



秦锋, 蔡孟楷, 张伟东, 等. 3 株 H1N1 亚型猪流感病毒的 HA 基因遗传信息及抗原特异性分析[J]. 华南农业大学学报, 2017, 38(5): 13-18.

3 株 H1N1 亚型猪流感病毒的 HA 基因遗传信息及抗原特异性分析

秦 锋^{1†}, 蔡孟楷^{1†}, 张伟东², 张 京³, 方 博¹, 黄俊明¹, 卜德新¹,
罗勇峰¹, 马 骏¹, 付新亮¹, 曹振鹏¹, 张桂红¹

(1 广东省动物源性人兽共患病预防与控制重点实验室/国家生猪种业工程技术研究中心/
华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642; 2 华南农业大学医院, 广东 广州 510642;
3 烟台市福山区动物卫生监督所, 山东 烟台 261400)

摘要:【目的】分析 3 株属于欧亚类禽(SWSS1)、经典(SWL6)与 Pdm09H1N1(Pdm091057)分支的猪流感病毒的 HA 基因遗传信息及抗原的特异性, 为 HA 基因抗原表位的功能研究及流感防控奠定基础。【方法】以 SWSS1 株、SWL6 株和 Pdm091057 株流感病毒为材料, 比较分析 3 株 H1N1 亚型 HA 基因片段的遗传信息, 制备全病毒灭活疫苗, 各免疫 3 只雌性新西兰大白兔, 采用血凝抑制(Hemagglutination inhibition, HI)反应试验检测抗体滴度。【结果】3 株病毒的 HA 基因片段的氨基酸序列相似性为 69.4%~89.1%, 各分支的 HA 基因的抗原表位存在差异; 3 株病毒经过 2 次免疫后平均 HI 抗体滴度均能达 1 280 以上, 且 SWSS1 的平均 HI 抗体滴度高达 2 560。同时 SWSS1 与 SWL6、Pdm091057 这 2 株病毒均无血清学交叉反应, 而 SWL6 与 Pdm091057 有较低的血清学交叉反应。【结论】3 株猪流感病毒的 HA 基因片段抗原表位存在着差异, 可能是 3 毒株之间血清学交叉反应较低的原因。3 株病毒免疫原性均较好, 可作为候选疫苗株。

关键词: 猪流感病毒; H1N1; 遗传信息; 抗原表位; 血凝抑制; 抗体滴度; HA 基因
中图分类号: S852.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-411X(2017)05-0013-06

Analysis of genetic information in HA genes and antigen specificities of three strains of H1N1 swine influenza virus

QIN Feng^{1†}, CAI Mengkai^{1†}, ZHANG Weidong², ZHANG Jing³, FANG Bo¹, HUANG Junming¹, BU Dexin¹,
LUO Yongfeng¹, MA Jun¹, FU Xinliang¹, CAO Zhenpeng¹, ZHANG Guihong¹

(1 Key Laboratory of Zoonosis Prevention and Control of Guangdong Province/National Engineering Research Center for Breeding Swine Industry/College of Veterinary, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;
2 Hospital of South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;
3 Animal Health Supervision of Fushan District, Yantai 261400, China)

Abstract: 【Objective】 To study the genetic information in HA genes and antigen specificities of SWSS1, SWL6 and Pdm091057 strains which respectively belongs to Eurasian avian-like, classical and Pdm09H1N1 branches of H1N1 swine influenza viruses (SIV), and provide a basis for functional study on antigenic epitopes of HA gene as well as

收稿日期: 2016-10-19 优先出版时间: 2017-07-14
优先出版网址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20170714.0855.006.html>

作者简介: 秦 锋(1989—), 男, 硕士研究生, E-mail: 987031750@qq.com; 蔡孟楷(1991—), 男, 硕士研究生, E-mail: 1163034288@qq.com; †对本文贡献相同; 通信作者: 张桂红(1968—), 女, 教授, 博士, E-mail: guihongzh@scau.edu.cn

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD0500707); 国家生猪产业技术体系专项(CARS-36); 广东省科技计划(2013B020202002); 广东省条财处项目(2012B060400015); 广东省高等学校优秀青年教师培养计划(YQ201530)

prevention and control of influenza virus. 【Method】 We compared the genetic information in *HA* gene fragments of three H1N1 subtypes, SWSS1, SWL6 and Pdm091057. Inactivated SIV vaccines were prepared and each type of vaccine was used to immune three New Zealand white rabbit. The hemagglutination inhibition (HI) reaction was used to detect antibody titers. 【Result】 The amino acid sequences of *HA* gene fragments had 69.4%–89.1% similarities among three SIV strains. There were variations in antigenic epitopes of *HA* genes of the three strains. The average HI antibody titers were all above 1 280 for three strains after the second immunization, and the average HI antibody titer for SWSS1 reached 2 560. SWSS1 had no serological cross reaction with SWL6 or Pdm091057 strain, while SWL6 and Pdm091057 strains had low degree of serological cross reaction. 【Conclusion】 Three SIV strains have differences in antigenic epitopes of *HA* gene, which may be the reason for the low degree of serological cross reaction among strains. All three strains have good immunogenicity, and can be used as candidate vaccine strains.

Key words: swine influence virus; H1N1; genetic information; antigenic epitope; hemagglutination inhibition; antibody titer; *HA* gene

甲型流感病毒可引起包括人、猪、马、鸟类及海洋动物感染的病毒性传染病，其主要宿主是水禽。猪呼吸道上皮细胞具有 2 种流感病毒受体，能够同时感染人流感病毒和禽流感病毒，被认为是流感病毒的中间宿主或流感病毒的“混合器”。在猪体内同时感染的多种流感病毒有可能通过重组，或在哺乳动物的适应过程，产生新的变异毒株^[1]。1993 年 Fan 等^[2]在中国南方以及东南亚地区分离出类禽(Eurasian avian-like, EA)H1N1 SIV，现该类病毒已在亚洲多个地区猪群中广泛流行。2009 年甲型 H1N1/2009 流感(Pdm09H1N1)在墨西哥暴发，并且迅速蔓延感染至其他国家地区。Pdm09H1N1 流感病毒来源于猪，是一种人、猪、禽三源重组的病毒^[3]。Chen 等^[4]在对华南地区流感病毒血清学调查中发现，同 1 份血清中可以同时检测到 3 种亚型流感病毒抗体，表明 H1N1 猪流感的流行状况复杂。欧亚类禽 H1N1、Pdm09H1N1、经典 H1N1 等亚型猪流感病毒长期共存在我国猪群中^[5]，严重影响猪群的健康和公共卫生安全。

本研究对华南农业大学兽医学院分离到的猪流感病毒 SWSS1 株、SWL6 株和 Pdm091057 株，进行生物信息学分析，并制备全病毒灭活疫苗，免疫雌性新西兰大白兔，采用血凝抑制试验方法，对流行于我国猪群中的 H1N1 亚型猪流感病毒不同分支之间的血清学交叉特性进行分析，以期血清学诊断提供参考依据，同时也为流感病毒的通用疫苗的研制及防控奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

7 株流感病毒株由华南农业大学兽医学院传染病实验室提供，分别为 SWSS1: A/swine/Guangdong/

SS1/2012(H1N1)、SWL6: A/swine/Guangdong/L6/2012(H1N1)、Pdm091057: A/Guangdong/1057/2010(H1N1)、A/swine/Guangdong/122/2010(H3N2)、A/Chicken/Shanghai/10/2001(H9N2)、A/Duck/Anhui/1/2006/(H5N1)、A/Pigeon/Shanghai/S1421/2013(H7N9)，其中，A/swine/Guangdong/SS1/2012(H1N1)、A/swine/Guangdong/L6/2012(H1N1)和 A/Guangdong/1057/2010(H1N1)作为免疫原用于制备灭活疫苗。12 只雌性新西兰大白兔购自南方医科大学动物实验中心；SPF 鸡胚购自广州市华南农业大学生物药品有限公司。

1.2 方法

1.2.1 病毒的增殖 病毒增殖按照文献[6]的方法进行。

1.2.2 病毒血凝效价、EID₅₀ 及病毒的鸡胚生长曲线的测定 待检病毒液的血凝试验按照世界卫生组织的标准进行，病毒株的 EID₅₀ 按照文献[6]的方法进行测定。将 100 EID₅₀ 的原始病毒接种 9 日龄的 SPF 鸡胚，分别在 24、36、48、60 和 72 h 收集尿囊液进行血凝效价测定，并绘制鸡胚生长曲线。

1.2.3 遗传和抗原相关性分析 在 GenBank 中选择具有代表性的 H1N1 猪流感病毒不同分支参考毒株，利用生物信息学软件分析 SWSS1、SWL6 和 Pdm091057 病毒株的遗传进化情况。

1.2.4 疫苗制备 收获 10⁷ EID₅₀ 以上的病毒液，按照体积比 1:1，加入体积分数为 0.2% 的甲醛溶液做灭活抗原。置 37 ℃ 恒温摇床内灭活 24–48 h，并在 10 日龄 SPF 鸡胚上连续传 3 代安检。分别取 3 株灭活病毒抗原液，分别用弗氏佐剂制备上述 3 种病毒的全病毒灭活疫苗，油水体积比为 2:1。

1.2.5 免疫试验 将 12 只新西兰大白兔分成 4 组, 每组 3 只, 第 1、2、3 组为免疫组, 分别腹腔注射 SWSS1、SWL6 和 Pdm091057 的全病毒灭活疫苗, 0.1 mL·只⁻¹, 第 4 组为 PBS 对照组。免疫后每周采血检测血凝抑制(Hemagglutination inhibition, HI) 抗体滴度, 2 次免疫后待抗体水平达到稳定时, 收获血清备用。

1.2.6 血清学交叉反应试验 进行 SWSS1、SWL6 和 Pdm091057 病毒株之间的血清学交叉反应试验以及 H3、H5、H7、H9 亚型流感病毒的血清学交叉反应试验。HI 试验参照文献[7]的方法进行。

2 结果与分析

2.1 HA 基因片段遗传信息和抗原位点分析

SWSS1、SWL6 和 Pdm091057 病毒株及在 GenBank 中所选参考毒株的遗传进化分析表明, SWSS1 株属于欧亚类禽分支, SWL6 属于经典 H1N1 分支, Pdm091057 属于 Pdm09H1N1 分支 (图 1)。病毒抗原位点所在的 HA 基因片段的氨基酸序列相似性对比结果显示, SWSS1 株与 SWL6 株的 HA 基因片段的氨基酸序列相似性为 70.3%, SWSS1 株与 Pdm091057 株的 HA 基因片段的氨基

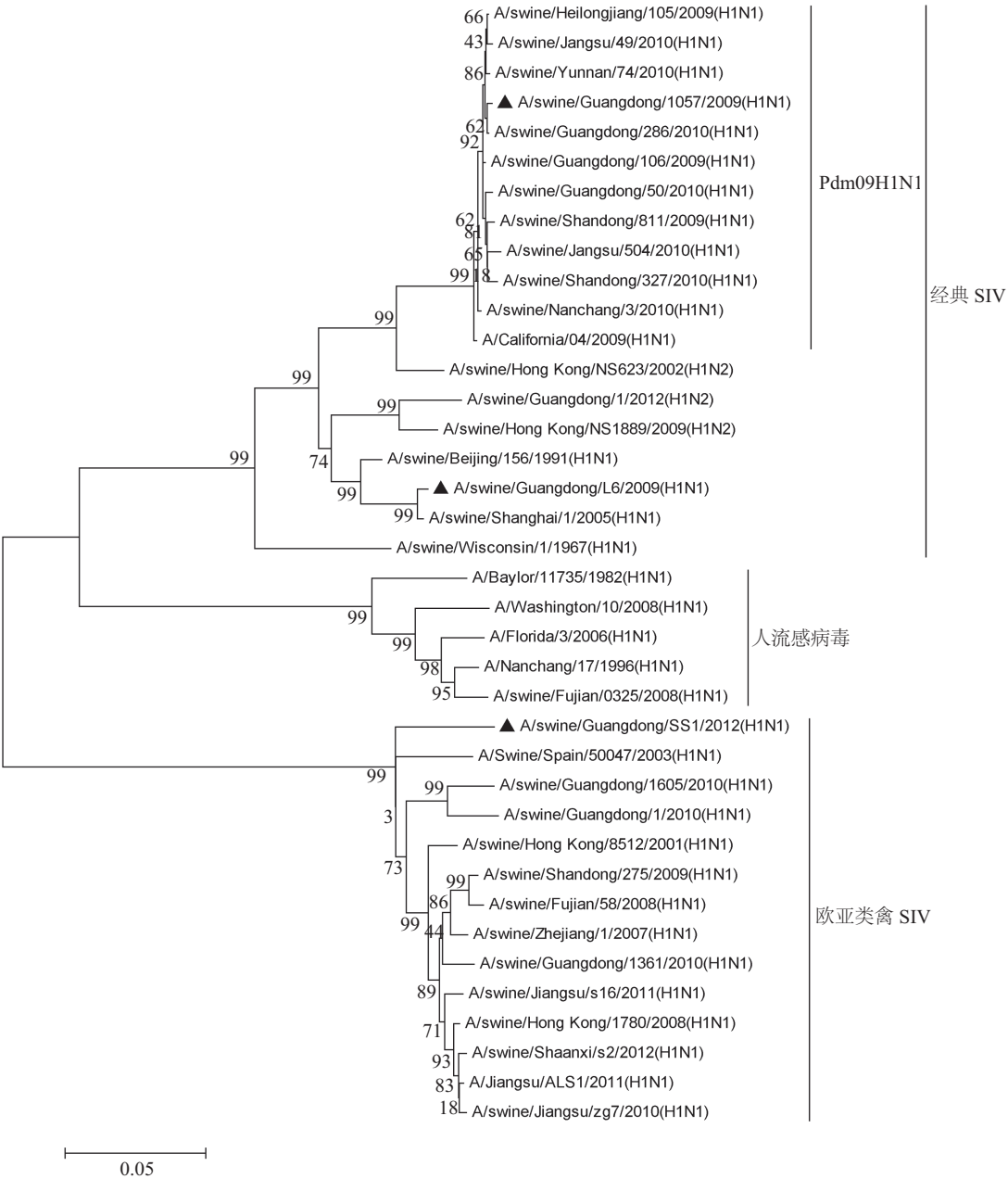


图 1 SWSS1、SWL6 和 Pdm091057 病毒株的 HA 基因遗传进化关系

Fig. 1 Phylogenetic tree of HA genes of SWSS1, SWL6 and Pdm091057 strains

酸序列相似性为 69.4%，SWL6 株与 Pdm091057 株的 HA 基因片段的氨基酸序列相似性为 89.1%。

进一步分析 3 株病毒株 HA 基因片段的抗原位点^[7]，SWSS1 毒株与 SWL6、Pdm091057 毒株的 HA 基因片段的抗原位点比较结果见图 2，SWSS1 毒株与 SWL6 毒株在 Sa 位点有 4 个氨基酸位点的不同，与 Pdm091057 毒株有 2 个氨基酸位点的不同；SWSS1 毒株与 SWL6 毒株 Sb 抗原位点有 4 个

氨基酸位点的不同，与 Pdm091057 毒株 Sb 抗原位点有 2 个氨基酸位点的不同；SWSS1 毒株与 SWL6 毒株 Cb 抗原位点有 2 个氨基酸位点的不同，与 Pdm091057 毒株 Cb 抗原位点有 1 个氨基酸位点的不同；SWSS1 毒株与 SWL6 毒株、Pdm091057 毒株 Ca1 抗原位点各有 3 个氨基酸位点的不同；SWSS1 毒株与 SWL6 毒株、Pdm091057 毒株 Ca2 抗原位点各有 5 个氨基酸位点的不同。



绿色、黄色、红色、蓝色和紫色方框内分别为 Sa、Sb、Cb、Ca1 和 Ca2 位点。

图 2 SWSS1、SWL6 和 Pdm091057 病毒株 HA 基因片段抗原表位分析

Fig. 2 Analysis of antigenic epitopes in HA gene fragments of SWSS1, SWL6 and Pdm091057 strains

2.2 病毒血凝效价、EID₅₀ 及病毒的鸡胚生长曲线

SWSS1、SWL6 和 Pdm091057 病毒株分别接种鸡胚收集尿囊液，检测病毒的红细胞凝集效价分别为 2¹¹、2⁹ 和 2¹⁰；计算 SWSS1、SWL6 和 Pdm091057 病毒株的鸡胚半数感染量，其 lgEID₅₀·mL⁻¹ 分别为 9.0、8.2 和 8.5；将 100 EID₅₀ 的原始病毒液接种 9 日龄的 SPF 鸡胚，收集尿囊液进行血凝效价测定，结果如图 3 所示，3 株病毒株在鸡胚中均表现出高复制能力，具有较高的鸡胚适应性。

2.3 灭活疫苗免疫后病毒株的 HI 抗体滴度

采用血凝抑制试验检测免疫 2 次后兔血清中 HI 抗体滴度，以评价 SWSS1、SWL6 和 Pdm091057 病毒株的免疫效果，结果如图 4 所示，首免第 3 周 HI 抗体滴度可达到 1 280 以上，第 3 周再次免疫后，3 株病毒株均可诱导较高的 HI 抗体滴度，且 SWSS1 的 HI 平均抗体滴度高达 2 560 以上。

2.4 血清学交叉反应

上述试验制备的阳性抗 SWSS1 血清、抗 SWL6 血清和抗 Pdm091057 血清为标准血清，H1、

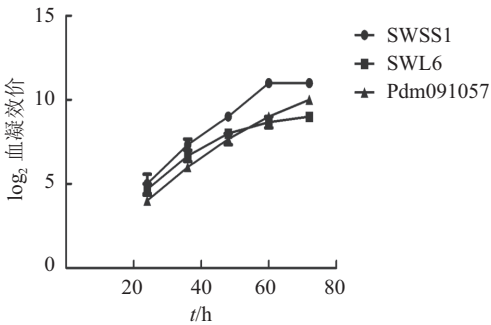


图 3 病毒的鸡胚生长曲线

Fig. 3 Chicken embryo growth curves of the viruses

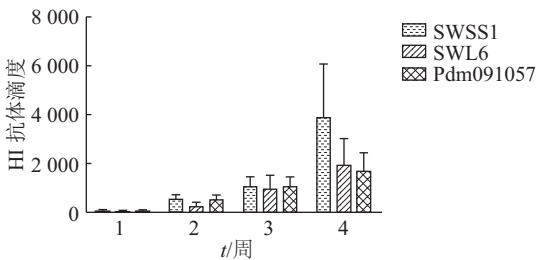


图 4 HI 抗体滴度

Fig. 4 HI antibody titer

H3、H5、H7、H9 亚型流感病毒株血清学交叉反应如表 1 所示,SWSS1 毒株制备的抗体与类人季节性 H3N2 亚型流感病毒具有较低水平的血清学交叉反应,与其他亚型无血清学交叉反应,SWL6 与 Pdm091057 毒株制备的抗体相互之间具有较低的血清学反应,与其他亚型流感病毒无血清学反应。

表 1 不同亚型抗原对标准血清抗体滴度检测结果
Tab. 1 The titers of different subtypes of the influenza virus against the standard serums

毒株(四单位抗原)	HI抗体滴度		
	抗SWSS1血清	抗SWL6血清	抗Pdm091057血清
A/swine/Guangdong/SS1/2012(H1N1) ¹⁾	2 560	<20	<20
A/swine/Guangdong/L6/2012(H1N1) ²⁾	<20	1 280	40
A/Guangdong/1057/2010(H1N1) ³⁾	<20	40	1 280
A/swine/Guangdong/I22/2010(H3N2)	40	<20	<20
A/Duck/Anhui/1/2006/(H5N1)	<20	<20	<20
A/Chicken/Shanghai/10/2001(H9N2)	<20	<20	<20
A/Pigeon/Shanghai/S1421/2013(H7N9)	<20	<20	<20

1) 为SWSS1; 2) 为SWL6; 3) 为Pdm091057。

3 讨论与结论

近年来随着流感病毒的变异,猪流感病毒感染人的现象时有发生,流感病毒可通过不断变异和进化,逃避宿主的免疫保护,引起新的暴发和流行^[8]。Liu 等^[9]对华南地区猪群流感的发生和流行情况进行的研究表明多数猪场存在 H1、H3 亚型猪流感病毒感染情况,一些猪群还存在禽源 H4、H5、H7、H9 等亚型流感病毒抗体^[10]。目前在世界猪群中流行的 H1N1 流感病毒主要分为 3 类:经典 H1N1、类禽 H1N1、类人 H1N1。有研究报道^[11],类禽 H1N1 在华南地区猪群中较为活跃,随着变异和重组,感染人的风险逐步增强。

本试验分析了甲型 H1 亚型流感病毒的 HA 基因遗传进化关系,SWSS1 株属于欧亚类禽分支,SWL6 属于经典 H1N1 分支,Pdm091057 属于 Pdn09H1N1 分支。3 株病毒的 HA 基因片段的氨基酸序列相似性为 69.4%~89.1%。同时,HA 基因抗原表位分析揭示了 SWSS1、SWL6 和 Pdm091057 毒株之间抗原位点的差异,这些差异会导致流感病毒表面蛋白构象的理化特性不同^[11],这可能是 H1 亚型病毒之间的无血清学交叉反应的原因。同时,近年来的血清学调查显示^[12],猪群中有多种亚型共感染的情况,在同一份血清中能同时检测到 H1、H3 等多种亚型的流感抗体,且 HI 抗体效价相对较高,而本研究表明,SWSS1 毒株制备的抗体与类人季节性 H3N2 亚型流感病毒具有较低水平的血清学交叉反应,与其他亚型无血清学交叉反应,SWL6 株与 Pdm091057 株制备的抗体相互之间具有较低的

血清学反应,而与其他亚型流感病毒无血清学反应,以上也证明了流感病毒在猪群中的共感染现象的存在,并且为流感病毒在猪“混合器”作用下发生流感病毒重组的可能提供了试验依据。另外,本试验抗 SWSS1 血清与人季节性 H3N2 亚型流感病毒之间及 SWL6 株与 Pdm091057 株制备的抗体相互之间血清学交叉反应均较低,尽管其交叉反应机制尚不清楚,但 Pdm091057 株的 HA 基因来源于经典 H1 亚型流感病毒的重组病毒,有研究表明流感病毒 HA 蛋白在病毒交叉反应的过程中起决定性作用^[13-14],理论上解释了在进化关系上 SWL6 株与 Pdm091057 株存在着一定的亲缘关系,推测可能是其具有较低的血清学交叉反应的原因。

本试验中 3 株病毒株在鸡胚中均表现出高的复制能力,具有较高的鸡胚适应性。首免后 HI 抗体滴度达到 1 280 以上,再次免疫后 3 株病毒株均可以诱导较高的 HI 抗体滴度,且 SWSS1 的平均 HI 抗体滴度高达 2 560 以上,有研究表明类禽 H1N1 流感病毒能降低同源异源 H1 亚型流感病毒对小鼠上致病性^[15],其保护机制有待进一步研究。本试验结果显示,类禽 SWSS1 株、SWL6 株、Pdm091057 株病毒诱导机体产生高水平的抗体滴度,且平均 HI 抗体滴度达 1 280 以上,可以作为理想的疫苗候选株。另外普遍认为注射疫苗是抵抗流感病毒感染的有效方法,本研究初步分析了 3 株 H1 亚型流感病毒的 HA 蛋白的抗原表位,为下一步流感病毒致病机制的研究及基因工程通用表位疫苗的研制奠定基础。

参考文献:

- [1] QIAO C, LIU L, YANG H, et al. Novel triple reassortant H1N2 influenza viruses bearing six internal genes of the pandemic 2009/H1N1 influenza virus were detected in pigs in China[J]. J Clin Virol, 2014, 61(4): 529-534.
- [2] FAN X, ZHU H, ZHOU B, et al. Emergence and dissemination of a swine H3N2 reassortant influenza virus with 2009 pandemic H1N1 genes in pigs in China[J]. J Virol, 2012, 86(4): 2375-2378.
- [3] ZHU H, ZHOU B, FAN X, et al. Novel reassortment of Eurasian avian-like and pandemic/2009 influenza viruses in swine: Infectious potential for humans[J]. J Virol, 2011, 85(20): 10432-10439.
- [4] CHEN J, MA J, WHITE S K, et al. Live poultry market workers are susceptible to both avian and swine influenza viruses, Guangdong Province, China[J]. Vet Microbiol, 2015, 181(3/4): 230-235.
- [5] DUCATEZ M F, HAUSE B, STIGGER-ROSSER E, et al. Multiple reassortment between pandemic (H1N1) 2009 and endemic influenza viruses in pigs, United States[J]. Emerg Infect Dis, 2011, 17(9): 1624-1629.
- [6] MORENO A, DI TRANI L, FACCINI S, et al. Novel H1N2 swine influenza reassortant strain in pigs derived from the pandemic H1N1/2009 virus[J]. Vet Microbiol, 2011, 149(3/4): 472-477.
- [7] ANDERSON T K, CAMPBELL B A, NELSON M I, et al. Characterization of co-circulating swine influenza A viruses in North America and the identification of a novel *H1* genetic clade with antigenic significance[J]. Virus Res, 2015, 201: 24-31.
- [8] YANG H, CHEN Y, QIAO C, et al. Prevalence, genetics, and transmissibility in ferrets of Eurasian avian-like H1N1 swine influenza viruses[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2016, 113(2): 392-397.
- [9] LIU W, WEI M T, TONG Y, et al. Seroprevalence and genetic characteristics of five subtypes of influenza A viruses in the Chinese pig population: A pooled data analysis[J]. Vet J, 2011, 187(2): 200-206.
- [10] QIU Y, DE HERT K, VAN REETH K. Cross-protection against European swine influenza viruses in the context of infection immunity against the 2009 pandemic H1N1 virus: Studies in the pig model of influenza[J]. Virus Res, 2015, 46: 105.
- [11] VIJAYKRISHNA D, POON L L, ZHU H C, et al. Reassortment of pandemic H1N1/2009 influenza A virus in swine[J]. Science, 2010, 328(5985): 1529.
- [12] CHEN Y, ZHANG J, QIAO C, et al. Co-circulation of pandemic 2009 H1N1, classical swine H1N1 and avian-like swine H1N1 influenza viruses in pigs in China[J]. Infect Genet Evol, 2013, 13: 331-338.
- [13] GARTEN R J, DAVIS C T, RUSSELL C A, et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans[J]. Science, 2009, 325(5937): 197-201.
- [14] 王舒宁, 李国庆, 吴迪, 等. 甲型 H1N1 流感病毒 HA 蛋白抗原表位及受体结合位点突变特性的对比研究[J]. 生物物理学报, 2012(6): 486-498.
- [15] SUI J, YANG D, QIAO C, et al. Protective efficacy of an inactivated Eurasian avian-like H1N1 swine influenza vaccine against homologous H1N1 and heterologous H1N1 and H1N2 viruses in mice[J]. Vaccine, 2016, 34(33): 3757-3763.

【责任编辑 庄 延】