

学校编码: 10384
学号: 20120051403150

分类号 _____ 密级 _____
UDC _____

厦 门 大 学
博 士 学 位 论 文

H5 亚型血凝素单抗库的构建、广谱中和单抗的发现及其对 H5N1 禽流感的治疗研究

Establishment of H5 Haemagglutinin
Monoclonal Antibodies Panel, Identification of
Broad Reactive Neutralizing Monoclonal
Antibodies and Their Cross-Protection against
H5N1 Infection

陈毅歆

指导教师姓名: 夏宁邵 教授
专业名称: 生物化学与分子生物学
论文提交日期: 2008 年 11 月
论文答辩时间: 2008 年 12 月
学位授予日期: 2008 年 月

答辩委员会主席: _____
评 阅 人: _____

2008 年 11 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（）
课题（组）的研究成果，获得（）课题（组）
经费或实验室的资助，在（）实验室完成。

（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，
未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

200 年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

200 年 月 日

目 录

第一章 前 言	1
1.1. 流感病毒的概述	2
1.1.1. 流感病毒的分类与命名	2
1.1.2. 流感病毒形态与化学组成	3
1.1.3. 流感病毒的分子生物学	5
1.1.4. 历史上的全球性大流感 (Pandemic)	14
1.2. 禽流感病毒的概述	17
1.2.1. 病毒的宿主	17
1.2.2. 流感病毒的变异与进化	21
1.2.3. H5N1 禽流感病毒的起源、扩散和进化	23
1.2.4. H5N1 禽流感病毒爆发大流行的潜在可能性	26
1.3. H5N1 禽流感病毒的感染与治疗	27
1.3.1. 人类感染H5N1 禽流感病毒的发病机制	27
1.3.2. H5N1 禽流感病毒感染的毒力影响因子	28
1.3.3. H5N1 禽流感病毒动物感染模型	30
1.3.4. 流感抗病毒药物	33
1.4. 本论文的研究意义和主要研究内容	36
第二章 材料与方 法	38
2.1. 主要仪器	38
2.2. 主要耗材	39
2.3. 主要试剂和实验动物	40
2.4. 常用溶液和培养基的配制	42
2.5. 实验方法	46
2.5.1. 分子克隆相关操作	46
2.5.2. 重组杆状病毒表达重组血凝素蛋白	48
2.5.3. 细胞免疫荧光试验	50
2.5.4. 流感病毒的培养和灭活	51
2.5.5. 流感病毒的滴度测定	52
2.5.6. 流感病毒基因的获得和序列分析	52
2.5.7. 流感病毒对小鼠的免疫	52
2.5.8. 融合杂交瘤的制备与筛选	53
2.5.9. 杂交瘤细胞的培养	55
2.5.10. 单抗腹水的诱导	55
2.5.11. 单抗腹水的纯化	56
2.5.12. 单抗F(ab') ₂ 的制备	56
2.5.13. 单抗Fab的制备	56
2.5.14. 血凝抑制试验 (Hemagglutination Inhibition Assay, HI)	57
2.5.15. 细胞微孔中和实验	57
2.5.16. 酶联免疫吸附分析 (ELISA)	58

2.5.17.	抗体半衰期的测定	59
2.5.18.	流感病毒逃逸突变株的诱导	59
2.5.19.	流感病毒对小鼠的感染和组织采集	60
2.5.20.	流感病毒对家猫的感染和组织采集	60
2.5.21.	组织病毒滴度测定	60
2.5.22.	免疫组化分析	60
第三章 结果与分析		61
3.1.	大容量H5亚型血凝素单克隆抗体库的构建	61
3.1.1.	H5N1禽流感病毒代表株(H5N1 Virus Panel)的选择	61
3.1.2.	H5亚型血凝素单抗库的建立和广谱单抗的发现	64
3.1.3.	单毒株免疫和多毒株免疫的不同效果	67
3.1.4.	H5亚型血凝素单抗盘(H5 MAb Panel)及其对病毒的抗原性分析	70
3.1.5.	治疗性H5亚型血凝素广谱单抗的选择及活性鉴定	75
3.1.6.	本节小结	80
3.2.	H5亚型血凝素广谱中和单抗的治疗研究	82
3.2.1.	广谱单抗对小鼠(同源动物)H5N1禽流感病毒感染的疗效	82
3.2.2.	单抗13D4对家猫(异源动物)H5N1禽流感病毒感染的疗效	90
3.2.3.	单抗13D4 F(ab') ₂ 片段疗效探索并与“达菲”比较	92
3.2.4.	单抗13D4的治疗机制	94
3.2.5.	本节小结	98
3.3.	H5广谱单抗的分子基础	99
3.3.1.	单抗13D4的潜在结合位点	99
3.3.2.	单抗13D4对逃逸突变病毒的治疗效果	103
3.3.3.	本节小结	105
第四章 讨 论		106
4.1.	H5亚型血凝素广谱单抗的免疫筛选策略	106
4.2.	H5N1禽流感病毒的抗原性漂移	107
4.3.	单抗在H5N1禽流感病毒抗原性分析和疫苗株鉴选中的作用	108
4.4.	被动免疫及广谱中和单抗对H5N1禽流感治疗的重要性	110
4.5.	异源抗体治疗的可行性	112
4.6.	单抗13D4结合位点的生物学性质	113
4.7.	未来潜在的工作	114
结 论		117
创 新 点		118
参 考 文 献		119
在校期间获得的奖励和科研成果		129
致 谢		133

摘要

2003 年以来, 高致病性 H5N1 禽流感病毒 (H5N1 病毒) 在禽类中的持续流行和不断发生的人类感染事件使人们担心 H5N1 病毒可能持续进化成引发人类流感大流行的大流感病毒株。为此, 研制 H5N1 病毒的疫苗和抗体治疗药物成为当前应对 H5N1 病毒引发潜在流感大流行的研究热点, 而 H5N1 病毒最主要的中和抗体来自于表面糖蛋白血凝素 (HA), 因此 HA 成为主要研究靶标。

H5N1 病毒具有高度变异性, 故疫苗研制的关键是疫苗株的选择。根据分子进化树分析预测结果显示 H5N1 病毒 HA 基因已演变成至少 10 种不同抗原性特征的变异分支 (Clade 0 - 9)。虽然病毒抗血清可真实地反映出病毒的抗原性表现型, 但是 H5N1 病毒新变异株的不断出现和低免疫原性特点使及时制备各种雪貂抗血清变得困难。建立一个 H5 亚型血凝素单抗库 (H5 MAb Panel), 将有助于 H5N1 病毒新流行株的抗原性变异监测, 并指导疫苗株的选择。为此开展了如下工作: (1) 利用分子进化树分析 1997~2007 年分离的 114 株 H5N1 病毒的 HA 基因, 并选择位于进化树不同分支的 40 株 H5N1 病毒代表株 (H5N1 Virus Panel) 用于单抗的制备和鉴定; (2) 利用 Clade 1、2.1、2.2、2.3、8 等五种变异分支的 H5N1 病毒免疫和筛选, 建立一个包含 476 株单抗的 H5 亚型血凝素单抗库; (3) 利用血凝抑制试验 (HI) 分析 476 株 H5 单抗对 40 株 H5N1 病毒的反应性, 把单抗分成九种反应类型 (M1 - M9), 并发现 60 株属于 M1、M2 类的“广谱单抗”能与 40 株病毒全部或基本全部反应; (4) 从中选出 15 株代表性单抗组成 H5 MAb Panel 对 40 株 H5N1 病毒进行细胞中和试验分析, 进一步把 15 株单抗分成三类, 代表 H5 MAb 三种不同的表位识别特征 (I、II、III), 其中“广谱单抗”属于第 I 类; (5) 细胞中和试验结果反映了 H5N1 病毒的抗原性特征, 并把 40 株 H5N1 病毒分成四类, 代表 H5 亚型血凝素的四种不同抗原性 (A、B、C、D)。A 类病毒大部分为 Clade 2.1 (印尼流行株); B 类病毒最具多样性, 除了 Clade 1 (越南流行株), 还包括 Clade 0、4、5、7、8、9 等; C 类病毒主要为 Clade 2.2 (青海类似株, QH-like); D 类主要是 Clade 2.3.4 (福建类似株, FJ-like)。总之, 本研究成功建立了一个 H5 MAb Panel, 可为 H5N1 病毒的变异监控、抗原性分析和疫苗株选择更新提供有用的研究工具。

人类感染 H5N1 病毒具有高致死率, 可能原因是病毒感染人体后会迅速扩散

到体内多个组织器官，导致严重的并发症。流感病毒传统的抗病毒治疗药物（离子通道抑制剂和神经氨酸酶抑制剂）对H5N1病毒疗效一般，且疗效依赖于病毒感染早期或感染之前开始用药，而实际临床病人一般都在出现症状的发病中后期才发现。因此寻找H5N1病毒的治疗新途径势在必行。近年来，被动免疫日益被用于治疗急性传染病，利用中和抗体快速清除体内病毒，因此H5血凝素中和单抗成为治疗H5N1病毒的一种选择。鉴于H5N1病毒HA抗原性存在多种变异分支，理想的治疗单抗应对不同变异分支有广谱疗效。为此在H5N1病毒动物感染模型中对上述获得的H5广谱单抗进行治疗研究：（1）建立了H5N1病毒动物感染模型（BALB/c小鼠和家猫），确定了病毒对动物的一周致死剂量，鉴定了广谱单抗及其片段在不同动物体内半衰期等生物学性质，选择13D4、13D4 F(ab')₂开展治疗研究；（2）在小鼠体内证明广谱单抗13D4对Clade 1、2.1、2.2、2.3等已引发人类感染的四种变异分支的H5N1病毒感染均有良好疗效，显示了广谱疗效，而且疗效与单抗给药时间和剂量有关，越早给药，用药剂量越小；（3）组织病毒滴度分离研究显示，广谱单抗在体内能高效清除病毒，使得单抗在病毒引发肺外多器官感染时仍有效，单抗能在病毒感染24小时内将肺组织中的病毒完全清除；（4）利用片段单抗13D4 F(ab')₂治疗H5N1病毒感染鼠，显示疗效不如13D4全抗体，但明显优于抗流感病毒药物奥赛米韦（达菲）；（5）进一步比较不同抗体亚类广谱单抗对H5N1病毒感染鼠的治疗效果，发现IgG2a和IgG2b亚类的疗效明显好于IgG1，而IgM和IgG3亚类无疗效，提示广谱单抗的治疗机制可能与抗体Fc段介导的ADCC、补体激活或免疫调理有关；（6）单抗13D4还对H5N1病毒感染家猫有良好的异源抗体治疗效果；（7）为认识广谱单抗识别的保守表位，利用逃逸突变分析方法鉴定出单抗13D4至少结合两个位点氨基酸（第152位和第182位），相应突变株对小鼠的毒力均下降，提示这两个位点与病毒受体结合区有关；（8）HI试验显示任意一个点的突变病毒株均不能完全逃避单抗13D4的结合，动物实验显示单抗13D4对逃逸病毒感染鼠虽疗效下降但仍可有效保护。总之，本研究获得的13D4等H5亚型血凝素广谱中和单抗对同源和异源动物感染H5N1病毒均有良好疗效，而且广谱单抗通过结合H5N1病毒血凝素上至少2个保守的关键位点，增强了单抗应对病毒单一突变的治疗能力。

关键词：流感；H5N1；血凝素；抗体；抗原性；治疗；表位

Abstract

Long-term endemicity of highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses in birds and sporadic human transmissions by H5N1 viruses since 2003 have raised the concern of a potential pandemic. It has been explored actively in the development of the H5N1 pre-pandemic vaccine and treatment. Hemagglutinin (HA) of H5N1 virus is the key protein producing neutralizing antibody and becomes a hot target.

Given the high variation, the key work is to select an ideal virus candidate for vaccine development. Based on phylogenetic analysis of HA sequence, H5N1 viruses have been divided into at least 10 genetical clades. The antibody was traditionally used to analysis the real antigenicity of virus, however, co-circulation of multiple antigenic variants of H5N1 virus and low immunogenicity of H5N1 viurs hamper the timely production of standard H5N1-specific ferret antisera. Thus, it is useful to establish a panel of H5 HA specific MAb for antigenic analysis and vaccine selection of H5N1 virus. The result as bellows: A panel of 476 H5 HA specific MAb has been established and characterized by HI assay to 40 H5N1 viruses representing different genetic lineages from 1997 to 2007. A panel of 60 broadly cross-reactive MAbs have been found due to their almost cross-reactive with all the 40 H5N1 virus. According to their HI reactive spectrums, 15 representative MAbs were further selected as a panel to characterize the antigenicity of H5N1 virus. Four antigenic groups, A, B C and D, were identified among 40 H5N1 viruses based on their cross-reactive spectra with this panel of MAbs in neutralisation assay. Group A consists mostly of clade 2.1 viruses, which are circulating mainly in Indonesia; Group B consists of the most genetically diversified variants, including viruses from clade 0, 1, 4, 5, 7 and 9; Group C contains primarily clade 2.2 Qinghai-like viruses; and Group D is composed almost exclusively of clade 2.3.4 Fujian-like viruses. In summary, this study established a useful panel of H5 HA MAbs and will facilitate for the recognition of emerging antigenic variants of the H5N1 virus and help in the selection or evaluation of vaccine strains.

Human H5N1 infections cause rapid dissemination of virus to multiple organs and are associated with severe disease and high mortality. Difficulties of current anti-viral drugs, such as ion channel blockers and neuraminidase inhibitors, in treatment and high mortality rates may be attributable to failures in rapid neutralization and control dissemination of H5N1 virus in humans after symptoms

emerge. Passive immunotherapy has been used increasingly in treatment of infectious diseases. However, to achieve neutralization, therapeutic antibodies rely on their specific binding to epitopes in the HA protein of influenza viruses. Continuous evolution and co-circulation of multiple genetic H5N1 lineages in broad regions have, however, generated antigenically diverse variants that pose significant challenges for developing broadly cross protective therapeutic MAbs. Thus, the ideal therapeutical antibody is the broadly cross-reactive H5 specific MAbs. One of these MAbs, 13D4, has been demonstrated to protect mice against lethal challenge by 4 H5N1 strains representing the current major genetic populations, clades 1, 2.1, 2.2, and 2.3, even at a stage of infection when H5N1 virus has disseminated beyond the pulmonary system. Complete neutralization of virus in lung tissue of infected animals was observed 24 h after treatment with 13D4. Compared the protection efficacy between different isotypes of cross-reactive MAb, it was found that both IgG2a and IgG2b are better than IgG1, IgM, IgG3. This suggested that Fc fragment of MAb may be related to protection. Further study also showed that efficacy of F(ab')₂ is less than whole antibody but better than oseltamivir (Tamiflu) in protect H5N1 infected mice. It was also observed that MAb 13D4 provide a good heterologous protection efficacy for H5N1 infected cat. Mapping of this MAb with escape mutants showed it to bind to 2 conserved, possibly critical, sites of H5N1 hemagglutinin, 152 and 182. It was also found that their escape mutants were partially attenuated in mice. Such evidence supports the idea that these sites may be critical to virus function. HI assay showed these escape mutants still retain hemagglutination inhibition, albeit at a lower level than their parental viruses. 13D4 MAb was still able to protect mice against a lethal challenge of N182K virus, although with lower efficiency. In summary, H5 broad-reactive MAbs such as 13D4 may lie in the fact that they target conserved, critical, and, therefore, preserved HA antigenic sites in H5N1 viruses and may have therapeutic value in controlling infection due to current and future H5N1 variants.

Keywords: Influenza; H5N1; HA; antibody; antigenicity; treatment; epitope

缩略词

缩写	英文全称	中文名称
°C	degree celsius	摄氏度
μg	microgram	微克
μL	microlitre	微升
μM	micromolar	微摩尔
AIV	avian influenza virus	禽流感病毒
BH goose	bar-headed goose	斑头雁
BH Gs	bar-headed goose	斑头雁
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
Ck	chicken	鸡
Clade	clade	变异分支
CO ₂	carbon dioxide	二氧化碳
CP heron	chinese pond heron	中华池鹭
d	days	天
Dk	duck	鸭
dpi	days post infection	感染后天数
EID ₅₀	embryo infectious dose 50	半数鸡胚感染剂量
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附实验
Env	enviroment	自然环境分离
ER	endoplasmic reticulum	粗面内质网
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
FJ	Gujian	福建
Flu	influenza	流感病毒
Freunds	freunds adjuvant	福氏佐剂
g	gravity	重力速度
GD	Guangdong	广东
Gf	guinea fowl	珍珠鸡
Ghr	grey heron	灰苍鹭
Golgi	golgi body	高尔基体
Gs	goose	鹅
GX	Guangxi	广西
GY	Guiyang	贵阳
HA	hemagglutinin	血凝素
HI	hemagglutination inhibition	血凝抑制
HK	Hong Kong	香港

缩略词

HN	Hunan	湖南
hPI	hours post infection	感染后小时
HPAIV	high pathogenic avian influenza virus	高致病禽流感病毒
h	hour	小时
HRP	horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
IDN	Indonesia	印度尼西亚
IFA	indirect immunofluorescent assay	间接免疫荧光检测
IgG	immunoglobulin G	免疫球蛋白 G
IgM	immunoglobulin M	免疫球蛋白 M
JX	Jiangxi	江西
kD	kilo daltons	千道尔顿
L	litre	升
LPAIV	low pathogenic avian influenza virus	低致病禽流感病毒
M	Mol/L	摩尔/升
M1	matrix protein 1	基质蛋白 1
M2	matrix protein 2	基质蛋白 2
MAb	monoclonal antibody	单克隆抗体
MDCK	madin-darby canine kidney	犬肾细胞
MDk	migratory duck	候鸟野鸭
min	minute	分钟
MLD ₅₀	mouse lethal dose 50	小鼠半数致死剂量
mM	mmol/L	毫摩尔/升
mo	month	月
mRNA	messenger ribonucleic acid	信使 RNA
MYS	Malaysia	马来西亚
NA	neuraminidase	神经氨酸酶
NDV	new castle virus	新城疫病毒
NEP	nuclear export protein	核输出蛋白
NES	nuclear export sequence	核出口序列信号
ng	nanogram	纳克
NLS	nuclear location sequence	核定位序列信号
NP	nucleoprotein	核壳蛋白
NS	non Structural protein	非结构蛋白
pi	post infection	感染后
PA	polymerase acid	多聚蛋白酶 A
PB1	polymerase basic 1	多聚蛋白酶 B1
PB2	polymerase basic 2	多聚蛋白酶 B2
PBS	phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液

缩略词

PEG	polyethylene glycol	聚乙二醇
Ph	pheasant	雉鸡
PMK	primary rhesus monkey	新生恒河猴
Qa	quail	鹌鹑
QH	Qinghai	青海
Rb pochard	rosy billed pochard	玫瑰鹭
RBS	receptor binding site	受体结合位点
RNA	ribonucleic acid	核糖核酸
RNP	ribonucleoprotein	核糖核蛋白体
rpm	revolutions per minute	每分钟转速
SA	sialic acid	唾液酸
SCK	silky chicken	银丝鸡
s	second	秒
ST	Shantou	汕头
SZ	Shenzhen	深圳
TCID ₅₀	tissue culture infectious dose 50	半数组织感染剂量
THA	Thailand	泰国
VNM	Vietnam	越南
vRNA	viral ribonucleic acid	病毒 RNA
vRNP	viral ribonucleoprotein	病毒核糖核蛋白体
Wb	wild birds	野鸟
Wdk	wild duck	野鸭
WHO	World Health Organisation	世界卫生组织
YN	Yunnan	云南

注：按缩写词的第一个字母排序。

第一章 前 言

自 2003 年以来,高致病性 H5N1 禽流感病毒从东南亚地区逐渐扩散到欧洲、中东、非洲等地区并持续流行,不仅使疫区养禽业蒙受巨大损失,而且还不断发生病毒突破种间屏障直接传人感染致死事件,造成全球社会恐慌[1-3]。据世界卫生组织(WHO)最新统计数字,H5N1 禽流感病毒已造成 15 个国家的 380 多个病人感染,其中 245 人死亡,病死率高达 63% [4],而且目前仍缺乏有效的治疗药物,因此 H5N1 禽流感疫情已成为继 2003 年“非典”疫情之后,人类面临的最大的传染病威胁之一。目前 WHO 推荐治疗药物是“达菲”,该药物必须是病毒感染前或病毒感染早期用药才有效[5-7],而实际情况中的临床病人通常都在发病中后期才到医院就诊,已错过该药的最佳治疗时机[8, 9],而且 H5N1 禽流感病毒出现对奥塞米韦的耐药株也增加了该药物的应用前景[10]。因此,研制 H5N1 禽流感新型特效药成为当前一个研究热点。近年来,被动免疫治疗方法越来越多地被运用于治疗传染病[11],利用 H5N1 禽流感病毒感染病人的恢复期血清治疗禽流感患者已经得到多次有益的尝试并取得较好的效果[12, 13],这使得利用抗体治疗 H5N1 禽流感感染成为一个新的研究热点。中和单抗能高效结合病毒的中和表位并抑制病毒对细胞的感染达到治疗病毒感染的效果,而 H5N1 禽流感病毒最主要的中和表位位于病毒的表面抗原血凝素(HA) [14],因此 HA 中和单抗成为治疗 H5N1 禽流感病毒的首选。然而,由于流感病毒的持续快速变异,自然界中 H5N1 禽流感病毒已形成多种抗原性不同的变异亚系病毒株共流行的状况[15, 16]。根据 HA 抗原性差异情况,当前的 H5N1 禽流感病毒已被分为至少 10 个主要进化分支(Clade) [17]。为了获得对不同变异分支的 H5N1 禽流感病毒均有效的中和单抗,就必须确保这样的单抗具备广谱性,即对抗原性有明显不同的变异株均有类似的中和活性。因此,研制 H5N1 禽流感病毒 HA 广谱性中和单抗并探索广谱中和单抗对 H5N1 禽流感病毒感染的治疗效果成为本论文的主要研究目的。

H5N1 禽流感病毒是一种甲型流感病毒,因此认识甲型流感病毒有助于更好的认识 H5N1 禽流感,而单抗治疗研究将涉及 H5N1 禽流感病毒的致病机理、动物感染模型及相应的抗病毒治疗方式等。以下将对这些内容进行综述。

1.1. 流感病毒的概述

1.1.1. 流感病毒的分类与命名

流行性感冒简称流感，是由流感病毒引起的急性呼吸道传染病。流感病毒属正粘病毒科（Orthomyxoviridae），流感病毒属，为单链负义 RNA 病毒。粘病毒是指对人或某些动物红细胞表面的粘蛋白有亲和性的病毒，两者的区别以病毒核酸是否分节段为标准，分节段者为正粘病毒，不分节段者为副粘病毒[14, 18]。

流感病毒根据核壳蛋白和基质膜蛋白抗原性的不同可分为甲（A）、乙（B）、丙（C）三个血清型，它们具有某些特性的差别（表 1-1），其抗原性差别可通过琼脂扩散试验、补体结合试验等区分开来。甲、乙、丙型不仅反映了病毒被发现的年代及前后顺序，更主要的是反映了对人类危害程度的顺序[14, 18]。根据病毒表面抗原糖蛋白血凝素（HA）和神经氨酸酶（NA）的抗原性差异，甲型流感病毒又可分为 16 种 H 亚型(H1 - H16)和 9 种 N 亚型(N1 - N9)[3]。

表 1-1 甲、乙、丙型流感病毒的比较
Tab.1-1 Comparison of influenza A, B and C virus

性质	甲型	乙型	丙型
变异性	变异较快	变异较慢	未见变异
流行性	世界性流行	局部流行	散发流行
基因段数	8	8	7

由于流感病毒的亚型众多，给早期的病毒命名带来一定的困难。直到 1971 年国际流感工作会议提出了流感病毒命名的标准体系，1980 年又进行了修订[19]。命名法规定一株流感病毒的名称为：“型别（A、B、C）或（甲、乙、丙）/宿主来源（若为人，可省略）/分离地点/毒株序号/分离年代（H、N）”，如：A/Swine/Iowa/15/30 (H1N1)、A/Moscow/21/99(H3N2)，见图 1-1。

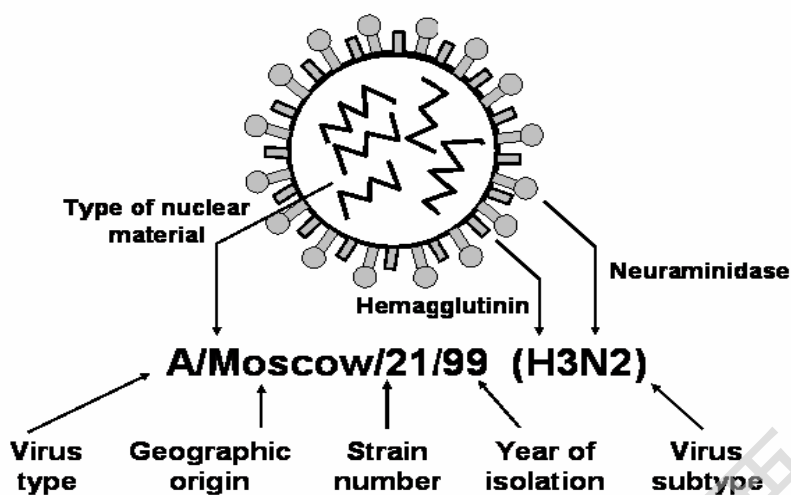


图 1-1 流感病毒命名的图解

Fig.1-1 A schematic diagram of influenza virus

1.1.2. 流感病毒形态与化学组成

从流感病毒的外部形态上来看，甲、乙型流感病毒的结构基本相同，丙型流感病毒的不同之处在于颗粒表面的刺突蛋白只有一种。甲、乙型流感病毒有多种形态，有的呈丝状、有的呈杆状，但一般为球形，电镜下病毒颗粒（如图 1-2）的直径约为 80 - 120nm [18]。

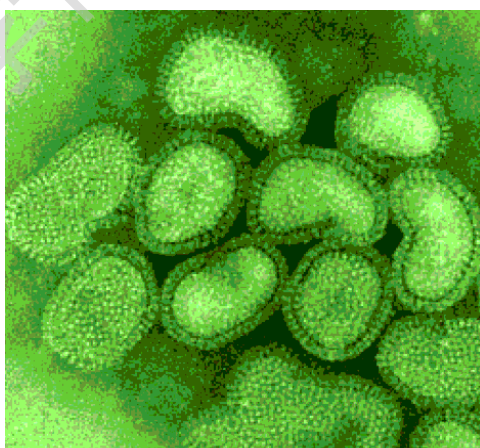


图1-2 流感病毒颗粒电镜图

Fig.1-2 The Electron micrographs of influenza virus virions

甲型流感病毒是有包膜的病毒颗粒，其结构主要包括病毒表面的包膜（即病毒囊膜，图1-3）和病毒内部核心（即核衣壳）两部分。囊膜的表面约有500个刺

突 (Spike), 离表面约10 - 14nm, 它们是由两种糖蛋白HA和NA组成的, HA与NA的比例为4:1 - 5:1左右。囊膜下面是呈螺旋状对称的核衣壳, 直径约70nm。病毒囊膜上镶嵌着三种蛋白——HA、NA、M2。囊膜由内向外, 可分为基质蛋白、类脂和糖蛋白三层。类脂层是脂质双层结构, 它来自宿主细胞膜或核膜, 其中镶嵌的两种糖蛋白HA和NA向外突出脂质双层形成刺突, 构成了流感病毒囊膜的最外层 - 糖蛋白层。在囊膜下面是一层内膜基质蛋白 (M1), 它介于核蛋白与脂质双层膜之间, 与组成脂质双层膜的种类紧密结合, 紧紧地包裹着核衣壳, 在维持病毒形状与完整性上起重要作用。病毒的核心在电子显微镜下呈电子致密状, 主要由核糖蛋白体 (RNP, ribonucleoprotein) 组成。RNP的组成是由四种核蛋白环绕螺旋状RNA形成的, 四种蛋白中以NP蛋白为主, 另外三种是RNA多聚酶 (PB1、PB2、PA)。RNP中的核酸是决定流感病毒的遗传特性的基因组RNA, 在甲、乙型流感病毒中有八个节段, 而丙型病毒则只有七个节段, 每一个节段就是一个基因, 其基因组分节段的特点使病毒具有高频率基因重配的能力, 容易发生变异[14]。

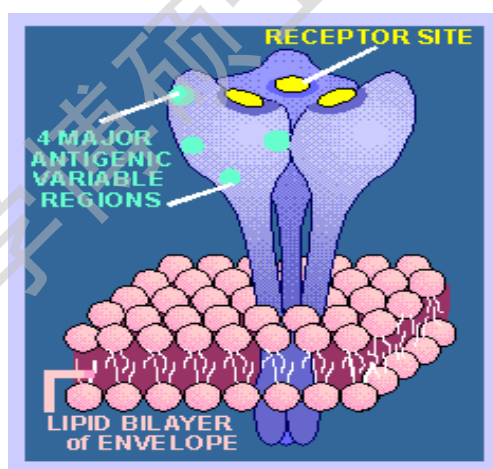


图 1-3 流感病毒的囊膜结构

Fig.1-3 The membrane structure of influenza virus

流感病毒颗粒由约 1%RNA、70%蛋白质、20%的脂质和 5 - 8%的碳水化合物组成。脂质位于病毒的膜内, 大部分为磷脂, 还有少量的胆固醇和糖脂。几种碳水化合物包括半乳糖、甘露糖、墨角藻糖和氨基葡萄糖和 RNA 内的核糖, 它们在病毒粒子中主要以糖蛋白或糖脂的形式存在。病毒蛋白及潜在的糖基化位点是病毒基因组所决定的, 但参与病毒膜的糖蛋白或糖类链的脂质和碳水化合物链的

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库