

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(3):395–399; 4 March 2010
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

应用焦磷酸测序技术快速检测猪流感病毒金刚烷胺耐药性的分子标签

刘华雷¹, 吕艳¹, 黄伟坚², 鄢明华³, 张维¹, 李明义¹, 王清华¹, 李金明¹, 郑东霞¹, 赵云玲¹, 孙承英¹, 王志亮^{1*}

(¹ 中国动物卫生与流行病学中心, 青岛 266032)

(² 广西大学动物科学技术学院, 南宁 530005)

(³ 天津市畜牧兽医研究所, 天津 300112)

摘要:【目的】本研究旨在通过焦磷酸测序技术对我国分离的 H1N1、H3N2、H9N2 等 3 种基因型的 10 株猪流感病毒分离株进行金刚烷胺耐药性鉴定。【方法】流感病毒 M2 蛋白 5 个关键位点氨基酸残基(第 26、27、30、31 和 34 位)中的任何一个发生突变会导致抗流感病毒药物中金刚烷胺抗药性的产生。本研究利用焦磷酸测序技术对 2004–2008 年国内分离的 10 株猪流感病毒 M 基因金刚烷胺耐药性分子决定区进行了鉴定, 并进行抗药性分析。【结果】基于 M2 蛋白基因保守区序列建立的焦磷酸测序技术能用于国内猪流感病毒的快速检测, 且具有较好的特异性和重复性。抗药性分析表明 10 株猪流感病毒国内分离株中 5 株 H1N1 分离株全部耐药, 主要存在 M2 蛋白的 V27T、V27I 或 S31N 位点的突变, 而 4 株 H3N2 和 1 株 H9N2 猪流感病毒分离株在 M2 蛋白 5 个关键位点上均未出现变异, 表明其对金刚烷胺敏感。【结论】基于 M 基因的焦磷酸测序技术可以用于我国猪流感病毒金刚烷胺耐药性快速鉴定。

关键词: 猪流感病毒; 焦磷酸测序; 抗药性分析

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 03-0395-05

猪流感是由猪流感病毒引起的一种急性、热性和高度接触性的猪呼吸道传染病, 临床以突发高热、咳嗽、呼吸困难、衰竭为特征^[1]。本病一年四季均可流行, 多发于深秋及初春气候骤变的季节, 临床发病率极高而死亡率低。该病在我国各种规模的养猪场中普遍存在, 难以根除, 对养猪业危害极大。此外, 猪流感病毒在公共卫生中也具有重要意义, 猪被认为是人流感病毒和禽流感病毒的“混合器”^[2]。2009 年 4 月从北美开始目前导致全球流感大流行的甲型 H1N1 流感病毒经研究证实这种新型流感病毒是北美和欧亚两种猪流感病毒的混合体, 而且最近在加拿大和阿根廷也出现了猪感染这种类型

H1N1 流感病毒^[3–5]。由于猪流感病毒对猪群的危害较大, 因此建立一种快速、敏感的鉴定方法对其防治至关重要。近年来出现的焦磷酸测序技术(Pyrosequencing)为进行流感病毒快速鉴定奠定了基础。焦磷酸测序技术是一种全新的基于四种酶(DNA 聚合酶、硫酸化酶、荧光素酶和双磷酸酶)的酶级联反应来进行遗传学分析和鉴定的定量序列分析技术, 不需要进行电泳, 具有极高的准确性和重复性, 其高通量、低成本可用于临床病原微生物的快速检测与诊断^[6–7]。流感病毒 M2 蛋白 5 个关键位点氨基酸残基(第 26、27、30、31 和 34 位)中的任何一个发生突变会导致抗流感病毒药物中金刚烷胺抗药

* 通信作者。Tel: +86-532-87839188; E-mail: zlwang111@yahoo.com.cn

作者简介: 刘华雷(1976–)男, 江苏丰县人, 博士, 副研究员, 主要从事重大动物疫病防控技术研究。E-mail: hualeiliuwy@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-09-23; **修回日期:** 2009-11-21

性的产生,近年来采用焦磷酸测序技术通过检测流感病毒 M2 蛋白的 5 个关键位点的突变来进行流感病毒抗药性快速鉴定上得到了很好的应用^[8-10]。本研究采用焦磷酸测序技术对 2004 - 2008 年期间国内分离的 10 株猪流感病毒对金刚烷胺耐药性的分子标签进行了检测,结果表明本技术快速、敏感,重复性和稳定性较好,初步证实我国 H1N1 亚型的猪流感病毒大多对金刚烷胺出现了不同程度的耐药性,而大部分 H3N2 亚型的猪流感病毒则相对敏感。该技术为快速进行抗流感病毒药物筛选提供了依据,具有广阔的应用前景。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 猪流感病毒:10 株猪流感病毒均为 2004 - 2008 年从国内临床发病的猪群中分离,通过接种 SPF 鸡胚进行繁殖后经国家外来动物疫病诊断中心鉴定后保存,详见表 1。

1.1.2 主要试剂和仪器:High Pure Viral RNA Kit 购自 Roche 公司;SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq High Fidelity 购自 Invitrogen 公司;Streptavidin Sepharose™ High Performance 为 GE Healthcare 产品;Pyro Gold SQA Reagents 1 × 96 Pyromark™ ID 购自 Biotage AB 公司。

1.2 RT-PCR 反应

1.2.1 引物设计:以 NCBI 上发表的所有猪流感病毒 M2 基因序列为模板,运用 PSQ Assay Design 软件进行分析,参照文献[9]合成一对引物 Biotin-P1、P2,其中引物 Biotin-P1 在 5'端采用生物素标记,用于 M2 基因片段的扩增,预期扩增片段大小为 231 bp。另外设计一条测序引物 P3,用于测序反应。3 条引物均从上海生工生物工程技术有限公司合成。本研究中所用的引物及其序列详见表 1。

1.2.2 RNA 提取:取新鲜繁殖的猪流感病毒鸡胚尿囊液毒,采用 Roche 公司生产的 High Pure Viral RNA Kit 提取各病毒分离株 RNA。提取的 RNA 立即用于 RT-PCR 扩增或置 -80℃ 保存。

表 1 引物名称及序列

Table 1 Primers used in this study

Primer	Sequence (5'→3')
Biotin-P1	Biotin-AGCTCCAGTGCTGCTCTGAAAG
P2	GA CTCAGGCACTCCTTC CGTAGAA
P3	GGCATTCAAGTGATCC

1.2.3 RT-PCR 反应:以提取的病毒 RNA 为模板,

采用一步法进行 RT-PCR 扩增其中 RT-PCR 反应条件为:50℃ 反转录 30 min;94℃ 预变性 2 min;94℃ 15 s,55℃ 30 s,68℃ 1 min,45 个循环;68℃ 5 min。取 5 μL PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定检测扩增结果。PCR 产物立即用于焦磷酸测序反应。

1.3 焦磷酸测序反应

1.3.1 测序单链模板的制备:按照焦磷酸测序反应操作说明制备单链 PCR 产物,并释放于含有退火缓冲液和测序引物的 96 孔板中。将含有单链 PCR 产物的 PSQ Low 反应板在 85℃ 放置 2 min 再取出冷却到室温即可进行焦磷酸测序反应。

1.3.2 测序反应:根据测序说明在试剂舱相应位置分别加入所需的底物 APS、酶混合物(DNA 聚合酶、ATP 硫酸化酶、荧光素酶和三磷酸腺苷双磷酸酶)、荧光素和 dNTP;在 PSQ™ 96MA System 进行 Pyrosequencing 反应。

1.4 特异性鉴定

将 10 株分离株采用普通 RT-PCR 方法扩增其 M2 区域,将 PCR 产物回收纯化后采用普通测序方法(Sanger 法)进行序列测定,分析其符合程度,序列测定由上海生物工程有限公司完成。

1.5 重复性鉴定

10 株分离株分别进行 3 次焦磷酸测序鉴定,比较每次序列测定结果的符合程度,确定其重复性和稳定性。

2 结果

2.1 RT-PCR 反应

采用引物 P1、P2,对 10 株猪流感病毒国内分离株进行 RT-PCR 扩增,结果均能扩增出与目的条带大小相符的特异性条带,且具有较好的特异性(图 1)

2.2 焦磷酸测序反应

对编号为 A-J 的 10 株猪流感病毒分离株进行的焦磷酸测序反应证实每次反应至少能测序 45 个碱基以上,完全能用于猪流感病毒的快速鉴定,测序的区域完全覆盖了猪流感病毒 M2 基因金刚烷胺类药物抗药性分析的 5 个关键位点,故能用于抗药性的快速鉴定(图 2)。表 2 为其中的 10 株分离株 5 个关键位点的氨基酸组成和抗药性分析结果。

2.3 特异性和重复性鉴定

10 株分离株焦磷酸测序结果与普通测序结果完全一致,符合率为 100%,序列测定结果图略;每个分离株均进行了 3 次重复检测,检测结果完全一致,证实该方法具有很好的重复性。

表 2 10 株猪流感病毒国内分离株 M2 蛋白
关键位点及其抗药性分析

Table 2 Key amino acid residues for M2 blockers
in ten swine influenza viruses

Isolates	Subtype	Key amino acid residues					Resistance
		26	27	30	31	34	
A	H1N1	L	T	A	N	G	+
B	H1N1	L	I	A	S	G	+
C	H1N1	L	I	A	S	G	+
D	H3N2	L	V	A	S	G	-
E	H1N1	L	I	A	S	G	+
F	H3N2	L	V	A	S	G	-
G	H1N1	L	I	A	S	G	+
H	H3N2	L	V	A	S	G	-
I	H3N2	L	V	A	S	G	-
J	H9N2	L	V	A	S	G	-

3 讨论

猪流感是危害养猪业较为严重的呼吸道传染病,一方面,猪流感病毒可引起患猪生产性能下降,是规模化养猪场主要的免疫抑制病,是“猪呼吸道病综合征”的主要病原,极易引起其它呼吸道细菌和呼吸道病毒的继发或混合感染,给猪场带来较大经济损失;另一方面,猪流感直接影响畜产品安全,对人类健康有潜在威胁。通过对我国猪群猪流感的血清学监测表明 H1 和 H3 亚型猪流感在我国猪群中普遍存在,H5 和 H9 亚型流感在部分省份已有感染。通过病原学监测表明 H1N1 和 H3N2 亚型病毒在我国猪群中大范围存在并常协同流行,H1N2、H5N1 和 H9N2 亚型病毒在猪群中已经存在,尚未出现流行^[11-13]。焦磷酸测序技术(Pyrosequencing)是近年发展起来的一种能够进行定量序列测定的新技术,具有高通量、快速、敏感等特点,其基本原理是通过 PCR 制备待测序 DNA 模板,其中 PCR 的一条引物用生物素标记。PCR 产物和偶联抗生物素蛋白的磁珠孵育,DNA 双链经碱性分开,纯化得到含生物素标记引物的待测序单链,并和测序引物结合成杂交体,然后进行焦磷酸测序。目前该技术在流感病毒抗药性快速鉴定上得到成功应用。目前存在的抗流感病毒药物主要分为两类,即离子通道阻断剂如金刚烷胺和神经氨酸酶抑制剂如达菲等^[14]。流感病毒 M2 蛋白的主要功能是在酸性环境下活化离子通道,金刚烷胺通过抑制这种 M2 离子通道的功能而抑制病毒增殖。近年来的研究表明金刚烷胺耐药性形成的分子基础是构成流感病毒离子通道 M2 蛋白跨膜区的第 L26、V27、A30、S31 和 G34 中的氨基酸残基发生突变,这些位点的突变削弱或消除了

M2 离子通道的活性,形成了金刚烷胺耐药性^[15]。我们通过对 GenBank 中发表的 1977 - 2008 年全球范围内分离的 61 株 H3N2 猪流感病毒 M2 蛋白决定金刚烷胺耐药性的 5 个关键位点进行了分析,结果表明有 48 株(79%)出现了耐药性,在 48 株耐药性毒株中有 39 株(81%)都出现了 S31N 位点的突变,最早自 1992 年在德国就出现了这种耐药性的毒株(GenBank 登录号 DQ186981),尤其是自 1997 年以后的分离株,耐药性更为普遍。在本研究中的 4 株 H3N2 均表现出对金刚烷胺敏感,通过对 GenBank 中发表的 2002 - 2006 年国内分离的 10 株 H3N2 猪流感病毒分离株进行抗药性分析,结果有 3 株对金刚烷胺易感,分别出现了 L26F(GenBank 登录号 EU273778 和 FJ830858)和 V27I(GenBank 登录号 EF455563),暂时未发现带有 S31N 位点突变的耐药性分离株。通过对 GenBank 中发表的 1930 年 - 2009 年全球分离的 194 株 H1N1 亚型的猪流感病毒对金刚烷胺的耐药性分析,结果表明有 79 株出现了耐药性,其中有 60 株出现了 S31N 位点的突变,1987 年在意大利就检测到了这种毒株的存在(GenBank 登录号 CY025254),在 1989 年后这种耐药性的毒株更为普遍。在本研究中的 5 株 H1N1 亚型猪流感病毒国内分离株均表现出对金刚烷胺不同程度的耐药性,其中有 1 株为 S31N 位点突变,其余 4 株为 V27I 突变。通过对 GenBank 中发表的 2004 - 2007 年国内分离的 4 株 H1N1 猪流感病毒分离株进行抗药性分析,结果有 2 株对金刚烷胺耐药,分别出现了 V27I(GenBank 登录号 EU502886)和 S31N(GenBank 登录号 FJ415612)。

参考文献

[1] Kothalawala H, Toussaint MJ, Gruys E. An overview of swine influenza. *The Veterinary quarterly*, 2006, 28: 46-53.

[2] Van Reeth K. Avian and swine influenza viruses; our current understanding of the zoonotic risk. *Veterinary research*, 2007, 38: 243-260.

[3] Dawood FS, Jain S, Finelli L, et al. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *The New England journal of medicine*, 2009, 360: 2605-2615.

[4] Smith GJ, Vijaykrishna D, Bahl J, et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature*, 2009, 459: 1122-1125.

[5] Trifonov V, Khiabani H, Greenbaum B, et al. The origin of the recent swine influenza A (H1N1) virus infecting humans. *Euro Surveill*, 2009, 14: 19193

- [6] Agah A, Aghajan M, Mashayekhi F, et al. A multi-enzyme model for Pyrosequencing. *Nucleic acids research*, 2004, 32: e166.
- [7] Elahi E, Ronaghi M. Pyrosequencing: a tool for DNA sequencing analysis. *Methods in molecular biology*, 2004, 255: 211-219.
- [8] Deyde VM, Gubareva LV. Influenza genome analysis using pyrosequencing method: current applications for a moving target. *Expert review of molecular diagnostics*, 2009, 9: 493-509.
- [9] Deyde VM, Nguyen T, Bright RA, et al. Detection of molecular markers of antiviral resistance in influenza A (H5N1) viruses using a pyrosequencing method. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2009, 53: 1039-1047.
- [10] Deyde VM, Okomo-Adhiambo M, Sheu TG, et al. Pyrosequencing as a tool to detect molecular markers of resistance to neuraminidase inhibitors in seasonal influenza A viruses. *Antiviral research*, 2009, 81: 16-24.
- [11] Cong YL, Wang CF, Yan CM, et al. Swine infection with H9N2 influenza viruses in China in 2004. *Virus genes*, 2008, 36: 461-469.
- [12] Liu J, Bi Y, Qin K, et al. Emergence of European avian-like H1N1 Swine Influenza A Viruses in China. *Journal of clinical microbiology*, 2009, 47: 2643-2646.
- [13] Yu H, Hua RH, Zhang Q, et al. Genetic evolution of swine influenza A (H3N2) viruses in China from 1970 to 2006. *Journal of clinical microbiology*, 2008, 46: 1067-1075.
- [14] Monto AS. Antivirals and influenza: frequency of resistance. *The Pediatric infectious disease journal*, 2008, 27: S110-112.
- [15] Cheung CL, Rayner JM, Smith GJ, et al. Distribution of amantadine-resistant H5N1 avian influenza variants in Asia. *The Journal of infectious diseases*, 2006, 193: 1626-1629.

Detection of molecular markers of amantadine resistance in swine influenza viruses by pyrosequencing

Hualei Liu¹, Yan Lv¹, Weijian Huang², Minghua Yan³, Wei Zhang¹, Mingyi Li¹, Qinghua Wang¹, Jinming Li¹, Dongxia Zheng¹, Yunling Zhao¹, Chengying Sun¹, Zhiliang Wang^{1*}

(¹China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao 266032, China)

(²College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China)

(³Tianjin Institute of Animal Husbandry and Veterinary Science, Tianjin 300112, China)

Abstract: [Objective] To evaluate the resistance against the adamantane of multi-genotype (H1N1, H3N2 and H9N2) swine influenza viruses isolated from China in recent years by pyrosequencing. [Methods] Mutation in one of five key amino acid residues (positions 26, 27, 30, 31 and 34) within the M2 protein of influenza A viruses, leading to resistance against the adamantane class of anti-influenza drugs. The residues L26, V27, A30, S31, and G34 in the M2 protein were targeted for pyrosequencing, and 10 swine influenza viruses obtained from China during 2004 to 2008 were used to perform the amantadine resistance analysis. [Results] All 5 H1N1 swine influenza viruses were adamantane resistance, three mutations were founded in these isolates, namely V27T, V27I and S31N. Other five isolates, including four H3N2 and one H9N2 swine influenza virus, were proved to be sensitive to amantadine. [Conclusion] Pyrosequencing technology based on the M2 gene can be used to determine the amantadine resistance for multi-genotype swine influenza viruses.

Keywords: Swine influenza virus; pyrosequencing; adamantane-resistance

(本文责编:王晋芳)

* Corresponding author. Tel: +86-532-87839188; Fax: +86-532-87839922; E-mail: zlwang111@yahoo.com.cn

Received: 23 September 2009 / Revised: 21 November 2009