

112

163-168

S85-2.651

猪瘟病毒石门株 NS2-3 基因片段的序列测定及比较

黄茜华 张楚瑜* 王宁 傅烈振 王家富

(武汉大学生命科学院, 武汉 430072)

摘要 根据猪瘟病毒 C 株的序列, 以计算机辅助设计, 化学合成 1 对引物 (PF 5648/PR 6604), 应用 RT-PCR 技术从感染猪血中成功地扩增了我国猪瘟病毒强毒石门株 NS2-3 基因片段, 大小为 957 bp, 位于 NS3 基因的中部 NTPase 和 Helicase 活性区。克隆后测序, 结果表明该段基因产物具有解旋酶超家族全部七个特征性保守序列, 包括共同的 NTP 结合基序 A 位点 (GXGKT/S) 和 B 位点 (3 hy, 2 x) D。序列同源性比较表明, 石门株与日本的 ALD 和 GPE⁻ 株同源性最高, 与其它 3 株猪瘟病毒 (C 株、Brescia 株和 Alfort 株) 的同源性也很高, 并与 2 株牛病毒性腹泻病毒 (BVDV) (NADL 株和 SD-1 株) 也有较高的同源性, 尤其是由核苷酸序列推导的氨基酸序列, 同源性均大于 90%, 是瘟病毒属基因组中最保守的区段, 这与该基因产物在病毒复制及聚蛋白前体加工过程中所具有的重要功能是一致的。

关键词 猪瘟病毒石门株, NS2-3 基因片段, 克隆, 序列分析

猪瘟是危害养猪业最重要的传染病之一。猪瘟的病原是猪瘟病毒 (CSFV), 属于黄病毒科瘟病毒属, 同属成员还包括牛病毒性腹泻病毒 (BVDV) 和绵羊边界病病毒 (BDV)。瘟病毒基因组为单股正链 RNA, 长度约为 12.3 kb, 含有一个大的开放读码框架 (ORF), 编码一个由约 4 000 个氨基酸残基组成的多聚蛋白。非致细胞病变 (NCP) 瘟病毒的多聚蛋白经过共翻译或翻译后切割机制, 由病毒和宿主细胞酶的作用而形成 11 种结构蛋白和非结构蛋白, 各产物按顺序排列为 NH₂-N^P_{ro}-C-E0-E1-E2-p7-NS2-3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH^[1]。其中 NS2-3 基因产物 (p125) 是一个多功能蛋白, NS3 部分具有丝氨酸类蛋白酶活性^[1,2], 核苷三磷酸酶活性^[1,3] 及解旋酶活性^[1,4,5], 其中蛋白酶活性对下游各基因产物的切割至关重要^[1,2], 而由 RNA 激活的 NTP 酶/RNA 解旋酶活性可以在病毒 RNA 复制、翻译等过程中解开病毒基因组的二级结构^[5]。因此, 该蛋白在病毒生命周期中至关重要。

猪瘟病毒石门株是我国猪瘟的标准强毒, 1945 年在石家庄解放区分离获得, 是我国制造灭活苗及鉴定、攻毒用标准强毒株。对其序列的测定有助于阐明猪瘟病毒的致病机理、演变规律, 并为有用基因的利用提供分子基础。我们扩增了猪瘟病毒石门株 NS2-3 基因片段, 对其进行了克隆和测序, 并与国外报道的毒株序列作了比较, 为我室对石门株 NS2-3 基因全序列的测定工作奠定了基础, 并为以后的基因表达及功能研究提供了依据。

收稿日期: 1998-04-21, 修回日期: 1998-07-23

* 通讯作者

1 材料和方法

- 1.1 病毒的增殖** 猪瘟病毒石门株 AV1411(04/8/97)购自中国兽药监察所。用生理盐水 1:10 稀释后耳静脉接种 2 月龄断奶的猪瘟非免疫猪(购自湖北省生药厂)。每天 3 次检测体温,当体温升到最高而开始下降时,约第 6-7 天,前腔静脉采取抗凝血, -30℃ 冻存。
- 1.2 猪瘟病毒 RNA 提取** 采用异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法从猪瘟抗凝血中提取总 RNA。
- 1.3 引物设计** 根据已公开报道的猪瘟病毒 C 株核苷酸序列^[6],借助计算机辅助设计了一对引物 PF5648 (正向引物,位置 5648~5669)和 PR6604(反向引物,位置 6581~6604),序列如下:PF5648;5'GCA TCA AGT GGA AGG GTA GTC G3';PR6604;5'CGT CAC TAT GAA GGG CAT CTT AGG 3'。由上海生工生物工程有限公司合成,纯度为测序级。
- 1.4 RT-PCR** 按照常规方法进行,同时设阴性对照。
- 1.5 扩增产物的克隆** 按照 Promega 公司的 pGEM-T vector system 说明书进行。受体菌为 TGI,由本室保存。经蓝/白斑筛选,碱裂解法提取质粒,经限制性内切酶(SABC)酶切及 PCR 方法鉴定阳性克隆。
- 1.6 序列测定** 采用 T7 和 SP6 正向和反向引物进行全自动测序。
- 1.7 序列分析和同源性比较** 采用 DNASIS 和 PROSIS 软件(Hitachi Software Engineering Co. Ltd.)。

2 结果

- 2.1 PCR 扩增及鉴定** PF5648 和 PR6604 对应的扩增片段长 957bp,位于 NS3 的中部,NT-Pase 及 Helicase 活性区^[1]。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,可见一条清晰的扩增带,大小与预期的一致,无非特异性扩增。而阴性对照无扩增。我们还采用 PCR 技术以扩增片段为模板进行二次扩增,也得到了大小一致的目的片段,并与 C 株的相应阳性片段作比较,进一步证实已获得目的片段(见图 1)。
- 2.2 扩增产物的克隆及鉴定** PCR 产物经低融点琼脂糖纯化后按 Promega 公司的 pGEM-T vector system 说明书进行克隆,命名为 pGEM957。采用酶切鉴定阳性克隆。根据已报道的 C 株序列^[6]可推测该基因片段内部存在单一的 BamH I (6436)和 Hind III (5711)切点及两个 EcoRI 切点(5798,6242),而 pGEM-T vector 无上述切点。酶切结果显示 BamH I、Hind III、EcoRI 均只有单一切点,推测有一个 EcoRI 位点已经变异。该克隆应该是阳性克隆(见图 2)。序列分析结果表示推测正确,6247 位碱基由 C 变为 T,致使该处 EcoRI 切点消失。
- 2.3 核苷酸序列的测定** 石门株 NS2-3 基因片段的核苷酸序列及推导的氨基酸序列见图 3。该片段具有解旋酶超家族的七个保守区段,其中包括一个截短的“A”位点:GXGKT/S(X:任意氨基酸残基)和“B”位点:(3hy,2X)D(hy:疏水性氨基酸残基),形成独立的 β -链- β -转角- α -螺旋结构(β -strand- β -turn- α -helix),是推测的 NTP 结合区^[5,7-9]。
- 2.4 NS2-3 基因片段的核苷酸和氨基酸序列与国外报道的 5 株 CSFV 及 2 株 BVDV 的同源性比较** 结果见表 1。石门株与日本的 CSFV ALD、GPE⁻ 株同源性最高,与另 3 株的同源性次之,与 2 株 BVDV 的同源性也较高,各株的氨基酸序列同源性均大于 90%,显示了该段基因的高度保守性。如石门株与 ALD、GPE⁻ 株比较在该段多肽内只有 2 个氨基酸残基的替换,其中一个为保守性替换。即使与 2 株 BVDV 比较也只有 28 个氨基酸残基的替换,其中 26 个是保守性替换。“A”、“B”两个 NTP 结合位点基序完全保守,可以推测各毒株该段多肽具有共同的高级结构。

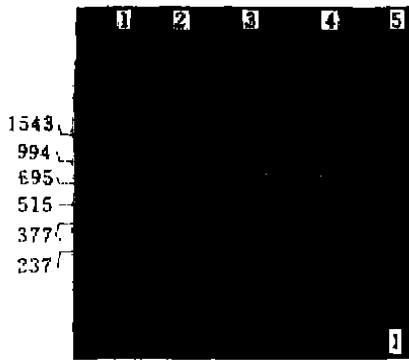


图 1 957 bp 片段的扩增

Fig. 1 Amplification of 957bp fragment

1. PCR 分子量标准
2. RT-PCR 产物
3. 二次扩增产物
4. 阳性对照
5. 阴性对照

1. PCR Marker
2. Product of RT-PCR
3. Product of the second amplification
4. Positive control
5. Negative control

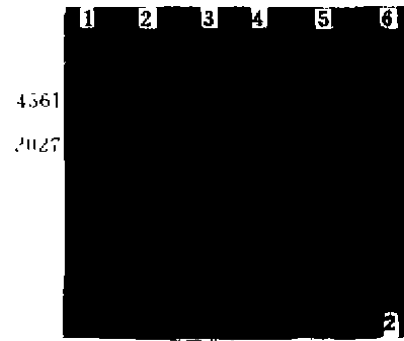


图 2 pGEM957 克隆的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of pGEM957

clone by restriction enzyme

1. λDNA HindIII 酶切分子量标准
2. pGEM957 BamHI 和 HindIII 双酶切产物
3. pGEM957 BamHI 酶切产物
4. pGEM957 HindIII 酶切产物
5. pGEM957 EcoRI 酶切产物
6. pGEM-T vector Pst I 酶切产物

1. λDNA/HindIII Marker
2. pGEM957/BamHI + HindIII
3. pGEM957/BamHI
4. pGEM957/HindIII
5. pGEM957/EcoRI
6. pGEM-T vector/Pst I

表 1 石门株 NS2-3 基因片段与其他瘟病毒的核苷酸和氨基酸序列同源性比较

Table 1 Nucleotide and deduced amino acid sequence homology analysis of NS2-3 gene fragment of CSFV Shimen strain with other pestiviruses

	CSFV					BVDV	
	ALD	GPE ⁻	C	Brescia	Alfort	SD-1	NADL
石门株 NS2-3 基因片段 核苷酸序列同源性 Nucleotide sequence homology of NS2-3 gene fragment of Shimen strain	97.7%	97.9%	96.3%	94.6%	87.2%	78.2%	77.7%
石门株 NS2-3 蛋白 氨基酸序列同源性 Amino acid sequence homology of NS2-3 protein of Shimen strain	99.3%	99.3%	98.4%	98.0%	98.0%	90.1%	90.1%

* * * DNA TRANSLATION * * *

1	GCA TCA AGT GGA AGG GTA GTC GGC AGG GTC AAG GTC GGG AAG AAT GAG	48	
1		Gly Arg Val Lys Val Gly Lys Asn Glu	9
49	GAC TCT AAA CCA ACC AAG CTT ATG AGT GGA ATA CAA ACA GTC TCC AAA	96	
10	Asp Ser Lys Pro Thr Lys Leu Met Ser Gly Ile Gln Thr Val Ser Lys	25	
97	AGT ACC ACA GAC TTG ACA GAA ATG GTA AAG AAG ATA ACG ACT ATG AAC	144	
26	Ser Thr Thr Asp Leu Thr Glu Met Val Lys Lys Ile Thr Thr Met Asn	41	
145	AGG GGA GAA TTC AGA CAA ATA ACC CTT GCT ACA GGT GCC GGA AAA ACC	192	
42	Arg Gly Glu Phe Arg Gln Ile Thr Leu Ala Thr Gly Ala Gly Lys Thr	57	
193	ACG GAA CTC CCT AGG TCA GTC ATA GAA GAG ATA GGG AGG CAT AAG AGA	240	
58	Thr Glu Leu Pro Arg Ser Val Ile Glu Glu Ile Gly Arg His Lys Arg	73	
241	GTC TTG GTC TTG ATC CCT CTG AGG GCG GCA GCA GAG TCA GTA TAC CAG	288	
74	Val Leu Val Leu Ile Pro Leu Arg Ala Ala Ala Glu Ser Val Tyr Gln	89	
289	TAT ATG AGA CAA AAA CAT CCA AGC ATT GCA TTT AAC CTG AGG ATA GGG	336	
90	Tyr Met Arg Gln Lys His Pro Ser Ile Ala Phe Asn Leu Arg Ile Gly	105	
337	GAG ATG AAG GAA GGG GAC ATG GCC ACA GGG ATA ACC TAT GCC TCA TAC	384	
106	Glu Met Lys Glu Gly Asp Met Ala Thr Gly Ile Thr Tyr Ala Ser Tyr	121	
385	GGT TAC TTC TGT CAG ATG CCA CAA CCT AAG TTA CGA GCC GCA ATG GTT	432	
122	Gly Tyr Phe Cys Gln Met Pro Gln Pro Lys Leu Arg Ala Ala Met Val	137	
433	GAG TAC TCC TTC ATA TTT CTT GAT GAG TAC CAC TGT GCC ACC CCA GAA	480	
138	Glu Tyr Ser Phe Ile Phe Leu Asp Glu Tyr His Cys Ala Thr Pro Glu	153	
481	CAA TTG GCT ATC ATG GGG AAG ATC CAC AGA TTT TCA GAG AAC CTG CGG	528	
154	Gln Leu Ala Ile Met Gly Lys Ile His Arg Phe Ser Glu Asn Leu Arg	169	
529	GTA GTA GCC ATG ACC GCA ACA CCA GCA GGC ACG GTG ACA ACC ACA GGG	576	
170	Val Val Ala Met Thr Ala Thr Pro Ala Gly Thr Val Thr Thr Thr Gly	185	
577	CAG AAA CAC CCT ATA GAA GAA TTT ATA GCC CCA GAA GTG ATG AAA GGG	624	
186	Gln Lys His Pro Ile Glu Glu Phe Ile Ala Pro Glu Val Met Lys Gly	201	
625	GAA GAC TTA GGC TCA GAG TAC TTG GAC ATT GCT GGA CTA AAG ATA CCA	672	
202	Glu Asp Leu Gly Ser Glu Tyr Leu Asp Ile Ala Gly Leu Lys Ile Pro	217	
673	GTA GAG GAG ATG AAG AGC AAC ATG CTG GTT TTT GTG CCC ACT AGG AAC	720	
218	Val Glu Glu Met Lys Ser Asn Met Leu Val Phe Val Pro Thr Arg Asn	233	
721	ATG GCG GTG GAG ACA GCA AAG AAA TTG AAA GCT AAG GGT TAC AAC TCA	768	
234	Met Ala Val Glu Thr Ala Lys Lys Leu Lys Ala Lys Gly Tyr Asn Ser	249	
769	GGC TAC TAT TAT AGT GGA GAG GAT GGA TCT AAC CTG AGG GTG GTA ACG	816	
250	Gly Tyr Tyr Tyr Ser Gly Glu Asp Gly Ser Asn Leu Arg Val Val Thr	265	
817	TGG CAG TCC CCG TAC GTG GTG GTG GCA ACC AAC GCG ACA GAA TCA GGT	864	
266	Ser Gln Ser Pro Tyr Val Val Val Ala Thr Asn Ala Thr Glu Ser Gly	281	
865	GTT ACT CTC CCG GAC TTG GAT GTG GTT GTC GAT ACA GGG CTT AAG TGT	912	
282	Val Thr Leu Pro Asp Leu Asp Val Val Val Asp Thr Gly Leu Lys Cys	297	
913	GAA AAG AGA ATA CGG CTG TCA CCT AAG ATG CCC TTC ATA GTG ACG	957	
298	Glu Lys Arg Ile Arg Leu Ser	304	

图3 猪瘟病毒石门株 NS2-3 基因片段的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 3 The nucleotide and deduced amino acid sequence of NS2-3 gene fragment of CSFV Shimen strain

3 讨论

猪瘟病毒石门株是我国的标准强毒,我们采用 RT-PCR 技术扩增了 NS2-3 基因的部分片段,序列分析表明该段基因高度保守,氨基酸序列同源性很高,两个推测的 NTP 结合位点完全保守,属于一个包括从大肠杆菌到人的多种解旋酶的超家族^[5,7-9]。在病毒的复制、翻译等过程中解开病毒基因组 RNA 的二级结构,在病毒的生命周期中起重要作用。而且,GPE⁻和 C 株都是弱毒株,其余五株为强毒株,它们在该段基因区域内的高度保守性说明该区域与病毒的毒力关系不大。

值得注意的是,同源性比较显示石门株与中国猪瘟兔化弱疫苗株 C 株的序列同源性反而低于与日本 ALD、GPE⁻ 株的同源性。石门株与 C 株在该段基因上的核苷酸序列同源性为 96.3%,氨基酸序列同源性为 98.4%。共有 6 个氨基酸残基的替换,其中五个是保守性替换。而石门株与 ALD、GPE⁻ 株的核苷酸序列同源性分别为 97.7% 和 97.9%,氨基酸序列同源性均为 99.3%,只有两个氨基酸残基的替换,其中一个是保守性替换。我们还对石门株 E2 基因的序列进行了测定,同源性比较结果相同(结果待发表)。相反,日本的 ALD 及其致弱的毒株 GPE⁻ 在该段基因上同源性很高(97.8%),而氨基酸的同源性更是高达 100%^[10]。虽然 C 株是用从中国分离的强毒株适应兔体培育而成的,但该结果提示石门株与 C 株之间的亲缘关系可能比日本的两株更远。这一设想尚需进一步的实验证实。

参 考 文 献

- 1 Meyers G, Thiel H-J. Molecular characterization of pestiviruses. *Adv Virus Res.* 1996, 47:53~118
- 2 Wiskerchen M, Collett M S. Pestivirus gene expression: protein p80 of bovine viral diarrhea virus is a proteinase involved in polyprotein processing. *Virology.* 1991, 184(1):341~350
- 3 Tamura J K, Warrener P, Collett M S *et al*. RNA-stimulated NTPase activity associated with the p80 protein of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. *Virology.* 1993, 193(1):1~10
- 4 Warrener P, Collett M S. Pestivirus NS3 (p80) protein possesses RNA helicase activity. *J Virol.* 1995, 69(3):1720~1726
- 5 Gorbalenya A E, Koonin V, Donchenko A P *et al*. Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acid Res.* 1989, 17(12):4713~4729
- 6 Moormann R J M, van Gennip H G P, Miedema G K W *et al*. Infectious RNA transcribed from an engineered full-length cDNA template of the genome of a pestivirus. *J Virol.* 1996, 70(2):763~770
- 7 Gorbalenya A E, Donchenko A P, Koonin V *et al*. A conserved NTP-motif in putative helicases. *Nature.* 1988, 333(5):22
- 8 Hodgman T C. A new superfamily of replicative proteins. *Nature.* 1988, 333(5):22~23
- 9 Linder P, Lasko P F, Leroy P *et al*. Birth of the D-E-A-D box. *Nature.* 1989, 337(6202):121~122
- 10 Isbikawa K, Nagai H, Katayama K *et al*. Comparison of the entire nucleotide and deduced amino acid sequences of the attenuated hog cholera vaccine strain GPE⁻ and the wild-type parental strain ALD. *Arch Virol.* 1995, 140(8):1385~1391

Sequencing and Comparison of NS2-3 Gene Fragment of Classical Swine Fever Virus Shimen Strain

Huang Qianhua Zhang Chuyu Wang Ning Fu Liezhen Wang Jiafu

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

Abstract A couple of CSFV specific primer (PF 5648 and PR 6604) was designed with the aid of computer primer designation software and synthesized based upon the relative conserved regions of published sequences of C strain. NS2-3 gene (p125 gene) fragment of CSFV Shimen strain was amplified successfully by RT-PCR from the anticoagulant blood of infected pig. The product length is 957 bp, located in the central of NS3, a putative NTPase and helicase domain. The obtained PCR product was cloned and then sequenced. The sequence showed that this fragment contained all of seven typical conserved segments of helicase superfamily, including two common NTP-binding motifs, namely, "A" site (GXGKT/S) and "B" site (3hy, 2x) D. Sequence homology analysis revealed that Shimen strain had the highest homology with Japanese strains (ALD and GPE⁻), and slightly lower homology with other three CSFV strains (C, Brescia and Alfort). Shimen strain had also significant homology with two BVDV strains (NADL and SD-1). The deduced amino acid sequence homology of Shimen strain with five CSFV and two BVDV strains was all upper than 90%. It is further confirmed that this fragment is the most conserved in pestivirus amino acid sequence. It is consistent with its essential function in replication and translation of virus genome and in processing of polyprotein precursor.

Key words Classical swine fever virus Shimen strain, NS2-3 gene fragment, Clone, Sequence analysis