

Identification of RT-PCR and Sequence Analysis of N Gene in *Peste des Petits Ruminants Virus*

Xiaopeng Li^{1,2}, Hualiang Chen¹, Junqiong Zhai¹, Xia Zhou¹, Song Cheng¹, Wenjuan Zhang¹, Manlin Luo^{1*}, Shaolun Zhai^{2*}

¹College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou Guangdong

²Animal Disease Diagnostic Center, Institute of Animal Health, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou Guangdong

Email: *710510116@qq.com, *280029676@qq.com

Received: Sept. 23rd, 2015; accepted: Oct. 6th, 2015; published: Oct. 19th, 2015

Copyright © 2015 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Two pairs of primers were designed to amplify the partial P gene and full-length N gene based on their own conserved sequences, respectively. RNA of suspected samples with PPRV was extracted and amplified by RT-PCR, from which target fragments of 766 bp and 1578 bp were obtained. Meanwhile, the RT-PCR reaction conditions, including annealing temperature and sensitivity, were optimized and 850 copies of PPRV can be tested under these conditions. PCR product of N gene was cloned into pMD-19T vector and the recombinant plasmid was transformed into DH5 α competent cells and sequenced, which showed that N gene was consistent with that expected. Compared with other strains from Yili, Xinjiang province and Beijing, the homologies of N gene were almost 100%, which indicated that PPRV, as lineage 4, was endemic in North and South of China.

Keywords

Peste des Petits Ruminants Virus, P/N Gene, Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, Homology, Sequence Analysis

小反刍兽疫RT-PCR的鉴定及N基因序列分析

李小鹏^{1,2}, 陈华良¹, 翟俊琼¹, 周霞¹, 程松¹, 张文娟¹, 罗满林^{1*}, 翟少伦^{2*}

*通讯作者。

文章引用: 李小鹏, 陈华良, 翟俊琼, 周霞, 程松, 张文娟, 罗满林, 翟少伦. 小反刍兽疫 RT-PCR 的鉴定及 N 基因序列分析[J]. 亚洲兽医病例研究, 2015, 4(4): 31-38. <http://dx.doi.org/10.12677/acrpvm.2015.44006>

¹华南农业大学兽医学院, 广东 广州

²广东省农业科学院动物卫生研究所动物疫病诊断中心, 广东 广州

Email: 710510116@qq.com, 280029676@qq.com

收稿日期: 2015年9月23日; 录用日期: 2015年10月6日; 发布日期: 2015年10月19日

摘 要

根据小反刍兽疫病毒(PPRV) P、N基因保守序列设计了两对引物, 分别扩增部分P基因及N基因的全长阅读编码框(ORF), 对疑似小反刍兽疫病毒的样品抽取RNA并以其为模板, 在RT-PCR的体系中能扩增出预期大小分别为766 bp、1578 bp的目的片段, 同时对退火温度, 敏感性及特异性等RT-PCR反应条件进行了优化。在最佳反应条件下, 该RT-PCR能检出最低850拷贝的PPRV基因组。对N全基因进行RT-PCR扩增并对PCR产物克隆于pMD-19T载体, 转化感受态细胞DH5 α 后, 对重组质粒测序, 结果表明N基因全长大小与预期完全一致。并且这两个基因与新疆伊犁、北京所发生的小反刍兽疫病毒同源性高达100%, 说明该病毒在中国南北方都有存在, 其亚型为基因4型。

关键词

小反刍兽疫病毒, P、N基因, 逆转录-聚合酶联反应, 同源性, 序列分析

1. 引言

小反刍兽疫(*peste des petits ruminants*, PPR)又别名为小反刍兽伪牛瘟、羊瘟、Kate、胃肠炎-肺炎综合征、传染性脓包状胃炎[1]。属于副粘病毒科(*Paramyxoviridae*), 麻疹病毒属(*Morbolivirus*) [2], 与牛瘟病毒(*Rinderpest virus*, RPV), 犬瘟热病毒(*Canine distemper virus*, CDV), 海豹瘟病毒(*Porpoise distemper virus*, PDV)同一属[3]。PPRV 是危害山羊及绵羊的高度接触性传染病, 以引起口腔溃疡、脓性鼻液及出血性胃肠炎和肺炎为特征的烈性传染病, 基于高度接触性传染速度快而被我国农业部列为一类烈性传染病, 畜牧生产中一旦发生该疫情必须上报并进行扑杀处理[4]。该病毒最早于 1940 年在西非报道, 在中东、非洲、阿拉伯半岛及南亚地区都有所波及, 至今中国新疆、北京都有所发现。这应引起我国相关地区的高度重视[4]。

PPRV 基因组为单股负链 RNA 病毒, 核苷酸全长大小为 15,948 bp [5], 病毒基因组 RNA 从 3'端至 5'端依次排列 6 个基因片段并编码 6 种蛋白和 2 种非结构蛋白, 分别是 N-P-M-F-H-L, 即核蛋白(N)、磷蛋白(P)、基质蛋白(M)、融合蛋白(F)、血凝素(H)、多聚酶蛋白(L)和非结构蛋白 C/V [6]。P 基因除了编码 P 蛋白之外, 还编码两种非结构蛋白 C 和 V, P 蛋白由 509 个氨基酸组成, 分子量大约为 54.9 ku, P 蛋白以寡聚体形式参与病毒的复制[7] [8]。N 蛋白为核衣壳蛋白并与 RNA 紧密结合, 对核酸起到保护的作用。M 蛋白与病毒的成熟、释放有关; 而 F、H 蛋白与病毒的吸附、侵入有关并决定着病毒的感染性[9]。

PPRV 的诊断方法有很多种, 主要有病毒分离鉴定、抗体血清学检测、抗原检测等。自从 1995 年 Forsyth 和 Barrett 根据 N 基因和 F 基因设计引物, 建立了 PPR 的 RT-PCR 检测方法以来, RT-PCR 方法在检测 PPR 得到广泛应用[10]。本研究通过对 P、N 基因的保守序列进行分析, 分别设计了 2 对引物, 一对通过 RT-PCR 扩增的方法, 用以快速、准确检测小反刍兽疫病毒; 一对用于对 N 全基因全长扩增以及序列比对, 分析该毒株与其它毒株的同源性, 从而为小反刍兽疫病毒的有效鉴定及输入性疫病的监控奠定良好的基础。

2. 材料与方法

2.1. 材料、试剂

病毒株(CH/GDDG/2014)分离自广东某羊场, 克隆载体 pMD-19T、DL2000、PrimeScript one step RT-PCR Kit Ver.2 均为生物工程(大连)有限公司产品, AxyPrep 病毒 DNA/RNA 提取小量试剂盒, 购自康宁生命科学(吴江)生物有限公司, Trizol 试剂、胶回收试剂盒及小量柱式质粒提取试剂盒均购自上海华舜公司。氯仿、异丙醇等其他试剂均为国产分析纯试剂。

2.2. 方法

2.2.1. 引物设计

参考 GenBank 下载的序列, 设计下列 2 对引物, 用于扩增 P、N 基因的扩增, 引物由北京睿博有限公司合成, 在 N 上游引物的 5'端分别引入 *Sph*I, 下游引物的 5'端引入 *Bam*HI 酶切位点。

Pf: 5'GGTACCATAGCATCACCGACTC3'

Pr: 5'CCCTTGCTCCTAAGTTTTTGTAAT3'

Nf: 5'ACATGCATGCATGGCGACTCTCCTAAAAG3'

Nr: 5'GGGGTACCTTAGCCGAGGAGATCCTTGT3'

预期 P、N 的扩增产物分别为 766 bp、1578 bp。

2.2.2. 病毒 RNA 的提取

参照 AxyPrep 病毒 DNA/RNA 提取小量试剂盒的说明书按步骤对病毒株(CH/GDDG/2014)提取 RNA, 用 DEPC 水溶解 RNA, 于-80℃保存备用。

2.2.3. 目的基因 RT-PCR 扩增

以提取的 RNA 为模板进行 RT-PCR, 分别以 Pf、Pr, Nf、Nr 为引物, 反应体系(25 μL): 12.5 μL 2 × 1 step buffer, 8.5 μL ddH₂O, 0.5 μL 正向引物, 0.5 μL 反向引物, 2.5 μL 模板, 0.5 μL Prime Script Enzyme MIX; 反应条件: 50℃ 30 min, 95℃ 5 min, 95℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 50 s, 进行 35 个循环后 72℃ 10 min, 4℃ 保存。扩增结束后在 1.2%的琼脂糖凝胶电泳, 观察结果。

2.2.4. 退火温度优化试验

以上述提取的 RNA 为模板进行 RT-PCR, 且设定退火温度分别为 53.0℃、54.0℃、55.0℃、55.5℃、56.0℃、56.5℃其他反应条件及体系不变, 扩增结束后在 1.2%的琼脂糖凝胶电泳, 观察结果, 来确定最佳的退火温度。

2.2.5. 特异性试验

以广东分离的小反刍兽疫山羊毒株(CH/GDDG/2014), 犬瘟热病毒, 新城疫病毒, 疫苗 Nigeria75/1 株的 RNA 为模板及 DEPC 水为空白对照, 并以 Pf、Pr 为引物进行 RT-PCR, 扩增结束后在 1.2%的琼脂糖凝胶电泳, 观察结果。

2.2.6. 敏感性试验

取 200 μL 提取的 RNA, 用浓度测定仪测定其初始浓度为 108.50 ng/μL, 之后对其 10 倍稀释到 10⁻⁸ ng/μL 并以各自浓度为模板, 以 Pf、Pr 为引物进行 RT-PCR, 结束后在 1.2%的琼脂糖凝胶电泳。

2.2.7. N 基因双酶切鉴定

分别以 Nf、Nr 为引物扩增 N 全基因, 将 PCR 产物回收后连接到 pMD-19T 载体, 转化到 DH5α 感

受态细胞后, 经蓝白斑筛选挑取白斑的单菌落摇菌, 抽提质粒并对其进行双酶切鉴定后送测序公司。

2.2.8. N 全基因测序结果分析

为了解全球的 PPRV 毒株的亲缘关系及遗传演化关系, 用 DNASTar 软件比对了本研究分离的 PPRV 流行毒株(CH/GDDG/2014)和 GenBank 已发表的国内外代表毒株, 选取了包括中国北京分离株(KP260624)、西藏分离株(JF939201)、新疆分离株(KM091959)、埃塞尔比亚分离株(KJ867540)、加纳分离株(KJ466104)、科特迪瓦分离株(EU267273)、肯尼亚分离株(KM463083)、乌干达分离株(KJ867543)、中东分离株(KJ867545)、印度分离株(KJ867542)、塞内加尔分离株(KM212177)、摩洛哥分离株(KC594074)的同源性。用 Clustalx 1.8.1 和 MEGA 6.0 软件将选取的各基因型代表参考毒株 PPRV1 系((EU267273); PPRV2 系(KJ466104)、(HQ197753); PPRV3 系(KM463083)、(KJ867543)、(KJ867544)、(KJ867545)、(KM212177); PPRV4 系(KP260624)、(KM091959)、(JF939201)及本研究分离的 PPRV 毒株(CH/GDDG/2014) N 基因进行序列比对分析并构建系统进化树。

3. 结果

3.1. RT-PCR 检测结果

针对 P 基因序列的保守区所设计的 1 对引物, 单独对 PPRV 有正确的扩增, 扩增片段大小为 766 bp, 并且扩增的目的条带没有任何杂带, 说明针对小反刍兽疫病毒所设计的引物特异性较好。其扩增结果见图 1。

3.2. 退火温度优化试验

以 Pf、Pr 为引物进行 RT-PCR 的退火温度的优化, 将不同退火温度的 PCR 产物进行电泳检测, 结果表明, 在不同的退火温度下均能扩增出目的条带, 而在退火温度为 55℃ 的条件下能扩增出明显的条带, 因此本实验最佳退火温度为 55℃ (见图 2)。

3.3. 特异性试验

在以上毒株的 RT-PCR 扩增并在琼脂糖凝胶电泳中, 只有广东分离的小反刍兽疫山羊毒株出现了与预期大小一致的正确条带, 而其他的及空白对照都没有条带, 结果表明以 Pf、Pr 为引物的 RT-PCR 扩增具有明显的特异性(见图 3)。

3.4. 敏感性试验

用 RT-PCR 方法扩增浓度为 108 ng/μL 的 RNA 模板以及依次按 10 倍稀释模板的浓度均出现了明显的目的条带, 即可知能检测到的目的基因的最低 RNA 模板的浓度为 1.085×10^{-5} ng/μL (见图 4)。

3.5. N 基因双酶切鉴定

经过以 Nf、Nr 为引物扩增 N 全基因, 将回收的 PCR 产物与 pMD-19T 载体连接获取的重组质粒分别进行 *Sph*I、*Bam*hI 双酶切(见图 5), 说明扩增的 DNA 片段成功连接到 pMD-19T 载体上。经引物移步法后, 测的 N 基因的 ORF 全长序列为 1578 bp。

3.6. N 全基因核苷酸同源性比对和系统进化树分析

N 全基因核苷酸同源性比对结果显示本研究分离的 PPRV 流行毒株(CH/GDDG/2014)基因组与国内的毒株同源性为 90.8%~99.9% (见图 6), 其中与国内 CH/XJYL/2013 的同源性高达 99.9%; 与国外代表毒株基因组的同源性为 88.9%~97.7%, 其中与 Sungri1996MSD 分离株(HQ693093)的同源性最高。由此可见我

们分离的 CH/GDDG/2014 毒株的与国内的其他毒株同源性高达 99.9%，与其他国家和地区分离株也具有较高的同源性，没有明显的地域性。但总的看来与国内毒株的同源性还是稍高于国外毒株。PPRV 目前分为四个系，其中 I、II、III 型存在于非洲国家，IV 系主要来源于亚洲，至今国内还未发现其它 3 个亚型的 PPRV。从系统进化树结果(图 7)可以看出，本分离株属于 IV 系，并且与国内其它地区的毒株处于同一个大分支上，再次说明国内主要流行 IV 系。

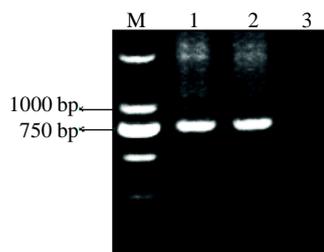


Figure 1. RT-PCR amplifications from samples M. DNA Marker2000; 1. Detection sample; 2. Positive control; 3. Negative control

图 1. RT-PCR 样品检测图 M. DNA 标准 DL2000; 1. 为检测样品; 2. 阳性对照; 3. 阴性对照

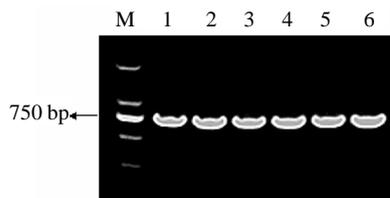


Figure 2. Optimization of annealing temperature of PPRV M. DNA Marker2000; 1 - 6: Annealing temperatures respectively are 53.0°C, 54.0°C, 55.0°C, 55.5°C, 56.0°C, 56.5°C

图 2. PPRV 的退火温度优化试验结果图 M. DNA 标准 DL2000; 1-6: 退火温度分别为 53.0°C, 54.0°C, 55.0°C, 55.5°C, 56.0°C, 56.5°C

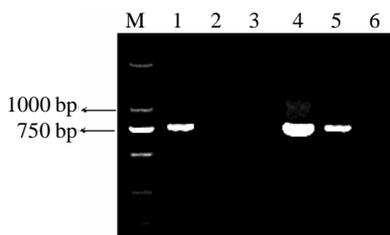


Figure 3. Specificity result of PPRV M. DNA Marker2000; 1. Pest des petits ruminants virus; 2. Canine distemper virus; 3. Newcastle disease virus; 4. Vaccine Nigeria75/1; 5. Positive control; 6. Negative control

图 3. PPRV 的特异性试验结果图 M. DNA 标准 DL2000; 1. 小反刍兽疫病毒; 2. 犬瘟热病毒; 3. 新城疫病毒; 4. 疫苗 Nigeria75/1 株; 5. 阳性对照; 6. 阴性对照

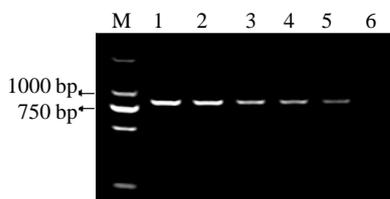


Figure 4. Sensitivity results of PPRV M. DNA Marker2000; 1 - 6 sample dilution respectively are: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} and 10^{-6}

图 4. PPRV 的敏感性试验结果图 M.DNA 标准 DL2000; 1~6 样品稀释度为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6}

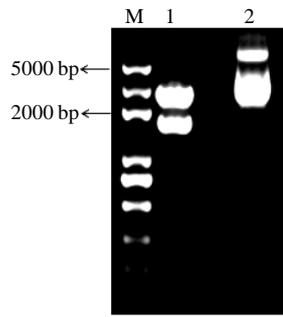


Figure 5. Dual-Enzyme digestion of N gene M. DNA Marker 5000; 1. dual-Enzyme digestion; 2. recombinant control
图 5. N 的双酶切鉴定图 M. DNA 标准 DL5000; 1. 双酶切; 2. 重组质粒对照

		Percent Identity																					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
Divergence	1	■	99.0	97.7	97.7	99.2	91.0	96.8	93.1	91.8	89.2	97.0	93.4	93.8	89.7	93.2	97.5	96.5	97.7	89.8	89.0	1	CH/BJ/2014.seq
	2	1.0	■	98.0	98.0	99.9	90.8	96.9	93.0	91.6	89.0	97.0	93.2	93.5	89.5	93.0	97.7	96.7	98.0	89.6	88.9	2	CH/GDDG/2014.seq
	3	2.4	2.1	■	99.9	98.1	91.1	97.3	93.1	92.3	89.2	97.5	93.5	94.0	89.9	93.2	98.0	97.0	99.9	90.0	89.0	3	CH/Tib/07.seq
	4	2.4	2.1	0.1	■	98.1	91.1	97.3	93.1	92.3	89.2	97.5	93.4	94.0	89.9	93.2	98.0	97.0	99.9	90.0	89.0	4	CH/TibetGeg07-30.seq
	5	0.8	0.1	0.9	1.9	■	90.8	97.0	93.2	91.8	89.0	97.1	93.3	93.6	89.9	93.2	97.7	96.7	98.1	89.6	88.9	5	CH/XJYL/2013.seq
	6	9.8	10.0	9.6	9.6	10.0	■	90.8	90.6	90.9	96.5	91.1	91.2	91.5	97.5	91.1	91.6	90.7	91.1	97.7	96.3	6	Ethiopia/1994.seq
	7	3.3	3.2	2.8	2.8	3.1	10.0	■	93.2	92.0	88.8	98.2	93.2	93.7	89.5	93.2	97.7	96.8	97.3	89.7	88.7	7	Ethiopia/2010.seq
	8	7.3	7.4	7.3	7.3	7.3	10.3	7.2	■	91.4	89.0	93.2	97.0	96.3	89.5	98.6	93.4	92.5	93.1	89.6	89.0	8	GhanaNK/2010.seq
	9	8.8	9.0	8.2	8.2	8.9	9.8	8.6	9.2	■	89.5	92.2	92.3	92.5	90.0	91.4	92.6	91.8	92.3	90.1	89.4	9	ICV89.seq
	10	11.9	12.1	12.0	12.0	12.1	3.6	12.5	12.2	11.6	■	89.2	89.4	89.8	94.7	89.4	89.6	88.7	89.2	94.9	99.5	10	KN5/2011.seq
	11	3.1	3.1	2.6	2.6	2.9	9.6	1.8	7.3	8.4	11.9	■	93.2	93.8	89.9	93.1	97.8	97.0	97.5	90.1	89.1	11	Morocco/2008.seq
	12	7.2	7.2	6.8	7.0	7.1	9.5	7.2	3.1	8.3	11.7	7.3	■	97.4	89.7	97.1	93.7	92.8	93.4	89.9	89.4	12	Ng76/1.seq
	13	6.6	6.9	6.3	6.3	6.8	9.2	6.7	3.9	8.0	11.2	6.6	2.7	■	90.4	96.4	94.0	93.3	94.0	90.5	89.8	13	Nigeria/75/1.seq
	14	11.3	11.6	11.1	11.1	11.6	2.5	11.5	11.6	11.0	5.5	11.0	11.3	10.5	■	89.9	90.4	89.5	89.9	99.7	94.7	14	OMan1983.seq
	15	7.2	7.4	7.2	7.2	7.3	9.7	7.2	1.4	9.2	11.7	7.4	3.0	3.7	11.1	■	93.4	92.4	93.2	90.0	89.4	15	SnDK11/13.seq
	16	2.5	2.3	2.0	2.0	2.3	9.0	2.4	7.0	7.9	11.5	2.2	6.6	6.3	10.4	7.0	■	99.0	98.0	90.6	89.4	16	Sungri/96MSD.seq
	17	3.6	3.4	3.1	3.1	3.4	10.1	3.3	8.1	8.9	12.5	3.1	7.6	7.1	11.5	8.1	1.0	■	97.0	89.7	88.5	17	Sungri96.seq
	18	2.4	2.1	0.1	0.1	1.9	9.6	2.8	7.3	8.2	12.0	2.6	7.0	6.3	11.0	7.2	2.0	3.1	■	90.1	89.0	18	TibetaBhara/2008.seq
	19	11.2	11.4	11.0	11.0	11.4	2.4	11.4	11.4	10.8	5.4	10.9	11.1	10.3	11.3	10.9	■	94.8	94.8	94.8	94.8	19	UAE1986.seq
	20	12.2	12.3	12.2	12.2	12.3	3.9	12.6	12.2	11.8	0.5	12.1	11.7	11.2	5.6	11.7	11.8	12.9	12.2	5.4	■	20	Uganda2012.seq

Figure 6. Comparison of nucleotide homology between isolated strains and different subtype reference strains
图 6. 分离毒株与各亚型参考毒株核苷酸同源性比较

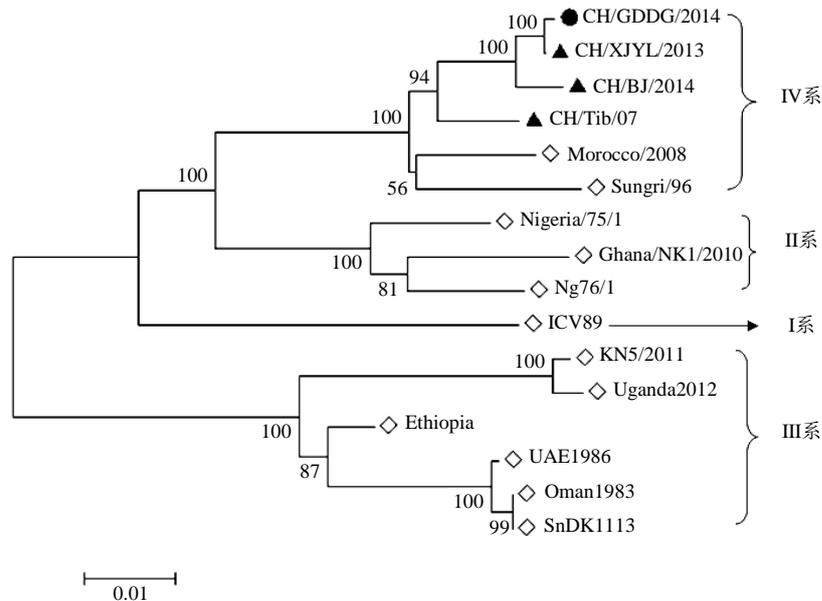


Figure 7. Phylogenetic tree analysis of N gene of isolated strains and reference strains
图 7. 分离毒株和参考毒株 N 基因系统进化树分析

4. 讨论

小反刍兽疫病毒作为我国的一类传染病之一，一年四季均可发生，以春冬季较为流行，其中绵羊最为敏感。该病主要通过呼吸道和消化道感染，其中发病羊群的眼、鼻、口腔分泌物和排泄物携带大量的病毒，可以传染健康的羊群[11]。同时被污染的饲料、食用的水和食用工具等都是重要的感染方式。该病对我国边境及内陆畜牧业存在着严重的威胁，因为牧群的跨国放牧运输，使得该疫病在防疫工作上存在一定的难度，如在 2007 年在我国西藏有报道，接着在新疆伊犁也出现流行，2015 年又在我国北京也有报道，给养殖业造成巨大的损失。

现阶段的 RT-PCR 对该病的检测方法很多，检测的基因有 N、P、F 和 M 等，为了更准确，快速，灵敏地检测出小反刍兽疫病毒，本研究参照(GB/T 27982-2011)的检测方法，通过扩增部分 N 基因，获得目的大小 351 bp，同时针对 P 基因设计了一对保守序列建立的 RT-PCR 方法，经试验表明其灵敏度高，特异性好，为快速准确检测小反刍兽疫病奠定了基础。

小反刍兽疫的结构蛋白中，N 蛋白非常保守，并且有很高的免疫原性，可以用来制备诊断抗原，但是 N 蛋白激活的抗体不能中和病毒[12]。此外 N 蛋白在病毒的复制和转录中也起到关键性的作用。本研究对 N 全基因序列进行分析，并以其他的麻疹病毒属进行核苷酸比对，结果表明本毒株与新疆伊犁，中国北京毒株序列的同源性高达 100%。近几年国内小反刍兽疫病在不断地暴发，且流行都为小反刍兽疫病毒基因 IV 系，目前本病尚无特制治疗方法。发病初期只能使用抗生素类药物控制继发感染[13]。该病一旦发现，必须进行严密性的封锁，扑杀患畜，彻底消毒。为了更好地对该病进行防范，应加大对该病研究力度，例如对该疫病的流行病学，免疫机制及疫苗等的研究势在必行，为更有效地控制该疫情的发生提供有力的保障[14]。

基金项目

广东省科技计划项目(No. 2014A070713021; No. 2014B040404061)、广东省农业科学院院长基金项目(No. 201531)。

参考文献 (References)

- [1] Özkul, A., Akca, Y., Alkan, F., Barrett, T., Karaoglu, T., Dagalp, S.B., *et al.* (2002) Prevalence, distribution and host range of *Peste des petits ruminants virus*, Turkey. *Emerging Infection Disease*, **8**, 708-712.
<http://dx.doi.org/10.3201/eid0807.010471>
- [2] Taylor, W. P. and Abegunde, A. (1979) The isolation of *peste des petits ruminants virus* from Nigerian sheep and goats. *Research in Veterinary Science*, **26**, 94-96.
- [3] Saravanan, P., Singh, R.P., Balamurugan, V., Dhar, P., Sreenivasa, B.P., Muthuchelvan, D., *et al.* (2004) Development of a N gene-based PCR-ELISA for detection of *peste-des-petits-ruminants virus* in clinical samples. *Acta Virologica*, **48**, 249-255.
- [4] 赵文华, 杨仕标, 蒋梅, 等 (2007) 小反刍兽疫病毒的 N、M、F 及 H 基因的序列测定和分析. *动物医学进展*, **11**, 8-11.
- [5] 刘文华, 等 (2010) 中国小反刍兽疫病毒分离株 China/Tib/07 全基因组序列测定与分析. *病毒学报*, **4**, 322-329.
- [6] 张玲, 包静月, 李林, 等 (2010) RT-PCR 鉴别小反刍兽疫病毒疫苗株与强毒株方法的建立. *动物医学进展*, **3**, 17-20.
- [7] Diallo, A. (2003) Control of *peste des petits ruminants*: Classical and new generation vaccines. *Developments in Biological (Basel)*, **114**, 113-119.
- [8] Obi, T.U. and Patrick, D. (1984) The detection of *peste des petits ruminants* (PPR) virus antigen by agar gel precipitation test and counter-immunoelectrophoresis. *Journal of Hygiene*, **93**, 579-586.
<http://dx.doi.org/10.1017/S0022172400065165>
- [9] Keita, D., de Almeida, R.S., Libeau, G. and Albina, E. (2008) Identification and mapping of a region on the mRNA of

Morbillivirus nucleoprotein susceptible to RNA interference. *Antiviral Research*, **80**, 158-167.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.06.006>

- [10] 毛立 (2010) 小反刍兽疫检测方法的建立和初步应用. 新疆农业大学, 乌鲁木齐, 85.
- [11] Bailey, D., Banyard, A., Dash, P., Ozkul, A. and Barrett, T. (2005) Full genome sequence of *peste des petits ruminants* virus, a member of the *Morbillivirus* genus. *Virus Research*, **110**, 119-124.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2005.01.013>
- [12] Haffar, A., Libeau, G., Moussa, A., Cécile, M. and Adama, A. (1999) The matrix protein gene sequence analysis reveals close relationship between *peste des petits ruminants* virus (PPRV) and dolphin morbillivirus. *Virus Research*, **64**, 69-75. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1702\(99\)00080-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1702(99)00080-5)
- [13] 李刚, 江彦增, 晁生玉, 张锦秀, 等 (2007) 小反刍兽疫快速诊断技术及其疫苗的研究进展. *中国畜牧兽医*, **5**, 81-83.
- [14] 沈德和, 等 (2014) 一例输入性山羊小反刍兽疫的处置体会. *畜禽业*, **12**, 8-9.