

密级

论文编号

中国农业科学院 硕士学位论文

H9N2 亚型禽流感病毒进化分析及 H5N1 亚
型禽流感变异株疫苗株的构建

**Evolution of H9N2 Influenza Viruses in Mainland China
and Construction of H5N1 Avian Influenza Variant as
Vaccine Candidate**

硕 士 研 究 生： 钟 功 勋

指 导 教 师： 陈 化 兰 研 究 员

申 请 学 位 类 别： 农 学 硕 士

专 业： 预 防 兽 医 学

研 究 方 向： 动物流感病毒分子生物学

培 养 单 位： 中国农业科学院研究生院

哈尔滨兽医研究所

提交日期 2007 年 6 月

Secrecy:

No.

Chinese Academy of Agricultural Sciences
Master Dissertation

**Evolution of H9N2 Influenza Viruses in Mainland China
and Construction of H5N1 Avian Influenza Variant as
Vaccine Candidate**

Candidate: ZHONG Gongxun

Advisor: Prof. CHEN Hualan

Major: Preventive Veterinary Medicine

Specialty: Molecular Biology of Influenza virus

Chinese Academy of Agricultural Sciences

June 2007

独 创 性 声 明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：

时间： 年 月 日

关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

研究生签名：

时间： 年 月 日

导师签名：

时间： 年 月 日

中 国 农 业 科 学 院

硕士学位论文评阅人、答辩委员会名单表

论文题目		H9N2 亚型禽流感病毒进化分析及 H5N1 亚型禽流感变异株疫苗株的构建				
论文作者		钟功勋	专 业	预防兽医	研究方向	动物流感病毒 分子生物学
指导教师		陈化兰 研究员		培养单位（研究所）		哈尔滨兽医研究所
姓名		职称	硕(博)导师	单 位	专 业	签 名
评 阅 人	刘湘涛	研究员	硕导 ☐ 博导 ☒	兰州兽医研究所	预防兽医学	
	乔传玲	副研究员	硕导 ☒ 博导 ☐	哈尔滨兽医研究所	预防兽医学	
答 辩 主 席	李书华	研究员	硕导 ☒ 博导 ☐	黑龙江省兽医局	预防兽医学	
答 辩 委 员	李一经	教授	硕导 ☐ 博导 ☒	东北农业大学	预防兽医学	
	刘思国	副研究员	硕导 ☒ 博导 ☐	哈尔滨兽医研究所	预防兽医学	
	冯 力	副研究员	硕导 ☒ 博导 ☐	哈尔滨兽医研究所	预防兽医学	
	王靖飞	副研究员	硕导 ☒ 博导 ☐	哈尔滨兽医研究所	预防兽医学	
会议记录（秘书）			曾显营			
论文答辩时间地点			2007 年 6 月 12 日 哈尔滨兽医研究所			

摘 要（一）

H9N2 亚型禽流感病毒在全世界范围内广泛流行，不仅给养禽业造成了巨大的经济损失，而且对人类健康造成威胁。我国在 1994 年从广东省某鸡场中分离到第一株 H9N2 亚型禽流感病毒，此后，该亚型禽流感病毒迅速在国内蔓延，给养禽业造成了严重危害。

本实验室李呈军等人对 H9N2 亚型禽流感病毒 1996~2002 年国内分离株进行了系统的遗传演化分析，所观察到的病毒都是起源于 CK/BJ/1/94-like 病毒，并且在进化过程中发生了复杂的基因重组。为了持续观察国内 H9N2 亚型禽流感病毒的变化方向，本研究对 2003~2004 年中国大陆分离到的 13 株代表性的 H9N2 亚型禽流感病毒进行序列测定和遗传演化分析。发现其中 11 株病毒的 HA 基因属于 CK/BJ/1/94 群系，NA 基因属于 CK/BJ/1/94 或 DK/HK/G9/97 群系，说明 CK/BJ/1/94 群系病毒仍是我国 H9N2 病毒流行的最主要类型。而另外两株病毒 HA 和 NA 基因均属于 G1 群系；同时，我们对其中一株 G1 群系病毒 QA/GD/125/03 进行了全基因测序，通过遗传分析发现其为 G1 群系病毒和其它群系病毒的自然重组毒株，表明 G1 亚群病毒至少是该亚群病毒的一些基因节段在我国家禽中仍然存在并已进入鸡群。而且这些类 G1 病毒具有不同的抗原性以及人流感病毒的受体结合位点。本研究结果强调应对 H9N2 病毒的防治及其公共卫生意义予以高度重视。

流感病毒血凝素受体结合位点特性与病毒宿主特异性密切相关。本研究 13 株病毒中有 9 株病毒的血凝素 226 位氨基酸为 L，使病毒能与人类细胞中的 α -2,6 半乳糖苷键连接的唾液酸受体结合。特别是两株 G1 亚群病毒 CK/GD/123/03 和 QA/GD/125/03 的 H183, E190, L226 组合，呈现了典型的人流感病毒受体结合位点特性，与 1997 年香港禽流感病毒感染人事件发生时从鹌鹑中分离的 A/QA/HK/G1/97(H9N2)和 1999 年香港女童中分离到的毒株 A/HK/1073/99 (H9N2) 以及早期 H3N2 亚型人流感病毒相同。HA 头部受体结合位点附近新增两个潜在糖基化位点，有可能改变病毒的抗原性并影响受体结合特性而感染新的宿主，并进一步对人类公共卫生造成威胁。

某些在同一地区不同种类家禽体内分离到的病毒具有很高的同源性，表明当 H9N2 亚型禽流感病毒进入某一地区后，常会引起该地区多种家禽同时感染，并且由于它的低致病性而使其更易长期在家禽间传播，增加了防控难度。

关键词：H9N2，禽流感，遗传分析，G1 亚群

摘 要（二）

H5N1 亚型高致病性禽流感的爆发给世界养禽业造成毁灭性打击，而且具有重要的公共卫生意义。疫苗免疫是预防高致病性 H5N1 亚型禽流感的重要防线。流感病毒反向遗传操作系统的建立为流感病毒疫苗研制提供了有力工具。

利用我国分离的第一株 H5N1 亚型禽流感病毒 A/Goose/Guangdong/1/96 制备的重组灭活疫苗在我国广泛应用，为我国禽流感疫情的防控工作做出了巨大贡献。然而，自 2006 年以来，在国内某些地区陆续分离到一些 H5N1 亚型禽流感病毒抗原变异株，使用疫苗免疫后的鸡群仍不能抵御这些病毒的感染。因此，我们有必要针对这些抗原变异株制备新的疫苗以阻止禽流感病毒的感染和蔓延。

本研究人工救获了 H5N1 亚型重组流感病毒株 H5N1(SX)/PR8。其 HA 和 NA 基因来源于我国分离的 H5N1 亚型高致病性禽流感病毒抗原变异株 A/Chicken/Shanxi/2/2006(CK/SX/2/06)，使疫苗株具有与国内变异株相一致的抗原性。六个内部基因来源于高滴度鸡胚适应株 A/Puerto Rico/8/34(PR8)，使病毒具有高滴度鸡胚生长特性。通过分子修饰去除了 HA 基因裂解位点的多个连续的碱性氨基酸，使其具备了低致病性禽流感病毒的 HA 基因特征，令疫苗更具安全性。

利用该重组毒株制备的全病毒灭活疫苗在通过了本实验室后续的生物特性与安全性试验后，证实其具有理想疫苗的所有特点并迅速投入生产应用，对这一抗原群病毒引发的高致病性禽流感疫情防控起到了关键性作用。

关键词：H5N1，抗原变异株，疫苗，反向遗传操作

Abstract

Part I

H9N2 avian influenza is recognized as a continuing threat to both the animal and human public health. In Mainland China, H9N2 AIV was firstly isolated from chickens in Guangdong province in 1994, and then H9N2 AIV circulated widely in the domestic poultry and had caused great economic losses in China.

Previous study systemically analyzed representative H9N2 AIV isolated from poultry in Mainland China during 1996~2002, and revealed that all of the viruses originated from CK/BJ/1/94-like virus and formed multiple genotypes through complicated reassortment. In order to consecutively observe the change of the H9N2 AIV in Mainland China, 13 representative H9N2 subtype viruses isolated from poultry in Mainland China during 2003~2004 have been genetically analyzed in this study. Our results showed that 11 of 13 viruses bear the CK/BJ/1/94-like HA genes and CK/BJ/1/94 or G9-like NA genes, indicating that CK/BJ/1/94-like virus were still predominant in H9N2 subtype influenza epidemic in Mainland China. However, the other two viruses isolated from Guangdong province have G1-like HA and NA genes. Analysis of the entire genomes showed that G1-like virus QA/GD/125/03 is a reassortant between G1-like and other group viruses and formed a new genotype of Asian H9N2 viruses. It implied that the viruses containing some genes of G1-like viruses were still circulating in the domestic poultry and started to infect chickens as well as quails. The detection of G1-like virus, which had different antigenic properties and human influenza virus like amino acids at the receptor binding sites of HA gene, suggested that high attention need to be paid to the control of H9N2 viruses in both poultry and humans.

Amino acids in the receptor-binding sites of the HA were associated with the receptor binding specificity. The Q226L mutation at receptor binding site primarily determined the change in receptor recognition during interspecies transfer. In this study, nine of the 13 H9N2 viruses had L at position 226 of HA, made it prefer to binding to SA α 2, 6Gal moieties in human cell. Especially the combination of H183, E190 and L226 at receptor binding sites in CK/GD/123/03 and QA /GD/125/03, same as those in G1 and A/Hong Kong/1073/99, presenting typical human virus-like receptor binding specificity. Two additional potential glycosylation sites near the receptor binding sites of the head of HA may be associated with antigenicity and receptor binding characteristics and thus host range.

We also found that some viruses isolated in same region of different species shared high homology of HA and NA genes, indicating that the H9N2 viruses had not been controlled in time when the viruses invaded into certain region. Subsequently, poultry of different species will be infected simultaneously and make it hard to eliminated the viruses.

Key words: H9N2, avian influenza, genetic analysis, G1 sublineage

Part II

H5N1 highly pathogenic avian influenza is responsible for one of the most devastating diseases in domestic poultries and also has a substantial significance on public health. Vaccination is a useful method for the avian influenza control. Plasmid-based reverse genetics has been proved to be a powerful tool to generate ideal reassortant influenza vaccine candidates.

H5N1-inactivated vaccine developed by reverse genetics based on A/Goose/Guangdong/1/96 has been widely used in our country. However, antigenic mutant has been found in some regions of Mainland China since 2006 and resent vaccine seems to be ineffective. New vaccine should be developed to prevent infection of those viruses.

In this study, vaccine candidate strain H5N1(SX)/PR8 was generated based on representative antigenic mutant A/Chicken/Shanxi/2/2006. HA and NA genes were derived from A/Chicken/Shanxi/2/2006 and 6 internal genes were derived from a high growth virus A/Puerto Rico/8/34. Multiple basic amino acids in the cleavage site of HA were deleted.

H5N1(SX)/PR8 inactivated vaccine is proved to bear the same antigenicity as antigenic mutant, high growth property and low pathogenicity. The application of the new vaccine will be beneficial to control the H5N1 high pathogenic avian influenza in our country.

Key words: H5N1, antigenic mutant, inactivated vaccine, reverse genetics

目 录

第一章 引言	1
1.1 禽流感病毒生物学特性	1
1.1.1 禽流感病毒的组成和复制	1
1.1.2 HA和NA基因功能	2
1.1.3 内部基因功能	4
1.2 流感的历史及其流行现状	6
1.2.1 高致病性禽流感	6
1.2.2 低致病性的H9N2 亚型禽流感	7
1.2.3 公共卫生意义	8
1.3 禽流感疫苗	9
1.3.1 灭活全病毒疫苗	9
1.3.2 亚单位疫苗	9
1.3.3 重组活载体疫苗	9
1.3.4 DNA疫苗	10
1.3.5 反向遗传操作疫苗	10
1.4 反向遗传操作技术及其在流感病毒研究中的应用	11
1.4.1 反向遗传学和反向遗传操作技术	11
1.4.2 流感病毒反向遗传操作系统的发展过程	11
1.5 本研究的目的是和意义	12
第二章 H9N2 亚型禽流感病毒表面蛋白基因遗传演化分析	14
2.1 材料和方法	14
2.1.1 材料	14
2.1.2 方法	15
2.2 结果	17
2.2.1 序列测定结果	17
2.2.2 HA基因遗传分析	17
2.2.3 NA基因遗传分析	22
2.2.4 QA/GD/125/03 全基因组分析	27

2.3 讨论.....	27
第三章 H5N1 亚型禽流感病毒重组灭活疫苗的构建	29
3.1 材料与方法.....	29
3.1.1 材料	29
3.1.2 方法	31
3.2 结果.....	33
3.2.1 pBD-MutHA质粒的构建.....	33
3.2.2 H5N1(SX)/PR8 的救获和病毒鉴定.....	34
3.3 讨论.....	35
第四章 结论	37
参考文献	38
附录	46
附录 1 13 株H9N2 亚型禽流感病毒HA基因组序列	46
附录 2 13 株H9N2 亚型禽流感病毒NA基因组序列	50
致谢	54
作者简介	55

英文缩略表

英文缩写	英文全称	中文名称
AI	Avian influenza	禽流感
AIV	Avian influenza virus	禽流感病毒
Amp ^r	ampicillin resistant	氨苄青霉素抗性
bp	base pair	碱基对
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
cDNA	complementary DNA	互补 DNA
DTT	dithiothreitol	二巯基苏糖醇
EDTA	ethylenediamine tetra-acetic acid	乙二胺四乙酸
HA	Hemagglutinin	血凝素
HI	hemagglutination inhibit	血凝抑制
HPAI	High pathogenic avian influenza	高致病性禽流感
IPTG	isopropyl- β -thiogalactopyranoside	异丙基- β -D-硫代半乳糖苷
Kb	kilobases	千碱基
KDa	kilodalton	千道尔顿
LB	luria-bertani medium	LB 培养基
LPAI	Low pathogenic avian influenza	低致病性禽流感
min	minute	分钟
ml	milliliter	毫升
NA	Neuraminidase	神经氨酸酶
NeuAc	N-acetylneuraminic acid	N-乙酰神经氨酸
NeuGc	N-glycolylneuraminic acid	N-羟乙酰神经氨酸
OD	optical density	光密度
PBS	phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
pH	power of hydrogen	酸碱值
RNase	ribonuclease	核糖核酸酶
SA	sialic acid	唾液酸
SPF	specific pathogen free	无特定病原
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactoside	5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷

第一章 引言

禽流感 (Avian Influenza, AI) 是由 A 型流感病毒所引起的禽类的感染和/或疾病综合征。该病 1878 年首次发生于意大利, 当时称之为“鸡瘟”, 现已几乎遍布世界各地。AI 可引起大多数家禽、野禽及水禽的感染, 其中以鸡和火鸡最为易感, 水禽则为流感病毒的自然宿主(Hinshaw, et al, 1980)。

1997 年之前, 尽管人和其他灵长类动物可人工感染禽流感病毒, 但在这些宿主体内禽流感病毒的复制受到很大限制, 使人们一直认为禽流感病毒在自然界不能跨越种间屏障直接感染人类, 然而 1997 年香港爆发的 H5N1 亚型禽流感导致 18 人感染, 其中 6 人死亡, 这一事件使人们清楚地认识到禽流感不仅可直接由禽感染人, 而且还能致人死亡 (Subbarao, et al, 1998)。

高致病性禽流感所造成的危害往往是迅即的, 猝不及防的。与之相比, 低致病性禽流感的发生是潜在性的。但是 LPAI 同样可怕, 同样可以给养禽业带来灭顶之灾, 对人类的威胁同样存在。低致病性禽流感病毒的流行特点就是分布极为广泛, 危害持久和难以控制。尤其是 H9N2 AIV, 不仅在全世界范围的禽类中广泛流行, 而且可以感染人 (Peiris, et al, 1999; Guo, et al, 1999), 同时还是 97 年香港禽流感感染人事件的 H5N1 AIV 的内部基因的供体 (Guan, et al, 1999), 因此, 对 H9N2 AIV 研究工作也非常重要。

禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV)最显著的生物学特征之一就是亚型众多, 不同亚型病毒之间可以通过交换某些基因片段发生基因重排, 出现具有新的生物学特征的病毒, 而且其抗原变异频繁, 包括由点突变引起的抗原漂移 (Antigenic drift) 和不同亚型毒株同源重组产生新亚型所引起的抗原转变 (Antigenic shift) (Wiley, et al, 1981; Webster, et al, 1981), 因此为禽流感的有效防制带来了极大的困难和挑战。

在美国和其他一些发达国家, 对高致病力禽流感的控制与消灭主要是采取检疫、扑杀和隔离措施。在我国, 为了更好地防止该病的发生, 在采取各种控制措施的同时, 目前普遍采用的手段主要还是疫苗接种, 且疫苗免疫已成为当今用来控制日益严重的禽流感疫情的关键环节、主动措施和最后防线。在目前, 重组灭活疫苗是应用最为广泛的禽流感疫苗 (Subbarao, et al, 2003), 它的安全性和有效性已经在实践中得到证实。

1.1 禽流感病毒生物学特性

1.1.1 禽流感病毒的组成和复制

禽流感病毒属于正粘病毒科, A型流感病毒, 是有囊膜, 多形态的单股负链RNA病毒。基因组分为 8 个节段, 由大到小依次为PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M、NS。每个RNA片段的 5' 末端均有 13 个高度保守的核苷酸, 即 3'-GGAACAAAGAUGAppp-5', 3'末端有 12 个保守核苷酸,

即 3'-OHUCGUUUUCGUCC-5'。在这些共有序列中,可部分互补,形成锅柄环状结构,该结构是病毒RNA聚合酶结合所必需的核苷酸识别位点。A型流感病毒共编码 11 种病毒蛋白,其中 8 种是病毒的组成成分(HA、NA、NP、M1、M2、PB1、PB2 和PA),长度最小的NS基因编码两个非结构蛋白NS1 和NS2,PB1-F2 则位于细胞的线粒体中,与流感病毒介导的细胞凋亡有关(Chen, et al, 2001)。病毒粒子外的脂质囊膜伸出许多纤突,包括血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA) 两种糖蛋白,也是病毒主要的表面抗原,根据HA和NA的不同,A型流感病毒可分为不同亚型,目前已鉴定 16 种HA和 9 种NA亚型(Baker, et al, 1987; Fouchier, et al, 2004)。

流感病毒 HA 表面具有受体结合位点(Receptor Binding Site, RBS),可以识别和结合宿主细胞表面唾液酸受体(Wilson, et al, 1981)。病毒首先吸附于细胞表面受体上,通过由受体介导的内吞作用进入细胞。病毒粒子导入细胞的内含体,PH 值降低,导致 HA 的构象改变,介导膜的融合,核衣壳随之进入细胞质,然后迁移至细胞核。由病毒的 PB2 识别和切割宿主细胞 mRNA 的帽子结构,作为转录的引物,合成病毒的 mRNA。然后翻译成 HA、NA、NP 和三个聚合酶蛋白 PB2、PB1、PA。NS 和 M 基因每一个前体 mRNA 产生两个成熟的 mRNA 分子,分别翻译出 NS1, NS2 和 M1, M2 蛋白。为使复制开始,vRNA 需要另一转录本 cRNA,它的合成无需引物启动,3' 端也无 Poly(A),其序列与 vRNA 完全互补,是 vRNA 合成的模板。三种类型的 RNA 均在细胞核内合成,在病毒感染的早期主要合成 mRNA 和 cRNA,而后期基本上仅合成 vRNA。HA, NA 和 M2 蛋白沿着高尔基体移动,定位到胞浆膜上,然后基质蛋白、病毒的核衣壳、RNP 依次组装形成子代病毒粒子。病毒蛋白和 vRNA 组装完成后,病毒释放部位的胞浆膜形成了子代病毒粒子的囊膜,将基质蛋白和核衣壳包裹起来,病毒粒子最后以出芽方式从细胞膜上释出。

1.1.2 HA 和 NA 基因功能

HA 和 NA 参与流感病毒和宿主细胞的吸附、融合和子代病毒粒子的释放过程。流感病毒的宿主特异性、组织嗜性和致病力需要病毒从感染细胞中的有效释放以及病毒和新靶细胞的有效结合。这是通过 HA 受体结合特性的调节和 NA 酶活性的调节来实现的,从而使 HA 和 NA 的活性达到最佳的平衡。

1.1.2.1 HA 的裂解与流感病毒致病性的关系

尽管 AIV 的毒力是由多个基因决定的,然而 HA 是最具决定性作用的(Steinhauer, et al, 1999)。病毒产生新的感染性粒子的必要条件是 HA 必须在宿主蛋白酶作用下裂解为 HA1 和 HA2 两个亚单位。因此,HA 的裂解活性对病毒感染和在宿主体内的扩散是非常关键的。HA 的裂解活性是由两种结构决定的,即裂解位点的氨基酸序列和裂解位点附近是否有糖基化位点。蛋白酶在组织中的不同分布和 HA 对这些酶的敏感性决定了流感病毒的组织嗜性。LPAIV 在 HA 裂解位点上游只有单个的碱性氨基酸 R,只能在呼吸道、消化道等少数细胞中被裂解,造成温和感染或不表现临床症状;而 HPAIV 的 HA 裂解位点上游有多个连续的碱性氨基酸插入,可以在各种宿主细胞中裂解,造成感染动物全身系统衰竭,导致死亡(Bosch, et al, 1981)。即使裂解位点处有多个碱性氨基酸,如果在该位点附近糖基化位点上的寡糖链将裂解位点遮掩起来,那么该毒株仍然表现

为低致病性,但这种毒株在复制过程中糖基化位点如发生缺失,则非常容易转变为高致病性毒株,例如 1983-1984 宾西法尼亚爆发 H5N2 禽流感就是由于低致病性禽流感病毒在 HA 裂解位点附近丢失了 Asn-11 糖基化位点后转变为高致病性毒株而引起的大流行 (Desphande, et al, 1987; Kawaoka, et al, 1984)。

1.1.2.2 受体结合与释放的特异性

HA 的受体结合位点位于 HA 亚单位的顶端,与连接在宿主细胞半乳糖表面的唾液酸 (sialic acid, SA) 结合 (Weis, et al, 1988)。流感病毒的 HA 识别两种类型的 SA,即 N-乙酰神经氨酸 (N-acetylneuraminic acid, NeuAc) 和 N-羟乙酰神经氨酸 (N-glycolylneuraminic acid, NeuGc),它们分别与 α -2,3 糖苷键或 α -2,6 糖苷键连接的半乳糖结合 (Gambaryan, et al, 1995)。

HA 受体结合位点氨基酸组成以及宿主细胞唾液酸种类和糖苷键类型在很大程度上影响流感病毒在不同宿主内的复制能力。在典型禽流感病毒中,HA 的 226 位为谷氨酸,与 α -2,3 半乳糖连接的唾液酸结合,而在 H2 和 H3 亚型的人流感病毒中 226 则为亮氨酸,与 α -2,6 半乳糖连接的唾液酸结合 (Connor, et al, 1994; Rogers, et al, 1983; Vines, et al, 1998; Matrosovich, et al, 2000)。1968 年香港流感的 HA 基因是源于 AIV 的,对该病毒的前期病毒的氨基酸序列分析表明,在禽到人的传递过程中,HA 仅仅发生了 6 个氨基酸的改变,但是每个改变都发生在 HA 分子的头部,也就是 RBS 附近,这其中就包括 226 位的 Gln 变成了 Leu。

宿主不同,流感病毒的受体特异性也不同。人流感病毒的受体多为唾液酸 α -2,6-半乳糖的寡糖 (SA-2,6-Gal),禽和马流感病毒的受体主要是唾液酸 α -2,3-半乳糖的寡糖 (SA-2,3-Gal)。相应的,在人的气管上皮细胞表面主要含有 SA-2,6-Gal;而在马的气管和鸭的肠道主要含有 SA-2,3-Gal;值得注意的是,在猪的气管上皮细胞中同时含有 SA-2,6-Gal 和 SA-2,3-Gal,这也就揭示了猪对人和禽的流感病毒都很敏感的原因。

1.1.2.3 HA 糖基化和唾液酸化对受体亲和性的调控作用

受体结合位点附近糖基化位点的变化是细胞嗜性和宿主范围的重要决定因素 (Ohuchi, et al, 1997)。在 HA 分子的头部和颈部具有 4-11 个潜在糖基化位点。HA 分子受体结合位点附近的糖基化和唾液酸化对流感病毒从宿主细胞内的释放起调控作用,并因此而影响到病毒的致病力和组织嗜性 (Baigent, et al, 1999; Ohuchi, et al, 1997)。寡糖链的存在由于空间位阻效应会降低 HA 与受体结合的亲和性,寡糖链表面发生唾液酸化以后,部分或全部的占据了受体结合位点,使得 HA 受体结合位点无法和细胞表面的受体结合。只有当 NA 将 HA 表面的唾液酸裂解以后 HA 才能获得完全的受体结合能力 (Wagner, et al, 2000; Baigent, et al, 2001)。Inkster 通过比较鸭和人流感病毒 HA 氨基酸序列及其糖基化位点,认为 HA 糖基化位点的数目和分布对流感病毒宿主的特异性也有一定的影响 (Inkster, et al, 1993)。

流感病毒从宿主细胞释放的过程中需要 NA 的唾液酸酶活性裂解宿主细胞的唾液酸,所以流感病毒 HA 的受体结合特性和 NA 的受体裂解特性以及 NA 的颈部区长度应该是相匹配的。HA

和 NA 不相匹配会限制重排病毒的增殖。NA 的颈部长度和序列在不同亚型病毒会有所不同(Blok, et al, 1982)。NA 的颈部起到支持作用, 将 NA 的酶活性位点暴露在病毒囊膜表面, 使 NA 的活性位点和底物充分接触而发挥作用。

1.1.3 内部基因功能

1.1.3.1 聚合酶蛋白 (Ploymerase)

流感病毒的聚合酶 PB2、PB1 和 PA 是由 3 个最大的 vRNA 片段 (1-3) 编码的三种蛋白质, 分别为 96KDa、87KD 和 85KDa。其中 PB2 和 PB1 是碱性蛋白, PA 是酸性蛋白。其氨基酸序列有一个共同特点, 均有特定的亲核序列区, 可使这几种蛋白在胞浆中合成后能顺利进入细胞核, 所以在感染细胞的细胞核内都可发现这 3 种蛋白。研究表明, 在感染后的复制过程中, 这 3 种聚合酶蛋白合成的数量虽然很少, 但它们对病毒的基因表达和复制来说是必不可少的。PB2 由片段 1 编码, 大约 759 个氨基酸残基, 在病毒 mRNA 转录的起始阶段, 识别 5'端的 I 型帽子结构并与之结合, 同时还具有限制性内切酶活性, 参与切割宿主 mRNA 帽子结构作为病毒 mRNA 合成的引物。PB1 由片段 2 编码, 约 757 个氨基酸残基, 主要负责病毒 mRNA 合成的启动并使之逐渐延长, 在 vRNA 转录和复制过程中, PB1、PB2 一起随链的延长而移动, 参与 vRNA 的复制, 在 vRNA 的合成过程中扮演蛋白激酶或螺旋-解螺旋的角色 (Hatta, et al, 2000)。

在动物模型和宿主细胞的培养物中, PB2 蛋白对流感病毒的宿主特异性发挥着重要作用。PB2 蛋白 627 位点的氨基酸残基是其影响宿主特异性主要位点 (Subbarao, et al, 1993; Hatta, et al, 2001), 同时还包括 701 位点的氨基酸(Li, et al, 2006)。此外 PB1, PA 和 NP 也影响到流感病毒的宿主特异性 (Horimoto, et al, 2000; Naffakh, et al, 2000; Zhou, et al, 1999; Almond, et al, 1977), 并且流感病毒复制复合体的四种蛋白成分的相互匹配是非常重要的。

1.1.3.2 核蛋白 (Nucleoprotein, NP)

NP 是由片段 5 编码的结构蛋白, 是构成病毒核衣壳的主要蛋白成分。NP 具有型特异性。NP 和 PB2、PB1、PA 与 vRNA 一起构成 RNP, 具有稳定 vRNA, 使之免受 RNA 酶降解的作用。在流感病毒的各个基因中, NP 基因最为保守。核蛋白是一种单体的磷酸化多肽, 其 327~345 位氨基酸区域参与了 NP 的亲核功能, 使 NP 具有亲核性, 在胞浆中合成后被运往细胞核。NP 还是一种多功能蛋白质, 除了形成病毒的核衣壳外, 还在病毒的表达和复制过程及确定病毒的宿主特异性方面起一定作用。NP 是宿主的细胞毒性 T 细胞免疫应答的主要靶标, 但是抗 NP 的抗体不足以给宿主提供免疫保护 (殷震等, 1997; 卡尔尼克等, 禽病学, 1999)。

1.1.3.3 基质蛋白 (Mateix Protein, M)

M 蛋白是由 vRNA 片段 7 编码的非糖基化蛋白, 是病毒粒子中含量最大的蛋白, 占病毒粒子总量的 30%-40%。M 基因有两个阅读框架(ORF), 可转录出两种 mRNA 分子, 分别翻译出 M1、M2。M1 由 252 个氨基酸组成, 分子量为 25KD, 是核衣壳的主要成分, 它在病毒囊膜下面沿着

囊膜形成一个壳,对病毒颗粒核心部分起保护作用。它既存在于感染细胞的胞浆,也存在于核内。具有型特异性,其抗原性的差异是流感病毒的分型依据之一,在调节病毒核糖核蛋白穿越核膜、病毒粒子出芽和装配过程中起着关键性的作用。尽管 HA 和 NA 蛋白可能在选择病毒粒子在感染细胞中的装配位置起一定作用,但当 HA 和 NA 不存在的情况下,病毒在感染细胞中依旧可形成病毒粒子。而在 M1 合成减少或发生突变的情况下,感染细胞中病毒粒子的合成量会大大减少,所以说 M1 蛋白在病毒粒子形成和出芽过程中起着最关键的作用。M1 蛋白位于病毒囊膜和 vRNP 平行的位置,向外与跨膜蛋白的尾部相互作用,向内与 vRNP 作用,这些相互作用激发了出芽过程,从而形成并释放病毒粒子。

M2 由 97 个氨基酸组成,分子量为 15KD。M2 是跨膜离子通道蛋白,氨基端在囊膜外,羧基端在囊膜内,主要以四聚体的形式存在于感染细胞的细胞膜上,而在病毒颗粒中含很少。M2 功能是质子选择离子性通道作用,参与调节膜内 pH 值,在病毒的生活周期中起着装配病毒的作用。Zebedee 等 (Zebedee, et al, 1989) 发现,在一个感染了流感病毒的哺乳动物细胞表面大约有 106-107 个的 M2 分子,但只有很少被混合于病毒粒子中,这是由于能够起离子通道作用的 M2 的数量受 PH 值的制约。M2 蛋白的质子选择离子通道活性是在认识流感病毒复制周期中发现的。M2 的低 pH 值活性和质子选择活性最直接的证据是从非洲蟾蜍卵母细胞和哺乳动物细胞中表达 M2 蛋白过程中获得的,表达 M2 蛋白的细胞表面存在电流,这种电流可被金刚烷特异地阻止。而且,无论将 M2 蛋白跨膜区还是纯化的 M2 蛋白掺入到脂质双层表面后都会检测到对金刚烷敏感的电位。近年来发现,对盐酸金刚烷胺病毒株的出现与 M2 蛋白跨膜区 25~43 位残基中个别氨基酸发生替换密切相关,常见的为 27, 30, 31 和 34 位残基的替换。通过这些研究发现在病毒复制过程中,病毒粒子通过受体介导的内吞作用进入细胞后,M2 离子通道被外周酸性环境激活而使质子进入病毒粒子。而低 pH 值可以使 M1 蛋白与 vRNA 之间的相互作用减弱,从而有利于 vRNP 释放并进入细胞核。另一方面,M2 蛋白在合成后向细胞质运送过程中致使细胞质与高尔基体内的 pH 值达到某种平衡,高尔基体内的低 pH 易使 HA 蛋白高级结构进一步形成。虽然 Watanabe 等报道在失去 M2 离子通道的情况下,流感病毒仍可进行多次复制,但如果没有 M2 跨膜离子通道,流感病毒的复制效率可能会大幅下降。

1.1.3.4 非结构蛋白 (Nonstructural Protein, NS)

A 型流感病毒基因片段 8 编码两种非结构蛋白 NS1 和 NS2,它们大量存在于被感染细胞的胞核和胞浆内,而不属于病毒粒子的结构蛋白成分。NS1 是线性 mRNA 的产物,而 NS2 由剪接的 mRNA 转录而来。NS1 和 NS2 有 70 个氨基酸的重叠,并且在氨基端有 9 个氨基酸是相同的。

NS1 蛋白具有两个高度保守的功能区:氨基端 19~38 位氨基酸的 RNA 结合区,它能结合 mRNA 的多聚 A 序列;另一个功能区为中部 134~161 位氨基酸的效应区,能与细胞内蛋白相互作用,抑制 mRNA 的核输出。NS1 蛋白有多种功能,它可干扰 mRNA 前体的剪切,干扰 mRNA poly (A) 的形成以及干扰细胞 mRNA 从细胞核进入细胞质,还可以使依赖 RNA 的蛋白激酶失去活性。

NS1 蛋白因能够抑制干扰素介导的宿主细胞抗病毒反应而使其成为研究热点之一。NS1 通过抑制干扰素调节因子的活性来对抗宿主的抗病毒系统, 而该因子可调节 α -干扰素和 β -干扰素基因的表达。A 型流感病毒的 NS1 蛋白是一种 RNA 结合蛋白, NS1 拮抗干扰素特性主要与 NS1 蛋白的双链 RNA(dsRNA)结合区有关, NS1 蛋白与病毒复制产生的 dsRNA 的结合可以阻止 dsRNA 活化的抗病毒信号传导通路。通过这种机制, NS1 蛋白可以阻止 IFN α/β 的合成。同样的道理, NS1 蛋白通过和双链 RNA 结合, 使宿主无法激活抗病毒反应的各种成分, 包括 IRF-3, NF- κ B, AP-1 转录因子和 PKR (Talon, et al, 2000; Wang, et al, 2001; Ludwig, et al, 2002; Lu, et al, 1995), 因此可以影响流感病毒的致病力。

NS2 蛋白的主要功能是介导组装好的 vRNP 从细胞核中输出到细胞质中, NS2 羧基端的 70 个氨基酸是 M1 的结合区, 通过 M1 蛋白与 vRNPs 发生联系。NS2 蛋白包含一个核输出信号(NES)功能区, 在酵母双杂交系统中, NS2 蛋白可与核穿孔复合体(NPC)的某些成分结合。因此可以认为 NS2 充当连接 M1-RNP 复合体和 NPC 的一个分子接合器来介导 M1-RNP 穿过核膜的功能。此外, NS2 蛋白在 cRNA 复制过程中具有一种错误调节功能, 参与调节病毒 RNA 合成过程。

1.2 流感的历史及其流行现状

1878 年意大利爆发高致病性禽流感, 当时称为“鸡瘟”, 到现在已有近 130 年的历史了。在此期间, 人类对禽流感和禽流感病毒的认识不断增加。1902 年首次从鸡体内分离到引起意大利“鸡瘟”的病原 A/Chicken/Brescia/1902(H7N7), 这也是人类首次从鸡体内分离到流感病毒, 比首次分离到人流感病毒早了 30 年。1936 年, Burnet 报道用鸡胚增殖流感病毒获得成功, 这一突破不仅使流感病毒的分离更加容易, 而且也使获得高滴度病毒变得更加简单(Burnet, et al, 1936)。1941 年 Hirst 发现了流感病毒的血凝活性(Hirst, et al, 1941), 1955 年, Schafer 证明禽流感病毒属于 A 型流感病毒。1957 年和 1968 年人流感流行株的出现促使人们更为广泛地研究动物中流感病毒的分布情况, 以此来探求流感病毒流行株的来源。经过主动监测, 从野禽, 笼养鸟, 家养鸭, 鸡以及火鸡等各种禽类中分离到许多非致病性的 A 型流感病毒, 这些分离株的发现使人们更有理由相信 A 型流感病毒广泛分布在鸟类中, 特别是在水禽中几乎所有亚型的禽流感病毒都可以分离到。

1.2.1 高致病性禽流感

毒株监测和分离发现所有高致病性毒株(High Pathogenic Avian Influenza Virus, HPAIV)全部属于 H5 和 H7 两个亚型, 但并非所有 H5 和 H7 亚型禽流感病毒都是高致病性的, 只有一部分具有高致病性。然而正是这一部分高致病性毒株, 常常对养禽业造成毁灭性的打击, 带来巨大经济损失。

自从 1959 年 HPAI 首次报道以来, 全世界爆发了数十次 HPAI, 其中以 1959 年英格兰 H5N1, 1983~1984 年, 美国宾夕法尼亚州、1994 年墨西哥禽流感、1997 年香港禽流感以及 2003 年以来始于东南亚并波及全世界的 H5N1 HPAI 最为严重。高致病性禽流感的发生态势, 明显表现出发生频率加快、次数增多、范围扩大, 不断侵袭整个世界, 造成的危害越来越严重。例如上世纪 70

年代主要有三次爆发, 澳大利亚 (1976[H7])、英国 (1979[H7])、德国 (1979[H7]), 上世纪 80 年代爆发了三次, 澳大利亚 (1985[H7])、美国 (1983[H5])、爱尔兰 (1983[H5]), 到了上世纪 90 年代及本世纪初, 爆发次数大大增加, 澳大利亚 (1992[H7]、1995[H7]、1997[H7])、英国 (1991[H5])、墨西哥 (1994[H5])、巴基斯坦 (1995、2000)、意大利 (1997[H5])、香港 (1997、2001,2002[H5])、巴基斯坦 (2000)、意大利 (2000[H7]) 均爆发了 HPAI。特别是 2003 年以来, HPAI 更是以大面积持续性爆发的形式广泛传播, 由此可见, 全世界高致病性禽流感爆发次数正逐年上升, 对养禽业的危害也是越来越严重。

1.2.2 低致病性的 H9N2 亚型禽流感

除了 H5 和 H7 亚型禽流感所引起的严重危害外, 低致病性的 H9N2 亚型禽流感病毒的危害也不容忽视, 进入上世纪 90 年代以后, H9N2 亚型禽流感病毒开始在家禽中广泛流行。包括在 1995-1998 年德国的鸡, 鸭和火鸡(Werner, 1998, 1999), 1994 和 1996 年意大利的鸡 (Fioretti, et al, 1998), 1997 年爱尔兰的雉鸡 (Campbell, et al, 1998), 1995 年南非的鸵鸟以及 1995 和 1996 年美国的火鸡 (Halvorson, et al, 1998) 中都有流行的报道。在韩国, 1996 年发生了数起 H9N2 AIV 对肉种禽场的感染事件, 感染禽表现典型的 AI 临床症状, 并伴有 10-30% 的死亡率 (Mo, et al, 1998; Lee, et al, 2000); 在伊朗、沙特阿拉伯等中东国家 (Nili, et al, 2002, 2003) 及巴基斯坦 (Naeem, et al, 1999, 2003; Bano, et al, 2003) 也先后发生了 H9N2 AIV 在鸡和雉鸡群中的大规模流行; 在日本, 于进口笼养鸟的例行检查中发现了 H9N2 AIV (Mase, et al, 2001)。

1994 年在我国广东某鸡场首次分离到了 H9N2 亚型禽流感病毒, 临床表现为产蛋下降, 并有一定的死亡率, 实验室感染表现典型的临床症状但是不致鸡死亡 (陈伯伦等, 1994)。这次 AI 发生之后, H9N2 AIV 在我国一直呈上升趋势, 严重制约了养禽业的发展。唐秀英等先后从发病鸡、鸭和鹌鹑体内分离到大量的 H9N2 AIV (付朝阳等, 2001; 唐秀英等, 2000), 1997 年, 陈福勇等也从华北地区某鸡场分离到 H9N2 AIV (陈福勇等, 1999)。此后, 刘秀梵等在 1996-2002 年间分离到了二十几株 H9N2 亚型禽流感病毒 (Liu, et al, 2003; Lu, et al, 2003), 刘金华等也在发病鸡体内分离了多株 H9N2 亚型禽流感病毒 (Liu, et al, 2003a, 2003b, 2004), Liu 等在我国南昌地区活禽市场对流感病毒基因库所做的流行病学调查中分离到了 16 株 H9N2 亚型禽流感病毒 (Liu, et al, 2003)。而且近几年, 从香港活禽市场分离到了大量的 H9N2 AIV (Guan et al, 1999, 2000; Li, et al, 2003; Choi, et al, 2004)。本实验室于 1996-2004 年间从发病或无明显症状的家禽中分离到大量 H9N2 亚型 AIV, 李呈军等人对其中 27 株 1996-2002 年间分离到的病毒进行了系统的遗传演化研究, 发现这些病毒在进化过程中不断发生重组, 形成多个基因型 (Li, et al, 2005)。这说明 H9N2 亚型 AIV 在我国广泛存在, 并且多呈低致病性感染, 然而由于其分布广泛并且呈逐渐蔓延之势, 给养禽业造成的威胁是巨大的。

H9N2 亚型禽流感病毒不仅在家禽中广泛流行, 也可以感染哺乳动物和人类。1999 年 Peiris 等首次从猪体内分离到 H9N2 亚型流感病毒, 分析表明, 这两株病毒均为典型的禽流感病毒 (Peiris, et al, 1999)。随后, Peiris 等对 1998 到 2000 年间香港由我国大陆引进的猪群进行了流行病学调查,

结果表明 H9N2 亚型禽流感病毒已经在猪群中广泛传播, 在猪体内分离到的 H9N2 亚型病毒都来源于 A/Chicken/Beijing/1/94 或 A/Duck/Y280/97 群系病毒(Peiris, et al, 2001)。此后, 李海燕等在对我国山东, 福建等省猪群所做的流行病学调查分离到了多株 H9N2 亚型流感病毒(李海燕等, 2004)。Xu 等也相继报道了在山东省的猪体内分离到了 H9N2 亚型禽流感病毒(Xu, et al, 2004)。这些都表明 H9N2 亚型禽流感病毒可以感染猪——这一种间传播的中间宿主, 经过在猪体内进一步适应或与猪体内的其它亚型流感病毒进行基因重排, 有可能产生新的能够在人体内有效复制的流感病毒, 从而引起人流感的流行。

1.2.3 公共卫生意义

20 世纪后全球共出现 4 次人流感世界大流行, 其中有三次与禽流感密切相关。

第一次大流行发生于 1918~1919 年, 称为“西班牙流感”(Spanish Influenza), 导致约 7 亿多人感染, 2000-4000 万人死亡, 而且死亡者多为青壮年。这次大流行是人类史上最大瘟疫之一。引起这次大流行的病原体是 H1N1 亚型病毒, 而且病毒的 8 个基因节段全部来自于禽类。种系发生分析表明, 这次大流行的流感病毒的 HA 基因虽更接近于禽流感病毒, 但它属于哺乳动物流感病毒。有人推测可能是禽流感病毒全基因先传给猪再传给人。

第二次大流行发生于 1957 年, 称为“亚洲流感”(Asian Influenza)。最早出现于中国贵州, 由 H2N2 亚型病毒引起。研究证实, 这一次流行病毒是人和禽流感病毒通过基因重配而来, 其 HA、NA、PB1 三个基因片段来源于禽流感病毒, 其余的基因片段来自人流感病毒。

第三次大流行发生于 1968 年, 称为“香港流感”(Hong Kong Influenza)。最早出现于中国香港, 由 H3N2 亚型病毒引起。研究表明, 这一次流行病毒也是人和禽流感病毒通过基因重配而来, 其 HA 和 PB1 基因来源于禽流感病毒, 其余基因节段来自人流感病毒。当时的人群缺乏相应的 HA 糖蛋白的中和抗体, 造成病毒在人群中流行。

然而, 1997 年香港鸡群中暴发了由 H5N1 亚型禽流感病毒引起的 HPAI (Subbarao, et al, 1998), 令人震惊的是在这次暴发中, 有 18 人直接感染了该病毒, 其中 6 人死亡。随后对分离到的病毒进行抗原和基因分析, 发现该 H5N1 毒株的 8 个基因节段均来自禽流感病毒, 而且 HA、NA 与从禽类分离到的毒株非常相似(Lin, et al, 2000)。Subbarao(1998)等对首例 H5N1 感染者的病毒进行分析, 发现在 HA1 和 HA2 断裂位点邻近插入了一个由多个碱性氨基酸(Arg-Gln-Arg-Arg)组成的结构, 类似结构也见于高致病性的 H5 禽流感病毒中(Arg-Lys-Lys-Arg), 通常在人流感病毒中是没有的。

1999 年 7-8 月, 郭元吉等进行 H9 流行病调查时发现, 在华南和华北地区, 约有 19% 的人体内含有 H9 抗体 ($HI \geq 20$), 并且从广东省的 5 名流感患者体内分离到了 5 株 H9N2 流感病毒, 患者都表现为典型的流感临床症状, 并且已经康复(Guo, et al, 1999); 1999 年 3 月 Peiris 等从香港的两个患流感的女孩体内分离到了两株 H9N2 亚型流感病毒(Peiris, et al, 1999), 值得庆幸的是两

个患者都很快康复了,没有发生 1997 年那样的 H5N1 禽流感病毒感染并致死人的事件。Lin 等对这两株病毒进行的研究表明,它们的所有基因片段都与 A/Quail/Hong Kong/G1/97(H9N2) (QA/HK/G1/97) 高度同源,为典型的 AIV (Lin, et al, 2000)。由此可见, H9N2 AIV 有可能突破种间屏障,无需经过中间宿主的传递即可直接感染人,并且,由于 H9N2 AIV 的低致病性,更增加了其感染人并在人群中存在下去的可能性。

2003 年以来,在世界范围内出现了多次 AI 感染人的事件,所涉及的病毒包括 H5N1 和 H7N7 亚型,特别是 H5N1 亚型病毒造成人类的感染及死亡事件令人触目惊心,截至 2007 年 5 月, H5N1 亚型 HPAI 已造成全世界范围内 307 人感染, 186 人死亡, 其中我国 24 人感染, 15 人死亡。

1.3 禽流感疫苗

对于用疫苗接种预防禽流感的做法一直存在着不同的看法,在一些国家禁止或不鼓励使用疫苗预防禽流感,因为这样会影响整个国家的禽流感扑灭计划。然而,大多数国家还保留在紧急状态下使用疫苗控制禽流感的措施。

在我国现阶段,禽流感防控采用疫苗接种和扑杀相结合的策略,将疫苗接种作为控制计划的一部分对疫情控制和防止病原扩散起到了至关重要的作用。

1.3.1 灭活全病毒疫苗

灭活全病毒疫苗一般是用甲醛灭活禽流感病毒鸡胚增殖的尿囊液,辅以佐剂制成的油乳剂疫苗。灭活全病毒疫苗安全性好,抗原组分齐全,免疫原性强,没有毒力返强和变异的危险,能够经受同抗原群 AIV 的攻击。禽流感灭活疫苗还便于储藏,一旦确定禽流感暴发的病毒亚型,便可立即用于紧急免疫预防,还可方便地制备针对几种不同亚型病毒的多价疫苗。

1.3.2 亚单位疫苗

亚单位疫苗是提取禽流感病毒具有免疫原性的蛋白,辅以佐剂制备而成,这种疫苗具有很好的安全性,并能够刺激机体产生足够的免疫力。随着分子生物学技术的发展,可以将免疫原基因连接到载体质粒上,然后利用原核或真核表达系统表达获得大量的蛋白产物,并且用这种方式生产的蛋白产量高、易于纯化,因而具有很好的开发和应用前景。

1.3.3 重组活载体疫苗

将具有免疫保护性的抗原基因重组到载体病毒中,进而随其在体内的增殖而不断表达外源基因,可以有效诱导机体特异性免疫反应的产生,同灭活苗相比疫苗用量少,又不需要添加佐剂,成本大大降低,而且免疫保护持续时间长,效果好。目前常用的病毒载体有:痘病毒、疱疹病毒和逆转录病毒,其中痘病毒载体又包括痘苗病毒和禽痘病毒。乔传玲(2001)等构建了重组禽痘

病毒疫苗 rFPV-HA-NP, 可以完全抵抗 H5N1 病毒的攻击和部分抵抗 H7N1 病毒的攻击, 该疫苗在生产实践中对我国禽流感疫情的控制发挥了较大作用。

1.3.4 DNA 疫苗

DNA 疫苗(DNA vaccine)又称基因疫苗(genetic vaccine)、核酸疫苗(nucleic acid vaccine), 是近十年来新兴的一种疫苗, 利用病原的保护性抗原构建真核表达质粒, 再将质粒 DNA 通过肌肉注射或基因枪直接导入机体细胞, 使外源基因借助于机体内源性表达系统表达并提呈给宿主免疫系统, 诱导产生特异性的免疫应答反应, 从而达到免疫的目的新型基因工程疫苗 (Robinson, et al, 1997)。DNA 疫苗的抗原合成和提呈过程与病原的自然感染相似, 抗原蛋白经内源性合成后转运到细胞表面, 通过 MHC-I 类 II 类分子直接递呈给免疫系统, 而且核酸疫苗的免疫原单一, 只有编码所需抗原的血凝素基因被导入细胞得到表达, 无散毒和毒力返强的威胁。与传统的全病毒灭活疫苗相比, DNA 疫苗防制 H5 亚型高致病力禽流感具有免疫保护期长、不干扰常规血清学免疫监测的突出优点, 但也存在免疫剂量大、使用成本稍高的缺陷。

1.3.5 反向遗传操作疫苗

1.3.5.1 禽流感重组灭活疫苗

以我国分离到的第一株 H5N1 亚型 HPAI 毒株 GS/GD/1/96 为背景研制的重组禽流感病毒灭活疫苗由本实验室研制成功。该疫苗突破了高致病力禽流感疫苗防制的技术瓶颈, 与先前疫苗相比, 具有更强的抗原针对性, 对鸡的有效免疫保护期更长。在实验条件下对鸡的有效免疫保护长达 3 个月以上。它的推广应用为我国 H5N1 亚型高致病力禽流感的防制提供了坚实的技术保障。该疫苗株的研制采用了流感病毒反向基因操作技术, 其决定免疫保护原性的表面基因来自 H5N1 亚型高致病力禽流感流行株, 并人工缺失了血凝素裂解位点上游的多个碱性氨基酸, 而且使用低致病性高繁殖力毒株 PR8 作为内部基因供体, 使疫苗株具有良好的抗原针对性、高安全性、高滴度鸡胚生长特性。该疫苗在我国及部分东南亚国家的大范围应用, 为 H5N1 高致病性禽流感疫情的控制作出了巨大的贡献。

1.3.5.2 禽流感-新城疫二联活疫苗

以新城疫病毒为载体研制而成的禽流感-新城疫二联活疫苗是反向遗传技术在疫苗研制领域的又一成功应用。利用负链 RNA 病毒的反向遗传操作技术将 H5N1 亚型禽流感病毒的 HA 基因片段插入到新城疫 LaSota 弱毒株中, 在发挥新城疫预防免疫作用的同时可以有效地预防 H5 亚型禽流感, 在国际上处于领先水平。

1.4 反向遗传操作技术及其在流感病毒研究中的应用

1.4.1 反向遗传学和反向遗传操作技术

反向遗传学是相对于经典遗传学而言的。经典的遗传学是从生物的表型、性状到遗传物质来研究生命的发生和发展规律,反向遗传学则是直接从生物的遗传物质入手来阐述生命发生发展的本质现象,与之相关的各项技术统称为反向遗传操作技术。

反向遗传操作技术(Reverse Genetics Manipulation)是一种新兴的分子生物学技术,利用它可对 RNA 病毒直接进行遗传操作,为 RNA 病毒的研究提供了强大的工具。RNA 病毒基因组经反转录为 cDNA,克隆到合适的转录表达载体上,使之受控于强的转录启动子下,在体外应用 RNA 聚合酶转录系统合成病毒基因组的 RNA,然后再用这些体外转录本转染宿主细胞,使之在宿主细胞内包装生成具有感染性的病毒粒子,从细胞培养物中回收病毒,得到感染性分子克隆。另一种方法是经反转录的 cDNA 直接克隆到表达载体上获得具有感染性的 cDNA,而后用含有感染性 cDNA 的质粒转染细胞,经细胞内转录生成具有感染性的病毒 RNA。在此基础上,人们就可以根据自己的需要在 DNA 水平上实现了对 RNA 病毒进行加工、修饰,从而研究病毒基因组的结构与功能,也可以研究病毒的转录、表达机制和致病机制,筛选新型疫苗毒株,构建新型载体系统等。

1.4.2 流感病毒反向遗传操作系统的发展过程

上世纪 80 年代,Plotch 等从去污剂破坏的病毒中分离到 vRNP 之后,科研工作者们开始尝试在实验室条件下产生流感病毒,1989 年,Palese 和其同事开创了利用含来源于 cDNA 克隆 vRNA 的重组病毒进行研究的先例,首次建立了可对负链 RNA 病毒基因进行修饰的系统。该系统是将 cDNA 克隆转录出的 vRNA 和纯化好的 NP 及三种聚合酶在体外作用形成 RNP 复合体,将这种 RNP 复合体转染真核细胞,同时用辅助病毒提供其他 vRNP,结果产生出含有来源于 cDNA 克隆 vRNA 的重组病毒。然而在这一系统大量的子代病毒是辅助病毒,需要利用抗体中和特性、温度敏感性、宿主特异性或药物抗性来筛选获得重组病毒。尽管最终建立了 8 个片段中的 6 个片段的筛选方法(包括 HA、NA、PB2、NP、M、NS),但这一系统的技术要求很高而且所需的有效选择系统很有限,因此利用这一方法去修饰流感病毒基因组只能在有限的几个实验室进行。

Neumann 等在 1994 年利用 RNA 聚合酶 I 在细胞内合成流感病毒的 RNA,从而为流感病毒的反向遗传操作带来了新的生机(Neumann, et al, 1994)。RNA 聚合酶 I 在细胞核内广泛存在,它转录产生核糖体 RNA (rRNA),同流感病毒的 vRNA 相同,也不具有 5'端帽子和 3'poly(A)尾巴。此外, RNA 聚合酶 I 在确定的启动子和终止子序列起始和终止转录而不延伸到转录区内,所以 RNA 聚合酶 I 的转录本在其 5'和 3'端不含有多余的核苷酸。1994 年 Neumann 等克隆了一个流感病毒的 cDNA,将其置于 RNA 聚合酶 I 的启动子和终止子的控制之下,在转染细胞后发现细胞内的 RNA 聚合酶 I 合成出了病毒的 RNA。在 1996 年 Pleschka 等利用上述 RNA 聚合酶 I 系统,通过在细胞核内产生 NA 基因的 vRNP,并由辅助病毒提供其它所需的 vRNP 复合体,从而救获了

重组流感病毒(Pleschka, et al, 1996)。尽管 RNA 聚合酶 I 系统仍需要一定的筛选系统来区分重组病毒和辅助病毒，但是它较 RNP 转染的方法更方便，因为它不需要进行体外转录，蛋白纯化和体外 RNP 的组装。然而这两种系统都需要依赖辅助病毒，所以病毒救获的效率很低，不能产生出存在严重生长缺陷的病毒。

1999年，完全由质粒系统产生流感病毒的技术难题被 Neumann 和 Fodor 分别攻克了。Neumann 等将流感病毒八个基因片段的 cDNA 分别克隆到上游含有 RNA Poly I 启动子、下游含有 RNA 聚合酶 I 终止序列的质粒上。将这八种转录 vRNA 的质粒与九种表达流感结构蛋白的质粒共转染 293T 细胞，在细胞 RNA 聚合酶 I 的作用下转录出 vRNA，同时由表达质粒在细胞中表达提供各种结构蛋白，从而启动了流感病毒的复制循环，产生出人工制造的流感病毒。这即所谓的 17 质粒系统。随后，转染时将表达结构蛋白的质粒减少到四种，即只将四种复制必需蛋白（NP、三种聚合酶蛋白）的表达质粒与八种转录 vRNA 质粒共转染来救获病毒，这即是 12 质粒系统。Fodor 等同时建立的 12 质粒系统与 Neumann 等建立的很相似，同样将 vRNA 的 cDNA 克隆到 RNA 聚合酶 I 启动子下游，但在 cDNA 下游为 δ 肝炎病毒的核酶序列（能精确切割转录本，使 vRNA 既完整又无多余序列），将八种转录 vRNA 的质粒与四种复制必需蛋白的表达质粒共转染 Vero 细胞来获得流感病毒。Neumann 等采用的 293T 细胞的转染效率很高，病毒 RNA 和各种结构蛋白在细胞中很容易组装成有感染性的病毒粒子，而 Fodor 等利用 δ 肝炎病毒的核酶使流感病毒的 vRNA3' 末端序列更精确无误。

Hoffmann 等建立了另一系统—8 质粒载体系统，这一系统中，病毒 cDNA 被插入到 RNA 聚合酶 I 启动子和终止序列之间，然后将 RNA 聚合酶 I 转录部分作为整体插入到 RNA 聚合酶 II 启动子和 polyA 之间，从而形成了一个双向转录系统。转染 293T 细胞后，在细胞提供的 RNA 聚合酶 I 和 RNA 聚合酶 II 的作用下，以病毒 cDNA 为模板同时向两个方向起始转录，分别合成 mRNA 和 vRNA，转录出的 mRNA 在细胞质中翻译出流感病毒的结构蛋白，最终使结构蛋白与 vRNA 装配成有感染性的病毒粒子。由于 8 质粒系统不需要另外的蛋白表达质粒提供结构蛋白，因此减少了产生流感病毒所需质粒的数量。与 12 质粒系统相比，8 质粒载体系统具有更高的效率。

近年来，流感病毒分子生物学研究进展很快，主要表现在分子流行病学、流感病毒复制及其调控、流感病毒载体改造及应用、流感病毒治疗与预防等领域。其中流感病毒复制及其调控机制是揭示流感病毒感染性与致病性机制，研究有效治疗与预防措施的基础，这一领域的进展得益于流感病毒反向遗传操作技术的建立与应用。

1.5 本研究的目的和意义

我国于 1994 年首次在广东发病鸡群中分离到 H9N2 亚型禽流感病毒，其后 H9N2 病毒在 20 多个省市的鸡群和鸭群中流行并引起发病，给养禽业造成了巨大的经济损失。尤为重要，在中国大陆和香港地区一些 H9N2 亚型流感病毒已经传播给了猪和人，有可能给人类健康造成新的威胁。Guan 等(Guan, et al, 2001)将欧亚种系 H9N2 亚型 AIV 分为三个群系，其代表毒株分别为 A/Quail/Hong Kong/G1/97(G1)，A/Duck/Hong Kong/Y280/97(Y280)和 A/Duck/Hong Kong/Y439/97

(Y439)。本实验室李呈军等人对 H9N2 亚型禽流感病毒 1996~2002 年国内分离株进行了系统的生物学特性和遗传演化分析,发现这些病毒在进化过程中不断发生重组,形成多个基因型。其中与抗原性相关的表面蛋白基因 HA 可分为 2 个亚群,分别以 A/chicken/Beijing/1/94 和 A/chicken/Heilongjiang/35/01 为代表株。其中 A/chicken/Beijing/1/94 亚群病毒包括 Guan 等报道的 Y280 类病毒,而 A/chicken/Heilongjiang/35/01 则含有北美群系的 HA 基因。我国在 2002 年以前没有分离到 G1 或 Y439 类 H9N2 亚型禽流感病毒。为了持续观察国内 H9N2 亚型禽流感病毒的变化方向,本研究对 2003~2004 年中国大陆分离到的 13 株 H9N2 亚型禽流感病毒进行了遗传演化分析,以期为我国 H9N2 亚型禽流感的防治提供理论和试验依据。

H5N1 亚型禽流感的爆发不仅给世界养禽业造成毁灭性打击,而且具有重要的公共卫生学意义,对 H5N1 亚型禽流感的防治工作是全世界相关研究人员面临的重大课题。疫苗免疫是预防高致病性 H5N1 亚型禽流感的重要防线。高效、安全、实用的禽流感疫苗的研制一直是世界养禽业关注的焦点。

在我国,安全高效的 H5N1 亚型禽流感重组病毒灭活疫苗已经得到广泛应用,取得了前所未有的成功。而 2006 以后,在我国某些地区多次分离到不同抗原群的 H5N1 高致病性毒株,而现有疫苗不能对免疫家禽起到有效保护。为了抑制 H5N1 亚型高致病性禽流感在我国蔓延,研制针对这部分抗原变异病毒的疫苗显得极为紧迫,因此,本研究采用国内具有代表性的抗原变异株 CK/SX/2/06 为背景构建 H5N1 亚型禽流感抗原变异株疫苗株,以期能够对这一抗原群的 H5N1 亚型高致病性禽流感进行有效的防治。

第二章 H9N2 亚型禽流感病毒遗传演化分析

2.1 材料和方法

2.1.1 材料

2.1.1.1 病毒分离株

表 2-1 H9N2 病毒分离株及其简称
Table 2-1 H9N2 viruses and abbreviation

病毒 Virus	简称 Abbreviation
A/Sheldrake/Hubei/114/2004 (H9N2)	SD/HuB/114/04
A/Duck/Anhui/143/2004 (H9N2)	DK/AH/143/04
A/Goose/Guangdong/131/2004 (H9N2)	GS/GD/131/04
A/Chicken/Guangdong/129-1/2004 (H9N2)	CK/GD/129-1/04
A/Duck/Guangdong/133/2004 (H9N2)	DK/GD/133/04
A/Chicken/Guangdong/129-2/2004 (H9N2)	CK/GD/129-2/04
A/Chicken/Fujian/136/2004 (H9N2)	CK/FJ/136/04
A/Chicken/Fujian/135/2004 (H9N2)	CK/FJ/135/04
A/Chicken/Guangdong/128/2004 (H9N2)	CK/GD/128/04
A/African wild goose/Tianjin/ 101/2004 (H9N2)	AFWB/TJ/101/04
A/Goose/Tianjin/102/2004 (H9N2)	GS/TJ/102/04
A/Chicken/Guangdong/123/2003 (H9N2)	CK/GD/123/03
A/Quail /Guangdong/125/2003 (H9N2)	QA/GD/125/03

均来自于有温和型禽流感症状或无明显症状的养禽场，其中病禽表现喷嚏，咳嗽，流泪，产蛋下降、下痢等症状，死淘率升高，并且大部分禽群有细菌混合感染。采集家禽病料标本或泄殖腔、喉头棉拭子于哈尔滨兽医研究所国家禽流感参考实验室进行疾病诊断和病毒分离。

2.1.1.2 SPF 鸡胚

9-11 日龄 SPF 鸡胚购自哈尔滨兽医研究所实验动物中心。

2.1.1.3 血凝素亚型鉴定抗原及血清

所用的禽流感血凝素分型参照抗原 Dk/Albe/35/76 (H1)、Dk/Ger/1215/73 (H2)、Dk/Ukra/1/63 (H3)、Dk/Cze/56 (H4)、Tk/Eng/N28/73 (H5)、Tk/Cana/63 (H6)、Afri Star/983/79 (H7)、Tk/Onta/6118/68 (H8)、Tk/Wis/1/66 (H9)、PD 384/79 (H10)、Dk/Eng/56 (H11)、Dk/Albe/60/76 (H12)、Gul/Mal/704/77 (H13)、Mal/Gur/263/82 (H14)、Dk/Aus/341/83 (H15) 由英国兽医中心实验室惠赠，相应 SPF 鸡血清由农业部动物流感重点开放实验室制备；新城疫 (ND) 和减蛋

综合症 (EDS-76) 参考抗原和血清由哈尔滨兽医研究所疫病诊断中心提供。

2.1.1.4 神经氨酸酶亚型鉴定抗原及血清

神经氨酸酶分型参照抗原由英国兽医中心实验室惠赠, 相应 SPF 鸡血清由农业部动物流感重点开放实验室制备。神经氨酸酶抑制 (NI) 试验参照抗原及相应血清: Dk/Albe/35/76 (N1)、Tk/Eng/N28/73 (N2)、Dk/Ger/1215/73 (N3)、Tk/Onta/6118/68 (N4)、Dk/Albe/60/76 (N5)、Dk/Cze/56 (N6); Tk/Scot/70 (N7)、Dk/Ukra/1/63 (N8)、Dk/Memp/546/76 (N9)。

2.1.1.5 主要试剂与仪器

r-Taq 聚合酶, EX-Taq 聚合酶, dNTPs, pMD18-T 载体连接试剂盒, DNA Marker DL 2000、DL 15000 购自大连宝生物工程有限公司, RNA 提取试剂 Trizol LS, DTT, 鼠源反转录酶 (MLV) 试剂盒, RNaseOUT 均购自 Invitrogen 公司。测序试剂盒 CEQTM DTCS Quick Start Kit 购自 BECKMAN 公司, 小量胶回收试剂盒与小量质粒提取试剂盒购自上海华舜生物技术有限公司。测序引物由禽流感国家参考实验室提供。

高速离心机 (Beckman Allegra TM21R), PCR 仪 (Perkin Elmetr Gen Amp PCR system 2400), 测序仪 (Beckman CEQ)。

2.1.2 方法

2.1.2.1 病毒分离及有限稀释克隆纯化

由现地采集的发病或无明显症状家禽脏器在无菌的条件下研磨, 然后加入 1ml 冰上预冷的 PBS 水 (每毫升 PBS 含 1000 单位的青霉素和 1000 单位的链霉素), 对于喉头拭子和泄殖腔拭子样品直接加入 1ml PBS, 然后以 4000rpm/min 低速离心 5min, 取上清经尿囊腔途径接种 9-11 日龄 SPF 鸡胚。孵化 48 小时后收取鸡胚尿囊液, 进行血凝试验 (HA), 对于有血凝价的鸡胚尿囊液进行血凝抑制和神经氨酸酶抑制试验鉴定病毒亚型, 没有血凝价的鸡胚收取尿囊液后在 SPF 鸡胚上盲传三代, 如果仍然没有血凝性则认为是病毒分离阴性。病毒分离后需要在 SPF 鸡胚上进行 3 次零点有限稀释克隆纯化, 即每一次均取最高稀释度有血凝价鸡胚尿囊液作为下一次传代纯化的种毒, 如此经三次纯化后, 以 10^{-3} 稀释接种 9-11 日龄 SPF 胚, 48 小时后收取鸡胚尿囊液, 经菌检证明无污染, 分装于小管中作为种毒贮存于 -70°C 。

2.1.2.2 病毒基因组 RNA 提取与反转录

取 $250\mu\text{l}$ 病毒尿囊液, 加入 $750\mu\text{l}$ Trizol LS 裂解液, 混匀, 室温作用 10min, 再加入 $200\mu\text{l}$ 氯仿, 混匀, 室温放置 5min 后 $12000g$ 、 4°C 离心 15min, 转移上清至新的离心管中, 加 $500\mu\text{l}$ 的异丙醇, 室温放置沉淀 10min。 $12000g$ 离心 10min 后弃上清, 沉淀真空干燥后, 重悬于 DEPC 处理水。RNA 提取出来以后, 反转录按鼠源反转录酶 (MLV) 试剂盒说明加入各成分(反转录引

物序列为 Uni12 5'-AGC AAA AGC AGG-3'), 37℃反应 2-3h, 直接用于 PCR。

2.1.2.3 PCR 与目的片段的回收

PCR 引物是根据 GenBank 中 H9N2 亚型禽流感病毒的序列选择同源性最高的区域设计的。PCR 按 EX-Taq 聚合酶使用说明书上的比例加入各成分,在 PCR 仪上进行。8 个基因片段预变性温度和时间均为 95℃ 5 min, 在 PCR 循环中, 变性 94℃、1 min, 退火 53℃、1 min, 延伸 72℃, 时间长短根据片段大小而定, PB2, PB1 和 PA 为 2 min, HA, NP 和 NA 为 1.5min, M 和 NS 为 1min, 35 个循环后继续于 72℃延伸 8 min。取 5 μl PCR 产物在 1%琼脂糖凝胶上电泳检查结果, 然后按小量胶回收试剂盒说明进行目的片段的回收。

2.1.2.4 目的片段的克隆

在 10μl 体系下, 按 pMD18-T 载体连接试剂盒说明分别加入目的片段、pMD18-T 载体与 SolutionI, 16℃水浴连接 2h 以上。将连接产物全部加入 100μl JM109 感受态中, 冰浴 30min, 42℃热激 90sec, 冰浴 2min, 加入 1ml 无抗生素的 LB, 37℃摇床上培养 45min, 5000rpm 离心 2min, 预留 200μl 左右上清悬浮沉淀, 加入 40μl X-gal, 4μl IPTG, 重悬沉淀, 均匀涂布于含 Amp 的 LB 琼脂平板上, 37℃培养 14-16h。挑取白色菌落接种于含 Amp 的液体 LB 培养基中, 37℃振荡培养 12h。在 1.5ml Eppendorf 管中加 1.5ml 细菌培养液, 12000rpm 离心 30sec, 弃尽上清, 加入 30μl 灭菌蒸馏水悬浮沉淀, 再加入 100μl 酚: 氯仿: 异丙醇 (25: 24: 1) 混合液, 上下颠倒 4-5 次, 加入高真空绝缘硅脂, 12000rpm 离心 3min, 在同一管中加入 100μl 氯仿, 继续离心 2min, 取 5μl 上清进行电泳, 根据质粒大小初步判断挑阳性质粒, 疑似阳性质粒进一步用质粒 PCR 鉴定。鉴定为阳性质粒的菌液, 用小量质粒回收试剂盒重新提取质粒, 用于序列测定。

2.1.2.5 序列测定

在 PCR 管中分别将 PCR 鉴定阳性质粒和适量 ddH₂O 混合, 96℃加热预变性 3min, 自然冷却到室温后加入测序引物 (5pmol/μl) 和 DTCS Quick Start Master Mix 2 μl, 混匀后进行测序 PCR 反应, PCR 反应程序为: 96℃ 20sec、50℃ 20sec、60℃ 4min, 35 个循环, 最后保持在 4℃。PCR 反应完成后加入 2.5ul 的反应终止液 (3M pH5.2 的 NaOAc 1ul, 100 mM pH8.0 的 EDTA 1ul, 20mg/ml 的 Glycogen 0.5ul, 即用即配) 终止反应, 然后加入 30ul 95%冰乙醇沉淀 DNA, 混匀, 4℃、12000rpm 立即离心 20min。小心倒掉上清后, 用 100-200ul 70%冰乙醇两次洗脱残留的盐, 4℃、12000rpm 离心 5min。真空抽干或室温晾干 DNA 后, 用 30ul 甲酰胺充分溶解 DNA 沉淀, 小心加入 CEQ 样品板孔内, 最后加一滴石蜡油到样品板孔内。随即采用双脱氧链终止法在 BechmanCEQ8000 测序仪 (Bechman, America) 上对克隆重组质粒进行测序, 之后利用 DNASTAR 软件 (DNASTAR.Inc.) 将得到的序列进行分析。

2.1.2.6 序列拼接与分析

利用 DNASTAR 软件中的 Seqman 拼接所有序列, 应用 MegAlign 进行同源性比较和进化分

析。

2.2 结果

2.2.1 序列测定结果

为从分子水平上了解我国 2003-2004 年间分离到的 H9N2 亚型禽流感病毒的遗传演化情况, 对 13 株代表性的 H9N2 亚型禽流感病毒的表面蛋白序列进行分析, 并从 GenBank 中获得代表性的 H9N2 病毒基因序列用于比较, 其中包括引起我国广东发生第一起 H9N2 亚型禽流感的病毒 CK/BJ/1/94, 1997 年香港活禽市场上分离到的 H9N2 代表株 QA/HK/G1/97, CK/HK/G9/97, DK/HK/Y280/97, DK/HK/Y439/97 和北美群系代表株 Turkey/Wisconsin/1/66 等。

HA 和 NA 基因片段的序列测定结果见附录。

2.2.2 HA 基因遗传分析

这 13 株病毒的 HA 基因均属于欧亚种系, 其 HA 核苷酸序列的同源性在 87.0% 至 99.9% 之间, 氨基酸序列的同源性在 89.8% 至 99.8% 之间。从遗传学上可分为 2 个分支, 即 A/chicken/Beijing/1/94 亚群分支与 G1 亚群分支。两株病毒 CK/GD/123/03 和 QA/GD/125/03 属于 G1 亚群, 分支内 HA 基因的核苷酸序列同源率在 98.0% 以上; 其它 11 株病毒均属于 A/chicken/Beijing/1/94 亚群, 分支内 HA 基因的同源率不低于 94.7%; 而两个分支之间 HA 基因的同源率不超过 92.5%。在这些分离株中没有发现 DK/HK/Y439/97 群系或北美群系的 HA 基因。HA 基因系统发育进化关系见图 2-1。

13 株 H9N2 亚型 AIV 的 HA 裂解位点附近的氨基酸均为 -PARSSR/GL-, 均无多个连续的碱性氨基酸插入, 具有典型的低致病性禽流感病毒特点的 HA 基因特征。

病毒血凝素上第 183, 190 和 226 位 (参照 H3 位点) 氨基酸是关键受体结合位点, 与病毒的受体结合特性和宿主特性相关。特别是其中的 226 位氨基酸, 在禽流感病毒中为谷氨酸(Q), 与 α -2,3 半乳糖连接的唾液酸结合, 而在 H2 和 H3 亚型的人流感病毒中则为亮氨酸(L), 与 α -2,6 半乳糖连接的唾液酸结合。在我们的 13 株 H9N2 亚型 AIV 中, HA 基因的受体结合位点上存在着显著的差异, 某些毒株呈现出典型的人流感受体结合特性, 详见表 2-3。

13 株病毒的血凝素 HA1 和 HA2 部分、各含有 5 个 (第 11, 123, 200, 280 和 287 位氨基酸) 和两个 (474 和 533) 保守的潜在糖基化位点。此外, GS/TJ/102/04 和 AFWB/TJ/101/04 在 150 位上由 A 突变成 T 使它们在 148 位 (即参照 H3 时的 160 位) 上出现一个新的潜在糖基化位点。CK/GD/123/03 和 QA/GD/125/03 在 89 位上由 L 突变成 T, 在 188 位由 T 突变成 N, 使它们在位于 HA 头部受体结合位点附近的 87 和 198 位 (即参照 H3 时的 94 和 198 位) 上出现两个新的潜在糖基化位点, 有可能改变病毒的抗原性并影响受体结合特性而感染新的宿主。

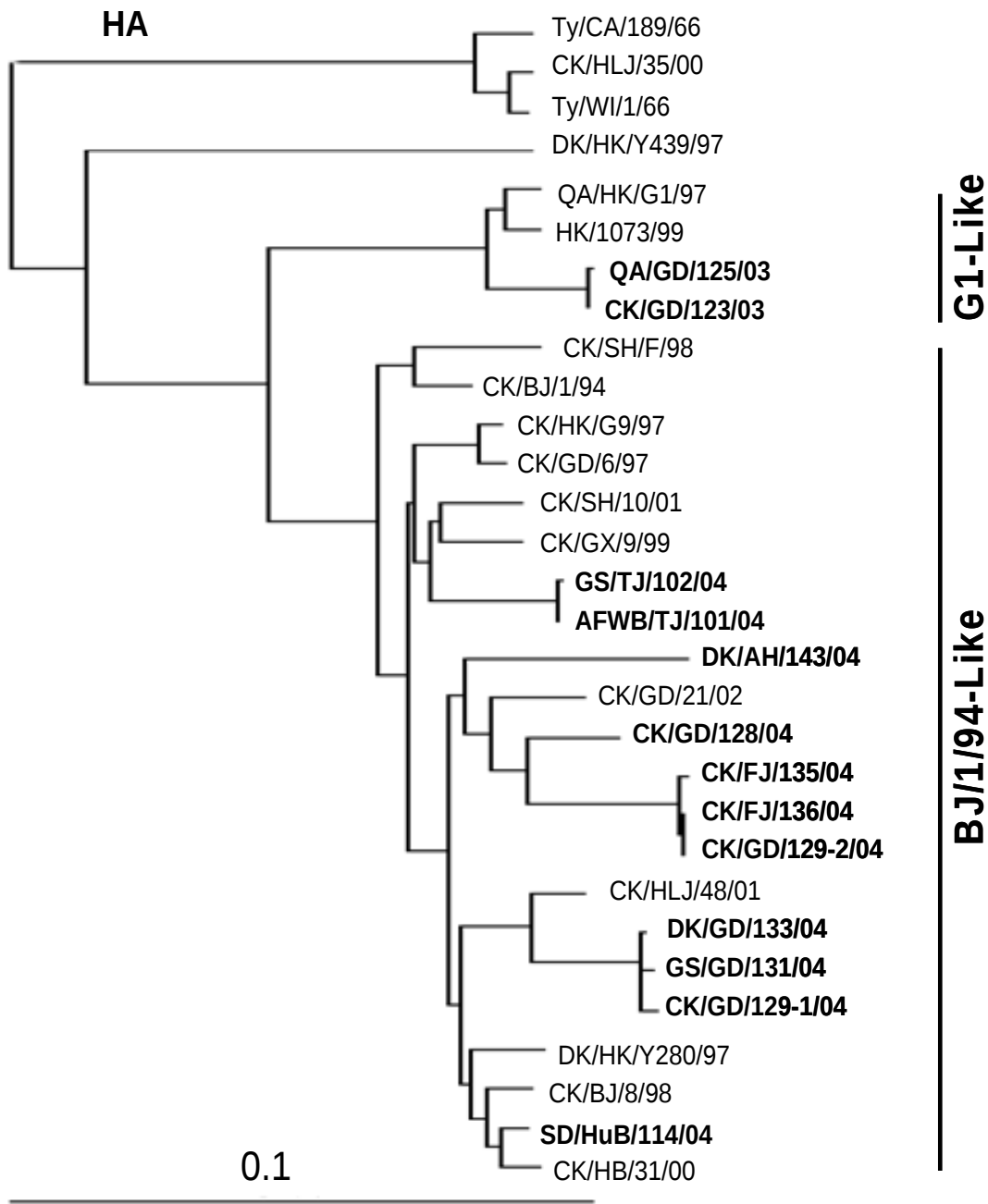


图 2-1 H9N2 亚型 HA 系统发育基因进化树(43-1572, 1530bp)

Figure 2-1 Phylogenetic tree for H9 HA gene of influenza A viruses. Nucleotides 43-1572 (1530bp) of HA were used for the phylogenetic analysis.

表 2-2 HA 基因同源性比较（左下为氨基酸右上为核苷酸）

Table 2-2 Homology of HA gene

	SD/HuB/114/04	DK/AH/143/04	GS/GD/131/04	CK/GD/129-1/04	DK/GD/133/04	CK/GD/129-2/04	CK/FJ/136/04	CK/FJ/135/04	CK/GD/128/04	AFWB/TJ/101/04	GS/TJ/102/04	CK/GD/123/03	QA/GD/125/03	CK/BJ/1/94	DK/HK/Y280/97	CK/HK/G9/97	CK/SH/F/98	QA/HK/G1/97	HK/1073/99	DK/HK/Y439/97	Ty/WI/1/66	CK/HLJ/35/00	Ty/CA/189/66	CK/BJ/8/98	CK/GD/6/97	CK/GD/21/02	CK/GX/9/99	CK/HB/31/00	CK/HLJ/48/01	CK/SH/10/01
SD/HuB/114/04	***	94.2	95.6	95.4	95.8	94.0	94.1	94.1	95.6	95.5	95.4	88.8	88.8	95.9	97.7	96.5	94.6	89.9	90.1	82.8	79.3	79.2	79.7	98.5	96.5	96.5	96.1	99.0	96.9	96.3
DK/AH/143/04	96.3	***	92.2	92.0	92.2	91.9	92.0	92.0	93.1	92.5	92.4	87.9	87.8	92.5	93.9	93.3	91.7	88.2	88.4	83.5	78.7	78.6	78.4	94.3	93.2	94.1	92.6	94.1	93.9	93.7
GS/GD/131/04	96.9	96.9	***	99.5	99.7	91.7	91.8	91.8	96.3	92.5	92.4	86.8	86.7	93.2	95.2	94.0	92.2	88.0	88.0	82.5	77.8	77.7	78.0	95.5	93.9	94.0	93.3	95.4	97.1	93.3
CK/GD/129-1/04	96.5	96.1	98.8	***	99.6	91.3	91.4	91.4	96.1	92.4	92.4	86.7	86.7	93.1	95.0	93.7	92.0	87.8	87.9	82.4	77.6	77.5	77.7	95.4	93.7	93.9	93.2	95.3	96.9	93.1
DK/GD/133/04	97.1	96.7	99.4	99.0	***	91.7	91.8	91.8	96.3	92.7	92.7	87.0	86.9	93.4	95.3	94.1	92.4	88.1	88.2	82.7	78.0	77.8	78.1	95.7	94.1	94.1	93.5	95.6	97.0	93.4
CK/GD/129-2/04	95.5	96.3	96.3	95.5	96.1	***	99.9	99.8	95.6	92.4	92.3	87.0	86.9	92.5	94.2	93.1	91.5	87.5	87.6	81.4	78.8	78.8	79.2	93.9	92.7	95.8	92.9	93.8	92.8	92.8
CK/FJ/136/04	95.7	96.5	96.5	95.7	96.3	99.8	***	99.9	95.6	92.4	92.4	87.1	87.0	92.6	94.2	93.2	91.6	87.5	87.6	81.3	78.7	78.6	79.0	93.9	92.8	95.9	92.9	93.9	92.9	92.9
CK/FJ/135/04	95.5	96.3	96.3	95.5	96.1	99.6	99.8	***	95.4	92.3	92.2	86.9	86.9	92.4	94.1	93.0	91.4	87.3	87.4	81.4	78.5	78.4	78.8	94.0	92.6	95.8	92.7	94.0	92.9	92.7
CK/GD/128/04	96.5	96.9	98.0	97.3	97.8	98.2	98.4	98.2	***	93.5	93.5	87.6	87.6	93.7	95.4	94.2	92.5	88.4	88.6	82.2	78.8	78.6	79.1	95.6	94.1	95.4	94.1	95.5	95.7	94.0
AFWB/TJ/101/04	96.3	96.1	95.5	95.1	95.7	94.9	95.1	94.9	95.5	***	99.9	89.2	89.1	95.6	95.2	95.8	94.3	90.3	90.1	83.2	79.6	79.3	79.7	95.2	96.1	93.9	96.1	95.2	93.9	96.3
GS/TJ/102/04	96.1	95.9	95.3	94.9	95.5	94.7	94.9	94.7	95.3	99.8	***	89.0	89.0	95.5	95.2	95.8	94.2	90.3	90.0	83.1	79.5	79.3	79.6	95.2	96.1	93.9	96.1	95.1	93.9	96.1
CK/GD/123/03	90.2	90.4	90.6	90.0	90.6	90.4	90.6	90.4	91.0	90.8	90.6	***	99.9	91.3	88.9	89.9	89.2	97.2	97.6	83.3	78.6	78.4	78.7	89.0	89.9	88.0	89.5	88.8	88.4	89.6
QA/GD/125/03	90.0	90.2	90.4	89.8	90.4	90.2	90.4	90.2	90.8	90.6	90.4	99.8	***	91.2	88.8	89.9	89.1	97.1	97.5	83.3	78.4	78.2	78.6	89.0	89.8	87.9	89.4	88.7	88.4	89.5
CK/BJ/1/94	96.3	95.3	95.9	95.5	96.1	94.7	94.9	94.7	95.5	96.1	95.9	92.2	92.0	***	95.9	96.8	96.7	92.8	92.5	84.6	80.5	80.3	80.4	95.8	96.7	94.4	95.9	95.5	94.4	96.0
DK/HK/Y280/97	97.1	96.7	97.3	96.7	97.3	95.9	96.1	95.9	96.9	95.9	95.7	90.2	90.0	95.7	***	97.3	94.6	90.1	90.2	82.5	79.7	79.5	80.1	97.6	97.1	96.1	96.1	97.6	96.5	96.1

	CK/SH/10/01	CK/HLJ/48/01	CK/HB/31/00	CK/GX/9/99	CK/GD/21/02	CK/GD/6/97	CK/BJ/8/98	Ty/CA/189/66	CK/HLJ/35/00	Ty/WI/1/66	DK/HKY439/97	HK/1073/99	QA/HK/G1/97	CK/SH/F/98	CK/HK/G9/97	DK/HK/Y280/97	CK/BJ/1/94	QA/GD/125/03	CK/GD/123/03	GS/TJ/102/04	AFWB/TJ/101/04	CK/GD/128/04	CK/FJ/135/04	CK/FJ/136/04	CK/GD/129-2/04	DK/GD/133/04	CK/GD/129-1/04	GS/GD/131/04	DK/AH/143/04	SD/HuB/114/04
CK/HK/G9/97	96.1	95.9	96.5	95.7	96.3	95.1	95.3	95.1	95.9	96.1	95.9	91.4	91.2	96.7	97.3	***	95.2	91.0	91.0	83.3	79.7	79.5	79.9	96.2	99.2	94.9	96.6	96.4	95.2	96.3
CK/SH/F/98	95.5	95.3	95.1	94.3	94.9	94.1	94.3	94.1	94.7	95.3	95.1	89.8	89.6	96.3	95.5	96.1	***	90.7	90.3	83.3	79.9	79.7	79.8	94.4	95.2	93.6	94.9	94.1	93.1	94.9
QA/HK/G1/97	90.6	90.6	90.8	90.2	90.8	90.6	90.8	90.6	91.0	91.2	91.0	98.2	98.0	92.5	90.6	91.4	90.2	***	98.8	83.6	78.8	78.6	79.3	90.2	90.9	88.6	90.4	89.9	89.3	90.5
HK/1073/99	90.6	90.8	90.8	90.2	90.8	90.6	90.8	90.6	91.0	91.2	91.0	98.6	98.4	92.5	90.6	91.4	90.2	98.8	***	83.5	79.3	79.0	79.5	90.2	90.9	88.8	90.3	90.0	89.4	90.5
DK/HKY439/97	88.6	88.8	89.4	88.8	89.4	88.4	88.2	88.0	89.0	89.4	89.2	88.2	88.0	90.6	89.4	90.2	90.2	88.6	88.2	***	80.9	80.5	81.5	83.1	83.1	82.6	83.2	82.9	83.3	83.8
Ty/WI/1/66	87.5	87.1	87.3	86.7	87.3	87.3	87.3	87.1	87.8	87.6	87.5	87.1	86.9	88.6	87.3	87.5	87.6	87.1	87.6	89.8	***	99.3	98.2	79.3	79.9	79.7	79.3	79.3	78.9	79.4
CK/HLJ/35/00	87.1	86.7	86.9	86.3	86.9	87.1	86.9	86.7	87.5	87.1	86.9	86.7	86.5	88.2	86.9	87.1	87.3	86.7	87.3	89.4	98.8	***	98.0	79.2	79.7	79.5	79.1	79.2	78.8	79.2
Ty/CA/189/66	87.3	86.9	86.9	86.3	86.9	87.3	87.1	86.9	87.6	87.5	87.3	86.9	86.7	88.4	87.3	87.5	87.6	87.3	87.5	91.0	97.8	97.5	***	79.6	80.1	79.9	79.4	79.6	79.4	79.7
CK/BJ/8/98	97.1	96.7	97.3	96.9	97.5	95.7	95.9	95.7	96.9	95.9	95.7	90.2	90.0	95.7	97.3	95.9	95.1	90.4	90.4	88.6	87.5	87.1	87.3	***	96.3	96.1	96.1	98.4	96.9	96.1
CK/GD/6/97	96.5	95.5	96.1	95.7	96.3	94.5	94.7	94.5	95.5	96.5	96.3	90.8	90.6	96.7	97.1	98.8	95.7	90.8	90.8	89.6	87.6	87.3	87.5	96.3	***	94.9	96.5	96.3	95.1	96.4
CK/GD/21/02	97.5	97.6	97.1	96.7	97.3	97.5	97.6	97.5	97.5	96.5	96.3	90.8	90.6	96.1	97.3	95.9	95.7	91.2	91.2	89.2	87.6	87.3	87.5	97.3	96.3	***	94.7	96.3	95.2	94.7
CK/GX/9/99	95.7	94.9	95.5	94.9	95.5	94.5	94.7	94.5	94.7	95.5	95.3	90.4	90.2	95.3	95.7	95.9	95.1	90.8	90.8	89.2	87.1	86.5	86.9	95.5	95.9	95.9	***	96.0	94.6	97.1
CK/HB/31/00	97.5	96.5	97.1	96.7	97.3	95.7	95.9	95.7	96.7	95.7	95.5	90.4	90.2	95.7	97.3	95.9	94.9	90.8	90.8	89.0	87.5	87.1	87.3	97.3	95.9	97.3	95.5	***	96.8	95.8
CK/HLJ/48/01	97.1	97.3	98.8	98.0	98.6	96.5	96.7	96.5	98.0	95.7	95.5	90.8	90.6	96.1	97.5	96.3	95.3	91.0	91.0	89.8	87.5	87.1	87.3	97.5	95.9	97.3	95.3	97.3	***	94.8
CK/SH/10/01	97.3	96.7	96.9	96.1	96.7	95.9	96.1	95.9	96.5	97.1	96.9	91.0	90.8	96.7	97.1	97.1	96.7	91.4	91.4	89.6	88.2	87.6	88.0	97.1	97.5	97.5	97.1	96.7	97.1	***

表 2-3 HA 基因特征性位点氨基酸序列分析

Table 2-3 Amino acids in the HA gene of H9N2 influenza viruses

毒株	HA 裂	可能受体结合位点											潜在糖基化位点									
	解位点																					
	326-329 RSSR	98 Y	134-137 GTSK	153 W	155 T	183 N	186 P	190 V	194 L	195 Y	226 Q	228 G	11 NST	87 NGT	123 NVS	148 NNT	188 NDT	200 NRT	280 NTT	287 NVS	474 NGT	533 NGS
SD/HuB/114/04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—	—	+	+	+	+	+
DK/AH/143/04	+	+	+	+	+	+	+	A	+	+	L	+	+	—	+	—	—	+	+	+	+	+
GS/GD/131/04	+	+	+	+	+	+	+	A	+	+	L	+	+	—	+	—	—	+	+	+	+	+
CK/GD/129-1/04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—	—	+	+	+	+	+
DK/GD/133/04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	L	+	+	—	+	—	—	+	+	+	+	+
CK/GD/129-2/04	+	+	+	+	+	+	+	A	+	+	L	+	+	—	+	—	—	+	+	+	+	+
CK/FJ/136/04	+	+	+	+	+	+	+	A	+	+	L	+	+	—	+	—	—	+	+	+	+	+
CK/FJ/135/04	+	+	+	+	+	+	+	A	+	+	L	+	+	—	+	—	—	+	+	+	+	+
CK/GD/128/04	+	+	+	+	+	+	+	A	+	+	L	+	+	—	+	—	—	+	+	+	+	+
AFWB/TJ/101/04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—	+	+	+	+	+
GS/TJ/102/04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—	+	+	+	+	+
CK/GD/123/03	+	+	GTSR	+	+	H	+	E	+	+	L	+	+	+	NVT	—	+	+	NST	NIS	+	+
QA/GD/125/03	+	+	GTSR	+	+	H	+	E	+	+	L	+	+	+	NVT	—	+	+	NST	NIS	+	+

2.2.3 NA 基因遗传分析

13 株 H9N2 亚型 AIV 的 NA 基因从遗传学上可分为 3 个分支,即 A/chicken/Beijing/1/94 亚群分支、G9 亚群分支和 G1 亚群分支,各分支内同源率分别达到 92.3%、94.2%和 96.7%以上。其中 G1 亚群病毒亲缘关系最远,与其它分支病毒同源率低于 89.5%; A/chicken/Beijing/1/94 亚群分支和 G9 亚群分支之间同源率亦不高于 90.9%。NA 基因系统发育进化关系见图 2-2。

流感病毒表面糖蛋白 NA 茎部可以有不同长度氨基酸的缺失。通过对 13 株病毒的 NA 基因序列分析后发现,3 株病毒 GS/GD/131/04、CK/GD/129-1/04 和 DK/GD/133/04 与 G9 群系的其它病毒相似,在 NA 茎部未发生缺失,可以认为是 G9 群系 NA 基因的一个共同特征;CK/GD/123/03 和 QA/GD/125/03 在 131-136 位之间缺失 6 个核苷酸,导致了 2 个氨基酸的缺失;SD/HuBSZ/114/04 在 200-223 位之间缺失 24 个核苷酸,导致了 8 个氨基酸的缺失;而其余 5 株病毒在 206-214 位之间则缺失 9 个核苷酸,导致了 3 个氨基酸的缺失。

如表 2-5 所示,13 株病毒的 NA 基因在可能的血凝素结合(Hemadsorbing, HB)位点上表现出较大的差异,在 366-373 位点区域的 367 位,368 位,370 位的氨基酸变异较大。在 367 位上,有 3 株病毒为 E,其余均为 K;368 位上,5 株病毒为 K,各有 4 株病毒为 S 和 E。在 399-404 位点区域的 401 和 403 位的氨基酸变化较大,在 401 位上 SD/HuB/114/04 和 DK/AH/143/04 为 E,其余 11 株均为 D;402 位上,两株为 K,其余 11 株为 N;403 位上,有 3 株病毒为 S,其余 10 株均为 W。在 431-433 位点区域有 8 株病毒为 PQE,3 株病毒为 PKE,CK/GD/123/03 和 QA/GD/125/03 为 PHE。

大部分毒株 NA 氨基酸序列存在 6 个潜在的糖基化位点,分别在 69, 86, 146, 200, 234 和 402 位,而 CK/GD/123/03 和 QA/GD/125/03 在 402 位上由 N 突变为 K 而丧失了此潜在糖基化位点。此外,8 株病毒 NA 基因在 44 位存在潜在糖基化位点,7 株病毒在 61 位都存在潜在糖基化位点,CK/FJ/136/04 在 336 位多出一个潜在糖基化位点。但是从总体而言,所有毒株 NA 基因的潜在糖基化位点数量不超过 8 个,见表 2-5。

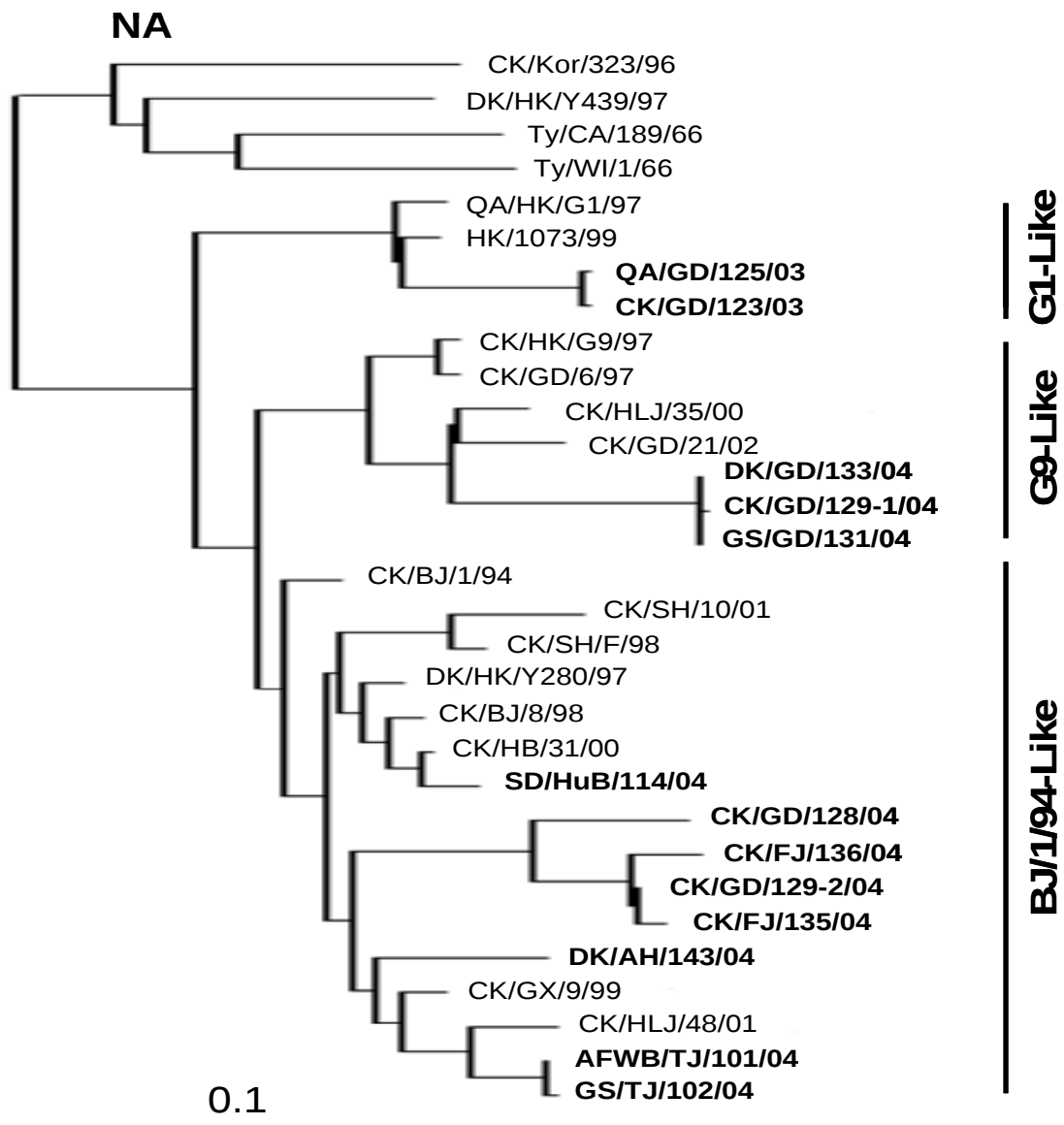


图 2-2 H9N2 亚型 NA 基因系统发育进化树(19-1404, 1386bp)

Figure 2-2 Phylogenetic tree for the N2 NA gene of influenza A viruses. Nucleotides 19-1404 (1386bp) of NA were used for the phylogenetic analyses.

表 2-4 NA 基因同源性比较（左下为氨基酸右上为核苷酸）

Table 2-4 Homology of NA gene

	SD/HuB/114/04	DK/AH/143/04	GS/GD/131/04	CK/GD/129-1/04	DK/GD/133/04	CK/GD/129-2/04	CK/FJ/136/04	CK/FJ/135/04	CK/GD/128/04	AFWB/TJ/101/04	GS/TJ/102/04	CK/GD/123/03	QA/GD/125/03	CK/BJ/1/94	DK/HK/Y280/97	CK/HK/G9/97	CK/SH/F/98	QA/HK/G1/97	HK/1073/99	DK/HK/Y439/97	CK/Kor/323/96	Ty/WI/1/66	CK/HLJ/35/00	Ty/CA/189/66	CK/GD/21/02	CK/GD/6/97	CK/SH/10/01	CK/BJ/8/98	CK/HB/31/00	CK/GX/9/99	CK/HLJ/48/01
SD/HuB/114/04	***	95.0	90.2	90.2	90.3	93.5	92.7	93.2	92.3	94.7	94.6	89.7	89.5	96.8	97.7	93.8	95.9	91.8	91.8	87.3	86.7	85.9	92.7	86.3	93.9	92.5	94.7	98.2	98.9	96.4	94.7
DK/AH/143/04	94.3	***	89.3	89.1	89.3	94.3	93.1	94.0	92.7	95.4	95.4	88.7	88.7	95.1	96.3	92.4	94.9	90.8	90.9	86.2	85.2	85.3	91.5	85.0	92.5	91.1	93.5	96.1	95.9	97.1	95.4
GS/GD/131/04	89.2	90.2	***	99.9	99.9	88.4	87.5	88.1	90.8	89.0	88.9	87.6	87.7	93.0	91.5	94.4	90.6	89.7	89.6	85.7	85.6	85.1	95.9	85.1	94.2	95.0	89.2	91.1	90.8	90.7	89.3
CK/GD/129-1/04	89.2	90.0	99.8	***	99.9	88.2	87.4	87.9	90.7	88.9	88.7	87.6	87.6	92.9	91.4	94.3	90.4	89.6	89.5	85.6	85.4	85.1	95.8	85.1	94.2	94.9	89.0	90.9	90.7	90.6	89.2
DK/GD/133/04	89.2	90.2	100.0	99.8	***	88.5	87.6	88.2	90.9	89.1	89.0	87.7	87.8	93.1	91.6	94.4	90.6	89.9	89.7	85.8	85.6	85.2	96.0	85.2	94.3	95.1	89.3	91.1	90.9	90.8	89.4
CK/GD/129-2/04	93.0	95.9	90.4	90.2	90.4	***	98.9	99.7	96.7	94.3	94.2	87.1	87.1	93.7	94.8	91.7	93.9	89.4	89.3	84.7	85.7	83.8	90.5	84.0	91.9	90.6	92.7	94.6	94.6	95.4	93.8
CK/FJ/136/04	91.2	93.5	88.2	88.0	88.2	97.6	***	98.7	95.8	93.3	93.3	86.1	86.2	92.8	94.0	91.1	93.0	88.5	88.5	83.9	85.3	82.9	89.6	83.2	91.3	89.6	91.7	93.8	93.7	94.3	93.0
CK/FJ/135/04	92.5	95.4	90.0	89.8	90.0	99.6	97.6	***	96.4	94.0	93.9	86.8	86.9	93.4	94.6	91.4	93.6	89.1	89.0	84.5	85.4	83.5	90.2	83.7	91.6	90.3	92.4	94.3	94.3	95.1	93.5
CK/GD/128/04	92.1	94.6	91.7	91.5	91.7	97.8	95.4	97.4	***	93.0	92.9	87.5	87.7	93.6	93.8	92.6	92.7	89.4	89.4	85.5	85.4	83.9	91.9	84.1	92.7	91.9	91.6	93.5	93.4	94.0	92.6
AFWB/TJ/101/04	93.4	95.9	90.8	90.6	90.8	95.2	93.0	94.8	93.7	***	99.8	88.1	88.2	94.8	96.2	92.6	94.6	90.5	90.5	86.5	85.5	85.0	91.4	85.2	92.5	91.0	93.9	96.0	95.7	97.6	97.9
GS/TJ/102/04	93.0	95.4	90.4	90.2	90.4	94.8	93.0	94.3	93.2	99.3	***	87.9	87.9	94.8	96.1	92.4	94.6	90.3	90.3	86.3	85.5	84.9	91.3	85.0	92.4	90.8	93.8	95.9	95.6	97.5	97.8
CK/GD/123/03	89.4	88.9	88.5	88.5	88.5	88.7	86.9	88.2	88.2	88.0	87.6	***	99.8	92.4	90.1	90.0	89.7	96.7	97.1	85.6	85.4	84.4	89.6	84.9	90.1	88.8	88.1	90.0	89.9	89.5	87.7
QA/GD/125/03	89.2	89.1	88.7	88.5	88.7	88.9	87.1	88.5	88.5	88.2	87.8	99.3	***	92.5	90.2	90.1	89.8	96.8	97.2	85.7	85.5	84.5	89.7	85.0	90.1	88.9	88.2	90.1	90.0	89.5	87.8
CK/BJ/1/94	94.9	95.4	92.9	92.6	92.9	94.8	93.0	94.3	94.1	94.6	94.1	92.4	92.6	***	97.6	96.8	96.4	94.9	94.9	90.3	89.4	88.7	95.8	88.9	96.8	94.9	94.8	97.5	97.3	96.7	94.8
DK/HK/Y280/97	96.5	97.4	91.9	91.7	91.9	96.1	94.1	95.6	95.2	96.5	96.1	90.6	90.8	97.4	***	95.0	97.4	92.7	92.7	87.9	87.4	86.6	93.9	87.0	94.9	93.3	96.0	98.6	98.6	97.9	96.2
CK/HK/G9/97	91.4	92.6	94.4	94.2	94.4	92.2	90.4	91.7	92.4	93.0	92.6	90.2	90.4	95.5	93.9	***	94.0	92.3	92.3	88.2	88.0	87.0	96.8	87.4	99.4	96.2	92.7	94.7	94.6	93.8	92.4

CK/HLJ/48/01	CK/GX/9/99	CK/HB/31/00	CK/BJ/8/98	CK/SH/10/01	CK/GD/21/02	CK/GD/6/97	Ty/CA/189/66	CK/HLJ/35/00	Ty/WI/1/66	CK/Kor/323/96	DK/HK/Y439/97	HK/1073/99	QA/HK/G1/97	CK/SH/F/98	CK/HK/G9/97	DK/HK/Y280/97	CK/BJ/1/94	QA/GD/125/03	CK/GD/123/03	GS/TJ/102/04	AFWB/TJ/101/04	CK/GD/128/04	CK/FJ/135/04	CK/FJ/136/04	CK/GD/129-2/04	DK/GD/133/04	CK/GD/129-1/04	GS/GD/131/04	DK/AH/143/04	SD/HuB/114/04	
CK/SH/F/98	95.8	97.4	91.9	91.7	91.9	96.3	94.3	95.9	95.4	96.1	95.6	90.8	91.1	97.2	98.9	94.1	***	91.9	92.0	88.1	87.3	86.7	93.2	86.9	93.9	92.4	97.7	97.1	96.9	96.4	94.7
QA/HK/G1/97	91.2	91.1	90.2	90.0	90.2	90.4	88.7	90.0	89.8	90.0	89.5	95.9	96.1	94.8	92.8	92.2	93.0	***	98.9	87.3	86.9	85.9	91.8	86.3	92.7	90.9	90.3	92.5	92.4	91.9	90.3
HK/1073/99	91.6	91.5	90.7	90.4	90.7	90.8	89.1	90.4	90.4	90.4	90.0	96.7	97.0	95.2	93.2	92.6	93.5	98.5	***	87.4	87.0	86.1	91.8	86.3	92.7	90.9	90.6	92.5	92.4	91.9	90.2
DK/HK/Y439/97	87.0	86.9	87.0	86.8	87.0	86.7	85.0	86.3	86.9	87.1	86.7	85.7	85.9	90.7	88.9	88.5	89.1	87.4	88.3	***	91.2	90.8	87.5	91.6	88.6	86.9	87.1	88.0	88.0	87.0	86.4
CK/Kor/323/96	87.4	86.7	86.4	86.1	86.4	87.8	86.1	87.4	87.4	87.4	86.9	85.2	85.4	89.6	88.7	87.9	88.2	86.5	87.4	91.3	***	89.8	87.2	90.4	88.2	86.7	85.8	87.4	87.4	86.6	85.8
Ty/WI/1/66	86.6	86.9	85.7	85.5	85.7	85.8	84.1	85.4	85.8	86.5	86.1	84.6	84.8	89.4	88.2	87.7	88.0	86.5	87.4	90.0	90.5	***	86.4	92.5	87.4	85.9	85.8	86.8	86.6	85.9	85.0
CK/HLJ/35/00	90.7	91.5	96.3	96.1	96.3	91.7	89.8	91.3	92.4	92.2	91.7	89.8	90.0	94.8	93.2	97.0	93.5	91.7	92.2	88.5	88.1	87.0	***	87.0	96.7	97.7	92.1	93.6	93.4	92.9	91.4
Ty/CA/189/66	87.4	87.8	87.0	86.8	87.0	86.9	85.2	86.5	86.9	87.8	87.4	86.5	86.7	90.9	89.3	89.2	89.1	88.3	89.1	92.9	92.0	92.9	88.7	***	87.7	86.4	85.8	87.0	86.9	86.1	85.3
CK/GD/6/97	91.9	92.6	93.9	93.7	93.9	92.2	90.4	91.7	92.4	92.8	92.4	90.2	90.4	95.5	93.9	99.1	94.1	92.6	93.0	89.0	88.1	88.1	96.5	89.4	***	96.1	93.0	94.8	94.6	93.8	92.2
CK/GD/21/02	90.7	91.7	95.7	95.5	95.7	91.9	90.0	91.5	92.4	92.2	91.7	89.6	89.8	94.4	93.2	96.1	93.5	91.5	91.7	87.9	87.7	86.6	97.8	88.1	95.7	***	91.4	93.1	93.1	92.6	91.0
CK/SH/10/01	94.7	96.1	90.8	90.6	90.8	95.4	93.5	95.0	94.6	95.4	95.0	89.8	90.0	95.6	97.8	93.0	98.5	91.5	91.9	87.8	87.6	86.7	92.4	87.8	93.0	92.6	***	95.8	95.6	95.1	93.5
CK/BJ/8/98	96.9	96.5	90.8	90.6	90.8	95.2	93.2	94.8	94.3	96.1	95.6	90.2	90.4	96.5	98.7	93.0	98.0	92.4	92.8	88.7	88.2	88.5	92.4	89.5	93.5	92.4	96.9	***	99.1	97.4	95.8
CK/HB/31/00	97.8	96.1	90.4	90.2	90.4	94.8	93.0	94.3	93.9	95.2	94.8	89.8	90.0	96.1	98.3	92.6	97.6	91.9	92.4	88.2	88.2	87.6	91.9	88.7	93.0	91.9	96.5	98.7	***	97.4	95.7
CK/GX/9/99	95.4	97.8	91.7	91.5	91.7	96.5	94.3	96.1	95.2	97.6	97.2	89.8	90.0	96.5	98.5	93.5	98.0	91.9	92.4	88.5	88.2	87.8	93.0	88.9	93.5	93.2	96.9	97.6	97.2	***	97.5
CK/HLJ/48/01	93.2	95.6	90.2	90.0	90.2	94.6	92.6	94.1	93.5	97.4	97.2	88.0	88.2	94.1	96.1	92.2	96.1	90.0	90.4	87.1	87.1	86.7	91.5	87.6	91.9	91.7	95.0	95.2	95.0	97.2	***

2-5 NA 基因氨基酸序列分析

Table 2-5 Amino acids in the NA gene of H9N2 influenza viruses

毒株	颈部缺失		潜在的糖基化位点									HB 位点		
	9 bp	206-214	44	61	69	86	146	200	234	336	402	366-373	399-404	431-433
			NSS	NIT	NST	NWS	NGT	NAT	NGT	NCT	NWS	IKEDTRSG	DSDNWS	PQE
SD/HuB/114/04	24 bp	200-223	—	NNT	NTT	+	+	+	+	—	+	+	DSENWS	+
DK/AH/143/04	+	+	—	—	NNT	+	+	+	+	—	+	+	DSENWS	+
GS/GD/131/04	—	—	NVT	NVT	+	+	+	+	+	—	NSS	IEKDTRSG	DSDNSS	PKE
CK/GD/129-1/04	—	—	NVT	NVT	+	+	+	+	+	—	NSS	IEKDTRSG	DSDNSS	PKE
DK/GD/133/04	—	—	NVT	NVT	+	+	+	+	+	—	NSS	IEKDTRSG	DSDNSS	PKE
CK/GD/129-2/04	+	+	—	—	+	+	+	+	+	—	+	IKSDTRSG	+	+
CK/FJ/136/04	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	IKSDTRSG	+	+
CK/FJ/135/04	+	+	—	—	+	+	+	+	+	—	+	IKSDTRSG	+	+
CK/GD/128/04	+	+	—	—	+	+	+	+	+	—	NSS	IKSDSRSG	+	+
AFWB/TJ/101/04	+	+	NIS	—	+	+	+	+	+	—	+	+	+	PHE
GS/TJ/102/04	+	+	NLS	—	+	+	+	+	+	—	+	+	+	PHE
CK/GD/123/03	6 bp	131-136	NSS	NMT	NNT	+	+	+	+	—	—	IKKDSRSG	DSDKWS	+
QA/GD/125/03	6 bp	131-136	NSS	NMT	NNT	+	+	+	+	—	—	IKKDSRSG	DSDKWS	+

2.2.4 QA/GD/125/03 全基因组分析

为了进一步了解所分离到的 G1 群系病毒的内部基因情况，我们将 QA/GD/125/03 进行全基因组测序，并与 Genbank 中的序列进行比对。发现其内部基因来自不同群系病毒，其中 PA 和 NP 基因节段与 CK/GD/56/01 及 CK/SH/F/98 高度同源，其它 6 个基因节段与 G1 群系病毒高度同源，因此推测 QA /GD/125/03 为 G1 群系病毒和 CK/SH/F/98 群系病毒的自然重组毒株。各基因与遗传关系相近毒株的同源率见表 2-6。

表 2-6 与 QA /GD/125/03 各基因遗传关系相近的毒株及其同源率

Table 2-6 H9N2 viruses that closely related to QA /GD/125/03

基因 gene	毒株及其与 QA /GD/125/03 的同源率 Viruses and their homology (%) to QA /GD/125/03		
	毒株 virus	同源率* Homology	同群系代表毒株 Representative virus
PB2	A/Hong Kong/1074/99	97.6%	QA/HK/G1/97
PB1	A/chicken/Guangxi/10/99	98.6%	QA/HK/G1/97
PA	A/chicken/Guangdong/56/01	99.2%	CK/SH/F/98
HA	A/Hong Kong/1074/99	97.9%	QA/HK/G1/97
NP	A/chicken/Guangdong/56/01	98.6%	CK/SH/F/98
NA	A/Pheasant/Hong Kong/SSP11/99	97.1%	QA/HK/G1/97
M	A/Duck/Shantou/1043/00	99.2%	QA/HK/G1/97
NS	A/chicken/Guangxi/9/99	97.9%	QA/HK/G1/97

*The sequences were compiled by MagAlign program of the DNASTar package. The nucleotide sequences used for the comparison are as follow:

PB2: nt 37-2288 (2252bp), PB1: nt 25-2257 (2223bp), PA: nt 25-2168 (2144bp), HA: nt 34-1662 (1629bp), NP: nt 46-1526 (1481bp), NA: nt 20-1306 (1287bp), M: nt 26-1001 (978bp), NS: nt 27-859 (833bp).

2.3 讨论

H9N2 亚型禽流感病毒在我国广泛存在，是影响家禽养殖业的主要病原之一。Guan 等对香港活禽市场 H9N2 亚型禽流感病毒的遗传演化分析表明欧亚种系的 HA 基因可以分为三个群系，分别以 QA/HK/G1/97, DK/HK/Y280/97(CK/BJ/1/94)和 DK/HK/Y439/97 为代表 (Guan, et al, 1999)。本实验室李呈军等人对 H9N2 亚型禽流感病毒 1996~2002 年国内分离株进行了系统的遗传演化分析，所观察到的病毒都是起源于 CK/BJ/1/94-like 病毒，并且在进化过程中发生了复杂的基因重组。在本研究中，13 株病毒中有 8 株的 HA 和 NA 基因均属于 CK/BJ/1/94 群系，3 株病毒为 CK/BJ/1/94 群系 HA 和 G9 群系 NA 的组合。表明 CK/BJ/1/94 群系病毒仍是我国 H9N2 病毒流行的最主要类型。同时从表 2-2 我们发现，某些在同一地区不同种类家禽体内分离到的病毒具有很高的同源性，如 AFWB/TJ/101/04 和 GS/TJ/102/04，CK/GD/123/03 和 QA/GD/125/03，CK/GD/129-1/04、GS/GD/131/04 和 DK/GD/133/04，表明当 H9N2 亚型禽流感病毒传入家禽后并未得到及时控制和

清除。

流感病毒血凝素上受体结合位点特性与病毒宿主特异性密切相关。在病毒逐渐适应新的宿主过程中, 决定受体结合特异性的 226 位氨基酸通常首先发生变化 (Matrosovich, et al, 2001)。Matrosovich 等对 1997-1999 年在香港活禽市场上分离到的 H9N2 亚型禽流感病毒血凝素的受体结合特性进行了分析, 结果表明在这些病毒 HA 受体结合位点的 190 位存在较大的变化, 可以是 V, A, 或 T, 在 226 位都为 L。这些病毒不和卵类粘蛋白 (Ovo) 结合, 但是和猪巨球蛋白 (PM) 结合, 表现出人流感病毒的受体结合位点特征, 他们认为这一特性是由于 226 位的亮氨酸 (L) 所赋予的。我们的 13 株 H9N2 亚型 AIV 中有 9 株病毒的血凝素 226 位氨基酸为 L, 使病毒能与人类细胞中的 α -2,6 半乳糖苷键连接的唾液酸受体结合 (Matrosovich, et al, 1997)。特别是 CK/GD/123/03 和 QA/GD/125/03 的 H183, E190, L226 组合, 呈现了典型的人流感病毒受体结合位点特性 (Matrosovich, et al, 2000), 与 1997 年香港禽流感病毒感染人事件发生时从鹌鹑中分离的 G1 和 1999 年香港女童中分离到的毒株 A/HK/1073/99 (H9N2) 以及早期人流感病毒相同。HA 头部受体结合位点附近新增两个潜在糖基化位点, 有可能改变病毒的抗原性并影响受体结合特性而感染新的宿主, 可能进一步对人类公共卫生造成威胁。

在流感病毒的 HA 受体结合活性和 NA 的受体破坏活性之间存在着一种平衡关系, 这样病毒才能保持其感染性 (Baum, et al, 1991; Kaverin, et al, 2000; Mitnaul, et al, 2000)。在本研究中 13 株病毒 NA 基因的一个明显的特征就是在血凝素结合位点 (HB) 上存在显著的突变。NA 的 HB 位点位于 NA 分子的表面, 和 NA 的唾液酸酶活性位点相远离。在 N9 亚型 NA 基因的 HB 位点形成了三个环状结构, 包括 367-372 位的氨基酸, Asn-400, Trp-403 和 Lys-432, 所形成的环状结构中的氨基酸直接和唾液酸结合 (Varghese, et al, 1997)。在水禽的 N2 亚型病毒, 鸡的 H5N2 亚型病毒, 以及其它一些宿主的某些病毒, 诸如 DK/HK/Y439/97 和 Ck/Korea/323/96 等病毒 NA 的 HB 位点上这些氨基酸是非常保守的。然而在 Matrosovich 等人对香港 1997-1999 年的 H9N2 亚型禽流感病毒进行分析后发现在这些病毒 HB 位点的部分氨基酸发生了突变, 其结果是导致病毒的唾液酸结合活性降低 (Matrosovich, et al, 2001)。在本研究中 13 株病毒在 NA 的 HB 位点也发生了明显的突变, 其原因可能是要保持 HA 和 NA 之间功能的平衡。

1997 年香港出现 H5N1 亚型禽流感病毒感并染致死人事件, 同期在鹌鹑中分离到的 H9N2 病毒 G1 被认为是 H5N1 亚型病毒的内部基因供体, 1999 年从香港女童体内分离到的 H9N2 病毒 A/HK/1073/99 与 G1 高度同源, 使这一群系病毒备受关注 (Peiris, et al, 1999)。先前普遍认为 G1 亚群病毒仅限于鹌鹑中流行 (Xu, et al, 2007), Li 等曾在我国大陆的 H9N2 亚型禽流感病毒中发现类 G1 病毒的内部基因 (Li, et al, 2005)。本研究首次在中国大陆的分离株中发现类 G1 的 HA 和 NA 基因 (CK/GD/123/03 和 QA/GD/125/03), 并发现 QA/GD/125/03 为 G1 群系病毒和 CK/GD/56/01 或 CK/SH/F/98 群系病毒的自然重组毒株, 其 PA 和 NP 基因节段来自 CK/GD/56/01 或 CK/SH/F/98 群系病毒, 其它 6 个基因节段来自 G1 群系病毒。类 G1 病毒的抗原性与其他 H9N2 病毒差异较大, 而且其 HA 基因的受体结合特性具有明显的哺乳动物流感病毒特征, 因此对该类病毒的防治及其公共卫生意义应予以高度重视。

第三章 H5N1 亚型禽流感病毒变异株疫苗株的构建

3.1 材料与方法

3.1.1 材料

3.1.1.1 病毒株

备选疫苗株的构建以 A/Chicken/ShanXi/2/2006 (H5N1) (CK/SX/2/06)为背景毒株。

根据本实验室提供的资料,对我国 2006 年以来分离的大量 H5N1 亚型高致病性禽流感病毒进行了系统的抗原性分析,证实部分毒株在起主要免疫保护作用的 HA 基因发生明显变异,这些变异株的抗原性与我国大部分 H5N1 亚型分离株有所不同,而与 CK/SX/2/06 病毒株抗原性基本一致。

CK/SX/2/06 HA 基因序列如下:

```
AGCAAAAGCAGGGGTATAATCTGTCAAAATGGAGAAAATAGTGCTTCTTCTGCAATAATCGGTCTTGTTAAAGTGATCAGATTGCGTTGGTTACCATG
CAAACAACCTCAACAGAGCAGGTTGACACAATAATGGAAGAAGACGTTACTGTTACACATGCTCAAGACATACTGGAGAAGACACACAACGGGAAGCTC
TGCAACCTAGATGGAGTGAAGCCTCTAATTTTGAAAGATTGTAGTGTAGCTGGATGGCTCCTCGGAAACCAATGTGTGACGAATTTCTCAATGTGTGCG
AATGGTCTTACATAGTGGAAGAGGCCAGTCCAGCCAATGGCCTCTGTATCCAGGGGATTTCATGACTATGAAGAAGTGAACACCTATTGAGCAGAAT
AAACCATTTTGAGAAAATTAAGATCATCCCCAAAAGTTCTTGGTCCAATCATGAAGCCTCAGGGGTGAGCTCAGCATGTTCTATCTGGGGAAGCCCTCC
TTTTTCAGAAATTTGGTATGGCTTATCAAAAAGAATAATACATACCCACCAATAAAGGTGAAGTACACCAATACCAACCAAGAAGATCTTTTGGTACTGTG
GGGGATTACCATCCCAACGATGAGACAGAGCAGATAAAGATCTATCAAAACCAACCACCTATATTCCGTTGGAACATCAACACTAAACCAGAGATTG
GTACCAAAAATAGCTACTAGATCCAAAGTGAACGGGCAAGTGAAGAATGGAGTTCTTCTGACAATTTTAAAGCCGAATGATGCTATCAATTCGATA
GTAATGGAAATTTTATGCTCCAGAATATGCATACAAAATGTCAAGAAAGGGGACTCAGCGATTATGAAAAGTGAATTGGAATATGGTAACTGCAACACC
AAGTGTCAAATCCAATGGGGGCGATAAATCTAGTATGCCATTCCACAACATACACCCTCTCACCATCGGGGAATGCCCAATATGTGAATCAACAG
ATTAGTCTCGCGACTGGACTCAGAAATGCCCTCAAAGAGAGGGAGGAAGAAGAAAAAGAGGACTATTGGAGCCATAGCAGGGTTTATAGAGGGAG
GATGGCAGGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGGTACCACCATAGCAATGAGCAGGGGAGTGGATACGCTGCAGACAAAGAATCCACTCAAAGGCAATAG
ATGGAATCACCAATAAGGTCAACTCGATCATTGACAAAATGAACACTCAGTTTGAGGCCGTTGGAAGGGAATTTAATAACTTAGAAAGGAGAATAGAAAA
TTTAAACAAAAAGATGGAGGACGGATTCTAGATGTCTGGACTTATAACGCTGAACCTCTGGTTCTCATGGAATGAGAGAACTCTAGACTTTCATGACT
CAAATGTCAAGAACCTTTACGAAAAGTCCGACTGCAGCTTAGGGATAATGCAAAGGAGCTGGGTAAACGGTTGTTTCGAGTTCTACCACAAATGTGATAA
TGAATGTATGGAAGTGTAAAAACGGAACGTATGACTACCCGCAGTATTCAGAAGAAGCAAGACTAAACAGAGAGGAAATAAGTGGAGTAAAATTGGA
ATCAATGGTAACTTACCAAAATACTGTCAATTTATTCAACAGTGGCGAGTTCCTAGCATGGCAATCATGGTGGCTGGTCTATCTTTATGGATGTGCTCCAAT
GGATCGTTACAATGCAGAAATTGCATTTGAATTTGTGAGTTCAGATTGTAGTTAAAAACACCTTGTTTCTACT
```

CK/SX/2/06 NA 基因序列如下:

```
AGCAAAAGCAGGAGTTTAAATGAATCCAAATCAGAAGATAACAACCATCGGATCAATCTGTATGGTAATTGGAATAGTTAGCTTAATGTTACAAATTGGG
AACATGGTCTCAATATGGGTCAAGTCAATTCAGACTGGGAATCAACGCCAAGCTGAACCATGCAGCAACACTAAATTTCTTACTGAGAAAGCTGTGG
```

CTTCAGTAACATTAGCGGGCAATTCATCTCTTTGCCCATTAGCGGATGGGCTGTATACAGTAAGGACAACAGCATAAGGATCGGTTCCAAGGGGGATGTG
TTTGTATAAGAGAGCCGTTTCATCTCATGCTCACACTTGAATGCAGAACTTTCTTTTGAAGTACTAGGGAGCTTTGCTAAATGACAAGCACTCCAATGGGAC
AGTCAAAGACAGAAGCCCTCACAGAACATTAATGAGTTGTCTGTGGGTGAGGCCCCCTCCCCTTATAACTCAAGGTTTGAGTCTGTGCTTGGTCAGCA
AGTGCTTGCCATGATGGCACCAGTTGGTTGACAATTGAATTTCTGGCCAGATAATGGGCTGTGGCTGTATTGAAATACAATGGCATAATAACAGACAC
TATCAAAAGTTGGAGAAACAACATACTGAGAACGCAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAAATGGCTCCTGCTTTACTGTAATGACTGATGGACCAAGTAAT
GGGACGGCTCATATAAGATTTTCAAAATGGAAAAAGGAAAGTGGTTAAATCAATCGAATTGGATGCTCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCCTGTTA
TCCTGATGCCGGCGAAATCACATGTGTGTCAGAGATAATTGGCATGGCTCAAATAGACCATGGTTATCTTTCAATCAAAATCTGGAGTATCAAATAGGGTA
TATATGCAGTGGAGTTTTCGGAGACAATCCACGCCCAATGATGGAACAGGTAGTTGTGGTCCGGTGTCTCTTAACGGGGCATATGGGGTAAAGGGTTT
TCATTTAAATACGGCAATGGTGTGTTGGATCGGGAGAACCAAAAGCACTAATTCAGGAGCGGCTTTGAAATGATTGGGATCCAAATGGGTGGACTGGAA
CGGACAGCAGTTTTCGGTGAAGCAAGATATCGTAGCAATAACTGATTGGTCAGGATATAGCGGGAGTTTGTCCAGCATCCAGAACTGACAGGATTAGA
TTGCATAAGACCTTGTCTTGGGTTGAGTTGGTCAGAGGGCGGCCAAAGAGAACACAATCTGGACTAGTGGGAGCAGCATATCCTTTTGTGGTGTAAAT
AGTGACACTGTGGGTTGGTCTTGGCCAGACGGTGTGAGTTGCCATTACCATTGACAAGTAGTTTGTTCAAAAAACTCCTTGTCTTACT

3.1.1.2 SPF 鸡胚

9-11 日龄 SPF 鸡胚购自哈尔滨兽医研究所实验动物中心。

3.1.1.3 质粒载体及转染质粒

pBD 载体由陈化兰博士构建，将单向转录质粒载体 pPolIsapIRib 中包含的聚合酶 I 启动子—SapI 克隆位点—鼠源核酶序列的 XbaI 酶切片段，反向插入 pCI (Promega) 质粒的 XbaI 位点，形成 RNA 聚合酶 II 启动子 (CMV) →病毒 RNA 转录终止信号序列 Rib→流感病毒基因组 cDNA (5'→3')→人 RNA 聚合酶 I 启动子→mRNA 转录终止 PolyA 信号序列(SV40)构成的双向转录表达质粒载体，利用该载体可同时转录出流感病毒负链 vRNA 和正链 mRNA。

本研究中利用了经过修饰后的 12 质粒反向遗传操作系统，其中六个内部基因的 vRNA 转录质粒 pPOLI-PB2, pPOLI-PB1, pPOLI-PA, pPOLI-NP, pPOLI-M 和 pPOLI-NS 和四个聚合酶基因的蛋白表达质粒 pcDNA-PB2, pcDNA-PB1, pcDNA-PA 和 pcDNA-NP 均来自于人源流感病毒株 A/Puerto Rico/8/34 (A/RR/8/34)，是由美国联邦疾病控制中心的 Kanta Subbarao 博士惠赠。分子修饰致弱的 HA 基因双向转录质粒 pBD-MutHA 和全长 NA 基因双向转录质粒 pBD-NA 在本研究中构建，来源于我国 H5N1 亚型禽流感病毒抗原变异株 A/Chicken/ShanXi/2/2006(H5N1) (CK/SX/2/06)。

3.1.1.4 主要试剂和仪器

DNA Polymerase I Klenow 大片段，T4 DNA 聚合酶，T4 DNA 连接酶，内切酶 SapI, XhoI 购自 NEB 公司，dATP, dGTP, dCTP 和 dTTP, r-Taq DNA 聚合酶，pMD-18T 载体购于大连宝生物工程有限公司。RNA 提取试剂 Trizol LS，鼠源反转录酶 (MLV) 试剂盒，DTT，RNaseOUT 和 Pfx 高保真 DNA 聚合酶，转染试剂盒 Lipofectamine 2000，无血清培养基 Opti-MEM 购自 Invitrogen 公司。胶回收试剂盒与小量质粒回收试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司。测序反

应试剂盒(CEQTM DTCS Quick Start Kit)购自 BECKMAN 公司。转染质粒提取试剂盒(Perfectprep Plasmid Mini) 购自 Eppendorf 公司。

3.1.1.5 引物

pBD-MutHA 和 pBD-NA 双向转录质粒构建过程中所用到的引物, 由上海博亚生物工程有限公司合成。具体见表 3-1。

表 3-1 转染质粒构建所用到的引物

Table 3-1 Primers used in the construction of transfectant plasmids	
引物名称	引物序列
HA1F	5'- AGCAAAAGCAGGGGTATAAT -3'
MutHA1R	5'-CTGACTCGAGTCTCTCGTTGAGGGGCATTCTGAG-3'
MutHA2F	5'-TCGAGGACTATTTGGAGCTATAG-3'
HA2R	5'-AGTAGAAACAAGGGTGT TTTT TAACTAC-3'
NAF	5'-CCAGCAAAAGCAGGAGTTTAAAATGAATCC-3'
NAR	5'-TTAGT AGA AAC AAG GAG TTT TTT GAA-3'

3.1.2 方法

3.1.2.1 病毒 RNA 提取、反转录和 PCR 扩增

CK/SX/2/06 种毒 10-5 稀释接种 9-10 日龄 SPF 鸡胚后收集尿囊液(涉及种毒株活病毒的试验均在生物安全 3 级实验室(BSL-3)进行)。按照第二章的方法进行 RNA 提取与反转录, 产生病毒的 cDNA。PCR 是在 Pfx 高保真 DNA 聚合酶作用下进行, 按试剂盒说明书加入各成分, 94℃ 变性 5min, 进入以下循环, 变性 94℃ 1min, 退火根据引物不同在 52-65℃ 之间, 时间为 1min, 延伸 68℃ 2-3min, 共 35 个循环, 72℃ 延伸 10min。

3.1.2.2 序列测定

按照第二章中的方法进行。

3.1.2.3 HA 和 NA 转染质粒 pBD-MutHA 和 pBD-NA 的构建

以 CK/SX/2/06 病毒的 cDNA 为模板, 以两对引物 HA1F/MutHA1R 和 MutHA2F/HA2R 分别用 Pfx 进行 PCR 反应, 扩增出 HA1 和 HA2 片段, 目的是去除 HA 裂解位点的多个连续碱性氨基酸, 使其获得低致病性禽流感病毒的 HA 基因特征。然后用 rTaq 酶 37℃ 作用 10min 再 3'端加上 A 尾, 取 5ul PCR 产物在 1%琼脂糖凝胶上电泳检查扩增结果, 两个基因片段 HA1 和 HA2 分别用小量胶回收试剂盒回收。

HA1 和 HA2 片段回收后, 均用 XhoI 进行酶切, 然后将经过酶切的 HA1, HA2 两片段和

pMD-18T 载体以 3:3:1 的比例混合, 16℃, 用 T4 DNA 连接酶作用 16h, 然后按常规方法转化 JM109 感受态大肠杆菌, 挑菌, 提取质粒, 进行电泳, 以引物 HA1F/HA2R 进行 PCR 鉴定。经质粒电泳鉴定及 PCR 鉴定为同时为阳性的质粒用小量质粒提取试剂盒提取质粒后溶于 50 μ l 的灭菌去离子水中, 用于测序反应。

对于 PCR 鉴定阳性和测序正确的阳性质粒 T-MutHA, 以引物 HA1F/HA2R 进行 PCR, 此引物与 HA 基因的 5' 和 3' 末端序列完全吻合外, 上游引物 5' 端增加两个碱基 CC, 下游引物 5' 端增加 TT。PCR 产物在 dCTP 和 dTTP 存在下用 T4 DNA 聚合酶 12℃ 处理 30min, 75℃ 20min 使酶失活, 胶回收试剂盒回收用于连接反应。

以 CK/SX/2/06 的 cDNA 为模板, 利用引物 NAF/NAR 进行 PCR 扩增 NA 基因用于与 pBD 载体连接。

pBD 载体用 SapI 酶在 37℃ 下酶切作用 3h, 用胶回收试剂盒回收, 然后在 dGTP 和 dATP 存在的条件下用 DNA Polymerase I Klenow 大片段于 25℃ 作用 25min, 75℃ 20min 使酶失活, 胶回收试剂盒回收, 备用。

PCR 产物和 pBD 载体处理好以后, 按照 1:3-1:6 的比例混合, 16℃, 用 T4 DNA 连接酶作用 16h, 转化 JM109 感受态细胞, 挑菌, 提质粒, 进行电泳, 分别以引物 HAF1/HAR1 和 NAF/NAR 进行 PCR 鉴定。鉴定为阳性的质粒用小量质粒提取试剂盒提取质粒后溶于 50 μ l 的灭菌去离子水中, 用于测序反应。

3.1.2.4 分子致弱的 H5N1 亚型禽流感病毒抗原变异疫苗株 H5N1(SX)/PR8 的救获

293T 细胞 (人胚胎肾细胞) 先以含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液培养于细胞培养瓶中, 连续传代, 状态稳定后传于六孔板中, 置于 37℃, 5%CO₂ 培养箱中培养。待 293T 细胞长至 90% 铺满时, 按 Lipofectamine 2000 试剂盒使用说明书进行转染。

利用经过修饰的 12 质粒反向遗传操作系统人工构建 H5N1 亚型禽流感病毒抗原变异疫苗株。上述来源于 A/PR/8/34 病毒的 6 种单向转录质粒和 4 种蛋白表达质粒以及本研究中构建的双向转录质粒 pBD-MutHA 和 pBD-NA, 每个质粒取 0.5 μ g 加入 50 μ l OPTi-MEM 培养基中充分混合均匀, 同时取 12 μ l Lipofectamine 2000 转染试剂加入 250 μ l OPTi-MEM 培养基中, 混匀后于室温静置 5min。然后将含有转染试剂和质粒的 OPTi-MEM 培养基混合, 于室温作用 30min。

待转染试剂和质粒作用完全后, 将六孔板中的细胞培养液吸掉, 并用 OPTi-MEM 培养基洗两次, 然后每孔加入 1 ml 的 OPTi-MEM 培养液, 并将转染试剂与质粒混合物加入 293T 细胞六孔板的一个孔内, 于 37℃, 5%CO₂ 培养箱中培养。转染 16 小时后将培养板中的转染试剂换掉, 然后用 OPTi-MEM 洗两次, 以除去残留的转染试剂, 最后加入 2ml OPTi-MEM (含 0.5 μ g/ml TPCK-Trypsin), 继续培养 48-72 小时。转染结束后将细胞吹洗下来, 分散均匀后接种 9-11 日龄 SPF 鸡胚, 每个鸡胚尿囊腔接种 0.2ml 转染细胞悬液。接种后 48 小时收取鸡胚尿囊液, 以 0.5%

的鸡红细胞进行血凝试验（HA），对于有血凝价的鸡胚收取尿囊液，进行病毒鉴定。

3.1.2.5 H5N1(SX)/PR8 病毒及 HA 和 NA 基因的鉴定

利用反向遗传操作系统人工构建了 H5N1/PR8 病毒以后，需要对救获的病毒进行鉴定，以确定所救获病毒的 HA 和 NA 基因是否包含有所加入的分子修饰。H5N1(SX)/PR8 病毒接种 SPF 鸡胚，48h 后收取鸡胚尿囊液，提取病毒的 RNA，然后利用流感病毒的特异性引物 Uni-12 进行反转录产生病毒的 cDNA。利用 HA 和 NA 基因的特异性引物 HA1F/HA2R 和 NAF/NAR 进行 PCR 扩增，PCR 产物经过琼脂糖凝胶（1%）电泳鉴定后回收，然后用 CEQ™ DTCS-QUICK Star Kit 进行 PCR 产物测序。

3.2 结果

3.2.1 pBD-MutHA 质粒的构建

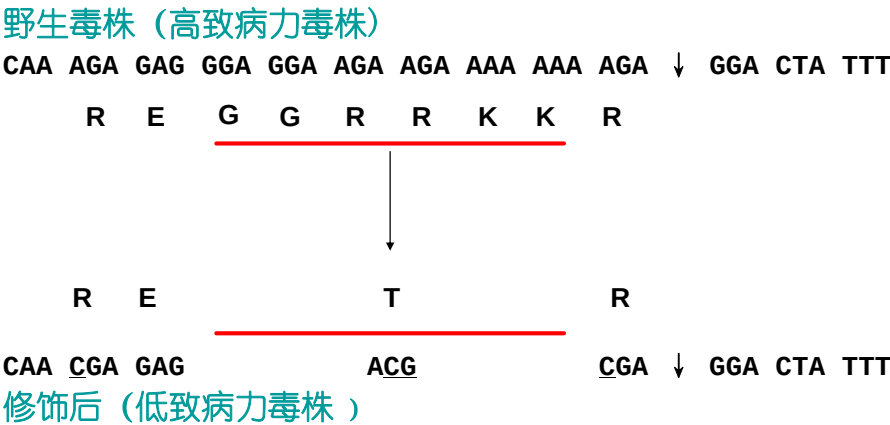


图 3-1 分子修饰致弱的 HA 基因双向转录质粒 pBD-MutHA 的构建策略

Figure 3-1 Construction of pBD-MutHA with molecularly attenuated HA gene

野生型的 CK/SX/2/06 病毒是高致病性禽流感病毒，为了构建分子修饰致弱的疫苗株，采用 PCR 的方法缺失 HA 基因裂解位点的多个连续氨基酸，使其获得低致病性禽流感病毒的 HA 基因特征，具体的构建策略如图 3-1 所示。

3.2.1.1 T-MutHA 质粒的构建

以 CK/SX/2/06 病毒的 cDNA 为模板，利用两对引物 HA1F/MutHA1R 和 MutHA2F/HA2R 分别进行 PCR 反应，扩增出 MutHA1 和 MutHA2 片段。取 5ul PCR 产物在 1%琼脂糖凝胶电泳上检查扩增结果，片段 HA1 和 HA2 的大小依次分别为：1078bp 和 752bp（见图 3-2），电泳结果与预期相符。

将 MutHA1 和 MutHA2 片段回收后，分别用 XhoI 进行酶切，然后将经过酶切的 MutHA1，MutHA2 两片段和 pMD-18T 载体以 3:3:1 的比例混合，进行连接，转化，提取质粒，以引物

HAF1/HAR1 进行 PCR 鉴定 (图 3-2)。CK/SX/2/06 的野生型 HA 基因全长为 1776bp, 经过突变以后应为 1764bp, PCR 电泳结果与预期一致。鉴定为阳性的质粒用小量质粒回收试剂盒提取质粒后溶于 50 μ L 的灭菌去离子水中, 用于测序反应。测序结果表明, T-MutHA 质粒中 HA 基因为 1767bp, 该质粒中插入的 HA 基因与野生基因不同, 其 HA 裂解位点的氨基酸序列已由 -REGGRRKKR-突变为-RETR-, 后者为典型的 H5 亚型低致病力禽流感病毒 HA 分子特征。而且, 将靠近裂解位点的精氨酸 (R) 密码子由 AGA 无意突变为 CGA, 这样就避免了在病毒传代的过程中由于聚合酶蛋白的核苷酸序列复制作用而重新在 HA 裂解位点插入新的碱性氨基酸而使毒力返强。

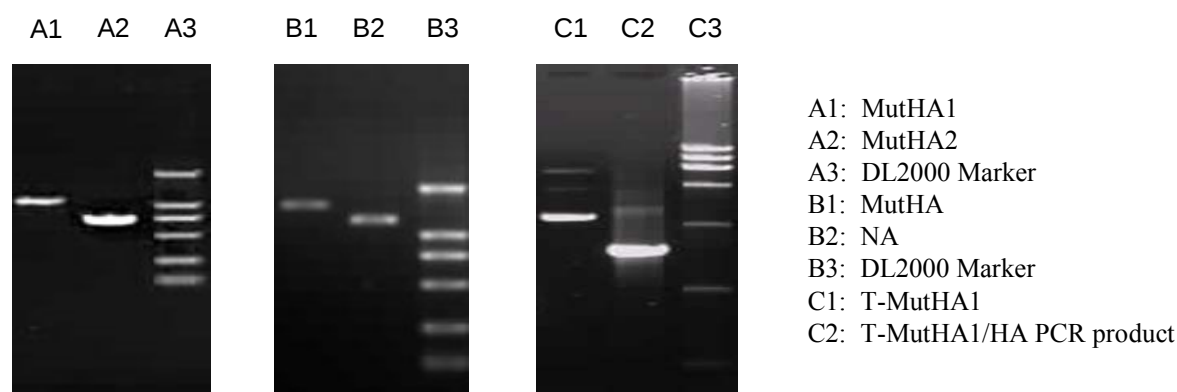


图 3-2 T-MutHA 质粒的构建和 PCR 鉴定

Figure 3-2 Construction and PCR identification of T-MutHA

3.2.1.2 pBD-MutHA 和 pBD-NA 质粒构建

以质粒 T-MutHA 为模板, 以引物 HA1F/HA2R 进行 PCR, 扩增全长的 MutHA 基因。MutHA 和全长 NA 基因 PCR 产物在 dCTP 和 dTTP 存在下用 T4 DNA 聚合酶处理后, 以胶回收试剂盒回收用于连接反应。pBD 载体用 SapI 酶在 37°C 下酶切处理后用胶回收试剂盒回收, 然后在 dGTP 和 dATP 存在的情况下用 DNA Polymerase I Kleonw 处理, 胶回收试剂盒回收。PCR 产物和 pBD 载体处理好以后, 进行连接转化, 提取质粒, 进行电泳, 分别以引物 HA1F/HA2R 和 NAF/NAR 进行 PCR 鉴定, 结果为阳性。鉴定为阳性的质粒用小量质粒提取试剂盒提取质粒后溶于 50 μ L 的灭菌去离子水中, 用于测序反应。测序结果表明, pBD-MutHA 质粒中 HA 基因为 1764bp, 与 T-MutHA 中相同, HA 裂解位点的氨基酸序列为-RETR-。MutHA 其它位点以及 NA 基因均未发生突变。

3.2.2 H5N1(SX)/PR8 的救获和病毒鉴定

12 种质粒共同转染 293T 细胞后 24 小时后换液, 每孔补加 200 μ l OPTI-MEM (含 0.5 μ g/ml TPCK-Trypsin), 继续培养 48-72 小时。然后将转染细胞悬液接种 SPF 鸡胚, 48 小时后测定尿囊液的血凝活性。对于有血凝价的尿囊液以 104 稀释后, 接种 SPF 鸡胚, 48 小时后收取尿囊液, 提取病毒 RNA, 进行 RT-PCR, 对 HA 和 NA 基因进行序列测定, 以鉴定救获病毒的 HA 和 NA

基因中是否包与设计相符。序列分析结果表明 HA 基因全长为 1764 bp, 在 HA 裂解位点的氨基酸组成为-RETR-, 为低致病力禽流感病毒的 HA 基因特征; NA 基因全长无发生突变, 均与预期的疫苗株病毒一致。

3.3 讨论

H5N1 亚型高致病性禽流感病毒流行范围广泛, 给养禽业造成了严重危害, 尤其是 2003 年开始席卷整个东南亚地区并扩散到世界各地的 H5N1 亚型禽流感大流行更是给养禽业带来了灾难性的打击。野生鸟类和鸭, 鹅等水禽是流感病毒的自然宿主, 流感病毒在这些宿主体内稳定进化, 并且进一步传播给家禽 (Chin, et al, 2002; Webster, et al, 2002)。而 2005 年以后出现了对野生鸟类及鸭等水禽的高致病性毒株, 使 H5N1 亚型禽流感的防治显得更为困难。因此, 除了加强流行病学监测和生物安全措施, 疫苗免疫是防制禽流感发生的主动措施和关键环节。

2004 年以来, 以我国第一株 H5N1 HPAIV 为背景研制的人工致弱 H5N1 亚型重组流感病毒灭活疫苗在我国广泛应用, 取得了极大的成功。而 2006 以后, 在我国某些地区多次分离到不同抗原群的 H5N1 高致病性毒株, 而现有疫苗不能对免疫家禽起到有效保护。为了抑制 H5N1 亚型高致病性禽流感在我国蔓延, 研制针对这部分抗原变异病毒的疫苗株显得极为紧迫, 本研究中采用国内具有代表性的抗原变异株 CK/SX/2/06 作为 HA 和 NA 基因供体, 重组 A/Puerto Rico/8/34(PR8) (H1N1) 的 6 个内部基因, 通过分子修饰去除了 HA 基因裂解位点的多个连续的碱性氨基酸, 人工救获了 H5N1 亚型重组流感病毒 H5N1(SX)/PR8 作为抗原变异疫苗株。

A/PR/8/34 是最常用的疫苗病毒株内部基因供体株, 为多次传代后的鸡胚生长适应株, 在鸡胚生长后不致死, 具备良好疫苗株生长滴度高的特点。

CK/SX/2/06 病毒具有和我国现有 H5N1 亚型禽流感抗原变异病毒良好的抗原一致性。根据本实验室提供的资料, 对我国 2006 年以来分离的大量 H5 亚型高致病性禽流感病毒进行了系统的抗原性分析, 证实部分毒株在起主要免疫保护作用的 HA 基因发生明显变异, 这些变异株与 CK/SX/2/06 病毒株抗原性基本一致。

流感病毒 HA 基因是分子修饰致弱的主要靶基因。HA 基因裂解位点具有多个连续的碱性氨基酸是禽流感病毒具有高致病性的重要决定因素和必要条件。因此疫苗设计的一个重要策略就是通过突变的方法去除 HA 基因裂解位点的多个碱性氨基酸, 使其具有低致病力禽流感病毒的 HA 基因特征, 所产生的流感病毒疫苗株则成为对鸡胚无致死性的低致病力毒株。在本研究中, 将 CK/SX/2/06 HA 基因裂解位点的-REGGRKK-突变为-RETR-, 缺失了 4 个氨基酸, 并把一个赖氨酸 (K) 突变为苏氨酸 (T), 将靠近裂解位点的精氨酸密码子 AGA 无意突变为 CGA, 以避免由于聚合酶的核苷酸序列复制作用而重新在裂解位点处插入多个碱性氨基酸导致毒力返强。

利用以质粒为基础的反向遗传操作系统是对流感病毒基因组进行修饰构建具有所需要特征疫苗株的最佳方法和有效途径。利用这一技术, 可以把一个良好疫苗株所应有的特性集于一身。所救获的流感病毒疫苗株具有 H5N1 变异株 CK/SX/2/06 的 HA 和 NA 基因以及 A/PR/8/34 病毒的

六个内部基因。根据本实验室的后续研究，该疫苗备选株既具有高滴度鸡胚生长特性，又具有对鸡和小鼠的低致病性，对鸡胚的不致死性，具备了一个良好疫苗株所应该具备的各种条件。

第四章 结论

1. 本研究对源自我国 2003-2004 年具有代表性的 13 株 H9N2 亚型禽流感病毒表面基因及 CK/GD/135/03 毒株全基因进行序列测定。这些病毒均具有低致病力毒株的分子特性。
2. 遗传分析表明 CK/BJ/1/94 群系病毒仍是我国 H9N2 病毒流行的最主要类型。同时分离到了两株 G1 群系的 H9N2 亚型病毒，其中一株为鸡源病毒，表明 G1 亚群 H9N2 病毒开始在我国大陆出现并已从鹌鹑宿主扩散到鸡群。
3. 一些毒株的 HA 基因的受体结合特性具有明显的哺乳动物流感病毒特征，部分毒株 HA 头部受体结合位点附近新增的潜在糖基化位点，有可能改变病毒的抗原性并影响受体结合特性而感染新的宿主，其对人类公共卫生安全造成的威胁应予以高度重视。
4. 利用反向遗传操作系统人工构建了一株低致病力、高滴度鸡胚生长特性的 H5N1 亚型禽流感病毒抗原变异疫苗株 H5N1(SX)/PR8，具有国内抗原变异流行毒株的表面基因和 A/PR/8/34 的六个内部基因。利用该毒株制备的重组灭活疫苗已投入生产应用。

参考文献

- 1 陈伯伦, 张泽纪, 陈伟斌。禽流感研究 I: 鸡 A 型禽流感病毒的分离与血清学初步鉴定, 中国兽医杂志。1994, 20 (10): 3-5。
- 2 陈福勇, 夏春。禽流感 A/鸡/北京/1/96 (H9N2) 株核蛋白基因克隆和序列分析, 中国预防兽医学报, 1999, 21 (2): 130-133。
- 3 付朝阳。H9 亚型禽流感油乳剂灭活疫苗体液及细胞免疫应答的监测研究: [硕士学位论文], 哈尔滨: 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 2001。
- 4 卡尔尼克 主编, 高福, 苏敬良 主译。禽病学(第十版)。北京, 中国农业大学出版社, 1999。
- 5 李海燕, 于康震, 杨焕良, 辛晓光, 陈君彦, 赵朴, 毕英佐, 陈化兰。中国猪体内 H5N1 和 H9N2 亚型禽流感病毒的分离和鉴定。2004, 中国预防兽医学报, 26: 1-6。
- 6 乔传玲。禽流感病毒 HA-NA、HA-NP、及 NP 基因重组禽痘病毒的构建及其免疫效率的研究: [博士学位论文], 哈尔滨: 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 2001。
- 7 唐秀英, 付朝阳, 冯菊艳。H9 亚型禽流感的流行与防制, 预防兽医学进展, 2000, 2 (4): 1-4。
- 8 殷震, 刘景华 主编。动物病毒学(第二版), 北京: 科学出版社, 1997。
- 9 Air, G. M., W. G. Laver,. The neuraminidase of influenza virus. *Proteins*, 1989, 6(4):341-356.
- 10 Almond, J. W. A single gene determines the host range of influenza viruses. *Nature* 1977:270(5638): 617-618.
- 11 Baigent, S. J., Bethell, R. C., McCauley, J. W. Genetic analysis reveals that both haemagglutinin and neuraminidase determine the sensitivity of naturally occurring avian influenza viruses to zanamivir in vitro. *Virology* 1999, 263(2):323-338.
- 12 Baigent, S. J., and McCauley, J. W. Glycosylation of haemagglutinin and stalk-length of neuraminidase combine to regulate the growth of avian influenza viruses in tissue culture. *Virus Res.* 2001, 79(1-2):177-185.
- 13 Baker A. T, J. N. Varghese, W. G. Laver, et al. Three-dimensional structure of neuraminidase of subtype N9 from an avian influenza virus. *Proteins*, 1987, 2:111-117.
- 14 Baum, L. G., and Paulson, J. C. The N2 neuraminidase of human influenza viruses has acquired substrate specificity complimentary to the haemagglutinin receptor specificity. *Virology* 1991, 180(1):10-15.
- 15 Blok, J., and Air, G. M. Variation in the membrane-insertion and "stalk" sequences in eight sub-types of influenza type A virus neuraminidase. *Biochem.* 1982, 21(17):4001-4007.
- 16 Bosch F.X., Garten W., Klenk H.D., Rott R. Proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinins: primary structure of the connecting peptide between HA1 and HA2 determines proteolytic cleavability and pathogenicity of avian influenza viruses. *Virology*, 1981, 113 (3):725-735.
- 17 Burnet, F. M.. Influenza virus on the developing egg. *Br. J. Exp. Pathol.*, 1936, 17:282.
- 18 Campbell, G. Report of the Irish national reference laboratory for 1996 and 1997. In *Proceedings of*

- the Joint Fourth Annual Meetings of the National Newcastle Disease and Avian Influenza Laboratories of Countries of the European Union. Brussels, Belgium. 1998, 13.
- 19 Chen, H., Deng, G., Li, Z., Tian, G., Li, Y., Jiao, P., Zhang, L., Liu, Z., Webster, R. G., Yu, K. The evolution of H5N1 influenza viruses in ducks in southern China. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004, 101(28):10452-10457.
- 20 Chen W., P. A. Calvo, D. Malide, J. Gibbs, U. Schubert, I. Bacik, S. Basta, R. O. Neill, J. Schickli, P. Palese, P. Henklein, J. R. Bennink, and J. W. Yewdell. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nature Medicine* 2001; 7: 1306-1312.
- 21 Chin, P. S., Hoffmann, E., Webby, R., Webster, R. G., Guan, Y., Peiris, M., Shortridge, K. F. Molecular evolution of H6 influenza viruses from poultry in Southeastern China: prevalence of H6N1 influenza viruses possessing seven A/Hong Kong/156/97 (H5N1)-like genes in poultry. *J. Virol.* 2002, 76(2):507-516.
- 22 Choi, Y. K., Ozaki, H., Webby, R. J., Webster, R. G., Peiris, J. S., Poon, L., Butt, C., Leung, Y. H. C., Guan, Y. Continuing evolution of H9N2 influenza viruses in southeastern China. *J. Virol.* 2004, 78(16):8609-8614.
- 23 Connor, R. J., Kawaoka, Y., Webster, R. G., Paulson, J. C. Receptor specificity in human, avian and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology* 1994, 205(1):17-23.
- 24 Deshpande, K. L., Fried, V. A., Ando, M., Webster, R. G. Glycosylation affects cleavage of an H5N2 influenza virus haemagglutinin and regulates virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987, 84(1):36-40.
- 25 Fioretti, A., Menna, L. F., Calabria, M. The epidemiological situation of avian influenza in Italy during 1996-1997. In *Proceedings of the Joint Fourth Annual Meetings of the National Newcastle Disease and Avian Influenza Laboratories of Countries of the European Union*, Brussels, Belgium. 1998, 17-22
- 26 Fodor E., Devenish L., Engelhardt O. G., Palese P., Brownlee G. G., and Garcia-Sastre, A. 1999. Rescue of influenza A virus from recombinant DNA. *J. Virol.* 73, 9679-9682.
- 27 Fouchier, R. A. M., Munster, V., Wallensten, A., Bestebroer, T. M., Herfst, S., Smith, D., Rimmelzwaan, G. F., Olsen, B., Osterhaus, A. D. M. E. Characterization of a Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16) Obtained from Black-Headed Gulls. *J. Virol.* 2004, 79(5):2814-2822.
- 28 Gambaryan, A. S., Piskarev, V. E., Yamskov, I. A., Sakharov, A. M., Tuzikov, A. B., Bovin, N. V., Nifantev, N. E., Matrosovich, M. N. Human influenza virus recognition of oligosaccharides. *FEBS Letters* 1995, 366(1):57-60.
- 29 Garcia, A., Johnson, H., Srivastava, D. K., Jayawardene D. A., Wehr, D. R., Webster, R. G. Efficacy of inactivated H5N2 influenza vaccines against lethal A/Chicken/Queretaro/19/95 infection. *Avian Dis.* 1998, 42(2):248-256.
- 30 Garcia, M., Crawford, J. M., Latimer, J. W., RiveraCruz, E. & Perdue, M. L. Heterogeneity in the haemagglutinin gene and emergence of the highly pathogenic phenotype among recent H5N2 avian

- influenza viruses from Mexico. *J. Gen. Virol.* 1996, 77(7):1493-1504.
- 31 Guan Y, Shortridge K F, Krauss S, et al. Two lineages of H9N2 influenza virus continue to circulate in land-based poultry in southeastern China. *International Congress Series*, 2001, 1219:187-193.
- 32 Guan, Y., Shortridge, K. F., Krauss, S., Webster, R. G. Molecular characterization of H9N2 influenza viruses; were they the donors of the “internal” genes of H5N1 viruses in Hong Kong? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96(16):9363-9367.
- 33 Guan, Y., Shortridge, K. F., Krauss, S., Chin, P. S., Dyrting, K. C., Ellis, T. M., Webster, R. G., and Peiris, M. H9N2 influenza viruses possessing H5N1-like internal genomes continue to circulate in poultry in southeastern China. *J. Virol.* 2000, 74(20):9372-9380.
- 34 Guo, Y. J., Li, J. W., Cheng, I. Discovery of humans infected by avian influenza A (H9N2) virus. *Chin. J. Exp. Clin. Virol.* 1999, 13(2):105-108.
- 35 Halvorson, D.A., Frame, D. D., Friendshuh, A. J., Shaw, D.P. Outbreaks of low pathogenicity avian influenza in USA. In *Proceedings of the 4th International Symposium on Avian Influenza*. Athens, GA, USA 1998, 36-46.
- 36 Hatta M, Asano Y, Masunaga K, et al. Mapping of functional domains on influenza A virus RNA polymerase PB2 molecule using monoclonal antibodies. *Arch Virol.* 2000,145: 1947-1961
- 37 Hatta, M., Gao, P., Halfmann, P., Kawaoka, Y. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science* 2001, 293(5536):1840-1842.
- 38 Hinshaw, V. G., Webster, R. G., Turner, B. The perpetuation of orthomyxoviruses and paramyxoviruses in Canadian waterfowl. *Can. J. Microbiol.* 1980, 26(5):622-629.
- 39 Hirst, G. K.. Agglutination of red cells by allantoic fluid of Chicken embryos infected with influenza virus. *Science*, 1941, 94:22-23.
- 40 Hoffmann, E., Neumann, G., Kawaoka, Y., Hobom, G., and Webster, R. G. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, 97(11):6108-6113.
- 41 Horimoto, Y., Yamazaki, Y., Fukushima, T., Saito, T., Lindstrom, S. E., Omoe, K., Nerome, R., Lim, W., Sugita, S., Nerome, K. Evolutionary characterization of the six internal genes of H5N1 human influenza A virus. *J. Gen. Virol.* 2000, 81(5):1293-1303.
- 42 Inkster, M. D., Hinshaw, V. S., Schulze, I. T. The haemagglutinins of duck and human H1 influenza viruses differ in sequence conservation and in glycosylation. *J. Virol.* 1993, 67(12):7436-7443.
- 43 Kaverin, V. V., Matrosovich, M. N., Gambaryan, A. S., Rudneva, I. A., Shilov, A. A., Varich, N. L., Makarova, N. V., Kropotkina, E. A., and Sinitsin, B. V. Intergenic HA-NA interactions in influenza A virus: postreassortant substitutions of charged amino acid in the hemagglutinin of different subtypes. *Virus Res.* 2000, 66(2):123-129.
- 44 Kawaoka Y, Naeve C.W, Webster R.G. Is virulence of H5N2 influenza viruses in chickens associated with loss of carbohydrate from the hemagglutinin? *Virology*, 1984, 139:303-316
- 45 Lee, C. W., Song, C. S., Lee, Y. J., Mo, I.-P., Garcia, M., Suarez, D.L. Kim, S. J. Sequence analysis

- of the haemagglutinin gene of H9N2 Korean avian influenza viruses and assessment of the pathogenic potential of isolate MS96. *Avian Dis.* 2000, 44(3):527-535.
- 46 Li C, Yu K, Tian G, et al. Evolution of H9N2 influenza viruses from domestic poultry in Mainland China. *Virology*, 2005, 340:70-83.
- 47 Li, Z., Y. Jiang, P. Jiao, A. Wang, F. Zhao, G. Tian, X. Wang, K. Yu, Z. Bu, H. Chen. The NS1 gene contributes to the virulence of H5N1 avian influenza viruses. *J. Virol.*, 2006, 80(22):11115-11123.
- 48 Li, K. S., Xu, K. M., Peiris, J. S. M., Poon, L. L. M., Yu, K. Z., Yuen, K. Y., Shortridge, K. F., Webster, R. G., Guan, Y. Characterization of H9 subtype influenza viruses from the ducks of southern China: a candidate for the next influenza pandemic in humans? *J. Virol.* 2003, 77(12):6988-6994.
- 49 Lin, Y. P., Shaw, M., Gregory, V., Cameron, K., Lim, W., Klimov, A., Subbarao, K., Guan, Y. L., Krauss, S., Shortridge, K., Webster, R., Cox, N., Hay, A. Avian-to-human transmission of H9N2 subtype influenza A viruses: relationship between H9N2 and H5N1 human isolates. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 2000, 97(17):9654-9658.
- 50 Liu, H. Q., Liu, X. F., Cheng, J., Peng, D. X., Jia, L. J., Huang, Y. Phylogenetic analysis of the hemagglutinin genes of twenty-six avian influenza viruses of subtype H9N2 isolated from chickens in China during 1996-2001. *Avian Dis.* 2003, 47(1):116-127.
- 51 Liu, J. H., Okazaki, K., Mweene, A., Shi, W. M., Wu, Q. M., Su, J. L., Zhang, G. Z., Bai, G. R., Kida, H. Genetic conservation of hemagglutinin gene of H9 influenza virus in chicken population in Mainland China. *Virus Genes* 2004, 29(3):329-334.
- 52 Liu, J. H., Okazaki, K., Shi, W. M., Wu, Q. M., Mweene, A. S., Kida, H. Phylogenetic analysis of neuraminidase gene of H9N2 influenza viruses prevalent in chickens in China during 1995-2002. *Virus Genes* 2003, 27(2):197-202.
- 53 Liu, J., Okazaki, K., Ozaki, H., Sakoda, Y., Wu, Q., Chen, F., Kida, H. H9N2 influenza viruses prevalent in China are phylogenetically distinct from A/quail/Hong Kong/G1/97 presumed to be the donor of the internal protein genes of the H5N1 Hong Kong/97 virus. *Avian Pathology* 2003, 32(5):551-560.
- 54 Liu, M., He, S. Q., Walker, D., Zhou, N. N., Perez, D. R., Mo, B., Li, F., Huang, X. T., Webster, R. G., and Webby, R. J. The influenza gene pool in a poultry market in south central China. *Virology* 2003, 305(2):267-275.
- 55 Lu, J. H., Liu, X. F., Shao, W. X., Zhang, P. H., Wei, D. P. Genetic Characterization of the Entire Genome of an H9N2 Avian Influenza Virus A/Chicken/Shanghai/F/98. *Acta Microbiologica Sinica* 2003, 43:434-441.
- 56 Lu, Y., Wambach, M., Katze, M. G., Krug, R. M. Binding of the influenza virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylated the eIF-2 translation initiation factor. *Virology* 1995, 214(1):222-228.
- 57 Ludwig, S., Wang, X., Ehrhardt, C., Zheng, H., Donelan, N., Planz, O., Pleschka, S., Garcia-Sastre, A., Heins, G., Wolff, T. The influenza A virus NS1 protein inhibits activation of Jun N-terminal

- kinase and AP-1 transcription factors. *J. Virol.* 2002, 76(21):11166-11171.
- 58 Mase, M., Imada, T., Sanada, Y., Etoh, M., Sanada, N., Tsukamoto, K., Kawaoka, Y., Yamaguchi, S. Imported parakeets harbor H9N2 influenza A viruses that are genetically closely related to those transmitted to humans in Hong Kong. *J. Virol.* 2001, 75(7):3490-3494.
- 59 Matrosovich, M., Gambaryan, A. S., Teneberg, S., Piskarev, V. E., Yamnikova, S. S., Lvov, D. K., Robertson, J. S., Karlsson, K. A. Avian influenza A viruses differ from human viruses by recognition of sialyloligo-saccharides and gangliosides and by a higher conservation of HA receptor-binding site. *Virology*, 1997, 223 (1):224-234.
- 60 Matrosovich, M., Tuzikov, N., Bovin, A., Gambaryan, A., Klimov, A., Castrucci, M. R., Donatelli, I., Kawaoka, Y. Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, H3 avian influenza virus haemagglutinins after their introduction into mammals. *J. Virol.* 2000, 74(18):8502-8512.
- 61 Matrosovich, M. N., Krauss, S., Webster, R.G. H9N2 influenza A viruses from poultry in Asia have human virus-like receptor specificity. *Virology* 2001, 281(2):156-162.
- 62 Matrosovich, M., Tuzikov, N., Bovin, A., Gambaryan, A., Klimov, A., Castrucci, M. R., Donatelli, I., Kawaoka, Y. Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, H3 avian influenza virus haemagglutinins after their introduction into mammals. *J. Virol.* 2000, 74(18):8502-8512.
- 63 Mitnaul, L. J., Matrosovich, M. N., Castrucci, M. R., Tuzikov, A. B., Bovin, N. V., Kobasa, D., Kawaoka, Y. Balanced hemagglutinin and neuraminidase activities are critical for efficient replication of influenza A virus. *J. Virol.* 2000, 74(13):6015-6020.
- 64 Mo IP, Song CS, Kim KS & Rhee JC. (1998). An occurrence of non-highly pathogenic avian influenza in Korea. In *Proceedings of the 4th International Symposium on Avian Influenza*. 1997 (pp. 379-383). Athens, Georgia, USA.
- 65 Naeem, K., Naurin, M., Rashid, S. Bano, S. Seroprevalence of avian influenza virus and its relationship with increased mortality and decreased egg production. *Avian Pathology*, 2003, 32(3):283-287.
- 66 Naeem, K., Ullah, A., Manvell, R. J., Alexander, D. J. Avian influenza A subtype H9N2 in poultry in Pakistan. *Veterinary Record*. 1999, 145(19):560.
- 67 Naffakh, N., Massin, P., Escriou, N., Crescenzo-Chaigne, B., van der Werf, S. Genetic analysis of the compatibility between polymerase proteins from humans and avian strains of influenza A viruses. *J. Gen. Virol.* 2000, 81(5):1283-1291.
- 68 Neumann, G., Zobel, A., Hobom, G. RNA polymerase I-mediated expression of influenza viral RNA molecules. *Virology* 1994, 202(1):477-479.
- 69 Neumann, G., Watanabe, T., Ito, H., Watanabe, S., Goto, H., Gao, P., Hughes, M., Perez, D., Donis, R., Hoffmann, E., Hobom, G., Kawaka, Y. Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96(16):9345-9350.
- 70 Nili, H., Asasi, K. Natural cases and an experimental study of H9N2 avian influenza in commercial broiler chickens of Iran. *Avian Pathology* 2002, 31(3):247-252.
- 71 Nili, H. Asasi, K. Avian Influenza (H9N2) outbreak in Iran. In: *Proceedings of the Fifth*

- International Symposium on Avian Influenza, Athens, Georgia, April 14-17, 2002. *Avian Dis.* 2003, 47:828-831.
- 72 Ohuchi, M., Ohuchi, R., Feldmann, A., Klenk, H. K. Regulation of receptor binding affinity of influenza virus haemagglutinin by its carbohydrate moiety. *J. Virol.* 1997, 71(11):8377-8384.
- 73 Peiris, J. S., Guan, Y., Markwell, D., Ghose, P., Webster, R. G., Shortridge, K. F. Cocirculation of avian H9N2 and contemporary "human" H3N2 influenza A viruses in pigs in southeastern China: potential for genetic reassortment? *J. Virol.* 2001, 75(20):9679-9686.
- 74 Peiris, M., Yuen, K. Y., Leung, C. W., Chan, K. H., Ip, P. L., Lai, R. W., Orr, W. K., Shortridge, K. F. Human infection with influenza H9N2. *Lancet* 1999, 354(9182):916-917.
- 75 Peiris, M., Yam, W. C., Chan, K. H., Ghose, P., Shortridge, K. F. Influenza A H9N2: aspects of laboratory diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 1999, 37(10):3426-3427.
- 76 Pleschka, S., Jaskunas, R., Engelhardt, O. G., Zurcher, T., Palese, P., Garcia-Sastre, A. A plasmid-based reverse genetics system for influenza A virus. *J. Virol.* 1996, 70(6):4188-4192.
- 77 Plotch, S. J., Bouley, M., Krug, R. M. Transfer of 5'-terminal cap of globin mRNA to influenza viral complementary RNA during transcription in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979, 76(4):1618-1622.
- 78 Robinson, H. L., Boyle, C. A., Feltquate, D. M., Morin, M. J., Santoro, J. C., Webster, R. G. DNA immunization for influenza virus: studies using hemagglutinin- and nucleoprotein- expressing DNAs. *J. Infect. Dis.* 1997, 176:(Suppl 1):S50-55.
- 79 Rogers, G. N., Paulson, J. C., Daniels, R. S., Skehel, J. J., Wilson, I. A., Wiley, D. C. Single amino acid substitutions in influenza haemagglutinin change receptor specificity. *Nature* 1983, 304(5921):76-78.
- 80 Schafer, W. Sero-immunologic studies on incomplete forms of the virus of classical fowl plague (German). *Arch. Exp. Vet. Med.*, 1995, 9:218-230.
- 81 Steinhauer, D. A. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology* 1999, 258(1):1-20.
- 82 Subbarao, E. K., London, W., Murphy, B. R. A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range. *J. Virol.* 1993, 67(4):1761-1764.
- 83 Subbarao, K., Klimov, A., Katz, J., Regnery, H., Lim, W., Hall, H., Perdue, M., Swayne, D., Bender, C., Huang, J., Hemphill, M., Rowe, T., Shaw, M., Xu, X., Fukuda, K., Cox, N. Characterization of an Avian Influenza A (H5N1) Virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science* 1998, 279(5349):393-396.
- 84 Subbarao, K., Chen, H., Swayne, D., Mingay, L., Fodor, E., Brownlee, G., Xu, X., Lu, X., Katz, J., Cox, N., Matsuoka, Y. Evaluation of a genetically modified reassortant H5N1 influenza A virus vaccine candidate generated by plasmid-based genetics. *Virology* 2003, 305(1):192-200.
- 85 Talon, J., Horvath, C. M., Polley, R., Basler, C. F., Muster, T., Palese, P., Garcia-Sastre, A. Activation of interferon regulatory factor 3 is inhibited by the influenza A virus NS1 protein. *J. Virol.* 2000, 74(17):7989-7996.

- 86 Taubenberger, J. K. Influenza virus hemagglutinin cleavage into HA1, HA2: no laughing matter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95(17):9713-9715.
- 87 Tian G, Zhang S, Li Y, Bu Z, Liu P, Zhou J, Li C, Shi J, Yu K, & Chen H. (2005). Protective efficacy in chickens, geese and ducks of an H5N1-inactivated vaccine developed by reverse genetics. *Virology* 341:153-162
- 88 Varghese, J. N., Colman, P. M., van Donkelaar, A., Blick, T. J., Schasrabudhe, A., Mckimm-Breschkin, J. L. Structural evidence for a second sialic acid binding site in avian influenza virus neuraminidases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94(22):11808-11812.
- 89 Vines, A., Wells, K., Matrosovich, M., Castrucci, M. R., Ito, T., Kawaoka, Y. The role of influenza A virus haemagglutinin residues 226 and 228 in receptor specificity and host range restriction. *J. Virol.* 1998, 72(9):7626-7631.
- 90 Wagner, R., Wolff, T., Herwig, A., Pleschka, S., Klenk, H. D. Interdependence of haemagglutinin glycosylation and neuraminidase as regulators of influenza virus growth: a study by reverse genetics. *J. Virol.* 2000, 74(14):6316-6323.
- 91 Wang, X., Li, M., Zheng, H., Muster, T., Palese, P., Beg, A. A., Garcia-Sastre, A. Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF- κ B and induction of alpha/beta interferon. *J. Virol.* 2001, 74(24):11566-11573.
- 92 Webster, R. G., Hinshaw, V. S., Bean, W. J., Van Wyke, K. L., Geraci, J. R., St. Aubin, D. J., Retursson, G. Characterization of an influenza A virus from seal. *Virology* 1981, 113(2):712-724.
- 93 Webster, R. G., Guan, Y., Peiris, M., Walker, D., Krauss, S., Zhou, N. N., Govorkova, E. A., Ellis, T. M., Dyrting, K. C., Sit, T., Perez, D. R., Shortridge, K. F. Characterization of H5N1 influenza viruses that continue to circulate in geese in southeastern China. *J. Virol.* 2002, 76(1):118-126.
- 94 Weis, W., Brown, J. H., Cusack, S., Paulson, J. C., Skehel, J. J., Wiley, D. C. Structure of the influenza virus haemagglutinin complex with its receptor sialic acid. *Nature* 1988, 333(6172):426-431.
- 95 Werner, O. Avian influenza - situation in Germany 1997/1998. In *Proceedings of the Joint Fifth Annual Meetings of the National Newcastle Disease and Avian Influenza Laboratories of Countries of the European Union*, 1998. Vienna, Austria. 1999, 10-11.
- 96 Werner, O. Avian influenza - situation in Germany 1995-/1997. In *Proceedings of the Joint Fourth Annual Meetings of the National Newcastle Disease and Avian Influenza Laboratories of Countries of the European Union*, 1997. Brussels, Belgium. 1998, 9-10.
- 97 Wiley, D. C., Wilson, I. A., Skehel, J. J. Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation. *Nature* 1981, 289(5796):373-378.
- 98 Wilson, I. A., Skehel, J. J., Wiley, D. C. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 angstroms resolution. *Nature* 1981, 289(5796):366-373.
- 99 Xu K M, Li K S, Smith G J, et al. Evolution and molecular epidemiology of H9N2 influenza A viruses from quail in southern China, 2000 to 2005. *J Virol*, 2007, 81:2635-2645.

-
- 100 Xu KM, Li KS, Smith GJ, Li JW, Tai H, Zhang JX, Webster RG, Peiris JS, Chen H, Guan Y. Evolution and molecular epidemiology of H9N2 influenza A viruses from quail in southern China, 2000 to 2005. *J Virol*, 81:2635-2645 2007
- 101 Xu, C. T., Fan, W. X., Rong, W., Zhao, H. K. Isolation and identification of swine influenza recombinant A/Swine/Shandong/1/2003(H9N2) virus. *Microbes Infect.* 2004, 6(10):919-925.
- 102 Zebedee S. L., Lamb R. A., 1989, Influenza virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. *J. Virol.* 62:2762~2772
- 103 Zhou, N. N., Shortridge, K. F., Claas, E. J., Krauss, S. L., Webster, R. G. Rapid evolution of H5N1 influenza viruses in chickens in Hong Kong. *J. Virol.* 1999, 73(4):3366-3374.

附录

附录 1 13 株 H9N2 亚型禽流感病毒 HA 基因组序列

		*	20	*	40	*	60	*	80	*	100	
		AGCAAAAGCAGGGGAATTCACAACCACTCAAGATGGAAGTAGTATCACTAATAACTATACTACTAGTAGTAACAGTAAGCAATGCAGATAAAATCTGCA										
SD/HuB/114/04	:											100
DK/AH/143/04	:	C										100
GS/GD/131/04	:	T										100
CK/GD/129-1/04	:	A										100
DK/GD/133/04	:	A										100
CK/GD/129-2/04	:	AC T A										100
CK/FJ/136/04	:	AC T A										100
CK/FJ/135/04	:	AC T A										100
CK/GD/128/04	:	A										100
AFWB/TJ/101/04	:	A										100
GS/TJ/102/04	:	A										100
CK/GD/123/03	:	T GA GA AC A										100
QA/GD/125/03	:	T GA GA AC A										100
		*	120	*	140	*	160	*	180	*	200	
		TCGGCTACCAATCAACAACTCCACAGAACTGTAGACAGCTAACAGAAAACAATGTTCTGTGACACATGCCAAAGAATTGCTCCACAGACACAA										
SD/HuB/114/04	:											200
DK/AH/143/04	:	G										200
GS/GD/131/04	:	T										200
CK/GD/129-1/04	:	T										200
DK/GD/133/04	:	T										200
CK/GD/129-2/04	:	T										200
CK/FJ/136/04	:	C										200
CK/FJ/135/04	:	C										200
CK/GD/128/04	:	T T										200
AFWB/TJ/101/04	:	C										200
GS/TJ/102/04	:	C										200
CK/GD/123/03	:	TC G G										200
QA/GD/125/03	:	TC G G										200
		*	220	*	240	*	260	*	280	*	300	
		TGGGATGCTGTGTGCAACAAATCTGGGACATCCTCTTATTCTAGACACCTGTACCATTGAAGGACTAATCTATGGCAACCCCTTCTGTGATCTACTGTTG										
SD/HuB/114/04	:											300
DK/AH/143/04	:	A										300
GS/GD/131/04	:	A										300
CK/GD/129-1/04	:	A										300
DK/GD/133/04	:	A										300
CK/GD/129-2/04	:	A										300
CK/FJ/136/04	:	A										300
CK/FJ/135/04	:	A										300
CK/GD/128/04	:	A										300
AFWB/TJ/101/04	:	C										300
GS/TJ/102/04	:	A										300
CK/GD/123/03	:	A										300
QA/GD/125/03	:	A										300
		*	320	*	340	*	360	*	380	*	400	
		GGAGGAAGAGAATGGTCTACATCGTCGAAAGACCATCGGCTGTTAATGGATTGTGTTACCCCGGAATGTAGAAAACCTAGAAGAACTAAGGTCACCTT										
SD/HuB/114/04	:											400
DK/AH/143/04	:	G										400
GS/GD/131/04	:	T T										400
CK/GD/129-1/04	:	T T										400
DK/GD/133/04	:	T T										400
CK/GD/129-2/04	:	G										400
CK/FJ/136/04	:	G										400
CK/FJ/135/04	:	G										400
CK/GD/128/04	:	T										400
AFWB/TJ/101/04	:	T										400
GS/TJ/102/04	:	T										400
CK/GD/123/03	:	A										400
QA/GD/125/03	:	A										400
		*	420	*	440	*	460	*	480	*	500	
		TTAGCTCTGCTAGTCTCTACCAAGAATCCAGATCTTCCAGACACAATCTGGAATGTGTCTTACAGTGAACAAGCAAAGCATGTTTCAGATTCTTCTA										
SD/HuB/114/04	:	T										500
DK/AH/143/04	:	C T										500
GS/GD/131/04	:											500
CK/GD/129-1/04	:											500
DK/GD/133/04	:											500

CK/GD/129-2/04	: . . . T G G	: 500
CK/FJ/136/04	: . . . T G G	: 500
CK/FJ/135/04	: . . . T G G	: 500
CK/GD/128/04	:	: 500
AFWB/TJ/101/04	: C	: 500
GS/TJ/102/04	: C	: 500
CK/GD/123/03	: . . . T . C C A C C A T . C G G G	: 500
QA/GD/125/03	: . . . T . CA C A C C A T . C G G G	: 500
*520 *540 *560 *580 *600		
CAGAAGCATGAGATGGTTGACTCAAAAGAACACGCTTACCCTGTTCAAGACGCCCAATACACAAATAATAGAGGAAAGAACATTCTTTTCATGTGGGGC		
SD/HuB/114/04	: C A G	: 600
DK/AH/143/04	: . . G A C G T	: 600
GS/GD/131/04	: G G	: 600
CK/GD/129-1/04	: G G	: 600
DK/GD/133/04	: AG	: 600
CK/GD/129-2/04	: C T T C G C	: 600
CK/FJ/136/04	: C T T C G C	: 600
CK/FJ/135/04	: C T T C G C	: 600
CK/GD/128/04	: G	: 600
AFWB/TJ/101/04	: . . G A A G	: 600
GS/TJ/102/04	: . . G A A G	: 600
CK/GD/123/03	: . . G . T C A . G . GGGTT C C G G T	: 600
QA/GD/125/03	: . . G . T C A . G . GGGTT C C G G T	: 600
*620 *640 *660 *680 *700		
ATAAATCACCCACCCACTGATACTGCGCAGACAAATCTGTACACAAGGACTGACACAACAACAAGTGTGGCAACAGAGATATAAATAGGACCTTCAAAC		
SD/HuB/114/04	: T G G	: 700
DK/AH/143/04	: G A	: 700
GS/GD/131/04	: G	: 700
CK/GD/129-1/04	: T G	: 700
DK/GD/133/04	: T G	: 700
CK/GD/129-2/04	: T . C A A	: 700
CK/FJ/136/04	: T . C A A	: 700
CK/FJ/135/04	: T A A	: 700
CK/GD/128/04	: C G	: 700
AFWB/TJ/101/04	: TT . C . . C . . TA A	: 700
GS/TJ/102/04	: TT . C . . C . . TA A	: 700
CK/GD/123/03	: . . C AT . . C . AA . A T A . AC C . . A T . G	: 700
QA/GD/125/03	: . . C AT . . C . AA . A T A . AC C . . A T . G	: 700
*720 *740 *760 *780 *800		
CATTGATAGGGCCAAGGCCCTTGTCATGGTCTGCAGGGAAGAATTGATTATTATGGTCGGTATTGAAACAGGTCAAACATTGCGAGTAAGATCCAA		
SD/HuB/114/04	: T A G	: 800
DK/AH/143/04	: A . T A A C	: 800
GS/GD/131/04	: T A AG C G G	: 800
CK/GD/129-1/04	: T A G C G G	: 800
DK/GD/133/04	: T G C G G	: 800
CK/GD/129-2/04	: A T C C G	: 800
CK/FJ/136/04	: A T C C G	: 800
CK/FJ/135/04	: A T C C G	: 800
CK/GD/128/04	: G G G T C G	: 800
AFWB/TJ/101/04	: . . G A A G C A G	: 800
GS/TJ/102/04	: . . G A A G C A G	: 800
CK/GD/123/03	: . . G G A C . A C	: 800
QA/GD/125/03	: . . G G A C . A C	: 800
*820 *840 *860 *880 *900		
TGGGAATCTAATCGCTCCATGGTATGGACACATTCTTTCAGGAGAGAGCCATGGAAGAAATCCTGAAGACTGATTAAACAGTGGTAACCTGTGTAGTGCAA		
SD/HuB/114/04	: G C	: 900
DK/AH/143/04	: G C A A	: 900
GS/GD/131/04	: . . C G T A G	: 900
CK/GD/129-1/04	: . . C G T A G	: 900
DK/GD/133/04	: . . C G T A G	: 900
CK/GD/129-2/04	: G A C CG	: 900
CK/FJ/136/04	: G A C CG	: 900
CK/FJ/135/04	: G A C CG	: 900
CK/GD/128/04	: G A C C	: 900
AFWB/TJ/101/04	: G	: 900
GS/TJ/102/04	: G	: 900
CK/GD/123/03	: T G G A GT	: 900
QA/GD/125/03	: T G G A GT	: 900
*920 *940 *960 *980 *1000		
TGTCAGACAGAAAAAGGTGGCTTAAATACTACATTGCCATTCCACAATGTAAGTAAGTACGCATTGGAAACTGCCCAAAATATGTTGGAGTAAAGAGTC		
SD/HuB/114/04	: G G T	: 1000
DK/AH/143/04	: T A C T	: 1000
GS/GD/131/04	: A G G C	: 1000
CK/GD/129-1/04	: A G G C	: 1000
DK/GD/133/04	: A G G C	: 1000
CK/GD/129-2/04	: G A A G G A	: 1000

CK/FJ/136/04	:	G.....	A.....	A.....	G.....	G.....	G.....	A.....	: 1000
CK/FJ/135/04	:	G.....	A.....	A.....	G.....	G.....	G.....	A.....	: 1000
CK/GD/128/04	:	T.....	C.....	C.....	G.....	G.....	G.....	A.....	: 1000
AFWB/TJ/101/04	:	C.....	A.....	T.....	C.....	A.....	T.....	C.....	: 1000
GS/TJ/102/04	:	C.....	A.....	T.....	C.....	A.....	T.....	C.....	: 1000
CK/GD/123/03	:	T.....	G.....	C.....	G.....	A.....	C.....	A.....	: 1000
QA/GD/125/03	:	T.....	G.....	C.....	G.....	A.....	C.....	A.....	: 1000
*1020 *1040 *1060 *1080 *1100 TCAAACGGCAGTTGGTCTGAGGAATGTGCCTGCTAGATCAAGTAGAGGACTATTTGGAGCCATAGCTGGATTATAGAGGGAGGTTGGTCAGGACTAGT									
SD/HuB/114/04	:	T.....	C.....	C.....	G.....	A.....	G.....	G.....	: 1100
DK/AH/143/04	:	T.....	C.....	C.....	G.....	A.....	G.....	G.....	: 1100
GS/GD/131/04	:	T.....	C.....	C.....	G.....	A.....	G.....	G.....	: 1100
CK/GD/129-1/04	:	T.....	CC.....	A.....	T.....	A.....	A.....	A.....	: 1100
DK/GD/133/04	:	T.....	C.....	C.....	G.....	A.....	G.....	G.....	: 1100
CK/GD/129-2/04	:	G.....	C.....	G.....	C.....	G.....	G.....	G.....	: 1100
CK/FJ/136/04	:	G.....	C.....	G.....	C.....	G.....	G.....	G.....	: 1100
CK/FJ/135/04	:	G.....	C.....	G.....	C.....	G.....	G.....	G.....	: 1100
CK/GD/128/04	:	T.....	C.....	C.....	G.....	A.....	G.....	G.....	: 1100
AFWB/TJ/101/04	:	T.....	G.....	G.....	G.....	G.....	G.....	G.....	: 1100
GS/TJ/102/04	:	T.....	G.....	G.....	G.....	G.....	G.....	G.....	: 1100
CK/GD/123/03	:	C.....	C.....	C.....	G.....	A.....	C.....	C.....	: 1100
QA/GD/125/03	:	C.....	C.....	C.....	G.....	A.....	C.....	C.....	: 1100
*1120 *1140 *1160 *1180 *1200 TGCTGGTTGGTATGGGTTCCAGCATTCAAATGATCAAGGGTTGGTATGGCTGCAGATAGAGACTCAACTCAAAGGCAATTGACAAAATAACATCCAAA									
SD/HuB/114/04	: C.....	C.....	C.....	A.....	A.....	A.....	A.....	A.....	: 1200
DK/AH/143/04	: C.....	C.....	C.....	A.....	A.....	A.....	A.....	A.....	: 1200
GS/GD/131/04	:	AAC.....	AAC.....	AAC.....	AAC.....	AAC.....	AAC.....	AAC.....	: 1200
CK/GD/129-1/04	:	AAC.....	AAC.....	AAC.....	AAC.....	AAC.....	AAC.....	AAC.....	: 1200
DK/GD/133/04	:	AAC.....	AAC.....	AAC.....	AAC.....	AAC.....	AAC.....	AAC.....	: 1200
CK/GD/129-2/04	:	T.....	A.....	A.....	A.....	A.....	A.....	A.....	: 1200
CK/FJ/136/04	:	T.....	A.....	A.....	A.....	A.....	A.....	A.....	: 1200
CK/FJ/135/04	:	T.....	A.....	A.....	A.....	A.....	A.....	A.....	: 1200
CK/GD/128/04	:	T.....	A.....	A.....	A.....	A.....	A.....	A.....	: 1200
AFWB/TJ/101/04	: C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	: 1200
GS/TJ/102/04	: C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	: 1200
CK/GD/123/03	: A.....	C.....	T.....	T.....	G.....	T.....	T.....	T.....	: 1200
QA/GD/125/03	: A.....	C.....	T.....	T.....	G.....	T.....	T.....	T.....	: 1200
*1220 *1240 *1260 *1280 *1300 GTGAATAATATAGTCGATAAAATGAACAAACAATATGAAATATTGATCATGAATTCAGCGAGGTTGAAACTAGACTCAATATGATCAATAATAAGATTG									
SD/HuB/114/04	:	T.....	G.....	G.....	C.....	C.....	G.....	T.....	: 1300
DK/AH/143/04	:	T.....	G.....	G.....	C.....	C.....	G.....	T.....	: 1300
GS/GD/131/04	:	A.....	A.....	A.....	A.....	A.....	A.....	A.....	: 1300
CK/GD/129-1/04	:	A.....	A.....	A.....	A.....	A.....	A.....	A.....	: 1300
DK/GD/133/04	:	A.....	A.....	A.....	A.....	A.....	A.....	A.....	: 1300
CK/GD/129-2/04	:	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	: 1300
CK/FJ/136/04	:	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	: 1300
CK/FJ/135/04	:	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	: 1300
CK/GD/128/04	:	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	: 1300
AFWB/TJ/101/04	:	G.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	: 1300
GS/TJ/102/04	:	G.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	: 1300
CK/GD/123/03	:	C.....	G.....	G.....	A.....	A.....	A.....	A.....	: 1300
QA/GD/125/03	:	C.....	G.....	G.....	A.....	A.....	A.....	A.....	: 1300
*1320 *1340 *1360 *1380 *1400 ATGACCAAATTCAGACATATGGGCATATAACGCGAGAATTGCTAGTCTGCTTGAAAACAGAAAACACTCGATGAGCATGATGCGAATGTAAACAATCT									
SD/HuB/114/04	:	C.....	T.....	A.....	A.....	A.....	A.....	A.....	: 1400
DK/AH/143/04	:	C.....	T.....	A.....	A.....	A.....	A.....	A.....	: 1400
GS/GD/131/04	:	A.....	A.....	T.....	G.....	A.....	A.....	A.....	: 1400
CK/GD/129-1/04	:	A.....	A.....	T.....	G.....	A.....	A.....	A.....	: 1400
DK/GD/133/04	:	A.....	A.....	T.....	G.....	A.....	A.....	A.....	: 1400
CK/GD/129-2/04	:	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	: 1400
CK/FJ/136/04	:	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	: 1400
CK/FJ/135/04	:	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	: 1400
CK/GD/128/04	:	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	: 1400
AFWB/TJ/101/04	:	T.....	T.....	T.....	T.....	T.....	T.....	T.....	: 1400
GS/TJ/102/04	:	T.....	T.....	T.....	T.....	T.....	T.....	T.....	: 1400
CK/GD/123/03	:	A.....	G.....	T.....	T.....	A.....	A.....	A.....	: 1400
QA/GD/125/03	:	A.....	G.....	T.....	T.....	A.....	A.....	A.....	: 1400
*1420 *1440 *1460 *1480 *1500 ATATAACAAAGTGAAGAGGGCACTGGGTTCCAATGCACTGGAAGATGGGAAAGGATGTTTCGAGCTATACCATAAATGTGATGACCACTGCATGGAGACA									
SD/HuB/114/04	: C.....	A.....	A.....	A.....	A.....	A.....	A.....	A.....	: 1500
DK/AH/143/04	:	T.....	T.....	A.....	C.....	C.....	C.....	T.....	: 1500
GS/GD/131/04	:	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	A.....	: 1500
CK/GD/129-1/04	:	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	A.....	: 1500
DK/GD/133/04	:	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	C.....	A.....	: 1500
CK/GD/129-2/04	:	T.....	T.....	C.....	G.....	T.....	T.....	T.....	: 1500
CK/FJ/136/04	:	T.....	T.....	C.....	G.....	T.....	T.....	T.....	: 1500

CK/FJ/135/04	: T T C G T	: 1500
CK/GD/128/04	: T T C	: 1500
AFWB/TJ/101/04	: A G T	: 1500
GS/TJ/102/04	: A G T	: 1500
CK/GD/123/03	: GG C TA T T A	: 1500
QA/GD/125/03	: GG C TA T T A	: 1500

	* 1520	* 1540	* 1560	* 1580	* 1600	
	ATTCGGAACGGGACCTATAACAGAAGAAAGTATAAAGAGGAATCAAGACTAGAAAGACAGAAAATAGAAGGGGTCAAGCTGGAATCTGAAGGAACCTACA					
SD/HuB/114/04	: G					: 1600
DK/AH/143/04	: A G A					: 1600
GS/GD/131/04	: A T G G A C					: 1600
CK/GD/129-1/04	: A T G G A C					: 1600
DK/GD/133/04	: A T G G A C					: 1600
CK/GD/129-2/04	: T A C G C ATT G					: 1600
CK/FJ/136/04	: T A C G C ATT G					: 1600
CK/FJ/135/04	: T A C G C ATT G					: 1600
CK/GD/128/04	: T T G G C					: 1600
AFWB/TJ/101/04	: T C C G					: 1600
GS/TJ/102/04	: T C C G					: 1600
CK/GD/123/03	: T G G T G T G					: 1600
QA/GD/125/03	: T G G T G T G					: 1600

	* 1620	* 1640	* 1660	* 1680	* 1700	
	AAATCCTCACCATTATTGCGACTGTCGCCTCATCTCTTGTGATTGCAATGGGGTTTGCTGCCTTCTGTCTGCGCCATGTCCAATGGATCTTGCAGATG					
SD/HuB/114/04	:					: 1700
DK/AH/143/04	: G T C					: 1700
GS/GD/131/04	: T C					: 1700
CK/GD/129-1/04	: T C					: 1700
DK/GD/133/04	: T C					: 1700
CK/GD/129-2/04	: C					: 1700
CK/FJ/136/04	: C					: 1700
CK/FJ/135/04	: C					: 1700
CK/GD/128/04	: C					: 1700
AFWB/TJ/101/04	:					: 1700
GS/TJ/102/04	:					: 1700
CK/GD/123/03	: C G C T					: 1700
QA/GD/125/03	: C G C T					: 1700

	* 1720	* 1740	
	CAACATTGTATATAATTGGCAAAAACACCCTTGTCTTCTACT		
SD/HuB/114/04	:		: 1742
DK/AH/143/04	:		: 1742
GS/GD/131/04	:		: 1742
CK/GD/129-1/04	:		: 1742
DK/GD/133/04	:		: 1742
CK/GD/129-2/04	: T		: 1742
CK/FJ/136/04	: T		: 1742
CK/FJ/135/04	: T		: 1742
CK/GD/128/04	:		: 1742
AFWB/TJ/101/04	:		: 1742
GS/TJ/102/04	:		: 1742
CK/GD/123/03	:		: 1742
QA/GD/125/03	:		: 1742

51

GS/TJ/102/04	: C C C A	: 991
CK/GD/123/03	: C A G G A . G . . . T . T G G	: 994
QA/GD/125/03	: C A G G A . G . . . T . T G G	: 994
*1020*1040*1060*1080*1100 AATGATGATAGCTCCAGCAGCAGCAACTGCAGGGATCCTAATAACGAGAGAGGGGCCAGGAGTGAAAGGTTGGGCCTTTGACAATGGAAATGATATTT		
SD/HuB/114/04	: A	: 1076
DK/AH/143/04	: A . C G G	: 1091
GS/GD/131/04	: C . . . TA . T T G C	: 1100
CK/GD/129-1/04	: C . . . TA . T T G C	: 1100
DK/GD/133/04	: C . . . TA . T T G C	: 1100
CK/GD/129-2/04	: T A G A	: 1091
CK/FJ/136/04	: T C C . A . . . A C . A . A . . . A A	: 1091
CK/FJ/135/04	: T A T G A	: 1091
CK/GD/128/04	: T A G G A	: 1091
AFWB/TJ/101/04	: T T . A G GT	: 1091
GS/TJ/102/04	: T T . A G GT	: 1091
CK/GD/123/03	: C T T C G G G	: 1094
QA/GD/125/03	: C T T C G G G	: 1094
*1120*1140*1160*1180*1200 GGATGGGACGAACAATCAAAAATGATTCACGCTCAGGTTATGAGACTTTACGGGTCGTTGGTGGTGGACACGGCTAATTCGAAGTCACAGATAAATAG		
SD/HuB/114/04	: G . G T AA	: 1176
DK/AH/143/04	: G T AA	: 1191
GS/GD/131/04	: A . . . G . TG . . . G A A A T C . G . . .	: 1200
CK/GD/129-1/04	: A . . . G . TG . . . G A A A T C . G . . .	: 1200
DK/GD/133/04	: A . . . G . TG . . . G A A A T C . G . . .	: 1200
CK/GD/129-2/04	: G . . . A . G A	: 1191
CK/FJ/136/04	: CG . . . A . G A	: 1191
CK/FJ/135/04	: G . . . A . G A	: 1191
CK/GD/128/04	: G . . . A . G A	: 1191
AFWB/TJ/101/04	: G . . . G . A A . C A G	: 1191
GS/TJ/102/04	: G . . . G . A A . C A G	: 1191
CK/GD/123/03	: G . A . . . G . . . T T A	: 1194
QA/GD/125/03	: G . A . . . G . . . T T A	: 1194
*1220*1240*1260*1280*1300 ACAAGTCATAGTTGACAGTGATAACTGGTCTGGGTATTCTGTATCTTCTCTGTTGAAGCAAAAACGCATCAACAGGTGTTTTATGTGGAGTTGATA		
SD/HuB/114/04	: A T A	: 1276
DK/AH/143/04	: C	: 1291
GS/GD/131/04	: T . C T C G A	: 1300
CK/GD/129-1/04	: T . C T C G A	: 1300
DK/GD/133/04	: T . C T G A	: 1300
CK/GD/129-2/04	: G . A	: 1291
CK/FJ/136/04	: G . A	: 1291
CK/FJ/135/04	: G . A	: 1291
CK/GD/128/04	: G . A	: 1291
AFWB/TJ/101/04	: C	: 1291
GS/TJ/102/04	: C	: 1291
CK/GD/123/03	: G A A A C A	: 1294
QA/GD/125/03	: G A A A C A	: 1294
*1320*1340*1360*1380*1400 AGAGGAAGACCACAGGAGACTAGGGTGTGGTGACTTCAAATAGCATCTTGATTTTGTGGAACCTCAGGTACCTATGGAACAGGCTCATGGCCTGATG		
SD/HuB/114/04	: A	: 1376
DK/AH/143/04	: C . A T	: 1391
GS/GD/131/04	: A A T C T T	: 1400
CK/GD/129-1/04	: A A T C T T	: 1400
DK/GD/133/04	: A A T C T T	: 1400
CK/GD/129-2/04	: . G A C T C	: 1391
CK/FJ/136/04	: . G A C T C	: 1391
CK/FJ/135/04	: . G A C T C	: 1391
CK/GD/128/04	: . G A C C	: 1391
AFWB/TJ/101/04	: T G	: 1391
GS/TJ/102/04	: . . A T G	: 1391
CK/GD/123/03	: . . . G C . A . A G T C	: 1394
QA/GD/125/03	: . . . G C . A . A G T C	: 1394
*1420*1440*1460 GGGCGAATATCAATTTTCATGCCTATATAAGCTTTGCGCAATTTTAGAAAAAATCCTTGTTTCTACT		
SD/HuB/114/04	: C	: 1442
DK/AH/143/04	: . A C	: 1457
GS/GD/131/04	: . . . A	: 1466
CK/GD/129-1/04	: . . A	: 1466
DK/GD/133/04	: . . A	: 1466
CK/GD/129-2/04	:	: 1457
CK/FJ/136/04	:	: 1457
CK/FJ/135/04	:	: 1457
CK/GD/128/04	:	: 1457
AFWB/TJ/101/04	:	: 1457
GS/TJ/102/04	:	: 1457

CK/GD/123/03	: . A. C. T. . . C.	: 1460
QA/GD/125/03	: . A. C. T. . . C.	: 1460

致 谢

本研究是在导师陈化兰研究员的悉心指导下完成的。导师渊博的知识、严谨的治学态度、一丝不苟的敬业精神和实事求是、无私忘我的工作作风将永远激励我奋进。三年来，导师在学习、工作和生活等各个方面都给予了无微不至的关心和帮助，值此论文付梓之际，首先向导师致以最诚挚的敬意和由衷的感谢！

兽医生物技术国家重点实验室的步志高研究员在实验过程中给予了大量的指导，在工作和生活等各个方面都给予了无私的关怀和帮助，在此致以由衷的谢意！

感谢科研处处长王笑梅研究员、付朝阳副处长、孙百明、张晶、刘益明老师及研究生院学生工作处于子荣副处长、杨建玲老师的关心与支持！

衷心感谢姜永萍副研究员、邓国华副研究员、李雁冰副研究员、王秀荣副研究员、田国彬副研究员、乔传玲副研究员、关云涛老师、施建忠老师、包红梅老师、刘丽玲老师、陈艳老师、曾显营老师、葛金英老师、王喜军老师、刘全贵老师及高玉伟博士在实验中的帮助和支持，感谢李泽军博士、李呈君博士的指点。感谢葛婉娥女士和宋素艳女士在实验中给予的帮助！

感谢实验动物中心主任曲连东研究员、姜颖女士等在动物实验方面提供的帮助。

特别感谢朱启运博士、焦培荣博士、樊树芳博士三年来在实验及生活中的指点和帮助。衷心感谢许传田博士、平继辉博士、陈樱博士、贾贝贝硕士、宋家升硕士、王冬硕士、张莹硕士的大力帮助，感谢温志远博士、陈伟业博士、葛红岩博士、王爱琴硕士、温峰琴硕士、赵凤菊硕士、李婷硕士、韩庆功硕士、孙凯硕士、刘威龙硕士、刘畅硕士、赵海丹硕士、左青山硕士、夏俊硕士、熊蕊硕士、黎玉梅硕士、刘科硕士、王艳丽硕士、李峻辉硕士、艾嘉亮硕士、张飞硕士、李雪平硕士、杨忠萍硕士、田丽娜硕士、武嘉男硕士、吴运普硕士在实验及生活上的帮助和支持！

感谢我的同窗好友刘建东、白兴华、吴国军、赵建军、王昱、丁选亚、崔红玉、何来、肇慧君、张晓威、张晓霁、司微、李慕瑶、彭伍平、王延辉、邓小云、张建华、王群，感谢一起奋斗的兄弟们。特别感谢老友龚利洋多年来在生活和工作上默默的照顾和鼓励。

向中国农业科学院研究生院及哈尔滨兽医研究所的全体老师致以衷心的感谢！

借此机会，向支持和爱护我的父母和姐姐致以最诚挚的敬意和深情的谢意，是他们的殷切期望和无私奉献让我安心远游求学，顺利完成学业。感谢陶丽红多年来对我的理解、支持和鼓励。

最后，向给予我关心、支持和帮助的所有老师、同学及亲友们致以深深的谢意！

作者简历

钟功勋，男，1982 年 1 月出生于浙江省宁波市宁海县。1999 年 9 月进入浙江大学动物科学学院动物科学专业学习，2003 年 7 月毕业，获农学学士学位。2004 年 9 月进入中国农业科学院研究生院及哈尔滨兽医研究所攻读硕士学位。主要从事 H9N2 亚型禽流感病毒遗传演化和 H5N1 亚型禽流感疫苗的研究。