

A 型猪流感病毒山东分离株鉴定及其 HA 基因序列分析

许传田, 范伟兴**, 赵宏坤

(山东农业大学动物科技学院, 山东泰安 271018)

Isolation and Identification of Type A Swine Influenza Virus from Shandong Province and Sequence Analysis of HA Gene

XU Chuan-tian, FAN Wei-xing**, ZHAO Hong-kun

(College of Animal Science, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

Abstract: 10 influenza viruses were isolated from sicked pigs in different places of Shandong province from autumn of 2002 to spring of 2003. They were all identified as Influenza A virus of H9N2 subtype by National Influenza Research Center. The complete HA gene of one isolate Sw/SD/1/2003 (H9N2) was cloned and sequenced and compared with other H9N2 isolates of avian and swine in GenBank. The results indicated that the isolate Sw/SD/1/2003 (H9N2) was similar to Ck/GX/1999 (H9N2) and Ck/YN/2000 (H9N2) in HA gene; Sw/SD/1/2003 might come from an avian influenza H9N2 subtype according to the phylogenetic analysis of HA genes; the amino acid sequence at the HA cleavage site in Sw/SD/1/2003 is R-S-L-R-G, but the sequences of all other H9N2 subtypes of porcine isolates and avian isolates are R-S-S-R-G.

Key words: Swine influenza virus; Sw/SD/1/2003; HA; Amino acid cleave site

摘要: 从山东各地疑似流感发病猪分离到 10 株流感病毒, 经国家流感中心鉴定均为 A 型流感病毒 H9N2 亚型。将其中一株 Sw/SD/1/2003 (H9N2) 的血凝素全基因 (HA) 进行克隆与测序, 与 GenBank 收录的其它猪流感和禽流感 H9N2 亚型的 HA 基因进行比较, 发现 Sw/SD/1/2003 (H9N2) 的血凝素基因在核苷酸序列方面同广西 1999 年分离的禽流感毒株 Ck/GX/99 (H9N2) 和 2000 年云南分离的禽流感毒株 Ck/YN/2000(H9N2) 的同源性最高; 进化树分析表明 Sw/SD/1/2003 (H9N2) 起源于禽源的 H9N2 亚型流感病毒; Sw/SD/1/2003 的 HA 氨基酸裂解位点与其他 H9N2 亚型不同, Sw/SD/1/2003 的 HA 氨基酸裂解位点是 R-S-L-R-G, 而其它猪流感和禽流感 H9N2 亚型都是 R-S-S-R-G。

关键词: 猪流感病毒; Sw/SD/1/2003 (H9N2); HA; 氨基酸裂解位点

中图分类号: S852.65*9.5

文献标识码: A

文章编号: 1003-5152(2004)01-0027-05

流感病毒属正粘病毒, 有 A、B 和 C 三型, A 型流感病毒可以感染禽、猪、马等多种动物和人, 其中 A 型禽流感病毒不但感染禽, 而且可以感染猪, 如 1998 年香港爆发的猪流感是由中国南方禽流感病毒突破种间屏障从禽传到猪^[1], 具有重要流行病学意义的是猪流感病毒也能感染人, 如 1976 年春美国新泽西州迪克斯堡兵营一人死于猪流感, 这一事件震惊世界^[2]。猪在流感病毒的种间传播方面占有很特

别的地位, 猪既有禽流感病毒的表面受体又有人流感病毒的表面受体^[3], 禽流感病毒和人流感病毒均可感染猪, 而且这些病毒能在猪体内发生重组^[4]。研究表明引起 1918 年“西班牙流感”的病毒与猪流感 H1N1 毒株有密切关系^[5], 这引起广泛关注, 因此猪流感具有特别重要的公共卫生意义。

目前国外对猪流感病毒的研究很多, 但国内只有香港对猪流感病毒有过报道, 大陆对猪流感

收稿日期: 2003-07-17, 修回日期: 2003-08-27

作者简介: 许传田 (1975-), 男, 硕士研究生, 研究方向为动物传染病防制。

** 通讯作者。Corresponding author. Tel: 0538-8212105, E-mail: fanweigsjl@hotmail.com

病毒的研究颇少。近年来春秋和冬季在山东各地猪场不断出现疑似猪流感的呼吸道疾病, 2002 年 10 月到 2003 年 1 月, 我们从十几个具有代表性的发病猪场采集发病猪的鼻咽棉拭子和死亡猪的肺脏, 接种 SPF 鸡胚, 获得血凝性稳定且血凝价较高的尿囊液样品 58 份, 对其中 10 个样品的亚型进行鉴定, 并将具有代表性的一株病毒的血凝素全基因进行了克隆和测序, 旨在弄清近来山东流行的猪流感病毒的来源以及和同亚型的其他流感病毒的亲缘关系。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

SPF 鸡胚由山东齐鲁制药厂提供; 豚鼠和小白鼠均购自泰安生物制品厂。Taq DNA 聚合酶, 限制性内切酶 *EcoR* I, *Pst* I, *Bam*H I, pMD18-T vector, AMV 反转录酶, RNAeasy 提取试剂盒等均购自大连宝生物公司。

1.2 疑似猪流感发病猪场调查和样品的采集

2002 年 10 月~2003 年 1 月, 从山东的济宁、宁阳、莘县、邹城、莱芜、梁山、莒南等地对疑似猪流感病例进行现场诊断, 并采集发病猪的鼻咽棉拭子 160 份和死亡猪的肺脏样品 51 份, 放入含 50% 甘油的保存液中, 置 4℃ 或 -20℃ 保存备用。

1.3 病毒的分离鉴定

病料及猪棉拭子按常规方法处理, 接种 9~10 日龄 SPF 鸡胚, 每胚羊膜腔和尿囊腔各接种 0.1 mL, 置 35℃ 孵化至 72h, 放 4℃ 过夜后无菌收集鸡胚羊水和尿囊液, 用 0.5% 的豚鼠红细胞测其血凝性。连续盲传 3 代仍无血凝性的样品放弃, 所有病料均经 5~8 代不等的传代分离病毒。选代表性的 10 个样品送国家流感中心进行亚型鉴定, 操作和结果判定参见文献^[6,7]。

在已鉴定亚型的 10 株猪流感病毒中, 选典型的一株 Sw/SD/1/2003 进行以下工作: 对该毒株进行小白鼠致病性试验; 对其 HA 全基因进行克隆测序; 对其 HA 基因的核苷酸进行同源性分析; 对该毒株 HA 氨基酸序列进行比较; 对该毒株与同亚型的其他流感毒株的 HA 基因氨基酸形成的进化树进行分析。

1.4 小白鼠致病性试验

18 只 1 月龄的小白鼠分为 3 组, 每组 6 只。第一组的 6 只小白鼠全部用含 Sw/SD/1/2003 病毒的尿囊液对小白鼠进行点眼和滴鼻; 第二组中将其中的 3 只用含 Sw/SD/1/2003 病毒的尿囊液进行点眼和

滴鼻, 另三只不作任何处理, 但和接种病毒的 3 只一起饲养; 第三组的 6 只小白鼠只接种生理盐水作为对照组。

1.5 HA 全基因的扩增

1.5.1 病毒 RNA 的提取: 参考文献^[8], 在 DEPC 处理过的 1.5 mL 离心管中加入 100 μL 新鲜尿囊液, 加入冰浴的变性液 600 μL, 震荡 5 min。再加入 2 mol/L 乙酸钠 (pH 4.0) 60 μL, 颠倒混匀, 再加入苯酚: 氯仿: 异戊醇 600 μL, 颠倒 3~5 次, 冰浴 15 min, 4℃ 12000g 离心 20 min, 吸出上层, 加入等体积异丙醇, 放 -20℃ 5 min, 4℃ 12000g 离心 10 min, 用 75% 冰浴乙醇洗涤一次。真空干燥后加入 20 μL 水 -20℃ 保存。

1.5.2 引物的设计与合成: 参考 GenBank 收录的流感病毒血凝素核苷酸序列, 设计用于合成流感病毒血凝素基因的一对特异引物, 由上海博亚生物工程公司合成。

P1: 5'-AGCAAAAGCAGGGG-3'

P2: 5'-AGTAGAAACAAGGGTGT-3'

1.5.3 HA 基因的扩增: 用溶 DEPC 水的 RNA 为模板, 首先进行反转录合成流感病毒 cDNA, 再以特异引物扩增 HA 基因, 具体操作参见文献^[9]。取 5 μL PCR 产物, 在 0.8% 琼脂糖凝胶上进行电泳分析, 剩余者 4℃ 保存备用。

1.6 HA 基因克隆和测序

参考文献^[10]方法, 将回收的 PCR 产物与 pMD18-T 载体进行连接后转化 TG1 感受态细胞, 选经 *Bam*H I, *Eco*R I + *Pst* I 酶切鉴定的阳性重组质粒送上海博亚生物工程有限公司测序。

1.7 HA 序列比较和进化树分析

用 DNA Star (version 4.0) 软件进行序列分析, 文中用到的参考序列为: Dk/HK/97(AF156376)、Sw/HK/2106/98(AF400776)、Sw/HK/3297/98(AF400777)、Ck/BJ/97(AF461530)、Ck/GX/99(AY036880)、Sw/HK/9/98(AF222810)、Ck/YN/20000(AF461529)、Ck/SH/2001(AY083840)、Sw/HK/10/98(AB080227)、A/GZ/99(AY043019)、Ck/HK/97(AF156373)、Ck/Pakstain/99(AF218118)、Ck/Kerea/96(AF203015)、Turkey/Wisconsin/66(D90305)、Turkey/minnesta/95(AF156387), 括号中的编号为该毒株 HA 基因序列在 GenBank 中的的序列号。

2 结果

2.1 疑似流感发病猪场调查

调查山东省的十几个发病猪场, 发病猪临床症

状基本一致, 有流泪、咳嗽、高热, 全身皮肤淤血, 个别猪后期瘫痪, 剖检死亡猪, 肺脏有明显出血变化, 肺肿大, 气管内有泡沫状液体。

2.2 病毒的分离鉴定

病料和棉拭子共 211 份样品接种 SPF 鸡胚经 5~8 代不等的传代, 选出血凝价在 $2^7 \sim 2^{11}$ 之间且血凝价比较稳定的尿囊液 58 份, 10 个送检样品血清型鉴定结果均为 A 型流感病毒 H9N2 亚型, 这说明山东各发病猪厂流行的猪流感病毒是 H9N2 亚型。

2.3 小白鼠致病性

接种含 Sw/SD/1/2003 病毒的尿囊液 10d 后, 全部接种病毒的一组中的 6 只小白鼠死亡一只; 50% 接种病毒的 6 只小白鼠中, 其中接种病毒的 3 只在接种 3d 后出现一些类似流感症状如神不振、不愿运动、嗜睡等但没有小白鼠死亡, 没有接种病毒的 3 只没有异常症状; 对照组的 6 只小白鼠没有异常变化。实验组中组中没有死亡小白鼠 2 周后恢复正常。取死亡的一只小白鼠的肺脏, 按常规处理后接种 9-10 日龄 SPF 鸡胚, 从其尿囊液中能重新分离到 Sw/SD/1/2003 (H9N2) 流感病毒, 这表明 Sw/SD/1/2003 毒株具有致病性。

2.4 HA 基因 PCR 扩增

HA PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳可见一条大小 1.7kb 的 DNA 带 (图 1)。

2.5 重组质粒的鉴定

重组质粒经限制性内酶 *EcoR* I 单酶切和用 *Bam*H I + *Pst* I 双酶切得到的条带和预期结果相符。

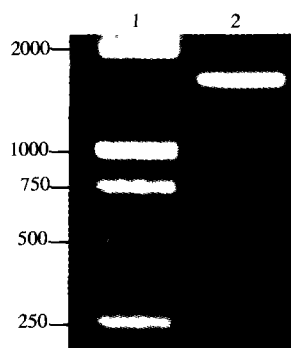


图 1 HA 基因产物 PCR 电泳结果

Fig.1 PCR products of HA gene in agarose gel

1, DL-2000Marker; 2, PCR Products of HA gene.

2.6 HA 基因测序

Sw/SD/1/2003 HA 基因的核苷酸序列长 1742bp, 在 5' 端含有 33 个核苷酸的非编码区, 接

着一个编码 560 个氨基酸的阅读框, 3' 端有 26 个核苷酸的非编码区。

2.7 HA 基因核苷酸序列同源性分析

将 Sw/SD/1/2003 与其它 H9N2 亚型毒株进行比较, 核苷酸差异程度为: 山东近期流行的 H9N2 禽流感毒株差异最小, 次之为几株 H9N2 亚型的猪流感毒株, 差异较大的是几株 H9N2 亚型的国外火鸡流感毒株。Sw/SD/1/2003 与 Ck/GX/99、Ck/YN/20000、Dk/HK/97、Sw/HK/2106/98、Sw/HK/3297/98、Ck/BJ/97、Sw/HK/9/98、Ck/SH/2001、Sw/HK/10/98、Ck/HK/97、A/GZ/99、Turkey/Wisconsin/66、Turkey/minnesta/95、Ck/Ker-ea/96、Ck/Pak-stain/99 核苷酸的同源性分别为 97.2%、96.9%、95.2%、95.1%、94.8%、94.9%、94.3%、95.7%、94.4%、95.2%、91.9%、80.4%、89.4%、89.2%、89.4%。Sw/SD/1/2003 与近年来中国南方几株 H9N2 亚型的禽源的流感毒株的同源性都在 95.7% 以上, 与国外几株 H9N2 禽流感病毒同源性在 80%~90% 之间。

2.8 HA 氨基酸序列分析

Sw/SD/1/2003 HA 的氨基酸裂解位点与其它毒株的明显不同, Sw/SD/1/2003 HA 的氨基酸裂解位点是 R-S-L-R-G, 其它 H9N2 亚型的 HA 氨基酸裂解位点是 R-S-S-R-G, 显然不同于其它 4 株猪流感病毒 HA 氨基酸裂解位点, 也不同于禽源的几个毒株 HA 的氨基酸裂解位点。这种差异提示我们 Sw/SD/1/2003 H9N2 亚型毒株的血凝素氨基酸序列已发生了某些变化。

2.9 HA 氨基酸进化树分析

通过 Sw/SD/1/2003 与其他 H9N2 亚型流感毒株的 HA 的氨基酸形成的进化树中, 可以看出三个禽源流感毒株 Sw/SD/1/2003 与 Ck/GX/99、Ck/YN/2000、Ck/SH/2001 的亲缘关系最近, 而与香港猪流感病毒 Sw/HK/2106/98、Sw/HK/3297/98、Sw/HK/9/98 和 Sw/HK/10/9 的亲缘关系关系比较远 (见图 2)。

3 讨论

我们调查山东 18 个疑似猪流感发病猪场, 经病毒分离鉴定证明 10 个场为猪流感。从发病猪场采集病料 211 份接种 SPF 鸡胚, 经 5-8 代的传代, 最后分离到 58 株流感病毒, 发现猪流感病毒的分离率不高(27.5%)。在病毒分离过程中, 发现有些毒株经尿囊腔接种后得到的尿囊液的血凝价较高而且稳定, 一些毒株经羊膜腔接种后得到的尿囊液的血凝价较高而且稳定, 目前还不能解释这种现象,

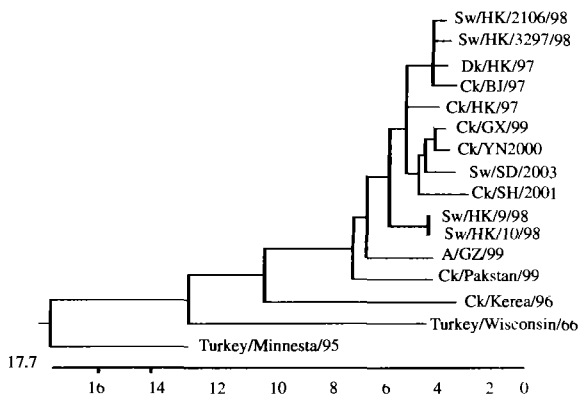


图 2 H9 HA 分子进化树

Fig.2 H9 HA phylogenetic tree

所以在首次接种病料分离病毒的时候，为防止一些流感毒株分离失败最好通过尿囊腔和羊膜腔双腔接种病料。

自 1918 年美国首次报道猪流感^[11]以来，猪流感在世界各地不断给养猪业造成严重的损失，是引起猪呼吸道疾病的主要病原之一^[12]。第一株猪流感病毒 H1N1 亚型毒株直到 1931 年才被分离鉴定，它与 1918 年的“西班牙流感”的病原有密切关系^[5]，以后几乎每年都有经典猪流感病毒 H1N1 亚型引起的猪流感，20 世纪 70 年代类禽 H1N1 猪流感传到亚洲的台湾、香港、日本等；流行于世界范围内猪群的 H3N2 亚型猪流感病毒起源于类人 H3N2 亚型毒株，1970 年在香港猪群中也分离到了 H3N2 亚型的猪流感病毒；日本(1978 和 1980)、法国(1987 和 1994)、英国(1994)报道了由 H1N1 和 H3N2 毒株进行基因重排后产生的新亚型毒株 H1N2 引起的猪流感；1998 香港的猪群中分离到 H9N2 亚型流感病毒^[1]。2002 年 10 月到 2003 年 1 月，山东不同疑似流感发病猪厂分离到 10 株猪流感病毒鉴定结果均为 H9N2 亚型，没有分离到 H1N1 和 H3N2 猪流感毒株，这表明 H9N2 已经成为引起山东猪群发生猪流感的一个重要的流行毒株，H9N2 能否象 H1 和 H3 那样在全国甚至世界范围内猪群中流行还有待于进一步的猪流感病毒的分离鉴定。通过 Sw/SD/1/2003 和其它 H9N2 亚型流感毒株 HA 基因的核苷酸同源性分析发现 Sw/SD/1/2003 与中国近期流行的三个禽流感毒株 Sw/SD/1/2003 与 Ck/GX/99、Ck/YN/2000、Ck/SH/2001 HA 基因核苷酸的同源性都高于 95.7%，小白鼠致病性试验又表明 Sw/SD/1/2003 毒株具有致病性，推测 Sw/SD/1/2003 可能来源于近期流行的禽流感病毒

H9N2 亚型毒株。禽源猪流感毒株 Sw/SD/1/2003 也可能在以后的猪群中引起更大的危害。

猪在禽流感和人流感病毒的重组中起到中间宿主的作用^[13]，禽流感病毒可能在猪体内重组形成新的毒株。H9N2 亚型禽流感病毒自 1966 年从美国威斯康星火鸡中分离到，现已在世界各地广泛分布^[14]，郭元吉对鸡群中血清流行病学调查结果表明 H9 亚型毒株在我国鸡群中也已经分布很广泛^[15]。1997 年从香港的鹌鹑和鸡中分离到 H9N2 亚型毒株，1998 年又从香港的猪中分离到 H9N2 亚型毒株^[1]。中国南方猪和鸡饲养密度大，而且许多地方猪和鸡在同一个厂饲养，这无疑增加了禽流感病毒传到猪的机会，因此禽流感病毒可能经过一系列的变异以致适应新的宿主猪，从而引起猪流感的流行，在猪形成新毒株后能否再突破种间屏障传到人有待于不断对猪和人流感病毒的分离鉴定，因为猪流感病毒传到人的报道也不少，所以弄清 Sw/D/1/2003 毒株的起源及其分子流行机理具有特别重要的公共卫生意义。

流感病毒 HA 氨基酸裂解位点的变化将影响流感病毒的毒力变化^[16]，而 Sw/SD/1/2003 HA 的氨基酸裂解位点和其它流感病毒 HA 的氨基酸裂解位点有明显差异。这种差异提示我们 Sw/SD/1/2003 H9N2 毒株的毒力可能已经有所变化，这很可能由于禽流感病毒在突破种间屏障传到猪的过程中为适应宿主猪而作出了一些必要的改变，是否这种改变是引起流感病毒毒力变化的必需因素还有待于进一步研究。猪流感病毒的公共卫生的意义重大，因此及时掌握和了解世界各地猪流感的流行情况和变异情况是十分有意义的。

参考文献

- [1] Shortridge K F, Webster R G. Geographical distribution of swine (Hsw1N1) and Hong Kong (H3N2) influenza virus variants in pigs in southeast Asia[J]. Intervirology, 1979, 11: 9-15.
- [2] Hinshaw V S, Bean W J, Webster R G, *et al*. The prevalence of influenza virus in swine and the antigenic and genetic relatedness of influenza virus from man and swine[J]. Virology, 1978, 84: 51.
- [3] Ito T, Couceiro J N, Kelm S, *et al*. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential[J]. J Virol, 1998, 72: 7367-7373.
- [4] Webster R G, Bean W J, Gorman O T, *et al*. Evolution and ecology of influenza A viruses[J]. Microbiol Rev, 1992, 56(1): 152-179.
- [5] Lin Y P, Shaw M, Gregory V, K, *et al*. Avian-to-human transmission of H9N2 subtype influenza viruses: relationship between H9N2 and H5N1 human isolates[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 9654-

- 9658.
- [6] Taubenberger J K. 1918 Pandemic-new date[J]. *Influenza Esw*, 1998, 9:3.
- [7] OIE Stands Commission. Manual of stands for Diagnostic Tests and vaccines. 3rd ed, the International Committee of the OIE, Paris, France, 1996, 155-160.
- [8] Mikhail M, Fan W X, Zhao H K, Wei-xing, ZHAL Hong-kun, *et al.* The surface glycoproteins of H5 influenza isolated from Humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties[J]. *J Virol*, 1999, 73:1146-1115.
- [9] Saiki R K, Gelfand D H, Sattels A, *et al.* Primer directed enzymatic amplification of DNA with a the most stable DNA polymerase[J]. *Science* 1988, 239: 487-492.
- [10] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T, 等 (金冬雁, 梨孟枫, 侯云德译). 分子克隆指南[M], 第二版. 北京: 科学出版社, 1992, 19-22.
- [11] Shope R E. Swine influenza[J]. *J Exp Med*, 193 a, 54: 349-359.
- [12] Loeffen, W L, Kamp, E M, Stockhofe-Zurwieden N, *et al.* Survey of infectious agents involved in acute respiratory disease in finishing pigs[J]. *Vet. Rec.*, 1999 145, 123-129.
- [13] Scholtissek C, Hinshaw V S, Olsen C W. Influenza in pigs and their role as the intermediate host[A]. In: *Textbook of influenza*[C]. Ed by Nicholson K G, Webster R G, Hay A J, Oxford: Blackwell Science, 1998. 137-145.
- [14] Yi G, Fan W X, Zhao H K, *et al.* Molecular characterization of H9N2 influenza viruses[J]. *Proc.Natl. Acad USA*, 1999, 96: 9363-9367.
- [15] 郭元吉, 李建国, 程小雯, 等. 禽 H9N2 亚型流感病毒能感染人的发现[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1999, 13 (2) : 105-108.
- [16] Ohuchi M, Orlich M, Ohuchi R, *et al.* Mutations at cleavage site of the hemagglutinin alter the pathogenicity of influenza virus A/chick/penn/83 HSN2[J]. *Virology*, 1989, 168: 274-280.