

广州市 A 型流感病毒血凝素基因的遗传变异研究

方丹云¹, 田 疆¹, 周经姣¹, 周 红¹, 何丽娟², 陈艺韵², 狄 彪², 江丽芳^{1*}

(1. 中山大学中山医学院微生物教研室, 广东 广州 510080; 2. 广州市疾病预防控制中心, 广东 广州 511008)

摘要:【目的】了解 2006–2007 年广州地区流感的病原学分布, 掌握 H1N1 亚型流感病毒血凝素基因(HA)的遗传和进化特征。【方法】选取 2006–2007 年广州市 19 个流感监测点的流感病毒代表株共 45 株, 应用病原学、血清学和分子生物学方法对病毒的型别进行了鉴定; 选取 24 株 H1N1 亚型流感病毒进行全长 HA 基因的扩增、克隆与分子进化分析。【结果】A 型流感病毒 H1N1 和 B 型流感病毒交替成为广州地区 2006 年流感的优势流行株; 2006–2007 年广州地区 H1N1 亚型流感病毒流行株在 HA 蛋白的抗原区、受体结合位点和潜在糖基化位点均发生了点突变; 遗传进化分析结果表明, 24 株 H1N1 亚型毒株间基因同源性的平均值为 98.4%; 与 WHO 推荐的疫苗株(New Caledonia/20/1999 和 Solomon Islands/3/2006)相比, 同源性高达 96.6%和 97.8%。【结论】2006 年, 广州地区流感的病原体为 H1N1 亚型流感病毒和 B 型流感病毒; 2006–2007 年广州市 H1N1 亚型流感病毒 HA 基因发生了一定程度的变异, 有必要对毒株的变异加强监测; WHO 推荐的 2006–2007 年 H1N1 亚型流感病毒疫苗株适用于我国人群的免疫预防。

关键词: 流感病毒; H1N1 亚型; HA 基因; 遗传变异分析

中图分类号: R373.13 文献标识码: A 文章编号: 1672-3554(2009)05-0492-05

Genetic Mutation of Hemagglutinin Gene of Influenza A Virus in Guangzhou

FANG Dan-yun¹, TIAN Jiang¹, ZHOU Jing-jiao¹, ZHOU Hong¹, HE Li-juan²,
CHEN Yi-yun², DI Biao², JIANG Li-fang^{1*}

(1. Department of Microbiology, Zhongshan Medical College, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;

2. Center for Diseases Control and Prevention of Guangzhou, Guangzhou 511008, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the pathogen distribution of flu, and understand the genetic evolution of A/H1N1 subtype of influenza virus in Guangzhou in 2006 and 2007. 【Methods】 Forty-five representative isolates were selected from 19 influenza surveillance sentinel hospitals or labs, and the subtypes of these strains were identified by the method of serology, molecular biology, and bioinformatics. The HA gene of 24 A/H1N1 isolates was then amplified, cloned, and analyzed. 【Results】 A/H1N1 and influenza B virus became predominant strain by turn in 2006 in Guangzhou. Among the A/H1N1 isolates, some point-mutations occurred at the HA antigenic sites, receptor binding sites and potential glycosylation sites in the years of 2006 and 2007. The genetic and evolutionary analysis revealed that the homology among the 24 A/H1N1 isolates, on the average, was 98.4%. Compared with the WHO recommended vaccine strains (New Caledonia/20/1999 and Solomon Islands/3/2006), the homologies reached up to 96.6% and 97.8%. 【Conclusion】 A/H1N1 and influenza B virus are the predominant strains in Guangzhou in 2006. The research showed that point-mutations occurred to some extent during the years of 2006 and 2007. Hence, monitor of the variant of influenza virus should be strengthened. And the WHO recommended vaccine strains of 2006 and 2007 have the immune effect on the population of our country.

Key words: influenza virus; H1N1; hemagglutinin gene; genetic mutation

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(5):492-496]

我国是世界公认的流感多发地乃至发源地, 特别是我国华南地区更被认为是“世界流感流行

中心”, 20 世纪的 3 次流感大流行有 2 次首发于该地区, 即 1957 年“亚洲流感”首发于贵州, 1968 年

收稿日期: 2009-06-27

基金项目: 广东省科技计划项目(2005A20901005); 广东省科技计划项目(2006B21101003)

作者简介: 方丹云, 主管技师, E-mail: danyunf@yahoo.com.cn; * 通信作者: 江丽芳, 教授, 博士导师, E-mail: jianglf909@yahoo.com.cn

“香港流感”首发于香港^[1-2]。每次大流行都是A型流感病毒基因重组所致。广州地区每隔几年就会出现一定规模的流感流行或爆发流行。2006年广州地区爆发了13起H1N1亚型流感疫情,是该亚型流感病毒在该地区沉寂了4年后的再次流行。为了了解该亚型病毒再次爆发流行的分子基础,掌握广州地区H1N1亚型流感病毒的遗传和进化特征,为流感的预测和防治提供科学依据,本文对2006年至2007年广州地区流感的病原学进行了分析,并对H1N1亚型流感病毒分离株HA基因进行了扩增、克隆和进化分析。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

RNAeasy™ Total RNA Isolation Kit (Qiagen), PrimeScript™ Reverse Transcriptase (Takara), dNTP Mix (北京赛百胜), LA Taq (Takara), TIANgel Midi Purification Kit (TIANGEN), pGEM-T easy

Vector System I (Promega)。

1.2 毒株及其来源

流感病毒毒株由广州市疾病预防控制中心(CDC)提供,包括2006年广州市13个疫点分离的毒株共44株,以及2007年分离的唯一1株H1N1亚型分离株流感病毒。

1.3 病毒的培养和鉴定

病毒株在MDCK细胞中分离培养,当出现++~+++细胞病变时收获病毒,并用血凝试验和血凝抑制试验鉴定病毒^[3]。

1.4 病毒的分子生物学分型

从病毒悬液中提取RNA,再用两步法进行RT-PCR。根据WHO推荐的引物,由上海英骏生物技术有限公司合成了鉴别H1N1亚型、H3N2亚型和B型的引物,引物序列见表1。PCR反应的条件是:95℃ 3 min,95℃ 30 s,42℃ 30 s,72℃ 30 s,28个循环后,72℃ 7 min。扩增产物用1%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

表1 流感病毒型别鉴定引物

Table 1 The primer pairs used for RT-PCR for identification of influenza virus subtype

Subtype	Name	Sequence	Expected length(bp)
A	FluAnp-1	ATCACTCACTGAGTGACATC	306
	FluAnp-2	CCTCCAGTTTTCTTAGGATC	
	FluBns-1	CGGACAACATGACCACAAC	226
B	FluBns-2	TCTCTCTCAAGAGACATCC	
	H1detect-F	GATGCAGACACAATATGTATAGG	600
H1N1	H1detect-R	CACTACAGAGACATAAGCATTT	
	H3detect-F	TCAGATTGAAGTGACTAATGCT	950
H3N2	H3detect-R	AATTTTGATGCCTGAAACCGT	

1.5 H1N1亚型HA基因全长的扩增及、克隆和序列测定

用RT-PCR法对所选择的24株H1N1亚型流感病毒的全长HA基因进行了扩增,正向引物序列为5'-AGCAAAGCAGGGGAAAATA-3',反向引物为5'-AGTAGAAACAAGGGTGTYYY-3'。扩增产物纯化后与T载体连接,再转化到*E.coli* DH-5 α 感受态细胞,建立阳性克隆。用RT-PCR、*Not* I和*Eco*R I限制型内切酶初步鉴定,最后由上海英骏生物技术有限公司进行序列测定。由于HA基因片段较长,设计了一条测序中间引物,序列为:5'-AAATTTGCTATGGCTGACG-3'。

利用DNASar软件包的EditSeq对测序结果进行校对,拼接出HA基因全长序列,确定ORF并推导出氨基酸序列,将所得的部分序列结果提交到GenBank。

1.6 序列分析

运用MEGA 3.1程序中的Clustal W方法对氨基酸序列同源性和位点的变异进行分析。用DNASar、Clustal X软件,将本研究的24个分离株与国内(包括港、澳、台地区)2005年和2006年部分分离株和国际代表株或疫苗株(New Caledonia/20/1999、Beijing/262/1995、Bayern/7/1995、Singapore/6/1986、Solomon Islands/3/2006、Puerto Rico/8/

1934/Mount Sinai、Weiss/1943、Brazil/11/1978、USSR/90/1977、Fort Monmouth/1/1947、Den/1/1957)的 HA 基因核苷酸序列比对并构建系统发生树。根据比对结果,选取关键位点发生变异的 1 株病毒与未发生相应变异的 1 株病毒,在 3D-JIGSAW 蛋白质结构数据库进行蛋白空间结构预测。

2 结 果

2.1 毒株分布

本研究挑选的 44 株 2006 年分离的病毒中, B 型 21 株, H1N1 亚型 23 株, 无 H3N2 亚型。在时间上出现了优势流行株的交替现象, 3 月和 4 月以 B 型流感病毒流行为主, 5 月份病例数明显减少。而 6 月份则以 H1N1 亚型病毒流行为主, 此时未见 B

型流感。7 月份以后疫情得到控制。

2.2 H1N1 亚型流感病毒 HA 基因遗传和进化分析

将其中 7 株病毒的 HA 序列递交到 GenBank, 登录号分别为: EU382981~EU382987。

2.3 24 株病毒株间及与国际疫苗株的同源性分析

本研究的 24 株毒株间同源性较高, 在 98.9%~96.4% 之间, 平均值为 98.4%。与 2006 年至 2007 年疫苗株 New Caledonia/20/1999 的同源性在 98.1%~95.9% 之间, 平均值为 96.63%, 与 2007 年至 2008 年疫苗株 Solomon Islands/3/2006 的同源性在 98.6%~97.0% 之间, 平均值为 97.79%。

2.4 HA 蛋白的氨基酸变异

HA 蛋白具有 5 个抗原位点 (Sa、Sb、Ca1、Ca2、Cb)^[4], 通过与挑选出的代表株比对发现, 本研究的 24 株分离株的 HA 蛋白在抗原区及其附近有多个氨基酸变异(表 2)。

表 2 HA1 抗原区及其附近位点的氨基酸变异

Table 2 Position of amino acid mutations in the HA1 antigenic sites and the sites closing to the antigenic sites

Antigenic site	A.A. No.	44	82	1099	1481	1531	1561	1684	1993	2091	2158	2470	2450	588	483	506	555	657	665	610	788	815	1451	1576	56	Majority	
Sb	205	·	M	M	M	M	·	·	·	S	M	N	S	N	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	S	R
Sb	206	·	T	T	T	T	·	·	·	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	A
Sb	170	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	R	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	G
Ca1	183	·	·	·	·	·	·	·	·	E	·	·	E	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	E	A
Ca1	187	·	·	·	·	·	·	·	·	K	·	·	K	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	K	E
Sa	179	·	·	·	·	·	I	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	S
Cb*	89	P	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	S
Ca2*	158	·	·	·	·	·	·	E	·	·	·	·	·	·	·	·	E	·	·	·	·	·	·	·	·	·	K

a. A (*) indicates residues which lie immediately adjacent to antigenic residues in the three-dimensional structure and are tentatively assigned to the sites shown; b. A (·) indicates that no mutation is found in the amino acids site.

在 Sb 抗原区的 205 位有 15 株发生了 R→M 变异, 2 株 R→N 变异, 3 株 R→S 变异, 206 位有 20 株发生了 A→T 变异, 其中 2091、2450、56 号毒株除了在这两个位点发生变异外, 还在 Ca1 抗原区发生了 183 位 A→E, 187 位 E→K 变异。506 号毒株在 Sb 抗原区 6 个位点中的 3 个位点(205、206、179 位)发生了变异。一些毒株在抗原区附近位点也发生了点突变, 如 44 号毒株在靠近 Cb 抗原区的 89 位 S→P 变异; 483 号毒株在靠近 Cb 抗原区的 133 位 I→L 变异。

205 位和 206 位氨基酸也恰是组成 HA 蛋白的受体结合位点 190 螺旋的两个位点^[5]。选择发生了该变异的 506 号毒株和没有发生该变异的

1561 号毒株, 分别预测其 3-D 空间结构(图 1)。经过软件分析, 1561 株中第 204、205、206 位 α-C 构成的角度为 95.0 度, 第 205、206、207 位 α-C 构成的角度为 91.2 度, 这与 506 株中相同位点构成的角度十分相近(分别为 95.5 度和 91.2 度)。1561 株第 204、205、206、207 位 α-C 转角角度为 52.8 度, 而 506 株相同位置的转角角度为 57.1 度。1561 株中第 205 位与第 210 位之间氢键的长度为 2.806 埃, 在 506 株中为 2.782 埃。其余受体结合位点未发生变异。

潜在糖基化位点方面, 除 1561 号、657 号毒株外, 其余毒株的 HA 氨基酸序列有 10 个潜在糖基化位点, 其中编码 HA1 蛋白的氨基酸序列中有 8

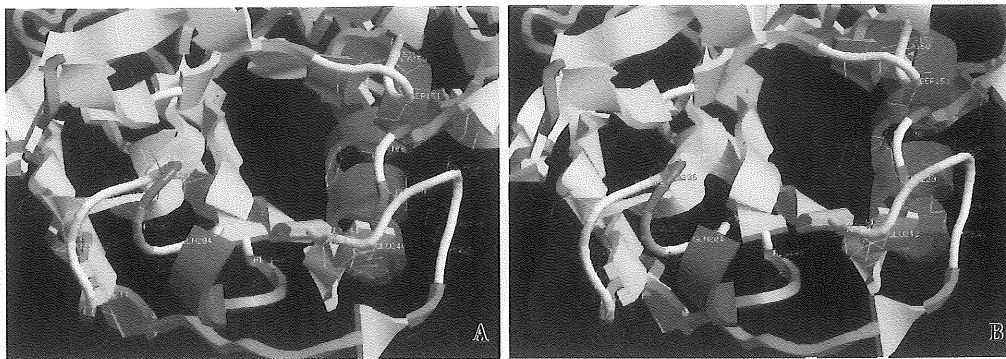


图 1 HA 蛋白 190 螺旋受体结合位点空间结构模拟图

Fig.1 The predicted 3-D structure of the 190 helix of receptor-binding domain (RBD) of HA

A:506; B:1561. (A) The RBD is marked with white ribbon and letters; (B) The 205 mutation site is marked with turquoise ribbon and letters; (C)The 206 mutation site is marked with pink ribbon and letters; (C)The length of hydrogen bond between 205 and 209 is marked with turquoise letters.

个,编码 HA2 蛋白的氨基酸序列中有 2 个,分别
在第 27、28、40、71、104、142、177、303、497、556 位。
1561 号毒株无 177 位的潜在糖基化位点,657 号
毒株在 414 位多了 1 个潜在糖基化位点。

HA0 分割位点无变异,仍然为精氨酸(Arg,R)。

2.5 HA-ORF 核苷酸的遗传进化分析

从进化树(图 2)上可以看出,本研究的 24 株
分离株呈集中分布,其中有 23 株进化关系较近,
只有 2006 年最早分离到的 44 号分离株相隔较
远,2007 年分离株 56 与 2006 年的分离株进化关
系密切。2006 年在澳门分离的 Macau/10258/
2006,与本研究的 24 株分离株进化关系较近。国
际代表株和疫苗株与这 24 株整体亲缘关系较远。
相对来说,44 号分离株与 New Caledonia/20/1999
关系较近,其余 23 株病毒与 Solomon Islands/3/
2006 关系较近,也反映出 2006 年以来广州地区
H1N1 亚型流感病毒发生了进化。

3 讨 论

2006 年广州市 H1N1 亚型流感病毒的小规模
爆发是该亚型病毒在沉寂了 4 年后在广州甚至是
广东省的再次流行^[6-7],并且这次爆发主要发生
在大学里,一个免疫力健全的成年人群体里,反映出
这个人群中的一部分人对流感病毒的免疫力相对
较低,也提示病毒可能发生了一定程度的变异。

本研究的 24 个分离株在多个抗原位点发生
了变异,有 20 株在 HA 蛋白 Sb 抗原区 205 位和
206 位同时发生了变异;在 205 位发生 R→S 变异
的 3 个毒株(2091、2450、56)同时在 Ca1 抗原区的

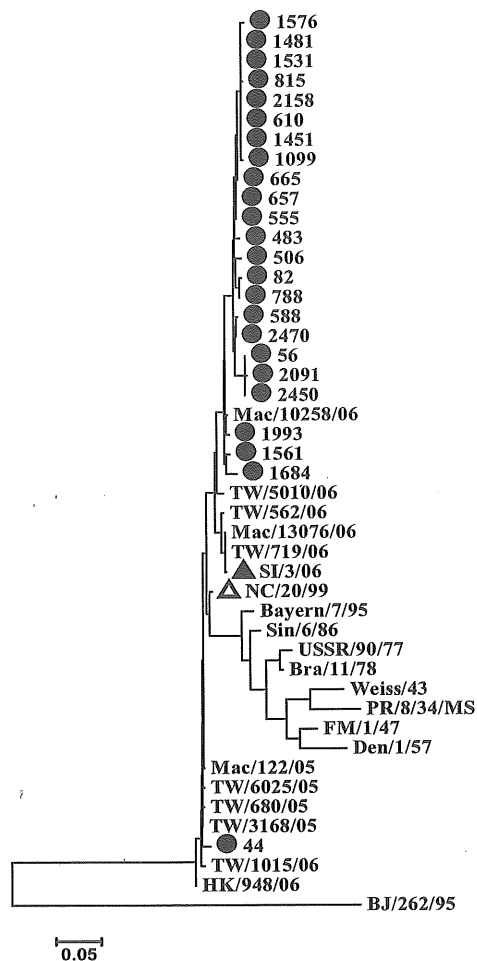


图 2 HA 基因 ORF 的系统进化分析

Fig.2 Phylogenetic relationships of the ORF of HA gene

The 24 isolates are marked by the symbol ●. The two vaccine strains of 2006-2007 and 2007-2008 are separately marked by the symbol △ and ▲.

BJ: Beijing; Den: Denver; FM: Fort Monmouth; HK: Hong Kong; Mac: Macau; MS: Mount Sinai; NC: New Caledonia; PR: Puerto Rico; SI: Solomon Islands; Sin: Singapore; TW: Taiwan.

183位和 187 位也发生了变异。一般认为,一个有流行病学意义的重要变种需要在两个或两个以上的抗原区至少存在 4 个氨基酸替换^[8],因此这 3 株病毒是具有一定流行病学意义的变种。在爆发期分离到的 506 株,除了在 205 位和 206 位分别发生变异外,还在 Sb 抗原区 170 位还发生了变异。综合分析各毒株的变异情况可知,Sb 抗原区 205 位 R→M 变异和 170 位 G→R 变异很有可能引起了 Sb 抗原区空间结构改变,以致影响到与人体内抗体的结合,是 2006 年流感流行的可能原因之一。计算与近两年的国际疫苗株 HA 蛋白的同源性发现,与 Solomon Islands/3/2006 株的同源性略高于与 New Caledonia/20/1999 株的同源性,说明新的疫苗株比旧疫苗株更能反映当下流感病毒的变异情况。对 HA 蛋白 3-D 空间结构分析显示 205 位和 206 位的改变引起了受体结合位点结构的微小变化,但这一变化具体对病毒与受体结合有什么影响,还需继续研究。

从对 HA-ORF 的遗传和进化分析中可以看出,24 个分离株中有 23 株的 HA 基因同源性较高,只有 44 号分离株的 HA 基因与其它 HA 基因的进化关系较远,而与 2005 年从其它地区的分离株关系较近。并且 44 号毒株与 2006 年至 2007 年疫苗株 New Caledonia/20/1999 株进化关系较近,其它分离株都与 2007 年至 2008 年的疫苗株 Solomon Islands/3/2006 株进化关系较近,再次说明新的疫苗株更能反映病毒的变异状况,

流感病毒的一个显著的特点就是其抗原性可发生持续不断的变异。这使得病毒可以避开人体中已存在的中和抗体的作用,从而再次引发感染。面对流感病毒的不断进化和不断侵袭,人类目前

在与流感病毒的斗争中显得很被动,特别是在预防方面。要改变这一被动局面,就要对病毒的进化进行长期、严密的监测,以求找到它进化的规律,这样将有利于流感流行的预测,同时有利于流感疫苗的开发和应用,最大程度降低流感对人类的危害。

参考文献:

- [1] 金 奇. 医学分子病毒学 [M]. 北京:科学出版社, 2001:633-657.
- [2] Taubenberger JK, Morens DM. 1918 influenza: the mother of all pandemics [J]. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12(1):15-22.
- [3] 全国流感/人禽流感监测实施方案(2005~2010 年度). (2005-08-19)[2008-05] <http://www.chinacdc.net.cn/n272442/n272530/n294176/n339986/appendix/20050819001.d°C>.
- [4] Kamps BS, Hoffmann C, Preiser W. Influenza report 2006 [R]. Paris, Cagliari, Wuppertal, Sevilla: Flying Publisher, 2006.
- [5] 张家准,徐 红,舒跃龙,等. 1981-2005 年中国 H1N1 甲型流感病毒血凝素基因的 HA1 演变特征 [J]. *病毒学报*, 2007, 23(5):350-355.
- [6] 李铁钢,刘维斯,秦鹏哲,等. 2006 年广州市 145 起流感样病例暴发疫情分析 [J]. *华南预防医学*, 2007, 33(3):29-30.
- [7] 鄢心革,彭国文,张 欣,等. 2003 年广东省流感病毒的流行概况及特征 [J]. *中国公共卫生*, 2005, 21(10): 1174-1175.
- [8] Wilson IA, Cox NJ. Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin [J]. *Annual Review of Immunology*, 1990, 8(1): 737-787.

(编辑 徐 杰)

我方积乾教授获“第五届全国高等学校教学名师奖”

由教育部组织开展的“第五届全国高等学校教学名师奖”评选结果于 2009 年教师节到来之际揭晓,中山大学公共卫生学院方积乾教授榜上有名。2009 年 9 月 9 日在北京人民大会堂举行了隆重的授奖仪式,国家领导人胡锦涛、温家宝、李长春、习近平等同志出席并接见了获奖教师。方积乾教授是继王庭槐教授(第三届)、詹希美教授(第四届)之后,中山大学医科的第三位“国家教学名师”。方积乾教授 1961 年于复旦大学数学系毕业,一直勤奋耕耘于医学统计学教学的第一线,其间于 1985 年在美国加州大学伯克利分校获生物统计学博士学位。在近半个世纪的教学生涯中,方教授十分注重本科生教学,致力于教学改革探索,带领教学团队取得一系列的教学改革成果,并将《医学统计学》培植为国家精品课程(2008)。

(中山大学公共卫生学院医学统计与流行病学系)