

猪乙脑病毒分离株 BSF.ZZ-1 和 BSF.ZZ-3 在 BHK-21 细胞上的传代培养及 *E* 基因序列稳定性分析

胡 博^{1,2}, 滕 蔓², 禹乐乐², 罗 俊², 迟佳琪^{1,2}, 宿靖伟^{2,3}, 柴书军², 张改平²

(1. 吉林大学 畜牧兽医学院, 吉林 长春 130000; 2. 河南省农业科学院 河南省动物免疫学重点实验室, 农业部动物免疫学重点实验室, 河南 郑州 450002; 3. 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 为研究猪乙脑病毒(JEV)分离株遗传基因的稳定性,将 JEV 分离株 BSF.ZZ-1 和 BSF.ZZ-3 在 BHK-21 细胞上进行连续传代培养,并对其 *E* 基因的遗传稳定性进行了研究。结果表明,经连续传代 60 次后病毒 *E* 基因趋于稳定,BSF.ZZ-1 毒株 *E* 蛋白氨基酸位点 E21(A→V)、E200(T→A)、E244(G→E)、E279(M→K)和 E426(G→D),以及 BSF.ZZ-3 毒株的 E244(G→E)、E255(F→L)、E285(M→L)、E368(L→S)和 E497(N→S)传代后发生稳定点突变。与 JEV 毒力相关的部分位点如 E107、E138、E176、E177 和 E315 遗传稳定性较高,经连续传代后均未发生突变,与疫苗株 SA14-14-2 相应位点完全一致。但是,另外一些位点的遗传稳定性较差,如 BSF.ZZ-3 的 E279(M→K→M)出现反复突变。这些突变是否与 JEV 的宿主细胞适应性及毒力变化相关有待进一步研究。

关键词: 乙脑病毒; BSF.ZZ-1; BSF.ZZ-3; BHK-21 细胞系; 传代培养; *E* 基因; 序列分析

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2013)06-0071-06

Sequence Analysis of the *E* Gene of JEV Isolate BSF.ZZ-1 and BSF.ZZ-3 Passaged in BHK-21 Cells

HU Bo^{1,2}, TENG Man², YU Le-le², LUO Jun², CHI Jia-qi^{1,2},
SU Jing-wei^{2,3}, CHAI Shu-jun², ZHANG Gai-ping²

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130000, China; 2. Henan Provincial Key Laboratory of Animal Immunology, Key Laboratory of Animal Immunology of the Ministry of Agriculture, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China; 3. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In this paper, the genetic stability of *E* gene of JEV isolates BSF.ZZ-1 and BSF.ZZ-3 passaged in BHK-21 cells (Baby hamster kidney cell line) was studied. The results showed that the *E* gene is becoming stable after 60 passages in BHK-21 cells. After serial subcultivation, stable amino acid (aa) mutation happened at the sites E21(F→L), E200(T→A), E244(G→E), E279(N→S) and E426(G→D) in isolate BSF.ZZ-1 and sites E244(G→E), E255(F→L), E285(M→L), E368(L→S) and E97(N→S) in isolate BSF.ZZ-3. No mutations were observed at part of the virulence correlated aa sites, such as E107, E138, E176, E177 and E315, similar to those of vaccine strain SA14-14-2. However, mutations at the virulence correlated aa sites of E279(M→K→M) of BSF.ZZ-3 happened repeatedly. Whether these mutations are correlated with the virulence variation and adaptability of JEV to host cells needs to be further studied.

Key words: JEV; BSF.ZZ-1; BSF.ZZ-3; BHK-21 cell line; Serial subcultivation; *E* gene; Sequence analysis

日本流行性乙型脑炎 (Japanese encephalitis, JE) 是由乙脑病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV) 引起的一种重要的人畜共患传染病^[1]。乙型脑炎

在世界各地都有流行,在我国尤为严重,占世界发病人数的 80% 以上^[2]。继西藏分离到 XZ0934 株^[3]、新疆分离到 XJ/08/01 株^[4]后,我国除青海省外其

收稿日期: 2013-08-01

基金项目: 国家“公益性”行业(农业)科研专项经费(201203082-5)

作者简介: 胡 博(1987-),男,辽宁抚顺人,在读硕士,主要从事微生物与免疫学研究。

通讯作者: 张改平(1960-),男,河南内黄人,研究员,院士,主要从事动物免疫学及重大疫病快速检测技术研究。

他各省均已乙脑流行的报道。蚊虫是 JEV 的主要传播媒介,猪作为最重要的储存宿主,在 JEV 的传播中起到关键作用。JEV 给养猪业带来严重的经济损失。

JEV 属于黄病毒科(Flaviridae)、黄病毒属(*Flavivirus genus*) 病毒基因组全长 11 kb,为单股正链 RNA 病毒,5' 末端有一个 I 型帽子结构(m7GpppAmp),3' 末端多为 CU-OH,无 poly A 尾巴^[5]。全基因组含 1 个开放型阅读框,编码 3 个结构蛋白和 7 个非结构蛋白^[6]。其中 E 蛋白是 JEV 的主要结构蛋白之一,在保护性免疫及防治病毒感染中起重要作用^[7]。E 蛋白氨基酸序列的变化可导致病毒毒力的改变。氨基酸残基位点 E107、E138、E176、E177、E264、E279、E315、E439、NS2b-63、NS3-105 和 NS4b-106 等被认为是 JEV 减毒过程中的关键突变位点,与 JEV 毒力直接相关^[8]。此前,王兴涛等^[9]从河南某规模化种猪场发病种公猪的精液中分离到 2 个 JEV 毒株 BSF. ZZ-1 和 BSF. ZZ-3。BSF. ZZ-1、BSF. ZZ-3 对 3 日龄乳鼠致死率分别为 66.7%、100%,但乳鼠发病时间较晚,约 7~10 d。*M* 基因和 *E* 基因系统进化树分析表明,这 2 个分离株均属于 JEV 基因 III 型,与疫苗株 SA14-14-2 进化关系最近^[9]。全基因组序列分析发现,这 2 个分离株与 SA14 强毒株核苷酸序列同源性分别为 99.8% 和 99.7%,氨基酸序列同源性均为 99.1%,但与疫苗株 SA-14-14-2 存在多个氨基酸关键位点的差异,提示这些位点的回复突变可能导致毒力返强^[10]。本研究对 BSF. ZZ-1 和 BSE. ZZ-3 在 BHK-21 细胞上进行了连续传代,并对多个代次病毒的 *E* 基因序列进行分析,以期研究其在细胞传代过程中基因的稳定性及关键氨基酸位点的变化情况。

1 材料和方法

1.1 病毒株、细胞及主要试剂

BSF. ZZ-1、BSF. ZZ-3 毒株(均分离自河南某规模化猪场临床病例)和 BHK-21 细胞系均由河南省动物免疫学重点实验室保存备用;新生牛血清(NCS)购自杭州四季青公司;DNA 回收试剂盒、pMD19-T 载体、*ExTaq* 酶、*E. coli* DH5 α 感受态细菌、M-MLV 逆转录酶、RNA 酶抑制剂和 dNTP 均购自 TaKaRa 公司;TRIzol 购自 Invitrogen 公司。

1.2 引物设计

根据 NCBI GenBank 已报道 JEV 基因组序列,用 Primer Premier 5.0 软件设计 1 对 *E* 基因特异性引物,上游引物为 JEVpE-F958: 5'-TTGGTCGCTCCG

GCTTACAG-3',下游引物为 JEVpE-R2532: 5'-GCC ACTTCCACACCTCATCT-3'。上述引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 病毒传代培养

按常规方法复苏 BHK-21 细胞,连传 3 代使细胞复壮 0.25% 胰酶消化后用含 8% NCS 的 DMEM 稀释细胞,以 1.25×10^6 个细胞/瓶的初始量接种到 25 cm² 细胞瓶中进行培养,制备细胞单层。24 h 后分别接种 0.5 mL 效价为 $10^{3.5}$ TCID₅₀/0.1 mL 的 BSF. ZZ-1 和 $10^{4.2}$ TCID₅₀/0.1 mL 的 BSF. ZZ-3 原代病毒液,37℃ 孵育 1.5 h 后弃去,各添加 5 mL 含 3% NCS 的 DMEM 进行培养,48 h 后观察细胞病变(Cytopathic effect, CPE),出现明显 CPE 时收毒,冻存储备用。取上一代次病毒液反复冻融 3 次,同上进行下一代次的病毒培养。传代病毒从第 1 代至第 60 代依次命名为 BSF. ZZ-1-p1 ~ BSF. ZZ-1-p60 或 BSF. ZZ-3-p1 ~ BSF. ZZ-3-p60。

1.4 病毒 RNA 提取及 RT-PCR

取 BSF. ZZ-1、BSF. ZZ-3 之 p3、p5、p10、p15、p20、p25、p30、p35、p40、p45、p50、p55 及 p60 传代病毒液各 300 μ L,常规 TRIzol 法提取总 RNA, -70℃ 保存备用。以 JEVpE-2532 为引物制备 cDNA,并采用上述引物扩增 JEV *E* 基因。PCR 采用 20 μ L 体系:取 *ExTaq* 酶 10 μ L,上、下游引物各 1 μ L, cDNA 1 μ L, d₃H₂O 7 μ L。PCR 条件为:94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 1.5 min, 共进行 30 个循环;循环结束后 72℃ 延伸 10 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行鉴定。

1.5 基因克隆及序列分析

用 1% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行分析,回收目的片段,连接 pMD-19 T 载体后,转化 *E. coli* DH 5 α 感受态细胞,菌液 PCR 鉴定阳性菌落送大连 TaKaRa 公司测序。用 DNASTAR 中的 MegAlign 软件分析不同代次 JEV *E* 基因的核苷酸及氨基酸的序列同源性,并结合强、弱毒株的氨基酸位点差异进行比对分析。以 GenBank 中已报道的 10 个代表性 JEV 毒株(表 1)为参考株,以墨累河谷脑炎病毒株 MEV-1-51 为外群,根据 Shirish 等^[11]和 Chen 等^[12]报道的方法,用 MEGA 4.0 软件构建 JEV *E* 基因系统进化树。

2 结果与分析

2.1 病毒在 BHK-21 细胞的传代培养

将分离株 BSF. ZZ-1 和 BSF. ZZ-3 在 BHK-21 细胞上连续传 60 代。与对照组相比,接种各代次病毒

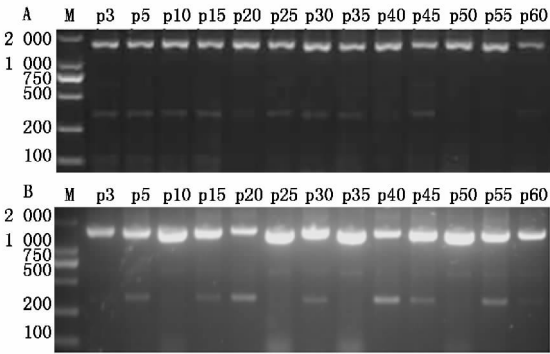
后 48 h 至 72 h ,BHK-21 细胞均出现圆缩、聚集; 始脱落 ,未见细胞融合 ,而对照组细胞形态正常。
72 h后 CPE 明显 ,大部分细胞表现为间隙加大、开

表 1 JEV 参考毒株的背景信息

Tab. 1 Information of the reference isolates used in this study						
编号 Number	毒株 Isolate	基因型 Genotype	基因号 Acc. No.	年份 Year	国家与地区 Location	来源 Source
1	Ishikawa	I	AB051292	1994	日本	猪
2	SX09S-01	I	HQ893545	2009	山西	猪
3	Bennett	II	HQ223285	1951	韩国	人
4	SA14	III	U14163	1954	西安	人
5	P3	III	U47032	1949	北京	人
6	Beijing-1	III	L48961	1949	北京	人
7	SA14-14-2	III	AF315119	1960s	中国	蚊虫
8	SA14-12-1-7	III	AF416457	1960s	中国	蚊虫
9	JKT6468	IV	AY184212	1981	印度尼西亚	蚊虫
10	Muar	V	HM596272	1952	马来西亚	人
11	MVE-151		NC_000943	1951	澳大利亚	人

2.2 不同代次病毒 E 基因 RT-PCR 结果

常规 Trizol 法分别提取 BSF. ZZ-1、BSF. ZZ-3 之 p3、p5、p10、p15、p20、p25、p30、p35、p40、p45、p50、p55 及 p60 的 BHK-21 细胞培养物总 RNA ,利用 RT-PCR 方法扩增 JEV E 基因。电泳分析结果表明 ,各代次病毒液中均扩增出了大小约为 1 600 bp 的特异性 PCR 产物 ,与预期产物大小基本相符 (图 1) 。



A. BSF. ZZ-1; B. BSF. ZZ-3; M. DNA 分子量标记。
A. BSF. ZZ-1; B. BSF. ZZ-3; M. DNA molecular weight marker.

图 1 BHK-21 细胞传代病毒 E 基因
RT-PCR 产物的电泳鉴定

Fig.1 Amplifications of the E genes from parental JEV strains and their progeny virus passaged on BHK-21 cells

2.3 E 基因核苷酸序列分析结果

对 BSF. ZZ-1 和 BSF. ZZ-3 p3 ~ p60 的各代次 BHK-21 细胞传代毒 E 基因进行克隆测序 ,结果显示扩增的 E 基因长度均为 1 574 nt。序列比对分析结果发现 ,经连续传代 60 次后各代次病毒 E 基因趋于稳定 ,各代次病毒与 p60 的氨基酸和核苷酸序列同源性在 99.5% ~ 100% ,其中 p35 与 p60 的同

源性为 100% ,p15、p25、p35 和 p40 之间的核苷酸和氨基酸的同源性均为 100% 。

2.4 E 基因氨基酸位点差异分析

以具有代表性的强毒株 SA14、P3、Beijing-1 及弱毒株 SA14-14-2 和 SA14-12-1-7 的 E 基因为参考 ,分析 BSF. ZZ-1、BSF. ZZ-3 传代病毒的 E 基因氨基酸序列稳定性。结果显示 ,与 JEV 毒力相关的位点 (如 E107、E138、E176、E264、E315、E439) 经连续传代 60 次后遗传稳定性较高 ,均未发生突变 ,与 SA14-14-2 相应位点完全一致。而 BSF. ZZ-1 毒株的 E21、E200 和 E426 自初次传代就分别发生 A→V、T→A 和 G→D 的稳定突变 ,E130 发生 I→V→I 的反复突变 ,E244 自第 10 代发生 G→E 的稳定突变 ,E279 自第 5 代发生 M→K 的稳定突变(表 2) ; BSF. ZZ-3 毒株的 E255、E285、E368 和 E497 自初次传代就分别发生 F→L、M→L、L→S 和 N→S 的稳定突变 ,E244 自第 35 代发生 G→E 的稳定突变 ,E279 发生 M→K→M 的反复突变(表 3) 。

2.5 E 基因系统进化分析

以涵盖 JEV 全部 5 个基因型的 10 个代表性毒株的 E 基因序列为参考 ,以 MVE-151 为外群毒株构建 E 基因的系统进化树。进化分析结果显示 ,BSF. ZZ-1 和 BSF. ZZ-3 及其细胞适应株与 SA14-12-1-7 和 SA14-14-2 均位于基因 III 型的同一分支(图 2) ,与其他毒株相比 ,中间减毒株 SA14-12-1-7 与强毒株 SA14 的进化关系最近 ,而 BSF. ZZ-1、BSF. ZZ-3 以及这 2 个毒株的细胞传代株与疫苗弱毒株 SA14-14-2 进化关系最近。

表 2 BSF. ZZ-1 各代次传代病毒 E 基因氨基酸位点差异分析

Tab. 2 Comparison of the amino acid differences between JEV isolate BSF. ZZ-1 of all generations and other reference isolates

毒株 Strain	氨基酸 AA										
	E21	E107	E130	E138	E176	E177	E200	E244	E279	E426	E447
SA14	V	L	I	E	I	T	A	E	K	D	G
P3	V	L	I	E	I	T	A	E	K	D	G
Beijing-1	V	L	I	E	I	T	A	E	K	D	G
SA14-12-1-7	V	L	I	K	V	A	A	E	K	D	G
SA14-14-2	V	F	I	K	V	A	A	G	M	D	D
BSF. ZZ-1	A	F	I	K	V	A	T	G	M	G	G
BSF. ZZ-1-p3	V	-	V	-	-	-	A	-	-	D	-
BSF. ZZ-1-p5	V	-	V	-	-	-	A	-	-	D	-
BSF. ZZ-1-p10	V	-	V	-	-	-	A	-	K	D	-
BSF. ZZ-1-p15	V	-	V	-	-	-	A	E	K	D	-
BSF. ZZ-1-p20	V	-	V	-	-	-	A	E	K	D	-
BSF. ZZ-1-p25	V	-	V	-	-	-	A	E	K	D	-
BSF. ZZ-1-p30	V	-	V	-	-	-	A	E	K	D	-
BSF. ZZ-1-p35	V	-	V	-	-	-	A	E	K	D	-
BSF. ZZ-1-p40	V	-	V	-	-	-	A	E	K	D	-
BSF. ZZ-1-p45	V	-	-	-	-	-	A	E	K	D	-
BSF. ZZ-1-p50	V	-	-	-	-	-	A	E	K	D	-
BSF. ZZ-1-p55	V	-	-	-	-	-	A	E	K	D	-
BSF. ZZ-1-60	V	-	-	-	-	-	A	E	K	D	-

注 “-”表示该位点的氨基酸残基与 BSF. ZZ-1 原代病毒相应位点的氨基酸残基一致。

Note: “-” means the same amino acid to BSF. ZZ-1.

表 3 BSF. ZZ-3 各代次传代病毒 E 基因氨基酸位点差异分析

Tab. 3 Comparison of the amino acid difference between JEV isolate BSF. ZZ-3 of all generations and other reference isolates

毒株 Strain	氨基酸 AA										
	E107	E138	E176	E177	E244	E255	E279	E285	E368	E447	E497
SA14	L	E	I	T	E	L	K	L	S	G	N
P3	L	E	I	T	E	L	K	L	S	G	N
Beijing-1	L	E	I	T	E	L	K	L	S	G	N
SA14-12-1-7	L	K	V	A	E	L	K	L	S	G	N
SA14-14-2	F	K	V	A	G	L	M	L	S	D	N
BSF. ZZ-3	F	K	V	A	G	F	M	M	L	G	N
BSF. ZZ-3-p3	-	-	-	-	-	L	-	L	L	-	S
BSF. ZZ-3-p5	-	-	-	-	-	L	-	L	S	-	S
BSF. ZZ-3-p10	-	-	-	-	-	L	K	L	S	-	S
BSF. ZZ-3-p15	-	-	-	-	-	L	K	L	S	-	S
BSF. ZZ-3-p20	-	-	-	-	-	L	K	L	S	-	S
BSF. ZZ-3-p25	-	-	-	-	-	L	K	L	S	-	S
BSF. ZZ-3-p30	-	-	-	-	-	L	K	L	S	-	S
BSF. ZZ-3-p35	-	-	-	-	-	L	-	L	S	-	S
BSF. ZZ-3-p40	-	-	-	-	E	L	-	L	S	-	S
BSF. ZZ-3-p45	-	-	-	-	E	L	-	L	S	-	S
BSF. ZZ-3-p50	-	-	-	-	E	L	-	L	S	-	S
BSF. ZZ-3-p55	-	-	-	-	E	L	-	L	S	-	S
BSF. ZZ-3-60	-	-	-	-	E	L	-	L	S	-	S

注 “-”表示该位点的氨基酸残基与 BSF. ZZ-3 原代病毒相应位点的氨基酸残基一致。

Note: “-” means the same amino acid to BSF. ZZ-3.

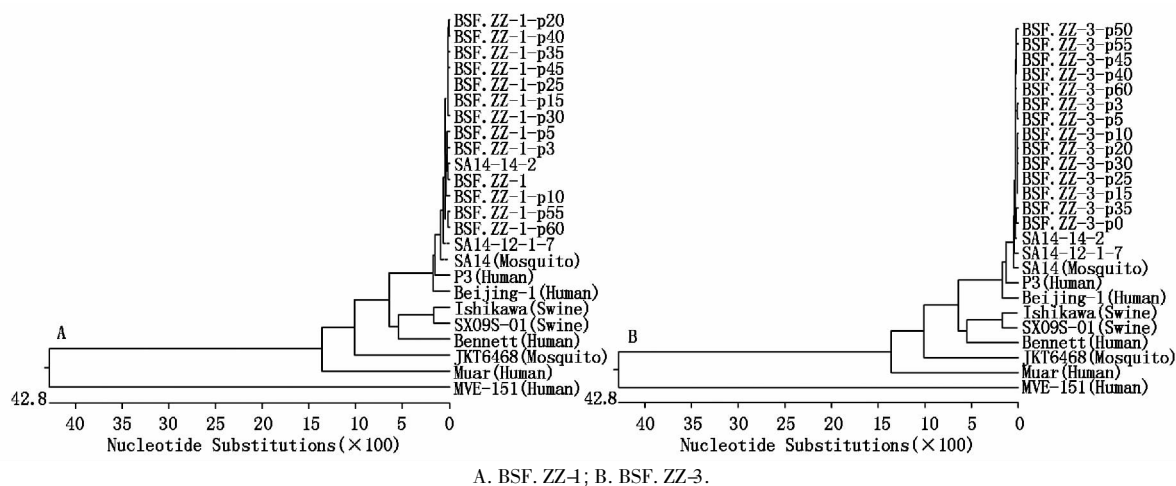


图 2 JEV 毒株及其 BHK-21 传代病毒的 E 基因系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic analysis based on E gene of the parental JEV strains and their progeny viruses passaged on BHK-21 cells

3 讨论

近年来,乙脑在我国的流行范围进一步扩大。目前,JEV 基因分型主要以 E 基因为参考,共分为 5 个基因型^[11-12]。2001 年,我国首次分离到基因 I 型,近期的研究表明,目前我国基因 I 型与 III 型已发生共流行的趋势^[13],并且基因 I 型呈扩大趋势^[14]。众多研究均已证实 E 基因是决定 JEV 毒力的关键因素^[6-8,15-16]。E 蛋白含有 3 个抗原结构域:结构域 I、II 和 III。结构域 I 也被称为中心域,由 E1~E51、E137~E196 和 E293~E311 的 130 个氨基酸残基组成,具有糖基化位点和血清学及生物学活性的抗原表位;结构域 II 由 E52~E136 和 E197~E292 的 181 个氨基酸残基组成,具有中和活性和血凝活性的抗原表位;结构域 III 由 E312~E411 的 100 个氨基酸残基组成,参与受体结合过程,在黄病毒属中十分保守^[17]。其中氨基酸残基位点 E107、E138、E176、E177、E264、E279、E315、E439 等被认为是 JEV 减毒过程中的关键突变位点,与 JEV 毒力直接相关^[6]。

本研究表明,BSF. ZZ-1 在 BHK-21 细胞传代过程中,E21 位于结构域 I 中,该域具有糖基化位点和血清学及生物学活性的抗原表位,进而影响到毒力。E130 发生 I→V→I 的反复突变。E279 位于结构域 II 中,该结构域具有中和作用和血凝活性的表位,这一突变可导致 JEV 毒力的返强^[7]。E130、E200、E244 和 E279 都位于结构域 II 中,说明结构域 II 不稳定性较高,未发现结构域 III 的位点突变;BSF. ZZ-3 在 BHK-21 细胞传代过程中,E279 发生 M→K→M 的反复突变,E244、E255、E279、E285 也都位于结构域 II 中。E368 位于结构域 III 中,该结构域是

受体的主要结合部位,该区域位点的改变可能会影响 JEV 与宿主的结合能力,进而影响到毒力。综合 BSF. ZZ-1、BSF. ZZ-3 这 2 个分离毒株的变化情况,E244、E279 位点为高突变位点,对毒力影响较大;而 E200、E255、E285、E426 和 E497 自初次传代就发生稳定突变,他们的氨基酸极性与酸碱性各不相同,改变后可能导致 JEV 中和活力的改变,但与 JEV 的毒力致弱是否相关仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] Solomon T, Ni H, Beasley D W *et al.* Origin and evolution of Japanese encephalitis virus in southeast Asia [J]. J Virol 2003, 77(5): 15.
- [2] Wang H Y, Takasaki T, Fu S H, *et al.* Molecular epidemiological analysis of Japanese encephalitis virus in China [J]. J Gen Virol 2007, 88(3): 885-894.
- [3] Li M H, Fu S H, Chen W X *et al.* Genotype V Japanese encephalitis virus is emerging [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2011, 5(7): e1231.
- [4] 刘 昊, 金宁一, 段 纲, 等. 乙型脑炎病毒 XJ/08/01 株的分离鉴定及 PrM/E 基因的遗传进化分析 [J]. 中国兽医科学 2009, 39(7): 565-569.
- [5] 殷 震, 刘景华. 动物病毒学 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1997: 631-664.
- [6] Lin K C, Chang H L, Chang R Y. Accumulation of a 3'-terminal genome fragment in Japanese encephalitis virus-infected mammalian and mosquito cells [J]. Journal of Virology 2004, 78(10): 5133-5138.
- [7] 项秉懿, 陈苏民. 乙型脑炎病毒的分子生物学研究进展 [J]. 中国病毒学, 1993, 8(3): 199-206.
- [8] 俞永新, 武佩芬, 敖 坚, 等. 一株免疫性进一步提高的乙脑活疫苗减毒株的选育 I, SA14-14-2 弱毒株的某些生物学特性 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志,

- 1981 ,1(2) : 77 - 83.
- [9] 王兴涛,罗俊,藤蔓,等.猪流行性乙型脑炎病毒种猪精液分离株的鉴定及进化分析[J].河南农业科学,2011,40(5):152-157.
- [10] 禹乐乐,藤蔓,罗俊,等.猪源乙型脑炎病毒河南分离株的全基因组测序及进化分析[J].华北农学报,2012,27(5):184-190.
- [11] Shirish P Banerjee K. Phylogenetic analysis of the envelope gene of Japanese encephalitis virus[J]. Virus Res, 1996,42(1/2):107-117.
- [12] Chen W R, Tesh R B, Rico H R *et al.* Genetic variation of Japanese encephalitis virus in nature [J]. J Gen Virol, 1990,71(12):2915-2922.
- [13] Chen S P. Molecular phylogenetic and evolutionary analysis of Japanese encephalitis virus in China [J]. Epidemiology and Infection, 2012,140(9):1637-1643.
- [14] Li M H, Fu S H, Chen W X *et al.* Genotype V Japanese encephalitis virus is emerging [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2011,5(7):e1231.
- [15] Pan X L, Liu H, Wang H Y *et al.* Emergence of genotype I of Japanese encephalitis virus as the dominant genotype in Asia [J]. Journal of Virology, 2011,85(19):9847-9853.
- [16] 卜丹,罗俊,樊剑鸣,等.猪乙脑病毒河南分离株 CSF. ZMD-3 的分离鉴定及分子进化分析[J].河南农业科学,2010(4):103-106.
- [17] Liu H, Lu H J, Liu Z J *et al.* Japanese encephalitis virus in mosquitoes and swine in Yunnan province China 2009-2010 [J]. Vector Borne and Zoonotic Diseases, 2013,13(1):41-49.

《华北农学报》征订启事

《华北农学报》1986年创刊,由河北、北京、天津、河南、山西、内蒙古六省市农科院、农学会联合主办,为全国首家跨省、市、区多单位联办的农业学术刊物。本刊立足华北,面向全国和全世界。主要刊载农业基础科学学术论文、研究报告及科研简报,报道农业学术动态。主要服务于农业高等院校师生和农业科研机构的研究人员。

《华北农学报》为中国科学引文数据库核心期刊(CSCD 核心库)、中文核心期刊、中国科技核心期刊、RCCSE 中国权威学术期刊(A⁺)和中国农业核心期刊。在2011年版《中文核心期刊要目总览》综合性农业科学类核心期刊中排名第2位;2012年《华北农学报》影响因子达到2.086,被引频次4682次,学科排名全国第1位,成为我国有影响力的农业学术刊物。《华北农学报》多次荣获国家级及省级奖励:全国优秀科技期刊评比三等奖、全国优秀农业期刊学术类一等奖、首届华北优秀期刊、首届北方十佳期刊、中国北方优秀期刊、河北省荣誉期刊、河北省十佳期刊及河北省优秀期刊等奖项;2011年被评选为“中国精品科技期刊”。

《华北农学报》国内外公开发行,国内统一刊号:CN13-1101/S,国际刊号 ISSN 1000-7091。双月刊,双月28日出版,国际标准大16开本,240页,每期定价12元,全年72.00元。邮发代号:18-10,国外发行代号:5918。全国各地邮局均可订阅。可随时汇款到编辑部订阅,请注明刊名、份数、姓名、地址、邮编及电话。

欢迎订阅、欢迎投稿。

通讯地址:河北省石家庄市和平西路598号 《华北农学报》编辑部

邮 编:050051

电 话:0311-87652166

E-mail: hbnxb@163.com

网 址: <http://www.hbnxb.net/>