

禽流感病毒新疆株A/Duck/XJ/4(H5N1)的PB1、PB2和PA基因测序及进化分析

汪萍¹, 沙依兰古丽¹, 符子华¹, 盛卓君², 巴哥得力², 陆桂丽¹, 成进^{1*}
(新疆畜牧科学院兽医研究所 乌鲁木齐 830000; 2. 新疆自治区动物防疫监督总站 830011)

摘要: 通过RT-PCR技术对禽流感病毒新疆株A/Duck/XJ/4(H5N1)的PB1、PB2和PA基因分别进行了扩增及克隆, 测序结果表明该毒株的PB2、PB1和PA基因全长核苷酸序列分别为2341 bp、2282 bp和2187 bp。同源性分析表明A/Duck/XJ/4(H5N1)株与禽源、野生鸟类和猪源的禽流感毒株均有很高的同源性(86.3%~99.6%)。与人源毒株相比, PB2和PA与A/HK/156/97(H5N1)株的同源性较低(86.3%~88.7%); 与A/Vietnam/CL01/2004(H5N1)株和A/human/Zhejiang/16/2006(H5N1)株的同源性较高(93.0%~98.8%); PB1与人源毒株A/HK/156/97(H5N1)、A/Vietnam/CL01/2004(H5N1)、A/human/Zhejiang/16/2006(H5N1)同源性为91.1%~93.2%。

关键词: 禽流感病毒; PB1、PB2和PA基因; RT-PCR; 序列分析

中图分类号: Q 349 +.55 文献标识码: A 文章编号: 1000-2324(2008)03-0331-05

收稿日期: 2005-10-11

基金项目: 国家“863”计划现代农业技术领域重大项目资助, 农作物重大病害多功能广谱生防菌剂研究与别(2006AA10211); 山东省教育厅科研计划项目(J98B01)

作者简介: 汪萍(1979-), 女, 实习研究员, 研究方向为预防兽医。

*通讯作者: Author for correspondence. E-mail: yanght@keylab.net

SEQUENCE ANALYSIS OF PB1, PB2 AND PA GENE OF AVIAN INFLUENZA VIRUS XINJIANG STRAIN A/DUCK/XJ/4
WANG Ping¹, SHAYILAN Gu-li¹, FU Zi-hua¹, SHENG Zhuo-jun², BAGEDELI², LU Gui-li¹, CHENG Jin^{1*}

(1. Institute of Veterinary Science, Xinjiang Academy of Animal Science, Urumqi 830000, China; 2. Xinjiang General Station of Animal Epidemic Prevention, Urumqi 830011, China)

Abstract: PB1, PB2 and PA gene of A/Duck/XJ/4(H5N1) strain were amplified by RT-PCR and cloned. The sequences analysis showed that the full-length gene of PB1, PB2 and PA were 2341 bp, 2282 bp and 2187 bp respectively. The homology analysis indicated that A/Duck/XJ/4(H5N1) strain has high homology with the reported strain from poultry, wildfowl and pig(86.3%~99.6%). By comparing with the strain from human, PB2 and PA gene of A/Duck/XJ/4(H5N1) strain has low homology with A/HK/156/97(H5N1) strain (86.3%~88.7%) and has high homology with A/Vietnam/CL01/2004(H5N1) and A/human/Zhejiang/16/2006(H5N1) (93.0%~98.8%). By comparing PB1 gene of A/Duck/XJ/4(H5N1) strain with A/HK/156/97(H5N1) strain, A/Vietnam/CL01/2004(H5N1) strain and A/human/Zhejiang/16/2006(H5N1) strain, the homologies are 91.1%~93.2%.

Key Words: Avian influenza virus; PB1; PB2 and PA gene; RT-PCR; sequence analysis

禽流感(avian influenza, AI)是由A型流感病毒引起的一种禽类的感染和/或疾病综合征。该病被世界动物卫生组织规定为A类传染病,我国列为一类动物疫病[1,3]。该病呈世界性流行,可以给家禽养殖业带来巨大的经济损失,对人类健康构成严重的威胁。

禽流感病毒的基因组由8个分子量不同的RNA片断组成,分别编码10种蛋白,其中聚合酶蛋白由三种成分组成,它们是PB1, PB2, PA这三种蛋白质是病毒粒子中分子量最大的蛋白质,这3种聚合酶在功能上也各有分工, PB1是在病毒mRNA合成起始后使之逐渐延长; PB2的作用是在病毒mRNA转录的起始阶段识别并结合在5'端I型帽状结构上,同时还有限制性内切酶的活性,参与宿主mRNA帽状结构的切割[1,2,4]。在感染后的复制过程里,聚合酶蛋白质合成的数量虽然很少,但它们对病毒的基因表达和复制来说是必需的[1,5]。

上世纪90年代开始,对禽流感病毒的研究一直是研究热点,并在禽流感病毒蛋白的分子生物学研究方面取得了很大的进展。本文对禽流感病毒新疆株PB1, PB2和PA基因进行了序列测定,并对禽流感病毒新疆株的PB1, PB2和PA基因的变异及演化进行了分析,从而为新疆禽流感的防控提供基础性资料。

1 材料和方法

1.1 病毒

本研究所用毒株为禽流感病毒新疆株A/Duck/XJ/4(H5N1)。

1.2 主要试剂

TRIzol LS Reagent、M-MLV 反转录酶购自Invitrogen公司。EX Taq聚合酶、dNTPs、RNA酶抑制剂、Agarose、Yeast extract、X-gal (Promega产品)、IPTG(Promega产品)、凝胶回收试剂盒、DNA Marker等购自大连宝生物工程有限公司,质粒(小量)提取试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司。

1.3 引物
根据在GenBank中已经发表的相应基因片断的核苷酸序列，采用Oligo6.0软件设计3对特异性引物，并由生物工程（大连）有限公司合成，其引物序列见表一。

表1 PCR引物序列和通用引物序列

基因 Genes	上游引物 (5' -3')	下游引物 (5' -3')
	Up-stream primers (5' -3')	Down-stream primers (5' -3')
PB2	ATggAgAgAATAAgAgAACTAAgA	ACTAATTgATggCCATCCgAAT
PB1	AgCAAAAgCaggCAAACCATTgA	AgTAGAAACAaggCATTtTTTCAT
PA	ATggAAgACTTTgTgCgACAATgCTTCA	TgCATgTgAAggAAggAgTTgAACC
反转录通用引物序列	5' -AGCAAAAGCAGG-3'	

1.4 病毒RNA的提取

按照TRI ZOL LS Reagent试剂盒的使用说明，从鸡胚尿囊液中提取病毒RNA。

1.5 病毒基因的RT-PCR扩增

以反转录通用引物为引物，用Invitrogen公司的反转录酶（M-MLV），按试剂盒说明书进行反转录，合成cDNA，再以cDNA为模板进行PCR。PCR反应条件为：95 °C预变性5 min，94 °C变性60 s，52 °C退火60 s，72 °C延伸60 s，循环40次，最后72 °C再延伸10 min。

1.6 目的基因克隆、鉴定与测序

PCR产物用胶回收试剂盒回收，连接于pMD18-T载体，筛选阳性菌落，提取重组质粒，进行电泳鉴定并送宝生物工程（大连）有限公司进行序列测定。

1.7 序列分析

利用DNA Star分析软件将获得的序列与在NCBI网站上公布的相关参考毒株的核苷酸序列进行同源性比较和基因进化分析。

2 结果

2.1 RT-PCR扩增结果

禽流感A/Duck/XJ/4(H5N1)株的PB2、PB1和PA基因的RT-PCR扩增产物经1%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。

2.2 重组质粒的鉴定结果

筛选阳性菌株，提取质粒，以质粒为模板进行PCR扩增，用1%琼脂糖凝胶电泳进行鉴定，得到2.3 kb左右的特异条带，与预期的目的条带大小相符（见图1、2、3）。

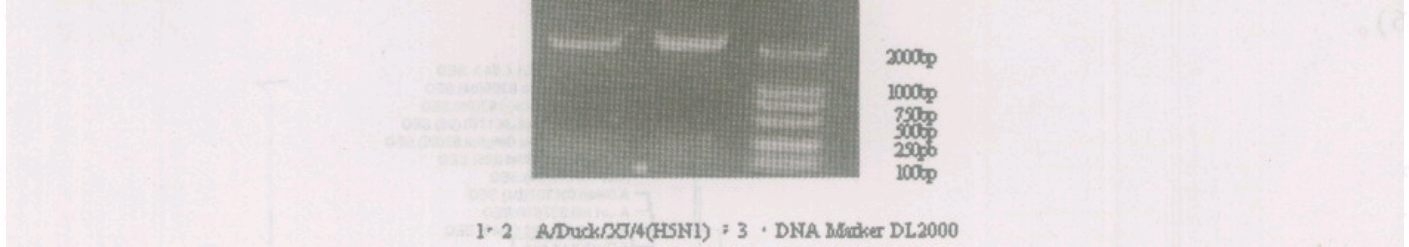


图3 PA基因重组质粒的PCR鉴定

Fig.3 PCR identification of recombinant plasmids of PA gene

2.3 PB1、PB2和PA基因的序列测定和分析

2.3.1 序列测定 禽流感病毒A/Duck/XJ/4(H5N1)株的PB2、PB1和PA基因全长核苷酸序列分别为2341 bp、2282 bp和2187 bp；PB2基因最大的开放阅读框在28-2307 P之间，含2279个碱基，编码760个氨基酸。PB1基因最大的开放阅读框在115~2271 bp，含2056个碱基，编码719氨基酸。PA基因最大的开放阅读框在6~2152之间，含2145个碱基，编码717个氨基酸。

2.3.2 基因序列分析 ①同源性分析。用DNASar分析软件将已获得的序列与参考毒株进行同源性分析，结果显示，PB2、PB1和PA基因与所选鸡源性毒株的同源性在91.1%~99.6%之间；与鸭源毒株的同源性在86.5%~99.1%之间；与鹅源毒株的同源性在93.1%~97.8%之间；与野禽源毒株的同源性在90.2%~99.4%；与猪源毒株的同源性在93.8%~98.6%。

将已获得的序列与1997~2006 a人源参考毒株进行同源性分析，结果表明PB2与1997 a人源参考毒株A/HK/156/97(H5N1)同源性在86.3%，与2004 a和2006 a人源参考毒株A/Vietnam/CL01/2004(H5N1)、A/human/Zhejiang/16/2006(H5N1)的同源性在97.8%和98.8%；PB1与1997 a人源参考毒株A/HK/156/97同源性在91.1%，与2004 a、2006 a人源参考毒株A/Vietnam/CL01/2004(H5N1)、A/human/Zhejiang/16/2006(H5N1)的同源性在93.2%和91.8%；PA与1997 a人源参考毒株A/HK/156/97(H5N1)同源性在88.7%，与2004 a、2006 a人源参考毒株A/Vietnam/CL01/2004(H5N1)、A/human/Zhejiang/16/2006(H5N1)的同源性在98.5%和93.0%。②基因进化分析。将A/Duck/XJ/4(H5N1)株与所选参考毒株PB2、PB1和PA基因核苷酸序列进行了基因进化分析，绘制了核苷酸发育树。分析表明，A/Duck/XJ/4(H5N1)株 PB2基因与A /swan/Guangxi/307/2004(H5N1)、A/Chi cken/Henan/16/2004(H5N1)、A/CH/Hubei/489/04(H5N1)和A/Duck/GX/50/01(H5N1)等毒株在一个小分支之内，其中与A/Chi cken/Henan/16/2004(H5N1)亲缘关系最近，见图4。

PB1基因处于A/HK/156/97(H5N1)进化分支内，与A/Bar-headed Goose/Qinghai/62/05(H5N1)、A/migratory duck/Jiangxi/1701/2005(H5N1)等毒株的亲缘关系最近，但为一个独立的小分支（见图5）。

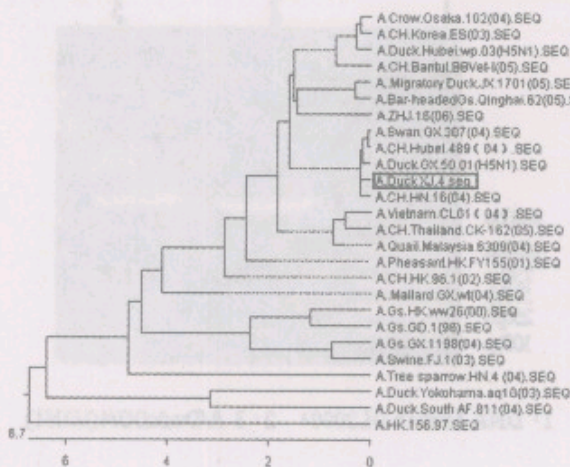


图4 PB2 基因进化分析

Fig.4 The phylogenetic tree of PB2 gene

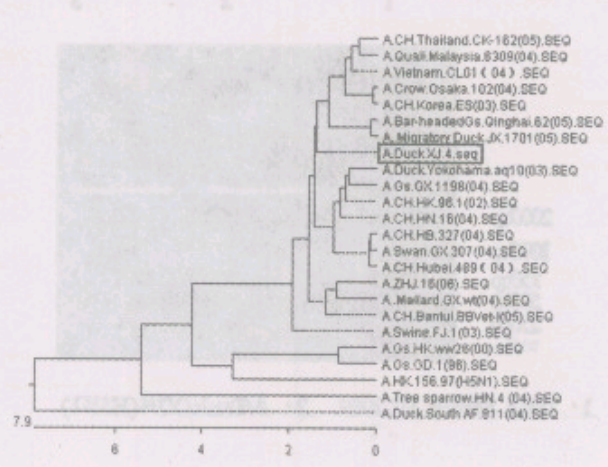


图5 PB1 基因进化分析

Fig.5 The phylogenetic tree of PB1 gene

PA基因处于A/HK/156/97进化分支内，与A /swan/Guangxi/307/2004 (H5N1)、A/Chi cken/ Hubei /327/2004(H5N1)和A/CH/Hubei/489/04 (H5N1)等毒株在一个小分支之内，与它们亲缘关系最近（见图6）。

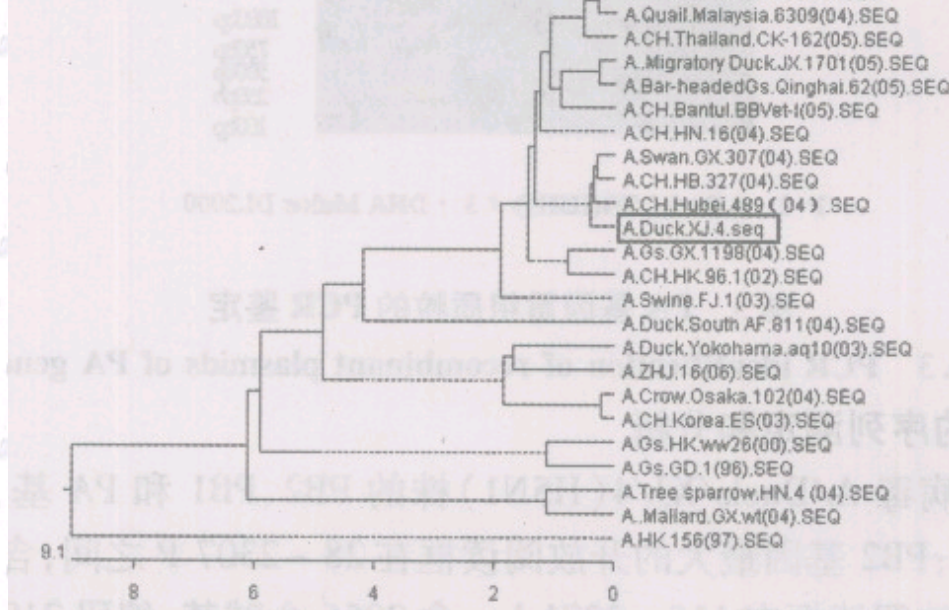


图6 PA基因进化分析

Fig.6 The phylogenetic tree of PA gene

3 讨论

本试验成功地扩增并克隆了禽流感病毒新疆株A/Duck/XJ/4(H5N1)的PB1、PB2和PA基因全序列，并测定了cDNA核苷酸序列。对PB2基因的氨基酸序列分析表明，A/Duck/XJ/4(H5N1)株PB2基因上627位点的氨基酸为亲禽类细胞的谷氨酸(E)，而非赖氨酸(K)，701位点的氨基酸为D[13]，提示A/Duck/XJ/4(H5N1)株不能引起对哺乳动物的感染。

同源性分析表明A/Duck/XJ/4(H5N1)株与禽源、野生鸟类和猪源的禽流感毒株均有很高的同源性。与人源毒株相比，A/Duck/XJ/4(H5N1)株的PB2和PA与早期的H5亚型禽流感毒株(A/HK/156/97(H5N1))的同源性较低(86.3%~88.7%)；与近年来毒株的同源性较高(93.0%~98.8%)，显示出PB2和PA在宿主特异性上的变异过程。将PB1基因与1997 a~2006 a的毒株进行同源性比较，表明其同源性为91.1%~93.2%，较PB2和PA变化不大。

同源性分析表明A/Duck/XJ/4(H5N1)株与禽源、野生鸟类和猪源的禽流感毒株均有很高的同源性。与人源毒株相比，A/Duck/XJ/4(H5N1)株与1997~2006 a人源参考毒株进行同源性分析表明，PB1与1997年的A/HK/156/97(H5N1)株的同源性在91.1%，与2004 a(A/Vietnam/CL01/2004(H5N1))和2006 a人源毒株(A/human/Zhejiang/16/2006(H5N1))的同源性在93.2%和91.8%，同源性变化不明显，说明PB1基因比较保守。A/Duck/XJ/4(H5N1)株的PB2和PA与早期的H5亚型禽流感毒株(A/HK/156/97(H5N1))的同源性较低(86.3%~88.7%)；与近年来毒株的同源性较高(93.0%~98.8%)，由此可见，PB2,PA聚合酶某些位点的基因突变或缺失，可能使病毒获得适应新的动物宿主的能力[13]。显示出PB2和PA从时间上对宿主适应性的变异过程。

参考文献

- [1] 甘孟侯主编. 禽流感(第二版)[M]. 北京:中国农业出版社. 42-43
- [2] 殷震, 刘景华主编. 动物病毒学(第二版)[M]. 北京:科学出版社. 731-732
- [3] 郑腾, 陈枝华. 禽流感的历史和公共卫生意义[J]. 生物学通报, 2002, 37(4):13-15
- [4] Atsushi Kawaguchi, Tadasuke Naito, Kyosuke Nagata, et al. Involvement of Influenza Virus PA Subunit in Assembly of Functional RNA Polymerase Complexes[J]. J Virol. 2005, 79(2): 732-744
- [5] Aya Honda, Kiyohisa Mizumoto, Akira Ishihama, et al. Minimum molecular architectures for transcription and replication of the influenza virus [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(20): 13166-13171
- [6] D. J. Hulse-Post, J. Franks, K. Boyd, et al. Molecular Changes in the Polymerase Genes (PA and PB1) Associated with High Pathogenicity of H5N1 Influenza Virus in Mallard Ducks [J]. J Virol., 2007, 81(16): 8515-8524
- [7] GABRIEL G, DAUBER B, WOLFF T, et al. The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(51): 18590-18595.
- [8] Z. Kou, F. M. Lei, J. Yu, et al. New Genotype of Avian Influenza H5N1 Viruses Isolated from Tree Sparrows in China [J]. J Virol., 2005, 79(24): 15460-15466
- [9] Tao Deng, Jane Sharps, Ervin Fodorin, et al. In Vitro Assembly of PB2 with a PB1-PA Dimer Supports a New Model of Assembly of Influenza A Virus Polymerase Subunits into a Functional Trimeric Complex[J]. J Virol, 2005, 79(13): 8669 - 8674