

文章编号:1002-2694(2007)03-0211-03

福建省人感染 H5N1 禽流感病毒血凝素基因测定和分析*

翁育伟,严延生,杨式芹,张志珊,谢剑锋,吴冰珊,沈晓娜

摘要:目的 了解我省人感染高致病性禽流感 H5N1 亚型病毒血凝素基因的特点以及和其他毒株序列间的关系。方法 从采集自两例福建省感染者的标本中扩增 H5N1 禽流感病毒血凝素基因并作序列测定,获得的序列同其他 H5N1 禽流感病毒的血凝素基因进行比较并作进化分析。结果 获得福建省的两例感染者中的 H5N1 禽流感病毒血凝素基因,并推导出该基因的氨基酸序列。结果表明,两株病毒的血凝素基因在蛋白酶水解位点均含有多个连续的碱性氨基酸,符合高致病性禽流感病毒的特征。经 Blast 程序检索发现,我省两例感染者与国内其他省份的感染者携带的病毒血凝素基因具有很高的相似性,提示国内的 H5N1 禽流感病毒感染者的病毒来源可能有一定的关系。结论 通过对两例福建省感染者标本中的 H5N1 禽流感病毒血凝素基因进行序列测定,了解病毒基因的部分特点。通过序列比较分析为分子流行病学调查提供线索,但还需对其他基因序列以及病毒的致病性等生物学特征作进一步分析。

关键词:禽流感病毒;H5N1;血凝素基因;序列测定;进化分析

中图分类号:R373.1 **文献标识码:**A

Sequencing and analysis of HA gene of Avian influenza H5N1 subtype virus from two human infections found in Fujian province

WENG Yur-wei, YAN Yan-sheng, YANG Shi-qin, ZHANG Zhi-shan,
XIE Jian-feng, WU Bing-shan, SHEN Xiao-na

(Fujian Provincial Center for Disease Prevention and Control, Fuzhou 350001, China)

ABSTRACT:To characterize the hemagglutinin (HA) gene of high pathogenic avian influenza viruses (HPAIV) H5N1 in Fujian province and to analyse the phylogenetic relation with other H5N1 viruses isolated previously. Viral HA gene segments were amplified from the respiratory specimen collected from two human cases, and the product were cloned into plasmid followed by sequencing and comparison with other viral sequence data released previously. A multiple basic residual motif was found in hydrolysis site in two obtained viral HA sequences, which was consistent with the feature of high pathogenicity. By blasting throughout the GenBank and the phylogenetic analysis, the closest related virus sequences were those from the infected persons in Guanxi and Anhui provinces. This result implicates that those viruses, caused human infected, might be close related genetically, but the circulated status were still unclear. Meanwhile, according to the reconstructed phylogenetic tree, there were three groups (Gps) in the viruses participated in the comparison, which was inconsistent with the previous study. The global migratory route of the wild birds and the pattern of poultry raised might contribute to the genetic complexity of avian influenza virus in China mainland. Of the two HPAIV strains found in Fujian, the other internal genes and viral biological feature, including pathogenic effect in animal host, need further identification.

KEY WORDS: Avian influenza virus; H5N1; hemagglutinin gene; sequencing; phylogentic analysis

自 1997 年香港首次报告人感染 H5N1 亚型高致病性禽流感病毒暴发流行以来,全球许多国家和地区先后发现该病毒感染者,同时在多种野生禽类宿主中也发现该病毒^[1]。H5N1 亚型高致病性禽流感病毒具有传播迅速、病死率高、病毒变异速度极快、宿主范围广等特点,引起全球的极大关注,甚至有些学者称 H5N1 亚型病毒将引起下次全球流感大暴发^[1]。我国作为养禽业大国,农村地区禽类饲

养多为散养,缺乏良好的饲养环境和消毒条件,容易导致家禽间的病毒传播和扩散。同时,禽类饲养以及下游的禽业加工人员处于高危状态。目前国内已有多省份报告 H5N1 亚型高致病性禽流感病例,2005 - 2006 年,福建省先后发生两例 H5N1 亚型高

*福建省科技重大专项资助(No. 2004 YZ01-2)

通讯作者:严延生, Email:yysh@pub1.fz.fj.cn

作者单位:福建省疾病预防控制中心,福州 350001

致病性禽流感病毒感染者,其中1例死亡。如何预防和控制 H5N1 亚型高致病性禽流感病毒在我国的传播流行是当前公共卫生部门的工作重点之一。从病原学角度来讲,研究病毒的生物学特征有利于控制病毒传染源,控制病毒的传播宿主,同时病毒生物学特征的研究对该病毒的致病机制研究具有极大的促进作用。此外了解病毒的分子流行病学特征,也是控制病毒传播途径的基础工作之一。基于上述原因,我们对我省发生的两例感染者的标本进行了病毒核酸扩增和序列测定,并对测定结果进行了初步分析。

1 材料和方法

1.1 材料 咽拭子标本分别采集自我省两例 H5N1 感染者。病毒 RNA 提取试剂使用 Viral RNA mini kit (Qiagen),逆转录试剂采用 SuperScript III Rnase H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen),PCR 试剂使用 Ex Taqase (TaKaRa),PCR 产物纯化、克隆试剂采用 QIAquick PCR purification kit (Qiagen),pMD18T (TaKaRa) 用于克隆 PCR 产物。实验所用引物合成自 TaKaRa 公司。其他均为常规试剂。

1.2 方法

1.2.1 病毒核酸提取及 cDNA 合成 采集自急性期的咽拭子标本用于病毒核酸的提取。为提高病毒 RNA 的浓度,样本体积按说明书推荐的两倍体积(280 μ l)加入。提取方法按试剂使用说明书,提取后的 RNA 用 35 μ l 无 Rnase 的水洗脱并加入 1 μ l Rnase inhibitor (TaKaLa, 40 units/ μ l),于 -80 $^{\circ}$ C 备用。cDNA 合成按以下方法:引物 Uni12 (5'-AGCAAA GCA GG-3', 100 μ g/ μ l) 1 μ l,提取的病毒 RNA 8 μ l, dNTP (10 mmol/L, each) 1 μ l,混合后置 65 $^{\circ}$ C 孵育 5 min,立即插入冰浴中保持 1 min,稍离心后加入以下混合物:5 $\times$ First-strand buffer 1 μ l, DTT (0.1 mol/L) 1 μ l, Superscript III reverse transcriptase (200 units/ μ l) 1 μ l, Rnase inhibitor (TaKaLa, 40 units/ μ l) 1 μ l。混匀后置 25 $^{\circ}$ C 孵育 5 min,随后置 50 $^{\circ}$ C 孵育 60 min。逆转录产物置 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.2 全长血凝素基因的 PCR 扩增 按以下各组分混合 PCR 反应混合物:10 $\times$ buffer 5 μ l, dNTP (2.5 mmol/L each) 4 μ l, MgCl₂ (25 mmol/L) 3 μ l, 引物 H5HAFull/F: (5'-AGCAAAAGCA GGG GTCCAATCTGT CAA-3', 10 μ mol/L) 和 H5HAFull/R (5'-AGTAGAACAAGGGTGT-3', 10 μ mol/L) 各 2.5 μ l, Ex Taqase (5 units/ μ l)

0.5 μ l, cDNA Template 2 μ l, H₂O 30.5 μ l。按以下反应程序进行 PCR 扩增:95 $^{\circ}$ C, 5 min, 1 个循环; 94 $^{\circ}$ C, 30 s, 50 $^{\circ}$ C, 30 s, 72 $^{\circ}$ C, 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C, 5 min, 1 个循环; 4 $^{\circ}$ C 保温。反应产物置 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.3 片段纯化和克隆 PCR 扩增产物使用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳、切胶。切下的凝胶使用 QIAquick PCR purification kit 进行回收,方法按使用说明。回收产物经电泳鉴定后进行 AT 克隆。取回收后 PCR 产物 1 μ l, pMD18T (50 ng/ μ l) 1 μ l, 连接缓冲液 1 μ l, T4 ligase 1 μ l, 去离子水 6 μ l 混合,置 16 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。取 1 μ l 连接产物加入 50 μ l DH5 α 感受态细胞,轻轻混匀后置冰上 30 min,转 42 $^{\circ}$ C 热激 45 s,立即插入冰浴并保持 2 min。加入 250 μ l SOC 液体培养基,置摇床 37 $^{\circ}$ C 震荡 45 min。取 50 μ l 涂布含 100 μ g/ml Ampicillin 并预先涂布 35 μ l X-gal (50 mg/ml)、20 μ l IPTG (100 mmol/L) 的 LB 平板,37 $^{\circ}$ C 培养过夜。挑取转化平板上的白色菌落若干,提取重组质粒并酶切鉴定,选取正确的菌落保存并提取质粒用于序列测定。

1.2.4 序列测定和分析 经鉴定后的各片段重组质粒交由北京三博远志 (Sunbio) 生物公司进行双向序列测定。测定后的各片段序列采用 Seqman 程序 (DNASTAR software package) 进行拼接并组装成完整的 HA 基因序列。根据全长 HA 阶段序列推导病毒 HA 氨基酸序列。应用 Mega (version 3.1) 软件,将两株病毒的 HA 序列同其他 H5N1 病毒 HA 基因序列进行多序列排列 (Clustal w) 后计算各序列间的遗传距离 (Kimura 2-parameter) 并构建进化树 (Neighbor Joining)。

2 结果

福建省 2 例 H5N1 感染者已经国家流感中心证实,本实验室也从感染者多种急性期标本中检出 H5N1 特异性核酸片段,2 病例所感染的病毒暂命名为 A/ Fujian/ 1/ 2005 和 A/ Fujian/ 1/ 2006。急性期咽拭子标本经病毒提取、两步法 RT-PCR 扩增后获得约 1.8 kb 的目的产物,对产物进行克隆并测序后,发现两者 HA 基因全长分别为 1776 和 1777 nt,二者之间差异为 25 nt。推导的血凝素蛋白氨基酸长度均为 567 aa,二者间有 14 aa 的差异。

分析血凝素蛋白的氨基酸序列发现,在蛋白酶水解位点 (339 - 345 aa) 附近存在连续多个碱性氨基酸的基序 (RERRRKR),根据国际兽医局采用的病毒致病性高低的判定标准,蛋白酶水解位点附近的连续多个碱性氨基酸是包括 H5、H7 亚型在内的高

致病性禽流感病毒的特征之一,以往对 H5 亚型的研究也发现有该基序存在。据此,推断我省两株人感染禽流感病毒为高致病性病毒。

经 Blast 程序检索 GenBank 中所有病毒序列发现,在感染者中获得的病毒 HA 序列中,国内其他省份感染者中发现的毒株,如 A/ Guangxi/ 1/ 2005、A/ Anhui/ 1/ 2005 等,与我省两株病毒序列一致性最高 (Identity :98 %)。源于禽类的病毒 HA 序列,相似性最高的是 A/ duck/ Fj/ 1734/ 2005 (Identity :98 %)。应用 Mega 软件分析我省两株病毒及 32 株 2005 年亚洲 H5N1 禽流感病毒 HA 序列,了解同期亚洲禽流感病毒分布及变异情况。结果 (图 1) 表明,福建和安徽、广西两省的 5 株禽流感病毒的 HA 序列相似。但与同期亚洲其他地区间的禽流感病毒如印度尼西亚、越南和泰国以及蒙古和土耳其等发现的禽流感病毒与其比较,均差距甚远。

3 讨论

据报道,1997 年至今,流行于亚欧国家和地区的人感染高致病性 H5N1 禽流感病毒的 HA 基因源于 Gs/ Gd/ 96 样病毒,经过和其他禽流感病毒发生基因重排产生多种的基因型^[8,9]。2003 年以后,Z 基因型毒株在流行中占据了主导地位^[4]。该基因型的毒株又可以分成两种独特的群,两群病毒在地理分布上具有明显的差异,即在泰国、越南等国家分离的毒株形成一群,印尼、中国大陆等国家分离的毒株属于另一群。除地理分布上的差异外,两群病毒的某些特征也具有明显的差异,如在泰国、越南分离的毒株中,由于 M2 基因突变导致病毒具有金刚烷胺类药物耐药性^[4]。从 2005 年的部分毒株 HA 基因比较来看,我省两例人感染病例中的病毒 HA 基因属于后一群,和泰国越南等地的毒株差别明显 (Dk/ Vietnam/ 568/ 05 除外)。值得注意的是,就 HA 基因的遗传距离来看,2005 年自国内的禽间分离的部分毒株同上述两群毒株间的遗传距离类似于这两群间的距离,这些毒株是否属于另外的病毒群 (图 1, group 3 ?) 还有待其他证据的支持,比如病毒间抗原差异的研究等。以上比较的结果说明在 2005 年, H5N1 禽流感病毒在国内已经具有较大的多样性,这可能和自然界中野生禽类的迁徙路径^[2]以及我国农村地区禽类的养殖模式等因素有关。

对两例感染者进行的流行病学及个案调查中,未证明有明确的禽类接触史,但病毒 HA 基因比较的结果表明,福建与安徽、广西等两省的 5 个病例携带的 H5N1 高致病性禽流感病毒毒株,在 HA 基因序列上相似。这是否提示,导致这些病例感染的 H5N1

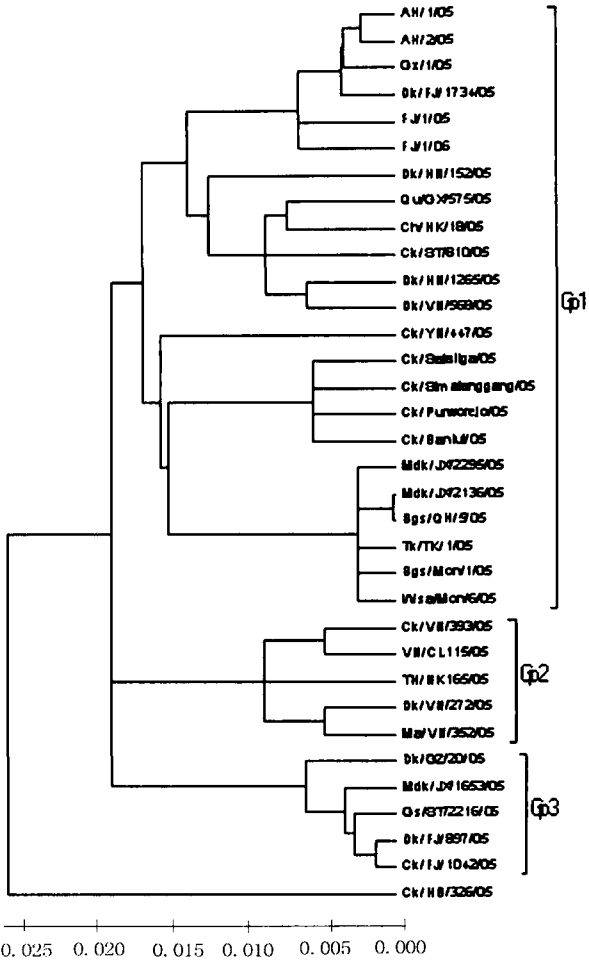


图 1 两株福建省禽流感病毒和部分 2005 年毒株 HA 基因的进化分析

图中有 4 株病毒株分离至印尼: Ck/ Salatiga/ 05, Ck/ Simalanggang/ 05, Ck/ Purworejo/ 05 和 Ck/ Bantul/ 05

Fig. 1 Phylogenetic analysis of HA gene of two Fujian isolates and some strains isolated in 2005

Dk: duck; Qu: quail; Ch: Chinese pond heron; Ck: chicken; Mdk: migratory duck; Bgs: bar-headed goose; Tk: turkey; Wsa: whooper swam; Ma: mallard; Gs: goose; AH: Anhui; GX: Guangxi; FJ: Fujian; HN: Hunan; HK: Hongkong; ST: Shantou; YN: Yunnan; JX: Jiangxi; QH: Qinghai; GZ: Guangzhou; HB: Hebei; VN: Vietnam; TK: Turkey; Mon: Mongolia; TH: Thailand. The four virus strains, Ck/ Salatiga/ 05, Ck/ Simalanggang/ 05, Ck/ Purworejo/ 05 and Ck/ Bantul/ 05, were all isolated in Indonesia.

病毒有相同的来源,或者毒株间在遗传上有更紧密的亲缘关系? 本研究从时间断面了解福建省两株 H5N1 禽流感病毒同其他病毒间的遗传关系,这为进一步研究这些病毒如何进化,以及在自然界中传播流行的状况,提供了一些线索。同时这种病毒分 (下转第 217 页)

把能表达保护性抗原的 DNA 疫苗与 BCG 联合应用,可以弥补 BCG 分泌该抗原的缺失与不足。这可能就是 DNA + BCG 序贯免疫中免疫增强效应的机制之一^[7]。有趣的是 BCG 组的 CTL 杀伤率变异系数较大,这与 Lee^[8]等人的报道相似:说明 BCG 在不同个体中分泌于胞壁外的蛋白在数量上是有所不同的,这可能是造成了 BCG 的免疫保护效果从 0%~80%不等的^[1]原因之一。

在过去几十年里,CD₈⁺ T 淋巴细胞的 CTL 活性都是采用经典的⁵¹Cr 释放法来完成。而 MTT 法较⁵¹Cr 释放试验操作简单,不存在放射性污染问题,有较多的优越性。本研究利用携带结核菌的分泌蛋白基因的重组表达质粒成功地构建了 CTL 特异性杀伤结核菌的靶细胞,为研究结核疫苗的免疫效果提供了较好的研究手段。

(同济医学院微生物教研室范雄林教授赠送 pTB30s 及 Ag85B 上下游引物,特此致谢。)

参考文献:

- [1] World Health Organization. Health system: improving performance [R]. World health report, 2000:152-164.

- [2] 范雄林,徐志凯,李元,等. 结核分支杆菌 Ag85B 分泌蛋白基因疫苗的构建和免疫原性的研究 [J]. 中华结核与呼吸杂志, 2001, 24(9):548-550.
- [3] 骆旭东,朱道银,陈全,等. Ag85B DNA 疫苗对鼠结核分枝杆菌感染的保护作用 [J]. 中华传染病杂志, 2005, 23(2):118-120.
- [4] Ko HJ, Ko SY, Kim YJ, et al. Optimization of codon usage enhances the immunogenicity of a DNA vaccine encoding Mycobacterial antigen Ag85B [J]. Infection and Immunity, 2005, 73(9):5666-5674.
- [5] Sud D, Bigbee C, Flynn JL, et al. Contribution of CD₈⁺ T cells to control of *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. J Immunol 2006, 176(7):4296-4314.
- [6] Feng CG, Palendira U, Demangel C, et al. Priming by DNA immunization augments protective efficacy of *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin against tuberculosis [J]. Infect Immun, 2001, 69(6):4174-4176.
- [7] Cai H, Yu DH, Hu XD, et al. A combined DNA vaccine-prime, BCG-boost strategy results in better protection against *Mycobacterium bovis* challenge [J]. DNA Cell Biol, 2006, 25(8):438-447.
- [8] Lee BY, Horwitz MA. Identification of macrophage and stress-induced proteins of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. J Clin Invest, 1995, 96:245-249.

收稿日期:2006-08-16;修回日期:2006-12-05

(上接第 213 页)

子流行病学的研究还能为疾病的干预提供参考,对防止造成病毒进一步流行扩散,具有重要的意义。对病毒进行全面的研究还应当包括对病毒的其他分子特征以及生物学特征的研究,如病毒致病性等。有研究表明, H5N1 禽流感病毒的致病性和多个基因的变异有关,如 HA 蛋白的受体嗜性^[6]、NA 蛋白的缺失^[8]、PB2 基因 627 位和 HA 蛋白 227 位氨基酸的突变^[5]、NS1 基因的突变^[7]等。H5N1 禽流感病毒可能可以通过在不同宿主间的传播,逐步提高其毒力^[6]。目前对福建省两例感染者中 H5N1 毒株的致病性,如这些毒株在禽类和哺乳动物间的致病性如何等尚不了解。因此,在对我省两株 H5N1 病毒的 HA 基因进行比较的初步研究基础上,对其他基因序列的特征以及病毒在哺乳动物中致病性特征研究上还有待进一步深入。

参考文献:

- [1] Monto A S. The Threat of an Avian Influenza Pandemic [J]. New England Journal of medicine, 2005, 352(4):323.
- [2] Olsen B, Munster V J, Wallensten A, et al. Global Patterns of Influenza A Virus in Wild Birds [J]. Science, 2006, 312:384.
- [3] Chen H, Deng G, Li Z, et al. The evolution of H5N1 influenza

viruses in ducks in southern China [J]. Proceedings of national academic of science of USA, 2003, 101(28):10452.

- [4] Li K S, Guan Y, Wang J, et al. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia [J]. Nature, 2004, 8:209.
- [5] Hatta M, Gao P, Halfmann P, et al. Molecular Basis for High Virulence of Hong Kong H5N1 Influenza A Viruses [J]. Science, 2001, 293:1840.
- [6] Matorovich M, Zhou N, Kawaoka Y, et al. The Surface Glycoproteins of H5 Influenza Viruses Isolated from Humans, Chickens, and Wild Aquatic Birds Have Distinguishable Properties [J]. Journal of virology, 1999, 73(2):1146.
- [7] Seo S H, Hoffmann E, Webster R G. Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine response. [J]. Nature medicine, 2002, 8:950.
- [8] The World Health Organization Global influenza program surveillance network. Evolution of H5N1 Avian influenza viruses in Asia [J]. Emerging infectious disease, 2005, 11(10):1515.
- [9] Guan Y, Peiris J S M, Lipatov A S, et al. Emergence of multiple genotypes of H5N1 avian influenza viruses in Hong Kong SAR. [J]. Proceedings of national academic of science of USA, 2003, 99(13):8950.
- [10] WHO. H5N1 avian influenza timeline. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza.

收稿日期:2006-08-17;修回日期:2006-11-17