

文章编号: 1671-8836(2007)06-0717-06

一株 H5N1 亚型禽流感毒的分离 鉴定与基因组序列分析

寇 铮^{1,2}, 李永东², 雷富民³, 周艳红¹, 陈绳亮², 李天宪²

(1. 华中科技大学 生命科学与技术学院/湖北生物信息与分子成像重点实验室, 湖北武汉 430074;

2. 中国科学院 武汉病毒研究所/病毒学国家重点实验室, 湖北武汉 430071;

3. 中国科学院 动物研究所, 北京 100080)

摘要: 对一株于 2005 年从浙江省分离获得的禽流感病毒株(A/Chicken/Zhejiang/24/2005)进行了鉴定、全基因组序列测定、分析和致病性研究。经血凝抑制试验和神经氨酸酶抑制试验证实,此分离病毒株为 H5N1 亚型。对该毒株的全基因组序列测定和分析显示,HA 蛋白在 HA1 和 HA2 连接处,含有连续多碱性氨基酸模体(-RRKKR-)。进化分析结果表明,A/Chicken/Zhejiang/24/2005(H5N1)7 个基因来源于 2004~2005 年湖南地区流行株,但 PB1 基因来源于未知野禽毒株。动物实验结果显示,Ck/ZJ/24/05 对鸡和鸭均具有高致病性,对小鼠无致病性,与 HA 的序列特征相符合。

关键词: 禽流感病毒; H5N1 亚型; 基因组; 致病性

中图分类号: R 373.1 **文献标识码:** A

0 引言

自 2003 年以来,亚洲国家持续爆发高致病性禽流感疫情,病原体为高致病性 H5N1 亚型禽流感病毒^[1,2]。作为动物疫源性疾病,H5N1 亚型禽流感可以跨越宿主屏障,感染人群,持续威胁公共卫生^[3,4]。同时,H5N1 亚型禽流感病毒长期在亚洲不同地区流行,导致在局部地理范围内产生了特定的流感进化株^[5]。2005 年,青海湖迁徙水禽大规模感染 H5N1 亚型禽流感病毒的事实^[6,7],表明高致病性禽流感病毒能在野禽种群中传播,并对其他野生动物和公共卫生构成持续性潜在威胁。目前,多种基因型的 H5N1 亚型病毒从家禽和野禽中被分离得到,预示了病毒基因在野禽的病毒基因库与各个地理范围的病毒基因库之间频繁流动,并通过基因重排而产生新的基因型^[2]。病毒基因的多样性导致了禽流感病毒具有感染哺乳动物的能力^[1],同时,可产生具有潜在感染能力的大流行毒株^[5]。

2005 年,浙江省某县出现高致病性禽流感疫

情,并从病死鸡的组织中分离得到一株高致病性禽流感病毒 A/Chicken/Zhejiang/24/2005(H5N1)(Ck/ZJ/24/05)。通过对分离病毒株进行生物学鉴定、全基因组序列测定、分析和致病性研究,初步揭示了禽流感病毒株 A/Chicken/Zhejiang/24/2005(H5N1)的分子特性及其致病性,为研究我国禽流感病毒的遗传、进化和流行规律,以及禽流感疫苗的研制提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

采集病鸡肺组织用于病毒分离;无特定病原(specific pathogen free,SPF)鸡胚和 SPF 雏鸡购自北京梅里亚维通试验动物技术有限公司;SPF BALB/c 小鼠购自湖北省实验动物中心;夹心 ELISA 禽流感病毒抗原诊断试剂盒由华中农业大学动物医学院提供。

1.2 病毒的分离与鉴定

采集病鸡肺脏组织,置液氮保存。组织样品经研

收稿日期: 2007-08-24 - 通讯联系人. E-mail: litx@wh.iov.cn

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973)项目(2005CB523007,2005CB523004 和 2006BAD06A01)

作者简介: 寇 铮(1979),男,博士生,现从事生物信息学与分子病毒学研究. E-mail: magic@wh.iov.cn

磨后, 4 °C, 6 000 r/min 离心 5 min, 吸取上清液, 加入双抗(青霉素 40 000 U/mL, 庆大霉素 8 000 U/mL), 4 °C, 6~12 h. 接种 9~11 日龄的 SPF 鸡胚, 37 °C 培养, 弃去 24 h 内死亡鸡胚, 收获 24~96 h 死亡鸡胚尿囊液, 置-20 °C 保存备用.

取 100 μ L 尿囊液于酶标板孔内, 其余操作步骤按照试剂盒说明书进行. 检测禽流感抗原, OD_{450nm} \geq 0.2 判为阳性, OD_{450nm} < 0.2 判为阴性. 血凝抑制试验(hemagglutination inhibition test, HI)和神经氨酸酶抑制试验(neuraminidase inhibition test, NI)被用来鉴定毒株亚型, 其中系列抗体购置于中国兽药监测所. 操作均在 BSL-2 实验室中进行.

1.3 病毒纯化与电镜观察

取病毒尿囊液 100 μ L, 4 °C, 6 000 r/min 离心 30 min, 取上清再于 4 °C, 30 000 r/min 离心 2 h 后, 弃上清, 用少量 PBS 悬浮沉淀, 4 °C 过夜. 病毒悬液

再经蔗糖密度梯度(20%、30%、40%、50%、60%), 4 °C, 110 000 r/min 离心 2 h, 于 30%~40% 的蔗糖区带可见明显乳白色带, 收集该区带, 加入适量的 0.01 mol/L PBS, 洗涤, 4 °C, 110 000 r/min 离心 2 h, 用少量 PBS 悬浮沉淀, 即为纯化的病毒. 将此病毒用 2% 磷钨酸负染后经透射电子显微镜观察病毒大小及形态.

1.4 病毒 RNA 提取及序列测定

取鸡胚尿囊液 100 μ L, 按 Trizol 试剂说明书提取病毒总 RNA. 禽流感病毒基因组 8 个基因片段的核酸序列具有如下特点: 在 5' 端和 3' 端分别含有由 13 和 12 个核苷酸组成的高度保守区. 根据这一特点, 以 3' 端的保守区设计反转录通用引物为 5'-AG-CAAAAGCAGG-3'. 参考 Hoffmann 等^[8] 报道的通用引物, 设计 8 对上游和下游引物(表 1), 由北京奥科生物公司合成.

表 1 流感基因组片段 PCR 扩增通用引物

基因片段	上游引物	下游引物
PB2	5'-TATTGGTCTCAGGGAGCGA AAGCAGGTG-3'	5'-ATATGGTCTCGTATTAGTAGA AAC AAGGTCGTTT-3'
PB1	5'-TATTCGTCTCAGGGAGCGAAAAGCAGGCA-3'	5'-ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAAACAAGGCATTT-3'
PA	5'-TATTCGTCTCAGGGAGCGAAAAGCAGGTAG-3'	5'-ATATGGTCTCGTATTAGTAGA AAC AAGGTA CTT-3'
HA	5'-TATTGGTCTCAGGGAGCGA AAGCAGGGG-3'	5'-ATATGGTCTCGTATTAGTAGA AAC AAGGGTGT TTT-3'
NP	5'-TATTCGTCTCAGGGAGCGAAAAGCAGGGTA-3'	5'-ATATGGTCTCGTATTAGTAGA AAC AAGGGTAT TTTT-3'
NA	5'-TATTCGTCTCAGGGAGCGAAAAGCAGGAGT-3'	5'-ATATGGTCTCGTATTAGTAGA AAC AAGGAGTT TTTT-3'
M	5'-TATTGGTCTCAGGGAGCGA AAGCAGGTAG-3'	5'-ATATGGTCTCGTATTAGTAGA AAC AAGGTAG TTTT-3'
NS	5'-TATTGGTCTCAGGGAGCGA AAGCAGGGTG-3'	5'-ATATGGTCTCGTATTAGTAGA AAC AAGGGTGT TTT-3'

注: PB2: polymerase basic protein 2, 碱性聚合酶蛋白 2; PB1: polymerase basic protein 1, 碱性聚合酶蛋白 1; PA: polymerase acid protein, 酸性聚合酶蛋白; HA: hemagglutinin protein, 血凝素蛋白; NP: nucleocapsid protein, 核蛋白; NA: Neuraminidase protein, 神经氨酸酶蛋白; M: Matrix protein, 基质蛋白; NS: nonstructural protein, 非结构蛋白

取 5 μ L RNA, 加入 10 μ mol/L 通用引物. 70 °C 加热 5 min, 冰浴 5 min; 然后加入 5 \times buffer 4 μ L, 10 mmol/L dNTP 1 μ L, RNasin 1 μ L, AMV 逆转录酶 0.5 μ L, DEPC 水 3.5 μ L, 混匀, 37 °C 水浴 60 min; 95 °C 加热 5 min 后置于-20 °C 保存备用.

于 PCR 反应管中加入以下试剂: 第一链 cDNA 2 μ L, 上游引物(100 nmol/L) 1 μ L, 下游引物(100 nmol/L) 1 μ L, 10 mmol/L dNTP 混合物 1 μ L, 10 \times buffer 5 μ L, LA Taq 0.5 μ L, H₂O 39.5 μ L, 共 50 μ L. 反应条件为 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 20 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 共 30 个循环, 最后 72 °C, 7 min.

RT-PCR 产物按常规方法进行琼脂糖电泳, 并纯化. 在 ABI PRISM 370 DNA 测序仪上, 采用 Amersham ET Dye Terminator Kit (Amersham Pharmacia Bio) 进行测序. 序列测定的引物可在 [http://](http://www.genomics.org.cn/AI/index.jsp)

www.genomics.org.cn/AI/index.jsp 获得.

使用 BioEdit 7.0.5.2 编辑所有的序列, 用 Clustal X 1.8 进行多序列比对. 利用 MEGA 3.1 中的 Neighbor-Joining 算法构建进化树, 并进行 1 000 次 Bootstrap 验证. 所有序列提交 GenBank 数据库, 注册号为: DQ520841, DQ520843, DQ520845, DQ520847, DQ520849, DQ520851, DQ520853, DQ520855.

1.5 动物实验

按照世界动物卫生组织(OIE)标准, 选择鸡、鸭和小鼠作为感染对象. 鸡和鸭组: 毒株分别感染 8 只 6 周龄的 SPF 雏鸡和雏鸭, 将各毒株尿囊液分别用无菌 PBS 作 1:10 稀释, 静脉接种, 0.2 mL/只, 观察 10 d. 小鼠组: 毒株分别感染 10 只雌性 SPF BALB/c 小鼠, 滴鼻感染, 50 μ L/只, 观察 14 d. 接种病毒滴度为 5.8 (\log_{10} EID₅₀/mL). 同时设立对照

组, 分别以同等剂量、途径接种无菌 PBS. 试验组和对照组各组均隔离饲养, 每天观察接种动物的发病情况和死亡数目. 实验均在 BSL-2 实验室中进行.

2 结果与分析

2.1 病毒分离与鉴定

经血清学鉴定, 从组织样本中分离出来的一株禽流感毒株(Ck/ZJ/24/05)为 H5N1 亚型禽流感病毒. 纯化后的病毒经电镜观察, 可见有囊膜的病毒粒子, 直径在 80~120 nm 之间(图 1).

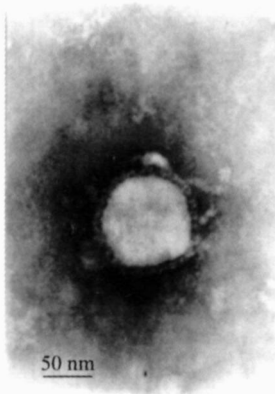


图 1 分离株 Ck/ZJ/24/05 的电镜照片

2.2 序列特征

对分离株(Ck/ZJ/24/05)的 8 个基因片段测序, 经 BLAST 分析显示, HA 基因和 NA 基因与已知 H5N1 毒株相应基因相似性为 99%. PB1 基因与 A/Chicken/Hongkong/31.4/2002(H5N1) PB1 基因相似性最高, 为 90%. 其余内部蛋白基因与已知 H5N1 毒株(A/Chicken/Hunan/999/2005(H5N1) 和 A/Chicken/Hunan/303/2005(H5N1)) 相似性为 97%~99%. 序列相似性分析显示, Ck/ZJ/24/05 来源于湖南分离株(表 2).

基于各个基因的核苷酸序列, 推导出蛋白序列. 经分析可知, HA 蛋白在 HA1 和 HA2 连接处, 含有连续多碱性氨基酸模体(-RRKKR-). Ha 等^[9]报道该模体是高致病性禽流感的特征序列. 与细胞表面受体结合的氨基酸残基与 Ha 等^[9]报道的氨基酸残基一致, 这说明 Ck/ZJ/24/05 可与具有 2, 3-NeuAcGal 键的细胞受体结合. 在 NA 蛋白分子的颈部缺失了 20 个氨基酸, 这个缺失存在于大多数 H5N1 亚型人源和禽源分离株中, Pilaipan 等^[10]报道此缺失有利于禽流感病毒在家禽中传播.

Ck/ZJ/24/05 的 M2 蛋白在穿膜区不具有 4 个

表 2 分离株 Ck/ZJ/24/05 与其他毒株的核酸序列相似性

基因片段	最高相似性毒株	相似性 / %
PB2	A/Chicken/Hunan/999/2005(H5N1)	99
PB1	A/Chicken/Hongkong/31.4/2002(H5N1)	90
PA	A/Chicken/Hunan/999/2005(H5N1)	97
HA	A/Chicken/Hunan/999/2005(H5N1)	99
NP	A/Chicken/Hunan/303/2005(H5N1)	99
NA	A/Chicken/Hunan/999/2005(H5N1)	99
M1	A/Chicken/Hunan/303/2005(H5N1)	99
NS1	A/Chicken/Hunan/999/2005(H5N1)	99

点突变(Ser31, Leu26, Val27, and Ala30). Suzuki 等^[11]报道这 4 个点突变与流感病毒的金刚烷抗药性相关. 在 NS1 蛋白中不具有一个 5 氨基酸残基(aa80~84)的缺失和一个点突变(Glu92). 在 PB2 蛋白中不存在 Lys627 的突变. Hatta 等^[12]报道 PB2 蛋白 627 位点突变与 H5N1 亚型病毒在小鼠中适应性相关. Ck/ZJ/24/05 的 NS1 蛋白的 N 端存在一个 PDZ 结构域受体(ESEV-COOH). Obenauer 等^[13]报道该受体在病毒复制密切相关的信号通路中起重要作用.

2.3 进化分析

根据进化分析的结果(图 2), Ck/ZJ/24/05 与其他 H5N1 亚型毒株的 HA 基因都来源于 Gs/GD/96, 并分散于一个大的进化分支, HA 存在一个单支来源的进化模式. 此外, Ck/ZJ/24/05 的 HA 基因与 Ck/HN/999/05 和 Dk/HN303/04 最为接近, 进化距离最短(Bootstrap 值>90%). 这个结果暗示其来源于湖南 H5N1 亚型分离株. NA 基因的分析结果与 HA 基因相似(图 2, NA 结果类似, 未显示). 内部蛋白基因 M1、PB2、PA、NP、NS1 的进化分析结果与 HA 和 NA 基因的结果基本一致, 即 Ck/ZJ/24/05 与 Ck/HN/999/05 和 Dk/HN303/04 在进化树中最为接近, 进化距离最短(图 2, PB2、PA、NP、NS1 结果类似, 未显示). 这 7 个基因的进化分析结果与序列相似性分析结果相符合.

PB1 的分析结果与其他 7 个基因不同(图 2). 在 PB1 基因的进化树上, Ck/ZJ/24/05 形成了一个单独的分支, 推断该基因来源于未知野禽毒株. 根据

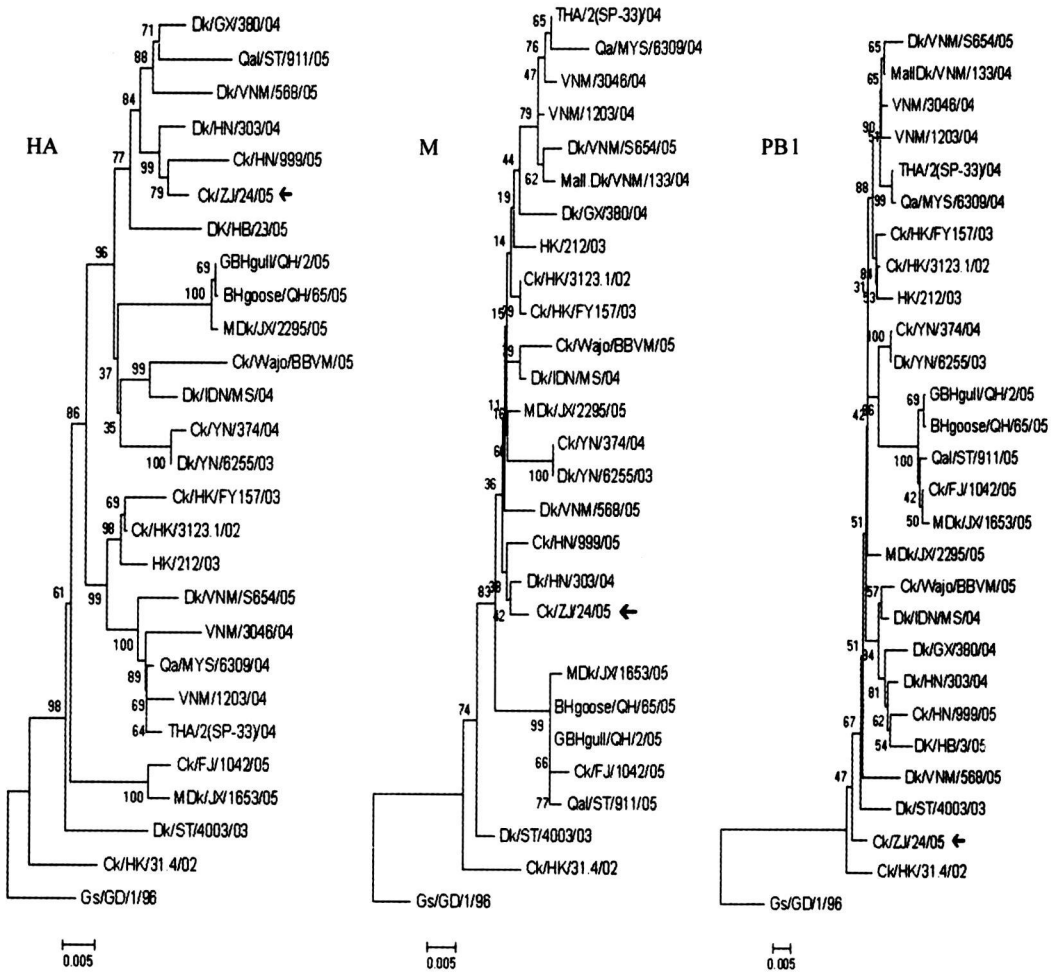


图 2 HA、M 和 PB1 基因的进化分析

8 个基因进化关系的分析结果, Ck/ZJ/24/05 来源于 04~05 年湖南流行株 (Ck/HN/999/05, Dk/HN303/04), PB1 基因片段发生了重排, 来源于野禽. 进化分析结果与相似性分析结果一致.

2.4 动物实验结果

Ck/ZJ/24/05 分离株的尿囊液分别感染鸡、鸭

表 3 动物实验结果

毒株	接种滴度/ $\log_{10} \text{EID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$	禽类感染 死亡数目/接种数目 (死亡天数)		小鼠感染		
		鸡	鸭	死亡数目/ 接种数目	肺中滴度/ $\log_{10} \text{EID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$	脑中滴度/ $\log_{10} \text{EID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$
					0/10	1.8
Ck/ZJ/24/05	5.8	8/8 (4~9)	6/8 (3~7)	0/10	1.8	0

3 讨论

根据两个外部蛋白, 血凝素蛋白 (HA) 和神经氨酸酶 (NA) 的抗原特性, A 型流感病毒分为 16 个 HA 亚型和 9 个 NA 亚型. 水禽被看作流感病毒的自然存储库, 携带各种亚型毒株. 高致病性禽流感因

和小鼠, 考察其致病性, 结果显示 (表 3), 该病毒株能引起感染鸡 100% 死亡. 感染鸭的死亡率为 75.0%. 但不引起感染小鼠死亡, 仅在小鼠的肺脏检测到较低的病毒滴度. 表明 Ck/ZJ/24/05 对鸡和鸭均具有高致病性, 对小鼠无致病性, 与 HA 的分子序列特征相符合.

其传播快、危害大, 被 OIE 定为必须报告的法定传染病之一, 我国将其列为一类动物疫病. 高致病性禽流感能引起家禽的快速死亡, 最高达到 100% 的死亡率. 从 2003 年以来, 亚洲国家持续爆发高致病性禽流感疫情, 病源为 H5N1 亚型. 作为动物源性疾病, H5N1 亚型禽流感可以跨越宿主屏障, 感染人群, 持续威胁公共卫生^[4].

2005年,浙江省某县出现高致病性禽流感疫情.从病死鸡的肺组织中,分离得到一株高致病性 H5N1 亚型禽流感病毒(A/Chicken/Zhejiang/24/2005).其 HA 蛋白在 HA1 和 HA2 连接处,含有连续多碱性氨基酸模体(—RRKKR—).细胞表面受体结合的氨基酸残基位点(aa 91, 130~134, 149, 151, 179, 186, 190, 191, 220~225)与 Gs/Gd/1/96 一致.一个 20 氨基酸的缺失存在于 NA 蛋白分子的颈部.动物实验显示 Ck/ZJ/24/05 对鸡和鸭均具有高致病性,对小鼠无致病性,与 HA 的分子序列特征相符合.该病毒 8 个基因的进化关系分析结果显示,Ck/ZJ/24/05 来源于 2004~2005 年湖南流行株(Ck/HN/999/05, Dk/HN303/04),但是, PB1 基因来源于未知野禽,发生了重排.进化分析结果与相似性分析结果类似.

大量证据显示,病毒基因的多样性导致了禽流感病毒具有感染哺乳动物的能力^[15].通过隐藏在迁徙野禽病毒库和本地家禽病毒库中不同基因型基因的流动和重排,潜在的大流行毒株可能被引发产生^[16~20].浙江与湖南在地理上相互临近,从序列分析的结果得知,Ck/ZJ/24/05 来源于 2004~2005 年湖南流行株, PB1 基因片段与来源于野禽的基因片段发生了重排^[1,17,21].因此,在禽流感的防治工作中,需要加强对流感和禽流感的流行病学和实验室检测,密切关注禽流感病毒的变异以及对人类可能产生的威胁,也应高度重视水禽中各亚型 AIV 隐性带毒的情况^[21~23].

参考文献:

- [1] Li K S, Guan Y, Wang J, *et al.* Genesis of a Highly Pathogenic and Potentially Pandemic H5N1 Influenza Virus in Eastern Asia[J]. *Nature*, 2004, **430**: 209-213.
- [2] Guan Y, Peiris J S A, Lipatov S, *et al.* Emergence of Multiple Genotypes of H5N1 Avian Influenza Viruses in Hong Kong SAR[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 8950-8955.
- [3] Subbarao K A, Klimov A, Katz J, *et al.* Characterization of an Avian Influenza A (H5N1) Virus Isolated from a Child with a Fatal Respiratory Illness[J]. *Science*, 1998, **279**: 393-396.
- [4] Claas E, Osterhaus A D, van Beek R, *et al.* Human Influenza A H5N1 Virus Related to a Highly Pathogenic Avian Influenza Virus[J]. *Lancet*, 1998, **351**: 472-477.
- [5] Webster R G, Bean W J, Gorman O T, *et al.* Evolution and Ecology of Influenza A Viruses[J]. *Microbiological Reviews*, 1992, **56**: 152-179.
- [6] Chen H, Smith G J D, Zhang S Y, *et al.* H5N1 Virus Outbreak in Migratory Waterfowl[J]. *Nature*, 2005, **436**: 191-192.
- [7] Liu J H, Xiao H X, Lei F M, *et al.* Highly Pathogenic H5N1 Influenza Virus Infection in Migratory Birds[J]. *Science*, 2005, **309**: 1206.
- [8] Hoffmann E, Stech J, Guan Y, *et al.* Universal Primer Set for the Full-Length Amplification of All Influenza A Viruses[J]. *Arch Virol*, 2001, **146**: 2275-2289.
- [9] Ha Y, Stevens D J, Skehel J J, *et al.* X-Ray Structures of H5 Avian and H9 Swine Influenza Virus Hemagglutinins Bound to Avian and Human Receptor Analogs[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 11181-11186.
- [10] Pilaipan P A, Prasert C C, Pakapak S, *et al.* Molecular Characterization of the Complete Genome of Human Influenza H5N1 Virus Isolates from Thailand[J]. *J Gen Virol*, 2005, **86**: 423-433.
- [11] Suzuki H, Saito R, Masuda H, *et al.* Emergence of Amantadine-Resistant Influenza A Viruses: Epidemiological Study[J]. *J Infect Chemother*, 2003, **9**: 195-200.
- [12] Hatta M, Gao P, Halfmann P, *et al.* Molecular Basis for High Virulence of Hong Kong H5N1 Influenza A Viruses[J]. *Science*, 2001, **293**: 1840-1842.
- [13] Obenauer J C, Denson J, Mehta P K, *et al.* Large Scale Sequence Analysis of Avian Influenza Isolates[J]. *Science*, 2006, **17**(311): 1576-1580.
- [14] Guan Y, Poon L L, Cheung C Y, *et al.* H5N1 Influenza: A Protean Pandemic Threat[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(21): 8156-8161.
- [15] Kawaoka Y, Chambers T M, Sladen W L, *et al.* Is the Gene Pool of Influenza Viruses in Shorebirds and Gulls Different from That in Wild Ducks[J]. *Virology*, 1998, **163**: 247-250.
- [16] Zhou N, Senne D, Landgraf J, *et al.* Genetic Reassortment of Avian, Swine, and Human Influenza Viruses in American Pigs[J]. *J Virol*, 1999, **73**: 8851-8856.
- [17] Kou Z, Lei F M, Yu J, *et al.* New Genotype of Avian Influenza H5N1 Viruses Isolated from Tree Sparrows in China[J]. *J Virol*, 2005, **79**: 15460-15466.
- [18] Lin Y P, Shaw M, Gregory V, *et al.* Avian-to-Human Transmission of H9N2 Subtype Influenza A Viruses: Relationship Between H9N2 and H5N1 Human Isolates[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 9654-9658.
- [19] Zhu Q Y, Qin E D, Wang W, *et al.* Fatal Infection with Influenza A (H5N1) Virus in China[J]. *The*

New England Journal of Medicine, 2006, **354**: 2731-2732.

- [20] Fouchier R A, Schneeberger P M, Rozendaal F W, *et al.* Avian Influenza A Virus (H7N7) Associated with Human Conjunctivitis and a Fatal Case of Acute Respiratory Distress Syndrome[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**: 1356-1361.
- [21] Chen H, Smith G J, Li K S, *et al.* Establishment of Multiple Sublineages of H5N1 Influenza Virus in Asia: Implications for Pandemic Control [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**: 2845-2850.
- [22] Kuiken T, Holmes E C, McCauley J, *et al.* Host Species Barriers to Influenza Virus Infections[J]. *Science*, 2006, **312**: 394-397.
- [23] Kuiken T, Leighton F A, Fouchier R A, *et al.* Public health: Pathogen Surveillance in Animals[J]. *Science*, 2005, **309**: 1680-1681.

Isolation and Genome Sequence Analysis of an Avian Influenza H5N1 Subtype Virus

KOU Zheng^{1,2}, LI Yongdong², LEI Fumin³, ZHOU Yanhong¹, CHEN Shengliang², LI Tianxian²

(1. School of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology/

Hubei Bioinformatics and Molecular Imaging Key Laboratory, Wuhan 430074, Hubei, China;

2. Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Science/ State Key Laboratory of Virology, Wuhan 430071, Hubei, China;

3. Institute of Zoology, Chinese Academy of Science, Beijing 100080, China)

Abstract: One avian influenza virus (A/Chicken/Zhejiang/24/2005) was isolated from duck in Zhejiang province in 2005. Based on the serology test, the isolate was H5N1 subtype. The genome sequences were analyzed. The HA gene had a multiple basic amino acids (—RRKKR—) at the connecting peptide between HA1 and HA2. Phylogeny analysis showed that the 7 genes of the isolate originated from Hunan strains (Ck/HN/999/05, Dk/HN303/04) and the PB1 gene originated from that of an unknown avian strain. Based on the animal test, the isolate was highly pathogenic to chicken and duck, but no pathogenic to mouse.

Key words: avian influenza virus; H5N1 subtype; genome; pathogenicity