

系统发生分析发现牛病毒性腹泻病病毒新基因亚型^{*}

徐兴然^{1,2}, 肖昌^{1,2}, 梁 龙³, 余兴龙¹, 张青婵¹, 涂长春^{1**}

(1. 解放军军事医学科学院军事兽医研究所, 长春 130062; 2. 西南农业大学, 重庆北碚, 400716; 3. 解放军军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071)

A New Gene Subtype of BVDV-1 from ZM-95, a Pig-isolated train

XU Xing-ran^{1,2}, XIAO Chang^{1,2}, LIANG Long³, YU Xing-long¹, ZHANG Qing-zhan¹, TU Chang-chun^{1**}

(1. Institute of Military Veterinary, Academy of Military Medical Science, Changchun 130062; 2. Southwest Agricultural University, Chongqing, 400716; 3. Institute of Bioengineering, Academy of Military Medical Science, Beijing, 100071)

Abstract: Two earlier Chinese isolates of *bovine viral diarrhea virus*, bovine CC-184 and pig ZM-95 were phylogenetically analyzed. The E2 gene encoding a major antigenic was obtained by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and nest-PCR. Sequencing results showed that the E2 genes of CC-184 and ZM-95 are 1122 and 1125 nucleotides in length, encoding 374 and 375 amino acids, respectively. Sequence comparison and phylogenetic analyses demonstrated that both isolates fall into the BVDV-1 group and distant from other *Pestiviruses* such as BVDV-2, *Border disease virus* (BDV) and *Classical swine fever virus* (CSFV). The E2 gene of CC-184 had the highest identity (91.8%) with its homologue in the Osloss strain. However, the E2 gene of ZM-95 is significantly divergent from other known Pestiviruses, with the highest sequence identity of 72.4% to strain Oregon c24v. Furthermore, isolate ZM-95 addressed significant evolution distance compared with the other established subgroups of BVDV-1, as indicated by phylogenetic analysis. Taking together with the fact that within BVDV-1 group sequences share at least 85% homology in the subgroup and 69%-75% between different subgroups, we suggested that the ZM-95 form a new subgroup, subgroup F. In addition, the E2 gene of ZM-95 possesses a characteristic variable region, which contains an insertion and encodes unique amino acid residues HYKKK. The low sequence identity with other BVDV-1 strains indicate that ZM-95 likely had an independent evolutionary pathway, and a unique transmission mechanism.

Key words: Pig-isolated BVDV; E2 gene; phylogenetic analyses; new gene subgroup

摘要:本研究对我国首次分离获得的牛源牛病毒性腹泻病毒(BVDV)毒株 Changchun 184(CC-184)和猪源牛病毒性腹泻病毒 ZM-95 进行了遗传衍化关系研究。选择主要抗原 E2 基因为研究对象,首先应用 RT-PCR 及套式 PCR 克隆得到 CC-184 和 ZM-95 的 E2 片段,通过序列测定发现 CC-184 和 ZM-95 E2 基因长度分别为 1,122bp 和 1,125bp,各自编码 374 和 375 个氨基酸残基。核酸序列同源性比较和系统发生分析表明 2 株病毒均属于 BVDV-1,CC-184 与 Osloss 亲缘关系最近,都属于已有的 b 基因亚型,其 E2 基因同源性达 91.8%。而 ZM-95 的 E2 基因有一个特征性的变异区,包含一个密码子序列插入,这一变异区编码了一段有别于其他瘟病毒的五肽氨基酸序列 HYKKK。结果还表明 ZM-95 与 BVDV-1 现有的 5 个基因亚型的亲缘关系均较远,E2 基因同源性最高(与 Oregon c24v)只有 72.4%。而 BVDV-1 亚型内毒株间的同源性大于 85%,亚型间的同源性在 69%~75% 之间,充分说明 ZM-95 是 BVDV-1 中一个新发现的基因亚型。通常认为猪源 BVDV 来源于牛,应该与牛源 BVDV 有十分近的遗

* 收稿日期:2005-05-26,修回日期:2005-07-19

* 基金项目:国家“973”计划资助课题(No. G1999011905)。

作者简介:徐兴然(1967—),男(汉族),重庆籍,讲师,博士,从事动物病毒学及分子病毒学研究。

** 通讯作者:涂长春(1962—),男(汉族),重庆籍,研究员,博士,从事动物病毒学及分子病毒学研究。

Corresponding author. Tel: 0431-7960009. E-mail: changchun_tu@hotmail.com

传关系,但是本研究发现 ZM-95 与其他已知牛源 BVDV 较低的基因同源性说明猪源 BVDV 还具有独立的遗传衍化与传播来源的可能性。

关键词:猪源 BVDV; E2 基因; 系统发生; 新基因亚型

中图分类号:R852.65

文献标识码:A

文章编号:1003-5125(2005)06-0626-06

牛病毒性腹泻病毒(*Bovine viral diarrhea virus*, BVDV)与猪瘟病毒(*Classical swine fever virus*, CSFV)和羊边界病毒(*Border disease virus*, BDV)同属于黄病毒科瘟病毒属的 3 个种。但是随着近年来研究的深入,发现 BVDV 是一大群变异较大、致病性明显不同的病毒,因此,国际病毒分类委员会的报告^[1](2000 年)又将其拆分为 2 个种,即 BVDV-1 和 BVDV-2。瘟病毒复杂的遗传多样性^[2,3,4,5]使得基因分型在各成员病毒分类研究中的地位日趋重要,主要根据其全基因组、5'端非编码区、N^{pro} 基因和 E2 基因序列对不同毒株进行基因型划分,而且利用这些基因片段分型的结果基本一致。此外,血清学反应、动物感染谱、致病性特征也是一个常用的分型依据。

BVDV-1 是瘟病毒属的代表种,因其毒株变异大,感染宿主范围广,除感染牛外,还可以跨种间感染绵羊、猪、鹿及其他野生动物,造成发病,因而受到国际病毒学研究的高度重视。BVDV-1 的基因和蛋白结构与其他瘟病毒一致。其基因组为单股正链 RNA,大小约为 12.3kb,包括一个大的开放阅读框(ORF)和两侧的非翻译区(UTR)。ORF 编码一个多聚蛋白,然后在宿主细胞和病毒自身蛋白酶作用下,进一步加工为成熟的蛋白,包括结构蛋白 C, E^{rns}, E1, E2, 非结构蛋白 N^{pro}, p7, NS2-3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B^[6,7,8]。

国内自 1984 年首次从发生牛病毒性腹泻病牛的流产胎儿中分离得到一株 BVDV,即本实验所用的 CC-184 以来^[9],对 BVDV 的生物学特性和流行病学进行一些相关的研究,随后于 1995 年首次从疑似猪瘟病毒感染的猪体内分离得到另一株 BVDV,即本实验所用 ZM-95^[10]。但是我国 BVDV 的研究工作仍然不多,毒株的遗传背景和分类地位的研究还未见报道,更不清楚这一病毒是如何在我国牛和猪之间进行传播的。本文首次报道了我国 BVDV 的基因测序和系统发生分析,发现一个新的 BVDV-1 基因亚型。研究结果还首次提出猪源 BVDV 感染具有不同的遗传衍化与传播来源的可能性。

1 材料与方法

1.1 实验材料

BVDV CC-184 和 ZM-95 由本实验室首次分离并保存,均为第 5 代 MDBK 细胞培养物。TRIZOL LS REAGENT 和逆转录试剂盒 THERMOSCRIPT RT-PCR SYSTEM (Invitrogen 公司); Agarose Gel DNA Extraction Kit (Roche 公司); Taq plus DNA polymerase(BBI 公司); T4 连接酶, pGEM-T 载体(Promega 公司); *E. coli* DH5 α 。

1.2 引物设计

对 GenBank 已发表的多个 BVDV-1 序列进行分析比较,应用软件 Vector NTI 3.0 和 DNASTAR 在 E2 基因的上下游设计 4 条引物:

F1: CT(GC)ACAACAGC(AT)GTAATACC,
F2: GACCA(AG)ATTGGTGGCCTTATGAGAC,
R1: CC(CT)(AG)AGGC(CT)(AT)T(CT)TGTT
CTGATA

R2: A(CT)T(AG)T(CT)ATG(GT)GTTA(AG)
CAAGTTGGC,

引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3 RT-PCR 及套式 PCR

取 250 μ L 细胞培养液用 TRIZOL LS REAGENT 提取其总 RNA,取提取的总 RNA,以 6-mer 随机引物,按 THERMOSCRIPT RT-PCR SYSTEM 说明书进行反转录获取第一链 cDNA,然后以 cDNA 为模板,用引物 F1/R2、F1/R1、F2/R1、F2/R2 配对进行 PCR 扩增。

1.4 PCR 产物的克隆及序列测定

用 Agarose Gel DNA Extraction Kit 纯化套式 PCR 产物,分别克隆至 pGEM-T 载体中,转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。蓝白斑筛选,挑取白色菌落做 PCR 快速鉴定,挑选 PCR 阳性克隆小提质粒,每一 PCR 产物最少获得 3 个克隆,然后挑选 2~3 克隆送 TaKaRa(大连)公司进行序列测定。对测序结果进行 Blast N 分析,确定所得到的序列为 BVDV 毒株序列。

1.5 序列比较分析

根据已确定的 E2 基因序列,应用 DNASIS 软件在系统默认参数下分析 CC-184 和 ZM-95 E2 基因与已发表序列毒株 E2 基因的同源性。用 DNASTAR 软件包对两个毒株的 E2 基因和 E2 蛋白

序列进行分析。

1.6 系统发生分析

用 Clustalx 软件对 BVDV CC-184 和 ZM-95 E2 基因和 E2 氨基酸序列与 GenBank 已发表序列进行序列对齐,应用 treepuzzle5.0 和 PHYLIP 软件包按 bootstrap 方法进行系统发生分析,分析应用的程序有 seqboot、neighbor、dnapars、dnaml 和 consense,treepuzzle。分析计算参数设定为 1000 次重复,其余参数为系统默认值。以 seqboot 和 consense 程序对系统发生树进行统计分析并计算 bootstrap 值,用 TreeView 软件编辑所生成的系统进化树并输出进化树图。分析用序列均源于 GenBank 数据库。同时应用 PHYLIP 软件包按 bootstrap 方法,用 seqboot、protpars、proml 和 consense 程序分析相应毒株的 E2 蛋白序列。根据分析得到的系统发生树确定两个毒株遗传衍化关系。

2 结果

2.1 2 个毒株 E2 基因的扩增与克隆

参照已发表的多个 BVDV 毒株基因组序列,分析它们基因组 2000~4000 bp 之间的同源性,设计了覆盖 BVDV-1 E2 基因的 4 条简并引物。RT-PCR 结果表明,以套式 PCR 扩增得到了预计大小约为 1.4 kb 的 F2/R2 基因片段(图 1)。将 2 个毒株的 F2/R2 基因片段分别克隆到 pGEM-T 载体中,转化 *E. coli* DH5 α 筛选得到 pT-184-F2/R2 和 pT-ZM-F2/R2 质粒。测序结果表明:CC-184 F2/R2 基因片段大小为 1391bp,ZM-95 F2/R2 基因片段为 1394bp,与预期结果相符。

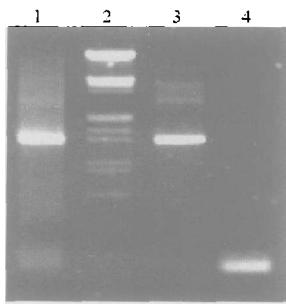


图 1 CC-184 和 ZM-95 RT-PCR 扩增结果

Fig. 1 RT-PCR result of BVDV-1 strain of CC-184 and ZM-95

1,CC-184 F2/R2;2, λ DNA EcoR I / Hind III Marker ;3,ZM-95 F2/R2;4,no template control.

2.2 E2 基因界定及其序列分析

用 DNASIS 和 DNASTAR 软件分析测序结果,根据真核细胞信号肽酶切点的-1 和-3 原则,并参考文献综合分析^[11,12]和 Blast 分析,确定 E2 基因

序列。结果表明 BVDV CC-184 E2 基因长度为 1,122bp(GenBank 登录号 AF526380),编码 374 个氨基酸残基(AAM88293.1),ZM-95 E2 基因片段长度为 1,125bp(GenBank 登录号 AF526381),编码 375 个氨基酸(AAM88294.2)。多序列比较发现,两个毒株 E2 基因序列 5' 端变异较大,而 3' 端较为保守,这与已报道的 BVDV 毒株 E2 基因的变异特点相一致。推导的 E2 氨基酸序列分析结果表明,两个毒株 E2 蛋白的 N 端变异性较大,而 C 端在瘟病毒属内较为保守;且均含有 4 个潜在的保守的糖基化位点 N-X-T 或 N-X-S。ZM-95 在 E2 蛋白第 55 位氨基酸残基处有一个组氨酸插入,其原因是在其 E2 基因序列的 163bp 处插入了一个密码子 CAC,紧接插入密码子后是一段高变区,这一高变区与插入密码子一起形成了 ZM-95 E2 氨基酸序列上的一个有别于其他瘟病毒的特征序列 HYKKK,与这一 5 肽序列相似的序列(HRKHK)仅在 Deer-GB1 和 KS86-1(+)两个毒株中发现(图 2)。

2.3 E2 基因同源性分析

用 DNASIS 软件分析了 CC-184 和 ZM-95 E2 基因与已发表瘟病毒 E2 基因的同源性,结果显示(表 1),CC184 E2 基因与 BVDV-1 Osloss E2 基因同源性最高,为 91.8%;而与 BVDV-2 890、CSFV shimen、BDV X818、Reindeer-1 H138 和 Giraffe-1 V60 Krefeld E2 基因的同源性较低;ZM-95 与已分析的 BVDV-1 各代表毒株的同源性在 68.5%~70.5% 之间,与属内其他 3 个种的代表毒株的差异更大,表明 ZM-95 是一从未报道过的新毒株。两个毒株由 E2 基因推导的氨基酸序列与瘟病毒属毒株间的同源性分析结果与核苷酸分析结果相似。

2.4 CC184 和 ZM-95 的遗传分类地位

应用 treepuzzle5.0 和 PHYLIP 软件包分析两个毒株与瘟病毒代表毒株的亲源关系,确定两个毒株的分类地位。结果(图 3)表明:通过 E2 基因分析能准确区分瘟病毒属内已确定的四个种,各参考毒株的分型地位与国外报道完全一致。构建的系统发生树结果显示 bootstrap 值除 ZM-95 为 78% 外均达到 100%,表明分析结果的高度可信^[13,14]。这一系统分析发现:CC-184 和 ZM-95 属于 BVDV-1,其中 CC-184 与 BVDV-1 代表毒株亲缘关系较近,而 ZM-95 则呈现出与 BVDV-1 毒株间的亲缘关系有一定的距离,在遗传进化上是介于 BVDV-1 和

4 0	5 0	6 0	
HEY S A K M R L K D T M V K V W C K E G Q F T	<u>HYKKK</u>	C A R - E S R Y L	ZM-95
Y . . . D G . Q . S . . . E . R . . G . E . I - F V Q . . K T . . T . . .			Sh9
K . . . P G . K . E . . . A . . E D . K L M - . L Q R . T . . T . . .			NADL
KD . . H G . T . E . . . A . . D . K L . . . Y A R . T . . T . . .			Oregon c24v
KD . . P E . M . E D . K L . . . Y Q R . T . . T . . .			nose
Y . . . D G . . . Q . . . G . V . . . G . E I K - . L I T . E . . . A . . .			Osloss
Y . . . D G . . . Q . . . E . V . . . D . E I K - . L I T . E . . . A . . .			CC-184
Y . . . D G . . . Q . . . A . V . . . D . E . I - . Q T I . E . . . A . . .			H
R . . K P . . Q . A L . . . D . E . V - <u>H R . . . G K</u> A . . .			Deer-GB1
Q . . K P . . Q . A L . E . . . D . E . V - <u>H R . . . G K</u> A . . .			KS86-1(+)
KD . . P G . . V . . . V A . . . D . . . I M E R . . . A . . .			519
KD . . P G . K . E . . . I A . . D . . . I - F M E R . . . A . . .			Deer-NZ1
. R P T K - - K . V . S . . Q . . . E G K D L K - I L . T . P K . . E . . .			890
D . K F D L K I Q . P L . M . Y . . N D . . F - V G . R . K A G . A . . .			giraffe-1
T D . R G N L E . D . G T . R A T . S R . F . R - F R G H . M I . G P . . .			X818
V D . K R N L Q . D . G T . R A V . S N . Y . R - I P P T . L I . G . . F I			reindeer-1
K . . H D L Q . N . G T . . A I . V A . S . K - V T A L N V V . S R . . .			Shimen
K . . N H D L Q . N . G T . . A I . V A . S . K - V T A L N V V . S R . . .			Alfort

图 2 瘤病毒 E2 蛋白序列比较分析结果

Fig. 2 Multiple alignment result of E2 glycoprotein of pestivirus viruses

GenBank accession numbers. EVDV-1: ZM-95 (AF526381), SH9 (AF144616), NADL (M31182), Oregon c24v (AF091605), Nose (AB033752), Osloss (M96687), CC-184 (AF526380), H (AF098157), Deer-GB1 (AF144615), KS86-1(+) (AB033753), 519 (AF144610), Deer-NZ1 (AF144614); BVDV-2, 890 (U18059); Giraffe-1, V60 Krefeld (AF144617); BDV, X818 (AF037405); Reindeer-1, H138 (AF144618); CS-FV, Shimen (AF092448), Alfort (J04358). Box indicates the HYKKK sequence of ZM-95, the HRKK sequences of Deer-GB1 and KS86-1(+) are underlined

表 1 BVDV CC-184 株和 ZM-95 株 E2 基因与瘤病毒毒株间的同源性分析(%)

Table 1 Results of homology analyses of BVDV CC-184 and ZM-95 E2 gene with pestiviruses

BVDV-1					BVDV-2	CSFV	BDV	Reindeer-1	Giraffe-1
Osloss	ILLC	CP7	NADL	SD-1	(890)	(shimen)	(X818)	(V60-Krefeld)	H138
CC-184	91.8	84.4	86.1	70.6	71.5	56.0	49.9	53.6	47.7
ZM-95	68.5	67.8	69.3	69.5	70.5	55.7	51.8	54.6	52.0

GenBank accession numbers. ILLC(U86599), SD-1(M96751) CP7(U63479)

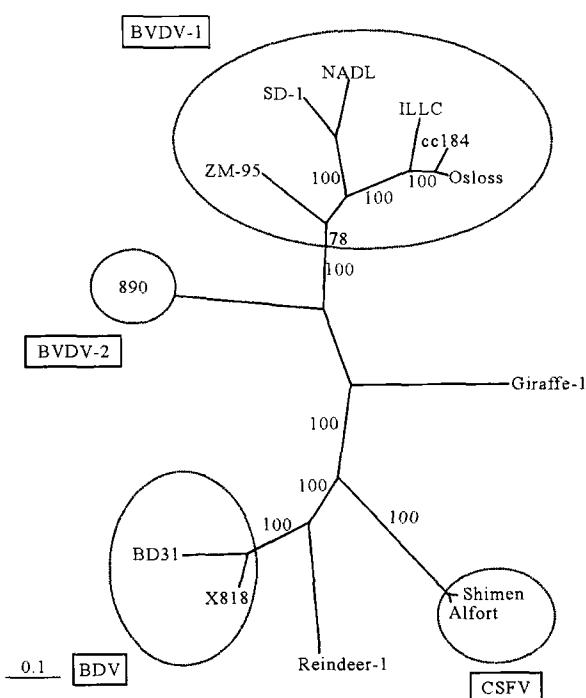


图 3 CC-184 和 ZM-95 株与其他瘤病毒代表株的 E2 基因系统发生分析

Fig. 3 Phylogenetic tree of CC-184 and ZM-95 with other pestiviruses

GenBank accession numbers; BD31(U70263)

BVDV-2 中间的一个毒株,这与同源性分析结果相一致。

2.5 CC-184 和 ZM-95 株的基因亚型

与瘤病毒属内 4 个已确定的种和 2 个尚未确定分类的代表毒株进行的系统发生分析结果表明 CC-184 和 ZM-95 均为 BVDV-1。BVDV-1 毒株很多, 变异较大, 因此基因亚型也多, 不同型间存在着较为明显的遗传差异, 我们分析了 BVDV-1 各基因亚型内和亚型间毒株^[4]的同源性, 结果表明同亚型毒株间的同源性大于 85%, 亚型间毒株间的同源性在 69%~75% 之间(数据未报)。而 ZM-95 与各亚型毒株间的同源性最高才达到 72.4% (Oregon c24v)。表 2 和图 3 表明 ZM-95 应该是一株新的 BVDV-1 变异株, 但与 BVDV-1 各型之间具有何种演化关系及其在遗传进化中是如何分化的仍不清楚, 为此, 我们选择 BVDV-1 各型的主要代表毒株与 ZM-95 进行了进化树的构建。将两个毒株 E2 基因与 BVDV-1 毒株进行多序列分析以确定它们的基因亚型, 分析结果(图 4)表明本研究通过 E2 基因对 BVDV-1 毒株的分型与国外的报道是一致的, 分为 a、b、c、d、e 5 个亚型, CC-184 株属于 b 亚型; ZM-95 株与已确定的五个亚型的遗传距离较远, 呈现出

相对独立的遗传衍化分枝,表明ZM-95株可能属于一个新的亚型,命名为f。分析所选毒株序列来源于GenBank,毒株来源于不同地域和不同的宿主,其中H株为荷兰分离的猪源BVDV-1毒株^[15],分析结果显示ZM-95株与其他猪源BVDV-1毒株在遗传衍化上无关。同时,ZM-95与地域较近的日本分离毒株Nose和KS86-1(+)也无遗传衍化相关性,这表明ZM-95可能具有独特的遗传衍化关系。Bootstrap值为84%~100%,显示系统进化树有很高的可信度(图4)^[13,14]。

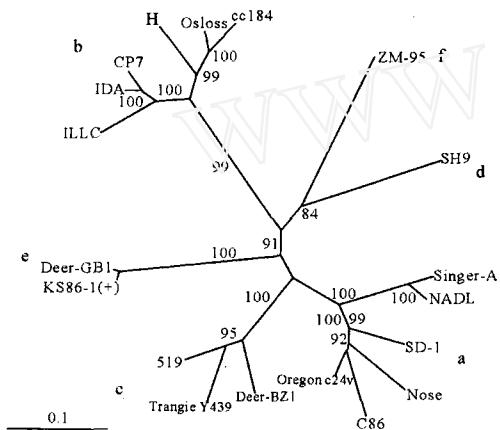


图4 基因亚型分析结果

Fig. 4 Subgroup analyses result of CC-184 and ZM-95 with BVDV-1

GenBank accession numbers. Singer-A (AF083348), Trangie Y439 (AF049222), IDA(AJ238812), C86(AF144611)。

3 讨论

CC-184株是我国于1983年首次从发生牛病毒性腹泻病牛的流产胎儿中分离到的BVDV毒株,在MDBK细胞中增殖可出现明显的空泡病变^[9];ZM-95株是从内蒙古哲盟地区自然感染的在临床及病理学诊断为疑似猪瘟的病料(用RT-PCR检测为CSFV阴性)中分离得到的“猪源”BVDV毒株^[10]。我们根据GenBank已发表毒株序列,通过计算机软件对这些序列中包含E2基因的区域进行分析比较,设计了2对简并性引物,成功地扩增了这2个毒株的E2基因。

随着分子生物学技术的进步和生物信息学分析软件完善,对瘟病毒变异与系统发生研究受到国外学者的高度重视,已分离的毒株被重新分类和确定亚型^[16,17]。分类瘟病毒可选择病毒基因组全序列或5'UTR、N^{pro}和E2基因。E2基因是瘟病毒的主要保护性抗原编码基因,在瘟病毒结构蛋白基因中变异较大,代表着毒株的遗传特性, van Rijn等^[18]通过对E2蛋白的同源性和抗原性将BVDV-1分为

a和b亚型,Becher等^[4]通过对瘟病毒N^{pro}和E2基因序列分析,将BVDV-1划分为a、b、c、d和e5个基因亚型,BVDV-2和CSFV分为a、b两个亚型。Avalos-Ramirez^[19]等通过分析瘟病毒的E2基因序列和病毒的抗原性的相似形,认为瘟病毒的分类应在现已确定的4个种的基础上将Reindeer-1 H138和Giraffe-1 V60 Krefeld列为两个种。我们克隆并分析了两个中国BVDV-1毒株的E2基因,系统发生分析结果显示:CC-184株属于BVDV-1 b亚型,ZM-95株并不属于已确定的基因亚型,形成了一个独立基因亚型(f),并可能具有独特的遗传衍化关系。

除CSFV外^[20],瘟病毒属内的成员具有较大的变异性,基因变异使其具有良好的环境适应性和较广的感染宿主。序列分析结果证实,同一地域不同宿主间的瘟病毒感染毒株间并无明显的基因亚型相关性,我们的分析结果也证实这一点。在分析的毒株中,猪源毒株V360株^[4]、H^[16]及本文报道的ZM-95株则分别属于a、b和f型。

猪感染BVDV首次报道于1976年^[21],猪感染BVDV后可以出现类似猪瘟样的临床症状,并认为牛是猪感染BVDV的传播来源^[22-24]。但是目前国际上尚未开展猪源BVDV的系统发生研究,还不明确猪源BVDV的进化途径,我们通过基于E2基因的系统发生分析,首次揭示猪源BVDV除来源于牛的传播外,还具有独立的遗传衍化来源的可能性。

参考文献

- [1] Heinz F X, Collett M S, Purcell R H, et al. Family Flaviviridae. In "Virus Taxonomy". Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Virus" [M]. Academic Press, San Diego. 2000. 859-878.
- [2] Ridpath J F. BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control [J]. Biologicals, 2003, 31: 127-131.
- [3] Nagai M, Ito T, Sugita S, et al. Genomic and serological diversity of bovine viral diarrhea virus in Japan [J]. Arch Virol, 2001, 146: 685-696.
- [4] Becher P, Orlich M, Kosmidou A, et al. Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification [J]. Virology, 1999, 262: 64-71.
- [5] Baule C, van Vuuren M, Lowings JP, et al. Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea viruses isolated in Southern Africa [J]. Virus Res, 1997, 52: 205-220.
- [6] Collett M S, Wiskerchen M, Welniak E, et al. Bovine viral diarrhea virus genomic organization [J]. Arch Virol Suppl, 1991, 3: 19-27.
- [7] Thiel H J, Plagemann P G W, Moennig V. Pestiviruses [A].

- [3rd ed. In: Fields Virology[C]. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996, 1: 1059-1073.]
- [8] Tautz N, Elbers K, Stoll D, et al. Serine protease of pestiviruses; determination of cleavage sites [J]. J Virol, 1997, 71: 5415-5422.
- [9] 李佑民, 刘振润. 牛病毒腹泻/粘膜病病毒株(长春184株)的分离与鉴定[J]. 兽医学报, 1983, 3: 113-120.
- [10] 王新平, 涂长春, 李红卫, 等. 从猪瘟病料检出牛病毒性腹泻病毒[J]. 中国兽医学报, 1996, 4: 321-325.
- [11] Rumenapf T, Unger G, Strauss J H, et al. Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses [J]. J Virol, 1993, 67: 3288-3294.
- [12] Elbers K, Tautz N, Becher P, et al. Processing in the pestivirus E2-NS2 region; identification of proteins p7 and E2p7 [J]. J Virol, 1996, 70(6): 4131-4135.
- [13] Holder M, Lewis P O. Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches [J]. Nat Rev Genet, 2003, 4: 275-284.
- [14] Efron B, Halloran E, Holmes S. Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 13429-13434.
- [15] Becher P, Orlich M, Shannon A D, et al. Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants [J]. J Gen Virol, 1997, 78: 1357-1366.
- [16] van Gennip H G, Widjojoatmodjo M N, de Smit A J, et al. An internal duplication in the 5' noncoding region of strain H: a bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolated from pigs [J]. Virus Genes, 1999, 19: 45-49.
- [17] Vilcek S, Belak S. Genetic identification of pestivirus strain Frijters as a border disease virus from pigs [J]. J Virol Methods, 1996, 60: 103-108.
- [18] van Rijn P A, van Gennip H G, Leendertse C H, et al. Subdivision of the pestivirus genus based on envelope glycoprotein E2 [J]. Virology, 1997, 237: 337-348.
- [19] Avalos-Ramirez R, Orlich M, Thiel H J, et al. Evidence for the presence of two novel pestivirus species [J]. Virology, 2001, 286: 456-465.
- [20] Vanderhallen H, Mittelholzer C, Hofmann M A, et al. Classical swine fever virus is genetically stable in vitro and in vivo [J]. Arch Virol, 1999, 144: 1669-1677.
- [21] Carbrey E A, Stewart W C, Kresse J I, et al. Natural infection of pigs with bovine viral diarrhea virus and its differential diagnosis from hog cholera [J]. J Am Vet Med Assoc, 1976, 169: 1217-1219.
- [22] Terpstra C, Wensvoort G. Natural infections of pigs with bovine viral diarrhoea virus associated with signs resembling swine fever [J]. Res Vet Sci, 1988, 45: 137-142.
- [23] Terpstra C, Wensvoort G. A congenital persistent infection of bovine virus diarrhoea virus in pigs: clinical, virological and immunological observations [J]. Vet Q, 1997, 19: 97-101.
- [24] Stewart W C, Miller L D, Kresse J I, et al. Bovine viral diarrhea infection in pregnant swine [J]. Am J Vet Res, 1980, 41: 459-462.