

一株 H3N2 亚型猪流感病毒广东分离株的基因组序列分析

姚 艳¹ 张桂红² 刘文军³ 陈铁桥¹ 孙 蕾^{3*}

(¹湖南农业大学动物医学院 长沙 410128)

(²华南农业大学兽医学院 广州 510642)

(³中国科学院微生物研究所分子病毒中心 北京 100101)

摘 要 从广东省疑似流感发病猪分离到 1 株 H3N2 亚型猪流感病毒(A/Swine/Guangdong/01/2005(H3N2)) ,对其各个基因进行克隆与测序 ,并与 GenBank 中收录的其它猪流感、禽流感和人流感的相关基因进行比较 ,结果表明 ,HA 全基因与广东 2003 ~ 2004 年分离的 H3N2 猪流感毒株的核苷酸序列同源性在 99% 以上 ,与纽约 90 年代末分离的 H3N2 人流感毒株同源性在 98.5% 以上 ;NA 基因与纽约 1998 ~ 2000 年分离的 H3N2 人流感毒株的核苷酸序列同源性在 99% 以上 ;NS 基因、M 基因的核苷酸序列与 H1N1 亚型猪流感毒株 A/swine/HongKong/273/1994(H1N1) 的核苷酸序列同源性较高 ,分别为 97.9%、98.4% ,与美洲 A/swine/Iowa/17672/1988(H1N1) 的核苷酸序列同源性分别为 96.7%、97.1% ;其他基因的核苷酸序列与 H3N2 人流感毒株具有很高的同源性。因此 ,推测其 M 和 NS 基因来源于 H1N1 亚型猪流感病毒 ,HA、NA 及其他基因均来源于 H3N2 亚型人流感病毒。表明此 H3N2 亚型猪流感病毒为 H3N2 亚型人流感病毒和 H1N1 亚型猪流感病毒经基因重排而得到的重组病毒。

关键词 :猪流感病毒 ;H3N2 亚型 ;H1N1 亚型 ;基因重排 ;重组

中图分类号 :Q933 文献标识码 :A 文章编号 :1001-6209(2007)05-0805-05

猪流感病毒(Swine influenza virus)属正粘病毒科 ,A、B 和 C 型流感病毒都能引发猪流感。目前已发现的 A 型猪流感至少有 H1N1、H1N2、H1N7、H3N2、H3N6、H4N6、H5N1 和 H9N2 八种不同亚型^[1]。猪在流感病毒的跨种间传播方面占有很特别的地位 ,猪既有禽流感病毒的表面受体又有人流感病毒的表面受体^[2] ,禽流感病毒和人流感病毒均可感染猪 ,而且这些病毒能在猪体内发生基因重排^[3]。1918 年“西班牙流感”的病毒与 H1N1 猪流感毒株有密切关系^[4,5]。因此 ,猪流感引起广泛关注。

我国发生猪流感近年有上升的趋势 ,H1N1 和 H3N2 亚型猪流感在我国大范围流行 ,李海燕等 2000 ~ 2003 年从我国东北、华北、华东、华南、西南等地区猪群分离鉴定了 25 株 H1N1 亚型、45 株 H3N2 亚型、3 株 H5N1 亚型及 H9N2 亚型猪流感病毒^[6,7]。我国华南地区具备孕育流感病毒的自然条件和环境。因此 ,华南地区流感病毒毒株在未来流感病毒变异和流行中的作用值得深入研究。本研究对 2005 年分离自广东省的 1 株 H3N2 亚型猪流感病毒

的基因组序列进行了分析 ,为我国的流感防控工作提供了科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒分离和鉴定 :105 份猪鼻腔棉拭子采自 2005 年广东省某猪场具有疑似流感症状的猪 ,病毒分离和亚型鉴定按照常规方法进行^[8]。

1.1.2 菌种和主要试剂 :克隆载体 pMD18-T 购自 TaKaRa 公司 ,宿主菌大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 由中国科学院微生物研究所动物病毒分子生物学实验室保存。病毒 RNA 提取 TRIAZOL 试剂盒、反转录试剂盒购自美国 Invitrogen 公司 ;pfu 酶、限制性内切酶 *Hind* III / *Bam* HI 购自 TaKaRa 公司 ;DNA Marker 购自博迈德生物技术有限公司 ;胶纯化回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自 Omega 公司。

1.1.3 引物 :参考 GenBank 收录的流感病毒的序列 ,采用 Primer5.0 设计引物 ,由上海生工生物工程技术有限公司合成。反转录采用通用引物 5'-

基金项目 :国家 973 项目 (2005CB523002) ,国家科技支撑计划资助项目 (2006BAD06A04 2006BAD06A03)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-10-64807503 ,E-mail sunlei362@im.ac.cn

作者简介 姚 艳(1982 -) ,女 ,湖南人 ,硕士研究生 ,主要从事畜禽传染病诊断与防治的研究。

其他作者 罗浑金¹

收稿日期 2007-01-12 ;接受日期 2007-02-12 ;修回日期 2007-06-27

AGCAAAAGCAGG-3',其它各片段的引物如下表 1 所示:

表 1 RT-PCR 引物

Table 1 Primers for RT-PCR

Fragments	Forward primers(5'→3')	Reverse primers(5'→3')	Size/bp
PB2	GCAGGTCAATTATATTCAGTATGGAA	AACTATTCAACATTAATTGATGGCC	2312
PB1-1	TTGAATGGATGTCATCCGACTCT	GTTGATTTCATTGAAATACITTCAGGTC	1158
PB1-2	GAGCATCGCACCCATAATGTCTCT	CATTATTTTTGCCGTCGAGTCTTT	1151
PA	CAGGTACTGATTCCGAAATGGAAGAT	GGACAGTATGGATAACAAATAGTAGCA	2331
HA	ATGAAGACTATCATTGCTTTGAGCTAC	TCAAATGCAAATGTTGCACCTAATG	1701
NP	TCACTGAGTGACATCAAAATCATGG	CTTAATTGTCGTACTCTTCTGCATTGT	1520
NA	AGCAAAGCAGGAGTAAAGATGAAT	AAGCTTATATAGGCATGAGATTGAGG	1433
M	ATATTGAAAGATGAGCCTTCTAACCG	ACTCCAACICTATGCTGACAAAATGAC	1027
NS	TGACAAAGACATAATGGATTCCAACAC	TGACCACTAGAAAACAAGGTCCTTT	882

1.2 RNA 的制备和 RT-PCR

按病毒 RNA 提取试剂盒 Trizol 说明书提取病毒总 RNA,按反转录试剂盒说明书获取 cDNA,以 cDNA 为模板按常规方法进行 RT-PCR。

1.3 基因的克隆和 PCR 鉴定

PCR 产物用胶回收试剂盒回收,加 A 尾后与载体 pMD18-T 连接,参照《分子克隆实验指南》进行克隆,并对重组质粒进行 PCR 鉴定。

1.4 基因序列比较分析

应用 DNASTar5.01 分析软件对各基因片段整个阅读框(ORF)内的核苷酸序列和推导的氨基酸序列进行分析,将所测得的各基因片段的序列在 GenBank 中进行 BLAST,分析各个片段的来源。

采用 DNASTar5.01 分析软件,以基因 ORF 为基本单元,将该毒株的各个基因片段与 GenBank 中的猪流感、禽流感及人流感病毒的相应基因片段进行核苷酸序列进行分析,并绘制进化树。

2 结果

2.1 病毒分离鉴定

从 105 份猪鼻腔棉拭子中分离出 4 株流感病毒,经鉴定均为 H3N2 亚型 A 型流感病毒,本研究所涉及的 1 株 H3N2 猪流感病毒命名为:A/Swine/Guangdong/01/2005(H3N2)。

2.2 RT-PCR 产物的鉴定

取 PCR 产物 5 μ L 于 1% 琼脂糖凝胶上电泳,结果表明扩增产物 HA 基因约为 1.7kb,NA 基因约为 1.4kb,NS 基因约为 0.9kb,M 基因约为 1.0kb,NP 基因约为 1.5kb,PA 基因约为 2.3kb,PB2 基因约为 2.3kb,PB1-1(1~1158bp)基因约为 1.2kb,PB1-2(1031~2300bp)基因约为 1.2kb,与预计的 cDNA 大

小一致,见图 1。

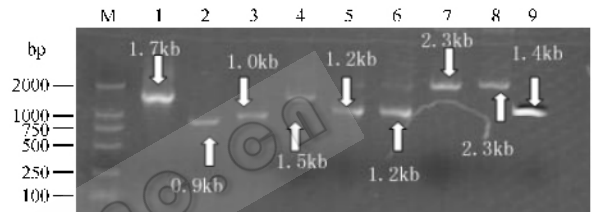


图 1 PCR 产物电泳结果

Fig. 1 PCR products by 1% agarose gel electrophoresis. M. DNA Marker DL2000; 1. HA gene; 2. NS gene; 3. M gene; 4. NP gene; 5. PB1-1 gene; 6. PB1-2 gene; 7. PA gene; 8. PB2 gene; 9. NA gene.

2.3 重组质粒的 PCR 鉴定

将目的片段连接到 PMD18-T 载体,对重组质粒进行 PCR 鉴定,结果与预期的大小相符合。

2.4 基因序列分析

A/Swine/Guangdong/01/2005(H3N2)HA 基因的测序结果表明,HA 基因编码区由 1701 个核苷酸组成,编码 567 个氨基酸,不存在核苷酸缺失。根据 HA 基因的核苷酸序列推导出其氨基酸序列,发现该 H3N2 亚型猪流感病毒的 HA1 蛋白有 11 个糖基化位点,在 8,22,38,63,122,126,133,144,165,246,285 位氨基酸处,分别为“-NST-”、“-NGT-”、“-NAT-”、“-NCT-”、“-NES-”、“-NWT-”、“-NGT-”、“NNS”、“-NVT-”、“-NST-”、“-NGS-”。HA1 和 HA2 剪切位点的序列为 PEKQTR↓G。利用 GenBank 中的 BLAST 工具进行同源性搜索比对表明,A/Swine/Guangdong/01/2005(H3N2)HA 全基因与广东 2003-2004 年分离 H3N2 猪流感毒株的核苷酸序列同源性在 99% 以上,与纽约 90 年代末分离 H3N2 亚型人流感毒株同源性在 98.5% 以上,与国内南昌 90 年代以及 21 世纪初台湾分离 H3N2 亚型人流感毒株的核苷酸序列同源性在 96% 以上,与香港 70 年代分离的鸭源毒株的核

苷酸序列同源性为 85.4%,与 21 世纪初西班牙分离 H3N2 亚型猪流感毒株的核苷酸序列同源性为 83.8%。

NA 基因编码区全长 1410 个核苷酸组成,编码 470 个氨基酸。将 NA 编码区全长基因序列与 GenBank 中已登录流感毒株的核苷酸序列比较结果表明 A/Swine/Guangdong/01/2005(H3N2)毒株 NA 基因与纽约 1998-2000 年分离 H3N2 人流感毒株的核苷酸序列同源性在 99% 以上,与国内南昌 90 年代分离人流感毒株的核苷酸序列同源性在 96.5% 以上,但与香港 70 年代分离的鸭源毒株和 21 世纪初西班牙分离 H3N2 亚型猪流感毒株的核苷酸序列同源性相对较低(85%)。

NS 基因与 H1N1 亚型猪流感毒株 A/swine/HongKong/273/1994(H1N1)的核苷酸序列同源性较高(97.9%);与美洲 A/swine/Iowa/17672/1988(H1N1)的核苷酸序列同源性 96.7%,但与 H3N2 亚型的流感病毒的核苷酸序列同源性相对较低。

M 基因的核苷酸序列与 H1N1 亚型猪流感毒株 A/swine/HongKong/273/1994(H1N1)的核苷酸序列同源性较高(98.4%);与美洲 A/swine/Iowa/17672/1988(H1N1)的核苷酸序列同源性为 97.1%,但与 H3N2 亚型的流感病毒的核苷酸序列同源性相对较低。

2.5 核苷酸进化树分析

A/Swine/Guangdong/01/2005(H3N2)毒株的 HA、NA、NS 和 M 基因与 GenBank 中相应流感病毒基因片段的遗传进化树如图 2 所示。由图 2-A 可见,A/Swine/Guangdong/01/2005(H3N2)的 HA 基因与国内广东省 21 世纪初以 A/Swine/Guangdong/6/2004 为代表的 H3N2 亚型猪流感分离株亲缘关系最近,且与 90 年代暴发的 H3N2 人流感流行株具有较近的亲缘关系。由此说明 A/Swine/Guangdong/01/2005(H3N2)的 HA 基因来源于 90 年代 H3N2 人流感病毒,而与 H1 亚型流感毒株相距较远。由图 2-B 可见,A/Swine/Guangdong/01/2005(H3N2)的 NA 基因同样与 90 年代暴发的 H3N2 人流感流行株亲缘关系最近,由此推测 A/Swine/Guangdong/01/2005(H3N2)的 NA 基因也来源于 90 年代 H3N2 人流感病毒,而与 N1 亚型流感毒株相距较远。在 NS 和 M 基因核苷酸进化树中(图 2-C,图 2-D),A/Swine/Guangdong/01/2005(H3N2)与 A/Swine/HongKong/273/1994(H1N1)和 A/Swine/Iowa/17672/1988(H1N1)形成一个分支,但与

国内外 H3N2 亚型流感的 NS 和 M 基因亲缘关系比较远,表明该毒株的 M 和 NS 基因均来源于 H1N1 亚型猪流感病毒。其他基因片段的进化树(图略)分析表明,该毒株的其他基因片段均来源于 H3N2 亚型流感病毒。以上分析表明,该 H3N2 亚型猪流感病毒是由 H3N2 亚型人流感病毒和 H1N1 亚型猪流感病毒经基因重排而得到的重组病毒。

3 讨论

猪是人流感与禽流感病毒发生基因重排和重组的重要场所,是人流感病毒和禽流感病毒的“混合器”。猪体内可以同时潜伏多种亚型的人、禽、猪流感病毒,基因重排和重组的直接结果便是产生新的流行毒株,在人群或畜禽群中流行,这也揭示了猪流感具有重要的公共卫生意义。目前已有很多关于猪流感病毒基因重排的报道。Li L. Shu 等对 1976~1982 年期间我国南方地区猪流感的调查结果表明,32 株 H3N2 猪流感毒株中有 3 株是由人流感和猪流感经基因重排得到的。1998 年从美国卡罗莱纳州分离的猪流感病毒为 H3N2 人流感病毒(HA、NA 和 PB1)和经典 H1N1 猪流感病毒(NP、NS、M、PB2 和 PA)的基因重组毒株,而从明已苏达州、爱荷华州和德克萨斯州分离的猪流感病毒为 H3N2 人流感病毒(HA、NA 和 PB1)、经典 H1N1 猪流感病毒(NP、NS、M)和 H9N2 禽流感病毒(PB2 和 PA)的三重重组毒株。本研究分离的 H3N2 猪流感病毒的 M 和 NS 基因来源于 H1N1 亚型猪流感病毒,HA、NA 及其他基因均来源于 H3N2 亚型人流感病毒分离株,表明此 H3N2 亚型猪流感病毒为 H3N2 亚型人流感病毒和 H1N1 亚型猪流感病毒的重组病毒。该研究再次证明了猪在流感病毒跨种间传播过程中确实起着“混合器”的重要作用。因此,随时掌握我国猪流感的分子流行病学和猪流感病毒的分子变异情况,对于我国流感的防控具有十分重要的意义。

我国华南地区由于其独特的经济、地理、气候和生态条件,规模化养殖场逐年增多,已成为流感暴发的重要地域。2002 年广东省爆发了多起由 H3N2 亚型流感病毒引起的流感流行,并且全年维持强势。因此,本文对广东省 1 株 H3N2 亚型猪流感病毒的基因重排进行了分析,以为该病毒的疫情监测及科学防制提供参考依据。

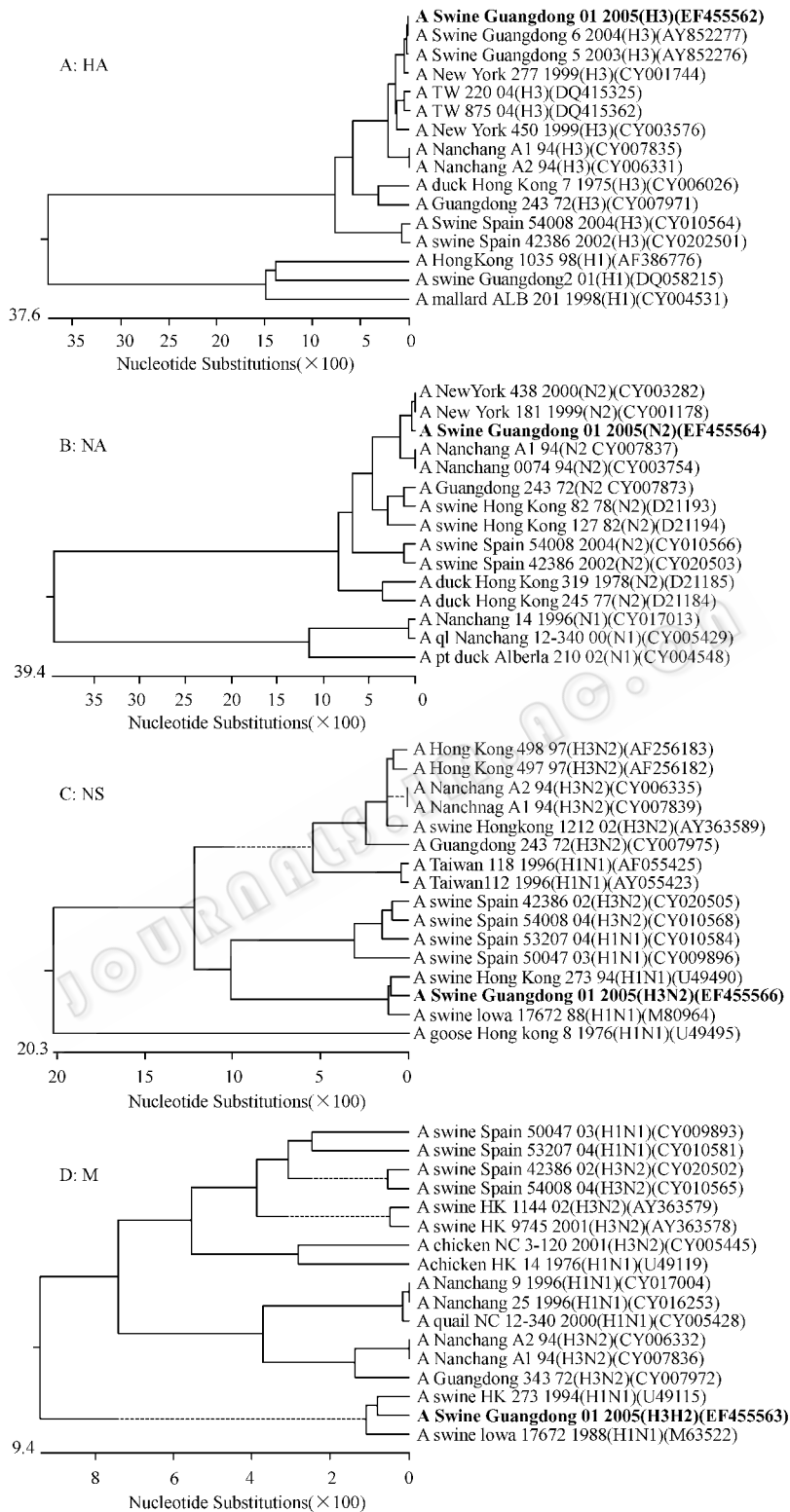


图2 A/Swine/Guangdong/01/2005(H3N2)猪流感毒株HA、NA、NS和M基因进化树

Fig.2 Phylogenetic tree of A/Swine/Guangdong/01/2005(H3N2). A: the HA gene(7-1701bp); B: the NA gene(224-1424bp); C: the NS gene(15-831bp); D: the M gene(35-998bp). Numbers in the first parentheses represent subtypes of influenza viruses.

Numbers in the second parentheses represent the sequences' accession number in GenBank.

参 考 文 献

- [1] Cox NJ, Subbarao K. Global epidemiology of influenza : past and present. *Annu Rev Med* , 2000 , **51** : 407 - 421 .
- [2] 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 Virol* , 1998 , **72** : 7626 - 7621 .
- [3] Webster RG , Bean WJ , Goraman WT. Evolution and ecology of influenza a viruses. *Microbiological Reviews* , 1992 , **56**(1) : 152 - 179 .
- [4] Taubenberger JK , Reid AH , Krafft AE , *et al.* Initial genetic characterization of the 1918 " Spanish " influenza virus. *Science* , 1997 , **275** : 1793 - 1796 .
- [5] Reid AH , Taubenberger JK , Fanning TG. Evidence of an absence : the genetic origins of the 1918 pandemic influenza virus. *Nat Rev Microbiol* , 2004 , **2** : 909 - 914 .
- [6] 陈君彦 , 李海燕 , 申之义 , 等 . H1N1 亚型猪流感病毒中国分离株血凝素基因分子演化的研究 . 中国预防兽医学报 , 2005 , **27**(1) : 13 - 17 .
- [7] 王连想 , 毕 英 , 李海燕 , 等 . 猪流感病毒广东株的分离鉴定及特性 . 中国兽医科技 , 2003 , **33**(2) : 17 - 22 .
- [8] 殷 震 . 动物病毒学 . 第二版 . 北京 : 科学出版社 , 1997 .
- [9] Shu L , Lin YP , Wright SM , *et al.* Evidence for interspecies transmission and reassortment of influenza a viruses in pigs in southern China. *Virology* , 1994 , **202**(2) : 825 - 33 .
- [10] Zhou N , Senne DS , Landgraf JS , *et al.* Genetic reassortment of avian , swine , and human influenza a viruses in American pigs. *J Virol* , 1999 , **73**(10) : 8851 - 8856 .

Genome sequence analysis of an H3N2 subtype swine influenza virus isolated from Guangdong province in China

YAO Yan¹ , ZHANG Gui-hong² , LIU Wen-jun³ , CHEN Tie-qiao¹ , SUN Lei^{3*}

(¹ College of Animal Medicine , Hunan Agricultural University , Changsha 410128 , China)

(² College of Veterinary , South China Agricultural University , Guangzhou 510624 , China)

(³ The Center for Molecular Virology , Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100101 , China)

Abstract : An H3N2 subtype swine influenza virus , A/Swine/ Guangdong/01/2005(H3N2) , was isolated from pigs with influenza-like signs in Guangdong province in 2005 . Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to amplify the gene segments for sequencing analysis . Phylogenetic analysis showed that the hemagglutinin (HA) gene of A/Swine/ Guangdong/01/2005 shared high degree of sequence identity with those of H3N2 viruses isolated from swine in Guangdong province from 2003 to 2004 and H3N2 viruses isolated from human in New York in the end of 1990s . The neuraminidase (NA) gene of this H3N2 swine virus had high degree of sequence identity with those of H3N2 viruses isolated from human in New York from 1998 to 2000 . While the nonstructure (NS) gene and matrix (M) gene of this H3N2 swine virus showed high degree of sequence identity with those of classical H1N1 swine influenza viruses . These results indicated that the M and NS gene might originate from the H1N1 subtype swine influenza viruses , while the HA , NA and other genes of this H3N2 subtype swine influenza virus might originate from the H3N2 subtype human influenza viruses . Therefore , the H3N2 swine influenza virus , A/Swine/ Guangdong/ 01/2005(H3N2) , is a recombinant of H3N2 human influenza virus and classical H1N1 swine influenza virus .

Keywords : Swine influenza virus ; H3N2 subtype ; H1N1 subtype ; genetic reassortment ; recombinant

Foundation item : Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (2005CB523002) ; National Programs for Technology Research and development of China (2006BAD06A04 , 2006BAD06A03)

* Corresponding author . Tel/Fax : 86-10-64807503 ; E-mail : sunlei362@im.ac.cn

Other author : LUO Hun-jin¹

Received : 12 January 2007 / Accepted : 12 February 2007 / Revised : 27 June 2007

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>