

2012~2015年H9N2亚型AIV分离株HA基因的克隆及序列分析

叶贺佳,梁昭平*,彭特,仇微红,许利娜

(广州市华南农大生物药品有限公司,增城 511300)

摘要: 为了解近年来中国部分地区 H9N2 亚型禽流感病毒流行特点及遗传进化情况,利用 RT-PCR 方法扩增 2012~2015 年分离的 17 株 H9N2 亚型禽流感病毒的 HA 基因片段,并进行序列测定和遗传进化分析,同时对 HA 蛋白的裂解位点、受体结合位点和潜在的糖基化位点进行分析。结果显示,17 株 H9N2 亚型禽流感病毒 HA 基因核苷酸和推导的氨基酸同源性分别为 87%~100%和 75%~100%,均属于 Y280-like 亚系毒株。HA 基因裂解位点均为非连续碱性氨基酸,属于低致病力毒株。HA 基因受体结合位点 149、198、234 和 235 位氨基酸存在变异,其中,16 株分离毒株的 234 位氨基酸由 Q 突变为 L,表现出人流感病毒受体结合特征。潜在糖基化位点分析结果显示,11 株病毒在 218 位氨基酸处缺失 1 个糖基化位点,4 株病毒在 492 位氨基酸处缺失 1 个糖基化位点,17 株病毒在 313 位氨基酸处增加 1 个糖基化位点。研究结果表明,应加强对 H9N2 亚型 AIV 的流行病学监测,关注疫苗毒株与流行毒株的差异。

关键词: H9N2 亚型禽流感病毒;HA 基因;克隆;序列分析

中图分类号:S852.65

文献标识码:A

文章编号:1671-7236(2016)05-1148-08

Cloning and Sequence Analysis of Hemagglutinin Genes of H9N2 Subtype Avian Influenza Virus Isolated Between 2012 to 2015

YE He-jia, LIANG Zhao-ping*, PENG Te, QIU Wei-hong, XU Li-na

(Guangzhou South China Biological Medicine Co., Ltd., Zengcheng 511300, China)

Abstract: In order to study the epidemiology and genetic evolution characteristics of H9N2 subtype avian influenza virus (AIV) isolated from some areas of China, the hemagglutinin (HA) gene of 17 H9N2 subtype AIVs isolated from 2012 to 2015 were amplified by RT-PCR. Sequencing and phylogenetic analysis were performed, and the molecular characteristics of the motif of HA protein cleavage site, the receptor binding sites and potential glycosylation sites were analyzed. The results showed that the HA gene of 17 strains shared nucleotide and deduced amino acid homologies ranging from 87% to 100% and 75% to 100%, respectively. All strains belonged to Eurasian lineage, Y280-like sublineage. The cleavage sites motif of 17 isolates lacked multiple basic amino acids, which made them low pathogenic strains. There were amino acid variations at sites 149, 198, 234 and 235 of the receptor binding sites, while 16 isolates had a leucine residue at site 234, indicative of the characteristics of human influenza virus-like receptor. The analysis results of potential glycosylation site indicated that a glycosylation site deletion took place at amino acid site 218 of 11 isolates and site 492 of 4 isolates, while an additional potential glycosylation site were found at amino acid site 313 of 17 isolates. In summary, the epidemiological investigation of H9N2 subtype AIV should be enhanced and the difference between isolated virus and vaccine virus

收稿日期:2015-10-30

基金项目:广州市产学研协同创新重大专项(201508020088)

作者简介:叶贺佳(1980-),男,广东东莞人,硕士,研究方向:兽用生物制品产品的研发,E-mail:super_jia@126.com

*通信作者:梁昭平(1967-),福建三明人,学士,研究方向:兽用生物制品,E-mail:liangzhaoping@gzscbm.com

should be paid more attention.

Key words: H9N2 subtype avian influenza virus; HA gene; cloning; sequence analysis

禽流感(avian influenza, AI)是由正黏病毒科流感病毒属的 A 型流感病毒引起的一种禽类烈性传染性疾病,该病给家禽业带来巨大的经济损失,同时也严重危害公共卫生安全。禽流感病毒(avian influenza virus, AIV)变异频繁,血清型众多,目前已发现 17 种 HA 亚型和 10 种 NA 亚型^[1]。根据 AIV 对易感鸡致病性的差异,可将 AIV 分为高致病性禽流感病毒(HPAIV)和低致病性禽流感病毒(LPAIV),H9N2 亚型低致病性禽流感病毒最早于 1966 年在美国威斯康辛州的火鸡中分离^[2]。1994 年,陈伯伦等^[3]首次从广东某鸡场发病鸡体内分离到 6 株 H9N2 亚型禽流感病毒。随后 H9N2 亚型禽流感病毒在全国范围内广泛流行,给家禽业造成严重的损失。1999 年以来,国内外报道多起人感染 H9N2 亚型 AIV 病例^[4],2013 年暴发的人感染 H7N9 亚型 AIV,其内部基因已证实是来自于 H9N2 亚型 AIV^[5]。因此,加强对 H9N2 亚型 AIV 的监测具有重要的公共卫生意义。

本研究对中国部分地区 2012~2015 年分离的 17 株 H9N2 亚型 AIV 的 HA 基因进行序列测定,通过进化及基因内部位点的分析,了解近年来国内部分地区 H9N2 亚型 AIV 的流行及变异情况,为疫病的防控及疫苗的研制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒 H9N2 亚型 AIV 毒株 A/Chicken/Henan/HY01/2012 (CK/NH/HY01/2012)、A/Chicken/Shandong/PL01/2012 (CK/SD/PL01/2012)、A/Chicken/Shandong/WF01/2012 (CK/SD/WF01/2012)、A/Chicken/Fujian/SB01/2012 (CK/FJ/SB01/2012)、A/Chicken/Yunnan/XJ04/2014 (CK/YN/XJ04/2014)、A/Chicken/Shandong/HZ03/2014 (CK/SD/HZ03/2014)、A/Chicken/Hebei/ZS005/2015 (CK/HB/ZS005/2015)、A/Chicken/Anhui/HW008/2015 (CK/AH/HW008/2015)、A/Chicken/Guangxi/SL001/2015 (CK/GX/SL001/2015)、A/Chicken/Zhejiang/TZ081/2015 (CK/ZJ/TZ081/2015)、A/Chicken/Guangdong/TS085/2015 (CK/GD/TS085/2015)、A/Chicken/Chongqing/DK099/2015 (CK/CQ/DK099/2015)、A/Chicken/Shandong/MH136/2015 (CK/SD/MH136/2015)、A/Chicken/

Shandong/023/2015 (CK/SD/023/2015)、A/Chicken/Shandong/026/2015 (CK/SD/026/2015)、A/Chicken/Shandong/029/2015 (CK/SD/029/2015)、A/Chicken/Guangdong/ZW01/2015 (CK/GD/ZW01/2015) 均由广州市华南农大生物药品有限公司技术部从山东、河南、广东、广西等省收集的发病家禽组织中分离,经鉴定均为 H9N2 亚型 AIV。

1.1.2 主要试剂 RNA 提取试剂盒、pMD18-T 载体克隆试剂盒、DL2000 DNA Marker 均购自 TaKaRa 公司;反转录试剂盒和核酸染料均购自 TIANGEN 公司;2×GoTaq PCR Master Mix 购自 Promega 公司。

1.1.3 引物设计 根据 GenBank 已发表的 H9N2 亚型 AIV HA 基因序列(登录号:KP412432),设计 1 对引物用于扩增 HA 基因全长序列,引物序列为:上游引物 P1:5'-TTTCACAACCACTCAA-GATGGAA-3';下游引物 P2:5'-AACAAAGGGT-GTTTTTGC-CAATTA-3';预期扩增片段长度为 1.7 kb。引物由英潍捷基(上海)公司合成。

1.2 方法

1.2.1 HA 基因的 RT-PCR 扩增与序列测定

按照 RNA 提取试剂盒说明书,从含有病毒的尿囊液中提取病毒基因组 RNA,按照反转录试剂盒进行反转录。以合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 反应条件为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,59 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 2 min,30 个循环;72 °C 延伸 10 min。反应结束后,取 PCR 产物在 1.0% 琼脂糖凝胶中进行电泳,按照胶回收试剂盒说明书进行目的基因的纯化。将回收的 PCR 产物与 pMD18-T 克隆载体连接,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,菌液 PCR 鉴定后挑取阳性菌落送英潍捷基(上海)公司进行序列测定。

1.2.2 HA 基因的序列分析 用 DNASTar 软件对获得的 HA 基因核苷酸序列进行同源性比对,并对 HA 基因的裂解位点、受体结合位点及潜在的糖基化位点进行分析。使用 Mega 6.06 软件中的 Clustal W 软件对序列进行比对,用 Neighbor-Joining 方法对本研究中的 17 株毒株的 HA 基因序列与 GenBank 已发表的 H9N2 亚型 AIV 参考毒株和疫苗毒株进行遗传进化分析,绘制系统进化树,参考毒株见表 1,其中 A/Chicken/Guangdong/SS/94、A/Chicken/Guangdong/TS/2004、A/Chicken/Shanghai/F/98 和 A/Chicken/Shandong/6/96 为疫苗毒株。

表 1 H9N2 亚型 AIV 参考毒株

Table 1 H9N2 subtype AIV reference strains

| 序号 No. | 参考毒株 Reference strains | GenBank 登录号 GenBank accession No. |
|--------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1 | A/Turkey/Wisconsin/1/1966 | AB295601 |
| 2 | A/Chicken/Heilongjiang/35/00 | DQ064366 |
| 3 | A/Chicken/Heilongjiang/u/1998 | FJ190113 |
| 4 | A/Hong Kong/1074/1997 | GU053179 |
| 5 | A/Guinea fowl/Hong Kong/WF10/99 | AY206676 |
| 6 | A/Bean goose/Korea/220/2011 | KJ013297 |
| 7 | A/Chicken/Beijing/1/1994 | AF156380 |
| 8 | A/Chicken/Korea/38349-P96323/96 | AF156384 |
| 9 | A/Duck/Hong Kong/Y280/97(Y280) | AF156376 |
| 10 | A/Quail/Hong Kong/G1/97 | AF156378 |
| 11 | A/Chicken/Hong Kong/G9/1997 | KF188366 |
| 12 | A/Duck/Hong Kong/Y439/1997 | KF188265 |
| 13 | A/Chicken/Guangdong/SS/94(SS94) | AF384557 |
| 14 | A/Chicken/Guangdong/TS/2004(TS04) | JQ639778 |
| 15 | A/Chicken/Shanghai/F/98(F98) | AF508574 |
| 16 | A/Chicken/Shandong/6/96(696) | AF508570 |

2 结果与分析

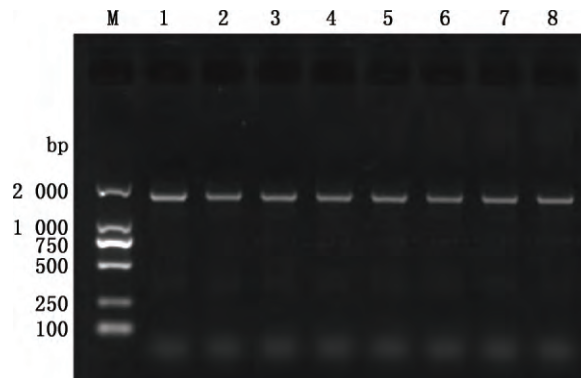
2.1 HA 基因的扩增结果

17 个毒株均扩增出大小约 1.7 kb 的特异性条带,与预期相符(图 1)。

2.2 HA 基因的核苷酸同源性分析

测序结果表明,17 株病毒的 HA 基因序列均为 1 702 bp,包含 1 个完整的开放性阅读框(ORF),编码区长度为 1 683 bp。使用 DNASTar 软件对 17 株毒株 HA 基因核苷酸序列进行分析,结果见图 2、3。

由图 2、3 可知,17 株毒株之间的核苷酸同源性为 87%~100%,推导的氨基酸同源性为 75%~100%,与 Y280-like 亚系代表毒株 A/Duck/Hong Kong/Y280/97 的核苷酸同源性为 87.2%~96.2%,与疫苗毒株 A/Chicken/Guangdong/TS/2004 的核苷酸同源性为 83.7%~92.7%,其中,2014 年以前分离的毒株与 TS 株的核苷酸同源性较高,均在 91%以上,2015 年分离获得的毒株与 TS 株的核苷酸同源性较低,仅达 84%左右,提示新分离毒株与疫苗毒株存在较大的序列差异。



M,DL2000 DNA Marker;1~8,部分毒株样品的扩增结果

M,DL2000 DNA Marker;1-8,PCR amplification products of some strain samples

图 1 HA 基因的 RT-PCR 扩增结果

Fig. 1 RT-PCR amplification of HA gene

同源性(%) Percent identity

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | |
|----|------|------|------|------|------|------|------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------------------|
| 1 | ■ | 96.8 | 96.8 | 94.8 | 96.2 | 92.5 | 92.4 | 92.5 | 93.1 | 91.2 | 91.0 | 90.8 | 87.6 | 87.8 | 87.2 | 87.4 | 90.6 | 90.5 | 90.7 | 90.7 | 90.7 | 90.1 | Y280 |
| 2 | 3.2 | ■ | 99.5 | 96.8 | 98.1 | 92.1 | 92.0 | 92.1 | 92.6 | 90.9 | 90.9 | 90.2 | 84.3 | 84.4 | 84.0 | 83.7 | 90.0 | 90.1 | 90.4 | 90.4 | 90.4 | 89.6 | SS94 |
| 3 | 3.2 | 0.5 | ■ | 97.0 | 98.2 | 92.1 | 92.0 | 92.1 | 92.7 | 91.2 | 91.1 | 90.2 | 84.3 | 84.6 | 84.2 | 83.7 | 90.0 | 90.2 | 90.7 | 90.7 | 90.5 | 89.6 | TS04 |
| 4 | 5.4 | 3.3 | 3.1 | ■ | 96.8 | 90.8 | 90.8 | 90.8 | 91.7 | 90.1 | 90.0 | 89.2 | 83.0 | 83.3 | 83.3 | 82.8 | 89.1 | 89.0 | 89.7 | 89.7 | 89.5 | 88.7 | F98 |
| 5 | 3.9 | 1.9 | 1.8 | 3.3 | ■ | 91.4 | 91.3 | 91.4 | 92.1 | 90.3 | 90.5 | 89.7 | 83.9 | 83.7 | 83.7 | 83.6 | 89.6 | 89.5 | 90.0 | 90.1 | 90.1 | 89.4 | 696 |
| 6 | 8.0 | 8.4 | 8.4 | 10.0 | 9.3 | ■ | 99.8 | 100.0 | 95.5 | 97.6 | 97.0 | 96.3 | 90.0 | 90.6 | 89.6 | 89.1 | 96.0 | 96.1 | 96.4 | 96.5 | 96.2 | 95.2 | CK/NH/HY01/2012 |
| 7 | 8.0 | 8.4 | 8.4 | 9.8 | 9.2 | 0.1 | ■ | 99.8 | 95.3 | 97.4 | 96.8 | 95.9 | 89.7 | 90.4 | 89.3 | 88.8 | 95.8 | 95.8 | 96.2 | 96.2 | 95.9 | 95.0 | CK/SD/PL01/2012 |
| 8 | 8.0 | 8.4 | 8.4 | 9.9 | 9.3 | 0.0 | 0.1 | ■ | 95.5 | 97.6 | 97.0 | 96.2 | 90.0 | 90.6 | 89.6 | 89.1 | 96.0 | 96.0 | 96.4 | 96.5 | 96.2 | 95.2 | CK/SD/WF01/2012 |
| 9 | 7.3 | 7.9 | 7.7 | 8.9 | 8.5 | 4.7 | 4.7 | 4.7 | ■ | 94.7 | 94.7 | 94.1 | 87.5 | 87.9 | 87.3 | 87.0 | 93.5 | 94.0 | 94.2 | 94.3 | 94.2 | 93.1 | CK/FJ/SB01/2012 |
| 10 | 9.5 | 9.9 | 9.6 | 10.8 | 10.6 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 5.5 | ■ | 96.1 | 95.2 | 89.1 | 91.3 | 89.1 | 88.8 | 95.1 | 95.2 | 95.7 | 95.8 | 95.2 | 94.3 | CK/YN/XJ04/2012 |
| 11 | 9.7 | 9.9 | 9.6 | 10.9 | 10.4 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 5.6 | 4.0 | ■ | 97.0 | 90.1 | 89.2 | 91.3 | 89.7 | 96.6 | 96.6 | 98.0 | 98.1 | 97.3 | 95.6 | CK/SD/HZ03/2012 |
| 12 | 10.0 | 10.7 | 10.7 | 11.9 | 11.3 | 3.8 | 4.0 | 4.0 | 6.2 | 5.0 | 3.1 | ■ | 92.3 | 88.3 | 89.5 | 91.4 | 99.2 | 98.5 | 95.9 | 96.3 | 97.1 | 97.8 | CK/HB/ZS005/2015 |
| 13 | 13.8 | 18.0 | 18.0 | 19.7 | 18.5 | 10.9 | 11.0 | 10.9 | 13.8 | 11.9 | 10.7 | 8.2 | ■ | 89.8 | 91.0 | 93.7 | 92.0 | 91.8 | 89.4 | 89.5 | 90.3 | 91.3 | CK/AH/HW008/2015 |
| 14 | 13.5 | 17.7 | 17.5 | 19.2 | 18.6 | 10.0 | 10.1 | 10.0 | 13.3 | 9.3 | 11.7 | 12.8 | 11.0 | ■ | 94.2 | 93.0 | 88.0 | 88.3 | 88.7 | 88.8 | 88.1 | 87.5 | CK/GX/SL001/2015 |
| 15 | 14.2 | 18.2 | 18.0 | 19.2 | 18.6 | 11.3 | 11.4 | 11.3 | 14.1 | 11.9 | 9.3 | 11.4 | 9.6 | 6.1 | ■ | 93.9 | 89.4 | 89.2 | 91.8 | 91.9 | 90.6 | 88.7 | CK/ZJ/TZ081/2015 |
| 16 | 13.9 | 18.6 | 18.7 | 19.9 | 18.9 | 11.9 | 12.0 | 11.9 | 14.4 | 12.3 | 11.1 | 9.1 | 6.6 | 7.4 | 6.4 | ■ | 91.5 | 91.1 | 88.7 | 88.9 | 89.5 | 92.1 | CK/GD/TS085/2015 |
| 17 | 10.2 | 10.9 | 10.9 | 12.1 | 11.5 | 4.1 | 4.2 | 4.1 | 6.9 | 5.1 | 3.5 | 0.8 | 8.5 | 13.1 | 11.5 | 9.0 | ■ | 98.2 | 95.9 | 96.0 | 96.8 | 97.6 | CK/CQ/DK099/2015 |
| 18 | 10.3 | 10.8 | 10.7 | 12.1 | 11.5 | 4.0 | 4.2 | 4.1 | 6.3 | 5.0 | 3.5 | 1.5 | 8.7 | 12.8 | 11.8 | 9.6 | 1.8 | ■ | 95.7 | 96.0 | 96.8 | 97.2 | CK/SD/MH136/2015 |
| 19 | 10.2 | 10.4 | 10.1 | 11.3 | 10.9 | 3.7 | 3.8 | 3.7 | 6.1 | 4.4 | 2.0 | 4.2 | 11.5 | 12.3 | 8.7 | 12.3 | 4.3 | 4.4 | ■ | 99.9 | 98.2 | 94.9 | CK/SD/023/2015 |
| 20 | 10.1 | 10.4 | 10.1 | 11.3 | 10.9 | 3.7 | 3.7 | 3.7 | 6.0 | 4.4 | 1.9 | 3.8 | 11.4 | 12.2 | 8.6 | 12.1 | 4.1 | 4.1 | 0.1 | ■ | 98.2 | 94.9 | CK/SD/026/2015 |
| 21 | 10.0 | 10.4 | 10.2 | 11.4 | 10.7 | 3.9 | 3.9 | 3.9 | 5.9 | 4.9 | 2.7 | 2.9 | 10.3 | 12.9 | 9.9 | 11.3 | 3.2 | 3.2 | 1.7 | 1.7 | ■ | 95.6 | CK/SD/029/2015 |
| 22 | 10.8 | 11.4 | 11.4 | 12.5 | 11.7 | 4.9 | 5.0 | 4.9 | 7.3 | 6.0 | 4.6 | 2.2 | 9.3 | 13.7 | 12.4 | 8.4 | 2.5 | 2.9 | 5.3 | 5.3 | 4.4 | ■ | CK/GD/ZW01/2015 |

图 2 17 株流行毒株与疫苗毒株的核苷酸同源性分析结果
Fig. 2 Nucleotide homology analysis between 17 isolates and vaccine strains

同源性(%) Percent identity

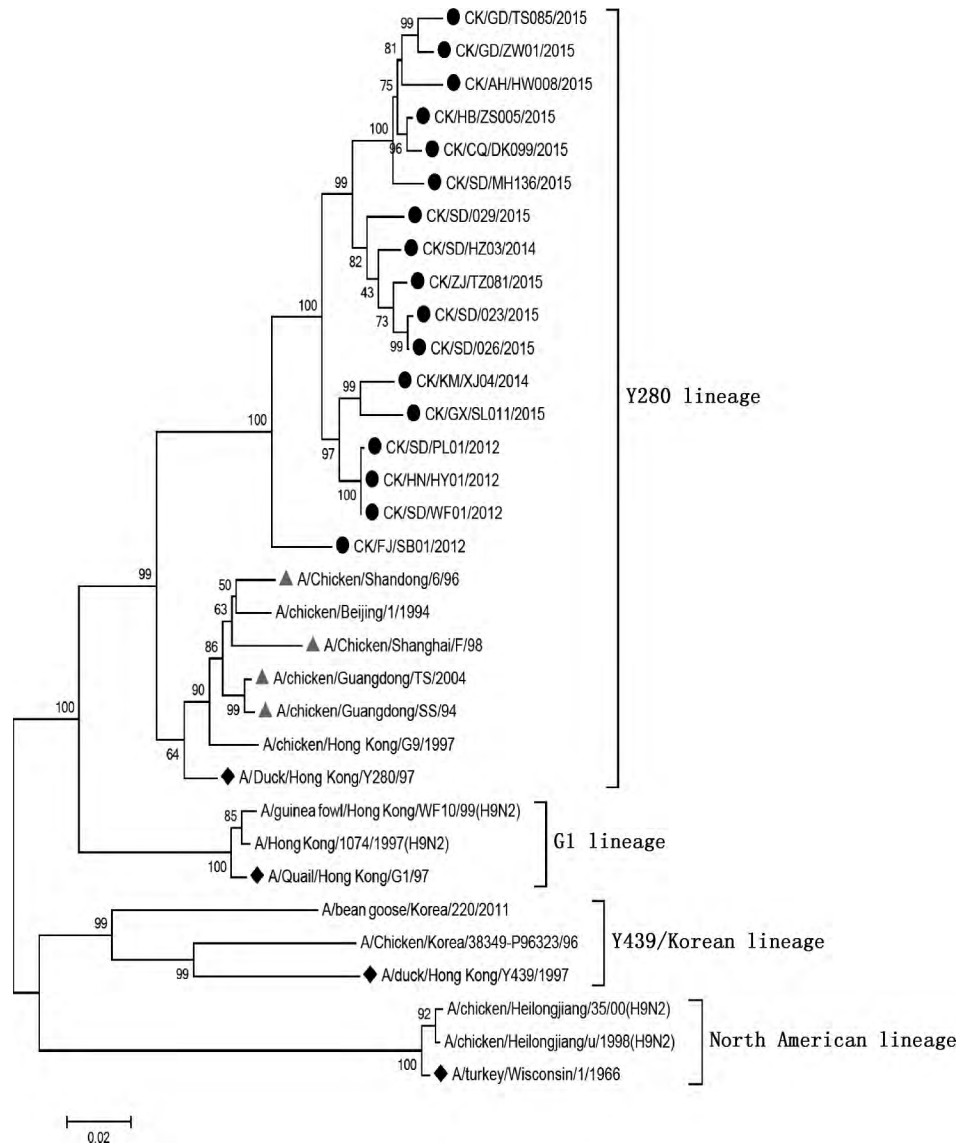
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | |
|----|------|------|------|------|------|------|------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------------------|
| 1 | ■ | 91.9 | 92.1 | 86.2 | 89.7 | 81.0 | 80.6 | 81.0 | 82.4 | 78.3 | 77.1 | 74.1 | 73.1 | 73.5 | 73.7 | 77.1 | 76.1 | 77.1 | 77.3 | 77.3 | 76.1 | Y280 | |
| 2 | 8.6 | ■ | 99.1 | 91.6 | 94.5 | 80.4 | 79.9 | 80.1 | 80.6 | 77.2 | 78.0 | 76.3 | 71.3 | 68.7 | 67.9 | 67.7 | 75.9 | 75.8 | 76.8 | 76.9 | 76.9 | 75.2 | SS94 |
| 3 | 8.4 | 0.9 | ■ | 92.2 | 95.0 | 80.4 | 79.9 | 80.1 | 80.6 | 77.6 | 78.4 | 76.3 | 71.3 | 69.0 | 68.3 | 67.7 | 75.9 | 75.8 | 77.2 | 77.3 | 76.9 | 75.2 | TS04 |
| 4 | 15.3 | 9.0 | 8.2 | ■ | 91.2 | 76.9 | 76.8 | 76.6 | 78.2 | 74.8 | 75.7 | 73.8 | 67.9 | 65.7 | 66.2 | 65.5 | 73.3 | 73.0 | 74.8 | 74.7 | 74.5 | 73.4 | F98 |
| 5 | 11.1 | 5.7 | 5.1 | 9.4 | ■ | 78.0 | 77.5 | 77.7 | 79.0 | 75.7 | 76.3 | 74.4 | 69.6 | 66.8 | 66.8 | 67.0 | 73.9 | 73.6 | 75.1 | 75.2 | 75.6 | 73.9 | 696 |
| 6 | 21.9 | 22.7 | 22.7 | 27.7 | 26.1 | ■ | 99.6 | 100.0 | 88.3 | 93.9 | 92.9 | 91.6 | 84.9 | 83.8 | 81.3 | 80.8 | 90.7 | 90.7 | 91.2 | 91.4 | 90.9 | 89.3 | CK/NH/HY01/2012 |
| 7 | 22.5 | 23.4 | 23.4 | 27.9 | 26.8 | 0.4 | ■ | 99.6 | 87.9 | 93.9 | 92.5 | 91.3 | 84.3 | 83.4 | 81.0 | 80.5 | 90.3 | 90.3 | 90.7 | 91.1 | 90.5 | 89.1 | CK/SD/PL01/2012 |
| 8 | 21.9 | 23.1 | 23.1 | 28.1 | 26.5 | 0.0 | 0.4 | ■ | 88.3 | 93.9 | 92.9 | 91.7 | 84.7 | 83.8 | 81.3 | 80.5 | 90.7 | 90.7 | 90.9 | 91.4 | 90.9 | 89.3 | CK/SD/WF01/2012 |
| 9 | 20.1 | 22.5 | 22.5 | 25.8 | 24.8 | 12.8 | 13.2 | 12.8 | ■ | 86.4 | 86.6 | 86.0 | 79.1 | 76.7 | 75.0 | 75.4 | 84.5 | 85.7 | 85.7 | 85.8 | 86.0 | 84.1 | CK/FJ/SB01/2012 |
| 10 | 26.0 | 27.3 | 26.7 | 30.8 | 29.4 | 6.4 | 6.4 | 6.4 | 15.0 | ■ | 89.6 | 88.9 | 81.9 | 84.3 | 78.9 | 78.3 | 87.7 | 88.5 | 88.1 | 88.6 | 87.9 | 86.5 | CK/YN/XJ04/2012 |
| 11 | 25.7 | 26.1 | 25.6 | 29.3 | 28.5 | 7.5 | 7.9 | 7.5 | 14.8 | 11.3 | ■ | 93.5 | 85.4 | 79.9 | 84.5 | 82.1 | 92.4 | 92.2 | 94.4 | 94.8 | 93.1 | 90.2 | CK/SD/HZ03/2012 |
| 12 | 27.4 | 28.6 | 28.6 | 32.2 | 31.4 | 8.9 | 9.3 | 8.9 | 15.5 | 12.1 | 6.8 | ■ | 89.2 | 78.4 | 81.5 | 84.8 | 97.8 | 95.7 | 90.7 | 91.4 | 93.3 | 94.6 | CK/HB/ZS005/2015 |
| 13 | 31.8 | 36.2 | 36.2 | 41.8 | 38.9 | 17.0 | 17.6 | 17.2 | 24.6 | 20.8 | 16.3 | 11.7 | ■ | 78.5 | 81.7 | 86.2 | 89.1 | 87.9 | 83.4 | 83.9 | 85.2 | 87.9 | CK/AH/HW008/2015 |
| 14 | 33.3 | 40.5 | 39.9 | 45.7 | 43.7 | 18.3 | 18.8 | 18.3 | 28.0 | 17.6 | 23.5 | 25.6 | 25.4 | ■ | 84.3 | 83.2 | 77.4 | 78.2 | 78.7 | 78.9 | 77.6 | 77.1 | CK/GX/SL001/2015 |
| 15 | 32.7 | 41.8 | 41.1 | 44.7 | 43.7 | 21.5 | 22.0 | 21.5 | 30.4 | 24.8 | 17.4 | 21.3 | 21.1 | 17.7 | ■ | 85.4 | 81.1 | 80.2 | 85.8 | 86.2 | 83.4 | 80.1 | CK/ZJ/TZ081/2015 |
| 16 | 32.4 | 42.1 | 42.1 | 46.0 | 43.4 | 22.2 | 22.7 | 22.6 | 29.8 | 25.7 | 20.5 | 17.1 | 15.3 | 19.1 | 16.2 | ■ | 85.1 | 84.0 | 79.6 | 80.3 | 81.9 | 86.9 | CK/GD/TS085/2015 |
| 17 | 27.4 | 29.1 | 29.1 | 33.0 | 32.1 | 10.0 | 10.4 | 10.0 | 17.4 | 13.5 | 8.1 | 2.3 | 11.8 | 26.9 | 21.8 | 16.7 | ■ | 95.0 | 89.9 | 90.3 | 92.5 | 93.8 | CK/CQ/DK099/2015 |
| 18 | 28.8 | 29.2 | 29.2 | 33.4 | 32.6 | 10.0 | 10.4 | 9.9 | 16.0 | 12.5 | 8.3 | 4.4 | 13.3 | 25.9 | 23.0 | 18.0 | 5.2 | ■ | 89.8 | 90.3 | 92.2 | 92.9 | CK/SD/MH136/2015 |
| 19 | 27.4 | 27.8 | 27.3 | 30.8 | 30.2 | 9.3 | 9.9 | 9.7 | 16.0 | 13.0 | 5.8 | 9.9 | 18.8 | 25.1 | 15.8 | 23.9 | 10.8 | 11.0 | ■ | 99.6 | 95.5 | 88.4 | CK/SD/023/2015 |
| 20 | 27.1 | 27.7 | 27.1 | 30.9 | 30.1 | 9.1 | 9.5 | 9.1 | 15.7 | 12.3 | 5.4 | 9.1 | 18.1 | 24.8 | 15.3 | 23.0 | 10.4 | 10.4 | 0.4 | ■ | 95.5 | 88.4 | CK/SD/026/2015 |
| 21 | 27.1 | 27.7 | 27.7 | 31.2 | 29.6 | 9.8 | 10.2 | 9.8 | 15.5 | 13.2 | 7.3 | 7.0 | 16.5 | 26.6 | 18.8 | 20.7 | 7.9 | 8.3 | 4.6 | 4.6 | ■ | 90.2 | CK/SD/029/2015 |
| 22 | 28.8 | 30.1 | 30.1 | 32.9 | 32.1 | 11.6 | 11.8 | 11.6 | 18.0 | 14.9 | 10.5 | 5.7 | 13.2 | 27.4 | 23.2 | 14.5 | 6.5 | 7.5 | 12.7 | 12.7 | 10.5 | ■ | CK/GD/ZW01/2015 |

图 3 17 株流行毒株与疫苗毒株的推导氨基酸同源性分析结果
Fig. 3 Deduced amino acid homology analysis between 17 isolates and vaccine strains

2.3 HA 基因的遗传进化树分析

应用 Mega 6.06 软件将 17 株分离毒株的 HA 基因序列与国内部分参考毒株及各分支的代表毒株进行比对并绘制系统进化树,结果见图 4。由图 4

可知,17 株分离毒株均为欧亚分支毒株,属于以 A/Duck/Hong Kong/Y280/97 为代表株的 Y280 亚系。



本研究中 17 株毒株用●标记;欧亚分支内各亚系的代表毒株用◆标记;参考疫苗毒株用▲标记
 17 isolates marked with ●; Reference strains of Eurasia lineage marked with ◆; Vaccine strains marked with ▲
 图 4 H9N2 亚型 AIV 的 HA 基因系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of H9N2 subtype AIV based on the HA gene

2.4 HA 蛋白氨基酸序列分析

应用 DNASTar 软件将本研究中的 17 株分离株、4 株欧亚分支亚系代表毒株、4 株疫苗参考毒株的 HA 基因核苷酸序列翻译成氨基酸序列进行分析,结果表明,17 株 H9N2 亚型 AIV 的 HA 基因均含长度为 1 683 bp 的编码区,编码 560 个氨基酸,其中 1—18 位氨基酸为信号肽,19—338 位氨基酸编码 HA1 片段;339—560 位氨基酸编码 HA2 片段。

2.5 HA 蛋白潜在糖基化位点分析

氨基酸序列分析结果表明,除 CK/AH/

HW008/2015 外,本研究中其他 16 株 H9N2 亚型 AIV 均具有 7~8 个潜在糖基化位点,CK/SD/HZ03/2014、CK/HB/ZS005/2015、CK/AH/HW008/2015、CK/ZJ/TZ081/2015、CK/GD/TS085/2015、CK/CQ/DK099/2015 等 11 个毒株 218—220 位氨基酸由 NRT 突变为 NRI,因而缺失了该处的糖基化位点;CK/AH/HW008/2015、CK/GX/SL001/2015、CK/ZJ/TZ081/2015 和 CK/GD/TS085/2015 4 个毒株 492—494 位氨基酸由 NGT 突变为 NEG,因而缺失了该处的糖基化位点;所有毒株在 313—315 位氨基酸处增加了 1 个糖基化位点(表 2)。

表 2 H9N2 亚型 AIV 的潜在糖基化位点分析

Table 2 Analysis of N-glycosylation site of H9N2 subtype AIV

| 序号 No. | 毒株名称 Strains | 潜在糖基化位点 Potential glycosylation site | | | | | | | |
|-----------|------------------|--------------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | | 29-31 | 141-143 | 218-220 | 298-300 | 305-307 | 313-315 | 492-494 | 551-553 |
| 1 | CK/NH/HY01/2012 | NST | NVS | NRT | NTT | NVS | NCS | NGT | NGS |
| 2 | CK/SD/PL01/2012 | NST | NVS | NRT | NTT | NVS | NCS | NGT | NGS |
| 3 | CK/SD/WF01/2012 | NST | NVS | NRT | NTT | NVS | NCS | NGT | NGS |
| 4 | CK/FJ/SB01/2012 | NST | NVS | NRT | NTT | NVS | NCS | NGT | NGS |
| 5 | CK/YN/XJ04/2014 | NST | NVS | NRT | NTT | NVS | NCS | NGT | NGS |
| 6 | CK/SD/HZ03/2014 | NST | NVS | — | NTT | NVS | NCS | NGT | NGS |
| 7 | CK/HB/ZS005/2015 | NST | NVS | — | NTT | NVS | NCS | NGT | NGS |
| 8 | CK/AH/HW008/2015 | NST | NVS | — | NTT | NVS | NCS | — | NGS |
| 9 | CK/GX/SL001/2015 | NST | NVS | NRT | NTT | NVS | NCS | — | NGS |
| 10 | CK/ZJ/TZ081/2015 | NST | NVS | — | NTT | NVS | NCS | — | NGS |
| 11 | CK/GD/TS085/2015 | NST | NVS | — | NTT | NVS | NCS | — | NGS |
| 12 | CK/CQ/DK099/2015 | NST | NVS | — | NTT | NVS | NCS | NGT | NGS |
| 13 | CK/SD/MH136/2015 | NST | NVS | — | NTT | NVS | NCS | NGT | NGS |
| 14 | CK/SD/023/2015 | NST | NVS | — | NTT | NVS | NCS | NGT | NGS |
| 15 | CK/SD/026/2015 | NST | NVS | — | NTT | NVS | NCS | NGT | NGS |
| 16 | CK/SD/029/2015 | NST | NVS | — | NTT | NVS | NCS | NGT | NGS |
| 17 | CK/GD/ZW01/2015 | NST | NVS | — | NTT | NVS | NCS | NGT | NGS |
| 18 | DK/HK/Y280/97 | NST | NVS | NRT | NTT | NVS | — | NGT | NGS |
| 19 | Qu/HK/G1/97 | NST | NVT | NRT | NST | NIS | — | NGT | NGS |
| 20 | CK/HK/G9/97 | NST | NVS | NRT | NTT | NVS | — | NGT | NGS |
| 21 | DK/HK/Y439/97 | NST | NVT | NRT | NTT | NVS | — | NGT | NGS |
| 22 | CK/GD/SS/94 | NST | NVS | NRT | NTT | NVS | — | NGT | NGS |
| 23 | CK/GD/TS/2004 | NST | NVS | NRT | NTT | NVS | — | NGT | NGS |
| 24 | CK/SH/F/98 | NST | NVS | NRT | NTT | NVS | — | NGT | NGS |
| 25 | CK/SD/6/96 | NST | NVS | — | NTT | NVS | — | NGT | NGS |

序号 1-17 为本研究分离毒株;序号 18-25 为参考毒株;“—”表示无糖基化位点

No. 1 to 17 indicated isolated strains; No. 18-25 indicated reference strains; “—”indicated no potential glycosylation site

2.6 HA 蛋白的裂解位点与受体结合位点分析

对 17 个毒株的裂解位点序列分析发现,所有毒株的裂解位点处的氨基酸残基均为 RSSR↓GLF,都是非连续碱性氨基酸,符合低致病性禽流感病毒的特征。构成受体结合位点的 7 个氨基酸(109aa、161aa、163aa、191aa、198aa、202aa、203aa)中第 198 位氨基酸的变化较大,可存在 V、T、K 3 种情况;受体结合部位右缘(146-150aa)氨基酸序列较保守,其中 CK/AH/HW008/2015 的 149 位氨基酸由 K

突变为 S, CK/GD/TS085/2015、CK/CQ/DK099/2015、CK/SD/MH136/2015、CK/SD/029/2015 和 CK/GD/ZW01/2015 5 株病毒 149 位氨基酸由 K 突变为 T,其余毒株 149 位氨基酸均为 K;受体结合部位左缘(232-237aa)氨基酸序列变化较大,除了 CK/FJ/SB01/2012 外,其他毒株的 234 位氨基酸均由 Q 突变为 L,235 位氨基酸均由 Q 突变为 M。本研究中的 16 个毒株的 HA 蛋白均有人样受体结合位点(Leu²³⁴)特征,具有感染人类的可能性(表 3)。

表3 H9N2 亚型 AIV 的裂解位点与受体结合位点分析

Table 3 Analysis of cleavage site and receptor-binding site of H9N2 subtype AIV

| 序号 No. | 毒株名称 Strains | 裂解位点 Cleavage site | 受体结合部位右缘 | 受体结合位点 | 结合部位左缘 |
|-----------|------------------|-----------------------|----------------|---------------------------|-----------------|
| | | | Right-edge | Receptor-binding site | Left-edge |
| | | | 146-150 | YWTNA(M/T)L Y | 232-237 |
| 1 | CK/NH/HY01/2012 | RSSR ↓ GLF | GTSKA | YWTN <u>T</u> L Y | NG <u>L</u> MGR |
| 2 | CK/SD/PL01/2012 | RSSR ↓ GLF | GTSKA | YWTN <u>T</u> L Y | NG <u>L</u> MGR |
| 3 | CK/SD/WF01/2012 | RSSR ↓ GLF | GTSKA | YWTN <u>T</u> L Y | NG <u>L</u> MGR |
| 4 | CK/FJ/SB01/2012 | RSSR ↓ GLF | GTSKA | YWTN <u>V</u> L Y | NGFQGR |
| 5 | CK/YN/XJ04/2014 | RSSR ↓ GLF | GTSKA | YWTN <u>V</u> L Y | NG <u>L</u> MGR |
| 6 | CK/SD/HZ03/2014 | RSSR ↓ GLF | GTSKA | YWTN <u>V</u> L Y | NG <u>L</u> MGR |
| 7 | CK/HB/ZS005/2015 | RSSR ↓ GLF | GTSKA | YWTN <u>T</u> L Y | NG <u>L</u> MGR |
| 8 | CK/AH/HW008/2015 | RSSR ↓ GLF | GTS <u>S</u> A | YWTN <u>T</u> L Y | NG <u>L</u> MGR |
| 9 | CK/GX/SL001/2015 | RSSR ↓ GLF | GTSKA | YWTN <u>V</u> L Y | NG <u>L</u> MGR |
| 10 | CK/ZJ/TZ081/2015 | RSSR ↓ GLF | GTSKA | YWTN <u>V</u> L Y | NG <u>L</u> MGR |
| 11 | CK/GD/TS085/2015 | RSSR ↓ GLF | GTS <u>T</u> A | YWTN <u>T</u> L Y | NG <u>L</u> MGR |
| 12 | CK/CQ/DK099/2015 | RSSR ↓ GLF | GTS <u>T</u> A | YWTN <u>T</u> L Y | NG <u>L</u> MGR |
| 13 | CK/SD/MH136/2015 | RSSR ↓ GLF | GTS <u>T</u> A | YWTN <u>K</u> L Y | NG <u>L</u> MGR |
| 14 | CK/SD/023/2015 | RSSR ↓ GLF | GTSKA | YWTN <u>V</u> L Y | NG <u>L</u> MGI |
| 15 | CK/SD/026/2015 | RSSR ↓ GLF | GTSKA | YWTN <u>V</u> L Y | NG <u>L</u> MGR |
| 16 | CK/SD/029/2015 | RSSR ↓ GLF | GTS <u>T</u> A | YWTN <u>V</u> L Y | NG <u>L</u> MGR |
| 17 | CK/GD/ZW01/2015 | RSSR ↓ GLF | GTS <u>T</u> A | YWTN <u>T</u> L Y | NG <u>L</u> MGI |
| 18 | DK/HK/Y280/97 | RSSR ↓ GLF | GTSKA | YWTN <u>T</u> L Y | NG <u>L</u> QGR |
| 19 | Qu/HK/G1/97 | RSSR ↓ GLF | GTS <u>R</u> A | YWT <u>H</u> E <u>L</u> Y | N <u>D</u> LQGR |
| 20 | CK/HK/G9/97 | RSSR ↓ GLF | GTSKA | YWTN <u>A</u> L Y | NG <u>L</u> QGR |
| 21 | DK/HK/Y439/97 | ASNR ↓ GLF | GTSRA | YWT <u>H</u> E <u>L</u> Y | NDQQGR |
| 22 | CK/GD/SS/94 | RSSR ↓ GLF | GTSKA | YWTN <u>A</u> L Y | NGQQGR |
| 23 | CK/GD/TS/2004 | RSSR ↓ GLF | GTSKA | YWTN <u>V</u> L Y | NGQQGR |
| 24 | CK/SH/F/98 | RSSR ↓ GLF | GTSKA | YWTN <u>A</u> L Y | NGQQGR |
| 25 | CK/SD/6/96 | RSSR ↓ GLF | GTSKA | YWTN <u>A</u> L Y | NGQQGR |

加下划线的氨基酸为有差异的位点

Amino acids with underline means different sites

3 讨论

根据 HA 基因序列的遗传进化分析结果,目前可将 H9N2 亚型 AIV 分为北美分支和欧亚分支两个大分支,欧亚分支可进一步细分为 Y280-like 亚系、G1-like 亚系及 Y439/Korean-like 亚系。本研究中 17 株 H9N2 亚型 AIV 的遗传进化分析结果表明,17 株病毒均为欧亚分支 Y280-like 亚系的毒株,但与 CK/GD/SS/94、CK/GD/TS/2004、CK/SH/F/98、CK/SD/6/96 等疫苗毒株处于相距较远的一个小分支上,2015 年新分离的毒株与 CK/GD/TS/2004 的核苷酸同源性差异可达 9.3%~16.3%,说明当前分离流行毒株与疫苗毒株存在较大的遗传差异。Shen 等^[6]对 2012~2013 年度华南地区 H9N2

亚型 AIV 的核苷酸同源性分析结果表明,该地区流行毒株与 CK/GD/SS/94、CK/SH/F/98、CK/SD/6/9 等疫苗毒株存在较大遗传差异,同源性差异可达 8%~10.4%。卢受昇等^[7]对 2013~2014 年度广东流行毒株的核苷酸同源性分析也有类似的结果,广东近期流行毒株与 CK/GD/SS/94 疫苗株的同源性差异可达 9.3%~10.9%。

流感病毒的 HA 受体结合位点的结构决定着病毒感染宿主的范围,本研究对 17 株分离株的受体结合位点及其左右侧缘序列进行分析,结果发现,第 198 位氨基酸的变化较大,可存在 V、T、K 3 种情况;受体结合部位右缘(146-150aa)氨基酸序列比较保守,受体结合部位左缘(232-237aa)氨基酸序列变化较大,除了 CK/FJ/SB01/2012 外,其他毒株

的 234 位氨基酸均由 Q 均突变为 L, 235 位氨基酸均由 Q 突变为 M。研究表明, 当流感病毒适应新的宿主时, 受体结合位点的第 234 位氨基酸通常首先发生变化, 若该氨基酸为 L, 则病毒可识别人呼吸道上皮细胞的唾液酸 $\alpha 2, 6$ -半乳糖, 若该氨基酸为 Q, 则易与禽类消化道细胞的唾液酸 $\alpha 2, 3$ -半乳糖结合^[8]。本研究中, 除 CK/FJ/SB01/2012 外, 其他 16 株病毒的 234 位氨基酸均为 L, 表现出人流感病毒受体结合特性, 这对人类公共卫生是一个潜在的威胁。

N 连接的糖基化位点被证实在病毒感染力和宿主细胞免疫反应中发挥重要作用, 尤其是 HA 裂解位点附件的糖基化位点可影响蛋白酶对 HA 的裂解, 进而引起病毒毒力的变化^[9]。有研究结果表明, 以往中国大陆地区大部分 H9N2 亚型 AIV 的 HA 蛋白质上有 7 个潜在的糖基化位点(拥有 N-X-T/S 基序, X 为除 P 以外的氨基酸), 分别位于 HA 上的 29、141、218、298、305、492 和 551 位^[10]。在本研究中, 11 株病毒的 220 位氨基酸发生突变, 因而缺失 1 个糖基化位点; 17 株分离株的 315 位氨基酸均由 P 突变为 S, 出现了 1 个新的糖基化位点; 其中 5 株病毒具有 8 个糖基化位点, 9 株病毒具有 7 个糖基化位点, 3 株病毒具有 6 个糖基化位点。卢受昇等^[7]研究表明, 145—147 位氨基酸处糖基化位点的增加, 能够增强其在鸡体内复制能力; 刘彦云等^[11]研究也表明, 该位点的变化不但能延长感染鸡的排毒周期, 且能加大排毒量。而在本研究中, 17 株病毒均未出现 145—147 位氨基酸糖基化位点的增加, 这些糖基化位点的增加或缺失是否会影响毒株的毒力及感染性, 仍需进一步研究。

4 结 论

本研究中 17 株 H9N2 亚型分离毒株均属于欧亚分支 Y280-like 亚型毒株, 虽然与 CK/GD/TS/2004 等疫苗毒株同属一个遗传进化大分支, 但核苷酸之间存在较大的遗传差异, 同时, 对毒株的氨基酸序列分析结果显示, 毒株的受体结合位点、潜在糖基化位点等均出现不同程度的变化。建议加强全国范围不同地区 H9N2 亚型 AIV 的持续监测, 关注疫苗毒株与流行毒株之间的基因和抗原差异, 制定合理防控措施。

参考文献:

- [1] Zhu Y, Yu W L, McBride R, et al. Hemagglutinin homologue from H17N10 bat influenza virus exhibits divergent receptor-binding and pH-dependent fusion activities [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(4):1458-1463.
- [2] Homme P J, Easterday B C. Characteristics of influenza A-turkey-Wisconsin-1966 virus [J]. *Avian Dis*, 1970, 14:66-74.
- [3] 陈伯伦, 张泽纪, 陈伟斌. 禽流感研究 I: 鸡 A 型禽流感病毒的分离和血清学初步鉴定 [J]. *中国兽医杂志*, 1994, 20(10):3-5.
- [4] 郭元吉, 谢健屏, 王 敏, 等. 从我国人群中再次分离到 H9N2 亚型流感病毒 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2000, 1(3):209-212.
- [5] Lam T T, Wang J, Shen Y, et al. The genesis and source of the H7N9 influenza viruses causing human infections in China [J]. *Nature*, 2013, 502 (7470): 241-244.
- [6] Shen H Q, Yan Z Q, Zeng F G, et al. Isolation and phylogenetic analysis of hemagglutinin gene of H9N2 influenza virus from chickens in South China from 2012 to 2013 [J]. *J Vet Sci*, 2015, 16(3):317-324.
- [7] 卢受昇, 高慧敏, 邓国东, 等. 广东地区近 2 年禽流感 H9 亚型 HA 基因的序列分析 [J]. *广东畜牧兽医科技*, 2014, 39(6):29-32.
- [8] Wan H, Perez D. Amino acid 226 in the hemagglutinin of H9N2 influenza viruses determines cell tropism and replication in human airway epithelial cells [J]. *J Virol*, 2007, 81(10):5181-5191.
- [9] Owen R E, Yamada E, Thompson C I, et al. Alterations in receptor binding properties of recent human influenza H3N2 viruses are associated with reduced natural killer cell lyses of infected cells [J]. *J Virol*, 2007, 81(20):11170-11178.
- [10] Xu K M, Smith G J D, Bahl J, et al. The genesis and evolution of H9N2 influenza viruses in poultry from southern China, 2000 to 2005 [J]. *J Virol*, 2007, 81 (8):10389-10401.
- [11] 刘彦云, 刘春国, 王寿山, 等. 10 株 H9N2 亚型禽流感病毒血凝素基因的序列分析 [J]. *中国畜牧兽医*, 2013, 40(8):13-19.

(责任编辑 秦 彤)