

分类号：
学 号：20232113041

密 级：
单位代码：10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



H9N2 亚型禽流感病毒流行病学调查及其致血凝活性丧失因素的研究

学 位 申 请 人	闫 奥 阳
指 导 教 师	张乾义研究员 王震副教授
申 请 学 位 类 别	专业学位硕士
专 业 名 称	兽医
研 究 领 域	不区分研究方向
所 在 学 院	动物科技学院

中国·新疆·石河子
2026年6月

分类号：
学 号：20232113041

密 级：
单位代码：10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



H9N2 亚型禽流感病毒流行病学调查及其致血凝活性丧失因素的研究

学 位 申 请 人	闫 奥 阳
指 导 教 师	张 乾 义 研 究 员 王 震 副 教 授
申 请 学 位 类 别	专 业 学 位 硕 士
专 业 名 称	兽 医
研 究 领 域	不 区 分 研 究 方 向
所 在 学 院	动 物 科 技 学 院

中 国 · 新 疆 · 石 河 子

2026 年 6 月

**Epidemiological Investigation of H9N2 Avian Influenza Virus and
Analysis of Factors Associated with the Loss of Hemagglutination
Activity**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Doctor of Agriculture

By

Yan ao-yang

(No specialization)

Dissertation Supervisor: Prof. Zang Qian-yi

June, 2026

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所呈交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：闫奥刚

时间：2026年5月22日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：闫奥刚

时间：2026年5月22日

导师签名：张乾义

时间：2026年5月22日

摘要

目的：本研究旨在调查我国部分地区 H9N2 亚型禽流感病毒的流行现状，通过解析其遗传进化与分子特征，以期掌握近年来 H9N2 亚型禽流感病毒的遗传演化规律，并探讨致部分 H9N2 亚型禽流感病毒血凝活性丧失的因素，为禽流感病毒风险评估和防控策略优化提供理论依据。

方法：2022~2023 年对山东、江苏和广东等地区养殖场采集的 310 份拭子样品进行病毒分离。对分离获得的 H9N2 亚型禽流感病毒进行全基因组测序，构建反向遗传 8 质粒拯救系统，通过基因重组及定点突变等方法，系统分析导致 H9N2 亚型禽流感病毒血凝活性丧失的因素，并通过测定病毒在 MDCK 细胞上的增殖能力和小鼠致病性，进一步探究这些因素对病毒生物学特性的影响。

结果：遗传进化分析显示，分离的 11 株 H9N2 亚型禽流感病毒 HA 基因均划归至当前流行的 h9.4.2.5 亚谱系，其内部基因则呈现与 H3、H6 和 H9 亚型禽流感病毒多元重组的特征。分子特征分析发现，11 株病毒的 HA 蛋白裂解位点氨基酸序列均为 PSRSSR↓GLF，符合低致病性禽流感病毒的特征。大多数毒株 HA 蛋白具有 HA-Q226L、H183N 和 A190V/T（H3 编号）等的突变，这些突变使病毒更易于与哺乳动物受体相结合，11 株病毒的 PB2 蛋白出现 A588V/I 的适应性突变。抗原性差异分析结果显示，位于 h9.4.2.5/group1 的 JM14 和 h9.4.2.5/group2 的 FS22 存在抗原性差异。基于反向遗传技术，拯救重组病毒和 HA 蛋白关键氨基酸突变病毒，系统分析重组与突变病毒对 H9N2 亚型禽流感病毒血凝活性、病毒复制能力及跨宿主传播能力的影响。以丧失血凝活性的 A/goose/Shandong/SDA5/2022(H9N2)（AV1572）为亲本毒株，拯救 HA 蛋白受体结合区域关键氨基酸突变毒株。结果表明，HA 蛋白突变是导致 H9N2 亚型禽流感病毒对鸡红细胞血凝性丧失的关键蛋白。进一步研究发现，HA 蛋白受体结合区域关键氨基酸 N149K、T150A、K205R 和 L234Q（H9 编号）为影响毒株对鸡红细胞血凝活性的具体分子因素，且与亲本毒株相比，T150A、K205R 和 L234Q 突变可使 H9N2 亚型禽流感病毒在 MDCK 细胞中的复制能力增强。毒株对 BALB/c 小鼠的致病性结果发现，不同位点突变毒株对小鼠的致病性存在差异，与亲本毒株相比，rAV1572HA-N149K、rAV1572HA-T150A、rAV1572HA-L234Q 病毒在小鼠体内肺脏中的复制水平明显升高（ $P < 0.05$ ）。表明 N149K、T150A、L234Q 的突变不仅影响毒株对鸡红细胞的血凝活性还对哺乳动物的致病力增强。

结论：我国山东、江苏和广东等地区流行的 H9N2 亚型禽流感病毒虽仍以 h9.4.2.5 亚谱系为主，但同一谱系不同 group 间的病毒出现抗原性差异。研究发现，H9N2 亚型禽流感病毒 HA 蛋白的受体结合区域 N149K、T150A、K205R 和 L234Q 是导致毒株丧失对鸡红细胞血凝活性的关键分子因素，且 N149K、T150A、L234Q 位点突变可增强病毒对哺乳动物的致病力。本研究从分子流行病学和功能机制层面，为 H9N2 亚型禽流感病毒的持续监测、疫苗株更新及风险评估提供了重要实验依据。相关关键突变位点可作为分子监测标志，用于早期识别具有潜在跨种传播能力的高风险毒株，对动物疫病防控及公共卫生安全具有重要意义。同时，本研究仍存在一定局限性。未来研究可进一步扩大监测范围，结合结构解析与受体结合实验，深入揭示关键突变介导的分子适应机制。同时，通过

禽类及哺乳动物模型评估其传播能力与公共卫生风险，为禽流感病毒的精准防控和风险预警体系构建提供更全面的科学依据。

关键词：H9N2 亚型禽流感病毒；流行病学；血凝活性；致病力；跨宿主传播

Abstract

Objective: This study aimed to investigate the current epidemiological status of H9N2 subtype avian influenza viruses (AIVs) circulating in several regions of China. By analyzing their genetic evolution and molecular characteristics, this study sought to elucidate the recent evolutionary patterns of H9N2 AIVs and explore the factors responsible for the loss of hemagglutinating activity in certain H9N2 strains, thereby providing a theoretical basis for risk assessment and optimization of avian influenza prevention and control strategies.

Methods: A total of 310 swab samples were collected from poultry farms in Shandong, Jiangsu, and Guangdong provinces between 2022 and 2023 for virus isolation. The isolated H9N2 AIVs were subjected to whole-genome sequencing. An eight-plasmid reverse genetics rescue system was constructed, and gene recombination together with site-directed mutagenesis was performed to systematically analyze the factors leading to the loss of hemagglutinating activity in H9N2 AIVs. In addition, viral replication in MDCK cells and pathogenicity in mice were evaluated to further investigate the effects of these factors on the biological characteristics of the virus.

Results: Phylogenetic analysis showed that the HA genes of the 11 isolated H9N2 AIV strains all belonged to the currently prevalent h9.4.2.5 sublineage, while their internal genes exhibited multiple reassortment events with H3, H6, and H9 subtype AIVs. Molecular characterization revealed that the HA cleavage site sequence of all 11 strains was PSRSSR↓GLF, which is consistent with the characteristics of low pathogenic avian influenza viruses. Most strains possessed mutations in the HA protein, including Q226L, H183N, and A190V/T (H3 numbering), which increase binding affinity to mammalian-type receptors. In addition, adaptive mutations A588V/I were detected in the PB2 protein. Antigenic analysis revealed antigenic differences between JM14 (h9.4.2.5/group1) and FS22 (h9.4.2.5/group2).

Using reverse genetics, recombinant viruses and HA key amino acid mutant viruses were generated to systematically analyze the effects of reassortment and mutations on hemagglutinating activity, viral replication capacity, and cross-host transmission potential of H9N2 AIVs. Using A/goose/Shandong/SDA5/2022 (H9N2) (AV1572), which had lost hemagglutinating activity, as the parental strain, mutants with key amino acid substitutions in the receptor-binding region of the HA protein were rescued. The results demonstrated that the HA protein is the key determinant responsible for the loss of hemagglutinating activity with chicken red blood cells. Further analysis revealed that amino acid substitutions N149K, T150A, K205R, and L234Q (H9 numbering) in the receptor-binding region of HA were the specific molecular determinants affecting hemagglutinating activity. Compared with the parental strain,

the T150A, K205R, and L234Q mutations enhanced viral replication in MDCK cells. Pathogenicity analysis in BALB/c mice showed that different mutants exhibited varying levels of pathogenicity. Compared with the parental virus, rAV1572HA-N149K, rAV1572HA-T150A, and rAV1572HA-L234Q showed significantly higher replication levels in the lungs and nasal turbinates of mice ($P < 0.05$). These findings indicate that the N149K, T150A, and L234Q mutations not only affect hemagglutinating activity with chicken red blood cells but also enhance pathogenicity in mammals.

Conclusion: H9N2 AIVs circulating in regions such as Shandong, Jiangsu, and Guangdong in China remain predominantly within the h9.4.2.5 sublineage; however, antigenic differences exist among viruses from different groups within the same lineage. This study demonstrates that amino acid substitutions N149K, T150A, K205R, and L234Q in the receptor-binding region of the HA protein are key molecular determinants responsible for the loss of hemagglutinating activity with chicken red blood cells. Moreover, mutations at N149K, T150A, and L234Q enhance viral pathogenicity in mammals. The results of this study show that the key mutation sites can be used as molecular monitoring markers to identify high-risk strains with cross-host transmission potential, and the difference in antigenicity provides a basis for the dynamic update of vaccine strains. There are also some limitations in the study, including limited sample area coverage and insufficient representativeness of animal models, and the receptor binding mechanism of related mutations still needs to be further elucidated. Future research can further expand the scope of monitoring, combined with structural analysis and receptor binding experiments, to further reveal the molecular adaptation mechanism mediated by key mutations ; at the same time, the avian and mammalian models were used to evaluate their transmission capacity and public health risks, providing a more comprehensive scientific basis for the accurate prevention and control of avian influenza virus and the construction of risk early warning system.

Key words: H9N2 avian influenza virus; epidemiology; hemagglutination activity; pathogenicity; interspecies transmission

中英文对照缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
AIV	Avian influenza virus	禽流感病毒
DEPC	Diethyl pyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
PBS	Phosphate buffered solution	磷酸盐缓冲溶液
IVPI	Intravenous pathogenicity index	鸡静脉致病指数
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
RT-PCR	Reverse transcriptase-PCR	反转录 PCR
RBD	Receptor Binding Domain	受体结合区域
HA	Hemagglutinin	血凝素
NA	Neuraminidase	神经氨酸酶
NS	Nonstructural protein	非结构蛋白
NP	Nucleoprotein	核蛋白
M	Matrix protein	基质蛋白
PA	Polymerase acidic protein	酸性聚合酶
PB1	Polymerase basic protein 1	碱性聚合酶 1
PB2	Polymerase basic protein 2	碱性聚合酶 2
LB	Lysogeny broth	溶菌肉汤
IAV	Influenza A virus	甲型流感病毒
NCBI	National Center for Biotechnology Information	(美国) 国家生物技术信息中心
RNA	Ribonucleic acid	核糖核酸
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	本地序列基本搜索工具
cDNA	Complementary DNA	互补 DNA
RNP	Ribonucleoprotein	核糖核蛋白
LPAIV	Low Pathogenic Avian Influenza virus	低致病性禽流感病毒
HPAIV	High Pathogenic Avian Influenza virus	高致病性禽流感病毒
IFN	Interferon	干扰素
MDCK	Madin-Darby canine kidney cells	犬肾细胞
SPF	Specific pathogen-free	无特定病原体的
RT-PCR	Reverse transcriptase-PCR	反转录 PCR
TCID ₅₀	50 percent tissue culture infective dose	半数组织培养感染量
EID ₅₀	median embryo infective dose	鸡胚半数感染量
ELD ₅₀	median embryo lethal dose	鸡胚半数致死量
WHO	world health organization	世界卫生组织
mL	milliliter	毫升
μL	Micro liter	微升
g	gram	克
h	hour	小时
min	minute	分钟
s	Second	秒

目录

摘要.....	VII
Abstract	III
中英文对照缩略词表.....	V
目录.....	VI
第 1 章 文献综述.....	1
HA 基因变异对 H9N2 亚型禽流感病毒生物学特性的影响	1
1.1 禽流感病毒 HA 蛋白的结构与功能	2
1.1.1 HA 蛋白一级结构	2
1.1.2 HA 的空间结构	3
1.2 HA 基因变异对病毒生物学特性的影响	4
1.2.1 HA 基因变异对传播性的影响	4
1.2.2 HA 基因变异对致病性的影响	4
1.2.3 HA 基因变异对抗原性的影响	6
1.2.4 HA 基因变异对疫苗和抗病毒药物研发的影响	6
1.3 结语与展望	9
1.4 研究目与意义	10
1.5 技术路线	11
第 2 章 我国部分地区 H9N2 亚型禽流感病毒流行病学调查	12
2.1 材料	12
2.1.1 实验样品	12
2.1.2 鸡胚	12
2.1.3 实验试剂	13
2.1.4 相关试剂配置	13
2.1.5 主要分子生物学软件	13
2.1.6 主要仪器	13
2.2 方法	14
2.2.1 引物的设计与合成	14
2.2.2 样品的采集及处理	15
2.2.3 病毒分离与鉴定	15
2.2.4 病毒的纯化	16

2.2.5 全基因 PCR 扩增	16
2.2.6 产物回收与纯化	18
2.2.7 目的片段与载体连接及序列测定	18
2.2.8 遗传进化与分子特征分析	19
2.2.9 抗原性差异分析	19
2.3 结果	19
2.3.1 样品采集	19
2.3.2 病毒全基因扩增	20
2.3.3 全基因组测序结果及相应序列拼接	21
2.3.4 系统发育分析	21
2.3.5 分子特征分析	31
2.3.6 抗原性差异分析	36
2.4 讨论	36
2.5 结论	38
第 3 章 H9N2 亚型禽流感病毒血凝活性丧失因素的研究	39
3.1 材料	39
3.1.1 毒株、载体、菌株与细胞	39
3.1.2 鸡胚和实验动物	40
3.1.3 主要试剂	40
3.1.4 实验仪器	40
3.2 方法	40
3.2.1 反向遗传操作系统的构建	40
3.2.2 不同重组和突变对病毒生物学特性的影响	45
3.3 结果	46
3.3.1 野生亲本病毒各基因片段全长的扩增	46
3.3.2 重组质粒鉴定结果	47
3.3.3 病毒拯救与鉴定结果	47
3.3.4 不同重组和突变对病毒生物学特性的影响	47
3.4 讨论	53
3.5 结论	56
全文总结	57
参考文献	58
附录 A	67
致谢	76

第1章 文献综述

HA 基因变异对 H9N2 亚型禽流感病毒生物学特性的影响

禽流感 (Avian Influenza, AI) 是一种主要危害家禽的高度接触性传染性呼吸道疾病, 其病原体为正粘病毒科的 A 型流感病毒^[1]。依据病毒表面血凝素 (HA) 和神经氨酸酶 (NA) 抗原特性的差异, 禽流感病毒可进一步划分为不同的 HA 和 NA 亚型^[1]。目前已在鸟类宿主中鉴定出 16 种 HA 亚型 (H1–H16) 和 9 种 NA 亚型 (N1–N9), 此外, H17N10 和 H18N11 亚型在蝙蝠中被发现^[2]。根据致病性差异, 禽流感病毒 (Avian influenza virus, AIV) 通常被分为高致病性禽流感病毒 (High pathogenic avian influenza virus, HPAIV) 和低致病性禽流感病毒 (Low pathogenic avian influenza virus, LPAIV)^[3]。HPAIV 主要见于 H5 和 H7 亚型^[3], 感染后可引起家禽出现严重的全身症状, 具有传播迅速、流行范围广和致死率高等特点, 常造成重大经济损失。LPAIV 包含多个亚型, 且不同亚型 AIV 在家禽中的持续流行并产生多种新型基因重配病毒, 对养殖业造成巨大经济损失^[4]。

H9N2 亚型 AIV 是 LPAIV 的重要代表亚型之一, 于 1966 年在美国威斯康星州首次被发现, 我国则于 1994 年在广东首次报道^[5-7]。H9N2 亚型 AIV 可通过飞沫、气溶胶^[8]、粪-口传播以及直接接触等^[9]多种途径传播, 多样化的传播模式提升了其环境适应性和扩散速度, 从而促进了病毒在全球范围内的传播^[10]。该病毒的宿主谱广泛, 不仅可感染鸡、鸭、火鸡、鸽子、鹌鹑、鸚鵡等多种禽类^[11], 还可跨物种感染狗、猪、及水貂等哺乳动物^[12-14]。值得注意的是, 流感病毒在多样化宿主间的传播过程中, 其抗原性容易发生变异。抗原性的变异进而使流感病毒获得逃避宿主免疫应答的能力, 为病毒的持续流行提供了有利条件。从临床危害来看, H9N2 亚型 AIV 感染家禽后, 通常引发轻至中度呼吸道症状及产蛋量下降; 但该病毒具有隐匿性强、宿主适应性高及持续流行的特点, 导致传统防控手段难以将其彻底根除。H9N2 亚型 AIV 若与其他病原体 (如沙门氏菌^[15]、禽致病性大肠杆菌^[16]、传染性支气管炎病毒^[17]、传染性喉气管炎病毒^[18]等) 发生混合感染, 还会进一步加剧患病家禽的临床症状、提高死亡率。值得注意的是, H9N2 亚型 AIV 常作为内基因供体参与其他亚型禽流感病毒 (如 H3N8、H5N1、H7N9 等^[19-21]) 的基因重配, 部分重组毒株表现出较强的宿主适应性和跨物种传播潜力, 对公共卫生安全构成潜在风险^[22]。