

猪瘟病毒石门株与兔化弱毒株 E0 糖蛋白基因的 克隆及序列分析*

王家富 张楚瑜** 王 宁 傅烈振 黄茜华

(武汉大学病毒研究所 武汉 430072)

摘 要:参考已发表的猪瘟病毒序列,设计并合成了一对引物,应用 RT-PCR 技术,扩增了猪瘟兔化弱毒(Hog cholera virus lapinized Chinese strain, HCLV)和石门强毒株的 E0 糖蛋白基因,并将其克隆到 pGEM-T 载体中,测定了其核苷酸序列,并推导了其氨基酸序列。结果表明我国这两株强弱不同毒株 E0 糖蛋白核苷酸序列同源性和推导的氨基酸序列源性分别为 95.0% 和 94.3%,有 13 个氨基酸的差异,HCLV 比石门株多了一个潜在的 N-糖基化位点。将我国这两株病毒与国外已报导的 HCV 毒株 E0 基因序列进行了比较,发现石门株与日本的两株毒株 ALD 和 GPE⁻ 同源性较高,核苷酸序列源性分别为 97.4% 和 96.5%,氨基酸源性分别为 97.4% 和 96.0%,而与欧洲 Brescia 株和 Alfort 株同源性较低,核苷酸源性分别为 92.2% 和 86.5%,氨基酸源性为 95.2% 和 92.5%,HCLV 与 ALD、GPE⁻、Brescia、Alfort 株核苷酸源性分别为 95.6%、94.9%、91.3%、85.5%,推导的氨基酸源性分别为 93.4%、92.5%、91.6%、90.7%。HCV E0 糖蛋白序列都具有地衣类与植物核苷酸酶(RNase)家族的最保守序列,催化活性的重要氨基酸残基位于 28~40,71~89 位的氨基酸。

关键词:猪瘟病毒, E0 基因, 克隆, 序列分析

中图分类号:S852.65 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209(2000)01-0032-37

猪瘟是由猪瘟病毒(Hog cholera virus, HCV)引起的一种猪高度接触性传染病,对养猪业危害严重,是世界粮农组织和各国政府严密监控和检疫的主要传染病之一。HCV 与牛病毒性腹泻病毒(Bovine viral diarrhea virus, BVDV)和羊边界病毒(Border disease virus, BDV)同属于黄病毒科瘟病毒属。HCV 基因组为单股正链 RNA 分子,总长约 12.3kb,含有一个大的开放阅读框架(ORF),编码 3898 个氨基酸组成的多聚蛋白,在病毒和宿主细胞酶的作用下加工成 11 种结构蛋白和非结构蛋白^[1]。HCV 编码三种糖蛋白 E0, E1, E2,其中 E0 和 E2 可介导 HCV 的免疫中和反应^[2-3]。E0 糖蛋白从 ORF 上第 268 个氨基酸开始到第 494 个氨基酸为止,共编码 227 个氨基酸,依靠二硫键的连接以同源二聚体的形式存在,分子量为 97kD。E0 糖蛋白不具备跨膜区,以一种未知的机制连接到病毒粒子表面,它从受感染的细胞中分泌到胞外。E0 糖蛋白具备地衣类与植物核苷酸酶家族的特征基序^[4]。

中国猪瘟兔化弱毒(HCLV)是我国唯一一株经批准用于生产的弱毒疫苗,其产生免

* 国家攀登计划 B 类项目 85-41 子专题资助课题

** 联系作者

作者简介:王家富(1972-),男,湖北武汉人,武汉大学生命科学学院讲师,博士,主要从事猪瘟病毒研究

收稿日期:1998-09-07,修回日期:1999-01-19

疫力快,对种猪、乳猪无残余毒力,免疫猪可以抵抗不同来源的猪瘟强毒株的攻击,并有坚强持久的免疫性,是世界上公认的最有效和安全的弱毒疫苗,在国内外被广泛应用,对猪瘟的控制起到了重要的作用。HCV 石门毒株是 1945 年在石家庄解放区分离的,是我国生产灭活苗和攻毒用的标准 HCV 强毒株。本研究利用 RT-PCR 的方法,扩增并克隆了国内标准强毒株石门株和兔化弱毒疫苗株 E0 基因,并进行了序列分析。

1 材料和方法

1.1 试剂

Total RNA Isolation Reagent kit, pGEM-T 载体, WizardTM Plus Minipreps DNA purification Systems 均购自 Promega 公司, AMV 逆转录酶, dNTPs, Taq 聚合酶等购自德国宝灵曼公司。

1.2 病毒的来源

HCLV 和石门强毒 AV1411 均购自中国兽药监察所。

1.3 方法

1.3.1 病毒的增殖:由湖北省生物制品厂完成 HCLV 在兔体内的增殖,本实验采取的是 482 代兔脾组织毒。石门强毒株接种猪瘟非免疫猪,在体内完成病毒的增殖,然后前腔静脉采取抗凝血, -30℃ 冻存。

1.3.2 引物设计:根据已发表的 HCV 基因组核苷酸序列^[5-7],用 Primer 软件设计了 1 对引物。引物 A:(位于 846~865)5' TCACCGACTGTCCATTGTGG 3',引物 B:(位于 2484~2504) 5' CAAGTAGCCCTATCTCATCGG 3',引物间跨距 1659bp,包含完整的 E0 基因。引物由上海生工公司合成。

1.3.3 HCV 病毒 RNA 的提取:参考 Promega 公司 RNA 提取试剂盒操作手册。

1.3.4 RT-PCR 反应:逆转录反应总 RNA 量为 1.5μg, AMV 反转录酶 2.5u,总体积 20μL, 42℃ 水浴 1h,用 2μL 反转录产物为模板,进行 PCR 循环。PCR 反应条件为 94℃ 40s, 52℃ 50s, 72℃ 120s, 扩增 35 个循环,最后 72℃ 延伸 7min。扩增产物在 2% TAE 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.5 特异扩增片段的克隆及序列测定:用 Clontech 公司的 Advantage PCR kit 纯化扩增片段后与 T 载体连接过夜,转化后筛选出阳性质粒。用 Promega 公司的小量提取质粒试剂盒纯化模板,序列测定由加拿大真达公司和美国赛百盛生物公司完成。

1.3.6 序列分析和同源性比较:采用 DNASIS 和 PROSIS 软件分析。

2 结果

2.1 HCLV 和石门强毒株 E0 糖蛋白基因的核苷酸序列

利用 RT-PCR 的方法成功扩增了含有石门株和 HCLV E0 糖蛋白基因的片段,长约 1.66kb,其核苷酸序列如图 1(两侧的序列略)。两者核苷酸同源性为 95.0%,有 34 个核苷酸的差异,石门株与日本的两株毒株的 ALD、GPE⁻ 同源性较高,分别为 97.4% 和 96.5%,与欧洲 Brescia 和 Alfort 株同源性较低,分别为 92.2% 和 86.5%,HCLV 与 ALD 和 GPE⁻ 的核苷酸同源性也较高,分别为 95.6% 和 94.9%,与 Brescia 和 Alfort 株的同源

性分别为 91.3% 和 85.5%。

SHIMEN	GAAAATATAA CTCAATGGAA CCTGAGCGAT AACGGCACTA ATGGTATTCA	050
HCLVT..C.....C..	
SHIMEN	GCATGCTATG TACCTTAGAG GGGTTAGTAG AAGCTTGCAT GGGATCTGGC	100
HCLVAC.....	
SHIMEN	CGGAAAAAAT ATGCAAAGGA GTCCCCACCT ACCTGGCCAC AGACACGGAA	150
HCLV	...GG.....A...C.....GT...G	
SHIMEN	CTGAAAGAAA TACAGGGAAT GATGGATGCC AGCGAGGGGA CAAACTATAC	200
HCLV	
SHIMEN	GTGCTGTAAG TTACAGAGAC ATGAATGGAA CAAACATGGA TGGTGTAACT	250
HCLV	
SHIMEN	GGTACAATAT AGACCCATGG ATACAGCTGA TGAATAGAAC CCAAGCAAAC	300
HCLV	..C.....C.....G..	
SHIMEN	TTGGCAGAAG GCCCTCCGGC CAAGGAGTGC GCTGTGACTT GCAGGTACGA	350
HCLVT.....	
SHIMEN	TAAAGATGCC GACATCAACG TGGTCACCCA GGCCAGAAAC AGGCCAACAA	400
HCLVT.....T.....	
SHIMEN	CCCTGACCGG CTGTAAGAAA GGAAAAAATT FTTCTTTTGT GGGTACAATT	450
HCLVC.....G.....C.....G..	
SHIMEN	ATAGAGGGCC CATGTAATTT CAATGTTTCC GTGGAGGATA TCTTGTACGG	500
HCLVA.....C.....T..	
SHIMEN	GGATCATGAG TGCGGCAGTT TGCTCCAGGA CACGGCTCTG TACCTAGTAG	550
HCLVA.....G.A.....	
SHIMEN	ATGGAATGAC CAACACTATA GAGAATGCCA GACAGGGAGC AGCCAGGGTA	600
HCLV	..A.....G.....G	
SHIMEN	ACATCTTGGC TCGGGAGGCA ACTCAGCACT GCCGGGAAGA GGTGGAGGG	650
HCLVT.....	
SHIMEN	TAGAAGCAAA ACCTGGTTTG GTGCCTATGC C 681	
HCLVC..T.....	

图 1 HCLV 和石门株 E0 基因核苷酸序列比较

Fig. 1 Comparison of nucleotide sequences of E0 gene of HCLV and virulent strain Shimen

2.2 HCLV 和石门强毒株 E0 糖蛋白氨基酸序列与国外报导的 4 株 HCV 序列同源性比较

根据所测的石门株和 HCLV 两株 E0 糖蛋白核苷酸序列, 推导了其氨基酸序列, 并与国外已报导的几株 HCV 序列进行了比较(图 2)。结果表明: 石门株和 HCLV E0 氨基酸同源性为 94.3%, 两者有 13 个 aa 的差异, HCLV 比石门株多一个 N-糖基化位点。石门株与日本的两株毒株 ALD、GPE⁻ 氨基酸同源性较高, 分别为 97.4% 和 96.0%, 而与欧洲的两株强毒株 Brescia 和 Alfort 株同源性较低, 分别为 95.2% 和 92.5%, HCLV 与 ALD、GPE⁻、Brescia 和 Alfort 株的氨基酸同源性分别为 93.4%、92.5%、91.6%、90.7%。E0

基因序列中所有半胱氨酸的数量和位置都非常保守,这可能是维持其蛋白空间构型所必需的。

SHIMEN	ENITQWNLSDNGTNGIQHAMYLRGVSRSLHGIVPEKICKGVPTYLATDTTELKEIQGMMDA	060
HCLV N..... G..... H..... V.....	
ALD I.....	
GPE ⁻ L.....	
Brescia R..... R..... V.....	
Alfort R..... N..... H..... R.....	
SHIMEN	SEGTNYTCCKLQRHEWVKHGWCNWNIDPWIQLMNRTQANLAEGPPAKECAVTCRYDKDA	120
HCLV H..... D..... V.....	
ALD	
GPE ⁻	.. R..... S..... D.....	
Brescia S..... N.....	
Alfort	.. R..... R..... T..... T..... D..... NT	
SHIMEN	DINVVTQARNRPTTLTGCKKGNFSFVGTIIEGPCNFNVSVEDILYGDHECGSLLQDTAL	180
HCLV A..... V..... S..... T..... A.....	
ALD	. V..... A..... V.....	
GPE ⁻	. V..... A..... V.....	
Brescia T..... A..... V.....	
Alfort	. V..... A..... V.....	
SHIMEN	YLVDMTNTIENARQGAARVTSWLGRQLSTAGKRLEGRSKTWFGAYA	227
HCLV	... E.....	
ALD RI.....	
GPE ⁻ RI.....	
Brescia R..... RI.....	
Alfort	.. L..... K..... R.....	

图 2 石门株和 HCLV E0 糖蛋白基因氨基酸序列与国外四株 HCV 序列同源性比较

Fig. 2 Comparison of deduced amino acid sequences of E0 gene of HCLV and strain Shimen with other four foreign HCV strains

2.3 E0 糖蛋白核苷酸酶活性区氨基酸序列比较

通过计算机分析,发现 E0 糖蛋白推导的氨基酸序列中有地衣类与植物核苷酸酶家族的特征序列,E0 序列中有两个区域与细胞外核苷酸酶,如硫胺素曲霉 T2(*Aspergillus oryzae* T2)、雪白根霉 Rh(*Rhizopus nivenus* Rh),及植物自我不适应型核苷酸酶,如翅形烟草(*Winged nicotine alata*)的 S-糖蛋白(Stylar glycoprotein)保守区域相似。尽管此序列相似性仅局限于 E0 中的两个小区域,但它们包含了维持催化活性所必需的氨基酸残基

(氨基酸 28~40, 71~89), 催化活性的氨基酸为 His³⁰, His⁷⁹(图 3)。

Box A			Box B		
SHIMEN	28	SLHGIWPGKICKG	SHIMEN	71	LQRHEWNKKGWCNWHNIDP
HCLV	28	SLHGIWPEKICKG	HCLV	71	LQRHEWNKKGWCNWNIDP
BVDV	28	SLHGIWPEKICTG	BVDV	71	LQRHEWNKKGWCNWNINIEP
RH	60	TLHGLWPKD-CSG	RH	117	FWSHEWSKKGTC-VSTYDP
T2	68	TLHGLWPDN-CDG	T2	124	FWEHEWNKKGTC-INTIEP
St	51	TLHGLWPDN----	St	105	FWKDEYVKKGTC-----

图 3 E0 糖蛋白核苷酸酶序列与地衣类和植物核苷酸酶的比较

(Box A 和 Box B 表示核苷酸酶活性区, 阴影部分表示催化活性的氨基酸)

Fig. 3 Sequence similarities between E0 gene of HCV and fungal and plant RNase. Alignments of the most conserved regions (homology Box A and B) within the family of known RNase and corresponding regions in E0 are shown. Shaded boxes indicate residues reported to be involved in catalysis.

3 讨论

E0 是 HCV 的一个重要蛋白, 在长期的进化中仍保持 RNase 活性, 其 RNase 具有多种功能, 与许多生物过程有关。E0 可抑制多种动物淋巴细胞的蛋白合成及引起淋巴细胞的凋亡^[8], HCV 感染的猪存在白细胞减少和免疫抑制, 这些结果提示 E0 在 HCV 的致病过程中起着重要的作用。E0 的 RNase 活性研究可能为猪瘟的防制开辟了一条新的途径。

本文利用 RT-PCR 的方法, 扩增并克隆了 HCLV 和石门强毒株完整的 E0 糖蛋白基因, 并进行了序列测定。比较国内外 HCV 毒株 E0 基因序列, 显示石门株与 HCLV 的序列同源性反而低于与日本 ALD、GPE⁻ 株的同源性, 表明 HCLV 虽是从中国分离的猪瘟强毒株(有报道说就是石门强毒株)适应兔体培育而成的, 但由于长期在兔体内传代而发生了遗传变异。石门株与 HCLV 株 E0 基因有 13 个 aa 残基的差异, HCLV 比石门毒株多了一个潜在的 N-糖基化位点(NRS), 这些差异对 HCLV 的毒力致弱有无影响, 还需进一步证实。

通过比较多株 HCV E0 氨基酸序列, 发现 E0 有 4 个保守区, 氨基酸位置为 21~43, 71~94, 123~141, 154~182, 其中 28~40, 71~89 位的氨基酸是 E0 糖蛋白 RNase 的活性区(见图 3), 催化活性的氨基酸为 His³⁰, His⁷⁹。E0 糖蛋白第 107 位氨基酸变异较大, 石门株和 ALD 株为 Ala, HCLV 为 Val, Brescia 株为 Ser, GPE⁻ 和 Alfort 株为 Asp, 这个位置氨基酸的高变性, 可能与其抗原决定簇的特异性有关。

我们已经构建了 HCLV 和石门强毒株全基因组 cDNA 文库(另文发表), 下一步我们准备构建 HCV E0 突变株和重组株, 以便进一步研究 E0 在病毒生命周期中的功能及阐明兔化弱毒疫苗株致弱机制。

参 考 文 献

- [1] Meyers G, Thiel H.J. *Adv Virus Res*, 1996, 47, 53~118.
- [2] Konig M, Lengsfeld T, Pauly T, et al. *J Virol*, 1995, 69, 6479~6486.
- [3] Weiland E, Ahl R, Stark R, et al. *J Virol*, 1992, 66, 3677~3682.

- [4] Schneider R, Unger G, Stark R, *et al.* *Science*, 1993, 261, 1169~1171.
- [5] Isbikawa K, Nagai H, Katayama K, *et al.* *Arch Virol*, 1995, 140(8), 1385~1391.
- [6] Meyers G, Rumenapf T, Thiel H-J. *Virology*, 1989, 171, 555~567.
- [7] Moormann R J M, Warmerdam P A W, Van der Meer B, *et al.* *Virology*, 1990, 177, 184~198.
- [8] Brusckke C J M, Hulst M M, Moormann R J M, *et al.* *J Virol*, 1997, 71(9), 6692~6696.

CLONING AND SEQUENCE ANALYSIS OF E0 GENE OF HOG CHOLERA VIRUS LAPINIZED CHINESE STRAIN AND VIRULENT SHIMEN STRAIN

Wang Jiafu Zhang Chuyu Wang Ning Fu Liezhen Huang Qianhua

(*Institute of Virology, Wuhan University, Wuhan 430072*)

Abstract: According to the published nucleotide sequences of genome of hog cholera virus, one pair of specific primers were designed and synthesized. From the spleen of rabbits which were infected with HCLV and HCV Shimen strain infected pig blood, the two E0 genes were amplified by RT-PCR. The amplified fragments were cloned into pGEM-T vector and sequenced. Sequence analysis showed nucleotide sequence and deduced amino acid sequence homologies of the E0 gene between HCLV and Shimen strain were 95.0% and 94.3%. There was 13 amino acid substitutions between them. One N-glycosylation site was missing from E0 gene of the Shimen strain. The nucleotide sequence homologies of the Shimen strain with the ALD, GPE⁻, Brescia and Alfort strains were 97.4%, 96.5%, 92.2% and 86.5%, respectively, the deduced amino acid sequence homologies were 97.4%, 96.0%, 95.2% and 92.5%, respectively. The nucleotide sequence homologies of E0 gene of the HCLV strain with the ALD, GPE⁻, Brescia and Alfort strains were 95.6%, 94.9%, 91.3% and 85.5%, respectively, the deduced amino acid sequence homologies were 93.4%, 92.5%, 91.6% and 90.7%, respectively. E0 gene from HCV was shown to be similar to a family of fungal and plant ribonuclease. The catalytically important residues were 28 to 40 and 71 to 89 of HCV E0 gene.

Key words: Hog cholera virus, E0 gene, Cloning, Sequence analysis