

H9N2 禽流感病毒陕西分离株 HA 基因的遗传变异分析

温肖会¹, 王晶钰¹, 王学艳¹, 熊浩山², 刘红彦¹

(1 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100; 2 四川省兽药监察所, 四川 成都 610041)

[摘要] **【目的】**对 H9N2 禽流感病毒 HA 基因全序列进行分析, 了解 H9N2 禽流感分离毒株 HA 基因的遗传变异情况。**【方法】**根据 GenBank 已发表的 H9N2 毒株的基因序列, 设计了 2 对 H9N2 禽流感病毒 HA 基因特异性引物, 运用 RT-PCR 方法对 XL、LF 和 WN 分离株进行了扩增, 然后将 PCR 产物送外进行测序, 用 DNASTAR 5.0 软件对测序结果进行了分析。**【结果】**XL、LF 和 WN 3 株 H9N2 分离株间 HA 基因的核苷酸同源性为 99.7%~99.9%, 推导氨基酸的同源性为 99.1%~99.6%; 分离株与参考毒株 HA 基因核苷酸的同源性为 96.2%~99.0%, 推导氨基酸的同源性为 96.2%~98.6%。通过对 3 个 H9N2 分离株间 HA 基因核苷酸序列的比较, 发现共有 5 个位点的核苷酸发生突变, 其中 4 个位点核苷酸的改变导致相应的氨基酸发生突变。HA 蛋白的 7 个受体结合位点比较保守, 但是其在 551~553 位缺失了潜在的糖基化位点。**【结论】**3 株 H9N2 分离株裂解位点氨基酸序列完全符合低致病性禽流感的特征 RSSR↓G, 但是 LF 裂解位点附近 333 位脯氨酸(Pro)突变为组氨酸(His), 即非极性氨基酸向极性带正电氨基酸(碱性氨基酸)转变, 裂解位点的变化可能是 H9N2 禽流感病毒生物学特性改变的分子基础。

[关键词] 禽流感病毒; H9N2; HA 基因; 遗传变异分析

[中图分类号] S858.352.65⁺9.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2009)04-0013-06

Genetic variation analysis of HA gene of H9N2 Avian Influenza Virus isolates from Shaanxi Province

WEN Xiao-hui¹, WANG Jing-yu¹, WANG Xue-yan¹, XIONG Hao-shan², LIU Hong-yan¹

(1 College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Sichuan Province Institute of Veterinary Drug Control, Chengdu, Sichuan 610041, China)

Abstract: **【Objective】**The study investigated the genetic variation of H9N2 Avian Influenza Virus (AIV) isolates. **【Method】**According to the nucleotide sequences of HA gene of H9N2 AIV, two pairs of primer were synthesized and used to amplify the HA gene of XL, LF and WN isolates by RT-PCR using genome RNA as template. The three products of PCR were sequenced, then the three sequences were analysed by using software of DNASTAR 5.0. **【Result】**Results showed that nucleotide homology of HA gene among the three isolates were at the range of 99.7%—99.9%, and amino acid homology was 99.1%—99.6%. The nucleotide homology and amino acid homology between isolated strains and the reference strains were 96.2%—99.0% and 96.2%—98.6% respectively. In comparison, five nucleotide sites mutated, of which four nucleotide site variations led to the mutation of corresponding amino acid sequences. Seven receptor binding sites of HA protein were comparatively conservative, while potential glycosylation sites were deleted in 551—553 amino acids. **【Conclusion】**The amino acid sequences at the three H9N2 isolates cleavage

* [收稿日期] 2008-05-27

[基金项目] 陕西省科技攻关项目(2006K02-G11)

[作者简介] 温肖会(1982—), 女, 河南安阳人, 在读硕士, 主要从事动物传染病学研究。

[通信作者] 王晶钰(1964—), 男, 陕西乾县人, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事预防兽医学研究。

E-mail: wjingyu2004@126.com

sites were completely constant with the unique rule of mildly pathogenic avian influenza—RSSR↓G. The 333 amino acid (Proline) near the LF cleavage site turned into Histidine. Therefore, the alteration from nonpolar amino acid to electropositive polar amino acid and variation of cleavage sites may be the molecular basis of biological characteristics variation of H9N2 AIV isolates.

Key words: Avian influenza virus(AIV); H9N2; HA gene; genetic variation analysis

H9N2 禽流感病毒为分布广泛的中低致病力毒株,可引起宿主的免疫抑制,并且可与其他病原微生物协同作用导致鸡群生长缓慢、产蛋量下降,因而给养禽业造成了巨大的经济损失^[1]。我国大陆自 1994 年首次分离到 H9N2 亚型禽流感病毒以来,先后从不同地区分离到多株相同亚型的禽流感病毒^[2]。1999 年以来,H9N2 亚型禽流感病毒感染人事件的多次发生^[3-4],使其公共卫生意义引起了全世界的广泛关注,对该亚型病毒的研究也因之取得了较快的进展^[5]。2002 年,曹维伟等^[6]从陕西地区疑似流感发病鸡中分离到 4 株流感病毒,对其中 1 株(A/Chicken/Shaanxi/3/2002(H9N2))的 HA 和 NA 进行了克隆和测序,并与 GenBank 收录的其他流感 H9N2 亚型的相关基因进行了比较,氨基酸进化树分析结果显示,A Chicken/Shaanxi/3/2002(H9N2)与 A/Chicken/Hong Kong/CSW153/03(H9N2)的亲缘关系最近,两者形成独立的分支。因为 HA 基因是流感病毒囊膜纤突的主要成分之一,是基因表达产物中最大的糖蛋白,也是诱生保护性免疫的主要抗原。HA 蛋白可与细胞表面病毒特异性受体结合,能介导病毒外膜与细胞内小体膜融合释放病毒核衣壳进入胞浆,并可刺激机体产生中和性抗体等^[7],故选用 HA 基因分析 H9N2 禽流感病毒的遗传背景及其遗传变异情况,可得到较为可靠的分析结果。为此,本实验室对 2003~2008 年从陕西省发病鸡群中分离到的 XL、LF、WN 3 株 H9N2 禽流感病毒进行了 HA 基因扩增和序列比较分析,以期了解 2003 年以来陕西省 H9N2 禽流感病毒的遗传变异情况,进而为我国禽流感防治策略的制定提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒和鸡胚 H9N2 禽流感病毒 LF(A/Chicken/shaanxi/03/2003)株、XL(A/Chicken/Shaanxi/03/2007)株和 WN(A/Chicken/shaanxi/01/2008)株,由西北农林科技大学畜禽重大疫病防治与畜产品安全实验室保存,2003~2008 年从陕西

省不同地区的发病鸡群中分离、鉴定获得。10 日龄 SPF 鸡胚,由杨凌绿方生物工程有限公司提供。

1.1.2 标准抗原及阳性血清 禽流感 H5、H9 亚型 HA 抗原(批号为 070910)和禽流感 H5、H9 亚型阳性血清(批号为 070910),由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所生产,陕西省畜牧兽医总站提供。新城疫标准抗原和阳性血清(批号为 070821),购自中国兽医药品监察所。

1.1.3 主要试剂和工具酶 Trizol Reagent,购自 Invitrogen 公司;AMV 反转录酶、Rnase-Inibitor、Taq DNA 聚合酶、dNTPs 等,购自宝生物(大连)工程有限公司;DNA 胶回收试剂盒和质粒小提试剂盒,购自北京百泰克生物技术有限公司;无水乙醇、异丙醇、氯仿等均为分析纯。

1.2 病毒增殖

取适量稀释度的种毒接种 10 日龄 SPF 鸡胚,每胚尿囊腔接种 0.1 mL,于 37℃ 孵化 72 h,弃去 24 h 内的死亡胚,收集 24~72 h 内死亡胚及 72 h 存活胚的尿囊液,置 4℃ 过夜后无菌收集鸡胚羊水和尿囊液,测定血凝价。

1.3 PCR 引物的设计与合成

根据 GenBank 已发表的 H9N2 毒株(登录号:EU086284、EU365371、DQ064369、DQ064354)的基因序列,用 Primer 5.0 软件设计 2 对 H9N2 的 HA 基因特异性引物,分别用于 HA 基因 Sequence 1 和 Sequence 2 的扩增。预期扩增产物片段长度分别为 849 和 888 bp。引物序列如下:

Sequence 1 引物:

S1P1: 5'-AGCAGGGGATTTTCACAACCAC-3'; S1P2: 5'-TCCGTGGCTCTCTCCTGAAAG-3'。

Sequence 2 引物:

S2P1: 5'-TCTTTTCAGGAGAGAGCCACGG-3'; S2P2: 5'-GCCAATTATATACAAATGTTG-CATCTG-3'。

以上引物均由上海生物工程有限公司合成。

1.4 H9N2 分离株病毒 RNA 的提取

按 Invitrogen 公司的 Trizol Reagent 试剂盒操作说明书,提取病毒基因组 RNA。

1.5 H9N2 分离株 HA 基因的 cDNA 合成

取溶于 DEPC 处理水中的 H9N2 分离株病毒 RNA 样品 11.5 μL , 加入上游引物 0.5 μL , 70 $^{\circ}\text{C}$ 持续 5 min, 冰浴 5 min; 再加入 10 $\times$ RT-PCR 缓冲液 4 μL , dNTPs (10 mmol/L) 2 μL , RNA 酶抑制剂 1 μL , AMV 反转录酶 1 μL , 置于 PCR 仪中进行 cDNA 合成, 以 42 $^{\circ}\text{C}$ 60 min、72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min 的程序进行 1 个循环, 结束 cDNA 合成后, 进入 PCR 扩增。

1.6 H9N2 分离株 HA 基因的扩增

PCR 反应体系 100 μL : 在 PCR 反应管中分别加入 cDNA 4 μL , 上、下游引物 (100 pmol/ μL) 各 1 μL , 5 $\times$ PCR Buffer 10 μL , dNTPs (10 mmol/L) 2 μL , Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μL) 0.5 μL , 灭菌超纯水加至 100 μL , 置于 PCR 仪中进行 PCR 扩增。PCR 反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 共进行 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。取 PCR 产物 5 μL , 用 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳观察结果。

1.7 H9N2 分离株 HA 基因 PCR 产物的纯化及序列测定

取 PCR 产物 50 μL 于 12 g/L 琼脂糖凝胶上电泳, 切下目的条带, 然后按凝胶回收试剂盒操作说明纯化回收 PCR 产物。将获得的纯化 PCR 产物送上海生物工程有限公司进行测序。

1.8 H9N2 分离株 HA 基因的序列分析

用 DNASTAR 5.0 软件对 3 株 H9N2 分离株的 HA 基因序列与 GenBank 上所公布的 22 个国内外 H9N2 禽流感毒株的 HA 基因序列进行比较和分析, 并绘制系统发育树。22 株参考毒株分别为: A/Chicken/Beijing/1/94 (AF156380), 简称为 BJ94; A/Chicken/Beijing/8/98 (DQ064354), 简称为 BJ98; A/Quail/Hong Kong/G1/97 (AF156378), 简称为 HKG1; A/Bird/Guangxi/A1/2006 (EU086284), 简称为 GX06; A/Chicken/Henan/98 (AF536696), 简称为 HN98; A/Chicken/Henan/43/02 (DQ064369), 简称为 HN02; A/Chicken/Heilongjiang/48/01 (DQ064367), 简称为 HLJ01; A/Chicken/Yunnan/1/99 (AF461528), 简称为 YN99; A/Chicken/Yunnan/Chuxiong2/2007 (EU216082), 简称为 YN07; A/Chicken/Hubei/C1/2007 (EU365371), 简称为 HuB07; A/Duck/Nanjing/01/1999 (DQ681221), 简称为 NJ99; A/Chicken/Ningxia/4/99 (DQ064375), 简称为 NX99; A/Duck/Zhejiang/03/2001 (DQ681207), 简称为 ZJ01; A/Chicken/Shanghai/F/98 (AY743216) 简称为

SH98; A/Chicken/Shanghai/1/02 (AY281745), 简称为 SH02; A/Chicken/Hebei/L1/2006 (EU573941), 简称为 HB06; A/Chicken/Gansu/2/99 (EF070733), 简称为 GS99; A/Chicken/Dubai/338/2001 (EF063513), 简称为 DB01; A/Chicken/Korea/01310/2001 (EU253561), 简称为 Korea01; A/Chicken/Iran/TH186/2007 (EU477245), 简称为 Iran07; A/Chicken/Israel/1953/2004 (EF501983), 简称为 Israel04; A/Chicken/Yokohama/aq144/2001 (AB256746), 简称为 Yokohama01。

2 结果与分析

2.1 3 株 H9N2 分离株 HA 基因的 RT-PCR 扩增

由图 1 可见, XL、LF 和 WN 3 株 H9N2 分离株经 RT-PCR 扩增后, 分别获得了大小约为 849 和 888 bp 的扩增片段, 与预期结果相符。

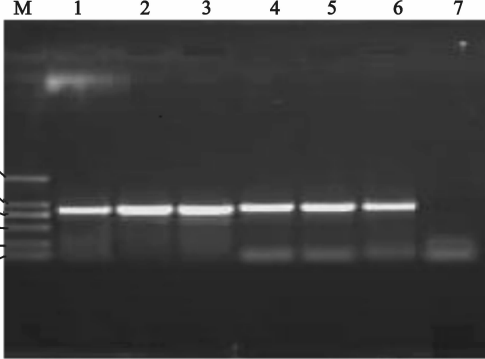


图 1 3 株 H9N2 AIV 陕西分离株 HA 基因的 RT-PCR 扩增

M. DNA Marker 2000; 1, 4. LF; 2, 5. WN; 3, 6. XL; 7. 空白对照; 1~3. Sequence 1; 4~6. Sequence 2

Fig. 1 Electropherogram of RT-PCR of HA gene of three H9N2 AIV isolates from Shaanxi Province

M. DL2000; 1, 4. LF; 2, 5. WN; 3, 6. XL; 7. Control; 1—3. Sequence 1; 4—6. Sequence 2

2.2 3 株 H9N2 分离株 HA 基因的序列分析

3 株 H9N2 分离株 Sequence 1 和 Sequence 2 核苷酸序列长度分别为 849 和 888 bp, 与预期相符, 其分别位于 HA 基因的 7~855 bp 和 834~1 721 bp。各分离株 HA 基因序列经拼接整理后, 长度均为 1 715 bp, 包含了 1 个完整的阅读框架 (ORF), 共编码 560 个氨基酸。提交 NCBI BLAST 进行检索, 经鉴定其为 H9N2 HA 基因序列片段。

2.2.1 核苷酸序列及推导的氨基酸序列同源性的分析

由表 1 可见, 3 株 H9N2 分离株间 HA 基因核苷酸的同源性为 99.7%~99.9%, 推导氨基酸同

源性为 99.1%~99.6%;3 株 H9N2 分离株与来源于同一支系部分参考毒株 HA 基因的核苷酸同源性为 96.2%~99.0%,推导氨基酸的同源性为 96.2%~98.6%。

表 1 3 株 H9N2 分离株与同源的 4 株 H9N2 AIV HA 基因核苷酸及推导氨基酸的同源性比较

Table 1 Comparison of nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of HA gene between three H9N2 AIV isolates and homologous four H9N2 AIV reference strains							%
毒株 Strain	WN	XL	LF	HN98	GX06	BJ98	BJ94
WN		99.9	99.8	99.0	98.5	99.0	96.4
XL	99.6		99.7	98.8	98.4	98.8	96.3
LF	99.5	99.1		98.8	98.4	98.8	96.2
HN98	98.0	97.7	97.5		98.2	99.4	96.2
GX06	98.6	98.2	98.0	97.7		98.1	95.9
BJ98	98.2	97.9	97.7	98.8	97.5		96.0
BJ94	96.7	96.4	96.2	95.8	96.7	95.7	

注:表中右上部分为 HA 基因核苷酸序列的同源性,左下部分为 HA 基因氨基酸序列的同源性。
Note:Up - right stands for nucleotide heterology of HA genes,down - left stands for amino acid heterology of HA genes.

2.2.2 核苷酸序列及推导的氨基酸序列的差异性分析 由表 2 可知,对 3 株 H9N2 分离株 HA 基因完整的 ORF 分析发现,核苷酸序列的差异表现在 5 个位点上的变化,同时推导氨基酸序列的差异表现在 4 个位点上的变化,其变化特点为散在的点突变。

表 2 3 株 H9N2 AIV HA 基因核苷酸与推导的氨基酸差异性比较

Table 2 Variability of nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of HA gene among three H9N2 AIV isolates									
毒株 Stain	核苷酸 Nucleotide					氨基酸 Aminoacid			
	899	998	1 018	1 103	1 579	333	340	368	527
LF	G	A	A	A	T	H	I	Q	F
XL	T	C	C	G	A	P	L	K	I
WN	G	C	C	C	A	P	L	Q	I

2.2.3 关键位点的序列比较 禽流感病毒 H9N2 的 HA 基因在 109,161,163,191,198,202,203 和 146~150 及 232~237 位构成了受体结合位点的袋状结构,这些位点的氨基酸均相当保守^[8-9]。从表 3 可以看出,3 株 H9N2 分离株 HA 基因的 7 个受体结合位点均未发生改变,但其在 551~553 位缺失潜在的糖基化位点,这可能对 HA 基因的加工成熟有一定影响。LF、WN 和 XL 株裂解位点氨基酸序列完全符合低致病性禽流感的特征 RSSR↓G,但是 LF 株裂解位点附近有 2 位氨基酸发生了突变,其一是 333 位的脯氨酸(Pro)突变为组氨酸(His),即由非极性氨基酸向极性带正电氨基酸(碱性氨基酸)转变,这有可能是 LF 株生物学特性改变的分子依据;其二是 340 位的亮氨酸(Leu)突变为异亮氨酸(Ile),二者同属于非极性氨基酸,因而其可能是无意义突变。

表 3 3 株 H9N2 分离株与同源 4 株 H9N2 AIV HA 基因序列关键位点的比较

Table 3 Comparison of several key sites of HA gene sequences between three H9N2 AIV isolates and homologous four H9N2 AIV reference strains														
毒株 Stain	受体结合位点 Receptor-binding site							潜在糖基化位点 Potential glycosylation sites						
	a	b	c	d	e	f	g	1	2	3	4	5	6	7
WN	Y	W	T	N	V	L	Y	NST	NVS	NRT	NTT	NVS	NGT	PARSSRGLF
LF	Y	W	T	N	V	L	Y	NST	NVS	NRT	NTT	NVS	NGT	HARSSRGIF
XL	Y	W	T	N	V	L	Y	NST	NVS	NRT	NTT	NVS	NGT	PARSSRGLF
BJ94	Y	W	T	N	V	L	Y	NST	NVT	NRT	NTT	NVS	NGT	NGS
BJ98	Y	W	T	N	V	L	Y	NST	NVS	NRT	NTT	NVS	NGT	PARSSRGLF
HN98	Y	W	T	N	V	L	Y	NST	NVS	NRT	NTT	NVS	NGT	NGS
GX06	Y	W	T	N	V	L	Y	NST	NVS	NRT	NTT	NVS	NGT	NGS

注:受体结合位点:a(109aa),b(161aa),c(163aa),d(191aa),e(198aa),f(202aa),g(203aa);糖基化位点:1(29~31aa),2(141~143aa),3(218~220aa),4(298~300aa),5(305~307aa),6(492~494aa),7(551~553aa)。
Note: Receptor-binding sites,their locations are;a (109aa),b(161aa),c(163aa),d(191aa),e(198aa),f(202aa),g(203aa);Potential glycoylation sites,their locations are;1(29-31aa),2(141-143aa),3(218-220aa),4(298-300aa),5(305-307aa),6(492-494aa),7(551-553aa)。

2.2.4 系统发生进化关系分析 对 3 株 H9N2 AIV 分离株与 22 株 H9N2 参考毒株的 HA 基因序列进行分析,并运用 DNASTar 5.0 软件绘制 HA 基

因的系统发育树。由图 2 可知,3 株 H9N2 AIV 分离株与北京和河南 1998 年分离毒株的遗传距离最近。

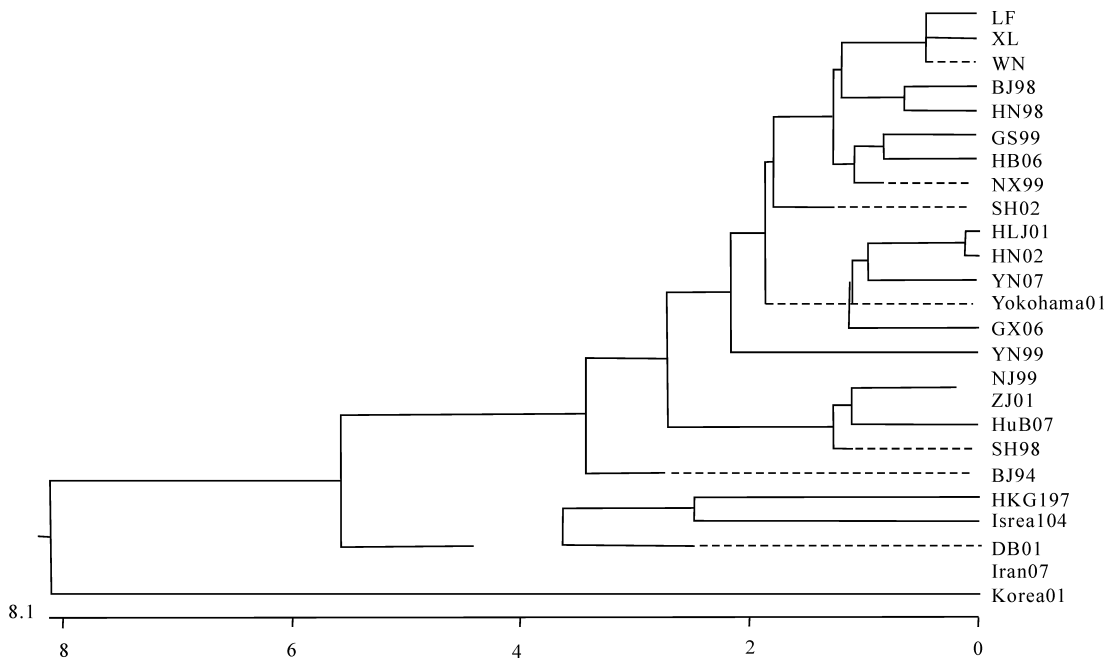


图 2 3 株 H9N2 AIV 分离株与 22 个参考毒株 HA 基因氨基酸序列的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of amino acid of HA genes of three H9N2 AIV isolates and reference strains

3 讨 论

1)Guo 等^[10]认为,目前的 H9 AIV 可分为北美和欧亚 2 大分支,而欧亚分支又可以分为 3 个亚分支,分别为类 A/Chicken/Beijing/1/94、类 A/Quail/Hong Kong/G1/97 和类 A/Chicken/Korea/01310/2001。本研究获得的 3 株 H9N2 AIV 分离株同属于第 2 谱系的第 3 亚系,属于欧亚分支中的类 A/ Chicken/ Beijing/ 1/ 94 亚分支,目前我国大多数分离株均属于此亚分支。本研究的 3 株分离毒株与参考毒株 A/Chicken/Beijing/8/98 和 A/Chicken/Henan/98 属于同一分支,遗传距离最近,与参考毒株 A/Chicken/Gansu/2/99、A/Chicken/Ningxia/4/99 和 A/Chicken/Hebei/L1/2006 的遗传距离也较近。

2)AIV HA 基因的潜在糖基化位点是影响毒力的重要因素之一。潜在的糖基化位点可通过两种方式影响 AIV 的毒力:一种是受体结合位点的糖基化会影响 AIV 和宿主细胞的结合水平。Perdue 等^[11]研究发现,毒株 A/CK/Victoria/75(H7N3)的受体结合位点附近存在的 1 个糖基与其毒力直接相

关,在这种病毒群体中只要有 1% 毒株的结合位点是糖基化的,则其毒力就会明显增强。1 株香港来源的毒株正是由于其受体位点附近 156 位氨基酸的糖基化而使其具有较强的毒性^[12]。另有学者认为,受体上的糖基不仅能增强 AIV 的毒力,而且与提高 AIV 在鸡上的适应性密切相关^[13]。另一种方式是裂解位点附近的糖基化位点还可能影响到蛋白酶对 HA 基因前体蛋白的裂解,裂解位点附近糖链的存在干扰了泛在性蛋白酶进入裂解位点,一旦发生糖基化作用,该病毒的毒力就可能增强^[14]。本研究 3 株 H9N2 分离株的 HA 基因包含有 6 个潜在的糖基化位点,与 A/Chicken/Beijing/8/98 株一样,其在 553 位发生了突变,即丝氨酸(Ser)→脯氨酸(Pro),使得 NGS→NGP,也就是说其在此处失去了 1 个潜在的糖基化位点,这可能对 HA 基因蛋白的加工成熟有一定的影响。

3)AIV 毒株毒力的强弱主要体现在 HA 基因裂解位点的变化上。Perdue 等^[15]根据 AIV 的毒力决定机制,对低致病性的 AIV 毒力进化提出了一个假说,认为低致病性的 AIV 在满足 3 个条件时,就可通过裂解位点的插入突变而演化为高致病性的

AIV。这 3 个条件分别是:①插入的核苷酸必须都是嘌呤核苷酸;②插入的核苷酸是以三核苷酸为基本单位而形成的重复序列,并以六核苷酸和九核苷酸为佳;③在 RNA 的有义链上,紧邻裂解位点 5'端的应是 1 个 RNA 二级结构相对稳定的区域。郭霄峰等^[16]对 KMI/99(H9N2)HA 进行的序列分析发现,其切割位点附近氨基酸的组成是 RSSR↓G(S-丝氨酸),符合低致病力毒株的分子特征,与高致病力毒株的分子特征 RXR/ KR↓G(X 为非碱性氨基酸)相似。从核苷酸组成分析,S 与 R 仅有 1 个碱基的差异,即 AGU(AGC)→AGA(AGG)。由此可以推测,H9N2 亚型禽流感病毒在其切割位点附近有可能进一步获得碱性氨基酸,其毒力有增强的迹象。3 个 H9N2 AIV 分离株 LF、WN 和 XL 裂解位点的氨基酸序列符合低致病性禽流感的特征 RSSR↓G,但是 LF 株裂解位点附近有 2 位氨基酸发生了突变,333 位 Pro 突变为 His,即非极性氨基酸向碱性氨基酸转变,这是 LF 株生物学特性改变的分子依据。

[参考文献]

- [1] 甘孟侯. 禽流感 [M]. 2 版. 北京:中国农业出版社,2002.
Gan M H. Avian Influenza [M]. 2nd edition. Beijing: Agricultural Press of China,2002. (in Chinese)
- [2] 石火英,孙 蕾,陈素娟,等. H9N2 亚型禽流感病毒复制特性的基因分析 [J]. 畜牧兽医学报,2008,39(2):189-194.
Shi H Y,Sun L,Chen S J,et al. Analysis of genes affecting the replication property of H9N2 avian influenza viruses [J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Science,2008,39(2):189-194. (in Chinese)
- [3] 宋晓峰,韩 平,黄凤玲. H9N2 亚型禽流感病毒 HA 基因氨基酸位点分析 [J]. 计算机与应用化学,2008,25(1):85-89.
Song X F,Han P,Huang F L. Amino acid sites analysis of H9N2 subtype avian influenza viruses HA gene in China [J]. Computers and Applied Chemistry, 2008,25(1):85-89. (in Chinese)
- [4] 郭元吉,谢健屏,吴昆昱,等. 流感病毒 A/广州/333/99(H9N2)毒株基因组特性的研究 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2002,16(2):142-145.
Guo Y J,Xie J P,Wu K Y,et al. Chracterization of genome of A/Guangzhou/333/99(H9N2) virus [J]. Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology,2002,16(2):142-145. (in Chinese)
- [5] 陈宣烁,钟婉玲,郑小敏,等. 禽流感病毒分子生物学的研究进展 [J]. 中国畜牧兽医,2006,33(1):63-67.
Chen X S,Zhong W L,Zhen X M,et al. Progress in molecular biology of avian influenza virus [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine,2006,33(1):63-67. (in Chinese)
- [6] 曹维伟,陈 杰,张燕霞,等. H9N2 亚型禽流感病毒陕西分离株的鉴定及 HA、NP、NA 全序列的测定 [J]. 中国动物检疫,2006,23(1):25-27.
Cao W W,Chen J,Zhang Y X,et al. Isolation and identification of subtype H9N2 avian influenza virus from Shaanxi province and sequence analysis of it's HA,NP,NA Gene [J]. Chinese Journal of Animal Quarantine,2006,23(1):25-27. (in Chinese)
- [7] 殷 震,刘景华. 动物病毒学 [M]. 2 版. 北京:科学出版社,1997:704-708.
Yin Z,Liu J H. Animal virology [M]. 2nd Edition. Beijing: Science Press,1997:704-708. (in Chinese)
- [8] Matrosovich M,Matrosovich T,Uhlendorff J,et al. Avian-virus-like receptor specificity of the hemagglutinin impedes influenza virus replication in cultures of human airway epithelium [J]. Virology,2007,361(2):384-390.
- [9] Lee C W,Senne D A,Suarez D L. Development of hemagglutinin subtype-specific reference antisera by DNA vaccination of chickens [J]. Avian Diseases,2003,47:1051-1056.
- [10] Guo Y J,Krauss S,Senne D A,et al. Characterization of the pathogenicity of the member of the newly established H9N2 influenza virus lineages in ASIA [J]. Virology,2000,269(1):278-288.
- [11] Perdue M L,Latimer J,Greene C,et al. Consistent occurrence of hemagglutinin variants among avian influenza virus isolates of the H7 subtype [J]. Virus Research,1994,34(1):15-29.
- [12] Lee M S,Chang P C,Shien J H,et al. Genetic and pathogenic characterization of H6N1 avian influenza viruses isolated in Taiwan between 1972 and 2005 [J]. Avian Diseases,2006,50(4):561-571.
- [13] 刘红旗,黄 勇,程 坚,等. 在疫苗免疫选择压力下 H9N2 亚型禽流感流行性感病毒 HA 基因的遗传变异 [J]. 病毒学报,2002,18(2):149-154.
Liu H Q,Huang Y,Cheng J,et al. Genetic mutations of the hemagglutinin gene of H9N2 subtype avian influenza viruses under the selective pressure of vaccination [J]. Chinese Journal of Virology,2002,18(2):149-154. (in Chinese)
- [14] Owen R E,Yamada E,Thompson C I,et al. Alterations in receptor binding properties of recent human influenza H3N2 viruses are associated with reduced natural killer cell lysis of infected cells [J]. Journal of Virology,2007,81(20):11170-11178.
- [15] Perdue M L,Swayne D E. Public health risk from avian influenza viruses [J]. Avian Diseases,2005,49(3):317-327.
- [16] 郭霄峰,廖 明,辛朝安. 禽流感病毒 KMI/99 H9N2) HA 和 NA 基因的序列分析 [J]. 畜牧兽医学报,2002,33(5):486-491.
Guo X F,Liao M,Xin Z A. Cloning and sequencing of HA and NA gene of A/Chicken/Guangxi/99(H9N2) [J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Science,2002,33(5):486-491. (in Chinese)