

# 禽流感病毒(H9N2)地方株NA基因的克隆及序列分析

唐志芬<sup>1</sup>, 师东方<sup>1</sup>, 刘常军<sup>2</sup>, 贾永清<sup>1</sup>, 管雪婷<sup>1</sup>, 王君伟<sup>1</sup>

(1. 东北农业大学动物医学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 牡丹江市畜牧局, 黑龙江 牡丹江 157000)

中图分类号:S858.353 文献标识码:A 文章编号:0529-6005(2005)03-0016-02

禽流感(Avian Influenza, AI)是由A型流感病毒引起各种家禽及野生禽类感染或发生疫病综合征的传染性疾病<sup>[1]</sup>。该病自1878年首次报道以来已有100多年的历史,目前已流行于世界上许多国家和地区,给养禽业造成了巨大的经济损失<sup>[2~3]</sup>。禽流感病毒(AIV)囊膜镶嵌的两种纤突—血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA),与病毒的毒力、传播关系密切<sup>[4]</sup>。NA是AIV表面仅次于HA的一种重要抗原,具有唾液酸酶的活性,可以在病毒感染靶细胞时,识别细胞表面流感病毒受体末端的唾液酸残基,使病毒能够进入细胞;NA的另一个功能是为要出芽的病毒粒子清理通道,利于病毒粒子的成熟和释放,并且阻止病毒粒子的凝集。它诱发的抗体可以抑制酶的活性,并具有免疫保护作用<sup>[5~8]</sup>。

自1994年陈伯伦等<sup>[9]</sup>从我国发病鸡首次分离到H9N2亚型AIV以来,已先后在全国各地从发病禽分离到H9N2亚型AIV。从已有的报道分析,H9N2亚型AIV在我国广泛存在,并且是我国现有AIV的主要亚型<sup>[10]</sup>,并越来越严重的威胁着我国养禽业的发展。本实验对从本地区所分离和鉴定的一株H9N2亚型AIV的NA基因进行了克隆与测序,为诊断和预防AIV提供了理论依据。

收稿日期:2003-08-17

作者简介:唐志芬(1976-),女,硕士,从事分子病毒学研究

通讯作者:王君伟,E-mail:jwwang@mail.neau.edu.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试验毒株 A/chicken/Mu dan jiang/0823/2000(H9N2),缩写为CMJ/00,分离于黑龙江省牡丹江地区,由东北农业大学动物医学院预防兽医系鉴定和保存。

1.1.2 菌株及质粒载体 大肠杆菌工程菌TG1由东北农业大学动物医学院预防兽医系保存;pMD18-T载体购自大连宝生物工程有限公司。

1.1.3 工具酶及试剂 限制性内切酶 *EcoR* I、*Xba* I, *Taq* 酶, *T<sub>4</sub>* DNA 连接酶, X-gal, IPTG, 鼠源反转录酶, RNA 酶抑制剂均购自大连宝生物工程有限公司。Trizol 试剂由加拿大 BioBasic Inc 进口分装。Gel Extraction Mini Kit 购自于上海华舜生物工程有限公司。抗生素氨苄青霉素(AMP)购于 Amersco 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 病毒的增殖与纯化 将病毒原液经 1:1 000 稀释后,接种于 10 日龄 SPF 鸡胚绒毛尿囊腔(0.2 ml/胚),同时以无菌生理盐水相同条件接种作为对照,37℃ 培养,收集 24 h 后死亡鸡胚尿囊液及对照组尿囊液。尿囊液 4℃ 10 000 r/min 离心 30 min,弃沉淀,上清液 4℃ 30 000 r/min 超速离心 1.5 h,收集沉淀,用 1 ml TNE(0.05 mol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA pH7.8, 0.13 mol/L NaCl)

## 参考文献:

- [1] 高维凡,宋世勇,韩露,等.应用酶联免疫吸附测定检测鸡血液中抗新城疫病毒抗体的动力学研究[J].沈阳农业大学学报,1997,28(3):214-217.
- [2] Earl Linwood blewett, Jeremiah T Saliki, R Eberle. Development of a competitive ELISA for detection of primates infected with monkey Bvirus (Herpes virus simiae)[J]. Tananta, 1999, 7, 59-67.
- [3] 曹洪敬,王文志,崔锦鹏,等. Dot-ELISA 间接法检测鸡新城疫病毒(NDV)的研究[J]. 中国动物检疫, 1998, 15(6): 1-3.

综上所述,表达NDV-F基因的重组苗是用来预防鸡群ND的一种效果较佳的基因工程苗(另文发表),免疫后如何评价其抗体效价是一个重要问题。因为F蛋白不能应用常规检测NDV抗体的HI试验进行检测,而血清中和试验要求的条件较高,一般实验室难以进行,因此我们摸索了两种ELISA方法,以期建立快速、简单、准确,能够适用于基层兽医防疫单位检测的方法。试验结果表明,这两种方法可以达到上述的要求,但仍需进一步完善,才能最终形成商品化试剂盒。

重悬病毒, -70℃冻存备用。

1.2.2 引物设计与合成 参照国内外已发表的 H9N2 亚型 NA 基因全序列用 oligo4.0 软件设计一对特异性引物, 其序列如下: 上游引物 Nu 5' GCG-GAATTCGTAAAAATGAATCC 3', 下游引物 NI 5' CGGTCTAGAAAAATTGCGAAAG 3'。设计的引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。根据 A 型流感毒株的 8 个基因组片段中 3' 端的核苷酸高度保守性, 设计简并通用反转录引物 5' CCT-GCTTTC(T)GCT 3', 由赛百盛合成。

1.2.3 RNA 提取及 RT-PCR 参照 Trizol 试剂盒的说明提取病毒 RNA, 对照用尿囊液作相同条件及步骤进行处理。RT 反应参照 Strand cDNA synthesis kit for RT-PCR(AMV)的说明进行。PCR 反应条件为: 94℃变性 5 min, 94℃ 60 s, 55.8℃ 60 s, 72℃ 90 s, 共进行 32 个循环, 72℃延伸 10 min, 4℃终止反应。对照组在相同条件下进行 RT 和 PCR 反应。以 12 g/L 琼脂糖凝胶 60 V 恒定电压电泳 30 min, 以 DNA DL 15 000 为 DNA marker 分析, 并扫描记录结果。

1.2.4 PCR 产物的纯化及克隆 将 PCR 产物在 12g/L 低熔点琼脂糖凝胶上电泳, 切下目的带。按胶回收试剂盒的使用说明回收目的 DNA。将纯化的目的 DNA 4.5 μl、pMD18-T 0.5 μl、连接液 5 μl 混匀, 14~16℃连接过夜, 转化 TG1 感受态细胞, 培养挑取白色菌落接种于含 Amp 的 5 ml LB 液体培养基, 37℃水浴振荡培养 12 h, 碱裂解法提取质粒。EcoRI 和 EcoRI + XbaI 进行单、双酶切及 PCR 鉴定阳性质粒, 命名为 pMD18-T-NA。

1.2.5 PCR 扩增产物的序列测定及分析 对经过酶切及 PCR 鉴定的阳性质粒进行序列测定, 测序由上海博亚生物技术有限公司完成, 应用 DNAMAN 软件进行序列分析。

## 2 结果

2.1 RT-PCR 扩增 电泳结果表明, 扩增产物为 1.4kb 左右, 与预期的结果相符(见图 1)。

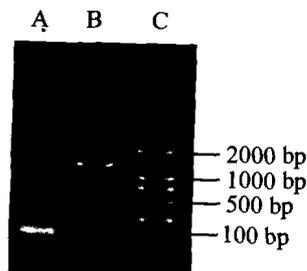


图 1 NA 基因 RT-PCR 产物电泳结果

Lane A: 阴性对照; Lane B: RT-PCR 产物;

Lane C: 2 000 bp marker

2.2 重组质粒 pMD18-T-NA 的鉴定 经 EcoRI 酶切可得到长约 4.1 kb 的一条带, 经 EcoRI 和 XbaI 双酶切得到约 1.4 kb 和 2.7 kb 的两条带, 再经 PCR 鉴定, 进一步证实了阳性重组质粒(见图 2)。

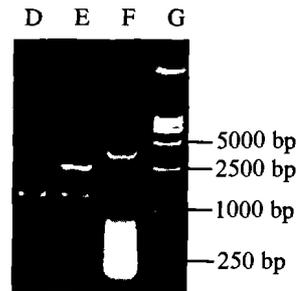


图 2 重组质粒 pMD18-T-NA 的酶切鉴定

Lane D: PCR 鉴定结果;

Lane E: EcoRI 和 XbaI 双切重组质粒 pMD18-T-NA;

Lane F: EcoRI 酶切重组质粒 pMD18-T-NA;

Lane G: DL 15 000 bp marker

2.3 序列测定与分析 测序结果表明 PCR 扩增片段大小为 1 448 bp, 包含完整的阅读框架, 编码 469 个氨基酸, 将所得核苷酸序列和推导的氨基酸序列与已发表的核苷酸序列和氨基酸序列同源性比较结果见表 1。该序列已经递交到 Genbank 中, 检索号为: AY451388。

表 1 CMJ/00 与其他 H9N2 亚型流感病毒 NA 基因核苷酸和氨基酸序列的同源性比较

毒株全称	毒株简称	核苷酸同源率(%)	氨基酸同源率(%)
A/Chicken/Korea/MS96/96	K96/96	87.50	88.30
A/Duck/HongKong/Y439/97	Y439/97	88.01	87.63
A/Chicken/Shanghai/F/98	SF/98	92.40	92.30
A/Parakeet/Chiba/1/97	C1/97	92.80	91.70
A/Chicken/HongKong/G9/97	HK9/97	96.60	95.50

## 3 讨论

地方株 CMJ/00 NA 基因的开放阅读框架由 1 407 bp 组成, 编码 469 个氨基酸残基。氨基酸序列分析表明: 氨基端的 8 个氨基酸残基高度保守(MNPNQKII), 前 6 个氨基酸残基组成神经氨酸酶的胞浆尾。根据推导的氨基酸序列推测 NA 蛋白可能的糖基化位点在 61、69、86、146、200、234、402 处, 与表 1 中的 5 个毒株比较发现: 毒株 SF/98 缺少 61 位糖基化位点; 毒株 CMJ/00、HK9/97 和 SF/98 的 69 位糖基化位点氨基酸序列是 -NST-, 而其他 3 个毒株此位点氨基酸序列是 -NNT-; 毒株 CMJ/00 和 HK9/97 的 402 位糖基化位点的氨基酸序列是 -NSS-, 而其他毒株此位点氨基酸序列是 -NWS-; 其他糖基化位点的氨基酸序列完全一致, 可见毒株 CMJ/00 的糖

# 噬/菌/体/生/态/防/治/效/果/试/验/初/报

赵 燕<sup>1</sup>, 任红卫<sup>2</sup>, 孔 健<sup>2</sup>, 任素芳<sup>1</sup>, 李法忱<sup>1</sup>

(1. 山东省农业科学院畜牧兽医研究所, 山东 济南 250100; 2. 山东大学生命科学学院, 山东 济南 250100)

**摘要:** 采用大肠杆菌 *E. coli* O-78、*E. coli* LH3-2 的噬菌体, 进行了自然感染条件下噬菌体制剂对蛋鸡公雏的保护率、噬菌体和常规药物对杂交肉雏鸡的保护率以及生长发育的影响试验。结果表明, 噬菌体制剂可明显改善雏鸡的下痢现象; 显著提高对雏鸡的保护率, 其效果与常规用药相同, 但是却降低了药物成本 90% 以上; 在雏鸡饲料中使用噬菌体制剂, 还能够使饲料利用率以及增重获得明显提高, 从而使经济效益得到显著提高。

**关键词:** 噬菌体; 制剂; 雏鸡; 生态学; 腹泻; 有效性

中图分类号: S852.69 文献标识码: B 文章编号: 0529-6005(2005)03-0018-02

众所周知, 由于在饲料中添加抗生素的负面影响日趋严重, 基于对人类公共卫生保护的责任, 世界卫生组织强烈要求使用对环境不造成危害的产品以替代抗生素, 来控制畜禽疾病和促进产量的增加。上

世纪 60 年代末, 在世界范围内各国先后将益生菌活菌制剂作为新的抗生素替代品用于畜禽饲料, 在促生长、预防畜禽细菌性下痢、消化不良等疾病方面获得较好效果<sup>[1]</sup>。这种益生菌的作用机制主要是通过生物竞争作用, 调节肠道菌群的生态平衡, 以达到预防疾病的目的。

收稿日期: 2003-09-18

作者简介: 赵燕(1950-), 女, 副研究员, 从事兽医微生物学研究工作

基化位点也高度保守。经氨基酸序列比较发现, 毒株 CMJ/00 的 63~65 位点没有发生氨基酸缺失。

Guo 等<sup>[11]</sup>研究认为, 在遗传演化上, H9N2 AIV 可分为 2 个分支, 即北美分支和欧亚分支。在欧亚分支中又可分为 3 个亚分支: A/Duck/Hong Kong/Y280/97(H9N2) 和 A/Chicken/HongKong/G9/97(H9N2) 是 Y280-like 亚分支的代表株; A/Duck/Hong Kong/Y439/97(H9N2) 和 A/Chicken/Korea/96323/96(H9N2) 是 Y439-like 亚分支的代表株; A/Quail/Hong Kong/G1/97(H9N2) 是 G1-like 亚分支的代表株<sup>[12]</sup>。由核苷酸和氨基酸序列的同源性比较可以看出, CMJ/00 与 HK9/97 的同源性最高, 核苷酸为 96.6%, 氨基酸为 95.5%, 由 NA 的分析说明此国内分离株 CMJ/00 属于欧亚分支, 与 Y280-like 亚分支的亲缘关系最近。对 NA 基因的成功克隆以及该基因的进一步表达, 对研究该毒株的毒力、宿主特性及分子流行病学具有重要意义。

## 参考文献:

- [1] 陈伯伦, 张泽纪. 禽流感[J]. 中国家禽, 1994, (2): 32-33.
- [2] Alexander. D J. Control of avian influenza[J]. Veterinary Bulletin, 1982, (52): 241-359.
- [3] Simons Hane. Avian influenza. Control and prevent[J]. Poultry International, 1998, 37(4): 32-45.
- [4] 甘孟侯. 禽流感(第二版)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004,

- 28-39.
- [5] Hay A J. The virus genome and its republication[A]. In Nicholson K G, Webster R G, Hay A J, et al. Textbook of influenza[M]. Blackwell Science Ltd, London. 1998. 43-53.
- [6] Colman P M, Laver W G, Varghese J N, et al. The three-dimensional structure of complex of influenza virus neuraminidase and an antibody[J]. Nature, 1987, 326: 358-363.
- [7] Colman, P. M., Structure and function of the neuraminidase [A]. In Nicholson K G, Webster R G, Hay A J, et al. Textbook of influenza [M]. Blackwell Science Ltd., London. 1998. 65-73.
- [8] Joseph N. Varghese, Peter M. Colman, Albertus van Donkelaar, et al. Structural evidence for a second sialic acid binding site in avian influenza virus neuraminidase[J]. Proc Natl Acad Sci, USA. 1997, 94(22): 11808-11812.
- [9] 陈伯伦, 张泽纪, 陈伟斌. 禽流感研究 I. 鸡 A 型禽流感病毒的分离与血清学初步鉴定[J]. 中国兽医杂志, 1994, 20(10): 3-5.
- [10] 郭霄峰, 廖明, 辛朝安. H9N2 亚型禽流感病毒的致病特性研究[J]. 华南农业大学学报, 2001, 22(3): 70-72.
- [11] Guo Y, Krauss S, Senne D A, et al. Characterization of the pathogenicity of members of the newly established H9N2 influenza virus lineage in Asia[J]. Virology, 2000, 267: 279-288.
- [12] Guan Y, Shortridge K F, Krauss S, et al. Molecular characterization of H9N2 influenza viruses. were they the donors of the "internal" genes of H5N1 viruses in Hong Kong. Proc Natl Acad Sci, USA, 1999, 96: 9363-9367.