

12 株猪瘟病毒 E2 基因主要抗原区域的序列差异分析*

王 琴 王在时** 赵 耘 李 博 丘惠深

(中国兽药监察所 北京 100081)

摘 要 :用 RT-PCR 扩增了 12 个不同时期分离的 HCV 毒株 E2 基因主要抗原区域的 cDNA 片段并对其进行了序列测定。应用 DNASTAR 序列分析软件对所测的 12 个 HCV 毒株与国内外已知的 6 个毒株 Alfort 株、Ald 株、Brescia 株、Gpe 株、C 株、CW 株及早期已测定的 HCLV 株、HCVSM 株和北京顺义株(BJSY2/96) 3 个毒株的相应片段进行了同源性比较分析。E2 基因主要区域长度均为 224 bp,包括从 HCV 2485 到 2708 位的 E2 基因 B、C 区域。所测的疫苗株 HCLV 与国外测得的疫苗株 C 株核苷酸及氨基酸同源性分别为 99.1% 和 100%,表明目前应用的疫苗株是稳定的;用目前我国流行的部分野毒株对 HCLV 株免疫猪的攻击试验表明,HCLV 对野毒株均具有很好的免疫力,这与序列分析结果相吻合。根据系统树分析,可将 HCV 分为两大群,5 株 90 年代的野毒株及 1 株 80 年代的野毒株(其中北京 3 株、河南 2 株、广东 1 株)均与国内外 C 株、标准株属同一群(即第一群),其核苷酸及氨基酸的同源性分别为 85.7%~100% 和 83.8%~100%;与 Alfort 株同属第二群的有 6 个野毒株(广西北海、辽宁、河北黄骅、吉林、深圳光明、四川成都),其中 80 年代与 90 年代的野毒株各有三株,核苷酸及氨基酸的同源性分别为 84.3%~100% 和 85.1%~100%;21 株 HCV 的核苷酸及氨基酸的同源性分别为 78.1%~100% 和 78.4%~100%。两群之间的特征性差异表现在 713 和 729 位氨基酸位点的不同。经分析发现猪瘟野毒株具有复杂性与多样性。

关键词 猪瘟病毒 E2 基因 序列分析

中图分类号 S85 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2000)06-0614-21

猪瘟(Hog Cholera, HC)是由猪瘟病毒(Hog Cholera Virus, HCV)引起的一种高度接触性传染病,在分类上属于黄病毒科(Flaviridae)瘟病毒属(Pestivirus)^[1]。目前猪瘟遍布全世界,经济损失巨大。

HCV 的 RNA 是线性单股正链,约 12.3kb,含有单一的开放阅读框架(ORF),编码 3898 个氨基酸残基。从 5' 端到 3' 端,HCV 的 ORF 可顺次翻译为衣壳蛋白 C 和高度糖基化的包膜糖蛋白 E2(gp51/55) \ E1(gp44/48) \ E3(gp33) 等四种结构蛋白以及 3~5 种非结构蛋白。其中 E2 基因是能产生中和抗体最为重要的包膜糖蛋白,基因长度为 1119bp,编码 373 个氨基酸残基^[2]。近年来,针对 E2 蛋白的单克隆抗体相继研究成功,基于抗体竞争结合原理,采用抗原俘获检测技术,可将 E2 基因分为 A、B、C、D 四个独特的功能区。其中 B、C 区域为产生抗原决定簇的主要区域,而且该区域为易变区^[3]。通过对 11 个不同时期分离的 HCV 野毒株及一个法国参考株 Thiverval 弱毒株的 E2 基因主要

* 国家重大自然科学基金资助项目(39893290-1-2)

** 通讯作者

作者简介:王 琴(1962-),女,副教授,兽医学硕士,研究方向为动物病毒分子生物学

收稿日期:2000-02-22 修回日期:2000-06-02

58℃ 60s, 72℃ 35s, 共 40 个循环, 72℃ 延伸 5min。

1.8 RT-PCR 产物的电泳检测与纯化

取 RT-PCR 产物 5 μ L, 于 1% 琼脂糖凝胶中电泳, 凝胶中含 0.5 μ g/mL 溴化乙锭, 电泳缓冲液为 1 \times TBE, 80V 30min, 电泳完后于长波紫外灯下观察照相, PCR 产物纯化采用 Promega 公司的 Wizard PCR Preps DNA 纯化试剂盒。

1.9 RT-PCR 产物的序列测定及序列分析

上述 12 个毒株 E2 主要抗原区域的 RT-PCR 产物序列测定由百灵克公司和博亚公司进行, 序列分析采用 DNASTar 序列分析软件。

2 结果

2.1 12 株 HCV 的 E2 主要抗原区域的 RT-PCR 结果

利用引物对 PZD1/PZD2 从细胞毒和血毒中分别扩增了 GDGZ1/95、HeBHH2/95、BJCY1/96、BJTX3/96、HeNXH2/98、HCVF94、HCVF98、HeNZZ1/82、SZGM1/85、LN1/84、SCCD1/79 和 Thiverval 株等 12 株 HCV E2 基因主要抗原区域的基因片段, 通过琼脂糖凝胶电泳证明了扩增的片段大小与预期的相符合。并对上述 12 株 HCV 进行了序列测定, 结果所测的基因片段为 E2 基因的主要抗原区域, 即从 2486 位到 2709 位, 其大小均为 224bp, 结果见图 1。

2.2 12 株 HCV 的核苷酸和氨基酸序列分析

利用 DNASTar 序列分析软件对上述 12 株 HCV 的核苷酸序列及其编码的氨基酸序列与国内外已知的其它 9 株病毒(Alfort 株、Ald 株、Brescia 株、Gpe 株、C 株、CW 株、HCLV 株、HCVSM 株和 BJSY2/96) 的相应序列进行比较分析和氨基酸序列的推导, 结果见图 2。同时对该 21 株 HCV 的核苷酸及氨基酸同源性进行了比较分析和系统进化树分析, 结果见图 3。

3 讨论

利用 DNASTar 序列分析软件对本次研究所测的 12 株 HCV 与国内外所测的 6 个标准株(Alfort 株、Ald 株、Brescia 株、Gpe 株、C 株和 CW 株)及我所已测的 HCLV 株、HCVSM 株和 BJSY2/96 株共 21 个毒株的相应序列进行分析比较。根据结果分析, 它们之间的核苷酸同源性由 78.1% 到 100% 不等, 氨基酸同源性由 78.4% 到 100% 不等。系统树分析结果, Brescia 株、Gpe 株、Ald 株、Thiverval 株、国外 C 株、我所及武汉大学所测的 C 株、石门强毒株及 7 株野毒(其中北京 3 株、河北 1 株、河南 2 株及广东 1 株)均为同一基因组, 其核苷酸同源性从 85.7% 到 100% 不等, 氨基酸序列同源性从 83.8% 到 100% 不等; 另外, 广西北海、辽宁、河北黄骅、吉林、深圳光明、四川成都等 6 株野毒株与法国的 Alfort 株处于基因 2 组中, 其核苷酸同源性从 84.3% 到 100%, 氨基酸同源性从 85.1% 到 100%。国外通过对 70 株 HCV、BVDV、BDV 的 5'NTR 序列分析^[10], 可将三者分为不同的群, 而在猪瘟毒株(48 株)这一群中, 根据不同的地区、年代又基本可将猪瘟毒株分为不同的亚群; Lowings 等^[11]对二十多个国家不同时期的 115 株疫苗毒、经典毒和流行毒株也进行了遗传发生关系的分析, 将其分为两个群、五个亚群, 但该系谱中没有一株是中国

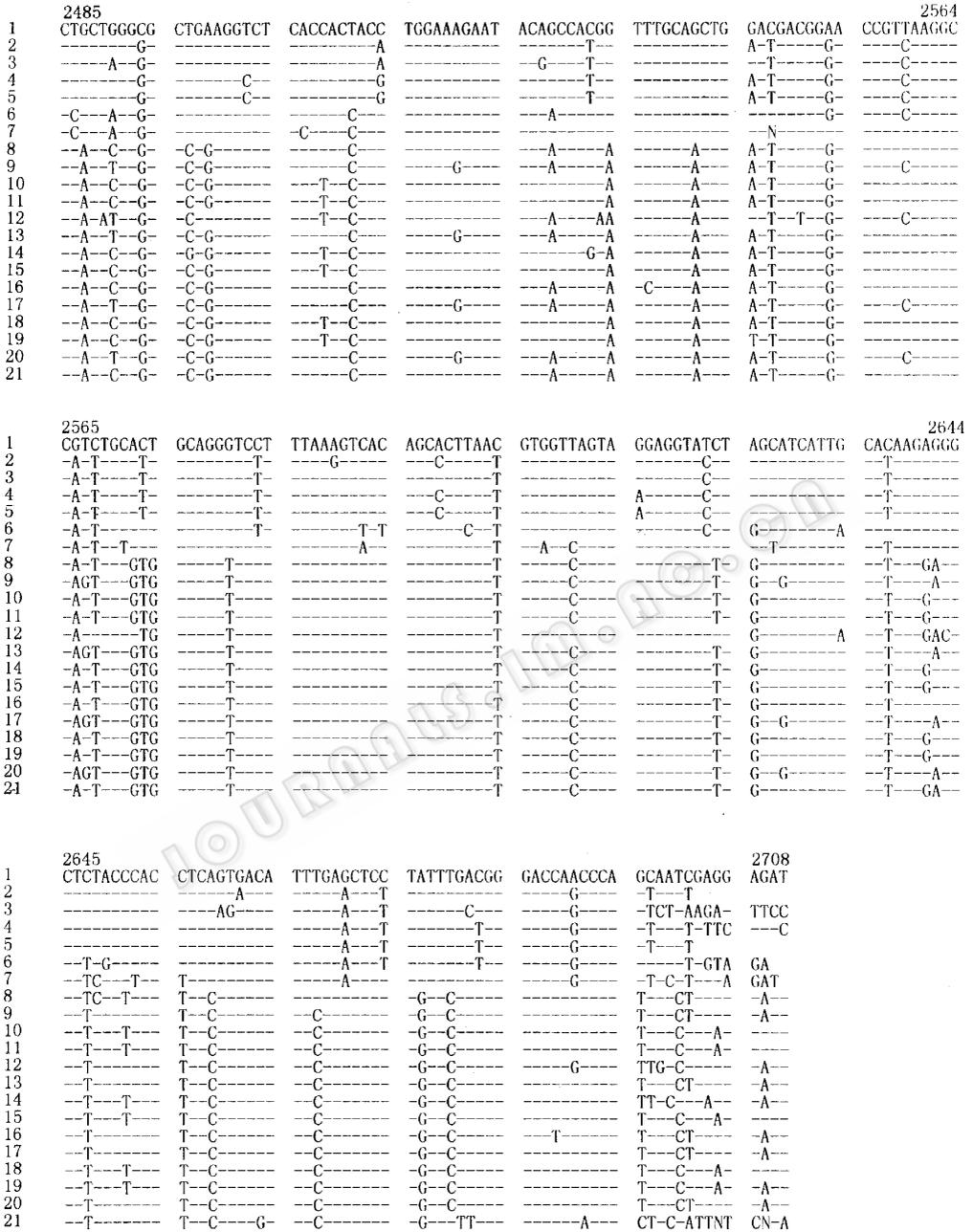


图 1 21 株 HCV E2 基因主要抗原区域核苷酸序列比较

Fig. 1 Comparison of the nucleotide sequence of E2 major gene of 21 strains HCV
1. Alfort ; 2. HCVF98 ; 3. LN1/84 ; 4. HeBHH2/95 ; 5. HCVF94 ; 6. SCCD1/79 ;
7. SZGM1/85 ; 8. Ald ; 9. BJSY2/96 ; 10. BJTX3/96 ; 11. BJCY1/96 ; 12. Brescia ;
13. C ; 14. CW ; 15. GDGZ1/95 ; 16. Gpe ; 17. HeNXH2/98 ; 18. HeNZZI/82 ;
19. HCVSM/97 ; 20. HCLV ; 21. Thiverval.

	709	*	**	*	**	*	*	*	**	783
1	LLGA	EGLTTTWKEY	SHGLQLDDGT	VKAVCTAGSF	KVTALNVYSR	RYLASLHKRA	LPTSVTFELL	FDGTNPAIEEI		
2	---	---	---N---	---I---	---	---	---	---S---		
3	---	---	G-----	---I---	---	---	---R---	---A---		
4	---	---	---N---	---I---	-----K	---	---	---S---		
5	---	---	---N---	---I---	-----K	---	---	---S---		
6	P---	---	N-----	---I---	---I---	---	---	---S---		
7	P---	P---	---E---	---I---	---	---V---	S-----	---S---		
8	---	G---	N-D-N-	---I-V-	---	---	---E---	SL-----		
9	---	G---	N-D-N-	---S-V-	---	---	---	---		
10	---	G---	---D-N-	---I-V-	---	---	---	---		
11	---	G---	---D-N-	---I-V-	---	---	---	---		
12	-H---	---	N-N---	---I-M-	---	---	---	---		
13	---	G---	N-D-N-	---S-V-	---	---	---	---		
14	---	G---	---QD-N-	---I-V-	---	---	---	---		
15	---	G---	---D-N-	---I-V-	---	---	---	---		
16	---	G---	N-D-N-	---I-V-	---	---	---	---		
17	---	G---	N-D-N-	---S-V-	---	---	---	---		
18	---	G---	---D-N-	---I-V-	---	---	---	---		
19	---	G---	---D-Y-	---I-V-	---	---	---	---		
20	---	G---	N-D-N-	---S-V-	---	---	---	---		
21	---	G---	N-D-N-	---I-V-	---	---	---	---		

图 2 21 株 HCV E2 基因主要抗原区域氨基酸序列比较
注：* 代表变异位点

Fig.2 Comparison of the amino acid sequence of E2 major gene of 21 strains HCV
1. Alfort ; 2. HCVF98 ; 3. LN1/84 ; 4. HeBHH2/95 ; 5. HCVF94 ; 6. SCCD1/79 ;
7. SZGM1/85 ; 8. Ald ; 9. BJSY2/96 ; 10. BJTX3/96 ; 11. BJCY1/96 ; 12. Brescia ;
13. C ; 14. CW ; 15. GDGZ1/95 ; 16. Gpe ; 17. HeNXH2/98 ; 18. HeNZZ1/82 ;
19. HCVSM/97 ; 20. HCLV ; 21. Thivalval.

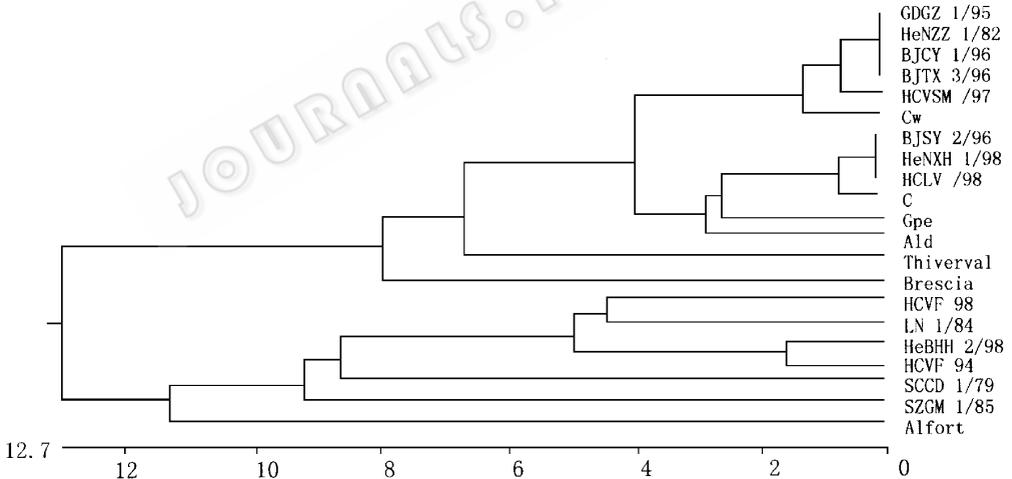


图 3 21 株 HCV 的系统进化树
Fig.3 Phylogenetic tree 21 strains HCV

的 HCV。因此核苷酸序列分析对国内 HCV 的分子流行病学调查是一个有力的工具。加大研究进度 增加不同时间和地区野毒株序列分析的数量和对相同野毒株的其它区域的序列分析 对猪瘟野毒的抗原性遗传变异及生态学研究具有十分重要的意义。

根据上述同源性结果分析 ,HCLV 株与野毒株 BJSY2/96 株、HeNXH2/98 株氨基酸同源性达 100% ,HCLV 株与 BJTX2/96 株和 BJCY1/96 株为 94.6% 与 HCVF98 株、

HeBHH2/98 株及 HCVF94 株分别为 87.5%、83.8% 和 86.1%。尽管我国 HCLV 株与这些野毒株同源性高低不一,野毒株对猪的毒力不一,传代猪所表现的临床症状、分布地区、分离时间(1994 年到 1998 年)不一,但 HCLV 株对上述 6 株(除 BJSY2/96 株未作动物试验外)野毒株的本动物免疫保护相关性试验结果均达到 100%^[12],证明了 HCLV 株对目前我国流行的部分野毒株的攻击具有坚强的保护力。虽然上述部分野毒株的氨基酸序列发生某些变异,但还没有引起免疫原性的明显变化。另外 E2 蛋白的氨基酸序列中均含有保守的 15 个半胱氨酸(Cys)残基,N 末端的 6 个 Cys 残基对 E2 结构的正确折叠及特异抗原决定簇的形成至关重要,N 端的 Cys693 和 Cys737 形成一个推测的二硫键并固定了 B 区及 C 区的构型。本次所测的 E2 主要区域中只包括 Cys737,在 21 个毒株中,没有一个 Cys737 发生变异。位于第 753 位至 759 位氨基酸处,有一段保守序列 RYLASLH^[11],除 SZGM1/85 株外,无一氨基酸发生变异,为亲水性,在整个 E2 蛋白抗原谱中抗原性峰值为最高,可能对抗原性产生起重要作用。我们对 HCLV、HCVSM、BJSY2/96、HeB-HH2/95 株及 Brescia 和国外 C 株的 E2 全序列分析也得到了相同的结果^[4],与李红卫等的结果是一致的^[13]。可推测 E2 蛋白在构型和抗原结构方面依然保持一定的稳定性。

从核苷酸及氨基酸序列比较结果来看,发现我们所测的疫苗株 HCLV 与国外测得的疫苗株 C 株同源性分别为 99.1% 和 100%,武汉大学所测的疫苗株 CW 与国外 C 株同源性分别为 94.2% 和 91.9%。三个 C 株相应序列的较高同源性,证明我们的方法是确切的,测出的 HCLV 相应序列是可靠的。根据 HCLV 株和 C 株的核苷酸序列来分析,从 2485 位到 2709 位这段区域,仅有 2 个核苷酸的差异,并没有影响氨基酸的编码,以至于 HCLV 株与国外 C 株的氨基酸序列达到 100% 的吻合。1996 年国外所测的 C 株^[14]在由中国引入后已传了若干代次,我们所用 HCLV 株来源与广东生药厂,是由中监所第 480 代种毒传代在 10 次以下用于制苗用毒株,由此证明了我们所用的 C 株与国外所测的 C 株在抗原性方面保持在较高水平。另外 HCVSM 株和 HCLV 株在核苷酸和氨基酸序列之间的同源性位 94.2% 和 93.2%,根据实验室动物试验表明,C 株对石门强毒株(HCVSM)的攻击可产生 100% 的保护,表明了 HCLV 株与 HCVSM 株 E2 基因主要编码区没有发生关键的变异。

在整个 21 株野毒的差异比较来看,HCVF94 株、SZGM1/85 株、SCCD1/79 株与 HCLV 株、C 株和 Thiverval 株及野毒株 HeNXH2/98 株和 BJSY2/96 株表现了核苷酸及氨基酸分别为 78.1% 和 78.4%、79.7% 的最低的同源性,表现出 80 年代流行的野毒株反而比 90 年代流行的野毒株与疫苗株之间的同源性低,就是在属于第二群的 80 年代野毒株之间,HCVF94 株与 SZGM1/85 株,HCVF94 株与 SCCD1/79 株之间也只有 85.1% 和 86.5% 的氨基酸同源性,这更说明了猪瘟野毒株具有多样性和复杂性。根据 Van Rijn 等对 E2 抗原区的部分氨基酸进行了点突变特异单抗反应性的研究^[15],发现 705、710(His、Gln、leu)、713、729(Asp、Gly)和 734(Lys、Glu)位氨基酸互换可影响 E2 B、C 区域中特异性单抗反应。在我们分析的上述突变位点中,713 位在第一群中为 Gln,在第二群为 Glu;729 位在第一群中 Asn,在第二群中为 Asp、Glu 和 Tyr。另外在 725、736、738、752、761、764、777 和 779 位表现了两群之间较规律的差异与互换。两群之间在这些位点的差异,是否对 HCV 造成影响,还要进一步进行研究。

4 结论

我们所测的 HCLV 株 E2 基因主要编码区是确切的,测序方法是正确的;从核苷酸和氨基酸的同源性及核苷酸系统进化树分析来看,猪瘟野毒株表现了复杂性与多样性。根据系统树分析,可将 HCV 分为两大群,90 年代的野毒株(除 HeNZZ1/82 株外)均与国内外 C 株、标准株属同一群(即第一群),与 Alfort 株同属一群的 6 个野毒株,80 年代与 90 年代的野毒株各有三株,虽然序列分析结果表明不同毒株 E2 基因主要序列和氨基酸序列发生了一定的变化,但部分野毒株的攻毒试验表明,HCLV 株对目前我国流行的部分野毒株仍具有坚强的保护力,该区域中 Cys737 与保守序列 RYLASLH 无一氨基酸发生变异(除 SZGM1/85 株外),推测 E2 蛋白在构型和抗原结构方面依然保持一定的稳定性,两群之间在 713 和 729 位氨基酸位点有显著的差异,有待在抗原性方面进行进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] 殷 霞,刘景华.动物病毒学.第二版.北京:科学出版社,1997.
- [2] Moormann R J M, Warmerdam P A M, Van der meer B, *et al.* *Virology*, 1990, **177**: 184~198.
- [3] Van Rijn P A, Van gennip H G P, Meijer E J, *et al.* *Journal of general virology*, 1993, **74**: 2053~2060.
- [4] 傅烈振,朱 燕,王家富,等.武汉大学学报(自然科学版).1999, **45**: 509~512.
- [5] 王 琴,李 博,王在时,等.微生物学报(待发表).
- [6] 郎洪武,丘惠深,王在时,等.猪瘟野毒的传代及病原性鉴定.见:陈永侗等主编.中国兽药监察所研究报告汇编第 14 辑.北京:1999.
- [7] 丘惠深,郎洪武,王在时,等.猪瘟病毒的分离鉴定及猪瘟弱毒疫苗与野毒株免疫相关性研究 II. 猪瘟野毒的纯化及电镜观察.见:谢庆阁等主编.畜禽重大疫病免疫防制研究进展.北京:中国农业出版社,1997. 101~105.
- [8] Meyers G, Ruemenapf T, Thiel H J. *Virology*, 1989, **171**: 555~567.
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, *et al.* *Molecular cloning*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [10] Hofmann M A, Brechtbuhl K, Stauber N. *Arch Virol*, 1994, **139**: 217~229.
- [11] Lowings P, Ibrate G, Needham J, *et al.* *J Gen Virology*, 1996, **77**: 1311~1321.
- [12] 丘惠深,王在时,郎洪武,等.中国兽药杂志.1997, **31**: 1~3.
- [13] 李红卫,涂长春,金扩世,等.猪瘟病毒石门株与免疫弱毒株主要保护性抗原 E2 基因的序列测定.见:谢庆阁等主编.畜禽重大疫病免疫防制研究进展.北京:中国农业出版社,1997. 22~26.
- [14] Moormann R J M, Van Gennip H G, Miedema G K, *et al.* *J Virol*, 1996, **70**: 763~770.
- [15] Van rijn P A, Miedema G K W, Wensvoort G, *et al.* *Journal of general virology*, 1994, **68**: 3934~3942.

NUCLEOTIDE SEQUENCE ANALYSIS OF E2 MAJOR PROTECTIVE ANTIGEN ENCODING REGION OF 12 STRAINS OF HOG CHOLERA VIRUS(HCV)*

Wang Qin Wang Zaishi Zhao Yun Li Bo Qiu Huishen

(National Control Institute of Veterinary Bioproducts and Pharmaceuticals, Beijing 100081)

Abstract: cDNA fragments, of HCV envelope glycoprotein E2 major gene of 11 field strains isolated in China in different time and 1 French reference strain (Thiverval) were amplified respectively, with

RT-PCR method and sequenced. The fragments amplified located by the 5' 2485 to 2708 of E2 major domains B and C and encoded 75 amino acid residues of E2 glycoprotein. All the products amplified by RT-PCR from 12 strains in the study were same size of 224 bp. Comparing 12 sequences with other 9 references strains sequence reported before using software DNASTAR, it was found that Hog Cholera Virus could be classified in two groups by analysis of phylogenetic tree. Strains Brescia, Gpe, Ald, Thiverval, C, CW, HCLV, HCVSM, BJCY1/96, BJTX3/96, BJSY2/96, HeNXH2/98, HeNZZ1/82 and GDGZ1/95 were assigned to group A and were 85.7% ~ 100% for nucleotide sequence and 83.8% ~ 100% for amino acid sequence in homology; but strains HCVF98, HCVF94, HeBHH2/95, LN1/84, SZGM1/85, SCCD1/79 and Alfort were assigned to group B and were 84.3% ~ 100% for nucleotide sequence and 85.1% ~ 100% for amino acid sequence in homology; and 21 strains of HCV were 78.1% ~ 100% for nucleotide sequence and for 78.4% ~ 100% amino acid sequence in homology. Homology were 99.1% for nucleotide sequence and 100% for amino acid sequence between strains HCLV in our study and strains C reported by Rijn's in the Netherlands. It's showed our method of sequencing is reliable. There were obvious differences between the two groups in sequences of envelope glycoprotein E2 major gene, especially in the amino acid substitutions of sites 713 and 729 respectively, and it is showed the two groups of HCV field strains might vary genetically in some extents. The results of other report of challenging of the partial field strains showed that the Chinese stock vaccine virus (HCLV) has good immunity.

Key words: Hog cholera virus, Envelope glycoprotein E2, Sequence analysis

* Major Project of National natural Science Foundation of China(39893290-1-2)

《微生物学报》承接广告业务

《微生物学报》创刊于 1953 年,双月刊,双月 4 日出版,由中国微生物学会和中科院微生物研究所主办。他是我国微生物学领域唯一的综合性学报级刊物。主要报道我国普通微生物学、工业、农业、医学、兽医微生物学、病毒学、免疫学和生物工程等方面的研究论文、研究简报和短篇综述等。

本刊历史悠久,发行量大,内容涵盖面广,深受国内外科研工作者、高等院校师生和企业科研管理人员的欢迎。他是我国自然科学核心期刊,被国内外一些重要的文摘刊物和数据库收录。曾多次被评为优秀科技期刊。

凡与微生物学及其各分支学科有关的试剂、药品、仪器、设备,以及生物工程产品等均欢迎在本刊刊登广告。本刊服务热情,信守协议,保证质量,价格合理,竭诚为广大用户服务。

联系电话 (010) 62630422 邮编 :100080

通讯地址 北京市海淀区中关村北一条 13 号《微生物学报》编辑部