

禽流感病毒分离株 A/ Goose/ Guangdong/ 3/ 96(H5N1) HA 基因序列分析

贾永清¹,陈化兰,邓国华,唐秀英,田国斌,于康震²,刘保全¹
(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室,哈尔滨 150001)

摘要 采用 RT-PCR 技术,以 A/ Goose/ Guangdong/ 3/ 96(H5N1) RNA 为模板,扩增了 1.73kb 的 HA 全基因 cDNA。将 HA cD2 NA 克隆后进行了序列测定,测序结果表明所扩增的 1728 个核苷酸片段包含了完整的 HA 基因的开放阅读框架和上下游引物序列、蛋白质合成的起始密码子和终止密码子。核苷酸序列比较分析结果表明:A/ Goose/ Guangdong/ 3/ 96(H5N1) 与 A/ Goose/ Guangdong/ 1/ 96(H5N1) 有 11 个核苷酸差异,同源率 99.4%;与 A/ HongKong/ 156/ 97(H5N1) 有 25 个核苷酸差异,同源率 98.6%;与 A/ Chicken/ HongKong/ 258/ 97(H5N1) 有 30 个核苷酸差异,同源率 98.3%;它们的氨基酸序列同源率依次分别为 99.2%、98.6%和98.1%。受体结合位点的氨基酸序列完全一致;HA 裂解位点氨基酸序列也完全一致,各有 5 个碱性氨基酸插入。这说明上述 4 个流感病毒分离株可能来自同一个祖先,具有相同的毒力和相似的生物学特性。

关键词 禽流感病毒; HA 基因
中图分类号 S852.659.5 **文献标识码** A **文章编号** 1008-0589(2000)01-0025-05

Analysis of Hemagglutinin Gene of Avian Influenza Virus Isolate
A/ Goose/ Guangdong/ 3/ 96(H5N1)

JIA Yongqing, CHEN Hualan, DENG Guohua, TANG Xiuying, TIAN Guobin, YU Kangzhen³, LIU Baoquan
(State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute of CAAS, Harbin 150001)

Abstract In this study, full-length cDNA of HA gene of A/ Goose/ Guangdong/ 3/ 96(H5N1) (GD/ 3) was amplified using RT-PCR method. The cDNA was cloned into Sma I site of pUC18 plasmid and then sequenced. The result of sequencing shows that the cDNA contains whole open reading frame of HA gene, initiation codon and termination codon. The results of comparative sequence analysis indicated that the sequence of the cDNA had 11 nucleotide differences and 99.4% of homology with A/ Goose/ Guangdong/ 1/ 96(H5N1) (GD/ 1), 25 nucleotide differences and 98.6% of homology with A/ HongKong/ 156/ 97(H5N1) (HK/ 156), and 30 nucleotide differences and 98.3% of homology with A/ Chicken/ HongKong/ 258/ 97(H5N1) (HK/ 258). Furthermore, the HA of GD/ 3 had the homology of 99.2% with GD/ 1, 98.6% with HK/ 156, and 98.1% with HK/ 258 at amino acid level. They shared the same basic amino acid insert at the cleavage site, which indicates that all 4 influenza virus isolates are probably evolved from same ancestor and have similar virulence and biological properties.

Key words Avian influenza virus; Hemagglutinin gene

³ Corresponding author

1997 年发生于香港的禽流感“杀人”事件令世人震惊,以铁的事实警示我们 H5N1 亚型的 HPAIV 可以引起人的发病甚至死亡^[1],它打破了人流感只是 H1、H2 和 H3 亚型的 A 型流感病毒感染,禽流感病毒只有通过中间宿主(如猪)体内与人流感病毒发生基因重排后才能感染人的常规。Suarez 等对 1997 年分离自香港人和鸡的 7 株流感病毒进行了鸡致病性试验和 8 个基因片段的基因序列比较分析,结果表明所有分离株均为高致病力毒株,且病原性和毒力相似;8 个基因片段的基因序列同源性极高(90%以上)^[2],进一步确定了人和禽的流感由同一亚型 HPAIV 所引起,给 H5 亚型 AIV 赋予了全新的公共卫生学意义。1996 年我国也分离到了 H5N1

亚型 HPAIV^[3],并对 A/ Goose/ Guangdong/ 1/ 96(H5N1) 分离株的 HA 基因进行了克隆和序列分析^[4]。

HA 是构成 AIV 囊膜纤突的主要蛋白之一,也是诱导动物机体产生中和抗体的主要免疫原,是病毒变异、毒力和宿主特异性的主要决定因素。因此,开展 AIV HA 基因序列及其变异的分析研究,对于 AI 的诊断和防制具有重要的理论价值和实践意义。本研究对我国又一高致病力禽流感分离株 A/ Goose/ Guangdong/ 3/ 96(H5N1) HA 基因进行了序列测定,并对其核苷酸和所推导的氨基酸序列与有关的 H5 亚型毒株进行了比较分析,现将结果报告如下。

1 材料和方法

111 毒株 A / Goose / Guangdong / 3 / 96 (H5N1) (GD/ 3):为华南农业大学辛朝安教授提供的广东分离株,由哈尔滨兽医研究所禽流感研究中心保存。

112 质粒 pUC18 由哈尔滨兽医研究所兽医生

1 东北农业大学动物医学院,哈尔滨 150030
2 通讯作者
基金项目:国家自然科学基金资助项目(39800112);
973 项目资助(GI999011902、GI999011905)
收稿日期:1999-06-09

物技术国家重点实验室仇华吉博士惠赠。

113 HA 基因的 RT-PCR 及克隆 方法参见文献 [5]。

114 序列测定 采用双脱氧链终止法以 F 引物(M13-47: cgccagggtttcccgagtcacgac) 和 R 引物(RV-M: gagcg2gataacaatttcacacagg) ,在 ABIPRISM™377DNA 测序仪上对克隆于 pUC18Sma I 位点的 HA cDNA 进行测序。

115 HA 基因序列及氨基酸序列分析: 用所测定的 GD/3HA 基 因 序 列 与 A/ Gose/ Guangdong/ 1/ 96 (H5N1) ^[4] (GD/ 1)、A/ Hong Kong/ 156/ 97 (H5N1) (HK/ 156) ^[1] 和 A/ Chicken/ HongKong/ 258/ 97 (H5N1) (HK/ 258) ^[2] HA 基因序列相比较,并对根据其 cDNA 序列推导的氨基酸序列进行分析,比较它们的同源性。

2 结果和讨论

211 GD/3 HA 基因序列见图 1,所测定的 1728 个核苷酸包含了 HA 完整的开放阅读框架,共编码 568 个氨基酸,其中信号肽 16 个氨基酸,HA1 330 个氨基酸,HA2 222 个氨基酸,并含有起始密码子和终止密码子。它所推导的氨基酸序列见图 2。

212 核苷酸序列比较结果表明 GD/3 与 GD/1 只有 11 个核苷酸差异,同源率 994. %,氨基酸序列有 5


个差异,同源率 99. 2 %;与 HK/ 156 有 25 个核苷酸差异,同源率 98. 6 %,氨基酸序列有 8 个差异,同源率 98. 6 %;与 HK/ 258 有 30 个核苷酸差异,同源率 98. 3 %,氨基酸序列有 11 个差异,同源率 98. 1 %。可以看出 4 个流感病毒分离株间同源性很高,有可能是由同一病毒株进化而来。

213 AIV HA 基因可在一定程度上决定病毒感染的宿主特异性,也就是由受体结合位点的氨基酸组成所决定。AIV 的受体结合位点由位于 HA1 上的 98、153、183、190、194、225、226 和 228 位的氨基酸所组成,在同种动物变异很小,非常保守^[6~8]。226 和 228 位氨基酸组成的改变(226:L v Q,228:S v G)可使人的 H3 亚型流感病毒感染鸭,在鸭的肠道中繁殖,同时还改变了其血凝活性^[7]。我们对这 4 株 H5 亚型流感病毒 HA 氨基酸序列比较的结果表明,其受体结合位点的核苷酸和氨基酸组成完全一致,无一差异。

214 AIV 高致病力毒株与低致病力毒株的差别,主要表现在 HA 酶切位点附近的氨基酸组成上,HPAIV HA1 的羧基端含有较多的碱性氨基酸^[7~9]。GD/3、GD/1、HK/ 156 和 HK/ 258 酶切位点核苷酸和氨基酸序列完全一致,各有 5 个碱性氨基酸插入,从酶切位点氨基酸序列分析,这 4 株 H5 亚型流感病毒都属 HPAIV。

	信号肽		HA1
GD/3	ATG GAG AGA ATA GTG CTT CTT CTT GCA ATA GTC AGT CTT GTC AAA AGT	GAT CAG ATT TGC 60	
GD/1	
HK/156	
HK/258C...T...C...	
GD/3	ATT GGT TAC CAT GCA AAC AAC TCG ACA GAG CAG GTT GAC ACA ATA ATG GAA AAG AAC GTT 120		
GD/1	
HK/156T...	
HK/258T...	
GD/3	ACT GTT ACA CAT GCC CAA GAC ATA CTG GAA AAG ACA CAC AAT GGG AAG CTC TGC GAT CTA 180		
GD/1	
HK/156G...C...	
HK/258G...C...	
GD/3	AAT GGA GTG AAG CCT CTC ATT TTG AGA GAT TGT AGT GTA GCT GGA TGG CTC CTC GGA AAC 240		
GD/1	
HK/156G...	
HK/258G...	
GD/3	CCT ATG TGT GAC GAA TTC ATC AAT GTG CCG GAA TGG TCT TAC ATA GTG GAG AAG GCC AGT 300		
GD/1	
HK/156	
HK/258	
GD/3	CCA GCC AAT GAC CTC TGT TAC CCA GGG GAT TTC AAC GAC TAT GAA GAA CTG AAA CAC CTA 360		
GD/1	
HK/156T...A...	
HK/258T...A...	

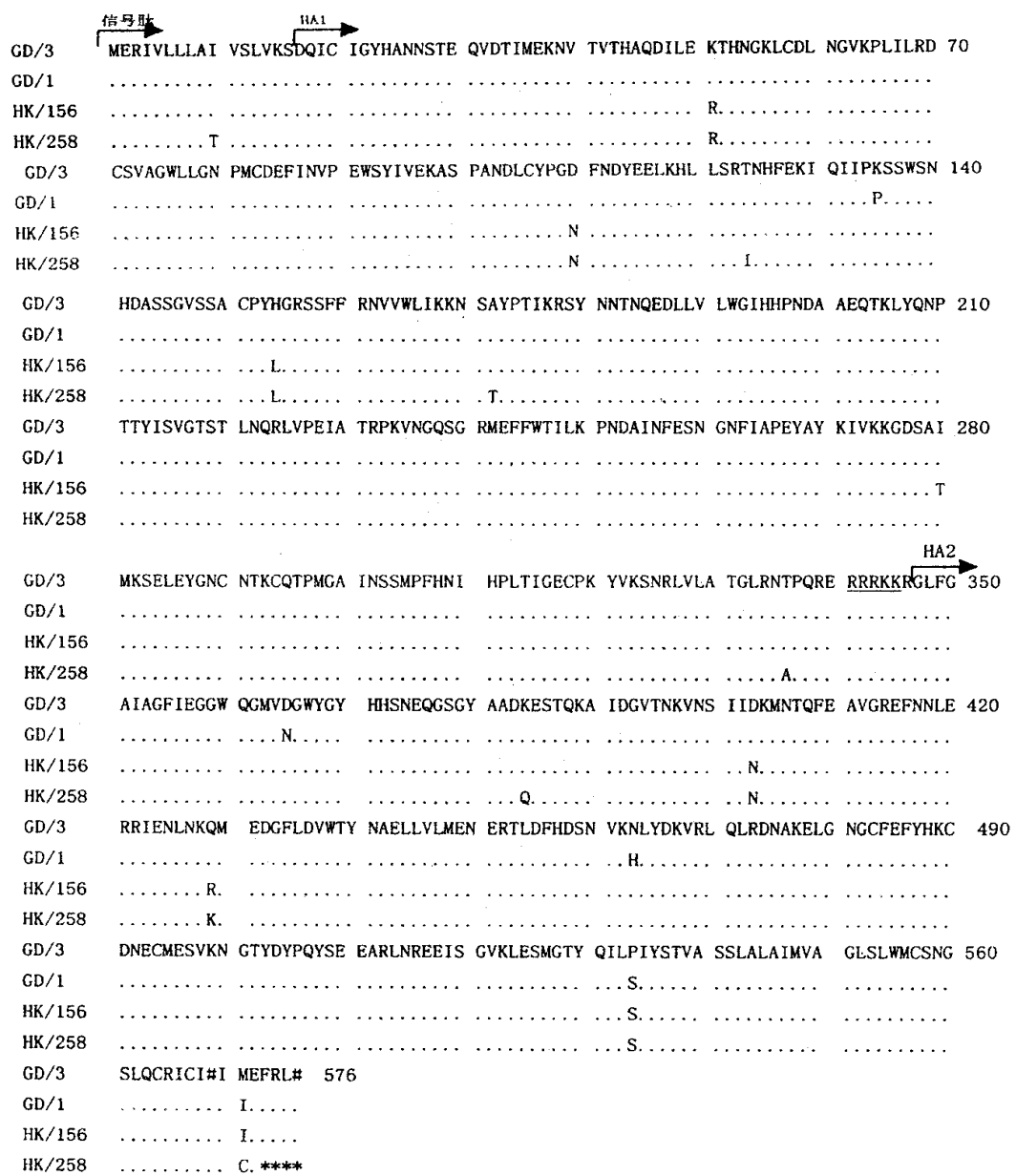
GD/3	TTG AGC AGA ACA AAC CAT TTT GAG AAA ATT CAG ATC ATC CCC AAA AGT TCT TGG TCC AAT 420
GD/1G CC.
HK/156T.G
HK/258T.G
GD/3	CAT GAT GCC TCA TCA GGG GTG AGC TCA GCA TGT CCA TAC CAT GGG AGG TCC TCC TTT TTC 480
GD/1
HK/156T
HK/258AT.
GD/3	AGA AAT GTG GTG TGG CTT ATC AAA AAG AAC AGT GCA TAC CCA ACA ATA AAG AGG AGC TAC 540
GD/1A
HK/156A
HK/258A
GD/3	AAT AAT ACC AAC CAA GAA GAT CTT TTA GTA CTG TGG GGG ATT CAC CAT CCT AAT GAT GCG 600
GD/1
HK/156G
HK/258G
GD/3	GCA GAG CAG ACA AAG CTC TAT CAA AAC CCA ACC ACT TAC ATT TCC GTT GGA ACA TCA ACA 660
GD/1A
HK/156ATC
HK/258C
GD/3	CTG AAC CAG AGA TTG GTT CCA GAA ATA GCT AC AGA CCC AAA GTA AAC GGG CAA AGT GGA 720
GD/1
HK/156
HK/258
GD/3	AGA ATG GAG TTC TTC TGG ACA ATT TTA AAG CCG AAT GAT GCC ATC AAT TTC GAG AGT AAT 780
GD/1
HK/156
HK/258
GD/3	GGA AAT TTC ATT GCT CCA GAA TAT GCA TAC AAA ATT GTC AAG AAA GGG GAC TCA GCA ATT 840
GD/1
HK/156A.
HK/258A.
GD/3	ATG AAA AGT GAA TTG GAA TAT GGT AAC TGC AAC ACC AAG TGT CAA ACT CCA ATG GGG GCG 900
GD/1
HK/156T
HK/258
GD/3	ATA AAC TCT AGT ATG CCA TTC CAC AAC ATA CAC CCC CTC ACC ATC GGG GAA TGC CCC AAA 960
GD/1
HK/156
HK/258
GD/3	TAT GTG AAA TCA AAC AGA TTA GTC CTT GCG ACT GGA CTC AGA AAT ACC CCT CAA AGA GAG 1020
GD/1
HK/156
HK/258G.

GD/3	AGA AGA AGA AAA AAG AGA  GGA CTA TTT GGA GCT ATA GCA GGT TTT ATA GAG GGA GGA TGG 1080
GD/1	...
HK/156	...
HK/258	...
GD/3	CAG GGA ATG GTA GAT GGT TGG TAT GGG TAC CAC CAT AGC AAT GAG CAG GGG AGT GGA TAC 1140
GD/1	... A...
HK/156	... A...
HK/258	...
GD/3	GCT GCA GAC AAA GAA TCC ACT CAA AAG GCA ATA GAT GGA GTC ACC AAT AAG GTC AAC TCG 1200
GD/1	...
HK/156	...
HK/258	... C...
GD/3	ATC ATT GAC AAA ATG AAC ACT CAG TTT GAG GCC GTT GGA AGG GAA TTT AAT AAC TTG GAA 1260
GD/1	...
HK/156	... A...
HK/258	... A...
GD/3	AGG AGG ATA GAG AAT TTA AAC AAG CAG ATG GAA GAC GGA TTC CTA GAT GTC TGG ACT TAT 1220
GD/1	...
HK/156	... A ... C
HK/258	... A ... C
GD/3	AAT GCT GAA CTT CTG GTT CTC ATG GAA AAT GAG AGA ACT CTA GAC TTT CAT GAC TCA AAT 1380
GD/1	...
HK/156	... C ...
HK/258	... C ...
GD/3	GTC AAG AAC CTT TAT GAC AAG GTC CGA CTA CAG CTT AGG GAT AAT GCA AAG GAG CTG GGT 1440
GD/1	... C...
HK/156	... C... C...
HK/258	... C...
GD/3	AAT GGT TGT TTC GAG TTC TAT CAC AAA TGT GAT AAT GAA TGT ATG GAA AGT GTA AAA AAC 1500
GD/1	...
HK/156	... A ...
HK/258	... A ... C ...
GD/3	GGA ACG TAT GAC TAC CCG CAG TAT TCA GAA GAA GCA AGA CTA AAC AGA GAG GAA ATA AGT 1560
GD/1	...
HK/156	...
HK/258	...
GD/3	GGA GTA AAA TTG GAA TCA ATG GGA ACT TAC CAA ATA CTG TCA ATT TAT TCA ACA GTG GCG 1620
GD/1	... C...
HK/156	... C...
HK/258	...
GD/3	AGT TCC CTA GCA CTG GCA ATC ATG GTA GCT GGT CTA TCT TTA TGG ATG TGC TCC AAT GGA 1680
GD/1	...
HK/156	...
HK/258	...

GD/3	TCG TTA CAA TGC AGA ATT TGC ATT TAA ATT ATG GAG TTC AGA TTG TAG	1728
GD/1T.....	
HK/156T.....	
HK/258TGT...* *** **	

注：* 表示该部位核苷酸缺失。箭头指示信号肽、HA1 和 HA2 的起始位点。
Notes: * represents lack of nucleotide,the arrows indicate the beginning sites of signal peptide,HA1 and HA2 subunits

图 1 AIV GD/3 HA 基因核苷酸序列比较分析
Fig.1 Comparative sequence analysis of HA gene of AIV GD/3



注：* 表示该部位氨基酸缺失，# 代表终止密码子，带下划线者为碱性氨基酸插入物，箭头指示信号肽、HA1 和 HA2 的起始位点。
Notes: * represents lack of amino acid, # represents termination codon, the underlined indicate inserts of basic amino acids at the cleavage site, the arrows indicate the beginning of signal peptide,HA1 and HA2 subunits

图 2 根据核苷酸序列推导的 AIV GD/3 HA 氨基酸序列比较分析
Fig.2 Comparative Amino acid sequence analysis of HA deduced from nucleotide sequence of AIV/ GD/ 96/ 3/ (H5N1)

抗 A 型产气荚膜梭菌 毒素单链抗体 1A8 的基因克隆及序列测定

赵宝华¹, 许崇波^{2,3}, 朱 平²

(11 河北师范大学生物系, 石家庄 050016; 21 解放军军需大学军事兽医研究所, 长春 130062)

摘要 应用 RT-PCR 技术, 从分泌具有中和活性的抗 A 型产气荚膜梭菌 毒素单克隆抗体 (McAb) 的杂交瘤细胞 1A8 中, 扩增出抗体 V_H 和 V_L 基因, 用 linker (Gy₄Ser₃)₃ 基因, 将 V_H 和 V_L 基因连接成 ScFv 基因, 并将其克隆至 pGEM-T 载体中。经核苷酸序列分析证实, V_H 和 V_L 基因及 linker 基因拼接正确, 基因全长 729bp, 经计算机分析, V_H 和 V_L 基因均为新发现的基因序列, 符合功能性重排的鼠抗体可变区基因特征。V_H 和 V_L 基因分别属于鼠免疫球蛋白重链 (A) 和轻链 K 家族。

关键词 A 型产气荚膜梭菌; 毒素; 单链抗体; 基因克隆; 核苷酸序列

中图分类号 Q785

文献标识码 A

文章编号 1008-0589(2000)01-0030-04

Cloning and Nucleotide Sequencing of ScFv Gene for Anti-alpha-toxin of clostridium perfringens Type A

ZHAO Baohua, XU Chongbo, ZHU Ping

(The Military Veterinary Institute, University of Quartermaster of PLA, Changchun 130062)

Abstract The V_H and V_L genes were amplified from a hybridoma cell line 1A8 producing mouse McAb against alpha-toxin of *Clostridium perfringens* type A by RT-PCR. The V_H and V_L genes were connected through a flexible linker (Gy₄Ser)₃ and the V_H-linker-V_L (ScFv) fusion gene was cloned into a clone vector pGEM-T. The ScFv gene was sequenced, analyzed by computer. The ScFv gene consists of 729bp encoding 243 amino acid residues. Both V_H and V_L genes were confirmed as functionally rearranged mouse immunoglobulin variable region genes and appeared to be new genes. According Kabat classed method, McAb 1A8 V_H gene segment and V_L gene segment belong to the mouse Ig heavy chain subgroup (A) and chain subgroup respectively.

Key words *Clostridium perfringens* type A; alpha-toxin; ScFv; gene cloning; nucleotide sequencing

毒素是 A 型产气荚膜梭菌所致平时创伤性气性坏疽的主要致病因子, 至今尚无有效的防治方法。许崇波等^[1,2]在克隆和高效表达 毒素保护性抗原基因基础上, 又研制了抗 毒素的单克隆抗体 (McAb), 其中 McAb 1A8 具有中和 毒素活性的作用^[3]。但由于这种单克隆抗体是鼠源性的, 难以用于临床。因此本研究在上述研究的基础上, 从具有中和 毒素活性的 McAb 1A8 细胞株中克隆了其单链抗体 (ScFv) 基因, 以期在适当的载体中表达出理想中和活性的 ScFv, 便于将来用于临床 毒素中毒

的治疗。

1 材料和方法

111 细胞株、菌株及载体 1A8 为分泌具有中和活性的抗 A 型产气荚膜梭菌 毒素 McAb 杂交瘤细胞株, 系许崇波等构建^[3]; 受体菌 JM105 由本室保存; pGEM-T 载体购自 Promega 公司。

112 试剂 限制性核酸内切酶 Sfi、Not、DL2000 DNA Marker, 购自 TaKaRa 公司; Taq DNA 聚合酶、T₄ DNA 连接酶、dNTPS、RNAgents Total RNA Isolation System、PolyAtract mRNA Isolation System、Wizard PCR Preps DNA Purification Systemiv, 购自 Promega 公司; Mouse ScFv Module/ Recombinant Phage Antibody System, 购自 Pharmacia 公司。

3 通讯作者

基金项目: 全军医药卫生科研基金课题, 98Q076;

收稿日期: 1999-05-31

参考文献

- [1] Subbarao K, Klimov A, Katz J, et al. Science, 1998, 279:393~396.
- [2] Suarez D.L., Perdue M.L., Cox N, et al. J. Virol., 1998, 72:6678~6688.
- [3] 唐秀英, 田国斌, 赵传删, 等. 中国畜禽传染病, 1998, 20(1):1~5.
- [4] 陈化兰, 于康震, 步志高. 中国农业科学, 1999, 32(2):87~92.

- [5] 陈化兰, 于康震, 田国斌, 等. 中国畜禽传染病, 1997, 19(2):16~18.
- [6] Kawaoka Y, Nestorowicz A, Alexander D J, et al. Virology, 1987, 158:218~227.
- [7] Vines A, Wells K, Matrosovich M, et al. J. Virol., 1998, 72:7626~7631.
- [8] Ohuchi M, Orlich M, Ohichi R, et al. J. Virol. 1989, 168:274~280.
- [9] 甘孟侯. 禽流感, 北京: 北京农业大学出版社, 1995.