

63 株 H9N2 亚型禽流感病毒 NA 基因序列分析

王守春¹, 尹燕博^{1*}, 王晓红¹, 李海英¹, 王建琳¹, 张毅², 郭妍妍³

(1. 青岛农业大学 动物科技学院, 青岛 266109; 2. 中国农业大学 动物医学院, 北京 100193;

3. 青岛澳兰百特生物工程有限公司, 青岛 266101)

摘要: 为了从分子水平上掌握我国 H9N2 亚型禽流感病毒 NA 基因变异情况和流行规律, 作者汇集了我国部分省市的 63 株 H9N2 亚型禽流感毒株, 采用 RT-PCR 技术对其 NA 基因进行扩增、克隆和测序, 并对所得序列进行同源性和进化分析。结果显示分离株核苷酸同源性在 87.4%~99.5%; 52 株 NA 蛋白颈部 63—65 位点缺失了 T、E、I 3 个氨基酸, 属于 Y280-like 分支, 11 株没有发生缺失, 属于 G9-like 分支, 没有发现 G1-like 分支和 Y439-like 分支的 NA 基因毒株; 唾液酸结合位点(HB)和抗原决定簇的氨基酸发生了明显的变异; 酶活性位点处的氨基酸非常保守, 没有发生与抗神经氨酸酶抑制剂奥塞米韦和扎那米韦相关的氨基酸突变; 36/63 毒株失去了 402 位点处的潜在 N-糖基化位点; 而 28/63 毒株新出现了 264 位点处的潜在 N-糖基化位点。本研究提示目前中国大陆地区商业鸡群流行的 H9N2 亚型禽流感病毒 NA 基因分为 2 个差异较大分支——Y280-like 分支和 G9-like 分支, 而 Y280-like 分支仍是我国 H9N2 亚型禽流感病毒流行的主要类型。

关键词: 禽流感; H9N2; 神经氨酸酶; 遗传进化分析

中图分类号: S852.659.5

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2011)02-0297-09

Sequence Analysis of Neuraminidase Genes of 63 H9N2 Subtypes Avian Influenza Viruses

WANG Shou-chun¹, YIN Yan-bo^{1*}, WANG Xiao-hong¹, LI Hai-ying¹, WANG Jian-lin¹, ZHANG Yi², GUO Yan-yan³

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China; 2. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 3. Qingdao Oland-Better Bioengineering Co., LTD, Qingdao 266101, China)

Abstract: In order to explore the genetic mutations of the neuraminidase and the law of the molecular epidemiology of H9N2 subtype Avian Influenza virus (AIV) in mainland of China, 63 H9N2 AIV strains were isolated from some poultry yards in China, the whole NA cDNA fragments of them were amplified by reverse transcription polymerase chain reaction, with primers specific to NA gene. After cloning and sequencing, homology and heredity evolution of NA gene sequences were analyzed. The sequence analysis showed that the homology of NA gene in this study was between 87.4%-99.5%. Neuraminidase of 52 strains had a deletion of 3 amino acid residues at positions 63-65, belong to Y280-like branch; the other 11 strains had no deletion in the stalk, belong to G9-like branch. Amino acid residues at hemadsorbing (HB) sites and antigenic determinants of these isolates exist variation. The amino acid residues in the enzyme active sites of the isolates were highly conserved and showed no mutations associated with resistance to the sialidase inhibitors oseltamivir and zanamivir. 36 strains viruses sequenced in this study contained potential glycosylation sites at 264 amino acid residues 28 strains lost potential glycosylation sites at 402

收稿日期: 2010-07-15

作者简介: 王守春(1984-), 男, 山东潍坊人, 硕士, 主要从事预防兽医学研究, E-mail: wangshouchun2005@163.com

* 通讯作者: 尹燕博, E-mail: yanboyin@yahoo.com.cn

amino acid residues. The results indicated that by now the NA gene of H9N2 AIV in mainland China belong to two branches, Y280-like and G9-like, and the most NA gene of the H9N2 isolates in China mainland belong to Y280-like.

Key words: avian influenza virus; H9N2; neuraminidase; phylogenetic analysis

H9N2 亚型为低致病性禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV),可引起家禽呼吸困难、腹泻、产蛋下降等症状,当继发细菌感染时可引起较高的死亡率。H9N2 亚型禽流感自从 1994 年在中国首次报道以来,已在中国大陆广泛流行^[1]。近几年,对我国部分省、市、区商品蛋鸡场及养鸡专业村进行禽流感血清学调查发现,H9 亚型 AIV 阳性鸡群占总的 AIV 抗体阳性鸡群的 93.67%,其中绝大部分是 H9N2 亚型^[2]。H9N2 亚型 AIV 已经成为制约养禽业发展重要因素,是我国现有 AIV 的主要亚型^[3]。

NA 是 AIV 表面的主要糖蛋白之一,也是其主要表面抗原之一,NA 诱导产生的抗体能提供保护作用^[4]。NA 蛋白的主要作用是裂解血凝素与细胞表面唾液酸连接,使病毒与细胞分离,在病毒出芽时防止病毒粒子聚集^[5]。针对 NA 酶活性的抑制剂在治疗流感病毒感染时效果显著,但是在人类身上已经分离到了耐神经氨酸酶抑制剂的毒株^[6-8]。因此,实时监测 NA 基因的进化,调查 NA 分子的特征至关重要。

1 材料和方法

1.1 病毒的分离与鉴定

将病料匀浆取上清,过滤后接种 10 日龄 SPF 鸡胚,收取 24~72 h 以后死亡或存活鸡胚的尿囊液,经常规 HI 鉴定和 RT-PCR 鉴定为 H9N2 亚型^[9]。

1.2 NA 基因的 RT-PCR 扩增及克隆测序

使用 Trizol 从尿囊液中提取病毒 RNA,反转录后,利用 PCR 反应扩增 NA 基因,PCR 产物使用 Gel Extraction kit 纯化回收后,插入 pMD-18T 质粒,转化入感受态细菌 DH5 α 扩增,将阳性单克隆菌液送北京 Invitrogen 公司测序。反转录引物使用流感通用反转录引物 Unit12:5'-AGCAAAGCAGG-3'^[10],PCR 引物为 NA-F: 5'-AGCAAAGCAGGAGTAAAAATG-3', NA-R: 5'-AGTAGAAA-CAAGGAGTTTTTT-3'^[11]。引物、Trizol 试剂、Gel Extraction kit、pM18-T 质粒和 DH5 α 感受态细

菌在 TaKaRa 公司合成和购买。

1.3 序列分析

借助 DNASTar、MegAlign 等软件,分析 NA 基因的同源性,HB 结合位点、酶活性位点、抗原决定簇位点处的氨基酸差异。应用 MEGA4.0 软件,使用 Neighbor-joining 方法以 NA 基因的开放阅读框为基元构建进化树。应用在线分析软件 <http://cn.expasy.org/prosite> 分析 NA 蛋白潜在的 N-糖基化位点。

2 结果

2.1 病毒分离及测序结果

实验室保存有 2007 年以前的 H9N2 亚型病毒 13 株,作者在 2007—2010 年从死亡或病禽中分离到 50 株 H9N2 亚型毒株,共计 63 株 H9N2 病毒(表 1)。时间为 1999—2010 年,涉及山东(40 株)、广东(6 株)、吉林(2 株)、辽宁(2 株)、北京(2 株)、河南(3 株)、黑龙江(1 株)、河北(2 株)、江苏(2 株)、四川(2 株)、广西(1 株)等 11 省份。测序结果经过 NCBI 在线比对全部为 H9N2 亚型的 NA 基因。其中 52 株基因全长为 1 458 bp,11 株全长为 1 467 bp。

2.2 NA 基因同源性分析

本研究 63 株毒株 NA 基因的核酸序列间同源性在 87.4%~99.5%,推导的氨基酸序列间同源性在 87.8%~99.4%;与 Y280-like 分支代表株 CK/HK/Y280/97^[12] 的核苷酸同源性在 90.2%~99.0%,氨基酸同源性在 90.1%~98.3%;与 G9-like 分支代表株 CK/HK/G9/97^[12] 的核苷酸同源性在 90.0%~99.0%;与 Y439-like 分支代表株 DK/HK/Y439/97^[12] 的核苷酸同源性在 83.6%~88.3%,氨基酸同源性在 85.4%~88.1%。

2.3 NA 蛋白氨基酸序列分析

H9N2 亚型 AIV NA 基因全长 1 467 bp,开放阅读框在 20—1 429 位核苷酸,编码 469 个氨基酸。如表 1 所示,本研究中 52 株 H9N2 亚型 AIV 的 NA 基因在颈部 63、64、65 处缺失了 T、E、I 3 个氨基酸,11 株没有缺失。63 株毒株的唾液酸结合位点,即红细胞结合位点(hemadsorbing site, HB)表

现出较大的变异,在 366—373 氨基酸位点区域 367、368、369 位点变异较大,399—433 氨基酸位点区域 402、403 位点变异较大,431—433 氨基酸区域 432 位点变异较大。63 个毒株的糖基化位点在 69、86、146、200、234 氨基酸位点处比较保守,44、61、264、402 位点变异较大,有 4 个毒株在 309 位点、7

个毒株在 331 位点出现了潜在的 N-糖基化位点,CK/GD/1/2002 失去了 146 位点处的潜在糖基化位点。抗原决定簇 153、199、331、368、402、403、432 处的氨基酸变异较活跃。酶活性位点处的氨基酸都非常保守,仅 CK/Beijing/2/2001(H9N2)在 294 位点 N→D 和 CK/SD ly/717/2009 在 151 位点处 D→G。

表 1 AIV NA 基因氨基酸序列分析

Table 1 Amino acid sequence analysis of NA gene of AIV strains

毒株 Name of virus strain	N-糖基化位点 Potential N-glycosylation sites											红细胞结合位点 Hemadsorbing (HB) sites			颈部缺失 Deletion
	44	61	69	86	146	200	234	264	309	331	402	366—373	399—404	431—433	in the stalk
CK/SD lc/710/2009	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	IKSDSRSG	DSDSWS	PQE	63—65
CK/SD lx/1201/2009	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	63—65
CK/SD jn/23/2009	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	63—65
CK/SD xt/1229/2008	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	63—65
CK/SD zc/523/2009	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	63—65
CK/SD qz/1129/2008	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+ N	63—65
CK/SD lx/330/2009	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+ N	63—65
CK/SD lx/24/2009	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	- N	63—65
CK/HN /5/2001	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+ N	63—65
CK/SD lx/35/2008	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	63—65
CK/SD lx/320/2008	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	63—65
CK/SD lx/2/2008	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	63—65
CK/SD qd/71/2009	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	63—65
CK/SD ly/18/2008	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	63—65
CK/SD lx/66/2008	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	63—65
CK/SD lx/327/2007	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	... N	63—65
CK/SD lx/316/2007	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	63—65
CK/GD/929/2009	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	63—65
CK/SD xt/227/2009	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	... G	63—65
CK/SD lx/635/2009	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	. I . G	63—65
CK/SD pl/1122/2008	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	... G	63—65
CK/SD lx/1129/2008	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	... G	63—65
CK/SD pl/108/2009	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	... G	63—65
CK/SD ly/44/2009	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	... G	63—65
CK/SD lx/312/2009	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	... G	63—65
CK/SD yt/1023/2009	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	... G	63—65
CK/SD pl/929/2009	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	T . . G	63—65
CK/SD pl/1128/2009	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	... G	63—65
CK/SD lx/22/2010	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	... G	63—65
CK/SD lx/115/2010	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	... G	63—65
CK/jilin/1128/2009	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	... H	63—65

(续表 1 Continued)

CK/SD pd/1128/2009	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	...	H	63-65	
CK/SD wf/1224/2009	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	...	R	63-65	
CK/SD cy/1201/2009	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	...	R	63-65	
CK/SD yt/728/2009	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	...	R	63-65	
CK/beijing/827/2009	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	...	R	63-65	
CK/liaoning/2009	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	...	R	63-65	
CK/SD wf/79/2009	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	...	R	63-65	
DK/SD ly/717/2009	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	...	R	63-65	
CK/HB/2/2002	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	...	R	63-65	
CK/JS nj/15/2001	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	...	R	63-65	
CK/SD cy/422/2008	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	...	R	N	...	63-65
CK/JL cc/423/2008	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	...	R	N	...	63-65
CK/Xichang10/2001	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	...	E	E N	...	63-65
CK/Beijing/2/2001	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	...	E	E N	...	63-65
CK/Henan/1/2001	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	...	E	N	...	63-65
CK/GD/2/2000	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	...	E	L	...	N	...	63-65
CK/JS NJ/13/2001	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	...	E	T	...	N	...	63-65
CK/SD/2/2001	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	...	E	T	...	N	...	63-65
CK/HBsyz/2/2001	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	...	E	N	...	63-65
CK/SD lc/1124/2007	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	...	E	N	...	63-65
CK/LN/1225/2008	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	...	E	N	...	63-65
CK/GD sz/u/1999	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	...	K	N S	... K	-
CK/GD/1/2002	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	...	E K	D S	... K	-
CK/GD/11/1999	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	...	E K	Y S	... K	-
CK/GD/10/2001	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	...	E K	N S	... K	-
CK/HLJ/u/1998	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	...	E K	N S	... K	-
CK/SDmp/1224/2007	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	...	E K	N S	... K	-
CK/henan/6/2006	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	...	E K	N S	... K	-
CK/SD yt/1105/2007	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	...	V K	N S	... K	-
CK/SC bs/1210/2007	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	...	V K	N S	... K	-
CK/SD lx/929/2007	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	...	V K G	N S	... K	-
CK/SD lx/1023/2007	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	...	V K	N S	... K	-

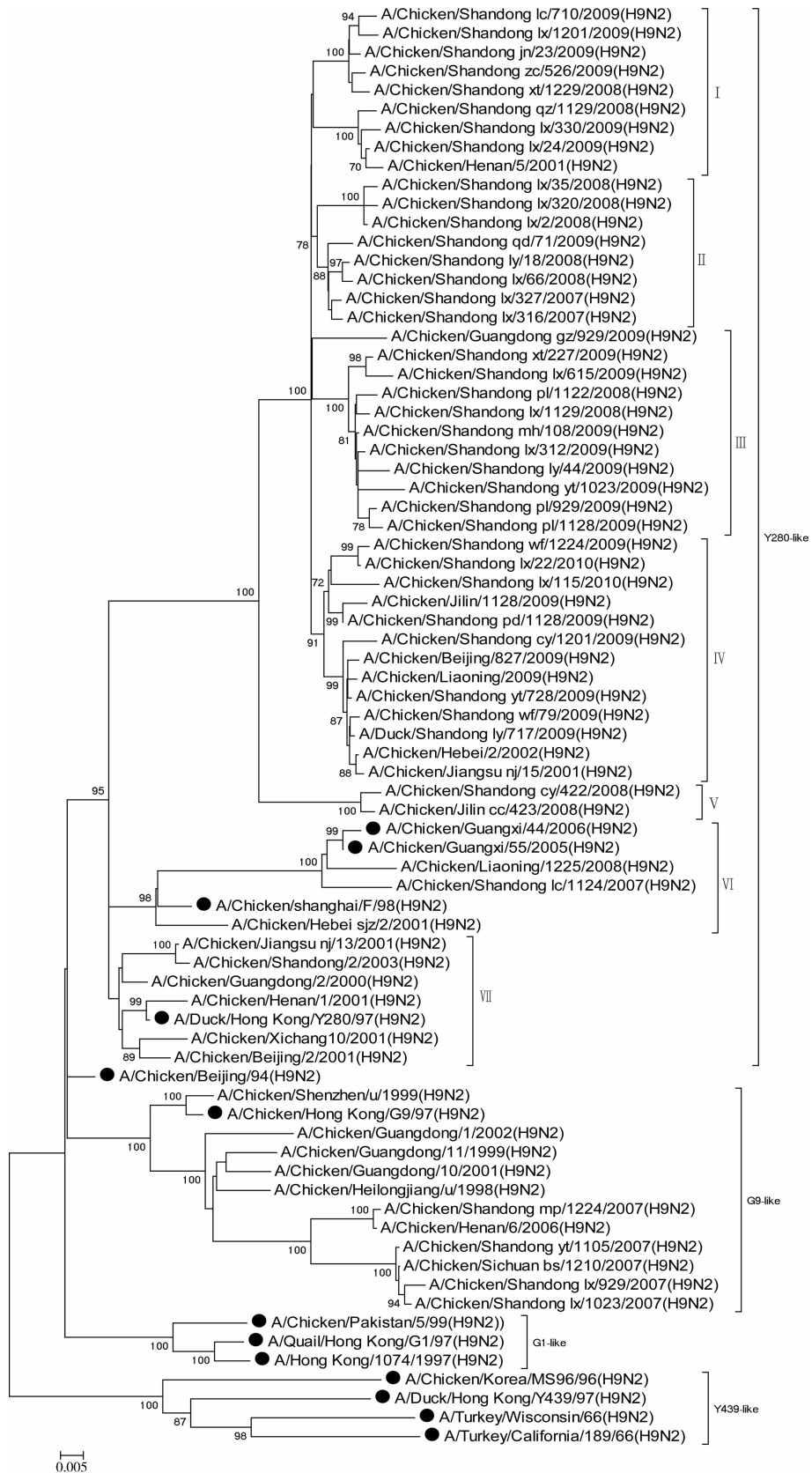
+. 有潜在糖基化位点; -. 失去潜在糖基化位点或颈部未缺失

+. Contain potential glycosylation sites; -. Lost potential glycosylation sites or without deletion in the stalk

2.4 系统进化树分析

图 1 显示,中国大陆地区流行的 H9N2 亚型禽流感病毒 NA 基因分为 2 个分支——Y280-like 分支和 G9-like 分支,本次分离的 63 株毒株的 NA 基因有 52 株位于 Y280-like 分支,11 株位于 G9-like 分支。Y280 分支内部又可分为 I ~ VII 7 个亚分支, I ~ V 亚分支间差异性较小, VI、VII 及 G9 分支与其他分支间的差异性都较大(表 2)。I ~ V 分支的毒株主要是山东省 2007—2010 年的分离株,也包

括了北京、辽宁、吉林等地区的分离株,以及 A/Chicken/Henan/5/2001、A/Chicken/Hebei/2/2002、A/Chicken/Jiangsu nj/15/2001 这 3 个分离时间较早的毒株。VI 亚分支为 2000—2003 年的分离株,与 2007—2010 年的近期分离株差异性较大(10.4%~10.8%)。VII 亚分支中本试验的 3 个山东、辽宁、河北地区的分离株与我国南部地区广西省 2005、2006 年的分离株亲缘关系较近。



本研究分离株没有“●”标志

Virus strains isolated and sequenced in this study are the strains which don't marked with “●”

图 1 63 株 H9N2 亚型禽流感分离株 NA 基因的遗传发育进化树分析

Fig. 1 Phylogenetic tree of NA gene of 63 H9N2 subtype AIV isolates

表 2 63 株毒株 NA 蛋白进化树各分支间的核苷酸差异性平均值

Table 2 Mean distances of nucleotide sequence between the strains of branches

分支 Branch	I	II	III	IV	V	VI	VII	G9
I		0.003	0.003	0.003	0.005	0.007	0.008	0.009
II	0.023		0.003	0.003	0.005	0.007	0.008	0.009
III	0.028	0.025		0.003	0.005	0.007	0.008	0.009
IV	0.024	0.022	0.026		0.005	0.007	0.008	0.009
V	0.052	0.049	0.052	0.047		0.007	0.008	0.009
VI	0.070	0.066	0.071	0.067	0.068		0.005	0.006
VII	0.108	0.106	0.109	0.104	0.107	0.064		0.007
G9	0.123	0.120	0.125	0.123	0.128	0.083	0.107	

I ~ VII 为图 1 中 Y280-like 内部的 7 个亚分支, G9 为 G9-like 分支。左下方的数字是各分支间的差异性平均值, 右上方的数字是标准差。表中数值通过 MEGA4 计算得到

I - VII are the seven small branches of Y280-like from Fig. 1, G9 is G9-like. The lower left data stands for mean distances, the upper right data stands for standard deviation. The data are computed by MEGA4

图 2 显示的是对 2003—2010 年山东 H9N2 分离株进行的 NA 基因遗传进化分析, 结果发现山东地区流行的 H9N2 亚型禽流感 NA 基因分为 2 个分支——Y280-like 分支和 G9-like 分支, 在分离到的 41 株山东地区毒株中 37 株属于 Y280-like 分支,

4 株属于 G9-like 分支。此次山东分离株中, A/Chicken/Shandong lc/1124/2007 (88.7% ~ 90.1%) 和 A/Chicken/Shandong/2/2003 (92.5% ~ 93.8%) 与 Y280-like 分支其他山东分离株同源性较低。

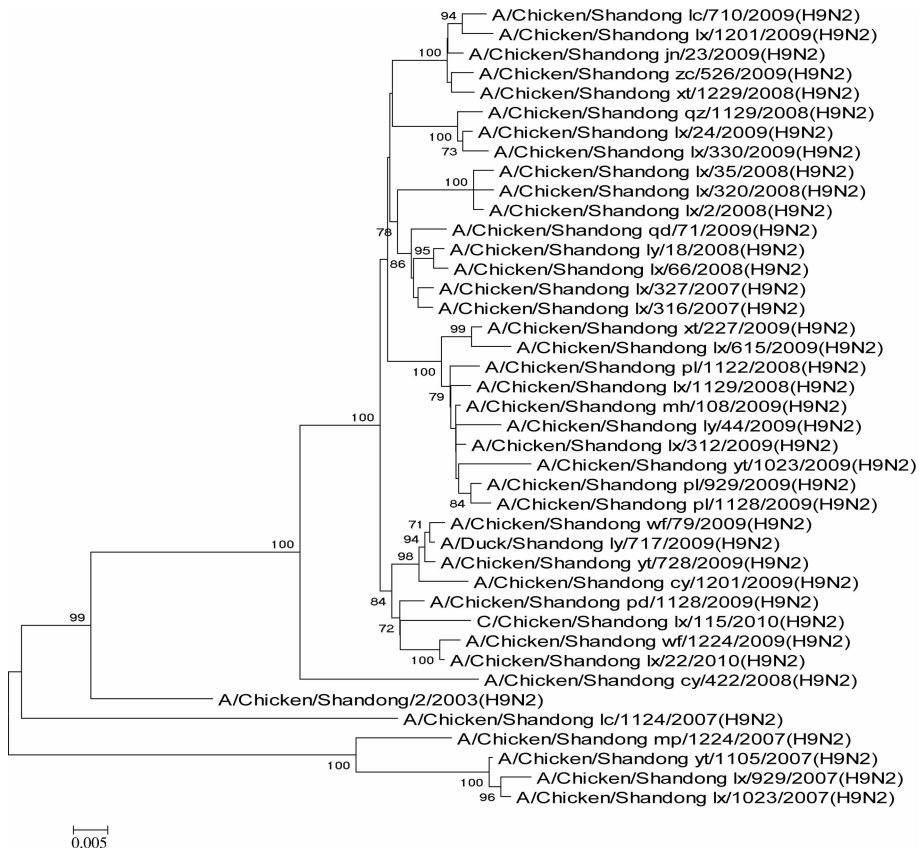


图 2 山东地区 H9N2 亚型禽流感分离株 NA 基因进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of NA gene of the H9N2 AIVs isolated in Shandong province

图 3 是作者用 2007—2010 年从胶东地区某养鸡场分离到的 16 株 H9N2 亚型 AIV NA 基因构建的进

化树, 该养殖场引起 H9N2 亚型禽流感疫情毒株的 NA 基因也分为 Y280-like 和 G9-like 2 个分支。

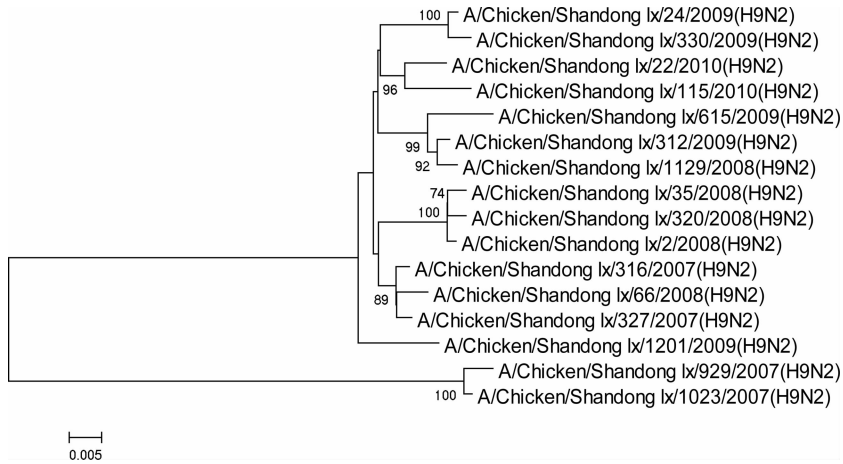


图 3 山东胶东地区某鸡场 16 株 H9N2 亚型禽流感 NA 基因进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on NA gene of 16 H9N2 AIV strains isolated from one chicken farm in eastern Shandong province

3 讨论

本研究 63 个 AIV 毒株中,大部分毒株同源性较高,如 I~V 分支间的差异性平均值在 2.3%~5.2%,分支之间同源性较高。VI 分支、VII 亚分支及 G9 分支的毒株与其他分支间的差异较大(6.6%~12.8%)。I~V 分支的毒株大多数是我国近期(2007—2010 年)北方地区包括山东、辽宁、吉林、北京、广东等省份的毒株,也包括 2001—2002 年 3 个分离时间较早的分离株;VI 分支的毒株与我南方省份的分离株亲缘关系较近;VII 分支毒株都是分离时间在 2001—2003 年的分离株;G9-like 分支是颈部未缺失的毒株,而在利用美国国立生物信息中心(NCBI)网站比对时发现 GenBank 提交的该分支毒株大部分分离自我国华南地区,且与本研究的该分支毒株同源性较高,由此推断本次北方地区 G9-like 分支的毒株起源于我国华南地区。从本次分离到的毒株看,H9N2 亚型 AIV 2007—2010 年的分离株与 2001—2003 年间的分离株相比,发生了较大的变异,表 2 所示 VI 分支与 I~V 分支间的差异性超过 10%;但在 2001—2002 年间分离自河南、河北、江苏的 3 个分离株却与本研究近期分离到的毒株亲缘关系较高,提示山东近期流行的毒株可能源自这 3 个地区。

本研究中 1 株分离自广东的毒株 A/Chicken/Guangdong gz/827/2009 与山东、辽宁、吉林、北京等北方省份的毒株同源性都较高,而 VI 分支中 3 个北方地区的毒株利用美国国立生物信息中心(NCBI)网站比对时发现,与我国广西地区 2006 年的分离株 A/Chicken/Guangxi 44/2006 和 A/Chicken/

Guangxi 的 NA 基因同源性非常高(99%),提示我国 H9N2 AIV 南北地区之间存在着基因交换。Huang 等也证实我国北部和南部地区不仅存在着毒株之间的交换,而且存在着以基因重排方式进行的基因交换^[13]。

本次分离株有 41 株分离自山东地区,山东地区流行的 H9N2 亚型 AIV 有 Y280-like 和 G9-like 两个分支的 NA 基因型在流行,其中 40 株病毒的 NA 基因属于 Y280-like 分支,是流行的主要基因型,而 G9-like 分支的 NA 基因型仅在 2007 年分离到 4 株,而在 2008、2009 年高密度的调查中没有发现该类型的基因型,可见 G9-like 分支的 NA 基因并未在山东地区形成稳定的遗传。本次分离到的大部分(37 株)山东地区 Y280-like 分毒株的 NA 基因非常保守,同源性在 96.5%~99.9%,而 A/chicken/shandong cy/422/2008 与其他毒株差异较大,同源性在 89.6%~95.7%,而与我国广西地区分离株亲缘关系较近(图 1)。山东地区 2007 年流行的 H9N2 亚型 AIV NA 基因呈现多样性,有 Y280-like 分支的北方流行株、Y280-like 分支的南方地区流行株及 G9-like 分支 3 种差异较大的 NA 基因在流行,为禽流感防控带来一定的难度。

本试验从山东胶东某鸡场内自 2007—2010 年连续几年分离到 16 株 H9N2 亚型 AIV,除 2007 年分离到的 2 株病毒的 NA 基因处于 G9-like 分支外,其余 15 株全部位于 Y280-like 分支,彼此间同源性在 97.2%~99.6%,非常保守。G9-like 分支的 NA 基因只在 2007 年零星出现,此后至 2010 年 2 月份再也没在该养殖场出现过。可见在胶东地

区、山东省乃至全国范围内具有 Y280-like 分支 NA 基因的毒株都是目前 H9N2 亚型 AIV 的主要类型, G9-like 分支的毒株偶有发生, 到目前为止在大陆商业鸡群中还没有发现具有 G1-like 和 Y439-like 分支 NA 基因的毒株。

NA 蛋白颈部相对于其他部分来说属于高变区。Iqbal 等认为 NA 蛋白影响病毒致病力的分子特征是颈部长度、唾液酸结合位点(HB 位点)、糖基化位点、抗原决定簇和酶活性位点^[14]。

Y280-like 的毒株在颈部 63—65 位点缺失 3 个氨基酸, G9-like 分支的毒株没有缺失, G1-like 分支(巴基斯坦毒株除外)在颈部 38—39 位点缺失 2 个氨基酸, Y439-like 分支的毒株没有缺失。Liu 等报道 NA 蛋白颈部 63—65 位点缺失 3 个氨基酸是大陆 H9N2 亚型 AIV 的分子标志^[15]。本研究涉及的大部分毒株符合这一特点, 而且还发现在山东、河南、四川等地区仍有颈部未缺失的毒株流行。NA 蛋白颈部发生缺失是高致病性亚型禽流感病毒 H5 和 H7 亚型的特征之一^[16], 而 NA 蛋白颈部缺失是否引起 H9N2 亚型 AIV 致病力增强目前尚无定论。

据报道韩国和北美地区及水禽 H9N2 亚型流感 NA 基因 HB 位点 366—373 区域和 399—403 区域的氨基酸序列-ISKDSRSG-和-DNNNWS-都非常保守^[17], 与本次分离株中的 HB 位点序列差异较大, 说明我国大陆地区 H9N2 亚型 AIV 从水禽到商业鸡群传播时 HB 位点序列发生了明显的适应性的变化。如表 1 所示, 这种变化主要发生在 367 位点 G9-like 分支毒株 S→E/V, Y280-like 分支 S→K; 368 位点 G9-like 分支毒株没有发生变化, 而 Y280-like 分支的毒株在该处的氨基酸呈现多样性, 分别出现了 K、E、H、R、D、G、S 多种氨基酸, 而处于进化树分支末端 1~3 亚分支的分离株在该位点处比较一致的突变为 S; 401 和 402 位点处突变也比较统一, 分别是 N→S 和 N→D, 403 位点 Y280-like 分支毒株没有发生过变化, G9-like 分支毒株突变为 S; 431—433 位点处 Y280-like 分支的毒株没有发生变异, G9-like 分支毒株在 432 位点处 Q→K。由此看出, Y280-like 分支和 G9-like 分支的毒株 HB 位点在进化中既有相同之处也存在差异。Matrosovich 等认为亚洲地区 NA 基因 HB 位点的进化受到抗体的阳性选择^[18], 本研究发现变异较大的 368、402、403、432 氨基酸位点恰好处于 NA 蛋白的抗原决定簇区域, 考虑到本研究毒株分离地区普遍免疫

H9N2 亚型禽流感灭活疫苗, 推测此次分离株 HB 位点的突变可能与疫苗的使用有关。Lu 等认为中国大陆商业鸡群和水禽之间存在双向传播^[11], 本研究中 1 株分离自山东地区肉鸭的 H9N2 亚型禽流感毒株 A/Duck/Shandong ly/717/2009 具有商业鸡群的 HB 位点特征, 与水禽 H9N2 的 HB 位点序列差异较大, 推测该毒株可能来源于商业鸡群。山东地区肉鸡和肉鸭的养殖量都非常大, 为水禽和商业鸡群之间毒株的互相传播提供了可能性。

郭霄峰等认为 NA 蛋白第 68、86、146、200、234、402 位的潜在糖基化位点非常保守, 对神经氨酸酶的作用至关重要^[19], 但本研究中 41/63 的毒株失去了第 402 位的潜在糖基化位点。本研究中 52 株 Y280-like 毒株与 G9-like 毒株相比, 因 45 位点氨基酸 S→P 失去了第 44 位点的潜在糖基化位点, 因 63—65 位点氨基酸缺失而失去第 63 位点的糖基化位点, 在第 264 位点新出现糖基化位点的 30 个毒株中有 29 株是 2008—2009 年分离到的, 在 41 株失去 402 糖基化位点的毒株中有 35 株分布在 2008—2009 年, 由于此次分离株大部分集中在山东省, 本研究认为山东地区 H9N2 亚型 AIV NA 蛋白具有失去 402 糖基化位点、获得 264 糖基化位点的趋势。Goto 等报道 NA 蛋白 146 位点糖基化位点的缺失改变了 NA 蛋白的空间位阻和在 C 末端存在赖氨酸残基时导致病毒致病力增强^[20], 本研究中毒株 CK/GD/1/2002 失去了 146 位的糖基化位点, 但是在 C 末端并不存在赖氨酸残基, 关于本毒株的毒力强弱有待于进一步的研究。331、402 糖基化位点处于抗原决定簇区域, 而且 402 位点同时也是唾液酸结合位点, 糖基化位点的失去或获得可能改变毒株的抗原性和酶活性而影响毒株的致病性。

当 N2 亚型 NA 蛋白酶活性位点氨基酸 292 位 R→K、119 位 E→G/A/D/V、294 位 N→S、151 位 D→E 和 276 位 E→D 时, 毒株获得了抗神经氨酸酶抑制剂奥塞米韦和扎那米韦的耐药性^[7-8]。而本研究毒株 NA 蛋白的在以上酶活性位点都非常保守, 没有发生类似的突变。仅 CK/Beijing/2/2001 (H9N2) 在 294 位点 N→D 和 CK/SD ly/717/2009 在 151 位点 D→G, 而这两株病毒是否对奥塞米韦和扎那米韦耐药还不清楚。

本研究没有发现位于 G1-like 分支的 NA 基因, G1-like 亚群毒株有重要的公共卫生学意义, 因为 Quail/HongKong/G1/97 的内部基因和 1997 年发生

的感染人的 H5N1 亚型禽流感相似^[12],而香港 1999 年从人身上分离到的 H9N2 也属于 G1-like 亚群^[21]。

4 结 论

从此次分离到毒株看,中国大陆地区商业鸡群流行的 H9N2 亚型禽流感病毒 NA 基因分为 2 个差异较大分支——Y280-like 分支和 G9-like 分支,而 Y280-like 分支仍是北方地区流行的主要病毒类型。G9-like 分支毒株在华南地区多发,在北方地区零星出现。本研究没有发现位于 G1-like 分支的 NA 基因。本次分离株唾液酸结合位点,糖基化位点变异较大;酶活性位点非常保守,没有发现具有抗神经氨酸酶抑制剂特征性突变的毒株。由于流感病毒种间传播及基因重排现象较多,所以应继续加强对商业鸡群中 H9N2 亚型 AIV NA 基因的检测,实时监控 G1 亚群毒株和耐神经氨酸酶抑制剂毒株是否在中国大陆地区出现。

参考文献:

- [1] 陈伯伦,张泽纪,陈伟斌,等. 禽流感研究 I:鸡 A 型禽流感病毒的分离和血清学初步鉴定[J]. 中国兽医杂志,1994,22:3-5.
- [2] 唐秀英,田国斌,赵传删. 中国禽流感流行株的分离鉴定[J]. 中国畜禽传染病,1998,20(1):1-5.
- [3] 陈福勇,夏 春. 禽流感 A/鸡/北京/1/96(H9N2)株核蛋白基因克隆和序列分析[J]. 中国预防兽医学报,1999,21(2):130-133.
- [4] OGRA P L, CHOW T, BEUTNER K R, et al. Clinical and immunologic evolution of neuraminidase-specific influenza A virus vaccine in humans[J]. *J Infect Dis*, 1997, 135: 466-506.
- [5] PALESE P, TOBITA K, UEDA M, et al. Characterization of temperature-sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase[J]. *Virology*, 1974, 63:397-410.
- [6] KISO M, MITAMURA K, SAKAI-TAGAWA Y, et al. Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study [J]. *Lancet*, 2004, 364: 759-765.
- [7] MCKIMM-BRESCHKIN J L. Resistance of influenza viruses to neuraminidase inhibitors [J]. *Antiviral Res*, 2000,47:1-17.
- [8] HURT A C, HOLIEN J K, PARKER M, et al. Zanamivir-resistant influenza viruses with a novel neuraminidase mutation [J]. *J Virol*, 2009, 83: 10366-10373.
- [9] 王秀荣,李冬梅,陈化兰,等. 禽流感病毒 N1 和 N2

亚型神经氨酸酶 RT-PCR 鉴别方法的建立[J]. 中国兽医科技, 2004, 34(4):9-13.

- [10] HOFFMANN E, STECH J, GUAN Y, et al. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses[J]. *Arch Virol*, 2001, 146: 2275-2289.
- [11] LU J H, LIU L X, SHAO W X, et al. Phylogenetic analysis of eight genes of H9N2 subtype influenza virus: A Mainland China strain possessing early isolates' genes that have been circulating [J]. *Virus Genes*, 2005, 31: 163-169.
- [12] GUAN Y, SHORTRIDGE K F, KRAUSS S, et al. Molecular characterization of H9N2 influenza viruses: were they donors of the internal genes of H5N1 viruses in HongKong? [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 9363-9367.
- [13] HUANG Y, HU B, WEN X, et al. Diversified reassortant H9N2 avian influenza viruses in chicken flocks in northern and eastern China [J]. *Virus Res*, 2010, 151(1):26-32.
- [14] IQBAL M, YAQUB AT, REDDY K, et al. Novel genotypes of H9N2 influenza A viruses isolated from poultry in Pakistan containing NS genes similar to highly pathogenic H7N3 and H5N1 viruses[J]. *PLoS ONE*, 2009, 4(6): e5788.
- [15] LIU J H, WU Q M, SHI Q M, et al. Phylogenetic analysis of neuraminidase gene of H9N2 influenza viruses prevalent in chickens in China during 1995-2002 [J]. *Virus Genes*, 2003, 27:197-202.
- [16] MATROSOVICH M N, KRAUSS S, WEBSTER R G. H9N2 influenza virus from poultry in Asia have human virus-like receptor specificity [J]. *Virology*, 2001, 28:156-162.
- [17] KOBASA D, RODER M E, WELL K, et al. Neuraminidase hemadsorption activity, conserved in avian influenza viruses, does not influence viral replication in ducks [J]. *J Virol*, 1997, 71: 6707-6713.
- [18] MATROSOVICH M, ZHOU N, KAWAOKA Y, et al. The surface glycoprotein of H5 influenza virus isolated from human, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties [J]. *J Virol*, 1999, 73: 1146-1155.
- [19] 郭霄峰,廖 明,辛朝安. 禽流感病毒 (H9N2) HA 和 NA 基因的序列分析 [J]. 畜牧兽医学报, 2002, 33(5):486-491.
- [20] GOTO H, KAWAOKA Y. A novel mechanism for the acquisition of virulence by a human influenza A virus [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 10224-10228.
- [21] PEIRIS M, YUEN K Y, LEUNG C W, et al. Human infection with influenza H9N2 [J]. *Lancet*, 1999,354:916-917.