

# 牛流行热病毒分离株 HN1/2012 的全基因组序列测定及演化分析

高闪电<sup>1</sup>, 王积栋<sup>1</sup>, 独军政<sup>1</sup>, 郑福英<sup>1</sup>, 田占成<sup>1</sup>, 殷宏<sup>1,2\*</sup>

(1. 中国农业科学院兰州兽医研究所, 家畜疫病病原生物学国家重点实验室, 甘肃省动物寄生虫病重点实验室, 兰州 730046; 2. 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 扬州 225009)

**摘要:** 旨在解析我国牛流行热病毒(BEFV)分离株 HN1/2012 的基因组特征, 为阐明我国 BEFV 毒株的演化规律提供数据。根据 GenBank 中收录的 BEFV 毒株的全基因组信息, 设计引物, 以 RT-PCR 扩增 11 段相互部分重叠的 DNA 片段, 克隆至 pGEM T-easy 载体, 分别进行测序, 利用 DNASTar 软件进行序列拼接获得 HN1/2012 株的全基因组序列。根据 BEFV 编码基因的转录起始(TD)和转录终止/多聚腺苷酸化(TTP)序列分析获得各基因序列及其开放阅读框(ORF), 与参考毒株比对序列相似性, 并以 G 基因序列构建系统发生树, 分析其遗传演化关系。结果显示: HN1/2012 株基因组全长为 14 899 nt, 包含前导序列(50 nt)、N 基因(1 328 nt)、P 基因(858 nt)、M 基因(691 nt)、G 基因(1 896 nt)、G<sub>NS</sub> 基因(1 785 nt)、 $\alpha$ 2 基因(638 nt)、 $\beta$  基因(459 nt)、 $\gamma$  基因(400 nt)、L 基因(6 470 nt)和尾随序列(70 nt)。病毒 9 个基因分别由 26、43、47、53、37、39、30、-21 nt 的基因间隔区(IGR)连接。在全基因组水平, HN1/2012 株与我国 2002 年浙江分离株 JT02L 的相似性最高, 但 G 基因与同期分离株 LYC11、LS11 相似性最高。重组分析表明 HN1/2012 株未发生基因重组。HN1/2012 株的演化可能与免疫选择压力导致的基因突变有关。本研究测定了 HN1/2012 株的基因组序列, 为我国 BEFV 分离株的全基因组分子演化研究奠定了基础。

**关键词:** 牛流行热病毒; 全基因组序列; 演化分析

中图分类号: S852.659.5

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2018)10-2223-09

## The Complete Genome Sequence Determination and Evolutionary Analysis of Bovine Ephemeral Fever Virus Strain HN1/2012

GAO Shan-dian<sup>1</sup>, WANG Ji-dong<sup>1</sup>, DU Jun-zheng<sup>1</sup>,  
ZHENG Fu-ying<sup>1</sup>, TIAN Zhan-cheng<sup>1</sup>, YIN Hong<sup>1,2\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Key Laboratory of Veterinary Parasitology of Gansu Province, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China; 2. Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou 225009, China)

**Abstract:** This study focused on determination of the genomic character of bovine ephemeral fever virus (BEFV) strain HN1/2012, which provided data for clarifying the genetic evolution of domestic strains of BEFV in China. Based on the complete genome of BEFV strains deposited in GenBank, eleven sets of primers were designed and used for RT-PCR for eleven overlapped DNA fragments. The obtained fragments were cloned to pGEM T-easy for sequencing and then assembled to obtain the complete genome sequence of the strain HN1/2012, using the DNASTar soft-

收稿日期: 2018-02-09

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(201303035); 农业部中央级公益性科研院所基本科研业务费(2016); 农业科技创新工程(ASTIP)

作者简介: 高闪电(1980-), 男, 河北石家庄人, 助理研究员, 博士, 主要从事家畜分子病毒学研究, E-mail: gaoshandian@caas.cn

\* 通信作者: 殷宏, 研究员, E-mail: yinhong@caas.cn

ware. Individual genes and the corresponding open reading frames (ORF) were determined based on the transcription initiation (TI) and transcription termination/polyadenylation (TTP) sequences. The evolutionary relationships between the strain HN1/2012 and the referenced BEFV strains were analyzed based on the sequence similarities and phylogenetic tree constructed based on the *G* gene sequences. The results showed that the genome of HN1/2012 strain is 14 899 nt in length, comprising a leader sequence (50 nt), *N* gene (1 328 nt), *P* gene (858 nt), *M* gene (691 nt), *G* gene (1 896 nt), *G<sub>NS</sub>* gene (1 785 nt),  $\alpha 1\alpha 2$  gene (638 nt),  $\beta$  gene (459 nt),  $\gamma$  gene (400 nt), *L* gene (6 470 nt), and a trailer sequence (70 nt). The nine genes were separated by intergenic regions (IGRs) of 26, 43, 47, 53, 37, 39, 30 and -21 nt. At genomic level, HN1/2012 demonstrated the highest similarity with JT02L that was isolated from Zhejiang in 2002, but its *G* gene had highest similarity with epidemic strains LYC11 and LS11 that circulated over the same period. Gene recombination was not found in HN1/2012 by recombination analysis, indicating that gene mutation promoted by immune selection pressure may account for the evolution of HN1/2012. The genomic sequence of bovine ephemeral fever virus strain HN1/2012 was determined in the present study, which may lay a foundation for evolution analysis of BEFV based on complete genome in China.

**Key words:** bovine ephemeral fever virus; complete genome sequence; evolution analysis

牛流行热 (bovine ephemeral fever, BEF) 是由牛流行热病毒 (bovine ephemeral fever virus, BEFV) 引起的黄牛、奶牛、肉牛及水牛的一种急性、非接触性传染病。该病由媒介昆虫蚊和库蠓传播, 发病动物出现发热、眼鼻分泌物增多、肌肉收缩僵硬、暂时性的跛足、关节肿胀等症状, 通常发病快而病程短, 持续 1~3 d, 严重时可表现为黏膜化脓、颤抖、瘫痪及死亡。BEF 传播迅速, 流行面广, 广泛分布于埃及、赞比亚、肯尼亚、澳大利亚、印度、印度尼西亚、巴勒斯坦、日本和中国等多个国家, 造成严重的经济损失<sup>[1-2]</sup>。BEFV 是弹状病毒科 (*Rhabdoviridae*)、暂时热病毒属 (*Ephemerovirus*) 的代表性物种, 与同属的阿德莱德里弗病毒 (ARV)、贝里墨病毒 (BRMV)、科汤卡恩病毒 (KOTV)、奥博第安病毒 (OBOV)、金伯利病毒 (KIMV)、马拉科病毒 (MALV)、普仲病毒 (PUCV)、库尔平耶病毒 (KOOLV) 以及雅塔病毒 (YATV) 具有相似的基因结构<sup>[3-7]</sup>。

BEFV 基因组为单股负链 RNA, 编码核蛋白 (N)、磷蛋白 (P)、基质蛋白 (M)、糖蛋白 (G) 和依赖 RNA 的 RNA 多聚酶 (L) 5 种结构蛋白<sup>[8]</sup>。G 蛋白横跨病毒囊膜, 是 BEFV 关键免疫保护性抗原, 也是病毒中和抗体的作用靶点, 该蛋白含 4 个抗原位点, 其中 G1、G2、G3 是主要中和位点<sup>[9]</sup>。在 G 蛋白和 L 蛋白编码基因之间含 5 个开放阅读框 (ORF),

编码非结构蛋白 *G<sub>NS</sub>* 和附属蛋白  $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ , 为暂时热病毒所特有<sup>[10]</sup>。*G<sub>NS</sub>* 蛋白与 G 蛋白结构相似, 来源可能与 G 基因重复复制有关。 $\alpha 1$  具有病毒离子孔道蛋白作用, 并且定位于高尔基复合体, 可与核质转运受体蛋白  $\beta 1$  以及核质转运受体蛋白-7 结合, 在核质转运过程中发挥作用<sup>[11]</sup>。

在我国建国前后就有 BEF 流行的记载<sup>[12]</sup>, 但直至 1955 年才被正式报道, 于 1976 年分离获得病毒 HVRI1/Beijing-1/JB76H 株<sup>[13]</sup>、amH 株以及 BH 株<sup>[14]</sup>。目前, 该病在我国台湾以及内地的 26 个省区均有流行, 感染动物包括黄牛、奶牛、水牛、牦牛、白牦牛等<sup>[15-18]</sup>。BEF 的流行具有一定的周期性, 在我国中部流行周期为 5~7 年, 小范围流行周期短至 2~3 年<sup>[19]</sup>。1976 年以来, 研究人员从北京、浙江、河南、山东分离获得了不同时期的毒株, 包括 Beijing-1、JT02L、LS11、LYC11 以及 BEFV-SD 等, 均属于东亚分支<sup>[19-20]</sup>。本实验室对早期分离的 JT02L 株基因组进行分析, 发现  $\alpha 3$  和  $\beta$  基因的 ORF 均发生较大的变化, 而且在  $\beta$  和  $\gamma$  基因间隔存在外源序列的重组, 可能与病毒的毒力密切相关<sup>[21]</sup>, 但目前没有关于我国 BEFV 近期分离株的基因组信息, 因此我们测定获得了 HN1/2012 株的全基因组序列, 并与澳大利亚、中东、国内早期的参考毒株进行了系统比较分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

牛流行热病毒 HN1/2012 株牛体传代病毒抗凝血,保存于本实验室。该毒株于 2012 年 7 月采自河南省洛阳市周边急性发热的高热期奶牛,本实验室定期于每年冬天无蚊、蠓活动时接种抗体阴性的成年牛进行传代,采集高热期(体温达 40.0 °C 以上)的 EDTA 抗凝血,于 -80 °C 保存。

### 1.2 主要试剂

RNA 提取试剂 RNAiso Plus、一步法 RNA RT-PCR 试剂盒 PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver. 2、Premix Taq™、DNA 纯化试剂盒、

DL2000 DNA Marker、质粒提取试剂盒,购自大连 TaKaRa 公司;pGEM T-easy 载体、连接酶为 Promega 公司产品;感受态细胞 Trans5α 购自北京全式金生物技术有限公司,其他试剂均为国产或进口分析纯。

### 1.3 引物设计

根据 GenBank 中收录的澳大利亚 BEFV BB7721 株的全基因组序列(GenBank 登录号: AF234533)以及我国早期分离株 Beijing-1 的部分基因组序列(GenBank 登录号: JX564640、U72399、AY854642)设计覆盖 BEFV 基因组的 11 对引物(表 1),用于扩增 11 个 DNA 片段。每相邻的 2 个 DNA 片段具有部分重叠,用于后续基因组序列拼接。

表 1 引物序列

Table 1 The sequences of the primers

| 引物<br>Primers | 引物序列(5'→3')<br>Primer Sequences | 位置/nt<br>Positions | 产物长度/bp<br>Product lengths |
|---------------|---------------------------------|--------------------|----------------------------|
| BEFV1F        | ACGAGAAAAACAAAAAAC              | 1                  | 820                        |
| BEFV1R        | GATACAAAAATCCAATCAAG            | 820                |                            |
| BEFV2F        | ACAAGGATGCCGCAGGAC              | 770                | 2 079                      |
| BEFV2R        | TTCCCTCTTCTTTTGCTC              | 2 848              |                            |
| BEFV3F        | ATTCATCCTAGAGATC                | 2 733              | 1 458                      |
| BEFV3R        | ACCATTCCCCCTCTTGTTG             | 4 190              |                            |
| BEFV4F        | CTCTGTTTGTCCTTACCAG             | 4 108              | 2 071                      |
| BEFV4R        | AATGACAGTATCTTCATCAG            | 6 178              |                            |
| BEFV5F        | GTGAGTACATAACAGGTC              | 6 108              | 2 025                      |
| BEFV5R        | GCTAGATCTAATCTCCT               | 8 132              |                            |
| BEFV6F        | GGGTAGTGCCTACATG                | 7 930              | 631                        |
| BEFV6R        | CTCTACTAAAGGATCT                | 8 560              |                            |
| BEFV7F        | GAAGAGGAGTCCATG                 | 8 483              | 1 304                      |
| BEFV7R        | GATGAGTTTGGAGATC                | 9 786              |                            |
| BEFV8F        | CCTAAAGAGTTAGAAG                | 9 017              | 2 012                      |
| BEFV8R        | TGTCCTCTGATTGCTGG               | 11 028             |                            |
| BEFV9F        | CAGACAATCAGCATGTG               | 10 604             | 2 181                      |
| BEFV9R        | TACAGTTCCTTGAAGTGC              | 12 784             |                            |
| BEFV10F       | AAATTTGACGCATCGCAG              | 12 718             | 1 701                      |
| BEFV10R       | TCCTGATCTGAGTATGGT              | 14 418             |                            |
| BEFV11F       | AGTCATCTAGTAACAACAAAG           | 14 345             | 556                        |
| BEFV11R       | ACGAAGAAAAACAAATAAAATAC         | 14 900             |                            |

#### 1.4 RNA 提取

根据 RNAiso Plus 试剂操作说明,从 BEFV HN1/2012 传代病毒抗凝血提取总 RNA。将保存于  $-80^{\circ}\text{C}$  的抗凝血充分解冻后取  $300\ \mu\text{L}$  至无 RNase 离心管中,加入  $800\ \mu\text{L}$  RNAiso Plus,加入  $200\ \mu\text{L}$  氯仿,混合均匀后室温放置 5 min。然后  $12\ 000\ \text{g}$   $4^{\circ}\text{C}$  离心 15 min,吸取上清液转移至另一新离心管中,加入  $700\ \mu\text{L}$  的异丙醇混匀、室温放置 10 min 后, $12\ 000\ \text{g}$   $4^{\circ}\text{C}$  离心 10 min。弃去上清并加入  $800\ \mu\text{L}$  75%乙醇,混匀后  $12\ 000\ \text{g}$   $4^{\circ}\text{C}$  离心 5 min,小心弃去上清,室温干燥沉淀 5 min,加入  $50\ \mu\text{L}$  无 RNase 水溶解 RNA。

#### 1.5 RT-PCR 和基因克隆

根据一步法 RNA RT-PCR 试剂盒说明书配制反应液,反应体系为利用  $2 \times \text{Buffer}$   $25\ \mu\text{L}$ 、RNase Free  $\text{dH}_2\text{O}$   $18\ \mu\text{L}$ 、上游引物和对应的下游引物 ( $10\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 各  $1\ \mu\text{L}$ 、Enzyme Mix  $2\ \mu\text{L}$ 、RNA  $3\ \mu\text{L}$ ,混匀后按反应程序  $50^{\circ}\text{C}$  30 min; $94^{\circ}\text{C}$  2 min; $94^{\circ}\text{C}$  30 s, $55^{\circ}\text{C}$  30 s, $72^{\circ}\text{C}$  2 min,反应 35 个循环后  $72^{\circ}\text{C}$  终延伸 10 min。扩增结束后,用 1%琼脂糖电泳并切胶回收目的条带,与 pGEM T-easy 载体连接后转化 Trans5 $\alpha$  感受态细胞,挑取单个菌落,利用 Premix Taq 进行菌落 PCR 鉴定,将初步鉴定为阳性重组菌培养、提取质粒送南京金斯瑞生物科技有限公司进行序列测定。

#### 1.6 基因组序列、基因结构及演化分析

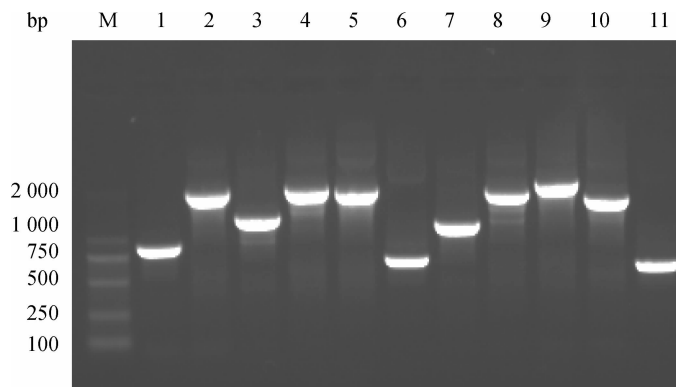
利用美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 网站中的 VecScreen 在线软件分析测序获得的各片段并

去除载体序列,之后利用 DNASTar 软件包中的 SeqMan 软件进行序列拼接,获得病毒全基因组序列。参考 GenBank 收录的澳大利亚 BB7721 株的基因组信息 (AF234533),根据 BEFV 基因的转录起始 (TI) 和转录终止/多聚腺苷酸化 (TTP) 序列,确定各基因的位置及对应的开放阅读框 (ORF),推导各基因的氨基酸序列,注释后提交 GenBank,获序列号。利用 DNASTar 软件包中的 MegAlign 软件,采用 Clustal W 的方法进行比对,分析各基因和核苷酸及其编码氨基酸与参考毒株 BB7721 (AF234533)、Ad12/TUR (KY012742)、JT02L (KY315724) 的序列相似性。以 HN1/2012 株糖蛋白 G 基因的胞外结构域编码序列 (1 572 nt) 进行 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 在线比对分析,下载同源序列,利用重组检测软件包 RDP4 中的 RDP、GENECONV、Chimaera、MaxChi、SiScan、3Seq、LARD 等方法进行检测,分析 HN1/2012 株基因可能发生的重组。利用 Mega6 软件包进行序列比对,构建系统发生树,分析 HN1/2012 株的分类地位。

## 2 结果

### 2.1 RT-PCR 扩增

用设计的 11 对引物进行 RT-PCR 扩增,经 1%琼脂糖凝胶电泳,得到了与预期大小相符的 11 个目的片段,与预期大小一致,片段长度分别为 820、2 079、1 458、2 071、2 025、631、1 304、2 012、2 181、1 701、556 bp (图 1)。



M. DL2000 相对分子质量标准;1~11. 引物对 1~11 (参见表 1) RT-PCR 扩增产物

M. DL2000 DNA marker; 1-11. RT-PCR product amplified with primer pairs 1-11 (see Table 1)

图 1 RT-PCR 扩增 BEFV 全基因组

Fig. 1 The RT-PCR amplification of complete genome of BEFV

## 2.2 克隆鉴定和测序

菌落 PCR 鉴定显示,成功将 11 个基因片段克隆到 pGEM T-easy 载体中。将阳性重组菌培养提取质粒经测序、拼接,获得了 HN1/2012 株的全基因组序列,全长为 14 899 nt。该序列已提交 GenBank,登录号为 KM276084。

## 2.3 基因组结构分析

根据 BEFV 基因的 TI 和 TTP 序列对 HN1/2012 株基因组进行分析注释,结果发现 HN1/2012 株与参考毒株 BB7721、Ad12/TU 具有相似的基因组结构:各基因均含有保守的 TI 序列 UUGUCC,在转录形成的 mRNA 含有 5'-cap-AACAGG-结构;除  $\beta$  基因的 TTP 序列为 GUAC[U]<sub>6</sub>,其余基因的 TTP 序列均为 GUAC[U]<sub>7</sub>,在转录的 mRNA 具有 CATG(A)<sub>7</sub> 结构。此外, $\alpha 1$  基因和  $\alpha 2$  基因由于具有共同的 TI 和 TTP 序列而位于同一转录单元内,在  $\alpha 2$  的 ORF 75—230 位编码另一读码框不同的附属蛋白  $\alpha 3$ 。HN1/2012 株基因组包含前导序列(50 nt,1—50 位)、N 基因(1 328 nt,51—1 378 位)、P 基因(858 nt,1 405—2 262 位)、M 基因(691 nt,2 306—2 996 位)、G 基因(1 896 nt,3 044—4 939 位)、G<sub>NS</sub> 基因(1 785 nt,4 993—6 777 位)、 $\alpha 1\alpha 2$  基因(638 nt,6 815—7 452 位)、 $\beta$  基因(459 nt,7 492—7 950 位)、 $\gamma$  基因(400 nt,7 981—8 380 位)、L 基因(6 470 nt,8 360—14 829 位)、尾随序列(70 nt,14 830—14 899 位)。相邻的基因由基因间隔区(IGR)连接,包括:N-P(26 nt)、P-M(43 nt)、M-G(47 nt)、G-G<sub>NS</sub>(53 nt)、G<sub>NS</sub>- $\alpha 1\alpha 2$ (37 nt)、 $\alpha 1\alpha 2$ - $\beta$ (39 nt)、 $\beta$ - $\gamma$ (30 nt)、 $\gamma$ -L(-21 nt,即基因之间含 21 nt 重叠区)。HN1/2012 株 G 基因在转录起始信号下游与 ORF 之间的非编码区存在一个 A 碱基缺失,总体符合经典的 BEFV 基因组特征。

## 2.4 基因组变异分析

序列比较分析发现,HN1/2012 株全基因组与本实验室测定的我国 2002 年分离株 JT02L 的核苷酸相似性最高(99.3%),其次为土耳其 2012 年分离株 Ad12/TUR(92.3%)和澳大利亚 1968 年分离株 BB7721(90.5%)。在核苷酸水平,不同 BEFV 毒株之间最为保守的基因组功能区段为前导序列和尾随序列,其次为 N 基因(平均相似性为 95.8%)、 $\gamma$  基因、L 基因和  $\alpha 1$  基因(平均相似性为 94.2%~94.8%)、M 基因、 $\beta$  基因、G 基因、G<sub>NS</sub> 基因的核苷酸序列变异较大(平均相似性为 93.0%~94.0%)。

在氨基酸水平,N 蛋白氨基酸序列最为保守(平均相似性为 99%),其次为 M 蛋白、L 蛋白、G 蛋白(平均相似性为 97.2%~98.1%)。 $\gamma$  蛋白、 $\beta$  蛋白、G<sub>NS</sub> 蛋白、 $\alpha 1$  蛋白的氨基酸变异较大(平均相似性 91.4%~94.9%)。P、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$  基因核苷酸和氨基酸平均相似性分别为 89.9%~91.9%和 71.5%~90.8%,均存在较大变异。总体上,HN1/2012 株基因组各基因与 JT02L 株相比变异较小,与我国早期分离株 Beijing-1 的抗原 G 基因的相似性也高于国外分离株 BB7721 和 Ad12/TUR,但其附属蛋白尤其  $\alpha 3$  与参考毒株 Beijing-1 的核苷酸、氨基酸均存在较大差异(表 2),说明附属蛋白在我国 BEFV 毒株演化中也可能发挥作用。HN1/2012 株与河南地区 2011 年 BEFV 分离株 LS11、LYC11 以及 2002 年浙江分离株 JT02L 的 G 蛋白表位一致。与我国疫苗株 JB76H 相比,这些毒株 G3 表位突变发生于 53 位(K→N)和 263 位(G→E);G4 表位(G 蛋白 455—482 位)的突变发生于 461 位(K→E)和 475 位(I→M),与山东 2011 年分离株变异基本相同,但后者在 476 位增加了 E→D 突变;G1 表位(487—503 位)和 G2 表位(168—189 位)在我国大陆分离株保守(图 2)。

## 2.5 系统进化分析

BLAST 结果显示,HN1/2012 株 G 蛋白胞外结构域编码区与我国(内地及台湾)、日本分离株以及部分 2012 年中东分离株(TR/CU15、TR/CU16、TR/CP3)和埃及分离株(EGY12)的核苷酸相似性为 95.0%~99.0%,与中东其他分离株的核苷酸相似性为 92.0%~93.0%,与澳大利亚分离株的核苷酸相似性为 90.0%~91.0%。与 GenBank 中收录的 BEFV 全基因组和 G 基因的参考序列进行重组检测,未发现 HN1/2012 株基因重组现象。利用 Mega6 软件进行演化分析,BEFV 毒株可分为东亚谱系、中东谱系以及澳大利亚谱系,与之前报道一致<sup>[19, 22-25]</sup>。HN1/2012 株处于东亚分支,这一大的分支还包括我国内地所有的其他 BEFV 分离株、我国台湾分离株以及日本的分离株(图 3)。土耳其 2012 年的分离株 TR/CU15、TR/CU16、TR/CP3 和埃及分离株 EGY12 也处于东亚分支。HN1/2012 株与我国河南 2011 年分离株 LS11 的亲缘关系最近,核苷酸和氨基酸的相似性均为 99.6%,其次为河南分离株 LYC11 以及山东 2011 年分离株,核苷酸和氨基酸相似性分别为 98.7%~99.4%和

表 2 HN1/2012 株与参考毒株各基因编码区核苷酸和编码氨基酸的相似性

Table 2 Percentage of nucleotide and amino acid similarity between individual gene coding region of HN1/2012 and reference viral strains

| 毒株<br>Strains | 前导区<br>Leader | N 基因<br>N gene | P 基因<br>P gene | M 基因<br>M gene | G 基因<br>G gene | G <sub>NS</sub> 基因<br>G <sub>NS</sub> gene | α1 基因<br>α1 gene | α2 基因<br>α2 gene | α3 基因<br>α3 gene | β 基因<br>β gene | γ 基因<br>γ gene | L 基因<br>L gene | 尾随区<br>Trailer |
|---------------|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|--|------------------|------------------|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| JT02L         | 100.0         | 99.8           | 99.9           | 99.7           | 97.0           | 99.4                                       | 100.0            | 99.1             | 97.4             | 99.4           | 99.7           | 99.6           | 98.6           |
|               | —             | <i>99.7</i>    | <i>100.0</i>   | <i>99.5</i>    | <i>99.3</i>    | <i>98.6</i>                                | <i>100.0</i>     | <i>94.8</i>      | <i>96.0</i>      | <i>99.0</i>    | <i>100.0</i>   | <i>99.4</i>    | —              |
| Ad12          | 98.0          | 93.8           | 88.2           | 92.0           | 92.4           | 90.1                                       | 92.1             | 89.5             | 89.1             | 91.4           | 91.3           | 93.7           | 100.0          |
|               | —             | <i>99.0</i>    | <i>87.4</i>    | <i>98.2</i>    | <i>97.1</i>    | <i>92.4</i>                                | <i>94.3</i>      | <i>93.9</i>      | <i>72.5</i>      | <i>97.1</i>    | <i>96.4</i>    | <i>97.6</i>    | —              |
| BB7721        | 98.0          | 93.7           | 87.7           | 90.3           | 90.5           | 89.6                                       | 90.6             | 86.0             | 83.3             | 90.4           | 93.6           | 90.9           | 90.0           |
|               | —             | <i>98.3</i>    | <i>85.2</i>    | <i>96.8</i>    | <i>94.7</i>    | <i>91.8</i>                                | <i>92.0</i>      | <i>87.9</i>      | <i>58.8</i>      | <i>93.4</i>    | <i>94.7</i>    | <i>96.2</i>    | —              |
| Beijing-1     |               |                |                |                | 96.3           |  | 83.1             | 82.3             | 76.3             | 82.4           | 84.1           |                |                |
|               |               |                |                |                | <i>97.9</i>    |  | <i>79.5</i>      | <i>80.2</i>      | <i>58.8</i>      | <i>87.9</i>    | <i>88.6</i>    |                |                |

—. 无氨基酸序列；斜体数字表示氨基酸序列相似性

—. No amino acid sequences; The similarity of amino acid sequences are shown in italic script

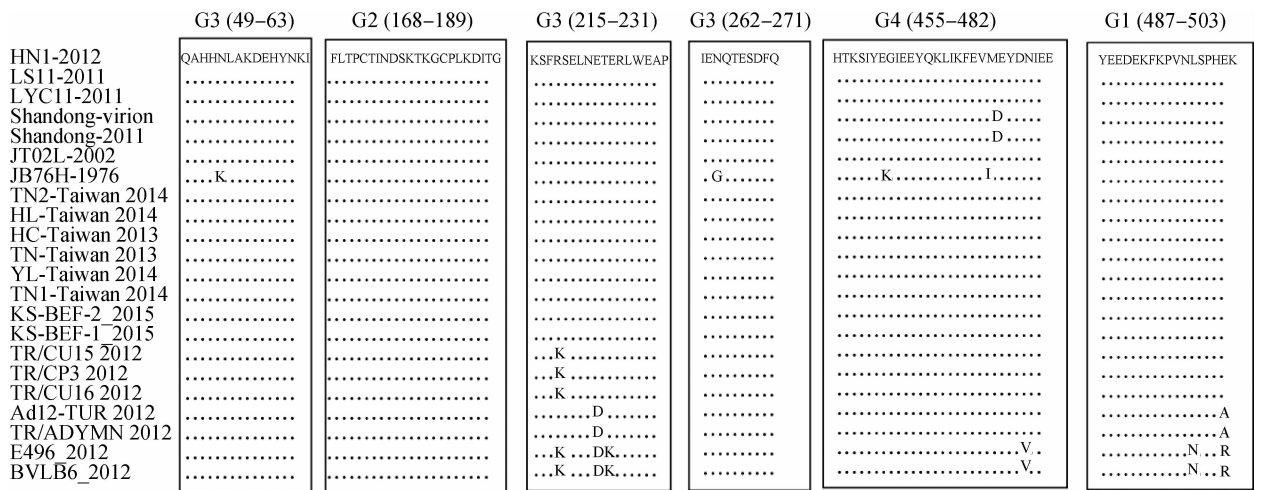


图 2 HN1/2012 株与参考毒株 G 蛋白表位比较

Fig. 2 Comparison of the epitopes on the G protein of HN1/2012 strain and reference viral strains

98.8%~99.6%，这些毒株构成了一个新的亚支，在起源上密切相关。此外，HN1/2012 株与中国 1976 年分离株 JB76H 以及 2002 年分离株 JT02L 分支距离较远，但与 2013—2014 年中国台湾分离株和日本 2015 年分离株、土耳其 2012 年分离株 CU15、CU16、CP3 距离相对较近，可能在演化上密切相关。

### 3 讨论

自 1867 年在东非首次报道 BEF，该病至今已有 150 余年的历史。影响 BEF 传播的因素较多，气象和环境因素（如季风及其风速和方向、温度和湿

度、季雨）及地理造成媒介昆虫的分布变化、动物的运输都可影响该病的传播，甚至造成不同大陆间远距离传播<sup>[2]</sup>。继 20 世纪 30 年代巴勒斯坦、印度、印度尼西亚、日本报道 BEF 之后，我国于 1955 年正式报道在广东省发现该病。至 1991 年该病在我国多次流行，遍布我国南部和中部的多个省区，而且在北方的辽宁、吉林也有报道<sup>[12]</sup>。我国河南地区关于该病的记载比较系统，自 1983 年至今有 8 次较大的 BEF 流行，其中最近的报道为 2011 年，发病率为 30%，死亡率达 5%<sup>[19]</sup>，同期在我国山东地区也报道了该病的流行，且分离株与河南 2011 年分离株在演化上密切相关<sup>[26]</sup>。

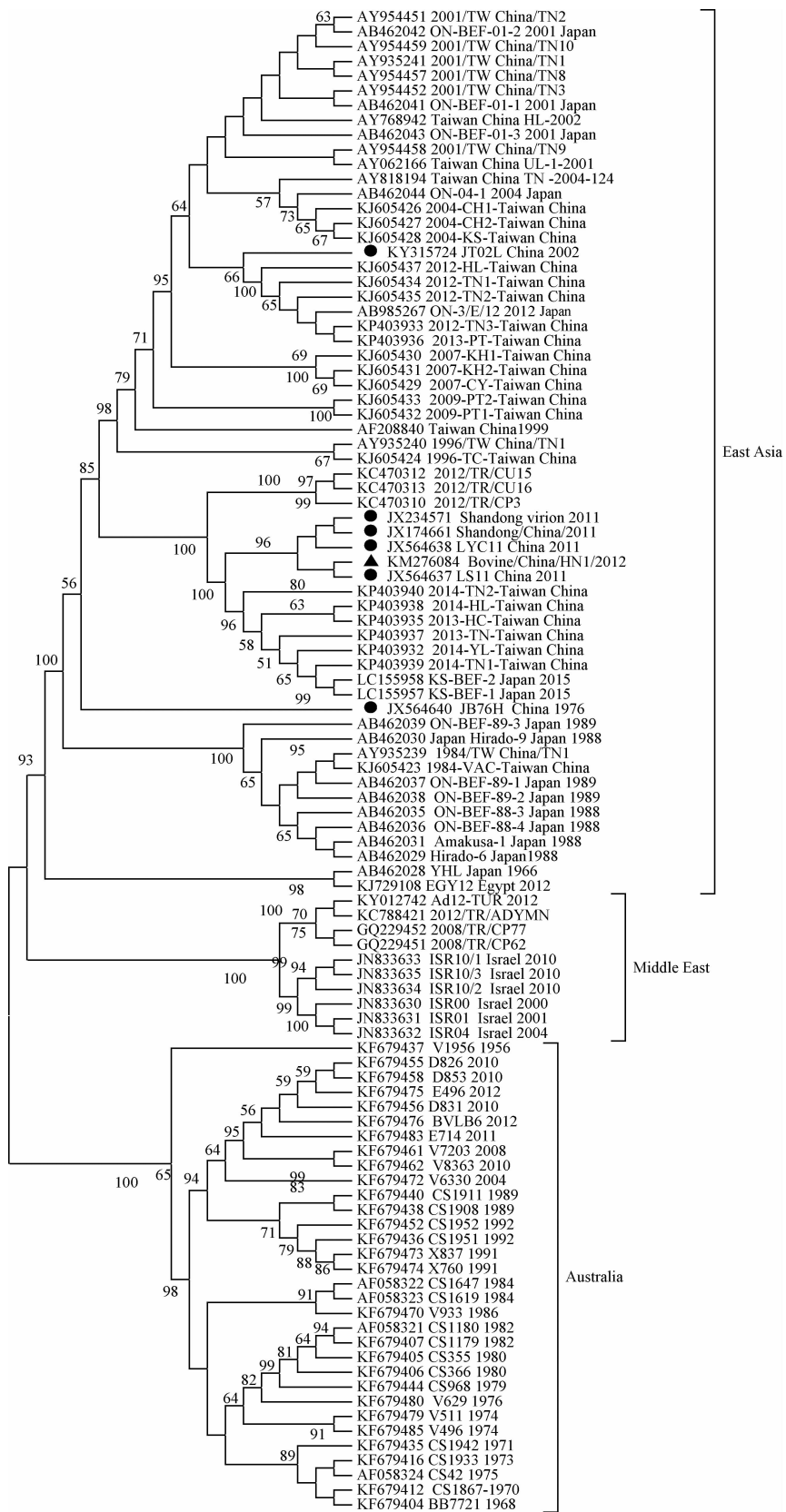


图 3 BEFV 毒株 G 基因系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on G gene of BEFV strains

RNA 病毒的演化因素包括同源重组、基因突变、病毒基因组节段的重排等。据推测,Shandong2011 株在 G 基因编码区 230—472 位的变异可能与澳大利亚和中东毒株的同源重组有关<sup>[26]</sup>。本研究测定了 HN1/2012 株的基因组序列,分析表明其基因组结构与经典的参考毒株相似。在已知的 BEFV 基因组序列中,HN1/2012 株与我国 2002 年分离株 JT02L 的相似性最高,尤其二者编码的 P、 $\alpha 1$ 、 $\gamma$  蛋白的氨基酸相似性为 100%,但二者 G 基因存在一定的差异,与早期分离株 JB76H 的 G 基因差异相对较大,这些差异表明我国不同地区 BEFV 抗原基因存在多态性。系统进化分析表明,HN1/2012 株与当地同期分离株 LS11、LYC11 高度同源,而且这些毒株 G 表位完全一致。目前我国在 BEF 流行的地区,多采用以 JB76H 株制备的疫苗对牛进行接种,抗原基因的变异可能更有利于 BEFV 毒株的生存。重组分析在 HN1/2012 株基因组和 LS11 株、LYC11 株的 G 基因均未发现基因同源重组信号,这些毒株的演化可能与免疫压力导致的基因突变密切相关。

#### 4 结 论

测定了我国近期 BEFV 分离株 HN1/2012 基因组序列,解析了其基因组特征,在基因组水平上明确了其与我国 2002 年分离株 JT02L 相似性最高,与中东谱系和澳大利亚毒株存在较大差异。G 基因的演化分析表明 HN1/2012 株与同期我国河南株亲缘关系最近,在毒株起源上密切相关。HN1/2012 株基因组信息的获得,弥补了我国最近流行周期毒株基因组信息的缺失,为基于全基因组的 BEFV 分子演化研究奠定了基础。

#### 参考文献 (References):

- [1] WALKER P J. Bovine ephemeral fever in Australia and the world [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2005, 292: 57-80.
- [2] WALKER P J, KLEMENT E. Epidemiology and control of bovine ephemeral fever [J]. *Vet Res*, 2015, 46: 124.
- [3] KING A M Q, ADAMS M J, CARSTENS E B, et al. Virus Taxonomy. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses [M]. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2012.
- [4] ADAMS M J, KING A M Q, CARSTENS E B. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2013) [J]. *Arch Virol*, 2013, 158(9): 2023-2030.
- [5] BLASDELL K R, VOYSEY R, BULACH D, et al. Kotonkan and Obodhiang viruses: African ephemero-viruses with large and complex genomes [J]. *Virology*, 2012, 425(2): 143-153.
- [6] BLASDELL K R, VOYSEY R, BULACH D, et al. Malakal virus from Africa and Kimberley virus from Australia are geographic variants of a widely distributed ephemero-virus [J]. *Virology*, 2012, 433(1): 236-244.
- [7] BLASDELL K R, WIDEN S G, DIVINEY S M, et al. Koolpinyah and Yata viruses: two newly recognised ephemero-viruses from tropical regions of Australia and Africa [J]. *Vet Microbiol*, 2014, 174(3-4): 547-553.
- [8] WALKER P J, BYRNE K A, CYBINSKI D H, et al. Proteins of bovine ephemeral fever virus [J]. *J Gen Virol*, 1991, 72(1): 67-74.
- [9] KONGSUWAN K, CYBINSKI D H, COOPER J, et al. Location of neutralizing epitopes on the G protein of bovine ephemeral fever rhabdovirus [J]. *J Gen Virol*, 1998, 79(11): 2573-2581.
- [10] MCWILLIAM S M, KONGSUWAN K, COWLEY J A, et al. Genome organization and transcription strategy in the complex GNS-L intergenic region of bovine ephemeral fever rhabdovirus [J]. *J Gen Virol*, 1997, 78(6): 1309-1317.
- [11] JOUBERT D A, BLASDELL K R, AUDSLEY M D, et al. Bovine ephemeral fever rhabdovirus  $\alpha 1$  protein has viroporin-like properties and binds importin  $\beta 1$  and importin 7 [J]. *J Virol*, 2014, 88(3): 1591-1603.
- [12] 白文彬. 我国牛流行热流行病学和防制概况 [J]. 中国预防兽医学报, 1993(4): 60-62.  
BAI W B. Status of epidemiology and prevention of bovine ephemeral fever in China [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 1993(4): 60-62. (in Chinese)
- [13] BAI W B, TIAN F L, WANG C, et al. Preliminary studies of the complement fixation test to confirm the diagnosis of bovine ephemeral fever [J]. *Aust J Biol Sci*, 1987, 40(2): 137-141.
- [14] 翟中和, 刘海德, 潘惟钧. 牛流行热病毒传代过程中接毒浓度对收获液病毒滴度及毒粒形态影响的研究 [J]. 畜牧兽医学报, 1980, 11(4): 201-208.



- ZHAI Z H, LIU S D, PAN W J. Study on the influence of inoculation concentration on virus titer and virion morphology during the passage of bovine ephemeral fever virus [J]. *Acta Veterinarian et Zootechnica Sinica*, 1980, 11(4): 201-208. (in Chinese)
- [15] WANG F I, HSU A M, HUANG K J. Bovine ephemeral fever in Taiwan [J]. *J Vet Diagn Invest*, 2001, 13(6): 462-467.
- [16] LI Z, ZHENG F, GAO S, et al. Large-scale serological survey of bovine ephemeral fever in China [J]. *Vet Microbiol*, 2015, 176(1-2): 155-160.
- [17] LIU D, LI K, ZHANG L, et al. Seroprevalence investigation of bovine ephemeral fever in yaks in Tibetan Plateau of China from 2012 to 2015 [J]. *Trop Anim Health Prod*, 2017, 49(1): 227-230.
- [18] 黄德萱,高闪电,康彪,等. 牛流行热在天祝白牦牛中流行病学的调查[J]. 中国兽医科学, 2017, 47(9): 1154-1158.
- HUANG D X, GAO S D, KANG B, et al. Epidemiological investigation of bovine ephemeral fever in Tianzhu white yaks [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2017, 47(9): 1154-1158. (in Chinese)
- [19] ZHENG F Y, QIU C Q. Phylogenetic relationships of the glycoprotein gene of bovine ephemeral fever virus isolated from mainland China, Taiwan, Japan, Turkey, Israel and Australia [J]. *Viol J*, 2012, 9: 268.
- [20] 王洪梅,侯佩莉,杨宏军,等. 牛流行热病毒山东地方株的分离与鉴定[J]. 山东农业科学, 2013, 45(2): 31-33.
- WANG H M, HOU P L, YANG H J, et al. Isolation and identification of bovine epidemic fever virus Shandong strain [J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2013, 45(2): 31-33. (in Chinese)
- [21] GAO S, DU J, TIAN Z, et al. Complete genome sequence of a bovine ephemeral fever virus JT02L strain in mainland China [J]. *Arch Virol*, 2017, 162(11): 3555-3558.
- [22] KATO T, AIZAWA M, TAKAYOSHI K, et al. Phylogenetic relationships of the G gene sequence of bovine ephemeral fever virus isolated in Japan, Taiwan and Australia [J]. *Vet Microbiol*, 2009, 137(3-4): 217-223.
- [23] AZIZ-BOARON O, KLAUSNER Z, HASOKSUZ M, et al. Circulation of bovine ephemeral fever in the Middle East-strong evidence for transmission by winds and animal transport [J]. *Vet Microbiol*, 2012, 158(3-4): 300-307.
- [24] TRINIDAD L, BLASDELL K R, JOUBERT D A, et al. Evolution of bovine ephemeral fever virus in the Australian epizootic [J]. *J Virol*, 2014, 88(3): 1525-1535.
- [25] TING L J, LEE M S, LIN Y L, et al. Invasion of exotic bovine ephemeral fever virus into Taiwan in 2013-2014 [J]. *Vet Microbiol*, 2016, 182: 15-17.
- [26] HE C Q, LIU Y X, WANG H M, et al. New genetic mechanism, origin and population dynamic of bovine ephemeral fever virus [J]. *Vet Microbiol*, 2016, 182: 50-56.

(编辑 白永平)