

蒙正群, 周丽军, 罗怡琳, 等. 2 株兔出血症病毒全基因测定与遗传进化分析[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(4): 854-861.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2018.04.020

2 株兔出血症病毒全基因测定与遗传进化分析

蒙正群¹, 周丽军¹, 罗怡琳¹, 冷依伊¹, 张鹏飞¹, 王 印^{1,2}, 姚学萍¹, 耿 毅¹, 杨泽晓¹

(1. 四川农业大学动物医学院, 四川 温江 611130; 2. 动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 四川 温江 611130)

摘要: 对 2 株兔出血症病毒(RHDV)SCH04、Sch07 进行全基因组序列测定, 并进行同源性及遗传进化分析。按照病毒核酸组成, 将病毒基因分 7 段进行 RT-PCR 扩增, 将分段扩增产物分别克隆到 pMD-19T 载体进行测序, 用 DNASTar 进行拼接, 得到全基因组序列; 参照 GenBank 上登陆的 31 株 RHDV 毒株全基因核苷酸序列、VP60 基因核苷酸序列以及 ORF2 编码基因核苷酸序列对 2 株病毒进行同源性和遗传进化分析。结果显示, SCH04 基因组全长 7 439 bp, Sch07 基因组全长 7 438 bp, 2 株病毒全基因的核苷酸序列同源性为 99.8%, 与 31 株参考毒株全基因的核苷酸序列同源性为 78.3%~97.0%; 2 株病毒的 VP60 基因核苷酸序列同源性为 99.7%, ORF2 编码基因核苷酸序列同源性为 99.2%。进化树显示 2 株病毒同属于抗原变异株 RHDVa(GI.1a) 基因群, 且亲缘关系最近。VP60 基因核苷酸序列与 ORF2 编码基因核苷酸序列均可以作为 RHDV 遗传进化分析。

关键词: 兔出血症病毒; 全基因; 序列; 遗传进化

中图分类号: S858.291.265

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2018)04-0854-08

Full genetic sequence determination and genetic evolution analysis of two rabbit hemorrhagic disease viruses

MENG Zheng-qun¹, ZHOU Li-jun¹, LUO Yi-lin¹, LENG Yi-yi¹, ZHANG Peng-fei¹, WANG Yin^{1,2}, YAO Xue-ping¹, GENG Yi¹, YANG Ze-xiao¹

(1. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Wenjiang 611130, China; 2. Key Laboratory of Animal, Disease and Human Health of Sichuan Province, Wenjiang 611130, China)

Abstract: The complete genomes of two rabbit hemorrhagic disease viruses(RHDV) SCH04, Sch07 were determined, and the homologies and genetic evolution were analyzed in the study. The virus's gene sequences were divided into seven sections for RT-PCR amplification according to the viral nucleic acid, and then the amplification products were cloned into pMD-19T vector for sequencing, and complete genomes were spliced by DNASTar software. The homologies and genetic evolution were analyzed by comparing with 31 strains viral complete genomes, VP60 gene sequences, and ORF2 encoding gene sequences in GenBank. The results showed that fragment length of two strains complete genomes SCH04 and Sch07 were 7 439 bp and 7 438 bp, respectively. The homology of nucleotide sequence between strains complete genomes was 99.8%, and the homologies of two strains with other 31 reference strains complete genomes were 78.3%~97.0%. The homology of VP60 gene sequences between two strains was 99.7% and the homology of ORF2 encoding gene sequences between two strains was

99.2%. Phylogenetic trees results showed the two strains belonged to the antigenic variation RHDVa(GI.1a) group, and genetic relationship was most recently. Both the VP60 gene sequences and ORF2 encoding gene sequences can be used for analyzing evolutionary relationship of RHDV.

Key words: rabbit hemorrhagic disease virus; complete genome; sequence; genetic evolution

收稿日期: 2017-11-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31402222); “十二五”国家科技支撑计划项目(2013BAD12B04); 四川省科技支撑计划项目(2016NZ0002)

作者简介: 蒙正群(1992-), 女, 贵州瓮安人, 硕士, 主要从事病原分子生物学研究。(E-mail) 1193269794@qq.com

通讯作者: 杨泽晓, (E-mail) yzyang2003@126.com

兔出血症(Rabbit hemorrhagic disease,RHD)是由兔出血症病毒(Rabbit hemorrhagic disease virus,RHDV)引起的一种急性、高度传染性和致死性兔疾病。RHDV感染兔后主要以呼吸系统出血、实质器官淤血水肿、肝脏坏死、淤血及出血性变化为主要特征^[1-2]。在流行初期,因为其传播快、发病急、发病率及致死率高等特点,被称为兔瘟。该病毒对于2月龄以上的兔子感染致死率极高。RHDV自1984年在江苏省无锡市首次发现以来,在全国各省市迅速蔓延,同时在全世界范围内流行^[3]。虽然RHDV基因序列较为保守,但是随着时间的推移以及地域面积的扩大,其基因组结构一直处在缓慢变异中,自早期经典RHDV(G1-G5)出现以来抗原变异株(RHDVa)、RHDVb相继出现^[4-7]。为了更好地对嵌杯状病毒科兔病毒属内的相关病毒进行分类,Le Pendu等^[8]对RHD的几种病毒进行了重新命名,将RHDVa命名为GL.1a,经典毒株中的G1命名为GL.1b,G2命名为GL.1c,G3~G5统一命名为GL.1d,RHDVb命名为GL.2。GL.2亚群病毒能够感染欧洲野兔以及幼年兔,死亡率为5%~70%^[9]。目前在中国未有GL.2的相关报道。

RHDV为单股正链RNA兔嵌杯状病毒,基因组全长约7.5 kb,除全基因组RNA外,病毒还含有约2.2 kp的亚基因组^[10]。RHDV的5'末端没帽子结构,经共价结合VPg蛋白,3'末端有一个短的polyA尾巴,病毒基因组含2个开放阅读框(ORF1和ORF2),5'末端的ORF1从第10个核苷酸延伸至第7 041个核苷酸,约占整个基因的94%,编码一个分子质量约为 2.56×10^5 的多聚蛋白。该多聚蛋白包括该病毒的重要结构蛋白VP60,VP60蛋白与诱导抗病毒感染的免疫反应直接相关,是新型诊断制剂、疫苗研制参考的重要部分^[11-12];同时VP60蛋白的编码基因高度保守,为RHDV分离株分子流行病学调查的首选基因^[13]。较短的阅读框ORF2在3'末端编码一个小结构蛋白VP10,分子质量约 1.2×10^4 。有研究结果表明VP10蛋白可显著下调VP60的表达,调节病毒的复制以及参与病毒粒子的释放和侵染细胞的过程^[14-15]。用大肠杆菌表达RHDV多聚蛋白内不同区域的基因,并以这些表达产物所制备的一系列单抗来识别该多聚蛋白的酶解产物,经放射免疫技术对VPg进行定位,发现ORF1的基因编码的

蛋白质顺序为NH₂-P16-P23-2C-P30-VPg-3C-3D-VP60-COOH,VP10编码基因从ORF2 3'末端开始,起始于基因组的第7 025位核苷酸,至7 378位核苷酸为止,与ORF1有17个核苷酸重叠^[16-17]。

本试验根据RHDV的基因顺序,设计7对引物分别对本实验室保存的2株RHDV的基因进行RT-PCR,然后进行克隆测序,使用软件将测序结果进行拼接得到全基因碱基序列,并参考NCBI已登录的RHDV毒株的VP60基因碱基序列、ORF2编码基因碱基序列、全基因碱基序列对2株病毒进行比对分析,旨在对RHDV的基因碱基序列的变异进行监测,丰富其流行病学资料,并对各基因序列比对方法进行比较分析。

1 材料与方法

1.1 主要材料

2株RHDV SCH04、Sch07肝脏组织由四川农业大学动物医学院动物检疫实验室保存,感受态大肠杆菌DH5 α 、EZNAOR Gel Extraction Kit、2 \times Taq PCR MasterMix、DNA分子量标准和胶回收试剂盒等购自天根生化科技北京有限公司,RNA提取相关的试剂、反转录试剂盒和pMD19-T载体等购自宝生物(大连)有限公司。

1.2 引物设计及合成

根据GenBank中RHDV的各基因碱基序列,使用Primer 5软件设计7对引物(表1),7对引物分别扩增RHDV的P16、P13、2C-like NTPase、P29、VPg、3C-like蛋白酶、3D-like蛋白酶、VP60蛋白和VP10蛋白的编码基因,且扩增的基因碱基序列相互有部分重叠,覆盖了病毒整个基因组。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 RHDV基因组RT-PCR扩增

参照Trizol试剂盒说明书进行RHDV RNA提取,用Reverse Transcription System试剂盒将RNA反转录成cDNA。以cDNA为模板,以表1中的引物进行分段扩增,反应体系(50.0 μ l):cDNA模板2.0 μ l,2 \times Taq PCR MasterMix 25.0 μ l,去离子水20.0 μ l,上、下游引物各1.5 μ l。PCR循环参数为:95 $^{\circ}$ C预变性5min;95 $^{\circ}$ C 30 s,53 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 2 min,34个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10 min。1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,用EZNAOR Gel Extraction Kit试剂盒纯化回收PCR产物。

表 1 RHDV 各基因片段扩增引物序列

Table 1 Primer sequences for the gene segments amplification of rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV)

基因	引物名称	引物序列(5'→3')	位置
P16-23	P1	GTGAAAATTATGGCGGCTATGTCGCGC	1~1 123
	P2	TGGGGACGGACTCCTCAAA	
2C-L	P1	AAGAGTTGTTTGACAC	1 087~2 239
	P2	CAAAGTACTGTTTCCACAT	
VPg	P1	ACTGAGCACCCGACGTGGCCTC	2 135~3 368
	P2	CAGCCACTGCCATTGTGTCTCAT	
3C-L	P1	TATGACAATGACTATGAGGG	3 316~3 778
	P2	CAGAAGAAGTTTGATGTTTC	
3D-L	P1	CAAAGGGAGTTTATGAAAC	3 746~5 316
	P2	TTTGCCCTCCATAACATTC	
VP60	P1	TGTGAATGTTATGGAGGGCAAA	5 308~7 044
	P2	ACGCTGGCACCTGCAAGTCCCA	
VP10	P1	ACACTCGTGTTCACCTGGGG	6 994~7 437
	P2	TTATAGCTTACTTTAACTAT	

1.4 PCR 扩增产物的克隆和序列测定

将 PCR 纯化产物与 pMD19-T Vector 连接转化至感受态大肠杆菌 DH5 α , 进行蓝白斑筛选, 挑取阳性克隆菌, 经菌液 PCR 进一步筛选验证阳性克隆。验证正确的每个片段至少送 3 个阳性克隆到 3 家公司(生工生物工程上海股份有限公司、成都擎科梓熙生物技术有限公司、华大基因科技有限公司)进行测序。

1.5 序列同源性和遗传进化分析

使用 DNASTar 中的 MegAlign 软件对测序结果进行拼接, 并登录 GenBank 下载国内外 31 株参考毒株(表 2), 根据文献[8]、[18]、[19]、[20]中兔出血症病毒的分型方法, 对参考毒株的相关序列进行截取, 使用 MegAlign 软件对两毒株的全基因组碱基序列、VP60 基因碱基序列以及 ORF2 编码基因碱基序列进行同源性分析并构建进化树。

表 2 参考 RHDV 毒株信息

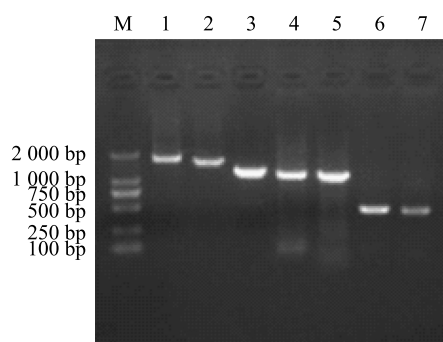
Table 2 Information of reference RHDV strains

毒株	登录号	地区	年份	毒株	登录号	地区	年份
BS89	X87607	意大利	2004	Rossi	EF558584	德国	2007
SD	Z29514	法国	1993	STR2012	KF677011	波兰	2004
FRG	M67473	-	1991	GRZ2004	KP144791	波兰	2004
AST/89	Z49271	西班牙	-	CD/China	AY523410	中国吉林	2004
Eisenhüttenstadt	EF558578	德国	2007	JX/CHA/97	DQ 205345	西班牙	1997
-	DQ189077	巴林岛	2005	IN-05	EU003578	美国	2005
PD1989	KP144789	波兰	1989	WHNRH	DQ280493	中国	2009
DD06	EF363035	德国	2007	Iowa2000	AF258618	美国	2000
HYD	JF412629	中国哈尔滨	2005	Hokkaido/2002	AB300693	日本	2002
Wika	EF558574	德国	2007	CBEst013-7	KM115680	葡萄牙	2013
Jena	EF558576	德国	2007	CBCoruche14-2	KM115698	葡萄牙	2014
NZ61	EF558580	新西兰	2007	Rij06-12	KP129395	西班牙	2014
MAL	KU882093	波兰	1994	Tar06-12	KP129397	西班牙	2014
V351	U54983	澳大利亚	1996	7-13_Barrancos	KF442963	葡萄牙	2014
NY-01	EU003581	美国	2001	Algarve1	KF442961	葡萄牙	2013
NJ-2009	HM623309	中国南京	2004				

2 结果与分析

2.1 RHDV SCH04 株和 Sch07 株基因组的扩增测序

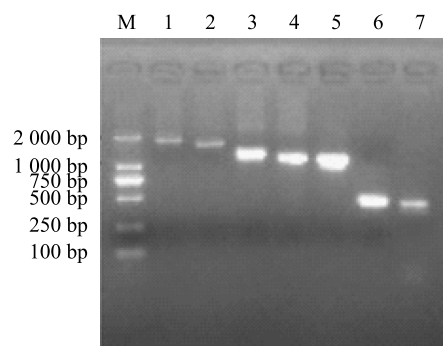
2株RHDV经常规方法进行PCR反应后,电泳结果显示2株RHDV扩增出的分段基因片段大小与各基因预期片段大小一致(图1、图2)。将2毒株各基因扩增片段分别克隆到pMD-19T载体中进行测序,采用DNASTar的MegAlign程序对基因组分段测序结果进行拼接并上传GenBank, SCH04株基因组全长7 439 bp(GenBank登录号为KX844830), Sch07株基因组全长7 438 bp(GenBank登录号KY171748)。



M:DL2000 marker; 1:VP60; 2:3D-L; 3:VPg; 4:2C-L; 5:P16-P23; 6:3C-L; 7:VP10。

图1 RHDV SCH04株基因的分段PCR扩增

Fig.1 PCR amplification of RHDV SCH04 gene segments



M:DL2000 marker; 1:VP60; 2:3D-L; 3:VPg; 4:2C-L; 5:P16-P23; 6:3C-L; 7:VP10。

图2 RHDV Sch07株基因的分段PCR扩增

Fig.2 PCR amplification of RHDV Sch07 gene segments

2.2 2株RHDV各基因的同源性比较分析

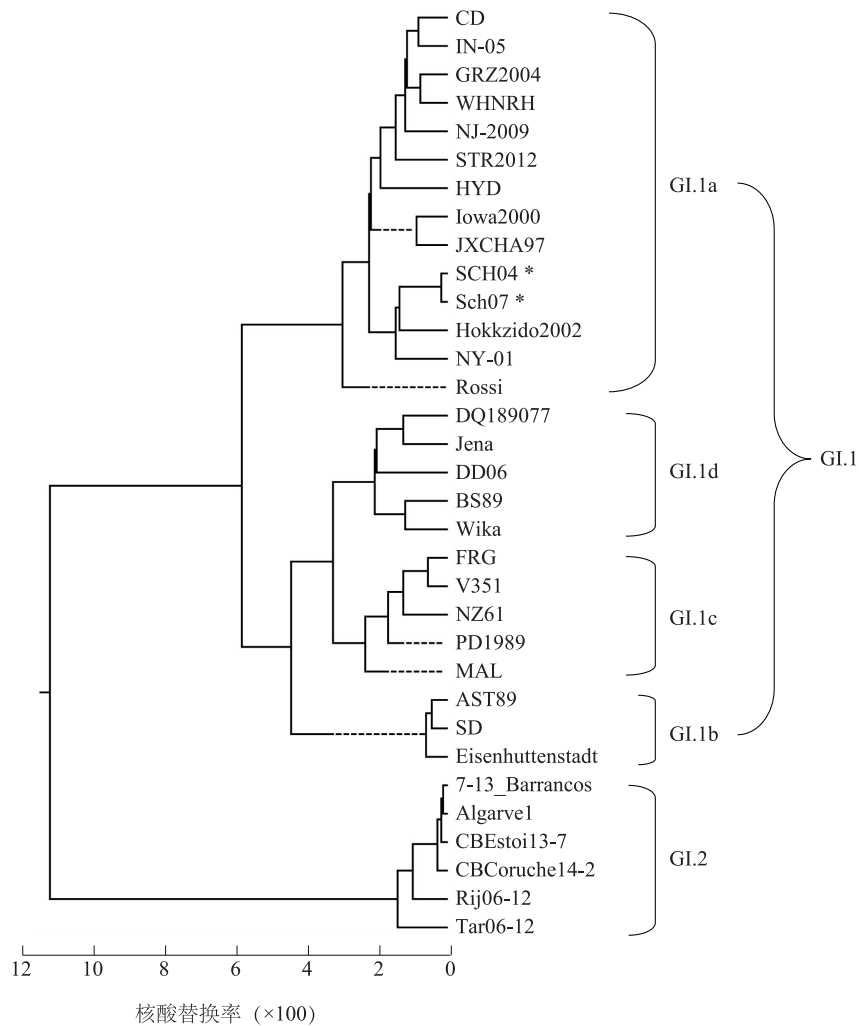
2.2.1 VP60核苷酸序列分析

将2株病毒的VP60基因进行同源性比较,结果显示核苷酸及其编码氨基酸同源性均为99.7%。SCH04、Sch07的VP60基因核苷酸序列与表2中的31株RHDV VP60基因核苷酸序列比对结果(图3)显示, SCH04、Sch07除了与6株GL.2病毒株同源性(79.1%~79.9%)稍低外,与其余的毒株同源性均在89.0%以上,这说明RHDV的衣壳蛋白基因核苷酸序列相当保守。参比的33株RHDV VP60基因有2个大分枝GL.1和GL.2, GL.1包括抗原变异株GL.1a以及经典毒株(GL.1b~GL.1d)2个分枝, SCH04、Sch07同属于抗原变异株GL.1a分枝,且与日本株Hokkaido2002、美国株NY-01亲缘关系很近,同属于一个基因群;另一个为GL.2分枝, GL.2分枝的毒株2010年在欧洲国家暴发,分枝6株参考毒株均分离自2013~2014年,从进化树可以看出GL.2分枝内毒株与经典毒株以及抗原变异株亲缘关系较远。

2.2.2 ORF2编码基因核苷酸序列的比对分析

使用MegAlign软件对33株RHDV的ORF2进行比对,结果显示2株RHDV的核苷酸、氨基酸同源性均为99.2%, SCH04与31株参考毒株核苷酸同源性为84.2%~96.9%, Sch07与31株毒株同源性为84.7%~97.2%。进化树分析结果(图4)与以VP60基因核苷酸序列构建的进化树稍有差异, ORF2基因进化树中经典GL.1a RHDV毒株分为2个主要分枝,但是SCH04、Sch07两毒株的遗传距离还是最近,且与日本株Hokkaido2002、美国株NY-01同为一个基因群,这与以VP60基因构建进化树的分析结果相同。

2.2.3 全基因比对分析 使用MegAlign软件进行SCH04和Sch07毒株与31株参考RHDV毒株的序列分析,结果显示SCH04与Sch07核苷酸序列以及编码的氨基酸序列同源性均为99.8%,与31株参考株的核苷酸序列同源性都在78.3%~97.0%。SCH04、Sch07的全基因序列全长分别为7 439 bp、7 438 bp,与参考毒株相比,在病毒基因的末端非编码区7 400 bp位置分别出现2个和1个腺嘌呤核苷酸的插入突变。全基因组进化树分析结果(图5)显示,33株全基因核苷酸序列构建的进化树与VP60核苷酸序列构建的进化树分枝结构差异较大,全基因核苷酸序列构建的进化树有2个分枝,一个分枝由葡萄牙分离的4株GL.2



* 为测序毒株。

图 3 基于 *VP60* 基因绘制的两毒株与参考毒株的进化树

Fig.3 The phylogenetic tree of the two strains and the reference strains based on the *VP60* genes

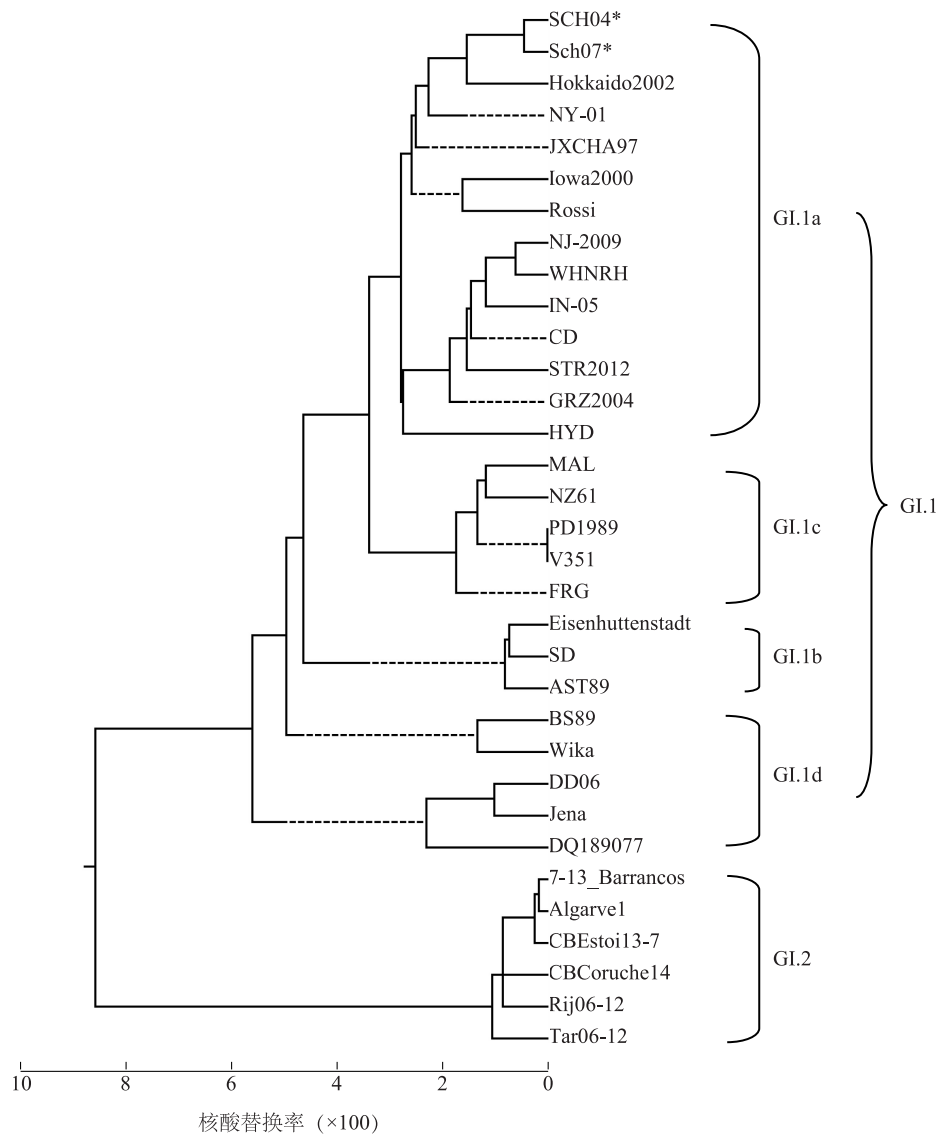
毒株 7-13_Barrancos、Algarve1、CBEstoi13-7 和 CBCoruche14-2 组成,另一分枝包括 3 个支分枝,分别是经典毒株(GI.1b~GI.1d)、抗原变异株 GI.1a 和 2 株西班牙分离的 GI.2 毒株 Rij06-12 和 Tar06-12。大分枝 GI.1a 中由 14 株 RHDV 组成 2 个小分枝。经典毒株由 GI.1b、GI.1c、GI.1d 组成 2 个大分枝。但是 SCH04、Sch07 受试 RHDV 毒株的遗传进化结果与以 *VP60* 和 ORF2 编码基因为基础构建的进化树的分析结果一致。

3 讨论

本研究采取分段扩增测序方法进行 RHDV 基因组扩增。与常规测定 RHDV 全基因序列的方法^[21]比较,本试验的方法可以更加方便地获取

RHDV 的全基因,测序的片段小,测序结果更加准确,不仅可以达到 RHDV 全基因组核苷酸序列测定目的,同时对于 RHDV 3D、3C 样蛋白质等的分析研究工作可直接提供具体基因片段^[22-24]。我们通过对实验室保存的 2 株 RHDV SCH04、Sch07 毒株全基因核苷酸序列进行分段扩增并测序,经拼接成功获得不包括 polyA 的全基因核苷酸序列,分别为 7 439 bp 和 7 438 bp,将 2 株全基因核苷酸序列上传 GenBank,进行同源性比对和基于不同基因片段的遗传演变分析,不仅丰富了 RHDV 的分子流行病学数据资料,而且为后续 RHDV 毒力相关研究奠定了基础。

目前 RHDV 遗传进化分析主要建立在 *VP60* 基因核苷酸序列基础上,把 RHDV 分为 GI.1 和



* 为测序毒株。

图 4 基于 ORF2 编码基因绘制的两毒株与参考毒株的进化树

Fig.4 The phylogenetic tree of the two strains and the reference strains based on the ORF2 encoding genes

GI.2基因群,GI.1 包括经典毒株(GI.1b~ GI.1d)和抗原变异株 GI.1a^[25-27]。本研究通过对 31 株 RHDV 全基因核苷酸序列、VP60 基因核苷酸序列、ORF2 编码基因核苷酸序列的同源性进行比对分析,并通过构建进化树分析毒株之间的亲缘关系,结果表明 VP60 基因核苷酸序列是极为保守的基因片段,与以往相关研究的结果一致。进化树分析结果表明:基于 VP60 基因和 ORF2 编码基因的分枝结构较全基因更能清楚地显示 RHDV GI.1 和 GI.2 基因群的区别,VP60 基因进化树和 ORF2 编码基因进化树均显示各毒株遗传距离差异不大,

这一结果表明 ORF2 编码区基因也可以作为 RHDV 遗传演变研究的参考基因,并且 ORF2 编码区基因比 VP60 基因核苷酸序列(约 1 740 bp)更短(约 355 bp),在克隆分析操作过程中可能更加方便。

本试验中 2 株 RHDV 均属于抗原变异株 GI.1a,全基因核苷酸序列、VP60 基因核苷酸序列和 ORF2 编码基因核苷酸序列进化树显示 RHDV 分群与时间有关系,时间对 RHDV 的变异影响程度显著高于地理区域的影响。比对结果显示 2 株病毒全基因核苷酸序列同源性为 99.8%,进化树

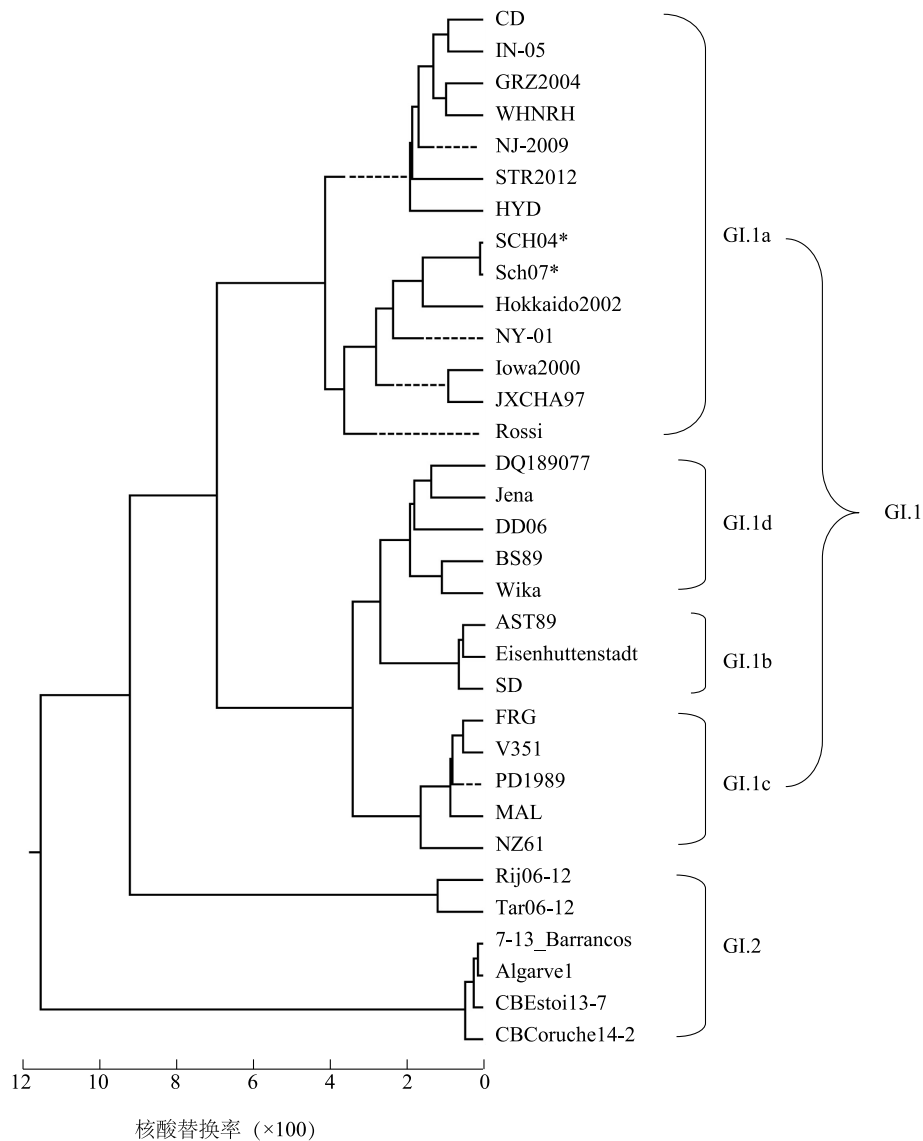


图5 RHDV 全基因组分子进化树

Fig.5 The phylogenetic tree of all full-sequenced RHDV strains

显示亲缘关系最近,与 31 株参考毒株全基因核苷酸序列的同源性相似。同时 2 株病毒在基因核苷酸序列末端非编码区的同一位置均出现碱基插入突变的现象,推测可能与碱基稳定性较差有关,因为该非编码区处于病毒基因组末端。2 株 RHDV 基因组末端碱基的插入突变,是否影响病毒的致病性以及 VP60 乃至全基因的表达调控,有待进一步研究。

参考文献:

[1] 刘胜江,薛华平,浦伯清,等. 兔的一种新病毒病—兔病毒性

出血症[J]. 畜牧与兽医,1984(6): 253-255.

- [2] 王芳,陈萌萌,宋艳华,等.兔出血症病毒新毒株 RHDV2 的流行与控制(综述)[J]. 江苏农业科学,2016,44(9):1-3.
- [3] XU W Y. Viral haemorrhagic disease of rabbit in China: epidemiology and virus characterization [J]. Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics), 1991, 10 (2): 393-408.
- [4] ABRANTES J, VAN DER LOO W, LE P J, et al. Rabbit hemorrhagic disease (RHD) and rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV): a review[J]. Vet Res, 2012, 43:12.
- [5] LE GALL-RECULE G, ZWINGELSTEIN F, BOUCHER S, et al. Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus

- in France[J]. Vet Rec, 2011, 168(5):137-138.
- [6] DUARTE M, HENRIQUES M, BARROS S C, et al. Detection of RHDV variant 2 in domestic rabbits in Azores[J]. Vet Rec, 2015, 176(19):499-500.
- [7] ABRANTES J, LOPES A M, DALTON K P, et al. New variant of rabbit hemorrhagic disease virus Portugal, 2012 - 2013[J]. Emerg Infect Dis, 2013, 19(11):1900-1902.
- [8] LE PENDU J, ABRANTES J, BERTAGNOLI S, et al. Proposal for a unified classification system and nomenclature of lagoviruses[J]. J Gen Virol, 2017, 98(7):1658-1666.
- [9] DALTON K P, NICIEZA I, BALSEIRO A, et al. Variant rabbit hemorrhagic disease virus in young rabbits, Spain[J]. Emerg Infect Dis, 2012, 18(12):2009-2012.
- [10] MEYERS G, WIRBLICH C, THIEL H J. Genomic and sub-genomic RNAs of rabbit hemorrhagic disease virus are both protein-linked and packaged into particles[J]. Virology, 1991, 184(2):677-686.
- [11] MARTINEZ-TORRECUDRADA J L, CORTES E, VELA C, et al. Antigenic structure of the capsid protein of rabbit haemorrhagic disease virus[J]. J Gen Virol, 1998, 79(8):1901-1909.
- [12] 张大鹏, 吕宁, 符容婕, 等. 兔出血症病毒衣壳蛋白 VP60 的原核表达及多克隆抗体制备[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2012, 40(3):18-22, 28.
- [13] 李桂黎, 任冉阳, 胡凌, 等. 兔病毒性出血病病毒 VP60 蛋白基因研究进展[J]. 动物医学进展, 2015, 36(2):93-96.
- [14] 陈柳, 刘光清, 倪征, 等. 兔病毒性出血病病毒次要结构蛋白(VP2)的表达和细胞内定位分析[J]. 中国动物传染病学报, 2009, 17(2):1-7.
- [15] CHEN L, LIU G Q, NI Z, et al. Minor structural protein VP2 in rabbit hemorrhagic disease virus downregulates the expression of the viral capsid protein VP60[J]. J Gen Virol, 2009, 90(12):2952-2955.
- [16] 缪秋红, 李传峰, 陈宗艳, 等. 兔出血症病毒遗传与变异的分子基础[J]. 中国动物传染病学报, 2013, 21(6):73-79.
- [17] MACHIN A, MARTIN ALONSO J M, PARRA F. Identification of the amino acid residue involved in rabbit hemorrhagic disease virus VPg uridylation[J]. J Biol Chem, 2001, 276(30):27787-27792.
- [18] LE GALL G, AMAULD C, BOILLETOT E, et al. Molecular epidemiology of rabbit haemorrhagic disease virus outbreaks in France during 1988 to 1995[J]. J Gen Virol, 1998, 79(1):11-16.
- [19] FORRESTER N L, TROUT R C, TUMER S L, et al. Unraveling the paradox of rabbit haemorrhagic disease virus emergence, using phylogenetic analysis; possible implications for rabbit conservation strategies[J]. Biological Conservation, 2006, 131(2):296-306.
- [20] MULLER A, FREITAS J, SILVA E, et al. Evolution of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) from the Iberian Peninsula[J]. Vet Microbiol, 2009, 135(3/4):368-373.
- [21] 李建文, 王红宁, 田浪, 等. 兔出血症病毒(RHDV) WHNRH 株的分离鉴定及基因组全序列的测定与分析[J]. 微生物学报, 2006, 46(5):720-725.
- [22] NEILL J D. Nucleotide sequence of a region of the feline calicivirus genome which encodes picornavirus-like RNA-dependent RNA polymerase, cysteine protease and 2C polypeptides[J]. Virus Res, 1990, 17(3):145-160.
- [23] BONIOTTI B, WIRBLICH C, SIBILIA M, et al. Identification and characterization of a 3C-Like Protease from rabbit hemorrhagic disease virus, a calicivirus[J]. J Virol, 1994, 68(10):6487-6495.
- [24] 朱杰. VPg 蛋白在兔出血症病毒翻译起始过程中的作用研究[D]. 北京:中国农业科学院, 2015.
- [25] NOWOTNY N, BASCUNANA C R, BALLAGI-PORDANY A, et al. Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease and European brown hare syndrome viruses by comparison of sequences from the capsid protein gene[J]. Arch Virol, 1997, 142(4):657-673.
- [26] LE GALL G, ZWINGELSTEIN F, LAURENT S, et al. Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease virus in France between 1993 and 2000, and the characterization of RHDV antigenic variants[J]. Arch Virol, 2003, 148(1):65-81.
- [27] WANG X L, HAO H F, QIU L, et al. Phylogenetic analysis of rabbit hemorrhagic disease virus in China and the antigenic variation of new strains[J]. Arch Virol, 2012, 157(8):1523-1530.

(责任编辑:张震林)