

中国 2000-2004 年鸡传染性支气管炎病毒地方分离株 核蛋白基因的遗传变异分析*

张庆霞, 韩宗玺, 邵昱昊, 陈建飞, 荣骏弓, 刘胜旺**, 孔宪刚

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室, 禽传染病研究室, 黑龙江哈尔滨 150001)

Genetic Variation of Nucleocapsid Genes of Infectious Bronchitis

Viruses Isolated in China from 2000 to 2004

ZHANG Qing-xia, HAN Zong-xi, SHAO Yu-hao, CHEN Jian-fei, RONG Jun-gong,
LIU Sheng-wang**, KONG Xian-gang

(Division of Avian Infectious Diseases, National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China)

Abstract: Nucleocapsid (N) protein genes of 13 *Infectious bronchitis virus* (IBV) strains isolated from 9 provinces in China between 2000 and 2004 were sequenced and compared to 42 IBV reference strains. The results showed that all of the N genes of the 13 isolates were composed of 1230 nucleotides, but point mutations were common. A phylogenetic tree based on amino acid sequences of N genes from the 55 IBV strains showed that these strains were classified into nine distinct clusters. 17 IBV isolates and 5 vaccines of America, Japan, Holland and China formed cluster I to cluster III. CK/CH/LHN/00I might be a re-isolation of vaccine strains. Recombinations were observed in the isolates of CK/CH/LSD/03I and CK/CH/LDL/01I. However, IBVs isolated mainly in China between 1995 and 2004 were grouped into cluster VI to cluster VIII. The deduced amino acid sequences identities of N genes among IBVs of the three clusters ranged from 88.3% to 100%, and 62.3% to 95.1% between these IBVs and those of other clusters. Hence, it was suggested that this genotype may have existed for a long time in China and have occurred with higher number of mutations. Two Korean isolates shared higher identity with Chinese IBV isolates of cluster VI. Taken together, these results showed that most of IBVs isolated in China formed distinct phylogenetic groups and had a close relationship with Korean isolates compared the foreign strains. On the other hand, recombination of IBV may have occurred at a rather high frequency in recent years in China especially between vaccine strains and field strains in the natural condition.

Key words: *Infectious bronchitis virus*; Nucleocapsid gene; Genetic variation

摘要: 对 2000-2004 年从中国 9 个省市分离到的 13 株 IBV 的核蛋白基因片段进行序列测定及分析的结果表明, 13 株 IBV 分离株核蛋白基因均含有一个长 1230bp 的 ORF, 但存在基因突变现象。与 GenBank 中的 42 株参考毒株核蛋白基因序列进行比较和分析, 系统进化关系显示 55 株 IBV 毒株分属于 9 个群。第 I-III 群主要包括美国、日本、荷兰等国家以及中国的部分 IBV 分离株和疫苗株。其中本研究中的 CK/CH/LHN/00I 可能为一株分离的疫苗毒, CK/CH/LSD/03I、CK/CH/LDL/01I 可能为重组毒。而中国近十年来分离的 IBV 毒株主要分布在第 VI-VIII 群中, 此 3 群内 IBV 毒株之间 N 蛋白推导氨基酸同源率为 88.3%~100%, 与其他各群之间同源率为 62.3%~95.1%。因此, 此基因型的 IBV 毒株可能在中国已有较长时间的的存在且发生了较大幅度的变异。其中第 VI 群中两株韩国分离株与中国 IBV 分离株具有较近的亲缘关系。以上结果表明, 中国大多数 IBV 分离株在 N

收稿日期: 2006-05-29, 修回日期: 2006-08-29

* 基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划重大项目: 重大动物疾病病原遗传变异与分子进化规律研究。

作者简介: 张庆霞 (1980-), 女, 山东聊城籍, 在读硕士研究生, 主要从事动物病毒分子生物学与分子免疫学研究。

** 通讯作者: 刘胜旺 (1969-), 男, 研究员。Corresponding author: Tel: 0451-85935065, E-mail: swliu@hvri.ac.cn.

基因进化关系上较为独立,与国外毒株相比,和韩国毒株进化关系密切。此外,中国 IBV 毒株基因重组现象更加普遍,尤其是疫苗毒和野毒之间的重组。

关键词: 传染性支气管炎病毒;核蛋白基因;遗传变异

中图分类号: S831.7

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)06-0575-06

鸡传染性支气管炎 (Infectious bronchitis, IB) 是由传染性支气管炎病毒 (*Infectious bronchitis virus*, IBV) 引起的一种急性高度接触性传染病。该病首先侵害鸡的呼吸系统,感染鸡表现气管啰音、咳嗽、打喷嚏等。有些毒株还可能侵害鸡的消化系统、泌尿生殖系统,造成感染鸡发生肾炎或产蛋母鸡的产蛋量下降以及蛋品质的下降,给养禽业造成严重的经济损失,成为影响世界各国养禽业发展的重要疾病之一^[1]。

IBV为Nido病毒目 (*Nidovirales*) 冠状病毒科 (*Coronaviridae*) 冠状病毒属 (*Coronavirus*) 第三抗原群的典型代表种^[2]。其基因组为不分节段的单股正链RNA,全长约27.6kb^[3]。病毒在感染细胞内产生6种亚基因组mRNA₍₁₋₆₎,其中mRNA₂、mRNA_{3c}、mRNA₄、mRNA₆分别编码IBV 4个结构蛋白:纤突蛋白 (spike, S)、小膜蛋白 (small envelope, E)、膜蛋白 (membrane, M) 和核蛋白 (nucleocapsid, N)^[1]。IBV N蛋白是一种磷酸化的非糖基化蛋白质,N蛋白可与病毒RNA结合,构成螺旋状核衣壳的基础^[4]。磷酸化可能加强了N蛋白与RNA结合的紧密程度^[5,6]。N蛋白是诱导体液免疫应答,尤其是细胞免疫应答的重要免疫原蛋白^[7,8]。以往的研究认为IBV N基因在进化上是比较保守的^[9,10],但近年来的报道表明N基因也存在缺失和插入现象,其中有些变异可能存在于N蛋白某些抗原表位及功能区域^[5,11]。因此,N基因分子特征的研究在IBV基因组的遗传衍化及其分子流行病学的研究中具有重要的作用^[11-15]。本课题组对1995-1999年我国部分IBV现地分离株N基因的分子特征进行了研究,发现其N基因存在基因突变和基因重组现象^[16]。为了更加全面的了解近年来我国IBV基因组的遗传变异情况,本研究进一步对2000-2004年我国部分IBV现地分离株N基因的分子特征进行了研究,并与其他国家和地区IBV毒株N基因序列进行了比较和分析,现将结果报告如下。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

13株国内IBV现地分离株由本课题组2000-2004年从我国黑龙江、辽宁、山东、广东等9个省

市分离或收集到,其来源及背景情况见表1。9~11日龄SPF鸡胚由哈尔滨兽医研究所实验动物中心提供。参照GenBank中IBV毒株N基因保守序列,设计1对引物N(+)和N(-)^[17],由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。受体菌TG1由本实验室保存。TRIzol Reagent RNA提取试剂盒、鼠源反转录酶SuperScriptTM II RT与RNasin购自Invitrogen公司。克隆载体pMD18-T、ExTaqDNA聚合酶、DNA Marker (DL 2,000)均购自宝生物工程(大连)有限公司。DNA片段快速纯化/回收试剂盒购自上海生工生物工程技术服务有限公司。其它试剂均为分析纯。

1.2 病毒的增殖与RNA的提取

将收集到的13株IBV分离株分别尿囊腔接种9~11日龄SPF鸡胚,37℃培养72h后(弃去24h内死亡的鸡胚),无菌收集尿囊液。按TRIzol试剂盒说明并参照文献^[18]方法提取病毒基因组RNA。

1.3 N基因的扩增、克隆和鉴定

应用RT-PCR按文献^[18]方法分别扩增13株IBV分离株N基因。将回收后的PCR产物与pMD18-T载体进行连接反应后,转入大肠杆菌TG1感受态细胞。碱裂解法提取质粒,经PCR初步鉴定,每个毒株随机选取3个阳性质粒委托上海生工生物工程技术服务有限公司进行核苷酸序列测定。

1.4 N基因核苷酸及其推导氨基酸序列的比较分析

首先利用Gene Runner和DNAMAN软件,参照GenBank中IBV毒株N基因序列,确定13株IBV分离株N基因开放阅读框(open reading frame, ORF)序列,然后将其和美国、荷兰、澳大利亚及我国相邻国家和地区(台湾、日本、韩国)的42株IBV参考毒株(见表2)的N基因核苷酸序列及推导的氨基酸序列进行比较分析,使用MegAlign (DNASar)中的Jotun Hein Method方法在N基因氨基酸水平上绘制系统进化树。

2 结 果

2.1 13株IBV分离株N基因的克隆及鉴定

经RT-PCR方法分别扩增到了与预期相符的大小约1.6Kb的片段。将这些PCR产物分别克隆到pMD18-T载体,经PCR扩增鉴定,筛选到了含有目的基因片断的重组阳性质粒。

表 1 13 株国内 IBV 现地分离株的背景

Table 1 Backgrounds of thirteen IBV isolates isolated in China between 2000 and 2004

IBV isolates	Year ^a	Province ^b	Production type	Organs ^c used for virus isolation	Accession number
CK/CH/LHN/001	2000	Henan	Broiler	Preventriculus	DQ352147
CK/CH/LDL/011	2001	Liaoning	Layer hen	Oviduct	DQ352148
CK/CH/LXJ/021	2002	Xinjiang	Layer hen	Kidney	DQ352150
CK/CH/LHLJ/021	2002	Heilongjiang	Layer hen	Kidney	DQ352149
CK/CH/LSHH/031	2003	Shanghai	Broiler	Kidney	AY839137
CK/CH/LAH/031	2003	Anhui	Layer hen	Kidney	DQ494213
CK/CH/LSD/031	2003	Shandong	Layer hen	Kidney	DQ352151
CK/CH/LJL/041	2004	Jilin	Layer hen	Preventriculus	AY839143
CK/CH/LDL/04II	2004	Liaoning	Broiler	Kidney	DQ352156
CK/CH/LGD/04II	2004	Guangdong	Layer hen	Kidney	DQ352154
CK/CH/LGD/04III	2004	Guangdong	Layer hen	Kidney	DQ352155
CK/CH/LHLJ/04V	2004	Heilongjiang	Broiler	Kidney	DQ352153
CK/CH/LHLJ/04XI	2004	Heilongjiang	Layer hen	Kidney	DQ352152

^a Year when the viruses were isolated; ^b Province where the viruses were isolated; ^c Kidney=Swollen kidney, Preventriculus=Swollen preventriculus, Oviduct=Atrophic oviduct.

表 2 参考毒株及其 GenBank 登录号

Table 2 Reference strains and the GenBank accession numbers

Strains	Origin	Accession number	Strains	Origin	Accession number	Strains	Origin	Accession number
CK/CH/LSC/951	Sichuan	DQ287915	J	Zhejiang	DQ084440	D1466	Holland	AF203006
CK/CH/LTJ/951	Tianjin	DQ287917	QXIBV	Shandong	AF199412	Vic S	Australia	U52594
CK/CH/LHB/961	Hebei	DQ287912	BJ	Beijing	AY319651	N1/88	Australia	U52599
CK/CH/LLN/981	Liaoning	DQ287914	H120	Vaccine strain	AY028296	Q3/88	Australia	U52600
CK/CH/LDL/981	Liaoning	DQ287910	H52	Vaccine strain	AF352310	V18/91	Australia	U52601
CK/CH/LSC/991	Sichuan	DQ287916	Jilin	Vaccine strain	AY839145	KB8523	Japan	M21515
CK/CH/LHLJ/991	Heilongjiang	AY842864	HK	Vaccine strain	AY761141	JP8147	Japan	AY363966
CK/CH/LAH/991	Anhui	DQ287909	JAAS	Vaccine strain	AY839138	JP9758	Japan	AY363968
LX4	Xinjiang	AY338732	D41	Vaccine strain	AY846837	K069-01	Korea	AY790344
CK/CH/LDL/971	Liaoning	Reference	TW97-4	China Taiwan	AY363965	K281-01	Korea	AY790345
tl/CH/LDT3/03	Guangdong	AY702975	Beaudette	USA	NC_001451	K210-02	Korea	AY790350
pf/CH/LKQ3/03	Guangdong	AY702085	Gray	USA	M85245	K203-02	Korea	AY790351
N	Zhejiang	AF352309	CU-T2	USA	U49858	K1255-03	Korea	AY790353
ZJ971	Zhejiang	AF352308	Conn	USA	AY942746	K514-03	Korea	AY790354

2.2 13 株 IBV 分离株 N 基因序列测定及分析

通过序列测定,得到了 13 株 IBV 毒株的核蛋白基因的序列,其 GenBank 登录号见表 1。该序列中包含 N 基因完整的 ORF,长度均为 1230bp,分别编码全长为 409 个氨基酸残基组成的多肽。它们均含有 30-34 个丝氨酸残基,在 165-190 位为丝氨酸聚居区,其中 9 个丝氨酸在位置上比较保守。13 株 IBV 分离株之间 N 基因核苷酸序列的同源性为 86.3%(CK/CH/LDL/011 与 CK/CH/L

GD/04III)~99.9%(CK/CH/LJL/041 与 CK/CH/LHLJ/04XI),推导氨基酸序列的同源性为 89.8%(CK/CH/LDL/011 与 CK/CH/LSHH/031)~100%(CK/CH/LJL/041、CK/CH/LHLJ/04V 与 CK/CH/LHLJ/04XI)。以我国常用疫苗株 H120 为参照,对 13 株 IBV 分离株 N 基因核苷酸序列进行分析,发现无碱基的缺失和插入现象,但存在广泛的基因突变(点突变),13 株 IBV 分离株 N 蛋白推导氨基酸的主要差异见表 3。

表 3 13 株 IBV 分离株与 H120 株 N 蛋白氨基酸主要差异比较

Table 3 Main differences of amino acids of N gene between our isolates and H120 strain

Strains	Position (AA)																									
	10	12	16	46	48	64	84	86	117	123	160	183	194	212	237	269	299	307	342	343	350	356	360	366		
H120	T	A	V	S	P	L	K	S	S	T	I	D	D	S	K	I	R	S	P	N	T	R	Q	S		
CK/CH/LHN/001	T	A	V	S	P	T	R	P	A	V	L	D	D	S	K	T	R	P	S	S	T	R	P	S		
CK/CH/LDL/011	T	A	V	A	P	T	R	P	A	V	I	E	D	S	K	T	R	S	P	N	T	R	Q	S		
CK/CH/LXJ/021	S	S	I	S	P	S	R	P	A	V	L	D	E	T	R	T	K	P	P	S	A	K	P	P		
CK/CH/LHLJ/021	S	S	I	A	A	N	R	P	A	V	L	E	E	T	R	T	K	P	P	S	A	K	P	P		
CK/CH/LSHH/031	S	S	I	A	A	N	R	P	A	V	L	D	E	T	R	T	T	S	S	S	A	K	P	P		
CK/CH/LAH/031	S	S	I	S	P	S	R	P	A	V	L	D	E	T	R	T	K	P	P	S	A	R	P	P		
CK/CH/LSD/031	T	A	V	S	P	P	R	P	A	T	L	E	D	S	K	I	K	S	S	S	G	R	P	P		
CK/CH/LJL/041	S	S	I	A	A	N	R	P	A	V	L	E	D	T	R	T	K	P	S	S	G	K	Q	P		
CK/CH/LHLJ/04V	S	S	I	A	A	N	R	P	A	V	L	E	D	T	R	T	K	P	S	S	G	K	Q	P		
CK/CH/LHLJ/04XI	S	S	I	A	A	N	R	P	A	V	L	E	D	T	R	T	K	P	S	S	G	K	Q	P		
CK/CH/LDL/04II	S	S	I	A	A	P	R	P	A	V	L	E	D	A	R	T	R	P	S	S	A	K	P	P		
CK/CH/LGD/04II	T	A	V	A	A	S	R	P	A	T	L	E	E	S	S	T	T	P	S	S	G	K	P	P		
CK/CH/LGD/04III	T	A	V	A	A	T	R	P	A	V	L	E	E	S	S	T	T	P	S	S	A	R	P	P		

2.3 与参考毒株 N 基因序列同源性及系统进化树分析

根据本研究中 13 株 IBV 分离株与 42 株参考毒株 N 蛋白推导氨基酸序列的比较发现, 13 株 IBV 分离株与参考毒株之间 N 基因推导氨基酸同源性为 62.2% (CK/CH/LSD/03I 与 Q3/88)~99.5% (CK/CH/LHN/00I 与 HK、Jilin 或 CK/CH/LDL/01I 与 K210-02)。应用 Jotun Hein Method 方法可将 55 株

IBV 毒株分成 9 个群 (见图 1), 本研究中的 IBV 分离株主要分布在第 VI-Ⅷ群中, 在第 I-Ⅲ群中各包含有一个本研究分离的 IBV。第 IV 群为韩国的主要 IBV 分离株, 它们构成了不同于国外 IBV 分离株的独特群体。澳大利亚传统毒株 Vic S 和我国疫苗株 JAAS (此疫苗从澳大利亚引进) 构成了第 V 群。第 IX 群为澳大利亚新的变异毒株 (V18/91、Q3/88 和 N1/99)。

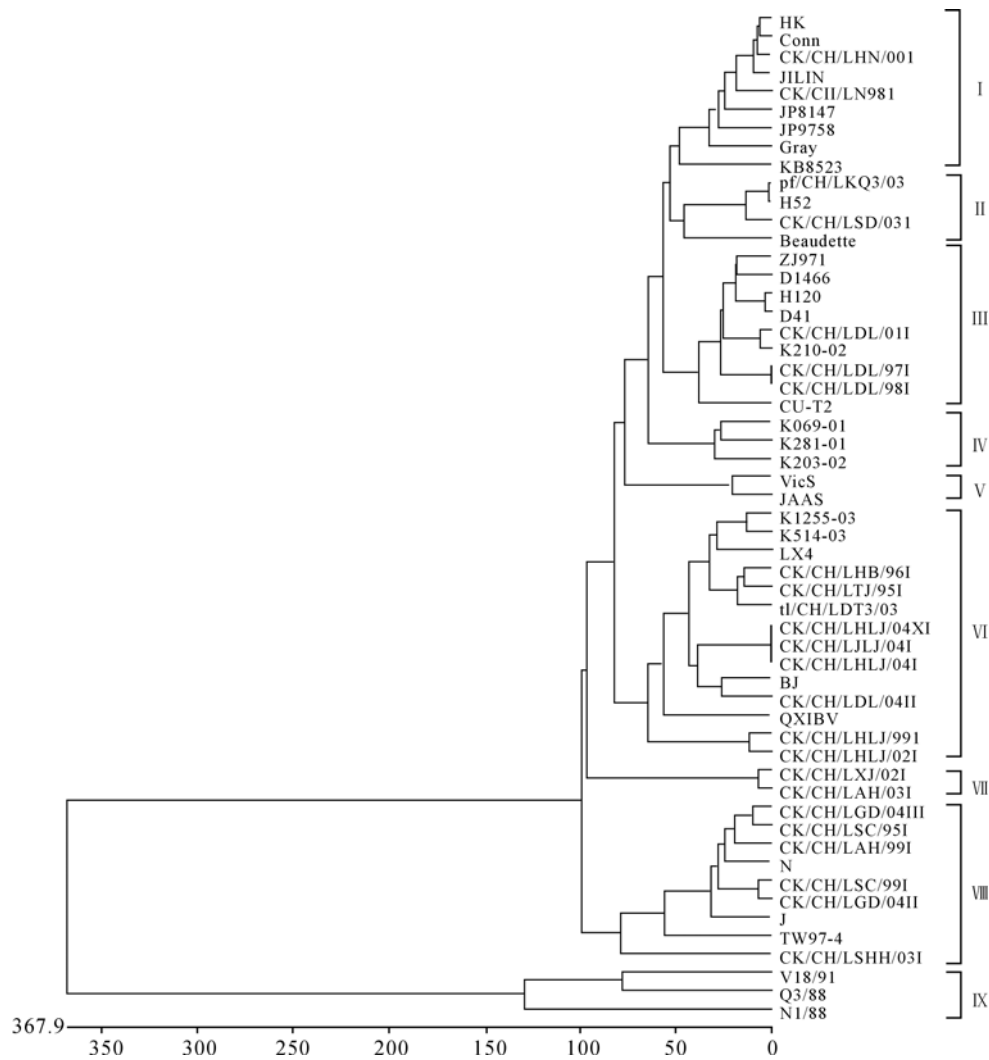


图 1 IBV 国内分离株与参考毒株 N 基因编码氨基酸系统进化树分析

Fig.1 Phylogenetic relationships based on the deduced amino acid sequences of N protein of thirteen IBV isolates and forty-two reference IBV strains

CK/CH/LHN/00I 属于第 I 群, 与我国疫苗株 HK、Jilin N 蛋白推导氨基酸同源性最高, 均为 99.5%。第 II 群为包括 H52 在内的 Mass 血清型毒株。本研究中的 CK/CH/LSD/03I 毒株包含在此群内, 与 H52 N 蛋白推导氨基酸同源性为 97.8%。第 III 群含有我国 4 株 IBV 分离株其中本研究中的 CK/CH/LDL/01I 与 K210-02、H120 N 蛋白推导氨基酸同源性分别为 99.5% 和 95.9%。第 VI-Ⅷ群共包含 25 株 IBV 分离株, 除韩国分离株 K514-03、K1255-03

外均为我国的 IBV 分离株, 其中包含本研究中的 10 株 IBV 分离株和台湾分离株 TW97-4。这 3 群毒株之间 N 蛋白推导氨基酸同源性为 88.3%~100%, 与其它各群之间同源性为 62.3%~95.1%。第 VI 群内各毒株 N 蛋白推导氨基酸同源性较高, 为 92.0%~100%, 其中韩国分离株 K514-03、K1255-03 与我国分离株 LX4 的分别为 94.2% 和 93.7%。该群中我国的 IBV 分离株除 tl/CH/LDT3/03 外, 均从我国北方省市分离到。CK/CH/LAH/03I 和 CK/CH/LXJ/02I

组成了单独的一群(第Ⅶ群),它们之间 N 蛋白氨基酸同源率为 98.8%,而与我国其它 IBV 分离株之间同源率为 90.3%~95.1%。主要从我国南部省市分离到的 8 株 IBV 毒株和台湾毒株 TW97-4 组成了第Ⅷ群,是另一群我国主要的 IBV 分离株。本群内 IBV 毒株之间 N 蛋白同源率差异较大,推导氨基酸同源率为 89.1%~99.0%。

3 讨论

本研究发现,我国 2000-2004 年 13 株 IBV 分离株与以往我国报道^[16,19]的 IBV 分离株 N 基因 ORF 均由 1230 bp 组成,无碱基的缺失或插入现象。但它们之间 N 基因序列同源性却存在较大差异,这种变异主要是由点突变引起的,其主要变异部位与我国 1995-1999 年 IBV 分离株 N 基因的情况基本相同^[16]。另外,13 株 IBV 分离株 N 蛋白氨基酸序列在 64 位、84 位、86 位和 117 位与 H120 疫苗株均不同,而且其蛋白序列上的 B 细胞和 T 细胞表位^[20,21]处存在较多的氨基酸替代现象(见表 3)。可见,点突变以及由此导致的氨基酸的改变是造成我国 IBV 分离株 N 基因发生变异的主要原因。与参考毒株进行比较发现,55 株 IBV 毒株被分成 9 个群(见图 1)。第 I 群主要为 Conn 型毒株和日本毒株。第 II 和第 III 群主要为 Mass 血清型毒株。在这 3 群中各含有本研究中的一个 IBV 分离株。第 IV、V、IX 群分别为韩国主要 IBV 分离株,澳大利亚传统毒株以及澳大利亚新的变异毒株。主要从我国分离到的 IBV 组成了第 VI-Ⅷ群,其中含有本研究中的 10 株 IBV 分离株。

已有的研究发现,从 S1 基因进化关系上分析,推测 CK/CH/LHN/00I 可能为分离的疫苗毒^[22]。而本研究对其 N 基因的分析发现,此毒株与我国疫苗株 HK 和 Jilin N 基因亲缘关系也非常近,它们之间氨基酸同源性很高(99.5%)。由此可以进一步推测 CK/CH/LHN/00I 可能为一株分离的疫苗毒。IBV 毒株间的基因重组是造成 IBV 变异毒株出现和流行的重要原因之一^[12,14,23]。CK/CH/LSD/03I N 基因序列和 H52 等 Mass 型毒株属于同一进化群(第 II 群),与 H52 氨基酸同源性达 97.8%,而其 S1 基因和国内大部分 IBV 分离株亲缘关系较近^[22],与 H52 氨基酸同源性仅 74.3%。由此可见,CK/CH/LSD/03I 可能是由疫苗株和国内流行的野毒株发生基因重组而来。对我国 IBV 分离株 S1 基因序列的分析时发现,CK/CH/LDL/01I 与 CK/CH/LDL/98I、“腺胃病变型”毒株 CK/CH/LDL/97I、J2 组成了我国一种

独特基因型 IBV^[22]。在本研究中,此基因型内的 IBV 毒株(J2 株 N 基因序列未有报道)N 基因序列与韩国毒株 K210-02 及 H120 同源性很高(99.5%和 95.9%),表明我国这种独特基因型 IBV 的 N 基因可能与韩国毒株及我国疫苗株具有共同的起源,而 S1 基因则不同。通过对我国 1995-1999 年^[16]及 2000~2004 年我国部分 IBV 分离毒株的分析发现,近年来我国 IBV 毒株之间的重组现象更加普遍,已成为我国 IBV 变异株产生的重要原因之一。

在 S1 基因序列进化关系上,我国 IBV 分离株基因 III 型(CK/CH/LTJ/95I、BJ 等)与韩国 IBV 分离株基因 III 型(如 K069-01)亲缘关系较近^[22],而本研究中他们的 N 基因属于不同的进化群。本研究还发现,K514-03、K1255-03 分离株的 N 基因与我国 IBV 分离株进化关系较近(第 VI 群),与 LX4 的氨基酸同源性较高(94.2%和 93.7%)。据报道这两个毒株是 2003 年从韩国分离到的,他们在 S1 基因进化关系上也属于韩国基因 III 型,但它们 N 基因与以往韩国的分离株不同,而与我国分离株亲缘关系较近^[11],与本研究结果相一致。可见韩国 IBV 分离株和我国 IBV 分离株之间存在密切的亲缘关系,而且各毒株之间可能发生了变异或重组。这可能与国际间畜禽贸易往来的不断加强,导致病毒从一个国家流入到了另一个国家有关^[13,24]。

从 N 基因编码氨基酸进化树上分析可见,我国 IBV 分离毒株主要分布在第 VI-Ⅷ群中,其中第 VI 群(除 tl/CH/LDT3/03)和第 VIII 群分别由我国北方和南方各省市的 IBV 分离株构成,具有较为明显的地理区域性(图 1)。这些毒株与国外 IBV 毒株(除韩国分离株 K514-03、K1255-03 和台湾毒株 TW97-4 外)的亲缘关系较远,可见这些 IBV 分离株在 N 基因进化关系上形成了自己较为独立的进化群。这与对 1995~1999 年我国 IBV 分离毒株 N 基因系统进化关系的分析一致^[16]。而且同一群内,从 1995 年至 2004 年间不同时期的 IBV 分离株都有存在,可见此基因型毒株在我国已有较长时间的存在,而且发生了较大程度的变异。这可能与病毒在遗传衍化过程中由于各种选择压力(如疫苗的免疫压力)而发生了不同程度的变异有关。

References

- [1] Cavanagh D, Naqi S. Infectious bronchitis [A]. In: Saif Y M, Barnes H J, Glisson J R, Fadly A M, McDougald L R, Swayne D E (Eds.), Diseases of Poultry [M]. 11th ed, Ames: Iowa State University Press, 2003: 101-119.

- [2] Cavanagh D. Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae [J]. Arch Virol, 1997, 142 (3): 629-633.
- [3] Boursnell M E, Brown T D, Foulds I J, *et al.* Completion of the sequence of the coronavirus avian infectious bronchitis virus [J]. J Gen Virol, 1987, 68: 57-77.
- [4] Zhou M L, Williams A K, Chung S, *et al.* The infectious bronchitis virus nucleocapsid protein binds RNA sequences in the 3' terminus of the genome [J]. Virology, 1996, 217 (1): 191-199.
- [5] Sapats S I, Ashton F, Wright P J, *et al.* Novel variation in the N protein of avian infectious bronchitis virus [J]. Virology, 1996, 226 (2): 412-417.
- [6] Chen H Y, Andrew G, Brian K. Dove, *et al.* Mass spectroscopic characterization of the coronavirus infectious bronchitis virus nucleoprotein and elucidation of the role of phosphorylation in RNA binding by using surface plasmon resonance [J]. J Virol, 2005, 79 (2): 1164-1179.
- [7] Ignjatovic J, Galli L. Structural proteins of avian infectious bronchitis virus: role in immunity and protection [J]. Adv Exp Med Biol., 1993, 342: 449-453.
- [8] Collisson E W, Pei J, Dzielawa J, *et al.* Cytotoxic T lymphocytes are critical in the control of infectious bronchitis virus in poultry [J]. Develop Comp Immunol, 2000, 24: 187-200.
- [9] Williams A K, Wang L, Sneed L W, *et al.* Comparative analyses of the nucleocapsid genes of several strains of infectious bronchitis virus and other coronaviruses [J]. Virus Res, 1992, 25: 213-222.
- [10] Boursnell M E, Binns M M, Foulds I J, *et al.* Sequence of the nucleocapsid genes from two strains of infectious bronchitis virus [J]. J Gen Virol, 1985, 66: 573-580.
- [11] Park J Y, Pak S I, Sung H W, *et al.* Variations in the nucleocapsid protein gene of infectious bronchitis viruses isolated in Korea [J]. Virus Genes, 2005, 31 (2): 153-162.
- [12] Jia W, Karaca K, Parrish C R, *et al.* A novel variant of avian infectious bronchitis virus resulting from recombination among three different strains [J]. Arch Virol, 1995, 140 (2): 259-271.
- [13] Yu L, Wang Z, Jiang Y, *et al.* Molecular epidemiology of infectious bronchitis virus isolates from China and Southeast Asia [J]. Avian Dis, 2001, 45 (1): 201-209.
- [14] Huang Y P, Lee H C, Cheng M C, *et al.* S1 and N gene analysis of avian infectious bronchitis viruses in Taiwan [J]. Avian Dis, 2004, 48 (3): 581-589.
- [15] Sheh H K, Shieh J H, Chou H Y, *et al.* Complete nucleotide sequences of S1 and N genes of infectious bronchitis virus isolated in Japan and Taiwan [J]. J Vet Med Sci, 2004, 66: 555-558.
- [16] Zhang Q X, Chen J F, Han Z X (张庆霞, 陈建飞, 韩宗玺), *et al.* Genetic Variations of Nucleocapsid Gene of Infectious Bronchitis Viruses Strains Isolated in China between 1995 and 1999 [J]. Chin J Virol (病毒学报), 2006, 22 (3): 225-229.
- [17] Liu S W, Chen J F, Chen J D, *et al.* Isolation of avian infectious bronchitis coronavirus from domestic peafowl (*Pavo cristatus*) and teal (*Anas*) [J]. J Gen Virol, 2005, 86: 719-725.
- [18] Liu S W, and Kong X G. A new genotype of nephropathogenic infectious bronchitis virus circulating in vaccinated and non-vaccinated flocks in China [J]. Avian Pathol, 2004, 33 (3): 321-327.
- [19] Liu S W, Du E Q, Kong X G (刘胜旺, 杜恩岐, 孔宪刚), *et al.* The molecular characteristics of mRNA₅ and mRNA₆ cDNA of infectious bronchitis virus LX4 isolated in China [J]. Virologica Sinica (中国病毒学), 2003, 18 (3): 265-270.
- [20] Seah J N, Yu L, Kwang J. Localization of linear B cell epitopes on infectious bronchitis virus nucleocapsid protein [J]. Vet Microbiol, 2000, 75 (1): 11-16.
- [21] Soe H S, Wang L, Smith R. The carboxyl-terminal 120-residue polypeptide of infectious bronchitis virus from nucleocapsid induces cytotoxic T lymphocytes and protects chickens acute infection [J]. J Virol, 1997, 71 (10): 7889-7894.
- [22] Liu S W, Zhang Q X, Chen J D, *et al.* Genetic Diversity of Avian Infectious Bronchitis Coronavirus Strains Isolated in China between 1995 and 2004 [J]. Arch Virol, 2006, (in press).
- [23] Lee C W, Jackwood M W. Origin and evolution of Georgia 98 (GA98), a new serotype of avian infectious bronchitis virus [J]. Virus Res, 2001, 80: 33-39.
- [24] Lee Y J, Sung H W, Choi J G, *et al.* Molecular epidemiology of Newcastle disease viruses isolated in South Korea using sequencing of the fusion protein cleavage site region and phylogenetic relationships [J]. Avian Pathol, 2004, 33: 482-491.