

## 不同动物源脑心肌炎病毒的分离、鉴定和全基因组序列分析

常洪涛<sup>1#</sup>, 刘慧敏<sup>2#</sup>, 陈 陆<sup>1</sup>, 杨 霞<sup>1</sup>, 赵 军<sup>1</sup>, 王新卫<sup>1</sup>, 姚惠霞<sup>1</sup>, 王川庆<sup>1\*</sup> (1. 河南农业大学 牧医学院, 河南 郑州 450002; 2. 中国科学院 动物研究所, 北京 100101)

**摘要:**为研究脑心肌炎病毒(encephalomyocarditis virus, EMCV)对不同动物宿主的感染情况。本试验应用改进的“细胞接种与 RT-PCR 方法相结合”技术,成功分离到国内首株地方土猪源 EMCV、首株家养野猪源 EMCV、1 株鼠源 EMCV 和 3 株良种猪源 EMCV,并进行了全基因组序列测定和分析。结果显示,6 株 EMCV 分离毒的基因组全长从 7 724~7 735 bp 不等,ORF 长度均为 6 879 bp,彼此间核苷酸同源性为 99.3%~99.8%,与其他不同动物源 EMCV 参考毒株的同源性为 79.9%~99.9%,与国内猪源、鼠源分离毒的同源性均在 99.4%以上;各基因片段中,以 VP1 和 2A 变异幅度最大,VP2 和 3D 最为保守;基于 EMCV 全基因组、ORF 和 VP1 基因序列绘制的系统发育进化树显示,EMCV 可分为 G1、G2 和 G3 3 个群,猪源 EMCV 主要分布在 G1、G2 群,鼠源 EMCV 在 G1、G3 群中均有分布;6 株 EMCV 分离毒与其他国内参考毒株同属于 G1 群,但分布并不完全集中。结果表明,地方土猪和家养野猪可感染 EMCV 并引起发病,提醒在进行地方品种养殖和野生动物家养时要充分考虑人兽共患疫病传播的生态学;鼠在良种猪、家养野猪和地方土猪 EMCV 之间的交叉感染、传播与流行中起到重要媒介作用;不同 EMCV 地方流行株间存在较大的地域差异,其传播具有一定的区域限制性;EMCV 在感染不同动物时可能会发生某些突变,以适应新的宿主。

**关键词:**脑心肌炎病毒;不同动物宿主;RT-PCR;全基因组;分子特征分析

中图分类号:S852.65 文献标志码:A 文章编号:1005-4545(2014)09-1442-06

## Isolation, identification and full length genome sequence analysis of EMCV from different animal source

CHANG Hong-tao<sup>1#</sup>, LIU Hui-min<sup>2#</sup>, CHEN Lu<sup>1</sup>, YANG Xia<sup>1</sup>, ZHAO Jun<sup>1</sup>, WANG Xin-wei<sup>1</sup>, YAO Hui-xia<sup>1</sup>, WANG Chuan-qing<sup>1\*</sup> (1. College of Animal Husbandry and Veterinary, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract:** In order to study the infection status of EMCV in the different animal hosts, Modified “cell inoculation and RT-PCR” technology was used in this study, and the 6 EMCV isolated strains from local aardvark, domesticated boar, mice and improved breed pig. We performed the full length genome sequencing and molecular characteristic analysis of the EMCV strains. The results showed that the full-genome sequence of 6 EMCV isolates generated a sequence of 7 724-7 735 bp in length, ORF length of 6 879 bp, and had 99.3%-99.8% nucleotide identity with each other, but 79.9%-99.4% with reference EMCV strains from different animal sources, 99.4% with Chinese strains from pig and mice. Among all gene fragments, VP1 and 2A are easy to mutation, the most conserved is VP2 and 3D. The phylogenetic tree based on the full length genome, ORF and VP1 gene sequences, EMCV was divided into G1, G2 and G3 groups. The results of this study showed the isolates from pig belong to G1 and G2 groups, the ones from mice distribute in G1 and G3 group, 6 isolates strains in this study belong to G1 group with other Chinese reference strains, but the distribution is not complete. The results identified that the EMCV infection could cause severe clinical symptoms in local aardvark and domesticated boar, which remind us of taking fully consideration of the zoonosis ecology

收稿日期:2013-12-15

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31272567)

作者简介:常洪涛(1978-),男,讲师,博士。

# 共同第一作者; \* 通讯作者, E-mail: wchuanq@163.com

in the course of wild animal breeding activities. Mice plays an important medium role in cross infection, transmission and prevalence of EMCV infection in improved pigs, domesticated boar and local aardvark. A big regional differences exist in EMCV and the transmission is limited in a range of area, moreover, some mutation may occurred in EMCV infection to adapt new hosts.

**Key words:** encephalomyocarditis virus; different animal hosts; RT-PCR; full length genome; molecular characterization analysis

# Joint first author; \* Corresponding author, E-mail: wchuanq@163.com

脑心肌炎病毒 (encephalomyocarditis virus, EMCV) 是一种具有自然疫源性的人畜共患疫病病原, 可以感染家畜、野生动物、啮齿动物和灵长类动物等, 近年来人感染发病也偶有发生<sup>[1-2]</sup>。自然条件下, 以猪感染后危害最为严重, 主要致使母猪发生繁殖障碍及仔猪的脑炎、心肌炎和急性死亡等<sup>[3-4]</sup>。自1945年在美国1只患急性心肌炎的黑猩猩体内分离到第1株病毒以来, 许多国家相继报道了该病的存在和发生。我国于2005年从疑似病死猪体内成功分离到首株EMCV<sup>[5]</sup>, 近年来证实猪群中感染已较为普遍, 血清抗体平均阳性率高达72%<sup>[6-7]</sup>, 并分离到多株良种猪源EMCV<sup>[8-9]</sup>。EMCV分类上属小RNA病毒科、心病病毒属, 是单股正链RNA病毒, 基因组全长约7.8 kb, 含有1个大的开放阅读框(ORF), 衣壳蛋白由VP1、VP2、VP3和VP4等4种结构蛋白组成, 其中以结构蛋白VP1的抗原性最强, 可刺激机体产生中和抗体<sup>[10-11]</sup>, 且与EMCV的致病性有关<sup>[12]</sup>。本试验对6株不同动物源EMCV河南地方流行株进行分离、鉴定和全基因组测序解析, 以期了解不同动物宿主对本病的感染情况, 丰富

EMCV 基因序列数据库, 并为研究其遗传演化和分子生态学提供参考。

## 1 材料与方法

**1.1 病料采集** 2012—2013年间采集河南省发病猪场送检的良种猪、家养野猪、淮南猪和猪场捕杀鼠的心脏、淋巴结和脾脏等疑似病料, -20℃冻存待用。

**1.2 主要试剂与细胞** RPMI-1640、新生牛血清等购自美国Hyclone公司, RNA提取用TRIzol LS Reagent购自Invitrogen公司, Taq DNA聚合酶、M-MLV反转录酶、pMD18-T载体、胶回收试剂盒、5'-Full RACE Kit和3'-Full RACE Core Set Vet. 2.0 Kit等均购自宝生物工程(大连)有限公司, BHK-21传代细胞系由本实验室保存。

**1.3 引物设计** 利用Primer Premier 5.0软件, 参考已发表的猪EMCV BJC3株基因序列(GenBank登录号: DQ464062), 设计并合成可覆盖其完整ORF的特异性引物(表1), 进行分段扩增、克隆。

表1 用于EMCV全基因组RT-PCR扩增的引物序列

引物	引物序列(5'-3')	扩增片段位置	长度/bp
ER-1F	ATTGTATGGGATCTGATCTGGGG	603~625	1 513
ER-1R	GTGTTGGATGCCTCAATGTAGGG	2 093~2 115	
ER-2F	GTATTCTACTCTGCCAGACAGCAC	1 948~1 971	1 575
ER-2R	CTAAACAATCTAACCTCCAAACCTC	3 498~3 522	
ER-3F	CTGATTCGGCACTCTGTCTTT	3 258~3 280	2 097
ER-3R	CATCTGTCGCTTCCTGTCTTGTT	5 332~5 354	
ER-4F	TGGCTAGGATTGAAAGGAAGAAG	5 226~5 248	1 050
ER-4R	TTTTACGTGGTACGTGAATACGG	6 253~6 275	
ER-5F	GTAGTGAATGCCTTTGAGCCACA	6 200~6 222	1 314
ER-5R	TTCTGCTTACCAGAATGAACGG	7 491~7 513	
5'GSP1	GAGGAGGAGTTATTCTTGCTGAGG	942~966	5'-UTR
5'GSP2	GGGGCCTAGACGTTTTTTAACCTC	659~682	
5'-RACE outer primer	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA		
5'-RACE inner primer	CGCGGATCCACAGCCTACTGATCAGTCGATG		
3'-GSP1	ATGTTGTCATACTATCGTCCAGG	7 430~7 452	3'-UTR
3'-RACE outer primer	TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT		

**1.4 病毒分离** 取各病料加PBS液研磨, 反复冻融3~5次, 加终浓度为1%的2×10<sup>4</sup>U/mL双抗(青、

链霉素)4℃作用12 h后, 12 000 r/min离心10 min。吸取病料上清接种于生长良好的BHK-21细胞单

层,37℃感作 50 min,弃去细胞上清并加入 2% RPMI-1640 于 37℃培养,盲传 3 代后收集出现细胞病变(CPE)的培养物。

**1.5 病毒理化特性鉴定** 取各分离毒培养物分别进行 TCID<sub>50</sub>测定、胰蛋白酶敏感试验、氯仿敏感试验、二价阳离子保护试验、耐酸性试验和耐热性试验等理化特性鉴定,并应用透射电镜观察各病毒粒子的大小及形态。

**1.6 病毒总 RNA 提取** 取各分离毒的细胞培养液,按照 TRIzol 使用说明书,提取总 RNA。

**1.7 RT-PCR 及测序** 应用各片段特异性引物,以各分离毒的总 RNA 为模板反转录成相应片段的 cDNA,并以各 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,同时优化 PCR 的最佳反应条件。PCR 反应条件:95℃ 4 min;95℃ 45 s,57~60℃ 60 s,72℃ 1 min,35 个循环;72℃ 延伸 10 min。基因组 5'端和 3'端扩增方法按 5'-Full RACE 和 3'-Full RACE Core Set Vet. 2.0 试剂盒说明书操作进行。各扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定、胶回收纯化后与 pMD18-T 载体连接,转化 DH5 $\alpha$ ,筛选阳性克隆经 PCR 鉴定后送至上海生工生物工程公司测序。并应用 DNASTar 软件和测序峰图软件 Chromas2.33 对各片段测序结果进行拼接,获得各分离毒的全基因组序列。

**1.8 同源性比较与系统进化分析** 运用 DNASTar 软件包中的 MegAlign 程序,将各分离毒全基因组序列

与 17 株从 NCBI GenBank 搜集下载的 EMCV 参考毒株(表 2)的基因序列及其推导的氨基酸序列进行同源性分析,并应用 MEGA 5.05 软件构建系统进化树。

表 2 用于序列比较和分析的 EMCV 参考毒株

序列号	分离地	宿主	毒株命名	核苷酸/bp
FJ897755	中国	猪	GXLC	7 725
FJ604852	中国	猪	GX0601	7 729
DQ464062	中国	猪	BJC3	7 746
DQ464063	中国	猪	HB1	7 735
HM641897	中国	猪	NJ08	7 724
DQ517424	韩国	猪	CBNU	7 713
EU780148	韩国	猪	K3	7 731
EU780149	韩国	猪	K11	7 744
X74312	德国	猪	PV21	7 861
M22458	加拿大	猪	EMC-D	7 829
M37588	巴拿马	猪	Dvariant	7 842
AY296731	美国	猪	EMCV-30	7 678
FJ604853	中国	鼠	GX0602	7 725
DQ288856	美国	鼠	PEC9	7 722
DQ294633	美国	鼠	Rz-pMwt	7 765
M81861	美国	黑猩猩	EMCV-R	7 835
L22089	乌干达	猴	Mengo-M	7 761

## 2 结果

**2.1 病毒分离** 从各疑似病料组织中成功分离到 6 株 EMCV 河南地方流行毒株(表 3),初代培养 48 h 时均出现 CPE,连传 3~4 代后,接种 24 h 即可出现典型 CPE。

表 3 2012—2013 年间 6 株 EMCV 河南流行毒株信息

毒株名称	分离时间、地点	分离宿主	序列号	基因组全长/bp	5'-UTR/bp	ORF/bp	3'-UTR/bp
JZ1201	2012,焦作	猪	KF836386	7 735	724	6 879	132
JZ1202	2012,焦作	家养野猪	KF836387	7 735	724	6 879	132
JZ1203	2012,焦作	鼠	KF836388	7 725	708	6 879	138
YM13	2013,义马	猪	KF836389	7 729	713	6 879	137
YY13	2013,原阳	猪	KF836390	7 724	714	6 879	131
HNXX13	2013,信阳	淮南猪	KF771002	7 725	709	6 879	137

注:JZ1201 株、JZ1202 株和 JZ1203 株分离自同一猪场

### 2.2 病毒形态及理化特性鉴定

**2.2.1 病毒形态** 在透射电镜下对 6 株分离毒的病毒粒子进行形态学观察,均可清晰观察到数个形状规则,直径为 25~29 nm 的圆形病毒粒子(图 1)。

**2.2.2 不同代次 TCID<sub>50</sub>测定** 6 株分离毒的 1~4 代分离毒细胞培养物 TCID<sub>50</sub>经测定(表 4),除 JZ1202 株和 HNXX13 株的病毒滴度在第 2 代时略有下降外,其他分离毒各代次基本稳定。

**2.2.3 理化特性鉴定** 各分离毒经 1%胰蛋白酶溶液 37℃消化 1 h 后,其中 JZ1201、JZ1202、YY13 和

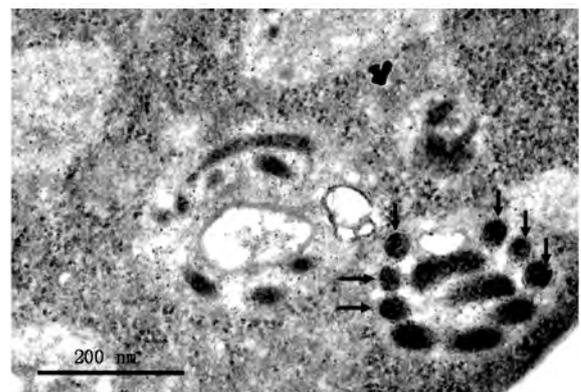


图 1 分离毒株感染 BHK-21 超微形态电镜图

表4 6株EMCV河南流行毒株不同代次细胞毒的TCID<sub>50</sub>测定

毒株代次	JZ1201	JZ1202	JZ1203	YM13	YY13	HNXX13
1	6.12	6.32	5.87	5.98	6.25	6.21
2	6.44	5.90	6.19	6.22	6.39	5.86
3	7.39	7.42	7.37	6.73	7.01	7.39
4	7.50	7.63	7.51	6.96	7.58	7.60

HNXX13株的TCID<sub>50</sub>下降明显,对胰蛋白酶较为敏感,而JZ1203、YM13的TCID<sub>50</sub>变化不大,对胰蛋白酶不敏感(表5)。各分离毒经终浓度为4.8%分析纯氯仿处理后,其TCID<sub>50</sub>均略低于对照组,可判定为全部不敏感(表5)。将各分离毒置于1.1 mol/L MgCl<sub>2</sub>溶液中50℃水浴1 h,其TCID<sub>50</sub>与对照组差异均不明显,说明二价阳离子并未有保护作用(表

5)。各分离毒在pH 3.0的酸性环境中作用1 h后,其TCID<sub>50</sub>明显低于对照组,表明均不耐酸(表5)。各分离毒分别置于37、50、60、70℃时处理1 h,发现37℃时TCID<sub>50</sub>均无明显变化,50℃时则与对照组差异显著,60℃时已完全失活,失去感染力,从而表明各分离株均对热敏感(表6)。

表5 6株EMCV河南流行毒株的胰蛋白酶敏感试验、氯仿敏感试验、二价阳离子保护试验和耐酸性试验结果

毒株	胰蛋白酶敏感试验		氯仿敏感试验		二价阳离子保护试验		耐酸性试验	
	试验组	对照组	试验组	对照组	试验组	对照组	试验组	对照组
JZ1201	3.28	7.56	5.86	7.56	4.19	4.02	3.62	7.56
JZ1202	3.94	7.63	5.78	7.63	4.32	3.99	3.53	7.63
JZ1203	7.72	7.72	6.63	7.72	3.85	3.77	3.75	7.72
YM13	6.98	6.99	5.92	6.99	3.69	3.52	3.21	6.99
YY13	4.08	7.26	5.33	7.26	4.37	3.62	3.48	7.26
HNXX13	3.75	6.68	5.96	6.68	4.25	3.85	3.46	7.18

表6 6株EMCV河南流行毒株的耐热性试验结果

毒株	对照组	37℃	50℃	60℃	70℃
JZ1201	7.56	7.52	3.86	—	—
JZ1202	7.63	7.63	4.25	—	—
JZ1203	7.72	7.59	3.66	—	—
YM13	6.99	6.87	2.99	—	—
YY13	7.26	7.17	3.51	—	—
HNXX13	6.68	6.68	3.25	—	—

注:“—”为无CPE

### 2.3 病毒基因组序列及结构分析

对阳性重组质粒中插入的各目的片段进行双向测序,利用DNAS-

tar软件和Chromas2.33软件对测序结果进行拼接,获得6株分离毒的全基因组序列(表3),全长从7 724~7 735 bp不等,5'-UTR和3'-UTR的长度分别为708~724 bp和131~138 bp,但中间的ORF长度均为6 879 bp,编码由2 292个氨基酸组成的多聚蛋白,可切割成1个病毒自身编码的前导蛋白(L)和11个蛋白终产物(1A~1D、2A~2C和3A~3D)。因此,6株分离毒的全基因组简图基本相似(图2),只是5'-UTR和3'-UTR的长度有不同差异。

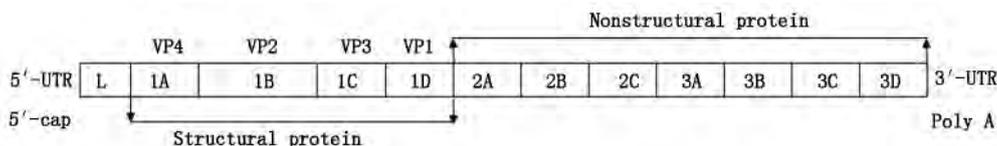


图2 6株分离毒的全基因组结构图

### 2.4 病毒全基因组及各基因片段的同源性比较

全基因组序列分析结果表明,6株分离毒之间的核苷酸同源性为99.3%~99.8%,与国内外不同动物源EMCV参考毒株的同源性为79.9%~99.9%,其中与国内猪源分离毒的同源性高达99.4%以上,与韩国分离毒和欧美分离毒同源性分别为99.4%~99.8%和79.9%~99.7%,与国内、外鼠源毒株

的同源性分别为99.4%~99.7%和79.9%~99.6%。3株良种猪源分离毒之间的同源性为99.3%~99.5%,与国内、外其他猪源参考毒的同源性分别为99.4%~99.9%和83.5%~99.6%。JZ1201株、JZ1202株和JZ1203株分离自同一猪场,彼此间同源性为99.4%~99.8%。JZ1202株与国内猪源参考毒的同源性为99.5%~99.9%。

HNXX13株与国内猪源分离毒的同源性高达99.6%以上,与韩国分离毒和欧美分离毒同源性分别为99.2%~99.7%和83.5%~99.2%,与国内、外鼠源毒株的同源性分别为99.6%和80.8%~99.5%。进而与参考毒株ORF和各基因片段的核苷酸、氨基酸序列比对分析,发现6株分离毒的非结构蛋白编码区均比结构蛋白编码区保守。在结构蛋白中,以VP1变异幅度最大,VP2最为保守;非结构蛋白中,以2A变异幅度最大,3D最为保守。6株分离毒VP1片段的氨基酸变异多发生在7~63位,JZ1201株、JZ1202株和JZ1203株的7位由K→R,YM13株的13位由T→A。63位变数最大,HNXX13株为Q,JZ1201株和JZ1203株为R,JZ1202株和YY13株为G,YM13株为E。

## 2.5 病毒系统进化分析 基于EMCV的全基因组

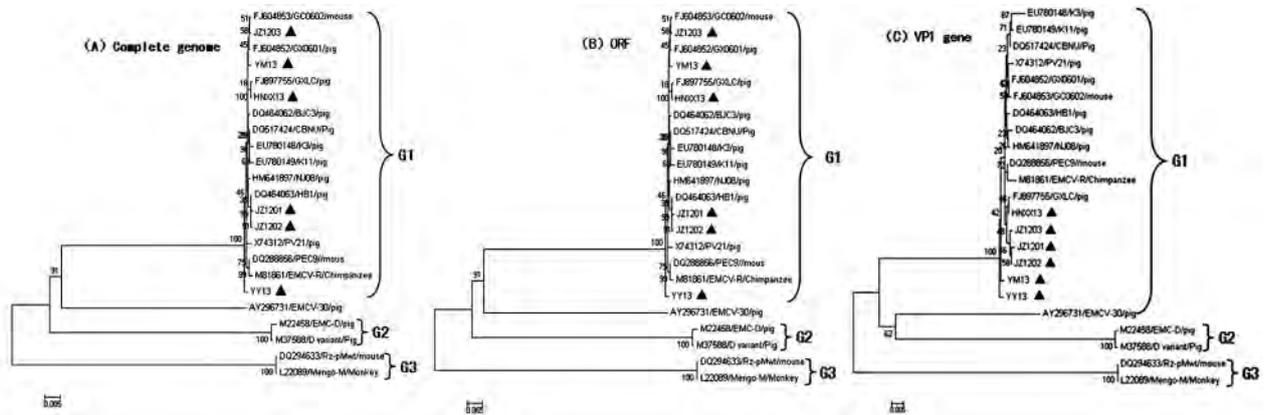


图3 基于EMCV全基因组(A)、ORF(B)和VP1基因(C)核苷酸序列的系统进化树

## 3 讨论

多年来,EMCV在养猪生产中多表现为亚临床症状,实际危害性尚不突出,因而并未受到公共卫生界和兽医界的高度重视。但值得警惕的是,该病是一种具有自然疫源性的人兽共患疫病,对人类健康始终存在潜在的威胁,猪群中EMCV的血清学阳性率也呈逐步上升趋势。野猪和地方土猪作为绿色食品的重要来源,因其独特的营养价值和风味而日益备受青睐,国内各地都在进行相关资源的开发利用。但随之而来的问题是,由于野生或传统散养生态环境的改变,接触家猪机会频繁以及屠宰、加工、消费环节中存在的风险因素,都使得它们携带多种病原体并感染家畜和人类变成可能。

开展不同动物宿主源EMCV地方株的分离、鉴定和全基因组序列测定分析,对丰富病毒流行病学资料和研究病毒结构与功能的关系至关重要。通常

和ORF序列,应用MEGA 5.05软件绘制系统发育进化树(图3),可见EMCV分为G1、G2和G3 3个群。猪源EMCV主要分布在G1群和G2群,鼠源EMCV在G1群和G3群中均有分布。6株分离毒与其他国内参考毒株均属于G1群,但分布并不完全集中,3株良种猪源EMCV也相距较远。家养野猪源EMCV与同场分离的良种猪源EMCV亲缘关系最近,两者均与HB1株高度同源,鼠源EMCV与国内鼠源参考株GX0602关系最为密切。淮南猪源EMCV则与GXLC株亲缘关系最近。基于EMCV的VP1基因序列,6株分离毒聚集在一起,且同处于进化树主干上,与国内猪源参考株GXLC最为接近。猪源EMCV-30株尽管属于G1群,却位于一个独立分支,明显不同于其他EMCV分离株。

情况下,EMCV在疑似病料组织中的含量很低,生产中也多表现为亚临床症状,因此病毒的直接分离、鉴定等工作难以有效开展。笔者曾多次尝试应用常规RT-PCR方法从病料中检测EMCV,成功率极低。由于猪瘟病毒(SCFV)、猪圆环病毒(PCV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)、猪伪狂犬病毒(PRV)和猪细小病毒(PPV)等多种猪重要病毒性病原均无法在BHK-21细胞上增殖,而EMCV接种后则很快能出现明显CPE。因此,本试验先将疑似病料处理后接种BHK-21细胞,一旦出现CPE后再用RT-PCR方法进行检测,最终成功分离到国内首株地方土猪源EMCV、首株家养野猪源EMCV、1株鼠源EMCV和3株良种猪源EMCV。这种改进的“细胞接种与RT-PCR方法相结合”技术,一方面大幅提高了疑似病料组织中EMCV的检出率和分离率,另一方面则可利用细胞接种技术进行初步鉴定。

本试验应用5'-RACE、3'-RACE和RT-PCR技术获得6株分离自良种猪、家养野猪、地方土猪和鼠

等4种不同动物宿主 EMCV 河南流行株的全基因组序列。分析结果表明,6株分离毒彼此高度同源,与国内猪源、鼠源参考毒株处于同一分支,说明可能存在交叉感染或具有共同感染来源,提醒我们在进行地方品种养殖和野生动物驯化中要充分考虑人兽共患疫病传播的生态学。其中 JZ1201 株和 JZ1202 株分离自同一发病猪场,该场依山而建,良种猪为山下集约化饲养,家养野猪则采用山上自由放牧与舍饲相结合的饲养模式,2个猪舍之间相距约3公里,饲养人员、饲料以及各种工具均为独立配置。在此次疫情中,家养野猪群首先出现临床症状,其分离毒与随后分离到的同场良种猪源 EMCV 的同源性高达 99.8%,据此推断应是同一株病毒感染不同猪种所致。而从该场捕杀鼠中所分离到的鼠源 EMCV 与同场良种猪源、家养野猪源 EMCV 的全基因组核苷酸同源性在 99.4%以上,VP1 基因的核苷酸、氨基酸同源性均高达 99.6%以上,尤其与良种猪源 EMCV 的氨基酸同源性为 100%,亲缘关系极高,证实鼠在家猪和野猪 EMCV 的交叉感染、传播与流行中起到重要媒介作用。

本试验首次成功分离到国内首株家养野猪源和淮南猪源 EMCV,由此证实 EMCV 可感染这些猪种并导致发病。其中淮南猪为河南省地方优良品种,主要产区集中在信阳市及其周边地区,是在艰苦条件下长期驯化、培育而成,通常情况下抗病力极强,该毒株的成功分离在一定程度上改变了“地方猪种抗病性强”的传统认识,但其是否来源于良种猪或是由于传统饲养模式改变而导致的自身内源感染,则有待进一步研究。

除 YY13 株外,其余 5 株 EMCV 分离株分别与国内同种动物宿主源 EMCV 亲缘关系最近,与韩国分离株的亲缘关系较近,与多数欧美毒株的亲缘关系较远,证明 EMCV 尽管存在较大的地域差异,但传播应有一定范围内的区域限制性。但 6 株分离毒与德国分离株 PV21 的亲缘关系却高达 99.1%以上,提示日益发达的国际交通和贸易也有可能加速 EMCV 的长距离扩散。

VP1 基因是 EMCV 基因组中最重要的中和性抗原表位所在区域,变异幅度最大,因此对其开展相关研究最具价值。本试验通过对 6 株分离毒的全基因组、ORF 和各基因片段的同源性比较,发现彼此间尽管同源性很高,但 VP1 蛋白均已出现细微变异,提示 EMCV 在感染良种猪、野猪、地方土猪和鼠时可能会发生某些突变,以适应新的动物宿主。分

离自同一猪场的良种猪源 EMCV、家养野猪源 EMCV 和鼠源 EMCV VP1 蛋白的第 7 位氨基酸均由 K→R,63 位氨基酸则分别为 R、G 和 R,再次证实 JZ1201 株和 JZ1202 株确为同一株病毒,但在野猪体内发生了个别氨基酸的变异。

#### 参考文献:

- [1] Deutz A, Fuchs K, Nowotny N, et al. Sero-epidemiological studies of zoonotic infections in hunters—comparative analysis with veterinarians, farmers, and abattoir workers[J]. *Wien Klin Wochenschr*, 2003, 115(3): 61-67.
- [2] Bberste M S, Gotuzzo E, Blair P, et al. Human febrile illness caused by encephalomyocarditis virus infection, Peru[J]. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15: 640-646.
- [3] Gelmetti D, Meroni A, Brocchi E, et al. Pathogenesis of encephalomyocarditis experimental infection in young piglets: a potential animal model to study viral myocarditis[J]. *Vet Res*, 2006, 37: 15-23.
- [4] 白娟, 蒋康富, 李玉峰, 等. 猪脑心肌炎病毒 NJ08 株基因组序列测定与分析[J]. *中国预防兽医学报*, 2011, 33(5): 402-404.
- [5] 盖新娜, 杨汉春, 郭鑫, 等. 猪脑心肌炎病毒的分离与鉴定[J]. *畜牧兽医学报*, 2007, 38(1): 59-65.
- [6] Zhang G Q, Ge X N, Guo X, et al. Genomic analysis of two porcine encephalomyocarditis virus strains isolated in China[J]. *Arch Virol*, 2007, 152: 1209-1213.
- [7] 张家龙, 盖新娜, 马良, 等. 规模化猪场脑心肌炎病毒的血清学调查[J]. *中国兽医杂志*, 2007, 43(1): 7-9.
- [8] 盖新娜, 杨汉春, 郭鑫, 等. 猪脑心肌炎病毒的分离与鉴定[J]. *畜牧兽医学报*, 2007, 38(1): 59-65.
- [9] Zhang G Q, Ge X N, Guo X, et al. Genomic analysis of two porcine encephalomyocarditis virus strains isolated in China[J]. *Arch Virol*, 2007, 152: 1209-1213.
- [10] Knipe D M, Howley P M, Griffin D E, et al. *Fields Virology* [M]. 4th Edition, Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2001: 685-715.
- [11] Suh Y S, Ha S J, Lee C H, et al. Enhancement of VP1-specific immune response and protection against EMCV-K challenge by co-delivery of IL-12 DNA with VP1 DNA vaccine [J]. *Vaccine*, 2001, 19 (15/16): 1891-1898.
- [12] Koenen F, Vanderhallen H, Castryck F, et al. Epidemiologic, pathogenic and molecular analysis of recent encephalomyocarditis outbreaks in Belgium[J]. *Zentralbl Vet Med B*, 1999, 46(4): 217-231.