

H5N1 亚型禽流感病毒 A/duck/Shandong/093/2004 株的全基因克隆及序列分析

龙进学 王曲直 卢建红 刘玉良 刘秀梵*

(扬州大学畜牧兽医学院 农业部畜禽传染病学重点开放实验室 扬州 225009)

摘要 应用流感病毒通用引物^{4,1}和 H5N1 亚型禽流感(*Avian influenza virus*, AIV)的型特异性引物,成功的扩增出 H5N1 亚型禽流感病毒 A/duck/Shandong/093/2004 株(简称 A/D/SD/04)的全基因组序列(包括 5'和 3'端的非编码区序列)。A/D/SD/04 的基因组核苷酸全序列与 18 株网上公布的禽流感基因序列进行比较和分析,结果与 4 株鸭源 H5N1 的 5~7 个基因具 99% 以上的同源性;与 14 株 H5N1 有至少一个以上内部基因同源性在 95% 以上。与 H9 亚型 AIV 代表株 A/Quail/Hongkong/G1/97(简称 G1 株)和 A/Chicken/Beijing/1/94(简称 BJ94)比较,除了非结构基因(Nonstructural gene, NS)与 G1 株的同源性为 95.3% 外,其余基因均在 36.6%~92.1% 之间。说明 A/D/SD/04 没有 H9N2 基因的直接整合,是 H5N1 毒株在自然界的重组株。推导的 HA 氨基酸序列分析,A/D/SD/04 的血凝素(Hemagglutinin, HA)裂解位点与比较的 16 株 AIV 的序列一致,是高致病性禽流感的分子特征(PQRERRRKR/G),第 226 位氨基酸是对禽类和哺乳细胞均具有亲嗜性的蛋氨酸(Met)。神经氨酸酶(Neuraminidase, NA)在第 48 位氨基酸(颈部)后有 20 个氨基酸的缺失,但非结构蛋白(NS)没有在 79~84 氨基酸发生缺失。碱性聚合酶(α PB2)的 627 位氨基酸是亲禽类细胞的谷氨酸(Glu, E)。结合生物学特性和分子特征,A/D/SD/04 对小鼠的致病力是由多种因素决定,其可能是一株对鸡高度致病,并逐渐获得对哺乳动物致病能力的中间重组病毒。

关键词 H5N1 亚型禽流感病毒,通用引物,全基因组序列,序列分析

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2005)05-0690-07

禽流感病毒在家禽和水禽中的广泛存在^[1,2]给养禽业带来了严重的威胁,1997 年发生的香港流感事件(H5N1),2004 年东南亚 H5N1 和 1999 年大陆 H9N2 亚型 AIV 感染人事件^[3,5,6],使 AIV 成为目前严重危害人类健康的重要传染性疾病之一。AIV 是单股负链分节段的 RNA 病毒,其基因组复制时,具有 RNA 病毒特有的核酸碱基易变性,即抗原漂移(Antigen drift)。不同的 AIV 同时感染同一细胞时,两个病毒的基因节段相互间还会发生基因重排,引起抗原转变(Antigen shift)。所以,在自然界中每隔一定的时间,就会产生新的流感毒株造成流行。高效的流感疫苗开发、流感病毒基因功能研究、流感病毒的致病机理和宿主特异性等的研究,以及对流行株抗原变异的实时跟踪及进化规律研究等,是控制流感的关键所在。对流感病毒的基因组序列进行测定和分析则是进行各项研究的基础。网上的国际数据库(NCBI)已经登陆了许多流感病毒的相关序列,对流感病毒的研究起了巨大的推动作用。但是,多

数只是病毒的开放阅读框(ORF)部分的核酸序列,缺少基因的 5'和 3'末端的非编码区序列。流感病毒基因的 5'和 3'末端的非编码区序列中含有核酸翻译转录的调控信号,对病毒在宿主中的繁殖能力、对不同动物的致病力等起重要的作用,是流感病毒研究和分析必不可少的。另外,近十多年发展起来的流感病毒拯救技术也要求对病毒完整序列的准确测定。本研究采用流感病毒通用引物与 H5N1 型特异性引物相结合的方法,成功扩增一株 H5N1 亚型禽流感病毒(A/D/SD/04)的全基因组序列,为后续研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 毒株 A/Duck/Shandong/093/2004(简称 A/D/SD/04)由本实验室分离并保存,H5 亚型 AIV 的标准阳性血清由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提供,血凝抑制试验(HI)初步鉴定为 H5 亚型 AIV。

基金项目 国家科技攻关项目(2004BA519A19)江苏省属高校重大基础研究项目(05KJA23016)

* 通讯作者。Tel/Fax: 86-514-7991416; E-mail: xliu@mail.yzu.edu.cn

作者简介 龙进学(1976-)男,广西桂林人,博士研究生,主要从事禽流感病毒基因功能研究。E-mail: long-zx-1976@163.com

收稿日期 2005-01-07,修回日期 2005-04-28

1.1.2 主要试剂: Expand High Fidelity PCR System、dNTP(10mmol/L)和 Agrose Gel DNA Extraction Kit 购自 Roche 公司。反转录酶 MLV-L(10U/ μ L)和 RNA 酶抑制剂(RNasin)(40U/L)购自 Promega 公司。PCR2.1[®]-T vector 购自 Invitrogen 公司。UNIQ-10 柱式总 RNA 提取试剂盒、T4 连接酶、Taq 酶和 PCR 产物回收试剂盒均购自上海 Sangon 公司。

1.2 引物设计

参照文献[4],设计合成扩增流感病毒的血凝素(HA)、神经氨酸酶(NA)、核蛋白(NP)、基质蛋白(MP)和非结构蛋白(NS)基因的通用引物,预期扩增片段分别约为 1.7kb、1.4kb、1.5kb、1.0kb 和 0.9kb。

分析已在 NCBI 上公布的 H5N1 亚型 AIV 的碱性聚合酶 α (PB2)、碱性聚合酶 β (PB1)和磷蛋白(PA)的序列,分别在其保守区(1100~1126,1090~1113,1046~1068位)设计合成 3 对引物,与 PB2、PB1 和 PA 的通用引物^[4]组合,分两段扩增 PB2、PB1 和 PA,预计所扩增的 6 条片段大小在 1.6~1.9 kb 之间。以流感病毒 RNA 的 3' 端保守序列(5'-AGUAGAAACAAGG NNN UUUUU NNN CC UGCUUUUGCU3')设计合成 8 节段通用的 12 碱基的反转录引物^[4]。11 对 PCR 引物和 12 碱基的反转录引物均由上海 Sangon 公司合成引物序列见表 1。

表 1 A/D/SD/04 全基因组扩增用引物

Table 1 The primers of RT-PCR for full fragments of A/D/SD/04

Name of the primers	Primer sequence	Fragment/bp
PB2	Bm-PB2-1 5'-TATTGGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGTC-3'	1900
	PB2-m-2 5'-GGGGCTGTGCAAATGGTA-3'	
	Bm-PB2-2 5'-ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAAACAAGGTCGTTT-3'	1600
	PB2-m-1 5'-CCAGGCGGAGAAGTGAGAAA-3'	
PB1	Bm-PB1-1 5'-TATTGGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGCA-3'	1700
	PB1-M-2 5'-TGGCATCGTAGGTGTATCTG-3'	
	Bm-PB1-2 5'-ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAAACAAGGCATT-3'	1600
	PB1-M-1 5'-AAGATGCTGAAAGGGGAAAAT-3'	
PA	Bm-PA-1 5'-TATTGGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGTAC-3'	1400
	PA-M-2 5'-TCTCTGCAATGGGATACTTC-3'	
	Bm-PA-2 5'-ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAAACAAGGTACTT-3'	1500
	PA-M-1 5'-AGAGCCTATGTGGATGGA-3'	
HA	Bm-HA-1 5'-TATTGGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGGG-3'	1780
	Bm-HA-2 5'-ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAAACAAGGTCGTTTT-3'	
NP	Bm-NP-1 5'-TATTGGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGGTA-3'	1650
	Bm-NP-2 5'-ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAAACAAGGTCGTTTT-3'	
NA	Bm-NA-1 5'-TATTGGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGAGT-3'	1400
	Bm-NA-2 5'-ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAAACAAGGAGTTTTT-3'	
MP	Bm-M-1 5'-TATTGGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGTAG-3'	1100
	Bm-M-2 5'-ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAAACAAGGTAGTTTT-3'	
NS	Bm-NS-1 5'-TATTGGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGGTG-3'	900
	Bm-NS-2 5'-ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAAACAAGGTCGTTTT-3'	
12bp primer	5'-ACGGAAGCAGG-3'	

1.3 RNA 提取

参照上海 Sangon 公司 UNIQ-10 柱式总 RNA 提取试剂盒说明进行 RNA 的提取。

1.4 RT-PCR

按常规法,RT-PCR 反应体系:33 μ L 病毒 RNA,10 μ L 反转录 buffer,2.5 μ L dNTP(10mmol/L),1.5 μ L 50pmol/L 的 12 碱基反转录引物,2 μ L 反转录酶 MLV-L,1 μ L RNasin,于 37 $^{\circ}$ C 反应 1h,于 75 $^{\circ}$ C 下 15min 灭活反转录酶。取 1 μ L 模板进行 PCR 扩增,PCR 反应体系:10 \times buffer 5 μ L,10mmol/L dNTP 1 μ L,上游引物 1 μ L,下游引物 1 μ L,超纯水 40 μ L,Expand

High Fidelity DNA 聚合酶 1 μ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 3min,94 $^{\circ}$ C 20s,58 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 7min,30 个循环,72 $^{\circ}$ C 10min。

1.5 PCR 产物的克隆、鉴定和序列分析

PCR 产物电泳,切割预期大小的目的条带,用 Agrose Gel DNA Extraction Kit 回收,与 PCR2.1[®]-T vector 连接。将连接产物转化 DH5 α 感受态细胞,在 X-Gal + IPTG + Amp 的 LB 平板上筛选,扩大培养,常规方法小量制备质粒。质粒初步电泳验证后,进行 PCR 鉴定。最后,每个样品选取 3~5 个阳性克隆,送上海联合基因科技有限公司测序,以两个相同序

列假定为真实序列。

用 DNASTAR 4.0 软件的 Editseq 拼接获得全序列,用 Clustal V method 分别比较 A/D/SD/04 的 8 个基因与 18 株 NCBI 公布的 AIV (16 株 H5N1, 2 株 H9N2) 的同源性,并绘制进化树。

2 结果

扩增的 11 段 (HA, NA, NP, MP, NS 和分两段扩增的 PB2, PB1 和 PA) PCR 产物经 T 载体克隆、PCR 鉴定、测序,拼接获得 A/D/SD/04 的全序列,上传到国际序列库 (NCBI) 中,接受号:NA 为 AY845190;HA 为 AY845191;PB2、PB1、PA、NP、MP 和 NS 分别为 AY856861 ~ AY856866。

2.1 产物克隆的 PCR 鉴定

质粒常规小量制备,100 倍稀释后,取 2 μ L 作模板进行 PCR 鉴定,结果可以扩增出目的大小的条带 (图 1、2),表明 11 个目的带成功克隆到 PCR2.1* -T vector 上。

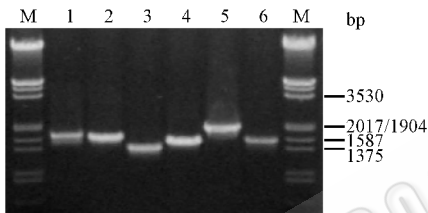


图 1 PB2、PB1 和 PA 扩增产物电泳图谱

Fig. 1 The results of amplifying of PB2, PB1 and PA gene

M. Lambda DNA/*Hind* III + *Eco* R I markers; 1. PB1-1(1700bp); 2. PB1-2(1600bp); 3. PA-1(1400bp); 4. PA-2(1500bp); 5. PB2-1(1900bp); 6. PB2-2(1600bp).

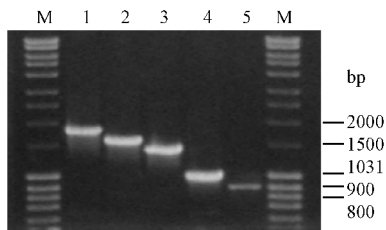


图 2 HA, NA, NP, NS 和 M 扩增产物电泳图谱

Fig. 2 The results of amplifying of HA, NA, NP, M and NS gene

M. MassRuler™ DNA Ladder; 1. HA(1780bp); 2. NP(1650bp); 3. NA(1400bp); 4. M(1100bp); 5. NS(890bp).

2.2 测序结果和序列分析

2.2.1 碱性聚合酶 2 (Polymerase basic protein 2, PB2):全长为 2341 个碱基 (base pair, bp), 编码区在 28 ~ 2307, 共编码 760 个氨基酸。A/D/SD/04 与 18 株 AIV 的 PB2 基因的核苷酸同源性在 85% ~ 99.5% 之间,与 BJ94、G1、A/HK/483 和 A/HK/486 的同源性

最低 (85% ~ 92.1%), 与另 14 株 H5N1 的同源性在 93.2% 以上 (表 2)。推导氨基酸的同源性则在 95.9% ~ 99% 之间 (数据未列), 说明 AIV 的 PB2 是高度保守的, 核苷酸在进化过程中多为沉默突变。18 株 AIV 的进化关系见图 3-A, A/D/SD/04 与 A/DK/AY/01、A/DK/FJ/02 和 A/GI/02 的同源性在 99% 以上, 形成较远离于其他毒株的另一独立小分支, 但与 A/G/GD/96、BJ94 (H9N2 代表株) 及 2000 ~ 2004 年期间绝大部分的 H5N1 处于同一大分支; G1/97 和感染哺乳动物的 97 香港分离株 (A/C/483 和 A/C/486) 在第二分支。

2.2.2 碱性聚合酶 1 (Polymerase basic protein, PB1):全长为 2341bp, 编码区为 25 ~ 2298, 编码 758 个氨基酸。与 18 株 AIV 的同源性在 90.5% ~ 99.3% 之间 (表 2)。PB1 推导的氨基酸同源性则在 96.8% ~ 99.7% 之间, 说明核苷酸多为沉默突变。在 PB1 的基因进化树可以分为 5 个分支 (图 3-B): A/D/SD/04 与 A/D/AY/01、A/D/FJ/02 和 A/GI/02 的同源性在 99% 以上, 处于同一小分支上, 与 A/D/FJ/00 形成远离于其他毒株的独立地第 3 分支; 以 A/G/GD/96 为起源的第 5 分支, 主要为华南地区 (广东、广西和香港) 2000 ~ 2002 年的分离株; A/D/FJ/01 为起源的第 4 分支, 则以 2004 年的毒株为主; G1 是 1997 年香港 H5N1 内部基因的直接提供者, 与之构成第二分支; BJ94 是独立的第一分支。

2.2.3 磷蛋白 (PA):全长为 2233bp, 编码区在 25 ~ 2175, 编码 717 个氨基酸。A/D/SD/04 与 18 株 AIV 的核苷酸序列同源性在 90.8% ~ 99.5% 之间, 推导的氨基酸同源性在 96.1% ~ 99.3% 之间。PA 的核苷酸序列进化树见图 3-C, 第四分支包括广东及附近地区 2000 ~ 2004 年间和我国及东南亚 2004 年大部分的分离株, 均以 A/G/GD/96 为起源; A/D/SD/04 与 A/D/AY/01、A/D/FJ/02、A/D/GX/02 和 A/GI/02 的同源性在 99.1% ~ 99.5% 之间, 形成第三分支; 第二分支仍是 G1 和香港 97 年的两个分离株; BJ94 与其他 18 株 AIV 的同源性只有 87.5% ~ 91.1%, 是最远的第一分支。

2.2.4 核蛋白 (NP):全长为 1565bp, 编码区为 46 ~ 1542, 编码 399 个氨基酸。A/D/SD/04 的 NP 基因与越南、泰国和我国吉林的 2004 年分离株同源性高 (96% 以上), 在进化树上处于第三分支 (图 3-D)。北京 94 仍是与其他毒株距离最远的一独立分支 (第一分支); 第二分支是 G1/97 和香港 97 年流行株。第四系以 A/G/GD/96 为代表 (或来源的), 包括广东

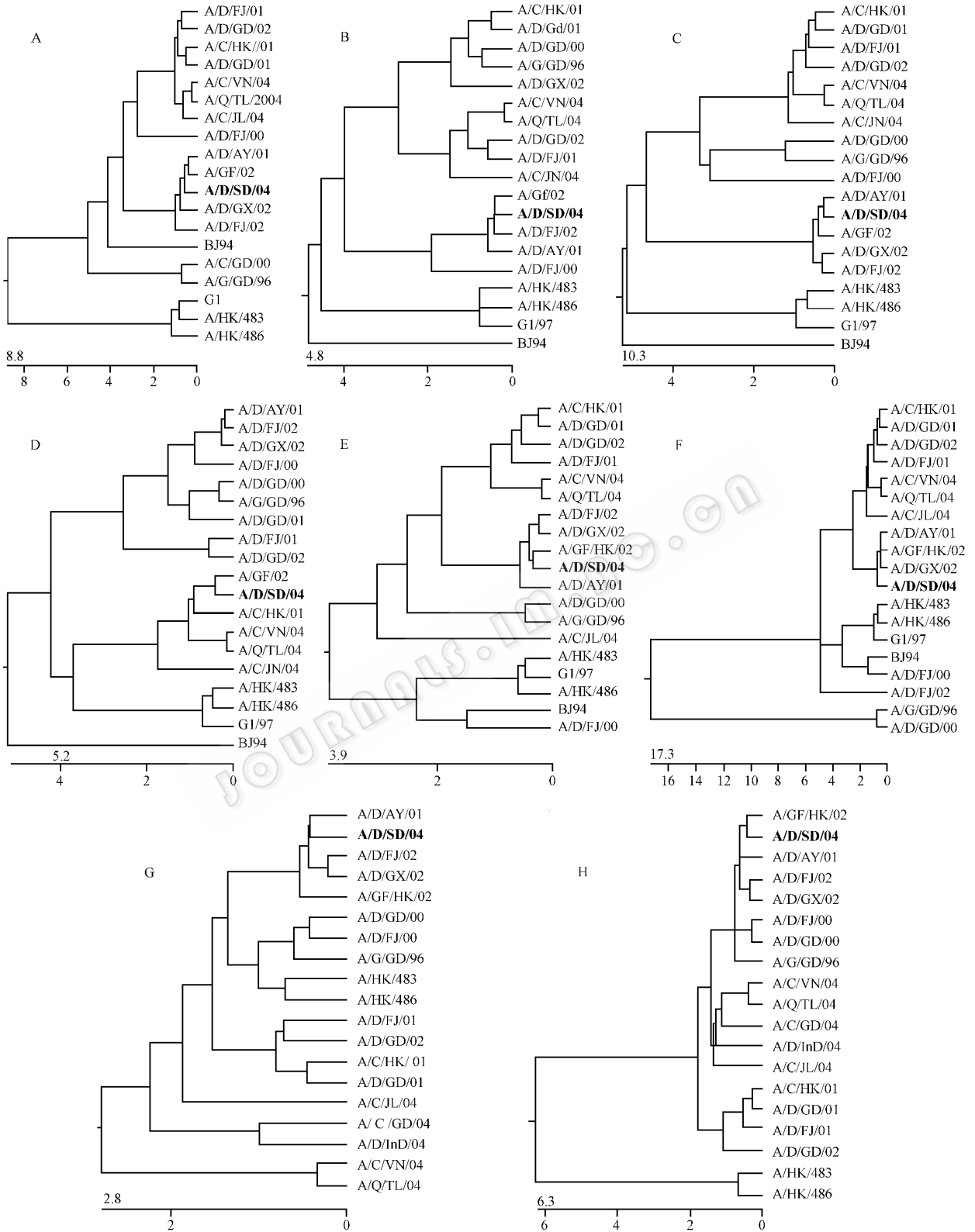


图 3 A/D/SD/04 各基因的进化树

Fig.3 Phylogenetic trees of A/D/SD/04

A :PB2 ;B :PB1 ; C :PA ;D :NP ;E :MP ;F :NS ;G :HA ;H :NA .

及其附近省份 2000~2002 年的 H5N1 分离毒株。

2.2.5 基质蛋白 (Matrix protein, M):全长为 1027bp, 编码区分为两部分, M1 编码区在 26~784 位, 编码 253 个氨基酸, M2 是发生 RNA 编辑的, 由 26~51 + 740~1007 组成, 共编码 98 个氨基酸。A/D/SD/04 与 A/G/GD/96、和 2004 年发生于越南、泰国的及我国部分省市(包括广东 97~2004 年的)的毒株同源性在 96%~99.5%, 它们处于同一进化分支上(图 3-E), 其极可能是由 A/G/GD/96 进化而来的, 并表明 A/G/GD/96 提供的 MP 基因一直在广东地区流传。A/HK/483、A/HK/486 与 G1/97 与 A/D/SD/04 的同源性只有 90.8%~91.8%, 形成第二分支。BJ94 和 A/D/FJ/00 高度同源构成第一分支。

2.2.6 非结构蛋白(NS):全长为 890bp, 编码区也分两部分, 编码两个非结构蛋白, NS1 编码区为 27~719, 编码 231 个氨基酸, NS2 由 27~56 + 529~864 通过 RNA 编辑组成, 产生 122 氨基酸的 NS2。A/D/SD/04 的 NS1 在 79~84 位氨基酸没有发生缺失, 比较的 18 株 AIV 中, 7 株在此位点发生缺失(3 株鸭源、3 株鸡源和 1 株鹌鹑源)。进一步比较 NCBI 中公布的 41 株 H5N1 亚型 AIV 的 NS 序列, 发现共有 22 株均在 NS1 的 79~84 位氨基酸处发生了缺失, 而且此 22 株均是 2000 年后的分离株(数据未列), 说明 NS1 在此位的缺失具有一定的时间规律性。NS1 79~84 位氨基酸处的缺失是否为 AIV 的进化特征, 以及与病毒致病性的关系等有待进一步研究。18

株 NS 的基因进化分析分为 A 和 B 两大系:A 系是类 BJ94 系, 大多数的毒株属于此系。A 系进化过程中分化为 3 个小系:以 NS1 的 79~84 位缺失 5 个氨基酸为特征的第 1 小系, 包括了 2004 年的 3 株和部分 2001~2002 年的 H5N1, 第 2 小系是 NS1 蛋白 79~84 位无缺失, 第 3 小系则是仍与 BJ94 和 G1/97 较为相近的 AIV 分离株, 包括福建 2000 和 2002 年的两个分离株, 此小系的 NS1 蛋白 79~84 位也无缺失。B 系是类 A/G/GD/96 系, 包括 A/D/GD/00, 二者的同源性为 98.8%。A/D/SD/04 属于 A 系中的第 2 小系(图 3-F)。

2.2.7 血凝素(HA):全长为 1779bp, 编码区为 29~1735, 编码 569 个氨基酸, 裂解位点位 PQRERRRKKR/G 为高致病性 AIV 的特征的。推导 A/D/SD/04 的 HA 氨基酸分析, 其 HA1 在 10、11、23、154、165 和 286 位上均具有潜在的糖基化位点。HA 的受体结合位点相当保守, 91 位是酪氨酸(Y), 129~133 位:丝-甘-缬-丝-丝氨酸(SGVSS), 149 位是色氨酸(W), 186 位是谷氨酸(E), 190 位亮氨酸(L), 220~224 位:天冬酰胺-甘-谷氨酰胺-丝-甘氨酸 NGQSG, 但是, 在 226 位是与 A/HK/486 相同的蛋氨酸(Met)。HA 的进化树见图 3-G。

2.2.8 神经氨酸酶(NA):全长为 1398bp, 编码区为 21~1370, 编码 450 个氨基酸。A/D/SD/04 与 18 株 H5N1 的同源性在 86.1%~99.2% 之间(表 2)。A/D/SD/04 在第 48 位氨基酸后缺失了 20 个氨基酸,

表 2 A/D/SD/04 与 18 株 AIV 核苷酸的同源性分析

Table 2 Phylogenetic analysis of nucleotide of A/D/SD/04 with 17 AIV strains

Strains	Abbreviations	A/D/SD/04								
		PB2	PB1	PA	NP	MP	NS	HA	NA	
A/Chicken/Beijing/1/94	BJ94	92.1	90.6	91.1	89.6	91.8	91.8	48.4	36.5	
A/Quail/Hongkong/G1/97	G1	85.0	90.5	92.4	92.3	90.8	95.3	48.6	36.3	
A/Goose/Guangdong/1/96	A/G/GD/96	93.8	92.5	91.9	93.2	96.9	67.1	97.8	97.5	
A/Duck/Anyang/ALV-1/2001	A/D/AY/01	99.5	99.3	99.5	92.5	99.2	99.2	99.2	99.2	
A/Hongkong/483/97	A/HK/483	85.6	90.5	92.0	92.5	91.8	90.6	97.3	86.4	
A/Hongkong/486/97	A/HK/486	85.7	91.0	92.1	92.6	91.3	91.2	97.1	86.1	
A/Duck/Guangdong/12/2000	A/D/GD/00	94.7	92.8	91.6	93.0	96.4	65.0	97.3	98.5	
A/Duck/Guangdong/01/2001	A/D/GD/0)	94.7	92.4	91.3	92.7	96.4	95.3	98.1	92.9	
A/Duck/Guangdong/22/2002	A/D/GD/0)	94.1	91.6	90.8	91.9	96.1	95.9	97.4	92.1	
A/GF/HK/38/2002	A/GF/02	98.6	99.3	99.4	99.1	99.4	99.5	99.5	99.0	
A/Duck/Guangxi/53/2002	A/D/GX/02	99.3	94.2	99.1	92.5	99.1	99.1	99.2	98.3	
A/Chicken/VietNam/33/2004	A/C/VN/04	93.9	90.9	90.8	98.1	96.1	93.9	96.4	96.2	
A/Chicken/Jinlin/9/2004	A/C/JL/04	94.4	91.7	91.8	96.8	94.2	94.7	98.0	96.7	
A/Quail/Thailand/57/2004	A/Q/TL/04	94.0	90.7	90.7	98.1	96.3	93.6	96.7	95.7	
A/Duck/Fujian/19/2000	A/D/FJ/00	93.2	96.2	91.2	92.1	91.7	89.2	97.7	98.2	
A/Duck/Fujian/17/2001	A/D/FJ/01	94.2	91.2	90.8	91.9	95.9	94.8	98.2	93.1	
A/Duck/Fujian/01/2002	A/D/FJ/02	99.0	99.1	99.3	92.5	99.5	92.4	99.3	99.0	
A/Chicken/HongKong/N1873/01	A/C/HK/01	94.7	92.5	91.2	98.1	97.0	95.2	97.7	92.8	

与之比较的 18 株 H5N1 中有 12 株具相同缺失,估计这种缺失与病毒的毒力相关。进化树分析发现,A/G/GD/96 却与 12 株有氨基酸缺失和 4 株没有氨基酸缺失的毒株的碱基同源性为 95.5%~98.6%。流感病毒 NA 颈部的长短是与病毒直接影响着病毒从宿主细胞表面的释放,即与病毒的再次感染和繁殖能力密切相关的。NA 颈部 20 个氨基酸的缺失是否为 AIV 在进化过程中适应环境压力的突变,需要进一步研究。A/HK/483 和 A/HK/486 独自成一系,是远离大陆和东南亚各国 2004 年分离株的。NA 的进化树见图 3-H。

3 讨论

以流感病毒的 RNA 节段的 5' 和 3' 端的高度保守序列为基础,设计合成的流感病毒 PCR 通用引物,能方便的扩增出 5 个目的基因(HA、NA、NP、M 和 NS)。对于 3 个聚合酶基因(PB2、PB1 和 PA)可采用 H5 的型特异性引物与通用引物相结合的方法比复杂的 cDNA 末端随机扩增(Random amplification of cDNA ends, RACE)更快捷。

AIV 在进化过程中,不仅其表面基因 HA 和 NA 的可发生抗原漂变(Drift)来逃避宿主的免疫压,而且不同 AIV 之间也可通过基因互换(Reassortment),形成适应性更高,毒力更强的自然重组株,引发新的疫情。水禽和野鸟则是基因重组病毒主要的基因供体库^[7,8]。由水禽提供基因,然后在完成病毒重组后传给鸡等陆生家禽,病毒再从陆生家禽回到水禽,即形成双向传播。通过对 A/D/SD/04 与 18 株不同来源及亚型 AIV 的序列同源性分析,A/D/SD/04 与 A/GF/02 和 A/D/AY/01 的 7 个基因,与 A/D/FJ/02 的 6 个基因和 A/D/GX/02 的 5 个基因的同源性在 99.0% 以上,表明此 5 株 AIV 直接为 A/D/SD/04 提供了基因,证实了相同亚型 AIV 之间存在基因的直接互换。由于 H5N1 的传播主要是通过粪口途径,但此 5 株 H5N1 的分离地相隔甚远,合理解释是商业运输和野鸟等水禽的传播,以及双向传播的可能发生。因此在禽流感的防治工作中,应高度警惕水禽中普遍隐性带毒(各亚型 AIV)的情况,饲养管理中要尽量减少水禽和野鸟等与家禽(鸡等)的直接接触,如混养等。A/D/SD/04 与此 4 株鸭源(2002~2001 年)H5N1 的互换基因的核酸同源性在 99% 以上,而它们分离的时间间隔是 4 年,这也证实 H5N1 亚型 AIV 在鸭体内的基因进化基本属于静止状态。

A/D/SD/04 与 A/G/GD/96(我国最早的 H5N1 分

离株)的 NS 基因同源性只有 67.1%,M 的有 96.9%,其余内部基因也只在 91.9%~93.8% 之间,而且 A/D/SD/04 在 NA 的茎部有 20 个氨基酸的缺失,A/G/GD/96 则没有。在 8 基因的核苷酸进化树上,二者也不在同一分支上(图 3),说明 A/G/GD/96 不是 A/D/SD/04 的直接祖先。G1 和 BJ94 是 H9N2 亚型 AIV 的代表毒株,A/D/SD/04 与此二毒株比较,除了与 G1 株的 NS 基因高(95.3%)外,其他均在 85%~91.8% 之间。说明 A/D/SD/04 内部基因不是直接由 G1 和 BJ94 提供。与 10 株 H5N1 有一个以上的内部基因同源性高于 95%,而且与 4 株鸭源 H5N1 的 5~7 个基因具 99% 以上的同源性,充分说明 A/D/SD/04 是 H5N1 的自然重组株。

A/D/SD/04 的 HA 裂解位点是典型的高致病性禽流感的分子特征。受体位点也非常保守,与其他 H5 亚型高致病性禽流感的 HA 受体一样,没有发生变异。HA 的第 226 位受体位点与 A/HK/486 和 A/HK/156 同为 Met,是对 SA α -2,3Gal 和 SA α -2,6Gal 具有相同的结合能力的受体,这可能是 A/D/SD/04 对鸡高致病的同时又能感染小鼠(哺乳类动物)的重要标志。A/D/SD/04 的 HA1 的 10、11、23、165 和 286 位的潜在的糖基化位点与 A/G/GD/96 和近年来的 H5N1 分离株相同,但是,没有认为是鸡适应性特征的 158 位的潜在糖基化位点^[9]。A/D/SD/04 与 A/HK/483 一样,在 154 位多了个潜在的糖基化位点,此变化是否是对小鼠致病的影响因素之一需要进一步研究。PB2 的 627 位氨基酸被认为是与宿主特异性和病毒复制能力密切相关的^[3,5],Jacqueline 等^[3]认为,在保持高致病性的 HA 裂解特征的基础上,627 位的谷氨酸(E)和赖氨酸(K)的互变是影响 H5N1 能否对小鼠致病的关键,其研究的毒株 A/HK/483 能引起小鼠高度致病,其 PB2 蛋白的 627 位是赖氨酸(K)。然而,推导 A/D/SD/04 的 PB2 氨基酸序列发现,第 627 位氨基酸并不是亲哺乳动物细胞的赖氨酸(K),而是与 14 株不引起哺乳动物致病的 H5N1 一样,是亲禽类细胞的谷氨酸(E),说明 627 位氨基酸并不是决定 AIV 对小鼠致病性的唯一关键。分析 PB2 的第 355 位氨基酸,只有 A/HK/483、G/97 和 A/G/GD/96 的是 K,A/D/SD/04 与其余的 15 株 H5N1 是精氨酸(R),对小鼠不致病的 A/HK/486^[3]是 Q;但是 A/D/SD/04 的第 1090 位核苷酸是与 A/HK/483 一样是丙氨酸(A),这是对小鼠致病的特征之一。另外,认为是对小鼠致病相关的位点^[3]是 PB1 的第 198 和 317 位氨基酸,A/D/SD/04 的 198 位与 A/HK/

483 一致(是 K),但是 317 位却与 A/HK/486 相同(是 M),而非 A/HK/483 的 I。A/D/SD/04 对小鼠感染并致病(未列数据),说明水禽中的 H5N1 确实开始(2002 年以后)直接获得了向哺乳动物传染并导致发病的能力^[10]。A/D/SD/04 的分子特征与 A/C/HK/483 只有部分符合,说明 H5N1 亚型 AIV 能否对哺乳动物(小鼠)致病性是多因素决定的。A/D/SD/04 可能是由高致病性 AIV(HPAIV)向能引起哺乳动物感染致病进化的中间毒株,可作为代表病毒株,研究 HPAIV 如何获得对哺乳类动物致病性的进化机理。

参 考 文 献

- [1] Webster R G, Bean W J, Gorman O T, *et al.* Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbio Rev*, 1992, **56**(1):152 - 179.
- [2] Masato H, Yoshihiro K. The continued pandemic threat posed by avian influenza viruses in Hong Kong. *TRENDS in Microbiology*, 2002, **10**(7):340 - 344.
- [3] Katz J M, Lu X H, Tumpey T M, *et al.* Molecular correlates of influenza A H5N1 virus pathogenesis in mice. *Journal of Virology*,

2000, **74**(22):10807 - 10810.

- [4] Hoffmann E, Stech J, Guan Y, *et al.* Universal primer set the full-length amplification of all influenza A viruses. *Archives of Virology*, 2001, **146**:2275 - 2289.
- [5] Kyoko S, Stefan H, Masato H, *et al.* PB2 amino acid at position 627 affects replicative efficiency, but not cell tropism, of Hong Kong H5N1 influenza A viruses in mice. *Virology* 2004, **320**:258 - 266.
- [6] Masato H, Peng G, Peter H, *et al.* Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science*, 2001, **293**:1840 - 1842.
- [7] Karl G N, John M W, Maria Z. Influenza-seminar. *The Lancet*, 2003, **362**:1733 - 1745.
- [8] Guan Y, Peiris M, Kong K F, *et al.* H5N1 Influenza viruses isolated from geese in southeastern China: Evidence for genetic reassortment and interspecies transmission to ducks. *Virology*, 2002, **292**:16 - 23.
- [9] Chang W L, Dennis A S, Jose A L, *et al.* Characterization of recent H5 subtype avian influenza viruses from US poultry. *Avian pathology* 2004, **33**(3):288 - 297.
- [10] Chen H L, Deng G H, Li Z, *et al.* 2004 the evolution of H5N1 influenza viruses in ducks in southern China. *PNAS*, **101**(28):10452 - 10457.

Cloning of full-length genes of H5N1 subtype Avian influenza virus strain A/duck/Shandong/093/2004 and analysis of the sequences

LONG Jin-xue WANG Qu-zhi LU Jian-hong LIU Yu-liang LIU Xiu-fan*

(Key Laboratory of Animal Infectious Diseases of Ministry of Agriculture, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: The eight full-length genes, including the 5' and 3' ends of H5N1 subtype Avian influenza virus (A/duck/Shandong/093/2004) were amplified by using the universal primers and H5 specific primers. The method used for the amplification of Avian influenza virus's full-length sequence was more easily and rapidly than that of rapid amplification of cDNA ends assay (RACE). The amplified segments were cloned into the T vector PCR 2.1, respectively. Three to five positive clones of each gene were sequenced and the same two sequencing results of the full-length genes were obtained. The phylogenetic analysis results showed that all the eight segments of the A/duck/Shandong/093/2004 were different from the A/Quail/Hongkong/G1/97 and A/Chicken/Beijing/1/94, but showed highly similarity (99% and above) to that of four H5N1 strains, which were isolated in 2002 in duck. It revealed that this strain was resulted from re-assortment of H5N1 rather than H9N2. The NA sequence of A/D/SD/04 was analyzed and the result demonstrated that there are 20 amino acids missing in 48 ~ 68 sites, however, there was no residue lost in NS gene in 263 to 277 sites. The motif of HA cleavage site is PQRERRRKR/G, which is the characteristic of HPAIV. The 226 amino acid residue was Met (M), which can react with both A α -2, 3Gal and SA α -2, 6Gal receptor. And the 627 residue of PB2 was Glutamic acid (E). The result mentioned above confirmed that H5N1 subtype AIV has multiple determinants in its virulence. A/D/SD/04 is the mid-strain evolving from HPAIV to a virulent strain of mammal.

Key words: H5N1 Subtype influenza virus, Universal primer, Full-length genes, Sequence analysis

Foundation item: Chinese National Programs for Science and Technology Development(2004BA519A19); Major Basic Research Project for Provincial University and College of Jiangsu(05KJA23016)

* Corresponding author. Tel/Fax: 86-514-7991416; E-mail: xfliu@mail.yzu.edu.cn

Received date 01-07-2005