

林裕胜, 江锦秀, 张靖鹏, 等. 羊口疮病毒疫苗株和 ORFV-PN 株 *ORFV011* 基因的比较分析 [J]. 福建农业学报, 2020, 35 (2): 124-129.

LIN Y S, JIANG J X, ZHANG J P, et al. Comparison of *ORFV011* Genes of Orf virus Vaccine strain and ORFV-PN Strain [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2020, 35 (2): 124-129.

羊口疮病毒疫苗株和 ORFV-PN 株 *ORFV011* 基因的比较分析

林裕胜, 江锦秀, 张靖鹏, 游 伟, 胡奇林*

(福建省农业科学院畜牧兽医研究所, 福建 福州 350013)

摘要:【目的】比较分析羊口疮病毒疫苗株与 ORFV-PN 株 *ORFV011* 基因的分子特点、编码蛋白的生物学功能差异, 为福建省羊口疮的科学防控提供理论指导。【方法】对羊口疮疫苗株和 ORFV-PN 株 *ORFV011* 基因进行克隆和测序, 运用生物信息学相关软件比较分析两者测序结果的差异。【结果】测序结果显示, 疫苗株和 ORFV-PN 株 *ORFV011* 基因均由 1 137 个核苷酸组成, 编码 378 个氨基酸。核苷酸序列和氨基酸序列相似性比较显示, ORFV-PN 与疫苗株和弱毒株 D1701 株 *ORFV011* 基因核苷酸序列相似性分别为 98.6% 和 98.4%, 氨基酸序列相似性均为 98.7%。与疫苗株相比, ORFV-PN 株共有 16 处核苷酸变异和 5 处氨基酸变异。在蛋白二级结构上, ORFV-PN 株和疫苗株 α -螺旋占比分别为 34.13% (129/378) 和 30.42% (115/378), β -转角占比分别为 6.08% (23/378) 和 6.88% (26/378), 无规则卷曲占比分别为 37.30% (141/378) 和 39.15% (148/378), β -折叠占比分别为 22.49% (85/378) 和 23.54% (89/378)。蛋白三级结构上, ORFV-PN 株预测的三维结构与疫苗株的三维结构在 α -螺旋和无规则卷曲上有一定的差异。【结论】福建省羊口疮病毒 *ORFV011* 基因出现变异, 应当引起广大兽医工作者的重视, 有关部门应当加强对羊口疮的监测。

关键词: 羊口疮病毒; 疫苗株; ORFV-PN; *ORFV011* 基因

中图分类号: S 852.659.1

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2020) 02-0124-06

Comparison of *ORFV011* Genes of Orf virus Vaccine strain and ORFV-PN Strain

LIN Yu-sheng, JIANG Jin-xiu, ZHANG Jing-peng, YOU Wei, HU Qi-lin*

(Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350013, China)

Abstract: 【Objective】To provide theoretical basis for prevention and control of Orf in Fujian, the molecular characteristics and biological functions of *ORFV011* genes of the vaccine strain and ORFV-PN strain were compared. 【Methods】*ORFV011* genes from the two strains were cloned and sequenced for comparison and analysis using bioinformatics software.

【Results】The sequencing results indicated that both genes composed of 1 137 nucleotides coding 378 amino acids. The nucleotide sequence similarity of *ORFV011* of the ORFV-PN strain was 98.6% with that of the vaccine strain, while 98.4% with that of the lentogen strain D1701. The amino acid sequence similarity of *ORFV011* of the ORFV-PN strain with either the vaccine strain or the D1701 strain was the same at 98.7%. There were 16 nucleotide mutations and 5 amino acid variations in the gene of the ORFV-PN strain as compared to that of the vaccine strain. On the secondary structure, the encoded protein by *ORFV011* gene of the ORFV-PN strain and the vaccine strain had 34.13% (or 129/378) and 30.42% (or 115/378) alpha helixes, respectively; 6.08% (or 23/378) and 6.88% (or 26/378) beta turns, respectively; 37.3% (or 141/378) and 39.15% (or 148/378) random coils, respectively; and, 22.49% (or 85/378) and 23.54% (or 89/378) extended strands, respectively. The predicted three-dimensional structure of *ORFV011* of the ORFV-PN strain showed differences on the alpha helixes and random coils as compared with that of the vaccine strain. 【Conclusion】It appeared that *ORFV011* of the ORFV-PN strain deviated from that of the vaccine strain in sequence as well as secondary and three-dimensional structures. Thus, special attention must be placed in monitoring and controlling the Orf.

Key words: Orf virus; vaccine strain; ORFV-PN strain; *ORFV011* gene

收稿日期: 2019-11-29 初稿; 2020-01-25 修改稿

作者简介: 林裕胜 (1988-), 男, 助理研究员, 主要从事动物传染病研究 (E-mail: 369807285@qq.com)

* 通信作者: 胡奇林 (1963-), 男, 研究员, 主要从事动物传染病学和免疫学研究 (E-mail: hq1562713@163.com)

基金项目: 福建省科技计划公益类专项 (2018R1023-1); 福建省农业科学院科技创新团队建设项目 (STIT2017-1-5)

0 引言

【研究意义】羊口疮病毒 (Orf virus, ORFV) 是一种变异性较强的病毒, 病毒基因组长度因毒株不同而有所区别。ORFV011 基因编码的 B2L 蛋白是重要的免疫原性蛋白, 是研究羊口疮 (Orf) 新型疫苗的重要靶基因。通过比较分析羊口疮病毒疫苗株和地方分离株 ORFV011 基因的分子特点、编码蛋白的生物学功能, 可为福建省羊口疮的诊断、流行病学调查及疫苗选择提供理论依据。【前人研究进展】羊口疮是羊口疮病毒引起的一种接触性人兽共患传染病, 该病的发病率在 4%~100%, 死亡率 1%~59% 不等^[1-2]。ORFV011 基因全长为 1 137 bp, 编码 42 kDa 左右蛋白, 可刺激机体产生强烈的抗体反应^[3-6]。ORFV011 基因位于基因组中部高度保守区域, 保守性较强, 常利用该基因建立 PCR 诊断及分子流行病学调查。Wang 等^[7] 根据 ORFV011 基因建立了 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检查方法; Wang 等^[8] 根据 ORFV011 基因对安徽省羊口疮病毒分离株进行鉴定及遗传变异分析。从近年来 ORFV011 基因分子遗传特征的报道来看, 该基因已经出现一定程度的变异, 如 Nagarajan 等^[9] 研究发现印度分离株的 ORFV011 基因与羊口疮病毒、伪牛痘病毒和牛丘疹性口炎病毒的同源性分别为 98.14%、96.29% 和 83.59%。王秋霞等^[10] 通过对江苏省羊口疮病毒的分离鉴定及 ORFV011 基因的遗传进化分析结果显示, 4 株分离株 ORFV011 基因与疫苗株的同源性仅有 96.8%~98.1%, 暗示羊口疮病毒已经出现一定程度的变异。【本研究切入点】已有研究人员对羊口疮病毒疫苗株和地方分离株 F1L 基因进行了比较分析^[11], 然而对于疫苗株和地方分离株的 ORFV011 基因对比研究尚未见报道。【拟解决的关键问题】本研究通过对羊口疮病毒疫苗株和 ORFV-PN 株 ORFV011 基因进行克隆测序, 对国内外不同分离株间 ORFV011 基因核苷酸序列、其推导的氨基酸序列和编码蛋白质结构进行比较分析。

1 材料与amp;方法

1.1 样品来源

福建省内某疑似患羊口疮的羊唇部痂皮组织利用羊睾丸原代细胞分离鉴定后, 命名为 ORFV-PN 株。

1.2 试验材料

羊口疮弱毒疫苗购自山东泰丰生物制品有限公司, DH5a 感受态和 DNA/RNA 提取试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司, 质粒小量提取试剂盒、

胶回收试剂盒购自湖南艾科瑞生物工程有限公司; 限制性内切酶 *Bam* HI 和 *Sal* I 购自 NEB 公司; DNA Marker DL2000、DL 5000 采购自 TaKaRa 公司; pMC100-M 载体购自武汉齐美欣科生物技术有限公司; 1-5TM Hi-Fi DNA polymerase 高保真酶购自 MCLAB 公司。

1.3 引物的设计合成

通过下载 GenBank 中公布的 ORFV011 基因序列 (GenBank 登录号: DQ184476), 利用 Oligo7.0 软件结合参考文献 [12] 设计 1 对扩增 ORFV011 基因全长的特异性引物, 在引物两端添加酶切位点, 引物由福州白鲸生物股份有限公司合成。上游引物 ORFV011F: 5'-CGGGATCCATGTGGCCGTTCTCCTCA-3'; 下游引物 ORFV011R: 5'-GCGTCGACTTAATTATTGGCTTGCAGAACT-3', 划线部分分别为 *Bam* HI 和 *Sal* I 内切酶。

1.4 疫苗株与 ORFV-PN 株病毒 DNA 的提取和常规 PCR 扩增

利用全式金病毒 DNA/RNA 提取试剂盒分别提取疫苗株和 ORFV-PN 株 DNA, 冻存于 -20℃ 冰箱。疫苗株和 ORFV-PN 株 PCR 反应体系均为 40 μL: 1-5TM Hi-Fi DNA polymerase 20 μL, 模板 6 μL, 上、下游引物 (10 μmol·L⁻¹) 各 2 μL, ddH₂O 10 μL。反应程序: 95℃、3 min; 95℃、15 s, 55℃、15 s, 72℃、15 s, 30 个循环; 72℃、5 min。

1.5 疫苗株和 ORFV-PN 株 ORFV011 基因克隆测序

将凝胶电泳上条带正确的片段利用胶回收试剂盒进行切胶回收, 回收产物与 pMC100-M 载体进行连接, 连接后的产物转化至 DH5a 感受态细胞中, 涂布 LB 平板, 将涂布后的平板放入 37℃ 培养箱中培养 24 h 后, 挑取单个菌落进行培养, 利用质粒提取试剂盒提取培养菌质粒, 进行 PCR 和双酶切验证。将验证正确的质粒送往福州尚亚生物技术有限公司进行测序。

1.6 疫苗株和 ORFV-PN 株 ORFV011 基因核苷酸和氨基酸序列比较

疫苗株和 ORFV-PN 株测序结果利用生物信息学软件进行比对, 比较两者在核苷酸和氨基酸水平上的突变情况; 同时将测序结果与 GenBank 上已公布的国内外主要毒株 (表 1) 的 ORFV011 基因序列进行比对分析。

1.7 疫苗株和 ORFV-PN 株 ORFV011 蛋白质一级结构与功能的比较分析

将疫苗株和 ORFV-PN 株 ORFV011 基因克隆测序后正确的核苷酸序列翻译成氨基酸后分别上传至在线软件 ProtParam、NCBI-Conserved Domain Architecture

表 1 ORFV 参考毒株
Table 1 ORFV reference strains

毒株Virus	登录号GenBank	分离地Isolation site	时间Time
NZ2	DQ184476	新西兰New Zealand	2005
OV-SA00	AY386364	美国USA	2003
OV-IA82	AY386363	美国USA	2003
D1701	HM133903	德国Germany	2010
NA1-11	KF234407	中国广东Guangdong, China	2013
Shanxi	HQ202153	中国山西Shanxi, China	2010
Jilin	KJ808074	中国吉林Jilin, China	2011
Guizhou	KP994595	中国贵州Guizhou, China	2010
Xinjiang2	KF666565	中国新疆Xinjiang, China	2012
FJ-NP	KC568369	中国福建Fujian, China	2013
FJ-GT	KC568394	中国福建Fujian, China	2009
China vaccine	JQ904789	中国甘肃Gansu, China	2012

Retrieval Tool、TMHMM 2.0、Signal IP 5.0 和 NetNGlyc 1.0 Server 中, 对两者的氨基酸组成和理化性质、保守结构域、跨膜区、信号肽及糖基化位点进行

1.8 疫苗株和 ORFV-PN 株 ORFV011 蛋白质二级结构与功能的比较分析

利用 Lasergene 软件和 SOPMA 在线软件对疫苗株和 ORFV-PN 株 ORFV011 蛋白的亲水性、疏水性、抗原指数、 α -螺旋、 β -转角、无规则卷曲和 β -折叠的占比等进行对比分析。

1.9 疫苗株和 ORFV-PN 株 ORFV011 蛋白质三级结构分析

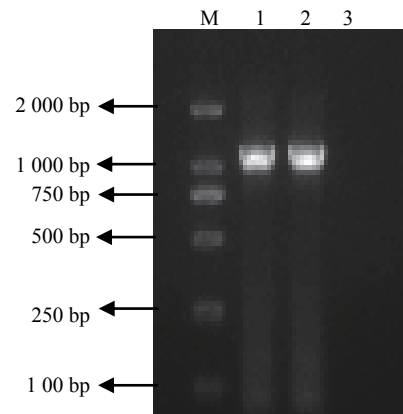
分别将疫苗株与 ORFV-PN 株的 *ORFV011* 基因推导的氨基酸序列上传至 Swiss-Model 在线软件进行蛋白 3D 结构预测, 预测结果运用 Swiss-PDB-Viewer 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 疫苗株和 ORFV-PN 株 *ORFV011* 基因的扩增及重组质粒双酶切

分别以提取的疫苗株和 ORFV-PN 株的 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 在凝胶成像系统下可见疫苗株和 ORFV-PN 株在 1 000 bp 左右有明显片段, 与预期片段大小相一致 (图 1)。将凝胶电泳上条带正确的片段利用胶回收试剂盒进行切胶回收, 回收产物与 pMC100-M 载体进行连接, 连接后的产物转化至 DH5 α 感受态细胞中, 涂布 LB 平板, LB 平板放入 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 24 h 后挑取单个菌落进行培养, 利用质

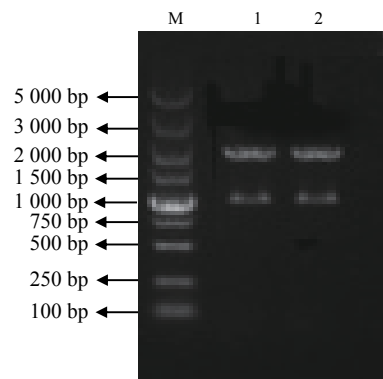
粒提取试剂盒提取质粒, 提取的质粒用 *Bam* HI 和 *Sal* I 进行双酶切, 酶切后得到两个片段, 一个约为 2 300 bp, 与 pMC100-M 大小相等, 另一个片段约为 1 100 bp, 与目的片段大小一致 (图 2)。



注: M: 2000 DNA Ladder; 1: 疫苗株 DNA; 2: ORFV-PN 株 DNA; 3: 阴性对照。

Note: M:2000 DNA Ladder; 1: DNA of vaccine strain; 2:DNA of ORFV-PN strain; 3: negative control.

图 1 *ORFV011* 基因的 PCR 扩增
Fig. 1 PCR amplification of *ORFV011* genes



注: M: 5000 DNA Ladder; 1: 疫苗株重组质粒; 2: ORFV-PN 株重组质粒。

Note: M: 5000 DNA Ladder; 1: the recombination plasmid of vaccine strain; 2: the recombination plasmid of ORFV-PN strain.

图 2 *ORFV011* 重组质粒双酶切鉴定结果

Fig. 2 Identification of *ORFV011* recombination plasmid by restriction endonuclease digestion

2.2 疫苗株和 ORFV-PN 株 *ORFV011* 基因序列测定分析

将疫苗株和 ORFV-PN 株 *ORFV011* 基因阳性质粒送往福州尚亚生物技术有限公司进行测序, 测序结果利用 DNASTar 和 MEGA7.0 软件进行比较分析。测序结果显示: 疫苗株和 ORFV-PN 株 *ORFV011* 基因均为 1 137 bp, 编码 379 个 aa。核苷酸和氨基酸同源性比对结果为: 疫苗株与 ORFV-PN 株的核苷酸序

列同源性为 98.6%；与疫苗株相比，ORFV-PN 株共有 16 处核苷酸差异，分别为 32 位碱基 C 突变为 G，42 位碱基 C 突变为 T，201 位碱基 G 突变为 A，238 位碱基 G 突变为 A，301 位碱基 G 突变为 A，315 位碱基 G 突变为 A，367 位碱基 A 突变为 C，369 位碱基 A 突变为 C，375 位碱基 A 突变为 G，636 位碱基 A 突变为 G，660 位碱基 G 突变为 A，822 位碱基 G 突变为 A，840 位碱基 G 突变为 A，897 位碱基 C 突变为 T，1044 位碱基 G 突变为 A，1119 位碱基 C 突变为 T；疫苗株和 ORFV-PN 株氨基酸序列同源性为 98.7%，与疫苗株相比，ORFV-PN 株共有 5 处氨基酸差异，分别为 11 位氨基酸 G 突变为 A，80 位氨基

酸 I 突变为 V，100 位氨基酸 I 突变为 V，123 位氨基酸 L 突变为 I，126 位氨基酸 A 突变为 T。疫苗株和 ORFV-PN 株 *ORFV011* 基因的核苷酸序列和氨基酸序列与国内外毒株的相似性分别为 96.9%~99.4% 和 97.8%~99.1%，其中 ORFV-PN 株与弱毒株 D1701 核苷酸和氨基酸序列相似性分别为 98.4% 和 98.7%，可见不同地区分离株 *ORFV011* 基因有一定差异。通过 MEGA7.0 构建遗传进化树发现，本研究中的 ORFV-PN 株 *ORFV011* 基因氨基酸与新疆毒株 KF666565、山西毒株 HQ202153 同源性最高，同时与贵州毒株 KP994595 较接近，处在同一进化分支上，与疫苗株和弱毒株 D1701 相距较远（图 3）。

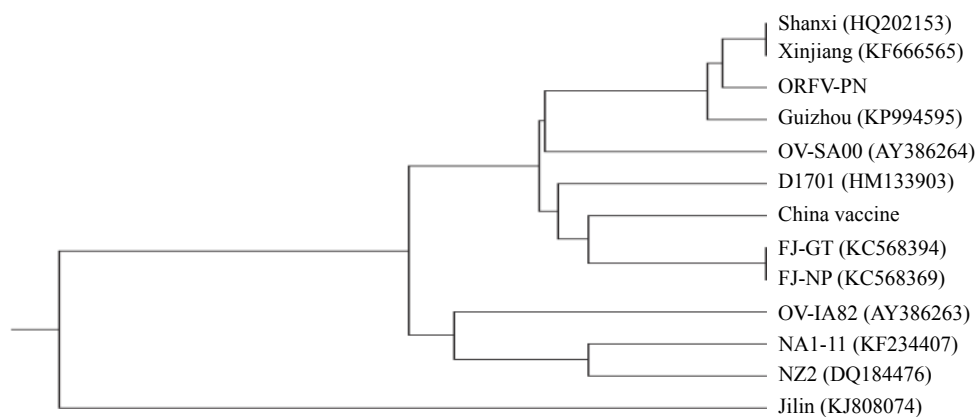


图 3 羊口疮病毒 *ORFV011* 基因遗传进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of *ORFV011* gene

2.3 疫苗株和 ORFV-PN 株 *ORFV011* 蛋白质一级结构、理化性质和保守结构域分析

将疫苗株和 ORFV-PN 株 *ORFV011* 基因推导的氨基酸序列分别上传至 ExPasy 在线软件进行分析，从分析结果可知，疫苗株和 ORFV-PN 株 *ORFV011* 蛋白的相对分子质量分别为 41.67 和 41.69 kDa，理论等电点均为 6.01；ORFV-PN 株脂肪族氨基酸指数和亲水性指数与疫苗株相比均变小。利用 TMHMM 2.0 在线软件和 SignalP 5.0 在线分析结果显示，疫苗株和 ORFV-PN 株 *ORFV011* 蛋白均无跨膜区和信号肽。利用 NetNGlyc 1.0 Server 在线软件对疫苗株和 ORFV-PN 株 *ORFV011* 蛋白进行糖基化位点预测，结果显示均有 4 个糖基化位点，没有发生变化。经 NCBI-Conserved Domain Architecture Retrieval Tool 在线分析疫苗株和 ORFV-PN 株 *ORFV011* 蛋白的保守性结构域发现，疫苗株和 ORFV-PN 株 *ORFV011* 蛋白均含有 2 个磷脂酶 D 超家族的保守结构域以及对应的特异性结合位点。

2.4 疫苗株和 ORFV-PN 株 *ORFV011* 蛋白高级结构及功能分析

通过 Lasergene 软件中 Protean 程序对疫苗株和 ORFV-PN 株 *ORFV011* 蛋白二级结构进行分析，结果（图 4）显示：疫苗株和 ORFV-PN 株 *ORFV011* 蛋白抗原位点均分布在 60~120、160~180、200~220、260~279 位氨基酸，具有较好的柔韧性，前 3 个抗原可及性较高。由表 2 可知，疫苗株和 ORFV-PN 株 *ORFV011* 蛋白二级结构中 α -螺旋、 β -折叠和无规则卷曲较多，其中 ORFV-PN 株 α -螺旋比疫苗株多 14 个， β -转角、 β -折叠和无规则卷曲比疫苗株分别少 3 个、7 个和 4 个。通过 Swiss-Model 在线软件提交疫苗株与 ORFV-PN 株 *ORFV011* 蛋白序列进行三维结构的预测，从建模结果发现，与磷酸酯酶 D (Phospholipase D) 结构相似性最高，与蛋白结构域预测结果相同。由图 5（箭头所指位置）可以看出，疫苗株和 ORFV-PN 株 *ORFV011* 蛋白的三维结构有一定的差异，与二级结构预测结果一致，具体体现在无规则卷曲的程度和 α -螺旋的长度上。

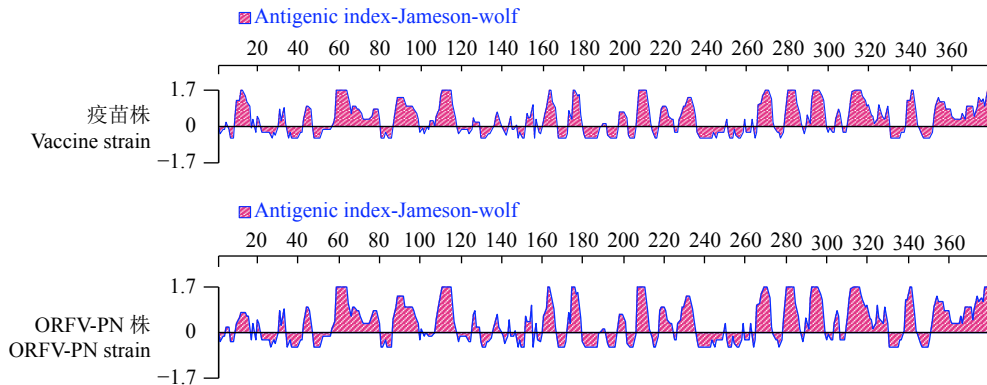


图 4 疫苗株和 ORFV-PN 株 ORFV011 蛋白抗原位点预测

Fig. 4 Predicted antigenic indices on ORFV011 in vaccine and ORFV-PN strains

表 2 疫苗株和 ORFV-PN 株 ORFV011 蛋白二级结构预测

Table 2 Predicted secondary structures of ORFV011 in vaccine and ORFV-PN strains

蛋白二级结构预测 Secondary structure prediction	α -螺旋 Alpha helix	β -转角 Beta turn	无规则卷曲 Radom coil	β -折叠 Extended strand
ORFV-PN 株 ORFV-PN strain	34.13% (129/378)	6.08% (23/378)	37.3% (141/378)	22.49% (85/378)
疫苗株 Vaccine strain	30.42% (115/378)	6.88% (26/378)	39.15% (148/378)	23.54% (89/378)

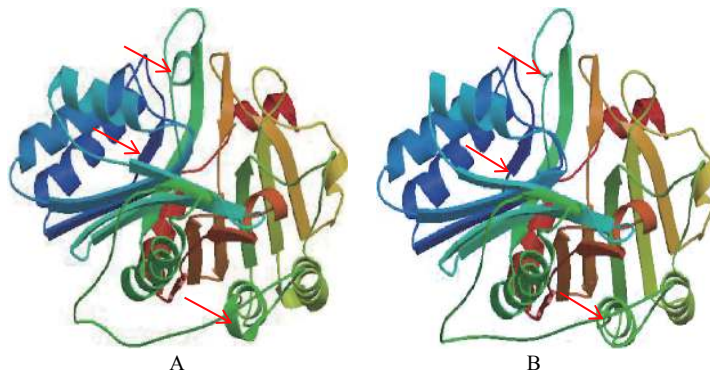


图 5 疫苗株 (A) 和 ORFV-PN 株 (B) ORFV011 蛋白结构域三维结构预测

Fig. 5 Predicted 3D tertiary structures of ORFV011 in vaccine strain (A) and ORFV-PN strain (B)

3 讨论

疫苗接种是控制传染病发生的有效手段之一。目前国内外对羊口疮的预防主要是通过接种弱毒疫苗。然而,由于羊口疮病毒弱毒疫苗接种方法的特殊性,以及各地使用疫苗免疫后效果不理想,出现免疫失败和重复感染,近年来出现了关于羊口疮病毒弱毒疫苗是否能够提供有效保护的疑惑^[11,13]。

据报道,ORFV011 基因编码约 42 kDa 的蛋白具有良好的免疫原性,可以刺激机体产生强烈的抗体反应^[14]。此外 ORFV011 基因常被用作遗传进化树分析,是作为羊口疮病毒分子流行病学研究的参考对象之一^[15-18]。对福建省地方株和疫苗株 ORFV011 基因的分子特征及蛋白结构的比较分析,可为福建省羊口疮的诊断、流行病学调查及疫苗选择提供理

论依据,同时有助于阐明羊口疮病毒的致病机制^[7]。

本研究通过对市面上购买的商品化羊口疮病毒疫苗弱毒株和福建省 ORFV-PN 株提取 DNA,利用设计的特异性引物扩增 ORFV011 全基因,将扩增产物进行胶回收,转化至基因工程菌中,将阳性克隆子送生物技术公司测序,利用生物信息学软件对测序后的核苷酸序列和蛋白结构进行比较分析。核苷酸序列和氨基酸序列相似性比较显示,ORFV-PN 与疫苗株和弱毒株 D1701 株 ORFV011 基因核苷酸序列相似性分别为 98.6% 和 98.4%,氨基酸序列相似性均为 98.7%,与疫苗株相比,ORFV-PN 株共有 16 处核苷酸变异和 5 处氨基酸变异,该结果与李智、El-Tholoth、ZHANG 等^[15-18]研究结果一致。在蛋白一级结构上,疫苗株和 ORFV-PN 株 ORFV011 蛋白均有 4 个糖基化位点,位点未发生转移或突变;两者

均无信号肽,表明ORFV011为非分泌蛋白;亲水性区域和理论等电点均相同,但相对分子质量却不同,这与氨基酸的点突变有关。在蛋白二级结构上,ORFV-PN株和疫苗株的抗原位点差异甚小,但在 α -螺旋、 β -转角、无规则卷曲和 β -折叠数量上存在一定的差异,ORFV-PN株和疫苗株 α -螺旋占比分别为34.13%和30.42%, β -转角占比分别为6.08%和6.88%,无规则卷曲占比分别为37.3%和39.15%, β -折叠占比分别为22.49%和23.54%;蛋白三级结构上ORFV-PN株预测的三维结构与疫苗株的三维结构在 α -螺旋和无规则卷曲上有一定的差异,三级结构上的差异与二级结构预测相一致。

本研究运用多种生物信息学软件对羊口疮病毒疫苗株和福建ORFV-PN株ORFV011基因及编码的蛋白在分子特征以及蛋白结构功能方面进行分析,结果显示,福建省羊口疮病毒已出现一定的变异,应当引起广大兽医工作者和有关部门的重视,加强对羊口疮的监控。

参考文献:

- [1] 王晴楠,张凯照,宁章勇.我国1984-2014年羊口疮报道文献的统计分析[J].畜牧与兽医,2015,47(9):111-113.
WANG Q N, ZHANG K Z, NING Z Y. The statistical analysis of orf reported literature in China during 1984-2014 [J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2015, 47 (9) : 111-113. (in Chinese)
- [2] LIN Y, JIANG J. TaqMan-based real-time quantitative fluorescence PCR for detection of Orf virus [J]. *Indian Journal of Animal Sciences*, 2019, 89 (3) : 233-237.
- [3] LI H X, ZHU X L, ZHENG Y D, et al. Phylogenetic analysis of two Chinese orf virus isolates based on sequences of B2L and *Vir* genes [J]. *Archives of Virology*, 2013, 158 (7) : 1477-1485.
- [4] SPYROU V, VALIAKOS G. Orf virus infection in sheep or goats [J]. *Veterinary Microbiology*, 2015, 181 (1/2) : 178-182.
- [5] MUSSER J M B, TAYLOR C A, GUO J H, et al. Development of a contagious ecthyma vaccine for goats [J]. *American Journal of Veterinary Research*, 2008, 69 (10) : 1366-1370.
- [6] DUAN C H, LIAO M Y, WANG H, et al. Identification, phylogenetic evolutionary analysis of GDQY orf virus isolated from Qingyuan City, Guangdong Province, Southern China [J]. *Gene*, 2015, 555 (2) : 260-268.
- [7] WANG Y, YANG K K, BAI C X, et al. Development of a SYBR Green I real-time PCR for the detection of the orf virus [J]. *AMB Express*, 2017, 7: 21.
- [8] WANG Y, YANG K, WANG Y A, et al. Identification and phylogenetic analysis of an orf virus strain isolated in Anhui Province, East-central China, in 2018 [J]. *Acta Virologica*, 2019, 63 (3) : 270-277.
- [9] NAGARAJAN G, POUROUCHOTTAMANE R, REDDY G B M, et al. Molecular characterization of Orf virus isolates from Kodai hills, Tamil Nadu, India [J]. *Veterinary World*, 2019, 12 (7) : 1022-1027.
- [10] 王秋霞,朱相儒,易成功,等.江苏省羊口疮病毒的分离鉴定及B2L基因的遗传进化分析[J].中国畜牧兽医,2017,44(4):950-958.
WANG Q X, ZHU X R, YI C G, et al. Isolation and identification of orf virus from Jiangsu Province and phylogenetic analysis of their B2L gene [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2017, 44 (4) : 950-958. (in Chinese)
- [11] 王文莉,魏楠楠,徐守兴,等.羊口疮病毒疫苗株和ORFV-PN株F1L基因的比较分析[J].中国动物传染病学报,2019,27(4):83-87.
WANG W L, WEI N N, XU S X, et al. Comparative analysis of F1L genes in vaccine and field strains of orf virus [J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2019, 27 (4) : 83-87. (in Chinese)
- [12] 鲜思美,李鹏飞,冯将,等.羊IL-2基因和羊口疮病毒B2L基因真核表达重组质粒联合免疫小鼠的效果评价[J].中国预防兽医学报,2017,39(8):663-667.
XIAN S M, LI P F, FENG J, et al. Evaluation of the combined immunization effect induced by eukaryotic expression recombinant plasmid of OrfV-B2L gene and sheep IL-2 gene in mice [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2017, 39 (8) : 663-667. (in Chinese)
- [13] FRIEBE A, FRIEDERICH S, SCHOLZ K, et al. Characterization of immunostimulatory components of orf virus (*Parapoxvirus ovis*) [J]. *Journal of General Virology*, 2011, 92 (7) : 1571-1584.
- [14] 郑增忍,李会荣,龚振华,等.接触传染性脓疱皮炎病毒B2L基因的克隆和序列分析[J].中国兽医学报,2004,24(3):236-239.
ZHENG Z R, LI H R, GONG Z H, et al. Cloning and sequence analysis of B2L gene of contagious pustular dermatitis virus [J]. *Chinese Journal of Veterinary*, 2004, 24 (3) : 236-239. (in Chinese)
- [15] 张克山,何继军,尚佑军,等.羊传染性脓疱病毒湖北株的鉴定及分子特征分析[J].畜牧兽医学报,2010,41(9):1154-1157.
ZHANG K S, HE J J, SHANG Y J, et al. Identification and molecular characteristic analysis of orf virus(ORFV) Hubei strain [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2010, 41 (9) : 1154-1157. (in Chinese)
- [16] 李智,仲亮,张静,等.羊口疮病毒QD/2015株B2L基因克隆及生物信息学分析[J].中国动物检疫,2017,34(3):91-96.
LI Z, ZHONG L, ZHANG J, et al. Cloning and bioinformatic analysis of B2L gene of orf virus QD/2015 strain [J]. *China Animal Health Inspection*, 2017, 34 (3) : 91-96. (in Chinese)
- [17] EL-THOLOTH M, ELNAKER Y F, SHIHA G. Phylogenetic analysis of B2L gene of Egyptian orf virus from naturally infected sheep [J]. *Virus Disease*, 2015, 26 (3) : 147-150.
- [18] ZHANG K, LIU Y, KONG H, et al. Comparison and phylogenetic analysis based on the B2L gene of orf virus from goats and sheep in China during 2009-2011 [J]. *Archives of Virology*, 2014, 159 (6) : 1475-1479.

(责任编辑:张梅)