

# 猪乙脑病毒 BHK-21 细胞传代株 BSF.ZZ-1-p60 和 BSF.ZZ-3-p60 的全基因组序列分析

滕蔓<sup>1</sup>,胡博<sup>1</sup>,冯丽丽<sup>2</sup>,樊剑鸣<sup>3</sup>,郅玉宝<sup>1</sup>,李秀杰<sup>1</sup>,邓瑞广<sup>1</sup>,罗俊<sup>1\*</sup>

(1. 河南省农业科学院 动物免疫学重点实验室/河南省动物免疫学重点实验室/农业部动物免疫学重点实验室,河南 郑州 450002; 2. 河南省农业科学院 农业经济与信息研究所,河南 郑州 450002;  
3. 郑州大学 公共卫生学院,河南 郑州 450001)

**摘要:**为研究猪源乙脑病毒分离株基因遗传稳定性,对猪源乙脑病毒分离株 BSF.ZZ-1 和 BSF.ZZ-3 在 BHK-21 细胞上连续传代 60 次后的病毒全基因组进行序列测定及分析。结果表明,BSF.ZZ-1-p60、BSF.ZZ-3-p60 基因组全长均与各自的亲本毒株 BSF.ZZ-1、BSF.ZZ-3 一致,均为 10 977 nt,在 2 个病毒基因组的 10 701 nt 位点处均插入 1 个碱基 G。与亲本毒株相比,2 个细胞传代毒株的病毒基因组经连续传代后趋于稳定,均有 10 个位点发生氨基酸突变,这些突变主要集中在 E 蛋白区域。核苷酸序列同源性比对分析发现,与其他 JEV 参考毒株相比,BSF.ZZ-1-p60 和 BSF.ZZ-3-p60 与弱毒疫苗株 SA14-14-2 的核苷酸序列同源性较高,分别为 99.6% 和 95.9%,其氨基酸序列与猪源野毒分离株 SH0601 和 HW 的氨基酸序列同源性较高,分别为 98.2%、86.4% 和 98.3%、86.5%。

**关键词:**猪;乙脑病毒;BHK-21 细胞;细胞传代;病毒基因组;序列分析

**中图分类号:**S855.3   **文献标志码:**A   **文章编号:**1004-3268(2016)03-0135-06

## Sequence Analysis of Full-length Genomes of Two Japanese Encephalitis Virus Strains BSF.ZZ-1-p60 and BSF.ZZ-3-p60 Passaged on BHK-21 Cells

TENG Man<sup>1</sup>, HU Bo<sup>1</sup>, FENG Lili<sup>2</sup>, FAN Jianming<sup>3</sup>, ZHI Yubao<sup>1</sup>, LI Xiujie<sup>1</sup>, DENG Ruiguang<sup>1</sup>, LUO Jun<sup>1\*</sup>

(1. Henan Provincial Key Laboratory of Animal Immunology/Key Laboratory of Animal Immunology of the Ministry of Agriculture, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China; 2. Institute of Agricultural Economics and Information, Henan Academy of Agriculture Sciences, Zhengzhou 450002, China;  
3. College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

**Abstract:** In this study, the full-length genomes of two Japanese encephalitis virus (JEV) strains, BSF.ZZ-1-p60 and BSF.ZZ-3-p60 that were isolated from pigs and passaged on BHK-21 Cells, were sequenced and compared with reference strains. The results showed that same to the parental viruses, both of the genomes of BSF.ZZ-1-p60 and BSF.ZZ-3-p60 were 10 977 nt long, with an insert base of G at the 10 701 nt site. Compared to the parental strains, the viral genomes of BSF.ZZ-1-p60 and BSF.ZZ-3-p60 were stabilized after passaged on BHK-21 cells for 60 times, with a total of 10 amino acid mutations which mainly occurred in E proteins in both strains. Compared to the reference JEV strains, both BSF.ZZ-1-p60 and BSF.ZZ-3-p60 showed highest nucleotide sequence homologies (99.6% and 95.9%) to vaccine strain SA14-14-2, while for the amino acid sequences, both strains showed highest homologies (98.2%,

收稿日期:2015-11-20

基金项目:国家公益性行业(农业)科研专项(201203082-5);河南省科技攻关计划项目(152102110127);河南省农业技术推广财政补助资金项目(YCN201519111);河南省农科院科研发展专项资金项目(20157817)

作者简介:滕蔓(1977-),女,河南周口人,助理研究员,博士,主要从事动物疫病快速检测技术研究及产品研发。

E-mail:tm135@aliyun.com

\* 通讯作者:罗俊(1978-),男,河南罗山人,研究员,博士,主要从事动物病毒流行病学、病原学、致病机制及快速检测技术研究。E-mail:luojun593@aliyun.com

86.4% and 98.3%, 86.5% ) to that of the pig-originated strains SH0601 and HW, respectively.

**Key words:** pig; JEV; BHK-21 cell; cell passage; viral genome; sequence analysis

日本流行性乙型脑炎 (Japanese encephalitis, JE) 是由日本流行性乙型脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV) 感染人、猪、马等多种动物引起的一种急性人畜共患传染病<sup>[1]</sup>。JE 简称乙脑, 该病主要发生于学龄前儿童及老龄人群, 患者或感染动物的临床症状主要表现为神经性脑炎, 痊愈后往往留下严重的后遗症。蚊虫是 JEV 的自然宿主和重要传播媒介, 尤其是三带喙库蚊, 病毒可随蚊虫冬眠而越冬存活。猪是 JEV 的重要贮存和扩增宿主, 经由蚊虫叮咬后, JEV 可在人群和猪群之间形成人—蚊—猪的循环传播<sup>[2]</sup>。不同日龄猪均可感染 JEV, 发病猪主要表现为妊娠母猪流产、木乃伊胎、新生仔猪脑炎或种公猪睾丸炎, 导致猪群繁殖障碍及生产性能下降, 给养猪业造成严重的经济损失, 同时也增加了人群公共卫生安全的风险。

JEV 是一种单股正链 RNA 病毒, 在分类上属于黄病毒科 (Flaviridae)、黄病毒属 (*Flavivirus*), 病毒基因组全长为 11 kb, 5'末端有一个 I 型帽子结构 (m7GpppAmp), 3'末端多为 CU - OH, 无 poly A 尾巴<sup>[3]</sup>。JEV 共编码 3 个结构蛋白 (C - PrM/M - E) 和 7 个非结构蛋白 (NS1 - NS2a - NS2b - NS3 - NS4a - NS4b - NS5), 各基因区段间无重叠。此前, 笔者所在课题组从河南省某规模化种猪场睾丸肿大的发病公猪精液中分离到 2 个 JEV 流行毒株 BSF.ZZ-1 和 BSF.ZZ-3, 基于 *prM* 和 *E* 基因的系统发生树分析显示, 这 2 个毒株均属于基因 III 型<sup>[4-5]</sup>。将这 2 个猪源分离株在 BHK-21 细胞上进行连续传代, 对不同代次毒株 *E* 基因序列分析的结

果表明, 连续传代 60 次后, 病毒 *E* 基因已基本稳定<sup>[6]</sup>。前期研究未对这 2 个猪源分离株的全基因遗传稳定性进行测定, 为此, 本研究对 BSF.ZZ-1 和 BSF.ZZ-3 的细胞传代毒株 BSF.ZZ-1-p60 和 BSF.ZZ-3-p60 的全基因组分别进行了序列测定, 以期探讨细胞连续传代后整个病毒基因组的变化情况, 为后续疫苗研究奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞、毒株及试剂

BHK-21 细胞系由本实验室保存; JEV 分离株 BSF.ZZ-1 和 BSF.ZZ-3 毒株均为本实验室分离保存<sup>[4-5]</sup>; 新生牛血清 (NCS) 购自杭州四季青公司; TRIzol 购自 Invitrogen 公司; M-MLV 逆转录酶、pMD19-T 载体、DNA 回收试剂盒、Ex Taq 预混酶、RNA 酶抑制剂、*E. coli* DH 5 $\alpha$  感受态细菌、dNTP 均由 TaKaRa 公司提供。

### 1.2 病毒传代

常规方法复苏 BHK-21 细胞, 按文献[7]的方法制备细胞单层, 然后将 BSF.ZZ-1 和 BSF.ZZ-3 毒株在 BHK-21 细胞上连续培养, 传代 60 次后收集子代病毒培养物, 分别命名为 BSF.ZZ-1-p60 和 BSF.ZZ-3-p60, -70 ℃ 冻存备用。

### 1.3 引物设计

根据 GenBank 已报道的 JEV 参考毒株全基因组序列, 用 Primer Premier 5.0 软件设计 8 对保守的 JEV 全基因组重叠引物(表 1), 引物由生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 用于 JEV 病毒全基因组 RT-PCR 扩增的引物

引物编号	引物名称	类型	引物序列 (5'-3')	引物长度/bp	PCR 产物长度/bp
1	JEVpC/M - F11	5'	CTGTGTGAACCTCTGGCTTAG	22	967
	JEVpC/M - R978	3'	AACTGTAAGCCGGAGCGACCAA	22	
2	JEVpE - F958	5'	TTGGTCGCTCCGGCTTACAG	20	1 574
	JEVpE - R2532	3'	GCCACTTCCACACCTCATCT	20	
3	JEVpNS1 - F2526	5'	AAGTGGCATCTCGTGCACA	20	1 149
	JEVpNS1 - R3675	3'	CCCAAGCATCAGCACAAGTA	20	
4	JEVpNS2 - F3661	5'	GTGCTGATGCTGGGGCAT	20	1 366
	JEVpNS2 - R5027	3'	AGAACATGGTGAGCCGGATGT	20	
5	JEVpNS3 - F5005	5'	GGAACATCCGGCTACCCAT	20	1 495
	JEVpNS3 - R6500	3'	CATGCGACCGAGCACCTCTA	20	
6	JEVpNS4 - F6487	5'	GTGCTCGTCGGCATGCCCTGA	20	1 313
	JEVpNS4 - R7800	3'	GCCTGCTTCAGTGCCTCCA	20	
7	JEVpNS5/1 - F7780	5'	AGGTGGACCGCACTGAAGCA	20	1 650
	JEVpNS5/1 - R9430	3'	CATGACCTTGACCACTTTGT	20	
8	JEVpNS5/2 - F9400	5'	ACAGGCACAAAAGTGGTCAAG	20	1 578
	JEVpNS5/2 - R10978	3'	AGATCCTGTCTTCCTCA	20	

#### 1.4 RT-PCR

各取 300 μL BSF.ZZ-1-p60 和 BSF.ZZ-3-p60 病毒液,采用 TRIzol 法提取总 RNA。用表 1 中的 3'引物作为反转录引物,分别制备 cDNA。20 μL PCR 体系包括:Ex Taq 预混酶 10 μL、cDNA 模板 1 μL、5'及 3'引物各 1 μL、d<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O 7 μL。PCR 反应条件设定为:94 ℃ 预变性 4 min;94 ℃ 变性 30 s、55 ℃ 复性 30 s、72 ℃ 延伸 2 min,共 30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。最后用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物。

#### 1.5 基因克隆及测序

采用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物并回收目的片段,连接 pMD19-T 载体后转化至 DH 5α 感

受态细胞,涂氨苄青霉素抗性的 LB 平板,37 ℃ 培养过夜。菌落 PCR 筛选阳性克隆,PCR 反应体系和条件同 1.4,最后将阳性菌送样至生物工程(上海)股份有限公司测序。

#### 1.6 全基因组序列分析

用 DNASTAR MegAlign 软件将测序获得的 8 个基因片段分别与部分 JEV 参考毒株(表 2)全基因组序列进行比对,分析其序列同源性,然后用 SeqMan 软件将基因片段拼接成全基因组。最后分析 BSF.ZZ-1-p60 和 BSF.ZZ-3-p60 与 6 个参考毒株的全基因组核苷酸及氨基酸序列同源性,并结合 15 个强、弱参考毒株的基因组对关键氨基酸位点进行比对分析。

表 2 JEV 参考毒株的背景信息

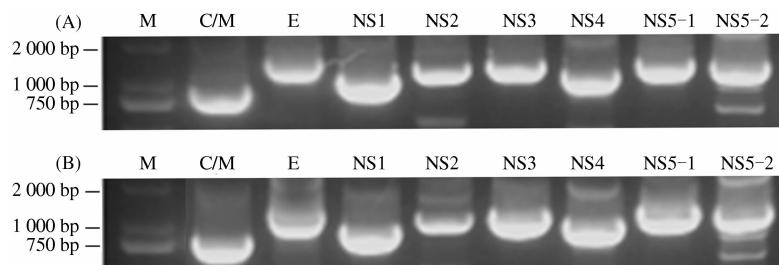
编号	毒株	基因型	登录号	年份	国家与地区	来源
1	P3	III	U47032	1949	北京	人
2	SA14	III	U14163	1954	西安	人
3	Beijing-1	III	L48961	1949	北京	人
4	HW	III	AY849939	1988	湖北	猪
5	HWe	III	EF107523	1988	湖北	猪
6	SA14-12-1-7	III	AF416457	1960s	中国	蚊虫
7	SH0601	III	EF543861	2006	上海	猪
8	JaGAr01	III	AF069076	1959	日本	蚊虫
9	P20778	III	AF080251	1958	印度	人
10	SA14-14-2	III	AF315119	1960s	中国	蚊虫
11	JEV-at222	III	AB196924	不详	日本	人
12	JEV-at31	III	AB196923	不详	日本	人
13	JaOH0566	III	AY508813	1966	日本	人
14	CH2195LA	III	AF221499	1994	台湾	蚊虫
15	ML17	III	AY508812	1981	日本	疫苗
16	GP78	III	AF075723	1978	印度	人

## 2 结果与分析

#### 2.1 JEV 细胞传代毒株基因组的 RT-PCR 扩增及测序结果

将猪源 JEV 分离株 BSF.ZZ-1 和 BSF.ZZ-3 在 BHK-21 细胞上连续传代 60 次,分别提取病毒培养物总 RNA,然后用 JEV 特异性引物(表 1)对 2

个传代毒株的病毒全基因组进行 RT-PCR,分别扩增 JEV 的 C/M、E、NS1、NS2、NS3、NS4、NS5-1 和 NS5-2 基因片段。电泳分析结果表明,所扩增的 PCR 产物条带均与预期大小相符(图 1)。PCR 产物经克隆测序,结果显示,2 个毒株的 8 个基因组片段与 SA14-14-2 的核苷酸序列同源性均在 98% 以上。



(A) 为 BSF.ZZ-1-p60; (B) 为 BSF.ZZ-3-p60

图 1 RT-PCR 扩增 BHK-21 细胞传代毒株的基因片段

## 2.2 JEV 细胞传代毒株全基因组的序列拼接及分析结果

对克隆获得的 8 个病毒基因片段序列分别进行全基因组拼接, 分析结果显示, BSF. ZZ - 1 - p60 和 BSF. ZZ - 3 - p60 的病毒基因组全长均为 10 977 nt, 在 2 个病毒基因组的 10 701 nt 位点处均有 1 个插入碱基 G。BSF. ZZ - 1 - p60 的 A、G、T、C 比例分别为 27.67%、28.42%、21.01%、22.90%; BSF. ZZ - 3 - p60 的 A、G、T、C 比例分别为 27.75%、28.35%、20.99%、22.91%。2 个毒株 5' 非编码区均含有 96 个核苷酸, 均有 1 个 97 位至 10 392 位的单一开放阅读框, 编码 3 432 个氨基酸残基。

## 2.3 JEV 细胞传代毒株基因组与参考毒株的序列同源性比对分析结果

将 BSF. ZZ - 1 - p60、BSF. ZZ - 3 - p60 的病毒

全基因组序列分别与表 2 中的强毒株 SA14、弱毒疫苗株 SA14 - 14 - 2、中间减毒株 SA14 - 12 - 1 - 7 以及 3 个猪源分离强毒株 SH0601、HWe 和 HW 进行同源性比对分析, 结果表明, BSF. ZZ - 1 - p60 和 BSF. ZZ - 3 - p60 的全基因组核苷酸序列同源性与 SA14、SA14 - 14 - 2、SA14 - 12 - 1 - 7 疫苗株较高, 其中与 SA14 - 14 - 2 同源性最高, 分别为 99.6% 和 95.9%, 但与 SH0601、HWe 和 HW 的同源性较低(表 3)。6 个参考毒株的全基因组氨基酸序列与 BSF. ZZ - 1 - p60 的同源性均较高, 而与 BSF. ZZ - 3 - p60 的氨基酸序列同源性均较低。BSF. ZZ - 1 - p60 和 BSF. ZZ - 3 - p60 与 SH0601 和 HW 的氨基酸序列同源性较高, 分别为 98.2%、86.4% 和 98.3%、86.5%。

表 3 JEV 细胞传代毒株与 6 个参考毒株的基因组序列同源性分析

毒株	核苷酸同源性		氨基酸同源性		%
	BSF. ZZ - 1 - p60	BSF. ZZ - 3 - p60	BSF. ZZ - 1 - p60	BSF. ZZ - 3 - p60	
SA14	99.2	95.6	96.4	84.6	
SA14 - 14 - 2	99.6	95.9	96.8	85.0	
SA14 - 12 - 1 - 7	99.4	95.7	96.5	84.7	
SH0601	78.1	74.2	98.2	86.4	
HWe	78.0	75.5	96.0	84.1	
HW	77.9	73.9	98.3	86.5	

## 2.4 JEV 细胞传代毒株病毒全基因组关键氨基酸残基位点差异分析

将 BSF. ZZ - 1 - p60、BSF. ZZ - 3 - p60 与表 2 中的 10 个强毒株、5 个弱毒株及其亲本毒株的全基因组氨基酸序列进行比对, 分析关键氨基酸位点的差异(表 4)。与 SA14 等强毒株和弱毒株相比, 2 个细胞传代毒株及其亲本毒株的氨基酸序列特征与疫苗毒株 SA14 - 14 - 2 和中间减毒株 SA14 - 12 - 1 - 7

更接近; 与亲本毒株 BSF. ZZ - 1 和 BSF. ZZ - 3 相比, 2 个细胞传代毒株各自均发生了 10 个位点的氨基酸突变, 主要集中在 E 蛋白区域; 2 个细胞传代毒株之间也有多个氨基酸位点差异, 如 E107、E138、E176、E279 等。上述结果表明, BSF. ZZ - 1 - p60 和 BSF. ZZ - 3 - p60 的病毒全基因组氨基酸序列与弱毒疫苗株 SA14 - 14 - 2 差异最小。

表 4 BSF. ZZ - 1 - p60、BSF. ZZ - 3 - p60 与 15 个参考毒株全基因组关键氨基酸位点差异分析

位点	强毒株								弱毒株					亲本毒株			传代毒株	
	SA14	Bei jing - 1	P3	HW	HWe	P20- 778	GP 78	JaG- Ar01	JaOH 0566	JEV - at31	CH21- at222	ML 95LA	SA14 - 17	SA14 - 12 - 1 - 7	BSF. ZZ - 14 - 2	BSF. ZZ - 12 - 1 - 7	BSF. ZZ - 1 - p60	BSF. ZZ - 3 - p60
C11	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-
C57	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-
C66	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S
C74	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-
M2	K	-	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M5	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-
M24	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-
E42	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E76	T	-	M	M	M	-	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E81	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-
E107	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	F	F	F	F	-
E138	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K	K	K	K	K	-
E176	I	-	-	-	-	T	-	-	-	-	T	-	V	V	V	V	V	-

续表4 BSF.ZZ-1-p60、BSF.ZZ-3-p60与15个参考毒株全基因组关键氨基酸位点差异分析

位点	强毒株										弱毒株						亲本毒株			传代毒株	
	SA14	Bei jing - 1	P3	HW	HWe	P20- 778	GP 78	JaG- Ar01	JaOH 0566	JEV at31	JEV - at222	CH21- 95LA	ML 17	SA14 - I2 - 1 - 7	SA14 - 14 - 2	BSF. ZZ - 1	BSF. ZZ - 3	BSF. ZZ - 1 - p60	BSF. ZZ - 3 - p60		
E177	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A	A	-	A		
E244	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	G	G	G	-	-		
E264	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H	H	H	H	H	H		
E271	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
E279	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M	M	M	-	M		
E315	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	V	V	V	V		
E439	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	R	R	R	R		
E447	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	D	-	-	-		
NS1 - 22	V	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	H	H		
NS1 - 235	D	G	-	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	-	-	-	-	-	-		
NS1 - 292	S	G	-	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	-	-	-	-	-	-		
NS1 - 339	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M	M	M	M	M		
NS1 - 351	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H	H	H	H	H		
NS1 - 354	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K	K	K	K	K	K		
NS1 - 392	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	V	V	V	V		
NS2a - 1	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-		
NS2a - 121	H	Q	-	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	-	-	-	-	-	-		
NS2b - 63	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	D	D	D	D		
NS2b - 65	D	-	-	-	-	-	E	-	-	-	-	-	-	G	G	G	G	G	G		
NS3 - 31	L	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-		
NS3 - 59	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	V	V	V	V	V		
NS3 - 105	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	G	G	G	G	G		
NS3 - 235	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	V	V	V	V		
NS3 - 246	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-		
NS3 - 474	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
NS4a - 64	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-		
NS4a - 240	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-		
NS5 - 255	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	V	V	V	V	V		
NS5 - 231	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y	-	-	-		
NS5 - 268	H	-	Y	Y	Y	-	Y	Y	Y	Y	-	Y	-	Y	Y	Y	G	G	G		
NS5 - 557	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
NS5 - 635	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
NS5 - 639	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H	H	H	H	H	H		
NS5 - 671	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A	A	A	A	A		
NS5 - 855	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-		

注：“-”表示该位点的氨基酸残基与SA14相应位点的氨基酸残基一致。

### 3 讨论

JE最早发现于日本,之后在东南亚也相继报道,调查显示,JE最初可能发生于印度尼西亚或马来西亚<sup>[8-9]</sup>。与其他病毒相比,JEV病毒基因组编码的大多数基因较为保守,更多研究主要集中于prM或E基因。此前研究表明,基因I型JEV毒株的流行分布日渐广泛,有超过基因III型的趋势<sup>[10-11]</sup>。在长期疫苗免疫压力及病毒自身进化过程中,JEV是否可能发生病毒变异或毒力增强,仍需要更加密切、广泛的流行病学调查及疫情监测。猪是JEV最重要的储存和扩增宿主<sup>[2]</sup>,因此研发高效的猪用乙脑疫苗、做好猪群的免疫接种,对于有效控制人群乙脑的流行至关重要。在此前研究中<sup>[4-6]</sup>,笔者所

在课题组已从临床病例猪中分离了2个JEV流行毒株BSF.ZZ-1和BSF.ZZ-3,并将其在BHK-21细胞上进行了连续60次的传代培养,对传代毒株E基因的序列分析发现病毒传代已趋稳定。因此在本研究中,对BSF.ZZ-1-p60和BSF.ZZ-3-p60这2个细胞传代毒株的全基因组进行了序列测定和分析,结果表明,与亲本毒株相比,连续传代的子代病毒基因组有多个氨基酸残基位点的稳定突变,其中E蛋白突变较多。与强毒株SA14和弱毒株SA14-12-1-7、SA14-14-2<sup>[12-13]</sup>相比,BSF.ZZ-1-p60和BSF.ZZ-3-p60与疫苗株SA14-14-2的核苷酸序列同源性最高。此前研究表明,影响JEV毒力的除了E基因起关键作用外,还包括C基因和一些非结构基因。氨基酸残基位点E107、E138、E176、

E177、E264、E279、E315、E439、NS2b-63、NS3-105 和 NS4b-106 等被认为是 JEV 减毒过程中的关键突变位点,与 JEV 毒力直接相关<sup>[14]</sup>。本研究显示,BSF.ZZ-1-p60 和 BSF.ZZ-3-p60 基因组中这些位点大多与疫苗株 SA14-14-2 一致,与 SA14 不一致。从病毒全基因组氨基酸序列同源性来看,BSF.ZZ-1-p60 和 BSF.ZZ-3-p60 与猪源分离株的同源性更高,这为今后进一步筛选猪用乙脑疫苗候选毒株奠定了良好的基础。

#### 参考文献:

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京:科学出版社,1997:470-473.
- [2] Konno J, Endo K, Agatsuma H, et al. Cyclic outbreaks of Japanese encephalitis among pigs and humans[J]. American Journal of Epidemiology, 1966, 84(2):292-300.
- [3] 项秉懿,陈苏民. 乙型脑炎病毒的分子生物学研究进展[J]. 中国病毒学,1993,8(3):199-206.
- [4] 王兴涛,罗俊,滕蔓,等. 猪流行性乙型脑炎病毒种猪精液分离株的鉴定及进化分析[J]. 河南农业科学,2011,40(5):152-157.
- [5] 禹乐乐,滕蔓,罗俊,等. 猪源乙型脑炎病毒河南分离株的全基因组测序及进化分析[J]. 华北农学报,2012,27(5):184-190.
- [6] 胡博,滕蔓,禹乐乐,等. 猪乙脑病毒分离株 BSF.ZZ-1 和 BSF.ZZ-3 在 BHK-21 细胞上的传代培养及 E 基因序列稳定性分析[J]. 华北农学报,2013,28(6):71-76.
- [7] Teng M, Luo J, Xing G X, et al. Main factors influencing the efficient propagation of virulent or attenuated strains of Japanese encephalitis virus in BHK-21 cells [J]. Indian Journal of Virology, 2012, 23(3):344-348.
- [8] Solomon T, Ni H, Beasley D W, et al. Origin and evolution of Japanese encephalitis virus in southeast Asia[J]. Journal of Virology, 2003, 77(5):3091-3098.
- [9] Mackenzie J S, Williams D T, Smith D W. Japanese encephalitis virus: The geographic distribution, incidence, and spread of a virus with a propensity to emerge in new areas [M]//Tabor Emerging viruses in human populations. Holard: Elsevier, 2007:201-268.
- [10] Chen S P. Molecular phylogenetic and evolutionary analysis of Japanese encephalitis virus in China[J]. Epidemiology and Infection, 2012, 140(1):1637-1643.
- [11] Teng M, Luo J, Fan J M, et al. Molecular characterization of Japanese encephalitis viruses circulating in pigs and mosquitoes on pig farms in the Chinese province of Henan[J]. Virus Genes, 2013, 46(1):170-174.
- [12] Xin Y Y, Ming Z G, Peng G Y, et al. Safety of a live-attenuated Japanese encephalitis virus vaccine (SA14-14-2) for children[J]. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1988, 39(2):214-217.
- [13] 俞永新,武佩芬,熬坚,等. 一株免疫性进一步提高的乙脑活疫苗减毒株的选育 I, SA14-14-2 弱毒株的某些生物学特性[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 1981, 1(2):77-83.
- [14] 李静,俞永新,安琪,等. 乙型脑炎病毒减毒活疫苗株 (SA14-14-2) 神经毒力减弱的分子基础[J]. 中国病毒病杂志[J]. 2011, 1(1):51-57.