

武军元,黄忠武,康强,等. 新疆油鸡禽流感病毒 Xj14 分离株 PA 基因的克隆与序列分析[J]. 江苏农业科学,2017,45(8):20-22.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.08.005

新疆油鸡禽流感病毒 Xj14 分离株 PA 基因的克隆与序列分析

武军元^{1,2}, 黄忠武³, 康强⁴, 姚礼文⁵

(1. 塔里木大学, 新疆阿拉尔 843300; 2. 新疆生产建设兵团塔里木畜牧科技重点实验室, 新疆阿拉尔 843300;
3. 新疆库车县动物疾病预防控制中心, 新疆库车 842000; 4. 阿克苏地区动物疫病控制诊断中心, 新疆阿克苏 843000;
5. 新疆阿瓦提县畜禽改良站, 新疆阿瓦提 843200)

摘要:为了从分子水平上掌握新疆油鸡 H9N2 亚型禽流感病毒 PA 基因的遗传进化情况,采用 RT-PCR 技术对新疆油鸡分离株 Xj14 的 PA 基因进行克隆、测序及分子进化分析,将 PA 基因的核苷酸序列和对应的氨基酸序列与 GenBank 中已经公布的参考序列进行同源性比较。结果表明,新疆油鸡分离株的 PA 基因由 2 151 个碱基组成,编码 716 个氨基酸,与 AIV A/Duck/HongKong/Y439/97 的 PA 基因处于同一分支,其核苷酸和氨基酸水平的同源性依次为 89.9% 和 96.9%,在系统进化上属于欧亚分支中的 Y439 谱系。

关键词:禽流感病毒;油鸡;PA 基因;克隆;序列分析

中图分类号: S852.65⁺7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)08-0020-03

禽流感(avian influenza,AI)是由 A 型流感病毒(avian influenza virus,AIV)引起的病毒性传染病。自 Homme 等 1966 年从威斯康辛州患有温和呼吸道疾病的火鸡中分离到第 1 株 H9N2 亚型禽流感病毒之后,该亚型病毒在世界范围内呈广泛流行的趋势^[1-4]。我国 1994 年首次从广东省的发病鸡群中分离到 H9N2 亚型禽流感病毒^[5-6],1998 年首先报道 H9N2 亚型 AIV 可以感染人^[7],1999 年我国香港地区发生了人感染 H9N2 的病例^[8]。进一步的研究结果表明,1997 年我国香港地区感染人的 H5N1 病毒的内部蛋白基因片段来源于 H9N2 亚型 AIV^[9];2013 年发生于我国上海等地的重配病毒 H7N9 中 6 个内部基因均来自 H9N2 亚型 AIV^[10];刘金华等近期发表在 PNAS 上的研究结果揭示,单一基因型 H9N2 流感病毒在我国鸡群中的优势流行 H7N9 流感病毒的重排提供了充分条件^[11]。A 型流感病毒基因组由 8 个单股负链 RNA 片段

组成,它们编码 11 个已知的病毒蛋白质,RNA 聚合酶是由流感病毒基因组 3 个最大的片段 PB1、PB2 和 PA 编码的异源三聚体复合物。其中,PB1 是病毒 RNA 聚合酶的催化亚基,负责病毒 RNA 的复制以及转录、PB2 以一种称为“Snatch”的方式参与宿主 mRNA 帽状结构的切割而完成病毒 mRNA 的转录^[12]。近年来的研究结果表明,PA 亚基不但参与病毒复制过程,而且参与病毒 RNA 转录、决定内切核酸酶和蛋白酶的活性,以及参与病毒粒子组装等多种生命活动过程,基于筛选慢性肝炎和艾滋病药物的启示^[13],PA 蛋白因可以抑制病毒的复制转录、有效发挥抗病毒作用而成为新型抗流感药物研发的潜在靶点。

由此可见,加强对不同物种 H9N2 亚型 AIV 的检测,密切关注其重配情况,进一步对其生物学特性以及分子流行病学进行研究,对于预测和防控流感大流行的发生具有不可忽视的作用。本研究对从新疆油鸡当中分离到的 1 株 H9N2 亚型禽流感病毒进行 PA 基因克隆测序,并进行分子进化分析,以了解新疆油鸡 H9N2 亚型 AIV PA 基因遗传进化的情况。

收稿日期:2016-09-22

基金项目:国家自然科学基金(编号:31160513)。

作者简介:武军元(1980—),男,甘肃武威人,博士,副教授,主要从事动物病原微生物学研究。E-mail:wjyn-w@126.com。

[29]李捷,邱湘,范萍,等. 普洱茶片调节高脂血症 60 例[J]. 中国中医药现代远程教育,2009,7(11):22-23.

[30]杨新河,李勤,黄建安,等. 普洱茶茶色素提取工艺条件的响应面分析及其抗氧化性活性研究[J]. 食品科学,2011,32(6):1-6.

[31]魏冰,胡小华,余兰平,等. 云南普洱茶籽油的研究与开发[J]. 中国油脂,2010,35(7):5-8.

[32]舒庆玲,赵和涛. 茶渣饲养肉用鸡效果研究[J]. 安徽农业科学,1995,23(4):355-356.

[33]胡民强,王岳飞,徐侠钟,等. 茶渣生物洁净有机肥肥效试验研究[J]. 茶叶,2006,32(3):145-147.

[34]白娜,符征鸽,梅自力. 茶渣沼气发酵潜力研究[J]. 中国沼

气,2001,29(3):20-23.

[35]郑生宏,柴红玲,李阳. 茶树修剪作用与修剪枝的再利用[J]. 茶叶科学技术,2012(3):34-36.

[36]彭国珉,龙岳林,孙方涛,等. 湘西自治州茶树资源及其园林应用前景[J]. 湖南农业大学学报,2012,38(1):160-162.

[37]冉懋雄. 试论天然药物茶的开发研究[J]. 中药材,1990,13(12):44-48.

[38]贾秀禹,梁永宁. 云南普洱茶文化旅游可行性分析与建议[J]. 民族论坛,2008(10):42-43.

[39]和献中,王世金. 云南省普洱茶文化与旅游互动发展战略[J]. 云南师范大学学报(自然科学版),2009,29(6):52-57.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒 H9N2 亚型禽流感病毒新疆油鸡分离株 A/Chicken/XinjiangBaicheng/1/2014 (H9N2) (简称 Xj14) 于新疆生产建设兵团塔里木畜牧科技重点实验室分离保存。

1.1.2 主要试剂及仪器设备 High Pure Viral RNA Kit (Cat. No. 11858882001) 购自 Roche 公司; PrimeScript™ II First-strand cDNA Synthesis Kit (Cat. No. 6210A) 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; HiPure Gel Pure DNA Kits 购自 Magen 公司; pGEM-T Easy Vector 购自 Promega 公司; Trans 2K DNA Markers、TransTaq-T DNA Polymerase 购自北京全式金生物技术有限公司; TIANprep Mini Plasmid Kit 购自天根生化科技有限公司。梯度 PCR 仪、全自动凝胶成像分析系统、高速离心机为德国 Eppendorf 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 参照已知的 AIV 序列设计了 1 条反转录通用引物 Uni 12, 用于 AIV 各片段的反转录扩增, 序列为 Uni 12; 5'-AGCAAAAGCAGG-3'。

参考 NCBI 公布的 H9N2 亚型 AIV 的 PA 基因序列, 利用 Primer premier 5.0 软件设计一对基因特异性引物, 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, 序列为 Bm-PA-1: 5'-TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGTAC-3'; Bm-PA-2: 5'-ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGG-TACTT-3'。

1.2.2 病毒 RNA 提取及 PA 基因 RT-PCR 扩增 取 200 μL 尿囊液, 按照 Roche 公司的 High Pure Viral RNA Kit (Cat. No. 11858882001) 说明书提取病毒 RNA, 用流感病毒反转录通用引物 Uni-12, 按照 PrimeScript™ II First-strand cDNA Synthesis Kit (Cat. No. 6210A) 说明书反转录合成 cDNA。用所设计的 PA 基因特异性引物进行 PCR 扩增, 采用 50 μL 的反应体系, 组成如下: 10 × PCR 缓冲液 5 μL, 10 mmol dNTPs 4 μL, Taq DNA 聚合酶 (5 U) 0.5 μL, 上下游引物各 1 μL (10 μmol), cDNA 模板 1 μL, 无 RNA 酶的水 37.5 μL。反应条件: 95 ℃ 5 min; 95 ℃ 40 s, 53 ℃ 40 s, 72 ℃ 2.5 min, 35 个循环; 72 ℃ 10 min。PCR 反应结束后, 取 5 μL 反应产物在 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳, 在紫外灯下观察结果。

1.2.3 PA 基因克隆与序列测定 参照 HiPure Gel Pure DNA Kits 说明书将 RT-PCR 产物纯化回收, 回收产物克隆到 pGEM-T Easy Vector 上, 将连接产物转化到 DH5α 感受态细胞中, 选择 PCR 鉴定为阳性的重组质粒送北京擎科武汉测序部进行序列测定。

1.2.4 PA 基因生物学分析 应用序列分析软件 DNASTar 对测序结果进行拼接处理, 将所得序列与 GenBank 中公布的 H9N2 亚型流感病毒典型代表株 (表 1) 的 PA 基因序列进行同源性比较, 用 MEGA6 软件的 neighbour-joining 方法构建进化树, 分析其遗传进化关系。

2 结果与分析

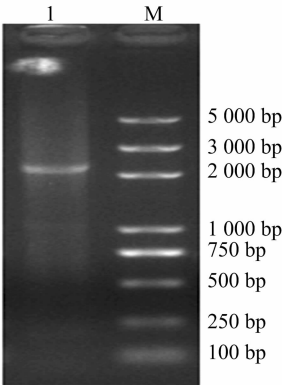
2.1 PA 基因的 RT-PCR 扩增

利用设计的针对 PA 基因的特异性引物 Bm-PA-1/Bm-

表 1 同源性分析的参考毒株

参考毒株	缩写
A/chicken/Beijing/1/94	BJ/94
A/Quail/HongKong/G1/97	G1
A/Duck/HongKong/Y439/97	Y439
A/Quail/HongKong/NT28/99	NT28

PA-2 进行 PCR, 扩增产物经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示, 分离株 PA 基因在 2 200 bp 左右有 1 条特异条带, 与预期大小一致 (图 1)。



M—Trans 2K Plus DNA Marker; 1—PA 基因
图 1 PA 基因的 RT-PCR 扩增

2.2 PA 基因的核苷酸及氨基酸序列同源性分析

测序结果表明, 本研究扩增的 PA 基因开放阅读框由 2 151 个碱基组成, 编码 716 个氨基酸, 将扩增的核酸序列提交 NCBI 数据库获得 GenBank 登录号 KX575647。将本研究分离毒株与 GenBank 公布的其他毒株进行核苷酸和氨基酸序列同源性比较, 结果发现, 本研究分离毒株的核苷酸和氨基酸序列均与 A/Duck/HongKong/Y439/97 具有较高的同源性, 其核苷酸和氨基酸水平的同源性依次为 89.9% 和 96.9% (表 2)。

表 2 分离毒株与参考毒株 PA 基因核苷酸和氨基酸同源性比较

毒株	同源性 (%)				
	Xj14	BJ/94	G1	Y439	NT28
Xj14		89.3	90.4	89.9	87.9
BJ/94	95.5		91.0	89.7	96.9
G1	95.1	95.8		89.9	89.4
Y439	96.9	97.1	96.4		87.9
NT28	94.6	98.6	95.5	96.2	

注: 右上部分为核苷酸序列同源性, 左下部分为推导的氨基酸序列同源性。

2.3 PA 基因的系统进化分析

将本研究分离毒株与国内流行毒株的 PA 基因进行多序列比对并绘制 PA 基因的系统发育进化树 (图 2), 分析结果表明, 新疆油鸡分离毒株 Xj14 的 PA 基因与 2013 年世界卫生组织推荐的疫苗株 A/HongKong/33982/2009 亲缘关系最近, 与国内参考毒株 A/Duck/HongKong/Y439/97 同处于一个分支。

3 讨论

禽流感病毒是目前危害世界及我国养禽业的烈性病毒之一。禽流感病毒的血清亚型众多, 遗传变异程度极其频繁, 目前, H5 和 H7 亚型禽流感病毒对养殖业造成的直接危害较

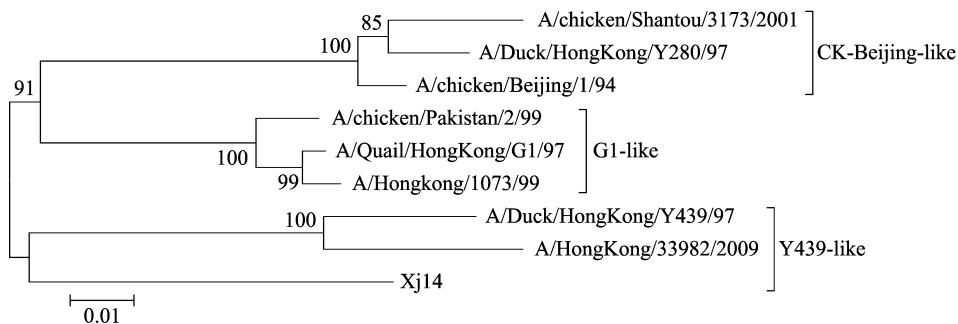


图2 PA 基因的系统进化树

大,因此,该亚型是基层生产防控的重点。H9N2 禽流感是中国大陆主要的流行亚型,感染鸡群具有发病率高、免疫抑制和产蛋下降的特点,而且一旦感染很难清除,对养殖业以及公共卫生造成了极大的危害。近期, Pu 等研究发现,单一基因型 H9N2 流感病毒在我国鸡群中的优势流行 H7N9 流感病毒的重排提供了充分条件^[11],由此可见, H9N2 流感病毒可以通过基因重组或重配产生新的对哺乳动物甚至人类高致病力的病毒株。

禽流感病毒依据 HA 和 NA 基因的分子进化特征可以分为北美和欧亚两大谱系,欧亚谱系又进一步分为 A/CK/BJ/94、G1/97 和 Y439/97 3 个亚分支^[14], AIV 的 HA、NA、NP、M、PB1、PB2 和 PA 进化情况相似。笔者所在实验室前期的研究结果显示,新疆油鸡分离株 Xj14 的 HA 和 NA 基因均属于国内稳定存在的 BJ/94 亚分支,且从分子水平上证实 Xj14 为低致病力的毒株,只是 HA 在关键位点出现 Q234L 的突变, NA 基因在 3 个红细胞吸附区域发生多处突变, HA、NA 基因的糖基化位点均有所增加,这种受体结合位点的改变和潜在糖基化位点的增加可能使之在进化过程中获得跨种传播的能力^[15]。本研究发现,新疆油鸡分离毒株 Xj14 的 PA 基因与 2013 年世界卫生组织推荐的疫苗株 A/HongKong/33982/2009 亲缘关系最近,与欧亚谱系国内参考毒株 A/Duck/HongKong/Y439/97 处于一个分支。因此,新疆油鸡分离株 Xj14 很有可能是欧亚谱系不同亚分支重排的新毒株,其中,疫苗株 A/HongKong/33982/2009 参与病毒的重排组成。

综上所述,应当加强边疆新疆地区 H9N2 亚型 AIV 监控的力度,为流感大数据的建立提供理论依据。

参考文献:

- [1] Homme P J, Easterday B C. Avian influenza virus infections. IV. Response of pheasants, ducks, and geese to influenza A - turkey - Wisconsin - 1966 virus[J]. Avian Dis, 1970, 14(2): 285 - 290.
- [2] Alexander D J. A review of avian influenza in different bird species [J]. Vet Microbiol, 2000, 74(1/2): 3 - 13.
- [3] Brown I H, Banks J, Manvell R J, et al. Recent epidemiology and ecology of influenza A viruses in avian species in Europe and the Middle East[J]. Dev Biol, 2006, 124: 45 - 50.
- [4] Lee Y J, Shin J Y, Song M S, et al. Continuing evolution of H9 influenza viruses in Korean poultry [J]. Virology, 2007, 359(2): 313 - 323.
- [5] Wang J Y, Ren J J, Liu W H, et al. Complete genome sequence of a new H9N2 avian influenza virus isolated in China [J]. Genome Announc, 2013, 1(3): e00261.
- [6] 陈伯伦, 张泽纪, 陈伟斌. 禽流感研究 I. 鸡 A 型禽流感病毒的分离与血清学初步鉴定[J]. 中国兽医杂志, 1994, 20(10): 3 - 5.
- [7] Guo Y J, Li J G, Cheng X W. Discovery of man infected by avian influenza A (H9N2) virus [J]. Chin J Exp Clin Virol, 1999, 13(2): 105 - 108.
- [8] Peiris M, Yuen K Y, Leung C W, et al. Human infection with influenza H9N2[J]. The Lancet, 1999, 354(9182): 916 - 917.
- [9] Liu J H, Okazaki K, Ozaki H, et al. H9N2 influenza viruses prevalent in poultry in China are phylogenetically distinct from A/quail/Hong Kong/G1/97 presumed to be the donor of the internal protein genes of the H5N1 Hong Kong/97 virus [J]. Avian Pathology, 2003, 32(5): 551 - 560.
- [10] Gao R, Cao B, Hu Y, et al. Human infection with a novel avian - origin influenza A (H7N9) virus [J]. N Engl J Med, 2013, 368(20): 1888 - 1897.
- [11] Pu J, Wang S G, Yin Y B, et al. Evolution of the H9N2 influenza genotype that facilitated the genesis of the novel H7N9 virus [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112(2): 548 - 553.
- [12] Li M L, Rao P, Krug R M. The active sites of the influenza cap-dependent endonuclease are one different polymerase subunits [J]. EMBO J, 2001, 20(8): 2078 - 2086.
- [13] Xing S H, Li X B. Research progress of anti - virus activity and action mechanism of febrifuge and detoxifying herbs [J]. Chin Pharmacol Bull, 2014, 30(4): 464 - 468.
- [14] Bi J M, Deng G C, Dong J, et al. Phylogenetic and molecular characterization of H9N2 influenza isolates from chickens in Northern China from 2007—2009 [J]. PLoS One, 2010, 5(9): e13063.
- [15] 武军元, 康强. 新疆油鸡 H9N2 亚型禽流感病毒分离株 HA 和 NA 基因的克隆及进化生物信息分析[J]. 中国兽医学报, 2016, 36(4): 623 - 629.