

· 疾病监测 ·

浙江省人禽流感病毒 Zhejiang/16/2006 株的基因特性分析

卢亦愚 严菊英 徐昌平 茅海燕 冯燕 陈寅 李榛 李敏红 史雯

【摘要】 目的 分析浙江省首例报道的人禽流感 H5N1 病毒株 A/Zhejiang/16/2006 的基因特性与系统进化关系。**方法** 对 A/Zhejiang/16/2006 病毒株的全序列 8 个基因片段作序列测定,并与国内外相关病毒株进行同源性与系统进化比较。**结果** A/Zhejiang/16/2006 的 HA 序列,与周边国家和地区的 H5N1 病毒株之间存在 11 个氨基酸的差异,但这些差异并未影响到相关糖基化位点的稳定;在 NA 区,1997 年以后的毒株均缺少第 49~68 位的 20 个氨基酸。总体上中国大陆近年 H5N1 毒株的 8 个基因片段与周边国家和地区毒株相比形成另一个分支,并与 1996-1997 年香港及广东的 H5N1 毒株之间存在较大差异,但有个别毒株的基因片段在系统进化树上远离当前的毒株而更接近 1997 年的病毒株。**结论** A/Zhejiang/16/2006 与中国大陆近年的病毒株自成一个体系,与周边国家和地区的 H5N1 病毒株之间存在一定差异。

【关键词】 人禽流感病毒(H5N1); 基因特性; A/浙江/16/2006

Study on the genetic characteristics of the avian influenza virus strain A/Zhejiang/16/2006 LU Yi-yu, YAN Ju-ying, XU Chang-ping, MAO Hai-yan, FENG Yan, CHEN Yin, LI Zhen, LI Min-hong, SHI Wen. Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310009, China

【Abstract】 Objective To study the genetic characteristics of avian influenza virus strain A/Zhejiang/16/2006 which was isolated from the case first reported in Zhejiang province. **Methods** Complete genome of A/Zhejiang/16/2006 including eight segments were sequenced and compared on the genetic homogeneity with sequences of the similar strains provided through domestic and overseas sources. **Results** There were 11 amino acids showing differences on HA between A/Zhejiang/16/2006 and the H5N1 isolates of neighboring countries, but these differences had not affected the stability of glycosylation sites. In the NA region, 20 amino acids located in the 49th to 68th position were found absent in the isolates obtained after 1997. Eight segments of H5N1 isolates, circulating in the mainland of China in the recent years, formed a separate branch compared to the strains in neighboring countries and there was also obviously different from the strains isolated in Hong Kong and Guangzhou in 1996 and 1997. However, several Chinese strains were close to the Hong Kong strains isolated in 1997 but different from the current strains in the phylogenetic tree. **Conclusion** The influenza virus strain A/Zhejiang/16/2006 formed a separate branch with the strains isolated in the mainland of China in the past years but it presented an obvious difference with the isolates from the neighboring countries.

【Key words】 Avian influenza virus(H5N1); Genetic characteristic; A/Zhejiang/16/2006

自中国香港 1997 年出现人类感染高致病性禽流感病毒 H5N1 致死事件以来,全球感染病例已达 300 多例。2005 年 10 月内地首次报道人感染高致病性 H5N1 确诊病例之后,至今已报告病例 25 例,其中死亡 16 例。2006 年 2 月,浙江省确认 1 例来自安吉县的高致病性禽流感病毒 H5N1 病例,最终导致患者死亡。为了更好地探讨高致病性禽流感病

毒 H5N1 的基因特性与变异规律,我们对浙江省所分离到的高致病性禽流感 H5N1 病毒株的全基因组 8 个片段进行序列测定,并采用生物信息学软件,与美国 NCBI GenBank 上的相关序列进行比对,以探讨浙江省以及东南亚各地近年感染高致病性禽流感病毒 H5N1 的基因特性与系统进化的关系。

材料与方法

1. 材料来源:浙江省人感染禽流感病毒[A/Zhejiang/16/2006(H5N1)]来自 2006 年 2 月浙江省

基金项目:浙江省自然科学基金重点资助项目(Z303909)

作者单位:310009 杭州,浙江省疾病预防控制中心病毒研究所
浙江省公共卫生应急检测关键技术重点实验室

安吉县的人感染禽流感 H5N1 病例,由浙江省疾病预防控制中心病毒研究所重点实验室在BSL-3实验室中从该患者气管吸出液标本中分离得到。采用RT-PCR与荧光定量RT-PCR诊断后,送国家流感中心确认。

2. 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, H5N1 病毒各基因片段的扩增引物由本实验室自行设计(表 1)。

表1 高致病性禽流感病毒 H5N1 全基因组测序引物

基 因	序 列 (5' ~ 3')
HA	HA-F AGC AAA AGC AGG GGT CTA ATC TG
	HA-R GTA ACG ATC CAT TGG AGC ACA YCC
NA	NA-F CCA AAT MAG AAG ATA ATA ACC
	NA-R GTC AAT GGT GAA TGG CAA CTC
M	M-F GCA AAA GCA GGT AGA TRT TGA AAG
	M-R CAC AGC ART CTG CTG TTC CTG CCG
PB2	PB2-F CAG GTC AAW TAT ATT CAA TAT GGA
	PB2-R ACT AAT TGA TGG CCA TCC GAA TTC
NP	NP-F AGC AGG GTA GAT AAT CAC TCA CTG
	NP-R TAC TCC TCT GCA TTG TCT CCG AAG
NS	NS-F GCA GGG TGA CAA AAA CAT AAT GGA
	NS-R TAT CAT TAA ATA AGC TGA AAC GAG
PB1	PB1-F CCA TTT GAA TGG ATG TCA ATC CGA
	PB1-R GCC GTC TGA GCT CTT CAA TGG TGG
PA	PA-F GCA GGT ACT GAT CCA AAA TGG AAG
	PA-R GCA TTG CCA CAA CTA TTT CAG TGC

RT-PCR 采用 Roche 公司的 RT-PCR system 1854476 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 0.5 μl, 酶混合物 (5 U/μl) 0.5 μl, 病毒 RNA 10 μl, 补足 ddw 至 50 μl。反应条件为 50℃ 30 min, 94℃ 2 min 进行逆转录, 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。

3. 序列分析: 采用 Big Dye™ Terminator V 3.0 Cycle Sequence Ready Reaction 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 等生物软件对 H5N1 的 8 个片段基因序列进行比较分析, 东南亚各国及我国高致病性禽流感病毒 H5N1 的相关基因序列由美国 NCBI 的 GenBank 下载。

结 果

1. A/Zhejiang/16/2006 与国内外同期病毒株在

HA 区域的主要差异: 对浙江省人禽流感病毒分离株 A/Zhejiang/16/2006 全序列的 PB1、PB2、PA、HA、NP、NA、M(M1、M2) 和 NS(NS1、NS2) 8 个片段, 进行序列测定 (NCBI 的 GenBank 的登录号分别为 EF100817-EF100818; DQ643809-DQ643814)。

A/Zhejiang/16/2006 与 A/Anhui/1/05、A/Duck/Fujian/1734/05、A/Guangdong/01/06、A/Guangzhou/1/06 以及 A/HongKong/156/97 之间, 在 HA 区的氨基酸同源性分别为 99.8%、99.5%、100%、99.4% 和 93.2%。

A/Zhejiang/16/2006 的 HA 裂解位点序列为 LRERRKRGL, 含多个碱性氨基酸, 符合高致病性禽流感病毒特征。此外, 该毒株 HA 蛋白 226~228 位氨基酸为 QSG, 属于禽源宿主受体结合位点。从 HA 区的氨基酸同源性来看, A/Zhejiang/16/2006 与同一时期我国大陆的安徽、福建、广东等地区的人源及禽源 H5N1 毒株属同一类型(表 2)。

表2 我国大陆与周边国家和地区 H5N1 病毒株在 HA 区域的氨基酸差异

病毒株	氨基酸位置										
	8	156	157	171	190	197	243	285	326	338	345
Zhejiang/16/2006	L	T	P	N	I	S	D	V	K	L	-
Guangdong/01/06	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Guangzhou/1/06	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Chicken/HongKong/282/06	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Anhui/1/05	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Guangxi/1/05	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Chicken/Fujian/9821/05	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Indonesia/01759/06	F	S	S	S	V	P	E	L	R	Q	K
Iraq/207/06	F	R	S	S	V	P	E	L	R	Q	K
Turkey/12/06	F	R	S	S	V	P	E	L	R	Q	K
Egypt/12374/06	F	R	S	S	V	P	E	L	R	Q	K
Cambodia/TP52a/05	F	Q	S	S	V	P	E	L	R	Q	K
VietNam/HN30408/05	F	K	S	S	V	P	E	L	R	Q	K
Thailand/NK165/05	F	K	S	S	V	P	E	L	R	Q	K

从 HA 区的氨基酸进化树上可以看出, 我国大陆的 H5N1 病毒株 (2004-2006 年湖南、广西、香港、广东、福建及浙江的分离株) 与阿拉伯半岛周边的 H5N1 病毒株 (2004-2006 年伊拉克、土耳其、埃及包括我国青海湖候鸟中的分离株) 分别形成了二个分支。此外, 近几年我国大陆与周边国家和地区高致病性禽流感 H5N1 病毒株在 HA 区氨基酸的 8、156、157、171、190、197、243、285、326、338 和 345 位点的 11 个氨基酸, 有着明显差异; 在 345 位点也即 HA 裂解位点的碱性氨基酸 K, 我国大陆的

H5N1 均有缺失。HA 区的这些位点变异均未影响到糖基化位点的变化,目前 A/Zhejiang/16/2006 株在 HA 位上与近年国内外其他禽源与人源的毒株相同,具有 26、27、39、181、209、302、500 和 559 位上的 8 个糖基化位点,相对比较稳定。

2. 神经氨酸酶的系统进化分析: A/Zhejiang/16/2006 与 A/Duck/Fujian/1734/05、A/HongKong/156/97 在 NA 区的同源性为 98.7% 和 91.5%,与我国大陆的 A/Guangdong/01/06、A/Guangdong/01/01、A/Turkey/12/06、A/Tncbne/CDC326T/2/06 的同源性分别为 97.0%、96.7%、96.7% 和 96.7%,在系统树上形成一个分支。此外,除 A/Goose/Guangdong/1/96 病毒株在 49~68 位是 CNQ SII TYE NNT WVN QTY VN 外,1997 年以后的 H5N1 高致病性禽流感病毒株,无论是来自禽类还是来自人类的病毒株,无论是我国大陆还是其他国家和地区,其 NA 区的氨基酸均缺少 49~68 位的 20 个氨基酸。由于这些 NA 区氨基酸的缺失,使 A/Zhejiang/16/2006 等国内外近年分离的病毒株与 1996 年我国华南地区的鹅分离株相比缺失了 50、58、63 与 68 位上的糖基化位点,与 A/HongKong/156/97 株相比,缺失了 50 位上的糖基化位点。

3. A/Zhejiang/16/2006 与同期病毒株的氨基酸差异: A/Zhejiang/16/2006 株的全序列 8 个片段与近年我国大陆的 A/Guangdong/01/06 株以及周边国家的 A/Turkey/12/06、A/Indonesia/CDC759/2006、A/VietNam/105/05、A/Indonesia/5/05 及 A/Thailand/16/04 株的氨基酸差异进行比较,结果见表 3。

表3 A/Zhejiang/16/2006 与同期分离的病毒株
各片段氨基酸差异的比较(%)

A/Zhejiang/ 16/2006 H5N1 基因片段	编 号					
	1	2	3	4	5	6
PB1	99.2	99.1	98.8	99.1	99.2	99.1
PB2	97.4	97.1	97.9	98.0	98.0	98.0
PA	98.2	96.6	96.2	96.5	96.5	97.3
HA	99.4	96.9	96.3	96.5	96.5	96.5
NP	99.1	98.5	98.7	98.7	98.7	99.0
NA	96.9	96.9	96.6	96.6	96.6	96.1
M1	99.0	99.6	98.4	99.6	99.6	99.6
M2	98.8	98.8	93.3	96.6	96.6	94.4
NS1	99.1	94.1	96.0	96.4	96.4	96.0
NS2	99.2	93.4	95.0	95.9	95.9	95.0

注:编号 1~6 分别代表 A/Guangdong/01/06、A/Turkey/12/06、A/Indonesia/CDC759/2006、A/Vietnam/105/05、A/Indonesia/5/05、A/Thailand/16/04

4. A/Zhejiang/16/2006 株全序列 8 个片段的基因进化树比较:对 A/Zhejiang/16/2006 株基因 8 个片段的系统进化树进行了比较,见图 1。

讨 论

近年来,流行于欧亚大陆的人感染高致病性禽流感毒 H5N1,由于基因重组而形成了不同的基因型,如 2003~2004 年东南亚地区出现了 V 与 Z 基因型病毒株,而以后出现的病毒株,又在此基础上继续进化,使 H5N1 病毒株呈现出多样性,这是近年人禽流感病毒株进化的特点之一^[1]。

从 HA 的系统进化树来分析, A/Zhejiang/16/2006 与近年国内外的 H5N1 毒株之间,大体上可分成 5 个群。第一群以东南亚地区的泰国、越南、柬埔寨、马来西亚等地区的禽类与人间的禽流感病毒 H5N1 为主;第二群是以 2005~2006 年阿拉伯半岛、埃及、土耳其、伊拉克、我国青海湖斑头雁以及印度尼西亚的 H5N1 为主;第三群是以 2005~2006 年我国大陆的禽流感与人禽流感病毒株为主,其中 A/Zhejiang/16/2006 与 A/Anhui/1/05、A/Goose/Guiyang/1304/06 最为接近;第四群比较特殊,只有北京 2003 年与海南 2004 年的 2 株 H5N1 毒株;第五群,就是 1996 年与 1997 年的广东与香港的 H5N1(包括最早报道的人禽流感)毒株。这种分群与 WHO 在前几年对 HA 的系统进化分为 3 个群的状况基本一致^[2]。本文从 WHO 的原第二群中又分出了阿拉伯半岛与我国大陆二个子群,另一方面,又增加了 A/Beijing/01/03 与 A/Treesparrow/Henan/1/04 两株这个小群。在 HA 基因进化树上,浙江省人禽流感病毒株 A/Zhejiang/16/2006/ 与我国大陆的禽流感毒株(除北京 2003 年病毒株外)相对都集中在第三群,提示 H5N1 禽流感病毒在其流行中虽然已具有较高的易变性和多样性,但在我国大陆流行的 H5N1 禽流感病毒株还相对比较稳定,如 HA 区有 11 个氨基酸与周边国家均不相同。构成了近年我国大陆 H5N1 毒株的独特特征,与周边国家和地区毒株之间存在明显的差异。从青海湖斑头雁与海南的麻雀等携带 H5N1 状况分析,其 HA 基因与我国大陆流行株相差较远,推测可能与自然界内的野生禽类的迁徙途径有关^[3,4]。

目前的 A/Zhejiang/16/2006 以及近年国内外 H5N1 毒株的 NA 区仅有 88、146 与 235 位 3 个糖基位点,比 1997 年以前的病毒株少了 4 个糖基化位

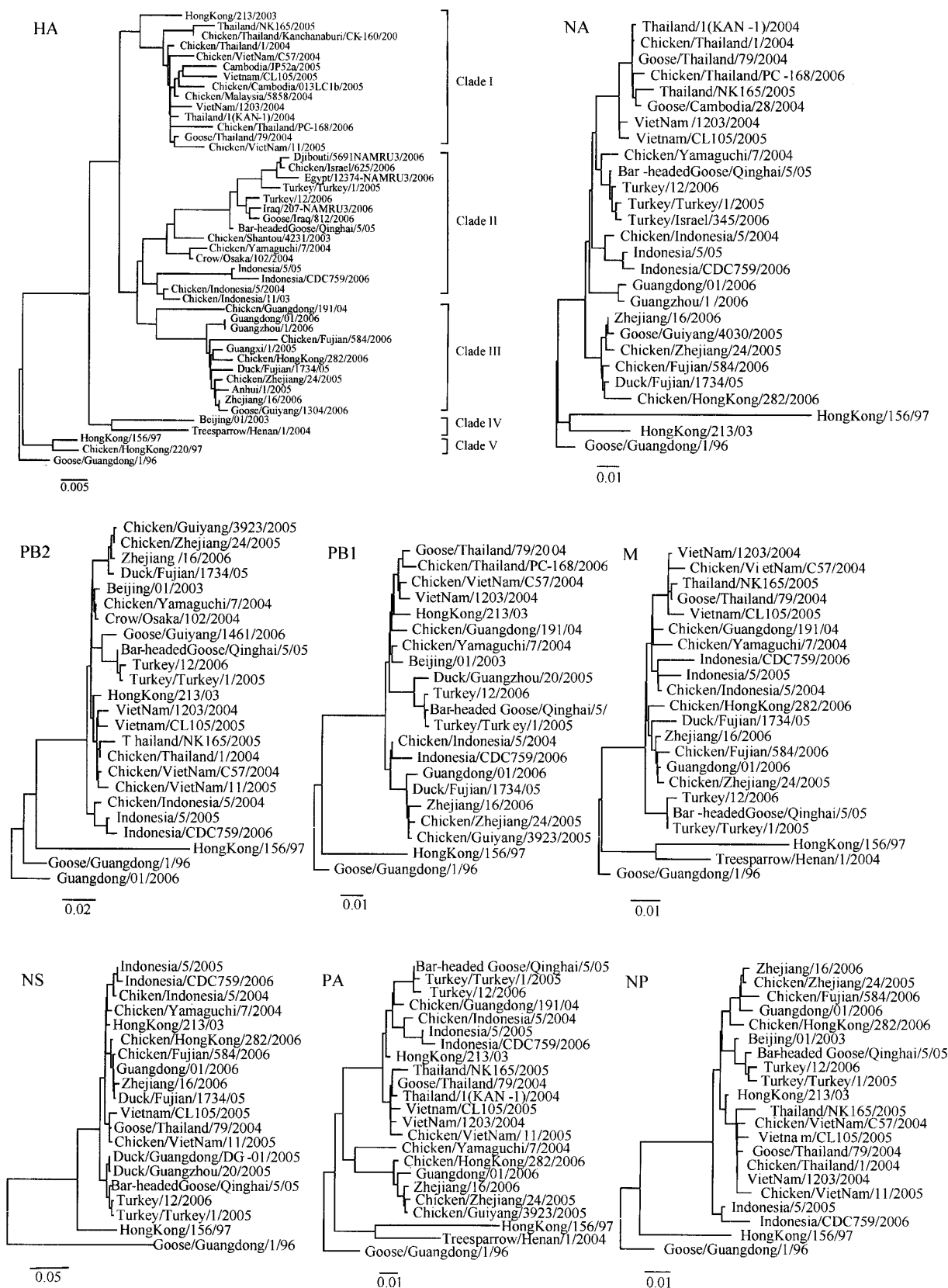


图1 A/Zhejiang/16/2006 株 8 个片段的氨基酸进化树

点,由于近年 H5N1 病毒株在 NA 区缺失的 49~68 位于 NA 蛋白的基杆区,该处缺失可延长病毒停留在细胞膜上的时间,以弥补因 HA 蛋白 N154 的糖基化作用而降低与唾液酸受体的结合能力。

将 A/Zhejiang/16/2006 株的其他片段与近年我国及周边地区的 H5N1 病毒株 A/Guangdong/01/06、A/Turkey/12/06、A/Indonesia/CDC759/2006、A/VietNam/105/05、A/Indonesia/5/05 与 A/Thailand/16/04 比较中可以看出,浙江省病毒株总体上与 A/Guangdong/01/06 最为接近。但对这些片段具体分析,病毒株之间在 PB1 上的同源性为 98.1%~99.2%,在 NP 上的同源性为 98.5%~99.1%,在 M1 上的同源性为 98.4%~99.6%,各病毒株之间相对差异不大,较为稳定,且浙江省病毒株与广东省病毒株在这些片段间的同源性最好。另一方面, A/Zhejiang/16/2006 株与 A/Guangdong/01/06 株之间在 PB2 与 M1 基因上的氨基酸同源性分别为 97.4% 和 99.0%,而 A/Zhejiang/16/2006 株与 A/Indonesia/5/05、A/Thailand/16/04 株在 PB1 上的同源性达 98.0%,与 A/Turkey/12/06、A/VietNam/105/05、A/Thailand/16/04 株在 M1 上的同源性竟达 99.6%。在 PB2 与 M1 等个别基因上,浙江省毒株与周边国家和地区的同源性较国内毒株更高,提示禽流感 H5N1 在不同宿主之间传播与基因重组、进化中出现的多样性^[5]。

从系统进化树中可以看出, A/Goose/Guangdong/1/96 和 A/HongKong/156/97 的 8 个基因,与近年的其他病毒株均处在不同分支中,且距离很远。显示 H5N1 近几年来已发生了较大变化。同时在系统进化树 HA 中的 A/Beijing/01/03、A/Treesparrow/Henan/1/04, PB2 中的 A/Guangdong/01/06, PA 与 M 中的 A/Treesparrow/Henan/1/04, NP 中的 A/Indonesia/5/05、A/Indonesia/CDC759/2006 等远离近年的人间与禽间的 H5N1 毒株,而更

接近于早些年代的 A/HongKong/156/97 株,该现象提示存在着不同病毒株间片段重组的可能。

近年我国大陆以及周边国家和地区的 H5N1 高致病性禽流感病毒株,其 NA 区的 274 位均为组氨酸,显示目前的这些流行病毒株对神经氨酸酶抑制类药物是敏感的。而从 M2 的氨基酸比较中可以看出 2005 年的我国福建、香港和越南、泰国等地的禽源株,以及泰国的 A/Thailand/NK165/05、A/VietNam/CL.105/05 人禽流感株,在 31 位上的 S 均已突变成 N。此外,人禽流感株 A/Indonesia/75a/06 等也出现了 27 位上 V 向 A 的突变,这些位点的突变减弱或消除了 M2 离子通道的活性,形成对金刚烷类药物的耐药性^[5,6]。而 A/Zhejiang/16/2006 株以及目前我国大陆的禽流感病毒株在 M2 蛋白第 25~42 位上的 5 个氨基酸分别为 26L、27V、30A 和 31S,均未发生突变,表明该类病毒株对金刚烷胺类药物与神经氨酸酶抑制类药物如达菲等依然敏感,尚未形成抗药性。

参 考 文 献

- [1] 翁育伟,严延生,杨式芹,等.福建省人感染 H5N1 禽流感病毒血凝素基因测定和分析.中国人畜共患病学报,2007,23:211-217.
- [2] Donis RO. Evolution of H5N1 avian influenza viruses in Asia. Emer Infect Dis, 2005, 11: 1515-1521.
- [3] 真瀬昌司,何岡義裕.最近日本で分離された鳥インフルエンザウイルス.ウイルス,2005,55:231-238.
- [4] Yasuaki Hiromoto, Yoshinao Yamazaki, Tatsunobu Fukushima, et al. Evolutionary characterization of the six internal genes of H5N1 human influenza virus. J Gen Virol, 2000, 81: 1293-1303.
- [5] Luyushina NA, Govorkova EA, Webster RG. Detection of amantadine-resistant variants among avian influenza viruses isolated in North America and Asia. J Virol, 2005, 34(1): 102-106.
- [6] Pilaipan P, Prasert A, Pakapak CC, et al. Molecular characterization of the complete genome of human influenza H5N1 virus isolates from Thailand. J Gen Virol, 2005, 86: 423-433.

(收稿日期:2007-11-29)

(本文编辑:张林东)