

H₉ 与 H₅ 亚型禽流感病毒血凝素基因的快速鉴别

黄 兵^{1,2}, 马秀丽², 王莉莉², 李玉峰², 刘玉山², 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, 江苏南京 210095; 2. 山东省农业科学院家禽研究所, 山东济南 250023)

Rapid Identification of Hemagglutinin Gene of Avian Influenza Virus Subtype H₉ and H₅

HUANG Bing^{1,2}; MA Xiu-li²; WANG Li-li²; LI Yu-feng²; LIU Yu-shan²; CHEN Pu-Yan^{1**}

(1. Key Laboratory of Animal Disease Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Poultry Science, Shandong Academy of Agricultural Science, Jinan 250023, China)

Abstract: A method of one-step reverse transcription polymerase chain reaction was developed to subtype hemagglutinin (HA) gene of Avian influenza virus (AIV). One pair of primers were designed on the basis of HA gene of AIV, allowing simultaneous detection of AIV subtype H₉ and H₅, and the specific amplicons were 579bp and 177bp in size respectively. The primers were specific for AIV (H₉ and H₅ subtype) with no cross-reaction to RNA from the chicken muscle and other chicken pathogens such as Newcastle disease virus etc. The sensitivity of this assay was about 50pg of total RNA of AIV. Our data showed that this method was simple and feasible for rapid identification and subtyping of AIV subtype H₉ and H₅ at a single reaction. In addition, both diagnostic amplicons for AIV subtype H₉ and H₅ contained the cleavage site sequence of HA gene, from which the amino acid sequence might be deduced to predict the potential virulence of AIV.

Key words: Avian influenza virus (AIV); Hemagglutinin gene; One-step RT-PCR; Subtyping

摘要: 建立一步法 RT-PCR 检测方法, 对禽流感病毒 (Avian influenza virus, AIV) 的血凝素 (Hemagglutinin, HA) 分型进行了研究。参照 AIV 的 HA 基因序列设计 1 对引物, 对 H₉ 和 H₅ 亚型 AIV 进行了扩增, 产物大小分别为 579bp 和 177bp。经测试, 该引物不与新城疫病毒等鸡的其它传染性病原及鸡肌肉组织的核酸发生交叉反应。敏感性分析发现, 从 50pg 的 AIV 总 RNA 中亦能扩增到目的条带。结果表明, 此次利用 1 对引物建立的一步法 RT-PCR 方法简便适用, 可以在一次反应中同时将 H₉ 和 H₅ 亚型 AIV 进行快速检测和分型。另外, 两个亚型的扩增产物均包含了 HA 裂解位点在内的基因序列, 可通过测序推导氨基酸顺序以预测 H₅ 或 H₉ 亚型禽流感病毒的潜在毒力。

关键词: 禽流感病毒; 血凝素基因; 一步法 RT-PCR; 分型

中图分类号: S852.65+9.5

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2005)05-0498-05

禽流感 (Avian influenza, AI) 是由 A 型流感病毒 (Avian influenza virus, AIV) 引起的禽的感染和疾病综合征。根据血凝素 (Hemagglutinin, HA) 的抗原差异可将 AIV 分为 15 个 HA 亚型, 在禽群中频繁致病的主要有 H₉、H₇ 和 H₅ 亚型^[1], 而中国出现的是 H₉ 和 H₅ 亚型^[2,3]。HA 在决定病毒致病力等方面起着重要作用, 但相同血清亚型的 AIV 毒株

之间的生物学特性可能相差很大, H₅ 亚型病毒感染以高死亡率为特征, 但亦有低致病力的毒株存在^[1]。H₉ 亚型则引起轻微的呼吸道症状、产蛋下降和细菌并发症。两个亚型病原都具有重要的公共卫生意义^[4-6], 很有必要进行 HA 鉴别。传统的 AIV 鉴定方法是病毒分离, 然后进行生物学试验和血清学分型, 这要花费较长的时间。核酸检测技术具有敏感、

收稿日期: 2005-03-17, 修回日期: 2005-05-13

作者简介: 黄兵 (1973 -), 男, 贵州省籍, 博士研究生, 主要从事动物病毒分子生物学与免疫学研究。

** 通讯作者。Corresponding author. Tel: 86-25-84396028; E-mail: aid@njau.edu.cn

快速的特点,已应用于对所有亚型 AIV 感染的早期检测^[7]。已有通过设计 2 对引物,建立了反转录和 PCR 分步进行的 H₉ 和 H₅ 亚型 AIV 的分型方法^[8]。一步法 RT-PCR 的发展使多种 RNA 病原的检测更加简便^[9],目前还未用于上述两种亚型 HA 的基因检测,同时亦未见仅用 1 对引物同时将 H₉ 和 H₅ 亚型 HA 区分开的报道。

1 材料与方法

1.1 材料

产蛋下降综合征病毒(Egg drop syndrome virus, EDSV)、新城疫病毒(*Newcastle disease virus*, NDV)、传染性气管炎病毒(*Infectious bronchitis virus*, IBV)、传染性法氏囊病毒(*Infectious bursal disease virus*, IBDV)、呼肠孤病毒(Reovirus, ReoV)、网状内皮增生症病毒(*Reticuloendotheliosis virus*, REV)以及 SPF 鸡和鸡胚,由山东省农业科学院家禽研究所提供。AIV 毒株(A/duck/China/QJ/01(H₅N₁)和 A/Chicken/shandong/2/02(H₉N₂)),由青岛出入境检验检疫局提供。3 个低致病性 H₉ 亚型 AIV 毒株,本室从发病肉鸡群中分离到,血凝抑制试验鉴定。

1.2 工具酶与试剂

Trizol RNA 提取试剂购自 Gibco/BRL 公司。反转录酶(AMV)、RNA 酶抑制剂及 dNTP 混合物等购自 Promega 公司。Platinum Taq DNA 聚合酶购自 Invitrogen 公司。UniQ-10 柱式胶回收试剂盒购自生工生物工程(上海)有限公司。限制性内切酶和 PMD18-T vector 购自宝生物工程(大连)有限公司。宿主菌大肠杆菌 DH5 为本室保存。其它试剂均为国产或进口分析纯。

1.3 病毒增殖

取 9~11 日龄 SPF 鸡胚接种种子毒,收集 24~96h 的活胚和死胚尿囊液,其中 IBV 的增殖时间为 36h,IBDV 和 ReoV 为鸡胚毒,REV 为鸡胚成纤维细胞毒,EDSV 为鸭胚接种物。病毒液均于 -20 保存备用。

1.4 核酸提取

取 200 μ L 病毒液, RNA 提取按 Trizol RNA 提取试剂说明书进行。用蛋白酶 K 消化,酚-氯仿抽提提取 EDSV 的 DNA^[10]。

1.5 引物设计

参照 GenBank 中公开发表的 H₅ 和 H₉ 亚型 AIV 核酸序列(GenBank 登录号 AF046099 和 AF461515),用 Primer primere5.0 软件设计引物,

正链引物为 5-AGTATGCCATTCCACAACA TA CACC-3,负链引物为 5-TCCCTGCCATCCTC CCTCTAT-3,对 H₉ 和 H₅ AIV 的特异性扩增产物分别为 579bp 和 177bp。参照 AIV 核酸序列(GenBank 登录号 AY743216)设计扩增 H₉ 亚型 AIV 的 HA 全序列的引物,正链引物为 5-CCAGT CAAAA TGGAAACAATA-3,负链引物为 5-TG GTTCTGCCAATTATATACA-3,扩增片段大小为 1.7kb。引物合成由生工生物工程(上海)有限公司完成。

1.6 RT-PCR 扩增

采用一步法 RT-PCR 反应体系,在 0.2mL 反应管中依次加入 4 μ L RT Buffer (5 \times), 3 μ L PCR Buffer (10 \times), 200 μ mol/L dNTP 混合物, 1.5 mmol/L MgCl₂, 1 μ L RNA 酶抑制剂,正链和负链引物各 15pmol, 5U AMV 反转录酶, 1.5U Platinum Taq DNA 聚合酶, RNA 模板各 50ng, 补 ddH₂O 至 50 μ L。于 42 $^{\circ}$ C 30min, 95 $^{\circ}$ C 10min, 然后 95 $^{\circ}$ C 15s, 59 $^{\circ}$ C 15s, 72 $^{\circ}$ C 10s, 共 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 2min。反应结束后取 10 μ L 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳-溴化乙锭染色分析。AIV H₉ 亚型 HA 全序列的扩增按常规 RT-PCR 进行^[10]。

1.6.1 特异性试验:分别提取 AIV、EDSV、NDV、IBV、IBDV、REV、ReoV 及 SPF 鸡肌肉组织的核酸进行测试。

1.6.2 敏感性试验:将 H₉ 和 H₅ 亚型 AIV 的新鲜鸡胚尿囊液混合物用 ddH₂O 以 1:10 系列稀释,提取模板 RNA,用核酸蛋白测定仪(型号 GBC Cintra 10e)定量,然后进行测试。

1.6.3 扩增产物克隆鉴定:将两个亚型扩增产物和 H₉ 亚型 HA 全序列扩增产物分别用 DNA 柱式离心回收试剂盒回收,与 PMD18-T vector 连接,转化宿主菌 DH5。挑取白色菌落用 LB 液体培养基增菌,少量提取质粒^[10],用限制性内切酶鉴定。

1.6.4 序列分析:将酶切鉴定为阳性的重组质粒测序,推导氨基酸顺序,并用 Oligo6.3 软件分析引物与 H₉、H₇ 和 H₅ 亚型 AIV 的 HA 基因的互补特性。

2 结果

2.1 特异性

通过 2% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色分析,结果表明, H₉ 和 H₅ 亚型 AIV 的扩增产物大小分别在 570bp 和 170bp 左右,与设计要求一致,见图 1。通过测序分析,两个扩增产物均为特异性序列。

对 3 个低致病性 H₉ 亚型 AIV 分离物亦能够扩增到目的条带。

2.2 敏感性

从 AIV 鸡胚尿囊液中提取 50pg 总 RNA 亦能扩增到目的条带, H₉ 和 H₅ 亚型 AIV 的 RNA 混合物与单一模板 RNA 的扩增效率一样, 见图 2。

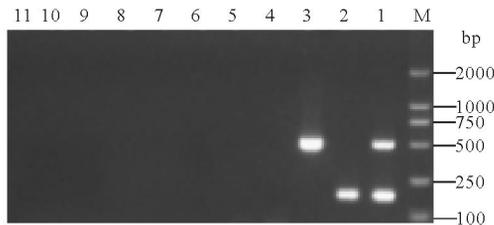


图 1 引物的特异性

Fig. 1 Specificity of diagnostic primer

M. DL2000 marker; 1. AIV (H₉/H₅); 2. AIV (H₅); 3. AIV (H₉); 4. EDSV; 5. NDV; 6. IBDV; 7. IBV; 8. ReoV; 9. REV; 10. SPFchicken muscle; 11. normal egg allantoic fluid

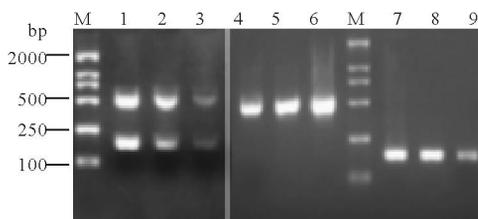


图 2 一步法 RT-PCR 测定 AIV 总 RNA 的敏感性

Fig. 2 Sensitivity of one-step RT-PCR for total RNA of AIV

M. DL2000 marker; 1. 5ng (H₉/H₅); 2. 0.5ng (H₉/H₅); 3. 50pg (H₉/H₅); 4. 50pg (H₉); 5. 0.5ng (H₉); 6. 5ng (H₉); 7. 5ng (H₅); 8. 0.5ng (H₅); 9. 50pg (H₅)

2.3 扩增产物克隆及酶切鉴定

通过 *EcoRI* 和 *HindIII* 双酶切鉴定, 获得了含 H₅ 和 H₉ 亚型 AIV 的特异产物的重组质粒, 分别命名为 pHB305 和 pHB306, 见图 3。按照常规 RT-PCR 扩增了 H₉ 亚型 AIV 的 HA 基因全序列, 用 *SalI* 和 *BamHI* 双酶切鉴定, 获取重组质粒, 命名为 pHB307, 见图 4。

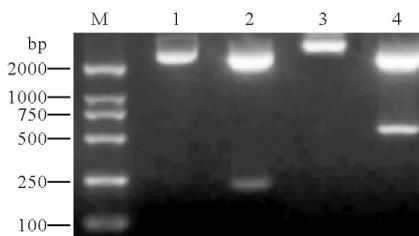


图 3 扩增产物重组质粒的酶切鉴定

Fig. 3 Identification of PCR products in recombinant plasmid by restriction endonuclease

M. DL2000 marker; 1. pHB305; 2. pHB305 (*EcoRI*/*HindIII*); 3. pHB306; 4. pHB306 (*EcoRI*/*HindIII*)

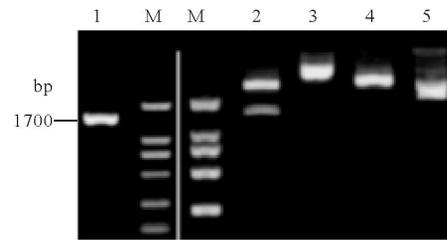


图 4 H₉ 亚型 AIV HA 基因扩增及重组质粒的酶切鉴定

Fig. 4 Amplification of HA gene of AIV (H₉) and Identification of recombinant plasmid by restriction endonuclease

M. DL2000 marker; 1. amplicon for HA gene; 2. pHB307 (*SalI*/*BamHI*); 3. pHB307; 4. pUC19 (*SalI*/*BamHI*); 5. pUC19

2.4 序列分析

图 5 列出了根据 H₉ 和 H₅ 两个亚型扩增产物的测序结果推导氨基酸序列, 其中 H₉ 亚型 HA 裂解位点的氨基酸序列为³³³ N-PARSSR GLF-COOH³⁴¹, H₅ 亚型 HA 裂解位点的氨基酸序列³³⁷ N-PQRERRR KKR GLF-COOH³⁴⁹。测定的 H₉ 亚型 AIV 的 HA 全序列已录入 GenBank, 登录号为 A Y949989。

H₉ subtype

N-SMPFHNHPIQDAQYTNNRGKSLFMWFNHPPTDVTQTNLYT
RTDITTSVATEDINRTRPLIGRPLVNGQQGRIDY YWSVLKPGQT
LRVRSNGNLIAPWYGHILSGESHGRILKTDLNSGNCVQCCQTERG
GLNTLPLFHNVSKYAFGNCPKYVGVKSLKLAVGLRNVPARSSRG
LFGAIAAGFIEGGWQG-COOH

H₅ subtype

N-SMPFHNHPLTIGECPKYVKSNRNLVATGLRNTPQRERRRKRKRG
LFGAIAAGFIEGGWQG-COOH

图 5 扩增产物测序推导的氨基酸序列

Fig. 5 Amino acid sequences through Sequencing of PCR products

2.5 引物与靶序列的互补特性

经比较, 该对引物与 GenBank 上录入的 H₅ 亚型 AIV 的 HA 序列高度同源, 而与 H₇ 亚型 HA 基因无任何交叉互补性。以能检测到目的条带的 AIV 毒株 A/Chicken/shandong/2/02 (H₉N₂) 的 HA 基因序列作为参照, 用 Oligo6.3 软件分析检测引物与 H₉ 亚型毒株的相应位置序列的互补性, 结果发现, H₉ 亚型各毒株间 HA 基因扩增区域较为保守, 特别是引物的 3-端与互补序列的同源性亦很高。表 1 列出了引物与各毒株 HA 序列的互补性。

3 讨论

鉴于 H₉ 和 H₅ 亚型 AIV 在中国地区流行及重要的公共卫生意义, 很有必要对这两个亚型 HA 进

表 1 引物的互补特性
Table 1 Complementarity of primers

GenBank accession number	Strain of virus	G (kcal/mol)		GenBank accession number	Strain of virus	DG (kcal/mol)	
		Forward primer	Reverse primer			Forward primer	Reverse primer
A Y949989	A/ Chicken/ shandong/ 2/ 02	-5.1	-19.8	AF461520	A/ Chicken/ Shandong/ 1/ 98	-8.3	-19.8
A Y664665	A/ chicken/ Hong Kong/ FY23/ 03	-6.4	-19.8	AF461532	A/ Chicken/ Shanghai/ F/ 98	-6.4	-19.8
A Y281745	A/ Chicken/ Shang Hai/ 1/ 02	-5.1	-19.8	AF536698	A/ Chicken/ Shandong/ 98	-6.4	-19.8
A Y594195	A/ chicken/ Hebei/ 1/ 01	-5.1	-19.8	A Y623810	A/ chicken/ Beijing/ 9/ 98	-6.4	-19.8
A Y083840	A/ Chicken/ Shanghai/ 3/ 01	-6.4	-19.8	A Y743216	A/ Chicken/ Shanghai/ F/ 98	-6.4	-19.8
AF461513	A/ Chicken/ Gangxi/ 1/ 00	-6.4	-19.8	AF156373	A/ Chicken/ Hong Kong/ G9/ 97	-6.4	-19.8
AF508567	A/ Chicken/ Henan/ 62/ 00	-5.1	-19.8	AF508564	A/ Chicken/ Guangdong/ 11/ 97	-5.1	-19.8
AF461531	A/ Chicken/ Hebei/ 2/ 00	-5.1	-19.8	AF508566	A/ Chicken/ Heilongjiang/ 10/ 97	-6.4	-19.8
AF461518	A/ Chicken/ Liaoning/ 1/ 00	-5.1	-19.8	AF461530	A/ Chicken/ Beijing/ 1/ 97	-6.4	-19.8
A Y206677	A/ chicken/ Hong Kong/ WF2/ 99	-6.4	-19.8	AF508569	A/ Chicken/ Sichuan/ 5/ 97	-6.4	-19.8
A Y036880	A/ Chicken/ Guangxi/ KMI/ 99	-5.1	-19.8	AF508572	A/ Chicken/ Shenzhen/ 9/ 97	-6.4	-19.8
AF461516	A/ Chicken/ Henan/ 1/ 99	-6.4	-19.8	AF536692	A/ Chicken/ Guangdong/ 97	-6.4	-19.8
AF461521	A/ Chicken/ Shandong/ 2/ 99	-6.4	-19.8				

行鉴别。经典的 AIV HA 亚型鉴定方法有血凝试验、血凝抑制试验、单抗 ELISA 等,需要针对不同亚型病毒分别进行测试^[11]。荧光 RT-PCR 的发展使 AIV 核酸检测更加快捷^[12],但需要专用的仪器,检测成本偏高,一般的实验室难于推广。传统的 RT-PCR 仍然是较为理想的检测方法,而采用多重 RT-PCR 进行分子鉴别大大简化了试验操作,并已有分别设计引物进行基因检测的报道^[9]。此次根据 AIV 的 HA 基因的相似性设计了 1 对引物建立的一步法 RT-PCR,对 H₉ 和 H₅ 亚型 AIV 的 HA 扩增片段大小分别为 579bp 和 177bp。通过对扩增产物重组质粒的酶切及测序分析,结果表明两个亚型的扩增片段均为特异产物。该引物与鸡的几种病毒包括 EDSV、NDV、IBV、IBDV、REV、ReoV 以及 SPF 鸡肌肉组织的核酸均无交叉反应。从病毒尿囊液中提取 50pg 的 AIV 总 RNA 亦能扩增到目的条带,经凝胶电泳染色很容易将两个亚型的检测产物区分开。试验结果表明,所建立方法特异性和敏感性都较高。

由于试验中对两个亚型的测试毒株较少,所以比较了 GenBank 中收录的病毒株以预测检测引物的特异性。分析结果发现,所设计的引物与 H₅ 亚型 AIV 的 HA 序列高度同源,与 H₇ 亚型 AIV 的 HA 序列无互补可能性。将 H₉ 亚型试验毒株(A/ Chicken/ shandong/ 2/ 02)的 HA 序列进行扩增、测

序,确定了检测引物所在的位置,并比较了表 1 中列出的 AIV 毒株的 HA 的互补性,结果表明,H₉ 亚型 AIV 各毒株间的 HA 基因保守,特别是引物 3 端与互补序列的同源性亦很高。这些数据表明,该引物的特异性好,可以用于 AIV 的 H₉ 和 H₅ 亚型血凝素的分子分型。

AIV 各个病毒株的毒力差异很大,H₅ 亚型 AIV 亦有低致病力和高致病力毒株存在。HA 对病毒的致病性起关键作用,未裂解的 HA 无传染性,只有 HA 裂解为 HA₁ 和 HA₂,暴露融合肽段,病毒才能通过融合进入宿主细胞。已知高致病力毒株与低致病力毒株的 HA 裂解位点的氨基酸序列有差异,前者富含 Arg 或 Lys 等碱性氨基酸。而低致病力毒株缺乏 Arg 或 Lys 等氨基酸的重复,切割效率极低,不易裂解^[11]。因而世界动物卫生组织(OIE)对高致病性 AIV 的判定依据除了动物和细胞培养接种试验外,还对病毒 HA 裂解位点的氨基酸序列进行分析,如果 HA 裂解位点有 Arg、Lys 等碱性氨基酸重复出现,则具有潜在的高致病性。本次试验设计的扩增产物中均包含了裂解位点在内的基因片段,经测序推导出氨基酸序列就可以判断 H₅ 或 H₉ 亚型禽流感病毒的致病性高低。试验中所用的 H₉ 亚型病毒株(A/ Chicken/ shandong/ 2/ 02)的 HA 裂解位点的氨基酸为³³³N-PARSSR-GLF-COOH³⁴¹,为低致病力病毒,而 H₅ 亚型毒株(A/ duck/ China/ QJ/ 01)的 HA

裂解位点的氨基酸序列为³³⁷ N-PQRERRRKKR GLF-COOH³⁴⁹,系高致病力毒株的特征。

此次建立的一步法 RT-PCR 只用 1 对引物,在一次反应中就能同时检测两个亚型病毒,整个试验过程在数小时内即可完成,与 RT 和 PCR 分步进行的检测方法相比,操作更加简便,进一步提高了检测效率,为禽流感特别是高致病性禽流感的防制提供了有效的早期快速诊断和监测手段。

参考文献

- [1] Saif Y M, Barnes H J, Glisson J R. Disease of poultry[M]. 11th ed. Iowa: Iowa State University Press, 2002. 135-160.
- [2] 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): 288-297.
- [3] Chen H, Deng G, Li Z, *et al*, The evolution of H5N₁ influenza viruses in ducks in southern China [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(28): 10452-10457.
- [4] Capua I, Alexander D J. Avian influenza: recent developments [J]. Avian Pathol, 2004, 33(4): 393-404.
- [5] Normile D. Avian flu. Mild illnesses confound researchers[J]. Science, 2005, 307(5706): 27.
- [6] 郭元吉,温乐英,王敏,等. 从人分离出两株甲型流感 H9N2 亚型毒株内部基因特性的研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2003, 17(3): 225-228.
- [7] Lee M S, Chang P C, Shien J H, *et al*, Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR [J]. J Virol Methods, 2001, 97(1-2): 13-22.
- [8] 刘 燕, 钱爱东. 禽流感病毒 H5 和 H9 亚型 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 吉林农业大学学报, 2004, 26(1): 93-96.
- [9] Payungporn S, Phakdeewirot P, Chutinimitkul S, *et al*, Single-step multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for influenza A virus subtype H5N1 detection[J]. Viral Immunol, 2004, 17(4): 588-593.
- [10] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [11] Swayne DE, Glisson J R, Jackwood M W, *et al*, A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens [M]. Fourth ed. Florida: The American Association of Avian Pathologists, 1998.
- [12] Spackman E, Senne D A, Myers T J, *et al*, Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(9): 3256-3260.