

江苏省2013年甲型H1N1(09pdm)流感病毒血凝素和神经氨酸酶分子特征分析

资海荣¹, 郭艳¹, 邓斐², 余慧燕², 王慎骄², 汤奋扬², 祁贤^{2*}, 卫平民^{1*}

(¹东南大学公共卫生学院流行病学教研室, 江苏 南京 210009; ²江苏省疾病预防控制中心, 江苏 南京 210009)

[摘要] 目的:分析江苏省2013年甲型H1N1(09pdm)流感病毒血凝素(hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(neuraminidase, NA)变异情况,分析其遗传进化特征。方法:按照流感样病例定义,收集江苏省各哨点医院流感样病例标本,阳性样本经病毒分离培养及亚型鉴定。选取2013年不同时间段、不同地区具有代表性的14株甲型H1N1(09pdm)阳性毒株,利用特异性引物扩增HA、NA基因,测序并分析其遗传进化特征。结果:14株分离毒株与疫苗株A/California/07/2009(H1N1)的HA基因核苷酸和氨基酸同源性分别为97.6%~98.4%和96.5%~98.0%。NA基因核苷酸和氨基酸同源性分别为98.4%~98.9%和97.0%~98.5%。遗传进化分析表明,14株分离株HA和NA基因分属于不同的进化谱系。分子特征表现为HA氨基酸序列出现D114N、K300E、E516K的变异,NA分子特征表现为N44S位点变异。从2013年左右开始甲型H1N1(09pdm)流感基因多样性增加;通过FEL模型得到一个正向压力选择HA氨基酸位点310,一个正向压力选择NA氨基酸位点4,通过REL模型得到9个正向压力选择HA氨基酸位点179、180、239、301、303、310、311、312、313(含位点310),5个正向压力选择NA氨基酸位点4、23、52、287、374(含位点4)。HA蛋白具有9个潜在糖基化位点,7个位于HA1上,2个位于HA2上;NA蛋白共有9个潜在糖基化位点。14株分离毒株在NA蛋白酶活性中心及周围辅助位点上均未发现变异。结论:2013年江苏省甲型H1N1(09pdm)流感HA、NA基因变异加快,遗传多样性增加,未来的遗传进化值得进一步关注。

[关键词] 甲型H1N1(09pdm);血凝素;神经氨酸酶;分子特征

[中图分类号] R373.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)06-812-11

doi:10.7655/NYDXBNS20150611

Molecular characteristics of hemagglutinin and neuraminidase genes of influenza A/H1N1(09pdm) viruses, Jiangsu province, 2013

Zi Hairong¹, Guo Yan¹, Deng Fei², Yu Huiyan², Wang Shenjiao², Tang Fenyang², Qi Xian^{2*}, Wei Pingmin^{1*}

(¹Department of Epidemiology, School of Public Health, Southeast University, Nanjing 210009; ²Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the genetic characterization of hemagglutinin and neuraminidase genes of influenza A/H1N1(09pdm) viruses in Jiangsu province, 2013. **Methods:** Specimens from influenza-like cases in Sentinel hospitals from Jiangsu province were isolated by cell cultivation and performed by subtype identification. Fourteen representative positive strains of A/H1N1(09pdm) viruses were selected within different regions in 2013. HA and NA genes of 14 isolates were sequenced and the genetic characterization was analyzed. **Results:** Compared with vaccine strain A/California/07/2009 (H1N1), the HA and NA genes of 14 isolates shared the highest nucleic acid sequence similarity (97.6%~98.4% and 98.4%~98.9%, respectively), and amino acid sequence similarity (96.5%~98.0%, 97.0%~98.5%, respectively). The phylogenetic analysis showed that the HA and NA genes of all 14 strains were divided into two clusters. The amino acid substitutions of the HA proteins (D114N, K300E and E516K) and NA proteins (N44S) of 14 isolates were observed. The evolution dynamics revealed that the genetic diversity of influenza A/H1N1(09pdm) viruses increased. The positive pressure sites were observed in HA proteins site 179, 180, 239, 301, 303, 310, 311, 312, 313(including site 310) and NA proteins 4, 23, 52, 287, 374 (including site 4) by FEL and REL model. Of 14 isolates, the

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81273143);江苏省医学重点人才基金项目(RC2011084);江苏省自然科学基金项目(BK20131450)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: mpw1963@126.com; qixiansyc@hotmail.com

HA protein contained 9 potential glycosylation sites (7 in HA1 and 2 in HA2), whereas NA protein contained 9 potential glycosylation sites. **Conclusion:** In 2013, the influenza A/H1N1(09pdm) viruses had undergone molecular evolution to generate genetic diversity and this emphasize the importance of reinforcing virus surveillance.

[Key words] A/H1N1(09pdm); hemagglutinin; neuraminidase; molecular characteristics

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(06): 812-822]

流感病毒属于正黏病毒科,分为甲、乙、丙 3 型。甲型流感病毒基因组包括 8 个独立片段,其中片段 4 和片段 6 分别编码表面糖蛋白血凝素(hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(neuraminidase, NA)。HA 和 NA 是甲型流感血清分析的基础,能够刺激机体产生保护性中和抗体,在决定病毒宿主特异性和致病性方面也发挥重要作用。

甲型流感病毒血清型复杂,遗传变异快^[1],经常引起人类流感流行或大流行。20 世纪以来,全球范围内共发生了 4 次流感大流行,包括 1918 年的“西班牙流感”(H1N1)、1957 年“亚洲流感”(H2N2)和 1968 年的“香港流感”(H3N2)^[2]。2009 年春,源于北美的新的三源基因重配甲型 H1N1 流感病毒引起了本世纪首次流感大流行,WHO 建议命名为甲型 H1N1(09pdm),以区别之前在人群中流行的季节性甲型 H1N1。之后,甲型 H1N1(09pdm)流感病毒成为人类季节性流感病毒的新成员。江苏省 2009~2013 年流感监测结果显示,2010~2011 年春季存在甲型 H1N1(09pdm) 流感流行,2011 年秋冬季至 2012 年甲型 H1N1 流感呈低水平散发。2013 年甲型 H1N1(09pdm)流感出现新的流行。本研究选取 2013 年江苏省不同地区、不同时间 14 株甲型 H1N1(09pdm)病毒 HA 及 NA 基因特性进行分析,旨在了解继 2009~2010 年甲型 H1N1(09pdm)大流行,再次出现新的流行后,甲型 H1N1(09pdm)病毒分子变异及进化情况,为流感疫苗的筛选及病毒演化趋势判断提供重要的参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

2013 年江苏省 29 家流感监测哨点医院采集流感样病例咽拭子标本共 28 759 份,分离阳性毒株 2 341 株,其中甲型 H1N1 阳性标本共 815 份。

狗肾细胞(MDCK,北京 CDC),DMEM 培养基、胎牛血清、EDTA 胰酶(2 mg/mL)(Gibco 公司,美国),TPCK 胰酶(Sigma 公司,美国),双抗生素(PS, Invitrogen 公司,美国),TPCK 胰酶、HEPES 缓冲液、PBS 缓冲液、5×MagMAX™-96 Viral RNA Isolation

Kit(Ambion 公司,美国),逆转录试剂盒(Invitrogen 公司,美国),Ex Taq PCR 试剂盒(TaKaRa 公司,日本),Eel Extraction kit(QIAGEN 公司,德国),Golden View 荧光 PCR 仪 7500、PCR 扩增仪、ABI 3500X 测序仪(ABI 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 样本采集及病毒分离

收集流感样病例咽拭子,提取病毒 RNA,利用 real time RT-PCR 法对流感病毒特异性核酸进行检测分型。通过 MDCK 细胞对病毒核酸阳性样本进行分离培养。

1.2.2 HA 和 NA 全基因 PCR 扩增

选择江苏省 2013 年 14 株不同时间、不同地区甲型 H1N1(09pdm)流感病毒,利用逆转录试剂盒将提取的病毒 RNA 通过逆转录反应反转录为 cDNA,利用自行设计的引物(表 1)进行 HA 和 NA 全基因 PCR 扩增。

利用引物进行 PCR 扩增,扩增体系:10×Buffer (含 Mg²⁺)5 μL、dNTP Mix(2.5 mmol/L)8 μL、正反向引物各 2 μL、Ex Taq enzyme 0.5 μL、cDNA 1.5 μL、DEPC H₂O 31 μL,总体积为 50 μL。扩增反应程序:95℃ 10 min;94℃ 30 s,52℃ 30 s,72℃ 3 min,循环 35 次;72℃延伸 10 min,4℃保存。PCR 扩增产物利用 1%的琼脂糖电泳检测鉴定、凝胶 DNA 回收并纯化,PCR 纯化产物经测序仪完成测序。

1.2.3 序列分析

对测序结果利用 Lasergene 7.0 DNA star 软件中的 EditSeq 和 MegAlign 进行序列对比拼接,得到全长的 HA 及 NA 序列。

从 NCBI Influnza virus database(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database/nph-select.cgi?go=database>)中选取 2009 年甲型 H1N1(09pdm)暴发后全球各地不同时间段有代表性的甲型 H1N1(09pdm)流感病毒毒株 HA 序列 89 条(其中非洲 6 株、亚洲 28 株、欧洲 20 株、北美 17 株、南美 11 株、大洋洲 7 株),NA 序列 94 条(其中非洲 8 株、亚洲 28 株、欧洲 23 株、北美 15 株、南美 14 株、大洋洲 6 株),与本研究 14 条序列进行比较,其中包括

表 1 甲型 H1N1(09pdm)流感 HA 和 NA 基因的引物对序列

Table1 Primer pairs used for amplification of HA and NA genes of influenza A/H1N1(09pdm) strains

基因	引物名称	引物起点	序列(5'→3')
HA	HA-S1-F	33	TGTAACACGACGGCCAGTATGAAGGCAATACTAGTAGTTCT
	HA-S1-R	976	CAGGAAACAGCTATGACCAATGGGAGGCTGGTGTATTAT
	HA-S2-F	936	TGTAACACGACGGCCAGTGCTATAAACACCAGCCTCCC
	HA-S2-R	1 772	CAGGAAACAGCTATGACCCTCATGCTTCTGAAATCCT
NA	NA-S1-F	21	TGTAACACGACGGCCAGTATGAATCCAACCCAAAAGA
	NA-S1-R	830	CAGGAAACAGCTATGACCGACTATCTTCCCTTTTCTAT
	NA-S2-F	781	TGTAACACGACGGCCAGTAGATCTTCAGAATAGAAAAG
	NA-S2-R	1 447	CAGGAAACAGCTATGACCATTACTTGTCAATGGTAAATGGC

WHO 推荐的疫苗株 A/California/07/2009 (H1N1)及中国代表株 A/Sichuan/1/2009 (H1N1)、变异代表株 A/Osaka/180/2009 (H1N1)、A/New York /18/2009 (H1N1)。

采用 Molecular Evolutionary Genetics Analysis version(MEGA)5.2.1 软件进行对比、基因及氨基酸的变异分析。通过 BEAST v1.8.0 软件进行基因进化树以及 Bayesian skyline reconstruction 构建。利用 Data monkey (<http://www.datamonkey.org/dataupload.php>) 在线软件进行 HA 和 NA 基因选择压力分析。

2 结果

2.1 流感监测结果

由 2009~2013 年江苏省流感网络实验室监测数据结果可见,2009~2010 年为甲型 H1N1(09pdm)流感的首次暴发阶段。2011~2012 年甲型 H1N1(09pdm)整体处于低水平的散发状态,从 2013 年开始甲型 H1N1(09pdm)出现新的流行。2013 年 1~12 月,江苏省共获得流感监测样本 28 759 份,分离得到阳性毒株 2 341 株,阳性率为 8.1%,其中阳性毒株中,季节性 H3N2 流感 1 318 株(56.30%),甲型 H1N1(09pdm)流感 815 株(34.81%),乙型流感 198 株(8.46%),A 未分型 1 株,混合型 9 株(0.38%)。2013 年全年各月份均有甲型 H1N1(09pdm)的流

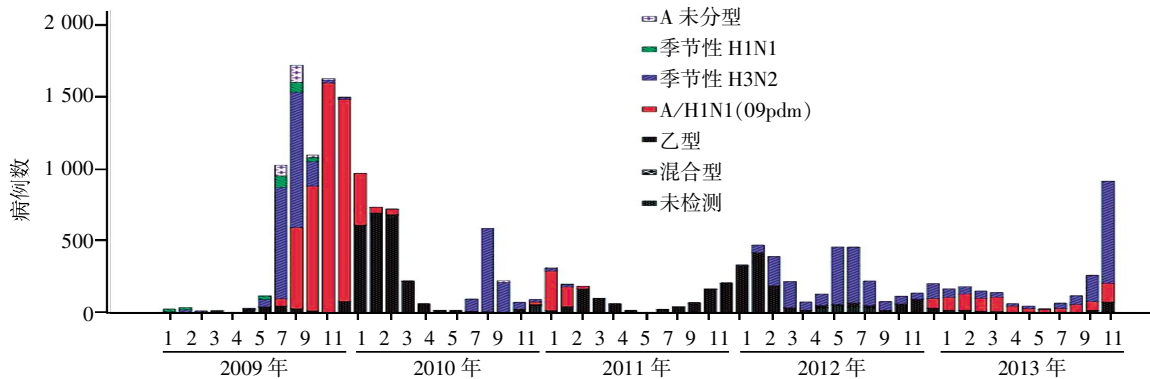


图 1 江苏省 2009~2013 年流感流行情况

Figure 1 Distribution of influenza virus strains by the laboratory-based surveillance in Jiangsu from 2009 to 2013

行(图 1)。

2.2 同源性分析

本研究对 104 株毒株(含 14 株测序毒株)的 HA 序列、109 株毒株(含 14 株测序毒株)的 NA 序列分别与疫苗株 A/California/07/2009(H1N1)的 HA、NA 序列进行比对,MEAG 软件 distance 版块计算 HA 基因核苷酸与氨基酸总的遗传距离分别为 0.024、0.027,NA 基因核苷酸与氨基酸总的遗传距离分别为 0.009、0.012。14 株分离毒株与疫苗株 A/California/07/2009(H1N1)的 HA 基因核苷酸和氨

基酸同源性分别为 97.6%~98.4%、96.5%~98.0%, NA 基因核苷酸和氨基酸同源性分别为 98.4%~98.9%、97.0%~98.5%。14 株测序分离毒株与中国代表株 A/Sichuan/1/2009(H1N1)的 HA 基因核苷酸和氨基酸同源性分别为 97.7%~98.5%、97.1%~98.4%,NA 基因核苷酸和氨基酸同源性分别为 98.4%~98.9%、97.0%~98.5%。

2.3 系统进化树分析

由 HA 基因系统进化树图(图 2A)可以发现,HA 基因进化树总体上可以分为 5 个谱系,第 I 分

枝的特征体现在不含有 HA 氨基酸序列 S220T 变异的毒株集,其中 A/Paris/27722/2009(H1N1)、A/Canada-MB/RV/2013(H1N1)、A/Wyoming/16/2009(H1N1)分枝表现为 HA 氨基酸序列存在 K2E 变异,属于 Martha 等^[3]研究分类中第 6 类。Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ分枝特征体现在含有 HA 氨基酸序列 S220T 变异,属于 Martha 等研究中分类第 7 类,而Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ分枝相比Ⅱ分枝,出现了 E391K 变异,Ⅳ、Ⅴ分枝相比Ⅲ分枝,HA 氨基酸序列出现了 S202T 及 S468N 变异,Ⅴ分枝相比Ⅳ分枝,HA 氨基酸序列出现 D114N、K300E、E516K。本研究中的 A/Jiangsuqinhuai/SWL1544/2013(H1N1)、A/Jiangsutinghu/SWL1354/2013(H1N1)分布于第Ⅳ分枝的两株(group1)与其余分布于第Ⅴ分枝毒株(group2)两组之间的基因核苷酸与氨基酸遗传距离分别为 0.027、0.024。

由 NA 基因系统进化树图(图 2B)可以发现,NA 基因进化树总体上可以分为 5 分枝,其中第Ⅰ分枝包括 5 株 A/Uganda/MUWRP-240/2011、A/Bangkok/INS491/2010、A/India/Blore/2010、A/Ardebil/56/2011、A/Limoges/1159/2010,它们存在着 394V,其他毒株均发生 V394I 变异,第Ⅱ分枝的特征体现在 106V、248N,未发生 V106I 及 N248D 变异,第Ⅲ分枝特征体现在 V106I、N248D、Y351F 变异,而其他位点上相对变异较少。第Ⅳ、Ⅴ分枝均存在 V241I 及 N369K 变异,其中有 2 株特别株, A/Toyama/110/2011 不存在 V241I,而 A/Shiraz/7/2013 不存在 N369K 变异。第Ⅴ分枝相比第Ⅳ分枝存在 N44S 位点改变。

系统进化树由贝叶斯软件 MCMC 推导,其中标记序列为本研究分离得到的 14 株测序,标尺值 0.6 代表单位长度内核苷酸差异水平。

2.4 进化动力学分析

通过 Bayesian skyline reconstruction 建立模型,对 2009~2013 年甲型 H1N1(09pdm)流感流行历史及进化动态情况进行估算,由于不确定性的存在,在估算中使用了 95%的置信区间,利用这个模型对 HA 及 NA 基因时空变化进行推断和猜想,模型建立结果表明(图 3),在 2010~2012 年甲型 H1N1(09pdm)流感病毒维持着相对稳定的状态,而 2013 年甲型 H1N1(09pdm)流感基因多样性增加,也在一定程度上表明甲型 H1N1(09pdm)流感的感染增多。

2.5 选择压力分析

通过 SLAC、FEL、REL 模型进行序列分析,得到结果(表 2)。通过 FEL 模型得到 1 个正向压力选择 HA 氨基酸位点 310,一个正向压力选择 NA 氨基酸

位点 4,通过 REL 模型得到 9 个正向压力选择 HA 氨基酸位点分别是 179、180、239、301、303、310、311、312、313,5 个正向压力选择 NA 氨基酸位点分别是 4、23、52、287、374。

2.6 HA、NA 分子特征分析

甲型 H1N1(09pdm)流感病毒 HA 由 566 个氨基酸残基组成,分别为 HA1(326aa)和 HA2(223aa)两部分组成,NA 基因 ORF 全长 1 407 bp,编码 469 个氨基酸。以 A/California/07/2009(H1N1)作为参考毒株,得到 14 株分离株的变异情况(表 3、4),HA 蛋白共有 51 处发生变异,其中 14 株分离株均发生变异的位点为 P83S、S185T、S203T、I321V、E374K、S451N(按照去信号肽 HA 氨基酸排序,下同),其次发生频率较高的为 D97N、V234I、K283E、E499K。NA 蛋白共有 44 处发生变异,其中 14 株分离株均发生变异的位点为 V241I、N248D、Y351F、N369K,其次发生频率较高的为 T4N、N44S、N200S。

抗原位点:已有研究表明,甲型 H1N1(09pdm)的 HA 蛋白具有 4 个抗原位点^[4-5],即 Ca(137~142,166~170,203,221,235)、Cb(70~75)、Sa(124,153~157,159~164)、Sb(184~195),H1 亚型 HA1 蛋白上的 44 个氨基酸是宿主免疫系统作用的靶点,其变异直接影响病毒的抗原漂移。与疫苗株 A/California/07/2009 进行对比发现,本研究分离毒株变异位点中 41 处发生在 HA1 蛋白上,占总变异数的 80.39%,其中 8 个变异发生在抗原位点上(Ca 2 个,Sa 3 个,Sb 3 个),分别为 H138Q、S203T、S162N、K163E/K163Q、S164F、S185T、A186T、L191I。

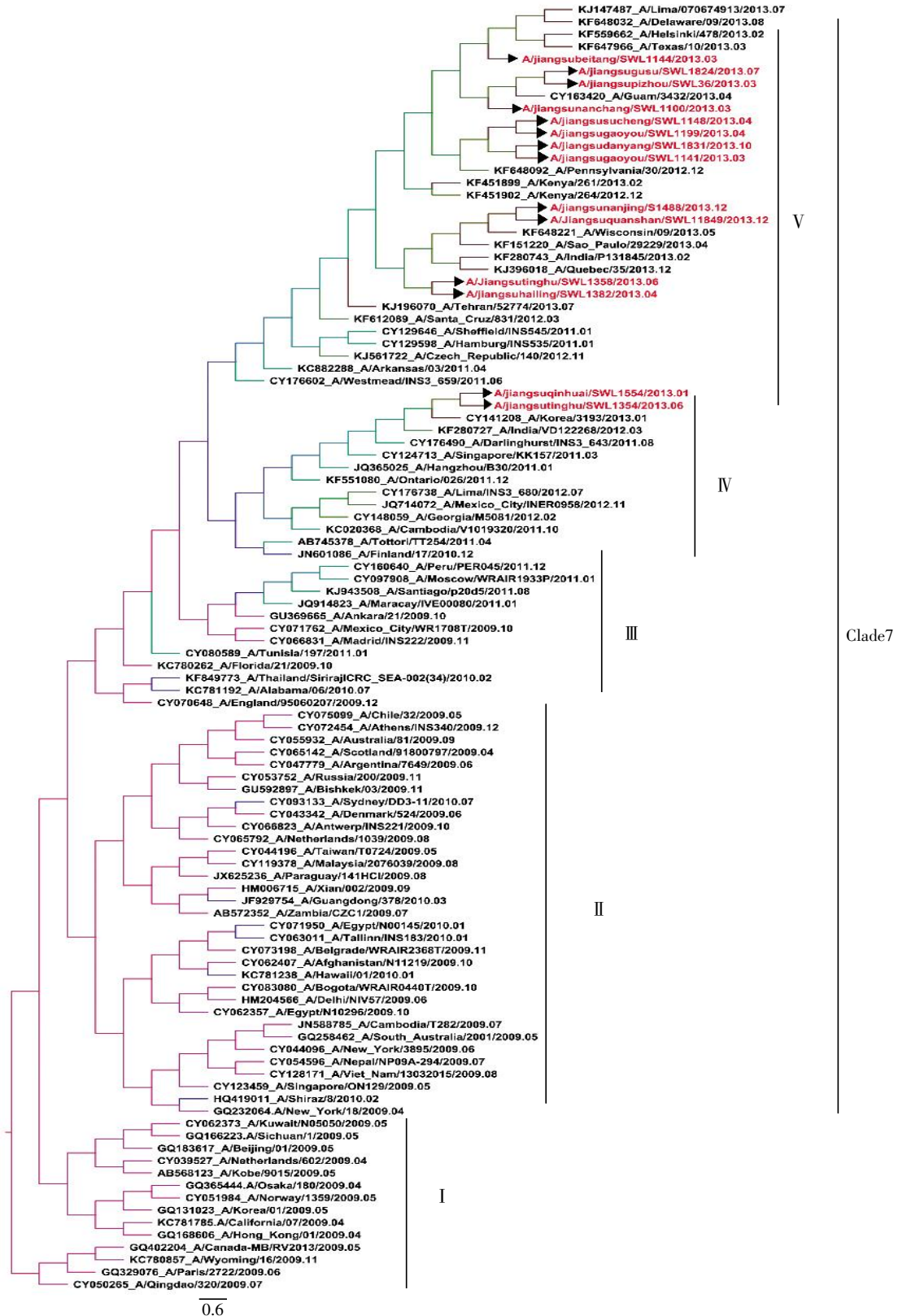
糖基化位点:HA 蛋白具有 8 个固定的糖基化位点,分别为 10NNST、11NST、23NVT、87NGT、276NTT、287NTS、481NGT 和 540NGS,6 个位于 HA1 上,2 个位于 HA2 上,另外在 HA1 上新增加糖基化位点 NKS(3 株)。NA 蛋白共有 7 个固定的糖基化位点,分别为 5DNQS、58NNTW、63NQTY、68NISN、88 NSSL、146 NGTI 和 235NGSC,大部分毒株还出现 42NQS(12 株),另外有 2 株出现 N386K 导致 386NFS 糖基化位点消失。何敏等^[6]在研究中发现,南京地区部分毒株还存在 42NSQ、50NQS、386NFS、437NGS 氨基酸位点的改变。

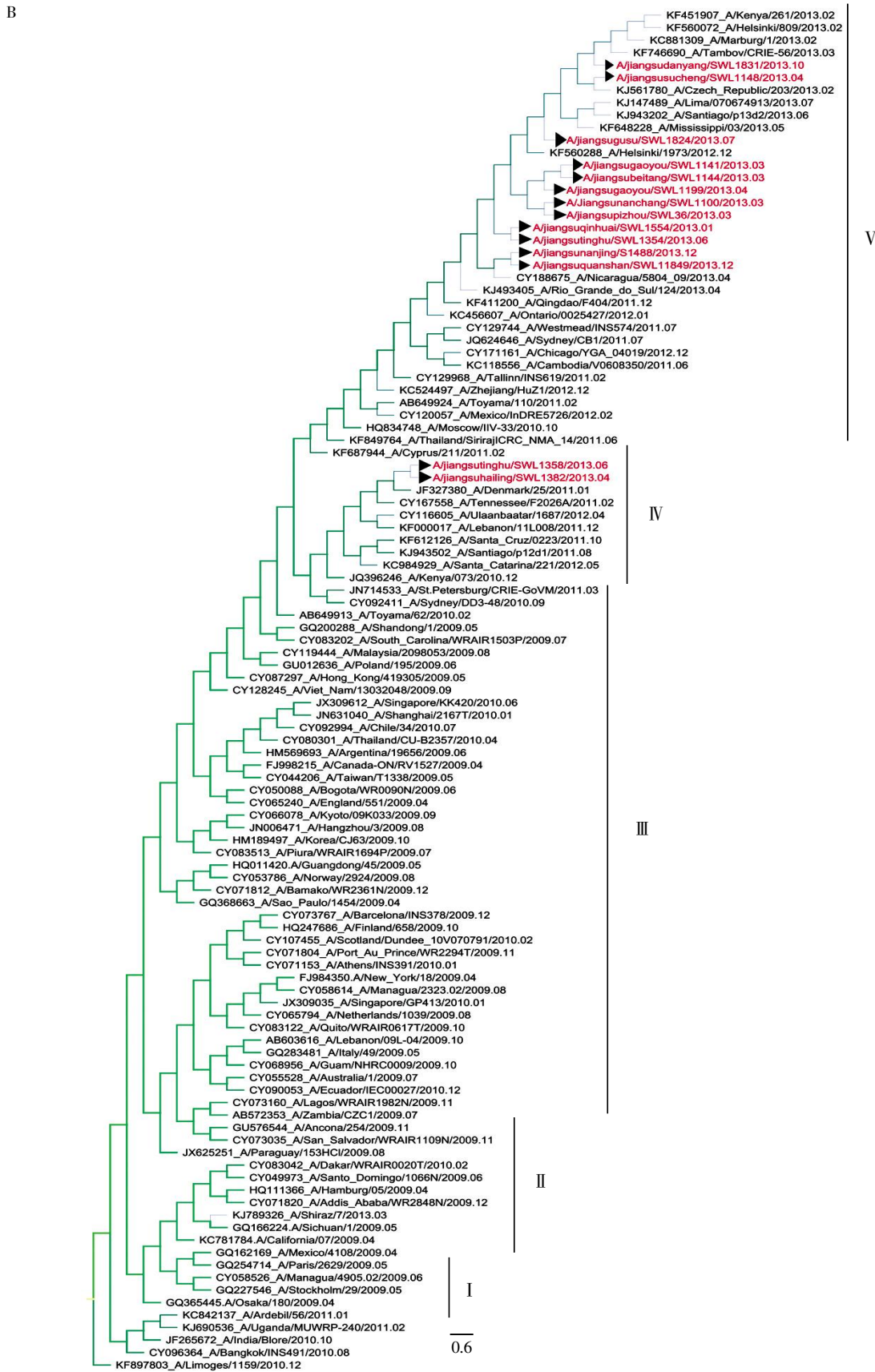
受体结合位点(receptor-binding site,RBS)及裂解位点:流感病毒 HA 蛋白与宿主细胞表面受体结合是流感病毒感染过程中的关键环节^[7-8]。HA 蛋白的受体结合特征是流感病毒宿主限制性的一个重要决定因素^[7],受体结合位点是 HA 所特有的,其氨

基酸的变异可影响病毒与宿主细胞受体的结合能力。甲型流感病毒的受体结合位点由220环(去信号肽蛋白218~225位)、130环(去信号肽蛋白132~135位)、190螺旋(去信号肽蛋白187~195位)构成^[9]。本研究结果显示,在相对保守的130环

未有分离株发生突变,在220环有1株分离株发生了D222N变异,2株分离株发生了D222G变异,在突变率较高的190螺旋,1株发生了L191I变异。HA蛋白由HA1与HA2两部分组成,连接两者的为1个碱性氨基酸R,HA蛋白的裂解位点氨基酸序列

A

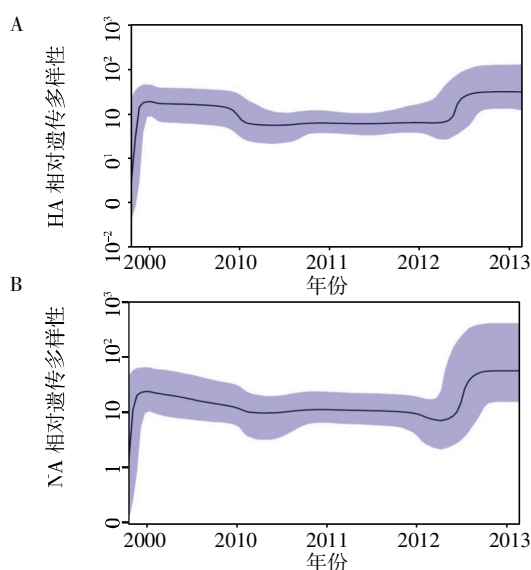




系统进化树由贝叶斯软件 MCMC 推导,其中▶标记序列为本研究分离得到的 14 株测序,标尺值 0.6 代表单位长度内核苷酸差异水平。

图 2 2009~2013 年甲型 H1N1(09pdm)流感 HA(A)与 NA(B)基因系统进化树

Figure 2 Phylogenetic tree of the HA(A) and NA(B) gene segments of A/H1N1(pdm09) between 2009 and 2013



黑色实线为估计中位数,蓝色区域的上下沿线分别为95%置信区间。

图3 甲型H1N1(09pdm)流感毒株HA(A)、NA(B)基因的进化动力学

Figure 3 Evolutionary dynamics of the HA(A) and NA(B) genes of A/H1N1(09pdm) influenza virus strains

表2 2013年江苏省甲型H1N1(09pdm)分离毒株中正向选择位点分布

Table 2 The distribution of positively selected sites among A/H1N1(09pdm) viruses in jiangsu, 2013

基因	模型	氨基酸位点	dN/dS	标准[dN-dS]	后验概率	贝叶斯因子	P值
HA	SLAC	N/D	0.343	-	-	-	
	FEL	310	-	241.819	-	-	0.060
	REL	179/180/239/ 301/303/310/ 311/312/313	0.349	2.393/2.589/3.020/ 2.432/2.419/3.011/ 2546/2.993/2.594	0.833/0.884/0.997/ 0.844/0.840/0.995/ 0.873/0.990/0.886	110.412/169.207/79 36.43/ 119.155/116.094/4 428.36/ 152.365/2210.93/171.372	
		NA	SLAC	N/D	0.437	-	-
NA	FEL	4	-	376.981	-	-	0.044
	REL	4/23/52/ 287/374	0.595	5.138/3.024/3.166/ 3.071/3.431	0.998/0.694/0.702/ 0.693/0.744	5.138/3.024/0.701/ 0.693/0.743	

N/D表示没有发现,正向选择压力位点的显著性差异水平 $P=0.1$ 、贝叶斯因子=50。

3 讨论

甲型H1N1(09pdm)病毒自2009年在人群中流行以来,其遗传变异及演化方向一直是流感病毒监测的重要内容。监测数据显示,2011~2012年甲型H1N1(09pdm)病毒处于低水平的散发状态,而2013年出现新的流行。本研究中,2013年江苏分离株HA、NA核苷酸与氨基酸的遗传距离与国内其他省份的研究结果比较相对较大^[13],且大于2009~2011年日本地区的结果^[14],可能与病毒表面蛋白的变异速度加快有关。

系统进化分析和进化动力学分析表明,2013年江苏省甲型H1N1(09pdm)流感病毒存在不同的基

为PSIQSR↓GLFGA,结果显示,本研究中13株毒株序列呈现为低毒性序列,其中A/Jiangsupizhou/SWL36/2013发生非碱性氨基酸变异,序列为LSIQSR↓GLFGA。

NA蛋白酶活性耐药位点:NA抑制剂的设计基于NA保守的活性位点^[10],NA蛋白的酶活性位点非常保守,这些位点常常是抗流感药物开发的靶点,NA蛋白酶活性中心包括R118、D151、R152、R225、E277、R293、R368和Y402等催化部位的8个氨基酸位点,以及周围辅助位点E119、R156、W179、S180、D/N199、I223、E228、H275、E278、N295、E425等11个氨基酸位点^[10-11],本研究14株分离病毒在这些位点上均未发现变异。

此外,研究表明^[7,12],NA蛋白某些氨基酸残基的突变可以使病毒对NA抑制剂产生耐药,包括I19E、I52R、I275H和I295N,14株分离病毒在这些位点上均未发现改变。

因型流行,基因多样性增加。14株HA基因主要分为两个谱系,分别属于IV、V分枝,其中12株处于V分枝,成为江苏省甲型H1N1(09pdm)的优势毒株,分子特征主要体现在D114N、K300E、E516K的突变,14株分离株均属于Martha等研究中HA基因分型的clade 7。14株病毒的NA基因进化上处于2个谱系,其中12株构成V分枝,主要体现在N44S的突变。

流感病毒作为一种RNA病毒,由于RNA聚合酶的缺失,使之具有了很高的自发突变率,抗原漂移是甲型流感病毒变异的一个重要方式。漂移变体的出现是由于正向选择导致自发突变,可以逃避现有的免疫力^[15]。已有研究表明,HA1与NA的 ω 值

表 3 2013 年江苏省分离毒株中 HA1 与 HA2 中氨基酸位点变异情况^a
Table 3 Amino acids mutation in the HA1 and HA2 of the Jiangsu A/H1N1(09pdm) virus in 2013

毒株名称	氨基酸位点(去信号肽)																
	1	31	32	35	40	47	83	84	97	114	121	127	138 ^b	143	162 ^b	163 ^b	164 ^b
A/California/07/2009(H1N1)	D	N	L	D	K	V	P	S	D	F	S	D	H	S	S	K	S
A/Jiangsubeitang/SWL1144/2013	S	.	N
A/Jiangsudanyang/SWL1831/2013	I	S	.	N
A/Jiangsugusu/SWL1824/2013	S	.	N	N	.	.
A/Jiangsugaoyou/SWL1141/2013	Q	.	S	.	N
A/Jiangsuhailing/SWL1382/2013	S	.	N	V
A/Jiangsugaoyou/SWL1199/2013	.	.	F	.	.	.	S	.	N	E	.
A/Jiangsunanchang/SWL1100/2013	.	H	S	.	N
A/Jiangsunanjing/S1488/2013	S	.	N	Q	.
A/Jiangsupizhou/SWL36/2013	S	.	N
A/Jiangsuqinhuai/SWL1554/2013	S	G	Q	G	.	.	.
A/Jiangsuquanshan/SWL11849/2013	S	.	N	Q	F
A/Jiangsusucheng/SWL1148/2013	.	.	F	.	.	.	S	.	N	E	.
A/Jiangsutinghu/SWL1354/2013	.	.	.	G	.	.	S	G	.	.	.	E	Q	G	.	.	.
A/Jiangsutinghu/SWL1358/2013	S	.	N	.	I

毒株名称	氨基酸位点(去信号肽)																
	183	185 ^b	186 ^b	191 ^b	197	203 ^b	215	222	234	256	262	271	274	283	284	285	286
A/California/07/2009(H1N1)	S	S	A	L	A	S	A	D	V	A	G	P	D	K	G	A	I
A/Jiangsubeitang/SWL1144/2013	.	T	.	.	.	T	.	.	I	.	R	R	N	E	.	.	.
A/Jiangsudanyang/SWL1831/2013	.	T	T	I	.	T	.	.	I	E	.	.	.
A/Jiangsugusu/SWL1824/2013	P	T	.	.	.	T	.	.	I	E	.	.	M
A/Jiangsugaoyou/SWL1141/2013	.	T	T	.	.	T	.	.	I	E	.	.	.
A/Jiangsuhailing/SWL1382/2013	.	T	.	.	.	T	E	.	.	.
A/Jiangsugaoyou/SWL1199/2013	.	T	T	.	.	T	.	.	I	E	V	T	L
A/Jiangsunanchang/SWL1100/2013	.	T	.	.	.	T	.	N	I	E	.	.	.
A/Jiangsunanjing/S1488/2013	.	T	.	.	.	T	.	.	.	T	.	.	.	E	-	.	.
A/Jiangsupizhou/SWL36/2013	.	T	.	.	.	T	V	.	I	E	.	.	M
A/Jiangsuqinhuai/SWL1554/2013	.	T	.	.	.	T	.	G
A/Jiangsuquanshan/SWL11849/2013	.	T	.	.	.	T	.	G	.	T	.	.	.	E	C	.	.
A/Jiangsusucheng/SWL1148/2013	.	T	T	.	.	T	.	.	I	E	V	T	L
A/Jiangsutinghu/SWL1354/2013	.	T	.	.	T	T
A/Jiangsutinghu/SWL1358/2013	.	T	.	.	.	T	E	.	.	.

毒株名称	氨基酸位点(去信号肽)																
	287	293	294	295	296	303	321	322	344	352	374	451	496	499	502	531	548
A/California/07/2009(H1N1)	N	Q	N	I	H	C	I	P	M	H	E	S	N	E	G	G	C
A/Jiangsubeitang/SWL1144/2013	V	.	.	.	K	N	.	K	.	.	.
A/Jiangsudanyang/SWL1831/2013	.	H	S	V	D	.	V	.	.	.	K	N	.	K	.	.	.
A/Jiangsugusu/SWL1824/2013	D	H	I	T	Y	.	V	.	.	.	K	N	.	K	E	.	W
A/Jiangsugaoyou/SWL1141/2013	V	.	.	R	K	N	.	K	.	.	.
A/Jiangsuhailing/SWL1382/2013	V	.	.	.	K	N	.	K	.	.	.
A/Jiangsugaoyou/SWL1199/2013	V	.	.	.	K	N	.	K	.	.	.
A/Jiangsunanchang/SWL1100/2013	V	.	.	.	K	N	.	K	.	.	.
A/Jiangsunanjing/S1488/2013	V	.	.	.	K	N	.	K	.	.	.
A/Jiangsupizhou/SWL36/2013	V	L	.	.	K	N	.	K	.	.	.
A/Jiangsuqinhuai/SWL1554/2013	V	.	.	.	K	N
A/Jiangsuquanshan/SWL11849/2013	V	.	L	.	K	N	.	K	.	.	.
A/Jiangsusucheng/SWL1148/2013	V	.	.	.	K	N	.	K	.	.	.
A/Jiangsutinghu/SWL1354/2013	.	R	V	.	.	.	K	N	I	.	.	W	.
A/Jiangsutinghu/SWL1358/2013	.	.	.	T	.	W	V	.	.	.	K	N	.	K	.	.	.

a:以 A/California/07/2009(H1N1)作为参考毒株;b:发生变异的抗原位点。

表 4 2013 年江苏省分离毒株 NA 氨基酸位点变异情况^a
Table 4 Amino acids mutation in the NA of the Jiangsu A/H1N1(09pdm) virus in 2013

毒株名称	氨基酸位点(去信号肽)														
	1	2	4	10	11	12	23	30	34	44	45	47	52	55	61
A/California/07/2009(H1N1)	M	N	N	I	G	S	I	I	I	N	Q	E	S	T	W
A/Jiangsunanchang/SWL1100/2013	.	T	T	S	L
A/Jiangsuqinhuai/SWL1554/2013	.	.	T	S	H	.	N	.	.
A/Jiangsuhailing/SWL1382/2013	.	.	T	.	.	.	M
A/Jiangsutinghu/SWL1354/2013	.	.	T	T	.	S	H	.	T	.	.
A/Jiangsugaoyou/SWL1199/2013	.	.	T	S
A/Jiangsusucheng/SWL1148/2013	S
A/Jiangsutinghu/SWL1358/2013	.	.	T	.	.	.	M
A/Jiangsudanyang/SWL1831/2013	S
A/Jiangsupizhou/SWL36/2013	.	.	T	S
A/Jiangsugaoyou/SWL1141/2013	.	.	T	S
A/Jiangsunanjing/S1488/2013	.	.	.	M	V	W	.	.	V	S	.	.	.	I	.
A/Jiangsubeitang/SWL1144/2013	.	.	T	S
A/Jiangsugusu/SWL1824/2013	S
A/Jiangsuquanshan/SWL11849/2013	.	.	T	.	.	.	M	.	V	S	.	G	.	.	.

毒株名称	氨基酸位点(去信号肽)														
	74	84	94	106	115	165	200	241	248	257	265	272	273	287	313
A/California/07/2009(H1N1)	F	K	V	V	F	E	N	V	N	R	K	P	N	E	Q
A/Jiangsunanchang/SWL1100/2013	S	I	D	A	H
A/Jiangsuqinhuai/SWL1554/2013	L	N	.	.	.	K	S	I	D
A/Jiangsuhailing/SWL1382/2013	.	.	.	I	.	.	.	I	D	.	.	L	T	K	.
A/Jiangsutinghu/SWL1354/2013	.	N	S	I	D
A/Jiangsugaoyou/SWL1199/2013	S	I	D
A/Jiangsusucheng/SWL1148/2013	I	D	T
A/Jiangsutinghu/SWL1358/2013	.	.	.	I	.	.	.	I	D	K	.
A/Jiangsudanyang/SWL1831/2013	S	I	D	H
A/Jiangsupizhou/SWL36/2013	L	.	S	I	D	H
A/Jiangsugaoyou/SWL1141/2013	.	.	A	.	.	.	S	I	D	.	E
A/Jiangsunanjing/S1488/2013	S	I	D
A/Jiangsubeitang/SWL1144/2013	S	I	D
A/Jiangsugusu/SWL1824/2013	S	I	D
A/Jiangsuquanshan/SWL11849/2013	S	I	D

毒株名称	氨基酸位点(去信号肽)														
	321	340	351	364	369	374	386	389	396	432	457	464	466	467	468
A/California/07/2009(H1N1)	I	S	Y	S	N	I	N	I	I	K	W	P	T	I	D
A/Jiangsunanchang/SWL1100/2013	.	.	F	.	K	V
A/Jiangsuqinhuai/SWL1554/2013	.	.	F	.	K	.	.	T
A/Jiangsuhailing/SWL1382/2013	.	.	F	.	K
A/Jiangsutinghu/SWL1354/2013	.	.	F	.	K	.	.	T
A/Jiangsugaoyou/SWL1199/2013	.	.	F	.	K	.	.	T
A/Jiangsusucheng/SWL1148/2013	.	.	F	N	K	V
A/Jiangsutinghu/SWL1358/2013	.	P	F	.	K	.	.	.	V
A/Jiangsudanyang/SWL1831/2013	.	.	F	.	K
A/Jiangsupizhou/SWL36/2013	.	.	F	.	K
A/Jiangsugaoyou/SWL1141/2013	.	.	F	.	K
A/Jiangsunanjing/S1488/2013	V	.	F	.	K	.	K	.	.	E
A/Jiangsubeitang/SWL1144/2013	.	.	F	.	K
A/Jiangsugusu/SWL1824/2013	.	.	F	.	K	G	T	P	F	H	.
A/Jiangsuquanshan/SWL11849/2013	V	.	F	.	K	.	K	.	.	E

a: 以 A/California/07/2009(H1N1)作为参考毒株。

分别是 0.314 和 0.258,均小于 1^[14],在整个毒株群中未发现正向选择压力位点。本研究进一步探索江苏省 2013 年甲型 H1N1(09pdm)流感分离毒株中 HA、NA 中正向选择压力的特殊位点,通过不同的模型进行选择压力分析,结果发现 HA 的 310 位点及 NA 的 4 位点在不同模型下均为正向选择压力位点,与 Furuse 等^[15]在研究中发现的 206 和 264 位点及 Khandaker 等^[14]发现的日本地区 HA1 的 197(去信号肽)、NA 的 46 位点不同,Li 等^[16]研究中也尚未有对本研究中出现位点的报道,关于此研究中 HA 及 NA 出现的正向压力选择位点的功能及不同地区及季节正向选择压力位点之间是否存在关系,有待进一步研究。

流感病毒氨基酸抗原位点的突变,受体结合位点的变异和潜在糖基化位点的变化都有可能改变流感病毒的抗原特性、宿主适应性和致病力^[14]。HA、NA 变异分析发现,其中突变频率较高的 HA 变异位点 P83S、S185T、S203T、I321V 及 NA 变异位点 N44S、V241I、N248D、N369K 在 Khandaker 等^[14]的研究中也同样发现,而在他们的研究中突变频率较高的 S143G、S183P、A197T、I295V 在本研究中的少数分株离中存在。Maurer-Stroh 等^[17]研究发现,N368K、K432E 等位点位于抗原决定簇上,分离毒株中出现 N368K、K432E 等位点的改变,与南京地区研究结果一致^[6],此外研究表明,HA 基因 D222 突变是导致临床重症病例的重要原因,具有重要临床意义^[18-20],本研究中有 2 株发生 D222G 突变,1 株发生 D222N 突变,应继续加强对其病原学和基因变异情况的监测。

研究表明^[21],糖基化位点的非糖基化以及糖基化位点数量的变化都可能会影响蛋白质折叠和运输,进而导致流感病毒结合受体的能力和病毒致病性降低。病毒在进化过程中会获得新的糖基化位点,新的糖基化位点可能会掩盖抗原位点,成为病毒逃逸免疫压力的一种方式,本研究中的 14 株分离株中共发现了 HA 糖基化位点 9 个,其中 10NNST、11NST、23NVT、87NGT 为 HA1 上保守的糖基化位点,可追溯到 A/South Carolina/1/1918^[22]。481NGT 和 540NGDL 为 HA2 上保守的糖基化位点,与江苏省首例甲型 H1N1(09pdm)毒株^[22]相比,HA 增加了 2 个糖基化位点。NA 固定糖基化位点 7 个,与国内其他研究结果一致^[6],另外出现 2 个位点的改变,推测本次甲型 H1N1(09pdm)流行与糖基化位点的增加及改变存在一定关系。研究表明,HA 蛋白裂解位点上游出现多个碱性残基(R、K、H),可

能会提高毒株致病性^[12],本研究中发现 1 株分离株裂解位点出现非碱性氨基酸变异,序列改变对毒株致病性高低程度的影响有待进一步研究。

NA 蛋白在 119E、152R、275H 和 295N 位点均未发生氨基酸改变,表明对 NA 抑制剂如奥司他韦磷酸盐等敏感^[23]。本研究未发现酶活性位点及耐药位点的变化,表明目前所使用的抗流感药物尚能够发挥作用。

总之,本研究通过初步分析,获得了江苏省 2013 年 A/H1N1(09pdm)病毒变异情况,新的糖基化位点增加,基因多样性增加、正向选择压力位点的存在都在一定程度上预示着 A/H1N1(09pdm)病毒在未来一段时间还将成为江苏省流感流行的优势毒株。流感基因的监测对于流感预防决策的制定及流感疫苗的研制有着重要意义,因此相关部门应该重视并加强流感基因的监测。

[参考文献]

- [1] 吴静,丁勇,刘成友. 甲型 H1N1 流感病毒 HA 基因的简单重复序列预测[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2013,33(1):42-47
- [2] 聂绍发,李立明. 流行病学[M]. 6 版. 北京:人民卫生出版社,2010:430-447
- [3] Nelson M, Spiro D, Wentworth D, et al. The early diversification of influenza A/H1N1pdm[J]. PLoS Curr,2009,1:RRN1126
- [4] Igarashi M, Ito K, Yoshida R, et al. Predicting the antigenic structure of the pandemic (H1N1)2009 influenza virus hemagglutinin[J]. PLoS One,2010,5(1):1-7
- [5] Brownlee GG, Fodor E. The predicted antigenicity of the haemagglutinin of the 1918 Spanish influenza pandemic suggests an avian origin[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci,2001,356(1416):1871-1876
- [6] 何敏,石利民,王燕,等. 2013 年南京市甲型 H1N1 流感病毒 NA 基因的进化分析[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2014,34(12):1783-1788
- [7] 祁贤,汤奋扬,李亮,等. 新甲型 H1N1(2009)病毒的早期分子特征[J]. 微生物学报,2010,50(1):81-90
- [8] 李伟,罗鹏飞,邓斐,等. 江苏省 2011 年乙型流感病毒血凝素和神经氨酸酶分子流行特征[J]. 中华微生物学与免疫学杂志,2012,12(32):1026-1033
- [9] Gamblin SJ, Haive LF, Russell RJ, et al. The structure and receptor binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin [J]. Science,2014,303(5665):1838-1842
- [10] Richard M, Claire D, Mendy B, et al. Impact of influenza A virus neuraminidase mutations on the stability, activity, and sensibility of the neuraminidase to neuraminidase in-

- hibitors[J]. *J Clin Virol*, 2008, 41(1):20-24
- [11] 刘 倜, 林 艺, 王 爽, 等. 甲型 H1N1 流感病毒神经氨酸酶基因进化分析[J]. *中国公共卫生*, 2011, 1(27): 20-22
- [12] 任娟娟, 王晶钰, 刘红彦, 等. 陕西省 avian-like H1N1 猪流感病毒的遗传进化分析[J]. *中国农业科学*, 2013, 46(18):3901-3913
- [13] 谢剑锋, 沈晓娜, 王美爱, 等. 福建省甲型 H1N1 流感病毒基因特征研究[J]. *病毒学报*, 2014, 1(30):37-43
- [14] Khandaker I, Suzuki A, Kamigaki T, et al. Molecular evolution of the hemagglutinin and neuraminidase genes of pandemic (H1N1)2009 influenza viruses in Sendai, Japan, during 2009-2011[J]. *Virus Genes*, 2013, 47(3): 456-466
- [15] Furuse Y, Shimabukuro K, Odagiri T, et al. Comparison of selection pressures on the HA gene of pandemic (2009) and seasonal human and swine influenza A H1 subtype viruses[J]. *Virology*, 2010, 405(2):314-321
- [16] Li WF, Shi WF, Qiao HJ, et al. Positive selection on hemagglutinin and neuraminidase genes of H1N1 influenza viruses[J]. *Virology J*, 2011, 8:183
- [17] Maurer-Stroh S, Ma J, Lee RT, et al. Mapping the sequence mutations of the 2009 H1N1 influenza A virus neuraminidase relative to drug and antibody binding sites[J]. *Biol Direct*, 2009, 4(1):18
- [18] Houg HS, Garner J, Zhou Y, et al. Emergent 2009 influenza A(H1N1)viruses containing HA D222N mutation associated with severe clinical outcomes in the Americas[J]. *J Clin Virol*, 2012, 53(1):12-15
- [19] Wang B, Dwyer DE, Soedjono M, et al. Evidence of the circulation of pandemic influenza (H1N1)2009 with D222D/G/N/S hemagglutinin polymorphisms during the first wave of the 2009 influenza pandemic[J]. *J Clin Virol*, 2011, 52(4):304-306
- [20] Chan PK, Lee N, Joynt GM, et al. Clinical and virological course of infection with haemagglutinin D222G mutant strain of 2009 pandemic influenza A (H1N1)virus[J]. *J Clin Virol*, 2011, 50(4):320-324
- [21] Reid AH, Fanning TG, Johan V. Origin and evolution of the 1918 Spanish influenza virus hemagglutinin gene[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(4):1651-1656
- [22] 祁 贤, 崔仑标, 李 亮, 等. 江苏首例甲型 H1N1 (2009) 流感病毒分离及其血凝素分子遗传特征分析[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(2):305-310
- [23] Scholtissek C, Quack G, Klenk HD, et al. How to overcome resistance of influenza A viruses against adamantane derivatives[J]. *Antiviral Res*, 1998, 37(2):83-95

[收稿日期] 2014-12-31

.....

(上接第 776 页)

- [13] Liu X, Lin H, Tang Q, et al. Characterization of a human antibody fragment Fab and its calcium phosphate nanoparticles that inhibit rabies virus infection with vaccine[J]. *PLoS One*, 2011, 6(5):e19848
- [14] 张夏玲, 孙见宇, 殷 珏, 等. 全人源抗狂犬病病毒单克隆抗体的制备与鉴定[J]. *南京医科大学学报:自然科学版*, 2012, 32(6):739-744
- [15] Singh A, Yadav D, Rai KM, et al. Enhanced expression of rabies virus surface G-protein in *Escherichia coli* using SUMO fusion[J]. *Protein J*, 2012, 31(1):68-74
- [16] Ramya R, Mohana Subramanian B, Sivakumar V, et al. Expression and solubilization of insect cell-based rabies virus glycoprotein and assessment of its immunogenicity and protective efficacy in mice[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2011, 18(10):1673-1679
- [17] Huang H, Xiao S, Qin J, et al. Construction and immunogenicity of a recombinant pseudotype baculovirus expressing the glycoprotein of rabies virus in mice[J]. *Arch Virol*, 2011, 156(5):753-758
- [18] Astray RM, Ventini DC, Boldorini VL, et al. Rabies virus glycoprotein and immune response pattern using recombinant protein or recombinant RNA viral vectors[J]. *Vaccine*, 2014, 32(24):2829-2832
- [19] Rossi N, Silva BG, Astray R, et al. Effect of hypothermic temperatures on production of rabies virus glycoprotein by recombinant *Drosophila melanogaster* S2 cells cultured in suspension[J]. *J Biotechnol*, 2012, 161(3):328-335

[收稿日期] 2015-01-19