

禽流感病毒分离株 HA 基因的克隆及序列分析研究

论著

李晶¹ 李治² 刘华¹ (1襄樊市中心医院 肝病科 华中科技大学同济医学院附属襄樊医院 湖北 襄樊 441000; 2陕西师范大学生命科学学院 陕西 西安 710000)

【摘要】 目的 对禽流感病毒番鸭分离株进行 HA 全基因克隆及序列分析比较,以了解其 HA 基因的分子生物学性状及进化情况。方法 提取及扩增分离株病毒 RNA,对其 PCR 产物进行克隆及测序,对阳性重组质粒进行电泳鉴定及测序。结果 番鸭流感病毒分离株与欧亚种系代表株及北美种系代表株作同源率比较分析,同源率低。与 GD/96 比较,基因亲缘关系极为密切,且具有相似的生物学特性。分离株 HA 基因裂解位点的氨基酸序列符合 A/N 1957/PR/3/36(H3N2)强毒株 HA 基因裂解位点的分子模式。结论 该分离株的 HA 基因裂解位点的氨基酸序列符合 A/N 1957/PR/3/36(H3N2)强毒株 HA 基因裂解位点的分子模式。本试验为 H5 亚型 HPA/N 和 LPA/N 的分子生物学诊断和基因工程疫苗的研究奠定了基础。

【关键词】 禽流感病毒 血凝素基因 序列分析

Cloning and sequence analysis of avian influenza virus isolates HA gene LI Jing, LI Zhi, LIU Hua 1 Attending Physician, Hepatology Department, Xiangfan Central Hospital, Hubei, MMCS, Lanzhou, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology; 2 Ph D, Associate professor, College of life sciences, Shaanxi Normal University, Xian, Shaanxi 710062, China

【Abstract】 Objective To analyze the genetic and molecular biologic characteristics of Muscovy duck avian influenza virus HA gene. Methods Viral RNA was isolated and amplified and the HA genes of Muscovy duck avian influenza virus were sequenced and analyzed. Results and Conclusion The results of HA gene sequencing showed that Muscovy duck avian influenza viruses were different with the virus isolated from Eurasia gemline and North America gemline, but they were similar to GD/96. The cleavage site in HA of the influenza virus isolate is similar to highly pathogenic avian influenza virus.

【Key words】 Avian influenza virus; Hemagglutinin gene; Sequence analysis

禽流感 (A I) 是由正粘病毒科 型流感病毒引起的传染性疾病综合征。该病 1878 年首次报道于意大利,现已蔓延到许多国家。根据禽流感病毒 (A/N) 对某一宿主致病性的差异,可将其分为高致病性禽流感病毒 (HPA/N) 和低致病性禽流感病毒 (LPA/N)。根据表面结构蛋白血凝素 (HA) 和神经氨酸酶 (NA) 抗原性的差异,目前又可分为 16 个 H 亚型,10 个 N 亚型。世界上所有的高致病性禽流感均是由 H₅ 和 H₇ 亚型毒株引起的。1997 年香港鸡群暴发 H₅N₁ 亚型高致病力毒株引起的禽流感并直接传染给了人。2000 年初,由浙江省送检的番鸭体内分离出了 H₅ 亚型。05 年 12 月 15 日江西遂川县发生禽流感疫情,确诊为 H₅N₁ 亚型高致病性 A/N。2005 年 12 月 22 日四川省大竹县发生高致病性禽流感疫情,06 年 1 月 3 日,国家禽流感参考实验室分离到 H₅N₁ 亚型高致病性禽流感病毒。

HA 被认为是决定 A/N 致病力和宿主特异性主要的因子,高致病性禽流感病毒感染宿主细胞的先决条件是宿主蛋白酶将 HA 裂解为 HA₁ 和 HA₂,高致病性禽流感病毒致病力的分子基础是裂解位点处的氨基酸序列。多数 LPA/N 在 HA 裂解位点处通常只有一个碱性氨基酸 - - 精氨酸,只能被精氨酸特异的蛋白酶裂解,结果该病毒仅限于在呼吸道和消化道增殖。HPA/N 在 HA 裂解位点处有多个碱性氨基酸,能被泛在性蛋白酶裂解而引起全身感染。本研究对禽流感病毒番鸭分离株进行了 HA 全基因克隆及序列分析比较,旨在了解其 HA 基因的分子生物学性状及进化情况等。

1 材料与方法

1.1 毒株分离 番鸭流感病毒分离株 JM (A/Muscovy/Jiangxi) 由香港大学微生物学系分离并保存。

1.2 菌种和分子生化试剂 大肠杆菌转化菌株 TG₁ 由陕西师

范大学生命科学院保存,分子生物学试剂胺苄青霉素、X - GAL、IPTG 等均购自华美生物工程公司。试剂盒 RNase Total Total RNA Isolation System, Pgem - T Vector QIA quick System 购自美国 Promega 公司, Titan One Tube RT-PCR Kit 购自美国 BM 公司, QIA quick Gel Extraction Kit 购自德国 QIAGEN 公司。

1.3 引物 基于国内外已发表的 HA 基因全序列,对引物作如下设计(引物由大连宝生物公司合成)。

(上游引物): AAAA TGGAGA GAA TAGTGCTT3 ,

(下游引物): CTACAA TCTGAAC TCAA TAAAT3

1.4 病毒的增殖及提纯 将分离病毒毒株于 12 日龄非免疫鸡胚接种,收集死亡 24 h 后的鸡胚尿囊液,取 8 000 g 离心操作 30 min 去除杂质,取上清液 25 000 g 离心操作 3 h,去掉上清液,沉淀用 1 ml STE 悬浮, - 70 °C 冻存备用。

1.5 分离株病毒 RNA 的提取及扩增 按照 RNA gent Total RNA Isolation System 的说明书提取病毒 RNA,将 RNA 沉淀物溶于 15 μL 无酶的灭菌水中。按照 Titan One Tube RT - PCR 的说明书进行病毒 RNA 的扩增操作。取 PCR 产物 10 μL,以 DNA/EcoRI + Hind 消化物为 Marker, 1% 琼脂糖凝胶电泳,观察所扩增片段的大小。

1.6 PCR 产物的克隆及其序列测定 参照 QIA quick Gel Extraction Kit 的说明书对 PCR 产物进行提纯。提纯产物与 Pgem - T 质粒载体用 T4DNA 连接酶于 16 °C 连接过夜,再转化到感受态大肠杆菌 TG₁ 中。用含氨苄青霉素、X - gal, IPTG 的 LB 平板将转化菌进行筛选,挑取白色菌落接种于 2 ml B 液体培养基中,提取质粒并且作酶切鉴定操作。选取鉴定为阳性的克隆片段进行序列测定。克隆片段序列测定工作由上海基康生物技术有限公司完成。

2 结果

2.1 PCR 扩增片段大小 经 1% 琼脂糖凝胶电泳后的 PCR 扩增片段显示扩增片段大小为 1.7 kb, 结果与预期大小相符。

2.2 阳性重组质粒的电泳鉴定 将筛选后的液体培养物作质粒提取, 电泳鉴定初步获得了阳性重组质粒。重组质粒经过 BstZI 酶切后电泳, 结果出现大小约 1.7 kb 和 3.0 kb 的 2 个条带, 分别与预期扩增片段及 pGEM-e 载体的大小相符, 说明克隆成功。

2.3 测序结果 JM 的测序结果见图 1。测得的表面结构蛋白血凝素基因核苷酸序列长度为 1732 bp, 包含完整的开放阅读框架, 编码 568 个氨基酸, 其中信号肽 16 个氨基酸, 与已发表序列同源性比较结果见表 1。

图 1 JM 的 HA 基因核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

注: * JM 的 HA 基因氨基酸序列上潜在的糖基化位点用下划线标出, 受体结合位点用黑斜体标出, HA 和的起始位点用箭头标出 HA₂, 方框内为碱性氨基酸插入序列。

表 1 禽流感病毒番鸭分离株与其它 H₅ 亚型流感病毒 HA 基因核苷酸序列的同源性

毒株全称	毒株简称	Genebank 检索号	核苷酸同源率 (%)
A /Turkey/Ireland/1378/83	Ire/83	M18450	88
A /Chicken/Pennsylvania/1/83	PA/83	J04325	80
A /Goose/Guangdong/1/96	GD/96	AF144305	99
A /HongKong/156/97	HK/97	AF028709	98

3 讨论

AIV 具有 8 个基因片段, 血清亚型非常多, 遗传变异也极为

频繁, 其中以 HA 基因发生率最高^[1]。与 HA 基因种系分析, 通常可将 H₅ 亚型 AIV 分为两个种系: 北美种系和欧亚种系^[2]。HA 基因同源性分析结果显示, JM 病毒分离株与欧亚种系代表株 Ire/83 作同源率比较分析, 同源率为 88%, 而与北美种系代表株 PA/83 同源率比较仅为 80%, 显示该毒株更可能起源于欧亚种系。与 GD/96 比较, 同源率高达 99%。氨基酸序列分析资料显示, JM 病毒分离株 HA 的裂解位点序列、六个糖基化位点及两个受体结合位点与 GD/96 完全一致, 表明这两个毒株 HA 基因亲缘关系极为密切, 且具有相似的生物学特性。

在本实验研究中, JM 分离株的 HA 基因裂解位点的氨基酸序列为 R R R K K R GLF, 符合 AIV 强毒株基因裂解位点的分子模式。AIV 的致病力不仅与 HA 的裂解特性有关, 还受其二级结构状态影响。裂解位点附近的寡糖链可以阻止蛋白酶对表面结构蛋白血凝素的切割, 多个碱性氨基酸的裂解位点处 LPAIV 可通过糖基化位点的丢失突变成 HPAIV, 因此尚无法就此判断为 HPAIV。静脉接种指数 (MPI) 是国际上公认的衡量病毒致病力强弱的标准, IPVE 因此判为 HPAIV。该毒株对相应宿主的致病力还有待进一步研究。

水禽尤其是鸭类是 AIV 的重要贮存库和传染源, 一般带毒而很少发病^[3]。长期以来, 华南地区栖居的健康鸭就携带有 H₅ 亚型亚型 AIV^[4]。1996 年, 从发病鹅体内分离到 H5N1 AIV, 对鸡达到了高致病力标准。至 05 年底关于高致病性 H₅ 及 H₇ 亚型 AIV 引起鸭类发病的报道已经数起了^[5,6], 该番鸭病毒分离株若证明为 HPAIV, 则再次提醒我们对水禽禽流感的监测和防制不容忽视。H₅N₁ 亚型禽流感病毒打破了种间障碍直接将病毒传给了人, 这赋予了我们新的公共卫生意义。

JM 病毒分离株 HA 基因的成功克隆为 H₅ 亚型 HPAIV 和 LPAIV 的分子生物学诊断和基因工程疫苗的研究奠定了基础。现实提醒我们, 科学研究应在目前病原鉴定、疫病诊断及疫苗免疫等关键技术基本解决的基础上, 将研究重点转移 H₅ 到和 H₇ 亚型 HPAIV 的快速诊断上, 为今后切实把高致病性禽流感病毒消灭在萌芽状态, 为避免高致病性禽流感病毒的发生及传播危害提供技术储备。

参考文献

- Wood GW, McCauley J W, Bashiruddin J B, et al Dduced amino acid sequences at the hemagglutinin cleavage site of avian influenza A viruses of H5 and H7 subtypes [J]. Arch Virol, 1993, 130: 209 - 217.
- Subbarao K, Klimov A, Katz J, et al Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness [J]. Science, 1998, 279: 393 - 396.
- 于康震, 陈化兰, 唐秀英. 97 香港禽流感 [J]. 中国畜禽传染病, 1998, (3): 187 - 191.
- 甘孟侯. 禽流感 [M]. 北京: 北京农业大学出版社, 2005. 49 - 52, 6974.
- 陈化兰, 于康震, 步志高. 一株鹅源高致病力禽流感病毒分离株血凝素基因的分析 [J]. 中国农业科学, 1999, (2): 87 - 92.
- 唐秀英, 田国斌, 赵传刚, 等. 中国禽流感流行株的分离鉴定 [J]. 中国畜禽传染病, 1998, (1): 1 - 5.

(收稿日期: 2006-08-18)