

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00637

## 2009年新型甲型H1N1流感病毒全基因组序列重组分析

殷建华<sup>△</sup>, 谢佳新<sup>△</sup>, 韩磊, 鹿文英, 韩一芳, 张宏伟, 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:**分析2009年流行的新型甲型流感病毒(A/H1N1)全序列的基因重组现象。**方法:**从NCBI基因数据库下载2009年新型甲型流感病毒(A/H1N1)全基因组序列,采用Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 4.0(MEGA 4.0)软件对8条基因序列进行拼接和比对,分析2009年爆发株与历史流行株序列间的同源性;同时采用Simplot 3.5.1软件分析新型流感病毒A/H1N1基因重组现象。**结果:**2009年3月以来爆发的新型A/H1N1病毒株聚合酶B1(polymerase B1, PB1)基因来自于人H3N2,其同源性为93.7%;聚合酶B2(polymerase B2, PB2)和聚合酶A(polymerase A, PA)与禽H5N1同源性较高,同源性分别为89.0%、89.9%;血凝素(hemagglutinin, HA)、核蛋白(nucleoprotein, NP)和非结构蛋白(non-structural protein, NS)与北美地区猪H1N1同源性较高,同源性分别为91.7%、93.1%和93.1%;神经氨酸酶(neuraminidase, NA)和基质蛋白(matrix protein, MP)与欧洲地区猪H1N1同源性较高,同源性分别为90.5%、95.5%。全基因组序列同源性分析发现2009年新型A/H1N1病毒与北美地区猪H1N1病毒同源性最高,为83.9%。**结论:**2009年新型甲型H1N1流感病毒可能是人H3N2、北美地区猪H1N1、欧洲地区猪H1N1、禽H5N1的基因重排病毒。

**[关键词]** H1N1甲型流感病毒;病毒基因组;遗传重排;进化

**[中图分类号]** R 373.13 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)06-0637-04

### Recombination analysis of full-length genomic sequences of novel influenza virus A/H1N1 in 2009 pandemic

YIN Jian-hua<sup>△</sup>, XIE Jia-xin<sup>△</sup>, HAN Lei, LU Wen-ying, HAN Yi-fang, ZHANG Hong-wei, CAO Guang-wen\*

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

**[ABSTRACT]** **Objective:** To analyze the recombination of full-length genomic sequences of novel influenza virus A/H1N1 in 2009 pandemic. **Methods:** The full-length sequences of the novel A/H1N1 and reference sequences were downloaded from NCBI database. MEGA4.0 software was used to connect, align sequences, and analyze the similarity between the full-length sequences of the novel virus and each of the reference strains. Recombination was analyzed by Simplot software (version 3.5.1). **Results:** Simplot analysis indicated that the PB1 genes (polymerase B1, PB1) of the novel A/H1N1 viruses might evolve from human H3N2 virus (identity:93.7%); the PB2 genes (polymerase B2, PB2) and the PA genes (polymerase A, PA) might evolve from avian H5N1 viruses (identity:89.0%, 89.9%, respectively); the HA genes (hemagglutinin, HA), the NP genes (nucleoprotein, NP) and the NS genes (non-structural protein, NS) showed high similarities with those of swine H1N1 viruses isolated in North America (identity:91.7%, 93.1%, and 93.1%, respectively); and the NA genes (neuraminidase, NA) and the MP genes (matrix protein, MP) might evolve from European swine H1N1 viruses (identity:90.5%, 95.5%, respectively). The full-length sequence of the novel A/H1N1 viruses had a highest similarities with swine H1N1 viruses isolated in North America (identity:83.9%). **Conclusion:** The novel influenza virus A/H1N1 is a recombinant virus evolving from human H3N2 viruses, swine H1N1 from North America, swine H1N1 from Europe, and swine H5N1 from Asia.

**[KEY WORDS]** H1N1 subtype influenza A virus; viral genome; genetic reassortment; evolution

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(6):637-640]

甲型(A)流感病毒(influenza virus A)基因组含有8个RNA基因片段<sup>[1]</sup>,最大的3个RNA片段

**[收稿日期]** 2009-05-22 **[接受日期]** 2009-05-27

**[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]** 殷建华, 硕士, 讲师. E-mail: hawkyjh163@163.com; 谢佳新, 博士生. E-mail: xiejiaxin2006@yahoo.com.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

PB2 (polymerase B2)、PB1 (polymerase B1) 和 PA (polymerase A) 编码聚合酶;第4个编码血凝素 (hemagglutinin, HA) 蛋白 (表面糖蛋白, 主要抗原);第5个编码核蛋白 (nucleoprotein, NP), 其主要功能是 RNA 结合、合成和 RNA 核运入;第6个编码 NA (neuraminidase, 神经氨酸酶活性, 主要抗原) 和 NB (neuraminidase B) 蛋白 (NB 蛋白在感染中起辅助作用);第7个编码基质蛋白 M1 (matrix protein 1) 和 M2 (matrix protein 2);第8个片段编码非结构蛋白 NS1, 通过剪接还可以编码 NEP/NS2 蛋白。

流感病毒的基因重排是指2种病毒在感染细胞内基因片段的重新分配, 导致新基因型的出现, 理论上可以发生  $2^8$  (256) 种基因变异。重排只能发生在不同种属的病毒间, A、B、C 3 个属间不能发生重排。最著名的重排是造成 1957 年和 1968 年大流行的人流感病毒, 分别含有禽流感病毒的 HA、PB1、NA 和 HA、PB1<sup>[2-3]</sup>。此外, 在北美猪群间广泛流行的病毒发现有人/禽/猪三联重排的毒株, 而高致病性 H5N1 型禽流感病毒则来源于多种禽流感病毒间的重排<sup>[4]</sup>。病毒基因重组是指流感病毒基因片段通过模板切换方式获得不同来源的遗传信息, 从而提高病毒的生物学适应能力。一些低致病性的禽流感病毒的 HA 基因也可以从 M 基因或 NP 基因获得核酸序列后, 变为高致病性<sup>[5]</sup>。本研究分析了 2009 年 3 月北美爆发的新型甲型流感病毒 A/H1N1 全基因序列中的重组现象, 确定重组位点, 对今后流感病毒的预防和控制措施的制定提供依据。

## 1 资料和方法

1.1 资料 通过 NCBI 数据库下载代表不同地区 (亚洲、欧洲、北美)、不同时期 (1978~2009 年)、不同亚型 (H1N1、H5N1、H3N2) 和不同宿主 (人、禽、猪) 的甲型流感病毒全基因参考序列, 其中香港人 H1N1 (CY009292 ~ CY009299), 人 H3N2 (CY032969 ~ CY032976), 欧洲猪 H1N1 (CY022986 ~ CY022993), 北美猪 H1N1 (CY039917 ~ CY039924), 禽 H1N1 (AY180460、AY180470、AY180543、AY180603、AY180662、AY180748、AY180836、AY180855), 禽 H5N1 (EU930876 ~ EU930883), 人 H5N1 (DQ372591 ~ DQ372598), 2009 年新型甲型 A/H1N1 流感病毒 (GQ149631 ~ GQ149638)。

1.2 全序列基因拼接 采用 Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 4.0 (MEGA4.0) 软件<sup>[6]</sup>进行序列比对, 对齐后按 PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、MP 和 NS 顺序从 5'→3' 方向排列拼接, 要

求 8 条基因来源于同一株病毒。

1.3 基因重组分析 以 2009 年流行的新型甲型 A/H1N1 病毒株为质询序列, 以下载并拼接的不同地区、不同种属及不同时间的序列为参考序列, 通过 Simplot 3.5.1 软件<sup>[7]</sup>的 Bootscanning 程序分析全序列基因重组。采用 200 个核苷酸的滑动窗口, 以 20 个核苷酸的步伐从基因组 5' 端向 3' 端方向滑动。用 NJ 法对每个序列片段组构建进化树, 用 Kimura 两参数法计算进化距离, 设定核酸转换/颠换比例为 2.0, 运用 Bootscanning 法对各窗口下由随机切断和补齐产生的 100 个假想数据集通过上述算法构建的进化树进行评估。最后, 以质询序列分组的 Bootscanning 值为纵坐标, 以基因组长度为横坐标, 得到对质询序列的 Bootscanning 分析图。

1.4 同源性分析 采用 MEGA 4.0 软件进行序列比对, 以 2009 年流行的新型甲型 A/H1N1 病毒株为参考序列, 根据各序列间碱基的差异数计算各亚型序列间的同源性。

## 2 结果

采用 MEGA4.0 软件进行序列比对, 对齐后获得 PB2 (2 312 bp)、PB1 (2 274 bp)、PA (2 151 bp)、HA (1 699 bp)、NP (1 497 bp)、NA (1 413 bp)、MP (982 bp)、NS (841 bp) 共 8 个基因片段, 拼接后形成长度为 13 169 bp 的全基因序列。

经 Simplot 软件分析 (图 1、表 1), PB1 基因来自于人 H3N2, 同源性为 93.7%; PB2、PA 与禽 H5N1 同源性较高, 分别为 89.0%、89.9%; HA、NP 和 NS 与北美猪 H1N1 同源性较高, 分别为 91.7%、93.1%、93.1%; NA 和 MP 与欧洲猪 H1N1 同源性较高, 分别为 90.5%、95.5%。全基因序列同源性分析发现与北美猪 H1N1 最高, 同源性为 83.9%。

## 3 讨论

本研究应用 Simplot 软件分析 2009 年新型甲型 A/H1N1 流感病毒的全长序列 8 个基因中的基因重组现象, 结果证明 PB1 基因来自于人 H3N2 的基因, 其同源性为 93.7%; PB2、PA 与禽 H5N1 同源性较高, 同源性分别为 89.0%、89.9%, 可能从禽 H5N1 基因中获取了部分基因片段。这些对比结果的正确性可能受参比序列来源的影响。由于本研究中采用的各病毒全基因组序列全部来源于同一病毒株, 而且具有全长 8 条基因的病毒株较少, 因此该结果可能有一定的偏性。

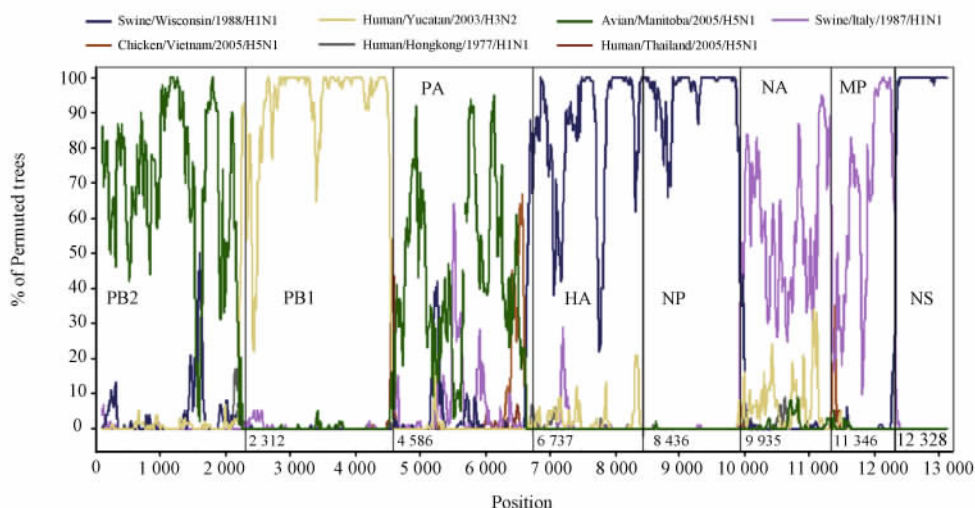


图 1 新型甲型 A/H1N1 流感病毒全基因组序列重组分析

Fig 1 Recombination analysis of full-length genomic sequence of novel influenza virus A/H1N1

PB1: Polymerase B1; PB2: Polymerase B2; PA: Polymerase A; HA: Hemagglutinin; NP: Nucleoprotein; NA: Neuraminidase; MP: Matrix protein; NS: Non-structural protein

表 1 2009 年新型甲型流感病毒全基因组序列与流感病毒参考序列的同源性比较

Tab 1 Comparison of identities between novel A/H1N1 influenza virus isolated in 2009 and reference influenza virus sequences

Influenza virus strain	Identities with Human/Mexico/2009/H1N1 (%)								
	Full sequence	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	MP	NS
Human/HongKong/1977/H1N1	80.5	83.1	77.8	80.3	73.7	82.2	77.2	88.0	82.0
Human/Thailand/2005/H5N1	80.5	82.0	83.5	88.2	48.7	80.0	83.3	90.3	80.3
Swine/Italy/1987/H1N1	83.4	81.5	84.6	85.2	69.0	81.9	90.5	95.5	78.5
Swine/Wisconsin/1988/H1N1	83.9	80.6	76.0	78.4	91.7	93.1	77.0	87.3	93.1
Human/Yucatan/2003/H3N2	72.9	81.6	93.7	80.1	-	79.9	-	84.2	79.6
Avian/Manitoba/2005/H5N1	82.4	89.0	85.3	89.9	50.0	79.6	82.3	89.4	82.3

PB1: Polymerase B1; PB2: Polymerase B2; PA: Polymerase A; HA: Hemagglutinin; NP: Nucleoprotein; NA: Neuraminidase; MP: Matrix protein; NS: Non-structural protein. -, Similarity lower than 0.0%

1957 年“亚洲流感”是当时流行于人群中的 H1N1 病毒从禽流感病毒中获得了 HA、NA、PB1 基因片段而产生的 H2N2 亚型病毒引起的<sup>[2-3]</sup>。1968 年“香港流感”是当时人群中 H2N2 病毒从禽流感病毒获得 HA、PB1 基因后产生的 H3N2 亚型流感病毒引起的<sup>[2-3]</sup>。HA 基因是流感病毒最主要抗原基因,承受的免疫压力最大,进化和变异速度最快。本研究结果表明 2009 年新型甲型 H1N1 流感病毒的 HA 基因获取了北美猪 H1N1 的部分片段, NP 与 NS 同样也是来自北美猪 H1N1,而 NA 和 MP 基因来自欧洲猪 H1N1 基因。流行于欧洲地区猪群中的类禽 H1N1 病毒可以感染人并具有在人身复制的能力<sup>[8]</sup>,这就增加了新流感病毒基因经猪体重排后传播给人的可能性。近年来,在北美和欧洲猪群中流行的基因重排病毒常含有禽流感病毒基

因片段<sup>[9]</sup>。研究中所选用的人 H3N2 病毒株是来自 2003 年的墨西哥,禽 H5N1 来自 2005 年的加拿大,猪 H1N1 病毒株来自北美及欧洲。此外人流感病毒 H5N1 和 H1N1 片段并没有在新型病毒中发现。

猪在此次流行的 H1N1 病毒的形成过程中可能起了“基因混合器”的作用<sup>[5]</sup>。1918 年引起世界性流行的流感病毒 H1N1 就可能来自禽流感病毒<sup>[10]</sup>;实验感染发现,禽、人流感病毒在猪体内都可有效繁殖,种系及流行病学分析也表明,禽、人流感病毒可通过自然途径传播给猪<sup>[11]</sup>,并在猪体内重组后传播给人。1997 年香港 H5N1 禽流感人群感染及死亡病例的发生<sup>[12]</sup>是禽流感病毒首次未经中间动物宿主直接传播给人,但未能在人群中建立有效传播。禽流感病毒在人类及其他灵长类动物中不能有效复制,但此次流行的 H1N1 病毒的聚合酶是由人

H3N2与禽H5N1重组形成,HA与NA分别来自北美地区猪H1N1和欧洲地区猪H1N1,使得该病毒侵袭性和致病力增强,可以在人群间传播。同时由于HA和NA来自于猪,使得针对人病毒的疫苗失去作用,使得病毒迅速在人群中传播。

综上所述,2009年新型甲型H1N1流感病毒是整合了人H3N2、北美地区猪H1N1、欧洲地区猪H1N1以及禽H5N1序列的基因重排病毒。新型病毒可能通过此次重排获得了高侵袭性和致病力。流感病毒的变异速度之快、基因重组频率之高正逐渐打破宿主间的特异性<sup>[9]</sup>,使得人与人、人与动物间相互传播成为可能。美国国家疾病预防控制中心最近研究<sup>[13]</sup>表明,以前用于预测人流感病毒的分子标志已不适合这次爆发的新型流感病毒,流感病毒可能存在着一些我们尚未了解的分子决定簇来主导在人群中传播,如何有效监测、预防和控制流感病毒是当前迫切需要解决的问题。

#### [参考文献]

- [1] Nicholson K G, Wood J M, Zambon M. Influenza[J]. Lancet, 2003,362:1733-1745.
- [2] De Jong J C, Rimmelzwaan G F, Fouchier R A, Osterhaus A D. Influenza virus: a master of metamorphosis[J]. J Infect, 2000, 40:218-228.
- [3] Horimoto T, Kawaoka Y. Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents[J]. Nat Rev Microbiol, 2005,3:591-600.
- [4] Hulse-Post D J, Sturm-Ramirez K M, Humberd J, Seiler P, Gorkovkova E A, Krauss S, et al. Role of domestic ducks in the propagation and biological evolution of highly pathogenic H5N1 influenza viruses in Asia[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102:10682-10687.
- [5] Ma W, Kahn R E, Richt J A. The pig as a mixing vessel for influenza viruses: Human and veterinary implications[J]. J Mol Genet Med, 2009,3:158-166.
- [6] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Mol Biol Evol, 2007,24:1596-1599.
- [7] Lole K S, Bollinger R C, Paranjape R S, Gadkari D, Kulkarni S S, Novak N G, et al. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination[J]. J Virol, 1999,73:152-160.
- [8] Wood G W, Banks J, Brown I H, Strong I, Alexander D J. The nucleotide sequence of the HA1 of the haemagglutinin of an HI avian influenza virus isolate from turkeys in Germany provides additional evidence suggesting recent transmission from pigs[J]. Avian Pathol, 1997,26:347-355.
- [9] Karasin A I, Landgraf J, Swenson S, Erickson G, Goyal S, Woodruff M, et al. Genetic characterization of H1N2 influenza A viruses isolated from pigs throughout the United States[J]. J Clin Microbiol, 2002,40:1073-1079.
- [10] Tumpey T M, Basler C F, Aguilar P V, Zeng H, Solórzano A, Swayne D E, et al. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus[J]. Science, 2005,310:77-80.
- [11] Kuiken T, Holmes E C, McCauley J, Rimmelzwaan G F, Williams C S, Grenfell B T. Host species barriers to influenza virus infections[J]. Science, 2006,312:394-397.
- [12] Claas E C, Osterhaus A D, van Beek R, De Jong J C, Rimmelzwaan G F, Senne D A, et al. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus[J]. Lancet, 1998,351:472-477.
- [13] Garten R J, Davis C T, Russell C A, Shu B, Lindstrom S, Balish A, et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans[J]. Science, 2009 May 22. [Epub ahead of print]

[本文编辑] 尹 茶

#### · 编后记 ·

经过专题作者及编辑部全体人员的不懈努力,本期的新型甲型H1N1流感专题终于如期完成了。本以为流感疫情的控制会告一段落,但迎来的却是世界卫生组织(WHO)总干事陈冯富珍博士于2009年6月11日晚正式决定将全球流感大流行的警戒级别由5级提升至6级的消息。6级是全球流感大流行的警戒级最高级,这意味一场全球性疫情正发生,世界正处在2009年流感大流行的开端。

1918年西班牙流感大流行距今已有近百年的时间,这期间人类从未摆脱过流感大流行的威胁,也从未停止过与其的斗争。人类与病毒正进行着一场没有终点的马拉松竞赛。当前正值甲型H1N1流感全球肆虐,全球科学家和医务工作者正为抗击病毒进行艰苦卓绝的努力,我国也不例外。作为国内的医学期刊,全面、及时地报道我国科研工作者的关于新型甲型H1N1流感的最新研究成果是我们义不容辞的责任,也算是为抗击流感尽一份绵薄之力。当然,本期专题的作者来源还比较单一,不能全面反映国内学者的研究状况,希望以后能得到更多的科研团队的支持;也期待着不久的将来,我国科学家能在最尖端领域有重大发现。最后,希望此次流感大流行疫情尽快得到有效控制,让SARS曾留给人们的伤痛不再重演。

《第二军医大学学报》编辑部