	0.288	0.040
	LR1	0.292	0.043
DOBV	Saaremaa virus	0.325	0.047
PUUV	Kazan	0.344	0.049
THOV	VRC-66412	0.528	0.078
ANDV	Maporal virus	0.376	0.054

### 3 讨论

来自不同国家和地区的集装箱随入境货轮到达国内港后,会被移运至指定的口岸查验场地,随后卫生检疫工作人员将按照一定抽查比例进行开箱查验。2011 年 12 月 11 日,宁波出入境检验检疫局穿山办事处工作人员在对其所辖监管场地新入境废物原料的集装箱进行开箱查验时,在货物堆中检获 1 只自毙鼠。随后检查该集装箱的箱体完整性,证实其封条完好,无破损,并且是首次开箱查验,因此判定该鼠是从货物装载国输入。

HV 属于布尼亚病毒科汉坦病毒属,是一种分节段的负链 RNA 病毒,其基因组分为大(L)、中(M)、小(S)3 个片段,这 3 个 RNA 片段分别编码依赖 RNA 的

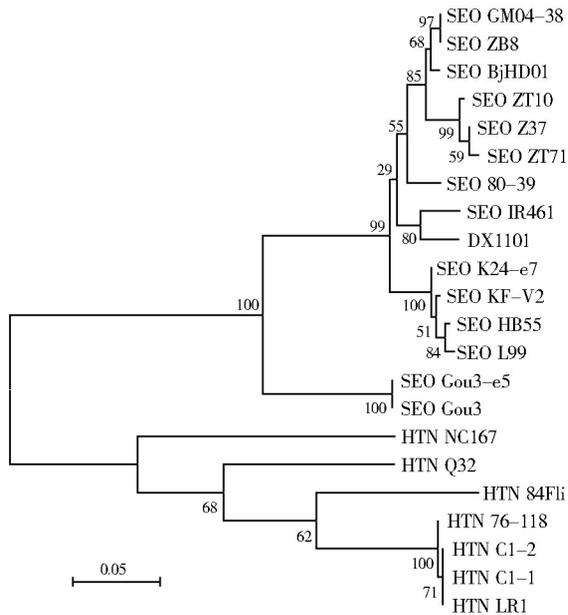


图3 不同基因型HV巢式RT-PCR SEO特异性引物M基因扩增产物构建的系统发生树

Figure 3 Phylogenetic tree made from nested PCR products of different types of Hantavirus M gene amplified by SEO specific primers

表4 DX1101病毒与不同HV间M基因距离及标准误分析  
Table 4 Genetic distances between DX1101 and different Hantavirus strains in terms of M gene and their standard errors

型	毒株	基因距离	标准误
SEOV	GM04-38	0.082	0.026
	Z37	0.112	0.035
	ZB8	0.082	0.026
	80-39	0.101	0.031
	BjHD01	0.082	0.026
	Gou3-e5	0.315	0.130
	K24-e7	0.107	0.033
	KF-V2	0.118	0.035
	Gou3	0.315	0.130
	HB55	0.117	0.035
	IR461	0.073	0.023
	L99	0.123	0.036
	ZT71	0.112	0.034
ZT10	0.108	0.032	
HTNV	76-118	1.095	0.547
	C1-2	1.106	0.549
	C1-1	1.106	0.549
	NC167	1.227	0.645
	Q32	1.131	0.602
	84Fli	1.106	0.549
	LR1	1.231	0.627

RNA 聚合酶、糖蛋白 G1 和 G2 及核衣壳蛋白<sup>[7-8]</sup>。HV 在进化过程中容易发生变异,目前已经发现 30 多种血清型或基因型的 HV<sup>[9]</sup>。

本研究分别采用简并 RT-PCR 法和巢式 RT-PCR 法进行病毒检测,其中简并 RT-PCR 法检测的目的基因为 HV 的 L 片段,该简并引物是依据 HV 群 L 基因所表达的 RNA 聚合酶保守核苷酸序列并依据 CODEHOP 程序进行设计。巢式 RT-PCR 则依据 HTNV 与 SEOV

在 M 片段序列差异,设计各自的特异性引物进行检测。从本研究结果看,两种方法都可以从该鼠中检测出 HV,巢式 RT-PCR 对于 HTNV 和 SEOV 可以直接分型,但是对于其他型别的 HV 则无法检测,而本研究所设计使用的简并 RT-PCR<sup>[10]</sup>,则能够对 HV 群所有基因型病毒进行检测,可用于发现新型或者未知的 HV。

从系统进化树结果来看,目前国际上对 SEOV L 基因的研究相对较少,从 GenBank 里仅获得 5 个病毒株的 L 基因序列,其中 80-39 株为韩国分离,其余 4 株均在我国分离,从 L 基因扩增序列所建立的系统进化树可以知道,DX1101 与 5 株 SEOV 的遗传距离极为接近,但仍存在部分基因变异。M 基因的研究相对较多,我们对所有 GenBank 中 SEOV 株进行分析,除 IR461 和 80-39 株外,其余来源均为国内。通过 14 个病毒株的比对,从遗传距离上看,与 DX1101 最为接近的是英国分离株 IR461,遗传距离为 0.073,其次是山东省分离株 GM04-38、ZB8 以及北京分离株的遗传距离为 0.082,而与 7 株浙江省分离株 Z37、Gou3-e5、K24-e7、KF-V2、Gou3、ZT71、ZT10 的遗传距离为 0.107~0.315 相对较远。从遗传进化树上看 DX1101 与英国分离株 IR461 在同一分支,结合该集装箱来自欧洲某国,因此判定与英国分离株 IR461 的同源性极大。本研究证实传染病病原体可能通过医学媒介携带传入国内,这对于加强入境集装箱的国境卫生检疫有重要指导意义。

参考文献

- [1] 吕志平,潘德观.媒介生物与国际交通[J].中华卫生杀虫药械,2004,10(2):73-75.
- [2] 胡群,童淑梅,马思杰,等.首例入境集装箱中发现疑似鼠疫感染的检测[J].中国国境卫生检疫杂志,2011,34(1):17-19.
- [3] 王学娟,陈继永.我国流行性出血热流行病学研究现状[J].医学动物防制,2000,16(4):215-217.
- [4] 李家亮,李德新.汉坦病毒病原学研究进展[J].中华实验和临床病毒学杂志,2005,19(2):198-201.
- [5] Mertens M, Essbauer SS, Rang A, et al. Non-human primates in outdoor enclosures: Risk for infection with rodent-borne Hantaviruses [J]. Veterinary Microbiology, 2011, 147(3-4):420-425.
- [6] 姚昆,江佳富,张文义,等.我国东北部分地区宿主动物感染汉坦病毒的分子流行病学调查[J].中国病原生物学杂志,2007,2(1):1-10.
- [7] Schmaljohn CS, Hasty SE, Dalrymple JM, et al. Antigenic and genetic properties of viruses linked to HFRS[J]. Science, 1985, 227(4690):1041-1044.
- [8] Elliott LH, Kiley MP, Mc Cormick JB, et al. Hantaan virus: identification of virion proteins [J]. J Gen Virol, 1984, 65(8):1285-1293.
- [9] 杨占清,俞守义.汉坦病毒基因分型及其分子流行病学研究进展[J].中国人兽共患病杂志,2005,21(3):250-255.
- [10] Rose TM, Henikoff JG, Heniko HS. CODEHOP (Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primer) PCR primer design [J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31(13): 3763-3766.

收稿日期:2012-10-15