

野鸡源 H9N2 亚型禽流感病毒 NA 基因的序列分析

罗琴芳, 刘华圆, 郭霄峰

(华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要: 通过病毒 RNA 抽提、RT-PCR 克隆, 试验一次性获得野鸡源禽流感病毒 A/ Pheasant/ Guangdong/ GZI/ 2003 (H9N2) NA 全基因。序列分析及联机检索表明, 该病毒的 NA 基因由 1 458 bp 组成, 其中开放阅读框 (ORF) 1 401 bp 编码 466 个氨基酸; ORF 与 A/ Chicken/ Guangdong/ 11/ 97 同源性最高, 达 98%; 与 A/ Chicken/ Guangdong/ 11/ 97 的 NA 亲缘性最近。

关键词: 禽流感病毒; NA 基因; RT-PCR; 克隆; 序列分析

中图分类号: S855. 3 文献标识码: A 文章编号: 1001-411X(2006)01-0101-03

Analysis of NA Gene of H9N2 Avian Influenza Virus from Pheasant

LUO Qing-fang, LIU Hua-yuan, GUO Xiao-feng

(College of Veterinary Medicine, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Based on the reported sequences of NA gene of avian influenza virus (AIV) H9N2 subtype, a pair of primers was designed for the amplification of NA gene from a strain of AIV H9N2 subtype isolated from a pheasant (A/Pheasant/Guangdong/GZI/2003 (H9N2)) by RT-PCR. Sequence analysis indicated that the NA gene was 1 458 bp and the open reading frame (ORF) was 1 401 bp in length, encoding for 466 amino acids, sharing more than 98% identities with A/Chicken/Guangdong/11/97 (H9N2).

Key words: avian influenza virus; NA gene; RT-PCR; cloning; sequencing analysis

多年来, 禽流感一直受到人们的关注。1998、1999 年先后从猪和人体内分离到 H9N2 亚型禽流感病毒 (H9N2 AIV), 尤其是 1997、1999 年香港发生 H5N1 及 H9N2 亚型禽流感病毒感染人的事件^[1,2]以来, 更引起了各国研究人员对 H9N2 AIV 的广泛关注。

禽流感病毒 (AIV) 属正粘病毒科 A 型流感病毒属, 病毒粒子直径 80 ~ 120 nm, 呈球形、杆状或长丝状^[3], 为负股 RNA 病毒, 基因组分为 8 个片段, 编码 10 种蛋白。禽流感病毒的主要免疫原性相关蛋白有 NP、M2、HA 和 NA 蛋白。血凝素 (HA) 和神经氨酸酶 (NA) 是病毒 2 种重要的囊膜表面结构蛋白。NA 糖蛋白由 AIV 基因组片段 6 所编码, 在决定病毒毒力和宿主特异性方面具有重要作用, 同时 NA 又是流感病毒亚型分型的主要依据。该基因长约 1 443 ~ 1 492 bp, 编码约 470 个氨基酸, 是一种糖苷外切酶,

具有从 α 糖苷键上除去唾液酸 (N-乙酰神经氨酸)^[5] 和从病毒感染的细胞上除去唾液酸残基的功能, 这对防止病毒粒子聚集是很重要的。NA 可诱导机体产生特异性的抗体, 病毒在细胞表面成熟时, 它可移去细胞膜出芽点上的神经氨酸, 有利于病毒的成熟和释放。NA 抗体可以抑制酶活性, 并具有免疫保护作用。由于 NA 的活性可被特异性的抑制物或抗体所抑制, 从而使 NA 丧失吸附、融合、复制、装配和出芽等功能, 根据这一特点, 国内外研究出许多抗流感药物。但是, 编码 NA 基因易发生突变和重排, 引起 NA 的抗原漂移、位移现象, 从而造成流感的难以预防性及经常性的暴发流行^[5]。因此, 对 AIV NA 基因进行克隆、测序及其分子进化分析, 对于 AI 的诊断、防治及揭示各流行毒株间的分子进化关系具有重要的理论价值和现实意义。

收稿日期: 2005-09-19

作者简介: 罗琴芳 (1978-), 女, 讲师, 博士研究生; 通讯作者: 郭霄峰 (1963-), 男, 教授, 博士, E-mail: xfguo@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (30270987; 30440010); 广东省自然科学基金 (020996)

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒 野鸡源禽流感病毒株 A/Pheasant/Guangdong/GZI/2003 (H9N2), 缩写为 NAYj, 由华南农业大学兽医学院微生物教研室分离鉴定。

1.1.2 引物 上下游引物覆盖了禽流感病毒 NA 基因的 ORF 和两侧的非编码区, 由上海生工生物工程公司合成。P₁: 5' AGCAAAAGCAGGAGTG 3', P₂: 5' AGTAGAAACAAGGAGTTTTT 3'。

1.1.3 质粒及工程菌 pMD 18-T 载体购自 TakaRa 公司。工程菌 DH5 α , 华南农业大学兽医学院微生物室保存。

1.1.4 工具酶和试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司, AMV 反转录酶、RNasin 购自 Promega 公司, TaqPlus、dNTP 购自上海生工生物工程公司。200 bp ladder 购自天为时代生物公司。

1.2 方法

1.2.1 病毒 RNA 的抽提 按照 Trizol 试剂盒说明书进行。

1.2.2 NA 基因的 RT-PCR 取 10 μ L 提取的 vRNA 进行反转录, 反转录按 Promega 公司 AMV 试剂说明书进行。反应完毕, 95 $^{\circ}$ C 灭活 5 min, 4 $^{\circ}$ C 保存, 备用。合成的 cDNA 用作 PCR 模板, 并运行如下程序: 94 $^{\circ}$ C 45 s、50 $^{\circ}$ C 45 s、72 $^{\circ}$ C 90 s 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 8 min。反应产物进行电泳鉴定。

1.2.3 RT-PCR 产物 NA 基因的纯化回收 RT-PCR 产物于 0.01 g/mL 的琼脂糖凝胶中电泳后, 按 QIAquick Gel Extraction Kit 的说明纯化核酸。

1.2.4 NA 基因的克隆及重组子 PCR、酶切鉴定

NA 基因与 pMD18-T 连接, 并参照文献[6]的方法克隆和筛选。小量碱法抽提质粒, PCR、酶切鉴定。

1.2.5 NA 基因的序列测定及分析 选择经质粒 PCR 鉴定的阳性重组质粒送博亚公司测序。测序结果直接通过万维网提交到 GenBank 进行 Blast。用生物学软件 DNASTAR 5.0 与多株重要的代表毒株进行核苷酸序列比较, 并绘制基因进化树。

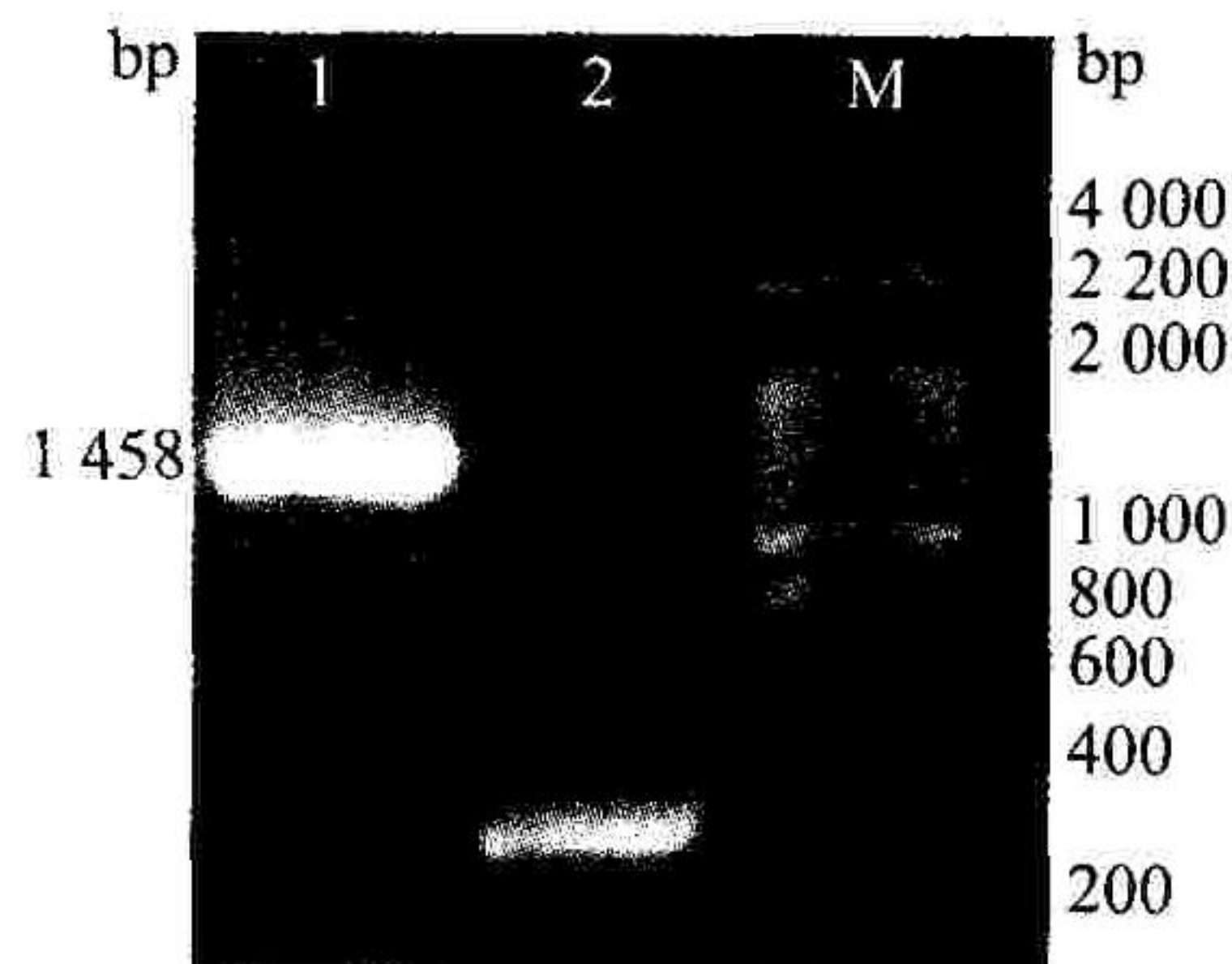
2 结果

2.1 野鸡源毒株 NA 基因 RT-PCR

用引物 P₁ 和 P₂ 对禽流感病毒 H9N2 亚型野鸡毒株 NA 基因进行 RT-PCR 扩增, PCR 产物在 0.01 g/mL 琼脂糖凝胶中电泳并与 200 bp ladder 比较, 发现 RT-PCR 产物在 1 460 bp 左右有 1 条特异的扩增带(图 1)。

2.2 重组子的鉴定

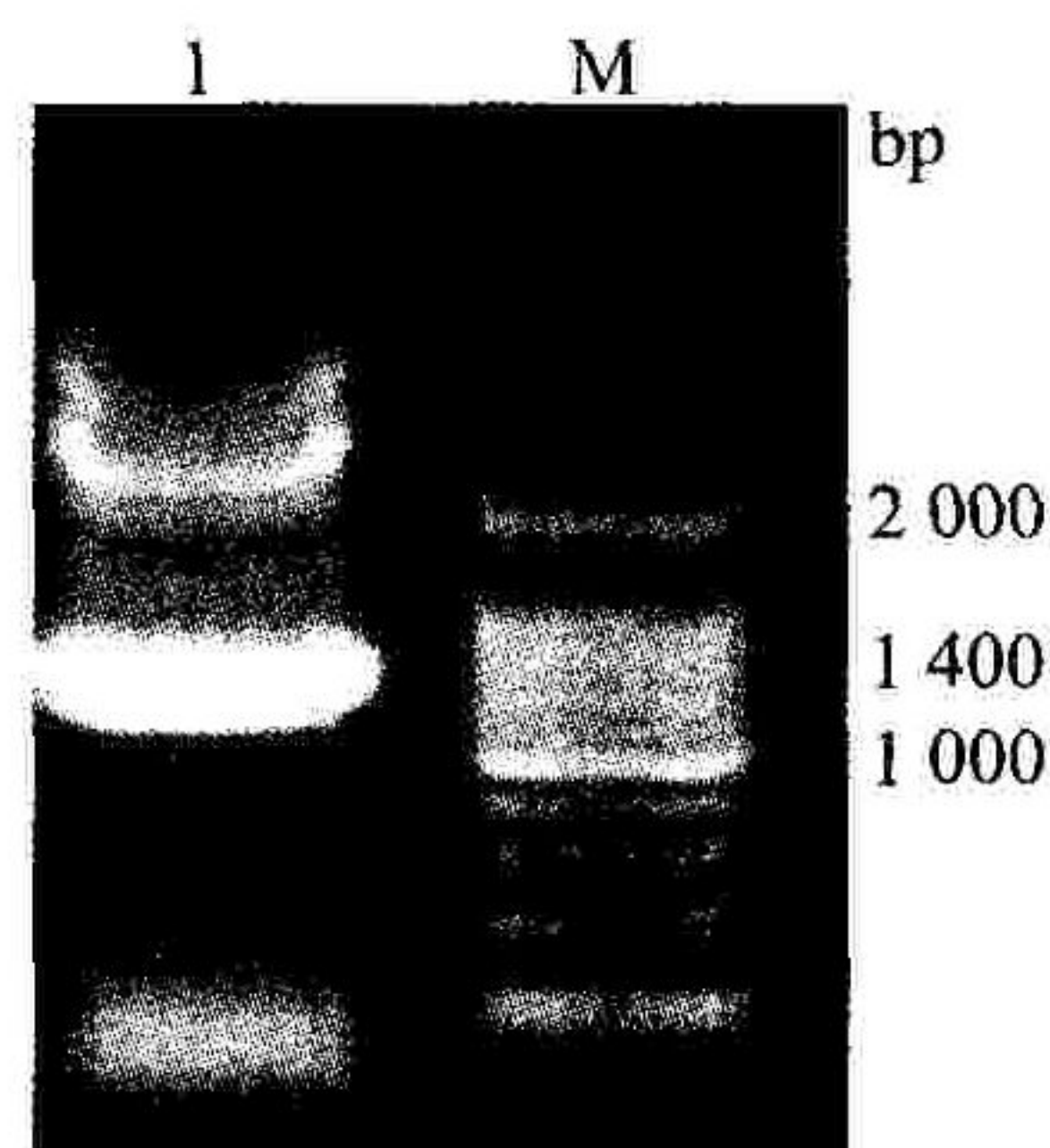
小量碱法抽提可疑重组质粒, 经 PCR 扩增, 电泳结果显示在 1 460 bp 左右有 1 条特异带, 与预计片段大小相符(图 2), EcoR I 酶切电泳结果与理论相符。



1: 野鸡毒株 NA 基因 RT-PCR 产物; 2: 阴性对照; M: 200 bp ladder
1: PCR product; 2: negative control; M: 200 bp ladder

图 1 A/Pheasant/Guangdong/GZI/2003 (H9N2) NA 全基因 RT-PCR 扩增

Fig. 1 PCR Amplification of A/Pheasant/Guangdong/GZI/2003 (H9N2) NA gene by RT-PCR



1: 重组质粒 PCR 产物; M: mark III

1: PCR product; M: mark III

图 2 重组质粒 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmids by PCR

2.3 NAYj 基因测序结果的联机检索分析

测序结果表明, 该克隆片段为 1 458 bp, 包括一个完整的阅读框(ORF)和侧翼的非编码区。该 ORF 由 1 401 个碱基组成, 编码 466 个氨基酸(图 3)。

2.4 NAYj 基因核苷酸序列的分析与比较

NAYj 基因与 15 株不同毒株的 cDNA 核苷酸进行序列比较。该毒株的 NA 基因与 A/Chicken/Guangdong/11/97 同源性达 98%; 与 A/Duck/Hongkong/Y280/97、A/Chicken/Hongkong/KC12/99、A/Chicken/Hongkong/FY20/99、A/Chicken/Henan /62/00 同源性达 97%。

系统发育树表明, 该毒株的 NA 基因与 A/Chicken/Guangdong/11/97 的 NA 基因同源性最近。与 A/Duck/Hongkong/Y280/97 处于同一支干(图 4)。

ATGAATCCAAATCAGAAGATAATAGCAATTGGCTCTGTTTCTAATTGCGATAATA
 M N P N Q K I I A I G S V S L T I A I I
 TGTTTTCTCATGAGATTGCCATCTTAACAACGACTATGACACTACATTTCAGCAGAA
 C F L M O I A I L T T T M T L H F K Q N
 GAATGCAGCAACCCATCGAATAATCAAGTAGTGCCATGTGAACCAATCATAATAGAGG
 E C S N P S N N Q V V P C E P I I I E R
 AACATAGTGCATTGAACAGTACTACCATAGAGAAGAAATTTGTCCCAAGTGGCAGAA
 N I V H L N S T T I E K E I C P K V A E
 TACAAGAATTGGTCAAAACCAATGTCAAATTACAGGGTTCGCTCCTTCTCAAAGGAC
 Y K N W S K P Q C Q I T G F A P F S K D
 AACTCAATTAGGCTTTCCGAGGTGGGATATCTGGGTGACAAGAGAACCTTATGTGCG
 N S I R L S A G G D I W V T R E P Y V S
 TCGGTCCTTGGTAAATGTTATCAATTTGACATTTGGGACGGGAACCACTTTGAAAAACAA
 C G L G K C Y Q F A L G Q G T T L K N K
 CACTCAATGGGCACTACATGATAGAATTCCTCATAGAACCCTTTAATGAATGAGTTA
 H S N G T T H D R I P H R T L L M N E L
 GGTGTCCTTTCATTTGGGGACCAACAAGTGTGCATAGCATGGTCCAGCTCAAGCTGC
 G V P F H L G T K Q V C I A W S S S S C
 CATGATGGGAAAGCATGGTTACATATTTGTGCTGGGATGATAAAATGCGACTGCT
 H D G K A W L H I C V T G D D K N A T A
 AGTATCATTTATGATGGGATGCTTGTGACAGTATTGGTTCATGGTCCAAAAACATCCTC
 S I I Y D G M L V D S I G S W S K N I L
 AGAAGTCAAGGAGTCAAGTGCATCAATGGAAGTGTACAGTAGTAATGACTGAT
 R T Q E S E C V C I N G T C T V V M T D
 GGAAGTGCATCAGGAAGGCTGACACTAGAATATTATTCATAAGAGAAGGGAATGTA
 G S A S G K A D T R I L F I R E G K I V
 CATATTAGCCCATTTGTCAGGAAGTGTGTCAGCATGTGGAGGAATGCTCCTGTTACCCCGG
 H I S P L S G S A Q H V E E C S C Y P R
 TATCCAGAAGTTAGGTGTGTTGACAGACAATTGGAAGGCTCCATAGGCCCTTCTA
 Y P E V R C V C R D N W K G S N R P V L
 TATATAAATGGCAGATTATAGTATTGGTCCAGTATGTGTCAGGACTGTTGGC
 Y I N M A D Y S I G S S Y V C S G L V G
 GACACCAAGAAATGATGATAGTCCAGCAGCAAGTGCAGGGATCCTAATAACGAG
 D T P R N D S S S S N C R D P N N E
 AGAGGGGCCAGGAGTGAAGGGTGGGCTTTGACGTTGGAAATGATATTTGGATGGGA
 R G A P G V K G W A F D V G N D I W M G
 CGGACAATCAAGAGGACTCAGCTCAGGTTATGAGACTTTGAGGTCATTGGTGGTGG
 R T I K E D S R S G Y E T F R V I G G W
 ACCACGGCTAATCCAAGTACAGATAAATAGACAAGTACATGTTGACAGTGAACAAGTGG
 T T A N S K S Q I N R Q V I V D S D N W
 TCTGGGTATCTGTTCTCTCTGTTGAAGGCAAACTGCATCAACAGGTGTTTAT
 S G Y S G I F S V E G K N C I N R C F Y
 GTGGAGTTGATAAGAGGAAGACACAGGAGACTAGGTTGTGGTGGACTCAATAGCATC
 V E L I R G R P Q E T R V W W T S N S I
 ATTGTATTTGTGGAACCTCAGGTACCTATGGAACAGGCTCATGGCCTGATGGGCGAAT
 I V F C G T S G T Y G T G S W P D G A N
 ATCAACTCATGCTATATAA
 I N F M P I *

图3 A/Pheasant/Guangdong/GZI/2003(H9N2) NA 基因序列及编码的氨基酸序列

Fig. 3 The sequence of nucleotide and amino acids of A/Pheasant/Guangdong/GZI/2003(H9N2) NA gene

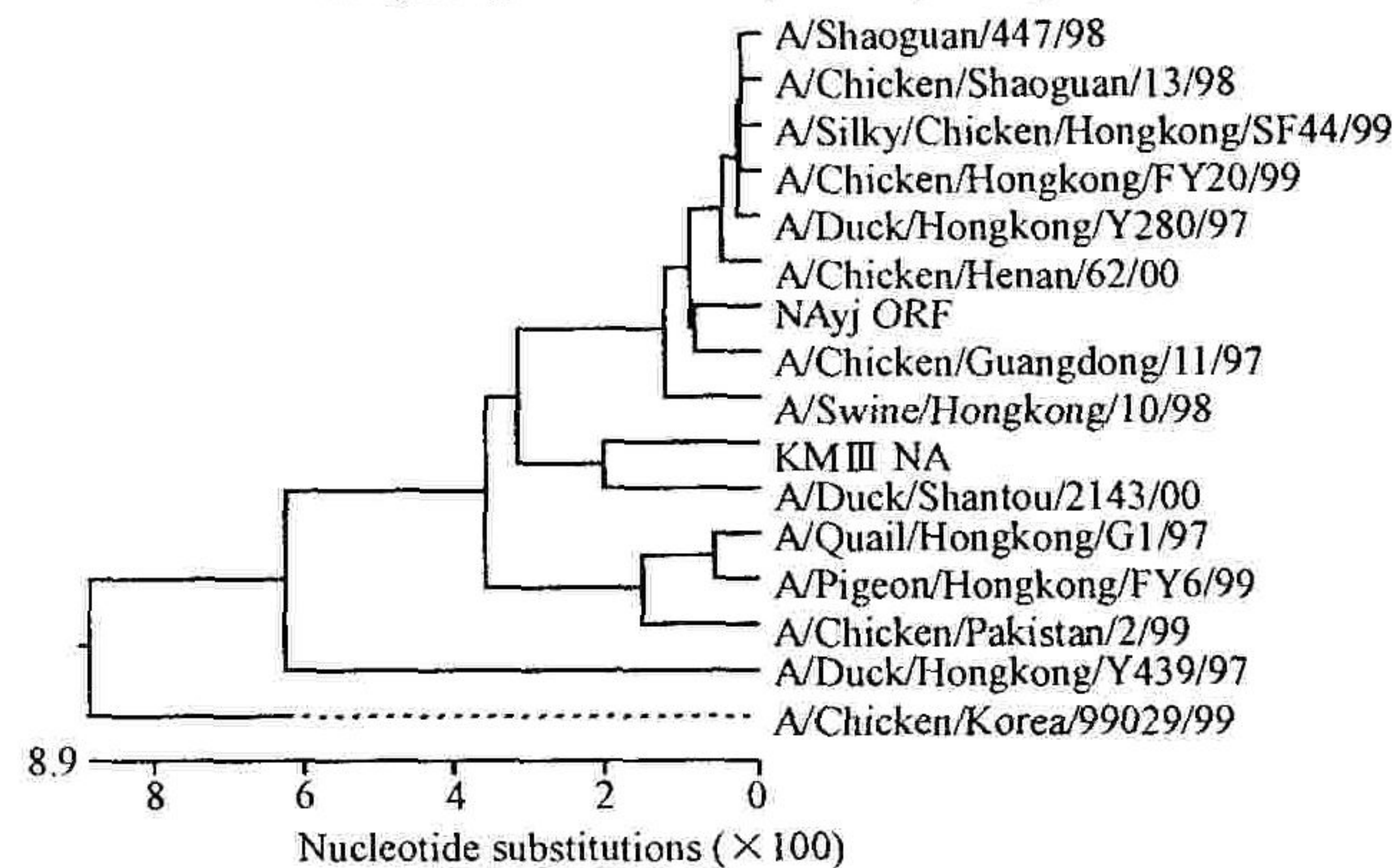


图4 A/Pheasant/Guangdong/GZI/2003(H9N2) NA 基因的进化分析

Fig. 4 Phylogenetic analysis of A/Pheasant/Guangdong/GZI/2003(H9N2) NA gene

3 讨论

NA 是流感病毒重要的表面结构糖蛋白,可促进病毒粒子从感染的细胞中释放并向组织间扩散.目前对 NA 抑制剂作为抗流感药物的研究,是该领域的一大研究与开发热点.系统进化研究表明,在亚洲地区 H9N2 亚型禽流感病毒基因在遗传进化上存在 3 个相对独立的进化分支^[8-9],其代表株分别为 A/Duck/Hongkong/Y280/97、A/Quail/Hongkong/G1/97、A/Duck/Hongkong/Y439/97. 自中国大陆分离的

鸡源 H9N2 病毒,其 HA 基因属于相同的进化分支,尚未发现属于 A/Quail/Hongkong/G1/97 分支或 A/Duck/Hongkong/Y439/97 分支的病毒^[7].但流感病毒具有基因重排的特点,HA 基因属于相同的分支,但不能说明 NA 基因或内部基因也属于相同的分支.

现有的资料显示,中国大陆鸡源许多 H9N2 分离株的 NA 蛋白在其茎部的第 63、64、65 位点上都有 T、E、I 3 个氨基酸的丢失^[10],而与中国邻近的韩国、巴基斯坦鸡源 H9N2 分离株的 NA 没有类似的氨基酸丢失,因此这些部位氨基酸的丢失可初步认为是中国大陆 H9N2 流感病毒分离株的一个重要标记.本次克隆的 NAYJ 基因经氨基酸推导及与标准株 A/Duck/Hongkong/Y280/97 等多株比较分析,其在第 63、64、65 位点上也有 3 个氨基酸的丢失,说明 NA 蛋白遗传性较稳定.至于 NA 基因多位点突变是否会导致 NA 蛋白结构与功能的改变以及毒株毒力强弱的变异,还有待进一步的研究.

参考文献:

- [1] 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.
- [2] PEIRIS M, YUEN K Y, LEUNG C W, et al. Human infection with influenza H9N2[J]. Lancet, 1999, 354:916-917.
- [3] 郭霄峰, 廖明, 辛朝安. H9N2 亚型禽流感病毒纤突蛋白基因的分析[J]. 中国人兽共患病杂志, 2002, 18(4): 17-19.
- [4] TAISUKE H, OSHIHIRO K. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2001, 14(1):129-149.
- [5] 周旭, 李益民, 侯玲, 等. 流感病毒血凝素基因、神经氨酸酶基因在小鼠中的免疫效果观察[J]. 微生物学免疫学进展, 2001, 29(1): 15-19.
- [6] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. 分子克隆实验指南[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1998:19-20.
- [7] 刘红旗, 程坚, 彭大新, 等. 我国部分地区 H9 亚型禽流感病毒血凝素基因序列比较与遗传发生关系分析[J]. 微生物学报, 2002, 42(3): 288-299.
- [8] GUAN Yi, 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 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96:9 363-9 367.
- [9] GUAN Yi, SHORTRIDGE K F, KRAUSS S, et al. H9N2 influenza viruses possessing H5N1-like internal genomes continue to circulate in Southern China [J]. J Virol, 2000, 74:9 372-9 380.
- [10] 郭霄峰, 廖明, 辛朝安. 禽流感病毒 KML/99(H9N2) HA 和 NA 基因的序列分析[J]. 畜牧兽医学报, 2002, 33(5): 486-491.

【责任编辑 柴 焰】