

浙江省 1998 - 2005 年甲 3 亚型流感病毒株 HA1 区和 NA 区基因特性分析

卢亦愚 严菊英 茅海燕 冯燕 徐昌平 周敏 余蓓蓓

【摘要】 目的 分析近几年浙江省甲 3 亚型流行性感(流)感流行株血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)基因的特性、变异与流感流行的关系。方法 选择浙江省 1998 - 2005 年流感流行期间分离的甲 3 亚型代表株 25 株,提取病毒 RNA,扩增 HA1 和 NA 基因,进行序列测定,用 BioEdit 软件分析处理。结果 浙江省近几年甲 3 亚型流感流行株在 HA1 区的核苷酸长度均为 987 bp,编码 329 个氨基酸;在 NA 区的核苷酸长度为 1362 bp,编码 454 个氨基酸。1998 - 2005 年甲 3 亚型流感病毒 HA1 区与 NA 区的氨基酸同源性分别在 90.9% ~ 99.3% 与 95.2% ~ 99.5% 之间,HA1 区的变异较 NA 区更大。这 8 年间在 HA1 区共发生了 30 个氨基酸的替代,其中 14 个氨基酸位点涉及 HA1 区的 4 个抗原决定簇;NA 区发生了 21 个氨基酸替代,其中 5 个氨基酸位点涉及 NA 区的 3 个抗原决定簇。在 1998 与 2002 年无论是 HA1 区还是 NA 区,均产生了较大的变异,在氨基酸进化树上也形成了独立的分支。近年的甲 3 亚型毒株 HA1 区有 11 个糖基化位点,较早期毒株 A/Aichi/2/68 增加了 5 个,仅 1998 年至今的 8 年中就增加了 3 个。结论 浙江省 1998 与 2002 年的二次较大规模的甲 3 亚型流感流行均与病毒的抗原性漂移有关。

【关键词】 流行性感(流)感病毒;甲 3 亚型;基因特性

Genetic analysis on HA1 and NA regions of influenza virus subtype A3 isolates of Zhejiang province during 1998 - 2005 LU Yi-yu, YAN Ju-ying, MAO Hai-yan, FENG Yan, XU Chang-ping, ZHOU Min, YU Bei-bei. Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310009, China

【Abstract】 **Objective** To study the relationship between influenza epidemic and genetic characteristic on HA and NA regions of influenza virus subtype A3 isolates of Zhejiang province in the recent years. **Methods** RNA of 25 influenza virus subtype A3 isolates, circulated in Zhejiang province during 1998 to 2005, was extracted. HA1 and NA regions were amplified and sequenced. All the sequence data were analyzed using BioEdit. **Results** HA1 and NA regions of all the isolates belonged to 987nt and 1362nt, encoding protein of 329 and 454 amino acids respectively. Isolates shared amino acid homology of 90.9% - 99.3% and 95.2% - 99.5% on HA1 and NA regions, while divergence on HA1 was greater than that on NA region. During a period of 8 years, 30 amino acids on HA1 region were substituted and 14 of which refer to 4 antigenic determinant sites. Meanwhile, 21 amino acids on NA region were substituted and 5 of which referred to 3 antigenic determinant sites. Significant divergences, both in HA1 and NA, were observed among isolates in 1998 and 2002, showing that they belonged to absolutely different branches. Additionally, influenza virus subtype A3 isolates identified in recent years, with 11 N-linked glycosylation sites in HA1 region, had 5 sites more than early A/Aichi/2/68 strain. Since 1998, 3 sites had been inserted in epidemic strains, indicating the accelerated trend of glycosylation sites were increasing. **Conclusion** There is a correlation between antigenic drift of influenza virus subtype A3 and the two epidemics in Zhejiang province in 1998 and 2002.

【Key words】 Influenza virus; Subtype A3; Genetic characteristic

甲 3 亚型(H3N2)流行性感(流)感病毒是近年来在我国引起人群流感暴发的主要原因,而流感病毒的血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)是最主要的病毒抗原,它不仅与机体的免疫应答密切相关,而且这二个抗原基因的变异是流感病毒发生抗原变异的

分子基础。本研究对 1998 - 2005 年间分离到的甲 3 亚型流感病毒株进行了 HA 基因和 NA 基因的特性分析,从分子水平对甲 3 亚型流感病毒的变异进行探讨。

材料与方 法

基金项目:浙江省自然科学基金重点资助项目(Z303909)
作者单位:310009 杭州,浙江省疾病预防控制中心

1. 标本来源:1998 - 2005 年浙江省流感流行期

间,从浙江省儿童医院和邵逸夫医院门诊、急诊处采集患者上呼吸道感染、体温>38℃的疑似流感患者含漱液标本,冷藏保存。

2. 病毒分离和鉴定:含漱液标本经处理后同时接种 MDCK 细胞和 9-11 日龄鸡胚,阳性分离物用血凝抑制试验(HI)进行型别鉴定。具体操作步骤参考《流行性感病毒及其实验技术》^[1]。MDCK 细胞、流感标准毒株和抗血清由国家流感中心和 WHO 提供。病毒 RNA 提取采用德国 QIAGEN 公司的 Reansy Mini Kit,按试剂盒说明书操作。引物:RT 采用通用引物 5'-AGC AAA AGC AGG-3',HA1 区序列扩增引物采用:HA1 F:5'-GCA AAA GCA GGG GAT AAT TC-3',HA1 R:5'-TCT ATG AAA CCT GCT ATT GC-3'。NA 区序列扩增引物采用:NA F:5'-ATG AAT CCA AAT CAA AAG ATA-3',NA R:5'-ATA GGC ATG AGA TTG ATG/A TC-3'。引物均由上海生物工程公司合成纯化。逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)采用 TaKaRa 公司 one step RT-PCR kit,反应体系为:ddw 1.4 μl、10×buffer 2 μl、dNTPmix(2.5 mmol/L each) 4 μl、20 pmol universal primer 1 μl、RNasin(40 U/μl) 1 μl、提取的病毒 RNA 10 μl、AMV-RT(40 U/μl)0.6 μl,混合后 42℃ 1 h,95℃ 5 min,进行逆转录。PCR 采用 ddw 66.5 μl、10×Taq buffer 10 μl、dNTPmix(2.5 mmol/L each) 8 μl、Taq 0.5 μl、20 pmol sense 与 antisense primer 各 2.5 μl、50℃ 30 min 逆转录后,94℃ 2 min,然后 94℃ 30 s,51℃ 30 s,72℃ 1 min,35 个循环反应后 72℃ 9 min,最后转入 4℃。

3. 序列测定和统计学分析:采用 ABI PRISM 公司的 DNA Sequencing kit (Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction),合成相关引物后

采用 per mix 4 μl、5× Sequencing buffer 2 μl、primer 3.2 pmol、DNA 50 ng、补足 ddw 至 20 μl、96℃ 30 s 预变性,然后 96℃ 10 s,50℃ 5 s,60℃ 4 min,25 个循环后转入 4℃。最后采用 Sephadex G-50 除去多余引物等干扰物质,冷冻干燥后上 ABI 3100 Genetic Analyzer 进行全自动序列测定。WHO 推荐疫苗株与国内外相关参考株的 HA1、NA 序列,由美国 NCBI 的 GenBank 下载。采用 BioEdit 5.0.9.1 软件对测序结果进行分析处理。

结 果

1. 甲 3 亚型流感 HA1 区序列的基因特性与分析:对 1998-2005 年间的 25 株甲 3 亚型的流感病毒 HA1 基因区进行了序列测定,核苷酸均为 987 bp,未发现核苷酸的丢失或插入。由此推导 HA1 区的氨基酸为 329 个。这些甲 3 亚型 HA1 区的氨基酸同源性在 90.9%~99.3% 之间,分离年代越接近的毒株同源性越好(表 1)。2005 年的甲 3 亚型流行株 A/浙江/209/05 与 1998 年的 A/浙江/10/98 相比,HA1 区的同源性仅 90.9%,这 8 年间共发生了 30 个氨基酸的替代,其中 14 个位点分别位于抗原决定簇 A 区的 133~137 和 140~146 位氨基酸,B 区的 156~160 位和 187~198 位氨基酸,以及 E 区的 83 位氨基酸。

在这 8 年间,有二次较大的变异,即为 1998 与 2002 年,特别是 1998 年甲 3 亚型流感流行期间,共分离到二类毒株,一类是占不到 10% 的 O 相类毒株,以 A/浙江/10/98 为代表;另一类是占当年分离株 90% 以上的 D 相类毒株,以 A/浙江/18/98 为代表。二者之间在 HA1 区的氨基酸变异数达 13 个,同源性仅 96.0%,存在较大的差异。此外,2002 年

表 1 浙江省近年来甲 3 亚型流感病毒 HA1 区不同位点的氨基酸替代

病毒株	25	50	57	62	75	83	121	124	131	133	137	142	144	145	155	156	158	159	160	172	186	189	192	194	196	202	222	225	226	227	253	276	326			
A/Wuhan/359/95	L	R	R	K	H	E	T	G	A	D	Y	G	V	K	H	K	E	Y	K	D	S	S	T	I	V	V	W	G	I	S	Y	N	K			
Zhejiang/10/98	H	.		
Sydney/5/97	.	.	.	E	.	N	S	.	N	S	I	.	.	Q	K	A	K	.	
Zhejiang/18/98	.	.	.	E	.	N	S	.	N	F	R	I	.	.	Q	K	L	A	V	.	.	.	K	.	
Panama/2007/99	.	.	Q	E	.	N	S	.	N	S	R	N	.	.	Q	K	.	E	.	.	I	L	A	V	K	.	
Zhejiang/06/99	.	.	Q	E	.	N	S	.	N	S	R	I	.	.	Q	K	.	R	L	A	V	K	.	
Moscow/10/99	.	.	Q	E	.	N	S	.	N	S	R	I	.	.	Q	K	.	R	L	T	K	.	
Zhejiang/8/02	.	G	Q	E	.	K	N	S	T	N	S	R	N	.	Q	K	.	E	G	.	I	L	A	I	R	D	V	K	.	
Zhejiang/80/03	I	G	Q	E	Q	K	N	S	T	N	S	R	N	.	T	H	K	.	E	G	.	I	L	A	I	R	D	V	P	K	.	
Zhejiang/550/04	I	G	Q	K	Q	K	N	S	T	N	S	R	N	N	T	H	K	F	.	E	G	N	I	L	A	I	R	D	K	T	
Zhejiang/209/05	I	G	Q	E	Q	K	N	S	T	N	S	R	N	N	T	H	K	F	.	E	G	N	I	L	A	I	R	N	.	P	K	R
Fujian/3/03	I	G	Q	E	Q	K	N	S	T	N	S	R	N	.	T	H	K	.	E	G	.	I	L	A	I	R	D	V	K	.
California/7/04	I	G	Q	E	Q	K	N	S	T	N	S	R	N	N	T	H	K	F	.	E	G	N	I	L	T	I	R	D	.	P	K	.

的 A/浙江/8/02 与 1999 年的 A/浙江/06/99 之间,在 HA1 区的同源性为 96.6%,也存在相当的变异。从 HA1 的系统进化树上也可看出,2002 年以后的毒株形成了另一个分支(图 1a)。

此外,上述毒株在 HA1 区有 8~11 个糖基化位点(N-X-T/S),其中 A/浙江/10/98 仅 8 个糖基化位点,与近年毒株相比缺少 122、133 与 144 位上的位点,A/浙江/18/98 与 A/浙江/06/99 均有 10 个糖基化位点,比前者增加了 122 与 133 位上的 2 个糖基化位点,而 1999 年以后的毒株均有 8、22、38、63、122、126、133、144、165、246 与 285 位共 11 个糖基化位点。

2. 甲 3 亚型流感 NA 基因特性与分析:所测定的甲 3 亚型流感病毒 NA 基因的核苷酸均为 1362 bp,由此推导的氨基酸数为 454 个。浙江省

1998-2005 年间甲 3 亚型毒株在 NA 区共发生了 21 个氨基酸变异,其中 5 个氨基酸分别涉及 NA 的 3 个抗原决定簇,即 A 区 1 个,B 区 3 个与 C 区 1 个,分别位于抗原决定簇 A 区的 383~387 位氨基酸,B 区的 197~200 与 221 位氨基酸以及 C 区的 339 位氨基酸。其中以 1998-1999 年、1999-2002 年之间的氨基酸变异最大,分别均达到 11 个与 8 个,2002 年以后的毒株在基因进化树上也形成独立分支(表 2、图 1b)。2005 年的甲 3 亚型流行株 A/浙江/209/05 与 A/浙江/10/98 相比,其 NA 区的氨基酸同源性为 95.2%。其中 A/浙江/10/98 与 A/浙江/18/98 间氨基酸同源性为 98.7%;A/浙江/8/02 与 A/浙江/06/99 之间的氨基酸同源性为 98.2%,反映出近 8 年来甲 3 亚型毒株的 NA 区也发生了较大的改变,但其变异程度略小于 HA1 区。

表 2 浙江省近年来甲 3 亚型流感病毒 NA 区不同位点的氨基酸替代

病毒株	9	18	23	30	42	43	93	143	197	199	208	216	221	249	265	267	285	307	329	339	370	381	385	401	431	432	437	
A/Wuhan/359/95	T	A	L	V	C	N	K	R	H	E	D	G	K	R	I	P	S	V	N	N	L	G	K	G	K	Q	W	
Zhejiang/10/98	M	
Sydney/5/97	S	P	F	E	
Zhejiang/18/98	S	.	.	.	K	P	F	E	
Panama/2007/99	T	.	P	.	.	.	D	S	E	
Zhejiang/06/99	N	G	D	.	N	.	.	K	T	.	P	.	.	.	D	.	E	L	
Moscow/10/99	N	G	D	.	N	.	.	K	T	.	P	.	.	.	D	.	E	L	
Zhejiang/8/02	.	S	F	I	F	.	N	V	D	.	N	.	K	T	T	P	I	.	D	.	E	N	L	
Zhejiang/80/03	.	S	F	I	F	.	N	V	D	.	.	V	K	T	T	P	I	.	D	.	E	N	D	N	.	.	L	
Zhejiang/550/04	.	S	F	I	F	.	D	V	D	K	N	V	E	K	T	T	P	I	.	D	.	E	N	.	.	.	E	L
Zhejiang/209/05	.	S	F	I	F	.	N	V	D	K	N	V	E	K	T	T	P	I	.	D	.	E	N	.	.	.	E	L
Fujian/411/02	.	.	.	I	F	.	D	V	D	K	N	V	E	K	T	T	P	I	T	D	.	E	N	.	.	.	E	.
California/7/04	.	S	F	I	.	.	D	V	D	K	N	V	E	K	T	T	P	I	.	D	.	E	N	.	.	.	E	L

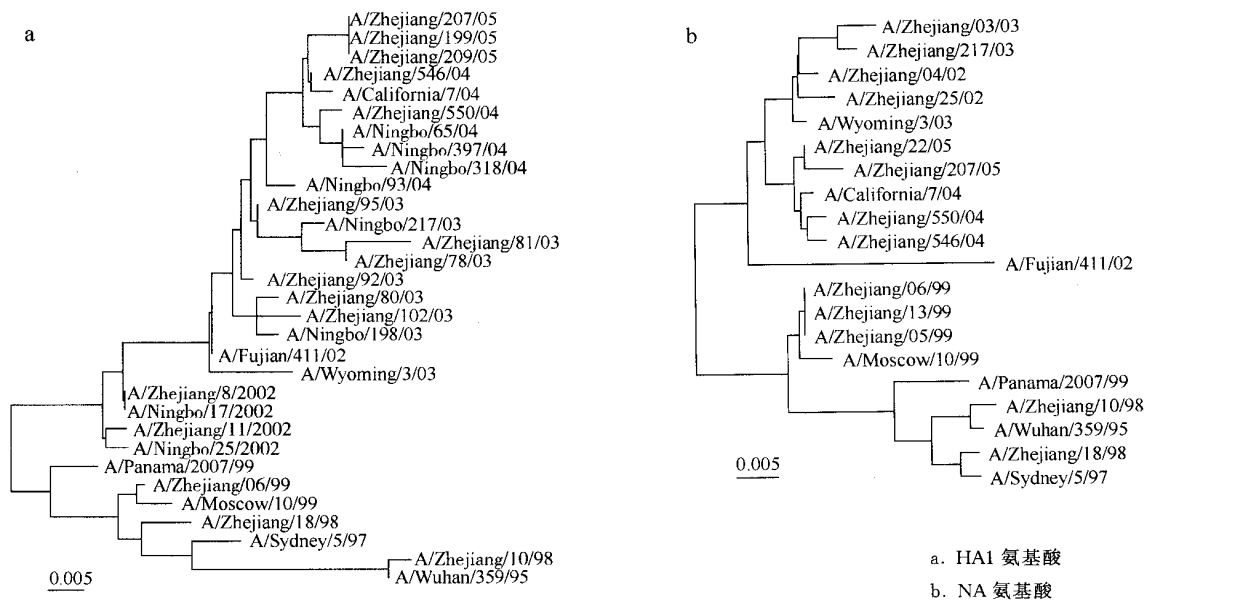


图 1 甲 3 亚型流感病毒 HA1、NA 氨基酸系统进化树

甲 3 亚型 NA 区的糖基化位点, 1999 - 2005 年浙江甲 3 亚型毒株(除 2002 年外)的 NA 区都具有 61、70、86、93、146、200、234、329 和 402 位的 9 个糖基化位点。其中 1998 年的 A/浙江/10/98、A/浙江/18/98 以及 A/浙江/550/04 缺少 93 位上的糖基化位点, 比其他毒株少 1 个, 仅 8 个糖基化位点。

讨 论

HA 与 NA 是流感病毒的重要表面抗原, 与流感病毒的抗原变异密切相关。甲 3 亚型流感病毒的 HA1 区上至少有 A、B、C、D 与 E 5 个抗原决定簇^[2,4], 尤其 A 与 B 抗原决定簇对流感病毒抗原性的影响更大; NA 蛋白分子上也已知有 A、B 与 C 3 个抗原决定簇^[2]。在人群免疫的压力下, HA 与 NA 常常发生抗原漂移, 引起病毒抗原性的改变, 使以往人群在流感病毒感染后体内所产生的特异性抗体, 不能阻止新变异病毒的侵入, 从而引起流感的暴发或流行^[5]。

浙江省近 8 年来的甲 3 亚型流感病毒在 HA1 区和 NA 区的氨基酸变异, 主要集中在 1998 与 2002 年二个时间段, 其他年份相对比较稳定。1998 年的主要流行株 A/浙江/18/98 类毒株, 与 1997 年的流行株 A/广东/66/97 及 A/香港/1/97 株在 HA1 区存在 16 个氨基酸的差异, 其中涉及抗原决定簇区达 12 个, 二者间已经发生了相当的变异。同时, A/浙江/18/98 与当年的疫苗株 A/武汉/359/95 相比, 在 HA1 区发生了 13 个位点的氨基酸变异, 其中位于抗原决定簇 A 区与 B 区分别有 5 个与 4 个, 涉及 C、D 与 E 区的各有 1 个。在 NA 区, A/浙江/18/98 与上一年的甲 3 流行株 A/志贺/25/97 以及当时疫苗株 A/武汉/359/95 之间分别仅有 4 个与 5 个氨基酸差异, 表明 NA 区的变异要小于 HA1 区。而 2002 年的流行株 A/浙江/8/02, 无论与当时的疫苗株 A/莫斯科/10/99, 还是与 3 年前的流行株 A/浙江/06/99 相比, 在 HA1 区均有 13 个位点发生了氨基酸变异, 其中有 9 个位点涉及抗原决定簇区; 同时与上一年甲 3 流行株 A/香港/4/01 之间, 也存在 11 个位点的氨基酸差异。在 NA 区, A/浙江/8/02 与 A/浙江/06/99、A/台湾/2332/01 之间分别有 8 个与 11 个位点的氨基酸差异, 与疫苗株 A/莫斯科/10/99 存在 10 个位点的氨基酸差异。表明浙江省 1998 和 2002 年的流行株与各自同期的 WHO 疫苗推荐株以及前期的流行株相比, 在 HA1 与 NA 区均已存在相当的差异, 从氨基酸进化树上也可以看出它们已形成了单独

的分支。根据我省流感监测点的资料, 1998 与 2002 年流感发病率达到 2000/10 万以上, 显著高于其他年份。表明 1998 年浙江省发生了甲 3 亚型流感流行, 人群普遍具有了抵抗力, 但由于 HA 与 NA 不断发生抗原漂移的累积, 导致间隔 4 年后, 浙江省在 2002 年再次发生甲 3 亚型流感的流行。同时由于这 2 年甲 3 流感流行株与疫苗株之间的差异, 也提示当时甲 3 亚型流感疫苗的保护效果会受到一定影响^[6]。

近来的研究表明, 糖基化具有防止流感病毒蛋白被水解, 稳定蛋白的结构, 阻碍抗体对病毒粒的识别和清除等功能^[7]。本次测序甲 3 亚型毒株的 HA1 区有 8~11 个糖基化位点, 而早期 H3N2 流行株 A/Aichi/2/68 的 HA1 区仅有 8、22、38、81、165 与 285 共 6 个糖基化位点。近年的测序毒株与之相比, 除 81 位点消失外, 共新增加 6 个糖基化位点, 从 1968 - 1998 年中, 甲 3 亚型流感病毒 HA1 区的糖基化位点仅增加了 2 个, 而 1998 年以后仅若干年时间, 流感甲 3 亚型的糖基化位点就增加了 3 个, 提示 HA1 区的部分糖基化位点并非特别保守, 且这些位点的增加有加快的趋势, 而这些糖基化位点的增加, 会对流感病毒的抗原性产生一定程度的影响。在 NA 区, 当前 2005 年毒株存在 9 个糖基化位点, 与早期流行株 A/Aichi/2/68 NA 区的 8 个糖基化位点相比, 减少了第 69 位点而增加了 93 与 329 位点, 变异不大, 相对比较稳定。

上述结果显示, 近年来浙江省甲 3 亚型流感病毒 HA1 蛋白编码区变异频率高于 NA 蛋白, 蛋白的变异往往带来抗原漂移从而引起新一轮流感的流行, 因此密切监测 HA1 与 NA 基因, 特别是 HA 基因的变异情况, 对流感预测、预防与疫苗筛选都具有十分重要的参考价值。

参 考 文 献

- [1] 郭元吉, 程小雯. 流行性感病毒及其实验技术. 北京: 中国三峡出版社, 1997: 94-106.
- [2] Enrique T Munoz, Michael W Deem. Epitope analysis for influenza vaccine design. *Vaccine*, 2005, 23: 1144-1148.
- [3] Lee MS, Chen J. Predicting antigenic variants of influenza A/H3N2 viruses. *Emerg Infect Dis*, 2004, 10: 1385-1390.
- [4] Bush RM, Bender CA, Subbarao K, et al. Predicting the evolution of human influenza A. *Science*, 1999, 286: 1921-1925.
- [5] Nicholson Karl G. *Influenza*. London, UK, 2000: 54-81.
- [6] 卢亦愚, 严菊英, 孙朝英, 等. 1988 - 2005 年甲 3 亚型流感流行株与疫苗株的 HA1 区差异探讨. *中华流行病学杂志*, 2006, 27(12): 1069-1072.
- [7] 朱汝南, 钱渊, 王芳, 等. 北京市 1998 - 2004 年婴幼儿 A3 型流感病毒分离株 HA1 基因序列分析. *中华流行病学杂志*, 2006, 27(3): 241-244.

(收稿日期: 2007-05-24)

(本文编辑: 尹廉)