

文章编号:1002-2694(2008)06-0543-05

H9N2 亚型禽流感病毒 A/Chicken/Gansu/2/99 株基因组的分子特征*

独军政¹,侯顺利^{1,2},易华山¹,付生芳¹,常惠芸¹,才学鹏¹

摘要:目的 测定 H9N2 亚型禽流感病毒 A/Chicken/Gansu/2/99 (CK/GS/2/99) 分离株的基因组序列并与参考毒株进行同源性分析,阐明该毒株的遗传变异及分子特征。方法 采集发病鸡泄殖腔样品,经鸡胚尿囊腔接种分离病毒,采用 RT-PCR 方法对 CK/GS/2/99 株的 8 个分节段基因进行扩增,分别将其克隆到 pGEM-T easy 载体后进行序列测定与同源性分析。结果 CK/GS/2/99 株 PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M、NS 基因的开放阅读框分别由 2280、2274、2151、1683、1497、1401、759、864 个碱基组成,分别编码 759、757、716、560、498、466、252/97、231/122 个氨基酸残基。该毒株 HA 上 HA1 和 HA2 裂解位点序列为 PARSSR GLF,具有典型的低致病性禽流感病毒的特征。同源性分析显示,CK/GS/2/99 株与 1998-2002 年间大部分中国大陆分离株遗传关系较近,尤其与 CK/NX/4/99 和 CK/HB/31/00 株遗传关系密切。结论 CK/GS/2/99 与大部分流行于中国内陆的 H9N2 亚型毒株均来源于共同的祖先毒株 CK/BJ/1/94,这为了解中国 H9N2 亚型禽流感病毒的分子流行病学提供了资料。

关键词:禽流感病毒;H9N2 亚型;A/Chicken/Gansu/2/99;序列分析

中图分类号:Q786;Q93 **文献标识码:**A

Molecular characteristics of the genome of H9N2 subtype avian influenza virus strain A/Chicken/Gansu/2/99

DU Jun-zheng¹, HOU Shun-li^{1,2}, YI Hua-shan¹, FU Sheng-fang¹, CHANG Hui-yun¹, CAI Xue-peng¹

(1. Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture, State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China;
2. Center of Disease Control, Lanzhou Military Area, Lanzhou 730020, China)

ABSTRACT: To elucidate the molecular characteristic and evolution status of avian influenza virus strain CK/GS/2/99, A strain of H9N2 avian influenza virus (CK/GS/2/99) isolated from the cloacal swabs of diseased chickens in Gansu province, 8 genes of avian influenza virus strain CK/GS/2/99 were amplified by RT-PCR method. The genes were sequenced, and compared with the genome of referenced influenza viruses. The open reading frame (ORF) of PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M and NS of CK/GS/2/99 contained 2280, 2274, 2151, 1683, 1497, 1401, 759, 864 nucleotides encoding 759, 757, 716, 560, 498, 466, 252/97, 231/122 amino acids respectively. The amino acid sequence of the cleavage site between HA1 and HA2 is PARSSR GLF, with the typical characteristics of the low pathogenic avian influenza virus. The results showed high nucleotide and amino acid sequence identity between CK/GS/2/99 and most H9N2 subtype isolates in mainland China from 1998 to 2002, especially, CK/NX/4/99 and CK/HB/31/00, isolates in mainland China. This study lay a foundation to know the molecular epidemiology of H9N2 subtype avian influenza virus in China.

KEY WORDS: avian influenza virus; H9N2 subtype; A/Chicken/Gansu/2/99; sequence analysis

禽流感是由 A 型禽流感病毒 (avian influenza virus, AIV) 引起的禽类烈性传染病。自 1878 年首次在意大利发现禽流感以来,世界各地都曾由特定毒株引起的禽流感暴发和流行,造成了巨大的经济损失。AIV 根据致病力的不同可以分为高致病性禽流感病毒 (highly pathogenic avian influenza vi-

*基金项目:国家“十一五”重大科技支撑计划“禽流感等重大动物疫病综合防控技术研究”项目 (No. 2006BAD06A14)

通讯作者:常惠芸, Email: changhuiyun @126.com

作者单位:1. 中国农业科学院 兰州兽医研究所 家畜疫病病原生物学国家重点实验室 农业部畜禽病毒学重点开放实验室,兰州 730046;

2. 兰州军区疾病预防控制中心,兰州 730020

rus, HPAIV) 和低致病性禽流感病毒 (low pathogenic avian influenza virus, LPAIV)。目前已知的所有 HPAIV 都属于 H5 和 H7 亚型,但也并不是所有的 H5 和 H7 亚型禽流感病毒都属于 HPAIV。高致病性禽流感所造成的危害往往是促不及防的。与之相比,低致病性禽流感的发生是潜在性的,但是它同样可怕,同样可以给养禽业带来灭顶之灾,对人类的威胁同样严重^[1-2]。LPAIV 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^[3],同时还是 97 年香港禽流感感染人事件的 H5N1AIV 的内部基因的供体^[4]。1999 年,我们从甘肃某养殖场发病鸡群中分离到了一株 H9N2 亚型 AIV A/Chicken/GanSu/2/99 (CK/GS/2/99),为了了解该毒株的遗传变异及分子特性,本研

究对其基因组进行了序列测定和遗传关系分析。

1 材料与方法

1.1 材料 SPF 鸡胚购自北京梅利亚实验动物有限公司;抗 H9N2AIV 阳性血清购自中国农科院哈尔滨兽医研究所;IB、ND 阳性血清购自中国兽药监察所。AMV 反转录酶、dNTP、Ribonuclease Inhibitor、DNA Marker、X-gal、IPTG、限制性内切酶、pGEM-T easy 载体、感受态细胞 JM109、胶纯化回收试剂盒均购自宝生物(大连)工程公司;B 型质粒小量快速提取试剂盒购自博大泰克公司,RNeasy Mini Kit 购自 QIA GEN 公司。流感病毒通用反转录引物为 Uni12:5-A GCRAAA GCA GG-3,同时设计用于扩增 H9N2 亚型 AIV 各段基因编码区序列的特异引物,见表 1,引物均由宝生物(大连)工程公司合成。

表 1 CK/GS/2/99 全基因扩增用引物

Table 1 primers of RT-PCR for gene fragments of CK/GS/2/99

Gene	Up-stream primers	Down stream primers	Fragment/ bp
PB2	5-A GCRAAA GCA GGTCAA WTATA TTCAA T-3	5-AGTA GAAACAA GGTCGTT TTTAAACWA TTC-3	2280
PB1	5-A GCRAAA GCCAAACCA TTTGA-3	5-AGTA GAAACAA GGCA TTTTTCAT-3	2274
PA	5-A GCRAAA GCA GGTACTGA TCC-3	5-AGTA GAAACAA GGA GTTTTT-3	2151
HA	5-ATGGAA GTA GTA TCACTAATAACTAAC-3	5-TTA TA TACAAA TGTTGCA TCTGCAAG-3	1683
NP	5-GCAAAA GCA GGGTA GA TAA TCACT-3	5-AGGGTA TTTTCTTCAATTGTCAT-3	1497
NA	5-ATGAATCCAAA TCARAA GATAA TAGC-3	5-AAATTGCGAAA GCTTATA TAGCA-3	1401
M	5-ATGAGTCTCTCCGAGGTCA-3	5-ACTCCA GCTCGTTGACAA T-3	982
NS	5-GAGGA TCCATGGA GGCGTTAGTGC-3	5-TAAA GCTTGGCGATGGCACA TCTGCA T-3	890

1.2 方法

1.2.1 病毒分离 用无菌棉拭子采集发病鸡泄殖腔内容物样品,置于含适量抗生素的 Hank's 液中,4℃ 保存。以 3 000 r/min 离心去除杂质,取上清液,用 0.22μm 的滤膜过滤除菌,并加入适量双抗。取滤液以 0.2mL/胚的接种剂量接种 9~10 d 龄鸡胚尿囊腔,37℃ 孵育,逐 d 观察。无菌收获 24h 以后的死胚及 96h 活胚的尿囊液,测血凝价(HA)。若出现血凝活性,则继续传代并测定血凝价。若血凝价为阴性,则盲传 3 代,仍为阴性者弃去,如为阳性,则继续传代并测定血凝价。病毒分离阳性者置于 -80℃ 冻存。

1.2.2 病毒鉴定 病毒分离为阳性尿囊液分别与 ND、IB 等标准阳性血清进行血凝抑制试验(HI);同时,用 AIV 标准阳性血清与阳性分离株的尿囊液进行 HI、NI 试验,实验方法参照按文献^[5]进行。

1.2.3 RT-PCR 按照 RNeasy Mini Kit 操作说明,从鸡胚尿囊液中提取总 RNA。以 Uni12 为引物,用反转录酶 M-MLV 按照试剂盒说明书进行反

转录合成 cDNA,再以 cDNA 为模板进行 PCR 分别扩增 HA、NA、NP、NS、M、PA、PB1、PB2 基因片段,1%的琼脂糖电泳观察结果。

1.2.4 基因克隆 将纯化的 PCR 产物和 pGEM T-easy 载体于 16℃ 水浴进行连接反应,转化感受态细胞 JM109,均匀涂布于含有 IPTG、X-gal 和 Amp 的 LB 琼脂平板上,37℃ 温育 12h 后,挑取白色单个菌落。以碱裂解法小剂量制备质粒,并进行酶切和 PCR 鉴定,将初步鉴定为阳性的重组质粒送上海生物工程公司测序。

1.2.5 序列分析 重组质粒序列测定后,借助 DNASTar、BioEdit、Mega3.1、ClustalX 等分子生物学软件与参考序列比较分析。将鉴定正确的重组质粒送上海生物工程公司测序,来自 GenBank 的参考基因为:A/Chicken/Shijiazhuang/2/98 (CK/SJZ/2/98)、A/Chicken/Ningxia/4/99 (CK/NX/4/99)、A/Chicken/Guangdong/4/00 (CK/GD/4/00)、A/Chicken/Beijing/1/94 (CK/BJ/1/94)、A/Swine/Hong Kong/10/98 (Sw/HK/10/98)、A/Chicken/

Heilongjiang/35/00(CK/HLJ/35/00)、A/Chicken/Hebei/31/00(CK/HB/31/00)和A/Chicken/Henan/43/02(CK/HN/43/02)。

2 结果

2.1 病毒的分离鉴定 从所采集的样品中分离到1株AIV,鸡胚接种第1代,尿囊液即具HA活性,但胚体病变不明显。传至第3代,部分胚体出现明显的出血斑点,绒毛尿囊膜增厚出血,部分鸡胚死亡。HA阳性尿囊液不能被ND、EDSV的阳性血清所抑制,而能被禽流感阳性血清所抑制,说明该分离株不是NDV或IBV。用H9N2亚型阳性血清进行HI、NI试验,结果表明该分离株为H9N2亚型,命名为A/Chicken/Gansu/2/99,简称CK/GS/2/99。

2.2 序列测定 通过RT-PCR技术对AIV CK/GS/2/99株的8个基因片段分别进行扩增,然后将其克隆到pGEM-Teasy载体。测序结果表明:CK/GS/2/99株的8个基因片段(PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M、NS)的开放阅读框分别长2 280bp、2 274bp、2 151bp、1 683bp、1 497bp、1 401bp、759bp、864bp,这8个基因已被登录GenBank,登录号分别为:EF070740、EF070739、EF070738、EF070733、EF070735、EF070734、EF070737和EF070736。

2.3 序列分析 CK/GS/2/99株HA基因的cDNA包含了一个完整的开放阅读框(ORF),由1 683bp组成,编码560个氨基酸,包括信号肽(1~18a.a)、HA1(19~337a.a)和HA2(339~560a.a)。氨基酸序列分析表明,该毒株HA蛋白含有6个潜在的糖基化位点,其中11、123、200、280、287位等5个位于HA1部分、474位于HA2部分,参考毒株在这些位置的糖基化位点也很保守,仅CK/HLJ/35/00和CK/GD/4/00分别在200和287位各少一个糖基化位点。HA1和HA2的裂解位点序列为PARSSR GLF,无连续的多个碱性氨基酸插入,具有典型的低致病性禽流感病毒特征,在本文参考毒株中仅CK/HLJ/35/00株的裂解位点序列为PAVSSR GLF,其余参考毒株与CK/GS/2/99株的裂解位点相同。CK/GS/2/99株HA上受体结合位点的173、180、216位氨基酸分别为N、V、L,除了CK/HLJ/35/00株在173位为H外,其他毒株均为N;180位变化较大,除了V之外,还有A、T、E;216位有3株为Q、6株为L。CK/GS/2/99株NA基因完整的阅读框架区包含1 401个核苷酸,共编码466个氨基酸。值得注意的是,除了CK/HLJ/35/00、CK/HN/43/02、CK/BJ/1/94株在NA

蛋白63、64、65位的氨基酸分别为T、E、I外,CK/GS/2/99与其他参考毒株在此位置的氨基酸均被缺失。NA蛋白的氨基酸序列存在6个潜在的糖基化位点,分别在69、86、146、200、234和402位。

M基因和NP基因在流感病毒中是相当保守的基因。CK/GS/2/99株M基因包含两个完整的开放阅读框,其中M1由1-759碱基组成,编码252个氨基酸。M2由692-982位碱基组成,编码97个氨基酸。M1和M2均无潜在的糖基化位点。本实验对NP和M的序列比较发现该毒株与参考毒株的同源性在88.1%~99.3%之间,但它们的推导的氨基酸序列的同源性均高于96.0%以上。这表明它们是很保守的基因。NS基因的编码区由838个核苷酸组成,编码NS1和NS2两种非结构蛋白,NS1编码区为1-693,编码231个氨基酸;NS2由1-27、500-838位核苷酸通过RNA编辑组成,编码122个氨基酸。RNA聚合酶PB2、PB1和PA这三种成分是病毒粒子中分子量最大的蛋白质,编码CK/GS/2/99株的这三种蛋白的基因分别由2 280bp、2 274bp、2 151bp组成。

CK/GS/2/99株与参考毒株的核苷酸和氨基酸同源性分析表明,HA、NA、NS三个基因的变异较大,PB2、PB1、PA、M、NP基因比较保守(表2)。以PB2、PB1、PA、HA、NP、NA和NS基因分别绘制的系统进化树表明,CK/GS/2/99与CK/NX/4/99、CK/HB/31/00株大致处于同一进化分支中,表明它们之间遗传关系密切,可能来源于共同的祖先CK/BJ/1/94。由PB2、PB1、PA、NP四个基因构建的系统树很相似,证明了这四个基因在病毒进化过程中的保守性。总的看来,CK/HLJ/35/00株在遗传关系上比较独特,属于单独的进化分支,见图1。

3 讨论

自1966年在美国威斯康星州首次在火鸡中发现H9N2亚型AIV以来,该病在亚洲、欧洲、非洲及美洲等已广泛流行。1994年,我国首次从广东某鸡场分离到了H9N2亚型AIV。此后,唐秀英、刘秀梵、刘金华等多位学者先后从我国发病鸡、鸭和鹌鹑体内分离到几十株H9N2 AIV。1999年,Peiris等首次从猪体内分离到H9N2亚型流感病毒^[6]。同年,他们又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^[5],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亚型AIV感染并致死人的事件。Lin等对这两株病毒进行研究表明,它们的所有基因片段都与A/Quail/Hong Kong/G1/97(H9N2)高度同源^[7]。由

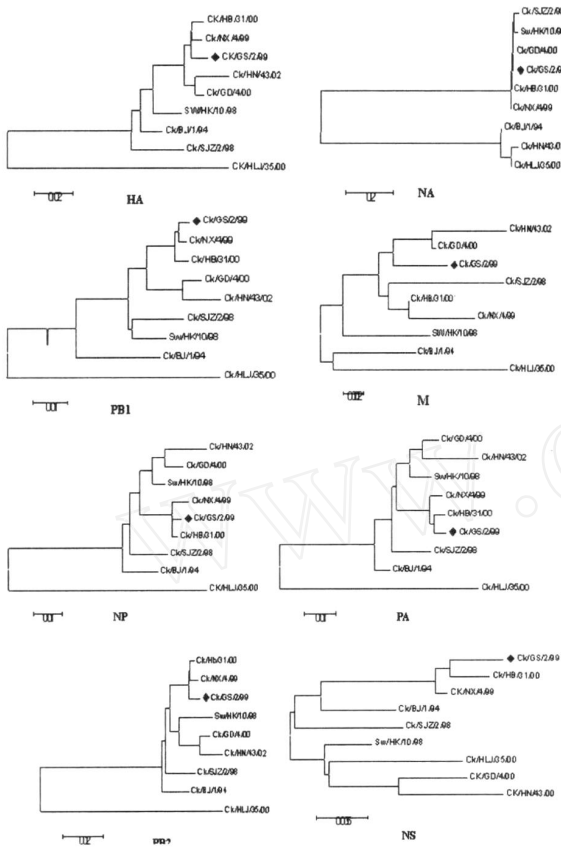


图 1 CK/GS/2/99 株各基因的系统发生树

Fig. 1 Phylogenetic tree of each gene of CK/GS/2/99

此可见, H9N2 亚型 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, 因此, 开展 H9N2 亚型的 AIV 研究具有重要的公共卫生意义。

流感病毒的宿主特异性、组织嗜性和致病力与 HA 的受体特异性以及 NA 的唾液酸酶活性和特异性是密切相关的^[8]。Matrosovich 等发现 HA 受体结合位点 216 位为 L 的 AIV 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特征^[9]。这些病毒在 180 位存在较大的变化, 可以是 V、A 或 T, 但在 180 位为 V 的病毒具有与 PM 最强的结合能力, 和 1968 年引起香港流感大流行的 H3N2 亚型流感病毒具有类似的 PM 结合能力。本实验所分离的 CK/GS/2/99 株 HA 上受体结合位点在 180 和 226 位分别为 V 和 L, 是否由此可以推断该株病毒具有感染哺乳动物的潜在危险还有待进一步实验证明。Skehel 等发现流感病毒 HA 上的糖基化位点还会影响流感病毒的抗原性, 从而病毒与抗体的相互作用^[10]。本文中 CK/HLJ/35/00 和 CK/GD/4/00 株分别在 200 和 287 位各缺失了一个糖基化位点, 这是否影响了病毒的抗原性有待深入研究。流感病毒 NA 蛋白的主要功能是促进病毒的释放和在宿主体内的扩散^[11]。刘金华等认为, 中国大陆的鸡源 H9N2 病毒

表 2 CK/GS/2/99 株与参考毒株的核苷酸和氨基酸同源性比较(%)

Table 2 Homology comparison between CK/GS/2/99 and other AIV isolates

毒株	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS
CK/BJ/1/94	96.8	94.3	96.7	95.3	96.8	96.8	97.7	96.7
	97.3	98.5	98.3	96.3	98.0	95.3	96.0	95.2
CK/HB/31/00	99.1	99.2	99.3	98.5	99.5	99.0	99.0	99.0
	98.9	99.3	99.4	98.2	99.8	98.5	97.6	96.4
CK/HLJ/35/00	84.5	88.7	88.1	80.2	88.1	93.2	96.9	95.5
	94.5	95.4	94.1	87.9	96.8	91.4	96.0	93.5
CK/NX/4/99	98.9	99.5	98.7	98.6	98.9	99.0	98.4	99.3
	99.1	99.5	98.3	98.8	99.0	98.5	96.9	96.4
CK/SHJZH/2/98	97.0	97.0	96.7	93.5	97.0	96.5	98.0	96.8
	97.6	98.8	97.9	94.8	98.4	96.1	97.2	93.2
Sw/HK/10/98	96.0	97.3	96.9	95.9	97.7	97.2	98.3	96.5
	96.1	99.2	97.2	96.5	99.4	96.9	99.6	92.8
CK/GD/4/00	96.3	97.3	96.8	97.8	97.1	98.7	93.1	95.8
	97.8	98.7	97.5	98.4	99.0	98.5	99.6	92.5
CK/HN/43/02	95.7	96.6	95.3	96.7	96.1	92.4	98.1	95.5
	98.2	98.7	96.7	97.7	98.6	90.6	96.6	91.0

注: 奇数行表示核苷酸序列的同源性; 偶数行表示氨基酸序列的同源性。

Note: The odd lines represent the nucleotide sequence similarity; The even lines represent the amino acid sequence similarity.

与其它毒株相比, 其 NA 茎部的第 63、64、65 位点氨基酸发生缺失, 可以认为是中国大陆鸡源 H9N2 AIV 的一个分子标记^[12]。本研究发现虽然 CK/

GS/2/99 和部分参考毒株在 NA 茎部 63、64、65 位存在氨基酸的缺失, 但 CK/HLJ/35/00、CK/HN/43/02、CK/BJ/1/94 三个毒株 NA 蛋白在这三个位

置的氨基酸为 T、E、I。至于这三个位点氨基酸缺失的生物学意义目前未见相关报道。

为从分子水平上了解 H9N2 亚型 AIV CK/GS/2/99 株的遗传演化情况,将其基因组与近年来比较有代表性的我国流行毒株的基因组进行了比较分析,其中包括引起我国发生第一起 H9N2 亚型禽流感的病毒 CK/BJ/1/94。系统进化分析表明,CK/GS/2/99 株和其他参考毒株包括 CK/SJZ/2/98、CK/NX/4/99、CK/GD/4/00、CK/BJ/1/94、CK/HB/31/00 和 CK/HN/43/02 株的遗传进化关系密切,尤其与 CK/NX/4/99、CK/HB/31/00 株关系最近,从进化树和分离病毒的时间,我们可以推断 CK/BJ/1/94 是这些毒株的共同祖先,也可能是猪流感 Sw/HK/10/98 株的祖先,只是该病毒株在遗传进化中发生了比较复杂的基因重排。此外,病毒分布反应出时间参数,而不是地域参数,即病毒出现后并不局限于该区域,而是蔓延到临近的省份或在全国范围内流行。CK/HLJ/35/00 病毒是我国分离到的第一株具有北美禽流感基因特征的 H9N2 亚型病毒,从本文研究结果看,并没有证据表明该株病毒在我国家禽中稳定存在。这与 Li 等人的研究结论基本一致,他们对 1996 - 2002 年间分离于中国的 27 株 H9N2 亚型 AIV 毒株的研究表明,流行于中国大陆的 H9N2 亚型 AIV 源于 CK/BJ/1/94,由于这些毒株发生基因重排而呈多基因型。而且,灭活疫苗免疫试验表明不同病毒疫苗之间交叉免疫原性差,不能提供完全的免疫保护,提示 H9N2 亚型禽流感的防治疫苗候选株应在严格抗原性分析的基础上及时更新^[13]。总之,我国 H9N2 亚型禽流感病毒的遗传演化较为复杂,存在广泛的基因重排现象,形成了多个不同的基因型,并且目前 H9N2 亚型的 AIV 毒株在中国大陆仍然呈流行趋势,对于该亚型病毒的广泛深入研究,可以促进对禽流感病毒起源进化和流行病学的进一步理解,从而达到有效预防控制禽流感的目的。

参考文献:

- [1] Webster R G, Bean W J, Gorman O T, et al. Evolution and ecology of influenza A viruses [J]. *Microbiol Rev*, 1992, 56(1): 152-179.
- [2] Fouchier R A M, Munster V, Wallensten A, et al. Characterization of a novel influenza virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from Black-Headed gulls [J]. *J Virol*, 2004, 79(5): 2814-2822.
- [3] Peiris M, Yuen K Y, Chan K H, et al. Human infection the influenza H9N2 [J]. *Lancet*, 1999, 354(82): 916-917.
- [4] Guan Y, Shornidge K F, Krauss S, et al. H9N2 influenza viruses possessing H5N1-like internal genomes continue to circulate in poultry in southeastern China [J]. *J Virol*, 2000, 74(20): 9372-9380.
- [5] 农业部畜牧兽医局译. 世界动物卫生组织著. 哺乳动物、禽、蜜蜂 A 和 B 类疾病诊断试验和疫苗标准手册 [M]. 北京, 中国农业科学出版社, 2002: 197-202.
- [6] Peiris J S, Guan Y, Marhwell D, et al. Cocirculation of avian H9N2 and contemporary "human" H3N2 influenza A viruses in pigs in southeastern China: potential for genetic reassortment [J]. *J Virol*, 2001, 75(20): 9679-9686.
- [7] Lin Y P, Shaw M, Gregory V, et al. Avian-to-human transmission of H9N2 subtype influenza A viruses: relationship between H9N2 and H5N1 human isolates [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(17): 9654-9658.
- [8] Weis W, Brown J H, Cusack S, et al. Structure of the influenza virus haemagglutinin complex with its receptor sialic acid [J]. *Nature*, 1988, 333(6172): 426-431.
- [9] Matrosovich M N, Krauss S, Webster R G. H9N2 influenza A viruses from poultry in Asia have human virus-like receptor specificity [J]. *Virology*, 2001, 281(2): 156-162.
- [10] Skehel J J, Stevens D J, Daniels R S, et al. A carbohydrate side chain on haemagglutinins of Hong Kong influenza viruses inhibits recognition by a monoclonal antibody [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81(6): 1779-1783.
- [11] Air G M, Laver W G. The neuraminidase of influenza virus [J]. *Proteins*, 1989, 6(4): 341-356.
- [12] 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.
- [13] Li C, Yu K, Tian G, et al. Evolution of H9N2 influenza viruses from domestic poultry in mainland China [J]. *Virology*, 2005, 340(1): 70-83.

收稿日期: 2007-12-14; 修回日期: 2008-03-22