

猪瘟疫病毒中国标准强毒株——F114 株全长 cDNA 的构建*

聂玉春 柯叶艳 陈建国 丁明孝**

(北京大学生命科学院 北京 100871)

摘 要:应用 RT-PCR 技术,分段克隆了猪瘟疫病毒中国标准强毒株 F114 株的全基因组,经测序验证,用 DNAMAN 软件比较分析与其它几个代表毒株的同源性,发现与 Brescia、Alfort 及 C 株核苷酸序列同源性分别为 96.80%, 86.03% 和 95.70%, 氨基酸序列同源性分别为 98.54%, 93.33% 和 97.41%。将各段 cDNA 连接到 pGEM-T 和 pBluescript II sk⁺ 质粒,得到两个亚克隆 sk-0164(即 sk⁺ 质粒中插入片断为 1~6441nts,依次类推)和 sk-64122,再将两个亚克隆连接成 sk-12297,即 CSFV 全长 cDNA 克隆。

关键词:猪瘟疫病毒, 全长 cDNA, 序列同源性

中图分类号:S852.65 文献标识码:A 文章编号:0001-6209 (2001) 04-0452-05

猪瘟疫病毒(Classical Swine Fever Virus, CSFV)是引起猪高度传染性疾病——猪瘟疫的病原,与羊边界病病毒(Border Disease Virus, BDV)、牛病毒性腹泻病病毒(Bovine Viral Diarrhea Virus, BVDV)一起构成黄病毒科的瘟病毒属。猪瘟疫病毒是基因组长约 12.3kb 的正链 RNA 病毒,一个大 ORF 编码约 3900 个氨基酸多肽,在翻译过程中或翻译后被加工成结构和非结构蛋白^[1,2]。尽管猪瘟疫病毒仅编码 11~12 个蛋白,但它与宿主细胞的相互关系比较复杂,其致病相关蛋白方面的研究缺乏有力证据,研究猪瘟疫病毒的致病机理进展缓慢。从全长 cDNA 恢复有活性的病毒粒子这一手段的成熟及应用,是研究病毒的致病因子、RNA 复制、病毒基因产物的功能、阐明病毒的致病机理等极具价值的工具。目前已在多种正链 RNA 病毒中成功应用。国外文献已报道了构建 CSFV 的 C 株和 Alford/187 株、BVDV 的 NALD 株等的全长 cDNA,并用于研究病毒单个蛋白的功能,取得了一些可喜进展^[3~5]。本实验用我国标准强毒株(石门株)为材料,构建了 CSFV 全长 cDNA,为研究猪瘟疫病毒增殖、致病机理及中国强弱毒株之间的关系提供了理想的材料。

1 材料和方法

1.1 病毒与细胞

石门株 F114 脾淋毒(购自中国兽药监察所),在 PK-15 细胞上复壮至第五代,差速离心法纯化病毒,用盐酸胍裂解法提取 RNA,用于 RT-PCR。

1.2 载体与引物

所用载体有 pBluescript II sk⁺、pGEM-T 和 pET-28a 等。Taq 酶 Elongase system、反转录

* 国家攀登计划资助项目(No.85-44-02-05)和国家重点基础研究发展规划项目(G1999011904)资助

** 通讯作者

作者简介:聂玉春(1973-),男,安徽和县人,北京大学博士研究生,从事病毒分子生物学和细胞生物学研究。

收稿日期:2000-07-24,修回日期:2001-01-12

酶 Superscript II 和 T4 DNA 连接酶均购自 Life Technology, Inc., 限制性内切酶购自 NEB 和 Promega 公司

根据已发表的猪瘟疫病毒 C 株及 Brescia 序列设计引物,由塞百盛生物公司合成。引物名称为“P”表示上游引物,“N”表示下游引物,数字表示引物 5' 端对应的病毒基因组中碱基位置。

P1:AGA TTG AAT TCG TCG ACT AAT ACG ACT CAC TAT AGT ATA CGA GGT TAG TTC ATT CTC

N1298:GGA CTC CTT TGC ATA TTT TTT CCG GC

P1172:CGG GAT CCA TGG CCG AAA ATA TAA CTC A'

N3475:ATT TGT TGT CTT GGT GGT GTG AGA ATT CCG

P3231:AGG TGC ATG CAT CAG ATG AAA GAT TGG GCC

P5106:GAA GAT CTA TGG GAG ATT TGG AAC ACC TTG

N5711:AAG CTT-ATG AGT GGA ATA CAA ACA G

P6436:CCT GAG GAT CCA TCT AAC CT

N6441:GAT GGA TCC TCA CCA CTA T

P8660:GGT TCA TTT CTC TGC ATA AAT AAA TTC GGG

N8690:CCC GAA TTT ATT TCT GCA GAG AAA TGA ACC

P9909:GGG GAT CC ATG AAA CTG AGT AAT TGG GTG ATG CAA G

N10721:CGG AAT TCT CAG GCG GTC CAG TCA TCG TT

N12297:GA TCT AGA GCC CGG GCC GTT AGA AAT TCC C

1.3 RT-PCR 及亚克隆过程

为了获取 CSFV 全基因组 cDNA,用 N6441 和 N12297 为一套引物,分别做 3 套独立的逆转录反应。分段 PCR 扩增 3 套如下片段:F0112(即 CSFV 基因组上第一个到第 1200 多碱基,依次类推)、F1134、F3257、F5164、F6486、F86107 和 F99122,分别亚克隆入 pBluescript SK⁺ 或 pGEM-T 的 EcoR V 位点,经 ABI PRISM 377XL 测序验证正确后,再将 F0112、F1134、F3257 及 F5164 连接成亚克隆 SK-0164,将 F6486、F86107 和 F99122 连接成亚克隆 SK-64122。最后将 SK-0164 和 SK-64122 连接成 SK-01122。

2 结果

2.1 cDNA 合成及 PCR

根据已发表 CSFV 的 C 株及 Brescia 序列,用 primer 5.0 辅助设计引物。用 N6441 和 N12297 作为反转录引物,考虑到长片段 PCR 扩增时的错配率,将基因分成七段扩增,因此合成了七对引物,最长的片段 2.5kb,最短的 1.2kb。优化 PCR 条件,各段都扩增出了与理论相符的片段(图 1)。

2.2 PCR 产物的克隆及序列测定

分别将三套 PCR 得到的片段与载体连接后,经 IPTG/X-gal 筛选,酶切鉴定出阳性质粒,再经测序验证。三次测序结果中出现差异时,以其中两次结果相同者视为正确。根据测序结果,选取以下酶切位点连接,其中 5' 端的 *Sa*I, 3' 端的 *Sf*I 和 *Xba*I 为引入位

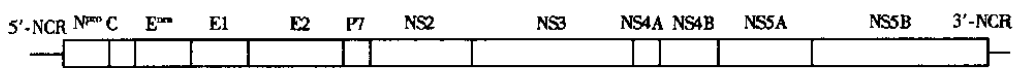


图 1 CSFV 基因组结构

Fig.1 The organization of CSFV

NCR: non-code region, Npro: the first non-structure protein, C: core protein, E0, E1, E2: envelope protein, NS2 - 5: non-structure protein.

点, *Bam*H I 位点在基因组中只出现在第 6436 核苷酸处(图 2)。所测序列已录入 Genebank, 序列号为: AF333000。

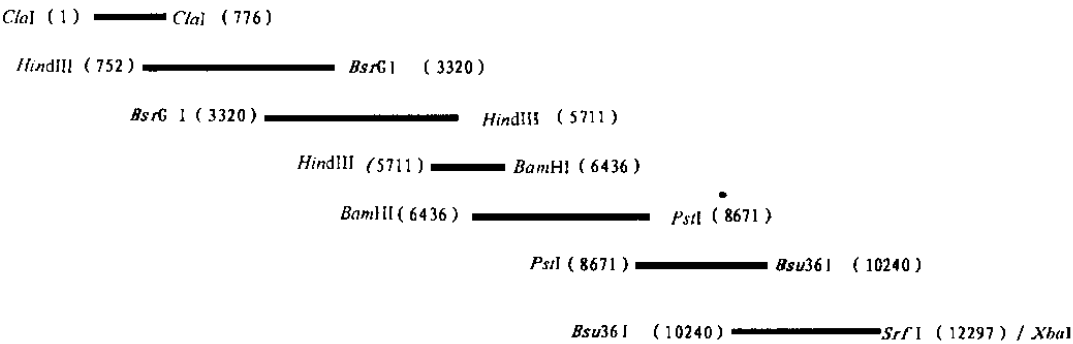


图 2 构建全长 cDNA 的七个片段示意图

Fig.2 The seven fragments used to construct the full-length cDNA

The restriction endonucleases sites at the both ends of the lines are used in construction of full-length cDNA, and the numbers behind the sites show it's location in virus genome.

2.3 全序列比较

所得石门 F114 株全序列与 Brescia, C 和 Alfort 株进行比较发现与 Alfort 株差异较大, 这与其它毒株与 Alfort 株比较结果一致。与欧洲标准强毒株 Brescia 同源性为 96.80%, 略高于 C 株的 95.70%。编码氨基酸序列比较结果也显示了这种一致性, 即 F114 与 Brescia 同源性为 98.54%, 略高于 C 株的 97.41%(表 1)。

表 1 石门株 cDNA 序列与其它毒株的比较结果

Table 1 The results of sequence analysis

	Nucleotide sequence identity/%	Amino acid sequence identity/%
Brescia	96.80	98.54
C strain	95.70	97.41
Alfort	86.03	93.33

Brescia: strong virulent strain of Europe, C strain: Chinese strain, Alfort: moderate virulent strain of Europe

2.4 全长 cDNA 连接及鉴定

全长 cDNA 连接的具体流程如图 3。

连接成的全长 cDNA sk-12297 经 *Sal* I 和 *Not* I 双酶切, 得 12.3kb 插入片段和 2.9kb 的载体条带(图 4)。

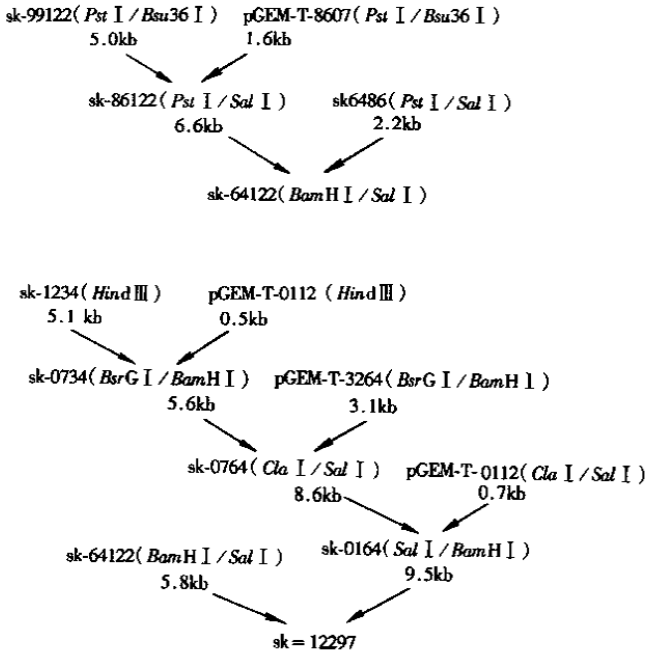


图3 全长 cDNA 连接流程图

Fig.3 The procedure of construction of full-length cDNA

The restriction endonucleases sites behind the plasmid were used in ligation, the number below the plasmid show the size of fragment recovered.

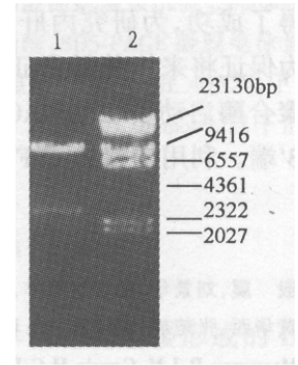


图4 SK-12297 酶切电泳照片

Fig.4 Identification of recombinant SK-12297

1. SK-12297 / Sal I + Not I;
2. λDNA / Hind III marker.

3 讨论

序列比较显示,我们获得的石门株序列 5' 端 14 个碱基(GTATACGAGGTTAG)是相当保守的,与 C、Brescia 和 Alfort 株的相应序列完全相同。这可能与 BVDV 的特征相似,即 5' 端 9 个碱基与 5' 端非翻译区后部对应碱基形成有功能的茎环二级结构。石门株、Brescia 和 Alfort 株在第 123 位少一个碱基“A”,而 C 株则于此处多一个“A”。但 C 株比其它三株于 246 位少一个碱基“C”。这种差别在 CSFV 强弱毒株之间的意义尚不清楚。本实验所测的石门株序列与报道的石门株序列核苷酸同源性 99.4%,氨基酸同源性 99.5%^[2],除去 3' 端经 1000 个碱基,二者同源性达到 99.8% 以上,在差异较多的 3' 端,我们所测的序列与其它来源的 CSFV 序列一致,而已报道的石门株序列则是唯一的。这种差别可能是材料来源有所不同或实验方法不同所致。在克隆过程中发现,将石门株基因 5' 端一半插入 pBluescript II sk⁺ 中,得重组质粒 SK-64122,转化后,对宿主菌 XL-1Blue 无明显影响,将 3' 端一半插入 pBluescript II sk⁺ 中,得 SK-64122,转化后,轻度抑制宿主菌的生长。这与 Hofmann 等构建的 Alfort/187 全 cDNA 有所不同,将 Alfort/187 基因组的 5' 端或 3' 端任一半插入 pBluescript II sk⁺ 中,都会强烈抑制宿主菌 XL-1-Blue 的生长,Khromykh 等构建 Kunjin 病毒的全长 cDNA 时也发生了类似现象^[4,6]。因此,他们无法用 pBluescript II sk⁺ 质粒构建 CSFV 全长 cDNA。这可能是由于两种毒株基因组序列差异造成的。连接成全长 cDNA 后,即 SK-12297,转化后对宿主菌抑制较强。这种现象体现了同种病毒在细节方面的差异,而在整体方面又能相似特征的性质。从全长 cDNA 获得有活性的病毒粒子的

方法,有利于人们对病毒基因组按不同目标进行操作,快速寻找病毒的重要功能基因,为研究病毒单个基因的作用和功能提供了良好的前景。有人研究了鼠肝炎病毒(MHV)强弱毒之间的关系,发现将 MHV 病毒的 S 基因替换到由 MHV 弱毒构建的全长 cDNA 中,获得的感染性 RNA 变成了有致病力的感染性 RNA,子代病毒的组织亲嗜性也与强毒株一致,从而认为 S 基因是 MHV 的重要致病基因^[7,8]。近年来,从全长 cDNA 获得有活性的病毒粒子的方法,已在研究多种较小的 RNA 病毒中得到应用,如:新城疫病毒^[9],牛病毒性腹泻病病毒^[5]。最近,从全长 cDNA 获得有感染性的人丙型肝炎病毒 RNA 感染细胞和黑猩猩获得了成功,为研究丙肝这一难题带来了曙光^[10,11]。

为保证将来体外转录正确进行,产生严格的 5'和 3'端,将 CSFV cDNA 的 5'端置于 T7 RNA 聚合酶启动子(TTAATACGACTCACTATA)下游。在 3'端引入 *Srf*I 位点,切割后产生石门株的 3'端。利用构建的 CSFV 全长 cDNA 研究我国猪瘟强弱毒之间的关系,正在研究中。

参 考 文 献

- [1] 殷 震,刘景华.动物病毒学.第二版.北京:科学出版社,1997.652~664.
- [2] 黄华西,张楚瑜,王家富,等.科学通报,1999,17:1823~1825.
- [3] Moormann R J M, Gennip H G P, Miedema G K W, et al. *J Virology*, 1996, 70:763~770.
- [4] Nicolas R, Tratschin J, Mittelholzer C, et al. *J Virology*, 1996, 70:3478~3487.
- [5] Kummerer B, Meyers G. *J Virology*, 2000, 74:390~400.
- [6] Khromykh A A, Westaway E G. *J Virology*, 1994, 68:4580~4588.
- [7] Joanna J, Phillips M, Ming C, et al. *J Virology*, 1999, 73:7752~7760.
- [8] Carlos M, Sánchez A I, Jose M, et al. *J Virology*, 1999, 73:7607~7618.
- [9] Ben P H P, Leeuw O S, Koch G, et al. *J Virology*, 1999, 73:5001~5009.
- [10] Marian E M, Mihalik K, Fernandez J, et al. *J Virology*, 1999, 73:3317~3325.
- [11] Keril J B, Kolykhalov A A, Rice C M. *Science*, 2000, 290:1972~1974.

CONSTRUCTION OF THE FULL-LENGTH cDNA CLONE OF CHINESE VIRULENT STRAIN—F114*

Nie Yuchun Ke Yeyan Chen Jianguo Ding Mingxiao**

(College of life sciences, Peking University, Beijing 100871)

Abstract: Seven subclones covered the complete genome of classical swine fever virus Chinese virulent strain F114 were obtained by reverse transcription PCR. The complete nucleotide sequence of the genome of strain F114 was determined by sequencing. The cDNA fragments were then assembled and inserted downstream of a T7 promoter in pBluescript II sk⁺ plasmid vector to obtain the full-length cDNA clone sk-12297. Homology comparison of the nucleotide and amino acid sequence of strain F114 with the known sequences of HCLV, Brescia and Alfort showed 95.70%, 96.80%, 86.03% identity in nucleotide and 97.41%, 98.54%, 93.33% identity in amino acid respectively.

Key words: Classical Swine Fever Virus (CSFV), Full-length cDNA, Homology comparison

* The work was supported by 973 grant from National Science and Technology Commission of China

** To whom correspondence should be addressed