



张克山,陈芳艳,刘 金,等. 珠三角地区鸭坦布苏病毒的全基因序列测定与分析[J]. 华南农业大学学报,2015,36(3):13-19.

珠三角地区鸭坦布苏病毒的全基因序列测定与分析

张克山¹,陈芳艳²,刘 金¹,蔡丝丝¹,刘湘红¹,张靖鹏¹,陈瑞爱^{1,3},王林川^{1,3}

(1 华南农业大学 兽医学院,广东 广州 510642; 2 华南农业大学 动物科学学院,广东 广州 510642;
3 广东大华农动物保健品股份有限公司,广东 新兴 527400)

摘要:【目的】了解 2010 年以来分离于珠三角地区鸭坦布苏病毒病 (Duck Tembusu virus, DTMUV) GDNS2010. 1、GDNS2010. 2、GDZQ2012、GDPY2013 株的分子特征。【方法】参考 GenBank 收藏的 DTMUV JS804 株,共设计合成 11 对特异性引物,扩增了 4 株病毒的全基因序列片段。【结果和结论】4 株病毒全长约为 10 990 bp,无 Ploy(A)尾结构,仅含有 1 个大的 ORF,共编码 3 426 个氨基酸,5'非编码区(5'UTR)各含有 94 bp。在 3'非编码区(3'UTR),GDNS2010. 1、GDNS2010. 2 毒株在 103 395 ~ 103 411 bp 处缺失 10 个碱基。联合前期试验已测定的 2 株病毒序列 (GDHZ2012. 1、GDHZ2012. 2),用 DNASTar 和 MEGA6. 0 序列分析软件将 6 株病毒同 GenBank 收藏的国内的其他坦布苏病毒株比对,发现核酸序列相似性在 98% 以上,与 Ntaya 病毒和 Sitiawan 病毒相似性较大,相似性都在 73% 左右;与西尼罗河病毒、日本乙型脑炎病毒、黄热病毒等相似性皆低于 63%。6 株病毒囊膜蛋白 E 核酸序列相似性为 97. 5% ~ 99. 9%,推导氨基酸序列相似性在 97% 以上,其中同一地区分离的毒株相似性最高,达 99. 9%;在囊膜蛋白 E154 位存在一潜在的糖基化位点 Asn-Try-Ser,在 E 蛋白结构域 II 第 E289 位,极性带正电荷的 Lys 变为极性带负电荷的 Glu,推测这一位点可能为病毒的毒力位点。

关键词:鸭坦布苏病毒;克隆测序;全基因组序列;囊膜蛋白毒力位点;鸭黄病毒
中图分类号:S855. 3 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2015)03-0013-07

Molecular cloning and sequence analyses of the complete genome of duck Tembusu virus isolated from the Pearl River Delta region

ZHANG Keshan¹, CHEN Fangyan², LIU Jin¹, CAI Sisi¹, LIU Xianghong¹,
ZHANG Jingpeng¹, CHEN Ruiai^{1,3}, WANG Linchuan^{1,3}

(1 College of Veterinary, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;
2 College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;
3 Guangdong Dahuanong Animal Health Products Co., Ltd., Xinxing 527400, China)

Abstract:【Objective】In order to comprehend the molecular characteristics of duck Tembusu virus, the isolations of GDNS2010. 1, GDNS2010. 2, GDZQ2012, GDPY2013 in the Pearl River Delta region were analyzed. 【Method】From the reference strains (GenBank accession no. JS804), eleven pairs of specific primers were designed and synthesized to amplify genome sequence fragments of GDNS2010. 1, GDNS2010. 2, GDZQ2012, GDPY2013. The whole genome sequences of these four viruses were obtained. The complete genome sequences of four viruses were obtained by sequencing and splicing. 【Re-

收稿日期:2014-04-09 优先出版时间:2015-04-14
优先出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20150414.0924.001.html>
作者简介:张克山(1988—),女,硕士,E-mail:zhangksh1988@163.com;通信作者:王林川(1965—),男,教授,博士,E-mail:lcwang@scau.edu.cn
基金项目:广东大华农动物保健品股份有限公司科研基金(113A2012206-1)

sult and conclusion】 Analyses showed that the full length of these four viruses was 10 990 bp, no Ploy (A) tail structure comprising one large ORF, encoding 3 426 amino acids. The 5' non-coding region (5' UTR) contained 94 bp. Ten bases were missing from 103 395 bp to 103 411 bp of GDNS2010.1 and GDNS2010.2 strains in the 3' non-coding region (3' UTR). Two sequences of GDHZ2012.1 and GDHZ2012.2 preliminarily determined were joined for a sequence analysis. DNASTar and MEGA6.0 were used to analyze the sequences of six virus strains. Comparisons with other domestic Tembusu viruses recorded in GenBank showed that the similarity of the nucleic acid sequence was more than 98%. In comparison with Ntaya virus, Sitiawan virus, the similarity was about 73%. Compared with West Nile virus, Japanese encephalitis virus and yellow fever virus, the similarities were less than 63%. The similarity for nucleic acid sequence of envelope protein in the six isolates remained between 97.5% - 99.9%; the similarity of deduced amino acid sequence was found to be more than 97% whereas isolates from the same area had 99.9% similarity. In the site of E154 in envelope, there are a potential glycosylation site Asn-Try-Ser and a potential virulence loci in E289.

Key words: duck Tembusu virus; cloning and sequencing; complete genome sequence; virulence loci in envelope protein; duck flavivirus

鸭坦布苏病毒 (Duck Tembusu virus, DTMUV) 属于黄病毒科黄病毒属恩他耶病毒群,其基因组结构与其他黄病毒相似,是一种约有 11 kb 单股正链的 RNA 病毒. 基因组仅有 1 个大的阅读框架 (ORF), 两端是与病毒复制有关的 5'端和 3'端非编码区^[1-2]. 基因组编码 1 个大的蛋白前体,后在宿主信号肽酶和病毒丝氨酸蛋白酶的共同催化作用下裂解为 3 个结构蛋白和 7 个非结构蛋白,在基因组中的顺序为:5'-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3', 其中 E 蛋白是黄病毒主要的结构蛋白,在病毒吸附、与宿主细胞膜融合以及病毒组装过程中具有重要的作用. 同时, E 蛋白也是黄病毒主要的病毒抗原, 含有多种抗原表位, 可通过诱发中和抗体产生保护性免疫应答^[3]. NS5 是最大的非结构蛋白, 含有 910 个氨基酸, 具有 RNA 依赖性 RNA 聚合酶、甲基转移酶、鸟苷酸转移酶等多种酶活性^[4]. Forwood 等^[5]发现登革病毒 NS5 茎环区的 37 个氨基酸 (369 ~ 405 位氨基酸) 含有核定位信号 (Nuclear localization signal, NLS), 在氨基端的 327 ~ 343 氨基酸含有核输出序列 (NES), 在病毒基因组的复制过程中发挥关键作用. 了解病毒基因结构特点是分析病毒遗传进化、生长繁殖、毒力、致病机理的分子基础, 有助于进一步的研究鸭黄病毒病工作的开展. 因此本文测定并分析了 2010—2013 年分离于珠三角的 6 株鸭源坦布苏病毒全基因结构.

1 材料与方法

1.1 试验材料

- 1.1.1 病毒与鸭胚 鸭黄病毒为广东自然分离毒株,鸭胚由云城温氏公司孵化场提供.
- 1.1.2 菌株与载体 大肠埃希菌 *Escherichia coli* DH5a 由广东大华农动物保健品股份有限公司生药研发中心保存, pGEM-T-easy vector system 为 Promega 公司产品.
- 1.1.3 主要试剂 RNA/DNA 抽提试剂盒、DNA Marker DL2000、M-MLV 反转录酶、(10 ×) PCR Buffer (含 Mg²⁺)、dNTP、PrimeSTAR Max 高保真 DNA 聚合酶、*Taq* 聚合酶均为 TaKaRa 公司产品; 凝胶回收试剂盒、小质粒抽提试剂盒为 Omega 公司产品; 氨苄青霉素 (Amp) 为 Invitrogen 公司产品; LB 培养基购自广州环凯生物技术公司.

1.2 试验方法

- 1.2.1 鸭坦布苏病毒全基因序列的引物设计与合成 参照 GenBank 收藏的坦布苏病毒 JS804 株 (登录号: NC_015843) 序列, 应用 Primer premier5.0 软件设计引物, 见表 1, 由广州英潍捷基贸易有限公司合成.
- 1.2.2 病毒 RNA 的抽提与目的基因扩增 参照 TaKaRa 产品 RNA/DNA 抽提试剂盒说明书步骤抽提病毒 RNA. 利用 M-MLV 反转录酶 (TaKaRa 公司) 和随机引物将 RNA 反转录成 cDNA; 取模板 2 μL、Random Primer 1 μL 和 RNase free ddH₂O 至 6 μL, 70 °C

表 1 鸭坦布苏病毒全基因组的 PCR 扩增引物

Tab.1 PCR primers for amplification of the full-length genome of duck Tembusu virus

引物名称	序列	位置	长度/bp
TemF1	5'-AGAAGTTTCGCCTGTGTGA-3'	1 ~ 900	900
TemR1	5'-CTCGTCGTTCCCAGATTCC-3'		
TemF879	5'-GCTGGAATCTGGGAACGAC-3'	879 ~ 1 742	863
TemR879	5'GGAGGGCTCCTTCTTGTGAT-3''		
TemF1392	5'-CCACGGAAGCGAGCACCT-3'	1 392 ~ 2 775	1 383
TemR1392	5'-TTCGGCAGCCTCTGATTAGTTT -3'		
TemF2704	5'- CGCCATTGACTTGACTGT-3'	2 704 ~ 3 979	1 275
TemR2704	5'-AACAAAGTGGCAGAGCAAAGGAG-3'		
TemF3958	5'-CTCCTTTGCTCTGCCACTTG -3'	3 958 ~ 4 863	905
TemR3958	5'-ACGCCATTCCATTGCTTC-3'		
TemF4635	5'-CCGAAGTAGGCAATGGAGT-3'	4 635 ~ 5 994	960
TemR4635	5'-TGTCTGTTATTGGCGAGTTG-3'		
TemF5573	5'-TCCAACTCGCCAATAACAGAC-3'	5 573 ~ 6 143	571
TemR5573	5'-CGTCAACCTTGTCCCGCTCT-3'		
TemF5847	5'-CGCAACGGGTCATAGATAGTC-3'	5 847 ~ 7 491	1 645
TemR5847	5'- AACATTCCAAACTCGGTCAAG-3'		
TemF7465	5'-GCTAACCTTGACCGAGTTTG-3'	7 465 ~ 8 888	1 424
TemR7465	5'-CCAGGGCTGCGTTACTATT-3'		
TemF8788	5'-CGTGCCAAGATGGATGTG -3'	8 788 ~ 10 029	1 242
TemR8788	5'-CATGAGACAGGGACAGATGAG-3'		
TemF9382	5'-GAATAAGGTGGTGAAGGTAATGC-3'	9 382 ~ 10 990	1 608
TemR9382	5'-AGATCCTGTGTCTACCAC-3'		

作用 10 min 后冰上急冷 2 min;离心数秒后,将上述模板变性溶液 6 μL 与 2 μL 5 × M-MLV Buffer 、0.5 μL dNTP-Mixture 、0.25 μL RNase Inhibitor 、0.25 μL RNase M-MLV 、1 μL RNase free ddH₂O 混匀,合成第 1 链 cDNA,反应条件:30 ℃ 10 min,42 ℃ 1 h,70 ℃ 15 min,结束反应.取转录产物,分别用上下游引物进行 PCR 扩增,反应体系为:2 × PrimeSTAR Max 高保真 DNA 聚合酶预混剂 25 μL、上下游引物各 1 μL、cDNA 模板 2 μL,灭菌 ddH₂O 至 50 μL,PCR 反应条件:95 ℃ 预变性 5 min;98 ℃ 变性 10 s,55 ℃ 退火 10 s,72 ℃ 延伸时间根据片段大小而定(10 s · kb⁻¹),35 个循环;72 ℃ 10 min,获得目的片段.

1.2.3 目的基因的克隆与测序 PCR 扩增产物加 A 碱基后,经 0.01 g · mL⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳后,切下目的条带,用 DNA 凝胶回收试剂盒回收目的片段;取目的片段连接 pGEM-T-easy vector 载体,重组质粒转化 DH5a 感受态细胞;转化后均匀涂布于含 100 μg · mL⁻¹ 的 Amp 的 LB 琼脂板上,过夜,挑取可疑阳

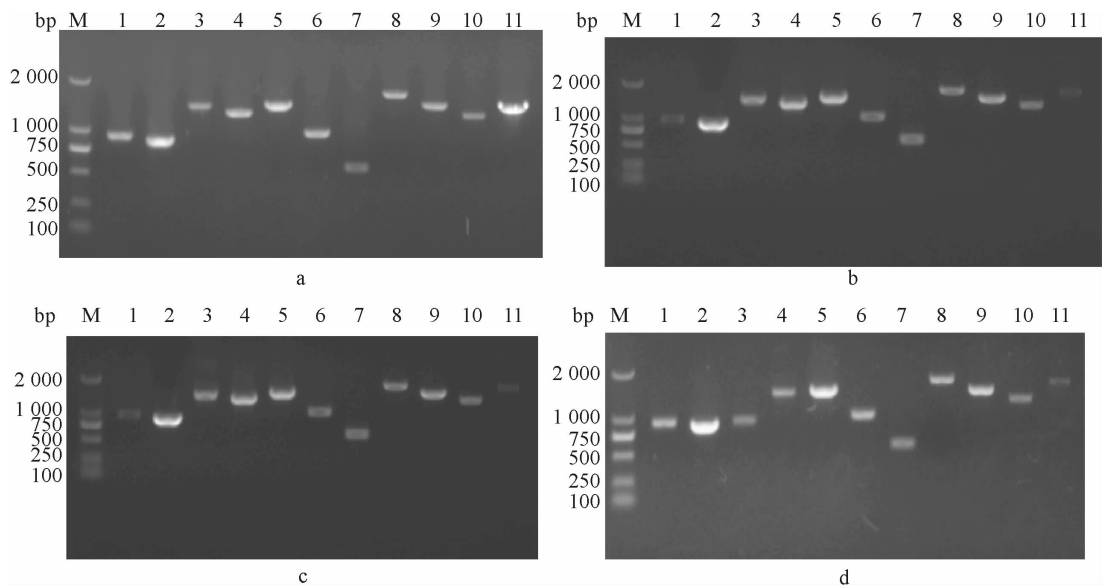
性菌落,摇菌,抽提质粒 PCR 鉴定为阳性后送英潍捷基公司测序.

1.2.4 目的基因的序列结果与分析 测序结果通过国际互联网提交 NCBI Blast Server 进行联机检索,以及与 GenBank 中注册的其他黄病毒的相应核苷酸序列进行比较分析.应用 DNASTar (Version 5.07) 分析软件,将所获得的 4 株鸭坦布苏病毒基因片段的序列分别进行整理和拼接,形成完整的病毒基因序列.联合 GDHZ2012.1、GDHZ2012.2 病毒序列, DNASTar 的 MegAlign 中的 clustal W method 算法比较不同地区的鸭坦布苏病毒各蛋白的核苷酸和氨基酸序列相似性,用 Mega 6.0 软件的 NJ 算法,绘制出系统发育进化树.

2 结果

2.1 全基因组各片段的扩增

使用设计的引物经 PCR 扩增目的基因,电泳后获得了与预期大小相符的条带(图 1).



M; DNA marker DL2000; 1 ~ 11 片段大小分别为 900、863、1 383、1 275、905、960、571、1 645、1 424、1 242、1 608 bp.

图 1 GDNS2010. 1(a)、GDZQ2012(b)、GDNS2010. 2(c)、GDPY2013(d)全基因序列片段的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of the complete genome of GDNS2010. 1(a), GDZQ2012(b), GDNS2010. 2(c), GDPY2013(d)

2.2 全基因组相似性与进化分析

测序结果经 SeqMan 软件去载体、拼接后,得到了病毒的全长核苷酸序列,其中 GDNS2010. 1、GDNS2010. 2 两毒株在 103 395 ~ 103 411 bp 处缺失 10 个碱基;编码区位于 95 ~ 10 372 bp,共编码 3 462 个氨基酸;将拼接好的序列与 GenBank 上收藏的 16 个相关病毒序列(包含 10 个 TMUV 和 6 个黄病毒属成员病毒),见表 2 前 16 条序列. 经 MegAlign 软件比对(图 2):分离株与其他 TMUV 毒株相似性都在 98% 以上,其中 GDHZ2012. 1 与 GDPY2013 两毒株与参考毒株 JS804 相似性最高,分别为 99. 4%、99. 3%;进化树分析显示,GDPY2013 株与 JS804 处在同一节点;在 6 毒株之间,GDZQ2012 与其他毒株差异最大,分离于同一地方的 GDNS2010. 1、GDNS2010. 2 和 GDHZ2012. 1、GDHZ2012. 2 的核苷酸相似性很高,处于进化树上的同一节点,可能由同一毒株进化得到. 与黄病毒属成员相比较发现:相似性最高的是 Sitiawan 病毒,相似性为 87. 5% ~ 88. 1%,其次为 Ntaya-IPDIA 株和以色列的火鸡脑脊髓炎病毒,相似度都为 72% 以上,而西尼罗河病毒、日本乙型脑炎病毒、黄热病毒等相比较,相似性皆低于 63%.

2.3 病毒主要结构蛋白 E 基因分析

将病毒的主要结构蛋白 E 蛋白与其他 TMUV

表 2 参考毒株及序列登录号

Tab. 2 Reference strains in GenBank and their accession numbers

毒株	分离地	年份	登录号
Sitiawan virus	马来西亚	2000	JX477686
HLD115	中国 - 沈阳	2012	NC_017086
17D vaccine strain	美国-堪萨斯州	1985	NC_002031
West Nile virus	美国-佛吉尼亚州	1993	NC_001563
Japanese encephalitis virus	日本	1987	NC_001437
IPDIA	喀麦隆	1966	NC_018705
Israel/106819	以色列	2010	KC734552
FX_2012	中国 - 山东	2012	KC990541
SDMS	中国 - 山东	2013	KC333867
WJ-1	中国 - 广东	2012	JX549382
WR	中国 - 福建	2010	JX196334
JS	中国 - 北京	2012	JQ920422
Byd-1	中国 - 北京	2012	JQ920420
ZJ 407	中国 - 浙江	2010	JQ314464
ZJ GH-2	中国 - 浙江	2010	JQ314465
JS804	中国 - 江苏	2010	NC_015843
Fengxian-1	中国 - 上海	2011	HQ833330
HN1	中国 - 河南	2012	JQ669731
SHYG-1	中国 - 江苏	2013	KC581714

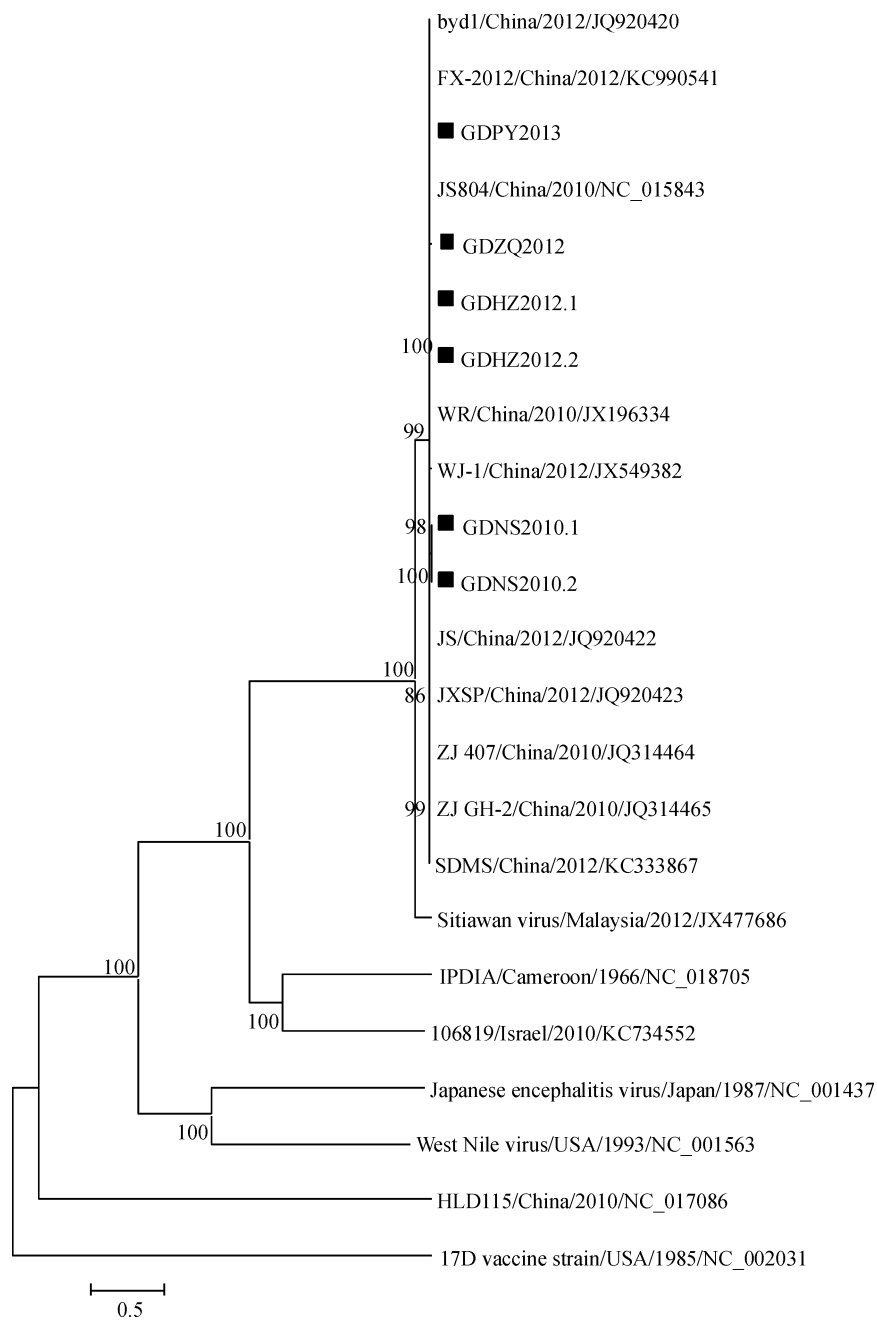


图 2 鸭坦布苏病毒株进化树(邻接法)

Fig. 2 Phylogenetic tree of DTMUV strains (by NJ method)

(参考株见表 2 后 4 条序列)比较发现,核苷酸序列相似性为 97.5% ~ 99.3%,推导氨基酸序列相似性在 97% 以上(图 3). 由图 3 可见,根据较保守的病毒 E 基因序列分析建树发现:珠三角分离的 6 株毒与国内其他地区分离的毒株在遗传关系上 JS804 与 GDHZ2012. 1、GDHZ2012. 2、GDPY2013, GDZQ2012 与 SHYG-1, GDNS2010. 1、GDNS2010. 2 与 Fengxian-1 分别有共同节点. 这提示 DTUMV 病毒可能在近 3 年来并未形成较大差异的地方毒株. GDNS2010. 1、GDNS2010. 2、GDZQ2012、GDHZ2012. 1、GDHZ2012. 2、GDPY2013 各毒株与参考毒株 JS804 相比较碱基变

化较多,但多为无义突变. 6 株毒株间推导氨基酸变化情况见表 3;GDHZ2012. 1、GDHZ2012. 2 第 128 位氨基酸由极性带正电荷的 Arg 变为非极性不带电荷的 Met; GDHZ2012. 2 第 289 位由极性带正电荷的 Lys 变为极性带负电荷的 Glu;在第 458 位由极性不带电荷的 Ser 变为非极性 Pro;GDPY2013 株在 313 位由极性带正电荷的 Arg 变为非极性不带电荷的 Met. 这些改变蛋白极性或带电荷数的位点很可能就是潜在的毒力位点. 另外,囊膜蛋白第 154 位存在一个潜在的糖基化位点(Asn154-Try-Ser),这一位点在大多数黄病毒中保守^[6].

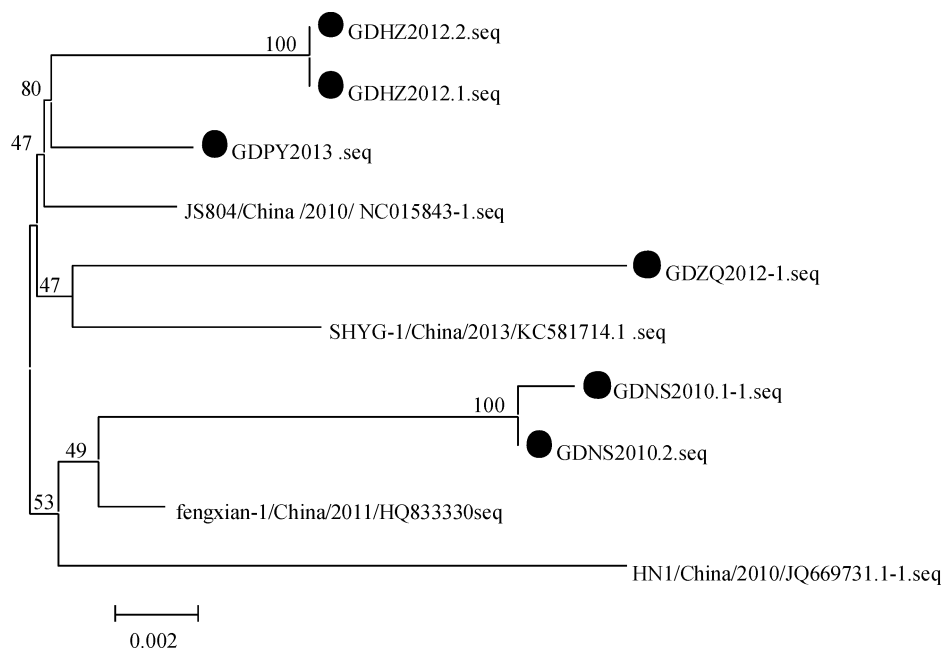


图 3 鸭坦布苏病毒 E 基因遗传进化树分析(邻接法)

Fig. 3 Phylogenetic tree of envelope gene of DTMUV strains(by NJ method)

表 3 E 基因推导氨基酸突变表

Tab. 3 The mutations in the deduced amino acid sequences of envelope gene

毒株	碱基变化位置	碱基变化
GDHZ2012. 1	128/179/451/488	R→M,V→I,K→R,V→I
GDHZ2012. 2	128/179/289/451/458/488	R→M,V→I,K→E,K→R,S→P,V→I
GDPY2013	107/313/445/468	L→F,K→E,V→A,L→P
GDZQ2012	232/367/394	T→M,T→M,R→K
GDNS2010. 1	369/474	I→V,M→I
GDNS2010. 2	474	M→I

3 讨论

2010 年鸭坦布苏病毒病的突然爆发与迅速蔓延给我国水禽养殖带来了巨大的经济损失. 目前认为鸭坦布苏病毒只感染鸭、鹅、家雀,但同时鸭黄病毒属于黄病毒科黄病毒属的成员;而黄病毒属中大量成员威胁人类健康,如日本乙型肝炎、登革热、黄热病、蜱传染性脑炎等^[7-8]. Tang 等^[9]对 132 份来自鸭产业工作人员的血清检测发现其抗体阳性率达 71.9%,63 份口腔拭子检测病毒 RNA 阳性率达 47.7%,这是否意味着鸭坦布苏病毒同其他的黄病毒属成员一样具有公共卫生意义还需进一步确认. 虽鸭坦布苏病毒是一种国内新发疾病,但近两年报道病毒的全基因序列已有几十条, Yu 等^[3]对 2010—2012 年分离到的 6 株坦布苏病毒的 E 蛋白结构、抗原性和进化特性的研究发现,坦布苏病毒分 I、II 2 个基因型,II 为主要的基因型,他们还发现病毒 E 蛋白氨基酸突变位点有 13 处,而中和试验病毒的中和

<http://xuebao.scau.edu.cn>

特性却没有表现出差异. 本试验将 2010—2013 年分离测序获得的 6 株病毒核苷酸序列与 GenBank 收藏的 10 株坦布苏病毒相比较,发现 6 毒株的核苷酸相似性与近 4 年国内报道的坦布苏病毒的核苷酸序列相似性都很高,在 97% 以上,这提示在 4 年间里坦布苏病毒并未发生大的变异,感染宿主范围并没有扩大;国内也未出现如 2010 年的大范围流行,仅出现地方性流行^[10]. 这可能一方面与感染宿主逐渐产生特异性抗体,形成了免疫保护有关;另一方面可能与目前国内缺乏有效防治此病疫苗与药物的情况有关,在这种情况下病毒面临的选择压力小,没能使病毒发生大的新的变异. 但这不能否认病毒在各个地方呈现地方特色,如在前期试验中,笔者发现这 6 毒株中 2012 年分离于惠州的 2 株病毒就存在毒力差异,测定发现 GDHZ2012. 1 的 EID₅₀ 比 GDHZ2012. 2 的 EID₅₀ 高出 2 个稀释度,第 5 代毒颅内接种 7 日龄小鸭时前者能引起明显的临床症状,甚至死亡,后者发病较缓,且

临床症状较轻^[11]. 巧合的是在 E 蛋白基因序列里 GDHZ2012. 2 比 GDHZ2012. 1 多 2 个突变位点,尤其是 GDHZ2012. 2 第 289 位由极性带正电荷的 Lys 变为极性带负电荷的 Glu,这一位点使得蛋白的带电荷数发生改变. 已有研究表明,第 289 位氨基酸位于 E 蛋白结构域 II 中,结构域 II 中有糖基化位点和具有血清学及生物活性的抗原表位^[12-14].

在序列拼接完成后,发现 GDNS2010. 1、GDNS2010. 2 毒株在 103 395 ~ 103 411 bp 处缺失 10 个碱基. 有趣的是这 2 毒株的 EID₅₀ 都不高,第 5 代毒的 EID₅₀ 分别为 10^{-3.13}、10^{-2.8},这段缺失序列处在病毒的 3'UTR,这段缺失的序列是否是病毒复制能力低于其他 4 株毒的原因,可通过感染性克隆技术作进一步研究确认,文献报道的是黄病毒的 3'UTR 影响着病毒的复制、增殖,调控病毒翻译效率^[15-16].

鸭坦布苏病毒病作为一种国内新发的传染性疾病,目前对于其流行病学特点、致病机理等生物学特征尚不是很清楚,临床上缺乏有效的检测手段与防治疫苗、药物;也不清楚是否威胁人类健康. 本文测定分析了 2010—2013 年间分离于珠三角地区的 6 株鸭源坦布苏病毒,为下一步的疫苗筛选、分子诊断、反向操作奠定了基础.

参考文献:

[1] BAI X, LU R, LIU C, et al. Molecular characterization of a duck Tembusu virus from China [J]. *Virus Genes*, 2013, 47(3): 478-482.

[2] MUKHOPADHYAY S, KUHN R J, ROSSMANN M G. A structural perspective of the flavivirus life cycle [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2005, 3(1): 13-22.

[3] YU K, SHENG Z Z, HUANG B, et al. Structural, antigenic, and evolutionary characterizations of the envelope protein of newly emerging duck Tembusu virus [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e71319.

[4] LU G, GONG P. Crystal structure of the full-length Japanese encephalitis virus NS5 reveals a conserved methyltransferase-polymerase interface [J]. *PLoS Pathog*, 2013, 9(8): e1003549.

[5] FORWOOD J K, BROOKS A, BRIGGS L J, et al. The 37-amino-acid interdomain of dengue virus NS5 protein contains a functional NLS and inhibitory CK2 site [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 257(3): 731-

737.

[6] ZHANG Y, CHEN P, CAO R, et al. Mutation of putative N-linked glycosylation sites in Japanese encephalitis virus premembrane and envelope proteins enhances humoral immunity in BALB/C mice after DNA vaccination [J]. *Virology*, 2011, 8: 138.

[7] TANG Y, DIAO Y, YU C, et al. Characterization of a Tembusu virus isolated from naturally infected house sparrows (*Passer domesticus*) in Northern China [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2013, 60(2): 152-158.

[8] ZHU W, CHEN J, WEI C, et al. Complete genome sequence of duck Tembusu virus, isolated from Muscovy ducks in southern China [J]. *J Virol*, 2012, 86(23): 13119.

[9] TANG Y, GAO X, DIAO Y, et al. Tembusu virus in human, China [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2013, 60(3): 193-196.

[10] 刘志刚,孙青松,姚蓉,等. 鸭坦布苏病毒研究进展 [J]. *中国动物传染病学报*, 2013, 21(1): 81-86.

[11] 李庆阳,陈芳艳,刘平,等. 鸭坦布苏病毒 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立 [J]. *动物医学进展*, 2012, 33(7): 18-22.

[12] GRITSUN T S, HOLMES E C, GOULD E A. Analysis of flavivirus envelope proteins reveals variable domains that reflect their antigenicity and may determine their pathogenesis [J]. *Virus Res*, 1995, 35(3): 307-321.

[13] KIMURA-KURODA J, YASUI K. Antigenic comparison of envelope protein E between Japanese encephalitis virus and some other flaviviruses using monoclonal antibodies [J]. *J Gen Virol*, 1986, 67(Pt 12): 2663-2672.

[14] 张羽,曹瑞斌,顾金燕,等. 猪源乙型脑炎病毒 NJ2008 株 E138 位突变病毒的构建与生物学特性初步研究 [C]//佚名. 中国畜牧兽医学学会兽医公共卫生学分会第二次学术研讨会论文集. 北京:中国畜牧兽医学学会, 2014:312-315.

[15] ALVAREZ D E, EZCURRA A L D L, FUCITO S, et al. Role of RNA structures present at the 3' UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication [J]. *Virology*, 2005, 339(2): 200-212.

[16] PROUTSKI V, GOULD E A, HOLMES E C. Secondary structure of the 3' untranslated region of flaviviruses: Similarities and differences [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(6): 1194-1202.

【责任编辑 柴 焰】