

## 新甲型 H1N1 (2009) 流感病毒的早期分子特征

祁贤, 汤奋扬\*, 李亮, 崔仑标, 吴斌, 祖荣强, 朱凤才, 羊海涛, 汪华

(江苏省疾病预防控制中心, 南京 210009)

**摘要:**【目的】本世纪首次流感大流行的病原属于甲型 H1N1 流感病毒, 在遗传特性和抗原性等方面都有别于人群中流行多年的季节性 H1N1 流感病毒。为了深入了解病毒的遗传特性, 跟踪病毒的演化趋势, 及时发现具有流行病学意义的变异株, 本研究对早期分离的甲型 H1N1 (2009) 病毒的分子特性进行了详细分析。【方法】通过 GenBank 的流感资源中心下载相关毒株的基因组信息, 序列分析采用 DNASTar 软件包的 EditSeq 和 MegAlign, 比较与病毒致病性和宿主特异性相关的氨基酸变化情况。以 A/California/07/2009 (H1N1) 作为新甲型 H1N1 (2009) 的早期代表株进行详细的分子特征分析。【结果】A/California/07/2009 不具备高致病性流感病毒的分子特征; 病毒编码的 11 个蛋白大部分保留有猪流感病毒的分子特征, 同时也具有一些禽和人流感病毒的特征; PB1-F2 在 11aa, 57aa 和 87aa 后发生断裂, 具有古典猪 H1N1 和人 H1N1 双重特点, 这是甲型 H1N1 (2009) 病毒一个特有的分子特征。【结论】首次详细分析了新甲型 H1N1 (2009) 病毒的分子特征。随着病毒在人群中的进一步适应和持续存在, 这些分子特征将发生变化, 应该特别关注这些变化对病毒的传播力和致病性的影响。

**关键词:** 甲型流感病毒; H1N1; PB1-F2; 流感大流行; 分子特征

**中图分类号:** R37      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2010) 01-0081-10

流感病毒属于正粘病毒科, 根据 NP 蛋白的抗原性可分为甲型、乙型和丙型流感病毒。在流感病毒大家族中, 甲型流感病毒的宿主分布最广, 可感染禽、人、猪、马、狗、猫、海洋哺乳动物 (海豹、鲸等) 等<sup>[1]</sup>。在整个甲型流感病毒的生态分布中, 野生水禽是主要的自然贮存宿主和基因库, 目前发现的所有甲型流感病毒亚型 (16 个 H 亚型和 9 个 N 亚型) 都存在于野生水禽中, 而猪被认为是禽、人流感病毒的中间宿主和不同来源流感病毒的基因“混合器”<sup>[2]</sup>。20 世纪人类经历了 3 次流感大流行, 分别是 1918 年西班牙流感 (H1N1)、1957 年亚洲流感 (H2N2) 和 1968 年香港流感 (H3N2)<sup>[1,2]</sup>。据估计, 全球每年约有 25-50 万人死于季节性流感引发的

疾病<sup>[3]</sup>。甲型流感有两种主要的变异方式, 即表面蛋白 HA 和 NA 点突变引起的抗原漂移 (antigenic drift) 和 8 基因节段重配引起的抗原转移 (antigenic shift), 而抗原转移往往引起人类流感新的大流行<sup>[2]</sup>。甲型流感病毒基因分 8 个节段, 目前发现编码 11 种蛋白, 这些蛋白与病毒的致病性和宿主特异性密切相关<sup>[4]</sup>。

自 2009 年 3 月份, 源于北美的流感疫情向全球迅速扩散, 最终演变为 1968 年以来新世纪首次流感大流行。此次大流行的病原属于新甲型 H1N1 流感病毒, 在遗传特性和抗原性等方面都有别于人群中流行多年的季节性 H1N1 流感病毒, 人群普遍易感。进化分析表明, 新甲型 H1N1 (2009) 流感病毒是欧

基金项目: 国家自然科学基金 (30901285), 江苏省自然科学基金 (SBK200922783)

通信作者: Tel/Fax: +86-25-83759507; E-mail: tfyepi@jscdc.cn

作者简介: 祁贤 (1971-), 男, 博士, 副研究员, 主要研究方向为流感病毒病原学。E-mail: qixiansyc@hotmail.com

收稿日期: 2009-09-25; 修回日期: 2009-11-22

洲猪流感病毒(提供 NA 和 M 基因)和北美三源基因重配的猪 H1 流感病毒(提供 PB2、PB1、PA、HA、NP 和 NS 基因片段)通过基因重配的产物;从基因的最初来源看含有人、禽和猪流感病毒的基因,该病毒可能早在 2008 年 12 月到 2009 年 1 月间就在猪群中出现<sup>[5]</sup>,目前已经成为全球人群中甲型流感病毒优势流行株。

新甲型 H1N1(2009)病毒的显著特点是在人群中传播速度快,但致病力与季节性流感病毒相当。随着病毒的快速传播和人群免疫屏障的逐步建立,病毒的变异成为关注的焦点。深入了解病毒的分子特性,对于跟踪其遗传变异,及时发现具有流行病学意义的变异株具有重要意义。但目前对病毒的分子特征研究,报道较少。本研究通过甲型流感病毒在人、猪和禽等宿主中的进化特征分析,详细分析了甲型 H1N1(2009)早期流行株致病性、抗药性和宿主特异性的分子特性;在此基础上,预测了病毒的进化和变异趋势。

## 1 材料和方法

### 1.1 病毒序列

通过 GenBank 的流感资源中心 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html>) 下载相关病毒的基因组信息。我们分析了约 120 株不同年代、不同宿主(主要是禽、猪和人)的流感病毒序列(资料未显示),以便确定病毒在不同宿主中的分子进化特征。其中 A/California/07/2009(H1N1)是目前新甲型 H1N1(2009)疫苗株,A/South Carolina/1/18(H1N1)作为 1918 年西班牙流感代表毒株;A/Brisbane/59/2007(H1N1)是 WHO 推荐的 2008 - 2009 年度和 2009 - 2010 年度北半球季节性 H1N1 疫苗推荐株;A/Swine/Iowa/1/1930(H1N1)作为古典猪 H1N1 病毒代表株;以 A/Swine/Indiana/9K035/1999(H1N2)、A/Swine/Hong Kong/5190/1999(H3N2)和 A/Swine/England/WVL7/1992(H1N1)作为新甲型 H1N1 母源病毒的代表株。

### 1.2 序列比较分析

序列分析采用 DNASTar 软件包(Madison, WI, USA)的 EditSeq 和 MegAlign。将新甲型 H1N1(2009)疫苗株 A/California/07/2009(H1N1)和其它参考毒株编码的 11 蛋白(HA、NA、NP、M1、M2、NEP、NS1、PB1、PB2、PA 和 PB1-F2)进行分析,比较与病毒致病性、耐药性以及宿主特异性相关的氨基酸变化情况。

## 2 结果

### 2.1 血凝素(Hemagglutinin, HA)

**2.1.1 裂解位点(Cleavage site):** A/California/07/2009 的 HA 基因编码区全长 1701bp,共编码 566 个 aa,包括 N 末端 17 个 aa 的信号肽。HA 蛋白由 HA1(326aa)和 HA2(223aa)两部分组成,二者由一个碱性氨基酸 R 连接,裂解位点 aa 序列为 IQSR↓G,与高致病性禽流感病毒含多个碱性氨基酸裂解位点相比,是典型的低致病性流感病毒特征之一<sup>[1]</sup>。

**2.1.2 抗原位点(Antigenic site):** HA 蛋白是流感病毒的主要表面抗原之一,遗传进化最为活跃。与 HA2 蛋白相比,HA1 蛋白位于 HA 蛋白的球部,承受着更大的免疫选择压力,因此更易发生变异。早期研究表明 H1 亚型 HA1 蛋白上的 44 个氨基酸是宿主免疫系统作用的靶点,其变异直接影响病毒的抗原漂移<sup>[6]</sup>。44 个氨基酸分布在 4 个抗原位点上,即 Ca(14aa)、Cb(8aa)、Sa(13aa)和 Sb(13aa)。A/California/07/2009 与 A/Swine/Indiana/9K035/1999(北美三源基因重配猪 H1 病毒)相比,HA 核苷酸和推导的氨基酸相似性分别是 95.1% 和 94.9%,整个 HA 蛋白共有 27 个氨基酸差异,20 个位于 HA1 蛋白上,其中 6 个差异分布在 3 个抗原位点上(Ca 2 个、Cb 1 个、Sa 3 个)。相比之下,A/California/07/2009 与 A/Brisbane/59/2007 的 HA 核苷酸和推导的氨基酸相似性分别是 72.4% 和 79.0%,整个 HA 蛋白共有 108 个氨基酸差异,90 个位于 HA1 蛋白上,其中 23 个差异分布在 4 个抗原位点上(Ca 7 个、Cb 5 个、Sa 1 个、Sb 8 个)。可见新甲型 H1N1 病毒抗原位点的氨基酸与季节性 H1N1 病毒差别较大,这在分子水平上解释了二者在人群中血清抗体的差异。

**2.1.3 糖基化位点(Glycosylation site):** 某些糖基化位点是 HA 蛋白发挥功能所必需的。病毒在进化过程中也会获得新的糖基化位点,这些新积累的糖基化位点可能会掩盖抗原位点,成为病毒逃避宿主免疫压力的一种方式<sup>[7]</sup>。研究表明,所有禽 H1 病毒、A/South Carolina/1/18 和 A/Swine/Iowa/1/1930 的 HA1 蛋白拥有共同保守的 4 个糖基化位点,分布在 22、33、94 和 289 位<sup>[8]</sup>。A/California/07/2009 HA 蛋白在 278 位增加了一个糖基化位点(NTT),即有 5 个潜在糖基化位点,这与近年来古典猪 H1N1 和 A/Swine/Hong Kong/5190/1999 病毒完全一致。A/Brisbane/59/2007 在 63、129、163 位增加了 3 个,达到 7 个糖基化位

点。可见在糖基化方面, A/California/07/2009 的 HA 蛋白也保留了古典猪 H1 的特点, 与季节性 H1N1 病毒相比其糖基化的进化空间较大。

**2.1.4 受体结合位点 (Receptor-binding site, RBS):** 流感病毒 HA 蛋白与宿主细胞表面受体的结合是感染发生的关键一步。HA 蛋白受体分为 2 种:  $\alpha$ -2,3 半乳糖苷唾液酸 (SA $\alpha$ 2-3Gal) 和  $\alpha$ -2,6 半乳糖苷唾液酸 (SA $\alpha$ 2-6Gal)。禽和马流感病毒对 SA2,3Gal 具有亲嗜性, 而人和猪流感病毒对 SA2,6Gal 的亲嗜性最高<sup>[2]</sup>。HA 蛋白的受体结合特性也是流感病毒宿主限制性的一个重要决定因素。这种结合的特异性与 HA 蛋白受体结合位点上的一些氨基酸性质密切相关, 而这些氨基酸改变直接影响了病毒的受体结合特性。所有流感病毒都来源于野生水禽, 在流感病毒跨物种感染并适应新宿主(人和猪)的过程中, 受体结合特性的转变至关重要。研究发现, 一些 RBS 上的氨基酸在所有禽流感病毒中都是保守的, 而在哺乳动物中适应后就发生了变化, 具有了宿主特异性<sup>[8-9]</sup>。对于 H1 亚型流感病毒而言, 8 个与受体结合相关的氨基酸在禽 HA 中都是保守的, 但进入人或猪群中适应后则发生了变化(表 2)。研究表明, E190D 和 G225E/D 这两个位点氨基酸的转变, 在禽 H1 病毒增强 SA $\alpha$ 2-6Gal 亲和性, 同时减弱对 SA $\alpha$ 2-3Gal 亲和性中起关键作用; 特别是 E190D 的转变, 可能是禽 H1 病毒适应哺乳类(人和猪)的最低要求<sup>[8-9]</sup>。A/California/07/2009 HA 蛋白 190 和 225 位氨基酸都是 D, 这也是北美三源重配猪 H1 病毒(以 A/swine/Indiana/9K035/99 为例)和大多数 H1 病毒(以 A/Brisbane/59/2007

为例)的特征(表 1)。纯粹的古典猪 H1N1(即没有发生基因重配)和大多数欧洲类禽 H1N1(只有两株早期的流行株除外, 这两株 225 位是 E)在 190 和 225 位氨基酸分别是 D(哺乳类特征)和 G(禽类特征), 这可能也是猪流感病毒能够结合两种受体的分子机制之一<sup>[8]</sup>。三源重配 A/Swine/Indiana/9K035/1999 的 HA 来源于古典猪 H1N1 病毒, 其中一个重要的变化是 225 位氨基酸由 G 转变为 D。这就意味着与母源古典猪 H1N1 病毒相比, 北美重配的猪 H1 病毒已经大大增强了对 SA $\alpha$ 2-6Gal 受体的结合能力, 而这种特征在 A/California/07/2009 中也得到了保留, 这可能成为新甲型 H1N1 病毒在人际间传播的重要分子基础。此外, 其它 RBS 上相关氨基酸的变化对受体结合特性的影响还不清楚, 这种变化可能与宿主适应性有关。相对于禽 H1 而言, T155V/I 和 T159N/S 的转变是古典猪 H1 和类禽猪 H1 病毒的特征, 人 H1 病毒的 155 位没有变化, 而 159 位由 T 转为 G。A/California/07/2009 的 HA 蛋白的 155 和 159 位氨基酸分别是 V 和 N, 是典型的猪流感病毒特征(表 1)。我们分析发现, 与禽 H1 病毒一样, 大多数古典和类禽以及近年来(约在 2000 年以来)人 H1 在 186 位氨基酸是 P, 而 A/California/07/2009 和 A/swine/Indiana/9K035/99 则为 S, 在约 1999 年以前人 H1 的 186 也主要是 S(表 1)。总之, A/California/07/2009 的 HA 蛋白 RBS 位点的氨基酸同时具有人和猪流感病毒的特点, 而且这些特点已经存在于 1999 年产生的三源重配猪 H1 病毒中。

表 1 A/California/07/2009 与参考株 HA 受体结合位点氨基酸比较

Table 1 Amino acid residues on receptor-binding sites of HA proteins of A/California/07/2009 and the reference viruses

Virus	Residues on the receptor-binding sites of HA proteins <sup>a</sup>								
	71	138	155	159	186	190	194	225	lineage
A/California/07/2009 (H1N1)	E	A	V	N	S	D	L	D	Tripe-reassortant swine, North America
A/swine/Indiana/9K035/99 (H1N2)	E	A	V	N	S	D	L	D	Tripe-reassortant swine, North America
A/swine/Iowa/930/01 (H1N2)	E	A	V	N	P	D	L	D	Tripe-reassortant swine, North America
A/swine/Iowa/1/1976 (H1N1)	E	A	V <sup>#</sup>	N	P	D	L	G	Classical swine
A/Brisbane/59/2007 (H1N1)	E	A	T <sup>#</sup>	G <sup>#</sup>	P	D	L	D	Seasonal human
A/duck/Miyagi/66/1977 (H1N1)	D <sup>#</sup>	A <sup>#</sup>	T <sup>#</sup>	T <sup>#</sup>	P <sup>#</sup>	E <sup>#</sup>	L <sup>#</sup>	G <sup>#</sup>	Avian
A/swine/England/WVL7/1992 (H1N1)	D	A	V	N	P	D	L	G	Avian-like swine, Europe
A/South Carolina/1/18 (H1N1)	D	A	T <sup>#</sup>	S <sup>#</sup>	P	D <sup>#</sup>	L	D	Spain pandemic, 1918

<sup>a</sup> Residues numbering is aligned to the H3 virus HA. <sup>#</sup> Amino acid is conserved in all sequences in this host.

**2.2 神经氨酸酶 (Neuraminidase, NA)**

A/California/07/2009 的 NA 的 ORF 全长 1407bp, 编码 469 个氨基酸。NA 蛋白包括 3 个功能

区: 从 N 端开始约 30 个疏水序列是信号肽和膜锚定区; 从 77 位氨基酸起到 C 末端是头区, 包括所有的酶催化位点和抗原位点; 在膜锚定区和头部区之

间是约 50 个氨基酸的茎区。A/California/07/2009 的 NA 蛋白没有发生插入或缺失突变。没有发生氨基酸缺失的禽流感 N1 亚型 NA 蛋白一般有 7 个糖基化位点<sup>[8]</sup>, 分别位于 57、58 (按照 N1 亚型排序)、62、67、88、146 和 234 位, 而 A/South Carolina/1/18 有同样的糖基化位点。A/California/07/2009 和 A/Swine/England/WVL7/1992 除了上述 7 个位点, 在 389 位增加了一个糖基化位点, 总计 8 个位点。而 A/Brisbane/59/2007 也有 8 个位点, 其中五个位点与上述毒株位置相同(57、62、88、146 和 234), 而另外 3 个则分布在不同的位置(48、434 和 454 位)。可见与人季节性 N1 相比, A/California/07/2009 在糖基化方面与禽流感病毒更接近。对于 N1 亚型 NA, 146 位糖基化对病毒致病性的影响更值得关注。146 位糖基化位点在所有 N1 亚型(包括人、猪、禽)病毒中都是保守的, 该位点糖基化的丧失可能对病毒的组织嗜性, 特别是神经嗜性有影响<sup>[10]</sup>。毒株 A/WSN/33(H1N1) 和 A/NWS/33 是 2 株小鼠适应株, 可以在小鼠的脑部复制, 具有神经嗜性, 其典型特点是 NA 基因在 146 位缺少 1 个糖基化位点(N146Y/R), 这可能是神经嗜性的主要分子基础。同样, A/California/07/2009 在 146 位没有丧失糖基化位点, 因此可能不具备上述相应的神经嗜性。

N1 亚型 NA 的抗原位点目前还不明确, 但可以参照 N2 亚型 NA 的抗原位点<sup>[11]</sup>。A/California/07/2009 与 A/Brisbane/59/2007 相比, 核苷酸和氨基酸的同源性分别是 75.7% 和 80.5%, 共有 87 个氨基酸差异, 其中 8 个位于抗原位点上(N221Q, N329E, K331G, G339N, N344D, I368N, S369R, S370L)。A/California/07/2009 与 A/Swine/England/WVL7/1992 相比, 核苷酸和氨基酸的同源性分别是 94.2% 和 94.9%, 共有 24 个氨基酸差异, 其中只有 1 个位于抗原位点上(K331R)。可见 A/California/07/2009 的 NA 抗原性与季节性 H1N1 病毒差别较大。

NA 蛋白的酶催化活性位点在 4 聚体每个亚单位球状头部的表面, 包括 9 个酸性氨基酸(E119, D151, D198, E227, D243, E276, E227, D330, E425) 和 6 个碱性氨基酸(R118, R152, R224, H274, R292, K350), 这 15 个极性氨基酸在所有 A 型流感病毒的 NA 蛋白中都是保守的, 是发挥神经氨酸酶活性所必需的<sup>[11]</sup>。A/California/07/2009 在这些位点的氨基酸都很保守。与整个 NA 蛋白的相比, 茎区的氨基酸变异最大, 而且即使是同一亚型不同毒株间茎区的氨基酸变化也非常大。早期的研究显示茎区

长度对流感病毒的宿主限制性有影响; 茎区氨基酸的缺失能使酶活性减弱, 病毒粒子不能有效地从红细胞上释放下来<sup>[12]</sup>。A/California/07/2009 NA 蛋白的茎区没有氨基酸的插入和缺失。

神经氨酸抑制剂(oseltamivir 和 zanamivir) 是一类有效的抗甲型流感病毒药物。研究表明 NA 某些氨基酸残基的突变可以使病毒产生对这类抗流感病毒药物的耐药性, 包括 E119V, R292K, R293K, N294S 和 H274Y, 而不同药物和病毒亚型产生的耐药突变位点并不相同; 特别是 H274Y 是近年来季节性 H1N1 病毒产生对 oseltamivir 产生耐药性的主要分子机制<sup>[13-14]</sup>。A/California/07/2009 没有发现上述位点的突变, 表明对神经氨酸酶抑制剂敏感。

### 2.3 基质蛋白(Matrix protein) M1 和 M2

A/California/07/2009 的 M 基因来源于欧洲猪流感病毒。M 基因片段编码 M1 和 M2 两个蛋白。M1 蛋白由 252 个氨基酸组成, 是病毒囊膜的重要组成部分, 也是病毒粒子中含量最多的蛋白; 此外, M1 蛋白还具有多种生物学功能, 在病毒转录、组装和出芽等生活周期中起重要作用。101 - 105 位氨基酸(RKLKR) 是 M1 蛋白的 RNA 结合区(RNA-binding) 和核定位信号区(NLS), 其中 102 - 105 位残基较为保守, 101 位在不同分离株有变化(R、K、Q、T 或者 G)<sup>[15]</sup>。A/California/07/2009 的 101 - 105 位是 KKLKR, 这也是大多数欧洲猪流感病毒的特点; 人季节性流感 H1N1 (包括 A/South Carolina/1/18 和 A/Brisbane/59/2007) 和古典猪 H1N1 病毒都是 RKLKR (表 2)。101 位氨基酸是否与宿主特异性有关, 还不能确定。M1 蛋白在 148 - 162 位还包含有一个潜在的 CCHH 锌指结构基序(CATCEQIADSQHRSH)<sup>[16]</sup>, A/California/07/2009 M1 基因 CCHH 结构没有发生突变。

M2 蛋白由 97 氨基酸组成, 其中 N 末端的 9 个氨基酸与 M1 蛋白共有, 且另有 14 个氨基酸的编码区与 M1 基因重叠。M2 蛋白是同源四聚体整合膜蛋白, 具有离子通道活性, 是烷氨类药物的作用靶蛋白。M2 蛋白共有 97 个氨基酸, 结构上分为胞外区(1 - 24)、跨膜区(25 - 43) 和胞浆区(44 - 97)。A/California/07/2009 在胞浆区的 50 位有一个潜在的棕榈酰化蛋白 C<sup>[17]</sup> 和 64 位磷酸化蛋白 S<sup>[18]</sup>。在跨膜区, 大多数人病毒 28 位是 V, 而 A/California/07/2009 是 I, 这与 A/South Carolina/1/18 和欧洲猪流感病毒群, 而古典猪 H1N1 病毒则为 A<sup>[19]</sup>。M2 蛋白的胞外区在 14、16、18 和 20 四个位点的氨基酸在

禽和猪/人流感病毒中有明显的差别,禽病毒一般为 14G、16E、18K、20S,而人和古典猪 H1 病毒一般为 14E、16G、18R、20N<sup>[19]</sup>。A/California/07/2009 这四个位点有 2 个是禽的特点(16E、20S),2 个是哺乳动物特点(14E、18R),而 A/Swine/Hong Kong/5190/

1999 只有一个位点 18R 是与人类病毒一致,其余 3 个都是禽病毒特点(表 2)。可见 A/California/07/2009 的 M2 蛋白还具有禽流感病毒的特点,但已经获得了人流感病毒的部分特点。

表 2 A/California/07/2009 和参考株 M1 和 M2 氨基酸比较

Table 2 Amino acid comparison of M1 and M2 between A/California/07/2009 and reference viruses

Viruses	Residues on the M2 extracellular domain				
	M1 101 - 105	14	16	18	20
A/California/07/2009 (H1N1)	KKLR	E	E	K	S
A/Swine/Hong Kong/5190/1999 (H3N2)	KKLR	G	E	R	S
A/Brisbane/59/2007 (H1N1)	RKLR	E	G	R	N
A/Brevig Mission/1/18	RKLR	E	G	R	N
Classical Swine H1	RKLR	E	G	R	N
Human H1	RKLR	E	G	R	N
Avian H1	KKLR	G	E	K	S

研究表明,M2 蛋白跨膜区的 5 个氨基酸的改变可以使病毒产生对烷氨类药物的抗性,即 L26F、V27A、A30T、S31N 和 G34E<sup>[20]</sup>。欧洲猪流感病毒自从 1987 年以来,由于 S31N 的突变产生了对金刚烷氨类药物的抗性<sup>[21]</sup>。A/California/07/2009 的 M 基因来源于欧洲 SIV,因此新甲型 H1N1 病毒生来就具备了金刚烷氨类药物的抗性。

M1 和 M2 蛋白的某些氨基酸突变会影响病毒在小鼠、鸡胚及 MDCK 细胞等的致病性和增殖能力,如对 FM47 病毒,M1 蛋白 T139A 突变是病毒在鼠肺中高增殖的主要原因,而对于 A/Hongkong/1/1968(H3N2)在小鼠适应后,在 M1 蛋白(T167A)和 M2(D44N)蛋白都发生了一个氨基酸的突变<sup>[22-24]</sup>。这些突变都没有在 A/California/07/2009 的 M1 蛋白中发现。

#### 2.4 NS 蛋白 (Non-structural protein)

NS 基因编码 2 个蛋白,即 NS1 和 NEP(以前称为 NS2 蛋白)。NS1 是病毒的一种非必需毒力因子,通过拮抗 IFN 和 IFN 诱导蛋白的抗病毒活性来抑制宿主的免疫应答,此外,NS1 在病毒的复制周期中也起着重要的调节作用。NS1 分为 2 个功能区: N-末端的 RNA 结合区(1 - 73)和 C 末端的“效应”区(74 - 230)。NS1 蛋白的长度在不同的宿主和不同毒株并不相同,表现为一定的宿主特异性<sup>[25]</sup>。2000 年以后分离的 H5N1 病毒的 NS1 在 80 - 84 位发生了 5 个氨基酸的缺失,这种缺失的生物学意义尚不完全清楚,可能与病毒的致病性和宿主适应性有关<sup>[1,26]</sup>。同样,在对 H5N1 病毒研究中,发现 NS1 蛋白一些位点的突变,如 P42S、D92E 和 V149A,可

能会增强病毒在猪、小鼠及鸡的致病力<sup>[27-28]</sup>。A/California/07/2009 在 80 - 84 位没有发生相应氨基酸的缺失,也没有发现上述与毒力有关的位点突变。流感大规模基因组测序分析表明,禽流感病毒和 1918 流感病毒 NS1 蛋白的 C 末端(位于 227 - 230aa)4 个氨基酸残基具有 ESEV 或 EPEV 基序,是潜在的 PDZ 区结合基序(PDZ domain ligand, PL)。PDZ 区是由 80 - 90aa 组成的一种常见的蛋白结构,通过蛋白识别机制参与多种信号调节<sup>[29]</sup>。禽流感病毒的 PL 基序参与体外信号传递,是新发现的流感病毒毒力因子<sup>[30-32]</sup>。大多数人流感病毒 PL 基序为 RSEV 或者 RSKV,不具备结合 PDZ 的功能。序列分析表明,早期人 H1N1 病毒长度为 230 氨基酸,具有 PL 基序。但到了 1940 年代,人 H1N1、H2N2 和 H3N2 病毒的 NS1 蛋白延长至 237 氨基酸,PL 基序相应丢失。直到 1980 年代,大多数 H1N1 和 H3N2 病毒的 NS1 蛋白又恢复为 230 氨基酸,重新获得了 PL 基序<sup>[31]</sup>。我们此前的研究发现,与人流感病毒相比,古典猪 H1N1 病毒的 NS1 蛋白表现为不同的进化模式。我们分析了 GenBank 上 1930 年到现在的古典猪 H1N1 病毒的 NS1 序列,发现 1940 年代前病毒的长度为 230,具有与人病毒一样的 RSEV 基序。从 1950 - 1960 年代,PL 基序变为 GSEI;而从 1960 年代到现在,由于 220 位氨基酸突变为终止子,长度断裂为 219 氨基酸,PL 基序随即丧失,这是现代古典猪 H1N1 病毒的一个显著分子特征<sup>[30]</sup>。A/California/07/2009 的 NS1 同样只有 219aa,失去了 PL 基序,具有典型的现代古典猪 H1N1 流感病毒特征(表 3)。

表3 A/California/07/2009(H1N1)和参考株NS1蛋白C末端PL基序比较

Table 3 Molecular characterization of the four C-terminal residues of the NS1 proteins of A/California/07/2009 and reference viruses

Viruses	Four c-terminal residues	Location <sup>1</sup>	PL motif	Lineages
A/California/07/2009 (H1N1)	PEQK	219	-	Classical swine
swine/Tennessee/49/1977	PEQK	219	-	Classical swine
Swine/Indiana/9K035/99	PEQK	219	-	Classical swine
A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)	RSEV	230	+	Human
A/Hong Kong/486/97 (H5N1)	EPEV	230	+	Avian
A/Brevig Mission/1/1918 (H1N1)	KSEV	230	+	Avian

<sup>1</sup>The amino acids were numbered with the N-terminal asparagines of NS1 protein designated amino acid 1.

+ No deletion

- Deletion

## 2.5 核蛋白(Nucleoprotein, NP)

Reid 等鉴定了 NP 蛋白 6 个与宿主特异性有关的位点<sup>[33]</sup>。A/California/07/2009 的 313 位是 V,而

猪和禽病毒是 F,人病毒是 Y(表 4)。新甲型 H1N1 (2009)病毒的 NP 基因来源于古典猪 H1N1 病毒, 313 位由 F 突变 V 的生物学意义尚不清楚,可能是

表4 A/California/07/2009和参考株NP蛋白氨基酸比较

Table 4 Amino acids comparison of NP between A/California/07/2009 and reference viruses

viruses	16	33	100	136	283	313
A/California/07/2009 (H1N1)	G	I	V	I	L	V
A/Indiana/9K035/99 (H1N2)	G	I	V	I	L	F
A/Brevig Mission/1/18 (H1N1)	D	I	I	M	P	Y
Human	D	I	V	M	P	Y
Swine	G	I	I	M/I	L	F
Equine	G	R	R	L	L	F
Avian	G	R	R	L	L	F

\* A few strains have V at this position.

病毒适应人体的过度性突变。

## 2.6 多聚酶复合体(Polymerase components)

A/California/07/2009 病毒的这三个基因片段都来源于北美三源重配的猪 H1 病毒,而后的三个基因是在约 1998 年左右分别来源于禽病毒(PB2 和 PA)和人 H3N2 病毒(PB1)<sup>[5]</sup>。人 H3N2 病毒的 PB1 基因也是由禽流感病毒在约 1968 年提供的<sup>[2]</sup>。可见 A/California/07/2009 的 PB2 和 PA 基因由禽传到猪群后已经进化了 10 年左右;而 PB1 在人群中进化了 30 年后,又在猪群中进化了约 10 年。研

究表明,这三个基因在适应宿主过程中,形成了一些具有宿主特异性的保守氨基酸<sup>[34]</sup>。A/California/07/2009 与三源重配的猪 H1 病毒一样,PB2 基因的 5 个位点都保留了禽病毒的特点(199A, 475L, 567D, 627E, 702K),PA 基因的 5 个位点中有 4 个与禽病毒一致(55D、100V、552T),另外 1 个由于突变(E382D)而具有人和猪流感病毒特点(表 5)。可见 PB2 和 PA 虽然在猪体内进化了 10 年左右,但仍然保留了大部分禽流感病毒的分子特征。

表5 A/California/07/2009和参考株PB2、PB1和PA蛋白氨基酸比较

Table 5 Amino acid comparison of PB2, PB1 and PA between A/California/07/2009 and reference viruses

viruses	PB2					PB1		PA			
	199	475	567	627	702	375	55	100	382	552	
A/California/07/2009 (H1N1)	A	L	D	E	K	S	D	V	D	T	
A/Indiana/9K035/99 (H1N2)	A	L	D	E	K	S	D	V	D	T	
A/Brevig Mission/1/18 (H1N1)	S	M	N	K	R	S	N	A	D	S	
Human H1N1	S	M	N	K	R*	S	N	A	D	S	
Human H2N2	S	M	N	K	R	S	N	A	D	S	
Human H3N2	S	M	N	K	R	S	N	A	D	S	
Classical swine	S	M	D	K	R	S	N	V	D	S	
Avian	A	L	D	E	K	N/S/T**	D	V	E	T	
Equine	A	L	D	E	K	S	N	A	E	T	

\* All human H1N1 PB2 sequences have an A at position 702, except that two out of three A/PR/8/34 sequences have a L residue.

\*\* The majority of avian sequences have an N residue at position 375 of PB1, 18% have a S residue, 13% a T residue.

对于高致病性 H5N1 和 H7N7 病毒, PB2 基因 E627K 和 D701N 的突变, 在病毒适应哺乳动物和提高对小鼠的致病力方面起作用<sup>[13]</sup>。A/California/07/2009 病毒的 PB2 基因虽然在猪群中进化了 10 年左右, 但 627 和 701 位氨基酸仍然是 E 和 N, 表现为低致病性的分子特点。

## 2.7 PB1-F2 蛋白

PB1-F2 蛋白由 PB1 片段的另外一个 ORF 编码, 是流感病毒的一个重要毒力因子, 可以诱导细胞 (特别是肺泡巨噬细胞) 发生凋亡<sup>[35-38]</sup>。不同宿主不同亚型病毒的 PB1-F2 长度不同, 完整的 PB1-F2 为 90aa (A/Puerto Rico/8/34 为 87aa), 大多数禽流感病毒具有完整的 PB1-F2<sup>[39]</sup>。1947 年以前分离的人 H1N1 和古典猪 H1N1 病毒具有完整的 PB1-F2, 但之后分离株的 PB1-F2 出现断裂, 且二者断裂的部分各异。人 H1N1 在 57aa 后发生断裂, 而古典猪 H1N1 病毒分别在 11、25 和 34aa 后发生断裂。近 40% 的欧洲猪流感病毒 (约 1979 年来源于禽流感病毒) 的 PB1-F2 也在 11、25 和 34aa 后发生断裂<sup>[39]</sup>。大多数 H3N2 病毒的 PB1-F2 是完整的, 北美三源重配猪流感病毒的 PB1 来源于人 H3N2 病毒, 绝大多数的 PB1-F2 蛋白也没有发生断裂。可见 PB1-F2 在进化过程中, 逐步具有了宿主特异性特点<sup>[4]</sup>。与母源病毒不同, A/California/07/2009 的 PB1-F2 在 11aa、57aa 和 87aa 后发生断裂, 同时具有古典猪 H1N1 和人 H1N1 的 PB1-F2 断裂特点, 这可能是新甲型 H1N1(2009) 病毒的又一个突出的分子特点。断裂的 PB1-F2 丢失了位于 C 末端的线粒体跨膜定位信号, 因而丧失了上述功能<sup>[39]</sup>。因此, PB1-F2 的断裂可能也是 A/California/07/2009 致病力降低的分子基础之一。

## 3 讨论

现有文献对新甲型 H1N1 病毒的分子特性报道较少。我们通过对不同时间和不同宿主流感病毒的分析比较, 对新甲型 H1N1 病毒的分子遗传特性进行了详细解析, 许多发现都是首次报道。首先, 在分子水平上, 病毒似乎不具备高致病性特点。就目前了解的甲型流感病毒与致病性相关的分子特征 (主要来自对 H5N1 和 1918 年流感病毒的研究), 如 HA 多碱性氨基酸裂解位点、NS1 蛋白 P42S、D92E 和 V149A 位点突变、PB2 基因 E627K 的突变、PB1-F2 蛋白、NS1 蛋白、PB1 基序等, 新甲型 H1N1 病毒都不具备, 因此在分子水平上属于低致病性流感病毒, 这

一结果也与实际流行情况相符。但最近国外两个独立的研究小组所做的动物实验表明, 与季节性 H1N1 病毒相比, 新甲流 H1N1 病毒可以在雪貂和小鼠的下呼吸道复制, 有更强的致病性<sup>[40-41]</sup>。这一现象在人群中也有发现 ([http://www.who.int/csr/disease/swineflu/notes/h1n1\\_clinical\\_features\\_20091016/en/index.html](http://www.who.int/csr/disease/swineflu/notes/h1n1_clinical_features_20091016/en/index.html)), 但其详细的分子机制尚不清楚。研究显示人上呼吸道细胞主要表达 SA $\alpha$ 2-6Gal 受体, 而下呼吸道细胞主要表达 SA $\alpha$ 2-3Gal 受体<sup>[42]</sup>。古典猪流感病毒的特点之一是对两种受体都能够有效地结合。新甲型 H1N1 病毒 HA 蛋白保留了许多猪流感病毒的受体结合特点, 我们认为这可能是其能在人下呼吸道复制的一个原因。其次, 新甲型 H1N1 病毒编码的 11 个蛋白大部分具有猪流感病毒的分子特征, 同时也具有一些禽和人流感病毒的特征。新甲型 H1N1 病毒各基因片段从最初来源看都来自于禽流感病毒, 区别在于各基因介入猪群的时间不一样。病毒在不同宿主 (禽、人和猪) 长期进化时, 与宿主细胞大分子 (核酸和蛋白质等) 相互作用, 逐渐具备了宿主特异性, 表现在每个蛋白分子出现了一些与宿主相关的特异性氨基酸位点。此外, 我们发现新甲型 H1N1 的 PB1-F2 在 11aa、57aa 和 87aa 后发生断裂, 具有古典猪 H1N1 和人 H1N1 双重特点, 这一特点在以前的人、猪和禽流感病毒中都没有发现, 我们认为这是甲型 H1N1(2009) 病毒一个特有的分子特征。这一特征对其传播力和致病性有何影响, 有待于进一步研究。总之, 随着该病毒在人群中的进一步传播和持续存在, 在人体免疫系统的作用下, 猪流感和禽流感病毒的分子特征将逐渐消失, 而这些分子特征的改变将如何影响病毒的生物学特性, 值得进一步密切关注。

新甲型 H1N1 病毒的一个显著特点是在人群中的传播迅速, 表现出对人体的高度适应性, 其分子机制尚不清楚。一般认为, HA 蛋白受体结合特性的转变是病毒适应人体的关键一步。对于 H1 亚型 HA 而言, E190D 和 G225D 位点的突变对于病毒获得人群中的传播力至关重要<sup>[43]</sup>。与古典猪 H1N1 病毒相比, 新甲型 H1N1 病毒确实也获得了这种突变; 但一个疑问是其母源病毒, 即北美三源重配猪 H1 病毒也同样具有 E190D 和 G225D 突变, 近年来也报道了多起该类病毒感染人的案例<sup>[44]</sup>, 但为何其始终没有获得在人群中的传播能力? 可见 HA 受体结合特性的转变只是病毒获得在人际间传播的必要条件。HA 与人体呼吸道细胞的有效结合只是感染

发生的第一步,接下来病毒完成其复制周期,涉及到病毒蛋白间以及病毒蛋白与宿主细胞大分子间的相互作用。许多研究表明,病毒各基因的优化组合和蛋白功能的协调作用对于病毒的复制和毒力有重要影响<sup>[1]</sup>。与三源重配 H1 病毒相比,新甲型 H1N1 病毒从欧洲猪流感病毒中获得了 NA 和 M 基因片段,这种新的基因组合无疑对病毒适应新宿主起到了重要作用,但这种基因组合是如何影响病毒的传播力和致病力的,还有待于深入研究。因此,在跟踪病毒的变异时,不仅要重视表面蛋白(HA 和 NA)的变化,对内部基因的进化也应给与特别关注。

基因重配是流感病毒逃避免疫压力的另一种重要方式,新甲型 H1N1 病毒的母源病毒(北美三源基因重配和欧洲重配的猪流感病毒)具有很强的基因重配能力<sup>[45]</sup>。我们在关注新甲型 H1N1 病毒的同时,也不能忽视禽流感病毒(H5N1、H7N7、H9N2 等)。如果新甲流 H1N1 病毒继承了母源病毒的较强重配能力,那么就增加了与人季节性流感病毒和禽流感病毒发生重配的可能,而发生重配的宿主可能是人也可能是猪或禽。因此,应该加强对所有流感病毒的监测工作(包括新甲型 H1N1 病毒、季节性流感病毒和动物流感病毒),并将基因组测序工作作为一项重要的监测内容,如此才能在分子遗传进化分析的基础上,及时发现有流行病学意义的变异株,这对尽早制定防制策略具有重要意义。

## 4 结论

以疫苗株 A/California/07/2009 为代表,首次详细分析了新甲型 H1N1 病毒的早期分子特征,这些特征包括:具有低致病性的分子基础;同时具有人、禽和猪流感病毒的分子特点;PB1-F2 在 11aa,57aa 和 87aa 后发生断裂,具有古典猪 H1N1 和人 H1N1 双重特点,这是甲型 H1N1(2009)病毒一个特有的分子特征。我们预测随着病毒在人群中的进一步适应和持续存在,除了抗原漂移外,这位分子特征也将发生变化,应该特别关注这些变化对病毒的传播力和致病性的影响。此外,应该继续加强对新甲型 H1N1 病毒基因组测序工作,在分子遗传进化分析的基础上,及时发现有流行病学意义的变异株,这对尽早制定防制策略具有重要意义。

## 参考文献

- [ 1 ] Peiris JS, de J, Guan Y. Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health. *Clinical Microbiology Reviews*, 2007,20(2):243-267.
- [ 2 ] Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Reviews*, 1992,56(1):152-179.
- [ 3 ] McHardy AC, Adams B. The role of genomics in tracking the evolution of influenza A virus. *PLoS Pathogen*, 2009,5(10):e1000566.
- [ 4 ] Basler CF, Aguilar PV. Progress in identifying virulence determinants of the 1918 H1N1 and the Southeast Asian H5N1 influenza A viruses. *Antiviral Research*, 2008,79(3):166-178.
- [ 5 ] Smith GJ, Vijaykrishna D, Bahl J, et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature*, 2009,459(7250):1122-1125.
- [ 6 ] Caton AJ, Brownlee GG, Yewdell JW, Gerhard W. The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 hemagglutinin (H1 subtype). *Cell*, 1982,31(2 Pt 1):417-427.
- [ 7 ] Schulze IT. Effects of glycosylation on the properties and functions of influenza virus hemagglutinin. *The Journal Infectious Diseases*, 1997,176 Suppl 1:S24-S28.
- [ 8 ] Reid AH, Fanning TG, Hultin JV, Taubenberger JK. Origin and evolution of the 1918 "Spanish" influenza virus hemagglutinin gene. *Proceeding of the National Academy Sciences of the United States of America*, 1999,96(4):1651-6.
- [ 9 ] Matrosovich M, Tuzikov A, Bovin N, et al. Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. *Journal of Virology*, 2000,4(18):8502-8512.
- [ 10 ] Li S, Schulman J, Itamura S, Palese P. Glycosylation of neuraminidase determines the neurovirulence of influenza A/WSN/33 virus. *Journal of Virology*, 1993,67(11):6667-6673.
- [ 11 ] Colman PM, Varghese JN, Laver WG. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature*, 1983,303(5912):41-44.
- [ 12 ] Castrucci MR, Kawaoka Y. Biologic importance of neuraminidase stalk length in influenza A virus. *Journal of Virology*, 1993,67(2):759-764.
- [ 13 ] Qi X, Li X, Rider P, et al. Molecular characterization of highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses isolated from raccoon dogs in China. *PLoS One*, 2009,4(3):e4682.
- [ 14 ] Gubareva LV. Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Virus Research*, 2004,103(1-2):199-203.



- [15] Elster C, Larsen K, Gagnon J, et al. Influenza virus M1 protein binds to RNA through its nuclear localization signal. *Journal of General Virology*, 1997, 78 ( Pt 7 ): 1589-1596.
- [16] Elster C, Fourest E, Baudin F, et al. A small percentage of influenza virus M1 protein contains zinc but zinc does not influence in vitro M1-RNA interaction. *Journal of General Virology*, 1994, 75 ( Pt 1 ): 37-42.
- [17] Holsinger LJ, Shaughnessy MA, Micko A, et al. Analysis of the posttranslational modifications of the influenza virus M2 protein. *Journal of Virology*, 1995, 69 ( 2 ): 1219-1225.
- [18] Sugrue RJ, Belshe RB, Hay AJ. Palmitoylation of the influenza A virus M2 protein. *Virology* 1990, 179 ( 1 ): 51-56.
- [19] Reid AH, Fanning TG, Janczewski TA, et al. Characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus matrix gene segment. *Journal of Virology*, 2002, 76 ( 21 ): 10717-10723.
- [20] Abed Y, Goyette N, Boivin G. A reverse genetics study of resistance to neuraminidase inhibitors in an influenza A/H1N1 virus. *Antiviral Therapy*, 2004, 9 ( 4 ): 577-581.
- [21] Gregory V, Lim W, Cameron K, et al. Infection of a child in Hong Kong by an influenza A H3N2 virus closely related to viruses circulating in European pigs. *Journal of General Virology*, 2001, 82 ( Pt 6 ): 1397-1406.
- [22] Brown EG, Liu H, Kit LC, et al. Pattern of mutation in the genome of influenza A virus on adaptation to increased virulence in the mouse lung: identification of functional themes. *Proceeding of the National Academy Sciences of the United States of America*, 2001, 98 ( 12 ): 6883-6888.
- [23] Smeenk CA, Wright KE, Burns BF, et al. Mutations in the hemagglutinin and matrix genes of a virulent influenza virus variant, A/FM/1/47-MA, control different stages in pathogenesis. *Virus Research*, 1996, 44 ( 2 ): 79-95.
- [24] Smeenk CA, Brown EG. The influenza virus variant A/FM/1/47-MA possesses single amino acid replacements in the hemagglutinin, controlling virulence, and in the matrix protein, controlling virulence as well as growth. *Journal of Virology*, 1994, 68 ( 1 ): 530-534.
- [25] Basler CF, Reid AH, Dybing JK, et al. Sequence of the 1918 pandemic influenza virus nonstructural gene (NS) segment and characterization of recombinant viruses bearing the 1918 NS genes. *Proceeding of the National Academy Sciences of the United States of America*, 2001, 98 ( 5 ): 2746-2751.
- [26] Long JX, Peng DX, Liu YL, et al. Virulence of H5N1 avian influenza virus enhanced by a 15-nucleotide deletion in the viral nonstructural gene. *Virus Genes*, 2008, 6 ( 3 ): 471-8.
- [27] Li Z, Chen H, Jiao P, et al. Molecular basis of replication of duck H5N1 influenza viruses in a mammalian mouse model. *Journal of Virology*, 2005, 79 ( 18 ): 12058-12064.
- [28] Seo SH, Hoffmann E, Webster RG. The NS1 gene of H5N1 influenza viruses circumvents the host anti-viral cytokine responses. *Virus Research*, 2004, 103 ( 1-2 ): 107-13.
- [29] Sheng M, Sala C. PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annual Review of Neuroscience*, 2001, 24: 1-29.
- [30] Qi X, Pang B, Lu CP. Genetic characterization of H1N1 swine influenza A viruses isolated in eastern China. *Virus Genes*, 2009, 39: 193-199.
- [31] Obenauer JC, Denson J, Mehta PK, et al. Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates. *Science*, 2006, 311 ( 5767 ): 1576-1580.
- [32] Jackson D, Hossain MJ, Hickman D, et al. A new influenza virus virulence determinant: the NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. *Proceeding of the National Academy Sciences of the United States of America*, 105 ( 11 ): 4381-4386.
- [33] Reid AH, Fanning TG, Janczewski TA, et al. Novel origin of the 1918 pandemic influenza virus nucleoprotein gene. *Journal of Virology*, 2004, 78 ( 22 ): 12462-12470.
- [34] Taubenberger JK, Reid AH, Lourens RM, et al. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature*, 2000, 407 ( 7060 ): 889-893.
- [35] Zamarin D, Ortigoza MB, Palese P. Influenza A virus PB1-F2 protein contributes to viral pathogenesis in mice. *Journal of Virology*, 2006, 80 ( 16 ): 7976-7983.
- [36] Conenello GM, Zamarin D, Perrone LA, et al. A single mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 influenza A viruses contributes to increased virulence. *PLoS Pathogens*, 2007, 3 ( 10 ): 1414-1421.
- [37] Chen W, Calvo PA, Malide D, et al. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nature Medicine*, 2001, 7 ( 12 ): 1306-1312.
- [38] Coleman JR. The PB1-F2 protein of Influenza A virus: increasing pathogenicity by disrupting alveolar macrophages. *Virology Journal*. 2007; 4: 9.
- [39] Zell R, Krumbholz A, Eitner A, et al. Prevalence of PB1-F2 of influenza A viruses. *Journal of General Virology*, 2007, 88 ( Pt 2 ): 536-46.

- [40] Maines TR, Jayaraman A, Belser JA, et al. Transmission and pathogenesis of swine-origin 2009 A (H1N1) influenza viruses in ferrets and mice. *Science*, 2009, 325(5939):484-487.
- [41] Munster VJ, de WE, van den Brand JM, et al. Pathogenesis and transmission of swine-origin 2009 A (H1N1) influenza virus in ferrets. *Science*, 2009, 325(5939):481-483.
- [42] Nicholls JM, Chan MC, Chan WY, et al. Tropism of avian influenza A (H5N1) in the upper and lower respiratory tract. *Nature Medicine*, 2007, 13(2):147-149.
- [43] Tumpey TM, Maines TR, Van HN, et al. A two-amino acid change in the hemagglutinin of the 1918 influenza virus abolishes transmission. *Science*, 2007, 315(5812):655-659.
- [44] Shinde V, Bridges CB, Uyeki TM, et al. Triple-reassortant swine influenza A (H1) in humans in the United States, 2005-2009. *New England Journal of Medicine*, 2009, 60(25):2616-2625.
- [45] 祁贤, 陆承平. 猪流感病毒进化方式及其流行特点, 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2009, 49(9):1138-1145

## Molecular Characterization of the early phase of the Novel influenza A H1N1 (2009) Viruses

Xian Qi, Fenyang Tang\*, Liang Li, Lunbiao Cui, Bin Wu, Rongqiang Zu, Fengcai Zhu, Haitao Yang, Hua wang

(Jiangsu Center for Disease Control and Prevention, Nanjing 210009, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] Pathogens of the first influenza pandemic this century belong to influenza A H1N1 viruses, which are different from human seasonal H1N1 viruses in antigenic and genetic characterization. To better understand the genetic characteristics and evolution, timely detect variant strains with epidemiological importance, we analyzed in detail the molecular characterization of the early influenza A H1N1 (2009) virus. [ **Method** ] genomic sequences of reference influenza viruses were obtained from Influenza Resource Center of GenBank. Sequences were analyzed using the EditSeq and Megalign program with the Lasergene sequence analysis software package (DNASTar, Madison, WI, USA). A/California/07/2009 (H1N1) was selected as a representative strains of the novel influenza A H1N1 (2009) virus, and its molecular characteristics was determined. [ **Results** ] A/California/07/2009 do not contained the molecular characteristics of highly pathogenic influenza virus, and its 11 proteins retained most of the molecular characteristics of swine influenza virus, but also had some characteristics of avian and human influenza viruses. With a classical swine H1N1 and human H1N1 dual character, PB1-F2 protein of A/California/07/2009 terminates after 11aa, 57aa and 87aa, which is a unique molecular characteristics of influenza H1N1 (2009) virus. [ **Conclusion** ] This is the first report for detailed analysis of Molecular characteristics of the novel influenza A H1N1 (2009) virus. As the virus further adapt and persist in human populations, its molecular characteristics will change accordingly. So we should pay special attention to the effect on virus transmission and pathogenesis.

**Keywords:** Influenza A virus; H1N1; PB1-F2; influenza pandemic; Molecular characterization

(本文责编: 张晓丽)