



## 近20年中国部分地区鸡源H9N2亚型禽流感病毒HA基因遗传演化及其变异频率

孟芳<sup>1#</sup>, 徐怀英<sup>3#</sup>, 张伟<sup>3</sup>, 黄迪海<sup>2</sup>, 张再辉<sup>2</sup>, 刘霞<sup>2</sup>, 常维山<sup>1\*</sup>, 秦卓明<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup> 山东农业大学动物科技学院, 山东 泰安 271018

<sup>2</sup> 山东省健牧生物药业有限公司, 山东 济南 250100

<sup>3</sup> 山东农业科学院家禽研究所, 山东 济南 250023

**摘要:** 【目的】通过比较不同时期的H9N2亚型禽流感流行毒株HA基因的分子特征和变异频率, 揭示免疫压力下病毒的遗传演化趋势。【方法】选取源于课题组的40株鸡源H9N2毒株, 以及从GenBank下载的136株中国鸡源H9N2流行毒株和7株经典毒株的序列, 利用Lasergen 7.1和MEGA 5.1等软件, 对其HA基因进行系统演化、分子特征和变异频率分析。【结果】系统发育分析表明, 近20年的鸡源H9N2流行株分属于BJ94、Y280和S2等谱系, 优势流行株的分布与年代密切相关。氨基酸序列比较显示, H9N2病毒不同谱系之间具有各自的特征, 且存在着明显的氨基酸变异积累。以Ck/BJ/1/1994 HA基因为参照, 1994–2014年间, H9N2流行株核苷酸和氨基酸的年均进化率分别为 $5.73 \times 10^{-3}$ 和 $4.25 \times 10^{-3}$ 。其中, 2011–2014年的核苷酸(氨基酸)年均进化率为 $6.35 \times 10^{-3}$ ( $5.32 \times 10^{-3}$ ), 明显高于2006–2010年 $5.22 \times 10^{-3}$ ( $3.70 \times 10^{-3}$ ), 更显著高于疫苗推广初期1999–2005年的 $0.74 \times 10^{-3}$ ( $0.50 \times 10^{-3}$ )。【结论】H9N2疫苗株和流行毒株的不匹配是病毒变异频率加快的重要原因。

**关键词:** H9N2, 禽流感, HA基因, 进化, 变异频率

H9N2亚型禽流感(Avian Influenza, AI)主要是由低致病性H9N2亚型禽流感病毒(Avian Influenza virus, AIV)引起的家禽、野鸟等感染的一种低致病性传染病<sup>[1-3]</sup>。自1994年首次在广东发

现此病以来, 已在我国流行20余年, 不仅给养殖业带来巨大的经济损失, 也严重威胁着人类的健康。H9N2亚型AIV曾在1996–1998年引起全国第一次流感大流行, 此后伴随着H9N2亚型AIV灭活

基金项目: 国家自然科学基金(31372332); 科技部农转资金(SQ2013ECC600059); 山东省科技攻关重点支持项目(2009GG10009006); 济南市成果转化支持项目(2012CG92)

\*通信作者。E-mail: 秦卓明, qinzm1997@163.com; 常维山, wschang@sdau.edu.cn

#并列第一作者。

收稿日期: 2015-05-09; 修回日期: 2015-06-20; 网络出版日期: 2015-07-05

疫苗的推广使用, 该病的流行得到有效控制。但在2010–2011年间, 免疫后发病的病例明显增多, 传统疫苗的保护效力明显下降, 导致H9N2亚型AIV的第二次全国大流行, 商品肉鸡尤甚<sup>[4]</sup>。研究表明, H9N2亚型AIV在疫苗的免疫压力下出现了点突变、基因重排等多种形式的变异<sup>[5-6]</sup>。

H9N2亚型AIV的基因组由8个单股负链RNA片段组成, 编码至少11种蛋白, 而血凝素(Hemagglutinin, HA)蛋白是构成病毒囊膜纤突的主要成分, 与病毒的血凝活性、中和活性等密切相关, 且在病毒感染的吸附和穿膜过程中起关键作用<sup>[7-8]</sup>。在病毒的演变过程当中, HA基因变异明显高于其它7个基因<sup>[9]</sup>, 但有关H9N2亚型AIV HA基因的变异频率鲜有报道。

为探讨近20年来H9N2亚型AIV变异的情况, 我们分析了183株H9N2亚型AIV毒株的序列, 并以Ck/BJ/1/1994为参考毒株, 从HA基因的核苷酸和氨基酸水平上分析比较其进化速率和变异频率, 旨在进一步探讨H9N2亚型AIV遗传变异的特点和规律, 进而预测病毒演化的趋势, 为H9N2疫病的合理防控提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 H9N2亚型AIV HA基因序列来源

本课题组1999–2013年期间分离、鉴定并测序的40株H9N2亚型AIV流行毒株<sup>[10]</sup>, 以及从GenBank下载的136株具有代表性的中国鸡源H9N2流行毒株(包括1994–2014年间在山东、广东、江苏、河南、广西等养禽发达地区)和7株经典毒株序列。除代表毒株Y280 (A/Duck/HongKong/Y280/1997)外, 均为鸡源毒株。

### 1.2 系统发育树的构建

利用Lasergen 7.1和MEGA 5.1软件对上述毒株的HA基因核苷酸和氨基酸序列进行比对, 绘制系统发育树, 并对其氨基酸关键位点进行分析, 探讨其分子变异特征。

### 1.3 变异率和进化率的计算

以Ck/BJ/1/1994(GenBank No.: KF188294; BJ94)为参考株, 参照文献[11-12]方法, 计算各毒株HA基因与其核苷酸(氨基酸)的变异率和进化率。核苷酸(氨基酸)变异率=变异的核苷酸(氨基酸)数目/总核苷酸(氨基酸)数目。核苷酸进化率 $K$ 的计算公式为:  $K(\%)=1/2\ln[(1-2P/T-2Q/T)(1-2Q/T)^{1/2}]$ 。氨基酸年均进化率为氨基酸变异率与进化时间的比值。考虑到本研究中以年为单位, 而每年又有若干个病毒株, 故取其平均值。对不同时间段的进化率和变异率利用 $t$ 检验进行统计学比较, 评价其差异性。

## 2 结果和分析

### 2.1 HA基因进化树的构建

以H9N2亚型禽流感流行株HA基因核苷酸序列绘制系统进化树(图1), H9N2亚型AIV可分为欧亚谱系和北美谱系, 其中欧亚谱系包括G1-like、S2-like、Y280-like和BJ94-like等, 北美谱系包括Wisconsin-like等<sup>[13]</sup>。本研究涉及的176株H9N2地方流行毒株基因型分布如下: 29株属BJ94-like; 43株属Y280-like; 102株属于S2-like, 这表明S2-like为我国H9N2优势流行株。另有2株属于Y439-like。

### 2.2 HA基因核苷酸变异率与进化率分析及其与年代的相关性

**2.2.1 HA基因核苷酸变异率及年平均进化率的研究:** H9N2亚型AIV HA基因ORF核苷酸全长1683 bp, 以BJ94的HA基因核苷酸序列为参照, 不同年代的H9N2亚型AIV与其进行比较(详见表1)。发现1994–2014年间, H9N2流行株核苷酸的年均进化率为 $5.73 \times 10^{-3}$ , 其中, 1994–1998年(未使用疫苗)HA基因核苷酸年平均进化率为 $8.04 \times 10^{-3}$ ; 1999–2014年(疫苗使用后)为 $4.46 \times 10^{-3}$ , 显示出疫苗在控制H9N2病毒变异速度方面有明显的效果。此外, 研究还发现: 在疫苗使用后的不同阶段, 核苷酸

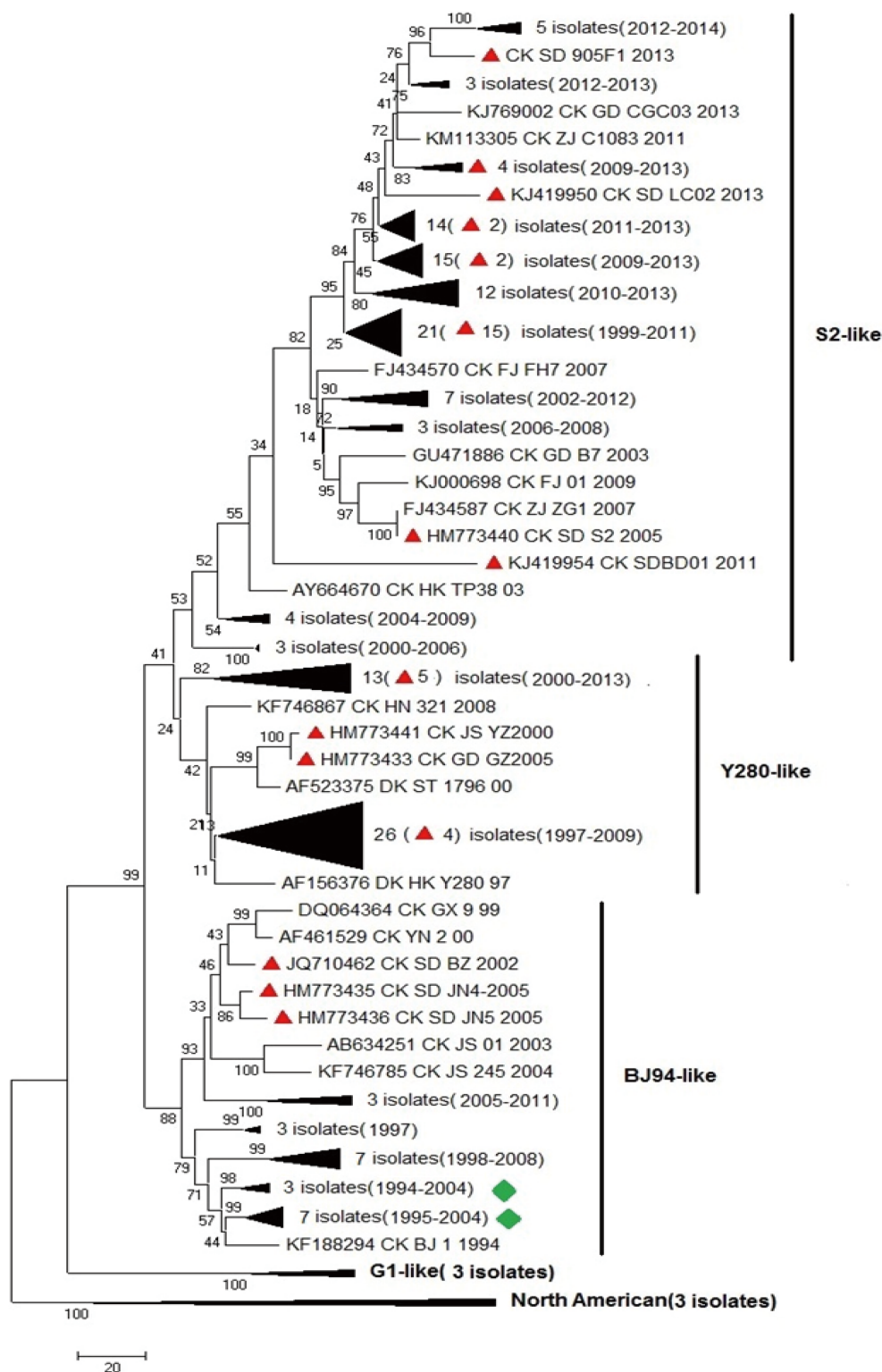


图 1. 我国1994-2014年间H9N2亚型禽流感病毒株的HA基因进化树

Figure 1. HA gene phylogenetic tree of H9N2 subtype AIV strains from 1994 to 2014 in China. GenBank No. were listed before the names of H9N2. ▲: more than two strains; ▲: H9N2 isolates in our lab, figure is the number of strains; (-): the separation time of strains; ◆: vaccine strain.

表1. 1994-2014年我国H9N2亚型AIV毒株HA基因核苷酸平均变异率和进化率

Table 1. HA gene average variation rate and evolution rate of H9N2 AIV strains from 1994 to 2014 in China

Period	Year	No. of strains	nt Length	No. of variation	Variation rate/%	P	Q	Evolution rate/%	Average evolution frequency rate (×10 <sup>-3</sup> )
Unused Vaccines	1994	1	1683	0	0	0	0	0	8.04
	1995	1	1683	32.0	1.90	24.0	8.0	2.18	
	1996	3	1683	38.0	2.26	29.7	8.3	2.56	
	1997	6	1683	52.0	3.09	43.2	8.8	3.45	
	1998	5	1683	59.4	3.53	47.4	12.0	4.02	
Using Vaccines	1999	6	1683	74.2	4.41	61.2	13.0	5.00	0.74
	2000	8	1683	68.6	4.08	56.0	12.6	4.63	
	2001	4	1683	69.1	4.41	56.8	12.3	4.64	
	2002	7	1683	84.3	5.01	69.4	14.9	5.72	
	2003	9	1683	79.3	4.71	63.2	16.1	5.43	
	2004	4	1683	55.8	3.32	46.0	9.8	3.72	
	2005	8	1683	81.4	4.84	66.9	14.5	5.52	
	2006	6	1683	102.3	6.08	82.8	19.5	7.07	5.22*
	2007	10	1683	116.0	6.89	93.8	22.2	8.08	
	2008	10	1683	104.4	6.20	85.6	18.8	7.19	
	2009	14	1683	125.9	7.48	101.9	24.0	8.83	
	2010	19	1683	136.9	8.13	110.5	26.4	9.68	
	2011	21	1683	136.4	8.10	111.4	25.0	9.59	6.35*
	2012	16	1683	144.2	8.57	116.8	27.4	10.23	
	2013	15	1683	149.6	8.89	120.9	28.7	10.65	
	2014	3	1683	166.7	9.90	130.7	36.0	12.13	

P stands for transition, Q stands for transversion. \* means highly significant difference comparing H9N2 isolates in 1999–2005 with separate periods ( $P<0.01$ ).

进化率存在较大的差异，1999–2005年间核苷酸年平均进化率只有 $0.74\times10^{-3}$ ，而在2006–2010和2011–2014两个阶段分别为 $5.22\times10^{-3}$ 和 $6.35\times10^{-3}$  ( $P<0.01$ )，显示出病毒在疫苗免疫压力下呈现变异速度加快的趋势。

**2.2.2 HA基因核苷酸进化率与年代的相关性：**以BJ94的HA基因核苷酸序列为参照序列，所有鸡源H9N2流行株与其比较，以其核苷酸进化率为纵坐标，以年代为横坐标，构建核苷酸进化率随年代

变化的散点图(图2)。结果表明：不同的年代其优势流行株不同。1994–1998年主要以BJ94-like毒株为主；1998–2008年主要以Y280-like为主；2005年后主要流行S2-like病毒，其中Y280-like是BJ94-like向S2-like过渡的毒株。同时可以看出，随着年代的变化，鸡源H9N2亚型AIV的变异率呈上升趋势，存在着核苷酸变异的积累。

2.3 HA基因氨基酸变异率和进化率的研究

HA基因共编码560个氨基酸，以BJ94为参

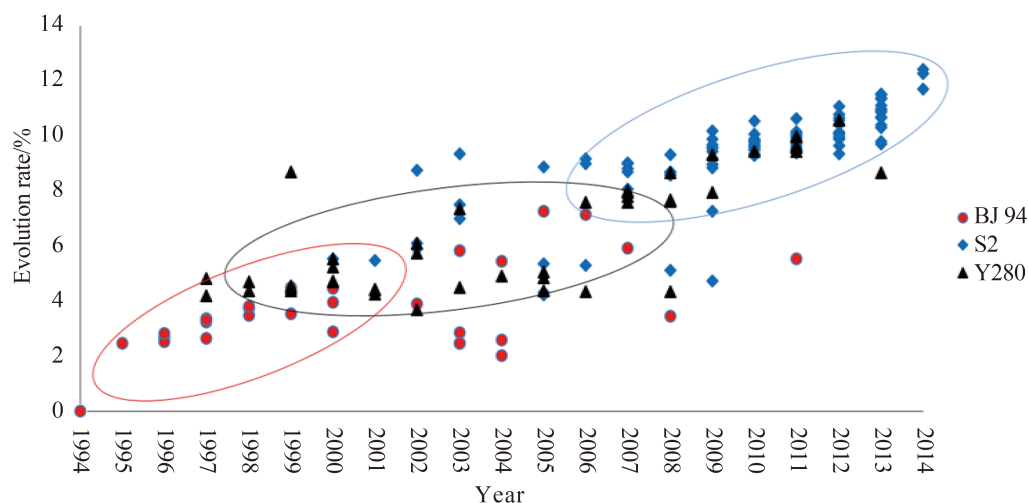


图 2. 176株不同谱系H9N2亚型禽流感病毒株HA基因的核苷酸进化率

Figure 2. HA gene evolution rate of 176 H9N2 subtype AIV strains in different lineages.

照, 不同年代的H9N2亚型AIV与其进行氨基酸比较, 其变异率和进化率见表2。比较显示: 1994–2014年间, H9N2流行株氨基酸的年均进化率为 $4.25 \times 10^{-3}$ 。氨基酸的变异趋势与上述核苷酸的变异趋势基本相同。未使用疫苗(1994–1998年)时, 其HA基因氨基酸年平均进化率为 $7.64 \times 10^{-3}$ ; 疫苗使用后, 初步分为3个阶段, 其中早期1999–2005年间H9N2流行株的年均氨基酸进化率为 $0.50 \times 10^{-3}$ , 中期2006–2010年间为 $3.70 \times 10^{-3}$ , 而后期2011–2014年间则为 $5.32 \times 10^{-3}$ 。显然, H9N2流行毒株在疫苗推广的不同时期其氨基酸变异速率存在明显的不同( $P < 0.01$ )。

## 2.4 HA基因氨基酸位点比较

选择不同谱系和年代的代表毒株, 对其氨基酸序列进行比对(表3)。比较显示, Y280-like与BJ94-like绝大部分位点相同, 而S2-like在216、253、282等8个位点出现特有的氨基酸替代。即便是S2-like内的毒株, 也存在多个位点的氨基酸替代, 如在127位出现了S→R的变异, 2009年前毒株多为丝氨酸(S), 2011年后的毒株均为精氨酸(R)。此外, 在H9N2的关键氨基酸位点如183、226、228等抗原决定位点也存在不同程度的变

异。值得关注的是, H9N2 HA基因氨基酸位点的遗传变异存在着明显的变异积累特点。

比较还发现: CK/SD/S2/2005株可能是Y280-like和S2-like的过渡毒株, 在63、183、318和320位点与Y280-like相同, 而在216、253、282等位点为S2-like特有的氨基酸替代; S2-like在234(受体结合位点)出现了谷氨酰胺(Q)→亮氨酸(L)的变异, 这表明, S2-like的病毒在分子水平上已具有和哺乳动物受体结合的能力, 是人类健康的潜在威胁。

## 3 讨论

病毒变异是病毒适应外界环境并维持生存的一种重要方式, 是生物进化的基本规律。病毒通常被认为是变异较高的微生物, 而流感病毒又是病毒变异的鼻祖<sup>[14]</sup>。一则归因于病毒本身复制频率较高, 在复制过程中很容易发生突变; 其次, 流感病毒属于RNA病毒, 其复制酶缺乏校正机制; 第三, 病毒在宿主体细胞内复制, 容易受到动物机体免疫系统的攻击和干扰, 病毒往往会通过变异来逃避宿主免疫系统(也可称为免疫压力)的攻击。

表2. 1994–2014年我国 176株H9N2亚型AIV毒株HA基因氨基酸进化率  
Table 2. HA amino acid substitution rate of 176 H9N2 AIV from 1994 to 2014 in China

Period	Year	No. of strains	Total aa sites	Substitution sites	Substitution rate/%	Average evolution frequency rate ( $\times 10^{-3}$ )
Unused Vaccines	1994	1	560	0	0	7.64*
	1995	1	560	14.0	2.50	
	1996	3	560	17.7	3.16	
	1997	6	560	18.0	3.21	
	1998	5	560	21.4	3.82	
Using Vaccines	1999	6	560	23.5	4.20	0.50
	2000	8	560	21.5	3.84	
	2001	4	560	22.3	3.98	
	2002	7	560	24.4	4.36	
	2003	9	560	26.6	4.75	
	2004	4	560	16.8	3.00	
	2005	8	560	25.5	4.55	
	2006	6	560	28.5	5.09	
	2007	10	560	29.9	5.34	
	2008	10	560	27.2	4.86	
	2009	14	560	36.8	6.57	
	2010	19	560	35.1	6.27	
	2011	21	560	36.0	6.42	
	2012	16	560	37.8	6.75	
	2013	15	560	39.5	7.05	
	2014	3	560	50.0	8.93	

\*: means highly significant difference comparing H9N2 isolates in 1999–2005 with separate periods ( $P<0.01$ ).

我国于1994年在广东省分离到H9N2亚型AIV<sup>[15]</sup>，1998年BJ94-like疫苗研制成功并投入使用，有效地控制了疫病最初的流行<sup>[16]</sup>。但自2005年以后，H9N2疫苗免疫保护率逐年下降<sup>[17]</sup>，特别是近几年H9N2发病率上升。本研究发现：与BJ94相比，2011–2014年间H9N2流行株的HA基因氨基酸年平均进化率为 $5.32 \times 10^{-3}$ ，变异明显加快，是1999–2005年( $0.50 \times 10^{-3}$ )的10.64倍，这表明H9N2流行株HA基因已在分子水平上发生了较大程度的变异<sup>[18]</sup>，进而导致了抗原性的改变，这与刘娟、张伟等的结论相吻合<sup>[10,19]</sup>。

1994–2014年间中国H9N2亚型禽流感病毒HA基因氨基酸年平均进化率为 $4.25 \times 10^{-3}$ ，远远高于欧美国家流感病毒HA基因的进化率 $1.9\text{--}3.0 \times 10^{-3}$ 个氨基酸/年<sup>[10,20]</sup>，二者的差别在于中国禽流感采用的是免疫预防策略，这暗示出疫苗免疫压力是中国H9N2变异速率增高的不可忽视的重要原因。进一步分析表明，使用疫苗前(1994–1998年)，H9N2流行株HA基因氨基酸平均进化率较高( $7.64 \times 10^{-3}$ )，该阶段为国内第一次H9N2亚型AIV大流行；在疫苗推广后的前6年(1999–2005)，年平均进化率只有 $0.50 \times 10^{-3}$ ，表明H9N2疫苗的推

表3. 不同谱系H9N2流行株与参考株HA基因氨基酸位点比较  
Table 3. Main difference of amino acids in HA gene among H9N2 isolates and reference strains

Virus name	Like	63	107	127	180	181	183	198	216	224	226	234	235	253	282	283	285	287	304	315	318	320	334	469	501
		S*	L	S	Q	E	N	V	E	L	G	L	Q	I	K	R	S	V	Q	S	I	I	S	V	Q
BJ94	BJ94	N	M	—	R	G	S	—	D	V	—	Q	—	V	N	S	N	V	H	P	V	V	A	M	K
CK/SD/6/1996		N	M	—	R	G	S	A	D	V	—	Q	—	V	N	S	N	V	—	P	V	V	A	M	K
CK/SH/F/1998		N	M	—	R	G	S	A	D	M	—	Q	—	—	N	S	N	V	H	P	V	V	A	M	K
CK/SD/BZ/2000		N	M	—	R	G	S	T	D	—	—	Q	—	V	K	S	N	V	H	P	V	V	A	M	K
CK/SD/JN5/2005		N	M	—	R	G	S	—	D	—	—	Q	—	V	—	S	N	V	H	P	V	V	A	M	K
DK/HK/Y280/1997	Y280	N	—	—	R	G	—	T	D	—	—	—	—	V	N	S	N	V	H	P	V	V	A	—	K
CK/SD/LW/1999		N	—	—	R	G	—	—	D	—	—	Q	—	V	N	S	N	V	H	P	V	V	A	—	K
CK/JS/YZ/2000		N	—	—	R	G	—	—	D	S	—	Q	—	V	N	S	N	V	H	P	I	V	A	—	K
CK/SD/BD/2008		N	—	—	R	G	—	T	D	—	—	Q	—	V	N	S	N	V	H	P	V	V	A	M	N
CK/SD/SIX/2010		N	—	—	R	G	—	—	D	—	—	—	—	V	—	N	N	V	—	P	V	V	A	M	N
CK/HB/CZ /2013		N	—	—	R	G	—	T	D	—	—	Q	—	V	N	S	N	V	—	P	V	V	A	M	N
CK/SD/S2/2005	S2	N	—	—	R	—	—	A	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	V	V	—	—	—
CK/SD/02/2008		—	—	—	—	G	—	A	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CK/SD/H/2009		—	—	R	—	—	—	A	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CK/SD/DY/2009		—	—	R	—	—	—	—	—	—	—	Q	M	—	—	K	—	—	—	—	—	—	—	M	—
CK/SD/YT01/2010		—	—	—	—	—	—	A	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CK/SD/YT07/2010		—	—	R	—	—	—	A	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CK/SD/YT01/2011		—	—	R	—	—	—	—	—	—	—	—	M	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CK/SD/905F1/2013		—	—	R	—	—	—	—	—	—	—	—	M	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CK/SD/HK01/2013		—	—	R	—	—	—	—	—	—	—	—	M	—	—	K	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CK/SD/FX/2013		—	—	R	—	—	—	—	—	—	—	Q	M	—	—	K	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CK/SD/LC03/2013		—	—	R	—	—	—	T	—	—	R	—	M	—	—	K	—	—	—	—	—	—	—	—	—

\*: the same amino acids of most H9N2 isolates at the same positions; —: the same amino acid.

广应用降低了排毒，减缓了病毒进化的速率。2005年以后，逐渐出现了逃避免疫的新的S2-like 流行谱系，2006–2010和2011–2014两个阶段，年平均进化率又明显加快，分别达到 $3.70\times10^{-3}$ 和 $5.32\times10^{-3}$ ，这表明疫苗毒株和流行毒株的不匹配是免疫失败的主要原因，这无疑对疫苗的有效防控提出了挑战。

下一步的工作方向：需加强对H9N2亚型

AIV的基因型和抗原性变异及其匹配进行系统跟踪研究，从而研制出针对性更强的疫苗，为H9N2亚型AIV的有效防控提供技术支撑。

参考文献

[ 1 ] Cox NJ, Subbarao K. Global epidemiology of influenza: past and present. *Annual Review of Medicine*, 2000, 51(1): 407-421.  
[ 2 ] Brown IH. Summary of avian influenza activity in Europe,

- Asia, and Africa, 2006-2009. *Avian Disease*, 2010, 54(Suppl): 187-193.
- [3] Peiris M, Yuen KY, Leung CW, Chan KH, Ip PLS, Lai RWM, Orr WK, Shortridge KF. Human infection with influenza H9N2. *The Lancet*, 1999, 354(9182): 916-917.
- [4] Liu HQ, Huang Y, Cheng J, Peng DX, Jia LJ, Zhang RK, Liu XF. Genetic mutations of the hemagglutinin gene of H9N2 subtype avian influenza viruses under the selective pressure of vaccination. *Chinese Journal of Virology*, 2002, 18(2): 149-154. (in Chinese)
- 刘红旗, 黄勇, 程坚, 彭大新, 贾立军, 张如宽, 刘秀梵. 在疫苗免疫选择压力下H9N2亚型禽流感病毒HA基因的遗传变异. *病毒学报*, 2002, 18(2): 149-154.
- [5] Zhao MJ, Liu QT, Sun Q, Zhang WJ, Zhao G, Gu M, Wang XQ, Hu SL, Liu XW, Liu XF. Full genome sequence of a natural reassortant H9N2 avian influenza virus isolated from domestic ducks in Jiangsu Province, China. *Genome Announcements*, 2013, 1(4): e00463-13.
- [6] Wang JY, Ren JJ, Liu WH, Tang P, Wu H, Wang CY, Chang CD, Liu HJ. Complete genome sequence of a new H9N2 avian influenza virus isolated in China. *Genome Announcements*, 2013, 1(3): e00261-13.
- [7] Srinivasan K, Raman R, Jayaraman A, Viswanathan K, Sasisekharan R. Quantitative characterization of glycan-receptor binding of H9N2 influenza a virus hemagglutinin. *PLoS One*, 2013, 8(4): e59550.
- [8] Post J, de Geus ED, Vervelde L, Cornelissen JB, Rebel JM. Systemic distribution of different low pathogenic avian influenza (LPAI) viruses in chicken. *Virology Journal*, 2013, 10(1): 23.
- [9] Yue H, Tang C, Yang FL, Li MY, Wu HY, Gong X. Genetic analysis and antigenic relationship of hemagglutinin genes of H9N2 avian influenza viruses in Mainland China. *Journal of Southwest University for Nationalities (Natural Science Edition)*, 2010, 36(2): 200-205. (in Chinese)
- 岳华, 汤承, 杨发龙, 李明义, 吴海燕, 宫晓. 中国大陆H9N2亚型禽流感病毒HA基因遗传分析及抗原相关性研究. *西南民族大学学报(自然科学版)*, 2010, 36(2): 200-205.
- [10] Liu J, Zhang W, Xu HY, Ma XL, Li J, Huang B, Qin ZM, Cui YS. Relationship between the neutralization index in chicken embryo and the homologies of HA gene of different H9N2 AIV isolates. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2013, 28(5): 23-28. (in Chinese)
- 刘娟, 张伟, 徐怀英, 马秀丽, 李建, 黄兵, 秦卓明, 崔言顺. H9N2禽流感不同毒株鸡胚交叉中和指数及其与HA基因氨基酸同源性相关的研究. *华北农学报*, 2013, 28(5): 23-28.
- [11] Du NX, Pan QQ, Zhang SF. The wrong idea of genetic distance and the exploration of the trace of virus evolution. *Virologica Sinica*, 2005, 20(3): 335-339. (in Chinese)
- 杜念兴, 潘芹芹, 张素芳. 遗传距离的错误观点和病毒进化踪迹的探索. *中国病毒学*, 2005, 20(3): 335-339.
- [12] Li HF, Lu YY, Yan JY, Xia ZZ, Zou Y, Xu CP, Feng Y. H and N gene variation rate of measles virus strain in China. *Virologica Sinica*, 2006, 21(6): 541-545. (in Chinese)
- 李海峰, 卢亦愚, 严菊英, 夏哲智, 邹艳, 徐昌平, 冯燕. 我国麻疹病毒流行株的H和N基因变异速率探讨. *中国病毒学*, 2006, 21(6): 541-545.
- [13] Guo YJ, Krauss S, Senne DA, Mo IP, Lo KS, Xiong XP, Norwood M, Shortridge KF, Webster RG, Guan Y. Characterization of the pathogenicity of members of the newly established H9N2 influenza virus lineages in Asia. *Virology*, 2000, 267(2): 279-288.
- [14] Stech J, Xiong X, Scholtissek C, Webster RG. Independence of evolutionary and mutational rates after transmission of avian influenza viruses to swine. *Journal of Virology*, 1999, 73(3): 1878-1884.
- [15] Chen BL, Zhang ZJ, Chen WB. Avian Influenza Virus I. Isolation and serological identification of avian influenza virus. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 1994, 20(10): 3-5. (in Chinese)
- 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.
- [16] Li CJ, Yu KZ, Tian GB, Yu DD, Liu LL, Jing B, Ping JH, Chen HL. Evolution of H9N2 influenza viruses from domestic poultry in Mainland China. *Virology*, 2005, 340(1): 70-83.
- [17] Wang ZL, Liu Y, Li JL, Chen SQ, Yang DG, Chai LN. Research on antigenic drift of H9N2 subtype avian influenza viruses. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2007, 27(3): 351-354. (in Chinese)
- 王泽霖, 刘岩, 李建丽, 陈少渠, 杨大光, 柴丽娜. H9N2亚型禽流感病毒抗原性变异的研究. *中国兽医学报*, 2007, 27(3): 351-354.
- [18] Liu HQ, Zhang PH, Liu XF, Liu WB, Jia LJ, Peng DX, Cheng J. Genetic mutations of hemagglutinin genes of H9N2 subtype influenza a viruses in the field in a five-year period. *Acta*



*Microbiologica Sinica*, 2003, 43(6): 706-711. (in Chinese)

刘红旗, 张评洪, 刘秀梵, 刘文博, 贾立军, 彭大新, 程坚. 封闭式饲养鸡场H9N2亚型禽流感病毒HA基因在5年内的遗传变异. 微生物学报, 2003, 43(6): 706-711.

- [19] Zhang W, Xu HY, Meng F, Ma XL, Liu X, Huang DH, Qin ZM, Liu JH, Zhao P. Evolution of H9N2 influenza viruses isolated in Shandong Province. *Science China (Life Sciences)*,

2015, 58(2): 212-214.

张伟, 徐怀英, 孟芳, 马秀丽, 刘霞, 黄迪海, 秦卓明, 刘金华, 赵鹏. 1999~2013年山东H9N2亚型禽流感病毒HA基因的演化和HI抗原性差异分析. 中国科学(生命科学), 2015, 45(2): 190-199.

- [20] Brown EG. Influenza virus genetics. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2000, 54(4): 196-209.

## Genetic evolution and substitution frequency of avian influenza virus HA gene in chicken H9N2 subtype in China in the last 20 years

Fang Meng<sup>1#</sup>, Huaiying Xu<sup>3#</sup>, Wei Zhang<sup>3</sup>, Dihai Huang<sup>2</sup>, Zaihui Zhang<sup>2</sup>, Xia Liu<sup>2</sup>, Weishan Chang<sup>1\*</sup>, Zhuoming Qin<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup> College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong Province, China

<sup>2</sup> Shandong Jianmu Biological Pharmaceutical Co, Ltd., Jinan 250100, Shandong Province, China

<sup>3</sup> Institute of Poultry Science, Shandong Academy of Agricultural Science, Jinan 250023, Shandong Province, China

**Abstract: [Objective]** Low pathogenic avian influenza (LPAI) H9N2 subtype virus has been prevalent in domestic poultry in China over two decades. This study was to determine the genetic evolution trend of H9N2 avian influenza virus (AIV) under immune pressure of vaccine. **[Methods]** H9 HA sequences of 40 isolates from the present study and 136 pandemic strains and 7 classical strains from China downloaded from GenBank, were genetically analyzed to determine evolution, molecular characteristic, and mutation frequency. **[Results]** Phylogenetic trees analysis suggested that H9N2 subtypes AIV could be clustered into 5 distinct lineages: G1-like, BJ94-like, Y280-like, S2-like and Americans lineages. Most H9N2 isolates in 2005–2014 belonged to S2-like sub-genotype, suggesting that this genotype was the dominate isolates in China. Further more, comparison based on the amino acid sequence showed that different lineages have their distinct characteristics, and significant accumulations of amino acid variation were also found. In addition, in comparison with reference Ck/BJ/1/1994 HA gene, average annual substitution rates of H9N2 pandemic strain nucleotide and amino acid were  $5.73 \times 10^{-3}$  and  $4.25 \times 10^{-3}$  from 1994 to 2014, respectively. Substitution rate during 2011–2014 were  $6.35 \times 10^{-3}$  and  $5.32 \times 10^{-3}$ , higher than that during the period of 2006–2010 ( $5.22 \times 10^{-3}$  and  $3.70 \times 10^{-3}$ ) and even much higher than that during the 1999–2005 ( $0.74 \times 10^{-3}$  and  $0.50 \times 10^{-3}$ ), when the vaccines were initially applied in the field. **[Conclusion]** Overall, these data indicate that the mismatch between H9N2 vaccine strains and pandemic strains drives the virus to quickly mutate.

**Keywords:** H9N2, AIV, HA gene, substitution, frequency

(本文责编: 李磊)

Supported by Natural Science Foundation of China (31372332), by the Ministry of Science and Technology of Agricultural Funds (SQ2013ECC600059) and by Project for Science Grants and Technology Development of Shandong Provincial and Jinan Program (2009GG10009006, 2012CG92)

\*Corresponding author. E-mail: Zhuomin Qin, qinzm1997@163.com; Weishan Chang, wschang@sdaa.edu.cn

#These authors contributed equally to this work.

Received: 9 May 2015; Revised: 20 June 2015; Published online: 5 July 2015