

Supplementary Figure 1

for

**Generation and protective efficacy of a cold-adapted attenuated
avian H9N2 influenza vaccine**

Yandi Wei, Lu Qi, Huijie Gao, Honglei Sun, Juan Pu, Yipeng Sun, and Jinhua Liu

A

	1	10	20	30	40	50	60
WTPB2	MERIKELRDLMSQSRTRREILT KTTVDHMAI IKKYTSGROEKNPALRMKMMAMKYPITAN						
CAPB2	MERIKELRDLMSQSRTRREILT KTTVDHMAI IKKYTSGROEKNPALRMKMMAMKYPITAN						
	70	80	90	100	110	120	
WTPB2	KRIMEMIPERNEQQTLSKTN DAGSDRVMVSP LAVTWNNRNGPTTSTVHYPKVYKTYFE						
CAPB2	KRIMEMIPERNEQQTLSKTN DAGSDRVMVSP LAVTWNNRNGPTTSTVHYPKVYKTYFE						
	130	140	150	160	170	180	
WTPB2	KVERLKHGTFGPVHF R NQVKIRRRVDINPGHADLSAKEAQDVIMEVVPNEVGARILTSE						
CAPB2	KVERLKHGTFGPVHF Q NQVKIRRRVDINPGHADLSAKEAQDVIMEVVPNEVGARILTSE						
	190	200	210	220	230	240	
WTPB2	SOLTITKEKKELODCKIAPLMVAYMLERELVRKTRFLPVAGGTSSVYIEVLHLTQGTGW						
CAPB2	SOLTITKEKKELODCKIAPLMVAYMLERELVRKTRFLPVAGGTSSVYIEVLHLTQGTGW						
	250	260	270	280	290	300	
WTPB2	EQMYTPGGKVRNDDVDQSLIIAARNIVRRAIVSADPLASLLEMCHSTOIGGVRMVDILRO						
CAPB2	EQMYTPGGKVRNDDVDQSLIIAARNIVRRAIVSADPLASLLEMCHSTOIGGVRMVDILRO						
	310	320	330	340	350	360	
WTPB2	NPTEEQAVDICKAAMGLRISSSFSGGF TFKRTSGSSVKREEEVLTGNLQTLKIRVHEGY						
CAPB2	NPTEEQAVDICKAAMGLRISSSFSGGF TFKRTSGSSVKREEEVLTGNLQTLKIRVHEGY						
	370	380	390	400	410	420	
WTPB2	EEFTMVGRRATAILRKATRRLIQ LIVSGKDEQSI AEAIIVAMVFSQEDCMIKAVRGDLNF						
CAPB2	EEFTMVGRRATAILRKATRRLIQ LIVSGKDEQSI AEAIIVAMVFSQEDCMIKAVRGDLNF						
	430	440	450	460	470	480	
WTPB2	VNRANQRLNPMHQLLRHFQKDAKVL FQNWGIEPIDNVGMIGILPDMTPSTEMSLRGVRV						
CAPB2	VNRANQRLNPMHQLLRHFQKDAKVL FQNWGIEPIDNVGMIGILPDMTPSTEMSLRGVRV						
	490	500	510	520	530	540	
WTPB2	SKMGVDEYSSAERVVVSIDRFLRV R DQRGNVLLSPEEVSETQTEKLTITYSSMMWEIN						
CAPB2	SKMGVDEYSSAERVVVSIDRFLRV R DQRGNVLLSPEEVSETQTEKLTITYSSMMWEIN						
	550	560	570	580	590	600	
WTPB2	GPESVLVNTYQWII RNWETVKIQWSQDP TMLYNKMEFEPFQSLVPKAARGQYSGFVRVLF						
CAPB2	GPESVLVNTYQWII RNWETVKIQWSQDP TMLYNKMEFEPFQSLVPKAARGQYSGFVRVLF						
	610	620	630	640	650	660	
WTPB2	QQMRDVLGTFD TVQIIKLLPFAAAPPEQSRMQFSSLT VNVVRGSGMIRIVVRGNSP VFNYNK						
CAPB2	QQMRDVLGTFD TVQIIKLLPFAAAPPEQSRMQFSSLT VNVVRGSGMIRIVVRGNSP VFNYNK						
	670	680	690	700	710	720	
WTPB2	ATRRLTVLQKDGALMEDPDEGTS GVESAVLRGFLILGKEDKRYGPALSINELSNLAKGE						
CAPB2	ATRRLTVLQKDGALMEDPDEGTS GVESAVLRGFLILGKEDKRYGPALSINELSNLAKGE						
	730	740	750				
WTPB2	KANVLIGQGDVVLVMKRRKRDSSIL TDSQTATKRIRMAIN						
CAPB2	KANVLIGQGDVVLVMKRRKRDSSIL TDSQTATKRIRMAIN						

B

1 10 20 30 40 50 60
WTPB1 MDVNP TLLFLKVPVQNAISTTFPYTGDPYPYSHGTGTGYTMDTVNRTHKYSEK GKWTNTE
CAPB1 MDVNP TLLFLKVPVQNAISTTFPYTGDPYPYSHGTGTGYTMDTVNRTHKYSEK GKWTNTE

70 80 90 100 110 120
WTPB1 TGAPQLNPIDG LPE DN E P S G Y A Q T D C V L E A M A F L E E S H P G I F E N S C L E T M E I V Q Q T R V D
CAPB1 TGAPQLNPIDG LPE DN E P S G Y A Q T D C V L E A M A F L E E S H P G I F E N S C L E T M E I V Q Q T R V D

130 140 150 160 170 180
WTPB1 KLTQGRQTYDWT LNRNQPAATALANTIEVFRSNGLTANESGRLIDFLKDVMSMDKEEME
CAPB1 KLTQGRQTYDWT LNRNQPAATALANTIEVFRSNGLTANESGRLIDFLKDVMSMDKEEME

190 200 210 220 230 240
WTPB1 ITTHFORKRRVRDNMTKKMVTQRTIGKKKQRLNKRSLIRALTLNMTKDAERGKLRRA
CAPB1 ITTHFORKRRVRDNMTKKMVTQRTIGKKKQRLNKRSLIRALTLNMTKDAERGKLRRA

250 260 270 280 290 300
WTPB1 IATPGMQIRGFVYFVEALARSICEKLEQSGLPVGGNEKKAKLANVVRKMMTNSQDTELSF
CAPB1 IATPGMQIRGFVYFVEALARSICEKLEQSGLPVGGNEKKAKLANVVRKMMTRSQDTELSF

310 320 330 340 350 360
WTPB1 TITGDNTKWNENQNP R M F L A M I T Y I T R N Q P E W F R N V L S I A P I M F S N K M A R L G K G Y M F E S K
CAPB1 TITGDNTKWNENQNP R M F L A M I T Y I T R N Q P E W F R N V L S I A P I M F S N K M A R L G K G Y M F E S K

370 380 390 400 410 420
WTPB1 SMKLRTOVPAEMLANIDLK YFNKSTREKIEKIRPLLIDGTASLSPGMMMGFMNMLSTVLG
CAPB1 SMKLRTOVPAEMLANIDLK YFNKSTREKIEKIRPLLIDGTASLSPGMMMGFMNMLSTVLG

430 440 450 460 470 480
WTPB1 VSILNLGQKKYTKNTYWDGLQSSDDFALIVNAPNHEG IQAGVDRFYRTCKLVGINMSKK
CAPB1 VSILNLGQKKYTKNTYWDGLQSSDDFALIVNAPNHEG IQAGVDRFYRTCKLVGINMSKK

490 500 510 520 530 540
WTPB1 KSYINRTGTFEFTSFFYRYGFVANFSMELPSPFGVSGINESADMSIGVTVIKNNMINNDLG
CAPB1 KSYINRTGTFEFTSFFYRYGFVANFSMELPSPFGVSGINESADMSIGVTVIKNNMINNDLG

550 560 570 580 590 600
WTPB1 PATAQMALQLFIKDYRYTYRCHRGDTQIQTRRAFELKKLWEQTRSKAGLLVSDGGPNLYN
CAPB1 PATAQMALQLFIKDYRYTYRCHRGDTQIQTRRAFELKKLWEQTRSKAGLLVSDGGPNLYN

610 620 630 640 650 660
WTPB1 IRLNH IPEVCLKWELMDEDYQGRLCNPINPFVSHKEIDSVNNAVVMPAHGPAKSMEYDAV
CAPB1 IRLNH IPEVCLKWELMDEDYQGRLCNPINPFVSHKEIDSVNNAVVMPAHGPAKSMEYDAV

670 680 690 700 710 720
WTPB1 ATTHSWIPKRRRSILNTSQRGVLEDEQMYQKCCNLF EKFFPSSSYRRPVGISSMVEAMVS
CAPB1 ATTHSWIPKRRRSILNTSQRGVLEDEQMYQKCCNLF EKFFPSSSYRRPVGISSMVEAMVS

730 740 750
WTPB1 RARIDARIDFESGGIKKEEFAEIMKICSTIEELRQK
CAPB1 RARIDARIDFESGGIKKEEFAEIMKICSTIEELRQK

C

	1	10	20	30	40	50	60
WTPA	MEDFVRQCFNPMIVELAEKAMKEYGE ^D PKIETNKFASICTHLEVC ^F MYSD ^F HFI ^D ERGES						
CAPA	MEDFVRQCFNPMIVELAEKAMKEYGE ^N PKIETNKFASICTHLEVC ^F MYSD ^F HFI ^D ERGES						
	70	80	90	100	110	120	
WTPA	TIIESGDPNALLKHRFEIIEGRDR ^T MAW ^T VVNSI ^C NTT ^G VEK ^P KFL ^P DL ^D Y ^D Y ^K EN ^R FI ^E I						
CAPA	TIIESGDPNALLKHRFEIIEGRDR ^T MAW ^T VVNSI ^C NTT ^G VEK ^P KFL ^P DL ^D Y ^D Y ^K EN ^R FI ^E I						
	130	140	150	160	170	180	
WTPA	GVTRRE ^V H ^I Y ^L E ^K K ^A N ^K I ^K S ^E K ^T H ^I H ^I F ^S F ^T G ^E E ^M A ^T K ^A D ^Y T ^L D ^E E ^S R ^A R ^I K ^T R ^L F ^T I ^R H						
CAPA	GVTRRE ^V H ^I Y ^L E ^K K ^A N ^K I ^K S ^E K ^T H ^I H ^I F ^S F ^T G ^E E ^M A ^T K ^A D ^Y T ^L D ^E E ^S R ^A R ^I K ^T R ^L F ^T I ^R H						
	190	200	210	220	230	240	
WTPA	EMASRGLWDSFRQSERGEETIEERFEITG ^T MRRLADQSLPPNFSSLENFRAYVDGFEPNG						
CAPA	EMASRGLWDSFRQSERGEETIEERFEITG ^T MRRLADQSLPPNFSSLENFRAYVDGFEPNG						
	250	260	270	280	290	300	
WTPA	CIEGKLSQMSKEV ^N ARIE ^P FL ^R TT ^P R ^L RL ^P NG ^P PCS ^Q RSK ^F LLMDALKLSIEDPSHEGE						
CAPA	CIEGKLSQMSKEV ^N ARIE ^P FL ^R TT ^P R ^L RL ^P NG ^P PCS ^Q RSK ^F LLMDALKLSIEDPSHEGE						
	310	320	330	340	350	360	
WTPA	GIPLYDAIKCMK ^T FFG ^W K ^E ^P NI ^I K ^P HEK ^G IN ^P NYLL ^T WK ^Q V ^L AEL ^Q DIENEEK ^I P ^K T ^K N ^M						
CAPA	GIPLYDAIKCMK ^T FFG ^W K ^E ^K NI ^I K ^P HEK ^G IN ^P NYLL ^T WK ^Q V ^L AEL ^Q DIENEEK ^I P ^K T ^K N ^M						
	370	380	390	400	410	420	
WTPA	K ^K T ^S Q ^L K ^W A ^L G ^E N ^M A ^P E ^K V ^D F ^E D ^C K ^D V ^N D ^L K ^Q Y ^S D ^E F ^E P ^R S ^L A ^C W ^I Q ^E F ^N K ^A C ^E L ^T D ^S						
CAPA	K ^K T ^S Q ^L K ^W A ^L G ^E N ^M A ^P E ^K V ^D F ^E D ^C K ^D V ^N D ^L K ^Q Y ^S D ^E F ^E P ^R S ^L A ^C W ^I Q ^E F ^N K ^A C ^E L ^T D ^S						
	430	440	450	460	470	480	
WTPA	S ^W V ^E L ^D E ^I G ^E D ^V A ^P I ^E H ^I A ^S M ^R R ^N Y ^F T ^A E ^V S ^H C ^R A ^T E ^Y I ^M K ^G V ^Y I ^N T ^A L ^L N ^A S ^C A ^A M ^D D ^F						
CAPA	S ^W V ^E L ^D E ^I G ^E D ^V A ^P I ^E H ^I A ^S M ^R R ^N Y ^F T ^A E ^V S ^H C ^R A ^T E ^Y I ^M K ^G V ^Y I ^N T ^A L ^L N ^A S ^C A ^A M ^D D ^F						
	490	500	510	520	530	540	
WTPA	Q ^L I ^P M ^I S ^K R ^T K ^E G ^R R ^K T ^N L ^Y G ^F I ^I K ^G R ^S H ^L R ^N D ^T D ^V V ^N F ^S M ^E F ^S L ^T D ^P R ^L E ^P H ^K W ^E K ^Y						
CAPA	Q ^L I ^P M ^I S ^K R ^T K ^E G ^R R ^K T ^N L ^Y G ^F I ^I K ^G R ^S H ^L R ^N D ^T D ^V V ^N F ^S M ^E F ^S L ^T D ^P R ^L E ^P H ^K W ^E K ^Y						
	550	560	570	580	590	600	
WTPA	C ^V L ^E I ^G D ^M L ^L R ^T A ^V G ^Q V ^S R ^P M ^F L ^Y V ^R T ^N G ^T S ^K I ^K M ^K W ^G M ^E M ^R R ^C L ^L Q ^S L ^Q Q ^I E ^S M ^I E ^A E ^S						
CAPA	C ^V L ^E I ^G D ^M L ^L R ^T A ^V G ^Q V ^S R ^P M ^F L ^Y V ^R T ^N G ^T S ^K I ^K M ^K W ^G M ^E M ^R R ^C L ^L Q ^S L ^Q Q ^I E ^S M ^I E ^A E ^S						
	610	620	630	640	650	660	
WTPA	S ^V K ^E K ^D L ^T K ^E F ^F E ^N K ^S E ^T W ^P I ^G E ^S P ^K G ^V E ^E G ^S I ^G K ^V C ^R T ^L L ^A K ^S V ^F N ^S L ^Y A ^S P ^Q L ^E G ^F S ^A						
CAPA	S ^V K ^E K ^D L ^T K ^E F ^F E ^N K ^S E ^T W ^P I ^G E ^S P ^K G ^V E ^E G ^S I ^G K ^V C ^R T ^L L ^A K ^S V ^F N ^S L ^Y A ^S P ^Q L ^E G ^F S ^A						
	670	680	690	700	710		
WTPA	E ^S R ^K L ^L L ^I V ^Q A ^L R ^D N ^L E ^P G ^T F ^D L ^E G ^L Y ^E A ^I E ^E C ^L I ^N D ^F W ^V L ^L N ^A S ^W F ^N S ^F L ^T H ^A Q ^R						
CAPA	E ^S R ^K L ^L L ^I V ^Q A ^L R ^D N ^L E ^P G ^T F ^D L ^E G ^L Y ^E A ^I E ^E C ^L I ^N D ^F W ^V L ^L N ^A S ^W F ^N S ^F L ^T H ^A Q ^R						

D

1 10 20 30 40 50 60
WTHA DKICIGYQSTNSTETVDTLTENNVPVTHAKELLHTEHNGMLCATSLGHPLILDCTIEGL
CAHA DKICIGYQSTNSTETVDTLTENNVPVTHAKELLHTEHNGMLCATSLGHPLILDCTIEGL

70 80 90 100 110 120
WTHA IYGNPSCDLLLGGREWSYIVERPSAVNGLCYPGNVENLEELRSLFSSARSYQRIQIFPDT
CAHA IYGNPSCDLLLGGREWSYIVERPSAVNGLCYPGNVENLEELRSLFSSARSYQRIQIFPDT

130 140 150 160 170 180
WTHA IWNVSYSGTSKACSDSFYRSMRWLTQKNNAYPIQDAQYTNNQEKNILFMWGINHPPTDTA
CAHA IWNVSYSGTSKACSDSFYRSMRWLTQKNNAYPIQDAQYTNNQEKNILFMWGINHPPTDTA

190 200 210 220 230 240
WTHA QTNLYTRDTTTSVATEEINRTFKPLIGPRPLVNGIQGRIDYYWSVLKPGQTLRIRSNGN
CAHA QTNLYTRDTTTSVATEEINRTFKPLIGPRPLVNGIQGRIDYYWSVLKPGQTLRIRSNGN

250 260 270 280 290 300
WTHA LIAPWYGHILSGESHGRILKTDLKRGSCTVQCQTEKGLNTTLPFQNVSKYAFGNCSKYI
CAHA LIAPWYGHILSGESHGRILKTDLKRGSCTVQCQTEKGLNTTLPFQNVSKYAFGNCSKYI

310 320 330 340 350 360
WTHA GIKSLKLAVALRNVPSSRSLFGAIAGFIEGGWSGLVAGWYGFQHSNDQGVGMAADRDS
CAHA GIKSLKLAVALRNVPSSRSLFGAIAGFIEGGWSGLVAGWYGFQHSNDQGVGMAADRDS

370 380 390 400 410 420
WTHA TQKAIDKITSKVNNIVDKMNKQYEIIDHEFSEVETRLNMINNKIDDQIQDIWAYNAELLV
CAHA TQKAIDKITSKVNNIVDKMNKQYEIIDHEFSEVETRLNMINNKIDDQIQDIWAYNAELLV

430 440 450 460 470 480
WTHA LLENQKTLDLDEHDANVNNLYNKVKRALGSSNAVEDGKGCFFELYHKCDDQCMETIRNGTYNRR
CAHA LLENQKTLDLDEHDANVNNLYNKVKRALGSSNAVEDGKGCFFELYHKCDDQCMETIRNGTYNRR

490 500 510 520 530 540
WTHA KYQEEKLERQKIEGVKLESEGTYKILTIYSTVASSIVIAMGFAAFLEWAMSNNGSCRCNI
CAHA KYQEEKLERQKIEGVKLESEGTYKILTIYSTVASSIVIAMGFAAFLEWAMSNNGSCRCNI

WTHA CI
CAHA CI

E

WTNP 1 10 20 30 40 50 60
CANP MASQGTKRSYEQMETGDRONATEIRASVGRMVSGIGRFYIQMCTELKLSDNEGRLIQNS
MASQGTKRSYEQMETGRDRONATEIRASVGRMVSGIGRFYIQMCTELKLSDNEGRLIQNS

WTNP 70 80 90 100 110 120
CANP ITIERMVLSAFDERRNRYLEEHP SAGKDPKKTGGPIYRRRDGKQVRELILYDKEEIRRIW
ITIERMVLSAFDERRNRYLEEHP SAGKDPKKTGGPIYRRRDGKQVRELILYDKEEIRRIW

WTNP 130 140 150 160 170 180
CANP ROANNGEDATAGLTHLMIWHSNLNDATYQRTALVRTGMDPRMCSLMQGSTLPRRSGAAG
ROANNGEDATAGLTHLMIWHSNLNDATYQRTALVRTGMDPRMCSLMQGSTLPRRSGAAG

WTNP 190 200 210 220 230 240
CANP AAVKGI GTMVMELIRMIKRGINDRNFWRGNGRRTRIA YERM CNILKGFQTAAQRAMMD
AAVKGI GTMVMELIRMIKRGINDRNFWRGNGRRTRIA YERM CNILKGFQTAAQRAMMD

WTNP 250 260 270 280 290 300
CANP QVRESRNP GNAEIEDLIFLARSALILRGSVAHK SCLPACVYGLAVASGYDFEREGYSLVG
QVRESRNP GNAEIEDLIFLARSALILRGSVAHK SCLPACVYGLAVASGYDFEREGYSLVG

WTNP 310 320 330 340 350 360
CANP IDPFRL LONSQVFS LIRPNENPAHKSQ L VVMACHSAAFEDLRVSSFIRGTRMVPRGQLST
IDPFRL LONSQVFS LIRPNENPAHKSQ L VVMACHSAAFEDLRVSSFIRGTRMVPRGQLST

WTNP 370 380 390 400 410 420
CANP RGVOIASNENIEAMD SNTLELRSRYWAIRTKSGGNTNQORASAGQVSVQPTFSVQRNLPF
RGVOIASNENIEAMD SNTLELRSRYWAIRTKSGGNTNQORASAGQVSVQPTFSVQRNLPF

WTNP 430 440 450 460 470 480
CANP ERATIMAAFTGNTEGRTSDMRTEIIRMMESARPEDV SFQGRGVFELSDEKATNP IVPSFD
ERATIMAAFTGNTEGRTSDMRTEIIRMMESARPEDV SFQGRGVFELSDEKATNP IVPSFD

WTNP 490
CANP MNNEGSYFFGDNAEEYDN
MNNEGSYFFGDNAEEYDN

F

```
      1      10      20      30      40      50      60
WTNS1 MDSNTVSSFQVDCFLWHVRKRKFADQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRSSTLGDIRTATRE
CANS1 MDSNTVSSFQVDCFLWHVRKRKFADQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRSSTLGDIRTATRE

      70      80      90      100     110     120
WTNS1 GKHIVERILEEESDEAFKMTIASVPAPRYLTDMTLEEMSRDWLMLIPKQKVTGSLCIRME
CANS1 GKHIVERILEEESDEAFKMTIASVPAPRYLTDMTLEEMSRDWLMLIPKQKVTGSLCIRME

      130     140     150     160     170     180
WTNS1 QAIVDKNITLKANFIVIFNRLEALILLRAFTDEGAIVGEISPLPSLPGHTDKDVKNAIGV
CANS1 QAIVDKNITLKANFIVIFNRLEALILLRAFTDEGAIVGEISPLPSLPGHTDKDVKNAIGV

      190     200     210
WTNS1 LIGCFEWNNDTVRVSETLQRFARWRSSEDEDGRPPLSPK
CANS1 LIGRFEWNNDTVRVSETLQRFARWRSSEDEDGRPPLSPK
```

Fig. S1. Amino acid sequences of the SD/01/10- wt and ca mutant viruses.

Identical sequences of PB2 (A), PB1 (B), PA (C), HA (D), NP (E), NS1(F) are shown in red, amino acid changes detected in the ca mutant viruses are shown in white.