

贾荣荣, 汪祥斌, 贾坤. 广东省牛流行热病毒分离株 JM 2020 的全基因组测序及进化分析 [J]. 华南农业大学学报, 2023, 44(3): 382-390.
JIA Rongrong, WANG Xiangbin, JIA Kun. Whole genome sequencing and evolutionary analysis of bovine ephemeral fever virus isolate JM 2020 in Guangdong Province[J]. Journal of South China Agricultural University, 2023, 44(3): 382-390.

广东省牛流行热病毒分离株 JM 2020 的全基因组测序及进化分析

贾荣荣✉, 汪祥斌, 贾坤✉

(华南农业大学 兽医学院/广东省宠物工程技术研究中心, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】分析广东省牛流行热病毒 (Bovine ephemeral fever virus, BEFV) 分离株 JM 2020 与其他地区毒株的进化关系, 阐明遗传进化与全基因组的特征, 为中国乃至世界对牛流行热疾病的流行情况以及预防该疾病提供有用信息。【方法】根据从 GenBank 下载的 BEFV 毒株的全基因组序列信息, 设计引物 PCR 扩增糖蛋白 (Glycoprotein, G) 基因; 另设计 10 对引物用于扩增全基因组, 送测序得到 10 个片段的基因序列, 运用 DNASTar 软件中的 EditSeq 手动编辑和拼接获得全基因组序列。运用 MEGA 6.0 分别构建 G 基因和全基因组进化树进行进化分析。【结果】JM 2020 毒株的 G 基因和全基因组与泰国毒株的核苷酸序列相似性均最高, 分别为 94.9%~99.3% 和 99.0%, 进化分析表明 JM 2020 与 2013—2017 年泰国毒株处于同一小分支, 而与 JB76H、JT02L 等国内毒株有一定进化距离。全基因组测序结果表明, JM 2020 全基因组长度为 14 902 个核苷酸 (nt), 包括 50 nt 的前导序列, 1 296 nt 的核蛋白 (Nucleoprotein, N) 基因, 837 nt 的磷蛋白 (Phosphoprotein, P) 基因, 672 nt 的基质蛋白 (Matrixprotein, M) 基因, 1 872 nt 的 G 基因, 1 812 nt 的非结构糖蛋白 II (Non-structural glycoprotein II, G_{NS}) 基因, 618 nt 的 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 基因, 444 nt 的 β 基因, 345 nt 的 γ 基因, 444 nt 的 RNA 依赖性聚合酶 (Large multi-functional enzyme, L) 基因和 73 nt 的尾随序列, 且分别被 21、47、68、67、23、64、59、79 和 35 nt 的区域隔开。JM 2020、qy2017 及泰国毒株均出现 P' 基因 (P 基因多顺反子产物) 截断的特征。【结论】JM 2020 毒株与 2017 年分离毒株 qy2017 序列相似性高且均与泰国毒株进化关系较近, 与 JB76H 等我国其他地区毒株有一定进化距离。该研究丰富了中国 BEFV 流行株的基因组信息, 为牛流行热疫病综合防控及开发新疫苗奠定了基础。

关键词: 牛流行热病毒; G 基因; 进化分析; 全基因组序列分析

中图分类号: S852.618

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2023)03-0382-09

Whole genome sequencing and evolutionary analysis of bovine ephemeral fever virus isolate JM 2020 in Guangdong Province

JIA Rongrong✉, WANG Xiangbin, JIA Kun✉

(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University/Guangdong Pet Engineering Technology Research Center, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】The purpose of this study was to analyze the evolutionary relationship between bovine ephemeral fever virus (BEFV) isolate JM 2020 in Guangdong Province and other strains from other regions, and

收稿日期: 2022-04-17 网络首发时间: 2023-03-30 15:47:58

首发网址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20230330.1452.002.html>

作者简介: 贾荣荣, 硕士研究生, 主要从事牛流行热病毒研究, E-mail: 1845234644@qq.com; 通信作者: 贾坤, 副教授, 博士, 主要从事奶牛疾病研究, E-mail: Jiakun@scau.edu.cn

基金项目: 广州市科技计划项目 (202206010131)

clarify the characteristics of genetic evolution and whole genome, so as to provide information for the epidemic situation and prevention of bovine ephemeral fever disease in China and the world. 【Method】 According to the whole genome sequence information of BEFV strain downloaded from GenBank, primers were designed to amplify glycoprotein (G) gene by PCR. The 10 pairs of primers were designed to amplify the whole genome, and the gene sequences of 10 fragments were obtained by sequencing. The whole genome sequences were manually edited and spliced by EditSeq in DNASTar software. Using MEGA 6.0 to construct *G* gene and whole genome evolutionary tree respectively for evolutionary analysis. 【Result】 The *G* gene and whole genome of the JM 2020 strain had the highest nucleotide sequence similarity with the Thai strain, which were 94.9%–99.3% and 99.0% respectively. The evolutionary analysis showed that JM 2020 was in the same small branch with the 2013 to 2017 Thai strains, while there was a certain evolutionary distance from domestic virus strains such as JB76H and JT02L. Whole genome sequencing results showed that whole genome of JM 2020 was 14 902 nucleotides (nt) in length, including 50 nt leader sequence, 1 296 nt nucleoprotein (N) gene, and 837 nt phosphoprotein (P) gene, 672 nt matrixprotein (M) gene, 1 872 nt *G* gene, 1 812 nt non-structural glycoprotein II (*G*_{NS}) gene, 618 nt $\alpha 1$ and $\alpha 2$ gene, 444 nt β gene, 345 nt γ gene, 6 444 nt large multi-functional enzyme (L) gene and tail sequence of 73 nt, which was separated by 21, 47, 68, 67, 23, 64, 59, 79 and 35 nt intergenic regions. The *P'* gene (polycistronic product of *P* gene) of JM 2020 was truncated like qy2017 and the Thai strain. 【Conclusion】 The JM 2020 strain is highly similar with the qy2017 strain isolated in 2017 and they are closely related to the evolution of the Thai strain. They have some evolutionary distance with JB76H strain etc. from other regions of China. This study enriches the genome information of BEFV epidemic strains in China and lays a foundation for the prevention and control of bovine ephemeral fever and the research of new vaccines.

Key words: Bovine ephemeral fever virus; *G* gene; Phylogenetic analysis; Whole genome sequence analysis

牛流行热 (Bovine ephemeral fever) 为虫媒介疾病, 主要由库蚊属蚊子传播, 可引起奶牛、水牛突发高热、肺炎、产奶产肉量下降、僵硬、跛、瘫、母牛流产等^[1-2]; 最主要的特点是来势迅猛, 突发高热, 一般为双相热, 可长达 5 d 左右, 症状较轻者可自行恢复, 重者致残、引起肺气肿导致死亡^[3]; 呈现明显的季节性和周期性, 在温暖潮湿的、适合蚊虫生长繁殖的热带和亚热带地区, 约 3~5 年大流行 1 次, 近年有周期缩短的趋势, 在华南地区奶牛场几乎每年都会流行^[4]; 发病率高达 100%, 青壮年牛易染病, 死亡率 1%~10%, 最高可达到 20%^[5]; 对广东省畜牧经济影响重大, 同时严重影响活体贸易^[6]。

牛流行热病毒 (Bovine ephemeral fever virus, BEFV) 为弹状病毒科, 暂时热病毒属成员, 外形呈子弹状, 病毒体的大小为 85 nm×180 nm 左右^[7]。目前为止, 仅鉴定出 1 种血清型。病毒基因组约为 14 900 个核苷酸 (nt), 按 3'-N-P-M-G-[GNS- $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - β - γ]-L-5' 的顺序编码 10 个转录单位, 目前已经确定了其中 5 种主要结构蛋白, 包括核蛋白 (Nucleoprotein, N)、磷蛋白 (Phosphoprotein, P)、基质蛋白 (Matrixprotein, M)、糖蛋白 (Glycoprotein, G) 和 RNA 依赖性聚合酶 (Large multi-functional

enzyme, L), 还有 1 个比较特殊的非结构糖蛋白 II (Non-structural glycoprotein II, *G*_{NS}), 其基因为位于 *G* 基因下游的第 2 个糖蛋白基因, 但在病毒粒子中并未发现该蛋白, 可能在自然感染宿主的过程中发挥作用^[8]。

在我国, 牛流行热于 1934 年首次在江苏省被报道。自 1955 年以来, 该病迅速传播扩散到我国的 25 个省份, 其中, 包括平均海拔超过 4 000 m 的西藏地区^[9]。1991 年 8 月位于我国 44°N 的吉林省某些地区报道出现了牛流行热。2011—2014 年, 对奶牛、水牛和牦牛进行血清学调查, 在全国 19 个省、5 个自治区和 2 个直辖市均检测到了 BEFV 中和抗体, 其中, 包括东北部的黑龙江^[10]。这些发现表明中国的 BEFV 感染范围可能比临床观察的要广。因此, 本研究对近年流行的病毒进行连续监视, 对了解流行病学模式、遗传进化以及病毒之间的抗原关系至关重要。

1 材料与方法

1.1 病毒株

JM 2020 病毒原液分离于广东省江门市疑似牛流行热病牛全血, 将牛全血样品接种入乳鼠脑内盲

传 3 代, 每代乳鼠脑组织都进行 RT-qPCR 检测^[11]。将第 3 代检测结果为阳性的脑组织匀浆处理后, 用高速冷冻低温离心机在 4 ℃ 条件下, 6 000 r/min 离心 10 min, 取上清液接种于 BHK-21 细胞, 传代培养有明显病变后收集病毒液。采集的全血和冻存的病毒液均保存于华南农业大学兽医学院外科实验室。

1.2 主要试剂

通用 RNA 提取试剂盒购自广州东盛生物科技有限公司, RNA 反转录试剂盒购自 TaKaRa 有限公

司, DNA 纯化回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司, pEASY®-Blunt Simple Cloning Kit 试剂盒购自全式金试剂公司, 细胞用 DMEM、PBS 以及预染蛋白 Marker 购自赛默飞世尔科技有限公司。

1.3 引物设计

从 GenBank 下载已发表的 BEFV 全长基因组序列^[12], 使用 Primer Premier 5.0 软件设计 G 基因以及 10 个片段引物(表 1)。所有引物均合成于广州天一辉远基因科技有限公司。

表 1 扩增 G 基因以及 JM 2020 全基因组序列引物
Table 1 Primers employed for the amplication of G gene and whole genome of JM 2020 strain

扩增片段 Amplified fragment	名称 Name	序列(5'→3') Sequence	位置/bp Location	产物大小/bp Size of product
G	BEFV G F	ATGTTCAAGGTCCTCATAATTACC	3 059~3 082	1 872
	BEFV G R	TTAATGATCAAAGAACCTATCATCACCGATTGGTTTAC	4 893~4 930	
1	BEFV1F	ACGAGAAAAAACAAAAAAC	1~20	820
	BEFV1R	GATACAAAAATCCAATCAAG	801~820	
2	BEFV2F	ACAAGGATGCCGCAGGAC	730~747	2 120
	BEFV2R	TCCCTCTTCTTTTGCTC	2 832~2 849	
3	BEFV3F	ATTCATCCTAGAGATCAGG	2 737~2 752	1 455
	BEFV3R	ACCATCCCCCTCTTGTTG	4 173~4 191	
4	BEFV4F	CTCTGTTTGCCTTACCAG	4 112~4 127	2 066
	BEFV4R	AATGACAGTATCTTCATCAG	6 158~6 177	
5	BEFV5F	TAGCCAGGCAAGCATCCTG	6 002~6 019	2 196
	BEFV5R	TGGATTACTCTCTTGATCAAACATGC	8 170~8 197	
6	BEFV6F	AGTGAGATAGATATATGTGATATTCC	7 898~7 823	864
	BEFV6R	TGCAAATATATGATGAGAATCTTC	8 738~8 761	
7	BEFV7F	ATGAAGAGGAGTCCATGGAC	8 520~8 539	1 275
	BEFV7R	TGGGCCAAGTATTATGACTG	9 775~9 794	
8	BEFV8F	ATTTGGACATAAGTGGACGGTG	9 099~9 120	1 904
	BEFV8R	TCCATTAATTGCATCATGGGGTC	10 980~11 002	
9	BEFV9F	CAGACAATCAGCATGTG	10 643~10 659	2 181
	BEFV9R	TACAGTTCCTTGAAGTGC	12 806~12 823	
10	BEFV10F	AAACTTGACTCATCGCAG	12 758~12 775	2 185
	BEFV10R	ACGAAGAAAAACAAATAAAATAC	14 920~14 942	

1.4 RNA 提取

根据通用 RNA 提取试剂盒说明书提取病毒液样品总 RNA, 取 200 μL 病毒液样品至无 RNA 酶的离心管中, 避光加入 1 mL RL 溶液, 涡旋震荡 15 s 后室温静置 5 min; 加入 200 μL 三氯甲烷, 涡旋震荡 15 s 后室温静置 3 min; 高速低温离心机 4 ℃、

12 000 r/min 离心 10 min, 样品将分为 3 层, 取第 1 层水相层到新的无 RNA 酶的离心管中; 加入水相层 50% 体积的无水乙醇, 混匀后将溶液转移到纯化柱中, 4 ℃、12 000 r/min, 离心 30 s, 弃废液; 加入 500 μL RPI 溶液, 4 ℃、12 000 r/min 离心 30 s, 弃废液; 加入 500 μL RW 溶液, 室温静置 2 min, 4 ℃、

12 000 r/min 离心 30 s, 弃废液; 加入 500 μ L RW 溶液, 室温静置 2 min, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 30 s, 弃废液; 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 2 min, 充分晾干; 将纯化柱转移到新的无 RNA 酶的离心管中, 加入 30 μ L RNase-free ddH₂O 室温静置 2 min, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 2 min, 得到总 RNA, 储存于-80 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

1.5 G 基因及全基因组的扩增

PCR 扩增 G 基因及有重叠序列的 10 个片段, 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s、55 $^{\circ}$ C 15 s、72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 扩增产物于 15 g/L 琼脂糖凝胶中进行电泳, 结束后使用凝胶成像系统拍照观察; 切下目的胶块用于纯化回收 DNA 片段; 连接 pEasy[®]-Blunt 载体后, 转化 Trans1-T1 感受态细胞, 挑取单克隆菌落经 PCR 鉴定为阳性菌落后测序。

1.6 G 基因进化分析及全基因组序列分析

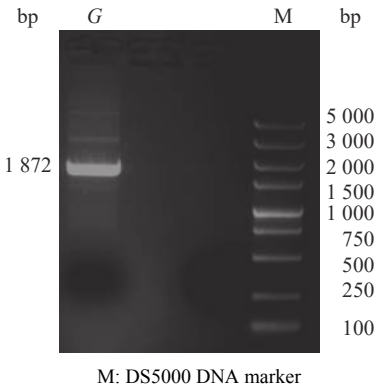
对 JM 2020 毒株 G 基因全长序列、疫苗株 JB76H、JT02L、LS11 2011 等以及不同地区野毒株共 70 株毒株进行系统进化分析, 使用 DNASTar 中 Editseq 和 Megalign 对 G 基因核苷酸序列及其推导的氨基酸序列进行编辑和相似性比较, 并使用 MEGA 6.0 绘制 BEFV G 基因系统发育进化树, 分析获得的野毒株 G 基因与其他地理株之间的差异。选取分支代表序列, 先用邻近法构建初步进化树, 然后用最大似然法重复计算构建进化树。

2 结果与分析

2.1 G 基因与全基因组的扩增

以反转录的 cDNA 为模板, 使用设计的引物分

别对 G 基因 (图 1) 及 10 个片段 (图 2) 进行全基因组扩增, 电泳结合测序结果显示在 1 872、820、2 120、1 455、2 066、2 196、864、1 275、1 904、2 181、2 185 bp 处有明亮条带, 与预期结果相符。将测序结果比对应后进行拼接, JM 2020 全长为 14 902 nt。



M: DS5000 DNA marker
图 1 PCR 扩增 G 基因

Fig. 1 PCR amplification of G gene

2.2 G 基因序列相似性及系统进化分析

为了更详细地研究广东 BEFV 毒株的遗传进化关系和分子流行病学, 使用 MEGA 6.0 软件对测序所得的 BEFV G 基因与 Genbank 下载的国内外共 70 株毒株 G 基因进行分析并构建遗传进化树, 结果显示, BEFV 感染区域主要分为东亚、澳大利亚及中东 3 个地区; 本毒株与中国、日本及泰国流行的毒株处于一大分支, 与 qy2017/China/2017、TH/NMA0012/2015/Thailand/2015、TH/NMA0025/2015/Thailand/2015、TH/NMA0076/2013/Thailand/2013、TH/NM0072/2017/Thailand/2017 关系较近, JM 2020 与疫苗株 JB76H 处于不同小分支, 关系较远 (图 3)。

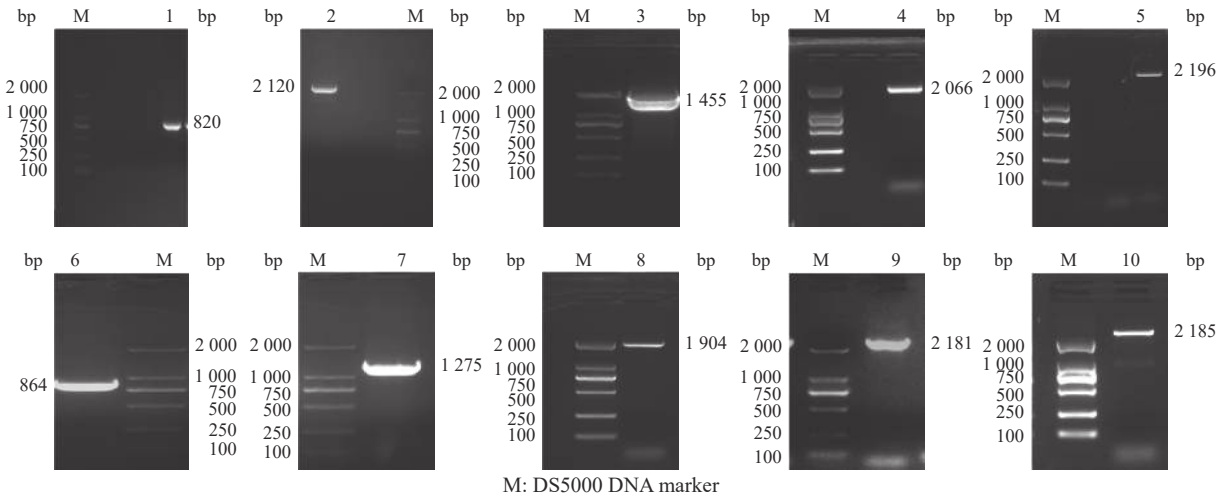


图 2 全基因组 (G 基因及 10 个片段)PCR 扩增结果

Fig. 2 Results of whole genome (G gene and 10 fragments) amplification by PCR

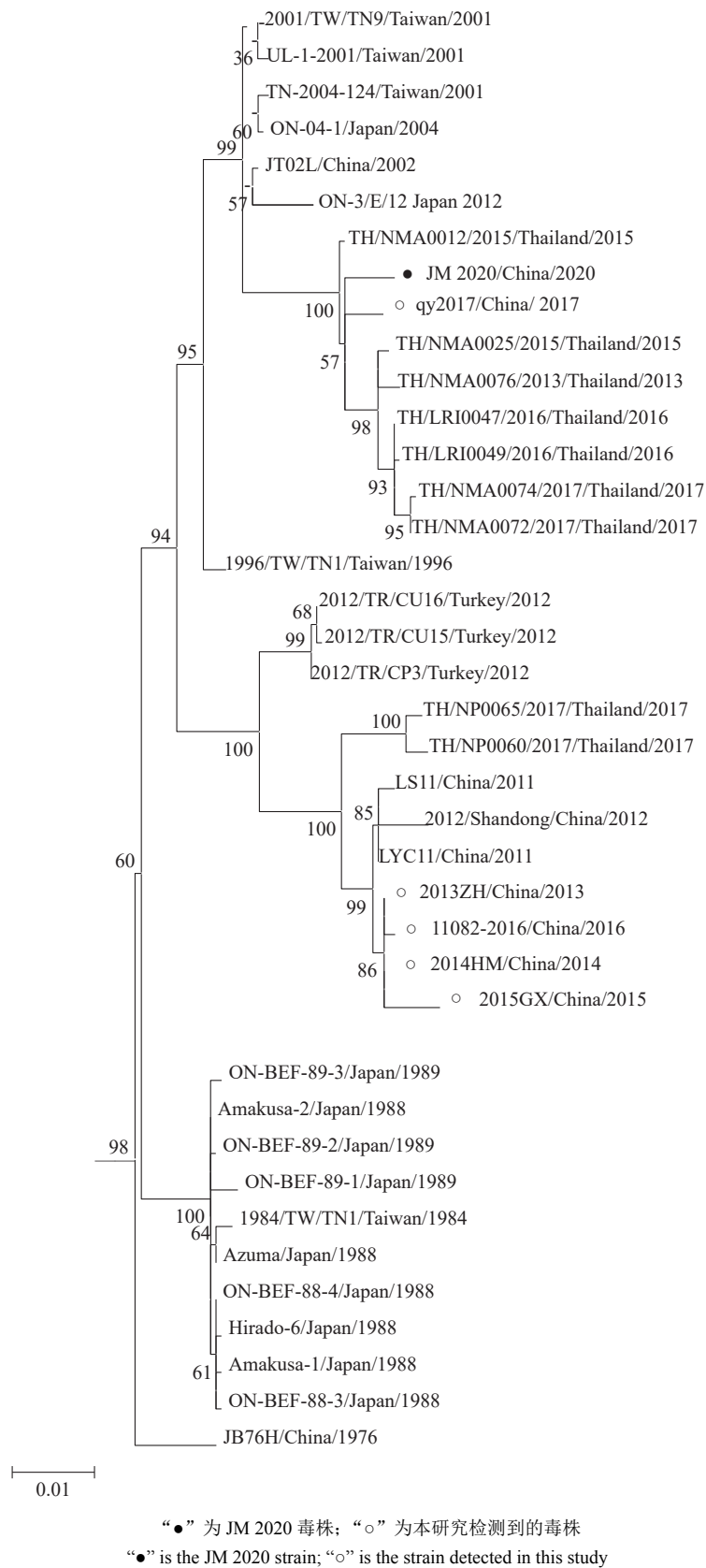


图 3 JM 2020 G 基因进化树
Fig. 3 Phylogenetic tree of JM 2020 G gene

核苷酸序列相似性比对发现, JM 2020 G 基因和全球 BEFV G 基因之间的核苷酸序列相似性为 90.1%~99.3%; 其中, 与澳大利亚毒株的相似性最低, 为 90.1%~91.1%, 与中东毒株相似性为 92.0%~92.4%, 与国内流行株相似性为 95.5%~98.9%, 与泰国地区毒株相似性为 94.9%~99.3% (图 4)。

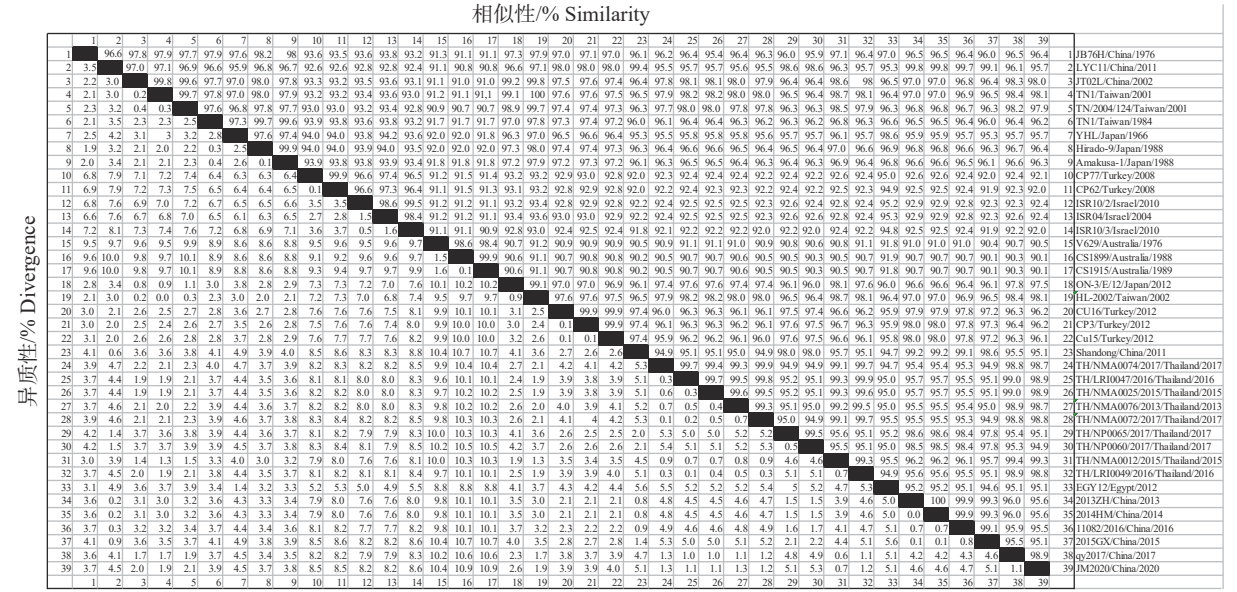


图4 JM 2020 毒株 G 基因核苷酸相似性分析 (部分)

Fig. 4 Nucleotide similarity analysis of G gene of JM 2020 strain (part)

G 蛋白相对分子质量为 72 300, 含有特异的中和抗原位点, 是诱导牛保护性免疫的主要抗原蛋白^[13]。G 蛋白包括 4 个抗原位点: G1(第 487~503 aa), G2(第 168~189 aa), G3(第 49~63 aa、第 215~231 aa 和第 262~271 aa) 和 G4(第 455~482 aa); G 基因序列有较高的保守性, 在毒株之间具有超过 90% 的相似性; G 蛋白抗原位点分析发现, 在高保守性抗原蛋白的 G2(T170N)、G3(K53N、G263E) 及 G4(K461E、I475M) 出现 5 个氨基酸位点突变(图 5), 这可作为近年来 JB76H 疫苗对广东地区保护效果差的原因之一。

2.3 全基因组系统进化树

应用 MEGA 6.0 软件构建 JM 2020 毒株全基因组系统进化树, 结果显示, JM 2020 毒株与泰国毒

株 TH/LRI0045/East Asia/2016 亲缘关系最近, 与南非毒株 RSA/OBP/BEF2008/South Africa/2008 亲缘关系最远(图 6)。

2.4 全基因组结构分析

JM 2020 病毒全基因组的 GC 含量为 33.35%, 包括 1 个 50 nt 的前导序列、1 296 nt 的 N 基因、837 nt 的 P 基因、672 nt 的 M 基因、1 872 nt 的 G 基因、1 812 nt 的 G_{NS} 基因、618 nt 的 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 基因、444 nt 的 β 蛋白基因、345 nt 的 γ 蛋白基因、6 444 nt 的 L 基因和 73 nt 的尾随序列(表 2)。每个基因的转录起始信号和转录终止信号序列保守, 分别为 AACAGG 和 CATGAAAAAAA, 而 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 基因的转录终止信号序列为 CTTGAAAA AAA。

	G3 (49-63 aa)	G2 (168-189 aa)	G3 (215-231 aa)	G2 (262-271 aa)	G4 (455-482 aa)	G1 (487-503 aa)
JB76H/China/1976	QAHHK LAKDEHYNKI	FLTPCTI NDSKTCGCLPKDITG	KSFRS ELNETRLWEAP	I GNQTESDFQ	HTKSI YKGI E EYQKLI KFEVI EYDNI EE	YEEID EKFKP/VNLS PHEK
LYC11/China/2011	N	N	N	E	E	M
LS11/China/2011	N	N	N	E	E	M
J1021/China/2002	N	N	N	E	E	M
Shandong/China/2011	N	N	N	E	E	M
2013ZH/China/2013	N	N	N	E	E	M
2014HM/China/2014	N	N	N	E	E	M
2015GX/China/2015	N	N	N	E	E	M
11082-2016/China/2016	N	N	N	E	E	M
qp.2017/China/2017	N	N	N	E	E	M
JM 2020/China/2020	N	N	N	E	E	M
1996-TW/TN1/Taiwan/1996	N	N	N	E	E	M
HL-2002/Taiwan/2002	N	N	N	E	E	M
THN/P0065/2017/Thailand/2017	N	N	N	E	E	M
TH/LRI0047/2016/Thailand/2016	N	N	N	E	E	M
THNMA0012/2015/Thailand/2015	N	N	N	E	E	M
THNMA0076/2013/Thailand/2013	N	N	N	E	E	M
THNMA0076/2013/Thailand/2013	N	N	N	E	E	M
ON-BEF-01-3/Japan/2001	N	N	N	E	E	M
ON-3/E/12/Japan/2012	N	N	N	E	E	M
EGY12/Egypt/2012	N	N	N	E	E	M
2008-TR-CP62/Turkey/2008	N	N	N	E	E	M
2008-TR-CP77/Turkey/2008	N	N	N	E	E	M
Dakalatt/Egypt/2017/Egypt/2017	N	N	N	E	E	M
Kafr/EI-sheikh/Egypt/2017/Egypt/2017	N	N	N	E	E	M
Dumetta1/Egypt/2017/Egypt/2017	N	N	N	E	E	M
ISR10/2/Israel/2010	N	N	N	E	E	M
CU16/Turkey/2012	N	N	N	E	E	M
CU15/Turkey/2012	N	N	N	E	E	M
CS1899/Australia/1988	N	N	N	E	E	M
CS1915/Australia/1989	N	N	N	E	E	M

“.” 为与对照组毒株氨基酸相同; “-” 为该位置氨基酸缺失

“.” is the same amino acid as the control group; “-” is the amino acid deletion at this position

图5 JM 2020 毒株 G 蛋白抗原位点分析

Fig. 5 Antigenic sites of G protein of JM 2020 strain

表 3 JM 2020 与参考毒株各基因编码区氨基酸序列相似性

Table 3 Amino acid sequence similarity of individual gene coding region between JM 2020 and reference strains	%					
参考毒株 Reference strain	<i>N</i>	<i>P</i>	<i>M</i>	<i>G_{NS}</i>	<i>G</i>	<i>L</i>
Bovine/China/Henan1/2012	99.5	97.8	100.0	76.4	98.6	98.2
qy2017/China/2017	99.5	99.3	88.0	99.5	99.0	99.7
Australian NC 002526.1	97.9	84.5	96.9	92.7	94.4	96.5
Australian AF234533.1	97.9	84.5	96.9	92.7	94.4	96.5
BEFV/Israel /2006	99.1	87.4	98.2	95.2	96.1	97.5
JT02L/China/2002	99.3	97.8	99.6	99.0	98.4	99.3
TH/LRI0045/East Asia/2016	99.5	98.6	100.0	99.7	99.2	99.7
India/2019	99.1	87.1	87.2	94.2	96.3	97.3
RSA/OBP/BEF2008/South Africa /2008	99.1	78.1	87.2	86.9	93.1	96.5
BEFV/Ad12/TUR/2012	98.6	87.1	98.2	93.2	96.5	97.3

95.2%)、*G_{NS}* 蛋白 (平均相似性为 93.0%) 和 *P* 蛋白 (平均相似性为 90.2%)。总体上, JM 2020 毒株各基因与泰国株 TH/LRI0045/East Asia/2016 毒株相比变异最小, JM 2020 全基因组和泰国分离株核苷酸序列相似性最高, 为 99.0%; 这表明广东近年流行株 JM 2020 和泰国分离株很可能具有相同的起源。且有分析显示, BEFV 分离株的进化关系与地理位置密切相关^[16-17]。

3 讨论与结论

牛流行热在广东省每年都有小范围流行^[17], 比中国其他地区更常见。根据本研究前期调研显示, 2013—2017 年, 在两广地区每年都检测到 BEFV, 截至 2022 年, 已检测到包括 JM 2020 在内共 6 株 BEFV 毒株。基于 JM 2020 全基因组序列的分子特征和 *G* 基因的系统发育分析, 证明了 JM 2020 与其他地理区域, 尤其是与泰国的 BEFV 遗传关系较近, 这为 BEFV 在东亚和东南亚之间流通提供了证据。有证据表明, BEFV 分离株之间的系统发育关系与地理位置密切相关^[16-17]。风和动物活体贸易在 BEFV 的跨界传播中起重要作用^[18]。由于季风环流的作用, 夏季风在高温季节给泰国和我国的亚热带地区带来丰沛的降水, 形成温暖湿润的气候, 有利于泰国虫媒介乘风传入中国广东沿海地区, 这为虫媒介的繁殖和传播病毒提供了有利的条件, 由于 BEFV 核苷酸序列数量有限, 东亚和东南亚之间的 BEFV 传播的具体途径仍然未知。中国为泰国农产品最重要的出口市场之一, 但截至 2022 年, 泰国牛肉还未获得中国市场准入许可, 中泰两国还没有牛肉进出口方面的相关协议; 因此, 基本可以排除通过活体贸易传播 BEFV 的可能。

进化分析表明, JM 2020 毒株与 2017 年在广东清远地区检测到的毒株 qy2017 核苷酸序列相似性为 98.9%, 与 2017 年以前广东地区检测到的 BEFV 序列相似性较低。但本毒株与 2013—2017 年的泰国流行株 (TH/LRI0045/East Asia/2015 等)*G* 基因以及全基因组的核苷酸和氨基酸序列相似性均最高, *G* 蛋白氨基酸序列相似性更是高达 99.2%, 这表明近几年所流行毒株应与泰国株密切相关, 且 2 株毒株和泰国株处于同一分支, 很可能具有相同起源。JM 2020 与疫苗株 JB76H、JT02L 等国内毒株核苷酸序列相似性为 95.1%~98.0%, 存在一定进化距离。qy2017 与泰国株的氨基酸序列相似性最高, 为 99.4%, 表明该毒株很可能是从泰国传入, 而 JM 2020 可能是 1 株新的突变株。这一研究对广东地区 BEFV 的流行及进化情况有了一定了解, 丰富中国流行 BEFV 基因库的同时, 为病毒的变异性研究和新型快速诊断技术的研发提供了新的 BEFV 种源, 为开发有效、保护力更强的新疫苗^[19] 提供了依据。

本研究成功扩增且测定了广东近年来流行毒株 JM 2020 全基因组, 绘制了系统进化树, 发现 JM 2020 与泰国株进化关系最近, 核苷酸序列相似性最高, 与澳大利亚毒株最远; 与 JB76H *G* 基因核苷酸序列有一定差异。全基因组结构分析为在基因结构方面对 BEFV 进行分子研究提供了有用信息, 了解 BEFV 的基因进化关系及基因组特征有助于广东省牛流行热流行病学的研究。

参考文献:

[1] WALKER P J. Bovine ephemeral fever in Australia and the world[J]. Current Topics in Microbiology and Immunology, 2005, 292: 57-80.

[2] 刘和斯. 牛流行热的临床特点、症状及防治措施[J]. 畜禽业, 2021, 32(10): 139.

[3] LEE F. Bovine ephemeral fever in Asia: Recent status and research gaps[J]. *Viruses*, 2019, 11(5): 412. doi: 10.3390/v11050412.

[4] JIA K, JIA R R, WANG X B, et al. Genetic characterization of bovine ephemeral fever virus in southern China, 2013–2017[J]. *Virus Genes*, 2020, 56(3): 390-395.

[5] LIN G Z, QIU C Q. Phylogenetic relationships of the partial G gene sequence of bovine ephemeral fever virus isolated from Mainland China, Taiwan, Japan, Australia, Turkey and Israel[J]. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 2012, 11(17): 3217-3222.

[6] STOKES J E, DARPEL K E, GUBBINS S, et al. Investigation of bovine ephemeral fever virus transmission by putative dipteran vectors under experimental conditions[J]. *Parasites & Vectors*, 2020, 13(1): 597. doi: 10.1186/s13071-020-04485-5.

[7] 李成, 谷守林, 姜绍德, 等. 应用电镜技术对牛流行热病毒形态学的研究[J]. 电子显微学报, 1993(1): 35.

[8] 江船. 牛流行热病毒感染宿主细胞差异表达 miRNA 的筛选及其鉴定[D]. 济南: 山东大学, 2018.

[9] LIU D, LI K, ZHANG L, et al. Seroprevalence investigation of bovine ephemeral fever in yaks in Tibetan Plateau of China from 2012 to 2015[J]. *Tropical Animal Health and Production*, 2017, 49(1): 227-230.

[10] LI Z, ZHENG F, GAO S, et al. Large-scale serological survey of bovine ephemeral fever in China[J]. *Veterinary Microbiology*, 2015, 176(1/2): 155-160.

[11] 汪祥斌, 贾坤, 贾荣荣, 等. 牛流行热病毒 TaqMan 实时定量 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 中国兽医学报, 2020, 40(3): 491-495.

[12] WANG F I, HSU A M, HUANG K J. Bovine ephemeral fever in Taiwan[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2001, 13(6): 462-467.

[13] TRINIDAD L, BLASDELL K R, JOUBERT D A, et al. Evolution of bovine ephemeral fever virus in the Australian episystem[J]. *Journal of Virology*, 2014, 88(3): 1525-1535.

[14] CHAISIRIRAT T, SANGTHONG P, ARUNVIPAS P, et al. Molecular characterization of bovine ephemeral fever virus in Thailand between 2013 and 2017[J]. *Veterinary Microbiology*, 2018, 227: 1-7.

[15] 童树喜. 牛流行热的流行病学调查及防治[J]. 中国畜牧业, 2021(5): 72-73.

[16] WALKER P J, KLEMENT E. Epidemiology and control of bovine ephemeral fever[J]. *Veterinary Research*, 2015, 46: 124. doi: 10.1186/s13567-015-0262-4.

[17] ZHENG F, QIU C. Phylogenetic relationships of the glycoprotein gene of bovine ephemeral fever virus isolated from mainland China, Taiwan, Japan, Turkey, Israel and Australia[J]. *Virology Journal*, 2012, 9: 268. doi: 10.1186/1743-422X-9-268.

[18] AZIZ-BOARON O, KLAUSNER Z, HASOKSUZ M, et al. Circulation of bovine ephemeral fever in the Middle East: Strong evidence for transmission by winds and animal transport[J]. *Veterinary Microbiology*, 2012, 158(3/4): 300-307.

[19] 杨金雨, 李赞, 王丹. 重新认识牛流行热及其疫苗[J]. 中国奶牛, 2018(5): 47-49.

【责任编辑 李庆玲】