

# 一株水禽流感病毒分离株表面膜蛋白基因的序列分析\*

张评浒, 薛峰, 唐应华, 钱忠明, 郝贵杰, 刘慧谋, 刘秀梵\*\*

(扬州大学 农业部畜禽传染病学重点开放实验室, 江苏扬州 225009)

## Molecular Analysis of the Surface Glycoprotein Genes of an Aquatic Bird Influenza Virus

ZHANG Ping-hu, XUE Feng, TANG Ying-hua, QIAN Zhong-ming, HAO Gui-jie,  
LIU Hui-mou, LIU Xiu-fan\*\*

(Key Laboratory of Animal Infectious Diseases of Ministry of Agriculture, Yangzhou University, Yangzhou, 225009, China)

**Abstract:** Several H11N2 subtype of Avian influenza A viruses were isolated from aquatic birds in live bird markets when we surveyed the ecology of the influenza in East China for more than two years and identified by specific RT-PCR. The hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) genes of one representative virus named A/Duck/Yangzhou/44/2002 (H11N2) (DYZ/44/02) was sequenced. The results showed the HA nucleotide sequence of DYZ/44/02 has high identity with Dk/England/56 (H11N6) and the NA nucleotide sequence of DYZ/44/02 has more than 95% sequence homology with Dk/Hokkaido/49/98 (H9N2). Sequencing and phylogenetic analysis of the N2 NA genes of DYZ/44/02 revealed that the NA gene of DYZ/44/02 has close relationships with that of Ck/Korea/MS96/96-like H9N2 virus and are distinct from those of Ck/Beijing/94 (H9N2). The sequence of cleavage site of DYZ/44/02 consists of a single arginine, as is the case with most other hemagglutinins exhibiting low susceptibility to proteolytic activation.

**Key words:** Avian influenza virus; H11N2 subtype; HA; NA; Cleavage site

**关键词:** 禽流感病毒; H11N2 亚型; HA; NA; 剪切位点

**中图分类号:** S831.7      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1003-5125(2005)05-0555-03

禽流感(Avian Influenza, AI)是由 A 型流感病毒所引起的各种家禽及野生禽类感染和/或疾病综合征<sup>[1]</sup>。根据其表面糖蛋白血凝素蛋白(Hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(Neuraminidase, NA)的抗原关系不同,目前可分为 16 种 HA 亚型和 9 种 NA 亚型<sup>[2,3]</sup>。近几年来,南亚国家屡有禽流感病毒突破种间屏障作用,直接感染人类或其它哺乳动物,甚至致人死亡事件<sup>[4-6]</sup>的情况发生,因而赋予了禽流感全新的公共卫生学意义。因此,准确的了解和把握水禽,尤其是家养水禽的流感生态,对预防禽流感的发生具有非常重要的现实意义。为了防

患于未然,近年来扬州大学农业部畜禽传染病学重点开放实验室,对我国华东地区的家养水禽带毒情况进行了两年多的监测,分离到多株 H11 亚型,迄今国内极少见该亚型报道。本文就国内家养水禽中分离株 Dk/YZ/44/02(H11N2)的表面膜蛋白基因序列进行了测序和序列分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒

禽流感病毒株 A/Duck/yangzhou/44/2002 (H11N2)由扬州大学农业部畜禽传染病学重点开

收稿日期:2005-04-04,修回日期:2005-05-23

\* 基金项目:国家科技攻关计划项目(2004BA519A02);江苏省属高校重大基础研究项目(05 KJA23016)

作者简介:张评浒(1976-),男(汉),湖南新化籍,博士生,主要从事禽流感流行病学的研究。E-Mail: zhangpinghu@163.com

\*\* 通讯作者, corresponding author: Tel:0514-7991416; E-mail: xfliu@yzu.edu.cn

放实验室分离并保存。SPF 种蛋和 SPF 鸡, RT-PCR 相关试剂与引物详见参考文献<sup>[7]</sup>。

### 1.2 6 周龄 SPF 鸡的致病性试验

按参考文献<sup>[8]</sup>进行。

### 1.3 病毒 RNA 的提取与 RT-PCR 以及序列分析

按参考文献<sup>[7]</sup>的方法进行。

### 1.4 NA 基因的遗传进化分析

利用 GenBank 中的 BLAST 查找核苷酸序列和氨基酸序列的同源序列,应用 DNASTar 软件进行遗传进化分析,绘制遗传进化树。

## 2 结果

### 2.1 对 SPF 鸡的致病性

接种 A/Duck/yangzhou/44/2002 (H11N2) 种毒尿囊液 10d 后,所有鸡只全部健活,无任何明显的发病症状,说明 A/Duck/yangzhou/44/2002 (H11N2) 毒株为低致病性毒株。

### 2.2 RT-PCR 结果

经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,扩增到的 HA 基因片段约 1.7kb。扩增到的 NA 基因片段约 1.5kb。

### 2.3 HA 基因测序结果与序列分析

HA 基因测序结果 (HA 基因序列号为 DQ080993, NA 基因序列号为 DQ080994) 及其推导的氨基酸序列结果表明,HA 基因编码区由 1698 个核苷酸组成,编码 564 个氨基酸。整个编码区含有 18 个 Cys,有 8 个潜在糖基化位点 (N-X-T/S),分别位于第 26、27、39、100、181、304、497、556 位氨基酸处)。剪切位点仅含一个碱性氨基酸 (R),特定氨基酸序列为 P-A-I-A-S-R,为典型低致病性禽流感病毒特征序列。

### 2.4 HA 基因的序列比较分析

#### 2.4.1 HA 和 NA 基因序列同源性比较

将 DK/YZ/44/02 株 HA 基因与 GenBank 中已登录禽流感毒株的核苷酸序列和推导的氨基酸序列进行最大同源性比较,比较结果表明,DK/YZ/44/02 株的 HA 基因与 A/duck/England/56 (H11N6) 和 A/Duck/Taiwan/g9/89 (H11N?) 同源性最高,分别为 89.6% 和 77.8%,氨基酸序列的同源性分别为 95.6% 和 91.1%;而 A/duck/England/56 (H11N6) 和 A/Duck/Taiwan/g9/89 (H11N?) 核苷酸同源性和推导的氨基酸同源性分别为 76.0% 和

89.8%。而 DK/YZ/44/02 株 NA 基因序列与 Dk/Hokkaido/49/98 (H9N2) 和 A/Ostrich/South Africa/9508103/95 (H9N2) 的 NA 基因核苷酸同源性最高,分别为 95.2% 和 94.1%,推导的氨基酸序列同源性分别为 96.0% 和 95.2%。编码区无氨基酸缺失。DK/YZ/44/02 株在分离时间上虽然比 A/duck/England/56 (H11N6) 晚了将近 50 年,仅有 21 个氨基酸发生了变异,每年每位点的氨基酸变异率为  $0.74 \times 10^{-3}$ ,但每年每位点核苷酸的变异率高达  $2.05 \times 10^{-3}$ 。根据 H3 亚型的 HA 蛋白结构模式图,比较 DK/YZ/44/02 与 A/duck/England/56 (H11N6) 的受体结合位点和抗原结合位点发现,两者的受体结合位点和抗原位点的氨基酸高度保守,没有氨基酸发生变异。但是当水禽肠道存在多个亚型禽流感病毒同时感染时,不同基因片段极易发生遗传重组,特别是神经氨酸酶,它不仅是流感病毒两种主要的表面糖蛋白之一,在病毒的感染和出芽过程中扮演重要角色,同时也与病毒的宿主特异性及病毒毒力有一定的关系<sup>[4]</sup>。从 DK/YZ/44/02 株 NA 基因的进化来看,其 NA 基因可能直接来源于水禽 H9N2 亚型禽流感病毒,是否通过基因重组后获得了 H9N2 感染哺乳动物的能力,还有待开展相关性研究。其内部基因是否也已发生了重组,还有待进一步研究。

#### 2.4.2 NA 基因的遗传进化分析

DK/YZ/44/02 株 NA 基因与 GenBank 流感病毒 NA 基因的遗传进化关系见图 1。由图 1 可以看出,Dk/YZ/44/02 (H11N2) 与日本近年水禽分离株 Dk/Hokkaido/49/98 (H9N2) Dk/Hokkaido/13/00 (H9N2) 的亲缘关系最近;与南非 95 年鸵鸟分离株和韩国 1996 年暴发的 H9N2 禽流感流行株也具有较近的亲缘关系,都位于同一个进化分支内,由此说明,Dk/YZ/233/02 (H6N2) NA 基因可能直接来源于 H9N2 亚型禽流感病毒。另外,Dk/YZ/233/02 (H6N2) NA 基因与 Dk/HK/Y439/97 (H9N2) 以及美洲的 H7N2、H5N2、H9N2 禽流感分离株也有较近的亲缘关系,它们可能来源于同一个进化组群,但与中国大陆以 Ck/BJ/94 为代表的 H9N2 禽流感毒株的 NA 基因相距较远,且不存在亚洲大陆 H9N2 禽流感 NA 基因的标志性缺失。

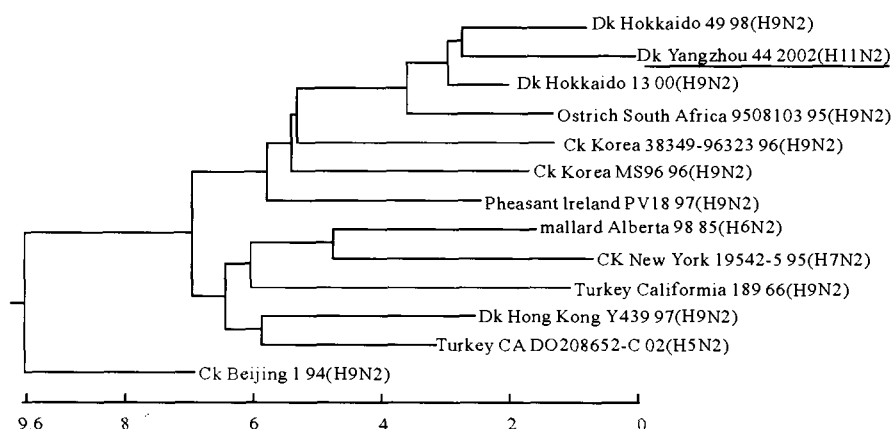


图1 DK/YZ/44/02(H11N2)禽流感毒株NA基因遗传进化树(61-1255bp)

Fig. 1 Phylogenetic tree from the NA gene of DK/YZ/44/02(H11N2) Avian influenza virus

Strain name and GenBank accession Dk/England/56 (H11N6) (D90306)、Dk/Taiwan/g9/89(H11N?) (AF310986)、Ostrich/South Africa/9508103/95 (H9N2) (AF508575)、Dk/Hokkaido/13/00(H9N2)(AY330340)、Dk/Hokkaido/49/98 (H9N2) (AY330338)、Ck/Korea/MS96/96 (H9N2) (AF203786)、Pheasant/Ireland/PV18/97 (H9N2) (AF508581)、Ck/Korea/38349-96323/96 (H9N2) (AF156400)、Turkey/CA/DO208652-C/02(H5N2)(AY300945)、Dk/HK/Y439/97(H9N2)(AF156395)、Mallard/Alberta/321/88 (H9N2) (AY633278)、Turkey/California/189/66 (H9N2) (AF156401)、Ck/Beijing/1/94(H9N2)(AF156398)、Ck/NY/19542/95(H7N2)(AY254120)、Mallard/Alberta/98/85(H6N2)(AY633310)。Abbreviation; Ck, chicken; Dk, Duck; HK, Hong Kong.

## 参考文献

- [1] 甘孟侯. 禽流感[M]. 第二版, 北京: 北京农业大学出版社, 1995. 74-78.
- [2] Webster R G, Bean W J, Gorman O T, *et al.* Evolution and ecology of influenza A viruses [J]. *Microbiol Rev*, 1992, 56: 152-179.
- [3] Fouchier R A M, Munster V, Wallensten A, *et al.* Characterization of a Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16) Obtained from Black-Headed Gulls[J]. *Virology*, 2005, 79: 2814-2822.
- [4] Hatta M, Gao P, Halfmann P, *et al.* Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses[J]. *Science*, 2001, 293(5536):1840-1842.
- [5] Guan Y, Shortridge K F, Krauss S, *et al.* Molecular characterization of H9N2 influenza viruses; were they the donors of the "internal" genes of H5N1 viruses in Hong Kong? [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 9363-9367.
- [6] Nguyen D C, Uyeki T M, Jadhao S, *et al.* Isolation and characterization of avian influenza viruses, including highly pathogenic H5N1, from poultry in live bird markets in Hanoi, Vietnam, in 2001[J]. *J Virol*, 2005, 79: 4201-4212.
- [7] 张评浒, 刘晓文, 钱志明. 家养水禽流感病毒分离株 A/Duck/Yangzhou/233/02(H6N2) 的表面膜蛋白基因的序列测定和遗传进化分析[J]. *微生物学报*, 2005, 45 (4): 491-495.
- [8] 世界动物卫生组织(农业部畜牧兽医局译). 哺乳动物、禽类和蜜蜂 A 类和 B 类疾病诊断试验和疫苗标准手册[M]. 第三版, 北京: 中国农业出版社, 2002. pp136-139.