

2000~2002 年我国流行的甲 3(H3N2) 亚型流感病毒抗原性及基因特性的研究

张烨 温乐英 李梓 郭俊峰 王敏 郭元吉

【摘要】 目的 了解 2000~2002 年我国流行的甲 3 流感病毒 HA 基因突变及其抗原变异情况。方法 鸡胚传代流感病毒,收获尿囊液作为抗原性分析抗原并提取病毒的 RNA,进行逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR),扩增产物用纯化试剂盒纯化后测序,用 MegAlign 软件进行基因种系发生树分析。结果 与 A/武汉/359/1995(H3N2)、A/Sydney/5/1997(H3N2)相比,2000~2002 年我国分离到的甲 3 亚型流感病毒的血凝素重链区氨基酸序列存在差异。2001~2002 年分离到的甲 3 毒株与 2000 年分离出的毒株的血凝素蛋白重链区(HA1)氨基酸序列有 4 个位点差异,它们分别位于 83、186、202 和 222 位,其中 83 和 186 分别位于抗原决定簇 E 和 B 区,其余均位于受体结合位点(RBS)的左臂。结论 2000~2002 年分离到的甲 3 亚型流感病毒的基因特性发生突变并导致其抗原性发生漂移。

【主题词】 正粘病毒科; 流感病毒 A 型,人; 抗原; 基因

Antigenic and genetic characterizations of group A influenza viruses (H3N2) circulated in men in China during 2000-2002 ZHANG Ye, WEN Le-ying, LI Zi, GUO Jun-feng, WANG Min, GUO Yuan-ji. National Institute of Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China

【Abstract】 Objective To understand the antigenic and genetic characteristics of influenza A (H3N2) viruses circulated in man in China from 2000 to 2002. **Methods** Embryonated chicken eggs inoculated with virus for amplification of viral yield. The harvesting egg allantoic fluids with influenza viruses were provided for testing antigen and RNA extraction. Virion RNA was transcribed into cDNA by reverse transcriptase, cDNA amplified by PCR, and the product of PCR was purified. Afterward RNA sequence analysis was performed by the dideoxynucleotide chain termination method using synthetic oligodeoxynucleotide primers. Finally the phylogenetic tree was analyzed with MegAlign software. **Results** The H3N2 viruses isolated during 2000-2002 were different in amino acid sequences on HA1 domain protein molecule from those of A/Wuhan359/1995 (H3N2) as well as those of A/Sydney/7/1997 (H3N2) strains. There were four different positions of amino acid sequence on HA1 domain protein molecule among the H3N2 viruses isolated in 2000 and during 2001-2002. They located at 83, 186, 202, 222 and 225 position, respectively. Of them 83 and 186 were in antigenic determinant E and B, respectively. The others located at left wall of the receptor binding site (RBS). **Conclusion** From the end of 2001 to the beginning of 2002, the influenza epidemic in Northern China caused by H3N2 virus was due to occurrence of antigenic and genetic changes of influenza A (H3N2) virus.

【Key words】 Orthomyxoviridae; Influenza A virus, human; Antigens; Genes

甲 3 亚型流感病毒是引起人类流感的主要病原之一,它曾经引起世界性的流感大流行。从我国 1997 年到 2002 年流感的流行情况分析来看,1999 年以前甲 3 亚型流感病毒的活动一直处于优势,2000~2001 年甲 3 亚型的活动明显减弱,直到 2001 年末甲 3 亚型在我国的东北、华北等大部分地区发生小规模流行,2002 年 7~9 月又在我国的广州引起了

局部的暴发流行。2002 年我国的甲 3 亚型流感病毒的活动占优势。因此,我们对 2000~2002 年各地分离到的甲 3 亚型流感病毒进行了抗原性及 HA1 基因特性进行了分析,探究其抗原性及基因特性的变化以便弄清活动增强的原因。

1 材料和方法

1.1 甲 3(H3N2)亚型病毒及抗血清 A/深圳/1/99、A/福建/151/2000、A/贵州/112/2001、A/哈尔滨/180/

作者单位:100052 北京,中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所流感研究室

2001、A/北京/125/2001、A/武汉/431/2001、A/CNIC/123/2001、A/广州/532/2002、A/湖南/367/2002、A/福建/411/2002。所有流感病毒接种 9 日龄鸡胚进行增殖,收获新鲜的鸡胚尿囊液,测定血凝效价,作为抗原使用并用于 RNA 的提取。抗鸡血清 A/深圳/1/99、A/福建/151/2000、A/CNIC/123/2001 抗血清均由国家流感中心提供。

1.2 抗原性测定 双向交叉血凝抑制实验,方法见参考文献[1]。

1.3 病毒 RNA 的提取 用新鲜的尿囊液按德国 Qiagen 公司的 Rneasy Mini Kit 中的 Rneasy Mini Kit Handbook 所提供的方法提取。

1.4 RT-PCR RT-PCR 所用的引物由宝生生物公司(大连)合成,引物 1: 5'AGCAAA GCAGGGG-ATAATT-3';引物 2: 5'CCTGGATTGCGCCGAAT-3';引物 3: 5'AGCAAA GCAGGGGAAAAT-3';引物 4: 5'GTAAATCCCGTTAATGCA-3'。逆转录酶、RNasin、TaqDNA 聚合酶均购自美国 Promega 公司。RT-PCR 方法见参考文献[2]。

1.5 PCR 产物纯化 按德国 Qiagen 公司的 QIAquick Gel Extraction Kit 中的 QIAquick Spin Handbook 所提供的方法纯化。

1.6 核苷酸序列测定 PCR 产物纯化后送宝生生物公司(大连)测序。

1.7 序列分析 序列分析种系发生树的绘制采用 DNASTAR MegAlign 软件。并从 GenBank 中摘录 A/武汉/359/95 (H3N2)、A/Sydney/5/97 (H3N2) 病毒的 HA1 序列参与序列分析,其收录号为 AF008722、AF180584。

2 结果

2.1 流感病毒抗原性分析 我们选择 7 株测定 HA 序列的甲 3 亚型流感病毒进行了抗原性分析,结果见表 1。可以看出 2001 年以后分离的甲 3 亚型流感病毒 A/CNIC/123/2001、A/天津/198/2001、A/北京/125/2001 效价比 A/深圳/1/99 的本身低 4 倍,比 A/福建/151/2000 的本身低 2 倍以上。这说明 2001 年以后分离的甲 3 亚型流感病毒的抗原性发生了变异。

2.2 基因特性分析 图 1 结果表明,所测定的毒株 HA1 区蛋白质序列均含 328 个氨基酸。与 1997 ~ 1998 年的流感甲 3 亚型国际疫苗株 A/武汉/359/95 (H3N2) 相比,我们测定的 2000 ~ 2002 年的甲 3 亚型流感病毒的 HA1 区的 25、50、57、62 和 75、83(抗原决

定簇 E 区),124、131、137 和 142、144(抗原决定簇 A 区),155、158、172(抗原决定簇 D 区),186 和 192(抗原决定簇 B 区)、194(RBS 的后壁)、196、202、222、225 (RBS 的左侧壁)、226 (RBS 的左侧壁)及 276 位发生了氨基酸替换;与 1998 ~ 2000 年的疫苗株 A/Sydney/5/97 (H3N2) 相比,我们测定的病毒的 HA1 区的 25、50、57、75、83、131、137、142、144、155、172、186、192、194、202、222、225、226 位点发生了氨基酸替换。

表 1 甲 3 亚型流感病毒株抗原分析

Tab. 1 Antigenic analysis of influenza A (H3N2) virus

抗原 Antigens	鸡抗血清 Chicken sera to		
	A/Shenzhen/ 1/99	A/Fujian/ 151/2000	A/CNIC/ 123/2001
A/Shenzhen/1/99	2 560	2 560	240
A/Fujian/151/2000	640	2 560	320
A/CNIC/123/2001	80	240	640
A/Tianjin/198/2001	120	320	320
A/Wuhan/431/2001	960	1 280	480
A/Beijing/125/2001	320	1 120	320
A/Guangzhou/1237/2001	960	1 120	240

2000 年分离到的甲 3 亚型病毒株有一部分毒株的 HA1 区氨基酸序列的 50、225、226 位点发生替换,而 2001 年以后的毒株也在这些位点发生了氨基酸的替换。2001 年分离的甲 3 亚型病毒与 2000 年的病毒株相比在 83、186、202、222 位存在着氨基酸的不同。2002 年分离到的甲 3 亚型流感病毒与 2001 年分离的病毒相比,在 25、75、131、155 位点存在氨基酸的差异。

2000 ~ 2002 年分离的甲 3 亚型流感病毒株与 A/武汉/359/95 (H3N2) 和 A/Sydney/5/97 (H3N2) 相比,除 A/贵州/112/2001 (H3N2) 外均在 144 位插入一个糖基化位点,A/贵州/112/2001 (H3N2) 又在 246 位丢失一个糖基化位点,从 HA1 区基因序列分析,A/贵州/112/2001 的基因特性更接近于 A/Sydney/5/97 (H3N2)。其 HA1 区基因与 A/Sydney/5/97 的同源性为 98.17%,与 A/福建/151/2000 的同源性为 96.03%,与 A/上海 1/1998 的同源性为 96.34%,与 A/深圳 1/1999 的同源性为 96.64%。

应用 DNASTAR MegAlign 绘制种系发生树见图 2。种系发生树也说明了 2000 ~ 2002 年我国分离到的甲 3 亚型流感病毒的抗原性及基因特性发生了变化。2000 ~ 2002 年分离的甲 3 亚型流感病毒株与 A/武汉/359/95 (H3N2)、A/Sydney/5/97 (H3N2) 间存在抗原性差异。从基因发生树上来看 A/贵州/112/2001 (H3N2) 的基因特性与 A/Sydney/5/97 (H3N2) 相类似。

[illegible]

" "表示氨基酸序列相同,黑线表示糖基化位点

图1 A(H3N2)亚型流感病毒 HA1 区氨基酸序列

The black line means the potential glycosylation site

Fig. 1 Deduced amino acid sequence of the HA1 gene of influenza A(H3N2) viruses

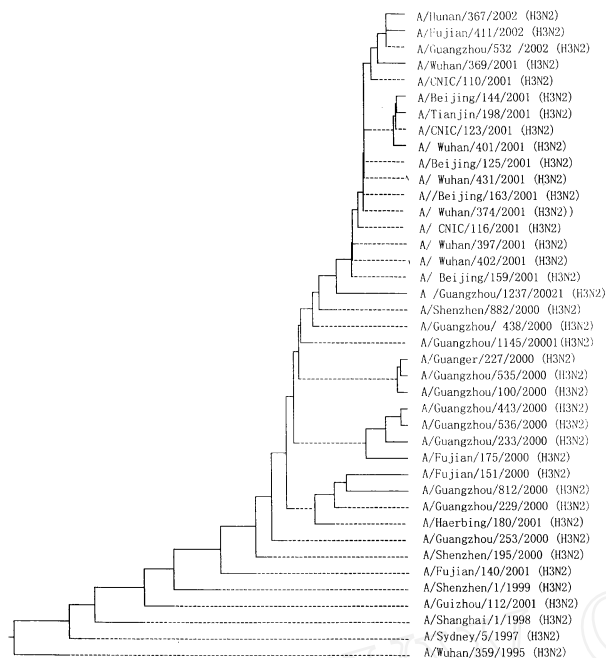


图 2 甲 3 亚型基因种系发生树

Fig. 2 Phylogenetic tree of influenza A (H3N2) viruses

3 讨论

流感病毒的抗原性变异与流感发生与流行密切相关。一般认为 HA1 蛋白分子的氨基酸替换发生 4 个以上并分布在两个以上的抗原决定簇上具有流行病学意义^[1]。2000 年分离的甲 3 亚型流感病毒 HA1 区氨基酸的替换,发生在 A、B、E 区及 RBS 的左侧壁和后壁。说明 2000~2002 年我国流行的甲 3 流感病毒的抗原性已经发生了变异。正是由于甲 3 亚型流感病毒抗原性发生了变异,才在人群中再次引起甲 3 亚型流感病毒的流行。流感病毒血凝素蛋白糖基化的主要作用是稳定血凝素蛋白结构,防止血凝素被水解以及阻碍抗体的识别。糖基化对血凝素的结构和功能十分重要。我们比较了甲 3 亚型流感病毒 HA1 区糖基化位点变异情况,2000 年以后分离的

流感病毒株与国际标准株 A/Sydney/5/97 (H3N2) 相比,在第 144 位增加了一个糖基化位点。A/贵州/112/2001 (H3N2) 的 144 位没有增加糖基化位点,而且又在 246 位缺失了一个糖基化位点。

有人认为 226 位氨基酸的改变能引起病毒 HA 蛋白与受体结合的特异性的改变^[3-5]。我们所测定的甲 3 流感病毒株在 226 位发生了改变,进一步证实了第 226 位的氨基酸发生替换对流感病毒抗原性变化来说是比较重要的。由于甲 3 亚型流感病毒 HA1 区的 RBS 的左侧壁和后壁及抗原决定簇 A、B、E 区都发生了氨基酸的替换,导致甲 3 亚型流感病毒的抗原性发生了漂移。而这种变异又是具有流行病学意义的,造成甲 3 亚型流感病毒的活动在平静了一年以后又在 2001 年冬季我国东北、华北等地区造成流感的小规模流行,并且引起 2002 年我国南方夏季的流感流行。由于流感病毒 HA 抗原性变异的幅度与其引起的流行程度有关,密切注意流感病毒的抗原性变异情况,对及时预测其流行情况有着重要的意义。

致谢:我们所采用的甲 3 亚型流感病毒的 HA1 区氨基酸序列除从 GenBank 中摘录和我们测定的以外,由美国 CDC 提供,在此表示感谢。

参 考 文 献

- 1 郭元吉,程晓雯. 流行性感冒病毒及其实验技术. 北京:三峡出版社,1997. 43-102.
- 2 Saiki RK, Gelfand DH, Stottels A, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 1988, 239:487-491.
- 3 Underwood PA. Receptor binding characteristics of strains of the influenza Hong Kong subtype, using a periodate sensitivity test. Arch Virol, 1985, 84:53-55.
- 4 Nobusawa E, Nakajima K. Amino acid substitution at position 226 of the hemagglutinin molecule of influenza (H1N1) virus affects receptor binding activity but not fusion activity. Virology, 1988, 167:8-14.
- 5 Hardy I, Li Y, Coulthart MB, et al. Molecular evolution of influenza A/H3N2 viruses in the province of Quebec (Canada) during the 1997-2000 period. Virus Res, 2001, 77:89-96.

(收稿日期:2003-10-30)