

# 一株商品肉鸡腺胃 H9N2 的分离鉴定及 HA 基因序列分析

王友令<sup>1,2</sup> 袁小远<sup>2</sup> 徐怀英<sup>2</sup> 杨金兴<sup>2</sup> 秦卓明<sup>2</sup> 廖明<sup>1</sup>

(1. 华南农业大学 兽医学院 广东 广州 510642; 2. 山东农业科学院 家禽研究所 山东 济南 250100)

**摘要:** 从 30 日龄商品肉鸡腺胃分离到一株具有血凝特点的病毒,经 HI 交叉抑制试验证实为 H9N2 病毒,命名 A/Chicken/Shandong/KD/09 病毒对 SPF 鸡无致病性 IVPI 为 0。对其 HA 基因进行克隆测序,HA 基因氨基酸裂解位点的基序为 RSSR↓GL 与弱毒基序一致。A/chicken/Shandong/KD/09 分离毒株与参考株 HA 基因的核苷酸之间的同源性和 94.5%~100% 氨基酸序列之间的同源性为 95.5%~99.8%。与国外 A/ck/Korea/ms96/96、A/Parakeet/chiba/1/97 和 A/turkey/Wisconsin/1/1966 HA 基因核苷酸序列同源性为 80.9%~91.5%,氨基酸序列同源性为 88.1%~91.5%。系统进化树分析表明,该毒株与近年来国内流行的 A/chicken/Shandong/2/02 禽流感毒株类似。

**关键词:** H9N2 病毒;腺胃;HA 基因

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2011)03-0037-05

## Isolation, Identification and Molecular Characterization of a H9N2 Isolate from a Broiler Flock Glandular Stomach

WANG You-ling<sup>1,2</sup>, YUAN Xiao-yuan<sup>2</sup>, XU Huai-ying<sup>2</sup>, YANG Jin-xing<sup>2</sup>,  
QIN Zhuo-ming<sup>2</sup>, LIAO Ming<sup>1</sup>

(1. The South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2. Institute of Poultry Science, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China)

**Abstract:** A newly H9N2 isolate named A/Chicken/Shandong/KD/09 was collected from a broiler flock glandular stomach. The biological test showed that the isolate A/Chicken/Shandong/KD/09 exhibited the IVPI value with 0 and the isolate shared a lentogenic motif <sup>335</sup>RSSR↓GL<sup>340</sup> at the HA protein cleavage site, which indicated that A/Chicken/Shandong/KD/09 was lentogenic. The HA gene nucleotides (amino acids) homologies is 94.5% - 100% (95.5% - 99.8%) between the isolate A/Chicken/Shandong/KD/09 and the China H9N2 isolates. The HA gene nucleotides (amino acids) homologies is 80.9% - 91.5% (88.1% - 91.5%) between the isolate A/Chicken/Shandong/KD/09 and A/ck/Korea/ms96/96, A/Parakeet/chiba/1/97, A/turkey/Wisconsin/1/1966 H9N2 isolates. Phylogenetic analysis of HA gene showed that the A/Chicken/Shandong/KD/09 was similar to that of the A/chicken/Shandong/2/02.

**Key words:** H9N2 subtype avian influenza virus; Glandular stomach; Haemagglutinin gene

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<sup>[1]</sup>。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。H9N2 禽流感病毒可引起宿主的免疫抑制,并且可

收稿日期:2011-02-08

基金项目:教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-06-9752);广东省自然科学基金项目(8451064201001132);教育部创新团队项目(IRT0723);国家肉鸡产业技术体系项目(nycyt-42-G3-03);广东省科技计划项目(2007A020300011)

作者简介:王友令(1974-),男,山东招远人,助理研究员,在读博士,主要从事禽病和分子病毒学研究。

通讯作者:廖明(1968-),男,北京人,教授,博士,主要从事动物病毒和分子生物学研究。

与其他病原微生物协同作用导致鸡群生长缓慢、产蛋量下降,因而给养禽业造成了巨大的经济损失<sup>[1-4]</sup>。我国大陆自 1994 年首次分离到 H9N2 亚型禽流感病毒以来,先后从不同地区分离到多株相同亚型的禽流感病毒<sup>[5]</sup>。2009 年春季,山东某商品肉鸡群连续数批流行一种以临床轻微呼吸道症状,死亡率达 20% 的疾病。危害的主要对象是 30 日龄左右的鸡群,剖检主要症状是腺胃糜烂、穿孔,淘汰率增高,造成了巨大的经济损失。与传统 H9N2 发病不同,该株 H9N2 病毒主要是引起消化系统腺胃病变坏死,从而导致消化系统功能紊乱,引起鸡群死亡增多。这是国内首次报道的从腺胃中分离的 H9N2 病毒,这无疑对传统的 H9N2 免疫预防提出了挑战。因为 HA 基因是流感病毒囊膜纤突的主要成分之一,是基因表达产物中最大的糖蛋白,也是诱生保护性免疫的主要抗原<sup>[6]</sup>。HA 蛋白可与细胞表面病毒特异性受体结合,能介导病毒外膜与细胞内小体膜融合释放病毒核衣壳进入胞浆,并可刺激机体产生中和性抗体等<sup>[7]</sup>,故选用 HA 基因分析 H9N2 禽流感病毒的遗传背景及其遗传变异情况,可得到较为可靠的分析结果。为了揭示该分离株 H9N2 分子特点,笔者对决定 H9N2 毒力的关键基因 HA 进行了相关研究,为进一步探讨该腺胃 H9N2 分离株的预防提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 病原分离鉴定

1.1.1 分离鉴定 山东某商品鸡场 30 日龄死亡商品肉鸡。采集发病鸡的腺胃按 1:2 加入灭菌生理盐水,匀浆后经超声波处理 3 000 r/min 离心 15 min,取上清加青(链)霉素双抗至 2 000 IU/mL (2 mg/mL),置 4℃ 冰箱过夜,菌检合格后,接种 SPF 鸡胚。经用特异性 ND、AIV-H9N2 和 AIV-H5 亚型禽流感等病毒单因子阳性血清进行 HI 交叉抑制试验做鉴别诊断。

1.1.2 病毒 EID<sub>50</sub> 的测定和 SPF 鸡的致病性试验 试验毒株通过 9~11 日龄 SPF 鸡胚增殖,将分离病毒传至最高代次的病毒尿囊液做 10 倍梯度稀释,取 10<sup>-6</sup>~10<sup>-10</sup> 稀释的尿囊液接种 10 日龄 SPF 鸡胚,每胚 0.2 mL。观察 120 h,每 8~12 h 照胚 1 次,记录有无死胚,120 h 后的活胚置于 4℃ 冷冻 8 h,上述所有鸡胚进行 HA 检测,按照 Reed-Muench 法计算 EID<sub>50</sub>。另将这些病毒尿囊液用生理盐水做 10 倍稀释后,经翅静脉接种 6 周龄 SPF 鸡,每只鸡 0.1 mL,每隔 24 h 记录发病和死亡情况,连续观察 10 d,计

算静脉接种致病指数(IVPI)。

1.1.3 试剂和物品 AIV-H9 和 AIV-H5 单因子阳性血清由中国农业大学实验动物研究所提供,NDV 阳性血清自制。AIV-H9 和 AIV-H5 诊断抗原购自农业部哈尔滨兽医研究所。SPF 鸡胚和 SPF 鸡由山东农业科学院家禽研究所 SPF 鸡场提供。

### 1.2 序列测定

1.2.1 引物设计 参考已有的文献设计 H9N2 亚型 AIV 的 HA 基因序列两对引物,分段扩增 HA 基因全长序列<sup>[8]</sup>。HA1 片段预计扩增长度为 574 bp,引物序列如下: HA1-U: AGCAAAAGCAGGGGAATTTTCAC; HA1-L: CTCTATTATTTGTGTATTGGGCGTC。HA2 片段预计扩增长度为 1 353 bp,引物序列如下: HA2-U: ACTAAGGTCACCTTTTAGCTCTGCT; HA2-L: AG-TAGAAACAAGGGTGTTTTTGC。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2.2 所用物品 Trizol 为 Gibco BRL 产品;AMV 逆转录酶、Rnasin、pGEM-T Easy Vector 购自 Promega 公司;DNA 回收试剂盒、dNTPS 购自 TaKaRa 公司。PCR Master Mix 增强剂购自北京朋远公司。DH5 $\alpha$  由山东农业科学院家禽研究所禽病重点实验室保存。

1.2.3 RT-PCR 按照 Trizol 试剂盒说明提取病毒 RNA,加入经 DEPC 处理的灭菌超纯水 12  $\mu$ L 溶解 RNA。取 7  $\mu$ L RNA,加入 10  $\mu$ mol/L RT 引物 4.5  $\mu$ L,经 70℃ 变性 5 min 后,冰浴 5 min,依次加入下列体系:5  $\times$  RT Buffer 4  $\mu$ L; 10 mmol/L dNTP 2  $\mu$ L; 40 U/ $\mu$ L Rnasin 0.5  $\mu$ L; 10 U/ $\mu$ L 的 AMV 2  $\mu$ L,反应总体积 20  $\mu$ L,混匀,37℃ 1 h。然后 95℃ 5 min,冰浴 5 min,-20℃ 保存。合成的 cDNA 可作为 PCR 扩增 HA 的模板。PCR 反应体系: cDNA 5  $\mu$ L,上、下游引物各 1.0  $\mu$ L,2  $\times$  PCR Master Mix 25  $\mu$ L,补足灭菌水至 50  $\mu$ L。F 反应条件: 94℃ 3 min,然后 94℃ 1 min,54℃ 1 min,72℃ 2.5 min,进行 33 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。取反应产物,以标准核酸分子量作对照,1% 琼脂糖凝胶电泳检验。

1.2.4 转化鉴定和测序 回收 PCR 产物,将回收物连接 16℃ 1.5 h 至 pGEM-T Easy Vector,转化至感受态 DH5 $\alpha$ ,均匀涂布于含 Amp + IPTG X-gal 的 LB 固体培养基平板,37℃ 培养 14~16 h。挑取白色菌落少量培养,作 EcoR I 酶切和 PCR 扩增双重鉴定。将阳性质粒送上海博采公司测序。

1.2.5 HA 基因的序列分析 将所得的 HA 序列拼接。结合 GenBank 上与本实验室自测的 16 株国内外 H9N2 禽流感毒株的 HA 基因序列: A/chicken/Beijing/8/98 (DQ064354), A/chicken/Beijing/L1/

2005( EU573940) ,A/Chicken/Guangdong/SS/94( AF384557) ,  
A/chicken/Hebei/L1/2006 ( EU573941 ) , A/chicken/  
HongKong/SF1/03( AY664668) ,A/Chicken/Shandong/1/  
98( AF461520) ,A/chicken/Shandong/2/02( AY949989) ,  
A/chicken/Shandong/6/96( DQ064376) ,A/chicken/Shan-  
dong/lx06/2007 ( FJ231865 ) , A/Chicken/Shanghai/F/98  
( AF461532 ) , A/ck/Korea/ms96/96 ( AF203008 ) , A/  
HongKong/1073/99 ( AJ404626 ) , A/Parakeet/chiba/1/97  
( AB04915) ,A/turkey/Wisconsin/1/1966( D90305) ,chick-  
en/Shandong/B1/2000 ( EU5739390 ) , A/chicken/Shan-  
dong/LY/08( 本实验室分离毒株) 。使用 DNAsar 的  
Lasergene 软件包进行比较和分析。利用 MegAlign  
程序中 Clustal W 方法比较序列的同源性、HA 裂解  
位点附近的氨基酸残基、受体结合位点以及潜在的  
糖基化位点 ,并绘制 HA 基因的系统进化树。

2 结果与分析

2.1 病毒的分离鉴定

病毒能在 90 ~ 120 h 致死鸡胚 ,可凝集鸡红细  
胞 血凝抑制试验不能被 NDV、H5 亚型 AIV 阳性血  
清抑制 ,而能被 H9 亚型 AIV 阳性血清所抑制 ,故该  
株病毒为 H9 亚型 AIV。

2.2 病毒 EID<sub>50</sub>的测定和 SPF 鸡的致病性试验

经接种 10 日龄 SPF 鸡胚 ,分离株 EID<sub>50</sub> 为  
10<sup>-7.6</sup>/0.2 mL。静脉接种 6 周龄 SPF 鸡 ,观察 10 d ,

试验鸡全部健活 ,未表现任何临床症状 ,对照组鸡也  
无异常表现 ,IVPI 为 0。

2.3 HA 基因的 RT-PCR 结果

扩增的 RT-PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶中电  
泳 ,结果与预期条带大小一致。

2.4 重组质粒酶切和 PCR 双重鉴定

将提取的初步鉴定为阳性者质粒通过 PCR 和  
酶切后获得 HA 为 1 700 bp 左右电泳条带 ,初步表  
明获得了基因扩增的阳性克隆。

2.5 HA 基因 cDNA 序列分析

2.5.1 HA 核酸序列及氨基酸序列的分析 将双向  
测序结果用 Dnaman 软件拼接 ,得到分离株 H9N2  
亚型禽流感 HA 基因的 cDNA 全序列长度为 1 742  
bp。获得的序列没有核苷酸的插入和缺失。其开放  
性阅读框( ORF) 全长为 1 683 个核苷酸 ,编码 560  
个氨基酸。其中前 18 个氨基酸为信号肽 ,其后是  
HA1( 19 ~ 337 aa) 和 HA2( 339 ~ 560 aa) 。

通过 DNASar 软件将所得核苷酸序列翻译成氨  
基酸序列 ,对 HA 裂解位点附近的氨基酸序列、构成  
受体结合位点的氨基酸序列以及潜在的糖基化位点  
的分析结果如表 1 所示。分离株 A/chicken/Shan-  
dong/KD/09 HA 裂解位点处的氨基酸残基为 RSSR  
↓GL ,HA 有 7 个潜在的糖基化位点( N-X-T/S ,X  
为除 P 以外的氨基酸) ,构成 HA 上唾液酸受体结  
合位点的氨基酸高度保守 ,与以往分离的北方毒株

表 1 H9N2 分离株与参考株 H9N2 AIV HA 基因序列关键位点的比较

Tab. 1 Comparison of several key sites of HA gene sequences between H9N2 AIV isolate and H9N2 AIV reference strains

毒株 Stain	受体结合位点 Receptor-binding site							潜在糖基化位点 Potential glycosylation site							裂解位点 ( 335 ~ 340 aa) Proteolytic cleavage site	
	a	b	c	d	e	f	g	1	2	3	4	5	6	7		
A/chicken/Shandong/KD/09 <sup>a</sup>	C	W	T	N	V	L	Y	NST	NVS	NRT	NTT	NVS	NGT	NGS	RSSRGL	
A/chicken/Shandong/LY/08	C	W	T	N	V	L	Y	NST	NVS	NRT	NTT	NVS	NGT	NGS	RSSRGL	
A/chicken/Beijing/8/98	C	W	T	N	V	L	Y	NST	NVS	NRT	NTT	NVS	NGT	—	RSSRGL	
A/chicken/Beijing/L1/2005	C	W	T	N	T	L	Y	NST	NVS	NRT	—	NVS	NGT	NGS	RSSRGL	
A/Chicken/Guangdong/SS/94	C	W	T	N	A	L	Y	NST	NVS	NRT	NTT	NVS	NGT	NGS	GSSRGL	
A/chicken/Hebei/L1/2006	C	W	T	N	T	L	Y	NST	NVS	NRT	NTT	NVS	NGT	NGS	RSSRGL	
A/chicken/HongKong/SF1/03	C	W	T	N	A	L	Y	NST	NVS	NRT	NTT	NVS	NGT	NGS	RSSRGL	
A/Chicken/Shandong/1/98	C	W	T	N	T	L	Y	NST	NVS	NRT	NTT	NVS	NGT	NGS	RSSRGL	
A/chicken/Shandong/2/02	C	W	T	N	V	L	Y	NST	NVS	NRT	NTT	NVS	NGT	NGS	RSSRGL	
A/chicken/Shandong/6/96	C	W	T	N	A	L	Y	NST	NVS	—	NTT	NVS	NGT	NGS	RSSRGL	
A/Chicken/Shanghai/F/98	C	W	T	N	A	L	Y	NST	NVS	NRT	NTT	NVS	NGT	NGS	RSSRGL	
A/ck/Korea/ms96/96	C	W	T	H	E	L	Y	NST	NVT	NRT	NTT	NVS	NGT	NGS	ASYRGL	
A/HongKong/1073/99	C	W	T	H	E	L	Y	NST	NVT	NRT	NST	NIS	NGT	NGS	RSSRGL	
A/Parakeet/chiba/1/97	C	W	T	H	E	L	Y	NST	NVT	NRT	NST	NIS	NGT	NGS	RSSRGL	
A/turkey/Wisconsin/1/1966	C	W	T	H	E	L	Y	NST	NVT	NRT	NTT	NIS	NGT	NGS	VSSRGL	
A/chicken/Shandong/B1/2000	C	W	T	N	T	L	Y	NST	NVS	NRT	—	NVS	NGT	NGS	RSSRGL	

注: “—”表示糖基化位点的缺失;受体结合位点: a( 109 aa) ,b( 161 aa) ,c( 163 aa) ,d( 191 aa) ,e( 198 aa) ,f( 202 aa) ,g( 203 aa) ;糖基化位点:  
1( 29 ~ 31 aa) 2( 141 ~ 143 aa) 3( 218 ~ 220 aa) 4( 298 ~ 300 aa) 5( 305 ~ 307 aa) 6( 492 ~ 494 aa) 7( 551 ~ 553 aa) 。

Note: Receptor-binding sites ,their locations are: a( 109 aa) ,b( 161 aa) ,c( 163 aa) ,d( 191 aa) ,e( 198 aa) ,f( 202 aa) ,g( 203 aa) ; Potential glyco-  
lationsites ,their locations are: 1( 29 ~ 31 aa) 2( 141 ~ 143 aa) 3( 218 ~ 220 aa) 4( 298 ~ 300 aa) 5( 305 ~ 307 aa) 6( 492 ~ 494 aa) 7( 551 ~ 553 aa) .

基本一致,但北方毒株在 198 位氨基酸存在 A 和 T;与南方毒株相比,南方毒株在 191 和 198 氨基酸分别为 H 和 E,这与北方毒株存在显著差异。此外 A/chicken/Beijing/8/98、A/chicken/Beijing/L1/2005、A/chicken/Shandong/6/96、A/chicken/Shandong/lx06/2007、A/chicken/Shandong/B1/2000 参考毒株有 6 个糖基化位点。分离株 A/chicken/Shandong/KD/09 潜在的糖基化位点没有缺失,而以往的山东分离参考株在 218-220 为存在糖基化位点的缺失。

2.5.2 HA 基因核苷酸和推定的氨基酸序列的同源性分析 将本试验分离的毒株与 GenBank 上发表

的参考毒株进行核苷酸序列和氨基酸序列的同源性比较结果如图 1 2 所示。A/chicken/Shandong/KD/09 分离毒株与 GenBank 上发表国内参考株 HA 基因的核苷酸之间的同源性为 94.5%~100%,氨基酸序列之间的同源性为 95.5%~99.8%。与国外 A/ck/Korea/ms96/96、A/Parakeet/chiba/1/97 和 A/turkey/Wisconsin/1/1966 HA 基因核苷酸序列同源性为 80.9%~91.5%,推导氨基酸序列同源性为 88.1%~91.5%。从核苷酸和氨基酸同源性分析来看,该毒株与 A/chicken/Shandong/2/02 毒株基本属于同一毒株,推测可能是该野毒的再次流行。

Percent Identity																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1		99.6	97.6	97.6	96.3	97.9	96.3	98.2	100.0	95.5	95.5	94.5	86.5	90.5	91.5	80.9	97.6
2	0.4		97.6	97.6	96.1	98.0	96.3	97.8	99.6	95.1	95.1	94.1	86.4	90.0	91.0	80.4	97.7
3	2.4	2.4		98.2	96.6	98.5	96.9	98.3	97.6	95.5	95.5	94.5	86.7	90.6	91.7	80.4	98.3
4	2.4	2.4	1.8		96.6	99.2	96.7	99.0	97.6	95.6	95.7	94.4	86.6	90.6	91.6	80.7	99.9
5	3.7	3.9	3.4	3.4		96.9	95.8	96.9	96.3	97.9	97.8	96.5	84.1	92.3	93.3	81.3	96.7
6	2.1	2.1	1.5	0.8	3.1		97.0	99.5	97.9	95.9	96.0	94.7	83.5	90.6	91.6	80.5	99.2
7	3.8	3.8	3.2	3.4	4.3	3.1		96.9	96.3	94.8	94.7	93.6	83.4	90.0	91.0	79.9	96.8
8	1.8	2.2	1.6	1.0	3.1	0.5	3.2		98.2	96.3	96.4	95.1	83.7	91.0	91.9	81.0	99.0
9	0.0	0.4	2.4	2.4	3.7	2.1	3.8	1.8		95.5	95.5	94.5	83.5	90.5	91.5	80.9	97.6
10	4.6	5.0	4.5	4.4	2.2	4.1	5.3	3.7	4.6		99.8	96.4	83.7	91.5	92.5	81.1	95.7
11	4.6	5.0	4.6	4.4	2.2	4.0	5.3	3.7	4.6	0.2		96.4	83.8	91.5	92.5	81.2	95.7
12	5.7	6.1	5.7	5.7	3.6	5.4	6.7	5.0	5.7	3.7	3.7		83.5	90.8	91.8	81.0	94.4
13	17.2	17.5	17.2	17.3	16.8	17.3	17.3	17.1	17.2	17.1	17.4		84.3	84.1	81.0	83.7	13
14	9.6	10.1	9.5	9.5	7.9	9.6	10.1	9.4	9.6	8.6	8.7	9.6	16.5		97.7	80.9	90.7
15	8.7	9.1	8.5	8.5	7.0	8.7	9.1	8.4	8.7	7.6	7.7	8.6	16.6	2.3		81.3	91.6
16	19.9	20.4	20.5	20.4	19.6	20.6	21.1	20.1	19.9	19.8	19.8	20.0	20.5	20.0	19.4		80.7
17	2.4	2.4	1.7	0.1	3.4	0.8	3.3	0.9	2.4	4.4	4.4	5.6	17.2	9.4	8.5	20.3	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17

Chicken-Shandong-kD-09  
Chicken-Shandong-LY-08  
A-chicken-Beijing-8-98  
A-chicken-Beijing-L1-2005  
A-Chicken-Guangdong-SS-9  
A-chicken-Hebei-L1-2006  
A-chicken-HongKong-SF1  
A-Chicken-Shandong-1-98  
A-chicken-Shandong-2-02  
A-chicken-Shandong-6-96  
A-chicken-Shandong-lx06-2007  
A-Chicken-Shanghai-F-98  
A-ck-Korea-ms96-96  
A-Hong Kong-1073-99  
A-Parakeet-chiba-1-97  
A-turkey-Wisconsin-1-1966  
chicken-Shandong-B1-2000

图 1 H9N2 分离株与 H9N2 参考毒株 HA 基因核苷酸同源性比较

Fig. 1 Homology comparison(%) of nucleotide sequences between H9N2 AIV isolate and reference strains

Percent Identity																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1		99.3	96.6	97.1	96.6	97.7	97.0	98.2	99.8	95.5	95.5	95.9	88.1	91.4	92.5	88.1	97.3
2	0.5		96.8	97.3	96.6	97.9	97.1	97.7	99.3	95.2	95.2	95.4	87.7	90.9	92.0	87.7	97.5
3	3.3	3.1		97.1	96.1	97.3	97.3	97.1	96.6	94.7	94.7	94.7	87.7	90.6	91.6	87.9	97.3
4	2.7	2.5	2.7		96.6	98.2	97.5	98.0	97.1	95.4	95.4	95.2	88.1	91.3	92.3	88.4	99.6
5	3.3	3.3	3.9	3.3		97.0	97.0	97.0	96.6	97.0	96.8	96.6	88.8	92.2	93.2	88.9	96.8
6	2.2	2.0	2.5	1.6	2.9		97.9	98.9	97.7	95.9	96.1	95.4	88.2	91.4	92.5	88.6	98.4
7	2.9	2.7	2.5	2.4	2.9	2.0		97.7	97.0	95.5	95.4	95.2	88.1	91.6	92.7	88.2	97.7
8	1.6	2.2	2.7	1.8	2.9	0.9	2.2		98.2	96.3	96.4	95.9	88.6	92.0	93.0	89.3	98.2
9	0.0	0.5	3.3	2.7	3.3	2.2	2.9	1.6		95.5	95.5	95.9	88.1	91.4	92.5	88.1	97.3
10	4.4	4.8	5.4	4.6	2.9	4.0	4.4	3.7	4.4		99.3	95.4	87.9	91.1	92.2	88.1	95.5
11	4.4	4.8	5.4	4.6	3.1	3.9	4.6	3.5	4.4	0.5		95.4	88.2	91.1	92.2	88.2	95.5
12	4.0	4.6	5.4	4.8	3.3	4.6	4.8	4.0	4.0	4.6	4.6		88.4	90.4	91.4	88.2	95.4
13	12.9	13.3	13.3	12.9	12.0	12.6	12.9	12.2	12.9	13.1	12.6	12.4		87.7	87.5	88.2	88.2
14	8.9	9.5	9.9	9.1	8.1	8.9	8.7	8.3	8.9	9.3	9.3	10.1	13.3		97.3	88.6	91.4
15	7.7	8.3	8.7	7.9	6.9	7.7	7.5	7.1	7.7	8.1	8.1	8.9	13.5	2.5		88.2	92.5
16	12.9	13.3	13.1	12.4	11.8	12.2	12.6	11.4	12.9	12.9	12.6	12.6	12.6	12.2	12.6		88.6
17	2.5	2.4	2.5	0.2	3.1	1.4	2.2	1.6	2.5	4.4	4.4	4.6	12.6	8.9	7.7	12.2	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17

Chicken-Shandong-kD-09  
Chicken-Shandong-LY-08  
A-chicken-Beijing-8-98  
A-chicken-Beijing-L1-2005  
A-Chicken-Guangdong-SS-94  
A-chicken-Hebei-L1-2006  
A-chicken-HongKong-SF1-03  
A-Chicken-Shandong-1-98  
A-chicken-Shandong-2-02  
A-chicken-Shandong-6-96  
A-chicken-Shandong-lx06-2007  
A-Chicken-Shanghai-F-98  
A-ck-Korea-ms96-96  
A-Hong Kong-1073-99  
A-parakeet-chiba-1-97  
A-turkey-Wisconsin-1-1966  
chicken-Shandong-B1-2000

图 2 H9N2 分离株与 H9N2 参考毒株 HA 基因核苷酸推导的氨基酸同源性比较

Fig. 2 Homology comparison(%) of deduced amino acid sequences between H9N2 AIV isolate and reference strains

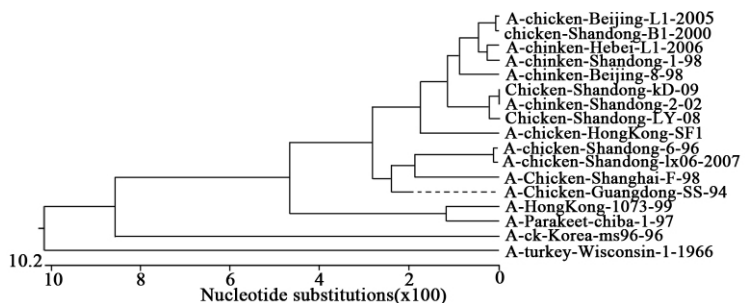


图 3 H9N2 AIV 分离株与 16 个参考毒株 HA 基因核苷酸序列的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of nucleotide sequences of HA gene of H9N2 AIV isolate and reference strains

2.5.3 系统发生进化关系分析 本试验所得的 HA 基因与 16 株参考毒株的 HA 基因的系统进化关系如图 3 所示。由图 3 可知分离株与近年来北方分离株遗传距离最近。

### 3 讨论

H9N2 亚型禽流感病毒最早从火鸡中分离得到。虽然, 其为中低致病力毒株, 但其存在广泛, 可引起家禽生长缓慢、产蛋量下降及免疫抑制, 引起继发及混合感染, 肉鸡在应激条件下可造成一定死亡, 造成严重的损失<sup>[9]</sup>。我国大陆自 1994 年分离到 H9N2 亚型禽流感病毒以来, 目前在绝大部分省市均有 H9N2 亚型禽流感的流行, 是威胁我国养禽业最严重的传染病之一。血凝素蛋白是禽流感病毒最重要的保护性抗原, 但 HA 基因变异频率很高, 其变异直接决定了禽流感病毒的致病性和抗原性变异。最近几年, 在疫苗的选择压力下, H9N2 亚型禽流感病毒 HA 基因发生了较大变异, 这种变异可能使其抗原性发生较大变化, 从而使目前使用疫苗的保护作用下降, 甚至进一步从低致病性向高致病性转变。因此, 要有效防控 H9N2 禽流感, 就必要对流行毒株的 HA 基因的遗传变异及不同毒株间的抗原相关性加以分析。这有利于掌握流行毒株的变异情况, 从而制备新的疫苗, 以防变异毒株突破原有疫苗保护而出现新的大流行。

本试验中的病毒分离自发病商品肉鸡腺胃中, 通过采集病料进行病毒分离, 以 HA 试验和 HI 试验进行鉴定, 确定为 H9 亚型 AIV。以往 H9N2 病毒主要分离于输卵管、肺脏、肝脏等器官, 国内至今没有报道从腺胃中分离到的病毒, 因为 H9N2 病毒在腺胃酸性环境中不易复制, 这是否与其他因素导致腺胃内酸碱平衡失调从而导致 H9N2 病毒复制有关还有待进一步研究证实。

Rohm 等<sup>[10]</sup>比较了低致病力毒株和高致病力毒株的 HA 裂解位点处的氨基酸序列, 发现低致病力毒株的 HA 裂解位点处通常只有单个的碱性氨基酸, 而高致病力毒株的 HA 裂解位点处, 一般有多个连续的碱性氨基酸插入。本研究结果显示, 该株病毒的 HA 裂解位点附近的氨基酸序列是 RSSR ↓ GL, 裂解位点附近的氨基酸序列符合低致病力毒株的分子特征, 这从分子水平证实了该株病毒为低致病力毒株。与此相一致, 该株病毒的 IVPI 为 0。HA 基因的受体位点和糖基化位点分析显示, 该株 AIV 有 HA 基因的受体结合位点和潜在的糖基化位点与国内分离的 H9N2 间基本相同, 没有大的变异, 而与

国外分离株差异较大。分离株的核苷酸同源率、氨基酸同源率与国内北方近年流行的参考毒株同源率较大。分离株 HA 基因与 16 株参考毒株的 HA 基因遗传系统进化关系表明, 分离株与近年来山东分离株遗传距离最近, 基本在同一分支, 说明目前流行的 H9N2 仍具有山东流行株的特点。除了 HA 外, NA, NS, PB2 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<sup>[11, 13]</sup>。

由于商品肉鸡生长周期短, 免疫器官发育不完善, 因此生产中疫苗免疫并不能达到满意的免疫效果。从该场具体发病情况分析, 我们推测该场流行的 H9N2 可能与周边环境中的野毒有关, 因此我们建议该场在生产中加强一次该分离毒 H9N2 油苗免疫, 使抗体达到平均值达到  $2^{10} \log_2$  以上, 并将抗体离散度调整在上下为 1 的范围内<sup>[12]</sup>。经实践证明, 该方法切实可行, 并取得了满意的预防效果。

### 参考文献:

- [1] 甘孟侯. 禽流感 [M]. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 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] 石火英, 孙蕾, 陈素娟, 等. H9N2 亚型禽流感病毒复制特性的基因分析 [J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(2): 189-194.
- [6] 卡尔尼克 B W. 禽病学 [M]. 10 版. 高福, 苏敬良, 译. 北京: 中国农业出版社, 1999: 742-758.
- [7] 殷震, 刘景华. 动物病毒学 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1997: 704-708.
- [8] 黄艳艳, 徐栋, 胡北侠, 等. 四株 H9N2 亚型禽流感病毒血凝素基因的克隆与分子特征分析 [J]. 浙江农业学报, 2009, 21(1): 25-29.
- [9] ZHANG Ping-hu, TANG Ying-hua, LIU Xiu-fan, et al. Characterization of H9N2 influenza viruses isolated from vaccinated flocks in an integrated broiler chicken operation in eastern China during a 5 year period (1998-2002) [J]. J Gen Virol, 2008, 89: 3102-3112.
- [10] rohm C, horimoto T, kawaoka Y, et al. Do hemagglutinin genes of highly pathogenic avian influenza virus constitute unique phylogenetic lineages? [J]. Virology, 1995, 209(2): 664-670.
- [11] 杨大光, 王新卫, 王泽霖, 等. 10 株不同年代 H9N2 AIV NA 基因的克隆及序列分析 [J]. 华北农学报, 2008, 23(6): 58-63.
- [12] 王友令, 袁小远, 徐怀英, 等. 高抗体水平肉种鸡 H9N2 的分离鉴定及 HA 基因序列分析 [J]. 华北农学报, 2010, 25(3): 23-27.
- [13] 韩春华, 林健, 刘月焕, 等. 北京 3 株 H9N2 型禽流感病毒 HA 基因的序列分析 [J]. 安徽农业科学, 2009, 10: 88-90.