

本栏目主持人: 胡藕祥

文章编号: 1005-944X(2006)10-0019-04

禽流感病毒 A/Ostrich/Denmark/72420/96 (LP AI- H₅N₂) 株 HA 全基因克隆与序列分析 *

李明义 于树涛¹⁾ 刘新文 宫晓 郭玉广 隋国宁¹⁾

(中国动物卫生与流行病学中心 青岛易邦生物工程有限公司 青岛市 266032)

摘要: 为进一步分析禽流感病毒(AIV)H₅N₂分离株血凝素(HA)基因的特性,参照已发表 H₅ 亚型禽流感 HA 基因序列设计了 1 对引物,采用 RT-PCR 技术,以禽流感病毒 A/Ostrich/Denmark/72420/96(D96)RNA 为模板,扩增了 HA 全基因并进行核苷酸同源性比较,氨基酸编码分析,绘制系统发育进化树。结果表明,扩增片段长 1737 个核苷酸,包含了完整的 HA 基因的开放阅读框架,与 Genbank 已发表的 H₅N₁ 和 H₅N₂ 分离株的 HA 基因序列比较,发现与国内 H₅N₁ 分离株同源性较低,只有 80%左右,而与 H₅N₂ 各株序列具有很高的同源性,最高达 97.5%,印证了 AIV 基因组 8 个片段间频繁的重组及 AIV 高变异性的特点。推导的氨基酸序列分析表明,HA 蛋白裂解位点上游丢失了 4 个连续碱性氨基酸(R-R-R-K),裂解位点处氨基酸序列为 E-T-R,仅包含一个碱性氨基酸(R-)残基,符合低致病性毒株的特征,证明为低致病性毒株。其 HA 推导后氨基酸序列与 H₅N₁AIV 的同源性接近 90%,以其研究的疫苗,可以有效抵御我国流行的 H₅ 亚型 AIV 病毒的感染,同时因为是弱毒株,以其研制的疫苗具有更好的安全性,也更符合公共卫生学的要求。

关键词: 禽流感病毒 H₅N₂ 亚型 HA 基因 序列分析

禽流感(Avian influenza)是由正黏病毒科 A 型流感病毒(influenza virus type A)引起的一种禽类感染和(或)疾病综合症。目前遍布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,同时可能突破种间屏障引发人感染和发病,具有重要公共卫生学意义。

HA 是流感病毒的主要囊膜糖蛋白,可以诱导动物机体产生中和抗体,是 AIV 的主要保护性抗原^[1-3],在病毒侵入宿主细胞过程中起关键作用,同时也是病毒变异、毒力和宿主特异性的主要决定因素。成熟的 HA 蛋白由 548~552 个氨基酸残基构成,在病毒的复制过程中,可被细胞内蛋白酶切割成 HA₁ 和 HA₂ 两个亚单位,其氨基酸裂解位点的序列决定着 AIV 的致病性。低致病性的 AIV 在靠近 HA 裂解位点处缺乏碱性氨基酸,而高致病性 AIV 裂解位点处有多个碱性氨基酸^[4-6]。

对 HA 基因的序列分析,有助于了解 HA 基因的变异规律,从而了解 AIV 的遗传演化背景。本研究克隆了 A/Ostrich/Denmark/72420/96 (D96) 的全长 HA 基因并进行序列测定和分析,以期从分子水平对其致病力决定因子,HA 变异规律加以研究。通过分子水平与 H₅N₁ 毒株抗原性的比较与分析,讨论以构建 DNA 疫苗防制我国流行的 H₅ 亚型 AIV 感染的可能性。

1 材料和方法

1.1 病毒

禽流感病毒 A/Ostrich/Denmark/72420/96(LP AI- H₅N₂) 株由中国动物卫生与流行病学中心保存。在 10~11 日龄 SPF 鸡胚上增殖病毒,收取 24h 后死亡鸡胚的尿囊液。

1.2 菌种

受体菌 JM109 由本中心保存提供。

1.3 试剂

反转录酶、Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 聚合酶、T4 多聚核苷酸激酶以及各种限制性内切酶均购自大连宝生物技术工程公司,DNA 凝胶

纯化试剂盒购自上海华舜生物工程公司,其它试剂均为进口或国产分析纯产品。

1.4 引物设计与合成

根据 GenBank 已发表的核苷酸序列,应用 Oligo6.0 软件设计一对 HA 基因引物,由大连宝生物合成。其序列如下:上游 5' -AAAATGGAAAGAATAGTGAT-3'; 下游 5' -GAACATTGTGGAAAGGCATA-3'。

1.5 病毒的纯化、扩增

在接种前按 1:2 的体积比将病毒液与新城疫阳性血清及 H9N2 阳性血清作用 1h,按 0.1 ml 胚接种,24 h 后收获死胚尿囊液,测血凝价。倍比稀接种 SPF 胚,24 h 后收获死胚尿囊液,收取最高 HA 滴度尿囊液。再次接种 SPF 胚,收获 24-48 h 死胚尿囊液,分装,-70 低温保存。

1.6 病毒 RNA 的提取

采用 Trizol LS Reagent 一步法从尿囊液中提取病毒 RNA,具体操作按说明书进行,提取的 RNA,-70 保存备用。

1.7 RT-PCR

1) 莱阳市畜牧局 265200

* 科技部科技攻关专项支持项目

取 RNA 悬液 1 μL 加入 20 pmol(1 μL)上游引物混匀 70 作用 10 min, 依次加入: H₂O 4 μL, 5 × 反转录酶缓冲液 3 μL, 0.1 M DTT 2 μL, 2.5 M 4dNTP 4 μL, RNA 酶抑制剂 1 μL, M-MLV 反转录酶 1 μL (200 U), 37 作用 1 h, 95 作用 10 min。

50 μL PCR 体系: 10 × ExTaq 缓冲液 5 μL, 2.5 mmol dNTP 4 μL, 20 pmol 上、下游引物各 1 μL, ExTaq 酶 0.3 μL 后, cDNA 4 μL, 灭菌去离子水 34.7 μL, 混匀。95 变性 5 min, 94 45s, 53 45 s, 72 1 min, 35 个循环, 72 延伸 10 min。取 8 μL PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 余者冻存。

1.8 PCR 产物克隆及鉴定

按 DNA 凝胶纯化试剂盒操作说明书从琼脂糖凝胶中回收和纯化 PCR 扩增产物, 按常规方法将 PCR

产物与克隆载体 pMD18-T 连接, 转入感受态细胞。以含 X-gal、IPTG、Amp+(100 ug/ml) 的 LB 平板培养。碱裂解法小量制备质粒 DNA, 分别采用 PCR 法和双酶切法鉴定。将阳性菌液 2 ml 送大连宝生物工程公司测序。

1.9 序列分析

用 DNASTAR 软件分析 HA 测序结果, 推导病毒蛋白一级结构的氨基酸序列, 分析 HA 基因的编码情况。与 GenBank 中已发表基因序列进行同源性比较, 绘制系统发育进化树, 阐述其进化关系。

2 结果

2.1 RT-PCR 试验

以特异性引物, 从制备的 LPAI-H5N2 病毒核酸 cDNA 模板扩增出一条约 1.7kb 的片段, 与预期的 HA 基因片段大小相符(图 1)。

2.2 重组质粒的鉴定

将克隆到的 HA 基因克隆到 pMD18-T 载体, 以 BamHI 和 Hind 限制性内切酶消化重组质粒, 酶切片段的大小与预期序列大小基本相符, 表明已克隆到 HA 基因(图 2)。

2.3 测序结果

测序结果显示, 扩增的 HA 基因长 1 737 bp, 包含完整的 HA 开放读码框, 编码 565 个氨基酸, 其中信号肽 16 个氨基酸, HA1 包含 323 个氨基酸, HA2 包含 222 个氨基酸, 并含起始和终止密码子。推导的氨基酸序列如图 3 所示。

2.4 HA 基因序列及分子进化分析

AIV 高致病性毒株与低致病性毒株的差别主要表现在 HA 蛋白裂解位点的氨基酸序列差异, HPAIV 在裂解位点含有较多的碱性氨基酸 [7-9], 相反, LPAIV 裂解位点缺失大部分的碱性氨基酸。从推导的氨基酸序列分析, 本实验所用毒株裂解位点丢失了 4 个连续碱性氨基酸(R-R-R-K), 裂解位点处氨基酸序列为 E-T-R, 仅包含一个碱性氨基酸(R-) 残基, 符合低致病性毒株特征, 属于 LPAIV。

将克隆到的 H₅N₂ HA 基因序列与 GenBank 中发表的 H5N1 和 H5N2 毒株的相关序列进行同源性比较。分析结果显示, 本试验所用毒株在 H5N2 亚型分支内, 从遗传学角度证明该病毒为 H5N2 亚型。进一步分析, 它与 H5N1 核苷酸同源性相对较低, 在 80.1%-80.9% 之间; 与 H5N2 的同源性很高, 尤其是与美国流行株 (AY2960) 的同源性最高, 达 97.5%, 这说明 Denmark/72420/96 毒株与美国毒株亲缘关系较近, 二者可能由同一毒株变异而来, 而与法国毒株 AJ632269 同源性低, 只有 83.5%。形成的系统发育进化树如图 4 所示。

3 讨论

AIV 的突出特点是其抗原的高度变异性, 而 HA 基因是 AIV 基因组中变异最大的基因, AIV 的抗原性和致病性很大程度上取决于

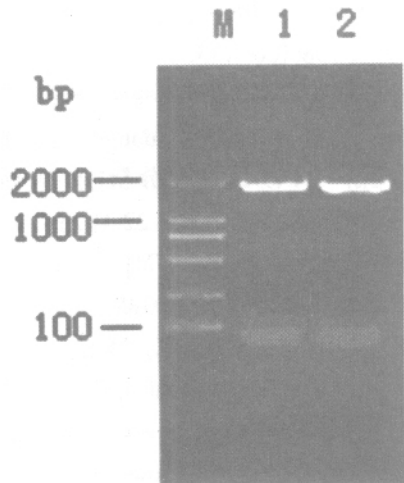


图1 RT-PCR产物的琼脂糖凝胶电泳结果
M. DL 2 000 DNA Marker;
1,2. AIV HA 扩增产物

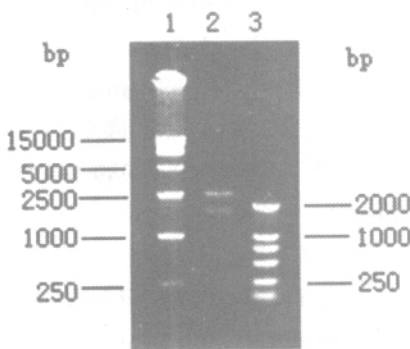


图2 重组质粒T-HA酶切鉴定
1. DL 15 000 DNA Marker;
2. 消化的 T-HA HindIII and BamHI;
3. DL 2 000 DNA Marker

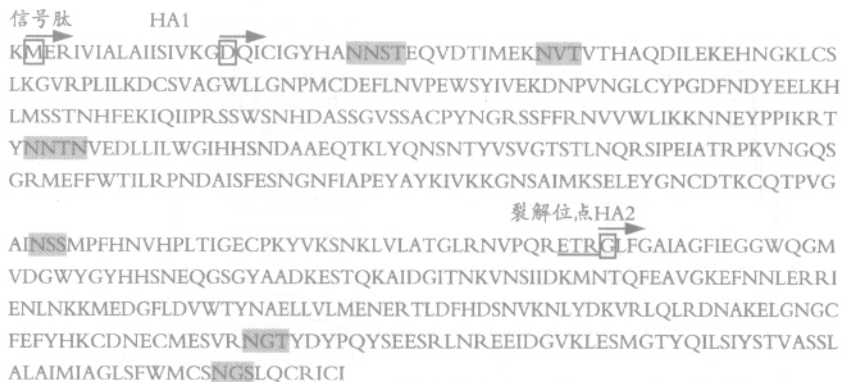


图3 A/Ostrich/Denmark/72420/96 HA基因推导的氨基酸序列
注: *HA基因氨基酸序列上潜在的糖基化位点以阴影标出, 裂解位点以下划线标出, 同时以箭头标出HA₁和HA₂的起始位点。

该基因的变异情况。同时,HA 在病毒吸附及穿膜过程中起关键作用,可刺激机体产生中和抗体来中和病毒的感染力,对宿主抵抗禽流感起到了决定性保护作用。因此对 HA 的研究可以更好的了解 AIV 的致病性、免疫原性的变异规律,有利于疫苗株的选择,对有效防制禽流感有重要意义。

在用鸡胚增殖病毒时,一般选用品用 9- 11 日龄的鸡胚,但因为这些毒株的致病力强,若鸡胚日龄太小,对病毒过于敏感,鸡胚容易快速死亡,从而使病毒增值量少,血凝价低。因此,本试验用 12 日龄的鸡胚接种病毒,病毒增殖快且血凝价高。

本实验通过 RT-PCR 方法成功获得了约 1.7kb 的目的片段,包含了完整的开放阅读框,编码 565 个氨基酸,与 GenBank 中发表的 H₅N₂ 和 H₅N₁ 序列进行同源性比对,绘制系统发育进化树。结果显示,Denmark/72420/96 毒株与中国流行的 H₅N₁ 毒株同源性相对较低,与 H₅N₂ 毒株同源性较高,属于 H₅N₂ 分支,同时,应注意的是与美国毒株亲源关系较近,同源性达 97.5%。

HA 裂解位点的氨基酸序列是决定 AIV 毒力的关键因素,研究表明,大多数 HPAIV 毒株,在其裂解

位点附近有多个碱性氨基酸,HA 可备机体细胞内的多种蛋白酶识别裂解^[10],因此,高致病性毒株在宿主体内有广泛的组织嗜性。低致病力毒株,往往在裂解位点缺失碱性氨基酸,只能为宿主的少数蛋白酶识别裂解,因此,LPAIV 只引起机体的局部感染,致病力也相对弱。本实验所用 Denmark/72420/96 毒株裂解位点序列为 E-T-R,与高致病性毒株相比,缺失 4 个连续碱性氨基酸 (R-R-R-K),符合 LPAIV 的特征,潜在致病力较低。

根据 Denmark/72420/96 毒株核苷酸序列推导氨基酸序列与我国流行 H₅N₁ 亚型毒株的氨基酸序列进行比较,同源性在 85.4%~89.2%之间,这样的变异对其抗原性影响不大,本毒株所表现的抗原性与我国流行的 AIV H₅ 毒株表现的抗原性极相似,可抗击流行株的攻击产生很好的保护力;同时它是弱毒株,潜在致病力较低,因此可作为弱毒疫苗生产的候选毒株。

参考文献

[1] Crawford J, Wilkinson B, Vosnesensky A et al. Baculovirus-derived hemagglutinin vaccines protect against lethal influenza infections by avian H5 and H7 subtypes [J]. *Vac-*

cine, 1999, 17(18):2265- 2274.
 [2] Kaverin N V, Rudneva I A, Ilyushina N A. Differences and similarities in the structure of the antigenic epitopes on influenza A virus hemagglutinin molecule of different subtypes [J]. *International Congress Series*, 2004, 1263:682- 686.
 [3] Guo J S ,Jin N Y.Highly pathogenic avian influenza and study in its sanitation[J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2004, 17:126- 128.
 [4] Webster R G, Rott R. Influenza virus pathogenicity: the pivotal role of haemagglutinin [J]. *Cell*, 1987, 50: 665- 666.
 [5] Vey M, Orlich M, Adler S et al. Haemagglutinin activation of pathogenic avian influenza virus of serotype H₇ requires the recognition motif R-X-R/K-R [J]. *Virology*, 1991, 188:408- 413.
 [6] 贾永清, 陈化兰, 邓国华等. 禽流感病毒分离株 A/Guangdong/3/96 (H₅N₁) NA 基因序列分析[J]. *中国预防兽医学报*, 2000, 22(1):25- 30.
 [7] 甘孟侯. 禽流感 [M], 北京: 北京农业大学出版社, 1995.
 [8] Vines A, Wells K, Matrosovich M et al. The role of influenza A virus hemagglutinin residues 226 and 228 in receptor specificity and host range restriction[J]. *Journal of Virology*, 1998 , 72(9):7626- 7631.
 [9] Ohuchi M, Orlich M, Ohuchi R Mutations at the cleavage site of the hemagglutinin after the pathogenicity of influenza virus A/chick/Penn/83 (H₅N₂) [J]. *Virology*. 1989,168 (2): 274- 80.
 [10] Wood G W, Mclauley J, Bas W E et al. Deduced amino acid sequences at the haemagglutinin cleavage site of avian influenza A virus of H₅ and H₇ subtypes[J]. *Archive Virology*, 1993, 130:209- 213.

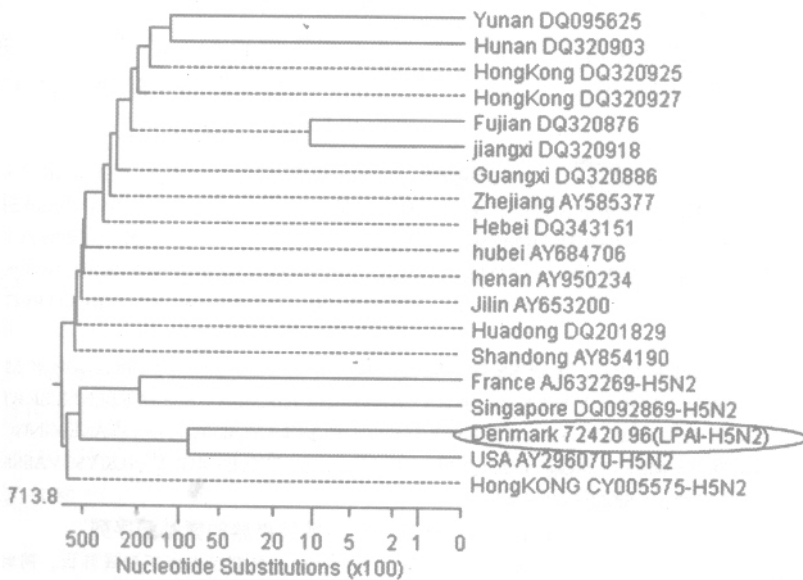


图4 HA基因进化树分析

文章编号: 1005-944X(2006)10-0022-04

新疆地方绵羊品种 PRNP 基因多态性研究 *

兰邹然^{1,2)} 阿依士拉³⁾ 张鲁安⁴⁾ 张学成²⁾ 刘雨田¹⁾ 王志亮^{1)*}

(1 中国动物卫生与流行病学中心国家外来动物疫病诊断中心 青岛 266032; 2 中国海洋大学生命科学与技术学部 青岛 266003; 3 新疆维吾尔自治区畜牧兽医总站 乌鲁木齐 830000; 4 新疆建设兵团畜牧兽医总站 乌鲁木齐 830000)

摘要: 从新疆采取了 8 个地方绵羊品种的血液样品 171 份, 提取绵羊基因组 DNA, 用 PCR 方法扩增绵羊 PRNP 基因, 通过序列测定, 对它们的 PRNP 基因型进行研究, 确定了 PRNP 基因 136、154、171 位密码子的多态性为 136(A/A), 154(H/R) 和 171(Q/R/H/K), 结果发现所检测的新疆地方绵羊品种 PRNP 基因 136 位密码子均为 A, 其基因型均为 A 型痒病抵抗性基因型。

关键词: PRNP 基因型 PCR 序列测定 多态性

传染性海绵状脑病(TSE)是一类人畜共患的慢性、中枢神经退行性疾病。包括人的 Kuru 病、克雅氏病(CJD)、格斯特曼- 斯特斯勒- 史茵克综合症(GSS)和致死的家族性失眠症(FFI)等; 动物的绵羊痒病(Scrapie)、牛海绵样脑病(BSE)、水貂传染性脑病(TME)、黑尾鹿及麋鹿的慢性消耗性疾病(CWD)、猫海

绵样脑病(FSE)等^[13], 其中以疯牛病因在英国引起众多的人感染而发生新变异克雅氏病(nvCJD)而受到极大关注。现在基本确定疯牛病的起因是牛饲喂了含有痒病 Prion 的肉骨粉, 因此可以认为痒病是疯牛病发生的主要原因。众多研究发现人和多种动物传染性海绵状脑病的发生与 PRNP 基因多态性有关^[12, 16, 17, 21]。作为传染性海绵状脑病原型的痒病, 它的发生与绵羊的 PRNP 基因型也具有一定的遗传学关系, 主

要表现在由绵羊 PRNP 基因 136 位、154 位、171 位密码子组成的 PRNP 基因型与绵羊对痒病的易感性有关^[9, 22, 24, 25]。某些 PRNP 基因型的羊可以抵抗痒病^[4, 6, 14, 19]。新疆是我国地方品种资源最丰富的地区, 又处于边境地带, 因此弄清其地方品种的痒病抗性遗传特征, 对于我国痒病的防范具有重大意义。本文通过 PCR 扩增和序列分析, 对新疆地方绵羊品种的 PRNP 基因多态性进行研究, 为我国痒病控制工作提供

*通讯作者

* 本研究由国家科技攻关计划课题(2004BA519A53)资助

Cloning and Sequence Analysis of Hemagglutinin Gene of Avian Influenza Virus A/Ostrich/Denmark/72420/96(LP AI- H₅N₂)

Li Ming-yi¹⁾ Yu Shu-tao²⁾ Liu Xin-wen¹⁾ Gong Xiao²⁾ Guo Yu-guang²⁾ Sui Guo-ning²⁾

(1. China Animal Health & Epidemiology Center, Qingdao, Shandong, 266032 2. Laiyang Animal Husbandry Bureau, Laiyang, Shandong)

Abstract: In order to analyze sequence similarities of hemagglutinin(HA) gene among avian influenza virus (AIV) subtype H₅N₂ isolates, the HA gene of avian influenza virus A/Ostrich/Denmark/72420/96 (LP AI- H₅N₁) isolate was amplified by RT-PCR according to the sequence published on GenBank. Then, the sequences were compared with GenBank data. The result showed that the cDNA contained 1737bp covering the whole ORF of HA gene. The HA gene sequence of the isolated strain shared about 80% nucleotide sequence identity with H₅N₁ isolates, but about 97% with some H₅N₂ isolates. The results confirmed the high frequency of recombination of the eight segment of AIV genome and the high variation ability of AIV. The amino acids of the cleavage site were E- - - - T- R, confirmed that LP AI- H₅N₁ was a low pathogenic strain. The amino acid sequence shared about 90% identity with H₅N₁ isolates and the antigenicity was almost the same. So the H₅N₂ vaccine can protect the chickens from H₅ subtype infection.

Key words: Avian Influenza Virus; Subtype H₅N₂; HA gene; Sequence Analysis