

2010–2011 年全球季节性 H3N2 流感病毒表面蛋白基因的分子遗传特性分析

罗鹏飞¹ 曹尚¹ 李伟¹ 李亮² 吴斌² 秦圆方² 邓斐² 祁贤^{2*} 卫平民^{1*}

(1. 东南大学 公共卫生学院 江苏 南京 210009)

(2. 江苏省疾病预防控制中心 江苏 南京 210009)

摘 要: 【目的】分析 2010 年 1 月至 2011 年 9 月间全球季节性 H3N2 流感病毒血凝素(Hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(Neuraminidase, NA)基因的演变和分子特征, 为流感病毒的防制提供分子信息依据。【方法】搜集期间季节性 H3N2 流感病毒 HA 和 NA 基因的完整核苷酸序列, 分别绘制两基因编码序列的进化树; 推导出相应的氨基酸序列, 统计不同毒株间氨基酸位点差异并分析重要功能位点的变化。【结果】在 136 条完整的片段 4 和 131 条片段 6 中, 2 条 HA 和 1 条 NA 序列源自猪群流感病毒, 剩余的序列根据进化特征可被分为两群。相比疫苗毒株, 发生在 HA 和 NA 蛋白抗原位点的平均差异数分别为 5.33 和 2.01 个, 3 个毒株分别在 HA 宿主受体结合位点和二硫键及 NA 耐药位点出现突变, 多数毒株的糖基化位点增多。江苏毒株和广东毒株分别属于群 1 和群 2, 且两省毒株间在 HA 蛋白抗原位点的差异数从 7 到 13 个不等。【结论】2010 年 1 月至 2011 年 9 月间的全球季节性 H3N2 病毒主要呈现两种基因进化特征。因抗原性差异对疫苗开发具有指导作用, 而多数毒株的抗原性检测信息仍然未知, 但从抗原位点和糖基化位点的变异情况来看, 多数毒株的抗原性可能已经变化, 为判断是否形成新的流行株, 应开展进一步的抗原性检测; 并且各地区卫生行政部门应根据耐药位点的变化, 制定相应的抗病毒治疗措施。

关键词: H3N2 流感病毒, 血凝素, 神经氨酸酶, 分子特征

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(No. BK2009434); 江苏省医学重点人才基金项目(No. RC2011084)

*通讯作者: 祁贤: Tel: 86-25-83759506; 信箱: qixiansyc@hotmail.com

卫平民: Tel: 86-25-83759337; 信箱: mpw1963@126.com

收稿日期: 2011-11-15; 接受日期: 2012-01-12

Molecular genetic characteristics of surface protein genes of globe seasonal H3N2 influenza virus in 2010–2011

LUO Peng-Fei¹ CAO Shang¹ LI Wei¹ LI Liang² WU Bin² QIN Yuan-Fang²
DENG Fei² QI Xian^{2*} WEI Ping-Min^{1*}

(1. Southeast University, Nanjing, Jiangsu 210009, China)

(2. Jiangsu Provincial CDC, Nanjing, Jiangsu 210009, China)

Abstract: [Objective] The evolutionary tendency and molecular characteristics of both HA (Hemagglutinin) and NA (Neuraminidase) gene of seasonal H3N2 subtype influenza viruses isolated in 2010-2011 were to be determined, and the molecular information made an important part of control and prevention of influenza worldwide. **[Methods]** We collected all nucleotide sequences of segment 4 and 6 that contained complete ORF (Open Reading Frames) of HA and NA gene during Jan-2010 and Sep-2011, phylogenetic trees based on ORF sequences of two genes were constructed. Theoretical amino acid (aa) chains of every sequences were deduced to find out the variation sites referring to vaccine strain, and prevalence of changes in functional positions were analyzed. **[Results]** Among all 267 sequences surveyed, 3 (2 HA and 1 NA) were strains of swine origin, while others could be classified into 2 groups by evolutionary relationships. Compared with vaccine strain, average variation sites on HA and NA antigenic determinant were 5.33 and 2.01, respectively. Sites mutations on RBS (Receptor of Bonding Sites) and HA disulfide as well as NA drug resistant sites were found in 3 different isolates. N-glycosylation sites of HA and NA were increased in most isolates. Besides, variation sites on HA antigenic determinant between isolates from Jiangsu and Guangdong were accounted from 7 to 13. **[Conclusion]** Two kinds of gene evolutionary characteristic were found in recent seasonal H3N2 subtype viruses. Antigenic difference between epidemical strains and vaccine strain are recommended for development of new vaccines, in spite of they were still unknown, the variations on antigenic positions and N-glycosylation sites between each isolates and vaccine strain would probably alter antigenic characteristics of most isolates surveyed, so further antigen detection work is required to be carried; Health administrative departments in different districts must improve the treatment followed drug resistance situation of local epidemical strains.

Keywords: H3N2 subtype influenza virus, Surface protein gene, Evolution, Molecular characteristic

流感病毒属正粘病毒科, 按其核衣壳蛋白 (Nucleocapsid protein, NP) 和基质蛋白 (Matrix protein, M) 基因的不同, 可以分为 A、B、C 三型; 其中 A 型流感可感染人、禽类和多种哺乳动物, 是威胁人类健康的重要病原体, 按其表面蛋白

(血凝素和神经氨酸酶) 的特性, A 型流感可分为 16 个 HA 亚型和 9 个 NA 亚型^[1]。季节性流感病毒(甲型 H1N1、甲型 H3N2 和乙型)在全球范围内广泛发病, 每年能造成大约 25–50 万人死亡^[2]。

流感病毒属负链 RNA 病毒, 其核酸物质呈

现分节段特征。其中甲型流感病毒的核酸由 8 个 (1–8) 片段组成, 分别编码: PB2/PB1/PA (聚合酶蛋白复合体, Polymerase protein complex)、HA、NP、NA、M 和 NS (非结构蛋白, Non-structural protein) 等, 其中片段 4 和片段 6 分别编码的 HA 和 NA 是病毒表面蛋白, 它们在病毒与宿主作用的过程中发挥重要作用, 是流感亚型鉴定和流感疫苗开发的分子基础, 病毒通过表面蛋白基因的活跃变异逃避宿主已有的体液免疫致使流感疫苗毒株需要不断更新^[1]。流感病毒众多亚型中, H3N2 亚型流感病毒在猪群、禽类和人群中均有分布, 其变异最为活跃, 研究显示 H3N2 亚型人流感病毒造成的病例最多^[3]。

NCBI 数据库中包含了全球各地重要的毒株信息, 本研究通过搜集 2010 年 1 月至 2011 年 9 月期间全部的人流感病毒表面蛋白基因全长序列信息, 对该时期全球季节性 H3N2 流感病毒的 HA 与 NA 基因的进化和变异特征进行分析, 为流感病毒的防治提供可靠依据。

1 材料与方法

1.1 材料

目的序列源自 NCBI 的 GenBank 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 毒株分离日期为 2010 年 1 月至 2011 年 9 月间, H3N2 亚型人流感病毒的 HA 和 NA 基因, 含完整编码区的核苷酸序列。

1.2 方法

采用 Bioedit 软件对核苷酸序列(.fasta 格式) 进行整理, 将其导入 MEGA 4 软件进行比对 (ClustalW), 采用 Neighbor-Joining 算法 (Number of differences 模型) 分别绘制 HA 和 NA 基因编码区核苷酸序列的进化树, 对树结构进行 Bootstrap 检验 (Replications=1 000), 并计算不同毒株间核苷酸差异的百分比。在 MEGA 4 中推导出每条序

列的氨基酸序列, 以 WHO 推荐的 2010–2011 年度北半球疫苗毒株 A/Perth/16/2009 (H3N2) 为参考毒株, 计算 HA 和 NA 蛋白抗原决定簇位点的平均差异数, 分析 HA 蛋白受体结合位点、潜在糖基化位点、二硫键及 NA 蛋白酶活性位点和潜在糖基化位点的变化。

2 结果

2.1 基因进化特征分析

参考 A/Perth/16/2009 (H3N2) 的片段 4 和 6 序列, 全部的目的核苷酸序列未发生碱基的插入或缺失。构建基于 HA 和 NA 基因编码序列的进化树 (图 1 和图 2 中的进化树只包含部分毒株, 剔除了一部分相同分离地的同源序列, 因它们在包含全部序列的进化树上处于相同的终末分支上)。

2.1.1 HA 基因进化树: A/Pennsylvania/09/2011 和 A/Indiana/08/2011 的序列在进化树上的位置相对独立, 序列比对 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 表明其与 A/Swine/Illinois/A00907647/2011 等美国猪群 H3N2 病毒序列的相似度均大于 99.2%, 可判断此两株病毒的 HA 基因片段源自猪群 H3N2 病毒。剩余的毒株可分为两群——群 1 (Group 1) 和群 2 (Group 2), 其中群 1 包括疫苗毒株和其他 20 株, 分离于墨西哥(1)、美国(1)、巴西(3)、塞黑(2)、日本(7)、泰国(3) 和中国(3); 另 114 株构成群 2, 分离于澳大利亚(2)、俄罗斯(2)、丹麦(3)、中国(4) 和美洲地区(103)。

2.1.2 NA 基因进化树: NA 基因总进化树显示出和 HA 基因相似的结构。其中, A/Indiana/08/2011 的序列与 A/Swine/Illinois/A00907647/2011 等序列的相似度均大于 99.3%; 剩余的毒株可分为两群: 群 1 包括疫苗毒株 A/Perth/16/2009 在内, 以及其他 18 株分离于墨西哥(1)、美国(1)、瑞典(1)、塞黑(2)、日本(7)、泰国(3) 和中国(3) 的毒株; 另 112 株构成群 2。

2.1.3 群 1 和群 2 的差异: 除去部分只有一个片段序列的毒株, 在 HA 和 NA 进化树中, 群 1 和群 2 所包含的毒株相同。另外, 两群毒株在 HA 基因的核苷酸平均差异情况为: 群 1 内为 0.8%, 群 2 内为 0.6%, 两群间为 1.7%; NA 方面, 群 1 内为 0.7%, 群 2 内为 0.5%, 两群间为 1.8%。

2.2 HA 基因相关位点的变异情况

A/Pennsylvania/09/2011 和 A/Indiana/08/2011 与猪群 H3N2 病毒具有较高的同源性, 同季节性 H3N2 病毒在核苷酸和氨基酸位点上存在大量差异, 以下不再对 2 株猪源流感病毒的基因序列进行分析。

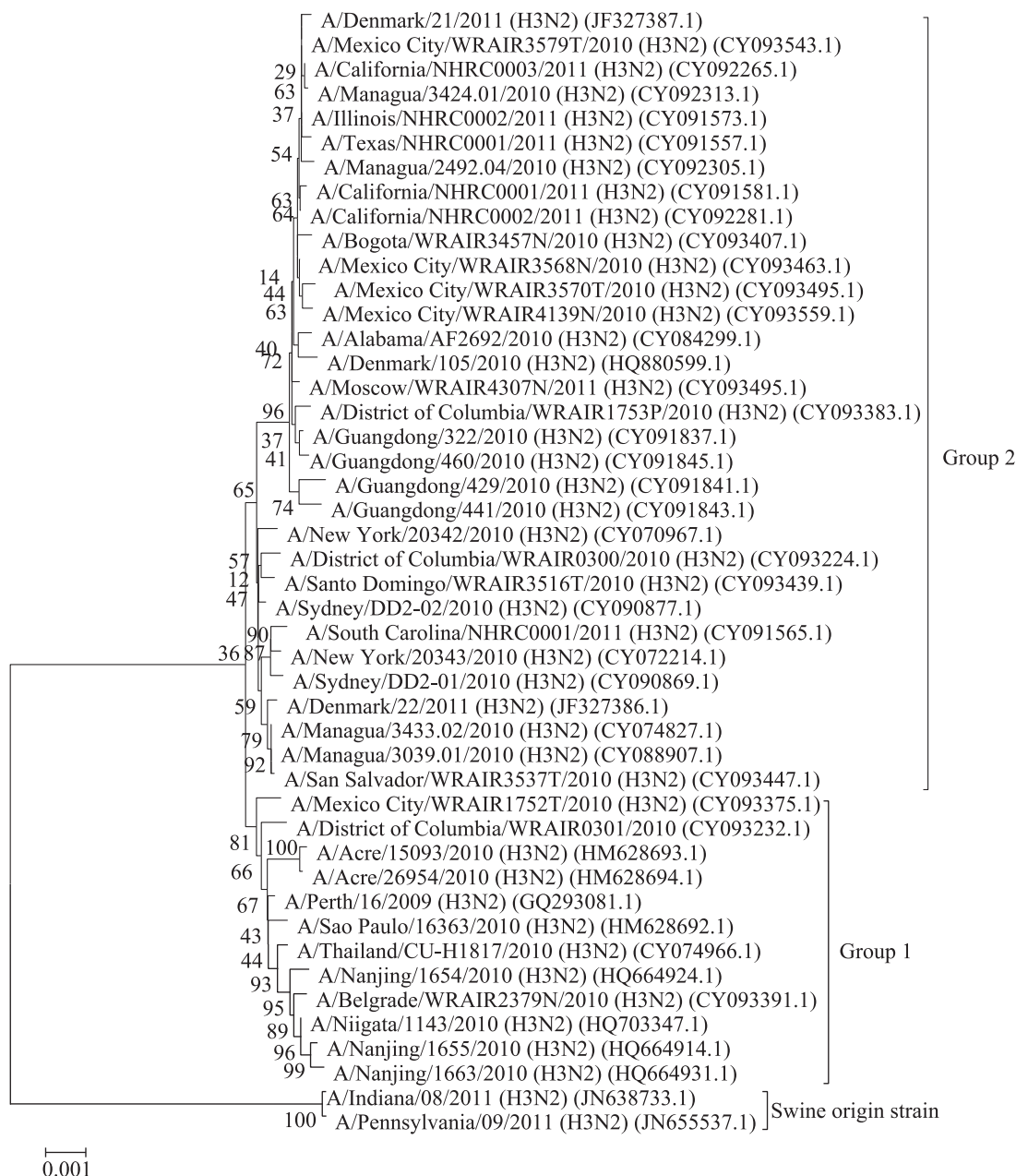


图 1 2010–2011 年间季节性 H3N2 流感病毒主要分离株的 HA 基因进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on HA gene of main seasonal H3N2 influenza isolates in 2010–2011

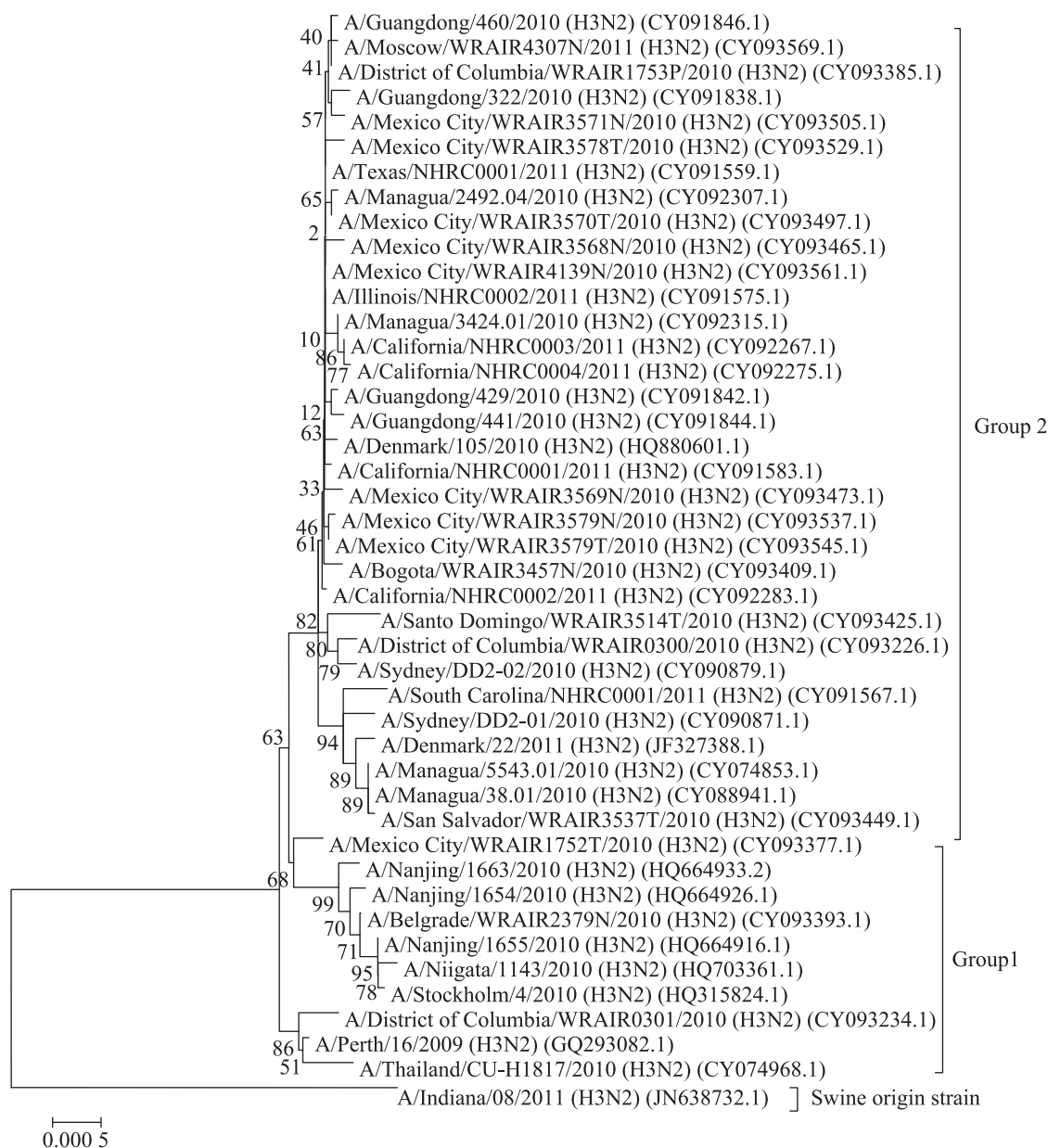


图 2 2010–2011 年间季节性 H3N2 流感病毒主要分离株的 NA 基因进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on NA gene of main seasonal H3N2 influenza isolates in 2010–2011

注: 对同一地区内所分离的同源性较高的序列, 只选取其中一条序列作为代表。图中每行为一个分离株, 包括拉丁名和 GenBank 序列号, 分支处的数字是 Bootstrap 检验的可信度, 图 1 和图 2 标尺值 0.001 和 0.000 5 分别代表单位长度内核苷酸差异水平。

Note: We selected only one from similar isolates that were from the same place as representative for the construction of phylogenetic trees. Each line is one isolate including its Latin Name and GenBank accession number, the numbers in each branch are the credibility of Bootstrap test, ruler values (0.001 and 0.000 5) represent the level of number of difference.

2.2.1 HA 蛋白剪切位点: HA 蛋白被剪切为两个亚基——HA1 (329 aa)和 HA2 (222 aa), 根据所推导的氨基酸序列, 133 株 H3N2 病毒的剪切位点序列均为 PEKQTR↓G, 相比疫苗毒株未发生变异。

2.2.2 HA 蛋白抗原位点: 季节性 H3N2 亚型流感病毒 HA 蛋白的 5 个抗原决定簇全部位于 HA1 亚基上, 包括 A、B、C、D 和 E 共 129 个位点^[4]。一般认为具有代表性的甲型流感病毒新变种要存在一定的抗原性差异, 并在 HA1 区存在 4 个以上的氨基酸变异, 这些氨基酸的变化还必须涉及 2–3 个抗原决定簇。与 WHO 推荐疫苗毒株 A/Perth/16/2009 (H3N2)相比, 131 个毒株在 HA1 存在氨基酸差异的位点累计 48 个, 其中 30 个位于抗原决定簇上(表 1); 统计每个毒株的抗原位点氨基酸差异数目, 发现 A/Thailand/CU-H1285/2010 和 A/Thailand/CU-H1817/2010 (1 个)最少, A/Guangdong/441/2010 (9 个)最多; 131 个毒株的平均差异数为 5.33 个, 群 1 毒株平均 3 个, 而群 2 毒株的平均值(5.63 个)满足了形成新变种 4 个以上的氨基酸变异的要求。

2.2.3 HA 蛋白宿主受体结合位点: 宿主受体结合位点包括 6 个残基(98Y、153W、190E、194 L、183 H 和 155T)组成口袋状的表面, 134–138 残基和 224–228 残基分别形成口袋的右壁和左壁^[5], A/Santo Domingo/WRAIR3516T/2010 发生 A138S 的变异, 可能造成病毒宿主结合位点的空间结构发生变化。

2.2.4 HA 蛋白二硫键: HA1 区第 14 位和 HA2 区第 137 位的半胱氨酸(C)间形成的二硫键, 将 HA1 和 HA2 相连, 以及 HA1 的第 52 与 277、64 与 76、97 与 139、281 与 305 位的半胱氨酸 C 间形成的二硫键^[6]。A/Nanjing/1655/2010 (H3N2)的 C305R 变异, 使得其二硫键数目减少一对。

2.2.5 HA 蛋白潜在糖基化位点: 病毒糖基化位

点的增加或减少对流感病毒的抗原性及其他生物学特性均有一定影响^[7]。疫苗株 A/Perth/16/2009 的 HA 蛋白含 10 个潜在糖基化位点, 分别位于第 8、22、38、63、122、126、133、165、246 和 285 位氨基酸, 表 2 显示, 115 株病毒增加了 2–3 个 HA 蛋白糖基化位点。增加的糖基化位点和可能改变表面蛋白本身的抗原性, 影响宿主细胞对病毒的识别。

2.3 NA 基因相关位点的变异情况

分离毒株 A/Indiana/08/2011 为猪源性, 以下不再对其基因序列进行分析。

2.3.1 NA 蛋白抗原位点: N2 亚型的神经氨酸酶有 7 个抗原决定簇共 34 个氨基酸位点^[8]。参考疫苗毒株的 NA 序列, 127 个毒株在 NA 上的存在氨基酸差异的位点累计为 34 个, 其中 6 个位于抗原决定簇上。在 127 个毒株的抗原位点差异数目中, A/Mexico City/WRAIR3579N/20、A/Mexico City/WRAIR3579T/2010、A/South Carolina/NHRC0001/2011 (3 个)最多, A/District of Columbia/WRAIR0301/2010 和 A/Mexico City/WRAIR1752T/2010 未见位点差异, 127 毒株平均 2.01 个。

2.3.2 NA 蛋白神经氨酸酶活性位点: 包括中心位点和辅助位点: 118R、151D、152R、224R、276E、292R、371R、406Y、119E、156R、178W、179S、198D/N、222I、227E、274H、277E、294N、425E, 神经氨酸酶抑制剂的耐药位点(N)变异包括 292 (R→K)、119 (E→G/A/D/V)、294 (N→S)、151 (D→E)、276 (E→D)会产生病毒对神经氨酸酶的耐药^[9–10]。A/Mexico City/WRAIR3579N/2010 发生 D151N 的变异, 可能产生耐药性。

2.3.3 NA 蛋白潜在糖基化位点: A/Perth/16/2009 的 NA 蛋白上存在 7 个糖基化位点: 第 61、70、86、146、200、234 和 329 位。表 2 显示, 113 株病毒增加了 1–2 个 NA 蛋白糖基化位点。

2.4 HA 和 NA 基因变异位点的稳定性

某些位点差异同时存在于不同地区的分离毒株上, 表明这种差异在病毒与宿主的作用过程中呈现出一定的稳定性, 若发生在抗原位点, 可能成为抗原位点新标志; 若发生在其他位点, 也能作为病毒新的生物标志物。

2.4.1 抗原位点: HA 蛋白方面, 群 1 毒株的第 50、124、214、260 和 262 位与群 2 毒株的第 44、48、53、62、92、94、144、212、213、214、230、280 和 312 位, 两群病毒仅在 214 位的差异相同; NA 蛋白方面, 群 1 中的 342 和 402 位以及群 2 中的 367 和 369 位, 未见两群相同的位点。

表 1 全部毒株在 HA 和 NA 蛋白氨基酸位点差异的位置和频数
Table 1 Positions and frequency of amino acid difference on HA and NA protein

抗原决定簇 Antigenic determinants		差异位点的位置(频数) Positions of difference (frequency)							
HA-A	S124N (4)	V130A (2)	T131A (2)	N133D (1)	A137S (1)	A138S (1)	R142G (1)	K144N (116)	
HA-B	N157K (1)	K188N (1)							
HA-C	S45N (4)	T48A (3)	E50K (9)	D53N (34)	N278K (1)	C305R (1)	N312S (74)		
HA-D	T212A (113)	V213A (2)	S214I (133)	I230V (32)					
HA-E	Q57H (1)	K62E (114)	N81D (2)	L86P (1)	S91R (1)	K92R (3)	Y94H (33)	I260M (11)	S262R/N (3)
Antigenic positions of NA	N342D (12)	H347N (1)	S367N (113)	K369T (113)	R400K (1)	G401S (1)	N402D (13)	T434N (3)	

表 2 毒株在 HA 和 NA 基因上的糖基化位点数目变化
Table 2 Changes of N-glycosylation sites of HA and NA

蛋白 Protein	分离毒株 Isolates	差异位点 Positions of difference	糖基化位点数目 Numbers of N-glycosylation sites
HA	A/District of Columbia/WRAIR0300/2010	T10A, S45N, K144N	12
	A/Acre/15093/2010	N38Y	10
	A/Guangdong/441/2010	S124N, K144N	11
	A/Nanjing1655/2010	S124N	10
	A/Nanjing1663/2010	S124N	10
	A/District of Columbia/WRAIR0301/2010	N133D	10
	A/Denmark/105/2010	E280T, K144N	13
	A/Denmark/22/2011	S45N, K144N	13
	Other 112 isolates	K144N	12
NA	A/Santo Domingo/WRAIR3514T/2010	T148I, S367N, K369T	7
	A/Mexico City/WRAIR3579N/2010	D151N, S367N, K369T	9
	A/District of Columbia/WRAIR0301/2010	S245N	8
	Other 111 isolates	S367N, K369T	8

2.4.2 其他位点: 群 1 中的 P162S/Q 和 R261Q 以及群 2 中的 S199A 比较普遍。其他非抗原位点的差异主要有 Group1 中的 D127N、I307M、L338F/S 和 E381G/K 以及群 2 中的 E41K 和 R430S。

2.5 中国大陆地区分离株的抗原位点差异
江苏(3)和广东(4)毒株分别位于两群中, 表 3 显示, 广东和江苏两地的分离毒株在 HA1 区抗原位点差异数目介于 7-13 个, 构成了毒株间抗原性差异的必要条件。

表 3 中国地区 7 个毒株间抗原位点的差异数 Table 3 Number of antigenic position differences between 7 Chinese isolates							
蛋白 Protein	分离毒株 Isolates	Gd/429	Gd/441	Gd/460	Nj/1654	Nj/1655	Nj/1663
HA	Guangdong/322	1	1	0	7	12	11
	Guangdong/429		2	1	8	13	12
	Guangdong/441			1	8	11	12
	Guangdong/460				7	12	11
	Nanjing/1654					4	4
	Nanjing/1655						2
NA	Guangdong/322	0	0	0	4	4	3
	Guangdong/429		0	0	4	4	3
	Guangdong/441			0	4	4	3
	Guangdong/460				4	4	3
	Nanjing/1654					1	2
	Nanjing/1655						1

3 讨论

猪源毒株 A/Pennsylvania/09/2011 和 A/Indiana/08/2011 在人群中的检出再次提醒我们流感基因监测的重要意义。因甲型 H3N2 流感病毒的宿主有人群、禽类和猪群, 人和禽甲型 H3N2 病毒可以分别与其结合而直接传染给猪^[11], 畜禽养殖为季节性流感病毒在不同宿主中进化提供了必要条件^[12], 病毒在猪群中长期的抗原变异和基因重配使得猪群和人群同时面临着“抗原漂移和抗原转变”威胁^[13], 因此 21 世纪首次 H1N1 流感大流行后, 全球流感病毒防治工作面临新的挑战。
根据进化特征和变异位点分布上呈现出的差别, 我们把所有的人群分离毒株分为群 1 和群 2。初步推断, 包括疫苗毒株的群 1 可能源自 2009 年的 H3N2 流感优势毒株, 经过抗原变异后于 2010

年在以上地区流行, 其他毒株构成的群 2 很可能是新变种, 其来源暂时难以确定; 另外, 群 2 包含了全部 2011 年的监测毒株, 其可能成为北美和中美洲地区今后的优势流行毒株, 同时一些地区没有 2011 年的监测数据, 暂不能确定这些地区未来的优势流行毒株。总之, 分离株的 HA 和 NA 基因都呈现出分化现象, 两群毒株的分离地点都遍布全球各地。在某些较小的范围内, 分离出了群 1 和群 2 两种病毒, 显示混合流行的存在。如哥伦比亚特区和墨西哥城的分离毒株多数属于群 2, 群 1 病毒检出数量相对少, 若群 1 病毒未来在人群中的检出率增加, 两地区内的季节性流感控制工作将会面临更大挑战。
对比疫苗株的 HA 序列, 群 2 毒株抗原位点的平均差异水平满足了形成抗原性差异的条件, 由于缺少病毒抗原性监测资料, 所以对于是否形

成新的流行毒株难以判断。就中国大陆地区的 7 株季节性 H3N2 病毒而言, 一株广东毒株和疫苗毒株间存在 9 个抗原位点差异, 同时广东和江苏两地间毒株 HA 抗原位点差异数目从 7 到 13 个不等, 都满足了毒株间产生抗原性差异的必要条件, 增加抗原性检测结果对判断分离株间 HA 蛋白的抗原特性非常必要。若抗原性差异一旦形成, 我国季节性 H3N2 病毒至少存在两种来源和进化过程, 要求国家流感中心在疫苗的研制和生产上必须做到合理评估, 以增加疫苗应用后的保护效果^[14]。另外, 东亚和东南亚地区在全球 H3N2 流感的流行中占有重要的地位^[3], 中国、日本和泰国流感毒株多数位于群 1, 只有广东 4 株病毒和全球其他地区分离毒株间存在较强的基因关联, 要判断该区域范围内的优势毒株还需要更多的监测样本。

抗病毒治疗能缓解流感患者的症状和促进流感的康复, M2 离子通道阻断剂(金刚烷胺和金刚乙胺)和神经氨酸酶抑制剂(扎那米韦和奥司他韦)是抗病毒治疗的主要药物。就 M2 离子通道阻断剂的耐药情况来讲, 其耐药位点位于 M 基因, 既往研究显示亚洲季节性 H3N2 流感毒株对 M2 阻断剂耐药率已经大于 60%^[15], 金刚烷胺和金刚乙胺已不适用于亚洲地区流感患者; 从本次研究结果推测, 所有毒株对神经氨酸酶抑制剂敏感, 支持了 NA 抑制剂在世界各地患者中的使用。

参 考 文 献

- [1] Baigent SJ, McCauley JW. Influenza type A in humans, mammals and birds: determinants of virus virulence, host-range and interspecies transmission[J]. *BioEssays*, 2003, 25(7): 657–671.
- [2] Russell CA, Jones TC, Barr IG, et al. The global circulation of seasonal influenza A (H₃N₂) viruses[J]. *Science*, 2008, 320(5874): 340–346.
- [3] Rambaut A, Pybus OG, Nelson MI, et al. The genomic and epidemiological dynamics of human influenza A virus[J]. *Nature*, 2008, 453(7195): 615–619.
- [4] Muñoz ET, Deem MW. Epitope analysis for influenza vaccine design[J]. *Vaccine*, 2005, 23(9): 1144–1148.
- [5] 王勇, 薛颖, 陈淑霞, 等. H₃N₂亚型人流行性感冒病毒 HA₁的蛋白序列同源性比较、变异规律及结构与功能的分析[J]. *病毒学报*, 2002, 18(4): 289–296.
- [6] Baker AT, Varghese JN, Laver WG, et al. Three-dimensional structure of neuraminidase of subtype N9 from an avian influenza virus[J]. *Protein: Structure, Function, and Genetics*, 1987, 2(2): 111–117.
- [7] Schulze IT. Effects of glycosylation on the properties and functions of influenza virus hemagglutinin[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 1997, 176(Suppl1): S24–S28.
- [8] 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(S1): 56–61.
- [9] Colman PM, Varghese JN, Laver WG. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase[J]. *Nature*, 1983, 303(5912): 41–44.
- [10] Gubareva LV. Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors[J]. *Virus Research*, 2004, 103(1/2): 199–203.
- [11] Brown IH. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs[J]. *Veterinary Microbiology*, 2000, 74(1/2): 29–46.
- [12] 祁贤, 陆承平. 猪流感病毒进化方式及其流行特点[J]. *微生物学报*, 2009, 49(9): 1138–1145.
- [13] Qi X, Jiao Y, Pan H, et al. Genetic analysis and rescue of a triple-reassortant H₃N₂ influenza A virus isolated from swine in Eastern China[J]. *Virologica Sinica*, 2009, 24(1): 52–58.
- [14] Russell CA, Jones TC, Barr IG, et al. Influenza vaccine strain selection and recent studies on the global migration of seasonal influenza viruses[J]. *Vaccine*, 2008, 26(S4): D31–D34.
- [15] Bright RA, Medina M, Xu XY, et al. Incidence of adamantane resistance among influenza A (H₃N₂) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern[J]. *Lancet*, 2005, 366(9492): 1175–1181.