

参考文献

[1] CHEN Y, MORRISM. Differentiation of brain angiotensin AT1a and AT1b receptor mRNAs: A specific effect of dehydration [J]. Hypertension, 2001, 37(2): 692 - 697.

[2] 吴莹, 黄爱龙, 唐霓, 等. 应用 RNA 干扰治疗小鼠急性乙型肝炎病毒感染 [J]. 中华医学杂志, 2005, 83(15): 1309 - 1312

[3] CHEN Y, CHEN H, MORRISM. Adenovirus-mediated small-interference RNA for in vivo silencing of angiotensin AT1a receptors in mouse brain [J]. Hypertension, 2006, 47(2): 230 - 237.

[4] RAIZADAM K, SUMNERS C, LU D. Angiotensin II type 1 receptor mRNA levels in the brains of normotensive and spontaneously hypertensive rat[J]. J neurochem, 1993, 60(5): 1949 - 1952

[5] SONTHEMER E J, CARTHEW R W. Silence from within: endogenous siRNAs and mRNAs[J]. Cell, 2005, 122(1): 9 - 12.

[6] BYRNES A, RUSBY J, WOOD M, et al Adenovirus gene transfer causes inflammation in the brain[J]. Neuroscience, 1995, 66(4): 1015 - 1024.

[7] HOLEN T, AMARZGUDU IM, WIGER M T, et al Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger tissue factor [J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(8): 1757 - 1766.

(收稿日期: 2008 - 03 - 10 编辑: 庄晓文)

B 型流感病毒广州株的分离及血凝素基因进化分析*

鲁俊鹏¹ 周荣² 欧志英² 曾其毅² 肖密丝² 罗满林¹

¹华南农业大学兽医学院 (广州 510642); ²广东省广州市妇女儿童医疗中心 (510663)

【摘要】目的 了解 B 型流感病毒广州分离株的分子流行病学背景和中國大陸地区该病毒的流行情况。方法 从疑似流感患儿身上取样,经荧光定量 RT-PCR 检测证实为 B 型流感病毒;应用 RT-PCR 方法扩增出该株病毒的 HA 片段,将该片段克隆到 T 克隆载体测序后进行序列分析;从 Genbank 中提取中国内地不同时间的 HA 基因序列和国际代表株序列,应用系统发育分析软件建立 HA 基因的系统发育树并进行进化分析。结果 软件分析表明广州株 HA 片段长 1 882 bp,编码 584 个氨基酸,新分离的 B 型流感病毒广州株在分类上属于 Yamagata 系;从 20 世纪 80 年代末期开始,中国内地流行的 B 型流感病毒分别属于 Victoria 系或者 Yamagata 系,20 世纪 90 年代和 21 世纪初同时存在 Victoria 系和 Yamagata 系的流行。结论 广州地区 2007 年存在 B 型流感病毒 Yamagata 系的流行,中国大陆地区 20 世纪 90 年代和 21 世纪初 Victoria 系和 Yamagata 系 B 型流感病毒的流行比例相当,时间规律不明显。

【关键词】 B 型流感病毒 HA 系统进化分析

B 型流感病毒是分节段的单股负链 RNA 病毒,分类学上属于正黏病毒科。B 型流感病毒能引起人类呼吸系统疾病。病毒的感染过程最早是由病毒表面的 HA 蛋白结合到宿主细胞表面的唾液酸受体开始的本实验室 2007 年 7 月分离到一株流感病毒,经荧光 PCR 方法检测证实为 B 型流感病毒,命名为 B/Guangzhou/01/2007。为了阐明这株病毒的分子流行病学背景,首先对其 HA 片段进行了测序。同时为了解中国大陆 B 型流感病毒的流行病学和 B/Guangzhou/01/2007 株同其他毒株的遗传学关系,对其进行了序列比对和遗传进化关系分析。

1 材料与方法

1.1 细胞及病毒分离所用试剂和溶液 狗胚肾细胞

株 (MDCK) 为广州市儿童医院中心实验室保存 (来自美国 ATCC);无血清细胞培养基 DMEM、细胞消化液 0.25% 胰酶 - EDTA、缓冲液 PBS (pH 7.4) 为 Invitrogen 公司产品;胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司。细胞生长液为体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM,细胞维持液为体积分数为 2% 胎牛血清的 DMEM。

1.2 质粒和菌株 pMD18 - T Vector 购于大连 TaKaRa 公司, E. coli DH5 由本实验室保存。

1.3 主要试剂 B 型流感病毒荧光定量 RT-PCR 检测试剂盒购自广州华银医药科技有限公司; MinBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit 反转录试剂盒 Prime-ScriptTM One Step RT-PCR Kit Taq DNA Polymerase DL2 000 均为 TaKaRa 公司产品;质粒小量提取试剂盒 Plasmid Mini Kit 凝胶回收试剂盒 Gel Extraction Kit 购自 OMEGA 公司;引物合成和测序由上海英骏生物技术有限公司完成;其他试剂为分析纯产品。

1.4 方法

1.4.1 病毒的分离 用消毒干棉签一支在患者咽腭弓

*广东省广州市科技攻关项目 (编号: 2006Z3 - E0331)
在读博士研究生
通讯作者。研究员,电话: 020 - 32053042, E - mail: zhou3218@yahoo.com

处轻拭一圈,置于含双抗的 DMEM 培养基中,4 静置 2 h,取 200 μ l 上清与 MDCK 细胞吸附 2 h 后,再加 800 μ l 细胞维持液促进细胞生长,48 h 后进行细胞血凝鉴定。细胞培养条件为:33 普通细胞培养箱中进行培养。

1.4.2 病毒 RNA 的抽提 参照 TaKaRa MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver. 3.0 的说明书进行:取 250 μ l 细胞培养上清,加入 1.5 ml 离心管中,经过 Solution A、Solution B 和 DB Buffer 处理后将上清 850 μ l 转移至 Spin Column 中,离心弃滤液后加入 500 μ l Rinse A,离心弃滤液后加入 500 μ l Rinse B,离心后弃滤液;将 Spin Column 安置于新的 1.5 ml 的离心管上,在 Spin Column 膜的中央加入 30 μ l Elution Buffer,离心洗脱病毒 RNA,置 -80 保存备用。

1.4.3 荧光定量 RT-PCR 根据广州华银医药科技有限公司的 B 型流感病毒荧光定量 RT-PCR 检测试剂盒操作说明书进行病毒基因检测,荧光定量 RT-PCR 反应条件为:第一步:37 25 min; 94 2 min; 第二步:94 15 s, 55 15 s, 72 20 s, 5 个循环; 第三步:94 5 s, 55 35 s, 40 个循环。荧光素设定为 FAM,在反应程序的第三步 55 末检测荧光强度。

1.4.4 引物设计与合成 参照 HOFMANN 等^[1]的方法,通过 DNAStar 5.0 软件进行序列比对,利用 Primer Premier 5.0 根据发夹结构、引物二聚体、碱基错配、引物平衡等原则计算机辅助设计了用于扩增 HA 全长片段的特异性引物,合成的引物干粉均用无菌水配置成 20 μ mol/L,作为标准浓度使用。序列如下:

HAS: 5' - TATTCGTCCTCAGGGAGCAGAA GCAAG-
CATTTTCTAA TATC - 3'

HAA: 5' - ATATCGICTCGIATTAGTAGTAACAAGAG-
CATTTTTC - 3'

1.4.5 一步法 RT-PCR 参照 PrimeScriptTM One Step RT-PCR Kit 说明书进行。RT-PCR 反应体系为:10 \times One Step RT-PCR Buffer 5 μ l, dNTP Mixture (10 mmol/L each) 2 μ l, RNase Inhibitor (40 U/ μ l) 1 μ l, PrimeScript RTase 0.5 μ l, Ex Taq HS (5 U/ μ l) 1 μ l, 上游引物 1 μ l, 下游引物 1 μ l, 模板 2 μ l, 用 RNase Free dH₂O 补齐至 50 μ l。RT-PCR 条件为:50 50 min, 94 5 min, 94 30 s, 58 30 s, 72 3 min, 共运行 25 个循环, 72 10 min。PCR 反应结束后取 5 μ l 电泳检测。

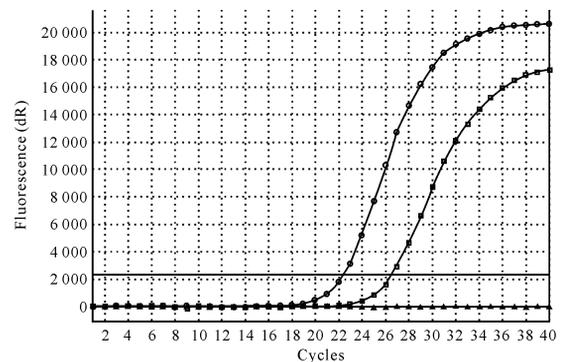
1.4.6 HA 片段的克隆和测序 参照 OMEGA 公司的 Gel Extraction Kit 说明书进行目的片段的胶回收纯化,按照常规方法与 pMD18-T Vector 连接,连接产物转化 E. coli DH5 感受态细胞。将转化菌涂布于含 Amp 的 LB 平板,37 培养过夜。根据 Amp 抗性初步筛选阳性转化菌。从平板上挑取数个单菌落分别接种于 3 ml 含 Amp 的 LB 液体培养基中,37 振荡培养过夜。参照 OMEGA 公司的 Plasmid Mini Kit 说明书进行质粒的小量抽提,用引物 HAS 和 HAA 进行 PCR 鉴定,PCR

条件为 94 预变性 5 min, 94 变性 30 s, 58 退火 30 s, 72 延伸 3 min, 共运行 25 个循环, 72 延伸 10 min。PCR 反应结束后取 5 μ l 行琼脂糖凝胶电泳检测。将阳性重组质粒命名为 pMD-HA, 选取 3 个克隆送测序公司测序。

1.4.7 测序结果的拼接和序列分析 利用 DNAStar 5.0 的 SeqMan 软件对所有的测序结果进行修订和装配。利用 SignalP 3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 和软件 Antheptot 2000 V6.0 进行信号肽的分析和预测、NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 进行 N-型糖基化位点预测。序列比对采用 ClustaX1.83 软件,用 MEGA4.0 软件进行进化分析^[2]。国内参考毒株为随机选择,包括完整的 HA1 区域,其中 20 世纪 70 年代 5 株、80 年代 8 株、90 年代 23 株、21 世纪初 9 株;国外参考株为 B/Lee/40、B/Yamagata/16/88、B/Victoria/2/87。利用病毒分子进化分析软件 MEGA 4.0 的泊松修正模型,对 HA 基因进行遗传图谱分析,进化树经过 1000 次复制的自检并在 Tree Explorer 软件中进行显示和编辑。同时绘制了辐射状的进化树(图略),来更加形象了解各毒株 HA 的遗传进化关系。

2 结果

2.1 病毒株的获得 临床样品经荧光定量 RT-PCR 检测后证实为 B 型流感病毒(见图 1),样品的 Ct 值为 22.48。接种的细胞出现细胞病理变化,将分离到的 B 型流感病毒命名为 B/Guangzhou/01/2007。



圆形:样品;方形:阳性对照;三角形:阴性对照

图 1 荧光定量 RT-PCR 检测结果

2.2 HA 片段的 RT-PCR 扩增 提取细胞培养物上清病毒 RNA,经 RT-PCR 扩增得到一条接近 2 kb 的片段(见图 2),与理论预期相符合。

2.3 pMD18-HA 阳性重组质粒的鉴定和测序 目的片段回收后与 pMD18-T Vector 连接转化,得到多个阳性克隆。PCR 鉴定得到一条接近 2 kb 的片段(见图 3),与理论预期一致。

2.4 HA 序列分析 HA 片段全长 1882 bp,软件分析表明,ORF 位于 nt34-1788,长 1755 bp,HA 编码 584 个氨基酸。将 HA 序列已提交到 NCB 数据库,登录号

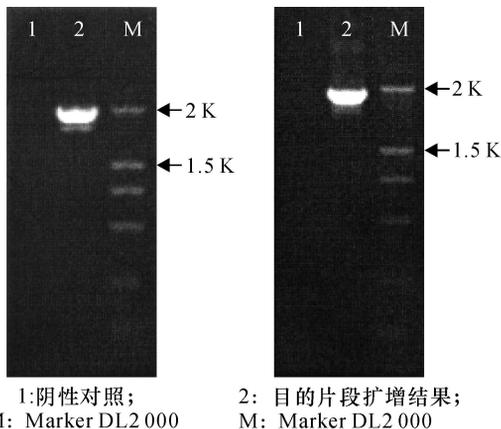


图2 HA片段RT-PCR扩增 图3重组质粒PCR鉴定

EU305614。HA编码的前15个氨基酸为信号肽序列。共有10个潜在的N-型糖基化位点,分别位于40,74,160,182,211,318,347,532,545,577位点上,其中7个位于HA1上,3个位于HA2上。

由进化树可以看出,新分离的毒株属于Yamagata系,说明广州存在Yamagata系流感B毒株的流行。该毒株与B/Wuhan/2/2001进化关系最近,DNAStar软件分析表明,同源性达到98.7%,编码氨基酸同源性则达到98.3%。中国大陆流行的毒株从20世纪80年代末期开始也分别属于Victoria系或Yamagata系。所选的参考毒株中,90年代的有23株,其中10株属于Victoria系,13株属于Yamagata系;21世纪初的有11株,其中5株属于Victoria系,6株属于Yamagata系,说明每个年代中,在中国同时流行有两个种系的病毒,而且比例相当,病毒流行的时间规律不明显。

3 讨论

B型流感病毒是节段的单股负链RNA病毒,分类学上属于正粘病毒科。B型流感病毒能引起人类呼吸系统疾病。病毒的感染过程最早是由病毒表面的HA蛋白结合到宿主细胞表面的唾液酸受体开始的。根据HA基因的种系分化差异,从1983年开始,B型流感病毒分化成两大系别^[3],一个是以B/Victoria/2/87株为代表的Victoria系,另一个是以B/Yamagata/16/88为代表的Yamagata系,并且两个系别的病毒株在遗传和抗原水平上是不同的^[4],针对两个系别的毒株产生的抗体之间没有交叉保护^[5]。在一定的时间和一定的地区,两个系别的病毒会有一个主要流行株^[6]。所以B型流感病毒疫苗株的选用要根据当时当地毒株的流行情况来决定。B型流感病毒在世界范围内的流行也在发生着变化。Yamagata系在90年代的流行范围严格地局限于亚洲,但是从2001年开始在世界的许多地方出现^[7]。1991年以来,Victoria系毒株很少从非洲、美洲和欧洲分离到,但却是亚洲一些国家的主要流行株^[8]。但2001~2002年Victoria系毒株越来越多的在亚洲之外的地方分离到,以至于WHO推荐在2002~2003年全球都用B/Hong Kong/330/01(Victoria系的一个毒株)作为疫苗株^[9-10]。

本研究自临床疑似流感病例身上分离到病毒,经荧光定量RT-PCR检测为B型流感病毒,细胞培养出现细胞病理变化,并最终经测序确定为Yamagata系B型流感病毒,三者结果一致。测得的广州流行株HA片段序列提交到NCBI数据库,登录号EU305614,本实验室对该株病毒做了保种。

流感血凝素是流感病毒的主要抗原之一,功能是与细胞表面病毒特异性受体结合,介导病毒外膜与细胞内小体膜融合释放病毒核衣壳进入胞浆,以及刺激集体产生中和性抗体,是主要的保护性抗体^[11]。并且HA基因在持续不断和快速地发生突变。因此HA基因的变异程度对流感B的抗原性有重要影响。流感B不像流感A,它没有亚型的区别,但是根据HA基因的种系发育关系,B型流感病毒分为Victoria系和Yamagata系,两个系别的病毒株产生的抗体之间没有交叉保护。预防流感B需要不同的疫苗。本研究发现,广州地区2007年存在Yamagata系毒株的流行,并且B型流感病毒的流行时间规律不明显,希望对广州地区流感B疫苗的选用提供参考。

参考文献

- [1] HOFMANN E, MAHMOOD K, YANG C F, et al Rescue of influenza B virus from eight plasmids [J]. Proc Natl Acad Sci, 2002, 99(17): 11 411 - 11 416.
- [2] TAMURA K, DUDLEY J, NEIM, et al MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Mol Biol Evol, 2007, 24(8): 1 596 - 1 599.
- [3] HAY A J, GREGORY V, DOUGLAS A R, et al The evolution of human influenza viruses [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2001, 356(1 416): 1 861 - 1 870.
- [4] ROTA P A, WALLIS T R, HARMON M W, et al Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983 [J]. Virology, 1990, 175(1): 59 - 68.
- [5] LEVANDOWSKIR A, REGNER Y H L, STATON E, et al Antibody responses to influenza B viruses in immunologically unprimed children [J]. Pediatrics, 1991, 88(5): 1 031 - 1 036.
- [6] SHAW M W, XU X, LI Y, et al Reappearance and global spread of variants of influenza B/Victoria/2/87 lineage viruses in the 2000 - 2001 and 2001 - 2002 seasons [J]. Virology, 2002, 303(1): 1 - 8.
- [7] CHIX S, BOLAR T V, ZHAO P, et al Co-circulation and evolution of two lineages of influenza B viruses in Europe and Israel in the 2001 - 2002 season [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(12): 5 770 - 5 773.
- [8] CHEN G W, SHIH S R, HSAO M R, et al Multiple Genotypes of Influenza B Viruses Cocirculated in Taiwan in 2004 and 2005 [J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(5): 1 515 - 1 522.
- [9] World Health Organization Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2002 - 2003 influenza season [J]. Wkly Epidemiol Rec, 2002, 77(8): 62 - 66.
- [10] World Health Organization Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2003 influenza season [J]. Wkly Epidemiol Rec, 2002, 77(41): 344 - 348.
- [11] 金奇. 医学分子病毒学 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 638 - 646 (收稿日期: 2007 - 12 - 29 编辑: 蔡欣)