

猪瘟病毒强弱毒株和野毒株 E2 全基因 序列测定及比较分析*

王 琴 李 博 王在时** 丘惠深 郎洪武

(中国兽医药品监察所 北京 100081)

摘 要: 为了比较猪瘟病毒(HCV)野毒株、疫苗株及标准株之间 E2 基因抗原区域的差异,采用 RT-PCR 扩增了 HCV 石门株、兔化弱毒疫苗株、野毒 03 及 07 株的囊膜糖蛋白 E2(gp55)全基因的 cDNA 片段,分别克隆于 pGEM-T 载体中并对其进行核苷酸序列测定及氨基酸序列的推导,同时进行了同源性比较及 E2 结构与功能的分析。所测 4 株 HCV E2 基因的长度均为 1273bp,所编码的氨基酸序列均包括部分信号肽序列和完整的跨膜区序列,共由 381 个氨基酸组成;4 个毒株 E2 蛋白 N 末端的 683 位至 690 位信号肽序列(WLLLVTGA)和 C 末端 1030 ~ 1063 位跨膜区均为保守序列,而且具疏水性;N 末端抗原功能区中,4 个 E2 蛋白与其它所比较序列在位于第 753 位至 759 位氨基酸处,均有一段保守序列 RYLASH,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,推测对抗原性产生起重要作用;4 个 E2 蛋白的氨基酸序列中均含有 15 个半胱氨酸(Cys)残基,其数量及位置与国外五株 HCV (Brescia, C, Alfort, ALD 和 GPE)完全一致。表明该 4 株 HCV E2 抗原具有相同的构型,尤其是 N 末端的 6 个 Cys 残基对 E2 蛋白结构的正确折叠及特异抗原决定簇的形成至关重要。同时对主要抗原区域氨基酸位点变异进行分析,发现疫苗株与野毒株之间抗原决定簇未发生明显变异。

关键词: 猪瘟病毒, E2 基因, 序列分析

中图分类号: S 85 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2001) 03-0320-09

猪瘟病毒(Hog Cholera Virus, HCV)属于黄病毒科(Flaviridae)瘟病毒属(Pestivirus)。由 HCV 引起的猪瘟(Hog Cholera, HC)是猪的一种高度接触性传染病,造成的经济损失巨大^[1]。我国早在 60 年代就研制成功了享誉世界的猪瘟兔化弱毒疫苗,在国内外以预防为主防治策略国家的实施中,有效地控制了猪瘟的急性发生和大流行。但在 70 年代后期,普遍出现免疫失败现象,因此根除猪瘟是一项艰巨而长期的工作,很有必要对其抗原基因进行分析。目前对 HCV 基因组结构已研究得比较清楚,其基因组为一线性单股正链 RNA,约 12.3kb,分子质量约为 4×10^6 kD。HCV RNA 基因组含有单一的开放阅读框架(ORF),编码 3898 个氨基酸残基。从 5'端至 3'端,HCV 的 ORF 可顺次翻译成衣壳蛋白 C 和高度糖基化的囊膜糖蛋白 E2(gp51 ~ 55)、E1(gp44 ~ 48)和 E3(gp33)等 4 种结构蛋白,以及 3 ~ 5 种非结构蛋白(包括 5'末端未表达的 P23 和 P125 等)。其中 E2 是 3 种囊膜糖蛋白中最主要的保护性抗原,产生 HCV 主要抗原结构蛋白。分子量约为 51 ~ 55kD,非糖基化的 E2 分子量约为 41kD,基因长度为 1.11kb,全长由 370 个氨基酸残基组成^[2]。本研究的目的是在国内外对 HCV E2 基因编码的抗原结构研究^[3-12]的基础上,对田间流行野毒

* 国家攀登计划 B 类项目(85-44-01-03)

** 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:2000-08-18,修回日期:2000-11-14

03 和 07 株、猪瘟兔化弱毒疫苗株和石门株(以下分别简称 F03 株、F07 株、HCLV 株和 SM 株)的 E2 基因进行序列测定和比较分析,进而找出各毒株之间主要抗原结构的差异与免疫保护的相关性,为猪瘟的控制提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 病毒

HCV 石门(SM)株细胞毒,由中国兽药监察所鉴定保存,本室繁殖;猪瘟兔化弱毒疫苗株(HCLV)细胞毒,由广东生药厂提供的合格产品;HCV F03 株细胞毒,由本室 1995 年于河北黄骅分离的野毒株,并通过本动物试验鉴定;HCV F07 株细胞毒,由本室 1996 年于北京顺义分离的野毒株,已作常规鉴定^[13]。

1.2 病毒细胞毒的纯化与浓缩

参照丘惠深等^[13]方法进行,同时设 PK15 细胞作平行操作。取 HCV 细胞培养上清液,4℃ 8000r/min 离心 30min,去沉淀。于上清中加入终浓度为 7%的 PEG6000 和 0.3mol/L NaCl 于 4℃~8℃慢速搅拌过夜。4℃ 8000r/min 离心 30min,去上清,以 0.05mol/L 的 TEN 溶解沉淀物,并于 4℃缓慢搅拌 5h,4℃ 7000r/min 离心 30min,上清为粗提病毒。

1.3 RNA 提取

按北京博大科技公司 RNA 提取试剂盒说明书进行,略加修改,所用器皿及试剂均进行无 RNase 处理。取上述纯化粗提病毒 300μL,加变性液 300μL,充分混匀,置 37℃ 5min。加入 1/10 体积 2.5mol/L NaAc 和等量水饱和酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),颠倒混合,充分乳化,置冰浴 15min,4℃ 8000r/min 离心,10min。取上清加等量异丙醇,-20℃沉淀 RNA 1h,4℃ 13000r/min 离心 20min,沉淀加入 300μL 变性液,溶解后加入等体积异丙醇,-20℃ 1h,沉淀为 RNA,弃上清,用 75%乙醇洗涤一次,4℃ 13 000r/min 离心 15min,真空抽干溶于 DEPC 水,置 -20℃保存备用。

1.4 寡聚核苷酸引物

根据 Brescia 株的基因序列,设计引物对 p1/p2 扩增 HCV E2 基因,预计长度为 1273bp,位于 Brescia 株基因组的 2407~3679 位置;引用朱燕等^[10]设计的引物对 p4/p5 扩增的长度预计为 572bp,位于 Brescia 株 E2 基因的 2827~3399 位置,用于 E2 基因重组质粒的套式扩增检测;另外设计一条特异引物 p3,位于 E2 的保守序列 2975~2813 位,用于 E2 基因中间部位测序。上述引物由中国科学院微生物研究所和赛百盛公司合成,见表 1。

表 1 引物序列及位置

Table 1 Sequences and positions of the primers

Primers	Sequences	Positions of brescia strain
p1	5'-CTGGTAACTGGGGCACAAG-3'	2407~2425
p2	5'-GCAGTAGTATCCA'TTTC'TTTAT-3'	3658~3679(Complementary)
p3	5'-TGCTTTCTATCTGTCTG-3'	2795~2813(E2 gene sequence)
p4	5'-CTGGATCCTGGTGTCTAGAGTGC-3'	2827~2851
p5	5'-ATACTCGCCCTTGAGCATAT-3'	3379~3399(Complementary)

1.5 反转录合成第一链病毒 cDNA

取上述提取的 HCV 细胞毒 RNA 约 5μg,用 GIBCO BRL 反转录试剂盒(Superscript II

RNase H Reverse Transcriptase, Cat No. 18064-014), 按操作说明进行反转录, 合成第一链 cDNA。反转录引物为 10pmol P2。

1.6 PCR 扩增 cDNA 片段^[14]

取上述反转录产物 2 ~ 5 μ L 于 0.5mL EP 管, 先热变性 5min, 立即冰浴。加入 5 μ L 10 倍 PCR 缓冲液 (15mmol/L MgCl₂, 500mmol/L KCl, 200mmol/L Tris·HCl pH9.0, 1% Triton X-100), p1/p2 引物各 0.5 μ L (2 μ g/ μ L), 2 μ L 10mmol/L dNTP, 2.5 单位 Taq plus II DNA 聚合酶 (Songon, Canada Biotechnology Department Division), 加水到 50 μ L, 覆盖液体石蜡油, 置 PCP 仪进行扩增 (DNA Thermal Cycle 480, USA), 以 93 $^{\circ}$ C 60s, 54 $^{\circ}$ C 60s, 72 $^{\circ}$ C 100s 为一次循环, 共循环 35 次, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

1.7 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, 60V 1h。电泳完后于长波紫外灯下观察照像。PCR 产物的回收纯化采用液氮冻融法^[15]。

1.8 E2 基因片段的克隆

回收纯化的 PCR 产物经定量后, 按 pGEM-T Easy Vector Systems 试剂盒进行连接反应 (Promega 公司)。取连接产物 5 μ L 转化感受态细胞 DH α , 于 X-gal 平板进行筛选, 取纯白色菌落于含 Amp (100 μ g/mL) 的液体 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 150r/min 振摇过夜, 按 Lysis triton 法提取质粒^[16], 同时挑取蓝色菌落作对照。所确定的阳性质粒分别命名为 pGSM、pGLV、pGF03 和 pGF07。

1.9 重组质粒的鉴定

取上述阳性重组质粒进行 *Eco*RI 酶切鉴定, 均获得约 3018bp 和 1273bp 的两条带, 分别为质粒和插入的扩增片段; 再以阳性重组质粒为模板, 用引物对 p1/p2 和 p4/p5 分别进行克隆片段的直接 PCR 和套式 PCR 鉴定, 经电泳检测后对阳性重组质粒进行序列测定。

1.10 序列测定与分析

经上述酶切鉴定及 PCR 鉴定后的阳性重组质粒, 采用双脱氧末端终止法进行序列测定, 所用测序酶为 Ampli Tap 酶, 测序仪为

ABI Prism 377 和 ABI 373A。测序送 CyberSyn 公司进行。序列分析采用软件 SEQAID II ver.3.81 (Kansas State University, USA) 进行结构特点、功能区及同源性比较研究。

2 结果

2.1 4 株 HCV E2 基因核苷酸序列及推导的氨基酸序列

采用 RT-PCR 扩增了 HCV SM、HCLV、F03 和 F07 株 E2 基因的 cDNA 片段 (图 1) 并克隆到 T 载体上, 利用 T 载体上的一对

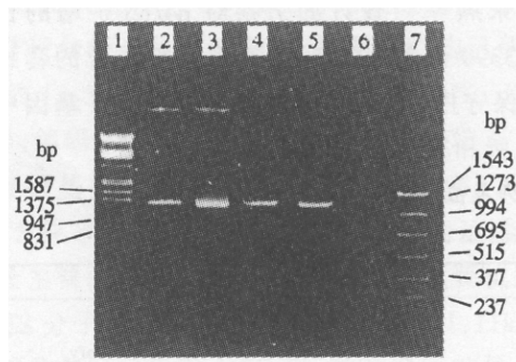


图 1 HCV E2 基因 RT-PCR 扩增结果

Fig. 1 HCV E2 gene RT-PCR result

1. λ DNA/*Eco*RI + *Hind*III; 2. SM; 3. HCLV; 4. F03;

5. F07; 6. Negative control; 7. PCR marker.

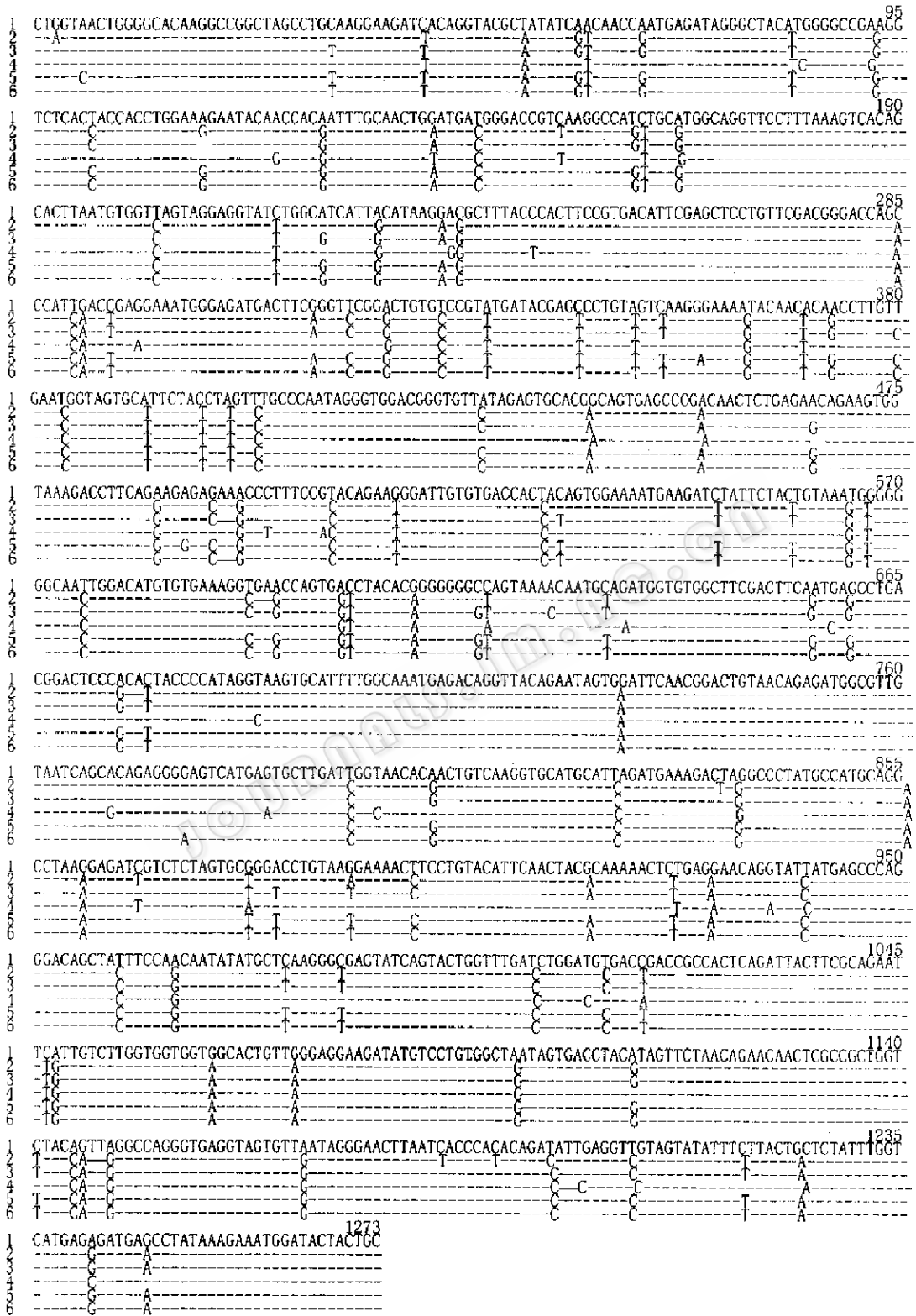


图 2 HCV E2 基因核苷酸序列比较

Fig.2 Comprison of the nucleotide sequence of HCV E2 gene

1. BRESCIA; 2. FC; 3. HCLV; 4. SM; 5. F03; 6. F07.

通用引物 T7 和 SP6 和一条合成的特异引物 P3 对 4 个 HCV E2 基因的重组质粒 pGSM、pGLV、pGF03 和 pGF07 进行测序,均获得了包括 E2 基因部分信号肽序列和完整的 TMR 序列的 cDNA 片段,共 1273bp。将 4 株 HCV E2 基因与 Brescia 株(GenBank 登录号:M31768)和国外测得的 C 株(GenBank 登录号:Z46258,以下简称 FC 株)^[3-4]的相应序列进行比较,结果见图 2。由核苷酸序列推导的氨基酸序列与 Brescia 株和 FC 株的相应序列进行比较,其氨基酸序列包括由部分信号肽序列和完整 TMR 序列的 381 个氨基酸残基,结果见图 3。



图 3 HCV E2 糖蛋白氨基酸序列比较

Fig.3 Comprison of amino acid sequences of envelope E2 glycoprotein of HCV

The signal peptide and the TMR are underlined and one of conserved regions is shadowed. Conserved cysteines in HCV E2 are indicated by asterisks. The amino acid mutations are indicated by closed circles.

1. BRESCIA; 2. FC; 3. HCLV; 4. SM; 5. F03; 6. F07.

2.2 核苷酸和氨基酸序列同源性比较

将测的 HCV SM、HCLV、F03 和 F07 株 E2 基因的 cDNA 核苷酸序列及其所推导的氨基酸序列分别与国外已知的 Brescia 株和 FC 株相应序列进行了同源性比较,结果两个野毒株与 HCLV 株及 FC 株核苷酸序列同源性高达 98% 以上,与 SM 株同源性在 95% 左右,与 Brescia 株同源性最低,为 91% 左右,结果见表 2。推导的氨基酸序列相比较,两个野毒株仍与 HCLV 株及 FC 株同源性高达 99% 以上,与 SM 株均为 95% 左右,与 Brescia 株同源性依然最低为 92% 左,结果见表 3。

表 2 核苷酸序列同源性比较

Table 2 Homology comparison of nucleotide sequence of HCV E2 genes (%)

	FC	SM	HCLV	F03	F07
Brescia	91.4	93.1	91.3	91.1	91.4
FC		95.4	98.7	98.6	98.8
SM			95.1	94.9	95.1
HCLV				99.7	99.9
F03					99.8

表 3 氨基酸序列同源性比较

Table 3 Homology comparison of amino acid sequence of HCV E2 glycoprotein (%)

	FC	SM	HCLV	F03	F07
Brescia	92.7	94.1	92.2	92.2	92.5
FC		95.5	99.1	99.1	99.3
SM			95.0	95.0	95.3
HCLV				99.5	99.8
F03					99.8

3 讨论

3.1 4 株 HCV E2 基因核苷酸及氨基酸序列同源性分析

E2(gp55)是 HCV 最具抗原性的糖蛋白,通过对所测 4 株 HCV E2 基因及推导的氨基酸序列进行比较分析,发现两个野毒株之间仅有 4 个碱基有差异,核苷酸及氨基酸同源性均为 99.8%。所测的 HCLV 株与 FC 株的核苷酸及氨基酸同源性分别为 98.7%和 99.1%,1996 年国外所测的 C(FC)株^[17]由中国引入后已传了若干代次;我们所用 HCLV 株来源与于广东生药厂,是中监所第 480 代种毒传代在 10 次以下用于制苗用毒株,两个 C 株相应序列的较高同源性表明了我国目前所用的 C 株与 FC 株在抗原性方面保持在较高水平。

3.2 对 4 株 HCV E2 糖蛋白抗原区氨基酸变异及功能的分析

近来针对 HCV E2 糖蛋白单克隆抗体相继研制成功,采用抗体竞争结合手段、中和反应及点突变等技术,证实了 E2 分子存在 4 个独特的抗原结构域 A、B、C 和 D,A 区又分为三个亚功能区 A1、A2 和 A3,各区的位置见表 4。其中 B、C 区是诱导产生中和抗体的主要部位,为非保守区;A1 和 A2 为保守区,A1 能诱导产生中和抗体;A3 和 D 区既不保守也不诱导产生中和抗体^[11]。根据上述划分,将所测 4 株 HCV 和 Brescia 及 FC 株 E2 糖蛋白的各功能区氨基酸变异的数目进行交叉比较分析,发现其变异多发生于 3'端。Van Rijn 等对 E2 抗原区的部分氨基酸进行了点突变的特异单抗反应性研究,在 B、C 区域中,发现 705、710、713、729、734、833、834、837 和 858 位氨基酸变异可影响特异 MAb 的产生和抗原决定簇的保守性。本研究所测的 4 个毒株主要抗原区第 690 至 866 位氨基酸中,SM 与 FC、HCLV、F03 和 F07 株之间分别存在 9、10、11 和 10 个氨基酸的差异,由 SM 株到其它株的氨基酸变异分别是 705(Asn→Asp)、723(Ser→Asn)、729(Tyr→Asn)、736(Ile→Ser)、761(Gly→Lys)、764(Leu→Pro)、788(Gly→Arg)、789(Phe→ser)、848(Glu→Asp)和 860 位(Thr→Ile)。与 Van Rijn 的研究相比,仅 705 和 729 位有相同的变异,且互换的氨基酸还不一样;在对特异性单抗反应和对 A 区抗原决定簇的高度保守区起决定作用的 710、833 和 834 位,我们的测定结果未发现差异;那么,723、736、761、788、789、848 和 860 位的差异到底对抗原性的影响如何,还有待于进一步研究。测得的 HCLV 株(疫苗株)与野毒株 F03 和 F07 的差异数仅 1 个和零个,加之疫苗株对强毒野毒株的攻毒试验的保护率是 100%^[18],推测我们目前所用疫苗株与野毒株之间抗原决定簇未发生明显的变异,与动物试验较为吻合。

表 4 4 株 HCV、Brescia 株及国外 C 株 E2 蛋白抗原区氨基酸序列差异数

Table 4 Variable numbers of amino acid of antigenic domain A,B,C and D of HCV E2

	Brescia /FC	Brescia /sm	Brescia /HCLV	Brescia /F03	Brescia /F07	FC /SM	FC /HCLV	FC /F03	FC /F07	SM /HCLV	SM /F03	SM /F07	HCLV /F03	HCLV /F07	F03 /F07
DOMAIN177aa (690~866)	18	15	19	20	19	9	1	2	1	10	11	10	1	0	1
DOMAIN A101aa (766~866)	8	5	9	10	9	3	1	2	1	4	5	4	1	0	1
DOMAIN A1A257aa (795~851)	10	1	2	1	1	0	1	0	1	2	1	1	0	1	1
DOMAIN A348aa (766~813)	5	3	5	6	5	2	0	1	0	2	3	2	1	0	1
DOMAIN B83aa (690~773)	10	10	10	10	10	6	0	0	0	6	6	6	0	0	0
DOMAIN C110aa (690~800)	15	13	15	15	15	8	0	0	0	8	8	8	0	0	0
DOMAIN D35aa (766~800)	5	3	5	5	5	2	0	0	0	2	2	2	0	0	0

3.3 4 株 HCV E2 糖蛋白的信号肽序列和 TMR 序列的分析

通过对 E2 糖蛋白的结构分析,在 N 末端 690Arg 有 8 个氨基酸(683~690)编码 E2 的信号肽序列 WLLLVTGA,预测的信号肽酶切割位点位于 Gly689 和 Arg690 之间,其作用是引导糖蛋白前体进入细胞内质网进行进一步加工。所测 4 株 HCV E2 基因编码的氨基酸序列均包括部分信号肽序列 LVTGA(见图 3),通过序列比较和疏水谱分析,证明均为保守序列和具有疏水性。位于 C 末端的 TMR(1030~1063)是一段保守序列,TMR 对 E2 糖蛋白的免疫原性十分重要,所测 4 株 E2 糖蛋白的 TMR 是完整的(见图 3),仅 SM 株与 C 株分别有二个 Ile-Val 的点突变,其影响有待于进一步研究。通过 SEQAID II 软件分析疏水谱发现均形成了 4 个疏水区,该结构使 E2 糖蛋白在囊膜上十分牢固,其疏水性对 E2 的穿膜作用十分重要^[19]。用重组疫苗免疫猪发现完整的 E2 基因重组苗(含 TMR)所产生的中和抗体滴度较不含 TMR 的要高得多,并且抗体产生速度也较快^[20]。研究表明用 COSI 细胞转染分别缺失信号肽序列和 TMR 序列的重组质粒,其表达产物不能与特异 MAbs 发生免疫反应,证明信号肽和 TMR 序列对 E2 基因的表达十分重要^[11]。另外,值得注意的是在 Brescia、FC 及 4 株 HCV E2 糖蛋白 753~759 位氨基酸处,有一段非常保守的序列为 RY-LASLH,无一氨基酸发生变异,对其进行抗原性及疏水谱分析,均为亲水性,且抗原性峰值在整个 E2 抗原谱中为最高,其平均值为 0.089、0.110、0.138、0.134、0.138、0.134 和 0.117,仅 SM 株略低一点,其位置正好处于最具抗原性的 B 区(690~773)和 C 区(690~800)之间,B、C 区是诱导产生中和抗体最为重要的一个部分。同时李红卫所测的石门株、兔化弱毒株、吉林野毒株、长春野毒株、南京弱毒株、成都弱毒株和吉林弱毒株,朱燕^[10]测得的弱毒株,国外报道的 C 株、ALD 株、CPE⁻株、Brescia 株和 Alfort 株,其 E2 蛋白在相同区域均有这一保守序列,均无一氨基酸发生变异^[8-10]。Eduardo Furado Flores 等 1996 年在研究 CRB-1 细胞对瘟病毒感染的选择性耐受时发现瘟病毒在进入细胞时需要一共同的细胞膜功能区。同时 Paul Lowings 等发现细胞受体序列中也有极为类似的保守区 RYLAIVH^[7,21]。我

们认为,该序列的保守性除与猎瘟病毒和宿主细胞的亲嗜性及宿主范围有关外,推测对 E2 糖蛋白抗原性起决定性作用。

3.4 E2 糖蛋白抗原构型

4 株 E2 糖蛋白的氨基酸序列中均含有保守的 15 个半胱氨酸(Cys)残基,其数量与位置与 Brescia、FC、ALD、GPE⁻ 及 Alfort 株完全一致。C 端的 9 个 Cys(869、877、893、896、915、931、946、967 和 984 位)形成了分子内二硫键,对 A 区结构似乎不很重要;而 N 末端的 6 个 Cys 对 E2 结构的正确折叠及特异抗原决定簇的形成至关重要。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,并且为 B、C 区 MAb 免疫反应所必须;Cys792 和 Cys856, Cys818 和 Cys828 形成了两个二硫键并导致了 A 区及 D 区的固定,并为 A、D 区 MAb 免疫反应所必须。由此形成了两个独立的抗原单位结构,一个包括 B、C 区,由多个非保守的抗原位点组成;另一个包括 A、D 区,由一些保守和非保守的抗原位点组成。根据对 E2 结构的预测分析,表明我们所测的 4 株 E2 糖蛋白在构型上没有发生变化,而且 4 株 E2 糖蛋白的构型是基本一致的。

致谢 本研究得到北京市农林科学院周 煜,中山大学李安兴博士后的帮助,特此致谢!

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] Ruménapt T, Meyers G, Stark R, et al. *Virology*, 1989, **171**: 18 ~ 27.
- [3] Moormann R J M, Warmerdam P A M, Van der meer B, et al. *Virology*, 1990, **177**: 184 ~ 198.
- [4] Meyers G, Ruménapt T, Thiel H J. *Virology*, 1989, **171**: 555 ~ 567.
- [5] Thiel H J, Stark R, Weiland E, et al. *Journal of Virology*, 1991, **65**: 4705 ~ 4712.
- [6] Van Rijn P A, Rene G P, Gennip V, et al. *Veterinary Microbiology*, 1992, **33**: 221 ~ 230.
- [7] Lowings P, Ihata G, Needham J, et al. *Journal of General Virology*, 1996, **77**: 1311 ~ 1321.
- [8] 李红卫,涂长春,金扩世,等. 猪瘟病毒石门株与免化弱毒株主要保护性抗原 E2 基因的序列测定. 见:谢庆阁,翟中和主编. 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.
- [9] 李红卫,涂长春,吕宗吉,等. 吉林省两个猪瘟病毒野毒株囊膜糖蛋白 E2 基因抗原决定区的序列分析与其它毒株的比较. 见:谢庆阁,翟中和主编. 畜禽重大疫病免疫防制研究进展. 北京:中国农业出版社,1995. 27 ~ 32.
- [10] 朱 燕,付烈振,王 宁,等. 猪瘟病毒免化弱毒疫苗株(HCLV)包膜糖蛋白 E1 基因 cDNA 扩增与克隆. 见:谢庆阁,翟中和主编. 畜禽重大疫病免疫防制研究进展. 北京:中国农业出版社,1997. 33 ~ 37.
- [11] Van Rijn P A, Van gennip H G P, Meijer E J, et al. *Journal of general virology*, 1993, **74**: 2053 ~ 2060.
- [12] Van Rijn P A, Miedema G K W, Wensvoort G, et al. *Journal of general virology*, 1994, **68**: 3934 ~ 3942.
- [13] 丘惠深,郎洪武,王在时. 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. 见:谢庆阁,翟中和主编. 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.
- [14] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning*. 2 nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- [15] 姜 泊. 分子生物学常用实验方法. 北京:人民军医出版社,1996.
- [16] 徐 洵. DNA 重组技术实验室操作手册. 北京:科学出版社,1990.
- [17] Moormann R J, Van Gennip H G, Miedema G K, et al. *Journal of Virology*, 1996, **70**(2): 763 ~ 770.
- [18] 丘惠深,王在时,郎洪武. 中国兽药杂志. 1997, **31**: 1 ~ 3.
- [19] 沈 同. 高级生物化学. 北京:高等教育出版社,1992.
- [20] Hulst M M, Westra D F, Wensvoort G, et al. *Journal of Virology*, 1993, **67**: 5435 ~ 5442.
- [21] Flores E F, Kreutz L C, Donis R O. *Journal of General Virology*, 1996, **77**: 1295 ~ 1303.

SEQUENCING OF E2 GENE AND COMPARISON ANALYSIS OF FOUR STRAINS HOG CHOLERA VIRUS (HCV) *

Wang Qin Li Bo Wang Zaishi Qiu Huishen Lang Hongwu

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

Abstract: Four cDNA fragments of envelope glycoprotein E2 gene of SM strain, HCLV strain, F03 strain and F07 strain were amplified respectively with RT-PCR method. The amplified E2 fragments of four HCV strains were all 1273 bp in length by agarose gel electrophoresis. Four E2 fragments were cloned respectively into pGEM-T easy vector. 1273bp cDNA fragment of Four HCV E2 gene were sequenced and 381 residues amino acid sequence of E2 glycoprotein were deduced. The signal peptide sequence (WLLLVTGA) located in the N-terminal residues 683 ~ 690 and the transmembrane region (TMR) sequence located in the C-terminal residues 1031 ~ 1063 of Four E2 gene were highly conserved and hydrophobic region. The conserved sequence among the E2 protein of pestiviruses, RYLASLH which located in the N-terminal residues 753 ~ 759 of domains B and C, was hydrophilic, and none of them were variable among the pestiviruses, and the greatest values of antigenic in all E2 antigenic domain. This suggest that the conserved sequence RYLASLH are involved in E2 epitopes. The number and locations of 15 cysteine residues in E2 are conserved among pestiviruses, suggesting that the structure of this glycoprotein is similar in pestiviruses and the first six cysteines are critical for the correct folding of E2 and essential for all identified epitopes. It is showed epitopes between HCLV strains and field strains are not variable obviously by analysing the variation of some main amino acid residue substitutions of E2 major antigenic domains.

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

* Major Project of National Basic Research Foundation of China (85-44-01-03)