

一株 H9N2 亚型禽流感病毒全基因组分析

胡 玥^{1,2}, 谭淑娴^{1,2} 和 君^{1,2}, 李小康^{1,2}, 李 芳^{1,2}, 焦培荣^{1,2},
元文宝^{1,2}, 廖 明^{1,2}

(1. 华南农业大学 农业部动物疫病防控重点开放实验室, 广州 510642;

2. 广东省动物源性人兽共患病预防与控制重点实验室, 广州 510642)

中图分类号: S852.65+9.5

文献标识码: A

文章编号: 1004-7034(2012)01-0014-03

关键词: 禽流感病毒; H9N2 亚型; 基因组; 系统发生分析

摘要: 为了研究 H9N2 亚型 AIV A/Chicken/Guangdong/333/2008 的全基因组序列变异情况, 试验利用 RT-PCR 方法扩增出该病毒的 8 个基因序列, 并应用 DNASTar 和 MEGA4.0 软件分析所得基因序列。结果表明: 该病毒 HA 基因的第 226 位氨基酸由 Q(Gln) 变为了 L(Leu), 其 NP 基因与 Viet Nam/1203/2004 (H5N1) 的 NP 基因同源率最高。说明该病毒已具备了感染哺乳动物的分子特征, 并可能在遗传演化过程中突变为高致病性的禽流感病毒(AIV)。

Analysis of full-length genes of a H9N2 subtype Avian influenza virus

HU Yue^{1,2}, TAN Shu-xian^{1,2}, HE Jun^{1,2}, LI Xiao-kang^{1,2}, LI Fang^{1,2},
JIAO Pei-rong^{1,2}, QI Wen-bao^{1,2}, LIAO Ming^{1,2}

(1. Key Laboratory of Animal Disease Control and Prevention of the Ministry of Agriculture,
South China Agricultural University, Guangzhou 510642; 2. Guangdong provincial Zoonosis Prevention and
Control Key Laboratory, Guangzhou 510642)

Key words: Avian influenza virus; H9N2 subtype; full-length gene; sequence analysis

Abstract: To study the whole genome sequence variation of H9N2 subtype AIV A/Chicken/Guangdong/333/2008, the eight gene sequences from a H9N2 subtype AIV were amplified by RT-PCR and analyzed by DNASTar and MEGA 4.0. The results showed that the amino acid at position 226 of HA turned Q to L and the sequence of NP was most similar with the NP of Viet Nam/1203/2004 (H5N1), which isolated from human. The results revealed that the virus had the molecular characteristics to infect mammals, it might mutate into highly pathogenic avian influenza (AIV) in the process of genetic evolution.

H9N2 亚型禽流感病毒(AIV) 的循环感染在我国禽类中长期存在, 是我国流行的主要 AIV 亚型之一, 并且该亚型 AIV 可与其他亚型(如 H5N1 亚型) AIV 发生重组, 进而导致毒力和基因型发生改变^[1-3]。H9N2 亚型 AIV 可以感染哺乳动物和在猪体内增殖, 可能产生抗原特性与遗传特性, 完全有别于禽流感的新型流感病毒^[4]。H9N2 亚型 AIV 还可感染人类, 在中国已有部分人群被检测出血清中 H9N2 亚型 AIV 抗体呈阳性的报道^[5]。因此, 对 H9N2 亚型 AIV 的研究具有重要的公共卫生学意义。

研究对禽流感病毒株 A/Chicken/Guangdong/333/2008 (H9N2) 的基因组进行了序列测定、比较和系统发生分析, 目的在于了解 A/Chicken/Guangdong/333/2008 毒株在遗传进化方面是否发生变异, 现报道如下。

1 材料

1.1 病毒

禽流感病毒株 A/Chicken/Guangdong/333/2008 (H9N2), 简称 Ck/GD/333/08, 由华南农业大学农业部动物疫病防控重点开放实验室分离、鉴定并保存。

1.2 试剂

Trizol 试剂, Invitrogen 公司产品; DL-2 000 Marker、dNTPs(2.5 mmol/L)、RNasin、反转录酶 M-MLV 均为宝生物工程(大连) 有限公司产品; E. Z. N. A. Gel Extraction Kit 纯化试剂盒, Omega 公司产品。

2 方法

利用 Trizol 试剂对含有病毒的鸡胚尿囊液提取病毒 RNA, 用 M-MLV 酶将所得到的 RNA 反转录成

收稿日期: 2011-03-14; 修回日期: 2011-09-13

基金项目: 国家肉鸡产业技术体系项目(ncytx-42-G3-03); 广东省科技计划项目(2009B020307002; 2009A0201006)

作者简介: 胡 玥(1984-), 女, 硕士研究生, shinddy@126.com.

通信作者: 廖 明(1968-), 男, 教授, 博士, mliao@scau.edu.cn.

cDNA,再用针对禽流感病毒8个基因片段的通用型特异性引物^[6],以RT-PCR将Ck/GD333/08株的8个基因片段扩增出来,按照E. Z. N. A. Gel Extraction Kit纯化试剂盒说明书回收目的片段,将目的片段送上海英潍捷基生物有限公司测序。

利用统计软件DNASar和MEGA4.0对所得到的序列和部分具有代表性的参考序列^[1]进行分析。系统发生树由MEGA4.0中“neighbor-joining”算得,用于计算核苷酸序列相似性和绘制系统发生树的各基因片段分别为PB2(49~2289位)、PB1(25~2233位)、PA(25~2151位)、HA(43~1602位)、NP(46~1501位)、NA(20~1403位)、M(7~984位)和NS(41~859位)。

3 结果

3.1 各基因的序列分析

3.1.1 各基因核苷酸序列的相似性分析 应用DNASar统计软件的MegAlign功能,将Ck/GD/333/08株各基因片段与部分具有代表性的参考毒株(由GenBank中下载,http://www.ncbi.nlm.nih.gov)进行比对,发现Ck/GD/333/08的NP基因与A/VN/1203/04(H5N1)的相似性高(96.2%),其余基因均与H9N2亚型禽流感的相似性最高,其中HA基因与A/duck/Hong Kong/Y280/97的相似性最高(94.1%),NA基因与A/Chicken/Beijing/1/94的相似性最高(93.5%)。以此次研究的毒株Ck/GD/333/08与H9N2亚型和H5N1亚型流感病毒参考株的基因进行比较的结果见表1。

表1 Ck/GD/333/08株同流感病毒参考毒株核苷酸序列相似性比较

Tab 1 A similar comparison of the nucleotide sequences between the virulent strains

CK/GD/333/08 and influenza virus		%							
毒株	亚型	Ck/GD/333/08							
		PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS
A/Hong Kong/156/97	H5N1	86.0	88.3	88.1	54.1	90.9	49.1	95.7	N
A/Viet Nam/1203/2004	H5N1	91.6	88.3	93.6	54.1	96.2*	49.5	88.8	87.9
A/Chicken/Beijing/1/94	H9N2	92.8	92.4	87.9	92.4	89.4	92.1	93.1	95.1*
A/duck/Hong Kong/Y280/97	H9N2	91.8	94.7*	87.3	94.1*	89.1	90.6	92.8	94.5
A/Chicken/Shanghai/F/98	H9N2	94.0*	89.6	89.7	91.4	95.9	89.9	93.3	95.1*
A/Chicken/Hong Kong/G9/97	H9N2	85.8	88.2	86.8	92.9	89.1	93.5*	93.2	94.3
A/Quail/Hong Kong/G1/97	H9N2	85.8	88.5	88.3	88.3	91.0	89.7	95.9	91.0
A/Chicken/Korea/38349-p96323/96	H9N2	87.7	89.2	91.8	83.3	90.8	86.0	90.6	89.1
A/Hong Kong/1073/99	H9N2	85.8	88.3	88.0	88.4	90.8	89.7	96.1*	90.8
A/Duck/Hong Kong/Y439/97	H9N2	92.6	88.5	94.0*	82.7	92.6	86.3	90.5	89.3
A/Turkey/Wisconsin/1/1966	H9N2	83.9	85.9	85.1	81.1	87.8	86.5	89.9	88.6

注: *表示与研究毒株匹配性最高的核苷酸序列; N表示无参考序列,没有比较。

3.1.2 HA蛋白的比较 对Ck/GD/333/08株的

HA裂解位点进行分析发现,该毒株位于裂解位点处的基序为R-S-S-R,符合低致病性禽流感病毒的分子特征。但值得注意的是,该毒株HA蛋白的受体结合位点的第226位氨基酸由Q(Gln)变为了L(Leu),使病毒由识别唾液酸 $\alpha 2 \sim 3$ (SA $\alpha 2 \sim 3$)受体变为识别哺乳动物唾液酸 $\alpha 2 \sim 6$ (SA $\alpha 2 \sim 6$)受体^[7-9]。该病毒HA上共有7个相对保守的糖基化位点,分别位于第21,128,210,289,296,483,541位。

3.2 各基因的系统发生树分析

Y. Guan等^[10]根据H9亚型AIV HA基因和NA基因的序列特点,将其分为欧亚系和北美系2个大的分支。HA基因欧亚系又分为3大亚系,代表毒株分别是Dk/HK/Y280/97、Qa/HK/G1/97和DK/HK/Y439/97;北美系代表毒株为Ty/Wisconsin/1/66。NA基因欧亚系又分为3大亚系,代表毒株分别是Ck/HK/G9/97、Qa/HK/G1/97和DK/HK/Y439/97。此次研究利用MEGA4.0统计软件,分别绘制了Ck/GD/333/08株PB2、PB1、PA、NP、M、NS、HA和NA基因的系统发生树。结果表明,HA基因位于Y280-like分支,NA基因位于系统发生树的G9-like分支,PB1基因位于系统发生树的BJ/1/94-like分支,PA基因位于系统发生树的Y439-like分支,PB2、NP、NS基因均位于系统发生树的SH/F/98-like分支,M基因位于系统发生树的G1-like分支,具体见图1。

4 讨论

此次研究的毒株Ck/GD/333/08的HA基因位于Dk/HK/Y280/97分支,此结果证明Dk/HK/Y280/97分支的毒株始终在大陆流行。

HA基因相关位点上氨基酸的种类决定了病毒对不同宿主唾液酸受体的亲和性。Q226主要识别SA $\alpha 2 \sim 3$ 受体,而L226主要识别SA $\alpha 2 \sim 6$ 受体。猪体内含有SA $\alpha 2 \sim 6$ 和SA $\alpha 2 \sim 3$ 2种受体,人的上呼吸道大面积分布着SA $\alpha 2 \sim 6$ 受体,禽类体内主要分布着SA $\alpha 2 \sim 3$ 受体。此次研究的毒株在其HA基因226位点上的氨基酸残基由识别SA $\alpha 2 \sim 3$ 受体的Q变为了能够识别SA $\alpha 2 \sim 6$ 受体的L,这种变化也出现在其他国家和地区^[3,11]。这一特点证明H9N2亚型AIV通过不断改变自身来适应新的宿主,具备了感染哺乳动物的分子特征。

从系统发生树中可以看出,此次研究毒株的各基因均符合欧亚系毒株的特点,各基因的系统发生关系虽位于不同分支,但具有H9N2亚型禽流感病毒的一般特征,未见明显变化。

但是,禽流感病毒可在相同和(或)不同亚型之间发生重组,已有报道发现^[1,11]H9N2亚型AIV可与H5N1亚型AIV的重组,如Ck/SH/F/98。H. R. Kim等^[12]报道发现,H9N2亚型禽流感可与H5N2亚型禽流感重组。此次对核苷酸序列的比较发现,Ck/GD/



更频繁的种间传播会加大流感病毒不同亚型之间的重组频率,有可能产生毒力更强且更易感染哺乳动物甚至人类的病毒。Y. P. Sun 等^[13]通过研究 H1N1 亚型禽流感和 H9N2 亚型禽流感重组时发现,重组病毒更容易感染小鼠且部分重组病毒的致病力明显高于 2 株亲本病毒。这一突破充分证明,低致病力 AIV 转变成为高致病力的 AIV 是可能发生的。虽然高致病力的 AIV 值得人们关注,但是也不能忽视低致病力的 H9N2 亚型 AIV 在人群中的带毒情况,因为这样的病毒可能通过不断在人群中传播、变异、重组造成新一轮的大流行。结合此次研究毒株 Ck /

(011)