

我国部分地区 H9 亚型禽流感病毒血凝素基因 序列比较与遗传发生关系分析

刘红旗 程 坚 彭大新 贾立军 张如宽 刘秀梵*

(扬州大学农业部畜禽传染病学重点开放实验室 扬州 225009)

摘 要:为从分子水平掌握我国 H9 亚型 AIV 的遗传变异情况和流行规律,本研究汇集近年来从我国 12 个省、市、自治区的发病鸡群中分离到的 23 株 H9 亚型禽流感病毒,通过 RT-PCR 方法和核苷酸序列测定获得了 23 个毒株的 HA 基因 cDNA 核苷酸序列。核苷酸和推导的氨基酸序列同源性比较结果表明,这些毒株 HA 基因的核苷酸序列同源性为 94.1% ~ 100%,氨基酸序列同源性为 95.4% ~ 100%。将这 23 个毒株和来自亚洲及世界其它地区的另外 31 株的 HA 基因 cDNA 序列同源性进行比较发现,分离自香港的 HK170499 株与日本的 2 个毒株关系较近。氨基酸序列分析发现,CKGS199、CKTJ196、CKTJ296、CKSH300 和 CKBJ197 五个毒株各发生了一个潜在的糖基化位点的丢失。54 株 H9 亚型 AIVHA 基因 55bp ~ 1152bp 的氨基酸序列分析发现,裂解位点尽管有 10 种基序,但本研究中的 23 株和近年来从我国大陆和香港地区的分离的毒株则均为 RSSR ↓ GLF,构成受体结合位点的 191 位氨基酸有一个规律,即所有中国大陆毒株与部分香港毒株都为 N,其它毒株均为 H,141aa ~ 143aa 处的糖基化位点有与 191aa 类似的规律,即:凡是 191aa 为 N 的毒株,该处均为 NV(CKBJ194 除外),凡是 191aa 为 H 的毒株,则该处均为 NVT。遗传发生关系分析,中国大陆毒株处于欧亚谱系的第一支。本研究结果表明近年来我国鸡群中 H9N2 亚型禽流感病毒的感染流行可能有一个共同的来源,这为制定防治该亚型禽流感流行的有效对策提供了重要的科学依据。

关键词: H9 亚型禽流感,同源性,序列分析,遗传发生关系

中图分类号 S852.65 文献标识码 A 文章编号 0001-6209(2002)03-0288-10

禽流感(Avian Influenza, AI)是由 A 型流感病毒中任何一种血清亚型毒株引起各种家禽及野生禽类感染和/或发生全身性和/或呼吸器官性综合症的传染病^[1],其病原通常称为禽流感病毒(Avian Influenza Virus, AIV),属正粘病毒科(Orthomyxoviridae)A 型流感病毒属,病毒基因组为分节段单股负链 RNA,编码至少 10 种病毒蛋白,其中血凝素蛋白(HA)为病毒最重要的表面抗原,也是遗传性和抗原性的高变区^[2]。A 型流感病毒亚型众多、易变。目前已发现有 15 种 H 亚型和 10 种 N 亚型,且各亚型之间无血清学交叉反应。AIV 不仅分布广泛,给养禽业造成巨大的经济损失,而且近来的研究表明,其在人类公共卫生上有重要的意义。因此,有关的研究者们对 AI 越来越重视。对于 AIV 的研究主要集中在 H5 和 H7 亚型上,因为迄今发生的高致病性禽流感(Highly Pathogenic Avian Influenza, HPAI)都是由这两个亚型的病毒引起的,而且 HPAI 在 OIE 的疾病分类上属 A 类疾病。但

* 通讯作者

作者简介 刘红旗(1973 -)湖南邵阳人,扬州大学博士研究生,现主要从事病毒分子生物学研究。

收稿日期 2001-08-20, 修回日期 2001-12-06

对 H9 亚型 AIV 的研究还不多。H9 亚型禽流感最早报道于 1996 年^[3]。自 20 世纪 90 年代开始, H9 亚型 AIV 已在亚洲鸡群广泛流行^[4]。我国自 1994 年首次报道从鸡群中分离到 H9 亚型 AIV 以来^[5], 目前绝大部分省市都有 H9 亚型 AIV 的流行, 给我国的养禽业造成了巨大的经济损失。1999 年香港卫生部报道了从 2 名有类流感症状的儿童体内分离到 H9 亚型 AIV^[6]。因此, 开展对 H9 亚型 AIV 的研究, 无论对养禽业, 还是对学术界以及人类公共卫生都有重大的意义。目前对 H9 亚型禽流感的研究主要是在有限的范围内的病原生物学特性和疫苗等方面, 获得了很多的宝贵资料。为了有效地控制该病的流行, 常用的方法是同亚型疫苗免疫接种。然而该亚型病毒在我国流行如此之广泛, 这些流行株之间的关系到底怎样, 还未见有报道。弄清我国 H9 亚型 AIV 流行株之间的关系, 可为制定防制该亚型禽流感流行的有效对策提供重要的科学依据。

1 材料和方法

1.1 病毒

23 株病毒分布于全国 12 个省、市、自治区, 均通过 9~11 日龄 SPF 鸡胚扩增, 血清学鉴定均为 H9N2 亚型 AIV, 本研究毒株及序列比较的参考毒株详细情况见表 1。

表 1 本研究毒株及参考毒株详细情况

Table 1 Viruses for this study and for reference

| Strains | Abbreviations | GenBank accession | Proteolytic cleavage site 3335aa ~ 341aa | Receptor-binding sites* | Potential glycosylation sites** |
|---------------------------|---------------|-------------------|--|-------------------------|---------------------------------|
| A/Chicken/Anhui/1/98 | CKAH198 | a | RSSR ↓ GLS | YWINVLY | NSI NVS NRT NIT NIS NGT NGS |
| A/Chicken/Gansu/1/99 | CKGS199 | a | RSSR ↓ GLS | YWINALY | NSI NVS DRT NIT NVS NGT NGS |
| A/Chicken/Guangxi/1/100 | CKGX100 | a | RSSR ↓ GLS | YWINVLY | NSI NVS NRT NIT NVS NGT NGS |
| A/Chicken/Guangxi/2/00 | CKGX200 | a | RSSR ↓ GLS | YWINVLY | NSI NVS NRT NIT NVS NGT NGS |
| A/Chicken/Hebei/1/00 | CKHB100 | a | RSSR ↓ GLS | YWINVLY | NSI NVS NRT NIT NIS NGT NGS |
| A/Chicken/Henan/1/99 | CKHN199 | a | RSSR ↓ GLF | YWINVLY | NSI NVS NRT NIT NVS NGT NGS |
| A/Chicken/Henan/2/98 | CKHN298 | a | RSSR ↓ GLF | YWINVLY | NSI NVS NRT NIT NIS NGT NGS |
| A/Chicken/Jiangsu/1/99 | CKJS199 | a | RSSR ↓ GLF | YWINVLY | NSI NVS NRT NIT NIS NGT NGS |
| A/Chicken/Jiangsu/2/98 | CKJS298 | a | KSSR ↓ GLF | YWINALY | NSI NVS NRT NIT NVS NGT NGS |
| A/Chicken/Liaoning/1/00 | CKLN100 | a | RSSR ↓ GLF | YWIHVLY | NSI NVS NRT NIT NVS NGT NGS |
| A/Chicken/Liaoning/2/00 | CKLN200 | a | RSSR ↓ GLF | YWINVLY | NSI NVS NRT NIT NVS NGT NGS |
| A/Chicken/Shandong/1/98 | CKSD198 | a | RSSR ↓ GLF | YWINVLY | NSI NVS NRT NIT NVS NGT NGS |
| A/Chicken/Shandong/2/99 | CKSD299 | a | RSSR ↓ GLF | YWINVLY | NSI NVS NRT NIT NVS NGT NGS |
| A/Chicken/Shanghai/1/98 | CKSH198 | b | RSSR ↓ GLF | YWINALY | NSI NVS NRT NIT NVS NGT NGS |
| A/Chicken/Shanghai/2/99 | CKSH299 | a | RSSR ↓ GLF | YWINVLY | NSI NVS NRT NIT NVS NGT NGS |
| A/Chicken/Shanghai/3/00 | CKSH300 | a | RSSR ↓ GLF | YWIHTLY | NSI NVS NRT NIT NVG NGT NGS |
| A/Chicken/Shanghai/4-1/01 | CKSH401-1 | a | RSSR ↓ GLF | YWINVLY | NSI NVS NRT NIT NVS NGT NGS |
| A/Chicken/Shanghai/4-2/01 | CKSH401-2 | a | RSSR ↓ GLF | YWINALY | NSI NVS NRT NIT NVS NGT NGS |
| A/Chicken/Tianjiang/1/96 | CKTJ196 | a | RSSR ↓ GLF | YWINALY | NSI NVS DRT NIT NVS NGT NGS |
| A/Chicken/Tianjing/2/96 | CKTJ296 | a | RSSR ↓ GLF | YWINVLY | NSI NVS DRT NIT NVS NGT NGS |
| A/Chicken/Yuanan/1/99 | CKYN199 | a | RSSR ↓ GLF | YWINALY | NSI NVS NRT NIT NVS NGT NGS |
| A/Chicken/Yuanan/2/00 | CKYN200 | a | RSSR ↓ GLF | YWINVLY | NSI NVS NRT NIT NVS NGT NGS |

(续表 1)

| Strains | Abbreviations | GenBank accession | Proteolytic | Receptor- binding sites* | Potential glycosylation sites** |
|---------------------------------|-----------------|----------------------|-----------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| | | | cleavage site 335aa ~ 341aa | | |
| A/Chicken/Beijing/1/97 | CKBJ197 | a | RSSR ↓ GLF | YWVNIYLY | NST NVS NRT NIT NVS NGT NGS |
| A/Chicken/Hebei/2/00 | CKHB200 | a | RSSR ↓ GLF | YWVNVLY | NST NVS NRT NIT NVS NGT NGS |
| A/Chicken/Beijing/1/94 | CKBJ194 | AF156380 | RSSR ↓ GLF | YWVNVLY | NST NV T NRT NIT NVS |
| A/Chicken/Hongkong/G23/97 | CKHKC2397 | AF156374 | RSSR ↓ GLF | YWVHVLY | NST NVS NRT NIT NVS |
| A/Chicken/Hongkong/G9/97 | CKHKC997 | AF156373 | RSSR ↓ GLF | YWVNVLY | NST NVS NRT NIT NVS |
| A/Chicken/Hongkong/SF2/97 | CKHKSF297 | AF186269 | RSSR ↓ GLF | YWVNVLY | NST NVS NRT NIT NVS |
| A/duck/Hongkong/Y280/97 | CKHKY28097 | AF156376 | RSSR ↓ GLF | YWVNVLY | NST NVS NRT NIT NVS |
| A/Chicken/Guangxi/KMI/99 | CKGKMI99 | AY036880 | RSSR ↓ GLF | YWVNVLY | NST NVS NRT NIT NVS NGT NGS |
| A/Pigeon/Hongkong/Y233/97 | PEHKY23397 | AF156375 | RSSR ↓ GLF | YWVNVLY | NST NVS NRT NIT NVS |
| A/Silkie/Hongkong/SF43/99 | SKHKSF4399 | AF186268 | RSSR ↓ GLF | YWVNVLY | NST NVS NRT NIT NVS |
| A/Chicken/Guangdong/SS/94 | CKGDSS94 | AF384557 | GSSR ↓ GLF | YWVNVLY | NST NVS NRT NIT NVS NGT NGS |
| A/Chicken/Korea/2/96 | CKKR296 | AF156385 | AS YR ↓ GLF | YWIHELY | NST NVT NRT NIT NVS |
| A/Chicken/Korea/3/96 | CKKR396 | AF156384 | AS YR ↓ GLF | YWIHELY | NST NVT NRT NIT NVS |
| A/Chicken/Korea/ms96/96 | CKKRms9696 | AF203008 | AS YR ↓ GLF | YWIHELY | NST NVT NRT NIT NVS NGT NGS |
| A/Chicken/Pakistan/2/99 | CKPK299 | AJ291392 | RSSR ↓ GLF | YWIHALY | NST NVT NRT NIT NIS |
| A/Chicken/Hongkong/739/94 | CKHK73994 | AF156379 | RSSR ↓ GLF | YWIHALY | NST NVT NRT NIT NIS |
| A/Duck/Hongkong/168/77 | DKHK16877 | AF156382 | AS GR ↓ GLF | YWIHELY | NST NVT NRT NIT NVS |
| A/Duck/Hongkong/784/79 | DKHK78479 | AF156383 | AS DR ↓ GLF | YWIHELY | NST NVT NRT NIT NVS |
| A/Duck/Hongkong/Y439/97 | DKHKY43997 | AF156377 | AS NR ↓ GLF | YWIHELY | NST NVT NRT NIT NVS |
| A/Goose/Minnesota/5733/80 | GSM1573380 | AF156389 | VS DR ↓ GLF | YWIHELY | NST NVT NRT NIT NVS |
| A/Hongkong/1703/99 | HK170399 | AJ40626 | RSSR ↓ GLF | YWIHELY | NST NVT NRT NIT NIS |
| A/Hongkong/1704/99 | HK170499 | AJ40627 | RSSR ↓ GLF | YWIHELY | NST NVT NRT NIT NIS NGT NGS |
| A/Parakeet/Chiba/1/97 | PRCB197 | AB049159 | RSSR ↓ GLF | YWIHELY | NST NVT NRT NIT NVS NGT NGS |
| A/Parakeet/Narita/92/98 | PRNR9298 | AB049160 | RSSR ↓ GLF | YWIHELY | NST NVT NRT NIT NVS NGT NGS |
| A/Quail/Arkansas/29209 - 1/93 | QAAK29209 - 193 | AF156388 | AS NR ↓ GLF | YWIHELY | NST NVT NRT NIT NIS |
| A/Quail/Hongkong/AF157/92 | QAHKAF15792 | AF156381 | RSSR ↓ GLF | YWIHELY | NST NVT NRT NIT NVS |
| A/Quail/Hongkong/G1/97 | QAHKG197 | AF156378 | RSSR ↓ GLF | YWIHELY | NST NVT NRT NIT NVS |
| A/Shorebird/Delaware/9/96 | SBDL96 | AF156386 | AS NR ↓ GLF | YWIHELY | NST NVT NRT NIT NIS |
| A/Turkey/California/189/66 | TKCL18966 | AF156390 | VSSR ↓ GLF | YWIHELY | NST NVT NRT NIT NIS |
| A/Turkey/Minnesota/38391 - 1/95 | TKMI38391 - 695 | AF156387 | AS NR ↓ GLF | YWIHELY | NST NVT NRT NIT NIS |
| A/Turkey/Pavia/40/83 | TKPA4083 | AF186266 | IS GR ↓ GLF | YWIHELY | NST NVT NRT NIT NIS |
| A/Turkey/Wisconsin/66 | TKWS66 | D90805 | VSSR ↓ GLF | YWIHELY | NST NVT NRT NIT NIS NGT NGS |

Note: * Receptor-binding sites :109aa, 161aa, 163aa, 191aa, 198aa, 202aa, 203aa; ** Potential glycosylation sites :29aa ~ 31aa,

141aa ~ 143aa, 218aa ~ 220aa, 298aa ~ 300aa, 305aa ~ 307aa, 492aa ~ 494aa, 551aa ~ 553aa ;

a :Viruses for this study ; b See referenc[8].

1.2 引物

根据 H9 亚型禽流感病毒中国分离株 HA 基因序列设计^[8]引物序列为:

上游引物 P1 5' - CCCAAGCTTATGGAAACATATTCACATA - 3' 27mer;

下游引物 P2 5' - CCTGTCGACGTAGAAACAAGGGTGT - 3' 26mer。

预期扩增出约 1.7kb 片段,由宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.3 病毒纯化与 RNA 提取

按参考文献 9 方法进行。

1.4 HA 基因 RT-PCR 扩增

按参考文献 [8] 方法进行, 为确保扩增结果的保真度, 本研究采用了 AMV 反转录酶和 High Fidelity PCR System - 5kb 进行 RT-PCR 扩增。

1.5 HA 基因 cDNA 克隆、鉴定和测序

RT-PCR 产物经凝胶回收后, 按 pGEM-T Easy 载体说明书进行连接、转化, 用 *Hind* III 和 *Sal* I 进行酶切鉴定, 鉴定为阳性克隆后送宝生物工程(大连)有限公司, 采用 Sanger 双脱氧链终止法测序。

1.6 23 个毒株 HA 基因 cDNA 核苷酸序列及推导的氨基酸序列分析比较

借助 DNA Star4.0 分析软件, 通过 Jotun Hein 方法分析比较所得序列的同源性、裂解位点、受体结合位点及潜在的糖基化位点的变化情况。

1.7 毒株与已发表的 H9 亚型毒株的 HA 基因 cDNA 核苷酸序列的比较

从 GenBank 和参考文献中获取 cDNA 核苷酸序列及推导的氨基酸序列, 借助 DNA Star4.0 分析软件, 通过 Jotun Hein 方法, 与本研究的序列进行比较。

1.8 绘制系统发育树

借助 DNA Star4.0 分析软件, 通过 Jotun Hein 方法, 以 HA 基因 55 ~ 1152bp 位核苷酸为基元, 对本研究毒株的 HA 基因与 GenBank 已注册的 H9 亚型流感病毒 HA 基因进行核苷酸同源性邻近排组分析, 建立 H9 亚型 HA 基因系统发育树。

2 结果

2.1 HA 基因 cDNA RT-PCR 扩增

以病毒 RNA 为模板, 利用特异性引物, 通过 RT-PCR 方法均扩增出约 1.7kb 的特异性条带, 其大小与预期完全相符(图略)。

2.2 HA 基因 cDNA 序列分析

共获得了 23 株 H9 亚型 AIV 的 HA 基因 cDNA 全序列, 长均为 1708bp, 没有核苷酸的插入和缺失, 核苷酸序列同源性为 94.1% ~ 100%, 推导的氨基酸序列同源性为 95.4% ~ 100%。cDNA 包含了一个完整的开放阅读框架(ORF), 编码区由 1683bp 组成, 共编码 560 个氨基酸, 包括信号肽(1aa ~ 18aa)、HA1(19aa ~ 337aa)、HA2(339aa ~ 560aa) 和一个精氨酸(338aa)。推导的氨基酸序列分析表明, 除 CKGS199、CKTJ196、CKTJ296、CKBJ197 和 CKSH300 五个毒株(含有 6 个潜在的糖基化位点)外, 其它毒株均含有 7 个潜在的糖基化位点(Asn-X-Ser/Thr, X 为除 Pro 以外的任意氨基酸), 其中 5 个位于 HA1 部分(29aa ~ 31aa、141aa ~ 143aa、218aa ~ 220aa、298aa ~ 300aa、305aa ~ 307aa), 2 个位于 HA2 部分(492aa ~ 494aa、551aa ~ 553aa), 与其它 19 个毒株相比, CKGS199、CKTJ196 和 CKTJ296 三个毒株在 218aa ~ 220aa 处缺少一个潜在的糖基化位点, CKSH300 在 305aa ~ 307aa 处缺少一个潜在的糖基化位点, CKBJ197 在 298aa ~ 300aa 处缺少一个潜在的糖基化位点。裂解位点序列分析发现, 所有 23 个毒株中, 除 CKJS298 株为 KSSR↓GLF 外, 其它毒株均为 RSSR↓GLF。构成受体结合位点的氨基酸(109aa、161aa、163aa、191aa、202aa、203aa)除 198 位氨基酸变化较大外, 其它位点在所有毒株中都是相当保守的。整个 HA 基因变异较大的区域在 55bp ~ 1152bp(19aa ~ 384aa)之间。

除了上述 23 个毒株 HA 基因全序列外, 还从 GenBank 和参考文献中获得了 8 株 H9 亚型 AIV 的 HA 基因的全序列, 包括 3 株中国大陆毒株(CKSH198、CKGDSS94、CKGXKMI99)、2 株日本毒株(PANT92A98、PACB197)、1 株韩国毒株(CKKRms96)、1 株美国毒株(CKWS66) 和 1 株从香港人体分离到的毒株(HK170499)。共计 31 株 H9 亚型 AIV HA 基因全序列, 进行核苷酸序列同源性比较(见表 2)。31 个毒株之间核苷酸同源性为 82.3% ~ 100%。中国大陆 26 个毒株之间同源性为 94.1% ~ 100%。中国大陆 26 株与 HK170499、PANT92A98、PACB197、CKKRms96、CKWS66 之间核苷酸同源性分别为: 90.7% ~ 92.2%、91.4% ~ 92.8%、91.5% ~ 92.9%、84.7% ~ 85.0%、82.8% ~ 83.6%。HK170499 与 PANT92A98、PACB197 两个毒株之间同源性较高, 分别为 97.6% 和 97.9%; 与 CKKRms96 和 CKWS66 的同源性较低, 只有 85.6% 和 83.0%。两个日本毒株(PANT92A98、PACB97)之间同源性为 99.2%, 与 CKKRms96 和 CKWS66 之间同源性分别为: 85.5% 和 83.3%; CKKRms96 和 CKWS66 之间同源性为 82.5%。

根据 HA 基因 cDNA 核苷酸序列同源性, 可将这 31 个毒株分为 3 支, 第一支只有一个毒株 CKWS66, 第二支由 CKKRms96 组成, 第三支包括 26 个中国大陆毒株和 1 个香港毒株(HK170499)、2 个日本毒株(PANT92A98、PACB197); 而第三支又可分为 2 支, 1 支由 26 个中国大陆毒株组成, 另一支由 1 个香港毒株(HK170499)和 2 个日本毒株(PANT92A98、PACB197)组成。

表 2 31 株 H9 亚型 AIVs HA 基因 cDNA 核苷酸序列同源性比较

Table 2 Comparison of nucleotide homology of HA genes cDNA of 31 H9 subtype AIVs

| | 26MCVs* | HK170499 | PANT92A98 | PACB197 | CKKRms96 | CKWS66 |
|-----------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 26MCVs* | 94.1% ~ 100% | 90.7% ~ 92.2% | 91.4% ~ 92.8% | 91.5% ~ 92.9% | 84.7% ~ 85.0% | 82.3% ~ 83.6% |
| HK170499 | | 100% | 97.6% | 97.9% | 85.6% | 83.0% |
| PANT92A98 | | | 100% | 99.2% | 85.5% | 83.1% |
| PACB197 | | | | 100% | 85.5% | 83.3% |
| CKKRms96 | | | | | 100% | 82.5% |
| CKWS66 | | | | | | 100% |

Note: * 26 stains of mainland China

54 个毒株(见表 1) 55bp ~ 1152bp 核苷酸序列及推导的氨基酸序列(19aa ~ 384aa)分析比较发现, 335aa ~ 341aa 裂解位点及邻近序列有 10 种模式, 但都没有与 HPAIV 相关的多个连续碱性氨基酸; 受体结合位点的 7 个氨基酸位点, 除 198aa 变化较大外, 109aa(Y)、161aa(W)、163aa(T)、202aa(L)、203aa(Y)五个位点在 54 个毒株中都是非常保守的, 而 191aa 有 2 种情况, 即 N 和 H, 中国大陆毒株和 6 个香港毒株为 N, 而其它香港毒株和国外毒株均为 H。19aa ~ 384aa 区域中除本研究 5 个毒株(CKGS199、CKTJ196、CKTJ296、CKBJ197 和 CKSH300)只有 5 个潜在的糖基化位点外, 其它 49 个毒株均有 6 个潜在的糖基化位点, 分别位于: 29aa ~ 31aa、82aa ~ 84aa、141aa ~ 143aa、218aa ~ 220aa、298aa ~ 300aa、305aa ~ 307aa、492aa ~ 494aa、551aa ~ 553aa; CKGS199、CKTJ196、CKTJ296 三个毒株在 218aa ~ 220aa 处失去了一个糖基化位点, CKSH300 在 298aa ~ 300aa 处失去了一个糖基化位点, CKBJ197 在 298aa ~ 300aa 处缺少一个潜在的糖基化位点; 另外, 141aa ~ 143aa 处的糖基化位点有与

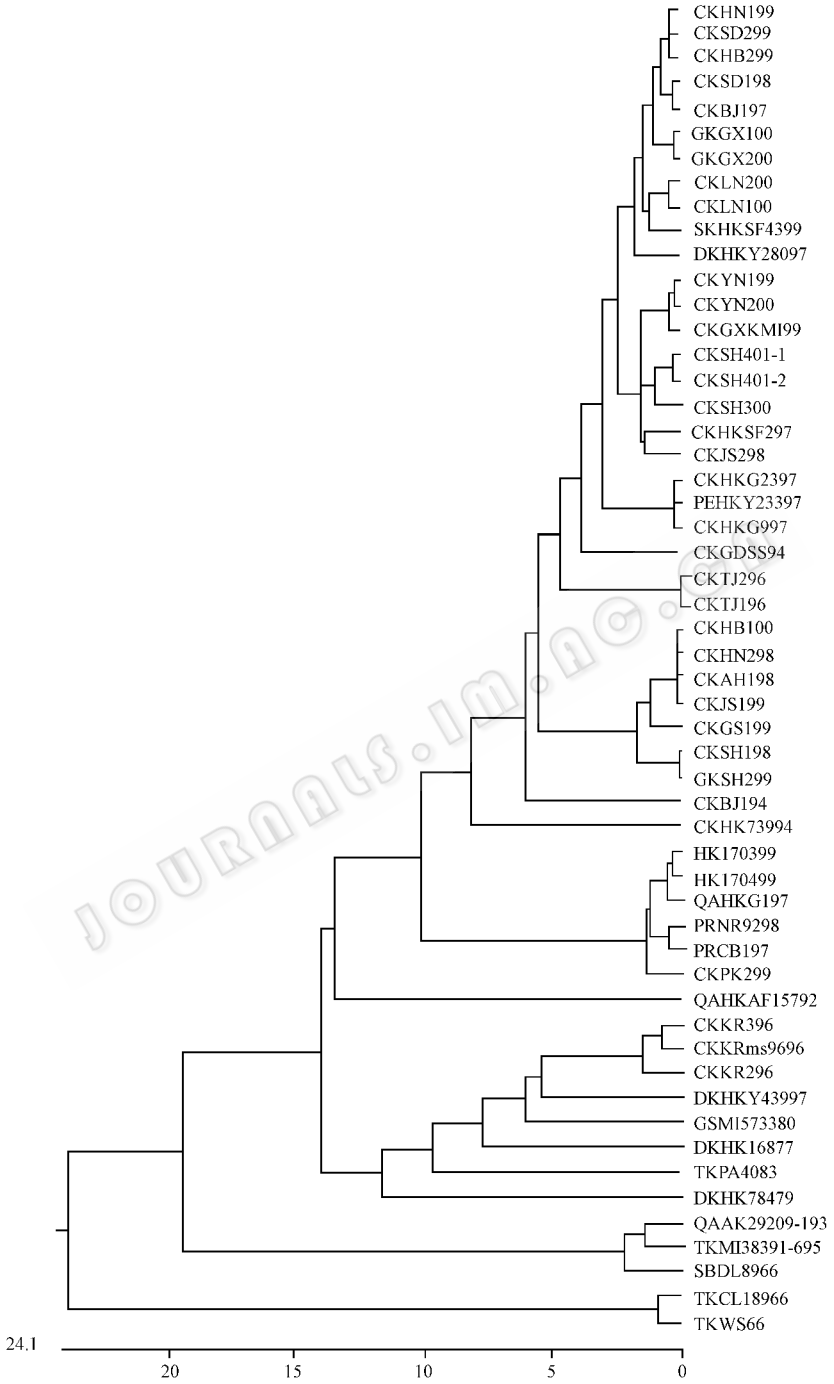


图 1 H9 亚型 A 型流感病毒株之间的遗传发生关系

Fig.1 Phylogenetic relationship among influenza A virus isolates of H9 subtype

191aa 类似的规律,即:凡是 191aa 为 N 的毒株,其 141aa ~ 143aa 处均为 NVS(CKBJ194 除外),凡是 191aa 为 H 的毒株,其 141aa ~ 143aa 处均为 NVT。

2.3 绘制系统发育树

从 GenBank 和参考文献中获取了 31 株 H9 亚型 AIV HA 基因 cDNA 的 55bp ~ 1152bp 之间的核苷酸序列,以此区域序列为基元,借助 DNA Star4.0 分析软件,通过 Jotun Hein 方法对获取的 31 个毒株的 HA 基因和本研究 23 个毒株 HA 基因进行同源性邻近排阻分析,建立了 H9 亚型 HA 基因的系统发育树(见图 1)。如图所示,54 个毒株可分为 2 个谱系(lineage),即欧亚谱系和北美谱系。欧亚谱系又可分为两个亚系(sublineage):亚系 A 和亚系 B,亚系 A 主要由中国大陆毒株组成,此外还包括部分香港毒株、日本毒株和巴基斯坦毒株;亚系 B 由韩国毒株、部分香港毒株和一个美洲毒株(GSM1573380)组成。北美亚系也可分为 2 个亚系:亚系 1 和亚系 2,亚系 1 为 3 个 90 年代的毒株(TKMI38391 - 695、QAAK29209 - 193、SBDL996),亚系 2 为 2 个 60 年代的毒株(TKWS66、TKCL8966)。

3 讨论

3.1 HA 基因 cDNA 全序列分析

共获得了 23 株 H9 亚型 AIV 的 HA 基因 cDNA 全序列,与已报道的序列一致^[8]。

HA 裂解位点的氨基酸序列可能是决定 AIV 毒力的关键因素。研究表明,大多数高致病力毒株的 HA 在其裂解位点附近有多个碱性氨基酸,因而可被细胞内多种蛋白酶所识别和裂解^[10]。因此,高致病力毒株在机体内具有泛嗜性;低致病力毒株的 HA 在其裂解位点附近通常只有一个精氨酸,故只能被有限的一些细胞内蛋白酶所识别,结果是只引起消化道或呼吸道的局部感染。Vey 等^[11]曾对强毒提出了一个最小序列要求,即 R/K - X - K/R - R(但也有例外)。本研究 23 个毒株的裂解位点(335aa ~ 341aa)的氨基酸序列为有两种,即 RSSR ↓ GLF 和 KSSR ↓ GLF,符合低致病性禽流感裂解位点的氨基酸序列特征。但核苷酸分析发现,54 个毒株中有 42 个株的 337aa 为 Ser,其相应的核苷酸分别为 AGT 和 AGC,它们都有可能突变为 AGA,即丝氨酸变为精氨酸,从而使裂解位点成为 HPAIV 的特征序列(R/K - X - K/R - R)。

AIV HA 上的受体结合位点呈袋状,位于头部末端(HA1 部分),每个 HA 单体上有一个^[12]。H9 亚型 AIV 的受体结合位点由 109aa、161aa、163aa、191aa、198aa、202aa、203aa 和 146aa ~ 150aa、232aa ~ 237aa 构成了一个袋状结构,比较了 54 株病毒的这些位点,结果发现,109aa、161aa、163aa、202aa、203aa、146aa ~ 150aa、232aa ~ 237aa 这几个位点是相当保守的,但被认为是 13 种亚型的 AIV 病毒 HA 中都十分保守的一个氨基酸—191aa 的组氨酸^[13,14],研究中却发现有两种情况,即:N 和 H,而且有一定的规律性:中国大陆毒株和 6 个香港毒株为 N,其它香港毒株和国外毒株均为 H(详见表 1),分析导致这种差异的原因可能是其分析的 13 个亚型毒株全部为国外的毒株,并没有包括中国的毒株,这是否是中国 H9 AIV 毒株或 AIV 毒株的一大特点,还需分析更多的毒株。另外,141aa ~ 143aa 处潜在的糖基化位点也有与 191aa 同样的规律,即:凡是 191aa 为 N 的毒株,其 141aa ~ 143aa 处均为 NVS(CKBJ194 除外),凡是 191aa 为 H 的毒株,其 141aa ~ 143aa 处均为 NVT,这也说明了我国大陆的毒株及 6 个香港毒株可能有一个共同来源。

HA 上潜在的糖基化位点是影响 AIV 毒力的可能因素之一。受体结合位点的糖基会影响 AIV 和宿主细胞的结合水平^[15]。裂解位点附近的糖基化位点可能影响到蛋白酶对 HA 前体蛋白的裂解,裂解位点附近糖链的存在干扰了泛在性蛋白酶进入裂解位点^[16]。本研究对 31 株病毒 HA 全基因和 54 株 55bp~1152bp 的潜在的糖基化位点进行了分析比较,54 个毒株中有 5 个毒株在某些部位出现糖基化位点丢失现象,至于这些潜在的糖基化位点的失去,是否会引起该毒株的某些生物学特性的改变,有待于进一步的研究。

3.2 HA 基因 cDNA 全序列同源性比较

获取了 31 株 H9 亚型 AIV HA 基因 cDNA 全序列,这些核苷酸序列同源性为 82.3%~100%。研究表明, A 型流感病毒同一亚型间 HA 基因同源性在 80% 以上,不同亚型同源性在 68.5% 以下^[14]。这进一步说明本研究的 23 个毒株与 H9 亚型 AIV 原形毒株(CKWS66)为同一亚型,即 H9 亚型。香港毒株 HK170499 与两个日本每株的同源性高于与中国大陆的毒株,由于没有详细的流行病学资料,只能说从人体分离到的香港毒株 HK70499 有可能来自日本。韩国毒株 CKKRms96 和美国毒株 CKWS66 与其它 29 个毒株相差较远,同源性为 80% 左右。

抗原漂移是由编码 HA 和/或 NA 蛋白的基因发生点突变引起的,是在免疫群体中筛选变异体的反应。在人类流感病毒确定得最细致,但已知也发生于禽类毒株^[17]。这些研究表明,禽类病毒发生抗原漂移比哺乳动物少,其原因尚不清楚,可能生命周期短的鸟类缺乏免疫选择压力。实质上,单一位点突变就能改变表面蛋白(HA 或 NA)的结构,因此也改变了它的抗原或免疫学特性,导致产生抗原性的变异体。从本研究的 23 个毒株 HA 基因 cDNA 全序列的比较来看,尽管时间上的跨度了 5 年(1996 年~2001 年),但核苷酸的同源性仍为 94.1%~100%,氨基酸同源性为 95.1%~100%,且没有核苷酸的插入或缺失,主要的突变方式为点突变。这为 H9 亚型 AIV 基因工程疫苗的推广应用提供了强有力的理论依据。

近年来, H9 亚型 AIV 在全世界广泛流行,给养禽业造成了巨大的经济损失,目前,对于该病最有效的预防控制措施是使用该亚型病毒的灭活苗。本研究证实,灭活苗的大量频繁使用,会加速病毒的变异速度。在本研究的 23 株病毒中,毒株 CKSH198、CKSH299、CKSH300、CKSH401-1、CKSH401-2 分别为 1998、1999、2000、2001、2001 年同一场的分离株,HA 基因核苷酸同源性比较表明,CKSH198 和 CKSH299 的同源性较高,为 99.9%,CKSH300、CKSH401-1、CKSH401-2 的同源性也很高,分别为 98.5%、98.2 和 99.7%,但前两个毒株与后三个毒株的同源性在 94% 左右。这 1999~2000 年之间的界线的形成,可能是由于该场从 1998 年开始使用该亚型病毒的疫苗,病毒在疫苗 1 年的选择压力下,2000 年开始发生变异,2001 年又适应了疫苗,变异就暂缓下来,以后是否会有更大的变化,有待于进一步追踪研究。由此看来,尽管自然选择压力对禽类流感病毒影响较小(可能是由于禽类生命周期短),但人为的选择压力(如疫苗)对该病毒的影响是不可忽视的,特别是对于 AIV 这样一种难以净化而始终在一个场里循环的病毒,尤其如此。

3.3 H9 亚型 HA 基因遗传发生关系

从建立的 H9 亚型 HA 基因的系统发育树(见图 1)发现,54 个毒株可分为 2 个谱系(lineage),即欧亚谱系和北美谱系。北美谱系的 5 个毒株均为美国毒株,而 Banks 等^[18]研

究发现北美谱系还包括欧洲意大利的一些毒株,分析原因可能是由于活禽贸易从欧洲传到北美的。北美谱系又可分为 2 个亚系:亚系 1 和亚系 2,亚系 1 为 3 个 90 年代的毒株(TKMI38391-695、QAAK29209-193、SBDL996),亚系 2 为 2 个 60 年代的毒株(TKWS66、TKCL8966),两个亚系间的核苷酸同源性的 81.2%~82.9%,差异性为 20.1%~22.5%,这是由于约 30 年的自然选择压力造成的。欧亚谱系又可分为两个亚系(sublineage):亚系 A 和亚系 B,亚系 A 主要由中国大陆毒株组成,此外还包括部分香港毒株、日本毒株和巴基斯坦毒株,中国大陆毒株可以分为 2 支,但没有时间和地域上的规律性,出现了不同地方、不同时间的毒株在同一地方共循环的特点,这可能是由于地方之间的商业来往日益频繁,再加上该病难以控制所造成的。亚系 B 由韩国毒株、部分香港毒株和一个美洲毒株(GSMI573380)组成。欧亚谱系中香港毒株分布很松散,没有自成一派,这可能是由于香港同国际间的频繁贸易往来,使世界不同国家和地区的毒株在香港汇集。美洲毒株 GSMI573380 也可能是欧亚谱系的毒株通过国际贸易传到美洲去的。韩国毒株从遗传发育树上看是归属于欧亚谱系,但同源性分析可以发现,它们同欧亚谱系和北美谱系都只有 85% 左右,建议将它们单独确立为一个谱系。

参 考 文 献

- [1] 陈伯伦,张泽纪,陈伟斌. 养禽与禽病防治, 2000, 7 : 11 ~ 13.
- [2] 甘孟侯. 禽流感. 北京: 北京农业大学出版社, 1995.
- [3] Homme P J, Easterday B C. *Avian Diseases*, 1970, 14 (2) : 285 ~ 290.
- [4] Alexander D J. Proceeding of the Fourth International Symposium on Avian Influenza. Athens, GA :United States Animal Health Association, 1997. 9 ~ 13.
- [5] 陈伯伦,张泽纪,陈伟斌,等. 中国兽医杂志, 1994, 22 (10) : 3 ~ 5.
- [6] 矢泽慈人. 刘霓红译. 鸡病研究会报, 1999, 33 (2) : 109.
- [7] Haas L. *J Vet Med*, 1997, 44 (5) : 257 ~ 272.
- [8] 程 坚,刘红旗,彭大新,等. 江苏农业研究, 2001, 22 : 70 ~ 73.
- [9] 吴艳涛,刘秀梵,张如宽,等. 江苏农学院学报, 1996, 17 : 73 ~ 74.
- [10] Senne D A. *Avian diseases*, 1996, 40 : 425 ~ 437.
- [11] Vey M, Olich M, Adlers S, et al. *Virology*, 1992, 188 : 408 ~ 413.
- [12] 郭元吉,程小雯. 流行性感冒美丽及实验技术. 北京: 中国三峡出版社, 1997.
- [13] Gilian M Air. *Proc Natl Acad Sci*. 1981, 78 : 7639 ~ 7943.
- [14] Nobusawa E, Aoyama T, Kato H. *Virology*, 1991, 182 : 475 ~ 485.
- [15] Perdue M L, Latimer J W. *Virology*, 1995, 213 : 276 ~ 283.
- [16] Kawaoka Y, Webster R G. *Arch Virol*, 1985, 103 : 139 ~ 145.
- [17] B W 卡尔尼克(高 福,苏敬良主译). 禽病学. 第十版. 北京: 中国农业出版社, 1999.
- [18] Banks J, Speidel E C, Harris P A, et al. *Vet Microbiol*, 2000, 74 : 87 ~ 92.

Comparison of Sequences of the Hemagglutinin Gene and Phylogenetical Analysis of H9 Subtype Avian Influenza Viruses Isolated From Some Regions in China

Liu Hongqi Cheng Jian Peng Daxin Jia Lijun Zhang Rukuan Liu Xiufan*

(Key Laboratory of Animal Infectious Diseases of Ministry of Agriculture, Yangzhou University, Yangzhou, 225009, China)

Abstract : In order to explore the genetic mutations of the hemagglutinin (HA) gene and the law of molecular epidemiology of H9 subtype avian influenza viruses in China, 23 H9 subtype avian influenza viruses (AIVs) were isolated from 12 provinces of China in recent years. Their nucleotide sequences of cDNA of HA gene were determined by RT-PCR and sequencing. Their nucleotide and putative amino acid sequences homology was compared. The results showed that their nucleotide sequence homology was from 94.1% to 100% and that amino acid sequence homology was 95.4% to 100%. The sequences of the HA gene of these isolates were analyzed and compared with that of another 8 isolates from reference. The similarity indicated that HK170499 isolated from Hong Kong was close to the 2 isolates of Japan. And of the 31 isolates with complete HA gene sequences there were 5 isolates, HA gene of which were loss of one potential glycosylation site, which were CKGS199, CKTJ196, CKT296, CKSH300 and CKBJ197. Then 1098 nucleotide regions (bases 55 to 1152) of HA gene of 23 isolates in this study were analyzed phylogenetically and compared with sequences from 31 H9 subtype viruses available in the GenBank database. Although considerable variation at the cleavage sites of the different viruses was observed, giving 10 different amino acid motifs, none had multiple basic amino acids that correlate with highly pathogenic avian influenza (HPAI) isolates. Examination of amino acid sequences involved in receptor binding site (RBS) revealed that the amino acid residue at position 191 characteristically distributed in the 54 isolates, that is, this amino acid residue of the isolates of mainland China and several Hong Kong strains was Asn (N) and that of the others was His (H). And the 141-143 amino acid residues, involved in forming the potential glycosylation sites, had the similar characteristic distribution with the 191aa position. The isolates with Asn-191, excluding CKBJ197, had NVS in the position 141aa-143aa, meanwhile those with His-191 had NVT. Twenty-six mainland China isolates was genetically in Eurasian lineage but did not show distinctly geographical and temporal relationship. It is concluded that in recent years H9N2 subtype AIV, circulating in chicken flocks of mainland China, may have a common origin. These findings provides important basis for establishment of scientifically preventive measurements to control H9 subtype avian influenza.

Key words : H9 subtype avian influenza, Homology, Sequence analysis, Phylogenetic relationship