

黄允真, 董嘉文, 李林林, 等. 鸡源 Cluster3 坦布苏病毒宿主适应性相关毒力基因鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2026, 58 (10): 93–100.

Huang Y Z, Dong J W, Li L L, et al. Identification of virulence genes associated with host adaptation in chicken-origin Cluster3 Tembusu virus [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2026, 58 (10): 93–100.

鸡源 Cluster3 坦布苏病毒宿主适应性相关毒力基因鉴定

黄允真^{1,2}, 董嘉文², 李林林², 孙敏华², 刘永杰^{1*}

(1. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210014;

2. 广东省农业科学院动物卫生研究所, 广东 广州 510640)

摘要: 前期研究发现, 鸡源 Cluster3 坦布苏病毒 (TMUV) 对鸡感染性显著强于鸭源 Cluster2 TMUV。为了鉴定出影响鸡源 Cluster3 TMUV 对鸡感染性的关键毒力基因, 本研究将 Cluster3 TMUV GX 株上的部分基因替换为 Cluster2 TMUV JM 株对应的基因, 构建了一系列重组毒株, 通过雏鸡感染试验评估重组病毒对鸡的感染性。结果: 雏鸡感染重组病毒 GX-JME 和 GX-JMNS2A 3 d 后, 脾脏和脑组织中病毒 RNA 拷贝数显著低于亲本株 GX 感染组, 血清中病毒载量显著低于 GX 感染组; GX 感染组和 GX-JMNS2A 感染组脑组织转录组 KEGG 富集分析显示, 表达差异基因主要与吞噬体形成通路、谷胱甘肽代谢通路和免疫相关通路相关。综上, E 基因和 NS2A 基因是潜在的影响 TMUV 对鸡感染性的关键毒力基因, 本研究为 TMUV 的跨物种感染研究提供了参考。

关键词: 坦布苏病毒; 重组病毒; 转录组; 毒力基因

中图分类号: S852.65 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2026)10-0093-08

Identification of virulence genes associated with host adaptation in chicken-origin Cluster3 Tembusu virus

HUANG Yunzhen^{1,2}, DONG Jiawen², LI Linlin², SUN Minhua², LIU Yongjie^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210014, China;

2. Institute of Animal Health, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Chicken-origin Cluster3 Tembusu virus (TMUV) demonstrates significantly higher infectivity in chickens, compared with duck-origin Cluster2 TMUV. To identify the key virulence genes responsible for the infectivity of chicken-origin Cluster3 TMUV in chickens, this study constructed a series of recombinant strains by replacing specific genes of the Cluster3 TMUV GX strain with the corresponding genes from the Cluster2 TMUV JM strain. The infectivity of the recombinant viruses in chicks was evaluated through infection experiments. The results showed that, at 3 days post-infection (dpi), the viral RNA load in the spleen and brain of the chicks infected with the recombinant viruses GX-JME and GX-JMNS2A were significantly lower than those in the group infected with the parental GX strain. Furthermore, at 3 dpi, the viral loads in the serum of the GX-JME and GX-JMNS2A infection groups were significantly lower than that in the GX infection group. Transcriptomic KEGG enrichment analysis of the differentially expressed genes in the GX infection and GX-JMNS2A infection groups revealed that these genes were primarily associated with pathways related to phagosome formation, glutathione metabolism, and immune response. These results indicated that the E and NS2A genes were potential key virulence genes influencing TMUV infectivity in chickens; which provided important insights for research on TMUV cross-species infection.

Keywords: Tembusu virus; recombinant virus; transcriptome; virulence gene

坦布苏病毒 (Tembusu virus, TMUV) 属于黄病

毒科 (Flaviviridae) 正黄病毒属 (Orthoflavivirus) 成员。2010 年, 我国华东主要鸭养殖区相继暴发了 TMUV 引起的以蛋鸭产蛋下降、肉鸭生长迟缓、雏鸭共济失调、死淘率升高为主要特征的传染性疾病, 随后该病在我国迅速蔓延^[1]。此后一段时间内, 虽偶有蛋鸡感染 TMUV 引起产蛋下降的病例, 但都未引起流行, 进化分析表明, 引起这些病例的毒株均为 Cluster2 TMUV^[2]。2020 年在我国广西、福建、湖北、江苏和山东等省份相继报道了 TMUV 感染引起鸡产

收稿日期: 2025-11-03; 修回日期: 2026-08-03

基金项目: 广东省现代农业产业技术体系创新团队建设专项 (2024CXTD20); 广东省基础与应用基础研究基金项目 (2024A1515012732); 猪禽种业全国重点实验室 (广东省农业科学院) 2024 年度 PI 团队自主选题研究项目 (GDNKY-ZQQZ-K20)

第一作者: 黄允真, 男, 硕士

* 通信作者: 刘永杰, 教授, 研究方向为动物病原学, E-mail:

liuyongjie@njau.edu.cn。

蛋下降综合征的病例，遗传进化分析结果显示，这些样本中检出的 TMUV 均为 Cluster3^[3]。我们团队于 2020 年在来自广西患产蛋下降的产蛋鸡卵巢样品中分离了 1 株 TMUV GX 株，遗传进化分析表明其为 Cluster3 TMUV；致病性研究显示，鸡源 TMUV GX 株（Cluster3）和鸭源 TMUV JM 株（Cluster2）分别感染 SPF 鸡后，GX 株在鸡的肝、脾、肺、肾和脑组织中高水平复制，而 JM 株在各组织中的仅能低水平复制，且很快被清除，二者均能在 SPF 鸭体内高水平复制^[4]。本研究拟通过反向遗传构建一系列嵌合毒株，并评估嵌合病毒对雏鸡的感染性，以期筛选出影响 TMUV 对鸡感染性和致病性的关键毒力基因，为深入研究 Cluster2 和 Cluster3 TMUV 感染鸡的能力差异及 TMUV 的跨种传播机制提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 毒株、细胞、质粒及试验动物

TMUV GX 株和 TMUV JM 株由广东省农业科学院动物卫生研究所分离、鉴定、保存。BHK-21 细胞、LMH 细胞、质粒 pACYC-Duet1、pCI-neo、pT7T、pJET1.2 由广东省农业科学院动物卫生研究所禽病研究室保存。SURE 感受态细胞购自上海唯地生物技术有限公司。SPF 鸡购自大华农禽蛋有限公司。

1.2 主要试剂

2×Prime STAR[®] Max DNA 聚合酶、RNA 提取试剂 RNAiso 购自 Takara 公司。HiScript II One Step RT-PCR Kit 试剂、2×Taq Plus Master Mix（Dye Plus）、HiScript[®] II One Step qRT-PCR SYBR Green Kit 试剂盒、ClonExpress[®] II One Step Cloning Kit 试剂盒均购

自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

1.3 TMUV 反向遗传操作系统构建

TMUV GX 株感染性克隆的构建：分别从 pCI-neo 和 pT7T 质粒扩增 CMV 启动子、SV40 poly（A）和丁型肝炎核酶（HDV Rz）。如图 1 所示，利用无缝克隆方法将上述扩增元件克隆至 pACYC-Duet1 质粒，获得质粒 pACYC-CMV-Rz。使用表 1 中引物将 TMUV GX 株基因组分段扩增，获得覆盖基因组的 DNA 片段 P1、P2、P3、P4。将 P1、P2 和 P3、P4 进行融合 PCR，获得片段 P1/2、P3/4。将 P1/2、P3/4 和线性化的 pACYC-CMV-Rz 质粒进行无缝克隆连接，连接产物转化 SURE 感受态细胞。经菌落 PCR 鉴定、测序、质粒提取等步骤，获得 TMUV GX 株感染性克隆pACYC-TMUV-GX。

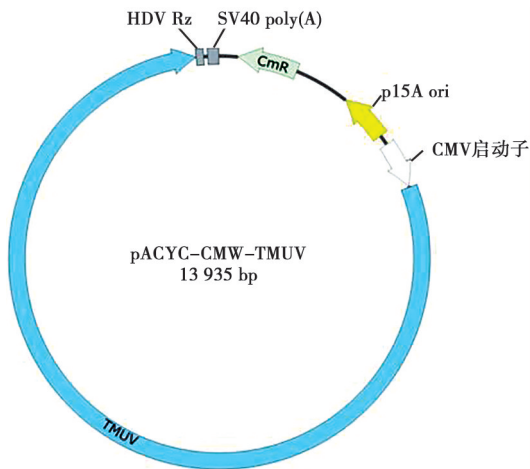


图 1 TMUV 感染性克隆质粒

表 1 用于 TMUV 感染性克隆构建的引物

引物名称	引物序列（5'→3'）	模板	片段	扩增长度/bp
GX1-F	AGAAGTTCATCTGTGTAACCT	GX 株 cDNA	P1	2 522
GX2522-R	AGATAAACATGCCTTGTCCG			
GX2427-F	ATTTTACTCTTCCTGGCAGT		P2	1 724
GX4149-R	AAAGGACTAGCAATTCCAACAG			
GX4135-F	AATTGCTAGTCCTTTGGTGT		P3	3 604
GX7738-R	CCGGTATTCCATGAAGCTCTT			
GX7605-F	CTCTGGCATGGACTATAACC		P4	3 390
GX10994-R	AGACTCTGTGTTCTACCAC			
CMV-TMUV-R	CACAGATGAAGTTCTCGGTTCACTAAACGAGCTCTG	pACYC-CMV-Rz	Line-pACYC	2 971
TMUV-Rz-F	TAGAACACAGACTCTGGGTCGGCATGGCATCTC			

病毒拯救：将感染性克隆 pACYC-TMUV-GX 转染至 BHK-21 细胞中，待细胞出现病变后收获培养

上清液，即为拯救的重组病毒 rGX。亲本株 GX 株和拯救株 rGX 株分别感染 BHK-21 细胞，收集不同时

间点细胞培养上清液，采用空斑试验测定病毒滴度，绘制病毒生长曲线。

1.4 TMUV GX 重组嵌合毒株构建及拯救

为了研究影响 Cluster3 TMUV 在鸡体内高水平复制的关键毒力基因，本研究将 GX 株的 E、NS1、NS2A、NS2B3、NS4A、NS4B、NS5 基因替换为鸭源 Cluster2 TMUV JM 株对应基因，构建重组嵌合毒株。以 JM 株 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，获得 TMUV JM 株 E、NS1、NS2A、NS2B3、NS4A、NS4B、NS5 基因 DNA 片段；采用 PCR 扩增的方法，将 pACYC-TMUV-GX 质粒按重组片段不同分别进行线性化。利用无缝克隆方法，获得重组感染性克隆 pACYC-GX-

JME、pACYC-GX-JMNS1、pACYC-GX-JMNS2A、pACYC-GX-JMNS2B3、pACYC-GX-JMNS4A、pACYC-GX-JMNS4B、pACYC-GX-JMNS5。将重组感染性克隆分别转染 BHK-21 细胞，转染 72 h 后细胞开始出现病变，待细胞约 80% 病变时，收获细胞培养上清液即为重组嵌合毒株 GX-JME、GX-JMNS1、GX-JMNS2A、GX-JMNS2B3、GX-JMNS4A、GX-JMNS4B、GX-JMNS5，于-80 ℃冻存。提取重组病毒 RNA，使用表 2 中引物进行 RT-PCR 扩增，扩增片段送至上海生工生物技术公司进行测序，以确认重组病毒是否正确拯救。

表 2 重组 TMUV 鉴定引物

引物名称	引物序列 (5'→3')	模板	扩增长度/bp
CMV-F	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG	pACYC-GX-JME	2 586
GX2522-R	AGATAAACATGCCTTGTCCG		
GX2427-F	ATTTTACTCTTCTCGGCAGT		
GX4149-R	AAAGGACTAGCAATTCCAACAG	pACYC-GX-JMNS1	1 724
GXNS1-F	GACATGGGTTGCTCAATCGAC	pACYC-GX-JMNS2A	1 737
JMNS2A-R	TCTCCGTGTCCTGGCTTC		
GX4135-F	AATTGCTAGTCCTTTGGTGT	pACYC-GX-JMNS2B3	3 604
GX7738-R	CCGGTATTCCATGAACTCTT		
GXNS3-F	GGAGGAGTCATCTGGGACG	pACYC-GX-JMNS4A	2 235
JMNS4A-R	TCTCTGCTCTCTGTTCTCG		
GXNS4A-F	TCAGCAATAGGGGTCCTTGAAG	pACYC-GX-JMNS4B	1 206
JMNS4B-R	ACGCAAGGTCCTGCCTG		
GX7605-F	CTCTGGCATGGACTATAACC	pACYC-GX-JMNS5	2 768
JMNS5-R	TTACAAAACACCTTCACTCCAG		

1.5 重组嵌合毒株的鸡体内感染性研究

为了筛选影响 TMUV 在鸡体内感染能力的关键毒力基因，本研究将重组嵌合毒株和亲本毒株分别感染 SPF 雏鸡，对比各重组嵌合毒株在鸡体内的复制能力差异，筛选出鸡源 TMUV 的关键毒力基因。60 只 7 日龄 SPF 雏鸡随机分为 10 组；各组分别以 1×10⁵ PFU/羽的剂量肌肉注射接种 TMUV GX、JM、GX-JME、GX-JMNS1、GX-JMNS2A、GX-JMNS2B3、GX-JMNS4A、GX-JMNS4B、GX-JMNS5，同时设立空白对照组。分别于感染 1、3 d 后，各组随机选取 3 只雏鸡实施人道主义安乐死。采集脾脏、脑组织和血清样品，放置于-80 ℃冰箱中，用于组织器官病毒载量和血清病毒载量测定。

1.6 病毒载量测定

血清中病毒载量测定采用空斑试验，脾脏和脑组

织病毒载量测定采用荧光定量 PCR (RT-qPCR)。处理冻存组织，使用 TRIzol 提取样品总 RNA，RNA 样品于-80 ℃冻存用于后续试验。根据 TMUV GX 株和 JM 株序列，分别设计相应的 RT-qPCR 引物，序列如表 3 所示。利用表中引物，PCR 分别扩增 TMUV GX 株和 JM 株 NS2A 片段，并将 NS2A 片段分别克隆至 pJET1.2 载体，获得用于病毒载量测定的标准品质粒 pJMNS2A 和 pGXNS2A。采用 RT-qPCR 方法测定组织器官病毒载量，具体步骤参见文献 [5]。

表 3 TMUV GX 株和 JM 株 qPCR 引物

引物名称	引物序列 (5'→3')	扩增长度/bp
qGX-NS2A-F	TGCTTTCAACATTCAGCCAGG	147
qGX-NS2A-R	GTTGAGCAATGTTGGCACGC	
qJM-NS2A-F	AAGTGGAGCAATCAGGAAAGC	171
qJM-NS2A-R	AAGTGGCAGAGCAAAGGAGC	

1.7 转录组差异表达分析

对于不同毒株感染组的脑组织，用 Oligo (dT) 磁珠对提取的组织样品总 RNA 进行 mRNA 富集。将 mRNA 进行随机打断，用 6 碱基随机引物合成 cDNA 第一链。使用 DNA 聚合酶合成 cDNA 第二链并纯化双链 cDNA。双链 cDNA 进行末端修复、加 A 尾并连接测序接头。用 AMPure XPbeads 筛选 cDNA 片段，随后 PCR 扩增得到最终的 cDNA 文库。文库送至中科新生命生物科技有限公司进行 Illumina 测序和生物信息学分析。

1.8 数据统计和分析

使用 GraphPad Prism 软件进行独立样本 *t* 检验分析数据，数据均表示为“平均值±标准差”。

2 结果

2.1 TMUV 感染性克隆构建

使用 TMUV GX 株 RNA 作为模板，分别扩增基因组 4 个片段 P1、P2、P3、P4，将 P1 与 P2、P3 与 P4 分别进行融合 PCR，获得融合片段 P1/2 和 P3/4。将构建的 pACYC-CMV-Rz 质粒进行 PCR 线性化，获得片段 Line-pACYC (图 2A)。

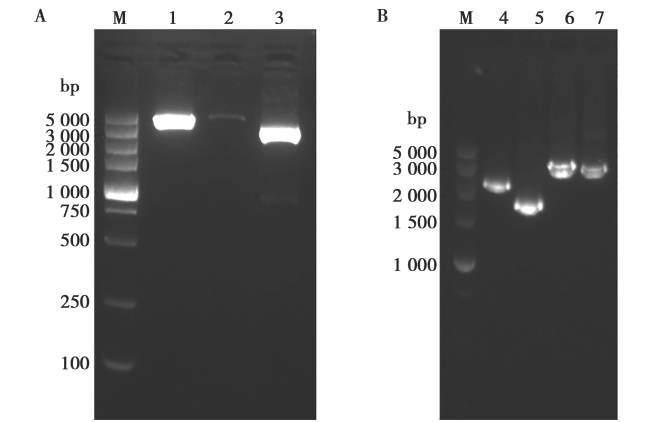
将获得的 P1/2、P3/4 和 Line-pACYC 进行无缝克隆连接，获得 TMUV 感染性克隆 pACYC-TMUV-GX，对质粒 pACYC-TMUV-GX 进行分段 PCR 扩增及测序。结果显示扩增得到大小分别为 2 522、1 798、3 604 和 3 390 bp 的 DNA 片段，与预期相符 (图 2B)；测序结果显示序列与亲本株基因组一致。

2.2 TMUV 病毒拯救

将感染性克隆 pACYC-TMUV-GX 转染至 BHK-

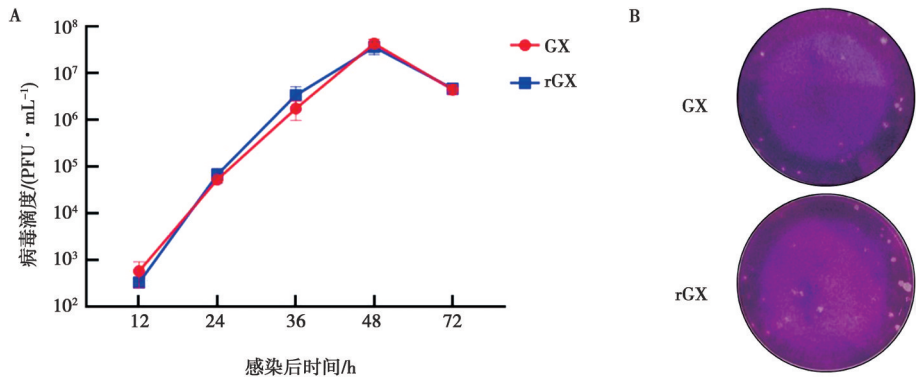
21 细胞，转染后 96 h，细胞开始出现变圆、皱缩、脱落等细胞病变效应，未转染的对照细胞状态良好。收获转染后的细胞上清液，接种 BHK-21 细胞进行病毒传代扩增。

将拯救毒株 rGX 与亲本毒株 GX 分别以感染比 (MOI) = 0.01 接种 BHK-21 细胞，在不同时间点收集培养上清液并分别测定病毒滴度，绘制生长曲线。结果如图 2 所示，拯救毒与亲本毒株在 BHK-21 细胞上有相同的生长动力学特性；将拯救毒 rGX 与亲本毒株 GX 感染 BHK-21 细胞 72 h 后形成的空斑形态相似。



M. 5 000 bp DNA Marker; 1. 片段 P1/2; 2. 片段 P3/4; 3. 片段 Line-pACYC; 4. 片段 P1; 5. 片段 P2; 6. 片段 P3; 7. 片段 P4。

图 2 pACYC-TMUV-GX 的构建 (A) 和 PCR 扩增 (B)



A. TMUV 在 BHK-21 细胞中的生长曲线; B. TMUV 感染 BHK-21 形成的空斑。

图 3 重组病毒的生长特性

2.3 TMUV 重组嵌合毒株构建

鸡源 Cluster3 TMUV GX 株能在鸡体内高水平复制并引起脏器病变，而鸭源 Cluster2 TMUV JM 株仅

能在鸡体内低水平复制，且很快被清除。为筛选出 Cluster3 TMUV 在鸡体内高水平复制的关键毒力基因，本研究以感染性克隆 pACYC-TMUV-GX 为骨架，将

其上的 E、NS1、NS2A、NS2B3、NS4A、NS4B、NS5 基因替换为 JM 株对应基因，获得重组 TMUV 感染性克隆。将重组 TMUV 感染性克隆分别转染 BHK-21 细胞，拯救出重组嵌合毒株 GX-JME、GX-JMNS1、GX-JMNS2A、GX-JMNS2B3、GX-JMNS4A、GX-JMNS4B、GX-JMNS5。提取重组嵌合病毒 RNA，利用表 2 中所示引物对相应的重组嵌合病毒进行 PCR 鉴定（图 4）。获得的 PCR 片段经上海生工生物技术有限公司测序，确认成功拯救出目标重组嵌合病毒。

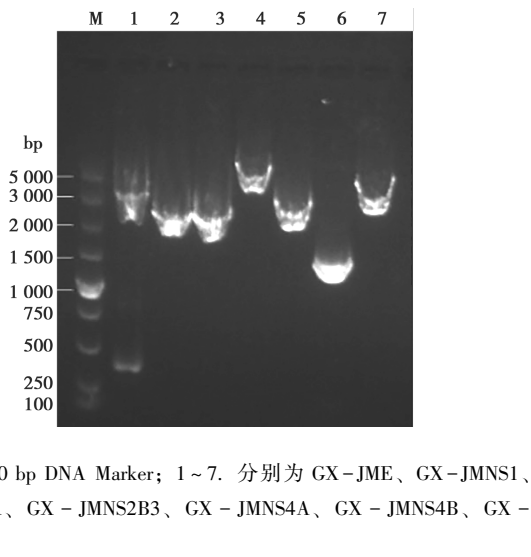


图 4 重组病毒 PCR 鉴定结果

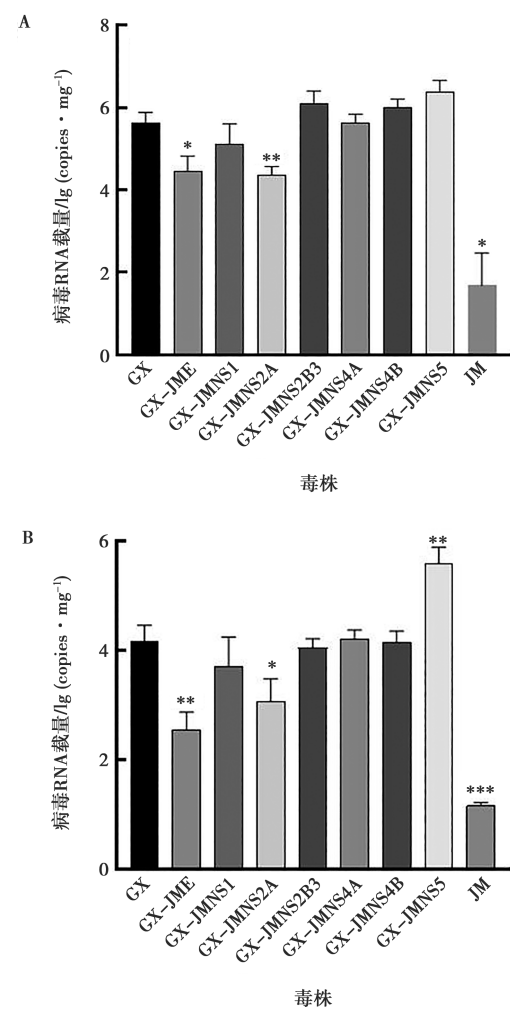
2.4 重组嵌合毒株对鸡致病性研究

为了筛选出 Cluster3 TMUV 在鸡体内高水平复制的关键毒力基因，将拯救的重组嵌合病毒 GX-JME、GX-JMNS1、GX-JMNS2A、GX-JMNS2B3、GX-JMNS4A、GX-JMNS4B、GX-JMNS5 以及亲本毒株 GX 和 JM 分别以 1×10^5 PFU/羽的剂量经肌肉注射接种 7 日龄 SPF 雏鸡。

感染后第 3 天，每组随机选取 3 只雏鸡采集脾脏和脑组织，采用 RT-qPCR 方法检测组织中的病毒 RNA 载量。结果如图 5 所示，GX-JME 和 GX-JMNS2A 感染组脾脏和脑组织中病毒 RNA 载量显著低于 GX 感染组，但 GX 感染组显著高于 JM 感染组；脑组织中 GX-JMNS5 感染组病毒 RNA 载量显著高于 GX 感染组；其余重组病毒感染组的病毒 RNA 载量与 GX 感染组无显著差异。

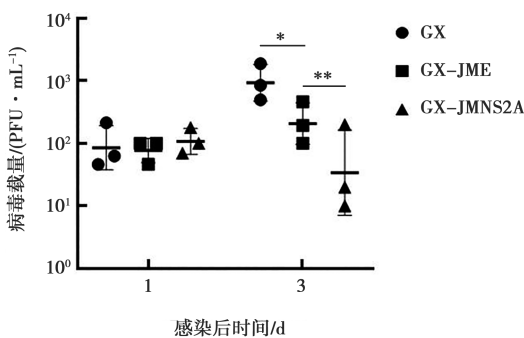
进一步比较 GX、GX-JME 和 GX-JMNS2A 感染组鸡血清中病毒载量，结果如图 6 所示。在感染后第 3 天，GX-JME 感染组血清病毒载量显著低于 GX 感染组（ $P < 0.05$ ）；GX-JMNS2A 感染组血清病毒载量

显著低于 GX-JME 感染组（ $P < 0.01$ ）。



注：与 GX 感染组比较，* 表示 $P < 0.05$ ，* * 表示 $P < 0.01$ ，* * * 表示 $P < 0.001$ 。

图 5 雏鸡感染重组 TMUV 后第 3 天脾脏（A）和大脑（B）组织中病毒载量



注：* 表示 $P < 0.05$ ；* * 表示 $P < 0.01$ 。

图 6 雏鸡感染重组 TMUV 后血清病毒载量

2.5 转录组表达差异分析

重组嵌合毒株的鸡体内感染性研究结果显示，NS2A 是影响 TMUV 在鸡体内感染能力的关键毒力基因。本研究将 GX 感染组、GX-JMNS2A 感染组和未感染对照组感染后第 1 天的脑组织样品进行转录组差异表达分析。

2.5.1 差异基因分析

以 $P \leq 0.05$ 和 $|\log_2[FC]| \geq 1$ 作为筛选差异表达基因的标准，分别对 GX 感染 *vs* 对照比较组、GX-JMNS2A 感染 *vs* 对照比较组、GX 感染 *vs* GX-JMNS2A 感染比较组差异基因进行聚类分析。结果如

图 7 所示，GX 感染 *vs* 对照比较组共 458 个差异表达基因，其中上调差异基因 296 个，下调差异基因 162 个；GX-JMNS2A 感染 *vs* 对照比较组共 295 个差异表达基因，其中上调差异基因 194 个，下调差异基因 101 个；GX 感染 *vs* GX-JMNS2A 感染比较组共 104 个差异表达基因，其中上调差异基因 20 个，下调差异基因 84 个。

2.5.2 差异基因 KEGG 富集分析

利用 KEGG 数据库，对 GX 感染 *vs* GX-JMNS2A 感染比较组的差异表达基因进行富集分析。图 8 挑选了富集显著的 Top20 通路条目进行展示。

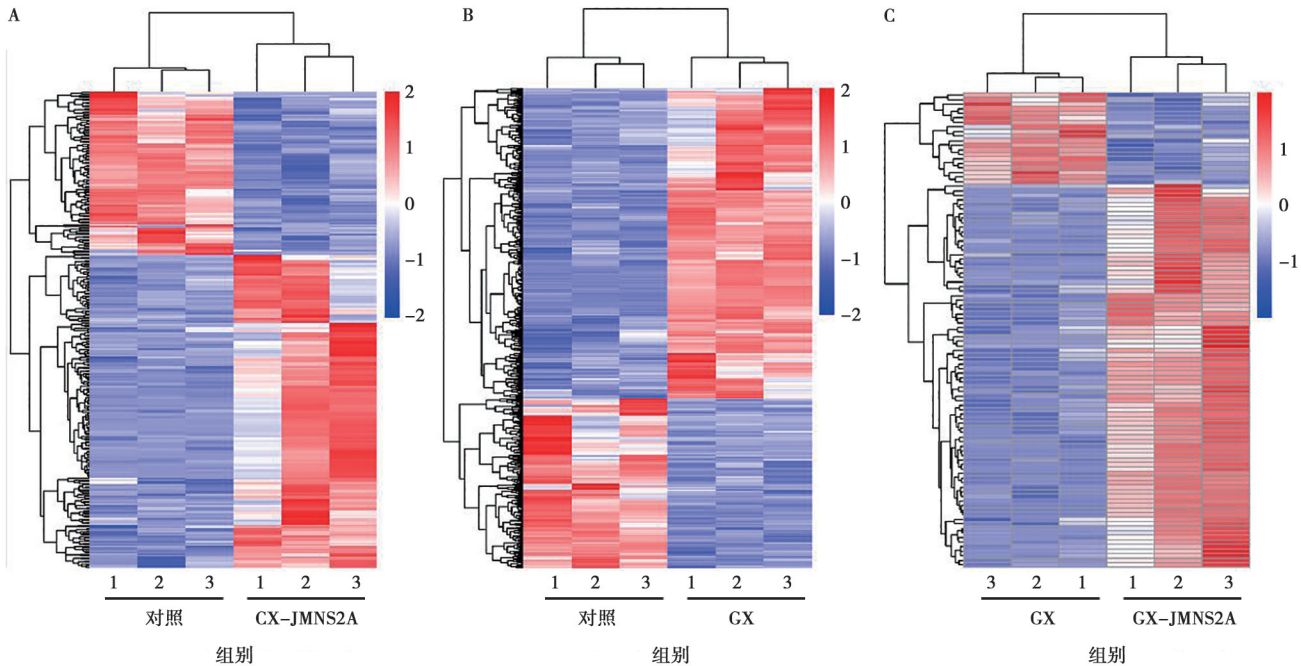


图 7 差异基因聚类分析

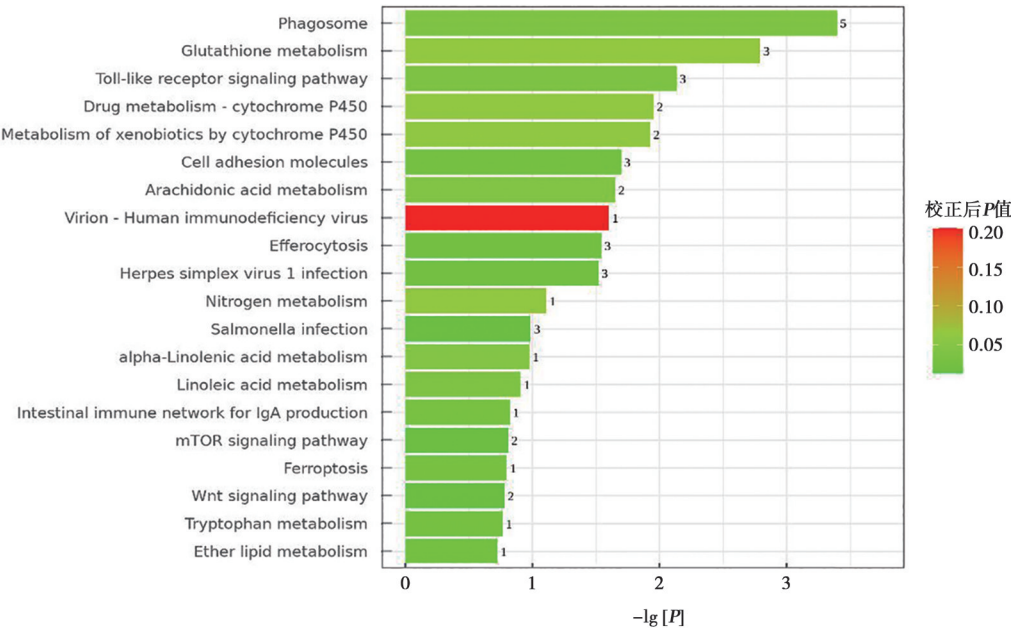


图 8 KEGG 富集分析

Top20 通路条目中,吞噬体形成 (Phagosome) 通路差异的基因有巨噬细胞甘露糖受体 1 样蛋白 4 (MMR1L4)、主要组织相容性复合体 II 类 β 链 (BLB2)、Toll 样受体 2 家族成员 B (TLR2B)、Toll 样受体 2 家族成员 A (TLR2A)、 H^+ 转运 ATP 酶 V1 亚基 G3 (ATP6V1G3); 谷胱甘肽代谢 (glutathione metabolism) 通路差异的基因有谷胱甘肽 S-转移酶 $\alpha 4$ (GSTA4)、造血型前列腺素 D 合成酶 (HPGDS)、谷胱甘肽特异性 γ -谷氨酰环转移酶 1 (CHAC1); 免疫相关通路差异的基因有 AP-1 转录因子亚基 (FOS)、C-C 趋化因子受体 2 (CCR2)、TLR2A、TLR2B 和 BLB2。

3 讨论

黄病毒的致病性与其编码的各个蛋白都紧密相关,为了初步筛选影响 TMUV 对鸡致病性和感染性的病毒基因,本研究将鸡源 Cluster3 TMUV GX 株其上的 E、NS1、NS2A、NS2B3、NS4A、NS4B、NS5 基因逐个替换为鸭源 Cluster2 TMUV JM 株对应的基因,构建了重组 TMUV。雏鸡体内感染试验结果表明, E 基因和 NS2A 基因是潜在的影响 TMUV 对鸡感染性的关键毒力基因。值得注意的是,黄热病毒 (YFV) 17D 疫苗株的毒力减弱同样与 E 基因和 NS2A 基因的突变密切相关,将这些突变引入 YFV Asibi 强毒株基因组的感染性克隆中,可降低病毒对小鼠的致病力^[6]。

黄病毒 E 蛋白,即囊膜蛋白,介导病毒与细胞受体结合,对病毒的嗜性及致病性至关重要。如登革病毒 1 型 (DENV-1) E 蛋白的 3 个哺乳动物适应性突变 (I324V、L351V 和 I380V) 能显著提高病毒与哺乳动物宿主细胞的结合能力,进而增强了 DENV-1 对哺乳动物的感染能力^[7]。一项对 TMUV 传代弱毒株与亲本株的比较研究显示,弱毒株 T367K 点突变增强了病毒与细胞表面糖胺聚糖 (GAG) 的结合能力,加速了病毒从血液中清除,降低了皮下接种鸭的病毒血症水平和主要靶器官的复制效率^[8]。Cluster2 TMUV 的 E 蛋白受体结合区与近年流行的 Cluster3 TMUV 存在 7 个共性氨基酸差异位点。这些位点的改变是否影响了 E 蛋白与鸡细胞相关受体的亲和性,进而影响了病毒对鸡的感染性,有待进一步研究。

黄病毒 NS2A 定位于内质网,是一种疏水性跨膜蛋白,在病毒 RNA 合成、病毒组装、逃避宿主免疫反应和致病性方面发挥重要作用。黄病毒 NS2A 对病毒致病性的影响是多方面的。例如寨卡病毒 (ZIKV) NS2A 通过劫持宿主 E3 泛素连接酶 AMFR,进而抑制宿主细胞选择性内质网自噬,增强病毒在小鼠模型中

的致病性,这种作用在其他黄病毒,包括 DENV、西尼罗病毒 (WNV) 和日本脑炎病毒 (JEV) 的 NS2A 蛋白中具有保守性^[9]。Cluster2 TMUV NS2A 蛋白通过与 TBK1 竞争性结合 STING 来抑制 β 干扰素 (IFN- β) 信号通路,减弱了对鸭的致病性^[10]。ZIKV NS2A A117V 突变使其在体外可降低宿主先天免疫反应和病毒诱导的细胞凋亡^[11]。

为进一步了解 NS2A 蛋白影响病毒对鸡感染性的分子机制,本研究对 GX 感染组、GX-JMNS2A 感染组感染后第 1 天的脑组织样品进行转录组差异表达分析。KEGG 富集分析结果显示,富集最显著的信号通路为吞噬体形成通路、谷胱甘肽代谢通路和免疫相关通路。吞噬体形成通路中差异表达基因 BLB2,即主要组织相容性复合体 (MHC) II 类 β 链,分布于抗原递呈细胞,与 α 链结合形成 MHC II 类分子,将外源性抗原肽递呈给 $CD4^+$ T 细胞。与 GX-JMNS2A 感染组相比, GX 感染组 BLB2 基因转录水平显著下调。有研究表明,病毒能通过抑制 MHC-II α 和 MHC-II β 的表达影响抗原呈递过程^[12]。与 GX-JMNS2A 感染组相比, GX 感染组 GSTA4 基因转录水平显著下调。GSTA4 基因,即谷胱甘肽 S-转移酶 $\alpha 4$ (GSTA4),定位于谷胱甘肽代谢通路中,主要参与氧化应激反应、解毒过程和炎症反应^[13-14],而 GSTA4 对病毒复制的影响仍有待研究。

4 结论

本研究成功构建了 Cluster3 TMUV 和 Cluster2 TMUV 的重组嵌合病毒,通过体内感染试验,筛选出的 TMUV E 基因和 NS2A 基因是影响病毒在鸡体内感染能力的关键毒力基因。GX 和 GX-JMNS2A 感染组宿主差异表达基因的 KEGG 富集分析显示,这些差异基因主要与吞噬体形成通路、谷胱甘肽代谢通路和免疫相关通路相关。

参考文献:

- [1] 张英. 坦布苏病毒在种鸭中垂直传播及其对种鸭的致病性研究 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2015.
- [2] Xu T, Liu X, Liu Q, et al. Effect of experimental infections of various Tembusu virus strains isolated from geese, ducks and chickens on ducklings [J]. Pol J Vet Sci, 2018, 21 (2): 389-396.
- [3] 刘东, 刘红祥, 刘秋云, 等. 引起肉种鸡产蛋下降的新型坦布苏病毒的分离和鉴定 [J]. 中国兽医学报, 2021, 41 (11): 2114-2120.
- [4] Huang Y, Hu Z, Dong J, et al. Chicken-origin Cluster 3.2 Tembusu virus exhibits higher infectivity than duck-origin Cluster 2 Tembusu virus in chicks [J]. Front Vet Sci, 2023, 10: 1152802.
- [5] Huang Y, Liu Z, Zhang J, et al. Evaluation of Tembusu virus single-

round infectious particle as vaccine vector in chickens [J]. Vet Microbiol, 2024, 298: 110270.

[6] Zhang J, Chavez E C, Winkler M, et al. Amino acid changes in two viral proteins drive attenuation of the yellow fever 17D vaccine [J]. Nat Microbiol, 2025, 10 (8): 1902–1917.

[7] Jiang T, Huang C, Ruan Q, et al. Envelope domain III E₃₂₄, E₃₅₁, and E₃₈₀ mutations lever adaptive evolution of DENV-1 genotype I [J]. J Virol, 2024, 98 (10): e01183–24.

[8] Sun M, Zhang L, Cao Y, et al. Basic amino acid substitution at residue 367 of the envelope protein of tembusu virus plays a critical role in pathogenesis [J]. J Virol, 2020, 94 (8): e02011 – e02019.

[9] Zhang L, Qin Y, Chen M. Flavivirus NS2A orchestrates reticulophagy to enhance viral pathogenicity [J]. Autophagy, 2025, 21 (5): 1167–1168.

[10] Zhang W, Jiang B, Zeng M, et al. Decreased virulence of duck Tembusu virus harboring a mutant NS2A with impaired interaction with STING and IFN β induction [J]. Vet Microbiol, 2022, 265: 109312.

[11] Ávila-Pérez G, Nogales A, Park J C, et al. A natural polymorphism in Zika virus NS2A protein responsible of virulence in mice [J]. Sci Rep, 2019, 9 (1): 19968.

[12] Lu X, Li W, Guo J, et al. N protein of viral hemorrhagic septicemia virus suppresses STAT1-mediated MHC class II transcription to impair antigen presentation in sea perch, *Lateolabrax japonicus* [J]. J Immunol, 2022, 208 (5): 1076–1084.

[13] Wróblewska J, Wróblewski M, Hołyńska-Iwan I, et al. The role of glutathione in selected viral diseases [J]. Antioxidants, 2023, 12 (7): 1325.

[14] Ma X, Zhao H, Song J K, et al. Retracing from outcomes to causes: NRF2-driven GSTA4 transcriptional regulation controls chronic inflammation and oxidative stress in atopic dermatitis recurrence [J]. J Invest Dermatol, 2025, 145 (2): 334–345. e11.

• 信息 •

