

2010—2014年山东H9N2亚型禽流感病毒分离鉴定及HA和NA基因序列分析

王冬冬^{1,2}, 张毅², 侯广宇², 刘永举³, 刘翔², 蒋文明², 李金平², 于建敏²,
范丹丹¹, 陈文雅⁴, 王守春⁴, 尹燕博^{1*}, 陈继明^{2*}

(1. 青岛农业大学动物科技学院, 青岛 266109; 2. 中国动物卫生与流行病学中心, 青岛 266032;
3. 青岛农业大学生命科学学院, 青岛 266109; 4. 青岛澳兰百特生物工程有限公司, 青岛 266101)

摘要: 旨在了解山东地区H9N2亚型禽流感病毒(AIV)的流行和遗传变异情况, 为该地区H9N2亚型禽流感的防控提供依据。通过鸡胚接种的方法从山东省分离到1 296株H9N2 AIV, 并选取40株对其进行HA和NA基因的扩增、测序及遗传进化分析。结果显示, 2013年H9N2 AIV的分离率最高, 达42.30%; 40株病毒的HA和NA的核苷酸序列同源性及推导的氨基酸相似性均在90%以上; HA裂解位点序列为PSRSSR↓GLF, NA颈部缺失3个氨基酸; HA和NA均存在糖基化位点的缺失和新的糖基化位点出现; 大部分毒株发生了易于感染人型受体的突变; 演化分析表明40株病毒的HA和NA基因均属于Y280-like亚分支。结果提示, H9N2 AIV在山东省各地区普遍流行且在2013年达到高峰, 所有毒株均符合低致病性禽流感病毒的分子特征, 并且具有结合哺乳动物唾液腺受体的能力, 因此应密切关注H9N2病原出现的新变化, 制定相应的防控措施。

关键词: H9N2; 禽流感病毒; HA; NA; 序列分析

中图分类号: S852.659.5

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2016)04-0852-05

Virus Isolation and Genetic Analysis of HA and NA Genes of H9N2 AIVs Isolated from Shandong Province from 2010 to 2014

WANG Dong-dong^{1,2}, ZHANG Yi², HOU Guang-yu², LIU Yong-ju³,
LIU Shuo², JIANG Wen-ming², LI Jin-ping², YU Jian-min², FAN Dan-dan¹,
CHEN Wen-ya⁴, WANG Shou-chun⁴, YIN Yan-bo^{1*}, CHEN Ji-ming^{2*}

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266019, China; 2. China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao 266032, China;
3. College of Life Science, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266019, China;
4. Qingdao Oland-Better Bioengineering Co., LTD., Qingdao 266101, China)

Abstract: In order to explore the epidemiological and genetic character of the H9N2 viruses, a long-term surveillance have been conducted in Shandong province. One thousand two hundred and ninety six strains of H9N2 virus were isolated from clinical samples, which were collected in chicken farms and LBMs, and the HA and NA genes of 40 strains selected were amplified and sequenced. The HA and NA genes of these viruses shared more than 90% identity at the nucleotide level and amino acid level; most viruses carried the amino acid sequence PSRSSR↓GLF at the HA cleavage site and a 3-amino-acid deletion in the NA stalk; new potential N-glycosylation sites were found in the HA and NA in some viruses; the Q226L (H3 numbering) mutation was detected in

收稿日期: 2015-09-30

基金项目: 国家自然科学基金(31272535); 山东省现代农业产业技术体系家禽创新团队建设项目(SDAIT-13-011-03)

作者简介: 王冬冬(1990-), 男, 山东安丘人, 硕士, 兽医师, 主要从事预防兽医学研究, E-mail: wdd20093246@163.com

* 通信作者: 尹燕博, E-mail: yanboyin2011@163.com; 陈继明, E-mail: chenjiming@cahec.com

all viruses at the receptor-binding pocket of HA; phylogenetic analysis showed that the HA and NA belong to the Y280-like sublineage. The H9N2 influenza virus was widely circulating in poultry farms of Shandong province, and reached peak in 2013; all of isolates preferentially bound to the human-like receptor, but still have the characteristic of low-pathogenic AIV. So, keeping monitoring and controlling H9N2 virus is necessary.

Key words: H9N2; avian influenza virus; HA; NA; sequences analysis

禽流感(avian influenza, AI)是由正黏病毒科 A 型流感病毒属禽流感病毒(avian influenza virus, AIV)引起的禽类的一种传染病。AIV 亚型众多,其中 H9N2 AIV 自 1994 年由陈伯伦等首次从中国大陆分离至今,已在我国持续流行,且宿主范围广泛,包括鸡、鸭、珍珠鸡、鹌鹑等^[1]。H9N2 AIV 已成为制约养禽业发展的重要因素,是我国现有 AIV 的主要亚型^[2]。

AIV 基因组分为 8 节段,至少翻译 11 种蛋白质,其中 HA 和 NA 为两种主要的表面糖蛋白,在流感病毒致病力、宿主特异性等方面起重要作用^[3-10]。HA 基因和 NA 基因的变异性强,是导致病毒抗原变异的主要原因,最能反映流感病毒的变异程度。因此监测 HA 与 NA 基因的进化,调查 HA 与 NA 基因的变异情况至关重要。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 病料和鸡胚 病料来源于 2010—2014 年

山东部分地区送检的病鸡或病变的肺、气管等组织; SPF 鸡胚购自山东 SPF 鸡实验种鸡场,由本实验室孵化至 10 日龄。

1.1.2 标准抗原和阳性血清 AIV、新城疫病毒(NDV)等抗血清由中国动物卫生与流行病学中心馈赠。

1.1.3 主要试剂 RNAiso Plus 试剂、Prime-Script™ One Step RT-PCR Kit(cat. # RR055A)购自宝生物工程(大连)有限公司;无水乙醇、异丙醇、三氯甲烷等均为国产分析纯。

1.1.4 引物设计与合成 HA、NA 基因全长扩增引物参考 E. Hoffmann 等^[10]的研究,引物序列见表 1;引物委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.1.5 主要生物学软件 Lasergene 7 软件包(DNASTAR, Madison, WI, USA), MEGA 6 软件(<http://www.megasoftware.net/>),在线工具 BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>),在线工具 NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)。

表 1 HA 和 NA 全长基因扩增引物

Table 1 Primer set used for RT-PCR amplification of HA and NA gene

基因 Gene	引物序列 Primer (5'-3')	产物长度/bp Expected size
HA	F: TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGG	1 778 + 29
	R: ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT	
NA	F: TATTGGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGAGT	1 413 + 29
	R: ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGAGTTTTTT	

1.2 病毒分离与鉴定

将样品除菌后经尿囊腔接种 10 日龄 SPF 鸡胚分离病毒,每天观察鸡胚存活情况,并于 72 h 无菌收获鸡胚尿囊液,放至 -80 °C 冰箱备用。收获的尿囊液经血凝(HA)、血凝抑制(HI)以及 RT-PCR 检测鉴定。在所分离鉴定的 H9N2 AIV 中,每年选取 8 株(共计 40 株)不同地区的病毒进行 HA 和 NA 基因全长的测序分析。

1.3 核酸提取及扩增

核酸提取参考 RNAiso Plus 试剂说明书进行。核酸样品冻存于 -80 °C 冰箱备用。参考 Prime-Script™ One Step RT-PCR Kit 说明书进行 HA 和 NA 基因全长的扩增。

1.4 基因序列分析

基因扩增产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定后委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。并通过

测序峰图及序列比对分析排除由 RT-PCR 扩增引起的突变。使用 SeqMan 等软件对测序获得的序列进行处理,使用 EditSeq 软件进行核苷酸翻译,使用 MegAlign 计算核酸及蛋白质序列的同源性,通过在线软件 NetNGlyc 1.0 Server 进行糖基化位点预测。

1.5 系统发育分析

从 GenBank 下载已报道的 9 株 H9N2 AIV 的 HA 和 NA 的基因序列作为参考,使用最大似然法(maximum likelihood)建立系统发育树。建树前,使用 MEGA 6 中的 Muscle 程序对建树序列基于密码子(codons)方式进行多重序列比对,利用 Find Best DNA Models 选择最优化的核苷酸替换模型,

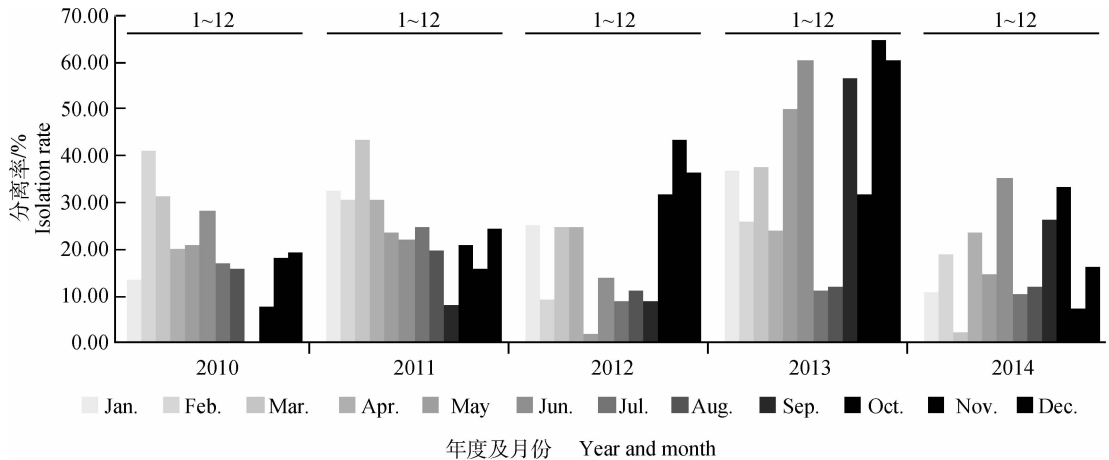


图 1 2010—2014 年 H9N2 亚型禽流感病毒分离率

Fig. 1 Isolation rates of H9N2 avian influenza viruses during 2010-2014

2.2 基因序列分析

将挑选的 40 株 H9N2 AIV 进行 HA 和 NA 基因的扩增和测序。序列分析显示,HA 基因的核苷酸相似性为 92.60%~100%,推导的氨基酸相似性为 94.86%~100%;仅 C/SD/LX294/10 毒株在 HA 蛋白裂解位点序为 PSRSSR↓GIF,其余毒株均为 PSRSSR↓GLF;C/SD/PL135/13 毒株和 C/SD/LY554/10 毒株在 HA 蛋白的 145 aa 处出现一个新的糖基化位点,C/SD/PL135/13 毒株在 313 aa 和 218 aa 处各缺失 1 个糖基化位点,有 7 株病毒(C/SD/YT818/14、C/SD/WF631/14、C/SD/ZC635/13、C/SD/WF345/12、C/SD/LX242/12、C/SD/GM814/12 和 C/SD/LC750/13)在 HA 蛋白的 218 aa 处缺失 1 个糖基化位点;C/SD/PL135/13 毒株在 HA 核苷酸序列的 703—705 位缺失 3 个碱基;测序毒株均有 Q226L、S138A、I155T 和 H183N 突变,

并参照 BIC(Bayesian information criterion)标准设置相应参数,自举值(bootstrap)设置为 1 000。

2 结果

2.1 病毒的分离鉴定

2010—2014 年间,本实验室共检测病料 5 629 份(2010 年 1 055 份,2011 年 2 177 份,2012 年 737 份,2013 年 688 份,2014 年 972 份),通过鸡胚接种分离到 H9N2 AIV 1 296 株(2010 年 223 株,2011 年 476 株,2012 年 161 株,2013 年 291 株,2014 年 145 株),H9N2 AIV 的年分离率分别为 21.14%、21.86%、21.85%、42.30%和 14.92%,每年各月份的病毒分离情况如图 1 所示。

90.0%(36/40)的毒株存在 T160A 突变,87.5%(35/40)的毒株存在 A190V 突变,这些位点的突变均与唾液腺受体结合特异性相关^[1]。NA 基因的核苷酸相似性为 91.10%~100%,推导的氨基酸相似性为 91.96%~100%;测序毒株均在 NA 蛋白的 63—65 aa 处缺失 3 个氨基酸;C/SD/PL135/13 在 NA 蛋白 143 aa 处出现一新糖基化位点,C/SD/LX823/14 毒株在 234 aa 处缺失 1 个糖基化位点。

2.3 HA 和 NA 基因进化分析

应用 MEGA 6 中 Find Best DNA Models 选择最优化的 HA 和 NA 基因核苷酸替换模型分别为 HKY+G+I 和 TN92+G+I,根据模型将参考序列与所测序列构建最大似然树(图 2)。40 株病毒的 HA 基因属于欧亚系 C/BJ/1/94 分支,并且与 D/HK/Y280/97 的相似性达 89.05%以上,属于 Y280 分支;NA 基因同样属于 C/BJ/1/94 分支,与 D/

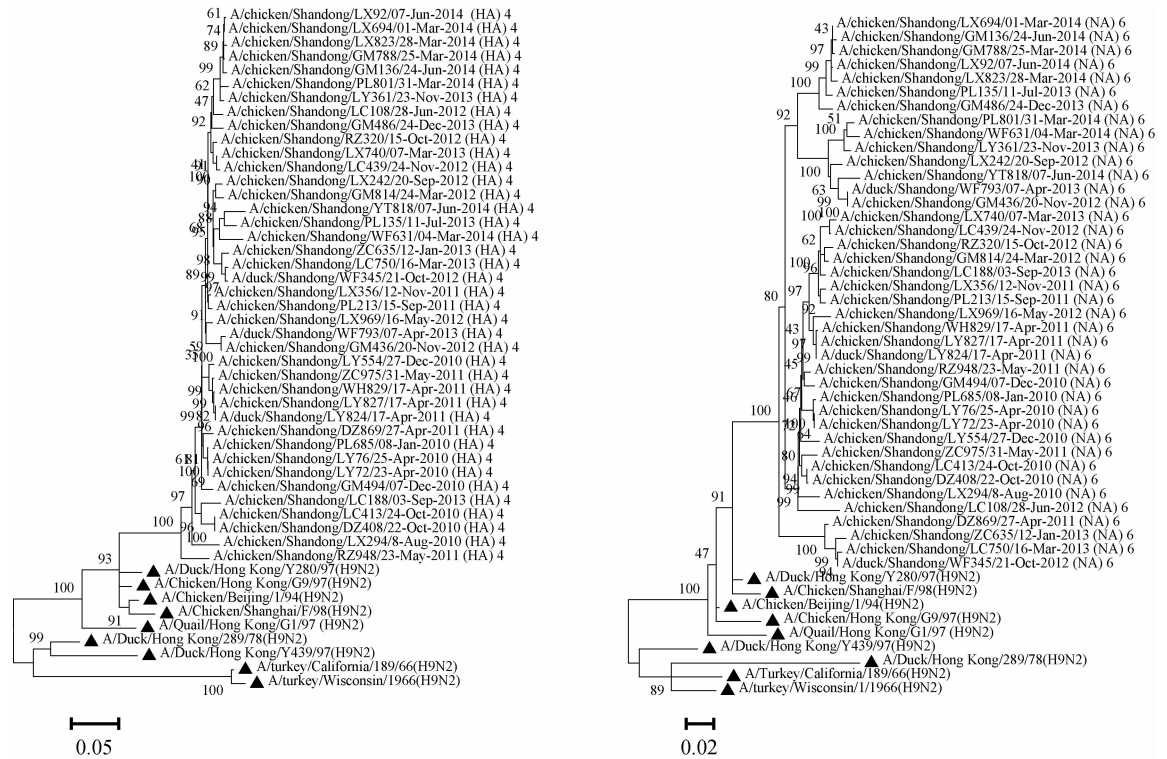


图 2 HA 与 NA 基因系统进化树
Fig. 2 Phylogenetic tree of HA and NA gene

HK/Y280/97 的相似性达 90.77% 以上,属于 Y280 分支。

3 讨论

通过本实验室对山东地区送检样料的 H9N2 AIV 分离情况可以看出,山东地区 H9N2 AIV 普遍流行,并在 2013 年达到峰值;病毒在春冬季节分离率较高,但在较少报道流感发生的温暖月份(7—9 月)也有病毒的分离。

基因序列分析显示,绝大多数毒株的 HA 裂解位点为 PSRSSR↓GLF,属于低致病性毒株的特征。40 株病毒的 NA 蛋白颈部均缺失 3 个氨基酸,这会增强 NA 蛋白酶的活性以及从红细胞释放的能力,同时 NA 颈部缺失的条件下,HA 蛋白序列的 316 aa 处(即裂解位点前第 5 个氨基酸)A→S 的突变可增强 HA 的裂解效率^[3]。2 株病毒在 HA 蛋白 145 aa 出现 S→N 的突变,造成 145—147 aa 多出 1 个糖基化位点,该位点的出现使得毒株的毒力增强和免疫原性的改变^[4]。40 株病毒蛋白质序列均存在与唾液腺受体结合特异性相关位点的突变,显示与哺乳动物唾液腺受体结合增强的特点,这类毒株的流行在公共卫生上值得关注。关于 HA 基因的核苷

酸序列在 703—705 处缺失 3 个碱基是否影响毒株生物学性状等还需进一步研究。

HA 和 NA 基因系统进化分析显示,病毒在不断进化,几乎每年都形成小的分支,但仍属 BJ/94-like 分支中的 Y280-like 亚分支,与国内其他学者的研究报道相一致,提示山东省 H9N2 AIV 可能处于一个比较稳定的遗传进化过程。

H9N2 AIV 不仅在家禽中广泛流行,且已通过多种变异机制获得对新宿主适应能力,可感染鼠、猪、犬等哺乳动物以及人类,对公共卫生健康构成巨大威胁。H9N2 AIV 为 H5N1、H7N9、H10N8 等造成人类死亡的流感病毒提供内部基因,提示加强对 H9N2 AIV 的监测显得尤为重要。

4 结论

山东省各地区普遍流行 H9N2 AIV,并且在 2013 年达到高峰。40 株病毒蛋白质序列均显示与哺乳动物唾液腺受体结合增强的特点,但 HA 蛋白裂解位点序列仍符合低致病性禽流感病毒的分子特征。山东省 H9N2 AIV 在不断进化,但仍属于 Y280-like 亚分支,处于比较稳定的遗传进化过程。

参考文献(References):

- [1] YOON S W, WEBBY R J, WEBSTER R G. Evolution and ecology of influenza A viruses[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2014, 385:359-375.
- [2] WU Y, WU Y, TEFSEN B, et al. Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11[J]. *Trends Microbiol*, 2014, 22(4):183-191.
- [3] CLI X, SHI J, GUO J, et al. Genetics, receptor binding property, and transmissibility in mammals of naturally isolated H9N2 avian influenza viruses [J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10(11):e1004508.
- [4] 王守春, 尹燕博, 王晓红, 等. 63 株 H9N2 亚型禽流感病毒 NA 基因序列分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2011, 42(2):297-305.
- WANG S C, YIN Y B, WANG X H, et al. Sequence analysis of neuraminidase genes of 63 H9N2 subtypes avian influenza viruses [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2011, 42(2):297-305. (in Chinese)
- [5] POST J, DE GEUS E D, VERVELDE L, et al. Systemic distribution of different low pathogenic avian influenza (LPAI) viruses in chicken [J]. *Virol J*, 2013, 10:23.
- [6] SRINIVASAN K, RAMAN R, JAYARAMAN A, et al. Quantitative characterization of glycan-receptor binding of H9N2 influenza A virus hemagglutinin[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4):e59550.
- [7] PALESE P, TOBITA K, UEDA M, et al. Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase[J]. *Virology*, 1974, 61(2):397-410.
- [8] SUN Y, TAN Y, WEI K, et al. Amino acid 316 of hemagglutinin and the neuraminidase stalk length influence virulence of H9N2 influenza virus in chickens and mice[J]. *J Virol*, 2013, 87(5):2963-2968.
- [9] 陈 陆, 郑鹿平, 赵 军, 等. H9N2 亚型禽流感病毒 HA 蛋白 S145N 变异株致病性及抗原特性[J]. *畜牧兽医学报*, 2012, 43(1):82-89.
- CHEN L, ZHENG L P, ZHAO J, et al. Characteristics of pathogenic and antigenic variation of H9N2 avian influenza viruses HA S145N mutants in China [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2012, 43(1):82-89. (in Chinese)
- [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.

(编辑 白永平)