

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.04.10

猪瘟病毒在宿主细胞中增殖与遗传变异的研究进展

孙骏翔, 徐璐, 王琴, 张乾义*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2017-10-23 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 04-0060-06 [中图分类号] S852.65

[摘要] 就瘟病毒属尤其是猪瘟病毒在宿主细胞中的增殖过程及遗传变异两个方面进行了介绍, 其中增殖过程主要包括病毒吸附宿主细胞及其内化、基因复制表达、病毒粒子的装配及释放几个步骤, 以期为研究瘟病毒在体内的增殖分布规律提供参考。

[关键词] 猪瘟病毒; 吸附; 复制; 装配; 变异

Progress about the Proliferation and Genetic Variations of CSFV in Host Cell

SUN Jun-xiang, XU Lu, WANG Qin, ZHANG Qian-yi*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: ZHANG Qian-yi, E-mail: zhangqy114@126.com

Abstract: In order to provide reference for the distribution research of pestiviruses within the host cell, the proliferation process and genetic variations of pestiviruses, especially classical swine fever virus (CSFV) were introduced. The proliferation process includes several key steps, such as the adsorption of virus to host cell and the internalization, the replication and expression of gene, the assembly and release of virus particles.

Key words: CSFV; adsorption; replication; assembly; variation

猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)是有囊膜的单股正链 RNA 病毒, 隶属于黄病毒科瘟病毒属。该属主要成员还包括牛病毒性腹泻病毒(Bovine viral diarrhea virus, BVDV)、边界病病毒(Border disease virus, BDV)等。瘟病毒不能在无脊椎动物体内增殖, 而且所有成员不通过节肢动物传播^[1]。瘟病毒在细胞浆内增殖并发育成熟。在宿主细胞中的增殖主要包括吸附宿主细胞及其内化、基因复制表达、病毒粒子的装配及释放等过程。而目前人们针对瘟病毒属在宿主体内增殖及遗传

变异过程知之甚少, 因此就瘟病毒属特别是猪瘟病毒的增殖过程及遗传变异情况进行了论述。

血清学实验证明, CSFV、BVDV 和 BDV 之间在抗原上存在很大相似性, 有很强的交叉反应, 肯定了它们之间存在着很近的亲缘关系。人们在早期按照宿主动物的种类来区别瘟病毒, 例如从牛中分离出的瘟病毒被命名为 BVDV, 而从猪中分离的则被称为 CSFV。实际上这三种病毒能在彼此的易感宿主中传播, 例如猪可以被 BVDV 或 BDV 自然感染, 而在动物感染实验中 BVDV 能感染猪和羊,

作者简介: 孙骏翔, 硕士研究生, 从事猪瘟分子病毒学研究。

通讯作者: 张乾义。E-mail: zhangqy114@126.com

BDV 能感染牛和猪。

1 病毒的增殖

1.1 病毒的吸附穿入及内化 OIE/国家猪瘟参考实验室应用可视化原位杂交技术 (ViewRNA ISH) 在体外细胞实验证明,CSFV 在感染细胞 0.5 h 以内吸附进入靶细胞^[2]。病毒吸附效率与环境 pH 有关,经过 NH_4Cl 处理的细胞,CSFV 感染效率会发生明显下降,说明 CSFV 建立感染的过程有可能依赖于酸性环境^[3]。病毒的吸附内化是一个极其复杂的过程,除了与 pH 有关外,病毒蛋白及其受体同样发挥着重要作用。瘟病毒在吸附和穿入宿主细胞时,主要由 E^{ms} 、E1、E2 三种囊膜糖蛋白与宿主细胞受体蛋白之间相互作用介导的内吞来完成。囊膜蛋白的糖基化对病毒侵染细胞有重要作用,应用糖基化抑制剂抑制 E^{ms} 、E1、E2 三种囊膜糖蛋白的糖基合成和修饰,可以有效地降低病毒对宿主细胞的感染能力^[4]。 E^{ms} 蛋白的受体是硫酸乙酰肝素 (HS)。 E^{ms} 蛋白中相应氨基酸的改变导致其与 HS 结合能力的差异,从而引起不同病毒毒株在体内和体外感染宿主细胞的能力差异^[5]。但 E^{ms} 对于病毒吸附宿主细胞却不是必须的,有研究表明在一个以假病毒为载体的试验中,E1 和 E2 即可满足病毒的穿入需要^[6],目前针对 E2 蛋白的受体尚无明确定论,免疫共沉淀试验证明猪瘟病毒 E2 蛋白能够沉淀 PK15 细胞表面的 CD46 分子^[7],说明 CD46 蛋白与猪瘟病毒 E2 蛋白之间存在相互作用,提示 CD46 蛋白可能是猪瘟病毒吸附过程中所必需的受体蛋白之一。

瘟病毒属同其他有囊膜病毒类似,也是通过胞吞作用进入靶细胞。以 CSFV 为例,CSFV 通过囊膜蛋白与受体结合,再经包涵素依赖的受体介导的胞吞途径内化。糖蛋白与受体结合后,激活或者暴露其相应的内吞信号,内吞信号能介导它们进入包被小窝,随后胞膜局部磷脂组成改变,从而使胞膜弯曲。一旦包被小窝向内凹陷到一定程度,包被小窝从细胞膜处分离从而形成胞吞囊泡。胞吞囊泡进入细胞浆后,在突触小泡磷酸酶 (Synaptojanin)、辅助蛋白 (Auxilin) 等蛋白共同作用下脱包被^[8],随

后在包涵素等参与下与质膜附近的早期内吞体融合,内吞体中的酸性环境可以促使病毒的穿透,完成病毒的侵入过程。

1.2 病毒基因翻译与复制 病毒侵入宿主细胞后,CSFV 基因组从核衣壳中释放后,单股正链 RNA 直接作为 mRNA 进行蛋白质翻译,翻译成一个由 3,898 个氨基酸残基组成的多聚蛋白,经过蛋白酶作用,被裂解成 4 个结构蛋白 (核心蛋白 C、 E^{ms} 、E1、E2) 和 8 个非结构蛋白 (N^{pro} 、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B)。各蛋白的排列顺序从 N 端到 C 端依次为 $\text{NH}_2\text{-N}^{\text{pro}}\text{-C-E}^{\text{ms}}\text{-E1-E2-P7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH}$ 。现已明确了 CSFV 大部分基因片段的分子结构和功能。病毒蛋白与宿主蛋白相互作用,共同完成病毒的翻译与复制。

CSFV RNA 复制是在细胞质膜上进行的,丝裂原激活的蛋白激酶激酶 2 (Mitogen-activated protein kinase kinase 2, MEK2) 位于细胞质内,是细胞外信号调节激酶 (Extracellular signaling - regulation kinase, ERK) 信号通路的重要激酶,ERK 信号通路可以与 JAK-STAT 信号通路相互调节发挥 $\text{INF-}\alpha$ 的抗病毒作用。MEK2 与 E2 蛋白互作可以下调 JAK-STAT 的信号通路,进而增强 CSFV 的复制^[9]。OIE/国家猪瘟参考实验室应用可视化原位杂交 (ViewISH) 技术对感染细胞中 CSFV RNA 的定位研究中发现,感染早期病毒 RNA 不仅存在于细胞浆,细胞核内也检测到病毒 RNA 的存在,提示宿主细胞核对病毒复制有着某种作用^[10]。已有文献证明核不均一性核糖核蛋白 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, hnRNPs) 是存在于细胞核中的一类蛋白,参与病毒 RNA 的合成与加工。在 CSFV 感染诱导 PK-15 细胞蛋白质组研究中也发现细胞中有 4 种 hnRNPs 的表达水平发生变化^[11],表明 CSFV 的复制同样需要宿主细胞 hnRNPs 参与病毒 RNA 的合成与加工。NS3 蛋白是核糖体切入位点结合蛋白,其 RNA 解旋酶活性可以增强核糖体切入位点内翻译和细胞翻译,是 CSFV 基因复制不可或缺的蛋白基因^[12]。NS5B 与 NS3 蛋白酶结构域

作用既可以增强核糖体切入位点作用,也可以增强细胞的蛋白翻译水平。体外实验证实 C 蛋白可以促进由 NS5B 蛋白介导的 RNA 从头合成途径,且 C 蛋白与 NS5B 共表达可以增强 NS5B 蛋白的活性^[13]。NS5B 编码的 RdRp(RNA 依赖性 RNA 聚合酶)是病毒复制酶的主要成分,与其他病毒蛋白及宿主细胞中的一些蛋白因子共同构成病毒复制酶系统。CSFV 的 RdRp 具有模板特异性,能复制病毒的 RNA 而不复制细胞的 RNA。RdRp 存在一段由 12 个氨基酸残基组成的 β -loop 结构,该结构可以调控 RdRp 准确的从病毒 RNA 3'末端起始 RNA 合成。RdRp 与 CSFV 正链 RNA 的 3'NTR 上的复制起始位点结合,在宿主蛋白和其他蛋白的帮助下,按照引物非依赖从头合成的机制,以正链 RNA 为模板起始病毒 RNA 的合成^[14]。随着负链 RNA 的延长,RdRp 沿着模板到达 5'NTR 内的复制起始识别位点,为合成第二条链做准备。由于 5'末端存在发卡结构,RdRp 到达 5'末端后利用自身的核糖核酸转移酶活性继续延长正在合成的 RNA 链,然后采用 copy-back 机制折返^[15],开始以负链为模板进行 RNA 的正链合成,连接处的单链部分随后被水解。

CSFV、BVDV 的 5'NTR 无甲基化的帽子结构由 360~386 个核苷酸组成,有两个复杂的茎环结构和发卡结构^[16]。CSFV 的 3'NTR 含有起始 RNA 合成的启动子、增强子等顺式作用元件,因此在病毒复制中起着非常重要的调控作用。3'NTR 的二级结构中,第一茎环及第一茎环和第二茎环之间的单链序列为复制起始的必需因子,其茎环结构的改变可以调节病毒 RNA 的复制效率。

1.3 病毒的装配与释放 新合成的病毒核酸和结构蛋白在感染细胞内组合成病毒颗粒的过程称为装配,而从细胞内转移到细胞外的过程为释放。病毒的装配是病毒复制增殖中的重要步骤,与大多数 RNA 病毒相似,CSFV 的装配也是在细胞质中完成。对于单链 RNA 病毒来说,壳体是沿着基因组组装的,组装原则是 RNA 在壳体的位置直接由与之结合的外壳蛋白决定^[17]。C 蛋白是 CSFV 编码的第一个结构蛋白,它在合成后不久即与基因组

RNA 结合包装形成核衣壳。另外,C 蛋白和宿主细胞骨架调控蛋白 IQGPA1(IQ domain GTPase—activating protein1)发生作用决定病毒从宿主细胞中释放以及感染细胞过程中穿透细胞膜^[18]。其余三个结构蛋白的二聚化可能在病毒装配中有着重要作用^[19]。病毒囊膜蛋白在细胞中的分布与数量在很大程度上决定了病毒成熟的部位。CSFV 的囊膜蛋白在 C-E^{ms}-E1-E2 前体的基础上,由定位在宿主细胞内质网和高尔基体上的信号肽酶、蛋白水解酶以及糖基化酶的作用下加工成熟的,并被转运到内质网上。成熟的病毒粒子常见于细胞质中的无定型基质的囊膜中,有时还可看到囊膜在质膜处的开口以及周围的无定型基质和其中的成熟病毒,提示 CSFV 可能是通过这一特殊结构向外释放,且多数释放的病毒依然吸附在无定型基质中^[20]。非结构蛋白也在 CSFV 的装配和释放中发挥作用,瘟病毒的 P7 蛋白是病毒孔蛋白家庭中的成员^[21],可以通过寡聚化在膜上形成一个亲水孔,进而调节跨膜阳离子的通透性,这对病毒的释放和成熟非常重要。与黄病毒和丙型肝炎病毒(HCV)相似,CSFV 在完成出芽的过程中获得病毒包膜。CSFV 在体外细胞培养下,发现新释放的病毒可以通过三种方式感染更多的细胞:一是感染细胞内释放的病毒粒子经过培养液感染新的易感细胞;二是被感染细胞通过有丝分裂直接传给子细胞,向培养液中加入抗猪瘟的抗血清不影响病毒感染滴度^[22];三是病毒通过细胞间桥在细胞之间传播^[23],或者外泌小体可以介导 CSFV 在细胞间的传递,从而开始新的病毒复制周期。

2 病毒的遗传变异

CSFV 和 BVDV 的 5'NTR 是高度保守的^[24],而 3'NTR 则完全相反。CSFV、BVDV 的 5'NTR 无甲基化的帽子结构有多个 AUG 密码子和一个核糖体结合位点,在病毒基因组复制及多聚蛋白表达中发挥重要的调控作用。不同 CSFV 毒株的 5'NTR 同源性较高,这有助于 CSFV 分子流行病学的调查和研究;同样,BVDV 的 5'UTR 包含保守序列和高变序列,可以作为 BVDV 基因分型的依据^[25]。陈锐等

从基于 5'NTR 序列绘制的系统进化树分析西部散养肉牛 BVDV,发现不同地区散养肉牛感染的 BVDV 基因亚型有所不同^[26]。CSFV 的 3'NTR 含有起始 RNA 合成的启动子、增强子等顺式作用元件,因此在病毒复制中起着非常重要的调控作用。比较猪瘟强毒株 Shimen 和疫苗株 HCLV 的 3'NTR 二级结构后发现,疫苗株的 3'NTR 存在一个富含 12bp 的 CTTTTTCTTTT 核苷酸结构,而强毒株 3'NTR 则没有这 12 个核苷酸的插入,研究表明,CSFV 3'NTR 插入 12 个核苷酸序列和病毒毒力的减弱有密切的关系^[27]。这 12 个核苷酸的插入可能导致 3'NTR 二级结构的不稳定性,从而影响病毒 RNA 的合成。CSFV 3'NTR 的二级结构对毒复制和毒力有很大的影响,其二级结构包括 4 个茎环,按逆时针方向依次为茎环 I、II、III、IV^[28],茎环 I、II 较为稳定,Shimen 株等强毒株的复制起始识别位点位于茎环 I 区域的右侧,而 C 株复制起始的识别位点是在茎环 I 顶端的两侧。茎环 III、IV 位于 3'NTR 的高可变区,也是二级结构变化最大的区域,它的变化影响到病毒整个 3'NTR 的二级结构,从而进一步影响了 CSFV RNA 的复制。

病毒的变异主要源于其基因的突变和重组^[29],而瘟病毒属成员均为 RNA 病毒,没有 RNA 聚合酶的校对功能,因此病毒的变异率较高。已有报道证实我国存在同源重组的 CSFV^[30]。病毒一般通过重要抗原表位的变异,从而丧失与抗体的结合能力,导致毒株无法被机体免疫系统有效清除,造成持续感染。CSFV 的 E2 蛋白可以诱导机体产生中和抗体从而有效对抗病毒感染,所以 E2 基因的变异可能导致 CSFV 流行毒株的免疫逃逸。通过对 CSFV 石门株不同代次 E2 基因主要抗原编码区序列差异分析,证实 CSFV 在体内及体外具有一定的遗传稳定性,不因宿主免疫系统的选择压力而发生明显的遗传变异^[31]。CSFV E2 蛋白有 15 个保守 Cys 位点,其中位于 N 端的 6 个 Cys 通过形成 3 对二硫键对结构的正确折叠以及特异性抗原决定簇形成起着重要作用。李玲伟研究发现了一株 CSFV 突变株,其 737 位 Cys 突变为 Arg,破坏 B/C

抗原区的空间结构,该突变株不能与部分对 B/C 抗原区的单克隆抗体反应,这一变异可能会影响疫苗的免疫效果^[32]。E2 基因是瘟病毒的主要保护性抗原编码基因,在瘟病毒结构蛋白基因中变异较大,代表着毒株的遗传特性。采用国际公认的利用 E2 基因序列进行分型可以将 CSFV 分为 3 个基因型,11 个基因亚型,即 1.1、1.2、1.3、1.4、2.1、2.2、2.3、3.1、3.2、3.3 和 3.4 亚型。Postel 等对欧洲 33 个 CSFV 分离毒株基因组 5'-NTR-E2 区段的约 3580 个核苷酸进行了分析,发现 E2 全长基因编码序列构建的进化树更具有统计学意义^[33],并利用 E2 全长分析,将以前 E2 基因片段系统进化分析鉴定的 1.2 亚型古巴 CSFV 流行毒株重新划分为基因 1.4 亚型^[34]。本实验室通过对近年来各地样本检测并使用 E2 全基因序列分析发现,猪瘟在我国流行毒株已从 2.1 型、2.2 型、1.1 型,变为 2.1 型、1.1 型,且 2.1 亚型分布更为广泛。

3 结 语

随着 NS3、N^{pro}、E2 等病毒蛋白质功能的研究深入,人们对瘟病毒在体内增殖过程的研究有了一定的进展。而了解和监控病毒的变异动态,将为该病毒的防控或净化提供有力的理论和技术支撑。本文通过论述瘟病毒在细胞内增殖过程及病毒蛋白和宿主蛋白在病毒吸附及内化、基因复制表达、病毒粒子的装配及释放等过程中所发挥的作用,系统的阐述了瘟病毒在机体中的增殖特性及遗传变异。但依然有许多问题亟待解决,如瘟病毒的内化过程中需要的细胞受体、宿主细胞核是否在病毒复制过程中起作用、病毒装配后具体是如何释放到胞外等,人们对此依然知之甚少。近年来,得益于高通量测序的发展,采用文库筛选法来筛选病毒的特异细胞受体逐步为研究者青睐。文库筛选法与免疫共沉淀等传统筛选受体方法相比具有高容量的特点,可涵盖全基因组,摆脱了传统方法仅能筛选高丰度细胞受体的局限性。相信随着科研人员对瘟病毒基础研究的进一步探索,不但可以为研究病毒与宿主间的相互作用提供思路,也为 CSFV 受体的互作蛋白研究提供科学的理论依据。

参考文献:

- [1] 扈荣良. 现代动物病毒学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2014: 1298.
Hu R L. Modern animal virology[M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2014: 1298.
- [2] 张玉杰, 赵燕, 徐璐, 等. RNA 可视化原位杂交技术对感染细胞中猪瘟病毒 RNA 定位与分布的研究[J]. 中国农业科学, 2016, 49(12): 2397-2407.
Zhang Y J, Zhao Y, Xu L, *et al.* Study of location and distribution of classical swine fever virus RNA in PK15 cells by visualization in situ hybridization technology[J]. Scientia Agriculture Sinica, 2016, 49(12): 2397-2407.
- [3] 梁武龙, 方佳, 林鸢, 等. 猪瘟病毒通过网格蛋白介导的内吞途径入侵 ST 细胞[J]. 畜牧兽医学报, 2017, (1): 140-149.
Lang W L, Fang J, Lin Z, *et al.* Classical swine fever virus entry into ST cells by clathrin-mediated endocytosis pathway[J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2017, 48(1): 140-149.
- [4] He D N, Zhang X M, Liu K, *et al.* In vitro inhibition of the replication of classical swine fever virus by porcine Mx1 protein[J]. Antiviral Research, 2014, 104(1): 128-135.
- [5] Eymann-Hani R, Leifer I, McCullough K C, *et al.* Propagation of classical swine fever virus in vitro circumventing heparin sulfate-adaptation[J]. Journal of Virological Methods, 2011, 176: 85-95.
- [6] Wang Z, Nie Y, Wang P, *et al.* Characterization of classical swine fever virus entry by using pseudotyped virus; E1 and E2 are sufficient to mediate viral entry[J]. Virology, 2004, 330: 332-341.
- [7] 常天明. 猪瘟病毒 E2 蛋白结合细胞受体的鉴定[D]. 中国农业科学院硕士学位论文, 2010.
Chang T M. Identification a Putative E2-binding cellular receptor of classical swine fever virus[D]. Master Dissertation of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2010.
- [8] 陈晔光, 张传茂. 分子细胞生物学[M]. 北京: 清华大学出版社, 2006: 105-205.
Chen Y G, Zhang C M. Molecular cell biology[M]. Beijing: Tsinghua University Press, 2006: 126.
- [9] Wang J, Chen S, Liao Y, *et al.* Mitogen-activated protein kinase kinase 2, a novel E2-interacting protein, promotes the growth of classical swine fever virus via attenuation of the JAK-STAT signaling pathway[J]. Journal of Virology, 2016, 90(22): 10271-10283.
- [10] Zhang Q Y, Xu L, Zhang Y J, *et al.* A novel view RNA in situ hybridization method for the detection of the dynamic distribution of classical swine fever virus RNA in PK15 cells[J]. Virology Journal, 2017, 14(1): 81.
- [11] 孙金福. 猪瘟病毒感染蛋白质组学研究[D]. 吉林大学博士学位论文, 2008.
Sun J F. Proteomics of classical swine fever virus infection[D]. Doctoral Dissertation of Jilin University, 2008.
- [12] Zhu Z L, Wang Y J, Yu J L. Classical swine fever virus NS3 is an IRES-binding protein and increases IRES-dependent translation[J]. Virus Research, 2010, 153(1): 106-112.
- [13] Xiao M, Bai Y, Xu H, *et al.* Effect of NS3 and NS5B proteins on classical swine fever virus internal ribosome entry site-mediated translation and its host cellular translation[J]. Journal of General Virology, 2008, 89(4): 994-999.
- [14] Li W, Zhang Y, Kao C C. The classic swine fever virus (CSFV) core protein can enhance denovo-initiated RNA synthesis by the CSFV polymerase NS5B[J]. Virus Genes, 2014, 49(1): 106-115.
- [15] 伊光辉, 张楚瑜. 正链 RNA 病毒起始 RNA 合成分子机制的研究进展[J]. 病毒学报, 2005, 21(2): 150-154.
Yi G H, Zhang C Y. Recent advances in molecular mechanisms of initiation of RNA synthesis in positive strand RNA viruses[J]. Chinese Journal of Virology, 2005, 21(2): 150-154.
- [16] Risager P C, Fahnøe U, Gullberg M, *et al.* Analysis of classical swine fever virus RNA replication determinants using replicons[J]. Journal of General Virology, 2013, 94(8): 1739-1748.
- [17] Jocelyn E K, Elliott S G, Stephen T K. Lewin's genes X[M]. Beijing: Science Press, 2014: 204.
- [18] Gladue D P, Holinka L G, Fernandez-Sainz I J, *et al.* Interaction between core protein of classical swine fever virus with cellular IQGAPI protein appears essential for virulence in swine[J]. Virology, 2011, 412(1): 68-74.
- [19] Fernández-Sainz I J, Largo E, Gladue D P, *et al.* Effect of specific amino acid substitutions in the putative fusion peptide of structural glycoprotein E2 on classical swine fever virus replication[J]. Virology, 2014, 456-457(1): 121-130.
- [20] 王镇, 闵光伟, 李明义, 等. 猪瘟病毒的形态结构与形态发生[J]. 微生物学通报, 2000, 40(3): 237-242.
Wang Z, Min G W, Li M Y, *et al.* The morphological structure and morphology of CSFV[J]. Microbiology China, 2000, 40(3): 237-242.
- [21] Bentham M J, Foster T L, McCormick C, *et al.* Mutations in hepatitis C virus p7 reduce both the egress and infectivity of assembled particles via impaired proton channel function[J]. Journal of General Virology, 2013, 94(10): 2236-2248.

- [22] 王三虎. 河南省猪瘟疫行病学调查及 E2 基因 DNA 疫苗的研究[D].南京农业大学博士学位论文,2007.
- Wang S H. Epidemiological investigation of classical swine fever in Henan province and study on DNA vaccine of E2 gene[D]. Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2007.
- [23] 王 琴, 涂长春. 猪瘟[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015:131.
- Wang Q, Tu C C. Classical swine fever [M]. Beijing: China agriculture Press, 2015:131.
- [24] 吴 锐. 猪瘟病毒糖蛋白 E2 和 3'非编码区在决定病毒特性和致病性中的作用[D].武汉大学博士学位论文,2015.
- Wu R. The effect of classical swine fever virus E2 and 3'UTR on virus characteristics and pathogenicity[D]. Doctoral Dissertation of Wuhan University, 2015.
- [25] M Deng, S Ji, W Fei, *et al.* Prevalence study and genetic typing of bovine viral diarrhea virus (BVDV) in four bovine species in China [J]. Plos One, 2015, 10(4): e0121718.
- [26] 陈 锐, 范学政, 朱元源, 等. 西部散养肉牛病毒性腹泻病毒流行及遗传变异[J]. 中国农业科学, 2016, (4913): 2634-2641.
- Chen R, Fan X Z, Zhu Y Y, *et al.* Prevalence study and phylogenetic analysis of bovine viral diarrhea virus in free-roaming beef cattle in western China [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2016, 49(13): 2634-2641.
- [27] Wang Y, Wang Q, Xu L, *et al.* 12-nt insertion in 3'untranslated region leads to attenuation of classic swine fever virus and protects host against lethal challenge [J]. Virology, 2008, (374): 390-398.
- [28] Sheng C, Yao Y, Chen B, *et al.* RNA helicase is involved in the expression and replication of classical swine fever virus and interacts with untranslated region [J]. Virus Research, 2013, 171(1): 257-261.
- [29] 杨德全, 鞠厚斌, 葛菲菲, 等. 猪瘟病毒基因组遗传变异研究进展[J]. 中国动物传染病学报, 2016, 24(5): 81-86.
- Yang D Q, Ju H B, Ge F F, *et al.* Advance in genetic variation of CSFV [J]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases, 2016, 24(5): 81-86.
- [30] Chen Y H, Chen Y F. Extensive homologous recombination in classical swine fever virus: A re-evaluation of homologous recombination events in the strain AF407339 [J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2014, 21(4): 311-316.
- [31] 赵 耘, 王在时, 王 琴, 等. 猪瘟病毒石门株不同代次 E2 基因主要抗原编码区序列差异分析[J]. 中国兽医杂志, 2002, 38(7): 7-10.
- Zhao Y, Wang Z S, Wang Q, *et al.* Sequence analysis of the major coding sequence of E2 of different batches of hog cholera virus Shimem strains[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2002, 38(7): 7-10.
- [32] 李玲伟. 我国部分省区猪瘟病毒 E0、E2 基因遗传变异分析及流行株全基因测定与分析[D]. 西北农林科技大学硕士学位论文, 2010.
- Li L W. Genetic and variation analyses on CSFV E0&E2 gene in parts of China and sequence analysis of the complete genome of epidemic strains[D]. Master Dissertation of Northwest Agriculture and Forestry University, 2010.
- [33] Postel A, Schmeiser S, Bernau J, *et al.* Improved strategy for phylogenetic analysis of classical swine fever virus based on full-length E2 encoding sequences [J]. Veterinary Research, 2012, 43(1): 1-15.
- [34] Postel A, Schmeiser S, Perera C L, *et al.* Classical swine fever virus isolates from Cuba form a new subgenotype 1.4 [J]. Veterinary Microbiology, 2013, 161(3): 334-338.

(编辑:李文平)