

# 抗体选择压作用下 H9N2 亚型禽流感病毒 HA 基因的变异

姜本红, 朱秀同, 孙贝贝, 崔治中\*

(山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018)

**摘要:** 【目的】了解 H9N2 亚型禽流感病毒 (AIV) 在抗体选择压作用下的遗传变异。【方法】将制备疫苗用的 LG1 株 H9N2 亚型 AIV 分别接种含有母源抗体鸡胚 (A 组) 和不含有母源抗体的 SPF 鸡胚 (B 组), 并连续传代。其中 A 组再分为 4 个独立的传代系列 A1-4, B 组再分为 2 个独立传代系列 B1-2。在每个传代系列, 分别对第 10, 20, 30, 40, 50 代病毒的 HA 基因进行扩增克隆测序, 并与原始病毒的序列比较。【结果】LG1 株 H9N2 在没有抗体的鸡胚的传代过程中, 仅发生少数碱基的不稳定随机变异, 且多为无义突变。在经测序的 2 个传代序列的 10 个不同代次病毒, 共出现了 29 个位点变异, 有义突变 (NS) 与无义突变 (S) 比值 NS/S 为 1.42。但在有抗体的鸡胚的传代过程中, 发生了多个呈现稳定遗传的有义突变。在经测序的 4 个传代序列的 20 个不同代次病毒, 共出现了 45 个位点变异, 有义突变 (NS) 与无义突变 (S) 比值 NS/S 为 3.46。【结论】在鸡胚传代过程中母源抗体提供的免疫选择压确实能影响 H9N2 的 HA 基因的变异。同时表明, 带有母源抗体的鸡胚是实验室条件下研究免疫选择压对病毒抗原性变异影响的一种有效的实验模型。

**关键词:** H9N2 亚型禽流感病毒; 抗体选择压作用; 遗传变异

**中图分类号:** Q78      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2009) 07-0955-05

禽流感 (Avian Influenza, AI) 是由 A 型流感病毒 (Avian Influenza Virus, AIV), 引起的严重危害养禽业的一种急性传染病。其中 H5 和 H7 亚型可表现为高致病性, 引起鸡急性死亡, 而 H9N2 亚型为低致病性毒株, 主要引起产蛋下降或呼吸道症状<sup>[1]</sup>。而 H9N2 在我国鸡群中的流行更为广泛<sup>[2-4]</sup>。

禽流感病毒属正粘病毒科流感病毒属, 病毒基因组为分节段的单股负链 RNA, 包含 8 个基因, 编码至少 11 种病毒蛋白, 其中血凝素蛋白 (HA) 为病毒最重要的表面抗原<sup>[5]</sup>。AIV 变异频繁, 血清亚型众多, 根据表面结构蛋白血凝素 (HA) 和神经氨酸酶 (NA) 的抗原性不同, 分为不同血清亚型。由于 RNA 聚合酶缺乏校对机制, 从而造成了 AIV 基因组 RNA 遗传上的不稳定性。为了能揭示免疫选择压在病毒演化中的作用, 在实验室可控条件下做研究是十分

必要的。

本实验对疫苗株 H9N2 亚型 HA 基因在免疫选择压作用下的变异规律进行了研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 病毒:** 传代前的原始病毒为 LG1 株 H9N2 亚型禽流感病毒, 由本实验室分离保存。该毒株为齐鲁动物保健品有限公司生产的 H9 亚型流感油乳疫苗 (兽药生字 (2007)150252081) 的原始种毒。

**1.1.2 鸡胚来源和接种:** SPF 鸡胚购自济南斯帕法斯家禽有限公司。有针对 LG1 株 H9N2 亚型禽流感病毒母源抗体的鸡胚来自经 H9 亚型禽流感灭活疫苗 (齐鲁动物保健品有限公司产品, 种毒为 LG1 株 H9N2 亚型禽流感病毒) 免疫的鸡 (亦来济南自斯帕

**基金项目:** 山东省农业重大应用技术创新课题 “鸡群免疫抑制性疾病的综合防控技术研究”

\* 通信作者: Tel: +86-538-8241560; Fax: +86-538-8241419; E-mail: zzcui@sdau.edu.cn

**作者简介:** 姜本红 (1983-), 女, 山东泰安人, 硕士研究生, 主要从事动物分子病毒学研究。

**收稿日期:** 2009-01-04; **修回日期:** 2009-04-15

法斯家禽有限公司的同品系鸡)。该批鸡分别在 6 W, 12 W 和 18 W 免疫 3 次。在开产前对 H9N2 的 HI 抗体滴度为  $2^9$ 。

**1.1.3 引物:** 根据 NCBI 已完成的 H9N2 亚型禽流感病毒的 HA 序列设计引物, 由上海宝生物生物技术有限公司合成。反转录引物: FZL: 5'-AGCAAAAGCAGG-3'; PCR 扩增引物: F: 5'-AATTTCCACAACCACTCAAG/AATG-3'; R: 5'-AGTAGAA ACAAGGCTGTTT-3'。

**1.1.4 主要试剂和仪器:** TRizol 购自 Invitrogen 公司; RT-PCR Kit 试剂盒购于 TaKaRa 公司; 凝胶回收试剂盒为美国 OMEGA 公司产品; T 载体 pMD18-T、限制性内切酶等均购自 TaKaRa 公司; 其他常规试剂均为国产分析纯; PCR 仪购自美国 Applied Biosystems 公司。

## 1.2 病毒的传代

对有母源抗体的鸡胚设为 A 组, 建立四个独立传代系列 A1, A2, A3 和 A4。无母源抗体的 SPF 鸡胚为 B 组, 建立两个独立的传代系列 B1 和 B2。所有 A 组和 B 组的传代系列在一开始时, 均接种同一批制备的 LG1 株 H9N2 亚型 AIV 尿囊液。10 日龄鸡胚尿囊腔接种 0.2 ml 1:1000 稀释的尿囊液。37℃ 孵育, 收集 24 h 后死亡鸡胚尿囊液。测定血凝价, 确定病毒存在。重复上面的操作, 进行传代。剩余尿囊液 -70℃ 保存备用。

## 1.3 HA 基因的扩增和克隆测序

**1.3.1 RNA 的提取:** 按 TRizol 试剂 (Invitrogen 公司, Cat no. 15596-026) 说明书操作提取尿囊液中病毒基因组 RNA。

**1.3.2 HA 基因的扩增:** 每个传代序列分别取第 10、20、30、40、50 代尿囊液提取 RNA 后进行 HA 基因的扩增。预期扩增的 HA 基因约 1700 bp。HA 基因 RT-PCR 扩增: 参照 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 (宝生物工程大连有限公司, TaKaRa Code: DRR019A) 反转录试剂盒说明书, 用特异性引物进行反转录和 PCR。PCR 反应条件为: 94℃ 变性 6 min, 95℃ 1 min, 50℃ 40 s, 72℃ 2 min, 共进行 32 个循环, 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 终止反应。

**1.3.3 HA 基因克隆、鉴定与测序:** 反应产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。RT-PCR 产物回收后, 按照 pMD18-T Vector (宝生物工程大连有限公司, TaKaRa Code: D101A) 连接试剂盒说明书进行连接并克隆, 经 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切鉴定后选取阳性克隆送上

海博尚生物工程公司进行核苷酸序列的测定。

## 1.4 HA 基因核苷酸序列及 NS/S 比值的比较分析

借助 DNA Star 软件进行分析比较。同时, 按已发表的方法比较不同传代系列核苷酸变异的有义突变 (Nonsynonymous, 即造成氨基酸变化的碱基突变, NS) 和无义突变 (Synonymous, 即不发生氨基酸变化的碱基突变, S) 的比值, 即 NS/S 值<sup>[6]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 不同传代毒 HA 基因核苷酸序列稳定性

测序结果表明, 所有传代所有传代毒的扩增的相应片段均为 1728 bp, 包含了一个完整的阅读框架, 编码区由 1683 bp 组成, 共编码 560 个氨基酸, 与已发表的序列相符。传代 50 代后, 不同传代系列有不同程度的变异, 但所有传代所得的序列结果与原代的同源性都保持在 99% 以上。

### 2.2 在有抗体的鸡胚传代的变异

LG1 株 H9N2 亚型 AIV 在有抗体的鸡胚传代, 共有 98 个 (次) 碱基发生突变。其中有 76 个碱基为有义突变, 分布在 45 个位点上。22 个无义突变, 分布在 13 个位点上。统计结果显示, LG1 毒株在有抗体的鸡胚传代过程中发生突变的位点 NS/S 为 45/13 = 3.46。稳定的突变主要发生在 20-40 代期间, 在 40 代后基本稳定下来。有 12 个突变碱基位点是连续两代以上稳定突变, 其 NS/S 比值为 9/3 = 3.00, 已显示抗体的免疫选择压作用。具体稳定变异位点见表 1。

### 2.3 在无抗体的 SPF 鸡胚传代的变异

LG1 株 H9N2 在 SPF 鸡胚传代, 共有 29 个 (次) 碱基突变, 分布在 29 个突变位点, 其中 17 个突变碱基为有义突变, 12 个突变碱基为无义突变, NS/S 比值为 17/12 = 1.42。从总体上看这些碱基都是随意突变, 没有连续两个以上代次稳定的碱基突变。

### 2.4 抗体对 H9-AIV 传代过程中碱基突变的 NS/S 比值的影响

抗体对 H9-AIV 传代过程中碱基突变的 NS/S 比值的影响具体情况见表 2。从表 2 可见, 在没有母源抗体的鸡胚中传代的 B 系列, 不仅有义突变 (NS) 少, 而且有义突变与无义突变的比值 NS/S 也低, 只有 1.42。相反, 在有母源抗体鸡胚中传代的每个系列, 不仅有义突变 (NS) 多, 而且有义突变与无义突变的比值 NS/S 也要高得多。3.45 的 NS/S 比值显著高与无母源抗体的对照系列。

**表 1 在有或无母源抗体鸡胚连续传代过程中发生稳定突变的 HA 基因 ORF 位点**

Table 1 Stable site mutations in the HA gene ORF during continued passages in embryos with or without maternal antibodies

passage serials	The base site number with stable base mutations (amino acid)											
	17*	24	313*	477*	496*	592*	593*	672*	796*	806*	828	1068
Original strain	T (L)	T	A (N)	G (M)	A (N)	G (A)	C (A)	G (M)	C (H)	C (S)	C	C
A1-10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
A1-20	—	—	—	—	—	—	—	—	—	T (S)	—	—
A1-30	C (P)	C	—	A (I)	—	—	—	A (I)	—	T (S)	—	—
A1-40	C (P)	C	—	A (I)	—	—	T (V)	A (I)	—	T (S)	—	—
A1-50	C (P)	C	—	A (I)	—	—	T (V)	A (I)	—	T (S)	—	—
A2-10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
A2-20	—	—	—	—	—	—	T (V)	—	—	—	—	—
A2-30	—	—	G (D)	—	—	—	T (V)	—	—	—	—	—
A2-40	—	—	G (D)	—	—	—	T (V)	—	—	—	—	—
A2-50	—	—	G (D)	—	—	—	T (V)	—	—	—	—	—
A3-10	—	—	—	—	—	—	—	—	T (V)	—	—	—
A3-10	—	—	—	—	—	A (V)	—	—	T (V)	—	—	T
A3-20	—	—	—	—	—	A (V)	—	—	T (V)	—	—	T
A3-30	—	—	—	—	G (D)	A (V)	—	—	T (V)	—	—	T
A3-40	—	—	—	—	G (D)	A (V)	—	—	T (V)	—	—	T
A3-50	—	—	—	—	G (D)	A (V)	—	—	T (V)	—	—	T
A4-10	—	—	—	—	—	—	—	—	T (V)	—	—	—
A4-20	—	—	—	—	—	—	—	—	T (V)	—	T	—
A4-30	—	—	—	—	—	—	—	—	T (V)	—	T	—
A4-40	—	—	—	—	—	—	—	—	T (V)	—	T	—
A4-50	—	—	—	—	—	—	—	—	T (V)	—	T	—
B1-10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B1-20	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B1-30	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B1-40	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B1-50	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B2-10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B2-20	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B2-30	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B2-40	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B2-50	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

\* black figures are nonsynonymous mutation sites, the left mutated sites are synonymous; “—” indicate that the base as the original strains; Serials A1-A4 were passages in embryos with maternal antibody; B1 and B2 were passages in embryos without maternal antibody.

**表 2 在有和无母源抗体鸡胚传代过程中 HA 基因突变的 NS/S 比值比较**

Table 2 Relationship between the ratio of NS/S in HA gene mutation and antibody in the process of H9N2 AIV

Passage serials	In eggs with maternal antibody					In eggs Without maternal antibody		
	A1	A2	A3	A4	total	B1	B2	total
NS sites	18	19	22	17	76	11	6	17
S sites	6	2	5	9	22	10	2	12
NS/S	3.00	9.50	4.40	1.89	3.45	1.10	3.00	1.42

NS: Nonsynonymous; S: Synonymous. The numbers in the table indicates mutation sites detected during the whole passages no mater stable or instable mutations.

### 3 讨论

自从 20 世纪 90 年代初认识到 H9N2 亚型 AIV

可能是鸡群产蛋下降的常见病原之一以来, 各鸡场已广泛应用 H9N2 亚型 AIV 的灭活疫苗。一些学者就已开始注意到 H9N2 亚型 AIV 流行毒株在疫苗诱

发的免疫选择压作用下的变异<sup>[7]</sup>。他们根据不同年份流行毒株 HA 基因的变异,并推测这是免疫选择压作用的结果。近几年来,有更多的流行株的 HA 基因完成了测序<sup>[8-10]</sup>,发现有更多的突变发生。虽然从临床上看,有理由怀疑在免疫选择压作用下发生了抗原性变异,但均未有直接试验证据来证明。在对人类或动物的不同病毒的分子流行病学调查中,为了显示免疫选择压对病毒基因组变异的影响,多采用与病毒中和反应相关的抗原基因中碱基突变的 NS/S 比作为一种判断依据<sup>[6,11-16]</sup>。我们实验室又进一步用这个方法在细胞培养中比较研究了特异性抗体对 ALV-J 的免疫选择压作用<sup>[7]</sup>。本研究用类似的方法探索了鸡胚中的特异性母源抗体对 H9N2-AIV 在鸡胚传代过程中 HA 基因变异的免疫选择压作用。在整个 50 代的传代中,只有在有母源抗体的鸡胚中的 4 个独立的传代系列的病毒的 HA 基因发生稳定的突变,且多为有义突变,NS/S 比大于 3.0,显示出特异性抗体的选择压作用。而在无母源抗体的二个独立的对照系列(B 组),则没有发生稳定地变异,所有变异的 NS/S 值也很低,小于 2 (表 2)。一般来说,当 NS/S 比大于 2.5 时,就认为已存在着特异性抗体的选择压作用的影响<sup>[6]</sup>。此外,在有母源抗体的鸡胚中的 4 个传代系列的病毒的 HA 基因,有 12 个碱基位点在 10-40 代时发生的突变开始稳定下来,而且其中有 9 个碱基突变是有义突变 (表 1)。但在无母源抗体的二个独立的对照系列,这些位点均没有发生突变。同时说明了这些位点的突变与抗体的存在密切相关。这也说明了,有母源抗体的鸡胚也可以像加入血清抗体的细胞培养一样,用作研究抗体的免疫选择压作用的另一种模型。

由于 RNA 聚合酶缺乏校正功能,在复制时容易出现差错,当氨基酸的改变积累到一定程度或突变氨基酸正好使抗原决定簇改变,则引起抗原性的改变。据估计,每个复制周期中 HA 基因每个核苷酸的突变几率为  $2 \times 10^{-3}$ ,也就是说病毒每复制一代,HA 基因上大约有一个碱基发生变异<sup>[7]</sup>。因此,在细胞培养上特别是在同一个动物体内,我们所称为一种病毒的群体实际上是在基因组上各有差异的准种 (quasispecies) 的群体。如果,这一突变相对于原始病毒在复制过程中有选择性优势,那么它在群体中的比例就会越来越大,否则只能维持在很低的比例,甚至由于存在某种逆势而逐渐消失。当 H9N2-AIV 在复制时的突变导致 HA 抗原表位的变异能抵抗特异性抗体的病毒中和作用时,或原有的病毒群体中

的就存在着对特异性抗体有一定抵抗力的准种时,经过传代增殖,少数的病毒粒子有可能成为优势群体。在本研究中,所有四个有抗体鸡胚中的传代系列,大都在 20~30 代期间变异最大,在 40 代时基本稳定下来,这似乎表明鸡胚中特定的抗体对已变异的病毒不再有明显的中和作用。

在我们对 ALV-J 的研究中发现,抗体选择压作用下的氨基酸的变化主要集中在该病毒 gp85 的高变区<sup>[7]</sup>,而且在相连的 2-3 个氨基酸可同时发生相关突变。但在本研究中,抗体选择压作用下的氨基酸的变化却随机分布在 HA 的不同区域,这也是与在 H9 的 HA 上还没有发现相应的高变区有关。

## 参考文献

- [1] Calnek BW. *Diseases of Poultry* (M). 10<sup>th</sup> ed. Ames, Iowa, USA: Iowa State University Press, 1997: 583 - 605.
- [2] 卢建红,刘秀梵,邵卫星,等. H9N2 亚型禽流感病毒基因组全长序列测定和各基因的遗传分析. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2003, 43 (4): 530 - 533.
- [3] 马洪雨,徐玲,邵明旭,等. 禽流感及其防治. *中国畜牧兽医 (China Animal Husbandry Veterinary Medicine)*, 2004, 31 (3): 35 - 36.
- [4] 石火英,陈素娟,刘秀梵,等. H9N2 亚型禽流感病毒传播途径特性的比较及其表面基因序列分析. *中国兽医学报 (Chinese Journal of Veterinary Science)*, 2007, 27 (1): 62 - 66.
- [5] Chen W, Calvo PA, Malide D, et al. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nature Medicine*, 2001, 7: 1306 - 1312.
- [6] Venugopal K, Smith LM, Howes K, et al. Antigenic variants of J subgroup avian leucosis virus: sequence analysis reveals multiple changes in env gene. *Journal of General Virology*, 1998, 79: 757 - 766.
- [7] 刘红旗,黄永,程坚,等. 在疫苗免疫选择压力下 H9N2 亚型禽流行性感病毒 HA 基因的遗传变异. *病毒学报 (Chinese Journal of Virology)*, 2002, 18 (2): 149 - 150.
- [8] 程坚,刘红旗,彭大新,等. 两株 H9N2 亚型禽流行性感病毒 HA 基因序列分析. *病毒学报 (Chinese Journal of Virology)*, 2002, 18 (3): 285 - 287.
- [9] 李曦,于康震,田国斌,等. H9N2 禽流感病毒中国分离株血凝素基因序列的初步分析. *中国预防兽医学报 (Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine)*, 2002, 24 (4): 249 - 250.
- [10] 钟功勋,李雁冰,陈化兰,等. H9N2 亚型禽流感病毒血凝素和神经氨酸酶基因的遗传分析. *中国预防兽医学报 (Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine)*, 2007, 29 (12): 946 - 949.

- [1] Bennis, Rutledge T, Folks T, et al. Genomic heterogeneity of AIDS retroviral isolates from North America and Zaire. *Science*, 1985, 230 (4728): 949 – 951.
- [2] Hwang SS, Boyle TJ, Lyerly HK, et al. Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV1. *Science*, 1991, 253 (5015): 71 – 74.
- [3] Shioda T, Levy LA, Chen Mayer C, et al. Small amino acid change in the V3 hypervariable region of gp120 can affect the T cell line and macrophage tropism of human immunodeficiency virus type I. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992, 89 (20): 9434 – 9438.
- [4] Silva RF, Faddy AM, Hunt HD. Hypervariability in the envelope gene of subgroup J avian leucosis virus obtained from different farms in the United States. *Virology*, 2000, 272 (1): 106 – 111.
- [5] Woelk CH, Jin L, Holmes EC, et al. Immune and artificial selection in the haemagglutinin (H) glycoprotein of respiratory measles virus. *Journal of General Virology*, 2001, 82: 2463 – 2474.
- [6] Cui Zhizhong, Du Yan, Zhang Zhi, et al. Comparison of Chinese field strains of avian leukosis subgroup J viruses with prototype strain HPRS – 103 and United States strains. *Avian Diseases*, 2003, 47 (4): 1321 – 1330.
- [7] 王增福, 崔治中. 在抗体免疫选择压作用下鸡 J 亚群白血病毒 gp85 基因的变异. 中国科学 (C 辑) 生命科学 (*Science in China, Series C*), 2006, 36 (1): 9 – 16.

## Mutations of the hemagglutinin gene of H9N2 subtype avian influenza viruses under selective pressure of antibody

Benhong Lou, Xiutong Zhu, Beibei Sun, Zhizhong Cui \*

College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

**Abstract:** [Objective] To understand mutations of avian influenza virus (AIV) under the antibody selective pressures.

[Methods] We continuously passed an H9N2-AIV strain LG1 in embryos with or without maternal antibody to LG1 in 6 separate serials. At the 10th, 20th, 30th, 40th and 50th passages in each serial, H9 hemagglutinin gene (HA) sequences were determined and compared to the original LG1 strain. [Results] Only unstable random mutations happened in 29 sites with nonsynonymous vs synonymous (N/S) mutation ratio of 1.42 during 50 passages in 2 serials without maternal antibodies. However, multiple stable nonsynonymous mutations were detected gradually during 50 passages of 4 serials in embryos with maternal antibody to LG1 strain, and the NS/S ratio was as high as 3.46 among 45 mutated sites. [Conclusion] The results suggested that the antibody selective pressure influenced mutations of H9N2 AIV HA gene during the passages in embryos with maternal antibody. Embryos with maternal antibody to certain viruses could be used as experimental models to study the immune selective pressures on viral mutations.

**Keywords:** H9N2 avian influenza virus; antibody selective pressure; genetic mutations

(本文责编: 王晋芳)