

· 实验研究 ·

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

朱汝南 钱渊 王芳 邓洁 赵林清 刘成贵

【摘要】 目的 了解 1998 - 2004 年北京地区婴幼儿中流行的 A3(H3N2)亚型流感病毒血凝素基因 HA1 区的基因变异特点。方法 提取该期间采集的呼吸道标本中 H3N2 亚型流感病毒的 RNA, 经逆转录-多聚酶链反应扩增得到 HA1 区基因片段。通过目的基因的克隆、测序或 PCR 产物直接测序, 进行序列分析。结果 1998 - 2004 年间北京地区婴幼儿中流行的 H3N2 亚型流感病毒血凝素 HA1 区基因均为 987 bp, 编码一个含 329 个氨基酸的蛋白质。这些 H3N2 亚型流感病毒血凝素 HA1 区的核苷酸和氨基酸同源性分别在 95.5% ~ 100.0% 和 93.0% ~ 100.0% 之间, 分离年份越近同源性越高。在 HA1 区有 7 个糖基化位点非常保守, 分别位于 8、22、38、63、126、165 和 285 位氨基酸。与 1997 年以前的毒株相比, 1997 年以后的毒株均在 122 和 133 位增加了一个糖基化位点。自 1999 年以后的毒株均在 144 位增加了一个糖基化位点。每年流行的毒株都较前一年的毒株出现了位于不同抗原决定簇或者受体结合位点的氨基酸替换。进化分析显示, 每年分离的毒株均与以前的毒株出现了不同程度的变化, 不断出现新的进化分支。结论 1998 - 2004 年间北京地区婴幼儿中流行的 H3N2 亚型流感病毒持续不断地发生着点突变, 导致抗原性不断发生漂移。加强监测和密切关注其变异动向对防控流感流行有极其重要的意义。

【关键词】 流感病毒; 血凝素基因; 序列分析

Sequence analysis of the HA1 regions of hemagglutinin genes of influenza viruses(H3N2) isolated from children in Beijing from 1998 - 2004 ZHU Ru-nan, QIAN Yuan, WANG Fang, DENG Jie, ZHAO Lin-qing, LIU Cheng-gui. Laboratory of Virology, Beijing Municipal Laboratory of Infection and Immunity, Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020, China
Corresponding author: QIAN Yuan, Email: yqianbjc@263.net

【Abstract】 **Objective** To characterize the HA1 regions of hemagglutinin gene of influenza viruses (H3N2) isolated from children in Beijing from 1998 - 2004. **Methods** The HA1 regions of hemagglutinin gene were amplified by RT-PCR from the viruses isolated and identified as A3(H3N2) from clinical samples collected from infants and children during the peak seasons of influenza between 1998 and 2004. PCR products were sequenced or cloned into T-A vector and were analyzed after being sequenced. **Results** The HA1 regions of hemagglutinin genes amplified from those isolates were 987 bp in length, encoding a protein of 329 amino acids in length. The identities of nucleotides and amino acids among these H3N2 isolates in Beijing and vaccines strains from 1998 - 2004 were 95.5% - 100.0% and 93.0% - 100.0%, respectively. The homology of the HA1 regions were related to the date of virus isolation, meaning the homology was higher among those strains isolated in nearer dates than others. Seven potential N-linked glycosylation sites in the HA1 regions located at amino acid positions 8, 22, 38, 63, 126, 165 and 285 were conserved in all the viruses analyzed. Two sites at 122 and 133 were inserted in those virus isolated after 1997, and another site at 144 appeared in those isolated after 1999. More amino acid substitutions located in the five putative antigenic sites or receptor binding sites were found more in the isolates than the isolates from previous year. Phylogenetic analysis showed new branches appeared continuously during 1998 - 2004. The strains isolated during winter in 2004 belonged to different branches, suggesting the appearance of new variants. **Conclusion** Amino acid substitutions continuously occurred in the HA1 regions of hemagglutinin genes in influenza virus(H3N2) isolated from children in Beijing from 1998 - 2004, which might have resulted in antigenic drift and led to the appearance of new variants.

【Key words】 Influenza virus; HA1 gene; Sequence analysis

儿童是对呼吸道传染病最易感的敏感人群,对儿童中的流感进行监测有着特殊重要的意义。A3 (H3N2)亚型流感病毒抗原变异相当活跃,往往是流行优势株,其血凝素基因的变异是病毒抗原性变异的分子基础^[1]。本研究对1998-2004年间分离到的、在北京地区婴幼儿中流行的H3N2亚型流感病毒的血凝素基因HA1区的序列进行了比较分析,从分子水平初步了解北京地区儿童中流感病毒的变异特点和规律。

材料与方法

1. 毒株:27株H3N2亚型流感病毒为1998-2004年间从首都儿科研究所附属儿童医院就诊患儿的呼吸道标本中分离。标本接种MDCK细胞后,用WHO流感诊断试剂盒经血凝抑制试验鉴定为H3N2亚型流感病毒。对1998-2002年各1株、2003年4株、2004年18株病毒进行了HA1区序列分析。毒株均在-70℃冻存。

2. 试剂:Trizol和逆转录酶M-MLV为Invitrogen公司产品;引物由上海博亚生物技术有限公司合成;Taq酶Expand Long Template PCR System为Boehringer Mannheim公司产品;DNA凝胶纯化回收试剂盒和载体pBS-T为天为时代科技有限公司产品;WHO流感诊断试剂盒由美国疾病预防控制中心提供。

3. 血凝素基因HA1区扩增、克隆和测序:使用Trizol提取病毒悬液中的RNA,用随机引物逆转录合成cDNA。HA1区基因扩增引物为:5'-ATGAAGACTATCATTGCT-3'和5'-ATTGCTGCTTGAGTGCTT-3';反应条件为:94℃ 5 min, 94℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 80 s, 扩增35个循环;72℃ 5 min。预期扩增产物大小为1184 bp。PCR产物经纯化后,与载体pBS-T连接,进行克隆测序。另一部分毒株直接用PCR产物进行测序,并加一测序引物5'-TAAGGGTAACAGTTGCTG-3'确证其5'端序列。

4. 序列和种系进化分析:应用DNASar和Clustal W软件将测序结果与历年WHO推荐的北半球H3N2亚型流感病毒疫苗株血凝素基因HA1区进行序列和种系进化分析。这些疫苗株包括:1996-1997年A/Nanchang/933/95(Nanchang95);

1997-2000年A/Sydney/5/97(Sydney97);2000-2001年A/Panama/2007/99(Panama99);2001-2004年A/Panama/2007/99和A/Moscow/10/99(Moscow99);2004-2005年北半球疫苗株A/Fujian/411/2002(Fujian02)和南半球疫苗株A/Wellington/1/2004(Wellington04);2005-2006年北半球疫苗株A/California/7/2004(California04)。

结 果

1. 血凝素基因HA1区测序结果及同源性分析:所测定的H3N2亚型流感病毒血凝素HA1区基因均为987 bp,编码一个含329个氨基酸的蛋白质,所有毒株的第329位氨基酸都是精氨酸。血凝素HA1区的核苷酸和氨基酸同源性分别在95.5%~100.0%和93.0%~100.0%之间,分离年份越接近的毒株同源性越高。18株2004年分离的病毒中有3株核苷酸同源性为100%,有两组(各有4株和5株病毒)之间的氨基酸同源性为100%。有一株2003-2004年流感流行季节的毒株(H4205)与Fujian02和Wellington04之间的核苷酸和氨基酸的同源性分别为99.1%和99.4%。2004年流感流行季节分离到的其他17株毒株的HA1与2005-2006年推荐疫苗株California04的氨基酸同源性(>98.8%,大多数>99.1%)高于与Fujian02和Wellington04的同源性(98.2%和98.5%),提示2004年北京地区冬季流行的H3N2亚型病毒较前一年流感季节已经出现了一定程度的变化。

2. HA1区基因特性分析:所有毒株在14、52、64、76、97、139、281和305位的半胱氨酸均保守不变。H2585和H4829分别在302和98位发生氨基酸替换而增加了一个半胱氨酸。有8个糖基化位点非常保守,分别位于8、22、38、63、126、165、246和285位氨基酸。表1显示了1998年以后的毒株在5个抗原决定簇和受体结合位点(RBS)发生了氨基酸替换。可以看出,每年流行的毒株与前一年的毒株或当年的推荐疫苗株比较,都出现了位于不同抗原决定簇或者RBS的氨基酸替换。

3. HA1区种系进化分析:进化树显示,1998-1999年分离的毒株与疫苗株Sydney97进化关系更近;1999-2001年分离的毒株与疫苗株Panama99进化关系更近;2002-2003年分离的毒株与疫苗株

Fujian02 和 Wellington04 进化关系更近;而 2004 年分离的毒株中只有 H4205 与 Fujian02 和 Wellington04 进化关系更近,其余的毒株都与这两株疫苗株的进化关系出现了明显分支,而与 2005 - 2006 年的疫苗株 California04 属于一个进化分支。另外,在 2004 年分离的毒株中有 5 株存在一个新的分支(图 1)。

讨 论

血凝素为病毒表面糖蛋白,其糖基侧链在稳定血凝素蛋白的三维结构和诱导机体产生中和抗体方面起作用。HA1 的氨基酸序列的改变常与流感病毒血凝素抗原性变化密切相关,有时也会造成病毒宿主范围的改变。一般认为作为一个具有代表性的新变种必须在其 HA1 区蛋白分子有 4 个以上氨基酸序列发生了替换,而且替换必须涉及到 2~3 个抗原决定簇^[2]。目前已知 H3N2 亚型流感病毒 HA1 蛋白分子上的抗原决定簇有 5 个,即 A、B、C、D 和 E^[2]。A 区位于由 140~146 位氨基酸形成的突出环上及 133~137 位氨基酸;B 区位于 155 位上面的主环(156~160)及球区末端围绕 α 螺旋结构的 187~198 位氨基酸;C 区位于球区下方 53、54、275 和 278 所在的区,有 52 位与 277 位半胱氨酸间的二硫键相连所形成三维结构的膨胀部;D 区位于 HA 三聚体交界处,由 207、174 位等表面氨基酸组成;E 区由 63、78、81 和 83 位形成的表面氨基酸区。上述抗原决定簇的氨基酸发生替换一般会引起 HA 蛋白的抗原漂移。位于 HA 蛋白上的 RBS 的氨基酸替换也与病毒颗粒抗原漂移有关。抗原决定簇 A 和 B 以及 RBS 在流感病毒的进化中起到相对重要的作用^[3]。对 1998 - 2004 年间北京地区婴幼儿中流行的 H3N2 亚型流感病毒血凝素基因 HA1 区序列分

析比较结果显示,不同年份的分离株 HA1 区基因之间虽然具有较高的核苷酸和氨基酸同源性,而且分离年份越接近的毒株之间同源性越高,但是 HA1 区的核苷酸在持续不断地、快速地发生着点突变,导致氨基酸的改变多数位于抗原决定簇 A、B 区或受体结合位点,提示流感病毒的抗原漂移可能主要受人群免疫压力的影响。H3N2 亚型流感病毒活动增强往往与流行毒株和当年疫苗株之间出现较为明显的氨基酸点突变有关。我们在 2004 年 8 月以后分离的毒株与疫苗株 Fujian02 之间都出现了位于 145 (A)、159(B)、189(B)、226(RBS)位的氨基酸替换,部分毒株在 227(RBS)和 326 位出现了氨基酸替换;少数毒株与刚公布的 2005 - 2006 年北半球疫苗株 California04 相比也出现了个别氨基酸的替换,因此密切关注其 HA1 蛋白分子的变异情况,充分认识到变异对其流行状况和疫苗使用效果的影响,将会更好地防控流感流行。

与 1997 年相比,所测的毒株均在 122 和 133 位增加了一个糖基化位点,自 1999 年以后的毒株均在 144 位增加了一个糖基化位点。HA1 区糖基化位点逐渐增多,增加的糖链可能会影响蛋白的抗原特性以及宿主 CD4⁺ 细胞对 HA 分子的识别^[4]。

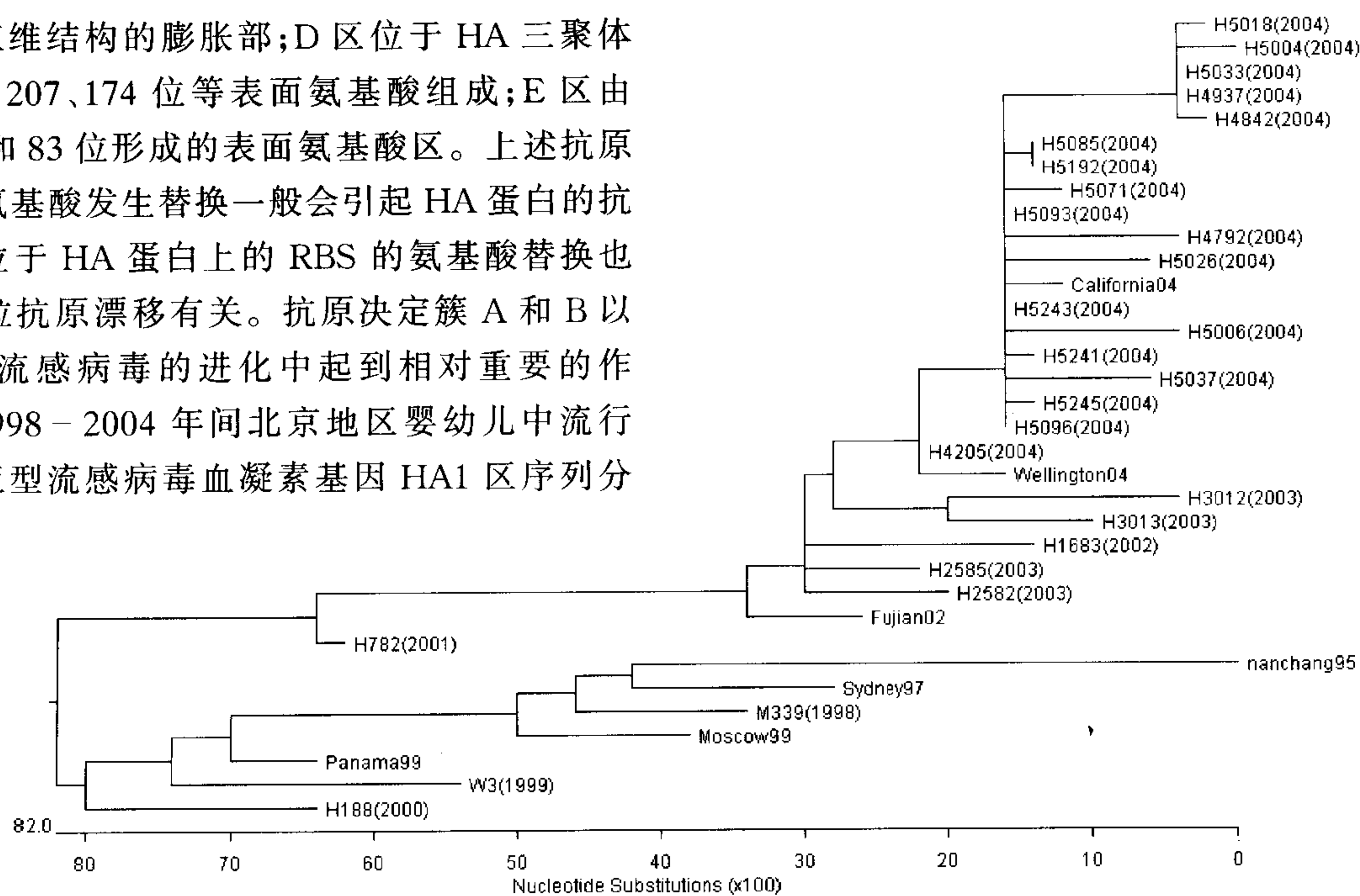


图1 H3N2 亚型流感病毒血凝素 HA1 区核苷酸序列的种系进化树

表1 H3N2 亚型流感病毒血凝素 HA1 区不同位点的氨基酸替换

氨基酸位点	25	50	57	62	75	83	121	124	131	133	137	142	144	145	155	156	158	159	172	186	189	192	194	196	202	222	225	226	227	276	326	
Nanchang95	L	R	R	K	H	E	T	G	A	D	Y	G	V	K	H	K	E	Y	D	S	S	T	L	V	V	W	G	I	S	N	K	
Sydney97	.	.	.	E	.	.	N	S	.	N	.	S	I	.	.	Q	K	I	A	K	.
M339(98)	.	K	.	E	.	.	N	S	.	N	F	R	I	.	.	Q	K	L	A	.	.	.	V	.	K	.	
W3(99)	.	.	Q	E	.	.	N	S	.	N	S	R	N	.	.	Q	K	.	E	.	.	I	L	A	.	.	.	V	.	K	.	
Panama99	.	.	Q	E	.	.	N	S	.	N	S	R	N	.	.	Q	K	.	E	.	.	I	L	A	.	.	.	V	.	K	.	
Moscow99	.	.	Q	E	.	.	N	S	.	N	S	R	I	.	.	Q	K	L	T	K	.
H188(00)	.	G	Q	E	.	.	N	S	.	N	S	R	N	.	.	Q	K	.	E	.	.	I	L	A	.	.	D	V	.	K	.	
H782(01)	.	G	Q	E	.	K	N	S	.	N	S	R	N	.	.	Q	K	.	E	G	.	I	L	A	I	R	D	V	.	K	.	
H1683(02)	I	G	Q	E	Q	K	N	S	T	N	S	R	N	N	T	H	K	.	E	G	.	I	L	A	I	R	D	V	P	K	.	
H2582(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	.	
H2583(03)	I	G	Q	E	Q	K	N	S	T	N	S	R	N	.	T	H	K	.	E	G	N	I	L	A	I	R	D	V	P	K	.	
H3012(03)	I	G	Q	E	Q	K	N	S	T	N	S	R	N	.	T	H	K	.	E	G	N	I	L	A	I	R	D	V	P	K	R	
H3013(03)	I	G	Q	E	Q	K	N	S	T	N	S	R	N	.	T	H	K	F	E	G	N	I	L	A	I	R	D	V	P	K	R	
Fujian02	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	.	
Wellington04	I	G	Q	E	Q	K	N	S	T	N	S	R	N	.	T	H	K	F	E	G	N	I	L	A	I	R	D	V	P	K	.	
H4205(04)	I	G	Q	E	Q	K	N	S	T	N	S	R	N	.	T	H	K	F	E	G	N	I	L	A	I	R	D	V	P	K	.	
H4792(04)	I	G	Q	E	Q	K	N	S	T	N	S	R	N	N	T	H	K	F	E	G	N	.	L	A	I	R	D	.	P	K	.	
H5004(04)	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	D	.	.	K	T	
H5006(04)	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	D	.	P	K	.	
H5026(04)	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	D	.	P	K	T	
H5033(04)	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	D	.	.	K	.	
H5037(04)	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	D	.	P	K	.	
H5085(04)	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	D	.	P	K	.	
H5192(04)	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	D	.	P	K	.	
H5241(04)	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	D	.	P	K	.	
H5245(04)	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	D	.	P	K	.	
California04	I	GE	Q	E	Q	K	N	S	T	N	S	R	N	N	T	H	K	F	E	G	N	I	L	A	I	R	D	.	P	K	.	

注:对两组氨基酸同源性的 2004 年毒株各组取一个为代表进行比较

王勇等^[5]对 1968 - 2002 年全球流行的人 H3N2 亚型流感病毒血凝素 HA1 区的序列进化关系进行分析,认为历史上的分离株以年代大致分为两大谱系,以 1984 - 1985 年为分界线,第一个谱系的生存周期为 18 年。如果谱系的生存周期是有规律性,那么也许目前正是 A3 型流感病毒新的谱系的生成阶段,因此加强监测和密切关注其变化动向十分必要。

参 考 文 献

1 Lee MS, Chen J. Predicting antigenic variants of influenza A/H3N2

viruses. *Emerg Infect Dis*, 2004, 10:1385-1390.
 2 Bush RM, Bender CA, Subbarao K, et al. Predicting the evolution of human influenza A. *Science*, 1999, 286:1921-1925.
 3 Wiley DC, Cox N. Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutini. *Annu Rev Immunol*, 1990, 8:737-771.
 4 金奇,主编.流行性感病毒.医学分子病毒学.第 1 版.北京:科学出版社,2001.
 5 王勇,薛颖,陈淑霞,等. H3N2 亚型人流行性感病毒 HA1 的蛋白序列同源性比较、变异规律及结构与功能的分析. *病毒学报*, 2002,8:289-296.

(收稿日期:2005-04-28)

(本文编辑:孙强正)