

猪 *SR-B I* 基因的克隆及其组织差异表达规律研究

堵 斌, 孙 超

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] **【目的】**扩增猪各组织清道夫受体 B 族 I 型(*SR-B I*)基因片段,并对其进行生物信息学分析,研究 *SR-B I* 在猪中的表达规律。**【方法】**采取不同月龄和不同猪种猪的内脏脂肪、皮下脂肪、肝脏、脾脏、肌肉、肾脏、肺脏、心脏等组织,提取其 RNA,根据 GenBank 已发表的人、小鼠及大鼠 *SR-B I* 基因序列,设计并合成 1 对引物,用 RT-PCR 法扩增猪 *SR-B I* 基因 cDNA 片段,检测该基因在猪各组织中的分布及其在不同月龄、不同部位、不同猪种脂肪组织中的转录表达规律。**【结果】**成功克隆了猪 *SR-B I* cDNA 片段,长度为 192 bp(EU366320);该基因与牛、人、中国仓鼠、大鼠、小鼠在氨基酸序列上分别有 84.1%,78.6%,77.5%,67.0%和 66.6%的同源性;*SR-B I* 基因 mRNA 在瘦肉型猪种上的表达量显著高于脂肪型猪种,随月龄的增加其表达量逐渐上升,且其在皮下脂肪的表达量较内脏脂肪高。**【结论】***SR-B I* mRNA 的表达与猪肥胖程度、年龄以及脂肪沉积部位密切相关。

[关键词] 猪;*SR-B I*;脂肪组织;表达规律

[中图分类号] S828.2;Q78

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2009)04-0007-06

Cloning and differential expression of *SR-B I* gene in pigs

DU Bin, SUN Chao

(College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】**cDNA sequences of the *SR-B I* gene were obtained and analyzed in biologic information, based on which the expression of *SR-B I* in pigs was studied. **【Method】**Visceral fat, subcutaneous fat, liver, spleen, muscle, kidney, lung and heart of different growth-stages and different types of pigs were collected. A pair of PCR primers were designed and synthesized according to *SR-B I* gene sequence of human, mouse and rat. Total RNA was extracted from adipose tissue of pigs, and then the *SR-B I* gene cDNA was cloned by RT-PCR. Thereafter, the level of *SR-B I* mRNA in various regions, different growth-stage, different parts and different types of pig adipose tissue were measured. **【Result】**The sequencing results showed that 192 bp pig's *SR-B I* cDNA fragment(EU366320) was successfully cloned. Homologous comparison with some animals indicated that pig *SR-B I* cDNA shared 84.1%, 78.6%, 77.5%, 67.0%, 66.6% similarity in bovine, human, *Cricetulus griseus*, mouse and rat. The expression level of *SR-B I* mRNA was significantly higher in adipose tissue of lean pigs than that of obese pigs, and also the expression level gradually increased as age grew. It was found that the abundance of *SR-B I* mRNA level increased more in subcutaneous fat than in visceral fat. **【Conclusion】**Our result suggested that *SR-B I* is a potential factor which may regulate adipogenesis in adipose tissue.

Key words: pig; *SR-B I*; adipose tissue; expression pattern

清道夫受体(Scavenger receptor)是主要存在于巨噬细胞膜表面的一类糖蛋白,已经发现的有 7 大

* [收稿日期] 2008-06-16

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30471267);教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-06-0865)

[作者简介] 堵 斌(1982—),男,江苏无锡人,在读硕士,主要从事动物生物技术研究。E-mail:db_530@163.com

[通信作者] 孙 超(1968—),男,陕西商南人,副教授,博士,主要从事动物生物化学研究。E-mail:sunchao2775@163.com

类型,能特异性结合并摄取氧化型低密度脂蛋白(Oxidized low density lipoprotein,ox-LDL)等多种配体,从而介导脂肪代谢和胆固醇酯(CE)的双向转运等过程。清道夫受体 B(包括 *SR-B I* 和 *CD36*)是一种高密度脂蛋白(High density lipoprotein,HDL)受体,具有特异的脂质转运功能。

在脂蛋白受体中,低密度脂蛋白受体(LDL-R)的发现较早,所以人们对低密度脂蛋白的代谢及其作用机制已有比较详尽的了解,并已有相关药物应用于临床,可有效降低心脑血管疾病的发病率。由于高密度脂蛋白受体(HDL-R)的发现较晚,人们对HDL的认识尚比较有限。高密度脂蛋白受体之一的清道夫受体 B- I (*SR-B I*)直到 1996 年才得以确认。Acton 等^[1]用 *SR-B I* 基因转染中国仓鼠卵巢(CHO)细胞后,发现这种物质能够与 HDL 结合,并促进细胞摄取 HDL 中的胆固醇而不摄取 HDL 中的其他成分,从而证明 *SR-B I* 可能是一种 HDL 受体,能介导高密度脂蛋白胆固醇酯(High density lipoprotein-cholesterol esters,HDL-CE)选择性地进入细胞内。*SR-B I* 最初是以乙酰化低密度脂蛋白(Acetylate-LDL,ac-LDL)为配体,在 *SR* 的表达克隆研究中被发现的^[2],而人 *SR-B I* (h*SR-B I*)是作为 *CD36* 膜蛋白超家族以及溶酶体整合膜蛋白相关蛋白时被独立发现的,所以又称为 CLA-1(*CD36* and LIMP II Analogous-1)^[3]。

目前,对 *SR-B I* 的研究主要集中在对动脉粥样硬化等心脑血管疾病的影响等方面,*SR-B I* 在脂肪中的作用机制尚未引起人们的关注。家猪具有较强的

脂肪沉积能力,是研究脂肪组织形成与发育的极好材料,也是研究肥胖遗传特性的理想动物模型。本试验利用 RT-PCR 克隆猪 *SR-B I* 基因 cDNA 片段,分析检测不同猪种、不同发育阶段和不同部位猪脂肪组织中 *SR-B I* mRNA 的表达规律,以期为进一步研究 *SR-B I* 在脂代谢中的作用机理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 组织样品 2,5,10 月龄大白猪(瘦肉型猪)及 5 月龄八眉猪(脂肪型猪)各 3 头,均由西北农林科技大学畜牧场提供。试验动物屠宰后,无菌采取心脏、肺、肝脏、脾脏、肾脏、肌肉、皮下脂肪及内脏脂肪等组织样,立即投入液氮中保存备用。

1.1.2 试剂 RNA 提取试剂盒 TRIzol、质粒小提试剂盒和普通琼脂糖 DNA 回收试剂盒,均为天根生化公司产品;反转录试剂盒 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 和 *Taq* 酶,为 Fermentas 产品;dNTP,西安沃尔森生物公司产品;pMD19-T vector,TaKaRa 产品;*E. coli* DH 5 α ,由本实验室保存。

1.2 试验方法

1.2.1 引物设计与合成 根据 Genbank 已发表的人(NM_001082959)、小鼠(NM_016741)及大鼠(NM_031541)*SR-B I* 基因序列,按照引物设计原则,利用 Primer Premier 5.0 软件,设计 *SR-B I* 基因和内参 β *actin* 基因扩增引物,并由上海生物工程技术服务有限公司合成。其共序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列及参数
Table 1 PCR parameter of primers

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer	退火温度/℃ T _m	扩增片段长度/bp Length
<i>SR-B I</i>	F:TCAAGCAGCAGGTCCTCAAG R:CTTGTGCCTGAACTCCCTGTA	59.8	192
β <i>actin</i>	F:ACTGCCGCATCCTCTTCCTC R:CTCCTGCTTGCTGATCCACATC	53.8	399

1.2.2 猪总 RNA 的提取 用 TRIzol 试剂法提取大白猪及八眉猪组织样总 RNA,用 DEPC 处理水溶解,−70 ℃ 保存备用。取出 1 μ L 粗提总 RNA,在 15 g/L 的琼脂糖凝胶上电泳检测 RNA 的完整性。利用分光光度计测定 RNA 溶液的 A_{230} 、 A_{260} 和 A_{280} 值,计算 A_{260}/A_{280} 和 A_{260}/A_{230} ,进而检测其浓度。一般认为,纯 RNA 溶液的 A_{260}/A_{280} 为 1.7~1.9, A_{260}/A_{230} 应大于 2.0^[4]。

1.2.3 猪 *SR-B I* 基因和内参 β *actin* 基因的 RT-

PCR 扩增 用 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit(Fermentas)进行猪 cDNA 第 1 链的合成,具体操作参照试剂盒说明书进行。以 cDNA 第 1 链为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 25 μ L:其中 10 $\times$ Buffer 2.5 μ L,25 mmol/L MgCl₂ 2.5 μ L,2.5 mmol/L dNTPs 2.5 μ L,10 μ mol/L 上、下游引物各 1 μ L,模板 cDNA 第 1 链 1 μ L,0.5 U/ μ L *Taq* 酶 0.2 μ L,超纯水 14.3 μ L。利用 MyCycler™ Thermal Cycler(BIO-RAD)梯度 PCR 仪

进行扩增(反应条件及各基因引物参数见表 1)。PCR 反应条件:95 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 30 s, 59.8 ℃或 53.8 ℃(依引物而定)退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,31 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min,4 ℃保存。PCR 产物用 15 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 猪 *SR-B I* 基因的克隆、测序及序列分析
利用普通琼脂糖 DNA 回收试剂盒,按产品说明书,从 15 g/L 普通琼脂糖凝胶上回收特异性条带,回收产物连接于 pMD-19T 载体,转化感受态 *E. coli* DH 5 α ,涂布平板,进行蓝白斑筛选,挑取阳性克隆接种于 10 mL LB 培养基中,过夜培养后用质粒小提试剂盒抽提质粒 DNA(碱裂解法),并进行 PCR 扩增鉴定,将经鉴定为阳性的质粒送上海生物工程技术服务有限公司测序。

利用 DNAMAN 软件,对猪 *SR-B I* 基因 cDNA 序列与小鼠、大鼠等其他 5 个物种的 cDNA 序列进行同源性比较,根据猪 *SR-B I* 的 cDNA 序列推导其编码的氨基酸序列并与其他动物 *SR-B I* 的氨基酸序列进行比较,使用 DNAMAN 软件对这些氨基酸序列进行遗传进化树分析。

1.2.5 猪 *SR-B I* 基因表达量的 PCR 检测 根据定量原理采用与实时定量 PCR 类似的方法进行基因表达量的测定。对于每一个样品,用同一体系分装于 6 个 EP 管中,在同一反应条件下扩增,于 19, 22,25,28,31 和 34 次循环时各取出 1 管,进行琼脂糖凝胶电泳,并用 SynGene Bio-image system 凝胶成像系统分析图像,测定各条带的吸光度值(OD 值),然后用 β actin 基因对目的基因的表达量进行校正。在 6 种不同循环次数中,选取同一循环次数下、不同样品之间差异最大时的校正值进行统计与分析。

1.2.6 数据统计与分析 采用 SPSS13.0 统计分析软件 One-way ANOVA 进行方差分析与显著性检验($\bar{x} \pm SE$)。

2 结果与分析

2.1 猪各组织 RNA 的提取及 *SR-B I* 基因的克隆与测序

对提取的猪各组织 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示,提取的总 RNA 有 3 条清晰的电泳条带,分别是 28s rRNA、18s rRNA 和 5s rRNA(图 1),表明所提取的总 RNA 比较完整,符合试验要求。

利用 RT-PCR 技术扩增猪 *SR-B I* 基因,得到

长约 192 bp 的片段,与设计的产物大小相近(图 2)。利用普通琼脂糖 DNA 回收试剂盒回收目的条带,连接载体克隆,并送交测序公司测序,经过正反 2 个测序反应,得到 192 bp 的核苷酸序列,GenBank 登陆号为:EU366320。

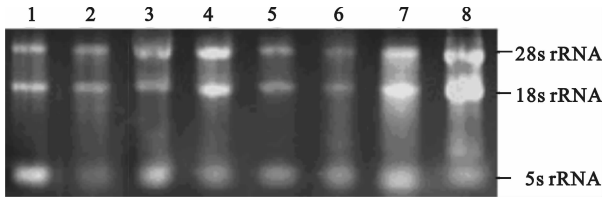


图 1 猪各组织总 RNA 的电泳图
1. 内脏脂肪;2. 皮下脂肪;3. 肝脏;4. 脾脏;
5. 肌肉;6. 肾脏;7. 肺脏;8. 心脏

Fig. 1 Agarose electrophoresis of total RNA of various tissues of pig

1. Visceral fat;2. Subcutaneous fat;3. Liver;4. Spleen;
5. Muscle;6. Kidney;7. Lung;8. Heart

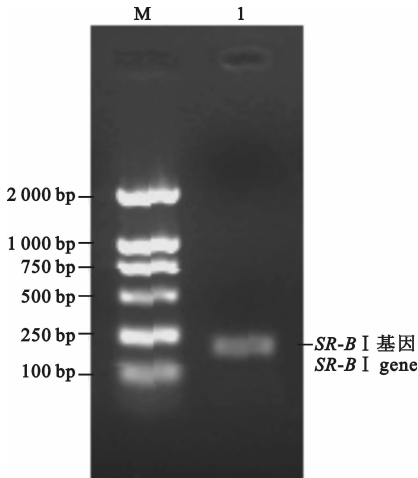


图 2 猪 *SR-B I* 基因的 RT-PCR 扩增产物
M. DL2000 Marker;1. 猪 *SR-B I* 基因扩增产物

Fig. 2 RT-PCR products of *SR-B I* gene of pig

M. DL2000 Marker;1. PCR products of *SR-B I* gene of pig

2.2 猪 *SR-B I* 基因 cDNA 序列的同源性比较及氨基酸序列的遗传进化树分析

猪 *SR-B I* 基因与其他物种 cDNA 序列的同源性比较结果(表 2)表明,猪 *SR-B I* 基因与牛的同源性最高,与人和中国仓鼠的同源性次之,与大鼠和小鼠的同源性较低。

对氨基酸序列的遗传进化树分析可知,动物的 *SR-B I* 氨基酸序列在特定区段具有严格的保守性,猪 *SR-B I* 氨基酸序列与牛先聚为 1 类,然后再与人聚为 1 类,小鼠和大鼠先聚为 1 类,然后再与中国仓鼠聚为第 2 类,最后和猪等聚为 1 类(图 3)。

表 2 猪与人及其他动物 *SR-B I* 基因 cDNA 同源性的比较

Table 2 Homologous comparison of the cattle *SR-B I* gene from some animals %

种 Species	猪 Sus	小鼠 Mus	大鼠 Rattus	中国仓鼠 Cricetulus griseus	人 Homo	牛 Bovine
猪 Sus	—	—	—	—	—	—
小鼠 Mus	66.6	—	—	—	—	—
大鼠 Rattus	67.0	90.0	—	—	—	—
中国仓鼠 Cricetulus griseus	77.5	88.2	87.7	—	—	—
人 Homo	78.6	67.2	66.2	78.6	—	—
牛 Bovine	84.1	66.9	66.1	76.1	77.0	—

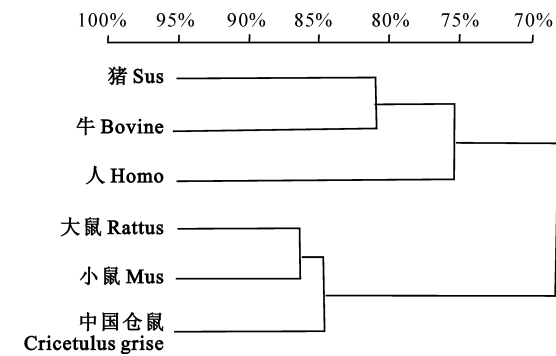


图 3 猪与其他哺乳动物 *SR-B I* 氨基酸序列的遗传进化分析

Fig. 3 Phylogenetic anglysis of amino acid *SR-B I* in pig and mammalian sequences

2.3 猪 *SR-B I* 基因 mRNA 表达规律分析

针对不同月龄、不同部位及不同品种猪的脂肪组织 *SR-B I* 基因,筛选出最佳扩增温度后,利用梯度 PCR 仪进行同批次扩增。由图 4 可见,在 34 次循环时均进入平台期,在 31 次循环时各样本间 *SR-B I* mRNA 表达量的差异最大,具有试验分析意义。

2.3.1 猪 *SR-B I* 基因 mRNA 的组织表达谱分析

由图 5 可以看出,在猪心脏、肺脏、肝脏、脾脏、肾

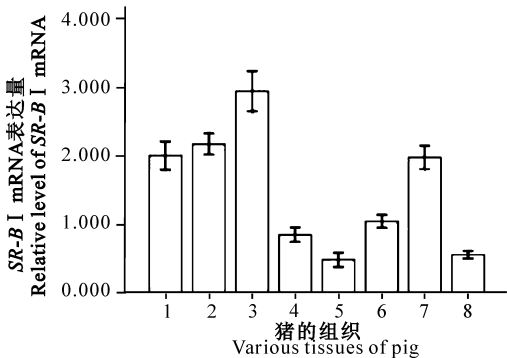


图 5 猪不同组织中 *SR-B I* mRNA 表达量的比较

1. 内脏脂肪;2. 皮下脂肪;3. 肝脏;4. 脾脏;
5. 肌肉;6. 肾脏;7. 肺脏;8. 心脏

Fig. 5 Expression of *SR-B I* mRNA in various tissues of pig

1. Visceral fat;2. Subcutaneous fat;3. Liver;4. Spleen;
5. Muscle;6. Kidney;7. Lung;8. Heart

脏、肌肉、皮下脂肪及内脏脂肪等组织中,均有 *SR-B I* 基因表达,表明 *SR-B I* 是一个表达谱非常广泛的基因;猪 *SR-B I* 基因在肝脏组织中高度表达,其次是皮下脂肪、内脏脂肪及肌肉等组织。

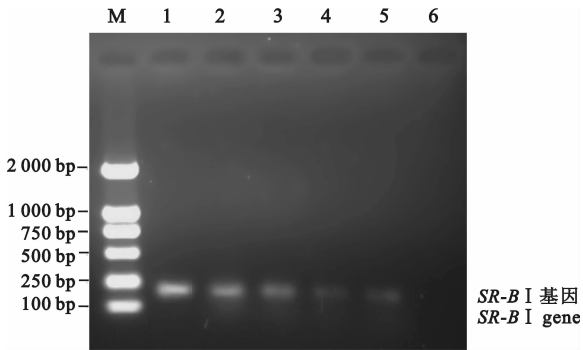


图 4 不同循环次数猪脂肪组织 *SR-B I* mRNA 表达量的电泳图谱

M. DL2000 Marker;1~6. 循环 34,31,28,25,22 和 19 次的 PCR 产物

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis analysis of *SR-B I* gene expression of different cycles in adipose tissue of pig

M. DL2000 Marker;1~6. PCR products of 34,31,28,25,22 and 19 cycles

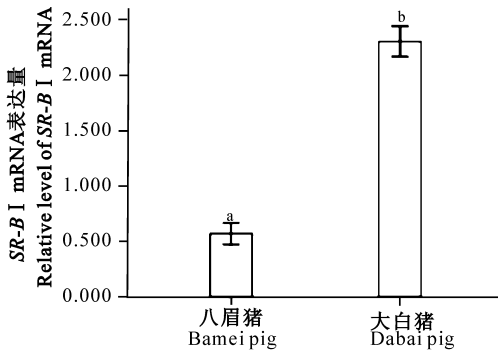


图 6 脂肪型和瘦肉型猪脂肪组织中 *SR-B I* mRNA 表达量的比较

(标不同小写字母表示差异显著,下同)

Fig. 6 Expression of *SR-B I* mRNA in adipose tissue from obese and lean pig

(Different lowercase letters, said a significant difference, The following fig are the same)

2.3.2 不同品种猪脂肪组织中 *SR-B I* 基因 mRNA 表达量的差异 图 6 表明,瘦肉型猪种脂肪组织中 *SR-B I* mRNA 的表达量显著高于脂肪型猪种脂肪组织 ($P<0.05$),*SR-B I* mRNA 的表达量呈现出随着猪肥胖程度增加而降低的变化规律。

2.3.3 不同月龄猪脂肪组织中 *SR-B I* mRNA 表达量的差异 图 7 表明,随着月龄的增加,*SR-B I*

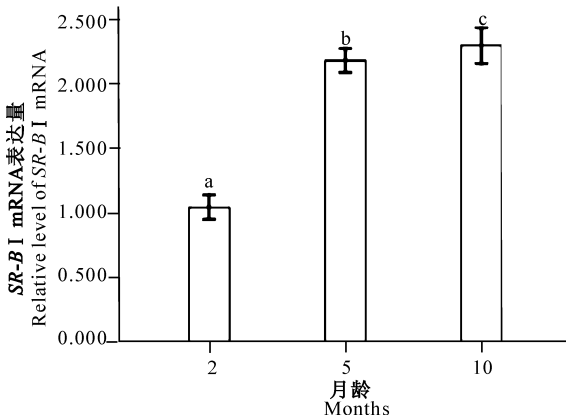


图 7 不同月龄猪脂肪组织中 *SR-B I* mRNA 表达量的比较
Fig. 7 Expression of *SR-B I* mRNA in adipose tissue from pigs at different months of age

3 讨论

SR 能特异性地结合并摄取 α *x*-LDL 等多种配体,从而介导脂肪代谢和 CE 的双向转运等过程。*SR-B I* 基因最初通过转染中国仓鼠卵巢(CHO)细胞获得^[1],清道夫受体 B(包括 *SR-B I* 和 CD36)是一种高密度脂蛋白受体,具有特异的脂质转运功能。本研究从猪脂肪组织中成功地克隆到长度为 192 bp 的 *SR-B I* 基因 cDNA 片段(GenBank 登陆号为:EU366320)。同源性比对发现,其与小鼠、大鼠、中国仓鼠、人和牛 *SR-B I* 基因的同源性分别为 66.6%,67.0%,77.5%,78.6%和 84.1%。

八眉猪主要分布于陕西、甘肃、宁夏、青海等省、自治区,其适应性强,抗逆性好,产仔数量多,沉积脂肪能力强,属脂肪型猪种;大白猪是国外引进品种,生长速度快,脂肪沉积慢,属瘦肉型猪种。本试验发现,瘦肉型猪种 *SR-B I* 基因 mRNA 的表达量显著高于脂肪型猪种。Jeyakumar 等^[5]研究发现,肥胖型小鼠肝脏的 *SR-B I* mRNA 表达量显著低于普通小鼠,这与本试验结果相一致。因脂肪型猪种脂肪沉积能力显著高于瘦肉型猪种^[6],说明 *SR-B I* 的表达量与个体肥胖程度可能存在相关性。有研究发现,*SR-B I* 的选择性脂质摄取,受细胞内信号级联

mRNA 的表达量逐渐升高,10 月龄猪 *SR-B I* mRNA 的表达量显著高于 2,5 月龄 ($P<0.05$);5 月龄猪 *SR-B I* mRNA 的表达量显著高于 2 月龄 ($P<0.05$)。

2.3.4 不同部位猪脂肪组织中 *SR-B I* mRNA 表达量的差异 图 8 表明,皮下脂肪中 *SR-B I* mRNA 的表达量显著高于内脏脂肪 ($P<0.05$)。

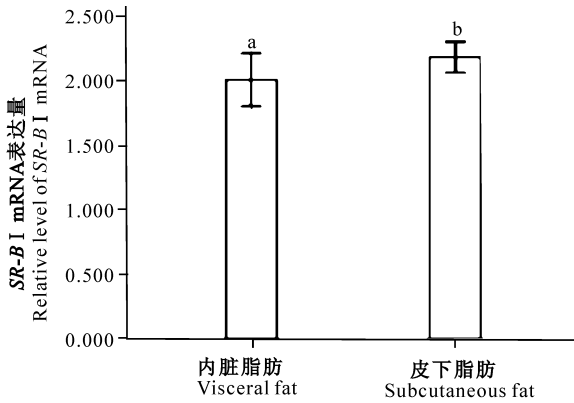


图 8 猪不同部位脂肪组织中 *SR-B I* mRNA 表达量的比较
Fig. 8 Expression of *SR-B I* mRNA in different adipose tissue from pig

放大系统的调节^[7]。有关 *SR-B I* 缺陷小鼠的研究结果表明,*SR-B I* 在脂蛋白代谢、胆固醇运输等过程中起关键作用。Out 等^[8]证明,*SR-B I* 是介导肝脏和肾上腺选择性吸收 CE 的惟一分子,是调节胆固醇逆转运的惟一靶点。Ashraf 等^[9]发现,特殊的氧化磷脂可以抑制 *SR-B I* 介导的对胆固醇的选择性摄取。氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)是体内脂肪形成的必需转录因子,其在促使脂肪细胞停止生长、引发细胞分化、维持成熟脂肪细胞分化表型等方面起着关键性作用^[10],PPAR γ 能刺激 *SR-B I* 基因的表达^[11],这说明 *SR-B I* 表达量的变化可能是导致肥胖型猪种脂肪细胞增殖及脂肪沉积速率较瘦肉型猪种快的诱因之一,但其具体机理尚待进一步研究。

Foster 等^[12]提出,基于氨基酸序列的系统进化树分析较核苷酸序列分析更为可靠,因为 DNA 序列的碱基序列有突变、缺失等现象^[13]。本试验结果表明,猪 *SR-B I* 氨基酸序列与牛先聚为 1 类,然后再与人聚为 1 类;小鼠和大鼠先聚为 1 类,然后再与中国仓鼠聚为第 2 类,最后和猪等聚为 1 类。

本研究克隆了猪 *SR-B I* 基因的 cDNA 序列片段,初步探讨了其在猪脂肪组织中的表达规律,但关于 *SR-B I* 促进脂肪沉积和脂肪细胞分化的具体机

理,还有待于进一步研究。

[参考文献]

[1] Acton S, Rigotti A, Landschulz K T, et al. Identification of scavenger receptor *SR-B I* as a high density lipoprotein receptor [J]. *Science*, 1996, 271(5248): 518-520.

[2] Brown M S, Goldstein J L. Scavenging receptors [J]. *Nature*, 1990, 343: 508-509.

[3] Calvo D, Vega M A. Identification, primary structure, and distribution of CLA-1, a novel member of the CD36/LIMP II gene family [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268 (25): 18929-18935.

[4] Sambrook J, Russell D W. *Molecular cloning: A laboratory manual* [M]. 3rd Edition. Beijing: Science Press, 2001: 516-532.

[5] Jeyakumar S M, Vajreswari A, Giridharan N V. Impact of vitamin A on high density lipoprotein cholesterol and scavenger receptor class B I in the obese rat [J]. *Obesity*, 2007, 15(2): 322-329.

[6] 杨公社, 邱 怀, 路兴中. 猪体脂肪形成的细胞学和形态学研究 [J]. *西北农业大学学报*, 1997, 25(1): 8-14.
Yang G S, Qiu H, Lu X Z. Cytological and morphological studies on adipose development in swine [J]. *Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry*, 1997, 25(1): 8-14. (in Chinese)

[7] Zhang Y, Ahmed A M, McFarlane N, et al. Regulation of *SR-B I* mediated selective lipid uptake in Chinese hamster ovary derived cells by protein kinase signaling pathways [J]. *J Lipid Res*, 2007, 48(2): 405-416.

[8] Out R, Hoekstra M. Scavenger receptor class B type I is solely responsible for the selective uptake of cholesteryl esters from HDL by the liver and the adrenals in mice [J]. *J Lipid Res*, 2004, 45: 2088-2095.

[9] Ashraf M Z, Kar N S, Chen X, et al. Specific oxidized phospholipids inhibit scavenger receptor bi-mediated selective uptake of cholesteryl esters [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(16): 10408-10414.

[10] Grimaldi P A. The roles of PPARs in adipocyte differentiation [J]. *Prog Lipid Res*, 2001, 40(4): 269-281.

[11] Rigotti A, Miettinen H, Krieger M. The role of the high density lipoprotein receptor *SR-B I* in the lipid metabolism of endocrine and other tissues [J]. *End Rev*, 2003, 24: 357-387.

[12] Davies P J, Nagy L. Retinoid X receptors: Exploring their (patho) physiological functions [J]. *Cell Death and Differentiation*, 2004, 11(2): 126-143.

[13] Foster P G, Hickey D A. Compositional bias may affect both DNA-based and protein-based phylogenetic reconstructions [J]. *Molecular Evolution*, 1999, 48: 284-290.

[3] Mangada M M, Takegami T. Molecular characterization of the Japanese encephalitis virus representative immunotype strain [J]. *Virus Res*, 1999, 59: 101-112.

[4] Yun S I, Kim S Y, Choi W Y, et al. Molecular characterization of the fully-length genome of the Japanese encephalitis viral strain K87P39 [J]. *Virus Res*, 2003, 96: 129-140.

[5] Chen W R, Tesh R B, Rico Hesse R. Genetic variation of Japanese encephalitis virus in nature [J]. *J Gen Virol*, 1990, 71(12): 2915-2922.

[6] 李晓宇, 宋 宏, 付士红, 等. 中国流行性乙型脑炎病毒分子生物学特性研究 [J]. *病毒学报*, 2004, 20(3): 200-209.
Li X Y, Song H, Fu S H, et al. The molecular biology of Japanese encephalitis viruses isolated in China [J]. *Chinese Journal of Virology*, 2004, 20(3): 200-209. (in Chinese)

[7] Rey F A, Heinz F X, Mandl C W, et al. The envelope glycoprotein from tick borne encephalitis virus at 2A resolution [J]. *Nature*, 1995, 375: 291-298.

[8] Kolaskar A S, Kulkarni-kale U. Prediction of three-dimensional structure and mapping of conformational epitopes of envelope glycoprotein of Japanese encephalitis virus [J]. *Virology*, 1999, 261: 31-42.

[9] 王环宇, 付士红, 李晓宇, 等. 我国首次分离到基因 I 型乙型脑炎病毒 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2004, 24(11): 843-849.
Wang H Y, Fu S H, Li X Y, et al. Isolation and identification of genotype I Japanese encephalitis virus in China [J]. *Chin J Microbiol Immunol*, 2004, 24(11): 843-849. (in Chinese)

[10] Ali A, Igarashi A. Antigenic and genetic variations among Japanese encephalitis virus strains belonging to genotype I [J]. *Microbiol Immunol*, 1997, 41(3): 241-252.

[11] Hase T, Dubois D R, Summers P L, et al. Comparison of replication rates and pathogenicities between the SA14 parent and SA14-14-2 vaccine strains of Japanese encephalitis virus in mouse brain neurons [J]. *Arch Virol*, 1993, 13(1/2): 131-143.

[12] Wills M R, Sil B K, Cao J X, et al. Antigenic characterization of the live attenuated Japanese encephalitis vaccine virus SA14-14-2: a comparison with isolates of the virus covering a wide geographic area [J]. *Vaccine*, 1992, 10(12): 861-872.

(上接第 6 页)