

猪瘟病毒石门株动物传代脾毒与组织培养 细胞毒 E2 基因序列的分析*

魏中锋, 张彦明, 孙 裴, 张永国, 洪海霞, 倪 斌, 郭抗抗

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 根据已发表的猪瘟病毒基因组序列, 设计合成了 2 对引物, 以脾毒和细胞毒总 RNA 为模板, 利用反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)、套式聚合酶链式反应(nPCR)及测序技术, 对多次动物传代和致细胞病变的猪瘟病毒主要囊膜糖蛋白 E2 基因的核苷酸序列进行了测定, 用 DNA star 软件比较分析了 E2 基因的核苷酸和氨基酸序列的同源性。结果发现, 脾毒和标准石门株核苷酸序列的同源性为 99.4%, 氨基酸序列的同源性为 99.0%; 细胞毒与标准石门株核苷酸序列的同源性为 98.3%, 氨基酸序列的同源性为 96.7%。由此说明, 猪瘟病毒经猪体多次传代和组织培养致细胞病变后, 均能保持遗传的稳定性。

[关键词] 猪瘟病毒; 致细胞病变; 序列分析; E2 基因; 序列同源性

[中图分类号] S852.65; Q785

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)06-0045-04

猪瘟(classical swine fever)是由猪瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV)引起的高度接触性传染病, 其特征是小血管变性所导致的内脏器官多发性出血、坏死^[1]。CSFV 属于黄病毒科(Flaviviridae)瘟病毒属(Pesivirus), 是单股正链的 RNA 病毒, 约 1.23×10^4 kb, 含 1 个大的读码框, 由 11 个编码结构蛋白和非结构蛋白的基因组成^[2]。E2 基因编码的是 CSFV 的 gp55 囊膜糖蛋白, 该蛋白参与病毒感染细胞的过程并激活中和抗体产生, CSFV 的中和性表位都在 gp55 糖蛋白上^[3], 因而 E2 在 CSFV 的研究中倍受重视。业已证明, 在 E2 分子上存在 4 个独特的抗原结构域 A、B、C、D, 其中 A 包括 3 个亚抗原结构域 A1、A2、A3, A1 与 A2 在猪瘟病毒中最为保守, A3 和 B、C、D 具有一定的可变性^[4]。本研究通过对动物多次传代的脾毒和致细胞病变的细胞毒 E2 基因序列的比较分析, 试图用分子生物学手段揭示该区域的遗传变异特点, 从而为猪瘟防制研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 猪瘟脾毒 猪瘟病毒石门株购于中国兽医药品监察所, 由本实验室保存, 经猪体传代约 40 代,

采取有明显病变的脾脏作为脾毒。

1.1.2 猪瘟细胞毒 用猪瘟病毒石门株脾毒感染培养的猪脐静脉血管内皮细胞^[5], 以发生明显细胞病变的细胞培养物作为细胞毒。

1.1.3 试剂 RNA 提取采用 GLBCOBR L 公司生产的 TRIZOL Reagent 试剂盒; 反转录酶(AMV)及反转录试剂 Taq DNA 聚合酶及 PCR 试剂 RNA 酶抑制剂 pMD18-T 载体均为大连宝生物工程有限公司产品; 纯化回收试剂盒为 BOEHRINGER MANNHEIM 公司产品; 大肠埃希菌 JM109 由本实验室保存。

1.1.4 主要仪器 3K-18 高速台式冷冻离心机(Sigma 公司); 高速微量离心机(Sigma 公司); PCR 仪(MJ 公司); 紫外凝胶成像系统(Syngene 公司)。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成 参考已发表的 A1-^[5]和 brescia^[6]设计, 由大连宝生物工程有限公司合成。引物位置及序列如下:

E1: 5' TGTA TTA GACCA GACTGG 3' (222 ~ 229)

E1': 5' CTGCCAACCGCCGTCTA TCTT 3' (3793 ~ 3773)

E2: 5' AGGGGACA GATCGTGCAA 3' (2367 ~

* [收稿日期] 2004-10-10

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30270988)

[作者简介] 魏中锋(1978-), 男, 陕西扶风人, 在读硕士, 主要从事分子病毒学与免疫学研究。

[通讯作者] 张彦明(1956-), 男, 陕西南郑人, 教授, 博士生导师, 主要从事分子病毒学与免疫学研究。

2 384)

E2' 5' GGCGA GTTGTCTGTTAG 3' (3 553~3 536)

1.2.2 病毒RNA提取 猪脾组织和致病变血管内皮细胞中猪瘟病毒RNA的提取,按试剂盒说明操作。

1.2.3 RT-PCR和nPCR 取适量上述所提取的RNA,分别加入E1(引物)、反转录酶缓冲液、dNTP、RNasin和AMV,42℃下1h进行反转录。反转录结束后,取适量反转录产物,加入引物E1, E1', dNTP, PCR buffer, Taq DNA聚合酶,然后先98℃ 8 min,再95℃ 50 s, 48℃ 1 min, 72℃ 2 min, 35个循环,最后在72℃下延伸10 min。套式扩增(nPCR)时,取上述PCR产物,以E2, E2'为引物,其余条件同上。扩增结束后取上述产物5 μL在含有0.5 μg/mL溴化乙锭(EB)的10 g/L琼脂糖凝胶中电泳检测。

1.2.4 扩增产物的纯化 参照试剂盒操作说明进行。

1.2.5 扩增产物的克隆 取适量纯化后的PCR产物,加入pMD18T载体及高效连接液Ligation Solution I,于16℃连接1h,取连接产物5 μL转化

感受态细胞JM109,培养过夜,挑选培养皿上的白色菌落培养过夜,取少量培养物提取质粒。

1.2.6 重组质粒的PCR鉴定 以E2, E2'为引物,对重组质粒进行PCR扩增鉴定。

1.2.7 重组质粒的酶切鉴定 用BamHI和HindIII酶切重组质粒,37℃ 3 h。

1.2.8 核酸序列测定及分析 由大连宝生物工程有限公司采用自动化测序仪完成,并利用DNA star软件对所测核苷酸序列进行分析比较。

2 结果与分析

2.1 目的基因的扩增及鉴定

以CSFV总RNA为模板,用引物E1进行反转录,引物E1, E1'进行第1次扩增,引物E2, E2'进行套扩。电泳检测证明,获得约1 200 bp的扩增产物(图1),与预期扩增的DNA片段大小相符,并且有较好的特异性和重复性。用碱裂解法提取质粒,电泳照像,用HindIII/BamHI酶切,得到1条与RT-PCR扩增产物大小相符的片段(图2)。以E2, E2'为引物,质粒为模板,扩增出约1 200 bp的片段(图3),表明获得了阳性克隆。

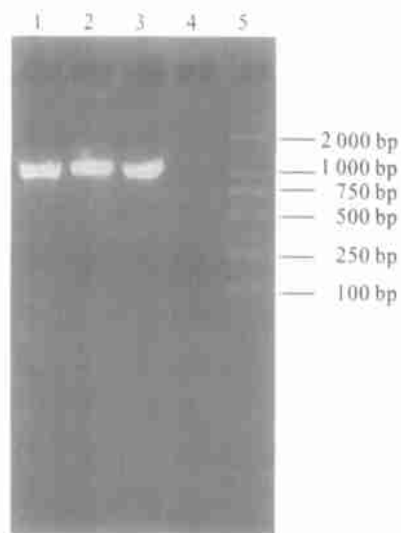


图1 PCR扩增产物电泳结果
1, 2 脾毒扩增结果; 3 细胞毒扩增结果
4 阴性对照; 5 标准分子量DNA
Fig 1 CSFV E2 gene PCR result
1, 2 Spleen virus PCR result;
3 Cultured cell virus PCR result;
4 Negative control;
5 2 000 bp DNA Marker

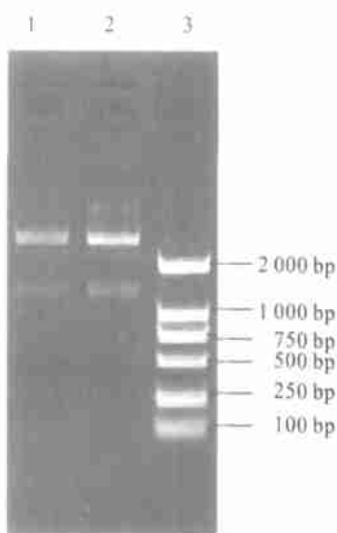


图2 重组质粒酶切鉴定
1 细胞毒重组质粒酶切鉴定;
2 脾毒重组质粒酶切鉴定;
3 标准分子量DNA
Fig 2 Restriction enzyme of recombinant plasmids
1 Cultured cell virus recombinant plasmids; 2 Spleen virus recombinant plasmids;
3 2 000 bp DNA Marker

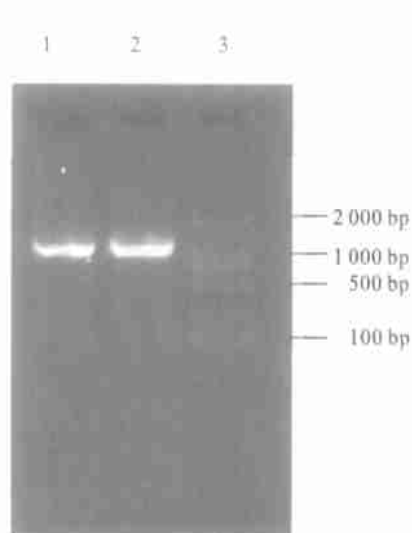


图3 重组质粒PCR鉴定
1 细胞毒重组质粒PCR鉴定;
2 脾毒重组质粒PCR鉴定;
3 标准分子量DNA
Fig 3 Identification of recombinant plasmids with PCR
1 Cultured cell virus; 2 Spleen virus;
3 DNA 2 000 bp DNA marker

2 2 目的基因的核苷酸序列及对应的氨基酸序列

完成了猪瘟石门株经猪多次传代和致细胞病变的细胞毒 E2 基因的克隆与测序后, 对所测的核苷酸序列及推导的氨基酸序列与标准石门株 E2 基因序列进行了比较, 同时对其核苷酸和氨基酸序列的同源性及氨基酸变异情况进行了分析, 结果列于表 1。由表 1 可见, 脾毒与标准石门株核苷酸序列的同源性为 99.4%, 氨基酸序列的同源性为 99.0%; 只有 3 个氨基酸发生变异, 分别为 921 bp (Glu → Asp), 1 022 bp (Arg → Gly) 和 1 034 bp (Ala → Ile)。细胞毒和标准石门株的核苷酸序列同源性为 98.3%, 氨基酸同源性为 96.7%, 共有 12 个氨基酸位点发生变异(表 2), 分别为 709 bp (Leu → Pro), 729 bp (Asn → Tyr), 769 bp (Ser → Ala), 837 bp (Arg → Lys), 840 bp (Val → Met), 845 bp (Arg →

Lys), 874 bp (Asn → Ser), 979 bp (Arg → Lys), 982 bp (Ser → Pro), 989 bp (Leu → Glu), 1 041 bp (Arg → Gly) 和 1 053 bp (Ala → Ile)。

表 1 E2 基因核苷酸同源性及氨基酸同源性比较
Table 1 E2 gene nucleotide sequence and amino acid homology comparison among Shimen strain, spleen and cultured cell virus %

病毒来源 Virus origin	石门株 Shimen	脾毒 Spleen virus	细胞毒 Cultured cell virus
石门株 Derived from china		99.0	96.7
脾毒 Derived from spleen	99.4		98.0
细胞毒 Derived from cultured cell	98.3	99.0	

注: 左下角数值为核苷酸同源性比较, 右上角数值为氨基酸同源性比较。
Note: The date of nucleotide on left; The date of amino on top right corner

表 2 细胞毒氨基酸变异情况

Table 2 Variability of cultured cell virus amino acid

病毒来源 Virus origin	氨基酸位置/bp Amino acid position											
	709	729	769	837	840	845	874	979	982	989	1 041	1 053
石门株 Shimen	Leu	Asn	Ser	Arg	Val	Arg	Asn	Arg	Ser	Leu	Arg	Ala
细胞毒 Cultured cell virus	Pro	Tyr	Ala	Lys	Met	Lys	Ser	Lys	Pro	Glu	Gly	Ile

3 讨论与结论

CSFV E2 糖蛋白是猪瘟病毒的主要保护性抗原, 编码该蛋白的 E2 基因是 CSFV 全基因组中变异最大的部分。据资料^[7]报道, 其变异在 3.2%~25.0%。对该区域进行序列分析和比较, 对研究 CSFV 的进化及其多样性具有重要意义, 有利于从分子水平上揭示近年来猪瘟毒力不断变异和非典型猪瘟至今仍在一些地区流行的可能内在原因。

猪瘟病毒是单股正链的 RNA 病毒, RNA 病毒较易发生变异的原因主要是 RNA 聚合酶的校正活性^[8]。已经证实, 在群落传代过程中, RNA 病毒基因组能够产生广泛的分子和抗原性改变^[7]。E2 基因编码的 gp55 蛋白的空间构型由 3 个疏水区和 3 个 N 端的链内二硫键构成。靠近 C 端的疏水区为 gp55 的膜锚定结构(TMR), 从 856 位半胱氨酸(Cys)后的第 6 个氨基酸至 C 端 TMR 之间, 形成有弹性的 α 螺旋结构, 没有抗原决定簇; 从 N 端 693 位至 856 位 Cys 间形成了富含抗原决定簇的 2 个抗原结构域, 这 2 个结构域由位于 737 和 792 位 Cys 间的 1 段 β 片层结构隔开。693 和 737 位 Cys 形成二硫键, 并组成 1 个序列非保守性(易变)抗原结构域, 具有中和性的 B、C 抗原区位于该结构域中; 另 1 个结构

域具序列保守性(不易变), 由 792 和 856 位 Cys 形成的二硫键组成, 包含中和抗原区 A 和非中和抗原区 D, 而 A、D 区由其间的 1 个疏水区和 818、828 位 Cys 形成的二硫键分开。在 A、B、C 3 个中和区中, 各有 1 段与中和性密切相关的高频突变序列或位点。E2 基因 N 端一侧的抗原区是非保守区, 变异较大的区域在 702~742 氨基酸残基之间^[9]; Van Rijn 等^[4]证明, 在 B、C 区域中, 705、710、713、729 和 734 位等位点的氨基酸变异将导致毒株逃脱与特定单抗的免疫反应。

对猪瘟病毒石门株经猪多次传代的脾毒 E2 基因的核苷酸序列和氨基酸序列的分析发现, 其与标准石门株核苷酸序列的同源性为 99.4%, 氨基酸序列的同源性为 99.0%。只有 3 个氨基酸发生变异, 并且都是跨膜区的疏水性氨基酸残基, 分别为 921 (Glu → Asp)、1 022 (Arg → Gly) 和 1 034 bp (Ala → Ile)。由此说明, 虽然猪瘟病毒石门株经过多次猪传代, 但其保护性抗原基因 E2 并未发生明显变化, 猪瘟病毒在遗传上表现出高度的稳定性, 此结果与 Vanderhallen H^[10]、赵耘等^[11]的研究结论一致, 同时也说明, 猪瘟 E2 基因的微小变化可能对猪瘟病毒分子流行病学有重要意义。

CSFV 感染只能专一性对猪致病, 人工接种可

使牛、绵羊、山羊和鹿等发生无症状感染^[12]。尽管 CSFV 可以在各种组织培养细胞中复制,但不能产生致细胞病变效应(CPE)。绝大多数 CSFV 野毒分离株、克隆株在感染适应细胞后均不产生病毒特异的细胞病变(CPE)。对猪瘟石门株脾毒致猪脐静脉血管内皮细胞病变的细胞毒核苷酸和氨基酸序列的分析发现,细胞毒与标准石门株的核苷酸序列同源性为 98.3%,氨基酸序列同源性为 96.7%,共有 12 个氨基酸位点发生变异,在 B、C 区有 709 (Leu → Pro) 和 729 bp (Asn → Tyr) 2 个, A、D 区有 5 个氨基酸发生变异,分别是 769 (Ser → Ala), 837 (Arg → Lys), 840 (Val → Met), 845 (Arg → Lys) 和 874 bp (Asn → Ser); 其余 5 个在跨膜区,分别是 979 (Arg → Lys), 982 (Ser → Pro), 989 (Leu → Glu), 1 041 (Arg → Gly) 和 1 053 bp (Ala → Ile)。837, 845, 1 041 位有

相同的变异,并且互换的氨基酸一样。729, 874, 769 和 982 位有相同的变异,但互换的氨基酸不同。在对特异性单抗反应和对 A 区抗原决定簇高度保守区起决定作用的 710, 833 和 834 位,本试验的测定结果未发现差异;而 709, 729, 769, 837, 840, 845, 874, 979, 982, 989, 1 041 和 1 053 位的差异到底对抗原性的影响如何,还有待于进一步研究。从以上结果可以看出,细胞毒 E2 基因较脾毒的变异大,这究竟是由于猪体内和猪脐静脉病变细胞内的环境因素不同所引起,还是由细胞病变过程中其他因素所致,尚需进一步研究。

以上两种结果均说明,无论在体外还是体内,猪瘟病毒都能发生了一定程度的变异,但变异不明显,所以可以认为,猪瘟病毒在体内和体外都能保持其遗传的稳定性。

[参考文献]

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 1997. 644- 652
- [2] Moormann R J M, Wamendamm P A M, VandeMerr B, et al. Molecular cloning and nucleotide sequence of hog cholera virus strain Brescia and mapping of the genomic region encoding envelope glycoprotein E1[J]. Virology, 1990, 177: 184- 198
- [3] Stark R, Rumenapf G, Meyer, et al. Genomic localization of hog cholera virus glycoproteins[J]. Virology, 1990, 174: 286- 289
- [4] Van Rijn P A, Van Gennip H G P, Demeijer E J, et al. Epitope mapping of envelope in E1 of hog cholera virus strain Brescia[J]. J Gen Virol, 1993, 74: 2053- 2066
- [5] 洪海霞, 张彦明, 孙裴, 等. 猪脐静脉血管内皮细胞的分离与培养[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2004, 32(5): 1- 4
- [6] Meryers G, Rumenapf T, Thiel H J, et al. Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus[J]. Virology, 1989, 171: 555- 567
- [7] Lowings P, Ibat G, Needham J, et al. Classical swine fever virus diversity and evolution[J]. J Gen Virol, 1996, 77: 1311- 1321
- [8] Steinhauer D A, Holland J J. Rapid evolution of RNA viruses[J]. Annu Rev Microbiol, 1987, 41: 409- 433
- [9] 李红卫, 涂长春, 金扩世, 等. 猪瘟病毒石门株与免疫弱毒株主要保护性抗原 E2 基因的序列测定[A]. 畜禽重大疫病免疫防制研究进展[C]. 北京: 中国农业科技出版社, 1997. 22- 26
- [10] Vanderhallen H, Mitterhozer C, Hofmann M A, et al. Classical swine fever virus is genetically stable *in vitro* and *in vivo*[J]. Arch Virol, 1999, 144: 1669- 1677
- [11] 赵耘, 王在时, 王琴, 等. 猪瘟石门株不同代次 E2 基因主要抗原编码区序列差异分析[J]. 中国兽医杂志, 2002, 38(7): 7- 10
- [12] Shimizu, Kumagai T. Experimental infection of pregnant goats with swine fever virus[J]. Vet Microbiol, 1989, 20(3): 207- 214

Sequencing analysis of E2 gene of muti-passaging spleen virus and cytopathogenic classical swine fever virus

WEI Zhong-feng, ZHANG Yan-ming, SUN Pei, ZHANG Yong-guo, HONG Hai-xia, NIBin, GUO Kang-kang

(College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: According to the published CSFV sequence, two pairs of primers were designed. E2 gene of muti-passaging and cytopathogenic classical swine fever virus was amplified and sequenced through RT-PCR, nPCR method. The nucleotide sequences and the deduced amino sequences of E2 gene were compared and analyzed by DNA star software. The results showed that the nucleotide homology between spleen virus and Shimen was 99.4%, the amino acid homology 99.0%, the nucleotide homology between cultured cell virus and Shimen 98.3%, the amino acid homology 96.7%. So it indicates that E2 genes of CSFV can be genetically stable after muti-passaging and cytopathogenic effect.

Key words: classical swine fever virus; cytopathogenic; sequence analysis; E2 gene; sequence homology