

一株 H5N1 亚型禽流感病毒的分离与鉴定*

寇 铮¹, 唐利军¹, 雷富民², 安学芳¹, 范兆军¹, 李天宪^{1**}

(1. 中国科学院武汉病毒研究所, 湖北武汉 430071; 2. 中国科学院动物研究所, 北京 100101)

Isolation and Identification of an Avian Influenza Virus of Subtype H5N1 from
Hubei ProvinceKOU Zheng¹, TANG Li-jun¹, LEI Fu-min², AN Xue-fang¹, FAN Zhao-jun¹, LI Tian-xian^{1**}

(1. Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China; 2. Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: A strain of avian influenza virus was isolated from lung tissue in 2004. It was determined to be a Avian influenza virus by ELISA and electron microscopy. HA and NA gene was amplified by RT-PCR and sequenced. By the analyses of HA and NA gene sequences, the isolate was an H5N1 subtype of avian influenza virus (A/Chicken/Yichang/Lung-1/04 (H5N1)).**Keywords:** Avian influenza virus; H5N1**摘要:** 2004 年 1 月湖北宜昌某鸡场暴发疫病, 从该鸡场濒死鸡肺组织中分离到了一株病毒, 电镜切片观察到典型的禽流感病毒粒子; 采用 ELISA 检测禽流感抗原为阳性; RT-PCR 扩增 HA、NA 基因并测序, 经 BLAST 分析, HA 基因与 A/Goose/Guangdong/1/96(H5N1) HA 基因同源性为 97%; NA 基因与 A/Goose/Guangdong/1/96(H5N1) NA 基因同源性为 96%, 确定该分离株为禽流感病毒 H5N1 亚型 (A/Chicken/Yichang/Lung-1/04 (H5N1))。**关键词:** 禽流感病毒; H5N1**中图分类号:** S831.7**文献标识号:** A**文章编码:** 1003-5125(2004)05-0490-03

禽流感 (Avian Influenza, AI) 是由 A 型流感病毒引起的一种禽类病毒性疾病, 被国际兽疫局和我国确定为第一类传染病^[1]。2003 年底, 亚洲部分国家和地区相继发生高致病性禽流感的暴发流行。继之我国广西等地 2004 年 1 月也出现禽流感暴发。其中, 湖北宜昌某鸡场发生禽流感, 病鸡表现为呼吸道症状, 不食, 继之死亡, 死亡率 15%~30%。本研究对该鸡群的病原进行了分离鉴定, 并分析其 HA、NA 基因序列, 从分子水平鉴定禽流感病毒亚型。

1 材料和方法

1.1 材料

用于病毒分离的病料取自湖北宜昌某鸡场 42 日龄发病艾维茵肉鸡; 用于病毒增殖的 SPF 鸡胚 (蛋) 购自中牧实业股份有限公司南京药械厂

(SCXK (苏) 2002-0037); 夹心 ELISA 检测禽流感病毒抗原诊断试剂盒由华中农业大学动物医学院提供; Trizol 试剂购自 Invitrogen; AMV 逆转录酶、Random Primer 购自 Promega; Taq 酶购自 Biostar, 胶回收试剂盒购自大连宝生物工程有限公司。

1.2 病鸡剖检

取濒死或死亡病鸡, 按大体剖解方法进行剖检。

1.3 电镜观察

取少量肺组织, 2.5% 戊二醛固定, 制超薄切片, 透射电镜观察。

1.4 病毒分离

取肺组织加无菌生理盐水研磨, 制成 10% 组织悬液, 加双抗, 3 000r/min 离心 10min, 取上清滤菌

收稿日期: 2004-04-13, 修回日期: 2004-06-14

* 基金项目: 国家科技攻关计划项目 (2004BA519A11)

作者简介: 寇铮 (1979-), 男, 河南洛阳籍, 硕士研究生, 研究方向为动物病毒学。

** 通讯作者。 Corresponding author. Tel: 027-87198465, E-mail: ltx@pentium.whiov.ac.cn.

后, 9 日龄鸡胚尿囊腔接种, 37℃ 孵化, 收集 48~96h 尿囊液, 检测血凝效价(HA)。鸡胚尿囊腔盲传至第三代, 收集 48h 尿囊液检测血凝效价, -20℃ 保存备用。

1.5 鉴别诊断

取 100μL 鸡胚尿囊液于酶标反映板孔内, 同时设置阴性对照、阳性对照, 其余操作步骤严格按照夹心 ELISA 检测禽流感病毒抗原诊断试剂盒说明书, 检测禽流感抗原, $OD_{450nm} \geq 0.2$ 判为阳性, $OD_{450nm} < 0.2$ 判为阴性; 采用血凝抑制实验排除新城疫: 将健康鸡血清和新城疫阳性血清分别做 1:10 稀释, 在 U 型板上加入 50μL, 再加入 50μL 有血凝活性的鸡胚尿囊液作用 15~30min, 最后加入 50μL 体积分数 0.5% 鸡红细胞, 15~30min 观察结果^[2]。

1.6 病毒 RNA 的提取及 RT-PCR

按 Trisol 试剂说明常规操作, 提取总 RNA。按 1μg 总 RNA 加 0.5μg 随机引物的比例混合, 70℃ 5min, 冰浴 5min, 室温放置 10min。同时添加 AMV Buffer 5μL、dNTP 2μL、RNasin 1μL、AMV 逆转录酶 1μL、H₂O 6μL, 逆转录反应体系为 25μL。混合物置于 37℃, 60min。PCR 为 50μL 体系, 反应条件为: 95℃ 5min, 94℃ 30s, 50℃ 30s, 72℃ 30s, 共 40 个循环。根据 HA、NA 基因的保守区各设计两对简并引物:

HA primers:

- 1) upper: 5'-ATGCCCA(C)AGACATACTGGAA-3'
lower: 5'-CATGGTGA(T)GAGGGTGTATGT-3'
- 2) upper: 5'-GAAAGGGGACTCAGCAAATTAT-3'
lower: 5'-AGTGCTAGGGAACTCGCC-3'

NA primer:

- 1) upper: 5'-AGACAGGGAATCAACACCAGG-3'
lower: 5'-AGATTTGAGCCATGCCAGT-3'
- 2) upper: 5'-GGGTGAG(C)GCT(A)CCTTCCCCATA-3'
lower: 5'-GGGCCGCCCTCTGATTAGCTC-3'

1.7 序列测定

RT-PCR 产物按常规方法进行琼脂糖电泳, 每对引物的理论扩增长度约为 0.8kb。将 4 条特异片段纯化, 委托中科院基因组研究所完成序列测定。

2 结果

2.1 病理剖检

取濒死或死亡病鸡, 按大体剖解方法进行, 可见病鸡咽喉气管粘膜充血、水肿, 分泌物大量增多, 肺、腺胃乳头、肝脏及脾有明显出血点(斑), 消化道粘膜充血水肿。

2.2 电镜观察

取肺组织, 固定, 制超薄切片, 透射电镜下观察, 可见病毒粒子, 呈球形或丝状, 球形病毒粒子直径在 80~120nm。(图 1)



图 1 濒死鸡肺组织切片电镜照片

Fig. 1 Electron micrographs of chicken lung tissue

A: Lung tissue of healthy chicken; B: Lung tissue of sick chicken. Bar= 300nm)

2.3 病毒鉴定

9 日龄鸡胚尿囊腔接种肺组织悬液, 48h~96h 无鸡胚死亡, 收集尿囊液, 检测血凝效价, $HA=2^3$ 。鸡胚尿囊腔盲传, 第二代, 48h 鸡胚死亡率为 10%; 第三代, 48h 鸡胚死亡率达 30%。收集血凝效价 $HA>2^8$ 的鸡胚尿囊液, 置 -20℃ 备用; 夹心 ELISA 法检测尿囊液结果显示阳性, $OD_{450nm}>0.6$; 利用新城疫阳性血清做血凝抑制实验, 不能抑制血凝活性, 排除新城疫病毒^[2]。因此可确定本次湖北宜昌该发病鸡病原分离株为禽流感病毒。

2.4 HA 基因和 NA 基因 PCR 扩增结果

用设计的 HA 和 NA 简并引物进行 RT-PCR, 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 并与 DNA 分子标准 DL2000 比较, 在 0.8kb 处有 4 条特异性条带, 与预期结果相符(图 2)。

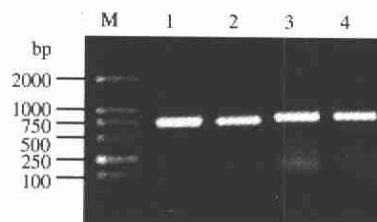


图 2 HA 及 NA 的 PCR 扩增结果

Fig. 2 The amplified result of HA gene and NA gene by RT-PCR

M, DL2000 marker; 1/2, Products of HA by RT-PCR; 3/4, products of NA by RT-PCR.

2.5 HA 基因和 NA 基因序列测定

将 4 条特异片段纯化, 委托中科院基因组研究所完成序列测定。测序结果经拼接, HA 基因扩增 1517bp, NA 基因扩增 1233bp (GenBank 登陆号为: AY623430、AY623431)。经 BLAST 分析, HA 基

因与 A/Goose/Guangdong/1/96(H5N1) HA 基因同源率为 97%，NA 基因与 A/Goose/Guangdong/1/96(H5N1) NA 基因同源率为 96%^[3]，可确定本次湖北宜昌禽流感病毒分离株为 H5N1 亚型。

3 讨论

本次湖北宜昌某鸡场暴发疫病鸡群表现明显的呼吸道症状、高死亡率；剖解见肺、肝脏及腺胃有明显出血点^[4]。肺组织超薄切片，电镜下可见流感病毒粒子，呈球形或丝状，球形病毒粒子直径在 80nm~120nm，尚可见囊膜及囊膜上的纤突。从病鸡肺组织分离到的病毒株，经鸡胚尿囊腔盲传至第三代，HA 血凝素效价可达 $2^8 \sim 2^{12}$ ，且血凝活性不能被抗新城疫病毒血清抑制，排除鸡新城疫；ELISA 检测尿囊液呈阳性反应，表明本病毒为禽流感病毒。扩增 HA 和 NA 基因并测序，测序结果经 BLAST 分析，HA 基因与 A/Goose/Guangdong/1/96(H5N1) HA 基因同源率为 97%，NA 基因与 A/Goose/Guangdong/1/96(H5N1) NA 基因同源率为 96%，可确定本病毒为 H5N1 亚型^[3]。推导的 HA 氨基酸序列中含有 RRRKKR 片段(297~302)，符合高致病力病毒株 HA 裂解位点的分子特征^[5]。因此认为，本次湖北省宜昌某鸡场暴发的禽流感，病原为禽流感病毒 H5N1 亚型，定名为 A/Chicken/Yichang/Lung-1/04(H5N1)。

参考文献

- [1] Alexander D J. 禽流感的世界流行情况及致病的分子基础[J]. 国外兽医学-畜禽传染病, 1998, 18:13-15.
- [2] 薛景山, Beck J R. 禽流感实验室诊断方法[J]. 中国兽医科技, 1998, 28: 42-43.
- [3] Xu X, Cox N J. Genetic characterization of the pathogenic influenza A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) virus: similarity of its hemagglutinin gene to those of H5N1 viruses from the 1997 outbreaks in Hong Kong[J]. Virology, 1999, 261 (1):15-19.
- [4] Perkins L E, Swayne D E. Varied pathogenicity of a Hong Kong-origin H5N1 avian influenza virus in four passerine species and budgerigars[J]. Vet Pathol, 2003, 40(1):14-24.
- [5] 陈化兰, 于康震, 卢景良. 禽流感病毒及其分子生物学研究进展[J]. 国外兽医学-畜禽传染病, 1997, 17: 3-7.
- [6] 李自力, 许青荣, 毕丁仁, 等. 湖北省禽流感的诊断及病毒株的分离与初步鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2001, 23: 146-148.

欢迎订阅

《长江流域资源与环境》由中国科学院资源环境科学与技术局和中国科学院武汉文献情报中心联合主办，科学出版社出版。它是全国唯一一份专门研究长江流域各种资源的开发利用保护与生态环境建设的综合性学术刊物，是中国科技论文统计源期刊，全国中文核心期刊，中国科学引文数据库(CSCD)源期刊，中国人文社会科学核心期刊，中文社会科学引文索引(CSSCI)来源期刊。它立足长江流域，面向国内外，围绕长江流域资源与生态环境重大问题，报道流域资源与生态环境科学研究成果、资源综合利用与生态环境保护工作经验，介绍国内外江河流域开发整治和环境保护的最新成就。主要栏目有：资源环境与社会可持续发展；自然资源；农业发展；生态环境；自然灾害；学术讨论·决策建议；动态信息。对从事资源与环境研究，以及广大农业、林业、气象、能源、水利、土地管理、旅游、经济、人口、生物、地理等学科部门的科技人员、决策与管理人、高等院校师生都很有参考价值。

《长江流域资源与环境》为双月刊，大 16 开本，每期 128 页，全年定价 90 元(含邮费)；国内外公开发行。国内统一刊号：CN42-1320/X，国内邮发代号：38-311，国外发行：42-1320Q。如有漏订者，可直接汇款到编辑部补订。银行汇款：户名：中国科学院武汉文献情报中心；账号：85493892261014638；开户银行：建行小洪山分理处。编辑部地址：武汉市武昌小洪山西区 25 号，《长江流域资源与环境》编辑部；邮政编码：430071，电话：(027)87198181，电子信箱：editoffi@public.wh.hb.cn