

114

109-173

S85-2.651

## 我国猪瘟病毒免化弱毒株囊膜糖蛋白 E0 基因的克隆及序列测定\*

李红卫 刘湘涛\*\* 李小兵 韩雪清\*\* 殷震

(长春农牧大学, 长春 130062)

\*\*(兰州兽医研究所, 兰州 730046)

**摘要** 采用异硫氰酸胍一步法从 480 代猪瘟病毒免化弱毒株(HCLV)脾毒中提取总 RNA, 以该 RNA 为模板, 进行反转录, 然后采用套式 PCR 扩增出 HCLV 的囊膜糖蛋白 E0 基因, 琼脂糖凝胶电泳表明其大小与预计相符。将扩增出的 E0 基因克隆到 pGEM-T 载体中, 用自动序列分析仪对其进行序列测定。将测得的序列及推导的氨基酸序列与国外测得的 C 株相应序列进行比较, 结果发现, 它们之间核苷酸序列同源率为 99.08%, 氨基酸序列同源率为 98.42%。

**关键词** 猪瘟病毒免化弱毒株, 囊膜糖蛋白 E0 基因, 克隆, 序列测定

HCLV

猪瘟病毒免化弱毒株(HCLV)又称 C 株, 是我国 50 年代培育的。它是目前国际上应用最广泛、国内唯一应用的疫苗毒株。该疫苗株对我国猪瘟的防治起到了决定性作用, 有效地控制了猪瘟在我国的急性发生和大流行, 也为欧洲一些国家的猪瘟控制和消灭作出了贡献。

猪瘟病毒(HCV)为黄病毒科瘟病毒属成员, 其基因组为单股正链 RNA, 长度为 12.3 kb, 仅含有一个大的开放阅读框架, 编码一个含 3 898 个氨基酸残基(AA)的多聚前体蛋白<sup>[1,2]</sup>。目前已经定位的蛋白有 p23、p14 和 E0、E1、E2, 它们均由 HCV RNA 5'端所编码, 除 p23 外, 其它 4 种均为 HCV 的结构蛋白。E0 N 末端为 Glu-268, 它由 227AA 构成, 分子量为 44~48 kDa<sup>[3]</sup>。

近几年, HCV 的基因克隆和序列测定进展很快, 仅在 GenBank 中可查到的 HCV 基因组全序列就达 10 个。其中 Moormann 等测定了 C 株细胞毒的基因组全序列并构建了其全长的 cDNA 克隆, 在体外可转录为感染性 RNA<sup>[4]</sup>。我国近几年在 HCV 的基因克隆和序列分析方面也取得了较大进展, 已经克隆了 HCV 石门系强毒株部分 5'端非编码区、E2 基因及免化弱毒株(细胞毒)的 E2 基因等, 并对它们进行了序列分析, 但未见到有关免化弱毒株组织毒的基因克隆和序列分析的报道<sup>[5,6]</sup>。

本研究利用 RT-PCR 技术首次扩增了我国 HCLV 细胞毒 E0 基因, 对其进行了克隆和序列分析, 并与 Moormann 等测定的 C 株序列进行了比较。这将为进一步研究 E0 的功能打下基础, 也可能为猪瘟的防治提供新的途径。

收稿日期: 1998-05-04, 修回日期: 1998-10-26

\* 国家攀登计划 B 类项目资助课题

## 1 材料和方法

### 1.1 病毒的增殖及 RNA 的提取<sup>[7]</sup>

HCLV 479 代冻干毒引自中国兽药监察所,在健康家兔体内增殖,采取呈定型热反应家兔的脾脏,用异硫氰酸胍一步法提取其总 RNA(采用 BRL 公司 TRI<sub>20L</sub> 试剂盒),琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性, Gene Quant (Pharmacia 公司)测定其纯度和浓度。

### 1.2 引物的设计与合成

根据 HCV C 株的序列设计合成两对引物<sup>[4]</sup>,引物的序列及在基因组中的位置分别为:

PA: 5' ACTATGG<sup>†</sup>AACCACCAGAATCTAGGAAG 3' (正链, 1075 ~ 1095, 划线部分为另加的起始密码子等)

PB: 5' GTGTTTTTGGGGAGGCAAGC 3' (负链, 1941 ~ 1922)

Pa: 5' AAAGCCCTATTGGCATGGG 3' (正链, 1108 ~ 1126)

Pb: 5' GGTGCAGTTGTTAGTGTACC 3' (负链, 1918 ~ 1897)

### 1.3 RT-PCR

取上面提取的 RNA 10  $\mu$ g, 加引物 PB 1  $\mu$ L (200 ng/ $\mu$ L), 65  $^{\circ}$ C 5 min, 立即冰浴 5 min; 然后依次加入 5 $\times$  RT buffer 4  $\mu$ L, dNTP (10 mmol/L) 1  $\mu$ L, AMV (10 u/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, RNasin (40 u/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, 加水补充至 20  $\mu$ L, 42  $^{\circ}$ C 1 h。

取反转录产物 5  $\mu$ L, 加引物 PA、PB 各 1  $\mu$ L (200 ng/ $\mu$ L), 10 $\times$  PCR buffer 5  $\mu$ L, 2.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 5  $\mu$ L (25 mmol/L), dNTP (10 mmol/L) 1  $\mu$ L, 加水至 49  $\mu$ L; 然后 98  $^{\circ}$ C 8 min, 加 Taq DNA 聚合酶 1  $\mu$ L (1 u/ $\mu$ L, Promega 公司), 以 95  $^{\circ}$ C 50 s, 48  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 2 min, 于 Bio Techs-97 DNA Thermocycler (Beijing Biotech Co Ltd) 进行循环反应。取 PCR 产物 1  $\mu$ L 50 倍稀释, 取 5  $\mu$ L 作为模板, 以 Pa、Pb 为引物, 与上面相同条件进行 PCR。

### 1.4 PCR 产物的克隆与序列测定

用 Agarose Gel DNA Extraction kit (Boehringer Mannheim 公司) 纯化 PCR 产物, 然后采用 pGEM-T 载体 (Promega 公司) 进行克隆 (按操作说明书进行)。克隆后用 ABI PRISM 377 DNA Sequencer 对扩增片段进行序列测定。

## 2 结果与讨论

按照要求 HCLV 需要来自组织毒, 但组织毒不易纯化, 又因为其含 HCLV 量较低, 单独一次 PCR 均不能成功扩增出特异性片段。有时竟扩增出与预计大小相符的片段, 但经测序证明为非特异性插入。扩增 HCLV 基因组其它区域, 也遇到了同样的问题。后来采用套式 PCR 才成功扩增出了与预计大小 (803 bp) 相符的片段, 即 E0 基因 (电泳图略)。

将扩增的片段克隆到 pGEM-T 载体中, 然后采用全自动序列分析仪对插入片段进行序列测定, 结果见图 1。将所测定的序列与 Moormann 等测得的 C 株序列进行比较 (见图 2 和图 3), 其同源性达 99.08% (762 个碱基中共有 7 个不同), 推导的氨基酸序列同源性为 98.42% (253 个氨基酸中共有 4 个差异), 这种差异的产生可能由 HCLV 的来源不同而引起 (据与 Moormann 等所在实验室了解, 其 C 株来自台湾)。

1	OG GTG ATA GCA ATT ATG TTG TAC CAA CCA GTT GAA GCC GAA AAT ATA	47
1	Y I A I M L Y Q P V E A E N I	15
48	ACT CAA TGG AAC CTG AGT GAC AAC GGC ACT AAT GGT ATC CAG CAT GCT	95
16	T Q W N L S D N G T N G I Q H A	31
96	ATG CAC CTT AGA GGG GTT AAC AGA AGC TTG CAT GGG ATC TGG CCG GGG	143
32	M H L R G V N R S L H G I W P G	47
144	AAA ATA TGC AAA GGA GTC CCA ACC CAC CTG GGC ACA GAC GTG GAG CTG	191
48	K I C K G Y P T H L A T D V E L	63
192	AAA GAA ATA CAG GGA ATG ATG GAT GGC AGC GAG GGG ACA AAC TAT ACG	239
64	K E I Q G M M D A S E G T N Y T	79
240	TGC TGT AAG TTA CAG AGA CAT GAA TGG AAC AAA CAT GGA TGG TGT AAC	287
80	C C K L Q R H E W N K H G W C N	95
288	TGG CAC AAT ATA GAC CCG TGG ATA CAG CTG ATG AAT AGA ACC CAA GCA	335
96	W H N I D P W I Q L M N R T Q A	111
336	GAC TTG GCA GAA GGC CCT CCG GTC AAG GAG TGC GCT GTG ACT TGC AGG	383
112	D L A E G P P V K E C A V T C R	127
384	TAC GAT AAA GAT GCT GAC ATC AAC GTG GTC ACC CAG GCT AGA AAC AGG	431
128	Y D K D A D I N V V T Q A R N R	143
432	CCA ACA ACC CTG ACC GGC TGC AAG AAA GGG AAA AAT TTT TCT TTT GCG	479
144	P T T L T G C K K G K N F S F A	159
480	GGT ACA GTT ATA GAG AGC CCA TGT AAT TTC CAT GTT TCC GCG GAG GAT	527
160	G T V I E S P C N F H V S A E D	175
528	ACC TTG TAT GGG GAT CAT GAG TGC GGC AGT TTA CTC CAG GAC GCA GCT	575
176	T L Y G D H E C G S L L Q D A A	191
576	CTG TAC CTA GTA GAT GGA ATG ACC AAC ACT ATA GAG AAT GCC AGA CAG	623
192	L Y L V D G M T N T I E N A R Q	207
624	GGA GCA GCG AGG CTG ACA TCT TGG CTC GGG AGG CAA CTC AGC ACT GCT	671
208	G A A R V T S W L G R Q L S T A	223
672	GGG AAG AGG TTG GAG GGT AGA AGC AAA ACC TGG TTT GGC GCT TAT GCC	719
224	G K R L E G R S K T W F G A Y A	239
720	CTA TCG OCT TAC TGT AAT GTA ACA AGC AAG ATA GGG TAC ATA T	762
240	L S P Y C N V T S K I G Y I	253

图 1 猪霍乱病毒兔化弱毒株 E0 基因的核苷酸及推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of E0 gene of hog cholera virus strain C

E0 是唯一可分泌到 HCV 侵染的细胞培养上清液中的糖蛋白,具有产生中和抗体的能力<sup>[8]</sup>。进一步研究发现,从 HCV 感染的细胞中分离纯化的 E0 和杆状病毒载体表达的 E0 蛋白均具有 RNase 活性,而这种 RNase 活性在 HCV 的复制过程中起着重要的作用,并且有可能是 HCV 在其自然宿主持续存在的原因<sup>[9]</sup>。HCLV E0 基因的成功克隆将对我们进一步研究 E0 的功能及如何利用该基因在猪霍乱的防治中发挥作用打下了基础。

```

EO DNA      1 CGGTGATAGC AATTATGTTG TACCAACCAG TTGAAGCCGA AAATATAACT
CFU DNA     1 *****
EO DNA      51 CAATGGAAAC TGAGTGACAA CGGCCTAAT GGTATCCAGC ATGCTATGCA
CEO DNA     51 *****
EO DNA     101 CCTTAGAGGG GTTAACAGAA GCTTGATGG GATCTGGCCG GGGAAAATAT
CEO DNA    101 *****
EO DNA     151 GCAAAGGAGT CCCAACCCAC CTGGCCACAG ACGTGGAGCT GAAAGAAATA
CEO DNA    151 *****
EO DNA     201 CAGGGAATGA TGGATGCCAG CGAGGGGACA AACTATAAGT GCTGTAAGTT
CEO DNA    201 *****
EO DNA     251 ACAGAGACAT GAATGGAACA AACATGGATG GTGTAAGTGG CACAATATAG
CEO DNA    251 *****
EO DNA     301 ACCOCTGGAT ACACGIGATG AATAGAACC AAGCAGACTT GGCAGAAGGC
CFU DNA    301 *****
EO DNA     351 CCTCOGGTCA AGGAGTGGCC TGTGACTTGC AGGTAAGATA AAGATGCTGA
CEO DNA    351 *****
EO DNA     401 CATCAACGTG GTCACCCAGG CTAGAAACAG GCCAACAAOC CTGACCGGCT
CFU DNA    401 *****
EO DNA     451 GCAAGAAAGG CAAAAATTTT TCTTTTGGG GTACAGTTAT AGAGAGCCCA
CEO DNA    451 *****
EO DNA     501 TGTAATTTCC ATGTTTCCGC GGAGGATACC TTGTATGGGG ATCATGAGTG
CEO DNA    501 *****
EO DNA     551 CGGCAGTTTA CTCCAGGAGC CAGCTCTGTA CCTAGTAGAT GGAATGACCA
CEO DNA    551 *****
EO DNA     601 ACACTATAGA GANTGCCAGA CAGGGAGCAG CGAGGGTGAC ATCTTGGCTC
CEO DNA    601 *****
EO DNA     651 GGGAGGCAAC TCAGCACTGC TGGGAAGAGG TTGGAGGGTA GAAGCAAAAC
CEO DNA    651 *****
EO DNA     701 CTGGTTTGGC GCTTATGGCC TATCGOCTTA CTGTAATGTA ACAAGCAAGA
CEO DNA    701 *****
EO DNA     751 TAGGATACAT AT.....
CEO DNA    751 *****
    
```

图 2 不同来源 E0 基因序列的比较  
 E0 来自本实验, CEO 来自 Moorman 等测得的 C 株序列。  
 Fig. 2 Sequence comparison of E0 gene from different sources  
 E0 was from our lab,  
 CEO was sequenced by Moorman *et al.*

```

EO AMI      1 VIAIMLYQPV EAENITQVNL SDNGTNGIQH AMHLRGVNRS LHGIWPGKIC
CEO AMI     1 *****
EO AMI     51 KGVPTHLATD VELKEIQGMM DASEGTNYTC CKLQRHEWVK HGWCNWHNID
CFU AMI     51 *****
EO AMI    101 PWIQLMNRTQ ADLAEGPPVK ECAVTCRYDK DADINVVYQA RNRPTTLTGC
CEO AMI    101 *****
EO AMI    151 KKGKNFSFAG TVIESPCNFH VSAEDTLYGD HECGSLQDA ALYLVDGMTN
CEO AMI    151 *****
EO AMI    201 TIENARQGA RVTSLGRQL STAGKRLEGR SKTWFGAYAL SPYCNVTSKI
CEO AMI    201 *****
EO AMI    251 GYI.....
CEO AMI    251 *****
    
```

图 3 不同来源 HCV C 株 E0 序列的比较  
 Fig. 3 Sequence comparison of E0 from different sources of HCV strain C

## 参 考 文 献

- 1 Meyers G, Rumenapf T, Thiel H J. Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. *Virology*, 1989, 171:555~567
- 2 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
- 3 Stark R, Rumenapf G, Meyers *et al.* Genomic localization of hog cholera virus glycoproteins. *Virology*, 1990, 174:286~289
- 4 Moormann R J, van Gennip H G, Miedema G K *et al.* Infectious RNA transcribed from an engineered full-length cDNA template of the genome of a pestivirus. *J Virol*, 1996, 70:763~770
- 5 涂长春, 李红卫, 金扩世等. 猪瘟病毒石门株特异 cDNA 片段的扩增与序列分析. *病毒学报*, 1994, 10(1):33~38
- 6 李红卫, 涂长春, 金扩世等. 猪瘟病毒石门株与兔化弱毒株主要保护性抗原 E2 基因的序列测定. *畜禽重大疫病免疫防治研究进展*(谢庆阁等主编), 中国农业科技出版社, 1997, 22~26
- 7 Chomezynski P, Piot, Nicoletta S. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenolchloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 1987, 162:156~159
- 8 Weiland E, Ahl R, Stark R *et al.* A second envelope glycoprotein mediates neutralization a pestivirus, hog cholera virus. *J Virol*, 1992, 66:3677~3682
- 9 Hulst MM, Panoto FE, Hoekman A *et al.* Inactivation of the RNase activity of glycoprotein E (rns) of classical swine fever virus results in a cytopathogenic virus. *J Virol*, 1998, 72:151~157

## Cloning and Sequencing of Envelope Glycoprotein E0 Gene of Hog Cholera Virus Strain C

Li Hongwei Liu Xiangtao\* Li Xiaobing Han Xueqing\* Yin Zhen

(Changchun University of Agricultural and Animal Sciences, Changchun 130062)

\* (Lanzhou Veterinary Institute, Lanzhou 730046)

**Abstract** The envelope glycoprotein E0 gene of hog cholera virus (HCV) strain C was amplified from total RNA extracted from HCV strain C infected rabbit spleen by reverse transcription and nested PCR. The PCR product was cloned into pGEM-T vector. Nucleotide sequencing was performed using an ABI PRISM sequencing device. Based on the incorporation of fluorescence labelled dideoxynucleotide terminators, the sequence was compared with HCV strain C sequenced by Moormann *et al.* The result showed that their homologies on nucleotide and amino acid sequences were 99.08% and 98.42%, respectively.

**Key words** Hog cholera virus strain C, Envelope glycoprotein E0 gene, Cloning, Sequencing