

临床样本中水貂嵌杯病毒的全基因组分析

王楷宸*, 庄青叶, 邱源, 王素春, 侯广宇

(中国动物卫生与流行病学中心, 青岛 266032)

摘要: 为分析水貂嵌杯病毒中国株的特性, 采用高通量测序方法测定青岛某养殖场检测的水貂嵌杯病毒的基因组, 并对其进行特性分析与比较基因组研究。结果显示, 该病毒全基因大小为 8 427 bp, 具有与其他嵌杯病毒相似的结构和基因顺序, 5'端具有帽子结构, 3'端具有 A 尾, 其与 19 株代表性毒株的全基因组和衣壳蛋白氨基酸序列同源性分析都证实该病毒与我国 2011 年报道的水貂嵌杯病毒同源性高, BLAST 进一步确认该病毒不属水貂肠道嵌杯病毒, 分析结果也对了解嵌杯病毒中各种未分属病毒的分类提供参考。

关键词: 水貂嵌杯病毒; 基因组; 分析; 高通量测序

中图分类号: S852.659.6

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2018)04-0771-06

Genome Analysis of the Mink Calicivirus Detected in Clinical Sample

WANG Kai-cheng*, ZHUANG Qing-ye, QIU Yuan, WANG Su-chun, HOU Guang-yu

(China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao 266032, China)

Abstract: To analyze the characterization of the mink calicivirus in China, the genome of the mink calicivirus detected in the farm of Qingdao was sequenced by high-throughput sequencing. The genome of the isolate was analyzed and compared with other caliciviruses. The results showed that the length of the isolate was 8 427 bp, which possessed the similar genomic organization, structure and gene order with the other calicivirus. It possessed 5'-untranslated region and 3'-poly(A) tail. The comparing analysis of the genome and capsid protein amino acid sequence of the virus and the 19 representative viruses showed that the identity between this virus and the Chinese virus detected in 2011 was high. The BLAST results showed that this virus was not belong to mink enteric calicivirus. The analysis was also useful to supply reference to the classification of the caliciviruses which haven't been defied into genera.

Key words: mink calicivirus; genome; analysis; high-throughput sequencing

嵌杯病毒科(*Caliciviridae*)病毒粒子一般呈球形或近球形, 核衣壳呈二十面体对称, 直径 27~40 nm。电镜观察检查时可见病毒粒子内部的高密度区为许多明亮的相互交叉的线条, 而低密度区是 7 个光线比较暗的凹陷, 中央有 1 个, 周围存在 6 个, 整体观察构成六芒星状的图像, 其形态如同一个具有似花边杯状或花萼状, 故此又称杯状病毒。嵌杯病毒为单股、正链 RNA 病毒, 其基因组大小约为

7.5 kb。嵌杯病毒与微 RNA 病毒非常接近, 以前归类于微 RNA 病毒科。目前, 嵌杯病毒科分为 5 个属: 水疱疹病毒属(*Vesivirus*)、兔病毒属(*Lagovirus*)、纽布病毒属(*Nebovirus*)和 2 个人类的嵌杯病毒属, 即诺瓦病毒属(*Norovirus*)和札幌病毒属(*Sappovirus*)^[1]。

水貂嵌杯病毒(mink calicivirus, MCV)是在美国的一个有出血性肺炎史却一直未确定病原的水貂

收稿日期: 2017-08-18

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFC120050); 中国动物卫生与流行病学中心创新基金(2015IF-0004FF)

作者简介: 王楷宸(1981-), 女, 山东人, 副研究员, 博士, 主要从事兽医微生物研究, Tel: +86-532-85613279; E-mail: wangkaicheng@cahec.cn

* 通信作者: 王楷宸

养殖场首次检测到^[2]。此种普通 MCV 通常不表现消化道的临床症状,可能表现为肺炎等呼吸道症状。2000 年, M. Guo 等报道了一种能引起水貂肠炎的嵌杯病毒,被命名为水貂肠道嵌杯病毒(mink enteric calicivirus, MEC)^[3]。MEC 与 MCV 的病毒颗粒形态没有差别,但是这两种病毒的 RNA 多聚酶基因分析却存在较大差异。MEC 的 RNA 多聚酶区域与人札幌病毒和猪嵌杯病毒的氨基酸相似性在 64%~71%,与水疱疹病毒相似性在 40%~51%,与诺瓦病毒氨基酸相似性为 29%~33%。而 MCV 的 RNA 聚合酶的氨基酸序列与水疱疹病毒的相似性最高,达到 58%~81%,与诺瓦病毒的相似性在 43%~51%;与兔病毒属病毒的相似性在 35%~37%;与诺瓦样病毒相似性在 27%~35%。结果表明 MCV 与水疱疹病毒亲缘关系最近,MEC 所属的科属同札幌病毒的亲缘关系最近。

国内外对感染水貂的嵌杯病毒研究较少,我国仅徐贵财 2007 年在大连地区的某发病水貂养殖场检测到该病原^[4],对病原特性和基因组特性进行研究,并报道了世界上唯一的水貂嵌杯病毒全基因组序列^[5]。本文对在青岛地区检测的一株水貂感染的嵌杯病毒的基因组进行高通量测序和分析,以期深入了解我国水貂感染的嵌杯病毒的分子生物学特性。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

Ion PGM Template OT2 400 Kit、Ion PGM Sequencing 400 Kit V2、E-Gel SizeSelect 2% Agarose、Ion 316 Chip Kit V2、Dynabeads MyOne Streptavidin C1 Beads、Qubit 核酸浓度测定仪及配套试剂均购自 Life technologies 公司;超净工作台(美国 Forma Scientific);移液器(Eppendorf);孵化器(德州诚信孵化设备有限公司);高速台式离心机(德国 Heraeus Biofuge primoR);PCR 扩增仪(Perkin Elmer Gen Amp PCR System 9600)。

1.2 核酸提取

自青岛市某养貂场 2016 年春季采集的粪便样品中检测到水貂嵌杯病毒(Mink/China/2/2016)^[6],将该份样品充分混匀后,经高速离心和过滤去除大分子物质和细菌,使用 QIAamp Viral RNA Mini Kit(Qiagen,德国)提取病毒核酸,-80 °C 保存。

1.3 高通量测序(NGS)文库构建

提取的病毒核酸采用中国动物卫生与流行病学中心报道的方法^[6]构建 NGS 文库。具体方法:8 μL 病毒 RNA 加入 1 μL 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物 A15N6 和 2 μL 无核酸酶的水进行混合,72 °C 5 min,然后 RNA 引物混合物放在冰上孵育至少 3 min;混合物加入 4 μL 5 \times first-strand buffer, 1 μL dNTP (100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 2 μL DTT (0.1 mol $\cdot \text{L}^{-1}$), 1 μL RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 U $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) 和 1 μL SuperScript® III Reverse Transcriptase (200 U $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) (Invitrogen, USA), 25 °C 反应 15 min,42 °C 反应 30 min,70 °C 15 min 终止反应;反应产物中再加入 1 μL RNase H (TaKaRa, Japan),37 °C 反应 20 min;采用 DynaMag™-2 Magnet 和 Agencourt® AMPure® XP Reagent (Beckman Coulter, USA)纯化合成的第一链 cDNA;纯化的第一链 cDNA 中加入引物 B15N6, 70 °C 5 min;再加入 1 μL Klenow fragment (5 U) (NEB, USA), 5 μL 10 \times NEBuffer 2, 2 μL dNTP (100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 1 μL DTT (0.1 mol $\cdot \text{L}^{-1}$), 37 °C 反应 30 min;最后采用 1 \times Phusion High-Fidelity Buffer, 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物 A30 和 B30(表 1), 0.5 U Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, USA), 进行 PCR 扩增。PCR 产物采用 E-Gel® SizeSelect™ Agarose Gel 进行电泳,筛选和回收约 450 bp 的扩增产物作为 NGS 文库。

1.4 NGS 测序

将 NGS 文库稀释为 26 pmol $\cdot \text{L}^{-1}$,应用 Ion PGM Template OT2 400 Kit 对 DNA 文库进行测序前的样品处理。处理后的样品加至 Ion 316 芯片,置于 PGM 测序仪进行测序。

1.5 测序数据分析

NGS 测序数据经质控后,采用 CLC genomics workbench 8.5.1(Qiagen, Germany)将测序得到的 reads 参考 GenBank 中已发表的水貂嵌杯病毒 MCV-DL/2007/CN 全基因组序列^[5](GenBank 登录号:NC_019712)进行 mapping 拼接,并分析拼接完成的基因组中的 ORF,注释后的序列提交 GenBank。

1.6 基因组特性分析

采用 MEGA 6.0^[7]将 Mink/China/2/2016 的全基因与衣壳蛋白氨基酸序列分别与 GenBank 中嵌杯病毒科的代表毒株(表 2)的全基因与衣壳蛋白氨基酸序列进行比对和进化分析,并对这些毒株的

衣壳蛋白氨基酸序列之间的 p-distance 进行分析。通过 BLAST 比对,分析该病毒是否属于 MEC。同时,将 Mink/China/2/2016 的 RdRP 氨基酸序列

表 1 引物与引物序列

Table 1 Primer and its sequence

| 引物名称 Primer name | 引物序列 Primer sequence |
|------------------|---------------------------------------|
| A15N6 | 5'-GTGTCTCCGACTCAGNNNNNN-3' |
| B15N6 | 5'-TGGGCAGTCGGTGATNNNNNN-3' |
| A30 | 5'-CCA/TCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG-3' |
| B30 | 5'-CCGCTTTCCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT-3' |

表 2 基因比较分析所使用的嵌杯病毒毒株

Table 2 The viruses used in the genome comparison

| 病毒名称 Virus | 病毒名称缩写 Abbreviation of virus | 毒株名 Isolate name | 宿主 Host | GenBank 登录号 GenBank accession number | ICTV 分类 ICTV classification |
|---------------|---------------------------------|---------------------|------------|---|--------------------------------|
| 猫嵌杯病毒 | FCV | Urbana | 猫 | NC_001481 | 水疱疹病毒属 |
| 猪水疱疹病毒 | VESV | A48 | 猪 | U76874 | 水疱疹病毒属 |
| 犬嵌杯病毒 | CaCV | | 犬 | NC_004542 | 水疱疹病毒属 |
| 水貂嵌杯病毒 | MCV | MCV-DL/2007/CN | 水貂 | NC_019712 | 水疱疹病毒属 |
| 兔出血症病毒 | RHDV | RHDV-FRG | 兔 | NC_001543 | 兔病毒属 |
| 欧洲野兔综合征病毒 | EBHSV | | 兔 | NC_002615 | 兔病毒属 |
| 诺如病毒 | Norovirus | | 人 | NC_001959 | 诺瓦病毒属 |
| 札幌病毒 | Sapporo | Mc10 | 人 | NC_010624 | 札幌病毒属 |
| 猪肠道札幌病毒 | PESV | Cowden | 猪 | NC_000940 | 札幌病毒属 |
| 纽伯里 1 病毒 | NBV | | 牛 | NC_007916 | 纽布病毒属 |
| 牛嵌杯病毒 | BCV | Kirkclareli | 牛 | NC_030793 | 纽布病毒属 |
| 鹅嵌杯病毒 | GCV | N | 鹅 | NC_024078 | 未分类 |
| 大西洋鲑鱼嵌杯病毒 | ASCV | Nordland/2011 | 鲑鱼 | NC_024031 | 未分类 |
| 海象嵌杯病毒 | WCV | | 海象 | NC_004541 | 未分类 |
| 兔嵌杯病毒 | RCV | MIC-07 | 兔 | NC_011704 | 未分类 |
| 猪嵌杯病毒 | SCV | pig/AB90/CAN | 猪 | NC_012699 | 未分类 |
| 牛肠道嵌杯病毒 | BECV | TCG | 牛 | NC_006875 | 未分类 |
| 鸡嵌杯病毒 | CCV | RS/BR/2015 | 鸡 | NC_033081 | 未分类 |
| 杜兰病毒 | TulaV | Tulane virus | 猴 | EU391643 | 未分类 |

2 结果

2.1 基因组解析

芯片上样率为 73%,测序文库得到质量较高的序列数据测序数据。CLC genomics workbench 8.5.1 拼接得到水貂嵌杯病毒中国株的全基因大小为 8 427 bp, GenBank 登录号为 MF677852。Mink/China/2/2016 基因组具有与其他嵌杯病毒相

似的结构和基因顺序,其 5' 端有帽子结构,与结合蛋白 VPg 共价结合,其 3' 端为聚 A 尾,基因组(图 1)中主要包含 3 个 ORF。ORF1(14—5 851)编码 1 946 个氨基酸的多聚蛋白,包括 AAA-like 蛋白、RNA 解旋酶(RNA helicase)、Walker A 模体、Walker B 模体、ATP 结合位点、多肽酶(peptidase)、蛋白酶(protease)和 RNA 依赖的 RNA 多聚酶(RdRP);ORF2(5 857—7 899)编码包含衣壳蛋

白(coat protein)的 681 个氨基酸;ORF3 编码 59 个氨基酸。

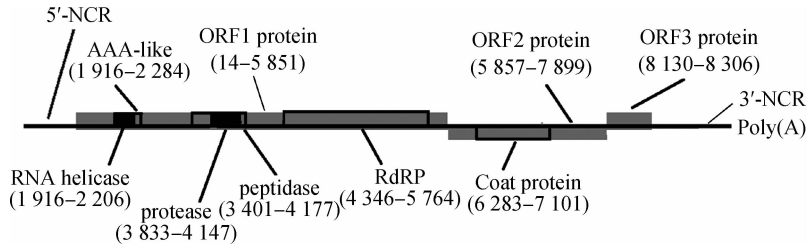


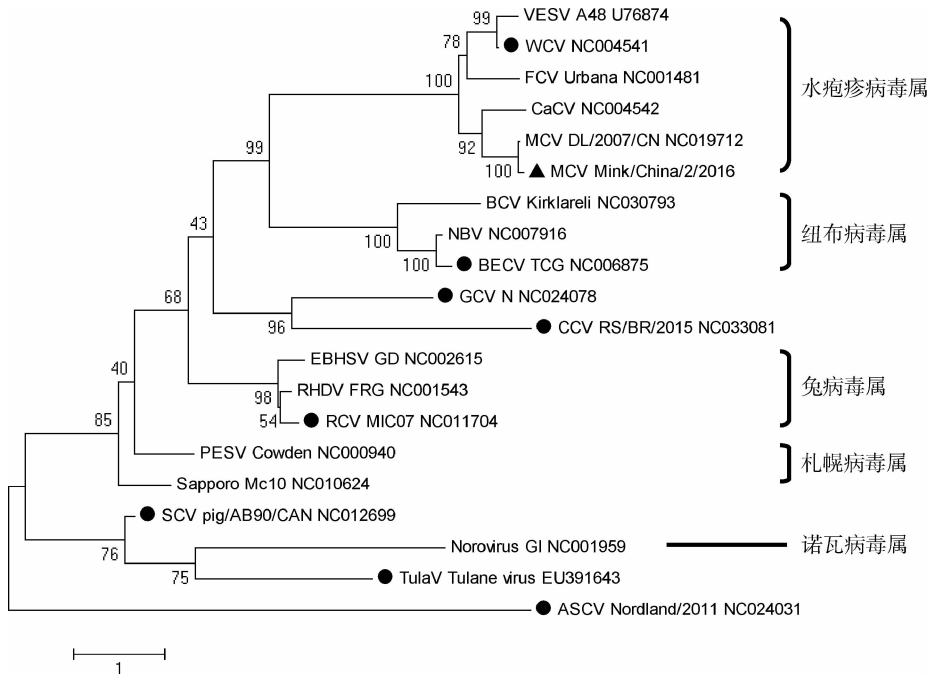
图 1 Mink/China/2/2016 基因组结构
Fig. 1 Genome structure of Mink/China/2/2016

2.2 基因组比较分析

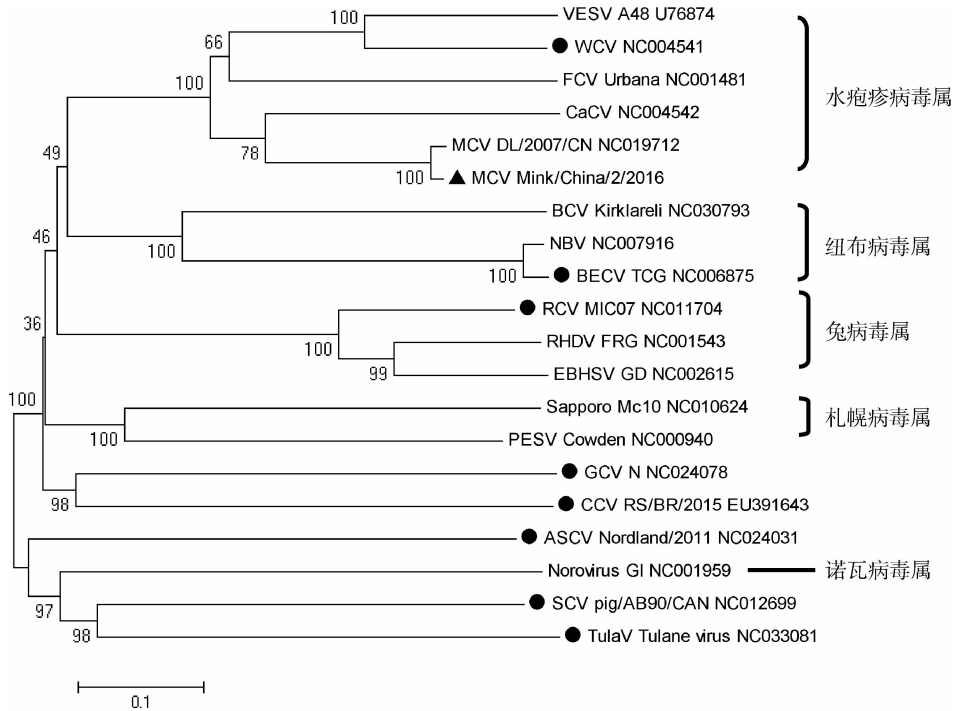
Mink/China/2/2016 与 19 株代表性毒株(表 2)的全基因组进化分析结果见图 2,衣壳蛋白氨基酸序列的进化分析见图 3,各毒株衣壳蛋白氨基酸序列之间的 p-distance 进行分析结果见图 4。全基因组序列进化分析与衣壳蛋白氨基酸序列进化分析结果一致,说明仅分析衣壳蛋白氨基酸序列就能够反映嵌杯病毒的遗传进化关系。Mink/China/2/2016 与已报道全基因的 1 株水貂嵌杯病毒(MCV DL/2007/CN)亲缘关系最近,两株水貂嵌杯病毒与 VESV、WCV、FCV、CaCV 归为同一分支。此分支各毒株衣壳蛋白氨基酸序列间的 p-distance

均小于 0.7,该属衣壳蛋白氨基酸序列与其他属间的 p-distance 大于 0.7,按照 ICTV 第九次病毒分类报告中嵌杯病毒科中各属的分类标准,应将水貂嵌杯病毒与 VESV、WCV、FCV、CaCV 归为水疱疹病毒属。BLAST 结果显示,Mink/China/2/2016 为 MCV,其 RdRP 氨基酸序列与 MCV 较近,与 MEC 较远。

同时,对表 2 中 8 种 ICTV 未分类的嵌杯病毒分析发现:WCV 归为水疱疹病毒属;BECV 归为纽布病毒属;GCV 和 CCV 归为一个单独的新属;RCV 归为兔病毒属;ASCV、SCV 和 TulaV 按照 ICTV 分类标准不属于任一已知的属。



▲. 水貂嵌杯病毒株 Mink/China/2/2016;●. ICTV 未确定属的嵌杯病毒
▲. Mink calicivirus isolate Mink/China/2/2016;●. Caliciviruses which had not classified by ICTV
图 2 嵌杯病毒全基因组进化分析
Fig. 2 Genome evolution analysis of caliciviruses



▲. 水貂嵌杯病毒中国株 Mink/China/2/2016; ●. ICTV 未确定属的嵌杯病毒

▲. Mink calicivirus isolate Mink/China/2/2016; ●. Caliciviruses which had not classified by ICTV

图 3 嵌杯病毒衣壳蛋白氨基酸序列进化分析

Fig. 3 Capsid protein amino acid evolution analysis of caliciviruses

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|
| 1. MCV Mink/China/2/2016 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2. MCV DL/2007/CN NC019712 | 0.022 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3. CaCV NC004542 | 0.377 | 0.377 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4. w/CV NC004541 | 0.381 | 0.385 | 0.583 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5. VESV A48 U76874 | 0.412 | 0.416 | 0.599 | 0.298 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6. FCV Urbana NC001481 | 0.426 | 0.430 | 0.611 | 0.506 | 0.531 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7. NBV NC007916 | 0.647 | 0.655 | 0.764 | 0.759 | 0.772 | 0.760 | | | | | | | | | | | | | | |
| 8. BECV TCG NC006875 | 0.655 | 0.659 | 0.775 | 0.763 | 0.776 | 0.766 | 0.036 | | | | | | | | | | | | | |
| 9. BCV Kirklareli NC030793 | 0.665 | 0.673 | 0.785 | 0.791 | 0.802 | 0.787 | 0.577 | 0.583 | | | | | | | | | | | | |
| 10. RHDV FRG NC001543 | 0.673 | 0.669 | 0.781 | 0.795 | 0.795 | 0.809 | 0.778 | 0.788 | 0.789 | | | | | | | | | | | |
| 11. RCV MIC07 NC011704 | 0.684 | 0.680 | 0.757 | 0.756 | 0.755 | 0.777 | 0.738 | 0.742 | 0.753 | 0.275 | | | | | | | | | | |
| 12. EBHSV GD NC002615 | 0.691 | 0.688 | 0.778 | 0.789 | 0.784 | 0.795 | 0.780 | 0.788 | 0.781 | 0.239 | 0.332 | | | | | | | | | |
| 13. PESV Cowden NC000940 | 0.702 | 0.710 | 0.759 | 0.765 | 0.774 | 0.744 | 0.768 | 0.768 | 0.759 | 0.776 | 0.748 | 0.762 | | | | | | | | |
| 14. Sapporo Mc10 NC010624 | 0.703 | 0.703 | 0.767 | 0.770 | 0.768 | 0.778 | 0.810 | 0.815 | 0.811 | 0.778 | 0.769 | 0.804 | 0.633 | | | | | | | |
| 15. CCV RS/BR/2015 EU391643 | 0.730 | 0.730 | 0.825 | 0.819 | 0.828 | 0.836 | 0.815 | 0.820 | 0.810 | 0.905 | 0.778 | 0.813 | 0.752 | 0.800 | | | | | | |
| 16. GCV N NC024078 | 0.733 | 0.730 | 0.812 | 0.824 | 0.824 | 0.831 | 0.830 | 0.826 | 0.816 | 0.810 | 0.761 | 0.810 | 0.794 | 0.810 | 0.763 | | | | | |
| 17. Norovirus GI NC001959 | 0.777 | 0.777 | 0.846 | 0.854 | 0.851 | 0.862 | 0.834 | 0.834 | 0.832 | 0.832 | 0.809 | 0.833 | 0.818 | 0.849 | 0.862 | 0.850 | | | | |
| 18. ASCV Nordland/2011 NC024031 | 0.798 | 0.802 | 0.824 | 0.837 | 0.825 | 0.843 | 0.796 | 0.795 | 0.806 | 0.820 | 0.826 | 0.825 | 0.795 | 0.813 | 0.829 | 0.829 | 0.801 | | | |
| 19. SCV pig/AB90/CAN NC012699 | 0.790 | 0.790 | 0.845 | 0.811 | 0.830 | 0.821 | 0.821 | 0.820 | 0.818 | 0.835 | 0.818 | 0.843 | 0.785 | 0.841 | 0.851 | 0.815 | 0.749 | 0.792 | | |
| 20. TulaV Tulane virus NC033081 | 0.804 | 0.804 | 0.863 | 0.873 | 0.875 | 0.873 | 0.859 | 0.857 | 0.852 | 0.845 | 0.822 | 0.851 | 0.822 | 0.846 | 0.879 | 0.873 | 0.787 | 0.799 | 0.709 | |

图 4 Mink/China/2/2016 与嵌杯病毒代表毒株衣壳蛋白氨基酸序列分析

Fig. 4 P-distance analysis of the capsid protein amino acid sequence of Mink/China/2/2016 and the representative caliciviruses

3 讨论

嵌杯病毒可引起包括人类、猫、猪、海洋哺乳动物、兔、野兔、牛、犬、爬行类、两栖类和昆虫等多个物种的呼吸道病、水疱、坏死性肝炎和胃肠炎等疾病。嵌杯病毒的感染常常持久,症状可能不明显、轻微,也可能严重^[8]。对人、猪、猫、兔和猪等动物感染的嵌杯病毒的研究报道较多,但对水貂感染的嵌杯病毒的研究报道国内外仅有 3 篇文献对此进行描述和研

究。J. F. Evermann 等^[2] 最先从水貂分离到嵌杯病毒,并发现分离到的水貂杯状病毒具有非常特殊的生物学特性,能够与人 O 型红细胞发生凝集,不能凝集鸡、鹅、兔、猪、牛、山羊、绵羊、犬、大鼠、豚鼠的红细胞,该生物学特性的发现是本科属继兔出血热病毒之后第二个具有能够凝集红细胞特性的病毒。该毒株还具有广泛的细胞嗜性、血凝特性以及感染细胞表现出来得迅速致成 CPE 现象等,对于该病毒的研究将具有非常重要的意义。之后, M. Guo

等^[3]又发现了能引起水貂肠炎的新型嵌杯病毒 MEC,并认为 MCV 属嵌杯病毒科札幌病毒属。2011 年, B. C. Yang 等^[5]报道了我国的一株 MCV 的全基因组。

为深入了解水貂嵌杯病毒的特性,本文从我国青岛地区水貂养殖场检测到一株嵌杯病毒,并采用高通量测序方法获得该病毒的全基因,也是世界上第二个报道的 MCV 全基因序列。从全基因分析结果来看,在青岛检测到的毒株与 2011 年报道的大连株全基因序列相似性极高,都属于水疱疹病毒属成员。编码的 3 个 ORF 的大小相同,仅由于氨基酸序列变化而存在微小的差异。说明 MCV 在我国的不同区域和不同时间的流行毒株变异非常小,若研发防控此病的疫苗将在不同地区均具适用性。

本文还对现在已发现的所有 19 种动物嵌杯病毒进行了遗传进化分析,为分析 8 种 ICTV 未分类的嵌杯病毒(WCV、BECV、GCV、CCV、ASCV、SCV、RCV 和 TulaV)的分类地位提供基础。根据分析结果推测,WCV 和 BECV 分别属于水疱疹病毒属和纽布病毒属。而禽源的两种病毒 GCV 和 CCV 在进化树上属同一分支,且两者衣壳蛋白氨基酸序列 p-distance 小于 0.7,应属同一个属,但与其他嵌杯病毒亲缘关系较远。ASCV、SCV 和 TulaV 衣壳蛋白氨基酸序列 p-distance 均大于 0.7,但在进化树中与诺瓦病毒属关系较近,是否可归为诺瓦病毒有待进一步研究。

4 结 论

报道了世界上第二株水貂感染的嵌杯病毒全基因,同时对嵌杯病毒各属的进一步分类提供基础数据,有利于了解我国流行的水貂嵌杯病毒的特性,进一步明确其与其他嵌杯病毒的进化关系。

参考文献(References):

[1] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 5 版. 北京: 中国农业

出版社, 2013.

LU C P. Veterinary microbiology[M]. 5th ed. Beijing: China Agriculture Press, 2013. (in Chinese)

[2] EVERMANN J F, SMITH A W, SKILLING D E, et al. Ultrastructure of newly recognized caliciviruses of the dog and mink[J]. *Arch Virol*, 1983, 76(3): 257-261.

[3] GUO M, EVERMANN J F, SAIF L J. Detection and molecular characterization of cultivable caliciviruses from clinically normal mink and enteric caliciviruses associated with diarrhea in mink[J]. *Arch Virol*, 2001, 146(3): 479-493.

[4] 徐贵财. 水貂杯状病毒分离鉴定与生物学特性研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2009.

XU G C. Isolation and characterization of a calicivirus from mink[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2009. (in Chinese)

[5] YANG B C, WANG F X, ZHANG S Q, et al. Complete genome sequence of a mink calicivirus in China [J]. *J Virol*, 2012, 86(24): 13835.

[6] QIU Y, CHEN J M, WANG T, et al. Detection of viromes of RNA viruses using the next generation sequencing libraries prepared by three methods[J]. *Virus Res*, 2017, 237: 22-26.

[7] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. *Mol Biol Evol*, 2013, 30(12): 2725-2729.

[8] MARKEY P J, LEONARD F C, FITZPATRICK E S, 等. 兽医微生物及所致传染病[M]. 2 版. 陈继明, 马洪超, 陆承平, 译. 北京: 中国农业出版社, 2015.

MARKEY P J, LEONARD F C, FITZPATRICK E S, et al. Veterinary microbiology and microbial disease[M]. 2nd ed. CHEN J M, MA H C, LU C P, trans. Beijing: China Agriculture Press, 2015. (in Chinese)

(编辑 白永平)