



# 新型甲型流感病毒

CAAS09生信二班




流感病毒在历史上曾经给我们带来了很大的灾难，1918年的西班牙大流行，造成了很多人死亡。目前，墨西哥流感开始在世界范围内大流行，虽然目前并没有太大的致死率，但是以目前的传播速度和以往的流行史，让我们不得不再次把目光投向这个病毒。






流感病毒在分类学上属于正粘病毒科

(**Orthomyxoviridae**) 甲型流感病毒属。流感病毒由8个基因编码10中蛋白，包括8个结构蛋白**HA**、**NA**、**NP**、**M1**、**M2**、**PB1**、**PB2**和**PA**，2个非结构蛋白**NS1**和**NS2**。根据病毒粒核蛋白(**NP**)和膜蛋白(**MP**)抗原特性及其基因特性不同，把流感病毒分为甲，乙，丙三型。甲型流感病毒根据其表面血凝素(**HA**)和神经氨酸酶(**NA**)蛋白结构及其基因特性又可分成许多亚型，至今甲型流感病毒已发现的血凝素有16个亚型(**H1-16**)，神经氨酸酶有9个亚型(**N1-9**)。



由于基因组是分节段的，故易产生同型不同株间基因重配。流感病毒，尤其人甲型流感病毒HA基因能经常不断的发生点突变，导致其编码的HA蛋白分子上氨基酸序列发生替换，造成其抗原性经常不断的发生漂移，每次抗原性漂移常带来不同程度的流感流行。

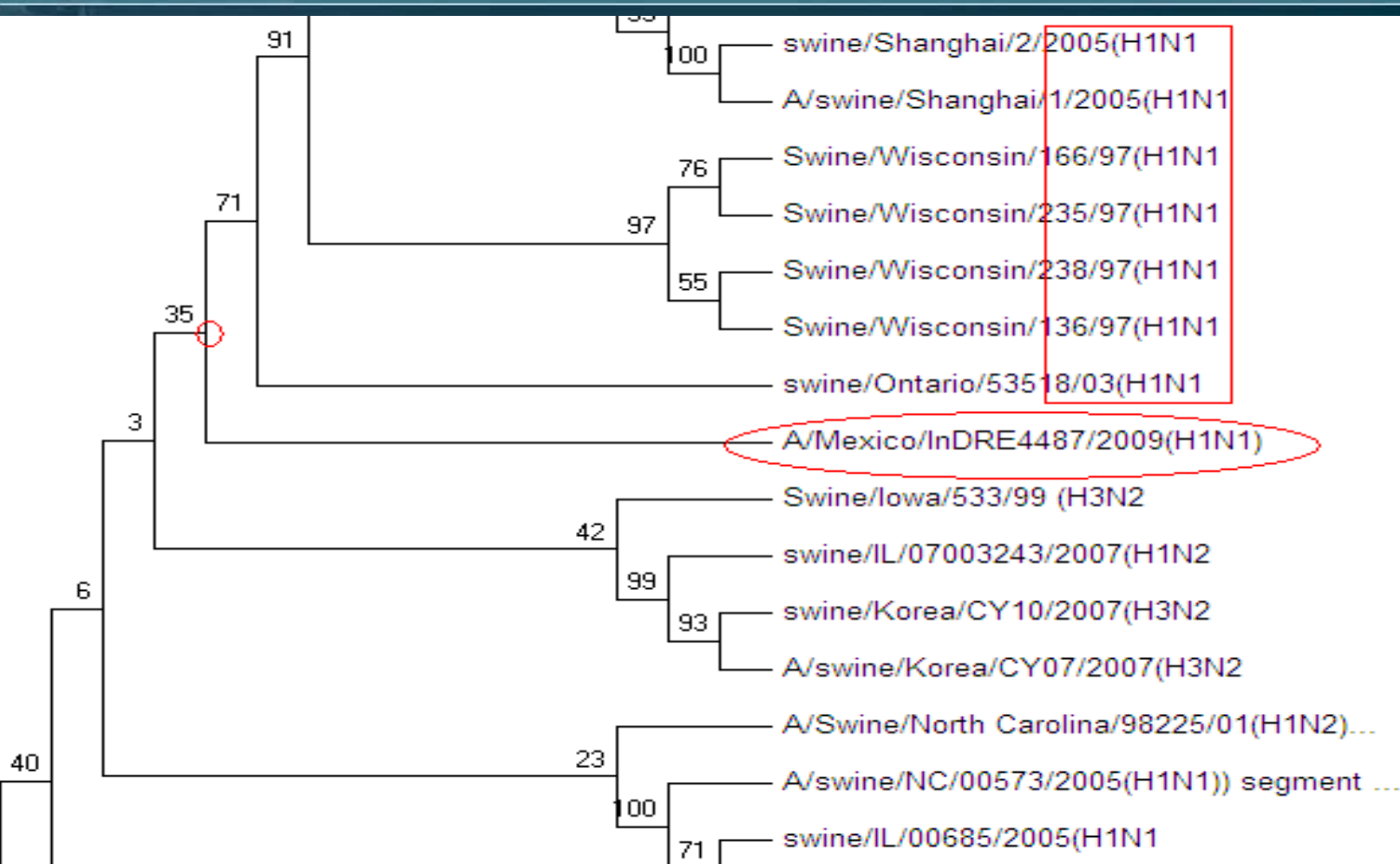


- 甲型流感病毒核酸片段来源分析
- H5N1与H1N1的HA比较
- 抗原表位的分析
- 达菲作用的机理

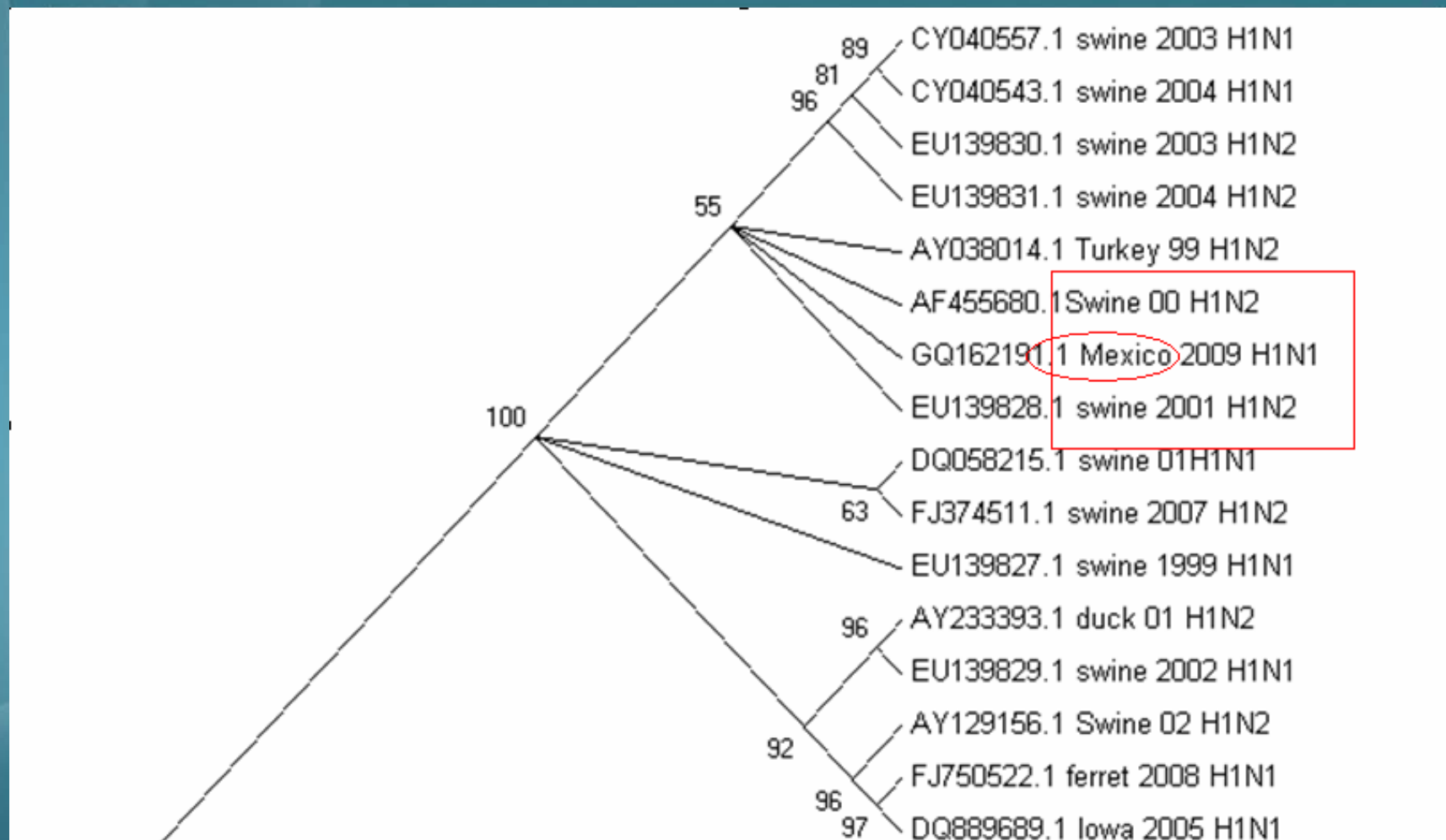
# 一、新型甲型流感来源分析

- 我们采用的方法是分别对流感病毒的**8**条核酸片段进行**BLASTN**比对和构建系统进化树。通过进化树推测新型甲型流感病毒的可能来源。比对序列来自于**NCBI**5月14日提供的**MEXICO**甲型流感病毒的全基因组核酸序列。

# (一)、对NP的分析

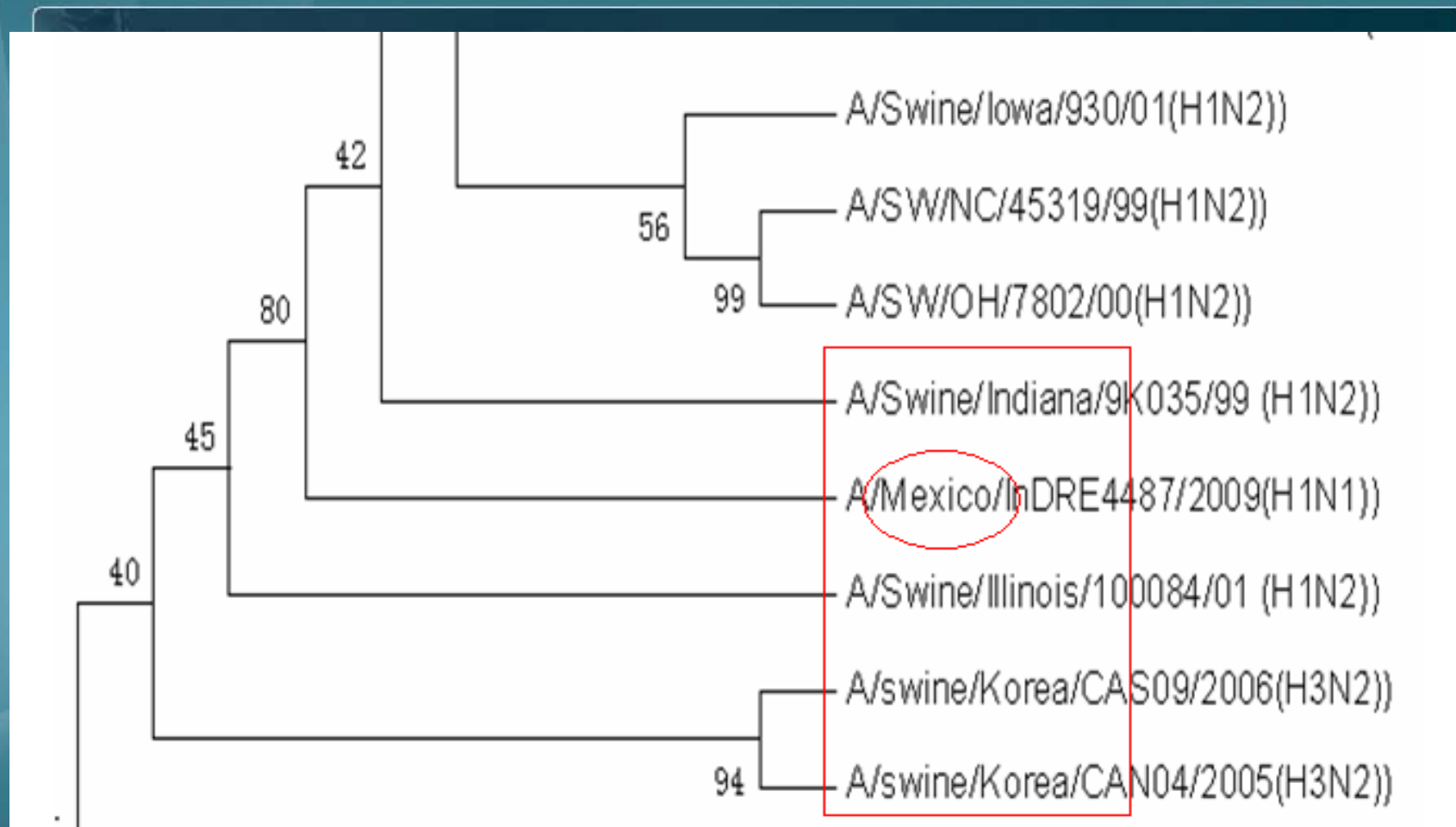


## (二)、对HA的分析

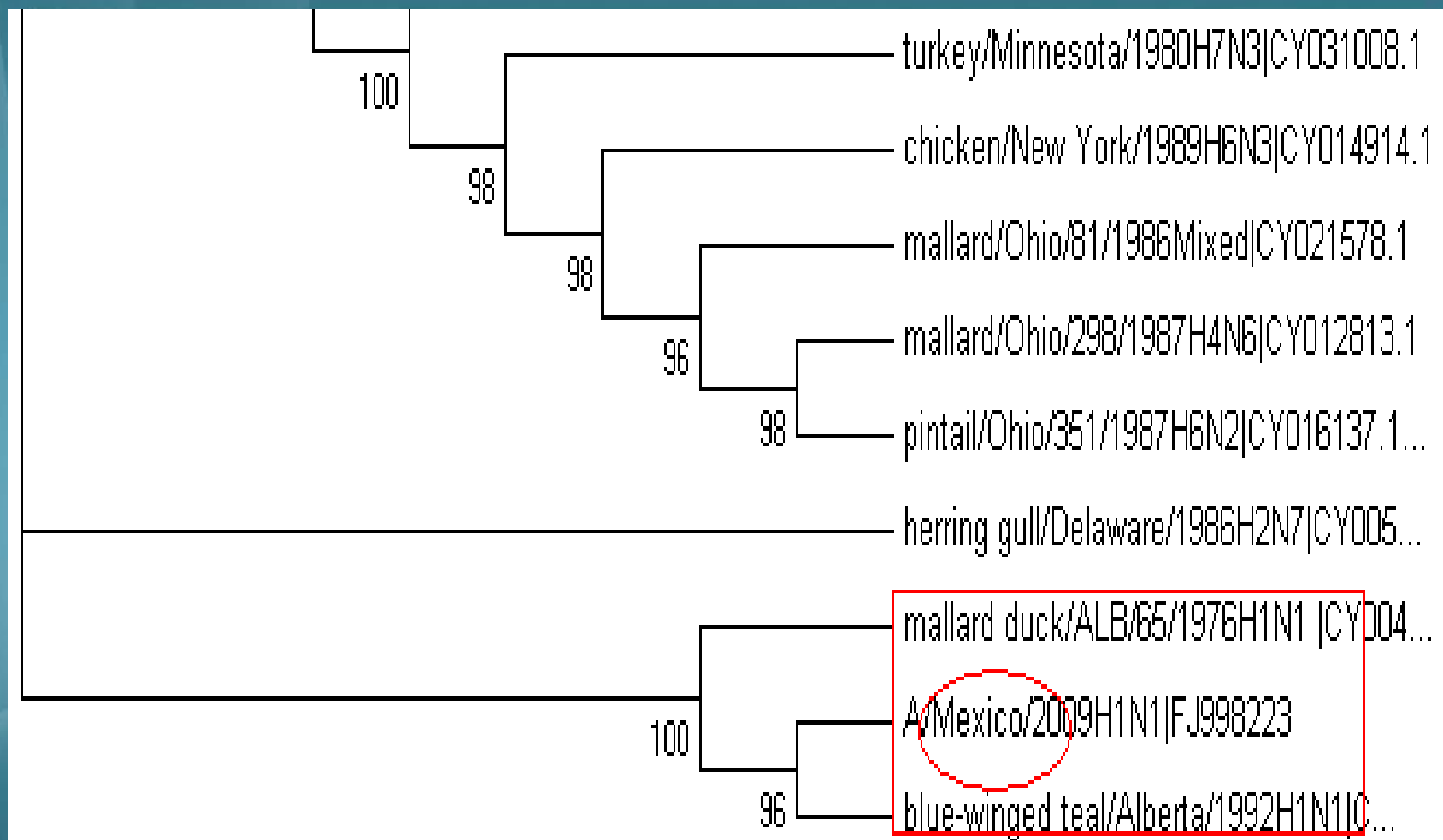




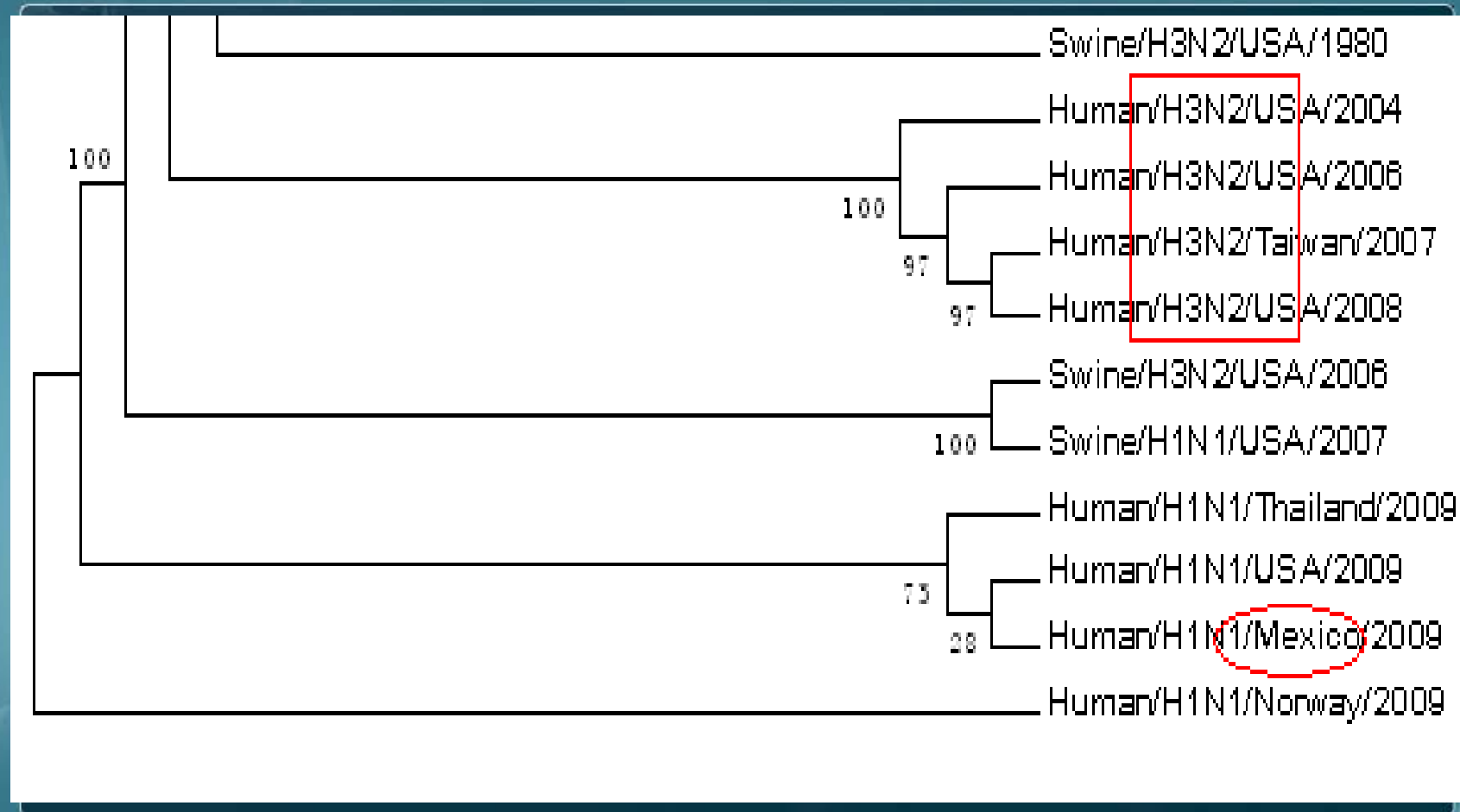
### (三)、对NS的分析



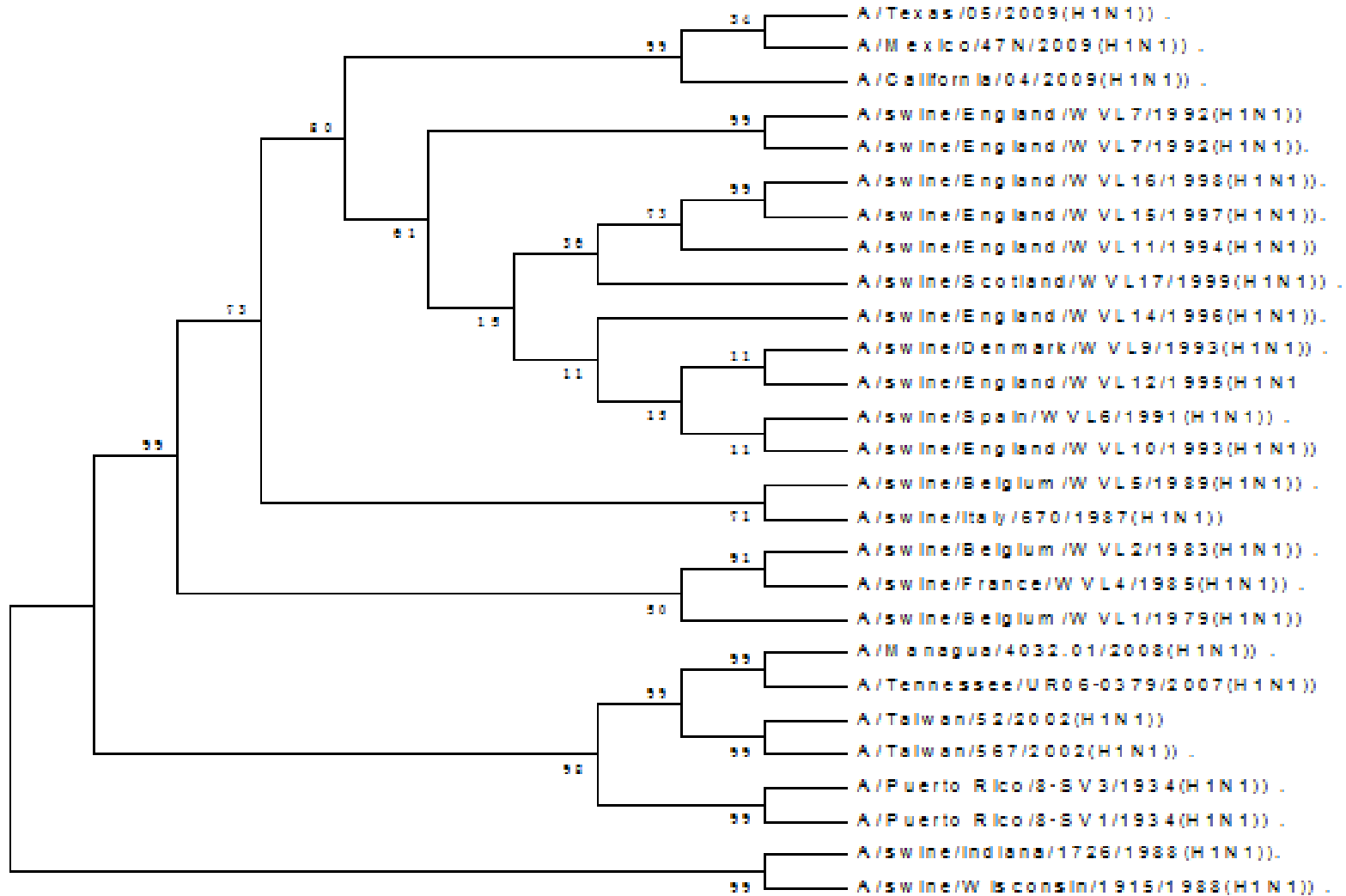
## (四)、对PA的分析



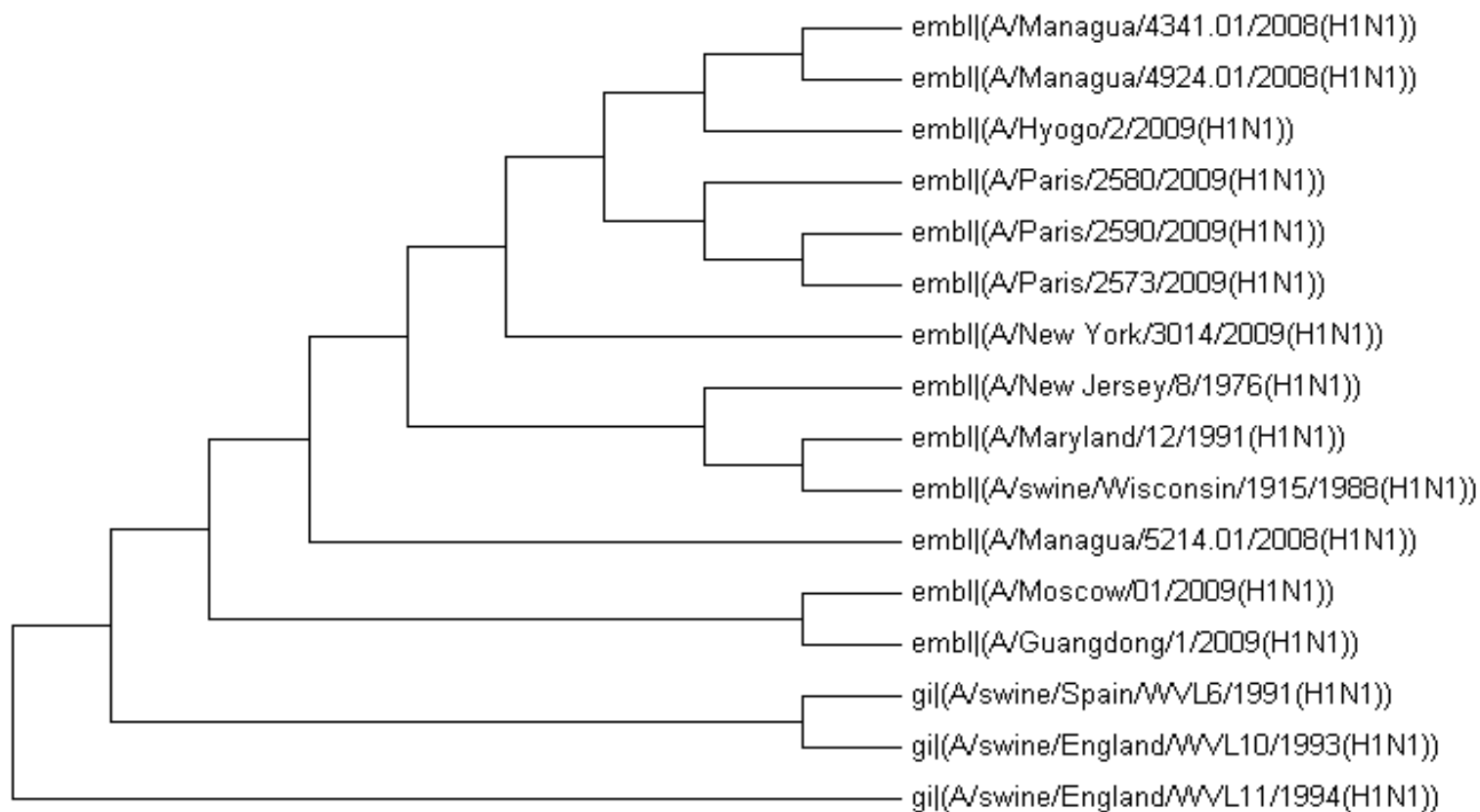
## (五)、对PB1的分析



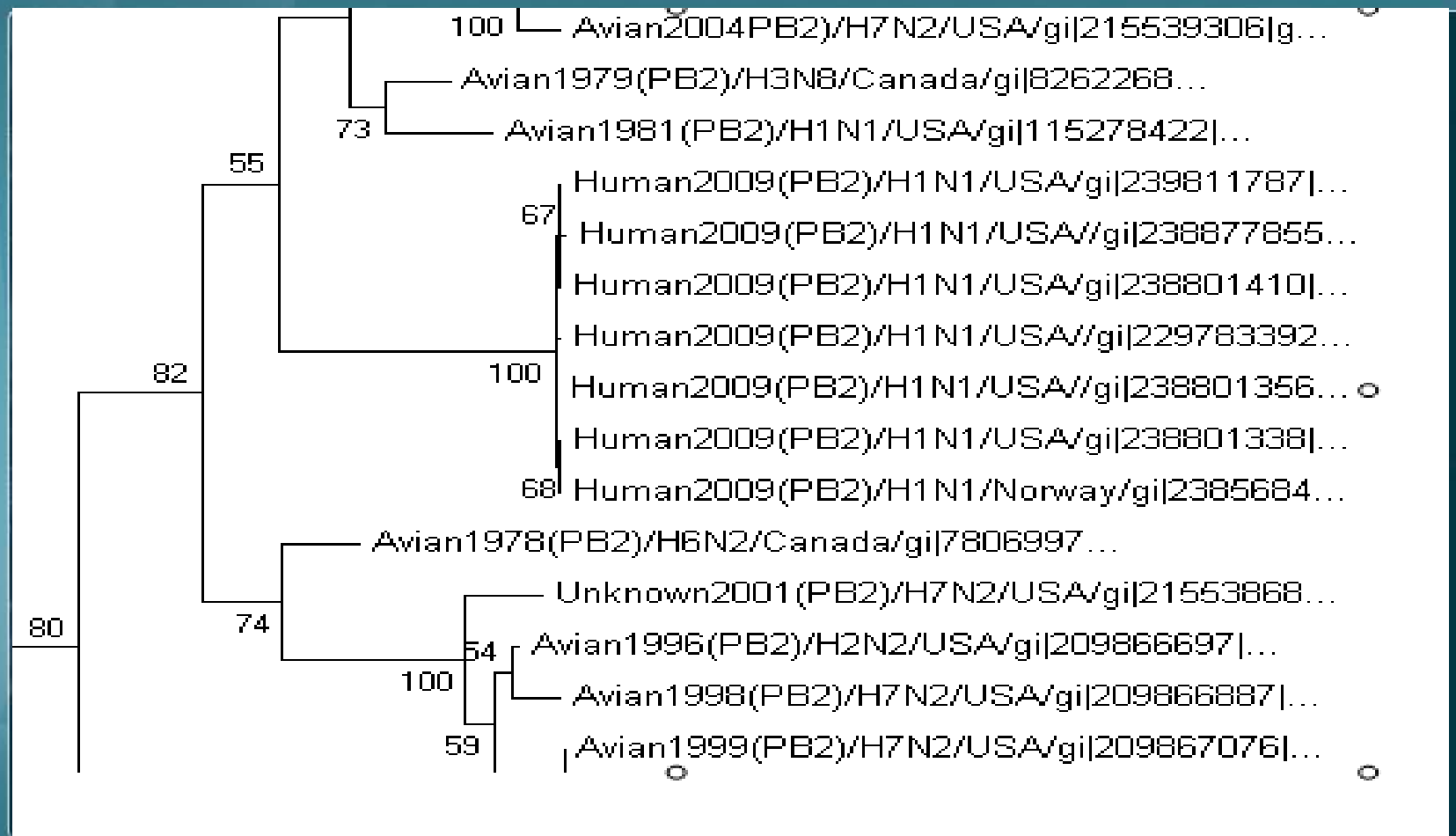
# (六)、对MP的分析



# (七)、对NA的分析



# (八)、对PB2的分析



# 结论：

- **HA、NP和NS**基因可能来自北美系猪流感病毒
- **NA和M**基因可能来自欧亚系猪流感病毒
- **PB2和PA**来自禽**H1N1**病毒
- **PB1**基因来自季节性**H3N2**人病毒

## 二、H5N1与H1N1的HA比较



研究表明，流感病毒感染的第一步是靠**HA**吸附于细胞膜上的病毒受体，然后通过**HA2**氨基端的作用使病毒脱壳。要完成这一步初始**HA0**需要在宿主蛋白酶(如**furin**和**PC6**丝氨酸蛋白酶)切下裂解为**HA1**和**HA2**。**HA**对蛋白酶切割的敏感性直接影响病毒的毒力，如果**HA**易于被切割，则毒株有较高的毒力；反之，则毒力较低。**HA**蛋白裂解活性主要是由**HA**蛋白裂解位点上游的碱性氨基酸含量决定。





高致病性的**H5N1**在裂解位点附近都有连续**4**个以上碱性氨基酸，多个碱性氨基酸裂解序列可以被分布于宿主全身的多种细胞蛋白酶(如在禽类体内广泛存在的**PC6**丝氨酸蛋白酶)裂解，流感病毒得以进入全身多种类型细胞进行复制，引起宿主各系统的病变





从**GenBank**中搜索**2009**年墨西哥毒株及**1997**年**H5**毒株，用**needle**软件进行比对，看看这两毒株间的进化上的关系。





Result:  View:

### Pairwise Alignment Result


LENGTH	SCORE	IDENTITY	SIMILARITY	GAPS
570	2053.5	366/570 (64.2%)	453/570 (79.5%)	6/570 (1.1%)

```
ACQ73386.1      1  MKAILVLLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLL      50
   |:.| |:|.|.:.:..|.:.|:|||||:|.||:|:|||||:|:.:|
AAC32102.1      1  MEKI-VLLLATVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDIL      49



ACQ73386.1     51  EDKHNGKLCCLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETS     100
   |.|||||.|.|||.|.|.|.:.:|||:|||||.|.:.:.....|:|:|.:.:
AAC32102.1     50  ERTHNGKLCDLNGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINVPEWSYIVEKA      99

ACQ73386.1    101  SSDNGTCYPGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVT    150
   |.|.|.|||:|.||||:..||.:.:|.||:|.:.|.|| |.||||:|.:.|:
```





从这两毒株的氨基酸比对来看，他们之间的一致性是**64.2%**和相似性达到**79.5%**，同源性不是很高。



从相关文献中我们可以看到，大部分**HA**氨基酸**N**端有一个由**16**个疏水氨基酸组成的信号肽，紧挨着信号肽的事有**328**个氨基酸残基的**HA1**，羧基端的**221**个氨基酸构成**HA2**，它两之间有一精氨酸残基，大概在**HA**的**344**位氨基酸左右存在宿主细胞蛋白酶的裂解位点。

## SEQUENCE LOGO

### Information Content

189.9 (bits)

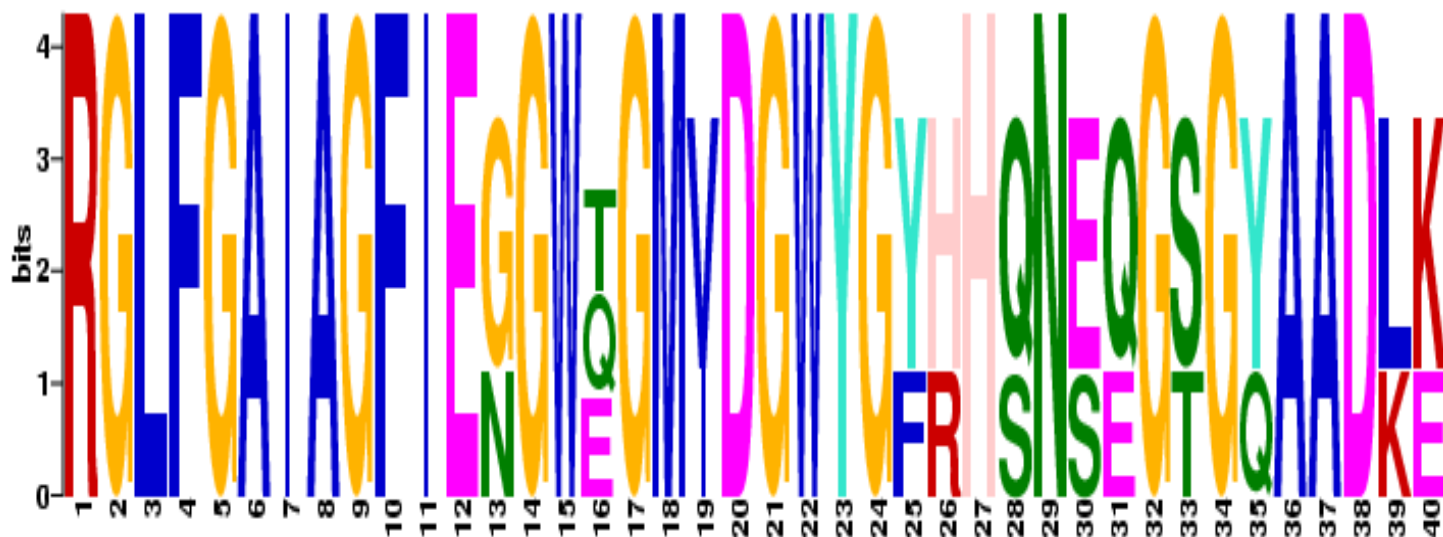
### Relative Entropy

187.2 (bits)

### Download LOGO

Without SSC: [\[EPS\]](#) [\[PNG\]](#)

With SSC: [\[EPS\]](#) [\[PNG\]](#)



NAME	START	P-VALUE	SITES
gj 229484029 gb ACQ73386.1	343	9.87e-60	G L R N V P S I Q S R G L F G A I A G F I E G G W T G M V D G W Y G Y H H Q N E Q G S G Y A
gj 3421266 gb AAC32102.1	345	8.51e-57	T P Q R E R R R K K R G L F G A I A G F I E G G W Q G M V D G W Y G Y H H S N E Q G S G Y A
gj 148910820 gb ABR18476.1	344	4.89e-52	G M R N V P E K Q T R G L F G A I A G F I E G W E G M I D G W Y G F R H Q N S E G T G Q A

保守区域

1997年的香港H5强毒株切割位点附近有碱性氨基酸富集 **RERRRKK RGLFGA** 而在最近流行的H1N1中在此处并没有碱性氨基酸的富集，因此我们推测，这次流行的H1N1流感病毒的致病性强，应该与其HA片段无关。

### 三、抗原表位的预测

流感病毒的基因组有8个节段，它们分别编码不同的蛋白，有的蛋白结构发生变异的频率很高，这给疫苗的生产带来很大麻烦，因此我们选取了保守性较高的NP蛋白进行表位预测。



# (一)、抗原表位的特性及预测原理

- 特性:

蛋白质抗原免疫识别的研究表明：蛋白质抗原并非通过其完整分子发挥功能，而是通过表位体现其特异性。抗原表位是免疫细胞或抗体识别的基本结构和功能单位。B细胞表位又称B细胞抗原决定簇，它是病原体中，具有免疫原性的短肽序列，是抗原中可相互结合的线性被B受体或抗体特异性识别并片段或空间构象性结构。

线性B细胞表位通常位于蛋白质表面突出、转角（turn）及环(loop)结构处。具有高亲水性、高可及性、高极性、高柔韧性、高抗原性、富含 $\beta$ -转角结构，但 $\alpha$ -螺旋和 $\beta$ -折叠结构少。

## • 原理：

实验研究表明，抗原表位多位于亲水性较高、溶剂可及的区域，另外表位的形成还与序列中特定氨基酸的出现、片段的可塑性及二级结构有关。因此，亲水性、可及性、极性、柔韧性、电荷分布以及与二级结构相关的 $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、 $\beta$ -转角和无规卷曲等目前被公认并且具有较好预测效果的参数，常被用于B细胞表位的分析。

蛋白质中的 $\beta$ -转角及无规卷曲多出现在球蛋白表面，为突出结构，利于与抗体嵌合，成为抗原表位的可能性大。 $\alpha$ -螺旋和 $\beta$ -折叠结构规则，有氢键维持，不易形变，很难合适地与抗体嵌合，且经常位于蛋白质的内部，因而富含 $\alpha$ -螺旋和 $\beta$ -折叠的区域成为表位的可能性较小。



抗原指数 $\geq 0.5$ , 亲水性指数 $\geq 1.5$ , 以及氨基酸的表面可能性指数 $\geq 7$ , 柔韧性指数 $\geq 0.45$ , 极性指数 $\geq 10$  的区段, 如果其内部或附近又富含 $\beta$ -转角结构, 并且 $\alpha$ -螺旋和 $\beta$ -折叠结构少, 则较有可能是B 细胞表位。



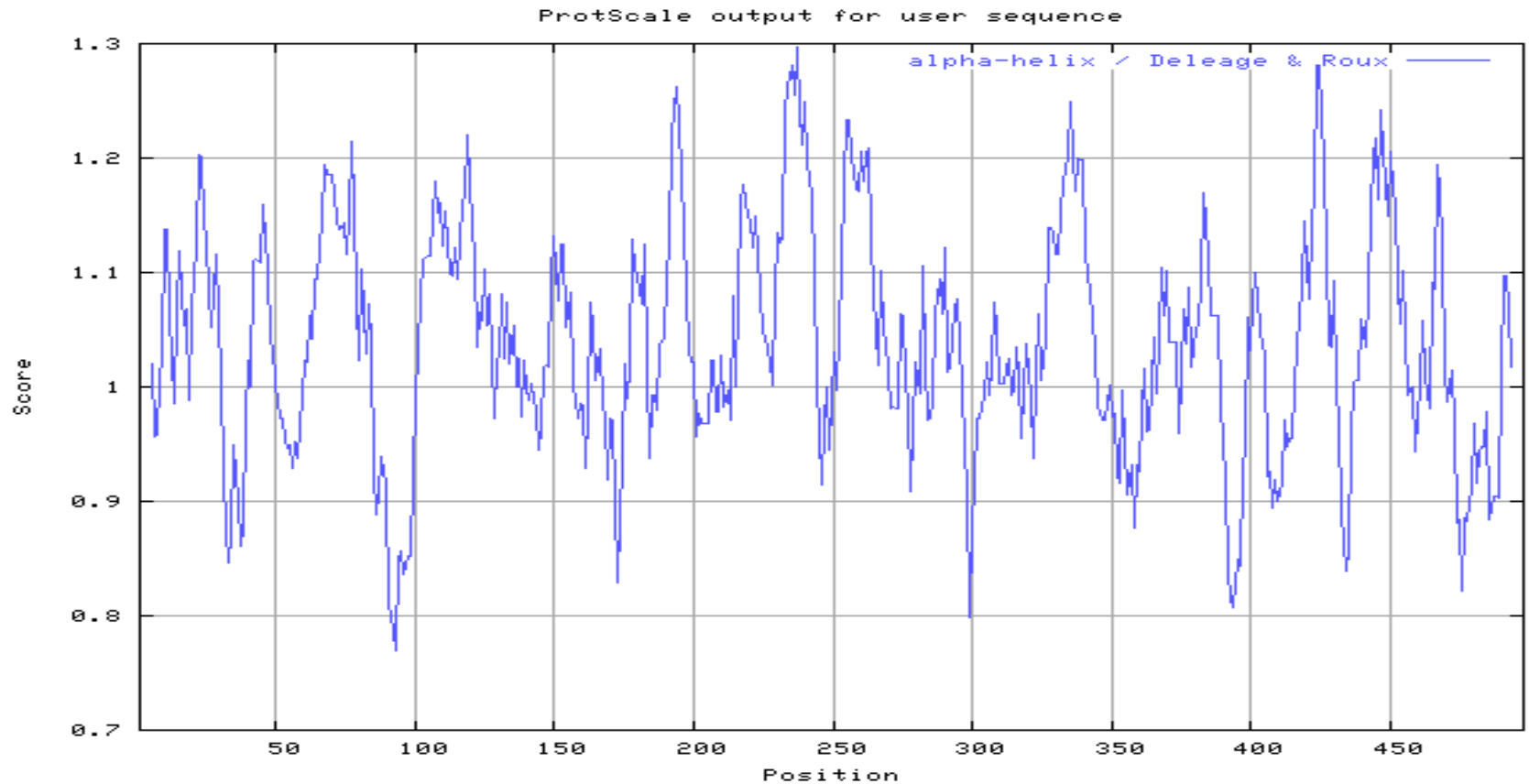
## (二)、预测方法

- 二级结构的预测：

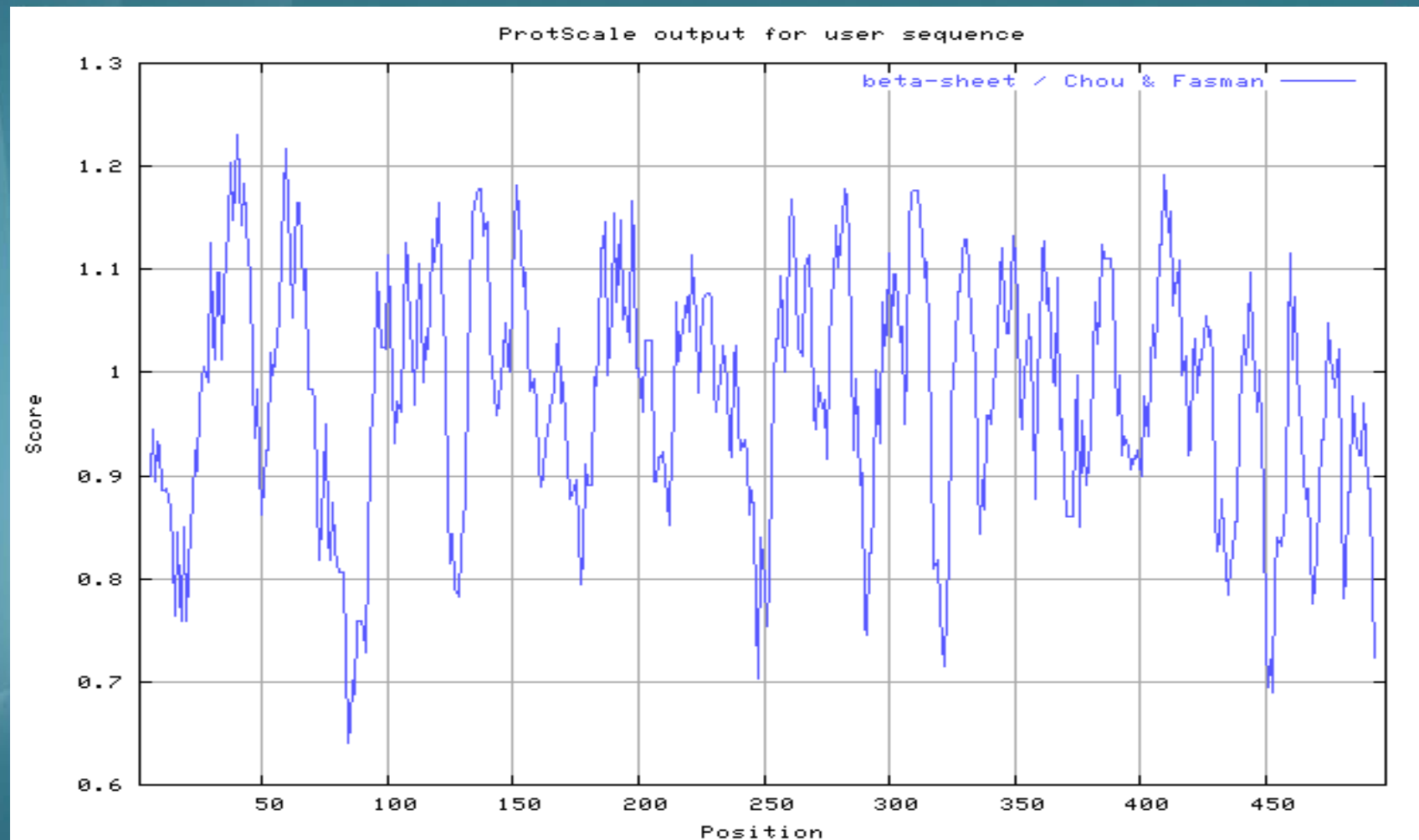
**Cohen**法预测转角等折叠类型，**Colied-coil**结构预测法用于预测跨膜蛋白的 $\alpha$ -螺旋结构，**Garnier-Robson**法是根据已知**3-D**结构蛋白的二面角参数和氢键网络来计算蛋白质中特定氨基酸残基形成的 $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、 $\beta$ -转角和卷曲的倾向性。

# $\alpha$ -螺旋的预测结果:

MIN: 0.769  
MAX: 1.297

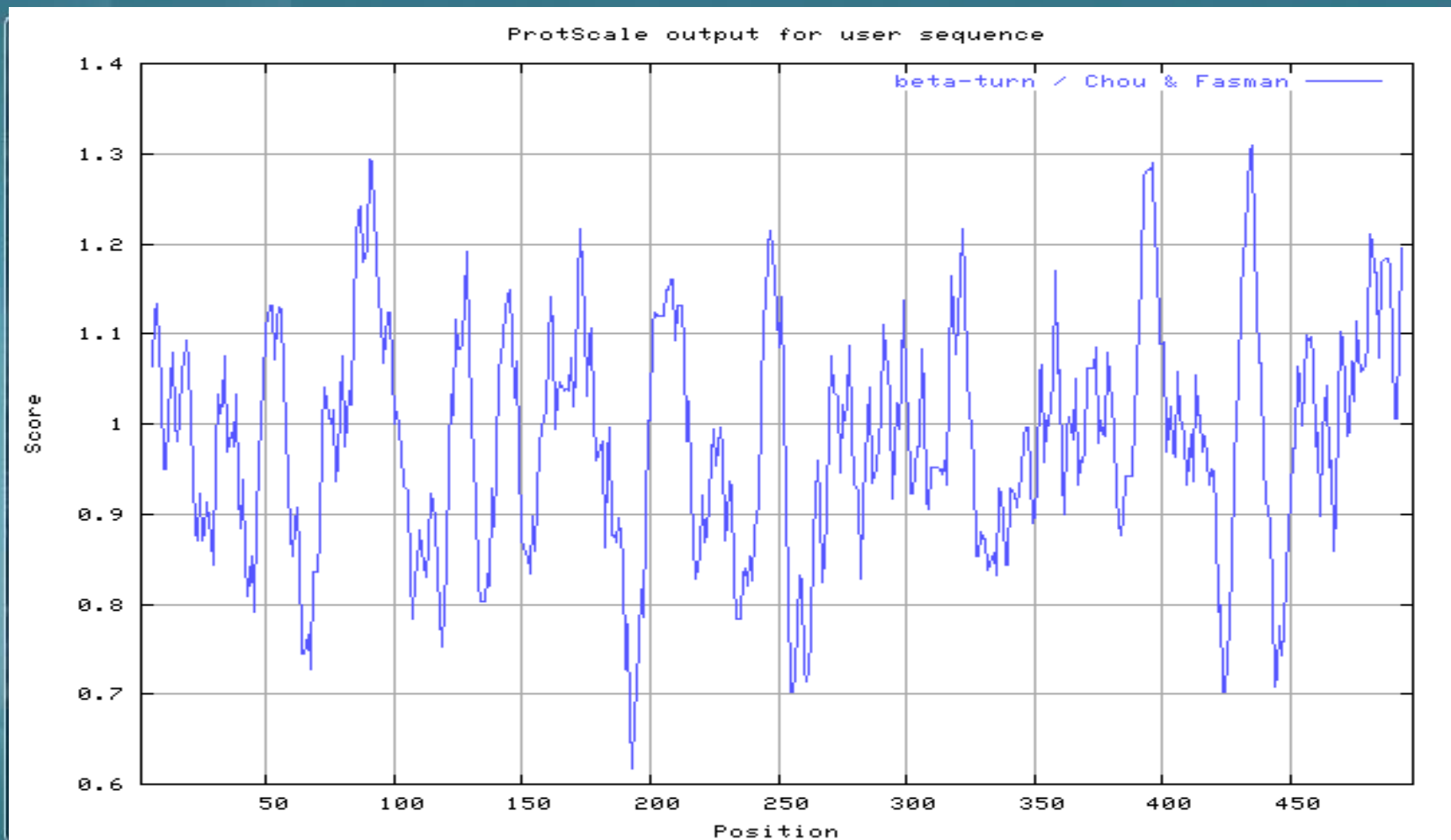


# $\beta$ -折叠的预测结果:





# $\beta$ -转角的预测方法:

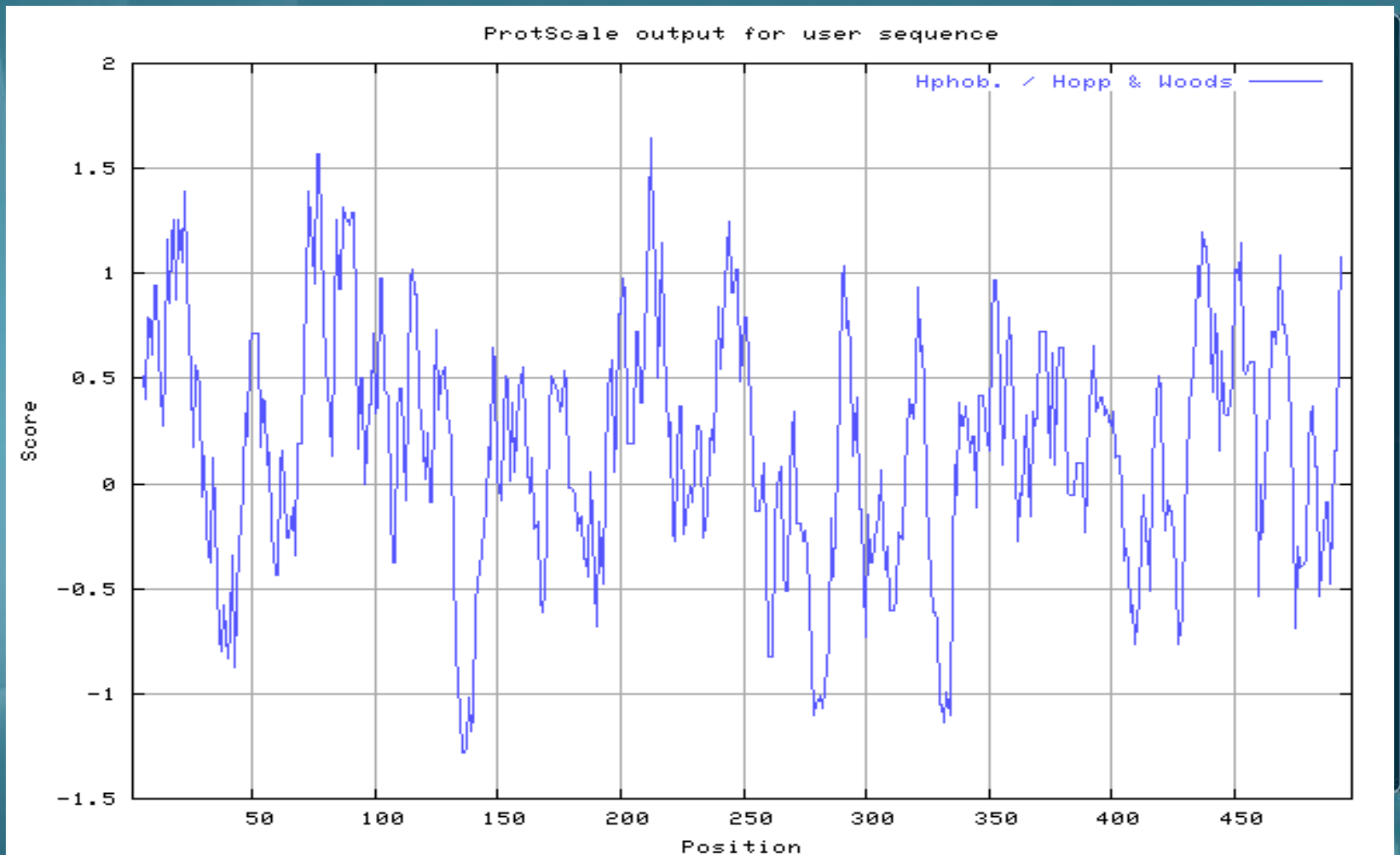


- **抗原表位的预测：**

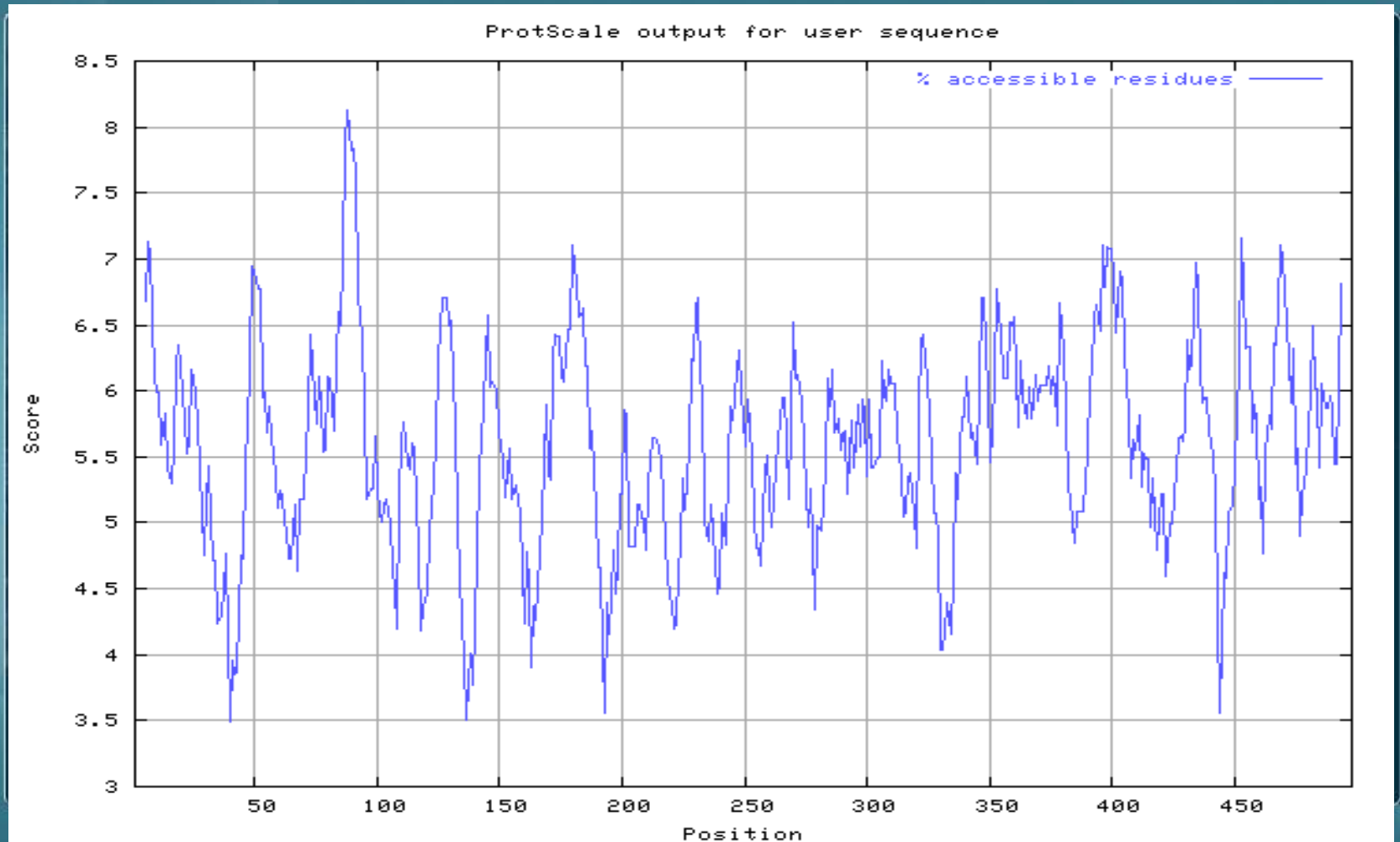
选择了Hopp&Woods亲水性、可及性参数、主链柔韧性参数、Welling抗原性参数、Grantham极性参数，综合考虑软件的集成性和运算速度，利用EXPASY网络数据库中的软件集成平台

<http://www.expasy.org/tools/protscale.html>进行B细胞表位预测。

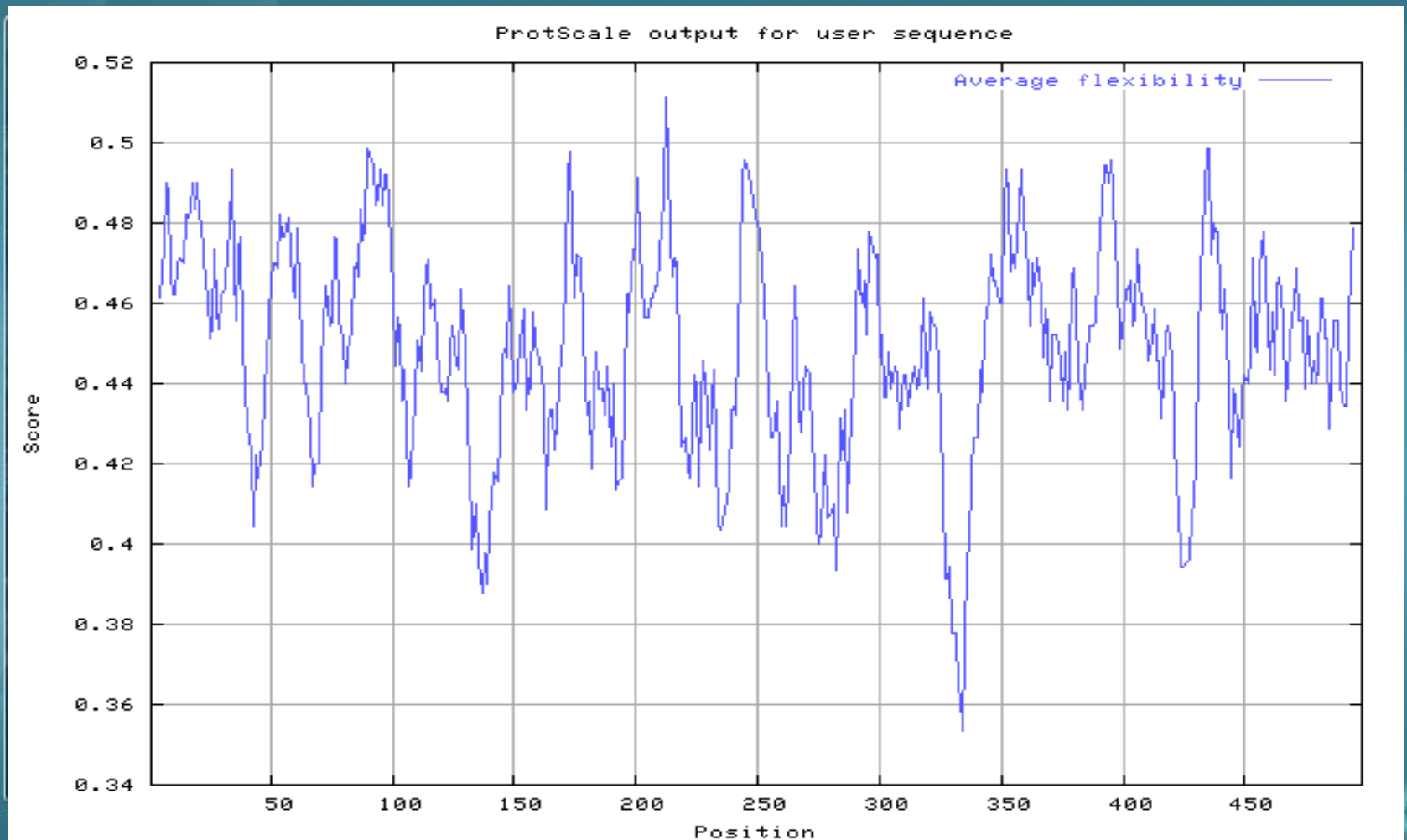
# 亲水性预测结果



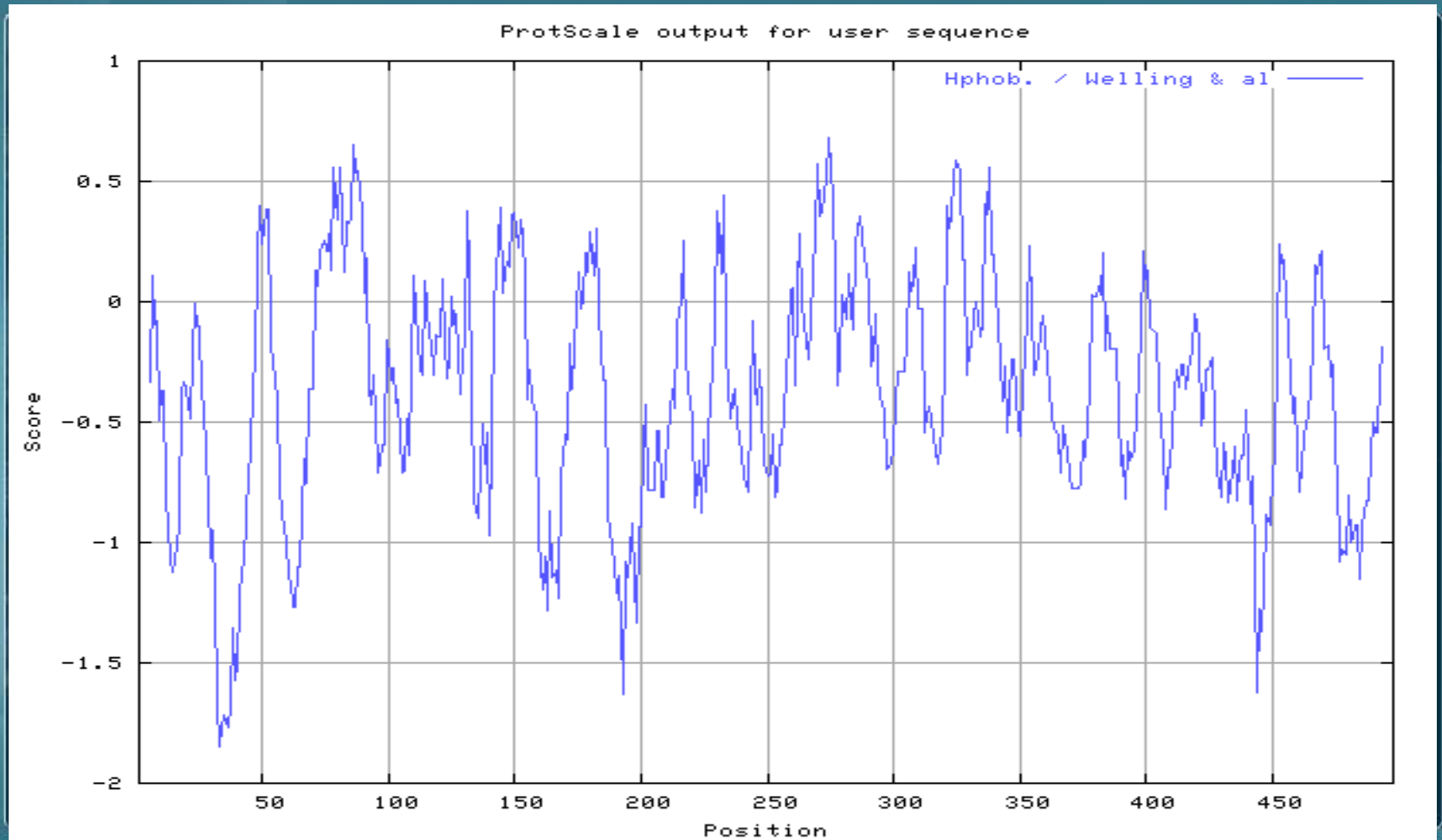
# 可及性预测结果



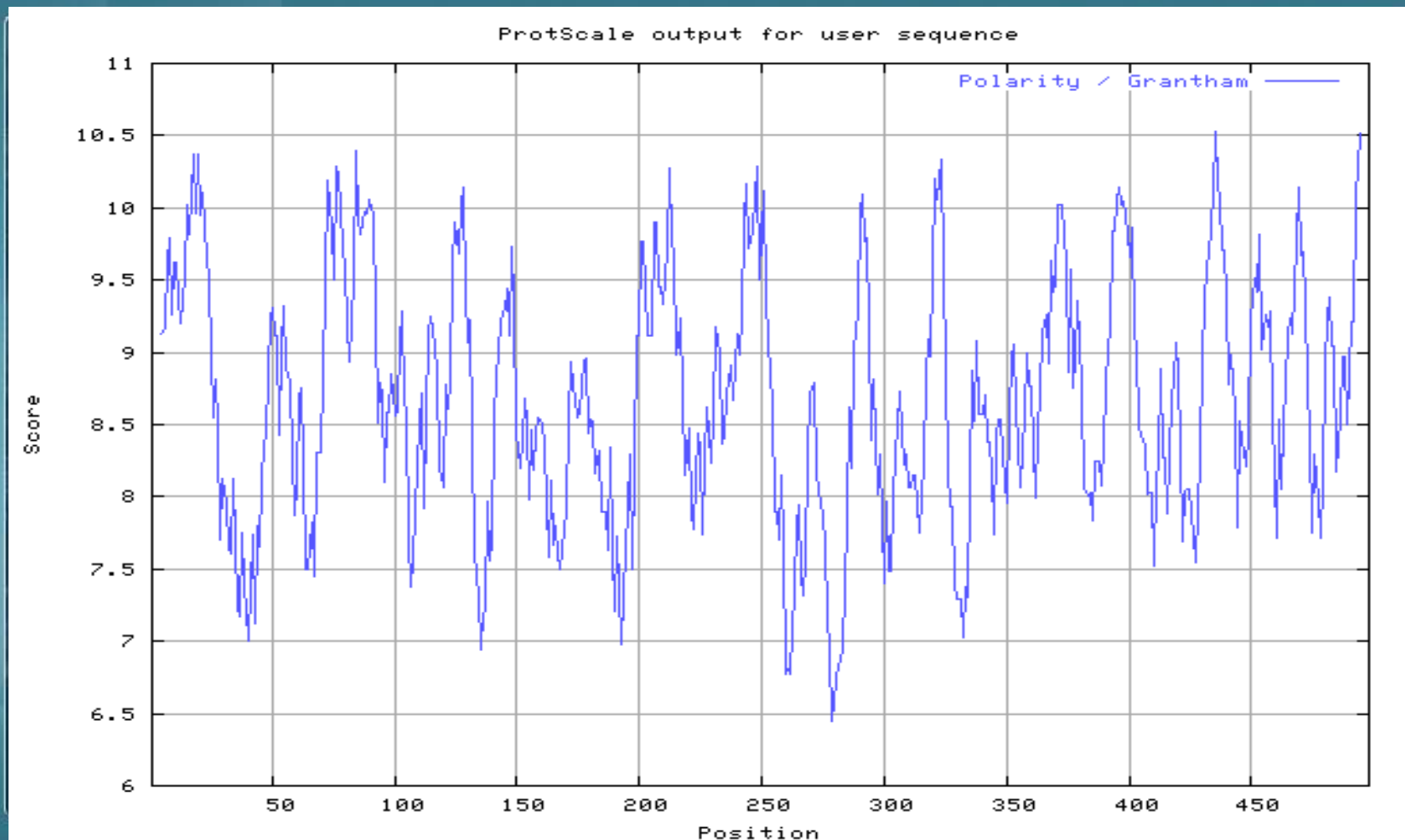
# 主链柔韧性预测结果



# Welling抗原性预测



# 极性预测结果

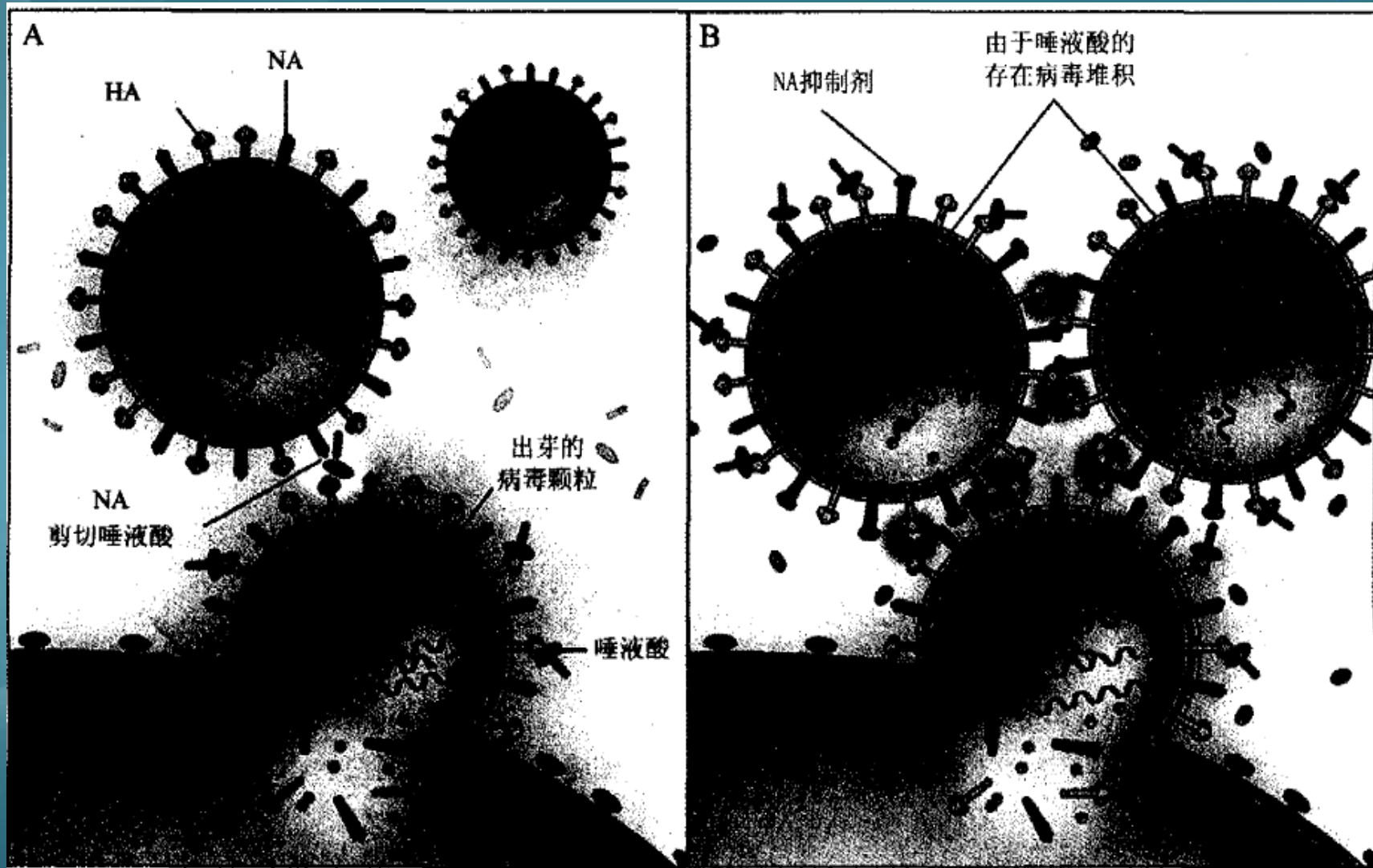


综上所述：

确定NP蛋白B细胞表位可能位于第5-8，  
17-22， 48-52， 75-81， 84-91， 244-248，  
393-401， 432-439， 468-471位氨基酸处。

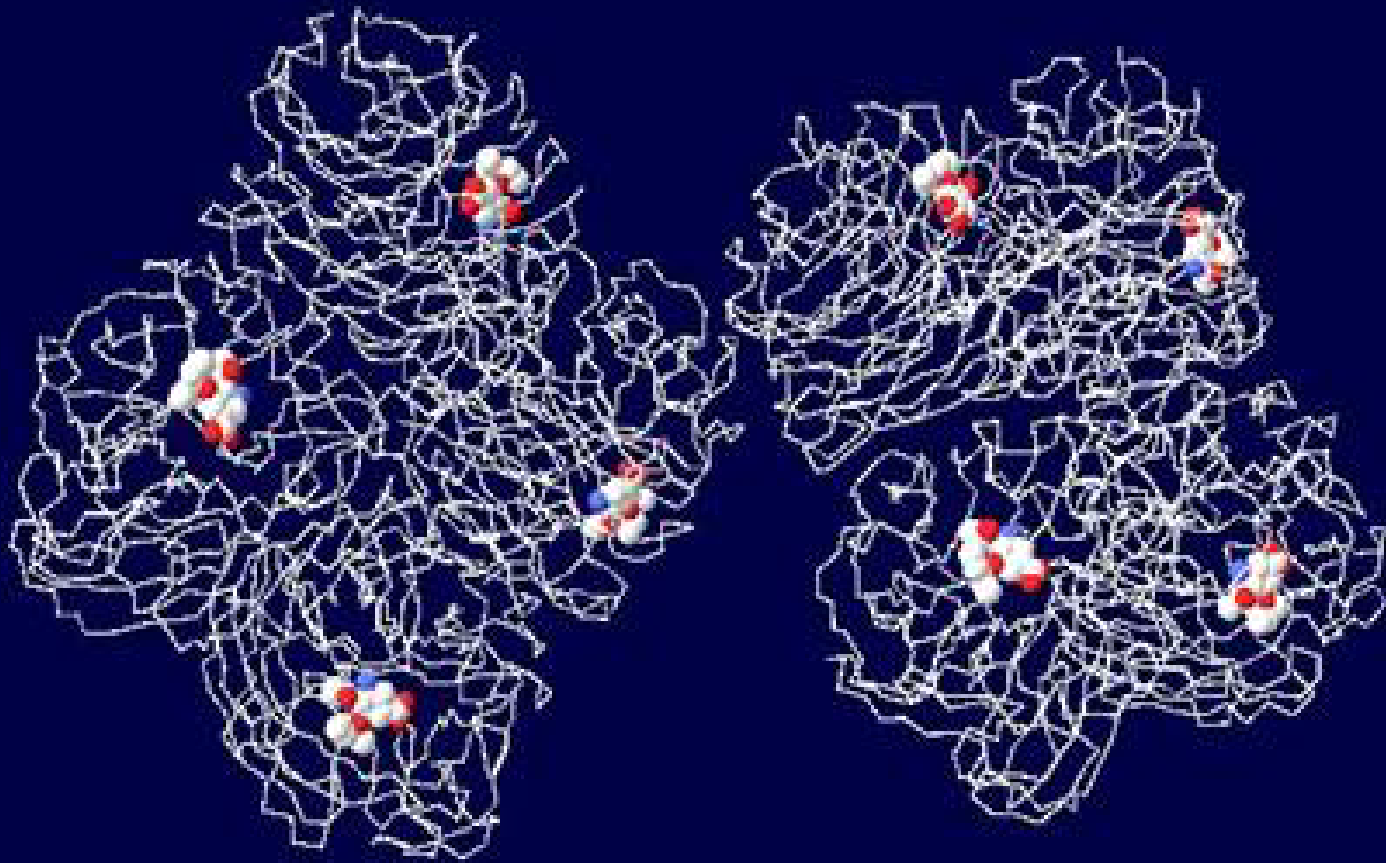


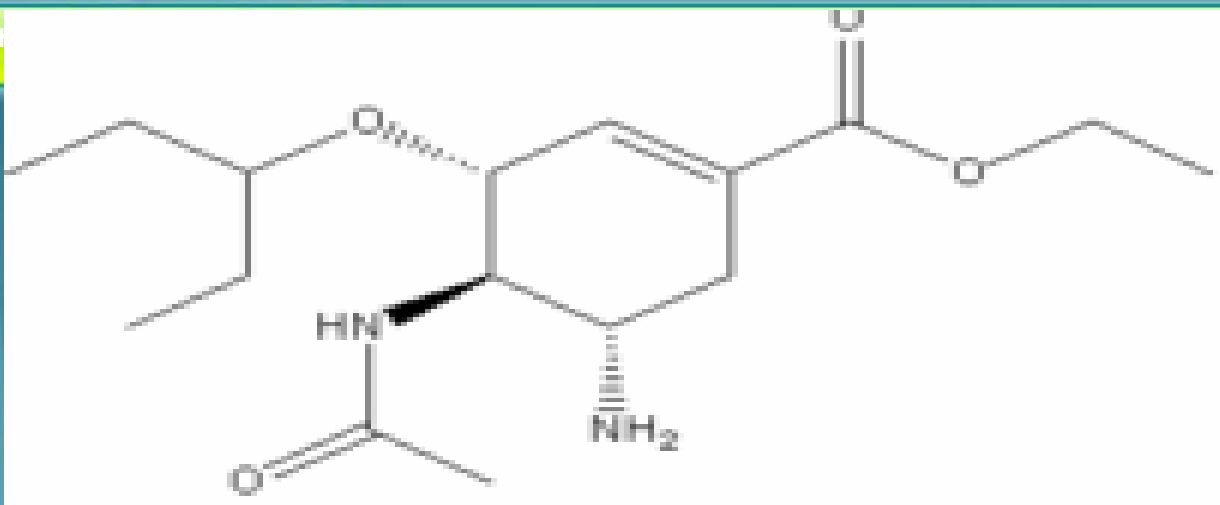
# 四、达菲的作用机理



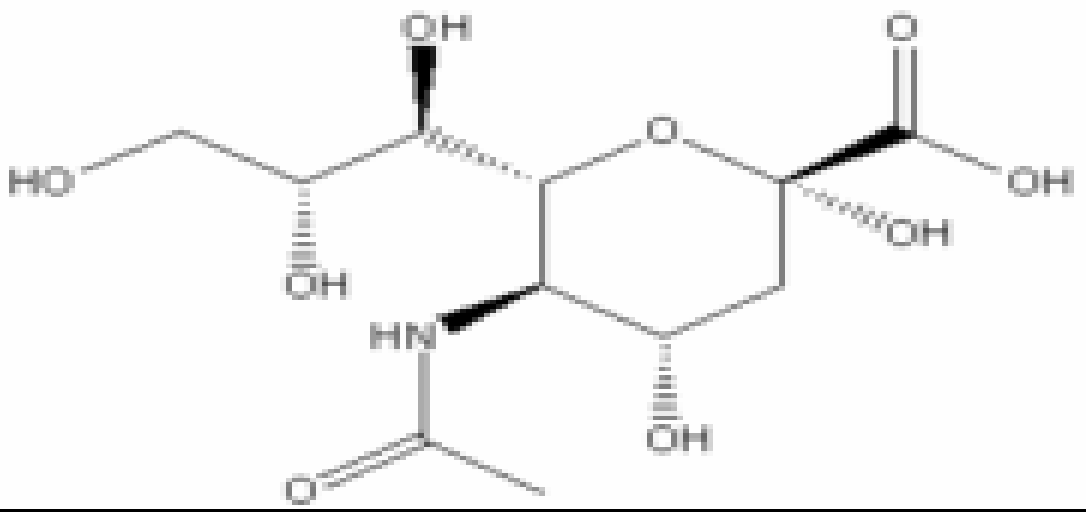
病毒正常出芽A和被神经氨酸酶抑制剂抑制的病毒出芽B对比

神经氨酸酶是病毒脱离宿主细胞时的关键酶，它的催化活性中心成“田”字形，作用底物是唾液酸。病毒通过切断唾液酸实现从宿主细胞脱离。

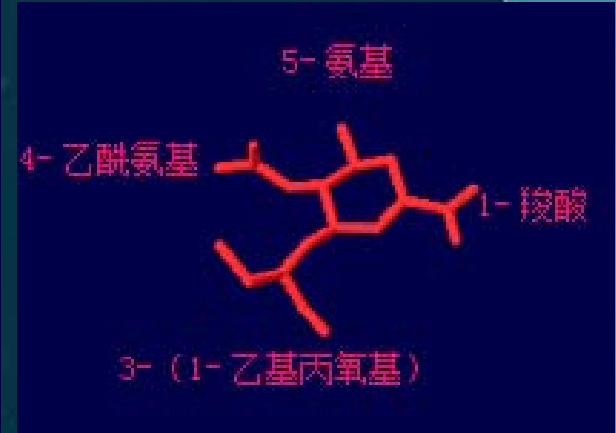
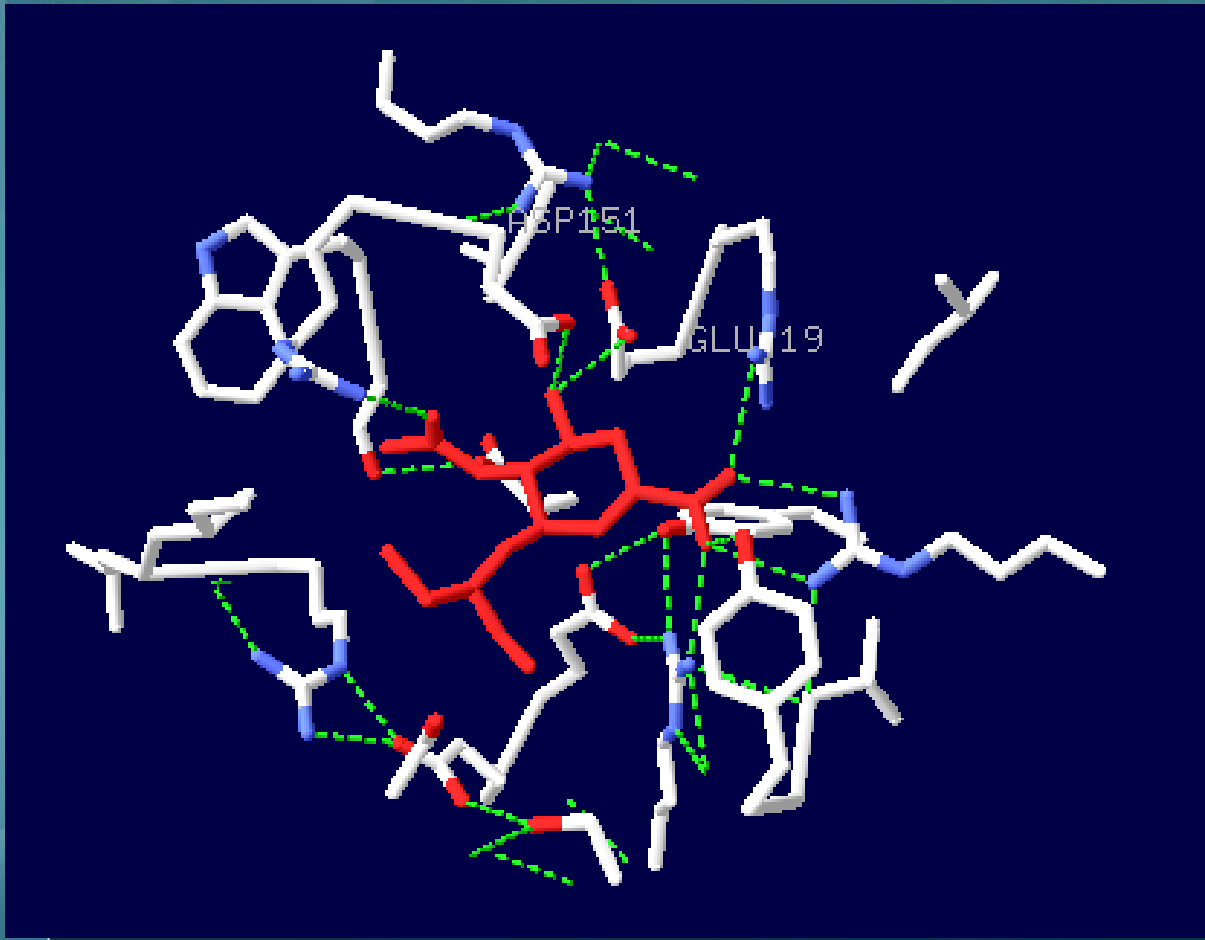


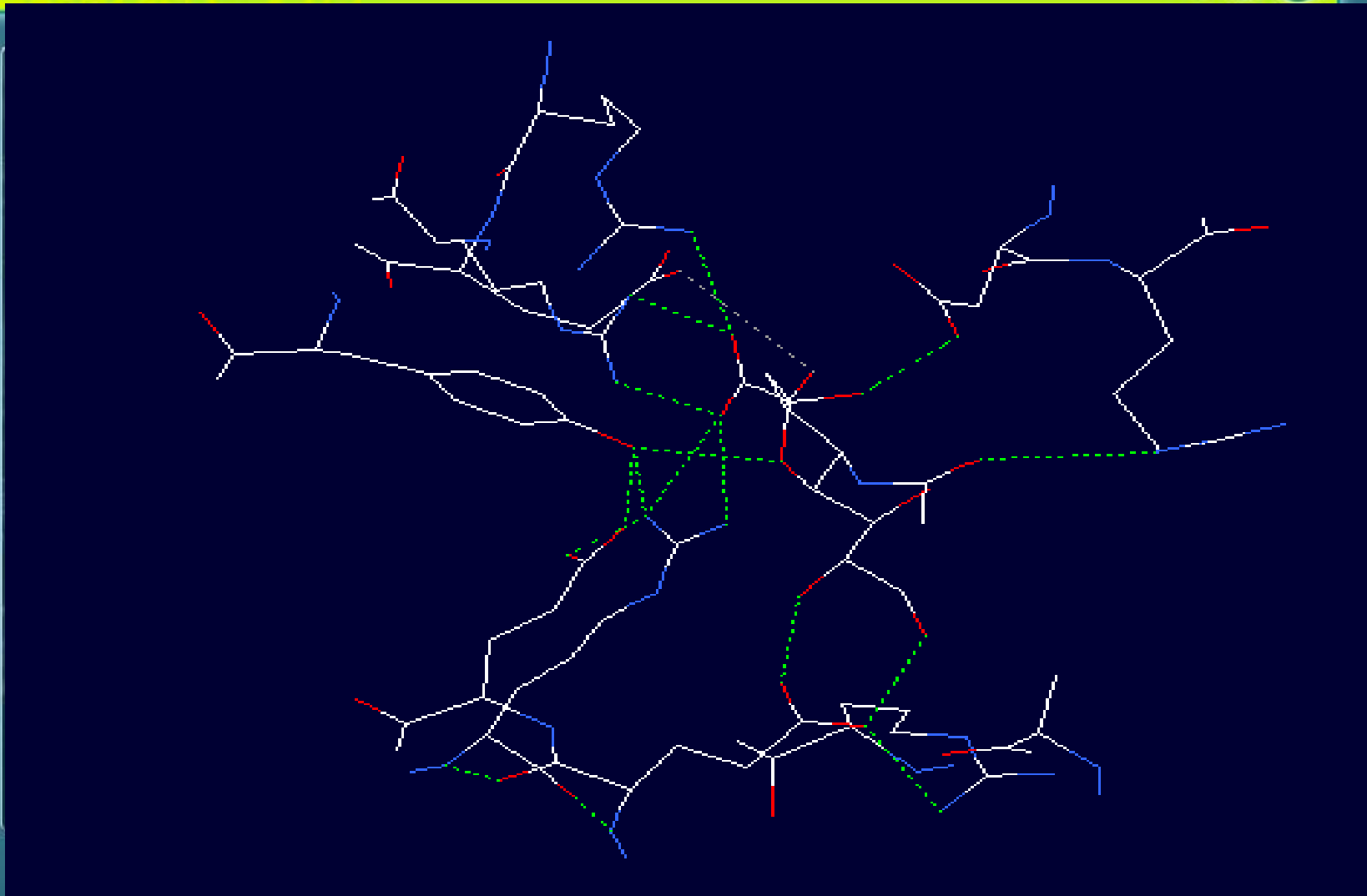


奥司他韦



噻液酸





# 致谢

- 感谢所有付出劳动的同学
- 感谢尊敬的罗老师