

狂犬病病毒浙江街毒株糖蛋白基因序列分析

王晓光 雷永良 陈秀英 孟胜利 唐青

【摘要】 目的 测定狂犬病病毒浙江株(鼬獾源和犬源)糖蛋白(GP)基因组全序列,从分子水平比较狂犬病病毒浙江株与其他地区代表性街毒株和疫苗株 GP 之间的差异。方法 乳鼠接种分离狂犬病病毒,RT-PCR 反应测定狂犬病病毒浙江株 GP 基因核苷酸序列,并进行序列和编码蛋白的比较分析。结果 测序获得浙江 5 株鼬獾源狂犬病病毒和 9 株犬源狂犬病病毒 GP 基因序列,全长 1575 个核苷酸,编码 524 个氨基酸。浙江病毒株与其他地区街毒株、疫苗株核苷酸和氨基酸序列相似性在 82.3%~99.9% 和 85.1%~99.8% 之间,种系分析显示浙江株均为基因 1 型,GP 编码蛋白无重组,主要抗原位点未出现较大的变异。结论 对 GP 基因一级结构综合分析表明,在某些区域存在优势抗原表位的可能性较大,可能出现潜在的蛋白质抗原决定簇,浙江株 GP 基因变异较小,与国内其他地区流行的代表性街毒株相似,但高于其他疫苗株,在基因结构及种系进化关系上存在一定的距离。

【关键词】 狂犬病病毒;糖蛋白;基因序列

Sequencing and analyses on glycoprotein gene of rabies viruses isolated in Zhejiang province, China WANG Xiao-guang¹, LEI Yong-liang¹, CHEN Xiu-ying¹, MENG Sheng-li², TANG Qing³. 1 Lishui Center for Disease Control and Prevention, Zhejiang 323000, China; 2 Wuhan Institute of Biological Products; 3 Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention

Corresponding author: TANG Qing, Email: qtang04@sina.com

This work was supported by a grant from the General Research and Development Projects of Zhejiang Science and Technology Department in 2009 (No. 2009C33166); Public Service Research and Development Project of Agriculture (No. 200803014); National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. SQ2006AA02Z112882)

【Abstract】 **Objective** Based on sequencing the genomes of glycoprotein (GP) gene of rabies viruses isolated in Zhejiang, we analyzed the properties of rabies viruses genetic variation in molecular level, and to compare with those of other representative vaccine strains and street virus strains, get the information about rabies viruses variation. **Methods** Suckling mice against rabies virus were selected. Overlapped fragments were amplified by RT-PCR and full-length genomes were assembled to analyze the nucleotide and deduced protein similarities and phylogenetic analyses of the GP genes. **Results** The fourteen full-length genomes were completely sequenced and they had the same genetic structure with 1575 *nts* and deduced protein with 524 *aa*. Genetic analysis revealed that the nucleotide and amino acid homologies of GP gene from Zhejiang strains and other vaccine strains or street virus strains were 82.3%–99.9% and 85.1%–99.8%. The fourteen strains were genotype 1 according to the phylogenetic analyses. The GP amino acids of Zhejiang strains rabies virus strains without any recombination occurred in GP and no larger variation appeared in the major antigenic sites. **Conclusion** The comprehensive analysis based on the first-level structure of GP demonstrated that it was possible that some advantageous antigenic epitopes existed in certain areas and potential antigenic determinants. It was evident that the GP gene of Zhejiang strains appear to be stable and their sequence similarity with the representative strains of street virus in China were higher than those of other vaccine strains. Some differences showed in the genetic structure and evolution relationship among Zhejiang strains, other street strains in other regions and vaccine strains.

【Key words】 Rabies virus; Glycoprotein; Gene sequencing

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.01.018

基金项目:浙江省科技厅 2009 年度一般科研计划项目(2009C33166);公益性行业(农业)科研专项(200803014);国家高技术研究发展计划(863 计划)(SQ2006AA02Z112882);公共卫生应急检测关键技术重点实验室开放课题

作者单位:323000 浙江省丽水市疾病预防控制中心(王晓光、雷永良、陈秀英);武汉生物制品研究所(孟胜利);中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所(唐青)

通信作者:唐青, Email: qtang04@sina.com

狂犬病病毒糖蛋白 (glycoprotein, GP) 在该病毒的免疫原性或组织嗜性和毒力方面均起着决定性作用^[1], 是最有效的保护性抗原^[2], 不仅诱导机体产生中和抗体实现体液免疫, 同时也是机体实现细胞免疫的良好抗原, 其膜外区决定狂犬病病毒的抗原特性, 该区段微小的变化即可能影响到病毒的抗原性, 此外 GP 也是狂犬病病毒与细胞受体结合的结构, 并与毒力有关, 在病毒致病和免疫中起着关键作用。Zhang 等^[3]、Yao 等^[4]曾测定浙江省温州市狂犬病患者脑组织分离株 [Wz1(H): EU700030] 和唾液经乳鼠脑内接种分离株 [Wz0(H): EF556198] GP 基因序列, 其他有关浙江狂犬病病毒 GP 病原学和基因特点的分析报道未见述及, 尚不清楚当前浙江狂犬病病毒街毒 (street virus) 流行株 GP 的抗原性、结构特征和遗传变异特点, 为此我们对浙江株 (鼬獾源和犬源) 狂犬病病毒 GP 基因组全序列进行测定分析, 从分子水平比较浙江株与其他地区典型的街毒株和疫苗株 GP 之间的差异。

材料与方 法

1. 标本来源: 收集浙江省 2008 年 2—12 月发生狂犬病疫区或疑似发生狂犬病地区外观健康的鼬獾^[5]和犬脑组织, 经过直接免疫荧光试验 (DFA) 和 RT-PCR 反应检测狂犬病病毒特异性抗原和核酸, 共获得 9 份阳性犬脑组织和 5 份阳性鼬獾脑组织。其中犬来自丽水市松阳县 (D01、D02、D04、D06、D08~D10)、遂昌县 (D03) 和缙云县 (D11), 鼬獾分别来自丽水市莲都区 (F01) 和杭州市淳安县临歧 (F02~F03)、汪宅 (F04) 和文昌 (F05), 阳性脑组织标本冻存于 -70 °C 备用。

2. 乳小白鼠接种分离狂犬病病毒: 将上述阳性脑组织研磨后脑内接种 1~2 日龄乳鼠, 当狂犬病症状不典型时, 在接种第 1 代后取乳鼠的脑组织按前述方法继续传代。若确定发病乳鼠为狂犬病病毒感染, 则在无菌条件下获得乳鼠脑组织, -70 °C 冻存。未发病而存活的小鼠保留至 21 d 后取其脑组织做酶联免疫吸附试验 (ELISA) 和 DFA 检测。

3. 引物^[6]与 RT-PCR: PCR 扩增引物及测序用引物 (上海生工生物工程技术有限公司) 合成见表 1。通过 Trizol (Invitrogen, 美国) 试剂抽提狂犬病病毒阳性脑组织细胞总 RNA; 用随机引物 pd(N)、(TaKaRa, 大连)、Ready-To-Go® You-Prime First-Strand Beads (GE, 美国) 反转录得到 cDNA; 用 GoTaq® Green Master Mix (Promega, 美国) 进行 PCR 扩增, 反应体

系参照试剂盒说明书, 反应条件见参考文献 [6]。

表 1 PCR 扩增及测序用引物序列

引物	序列 (5' ~ 3')	目的基因	扩增长度 (bp)	碱基位置
G1-F	TGGTGATAACATGRAYTC	GP 5'	1097	3000 ~ 4096
G1-R	ACCCATGTYCCRTCATAAG			
G2-F	TGGATTGTGGATKAAAGAGGC	GP 3'	1542	3995 ~ 5536
G2-R	GAGTTNAGRITGTARTCAGAG			

4. 序列测定分析: PCR 扩增的特异性片段用 1% 琼脂糖 (OXOID, 英国) 凝胶电泳分离, 通过 QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, 德国) 切胶回收并进行序列双向测定 (上海生工生物工程技术有限公司)。测序得到的狂犬病病毒 GP 基因序列和引用序列用以下生物学软件处理: ATCG、BioEdit 和 GENEDOC 用于序列编辑处理; ATCG 和 SeqMan 用于序列拼装; ClustalX 1.82 用于多重序列比对 (multiple sequence alignment) 分析; MEGA3 v3.1 软件用于分子进化遗传分析, Neighbor-Joining (NJ, replications=1000) 法绘制种系发生树; 用 DNASTar 中 MegAlign 软件进行序列匹配和多重序列比对 (Clustal 法); DNASTar 中 Protean 软件进行抗原表位优势 (antigenicity: Jameson-Wolf)、局部亲水性 (hydropathy: Hopp-Woods)、表面可能性 (surface probability: Emini) 和柔韧性区域 (flexible regions: Karplus-Schulz) 预测分析。引用序列均来自于 GenBank (Accession No 与背景信息见图 1)。

结 果

1. GP 基因测序: 5 株鼬獾源狂犬病病毒 (Accession No: FJ712193 ~ FJ712194、FJ825133 ~ FJ825135) 和 9 株犬源狂犬病病毒 (Accession No: FJ712195 ~ FJ712196、FJ825126 ~ FJ825132) GP 基因组全序列已提交 GenBank。狂犬病病毒浙江街毒株 GP 开放读码框 (open reading frame, ORF) 共 1575 个核苷酸, 编码 524 个氨基酸, 符合已研究狂犬病病毒特征, 依据功能不同分 4 个区段: 1~57 位核苷酸为信号肽 (signal sequence), 58~1374 位为膜外区 (ectodomain), 1375~1440 位为跨膜区 (transmembrane domain), 1441~1575 位为膜内区 (cytoplasmic domain)。

2. 蛋白序列比较: 以 PV 株氨基酸序列作为对照, 多序列比较 GP 主要功能位点氨基酸水平上的差异。只含有一个表位的独立抗原位点 G I 第 231 位 (aG、DRV 为 P, 其他为 L) 以及导致 GP 抗原性经常

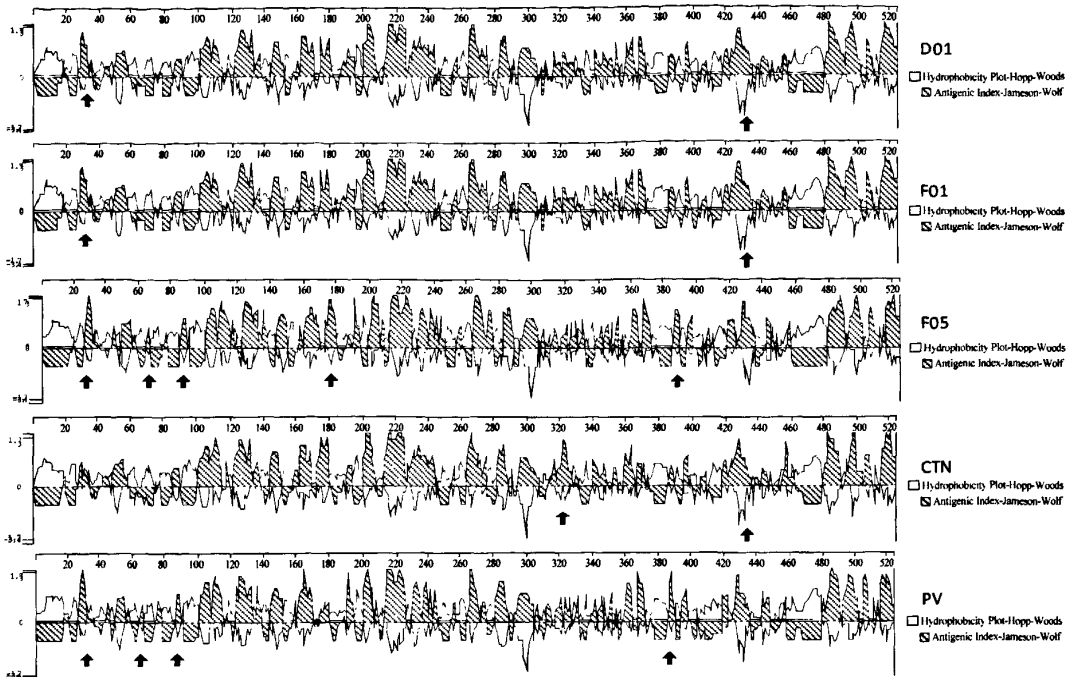


图1 GP抗原表位优势及亲水性分析(采用Jameson-Wolf, Hopp-Woods方法)

变化的G II位点(34~200区段)34~42位(MRV为GCTNLSEFS,其他为GCTNLSGFS)、147位(aG为N,其他为R)、184位(R)和198~200位(KRA)氨基酸和G III位点(330~357区段)上330~340位(第333位CTN为Q,其他均为R)氨基酸变化均较小;对GP的表达非常重要的细胞外区域糖基化位点N-X-S或N-X-T(X为任何一种氨基酸)第37~39位(N-L-S)、第247~249位(F02~F05: R-E-T; D01~D04、D06、D08~D11、F01; D-E-T)、第319~321位(N-K-T)、第480~482位(K-V-S)仅247位发生变化,说明GP具有较好的稳定性,虽有少量变异但并未影响GP的免疫原性。

3. 蛋白一级结构分析:用软件分析GP氨基酸结构抗原表位优势、局部亲水性、表面可能性和柔韧性区域^[7,8]。D01、F01在29、427~431位抗原表位优势显著升高,其中29位升高趋势与PV株接近,427~431位与CTN株接近;F05在29、69~71、85、175~177、180~182、388~389位抗原优势表位显著升高,其中175~177、180~182位氨基酸的改变为F05特有,推测在这些区域存在优势抗原表位的可能性最大,可能出现潜在的蛋白质抗原决定簇,其他表位升高趋势与PV株接近;局部亲水性分析比较变化趋势与抗原表位优势基本对应(图1)。特定区域位于GP表面的可能性(≥ 1)比较分散,数量较少,其中以86~90、99~110、124~148、161~168、198~204、

212~222、294~301、481~490位区域的表面可能性最大;蛋白质骨架区的柔韧性区域CTN株为32个,D01、F05、PV株为34个,F01为35个,其中比较大的区域分布在122~138、173~187、212~225、419~433位(图2)。

4. 序列相似性比较:从分子水平多序列比较浙江狂犬病病毒分离株与疫苗株、其他地区街毒株GP基因组核苷酸和氨基酸序列之间的差异。浙江病毒株序列相似性较高,核苷酸和氨基酸序列差异在0~12.2%和0.2%~6.7%之间,而犬源病毒株和鼬獾源病毒株F01之间(nt/aa, 98.6%~100%/98.5%~99.8%)、其他鼬獾源病毒株之间(nt/aa, 99.4%~100%/99.4%~99.8%)相似性非常高,因此选取不同宿主来源的D01、F01、F05作为代表株与其他引用序列进行比较(表2),核苷酸和氨基酸序列相似性在82.3%~99.9%和85.1%~99.8%之间, JX08-48/ZJ-LA(鼬獾源株,江西)与F05相似性最高,与F01比较低;Wz1(H)/Wz0(H)(人源株,温州)与D01相似性最高,与F01次之,与F05最低;D01、F01与其他动物宿主分离株070308(水牛源株,湖北)相似性最高,与MRV(鼠源株,河南)、DRV(鹿源株,吉林)、CHI1-BK(鹿源株,河南)较低(82.3%~85.3%),而F05与070308、MRV、DRV、CHI1-BK相似性均比较低(83.0%~88.2%);疫苗株CTN与F05相似性最高,与D01、F01相似性次之,疫苗株PV、aG与D01、

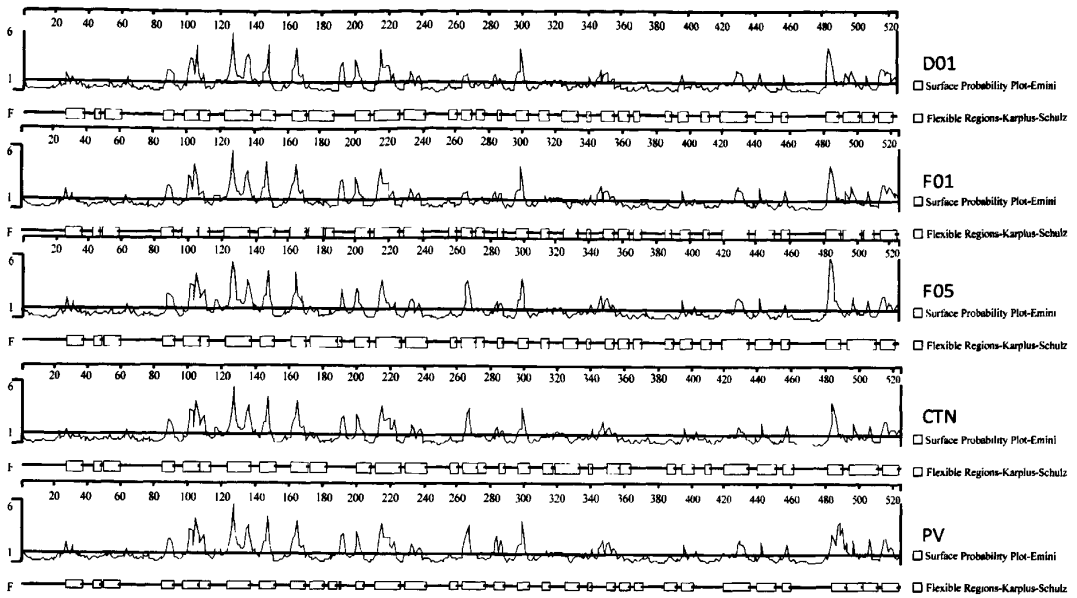


图2 GP抗原表面可能性及柔性区域分析(采用Emini, Karplus-Schulz方法)

表2 部分GP核苷酸和氨基酸序列相似性比较

	D01	F01	Wz1(H)	Wz0(H)	070308	JX08-48	ZJ-LA	F05	CTN	MRV	PV	aG	DRV	CHI1-BK
D01		98.8	99.3	99.3	98.3	87.6	88.2	88.2	87.4	83.4	83.6	83.1	82.5	85.3
F01	99.0		98.5	98.7	98.1	87.3	87.9	87.9	87.0	82.9	83.2	82.8	82.3	85.0
Wz1(H)	98.7	98.3		99.0	98.0	87.5	88.1	88.1	87.3	83.2	83.4	83.3	82.6	85.2
Wz0(H)	99.0	98.7	98.5		98.2	87.6	88.1	88.1	87.2	83.2	83.2	82.9	82.2	85.1
070308	99.2	99.2	98.5	98.9		87.7	88.2	88.2	87.1	83.4	83.5	83.2	82.7	85.1
JX08-48	94.1	94.1	93.7	93.7	94.7		99.3	99.2	92.8	83.7	83.9	83.7	82.8	86.3
ZJ-LA	94.3	94.3	93.9	93.9	94.9	99.6		99.9	92.9	84.0	84.2	83.7	82.9	86.5
F05	94.3	94.3	93.9	93.9	94.9	99.6	99.8		93.0	84.0	84.2	83.9	83.0	86.5
CTN	91.4	91.4	91.4	91.4	92.0	93.9	94.1	94.1		83.1	84.1	84.4	83.4	85.3
MRV	88.8	88.6	88.4	88.6	89.1	89.5	89.7	89.7	86.9		89.7	89.1	89.5	90.0
PV	90.5	90.3	90.5	90.3	90.9	92.2	92.4	92.4	88.8	88.6		91.6	90.4	92.6
aG	88.0	87.8	88.8	88.0	88.4	89.9	90.1	90.1	88.0	87.4	90.5		96.4	91.4
DRV	85.3	85.1	85.7	85.1	85.7	87.0	87.2	87.2	84.2	85.9	87.2	93.1		89.8
CHI1-BK	92.8	92.6	92.8	92.6	93.1	94.5	94.7	94.7	91.0	91.2	93.7	91.8	88.4	

注:表中白体字为氨基酸同源性(%),黑体字为核苷酸同源性(%)

F01、F05序列相似性最低(82.8%~84.2%)。将GP基因序列的各个蛋白不同区段分别加以比较(表3),结果显示GP变异主要存在于信号肽,膜内区变异明显,跨膜区较小,膜外区相对最为保守。

5. 种系发生分析:对14株狂犬病病毒浙江株和来源于GenBank的基因1型其他地区不同宿主来源毒株、疫苗株核苷酸序列以及其他6个基因型序列,进行基于GP基因序列种系发生分析(图3)。结果显示,浙江病毒株基因序列与其他基因1型序列形成独立的进化分支,共属基因1型;浙江犬源狂犬病病毒株和鼬獾源狂犬病病毒株F01与温州、北京、河北人源病毒株Wz1(H)/Wz0(H)、BeijingH1、Hebei0(H)及江苏、云南犬源病毒Wx1、Md06共聚类为分

表3 部分GP不同区段氨基酸序列相似性比较

病毒株	信号序列		膜外区		跨膜区		膜内区	
	nt(%)	aa(%)	nt(%)	aa(%)	nt(%)	aa(%)	nt(%)	aa(%)
D01/F01	96.5	100.0	98.9	99.3	98.5	95.5	99.3	100.0
D01/F05	78.9	78.9	88.7	96.4	87.9	86.4	87.4	86.4
D01/Wz1(H)	87.7	78.9	99.8	99.8	100.0	100.0	99.3	97.7
D01/CTN	80.4	77.8	87.7	94.5	80.3	77.3	90.4	88.6
F01/F05	78.9	78.9	88.3	96.1	89.4	90.9	86.7	86.4
F01/JX08-48	77.2	78.9	87.7	95.9	89.4	90.9	86.7	86.4
F01/ZJ-LA	78.9	78.9	88.3	96.1	89.4	90.9	86.7	86.4
F01/CTN	82.1	77.8	87.2	94.3	81.8	81.8	89.6	88.6
F05/Wz0(H)	78.9	73.7	88.7	88.7	87.9	86.4	86.7	86.4
F05/JX08-48	98.2	100.0	99.1	99.8	100.0	100.0	100.0	100.0
F05/ZJ-LA	100.0	100.0	99.8	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
F05/CTN	85.7	77.8	93.3	96.6	89.4	86.4	95.6	95.5

注:nt为核苷酸,aa为氨基酸

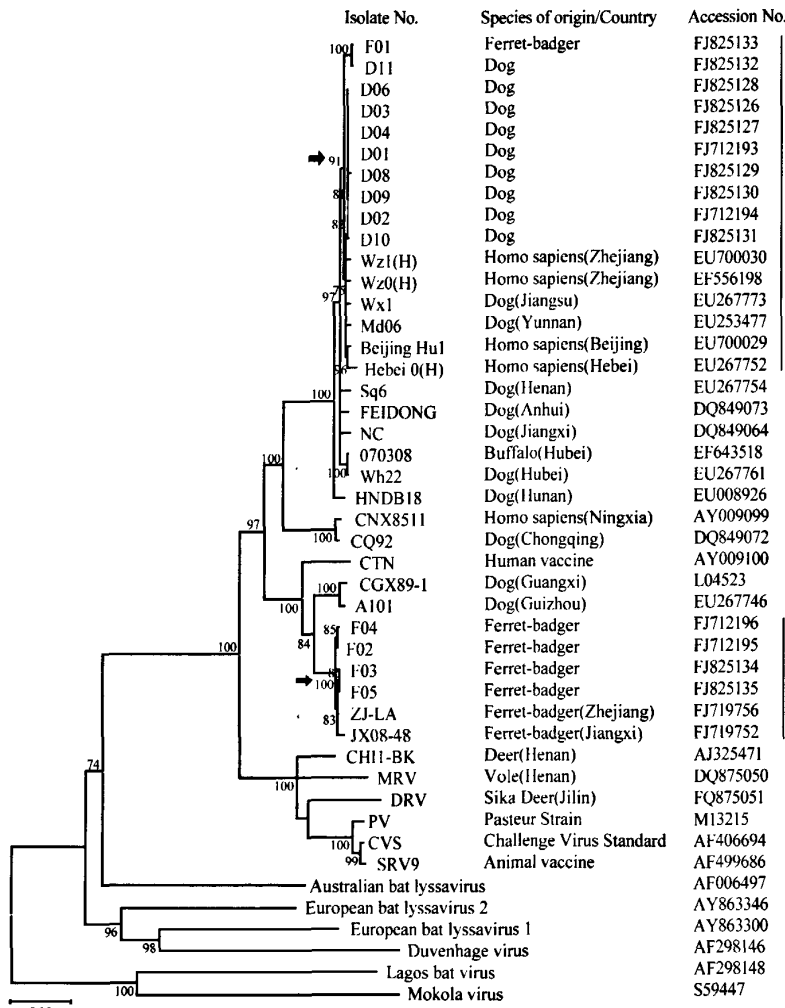


图3 基于狂犬病病毒GP基因的种系发生分析(应用MEGA3 v3.1软件^[9])

支 I (Bootstrap Values: 91), 在种系进化上亲缘关系最近; 黼獾源病毒浙江株 F02 ~ F05 与江西株 JX08-48/ZJ-LA 共聚类为分支 II (Bootstrap Values: 100), 进化关系最近, 与人用疫苗株 CTN 和广西、贵州犬源病毒株 CGX89-1、A101 亲缘关系较近, 与其他野生动物分离株 070308、MRV、DRV、CHI1-BK 进化关系均较远; 浙江病毒株与巴斯德株 PV 株进化关系最远。

讨 论

狂犬病病毒浙江株 14 个 GP 基因序列长度均为 1575 个核苷酸, 编码 524 个氨基酸的糖蛋白前体, 在切除 N 端的 19 个氨基酸后, 于内质网中经糖基化等修饰成为成熟的糖蛋白, 成熟的糖蛋白共含 505 个氨基酸, 包含 3 个主要功能区, 膜外区: 由 1 ~ 439 位氨基酸构成; 跨膜区: 由 440 ~ 461 位的 22 个疏水氨

基酸构成; 膜内区: 由 462 ~ 505 位氨基酸构成^[10]。比对显示狂犬病病毒浙江株 GP 在氨基酸水平, 最保守的区段为膜外区, 该区决定了狂犬病病毒的抗原特性, 其微小的变化即可能影响到病毒的抗原性, 其他依次为跨膜区、膜内区和信号肽, 浙江株 GP 编码区基因均无重组发生, 主要抗原位点未出现较大的变异, 研究表明狂犬病病毒进化过程中没有基因组重组变异的证据, 点突变和纯选择作用是病毒进化的主要动力^[11]。

浙江地区 14 株狂犬病病毒与本研究引用的街毒株或者来自街毒的减毒株的变异位点和变异类型相似, 对分离的街毒株 GP 抗原位点和其他

功能位点进行变异分析, 能够找到筛选疫苗免疫或者分析免疫失败的直接证据, 可以分析街毒株主要抗原位点和淋巴细胞表位^[12], 通过计算机分析蛋白质序列上的最大局部亲水性^[7], 并联合现有的蛋白质结构寻找潜在的蛋白质抗原决定簇^[8], 同时预测特定区域位于蛋白质表面的可能性和骨架区的柔韧性区域, Jameson 和 Wolf^[7]提出的综合预测方案, 各因素的权重分配为蛋白质二级结构占 40%、亲水性占 30%、表面可能性占 15%、柔韧性占 15%位, 综合分析这些区域存在优势抗原表位的可能性最大, 可能出现潜在的蛋白质抗原决定簇。本研究参与比较的浙江和国内其他地区狂犬病病毒街毒株以及疫苗株 GP 基因变异均较小, 作为主要的抗原区变异均不大, 这是因为狂犬病病毒本身具有很好的遗传稳定性^[13], 在氨基酸水平 CTN 株与我国多数街毒株相似性要高于其他疫苗株, 从而肯定了 CTN 株作为疫苗

GT1

II

GT7

GT6

GT5

GT4

GT2

GT3

株的保护效果^[14],而且这些街毒株主要的抗原位点具有共同的保护性免疫作用,可作为筛选疫苗株。GP基因3个抗原区内氨基酸的变异可以对病毒免疫原性有一定的影响,对于抗原部位其他位点存在的变异,不排除这些氨基酸序列的改变导致病毒毒力和免疫原性发生变化。

比较狂犬病病毒浙江株与中国其他不同地区代表性街毒株GP氨基酸序列,发现浙江病毒株基因变异较小;与疫苗株相比,无论是序列相似性,还是GP基因一些特殊位点的构成,均存在一定差异,浙江病毒株与其他地区流行的代表株的相似性均高于其他疫苗株;种系发生分析同样将街毒和疫苗株/固定毒分为两个分支,它们之间在基因结构及进化关系上存在一定的距离,表明抗原部位的变化不一定来自免疫选择的结果,可能是狂犬病病毒在不同地理环境下进化的结果^[15],或者是其他选择压力如适应特异性宿主所致。

比较不同基因型间及同一型内不同地区间狂犬病病毒的基因序列,发现GP基因是狂犬病病毒5个编码蛋白中变化最大的一个,由于RNA病毒突变率高,即使是在单一种群中也表现出很大的序列差异,而且这些病毒经过连续的实验室动物或细胞传代,所得到的序列很难反映某个易变种群的真实变异^[16]; Sacramento等已经注意到在法国街毒株与疫苗株之间GP差异达14.7%^[17],并提出有必要在世界范围内,尤其是对那些曾有免疫失败报道的国家开展狂犬病病毒的分子流行病学调查,因此分析街毒株GP基因特征是非常必要的,特别是目前国内对狂犬病宿主动物的研究范围主要集中于犬,关于野生动物的研究相对较少,但在国外一些消灭了家畜狂犬病的国家地区所推行的针对野生动物的口服免疫策略,野生动物狂犬病已明显下降,而我国对于狂犬病重要传染源的野生动物狂犬病的免疫预防尚属空白,有关狂犬病病毒GP的研究绝大多数来自对固定毒或者作为疫苗株的减毒株进行的分析,因此分析野生鼬獾狂犬病病毒GP基因特点更尤为重要。

参 考 文 献

[1] Anilionis A, Wunner WH, Curtis PJ. Structure of the glycoprotein gene in rabies virus. *Nature*, 1981, 294: 275-278.
 [2] Badrane H, Bahloul C, Perrin P, et al. Evidence of two *Lyssavirus* phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. *J Gen Virol*, 2001, 75: 3268-3276.
 [3] Zhang YZ, Xiong CL, Lin XD, et al. Genetic diversity of Chinese rabies viruses: evidence for the presence of two distinct clades in China. *J Infect Genet Evol*, 2009, 9(1): 87-96.

[4] Yao WR, Pan GQ, Xiong CL, et al. Detection and genetic characterization of rabies virus from human patients. *Virologica Sinica*, 2007, 22(4): 307-315.
 [5] Lei YL, Wang XG, Li H, et al. New animal hosts of rabies virus in mountain areas in Zhejiang province. *Chin J Epidemiol*, 2009, 30(4): 344-347. (in Chinese)
 雷永良, 王晓光, 李浩, 等. 浙江省山区狂犬病新宿主动物调查. *中华流行病学杂志*, 2009, 30(4): 344-347.
 [6] Meng SL, Yan JX, Xu GL. A molecular epidemiological study targeting the glycoprotein gene of rabies virus isolates from China. *Virus Research*, 2007, 124: 125-138.
 [7] Jameson BA, Wolf H. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *Comput Appl Biosci*, 1988, 4(1): 181-186.
 [8] Hopp TP, Woods KR. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78(6): 3824-3828.
 [9] Kumar S, Tamura K, Nei M, et al. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform*, 2004, 5(2): 150-163.
 [10] Xu L, Guo ZZ, Zhang YZ, et al. Advances in the research of the glycoprotein of rabies. *Chin J Zoonoses*, 2006, 22(9): 876-879. (in Chinese)
 徐兰, 郭增柱, 张永振, 等. 狂犬病病毒糖蛋白研究进展. *中国人兽共患病学报*, 2006, 22(9): 876-879.
 [11] Wunner WH, Dietzschold B, Smith CL, et al. Antigenic variants of CVS rabies virus with altered glycosylation sites. *Virol*, 1985, 140: 1-12.
 [12] Zhao YJ, Guo L, Huang Y, et al. Sequencing and analysis of the complete genome of one wild strain of vole rabies virus. *Chin J Zoonoses*, 2008, 24(7): 651-658. (in Chinese)
 赵云蛟, 郭利, 黄莹, 等. 1株鼠源狂犬病病毒野毒株全基因组序列测定与分析. *中国人兽共患病学报*, 2008, 24(7): 651-658.
 [13] Meng SL, Xu GL, Ming PG, et al. Sequences determination and analysis of the rabies virus nucleoprotein and glycoprotein genes in CTN-1 strain of eight generations. *Chin J Zoonoses*, 2007, 23(4): 327-332. (in Chinese)
 孟胜利, 徐葛林, 明平刚, 等. 狂犬病病毒疫苗株CTN-1八代次N和G基因序列测定及分析. *中国人兽共患病学报*, 2007, 23(4): 327-332.
 [14] Zhang YZ, Xiong CL, Zou Y, et al. Molecular characterization of rabies virus isolates in China during 2004. *Virus Res*, 2006, 121: 179-188.
 [15] Johnson N, McElhinney LM, Smith J, et al. Phylogenetic comparison of the genus *Lyssavirus* using distal coding sequences of the glycoprotein and nucleoprotein genes. *Arch Virol*, 2002, 147: 2111-2123.
 [16] Tang Q, Lillian AO, Charles ER, et al. Sequencing and position analysis of the glycoprotein gene of four Chinese rabies viruses. *Virologica Sinica*, 2000, 15(1): 22-33. (in Chinese)
 唐青, Lillian AO, Charles ER, 等. 我国四株狂犬病病毒糖蛋白基因序列分析和位点比较. *中国病毒学*, 2000, 15(1): 22-33.
 [17] Xiong CL, Zhang YZ, Lu SQ, et al. Progress on the study of biological characteristic of rabies virus. *Chin J Epidemiol*, 2006, 27(10): 913-916. (in Chinese)
 熊成龙, 张永振, 卢思奇, 等. 狂犬病病毒生物学特征研究进展. *中华流行病学杂志*, 2006, 27(10): 913-916.

(收稿日期: 2009-08-14)

(本文编辑: 张林东)