

分类号 \_\_\_\_\_  
UDC \_\_\_\_\_

学号 MZ120211592  
密级 \_\_\_\_\_



# 硕士学位论文

(全日制专业学位)

## A 型塞内卡病毒的演化分析及其 L 蛋白的功能研究

学 院： 兽医学院

专 业 学 位 类 别： 兽医硕士

专 业 学 位 领 域： 不分领域

研 究 生： 姬永琛

校 内 指 导 教 师： 吴慧光 副教授

校 外 指 导 教 师： 王典 高级畜牧师

国家乳业技术创新中心

答 辩 委 员 会 主 席： 戴有理 研究员

答 辩 日 期： 2024 年 6 月 1 日

# **Evolutionary analysis of Senecavirus A and functional study of its L protein**

A thesis submitted to  
Yangzhou University  
in partial fulfillment of the requirements  
for the degree of  
Master of Professional Degree in Veterinary Medicine

By

Yongchen Ji

Supervisor: Assoc. Prof. Huiguang Wu

Co-supervisor: Senior Livestock Specialist Dian Wang

Professional Degree in Veterinary Medicine

June 2024

## A 型塞内卡病毒的演化分析及其 L 蛋白的功能研究

本论文研究得到江苏省自然科学基金面上项目（编号：BK20211120）、广西重点研发计划项目（编号：桂科 AB21238003）、江苏省农业科技自主创新资金项目（编号：CX(21)2014）、扬州市市校合作专项项目（编号：YZ2022187）资助。

# 目 录

A 型塞内卡病毒研究进展.....	1
1 A 型塞内卡病毒概述.....	1
1.1 SVA 的发现及命名.....	1
1.2 SVA 的粒子结构.....	2
1.3 SVA 的基因组结构及主要功能.....	2
2 A 型塞内卡病毒的流行病学.....	8
2.1 易感动物、传染源及传播途径.....	8
2.2 国内外流行情况.....	8
3 A 型塞内卡病毒的感染机制.....	10
3.1 细胞受体.....	10
3.2 感染周期.....	11
4 A 型塞内卡病毒的临床症状及病理变化.....	11
4.1 临床症状.....	11
4.2 病理变化.....	12
5 A 型塞内卡病毒的诊断及预防.....	13
5.1 诊断技术.....	13
5.2 防控措施.....	15
5.3 疫苗研发进展.....	16
6 复制子技术.....	17
7 本研究的目的是与意义.....	18
第一章 A 型塞内卡病毒的演化分析.....	19
1 材料与方法.....	19
1.1 序列数据.....	19
1.2 重组分析.....	20
1.3 系统发育分析.....	20
1.4 遗传分化估计.....	20
1.5 特异性氨基酸分析.....	21
1.6 选择压力分析.....	21
1.7 演化动力学分析.....	21
1.8 系统地理学分析.....	22
1.9 迁移率分析.....	22
2 结果.....	23
2.1 重组分析.....	23
2.2 系统发育分析.....	23

2.3 选择压力分析.....	26
2.4 演化动力学分析.....	28
2.5 溯源分析.....	29
3 讨论.....	31
4 小结.....	33
第二章 A 型塞内卡病毒 L 蛋白的单抗制备和功能研究.....	34
1 材料与方法.....	34
1.1 生物材料.....	34
1.2 主要试剂与耗材.....	35
1.3 相关溶液的配制.....	36
1.4 主要仪器和设备.....	38
1.5 重组蛋白的原核表达.....	40
1.6 小鼠免疫.....	45
1.7 细胞融合与亚克隆.....	45
1.8 单克隆抗体腹水的制备.....	47
1.9 单克隆抗体的生物学特性鉴定.....	47
1.10 SVA L 蛋白的亚细胞定位.....	49
1.11 SVA L 蛋白的功能研究.....	49
2 结果.....	55
2.1 重组质粒的鉴定.....	55
2.2 重组蛋白的表达纯化与鉴定.....	56
2.3 L 单抗腹水的生物学鉴定.....	57
2.4 SVA L 蛋白的亚细胞定位.....	58
2.5 L 蛋白的氨基酸序列比对.....	58
2.6 L 蛋白突变感染性克隆质粒的构建与鉴定.....	59
2.7 L 蛋白突变病毒的拯救与鉴定.....	60
2.8 L 蛋白突变病毒的滴度测定.....	61
2.9 L 蛋白突变或缺失对 SVA 复制和转录翻译的影响.....	62
3 讨论.....	63
4 小结.....	65
全文结论.....	66
参考文献.....	67

## 摘要

A 型塞内卡病毒 (Senecavirus A, SVA) 是小 RNA 病毒科塞内卡病毒属的唯一成员, 近年来被鉴定为猪特发性水疱病 (Porcine idiopathic vesicular disease, PIVD) 的病原体。SVA 主要感染各个年龄段的猪, 引起皮肤、口鼻部和冠状动脉带上的水疱和糜烂等特征性症状, 尤其 1~4 日龄的仔猪可出现急性死亡, 死亡率可达 30%~70%。SVA 早期在美国、英国、澳大利亚、意大利等国家零星爆发, 因当时并未查明病因, 未能引起养猪业的足够重视。直至 2014 年末 2015 年初, SVA 在巴西多个区域的养猪场暴发, 随后形成全球流行的态势, 主要分布在北美洲、南美洲、欧洲、亚洲等地区, 对全球养猪业造成了较大的经济损失。现如今, 中国超过半数的省市都已有 SVA 感染的相关报道。尽管 SVA 是在 20 年前发现的, 但关于 SVA 的演变和传播历史仍不十分清晰。因此, 本研究对 SVA 的重组、系统发育、自然选择和演化动力学进行了综合分析, 以说明 SVA 的起源、演化和时空格局。

L 蛋白作为 SVA 基因组编码的第一个蛋白, 与其他小 RNA 病毒的 L 蛋白差异性较大, 且高度可变。口蹄疫病毒 (Foot and mouth disease virus, FMDV)、脑心肌炎病毒 (Encephalomyocarditis virus, EMCV) 等的 L 蛋白是一种多功能蛋白, 可发挥拮抗宿主抗病毒反应、抑制应激颗粒的组装等多种关键的生物学功能。然而, 因 L 蛋白巨大的序列差异性, 目前还不清楚 SVA L 蛋白的生物学功能。因此, 本研究利用原核表达系统和细胞融合技术制备了 L 蛋白的单克隆抗体, 为 L 蛋白的功能研究提供强有力的免疫学工具。此外, 进一步对 SVA 感染性克隆质粒 L 蛋白中相对保守的氨基酸位点进行突变, 并利用复制子技术对 L 蛋白的功能进行初步探究。

### 1. A 型塞内卡病毒的演化分析

为更进一步了解 SVA 的演化特征以及传播历史, 本研究对其进行了综合分析, 包括重组检测、系统发育、选择分析、演化动力学和系统地理学分析。选用下载的 238 株 SVA 全基因组序列进行重组检测, 共鉴定出 5 株重组毒株且均来自于中国。去除重组毒株后, 利用贝叶斯推断 (BI) 法进行系统发育分析表明, SVA 分为两个主要分支: 分支 I (2007 年之前的毒株) 和分支 II (2007 年之后的毒株), 遗传距离为  $0.0713 \pm 0.0030$ 。进一步分析 SVA 分支 I 和分支 II 的遗传多样性, 发现共存在 544 个特异性氨基酸替代,

77 个 Shannon 熵差异位点,表明两个分支间存在明显的演化差异。选择压力分析发现, SVA 的绝大多数位点处于负选择,仅存在 27 个正选择位点,表明正选择和负选择共同驱动 SVA 的演化。SVA 演化动力学分析的结果显示, SVA 的最近共祖时间(TMRCA)为 1986 年(分支I和II的 TMRCA 分别为 1986 和 2004 年),全基因组的演化速率是  $3.3522 \times 10^{-3}$  核苷酸替代每位点每年(nucleotide substitutions/site/year)。群体历史规模分析表明, SVA 的有效种群数量呈逐渐增加的趋势,在 2017 年之前略有波动,随后急剧下降。值得注意的是,系统地理学分析推断巴西可能是 2015 年以来 SVA 全球传播的源头。总之,这些数据为 SVA 演变和传播历史的基本理解提供了新的思路。

## 2. A 型塞内卡病毒 L 蛋白的单抗制备和功能研究

单克隆抗体可作为有力的免疫学研究工具。本研究针对 SVA L 蛋白全长进行原核表达,并纯化得到 L 重组蛋白免疫原。将重组蛋白免疫小鼠,随后经细胞融合、IFA 筛选和亚克隆得到一株分泌 L 蛋白抗体的杂交瘤细胞株,命名为 36-B3。将其扩大培养并注射小鼠腹腔,大量制备 L 单抗腹水。后续的生物学鉴定结果表明,该单克隆抗体适用于 IFA 试验以及外源性 L 蛋白的 Western Blot 检测。此外,利用 L 单克隆抗体进行亚细胞定位发现, SVA L 蛋白主要定位于内质网中。

L 蛋白序列在小 RNA 病毒科中的巨大差异性提示其功能保守性较差,而目前尚不清楚 SVA L 蛋白在其生命周期中发挥的具体功能。本研究首先对小 RNA 病毒中部分的 L 蛋白氨基酸序列进行比对,选取了 13 个相对保守位点。在 SVA 感染性克隆质粒(pC3-SVA-GD05)的基础上对 L 蛋白的这些位点进行突变,随后拯救病毒并测定其滴度。结果发现,唯有 SVA L 蛋白(L70A)突变使病毒致死,而其余突变位点对病毒滴度的影响较小。为进一步探究 L 蛋白的功能,选取了本实验室先前发现的使病毒致死或使病毒滴度明显减弱的突变和缺失位点(H42A、Q79A、 $\Delta$ 42H、 $\Delta$ 56R)以及本研究中发现的 L70A 突变位点替换到 SVA 复制子质粒(SVA-GD05-Rep)中,进行荧光定量 PCR 以及双荧光素酶报告基因检测,以研究 L 蛋白突变或缺失对于 SVA 复制和转录翻译的影响。结果表明, SVA L 蛋白突变(H42A、L70A、Q79A)和缺失( $\Delta$ 42H、 $\Delta$ 56R)不影响病毒的复制水平,但均在不同程度上抑制了荧光素酶基因的表达,表明 L 蛋白可能在蛋白合成过程中起到调控蛋白翻译的作用。

**关键词:** A 型塞内卡病毒; 演化分析; L 蛋白; 单克隆抗体; 转录和翻译

## Abstract

Senecavirus A (SVA), the only member of the genus *Senecavirus* belonging to the family of small RNA viruses, has been identified as causing porcine idiopathic vesicular disease (PIVD) in recent years. SVA mainly infects pigs of all ages, causing characteristic symptoms such as blisters and vesicles on the skin, mouth, nose and coronary artery bands, especially piglets 1-4 days old can suffer acute deaths, and the mortality rate can reach 30%-70%. SVA broke out sporadically in the United States, the United Kingdom, Australia, Italy and other countries in the early days, because the cause of the disease was not identified at that time, and failed to attract sufficient attention from the pig industry. Until the end of 2014 and the beginning of 2015, SVA outbreaks in pig farms in several regions of Brazil, followed by the formation of a global epidemic, mainly concentrated in North America, South America, Europe, Asia and other regions, which caused considerable economic losses to the global swine industry. To date, SVA infections have been reported in more than half of China's provinces and cities. Although SVA was discovered 20 years ago, its evolutionary and transmission history remains unclear. Therefore, this study aims to provide a comprehensive analysis of the recombination, phylogeny, natural selection, and evolutionary dynamics of SVA to illustrate its origin, evolution, and spatiotemporal patterns.

The L protein, which is the first protein encoded by the SVA genome, is significantly different from the L proteins of other small RNA viruses and is highly variable. The L proteins of foot and mouth disease virus (FMDV) and encephalomyocarditis virus (EMCV) are multifunctional proteins that perform a variety of key biological functions, such as antagonizing host antiviral responses and inhibiting the assembly of stress particles. However, the biological functions of the SVA L proteins remain unclear due to the significant sequence variability of the L proteins. Therefore, in this study, monoclonal antibodies to L proteins were prepared using a prokaryotic expression system and cell fusion technology to provide a powerful immunological tool for functional studies of L proteins. Furthermore, the amino acid sites that are relatively conserved in the L protein of the SVA infectious cloned plasmid were

mutated to explore the function of the L protein using replicon technology.

### **1. Evolutionary analysis of SVA**

To improve understanding of the evolutionary features of SVA and its dispersal history, this study conducted a comprehensive analysis including recombination detection, phylogenetic, selection analysis, evolutionary dynamics, and phylogeographic. Recombinant detection was performed on the whole genome sequence of 238 downloaded SVA strains, resulting in the identification of five recombinant strains, all of which were of Chinese origin. After removing the recombinant strains, phylogenetic analysis using Bayesian inference (BI) method demonstrated that SVA diverged into two main branches: clade I (pre-2007 strains) and clade II (post-2007 strains) with a genetic distance of  $0.0713 \pm 0.0030$ . Upon further analysis of the genetic diversity of SVA clades I and II, a total of 544 specific amino acid substitutions and 77 Shannon entropy difference sites were identified. These findings suggest significant evolutionary differences between the two clades. Selection pressure analysis revealed that the majority of sites in SVA were under negative selection, with only 27 positively selected sites present, suggesting that both positive and negative selection jointly drive the evolution of SVA. The results of the SVA evolutionary dynamics analysis showed that the most recent common ancestor (TMRCA) of SVA was 1986 (1986 and 2004 for TMRCA of clade I and II, respectively), and that the rate of evolution over the genome was  $3.3522 \times 10^{-3}$  nucleotide substitutions/site/year. Demographic history size analyses indicate that the effective population size in SVA has gradually increased over time, with slight fluctuations until 2017, followed by a sharp decline. Notably, phylogeographic analyses infer that Brazil may be the source of the global spread of SVA since 2015. Overall, this data provides new insights into the fundamental understanding of the evolution and diffusion history of SVA.

### **2. Monoclonal antibody production and functional studies of the SVA L protein**

Monoclonal antibodies can be valuable tools for immunological studies. In this study, the full-length SVA L protein was expressed in a prokaryotic system, purified and used as a recombinant protein immunogen for L against SVA. Mice were immunized with the recombinant protein, followed by cell fusion, IFA screening and subcloning to obtain a hybridoma cell line secreting antibodies to the L protein, named 36-B3, which was expanded in culture and injected into the peritoneal cavity of mice to produce large quantities of monoclonal L antibody ascites. Subsequent biological characterization showed that the

monoclonal antibody is suitable for IFA assays and Western blot detection of exogenous L proteins. In addition, subcellular localization using the monoclonal antibody L showed that the SVA L protein is mainly located in the endoplasmic reticulum (ER).

The high variability of L protein sequences across the small RNA virus family suggests that their function is poorly conserved, while the specific functions of SVA L proteins during their life cycle are not known. This study compares the amino acid sequences of L proteins in the small RNA virus and identifies 13 conserved sites. Based on the SVA infectious clone plasmid (pC3-SVA-GD05), we mutated specific sites on the L protein, rescued the virus and determined its titer. The study discovered that only the L70A mutation in the SVA L protein caused the virus to become lethal, while the other mutation sites had a lesser effect on the virus titer. To further investigate the function of the L protein, we substituted mutations and deletion sites (H42A, Q79A,  $\Delta$ 42H,  $\Delta$ 56R) previously identified in our laboratory as lethal to the virus or causing a significant reduction in viral titer, as well as the L70A mutation site identified in the present study, into the SVA replicon plasmid (SVA-GD05-Rep). Fluorescence quantitative PCR and dual-luciferase reporter gene assays were then performed to investigate the effects of L protein mutations or deletions on SVA replication, transcription and translation. The results showed that SVA L protein mutations (H42A, L70A, Q79A) and deletions ( $\Delta$ 42H,  $\Delta$ 56R) did not affect the level of viral replication, but all suppressed the expression of the luciferase gene to varying extents, suggesting that the L proteins may play a role in regulating protein translation during protein synthesis.

**Keywords:** Senecavirus A; Evolutionary analysis; L protein; Monoclonal antibody; Transcription and translation

## 缩略词表

英文缩写	英文名称	中文名称
aa	Amino acid	氨基酸
Amp / Kan	Ampicillin / Kanamycin	氨苄青霉素/卡那青霉素
ANTXR1	Anthrax toxin receptor 1	炭疽毒素受体 1
bp	Base pair	碱基对
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
BVDV	Bovine viral diarrhea virus	牛病毒性腹泻病毒
cDNA	Complementary DNA	互补脱氧核糖核酸
cGAS	Cyclic GMP-AMP synthase	环状 GMP-AMP 合成酶
CPE	Cytopathic effect	细胞病变效应
CSFV	Classical swine fever virus	经典猪瘟病毒
DAPI	4',6'-diamidino-2-phenylindole	4',6'-二脒基-2-苯基吲哚
ddH <sub>2</sub> O	Double distilled H <sub>2</sub> O	双蒸水
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium	细胞培养基
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
EB	Ethidium bromide	溴化乙锭
eIF	Eukaryotic initiation factor	真核起始因子
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
EMCV	Encephalomyocarditis virus	脑心肌炎病毒
ER	Endoplasmic reticulum	内质网
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
FMDV	Foot and mouth disease virus	口蹄疫病毒
GFP/EGFP	green fluorescent protein	绿色荧光基因
HAT	Hypoxanthine aminopterin thymidine	次黄嘌呤、氨基蝶呤、胸腺嘧啶核苷
HCV	Hepatitis C virus	丙型肝炎病毒
HRP	horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
HT	Hypoxanthine thymidine	次黄嘌呤、胸腺嘧啶核苷
ICTV	The international committee on taxonomy of viruses	国际病毒分类委员会

英文缩写 (续)	英文名称 (续)	中文名称 (续)
IFA	indirect immunofluorescence assay	间接免疫荧光试验
IFN- $\beta$	Interferon- $\beta$	干扰 $\beta$
IgSF	Immunoglobulins superfamily	免疫球蛋白超家族
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside	异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷
IRES	Internal ribosome entry site	核糖体进入位点
IRF	Interferon regulatory Factor	干扰素调节因子
kb / kDa	Kilo base pair / kilodalton	千碱基对/千道尔顿
LB	Luria-Bertani	LB 培养基
M	Mole	摩尔
mAb	monoclonal antibody	单克隆抗体
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	丝裂原活化蛋白激酶
MOI	Multiplicity of infection	感染复数
mtDNA	Mitochondrial DNA	线粒体脱氧核糖核酸
NCBI	National center of biotechnology information	美国国家生物技术信息中心
NLRP3	NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3	NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3
nm, $\mu$ m	Nanometer, Micrometer	纳米, 微米
OD	optical density	吸光度
ORF	Open reading frame	开放阅读框
PBS	phosphate buffered saline	磷酸盐溶液
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PIVD	Porcine idiopathic vesicular disease	猪特发性水疱病毒
PV	Poliomyelitis virus	脊髓灰质炎病毒
PVDF	polyvinylidene fluoride	聚偏二氟乙烯
r/min, rpm	Rotation per minute	每分钟转速
RdRP	RNA-dependent RNA polymerase	RNA 依赖性 RNA 聚合酶
RIG-I	Retinoic acid-inducible gene-I	视黄酸诱导基因蛋白-I
RNA	Ribonucleic acid	核糖核酸
RT-PCR	Reverse transcript polymerase chain reaction	反转录聚合酶链式反应
RT-qPCR	Reverse transcription quantitative real-time PCR	实时荧光定量 PCR
SDS-PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
sec, min, h	second, minute, hour	秒, 分, 时

缩略词表

英文缩写 (续)	英文名称 (续)	中文名称 (续)
Sev	Sendai virus	仙台病毒
SGs	Stress granules	应激颗粒
SVA	Senecavirus A	A 型塞内卡病毒
SVDV	Swine vesicular disease virus	猪水疱病病毒
TCID <sub>50</sub>	50% Tissue culture infective dose	半数细胞感染量
TGN	Trans-Golgi network	反式高尔基体网络
TMRCA	The most recent common ancestor	最近共祖时间
UTR	Untranslated region	非翻译区
VESV	Vesicular exanthema of swine virus	猪水疱疹病毒
VLPs	Virus like particles	病毒样颗粒
VNT	Virus neutralization test	病毒中和试验
VRPs	Viral replicon particles	病毒复制子颗粒
VSV	Vesicular stomatitis virus	水疱性口炎病毒
WB	Western blot	免疫印记
ZIKV	Zika virus	寨卡病毒
μg, mg, g	microgram, milligram, gram	微克, 毫克, 克
μL, mL, L	microliter, milliliter, liter	微升, 毫升, 升

## A 型塞内卡病毒研究进展

A 型塞内卡病毒 (Senecavirus A, SVA) 原名塞内卡谷病毒, 一种单股正链无囊膜的 RNA 病毒, 小 RNA 病毒科 (Picornaviridae) 塞内卡病毒属的唯一成员, 是引起猪水疱病的病原之一<sup>[1]</sup>。SVA 于 2002 年在美国从胚胎视网膜细胞 (PER.C6) 细胞系中偶然分离出来<sup>[2]</sup>。早在 20 世纪 80 年代, SVA 可能已经在猪群中流行, 新西兰、澳大利亚、美国、英国和意大利都曾报道过病因不明的猪水疱病的病例<sup>[3-7]</sup>。由于无法确定临床症状的病因, 该综合征被命名为猪特发性水疱病 (PIVD)<sup>[8]</sup>。直至 2007 年, 在从加拿大运往美国的水疱病病猪的生物样本中检测到 SVARN, 并被认定为这些猪水疱病的病原体<sup>[9]</sup>。2014 年底至 2015 年初, SVA 在巴西猪场大面积暴发<sup>[10-13]</sup>, 才引起养猪业的重视以及广大研究人员的注意。随后, SVA 在全球范围内广泛传播, 2015 年, 首次在中国报道, 2016 年, 蔓延至加拿大和泰国的猪群<sup>[7, 14]</sup>。SVA 感染的临床症状主要包括皮肤、鼻子、口腔和冠状动脉带上的水疱和糜烂, 临床上与经典的病毒性水疱疾病难以区分, 包括口蹄疫 (Foot and mouth disease, FMD)、猪水疱病 (Swine vesicular disease, SVD)、水疱性口炎 (Vesicular stomatitis, VS) 和猪水疱疹 (Vesicular exanthema of swine, VES) 等<sup>[9, 15]</sup>。各个年龄段的猪是 SVA 的主要贮藏宿主, 小鼠和家蝇亦可作为 SVA 的传播载体<sup>[16]</sup>, 但病毒的具体传播机制尚不明确。SVA 作为近十几年广为流传的病毒, 引起仔猪死亡和怀孕母猪的水疱症, 给养猪业带来的健康风险和经济损失不容忽视。目前, 关于 SVA 的研究已经取得部分进展, 但针对 SVA 的基础研究尚需补充完善, 为其疫苗研发及防控提供更为充分的理论依据。

### 1 A 型塞内卡病毒概述

#### 1.1 SVA 的发现及命名

塞内卡谷病毒 (Seneca Valley virus, SVV) 最初于 2002 年在美国马里兰州盖瑟斯堡一家基因治疗公司被发现。研究人员在 PER.C6 细胞中培养腺病毒-5 (Ad5) 载体时, 发现细胞出现异常快速的细胞病变反应 (Cytopathic effect, CPE), 并从中分离出一种未知病毒<sup>[2]</sup>。为了进一步分析该病毒, 对纯化的病毒样本进行电子显微镜检查, 显示为直径约 27 nm 的二十面体颗粒, 且病毒颗粒整体较小 (图 1-1A)。另外, 对受感染的

PER.C6 细胞进行超微结构研究, 早期未观察到病毒, 然而在感染 24 h 后的细胞中观察到了晶格状结构。由此怀疑该病毒是一种新型的小核糖核酸病毒 (Picornavirus, 简称小 RNA), 并将其命名为塞内卡谷病毒-001 (Seneca Valley virus-001, SVV-001)。据推测, 该病毒可能是通过使用受污染的胎牛血清或猪胰蛋白酶引入细胞培养物的<sup>[2, 17]</sup>。2015 年, 国际病毒分类委员会 (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) 正式将“塞内卡谷病毒”更名为“A 型塞内卡病毒”<sup>[18]</sup>。

## 1.2 SVA 的粒子结构

SVA 是小 RNA 病毒科, 塞内卡病毒属的唯一成员, 亲缘关系上与心脏病毒属最为密切<sup>[2, 17]</sup>。病毒颗粒外观上呈球形结构 (图 1-1A), 直径约为 27-30 nm, 包裹有二十面体对称性的无囊膜衣壳, 具有典型的小 RNA 病毒结构<sup>[2]</sup>。与其他心病毒属病毒类似, SVA 具有疏水口袋, 没有口袋因子。病毒衣壳由 VP1、VP2、VP3 和 VP4 四种结构蛋白组成 (图 1-1B), 各有 60 拷贝, 且蛋白的整体褶皱与小 RNA 病毒科其他病毒的相应蛋白非常相似<sup>[19]</sup>。VP1、VP2 和 VP3 三种衣壳蛋白位于病毒粒子的表面, 呈相似的果冻卷状折叠, 具有 8 条  $\beta$  链并排列成桶状结构<sup>[20, 21]</sup>。VP4 蛋白位于衣壳内部, 可能与病毒基因组接触, 且相对保守, 是四种结构蛋白中长度最短的<sup>[22]</sup>。SVA 在碱性环境下具有较为稳定的结构, 低酸 ( $\text{pH} \leq 5.5$ ) 环境下会分解成五聚体亚基<sup>[20]</sup>。

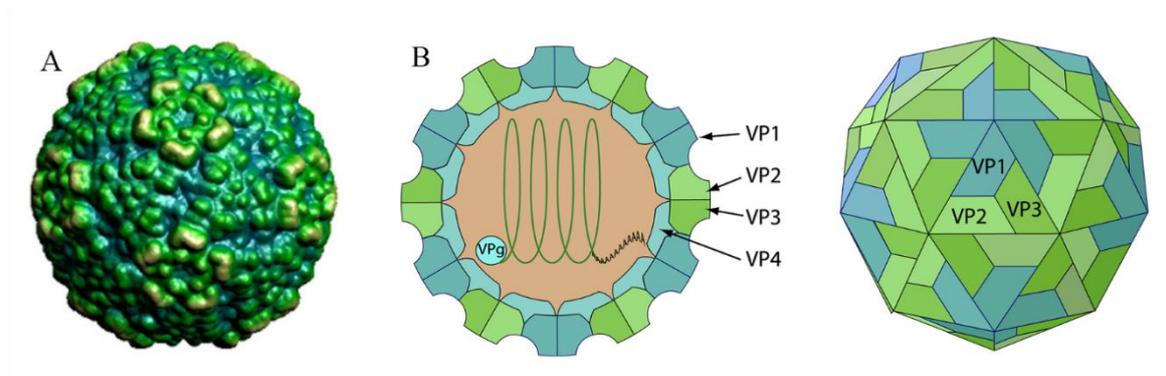


图 1-1 SVA 病毒粒子结构及平面示意图<sup>[19, 23]</sup>

Fig.1-1 Schematic representation of the particle structure and plane of SVA

## 1.3 SVA 的基因组结构及主要功能

SVA 是一种小核糖核酸 (RNA) 病毒, 为线性单链 RNA, 基因组为正极性, 长度约为 7300 nt<sup>[2]</sup>。基因组编码一个较大的单个开放阅读框 (Open reading frame, ORF),

该框架作为多聚蛋白前体表达，由病毒编码的蛋白酶加工成 L 蛋白、前体蛋白 P1、P2 和 P3（图 1-2）。SVA 多聚蛋白遵循小 RNA 病毒基因组的标准 L-4-3-4 布局，并由病毒编码的蛋白酶加工成成熟的病毒蛋白。前体蛋白 P1 被加工成四种结构蛋白，即 VP4、VP2、VP3 和 VP1。P2 和 P3 按 2A、2B、2C、3A、3B、3C 和 3D 的顺序被加工成非结构蛋白<sup>[1]</sup>。多聚蛋白的两侧含有一个非翻译区（5'UTR）和一个多聚腺苷酸化的非翻译 3'端（3'UTR）。5'UTR 有一个名为 VPg（Viral Protein in Genome-linked）的共价连接蛋白，它可能在复制过程中通过结合病毒 RNA 翻译的启动因子发挥作用<sup>[24, 25]</sup>。

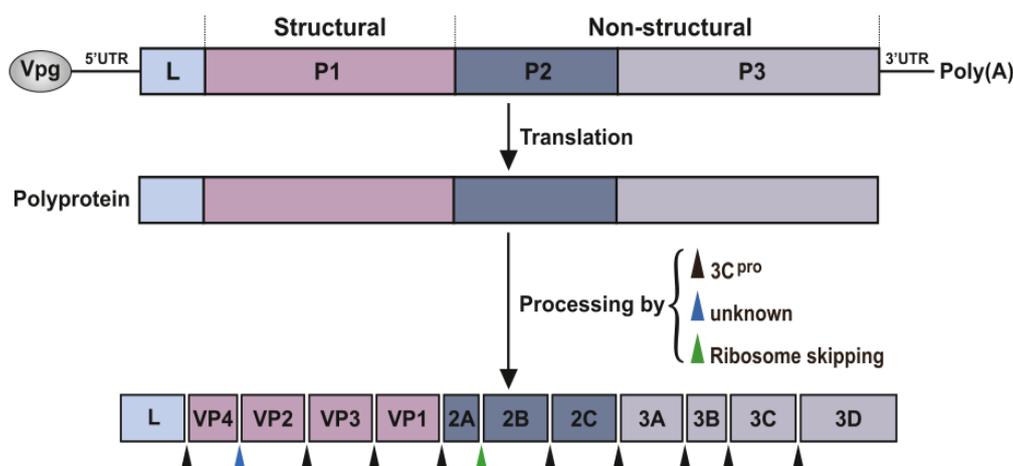


图 1-2 SVA 基因组结构示意图<sup>[26]</sup>

Fig.1-2 Schematic diagram of the SVA genome

### 1.3.1 非编码区

SVA 5'UTR 序列长约 665 bp，包含一个类似丙型肝炎病毒（Hepatitis C virus, HCV）的内部核糖体进入位点（Internal ribosome entry site, IRES），其中 406~625 nt 段序列与丙型肝炎病毒同源性为 57.3%，提示 SVA 的 IRES 为 IV 型。其结构和功能与经典猪瘟病毒（Classical swine fever virus, CSFV）和 HCV 相似，通过抑制细胞 RNA 的翻译来进行病毒 RNA 的独立翻译<sup>[27]</sup>。此外，IRES 通过独立于帽子结合蛋白、真核启动因子（eIF）4E 的过程来招募核糖体亚基<sup>[28]</sup>。IRES 由两个主要的茎环结构域 II（DII）和 III（DIII）组成<sup>[29, 30]</sup>。DII 是一个完整的茎环结构，而 DIII 包含有七个茎环亚域：DIIIa、DIIIb、DIIIc、DIII d1、DIII d2、DIII e 和 DIII f<sup>[31]</sup>。IRES 中的茎环结构是帽子非依赖性翻译活动和病毒复制的必需元件，发挥十分重要的作用<sup>[32]</sup>。已有研究证明 SVA III d2 亚结构域是病毒 RNA 合成和 SVA 生长所必需的，但不是 IRES 功能所必需的，III d2 缺失对 IRES 的活性没有影响<sup>[27]</sup>。SVA IRES 在病毒起始密码子 AUG 的上游含有假结结构。SVA 假结包含两个关键结构，即假结茎 I 和 II（PKS-I 和 II）。PKS-I 由两个碱基配对基序

(PKS-Ia 和 Ib)组成, 它们之间有一个 2 个碱基的不配对间隔 (UpS) (图 1-3A)。其中, PKS-Ib 基序对于病毒的生长是必不可少的<sup>[33]</sup>。一项研究表明, 破坏 IRES 中 PKS-II 的形成不会消除 IRES 启动蛋白表达的能力, 但会抑制病毒从 cDNA 克隆中恢复<sup>[34]</sup>。在 PKS-II 形成基序 (5'-UAGGU-3') 和起始密码子 AUG 之间共有 13 个核苷酸 (5'-AGCACAUACAAAU-3'), 且在野生型 SVA 中高度保守 (图 1-3B)。经验证, 假结和假结-AUG 间距对于 SVA 的复制至关重要<sup>[35, 36]</sup>。SVA 3'UTR 长度只有 71 nt, 末端含有多聚腺苷酸 Poly (A) 尾, 还具有两个发夹结构 (发夹 I 和发夹 II) 并相互作用形成吻合环结构<sup>[2]</sup>。3'UTR 可能参与病毒的复制和翻译, 其中, 发夹 I 在 SVA 的复制中发挥重要作用<sup>[27, 37]</sup>。

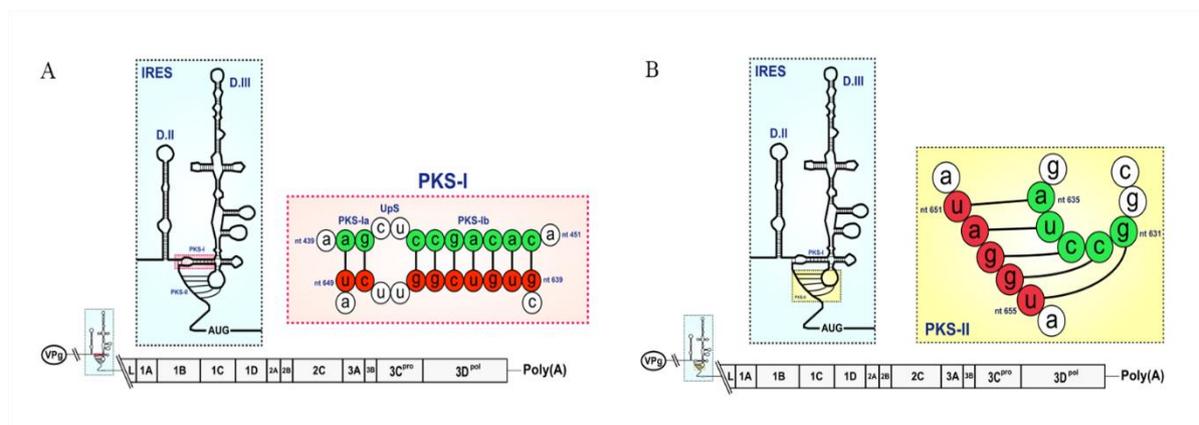


图 1-3 SVA 基因组 IRES 中 PKS-I 和 PKS-II 示意图<sup>[33, 34]</sup>

Fig. 1-3 Schematic representation of PKS-I and PKS-II within IRES of SVA genome

### 1.3.2 前导蛋白 L

前导蛋白 L (Leader protein) 是 SVA 编码的第一种蛋白质, 位于衣壳蛋白之前, 全长共包含 79 个氨基酸, 分子量仅有 9 KDa<sup>[2]</sup>。L 蛋白在小 RNA 病毒科中只存在于心病毒属 (*Cardiovirus*)、口蹄疫病毒属 (*Aphthovirus*)、捷申病毒属 (*Teschovirus*)、萨佩罗病毒属 (*Sapelovirus*)、峭病毒属 (*Kobuvirus*) 以及 A 型塞内卡病毒属 (*Senecavirus A*) 中。L 蛋白的序列在小 RNA 病毒科中高度可变, 其功能也不太保守。在口蹄疫病毒属和心病毒属中, L 蛋白是一种类似木瓜蛋白酶的半胱氨酸蛋白酶, 可以切割真核起始因子, 并通过抑制宿主细胞蛋白的合成来调节病毒的转录和翻译<sup>[38, 39]</sup>。此外, 心病毒属的 L 蛋白发挥多种与关键细胞过程密切相关的功能, 如 I 型干扰素和趋化因子的产生、应激颗粒的形成、核质运输、细胞凋亡和丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 活性等<sup>[40]</sup>。然而, L 蛋白既没有蛋白水解活性所需的催化残基, 也没有锌指基序和酪氨酸磷酸化基序<sup>[2]</sup>。L 蛋白的基因序列与其他小 RNA 病毒存在着较大的差异, 推测其可能具有

独特的功能，但 L 蛋白在 SVA 生命周期中的作用至今仍不清楚，仍需进一步挖掘其功能机制。

### 1.3.3 结构蛋白

结构蛋白主要参与病毒粒子的侵袭和组装。SVA 衣壳蛋白由基因组的 P1 区编码。P1 多肽被 3C 蛋白酶切割以产生 VP0、VP1 和 VP3。起初三种结构蛋白相互作用形生五聚体，在衣壳的组装过程中 VP0 进一步成熟裂解为 VP2 和 VP4<sup>[2,41]</sup>。VP1 蛋白包含 264 个氨基酸 (aa)，含有 BC 型环 (残基 50-74)、CD-II 型环 (残基 94-109) 和 GH 型环 (残基 185-215) 等三个茎环。VP2 蛋白包含 284 个氨基酸，含有一个 EF 型环 (残基 172-200)<sup>[19]</sup>。此外，VP2 蛋白编码序列中存在一个包含典型 AAACA 基序的顺式作用复制元件 (cre)，该基序将两个 U 残基添加到病毒 VPg 模板以产生病毒 RNA 合成所需的二酰化 VPg (VPg-pUpU)<sup>[42]</sup>。VP3 蛋白包含 239 个氨基酸，具有一个“knob”结构 (残基 57-73)。这些结构与病毒附着、侵袭、血清型特异性和保护性免疫反应有关，并且大多数抗原表位位于这些衣壳蛋白的环结构上<sup>[19]</sup>。

分布在病毒颗粒外表面的 VP1 蛋白被认为是免疫原性最强的结构蛋白，可以引发 B 细胞和 T 细胞反应，这意味着 VP1 蛋白中存在潜在的 B 细胞和 T 细胞表位<sup>[43-46]</sup>。然而，目前使用其单克隆抗体仅鉴定出一个线性 B 细胞表位，即 <sup>21</sup>GELAAP<sup>26</sup><sup>[47]</sup>。由于小 RNA 病毒科成员具有高度多态性的 VP1 蛋白，且包含有主要的中和抗原位点，因此 VP1 蛋白不仅可用于建立检测病毒抗体的血清学测定法，还可用于病毒的分子流行病学研究<sup>[43,48]</sup>。利用 VP1 蛋白进行 SVA 的演化分析，发现了四个从未被发现的核苷酸突变 (A65T、N94S、A114P 和 S229G)，这些突变被认为与当前中国 SVA 毒株中观察到的致病性改变有关<sup>[49,50]</sup>。最新的研究发现，与非结构蛋白类似，VP1 蛋白可以激活 AKT-AMPK-MAPK-MTO 信号通路诱导自噬<sup>[51]</sup>。

VP2 蛋白也是 SVA 外壳上的重要抗原。VP2 蛋白中已鉴定出多种不同的线性 B 细胞表位，包括 <sup>12</sup>DRVITQT<sup>18</sup>、<sup>71</sup>WTKAVK<sup>76</sup>、<sup>98</sup>GGAFTA<sup>103</sup>、<sup>150</sup>KSLQELN<sup>156</sup>、<sup>153</sup>QELNEE<sup>158</sup>、<sup>248</sup>YKEGAT<sup>253</sup> 等<sup>[47, 52, 53]</sup>。VP0 裂解产生 VP2 和 VP4 发生在病毒粒子形成和成熟的过程中，对病毒粒子的稳定性和传染性至关重要<sup>[54]</sup>。但关于 VP0 裂解成 VP2 和 VP4 的机制知之甚少。根据早期其他小 RNA 病毒的研究，有人提出 SVA VP2 中的组氨酸残基 H204 可能是 VP0 自裂解的原因，发生在病毒组装的最后阶段，并与病毒 RNA 的封装有关<sup>[20]</sup>。

VP3 蛋白在病毒感染和宿主的致病过程中起着重要的作用。VP3 蛋白可以在病毒感染早期诱导产生中和抗体<sup>[55]</sup>。现已利用单克隆抗体 (3E9) 在 VP3 蛋白中识别出一

个高度保守的线性 B 细胞表位 ( $^{192}\text{GWFSLHKLTK}^{201}$ )。进一步鉴定表明 W193、F194、L196 和 H197 是该单克隆抗体识别的关键残基<sup>[56]</sup>。VP4 蛋白的 N 端通常与肉豆蔻酸残基共价连接,这对于 VP4 蛋白介导的膜穿透十分重要<sup>[57]</sup>。其他小 RNA 病毒的研究表明,病毒通过与其细胞受体结合来启动感染,同时病毒衣壳发生构象变化,导致 VP4 蛋白外化并插入内体膜<sup>[58]</sup>。病毒进入细胞依赖于内吞作用,此时,VP4 蛋白发挥形成膜孔的特殊功能,病毒 RNA 通过囊泡膜上的孔道进入细胞质并启动翻译和复制<sup>[58, 59]</sup>。

### 1.3.4 非结构蛋白

虽然非结构蛋白不参与病毒组装,但它们在病毒复制和成熟过程中发挥着多种关键作用。它们可以改变膜的通透性和信号通路,促进病毒蛋白的转录,并帮助逃避宿主的抗病毒免疫反应。

#### 1.3.4.1 P2 前体蛋白

P2 前体蛋白被 3C 蛋白酶切割成 2A、2B、2C。2A 和 2B 蛋白之间的切割没有任何蛋白酶的参与,这是由于 2A 蛋白的羧基末端存在保守的 NPGP 基序,诱导并发挥 P1-2A/2BC-P3 核糖体跳跃功能,在 NPGP 基序的“G↓P”位点将 2A-2B 蛋白分离<sup>[2, 60]</sup>。SVA 2A 蛋白与小 RNA 病毒科其他病毒的 2A 蛋白存在显著差异,其 2A 蛋白仅含有 9 个氨基酸,是小 RNA 病毒科 2A 蛋白中最短的<sup>[2]</sup>。因此,2A 蛋白可能不存在其他已知的活性。2B 蛋白包含 128 个氨基酸,大小为 14.4 kDa。小 RNA 病毒中的 2B 蛋白具有病毒通道蛋白或病毒通道样蛋白活性,可以增强细胞膜的通透性,以促进细胞感染过程中病毒的复制和释放<sup>[61, 62]</sup>。小 RNA 病毒 2B 蛋白的二级结构彼此相似,推测 SVA 2B 蛋白也可作为病毒通道蛋白来提高膜通透性<sup>[1, 2]</sup>。此外,2B 蛋白以半胱天冬酶-9 (caspase-9) 和 caspase-3 依赖的方式诱导线粒体抗病毒信号蛋白 (MAVS) 降解来抑制 I 型干扰素的产生,其中,氨基酸 1-48 和 100-128 区域被确定为 2B 蛋白发挥该功能的关键区域<sup>[63]</sup>。另一项研究表明,2B 蛋白可在病毒复制过程中诱导线粒体 DNA (mtDNA) 的释放,释放的 mtDNA 与 cGAS 结合并激活环状 GMP-AMP 合成酶-干扰素基因刺激因子 (cGAS-STING) 介导的抗病毒免疫反应<sup>[64]</sup>。SVA 2AB 前体蛋白可以抑制自噬蛋白降解,以拮抗宿主对病毒的抑制作用,但目前没有直接证据表明 2B 蛋白参与自噬<sup>[65]</sup>。SVA 2C 蛋白序列高度保守,包含 322 个氨基酸,大小为 35.6 kDa,作为一种解旋酶样多肽参与 RNA 的合成。研究表明,2C 蛋白靶向于线粒体,通过激活 caspase-3 诱导细胞凋亡<sup>[66]</sup>。2C 蛋白还通过依赖自噬途径的方式诱导 cGAS 降解,其中第 9 位和第 153 位氨基酸发挥关键作用<sup>[64]</sup>。此外,2C 蛋白可以协同 3C 蛋白通过半胱天冬酶 (Caspase) 信号通路诱导视黄酸诱导基因蛋白-I (RIG-I) 降解,并降低仙台病

毒 (Sendai virus, Sev) 或 RIG-I 诱导的 IFN- $\beta$  产生来削弱宿主的先天免疫反应<sup>[67]</sup>。

#### 1.3.4.2 P3 前体蛋白

P3 前体蛋白被 3C 蛋白酶切割成 3A、3B、3C 和 3D。3A 蛋白是一种小型疏水膜蛋白, 包含 90 个氨基酸, 大小为 9.4 kDa, 且含有跨膜  $\alpha$  螺旋, 参与形成病毒复制复合体和复制细胞器的过程, 也与发病机制有关<sup>[2, 68]</sup>。但关于 3A 蛋白的功能知之甚少, 其功能还需进一步挖掘。最新的一项研究表明, 与 FMDV 类似, SVA 的 3A 蛋白可以抑制 IFN 信号传导, 并通过自噬途径抵消宿主的先天抗病毒反应<sup>[69]</sup>。3B 蛋白含有 66 个氨基酸, 大小为 2.4 kDa, 编码与其基因组 5'末端共价连接的 VPg 蛋白, 并作为负链和正链 RNA 合成的蛋白引物发挥作用<sup>[1]</sup>。FMDV 3B 蛋白可以与 RIG-I 等宿主抗病毒因子相互作用, 阻断 RIG-I 介导的免疫信号传导和宿主抗病毒反应<sup>[70]</sup>。但 SVA 3B 蛋白确切的功能机制仍有待明确。3C 蛋白包含 211 个氨基酸, 是一种类胰凝乳蛋白酶, 具有蛋白酶活性, 且其活性位点是相对保守的。3C 蛋白作为小 RNA 病毒科中的多功能蛋白被广泛研究。SVA 3C 蛋白在拮抗宿主抗病毒免疫中发挥多功能作用。几项研究表明, 3C 蛋白可以通过切割 MAVS、含有 Toll/IL-1R 结构域的接头诱导 IFN- $\beta$  (TRIF) 和 TRAF 家族成员相关 NF- $\kappa$ B 激活剂 (TANK) 来抑制 I 型干扰素的产生, 降解 RIG-I、关键干扰素调节因子 (IRF3、IRF7、IRF9)、信号转导与转录激活因子 (STAT1、STAT2) 等关键细胞因子以逃避宿主先天免疫应答<sup>[67, 71-73]</sup>。此外, 3C 蛋白还具有去泛素化作用, 靶向 RIG-I、TANK 结合激酶 1 (TBK1) 和 TNF 受体相关因子 3 (TRAF3) 抑制其泛素化, 从而抑制 I 型 IFN 信号通路的激活<sup>[74]</sup>。SVA 3C 蛋白在调节细胞死亡途径 (凋亡、焦亡、自噬等) 中也发挥一定的作用。3C 蛋白的水解活性在诱导细胞凋亡中发挥十分重要的作用, 并伴有细胞色素 C 释放到细胞质中<sup>[66, 75]</sup>。3C 蛋白通过切割 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NLRP3) 来抑制 NLRP3 炎症小体激活和典型细胞焦亡, 或在 Q193 和 Q277 位点裂解猪 Gasdermin D 蛋白 (pGSDMD) 并诱导 Caspase 非依赖性细胞焦亡<sup>[76]</sup>。3C 蛋白还可以协同 VP3 蛋白激活 ERK1/2 MAPK-MTOR 和 p38 MAPK-MTOR 通路以诱导细胞自噬<sup>[51]</sup>。另外, SVA 3C 蛋白还被证明能够促进病毒复制并抑制宿主细胞的翻译。有研究表明 3C 蛋白通过裂解和转运异质核糖核蛋白 A1 (hnRNP A1) 以促进 SVA 的复制<sup>[77]</sup>。另一方面, 3C 蛋白利用其蛋白酶活性诱导 poly (A) 结合蛋白细胞质 1 (PABPC1) 在残基 437 处裂解以抑制宿主细胞翻译<sup>[78]</sup>。此外, 3C 蛋白酶还能够破坏 eIF4G1-G3BP1 蛋白相互作用来抑制应激颗粒 (SGs) 的形成<sup>[79]</sup>。3D 蛋白是 SVA 编码的最后一个蛋白质, 是一种 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RdRp), 包含 463 个氨基酸, 大小为 51.3 kDa。3D 蛋白与其他小 RNA 病毒的 RdRp 具有一样的结构, 参与病毒

的复制，且可以与 3AB 蛋白相互作用，也可以作为 3CD 蛋白的组成部分<sup>[2]</sup>。RdRp 与其他病毒蛋白和宿主因子相互作用，启动和调节病毒 RNA 合成，参与病毒复制复合物的形成<sup>[80]</sup>。

## 2 A 型塞内卡病毒的流行病学

### 2.1 易感动物、传染源及传播途径

不同年龄段的猪都可被 SVA 感染，新生仔猪更为易感，尤其是 1~4 日龄仔猪，其发病率和死亡率更高，发病率高达 70%，死亡率从 15%~30%不等<sup>[43, 81, 82]</sup>。SVA 致病性的强弱可能因猪的年龄、品种以及毒株的不同而存在差异。患病猪和恢复期的猪都是本病的主要传染源。病毒血症期间是猪排毒的高峰期，病猪口、鼻、蹄部的水疱病灶、呼吸道分泌物以及排泄废物中均含有大量病毒，排出体外后污染的水源、饲料、运输工具以及农场走廊环境形成新的潜在传染源<sup>[16, 83-85]</sup>。虽然猪是 SVA 的主要天然宿主，但临床研究表明，啮齿类动物和昆虫也会传播病毒。通过 RT-qPCR 技术在小鼠粪便和小肠以及苍蝇样本中检测到了 SVA 抗原<sup>[16]</sup>。实验感染 SVA 的小鼠在接种后至少两周内可以保持亚临床状态并在粪便中脱落病毒，且 SVA 在苍蝇体内的存活时间长达至少 48 h<sup>[86]</sup>。这些结果表明，小鼠和苍蝇可能是 SVA 的天然贮存库和潜在载体。此外，科研人员在水牛、库蠓的体内也检测出 SVA 阳性抗原，并从水牛体内分离出一株 SVA 毒株，这一结果丰富了 SVA 的传播途径<sup>[85, 87]</sup>。上述结果表明，除了猪是 SVA 的天然传染源外，小鼠、水牛、苍蝇、库蠓等均可作为 SVA 的传播媒介。SVA 既可以直接接触传播，也可通过饲料、饮水等媒介间接接触传播。持续感染的母猪作为重要的传播宿主，可以将 SVA 传播给其所生的接触性仔猪，且 SVA 有可能在仔猪之间进行传播<sup>[88, 89]</sup>。已知 FMDV 可以通过气溶胶进行传播，但没有直接证据可以表明 SVA 也能进行气溶胶传播<sup>[90]</sup>。此外，研究人员在新生仔猪的多个组织中检测出 SVA 的 RNA 和抗原，并引发仔猪身上的多处病变，提示垂直传播可能是 SVA 的一种传播方式，但仍需进一步证实<sup>[91]</sup>。

### 2.2 国内外流行情况

SVA 于 2002 年在美国首次被发现，研究人员从细胞培养污染物中分离出一种新的未知病毒，经测序鉴定后命名为 A 型塞内卡病毒（Senecavirus A）。在美国进行的一项

为期 20 年的回顾性研究表明,自 1988 年以来, SVA 就在该国存在且可能一直在悄悄传播<sup>[2]</sup>。上世纪 80 年代起,美国、澳大利亚、新西兰、英国、意大利等国家就报道了多例未知病因的水疱病病例,且 FMD、SVD、VS、VES 等水疱病的诊断结果均为阴性<sup>[3-7]</sup>。2004 年,美国印第安纳州报告了不同类别猪只中水疱病的爆发,临床表现类似于外来动物水疱病,由于无法确定临床症状的病因,该综合征被命名为猪特发性水疱病 (PIVD)<sup>[8]</sup>。直至 2007 年,研究人员从加拿大运往美国的水疱病病猪的病变样本中检测到 SVA RNA,并将 SVA 作为这些猪水疱病的病原体<sup>[9]</sup>。2012 年,在美国印第安纳州一个患有水疱性病变的 6 月龄猪身上第二次检测到了 SVA,进一步证实了水疱病与 SVA 感染之间的相关性<sup>[15]</sup>。

2014 年底至 2015 年初,巴西不同区域的多个猪场报告了 SVA 疫情的大规模暴发,不同年龄段的猪(包括仔猪和成年猪)均受影响,其中,1~4 日龄新生仔猪的死亡率呈逐步上升趋势<sup>[10,11]</sup>。据报道,发病仔猪的临床症状包括嗜睡、皮肤充血、腹泻、神经症状和猝死等,临床症状和高死亡率持续约 2~3 周。成年猪的临床症状包括冠状动脉带、趾间隙和鼻子的囊疱或溃疡病变等<sup>[11, 81, 92]</sup>。另一项调查显示,在巴西的第二波疫情中,仔猪和育肥猪中 SVA 的暴发数量有所增加<sup>[93]</sup>。一项为期 10 年(2007-2016 年)的回顾性血清学调查显示, SVA 在 2014 年之前并未在巴西流行,2014 年之前获得的血清中抗 SVA 的抗体均呈阴性<sup>[94]</sup>。同年该国首次报告了 SVA 相关水疱病的暴发,这表明 SVA 极有可能是在 2014 年间流入巴西境内的。2014 年似乎是 SVA 在全球传播的一个重要转折点。自 2014 年之后, SVA 在全球范围内的传播愈演愈烈,巴西、美国、加拿大、哥伦比亚、泰国、越南、中国和印度等国家均出现了 SVA 疫情,感染相关的发病率和死亡率也显著增加<sup>[10, 16, 95-100]</sup>。

2015 年 3 月,中国广东省首次报道了 SVA 感染病例,并分离出中国第一个 SVA 毒株(CH-01-2015),临床症状主要表现为母猪水疱性病变和新生仔猪急性死亡。序列比对显示,新出现的毒株与来自加拿大、巴西和美国的 8 个 SVA 毒株具有 94.4~97.1% 的基因组同源性<sup>[14, 99]</sup>。2016 年 3 月,湖北省养猪场的仔猪受 SVA 影响暴发了水疱病,分离出一株传染性 SVA 毒株(HB-CH-2016),与 CH-01-2015 具有极高(99%)的基因组同源性,表明中国 SVA 爆发的这两次事件之间存在显著的流行病学相关性<sup>[101]</sup>。2016 年底至 2017 年初,黑龙江省、福建省和河南省陆续出现 SVA 疫情,并分离出三株毒株(SVA/HLJ/CHA/2016、CH/FuJ/2017 和 CH-HNKZ-2017),然而,这些毒株与美国毒株具有较高的遗传同源性<sup>[49, 102, 103]</sup>。上述结果表明不同来源的 SVA 毒株已经在中国流行。自 SVA 于 2015 年在中国广东省出现后,逐渐蔓延到其他省份,如今已有超过

半数的省份受到 SVA 的影响。中国动物卫生与流行病学中心 (CAHEC) 2019 年的调查报告以及其他的报道显示,除了广东、湖北、黑龙江、福建和河南之外,湖南、广西、山东、上海、云南、四川、辽宁、吉林、新疆、贵州、海南和甘肃等 12 个省市均有 SVA 被检出,严重影响了我国的生猪养殖<sup>[104-110]</sup>。对中国的 SVA 毒株进行系统演化分析,发现其可以分为 5 个遗传分支,表明自 2015 年以来,SVA 中国分离株呈现较快的演化速度,且不同毒株之间可能已经发生基因重组及变异的情况,提示 SVA 在我国流行的严峻形势<sup>[111]</sup>。

SVA 作为小 RNA 病毒,其在体外和体内复制过程中具有较高的基因突变率,通过复制选择机制进行的基因组重组是小 RNA 病毒的遗传特征。自在中国出现以来,SVA 一直在不断演化,已有很多关于 SVA 基因组重组的相关报道。研究发现,中国 SVA 分离株 (HeN-1/2018) 的基因组是由两个毒株重组而成,其中两个片段 (1-959 和 2355-7312 nt) 源自 USA/IA44452/2015,另一个片段 (960-2354 nt) 源自 USA/IN\_Purdue\_4885/2015<sup>[112]</sup>。Liu 等<sup>[113]</sup>从康复的水疱病屠宰猪中分离出两种新型 SVA (CH-GDFS-2018 和 CH-GDJY-2018),其结构蛋白区和非结构蛋白区均出现了重组片段,参与了国内和国外毒株之间的遗传重组。此外,Guo 等<sup>[114]</sup>将三个中国分离株 (HeNNY-1/2018、HB-CH-2016 和 SVA/CHN/2017) 鉴定为重组毒株。上述结果表明,自 2016 年或更早以来,SVA 毒株之间的重组可能已经在中国出现,不同毒株之间频繁的基因组重组导致了新变异株的出现,从而增加了 SVA 在中国传播的复杂性。

### 3 A 型塞内卡病毒的感染机制

#### 3.1 细胞受体

病毒粒子感染细胞的先决条件是与细胞表面的受体结合,病毒入侵细胞是一个复杂的过程,取决于多种因素。小 RNA 病毒已经演化出独立的机制来利用不同的分子作为其受体,大多病毒的细胞受体是属于免疫球蛋白超家族 (IgSF) 的细胞表面分子,唾液酸也可起到病毒受体或受体必需成分的作用<sup>[115]</sup>。SVA 不同于小 RNA 病毒科中的其他病毒,炭疽毒素受体 1 (ANTXR1) 是其感染人和猪细胞的独特受体,能直接与 SVA 发生高亲和力和稳定的相互作用<sup>[116, 117]</sup>。与之前发现的大多小 RNA 病毒的受体不同,ANTXR1 不是 IgSF 受体的成员,而是一种在肿瘤中表达的 I 型跨膜糖蛋白,并且 ANTXR1 vWA 结构域中的 N-连接糖基化是 SVA 附着和进入细胞所必需的<sup>[118]</sup>。在 SVA

的感染过程中, ANTXR1 在附着、内化和脱壳方面发挥着关键作用, 但它并不是介导 SVA 感染的唯一受体。其他研究表明, 唾液酸对于神经胶质瘤细胞中的 SVA 感染也发挥一定的作用<sup>[119]</sup>。

### 3.2 感染周期

SVA 感染期间, 病毒粒子首先与宿主细胞表面的 ANXTR1 受体结合, 然后经内吞作用将病毒粒子内化到宿主细胞中<sup>[68, 120]</sup>。SVA 与其受体的结合方式和脱壳机制与其他小 RNA 病毒不同。SVA 与其受体 ANTXR1 复合物的冷冻电镜结构表明, ANTXR1 可通过 VP2 DF 环和 VP1 CD 环附着在病毒上, 导致 VP1 GH 环和 VP3 GH 环的结构变化, 从而减弱质子间的相互作用并破坏衣壳组装的稳定性<sup>[121]</sup>。小 RNA 病毒科中的大多数肠道病毒通常在病毒粒子表面的“峡谷”处与它们的受体结合, “峡谷”是病毒粒子表面围绕 5 倍对称轴的凹陷处。受体结合诱导病毒粒子不稳定并释放“口袋因子”, 一种位于峡谷下疏水口袋中的脂肪酸, 以启动病毒粒子的脱壳<sup>[22]</sup>。结构分析表明, SVA 衣壳不具有典型的“峡谷”结构, 但含有一个无法释放“口袋因子”的疏水口袋, 且疏水裂隙的入口几乎完全被 VP1 亚基中的残基封闭, 这表明 SVA 可能利用不同的机制进行脱壳, 但具体机制尚不清楚<sup>[19]</sup>。SVA 病毒能够通过多种细胞途径感染细胞。它可以利用非受体介导的胞饮作用和受体介导的胆固醇途径入侵猪细胞, 而入侵人类细胞则依赖于酸性内体 pH 值、动力蛋白 II、网格蛋白、小窝蛋白和胆固醇<sup>[68, 120, 122]</sup>。SVA 病毒粒子侵入宿主细胞后, 从晚期内体分别转运到反式高尔基体网络(Trans-Golgi network, TGN) 或溶酶体中, 最终从溶酶体将其 RNA 释放到胞质溶胶中<sup>[120]</sup>。SVA 基因组释放到胞质溶胶中依赖于宿主翻译机制来启动翻译, 但 RNA 分子不能同时用于翻译和 RNA 复制过程。新产生的正链 RNA 分子作为下一轮翻译或复制的模板, 或者通过未知机制包装成成熟的病毒颗粒<sup>[123]</sup>。成熟的病毒颗粒可借助外泌体在细胞间传播, 且外泌体介导的感染无法被 SVA 特异性中和抗体阻断<sup>[124]</sup>。

## 4 A 型塞内卡病毒的临床症状及病理变化

### 4.1 临床症状

SVA 与 FMDV、SVDV、VSV、VESV 等病毒均可引起猪的水疱病, 且其症状极为

相似，单凭临床表现难以与这些经典的病毒性水疱病区分开来。SVA 在猪中诱发急性自限性水疱病，潜伏期为 4~5 日，特征性临床症状包括口鼻部、蹄部以及冠状动脉带上的水疱病变和糜烂，且可导致 10%~90%的猪只出现厌食症和跛行<sup>[15, 111, 125, 126]</sup>。对来自加拿大的一批感染 SVA 的成年猪进行调查显示，部分感染猪只鼻子上有红色的凝聚性糜烂，另有 25%~30%的猪只冠状动脉带和跛足处出现肿胀发白的囊泡，充满半透明液体，偶尔囊泡破裂，呈现圆形坏死边缘<sup>[9]</sup>。仔猪受 SVA 感染的影响尤为突出，7 日龄以内的仔猪受感染后，表现出嗜睡、肌肉无力、流涎过多、皮肤充血、神经症状以及腹泻等多种临床症状，可持续 3~10 天，部分会发生猝死<sup>[81]</sup>。

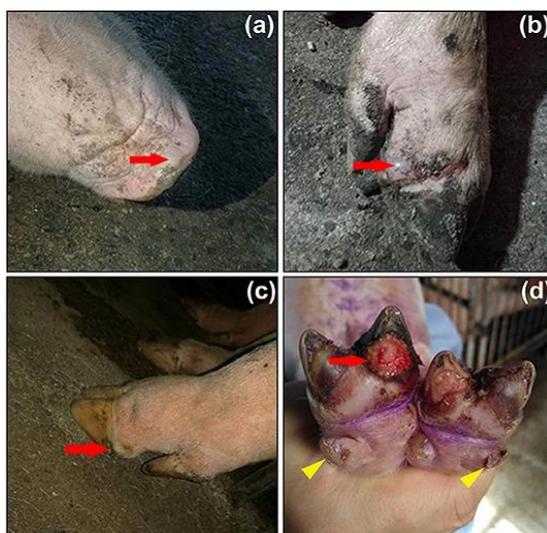


图 1-4 SVA 感染猪只的临床症状<sup>[111]</sup>

Fig.1-4 Clinical symptoms in SVA infected pigs

## 4.2 病理变化

感染 SVA 的 5~6 周龄猪只出现低烧和水疱等临床症状，且其病毒血症可持续至少 2 周。对病猪进行组织学检查后发现，SVA 在心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、颌下淋巴结、腹股沟淋巴结、肠道、舌头、扁桃体和蹄部水疱等组织中均有分布，表明 SVA 具有广泛的组织嗜性。其中，蹄部水疱、淋巴结和扁桃体中的病毒载量高于其他组织<sup>[85]</sup>。扁桃体中的病毒水平最高，且 SVA 可以在扁桃体中复制，表明扁桃体可能是感染急性期 SVA 复制的主要部位之一<sup>[126]</sup>。成年病猪的皮肤病变主要表现为表皮增生、溃疡、角膜塑形和角化不全性角化过度、中性粒细胞浸润和细胞碎片等<sup>[15]</sup>。在感染猪只冠状动脉带水疱性病变的皮肤中还观察到冠状动脉带皮炎，特征表现为真皮与表皮

的多灶性分离，并伴有水肿、炎症细胞浸润、角质形成细胞坏死、轻度出血和纤维蛋白积聚。此外，感染后的前 3~7 天，在扁桃体、脾脏和淋巴结中观察到轻度至中度的淋巴增生，而肺部则出现轻度肺不张，偶有弥漫性充血<sup>[126]</sup>。在仔猪中，间质性肺炎是 SVA 引发的主要组织病理学病变，其他组织病变还包含有白喉舌炎、肾盂上皮气球样变性、膀胱移行上皮、小肠萎缩性肠炎、淋巴细胞性心肌炎、淋巴浆细胞性脑炎、非化脓性脑膜脑炎、脉络丛炎以及罕见的细胞质内嗜酸性包涵体等。仔猪的皮肤损伤与成年猪的相似，主要表现为角化过度、坏死和真皮结痂等<sup>[81, 92, 127]</sup>。

## 5 A 型塞内卡病毒的诊断及预防

### 5.1 诊断技术

SVA 在临床上难以与其他经典病毒性水疱病鉴别开来，增加了临床诊断的难度。因此，建立一系列快速、灵敏和特异性的水疱性疾病诊断和鉴定方法来检测 SVA 感染对于其预防和控制是十分必要的。随着生物技术的发展，不同的分子诊断技术不断更新，在猪水疱病的病原体检测中发挥着显著的作用。现如今，已经建立了多种常规和新型的方法来诊断 SVA 感染。

#### 5.1.1 病原学诊断

基于 SVA 核酸的检测方法具有较高的特异性和灵敏度，在临床检测 SVA 方面发挥巨大的作用。现已有多种传统以及新型的分子检测方法报道，主要包括常规 RT-PCR、实时 RT-PCR (rRT-PCR)、绝缘等温 RT-PCR (RT-iiPCR)、套式 PCR、实时荧光定量 RT-PCR (qRT-PCR)、逆转录液滴数字 PCR (RT-ddPCR)、逆转录环介导的等温扩增 (RT-LAMP)、RT-LAMP-侧向层析试纸 (RT-LAMP-LFD)、重组酶聚合酶扩增 (RPA) 和 RPA-侧流层析试纸 (RPA-LFD) 等。上述所有方法中，qRT-PCR 在临床检测上的应用最为广泛，是所有水疱疾病检测的金标准，能够快速准确地从不同生物样本中检测 SVA 基因组。

目前已报道有多种不同靶标的分子生物学测定方法。范慧等<sup>[128]</sup>对 40 株 SVA 基因序列进行同源比对，选择其保守区域设计了 3 对引物并筛选出最佳扩增引物，通过对扩增参数进行优化成功建立了 SVA 的 RT-PCR 检测方法。该方法具有良好的特异性，且敏感性试验结果显示，病毒检测限可达 1 TCID<sub>50</sub>。靶向 SVA 3D 基因开发出一种新型 rRT-PCR，与其他水疱病病毒无交叉反应，灵敏度为 0.79 TCID<sub>50</sub>/ml，并可开发为商业

试剂盒<sup>[129]</sup>。靶向 SVA 保守的 5'UTR 和 3D 基因分别开发了 rRT-PCR 和 RT-iiPCR 检测方法,具有很高的灵敏度和特异性,其中 RT-iiPCR 适用于现场病原体的检测<sup>[130]</sup>。Feronato 等<sup>[131]</sup>设计靶向 VP1 基因的引物开发出一种套式 PCR,特别适用于大批量样本检测以及当其他技术不适用或检测为阴性的情况。qRT-PCR 是病原学检测较为常用的一种方法。Dall 等<sup>[132]</sup>利用 TaqMan 荧光探针靶向 SVA 基因组 VP1 基因的保守区域开发出一种新型 qRT-PCR 检测方法,灵敏度可达 13 拷贝/ $\mu\text{L}$ ,可作为病毒诊断和测定感染动物组织中 SVA 载量以及流行病学研究的有效工具。此外, Mu 等<sup>[133]</sup>靶向 SVA 高度保守的 L/VP4 基因序列开发出一种基于 SYBR green I 的 qRT-PCR 方法,病毒检出限可达  $6.4 \times 10^1$  拷贝/ $\mu\text{L}$ 。新型 RT-ddPCR 是一种第三代 PCR 技术。Zhang 等<sup>[134]</sup>基于 3D 基因开发的 RT-ddPCR 方法,其病毒检出限高达  $1.53 \pm 0.22$  拷贝/反应,灵敏度是 RT-rPCR 的 10 倍,在病毒载量低的样品中也能灵敏地检测 SVA。RT-LAMP 测定被认为是现场诊断 SVA 的快速检测方法。Armson 等<sup>[135]</sup>针对 SVA 5'UTR 和 VP3 基因开发出两种 RT-LAMP 检测方法,具有高度的灵敏度和特异性,且可在样品采集现场进行快速诊断检测,从样品接收到完成扩增仅需 12 分钟。将 RT-LAMP 与侧向层析试纸(LFD)相结合,开发出新型的 RT-LAMP-LFD 方法, SVA 检出限约为 11 拷贝/ $\mu\text{L}$ ,灵敏度是 RT-PCR 的 10 倍<sup>[136]</sup>。该方法摆脱了仪器的局限性,省时省力,有助于现场快速准确诊断。RPA 作为另一种新工具,是一种用于检测病毒核酸的高灵敏度和选择性等温扩增技术。Wang 等<sup>[137]</sup>针对 SVA 的保守区域开发了一种可在样本采集点使用的快速、简单、方便、低成本的 RPA 检测方法,该方法具有良好的灵敏度和特异性,通常可在 8~20 min 内得出结果。此外,樊晓旭等<sup>[138]</sup>针对 SVA 3D 基因开发的 RPA 方法,40°C 条件下,可在 10 分钟内检测到最低浓度为 28 拷贝/ $\mu\text{L}$  的 SVARNa。后又与 LFD 结合建立了 SVARPA-LFD 检测方法,可快速检测 SVA 且不依赖任何仪器设备<sup>[139]</sup>。上述这些传统以及新型的检测方法各有其自身的相对优点,针对不同的情况可选择最适合的检测方法。

### 5.1.2 血清学诊断

除了基于核酸的检测方法外,血清学诊断在 SVA 的临床检测中也起着关键作用。VP1、VP2 和 VP3 结构蛋白都已被评估为间接 ELISA 检测 IgG 的潜在抗原靶标。赵月龙等<sup>[140]</sup>开发了一种基于 VP1 蛋白的间接 ELISA,可用于检测 SVA 诱导的血清抗体,并与普通猪病毒的血清无交叉反应。Dvorak 等<sup>[141]</sup>将分离纯化出来的 VP1、VP2、VP3 蛋白用于包被板以开发一种间接 ELISA 用于特异性鉴定 SVA 血清抗体。结果显示,针对 VP2 蛋白的抗体反应高于 VP1 和 VP3,且 SVA-VP2-ELISA 的 ROC 分析显示灵敏

度和特异性分别为 94.2%和 89.7%。更多的研究表明基于 VP2 蛋白的阻断和间接 ELISA 对抗 SVA 血清显示出高灵敏度和特异性<sup>[142, 143]</sup>。基于病毒样颗粒 (Virus like particles, VLPs) 与天然病毒颗粒相似, 具有高度有序重复结构的高优先级抗原, 且比完整的病毒颗粒或多肽具有更好的安全性和免疫原性, Bai 等<sup>[144]</sup>利用 SVA-VLP 作为包被抗原开发了一种竞争性 ELISA, 其特异性和灵敏度分别为 100%和 94%。而 Ma 等<sup>[145]</sup>则利用制备的两种 SVA 单克隆抗体分别作为捕获抗体和检测抗体开发出用于检测 SVA 中和抗体的竞争性 ELISA, 该方法与其他相关病原体无交叉反应性, 其灵敏度和特异性分别高达 98.11%和 100%。另外, Liu 等<sup>[146]</sup>开发了一种用于检测血清样品的病毒中和试验 (VNT), 由于其结果将取决于绿色荧光, 而不是 CPE, 比传统 VNT 更为快速、灵敏和特异。

## 5.2 防控措施

近年来, 许多生猪生产国包括我国的大多省市都报告了 SVA 感染病例, 因此, 如何避免 SVA 相关的水疱病 (SVA-VD) 疫情发生显得尤为重要。目前, 在对 SVA 的感染发病机制、免疫学和流行病学等方面都取得了巨大进展, 获得的大量信息可直接应用于预防和控制 SVA-VD 的爆发。

目前, 尚无针对 SVA 感染的商业化疫苗或特异性治疗方法, 因此, 应加强包括畜群、动物和环境在内的生物安全措施, 避免将 SVA 和其他传染性病原体引入健康猪群和已确定感染的猪群。必须严格控制车辆、设备、人员、动物和食品进入养猪生产区域。在一项风险评估研究中, 牲畜拖车和尸体清除设备被主观评估为最有可能引入 SVA 的途径。因此, 车辆流通区域应远离牲畜饲养区域, 且使用同一车辆或牲畜拖车进行生猪运输, 避免与 SVA 阳性畜群的车辆、人员或动物接触<sup>[125]</sup>。此外, 还应加强流动人员以及养殖环境的生物安全问题。人员流动方面, 做好员工进出养殖区的消毒工作, 包括衣服、鞋子等的消毒。养殖环境方面, 必须对各种养殖设施、圈舍、走廊等进行严格的清洁和消毒, 可以使用氢氧化钠 (2%)、碳酸钠 (4%)、柠檬酸 (0.2%)、乙酸 (2%)、次氯酸钠 (3%)、氯化钠 (1%) 和二氧化氯等进行全面的消毒。此外, 加速过氧化氢 (AHP) 一种广谱消毒剂也被证明是一种有效的 SVA 消毒剂, 但其疗效取决于稀释度 (1:20) 和接触时间 (10 分钟)<sup>[147]</sup>。小鼠、苍蝇、库蠓等啮齿动物和昆虫已被证明是 SVA 的传播媒介, 因此, 做好养殖场蚊蝇、库蠓、小鼠的灭杀工作尤为重要, 切断其传播途径。新生仔猪, 尤其是一周龄以下的仔猪, 作为最易感 SVA 的对象, 应摄入足

量的优质初乳，并饲养在舒适的环境中，做好易感动物的防护工作。除去上述措施，对生猪的日常监测更有利于控制和预防病毒的传播。通过对养殖场有症状和无症状猪的生物样本进行定期诊断检查，一旦发现及时清除。以 SVA 为模型，牛津纳米孔（Oxford Nanopore MinION）测序已被证明可以用作调查和监测新发病毒性疾病的强大工具，可以快速、准确地检测出病原体<sup>[148]</sup>。

### 5.3 疫苗研发进展

疫苗免疫是预防和控制 SVA 最有效的方法，然而，目前市场上尚无商业化的 SVA 疫苗销售。因此，迫切需要开发一系列安全有效的疫苗，如今已有几种关于 SVA 疫苗的报道，包括灭活疫苗、减毒活疫苗、病毒颗粒样疫苗等。

在已报道的所有 SVA 疫苗中，灭活疫苗最早被研制。研究人员使用 SVA 分离株（CH-FJ-2017）制备出一种灭活候选疫苗。该灭活疫苗可诱导高滴度的中和抗体，且在受到同源病毒攻击时没有表现出临床症状，表明所生产的疫苗具有很高的保护效力<sup>[149]</sup>。此外，该研究小组还构建了一种重组质粒，该质粒不仅在 293T 细胞中有效表达融合多肽 P12A-3C，还可以在小鼠中诱导高滴度的 SVA 特异性抗体，为 SVA 疫苗的研制奠定了基础<sup>[150]</sup>。2019 年，Sharma 等<sup>[151]</sup>利用反向遗传学技术开发了一种新型的重组减毒 SVA 毒株（rSVA mSacII），体内实验表明该毒株已明显致弱，接种动物不会出现病变、病毒脱落，且病毒血症明显减少。rSVA mSacII 减毒株保留了其免疫原性，其免疫原性和保护效力评估显示，单剂量免疫即可诱导高滴度的中和抗体反应，证明了该减毒疫苗作为 SVA 候选疫苗的巨大潜力。然而，灭活疫苗、减毒疫苗仍然存在其弊端，疫苗减毒或灭活不足可能会导致动物发病并传播。病毒样颗粒（VLPs）疫苗作为一种新型疫苗，不含有遗传物质，不具有传染性或复制能力，比传统灭活、减毒疫苗更为安全，且具有与完整病毒相同的免疫原性，并诱导完美的免疫保护。Mu 等<sup>[152]</sup>利用原核表达系统表达纯化 SVA 的四种衣壳蛋白，并使用改进的 SUMO 融合蛋白原核表达系统来分别生产 His-SUMO 融合蛋白，进而自发组装形成与天然 SVA 颗粒大小和形状相似的 SVA VLPs。对猪进行免疫实验显示，接种动物机体的体液和细胞免疫均被激活，该 VLPs 疫苗诱导了高滴度的特异性和中和抗体，并诱导了 IFN- $\gamma$  的产生，可提供与灭活 SVA 疫苗相似的保护水平。免疫接种实验证明了该 VLPs 疫苗作为 SVA 候选疫苗的安全性和有效性，且具有巨大的潜在商业价值。

如今，SVA 疫苗的研发面临两大挑战。第一是筛选具有高毒力的标准毒株，用于

猪的感染试验。一些临床上分离出的低毒力 SVA 毒株不能够在接种动物身上复制 SVA 感染的临床症状。第二是建立易受 SVA 感染的实验动物模型。建立的 FMDV 实验动物模型为其发病机制和免疫原性方面的研究提供了帮助，但不适用于 SVA 感染。克服这两个挑战将极大地促进 SVA 疫苗的开发。

## 6 复制子技术

病毒复制子和感染性 cDNA 克隆技术是反向遗传学系统中的重要组成部分。病毒的全长 cDNA 感染性克隆能够进行自主复制、转录并组装成完整的具有感染性的病毒颗粒，通常被称为“病毒拯救”技术。与之不同的是，病毒复制子是一种自扩增核酸，不编码组装所需的病毒结构蛋白，但含有病毒 RNA 合成所需的所有病毒蛋白质和 RNA 信号，有时还含有报告基因（海肾、萤火虫荧光素酶、GFP、mCherry 荧光蛋白等）以方便分析<sup>[153, 154]</sup>。复制子最简单的形式是去除了结构基因的克隆病毒 cDNA，由于复制子缺乏结构蛋白，其不会产生感染性病毒颗粒，且只能进行一轮复制<sup>[155]</sup>。复制子可以通过用体外转录的 RNA 转染易感细胞的方式产生，也可以从 CMV 或 SV40 启动子下编码复制子 cDNA 的质粒中引入。病毒全长 cDNA 感染性克隆与复制子均可以在 DNA 水平上通过突变、插入、缺失和互补等手段研究 RNA 病毒的基因复制、表达、重组及 RNA 病毒与宿主的相互作用等。

早在 1988 年，Kaplan 等<sup>[156]</sup>就构建出缺失 P1 结构蛋白编码区的脊髓灰质炎病毒（PV）复制子，且该复制子的复制能力比其全长感染性克隆高出约 3 倍。病毒复制子在单股正链 RNA 病毒中发展的最为成熟，如黄病毒和小 RNA 病毒等，并且广泛应用于抗病毒化合物的测试、异源基因表达和病毒复制子疫苗等方面。Xie 等<sup>[157]</sup>报告了两种寨卡病毒（Zika virus, ZIKV）的复制子系统：一种是能区分病毒翻译和 RNA 合成的荧光素酶复制子；另一种是携带稳定荧光素酶复制子的细胞系，可用于筛选和鉴定病毒复制抑制剂。将 McInerney 等构建的 FMDV 复制子中编码氯霉素乙酰转移酶（CAT）的序列替换为编码与 GFP 绿色荧光蛋白-嘌呤霉素融合蛋白（GFP-PAC）相连接的 L 蛋白酶序列，从而构建出含有绿色荧光信号的 FMDV 复制子，且具有较强的复制能力<sup>[158, 159]</sup>。此外，通过对一种或多种结构蛋白进行缺失诱变构建出牛病毒性腹泻病毒（Bovine viral diarrhea virus, BVDV）复制子，其在表达互补结构蛋白的细胞系中可包装成没有感染性的 BVDV 病毒复制子颗粒（Viral replicon particles, VRPs），进而接种犊牛后能够诱导保护性免疫反应<sup>[160]</sup>。

## 7 本研究的目的是与意义

SVA 相关水疱病的全球流行以及反复暴发造成了巨大的经济损失，严重威胁到养猪业的发展。自 SVA 被发现以来，2015 年之前已在美国、英国、澳大利亚、加拿大、新西兰、巴西等地流行，2015 年传入中国，并开始大肆传播，现如今 SVA 已在中国超过半数的省市流行。随着 SVA 在国内的传播，其基因组重组频繁在不同毒株之间发生，提示了 SVA 在国内传播的复杂性以及遗传多样性。然而，SVA 的起源及其演变模式目前尚无确切的定论，因此，本研究通过生物信息学方法对其遗传演化和病毒传播历史进行全面的分析，从而对 SVA 的全球流行有一个更加全面的认识。

L 先导蛋白作为小 RNA 病毒科所特有的蛋白，在部分病毒（例如口蹄疫病毒属、心病毒属）中发挥多种关键的生物功能。然而，SVAL 蛋白在其生命周期中发挥怎样的作用尚不清楚，是否与其他小 RNA 病毒科病毒的 L 蛋白发挥类似的功能，这些仍需进行进一步的研究。本研究制备了 SVAL 蛋白的单克隆抗体作为 L 蛋白功能研究的工具，探究 L 蛋白在其生命周期中所发挥的作用，为 SVA 的分子特性以及感染发病机制的深入研究提供参考依据。

## 第一章 A 型塞内卡病毒的演化分析

A 型塞内卡病毒 (SVA) 是近几年新确定的猪特发性水疱病的病原体。临床感染的猪只表现出与口蹄疫和其他病毒性水疱病相似的症状, 偶尔出现仔猪急性死亡, 给受 SVA 疫情影响的国家造成严重的经济损失, 并一定程度上限制了养猪业的发展。自 2014 年以来, SVA 已被确定为巴西, 美国, 加拿大, 中国, 泰国, 哥伦比亚, 越南和印度等国家不同年龄猪群水疱病暴发的病原体。2015 年 SVA 传入我国以后, 在我国形成了大规模的流行模式, 超过半数的省市受到 SVA 疫情的影响。越来越多关于 SVA 基因组重组的报道表明, 全球猪群中流行的 SVA 毒株具有遗传多样性和复杂性。SVA 已呈现出全球流行的态势, 近年来, 巴西、中国和美国的 SVA 感染猪只数量呈上升趋势。截至目前, 巴西已报道了三波 SVA 疫情, 暴发的时间间隔越来越短, 且出现了很多 SVA 突变体, 可能是 SVA 为逃避宿主免疫反应或产生不同致病力毒株而发生的演化。

随着越来越多的 SVA 毒株被分离鉴定出来, 广大研究人员对其遗传演化以及流行病学进行了分析, 将 SVA 毒株分为一个、两个甚至多个分支。但由于使用 SVA 毒株基因组数量的不同, 所得到的结果错综复杂。本研究旨在通过利用所有公开发表的 SVA 基因组对其进行全面的系统发育分析, 以研究 SVA 的演化特性, 并试图阐述 SVA 的传播历史。

### 1 材料与amp;方法

#### 1.1 序列数据

截至 2021 年 12 月, 从美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 的 GenBank 数据库下载了 249 个完整的 SVA 全基因组序列, 具有相同 CDS 的基因组只保留其中一个。提取所有 SVA 全基因组序列的 CDSs, 并使用基于密码子的多序列比对软件 (MACSE) (版本 2.03) 进行比对<sup>[161, 162]</sup>。

## 1.2 重组分析

考虑到基因组重组会影响系统发育估计, 使用 RDP4 (版本 4.101) 软件<sup>[163]</sup> (包括 RDP、GENECONV、Chimera、MaxChi、BootScan、3Seq 和 SiSca 七种算法) 筛选潜在的重组 SVA 基因组。七种算法中至少有四种算法具有显著性 ( $P < 10^{-6}$ ) 的序列被认定为重组序列。为进一步验证 RDP4 的结果, 使用 R 程序 (版本 4.1.0)<sup>[164]</sup> 中的 seqcombo 程序包 (版本 1.14.1)<sup>[165]</sup> 进行序列相似性绘图。将检测到的 SVA 重组序列从数据集中剔除, 对剩余序列重新进行比对, 并按照上述标准再次检测重组信号, 直至无重组信号检出为止。

## 1.3 系统发育分析

利用 IQ-TREE 软件 (版本 1.6.12)<sup>[166]</sup> 中的 ModelFinder 模块<sup>[167]</sup> 评估数据集的最适演化模型。根据贝叶斯信息标准 (Bayesian information criterion, BIC) 选择 GTR+F+I+G4 核苷酸替代模型作为最佳拟合模型。利用 MrBayes 软件 (版本 3.2.7a)<sup>[168]</sup> 重建 SVA 基因组的贝叶斯推断 (Bayesian inference, BI) 系统发育树。运行 1000 万次马尔可夫链 (Markov Chain, MC) 迭代, 每 1000 代进行一次参数采样, 马尔科夫链蒙特卡洛 (Markov chain Monte Carlo, MCMC) 样本的前 25% 作为 burn-in 被丢弃。通过分离频率平均标准差 (Average Standard Deviation of Split Frequencies, ASDSF  $< 0.001$ )<sup>[169]</sup> 来验证贝叶斯推断树的拓扑收敛性。根据 Tracer 软件 (版本 1.7.1)<sup>[170]</sup> 获得的原始 MCMC 轨迹以确认 MC 的平稳性。根据潜在规模缩减因子 (Potential Scale Reduction Factor, PSRF) (接近于 1) 和有效样本量 (Effective Sample Sizes, ESS) (ESS  $> 200$ ) 来评估参数的收敛性。

## 1.4 遗传分化估计

使用最大复合似然法, 通过 MEGA (版本 11)<sup>[171]</sup> 估算两个分支之间的成对遗传距离。采用 1000 次 bootstrap 自举法估算方差, 并采用伽马分布 (shape parameter = 1) 模型模拟位点间演化速率的变化。使用双样本  $t$  检验, 通过 DIVEIN 软件<sup>[172]</sup> 比较两个分支之间遗传序列多样性的平均值差异。使用 PhyloPart 软件 (版本 2.1)<sup>[173]</sup> 中的系统发育分型方法对 SVA 分支进行分析。在 PhyloPart 分析中, 通过研究成对亲缘距离分布的百分阈值范围来确定最佳的百分阈值分配。根据 bootstrap 分支支持率 ( $> 90\%$ ) 和最佳

的百分阈值（49.6%）的标准将系统发育树划分为簇。

使用 DnaSP（版本 6.12.03）<sup>[174]</sup>估算序列统计量（ $K_{ST}$ ）、秩统计量（ $Z$ ）和最近邻统计量（ $Snn$ ）等遗传分化参数来确定 SVA 分离株间的分化情况。使用 Arlequin 软件（版本 3.5.2.2）<sup>[175]</sup>进行分子方差分析（Analysis Of Molecular Variance, AMOVA）来评估各种因素对 SVA 分支遗传分化的贡献，并进行 10000 次排列来评估各种因素的显著性。利用 Arlequin 软件（版本 3.5.2.2）<sup>[175]</sup>来估算基于  $F_{ST}$  的遗传距离，并通过进行 10000 次排列来检验与零假设下进化分支分化的显著偏差。使用如下的  $F_{ST}$  范围<sup>[176]</sup>来评估遗传分化程度： $0 < F_{ST} \leq 0.05$ ，轻度分化； $0.05 < F_{ST} \leq 0.15$ ，中度分化； $0.15 < F_{ST} \leq 0.25$ ，高度分化； $F_{ST} > 0.25$ ，超高度分化。

## 1.5 特异性氨基酸分析

首先确定了两个分支中的特异性氨基酸替代。Shannon 熵值被用来衡量 SVA 毒株数据集中每个位置的蛋白质序列变异性，其中熵值越高意味着变异性越高。使用蒙特卡罗随机化方法（Monte Carlo randomization method）（5 out of 100；存在替换）和 Bonferroni 校正法<sup>[177]</sup>来评估两个分支之间每个氨基酸位置的熵差异的统计显著性。

## 1.6 选择压力分析

使用 HyPhy（版本 2.5.31）<sup>[178]</sup>中的 BUSTED<sup>[179]</sup>检验 SVA 基因组的某些位点是否受到正向多样化选择的影响。使用 HyPhy（版本 2.5.31）的 RELAX<sup>[180]</sup>对分支 I 和分支 II 间的选择差异进行分析。使用 HyPhy（版本 2.5.31）中四种不同的特定位点方法，即单似然祖先计数法（SLAC）<sup>[181]</sup>、固定效应似然法（FEL）<sup>[181]</sup>、快速无约束贝叶斯近似法（FUBAR）<sup>[182]</sup>和混合效应进化模型（MEME）<sup>[183]</sup>确定 SVA 基因组中的正选择位点。SLAC、FEL 和 MEME 中  $P$  值小于 0.1（ $P < 0.1$ ）的位点，以及 FUBAR 中后验概率大于 0.9 的位点均被视为具有统计意义的选择位点。

## 1.7 演化动力学分析

使用 IQ-TREE 软件（版本 1.6.12）<sup>[166]</sup>中的 ModelFinder<sup>[167]</sup>模块选择最适核苷酸替换模型。通过路径采样和踏脚石采样（path sampling and stepping-stone sampling, PS/SS）方法<sup>[184]</sup>确定 SVA 数据集的最佳拟合模型组合是分子钟模型（严格分子钟模型和非相

关宽松对数正态分子钟模型)和溯祖人口模型(恒定种群规模、指数增长、贝叶斯 SkyGrid 和贝叶斯 Skyline)。使用边际似然法比较分子钟模型和溯祖模型的组合。通过 BEAST 软件(版本 1.10.4)<sup>[185]</sup>估算 SVA 的最近共祖时间(TMRCa)和核苷酸替换率。分别进行五次独立的 5 亿次 MCMC 采样,每 50000 步对参数和树进行一次采样。使用 BEAGLE(版本 3.1.0)<sup>[186]</sup>库程序提高计算效率。使用 Tracer(版本 1.7.1)<sup>[170]</sup>评估参数的收敛性,总链长的 burn-in 率为 10%,ESS>200 来评估参数的收敛性。使用 Tracer(版本 1.7.1)提取估算的分子钟速率和 TMRCa。使用 BEAST(版本 2.6.6)<sup>[187]</sup>的 LogCombiner(版本 2.6.6)软件包对所有树文件进行合并。使用 TreeAnnotator(版本 1.10.4)<sup>[188]</sup>从整个样本树中筛选出最大可信分枝(maximum clade credibility, MCC)树,并将前 10%的样本树作为 burn-in 舍弃。使用 FigTree 软件(版本 1.4.4)<sup>[189]</sup>对 MCC 树进行可视化。

## 1.8 系统地理学分析

使用 BEAST 软件(版本 2.6.6)<sup>[187]</sup>中的 MASCOT 软件包(版本 2.1.2)<sup>[190]</sup>进行系统地理推断。MASCOT 方法考虑不同亚种群规模的同时重建进化树以提高空间种群间迁移率的推断精度<sup>[190]</sup>。此外,利用 MASCOT 软件包估算迁移率、有效种群规模和内部节点的位置。采用 UCLN 分子钟模型和 GTR+F+I+G4 核苷酸替换模型的模型组合分析基因组数据集。进行三次独立的 MASCOT 分析,每次 2 亿次迭代,每 2 万次迭代对参数和树进行一次采样。使用 Tracer 软件(版本 1.7.1)<sup>[170]</sup>检查参数的收敛性,总链长的前 10%作为 burn-in 被丢弃。使用 LogCombiner 软件(版本 2.6.6)<sup>[187]</sup>对所有树文件进行合并。使用 TreeAnnotator 软件(版本 1.10.4)<sup>[188]</sup>从整个样本树中筛选出 MCC 树,并将前 10%的样本树作为 burn-in 舍弃。使用 FigTree 软件(版本 1.4.4)<sup>[189]</sup>对 MCC 树进行可视化。此外,利用 TreeAnnotator 软件(版本 1.10.4)<sup>[188]</sup>根据树的后验密度总结祖先地理状态的根状态后验概率(Root State Posterior Probabilities, RSPP)。采用位置随机化分析评估根节点推断位置的可靠性,随机抽取 20 个数据集,其中位置状态在序列之间随机交换。如上述步骤,使用贝叶斯系统地理学方法对每组数据进行了分析。

## 1.9 迁移率分析

采用与 O'Neill 等<sup>[191]</sup>类似的方法估算 SVA 随时间的迁移模式。在 Python 编程框架树探索环境(Environment for Tree Exploration, ETE)(版本 3.1.2)<sup>[192]</sup>下,使用脚本

[193](<https://github.com/admiralenola/global4scripts>)处理 MASCOT 分析生成的 MCC 树。以滑动窗口的方式遍历时间树。记录每年 4 个不同群落（巴西、加拿大、美国和中国）对应的进化枝数量。

## 2 结果

### 2.1 重组分析

一共从 GenBank 数据库中下载了 249 个 SVA 完整基因组，其中 11 个具有相同编码序列(CDS)的 SVA 毒株从数据库中剔除。使用 RDP4 软件中的 RDP、GENECONV、Chimera、MaxChi、BootScan、3Seq 和 SiSca 七种算法对数据集中的所有 SVA 序列进行重组检测，重组分析显示，5 株 SVA 毒株（GD04/2017、HeNKF-1/2018、HeNNY-1/2018、CH-GDMZ-2019 和 SVA/CHN/10/2017）被鉴定为重组毒株。每个重组毒株都包含两个或三个分离株，这些分离株被认为是其假定亲本谱系的代表。相似性图得出的结果与重组检测程序（RDP4）得出的结果相同（图 1-1）。GD04/2017（MH316113）重组毒株的亲本毒株为 SVA/CHN/07/2017（MG765556）、HB-CH-2016（KX377924）和 CH-LX-01-2016（KX751945），如图 1-1A；HeNKF-1/2018（MK357117）重组毒株的亲本毒株为 HeNZMD-1/2018（MK357115）和 CH-GDSG-2018-1（MN781982），如图 1-1B；CH-GDMZ-2019（MN887249）重组毒株的亲本毒株为 GD-S3/2018（MK802891）和 GX04/2020（MW117127），如图 1-1C；HeNNY-1/2018（MK357116）重组毒株的亲本毒株为 HeNZMD-1/2018（MK357115）和 HN02-2017（MH064434），如图 1-1D；SVA/CHN/10/2017（MG765559）重组毒株的亲本毒株为 GD01/2017（MH316114）和 SVA/CHN/11/2017（MG765560），如图 1-1E。值得注意的是，本研究中鉴定的 SVA 重组毒株均是从中国分离出来的，在其他国家的毒株中没有检测到重组毒株。去除重组基因组后，共保留 233 个 SVA 毒株序列进行后续分析，包括从中国、美国、加拿大、巴西、泰国、哥伦比亚和越南分离的毒株序列。

### 2.2 系统发育分析

#### 2.2.1 贝叶斯推断（BI）分析

选用剩余的 233 株 SVA 全基因组序列，根据贝叶斯信息标准选择 GTR+F+I+G4 核

苷酸替代模型作为最佳拟合模型并利用 MrBayes 软件构建 SVA 基因组的贝叶斯推断 (BI) 系统发育树 (图 1-2)。贝叶斯推断分析揭示了两个截然不同且支持度高 (后验概率 $\geq 0.99$ ) 的分支, 分别定义为分支 I 和 II。分支 I 由 1988 年至 2006 年从美国收集的 19 株毒株组成, 而分支 II 由 2007 年以后从七个国家收集的分离株组成。分支 I 和分支 II 间的遗传距离为  $0.0713 \pm 0.0030$ 。双样本  $t$  检验结果显示, 分支 I 和分支 II 的序列多样性存在显著性差异 ( $Z$  检验  $P=0.00188$ ;  $T$  检验  $P=0.009514$ ), 表明分支 I 和 II 间存在高度的遗传分化。值得注意的是, 研究发现 2007 年以前的毒株 (分支 I) 感染猪只没有表现出任何的临床症状, 而 SVA 引起的水疱病于 2007 年被发现。

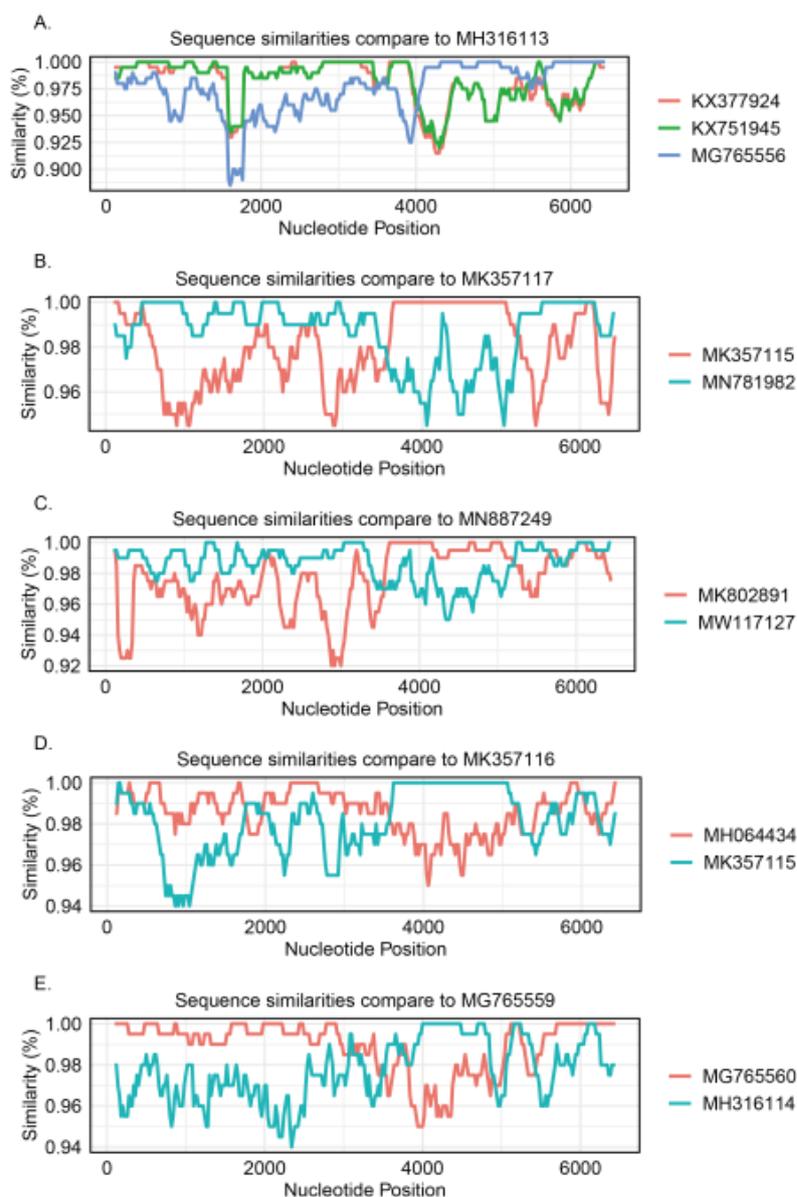


图 1-1 SVA 基因组的重组分析

Fig.1-1 Recombination analysis of the SVA genome

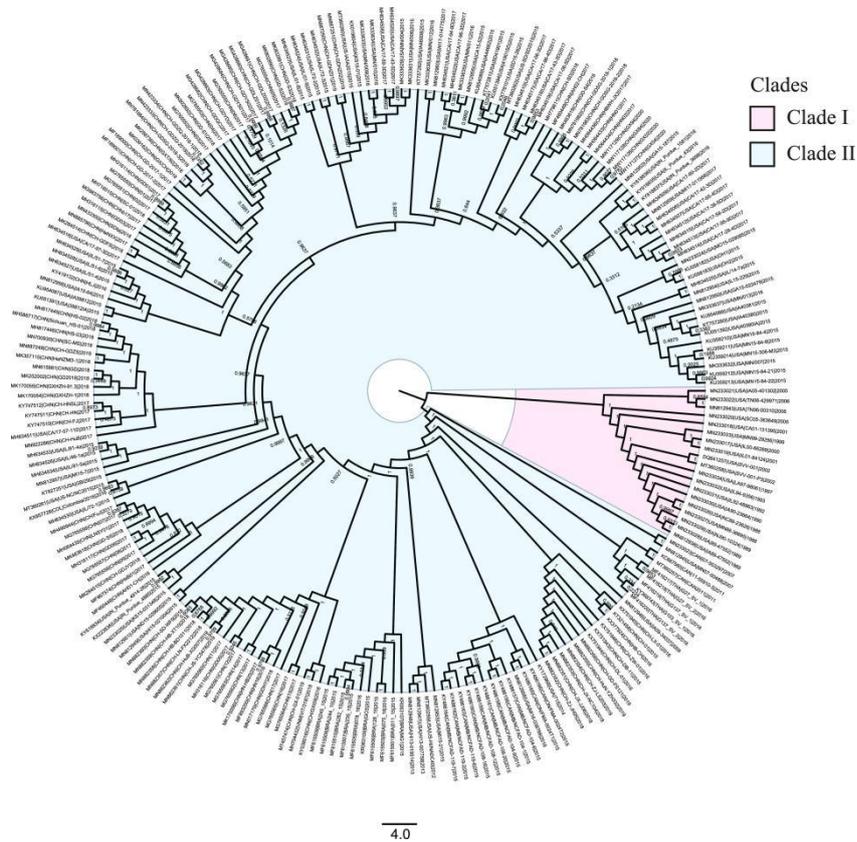


图 1-2 SVA 基因组的贝叶斯推断树

Fig.1-2 Bayesian inference tree of the SVA genome

### 2.2.2 特异性氨基酸替代位点及 Shannon 熵位点分析

进一步分析 SVA 分支I和分支II的遗传多样性，在分支I和分支II中共鉴定出 544 个特异性氨基酸替代位点，其中，分支I中 46 个，分支II中 498 个。为了确定潜在的序列特征模式，对 SVA 序列比对中每个氨基酸位置的 Shannon 熵进行了分析。Shannon 熵分析显示，与其他蛋白相比，SVA 序列中 VP3、VP1、2B、2C、3A、3C 和 RdRp 蛋白的高变异位点相对较多（图 1-3A）。此外还发现，分支I和分支II的不同氨基酸位点具有不同程度的变异性（图 1-3B 和 1-3C）。SVA 多聚蛋白中共鉴定出 77 个在分支I和分支II间具有显著差异 Shannon 熵的氨基酸位点。其中，分支I有 37 个，分支II有 40 个。经鉴定，SVA 主要抗原蛋白（VP1、VP2 和 VP3）含有 29 个差异位点（图 1-3D），表明分支I和分支II间的抗原特性存在显著差异。此外，其他差异位点主要分布在 RdRp（11 个），3A（10 个），2C（9 个），3C（7 个），2B（5 个）蛋白上，表明两个分支中这些蛋白的功能和活性可能不同。总之，Shannon 熵分析结果显示，分支I和分支II间抗原蛋白和功能蛋白的序列特征模式存在差异（图 1-3）。

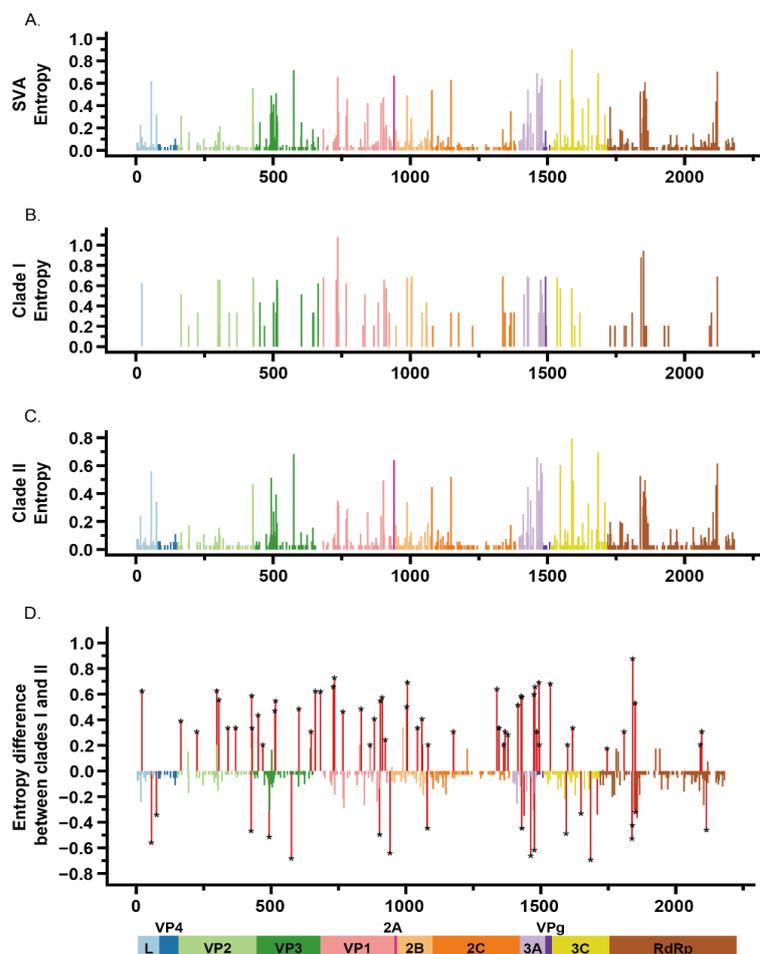


图 1-3 SVA 毒株的蛋白质序列变异性

Fig.1-3 Protein sequence variability of SVA strains

注：条形图所示，所有 SVA 序列（A）、分支I（B）和分支II（C）比对中每个氨基酸的 Shannon 熵值；D. 分支I和分支II序列之间的 Shannon 熵差。

Bars show Shannon entropy values for each amino acid in the comparison of all SVA sequences (A), branch I (B), and branch II (C); D. Shannon entropy difference between branch I and branch II sequences.

## 2.3 选择压力分析

采用 BUSTED 检验 SVA 基因组的结果显示，似然比检验的结果非常显著 ( $P < 0.01$ )，表明 SVA 基因组的某些位点受到正向多样化选择的影响。使用 Hyphy 软件中的 RELAX 分析 SVA 两个分支的基因组发现，与分支I相比，分支II的选择压力较小 ( $K=0.87$ ;  $P=0.0074$ )。单似然祖先计数 (SLAC) 和固定效应似然 (FEL) 分析发现，SVA 的绝大多数位点处于负选择。根据 SLAC、FEL、快速无约束贝叶斯近似 (FUBAR) 和进化混合效应模型 (MEME) 分析的结果显示，SVA 共存在 27 个正选择位点，分布在除 L、

3A 和 3B 基因外的整个 SVA 基因组。27 个正选择位点中，分别有 10 个和 17 个位点位于结构蛋白基因和非结构蛋白基因上，其中，主要分布在 RdRp（位点 54, 141, 241, 243, 369, 400 和 442）、VP1（位点 62, 63, 93, 97 和 194）、3C（位点 16, 20, 56, 68 和 115）、2C（位点 132, 153 和 270）、VP4（位点 5 和 7）、VP2（位点 156 和 277）、VP3（位点 41）、2A（位点 4）和 2B（位点 3）蛋白上（表 1-1）。总之，选择压力分析的结果表明，正选择和负选择共同驱动 SVA 的演化。

表 1-1 SVA 多聚蛋白的正向选择位点总结

Table 1-1 Summary of positive selection sites in SVA polyprotein

多聚蛋白位点 (Polyprotein site)	蛋白位点 (Protein Site)	蛋白名称 (Protein name)	分支 I 残基 (Clade I residues)	分支 II 残基 (Clade II residues)
84	5	VP4	T	F/T
86	7	VP4	S	L/S
306	156	VP2	K/N	K/N/S
427	277	VP2	M/T	K/M/R/T
475	41	VP3	I	I/V/X
735	62	VP1	K/L/Q	A/E/K/Q/T/V
736	63	VP1	E	A/E/T
766	93	VP1	A/V	A/V
770	97	VP1	G	A/D/G
867	194	VP1	A/R	R
941	4	2A	I	I/V/X
949	3	2B	S	F/S/T
1206	132	2C	A	A/L
1227	153	2C	L/S/X	F/L
1344	270	2C	I/L	I
1524	16	3C	V	I/V
1528	20	3C	I	H/I
1564	56	3C	T	A/I/T
1576	68	3C	D	D/T
1623	115	3C	V	C/V
1773	54	RdRp	V	A/M/V
1860	141	RdRp	E/V	I/L/M/T/V
1960	241	RdRp	F	F/N
1962	243	RdRp	S	L/S
2088	369	RdRp	V	A/I/V
2119	400	RdRp	L/S	A/L/S/V
2161	442	RdRp	A	A/V

## 2.4 演化动力学分析

使用 TreeAnnotator 程序从所有样本树中汇总最大可信进化分枝 (MCC) 树, 结果如图 1-4 所示。SVA 基因组的 MCC 树拓扑结构呈现出末端分支较短的特点。群体历史规模分析表明, 从 1986 年到 2017 年 SVA 有效群体数量表现出轻微波动且逐渐增加的趋势, 随后急剧下降 (图 1-5)。此外, 使用 BEAST 软件中的 MCMC 框架估算 SVA 的最近共祖时间 (TMRCA) 和核苷酸演化速率。估算的 SVA 全基因组的演化速率为  $3.3522 \times 10^{-3}$  核苷酸替代每位点每年 (nucleotide substitutions/site/year)。SVA TMRCA 的估计时间可追溯到 1986 年, 分支 I 和分支 II 的 TMRCA 分别为 1986 年和 2004 年。

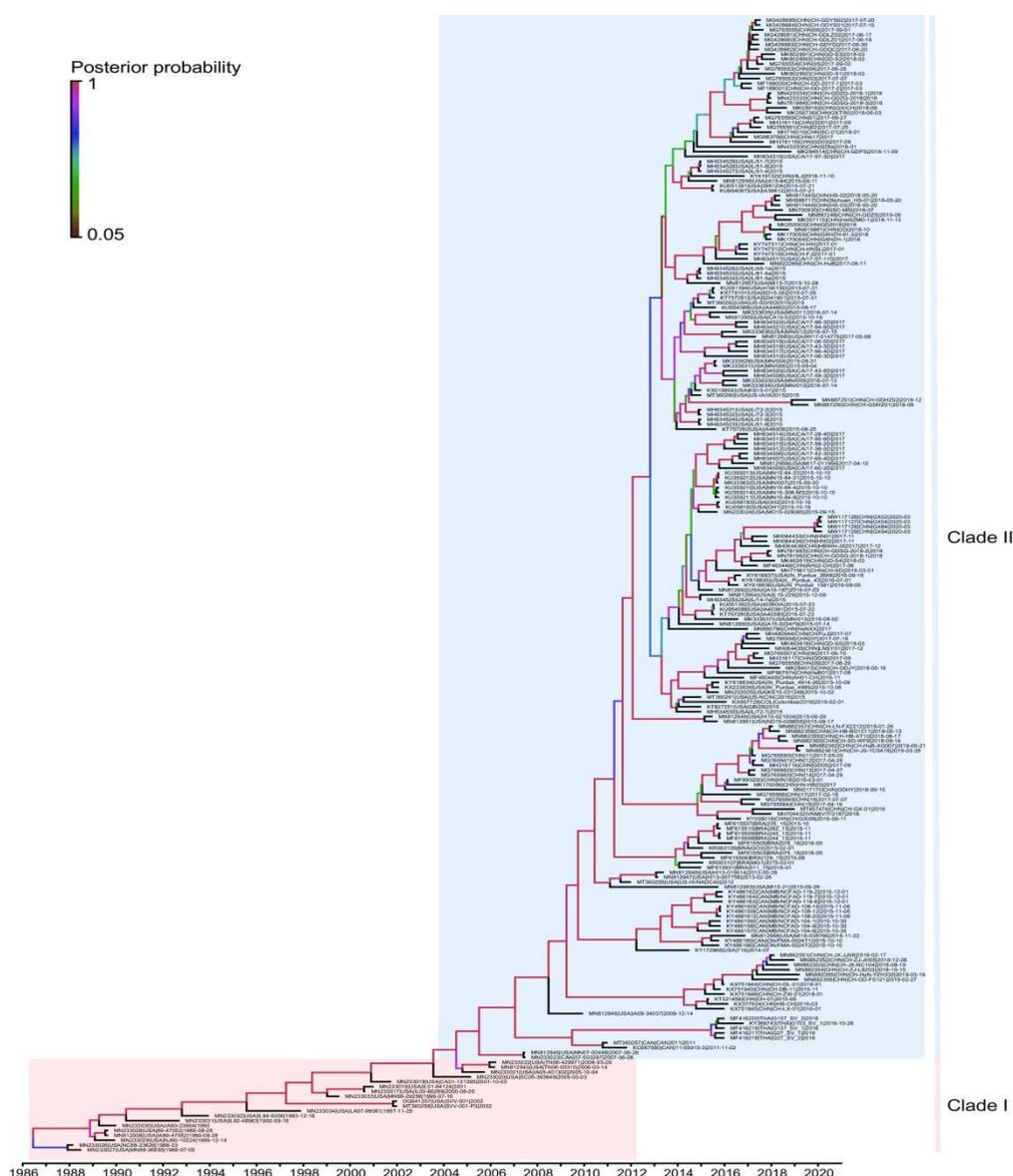


图 1-4 SVA 种群进化树分析

Fig.1-4 Evolutionary tree analysis of SVA populations

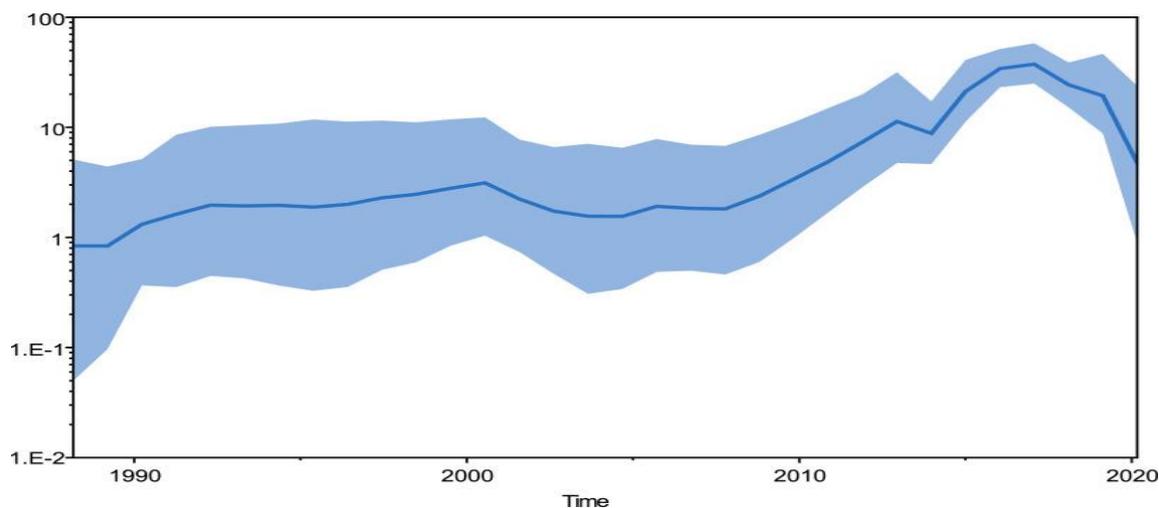


图 1-5 SVA 群体历史规模分析

Fig.1-5 Historical scale analysis of SVA Group

## 2.5 溯源分析

使用 BEAST 软件的 MASCOT 软件包对 2015 年以来 SVA 在不同国家之间的空间循环进行了谱系地理学分析。系统演化分析将 MCC 树的根定位于巴西，后验概率支持率最高（根状态后验概率[ $RSPP$ ]=0.4811），表明巴西最有可能是 2015 年以来 SVA 的暴发源（图 1-6A 和 1-6B）。据估计，中国的有效种群规模最大，其次是美国、加拿大和巴西，这表明与其他国家相比，中国的 SVA 种群具有最大的遗传多样性。值得注意的是，自 2015 年以来，SVA 的传播呈现出明显的不对称扩散模式（图 1-6C）：加拿大毒株主要来源于巴西，美国毒株主要来源于巴西和加拿大，中国毒株主要来源于巴西和美国。SVA 的不对称扩散模式表明，自 2015 年以来，SVA 的传播具有方向性，并以地理来源和目的地为特征，巴西被推断为 2015 年以来在加拿大、美国和中国分离出的毒株的主要来源地。此外，对 SVA 随时间的迁移模式进行分析，结果表明，SVA 在美国、加拿大和中国的内部传播占主导地位（图 1-7）。总之，上述结果表明，巴西在 2015 年后的 SVA 全球传播中起到了重要作用。

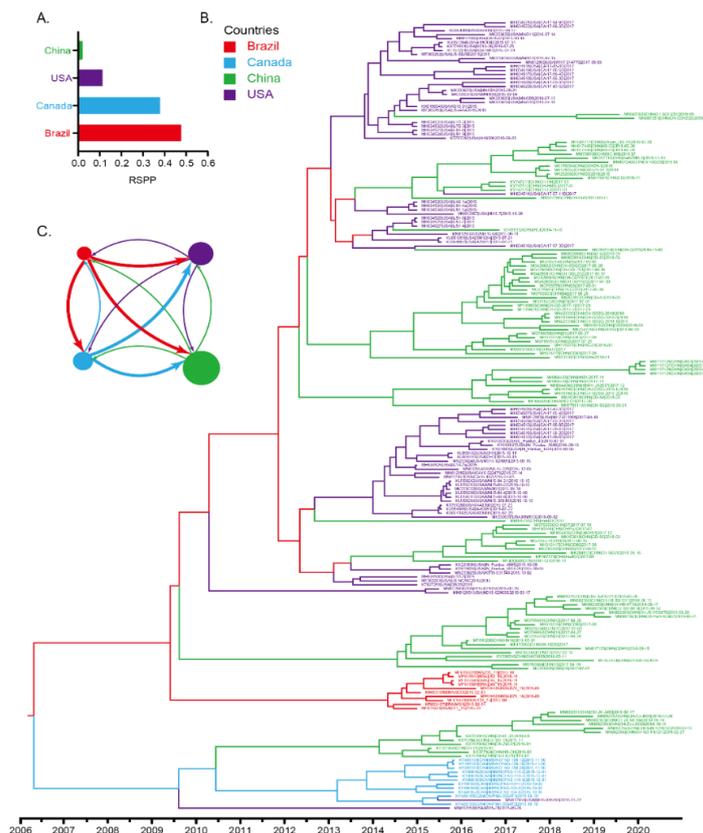


图 1-6 SVA 的谱系地理学分析

Fig.1-6 Phylogeographic analysis of SVA

注：A. 各国的根状态后验概率；B. SVA 毒株的系统地理学分析；C. 各国的有效种群规模（圆圈）和迁移率（箭头）

A. Root state posterior probabilities for each country; B. Phylogeographic analyses of SVA strains; C.

Effective population sizes (circles) and migration rates (arrows) for each country

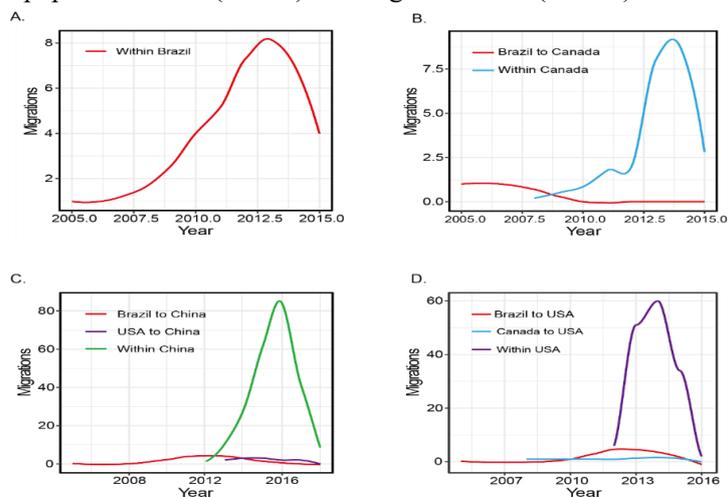


图 1-7 SVA 随时间的迁移模式

Fig.1-7 Migrations patterns of SVA through time

### 3 讨论

A 型塞内卡病毒 (SVA) 于 2002 年在美国被研究者偶然发现并分离出来。20 世纪末至 21 世纪初, 有大量未知病因水疱病的报道, 但直至 2007 年 SVA 才首次被确认为猪特发性水疱病的病原体。SVA 引起的猪水疱病临床上的特征性症状为口鼻部和冠状动脉带上的水疱性病变。截至 2014 年, NCBI 数据库中仅存有三株完整的 SVA 全基因组序列。2014 年末至 2015 年初, 巴西暴发了大规模的 SVA 疫情, 新生仔猪 (1~4 日龄) 大批量死亡, 对巴西的生猪养殖造成了较大的冲击。流行病学调查显示, SVA 在 2014 年前就已经在美国、英国、新西兰、加拿大、意大利、澳大利亚等国家存在。2015 年之后, SVA 似乎呈现全球流行的态势, 在全球肆意传播。2015 年 3 月, 广东省报道了国内首例 SVA 相关的猪水疱病病例, 此后逐渐蔓延至湖北、黑龙江、福建、河南、甘肃、广西等省份, 现如今国内超过半数的省市均有 SVA 的存在。而且, SVA 不同毒株之间的基因组重组在国内也有相关报道。值得注意的是, 自巴西首次 SVA 疫情暴发以来至现在至少已报道了三次 SVA 的大规模流行。截至 2021 年 12 月, NCBI 数据库中已存有 249 株完整的 SVA 全基因组序列。尽管 SVA 是在 20 年前发现的, 但其详细的演化特征尚不十分清楚, 因此, 有必要对 SVA 进行全面的遗传演化分析以更为全面的了解其演化和流行模式。

本研究通过使用大量已公开发表的数据并应用全面的分析方法来研究 SVA 的演化, 以全面了解 SVA 的遗传演化及传播模式。与其他病毒相比, 小 RNA 病毒中发生基因组重组的频率更高, 且容易在小 RNA 病毒的近缘毒株之间发生<sup>[194, 195]</sup>。之前的研究报道, 分别从加拿大和中国的 SVA 毒株中成功鉴定出 1 个和 8 个重组毒株<sup>[112-114, 196, 197]</sup>, 而本研究通过对所有 SVA 完整基因组序列进行重组分析只发现了 5 个重组毒株, 且全部来自中国。此外, MASCOT 分析的结果表明, 中国的 SVA 群体具有最大的有效种群规模, 有利于 SVA 不同毒株之间基因组重组的发生。

据报道, SVA 可分为多个不同的主要分支<sup>[1, 111, 198]</sup>。本研究利用 NCBI 数据库中公布的所有 SVA 完整基因组序列对其进行了严格且全面的系统发育树构建。构建的贝叶斯推断系统发育树显示, SVA 可分为两个截然不同且支持度较高的分支, 即分支 I (2007 年前的毒株) 和分支 II (2007 年后的毒株)。分支 I 和分支 II 的遗传距离为  $0.0713 \pm 0.0030$ 。同时, 统计检验发现, 分支 I 和分支 II 间存在高度的遗传分化。进一步分析 SVA 的分支 I 和分支 II 的遗传多样性发现, 分支 I 和分支 II 中共存在 544 个特异性氨基酸替代位点 (分支 I 46 个; 分支 II 498 个), 且 Shannon 熵分析鉴定出 77 个显著差异位点。上述结

果表明, SVA 存在两个明显演化差异的分支: 分支I和分支II。虽然 SVA 很早之前就已经在猪群中传播, 但直至 2007 年才首次发现与 SVA 相关的猪水疱病<sup>[9]</sup>。此外, 接种分支I中 SVA 毒株的猪并没有表现出特定的临床症状, 而接种分支II中 SVA 毒株的猪则会出现特征性的临床症状和水疱病<sup>[199, 200]</sup>。综合上述结果和越来越多的实验证据表明, SVA 很有可能在 2007 年经历了一次重大的基因分化, 形成了一个新的演化分支, 并导致毒力增强。

此外, 通过对 SVA 受选择的位点进行分析发现, SVA 的绝大多数位点处于负选择, 且存在 27 个正选择位点。该结果表明, 正选择和负选择共同驱动 SVA 的演化。SVA 的演化动力学分析结果表明, 其全基因组的演化速率为  $3.3522 \times 10^{-3}$  nucleotide substitutions/site/year, 远高于其他研究报道的  $2.696 \times 10^{-3}$  nucleotide substitutions/site/year<sup>[201]</sup>。SVA 的最近共祖时间为 1986 年, 这与之前的研究结果一致, 即 SVA 至少从 1988 年起就存在于猪群中<sup>[202]</sup>。2007 年之前在美国收集的 SVA 分支I毒株呈阶梯状拓扑结构, 这可能是病毒在美国猪群中逐渐传播所致, 而 SVA 分支II毒株呈现的短树枝状的拓扑结构则可能是 2015 年以 SVA 相关水疱病的暴发流行所致。与 SVA 感染的趋势一致, 群体历史规模分析表明, SVA 的有效群体数量在 2017 年以前呈现逐渐增加的趋势, 中间有轻微波动, 随后急剧下降。由于自然感染猪的抗 SVA 中和抗体滴度较高<sup>[94]</sup>, 2017 年后 SVA 有效种群数量的急剧下降很可能是由于猪群的群体免疫力造成的, 这种免疫力有可能是在 2015 年和 2016 年集中暴发 SVA 相关水疱病后获得的。另外, 本研究首次探索了 2015 年以来 SVA 疫情在巴西、美国、加拿大和中国之间的历史迁移路线。结果表明, 自 2015 年以来, 巴西可能是 SVA 相关水疱病的地理起源地点和全球传播源。考虑到这些国家的地理隔离, SVA 可能通过受污染的生猪或饲料的跨境贸易传播, 因此, 对生猪、饲料及其相关的跨境贸易进行全面监测, 将有助于控制 SVA 相关水疱病的全球暴发。通过加强各国之间的贸易监测和数据共享, 可以更有效地防控这种疾病的传播。

## 4 小结

- (1) SVA 重组分析鉴定出 5 株重组毒株，且均为中国毒株。
- (2) SVA 存在两个明显演化差异的分支：分支I（2007 年之前）和分支II（2007 年之后）。
- (3) SVA 的受选择位点分析表明，正选择和负选择共同驱动 SVA 的演化。
- (4) SVA 全基因组的演化速率为  $3.3522 \times 10^{-3}$  nucleotide substitutions/site/year。
- (5) SVA 的 TMRCA 为 1986 年（分支I和分支II的 TMRCA 分别为 1986 年和 2004 年）。
- (6) SVA 的谱系地理学分析表明，巴西在 2015 年后的 SVA 全球传播中起到了重要作用。

## 第二章 A 型塞内卡病毒 L 蛋白的单抗制备和功能研究

A 型塞内卡病毒 (Senecavirus A) 属于小 RNA 病毒科, 是塞内卡病毒属的唯一成员。SVA 引起的相关猪水疱病临床上与口蹄疫等病毒引起的症状极其相似且难以区分, 因此, 需要一定的检测手段对 SVA 进行区分鉴定。Ma 等<sup>[145]</sup>利用单 B 细胞抗体技术制备出两种具有较强中和活性的抗 SVA 单克隆抗体, 且利用该抗体建立了可用于 SVA 中和抗体快速检测的竞争性 ELISA。Yang 等<sup>[203]</sup>利用二乙烯亚胺 (BEI) 灭活的 SVA 抗原制备了五种单克隆抗体, 不仅可用于竞争性 ELISA 的开发进行 SVA 特异性的血清学检测, 还可用于 SVA 抗原的快速鉴定。此外, Chen 等<sup>[56]</sup>制备了针对 SVA VP3 蛋白的单克隆抗体 (mAb 3E9) 并鉴定了其抗原表位, 可作为深入研究 VP3 蛋白以及诊断试剂开发的强大工具。诸多研究表明, 单克隆抗体在病毒的检测、分离鉴定以及抗原表位鉴定等方面都发挥了极其重要的作用, 已经成为了病毒研究中不可或缺的强大工具。

SVA 基因组长度约为 7300 nt, 共编码四个结构蛋白和八个非结构蛋白。其中, L 非结构蛋白是其编码的第一个蛋白, 包含有 79 个氨基酸, 仅存在于小 RNA 病毒科的部分病毒中。目前, SVA 基因组编码的 VP1、VP2、VP3 以及 3C 蛋白相关单克隆抗体的制备均有报道<sup>[47, 56, 204]</sup>, 或许由于 L 蛋白过于短小, SVA L 蛋白单克隆抗体的制备尚没有相关报道。此外, L 蛋白序列在小 RNA 病毒科中极不保守, 存在较大差异, 但与心病病毒属的亲缘关系最近。L 蛋白序列的巨大差异性表明其功能可能并不保守且呈多样性。经证实, 由心病病毒属病毒编码的 L 蛋白是一种多功能蛋白, 含有“锌指”和“谷氨酸/天冬氨酸”等多种特殊结构域, 可干扰多种关键的细胞过程, 如 I 型干扰素和趋化因子的产生、核质运输、细胞凋亡等<sup>[40]</sup>。然而, SVA L 蛋白中并不含有相关的结构域, 且其在病毒生命周期中发挥的作用尚不清楚。本研究旨在制备 SVA L 蛋白的单克隆抗体作为有力工具, 进一步探究 L 蛋白的具体功能, 为 SVA 分子特征的深入挖掘奠定基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 生物材料

A 型塞内卡病毒毒株 (GD05/2017) 由本实验室分离保存; BHK-21 (鼠肾) 细胞、

ST-R (猪睾丸) 细胞 (IFN- $\alpha/\beta$  受体缺陷型)、SP2/0 (骨髓瘤) 细胞均由本实验室保存; 原核表达载体 pGEX-6p-1 由本实验室保存; SVA 毒株 (GD02/2017) 的全长 cDNA 感染性克隆质粒 (pC3-SVA-GD05)、SVA 复制子质粒 (SVA-GD05-Rep)、pCAGGS-3Flag-SVA-3C、pEGFP-SVA-L、pCAGGS-3Flag-L 真核表达质粒均由本实验室构建保存; pCMV-ER-GFP (内质网)、pGolgi-mCherry (高尔基体)、pLAMP1-mCherry (溶酶体)、pMito-mCherry (线粒体) 质粒购自 addgene 公司; 大肠杆菌 (Top10) 以及 BL21 (DE3) 感受态细胞均由实验室保存的菌种制备冻存; SVA 3C、VP3 蛋白单克隆抗体由本实验室制备保存; 6~8 周龄的 BALB/c 小鼠 (SPF 级) 购自于扬州大学比较医学中心。

## 1.2 主要试剂与耗材

主要试剂与耗材见表 2-1。

表 2-1 试剂与耗材

Table 2-1 Reagents and Consumables

试剂与耗材	公司
PrimeSTAR DNA 聚合酶	北京 Takara 公司
T4 DNA 连接酶	北京 Takara 公司
<i>EcoR</i> I、 <i>Xho</i> I、 <i>Sac</i> I、 <i>Sac</i> II 内切酶	北京 Takara 公司
DNA 分子标准	南京诺唯赞公司
26614 蛋白 Maker、三色预染蛋白 Maker	上海翊圣生物科技有限公司
RNA-easy Isolation Reagent	南京诺唯赞公司
反转录试剂盒	上海翊圣生物科技有限公司
质粒提取、PCR 纯化、胶回收试剂盒	南京 Omega 公司
超敏 ECL 化学发光试剂盒	新赛美生物科技有限公司
弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂	北京索莱宝公司
氨苄青霉素钠、卡那霉素、IPTG 粉末	北京索莱宝公司
细胞核 DAPI 染料	北京索莱宝公司
甲醇、无水乙醇、液体石蜡	国药集团化学试剂有限公司
PVDF 膜	Millipore 公司

透析袋	biosharp 公司
PEG 8000	上海生工生物工程股份有限公司
RIPA、Western 及 IP 细胞裂解液	碧云天生物技术有限公司
HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体	ABclonal 公司
HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体	ABclonal 公司
Dylight 488 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体	Abbkine 公司
Dylight 549 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体	Abbkine 公司
GFP 抗体、Flag 抗体	ABclonal 公司
胎牛血清 (FBS)	Sigma 公司
Polyethylene Glycol 1500 (PEG1500)	Sigma 公司
H4000 转染试剂	英格恩生物公司
DMEM 培养基粉末	Gibco 公司
HAT (50×)、HT (50×) 培养基添加剂	北京博奥龙公司
荧光素酶检测试剂盒	北京全式金生物技术有限公司

### 1.3 相关溶液的配制

1%琼脂糖凝胶：称取 0.3 g 的琼脂糖粉末倒入 30 mL 的 1×TAE 溶液中，放置到微波炉加热至完全融化，待其冷却至 60°C 左右，加入 1.5 μL EB 核酸染料，混匀后倒至提前插好梳子的制胶板中，待其完全凝固后即可使用。

50×TAE 溶液：称取 242 g Tris 粉末、37.2 g Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O 粉末溶于 800 mL 蒸馏水中，待充分溶解后加入 57.1 mL 醋酸再次混匀，最后加蒸馏水定容至 1 L，室温保存。

氨苄霉素 (Amp)：称取 5 g 氨苄青霉素钠粉末充分溶解于 40 mL 蒸馏水中，加蒸馏水定容至 50 mL，经 0.22 μm 孔径滤膜过滤除菌后分装保存于 -20°C。

卡那霉素 (Kan)：称取 2.5 g 硫酸卡那霉素粉末充分溶解于 40 mL 蒸馏水中，加蒸馏水定容至 50 mL，经 0.22 μm 孔径滤膜过滤除菌后分装保存于 -20°C。

LB 液体培养基：称取 10 g 胰蛋白胍粉末、10 g 氯化钠、5 g 酵母浸出物溶于 800 mL 蒸馏水中，待充分溶解后加蒸馏水定容至 1 L，经高温高压灭菌后置于室温保存。

LB 固体培养基：称取 10 g 胰蛋白胍粉末、10 g 氯化钠、5 g 酵母浸出物溶于 800

mL 蒸馏水中，充分溶解后加入 15 g 琼脂粉，加蒸馏水定容至 1 L，经高温高压灭菌后冷却至 60°C 左右，加入相应抗生素并立即倒入平皿内，待冷却凝固置于 4°C 保存备用。

2×YT 液体培养基：称取 16 g 胰蛋白胨粉末、10 g 酵母浸出物、5 g 氯化钠溶于 800 mL 蒸馏水中，待充分溶解后加蒸馏水定容至 1 L，经高温高压灭菌后置于室温保存。

IPTG (100mM)：称取 1.2 g IPTG 粉末充分溶解于 40 mL 蒸馏水中，加蒸馏水定容至 50 mL，经 0.22 μm 孔径滤膜过滤除菌后分装保存于 -20°C。

1×PBS 缓冲液：称取 8 g NaCl、1.42 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.27 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.2 g KCl 溶于 800 mL 蒸馏水中，待充分溶解后加蒸馏水定容至 1 L，置于室温保存。

1×TBST 缓冲液：称取 8.8 g 氯化钠，加入 20 mL 1 mol/L 的 Tris-HCl (PH8.0) 溶液，充分溶解于 800 mL 蒸馏水，加入 0.5 mL Tween-20 再次混匀后加蒸馏水定容至 1 L，置于常温保存。

1×SDS-PAGE 缓冲液：称取 18.8 g Glycine 粉末、3.02 g Tris 粉末、1 g SDS 粉末溶于 800mL 蒸馏水中，待充分溶解后加蒸馏水定容至 1 L，置于常温保存。

考马斯亮蓝染色液：称取 1 g 考马斯亮蓝粉末溶于 500 mL 蒸馏水中，充分溶解后加入 250 mL 异丙醇，100 mL 冰醋酸，充分混匀后加蒸馏水定容至 1 L，过滤除去颗粒物，置于室温保存。

考马斯亮蓝脱色液：取 50 mL 醋酸，25 mL 乙醇加入 300 mL 蒸馏水中，充分混匀后加蒸馏水定容至 500 mL，置于室温保存。

5×SDS Loading Buffer：称取 4 g SDS 粉末、0.2g 溴酚蓝粉末，加入 10 mL 1mol/L 的 Tris-HCl 溶液，加入 20 mL 甘油，充分溶解后加蒸馏水定容至 40 mL，分装后置于室温保存

Western blot 膜转印缓冲液：称取 5.8 g Tris 粉末、2.9 g Glycine 粉末、0.37 g SDS 粉末溶于 600 mL 蒸馏水中，待充分溶解后加蒸馏水定容至 800 mL，加入 200 mL 甲醇再次混匀，置于室温保存。

4%多聚甲醛溶液：称取 4 g 多聚甲醛粉末充分溶解于 100 mL PBS 溶液中，置于 4°C 保存。

4% BSA 溶液：称取 4 g BSA 粉末充分溶解于 100 mL PBS 溶液中，经 0.22 μm 孔径滤膜过滤除菌后分装保存于 -20°C。

0.2% Triton X-100 溶液：吸取 200 μL Triton X-100 加入 100 mL PBS 溶液中，充分混匀后置于 4°C 保存。

15% SDS-PAGE 分离胶：吸取 2.5 mL 30% Acrylamide、1.3 mL 1.5 mol/L Tris-HCl

(PH8.8)、0.05 mL 10%过硫酸铵、0.05 mL 10% SDS、1.1 mL 蒸馏水、0.02 mL TEMED 混匀。

5% SDS-PAGE 浓缩胶：吸取 0.5 mL 30% Acrylamide、0.38 mL 1 mol/L Tris-HCl (PH6.8)、0.03 mL 10%过硫酸铵、0.03 mL 10% SDS、2.1 mL 蒸馏水、0.03 mL TEMED 混匀。

5%脱脂奶粉封闭液：称取 1 g 脱脂奶粉充分溶解于 20 mL TBST 溶液中，现用现配。

DMEM 基础培养基：取一袋 DMEM 粉末（1 L 规格）充分溶解于 1 L 的无菌超纯水中，加入 3.7 g NaHCO<sub>3</sub>，溶解混匀后使用细胞滤器过滤除菌，分装后置于 4°C 保存。

细胞生长液：DMEM 基础培养基（含 10% FBS、1%青霉素-链霉素混合液），4°C 保存。

细胞维持液：DMEM 基础培养基（含 2% FBS、1%青霉素-链霉素混合液），4°C 保存。

Top10 感受态细胞的制备：

(1) 活化菌种：将 Top10 大肠杆菌菌种以 1%的比例接种于 4-5 mL 无抗性的 LB 液体培养基中，置于 37°C，220 r/min 的摇床中震荡培养过夜。

(2) 将复苏好的菌液按照 1 : 50 的比例接种于 80 mL 的 LB 液体培养基中，37°C 摇床震荡培养 2-3 h，待 OD 值达到 0.5-0.6 时，置于冰上静置 15 min。

(3) 将培养好的菌液转至 50 mL 无菌离心管中（两管，40 mL/管），冷冻离心机 4°C，3000 rpm，离心 10 min，离心结束弃掉上清。

(4) 向每管沉淀中加入 20 mL 预冷的 0.12 mol/L CaCl<sub>2</sub> 溶液，置于冰上轻轻敲打至沉淀混匀（或移液器轻轻吹打），冰上静置 30 min。

(5) 冷冻离心机 4°C，3000 rpm，离心 10 min，弃掉上清，吸尽残液。

(6) 每管中加入 3.2 mL 预冷的 0.12 mol/L CaCl<sub>2</sub> 溶液，0.8 mL 预冷的 80%甘油，充分混匀后分装至 1.5 mL 的 EP 管中（100 μL/管），置于-80°C保存备用。

## 1.4 主要仪器和设备

主要实验仪器和设备见表 2-2。

表 2-2 实验仪器和设备

Table 2-2 Experimental instruments and equipment

仪器与设备名称	公司名称
冰箱	海尔集团股份有限公司
制冰机	常州市雪科制冷设备有限公司
金属浴	杭州米欧仪器有限公司
微波炉	美的集团股份有限公司
匀浆机	南京中科拜耳医学科技有限公司
PCR 仪	德国耶拿分析仪器股份有限公司
移液器	德国 Eppendorf
电子天平	上海奥豪斯仪器有限公司
超纯水仪	南京易普易达科技有限公司
涡旋振荡器	美国 Scientific Industries
超低温冰箱	中科都菱科技有限公司
恒温水浴锅	美国精骐有限公司
超声破碎仪	南京先欧仪器制造有限公司
生化培养箱	上海新苗医疗器械有限公司
超净工作台	北京东联哈尔仪器制造有限公司
分光光度计	杭州遂真生物技术有限公司
废液抽吸系统	美国 WELCH
微量高速离心机	美国 Thermo Fisher
微量冷冻离心机	Gallop
高压蒸汽灭菌锅	驰通仪器有限公司
酶标仪(Glomax multi+)	美国 Promega 公司
垂直电泳仪、水平电泳仪	北京凯元信瑞仪器有限公司
生物安全柜、CO <sub>2</sub> 恒温培养箱	力康生物科技有限公司
凝胶成像仪、化学发光成像仪	上海天能科技有限公司
倒置光学显微镜、倒置荧光显微镜	德国 Leica 公司
双光子激光共聚焦显微镜	德国卡尔蔡司
恒温振荡培养箱、大型高速冷冻离心机	上海知楚仪器有限公司

## 1.5 重组蛋白的原核表达

### 1.5.1 SVA L 蛋白基因的扩增

根据 SVA GD05/2017 毒株 (GenBank: MH316116) 的基因组序列, 设计 L 基因序列的扩增引物, 将 *EcoR* I、*Xho* I 内切酶切割位点的序列和保护碱基分别加入上下游引物中。扩增的 L 基因序列长度为 237 bp, 引物由苏州金唯智公司合成 (表 2-3)。

表 2-3 L 蛋白扩增引物

引物名称	引物序列 (5'-3')	引物长度 (bp)
pGEX-SVA-L-F	CGCGAATTCATGCAGAACTCTCA	23
pGEX-SVA-L-R	CTCCTCGAGCTGTAGTTCATATAC	24

以感染性克隆质粒 (pC3-SVA-GD05) 为扩增模板, 分别加入上下游引物、ddH<sub>2</sub>O 以及高保真酶配成扩增体系 (50 μL), 充分混匀后放入 PCR 仪中进行扩增, 反应体系如下 (表 2-4):

表 2-4 L 基因的 PCR 反应体系

组分	体积 (μL)
ddH <sub>2</sub> O	22
2×PrimerStar Mix	25
上游引物 (10 μM)	1
下游引物 (10 μM)	1
pC3-SVA-GD05 (1 ng/μL)	1

反应程序: 98°C 3min; 98°C 10 s, 55°C 10 s, 72°C 10 s, 33 个循环; 72°C 10 min。

### 1.5.2 PCR 产物的检测与纯化

PCR 扩增完成后, 取 5 μL 扩增产物进行核酸电泳以检测扩增产物的准确性。电泳结束后, 利用凝胶成像系统进行成像观察并保存结果。利用 PCR 纯化试剂盒将剩余 PCR 扩增产物进行纯化, 去除多余成分, 具体步骤如下:

(1) 将剩余的 PCR 扩增产物转移至新的 1.5 mL EP 管中, 加入 4-6 倍体积的 CP Buffer, 充分混匀后进行瞬离, 收集管壁残留液体。

(2) 将上述混合液转至吸附柱 (外附收集管) 中, 13000×g 离心 1 min, 弃掉滤液。

(3) 加 700  $\mu\text{L}$  DNA Wash Buffer 至吸附柱中央滤膜处, 13000 $\times$ g 离心 1 min, 弃掉滤液。

(4) 重复步骤 (3)。

(5) 重新将吸附柱放入收集管中, 13000 $\times$ g 离心 2 min, 除尽剩余液体。

(6) 将吸附柱放入新的 1.5 mL EP 管中, 加 33  $\mu\text{L}$  Elution Buffer 洗脱液至吸附柱中央滤膜处, 静置 3-5 min, 13000 $\times$ g 离心 1 min, EP 管中收集到的液体即为纯化的 DNA, 立即进行下一步或保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$  备用。

### 1.5.3 酶切和胶回收纯化

将纯化后的 L 基因片段和 pGEX-6P-1 载体分别利用 *EcoR* I 和 *Xho* I 限制性核酸内切酶进行酶切, 37 $^{\circ}\text{C}$  条件下反应 4-6h, 酶切体系如下 (表 2-5) :

表 2-5 L 基因的酶切体系

组分	体积 ( $\mu\text{L}$ )
H <sub>2</sub> O	13
10 $\times$ H Buffer	5
<i>EcoR</i> I	1
<i>Xho</i> I	1
L 基因片段	30

酶切后的产物进行核酸电泳, 电泳结束后使用胶回收试剂盒进行胶回收纯化, 具体步骤如下:

(1) 在 UV 灯下尽可能切下完整的含有目的片段的凝胶, 放入 1.5 mL 的 EP 管中进行称重, 按照 100 mg:100  $\mu\text{L}$  的比例加入 XP2 Binding Buffer, 放置到 60 $^{\circ}\text{C}$  的恒温金属浴中进行加热, 直至凝胶完全融化, 涡旋混匀后进行瞬离, 收集管壁残留液体。

(2) 将融化的混合液转至吸附柱 (外附收集管) 中, 13000 $\times$ g 离心 1 min, 弃掉滤液。

(3) 加 300  $\mu\text{L}$  XP2 Binding Buffer 至吸附柱中央滤膜处, 13000 $\times$ g 离心 1 min, 弃掉滤液。

(4) 加 700  $\mu\text{L}$  SPW Wash Buffer 至吸附柱中央滤膜处, 13000 $\times$ g 离心 1 min, 弃掉滤液。

(5) 重复步骤 (4)。

(6) 重新将吸附柱放入收集管中, 13000×g 离心 2 min, 除尽剩余液体。

(7) 将吸附柱放入新的 1.5 mL EP 管中, 加 25-30 μL Elution Buffer 洗脱液至吸附柱中央滤膜处, 静置 3-5 min, 13000×g 离心 1 min, 回收的 PCR 产物使用分光光度计测量浓度, 立即进行下一步或保存于-20°C 备用。

#### 1.5.4 连接和连接产物转化

酶切纯化后的 L 基因片段、pGEX-6P-1 载体在 T4 DNA 连接酶的作用下, 4°C 过夜连接, 连接体系如下 (表 2-6) :

表 2-6 连接体系

Table 2-6 Connection system

组分	体积 (μL)
L 基因片段	6.5
pGEX-6P-1 载体	2
T4 DNA 连接酶	0.5
10×T4 DNA Ligase	1

将连接产物转入 Top10 感受态细胞中, 具体转化步骤如下:

(1) 从-80°C 超低温冰箱取出 Top10 感受态细胞置于冰上解冻, 融化后加入 5 μL 连接产物, 轻轻拍打混匀, 冰上孵育 30 min。

(2) 放置到 42°C 金属浴中热应激 1.5 min, 随后立即冰上静置 3-5 min。

(3) 加入 900 μL 不含抗性的 LB 液体培养基, 置于 37°C 恒温摇床 160 r/min 震荡培养 45 min。

(4) 5000 rpm 离心 3 min, 于超净工作台中弃掉 800 μL 上清培养基。

(5) 使用移液器轻轻吹打细菌沉淀进行重悬, 充分混匀后, 将全部菌液加入到含有氨苄抗性的 LB 固体培养皿中, 使用涂布珠将菌液均匀涂布。

(6) 将涂布有菌液的 LB 固体培养皿置于 37°C CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 12-16 h。

#### 1.5.5 重组质粒的提取与鉴定

从培养好的 LB 固体培养皿中挑选单个菌落置于 4 mL LB 培养基 (含有氨苄抗性) 中培养, 37°C 恒温摇床 220 r/min 震荡培养 12-16 h。使用质粒提取试剂盒进行质粒提取, 具体步骤如下:

(1) 将培养好的 4 mL 菌液转至 2 mL EP 管中, 12000 rpm 离心 1 min, 弃掉上清, 吸尽残液。

- (2) 加入 250  $\mu\text{L}$  Solution I 至细菌沉淀中，充分涡旋使菌体完全重悬。
- (3) 加入 250  $\mu\text{L}$  Solution II，缓慢柔和的上下颠倒 7-8 次，2-5 min 内完成该步骤。
- (4) 加入 350  $\mu\text{L}$  Solution III，缓慢柔和的上下颠倒 7-8 次，直至出现大量白色絮状沉淀，12000 rpm 离心 10 min。
- (5) 离心结束后，将上清转至吸附柱中，吸附柱置于真空泵上。
- (6) 加入 500  $\mu\text{L}$  HBC Buffer 至吸附柱中央滤膜处。
- (7) 加入 700  $\mu\text{L}$  DNA Wash Buffer 至吸附柱中央滤膜处。
- (8) 重复步骤 (7)。
- (9) 将吸附柱放置收集管中，12000 rpm 离心 2 min，除尽残留液体。
- (10) 将吸附柱转至新的 1.5 mL EP 管中，开盖静置 3 min，向吸附柱中央滤膜处滴加 60  $\mu\text{L}$  Elution Buffer，静置 5 min。
- (11) 12000 rpm 离心 1 min，收集提取的质粒，使用分光光度计测量质粒浓度，标记在管，放置  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

重组质粒的鉴定：使用 L 基因特异性扩增引物进行 PCR 鉴定，并使用 *EcoR* I 和 *Xho* I 限制性核酸内切酶进行酶切鉴定，经核酸电泳后由凝胶成像仪查看鉴定结果。

### 1.5.6 重组蛋白的诱导表达

将鉴定正确的 pGEX-SVA-L 阳性质粒转化至 BL21(DE3) 感受态细胞中，添加 IPTG 诱导重组蛋白表达，具体步骤如下：

- (1) 取 1  $\mu\text{L}$  阳性质粒转化至 BL21(DE3) 感受态细胞中，具体操作参照 1.5.4。
- (2) 挑取单个阳性菌落接种于 4 mL 含有氨苄抗性的 LB 液体培养基中，置于  $37^{\circ}\text{C}$  恒温摇床 220 r/min 震荡培养 12-16 h。
- (3) 将培养好的菌液按 1:50-1:100 的比例接种于 250 mL 含有氨苄抗性的 2 $\times$ YT 液体培养基中，置于  $37^{\circ}\text{C}$  恒温摇床 220 r/min 震荡培养 2 h。
- (4) 待  $\text{OD}_{600}$  值达到 0.6 左右时，按 1:500 的比例添加 IPTG，置于  $37^{\circ}\text{C}$  恒温摇床 220 r/min 继续培养 8-10 h。
- (5) 将培养好的菌液分装至 50 mL 离心管（6 管，40 mL/管）中， $4^{\circ}\text{C}$ ， $5000\times\text{g}$  离心 5 min，弃掉上清。
- (6) 向每管中加入 30 mL 无菌 PBS 缓冲液，充分涡旋混匀后， $4^{\circ}\text{C}$ ， $5000\times\text{g}$  离心 5 min，弃掉上清，重复两次，最终将细菌沉淀集中到一个离心管中。
- (7) 将离心管置于冰上进行超声破碎，设置程序为：25 Hz，工作 3 s，间歇 2 s，持续 15 min，直至浑浊菌液变至透亮状态。

(8) 取 100  $\mu$ L 破碎好的菌液作为对照，剩余的菌液 4 $^{\circ}$ C，12000 $\times$ g 离心 5 min，分别收集上清和沉淀。

(9) 将收集好的 SVA-L 重组蛋白的全菌、上清、沉淀分别加入 5 $\times$ Loading Buffer，涡旋充分混匀，置于 100 $^{\circ}$ C 金属浴加热 10 min，使蛋白完全变性。

(10) 取少量制备好的蛋白样品进行蛋白垂直电泳，考马斯亮蓝染色查看蛋白表达情况，剩余样品保存于 -20 $^{\circ}$ C。

### 1.5.7 重组蛋白的纯化与鉴定

对含有目的蛋白的样品进行蛋白垂直电泳，将目的蛋白分离开来，进行 SDS-PAGE 切胶纯化，具体步骤如下：

(1) 配制 15% 分离胶 45 mL，5% 浓缩胶 20 mL，平均依次加入大型垂直电泳制胶板的两侧（不插梳子），剩余空间使用蒸馏水填满，待其凝固后使用。

(2) 弃掉剩余蒸馏水，组装电泳仪，向电泳仪槽中添加 SDS-PAGE 电泳缓冲液，向凝胶中添加制备好的蛋白样品，120 V 恒压进行电泳，直至溴酚蓝指示剂跑至凝胶底部。

(3) 电泳结束后，取出凝胶，切下分离胶放入预冷的 0.25 M KCL 溶液中染色 5 min，蛋白呈现白色条带状。

(4) 根据重组蛋白的表达情况准确判断目的蛋白条带位置，切下含有目的蛋白的条带放入含有少量 PBS 溶液的平皿中，将其切成碎块转移至透析袋内，再加入 4 mL PBS 溶液，用夹子封口。

(5) 将装有凝胶的透析袋置于蛋白电泳装置中，恒压 120 V 电泳 2 h，电泳结束后，弃去凝胶碎块，保留透析袋中的 PBS 溶液（含有目的蛋白）。

(6) 将透析袋放入盛有 PBS 溶液的烧杯（放置有磁性转子）中，烧杯置于放满碎冰的泡沫箱中，在磁力搅拌器的作用下进行盐离子平衡，每小时更换一次 PBS 溶液，连续更换 3-4 次。

(7) 将透析袋放置于研碎的 PEG 8000 粉末中进行蛋白浓缩，直至蛋白浓度达到 1  $\mu$ g/mL 左右时，用 1.5 mL 的 EP 管进行分装，保存于 -80 $^{\circ}$ C。

(8) 取少量纯化好的蛋白样品加入 5 $\times$ Loading Buffer，金属浴 100 $^{\circ}$ C 变性 10 min，随后以纯化前的蛋白样品作为对照进行蛋白垂直电泳，考马斯亮蓝染色以查看纯化效果。

## 1.6 小鼠免疫

按照表 2-7 所示的免疫程序，将重组蛋白抗原接种于 3 只 6~8 周龄的 BALB/c 小鼠体内。第三次免疫接种 10 天后对 3 只小鼠进行眼眶静脉丛采血，置于 4℃ 过夜以分离血清。向密度达 90% 的 ST-R 细胞中接种 SVA 病毒，分别以采集的小鼠血清作为一抗，进行间接免疫荧光试验以检测小鼠血清中是否含有 SVA L 蛋白的抗体以及抗体特异性强度。选取免疫效果最好的小鼠进行最后的冲击免疫，3 日后进行杂交瘤细胞融合试验。

表 2-7 小鼠免疫程序

Table 2-7 Immunization program of mice

免疫次数	免疫时间	免疫佐剂	免疫剂量	免疫方式
首次免疫	第 1 天	弗氏完全佐剂	100 μg/只	背部皮下多点注射
二次免疫	第 14 天	弗氏不完全佐剂	50 μg/只	腹腔注射
三次免疫	第 28 天	弗氏不完全佐剂	50 μg/只	腹腔注射
冲击免疫	第 50 天	无	100 μg/只	腹腔注射

## 1.7 细胞融合与亚克隆

### 1.7.1 骨髓瘤细胞的培养

取一支冻存于 -80℃ 的 SP2/0 细胞进行复苏，连续传代培养。定点观察细胞的状态，当细胞呈现圆润饱满、大小均匀、清晰透亮的状态且处于对数生长期时，可用于进行细胞融合试验。用 DMEM 基础培养基将 SP2/0 细胞重悬，收集到 50 mL 无菌离心管中，短暂置于 37℃ 细胞培养箱中备用。

### 1.7.2 饲养细胞的获取

取一只未经免疫的健康 BALB/c 小鼠进行脱颈处死，随后将其浸泡于 75% 的酒精中进行消毒。5 min 后，拿镊子将小鼠置于生物安全柜操作台的泡沫板上，并固定小鼠的四肢和尾部。用手术剪沿着腹中线小心剪开被皮，暴露出腹膜并保证腹膜完整。用无菌的 10 mL 注射器吸取 5 mL 的 DMEM 基础培养基注入小鼠腹膜内，轻轻晃动使腹腔巨噬细胞（饲养细胞）充分重悬于 DMEM 中。最后将含有饲养细胞的 DMEM 混合液吸出收集至 15 mL 的无菌离心管中，短暂置于 37℃ 细胞培养箱中备用。

### 1.7.3 小鼠脾细胞的获取

对冲击免疫 3 天后的 BALB/c 小鼠进行眼眶采血并收集血清备用。随后将小鼠进行脱颈处死, 浸泡于 75% 的酒精中消毒 5 min, 后固定于生物安全柜操作台的泡沫板上。使用手术剪全程无菌操作完全打开小鼠腹腔, 并用镊子、剪刀等手术器械将脾脏完整的摘离出来置于干净无菌的细胞培养皿中。将脾脏周边的结缔组织、脂肪组织剔除干净并用 DMEM 对其进行冲洗并转移至另一个培养皿中。加入适量的 DMEM 保持脾脏湿润, 使用注射器针头将脾脏扎成许多小孔, 置于 50 mL 离心管上方的细胞筛中, 用注射器活塞轻轻地对脾脏进行研磨 (边研磨边滴加 DMEM), 使脾细胞充分的释放出来, 直至脾脏呈现白色透明状。最后用 DMEM 冲洗细胞筛收集脾细胞悬液, 置于 37°C 培养箱备用。

### 1.7.4 细胞融合

取少量 SP2/0 骨髓瘤细胞和脾细胞进行细胞计数, 将 SP2/0 细胞和脾细胞按照 1:5-1:10 的比例混合于 50 mL 无菌离心管中。充分混匀后, 1000 rpm 离心 10 min, 弃掉上清, 轻轻拍打离心管底部使细胞沉淀均匀分布在底部管壁。将离心管置于盛有 37°C 温水的烧杯中, 向离心管底部的细胞沉淀中逐滴加入 37°C 预热的 PEG1500 (1 min 内完成), 期间不停地转动离心管使 PEG1500 与细胞沉淀充分接触。继续旋转离心管, 遵循先慢后快的原则, 逐滴加入 1 mL DMEM (1 min 内完成), 逐滴加入 2 mL DMEM (1 min 内完成), 逐滴加入 6 mL DMEM (2 min 内完成)。最后, 添加 DMEM 将细胞悬液体积补至 20 mL, 并放置于 37°C 细胞培养箱 10 min。随后取出离心管 1000 rpm 离心 5 min, 弃掉上清, 添加 5 mL HAT 培养基轻轻重悬细胞, 然后加入 12 mL 饲养细胞悬液, 并补加 HAT 培养基至总体积为 72 mL。充分混匀后将融合后的细胞接种于 3 个 24 孔培养板中, 1 mL/孔, 放置于 37°C 细胞培养箱进行后续培养。培养 5 天后, 观察细胞生长状态并适量补液, 培养 10 天后, 弃去培养基并更换为 HT 培养基继续培养。

### 1.7.5 阳性杂交瘤细胞株的筛选与亚克隆

融合 12 天后, 细胞培养板的每孔中各吸取 100  $\mu$ L 杂交瘤细胞培养上清作为一抗, Dylight 488 标记的山羊抗小鼠 IgG 作为二抗, 同时分别设置 SP2/0 细胞培养上清和小鼠阳性血清作为阴阳性对照, 进行 IFA 检测。观察并标记荧光强度高的杂交瘤细胞孔, 并进行亚克隆, 具体步骤如下:

(1) 弃去阳性细胞孔内的培养基, 用 1 mL HT 培养基将细胞重悬, 取 10  $\mu$ L 细胞悬液进行细胞计数。

(2) 取 100 个杂交瘤细胞加入到 12 mL HT 培养基 (含有饲养细胞) 中, 混合均

匀后接种到 96 孔细胞培养板中, 100  $\mu\text{L}$ /孔, 放置于 37°C 细胞培养箱进行培养。孔内剩余的阳性杂交瘤细胞进行扩大培养, 冻存备份。

(3) 亚克隆后的第 7 天进行补液, 第 10-12 天进行 IFA 检测, 并将阳性孔内的杂交瘤细胞进行第二次亚克隆。二次亚克隆后, 对得到的单克隆阳性杂交瘤细胞进行扩大培养并进行冻存备份。

## 1.8 单克隆抗体腹水的制备

选取 2 只健康的 BALB/c 小鼠, 腹腔注射 0.5 mL 液体石蜡。1 周后, 用 200  $\mu\text{L}$  DMEM 重悬  $10^6$  个杂交瘤细胞注射到小鼠腹腔内。每天定点观察小鼠腹部状态, 直至腹部明显膨胀变大, 用注射器抽出腹水至离心管中, 5000 rpm 离心 10 min, 收集腹水上清分装后保存于 -20°C 备用。

## 1.9 单克隆抗体的生物学特性鉴定

### 1.9.1 间接免疫荧光检测

将 ST-R 细胞接种于 96 孔细胞培养板中, 待孔内细胞密度达到 80% 左右时, 按  $\text{MOI}=0.01$  将 SVA GD05/2017 毒株接种于细胞培养板, 以不接毒的细胞孔作为阴性对照, 放置于 37°C 细胞培养箱孵育 2 h, 弃去培养基, 加入含有 2% FBS 的细胞维持液继续培养。待孔内约 50% 的细胞出现病变时, 进行 IFA 检测, 具体步骤如下:

(1) 弃掉培养基, 用 PBS 缓冲液清洗 2 次。

(2) 固定: 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  4% 多聚甲醛溶液覆盖住细胞单层, 固定细胞形态, 室温孵育 15 min, 后加 PBS 溶液清洗 2 次。

(3) 打孔封闭: 加入以 1:1 比例混合的 0.1% Triton X-100 和 2% BSA 溶液进行打孔封闭, 室温孵育 30 min, 后加 PBS 溶液清洗 2 次。

(4) 孵育一抗: 将制备的腹水以 1:1000 的比例进行稀释, 加入到细胞板中, 并设置 SVA 3C 单抗孵育的细胞孔作为阳性对照, 4°C 孵育过夜, 后加 PBS 溶液清洗 3 次。

(5) 孵育二抗: 将 DyLight 488 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体以 1:1000 的比例进行稀释, 加入到细胞板中室温孵育 1 h, 后加 PBS 溶液清洗 3 次。

(6) 成像拍照: 将制备好的细胞板放于倒置荧光显微镜下进行观察并拍照保存。

### 1.9.2 Western Blot 鉴定

构建 pEGFP-SVA-L 真核表达质粒用于 SVA L 蛋白的外源性检测。将 ST-R 细胞接

种于 6 孔细胞培养板中,待孔内细胞密度达 60%左右时,使用 H4000 转染试剂将 pEGFP-SVA-L 质粒转染至细胞内,置于 37°C 细胞培养箱 6 h 后更换培养基,继续培养 36 h,细胞转染具体步骤如下:

(1) 将 4  $\mu\text{g}$  质粒用 50  $\mu\text{L}$  无血清的 DMEM 进行稀释,涡旋充分混匀,制成 DNA 稀释液。

(2) 将 10  $\mu\text{L}$  H4000 用 50  $\mu\text{L}$  无血清的 DMEM 进行稀释,涡旋充分混匀,室温静置 5 min。

(3) 将 H4000 稀释液加入到 DNA 稀释液中,涡旋充分混匀,室温静置 15 min。

(4) 将转染复合物加入到培养板细胞孔中,同时设置阴性对照,轻柔晃动混匀后置于 37°C 细胞培养箱。培养 6 h 后更换新鲜培养基,继续培养 36 h,随后收取细胞样品进行 Western Blot 试验。

Western Blot 试验具体步骤如下:

(1) 样品制备: 弃去培养基,用 PBS 溶液清洗 2 次,每孔加入 150  $\mu\text{L}$  RIPA 裂解液,用无菌枪头刮取细胞并收集于 1.5 mL 离心管中,置于冰上在 20 rpm 的摇床上裂解 30 min。随后 4°C, 12000 rpm 离心 10 min 并收集上清,加入 Loading Buffer 后置于 100°C 金属浴加热 10 min。

(2) 垂直电泳: 配制 15% SDS-PAGE 凝胶,置于电泳槽内(含有电泳缓冲液),将样品分为两组(按照 Maker、阴性对照、L 蛋白样品的顺序)分别加入到凝胶孔内,电泳仪 80 V 恒压电泳,待样品跑至分离胶时,转为 120 V 恒压直至电泳结束。

(3) 转膜: 提前裁剪与凝胶大小一致的 PVDF 膜,置于甲醇中浸泡 2 min 激活。按照黑板-海绵-滤纸-凝胶-PVDF 膜-滤纸-白板的是顺序组装夹子,置于电泳槽内(含有膜转印缓冲液),恒流 200 mA 转印 35 min。

(4) 封闭: 取出 PVDF 膜,用 TBST 溶液进行简单清洗,置于 20 rpm 摇床上的 5% 脱脂奶中封闭 2 h,随后用 TBST 溶液清洗 2 次,10 min/次。

(5) 孵育一抗: 按照分组将 PVDF 膜剪开,分别放入杂交袋中孵育 1:2000 比例稀释的 GFP 抗体和 L 单抗腹水,置于 4°C 转盘上孵育过夜。随后用 TBST 溶液将 PVDF 膜清洗 2 次,10 min/次。

(6) 孵育二抗: 两张 PVDF 膜对应一抗来源,分别孵育 1:5000 稀释的 HRP 标记的山羊抗兔和山羊抗小鼠抗体,室温孵育 1 h,随后用 TBST 溶液将 PVDF 膜清洗 2 次,10 min/次。

(7) 将 PVDF 膜置于成像仪暗箱内,滴加 ECL 发光液(A 液和 B 液 1:1 混合)进

行发光成像。

## 1.10 SVA L 蛋白的亚细胞定位

将 ST-R 细胞接种于 24 孔细胞培养板（含有细胞爬片）中，待孔内细胞密度达 60% 左右时进行细胞转染。同 1.9.2 中方法将 pCMV-ER-GFP（内质网）、pGolgi-mCherry（高尔基体）、pLAMP1-mCherry（溶酶体）、pMito-mCherry（线粒体）质粒分别与 pCAGGS-3Flag-L 质粒共转染，转染 36 h 后，按 1.9.1 中步骤进行免疫荧光操作，其中一抗为 L 单抗腹水，二抗为 Dylight 488 或 549 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体。用 DAPI 进行细胞核染色标记，取出细胞爬片放置在载玻片上制成观察样本，通过双光子激光共聚焦显微镜观察结果并保存图像。

## 1.11 SVA L 蛋白的功能研究

### 1.11.1 L 蛋白的氨基酸序列比对

选取部分小 RNA 病毒科病毒 L 蛋白的氨基酸序列使用 CLUSTALW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) 进行氨基酸序列比对。将比对后的序列文件上传至 ESPript3 (<https://esprict.ibcp.fr/ESPrict/ESPrict/>) 进行结果绘图。

### 1.11.2 L 蛋白突变感染性克隆质粒的构建及鉴定

分析 L 蛋白氨基酸序列比对结果，选取 13 个相对保守的位点进行点突变。以 SVA 感染性克隆质粒（pC3-SVA-GD05）为模板，设计 L 基因突变引物（表 2-8）。以一个位点为例，首先以 SVA-L-F/L-T14A-R 和 L-T14A-F/ SVA-L-R 两对引物分别扩增 A 和 B 片段，随后以 A 和 B 片段为模板，以 SVA-L-F/ SVA-L-R 为引物，采用 Overlap PCR 方法（表 2-9）扩增得到 AB 片段（即突变的 L 片段），按 1.5 中质粒构建方法将突变片段插入到 *SaC* I 和 *SaC* II 内切酶切开的感染性克隆质粒中完成点突变感染性克隆质粒的构建。构建完成的突变质粒送往南京擎科生物科技有限公司进行测序，并利用 SVA-L-F/ SVA-L-R 引物对进行 PCR 鉴定。

表 2-8 L 基因点突变引物

Table 2-8 Primers for L gene point mutations

引物名称	引物序列 (5'-3')	引物长度 (bp)
SVA-L-F	CACCGAGCTCGACCCTCCTTAGTAAG	26
SVA-L-R	CATTCCGCGGGAATCGAAATCATTC	25
L-T14A-F	GATACAGCCTCTGGCGCTTTTGAAGACGTAACC	33
L-T14A-R	GGTTACGTCTTCAAAGCGCCAGAGGCTGTATC	33
L-F15A-F	ACAGCCTCTGGCACCGCTGAAGACGTAACC	30
L-F15A-R	TCCGGTTACGTCTTCAGCGGTGCCAGAGGCTGT	33
L-E16A-F	GCCTCTGGCACCTTTGCTGACGTAACCGGAACA	33
L-E16A-R	TGTTCCGGTTACGTCAGCAAAGGTGCCAGAGGC	33
L-K22A-F	GACGTAACCGGAACAGCTGTCAAGATCGTTGAA	33
L-K22A-R	TTCAACGATCTTGACAGCTGTTCCGGTTACGTC	33
L-Y28A-F	GTCAAGATCGTTGAAGCTCCTAGATCGGTGAAC	33
L-Y28A-R	GTTACCGATCTAGGAGCTTCAACGATCTTGAC	33
L-Y37A-F	GTGAACAATGGTGTGCTGATTCGTCCACTCAT	33
L-Y37A-R	ATGAGTGGACGAATCAGCAACACCATTGTTAC	33
L-D38A-F	AACAATGGTGTGTTACGCTTCGTCCACTCATTG	33
L-D38A-R	AAATGAGTGGACGAAGCGTAAACACCATTG	30
L-E44A-F	CGTCCACTCATTGGCTATACTGAACCTACAGG	33
L-E44A-R	CTGTAGGTTTCAGTATAGCCAAATGAGTGGACGA	33
L-G50A-F	GATACTGAACCTACAGGCTGAAATTGAAATTTTA	34
L-G50A-R	TAAAATTTCAATTCAGCCTGTAGGTTTCAGTATC	34
L-E51A-F	CTGAACCTACAGGGTGCTATTGAAATTTTAAGG	33
L-E51A-R	CCTTAAAATTTCAATAGCACCTGTAGGTTTCAG	33
L-L70A-F	CCGCCAAACAACAAGCTGGACTGGACATCGTA	32
L-L70A-R	TACGATGTCCAGTCCAGCTTGTTGTTTGGCGG	32
L-V75A-F	CTTGGACTGGACATCGCTTATGAACTACAGGGT	33
L-V75A-R	ACCCTGTAGTTCATAAGCGATGTCCAGTCCAAG	33

L-E77A-F	CTGGACATCGTATATGCTCTACAGGGTAATGTT	33
L-E77A-R	AACATTACCCTGTAGAGCATATACGATGTCCAG	33

表 2-9 Overlap PCR 扩增体系

Table 2-9 Overlap PCR amplification system

组分	体积 ( $\mu\text{L}$ )
2×PrimeSTAR Max Premix	25
DNA	2
ddH <sub>2</sub> O	21

反应程序：98°C 3min；98°C 10 s，55°C 10 s，72°C 10 s，5 个循环；72°C 10 min。  
随后添加上下游引物进行如下扩增：

组分	体积 ( $\mu\text{L}$ )
上步反应液	48
上游引物 (10 $\mu\text{M}$ )	1
下游引物 (10 $\mu\text{M}$ )	1

反应程序：98°C 3min；98°C 10 s，55°C 10 s，72°C 10 s，30 个循环；72°C 10 min。

### 1.11.3 L 蛋白突变病毒的拯救与鉴定

**病毒拯救：**将 BHK21 细胞接种于 3 个 6 孔细胞培养板（15 个孔）中，待孔内密度达 60% 左右时，使用 H4000 转染试剂按 1.9.2 中方法将构建的 13 个点突变感染性克隆质粒分别转染至 BHK21 细胞中，同时设置阴性对照（未转染的正常细胞）和阳性对照（转染 pC3-SVA-GD05 质粒）。转染 72 h 后，收集每孔内的细胞上清，分别取 300  $\mu\text{L}$  上清接种于提前铺好的 ST-R 细胞中，置于 37°C 细胞培养箱中孵育 2 h 后，弃去上清，每孔内加入 2 mL 含 2% FBS 的细胞维持液继续培养。每天定时观察细胞状态，待 80% 的细胞发生病变（细胞皱缩、变圆和脱落）时，收集每孔内的细胞维持液，离心除去细胞碎片，收集的上清即为拯救的病毒液，分装后保存于 -80°C 备用。

**病毒鉴定：**将 ST-R 细胞接种于 3 个 6 孔细胞培养板（15 个孔）中，待孔内密度达 80% 左右时，将拯救的 13 株突变病毒按 MOI=0.01 接种到细胞板中，同时设置阴性对照（接种 DMEM）和阳性对照（接种 SVA GD05/2017 毒株）。2 h 后更换为含 2% FBS 的细胞维持液，37°C 细胞培养箱中继续培养，待孔内 50% 的细胞发生病变时，按照 1.9.1 中步骤进行 IFA 检测。

#### 1.11.4 L 蛋白突变病毒滴度的测定

将 ST-R 细胞接种于 5 个 96 孔细胞培养板中，待孔内密度达 80% 左右时，弃去培养基。使用含 2% FBS 的细胞维持液将上述拯救的 14 株病毒液（含拯救的 GD05/2017 毒株）按  $10^{-3}$ - $10^{-9}$  的梯度进行稀释，将稀释好的 7 个梯度的病毒液接种于细胞板中， $100\ \mu\text{L}$ /孔，每个稀释度设置 4 个重复孔，同时设置阴性对照。置于  $37^{\circ}\text{C}$  细胞培养箱中培养 2 h 后，每孔补加  $50\ \mu\text{L}$  的细胞维持液继续培养。每天观察细胞状态并进行记录，待出现细胞病变的孔数不在增多时，使用 Karber 法计算病毒滴度，计算公式： $\lg\text{TCID}_{50}=\text{L}-\text{D}(\text{S}-0.5)$ 。

#### 1.11.5 L 蛋白突变或缺失对病毒复制的影响

为进一步综合分析 L 蛋白是否对病毒的复制产生影响，选取了使病毒致死的 L70A 突变位点以及实验室先前发现的使病毒致死或使病毒滴度明显减弱的突变和缺失位点（H42A、Q79A、 $\Delta$ 42H、 $\Delta$ 56R），并将上述突变片段替换到 GD05-Rep 复制子质粒中。同 1.9.2 中方法将构建的 L 蛋白突变和缺失（H42A、L70A、Q79A、 $\Delta$ 42H、 $\Delta$ 56R）复制子质粒转染至 ST-R 细胞中，同时设置阴性对照（未转染质粒）和阳性对照（转染 SVA-GD05-Rep 复制子质粒）。转染 24 h 后，使用 RNA-easy Isolation Reagent 收取细胞样品，提取 RNA 并进行反转录，随后使用反转录得到的 cDNA 样品进行荧光定量 PCR（绝对定量）试验。

##### 1.11.5.1 RNA 提取与反转录

（1）弃去细胞培养液，用 PBS 溶液清洗 1 次，每孔加入  $250\ \mu\text{L}$  RNA-easy，用移液器将细胞吹打下来并收集到离心管中（无 RNA 酶），继续反复吹打直至充分裂解。

（2）向上述细胞裂解液中加入  $100\ \mu\text{L}$  RNase-free ddH<sub>2</sub>O，上下颠倒充分混匀，室温静置 5 min。

（3） $12000\times\text{g}$  离心 15 min，此时溶液分为上层水相（含 RNA）和下层沉淀，将上层水相小心转移至新的离心管中。

（4）加入等体积（ $350\ \mu\text{L}$ ）的异丙醇，上下颠倒充分混匀，室温静置 10 min； $12000\times\text{g}$  离心 10 min，出现白色沉淀，弃去上清。

（5）加入  $500\ \mu\text{L}$  75%乙醇（无 RNA 酶），轻弹管底使沉淀悬浮并上下颠倒数次。

（6） $8000\times\text{g}$  离心 3 min，弃去上清。

（7）重复步骤（5）和（6），弃去上清。

（8）开盖放置室温晾干，加入适量的 RNase-free ddH<sub>2</sub>O，涡旋 3 min 以充分溶解 RNA 沉淀。

(9)使用分光光度计检测 RNA 纯度( $OD_{260/280}$  值介于 1.8-2.2 之间表明纯度较高)。

(10) 提取的 RNA 产物立即进行反转录或暂存于-20℃备用。

使用 Hifair<sup>®</sup>V one-step RT-gDNA digestion SuperMix 进行反转录操作, 反应体系(表 2-10) :

表 2-10 反转录体系

组分	体积
RNase-free ddH <sub>2</sub> O	To 20 $\mu$ L
5×Hifair <sup>®</sup> one step RT SuperMix	4 $\mu$ L
gDNA Remover Mix	1 $\mu$ L
Total RNA	10 ng-1 $\mu$ g

反转录程序: 30℃孵育 5 min, 55℃孵育 15 min, 85℃孵育 30 s; 反转录得到的 cDNA 置于-80℃保存备用。

### 1.11.5.2 荧光定量 PCR

以 pCAGGS-3Flag-SVA-3C 质粒作为标准质粒, 按  $10^{-2}$ - $10^{-5}$  的梯度稀释为 4 个样品备用, 将上述反转录的 7 个 cDNA 样品(含阴阳性对照)稀释 5 倍备用。设计针对 3C 蛋白的定量引物(Q-SVA-3C-F: ACAGTCCGCTCTTCTTGTGG, Q-SVA-3C-R: GTCCGAGACGTACCATCACC), 并按如下体系(表 2-11)对上述共 11 个样品进行扩增, 每个样品设置 3 个重复孔。

表 2-11 荧光定量 PCR 反应体系

组分	体积 ( $\mu$ L)
Hieff qPCR SYBR Green Master Mix	10
Q-SVA-3C-F (10 $\mu$ M)	0.4
Q-SVA-3C-R (10 $\mu$ M)	0.4
cDNA	3
无菌超纯水	6.2

定量扩增程序: 恒温段: 95℃预变性 5 min; 循环段: 95℃ 10 s, 60℃ 30 s, 40 个循环; 溶解段: 95℃ 5 s, 60℃ 15 s, 95℃ 5 s。

### 1.11.6 L 蛋白突变或缺失对病毒翻译的影响

同 1.9.2 中方法将 1.11.5 中选取的一组 L 蛋白突变或缺失复制子质粒分别与 pRL-SV40（内参质粒）共转染至 ST-R 细胞（24 孔板）中，同时设置阴性对照（未转染复制子质粒）和阳性对照（转染 SVA-GD05-Rep 复制子质粒）。转染 36 h 后，使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒收取细胞样品，随后用酶标仪进行荧光素酶检测，具体步骤如下：

（1）取出细胞培养板置于冰上，弃去培养基，用足量的 PBS 溶液轻轻洗涤细胞 2 次。

（2）每孔加入 150  $\mu\text{L}$  专用细胞裂解液，用枪头将细胞刮取下来并用移液器轻轻吹打几次，收集到干净的离心管中，放在冰上置于 20 rpm 摇床裂解 30 min。

（3）4 $^{\circ}\text{C}$ ，12000 rpm 离心 10 min，吸取上清至新的离心管中，避免吸入沉淀，收集到的样品立即进行荧光素酶检测或短暂保存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 。

（4）吸取 60  $\mu\text{L}$  Luciferase Reaction Reagent 加入到测试孔底部，分别加入 40  $\mu\text{L}$  待测样品，轻轻混匀后放入酶标仪进行检测，记录酶标仪中萤火虫荧光素酶的活性数据。

（5）向上述测试孔中分别加入 40  $\mu\text{L}$  Stop Reagent，轻轻混匀后放入酶标仪进行检测，记录海肾荧光素酶的活性数据。对两组数据进行分析以得出其相对活性。

## 2 结果

### 2.1 重组质粒的鉴定

以 pGEX-SVA-L 重组质粒为模板，用 SVAL 蛋白的扩增引物进行 PCR 鉴定，扩增产物进行核酸凝胶电泳并成像检验。如图 2-1 所示，成功扩增出大小为 237 bp 的 L 基因条带。

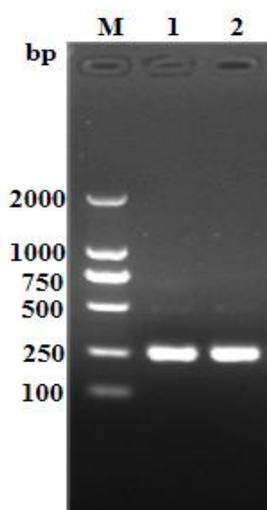


图 2-1 重组质粒的 PCR 鉴定

Fig.2-1 PCR identification of recombinant plasmids

注：M. DL2000 DNA maker; 1、2. pGEX-SVA-L

使用 *EcoRI* 和 *Xho I* 限制性内切酶对 pGEX-SVA-L 重组质粒进行酶切鉴定，酶切产物进行核酸凝胶电泳并成像检验。如图 2-2 所示，重组质粒被切割成两个条带，一个 5000 bp 左右的 pGEX-6p-1 线性化载体条带，一个 237 bp 的 L 基因条带。PCR 鉴定和酶切鉴定的结果均表明 pGEX-SVA-L 重组质粒构建成功。

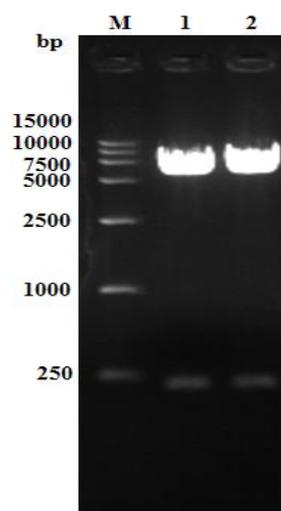


图 2-2 重组质粒的酶切鉴定

Fig.2-2 Enzymatic identification of recombinant plasmids

注：M. DL15000 DNA maker; 1、2. pGEX-SVA-L

## 2.2 重组蛋白的表达纯化与鉴定

将鉴定正确的 pGEX-SVA-L 重组质粒转化至 BL21 (DE3) 感受态细胞，经 IPTG 诱导表达重组蛋白。收集菌体并破碎制备蛋白样品，经切胶纯化后得到重组蛋白，大小约为 35 kDa (图 2-3)。结果表明，经纯化后去除了绝大多数的杂蛋白，纯化效果明显。

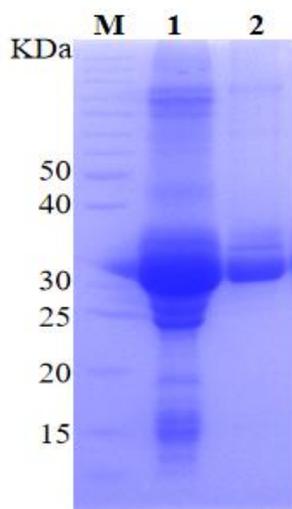


图 2-3 L 重组蛋白的纯化鉴定

Fig.2-3 Purification and identification of L recombinant proteins

注：M. 26614 Protein Marker; 1. pGEX-SVA-L 未纯化; 2. pGEX-SVA-L 纯化

M. 26614 Protein Marker; 1. pGEX-SVA-L unpurified; 2. pGEX-SVA-L purified

## 2.3 L 单抗腹水的生物学鉴定

### 2.3.1 间接免疫荧光检测

经细胞融合和亚克隆后，筛选出一株阳性杂交瘤细胞，命名为 36-B3，并成功进行 L 单抗腹水的大量制备，分装后保存于 $-20^{\circ}\text{C}$ 。对 SVA GD05/2017 毒株感染的 ST-R 细胞进行 IFA 检测，设置未感染细胞为阴性对照。如图 2-4 所示，SVA 感染的细胞观察到特异性绿色荧光，而对照组无荧光，表明 36-B3 株 L 单抗可用于 SVA 病毒感染中 L 蛋白的 IFA 检测。

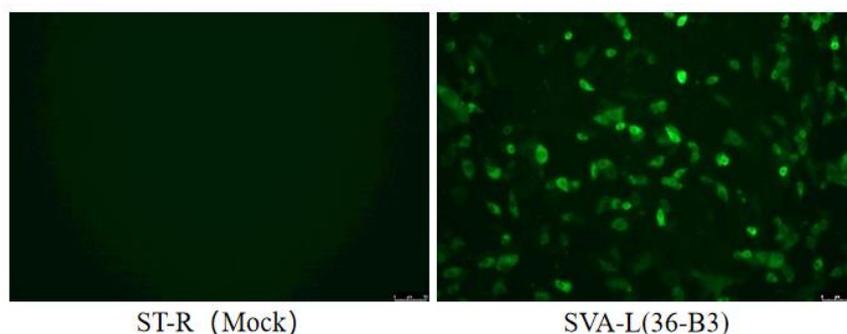


图 2-4 L 单抗的 IFA 鉴定

Fig.2-4 IFA identification of L monoclonal antibody

### 2.3.2 Western Blot 鉴定

将 pEGFP-SVA-L 真核表达质粒转染至 ST-R 细胞中，使用 L 单抗检测外源性表达的 SVA L 蛋白。如图 2-5 所示，pEGFP-SVA-L 真核质粒在 ST-R 细胞中成功表达（图 2-5A），且成功检测到相应大小的 EGFP-L 融合蛋白，大小约为 36 kDa（图 2-5B），阴性对照无蛋白条带。说明 SVA L 单抗可用于 L 蛋白的外源性检测。

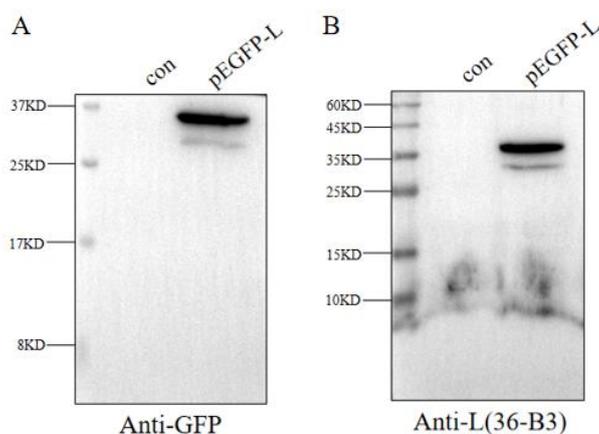


图 2-5 L 单抗的 Western Blot 鉴定

Fig2-5 Western Blot identification of L monoclonal antibody

## 2.4 SVA L 蛋白的亚细胞定位

为了确定 SVA L 蛋白在细胞中的分布,将 pCAGGS-3Flag-L 分别与 pCMV-ER-GFP (内质网)、pGolgi-mCherry (高尔基体)、pLAMP1-mCherry (溶酶体)、pMito-mCherry (线粒体)一起共转染到 ST-R 细胞中,通过共聚焦显微镜观察 SVA L 蛋白的亚细胞定位。如图 2-6 所示,L 蛋白的红色荧光信号与内质网的绿色荧光信号高度重合,形成黄色重叠区域,说明 SVA L 蛋白主要定位于内质网中。

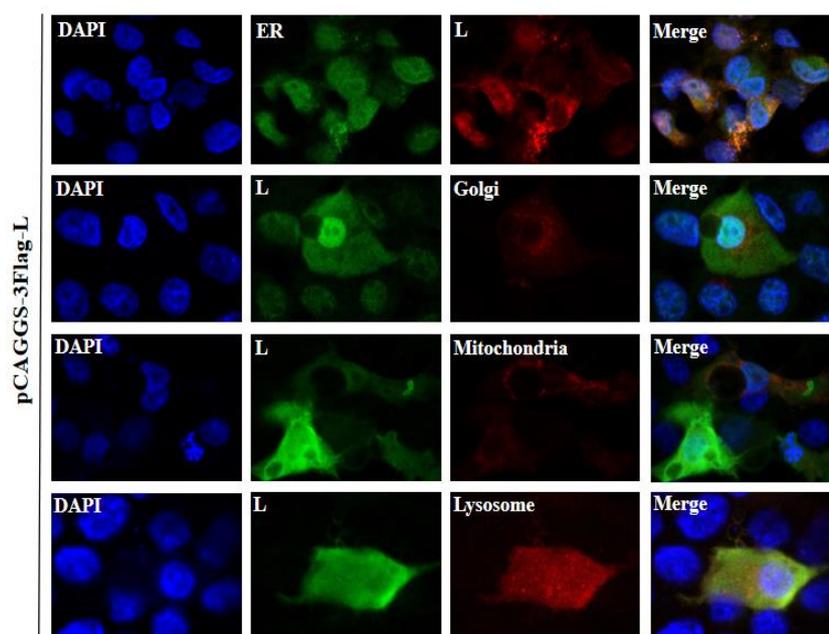


图 2-6 L 蛋白的亚细胞定位

Fig.2-6 Subcellular localization of L proteins

## 2.5 L 蛋白的氨基酸序列比对

选取小 RNA 病毒科部分病毒中的 L 蛋白序列,使用 CLUSTALW 和 ESPript3 进行氨基酸序列的比对和绘图。如图 2-7 所示,L 蛋白序列在小 RNA 病毒科中极不保守,不同病毒之间的 L 蛋白序列差异较大(图 2-7A);与亲缘关系较近的心脏病毒属部分病毒进行比对,发现 14 个相对保守的氨基酸位点(图 2-7B 中标红),并进行后续研究。



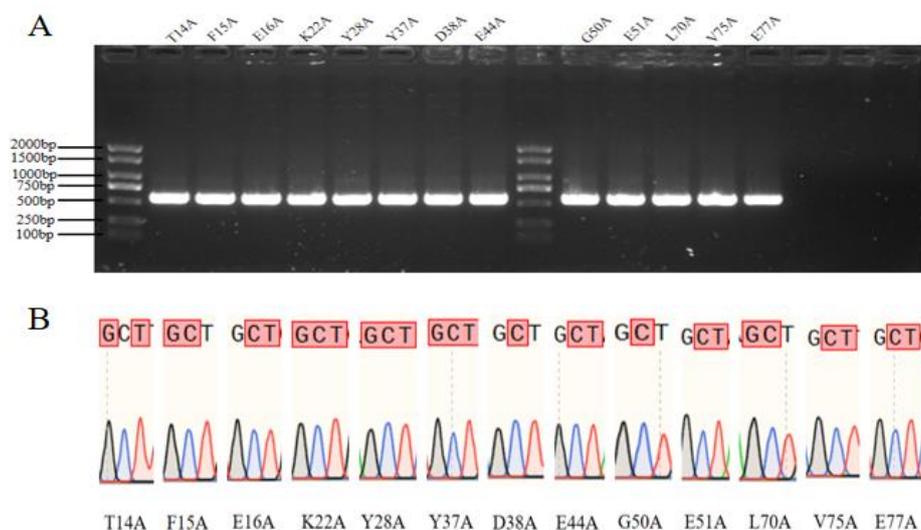


图 2-8 L 蛋白突变感染性克隆质粒的鉴定

Fig.2-8 Identification of infectious clonal plasmids with mutations in the L protein

## 2.7 L 蛋白突变病毒的拯救与鉴定

将上述构建的 13 个突变感染性克隆质粒以及 pC3-SVA-GD05 阳性对照分别转染至 BHK21 细胞中，72 h 后收集上清接种于 ST-R 细胞中，每天观察细胞状态。如图 2-9 所示，T14A、F15A、E16A、K22A、Y28A、Y37A、D38A、E44A、G50A、E51A、V75A、E77A 出现明显的细胞病变（细胞皱缩、变圆和脱落），唯独 L70A 没有细胞病变效应，与阴性对照一致（图 2-9A）。收集拯救的病毒感染 ST-R 细胞进一步进行 IFA 鉴定，与细胞病变结果一致，除 L70A 外均出现明显的绿色荧光（图 2-9B）。上述结果表明，成功拯救了 T14A、F15A、E16A、K22A、Y28A、Y37A、D38A、E44A、G50A、E51A、V75A、E77A 等 12 株 SVA L 蛋白突变病毒，而 70 位的亮氨酸（L）突变后使病毒致死。

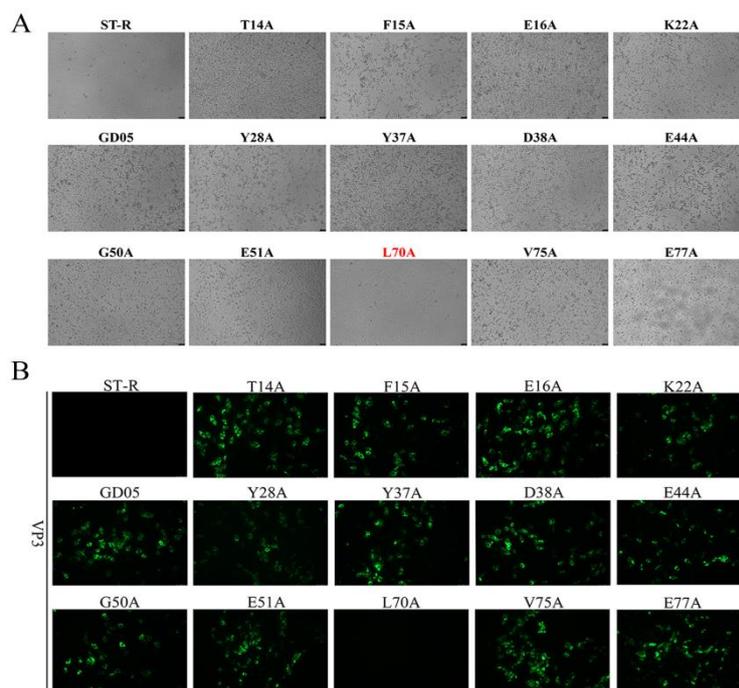


图 2-9 L 蛋白突变病毒的拯救与鉴定

Fig.2-9 Rescue and identification of L protein mutant viruses

## 2.8 L 蛋白突变病毒的滴度测定

取上述拯救的 14 株 F1 代突变病毒（含 GD05 阳性对照）按照 Karber 法测定病毒滴度。如图 2-10 所示，T14A、F15A、E16A、K22A、Y28A、Y37A、D38A 对病毒滴度的影响较小，E44A、G50A、E51A、V75A、E77A 使病毒滴度略微降低，唯有 L70A 位点使病毒致死。说明 L 蛋白中的 L70 位点在病毒的生命过程中可能发挥重要作用，且 L 蛋白对于病毒的存活不可或缺。

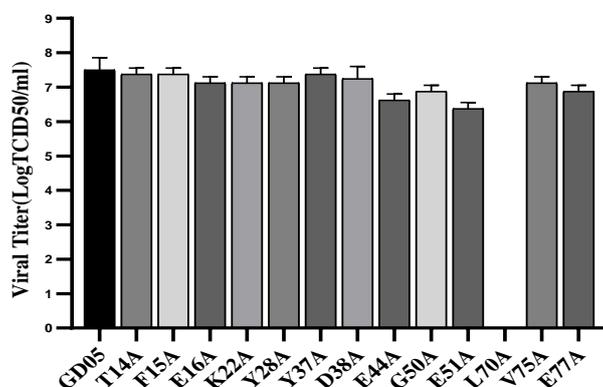


图 2-10 L 蛋白突变或缺失病毒的滴度

Fig.2-10 Titer of L-protein mutant or deletion viruses

## 2.9 L 蛋白突变或缺失对 SVA 复制和转录翻译的影响

为进一步综合分析 L 蛋白是否在病毒的复制和转录翻译过程中发挥作用, 选取使病毒致死的 L70A 突变位点以及实验室先前发现的使病毒致死或使病毒滴度明显减弱的突变和缺失位点 (H42A、Q79A、 $\Delta$ 42H、 $\Delta$ 56R), 并在 SVA-GD05-Rep 复制子质粒的基础上构建上述位点突变或缺失的复制子质粒, 分别命名为 Rep-H42A、Rep-L70A、Rep-Q79A、Rep- $\Delta$ 42H、Rep- $\Delta$ 56R (图 2-11A)。以 SVA-GD05-Rep 复制子质粒为阳性对照, 将上述复制子质粒转染至 ST-R 细胞中, 24 h 后提取 RNA 并反转录, 进行荧光定量 PCR (绝对定量) 试验以检验 L 蛋白突变或缺失对 SVA 复制水平的影响。如图 2-11B 所示, L 蛋白突变 (H42A、L70A、Q79A) 或缺失 ( $\Delta$ 42H、 $\Delta$ 56R) 对 SVA 的复制并无明显影响。以 SVA-GD05-Rep 复制子质粒为阳性对照, 同时设置阴性对照, 将上述复制子质粒分别与 pRL-SV40 共转染至 ST-R 细胞, 36 h 后收集细胞样品进行双荧光素酶检测, 以检验 L 蛋白突变或缺失对 SVA 转录翻译的影响。如图 2-11C 所示, Rep-H42A、Rep-L70A、Rep-Q79A、Rep- $\Delta$ 42H、Rep- $\Delta$ 56R 均对 SVA 均在不同程度上抑制了病毒的转录翻译活性, 其中, Rep-Q79A、Rep- $\Delta$ 42H、Rep- $\Delta$ 56R 的抑制效果最为显著。结果表明, SVA L 蛋白可能在病毒的转录翻译过程中发挥重要作用。

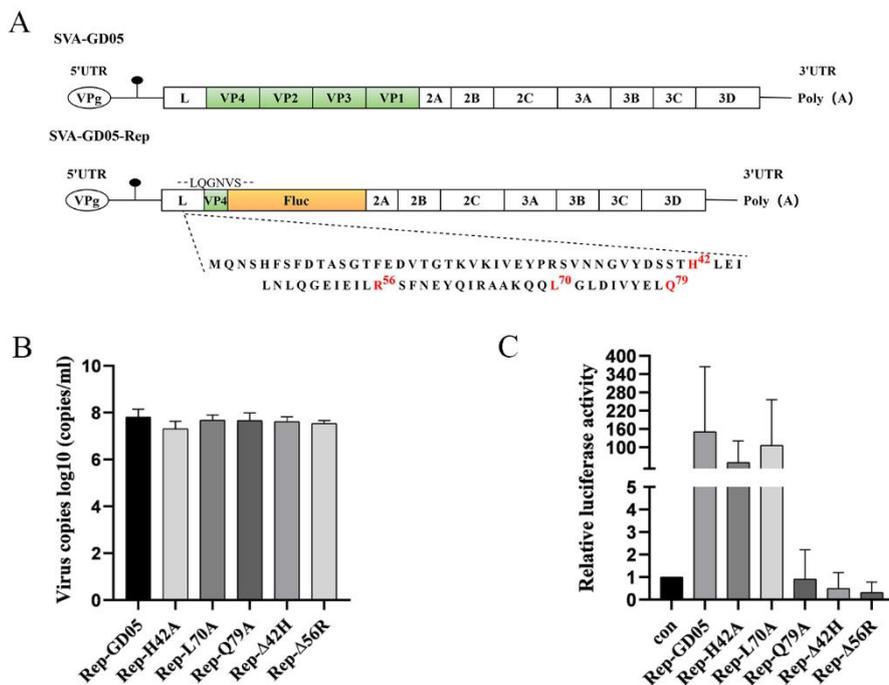


图 2-11 L 蛋白突变或缺失对 SVA 复制和转录翻译的影响

Fig.2-11 Effects of L protein mutations or deletions on SVA replication and transcription-translation

### 3 讨论

自 2015 年 SVA 在中国首次报道以来, 已经在全国范围内广为流传, SVA 在世界范围内也呈现出广泛的流行模式。随着对 SVA 的深入研究, 不断涌现出与 SVA 相关的研究报道, SVA 的流行病学调查、发病机制、免疫逃逸、蛋白功能、诊断技术开发等方面均有大量报道。单克隆抗体作为强大有利的研究工具在科学研究中发挥重要的作用, SVA VP1、VP2、VP3 以及 3C 蛋白的单克隆抗体均有报道, 且在蛋白的功能研究以及诊断技术的开发中起到关键作用。L 蛋白作为 SVA 病毒中的先导蛋白, 由基因组第一个编码合成, 但 SVA L 蛋白的功能到目前还尚不清楚。因此, 制备 SVA L 蛋白的单克隆抗体显得尤为重要。

本研究利用大肠杆菌原核表达系统表达 SVA L 蛋白, 该方法价格低廉、操作简单方便、菌体繁殖迅速且遗传稳定。由于 L 蛋白较小, 因此选用带有 GST 融合蛋白标签的 pGEX-6P-1 载体, 将 L 片段插入其中并表达, 以提高融合蛋白的表达量并方便后续的操作过程。使用 IPTG 诱导 L 蛋白表达, 通过切胶纯化方法进行蛋白纯化并使用 PEG8000 进行浓缩, 得到了纯度较高的 L 融合蛋白免疫原。使用得到的 L 融合蛋白免疫原对 6~8 周龄的 BALB/c 小鼠进行免疫, 待小鼠体内产生较高强度的抗体时, 取小鼠的脾细胞与状态良好的 SP2/0 细胞进行融合, 以得到既能无限繁殖又能产生相应抗体的杂交瘤细胞。经细胞融合、杂交瘤细胞的筛选及亚克隆后, 最终得到一株稳定分泌 L 蛋白抗体的杂交瘤细胞株, 将其命名为 36-B3。最后将扩大培养的杂交瘤细胞株注射小鼠到小鼠腹腔大量制备 L 单抗腹水。单抗制备过程中的每一步都十分关键, 例如表达载体的选择、蛋白免疫原的纯度、融合剂的选择、SP2/0 细胞的状态等都直接影响单克隆抗体的成功制备。

对得到的 SVAL 单克隆抗体进行生物学鉴定, 发现 L 单抗可用于检测 SVA 的细胞感染。但使用 L 单抗对收取的 SVA 感染细胞样品以及 pCAGGS-3Flag-L 质粒转染的细胞样品进行 Western Blot 检测, 不能较好地检测出 L 蛋白条带。分析可能是由于以下原因: 第一, SVAL 蛋白的分子量较小, 在蛋白电泳的过程中容易弥散, 较难检测到; 第二, SVA L 蛋白自身在细胞中的表达量较低, 检测的灵敏度不够。随后将 L 蛋白构建至 pEGFP-C3 质粒中, 以使用 L 单抗检测较大的 EGFP-L 融合蛋白, 经鉴定, 可以检测出相应大小的 L 融合蛋白条带, 说明 L 单抗可用于 L 蛋白外源性表达的 Western Blot 检测。进一步通过共聚焦显微镜对 SVAL 蛋白进行细胞亚定位, 结果表明, SVAL 蛋白主要定位于内质网中, 内质网主要功能是合成蛋白质和脂类, 这可能与 L 蛋白的

功能有关。

先导蛋白 L 只存在于小 RNA 病毒科的少数病毒属中，例如塞内卡病毒属、心病毒属、萨佩罗病毒属、口蹄疫病毒属等。不同病毒之间 L 蛋白的序列差异性较大，极不保守，本研究也通过 L 蛋白的氨基酸序列比对证实了这一点。口蹄疫病毒以及心病毒属病毒的 L 蛋白是一种多功能蛋白，发挥多种重要的生物学功能。口蹄疫病毒的 L 蛋白是一种木瓜蛋白酶样蛋白酶，除了发挥病毒蛋白酶的作用外，还具有强大的拮抗宿主抗病毒作用的能力，主要通过以下 3 种不同的机制抑制宿主抗病毒反应：①通过裂解真核翻译起始因子 4 $\gamma$  (eIF4G) 来阻断宿主蛋白合成，②通过抑制干扰素- $\alpha/\beta$  的产生来拮抗宿主先天免疫反应，③作为去泛素化酶催化先天免疫信号分子的去泛素化<sup>[205]</sup>。心病毒属病毒因其含有“锌指”等多种结构域，也参与并干扰 I 型干扰素和趋化因子的产生、核质转运、细胞凋亡等多种关键的细胞过程<sup>[40]</sup>。SVAL 蛋白与其他小 RNA 病毒氨基酸序列的巨大差异性提示其可能发挥不同的特殊功能。

为探究 SVAL 蛋白在其生命周期中发挥的作用，本研究选取 13 个相对保守的 L 蛋白氨基酸位点进行 SVA 感染性克隆质粒的突变，并进行突变病毒的拯救及滴度测定。结果发现，只有 L70A 使病毒致死，其余突变位点对病毒滴度的影响较小。此外，本实验室先前的研究表明， $\Delta 42H$ 、 $\Delta 56R$ 、Q79A 同样可以使病毒致死，且  $\Delta 20G$ 、H42A 使病毒毒力明显减弱<sup>[206]</sup>。上述结果表明，这些位点对于 L 蛋白较为关键且 L 蛋白对于病毒的存活不可或缺，L 蛋白在病毒的生命过程中可能发挥着重要作用。病毒复制子技术是研究蛋白功能和病毒复制的重要工具，为进一步综合探究 L 非结构蛋白是否在病毒的复制和翻译过程中发挥作用，选取了本研究中发现的使病毒致死的 L70A 突变位点以及先前研究发现的突变或缺失位点（H42A、Q79A、 $\Delta 42H$ 、 $\Delta 56R$ ），利用 SVA-GD05-Rep 复制子工具进行荧光定量 PCR（绝对定量）检测和双荧光素酶报告基因检测。发现 L 蛋白突变（H42A、L70A、Q79A）或缺失（ $\Delta 42H$ 、 $\Delta 56R$ ）不会影响病毒的复制水平，这与本实验室先前相对定量的实验结果相反<sup>[206]</sup>。另外，这些 L 蛋白突变或缺失位点均在不同程度上抑制了病毒的转录翻译活性，与本实验室先前试验结果一致<sup>[206]</sup>，验证了 L 蛋白在蛋白转录翻译过程中的重要性。此外，本研究发现 L 蛋白主要定位于内质网中，因此，推测 SVA L 蛋白可能在病毒的转录翻译过程中发挥重要作用或起到调控蛋白合成的作用。

## 4 小结

(1) 本研究利用原核表达系统和细胞融合技术成功制备了一株 SVA L 蛋白的单克隆抗体，命名为 36-B3。

(2) 该 L 单克隆抗体适用于 IFA 试验以及外源性 L 蛋白的 Western Blot 检测；亚细胞定位发现，SVA L 蛋白主要定位于内质网中。

(3) SVA L 蛋白 (L70A) 突变使病毒致死，表明 L 蛋白的 L70 位点可能在病毒的生命过程中发挥重要作用。

(4) SVA L 蛋白突变 (H42A、L70A、Q79A) 或缺失 ( $\Delta$ 42H、 $\Delta$ 56R) 不影响病毒的复制水平，但均在不同程度上抑制了荧光素酶基因的表达，表明 L 蛋白可能在蛋白合成过程中起到调控蛋白翻译的作用。

## 全文结论

1. SVA 重组分析鉴定出 5 株重组毒株，且均为中国毒株。系统发育分析表明，SVA 毒株存在分支I和分支II两个支系，且两个分支间存在明显的演化差异。正选择和负选择共同驱动 SVA 的演化，其全基因组的演化速率为  $3.3522 \times 10^{-3}$  nucleotide substitutions/site/year，最近共祖时间（TMRCA）为 1986 年。
2. SVA 群体历史规模分析表明，其有效群体数量表现出逐渐增加的趋势，从 1986 年到 2017 年有轻微波动，随后呈下降趋势。此外，巴西在 2015 年后的 SVA 全球传播中起到了重要作用。
3. 本研究成功制备了一株 SVA L 蛋白的单克隆抗体（36-B3），适用于 IFA 试验以及外源性 L 蛋白的 Western Blot 检测。
4. 新发现一个 L 蛋白的突变位点（L70A）可以使病毒致死，表明 L 蛋白的 L70 位点可能在病毒的生命过程中发挥重要作用。SVA L 蛋白突变或缺失不影响病毒的复制水平，但均在不同程度上抑制了荧光素酶基因的表达，推测 L 蛋白可能在病毒蛋白的合成过程中起到调控蛋白翻译的作用。

## 参考文献

- [1] J Segales, D Barcellos, A Alfieri, et al. Senecavirus A[J]. *Vet Pathol*, 2017, 54(1): 11-21.
- [2] L M Hales, N J Knowles, P S Reddy, et al. Complete genome sequence analysis of Seneca Valley virus-001, a novel oncolytic picornavirus[J]. *J Gen Virol*, 2008, 89(Pt 5): 1265-1275.
- [3] J F Montgomery, R E Oliver, W S Poole. A vesiculo-bullous disease in pigs resembling foot and mouth disease. I. Field cases[J]. *N Z Vet J*, 1987, 35(3): 21-26.
- [4] J F Montgomery, R E Oliver, W S Poole, et al. A vesiculo-bullous disease in pigs resembling foot and mouth disease. II. Experimental reproduction of the lesion[J]. *N Z Vet J*, 1987, 35(3): 27-30.
- [5] B L Munday, F B Ryan. Vesicular lesions in swine-possible association with the feeding of marine products[J]. *Aust Vet J*, 1982, 59(6): 193.
- [6] E Gibbs, H Stoddard, R Yedloutchnig, et al. A vesicular disease of pigs in Florida of unknown etiology[J]. *Florida Vet J*, 1983, 12(1): 25-27.
- [7] R A Leme, A F Alfieri, A A Alfieri. Update on Senecavirus Infection in Pigs[J]. *Viruses*, 2017, 9(7).
- [8] S F Amass, J L Schneider, C A Miller, et al. Idiopathic vesicular disease in a swine herd in Indiana[J]. 2004, 12(4): 192-196.
- [9] D S Pasma T, Shaw SL. Idiopathic vesicular disease in swine in Manitoba.pdf[J]. *Can Vet J*, 2008.
- [10] R A Leme, E Zotti, B K Alcantara, et al. Senecavirus A: An Emerging Vesicular Infection in Brazilian Pig Herds[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2015, 62(6): 603-611.
- [11] F A Vannucci, D C L Linhares, D E S N Barcellos, et al. Identification and Complete Genome of Seneca Valley Virus in Vesicular Fluid and Sera of Pigs Affected with Idiopathic Vesicular Disease, Brazil[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2015, 62(6): 589-593.
- [12] M Laguardia-Nascimento, M R Gasparini, B Sales É, et al. Molecular epidemiology

- of senecavirus A associated with vesicular disease in pigs in Brazil[J]. *Vet J*, 2016, 216: 207-209.
- [13] R A Leme, S A Headley, T E Oliveira, et al. Molecular, pathological, and immunohistochemical evidence of Senecavirus A-induced infections in pigs of different age groups with vesicular disease from Brazil[C]//Proceedings of the Allen D Lemans Swine Conference, Saint Paul, MN, USA.2015:19-22.
- [14] Q Wu, X Zhao, Y Chen, et al. Complete Genome Sequence of Seneca Valley Virus CH-01-2015 Identified in China[J]. *Genome Announc*, 2016, 4(1).
- [15] C S Singh K, Clark SG, Scherba G, Fredrickson R. Seneca Valley Virus and Vesicular Lesions in a Pig with Idiopathic Vesicular Disease[J]. *Journal of Veterinary Science & Technology*, 2012, 03(06).
- [16] L R Joshi, K A Mohr, T Clement, et al. Detection of the Emerging Picornavirus Senecavirus A in Pigs, Mice, and Houseflies[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2016, 54(6): 1536-1545.
- [17] N J Knowles, P L Hallenbeck. A new picornavirus is most closely related to cardioviruses[C]//Abstract of the EUROPIIC 2005—13th meeting of the European Study Group on the molecular biology of picornaviruses, Lunteren, the Netherlands.2005:23-29.
- [18] International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) [EB/OL], [2014-07]. [https://ictv.global/ictv/proposals/2014.016aV.A.v1.Picornaviridae\\_spren.pdf](https://ictv.global/ictv/proposals/2014.016aV.A.v1.Picornaviridae_spren.pdf).
- [19] S Venkataraman, S P Reddy, J Loo, et al. Structure of Seneca Valley Virus-001: an oncolytic picornavirus representing a new genus[J]. *Structure*, 2008, 16(10): 1555-1561.
- [20] M Strauss, N Jayawardena, E Sun, et al. Cryo-Electron Microscopy Structure of Seneca Valley Virus Procapsid[J]. *J Virol*, 2018, 92(6).
- [21] S Venkataraman, S P Reddy, J Loo, et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of Seneca Valley virus-001, a new member of the Picornaviridae family[J]. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2008, 64(Pt 4): 293-296.
- [22] J M Bergelson, C B Coyne. Picornavirus entry[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2013, 790: 24-41.
- [23] ICTV Report.Picornaviridae [EB/OL], [2017-10]. <https://viralzone.expasy.org/697>.

- 
- [24] V R Racaniello. Picornaviridae[J]. *The viruses and their replication in Fields Virology*, 2007, 796.
- [25] 梁越, 张飞云. 病毒末端结合蛋白 VPg 的功能研究进展[J]. *生物技术通报*, 2009, (04): 16-20.
- [26] Q Wang, H Meng, D Ge, et al. Structural and nonstructural proteins of Senecavirus A: Recent research advances, and lessons learned from those of other picornaviruses[J]. *Virology*, 2023, 585: 155-163.
- [27] M M Willcocks, N Locker, Z Gomwalk, et al. Structural features of the Seneca Valley virus internal ribosome entry site (IRES) element: a picornavirus with a pestivirus-like IRES[J]. *J Virol*, 2011, 85(9): 4452-4461.
- [28] E Martínez-Salas, R Francisco-Velilla, J Fernandez-Chamorro, et al. Picornavirus IRES elements: RNA structure and host protein interactions[J]. *Virus Research*, 2015, 206: 62-73.
- [29] L S Chard, Y Kaku, B Jones, et al. Functional analyses of RNA structures shared between the internal ribosome entry sites of hepatitis C virus and the picornavirus porcine teschovirus 1 Talfan[J]. 2006, 80(3): 1271-1279.
- [30] L E Easton, N Locker, P J Lukavsky. Conserved functional domains and a novel tertiary interaction near the pseudoknot drive translational activity of hepatitis C virus and hepatitis C virus-like internal ribosome entry sites[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(16): 5537-5549.
- [31] M M Willcocks, S Zaini, N Chamond, et al. Distinct roles for the IIIId2 sub-domain in pestivirus and picornavirus internal ribosome entry sites[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(22): 13016-13028.
- [32] N Wang, H Wang, J Shi, et al. The Stem-Loop I of Senecavirus A IRES Is Essential for Cap-Independent Translation Activity and Virus Recovery[J]. *Viruses*, 2021, 13(11).
- [33] F Liu, N Wang, Q Wang, et al. Motif mutations in pseudoknot stem I upstream of start codon in Senecavirus A genome: Impacts on activity of viral IRES and on rescue of recombinant virus[J]. *Veterinary Microbiology*, 2021, 262.
- [34] F Liu, N Wang, Y Huang, et al. Stem II-disrupting pseudoknot does not abolish ability of Senecavirus A IRES to initiate protein expression, but inhibits recovery of virus from cDNA clone[J]. *Veterinary Microbiology*, 2021, 255.

- [35] F Liu, Q Wang, N Wang, et al. Impacts of single nucleotide deletions from the 3' end of Senecavirus A 5' untranslated region on activity of viral IRES and on rescue of recombinant virus[J]. *Virology*, 2021, 563: 126-133.
- [36] F Liu, Q Wang, H Meng, et al. Experimental evidence for occurrence of putative copy-choice recombination between two Senecavirus A genomes[J]. *Vet Microbiol*, 2022, 271: 109487.
- [37] D Zhao, Q Wang, M Wang, et al. A putative wild-type or wild-type-like hairpin structure is required within 3' untranslated region of Senecavirus A for virus replication[J]. *Virology*, 2023, 585: 72-77.
- [38] C M T Dvorak, D J Hall, M Hill, et al. Leader Protein of Encephalomyocarditis Virus Binds Zinc, Is Phosphorylated during Viral Infection, and Affects the Efficiency of Genome Translation[J]. *Virology*, 2001, 290(2): 261-271.
- [39] A Gradi, N Foeger, R Strong, et al. Cleavage of eukaryotic translation initiation factor 4GII within foot-and-mouth disease virus-infected cells: identification of the L-protease cleavage site in vitro[J]. *J Virol*, 2004, 78(7): 3271-3278.
- [40] F Borghese, F Sorgeloos, T Cesaro, et al. The Leader Protein of Theiler's Virus Prevents the Activation of PKR[J]. *J Virol*, 2019, 93(19).
- [41] L E C Leong, C T Cornell, B L J M B o P Semler. Processing determinants and functions of cleavage products of picornavirus polyproteins[J]. 2002: 185-197.
- [42] H Meng, X Wang, L Wang, et al. Identification of cis-acting replication element in VP2-encoding region of Senecavirus A genome[J]. *Veterinary Microbiology*, 2023, 280.
- [43] L G Gimenez-Lirola, C Rademacher, D Linhares, et al. Serological and Molecular Detection of Senecavirus A Associated with an Outbreak of Swine Idiopathic Vesicular Disease and Neonatal Mortality[J]. *J Clin Microbiol*, 2016, 54(8): 2082-2089.
- [44] M F Maggioli, S Lawson, M de Lima, et al. Adaptive Immune Responses following Senecavirus A Infection in Pigs[J]. *J Virol*, 2018, 92(3).
- [45] H L Bachrach, D M Moore, P D McKercher, et al. Immune and antibody responses to an isolated capsid protein of foot-and-mouth disease virus[J]. *J Immunol*, 1975, 115(6): 1636-1641.
- [46] X Zhao, Q Wu, Y Bai, et al. Phylogenetic and genome analysis of seven senecavirus A

- isolates in China[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2017, 64(6): 2075-2082.
- [47] H Fan, H Zhu, S Li, et al. Identification of linear B cell epitopes on VP1 and VP2 proteins of Senecavirus A (SVA) using monoclonal antibodies[J]. *Veterinary Microbiology*, 2020, 247.
- [48] G H Wang, J Z Du, G Z Cong, et al. [Establishment of indirect ELISA diagnose based on the VP1 structural protein of foot-and-mouth disease virus (FMDV) in pigs][J]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 2007, 23(5): 961-966.
- [49] H Wang, C Li, B Zhao, et al. Complete genome sequence and phylogenetic analysis of Senecavirus A isolated in Northeast China in 2016[J]. *Arch Virol*, 2017, 162(10): 3173-3176.
- [50] X Zhao, Q Wu, Y Bai, et al. Phylogenetic and genome analysis of seven senecavirus A isolates in China[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2017, 64(6): 2075-2082.
- [51] Jiangwei Song, Lei Hou, Rong Quan, et al. Synergetic Contributions of Viral VP1, VP3, and 3C to Activation of the AKT-AMPK-MAPK-MTOR Signaling Pathway for Seneca Valley Virus-Induced Autophagy.[J]. *J Virol*, 2022, 96(2): e0155021.
- [52] W Wen, X Chen, Q Lv, et al. Identification of a conserved neutralizing epitope in Seneca Valley virus VP2 protein: new insight for epitope vaccine designment[J]. *Virol J*, 2022, 19(1): 65.
- [53] Z Zhang, F Yao, J Lv, et al. Identification of B-cell epitopes on structural proteins VP1 and VP2 of Senecavirus A and development of a multi-epitope recombinant protein vaccine[J]. *Virology*, 2023, 582: 48-56.
- [54] S Curry, E Fry, W Blakemore, et al. Dissecting the roles of VP0 cleavage and RNA packaging in picornavirus capsid stabilization: the structure of empty capsids of foot-and-mouth disease virus[J]. *J Virol*, 1997, 71(12): 9743-9752.
- [55] M F Maggioli, S Lawson, M de Lima, et al. Adaptive Immune Responses following Senecavirus A Infection in Pigs[J]. *J Virol*, 2018, 92(3).
- [56] M Chen, L Chen, J Wang, et al. Identification of a B-Cell Epitope in the VP3 Protein of Senecavirus A[J]. *Viruses*, 2021, 13(11).
- [57] J Cao, M Qu, H Liu, et al. Myristoylation of EV71 VP4 is Essential for Infectivity and Interaction with Membrane Structure[J]. *Virol Sin*, 2020, 35(5): 599-613.
- [58] A Panjwani, M Strauss, S Gold, et al. Capsid protein VP4 of human rhinovirus induces

- membrane permeability by the formation of a size-selective multimeric pore[J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10(8): e1004294.
- [59] T J Tuthill, D Bubeck, D J Rowlands, et al. Characterization of early steps in the poliovirus infection process: receptor-decorated liposomes induce conversion of the virus to membrane-anchored entry-intermediate particles[J]. *J Virol*, 2006, 80(1): 172-180.
- [60] V I Agol, A P Gmyl. Viral security proteins: counteracting host defences[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8(12): 867-878.
- [61] Z Li, Z Zou, Z Jiang, et al. Biological Function and Application of Picornaviral 2B Protein: A New Target for Antiviral Drug Development[J]. *Viruses*, 2019, 11(6).
- [62] A Agirre, A Barco, L Carrasco, et al. Viroporin-mediated membrane permeabilization. Pore formation by nonstructural poliovirus 2B protein[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(43): 40434-40441.
- [63] H Liu, K Li, W Chen, et al. Senecavirus A 2B protein suppresses type I interferon production by inducing the degradation of MAVS[J]. *Mol Immunol*, 2022, 142: 11-21.
- [64] B L Semler, H Liu, Z Zhu, et al. Innate sensing of picornavirus infection involves cGAS-STING-mediated antiviral responses triggered by mitochondrial DNA release[J]. *PLOS Pathogens*, 2023, 19(2).
- [65] D Sun, N Kong, S Dong, et al. 2AB protein of Senecavirus A antagonizes selective autophagy and type I interferon production by degrading LC3 and MARCF8[J]. *Autophagy*, 2022, 18(8): 1969-1981.
- [66] T Liu, X Li, M Wu, et al. Seneca Valley Virus 2C and 3C(pro) Induce Apoptosis via Mitochondrion-Mediated Intrinsic Pathway[J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 1202.
- [67] W Wen, M Yin, H Zhang, et al. Seneca Valley virus 2C and 3C inhibit type I interferon production by inducing the degradation of RIG-I[J]. *Virology*, 2019, 535: 122-129.
- [68] M Jia, M Sun, Y D Tang, et al. Senecavirus A Entry Into Host Cells Is Dependent on the Cholesterol-Mediated Endocytic Pathway[J]. *Front Vet Sci*, 2022, 9: 840655.
- [69] W Yang, D Li, Y Ru, et al. Foot-and-Mouth Disease Virus 3A Protein Causes Upregulation of Autophagy-Related Protein LRRC25 To Inhibit the G3BP1-Mediated RIG-Like Helicase-Signaling Pathway[J]. *J Virol*, 2020, 94(8).
- [70] X Zhang, Z Zhu, C Wang, et al. Foot-and-Mouth Disease Virus 3B Protein Interacts

- with Pattern Recognition Receptor RIG-I to Block RIG-I-Mediated Immune Signaling and Inhibit Host Antiviral Response[J]. *J Immunol*, 2020, 205(8): 2207-2221.
- [71] S Qian, W Fan, T Liu, et al. Seneca Valley Virus Suppresses Host Type I Interferon Production by Targeting Adaptor Proteins MAVS, TRIF, and TANK for Cleavage[J]. *J Virol*, 2017, 91(16).
- [72] Q Xue, H Liu, Z Zhu, et al. Seneca Valley Virus 3C(pro) abrogates the IRF3- and IRF7-mediated innate immune response by degrading IRF3 and IRF7[J]. *Virology*, 2018, 518: 1-7.
- [73] Jiangwei Song, Y Guo, , D Wang, , et al. Seneca Valley virus 3Cpro antagonizes type I interferon response by targeting STAT1-STAT2-IRF9 and KPNA1 signals.[J]. *J Virol*, 2023, 97(10): e0072723.
- [74] Q Xue, H Liu, Z Zhu, et al. Seneca Valley Virus 3C protease negatively regulates the type I interferon pathway by acting as a viral deubiquitinase[J]. *Antiviral Res*, 2018, 160: 183-189.
- [75] M H V Fernandes, M F Maggioli, J Otta, et al. Senecavirus A 3C Protease Mediates Host Cell Apoptosis Late in Infection[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 363.
- [76] W Wen, X Li, H Wang, et al. Seneca Valley Virus 3C Protease Induces Pyroptosis by Directly Cleaving Porcine Gasdermin D[J]. *J Immunol*, 2021, 207(1): 189-199.
- [77] J Song, D Wang, R Quan, et al. Seneca Valley virus 3C(pro) degrades heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 to facilitate viral replication[J]. *Virulence*, 2021, 12(1): 3125-3136.
- [78] Q Xue, H Liu, Z Zhu, et al. Seneca Valley Virus 3C(pro) Cleaves PABPC1 to Promote Viral Replication[J]. *Pathogens*, 2020, 9(6).
- [79] W Wen, Q Zhao, M Yin, et al. Seneca Valley Virus 3C Protease Inhibits Stress Granule Formation by Disrupting eIF4GI-G3BP1 Interaction[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 577838.
- [80] J Kerkvliet, R Edukulla, M Rodriguez. Novel roles of the picornaviral 3D polymerase in viral pathogenesis[J]. *Adv Virol*, 2010, 2010: 368068.
- [81] R A Leme, T E Oliveira, B K Alcântara, et al. Clinical Manifestations of Senecavirus A Infection in Neonatal Pigs, Brazil, 2015[J]. *Emerg Infect Dis*, 2016, 22(7): 1238-1241.

- [82] P Canning, A Canon, J L Bates, et al. Neonatal Mortality, Vesicular Lesions and Lameness Associated with Senecavirus A in a U.S. Sow Farm[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2016, 63(4): 373-378.
- [83] R A Leme, F M Miyabe, A M Dall Agnol, et al. Seneca Valley virus RNA detection in pig feed and feed ingredients in Brazil[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2019, 66(4): 1449-1453.
- [84] S A Dee, F V Bauermann, M C Niederwerder, et al. Survival of viral pathogens in animal feed ingredients under transboundary shipping models[J]. *PLoS One*, 2018, 13(3): e0194509.
- [85] J Zhang, C Li, Y Meng, et al. Pathogenicity of Seneca Valley virus in pigs and detection in *Culicoides* from an infected pig farm[J]. *Virology*, 2021, 18(1): 209.
- [86] J H Turner, W P Paim, M F Maggioli, et al. Prolonged Viability of Senecavirus A in Exposed House Flies (*Musca domestica*)[J]. *Viruses*, 2022, 14(1).
- [87] X Zhou, W F Liang, G B Si, et al. Buffalo-Origin Seneca Valley Virus in China: First Report, Isolation, Genome Characterization, and Evolution Analysis[J]. *Front Vet Sci*, 2021, 8: 730701.
- [88] M F Maggioli, M H V Fernandes, L R Joshi, et al. Persistent Infection and Transmission of Senecavirus A from Carrier Sows to Contact Piglets[J]. *J Virol*, 2019, 93(21).
- [89] S J P Tousignant, L Bruner, J Schwartz, et al. Longitudinal study of Senecavirus A shedding in sows and piglets on a single United States farm during an outbreak of vesicular disease[J]. *BMC Vet Res*, 2017, 13(1).
- [90] M Rweyemamu, P Roeder, D Mackay, et al. Epidemiological patterns of foot-and-mouth disease worldwide[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2008, 55(1): 57-72.
- [91] R A Leme, T E S Oliveira, A F Alfieri, et al. Pathological, Immunohistochemical and Molecular Findings Associated with Senecavirus A-Induced Lesions in Neonatal Piglets[J]. *J Comp Pathol*, 2016, 155(2-3): 145-155.
- [92] R A Leme, T E S Oliveira, A F Alfieri, et al. Pathological, Immunohistochemical and Molecular Findings Associated with Senecavirus A-Induced Lesions in Neonatal Piglets[J]. *Journal of Comparative Pathology*, 2016, 155(2-3): 145-155.
- [93] R A Leme, F M Miyabe, A M Dall Agnol, et al. A new wave of Seneca Valley virus

- outbreaks in Brazil[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2019, 66(3): 1101-1104.
- [94] V Saporiti, J T T Fritzen, C Feronato, et al. A ten years (2007-2016) retrospective serological survey for Seneca Valley virus infection in major pig producing states of Brazil[J]. *Vet Res Commun*, 2017, 41(4): 317-321.
- [95] W Xu, K Hole, M Goolia, et al. Genome wide analysis of the evolution of Senecavirus A from swine clinical material and assembly yard environmental samples[J]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0176964.
- [96] D Sun, F Vannucci, T P Knutson, et al. Emergence and whole-genome sequence of Senecavirus A in Colombia[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2017, 64(5): 1346-1349.
- [97] K Saeng-Chuto, P Rodtian, G Temeeyasen, et al. The first detection of Senecavirus A in pigs in Thailand, 2016[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2018, 65(1): 285-288.
- [98] J Arzt, M R Bertram, L T Vu, et al. First Detection and Genome Sequence of Senecavirus A in Vietnam[J]. *Microbiol Resour Announc*, 2019, 8(3).
- [99] Q Wu, X Zhao, Y Bai, et al. The First Identification and Complete Genome of Senecavirus A Affecting Pig with Idiopathic Vesicular Disease in China[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2017, 64(5): 1633-1640.
- [100] S Maan, K Batra, D Chaudhary, et al. Detection and Genomic Characterization of Senecavirus from Indian Pigs[J]. *Indian Journal of Animal Research*, 2021, (Of).
- [101] S Qian, W Fan, P Qian, et al. Isolation and full-genome sequencing of Seneca Valley virus in piglets from China, 2016[J]. *Virol J*, 2016, 13(1): 173.
- [102] C Liu, X Li, L Liang, et al. Isolation and phylogenetic analysis of an emerging Senecavirus A in China, 2017[J]. *Infect Genet Evol*, 2019, 68: 77-83.
- [103] H B Wang, B Tian, H L Lv, et al. Emergence and complete genome of Senecavirus A in pigs of Henan Province in China, 2017[J]. *Pol J Vet Sci*, 2019, 22(1): 187-190.
- [104] H Wang, C Niu, Z Nong, et al. Emergence and phylogenetic analysis of a novel Seneca Valley virus strain in the Guangxi Province of China[J]. *Res Vet Sci*, 2020, 130: 207-211.
- [105] 张志, 张丽丽, 张峰, 等. 2016—2018 年我国部分猪群塞尼卡病毒回顾性监测 [J]. *中国动物检疫*, 2019, 36(01): 1-6.
- [106] 代蕾, 王金秀, 方莉, 等. 2018 年海南省猪 A 型塞尼卡病毒血清流行病学调查 [J]. *中国动物检疫*, 2019, 36(12): 8-11+39.

- [107] 穆国冬, 卢松岩, 张忠湛, 等. 吉林省塞内卡病毒流行情况监测预警分析[J]. 吉林畜牧兽医, 2019, 40(12): 73-74.
- [108] 李小明. 塞尼卡谷病毒 CH-LZ-2017 株的分离及 qRT-PCR 检测方法的建立 [D]. 甘肃: 甘肃农业大学, 2018.
- [109] J Bai, H Fan, E Zhou, et al. Pathogenesis of a senecavirus a isolate from swine in shandong Province, China[J]. *Vet Microbiol*, 2020, 242: 108606.
- [110] K Peng, X Yin, Y Chen, et al. Isolation and phylogenomic analysis of two Senecavirus A isolates in Sichuan Province, 2018[J]. *Virus Genes*, 2020, 56(6): 785-791.
- [111] F Liu, Q Wang, Y Huang, et al. A 5-Year Review of Senecavirus A in China since Its Emergence in 2015[J]. *Front Vet Sci*, 2020, 7: 567792.
- [112] Z Wang, X Zhang, R Yan, et al. Emergence of a novel recombinant Seneca Valley virus in Central China, 2018[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2018, 7(1): 180.
- [113] J Liu, Y Zha, H Li, et al. Novel Recombinant Seneca Valley Virus Isolated from Slaughtered Pigs in Guangdong Province[J]. *Virol Sin*, 2019, 34(6): 722-724.
- [114] Z Guo, X X Chen, H Ruan, et al. Isolation of Three Novel Senecavirus A Strains and Recombination Analysis Among Senecaviruses in China[J]. *Front Vet Sci*, 2020, 7: 2.
- [115] M G Rossmann, Y He, R J Kuhn. Picornavirus-receptor interactions[J]. *Trends Microbiol*, 2002, 10(7): 324-331.
- [116] L A Miles, L N Burga, E E Gardner, et al. Anthrax toxin receptor 1 is the cellular receptor for Seneca Valley virus[J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(8): 2957-2967.
- [117] P R Chen, R R R Rowland, A M Stoian, et al. Disruption of anthrax toxin receptor 1 in pigs leads to a rare disease phenotype and protection from senecavirus A infection[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1).
- [118] N Jayawardena, L A Miles, L N Burga, et al. N-Linked Glycosylation on Anthrax Toxin Receptor 1 Is Essential for Seneca Valley Virus Infection[J]. *Viruses*, 2021, 13(5).
- [119] Z Liu, X Zhao, H Mao, et al. Intravenous injection of oncolytic picornavirus SVV-001 prolongs animal survival in a panel of primary tumor-based orthotopic xenograft mouse models of pediatric glioma[J]. *Neuro Oncol*, 2013, 15(9): 1173-1185.
- [120] W Liu, X Shang, W Wen, et al. Seneca Valley virus enters cells through multiple pathways and traffics intracellularly via the endolysosomal pathway[J]. *J Gen Virol*, 2023, 104(3).

- [121] L Cao, R Zhang, T Liu, et al. Seneca Valley virus attachment and uncoating mediated by its receptor anthrax toxin receptor 1[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(51): 13087-13092.
- [122] Lei Hou, X Tong, , Yang Pan, et al. Seneca Valley Virus Enters PK-15 Cells via Caveolae-Mediated Endocytosis and Macropinocytosis Dependent on Low-pH, Dynamin, Rab5, and Rab7[J]. *J Virol*, 2022.
- [123] R Kinobe, A Wiyatno, I M Artika, et al. Insight into the Enterovirus A71: A review[J]. *Rev Med Virol*, 2022, 32(6): e2361.
- [124] G Xu, S Xu, X Shi, et al. Intercellular transmission of Seneca Valley virus mediated by exosomes[J]. *Vet Res*, 2020, 51(1): 91.
- [125] K L Baker, C Mowrer, A Canon, et al. Systematic Epidemiological Investigations of Cases of Senecavirus A in US Swine Breeding Herds[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2017, 64(1): 11-18.
- [126] L R Joshi, M H V Fernandes, T Clement, et al. Pathogenesis of Senecavirus A infection in finishing pigs[J]. *J Gen Virol*, 2016, 97(12): 3267-3279.
- [127] T E S Oliveira, M M Z Michelazzo, T Fernandes, et al. Histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural evidence of spontaneous Senecavirus A-induced lesions at the choroid plexus of newborn piglets[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 16555.
- [128] 范慧, 李亮, 姜平, 等. 塞内卡病毒 A 的 RT-PCR 检测方法的建立和应用[J]. *畜牧兽医学报*, 2019, 50(06): 1312-1318.
- [129] V L Fowler, R H Ransburgh, E G Poulsen, et al. Development of a novel real-time RT-PCR assay to detect Seneca Valley virus-1 associated with emerging cases of vesicular disease in pigs[J]. *J Virol Methods*, 2017, 239: 34-37.
- [130] J Zhang, C Nfon, C F Tsai, et al. Development and evaluation of a real-time RT-PCR and a field-deployable RT-insulated isothermal PCR for the detection of Seneca Valley virus[J]. *BMC Vet Res*, 2019, 15(1): 168.
- [131] C Feronato, R A Leme, J A Diniz, et al. Development and evaluation of a nested-PCR assay for Senecavirus A diagnosis[J]. *Trop Anim Health Prod*, 2018, 50(2): 337-344.
- [132] A M Dall Agnol, R A A Otonel, R A Leme, et al. A TaqMan-based qRT-PCR assay for Senecavirus A detection in tissue samples of neonatal piglets[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2017, 33: 28-31.

- [133] S Mu, S W Abdullah, Y Zhang, et al. Development of a novel SYBR green I-based quantitative RT-PCR assay for Senecavirus A detection in clinical samples of pigs[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2020, 53.
- [134] Z Zhang, Y Zhang, X Lin, et al. Development of a novel reverse transcription droplet digital PCR assay for the sensitive detection of Senecavirus A[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2018, 66(1): 517-525.
- [135] B Armson, C Walsh, N Morant, et al. The development of two field-ready reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays for the rapid detection of Seneca Valley virus 1[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2019, 66(1): 497-504.
- [136] R A Tripp, J Li, W Liang, et al. Rapid and sensitive detection of Senecavirus A by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick method[J]. *PLoS One*, 2019, 14(5).
- [137] H Wang, X Ding, W Sun, et al. Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of Seneca Valley Virus[J]. *Anal Biochem*, 2022, 642: 114564.
- [138] 樊晓旭, 哈登楚日亚, 王英丽, 等. 塞尼卡谷病毒重组酶聚合酶扩增技术(RPA)实时荧光检测方法的建立[J]. *中国动物检疫*, 2017, 34(08): 81-86.
- [139] 樊晓旭, 宋翥远, 赵永刚, 等. 塞尼卡谷病毒重组酶聚合酶扩增-侧流层析试纸条检测方法的建立[J]. *中国预防兽医学报*, 2018, 40(05): 406-410.
- [140] 赵月龙, 闫若潜, 王淑娟, 等. 基于 A 型塞尼卡病毒结构蛋白 VP1 间接 ELISA 检测方法的建立及初步应用[J]. *中国预防兽医学报*, 2019, 41(08): 818-823.
- [141] C M T Dvorak, Z Akkutay-Yoldar, S R Stone, et al. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the identification of antibodies to Senecavirus A in swine[J]. *BMC Vet Res*, 2017, 13(1).
- [142] 申珊, 许立阳, 李蕊, 等. A 型塞内卡病毒 VP2 蛋白阻断 ELISA 检测方法的建立[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2020, (14): 87-90.
- [143] 申珊, 史雪坤, 李蕊, 等. A 型塞内卡病毒 VP2 蛋白间接 ELISA 检测方法的建立[J]. *中国兽医科学*, 2020, 50(02): 152-158.
- [144] M Bai, R Wang, S Sun, et al. Development and validation of a competitive ELISA based on virus-like particles of serotype Senecavirus A to detect serum antibodies[J]. *AMB Express*, 2021, 11(1).
- [145] Xueqing Ma , Jiixin Huang, Kun Li , et al. Development and Evaluation of a

- Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Based on Swine Monoclonal Antibodies for Detecting Neutralizing Antibodies against Senecavirus A.pdf[J]. *Microbiol Spectrum*, 2023.
- [146] F Liu, Y Huang, Q Wang, et al. Construction of eGFP-Tagged Senecavirus A for Facilitating Virus Neutralization Test and Antiviral Assay[J]. *Viruses*, 2020, 12(3).
- [147] K Hole, F Ahmadpour, J Krishnan, et al. Efficacy of accelerated hydrogen peroxide@disinfectant on foot-and-mouth disease virus, swine vesicular disease virus and Senecavirus A[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2017, 122(3): 634-639.
- [148] S Tan, C M T Dvorak, M P Murtaugh. Characterization of Emerging Swine Viral Diseases through Oxford Nanopore Sequencing Using Senecavirus A as a Model[J]. *Viruses*, 2020, 12(10).
- [149] F Yang, Z Zhu, W Cao, et al. Immunogenicity and protective efficacy of an inactivated cell culture-derived Seneca Valley virus vaccine in pigs[J]. *Vaccine*, 2018, 36(6): 841-846.
- [150] 魏婷, 杨帆, 张伟, 等. A 型塞内卡病毒 P12A-3C 基因真核表达质粒的构建及其免疫效力的研究[J]. *中国兽医科学*, 2020, 50(07): 861-868.
- [151] B Sharma, M H V Fernandes, M de Lima, et al. A Novel Live Attenuated Vaccine Candidate Protects Against Heterologous Senecavirus A Challenge[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2660.
- [152] S Mu, S Sun, H Dong, et al. Potent Protective Immune Responses to Senecavirus Induced by Virus-Like Particle Vaccine in Pigs[J]. *Vaccines*, 2020, 8(3).
- [153] F Almazán, I Sola, S Zuñiga, et al. Coronavirus reverse genetic systems: infectious clones and replicons[J]. *Virus Res*, 2014, 189: 262-270.
- [154] B M Kümmerer. Establishment and Application of Flavivirus Replicons[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1062: 165-173.
- [155] M C Hikke, G P Pijlman. Veterinary Replicon Vaccines[J]. *Annu Rev Anim Biosci*, 2017, 5: 89-109.
- [156] G Kaplan, V R Racaniello. Construction and characterization of poliovirus subgenomic replicons[J]. *J Virol*, 1988, 62(5): 1687-1696.
- [157] X Xie, J Zou, C Shan, et al. Zika Virus Replicons for Drug Discovery[J]. *EBioMedicine*, 2016, 12: 156-160.

- [158] G M McInerney, A M King, N Ross-Smith, et al. Replication-competent foot-and-mouth disease virus RNAs lacking capsid coding sequences[J]. *J Gen Virol*, 2000, 81(Pt 7): 1699-1702.
- [159] F Tulloch, U Pathania, G A Luke, et al. FMDV replicons encoding green fluorescent protein are replication competent[J]. *J Virol Methods*, 2014, 209: 35-40.
- [160] I Reimann, I Semmler, M Beer. Packaged replicons of bovine viral diarrhea virus are capable of inducing a protective immune response[J]. *Virology*, 2007, 366(2): 377-386.
- [161] V Ranwez, S Harispe, F Delsuc, et al. MACSE: Multiple Alignment of Coding SEquences accounting for frameshifts and stop codons[J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e22594.
- [162] V Ranwez, E J P Douzery, C Cambon, et al. MACSE v2: Toolkit for the Alignment of Coding Sequences Accounting for Frameshifts and Stop Codons[J]. *Mol Biol Evol*, 2018, 35(10): 2582-2584.
- [163] D P Martin, B Murrell, M Golden, et al. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes[J]. *Virus Evol*, 2015, 1(1): vev003.
- [164] R C Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria[J]. <https://www.R-project.org>, 2019.
- [165] Y G. Seqcombo: visualization tool for sequence recombination and reassortment[J]. R package version, 2021, 1(1).
- [166] L T Nguyen, H A Schmidt, A von Haeseler, et al. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies[J]. *Mol Biol Evol*, 2015, 32(1): 268-274.
- [167] S Kalyaanamoorthy, B Q Minh, T K F Wong, et al. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates[J]. *Nat Methods*, 2017, 14(6): 587-589.
- [168] F Ronquist, M Teslenko, P van der Mark, et al. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space[J]. *Syst Biol*, 2012, 61(3): 539-542.
- [169] C Lakner, P van der Mark, J P Huelsenbeck, et al. Efficiency of Markov chain Monte Carlo tree proposals in Bayesian phylogenetics[J]. *Syst Biol*, 2008, 57(1): 86-103.
- [170] A Rambaut, A J Drummond, D Xie, et al. Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7[J]. *Syst Biol*, 2018, 67(5): 901-904.

- 
- [171] K Tamura, G Stecher, S Kumar. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11[J]. *Mol Biol Evol*, 2021, 38(7): 3022-3027.
- [172] W Deng, B S Maust, D C Nickle, et al. DIVEIN: a web server to analyze phylogenies, sequence divergence, diversity, and informative sites[J]. *Biotechniques*, 2010, 48(5): 405-408.
- [173] M C Proserpi, M Ciccozzi, I Fanti, et al. A novel methodology for large-scale phylogeny partition[J]. *Nat Commun*, 2011, 2: 321.
- [174] J Rozas, A Ferrer-Mata, J C Sánchez-DelBarrio, et al. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets[J]. *Mol Biol Evol*, 2017, 34(12): 3299-3302.
- [175] L Excoffier, H E Lischer. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows[J]. *Mol Ecol Resour*, 2010, 10(3): 564-567.
- [176] S Wright. *Evolution and the genetics of populations, volume 4: variability within and among natural populations* [M]. University of Chicago press, 1984.
- [177] B T Korber, K J Kunstman, B K Patterson, et al. Genetic differences between blood- and brain-derived viral sequences from human immunodeficiency virus type 1-infected patients: evidence of conserved elements in the V3 region of the envelope protein of brain-derived sequences[J]. *J Virol*, 1994, 68(11): 7467-7481.
- [178] S L Kosakovsky Pond, A F Y Poon, R Velazquez, et al. HyPhy 2.5-A Customizable Platform for Evolutionary Hypothesis Testing Using Phylogenies[J]. *Mol Biol Evol*, 2020, 37(1): 295-299.
- [179] B Murrell, S Weaver, M D Smith, et al. Gene-wide identification of episodic selection[J]. *Mol Biol Evol*, 2015, 32(5): 1365-1371.
- [180] J O Wertheim, B Murrell, M D Smith, et al. RELAX: detecting relaxed selection in a phylogenetic framework[J]. *Mol Biol Evol*, 2015, 32(3): 820-832.
- [181] S L Kosakovsky Pond, S D Frost. Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acid sites under selection[J]. *Mol Biol Evol*, 2005, 22(5): 1208-1222.
- [182] B Murrell, S Moola, A Mabona, et al. FUBAR: a fast, unconstrained bayesian approximation for inferring selection[J]. *Mol Biol Evol*, 2013, 30(5): 1196-1205.

- [183] B Murrell, J O Wertheim, S Moola, et al. Detecting individual sites subject to episodic diversifying selection[J]. *PLoS Genet*, 2012, 8(7): e1002764.
- [184] G Baele, P Lemey, T Bedford, et al. Improving the accuracy of demographic and molecular clock model comparison while accommodating phylogenetic uncertainty[J]. *Mol Biol Evol*, 2012, 29(9): 2157-2167.
- [185] M A Suchard, P Lemey, G Baele, et al. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10[J]. *Virus Evol*, 2018, 4(1): vey016.
- [186] D L Ayres, A Darling, D J Zwickl, et al. BEAGLE: an application programming interface and high-performance computing library for statistical phylogenetics[J]. *Syst Biol*, 2012, 61(1): 170-173.
- [187] R Bouckaert, T G Vaughan, J Barido-Sottani, et al. BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis[J]. *PLoS Comput Biol*, 2019, 15(4): e1006650.
- [188] A J Drummond, A Rambaut. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees[J]. *BMC Evol Biol*, 2007, 7: 214.
- [189] FigTree (version 1.4.4) [EB/OL], [2018]. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- [190] N F Müller, D Rasmussen, T Stadler. MASCOT: parameter and state inference under the marginal structured coalescent approximation[J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(22): 3843-3848.
- [191] M B O'Neill, A Shockey, A Zarley, et al. Lineage specific histories of Mycobacterium tuberculosis dispersal in Africa and Eurasia[J]. *Mol Ecol*, 2019, 28(13): 3241-3256.
- [192] J Huerta-Cepas, F Serra, P Bork. ETE 3: Reconstruction, Analysis, and Visualization of Phylogenomic Data[J]. *Mol Biol Evol*, 2016, 33(6): 1635-1638.
- [193] O B Brynildsrud, C S Pepperell, P Suffys, et al. Global expansion of Mycobacterium tuberculosis lineage 4 shaped by colonial migration and local adaptation[J]. *Sci Adv*, 2018, 4(10): eaat5869.
- [194] E Simon-Loriere, E C Holmes. Why do RNA viruses recombine?[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9(8): 617-626.
- [195] M M Lai. Genetic recombination in RNA viruses[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1992, 176: 21-32.
- [196] K Saeng-Chuto, C J Stott, M Wegner, et al. The full-length genome characterization,

- genetic diversity and evolutionary analyses of Senecavirus A isolated in Thailand in 2016[J]. *Infect Genet Evol*, 2018, 64: 32-45.
- [197] J Liu, Q Guo, H Li, et al. Genomic diversity and recombination of Seneca Valley viruses emerged in pig herds in Guangdong Province during 2019[J]. *Virus Genes*, 2020, 56(5): 642-645.
- [198] L R Joshi, K A Mohr, D Gava, et al. Genetic diversity and evolution of the emerging picornavirus Senecavirus A[J]. *J Gen Virol*, 2020, 101(2): 175-187.
- [199] M H V Fernandes, M F Maggioli, L R Joshi, et al. Pathogenicity and cross-reactive immune responses of a historical and a contemporary Senecavirus A strains in pigs[J]. *Virology*, 2018, 522: 147-157.
- [200] H Zhang, P Chen, G Hao, et al. Comparison of the Pathogenicity of Two Different Branches of Senecavirus a Strain in China[J]. *Pathogens*, 2020, 9(1).
- [201] J Jiang, Y Zha, J Liu, et al. Isolation and evolutionary analysis of Senecavirus A isolates from Guangdong province, China[J]. *Infect Genet Evol*, 2021, 91: 104819.
- [202] N J Knowles, L M Hales, B H Jones, et al. Epidemiology of Seneca Valley virus: identification and characterization of isolates from pigs in the United States[J]. 2006.
- [203] M Yang, R van Bruggen, W Xu. Generation and diagnostic application of monoclonal antibodies against Seneca Valley virus[J]. *J Vet Diagn Invest*, 2012, 24(1): 42-50.
- [204] 陈密. A 型塞内卡病毒 3C 蛋白的功能研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2022.
- [205] Y Liu, Z Zhu, M Zhang, et al. Multifunctional roles of leader protein of foot-and-mouth disease viruses in suppressing host antiviral responses[J]. *Vet Res*, 2015, 46: 127.
- [206] 包正玉. A 型塞内卡病毒的致病性及其 L 蛋白的功能研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2022.