

浙江省人感染H7N9禽流感病毒的基因组序列分析

陈寅 茅海燕 李榛 徐昌平 高见 冯燕 王欣莹 严菊英 张严峻 卢亦愚

【摘要】 目的 分析浙江省2013年4月初一例人感染甲型H7N9禽流感患者的病原学和基因组序列特征。方法 提取患者标本的病毒RNA并用荧光定量RT-PCR方法检测,一步法RT-PCR扩增H7N9禽流感病毒基因组的8个片段,测序并拼接出基因组序列。下载目前已经公布的H7N9禽流感病毒和其他H7、N9亚型的病毒的HA和NA序列,采用Mega 5.1软件对其进行序列比对并构建进化树。根据测序的结果分析该例H7N9禽流感病毒的序列变异情况。结果 该患者标本甲型流感、H7亚型和N9亚型均为阳性,通过扩增基因组各片段并进行测序。对血凝素和神经氨酸酶基因进行比对和进化树构建,结果显示该H7N9病毒HA基因与A/duck/Zhejiang/12/2011(H7N3)的亲缘关系最近,NA基因与A/wild bird/Korea/A14/2011(H7N9)的亲缘关系最近。编码内部蛋白的6个基因均与中国大陆近两年的H9N2毒株最为相似。该标本的病毒HA蛋白发生了Q226L突变,而与已经公布的人感染H7N9禽流感毒株均不一致的是PB2未发生E627K突变。结论 从该份临床标本完成了检测和基因组各片段的扩增与测序。该病毒与已报道的人感染H7N9禽流感病毒同源性高,存在Q226L等重要位点的突变,但PB2未发生E627K突变。

【关键词】 H7N9禽流感病毒;基因组;序列分析;进化树

Genomic sequences of human infection of avian-origin influenza A (H7N9) virus in Zhejiang province CHEN Yin, MAO Hai-yan, LI Zhen, XU Chang-ping, GAO Jian, FENG Yan, WANG Xin-ying, YAN Ju-ying, ZHANG Yan-jun, LU Yi-yu. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Technical Innovation for Public Health Emergency Detection, Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310051, China

Corresponding author: LU Yi-yu, Email: luyiyuzjh@163.com

This work was supported by grants from the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (No. Y207819), the Program for Zhejiang Leading Team of Science and Technology Innovation (No. 2011R50021) and Key Medical Subjects Construction Project of Zhejiang Province (No. XKQ-009-003).

【Abstract】 Objective To analyze the etiology and genomic sequences of human infection of avian-origin influenza A (H7N9) virus from Zhejiang province. **Methods** Viral RNA was extracted from patients of suspected H7N9 influenza virus infection and real-time RT-PCR was conducted for detection of viral RNA. All 8 segments of influenza virus were amplified by one-step RT-PCR and genomic sequences were assembled using the sequencing data. All the currently available HA and NA genes of the novel H7N9 virus, some other HAs from H7 subtype and NAs from N9 subtype were downloaded from public database for phylogenetic analysis, using the Mega 5.1 software. Mutations and variations were analyzed, using the genomic sequence data. **Results** Reactions for influenza type A, subtype H7 and subtype N9 were all positive and all the genomic fragments were amplified for sequencing. After alignment, sequences were subjected for phylogenetic analysis. The results revealed highest homology with A/duck/Zhejiang/12/2011 (H7N3) in HA gene and with A/wild bird/Korea/A14/2011 (H7N9) in NA gene of the H7N9 influenza virus. All 6 genes coding for internal proteins shared highest identities with H9N2 avian influenza which were circulated in the Chinese mainland, in the last two years. The sequenced virus showed Q226L mutation in HA protein, but E627K was not presented in PB2 protein of this virus. The E627K mutation was shared by all the other novel

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.06.016

基金项目:浙江省自然科学基金(Y207819);浙江省重点科技创新团队计划(2011R50021);浙江省医学重点学科群建设计划资助(XKQ-009-003)

作者单位:310051 杭州,浙江省疾病预防控制中心 浙江省公共卫生应急检测关键技术重点实验室

通信作者:卢亦愚, Email: luyiyuzjh@163.com

H7N9 viruses resulted in human infections through analysis on the currently available sequences.

Conclusion Using the clinical samples, both detection of the viral genes and amplification of all 8 segments of the novel H7N9 influenza virus were accomplished. High homology of the novel H7N9 influenza viruses was observed by phylogenetic test, using the currently available sequences. The virus showed Q226L mutation on HA protein but E627K did not present on PB2 protein of this virus.

【Key words】 H7N9 avian influenza virus; Genome; Sequence analysis; Phylogenetic tree

流感病毒属正黏病毒科,分甲、乙、丙 3 个型,其基因组为分节段负链 RNA^[1]。甲型流感病毒多发于禽类,一些亚型也可感染猪、马等哺乳动物及人类。以往感染人的禽流感病毒亚型主要为 H5N1、H9N2、H7N7,其中感染 H5N1 的患者病情重,病死率高。2013 年以前已经报道的人感染 H7 亚型的禽流感病毒的有 H7N2、H7N3 和 H7N7^[2-5],引起人的呼吸道感染和结膜炎等症状。2013 年 3 月在我国上海、江苏、安徽、浙江等地相继出现人感染 H7N9 禽流感病例。这是全球首次发现人感染 H7N9 禽流感,是由来自于 H9N2 内部蛋白基因、H7 血凝素基因和 N9 神经氨酸酶基因等禽源流感病毒基因片段重配形成的一个新病毒所致。疫情发生后,国家流感中心迅速确定病原并公布与分析了 3 株病毒的基因组序列^[6],提供流感网络实验室用于荧光定量检测的引物与探针。本研究选取浙江省湖州市报告的人感染 H7N9 禽流感患者标本,通过 RT-PCR 扩增病毒基因组的全部 8 个片段进行序列测定,分析其核苷酸序列特点,为进一步开展 H7N9 禽流感病毒研究提供科学依据。

材料与方法

1. 材料:样本来自 2013 年 4 月 3 日浙江省湖州市报告一例疑似人感染 H7N9 禽流感病例采集的下呼吸道吸出物。该患者为男性,64 岁,农民。于 3 月 29 日发病,4 月 4 日死亡。病毒 RNA 采用 Qiagen RNeasy Mini Kit 提取,荧光定量 RT-PCR 采用 AgPath-ID One-Step RT-PCR 试剂盒,一步法基因扩增试剂盒 Titan One Tube RT-PCR System 购自 Roche。DNA Marker DL2000 和琼脂糖购自 TaKaRa 公司,DNA 凝胶回收试剂盒购自 Qiagen。

2. 病毒 RNA 提取和核酸检测:采用 Qiagen RNeasy Mini 试剂盒提取 200 μ l 临床样本中的总 RNA,溶于 50 μ l DEPC 处理的 H₂O 中。病毒 RNA 立即用于荧光定量 RT-PCR 检测。

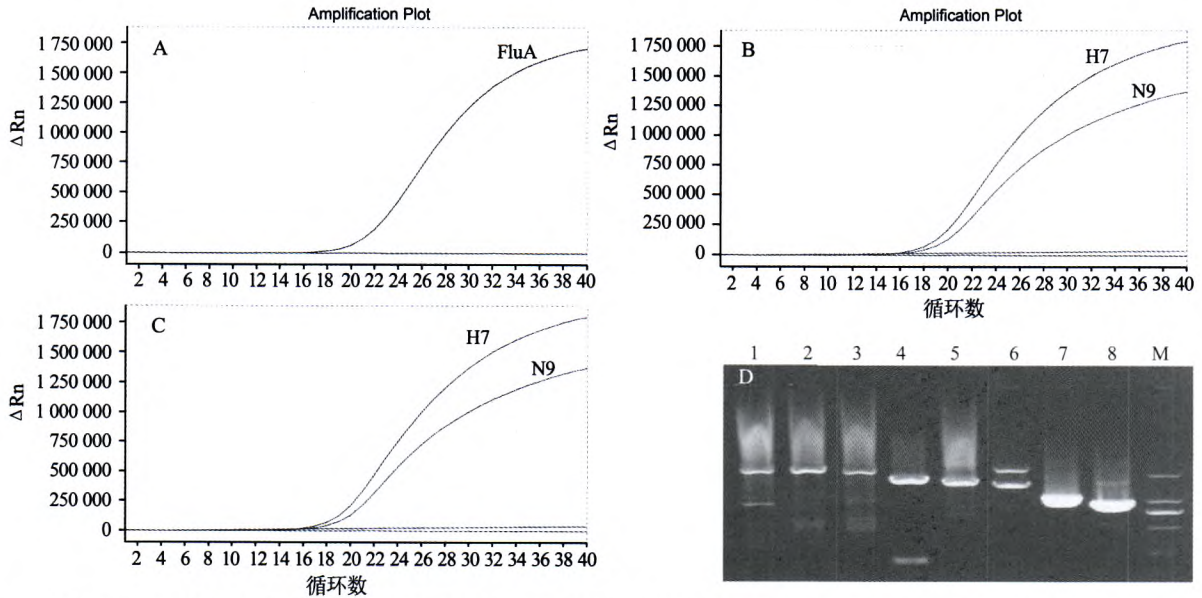
3. RT-PCR 扩增病毒基因片段:以 -70 $^{\circ}$ C 保存的患者标本 RNA 为模板,按照文献^[7]采用针对甲型流感病毒 8 个基因片段的保守区域的引物进行反转录与扩增,再依据已经公布的 H7N9 禽流感病毒基

因组序列设计各基因的中间测序引物。引物由上海生工生物技术有限公司合成,用 DEPC 处理 H₂O 溶解为 20 μ mol/L。按 Titan One Tube RT-PCR System 试剂盒要求配制 RT-PCR 反应液,反应体系为 25 μ l,其中 H₂O 5 μ l, dNTP 4 μ l, DTT 2.5 μ l, 5 \times RT buffer 5 μ l, 2 条引物各 0.75 μ l, Emix 1 μ l, RNase Inhibitor 1 μ l, 病毒 RNA 模板 5 μ l。RT-PCR 程序:42 $^{\circ}$ C 30 min; 94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 15 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 4 min, 循环 40 次; 68 $^{\circ}$ C 10 min。配制 1.5% 的琼脂糖凝胶,取扩增产物进行凝胶电泳,根据 DNA 分子量标准判断扩增条带大小是否正确。选取特异性扩增条带,用琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化目的条带。

4. 序列测定与种系发生树的构建:纯化的 PCR 扩增产物由上海生工生物技术有限公司测序。除扩增引物之外,同时用在各基因内部设计的引物用于测序。测序所得的序列文件用 DNASTar 软件的 SeqMan 进行分析并拼接出 H7N9 禽流感病毒的所有片段的完整 ORF 序列。将测序的 HA 和 NA 序列分别与 GenBank 或 EpiFlu 数据库中下载的其他地区的序列用 Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 5.1 (Mega 5.1) 软件进行比对^[8],保留各基因的 ORF 区域,去除非编码区的基因序列,用 Neighbor-Joining 方法绘制 NA 基因编码区的种系发生树,采用 Bootstrap 法 (replication = 1000) 进行检验。

结 果

1. 荧光定量 RT-PCR 检测、各片段扩增:以从患者下呼吸道吸出物标本提取的病毒 RNA 为模板,进行荧光定量 RT-PCR 检测,结果显示该患者样本中甲型、H7 亚型和 N9 亚型均为阳性。对于该标本,国家流感中心和浙江省疾病预防控制中心自行合成的检测 H7 和 N9 亚型的引物探针均能获得很好的扩增效果。以从患者标本提取的病毒 RNA 为模板,通过 RT-PCR 扩增各基因片段后电泳发现,均能获得符合预期大小的特异性扩增产物。紫外灯下割取目的条带,纯化后将 DNA 溶于 H₂O 中,用扩增时的 2 条引物和各基因内部的引物同时测序。荧光定量 RT-PCR 检测和病毒基因组片段的扩增结果见图 1。



注: A 为检测甲型流感病毒的荧光定量 RT-PCR; B 为检测 H7 和 N9 亚型流感病毒的荧光定量 RT-PCR(国家流感中心提供引物与探针); C 为检测 H7 和 N9 亚型流感病毒的荧光定量 RT-PCR 反应(本研究合成的引物与探针); D 为一步法 RT-PCR 扩增产物, 1~8 依次为 PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、MP、NS, M: DL2000 DNA 标准带

图 1 浙江省 1 株 H7N9 禽流感病毒荧光定量 RT-PCR 与片段扩增

2. 各基因序列相似度分析: 测序所得序列经 SeqMan 分析、拼接出 A/Zhejiang/HuZ1/2013 (H7N9) 的基因组序列, 各片段测序结果均包含了完整的 ORF 区。将各片段的序列利用 BLAST 进行分析, 在基因数据库中寻找相似度最高的序列。结果显示, 血凝素 (HA) 与 A/duck/Zhejiang/12/2011 (H7N3) 的相似度最高, 达到 99.25%。神经氨酸酶 (NA) 与 A/mallard/Czech Republic/13438-29K/2010 (H11N9) 的相似度为 96.46%。编码内部蛋白的 6 个基因均与中国大陆近两年 H9N2 毒株最为相似 (表 1)。

表 1 浙江省 H7N9 禽流感病毒各基因序列相似度分析

基因	长度 (bp)	相似度最高的毒株	亚型	相似度 (%)
PB2	2280	A/brambling/Beijing/16/2012	H9N2	99.25
PB1	2274	A/chicken/Jiangsu/Q3/2010	H9N2	98.81
PA	2151	A/chicken/Zhejiang/607/2011	H9N2	99.12
HA	1683	A/duck/Zhejiang/12/2011	H7N3	95.96
NP	1497	A/chicken/Zhejiang/611/2011	H9N2	98.80
NA	1398	A/mallard/Czech Republic/13438-29K/2010	H11N9	96.46
MP	982	A/chicken/Zhejiang/607/2011	H9N2	98.47
NS	838	A/chicken/Dawang/1/2011	H9N2	99.16

3. 病毒表面蛋白基因的进化分析: 将来自上海市和安徽省病例的 H7N9 病毒序列、禽和外环境 H7N9 病毒序列和测序的 A/Zhejiang/HuZ1/2013 (H7N9)、随机选取的两起人感染 H7 亚型禽流感病毒的 HA 基因以及其他 H7 亚型流感病毒的 HA 基因进行比对和进化树构建, 结果显示所有 2013 年人、

禽和外环境的 H7N9 毒株聚集在同一分支上, 这些 HA 基因与 A/duck/Zhejiang/12/2011 (H7N3) 的亲缘关系最近 (图 2)。同样将来自于上海市和安徽省病例的 H7N9 病毒序列、禽和外环境的 H7N9 病毒序列和测序的 A/Zhejiang/HuZ1/2013 (H7N9) 以及其他 N9 亚型的流感病毒的 NA 基因进行比对和进化树构建, 结果显示所有 2013 年的人、禽和外环境的 H7N9 毒株聚集在同一分支上, 这些 NA 基因与来自于 A/wild bird/Korea/A14/2011 (H7N9) 的亲缘关系最近。除了本次人感染 H7N9 禽流感病毒以外, 数据库中未见其他 N9 亚型流感病毒造成人的感染, NA 基因种系发生树结果见图 3。

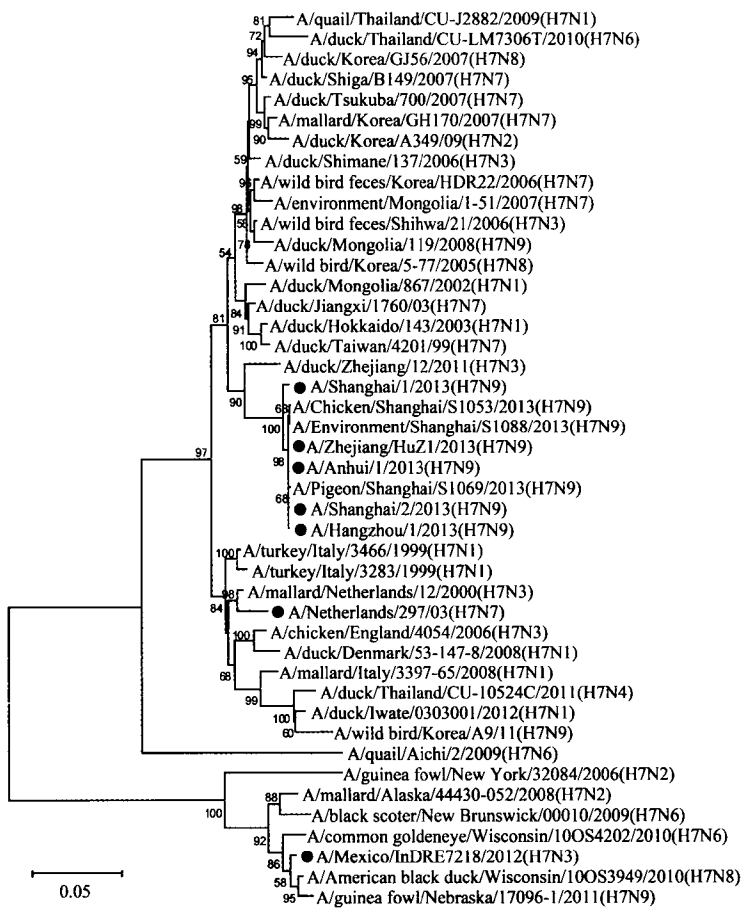
4. 病毒基因和蛋白重要位点的变异情况分析: 将测序的 A/Zhejiang/HuZ1/2013 (H7N9) 和来自于上海、安徽两地病例的 H7N9 病毒序列、禽和外环境 H7N9 病毒序列的 HA 和 NA 氨基酸序列进行比对, 并分析氨基酸变异情况 (表 2)。在 HuZ1 中, HA 蛋白发生了 Q226L^[6,9] (226 位为按照 H3 顺序), 提示病毒可能对 α -2, 6 受体位点结合能力有所增强。在 HuZ1 中, HA0 蛋白的切割位点的序列为 "PEIPKGR*GLF", 符合禽低致病性流感病毒的典型特征^[10,11]。

对 NA 蛋白的分析显示, 在 Shanghai1 毒株 NA 蛋白中发生的 R294K 据认为可以提高病毒对神经氨酸酶抑制剂的抵抗能力, 而包括 HuZ1 在内的其他 H7N9 禽流感病毒均未发生 R294K 或其他神经氨酸

表2 H7N9禽流感病毒表面糖蛋白序列变异情况

病毒	HA										NA							
	146	183	195	230	235	252	285	292	410	541	26	38	40	57	264	289	300	345
HuZ1	A	S	V	P	L	V	N	H	N	V	I	K	G	I	S	R	I	V
Anhui	A	S	V	P	L	V	N	H	N	V	I	K	G	I	S	R	I	V
Shanghai1	S	N	G	T	Q	V	D	Y	T	A	I	K	S	I	S	K	I	V
Shanghai2	A	S	V	P	L	V	N	H	N	V	M	K	G	I	S	R	I	V
Hangzhou1	A	S	V	P	I	V	N	H	N	V	I	K	G	I	S	R	I	V
Chicken	A	S	V	P	L	V	N	H	N	V	I	R	S	V	Y	R	V	I
Pigeon	A	S	V	P	L	I	N	H	N	V	I	K	G	I	S	R	I	V
Enviroment	A	S	V	P	L	V	N	H	N	V	I	K	S	V	S	R	V	I

注: HuZ1: A/Zhejiang/HuZ1/2013(H7N9); Anhui: A/Anhui/1/2013(H7N9); Shanghai1: A/Shanghai/1/2013(H7N9); Shanghai2: A/Shanghai/2/2013(H7N9); Hangzhou1: A/Hangzhou/1/2013(H7N9); Chicken: A/Chicken/Shanghai/S1053/2013(H7N9); Pigeon: A/Pigeon/Shanghai/S1069/2013(H7N9); Enviroment: A/Environment/Shanghai/S1088/2013(H7N9)



注: 采用 Mega 5.1 软件的 Neighbor-Joining 方法绘制, Bootstrap 值为 1000;

● 为感染人的 H7 亚型禽流感病毒, 其他病毒为禽源或外环境病毒

图2 H7N9禽流感病毒HA基因种系发生树

酶抑制剂耐药位点的变异, 提示病毒对奥司他韦等神经氨酸酶抑制剂依然敏感。此外, 与 Anhui、Shanghai1、Shanghai2 和 Hangzhou1 毒株一样, HuZ1 病毒的 NA 蛋白的 69~73 位的 Stalk 区亦发生缺失, 而研究表明此处缺失可引起病毒在小鼠感染中毒力的增强^[12]。

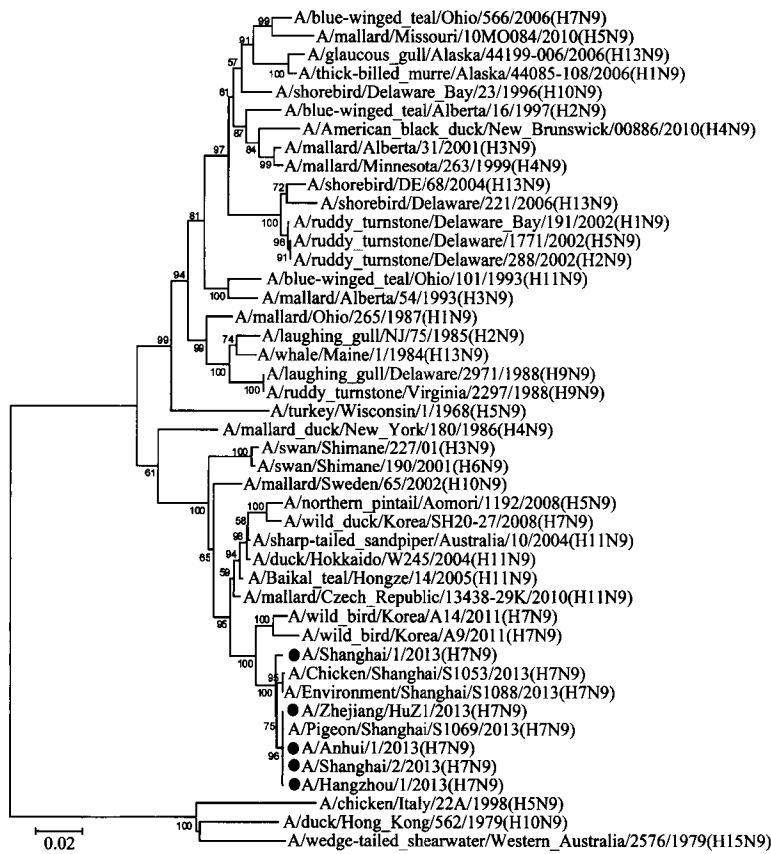
在内部蛋白 PB2 中, 国家流感中心已经公布的 Anhui、Shanghai1、shanghai2 和 Hangzhou1 人感染

H7N9 禽流感病毒毒株的序列中都发生了 E627K 的突变, 但 3 株分别来自于鸡、鸽子和外环境的 H7N9 禽流感病毒中, PB2 的 627 未发生突变, 仍然为 E。HuZ1 病毒与已报道的所有人源 H7N9 毒株不同, 其 PB2 的 627 位编码 E, 与禽源毒株一致。HuZ1 病毒的其他内部蛋白的重要位点均与 Anhui 株相同, 包括 M2 蛋白发生了金刚烷胺类药物 S31N 耐药位点突变, PB1 发生了 N30D 和 T215A 突变等。

讨论

本研究同源性分析表明, 人感染 H7N9 禽流感病毒与 2013 年在上海市采集的禽源和外环境 H7N9 病毒的同源性均较高, 未发生大的变异。HA 基因序列分析表明, HuZ1 病毒仍符合禽低致病性流感病毒的典型特征, HA 蛋白发生的 Q226L 变异对其受体结合特性以及病毒的致病性等仍有待进一步验证。在对 HA 基因的进化分析中, 除了本次 H7N9 感染人类的病毒序列以外, 还随机选取了两起人感染禽流感病毒的 HA 基因, 分别为来自荷兰的 H7N7 和墨西哥的 H7N3, 亲缘关系分析结果显示, 在这些造成人感染病毒之前的 2~3 年, 相近地域均有亲缘关系最近的禽类病毒存在, 提示在发生人的禽流感病毒感染之前, 在禽类和环境中已经存在具有类似基因片段的毒株循环与适应。

NA 蛋白的一些特征性序列、位点与国家流感中心公布的 Anhui 和 Shanghai2 两株病毒一致。而 HuZ1 病毒 PB2 蛋白的 627 位与已公布的 4 株人感染 H7N9 禽流感病毒株的序列均不同, 未发生 E627K



注:采用 Mega 5.1 软件的 Neighbor-Joining 方法绘制, Bootstrap 值为 1000; ● 为感染人的 N9 亚型禽流感病毒,其他病毒为禽源或外环境病毒

图 3 H7N9 禽流感病毒 NA 基因种系发生树

突变。虽然 PB2 的 E627K 突变可导致病毒对小鼠的毒力增强^[13],但本研究的患者由于体内病毒量大,病情进展极为迅速,在发病的第 7 天即死亡。因此,对于在 H7N9 病毒中 PB2 的 E627K 变异对病毒复制与致病能力的影响仍有待验证。

目前发现和确诊的人感染 H7N9 禽流感患者大多为重症,由于病毒的 M2 蛋白发生了 S31N 位点突变,导致对离子通道抑制剂(金刚烷胺类药物)耐药,神经氨酸酶抑制剂对人感染 H7N9 禽流感患者的治疗变得尤为重要。如疫情继续发展,应加强 H7N9 禽流感病毒 NA 基因的序列分析和表型监测,将有助于防控策略的制定和指导患者治疗。

本研究通过对浙江省人感染 H7N9 禽流感病毒的检测以及基因序列和进化分析,进一步了解病毒的变异及其分子特征,对从基因水平上认识人感染 H7N9 禽流感病毒、监测病毒的突变与变异以及对疫情的防控提供了科学依据。

参 考 文 献

[1] Guo YJ, Cheng XW. Influenza virus and its experimental

technology. Beijing: China Three Gorges Publishing House, 1997:5-24. (in Chinese)

郭元吉,程小雯. 流行性感冒病毒及实验技术. 北京:中国三峡出版社,1997:5-24.

[2] Ostrowsky B, Huang A, Terry W, et al. Low pathogenic avian influenza A (H7N2) virus infection in immunocompromised adult, New York, USA, 2003. Emerg Infect Dis, 2012, 18 (7) : 1128-1131.

[3] Hirst M, Astell CR, Griffith M, et al. Novel avian influenza H7N3 strain outbreak, British Columbia. Emerg Infect Dis, 2004, 10(12):2192-2195.

[4] Koopmans M, Wilbrink B, Conyn M, et al. Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. Lancet, 2004, 363(9409):587-593.

[5] Fouchier RA, Schneeberger PM, Rozendaal FW, et al. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(5):1356-1361.

[6] Gao R, Cao B, Hu Y, et al. Human Infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus. N Engl J Med, 2013, DOI: 10.1056/NEJMoa1304459.

[7] Hoffmann E, Stech J, Guan Y, et al. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. Arch Virol, 2001, 146(12): 2275-2289.

[8] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol, 2011, 28(10):2731-2739.

[9] Kageyama T, Fujisaki S, Takashita E, et al. Genetic analysis of novel avian A(H7N9) influenza viruses isolated from patients in China, February to April 2013. Euro Surveill, 2013, 18(15): pii: 20453.

[10] Alexander DJ. Avian influenza-diagnosis. Zoonoses Public Health, 2008, 55(1):16-23.

[11] Petersen H, Matrosovich M, Pleschka S, et al. Replication and adaptive mutations of low pathogenic avian influenza viruses in tracheal organ cultures of different avian species. PLoS One, 2012, 7(8):e42260.

[12] Matsuoka Y, Swayne DE, Thomas C, et al. Neuraminidase stalk length and additional glycosylation of the hemagglutinin influence the virulence of influenza H5N1 viruses for mice. J Virol, 2009, 83(9):4704-4708.

[13] Hatta M, Gao P, Halfmann P, et al. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. Science, 2001, 293(5536):1840-1842.

(收稿日期:2013-04-20)

(本文编辑:张林东)