

【论著】

从鸟类中分离到的 H1N1流感病毒株的鉴定

华柳, 程凯, 杨继红*, 赵以军

(华中师范大学生命科学院水生生态与工程重点实验室, 武汉 430079)

[摘要] 目的:对采集新鲜鸟粪便中甲型流感病毒进行检测、分离和鉴定。方法:采用鸡胚进行病毒分离,采用血凝试验初步确定病毒效价,用逆转录聚合酶链反应法(RT-PCR)扩增分离株的部分片段后进行克隆和测序,然后进行进化树分析。结果:从采集的80份新鲜鸟粪便中分离到一株低致病性流感病毒,其编号为WH-1,测出的部分NP基因序列经Blast比较,与A/Canterbury/106/2004/H1N1的同源性最高,核苷酸为99%,氨基酸为100%,与GenBank中收录的AV其它病毒株NP基因相应片段的同源性在96%以上。结论:分离得到WH-1为一株新的甲型流感分离毒株,该分离株可以用RT-PCR方法进行检测。

[关键词] 甲型流感病毒; RT-PCR; 克隆

[中图分类号] R373.1⁺3

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-8685(2008)06-0990-03

Isolation and identification of H1N1 influenza A virus in birds

Hua Liu, Cheng Kai, Yang Ji-hong*, Zhao Yi-jun

(Huazhong Normal University, Wuhan 430079, China)

[Abstract] **Objective:** To isolate and detect influenza A virus from fresh bird excrement and identify its genotype. **Methods:** Cock embryo was used to isolate influenza viruses, and the virus titer was determined through hemagglutination test. The gene was amplified by RT-PCR technique from the isolated strain and sequenced, and the gene phylogenetic tree was analyzed. **Results:** A positive strain of avian influenza virus was isolated from 80 fresh bird excrement, named WH-1, and the nucleotide and amino acids sequence showed the highest homology with A/Canterbury/106/2004/H1N1 strain, and identities were 99% and 100%, respectively. **Conclusion:** The acquired WH-1 is a new influenza A virus isolated strain and it can be detected by RT-PCR.

[Key words] Influenza A virus; RT-PCR; Clone

禽流感(Avian Influenza, AI)是由甲型流感病毒所引起的各种家禽及野生禽类感染疾病综合征^[1]。根据其表面糖蛋白血凝素蛋白(Hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(Neuraminidase, NA)的抗原关系不同,目前可分为16种HA亚型和9种NA亚型^[2,3]。近几年来,南亚国家屡有禽流感病毒突破种间屏障作用,直接感染人类或其它哺乳动物,甚至致人死亡事件^[4-6]的情况发生。高致病性禽流感病毒对养殖业具有毁灭性打击,因而被国际兽疫局规定为A类疾病;低致病性禽流感病毒虽然对家禽的致死性较低,但可导致产蛋下降,并造成免疫抑制,进而导致复合感染,对养殖业造成的经济损失同样相当可观^[7]。于康震等人的研究表明,近年来在我国许多地区都广泛存在着低致病性禽流感病毒的流行^[8],引起了国内兽医界的高度重视^[8]。我国自1993年以来在鸡、鸭、鹅、鸽等家禽中经血清学调查证实有AV(Avian Influenza virus)阳性禽群存在或已分离到A型禽流感毒。据报道,迄今为止,我国已分

离的AV有H4、H5、H7、H9和H14等亚型,给我国养殖业的可持续发展构成极大威胁。我们对分离到的WH-1毒株的部分NP基因进行了克隆,通过与数据库中序列的比较分析,发现该毒株为新的分离株,同时建立了该毒株的RT-PCR检测方法。

1 材料与方 法

1.1 病毒及临床样品

2006年9月份到12月份在华中师范大学南湖校区采集新鲜鸟粪80份,并作好标记;甲型流感病毒阳性对照样品由湖北省疾病预防控制中心提供。9日龄鸡胚,来杭鸡,购自华中农业大学种鸡场。

1.2 试剂

氯仿、异丙醇、75%酒精、dNTPs、AMV反转录酶、TaqDNA聚合酶、DNAmaker、5xRTbuffer、10xbuffer、DEPC水、X-Gal、IPTG、AMP、TRzol和pGEM-Teasy vector购自Promega公司,其余试剂均为分析纯。

1.3 粪便样品的RT-PCR检测

将5g采集的鸟粪样品置于5ml离心管中,加入生理盐水3ml,3000 r/min离心10 min,取上清。采用1.6中TRzol

[基金项目] 湖北省科技攻关计划重大招标项目(2006AA305A04)

[作者简介] 华柳(1980-),男,在读硕士生,主要从事微生物遗传研究。

* 通讯联系人, E-mail: cdcyang@163.com

方法分别提取 80 个粪便样品中的总 RNA,再按照如下方法进行 RT-PCR 扩增:

选择 NP 基因逆转录引物 5'-AGCAAAAGCAGGGT-3', PCR 引物为甲型流感病毒 NP 基因特异性引物: 5'-GCTTAA-CAATAGAGAGAAATGGTG-3', 5'-TCCATTCCTGCGGAA-CAAGAGC-3' (金红等文献中报道), 由上海 invitrogen 公司合成。RT-PCR 反应体系, 第一步: 5 × RT PCR buffer 2 μl, dNTP 2.5 mmol/L 1 μl, RNA 酶抑制剂 (40 U/μl) 1 μl, AMV 反转录酶 (5 U/μl) 1 μl, 逆转录引物 1 μl, RNA 5 μl, 反应体系 20 μl, 反应条件: 42 °C, 60 min。第二步: 10 × PCR buffer (Mg²⁺ free) 5 μl, Mg²⁺ 3 μl, dNTP 2.5 mmol/L 2 μl, TaqDNA 聚合酶 (5 U/μl) 1 μl, 上游引物 (20 μmol/L) 1 μl, 下游引物 (20 μmol/L) 1 μl, 逆转录产物 3 μl, DEPC 水 34 μl, 反应总体积 50 μl。反应条件: 95 °C 1 min, 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 7 min, 4 °C 或 -20 °C 保存。取 5 μl PCR 产物进行电泳分析, 预期条带大小为 300 bp。

1.4 鸡胚接种试验

选择 RT-PCR 检测出的阳性样品 (仅一例, 编号为 20061106), 加入生理盐水 3 ml, 3000 r/min 离心 10 min, 取 0.2 ml 上清接种到 9 日龄鸡胚尿囊腔, 37 °C 孵育, 每天照胚 4 次, 弃去 24 h 内死亡鸡胚, 将 48~72 h 后的鸡胚置于 4 °C 冰箱过夜, 然后收获尿囊液, 并观察记录鸡胚病变。对照组为每枚接种 0.2 ml 生理盐水, 上述试验组和对照组均设三个平行。

1.5 血凝试验 (HA)

用制备的 1% 鸡红细胞悬液, 应用微量法测定鸡胚尿囊液的血凝效价。

1.6 鸡胚尿囊液总 RNA 的提取和 RT-PCR

在 1.5 ml 的 eppendorf 管中加入病毒原液 (收获的尿囊液 3000 r/min 离心 5 min 取上清) 500 μl, 再加入 TRIzol 500 μl, 充分混匀, 室温放置 10 min。加入 200 μl 的氯仿, 盖紧离心管盖, 用力震荡离心管, 室温放置 10 min。离心 4 °C、13000 r/min, 15 min, 取上层液相移入另一管。加入等体积异丙醇, 轻轻颠倒离心管充分混匀液体, 室温放置 10 min。离心 4 °C、13000 r/min, 15 min, 用枪小心吸去所有上清。1 ml 75% 乙醇洗一遍, 离心 4 °C、8000 r/min, 10 min, 用枪小心吸去所有上清, 在超净台中干燥 5 min 后加入 50 μl DEPC 处理水。以上述提取的总 RNA 为模板, 采用 1.3 中所述的方法进行 RT-PCR。

1.7 NP 基因的克隆

上述 RT-PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶回收试剂盒进行纯化, 回收产物与 pGEM-Teasy 载体于 16 °C 连接过夜, 转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 37 °C 培养 16 h。经含 Amp^r、X-gal 和 IPTG 的 LB 平板筛选后, 用 PCR 方法对重组质粒进行鉴定, 筛选出含有正确插入片段的重组质粒。测序工作由上海 invitrogen 公司进行序列测定。

1.8 序列比较分析

将测序结果用 DNA star 的 MegAlign 软件进行序列比对分析, 参考 GenBank 中已公布的毒株序列。

2 结果

2.1 粪便样品的 RT-PCR 检测结果

从采集的 80 份鸟粪样品中, 提取 RNA, 能成功检测出一份阳性样品, 其 RT-PCR 扩增出一条 300 bp 条带, 与预期结

果相符。

2.2 病毒的分离和增殖

20061106 号鸟粪样品能够在 36~48 h 内使 9 日龄鸡胚全部死亡, 死亡鸡胚全身充血, 其尿囊液清亮, 能凝集红细胞, 凝集效价达 2⁶ 以上, 而对照鸡胚全部存活。将所得的病毒分离株命名为 WH-1。

2.3 WH-1 毒株部分 NP 基因的 RT-PCR 扩增及阳性克隆的鉴定

NP 基因的 RT-PCR 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳显示, 扩增片段大小与预期的目的条带大小相符, 约为 300 bp, 见图 1。

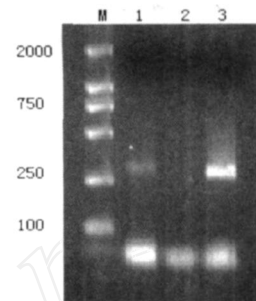


图 1 WH-1 毒株 NP 基因 RT-PCR 扩增产物的电泳结果
M 为 DL2000maker, 1 为阳性样品, 2 为阴性对照, 3 阳性对照

2.4 序列测定

序列测定结果表明, 我们正确克隆了该毒株的部分 NP 基因, 该序列为 300 bp。GCTTAA CAATAGAGAAATGGTGCTCTCTGCTTTCGATGAGGAGAAATAAATCTGGAA GAACATCCCA GCGCGGGGAAA GATCCTAA GAAACTGGA GGACCCA TATACAAA GAGTA GTGAAA GTGGGTGA GGGAACTCGTCCTTTATGACAAA GAA GAAA TAA GCGCGA TTTGCGCCAA GCCAACATGTTGTA TGA TGCAACGCGCTGGCTTGACTCACA TTA TGA TCTGCA TTCTAA TTTGAA TGA TACAAC TTA CCA GAGGACAA GAGCTCTTGTTTCGACCCGAA TGG。

2.5 进化树的绘制

见图 2。

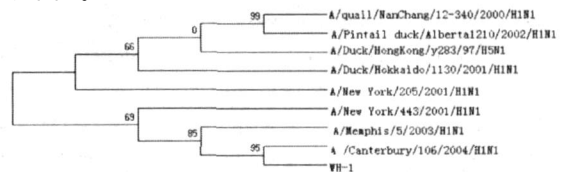


图 2 部分流行毒株的进化树

3 分析与讨论

甲型流感病毒由 8 个单独的单链 RNA 片段组成, NP 由 RNA 的第五节段基因编码 NP 是流感病毒的主要结构蛋白, 与病毒的 RNA 多聚酶复合体和 RNA 节段相连形成核糖核蛋白, 因此, 它不仅与流感病毒基因组的复制和转录有关, 在流感病毒的诊断和免疫方面也有重要意义^[9-10]。但值得一提的是, 由于 NP 基因的高度保守性, 可作为 A 抗原。本实验成功克隆出了 WH-1 分离毒株部分 NP 基因序列, 并与数株 H1N1 亚型 A/V 的 NP 基因进行了核苷酸和氨基酸的同源性比较, 序列分析显示 NP 核苷酸同源性为 96%~99%, 氨基酸同 (下转第 1015 页)

2.6 单抗 1B7识别抗原的分子量

采用胃癌细胞 N87总蛋白进行 Western blotting,结果显示 1B7单抗可识别其中约 32kDa大小的蛋白条带(图 4),其识别的抗原的相对分子质量约为 32kDa。

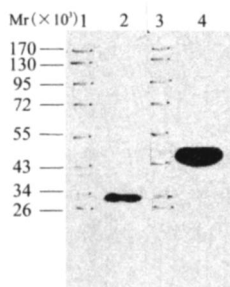


图 4 免疫印迹检测 1B7识别的抗原的分子量

1, 3. mark; 2. 1B7; 4. β -actin

3 讨论

肿瘤分子靶向治疗因其疗效明确、毒副作用低近年来备受人们青睐,开拓了肿瘤治疗的新纪元,而发展新的靶向治疗策略和药物的关键在于发现新的靶标。目前已报道的肿瘤相关基因/蛋白的筛选技术方法主要有抑制性削减杂交、基因表达系列分析、DNA微阵列、差异蛋白质组学、噬菌体展示文库、杂交瘤技术等。这些技术虽然能分离到一些肿瘤差异表达基因,但难以确定其有无功能,随后还必须进行大量的功能筛选和鉴定,才能在这些众多的差异基因中确定哪些是在肿瘤发生发展过程中发挥重要作用的功能性基因。传统的抗肿瘤细胞单抗制备方法因库容量较小,通常仅能获得与肿瘤阳性反应的单抗,难以获得大量抑制肿瘤生长转移的功能性单抗。2004年 Eustace等采用大规模制备抗肿瘤单抗库结合光灭活直接功能性筛选的方法从 1152株单抗中获得了 3个肿瘤转移相关的功能性基因^[8],证明通过建立大容量单抗库筛选获得肿瘤相关的功能基因和靶点是一条可行的技术路线,但该方法的筛选效率尚有待提高。

本研究以人胃癌细胞免疫小鼠制备获得了 1012株单抗,

其中 252株可与人胃癌细胞膜结合,经正常组织免疫组化筛选后仍获得了 145株克隆可能具有肿瘤特异性。细胞增殖实验发现其中至少有 11株单抗在体外能够显著地抑制胃癌细胞的增殖。选择抑制作用较强的单抗 1B7进行纯化,在浓度为 100、50、25 mg/ml时对胃癌细胞增殖的体外抑制率分别为 40%、35%、17% ($P < 0.05$),具有较好的剂量依赖关系。Western blotting实验证明该单抗识别的抗原的相对分子质量约为 32kDa。这些结果验证了我们所获得的多株单抗在体外能够抑制胃癌细胞的生长,它们识别的抗原可能在胃癌发生发展过程中发挥了重要作用,可能具有作为胃癌靶向治疗靶标的潜力。

[参考文献]

- [1] Ling Yang. Incidence and mortality of gastric cancer in China [J]. World J Gastroenterol, 2006, 12 (1): 17 - 20.
- [2] Van Cutsem E, Moiseyenko VM, Tjulandin S, *et al*. Phase III study of docetaxel and cisplatin plus fluorouracil compared with cisplatin and fluorouracil as first-line therapy for advanced gastric cancer: a report of the V325 Study Group [J]. J Clin Oncol, 2006, 24: 4991 - 4997.
- [3] Engel RH, Kaklamani VG. HER2 - positive breast cancer: current and future treatment strategies [J]. Drugs, 2007, 67 (9): 1329 - 1341.
- [4] Hwuwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, *et al*. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer [J]. N Engl J Med, 2004, 350: 2335 - 2342.
- [5] Zhang Y, Ran Y, Yu L, *et al*. Monoclonal antibody to human esophageal cancer endothelium inhibits angiogenesis and tumor growth [J]. Anticancer Res, 2006, 26 (4B): 2963 - 2970.
- [6] 孙立新, 冉宇靓, 胡海, 等. 靶向 HER2的抑制胃癌细胞功能性单抗的制备和鉴定 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2008, 15 (1): 14 - 19.
- [7] 朱立平, 陈学清. 免疫学常用实验方法 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2000: 69 - 71.
- [8] Eustace BK, Sakurai T, Stewart JK, *et al*. Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for hsp90 α in cancer cell invasiveness [J]. Nature Cell Biol, 2004, 6 (6): 507 - 514.

(收稿日期: 2008 - 04 - 08)

(上接第 991页)

源性为 99% ~ 100%, 序列分析同时还表明, 分离株与 A/Canterbury/106/2004/H1N1的同源性最高, 核苷酸为 99%, 氨基酸为 100%, 此 NP克隆基因序列均无插入或缺失变异, 仅存有点突变, 这些变异的机理及意义目前尚不清楚, 推测这些变异可能不会影响 NP分子的构象和功能, A/M分离株 NP成功克隆进一步证实了 NP的高度保守性, 它亦为进一步研究 NP与宿主特异性的关系, NP基因在病毒感染中的作用以及禽流感的诊断和免疫奠定基础。

[参考文献]

- [1] 甘孟侯. 禽流感 [M]. 第 2版. 北京: 北京农业大学出版社, 1995: 74 - 78.
- [2] Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, *et al*. Evolution and ecology of influenza A viruses [J]. Microbiol Rev, 1992, 56: 152 - 179.
- [3] Fouchier RAM, Munster V, Wallensten A, *et al*. Characterization of a novel influenza avirus hemagglutinin in subtype (H16) obtained from black headed gulls [J]. Virology, 2005, 79: 2814 - 2822.
- [4] Hatta M, Gao P, Halfmann P, *et al*. Molecular basis for high virulence of HongKong H5N1 influenza A viruses [J]. Science, 2001, 293 (5536): 1840 - 1842.

- [5] Guan Y, Shortridge KF, Krauss S, *et al*. Molecular characterization of H9N2 influenza viruses were they the donors of the "internal" genes of H5N1 viruses in HongKong? [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 9363 - 9367.
- [6] Nguyen DC, Uyeki TM, Jadhao S, *et al*. Isolation and characterization of avian influenza viruses, including highly pathogenic H5N1, from poultry in live bird markets in Hanoi, Vietnam, in 2001 [J]. J Virol, 2005, 79: 4201 - 4212.
- [7] 卡尔尼克·高福, 刘文军, 译. 禽病学 [M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1991: 455 - 471.
- [8] 于康震, 崔尚全, 付朝阳, 等. 禽流感与养禽业发展与人类健康 [J]. 中国预防兽医学报, 2000, 22 (4): 312 - 315.
- [9] Scholtissek C, Ludwig S, Fitch WN. Analysis of influenza A virus nucleoproteins for the assessment of molecular genetic mechanism leading to new phylogenetic virus lineages [J]. Arch Virol, 1993, 131 (324): 237 - 250.
- [10] Varekova E, Tkacova M, Mattila ML, *et al*. Comparison of 44/107 Lone step immunocapture enzyme immuno assay and time resolved fluoro immuno assay for influenza A diagnosis [J]. Virol Methods, 2001, 91 (2): 131 - 137.

(收稿日期: 2008 - 02 - 15)