

两个猪瘟病毒野毒株 gp55 基因抗原编码区序列的分析及比较*

李红卫 涂长春 吕宗吉** 金扩世 殷震

(长春农牧大学, 长春 130062)

5852.651

A 摘要 利用反转录-PCR方法扩增了吉林省猪瘟病毒(HCV)两个野毒株 gp55 基因的主要保护性抗原编码区,并将其克隆到 pGEM-T 载体中,然后用 Sanger 双脱氧法测定了其核苷酸序列,并推导了其氨基酸序列。将测定的这两个 HCV 野毒株的部分序列(350bp)与国内外已知的 HCV 序列进行比较,结果表明:这两个野毒株的核苷酸序列的同源性为 94.9%,氨基酸序列同源性为 97.4%,与 1985~1992 年意大利中部分离 4 个野毒株的同源性明显高于其它 HCV 毒株,核苷酸同源性分别为 97.2%~98.3% 和 94.0%~94.9%,氨基酸同源性分别为 98.3%~99.1% 和 97.4%~98.3%,而与我国的 HCV 标准强毒株即石门株的核苷酸同源性仅分别为 83.1% 和 83.1%,氨基酸同源性仅分别为 90.6% 和 91.4%。因此认为吉林省这两个野毒株与意大利中部的 4 个野毒株具有密切的关系,而与石门株很可能来源不同。

关键词 猪瘟病毒,野毒株, gp55 基因, 序列分析

家畜病毒

猪瘟(HC)是我国猪的最重要传染病之一,其病原体是猪瘟病毒,属黄病毒科瘟病毒属成员^[1]。虽然在我国应用兔化弱毒疫苗较好地控制了猪瘟疫情,但各地仍有猪瘟的散发和流行,其原因是复杂的。野毒株在大规模免疫接种的压力下发生抗原变异,逃避疫苗保护性免疫,可能是导致免疫失败的重要原因之一。

猪瘟病毒(HCV)只有一个血清型,但用单克隆抗体(McAb)可以将 HCV 区分为不同的毒株。对能引起猪瘟暴发流行的猪瘟病毒株进行流行病学跟踪研究,是成功消灭猪瘟的重要前提。由于 McAb 可能只对少数具有高免疫原性的位点呈现反应性,仅反复地作用于该病毒的一小部分区域,因此应用 McAb 难以全面和深入地阐明 HCV 及其相关病毒的内在结构、组成和相互关系^[2]。

PCR 技术与核酸序列测定技术相结合,已被广泛用于如丙型肝炎病毒^[3]、登革病毒^[4]、牛病毒性腹泻病毒^[5]、口蹄疫病毒^[6]等多种病毒的分子流行病学研究。Lowing 等^[2]和 Hofmann 等^[7]采用该技术分别对意大利和瑞士最近几年发生的猪瘟进行分子流行病学研究,结果表明:7 年间从意大利分离的 HCV 野毒株可以分为两个亚型而与另一亚型(包括 Weybridge 和 Alfort187 两个标准株),在序列上有明显的差异;瑞士最近几年发生的猪瘟至少由两种不同亚型的 HCV 野毒株引起。

本研究在测定了我国猪瘟病毒标准强毒石门株和兔化弱毒株主要保护性抗原 gp55 基因序

收稿日期:1996-03-07,修回日期:1997-03-24

* 国家自然科学基金和国家攀登计划 B 类项目资助课题
** 佛山科学技术学院,广东佛山

列的基础上,首次完成了国内两个 HCV 野毒株 gp55 基因抗原决定区的克隆和序列分析,并与国内外已知的 HCV 序列进行了比较,对它们存在的差别和关系在分子水平上进行了分析。

材料和方法

1 猪瘟病料 1995 年 7 月和 1996 年 1 月长春市郊区和吉林市效区某猪场分别送来病猪,临床症状、病理剖检均被诊断为典型的急性猪瘟,免疫荧光染色、电镜负染均为阳性。选择脾或淋巴结作为 PCR 检测病料。

2 病毒 RNA 提取^[6] 采用异硫氰酸胍一步法从猪瘟病料(脾或淋巴结)中提取总 RNA。

3 引物的设计与合成 根据 HCV Alfort 株^[9]与 Brescia 株^[10]的基因组序列,化学合成一对简并引物。其中引物 Pe0 5'端后 19 个碱基位于 Brescia 株的 2428~2436, Pa 则位于 Brascia 株的 2992~3011。

Pe0 5' CATGCGGCTAGCCTGc/tAAGGAAG 3'

Pa 5' GTCAGTGGt/gTCGCTTTc/tAC 3'

4 RT-PCR 取适量 HCV RNA,分别加入引物 Pa、反转录酶缓冲液、dNTP、RNasin 和 AMV(Promega),42℃水浴 1 h。再取适量反转录产物,加入引物 Pe0、Pa 等按常规方法以 95℃ 1 min、37℃ 2 min、73℃ 1 min、1 个循环,随后以 95℃ 40"、51℃ 1 min、73℃ 1 min、35 个循环,最后 73℃ 延伸 10 min。扩增产物于 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳。

5 扩增片段的克隆和序列分析^[11] 用标准方法将扩增片段纯化后或直接克隆到 pGEM-T 载体(按 Promega 操作说明进行)。克隆后用 Promega Taq 测序试剂盒或 Pharmacia T7 测序试剂盒对扩增片段进行序列测定。

6 核苷酸与氨基酸的序列对比与分析 将测得的核苷酸序列与推导的氨基酸序列与其它 HCV 株进行同源性比较,根据各 HCV 株的核苷酸序列用 DNAsis 计算机分析软件(Hitachi Software Engineering Co, Ltd)进行系统树分析。

结 果

1 长春、吉林两个野毒株的核苷酸和氨基酸序列

琼脂糖凝胶电泳表明,以 Pe0、Pa 为引物用 RT-PCR 法成功地从长春、吉林两地收集的猪瘟病料提取的 RNA 中扩增出了与预计大小(588bp)相符的片段(电泳图略)。将 PCR 产物直接克隆到 pGEM-T 载体中,然后用双脱氧法进行了序列测定。核苷酸序列测定结果见图 1。由核苷酸序列推导的氨基酸序列见图 2。

2 核苷酸和氨基酸序列比较

将测得 HCV 长春、吉林野毒株序列中的 5'端 350bp 及其编码的氨基酸序列(N 端 116aa)与国内外已知的其它 HCV 毒株相应序列进行同源性比较。各毒株来源及在 GenBank 中的编号见表 1,同源性比较结果见表 2 和表 3。最后我们根据各 HCV 株的核苷酸序列用 DNAsis 计算机软件进行了系统树分析,结果见图 3。结果表明:这两个野毒株的核苷酸序列及氨基酸序列,与 1985~1992 年意大利中部分离的 4 个野毒株的同源性明显高于其它 HCV 毒株,它们归于

表 1 HCV 株的来源及 GenBank 登录号
Table 1 Origins and Genbank accession numbers for the hog cholera virus isolates

毒株 Isolate	来源 Origin	GenBank 登录号 Accession (Genbank)
C1W	意大利	L36164
C2W	意大利	L36165
C3D	意大利	L36166
C4D	意大利	L36167
C5W	意大利	L36168
Alfort	法 国	J04358
Brescia	意大利	M31768
Shimen	中 国	U72047
HCLV	中 国	U72048
Taiwan	台 湾	U35069
ALD	日 本	D49532

同一基因型,而我国的 HCV 标准强毒石门株则位于另一基因型

```

CC 1 ACTACAGATA TGCATATCA TCAATCAATG AGATAGGGTT GCTAGGGGCT
JL 1 *****G* ***** *C* *****C* *G*****
CC 51 GAAGGTCTCA CCACTACATG GAAAGAATAC AGCCATGGTT TGCAGCTGGA
JL 51 ***** ***** ***** *****A*
CC 101 TGAOEGGACC GTCAAGGCCA TTTGCATTGC AGGGTCTTTT AAAGTCACAG
JL 101 ***** ***** ***** *****G*
CC 151 CACTTAATGT GGTAGTAGG AGGTACCTGG CATCATTGCA TAAGAGGGCT
JL 151 *C***** ***** *****A* *****
CC 201 CTACCCAOCT CAGTGACATT TGAACCTTTA TTTGAOGBAA CCAGCCOABT
JL 201 ***** *****A***** *****C*****G* *****
CC 251 AATTGAGGAG ATGGGAGATG ACTTCGGATT TGGGCTGTGC CCATTGACACA
JL 251 ***** *****T**G* **A***** **T***
CC 301 CGAGTCCOCT GGTCAAAGGG AAGTACAATA CCACITTTATT AAATGGCAGT
JL 301 *****A***** *****C***** *****
CC 351 GCTTTCTATC TAGTCTGCC AATAGGGTGG ACGGGTGTCA TAGAGTGAC
JL 351 ***** *****A***** *****
CC 401 TGCTGTGAGC CCCACAAOCC TGAGAACAGA GGTGGTAAAG ACTTTCAGGA
JL 401 **A***** *****T *****G***** *****T****
CC 451 GAGAGAAGCC TTTCCATAT AGAGTAGATT GTGTGACCAC CATGGTAGAA
JL 451 *****G***** **T***** *****
CC 501 AAAGAAGACC TATTCATTG CAAGTTGGGG GGTAAATTGGA CGTGT.....
JL 501 ***** *****T***** *****
    
```

图1 猪瘟病毒长春株(CC)和吉林株(JL)gp55 基因抗原决定区的核苷酸序列

Fig 1 Nucleotide sequene of gp55 antigen encoding region of HCV strains Changchun (CC) and Jilin (JL)

```

CC 1 YRYAISSINE IGLLGAEGLT TTWKEYSHGL QLDDGTVKAI CIAGSFKVTA
JL 1 *****T* ***** ***** *N*****
CC 51 LNVVSRRYLA SLHKRALPTS VTFELLEDGT SPVIEEMGDD FGFGLCPFDI
JL 51 ***** ***** *****L*****
CC 101 SPVVKGKYNT TLLNGSAFYL VCPIGWTGVI ECTAVSPITL RTEVVKIFRR
JL 101 ***** ***** ***** *****
CC 151 EKPPFYRVDV VTMVEREDL FHCKLGGNWT C.....
JL 151 *R***** ***** *****
    
```

图2 猪瘟病毒长春株(CC)和吉林株(JL)gp55 抗原区的氨基酸序列

Fig 2 Amino acid sequence of gp55 antigen region of HCV strains Changchun(CC) and Jilin(JL)

表2 CC株和 JL 株与其它 HCV 株核苷酸序列同源性比较

Table 2 Comparison of homology of the nucleotide sequences of HCV strains CC and JL with other ones

毒株 Isolate	核苷酸序列同源性(%) Nucleotide sequence identity (%)										
	C1W	C2W	C3D	C4D	C5W	Alfort	Brescja	Shimen	HCLV	Taiwan	ALD
CC	98.3	97.2	98.0	97.4	88.9	90.6	82.0	83.1	81.7	83.1	83.4
JL	94.9	94.3	94.6	94.0	89.1	90.9	81.7	83.1	80.9	83.1	84.3

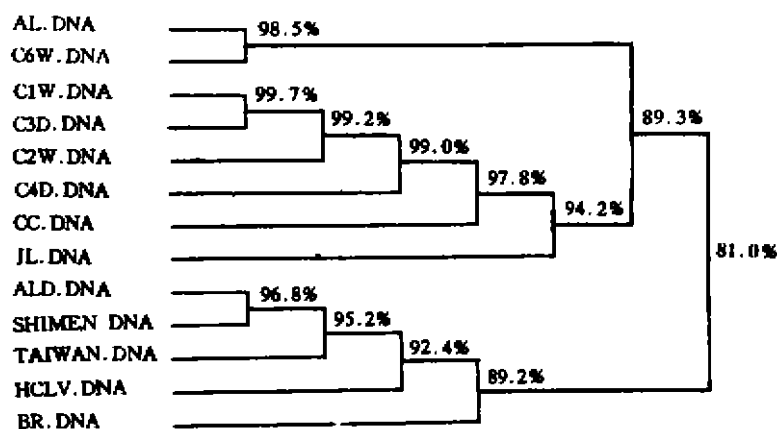


图3 各 HCV 株的系统树分析

Fig 3. Phylogenetic tree for HCV isolates

表3 CC株和JL株与其它HCV株氨基酸序列同源性比较

Table 2 Comparison of homology of the amino acid sequences of HCV strains CC and JL with other ones

毒株 Isolate	氨基酸序列同源性(%) Amino acid sequence identity (%)										
	C1W	C2W	C3D	C4D	C5W	Alfort	Brescia	Shimen	HCLV	Taiwan	ALD
CC	99.1	98.3	98.3	98.3	94.0	94.0	91.4	90.6	86.2	88.0	90.0
JL	98.3	97.4	97.4	97.4	93.1	93.1	90.6	91.4	87.1	88.8	90.6

讨 论

在我国,猪瘟仍是猪的头号传染病,但是在分子水平上对猪瘟传播、演变及病毒的遗传变异情况还缺乏了解,因此,很有必要在我国进行猪瘟的分子流行病学研究,从而为猪瘟的防治提供理论依据。

本研究所扩增的片段是 HCV 主要保护性抗原决定簇编码区,位于主要保护性抗原 gp55 基因 5'端一半。与猪瘟病毒同属的牛病毒性腹泻病毒相对应的 gp53 在抗原上的变异,正是导致该病逃脱免疫保护的原因^[5],因此分析和比较所扩增片段的序列,不仅可以进行 HCV 分子流行病学研究,而且可以分析 HCV 抗原的变异性,进而在分子水平探讨 HC 免疫接种失败的原因。

将测得的长春(CC)、吉林(JL)HCV 野毒株的核苷酸序列和氨基酸序列,与国内外已知的其它 HCV 相应序列进行比较。这两个野毒株的核苷酸序列的同源性为 94.9%,它们分别从相距 100 公里左右的长春市郊区和吉林市郊区收集,时间也仅差约半年,可是核苷酸序列却有明显的差异,这种差异的产生可能是毒株的变异所致,也可能是来源不同所引起。CC 株和 JL 株与意大利中部的 4 个野毒株(C1W、C2W、C3D 和 C4D)之间的同源性分别高达 97.2%~98.3% 和 94.0%~94.9%,可以归于同一基因亚型,因此可以推测吉林省近几年和意大利中部 1985~1992 年发生的猪瘟具有密切的关系,有必要进行深入调查研究。

CC株和JL株与我国的HCV标准弱毒株即石门株的核苷酸同源性仅分别为83.1%和83.1%,氨基酸同源性分别为90.6%和91.4%;与吉林兽医生物制品厂提供的猪瘟兔化弱毒株(HCLV)之间的核苷酸同源性分别为81.7%和80.9%,氨基酸同源性分别为86.2%和87.1%。这种差异的产生一方面可能由CC株和JL株与石门株的来源不同导致,另一方面也可能是变异引起。由于所比较的序列为主要保护性抗原决定区,因此这种差异很可能导致抗原性差异,从而使CC株和JL株逃脱兔化弱毒株的免疫保护,导致不完全免疫甚至免疫失败。另外,由于野毒株与标准石门株的氨基酸序列差异可能导致抗原性的差异。因此目前利用石门株单克隆抗体检测猪瘟野毒株及其抗体看来不够合理,有必要研究出多种野毒株的单克隆抗体。

总之,本研究在国内首次开展了HCV野毒株的基因克隆和序列分析,对吉林省CC株和JL株的遗传变异情况在分子水平上有一个初步的了解,为广泛开展我国猪瘟的分子流行病学打下实验基础,同时也为猪瘟的防治和诊断提供科学依据。

致谢 该研究得到本校夏志平、杨德才、王新平、周绪斌等同志的大力帮助,特此致谢。

参 考 文 献

- 1 Wengler G. Classification and nomenclature of viruses. *Arch Virol*, 1991, Suppl 2:228-229
- 2 Lowing J P, Paton D J, Sands J J *et al* . Classical swine fever: genetic detection and analysis of differences between virus isolates. *J Gen Virol*, 1994, 75:3461-3468
- 3 Ohno T, Mizokami M, Saleh M G *et al* . Usefulness and limitation of phylogenetic analysis for hepatitis C virus core region: application to isolates from Egyptian and Yemeni patients. *Arch Virol*, 1996, 141:1101-1113
- 4 Rico-Heese R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology*, 174:479-493
- 5 Ridpath J F, Bolin S R, Dubovi E J. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotype. *Virology*, 1994, 205:66-74
- 6 Beck E, Sterohmaier K. Subtyping of European foot and mouth disease virus strains by nucleotide sequence determination. *J Virol*, 1987, 61:1621-1629
- 7 Hofmann M A, Brechtbuhl K, Stauber N. Rapid characterization of new pestivirus strains by direct sequencing of PCR-amplified cDNA from the 5' noncoding region. *Arch Virol*, 1994, 139:217-229
- 8 涂长春,李红卫,金扩世等.猪瘟病毒石门株cDNA片段的扩增与序列分析. *病毒学报*, 1994, 10(1):33-38
- 9 Meyers G, Rumenapf T, Thiel H J. Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. *Virology*, 1989, 171:555-567
- 10 Moormann R J M, Warmerdam P A M, Meer B V D *et al* . Molecular cloning and nucleotide sequence of hog cholera virus strain Brescia and mapping of the genome region encoding envelope protein E1. *Virology*, 1990, 177:184-198
- 11 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning*. 2nd ed. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Sequence Analysis and Comparison of gp55 antigen encoding region of Hog Cholera Virus isolates of Changchun and Jilin

Li Hongwei Tu Changchun Lu Zongji* Jin Kuoshi Yin Zhen
(Changchun University of Agricultural and Animal Sciences, Changchun 130062)

One pair of oligonucleotide primers were designed to amplify the region of hog cholera virus (HCV) genome, which corresponds to a 588 bp portion encoding the major protective antigen region, a part of gp55 protein. The product was amplified from two virus isolates (strains CC and JL) which had been responsible for two hog cholera outbreaks in Jilin province in the northeast of China. The cDNA products were cloned into pGEM-T vector. Nucleotide sequencing was performed by Sanger's method. A part of the obtained two HCV (CC and JL) sequences, 350 bp, were compared with other HCV strains. This allowed confidently assigning the two virus isolates and 4 virus isolates from the central regions of Italy to a subgroup. But the Chinese standard virulent strain Shimen was assigned to another subgroup.

Key words Hog cholera virus, Field isolates, gp55 gene, Sequence analysis

* Fushan Veterinary College, Guangdong Province