

黄欣梅, 李 银, 刘宇卓, 等. 华东地区 H9N2 亚型禽流感病毒 HA 基因的遗传演化分析[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(2): 382-388.  
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.02.025

## 华东地区 H9N2 亚型禽流感病毒 HA 基因的遗传演化分析

黄欣梅, 李 银, 刘宇卓, 赵冬敏, 杨 婧, 韩凯凯

(江苏省农业科学院兽医研究所, 农业部兽用生物制品工程技术重点实验室, 国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏 南京 210014)

**摘要:** 为了解华东地区 H9N2 亚型禽流感病毒(AIV)的遗传特点和流行规律, 利用 RT-PCR 方法扩增华东地区 2008 ~ 2013 年分离的 17 株 H9N2 亚型 AIV 血凝素(HA)基因片段, 进行序列测定和遗传进化分析, 并对 HA 蛋白质的裂解位点、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 AIV HA 基因核苷酸和推导的氨基酸同源性分别为 84.6% ~ 99.3% 和 86.0% ~ 99.5%, 均属于欧亚分支。其中 15 株鸡源病毒属于 Y280-like 亚系, 2 株鸭源病毒属于 G1-like 亚系。HA 裂解位点都是非连续碱性氨基酸, 属于低致病力毒株。HA 受体结合位点 149、150、191、198 和 234 位氨基酸存在变异, 尤其是 234 位氨基酸有 14 株毒株变为 L, 表现出人流感病毒受体结合特性。有 2 株毒株在 145 位氨基酸出现新的糖基化位点, 5 个毒株在 218 位氨基酸缺失 1 个糖基化位点, 13 个毒株在 313 位氨基酸增加了一个新的糖基化位点。研究结果表明华东地区近年来 H9N2 亚型 AIV 存在一定的变异, 应加强对该类病毒的分子流行病学监测。

**关键词:** H9N2 亚型禽流感病毒; HA 基因; 进化分析

**中图分类号:** S852.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)02-0382-07

## Phylogenetic analysis of hemagglutinin genes of H9N2 subtype avian influenza virus in Eastern China

HUANG Xin-mei, LI Yin, LIU Yu-zhuo, ZHAO Dong-min, YANG Jing, HAN Kai-kai

(Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Veterinary Biological Engineering and Technology, Ministry of Agriculture/National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** To study the genetic characteristics and epidemiology of H9N2 subtype avian influenza virus (AIV) isolated from avian in Eastern China, the hemagglutinin (HA) gene of 17 H9N2 AIVs isolated from 2008 to 2013 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 the potential glycosylation sites were analyzed. The HA genes of these

strains shared nucleotide and deduced amino acid homologies ranging from 84.6% to 99.3% and 86.0% to 99.5%, respectively. All the 17 strains belonged to Eurasian lineage, among which, 15 chicken-derived isolates belonged to Y280-like sublineage, and 2 duck-derived isolates belonged to G1-like sublineage. The cleavage site

收稿日期: 2014-08-03

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目[ CX(14)2091 ]

作者简介: 黄欣梅(1981-), 女, 福建南安人, 硕士, 助理研究员, 主要从事家禽疫病流行病学和致病分子机制研究。(E-mail)

hxmrene@126.com

通讯作者: 李 银, (E-mail) muziyin08@163.com

motif of all isolates lacked multiple basic amino acids, which made them low pathogenic strains. The amino acids variants resided at the sites 149, 150, 191, 198 and 234 of the receptor binding sites. 14 out of the 17 isolates had a leucine residue at site 234, indicative of the characteristic of human influenza virus-like receptor. Due to gene mutation, an additional potential glycosylation site were found at amino acid site 145 of 2 isolates and site 313 of 13 isolates, and a glycosylation site deletion took place at amino acid site 218 of 5 isolates. The continuing evolution of H9N2 subtype AIVs in Eastern China emphasizes the importance of H9N2 influenza virus surveillance throughout this region.

**Key words:** H9N2 subtype avian influenza virus; HA gene; phylogenetic analysis

禽流感(Avian influenza, AI)是由正黏病毒科流感病毒属的A型流感病毒引起的以禽类呼吸系统和全身败血为特征的禽类传染病<sup>[1-4]</sup>。禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV)遗传变异极为频繁,血清亚型众多。目前,根据表面糖蛋白血凝素(HA)基因和神经氨酸酶(NA)基因的差异,AIV可以分为17种HA亚型和10种NA亚型<sup>[5]</sup>。根据AIV对易感鸡致病性的差异,可将AI分为高致病性AI(HPAI)和低致病性AI(LPAI)。H9N2亚型AIV最早于1966年从火鸡体内分离到<sup>[6]</sup>,虽然属于低致病性禽流感病毒,但是因为分布广泛,能造成宿主的免疫抑制,并能引起人类感染,其危害性不容忽视。中国自1994年首次在鸡体内分离到H9N2亚型AIV以来<sup>[7]</sup>,该病毒迅速传播至全国,目前H9N2亚型AIV已是中国主要的禽流感流行毒株<sup>[8]</sup>,给家禽养殖业带来巨大的经济损失。1999年以来,国内外报道多起人感染H9N2亚型AIV病例<sup>[9]</sup>,2013年爆发的人感染H7N9亚型AIV,其内部基因已证实是来自于H9N2亚型AIV<sup>[10]</sup>。因此,加强对H9N2亚型AIV的监测还具有重要的公共卫生意义。

血凝素(Hemagglutinin, HA)是A型流感病毒表面主要的囊膜糖蛋白,它参与病毒与唾液酸细胞表面受体结合以及病毒入侵宿主细胞时的细胞膜融合,在病毒吸附和穿膜过程中起关键作用<sup>[11]</sup>;HA是AIV诱导宿主产生保护性免疫的主要抗原,可以诱导产生特异性中和抗体,而且还能刺激机体产生细胞毒性T淋巴细胞反应<sup>[12]</sup>。HA基因变异频率很高,抗原位点或潜在糖基化位点氨基酸发生突变即可影响到病毒抗原性和致病性,受体结合区域氨基酸的变异能够导致病毒受体结合性的改变,进而影响病毒感染的宿主范围。早期的研究以HA基因和NP基因的系统进化分析为基础,将H9N2亚型AIV划分为2个独立的分支,包

括北美型和欧亚型。欧亚型可进一步分为3个主要的亚类分支:以A/duck/Hong Kong/Y280/97为代表的Y280-like亚系;以A/quail/HongKong/G1/97为代表的G1-like亚系;以及以A/duck/HongKong/Y439/97为代表的Y439-like亚系。中国大陆地区的H9N2亚型AIV主要存在于Y280亚系和G1亚系<sup>[13]</sup>。

本研究对华东地区2008~2013年分离的17株H9N2亚型AIV的HA基因进行测序,从分子生物学角度了解各毒株间的差异和变异规律,进而了解本地区H9N2亚型AIV的分布及演化规律,为H9N2亚型禽流感的防控提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 病毒 H9N2亚型AIV毒株 A/Chicken/Anhui/FT/2008(简称CK/AH/FT/08)、A/Chicken/Anhui/MG08/2008(简称CK/AH/MG08/08)、A/Chicken/Anhui/HF1004/2010(简称CK/AH/HF1004/10)、A/Chicken/Jiangsu/JT1005/2010(简称CK/JS/JT1005/10)、A/Chicken/Anhui/HF1012/2010(简称CK/AH/HF1012/10)、A/Chicken/Zhejiang/JX1012/2010(简称CK/ZJ/JX1012/10)、A/Chicken/Jiangsu/WJ1012/2010(简称CK/JS/WJ1012/10)、A/Chicken/Anhui/HF1503/2011(简称CK/AH/HF1503/11)、A/Chicken/Jiangsu/JT2201/2011(简称CK/JS/JT2201/11)、A/Chicken/Zhejiang/JX1506/2011(简称CK/ZJ/JX1506/11)、A/Chicken/Jiangsu/XZ0407/2012(简称CK/JS/XZ0407/12)、A/Chicken/Jiangsu/SZ0207/2013(简称CK/JS/SZ0207/13)、A/Duck/Jiangsu/KS0802/2013(简称DK/JS/KS0802/13)、A/Chicken/Zhejiang/JX1605/2013(简称CK/ZJ/JX1605/13)、A/Chicken/Zhejiang/JX1603/2013(简称CK/ZJ/JX1603/13)、A/Duck/Jiangsu/WX5001/

2013 (简称 DK/JS/WX5001/13)、A/Chicken/Jiangsu/WX0201/2013 (简称 CK/JS/WX0201/13) 由农业部兽用生物制品工程技术重点实验室从江苏、安徽、浙江等省的发病家禽中分离,经鉴定为 H9N2 亚型。将病毒接种 10 日龄 SPF 鸡胚,72 h 后收集尿囊液,测定血凝效价后置于  $-70^{\circ}\text{C}$  保存备用。

1.1.2 主要试剂 AMV 反转录酶、RNase Inhibitor、*Ex Taq* 酶、pMD18-T 载体克隆试剂盒、限制性内切酶等购自大连宝生物有限公司;体液病毒 DNA/RNA 抽提试剂盒、胶回收试剂盒、小量提取质粒试剂盒等购自 Axygen 公司。

## 1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 根据 GenBank 已发表的 H9N2 亚型 AIV HA 基因序列,设计 1 对引物用以扩增 HA 基因全长序列:上游引物为 5'-AGCAAAAG-CAGGGGAATTTTCAC-3';下游引物为 5'-AG-TAGAAACAAGGGTGTTC-3'。预期扩增片段长度为 1.7 kb。引物由南京金斯瑞公司合成。

1.2.2 HA 基因的 RT-PCR 扩增与测定 按照体液病毒 DNA/RNA 抽提试剂盒说明书,从含病毒尿囊液中提取病毒基因组 RNA,按 AMV 反转录酶说明书进行反转录。以合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 反应条件为:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,52  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 3 min,30 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。反应结束后,取 PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶中进行电泳,按胶回收试剂盒说明书纯化目的基因。将回收的 PCR 产物与 pMD18-T 克隆载体连接,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细菌。经酶切鉴定后,挑选阳性克隆质粒送南京金斯瑞公司进行基因序列测定。

1.2.3 HA 基因的序列分析 用 Lasergene 7.1 DNASTar 软件对获得的 HA 基因核苷酸和推导的氨基酸序列进行同源性比对,并对 HA 裂解位点、受体结合位点以及潜在的糖基化位点进行分析。用 MEGA5.05 软件中的 Clustal W 软件进行序列比对,用 Neighbor-joining 方法对本研究获得的 HA 基因序列与 GenBank 已发表的 H9N2 亚型禽流感经典毒株和疫苗毒株进行遗传进化关系分析,自举检验 (Bootstrap test) 参数设置为重复 1 000 次,绘制遗传进化树<sup>[14]</sup>。参考毒株见表 1,其中 CK/GD/SS/94、CK/SH/F/98、DK/NJ/01/99 和 CK/SD/6/96 为疫苗毒株。

表 1 H9N2 亚型 AIV 参考毒株

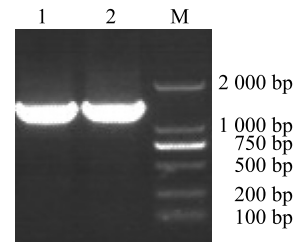
Table 1 H9N2 subtype AIV strains

参考毒株	缩写	GenBank 登录号
A/chicken/Guangdong/SS/1994	CK/GD/SS/94	AF384557
A/chicken/Shandong/L/2010	CK/SD/L/10	JN683645
A/chicken/Shanghai/F/1998	CK/SH/F/98	AY743216
A/duck/Nanjing/01/1999	DK/NJ/01/99	DQ681221
A/chicken/Shandong/6/1996	CK/SD/6/96	AF508570
A/chicken/Guangdong/LG1/2013	CK/GD/LG1/13	KC951122
A/chicken/Henan/HF/2012	CK/HN/HF/12	KC879298
A/chicken/Zhejiang/FSQ/2011	CK/ZJ/FSQ/11	JF715029
A/chicken/Wenzhou/622/2013	CK/WZ/622/13	KF259183
A/chicken/Rizhao/811/2013	CK/RZ/811/13	KF259172
A/chicken/Korea/ms96/1996	CK/KR/ms96/96	AF203008
A/chicken/Beijing/1/1994	CK/BJ/1/94	AF156380
A/chicken/Hong Kong/G9/1997	CK/HK/G9/97	AF156373
A/duck/Hong Kong/Y280/1997	DK/HK/Y280/97	AF156376
A/quail/Shantou/21605/2005	QU/ST/21605/05	EF154979
A/chicken/Hong Kong/33982/2009	CK/HK/33982/09	CY055140
A/quail/Hong Kong/G1/1997	QU/HK/G1/97	AF156378
A/duck/Hong Kong/Y439/1997	DK/HK/Y439/97	AF156377
A/quail/Arkansas/29209-1/1993	QU/AK/29209-1/93	AF156388
A/turkey/Wisconsin/1/1966	TU/WS/1/66	CY130054

## 2 结果

### 2.1 HA 基因的 RT-PCR 扩增

以提取的 17 株 H9N2 亚型 AIV 的 RNA 为模板,通过 RT-PCR 方法分别扩增出各自的 HA 基因片段,其大小约为 1.7 kb,与预期相符(图 1)。



1、2:HA 基因 RT-PCR 产物;M:DL2000 相对分子质量标准。

图 1 HA 基因 RT-PCR 扩增产物

Fig. 1 Amplification of HA gene by RT-PCR

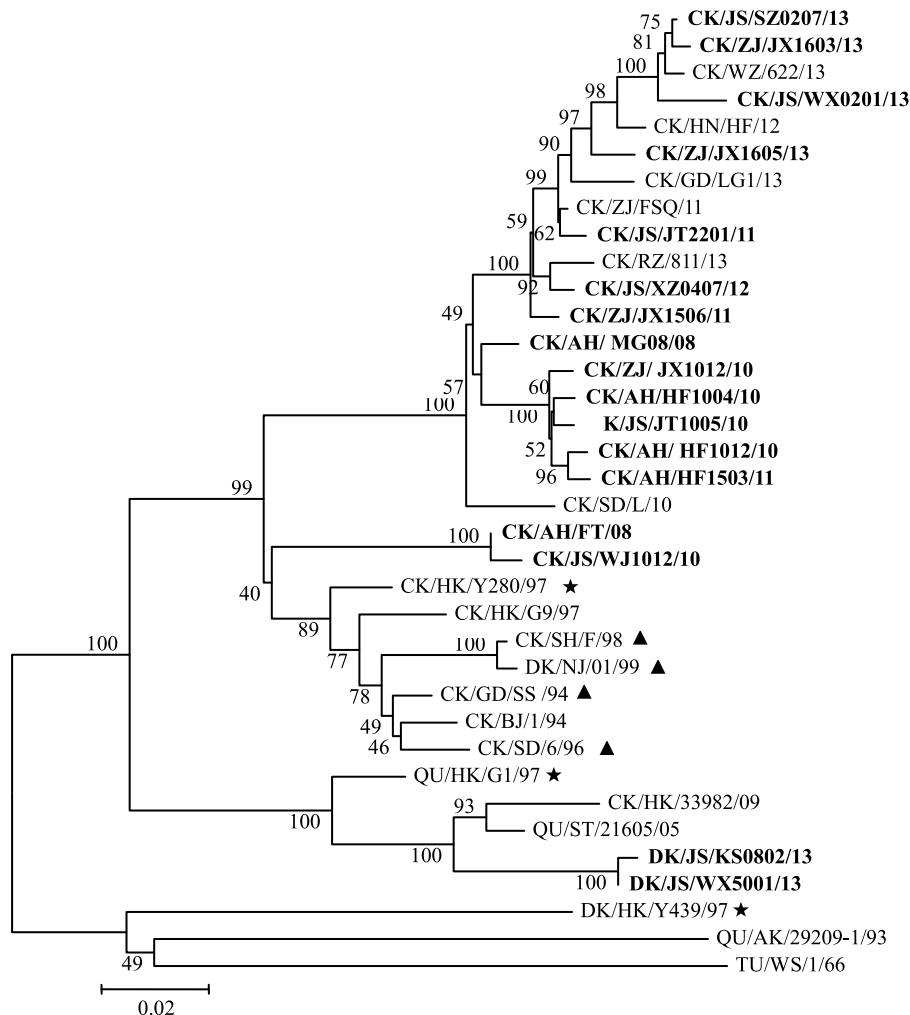
## 2.2 HA 基因的同源性分析

测序结果表明,17 株 H9N2 亚型 AIV 的 HA 基因序列均长 1 742 bp, 含有一个 1 683 个核苷酸的开放阅读框(ORF), 编码 560 个氨基酸, 均没有核苷酸的插入和缺失。通过 DNASTar 软件比对分析发现, 本试验分离的 17 株毒株 HA 基因核苷酸序列同源性为 84.6% ~ 99.3%, 推导的氨基酸同源性为 86.0% ~ 99.5%。其中 2 株鸭源的毒株 DK/JS/KS0802/13 和 DK/JS/WX5001/13 与 H9N2 亚型 AIV 欧亚分支 G1-like 亚系的代表株 QU/HK/G1/97 的同源性较高, 核苷酸序列同源为 93.0% ~ 93.2%, 氨基酸同源性为 93.6% ~ 94.4%。其余 15 株病毒分离宿主均为鸡, 与 Y280-like 亚系的代表株 DK/

HK/Y280/97 核苷酸序列同源性为 90.6% ~ 94.3%, 氨基酸同源性为 91.4% ~ 96.9%。

## 2.3 HA 基因系统进化分析

应用 MEGA5.05 软件将 17 株分离毒株的 HA 基因核苷酸序列与国内外部分参考毒株和各分支代表毒株进行比较并绘制系统进化树(图 2)。17 株分离毒株均属于欧亚分支, 其中 2 株鸭源病毒 DK/JS/KS0802/13 和 DK/JS/WX5001/13 位于以 QU/HK/G1/97 为代表株的 G1-like 亚系内。其余 15 株鸡源病毒属于以 DK/HK/Y280/97 为代表株的 Y280-like 亚系。其中 2 株鸡源病毒 CK/AH/FT/08 和 CK/JS/WJ1012/10 与疫苗株位于同一进化分支内, 与其他 13 株鸡源病毒亲缘关系较远, 属于不同的进化分支。



各参考毒株见表 1。本研究分离的 17 株毒株用黑体标记, 疫苗株用 ▲ 标记, 欧亚分支内各亚系的代表毒株用 ★ 标记。

图 2 H9N2 亚型 AIV HA 基因系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of H9N2 subtype AIV based on the HA gene



## 2.4 HA 蛋白质氨基酸序列分析

应用 Lasergene 7.1 DNASTar 软件将本研究获得的 17 株病毒与欧亚分支中 3 个亚系代表株的 HA 基因核苷酸序列翻译成氨基酸序列,并对 HA 裂解位点、受体结合位点以及潜在的糖基化位点进行分析(表 2)。17 株 H9N2 亚型 AIV 的 HA 基因均编码 560 个氨基酸,其中前 18 个氨基酸为信号肽,19~337 位氨基酸为 HA1 片段,339~560 位氨基酸为 HA2 片段。分离株中 CK/ZJ/JX1012/10 的 HA 裂解位点处氨基酸残基为 RSSR↓GLF,代表株 QU/HK/G1/97 为 ASNR↓GLF,其余均为 RSSR↓GLF,都是非连续碱性氨基酸,符合低致病性 AIV 的特征。

HA 受体结合位点的氨基酸改变会导致病毒与细胞受体结合特性的改变。HA 蛋白质中构成受体结合位点的氨基酸(109 aa,161 aa,163 aa,191 aa,198 aa,202 aa,203 aa)中第 198 位氨基酸变化比较大,存在 V、A、T、E 4 种情况。2 株鸭源毒株 DK/JS/KS0802/13 和 DK/JS/WX5001/13 与代表株 QU/HK/G1/97 和 DK/HK/Y439/97 在 191 位氨基酸为 H,其他毒株均为 N。受体结合部的右侧缘(146~150 aa)氨基酸序列较为保守,只有 2 株鸭源病毒的 149 位和 150 位氨基酸发生变化。受体结合部的左侧缘

(232~237 aa)氨基酸序列变化比较大,尤其是第 234 位氨基酸(对应 H3 AIV 中的 226 位),除 CK/JS/WJ1012/10、DK/JS/KS0802/13、K/JS/WX5001/13 和 DK/HK/Y439/97 在 234 位为 Q 外,其余病毒均为 L。一般认为,第 234 位氨基酸由 Q 变为 L 增加了病毒感染哺乳动物的可能性<sup>[15]</sup>。

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 位、141 位、218 位、298 位、305 位、492 位和 551 位<sup>[16]</sup>。对本研究获得的 17 株病毒 HA 蛋白质的糖基化位点进行分析,发现 CK/JS/WX0201/13 和 CK/ZJ/JX1603/13 的 145 位氨基酸突变为 N,出现新的糖基化位点;CK/JS/JT2201/11、CK/JS/SZ0207/13、CK/JS/WX0201/13、CK/ZJ/JX1605/13 和 CK/ZJ/JX1603/13 在 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;除了 CK/AH/FT/08、CK/JS/WJ1012/10、2 株鸭源病毒(DK/JS/KS0802/13 和 DK/JS/WX5001/13)以及 3 个分支代表株以外,其余分离毒株在 315 位氨基酸均由 P 突变为 S,出现了一个新的糖基化位点。

表 2 H9N2 亚型 AIV 裂解位点、受体结合位点和糖基化位点的比较

Table 2 Cleavage site, receptor-binding site and glycosylation site of H9N2 subtype AIV isolates

毒株	裂解位点	受体结合位点	受体结合部的 右侧缘	受体结合部的 左侧缘	潜在的 N-糖基化位点位置
					(29,141,145,218,298, 305,313,492,551)
CK/AH/FT/08	RSSR↓GLF	YWTNVLY	GTSKA	NGLQGR	NST NVS - NRT NTT NVS-NGT NGS
CK/AH/ MG08/08	RSSR↓GLF	YWTNVLY	GTSKA	NGLQGR	NST NVS - NRT NTT NIS NCS NGT NGS
CK/JS/WJ1012/10	RSSR↓GLF	YWTNVLY	GTSKA	NGQQGR	NST NVS - NRT NTT NVS - NGT NGS
CK/JS/JT1005/10	RSSR↓GLF	YWTNVLY	GTSKA	NGLQGR	NST NVT - NRT NTT NVS NCS NGT NGS
CK/AH/HF1004/10	RSSR↓GLF	YWTNVLY	GTSKA	NGLQGR	NST NVT - NRT NTT NVS NCS NGT NGS
CK/AH/HF1012/10	RSSR↓GLF	YWTNLY	GTSKA	NGLQGR	NST NVT - NRT NTT NVS NCS NGT NGS
CK/ZJ/JX1012/10	RSSR↓GLF	YWTNVLY	GTSKA	NGLQGR	NST NVT - NRT NTT NVS NCS NGT NGS
CK/AH/HF1503/11	RSSR↓GLF	YWTNVLY	GTSKA	NGLQGR	NST NVT - NRT NTT NVS NCS NGT NGS
CK/ZJ/JX1506/11	RSSR↓GLF	YWTNLY	GTSKA	NGLMGR	NST NVS - NRT NTT NVS NCS NGT NGS
CK/JS/JT2201/11	RSSR↓GLF	YWTNVLY	GTSKA	NGLMGR	NST NVS - - NTT NVS NCS NGT NGS
CK/JS/XZ0407/12	RSSR↓GLF	YWTNLY	GTSKA	NGLMGR	NST NVS - NRT NTT NVS NCS NGT NGS
CK/JS/SZ0207/13	RSSR↓GLF	YWTNTLY	GTSKA	NGLMGR	NST NVS - - NTT NVS NCS NGT NGS
CK/JS/WX0201/13	RSSR↓GLF	YWTNTLY	GTSKA	NGLMGR	NST NVS NGT - NTT NVS NCS NGT NGS
CK/ZJ/ JX1605/13	RSSR↓GLF	YWTNVLY	GTSKA	NGLMGR	NST NVS - - NTT NVS NCS NGT NGS
CK/ZJ/JX1603/13	RSSR↓GLF	YWTNTLY	GTSKA	NGLMGR	NST NVS NGT - NTT NVS NCS NGT NGS
DK/JS/WX5001/13	RSSR↓GLF	YWTNLY	GTSRS	NGQQGR	NST NVS - NRT NST NIS - NGT NGS
DK/JS/KS0802/13	RSSR↓GLF	YWTNLY	GTSMS	NGQQGR	NST NVS - NRT NST NIS - NGT NGS
DK/HK/Y280/97	RSSR↓GLF	YWTNTLY	GTSKA	NGLQGR	NST NVS - NRT NTT NVS - NGT NGS
QU/HK/G1/97	RSSR↓GLF	YWTNELY	GISRA	NDLQGR	NST NVT - NRT NST NIS - NGT NGS
DK/HK/Y439/97	ASNR↓GLF	YWTNELY	GTSRA	NDQQGR	NST NVT - NRT NTT NVS - NGT NGS

“-”表示无糖基化位点。

### 3 讨论

H9N2 亚型禽流感广泛分布在世界上许多国家,中国大陆自 1994 年首次报道以来,迅速传播至全国大部分地区,成为中国流行的主要禽流感,给家禽养殖业造成巨大的经济损失。尤其自 1999 年以来,发生多起人感染 H9N2 亚型 AIV 事件,以及 2013 年爆发的人感染 H7N9 亚型 AIV 与 H9N2 亚型 AIV 关系密切,H9N2 亚型 AIV 愈来愈引起人们的关注。流感病毒的 HA 蛋白质是病毒表面重要的糖蛋白。HA 基因发生的突变常会引起病毒抗原性变异。HA 蛋白质上的裂解位点、受体结合位点以及糖基化位点发生变化可能会影响病毒毒力、致病性、吸附能力和感染宿主范围<sup>[11]</sup>。因此,对于 H9N2 亚型禽流感病毒 HA 基因的分子流行病学监测具有重要意义。

H9N2 亚型 AIV 分为北美和欧亚 2 大分支,欧亚分支进一步分为 Y280-like 亚系、G1-like 亚系以及 Y439-like 亚系 3 个亚分支。本研究中的 17 株病毒均属于欧亚分支,其中 15 株鸡源病毒属于 Y280-like 亚系,这与 Chen 等报道的情况一致<sup>[17]</sup>。15 株鸡源病毒可进一步分为 2 个小分支,2 株分离时间较早的毒株 CK/AH/FT/08 和 CK/JS/WJ1012/10 与疫苗株位于同一进化分支内。而其他 13 株鸡源病毒与疫苗株之间存在一定的遗传距离,分属于不同的进化分支,说明近年来华东地区鸡群中 H9N2 亚型 AIV 正在不断变异演化,疫苗候选毒株也应与现阶段的流行毒株相匹配。值得注意的是,2 株鸭源病毒与 QU/HK/G1/97 亲缘关系较近,属于 G1-like 亚系。QU/HK/G1/97 毒株的内部基因与分离自人的 A/Hong Kong/156/1997 (H5N1) 毒株高度同源,G1-like 亚系的毒株被认为可能对哺乳动物具有潜在致病性。G1-like 亚系主要来自鹌鹑,此次从鸭体内分离到该亚系毒株,说明 G1-like 亚系毒株已在水禽中流行,很有可能会传入鸡群中,鉴于该亚系病毒的公共卫生意义,应加强对该类病毒的监测。

高致病性禽流感病毒的 HA 裂解位点处一般有多个连续的碱性氨基酸(K 或 R)存在,可以被多种蛋白酶识别裂解,而低致病力流感毒株的 HA 裂解位点处只有单个的碱性氨基酸,只能被呼吸道和消化道少数细胞中的蛋白酶所裂解。本研究毒株中有 1 株的 HA 裂解位点处氨基酸残基为 RSNR↓GLF,

其余均为 RSSR↓GLF,均为非连续碱性氨基酸,为低致病力毒株。

流感病毒 HA 受体结合位点的结构决定病毒感染宿主范围。本研究对 17 株病毒的受体结合位点及其左右侧缘序列进行分析,结果发现在 198 位氨基酸存在较大差异,为 V、A 或 T。在 191 位氨基酸,只有 2 株鸭源病毒为 H,其余鸡源病毒均为 N。受体结合部的右侧缘序列较为保守,鸡源病毒均为 GTSKA 序列,而 2 株鸭源病毒存在差异,分别为 GTSRS 和 GTSMS 序列。这些均说明鸭源和鸡源的 H9N2 亚型 AIV 存在较大的遗传差异。当流感病毒适应新的宿主时,第 234 位氨基酸(H3 亚型 AIV 中的 226 位)受体结合位点通常首先发生变化,若该处氨基酸为 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,若该处为 Q,则易与禽类消化道细胞的唾液酸  $\alpha 2,3$ -半乳糖结合<sup>[15]</sup>。本研究中,除 CK/JS/WJ1012/10 和 2 株鸭源病毒在 234 位为 Q 外,其余 14 株病毒均为 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 裂解位点附近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<sup>[18]</sup>。在本研究中,有 2 株病毒在 145 位氨基酸发生突变,因而出现新的糖基化位点;有 5 株病毒由于 220 位氨基酸发生突变,缺失了该处的糖基化位点;有 13 株病毒 315 位氨基酸由 P 突变为 S,因而增加了一个新的糖基化位点。有 7 株病毒有 7 个糖基化位点,10 株病毒有 8 个糖基化位点。这些糖基化位点的缺失及增加是否会影响病毒的抗原性以及感染性,还需要进一步的研究证实。

本研究对华东地区 2008~2013 年分离的 17 株 H9N2 亚型禽流感毒株的 HA 基因进行了序列分析,证实 H9N2 亚型 AIV 在本地区家禽中持续流行感染,鸭源病毒与鸡源病毒存在较大差异。由于采用灭活疫苗对 H9N2 亚型禽流感进行防控,在长期的免疫选择压力下,病毒更易发生基因突变和重组,遗传演化愈加复杂。本研究结果表明本地区鸡群中的 H9N2 亚型禽流感毒株随着时间推移,其遗传关系与疫苗株愈来愈远,在今后的防控工作中应考虑现行流行毒株与疫苗株之间的基因差异。加强对本地区 H9N2 亚型 AIV 的持续监测,对掌握该类病毒的

变异情况,制定防控措施和筛选疫苗毒株具有重要意义。

#### 参考文献:

- [1] KARNIC B W. 禽病学[M]. 10 版. 高福, 苏敬良, 译. 北京: 中国农业出版社, 1999: 742-758.
- [2] 唐应华, 陆吉虎, 吴培培, 等. 免疫增强剂提高禽流感疫苗效力的研究[J]. 江苏农业学报, 2014, 30(2): 344-348.
- [3] 申慧芳, 申惠敏, 贾秀珍, 等. H5N1 高致病性禽流感病毒 HA 基因在昆虫细胞中的表达及免疫原性[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(7): 24-27.
- [4] 谭丹, 黄建龙, 王昌建, 等. 2 株 H9N2 亚型禽流感病毒的致病性[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(5): 187-188.
- [5] ZHU X 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.
- [6] HOMME P J, EASTERDAY B C. Characteristics of influenza A-turkey-Wisconsin-1966 virus[J]. Avian Dis, 1970, 14: 66-74.
- [7] 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.
- [8] 刘洪雨, 刘玉芬, 于尔松. 禽流感病毒的研究进展[J]. 畜牧兽医科技信息, 2005(1): 4.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] ROGERS G N, PAULSON J C, DANIELS R S, et al. Single amino acid substitutions in influenza hemagglutinin change receptor binding specificity[J]. Nature, 1983, 304(5921): 76-78.
- [12] PING Y, ANJU B. Hemagglutinin specificity and neuraminidase coding the rapacity of neuraminidase deficient influenza viruses[J]. Virology, 2003, 229: 155-165.
- [13] GUO Y, KRAUSS S, SENNE D A, et al. Characterization of the pathogenicity of members of the newly established H9N2 influenza virus lineages in Asia[J]. Virology, 2000, 267(2): 279-288.
- [14] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Mol Biol Evol, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] CHEN F, YAN Z Q, LIU Y J, et al. Phylogenetic analysis of hemagglutinin genes of 40 H9N2 subtype avian influenza viruses isolated from poultry in China from 2010 to 2011[J]. Virus Genes, 2012, 45: 69-75.
- [18] 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.

(责任编辑: 张震林)