

SO SÁNH VÀ PHÂN TÍCH ĐẶC TÍNH ĐỘT BIẾN TRƯỢT-XÓA GEN NA(N1) THEO THỜI GIAN TIẾN HÓA CỦA VIRUS CÚM A/H5N1 Ở CÁC CHŨNG CỦA VIỆT NAM VÀ THẾ GIỚI

Lê Thanh Hòa, Nguyễn Thị Bích Nga, Lê Trần Bình

Viện Công nghệ sinh học

TÓM TẮT

Phân đoạn gen kháng nguyên Neuraminidase-NA(N1) của các chủng virus cúm A/H5N1 có đặc tính đột biến cao ở phần gen tại đầu 5'. So sánh và phân tích cấu trúc 657 nucleotide chuỗi gen N1 (đầu 5') của các chủng đại diện phân lập từ năm 1959 - 2006 cho thấy, thành phần nucleotide và amino acid đã có những biến đổi đột biến trượt-xóa gen xảy ra ở các chủng đang nhiễm từ năm 2003 trở lại đây, đó là xóa đi 60 nucleotide, giải phóng 20 amino acid khỏi gen N1, bao gồm các chủng của Trung Quốc, Indonesia, Việt Nam, Hàn Quốc, Thái Lan, Malaysia, Nigeria, Lào. Các chủng virus cúm A/H5N1 được phân định thành 3 giai đoạn tiến hóa theo phân tích gen N1: giai đoạn 1959 - 1996; giai đoạn 1996 - 2003; và giai đoạn 2003 đến nay liên quan đến sự co hẹp của gen N1. Đặc trưng của các chủng trước 1996 là có đầy đủ nguyên vẹn gen N1 cổ sinh; các chủng 1996 - 2003 đã mất 57 nucleotide; còn các chủng đang nhiễm H5N1 phân lập sau 2003 có chuỗi gen N1 ngắn hơn so với các chủng cổ điển do đã có đột biến xóa đi 60 nucleotide (20 amino acid). Điều này chứng tỏ gen N1 của các chủng virus phân lập sau 2003 đến nay đã có hiện tượng đột biến quan trọng tạo nên gen và sản phẩm gen N1 có chức năng biểu hiện cao nhất, thể hiện ở tính gây bệnh ngày càng cao và tính thích ứng vật chủ ngày càng đa dạng của virus cúm A/H5N1.

Từ khóa: Đột biến trượt-xóa gen, neuraminidase (NA), N1 subtype, virus cúm A/H5N1

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh cúm gà (Avian Influenza-AI), một loại bệnh có tính truyền nhiễm cấp tính điển hình của gia cầm do virus cúm A thuộc họ *Orthomyxoviridae* gây ra (Ito *et al.*, 1998). Virus cúm gia cầm có cấu trúc hệ gen RNA sợi đơn âm (-) gồm 8 phân đoạn (PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, MA, NS), trong đó phân đoạn kháng nguyên Neuraminidase (NA) là một protein liên kết nằm trên bề mặt của hạt virus (virion). NA là các gai có dạng hình nấm, chịu trách nhiệm phân giải thụ thể tế bào bằng cách cắt liên kết glycosid của phân tử acid sialic (N-acetylneuramic acid) giải phóng virus trong quá trình lây nhiễm (Castrucci, Kawaoka, 1993; Beigent, Cauley, 2001). Các nghiên cứu phân tử gen NA(N1) của virus cúm A/H5N1 cho thấy mức độ đột biến của phần đầu 5' liên quan đến quá trình thích ứng và gây bệnh trên nhiều đối tượng vật chủ (Matrosovich *et al.*, 1999; Takao *et al.*, 2002; Keawcharoen *et al.*, 2005). Do vậy, chúng tôi chỉ sử dụng 657 nucleotide thuộc đầu 5' gen N1 để so sánh phân tích về thành phần nucleotide, amino acid và phân tích đặc tính đột biến trượt-xóa trong gen N1 của virus (Bảng 1).

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày những nghiên cứu về đặc tính đột biến trượt-xóa gen của N1 qua thời gian tiến hóa trên cơ sở so sánh thành phần gen N1 của một số chủng virus cúm A/H5N1 đã được phân lập ở Việt Nam và thế giới.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thu nhận mẫu bệnh phẩm, tách RNA hệ gen, thực hiện RT-PCR và dòng hóa

Mẫu bệnh phẩm của gà bị nhiễm virus cúm A/H5N1 ở Hậu Giang năm 2005, ký hiệu là CkHG4, danh pháp quốc tế là A/Ck/Vietnam/HG4/2005(H5N1).

Vịt bị bệnh ở An Giang năm 2005, ký hiệu là DkAG, danh pháp quốc tế là A/Dk/Vietnam/AG/2005(H5N1).

Ngan bị bệnh ở Gia Lâm (Hà Nội) năm 2004, ký hiệu là MdGL, danh pháp quốc tế là A/Muscovy Duck/Vietnam/MdGL/2004(H5N1).

Gen N1 các chủng cúm A/H5N1 của chúng tôi EF057803 (CkHG4); EF057804 (DkAG) và thu nhận được đăng ký trong Ngân hàng gen là EF057805 (MdGL) (Bảng 1).

Bảng 1. Danh sách và ký hiệu các chủng cúm A/H5N1 cung cấp chuỗi gen N1.

Ký hiệu chủng so sánh	Đánh số chủng	Loài mắc	Năm phân lập	Nguồn gốc	Số đăng ký trong Ngân hàng gen
Ck-VN-HG4-05	1	Gà	2005	Hậu Giang - Việt Nam	EF057803
Dk-VN-AG-05	2	Vịt	2005	An Giang - Việt Nam	EF057804
Md-VN-GL-04	3	Ngan	2005	Gia Lâm - Hà Nội - Việt Nam	EF057805
Dk-VN-BL-05	4	Vịt	2005	Bạc Liêu - Việt Nam	đang đăng ký
VN-1194-04	5	Người	2004	Việt Nam	AY651445
VN-1203-04	6	Người	2004	Việt Nam	AY651447
Dk-VN-15-03	7	Vịt	2003	Việt Nam	DQ493019
Dk-VN-S654-05	8	Vịt	2005	Việt Nam	DQ321067
Ck-VN-HG-04	9	Gà	2004	Hậu Giang - Việt Nam	AY728895
VN-HT-04	10	Người	2004	Hà Tây - Việt Nam	AJ867075
VN-HG207-05	11	Người	2005	Việt Nam	DQ094292
VN-JP4207-05	12	Người	2005	Việt Nam	ISDN11782
Gs-TL-79-04	13	Ngỗng	2004	Thái Lan	AY651444
Ck-TL-73-04	14	Gà	2004	Thái Lan	AY651438
TL-676-05	15	Người	2005	Thái Lan	DQ360836
Ck-ML-5858-04	16	Gà	2004	Malaysbnia	ISDN80771
Ck-ML-935-06	17	Gà	2006	Malaysia	ISDN138758
Dk-Laos-3295-06	18	Vịt	2006	Lào	ISDN138782
Dk-Gd-12-00	19	Vịt	2000	Quảng Đông - Trung Quốc	AY585405
Dk-CN-E319-2-03	20	Vịt	2003	Trung Quốc	AY518363
Dk-IN-MS-04	21	Vịt	2004	Indonesia	AY651434
Ck-IND-7-03	22	Gà	2003	Indonesia	ISDN111353
Ck-KR-ES-03	23	Gà	2003	Hàn Quốc	AY676043
A-Ck-NG-642-06	24	Gà	2006	Nigeria	DQ529296
A-Ck-Scot-59	25	Gà	1959	Scotland	X07826
A-Gs-Qd-3-97	26	Ngỗng	1997	Quảng Đông - Trung Quốc	AF364335
A-Gs-Qd-1-96	27	Ngỗng	1996	Quảng Đông - Trung Quốc	AF144304
A-Dk-Qx-07-99	28	Vịt	1999	Quảng Tây - Trung Quốc	AY585408
A-Gs-HK-3014-8-00	29	Ngỗng	2000	Hồng Kông	AY059491
A-Gs-VN-113-01	30	Ngỗng	2001	Việt Nam	ISDN117743
A-HK-213-0-03	31	Người	2003	Hồng Kông	AB212056
A-Ck-HK-FY150-01	32	Gà	2001	Hồng Kông	AY221542
A-DkVN-NCVD1-05	33	Vịt	2005	Việt Nam	DQ366308
A-Dk-Gd-22-02	34	Vịt	2002	Quảng đông - Trung Quốc	AY585406
A-HK-212-0-03	35	Người	2003	Hồng Kông	AY575881
A-HK-482-97	36	Người	1997	Hồng Kông	AF102656
A-HK-516-97	37	Người	1997	Hồng Kông	AF296752
A-HK-532-97	38	Người	1997	Hồng Kông	AF102667
A-HK-156-97	39	Người	1997	Hồng Kông	AF036057

Ghi chú: Các chủng từ số 1 đến 24 (phần nền đậm) được sử dụng để phân tích so sánh thành phần gen N1 (nucleotide và amino acid) giữa các chủng. Toàn bộ 39 chủng (1 - 39) sử dụng để phân tích so sánh đột biến trượt-xóa gen N1.

Sử dụng bộ kit tách RNA hệ gen của virus, thực hiện phản ứng RT-PCR với cặp mồi đặc hiệu, tách dòng thu nhận chuỗi gen N1 của các chủng virus cúm A/H5N1 theo đúng quy trình hướng dẫn. Cặp mồi sử dụng thu nhận chuỗi gen N1 là N1ECOF-NINOTR (thu nhận toàn bộ gen N1 có độ dài 1370 nucleotide):

N1ECOF5'- CCGGAATTCAAAATGAATCCAAA
TCAGAAGATAATAACCATT -3';

N1NOTR: 5'- ATAAGAATGCGGCCGCTCACTA
CTTGTCAATGGTGAATGGCAA -3'.

Giải trình trình tự, xử lý và phân tích thành phần chuỗi gen

Sau khi thu nhận DNA plasmid tái tổ hợp chứa đoạn gen N1, tiến hành giải trình trình tự nucleotide trên máy giải trình tự tự động (automated sequencer) ABI-3100 Avant Genetic Analyzer của Applied Biosystems. Chuỗi nucleotide được xử lý trên máy Macintosh bằng chương trình SeqEd1.03; sau đó sử dụng chương trình AssemblyLIGN1.9 và hệ chương trình MacVector8.2 (Accelrys Inc.) để so sánh; đối chiếu và xử lý số liệu các chuỗi bằng chương trình GENEDOC2.5 (Nicholas, Nicholas, 1997). Thành phần amino acid của virus được thu nhận bằng cách sử dụng bộ mã của vi sinh vật bậc thấp (vi khuẩn-bacterial code) có trong Ngân hàng gen.

Chọn chuỗi so sánh thành phần nucleotide, amino acid và đặc tính đột biến trượt-xóa của gen N1

Thành phần các chuỗi nucleotide gen N1 của các chủng chúng tôi nghiên cứu được truy cập Ngân hàng gen quốc tế (GenBank) bằng chương trình BLAST tại website: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> và Trung tâm dữ liệu các chuỗi gen virus cúm (ISD = Influenza Sequence Database) tại website: <http://www.flu.lanl.gov/> đã được chọn lọc, thu nhận và phân tích so sánh với các chuỗi gen cúm A/H5N1 của Việt Nam để so sánh và đối chiếu với các chủng đã được công bố, đồng thời thu thập các chủng đại diện của Việt Nam và thế giới theo thời gian từ năm 1959 - 2006 (Bảng 1).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả truy cập dữ liệu Ngân hàng gen quốc tế

Chuỗi nucleotide của gen N1 của các chủng phân lập trên gia cầm tại Việt Nam được sử dụng để

truy cập Ngân hàng gen, kết quả cho thấy các chuỗi gen N1 của các chủng CkHG4, DkAG, MdGL có mức độ tương đồng rất cao so với các chủng H5N1 phân lập từ các vật chủ khác nhau như người, gà, vịt, ngan, chim cú... của Việt Nam và Thái Lan.

Kết quả so sánh đối chiếu thành phần chuỗi gen N1

Về amino acid, có 1 vị trí (vị trí 56) có sai khác lớn, đa số các chủng là Threonine, trong khi đó một số chủng của Việt Nam thay đổi amino acid Threonine (T) thành Asparagine (N) (Hình 1). Các chủng của Việt Nam hầu như hoàn toàn đồng nhất về trình tự amino acid, ngoại trừ có sai khác ở vị trí 56 (T $\leftrightarrow$ N) ở 4 chủng (số 1: A/Ck/VN/HG4/2005(H5N1); số 9: A/Ck/VN/HG/2004(H5N1); số 11: A/VN/HG207/2005(H5N1) và số 12: A/VN/JP4207/2005(H5N1), trong khi đó thành phần amino acid giữa các chủng của thế giới và Việt Nam có biến đổi lớn ở vùng tận cùng N (-NH₂) của 80 amino acid đầu tiên (Hình 1).

So sánh chuỗi amino acid của protein N1

Điều này cho thấy, các chủng cúm A/H5N1 của Việt Nam, từ khi xuất hiện tại Việt Nam cho đến 2005 không có đột biến lớn, chủ yếu tập trung vào một dòng gen N1 đã tiến hóa. Trong khi đó, các chủng của thế giới có biến động lớn về thành phần gen N1 và có thể thuộc nhiều dòng gen N1 khác nhau. Gen N1 do mang đặc tính đột biến qua các thời kỳ, nên đã tạo nên các dòng gen riêng biệt, cho nên kết quả phân tích của chúng tôi cũng hoàn toàn phù hợp với nhận xét đó (Chen *et al.*, 2007). Các vị trí glycosyl hóa không thay đổi (Hình 1).

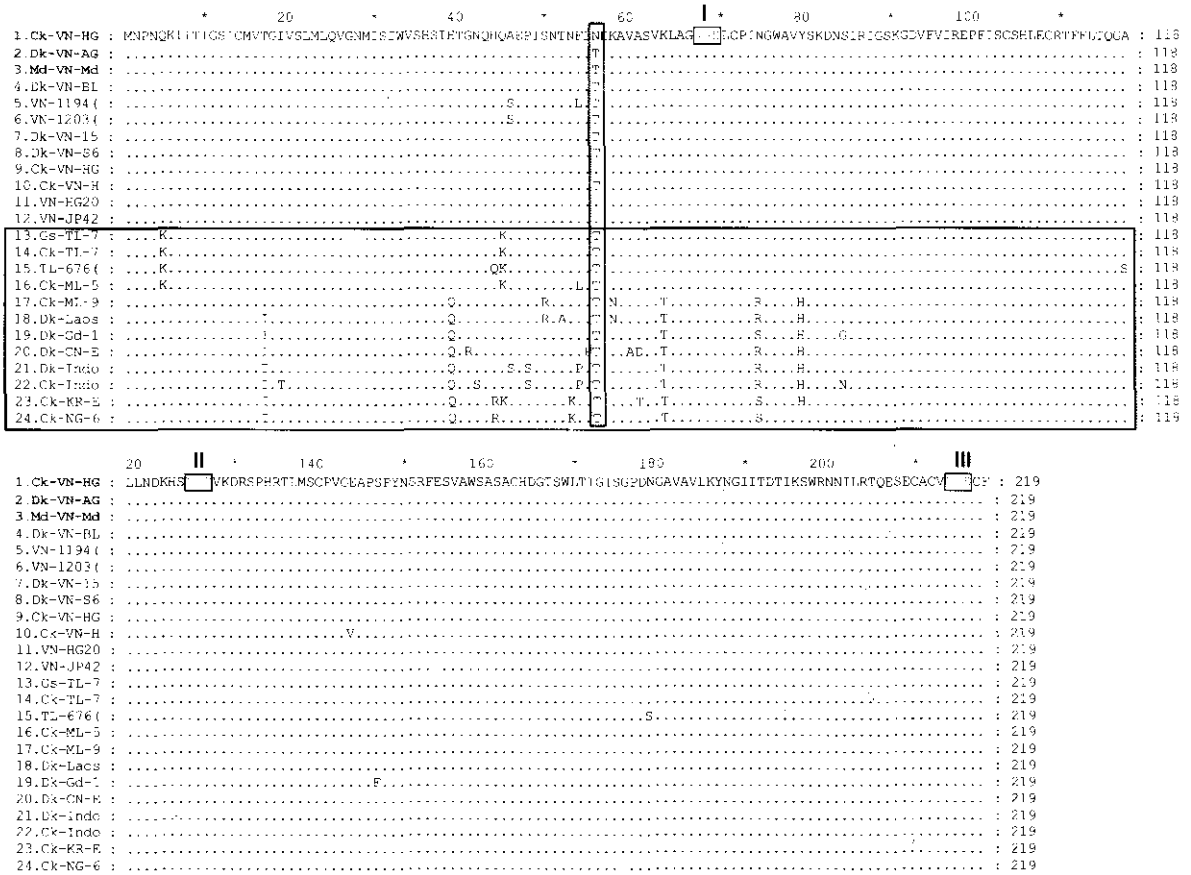
Kết quả phân tích đột biến trượt-xóa gen của N1 qua thời gian tiến hóa

Sự đột biến trượt-xóa gen (slippage-mediated deletion) qua các giai đoạn tiến hóa là hiện tượng đột biến hạn hữu được phát hiện ở gen N1 và đã được chứng minh là, thông qua loại hình đột biến xóa gen này, virus cúm A/H5N1 tạo nên những subtype N1 mới có độc lực cao hơn (Matrosovich *et al.*, 1999; Keawcharoen *et al.*, 2005).

Tất cả 39 chủng được liệt kê ở Bảng 1, phân lập trong 45 năm qua, trong đó gồm có chủng nguyên thủy (A/Ck/Scotland/1959(H5N1)), các chủng Hồng Kông phân lập năm 1997, các chủng phân lập sau năm 2003 và các chủng của chúng tôi nghiên cứu, được đối chiếu so sánh về thành phần nucleotide và amino acid của gen N1. Kết quả trình bày ở Hình 1.

Các chứng có thể phân chia thành 3 nhóm chính: i) nhóm các chứng *cổ điển* bao gồm các chứng phân lập từ năm 1959 đến trước năm 2003; ii) nhóm các chứng *trung gian* Hồng Kông 1997 bao gồm một số chứng chủ yếu phân lập trên người ở Hồng Kông

năm 1997; iii) nhóm các chủng *đương nhiễm* bao gồm các chủng phân lập sau năm 2003 ở các vật chủ khác nhau, trong đó có 3 chủng của chúng tôi (CkHG4, DkAG, MdGL) (Le Thanh Hoa *et al.*, 2006).



Hình 1. So sánh đối chiếu trình tự amino acid gen N1 của các chủng CkHG4, DkAG, MdGL với các chủng liên quan (Bảng1). Ghi chú: dấu (.) giống với trình tự amino acid của chủng CkHG4. Sự sai khác ở các chủng tiếp theo được thể hiện bằng các chữ cái ký hiệu của chúng. Các chủng ngoài Việt Nam (đồng khung ngang); chủng Ck-VN-HG4-2005 có sai khác với hầu hết các chủng còn lại (đồng khung dọc). I, II, III là vị trí gắn oligosaccharid (glycosyl hóa).

Kết quả phân tích cho thấy, đã có đột biến xóa gen (deletion mutation) xảy ra trong các chủng nhóm trung gian (ii) và nhóm đương nhiễm (iii), nhưng bản chất của đột biến có khác nhau. Biến động đột biến xóa nucleotide xảy ra ở vùng nucleotide có vị trí 145 - 213 (Hình 1). Cụ thể:

- Các chủng *cổ điển* cúm A/H5N1: toàn bộ gen N1 có độ dài 1410 nucleotide. Hầu hết tất cả các chủng H5N1 phân lập trước 2003 (ngoại trừ một số

chúng phân lập trên người ở Hồng Kông năm 1997) đều có gen N1 có độ dài tối đa này.

- Các chủng nhóm *trung gian* phân lập trên người ở Hồng Kông năm 1997 đã có đột biến xóa đi 57 nucleotide tại vị trí 157 - 213 so với thành phần nucleotide của các chủng cổ điển (ATCATTACTTACGAGAACAACACTTGGGTGA ATCAAACATATGTTAACATCAGCAAT), mã hóa cho 19 amino acid (IITYENNTWVNQTYV NISN),

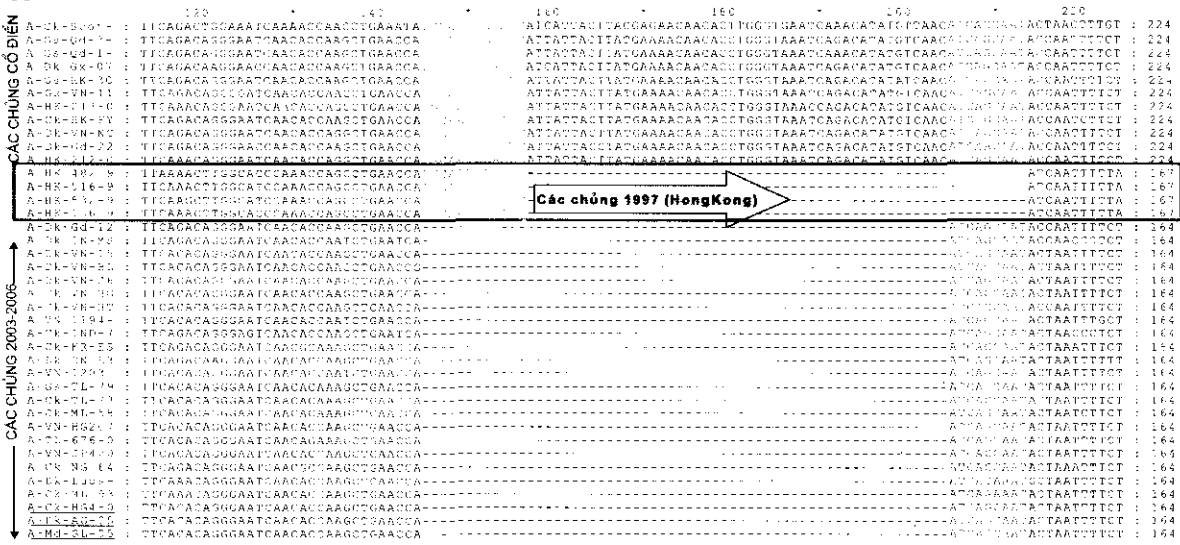
làm cho gen N1 chỉ còn lại 1353 nucleotide (Hình 2).

- Các chủng đương nhiệm phân lập sau năm 2003, có chuỗi gen N1 ngắn nhất, chỉ còn 1350 nucleotide,

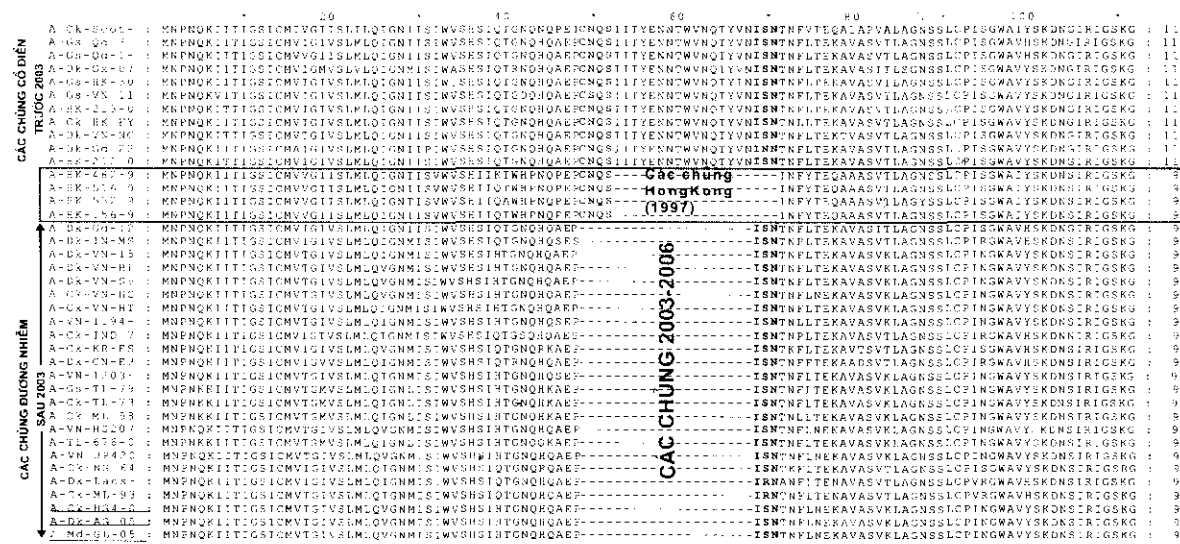
do đã có đột biến xóa đi 60 nucleotide, vị trí 145 - 204 mã hóa cho 20 amino acid

(CNQSIITYENNTWV NQTYVN) so với các chủng cổ điển (Hình 2).

A. ĐỘT BIẾN TRƯỢT-XOÁ NUCLEOTIDE TRONG GEN N1



B. ĐỘT BIẾN TRƯỢT-XOÁ AMINO ACID TRONG CHUỖI POLYPEPTIDE CỦA N1



Hình 2. Đột biến trượt-xóa nucleotide (A, hình trên, chỉ minh họa vùng đột biến) và amino acid (B, hình dưới) của gen N1 theo thời gian tiến hóa. 11 chủng trên cùng là các chủng cổ điển (1959 - 1996); 4 chủng (đóng khung) là các chủng phân lập trên người tại Hồng Kông năm 1997; 24 chủng bên dưới là các chủng phân lập sau 2003, trong đó có 3 chủng CkHG4, DkAG, MdGL (gạch bên dưới) là các chủng Việt Nam của chúng tôi phân lập và giải trình trình tự.

Các chủng sau 1997 đều có đột biến xóa gen ở gen N1: Các chủng *trung gian* Hồng Kông 1997 đột biến xóa đi 57 nucleotide, các chủng *đương nhiệm* đột biến xóa đi 60 nucleotide. Một điều hết sức đặc biệt là, các chủng *đương nhiệm* đột biến trượt-xóa 12 nucleotide ở đầu 5' (TGCAATCAAAGC) và giữ lại 9 nucleotide (ATCAGCAAT) ở đầu 3' mà trước đó đã bị xóa ở các chủng của nhóm *trung gian* (Hình 2). Rõ ràng, gen N1 trong các chủng hiện tại (từ sau năm 2003) không cần thiết duy trì 60 nucleotide mà trước đó các chủng cổ điển vốn có, điều này ắt hẳn có liên quan đến tính gây bệnh rất cao của các chủng H5N1 hiện nay (Keawcharoen *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2007).

Theo các số liệu đã công bố, gen N1 của các chủng cúm A/H5N1 phân lập trước năm 1997 có độ dài 1407 - 1410 nucleotide; còn của các chủng trong 10 năm gần đây (1997 - 2006) đã có hiện tượng đột biến xóa đi 57 hoặc 60 nucleotide, nên độ dài tổng cộng còn lại là 1350 nucleotide, ngắn hơn so với các chủng trước năm 1997 (Takao *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2007).

Sự co hẹp ở gen N1 thông qua cơ chế trượt-xóa 60 nucleotide (20 amino acid) cho thấy, các chủng cúm A/H5N1 phân lập sau 2003 đã có một hiện tượng đột biến quan trọng tạo nên gen và sản phẩm gen N1 có chức năng đặc hiệu cao nhất. Chức năng đặc hiệu của virus cúm A/H5N1 thể hiện ở tính gây bệnh ngày càng cao và tính thích ứng vật chủ ngày càng rộng của các chủng trong thời gian các năm gần đây.

Hiện nay, các chủng virus cúm A/H5N1 gây bệnh ở Việt Nam, Thái Lan và các nước Đông Nam Á và ngày nay lan sang các nước châu Âu-Phi thuộc loại có độc lực rất cao (HPAI - Highly Pathogenic Avian Influenza) mà từ trước cho tới những năm 2003 chưa có. Các chủng H5N1 hiện tại còn có khả năng thích ứng dần trên người, điều này thể hiện H5N1 trong các năm 2004 - 2007 đã gây chết người với tỷ lệ cao hơn rất nhiều so với H5N1 những năm 1996-1997 ở Hồng Kông và H5N1 trước năm 2003 ở châu Á. Tính gây bệnh trên người ngày càng tăng ở virus cúm A/H5N1 tạo cơ sở cho chúng ta nghĩ đến là rất có thể với cơ chế đột biến tăng độc, H5N1 sẽ trở thành virus gây bệnh cúm của người gây nên đại dịch (pandemic influenza).

KẾT LUẬN

Các chủng virus cúm A/H5N1 được phân định

thành 3 giai đoạn tiến hóa trong gen N1: giai đoạn 1959 - 1996; giai đoạn 1996 - 2003; và giai đoạn 2003-nay, trong đó đã có sự co hẹp ở gen N1. Đặc trưng của các chủng trước 1996 là còn đầy đủ nguyên vẹn gen N1 cổ sinh; các chủng 1996 - 2003 có chủng đã mất 57 nucleotide; còn các chủng *đương nhiệm* H5N1 phân lập sau 2003 có chuỗi gen N1 ngắn hơn so với các chủng cổ điển do đã có đột biến xóa đi 60 nucleotide (20 amino acid) ở vị trí 145 - 204 bằng cơ chế đột biến trượt-xóa gen.

Lời cảm ơn: Công trình được tiến hành bằng thiết bị của Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Gen và tài trợ kinh phí của đề tài độc lập cấp nhà nước (2006 - 2007): "Nghiên cứu xây dựng quy trình sản xuất vaccine cúm A/H5N1 cho gia cầm".

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Baigent SJ, McCauley JW (2001) Glycosylation of haemagglutinin and stalk-length of neuraminidase combine to regulate the growth of avian influenza viruses in tissue culture. *Virus Res* 79(1-2): 177-185.
- Castrucci MR, Kawaoka Y (1993) Biologic importance of neuraminidase stalk length in influenza A virus. *J Virol* 67: 759-764.
- Chen JM, Ma HC, Chen JW, Sun YX, Li JM, Wang ZL (2007) A preliminary panorama of the diversity of N1 subtype influenza viruses. *Virus Genes* 35(1): 33-40.
- Ito T, Couceiro JN, Kelm S, Baum LG, Krauss S, Castrucci MR, Donatelli I, Kida H, Paulson JC, Webster RG and Kawaoka Y (1998) Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol* 72: 7367-7373.
- Keawcharoen J, Amonsin A, Oraveerakul K, Wattanodorn S, Papravisit T, Kamda S, Lekakul K, Pattanarangsarn R, Noppornpanth S, Fouchier RA, Osterhaus AD, Payungporn S, Theamboonlers A, Poovorawan Y (2005) Characterization of the hemagglutinin and neuraminidase genes of recent influenza virus isolates from different avian species in Thailand. *Acta Virol* 49(4): 277-280.
- Le Thanh Hoa, Dinh Duy Khang, Phan Van Chi, Nong Van Hai, Truong Nam Hai, Nguyen Thi Bich Nga, Le Tran Binh (2006) Molecular characterization of the H5 gene for the highly pathogenic A/H5N1 strains isolated in Vietnam during 2004 - 2006. *Proceedings of International Workshop on Biotechnology in Agriculture* (20.10.2006). Nong Lam University Ho Chi Minh City: 68-71.

Matrosovich M, Zhou N, Kawaoka Y, Webster R (1999) The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *J Virol.* 73(2): 1146-1155.

Nicholas KB and Nicholas HB (1997) Genedoc: a tool

for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the author.

Takao S, Shimazu Y, Fukuda S, Kuwayana M and Miyazaki K (2002) Neuraminidase subtyping of human influenza A viruses by RT-PCR and its application to clinical isolates. *Jpn J Infect Dis* 55: 204-205.

COMPARATIVE ANALYSIS OF SLIPPAGE-MEDIATED MUTATION BASED EVOLUTION IN THE NA(N1) GENE OF THE A/H5N1 STRAIN OF VIETNAM AND GLOBAL ORIGINS

Le Thanh Hoa*, Nguyen Thi Bich Nga, Le Tran Binh

Institute of Biotechnology

SUMMARY

The 5' part of the antigenic NA(N1) gene of the A/H5N1 virus has a specially high rate of mutation. Comparative analysis of 657 nucleotides of N1 (at 5' end) of the representative strains isolated in the period 1959 - 2006 revealed that there has been slippage-mediated mutation occurring in the nucleotide and amino acid of the N1 gene, particularly, in the currently circulating strains (ie. those from 2003 to present). In the strains isolated during 2003 - 2006, there appeared a slippage-mediated mutation in N1 gene, such as the deletion of 60 nucleotides (20 amino acids). In our study, these include strains of China, Indonesia, Vietnam, Korea, Thailand, Malaysia, Nigeria, Laos. Up-to-date the A/H5N1 strains are divided into 3 evolutionary periods of mutation in the N1 genes: 1959 - 1996; 1996 - 2003 and 2003 - 2006. In the strains of 2003 - present, there has been the shrink of the N1 gene. The length of the N1 is unchanged in the classical strains up to 1996; while the N1 gene lost 57 nucleotides in those of 1996-2003 and 60 nucleotides in the circulating ones isolated after 2003, respectively. It is revealed that in those of H5N1 after 2003 up to present, the essential mutation has occurred leading to the formation of the most specifically functioning NA(N1) protein. It is speculated that the pathogenicity and the host adaptation become more and more multiple and diverse due to this change.

Keywords: A/H5N1, Influenza virus, neuraminidase (NA), N1 subtype, slippage-mediated mutation

* Author for correspondence: Tel: 84-4-37567297; E-mail: imibtvn@gmail.com