

禽流感病毒 A/Chicken/Jiangsu/JS-1/2002 (H9N2) 分子鉴定与起源分析

刘华雷¹ 何海蓉² 周 斌¹ 魏建超¹ 陈溥言^{1*}

(1 南京农业大学 农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室 南京 210095)

(2 扬州大学生物制品研究开发中心 扬州 225009)

摘要 运用 RT-PCR 技术扩增了禽流感病毒 A/Chicken/Jiangsu/JS-1/2002 (H9N2) 完整的血凝素 (HA) 基因, 并克隆到 pGEM[®]-T 载体中, 进一步进行了序列测定。序列测定结果已经登陆 GenBank, 登陆号为 AY364228。所扩增的 HA 基因长度为 1683 核苷酸, 共编码 560 个氨基酸, 其中信号肽长度为 18aa, HA1 为 319aa, HA2 为 223aa。HA 蛋白裂解位点的氨基酸组成为 RSSR↓GLF, 不含连续的碱性氨基酸, 具有低致病性 AIV HA 基因裂解位点的序列特征。通过构建一个包含 18 株 H9N2 亚型 AIV 的 HA 基因遗传进化树, 发现所有的 18 个毒株共可分为欧亚谱系和北美谱系两个谱系, 而本分离株在分类地位上国内另外的三个分离株同属于欧亚谱系, 在遗传进化上非常接近, 表明它们可能具有共同的起源。

关键词 禽流感病毒 H9N2 亚型 血凝素基因 (HA)

禽流感 (Avian Influenza, AI) 是严重危害畜牧业及公共卫生环境的一种传染性疾病。其病原为禽流感病毒, 在分类地位上属正粘病毒科, 为分节段单股负义 RNA 病毒^[1]。1985 年, 禽流感被我国农业部列为 I 类传染病, 世界动物卫生组织 (OIE) 定为 A 类传染病, 并被列入国际生物武器公约动物类传染病范围。根据 A 型流感病毒表面糖蛋白血凝素 (H) 和神经氨酸苷酶 (N) 的抗原关系程度可将其进一步分为多个不同的亚型。根据其致易感鸡致病性强弱, 可将禽流感病毒分为高致病性 AIV (如 H5N1 等) 和低致病性 AIV (如 H9N2 等)。高致病性 AIV (HPAIV) 感染禽类所导致的禽流感对养禽业具有毁灭性的打击, 故被国际兽疫局规定为 A 类疾病; 而一些低致病性 AIV 的感染虽然对感染禽的致病率低, 但可引起产蛋量的下降, 并可造成免疫抑制, 因而在普遍存在复合感染的情况下, 对养禽业造成的经济损失也相当大。因此, 禽流感一直是威胁世界养禽业的主要疾病之一, 世界各国都十分重视对 AIV 的研究工作。随着香港 1997 年发生

禽流感病毒感染人, 并导致 6 人死亡, 特别是最近在越南、新加坡、韩国、日本等许多亚洲国家都相继报道了禽流感的流行, 我国的广西、福建、安徽、河北等地也报道了禽流感不同程度的流行, 并且在越南和泰国也发现了禽流感感染人的事件, 因此, 世界范围内人们都高度重视禽流感。会感染人类的禽流感病毒现时所知有 H5N1 及 H9N2 两种。因此, 开展对禽流感病毒 H9N2 亚型的研究, 从分子水平掌握禽流感病毒 H9N2 亚型的流行特点, 不仅在病毒学、兽医学等学科上有重要的学术意义, 而且在公共卫生等方面也具有重大的社会意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

禽流感病毒分离株 A/chicken/Jiangsu/JS-1/2002 (H9N2), 缩写为 JS-1, 由本实验室分离保存, 国家流感中心鉴定为 H9N2 亚型。RNAgents[®] Total RNA Isolation System、AMV 反转录酶、pGEM[®]-T Vector 购自 Promega 公司, QIAquick Gel Extraction Kit 购自 QIAGEN 公司; 限制性内切酶 KpnI 和 BamH I 酶切购自大连宝生物; 大肠杆菌转化菌株 TG1 由本室保存。

收稿日期: 2004-09-21 修回日期: 2004-12-21

* 通讯作者, 电子信箱: hualailiu@njau.edu.cn

1.2 引物设计

根据 GenBank 发表的 HA 基因序列 AF384557 设计引物,由大连宝生物合成:

P1:ACGGTACCATGGAAGTAGTATCAC(含 Kpn I 酶切位点)

P2:CTGGATCC TTATATACAAATGTTGC (含 BamH I 酶切位点)。

1.3 病毒的分离与纯化和 RT-PCR 反应

将禽流感病毒 JS-1 株接种于 10 日龄 SPF 鸡胚,收集在 36~48h 死亡的鸡胚尿囊液,6000g 4℃ 离心 15min 弃沉淀,上清经 25000g 4℃ 离心 2h,沉淀用适量 STE 悬浮, -70℃ 冻存储备用。参照 Promega 公司的 RNAgents[®] Total RNA Isolation System 的说明书提取病毒 RNA 后进行反转录和 PCR 反应。其中 PCR 反应条件参数:95℃ 预变性 2min;94℃ 变性 1min、54℃ 退火 1min、72℃ 延伸 3min,进行 30 个循环;最后 72℃ 延伸 10min。取 PCR 产物 10μl,0.8% 琼脂糖凝胶电泳,鉴定所扩增片段的大小。

1.4 PCR 产物的克隆与鉴定和测序

将 PCR 产物回收纯化后,按 pGEM[®]-T 载体操作手册进行连接和转化。常规方法提取质粒,用 Kpn I 及 BamH I 进行双酶切鉴定。将经酶切鉴定为阳性的克隆进行序列测定。序列测定由大连宝生物工程有限公司完成。

1.5 HA 基因核苷酸序列及推导的氨基酸序列分析比较

从 GenBank 中获取已发表的 H9N2 亚型 HA 基因的 cDNA 核苷酸序列及推导的氨基酸序列,利用 DNASTar 软件分析其同源性和裂解位点、受体结合位点等特征。

1.6 系统发育进化树的建立

以基因分析软件 DNASTar 分析实验结果,将所测定的分离株的 HA 基因序列与 GenBank 中已发表的多株 H9N2 亚型的禽流感病毒 HA 相应片段作序列比较,并绘制 HA 的系统发育进化树。

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增

应用引物 P1、P2,对病毒分离株经提取 RNA 后进行 RT-PCR 扩增,反应产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳,以 λDNA/EcoRI + HindIII 消化物为 Marker,得到一条 1.7Kb 左右的特异性扩增条带,与预期设计的扩增片段大小相符。

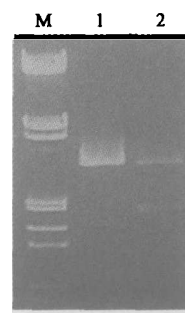


图 1 酶切鉴定电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of recombinant plasmids with enzymes

Lane M:λDNA EcoR I/Hind III; Lane1:pGEM-T vector digest with BstZI; Lane2:pGEM-HA digest with BamHI and KpnI

2.2 PCR 扩增产物的克隆、鉴定与测序

将 PCR 产物回收纯化后与按 pGEM[®]-T 载体操作手册进行连接、转化,常规方法提取质粒,用 Kpn I 和 BamH I 进行双酶切鉴定重组质粒,结果出现一条 1.7Kb 左右和一条 3.0Kb 左右的条带,分别与预期的扩增片段和 pGEM-T 载体大小相符,说明所扩增的 HA 基因片段已经克隆入重组质粒中(见图 1)。将经酶切鉴定为阳性的重组质粒(命名为 pGEM-HA)进行序列测定。序列测定由大连宝生物工程有限公司完成。

2.3 HA 基因片段的核苷酸序列及氨基酸序列分析

序列测定结果已经登陆到 Genebank,登陆号为 AY364228。所扩增的 HA 基因长度为 1683 个核苷酸,含有 HA 的完整阅读框架,共编码 560 个氨基酸,包括信号肽 18 个氨基酸,HA₁ 319 个氨基酸,HA₂ 223 个氨基酸,HA 蛋白裂解位点的氨基酸组成为 RSSR↓GLF,不含连续的碱性氨基酸,具有低致病性 AIV HA 基因蛋白裂解位点的序列特征,与 AIV 的弱毒株特征相符。HA 基因同源性分析表明本分离株与北京 94 年分离株 A/Chicken/Beijing/11/94、广东 94 年分离株 A/Chicken/Guangdong/SS/94、广西 99 年分离株 A/Chicken/Guangxi/KMI/99 核苷酸同源性较高,在 95.4%~96.6% 之间,氨基酸同源性也较高,在 95.5%~96.6% 之间,表明这些分离株可能具有共同的来源。与香港 97 年后的分离株核苷酸的同源性在 90.4%~94.7% 之间,氨基酸同源性在 89.7%~95.9% 之间。与其它毒株同源性相对较低,与美国威斯康星州火鸡分离株 A/

Turkey/ Wisconsin/66 核苷酸和氨基酸的同源性分别为 82.8% 和 87.7%。

表 1 本研究中应用的 H9N2 亚型 AIV 的来源和特性
Table 1 Origin and properties of H9N2 subtype AIV strains used in the phylogenetic analysis

| NO | strains | Region | Accession | RBS | Cleavage site |
|----|--------------------------------|------------|-----------|-----------|---------------|
| 1 | A/Chicken/Jiangsu/JS-1/2002 | Jiangsu | AY364228 | YSWNALYYW | RSSR ↓ GLF |
| 2 | A/Chicken/Beijing/1/94 | Beijing | AF156380 | YSWNVLYYW | RSSR ↓ GLF |
| 3 | A/Chicken/Guangdong/SS/94 | Guangdong | AF384557 | YSWNALYYW | CSSR ↓ GLF |
| 4 | A/Chicken/Guangxi/KMI/99 | Guangxi | AY036880 | YSWNALYYW | RSSR ↓ GLF |
| 5 | A/guinea fowl/HongKong/WF10/99 | Hong Kong | AY206676 | YSWHELYYW | RSSR ↓ GLF |
| 6 | A/Duck/Hong Kong /610/79 | Hong Kong | AY206680 | YSWHELYYW | VSNR ↓ GLF |
| 7 | A/Duck/Hong Kong/Y280/97 | Hong Kong | AF156376 | YSWNTLYYW | RSSR ↓ GLF |
| 8 | A/Quail/Hong Kong/G1/97 | Hong Kong | AF156378 | YSWHELYYW | RSSR ↓ GLF |
| 9 | A/Chicken/HongKong/WF2/99 | Hong Kong | AY206677 | YSWNALYYW | RSSR ↓ GLF |
| 10 | A/Quail/Hong Kong/AF157/92 | Hong Kong | AF156381 | YSWHELYYW | KSSR ↓ GLF |
| 11 | A/Hong Kong/1074/99 | Hong Kong | AJ404627 | YSWHELYYW | RSSR ↓ GLF |
| 12 | A/Quail/Arkansas/29209-1/93 | Arkansas | AF156388 | YSWHELYYW | ASNR ↓ GLF |
| 13 | A/Chicken/Korea/ms96/96 | Korea | AF203008 | YSWHELYYW | ASYS ↓ GLF |
| 14 | A/Turkey/California/189/66 | California | AF156390 | YSWHELYYW | VSSR ↓ GLF |
| 15 | A/Chicken/Pakistan/2/99 | Pakistan | AJ291392 | YSWHALYYW | RSSR ↓ GLF |
| 16 | A/Turkey/Wisconsin/66 | Wisconsin | D90305 | YSWHELYYW | VSSR ↓ GLF |
| 17 | A/Turkey/Minnesota/38391-6/95 | Minnesota | AF156387 | YSWHELYYW | ASNR ↓ GLF |
| 18 | A/Parakeet/Narita/92A/98 | Narita | AB049160 | YSWHELYYW | RSSR ↓ GLF |

Note: RBS(receptor binding site): the residues that form the receptor binding pocket, and which were composed by 109aa、148aa、161aa、191aa、198aa、202aa、203aa, additional two residues at positions 240 and 242 are able to influence the host range of influenza virus.
Cleavage site: started from 335aa to 341 aa.

表 2 禽流感病毒 H9N2 亚型 HA 基因核苷酸和氨基酸同源性比较 (%)
Table 2 Comparison of nucleotide and amino acid homology of HA gene of H9N2 subtype

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 |
|----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1 | | 96.5 | 96.6 | 95.2 | 90.4 | 85.2 | 94.6 | 90.7 | 94.7 | 89.4 | 90.6 | 79.7 | 83.4 | 80.4 | 90.9 | 80.7 | 80.5 | 91.6 |
| 2 | 95.7 | | 98.0 | 96.1 | 92.8 | 87.0 | 95.7 | 93.2 | 95.7 | 91.5 | 93.1 | 80.8 | 84.2 | 81.5 | 93.4 | 81.6 | 81.9 | 94.0 |
| 3 | 96.6 | 97.8 | | 96.8 | 92.2 | 86.6 | 96.7 | 92.3 | 96.7 | 90.3 | 92.4 | 80.9 | 84.1 | 81.4 | 92.4 | 81.3 | 81.5 | 93.2 |
| 4 | 95.5 | 96.2 | 96.8 | | 91.0 | 85.4 | 96.4 | 90.7 | 96.2 | 88.9 | 91.0 | 80.3 | 83.6 | 80.6 | 90.9 | 80.7 | 80.9 | 91.6 |
| 5 | 89.7 | 92.8 | 92.0 | 91.1 | | 85.1 | 90.0 | 98.6 | 90.3 | 89.5 | 99.3 | 79.1 | 83.5 | 81.0 | 96.0 | 81.0 | 79.7 | 97.0 |
| 6 | 90.0 | 91.4 | 90.9 | 90.3 | 89.6 | | 84.4 | 85.6 | 85.1 | 89.4 | 85.7 | 84.1 | 88.9 | 83.7 | 85.2 | 83.5 | 84.2 | 85.9 |
| 7 | 95.2 | 95.6 | 96.4 | 96.6 | 90.4 | 89.5 | | 90.0 | 97.8 | 88.2 | 90.2 | 79.7 | 82.4 | 80.1 | 90.2 | 79.8 | 79.7 | 91.1 |
| 8 | 89.7 | 92.8 | 92.1 | 91.2 | 99.1 | 89.7 | 90.6 | | 90.1 | 89.3 | 99.1 | 79.3 | 83.7 | 80.5 | 96.7 | 80.0 | 80.0 | 97.5 |
| 9 | 95.9 | 96.7 | 97.5 | 97.1 | 92.0 | 90.7 | 98.3 | 92.1 | | 89.3 | 90.5 | 79.7 | 84.1 | 81.2 | 90.4 | 81.2 | 80.3 | 91.3 |
| 10 | 90.8 | 93.1 | 92.5 | 91.4 | 91.0 | 92.9 | 91.0 | 91.0 | 92.6 | | 89.6 | 81.1 | 86.2 | 82.4 | 89.5 | 82.5 | 81.9 | 90.1 |
| 11 | 89.7 | 92.8 | 92.0 | 91.1 | 99.5 | 89.6 | 90.4 | 99.1 | 92.0 | 91.0 | | 79.3 | 84.3 | 81.0 | 96.5 | 81.0 | 80.1 | 97.4 |
| 12 | 88.8 | 90.0 | 89.4 | 89.2 | 87.8 | 93.7 | 88.4 | 88.0 | 89.0 | 89.6 | 88.0 | | 80.4 | 81.3 | 79.8 | 80.6 | 97.2 | 79.9 |
| 13 | 87.9 | 89.0 | 88.8 | 88.4 | 87.5 | 92.7 | 87.9 | 87.3 | 88.9 | 90.3 | 87.5 | 90.4 | | 81.0 | 83.2 | 81.0 | 81.2 | 84.1 |
| 14 | 87.7 | 89.2 | 88.8 | 88.1 | 88.1 | 93.1 | 87.4 | 88.0 | 88.8 | 89.2 | 88.1 | 92.9 | 88.6 | | 80.9 | 98.4 | 82.2 | 81.5 |
| 15 | 91.4 | 94.0 | 93.7 | 92.4 | 95.9 | 89.8 | 91.6 | 95.9 | 93.3 | 91.0 | 95.9 | 88.0 | 87.4 | 88.2 | | 80.6 | 80.6 | 97.8 |
| 16 | 87.7 | 89.3 | 88.9 | 88.2 | 88.2 | 92.5 | 87.4 | 87.8 | 88.9 | 89.2 | 88.2 | 91.9 | 88.2 | 98.0 | 88.1 | | 81.5 | 81.3 |
| 17 | 88.8 | 90.8 | 89.7 | 89.7 | 88.3 | 94.0 | 88.5 | 88.2 | 89.5 | 90.1 | 88.3 | 98.0 | 91.0 | 93.9 | 88.8 | 93.1 | | 80.9 |
| 18 | 91.1 | 93.9 | 93.0 | 92.0 | 96.6 | 90.2 | 91.6 | 96.9 | 93.0 | 91.6 | 96.6 | 88.6 | 87.5 | 88.6 | 97.3 | 88.4 | 89.4 | |

Note: The strains used in the table were identical with Table 1.
Nucleotide similarity is on right and amino acid similarity is left top row.

2.4 HA 基因进化树的构建

选取 Genbank 中已发表的 AIV 毒株的序列, 构建了一个包含 18 株 AIV 的遗传发生树(见图 3)。由图 3 可见, 所有的 18 株 H9N2 亚型的 AIV 共可以分为两个谱系, 即北美谱系和欧亚谱系。北美谱系则是由三个美国火鸡分离株 *A/Turkey/California/189/66*、*A/Turkey/Wisconsin/66* 和 *A/Turkey/Minnesota/38391-6/95* 以及一个鹌鹑分离株 *A/Quail/Arkansas/29209-1/93* 组成。本分离株与国内的其它三株分离株 *A/Chicken/Beijing/1/94*、*A/Chicken/Guangdong/SS/94* 和 *A/Chicken/Guangxi/KMI/99* 同属于欧亚谱系, 在遗传进化上非常接近, 表明它们可能具有共同的来源。

3 讨论

序列分析结果表明我们所克隆的 H9N2 亚型禽流感病毒分离株 JS-1 其 HA 基因共有 1683 个核苷酸, 包含了 HA 基因完整的编码区, 共编码 560 个氨基酸, 其中前 18 个氨基酸为信号肽序列, 主要是由疏水性氨基酸组成, 其功能主要是使得蛋白质能被定向转运, 在成熟的 HA 蛋白中并不包括信号肽。成熟的 HA1 蛋白有 319 个氨基酸, HA2 有 223 个氨基酸, 其 N 段的 14 个氨基酸构成了 HA 蛋白的融合肽。在 HA2 的 185 到 212 位氨基酸为 HA 蛋白的非极性跨膜区, 由疏水性氨基酸残基组成。最后 10 个氨基酸是 HA 蛋白的亲水性胞浆域, 主要由亲水性氨基酸组成, 它们高度保守。本分离株 HA 蛋白裂解位点的氨基酸组成为 RSSR↓GLF, 不

含连续的碱性氨基酸, 具有低致病性 AIV HA 基因裂解位点的序列特征, 符合非高致病力毒株的分子特征。因此, 从分子水平说明, 此分离株为低致病力毒株^[5]。H₉ 亚型 AIV 的受体结合位点由 109aa、148aa、161aa、191aa、198aa、202aa、203aa 和 146aa ~ 150aa、232aa ~ 237aa 构成了一个袋状结构, 而 240 和 242 位氨基酸则能够影响流感病毒的宿主范围^[6,7]。比较了 18 株病毒的这些位点, 结果发现, 109aa、148aa、161aa、163aa、202aa、203aa、240aa 和 242aa 这几个位点是相当保守的, 在 18 株 AIV 病毒中完全相同。仅 191 和 198 两个位点的氨基酸有不同。在 191 位内地的四个分离株和 2 个香港毒株均为 N, 其它的香港毒株和国外毒株均为 H(详见表 1), 这也说明了内地的毒株及 2 个香港毒株可能有一个共同来源。

通过构建一个 18 株 H9N2 亚型的禽流感病毒 HA 基因的遗传发生树, 发现所有的 18 株 AIV 共可以分为两个谱系, 即欧亚谱系和北美谱系, 这与有关报道相符^[8,9]。北美谱系是由三个美国火鸡分离株 *A/Turkey/California/189/66*、*A/Turkey/Wisconsin/66* 和 *A/Turkey/Minnesota/38391-6/95* 以及一个鹌鹑分离株 *A/Quail/Arkansas/29209-1/93* 组成。本研究的分离株与国内另外的三个分离株北京 94 年分离株 *A/Chicken/Beijing/1/94*、广东 94 年分离株 *A/Chicken/Guangdong/SS/94*、广西 99 年分离株 *A/Chicken/Guangxi/KMI/99* 在遗传进化上非常接近, 同属于欧亚谱系, 表明它们可能具有共同的起源。我们从核苷酸和氨基酸的同源性比较结果也发现

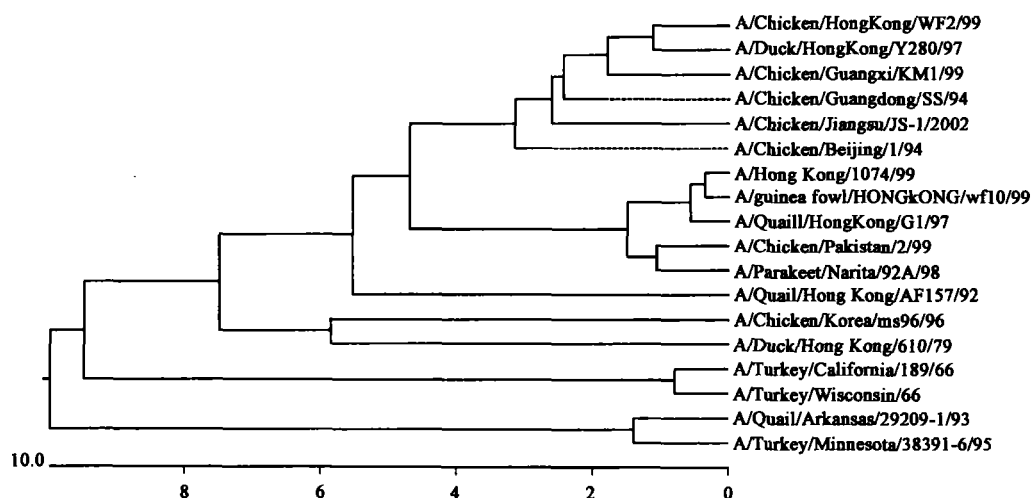


图 3 AIV 各毒株的基因进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of AIV strains based on nucleotide sequences of HA gene

这四株国内分离株之间同源性较高,在 95.4% ~ 98.0% 之间,这进一步表明国内的四株分离株具有共同的起源。

参考文献

- [1] 甘孟侯. 禽流感(第2版). 北京: 中国农业出版社, 2002, 1 ~ 79
- [2] Takehiko Saito, Wilina Lim, Takashi Suzuki, et al. Characterization of a human H9N2 influenza virus isolated in Hong Kong. *Vaccine*, 2002, 20: 125 ~ 133
- [3] Lin Y P, Shaw M, Gregory V, et al. Avian-to-human transmission of H9N2 subtype influenza A viruses-Relationship between H9N2 and H5N1 human isolates. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, 97: 9654 ~ 9658
- [4] 郭元吉, 李建国. 禽 H9N2 亚型流感病毒能感染人的发现. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1999, 13(2): 105 ~ 108
- [5] David A. Steinhauer. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology*, 1999, 258: 1 ~ 20
- [6] Nobusawa E, Aoyama T, Kato H. Comparison of complete amino acid sequences and receptor-binding properties among 13 serotype of hemagglutinin of influenza A virus. *Virology*, 1991, 182: 475 ~ 485
- [7] Eisen M B, Sabesan S, Skehel J J, et al. Binding of the influenza A virus to cell-surface receptors: Structure of five haemagglutinin-sialyloligo-saccharide complexes determined by X-ray crystallography. *Virology*, 1997, 232: 19 ~ 31
- [8] Guo Y J, Krauss S, Senne D A, et al. Characterization of the pathogenicity of members of the newly established H9N2 influenza virus lineages in Asia. *Virology*, 2002, 67: 279 ~ 288
- [9] Banks J, Speidel E C, Harris P A, et al. Phylogenetic analysis of influenza A viruses of H9 haemagglutinin subtype. *Avian Pathol*, 2000, 29: 353 ~ 360

Molecular identification and Phylogenetical Analysis of A/Chicken/Jiangsu/JS-1/2002(H9N2)

LIU Hua-lei¹ HE Hai-rong² Zhou Bin¹ WEI Jian-chao¹ CHEN Pu-yan¹

(1 Key Lab of Animal Diseases Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University Nanjing 210095, China)

(2 Biological Products Research Development Center, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract RT-PCR were employed to amplify the cDNA of hemagglutinin(HA) gene of A/Chicken/Jiangsu/JS-1/2002(H9N2) and the cDNA were cloned into pGEM[®]-T vector and sequenced. The sequencing result has logging in GenBank, the accession number was AY364228. The result revealed that the HA genes of JS-1 had a complete open reading frame(ORF) and composed of 1683 nucleotides, coding for 560 amino acids. The deduced amino acid sequence at the cleavage site of the HA protein was RSSR↓GLF, it was match to the characteristic of low virulent strain. A phylogenetic tree based on the nucleotide sequences of the HA gene revealed all the 18 strains were divided into two lineages, namely Eurasian lineage and North America lineage, the isolate JS-1 was similar to the other three strains isolated from China, included *A/Chicken/Beijing/1/94*, *A/Chicken/Guangdong/SS/94* and *A/Chicken/Guangxi/KMI/99*, belonged to the Eurasian lineage.

Key words Avian influenza virus H9N2 subtype Hemagglutinin gene