

甲型 H1N1 流感病毒神经氨酸酶基因遗传进化分析

田 疆^{1,2}, 周经姣^{1,2}, 陈艺韵³, 梁 瑜^{1,2}, 晏辉钧^{1,2}, 周俊梅^{1,2}, 刘岩^{1,2}, 付春云^{1,2},
高洪丽^{1,2}, 方丹云^{1,2}, 狄 飏^{3*}, 江丽芳^{1,2*}

(1. 中山大学中山医学院微生物教研室, 广东 广州 510080; 2. 广东省重大传染病预防和控制技术研究中心,
广东 广州 510080; 3. 广州市疾病预防控制中心, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】了解季节性 H1N1 流感病毒与 2009 年新型 H1N1 流感病毒神经氨酸酶(NA)基因的遗传进化关系,探讨甲型 H1N1 流感病毒的遗传变异规律。【方法】分别从 2006 年和 2009 年流感病人标本中分离并鉴定出季节性 H1N1 流感病毒和新型 H1N1 流感病毒,用 RT-PCR 技术扩增了病毒 NA 基因全序列,并对其分子进化和重要功能位点的遗传变异进行了分析。【结果】2009 年新型 H1N1 流感病毒与 2006 年季节性 H1N1 流感病毒比较,NA 基因的同源性较低(77.9% ~ 78.8%),与世界各地不同年代代表株及 WHO 推荐的 1979 ~ 2010 年季节性流感疫苗株比较,NA 基因的同源性也较低(78.1% ~ 79.3%),但与 WHO 推荐的 2009 年新型 H1N1 流感疫苗株比较同源性则高达 99% 以上;系统进化分析结果表明,2009 年新型 H1N1 流感病毒 NA 基因与欧亚猪流感病毒株 A/swine/Belgium/1/1983 的亲缘关系最近;并发现自 2005 年以来季节性 H1N1 流感病毒 NA 基因的某些抗原位点和神经氨酸酶活性位点已发生了变异。【结论】2009 年新型 H1N1 流感病毒 NA 基因可能来源于欧亚猪流感病毒;接种季节性流感疫苗不能对本次流行的新型流感产生有效的免疫保护作用;季节性 H1N1 流感病毒在流行过程中 NA 基因已发生了一定的变异,有必要持续跟踪和监测病毒的变异情况。

关键词: 甲型 H1N1 流感病毒; 神经氨酸酶基因; 遗传进化

中图分类号: R373.13 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2010)02-0207-06

Genetic Evolution of Neuraminidase Gene of Influenza A/H1N1 Virus

TIAN Jiang^{1,2}, ZHOU Jing-jiao^{1,2}, CHEN Yi-yun³, LIANG Yu^{1,2}, YAN Hui-jun^{1,2}, ZHOU Jun-mei^{1,2},
LIU Yan^{1,2}, FU Chun-yun^{1,2}, GAO Hong-li^{1,2}, FANG Dan-yun^{1,2}, DI Biao^{3*}, JIANG Li-fang^{1,2*}

(1. Department of Microbiology, Zhongshan Medical College, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;
2. Guangdong Provincial Research Center for Severe Infectious Disease, Guangzhou 510080, China;
3. Center for Diseases Control and Prevention of Guangzhou, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 This study was designed to investigate the genetic evolution of the neuraminidase (NA) gene of seasonal A/H1N1 and 2009 novel A/H1N1 influenza virus, and discuss the genetic variation of influenza A virus. 【Methods】 The virus strains were separately isolated from the clinical samples collected in 2006 and 2009, and then identified as seasonal A/H1N1 and novel A/H1N1. The full length of the NA gene of these strains was amplified by RT-PCR. Then the genetic evolution and mutations of important functional sites were analyzed. 【Results】 The homology of NA gene between the 2009 novel A/H1N1 isolates and 2006 seasonal A/H1N1 isolates was low (77.9% ~ 78.8%), so was the homology of NA gene between the 2009 novel A/H1N1 isolates and representative strains of different periods and 1979-2001 WHO recommended vaccine strains (78.1% ~ 79.3%). But compared with the WHO recommended vaccine strains of 2009 novel A/H1N1, the homology reached more than 99%. The genetic evolution analysis revealed that NA gene of 2009 novel A/H1N1 had the closest genetic relationship with the swine influenza A virus (A/swine/Belgium/1/1983) from Eurasian lineage, and some of the antigenic sites and neuraminidase active sites of NA gene of seasonal A/H1N1 were mutated after 2005. 【Conclusion】 The NA gene of 2009 novel A/H1N1 may

收稿日期: 2009-11-05

资助项目: 广东省科技计划项目(2009B020600001)

作者简介: 田疆, 博士研究生, 从事分子病毒学研究, E-mail: michael_t@163.com; * 通信作者: 江丽芳, 教授, 博士生导师, E-mail: jianglf909@yahoo.com.cn; 狄飏, 副主任医师, E-mail: biao65di@yahoo.com

originate from Eurasian lineage of swine influenza virus. The variation of NA gene of seasonal A/H1N1 has occurred in a certain degree. Hence, it is very necessary to continuously monitor the variant of influenza A virus.

Key words: influenza A/H1N1 virus; neuraminidase gene; genetic evolution

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(2): 207-212]

流行性感(influenza)简称流感,是由人流感病毒引起的危害人类健康的常见急性传染病,分为季节性流感和流感大流行两种流行类型。每年的季节性流感可以对世界上 10% ~ 20%的人口造成影响,300 ~ 500 万严重病例,25 ~ 50 万人死亡^[1]。流感大流行则可在短时间内使所有人群受影响,20 世纪曾发生过 3 次流感世界性大流行,其中 1918 年“西班牙流感”大流行,造成了全球 2 000 万 ~ 5 000 万人死亡^[2]。2009 年 4 月,从墨西哥开始爆发的新型 H1N1 流感在短时间内席卷全球,成为自 1968 年亚洲流感以来的又一次世界性流感大流行。历史上每一次流感大流行都是流感病毒抗原性变异形成新亚型的结果。神经氨酸酶(neuraminidase, NA)是流感病毒的主要表面抗原之一,可发生持续不断的变异,在新亚型形成过程中起重要作用。因此,了解 NA 基因在流行过程中的分子进化特点,掌握 NA 基因的遗传变异规律,对流感的病原学监测具有重要意义。

1 材料与方

1.1 病毒的分离培养与鉴定

1.1.1 病毒的分离培养 2006 年季节性流感病

毒由广州市疾病预防控制中心提供,2009 年新型 H1N1 流感病毒的分离培养在中山大学生物安全 III 级实验室(BSL-3)内用 MDCK 细胞培养。方法见全国流感/人禽流感监测实施方案(2005-2010 年度)。

1.1.2 病毒的鉴定 季节性 H1N1 流感病毒用血凝抑制试验以及 RT-PCR 的方法进行鉴定,具体方法见本课题组已发表的文章^[3]。2009 年新型 H1N1 流感病毒用 real-time RT-PCR 的方法进行鉴定,所用试剂盒由达安基因公司提供,反应条件是:50 °C 15 min,1 个循环;94 °C 15 min,1 个循环;94 °C 15 s,58 °C 45 s(收集荧光),40 个循环。

1.2 NA 基因全长序列引物的设计

季节性 H1N1 流感病毒的引物设计:从 NCBI 流感病毒基因组数据库中下载所有人类 H1N1 亚型流感病毒的 NA 基因全长序列,用 Clustal X 软件进行排列,找到基因两端的保守序列,再综合相关文献^[4],设计出可扩增 NA 基因全长的引物对,正向引物 5'-AGCAAAAGCAGGAGTTTAAAATGAA-3',反向引物 5'-AGTAGAAACAAGGAGTTTTTTT GAA-3'。2009 年新型 H1N1 流感病毒的 NA 基因,则按照 WHO 推荐的引物序列^[5]分段扩增(表 2)。所有引物均由上海英骏生物技术有限公司合成。

表 1 2009 年新型 H1N1 流感病毒 NA 基因扩增引物

Table 1 Primers used for amplification of the NA gene of 2009 novel A/H1N1 influenza virus

	Forward	Reverse	Expected length (bp)
1	TGTA AACGACGGCCAGTAGCAAAAGCAGGAGT	CAGGAAACAGCTATGACCCTGGACCRGAAATTCC	600
2	TGTA AACGACGGCCAGTTACACAAAAGACAAYAGC	CAGGAAACAGCTATGACCGGCCATCGGTCATTATG	422
3	TGTA AACGACGGCCAGTGCTCAGCAAGCCATGYCATGA	CAGGAAACAGCTATGACCCATATYTGATGAAAACC	527
4	TGTA AACGACGGCCAGTAATGRCARGCCTCRTACAA	CAGGAAACAGCTATGACCGCTGCTYCCRCTAGTCCAGAT	620
5	TGTA AACGACGGCCAGTTAGGATACATCTGCAGTGG	CAGGAAACAGCTATGACCAGTAGAAACAAGGAG	511

1.3 全长 NA 基因的扩增、克隆和序列测定

用 PCR 法扩增全长 NA 基因,反应条件为 95 °C 3 min,95 °C 30 s,42 °C 30 s,72 °C 1 min 40 s,28 个循环后,72 °C 7 min。扩增产物纯化后与 pGEM-T easy Vector System I (Promega)连接,再

转化到 *E.coli* DH-5 α 感受态细胞,建立 T-A 克隆。用 PCR 法和酶切法确定阳性克隆,最后由上海英骏生物技术有限公司进行测序。将测序结果拼接出 NA 基因的全长序列,利用 DNASTar 软件包的 EditSeq 确定 ORF 并推导出氨基酸序列,将序列结

果提交到 GenBank。

1.4 序列分析

将本研究分离到的毒株与 WHO 推荐的 1979–2010 年 H1N1 流感病毒疫苗株^[6]、1957 年以前部分 H1N1 亚型代表株(表 2)、猪流感病毒代表株和人感染猪流感病毒分离株的 NA 基因进行基因同源性比较,并进行遗传进化分析,构建系统进化树。

表 2 H1N1 流感病毒疫苗株和国际代表株

Table 2 The vaccine strains and international representative stains of H1N1 influenza virus

Strain name	Protein sequence	Years of vaccine strain
	accession	
A/Brevig Mission/1/1918	AAF77036	-
A/Puerto Rico/8/1934	ABD77678	-
A/Weiss/1943	AAF77045	-
A/Fort Monmouth/1/1947	ABD77810	-
A/Denver/1/1957	ABD15262	-
A/USSR/90/1977	ABF21333	1978 N-1980 S
A/Brazil/11/1978	ABO38068	1980 N-1984 S
A/Chile/1/1983	ABO38343	1984 N-1987 S
A/Singapore/6/1986	ABO38398	1987 N-1997 S
A/Bayern/7/1995	CAD57264	1997 N-1998 S
A/Beijing/262/1995	ACF41870	1998 N-2000 N
A/New Caledonia/20/1999	ABF21328	2000 S-2007 S
A/Solomon Islands/3/2006	ABU99068	2007 N-2008 S
A/Brisbane/59/2007	ACA28847	2008 N-2010 N
A/California/7/2009	ACP41952	2010 S

N: Northern Hemisphere; S: Southern Hemisphere

利用 NCBI 流感病毒基因组数据库中的“Multiple Alignment”功能,将本研究分离到的毒株与前述的疫苗株、代表株和 2005–2009 年世界各地具有全长序列且序列非一致的人 H1N1 流感病毒的 NA 基因全长氨基酸序列进行比对,然后对重要功能位点进行分析。

2 结 果

2.1 病毒分离培养结果

本研究共分离出 2006 年季节性 H1N1 流感病毒 23 株,2009 年新型 H1N1 流感病毒 5 株。

2.2 NA 基因 RT-PCR 扩增结果

从 2006 年 H1N1 分离株中按每个爆发点挑选一株的原则,共挑选了 7 株病毒(A/GZ/1561/

2006、A/GZ/1684/2006、A/GZ/483/2006、A/GZ/506/2006、A/GZ/555/2006、A/GZ/657/2006、A/GZ/665/2006),加上 5 株 2009 年新型 H1N1 分离株(A/GZSB/01/2009、A/GD/02/2009、A/GD/03/2009、A/GD/05/2009、A/GD/56/2009)进行全长 NA 基因扩增,扩增出的目的条带均与预期长度相符(图 1)。

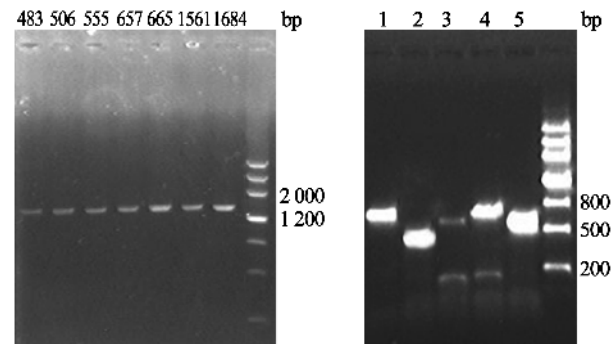


图 1 RT-PCR 扩增 NA 基因

Fig.1 The amplification of NA gene using RT-PCR

A: 7 selected strains of 2006 seasonal influenza A/H1N1; B: 1 of 5 selected strains of 2009 Novel A/H1N1; The NA gene was amplified in 5 pieces.

2.3 H1N1 流感病毒 NA 基因测序结果分析

2006 年 H1N1 分离株 NA 基因序列长度均为 1 462 bp, 编码 470 个氨基酸, 序列已提交给 GenBank, 登录号为 EU382988 ~ EU382994。2009 年新型 H1N1 流感病毒分离株 NA 基因序列长度均为 1 458 bp, 编码 469 个氨基酸。与 2006 年 H1N1 流感病毒比较,2009 年新型 H1N1 流感病毒 NA 编码区有 3 个连续碱基的缺失,导致编码的 NA 蛋白在第 436 位缺失 1 个氨基酸。

在 2006 年 H1N1 分离株中,年初分离的 2 株病毒(A/GZ/1561/2006 和 A/GZ/1684/2006)之间同源性较高;6 月份以后分离的 5 株病毒(A/GZ/483/2006、A/GZ/506/2006、A/GZ/555/2006、A/GZ/657/2006、A/GZ/665/2006)之间同源性也较高,但年初分离株和 6 月份以后分离株之间的同源性较低。2009 年新型 H1N1 分离株与 2006 年 H1N1 分离株之间的同源性很低,但 2009 年分离株相互之间的同源性高达 99% 以上(表 2)。

2.4 与疫苗株和代表株的同源性分析结果

选取本研究分离的 A/GZ/1561/2006、A/GZ/555/2006 和 A/GD/56/2009 为代表与 1998 ~ 2010

表 2 A/GZ/1561/2006, A/GZ/555/2006, A/GD/56/2009 NA 基因与各年代分离株以及疫苗株的同源性比较
Table 2 The analyses of NA nucleotide(NT) and amino acid (AA)homology of A/GZ/1561/2006, A/GZ/555/2006, A/GD/56/2009 and isolates from different period

	GZ/1561/06		GZ/555/06		GD/56/09	
	NT %	AA %	NT %	AA %	NT %	AA %
GZ/1561/06	100	100	98.4	96.8	78.1	80.6
GZ/555/06	98.4	96.8	100	100	77.9	80.8
BM/1/18	85.8	86.6	85.2	85.7	83.1	87.2
PR/8/34	87.0	88.5	86.4	87.4	80.9	83.5
Weiss/43	87.6	87.0	87.2	86.6	80.6	82.5
New Jersey/8/76	81.0	80.6	81.1	81.0	79.8	82.3
USSR/90/77	90.8	91.1	90.2	89.8	80.6	83.4
Beijing/262/95	96.1	96.8	95.3	95.7	79.1	81.4
NC/20/99	97.9	97.7	97.2	96.6	79.2	81.4
SI/3/06	97.7	96.7	97.1	95.6	78.0	80.7
Brisbane/59/07	98.6	97.6	97.9	96.6	78.2	80.9
Iowa/CEID23/05	79.4	80.6	79.4	80.6	79.9	81.9
SW/Iowa/15/30	84.5	84.9	84.1	84.4	84.1	87.6
SW/Belgium/1/83	79.3	84.2	79.3	84.0	92.1	92.5
Thailand/271/05	78.4	80.8	77.9	80.8	90.4	92.5
California/07/09	78.5	80.8	78.4	81.0	99.6	99.8
GD/56/09	78.1	80.6	77.9	80.8	100	100

GZ: Guangzhou; GD: Guangdong; BM: Brevig Mission; PR: Puerto Rico; FM: Fort Monmouth; NC: New Caledonia; SI: Solomon Islands; SW: swine; NT: Nucleotide; AA: Amino acid

年 H1N1 流感病毒疫苗株、2009 年新型 H1N1 疫苗株(A/California/07/2009)、人流感病毒代表株以及猪流感病毒代表株进行比较,结果见表 2。

2.5 系统进化分析

NA 基因有 3 个分支:人源分支、北美猪(古典猪)源分支、欧亚猪源分支。2006 年 H1N1 分离株与各年代 H1N1 代表株和疫苗株属于人源分支。2009 年新型 H1N1 与目前在世界各地流行的新型 H1N1 流感病毒一样,属于欧亚猪源分支。

2.6 抗原位点的变异

2005 年后,季节性 H1N1 流感病毒的 NA 蛋白在第 329、332、344 位有较大改变。第 329 位,2007 年上半年之前的毒株主要为 Lys(lysine,赖氨酸),而从 2007 年下半年开始则变为以 Glu(glutamic acid,谷氨酸)为主。第 332 位,2005 年的多数毒株为 Lys,2006 年 Lys→Glu 变异株明显增多(本研究分离的 2006 年的毒株均为 Glu),到 2007 年下半年

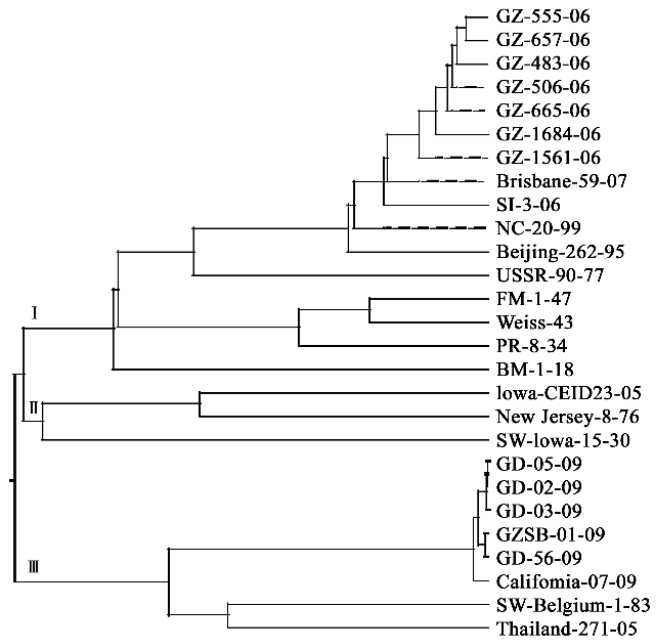


图 2 H1N1 流感病毒 NA 基因的系统进化分析
Fig.2 The phylogenetic analysis of NA gene of Influenza A/H1N1

I : Human lineage; II : classical swine (North American) lineage; III : Eurasian swine lineage

GZ: Guangzhou; GD: Guangdong; BM: Brevig Mission; PR: Puerto Rico; FM: Fort Monmouth; NC: New Caledonia; SI: Solomon Islands; SW: swine

则以 Glu 为主。第 344 位,2005 ~ 2007 年上半年的绝大部分毒株都为 Asp(aspartic acid,天冬氨酸),偶见 Asn(asparagine,天冬酰胺),例如本研究分离的 2006 年的季节性流感病毒中有 2 株为 Asp,另 5 株则为 Asn,从 2007 年下半年开始变为以 Asn 为主。

另外还发现在 338 位多数毒株为 Val(valine,缬氨酸),而在 2006-2007 年曾出现相当数量的 Val→Met (methionine, 甲硫氨酸) 变异株,但在 2008 年后这种变异株基本消失。在 367 位多数毒株为 Leu(leucine,亮氨酸),但从 2006 年开始出现 Leu→Ile(isoleucine,异亮氨酸)变异株,如本研究在 2006 年分离的毒株中就有 5 株是 Leu→Ile 变异株,并且 2007 年后这种变异株仍在不断增多。

2009 年新型 H1N1 流感病毒与季节性流感病毒相比,在多个抗原区存在多个位点的差异,但与 1947 年以前的代表株,特别是 A/Brevig Mission/1/1918,有更多相似的抗原位点。

2.7 神经氨酸酶活性位点和潜在糖基化位点的变异

所有 15 个神经氨酸酶活性位点中,除了 275

表 3 NA 基因的抗原位点变异

Table 3 The amino acid mutations in the NA antigenic sites

Site residue	2		3		4					5			6	7	
	200	329	331	332	336	339	340	341	344	365	366	367	396	432	434
GZ/555/06	N	K	G	E	N	T	V	D	N	N	R	I	I	R	N
GZ/1561/06	N	K	G	E	N	T	V	D	D	N	R	L	I	R	N
GD/56/09	N	N	K	T	G	S	S	N	N	I	S	S	I	K	N
BM/1/18	N	N	G	T	G	S	S	N	N	T	S	S	I	K	N
PR/8/34	N	E	G	T	G	Y	V	D	N	H	S	S	M	K	K
Weiss/43	D	K	G	K	G	Y	V	D	N	D	S	S	M	K	K
FM/1/47	D	K	G	K	G	N	V	D	D	N	S	S	V	K	N
Denver/57	D	K	G	K	D	N	V	D	D	N	S	S	M	R	K
USSR/90/77	D	K	G	K	D	N	V	D	D	N	S	S	M	R	K
Brazil/11/78	D	K	G	K	D	N	V	D	D	N	S	S	M	R	K
Chile/1/83	D	K	G	K	D	T	V	D	D	N	S	S	M	R	G
Singapore/6/86	D	K	G	K	D	T	V	D	D	N	S	S	M	R	N
Bayern/7/95	N	K	G	E	N	T	V	D	D	N	R	L	I	R	N
Beijing/262/95	N	K	G	E	N	T	V	D	D	N	R	L	I	R	N
NC/20/99	N	K	G	E	N	T	V	D	D	N	R	L	I	R	N
SI/3/06	N	K	G	E	N	T	V	D	D	N	R	L	I	R	N
Brisbane /59/07	N	E	G	E	N	T	V	D	D	N	R	L	I	R	N
California/7/09	N	N	K	T	G	S	S	N	N	I	S	S	I	K	N

For the high amino acid similarities of the strains isolated in 2006 and of the strains isolated in 2009, we just choose GZ /555/06 and GZ/1561/06 to be the representatives of 2006 seasonal A/H1N1, and GD/56/09 to be the representatives of 2009 Novel A/H1N1.

GZ: Guangzhou; GD: Guangdong; BM: Brevig Mission; PR: Puerto Rico; FM: Fort Monmouth; NC: New Caledonia; SI: Solomon Islands

位(N1 中;N2 中为 274 位)外,其余均保守。季节性 H1N1 流感病毒中,275 位在 2006 年末开始出现 His→Tyr 变异株,此后变异株不断增多,并在 2008 年后成为优势株。在 2009 年新型 H1N1 流感病毒中,该位点仍然为 His。

2005 年以后的季节性流感病毒,糖基化位点稳定在 9 个,分别位于第 44、58、63、70、88、146、235、434 和 455 位。与之相比,1983 年以前的代表株和 2009 年新型 H1N1 流感病毒没有第 70、434 位糖基化位点,而增加了第 68 位糖基化位点。在 1918-1947 年的代表株和 2009 新型 H1N1 流感病毒无 455 位糖基化位点。

3 讨 论

近年来,H1N1 亚型流行有增多的趋势,仅 2006 年广州市就发生了 13 起由 H1N1 引起的流感爆发事件^[3],2009 年又爆发了由新型 H1N1 流感病毒引起的世界流感大流行。基因分析结果显

示,季节性 H1N1 流行病毒在流行过程中 NA 基因不断发生变异,特别是 2005 年以后变异位点增多,变异速度加快,2006 年年初和 6 月份以后分离株核苷酸同源性只有 98.4%。系统进化分析结果表明,世界各地不同时期的 H1N1 代表株和本研究分离的 7 株 2006 年 H1N1 流行株 NA 基因均属于人源分支,而 5 株 2009 新 H1N1 流感病毒则属于欧亚猪源分支,在进化树上相距甚远,说明它们的来源不同。

2005-2009 年季节性 H1N1 流感病毒的 NA 基因有多个抗原位点发生变异,其中有 3 个抗原位点变异明显,这些变异株在 2007 年下半年以后流行突然增多,并迅速成为优势株。这种多个抗原位点的变异,从分子生物学角度支持了 WHO 将 2008-2009 年的流感病毒疫苗株由 A/Solomon Islands/3/2006 改为 A/Brisbane/59/2007 的必要性,并提示必须加强季节性流感病原学监测,及时掌握病毒的变异情况。

NA 基因的神经氨酸酶活性位点的变异会导

致酶活性的改变甚至丧失^[9]。本研究发现在季节性 H1N1 流感病毒 275 位发生了 H→Y 变异,有研究发现,该变异会使神经氨酸酶活性下降 70%~80%,产生活性的最佳 pH 值从 5.5~6.5 下降至 5.0^[10]。另据报道,1957 年和 1968 年两次流感世界性大流行的分离株在 pH 值低于 4.5 时仍有活性,而在爆发前后的毒株却不具备这一特性^[11-12],从推测这一特征可能是造成这两次流感大流行的重要因素^[13]。此外,NA 蛋白也是神经氨酸酶抑制剂类抗病毒药物如奥塞米韦(Oseltamivir)和扎那米韦(Zanamivir)的作用靶点。在体外实验中发现,具有 275 位 His→Tyr 变异的 H1N1 亚型病毒株对奥塞米韦的敏感度大大降低,但对扎那米韦的敏感性没有影响^[14]。

2009 年新型 H1N1 流感病毒的 NA 基因在抗原位点、神经氨酸酶活性位点和潜在糖基化位点都与季节性 H1N1 流感病毒有很大的差别,反而与 1947 年前的毒株有较多的相同位点。这可能是 2009 年新型 H1N1 流感大流行在年龄偏大的人群中发病率较低和接种过季节性流感疫苗的人群没能产生有效的保护力的原因之一。

综上所述,季节性 H1N1 流感病毒在流行的过程中不断发生变异,近年来变异速度有加快的趋势,特别是在一些重要功能位点发生了明显变异,提示了对病毒的变异进行密切的跟踪和监测的必要性。2009 年新型 H1N1 流感病毒的 NA 基因属于欧亚猪源分支,与季节性 H1N1 流感病毒的进化关系较远,另外在很多功能位点上二者也存在非常大的差异,这对新 H1N1 流感的防治有一定的指导意义。

参考文献:

- [1] World Health Organization. Prevention and control of influenza pandemics and annual epidemics (agenda item 14.14) [C/OL]. Fifty-Sixth World Health Assembly, (2003-05-28)[2008-09-10]. http://apps.who.int/gb/archive/pdf_files/WHA56/ea5623.pdf
- [2] Taubenberger JK, Morens DM. 1918 influenza: the mother of all pandemics [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2006, 12(1): 15-22.
- [3] 方丹云,田疆,周经姣,等.广州市 A 型流感病毒血凝素基因的遗传变异研究[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2009, 30(5): 492-496.
- [4] Hoffmann E, Stech J, Guan Y, et al. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses [J]. *Ach Virol*, 2001, 146(12): 2275-2289.
- [5] World Health Organization. Sequencing primers and protocol [C/OL], Pandemic (H1N1) 2009 guidance documents.(2009-05-12)[2009-05-18]. http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/GenomePrimers_2009_0512.pdf.
- [6] World Health Organization. World Health Organization Recommendations for Composition of Influenza Vaccines [EB/OL]. Influenza Research Database. <http://www.fludb.org/brc/vaccineRecommend.do?decorator=influenza>
- [7] Komadina N, Roque V, Thawatsupha P, et al. Genetic analysis of two influenza A (H1) swine viruses isolated from humans in Thailand and the Philippines [J]. *Virus Genes*, 2007, 35(2): 161-165.
- [8] Gray GC, McCarthy T, Capuano AW, et al. Swine workers and swine influenza virus infections [J]. *Emerg Infect Dis*, 2007, 13 (12): 1871-1878.
- [9] 金奇. 医学分子病毒学 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 633-657.
- [10] Lentz MR, Webster RG, Air GM. Site-Directed Mutation of the Active Site of Influenza Neuraminidase and Implications for the Catalytic Mechanism [J]. *Biochemistry*, 1987, 26 (17): 5351-5358.
- [11] Takahashi T, Suzuki T, Hidari KIP, et al. A molecular mechanism for the low-pH stability of sialidase activity of influenza A virus N2 neuraminidases [J]. *FEBS Letters*, 2003, 543 (1-3): 71-75.
- [12] Suzuki T, Takahashi T, Saito T, et al. Evolutional analysis of human influenza A virus N2 neuraminidase genes based on the transition of the low-pH stability of sialidase activity [J]. *FEBS Letters*, 2004, 557(1-3): 228-232.
- [13] 李向忠,方芳,陈则. 流感病毒神经氨酸酶不同区域的作用 [J]. *生命科学研究*, 2005, 9(2): 55-61.
- [14] Hurta AC, Ernest J, Deng YM, et al. Emergence and spread of oseltamivir-resistant A (H1N1) influenza viruses in Oceania, South East Asia and South Africa [J]. *Antivir Res*, 2009, 83 (1): 90-93.

(编辑 孙慧兰)