

# 2013~2014 年中国湖北省新甲型 H1N1 流感病毒 鸡胚适应性突变分析

方斌, 刘琳琳, 叶国军, 李翔, 余晓, 江永忠\*

(湖北省疾病预防控制中心 卫生检验检测研究所, 武汉 430079)

**摘要:**为了解湖北省流感监测网络中新甲型 H1N1 流感病毒鸡胚适应性突变的情况,本研究对 3 株湖北省新甲型 H1N1 流感病毒鸡胚株和对应细胞株进行 HA、NA 和 MP 蛋白进化树和基因进化速率分析,氨基酸突变位点、鸡胚适应性突变位点和三维建模分析。鸡胚株和对应细胞株在进化树分布和基因进化速率上的差异均呈现 NA>HA>MP 的特点,在 3 株鸡胚株中发现 4 个鸡胚适应性突变位点:HA 蛋白为 Q223R 和 V527I,NA 蛋白为 M19I 和 H275Y,其中 Q223R 突变会造成抗原表位 Sb 和 Ca2 相邻间的结构变化,H275Y 为典型的神经氨酸酶耐药突变位点。结果表明鸡胚适应性突变会在湖北省流感监测网络的流感病毒鸡胚分离工作中发生,这些突变可能影响疫苗候选株的筛选和疫苗有效性,因此需加强流感监测网络中鸡胚适应性突变的监测工作。

**关键词:**新甲型 H1N1 流感病毒;鸡胚株;进化树;鸡胚适应性;抗原表位;耐药位点

中图分类号:R373.1 文献标识码:A 文章编号:1000-8721(2016)05-0582-08

DOI:10.13242/j.cnki.bingduxuebao.003024

全世界每年因流感引起严重疾病的患者多达 300 万人至 500 万人,致死者达到 25 万人至 50 万人<sup>[1]</sup>。疫苗是目前预防和控制流感的首选方法<sup>[2]</sup>,流感疫苗组分每年的更新是保持疫苗有效性的关键<sup>[3]</sup>,它的更新主要基于疫苗候选株抗原特性的分析和筛选,而疫苗候选株主要来自人流感病毒的鸡胚分离株,但人流感病毒鸡胚适应性突变可能改变人流感病毒的基因和生物学特性,进而影响疫苗效果<sup>[4]</sup>。

人流感病毒在鸡胚中增殖获得鸡胚适应性后,其病毒增殖会更高效<sup>[5]</sup>,但鸡胚适应株在血凝素(hemagglutinin, HA)受体结合位点附近会出现氨基酸选择性突变,与之对应的 MDCK 细胞分离株则无此突变<sup>[6-10]</sup>。鸡胚适应性氨基酸突变影响流感病毒的性状有:受体特异性位点突变可能提高病毒在鸡胚中的复制效率<sup>[11]</sup>;某些突变会增强病毒对禽流感病毒 HA 蛋白偏好的 Sia( $\alpha$ 2-3)Gal 糖受体结合的能力,减弱其对马巨球蛋白的亲合力<sup>[12]</sup>;鸡胚适应性突变也可能减弱疫苗株流感疫苗的效力<sup>[13]</sup>。

流感病毒鸡胚株的分离和序列分析是湖北省流

感监测工作的重要组成部分。本研究对湖北省新甲型 H1N1 流感病毒(Influenza A H1N1pdm09)进行进化树、进化速率、氨基酸突变位点、鸡胚适应性突变位点和三维建模结构分析,探索鸡胚适应性突变对进化树和进化速率的影响,了解其对病毒的潜在糖基化位点、神经氨酸酶(neuraminidase, NA)耐药位点和 HA 蛋白抗原决定簇位点的影响,以及可能引起流感病毒性状和功能的改变。本研究将为流感监测网络中鸡胚适应性突变的监测提供数据支持,有利于疫苗候选株的筛选,对鸡胚分离工作管理的增强具有重要意义。

## 材料与方法

**1 毒株来源** 12 株新甲型 H1N1 流感病毒株从 2013~2014 年间湖北省流感监测网络流感样本中分离,其中 3 株鸡胚株和对应细胞株用于鸡胚适应性分析。样本的毒株名,患者年龄,性别,发病时间等信息详见表 1。

**2 毒株 RNA 提取,HA、NA、MP 基因反转录,PCR 扩增,测序** 取各毒株 100 $\mu$ l,采用 BIO ROBOT EZ1 核酸提取仪 EZ1 virus mini kit v2.0 试剂盒提取毒株 RNA。HA、NA 和 MP 基因测序引物序列由国家流感中心提供。采用 Access RT-PCR System 反转录和扩增。PCR 产物凝胶电泳阳性样送北京华大基因公司测定序列。采用 SeqMan 软件拼接序列,并上传至全球流感共享数据库 EpiFlu 数据系统(<http://platform.gisaid.org/epi3/frontend>)。

收稿日期:2016-06-16;修回日期:2016-07-27

基金项目:“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”科技重大专项(项目编号:2012ZX10004-207),题目:湖北及周边省传染病病原谱流行规律研究

作者简介:方斌(1980-),男,硕士研究生,主要从事流感病毒相关研究, Tel: +86-27-87740787, 13995619528, E-mail: nicolfang@163.com

\* 通讯作者:江永忠(1969-),男,主任技师,主要从事病原微生物相关研究, Tel: +86-27-87652855, 13971533738, E-mail: 575652423@qq.com

表 1 湖北省新甲 H1N1 流感毒株样本信息表

Table 1 Sample information of influenza A H1N1pdm09 virus isolated in Hubei

Isolated virus	Age/year	Gender	Disease time	Clustering case	Out patient	Passage
A/Hubei-Wujiagang/SWL310/2013	7	Female	2013/2/26	Yes	No	E2
A/Hubei-Jiangan/SWL1179/2013	8	Male	2013/4/14	No	Yes	C1
A/Hubei-Wuchang/SWL1322/2013	30	Female	2013/11/9	No	Yes	C2
A/Hubei-Xiangcheng/SWL1750/2013	1	Female	2013/12/2	No	Yes	C1
A/Hubei-Wujiagang/SWL1838/2013	31	Female	2013/12/3	No	Yes	C1
A/Hubei-Fancheng/SWL210/2014	19	Male	2014/1/5	No	Yes	C1
A/Hubei-Shashi/SWL317/2014 Egg *	16	Male	2014/1/9	Yes	No	E3
A/Hubei-Shashi/SWL317/2014 *	16	Male	2014/1/9	Yes	No	C1
A/Hubei-Xianan/SWL1129/2014 Egg *	2	Male	2014/2/4	No	Yes	E2
A/Hubei-Xianan/SWL1129/2014 *	2	Male	2014/2/4	No	Yes	C2
A/Hubei-Songzi/SWL1151/2014 Egg *	4	Female	2014/2/21	No	Yes	E1
A/Hubei-Songzi/SWL1151/2014 *	4	Female	2014/2/21	No	Yes	C1

注: \* 标注的毒株为用于鸡胚适应性分析的鸡胚株和对应细胞株。

Notes: Viruses isolated in chicken embryo and corresponding MDCK cell-derived viruses for egg-adapted analysis are marked as “\*”.

**3 序列来源和进化树分析** 从全球流感共享数据库下载 2013~2014 年湖北省 12 株新甲型 H1N1 流感病毒 HA 和 NA 基因和氨基酸序列, 8 株病毒 MP 基因和氨基酸序列, 其中 4 株不含 MP 序列的毒株由国家流感中心测序, 8 株含 MP 序列的毒株由湖北省疾病预防控制中心测序。同时下载流感病毒进化簇参考株对应核苷酸和氨基酸序列<sup>[14]</sup>。HA、NA 和 MP 蛋白进化簇参考株参照欧洲疾控中心流感季度概况报告(<http://ecdc.europa.eu/>), 新甲型 H1N1 流感病毒第 2-6 进化簇, 第 6A、6B、6C 和 7 进化簇参考株分别为: A/Czech Republic/32/2011、A/Hong Kong/3934/2011、A/Christchurch/16/2010、A/Astrakhan/1/2011、A/St. Petersburg/27/2011、A/Hong Kong/5659/2012、A/South Africa/3626/2013、A/Ghana/DARI-0095/2014 和 A/St. Petersburg/100/2011(见图 1)。HA、NA 和 MP 蛋白进化树采用 MEGA 5.2 软件绘制, 建树方法为邻接法(Neighbor-Joining, NJ), Bootstrap=1000。

**4 基因进化速率分析** 通过 BEAST 1.8.3 软件<sup>[15]</sup> (<http://beast.bio.ed.ac.uk/>) 对新甲型 H1N1 流感病毒鸡胚株和对应细胞株的 HA、NA 和 MP 基因分别进行进化速率分析, 置换模型(Substitution model)为 KEY, 分子钟模型为松弛钟模型(uncorrelated lognormal clock), MCMC 模拟过程运行 1 亿代, 且每 1 万代采样, 通过 Tracer 1.6 软件对进化速率结果进行分析<sup>[15-17]</sup>。

**5 氨基酸突变位点分析** 采用 MEGA 5.2 Sequence Data Explorer 分析 HA 蛋白抗原决定簇表位、鸡胚适应性氨基酸突变位点、神经氨酸酶耐药位

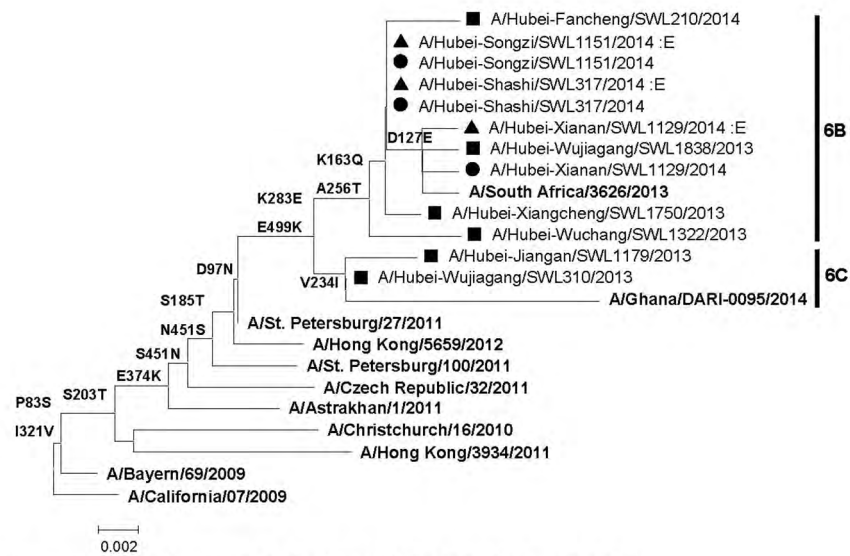
点和糖基化氨基酸突变位点, 氨基酸突变位点通过病毒与参考株 A/California/07/2009 序列比对获得, 鸡胚适应性氨基酸突变位点通过鸡胚株和对应细胞株序列比对获得。

**6 三维建模分析** 通过 SWISS-MODEL 搜索鸡胚株和对应细胞株 HA 和 NA 氨基酸序列的三维结构模板并模拟其三维结构<sup>[18-21]</sup>。HA 蛋白上毗邻抗原决定簇的位点和神经氨酸酶活性位点突变前后的差异均通过 PyMOL 软件编辑并标出<sup>[22]</sup>。

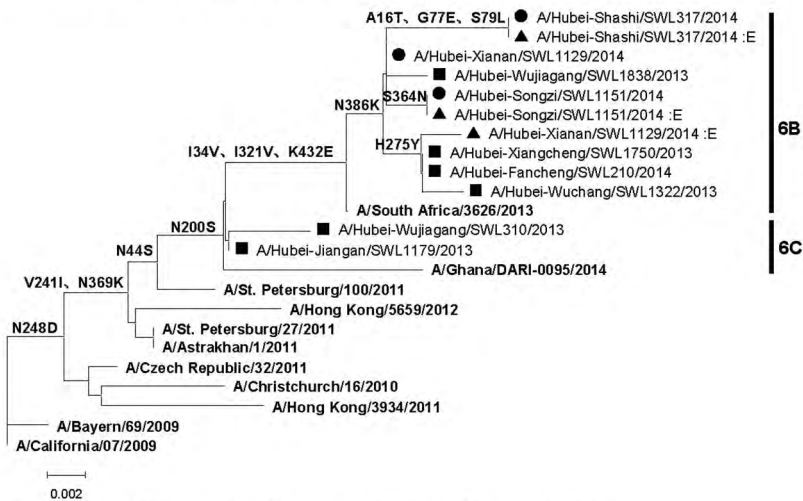
## 结 果

### 1 新甲型 H1N1 流感病毒细胞株和鸡胚株进化树分布

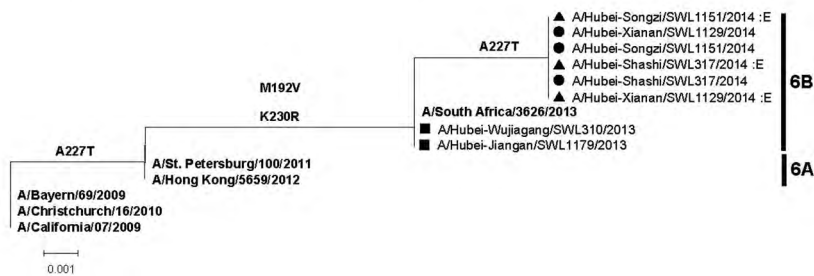
HA 蛋白进化树表明 2 株 2013 年湖北省分离株处在 6C 进化簇, 3 株 2013 年和 7 株 2014 年分离株均处在 6B 进化簇, 鸡胚株和对应细胞株均在 6B 进化簇, 该进化簇的标志性突变位点为 K163Q 和 A256T; NA 蛋白进化树表明 2 株 2013 年湖北省分离株也处在 6C 进化簇, 3 株 2013 年和 7 株 2014 年的分离株也处在 6B 进化簇, 鸡胚株和对应细胞株也均在 6B 进化簇, 该进化簇标志性突变位点为 I34V, I321V 和 K432E, 虽然与 HA 蛋白进化树的分布相似, 但 NA 基因进化树中 6B 进化簇的复杂度要大于 HA 进化树; MP 蛋白进化树与 HA、NA 蛋白进化树结构不同, 结构最简单, 8 株湖北省分离株均处在 6B 进化簇, 鸡胚株和对应细胞株也均在 6B 进化簇, 该进化簇标志性突变位点为 M192V 和 K230R(图 1)。



Phylogenetic tree of HA proteins of influenza A H1N1pdm09 viruses in Hubei



Phylogenetic tree of NA proteins of influenza A H1N1pdm09 viruses in Hubei



Phylogenetic tree of MP proteins of influenza A H1N1pdm09 viruses in Hubei

注:6A,6B和 6C 为进化簇号<sup>[14]</sup>;进化簇参考株为粗体;●同一新甲型 H1N1 病毒细胞株;▲同一新甲型 H1N1 病毒鸡胚株;■其他新甲型 H1N1 病毒;K163Q 等为对应进化簇代表突变位点;0.002,0.002 和 0.001 分别为 HA、NA 和 MP 蛋白进化树的进化距离  
Notes:6A, 6B and 6C are influenza A H1N1pdm09 virus phylogenetic clades<sup>[14]</sup>. Reference strains are marked in bold.  
MDCK cell-derived viruses for egg-adapted analysis are marked as "●" in the phylogenetic trees. Viruses isolated in chicken embryos for egg-adapted analysis are marked as "▲" in the phylogenetic trees. Other viruses are marked as "■" in the phylogenetic trees.  
The evolutionary distance of HA, NA and MP is 0.002, 0.002 and 0.001, respectively.

图 1 2013~2014 年湖北省新甲型 H1N1 流感病毒 HA、NA 和 MP 蛋白进化树

Figure 1 Phylogenetic tree of the HA, NA and MP proteins of influenza A H1N1pdm09 viruses in Hubei, 2013-2014

## 2 新甲型 H1N1 流感病毒细胞株和鸡胚株 HA、NA 和 MP 基因进化速率情况

通过对三株新甲型 H1N1 流感病毒鸡胚株和对应细胞株 HA、NA 和 MP 的蛋白进化簇分别进行基因进化速率分析,发现鸡胚株和对应细胞株 HA 基因每位点每年核苷酸置换速率均值分别为:  $2.3632 \times 10^{-3}$  和  $2.3689 \times 10^{-3}$ , NA 基因每位点每年核苷酸置换速率均值分别为:  $3.2893 \times 10^{-3}$  和

$3.1958 \times 10^{-3}$ , MP 基因每位点每年核苷酸置换速率均值分别为:  $1.7559 \times 10^{-3}$  和  $1.7584 \times 10^{-3}$ , 而鸡胚株和对应细胞株在 3 个进化树上的核苷酸置换速率的均值差的绝对值分别为  $5.7 \times 10^{-6}$ ,  $9.35 \times 10^{-5}$ ,  $2.5 \times 10^{-6}$ , 它们与鸡胚株和对应细胞株在三种进化树中分布的多态性和复杂度呈现  $NA > HA > MP$  的特点一致(图 1 和表 2)。

表 2 新甲 H1N1 流感病毒细胞株和鸡胚株 HA、NA 和 MP 基因置换率

Table 2 Evolutionary rate of HA, NA and MP genes of influenza A H1N1pdm09 viruses

Gene	Absolute difference <sup>a,b</sup> formean value	Mean value <sup>b</sup>	95% HPD interval <sup>b</sup>		Effective sample size(ESS)
			High value	Low value	
HA(Egg <sup>c</sup> )	0.0057	2.3632	3.7418	1.0582	7232
HA(MDCK)		2.3689	3.7920	1.1048	7319
NA(Egg)	0.0935	3.2893	6.2825	1.0526	9001
NA(MDCK)		3.1958	6.1695	1.0468	9001
MP(Egg)	0.0025	1.7559	3.4081	0.4563	8962
MP(MDCK)		1.7584	3.4196	0.4364	8842

注: a 鸡胚株和对应细胞株均值差的绝对值, b 每位点每年核苷酸置换速率为  $10^{-3}$ , c 中 Egg 和 MDCK 为鸡胚株和对应细胞株的注释

Notes: " a " represents the absolute difference for mean values between viruses isolated in chicken embryos and the corresponding MDCK cell-derived viruses " b " represents rates of nucleotide substitution as  $10^{-3}$ /site/year. Viruses isolated in chicken embryos and the corresponding MDCK cell-derived viruses are represented as " c " .

## 3 新甲型 H1N1 流感病毒细胞株和鸡胚株 HA、NA 和 MP 蛋白的氨基酸突变情况

12 株湖北省新甲型 H1N1 流感病毒分离株和 A/California/07/2009 参考株进行 HA 蛋白抗原决定簇比对分析表明其在 5 处抗原决定簇<sup>[13]</sup>中的 Sa, Sb, Ca1 和 Ca2 表位均含有抗原决定簇突变位点, 但鸡胚株和对应细胞株均含有这些突变位点(表 3)。12 株湖北省新甲型 H1N1 流感病毒分离株在 HA 蛋白潜在糖基化位点均未发生突变, 大部分 2014 年毒株在 NA 蛋白上携带 N386K 潜在糖基化位点突变, 但鸡胚株和对应细胞株均含有该突变位点。

通过三株鸡胚株与对应细胞株氨基酸位点的比较, 在 HA 蛋白上发现 2 处鸡胚适应性突变: Q223R、V527I, NA 蛋白上发现 2 处鸡胚适应性突变: M19I 和 H275Y。HA 蛋白多肽切割位点前 11 位也发现 1 处鸡胚适应性突变位点, 为与成熟的 HA 蛋白氨基酸序号命名区分, 将其命名为 V-11A。A/Hubei-Xianan/SWL1129/2014 鸡胚株不仅在 HA 蛋白上携带 V-11A 和 V527I, NA 上还携带 M19I 和 H275Y, 而 A/Hubei-Shashi/SWL317/2014 和 A/Hubei-Songzi/SWL1151/2014 均仅携带 Q223R(表 3)。

对鸡胚株和对应细胞株的神经氨酸酶活性位点

和神经氨酸酶非活性位点<sup>[23]</sup>搜索发现, A/Hubei-Xianan/SWL1129/2014 鸡胚株在神经氨酸酶活性位点上携带典型的神经氨酸酶抑制剂耐药突变位点 H275Y, 而细胞株不携带该位点(表 3)。

## 4 三维建模分析

选择 HA 蛋白鸡胚适应性突变位点 Q223R 和 NA 蛋白鸡胚适应性突变位点 H275Y(NAI 耐药位点)作为三维建模分析对象, 分析它们在鸡胚株和对应细胞株上的结构差异。通过 SWISS-MODEL 搜索并获得 A/Hubei-Songzi/SWL1151/2014 鸡胚株和对应细胞株 HA 蛋白氨基酸序列共同建模板(PDB ID: 4lvx); A/Hubei-Xianan/SWL1129/2014 鸡胚株和对应细胞株 NA 蛋白氨基酸序列共同建模板(PDB ID: 4b7r), 分别建模鸡胚株和对应细胞株的三维结构, 采用 PyMOL 软件编辑鸡胚适应性氨基酸突变前后的结构差异。

HA 蛋白单体三维模拟图表明 Q223R 并未引起 HA 蛋白抗原位点(Sa、Sb、Ca1、Ca2 和 Cb)的整体变化, 但 Q223R 突变引起毗邻 Sb 和 Ca2 间的 223 位点结构变化, 它由凹陷突起变为连续两个突起结构(图 2)。NA 蛋白单体和四聚体的三维模拟图表明大部分神经氨酸酶活性位点在 NA 蛋白凸出面一侧构成可结合底物口袋状的酶活性中心, 它们

与神经氨酸酶抑制剂敏感性降低相关,但 275H 和 275Y 并未造成其周围 NA 蛋白活性位点的位置和结构改变,鸡胚株的 NA 蛋白表面结构分析表明

275 位点存在于口袋状的酶活性中心内部,275Y 与 275H 在空间上不重叠,结构也不同(图 2)。

表 3 湖北省新甲型 H1N1 流感病毒 HA 蛋白抗原表位突变位点和鸡胚适应性突变位点  
Table 3 Amino acid substitutions in hemagglutinin and egg-adapted mutation sites of influenza A H1N1pdm09 viruses in Hubei

Viruses	Antigenic site of HA				Egg-adapted mutation of HA			Egg-adapted mutation of NA	
	Sa	Sb	Ca1	Ca2	-11	223	527	19	275
	159-164 <sup>b</sup>	184-195	203-205	137-142					
A/California/07/2009 <sup>a</sup>	PKLSKS <sup>c</sup>	TSADQQLYQNA	SSR	PHAGAK	V	Q	V	M	H
A/Hubei-Jiangan/SWL1179/2013	.....	.T <sup>d</sup> .....	T..	.....	.	.	A	.	.
A/Hubei-Wujiagang/SWL1838/2013	....Q.	.T.....	T..	.....	.	.	.	.	.
A/Hubei-Wujiagang/SWL310/2013	.....	.T.....	T..	.....	.	R	.	.	.
A/Hubei-Xiangcheng/SWL1750/2013	....Q.	.TV.....	T..	.....	.	.	.	.	Y
A/Hubei-Wuchang/SWL1322/2013	....Q.	.T.....	T..	.....	.	.	.	.	Y
A/Hubei-Fancheng/SWL210/2014	....Q.	.T.....	T..	....R	.	.	.	.	Y
A/Hubei-Shashi/SWL317/2014*	....Q.	.T.....	T..	.....	.	.	.	.	.
A/Hubei-Shashi/SWL317/2014 ;E <sup>e</sup>	....Q.	.T.....	T..	.....	.	R	.	.	.
A/Hubei-Songzi/SWL1151/2014*	....Q.	.T.....	T..	.....	.	.	.	.	.
A/Hubei-Songzi/SWL1151/2014 ;E	....Q.	.T.....	T..	.....	.	R	.	.	.
A/Hubei-Xianan/SWL1129/2014*	....Q.	.T.....	T..	.....	.	.	.	.	.
A/Hubei-Xianan/SWL1129/2014 ;E	....Q.	.T.....	T..	.....	A	.	I	I	Y

注:a 为氨基酸序列比对参考毒株,b 和 c 为氨基酸位点及对应氨基酸,d 为比对毒株对应氨基酸,“.”为对比毒株与参考毒株相同氨基酸,e 为鸡胚株,\* 标识毒株为鸡胚株对应的细胞株。

Notes: "a" represents reference strains."b" and "c" represent the amino acid sites and corresponding substitutions in the reference strains."d" represents the different amino acid substitutions between the viruses in Hubei and the reference strains. The same amino acid substitutions are marked as "." between the viruses in Hubei and the reference strains."e" represents viruses isolated in chicken embryos. Corresponding MDCK cell-derived viruses are marked as "\*".

## 讨 论

1943 年 Burnet 发现流感病毒的鸡胚适应性现象后<sup>[24]</sup>,人们陆续在 H1N1 和 H3N2 流感病毒鸡胚株中发现了鸡胚适应性氨基酸突变位点<sup>[25-26]</sup>。这些突变会影响病毒的受体结合特性<sup>[12]</sup>,有些突变可能与疫苗株的高产相关<sup>[27]</sup>,流感疫苗效力的降低甚至可能与 HA 蛋白抗原决定簇的鸡胚适应性突变有关<sup>[13]</sup>。湖北省流感监测网络中人流感病毒的鸡胚分离工作中也发现了鸡胚适应性突变,这些突变可能影响到疫苗候选株的特性和筛选。

湖北省新甲型 H1N1 流感病毒株 HA、NA 和 MP 蛋白进化树表明鸡胚适应性突变使鸡胚株和对应细胞株在进化簇的分布上有一定不同,特别是 A/Hubei-Xianan/SWL1129/2014 鸡胚株和对应细胞株在各进化树中不相邻且相距甚远,它使得鸡胚株和对应细胞株在三种进化树中分布的多态性和复杂度呈现 NA>HA>MP 的特点,且比其他两株鸡胚

株拥有更多的鸡胚适应性突变位点。鸡胚株和对应细胞株在三个进化树上的核苷酸置换速率的均值差的绝对值分别为  $5.7 \times 10^{-6}$ ,  $9.35 \times 10^{-5}$ ,  $2.5 \times 10^{-6}$ , 其绝对值大小同样呈现 NA>HA>MP 的特点。

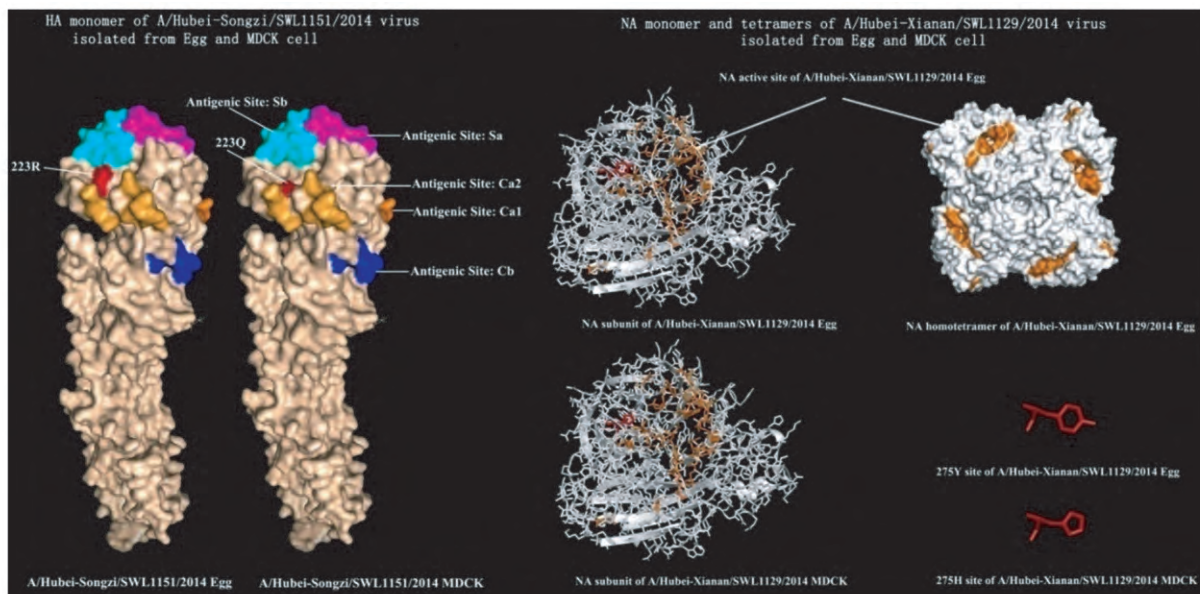
鸡胚适应性突变未引起糖基化位点突变和抗原决定簇的突变,但在 HA 蛋白上发现了鸡胚适应性突变位点 Q223R 和 V527I,在 NA 蛋白上发现了鸡胚适应性突变位点 M19I 和 H275Y。文献报道 Q223R 突变可促进病毒在鸡胚中自愈和增殖<sup>[27,28]</sup>, H275Y 是典型的神经氨酸酶抑制剂耐药突变位点<sup>[23]</sup>。研究表明大部分 HA 蛋白鸡胚适应性突变位点或存在于 HA 蛋白抗原决定簇上(如:K153E、K154E、G155E、A186D 和 D222G),或毗邻抗原决定簇(如:Q223R)<sup>[27,28]</sup>。A/Hubei-Songzi/SWL1151/2014 鸡胚株和对应细胞株的 HA 蛋白单体三维结构分析表明 Q223R 可能造成 Sb 和 Ca2 表位毗邻的 223 位点区域的结构由凹陷突起变为连续两个突起结构。223 位点并非 HA 蛋白抗原决定簇位点,但它毗邻抗原决定簇位点 222。本研究推测

人新甲型 H1N1 流感病毒通过 Q223R 三维结构的改变,实现对鸡胚宿主的适应性改变,使病毒在鸡胚中得到自愈和增殖。

新甲型 H1N1 流感病毒耐药株通常发现在对免疫缺陷病人进行神经氨酸酶抑制剂药物治疗期间<sup>[23]</sup>。而本研究发现在无神经氨酸酶抑制剂药物压力下,鸡胚适应性突变也可能引起 H275Y 突变。A/Hubei-Xianan/SWL1129/2014 鸡胚株和对应细胞株神经氨酸酶活性位点的三维结构分析表明细胞株 275H 和鸡胚株 275Y 在空间结构不相同且不重叠,275 位点存在于口袋状的酶活性中心点内部,但 H275Y 突变未造成酶活中心表面三维结构的改变。本研究推测酶活性中心表面三维结构的改变可能不是 H275Y 突变造成病毒耐药性的原因,这也和 NA 蛋白酶促反应通过质子传递的假设机理一致,即:底物结合活性位点后,275 位组氨酸提供一个质子到 277 位谷氨酸的游离部位链,277 位谷氨酸利用这个质子裂解糖甙键,导致多糖末端少了唾液酸,形成可

能电离的中间物,中间物被其他保守酸性残基游离的羟基稳定,最后水分子再质子化 275 位组氨酸,同时对转运状态的中间物提供一个羟基,导致游离的唾液酸从活性部位散开<sup>[29]</sup>。鸡胚适应性突变位点 H275Y 的发现提示应重视流感病毒鸡胚适应性引起耐药突变的监测,但鸡胚适应性引起的耐药突变对于疫苗株筛选和疫苗效力的影响还需进一步研究。

鸡胚适应性突变对鸡胚株的进化树分布和基因进化速率存在一定影响,虽未引起糖基化位点和抗原决定簇位点的突变,但鸡胚适应株携带的促进病毒在鸡胚中自愈和增殖的 Q223R 位点突变和病毒神经氨酸酶耐药位点 H275Y 和其他改变流感病毒特性的鸡胚适应性突变可能影响疫苗候选株筛选和疫苗的有效性,因此本研究建议加强流感病毒的鸡胚适应性突变监测,完善疫苗候选株筛选,保障疫苗株安全。



注:1. HA 蛋白单体模拟图:抗原位点 Sa 为品红色,Sb 为青色,Ca1 为橙色,Ca2 为黄色,Cb 为蓝色,鸡胚株 223R 和细胞株 223Q 位点为红色;2. NA 蛋白单体、四聚体模拟图:NA 蛋白活性位点为橙色,鸡胚株 275Y 和细胞株 275H 位点为红色  
Notes: Antigenic sites Sa, Sb, Ca1, Ca2 and Cb are identified in magenta, cyan, orange, yellow and blue. Substitutions 223R and 223Q are identified in red in the simulated figure of the HA monomer of A/Hubei-Songzi/SWL1151/2014 virus isolated from egg and MDCK cells, respectively. NA active sites are marked in yellow. The substitutions 275Y and 275H are marked in red in the simulated figure of the NA monomer and tetramers of A/Hubei-Xianan/SWL1129/2014 virus isolated from egg and MDCK cells, respectively.

图 2 湖北省新甲型 H1N1 流感病毒 HA 和 NA 蛋白模拟图

Figure 2 Simulated HA and NA proteins of influenza A H1N1 pdm09 viruses in Hubei

## 参考文献:

- [1] WHO. Influenza (Seasonal) [EB/OL]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en>.
- [2] Nichol K L, Treanor J J. Vaccines for Seasonal and Pandemic Influenza[J]. *J Infect Dis*, 2006, 194 Suppl 2(194 Suppl 2):S111-118.
- [3] Legrand J, Vergu E, Flahault A. Real-time monitoring of the influenza vaccine field effectiveness[J]. *Vaccine*, 2006, 24:6605-6611.
- [4] Ampofo WK, Azziz-Baumgartner E, Bashir U, Cox NJ, Fasce R, Giovanni M, Grohmann G, Huang S, Katz J, Mironenko A, Mokhtari-Azad T, Sasono PM, Rahman M, Sawanpanyalert P, Siqueira M, Waddell AL, Waiboci L, Wood J, Zhang W Q, Ziegler T, WHO Writing Group. Strengthening the influenza vaccine virus selection and development process: Report of the 3rd WHO Informal Consultation for Improving Influenza Vaccine Virus Selection held at WHO headquarters, Geneva, Switzerland, 1-3 April 2014[J]. *Vaccine*, 2015, 33(36):4368-4382.
- [5] Burnet F M. Influenza Virus Infections of the Chick Embryo Lung[J]. *Brit J Exp Pathol*, 1940, 21(3):147-153.
- [6] Robertson J S. Clinical influenza virus and the embryonated Hen's egg[J]. *Rev Med Virol*, 1993, 3(2):97-106.
- [7] Katz J M, Wang M, Webster R G. Direct sequencing of the HA gene of influenza (H3N2) virus in original clinical samples reveals sequence identity with mammalian cell-grown virus[J]. *J Virol*, 1990, 64(4):1808-1811.
- [8] Katz J M, Webster R G. Amino acid sequence identity between the HA1 of influenza A (H3N2) viruses grown in mammalian and primary chick kidney cells[J]. *J Gen Virol*, 1992, 73 ( Pt 5)(5):1159-1165.
- [9] Robertson J S, Bootman J S, Nicolson C, Major D, Robertson E W, Wood J M. The hemagglutinin of influenza B virus present in clinical material is a single species identical to that of mammalian cell-grown virus[J]. *Virol*, 1990, 179(1):35-40.
- [10] Robertson J S, Nicolson C, Bootman J S, Major D, Robertson E W, Wood J M. Sequence analysis of the haemagglutinin (HA) of influenza A (H1N1) viruses present in clinical material and comparison with the HA of laboratory-derived virus[J]. *J Gen Virol*, 1991, 72 ( Pt 11)(11):2671-2677.
- [11] Lu B, Zhou H L, Chan W, Kemble G, Jin H. Single amino acid substitutions in the hemagglutinin of influenza A/Singapore/21/04 (H3N2) increase virus growth in embryonated chicken eggs[J]. *Vaccine*, 2006, 24 (44-46):6691-6693.
- [12] Gambaryan A S, Robertson J S, Matrosovich M N. Effects of Egg-Adaptation on the Receptor-Binding Properties of Human Influenza A and B Viruses[J]. *Virology*, 1999, 258(2):232-239.
- [13] Skowronski D M, Janjua N Z, De Serres G, Sabaiduc S, Eshaghi A, Dickinson J A, Fonseca K, Winter A L, Gubbay J B, Kraiden M, Petric M, Charest H, Bastien N, Kwindt T L, Mahmud S M, Van Caesele P, Li Y. Low 2012-13 influenza vaccine effectiveness associated with mutation in the egg-adapted H3N2 vaccine strain not antigenic drift in circulating viruses[J/OL]. *Plos One*, 2014, 9(3):e92153.
- [14] WHO Influenza Centre London. Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccine for the Southern Hemisphere 2015[R]. London, United Kingdom: National Institute for Medical Research, 2014.
- [15] Drummond A J, Suchard M A, Xie D, Rambaut A A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7[J]. *Mol Biol Evol*, 2012, 29(8):1969-1973.
- [16] 万勇, 汤华. 甲型 N9 亚型流感病毒神经氨酸酶基因进化分析 [J]. *病毒学报*, 2015, 31(2):139-144.
- [17] 靳远. 甲型流感病毒重要亚型的进化研究[D]. 中国人民解放军军事医学科学院, 2015:14-15.
- [18] Biasini M. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(Web Server issue).
- [19] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling[J]. *Bioinformatics*, 2006, 22(2):195-201.
- [20] Kiefer F, Arnold K, Künzli M, Bordoli L, Schwede T. The SWISS-MODEL Repository and associated resources[J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(suppl 1):D387-D392.
- [21] Guex N, Peitsch M C, Schwede T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: a historical perspective[J]. *Electrophoresis*, 2009, 30 suppl 1(Supplement 1):S162-S173.
- [22] Delano W L. The PyMOL molecular graphics system [J]. *My Publications*, 2002.
- [23] Nguyen H T, Fry A M, Gubareva L V. Neuraminidase inhibitor resistance in influenza viruses and laboratory testing methods[J]. *Antivir Ther*, 2012, 17(1 Pt B):159-173.



- [24] Burnet F M, Bull D R. Changes in influenza virus associated with adaptation to passage in chick embryos[J]. Aust J Exp Biol Med Sci, 1943, 21:55-69.
- [25] Stevens J, Chen LM, Carney PJ, Garten R, Foust A, Le J, Pokorny B A, Manojkumar R, Silverman J, Davis R, Rhea K, Xu X, Bucher D J, Paulson J C, Cox N J, Klimov A, Donis R O. Receptor Specificity of Influenza A H3N2 Viruses Isolated in Mammalian Cells and Embryonated Chicken Eggs[J]. J Virol, 2010, 84 (21):8287-8299.
- [26] Rocha E P, Xu X, Hall H E, Allen J R, Regnery H L, Cox N J. Comparison of 10 influenza A (H1N1 and H3N2) haemagglutinin sequences obtained directly from clinical specimens to those of MDCK cell- and egg-grown viruses[J]. J Gen Virol, 1993, 74 ( Pt 11) (11):2513-2518.
- [27] Chen Z, Wang W, Zhou H, Suguitan A L Jr, Shambaugh C, Kim L, Zhao J, Kemble G, Jin H. Generation of live attenuated novel influenza virus A/California/7/09 (H1N1) vaccines with high yield in embryonated chicken eggs[J]. J Virol, 2010, 84(1):44-51.
- [28] Suptawiwat O, Jeamtua W, Boonarkart Ch, Kongchanagul A, Puthawathana P, Auewarakul P. Effects of the Q223R mutation in the hemagglutinin (HA) of egg-adapted pandemic 2009 (H1N1) influenza A virus on virus growth and binding of HA to human and avian-type cell receptors[J]. Acta Virol, 2013, 57 (3):333-338.
- [29] 郭元吉,程小雯. 流行性感冒病毒及其实验技术[M]. 北京:中国三峡出版社,1997:25-26.

## Analysis of Egg-adapted Mutations in Influenza A H1N1pdm09 Viruses in Hubei Province of China, 2013-2014

FANG Bin, LIU Linlin, YE Guojun, LI Xiang, YU Xiao, JIANG Yongzhong\*

(Institute of Health Inspection and Testing, Hubei Provincial Center for Disease Control and Prevention, Wuhan 430079, China)

**Abstract:** To investigate egg-adapted mutation in influenza A H1N1pdm09 viruses isolated from the Hubei influenza surveillance network, a comparative analysis was performed of three influenza A H1N1pdm09 viruses isolated in chicken embryo and the corresponding MDCK cell-derived viruses. Analyses included examination of the phylogenetic tree, evolutionary rates, amino acid substitutions, egg-adapted mutation and homology modeling. We found differences between the egg-adapted viruses and MDCK cell-derived viruses based on phylogenetic trees and evolutionary rates; the viruses showed a trend of "NA>HA>MP". Four amino acid substitutions (Q223R, V527I, M19I and H275Y) were found in three egg-adapted viruses. Q223R and V527I were present in the haemagglutinin protein, while M19I and H275Y were detected in neuraminidase. The Q223R mutation changed the structure of antigenic sites between Sb and Ca2. H275Y is a classic neuraminidase resistance mutation. The results suggest that the egg-adapted mutations were introduced when influenza viruses were isolated in chicken embryos from the Hubei influenza surveillance network. These mutations may affect the selection of vaccine candidates and vaccine efficacy; therefore, monitoring of egg-adapted mutations should be strengthened in the influenza surveillance network.

**Key words:** Influenza A H1N1pdm09 Virus; Chicken embryo; Phylogenetic tree; Egg-adaptation; Antigenic site; Drug-resistance site

\*Corresponding author: JIANG Yongzhong, E-mail:575652423@qq.com