

我国部分鸡源 H9N2 亚型流感病毒 NS1 基因序列分析

刘金华 史为民 吴清民 郭玉璞

(中国农业大学动物医学院 北京 100094)

摘要 对 1996 年至 2001 年间自我国部分养鸡场发病鸡或死亡鸡分离鉴定的 8 株 H9N2 亚型禽流感病毒的非结构蛋白基因(NS1)进行了扩增和序列测定,并分析和比较了其核苷酸和氨基酸的同源性。结果表明,NS1 基因核苷酸和氨基酸同源性分别为 96.5%~99.5% 和 94.5~98.6%,说明 NS1 基因在遗传进化上高度保守,稳定遗传。与中国香港、韩国、巴基斯坦及人源 H9N2 分离株相比较,发现中国大陆的鸡源 H9N2 分离株的 NS1 基因在其羧基端缺少 13 个氨基酸。系统进化树分析表明,该 8 株病毒的 NS1 基因属于相同的进化分支,而且中国的早年分离株 A/chicken/Beijing/1/94 位于该进化分支的根部,暗示这些分离株的 NS1 基因是由 A/chicken/Beijing/1/94 演化而来,尚未发现 NS1 基因属于 A/quail/Hong Kong/G1/97-like 分支的分离株。同时,系统进化树也说明了我国的 H9N2 分离株与韩国、巴基斯坦等地的 H9N2 分离株隶属于不同的进化分支,H9N2 亚型禽流感的发生和流行与地域有一定的相关性。

关键词 禽流感病毒 H9N2 非结构蛋白基因 序列分析

中图分类号 S852.65 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2003)05-0547-07

流感病毒的基因组为单股负链 RNA,含有大小不同的 8 个独立的 RNA 片段,其第 8 片段为非结构蛋白基因,编码非结构蛋白(Nonstructural protein)NS1 和 NS2。流感病毒的非结构蛋白基因与该病毒的其他基因组不同,它分为 A 和 B 两个等位基因群^[1],A 群包含禽源流感病毒和哺乳动物流感病毒,而 B 群流感病毒只包含禽源流感病毒;A 群和 B 群核苷酸碱基的同源性约为 72.3%左右^[2]。在选择压力的作用下,人源 H3N2 亚型流感病毒的进化与分离年代呈现明显的相关关系^[3];在我国的香港地区,H9N2 亚型禽流感病毒的 NS1 基因在遗传进化上也存在两个相对独立分支的亚群^[4]。我国大陆自 1992 年以来,H9N2 亚型禽流感时有流行和散发,业已对我国的养禽业造成了严重损失^[5]。国内学者对鸡源 H9N2 病毒的研究大多数局限于血凝素基因和免疫方面^[6-8],而对其非结构蛋白基因研究甚少,所以,在我国大陆流行的 H9N2 病毒的 NS1 基因属于何种基因群?同源性如何?进化如何?有何特点?与国外 H9N2 病毒非结构蛋白基因的关系如何等等尚不清楚。因此,本研究基于该背景对分离自 1996~2001 年间的 8 株鸡源 H9N2 流感病毒的非结构蛋白基因进行了序列测定与分析。

1 材料和方法

1.1 病毒

自 1996~2001 年间从不同省区临床发病鸡分离的 H9N2 病毒 8 株,由本实验室分离

鉴定和保存。其名称及简称如下: A/chicken/Hebei/1/96(Ck/HB/1/96), A/chicken/Guangdong/97(Ck/GD/97), A/chicken/Hebei/2/98(Ck/HB/2/98), A/chicken/Shandong/98(Ck/SD/98), A/chicken/Henan/98(Ck/HN/98), A/chicken/Beijing/3/99(Ck/BJ/3/99), A/chicken/Beijing/1/00(Ck/BJ/1/00), A/chicken/Hebei/1/01(Ck/HB/1/01)。

1.2 试剂和仪器

RNA 提取 TRIzol 试剂和逆转录各种试剂为 Gibco/BRL 公司产品; *Taq* DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司; PCR 产物纯化试剂盒为 QIAGEN 公司产品; 测序试剂盒 dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Kit 为 Biosystems 公司产品; PCR 扩增仪为美国 Perkin Elmer 公司产品; ABI Model 377 DNA 测序仪为美国 Biosystems 公司产品。

1.3 引物

依据 GenBank 发表的 H9N2 亚型病毒的 NS 基因序列用软件 Oligo4.0 设计 PCR 引物, 并由日本 SIGMA GENOSYS 公司合成。引物序列如下: 上游引物 NSF: 5'-GCAAAAAG-CAGGGTGACAAAAAC-3'; 下游引物 NSR: 5'-GAAACAAGGGTGTTTTATC-3', 分别位于 -25 ~ -4 (起始密码子 ATG 的 A 为 +1) 和 840 ~ 860 位置。预期扩增片段为 886bp, 扩增片段含完整的 NS1 基因和部分 NS2 片段。

1.4 病毒 RNA 的提取

取 250 μ L 尿囊液加 750 μ L TRIzol 试剂, 混匀后按说明书要求提取病毒 RNA。

1.5 逆转录 PCR

取以上制备的 RNA 5 μ L, 加 Uni 12 引物 (5'-AGCAAAGCAGG-3') (20pmol/ μ L) 1 μ L, 混合均匀, 于 70 $^{\circ}$ C 水浴中 5min, 然后迅速置冰中, 之后加以下成份: 5 \times 逆转录 buffer 4 μ L, DTT (0.1mol/L) 2 μ L, RNA 酶抑制剂 (40U/ μ L) 0.5 μ L, AMV 逆转录酶 (200U/ μ L) 1 μ L, dNTP (2.5mmol/L) 8 μ L, 混合均匀后, 37 $^{\circ}$ C 水浴 1h, 此为 cDNA。取以上制备 cDNA 2 μ L 作为模板, 加 10 \times PCR buffer 5 μ L, 上游和下游引物各 (20pmol/ μ L) 1 μ L, dNTP (2.5mmol/L) 4 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 (5U/ μ L) 0.25 μ L, 水 32.75 μ L, 总体积共 50 μ L, 混匀后, 置 PCR 扩增仪上进行扩增反应。扩增程序: 96 $^{\circ}$ C 30s, 96 $^{\circ}$ C 30s, 53 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 2min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 3min。PCR 产物经 QIAquick PCR 纯化柱纯化后, 作为测序模板。

1.6 cDNA 测序

取以上纯化的 PCR 产物作为模板, 采用直接法以 dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Kit 进行测序反应, 然后用 ABI Model 377 DNA 测序仪进行测序。

1.7 数据的分析和处理

测序结果经 AutoAssembler 软件编辑整理, DNASIS 软件推导氨基酸序列, Genetyx 软件进行核苷酸及氨基酸序列的比较分析。系统进化分析采用 PHYLIP 软件在 Internet 网上分析处理 (<http://spiral.gene.nig.ac.jp/homology/clustalw>), 分析结果用 TreeView 软件绘制系统进化树。

2 结果

2.1 8 株 H9N2 病毒的 NS1 基因核苷酸和蛋白质氨基酸同源性比较

序列分析表明, 所有 8 株 H9N2 病毒的 NS1 基因的碱基数目都相同, 为 654bn, 系完整

的 NS1 基因序列,测序结果已在 GenBank 上登录,序列号为 AY259215、AY259218、AY259219、AY259220、AY259221、AY259222、AY259224 和 AY259226。

根据测得的 NS1 基因碱基序列推导出编码的氨基酸序列,然后进行同源性比较。该 8 株 H9N2 禽流感 NS1 基因的核苷酸和氨基酸同源性比较结果(表 1)可知,8 株病毒分离株的 NS1 基因的核苷酸同源性在 96.5% ~ 99.5% 之间,氨基酸同源性在 94.5% ~ 98.6% 之间。2001 年的分离株 Ck/HB/1/01 与 1996 年的分离株 Ck/BJ/1/95 其核苷酸和氨基酸同源性分别为 97.9% 和 97.2%,该结果表明,在 H9N2 禽流感流行的过去 6 年中,其 NS1 基因高度保守,未发生大的变异。

表 1 NS1 基因核苷酸和推导的氨基酸序列同源性比较(%)

Table 1 Homology comparison of nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of NS1 genes(%)

	Ck/HB/1/96	Ck/GD/97	Ck/HB/2/98	Ck/SD/98	Ck/HN/98	Ck/BJ/3/99	Ck/BJ/1/00	Ck/HB/1/01
Ck/HB/1/96		97.2	96.3	95.4	96.8	98.6	97.2	97.2
Ck/GD/97	98.2		96.3	96.3	96.8	96.8	98.2	97.2
Ck/HB/2/98	97.2	96.9		96.3	98.6	95.9	95.0	98.2
Ck/SD/98	97.7	97.7	97.1		97.7	95.0	94.5	97.2
Ck/HN/98	97.4	97.1	99.2	97.6		96.3	95.0	98.6
Ck/BJ/3/99	99.5	98.0	97.1	97.6	97.2		98.6	96.8
Ck/BJ/1/00	98.6	98.9	96.5	97.2	96.6	99.1		95.4
Ck/HB/1/01	97.9	97.6	98.8	97.7	98.9	97.7	97.1	

Down-left stands for nucleotide homology; Up-right represents amino acid homology.

2.2 8 株 H9N2 病毒与其它 H9N2 病毒 NS1 基因氨基酸的序列比较

H9N2 禽流感病毒的血凝素基因序列分析表明,中国的分离株其血凝素基因都属于 A/duck/Hong Kong/Y280/97-like 进化分支^[6,8],并且具有很高的同源性,因此,我们将该病毒作为参考毒株把推导的氨基酸序列与该病毒的氨基酸序列进行了比较,一比较的还有人源分离株 A/Hong Kong/1073/99、A/quail/Hong Kong/G1/97-like 分支的代表株 A/quail/Hong Kong/G1/97、巴基斯坦分离株和韩国分离株。由图 1 可以看出,中国大陆 H9N2 分离株的 NS1 基因都编码 217 个氨基酸,其它分离株的 NS1 基因则编码 230 个氨基酸,中国大陆的分离株比其它株在其羧基端或末端缺少 13 个氨基酸。对于 H5 和 H7 流感病毒而言,其神经氨酸酶茎部的氨基酸丢失与其毒力呈相关关系^[9],虽然这些氨基酸的丢失对 NS1 功能的影响尚不明确,但我们可以将这些氨基酸的丢失作为中国大陆 H9N2 流感病毒分离株的一个标记。

2.3 系统进化树分析

图 2 表明了 8 株中国分离株 H9N2 禽流感病毒 NS1 基因的系统进化关系,它回答了我们以下 4 方面的问题(1)中国的 H9N2 亚型分离株都属于等位基因群 A 群,尚未发现属于 B 群的分离株。(2)中国的分离株都属于一个亚分支, A/chicken/Beijing/1/94 位于该分支的根部,暗示这些分离株可能是由该株进化演变而来。(3)中国香港的 H9N2 病毒分离株其 NS1 基因存在以 A/quail/Hong Kong/G1/97 为代表的分支和以 A/duck/Hong Kong/

Dk/HK/Y280/97	1	MDSNTVSSFQVDCFLWHVRRKRFADQELGDAPFLARLRDQKSLRGRGSLGLDIRTATHE	60
Qa/HK/G1/97	1D.....R.....	60
HK/1073/99	1D.....R.....	60
Ck/Kor/323/96	1R.....D.....E.....RA	60
Ck/Pak/2/99	1M.....D.....H.....S.....	60
Ck/HB/1/96	1R.....D.....K.....R.....	60
Ck/GD/97	1D.....R.....	60
Ck/HB/2/98	1	..P.....D.....	60
Ck/SD/98	1D.....	60
Ck/HN/98	1	..P.....D.....	60
Ck/BJ/3/99	1R.....D.....K.....RK	60
Ck/BJ/1/00	1R.....D.....K.....RK	60
Ck/HB/1/01	1D.....	60
Dk/HK/Y280/97	61	GKHIVERILEEESDEALKMTIASVPAPRYLTDMTLEEMSRDWLMLIPKQKVTGSLCIRMD	120
Qa/HK/G1/97	61S.....E.....P.....	120
HK/1073/99	61S.....E.....P.....	120
Ck/Kor/323/96	61	..Q.....G.....SS.....F..M.....A.....K..	120
Ck/Pak/2/99	61E.....	120
Ck/HB/1/96	61	120
Ck/GD/97	61	120
Ck/HB/2/98	61A.....V.....	120
Ck/SD/98	61K.....	120
Ck/HN/98	61	120
Ck/BJ/3/99	61S.....	120
Ck/BJ/1/00	61S.....	120
Ck/HB/1/01	61G.....	120
Dk/HK/Y280/97	121	QAIVDKNITLKANFSVIFNRLEALILLRAFTDEGAIVGEISPLPSLPGHTDDEVKNAIGI	180
Qa/HK/G1/97	121	..MG...I.....V	180
HK/1073/99	121	..VMG.T.I.....V	180
Ck/Kor/323/96	121	..MN.....T.....E.....V	180
Ck/Pak/2/99	121	..M...I.....M.....E.....V	180
Ck/HB/1/96	121	..M..T.....V	180
Ck/GD/97	121K.....V	180
Ck/HB/2/98	121T.....	180
Ck/SD/98	121N.....L.....N.....	180
Ck/HN/98	121T.....L.....	180
Ck/BJ/3/99	121T.....V	180
Ck/BJ/1/00	121K.....V	180
Ck/HB/1/01	121T.....	180
Dk/HK/Y280/97	181	LIGGF EWNDNTV RVSETLQRF AWRSSDE DGR PPLSPK EKREMER TIEPEV	230
Qa/HK/G1/97	181L.....T.....N..S..P..Q..KV.....	230
HK/1073/99	181L.....T.....N..S..P..Q..KV.....	230
Ck/Kor/323/96	181L.....I.....N..S..P..Q..K.A.S..S..	230
Ck/Pak/2/99	181L.....T.R..N..N..S..P..Q..WK.....	230
Ck/HB/1/96	181P.....	217
Ck/GD/97	181P.....	217
Ck/HB/2/98	181	217
Ck/SD/98	181	217
Ck/HN/98	181	217
Ck/BJ/3/99	181	217
Ck/BJ/1/00	181P.....	217
Ck/HB/1/01	181	217

图 1 测序毒株与发表毒株 NS1 基因 cDNA 氨基酸序列比较

Fig. 1 Comparison of amino acid sequences of NS1 gene among China H9N2 influenza viruses and published sequence of H9 subtype

Dot indicates residues identical to Dk/HK/Y280/97 virus ; Dash stands for the deletion of amino acid residue.

Y280/97 为代表的两个不同的亚分支^[4],而中国大陆的鸡源分离株其 NS1 基因都属于 A/duck/Hong Kong/Y280/97 为代表的分支,尚未发现属于 A/quail/Hong Kong/G1/97 分支的大陆分离株。(4)中国分离株与国外分离株如韩国分离株、巴基斯坦分离株属于不同的进化分支,说明虽然 H9N2 禽流感病毒在亚洲的许多国家发生与流行,但其起源和进化各有特点,与地域有相关性。

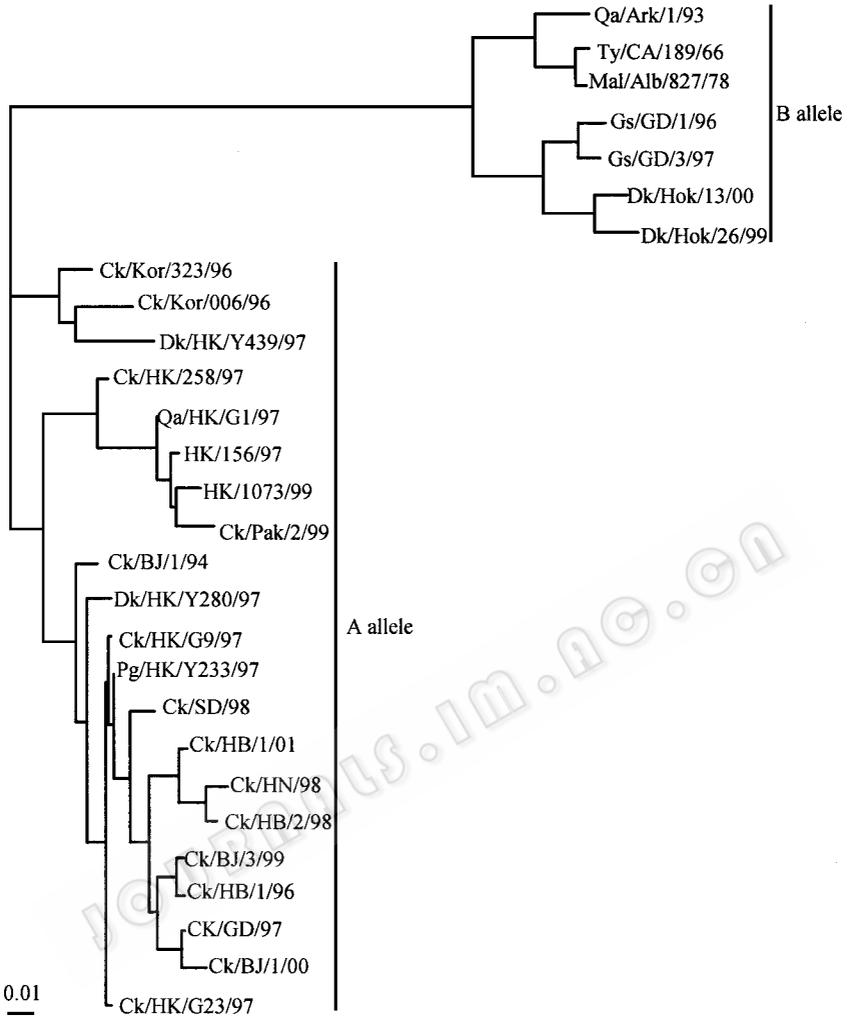


图 2 流感病毒 NS1 基因的系统进化发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of NS1 genes of influenza viruses

Abbreviations : Kor , Korea ; Ark , Arkansas ; CA , California ; Alb , Albert ; Hok , Hokkaido ; HK , Hong Kong ;

Qa , Quail ; Dk , Duck ; Ty , Turkey ; Mal , Mallard ; Pg , Pigeon ; Gs , Goose ; Ck , Chicken .

3 讨论

我国自 1992 年在广东省首次发生 H9N2 亚型禽流感以来,陆续在其它各省区有该病发生的报道^[5],业已对我国的养禽业造成了严重损失。国内对该病毒的研究多数都是侧重于 H9N2 病毒血凝素的研究,而非结构蛋白及其基因的研究较为少见。本研究通过对 1996~2001 年间分离的 8 株 H9N2 禽流感病毒的非结构蛋白基因序列分析表明,NS1 基因的核苷酸同源性在 96.5%~99.5% 之间,氨基酸同源性在 94.5%~98.6% 之间,说明中国的 H9N2 病毒的非结构蛋白基因的同源性高,进化稳定且高度保守。据报道,流感病毒的非结构蛋白基因分为等位基因群 A 群和等位基因群 B 群,两群群内的核苷酸序列同

源性分别为 86.5% ~ 99.4% 和 89.4% ~ 99.6% ;而两群之间的核苷酸同源性仅为 72.3% 左右^[2]。同源性比较结果表明中国的分离株在进化上属于相同的等位基因群,系统发育进化树也证明了这一点。

与其它毒株相比,中国大陆的分离株的非结构蛋白基因 NS1 缺少 13 个氨基酸。据报道,NS1 蛋白具有两个比较重要的功能区,其中的一个功能区位于分子的羧基端^[10],具有核输出信号,在感染流感病毒的细胞中,该信号具有活性,可使 NS1 蛋白运输到胞浆。虽然我们尚不能明确这些氨基酸的丢失对 NS1 基因功能的影响,但它至少可以作为中国大陆 H9N2 禽流感病毒的一个标记。相似的氨基酸丢失现象也发生在这些分离株的神经氨酸酶的茎部,鸡源 H9N2 中国分离株的神经氨酸酶茎部的第 63 ~ 65 位点的氨基酸也存在丢失现象(待发表资料)。

系统进化树分析表明,中国的 H9N2 亚型禽流感病毒的 NS1 基因进化稳定,都是由 A/chicken/Beijing/1/94 株进化而来,与亚洲其他国家的 H9N2 流感病毒有着明显的进化区别,这反映了 H9N2 流感病毒的分布与地域有相关的关系。图 2 也反映了 1996 年在广东省发生的鹅流感分离株 A/goose/Guangdong/1/96(H5N1) 病毒其 NS1 基因属于 B 基因群,而我们的研究表明,近年来引起我国鸡流感的 H9N2 病毒都位于 A 等位基因群内。值得一提的是,中国的这些分离株与中国香港 H5N1 病毒都位于一个相近的分支内,暗示我们对中国大陆的 H9N2 病毒的分子流行病学监测应当给予高度重视。

对流感病毒非结构蛋白功能基因和蛋白的研究已越来越受到重视。研究表明,非结构蛋白具有抑制干扰素的作用^[11],而且能够抑制宿主细胞 Pre-mRNA 的运输和剪接,从而关闭宿主细胞的基因表达,并且可以增强病毒 mRNA 翻译的效率^[12]。我们实验室已经利用大肠杆菌表达了流感病毒的非结构蛋白,将在研究非结构蛋白的活性以及对临床感染鸡与免疫鸡的鉴别诊断中发挥作用。

参 考 文 献

- [1] Treanor J J, Snyder M H, London W T, *et al.* The B allele of the NS gene of avian influenza viruses, but not the A allele, attenuates a human influenza A virus for squirrel monkeys. *Virology*, 1989, **171**: 1 ~ 9.
- [2] Kawaoka Y, Gorman O T, Ito T, *et al.* Influence of host species on the evolution of the nonstructural (NS) gene of influenza A viruses. *Virus Res*, 1998, **55**(2): 143 ~ 156.
- [3] Ludwig S, Schultz U, Mandler J, *et al.* Phylogenetic relationship of the nonstructural (NS) genes of influenza A viruses. *Virology*, 1991, **183**: 566 ~ 577.
- [4] 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? *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 9363 ~ 9367.
- [5] 甘孟侯. 禽流感. 第二版. 北京:中国农业出版社, 2002.
- [6] 刘红旗, 程 坚, 彭大新, 等. 我国部分地区 H9 亚型禽流感病毒血凝素基因序列比较与遗传发生关系分析. *微生物学报* 2002, **42**(3): 288 ~ 299.
- [7] 程 坚, 刘秀梵, 彭大新, 等. 表达 H9 亚型禽流感病毒血凝素基因的重组鸡痘病毒及其免疫效力. *微生物学报* 2002, **42**(4): 442 ~ 447.
- [8] 李 曦, 于康震, 田国斌, 等. H9N2 禽流感病毒中国分离株血凝素基因序列的初步分析. *中国预防兽医学报*, 2002, **24**(4): 249 ~ 251.
- [9] Matrosovich M, Zhou N, Kawaoka Y, *et al.* The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans. *chick-*

- ens , and wild aquatic birds have distinguishable properties. *J Virol* , 1999 , **73** :1146 ~ 1155.
- [10] Wang W , Krug R M. The RNA-binding and effector domains of the viral NS1 protein are conserved to different extents among influenza A and B viruses. *Virology* , 1996 , **223** (1) :41 ~ 50.
- [11] Garcia-Sastre A , Egorov A , Matassov D , *et al.* Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology* , 1998 , **252** (2) : 324 ~ 330.
- [12] Egorov A , Brandt S , Sereinig S , *et al.* Transfectant influenza A viruses with long deletions in the NS1 protein grow efficiently in vero cells. *J Virol* , 1998 , **72** (8) : 6437 ~ 6441.

Sequence Analysis of NS1 Gene of Some H9N2 Subtype Influenza Viruses Isolated from Chickens in China

Liu Jinhua* Shi Weimin Wu Qingmin Guo Yupu

(College of Veterinary Medicine , China Agricultural University , Beijing 100094 , China)

Abstract : The nonstructural protein(NS1) genes of eight H9N2 subtype influenza virus strains isolated from diseased chickens on different farms during 1996 ~ 2001 were amplified and sequenced. The nucleotide and deduced amino acid sequences of NS1 genes of these isolates were compared. The results showed that the homologies of nucleotide and amino acid of the isolates were 96.5% ~ 99.5% and 94.5 ~ 98.6% , respectively. These indicated that NS1 genes of H9N2 influenza viruses isolated in China were well conserved. Comparison of the amino acid sequences of NS1 genes of these isolates with those of H9N2 viruses isolated in Hong Kong of China , Korea and Pakistan demonstrated that nonstructural(NS1) proteins of the eight strains had a deletion of 13 amino acid residues at the carboxy terminus. Phylogenetic analyses showed NS1 genes of these isolates belonged to the same lineage and derived from an early chicken H9 virus isolated in 1994. The NS1 genes of the eight isolates belong to different sublineages from those of the H9N2 viruses isolated in Hong Kong , Korea and Pakistan , suggesting that the geographical distribution plays a significant role in the evolution of the H9N2 subtype influenza viruses.

Key words : Avian influenza virus , H9N2 subtype , Nonstructural protein gene , Sequence analyses

* Corresponding author. Tel : 86-10-62893837 ; E-mail : ljh@cau.edu.cn

Received date 03-25-2003