

10株不同年代 H9N2 AIV NA 基因的克隆及序列分析

杨大光^{1,2}, 王新卫¹, 王泽霖¹, 周欣¹

(1. 河南农业大学 牧医工程学院 河南 郑州 450002; 2. 河南科技学院 食品学院, 河南 新乡 453003)

摘要: 利用 RF-PCR 技术克隆了 10 株涵盖不同分离年代和不同毒力的 H9N2 亚型 AIV 的 NA 基因, 序列分析表明, 10 株 AIV 的 NA 基因的核苷酸和推导的氨基酸同源性高, 进化稳定。系统进化树分析表明, 其 NA 基因都属欧亚大陆禽分支, H9N2 流感病毒的分布与地域有相关性。其 NA 蛋白氨基酸序列潜在的糖基化位点以及氨基酸红细胞吸附位点出现的变化尚不能解释这些毒株生物学特性上的差别。但这些研究结果从理论上丰富了 H9N2 亚型禽流感的分子流行病学, 也为进一步研究该类毒株的进化提供了依据。

关键词: H9N2 AIV; NA 基因; 克隆; 序列分析

中图分类号: S858.31; Q785 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2008)06-0058-06

Clone and Sequencing of NA Genes of 10 H9N2 AIV Strains with Different Ages

YANG Da-guang^{1,2}, WANG Xin-wei¹, WANG Ze-lin¹, ZHOU Xin¹

(1. College of Animal Husbandry and Veterinary, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. Department of Food Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)

Abstract: NA genes of 10 H9N2 AIV strains, which cover all isolated ages and different virulence, were cloned by RF-PCR. The sequence analysis showed the homology of nucleotides of NA genes and their deduced amino acids between the 10 AIV strains was 91.6% - 99.0% and 91.9% - 100%, respectively, indicating the steady evolution of these chicken-source H9N2 AIV strains. Phylogenetic analysis suggested that the NA genes of these H9N2 AIVs belonged to Eurasian clade and their distribution displayed a certain regional correlation. The changes of potential glycosylation sites and erythrocyte adsorption sites of the 10 strains could not explain the difference of their biological characteristics. The result of this research not only enriched the molecular epidemiology of H9N2 subtype AIV, but also provided the scientific base for further studying the evolution of them.

Key words: H9N2 AIV; NA gene; Clone; Sequence analysis

H9N2 亚型禽流感病毒(AIV)是欧亚大陆存在的主要禽流感病毒。其变异频率很高,同一亚型内毒株间的致病力存在差异,同一毒株感染不同宿主时致病力也存在着差异,一个毒株在同一鸡群中长期流行时可能会随着对宿主的适应导致毒力增强^[1-4]。而且,随着 H9N2 亚型禽流感(AI)疫苗的广泛使用, AIV 在疫苗的选择压力下变异加快,以致现有的疫苗亚型与当地流行的 AIV 的抗原性不完全相符,从而造成免疫禽群仍可发生和流行 AI。

本研究对 1998-2005 年间分离的 10 个 H9N2 亚型 AI 毒株(涵盖不同致病力、抗原性、分离年代)

进行神经氨酸酶(NA)基因的克隆和序列分析,研究 NA 基因茎部缺失情况和基因的进化情况,对潜在的糖基化位点和红细胞吸附位点进行比较分析,旨在探究 NA 基因的变异对 AIV 毒力的影响,探究抗原性的差异、存在抗原性差异的毒株间的免疫原性变化不大的分子机理,也对研究毒株的宿主特性及分子流行病学具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 病毒

10 个不同年代分离到的 H9N2 亚型禽流感病毒

收稿日期: 2008-01-03

基金项目: 河南农业大学博士基金资助项目(30700065)

作者简介: 杨大光(1980-),男,河南武陟人,硕士,助教,主要从事动物病毒学研究。

通讯作者: 王新卫(1971-),男,河南泌阳人,博士后,主要从事动物病毒学研究。

分离株(表 1)。均由河南农业大学禽病研究所保存。

1.2 主要试剂

UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒、氯仿、异戊醇、无水乙醇均为上海生工生物工程技术有限公

司产品; 反转录试剂盒、Go Taq Green Master Mix Fermentas 为 Promega 产品; DNA 胶回收试剂盒、质粒快速提取试剂盒、IPTG、X-gal、琼脂糖、Marker DL2000、Marker III、限制性内切酶 *Pst* I 为 TAKARA 产品。

表 1 10 个 H9N2 AIV 毒株的背景材料

Tab.1 The background of 10 H9N2 subtype AIV strains

代号 No.	命名 Name	分离年代 Isolate year	半数组织感染量 TCID ₅₀	脑内接种指数 ICPI
23#	A/ Chicken/ Qixian/ A1/ 04 (H9N2)	2004	10 ^{-6.25}	0 238
18#	A/ Chicken/ Henan/ C4/ 02 (H9N2)	2002	10 ^{-5.25}	0 437
20#	A/ Chicken/ Huangdong/ A1/ 03 (H9N2)	2003	10 ^{-4.75}	0 338
8#	A/ Chicken/ Shangqiu/ A1/ 00 (H9N2)	2000	10 ^{-4.75}	-
10#	A/ Chicken/ Xuchang/ A1/ 00 (H9N2)	2000	10 ^{-4.5}	0 000
6#	A/ Chicken/ Guangzhou/ A1/ 99 (H9N2)	1999	10 ^{-4.5}	0 000
3#	A/ Chicken/ Henan/ A3/ 98 (H9N2)	1998	10 ^{-4.25}	0 287
24#	A/ Chicken/ Kaifeng/ A1/ 05 (H9N2)	2005	10 ^{-4.25}	0 000
15#	A/ Chicken/ Zhuhai/ A1/ 01 (H9N2)	2001	10 ^{-3.5}	-
17#	A/ Chicken/ Qixian (new) / A1/ 01 (H9N2)	2001	10 ^{-3.25}	0 000

注: 上述毒株再次出现时均以代号表示。
Note: The above virus strains were showed with their No. in the paper.

1.3 病毒的增殖

将 10 株 SPF 鸡胚增殖液作 1/1 000 稀释, 用细菌滤器过滤后接种于 9~ 11 日龄非免疫鸡胚尿囊腔 (0.2 mL/ 胚), 37℃ 培养, 弃 24 h 内死胚, 以后每隔 4~ 6 h 照胚 1 次, 死胚置 4℃ 保存, 72 h 后仍存活的鸡胚置 4℃ 冰箱过夜。然后收获尿囊液, 置 - 20℃ 冻存用于核酸提取。

1.4 引物的设计与合成

参照国内外已发表的 H9N2 亚型 AIV 的 NA 基因序列, 用 Primer 5.0 设计了一对特异性引物, 由上海生工生物工程技术有限公司合成。序列如下: 上游引物 NF 5'-AAT GAA TCC AAA TCA GAA GAT A-3'; 下游引物 NR 5'-AAG CTT ATA TAG GCA TGA AGT TG-3'。该引物涵盖了该基因完整开放阅读框。

1.5 病毒 RNA 的抽提与反转录

参照 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒说明书进行。然后按反转录试剂盒 (RevertAid TM First Strand cDNA Synthesis Kit) 说明书进行反转录, 即可得到 NA 基因第一链 cDNA, - 20℃ 保存备用。

1.6 PCR 扩增 NA 基因与酶切鉴定

PCR 反应体系为 50 μL: GoTaq Green Master Mix 25 μL, NF (20 pmol/ μL) 1 μL, NR (20 pmol/ μL) 1 μL, cDNA 5 μL, 双蒸水 18 μL。混匀后进入下列循环: 95℃ 预变性 4 min, 94℃ 变性 1 min, 58.9℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 共 32 个循环, 最后 72℃ 延伸 5 min。琼脂糖凝胶电泳分析鉴定 PCR 产物, 并用 *Pst* I 对之进行消化, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析结果。

1.7 NA 基因的序列测定及分析

对酶切鉴定的 PCR 产物进行测序 (三博远志生

物工程有限公司), 用 DNASTar 软件与 Genebank 上已发表的序列: A/ Duck/ Hongkong/ Y280/ 97 (H9N2); A/ Chicken/ Hong kong/ FY20/ 99 (H9N2); A/ Chicken/ Hongkong/ KC12/ 99 (H9N2); A/ Chicken/ Beijing/ 1/ 94 (H9N2); A/ Chicken/ Hong kong/ G9/ 97 (H9N2); A/ Chicken/ Hongkong/ 1073/ 99 (H9N2); A/ Chicken/ Hongkong/ 1074/ 99 (H9N2); A/ Quail/ Hong kong/ G1/ 97 (H9N2); A/ Duck/ HongKong/ Y439/ 97 (H9N2); A/ Chicken/ Pakistan/ 2/ 99 (H9N2); A/ Hebei/ 24/ 1989 (H1N2); A/ Swine/ Hongkong/ 72/ 77 (H3N2); A/ Hongkong/ 8/ 68 (H3N2); A/ Chicken/ Korea/ 38349-96323/ 96 (H9N2); A/ Chicken/ Korea/ MS96/ 96 (H9N2); A/ Chicken/ Pennsylvania/ 1370/ 1983 (H5N2); A/ Chicken/ Pennsylvania/ 8125/ 1983 (H9N2); A/ Chicken/ California/ 6643/ 01 (H9N2) 进行核苷酸及其推导的氨基酸的比较分析, 并绘制基因进化树。

2 结果与分析

2.1 NA 基因的 RT-PCR 扩增与酶切鉴定

RT-PCR 扩增后, 经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分析结果如图 1, 10 株均在大约 1 400 bp 左右处有 H9N2 亚型 AIV 的 NA 基因特异条带。10 株病毒的 NA 基因的 PCR 产物经 *Pst* I 消化后, 均产生 2 条特异 DNA 带, 分别是 1 012 bp 和 394 bp 左右 (图 2), 与 N2 亚型 AIV 的 NA 基因的理论值相符。

2.2 NA 基因序列测定结果

由北京三博远志生物公司对 PCR 产物进行序列测定结果表明, 成功地克隆了 NA 基因。3#, 6# 毒株 NA 基因的 ORF 全长 1 410 bp, 编码 470 个氨基

酸; 8# , 10# , 15# , 17# , 18# , 20# , 23# , 24# 毒株 *NA* 基因的 *ORF* 全长1 401 bp, 编码467 个氨基酸。

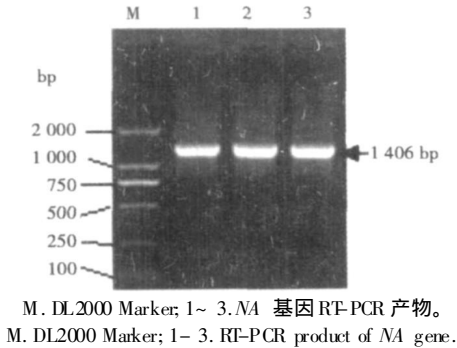


图 1 *NA* 基因 RT-PCR 扩增结果

Fig. 1 RT-PCR product of *NA* gene

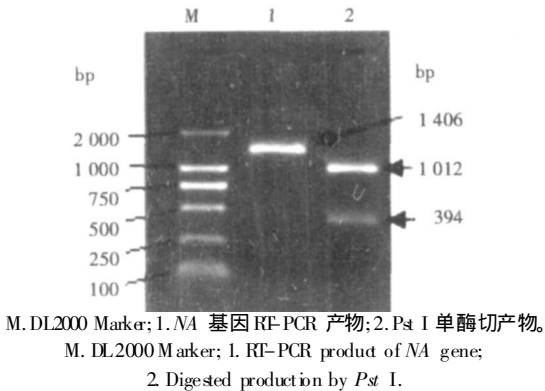


图 2 *NA* 基因的 *Pst* I 酶切鉴定

Fig. 2 Digestions identification of *NA* gene

2.3 AIV 分离株与其他毒株 *NA* 基因的核苷酸及其推导的氨基酸的序列比较结果

利用 DNASar 软件对 GeneBank 参考毒株和获

表 2 10 个毒株 *NA* 基因氨基酸序列潜在糖基化位点和红细胞吸附位点比较

Tab. 2 Comparison of potential glycosylation sites and erythrocyte adsorption sites of *NA* gene

毒株 Strains	潜在的糖基化位点 Potential glycosylation site										红细胞吸附位点 Erythrocyte adsorption site (366aa~ 373aa)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
3#	*	NSS	NIT	NST	NWS	NGT	NAT	NGT	*	NSS	IEKDSRSG
6#	*	NSS	NIT	NST	NWS	NGT	NAT	NGT	*	NSS	IEKDSRSG
8#	*	NPS	*	NST	NWS	NGT	NAT	NGT	*	NWS	IKEDSRSG
10#	*	NPS	*	NST	NWS	NGT	NAT	NGT	NIS	NWS	IKDDSRSG
15#	*	NPS	*	MST	NWS	NGT	NAT	NGT	*	NWS	IKEDSRSG
17#	NRS	*	*	NST	NWS	NGT	NAT	NGT	*	NWS	IKEDSRSG
18#	*	NIS	*	NST	NWS	NGT	NAT	NGT	*	NWS	IKEDSRSG
20#	*	NPS	*	NST	NWS	NGT	NAT	NGT	NIS	NWS	IKDDSRSG
23#	*	NPS	*	NST	NWS	NGT	NAT	NGT	NIS	NWS	IKDDSRSG
24#	*	NPS	*	NST	NWS	NGT	NAT	NGT	NIS	NWS	IKDDSRSG

注: 1~ 10 表示 *NA* 基因上可能出现的糖基化位点, 其位置分别为: 1. 38aa~ 40aa; 2. 44aa~ 46aa; 3. 61aa~ 63aa; 4. 69aa~ 71aa; 5. 86aa~ 88aa; 6. 146aa~ 148aa; 7. 200aa~ 202aa; 8. 234aa~ 236aa; 9. 264aa~ 266aa; 10. 402aa~ 404aa; * 表示缺失。

Note: 1~ 10 Stands for potential glycosylation sites of *NA* gene, which locate in 1. 38aa~ 40aa; 2. 44aa~ 46aa; 3. 61aa~ 63aa; 4. 69aa~ 71aa; 5. 86aa~ 88aa; 6. 146aa~ 148aa; 7. 200aa~ 202aa; 8. 234aa~ 236aa; 9. 264aa~ 266aa and 10. 402aa~ 404aa. *. Expressed deletion.

2.4 AIV 分离株与其他毒株 *NA* 基因的核苷酸及其推导的氨基酸的同源性分析

NA 基因核苷酸及其推导的氨基酸进行同源性比较结果见图 3, 4。28 个毒株的 *NA* 基因核苷酸的

得的 H9N2 亚型 AIV 的 *NA* 基因序列比较分析结果表明, 10# , 15# , 17# , 18# , 20# , 23# 和 24# 毒株的核苷酸序列在 187~ 195 位缺失了 9 个核苷酸 (-ACAGAGATA-)。另外, 15# 和 17# 毒株的核苷酸序列的 986 位核苷酸突变为 C, 导致失去了 *Pst* I 酶切位点。3# , 6# 毒株的核苷酸序列的 458 位核苷酸突变为 C。10# , 15# , 17# , 18# , 20# , 23# 和 24# 毒株在 63, 64, 65 位缺失了 (-T E T) 3 个氨基酸, 而 3# 和 6# 毒株则没有相应的缺失。

对 10 株 H9N2 亚型 AIV *NA* 基因的氨基酸序列潜在的糖基化位点和红细胞吸附位点比较发现(表 2), 17# 毒株在 38aa~ 40aa 多了 1 个糖基化位点, 而 44aa~ 46aa 位的糖基化位点则发生了缺失, 通过与 15# 毒株的比较, 推测这些变化不影响 AIV 的致病力; 10# , 20# , 23# , 24# 毒株在 264aa~ 266aa 位增加了 1 个糖基化位点(NIS); 44aa~ 46aa 位糖基化位点有 3 种(其中 3# , 6# 为 NSS; 8# , 10# , 15# , 20# , 23# , 24# 为 NPS, 18# 则为 NIS, 推测这 2 个位点的变化对 AIV 的致病力无影响); 除 3# , 6# 外, 其他毒株 61aa~ 63aa 位糖基化位点均发生了缺失。10 个 H9N2 亚型 AIV 毒株 *NA* 基因的氨基酸红细胞吸附位点(366aa, 373aa) 有 3 种情况: 3# , 6# 为 IEKDSRSG; 8# , 15# , 17# , 18# 为 IKEDSRSG; 10# , 20# , 23# , 24# 为 IKDDSRSG, 3 种情况在不同致病力的毒株中均有分布, 推测红细胞吸附位点的部分氨基酸的改变并不影响 AIV 的致病力。

同源性为 82.1%~ 99.9%, 本研究中获得 的 10 株 AIV 毒株的 *NA* 基因核苷酸的同源性为: 15# 与 17# 的同源性高于 15# 同其他毒株的同源性(96.8%), 8# 与 A/Chicken/Hongkong/FY20/99 同源

性高达98.8%。

28个毒株NA基因推导的氨基酸的同源性为82.5%~100%，其中本研究中获得的10株AIV毒株的NA基因核苷酸推导的氨基酸的同源性为91.9%~100%。10株AIV毒株的NA基因核苷酸及其推导的氨基酸的同源性分析表明，1998–2005年分离到的H9N2亚型AIV的NA基因进化稳定。

2.5 AIV分离株NA基因的进化分析

H9N2亚型AIV NA基因的系统进化关系见图

5。图5反映了:H9N2亚型AIV NA基因分为3个大的进化分支,即人型和猪型分支、美洲型分支和欧亚型分支;欧亚型分支中包含有4个亚分支,本研究中的10个H9N2亚型AIV毒株属G9-like和Y280-like亚分支。由NA进化树可见,参加进化树绘制的其他欧亚毒株属于G1-like亚分支和Y439-like亚分支。G1-like亚分支中的A/Quail/HongKong/G1/97-like病毒被认为是H5N1流感病毒内部基因的供体,在中国大陆尚未发现属于A/Quail/HongKong/G1/97

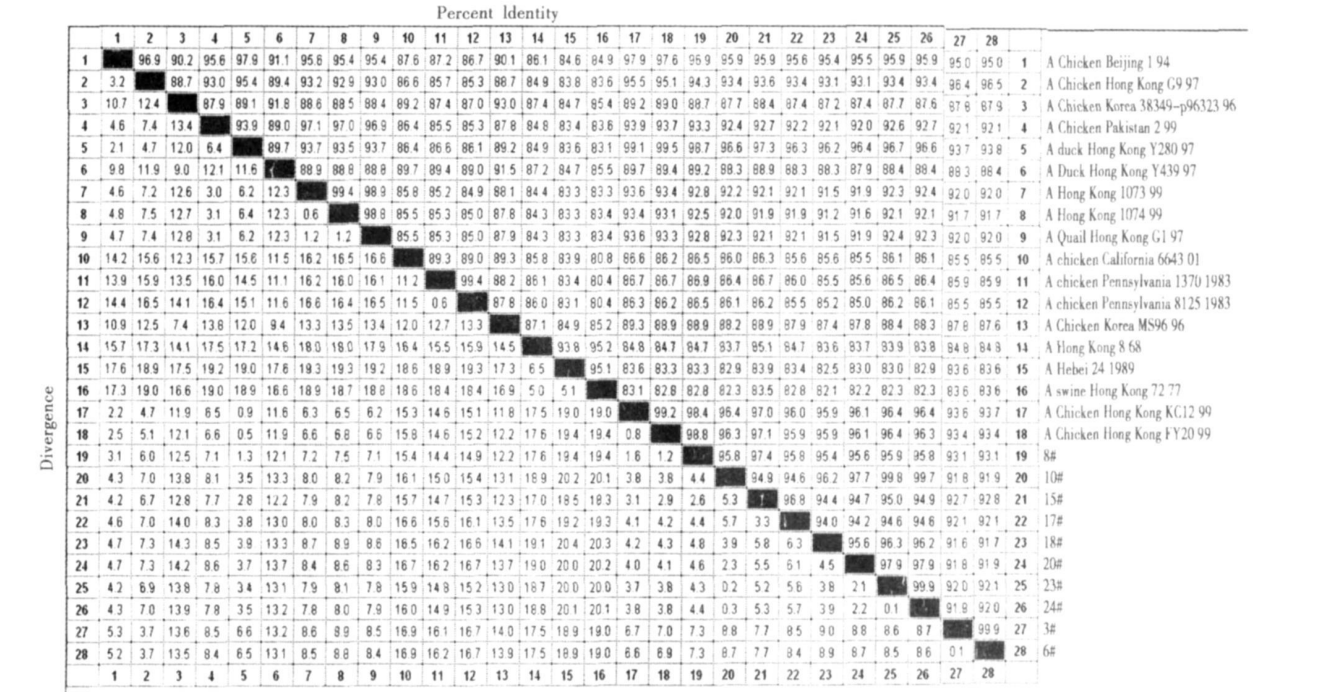


图3 10株AIV与其他毒株NA基因核苷酸同源性分析结果

Fig.3 Results of nucleotide homology of ten AIV strains and other strains

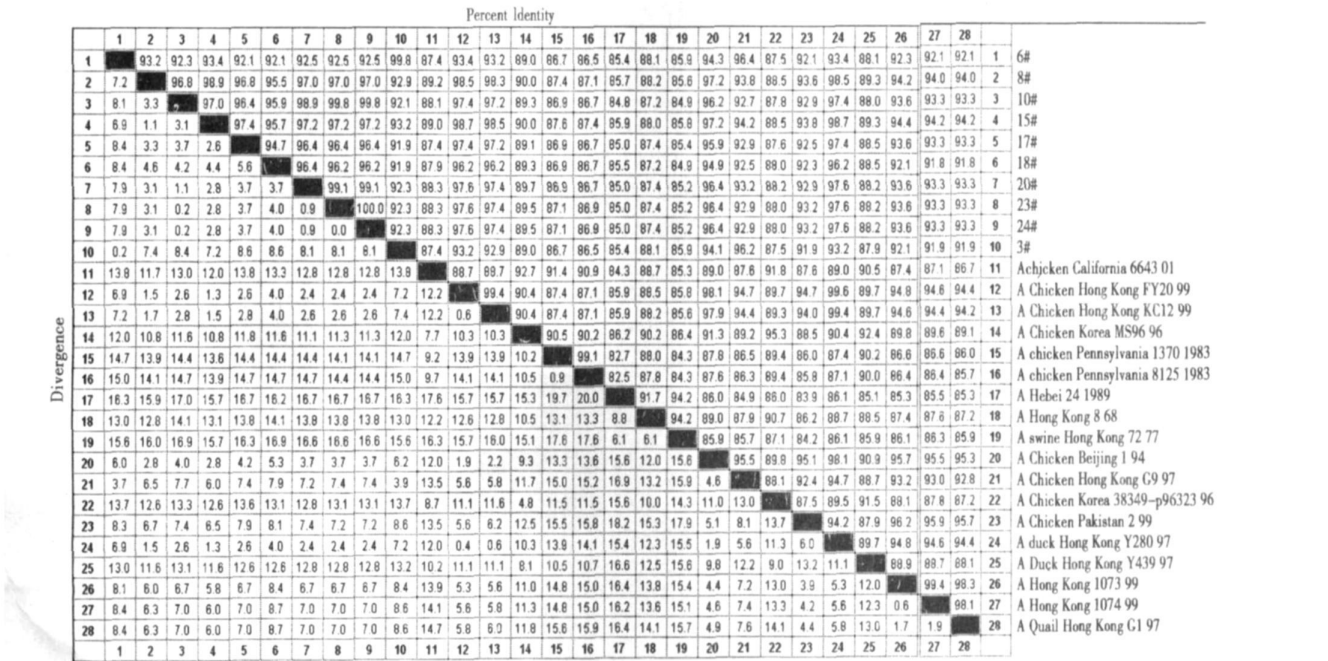


图4 10株AIV与其他毒株NA基因氨基酸同源性分析结果

Fig.4 Result of amino acid homology of ten AIV strains and other strains

分支的病毒。

NA 基因进化分析表明了中国分离株与韩国、巴基斯坦 H9N2 分离株等的进化区别,进而也表明

了虽然 H9N2 禽流感病毒在亚洲的许多国家发生与流行^[5,6],但其起源和进化各有特点,呈一定的地域相关性。

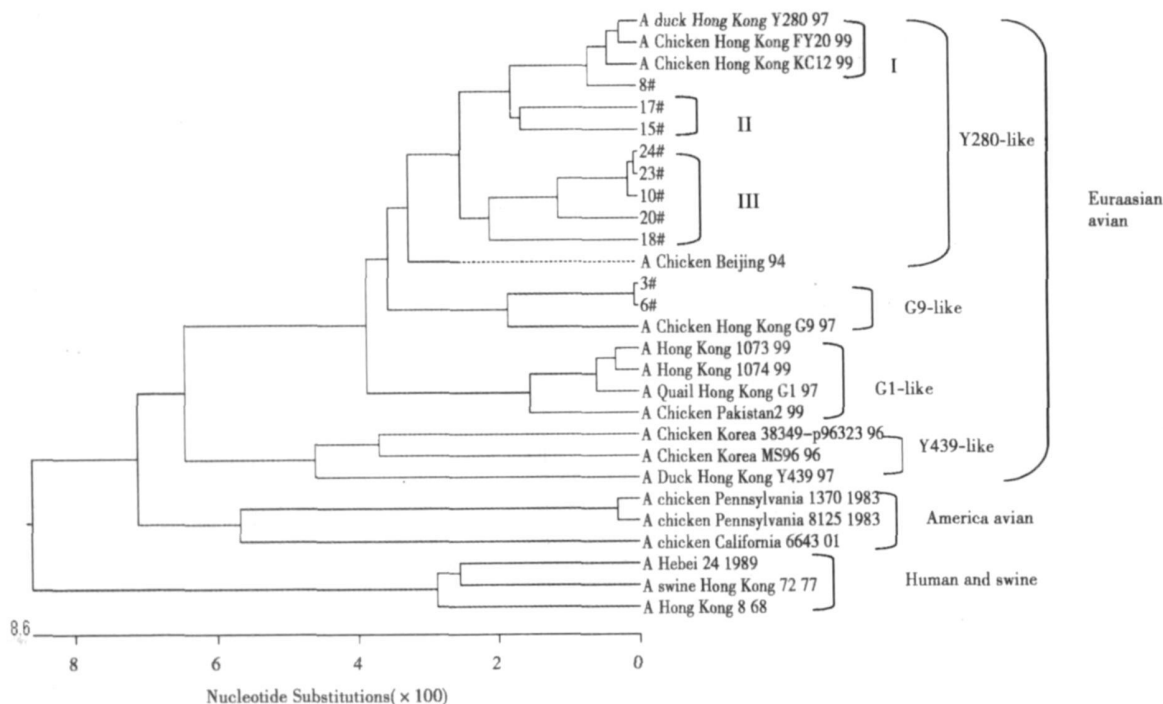


图 5 H9N2 AIV NA 基因的系统进化树

Fig. 5 The phylogenetic tree of NA gene of H9N2 subtype AIV

3 讨论

本研究获得了 1998–2005 年间分离到的 10 株 H9N2 亚型 AIV NA 基因。NA 基因全序列分析表明, 10 株 H9N2 AIV NA 基因的核苷酸同源性在 91.6% ~ 99.9% 之间, 推导的氨基酸同源性在 91.9% ~ 100% 之间, 说明中国的鸡源 H9N2 AIV 的 NA 基因同源性高, 进化稳定。3#, 6# 毒株的 NA 基因在其茎部的第 63, 64, 65 位点的 3 个氨基酸(T-E-I) 没有发生丢失, 其他分离株的 NA 基因的相应位置均发生了氨基酸的丢失, 但并未破坏 NA 基因的开放阅读框。对于 H5 和 H7 亚型流感病毒而言, 其神经氨酸酶茎部的氨基酸丢失与其毒力具有相关性^[7], 而对 H9N2 AIV 的 NA 基因是否也适用目前还不清楚。国内报道的 H9N2 AIV NA 基因 63~65 位氨基酸大多都发生了丢失, 目前尚不能明确其 NA 基因 63~65 位氨基酸(T-E-I) 的丢失对其功能蛋白的影响。

NA 氨基酸序列的潜在糖基化位点和红细胞吸附位点分析结果表明, 有 5 个糖基化位点(69~71, 86~88, 146~148, 200~202, 234~236) 无任何变化, 高度保守, 17# 毒株在 38~40 氨基酸处比其他毒株增加了一个糖基化位点(-NRS-), 而 44~46 位的糖基化位点则缺失; 10#, 20#, 23#, 24# 毒株在

264~266 位增加了一个糖基化位点(NIS)。3#, 6# 不存在亚洲大陆 H9N2 禽流感 NA 基因的标志性缺失, 其他毒株 61~63 位糖基化位点均缺失。刘金华等^[8]分析比较了 1995–2002 年在中国鸡群中分离的 H9N2 AIV 的 NA 基因, 发现在中国大陆分离的 H9N2 AIV 中, 红细胞吸附位点 366~372 位的氨基酸序列, 除 SS 株是 IKEDLRSG 外, 其余大部分是 IEKDSRS。本研究中 10 株 H9N2 AIV NA 基因的红细胞吸附位点(366~373) 也有所不同: 其中 3#, 6# 为 IEKDSRS, 8#, 15#, 17#, 18# 为 IKEDSRSG, 10#, 20#, 23#, 24# 为 IKDDSRSG, 都不同于人源 H9N2 AIV (如 A/HongKong/107/3/99 (H9N2)) 的 IKKDSRSG。至于糖基化位点的增加和丢失对 NA 蛋白功能和 AIV 的致病力有何影响, 红细胞吸附位点氨基酸的区别有何作用尚待进一步研究。

Guo 等^[9]研究表明, H9N2 AIV 分为 2 个遗传演化分支: 北美分支和欧亚分支。在欧亚分支中又可分为 3 个亚分支: A/Duck/Hong Kong/Y280/97 (H9N2) 和 A/Chicken/HongKong/G9/97 (H9N2) 是 Y280-like 亚分支的代表株; A/Duck/HongKong/Y439/97 (H9N2) 和 A/Chicken/Korea/96323/96 (H9N2) 是 Y439-like 亚分支的代表株; A/Quail/HongKong/G1/97 (H9N2) 是 G1-like 亚分支的代表

株^[10]。本研究结果表明, 10 株 H9N2 AIV 病毒的 NA 基因都属于欧亚大陆禽分支, 但其中 2 株(3# 和 6#) 属于 A/Chicken/HongKong/G9/97-like 亚分支, 与中国大陆以 A/Chicken/Beijing/1/94 为代表的 H9N2 亚型 AIV 的 NA 基因相距较远, 与 A/Chicken/HongKong/G9/97 关系最近。另外 8 株 H9N2 亚型 AIV 病毒则属于 A/Duck/HongKong/Y280/97-like 亚分支, 其中 8# 与 A/Chicken/HongKong/KC12/99 的关系最近。

中国大陆的 H9N2 AIV 的 NA 基因进化稳定, 与亚洲其他国家如韩国、巴基斯坦的同亚型病毒有明显的进化区别, 隶属于不同的亚分支, 这反映了 H9N2 流感病毒的分布与地域有相关性。图 3 说明香港的 H9N2 病毒分离株 NA 基因存在不同的表现形式。对于在第 63, 64, 65 位点氨基酸丢失的香港分离株而言, 其来源是由香港本地还是自大陆进口鸡的活体中分离到的, 尚待与香港的流感研究者探讨。如果是来源于香港本地, 则说明它们很可能与大陆的鸡源分离株有共同来源。就目前资料而言, 尚未在中国大陆分离到 A/Quail/HongKong/G1/97 样病毒。由于自人类分离到的 H9N2 病毒属于 A/Quail/HongKong/G1/97 样病毒^[11], 同时 A/Quail/HongKong/G1/97-like 病毒被认为是 H5N1 流感病毒的内部基因供体, 对人类具有潜在的威胁。因此, 对中国大陆的鸡源 H9N2 病毒的分子流行病学监测, 尤其是对诸如鸽子、鹌鹑、雉等禽类的流感病毒检测, 应当给予高度重视。

生物学试验结果表明, 1998–2005 年在全国多个省份分离到的 H9N2 亚型 AIV 的致病力存在着差异、抗原性也发生了漂移。本研究对 10 株(涵盖不同致病力、抗原性) H9N2 亚型 AIV 的 NA 基因进行了核苷酸及其推导的氨基酸的比较。但通过对 NA 基因潜在的糖基化位点和红细胞吸附位点的比较, 并没有发现可能影响 AIV 致病力、抗原性变化的因素。除了 NA 外, HA, NS 等均可影响 AIV 的致病力, AIV 抗原性的漂移也是多个基因共同作用的结果。

H9N2 亚型 AIV 致病力差异、抗原性漂移的分子机理还有待于对其他基因进行研究。

参考文献:

- [1] 甘孟侯. 禽流感 [M]. 第 2 版. 北京: 中国农业大学出版社, 2002.
- [2] 刘红旗, 彭大新, 程 坚, 等. H9N2 亚型禽流感病毒血凝素基因的遗传变异 [J]. 扬州大学学报: 农业与生命科学版, 2002, 23(2): 6–9.
- [3] 甘孟侯. 全球禽流感的流行形势 [J]. 中国预防兽医学报, 2004, 26(6): 468–471.
- [4] 周雪媚, 霍惠玲, 余锐萍, 等. 表达禽流感 HA 基因的重组马立克氏病病毒的构建 [J]. 华北农学报, 2007, 22(4): 168–171.
- [5] Lee C W, Song C S, Lee Y J, *et al.* Sequence analysis of the hemagglutinin gene of H9N2 Korean avian influenza viruses and assessment of the pathogenic potential of isolate MS96 [J]. Avian Dis, 2000, 44: 527–535.
- [6] Naem K, Ullah A, Manvell R J, *et al.* Avian influenza A subtype H9N2 in poultry in Pakistan [J]. Vet Rec, 1999, 145: 5601.
- [7] Matrosovich M, Zhou N, Kawaoka Y, *et al.* The surface glycoprotein of H5 influenza viruses isolated from human, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties [J]. Virology, 1999, 73: 1146–1155.
- [8] 刘金华, 史为民, 吴清民, 等. 鸡源 H9N2 亚型流行性感冒病毒神经氨酸酶基因序列分析 [J]. 病毒学报, 2004, 20(3): 237–241.
- [9] Guo Y, Krauss S, Senne D A, *et al.* Characterization of the pathogenicity of members of the newly established H9N2 influenza virus lineage in Asia [J]. Virology, 2000, 267: 279–288.
- [10] VGuan Y, Shortridge K F, Krauss S, *et al.* Molecular characterization of H9N2 influenza viruses were they the donors of the "internal" genes of H5N1 viruses in Hong Kong [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 9363–9367.
- [11] Lin Y P, Shaw M, Gregory V, *et al.* Avian-human transmission of H9N2 subtype influenza A viruses: relationship between H9N2 and H5N1 human isolates [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 9654–9658.