

· 实验室研究 ·

浙江省 2002 - 2006 年禽流感 H5N1 病毒
基因特性与进化重组分析

徐昌平 卢亦愚 严菊英 冯燕 茅海燕 李榛 陈寅 王舜侃 高筱萍

【摘要】 目的 对近年来浙江省禽流感病毒 H5N1 分离株的基因特性与进化重组特征进行分析。方法 通过对 2002 - 2006 年浙江省禽与人的 H5N1 病毒株进行全基因序列测定,采用 Mega 3.0 生物信息学软件分析病毒株基因特性并与相关基因型标准病毒株进行系统进化分析。结果 2002 - 2006 年浙江省 H5N1 病毒株 HA 序列裂解位点序列含多个碱性氨基酸,符合高致病性禽流感病毒特征;与 Gs/Guangdong/1/96 相比,除 Dk/Zhejiang/2/02 和 Ck/Zhejiang/8/03 株外其他病毒株均在 NA 蛋白茎区缺失 20 个氨基酸。全基因系统进化分析表明,2002 - 2003 年的分离株遗传基因基本属于当年流行的 B、W、X、Y、Z 等基因型,但部分病毒株不同基因片段属于不同基因型。结论 浙江省禽类中也广泛存在 H5N1 的基因片段重组现象,2005 年后的 Ck/Zhejiang/24/05 株及人 H5N1 Zhejiang/16/06 株各遗传基因基本上稳定于近年大陆流行的 FJ-like 基因型。

【关键词】 禽流感 H5N1; 基因特性; 进化; 重组

Molecular characteristics and its evolution of the complete genome of avian influenza H5N1 virus isolated in Zhejiang province from 2002 to 2006 XU Chang-ping, LU Yi-yu, YAN Ju-ying, FENG Yan, MAO Hai-yan, LI Zhen, CHEN Yin, WANG Shun-kan, GAO Xiao-ping. Institute of Virology, Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310051, China

【Abstract】 **Objective** To analyze the molecular characteristics and evolution reassortment of the complete genome of avian influenza H5N1 virus isolated in Zhejiang province in recent years. **Methods** Complete genomes of avian influenza H5N1 viruses isolated in Zhejiang province from 2002 to 2006 were sequenced. Molecular and evolution reassortment characterization of these virus strains were analyzed by Mega 3.0 bioinformatics software. **Results** Through study on the HA genes from all these strains, our data revealed that there were multiple basic amino acids at the cleavage site, which was typical for HPAIV. Compared with Gs/Guangdong/1/96, all these strains had a 20 amino acid deletion in the stalk of the NA, except for Dk/Zhejiang/2/02 and Ck/Zhejiang/8/03. Results from phylogenetic analysis showed that from 2002 to 2003 the H5N1 viruses belonged to the genotype of B, W, X, Y, Z, and other genotypes were prevailed in corresponding year. However, different gene fragments of several strains belonged to different genotypes. **Conclusion** Recombinant might be widespread among the poultry in Zhejiang province. The genetic genes of viruses isolated after 2005, the Ck/Zhejiang/24/05 and Zhejiang/16/06 strains were almost all originated from the FJ-like genotype stably.

【Key words】 Avian influenza H5N1; Genetic characteristics; Evolution; Reassortment

高致病性禽流感病毒 (highly pathogenic avian influenza virus) H5N1 亚型不仅感染禽类及哺乳动物,也能直接从禽类感染人类^[1,2]。自香港地区 1997 年出现人类感染高致病性禽流感 H5N1 病毒而致死的事件以来,世界上(包括我国在内)的感染病例已达 300 多例。据报道最初发现的人类高致病性禽流感 H5N1 病毒与禽源 Gs/Guangdong/1/96 株

密切相关,自 1996 年以来 H5N1 禽流感病毒基因型由于重组变异经 Gs/Gd/96、A、B、C、D、E、V、W、X、Y、Z、Z+ 不断演化为目前主要流行的 Z 基因型,其中鸡、鸭等禽类被认为是禽流感病毒基因重组的中间载体^[3-6]。为了分析近年浙江省禽流感 H5N1 病毒的基因特性与进化重组情况,本研究对浙江省 2002 - 2006 年分离到的禽及人 H5N1 毒株的全基因组 8 个片段进行序列测定,并利用生物信息学软件进行分析,探讨近年禽流感 H5N1 病毒的相关基因特性与进化重组的特征。

基金项目:浙江省科技攻关重点项目(2004C230001)

作者单位:310051 杭州,浙江省疾病预防控制中心病毒所

材料与amp;方法

1. 材料来源: 禽 H5N1 病毒株 Dk/Zhejiang/2/02、Dk/Zhejiang/3/02、Ck/Zhejiang/4/03、Ck/Zhejiang/8/03、Dk/Zhejiang/9/03 核酸由浙江省农科院提供; 人 H5N1 病毒株 Zhejiang/16/06 为 2006 年浙江省人感染禽流感 H5N1 病例, 在 BSL-3 实验室中从患者气管吸出液标本中分离得到; Dk/Zhejiang/25/04 全基因序列以及各 H5N1 基因型别代表株序列等均由美国 NCBI GenBank 数据库下载得到, H5N1 基因型各代表株见表 1^[3-6]。

表1 高致病性禽流感 H5N1 病毒基因型别代表株

病毒株	基因型别	病毒株	基因型别
Ck/HK/858.3/01	A	Ck/Shantou/4231/03	V
Ck/HK/SF219/01	A	Teal/China/2978.1/02	W
Ck/HK/YU562/01	B	Dk/Guangxi/1586/04	W
Dk/HK/646.3/01	B	Gs/Guangxi/1097/04	W
Ck/HK/31.4/02	B	Sck/HK/YU100/02	X
Ck/HK/829.2/01	C	Ck/HK/31.2/02	X
Ck/HK/FY77/01	C	Ph/HK/675.14/02	X
Ck/HK/FY150/01	D	Ck/HK/409.1/02	Y
Ck/HK/715.5/01	E	Ck/HK/96.1/02	Y
Ck/HK/873.3/01	E	Ck/HK/61.9/02	Z
Treesparrow/Henan/1/04	HN-like	Ck/HK/YU777/02	Z
Gs/Qinghai/5/05	QH-like	Gs/HK/739.2/02	Z+
Dk/Fujian/1734/05	FJ-like	HK/213/03	Z+

2. 引物设计: 世界范围内下载不同年份及地区的 H5N1 毒株全基因序列, 用 Mega 3.0 软件做基因同源性比对后, 在各基因片段 5' 及 3' 端保守区设计特异性引物, 引物序列见表 2。

表2 高致病性禽流感 H5N1 病毒 8 个基因的测序引物

基因	引物序列(5'-3')
HA	F AGC AAA AGC AGG GGT CTA ATC TG
	R GTA ACG ATC CAT TGG AGC ACA YCC
NA	F CCA AAT MAG AAG ATA ATA ACC
	R GTC AAT GGT GAA TGA CAA CTC
M	F GCA AAA GCA GGT AGA TRT TGA AAG
	R CAC AGC ART CTG CTG TTC CTG CCG
PB2	F CAG GTC AAW TAT ATT CAA TAT GGA
	R ACT AAT TGA TGG CCA TCC GAA TTC
NP	F AGC AGG GTA GAT AAT CAC TCA CTG
	R TAC TCC TCT GCA TTG TCT CCG AAG
NS	F GCA GGG TGA CAA AAA CAT AAT GGA
	R TAT CAT TAA ATA AGC TGA AAC GAG
PBI	F CCA TTT GAA TGG ATG TCA ATC CGA
	R GCC GTC TGA GCT CTT CAA TGG TGG
PA	F GCA GGT ACT GAT CCA AAA TGG AAG
	R GCA TTG CCA CAA CTA TTT CAG TGC

3. H5N1 全基因组扩增: H5N1 病毒核酸提取采用 Qiaqen RNAeasy Kit, 按试剂盒说明书操作。RT-PCR 采用 Roche 公司的 RT-PCR System Kit 进行, 反应体系为 50 μl: 其中 5× RT-PCR 缓冲液 10 μl, dNTPmix (10 mmol/L) 4 μl, DTT (100 mmol/L) 2.5 μl, RNase 抑制剂 1 μl, 20 μmol/L 的上下游引物各 1 μl, 酶混合物 (5 U/μl) 1 μl, 病毒 RNA 10 μl, 补足 ddH₂O 至 50 μl。反应条件为 50℃ 30 min, 94℃ 2 min 进行反转录, 然后 94℃ 30 s, 51℃ 30 s, 68℃ 2 min 进行扩增, 35 个循环后转入 68℃ 7 min, 再置 4℃。取 8 μl 反应产物进行电泳, 判断有无相应的特异性条带出现。

4. 序列测定与序列分析: 采用 Big Dye™ Terminator V 3.1 Sequence Kit 进行, PCR 产物纯化后在 ABI-3100 Avant 测序仪上自动完成序列测定。用 Mega 3.0 生物信息学软件对 H5N1 的 8 个基因序列进行基因特性与系统进化分析。

结 果

1. 病毒株基因特性分析: 完成对 Dk/Zhejiang/2/02 等 5 株禽 H5N1 病毒株全基因测序(序列待登录 GenBank), 完成对 Zhejiang/16/06 人 H5N1 病毒株全基因测序(GenBank 的登录号为 EF100817-EF100818, DQ643809-DQ643814)。基因及推导的氨基酸序列分析表明浙江省禽 H5N1 病毒株 Dk/Zhejiang/2/02 等以及人 H5N1 病毒株 Zhejiang/16/06 的 HA 裂解位点序列均含多个碱性氨基酸, 符合高致病性禽流感病毒特征; 全部病毒株 HA 蛋白 226~228 位氨基酸均为为 QSG(谷酰胺、丝氨酸、甘氨酸), 属于禽源宿主受体结合位点。与 Gs/Guangdong/1/96 相比, 除 Dk/Zhejiang/2/02 和 Ck/Zhejiang/8/03 株外, 其他病毒株均在 NA 蛋白茎区缺失 20 个氨基酸。此外, 在 PB2 基因第 627 位氨基酸除 Ck/Zhejiang/8/03 株为 K 外, 其他均为 E。

2. 全基因系统进化分析: 对 2002-2006 年浙江省禽流感 H5N1 遗传基因 8 个片段与相应的基因型标准株基因构建系统进化树进行分析(表 3)。

(1) HA 基因系统进化分析: 2002-2003 年 H5N1 病毒株 HA 基因属于 Z、V、W 基因型, 但其中 Dk/Zhejiang/2/02 株属于新基因型 HN-like; 而 Ck/Zhejiang/24/05 株及人 H5N1 病毒株 Zhejiang/16/06 同属于 FJ-like 型(图 1)。

(2) NA 基因系统进化分析: 2002-2003 年

H5N1 病毒株 NA 基因属于 Y、Z + 基因型, 与 HA 基因相同 Ck/Zhejiang/24/05 株及人 H5N1 病毒株 Zhejiang/16/06 同属于 FJ-like 型。发现 HK/156/97 与其他序列差异较大, 但与 Teal/HK/W312/97 (H6N1) 高度同源(图 2)。

(3) M 基因系统进化分析: Dk/Zhejiang/9/03 与 HK/156/97 株属于同一分支, Dk/Zhejiang/3/02 株属于 QH-like 型, 而 Dk/Zhejiang/2/02 株和 Ck/Zhejiang/8/03 株则自成一簇, 不属于其他任何基因型。人 H5N1 病毒株 Zhejiang/16/06 以及另外其他病毒株等分别属于 FJ-like、Z、Z + 基因型(图 3)。

(4) PB2 基因系统进化分析: Ck/Zhejiang/8/03 株属于 W 基因型, Dk/Zhejiang/2/02 株等其他毒株都属于 Z 基因型, 同样 Ck/Zhejiang/24/05 株及人 H5N1 病毒株 Zhejiang/16/06 同属于 FJ-like 型, 但 Dk/Zhejiang/9/03 则不属于任何基因型(图 4)。

(5) PB1 基因系统进化分析: 除 Ck/Zhejiang/24/05 株和人 H5N1 病毒株 Zhejiang/16/06 属于 FJ-like 型, 以及 Dk/Zhejiang/3/02 和 Ck/Zhejiang/4/03 属于 Z、Y 基因型外, 其他毒株 PB2 基因均与代表株有一定差异, 不属于任何基因型(图 5)。

(6) PA 基因系统进化分析: Dk/Zhejiang/2/02 和 Ck/Zhejiang/8/03 株属于 B 基因型, Dk/Zhejiang/9/03 属于 X 基因型, Dk/Zhejiang/3/02 和 Ck/Zhejiang/4/03 株属于 Z +、QH-like, 但 Ck/Zhejiang/24/05 株和人 H5N1 病毒株 Zhejiang/16/06 在 PA 基因上却与其他基因型代表株都有一定的差异(图 6)。

(7) NP、NS 基因系统进化分析: 除 Dk/Zhejiang/9/03 的 NS 基因属于 97-like 型, 其他病毒株的 2 个基因分别属于当年流行的 B、W、Y、Z、V 等基因型, 而 Dk/Zhejiang/9/03、Dk/Zhejiang/3/02 和 Ck/Zhejiang/4/03 株的 NP 基因均未能基因分型(图 7、8)。

表3 2002 - 2006 年浙江省高致病性禽流感 H5N1 病毒株 8 个基因所属基因类型

病毒株	基 因							
	HA	NA	PB1	PB2	PA	M	NS	NP
Dk/Zhejiang/2/02	HN-like	Z+	Unnamed	Z	B	Unnamed	W	B
Dk/Zhejiang/3/02	Z	Y/Z/V	Y/Z	Z	Z+/QH-like	QH-like	Y/Z	Unnamed
Dk/Zhejiang/9/03	V/QH-like	Y	Unnamed	Unnamed	X	97-like	97-like	Unnamed
Ck/Zhejiang/4/03	Z	Y	Y/Z	Z	Z+/QH-like	Z/Z+	Y/Z	Unnamed
Ck/Zhejiang/8/03	W	W	Unnamed	W	B	Unnamed	W	W
Ck/Zhejiang/24/05	FJ-like	FJ-like	FJ-like	FJ-like	Unnamed	FJ-like	FJ-like	V/QH-like
Zhejiang/16/06	FJ-like	FJ-like	FJ-like	FJ-like	Unnamed	FJ-like	FJ-like	V/QH-like

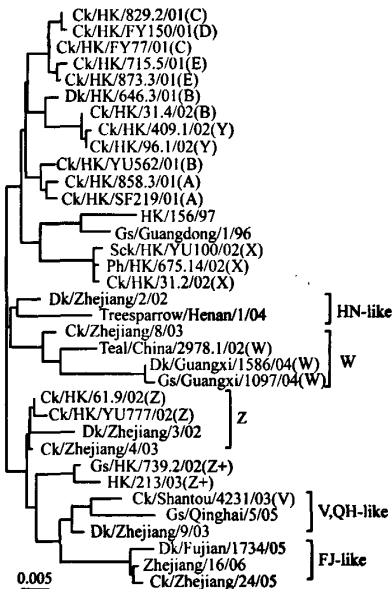


图1 高致病性禽流感 H5N1 病毒 HA 基因进化树

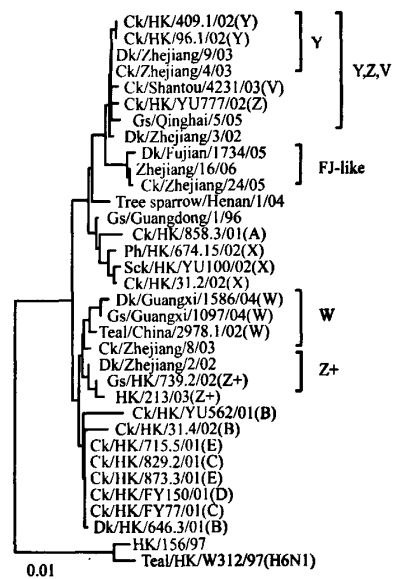


图2 高致病性禽流感 H5N1 病毒 NA 基因进化树

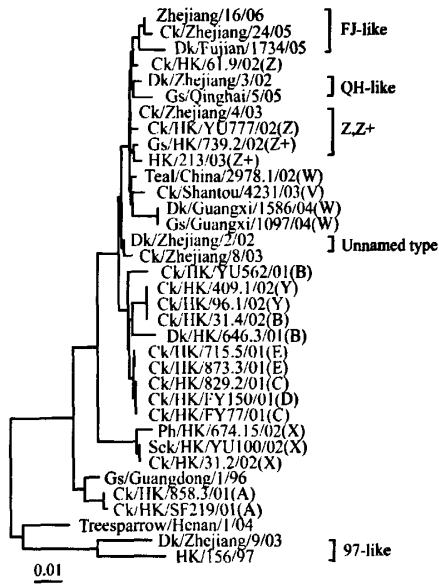


图3 高致病性禽流感 H5N1 病毒 M 基因进化树

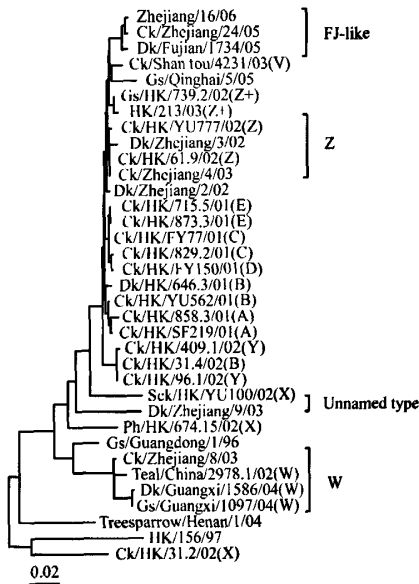


图4 高致病性禽流感 H5N1 病毒 PB2 基因进化树

讨论

随着全球禽流感疫情的扩大和人禽流感病例的持续增加,使禽流感病毒经过变异重组而感染人类的机会不断增大,因此加强对禽流感病毒的分子流行病学的研究,具有重要的现实意义。本研究对2002-2006年浙江省分离的禽 H5N1 和人 H5N1 病毒株全基因进行测序分析,发现与 Gs/Guangdong/1/96 株相比,全部病毒株均在 NA 蛋白茎区 49~68 位缺失 20 个氨基酸,提示这将会降低病毒与唾液酸受体的结合

能力^[7]。此外, PB2 蛋白第 627 位氨基酸的突变与病毒对小鼠的毒力有关^[8], 当该位点由 E 突变为 K 时,可引起小鼠全身及中枢神经系统感染而致死, Zhejiang/16/06 株的 PB2 蛋白第 627 位均为 E, 而 Ck/Zhejiang/8/03 株则为 K, 表明该病毒株对小鼠的神经系统可能有较强的毒力。

禽流感病毒可以通过基因重组的方式以适应新的环境和宿主,其结果往往替代了先前流行的病毒株而处于主导地位^[9]。本研究分析表明,浙江省 2002-2003 年分离的禽 H5N1 病毒株基因基本上属于当年流行的 B、W、Y、Z、Z+ 等基因型,但同一

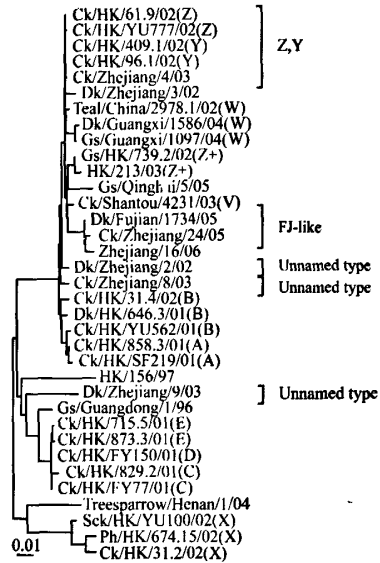


图5 高致病性禽流感 H5N1 病毒 PB1 基因进化树

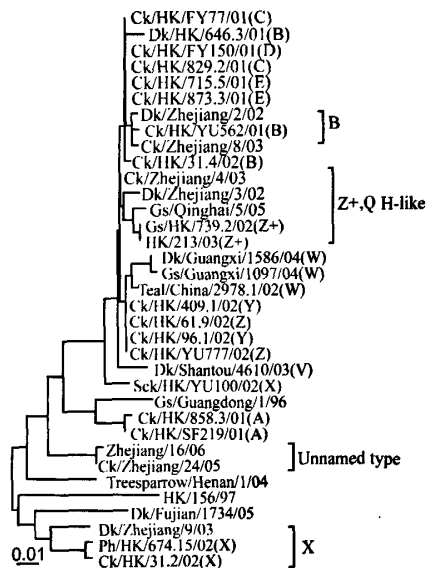


图6 高致病性禽流感 H5N1 病毒 PA 基因进化树

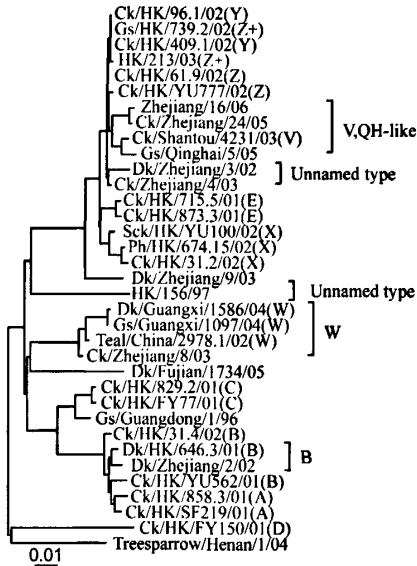


图7 高致病性禽流感 H5N1 病毒 NP 基因进化树

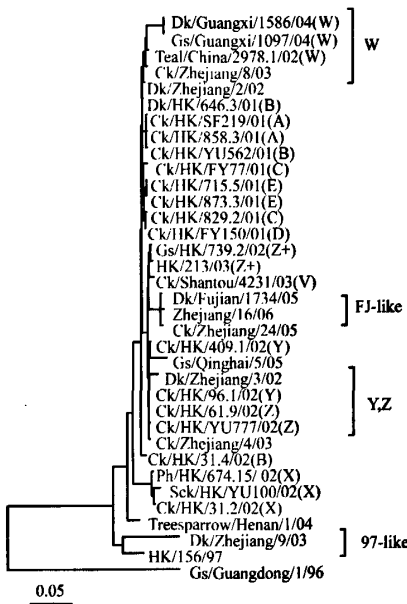


图8 高致病性禽流感 H5N1 病毒 NS 基因进化树

病毒株不同基因片段有些属于不同基因型,而 2005 年后分离的禽 H5N1 病毒株和人 H5N1 病毒株中,除个别遗传基因属于其他基因型外基本上与当前流行基因型代表株 FJ-like 同源,提示浙江省 H5N1 亚型高致病性禽流感病毒近年也处于不断重组和变异,从而获得稳定的以适应新环境和宿主的遗传特征。值得注意的是,其中 Dk/Zhejiang/9/03 株的 M、NS 基因均与首次报道的人 H5N1 毒株 HongKong/156/97 在进化树上处于同一分支,提示 Dk/Zhejiang/9/03 株的 M、NS 基因与当年的人 H5N1 病

毒株 HongKong/156/97 密切相关。此外,本研究还发现有些病毒株的部分基因片段和当年流行基因型均存在一定差异而不能归属于任何基因型,提示除已发现的基因型外,当时还可能还存在其他流行的基因型,如 Dk/Zhejiang/2/02 株 HA 基因与 Treesparrow/Henan/1/04 株高度同源,而该病毒株是 2004 年在河南省麻雀体内分离到并被认为是 H5N1 新基因型^[5]。Gs/Qinghai/5/05 株是从我国青海湖迁徙候鸟中分离到的且该病毒株被证实是由其他病毒株重组而成,其 M、PA、PB1、PB2 和 NS 基因被认为来源于 2004 年香港 Peregrine falcon/HK/D0028/04 株^[10,11],但在本研究中发现 Dk/Zhejiang/3/02 株的 PA 和 M 基因以及 Dk/Zhejiang/9/03 株的 HA 基因均与其高度同源,提示在 2002 年以前该类病毒株的某些基因片段就已经在禽间重组流行并稳定遗传。

禽流感病毒在禽类体内相互传播并产生重组,不断形成高致病性禽流感病毒的新基因型,并可随着候鸟的迁徙而广泛传播。近年来禽流感以及人禽流感在不同地区的不断暴发,已严重威胁着养殖业的发展和人类的健康,应积极完善流感与禽流感的监测体系,加强分子流行病学的相关研究,密切关注禽流感病毒的变异及对人类可能产生的威胁。

参 考 文 献

- [1] Subbarao K, Klimov A, Katz JH, et al. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science*, 1998, 279: 393-396.
- [2] Yuen KY, Chan PK, Peiris M, et al. Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. *Lancet*, 1998, 351: 467-471.
- [3] Guan Y, Poon LM, Cheung CY, et al. H5N1 influenza: a protean pandemic threat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101 (21): 8156-8161.
- [4] Guan Y, Peiris JSM, Lipatov AS, et al. Emergence of multiple genotypes of H5N1 avian influenza viruses in Hong Kong SAR. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99 (13): 8950-8955.
- [5] Kou Z, Lei FM, Yu J, et al. New genotype of avian influenza H5N1 viruses isolated from tree sparrows in China. *J Virol*, 2005, 79 (24): 15460-15466.
- [6] Li KS, Guan Y, Wang J, et al. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature*, 2004, 430: 209-213.
- [7] Puthavathana P, Auewarakul P, Charoenyong PC, et al. Molecular characterization of the complete genome of human influenza H5N1 virus isolates from Thailand. *J Gen Virol*, 2005, 86: 423-433.
- [8] Shinya K, Hamn S, Hatta M, et al. PB2 amino acid at position 627 affects replicative efficiency, but not cell tropism, of HongKong H5N1 influenza A viruses in mice. *Virology*, 2004, 320: 258-266.
- [9] Chen H, Smith GJD, Zhang SY. H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl. *Nature*, 2005, 436: 191-192.
- [10] Sturm-Raruierez KM, Ellis T, Bousfield B, et al. Reemerging H5N1 Influenza virus in HongKong in 2002 are highly pathogenic to ducks. *Virology*, 2004, 78: 4892-4901.
- [11] Mounts AW, Kwong H, Izuieta HS, et al. Case-county study of risk factors for avian influenza A (H5N1) disease, HongKong, 1997. *Infect Dis*, 1999, 180: 505-508.

(收稿日期: 2008-05-30)
(本文编辑: 张林东)