

2004年冬季北京患儿中低滴度甲 3型流感病毒 HA1基因特性分析

徐红 朱汝南 王芳 钱渊

【摘要】目的 分析 2004年流感流行季节北京地区流感样病患儿患者分离的低滴度甲 3型流感病毒血凝素 (HA1)基因的特性。方法 用 2004年流感流行季节分离的 22株低滴度甲 3型流感病毒提取病毒 RNA,经 RT-PCR扩增得到 HA1区基因片段。用生物信息软件分析 HA1区基因特性。结果 扩增的血凝素 HA1区基因均为 987 bp。22株 HA1氨基酸序列与当年的疫苗参考株比较,发现氨基酸变异,变异位点在 3个抗原决定簇 (A、B、D)和受体结合部位的位点,提示本流行季节的流感病毒变异较大,与世界卫生组织推荐 2005年疫苗参考株比较,与南半球参考株有 2个抗原决定簇 (A、D)的氨基酸存在不同,与北半球参考株无明显差异。还发现 1株变异,在高保守受体结合部位的底部 98位氨基酸也发生了变异。结论 2004年冬季流感流行株的变异倾向值得密切关注。

【关键词】 流感; 血凝素; 变异 (遗传学); 氨基酸

Characterization of low titer influenza subtype H3 viruses HA1 from children in Beijing the winter of 2004 XU Hong*, ZHU Runan, WANG Fang, QIAN Yuan, * Institute for Viral Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China

Corresponding author: XU Hong, Email: liuxu6328@263.net; QIAN Yuan, yqianbjc@263.net

【Abstract】 Objective To investigate HA1 hemagglutinin variant of influenza viruses isolated from children with influenza-like-illness (LI) patients in Beijing in the 2004—2005 season and all viruses were subtype H3 at low titer of HA. **Methods** RNA of the 22 strains of influenza A type (H3) from the LI children was extracted, HA1 fragment of hemagglutinin (HA) gene was amplified by RT-PCR and analyzed by bioinformatic softwares. **Results** 987 bps of HA1 coding 329 amino acid, which 22 strains influenza A type (H3 subtype) isolated from the 2004—2005 season, were amplified and compared with vaccine recommendation strains. We found that there were variations in their derivative amino acids of these strains with the vaccine strains of 2004 and variance sites in antigenic areas (A, B, D), and also in receptor sites. Comparing with the vaccine strains of southern hemisphere in 2005—2006 season recommended by WHO, the variances were detected at sites of antigenic areas, but there were no special variances between the isolated viruses and the northern-hemisphere vaccine strain in 2005—2006 season. In addition, one strain variance was also found at high conservation 98 of amino acid in bottom of receptor connect pocket. **Conclusion** The tendency of variations of influenza A subtype (H3) strains in the 2004 season would be noteworthy.

【Key words】 Influenza; Hemagglutinin; Variation (genetics); Amino acid

继中国香港首例禽流感病毒感染人的病例报告^[1-3]以来,2003年东南亚地区越南等国禽流感人感染事件又连续发生^[4],使全球对流感的关注倍增。世界卫生组织 (WHO)^[5]发出预警并呼吁各国

应该建立对流感大流行的防备计划,以应对可能发生的流感大流行。另外,1968年世界大流行迄今已36年,据历史记载,大流行间的最长间歇为39年,提示人类正面临着再次流感大流行的威胁。加强流感监测及时发现变异毒株和新毒株是防控大流行的关键。我们在2004年冬季婴幼儿患者中分离的甲3型流感病毒中有相当一部分毒株的血凝滴度很低。本研究选用这些毒株对其血凝素基因 HA1区进行分子水平分析,以探讨低滴度毒株血凝素 HA1

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 流感病毒室 (徐红);首都儿科研究所病毒研究室 (朱汝南、王芳、钱渊)

通讯作者:徐红,电子信箱:liuxu6328@263.net;钱渊,yqianbjc@263.net

的特性,核酸、氨基酸变异和抗原性变异特点,为了解 and 掌握流感变异及其流行规律提供基础数据,为防控流感策略的制定提供科学依据。

材料和方法

1. 病毒分离鉴定:参照 WHO 流感监测方法。主要步骤,将临床采集流感样病患儿的咽拭子或鼻咽洗液标本接种于 MDCK 细胞,33 培养,定期用豚鼠血细胞做血凝试验,血凝阳性者用血凝抑制试验鉴定。

2. 血凝抑制试验:采用 WHO 流感诊断试剂盒,由美国疾病预防控制中心 (CDC) 提供。

3. 分离毒株血凝素基因 HA1 区测序:选用 2004 年冬季首都儿科研究所附属儿童医院就诊患儿中分离的流感病毒毒株共 22 株,血凝滴度均 1 8。这些病毒都进行了核酸测序。(1) 引物:HA1 区基因 PCR 扩增测序引物为 H3F1: 5'-ATGAA GACTA TCA TTGCT-3' 和 H3R1184: 5'-ATTGCTGCTTGA GTGCTT-3', 扩增片段为 987 bp。除用以上两个引物测序外还加测另一个反应以确证其 5 端序列,引物为 5'-TAA GGGTAACA GTTGTG-3'。(2) 病毒 RNA 提取和血凝素基因 HA1 区扩增、克隆和测序:提取 22 株分离株的病毒 RNA,其 HA1 区基因使用 Qiagen 公司的 One-Step RT-PCR Kit 进行扩增,将产物直接进行测序或克隆测序。

4. 序列分析和系统树状分析:使用 Bioedit 和 ClustaW 等生物学软件进行序列分析和系统树状分析。选用近年 WHO 推荐的甲 3 型流感病毒疫苗株为参照 (疫苗株) 比对序列,它们是 A/Panama/2007/1999 和 2004—2005 年北半球疫苗株 A/Fujian/411/2002 (Fujian02) 和为 2005—2006 年新推荐的南、北半球疫苗株 A/Wellington/1/2004 (Wellington04) 和 A/Califimia/7/2004 (Califimia04)。

结 果

1. 病毒分离鉴定:血凝滴度 1 8 的甲 3 型流感病毒共 22 株,占甲 3 型的 68.7% (22/32)。

2. 血凝素基因 HA1 区核酸测序结果及核苷酸同源性分析:扩增的 22 株与当年的疫苗株、Fujian02 株较往年的疫苗株 Panama99 毒株关系近源;与 WHO 新推荐的 2005—2006 年度疫苗株 Wellington04 和 Califimia04 株更近源 (表 1)。

3. 流行株与疫苗参考株 HA1 的氨基酸序列比

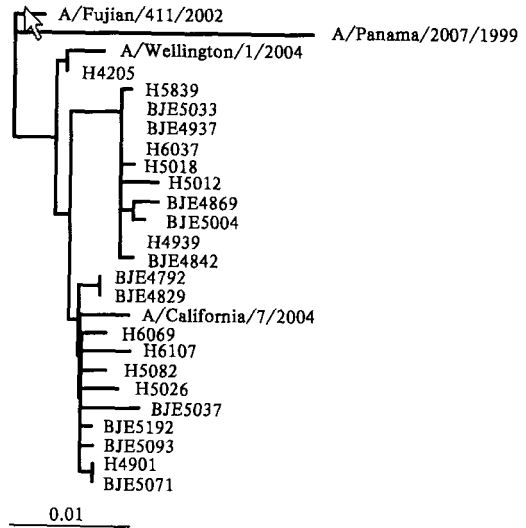


图 1 22 株甲 3 型流感病毒流行株与 WHO 疫苗株的 HA1 基因系统树状关系

较:22 株低滴度病毒的 HA1 区域编码的氨基酸序列与 WHO 推荐的疫苗参考株比较,与 Fujian02 比,有 4 个氨基酸位点不同 (145、159、189、226);与 Wellington04 比,有 2 个位点不同 (145、226);流行株的一部分和 Califimia 04 株相似;在 227 氨基酸位点有与 Fujian 02 株相同的,也有与 Wellington04 株相同的。所述这些氨基酸变异的位点都在血凝素抗原决定簇和受体结合的位点。

4. HA1 结构及其抗原性分子水平分析:(1) 血凝素蛋白二硫键保守性:22 株流行毒株在 14、52、64、76、97、139、281 和 305 位的半胱氨酸 (血凝素蛋白二硫键结合位点) 均保守不变。(2) 糖基化位点:甲 3 型流感病毒的血凝素 (HA) 至少有 7 个糖基化位点,其中 HA1 上有 6 个^[6]。HA 的糖基化对稳定三维结构、抗蛋白水解等方面起作用,其增减对病毒抗原性生物学活性都有一定的影响。本研究中 22 株血凝素 HA1 上有 9 个糖基化位点 (8、22、38、63、126、144、165、246、285),较 1968 年的甲 3 型毒株 (A/HongKong/68) 增加了 3 个糖基化位点,减少了一个位点。(3) 抗原决定簇和受体结合位点及其周边:22 株流感病毒除了表 1 中所示位点变异外,还发现 H4829 株在受体结合位点的底部位的 98 位酪氨酸 (Y) 被半胱氨酸 (C) 置换发生变异。

讨 论

22 株流行季节分离毒株的特点为血凝素滴度

表 1 分离株与当年及来年疫苗株氨基酸位点差异比较

毒株	氨基酸位点				
	145 (A)	159 (B)	189 (B)	226 (D, RBS)	227 (D, RBS)
Fujian02*	K	Y	S	V	S
Wellington04*	K	F	N	V	P
Califimia04*	N	F	N	I	P
BJE4792	N	F	N	I	P
BJE4829	N	F	N	I	P
BJE4842	N	F	N	I	S
BJE4869	N	F	N	I	S
BJE4937	N	F	N	I	S
BJE5004	N	F	N	I	S
BJE5033	N	F	N	I	S
BJE5037	N	F	N	I	P
BJE5071	N	F	N	I	P
BJE5093	N	F	N	I	P
BJE5192	N	F	N	I	P
H4025	N	F	N	V	P
H4901	N	F	N	I	P
H4939	N	F	N	I	S
H5012	N	F	N	I	S
H5018	N	F	N	I	S
H5026	N	F	N	I	P
H5082	N	F	N	I	P
H5839	N	F	N	I	S
H6037	N	F	N	I	S
H6069	N	F	N	I	P
H6107	N	F	N	I	P

注: * WHO 推荐疫苗株, Fujian02 为 2004 年度、其他两株为 2005—2006 年度的疫苗株; () 内字母代表不同的抗原簇和受体结合部位

低于 18, 血凝素 HA1 区域的核酸、氨基酸序列分析表明, 流行株与 2003—2004 年和新推荐的 2005—2006 年度南半球疫苗株存在差异, 表现在抗原决定簇和受体结合位点的氨基酸变异(表 1), 这些位点变异对血凝素的三维结构和空间构象以及抗原性会有一定影响。同源性分析也可见流行株与当年疫苗株不相同, 与 WHO 推荐的 2005—2006 年疫苗株近源, 但也有所不同。流行株除个别毒株外, 基本为两大群, 一群和 California04 相似, 另一群又不同于它。总之, 流行株无论与当年疫苗株还是新推荐的疫苗株不完全相同。这和我们分离的所有甲 3 型流感病毒分析的结果一致。它们的差异不仅在核酸序列, 而且在编码的氨基酸序列上都存在。结果提示 2004 年度流行毒株和对比的疫苗株存在差异, 此外流行株与 2005—2006 年南、北半球疫苗株的不同也提示其变异在加速, 因为南、北半球疫苗株的推荐仅相隔半年。因此流行株变异的趋势值得密切关

注。

22 株 HA 的氨基酸序列在二硫键结合位点均保守不变, 表明其三维结构稳定。流行株的氨基酸变异均在抗原决定簇以及受体结合位点, 目前已知 HA 的抗原决定簇有 5 个群分别为 A、B、C、D、E 群^[7,8], 流行株氨基酸变异涉及的抗原决定簇有 A、B、D, 它们均位于 HA 的头部, 是其功能的重要部位, 该部位的变异对病毒的抗原性是会有影响的。这也可能用来解释这些血凝滴度低的毒株和 WHO 流感鉴定试剂反应弱的现象, 因为试剂盒的标准抗体是抗 A/Wyoming/3/2003 的, 它是 Fujian411 的相似疫苗株。另外, 我国 2002—2003 年流行季节甲 3 型流行株有 2 个抗原决定簇的氨基酸位点变异^[9], 由此可见, HA 的抗原决定簇位点的氨基酸变异在增加而且活跃, 这种倾向值得高度重视。

血凝滴度低的流行株除了上述共性的变异外, 我们还发现有 1 株病毒在 98 位的氨基酸由酪氨酸变为半胱氨酸。已知流感病毒血凝素的受体结合位点呈口袋状, 由底部 (98、153 位氨基酸), 后壁 (183、190、194), 前壁 (131 ~ 137), 左侧壁 (225 ~ 228) 构成。其中 98、153、183、190、194、226 (G or L) 恒定不变^[10]。98、153、183、195 四个位点是构成口袋状的基础, 它们当中的 3 者直接与唾液酸结合。98 位点酪氨酸与 183 位点组氨酸结合为氢键^[11], 在病毒感染过程中起着重要作用。本研究中发现的 98 氨基酸位点变异, 酪氨酸 (Y) 变为半胱氨酸 (C), 两者虽都属极性氨基酸, 但半胱氨酸无侧链苯环羟基, 能否与 183 位组氨酸形成氢键存在疑问。该位点尚未见自然来源的毒株有变异的报道, 此变异的意义有待进一步研讨。但有文献 [12] 报告在 98 位点由苯丙氨酸置换酪氨酸后, 导致和红细胞黏着差, 结合力降低。我们用血细胞吸附试验也初步证实低滴度的毒株较高滴度的毒株吸附红细胞的能力弱。本次调查还发现糖基化位点较 1968 年株有 3 处增加、1 处减少, 其变化对病毒抗原性及其生物特性的影响, 也有待于进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Yuen KY, Chan PK, Peiris M, et al. Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. *Lancet*, 1998, 351: 467-471.
- 2 Tam JS. Influenza A (H5N1) in Hong Kong: an overview. *Vaccine*, 2002, 20(Suppl): S77-S81.
- 3 徐红. 禽流感及其预防控制. *中华检验医学杂志*, 2004, 27: 209-211.

- 4 Tran TH, Nguyen TL, Nguyen TD, et al Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. N Engl J Med, 2004, 350: 1179-1188.
- 5 Stöhr K The global agenda on influenza surveillance and control, Vaccine, 2003, 21: 1744-1748.
- 6 金奇,主编. 医学病毒分子学. 北京: 科学出版社, 2001. 633-689.
- 7 Wiley DC, Willson A, Skehel JJ. Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation. Nature, 1981, 289: 373-378.
- 8 Wilson A, Cox NJ. Structural basis of immune recognition of influenza virus haemagglutinin. Annu Rev Immunol, 1990, 8: 737-771.
- 9 徐红. 中国 2002—2003年度流行性感冒监测分析. 中华流行病学杂志, 2003, 24: 1010-1012.
- 10 Weis W, Brown JH, Cusack S, et al Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. Nature, 1988, 333: 426-431.
- 11 Cross KJ, Burleigh LM, Steinhauer DA. Mechanisms of cell entry by influenza virus. [http://www.emm.cbcu.cam.ac.uk/\(01\)00345-3a.pdf](http://www.emm.cbcu.cam.ac.uk/(01)00345-3a.pdf), 2001.
- 12 Brandli AW, Hansson GC, Rodriguez-Boulan E, et al A polarized epithelial cell mutant deficient in translocation of UDP-galactose into the Golgi complex. J Biol Chem, 1988, 263: 16283-16290.

(收稿日期: 2005-05-23)

(本文编辑: 毛家都)

· 企业与临床 ·

天津金章公司注重产品质量不断开拓新市场

天津金章公司办企业的宗旨是：“今天的质量、明天的市场”。本企业在天津市和平区金章医用新技术研究所基础上于 2001年 12月 19日宣告成立。公司以产品研究、开发、生产和经营及技术创新为一体。从研究所发展为公司的 12年来，公司本着以科研求发展，以质量促效益，以诚信求生存的理念，促进了生产规模不断壮大，品种不断增加，产品质量不断提高。目前产品已行销国内 17个省、自治区及天津、北京、重庆 3个直辖市。

为了企业的发展，为了进一步规范和规模化生产，1999年企业在天津市鑫茂民营科技园投资，建成 420m²的万级洁净厂区及百级灌装车间，并已通过国家药监局的验收，使生产环境和生产规模更上一层楼。目前主要研制开发及生产适用于医院、疾病防疫、卫生及食品检验的微生物系列产品，产品种类包括分离、选择、转送培养皿，细菌生化鉴定，各种鉴定纸片、药敏平皿、药敏纸片及细菌微量抗生素最低抑菌浓度试剂盒等八大系列 200多种产品，严格按照 GB4789.1-28“食品卫生检验方法微生物学部分”及“WS/T232-2002商业性微生物培养基质量检验规程”及“中华人民共和国药典”2000年版等为依据，采用国内外优质原料精制而成。多种产品质量稳定、价格合理、完善的售后服务，不断与国际水平接轨，使金章产品成为北方地区广受用户欢迎的知名产品。

公司主要产品并获奖的有：(1) 肠杆菌科及非发酵菌一次性微量抗生素最低抑菌和杀菌浓度试剂盒；(2) 葡萄球菌及肠球菌一次性微量抗生素最低抑菌和杀菌浓度试剂盒；(3) 酵母样真菌最低抑菌浓度测定试剂盒。已研制开发的产品：(1) 苯 /XV 双联平皿等系列用于分离肺炎链球菌和嗜血杆菌；(2) CPA 血平皿用于分离肺炎链球菌；(3) XV 平皿用于分离嗜血杆菌；(4) 冻干型嗜血杆菌最低抑菌浓度测试

盒；(5) 冻干型链球菌最低抑菌浓度测试盒；(6) AmpC 酶鉴定纸片；(7) ESBLs 鉴定纸片；(8) 金属酶鉴定纸片。正在研制、开发产品：(1) 冻干型肠杆菌科细菌鉴定系统；(2) 冻干型非发酵菌细菌鉴定系统；(3) 冻干型链球菌鉴定系统；(4) 冻干型肠球菌鉴定系统；(5) 与国家疾控中心合作，开发检测流行性脑炎及猪链球菌微量药敏试剂盒。

本公司为国内首家一次性细菌分离培养基通过国家食品药品监督管理局注册标准、注册检验并取得产品注册证。第一批：一次性选择性羊血琼脂培养基 产品标准 YZB/国 3260-40-2004、津食药监械(准)字 2005 第 2400005；一次性血琼脂培养基 产品标准 YZB/国 3261-40-2004、津食药监械(准)字 2005 第 2400001；一次性 HE 琼脂培养基 产品标准 YZB/国 3259-40-2004、津食药监械(准)字 2005 第 2400002；一次性 SS 琼脂培养基 产品标准 YZB/国 3266-40-2004、津食药监械(准)字 2005 第 2400006；一次性 GC 琼脂培养基 产品标准 YZB/国 3264-40-2004、津食药监械(准)字 2005 第 2400003；一次性麦康凯琼脂培养基 产品标准 YZB/国 3262-40-2004、津食药监械(准)字 2005 第 2400007；一次性伊红美蓝琼脂培养基 产品标准 YZB/国 3263-40-2004、津食药监械(准)字 2005 第 2400004；一次性沙保罗琼脂培养基 产品标准 YZB/国 3265-40-2004、津食药监械(准)字 2005 第 2400008。

联系方式：天津市金章科技发展有限公司 地址：天津市南开区西湖道 95号鑫茂民营科技园 B座 5楼 A单元 邮编：300190 电话：022-27649781 传真：022-27031770 邮箱：tjjzh@126.com 网址：www.tj-jinzhang.com.cn 开户银行：商业银行 兴科支行 帐号：103601201080138785 税号：123010473282674。

(收稿日期: 2005-08-24)

(本文编辑: 毛家都)