

# 2005-2007 年吉林省乙型流行性感胃病毒 HA1 基因序列分析

许爽, 吴燕平, 李响, 沈博, 杨显达

**摘要:** **目的** 了解 2005-2007 年吉林省乙型流行性感胃(流感)病毒 HA1 基因的演变特征。**方法** 采用 MDCK 分离培养流感病毒, 提取病毒 RNA, 经反转录和聚合酶链式反应扩增后测序。**结果** 2005-2007 年吉林省同时流行着乙型 Victoria 系和 Yamagata 系流感毒株。与 B/Shanghai/361/02 相比, 2005 年流行的乙型 Yamagata 系病毒有 8 个氨基酸位点发生改变; 2007 年流行的乙型 Yamagata 系病毒有 10 个氨基酸变化位点; 2007 年流行的乙型 Victoria 系毒株与 B/Malaysia/2506/04 相比, 只有 3 个氨基酸位点发生替换。**结论** 2005-2007 年吉林省流行的乙型 Yamagata 系病毒与 B/Shanghai/361/02 相比已经发生变化; 吉林省 2007 年 Victoria 系毒株与疫苗代表株 B/Malaysia/2506/04 比较接近。

**关键词:** 乙型流感; 血凝素基因; 核苷酸序列

中图分类号: R511.7

文献标识码: A

文章编号: 1003-9961(2009)09-0661-03

**Analysis on HA1 gene sequence of influenza B virus isolated in Jilin province, 2005-2007** XU Shuang, WU Yan-Ping, LI Xiang, SHEN Bo, YANG Xian-da. Jilin Provincial Center for Disease Control and Prevention, Changchun 130062, Jilin, China

**Corresponding author:** XU Shuang, Email: xujlcdc@tom.com

**Abstract:** **Objective** To analyze the characteristics of HA1 gene of influenza B virus isolated in Jilin province from 2005 to 2007, and to reveal the relationship between the influenza epidemic and the variation of HA1 region of the virus.

**Methods** Influenza B virus was isolated and cultured by MDCK cell, the RNA was extracted and the HA1 gene was amplified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The purified PCR products were sequenced.

**Results** The B/Yamagata lineage and B/Victoria lineage viruses co-circulated during 2005-2007. Compared with B/Shanghai/361/2002, B/Yamagata lineage virus circulated in Jilin in 2005 had 8 variant amino acids sites, B/Yamagata lineage virus circulated in 2007 had 10 variant amino acids sites. Compared with B/Malaysia/2506/04, B/Victoria lineage virus circulated in 2007 had only 3 variant amino acids sites. **Conclusion** Compared with B/Shanghai/361/2002, B/Yamagata lineage virus circulated in Jilin from 2005 to 2007 showed antigenic drift in HAI region; B/Victoria lineage virus was similar to the vaccine strain of B/Malaysia/2506/04.

**Key words:** influenza B; HA1 gene; nucleotide sequence

近几年来, 吉林省很多流行性感胃(流感)病例是由乙型流感病毒引起。乙型流感病毒和甲型流感病毒一样, 其 HA1 基因的变异具有重要的流行病学意义。笔者测定了 2005-2007 年在吉林省分离的一些乙型流感病毒的 HA1 基因序列, 与已经发表的一些序列进行比较, 试图阐明 2005-2007 年吉林省乙型流感病毒大致的流行演变情况以及在局部地区流行演变的特征, 从而为吉林省流感的监测和预防提供一些参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 毒株来源

作者单位: 吉林省疾病预防控制中心, 吉林 长春 130062

作者简介: 许爽, 女, 吉林省长春市人, 硕士, 主要从事病毒病原学工作

通信作者: 许爽, Email: xujlcdc@tom.com

收稿日期: 2009-03-17

流感监测网络实验室(吉林省疾病预防控制中心及长春市疾病预防控制中心), 采用 MDCK 细胞进行培养<sup>[1]</sup>, 并用标准血清(国家流感中心提供)进行型别鉴定为乙型流感病毒。

1.2 病毒 RNA 的提取 新鲜病毒细胞培养液采用德国 QIAGEN 公司 Rneasy Mini Kit 提取, 具体步骤参考产品说明书。

1.3 RT-PCR 引物 5'-GAA GGC AAT AAT TGT AVT-3' 和 5'-dAC CAG CAA TAG CTC CGA A-3'<sup>[2]</sup>, 由上海基康公司合成。其他试剂包括反转录酶、RNasin、TaqDNA 酶、dNTP 等均购自美国 Promega 公司。反转录及 PCR 方法参见文献[3], 取 8  $\mu$ l 流感病毒的 RNA 提取物作为模板, 与反转录引物合成第一链 cDNA。取 5  $\mu$ l cDNA 加入 PCR 反应体系进行扩增。PCR 反应条件为 95  $^{\circ}$ C 3 min, 94  $^{\circ}$ C 40 s, 50  $^{\circ}$ C 40 s, 72  $^{\circ}$ C 90 s 共 35 个循环, 最后 72  $^{\circ}$ C

8 min,产物用 1%的琼脂糖电泳检测。

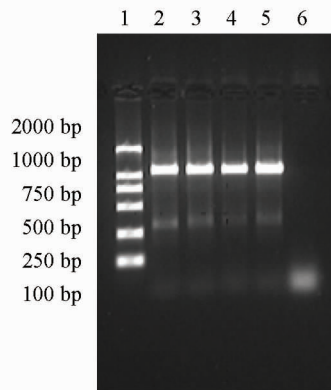
1.4 PCR 产物的纯化及序列测定 RT-PCR 产物按照德国 QIAGEN 公司的 QIAQUICK Gel Extraction Kit 中所提供的产品说明书进行。纯化产物送上海生工生物工程技术有限公司,所用测序仪器为 ABI PRISM 3730。

1.5 序列分析 核苷酸序列和对应的氨基酸序列分别均采用 DNASTAR MegAlign 序列分析软件进行,采用 Neighbor Joining 方法建立系统进化树。摘录在 GenBank 中收录的有关乙型流感病毒的 HA1 区序列来参与分析,其在 GenBank 中的收录号为:M58428、M58419、EF473501、EF456794。B/Malaysia/2506/04 及 B/Hongkong/330/01 序列来自 Influenza Sequence Database,序列号为 ISDN126672、ISDN13431。

2 结果

2.1 RT-PCR 结果 RT-PCR 扩增产物用 1%的琼脂糖电泳检测,HA1DNA 约为 1000 bp,扩增片段大小与设计的理论值相符合,见图 1。

2.2 序列分析结果 2005-2007 年,吉林省共分离到 128 株乙型流感病毒(2006 年未分离的乙型流感病毒),经血凝抑制试验定型为 2005 年分离的乙型流感病毒全部为 Yamagata 系,2007 年分离的乙型流感病毒同时存在 Yamagata 系和 Victoria 系,因此选取 16 株乙型流感毒株(其中 2005 年 4 株,为 Yamagata 系;2007 年 Yamagata 系和 Victoria 系各 6 株)进行血凝素基因 HA1 区核苷酸序列测定。核苷酸序列及推导出氨基酸序列结果分析表明:吉林省



1. DNA Marker; 2~5. HA1 基因; 6. 阴性对照

图 1 RT-PCR 扩增产物凝胶电泳图

Figure 1 Gel electrophoregram of products of RT-PCR

2005 年分离到的乙型 Yamagata 系流感病毒与 B/Shanghai/361/02 相比,有 8 个氨基酸位点发生改变(37I > T、40H > Y、129K > N、131L > P、179I > V、196D > N、232D > A、255G > R)。并且在 196 位增加了一个糖基化位点。吉林省 2007 年分离的 B 型 Yamagata 系流感病毒与 B/Shanghai/361/02 相比,核苷酸同源性为 96.9%~97.2%,见图 2,有 10 个氨基酸位点发生改变,在原来的基础上新增加了两个变化位点,分别为 48R > K、108P > A,同时 129N > K。2007 年分离的 B 型 Victoria 系毒株与 B/HongKong/330/01 比较有 7 个氨基酸位点发生替换(48K > E、80 K > R、116R > H、121N > T、129 K > N、164 E > D、197S > N)。在 197 位增加一个糖基化位点。与 2006-2008 年的国际疫苗株 B/Malaysia/2506/04 比

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25			
1	94.5	96.7	91.6	91.5	91.1	91.3	94.9	91.2	91.2	91.2	91.2	94.9	95.0	94.9	94.9	94.9	94.8	90.9	91.0	90.8	91.1	91.1	91.1	95.2	1	B/Victoria/2/87		
2	5.7	92.2	95.2	95.2	94.2	95.0	90.9	94.9	94.9	94.9	90.9	91.0	90.9	90.8	90.9	90.8	94.4	94.5	94.3	94.6	94.6	94.6	91.2	2	2	B/Yamagata/16/88		
3	3.4	8.3	90.2	90.2	89.3	90.2	96.9	89.9	89.9	89.9	96.9	96.8	96.7	96.7	96.7	96.6	89.5	89.6	89.4	89.7	89.7	89.7	97.2	3	3	B/Hongkong/330/01		
4	9.0	5.0	10.7	97.8	97.2	97.6	89.4	97.3	97.3	97.3	97.3	89.4	89.3	89.4	89.1	89.2	89.3	97.0	97.1	96.9	97.2	97.2	89.7	4	4	B/Shanghai/361/02		
5	9.1	5.0	10.7	2.3	97.4	99.6	89.7	99.3	99.3	99.3	89.7	89.6	89.7	89.4	89.5	89.6	98.2	98.3	98.1	98.4	98.4	98.4	90.0	5	5	B/Jilin/20/03		
6	9.6	6.1	11.8	2.9	2.7	97.2	88.5	96.9	96.9	96.9	96.9	88.5	88.4	88.5	88.2	88.3	88.4	97.0	97.1	96.9	97.2	97.2	97.2	88.8	6	6	B/Florida/4/06	
7	9.4	5.2	10.7	2.5	0.4	2.9	89.5	99.1	99.1	99.1	99.1	89.5	89.4	89.5	89.2	89.3	89.4	98.0	98.1	97.9	98.2	98.2	98.2	89.8	7	7	B/Tianjing/144/05	
8	5.4	9.9	3.2	11.6	11.3	12.8	11.5	89.2	89.2	89.2	89.2	98.8	98.9	98.8	98.7	98.8	88.8	88.8	88.9	88.9	88.9	89.3	8	8	8	B/Shenzhen/155/05		
9	9.5	5.3	11.1	2.8	0.7	3.2	0.9	11.9	99.8	100.0	99.8	89.4	89.1	89.2	89.1	89.2	89.3	98.5	98.6	98.4	98.7	98.7	89.5	9	9	9	B/Jilin/13/05	
10	9.5	5.3	11.1	2.8	0.7	3.2	0.9	11.9	0.2	99.8	100.0	89.4	89.1	89.2	89.1	89.2	89.3	98.5	98.6	98.4	98.7	98.7	89.5	10	10	10	B/Jilin/4/05	
11	9.5	5.3	11.1	2.8	0.7	3.2	0.9	11.9	0.0	0.2	99.8	89.4	89.1	89.2	89.1	89.2	89.3	98.5	98.6	98.4	98.7	98.7	89.5	11	11	11	B/Jilin/26/05	
12	9.5	5.3	11.1	2.8	0.7	3.2	0.9	11.9	0.2	0.0	0.2	89.4	89.1	89.2	89.1	89.2	89.3	98.5	98.6	98.4	98.7	98.7	89.5	12	12	12	B/Jilin/3/05	
13	5.4	9.9	3.2	11.6	11.3	12.8	11.5	1.2	11.7	11.7	11.7	99.1	99.2	99.1	99.2	99.7	88.9	89.0	88.9	89.0	89.1	89.1	89.1	89.1	13	13	13	B/Jilinchaoyang/ 1126/07
14	5.3	9.7	3.3	11.8	11.4	12.9	11.7	1.1	12.1	12.1	12.1	0.9	99.1	99.8	99.9	99.0	88.9	89.0	89.0	89.1	89.1	89.1	99.2	14	14	14	B/Jilinchaoyang/ 1129/07	
15	5.4	9.9	3.4	11.6	11.3	12.8	11.6	1.2	11.9	11.9	11.9	0.4	0.9	98.9	99.0	99.7	88.7	88.8	88.8	88.9	88.9	88.9	89.3	15	15	15	B/Jilinchaoyang/ 1141/07	
16	5.4	10.0	3.4	12.0	11.6	13.2	11.9	1.3	12.1	12.1	12.1	0.9	0.2	1.1	99.9	99.0	88.9	89.0	89.0	89.1	89.1	89.1	89.1	89.1	16	16	16	B/Jilinchaoyang/ 1156/07
17	5.4	9.9	3.4	11.9	11.5	13.0	11.8	1.2	11.9	11.9	11.9	0.8	0.1	1.0	0.1	99.1	89.0	89.1	89.1	89.2	89.2	89.2	89.1	17	17	17	B/Jilinchaoyang/ 1165/07	
18	5.5	10.0	3.5	11.8	11.4	12.9	11.7	1.3	11.8	11.8	11.8	0.3	1.0	0.3	1.0	0.9	88.8	88.9	88.9	89.0	89.0	88.0	89.0	18	18	18	B/Jilinzhelai/ 1156/07	
19	9.8	5.8	11.5	3.1	1.8	3.1	2.1	12.5	1.5	1.5	1.5	1.5	12.3	12.3	12.5	12.3	12.2	12.4	99.7	99.5	99.8	99.8	99.8	89.0	19	19	19	B/Jilinchaoyang/1214/07
20	9.7	5.7	11.4	3.0	1.7	3.0	2.0	12.4	1.4	1.4	1.4	1.4	12.2	12.2	12.4	12.2	12.0	12.3	0.3	99.6	88.9	99.9	99.9	89.1	20	20	20	B/Jilinchaoyang/1314/07
21	10.0	66.0	11.7	3.2	2.0	3.2	2.2	12.4	1.6	1.6	1.6	1.6	12.4	12.2	12.4	12.2	12.0	12.3	0.5	0.4	99.7	99.7	99.7	89.1	21	21	21	B/Jilinnanguan/161/07
22	9.6	5.6	11.3	2.9	1.6	2.9	1.8	12.3	1.3	1.3	1.3	1.3	12.0	12.0	12.3	12.0	11.9	12.2	0.2	0.1	0.3	100.0	100.0	89.2	22	22	22	B/Jilinzhelai/1158/07
23	9.6	5.6	11.3	2.9	1.6	2.9	1.8	12.3	1.3	1.3	1.3	1.3	12.0	12.0	12.3	12.0	11.9	12.2	0.2	0.1	0.3	0.0	100.0	89.2	23	23	23	B/Jilinzhelai/ 1165/07
24	9.6	5.6	11.3	2.9	1.6	2.9	1.8	12.3	1.3	1.3	1.3	1.3	12.0	12.0	12.3	12.0	11.9	12.2	0.2	0.1	0.3	0.0	0.0	89.2	24	24	24	B/Jilinzhelai/187/07
25	5.0	9.5	2.9	11.3	10.9	12.4	11.2	0.7	11.6	11.6	11.6	0.8	0.8	0.7	1.0	0.9	1.0	12.2	12.0	12.0	11.9	11.9	11.9	89.2	25	25	25	B/Malaysia/2506/04

图 2 2005-2007 年吉林省 B 型流感病毒 HA1 核苷酸同源性比较

Figure 2 Homology of influenza B viruses isolated in Jilin, 2005-2007

较,吉林省分离的 Victoria 系病毒有 3 个氨基酸位点发生替换(121T>A、134S>P、199A>T 位)。

构建的基因进化树(图 3)可以看出,2005-2007 年在吉林省流行乙型流感病毒根据基因特性分为两个不同的谱系 Yamagata 系和 Victoria 系。2007 年分离的 B 型 Yamagata 系流感病毒与 2005 年分离的流感病毒相比,在进化树上形成新的侧支,和 2006-2008 年国际疫苗代表株 B/Malaysia/2506/04 分布在不同的分支。2007 年分离的 B 型 Victoria 系流感病比较接近国际疫苗代表株 B/Malaysia/2506/04,同时更接近于国内代表株 B/Shenzhen/155/05。

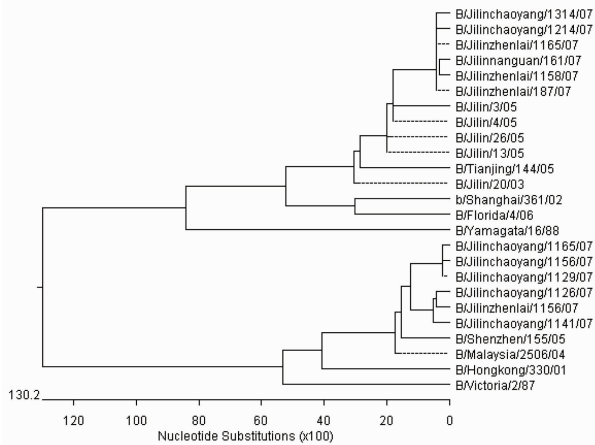


图 3 2005-2007 年吉林省乙型流感病毒 HA1 基因进化树  
Figure 3 Phylogenetic tree of influenza B viruses isolated in Jilin, 2005-2007

### 3 讨论

由于流感病毒的 HA 变异率很高,不同亚型的毒株或同一亚型的不同毒株均有差异,在机体的选择压力下,极易发生变异,从而引起流感病毒的抗原漂移和抗原转变,造成流行。因此,长期对 HA 抗原性变异特点进行监测、了解和掌握十分必要的。

乙型流感病毒的 HA1 区第 70~90 位 110~210 位之间的位点参与构成抗原的表位<sup>[1]</sup>。其间氨基酸的改变会导致病毒的抗原性改变<sup>[4]</sup>。本次研究中,吉林省的乙型流感病毒氨基酸的改变,大多发生在这些位置。

本次研究结果表明吉林省 2005 年流行的乙型 Yamagata 系病毒与当时的国际疫苗代表株 B/Shanghai/361/02 相比,有 8 个氨基酸位点发生改变;2007 年流行的乙型 Yamagata 系病毒有 10 个氨基酸变化位点,同时与 2006-2008 年国际疫苗代表株 B/malaysia/2506/04 相比,型别不匹配。可能由于

上述原因使得乙型 Yamagata 系流感病毒在吉林地区形成流行,并有流行增强趋势。

吉林省 2007 年流行的乙型 Victoria 系流感病毒与 2003-2004 年疫苗代表株 B/HongTong/330/01 相比距离较远,处在系统进化树不同分支,与 2006-2008 年疫苗代表株 B/Malaysia/2506/04 相比距离较近,只有 3 个氨基酸位点发生变异,说明毒株变异有限。对于疫苗接种率较高的地区,能够形成较好的保护。这也从一个方面解释了尽管 2005 年抗体水平调查结果显示吉林省普通人群抗 B 型 Victoria 系毒株抗体水平较低<sup>[5]</sup>,但是在 2007 年 Victoria 系毒株在吉林省引起的流行强度并没有超过往年的现象。

流感病毒第 4 节段基因编码的 HA 在病毒流行过程中至关重要,HA 的结构切割位点、头部结构的抗原决定簇、糖基化位点和磷酸化位点都和致病性有关<sup>[6]</sup>。对 HA 与宿主受体结合的特性的研究也将有助于认识宿主限制性的决定因素,以及有助于了解宿主引起高致病性和低致病性不同反应的决定因素,因此对 HA 基因的长期监测,可以为流感的防控工作采取更有效的措施提供科学依据。

### 参考文献

- [1] Guo YJ, Cheng XW. Influenza virus and laboratory detection technology [M]. Beijing: Three Gorges Press, 1997: 100-102. (in Chinese)  
郭元吉,程小雯. 流行性感冒病毒及实验技术[M]. 北京: 三峡出版社, 1997: 100-102.
- [2] Zhang Y, Wen YY, Wang M, et al. Antigenicity and gene characteristics of influenza B/Victoria lineage virus isolated in China, 2001 [J]. Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology, 2003, 17(1): 15-17. (in Chinese)  
张焯,温乐英,王敏,等. 2001 年中国新分离维多利亚系乙型流感病毒的抗原性及基因特性分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2003, 17(1): 15-17.
- [3] Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase [J]. Science, 1988, 239(4839): 487-491.
- [4] Shu YL, Wang M, Guo YJ. Antigenicity and gene characteristics of hemagglutinin protein of influenza B virus currently circulated in China [J]. Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology, 1996, 10(3): 217-221. (in Chinese)  
舒跃龙,王敏,郭元吉. 当前我国流行的乙型流感病毒血凝素蛋白抗原性及基因特性的研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 1996, 10(3): 217-221.
- [5] Wu YP, Xu S, Piao DF, et al. Etiological features of influenza in Jilin, 2004-2006 [J]. Chinese Journal of Public Health Engineering, 2006, 5(6): 366-368. (in Chinese)  
吴燕平,许爽,朴东风,等. 2004-2006 年吉林省流行性感冒病原学变化特点[J]. 中国卫生工程学杂志, 2006, 5(6): 366-368.
- [6] Zhang JH, Xu H. Molecular genetics characteristics and pathogenicity of hemagglutinin of influenza/avian influenza viruses [J]. Journal of Public Health and Preventive Medicine, 2006, 17(6): 33-34, 37. (in Chinese)  
张家淮,徐红. 流感/禽流感病毒血凝素的分子遗传特征与其至病性[J]. 公共卫生与预防医学杂志, 2006, 17(6): 33-34, 37.