

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00632

2009年新型甲型H1N1流感病毒聚合酶编码基因进化分析

韩磊,殷建华,谢佳新,李淑华,韩一芳,鹿文英,苏彤,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年新型甲型流感病毒(A/H1N1)聚合酶PA、PB1和PB2编码基因的进化规律。**方法:**从NCBI流感病毒基因数据库下载2009年新型甲型H1N1流行株的PA、PB1和PB2聚合酶编码基因序列以及人、猪和禽流感病毒相应的参考序列,采用Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 4.0(MEGA4.0)软件比对和修剪此次流行株的代表序列及所有参考株序列并构建系统树,再比对和修剪此次流行株的代表序列及人A/H1N1病毒各年代(1918~2008年)参考序列并构建系统树,同时比对此次流行株的代表序列及人A/H1N1各年代(1918~2008年)参考序列编码PB2蛋白的氨基酸序列。**结果:**不同地区分离的2009年新型甲型H1N1流感病毒的聚合酶PA、PB1和PB2编码基因均具有高度同源性,并聚集在一个独特的进化支上,与猪流感病毒对应基因接近。三者均与2005年美国爱荷华州分离的人A/H1N1病毒基因(A/Iowa/CEID23/2005/H1N1)具有高度的相似性。2009年新型甲型H1N1流感病毒、2005年美国爱荷华州流行的H1N1(DQ889682)病毒PB2蛋白第627位氨基酸与禽类流感病毒相同,均为谷氨酸,而与其他人A/H1N1(1918~2008年)病毒的赖氨酸不同。**结论:**2009年新型甲型H1N1流感病毒聚合酶基因可能来源于2005年美国爱荷华州分离的人A/H1N1病毒,禽流感病毒可能参与了聚合酶基因的重排过程。

[关键词] H1N1甲型流感病毒进化;聚合酶基因;基因重排

[中图分类号] R 373.13 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)06-0632-05

Evolutionary characteristics of polymerase PA, PB1, and PB2 genes of novel influenza virus A/H1N1 in 2009 pandemic

HAN Lei, YIN Jian-hua, XIE Jia-xin, LI Shu-hua, HAN Yi-fang, LU Wen-ying, SU Tong, CAO Guang-wen*

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

[ABSTRACT] **Objective:** To elucidate the evolutionary characteristics of polymerase PA, PB1, and PB2 genes of the novel influenza virus A/H1N1 in 2009 pandemic. **Methods:** The sequences of the PA, PB1, and PB2 genes of the novel H1N1 strains in 2009 pandemic, and the reference sequences of human, swine, and avian influenza viruses isolated during different years at different locations were retrieved from NCBI. Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 4.0 (MEGA4.0) software was employed to align and blunt nucleotide sequences, construct phylogenetic tree, deduce and align PB2 protein sequences, and the results were compared between the novel A/H1N1 and each of the reference strains. **Results:** The sequences of the PA, PB1, and PB2 genes of 2009 novel A/H1N1 strains isolated from different locations shared a high homology and clustered in a unique new clade, and were close to the swine influenza viruses. The PA, PB1, and PB2 genes of the novel H1N1 viruses had a high similarity with the corresponding sequences of a human H1N1 strain isolated in Iowa State of USA in 2005 (A/Iowa/CEID23/2005/H1N1). Alignments of the deduced protein sequences showed that the 627th amino acid of PB2 of the novel H1N1 strains and A/Iowa/CEID23/2005/H1N1 were glutamic acid (Glu), which was the same as that in the avian influenza virus in Iowa State of USA in 2005 (DQ889682), and was different from those of the reference sequences of human A/H1N1 strains isolated from 1918 to 2008, which were lysine (Lys). **Conclusion:** The 2009 novel A/H1N1 virus might be originated from the human A/H1N1 strains isolated in 2005 in Iowa State of America (A/Iowa/CEID23/2005/H1N1), and the polymerase gene of the novel H1N1 virus might re-assort with avian A influenza virus.

[KEY WORDS] H1N1 subtype influenza A virus; polymerase gene; gene rearrangement

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(6): 632-636]

2009年3月开始爆发流行的新型甲(A)型H1N1流感病毒属于正黏病毒科,为单链RNA病毒^[1],由8

[收稿日期] 2009-05-21 **[接受日期]** 2009-06-08

[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 “11th 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] 韩磊,硕士生。E-mail:hljywd@gmail.com

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

条独立基因片段组成,分别编码聚合酶 B1 (polymerase B1, PB1)、聚合酶 B2 (polymerase B2, PB2)、聚合酶 A (polymerase A, PA)、血凝素 (hemagglutinin, HA)、核蛋白 (nucleoprotein, NP)、神经氨酸酶 (neuraminidase, NA)、基质蛋白 (matrix protein, M1、M2)、非结构蛋白 (non-structural protein, NS1、NS2) 等 10 个基因产物。根据病毒外壳 HA 和 NA 的不同可将其分为不同亚型^[2],其中 H3N2、H1N1、H1N2、H5N1 具有高发病率和病死率^[3-4]。流感病毒 RNA 聚合酶 (polymerase) 是负责病毒 RNA 复制、转录等生物学功能的酶。其中 PB1 亚基具有 RNA 聚合酶活性,参与 mRNA 转录及 vRNA 的复制,将 PB2 亚基及 PA 亚基连接起来形成全酶 (holoenzyme); PB2 亚基具有识别宿主 mRNA 并切割其 5' 帽子结构的核酸内切酶活性,同时具有 3' → 5' 核酸外切酶活性,可能具有校对功能^[5]; PA 是一种磷酸化蛋白,具有诱导蛋白水解活性,与 RNA 聚合酶活性正相关^[6]。

不同宿主来源的 H1N1 基因具有各自的特异性,流感病毒可以通过基因重排或基因漂移发生变异,从而逃脱机体免疫清除,导致流感病毒大流行,如 1957、1968 年的流感大流行^[7]。通过分析流感病毒各基因进化情况来判断新型流感病毒的基因重排情况对新型病毒的防控至关重要^[8]。因此,本研究从 NCBI 流感病毒基因库下载了 2009 年新型甲型 H1N1 流感病毒编码 PA、PB1 和 PB2 聚合酶的基因序列及相应的参考序列,分析此次流行株 PA、PB1 和 PB2 聚合酶编码基因的变异规律,并对其中研究较多的 PB2 基因编码蛋白的氨基酸序列进行分析,为新型流感流行防控措施的制定提供依据。

1 资料和方法

1.1 聚合酶基因序列的下载

2009 年 5 月 9 日从 NCBI 流感病毒基因库^[9] 下载 2009 年新型甲型 H1N1 流感病毒 PA、PB1、PB2 序列各 5 条共 15 条,来自美国、墨西哥和加拿大,因要了解与这 3 段基因序列相接近的病毒株,所以参考流感病毒序列按照不同亚型 (H1N1、H3N2、H5N1)、不同宿主 (人、禽、猪)、不同地区以及不同年代的原则选取,共 192 条。在剔除了同一年和相同位置的种系发生上非常接近的序列后,分别得到 58、55、54 条参考序列,用来构建 PA、PB1、PB2 基因的系统进化树。

1.2 系统进化分析

采用 Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 4.0 (MEGA4.0) 软件来排列和修剪流感病毒各段基因序列,推论和排列 PB2 聚合酶编码基因编码蛋白的氨基酸序列,采用

NJ 法构建进化树 (Bootstrap=1 000)。

2 结果

2.1 新型甲型 H1N1 流感病毒基因同源性分析

来自美国、加拿大、墨西哥的 2009 年新型甲型 H1N1 流感病毒: PA (GQ117029、GQ117037、FJ998223、FJ998222、GQ117095), PB1 (FJ981616、FJ966080、FJ998226、FJ984367、GQ122094), PB2 (FJ969525、FJ998206、FJ984387、GQ120442、CY039900) 核苷酸序列测定结果表明各自具有高度的同源性,PA、PB1、PB2 基因序列的一致性均为 99.9%~100%,提示 2009 年新型甲型 H1N1 流感病毒来自相同的传染源。

2.2 不同种属甲型 H1N1 流感病毒聚合酶基因进化分析

不同宿主间系统进化分析进一步显示 2009 年新型甲型 H1N1 流感病毒聚集在一支独特的进化支上其 PA 基因与猪和禽流感病毒的关系较接近,与人流感病毒的关系较远 (图 1)。

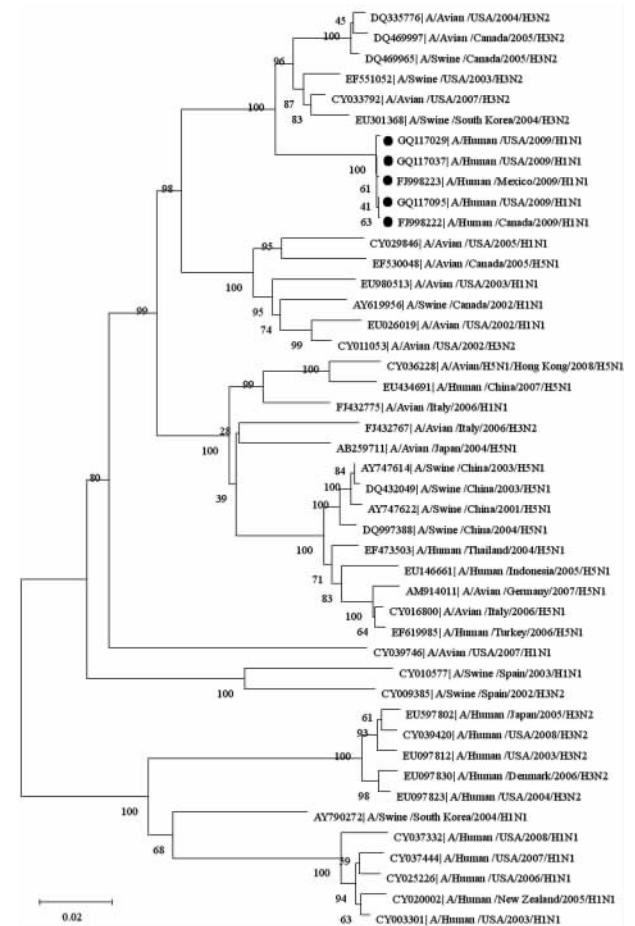


图 1 2009 年新型甲型 H1N1 流感病毒与不同宿主参考序列 PA 基因进化树

Fig 1 Phylogenetic tree of PA genes of 2009 novel A/H1N1 virus and reference sequences of different hosts
●: PA genes of novel A/H1N1 of the outbreak in 2009

PB1 基因与猪流感病毒的关系较接近,与人流感病毒的关系较远(图 2);PB2 基因与猪及禽流感病毒的关系较接近,与人流感病毒的关系较远(图 3)。结果显示 PA、PB1、PB2 基因均与猪流感病毒最接近,提示此次流行株可能由猪流感病毒进化而来,与 Garten 等^[10]关于 HA、NA 基因的结果类似,说明此次爆发的流行株可能是一种新型的独特的基因重排病毒株。

列的分析 2009 年新型甲型 H1N1 流感病毒 PB2 基因编码蛋白第 147、199、225、567、590、591、627 位氨基酸与不同年代(不包括 2005 年)人 A/H1N1 参考序列(DQ208309、CY020476、CY020292、CY019954、CY008995、CY021964、CY010371、CY019778、DQ508886、CY021700、CY006682、CY002543、EU097761、CY017378、CY037702)存在明显差异,而与 2005 年美国分离的人 A/H1N1 病毒株 DQ889682 一致。该结果提示 2009 年新型甲型 H1N1 流感病毒聚合酶基因可能来源于 2005 年美国爱荷华州分离的人 A/H1N1 病毒。进一步分析,新型甲型 H1N1 流感病毒、2005 年美国爱荷华州流行的 H1N1 (DQ889682)病毒 PB2 蛋白第 627 位氨基酸与禽类流感病毒相同,均为谷氨酸,而与其他人 A/H1N1 (1918~2008 年)流感病毒第 627 位的赖氨酸不同,提示禽流感病毒可能参与了聚合酶基因的重排过程。

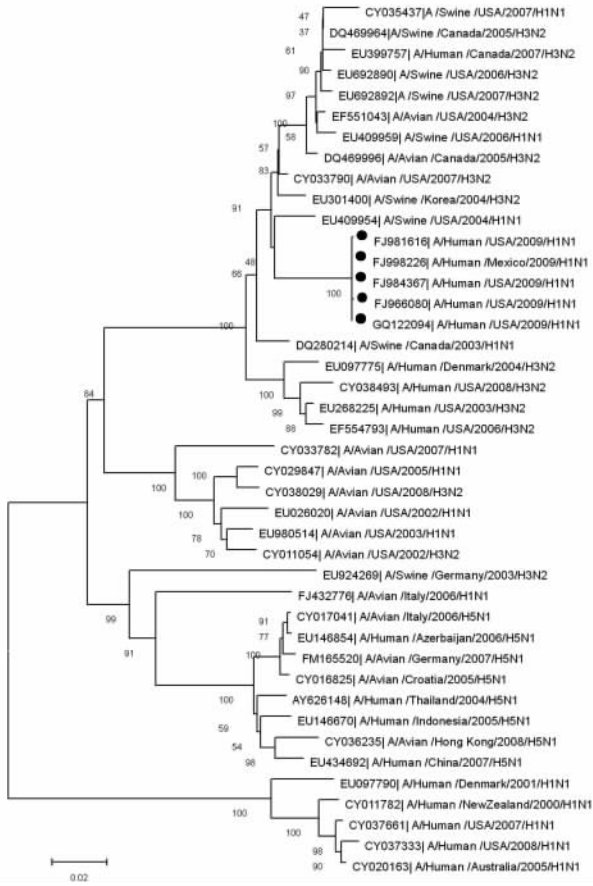


图 2 2009 年新型甲型 H1N1 流感病毒与不同宿主参考序列 PB1 基因进化树

Fig 2 Phylogenetic tree of the PB1 genes of 2009 novel A/H1N1 virus and reference sequences of different hosts

●:PB1 genes of novel A/H1N1 of the outbreak in 2009

2.3 不同年代人甲型 H1N1 流感病毒聚合酶基因进化分析 结果(图 4、图 5、图 6)发现:不同年代分离的人甲型 H1N1 流感病毒呈逐渐进化方式,2009 年新型甲型 H1N1 流感病毒 PA、PB1、PB2 基因与 2005 年美国分离的人 A/H1N1 病毒基因(A/Iowa/CEID23/2005/H1N1)均在进化上最接近。

2.4 流感病毒聚合酶 PB2 基因编码蛋白氨基酸序

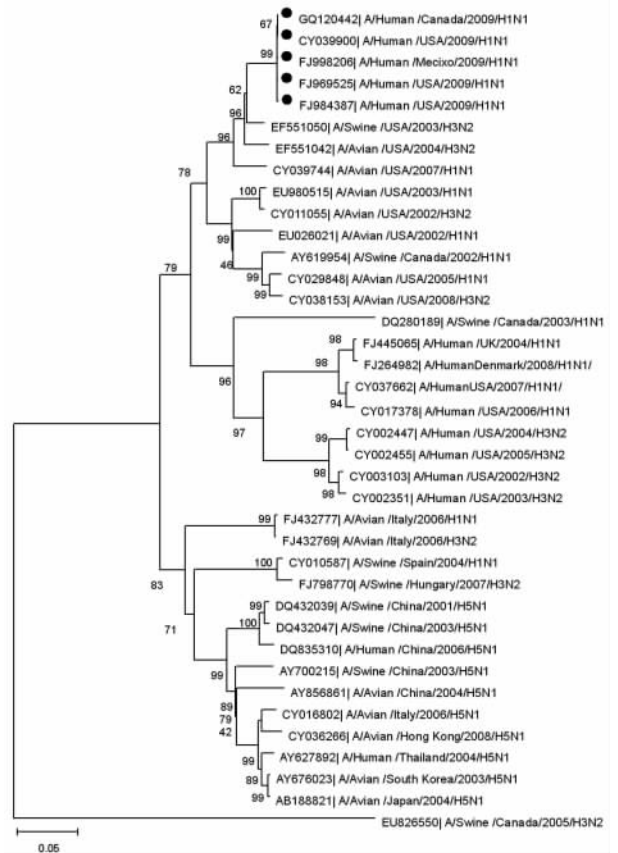


图 3 2009 年新型甲型 H1N1 流感病毒与不同宿主参考序列 PB2 基因进化树

Fig 3 Phylogenetic tree of the PB2 genes of 2009 novel A/H1N1 virus and reference sequences of different hosts

●:PB2 genes of novel A/H1N1 of the outbreak in 2009

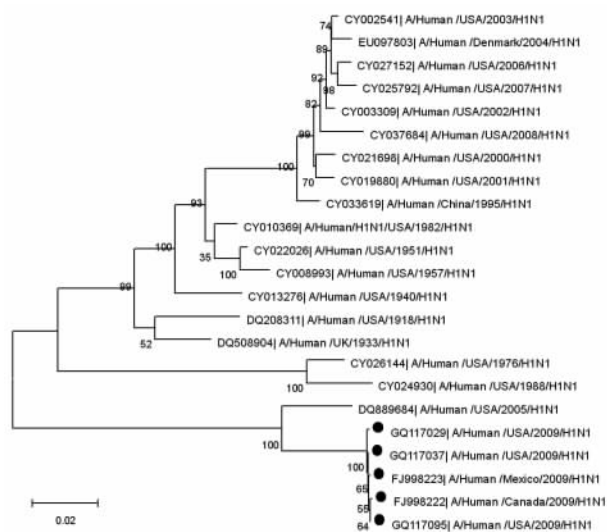


图 4 2009 年新型甲型 H1N1 流感病毒与人 H1N1 流感病毒参考序列 PA 基因进化树

Fig 4 Phylogenetic tree of the PA genes of 2009 novel A/H1N1 virus and reference sequences of human H1N1 influenza viruses

●: PA genes of novel A/H1N1 of the outbreak in 2009

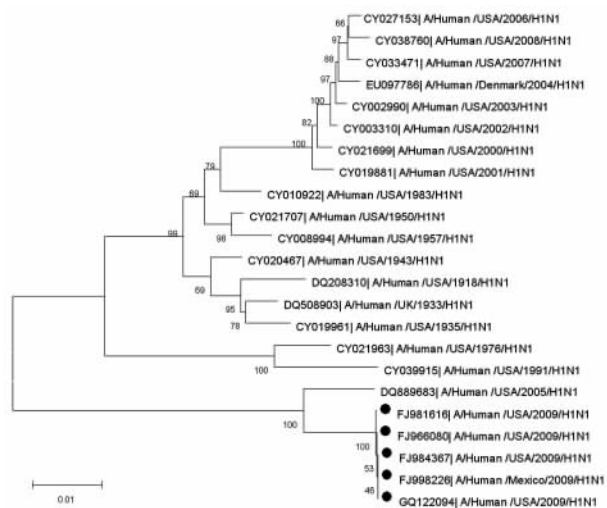


图 5 2009 年新型甲型 H1N1 流感病毒与人 H1N1 流感病毒参考序列 PB1 基因进化树

Fig 5 Phylogenetic tree of the PB1 genes of 2009 novel A/H1N1 virus and reference sequences of human H1N1 influenza viruses

●: PB1 genes of new human A/H1N1 of the outbreak in 2009

3 讨论

本研究结果显示, 2009 年 3 月开始流行的甲型 H1N1 流感病毒是一种新型的流感病毒, 且不同国家来源的 PA、PB1、PB2 基因片段同源性均达 99.9%~100%, 说明此次新型甲型 H1N1 流感病毒来自同一传染源, 且病毒到目前为止还没有发生变异。

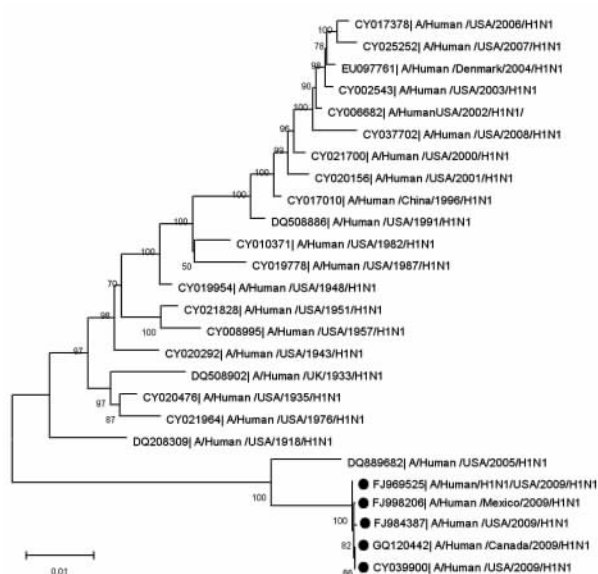


图 6 2009 年新型甲型 H1N1 流感病毒与人 H1N1 流感病毒参考序列 PB2 基因进化树

Fig 6 Phylogenetic tree of the PB2 genes of 2009 novel A/H1N1 virus and reference sequences of human H1N1 influenza viruses

●: PB2 genes of novel A/H1N1 of the outbreak in 2009

表 1 人甲型 H1N1 流感病毒 PB2 蛋白氨基酸序列分析
Tab 1 Amino acid substitutions of the deduced PB2 proteins from A/H1N1 influenza viruses

Viruses	Amino acid position						
	147	199	225	567	590	591	627
Novel H1N1 strains							
FJ98206/Mexico/2009	T	A	G	D	S	R	E
FJ984387/USA/2009	T	A	G	D	S	R	E
FJ969525/USA/2009	T	A	G	D	S	R	E
CY039900/USA/2009	T	A	G	D	S	R	E
GQ120442/Canada/2009	T	A	G	D	S	R	E
Human A/H1N1 references							
DQ208309/USA/1918	I	S	S	N	G	Q	K
CY020476/USA/1935	I	S	S	N	G	Q	K
CY020292/USA/1943	I	S	S	N	G	Q	K
CY019954/USA/1948	I	S	S	N	G	Q	K
CY008995/USA/1957	I	S	S	N	G	Q	K
CY021964/USA/1976	I	S	S	N	G	Q	K
CY010371/USA/1982	I	S	S	N	G	Q	K
CY019778/USA/1987	I	S	S	N	G	Q	K
DQ508886/USA/1991	I	S	S	N	G	Q	K
CY021700/USA/2000	I	S	S	N	G	Q	K
CY006682/USA/2002	I	S	S	N	G	Q	K
CY002543/USA/2003	I	S	S	N	G	Q	K
EU097761/Denmark/2004	I	S	S	N	G	Q	K
DQ889682/USA/2005	T	A	G	D	S	R	E
CY017378/USA/2006	I	S	S	N	G	Q	K
CY037702/USA/2008	I	S	S	N	G	Q	K

A: Alanine; D: Aspartic acid; E: Glutamic acid; G: Glycine; I: Isoleucine; K: Lysine; Q: Glutamine; R: Arginine; S: Serine; T: Threonine; N: Asparagine

流感病毒聚合酶基因进化分析结果显示,2009年新型甲型 H1N1 流感病毒 PA、PB1 和 PB2 聚合酶编码基因均与猪流感病毒接近,提示可能来源于猪流感病毒。Olsen 等^[11]报道,自 2005 年 1 月以来加拿大猪中已经分离出了 H3N2 流感病毒,除具有显著的人源 NA 基因外,这些病毒是与 1998 年美国猪群中出现相似的人/经典猪/禽流感病毒的重组株。猪可能作为流感病毒的中间宿主及病毒基因重组“混合器”在流感流行中发挥重要作用^[12]。基因进化结果还发现,PA、PB1 和 PB2 聚合酶编码基因均与 2005 年美国爱荷华州分离得到的人 A/H1N1 病毒基因(A/Iowa/CEID23/2005/H1N1)具有高度的相似性,且两者 PB2 基因编码蛋白第 147、199、225、567、590、591、627 位氨基酸相同,而 A/Iowa/CEID23/2005/H1N1 毒株是从美国爱荷华州 1 名养猪工人身上分离得到的^[13]。结果提示 2009 年新型甲型 H1N1 流感病毒聚合酶基因可能来源于 2005 年美国爱荷华州的 A/H1N1 病毒,且可能具备猪传人的能力。

流感病毒 PB2 基因编码蛋白氨基酸序列分析结果表明,2009 年新型甲型 H1N1 流感病毒 PB2 蛋白第 147、199、225、567、590、591、627 位氨基酸与不同年代人 A/H1N1 参考序列有明显差异,其第 627 位氨基酸是谷氨酸,不同于通常人 A/H1N1 的赖氨酸,与禽流感病毒一致^[14]。结果提示禽流感病毒可能参与了此次流感病毒的基因重排。

流感病毒聚合酶较为稳定,不像表面抗原 HA 和 NA 那样容易发生变异。因此,对流感病毒 RNA 聚合酶的结构和功能进行深入研究,找出其关键结构域和酶活性位点及其他功能位点,有利于开发出高效、低毒、不良反应小的破坏酶结构或抑制酶活性的新型的抗流感病毒新药,有效地防制流感流行。

[参考文献]

- [1] Wright P F, Webster R G. Orthomyxoviruses[M]//Knipe D M, Howley P M, Griffin D E, Lamb R A, Martin M A, Roizman B, et al. Field's virology. 2th Edition. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 2001: 1533-1579.
- [2] Nicholson K G, Wood J M, Zambon M. Influenza[J]. Lancet, 2003, 362: 1733-1745.
- [3] Cyranoski D. Snapshot: trouble in paradise[J]. Nature, 2007, 448: 738.
- [4] Pariani E, Amendola A, Zappa A, Bianchi S, Colzani D, Anselmi G, et al. Molecular characterization of influenza viruses circulating in Northern Italy during two seasons (2005/2006 and 2006/2007) of low influenza activity[J]. J Med Virol, 2008, 80: 1984-1991.
- [5] Brownlee G G, Sharps J L. The RNA polymerase of influenza A virus is stabilized by interaction with its viral RNA promoter[J]. J Virol, 2002, 76: 7103-7113.
- [6] Perales B, Sanz-Ezquerro J J, Gastaminza P, Ortega J, Santarén J F, Ortín J, et al. The replication activity of influenza virus polymerase is linked to the capacity of the PA subunit to induce proteolysis[J]. J Virol, 2000, 74: 1307-1312.
- [7] Stropkovská A, Mucha V, Fislóvá T, Gocník M, Kostolanský F, Varecková E. Broadly cross-reactive monoclonal antibodies against HA2 glycopeptide of influenza A virus hemagglutinin of H3 subtype reduce replication of influenza A viruses of human and avian origin[J]. Acta Virol, 2009, 53: 15-20.
- [8] Subbarao E K, London W, Murphy B R. A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range[J]. J Virol, 1993, 67: 1761-1764.
- [9] National Center for Biotechnology Information. Newest 2009 H1N1 Flu Outbreak sequences. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/Flu/Database/select>
- [10] 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]
- [11] Olsen C W, Karasin A I, Carman S, Li Y, Bastien N, Ojkie D, et al. Triple reassortant H3N2 influenza A viruses, Canada, 2005[J]. Emerg Infect Dis, 2006, 12: 1132-1135.
- [12] Ito T, Couceiro J N, Kelm S, Baum L G, Krauss S, Castrucci M R, et al. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential[J]. J Virol, 1998, 72: 7367-7373.
- [13] Gray G C, McCarthy T, Capuano A W, Setterquist S F, Olsen C W, Alavanja M C. Swine workers and swine influenza virus infections[J]. Emerg Infect Dis, 2007, 13: 1871-1878.
- [14] Naffakh N, Massin P, Eseriou N, Crescenzo-Chaigne B, van der Werf S. Genetic analysis of the compatibility between polymerase proteins from human and avian strains of influenza A viruses[J]. J Gen Virol, 2000, 81(Pt 5): 1283-1291.

[本文编辑] 贾泽军