

福建省猪瘟病毒流行毒株 *E0* 基因的克隆与序列分析

张磊^{1,2}, 王晶钰¹, 张志², 李晓成², 朱小甫^{1,2}

(1 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100; 2 中国动物卫生与流行病学中心, 山东 青岛 266032)

[摘要] **【目的】**对我国福建省流行的猪瘟病毒 *E0* 基因进行序列测定及分析。**【方法】**应用 RT-PCR, 从我国福建省送检的 54 份病料中扩增出 14 份猪瘟病毒 *E0* 基因, 将其克隆到 T 载体上并测序。利用 DNASTar 分析软件, 对所测定的 14 株流行毒株与参考毒株的相应基因片段进行同源性及序列分析。**【结果】**得到约 801 bp 的猪瘟病毒 *E0* 基因片段。序列分析表明, 14 株福建流行毒株可分为 2 个基因群, 其中 FJ216 与 ALD、Alfort187、Brescia、C HVRI、GPE、Glentorf、CAP、Shimen 和 HCLV 等我国主要参考毒株属于基因 1 群, 其他 13 株流行毒株和我国另一分离株 GXWZ02 属于基因 2 群。基因 1 群的 FJ216 与 HCLV 的核苷酸和氨基酸同源性分别为 95.0% 和 94.3%, 与 Shimen 的核苷酸和氨基酸同源性分别为 99.4% 和 99.1%; 而另外 13 株流行毒株之间核苷酸和氨基酸同源性分别为 89.7%~99.9% 和 93.84%~99.6%, 13 株流行毒株与 HCLV 株的核苷酸和氨基酸同源性分别为 81.8%~88.1% 和 86.8%~89.5%, 与 Shimen 株的核苷酸和氨基酸同源性分别为 83.4%~90.8% 和 88.6%~93.9%。得到的 14 株猪瘟病毒 *E0* 基因具有 RNase 活性的 2 个区域均高度保守, 没有发生变异。**【结论】**福建省近期流行的猪瘟病毒以基因 2 群为优势毒株, 而且大多数与 HCLV、Shimen 毒株之间存在较大差异。

[关键词] 猪瘟病毒; *E0* 基因; 基因克隆; 序列分析

[中图分类号] S852.65⁺9.6

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2009)02-0021-06

Cloning and sequence analysis of genome *E0* of CSFV isolated from Fujian

ZHANG Lei^{1,2}, WANG Jing-yu¹, ZHANG Zhi², LI Xiao-cheng², ZHU Xiao-fu^{1,2}

(1 College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 China Animal Health and Epidemiology Centre, Qingdao, Shandong 266032, China)

Abstract: **【Objective】** The study was to analyze the *E0* gene sequence of classical swine fever virus (CSFV) in Fujian, China. **【Method】** A total of 14 DNA fragments of *E0* gene isolated from 54 pathological tissues, from various regions in Fujian were amplified by RT-PCR, cloned, sequenced and compared with those of 10 reference strains Alfort187, ALD, Brescia, GPE, C HVRI, Shimen, GXWZ02, Glentorf, CAP and HCLV by using DNASTar software. **【Result】** The nucleotide sequence and the amino acid sequence of the 24 HCV strains shared an 81.8%—99.9% and an 86.8%—99.6% homology respectively. The 24 HCV strains were divided into 2 major groups, HCV group I being represented by FJ216, Shimen, HCLV and so on, and HCV group II by the other HCV strains of Fujian province and GXWZ02. But the two motifs of Erns RNase activity, SLHGIWPG (or E) (29—36 sites) and EWNKHGWC (75—82 sites) were highly conserved, there being only one mutation from E to O in the domain EWNKHGWC in the 14 field isolates,

* [收稿日期] 2008-04-07

[基金项目] 2005 年农业部中国猪病监测项目

[作者简介] 张磊(1982—), 男, 吉林东丰人, 在读硕士, 主要从事分子病原学与免疫学研究。E-mail: leileileileilei@263.net

[通信作者] 李晓成(1962—), 男, 陕西铜川人, 研究员, 主要从事兽医流行病学研究。E-mail: lxch2006@126.com

and no mutation being found in the key amino acid residue *H* located in the 30 and 79 sites. 【Conclusion】 Of the *E0* gene of the 14 field isolates, HCV was found to be complex, diverse and stable.

Key words: CSFV; *E0* gene; gene cloning; sequence analysis

猪瘟(Classical swine fever, CSF)是由猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)引起的猪的一种高度接触性传染病,严重危害养猪业的发展,是世界粮农组织和各国政府严密监控和检疫的主要传染病之一,也是我国养猪业面临威胁最大的传染病。CSFV 属黄病毒科瘟病毒属,为单股正链 RNA 病毒,长约 12.3 kb,含有一个大的开读框架(ORF),编码 3 898 个氨基酸组成的多聚蛋白,在病毒和宿主细胞酶的作用下可加工成 11 种结构蛋白和非结构蛋白^[1-2]。*E0* 蛋白是猪瘟病毒重要的糖蛋白之一,主要功能是构成 CSFV 的外鞘,参与 CSFV 感染细胞的过程,可诱导宿主动物产生保护性免疫应答。*E0* 蛋白有 RNase(RNA 酶)活性^[3],可降解病毒和细胞的 RNA;导致免疫抑制,引起动物淋巴和上皮细胞凋亡^[4];也与 CSFV 的宿主嗜性有关^[5],用 *E0* 蛋白可有效阻断 CSFV 对易感动物细胞的感染。这表明 *E0* 蛋白可能在 CSFV 对细胞的感染,以及细胞中的复制、表达和调控过程中起重要作用^[6]。因此,建立快速的猪瘟诊断方法,并对其 *E0* 基因序列进行分析,对该病的防治与控制有重要意义。

福建省是我国的养猪大省,也是猪瘟频发的地区之一,为了解福建猪瘟流行毒株的变异规律,本研究对福建省部分地区送检的病料进行了 CSFV 检测,并对流行毒株 *E0* 基因的分子流行病学进行了分析,现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源 福建省部分地区所采集猪的扁桃体、淋巴结、脾等病料组织共 54 份。

1.1.2 试剂 TRIzol LS Reagent 为美国 Invitrogen 公司产品;AMV 反转录酶(5 U/ μ L)、HPR I RNA 酶抑制剂(40 U/ μ L)、DEPC 处理水、*rTaq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L)、dNTP(2.5 mmol/L)、pMD18-T 载体克隆试剂盒、*Bam*H I (15 U/ μ L)及 *Hind* III(15 U/ μ 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 大肠杆菌由中国动物卫生与流行病学中心保存。

1.2 CSFV *E0* 基因的扩增与克隆

1.2.1 引物的设计及合成 根据 GenBank 上发表的 CSFV Shimen 株基因序列,设计 2 对引物 *E0*DF/*E0*DR 和 *E0*EF/*E0*ER;*E0*DF 5'-AAC CAC CAG AAT CTA GGA AG-3'(1 089~1 108 bp),*E0*DR 5'-GTG TTT TTG GGG AGG CAA GC-3'(1 941~1 922 bp);*E0*EF 5'-AAA GCC CTA TTG GCA TGG G-3'(1 118~1 136 bp),*E0*ER 5'-GGT GCA GTT GTT AGT GTA CC-3'(1 119~1 900 bp),预计扩增片段 801 bp。引物均由生工生物工程(上海)有限公司合成。

1.2.2 病料中总 RNA 的提取 取 2.0~5.0 g 病料组织(扁桃体、淋巴结、脾),剪碎后按 1:5 加入灭菌 PBS 液,于组织研磨器中充分研磨后,8 000 r/min 离心 10 min,取上清液,于 -20 ℃ 保存备用。取 250 μ L 上清液,按照 TRIzol LS Reagent 试剂说明进行总 RNA 的提取。

1.2.3 cDNA 反转录 在核酸干燥过程中,按照以下体系冰上配制反转录反应液:DEPC 处理水 10.0 μ L, dNTP 4.0 μ L, 5 $\times$ AMV 反转录酶 Buffer 4.0 μ L, *E0*DR(25 pmol/L) 1.0 μ L, AMV 反转录酶 0.5 μ L, HPR I RNA 酶抑制剂 0.5 μ L, 总体积 20.0 μ L。核酸干燥后用反应液反复吹打核酸,充分溶解后于 42 ℃ 水浴反转录 90 min,取出后 -20 ℃ 保存备用。

1.2.4 套式 PCR 扩增 *E0* 全基因 第 1 次 PCR 扩增按照以下反应体系进行:取第一链 cDNA 2.0 μ L 作为模板,超纯水 17.0 μ L, 10 $\times$ PCR Buffer 2.5 μ L, dNTP 2.0 μ L, *E0*DF/*E0*DR 各 0.5 μ L, *rTaq* DNA 聚合酶 0.5 μ L, 总体积 25.0 μ L。反应条件为:95 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 50 s, 54 ℃ 60 s, 72 ℃ 60 s, 共 35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min。

第 2 次 PCR 扩增:将第 1 次 PCR 扩增产物进行 10 倍稀释,取 2.0 μ L 作为模板进行第 2 次 PCR 扩增,反应体系同第 1 次扩增,引物为 *E0*EF/*E0*ER。反应条件为:95 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 50 s, 58 ℃ 60 s, 72 ℃ 60 s, 共 35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min。

1.2.5 PCR 扩增产物的克隆及测序 各毒株的 RT-PCR 扩增片段分别回收,按照 pMD18-T 载体

克隆试剂盒说明进行连接,连接产物转化 DH5a 感受态细胞^[7],经 Amp、IPTG、X-gal 筛选,挑取白色单个菌落,分别用 PCR 以及 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行鉴定,阳性质粒送生工生物工程(上海)有限公司进行测序。

1.3 E0 基因序列及其推导氨基酸序列的分析

利用 DNASTar 软件对生工生物工程(上海)有限公司测得的 E0 基因序列进行比较,绘制系统进化树;将核酸序列翻译为氨基酸序列后进行分析。

2 结果与分析

2.1 目的片段的 RT-PCR 扩增、克隆及鉴定结果

用设计的套式 PCR 引物 E0DF/E0DR 和 E0EF/E0ER 扩增出猪组织病料中 14 个 E0 基因片段 FJ281、FJ292、FJ326、FJ221、FJ202、FJ260、FJ200、FJ279、FJ237、FJ248、FJ252、FJ288、FJ272 和 FJ216,通过琼脂糖凝胶电泳证明,扩增片段大小与预期相符,约为 801 bp (图 1)。

2.2 E0 基因序列及其推导氨基酸序列的分析结果

2.2.1 同源性分析 由表 1 可见,FJ216 与 HCLV 的核苷酸和氨基酸同源性分别为 95.0%和 94.3%,与 Shimen 的核苷酸和氨基酸同源性分别为 99.4%和 99.1%;另外 13 株福建流行毒株与 HCLV 的核

苷酸和氨基酸同源性分别为 81.8%~88.1%和 86.8%~89.5%,与 Shimen 的核苷酸和氨基酸同源性分别为 83.4%~90.8%和 88.6%~93.9%,表明福建近期流行的 CSFV 大多数与 HCLV、Shimen 毒株之间存在较大差异。13 株福建流行毒株之间核苷酸同源性为 89.7%~99.9%,氨基酸同源性为 93.84%~99.6%,表明福建流行毒株之间的同源性较高(表 1)。

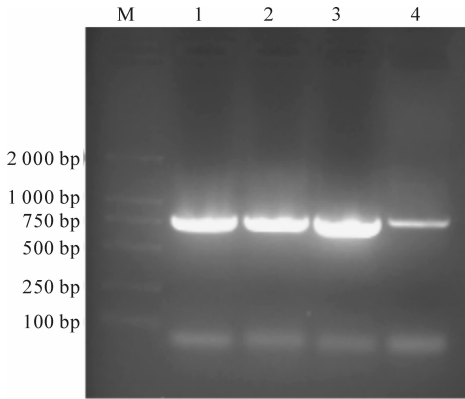


图 1 部分病料经套式 PCR 扩增后的琼脂糖凝胶电泳结果
M. DNA 分子标准质量 DL 2000;1~4. 部分目的基因的 PCR 产物

Fig. 1 Agrose electrophoresis of nest-PCR
from parts of swine samples

M. DNA Marker DL 2000;1-4. Partly PCR products

表 1 福建流行毒株与 HCLV、Shimen 株 E0 基因核苷酸和氨基酸序列同源性的比较

Table 1 Homology analysis of nucleotide and amino acids sequences of E0 genes between HCLV,Shimen strain and Fujian strain																
毒株 Strain	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1		95.0	95.0	84.6	84.2	84.6	83.4	84.3	83.6	84.3	90.8	84.2	84.6	84.3	84.3	84.2
2	94.3		99.4	83.1	83.1	83.6	81.8	82.6	82.1	83.3	88.1	83.1	83.3	82.8	83.3	83.1
3	94.3	99.1		83.3	83.1	83.6	81.8	82.6	82.1	83.3	88.1	83.1	83.3	82.8	83.3	83.1
4	89.9	87.3	87.7		99.0	99.4	94.7	95.2	95.2	99.1	93.3	98.4	99.1	95.7	99.1	98.7
5	89.0	87.3	87.3	97.4		99.6	94.9	95.3	95.6	99.9	92.8	98.5	99.3	96.2	99.3	98.8
6	90.4	88.6	88.6	98.7	98.7		95.3	95.7	95.7	99.7	93.3	99.0	99.7	96.3	99.7	99.3
7	89.5	86.8	86.8	96.1	96.1	97.4		96.6	95.2	95.0	89.7	94.3	95.0	95.2	95.0	94.6
8	89.5	87.7	87.7	97.8	97.8	99.1	96.5		96.2	95.5	90.8	95.0	95.5	96.5	95.5	95.0
9	88.6	86.8	86.8	96.9	97.8	98.2	95.6	98.2		95.5	89.9	94.7	95.5	96.5	95.5	95.0
10	89.5	87.7	87.7	97.8	99.6	99.1	96.5	98.2	97.4		93.0	98.7	99.4	96.3	99.4	99.0
11	93.9	89.5	89.5	95.2	94.3	95.6	93.4	94.7	93.9	94.7		92.5	93.3	91.1	93.0	92.5
12	88.6	86.8	86.8	96.9	96.9	98.2	95.6	98.2	86.5	97.4	93.9		98.7	95.3	98.7	98.2
13	89.9	88.2	88.2	98.2	98.2	99.6	96.9	98.7	97.8	98.7	95.2	97.8		96.0	99.7	99.0
14	89.5	87.7	87.7	97.8	98.7	99.1	96.5	99.1	98.2	99.1	94.7	97.4	98.7		96.0	95.6
15	89.5	87.7	87.7	97.8	97.8	99.1	96.5	98.2	97.4	98.2	94.7	97.4	99.6	98.2		99.0
16	89.0	87.3	87.3	96.5	96.9	97.8	95.2	96.9	96.5	96.9	93.4	96.1	97.4	96.9	96.9	

注:1. HCLV;2. Shimen;3. FJ216;4. FJ200;5. FJ202;6. FJ221;7. FJ237;8. FJ248;9. FJ252;10. FJ260;11. FJ272;12. FJ279;13. FJ281;
14. FJ288;15. FJ292;16. FJ326。右上部分为核苷酸比对结果,左下部分为氨基酸比对结果。

Note: 1. HCLV;2. Shimen;3. FJ216;4. FJ200;5. FJ202;6. FJ221;7. FJ237;8. FJ248;9. FJ252;10. FJ260;11. FJ272;12. FJ279;13. FJ281;
14. FJ288;Right up part is analysis results of nucleotide sequences,left down part is analysis results of amino acids sequences.

2.2.2 *E0* 基因系统进化树 从 GenBank 调出 ALD、Alfort187、Brescia、C HVRI、GPE、Glentorf、CAP、Shimen、GXWZ02 和 HCLV 共 10 株参考毒株 *E0* 基因序列,利用 DNAsar 软件与 14 株福建流行毒株测定序列进行比较,绘制 *E0* 基因系统进化树,结果见图 2。由图 2 可见,14 株福建 CSFV 流行毒株中,FJ281、FJ292、FJ326、FJ221、FJ202、FJ260、FJ200、FJ279、FJ237、FJ248、FJ252、FJ288、FJ272 等

13 株与我国另一分离株 GXWZ02 都属于基因 2 群;只有 1 株流行毒株 FJ216 与我国的主要参考毒株 Shimen、HCLV、C HVRI 以及 ALD、Alfort187、Brescia、GPE、CAP 和 Glentorf 等国外经典毒株属于基因 1 群。从图 2 可以看出,我国福建分离的 CSFV 流行毒株之间的遗传关系较近,与我国广西的分离株 GXWZ02 处于不同的分支。

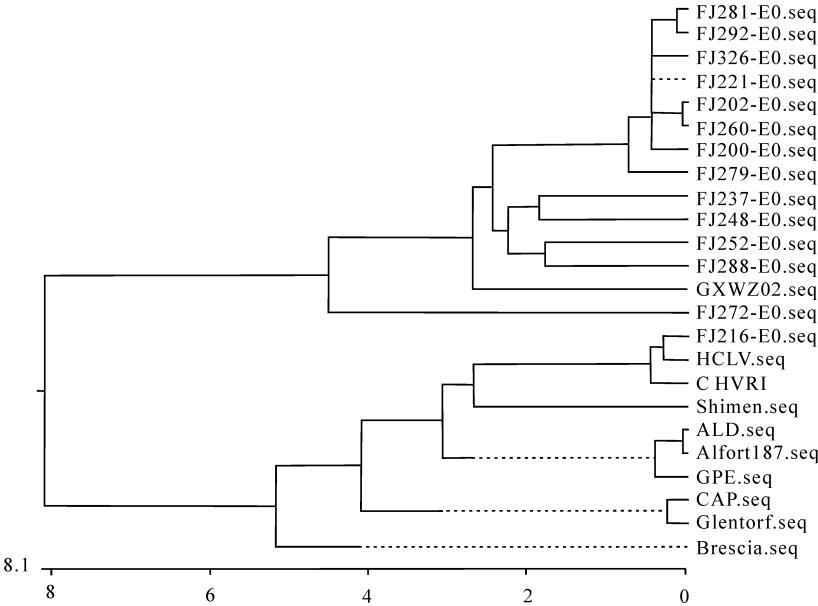


图 2 福建流行毒株与参考毒株 *E0* 基因的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *E0* gene of Fujian strain and reference strains

2.2.3 *E0* 基因 RNase 活性区序列的比较 已有研究发现,CSFV *E0* 基因含有与地衣类及植物核酸酶同样保守的 2 个氨基酸基序 SLHGIWPG(或 E)(29~36 位)和 EWNKHGWC(75~82 位),基序中位于 30 和 79 位的 H(His)为 RNase 的催化活性关键氨基酸残基。为此,本研究比较了福建省流行毒

株与我国疫苗株 HCLV 和强毒株 Shimen 之间的差异,结果见图 3。由图 3 可见,FJ216 毒株在第 36 位的氨基酸与我国疫苗株 HCLV 一致,均为 G,而其余毒株均为 E;FJ279 在第 75 位的氨基酸为 Q,其他毒株均为 E。

S	L	H	G	I	W	P	E	Shimen.seq	E	W	N	K	H	G	W	C	Shimen.seq
.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	HCLV.seq
.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	FJ216-E0.seq
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	FJ281-E0.seq
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	FJ200-E0.seq
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	FJ202-E0.seq
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	FJ221-E0.seq
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	FJ237-E0.seq
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	FJ248-E0.seq
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	FJ252-E0.seq
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	FJ260-E0.seq
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	FJ272-E0.seq
.	.	.	.	.	.	.	.	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	FJ279-E0.seq
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	FJ288-E0.seq
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	FJ292-E0.seq
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	FJ326-E0.seq

图 3 福建流行毒株与 HCLV 和 Shimen *E0* 基因的 2 个 RNase 活性区域比较

Fig. 3 Two conserved motifs of *E0* RNase activity between HCLV, Shimen strain and Fujian strain

3 讨 论

自从 20 世纪 70 年代以来,我国 CSF 发病、流行特点出现了新动向,以温和型 CSF 或非典型猪瘟为主,持续感染和隐性感染并存,出现免疫耐受和带毒综合征,免疫猪群常有免疫失败现象,流行趋势多为地区散发流行。其原因可能与疫苗质量、免疫剂量、疫苗接种时间、病毒毒力变化、疫苗株和流行毒株基因型差异等有关,这也是近年来努力探讨的问题,很多学者认为,我国 CSF 流行现状与 CSFV 遗传变异有关^[8-11]。

应用分子生物学技术对病毒进行遗传演化和变异分析,是近年研究病毒变异的重要技术方法和手段^[12-13]。本研究利用巢式 RT-PCR 技术和同源树进化分析猪瘟疫病毒的变异规律,结果表明,通过完善试验条件,利用分子生物学技术可以更有效、快速、准确地完成诊断和基因序列分析工作。

CSFV 糖蛋白 E0 既是一种包膜糖蛋白,又是一种核酸酶。E0 蛋白的 RNase 活性已分别被试验所证实^[9,14]。因此,本研究选择 E0 作为研究的靶基因具有较高的代表性。CSFV 疫苗株 LC 株是我国 20 世纪 50 年代培育成功并应用于 CSF 免疫的疫苗株,从 20 世纪 50 年代以来一直沿用至今,对我国 CSF 的防治起了很重要的作用。Shimen 株是我国 20 世纪 40 年代分离的强毒株,也是研究 CSFV 时最为常用的经典强毒株。所以在本研究中,选择这 2 株毒株作为比较对象,同时还选择了 2002 年在我国广西分离鉴定的 1 株强毒株作为参照进行了比较,发现 14 株福建流行毒株中,只有 1 株(FJ216)属于基因 1 群,而且该毒株与我国经典 Shimen 毒株的核苷酸序列同源性高达 99.4%,显然这一毒株与我国 Shimen 株属于同一来源;其他 13 株流行毒株之间的同源性较高,也说明福建省的主要流行毒株为基因 2 群,同时该群与我国广西分离株 GXWZ02 也有较高的同源性。通过分析 E0 主要抗原表位上的氨基酸顺序发现:14 株流行毒株在 29~36 位和 75~82 高度保守,除毒株 FJ216 第 36 位氨基酸 G 与 HCLV 一致外,其他毒株均无变化,这种变化可能与病毒的长期免疫压力有关,也可能是病毒在传播过程中杂交而来。

4 结 论

本研究建立了猪瘟疫病毒 E0 基因的巢式 RT-PCR 检测方法,对福建省送检的病料组织进行了

E0 基因的克隆和序列分析,结果表明,在我国长期使用猪瘟疫疫苗的压力下,我国猪瘟的流行毒株不仅与疫苗株 HCLV 之间发生了较大变异,而且与经典的 Shimen 强毒株之间也发生了较大变异。有关这种变异会带来多大影响目前尚不清楚,但这种状况对猪瘟的防治和免疫是一个严重的威胁。

[参考文献]

- [1] Konig M, Iengsfld T, Paulty T, et al. Thiel H J. Classical swine fever virus; independent induction of protective immunity by two structural proteins [J]. *Journal of Virology*, 1995, 69: 6479-6486.
- [2] 刘建玲, 张彦明, 苏正元, 等. 逆转录病毒载体介导的猪瘟疫病毒 E2 基因的真核表达 [J]. *中国病毒学*, 2006, 21(3): 249-252.
Liu J L, Zhang Y M, Su Z Y, et al. Expression of CSFV E2 envelope protein gene in eukaryotic cells and preparation of monoclonal antibodies against CSFV E2 envelope protein [J]. *Virologica Sinica*, 2006, 21(3): 249-252. (in Chinese)
- [3] Hulst M M, Himes G, Moormann R J M. Glycoprotein E2 of classical swine virus; Expression in insect cells and identification as a ribonuclease [J]. *Journal of Virology*, 1994, 200: 558-565.
- [4] Bruschke C J M, Hulst M M, Moormann R J M. Glycoprotein Erns of pestiviruses induces apoptosis in lymphocytes of several species [J]. *Journal of Virology*, 1997, 71: 6692-6696.
- [5] Hulst M M, Moormann R J M. Inhibition of pestivirus infection in cell culture by envelope proteins Erns and E2 of classical swine fever virus; Erns and E2 interact with different receptors [J]. *Journal of General Virology*, 1997, 78: 2779-2787.
- [6] Hulst M M, Panoto F E, Hoekman A, et al. Inactivation of the RNase activity of glycoprotein Erns of classical swine fever virus results in a cytopathogenic virus [J]. *Journal of Virology*, 1998, 72: 151-157.
- [7] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2002.
Sambrook J, Russel D W. *Molecular cloning a laboratory manual* [M]. 3rd ed. Translated by Huang P T. Beijing: Science Press, 2002. (in Chinese)
- [8] Hulst M M, Panoto F E, Moormann R J B. Inactivation of the RNase activity of glycoprotein Erns of classical swine fever virus results in acytopathogenic virus [J]. *Journal of Virology*, 1998, 72: 151-157.
- [9] 涂长春, 李红卫, 金扩世, 等. 猪瘟疫病毒石门株特异 cDNA 片段的扩增与序列分析 [J]. *病毒学报*, 1994, 10: 33-38.
Tu C C, Li H W, Jin K S, et al. Specific sequence amplification of chinese hog cholera virus strain Shimen [J]. *Chinese Journal of Virology*, 1994, 10: 33-38. (in Chinese)
- [10] 王 宁, 傅烈振, 张楚瑜, 等. 猪瘟疫病毒石门株 E2 基因序列分析 [J]. *中国农业科学*, 1999, 32(1): 74-78.
Wang N, Fu L Z, Zhang C Y, et al. Sequencing analysis of E2 gene of classical swine fever virus (CSFV) Shimen strain [J].

Scientia Agricultura Seinica,1999,32(1):74-78. (in Chinese)

[11] 李红卫,涂长春,吕宗吉,等. 异源猪瘟病毒 C 株 E2 基因保护性抗原编码区的序列分析与比较 [J]. 中国兽医学报,1998,18(2):112-114.

Li H W,Tu C C,Lü Z J,et al. Sequence analysis and comparison of protective antigen encoding region of E2 gene of hog cholera virus strain C from different sources [J]. Chinese Journal of Veterinary Science,1998,18(2):112-114. (in Chinese)

[12] 刘伯华,刘湘涛,韩雪清,等. 急、慢性猪瘟病毒分离株和疫苗株 E2 基因的序列分析 [J]. 畜牧兽医学报,2001,32(6):568-575.

Liu B H,Liu X T,Han X Q,et al. Analysis of E2 genes nucleotide sequences of prevalent virulent from acute and chronic viral strains and C-strain from cell culture of hog cholera virus [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica,2001,32(6):568-575. (in Chinese)

[13] 张永国,张彦明,邢福珊,等. 猪瘟流行野毒株 E2 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.

Zhang Y Q,Zhang Y M,Xing F S,et al. Simulation analysis of E2 gene code gp 55 protein of classical swine fever virus [J]. Journal of A&F University:Natural Science Edition,2003,31(5):128-132. (in Chinese)

[14] Windisch J M,Schneider R,Thiel H J. RNase of classical swine fever virus;Biochemical characterization and inhibition by virus-neutralizing monoclonal antibodies [J]. Journal of Virology,1996,70:352-358.

(上接第 20 页)

[10] Print C G,Loveland K. Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis [J]. Bioassays, 2000, 22(5):423-430.

[11] Margalit A,Cowan G,Harman M,et al. Apoptosis of bovine ovarian surface epithelial cells by Fas antigen/Fas ligand signaling [J]. Reproduction,2005,130(5):751-758.

[12] Skarzynski D,Shibaya M,Tasaki Y,et al. Fas-mediated apoptosis is suppressed by calf serum in cultured bovine luteal cells [J]. Reprod Biol,2007,7(1):3-15.

[13] Porcelli F,Meggiolaro D,Carnevali A. Fas ligand in bull ejaculated spermatozoa: a quantitative immunocytochemical study [J]. Acta Histochem,2006,108(4):287-292.

[14] Marilyn K. Binding of wheat germ ribosomes to bisulfite-modified reovirus messenger RNA: Evidence for a scanning mechanism [J]. J Mol Biol,1980,144(3):291-304.

[15] Riikonen R,Matilainen H,Rajala N,et al. Functional display of an alpha2 integrin-specific motif (RKK) on the surface of baculovirus particles [J]. Technol Cancer Res Treat,2005,4(4):437-445.

[16] Boonyarattanakalin S,Athavankar S,Sun Q,et al. Synthesis of an artificial cell surface receptor that enables oligohistidine affinity tags to function as metal-dependent cell penetrating peptides [J]. J Am Chem Soc,2006,128(2):386-387.