

149-155

3165(8)

第7卷第2期
1992年6月中国病毒学
VIROLOGICA SINICAVol. 7 No. 2
Jun. 1992用 ^{125}I 标记肽图估计近年来流行的
甲型流感病毒血凝素的变异率

严家新 黄鹤 潘南胜 姚洁

(湖北省医学科学院病毒学研究所, 武汉 430070)

R373.13

提 要

将一种灵敏而简便的 ^{125}I 标记肽图分析方法用于估计近年来流行的 5 株甲 1 型和 5 株甲 3 型流感病毒血凝素(HA)的变异率。经计算这两种亚型病毒HA的年平均氨基酸变异率分别为 0.47% 和 0.44%。但在 1986 年分离株与 1985 年分离株之间则有较大的变化, 对 HA 的变异率与流行病学资料的关系进行了讨论。

关键词: 甲型流感病毒 血凝素 突变率 肽图

自 1977 年以来, 新甲 1 和甲 3 亚型流感病毒同时流行于全世界。流感病毒的主要表面抗原血凝素(HA)经常发生, 目前尚无法预测的变异——抗原漂移(drift)和抗原转变(shift), 这分别是造成流感流行和大流行的主要原因^[1,2]。比较同时流行的甲 1 和甲 3 亚型流感病毒 HA 的变异率及其与流感流行的关系, 将有助于我们加深对这类病毒演变规律的理解, 从而找到控制这类疾病的切实可行的办法。

本室已建立 ^{125}I 标记肽图分析方法^[3]并曾用于对 1983 年以前流行的 7 株甲 3 型流感病毒的 HA 进行比较分析^[4,5], 发现该方法可粗略估计 HA 的年平均变异率, 而且所得结果与文献中相应基因的全序列分析的结果很一致。近几年很少有对新分离的甲型流感病毒的 HA 进行全序列分析的资料发表。本文报道我们对近年来流行的 5 株甲 1 型和 5 株甲 3 型流感病毒的 HA 进行的 ^{125}I 标记肽图分析(其中 2 株甲 3 型流感病毒是重复原来的实验以作对照), 并分析其变异率与流感流行的关系。

材 料 和 方 法

一、病毒株 1979 年至 1989 年年分离的甲 1 型流感病毒 5 株: A/鄂防/12/79(简称 79-12, 余类推), A/沪防/13/83, A/鄂科/1/85, A/京防/1/86, A/鄂科/3/89。1977 年至 1989 年分离的甲 3 型流感病毒 5 株: A/粤防/38/77, A/汉防/15/83, A/京科/266/85, A/孝防/2/86, A/京防/57/89。按常规方法用鸡胚增殖病毒。

本文于 1991 年 5 月 7 日收到, 7 月 21 日修回。

二、病毒株特异抗血清的制备及血凝抑制 (HI) 试验 用含流感病毒的新鲜尿囊液制备鸡免疫血清, 用此血清按常规方法进行 HI 试验^[6]。

三、病毒的浓缩、纯化和 HA 的分离提纯 基本上按文献〔3〕; 病毒阳性的尿囊液用终浓度 8% 的 PEG6000 沉淀以浓缩病毒, 然后用蔗糖密度梯度高速离心纯化病毒, 用 SDS-PAGE 分离提纯 HA。

四、HA 的¹²⁵I 标记 经考马斯亮蓝染色的凝胶上含 HA 的小片切下, 漂洗, 烘干后, 4℃ 保存备用。为保证¹²⁵I 标记条件的一致性, 待比较的同亚型毒株的¹²⁵I 标记和酶解一次同时进行。基本上按文献〔4〕, 用氯胺 T 法直接对含 HA 的凝胶小片在 1.5ml 小离心管中进行¹²⁵I 标记 标记的凝胶漂洗至洗液与凝胶的 γ 射线强度的比值 <0.05 , 标记的凝胶于 45℃ 烘干。

五、标记 HA 的酶解及酶解肽段的分离 基本上按文献〔4〕进行, 即直接对标记过的凝胶小片进行酶解, 酶解上清液冷冻干燥后, 在微晶纤维素膜上进行电泳——层析, 最后再进行放射自显影。

六、用¹²⁵I 标记肽图 (以下简称肽图) 估计流感病毒 HA 的氨基酸变异率的推算方法 胰蛋白酶是专一性很强的水解蛋白酶, 只酶解蛋白质分子中赖氨酸和精氨酸的羧基所形成的肽键。一般的蛋白质中所含氨基酸总共有 20 种, 被胰蛋白酶酶解产生的肽段的平均长度是 10 个氨基酸, 例如甲 3 型流感病毒 A/England/321/77 株的 HA 基因编码 550 个氨基酸^[11], 被胰蛋白酶切割后产生的肽段的平均长度正好是 10 个氨基酸, 该 HA 中可被¹²⁵I 标记的酪氨酸共 20 个, 据推算在¹²⁵I 标记肽图中应有约 15 个斑点可显示出来, 这约 15 个斑点的变化反映的是约 15 条肽段, 即总共约 150 个氨基酸的变化情况。可以假定不同年代的肽图中每个斑点的变化代表一个氨基酸的变化 (在较短时间间隔内在一个平均长度为 10 个氨基酸的短肽上发生多个氨基酸改变的机率很小)。如果不同年代的 HA 肽图中有一个斑点发生变化, 即表明在约 150 个氨基酸中有 1 个氨基酸发生了变化, 由此可推算出其氨基酸的变异率为 0.67%, 余可类推。

结 果

一、甲 1、甲 3 亚型流感病毒的抗原分析

用鸡免疫血清对所检测的 5 株甲 1 型和 5 株甲 3 型流感病毒进行 HI 试验的结果分别如表 1、表 2 所示。由表中可见, 这两种亚型病毒的小变异年年都有发生, 较晚毒株与较早毒株的抗血清之间, 以及较晚毒株的抗血清与较早毒株之间, 其 HI 反应的滴度大体上是逐渐降低, 即毒株间的抗原比越来越大, 说明这两种亚型的病毒都发生了逐渐的抗原漂移, 但其抗原比的数量变化与流行程度的变化之间看不出明显的规律, 不能精确地说明多少问题。

表 1 甲 1 型流感病毒不同年代分离株抗原比

Tab. 1 The antigen proportions of influenza A1 viruses isolated in different years (1979—1989)

	1	2	3	4	5
1. A/鄂防/12/79(H1N1)	1	6.4	2.2	12.4	20.2
2. A/沪防/13/83(H1N1)		1	6.8	10.2	19.6
3. A/鄂科/1/85(H1N1)			1	6.5	4.5
4. A/京防/1/86(H1N1)				1	1.4
5. A/鄂科/3/89(H1N1)					1

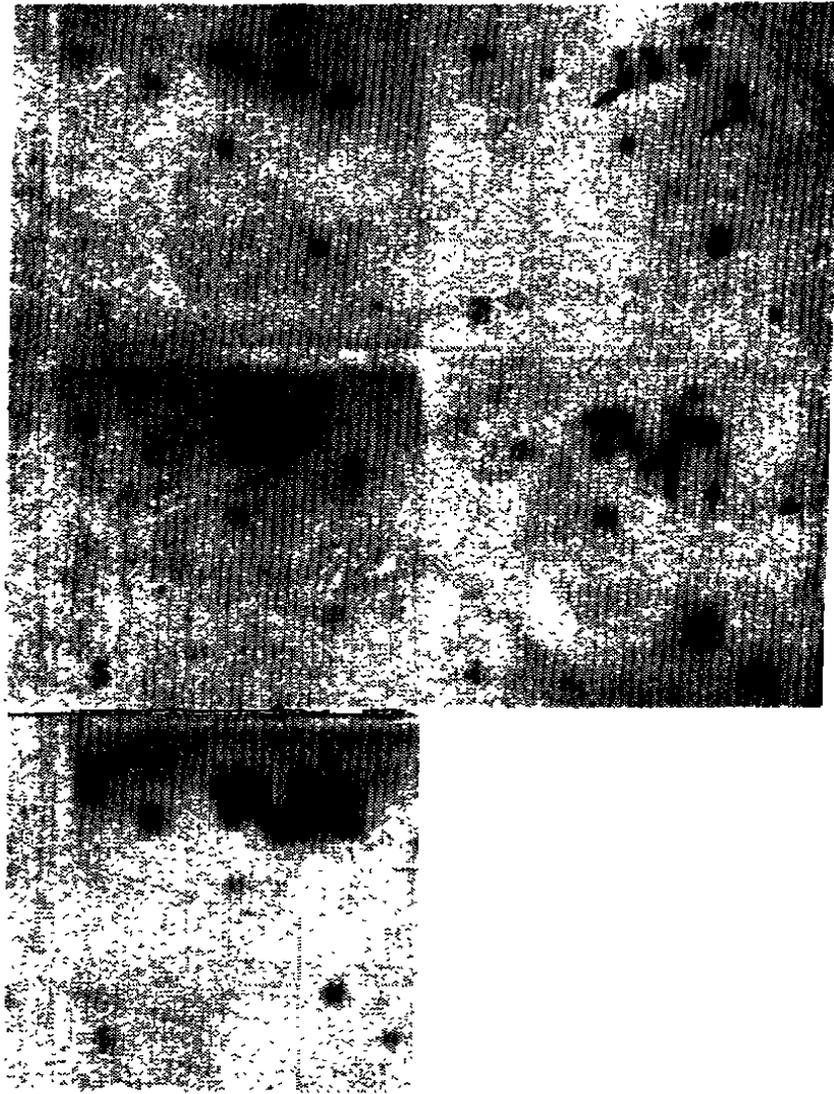


图1 甲1型流感病毒HA的¹²⁵I标记肽图

“↑”表示与较早毒株不同的斑点

“△”表示在较早毒株中有而在该毒株中消失了斑点。

1. A/鄂药/12/79(H1N1)

2. A/沪药/13/83(H1N1)

3. A/鄂科/1/85(H1N1)

4. A/京科/1/86(H1N1)

5. A/鄂科/3/89(H1N1)

Fig.1 Peptide maps of ¹²⁵I-labeled HA of the influenza A1 Viruses

1) A/Hubei/12/79(H1N1)

2) A/Shanghai/13/83(H1N1)

3) A/Hubei/1/85(H1N1)

4) A/Beijing/1/86(H1N1)

5) A/Hubei/3/89(H1N1)

Note: The “↑” indicates the spot which is different from a earlier strain.

The “△” shows the spot which disappears in a latter strain but appears in a earlier strain

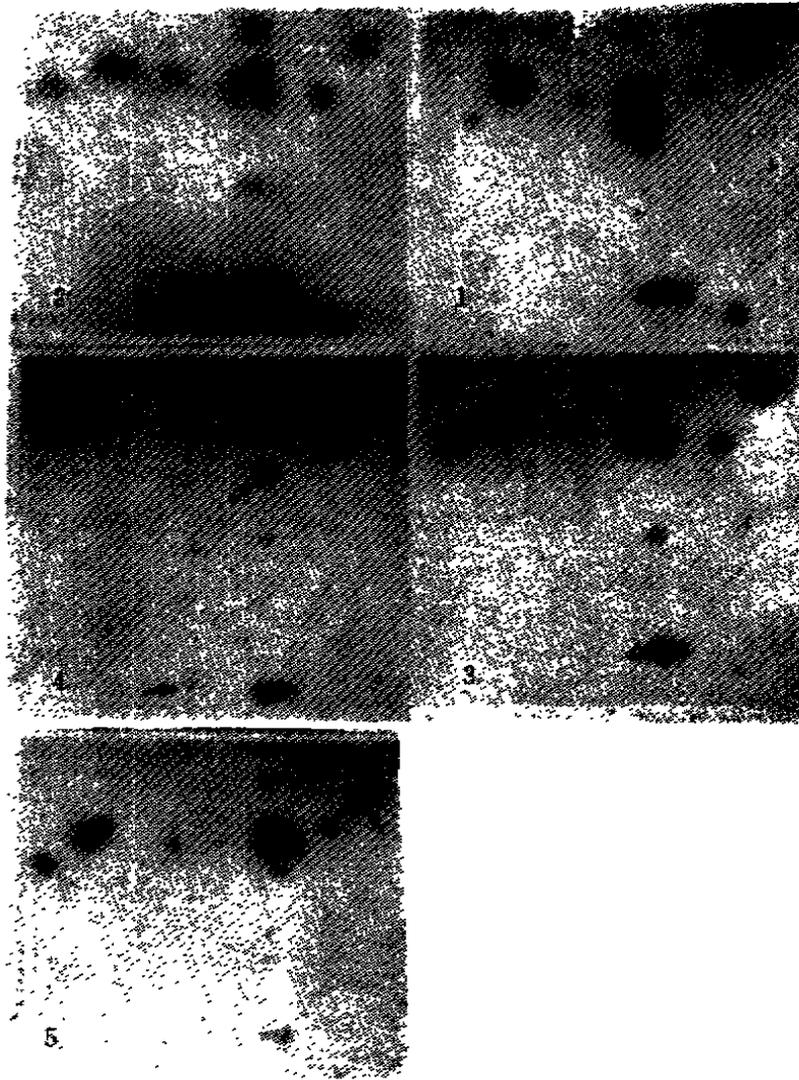


图 2 甲 3 型流感病毒 HA 的 ^{125}I 标记肽图

“1”与“△”的含义同图 1

1. A/粤防/38/77(H3N2)
2. A/汉防/15/83(H3N2)
3. A/京防/266/85(H3N2)
4. A/孝防/1/86(H3N2)
5. A/京防/57/89(H3N2)

Fig.2 Peptide maps of ^{125}I -labeled HA of the influenza A3 viruses

- 1) A/Guangdong/38/77(H3N2)
- 2) A/Wuhan/15/83(H3N2)
- 3) A/Beijing/266/85(H3N2)
- 4) A/Hubei/1/86(H3N2)
- 5) A/Beijing/57/89(H3N2)

The legend is the same as in Fig.1

表 2 甲3型流感病毒不同年代分离株抗原比
Tab.2 The antigen proportions of influenza A3 viruses isolated
in different years (1977—1989)

	1	2	3	4	5
1. A/粤防/38/77(H3N2)	1	1.7	4.6	2.8	22.2
2. A/汉防/15/83(H3N2)		1	3.2	2.8	16.0
3. A/京科/286/85(H3N2)			1	4.0	3.5
4. A/奉防/1/86(H3N2)				1	2.2
5. A/京防/67/89(H3N2)					1

二、甲1型流感病毒不同年代分离株HA的肽图比较

图1系国内从1979—1989年分离的5株甲1型流感病毒HA的肽图, 系按毒株分离的年代顺序依次排列, 这5张肽图中各肽点分布的基本格局表现出明显的相似性。每张肽图中斑点的总数都在13—16个之间, 其中有9—10个斑点在各图中的相对位置基本相同, 而其余斑点则存在不同程度的差别。图3a总结了依次以前株为准与后株相比时不同斑点的数目。在10年期间在本方法可检测到的约150个氨基酸中总共约有7个发生了变化, 故其氨基酸的年平均变化率约为0.47%。

三、甲3型流感病毒不同年代分离株HA的肽图比较

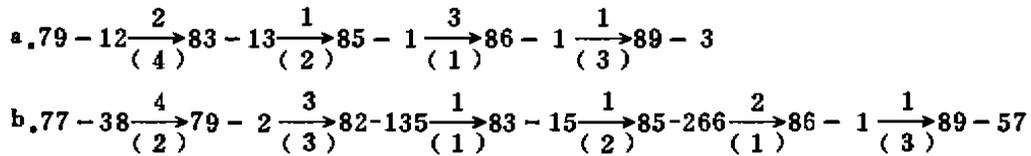
图2系国内从1977—1989年分离的5株甲3型流感病毒HA的肽图, 系按毒株分离的年代顺序依次排列。这5张肽图中各斑点分布的基本格局也明显相似, 每张肽图中斑点总数都在13—16之间, 其中约有8—9个斑点在各图中的相对位置基本相同, 图3.b表明依次以前株为准与后株相比时不同斑点的数目。其中1977年和1983年之间的毒株79—2和82—135系引用原来^[4]的结果。我们原已推算出1972—1983年间甲3型流感病毒HA的年平均变化率为0.9%, 与类似毒株序列分析的结果基本一致^[6]。在1983—1989年(跨度为6年)分离的4株病毒的HA肽图中, 后株与前株相比, 发生了变化的斑点总数为4, 故其氨基酸的年平均变异率约为0.44%。

四、甲1型与甲3型流感病毒HA肽图的比较

由图1与图2相互比较可见, 甲1型流感病毒与甲3型流感病毒HA的肽图在亚型之间彼此明显不同, 从图中看不出它们之间有亲缘关系。但在各亚型之内, 图中斑点的基本分布格局却较相似, 各图的差别可谓大同小异。

讨 论

我们这次进行比较的病毒中有2株甲3型病毒是采用1984年曾经用过的同一批冻干后低温保存的毒株(粤防77—38和汉防83—15), 所得肽图基本相同(仅某些肽点的浓淡略有差别, 这可能是受蛋白质空间结构的影响使不同位点的酪氨酸被标记的效率有区别而引起的), 这说明本方法的重复性很好。与类似毒株的全序列分析资料相比较, ¹²⁵I标记肽图与理论推算的结果很吻合, 说明本方法有相当的可靠性。以甲3型流感病毒A/England/321/77的HA为例, 该蛋白质由550个氨基酸组成^[7], 用本方法可揭示出其中约150个氨基酸的变化情况, 相当于该蛋白质氨基酸总数的27%。寡核苷酸指纹图谱方法通常只能检测出约10%的相应RNA序列的变化情况^[8], 所以在比较流感病毒HA的变异率时本方法要优于后者。

图 3 甲型流感病毒HA的¹²⁵I标记肽图比较a. 甲 1 型流感病毒(H₁N₁)b. 甲 3 型流感病毒(H₃N₂)

注: 箭头上的数字表示后株与前株相比不同斑点的数目, 箭头下(括号内)的数字为毒株分离的时间间隔(年)。

Fig. 3 The comparison of ¹²⁵I-labeled peptide maps of the HAs of influenza A virusesa. The influenza A₁ viruses(H₁N₁)b. The influenza A₃ viruses(H₃N₂)

Note: The numbers above arrows are the numbers of different spots between latter strain and earlier strain. The numbers below arrows (in parentheses) show the spans of isolating times (years).

最近十余年来,流感的流行程度在世界范围内明显降低,仅于1986年1月前后在北半球较大范围内曾引起较明显的流行^[10]。当时国内流行的优势株是甲1型,甲3型次之。用鸡免疫血清进行的HI试验显示,流行前后甲1与甲3型HA的抗原性都有变化,但影响这类抗血清所进行的HI试验的非特异因素很多,与各毒株HI滴度多年的变化率相比,流行前后HI滴度的变化并未表现出明显的特殊性。但流行前后间隔期为1年的相应毒株HA的肽图却都分别测出了3个和2个斑点的变化,这与它们在近几年的年平均变异率相比都是较大的变化。例如1989年与1986年分离的甲1和甲3型毒株,间隔时间为3年,均只检出了一个肽点的变化。所以我们的结论是:1986年与1985年间毒株的HA肽图的显著变化,可以反映1986年毒株发生的较显著的抗原漂移,这种较显著的抗原漂移可能是造成1986年初流感较大程度流行的直接原因。

据1983年以前发表的流感病毒HA全序列分析资料分析,甲1和甲3亚型的流感病毒的HA在抗原漂移的过程中其氨基酸组成的年变异率分别为0.8%和0.9%^[2]。我们用肽图分析方法对1983年以前流行的7株甲3型流感病毒HA进行的比较分析也得出了相似的结论^[4]。近年来很少有对新分离的甲型流感病毒HA进行全序列分析的资料发表。我们在本文中推算出近年来流行的甲1亚型和甲3亚型流感病毒HA的氨基酸年变异率分别为0.47%和0.44%,这与相应毒株在1983年以前的年变异率相比明显降低。这可能是最近十余年来在世界范围内流感流行程度明显降低的直接原因之一。

与流感病毒HA相比,其他致病病毒基因的变异率常常要低若干个数量级^[8],相对而言目前流感病毒HA的年变异率仍然相当高。最近十余年来世界上虽无流感大流行发生,但其局部暴发流行仍时有发生,其发病率仍属全国所有传染病之首,而且其大流行的潜在可能性仍时时威胁着全人类^[2],所以有必要继续从不同角度深入研究其遗传变异规律。

参 考 文 献

- (1) 严家新等, 1985, 国外医学分子生物学分册, 7(3): 126.
 (2) Kilbourne, E.D., 1987, *Influenza*, Plenum Medical Book Co., New York.
 (3) 严家新等, 1985, 生物化学与生物物理进展, 3: 79.
 (4) 严家新等, 1985, 中华微生物学和免疫学杂志, 5(3): 140.
 (5) Wang, M.L. et al., 1986, *Acta Virol*, 30: 97.
 (6) 黄楨祥主编, 1990, 医学病毒学基础及实验技术, 科学出版社, 北京。
 (7) Hauptmann R. et al., 1983, *J Gen Virol*, 64: 215.
 (8) Palese, P. et al, 1982, *Science*, 215: 1469.
 (9) Cox, N.J. et al., 1983, *Bull WHO*, 61: 143.
 (10) 国家流感中心, 1977—1989, 流感简报。

Estimation of the Rates of Haemagglutinin Mutation of Influenza A Viruses Isolated in Recent years Using the ¹²⁵I-labeled Peptide Mapping

Yan Jia-xin Huang He Pan Nan-sheng Yao Jie

(Hubei Academy of Medical Sciences, Wuhan, 430070)

A sensitive and simplified method of ¹²⁵I-labeled peptide mapping was used to estimate the rates of the haemagglutinin (HA) mutation of 5 strains of influenza A1 viruses and 5 strains of influenza A3 viruses. It could be calculated that the average rates of HA mutation for these two subtypes of viruses are 0.47% and 0.44% per year respectively. The strains isolated in 1986 showed some specialities as compared with the average rates of HA mutation. The relation between the rates of HA mutation and the epidemiological data was discussed.

Key words: Influenza A viruses Haemagglutinin Peptide mapping
Rate of mutation