***病毒系统发育分析***

测序所得的禽流感病毒基因序列数据可以利用系统发育分析的方法和技术路线构建病毒的进化树, 推断其进化历史, 寻找 基因来源或研究病毒之间的亲缘关系、基因交流以及遗传变 异情况。

Ho ffmann 等[ 7] 发现一株 H6N1 禽流感病毒的 6 个内部基因与病毒 A/ H K/ 156/ 97( H 5N1) 相同的片段序列高度相似( > 98% ) , 在进化树上位于同一分枝, 因此认为 H 6N1 禽流 感病毒可能是其遗传供体。另外, 基于基因组序列的系统发育 分析显示, 取自老虎、猫、猪、豹以及人等哺乳动物的 H 5N1 禽流感病毒与取自鸟类和家禽的 H5N1 病毒在亲缘关系上非常接近, 均属于禽流感病毒的范畴[ 8~ 10] 。Krauss 等[ 11] 研究了北 美水鸟体内的禽流感病毒, 并且与取自欧亚的病毒进行了系统发育分析, 结果表明美洲与欧亚的病毒很少发生病毒基因交流。

基因重配( reassortment) 和重组( recombination) 是禽流感病毒两种主要的遗传变异方式[ 12] 。所谓基因重配是指 2 种或多种不同亚型甚至同一亚型的不同基因型( genotype)的流感病毒基因片段的重配, 它是导致流感抗原转换的重要原因。

目前检测禽流感病毒重配, 常规的做法是利用系统发育分析构建进化树, 分别鉴定其基因组 8 个片段的来源, 然后定义一个基因型。与之具有相同基因来源的病毒同属于一个基因型, 来源不同病毒的属于其他基因型。

另外, 利用系统发育分析还可以检测禽流感病毒可能存在的重组。重组涉及核酸分子的断裂及其他核酸分子的再连接。

如上所述, 目前通常采用系统发育分析的方法分析禽流感病毒基因组每个片段的来源, 来确定该病毒是否是重配株。但是该方法依赖于进化树所提供的信息, 受数据本身的影响很大, 有时还受建树方法以及人为因素的影响, 分辨率不高, 重复性也较差。

现在已有多种生物信息学方法可以检测基因是否存在重组, 如 RDP2 [ 23] 、GENECONV [ 24] 和 Siscan [25] 等。由于算法之间的差异, 单纯地采用上述算法检测的结果往往不一致, 断点 ( breakpo int) 不同, 甚至出现假阳性的结果。

***病毒分子特征及蛋白分型分析***

将禽流感病毒基因序列用生物信息学提供的比对软件或手工调整对齐后翻译, 对其进行分子特征分析, 研究其关键位点或片段的变异, 就可以获得该病毒遗传和致病力的部分信息。如通过大量比对 H 3 和 H9 流感病毒的血凝素蛋白序列发现, H9N2 禽流感病毒血凝素蛋白 Gln226Leu 的突变是 H9 病毒能否侵染哺乳动物的标志。血凝素基因的连接肽被认为是决定禽流感病毒毒力和致病性的关键因素之一。而在连接肽位点存在的多重碱性氨基酸则被认为是高致病性病毒的标志。但是分子特征分析的结果有时不准确, 甚至是错误的, 因此需要结合其他生物学的数据才能得出充分的结论。

***病毒 RNA 和蛋白结构预测及显示***

通过同源建模进行 DNA、RNA 以及蛋白质高级结构预测是生物信息学研究的热点之一。禽流感病毒是负链 RNA 病 毒, 因此其 RNA 结构的变异可能对于病毒侵染宿主和致病力等起着重要的作用。

通过生物信息学技术手段还可以对禽流感病毒基因组各个基因片段在线或利用下载的软件进行蛋白结构预测, 并且通过显示软件将蛋白结构以及与结构相关的一些信息显示出来。 通过构建其蛋白的二维和三维结构, 可以研究其蛋白亲水性、 预测抗原表位及抗原性变异、发现并研究其重要的保守位点和催化活性位点等。

***病毒传播方向和传播方式研究***

Kilpatrick 等[ 45] 则利用数学模型整合了系统发育分析、候鸟迁徙和禽类运输的数据后提出 H 5N1 禽流感病毒的扩散是由候鸟迁徙和禽类运输共同造成的。

但是, 金冬雁[ 48] 认为该研究采用生物信息学的方法研究病毒的传播固然值得肯定, 但是存在取样不足和取样偏颇等诸多方面的问题, 其结论 尚须经过病毒学研究的验证。

当然, 单纯的数理统计分析不可避免地受多种因素的制约, 如取样不充分, 不合理, 甚至取样错误, 选择不同的数学模型或者参数可能得出不同的结果。因此, 如果结合应用全球卫星定位系统( Global Positioning System, GPS) 以及地理信息系 统对候鸟迁徙进行监控的数据, 将有助于研究禽流感病毒快速 传播的途径及方式, 并且还可以对禽流感病毒的传播方向进行预测。

***辅助流感疫苗开发和效果评价***

生物信息学已被用于辅助药物开发, 成为新药发现的重要工具和手段。与传统新药开发模式相比, 应用生物信息学技术的优势进行新药开发, 具有缩短新药研发周期、降低研发成本 以及提高研发成功率等优点。目前用于禽流感预防的疫苗有灭活疫苗、减毒活疫苗、重组疫苗、亚单位疫苗、核酸疫苗以及多肽疫苗等。

生物信息学可以帮助筛选禽流感病毒基因组内主要的抗原位点, 辅助设计基于禽流感病毒表面抗原和保守性蛋白的核酸疫苗和多肽疫苗。

更重要的是, 通过对病毒序列与核酸疫苗序列的比对、分子特征和系统发育分析, 可以评价核酸疫苗接种的有效保护性。潘劲草[58] 等对杭州甲 1 型、甲 3 型以及乙型流感病毒的序 列与世界卫生组织推荐的疫苗进行了比对和系统发育分析, 结果表明杭州分离的甲 1、甲3 和乙型流感病毒血凝素H A1 均分别与当时推荐疫苗株 H A1 的亲缘关系很近, 使用这些候选疫苗能够对甲 1、甲 3 和乙型流感病毒等起到很好的预防作用。