

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00628

## 2009年新型甲型H1N1流感病毒非结构蛋白基因进化分析

李淑华<sup>△</sup>, 韩一芳<sup>△</sup>, 苏彤, 鹿文英, 曹广文\*

第二军医大学基础部流行病学教研室, 上海 200433

**[摘要]** **目的:**探讨2009年新型甲型H1N1流感病毒的非结构蛋白(NS)基因进化规律。**方法:**从NCBI下载2009年新型甲型H1N1流感病毒以及北美、欧洲、亚洲地区以往流行的甲型H1N1流感病毒NS基因序列,利用Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 4.0(MEGA 4.0)软件对所选序列进行基因进化分析,并用NJ法构建进化树;对2009年新型甲型H1N1流感病毒NS基因核苷酸序列同源性及编码蛋白氨基酸序列进行分析。**结果:**2009年新型甲型H1N1流感病毒NS基因来源于猪A/H1N1流感病毒,与2005~2007年猪A/H1N1流感病毒具有较高的同源性(97.5%~97.6%),与1930~2007年猪A/H1N1流感病毒具有明显的时间进化关系;其重要抗原及拮抗宿主抗病毒能力的氨基酸位点基本没有变异。**结论:**2009年新型甲型H1N1流感病毒NS基因来源于猪A/H1N1流感病毒,NS基因编码蛋白拮抗宿主抗病毒能力并没有改变。

**[关键词]** H1N1甲型流感病毒;非结构蛋白;进化;变异

**[中图分类号]** R 373.13 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)06-0628-04

### Genetic characteristics and deduced protein variation of nonstructural protein of novel influenza virus A/H1N1 in 2009 pandemic

LI Shu-hua<sup>△</sup>, HAN Yi-fang<sup>△</sup>, SU Tong, LU Wen-ying, CAO Guang-wen\*

Department of Epidemiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[ABSTRACT]** **Objective:** To elucidate the genetic characteristics and deduced protein variation of nonstructural protein(NS) gene of the novel influenza virus A/H1N1 in 2009 pandemic. **Methods:** The sequence of NS gene of A/H1N1 viruses isolated in North America, Europe, and Asia during 1930-2009 were downloaded from NCBI database. MEGA4.0 software and NJ method were used for sequence alignment, protein sequence alignment, and the phylogenetic tree construction. **Results:** The NS genes of novel influenza virus A/H1N1 in 2009 pandemic were originated from A/swine/H1N1 virus of 2005-2007; they shared a high homology of 97.5%-97.6%. There was an obvious evolutionary relationship between the NS genes of novel A/H1N1 virus and those of the influenza A/swine/H1N1 viruses isolated in North America from 1930 to 2007. No obvious changes were found in the amino acid sites for the antagonistic function of NS1 against the host antiviral capacity among these viruses. **Conclusion:** The NS gene of novel influenza virus A/H1N1 in 2009 pandemic might evolve from swine A/H1N1 influenza viruses isolated in the United States. The antagonistic function of NS1 against the host antiviral capacity is not changed.

**[KEY WORDS]** H1N1 subtype influenza A virus; nonstructural protein; evolution; variation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(6):628-631]

2009年3月以来,一种新型甲型H1N1流感病毒已在美国、墨西哥、加拿大分离得到。截至2009年5月19日,世界卫生组织(WHO)官方网站公布全球已有40个国家和地区共9 830例新型H1N1流感感染患者<sup>[1]</sup>。加强对2009年新型甲型H1N1流

感病毒的监测对于有效地认识流感的传播及预防具有重要意义。

流感病毒属正黏病毒科,基因组由8个单独的单链RNA片段组成,共编码10种蛋白质,包括RNA聚合酶(PB2、PB1、PA),血凝素(HA),核蛋白

**[收稿日期]** 2009-05-22 **[接受日期]** 2009-06-01

**[基金项目]** 军队“十一五”科技攻关计划(06G65),上海市自然科学基金(07ZR14141),上海市公共卫生“三年行动计划”重点学科项目(08GWZX0201,08GWZX0101)。Supported by Key Research Project of Military “11<sup>th</sup> 5-year Plan” of China(06G65), Natural Science Foundation of Shanghai (07ZR14141), and the “Three-year G & D Program” on Shanghai Public Health Affairs(08GWZX0201,08GWZX0101)。

**[作者简介]** 李淑华,博士后, E-mail: hsl167@yahoo.com.cn; 韩一芳,硕士生, E-mail: hanyifang@yahoo.cn

<sup>△</sup>共同第一作者(Co-first authors)。

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel:021-81871060, E-mail: gcao@smmu.edu.cn

(NP), 神经氨酸酶 (NA), 基质蛋白 (M1、M2), 非结构蛋白 (NS1、NS2)。非结构蛋白 NS1 和 NS2 由基因组中最小的 RNA 片段编码, 该片段仅含有 890 个核苷酸, 其中有两个编码区, 编码 207 个氨基酸的 NS1 蛋白和 121 个氨基酸的 NS2 蛋白。这两种蛋白质大量存在于感染的细胞中, NS1 主要在核内, NS2 主要在胞质, 病毒颗粒中没有这两种蛋白质。NS 基因虽然不是重要的抗原基因, 但 NS1 作为一种多功能蛋白质, 具有拮抗宿主细胞抗病毒作用的功能<sup>[2-3]</sup>, 能与宿主细胞的多种因子发生相互作用, 既干扰天然免疫反应<sup>[4]</sup>, 又干扰宿主获得性免疫反应<sup>[5]</sup>, 在病毒的致病性中起重要作用。

本研究对 2009 年新型甲型 H1N1 流感病毒 NS 基因的全长序列进行了分析, 并与以往流行的甲型 H1N1 流感病毒 NS 基因进行比较, 为 2009 年新型甲型 H1N1 流感病毒的基因演变及其致病能力分析提供参考。

### 1 资料和方法

1.1 2009 年新型甲型 H1N1 流感病毒 NS 基因序列的获取 利用 NCBI 下载 2009 年 4 月 27 日~2009 年 5 月 19 日公布的各国流行的新型甲型 H1N1 流感病毒 NS 基因序列, 对所有的新型甲型 H1N1 流感病毒 NS 基因序列进行同源性分析, 根据同源性分析结果, 选取各地的部分序列作代表进行基因进化分析。

1.2 1918~2008 年甲型 H1N1 流感病毒 NS 基因序列的获取 利用 NCBI 基因库检索 1918~2008 年北美、欧洲、亚洲地区分离的 A/swine/H1N1、A/human/H1N1、A/avian/甲型 H1N1 流感病毒流行株 NS 基因序列, 在整体分析的基础上, 选取各地区的部分序列为代表进行基因进化分析。

1.3 NS 基因进化分析 采用 Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 4.0 (MEGA 4.0) 软件对所选序列进行基因进化分析, 并用 NJ 法构建进化树, 对 2009 年新型甲型 H1N1 流感病毒 NS 基因的进化来源、核苷酸同源性及其氨基酸序列特异性进行分析比较。

### 2 结果

2.1 2009 年新型甲型 H1N1 流感病毒 NS 基因进化分析 截至 2009 年 5 月 19 日, 共下载分布各国的 2009 年新型甲型 H1N1 流感病毒 NS 基因序列 83 条, 序列比对结果表明核苷酸相差 0~0.1%, 选取其中的 8 株序列与北美、欧洲、亚洲部分国家以往

分离的甲型 H1N1 流感病毒株 NS 基因构建基因进化树 (图 1)。

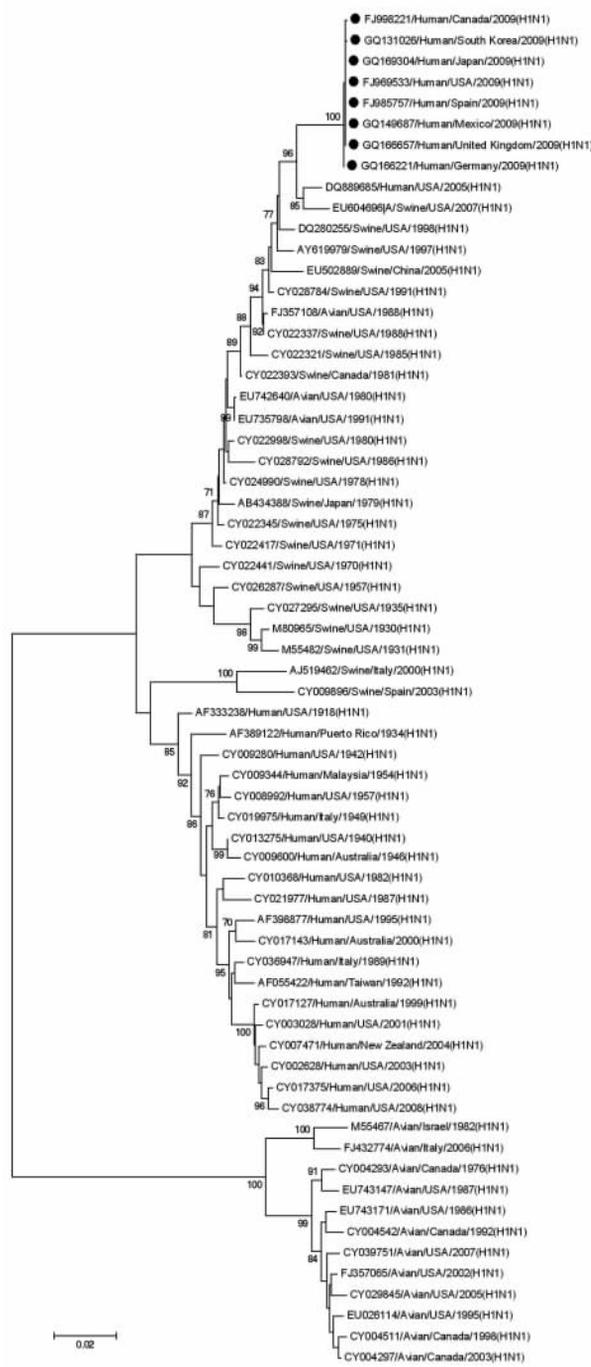


图 1 甲型 H1N1 亚型流感病毒 NS 基因进化树

Fig 1 Phylogenetic analysis of NS gene of H1N1 influenza virus

●: HA genes of novel A/H1N1 in 2009 pandemic

结果表明: 进化树共分 3 个主干支, 分别为 A/swine/H1N1、A/human/H1N1、A/avian/H1N1 主干支。各主干支没有呈现明显的地理分布。2009 年新型甲型 H1N1 流感病毒 NS 基因属于 A/swine/H1N1 病毒主干支, 并独立构成一小分支, 且与 2007

年美国 A/swine/USA/2007 (EU604696) 同源性最高,核苷酸序列差异为 2.4%~2.5%。由 A/swine/H1N1 主干支可见,2009 年新型甲型 H1N1 流感病毒与全球不同年代的 A/swine/H1N1 病毒有时间的进化关系。

核苷酸序列比对结果表明,2009 年新型甲型 H1N1 流感病毒与 1980~1999 年 A/swine/H1N1 核苷酸差异为 2.7%~4.3%,与 1930~1979 年 A/swine/H1N1 核苷酸差异为 4.0%~6.8%,提示随着时间的迁移,A/swine/H1N1 流感病毒与 2009 年新型甲型 H1N1 流感病毒同源性呈逐渐增高的趋

势。由于 NS 基因不易变异,推测 2009 年新型甲型 H1N1 流感病毒 NS 基因可能来源于 A/swine/H1N1 流感病毒。另外还可见 2007 年美国 A/swine/USA/2007 (EU604696) 与 2005 年美国 A/human/H1N1 (DQ889685) 有极高的同源性,核苷酸序列差异仅为 1.4%。推测 2005 年美国 A/human/H1N1 (DQ889685) 的 NS 基因可能也来源于 A/swine/H1N1 流感病毒。

2.2 新型甲型 H1N1 流感病毒 NS 基因编码蛋白重要功能位点氨基酸序列分析(表 1)

表 1 甲型 H1N1 亚型流感病毒 NS1 蛋白氨基酸序列的分析

Tab 1 Amino acid substitutions of the deduced NS1 proteins from H1N1 influenza viruses of different species

Virus strains (location/year)	Amino acid position					
	91	114	171	205	206	207
Novel H1N1 influenza virus in 2009						
GQ166221/Germany/2009	S	P	Y	N	C	D
GQ149687/Mexico/2009	S	P	Y	N	C	D
FJ969533/USA/2009	S	P	Y	N	C	D
FJ998221/Canada/2009	S	P	Y	N	C	D
FJ985757/Spain/2009	S	P	Y	N	C	D
GQ166657/United Kingdom/2009	S	P	Y	N	C	D
GQ131026/South Korea/2009	S	P	Y	N	C	D
GQ169304/Japan/2009	S	P	Y	N	C	D
Swine A/H1N1 references						
M80965/USA/1930	A	S	D	S	R	N
CY026287/USA/1957	A	S	D	S	R	N
CY022441/USA/1970	A	S	D	S	R	N
AB434388/Japan/1979	A	S	D	S	R	N
CY022393/Canada/1981	A	S	D	S	R	N
CY028784/USA/1991	A	S	D	S	R	N
AJ519462/Italy/2000	A	S	D	S	I	N
EU604696/USA/2007	A	P	N	N	R	N
Avian A/H1N1 references						
CY004293/Canada/1976	T	G	T	I	R	D
EU742640/USA/1980	A	S	D	S	R	N
EU743171/USA/1986	T	G	T	V	R	D
FJ357108/USA/1988	A	S	D	S	R	N
EU735798/USA/1991	A	S	D	S	R	N
CY004511/Canada/1998	A	G	T	V	R	D
FJ357065/USA/2002	A	G	T	V	R	D
CY039751/USA/2007	A	G	T	V	R	D
Human A/H1N1 references						
AF333238/USA/1918	T	S	D	S	S	N
CY009280/USA/1942	T	P	N	S	S	N
CY009344/Malaysia/1954	T	P	N	S	S	N
CY021977/USA/1987	T	P	N	S	S	N
CY017127/Australia/1999	T	P	N	S	S	N
CY003028/USA/2001	T	P	N	S	S	N
DQ889685/USA/2005	A	P	N	N	R	N
CY038774/USA/2008	T	P	N	S	S	N

G: Glycine; A: Alanine; V: Valine; I: Isoleucine; P: Proline; S: Serine; Y: Tyrosine; C: Cysteine; N: Asparagine; T: Threonine; D: Aspartic acid; R: Arginine

NS1(28~648 nt)是NS基因中重要的功能活性基因,其主要功能位点存在于NS1基因编码蛋白的第38、41、186位氨基酸<sup>[6]</sup>。氨基酸序列分析表明,2009年新型甲型H1N1流感病毒与2005~2007年A/swine/H1N1流感病毒仅相差13~15个氨基酸;与1930~1935年A/swine/H1N1流感病毒相差31~35个氨基酸;与A/human/H1N1流感病毒相差30~38个氨基酸;与A/avian/H1N1流感病毒相差66~67个氨基酸。这些氨基酸改变大多集中于NS蛋白的效应结构域(74~207位),其中变化较为集中的位点为91、114、171、205、206、207位,但目前关于这些位点的生物学功能不详;上述已知的拮抗机体抗病毒作用的功能位点并没有发现氨基酸变异。这提示2009年新型甲型H1N1流感病毒NS基因拮抗机体抗病毒作用的功能应该并没有改变。

### 3 讨论

NS基因进化分析结果表明,2009年新型甲型H1N1流感病毒NS基因与A/swine/H1N1流感病毒同源性较高,而与A/human/H1N1、A/avian/H1N1进化相对较远。在A/swine/H1N1流感病毒基因进化中,2009年新型甲型H1N1流感病毒与2007年美国A/swine/USA/2007(EU604696)同源性最高。但由A/swine/H1N1主干支可见,2009年新型甲型H1N1流感病毒与2005年美国A/human/USA/H1N1(DQ889685)具有极高的同源性。该分离株来自于1名美国养猪场工人,可见A/human/USA/H1N1分离株的NS基因也来自于A/swine/H1N1流感病毒的感染。通过对全球不同年代的A/swine/H1N1病毒的基因进化关系表明,2009年新型甲型H1N1流感病毒NS基因与全球不同年代的A/swine/H1N1病毒有时间进化关系。核苷酸序列比对结果表明,2009年新型甲型H1N1流感病毒与年代久远的A/swine/H1N1病毒差异大,而与年代较近A/swine/H1N1差异较小,但时间上的差异不很明显。由于NS基因相对稳定,提示2009年新型甲型H1N1流感病毒NS基因可能是A/swine/H1N1病毒长期进化的结果。

氨基酸变异及重要功能位点的比较结果表明,不同物种间H1N1亚型流感病毒氨基酸序列之间存在较大的差异,其中A/swine/H1N1与2009年新型甲型H1N1流感病毒氨基酸序列相差最小。这些氨基酸变化较为集中在第91、114、171、205、206、207位,由于目前这些位点的生物学功能不详,还不能预测其对NS蛋白的功能有何影响。对已知的重要功能位点的比对分析发现,新型甲型H1N1流感病毒NS基因决定其拮抗机体抗病毒作用的功能位点没有变异,提示2009年新型甲型H1N1流感病毒NS基因拮抗宿主抗病毒作用的功能并没有改变。对NS1蛋白功能的深入研究将为抗病毒药物和疫苗的研制提供新的靶点和契机<sup>[7]</sup>。

### [参考文献]

- [1] World Health Organization. Influenza A (H1N1)-update 33, 19, May, 2009. <http://www.who.int/csr/don/2009-05-19/en/index.html>
- [2] Nemeroff M E, Barabino S M, Li Y, Keller W, Krug R M. Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3' end formation of cellular pre-mRNAs[J]. *Mol Cell*, 1998, 1: 991-1000.
- [3] Mibayashi M, Martinez-Sobrido L, Loo Y M, Cárdenas W B, Gale M Jr, García-Sastre A. Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus[J]. *J Virol*, 2007, 81: 514-524.
- [4] Noah D L, Twu K Y, Krug R M. Cellular antiviral responses against influenza A virus are countered at the posttranscriptional level by the viral NS1A protein *via* its binding to a cellular protein required for the 3' end processing of cellular pre-mRNAs[J]. *Virology*, 2003, 307: 386-395.
- [5] Fernandez-Sesma A, Marukian S, Ebersole B J, Kaminski D, Park M S, Yuen T, et al. Influenza virus evades innate and adaptive immunity *via* the NS1 protein[J]. *J Virol*, 2006, 80: 6295-6304.
- [6] 李丽,徐可,孙兵. A型流感病毒NS1蛋白与宿主的相互作用[J]. *生命的化学*, 2008, 28: 237-241.
- [7] Baskin C R, Bielefeldt-Ohmann H, García-Sastre A, Tumpey T M, Van Hoeven N, Carter V S, et al. Functional genomic and serological analysis of the protective immune response resulting from vaccination of macaques with an NS1-truncated influenza virus[J]. *J Virol*, 2007, 81: 11817-11827.

[本文编辑] 贾泽军