

2015 年湖南部分地区 H9N2 亚型流感病毒 HA 和 NA 基因遗传进化

张爽^{1,2}, 陈全姣³, 毕玉海², 刘文军², 盛望¹, 张涛³, 李晶²

1 北京工业大学, 北京 100124

2 中国科学院微生物研究所 病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

3 中国科学院武汉病毒研究所, 湖北 武汉 430071

张爽, 陈全姣, 毕玉海, 等. 2015 年湖南部分地区 H9N2 亚型流感病毒 HA 和 NA 基因遗传进化. 生物工程学报, 2018, 34(4): 537–547.

Zhang S, Chen QJ, Bi YH, et al. Genetic evolution of HA and NA genes of H9N2 influenza viruses isolated in regions of Hunan Province, China, in 2015. Chin J Biotech, 2018, 34(4): 537–547.

摘 要: 我国湖南地区因水禽家禽饲养较多且密集, 是流感病毒高发省份。为了监测流感病毒的变异情况, 采用 RT-PCR 技术扩增了 10 株 H9N2 亚型流感病毒的 HA 和 NA 基因, 并进行了序列测定和分析。结果显示, 10 株分离株均属于欧亚分支中的 Y280 亚系; HA 碱性裂解位点序列均为 RSSR↓GLT, 为低致病性流感病毒特征; HA 受体结合位点 234 位均为 L, 具有与人唾液酸 α -2,6 受体结合的特性; NA 蛋白均在颈部 (63–65 位) 出现氨基酸缺失, 这种缺失能增加流感病毒在哺乳动物中的复制能力。提示 H9N2 亚型毒株近年有毒力和致病力趋于转强的可能性, 因此, 要加强对 H9N2 亚型禽流感病毒的监测, 密切关注它的重组趋势。

关键词: 遗传进化, H9N2 亚型流感病毒, HA 基因, NA 基因

Received: August 8, 2017; **Accepted:** October 27, 2017

Supported by: The Southeast Asia Biodiversity Research Institute, Chinese Academy of Sciences (No. Y4ZK111B01), National Natural Science Foundation of China (No. 31402216), National Key Research Program (Nos. 2016YFC1201303, 2016YFC1200803).

Corresponding authors: Jing Li. Tel/Fax: +86-10-64807503; E-mail: lj418@163.com

Tao Zhang. Tel/Fax: +86-27-87198167; E-mail: zonetone@msn.com

中国科学院东南亚生物多样性研究中心青年人才培养计划项目 (No. Y4ZK111B01), 国家自然科学基金 (No. 31402216), 国家重点研发计划 (Nos. 2016YFC1201303, 2016YFC1200803) 资助。

Genetic evolution of HA and NA genes of H9N2 influenza viruses isolated in regions of Hunan Province, China, in 2015

Shuang Zhang^{1,2}, Quanjiao Chen³, Yuhai Bi², Wenjun Liu², Wang Sheng¹, Tao Zhang³, and Jing Li²

¹ Beijing University of Technology, Beijing 100124, China

² Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

³ Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, Hubei, China

Abstract: The high prevalence of influenza A virus is identified in Hunan Province because of the high density of poultry farms. To survey the variations of H9N2 subtype avian influenza virus in Hunan province, we analyzed HA and NA genes of 10 virus strains isolated from different areas of Hunan Province. All these strains belong to the Eurasian lineage, Y280-like sub-lineage. The cleavage sites in their HA genes were all RSSR↓GLT, corresponding to the feature of low pathogenic AIV. All strains had an L (Leu) at the site 234 in the HA genes, indicating the ability of binding with the SA α -2,6 receptor. NA gene stalk deletions at aa 63–65 were also detected from all the isolates, indicating a possibility of increased virus replication in mammals. Our findings suggest that more attention should be paid to the surveillance of H9N2 influenza virus and its direction of reassortment.

Keywords: genetic evolution, H9N2 subtype influenza viruses, HA genes, NA genes

A 型流感病毒 (AIV) 属于正黏病毒科流感病毒属, 单股负链包膜 RNA 病毒。AIV 基因组由血凝素 (HA)、神经氨酸酶 (NA) 等 8 个基因片段组成。血凝素和神经氨酸酶组成不同的血清亚型, 目前已报道有 18 种 HA (H1–H18) 亚型和 11 种 NA (N1–N11) 亚型^[1-2]。AIV 根据致病性可分为高致病性流感病毒 (HPAI)、低致病性流感病毒 (LPAI) 和非致病性流感病毒 (NPAI)。

A 型流感病毒四季均可发病, 冬春两季为疾病的暴发期^[3]。病毒传播范围较广, 可随候鸟的迁徙路线传播; 传染源多为染病禽类排泄物污染的水, 禽类经消化道或呼吸道感染病毒。段晓东等^[4]报道称 2013 年我国广东省 91 个活禽市场的流感病毒感染阳性率高达 46.05%。随后蒋文明等^[5]报道 2014–2016 年间华东地区某市 94.12% 的活禽市场中均可检测出禽流感病毒。2014 年, Shi 等^[6]在我国湖南省洞庭湖东部共检测出 12 种不同血清亚型禽流感病毒, 2015 年之后病毒的变异情况及畜禽的感染情况未见系统报道。

AIV HA 蛋白影响着病毒致病力及宿主特性; 致病力强弱与 HA 蛋白在裂解位点处有无连续的碱性氨基酸插入相关, LPAI 无连续的碱性氨基酸插入, 不容易被切割, 而 HPAI 为连续插入, 因此 HPAI 表现出更强的致病力^[7]。此外, HA 基因的受体结合位点决定着宿主特性, 当氨基酸序列第 226 位 (H2、H3 序列位) 或第 234 位 (H9 序列位) 是谷氨酰胺 (Q) 时可与唾液酸 α -2,3 半乳糖受体结合感染禽类; 当是亮氨酸 (L) 时可与唾液酸 α -2,6 半乳糖受体结合, 感染哺乳动物^[8-9]。同时, HA 蛋白糖基化位点的增加或缺失, 以及 NA 蛋白颈部基因的缺失与否, 同样是 AIV 毒力改变的潜在决定因素^[10-11]。

为了实时监测湖南省 AIV 毒株的遗传进化、病毒变异特点及分子特征, 探究流感病毒的复制和传播机制以及其毒力和致病机理, 我们分析了 2015 年湖南省部分活禽市场的感染情况, 旨在通过对比 AIV 的 HA 和 NA 基因序列, 根据新分离 AIV 毒株的遗传变异情况对流感高发地区的流感

防控提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 病毒株

2015 年收集于湖南省部分岳阳活禽市场的 10 份病死禽的组织样品和健康家禽的咽拭子,由中国科学院武汉病毒研究所完成病毒分离、中国科学院微生物研究所完成病毒鉴定与保藏。

1.2 鸡胚

SPF 鸡胚 (10 日龄) 购自 (北京) 梅里亚动物保健有限公司。

1.3 主要试剂

TRIzol LS 试剂购自 Invitrogen 公司; 反转录酶、RNase 抑制剂、*Taq* DNA 聚合酶、DNA marker DL5000 由北京诺派生物科技有限公司惠赠; dNTPs、*Eco*R I、*Hind* III、pMD18-T 载体购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 无水乙醇、异丙醇、氯仿、NaCl、KCl、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 KH_2PO_4 、蔗糖购自北京化工厂; 青霉素、链霉素购自山东鲁抗医药股份有限公司; 琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒购自北京博迈德生物技术有限公司; 所有引物均由深圳华大基因科技有限公司合成。

1.4 病毒样品的收集、鉴定

将采集的样本进行样本量统计,向样本中加入青霉素、链霉素 10 000 IU/mL, 4 °C 作用 6 h 后, 7 000 r/min、4 °C 离心 5 min, 取上清接种 10 日龄 SPF 鸡胚, 每枚 0.1 mL; 增殖 72 h 后收集鸡胚尿囊液, 弃去 24 h 内死亡鸡胚。按照 TRIzol 试剂说明书, 提取尿囊液中病毒 RNA, 以提取的 RNA 为模板, 应用 M-F 和 M-R 为检测流感病毒不同亚型通用型引物 (表 1) 进行病毒毒种鉴定^[12]。

1.5 HA 基因的 RT-PCR 扩增

以 GenBank 上收录的 A/environment/Changsha/481/2014 (H9N2) 的 HA 基因 (登录号: KX247907.1)

为参考序列, 应用 Primer Premier 5.0 软件设计 H9-F、H9-R 引物 (表 1), 引物用于 H9 亚型鉴定以及基因扩增。按照 TRIzol 试剂说明书提取纯化后病毒 RNA, 逆转录反应体系共 25 μL , 包括 5 \times MMLV 5 μL 、MLV 1 μL 、dNTPs 2 μL 、RNase 1 μL 、随机引物 1 μL 、ddH₂O 和病毒 RNA 模板 14 μL 。逆转录反应程序为 42 °C 60 min; 80 °C 10 min。PCR 反应程序: 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 变性 30 s, 53 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min 30 s, 循环 30 次; 最后 72 °C 延伸 10 min。取 5 μL PCR 产物, 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 将 PCR 产物进行测序及序列分析。

1.6 NA 基因的 RT-PCR 扩增

以 A/environment/Changsha/481/2014 (H9N2) 的 NA 基因 (GenBank 登录号: KX247908.1) 为参考序列, 设计 N2-F、N2-R 引物 (表 1), 引物用于 N2 亚型鉴定及基因扩增。病毒 RNA 提取、逆转录及 PCR 反应方法同 1.6。取 5 μL PCR 扩增产物, 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.7 PCR 产物序列测定

按照 DNA 凝胶回收试剂盒和 pMD18-T 载体说明书, 对 PCR 产物进行纯化、连接、转化、酶切鉴定; 将阳性菌落测序。

1.8 HA 和 NA 基因关键氨基酸位点分析

利用 ExPASy 软件对 HA、NA 基因进行潜在

表 1 检测流感病毒 H9 及 N2 亚型特异性引物

Table 1 Primers for detection of M, H9 and N2 genes by RT-PCR

Primers	Primer sequences (5'-3')
M-F	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGTAG
M-R	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTA GTTTTT
H9-F	CTYCAACAGARCAYAATGG
H9-R	GYCACACTTGTTGTTGTRTC
N2-F	TGATGARYGARYTGGGTGT
N2-R	TGTCDCCMACAAGYCCTGA

糖基化位点预测。利用 DNASTar 中 MegAlign 软件,将 10 株分离株与经典株已知的潜在糖基化位点、蛋白分裂位点、颈部缺失位点和受体结合位点进行比对。

1.9 进化树建树及分析

利用 Mega 6 软件中 ClustalW 对分离株及 2012–2016 年新增流行株的 HA、NA 基因序列进行整理,用 DNASTar 软件包进行遗传分析,用 Neighbor-Joining Tree 方法分别建立 HA、NA 基因遗传进化树。

2 结果与分析

2.1 毒株分离与鉴定

在家禽市场采集 197 份样本,其中 10 份样本经鸡胚扩增后鉴定为 H9 阳性。对其 HA 和 NA 基因进行扩增鉴定,分别在 638 bp (H9) 和 495 bp (N2) 处出现阳性特异性条带,结果见图 1。确定该 10 株为 H9N2 亚型禽流感分离株。根据宿主、采样地及采样日期将 10 株 H9N2 亚型分离株进行命名(表 2)。

2.2 分离株 HA、NA 基因核苷酸和氨基酸序列比较

对测序结果拼接校正,得到 10 组 H9N2 亚型 AIV 的 HA、NA 基因核酸序列,全长分别为 1 683 bp 和 1 401 bp,分别共编码 560 个和 466 个氨基酸。10 株分离株 HA、NA 核苷酸同源性和 95.6%–100%,氨基酸同源性为 96.1%–100%和 95.9%–100%。与 Y280 (A/Duck/Hong Kong/Y280/97) 标准毒株核苷酸同源性分别为 91.2%–91.4%,氨基酸同源性为 91.2%–91.6%。

2.3 HA 蛋白潜在糖基化位点及裂解位点分析

对其 HA 蛋白进行潜在糖基化位点分析,结果显示,10 株分离株均具有 7–8 个潜在糖基化位点,其中 8 株分离株在 220 位由苏氨酸 (T) 变异

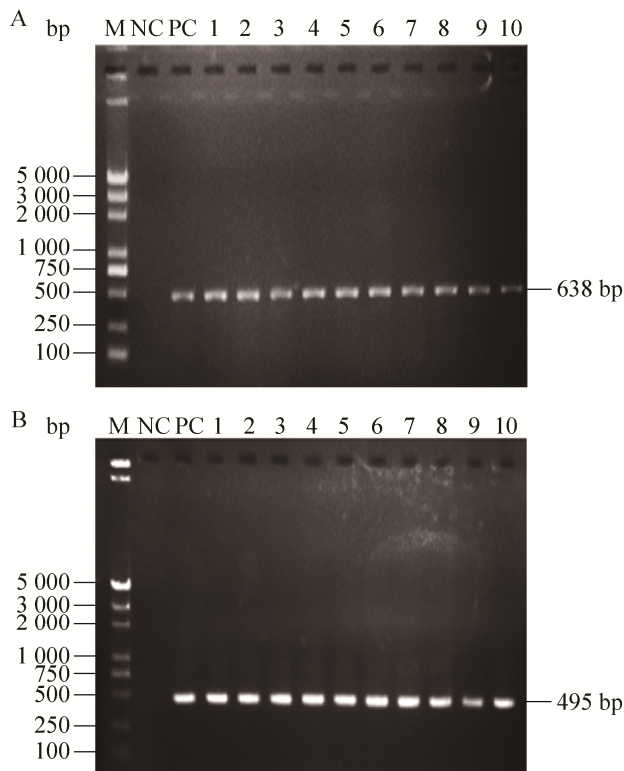


图 1 H9 (A) 和 N2 (B) 亚型 PCR 产物电泳结果
Fig. 1 Identification of H9 and N2 subtype. M: DL5 000; NC: negative control; PC: positive control; 1–10: isolated strains: YYFQH661-O, YYGK507-O, YYGK521-P, YYGK522-O, YYGK563-P, YYXS832-O, XKY 46, 0501, 0506, YYFQH689, respectively.

表 2 阳性分离株代号及简称

Table 2 Codes and abbreviations of isolated viruses

No.	Isolated viruses code (H9N2)	Abbreviated
1	A/chicken/Hunan/04.14 YYFQH661-O2015	YYFQH661-O
2	A/chicken/Hunan/04.14 YYGK507-O2015	YYGK507-O
3	A/chicken/Hunan/04.14 YYGK521-P2015	YYGK521-P
4	A/chicken/Hunan/04.14 YYGK522-O2015	YYGK522-O
5	A/chicken/Hunan/04.14 YYGK563-P2015	YYGK563-P
6	A/chicken/Hunan/04.14 YYXS832-O2015	YYXS832-O
7	A/chicken/Hunan/XKY 46201504.22	XKY 46
8	A/chicken/Hunan/YueYang050120150 4.14	0501
9	A/chicken/Hunan/YueYang050620150 4.14	0506
10	A/chicken/Hunan/YYFQH689-O2015	YYFQH689

表 4 H9N2 亚型 AIV 分离株 NA 潜在糖基化位点比较

Table 4 Potential glycosylation sites of NA of H9N2 AIV isolates

Viruses	Potential glycosylation sites (NA)									
	44	61	69	86	146	200	234	306	368	402
	NSS	NIT	NST	NWS	NGT	NAT	NGT	NMT	NGS	NWS
BJ94	—	+	+	+	+	+	+	—	—	+
Y280	—	—	+	+	+	+	+	—	—	+
Y439	—	+	NNT	+	+	+	+	+	—	+
Wisconsin66	—	+	NNI	+	+	+	+	—	—	+
YYGK507-O	+	—	+	+	+	+	+	—	+	—
YYGK521-P	+	—	+	+	+	+	+	—	+	—
YYGK522-O	+	—	+	+	+	+	+	—	+	—
YYGK563-P	+	—	+	+	+	+	+	—	+	—
YYXS832-O	+	—	+	+	+	+	+	—	+	—
XKY 46	+	—	+	+	+	+	+	—	+	—
0501	+	—	+	+	+	+	+	—	+	—
0506	+	—	+	+	+	+	+	—	+	—
YYFQH689	+	—	+	+	+	+	+	—	+	—

Annotation: “+” unchanged; “—” deleted.

表 5 H9N2 亚型 AIV 分离株 HA 受体结合位点比较

Table 5 Receptor binding site of HA of H9N2 AIV isolates

Viruses	Receptor binding sites (HA)							Left edge	Right edge
	109	161	163	191	198	202	203	232–237	146–150
	Y	W	T	N	T	L	Y	NGLMGR	GTSKA
BJ94	+	+	+	+	V	+	+	NGQQGR	+
Y280	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Y439	+	+	+	+	E	+	+	NGQQGR	+
Wisconsin66	+	+	+	+	E	+	+	NDQQGR	+
YYFQH661-O	+	+	+	+	A	+	+	+	+
YYGK507-O	+	+	+	+	+	+	+	+	+
YYGK521-P	+	+	+	+	+	+	+	+	+
YYGK522-O	+	+	+	+	+	+	+	+	+
YYGK563-P	+	+	+	+	+	+	+	+	+
YYXS832-O	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XKY 46	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0501	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0506	+	+	+	+	+	+	+	+	+
YYFQH689	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Annotation: “+” unchanged; “—” deleted.

一个碱基: AGU (AGC) 和 AGA (AGG), 存在裂解位点附近突变成连续的碱性氨基酸模式的可能性, 即存在由低致病 AIV 变异为高致病 AIV 的风险。

禽流感病毒的 HA 蛋白的糖基化位点一般有 5–11 个不等, 而糖基化位点的位置和数量是决定禽流感病毒抗原性、受体亲和毒力的重要因素^[20]。如果在 HA 裂解位点附近增加糖基化位点, 则会阻止蛋白酶裂解和病毒的感染^[21]。本研究的分离株 HA 基因均存在糖基化位点增加或丢失的现

象。NA 蛋白的作用是切断 HA 与宿主细胞之间的链接, 促使子代病毒从宿主细胞中释放, 防止自身凝集。NA 颈部缺失将会导致病毒复制力增强和改变宿主感染力^[22]。本研究的分离株 NA 均存在 63–65 位颈部缺失, 缺失导致分离株潜在糖基化位点新增与缺失。

近年来, 在已免疫的鸡群中常会检测出 H9N2 抗体, 研究表明 H9N2 亚型 AIV 进入大型的封闭性鸡群后, 为逃避疫苗和宿主的选择压力, 内部基因不断地变异, 产生新的变异株, 以便于病毒

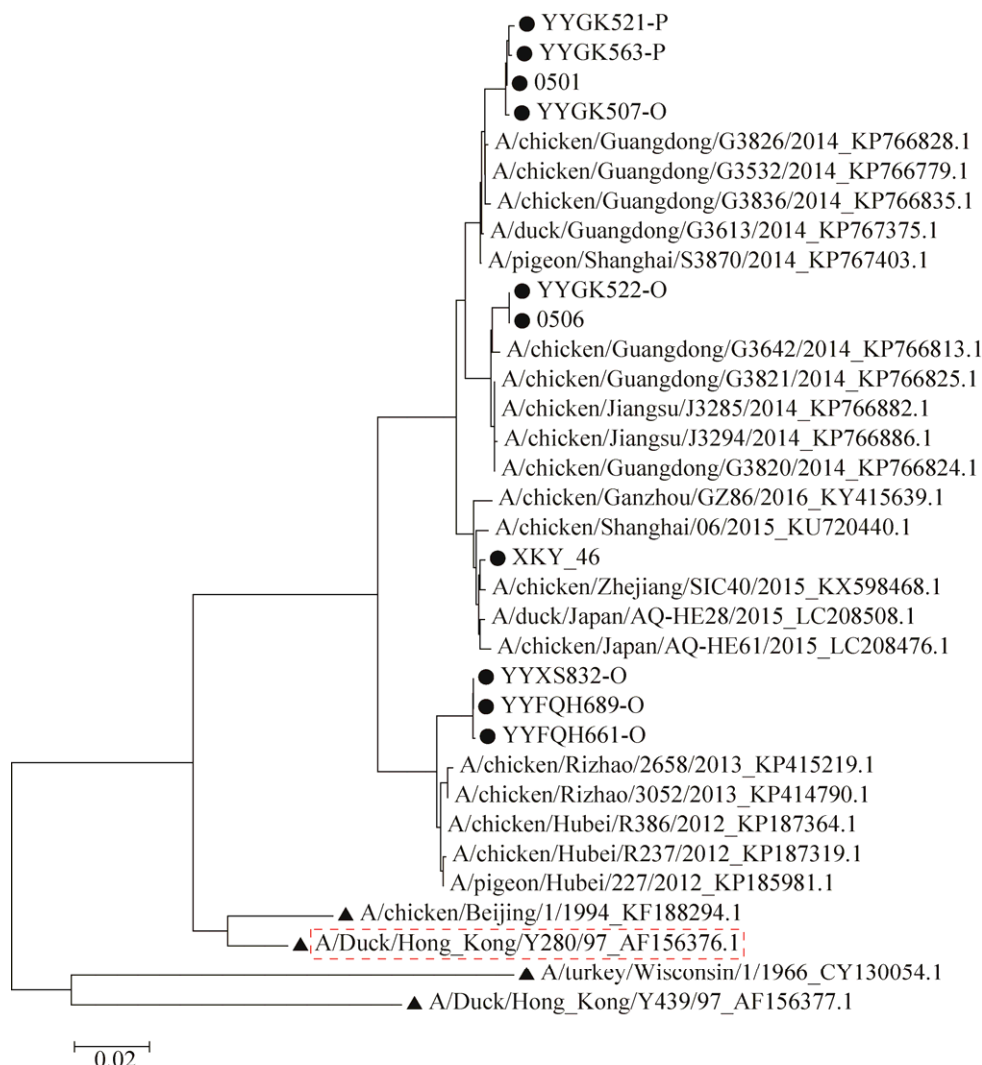


图 2 H9N2 亚型 AIV 分离株 HA 基因遗传进化树

Fig. 2 HA genes of H9N2 subtype AIV phylogenetic tree. ●: isolates; ▲: typical strain; empty: reference strain.

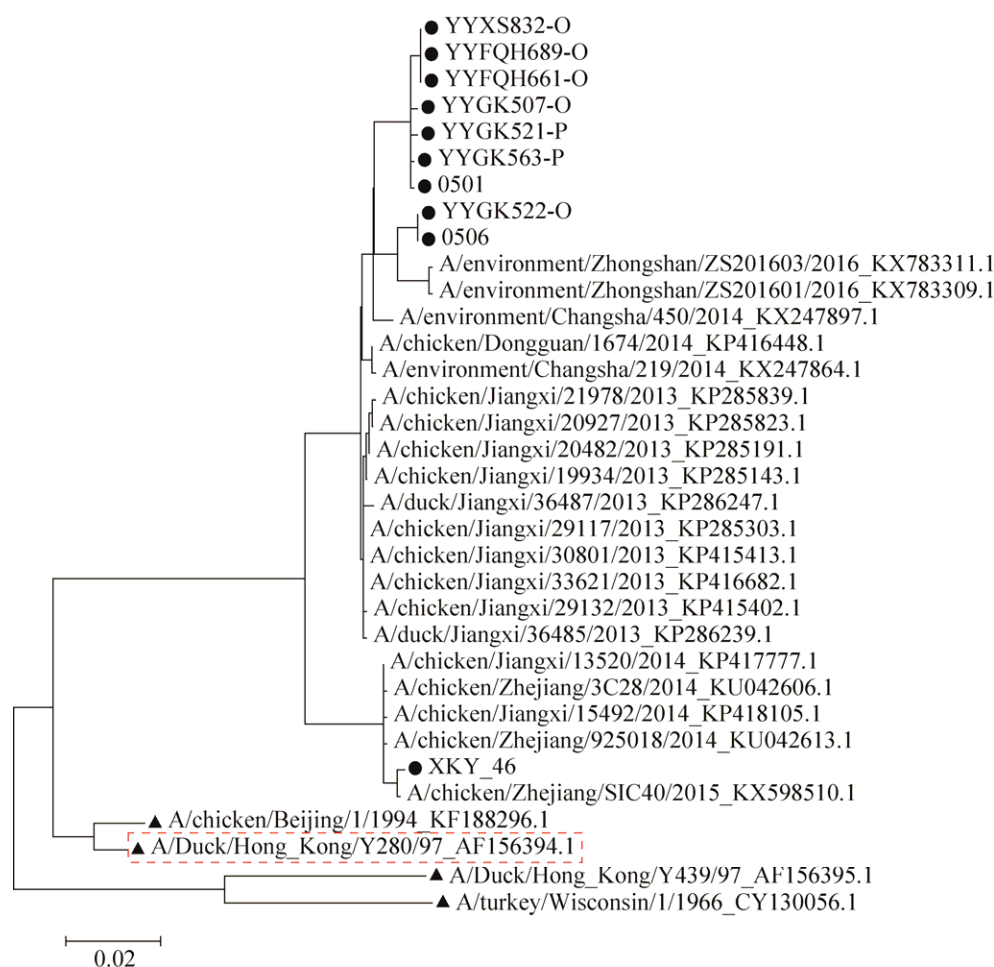


图 3 H9N2 亚型 AIV 分离株 NA 基因遗传进化树

Fig. 3 NA genes of H9N2 subtype AIV phylogenetic tree. ●: isolates; ▲: typical strain; empty: reference strain.

循环传播^[23-24]。本研究的 10 株 H9N2 亚型 AIV 毒株采集自活禽市场, 分离株与经典毒株的同源性较低、亲缘较远, 而与 2012–2016 年流行的分离毒株同源性较高、亲缘较近。这表明 HA 和 NA 基因在不断进化, 随时间的推移突变不断积累。在目前流行的 H9N2 亚型 AIV 中, 有报道称某些分离株已具备 H2N2、H3N2 的病毒特性, 即其 HA 受体结合位点的第 226 位 (H9 序列位为 234 位) 为亮氨酸 (L), 这种结构易与哺乳动物 SA α -2,6 Gal 受体结合^[8], 使人类及其他哺乳动物感染。本研究的 10 株分离毒株 HA 基因受体结合位点 234 位均有由谷氨酰胺 (Q) 变异为亮氨酸 (L), 增强了

对哺乳动物的潜在感染能力。综上本文中分离的 10 株 H9N2 病毒均存在 HA 蛋白 234 位氨基酸变异为亮氨酸 (L)、NA 蛋白颈部存在缺失的现象和存在 HA 裂解位点附近突变成连续的碱性氨基酸模式的可能性。然而这些位点的变化能否导致病毒毒力增加和致病性的改变, 即强弱毒株之间 (HPAI 和 LPAI) 的差别是由以上单因素决定的还是多种因素分层次共同决定的, 将是我们后续研究的重点。

根据报道, H9N2 亚型 AIV 不同地域的毒株间极易发生基因重组现象^[25], 加之在我国对禽流感免疫强度的高压下, AIV 基因组的突变重组率

和抗原性变异率也逐年升高,这有可能导致 AIV 流行毒株不断增加, AIV 转变为免疫耐受毒株,从低致病性转变高致病性的毒株^[26-27]。鉴于禽流感病毒毒力不断转强的趋势,我们对禽流感的防疫刻不容缓。目前我国很多农村地区仍采用鸡群散养的方式,且养殖户对于禽流感防治理念薄弱,加之交易方式仍以活禽市场为主,导致禽流感发病率相对较高,通过转变饲养管理模式和关闭活禽交易市场来防范禽流感的传播将是一个漫长的过程。因此在转型期间,应通过强化对饲养环境的消毒、严格免疫程序、加强病毒的监测和流行病学调查等方式来降低流感病毒发病率。

综上所述, H9N2 亚型 AIV 的毒力和致病力等生物学特性有趋于转强的可能性,我们必须重视并加强预警,为养禽业发展以及人类的公共卫生安全做好基础保障。

REFERENCES

- [1] Wu Y, Wu Y, Tefsen B, et al. Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends Microbiol*, 2014, 22(4): 183–191.
- [2] Ha Y, Stevens DJ, Skehel JJ, et al. H5 avian and H9 swine influenza virus haemagglutinin structures: possible origin of influenza subtypes. *EMBO J*, 2002, 21(5): 865–875.
- [3] Li J, Rao YH, Sun QL, et al. Identification of climate factors related to human infection with avian influenza A H7N9 and H5N1 viruses in China. *Sci Rep*, 2015, 5: 18094.
- [4] Duan XD, Shen D, Zhang HM, et al. Epidemiological investigation of avian influenza in retail live poultry markets in Guangzhou in 2013. *China Animal Health Inspec*, 2014, 31(11): 33–36, 43 (in Chinese).
段晓东, 沈丹, 张海明, 等. 2013 年广州市活禽农贸市场禽流感流行病学调查. *中国动物检疫*, 2014, 31(11): 33–36, 43.
- [5] Jiang WM, Wang Y, Li JP, et al. Epidemiological Survey and analysis on avian influenza virus in live bird markets in a city of eastern China during 2014–2016. *China Animal Health Inspec*, 2017, 34(1): 14–18 (in Chinese).
蒋文明, 王艳, 李金平, 等. 2014–2016 年华东地区某市活禽市场禽流感流行病学调查与分析. *中国动物检疫*, 2017, 34(1): 14–18.
- [6] Shi JH, Gao LD, Zhu Y, et al. Investigation of avian influenza infections in wild birds, poultry and humans in Eastern Dongting Lake, China. *PLoS ONE*, 2014, 9(4): e95685.
- [7] Chen XS, Zhong WL, Zheng XM, et al. Progress in molecular biology of avian influenza virus. *China Animal Husbandry Veter Med*, 2006, 33(1): 63–67 (in Chinese).
陈宣烁, 钟婉玲, 郑小敏, 等. 禽流感病毒分子生物学的研究进展. *中国畜牧兽医*, 2006, 33(1): 63–67.
- [8] Matrosovich MN, Krauss S, Webster RG. H9N2 influenza A viruses from poultry in Asia have human virus-like receptor specificity. *Virology*, 2001, 281(2): 156–162.
- [9] Lu L, Yin YB, Sun ZS, et al. Genetic correlation between current circulating H1N1 swine and human influenza viruses. *J Clin Virol*, 2010, 49(3): 186–191.
- [10] Abe Y, Takashita E, Sugawara K, et al. Effect of the addition of oligosaccharides on the biological activities and antigenicity of influenza A/H3N2 virus hemagglutinin. *J Virol*, 2004, 78(18): 9605–9611.
- [11] Li YF, Chen SJ, Zhang XJ, et al. A 20-amino-acid deletion in the neuraminidase stalk and a five-amino-acid deletion in the NS1 protein both contribute to the pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in mallard ducks. *PLoS ONE*, 2014, 9(4): e95539.
- [12] Hoffmann E, Stech J, Guan Y, et al. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch Virol*, 2001, 146(12): 2275–2289.
- [13] Liu S, Ji K, Chen JM, et al. Panorama phylogenetic diversity and distribution of Type A influenza virus. *PLoS ONE*, 2009, 4(3): e5022.
- [14] Guo JY, Li JG, Cheng XW, et al. Discovery of men infected by avian influenza A (H9N2) virus. *Chin J Exp Clin Virol*, 1999, 13(2): 105–108 (in Chinese).
郭元吉, 李建国, 程小雯, 等. 禽 H9N2 亚型流感病毒能感染人的发现. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1999, 13(2): 105–108.
- [15] Xu CT, Fan WX, Wei R, et al. Isolation and

- identification of swine influenza recombinant A/Swine/Shandong/1/2003(H9N2) virus. *Microbes Infect*, 2004, 6(10): 919–925.
- [16] Sun XX, Xu XK, Liu Q, et al. Evidence of avian-like H9N2 influenza A virus among dogs in Guangxi, China. *Infect Genet Evol*, 2013, 20: 471–475.
- [17] Ekiert DC, Bhabha G, Elslinger MA, et al. Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope. *Science*, 2009, 324(5924): 246–251.
- [18] Aamir UB, Wernery U, Ilyushina N, et al. Characterization of avian H9N2 influenza viruses from United Arab Emirates 2000 to 2003. *Virology*, 2007, 361(1): 45–55.
- [19] Nao N, Yamagishi J, Miyamoto H, et al. Genetic predisposition to acquire a polybasic cleavage site for highly pathogenic avian influenza virus hemagglutinin. *mBio*, 2017, 8(1): e02298–16.
- [20] Liu M, Chen HD, Luo FL, et al. Deletion of *N*-glycosylation sites of hepatitis C virus envelope protein E1 enhances specific cellular and humoral immune responses. *Vaccine*, 2007, 25(36): 6572–6580.
- [21] Tsuchiya E, Sugawara K, Hongo S, et al. Role of overlapping glycosylation sequons in antigenic properties, intracellular transport and biological activities of influenza A/H2N2 virus haemagglutinin. *J Gen Virol*, 2002, 83(12): 3067–3074.
- [22] Qi X, Lu CP. Genetic characterization of novel reassortant H1N2 influenza A viruses isolated from pigs in southeastern China. *Arch Virol*, 2006, 151(11): 2289–2299.
- [23] Li CJ, Yu KZ, Tian GB, et al. Evolution of H9N2 influenza viruses from domestic poultry in Mainland China. *Virology*, 2005, 340(1): 70–83.
- [24] Liu HQ, Huang Y, Cheng J, et al. Genetic mutations of the hemagglutinin gene of H9N2 subtype avian Influenza viruses under the selective pressure of vaccination. *Chin J Virol*, 2002, 18(2): 149–154 (in Chinese).
- 刘红旗, 黄勇, 程坚, 等. 在疫苗免疫选择压力下 H9N2 亚型禽流行性感冒病毒 HA 基因的遗传变异. *病毒学报*, 2002, 18(2): 149–154.
- [25] Bi YH, Lu L, Li J, et al. Novel genetic reassortants in H9N2 influenza A viruses and their diverse pathogenicity to mice. *Virol J*, 2011, 4(8): 505.
- [26] Liu ZH, Jiang T, Qin ED, et al. Progress in new vaccine strategies against influenza: a review. *Chin J Biotech*, 2012, 28(5): 550–556 (in Chinese).
- 刘志辉, 姜涛, 秦鄂德, 等. 流感疫苗研制的新策略. *生物工程学报*, 2012, 28(5): 550–556.
- [27] Sun QY, Chen Q, Xia LM. Prevalence status of H9N2 subtype avian influenza. *Prog Veter Med*, 2011, 32(10): 107–111 (in Chinese).
- 孙泉云, 陈琦, 夏炉明. H9N2 亚型禽流感流行现状. *动物医学进展*, 2011, 32(10): 107–111.

(本文责编 陈宏宇)