

陕西省部分地区猪瘟流行毒株与疫苗毒株 E_2 基因主要抗原区序列变异分析

朱小甫, 吴旭锦

(咸阳职业技术学院 生物科技系, 动物疫病分子生物学诊断实验室, 陕西 咸阳 712000)

摘要: 研究陕西省猪瘟病毒 E_2 基因主要抗原区变异情况, 为猪瘟防控提供依据。用巢式 PCR 方法对猪瘟疫苗和采自陕西省部分地区的疑似猪瘟病料进行 E_2 基因主要抗原区扩增并测序, 将测序结果与 HCLV 疫苗株和 Shimen 株 E_2 基因进行序列比对分析。结果表明, 23 株流行毒株之间的核苷酸同源性在 86.0%~100%, 氨基酸同源性在 87.8%~100%; 与 HCLV 株相比, 核苷酸同源性在 77.2%~81.2%, 氨基酸同源性为 78.9%~88.9%; 与经典强毒 Shimen 株核苷酸同源性为 77.2%~80.9%, 氨基酸同源性为 80.0%~90.0%。2 株疫苗毒 E_2 基因和 HCLV 株相比较, 核苷酸同源性为 93.4%, 氨基酸同源性为 90.0%; 和 Shimen 株核苷酸同源性为 94.1%, 氨基酸同源性为 92.2%。疫苗和经典 HCLV 株 E_2 主要抗原区相比, 在所测定的 91 个氨基酸位点中有 9 个位点发生了变异, 流行毒株相对于 HCLV 株有 12 个氨基酸位点发生了变异。流行毒株 E_2 基因主要抗原区发生了较明显的变异, 疫苗 E_2 基因主要抗原区和 HCLV 株相比发生了较为明显的变异。疫苗和流行毒株只有 3 个变异位点相同, 提示疫苗和流行毒的变异趋势不一致。

关键词: 猪瘟; E_2 基因; 序列分析

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

Sequence Analysis of Main Antigen Variation of E_2 Gene of Vaccine Strains and Virulent Classical Swine Fever Virus Isolated in Shanxi Province

ZHU Xiao-fu, WU Xu-jin

(Animal Epidemic Disease Diagnostic Laboratory of Molecular Biology, Department of Biology Science & Technology, Xianyang Vocational Technical College, Xianyang 712000, China)

Abstract: To get useful data for the prevention and control of classical swine fever, the main antigen variation of E_2 gene of classical swine fever virus in Shaanxi Province were analyzed by nested RT-PCR amplified. The main antigen of E_2 gene of the vaccines and parts of samples from the suspected classical swine fever from Shaanxi Province was sequenced, which was compared with HCLV vaccine strains and Shimen strain E_2 gene sequence. The results showed the nucleotide and amino acid homology of 23 pandemic strains are 86.0%~100% and 87.8%~100%, respectively. The nucleotide and amino acid homology between the pandemic strains and HCLV strain are 77.2%~81.2% and 78.9%~88.9%, respectively. And the nucleotide and amino acid homology between the pandemic strains and Shimen strains are 77.2%~80.9% and 80.0%~90.0%, respectively. Compared E_2 gene with HCLV, the nucleotide and amino acid homology are 90.0% and 93.4%, respectively. And nucleotide and amino acid homology are 94.

收稿日期: 2011-05-13

基金项目: 咸阳市科技计划项目(211K04-12)

作者简介: 朱小甫(1977-), 男, 硕士, 助教, 研究方向: 动物疫病分子病原学与免疫学, E-mail: zhuxiaofu2004@yahoo.com.cn

1% and 92.2% between Shimen strains and E_2 gene, respectively. Compared the main antigen of E_2 , 9 of 91 amino acid sites in HCLV mutated, and compared with HCLV, 12 amino acid sites in pandemic strains mutated. Prevalent virulent strains E_2 gene mutate obviously, E_2 gene in vaccine occurred obviously variation compared to HCLV. Vaccine and epidemic strains have only three same variable sites, which suggested that vaccine and epidemic strains have different variation trend.

Key words: classical swine fever; E_2 gene; cloning; sequence analysis

猪瘟(Classical swine fever, CSF)是一种严重威胁养猪业的烈性传染病,其病原为猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)。CSFV 在分类地位上属于黄病毒科(Flaviviridae)瘟病毒属(Pestivirus),同属的还有牛病毒性腹泻粘膜病病毒(Bovine viral diarrhea virus, BVDV)和边界病病毒(Border disease virus, BVDV)。CSFV 为有囊膜的单链正股 RNA 病毒,其基因组大小约为 12.3 kb,仅有一个大的开放阅读框(Open reading frame, ORF),CSFV 所有的结构蛋白和非结构蛋白均由这一 ORF 编码^[1,2]。CSFV 的囊膜糖蛋白有 E0、E1 和 E2, E0 蛋白具有 RNA 酶活性,进一步的研究还证实 E0 和 CSFV 感染细胞及减弱宿主的免疫防御有关^[3-5]; E2 蛋白是 CSFV 免疫保护的主要相关抗原,国内外对 E2 的研究最多,业已证实 E2 蛋白可分为 A、B、C、D 4 个功能区域, A 区又分为 A1、A2 和 A3 3 个亚区,其中 A1 亚区、B 区和 C 区能诱导产生中和抗体^[6,7]。

我国在研制成功猪瘟兔化弱毒苗(HCLV)并大范围应用以后,对控制 CSFV 的大范围流行起到了关键作用,为我国 CSFV 的防制作出了重要贡献,并且建立了以此疫苗免疫为主的防控策略。自 20 世纪 70 年代以后,CSFV 的流行特点发生了变化,临床上以非典型猪瘟为主,发病以散发为主要特征,免疫失败屡有发生,多数学者认为这一现象和 CSFV 基因变异有关。在 2008 年到 2010 年间,陕西省某些猪场相继发病,临床上出现了多年不见的典型病理变化。为了揭示当前 CSFV 流行毒株分子变异情况,我们对 CSFV 疫苗毒株和流行毒株 E_2 基因主要抗原区序列进行分析,以期明确当前流行毒株的分子变异规律,为 CSF 防控提供理论参考。

1 材料与方 法

1.1 病料和疫苗

由课题组采集陕西省疑似 CSF 的猪脾脏、肾

脏、肝脏和淋巴结,将组织病料充分研磨后离心收集上清液, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。猪瘟兔化弱毒疫苗脾苗(批号 2006003)和细胞苗(批号 2006002)为青岛某公司生产。

1.2 所用试剂

Trizol LS Reagent 为美国 Invitrogen 公司产品; AMV 反转录酶($5\text{ U}/\mu\text{L}$)、HPR I RNA 酶抑制剂($40\text{ U}/\mu\text{L}$)、DEPC 处理水、rTaq DNA 聚合酶($5\text{ U}/\mu\text{L}$)、dNTP(2.5 mmol/L)、pMD18-T 载体克隆试剂盒、BamH I ($15\text{ U}/\mu\text{L}$)及 Hind III ($15\text{ U}/\mu\text{L}$)限制性内切酶均为 TaKaRa 公司产品; UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒购自生工生物工程(上海)有限公司; DH5 α 大肠杆菌由本实验室保存。

1.3 引物的设计和合成

根据 GenBank 上发表的 CSFV Shimen 株及 HCLV 株全基因序列,由生工生物工程(上海)有限公司合成了 2 对引物 P1/P2、PED1/PED2, P1/P2 扩增 E_2 全长基因, PED1/PED2 扩增 E_2 基因主要抗原区 A 区域。序列及相对位置见表 1。

表 1 引物名称、序列、位置及长度

Tab. 1 The name, Sequence, position and length of the primers

| 引物名称 | 核苷酸序列 (5'→3') | 相对 Shimen 株位置 | 扩增长度 |
|------|--------------------------|---------------|---------|
| P1 | GTAAGTGGGGCACAAGG | 2423-2439 | |
| P2 | TTATCACTATCAGCCACAGGACAT | 3524-3504 | 1102 nt |
| PED1 | TCGACAACCAATGAGATAGGG | 2467-2487 | |
| PED2 | CACAGCCCAAATCCAAAGTCATC | 2738-2716 | 272 nt |

1.4 病毒总 RNA 的提取及反转录获得第一链 cDNA

取各病料上清液或疫苗稀释液各 $250\text{ }\mu\text{L}$, 参照 Trizol LS Reagent 试剂说明进行总 RNA 的提取, 空气中自然干燥总 RNA。核酸干燥后用 $10.0\text{ }\mu\text{L}$ DEPC 处理水充分溶解, 加入下游引物 P2 ($25.0\text{ }\mu\text{mol/L}$) $1.0\text{ }\mu\text{L}$, 置 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min, 取出后立即冰浴 5 min, 再分别加入 dNTP $4.0\text{ }\mu\text{L}$, $5\times$ AMV

Buffer 4.0 μL , AMV 0.5 μL , HPR I 0.5 μL , 总体积 20.0 μL 。42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反转录 90 min 后取出, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.5 E_2 主要抗原区基因的巢式 PCR 扩增及鉴定

取第 1 链 cDNA 4.0 μL 作为模板进行 PCR 反应, 反应体系中其他成分为: 超纯水 34.0 μL , 10 \times PCR Buffer 5.0 μL , dNTP 4.0 μL , 上下游引物各 1.0 μL (25.0 $\mu\text{mol/L}$), rTaq DNA 聚合酶 1.0 μL , 总体积 50.0 μL 。第 1 次扩增 PCR 条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s 共 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。第 2 次扩增取 10 倍稀释的第 1 次扩增产物 4.0 μL 作为模板, PCR 条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s 共 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。反应完毕后取 5.0 μL PCR 产物于 10 g/L 琼脂糖凝胶中电泳, 凝胶成像系统中观察照相。

1.6 PCR 产物的回收、克隆及测序

PCR 产物纯化按照 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒说明进行。回收产物与 pMD18-T 载体连接, 转化 DH5 α 感受态细胞, 经 Amp、IPTG、X-gal 筛选, 挑取白色单个菌落, 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇培至饱和, 菌液 PCR 鉴定为阳性, 提取质粒, BamHI、HindIII 双酶切鉴定, 阳性质粒送上海生工进行测序。

1.7 E_2 基因核苷酸和氨基酸序列比较分析

先后获得了 2 株疫苗毒株和陕西省 23 株流行毒株 E_2 主要抗原区 A 区域序列, 利用 DNASTar 软件与 GenBank 中发表的 CSFV 代表毒株分别进行核苷酸和氨基酸同源性比较分析, 并绘制系统发生树。

2 结果

2.1 E_2 基因主要抗原区扩增

采用以上条件从 23 份病料上清液和 2 份疫苗稀释液中成功扩增了 E_2 基因的主要抗原区 A 区域, 这 23 株流行毒株命名为 AH11、AH24、AH48、AH76、AH139、AH140、AH144、AH150、AH152、AH153、AH154、AH156、AH157、AH159、AH160、AH161、AH163、AH165、AH169、AH170、AH171、AH174 和 AH182, 分别来自陕西省咸阳市、宝鸡市、西安市、渭南市及铜川市, 巢式 PCR 扩增结果与预期的 272 nt 片段大小相符, 见图 1。

2.2 E_2 基因核苷酸和氨基酸序列比较

用 DNASTar 软件分析 2 株目前疫苗毒株、23

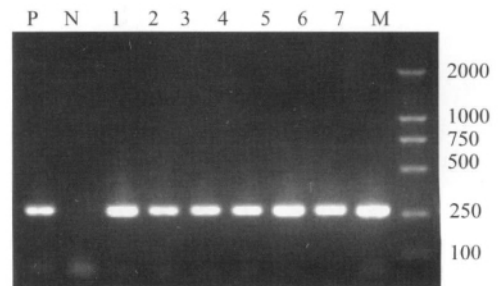


图 1 E_2 基因巢式 PCR 扩增电泳

注: 图 P 阳性对照, N 阴性对照, 1~5 部分病料扩增, 6 脾毒苗, 7 细胞苗, M DL2000 DNA 分子质量标准

Fig. 1 Result of nested PCR of E_2 gene

Note: P: Positive control; N: Negative control; 1~5: Result of some positives; 6: Vaccine strain of spleen;

7: Vaccine strain of cell culture; M: DL2000 DNA marker

株流行毒株和经典 HCLV 株及 Shimen 株的核苷酸和推导氨基酸的同源性, 分析表明 AH144、AH152、AH153、AH154、AH161、AH163、AH171 和 AH174 这 8 株同源性为 100%, 选 AH144 为代表; AH150 和 AH169 同源性为 100%, 以 AH150 为代表; AH165 和 AH170 同源性为 100%, 以 AH165 为代表; AH139、AH140 和 AH182 同源性为 100%, 以 AH139 为代表; 细胞苗和脾毒苗同源性也为 100%, 以细胞苗为代表。比较结果见表 2。

2.3 E_2 基因系统发生树分析

用 DNASTar 软件中 MegAlign 功能, 分析 2 株疫苗毒株、23 株流行毒株和经典 HCLV 株及 Shimen 株的核苷酸分子衍化关系, 对这些毒株进行基因分群。结果见图 2。

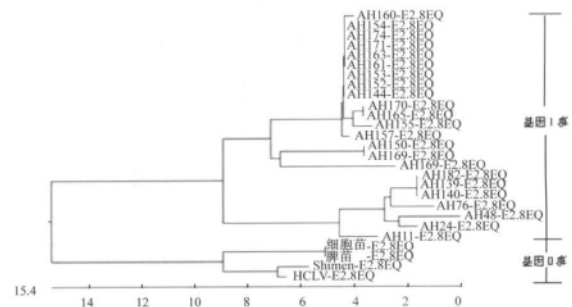


图 2 E_2 基因系统发生树

Fig. 2 Phylogenetic tree of E_2 gene

3 讨论

3.1 2 株疫苗和 23 株流行毒株 E_2 基因主要抗原区核苷酸和氨基酸同源性分析

E_2 蛋白作为 CSFV 主要保护性抗原能诱导机

表 2 E_2 主要抗原区核苷酸与推导氨基酸序列同源性

Tab. 2 Nucleotide and amino acid homogeneity of E_2 gene

%

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
|----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1 | | 95.2 | 90.8 | 87.9 | 89.7 | 90.4 | 89.3 | 90.4 | 90.1 | 95.2 | 94.1 | 94.5 | 79.8 | 80.1 | 80.1 |
| 2 | 94.4 | | 88.6 | 89.0 | 87.5 | 88.2 | 87.1 | 88.2 | 87.9 | 97.1 | 96.0 | 97.4 | 77.6 | 78.3 | 78.3 |
| 3 | 92.2 | 92.2 | | 94.1 | 98.9 | 99.6 | 93.0 | 99.6 | 99.3 | 88.6 | 86.8 | 87.9 | 79.4 | 80.5 | 80.1 |
| 4 | 92.2 | 94.4 | 97.8 | | 93.8 | 93.8 | 92.6 | 93.8 | 93.0 | 89.0 | 87.1 | 87.5 | 77.6 | 79.4 | 78.7 |
| 5 | 91.1 | 91.1 | 98.9 | 96.7 | | 98.5 | 92.3 | 98.5 | 98.9 | 87.5 | 85.7 | 86.8 | 79.4 | 80.5 | 80.1 |
| 6 | 91.1 | 91.1 | 98.9 | 96.7 | 97.8 | | 92.6 | 99.3 | 98.5 | 88.2 | 86.4 | 87.5 | 80.1 | 81.2 | 80.9 |
| 7 | 91.1 | 91.1 | 98.9 | 96.7 | 98.9 | 97.8 | | 92.6 | 92.3 | 87.9 | 86.4 | 86.4 | 77.2 | 80.1 | 79.4 |
| 8 | 92.2 | 92.2 | 100 | 97.8 | 98.9 | 98.9 | 98.9 | | 98.9 | 88.2 | 86.4 | 87.5 | 79.0 | 80.1 | 79.8 |
| 9 | 91.1 | 91.1 | 98.9 | 96.7 | 97.8 | 97.8 | 97.8 | 98.9 | | 87.5 | 86.0 | 87.1 | 78.3 | 79.4 | 79.0 |
| 10 | 95.6 | 98.9 | 93.3 | 93.3 | 92.2 | 92.2 | 92.2 | 93.3 | 92.2 | | 97.1 | 96.7 | 77.9 | 78.7 | 78.7 |
| 11 | 91.1 | 94.4 | 88.9 | 88.9 | 87.8 | 87.8 | 87.8 | 88.9 | 87.8 | 95.6 | | 96.0 | 76.8 | 77.2 | 77.2 |
| 12 | 94.4 | 97.8 | 92.2 | 92.2 | 91.1 | 91.1 | 91.1 | 92.2 | 91.1 | 98.9 | 94.4 | | 76.8 | 77.2 | 77.2 |
| 13 | 81.1 | 80.0 | 84.4 | 83.3 | 84.4 | 85.6 | 84.4 | 84.4 | 83.3 | 80.0 | 75.6 | 78.9 | | 93.4 | 94.1 |
| 14 | 82.2 | 83.3 | 87.8 | 86.7 | 87.8 | 88.9 | 87.8 | 87.8 | 86.7 | 83.3 | 78.9 | 82.2 | 90.0 | | 98.5 |
| 15 | 83.3 | 84.4 | 88.9 | 87.8 | 88.9 | 90.0 | 88.9 | 88.9 | 87.8 | 84.4 | 80.0 | 83.3 | 92.2 | 97.8 | |

注: 右上角为核苷酸同源性, 左下角为氨基酸同源性。

Note: Nucleotide homogeneity is in front of table, below is amino acid homogeneity, 1. AH11, 2. AH139, 3. AH144, 4. AH150, 5. AH156, 6.

AH157, 7. AH159, 8. AH160, 9. AH165, 10. AH24, 11. AH48, 12. AH76, 13. 细胞苗, 14. HCLV, 15. Shimen.

体产生保护性中和抗体, 流行毒株 E_2 基因的变异可能导致 E_2 蛋白抗原性的改变, 从而影响疫苗的免疫保护力, 因而研究 E_2 基因和蛋白的变异对制定 CSFV 防制策略具有重要意义。我国数位学者研究结果均认为流行毒株 E_2 基因发生了较大变异, 和 HCLV 株同源性约在 82%~84%^[8-10]。

从表 2 可以看出, 23 株流行毒株之间的核苷酸同源性在 86.0%~100%, 氨基酸同源性在 87.8%~100%; 和 HCLV 株相比, 核苷酸同源性在 77.2%~81.2%, 氨基酸同源性为 78.9%~88.9%; 与经典强毒 Shimen 株核苷酸同源性为 77.2%~80.9%, 氨基酸同源性为 80.0%~90.0%。表明 23 株流行毒株与 HCLV 株 E_2 基因和蛋白主要抗原区相比发生了明显的变异。

测得的 2 株当前 CSFV 疫苗株 E_2 基因主要抗原区, 和 HCLV 株相比较, 结果发现核苷酸同源性为 93.4%, 氨基酸同源性为 90.0%; 而和 Shimen 株相比, 核苷酸同源性为 94.1%, 氨基酸同源性为 92.2%, 与 Shimen 株的同源性反而比和 HCLV 株的同源性高, 结果提示目前疫苗 E_2 基因主要抗原区和 HCLV 株相比发生了较为明显的变异。

将流行毒株和测定的细胞苗 E_2 基因相比较, 核苷酸同源性在 76.8%~80.1% 之间, 氨基酸同源性为 75.6%~85.6% 之间。相对于和 HCLV 株的比较结果, 同源性更低, 提示测定的目前疫苗毒株和

流行毒株相对于 HCLV 株的变异方向是相反的。综合近年 CSFV E_2 基因分子流行病学研究成果, 可以看出 CSFV E_2 基因的变异呈现一种随时间的推移逐渐远离疫苗株的趋势, 现有疫苗株的保护作用需要密切关注, 提示我国应做好针对当前流行毒株的疫苗技术储备。

表 3 测定疫苗株和 HCLV 株 E_2 主要抗原区氨基酸位点变异

Tab. 3 Variation of vaccine strain and HCLV

| HCLV | 疫苗 | 位置 | 在 ORF 中 相对位置 | HCLV | 疫苗 | 位置 | 在 ORF 中 相对位置 |
|------|----|----|-----------------|------|----|----|-----------------|
| N | D | 4 | 665 | L | P | 63 | 724 |
| S | N | 22 | 683 | L | S | 78 | 739 |
| Q | H | 23 | 684 | G | R | 87 | 748 |
| I | S | 35 | 696 | F | S | 88 | 749 |

3.2 2 株疫苗和 23 株流行毒株 E_2 基因主要抗原区氨基酸位点变异分析

分析测定毒株氨基酸序列, 发现和 HCLV 株相比较, 疫苗株和流行毒株均在多个位点发生变异。疫苗株和 HCLV 比较变异位点情况见表 3, 流行毒株与 HCLV 比较变异位点情况见表 4。

表 3 提示当前疫苗和经典 HCLV 株 E_2 主要抗原区相比, 在所测定的 91 个氨基酸位点中有 9 个位点发生了变异, 表 4 则表明流行毒株相对于 HCLV 株有 12 个氨基酸位点发生了变异。Van Rijin 等^[11]

表 4 测定流行毒株和 HCLV 株 E_2 主要抗原区氨基酸位点变异

Tab. 4 Amino acid site variation of virulent strain and HCLV

| HCLV 流行毒株 | 位置 | 在 ORF 中 相对位置 site of ORF | HCLV 流行毒株 | 位置 | 在 ORF 中 相对位置 site of ORF |
|-----------|-------|--------------------------------|-----------|--------|--------------------------------|
| S | T | 2 | T | I(4 株) | 44 |
| G | E | 12 | G | R | 60 |
| Q | H | 23 | L | P | 63 |
| D | G | 24 | N | S | 76 |
| N | D 或 E | 28 | L | A 或 V | 78 |
| V | I 或 T | 37 | T | I 或 V | 79 |
| | | 663 | | | 705 |
| | | 673 | | | 721 |
| | | 684 | | | 724 |
| | | 685 | | | 727 |
| | | 689 | | | 729 |
| | | 698 | | | 730 |

研究表明在 E_2 基因的 B 区和 C 区内 705 位、710 位、713 位、729 位、734 位等位点的氨基酸变异会导致流行毒株发生免疫逃逸,这 5 个位点在 HCLV 株中分别为 N、L、G、N 和 K。在所测定的疫苗中,这 5 个位点均没有任何改变,9 个变异氨基酸位于其他位点,但疫苗在 E_2 的主要抗原区发生了近 10% 氨基酸变异,这对疫苗的免疫保护力有何影响,值得深入研究。流行毒株和 HCLV 株 E_2 主要抗原区比较,有 12 个氨基酸位点变化,其中 705 位有 4 株发生了 T→I 变异,729 位有 L→A 或 V 的变异,这 2 个位点和流行毒株免疫逃逸有关。此外尚有其他 10 个氨基酸位点的变异,流行毒株 E_2 主要抗原区发生了 13% 氨基酸变异,这对流行毒株的致病性以及疫苗的免疫保护作用有多大程度的影响,应予以密切关注。

比较疫苗和流行毒株的变异位点,只有 3 个位点相同,表明疫苗和流行毒株的变异趋势不一致。当前疫苗和流行毒株的差异比 HCLV 株和流行毒株的差异更大,这两种相反的变异趋势对于现有疫苗的保护力是个严峻考验。

3.3 23 株流行毒株 E_2 基因主要抗原区基因分群

国际上将 CSFV 划分为 3 个基因群 10 个基因亚群^[12]。涂长春^[13]测定了 1998—2002 年我国 30 个省、市、自治区 191 个 E_2 基因片段,分析表明这 191 株 CSFV 流行毒株可分为 2 个基因群,以基因 I 群为主,占所分析毒株的 74%(141/191),基因 II 群毒株流行占次要地位,占 26%(50/191),未发现基因 III 群毒株。图 3 显示 23 株流行毒株明显和 Shimen 株、HCLV 株及测定的 2 个疫苗株形成 2 大分支,划分为 2 个基因群,流行毒株均属于基因 II 群。相比 1998—2002 年研究结果,基因 I 群的流行进一步减弱,在这次测定的流行毒株中没有发现 1 株基因 II 群毒株,提示 CSFV 流行毒株基因变异趋向一致,当前 CSFV 流行株以基因 I 群占主导地位。

参考文献:

- [1] Meyers G, Rumenapf T, Thiel H J. Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus [J]. *Virology*, 1989, 171: 555-567.
- [2] Moormann R J M, Warmerdam P A M, Meer B V D, et al. Molecular cloning and nucleotide sequence of hog cholera virus strain Brescia and mapping of the genome region encoding envelope protein E1 [J]. *Virology*, 1990, 177: 184-198.
- [3] Hulst M M, Panoto F E, Hoekman A, et al. Inactivation of the Rnase activity of glycoprotein E^{ms} of classical swine fever virus in a cytopathogenic virus [J]. *J Virol*, 1998, 72(1): 151-157.
- [4] Meyers G, Saalmuller A, Buttner M. Mutations abrogating the Rnase activity in glycoprotein E^{ms} of the pestivirus classical swine fever virus lead to virus attenuation [J]. *J Virol*, 1999, 73(12): 10224-10235.
- [5] Iqbal M, Flick-Smith H, McCauley J W. Interaction of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E^{ms} with cell surface glycosaminoglycans [J]. *J Gen Virol*, 2000, 81: 451-459.
- [6] Van Rijn P A. A preliminary map of epitopes on envelope glycoprotein E1 of HCV strain Brescia [J]. *Veterinary Microbiology*, 1992, 33: 212-230.
- [7] Van Rijn P A. Antigen structure of envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus [J]. *Journal of General Virology*, 1994, 68: 3934-3942.
- [8] 赵耘, 王在时, 王琴, 等. 23 株猪瘟疫毒 E_2 基因主要抗原编码区序列差异分析 [J]. *中国兽医科技*, 2002, 32(3): 3-7.
- [9] 李明晖, 刘湘涛, 韩雪清, 等. 4 株猪瘟疫流行野毒株病毒结构蛋白 E_2 基因的核苷酸序列分析 [J]. *中国兽医科技*, 2001, 31(5): 8-10.
- [10] 张永国, 张彦明, 邢福珊, 等. 猪瘟疫流行野毒株 E_2 基因编码的 gp55 蛋白模拟分析 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2003, 31(5): 128-132.
- [11] Van Rijn P A, Van Gennip H G P, Demeijer E J, et al. Epitope mapping of envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus strain Brescia [J]. *J Gen Virol*, 1993, 74(10): 2053-2066.
- [12] Paton D J, McGoldrick A, Grieser-Wilke I, et al. Genetic typing of classical swine fever virus [J]. *Vet Microbiol*, 2000, 73: 137-157.
- [13] 涂长春. 中国猪瘟疫流行病学现状与防制研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2004.