

经猪血管内皮细胞多次传代的 CSFV E2 基因的遗传变异研究

温元鹏,张彦明,冶贵生,邓 文,熊奎州,王学艳

(西北农林科技大学 动物医学院,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 **【目的】**研究猪瘟疫病毒(CSFV) E2 基因在猪脐静脉血管内皮细胞中多次传代后的遗传变异情况,为 CSFV 的致病机理研究提供理论依据。**【方法】**分离并培养猪脐静脉血管内皮细胞,接种猪瘟疫病毒石门株脾毒后继续培养,染毒细胞经 3 次连续传代后全部死亡、脱落,收集每代细胞并提取总 RNA,采用 RT-PCR 方法扩增 CSFV E2 基因。将获得的目 的基因克隆入 T 载体并转化 DH5 α 感受态细胞,提取重组质粒,进行 PCR 和 BamHI、HindIII 酶切鉴定,将阳性的重组质粒进行测序,并用 DNASTar 软件进行序列分析。**【结果】**扩增出了 E2 基因,重组质粒 PMD18-T-E2 的 PCR 和双酶切鉴定结果表明,E2 基因与 pMD18-T 载体连接成功。各代猪脐静脉血管内皮细胞中 CSFV E2 基因之间的核苷酸序列同源性为 99.4%~99.9%,氨基酸序列同源性为 98.9%~99.8%;各代猪脐静脉血管内皮细胞中的 CSFV E2 基因与标准病毒石门株之间的核苷酸序列同源性为 98.9%~99.3%,氨基酸序列同源性为 98.9%~99.2%。**【结论】**猪瘟疫病毒石门株在猪血管内皮细胞上传代的过程中 E2 基因无明显的变异,能保持遗传的稳定性。

【关键词】 猪瘟疫病毒;E2 基因;猪脐静脉血管内皮细胞;序列分析

【中图分类号】 S852.65⁺1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-9387(2008)08-0031-05

Research of genetic diversity of E2 gene of classical swine fever virus that poly-passed in the swine umbilical vein endothelial cells

WEN Yuan-peng,ZHANG Yan-ming,YE Gui-sheng,DENG Wen,
XIONG Kui-zhou,WANG Xue-yan

(College of Veterinary Medicine,Northwest A&F University,Yangling,Shaanxi 712100,China)

Abstract: **【Objective】** The study researched the genetic diversity of E2 gene of classical swine fever virus that poly-passed in the swine umbilical vein endothelial cells to reveal the virus's pathopoiesis mechanism. **【Method】** Swine umbilical vein endothelial cells were isolated and cultivated continuously after CSFV were inoculated. Passaged for three times, the cells were all exfoliated and dead, the RNA was extracted from the collected cells. E2 gene was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) using the special primers. The PCR product was cloned into PMD-18T vector, then transformed into *E. coli*, the recombinant plasmid was extracted. The positive plasmid was sequenced after identified by PCR and restriction enzyme, the sequences were analyzed by DNASTar software. **【Result】** The results showed that E2 gene was amplified, and was inserted the recombinant plasmids PMD18-T-E2 exactly by PCR and restriction digestion. The nucleotide homology of E2 gene among each passage virus was 99.4%—99.9%,

* **【收稿日期】** 2007-09-05
【基金项目】 国家自然科学基金项目(30270988)
【作者简介】 温元鹏(1982—),男,山东烟台人,在读硕士,主要从事分子病原学与免疫学研究。
【通讯作者】 张彦明(1956—),男,陕西南郑人,教授,博士生导师,主要从事分子病原学与免疫学研究。
E-mail: ylzhangym@sohu.com

the amino acid homogeneity 98.8%—99.8%;the nucleotide homology of *E2* gene between each passage virus and shimen virus was 98.9%—99.3%,the amino acid homogeneity 98.9%—99.2%.【Conclusion】After poly-passaging in the swine umbilical vein endothelial cells,*E2* genes of CSFV were genetically stable.

Key words: classical swine fever virus;*E2* gene;swine umbilical vein endothelial cell;sequence analysis

猪瘟(Classical swine fever)是由猪瘟病毒(CSFV)引起的猪的一种高度接触性传染病。该病流行广泛,发病率高,危害极大,被国际兽医局(OIE)列为 A 类动物疾病^[1]。CSFV 是具有囊膜的单股正链 RNA 病毒,属于黄病毒科(Flaviridae)、瘟病毒属(Pestivirus),其基因组全长约为 12.3 kb,含有一个连续的大开放阅读框,编码一个由 389 8 个氨基酸残基组成的多聚蛋白^[2-3]。该多聚蛋白在病毒感染的宿主细胞内可裂解为 12 种病毒特异性蛋白质,其中 4 种为病毒结构蛋白,8 种为非结构蛋白。囊膜糖蛋白 E2 (gp55)为 CSFV 的跨膜结构糖蛋白,是诱导感染猪产生保护性免疫和 CSFV 中和抗体的主要结构蛋白,在 CSFV 的研究中具有十分重要的地位^[4-5]。E2 蛋白分子上存在 4 个独特的抗原结构域 A、B、C 和 D,其中 A 区包括亚抗原结构域 A1、A2 和 A3,A1、A2 最为保守,A3、B、C、D 均具有一定的变异性,A、B、C 区对诱导中和抗体的产生具有重要意义^[6-7]。E2 蛋白在病毒感染进入细胞的过程中,可与宿主细胞表面的 E2 特异性受体相互作用,从而介导病毒进入细胞中,用一定浓度的 E2 蛋白可完全阻断 CSFV 对体外培养细胞的感染过程^[8]。因此,E2 蛋白对病毒感染细胞进而增殖引起细胞病变具有重要作用。CSFV 对猪血管内皮细胞具有专嗜性。为了揭示 CSFV *E2* 基因的遗传变异特点,本研究对在猪血管内皮细胞中多次传代的 CSFV 石门株脾毒之间以及脾毒与标准猪瘟病毒石门株之间 *E2* 基因的序列进行了比较分析,以期研究猪瘟病毒对猪血管内皮细胞的致病变作用机理和猪瘟防治研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 菌株和毒株 DH5 α 菌株由西北农林科技大学重大动物疫病防治与畜产品安全研究室保存;猪瘟病毒石门株购于中国兽药监察所,经猪体多次传代复壮,采取有明显病变的脾脏,分离脾毒用于试验。

1.1.2 试 剂 Trizol 试剂购于 Invitrogen 公司;反转录酶 AMV 及反转录试剂、*Taq* DNA 聚合酶、

PCR 试剂、RNA 酶抑制剂、PMD18-T 载体、胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒和限制性内切酶 *Bam*H I、*Hind*III 均购自宝生物工程(大连)有限公司;M199 干粉购自 GIBICO 公司;胎牛血清购自四季青公司;羊下丘脑提取物由本实验室自制保存。

1.2 猪脐静脉血管内皮细胞的分离与培养

采取新生猪脐带,参照洪海霞等^[9]的方法分离、培养猪脐静脉血管内皮细胞。

1.3 不同代次 CSFV 的制备

培养猪血管内皮原代细胞,待其长至 80%融合时,将制备的猪瘟病毒悬液滴加于培养孔中,在 37℃、体积分数 5% CO₂ 培养箱中作用 1 h,然后更换新鲜的 M199 培养基。待染毒的细胞铺满后传代,直至内皮细胞脱落、死亡,同时收集每代细胞毒,−70℃保存备用。

1.4 CSFV RNA 的提取

根据 RNA 提取试剂盒说明书提取 CSFV RNA。

1.5 CSFV RNA 的 RT-PCR

1.5.1 引物的设计与合成 应用生物学软件设计特异性扩增 CSFV *E2* 基因的寡核苷酸引物,引物位置及序列如下:

E1: 5'-GTGGATATCACGACTGGCTTGTAAG-GAA-3'(242 9~245 6 bp);

E1':5'-ATACTCGAGCACCTGCCGCTAGTTGT-TCTGTTA-3'(353 6~356 8 bp)。

引物由上海生工生物技术有限公司合成。

1.5.2 RT-PCR 取适量的上述 RNA 提取物,分别加入引物 E1'(20 pmol/ μ L)1 μ L、反转录酶缓冲液 5 μ L、dNTP(25 mmol/ μ L)2 μ L、RNA 酶抑制剂(20 U/ μ L) 1 μ L 和反转录酶 AMV(10 U/ μ L) 1 μ L,42℃下作用 1 h。取反转录产物 2 μ L,加入引物 E1(20 pmol/ μ L) 1 μ L、E1'(20 pmol/ μ L) 1 μ L、dNTP(25 mmol/ μ L) 4 μ L、10×PCR buffer 5 μ L、*Taq* DNA 聚合酶 0.5 μ L、灭菌双蒸水 36.5 μ L。PCR 反应程序为:95℃ 5 min;95℃ 50 s,58℃ 1 min,72℃ 1 min,35 个循环;72℃延伸 10 min。扩增结束后,取扩增产物 5 μ L 在含有溴化乙锭的 10 g/L 琼脂糖凝胶上进行电泳。

1.6 CSFV E2 基因片段的纯化和克隆

将各代 CSFV 的扩增产物用胶回收试剂盒纯化回收,并与载体 PMD18-T 连接,构建重组载体 PMD18-T-E2。连接产物转化 DH5 α 感受态细胞,涂板、蓝白斑试验筛选阳性菌落、摇菌、提取质粒。

1.7 重组质粒 PMD18-T-E2 的鉴定

以 E1 和 E1' 为引物,对重组质粒 PMD18-T-E2 进行 PCR 扩增鉴定。用 *Bam*H I、*Hind* III 对重组质粒 PMD18-T-E2 进行双酶切(37 $^{\circ}$ C 酶切 3 h 左右),然后进行琼脂糖凝胶电泳。

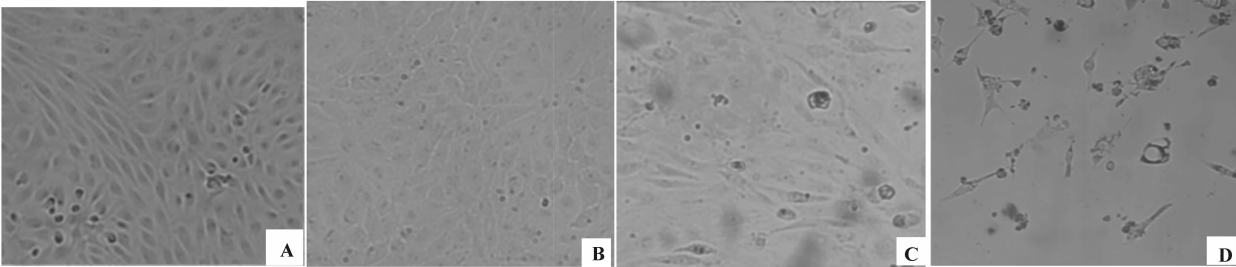


图 1 猪各代血管内皮细胞($\times 100$)
A. 原代猪脐静脉血管内皮细胞;B~D. 分别为接毒后传至第 2,3,4 代细胞
Fig. 1 Umbilicus veins endothelial cells in each passage ($\times 100$)

2.2 CSFV E2 基因的 RT-PCR 扩增结果

结果显示,扩增产物长度约为 1 200 bp(图 2),与预期的 DNA 片段长度相符。

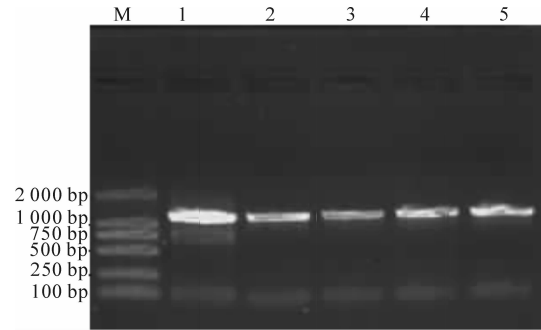


图 2 CSFV E2 基因的 RT-PCR 产物电泳结果
M. DL 2000 Maker;1. 原代内皮细胞毒(EC1);2. 传至第 2 代的内皮细胞毒(EC2);3. 传至第 3 代的内皮细胞毒(EC3);4. 传至第 4 代的内皮细胞毒(EC4);5. 猪瘟病毒石门株脾毒(EC5)

Fig. 2 CSFV E2 gene RT-PCR results
M. Maker DL2000;1. Primary Swine umbilical vein endothelial cell CSFV(EC1);2. Umbilicus veins endothelial cell CSFV in passages 2(EC2);3. Umbilicus veins endothelial cell CSFV in passages 3(EC3);4. Umbilicus veins endothelial cell CSFV in passages 4(EC4);5. Shimen spleen CSFV(EC5)

2.3 重组质粒 PMD18-T-E2 的鉴定结果

对重组质粒 PMD18-T-E2 进行 PCR 扩增和

1.8 CSFV E2 基因核酸序列测定与分析

将鉴定为阳性的重组质粒送交上海生工生物技术有限公司测序,并用 DNASar 软件进行序列分析。

2 结果与分析

2.1 CSFV 对猪血管内皮细胞的接毒传代结果

接种 CSFV 的猪原代血管内皮细胞,经 2 次传代,细胞开始有空泡样病变;经 3 次传代,细胞脱落死亡(图 1)。

*Bam*H I、*Hind* III 双酶切鉴定,结果均在 1 200 bp 左右出现预期的目的片段(图 3,4),表明目的基因与 pMD18-T 载体连接成功。

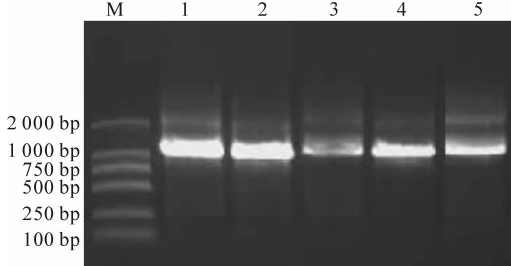


图 3 重组质粒 PMD18-T-E2 的 PCR 鉴定结果
M. Maker DL 2000;1. EC1;2. EC2;3. EC3;4. EC4;5. EC5
Fig. 3 Identification of recombinant plasmids with PCR

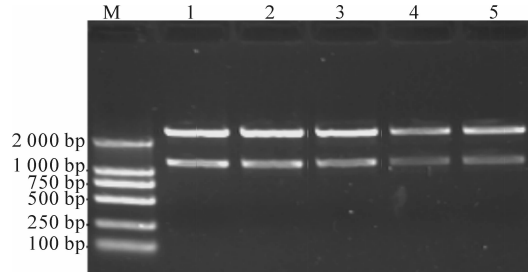


图 4 重组质粒 PMD18-T-E2 的酶切鉴定结果
M. Maker DL 2000;1. EC1;2. EC2;3. EC3;4. EC4;5. EC5
Fig. 4 Restriction enzyme of recombinant plasmids

2.4 CSFV E2 基因的序列分析

克隆测序后,用 DNASTar 软件对所测的核苷酸序列和推导的氨基酸序列与标准猪瘟病毒石门株 E2 基因的序列进行同源性比较,结果见表 1。由表 1 可知,各代细胞 CSFV 之间的核苷酸同源性为 99.4%~99.9%,氨基酸的同源性为 98.9%~

99.8%;各代细胞病毒与标准猪瘟病毒石门株的核苷酸同源性为 98.9%~99.3%,氨基酸的同源性为 98.9%~99.2%。CSFV E2 蛋白氨基酸的突变以散在的点突变为主,突变位点分别位于 707,709,715,728,729,747,947,993,994 和 1 009 等位点。

表 1 各代细胞 CSFV E2 基因核苷酸序列及其推导的氨基酸序列的同源性						
Table 1 Homology of nucleotide and deduced amino acid sequence of E2 gene among each passage virus						%
细胞毒株 Cell Strain	EC1	EC2	EC3	EC4	EC5	Shimen
EC1		99.9	99.8	99.8	99.6	99.3
EC2	99.7		99.7	99.7	99.5	99.2
EC3	99.7	99.4		99.6	99.4	99.1
EC4	99.4	99.2	99.2		99.8	99.1
EC5	99.2	98.9	99.4	99.8		98.9
Shimen	98.9	99.2	99.1	99.1	98.9	

注:右上部分为 CSFV E2 基因的核苷酸序列同源性,左下部分为氨基酸序列同源性。
Note: The upper right of contents are the homogeneity of nucleotide sequence of CSFV E2,and the lower left of contents are the homogeneity of deduced amino acid sequence of CSFV E2.

3 讨 论

CSFV 在猪体内感染并破坏多种细胞,使猪群迅速发病并引起死亡,而在体外培养细胞中 CSFV 一般不产生细胞病变(CPE),而且其增殖滴度很低^[10]。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特异的 CPE^[11-12]。上述结果说明,CSFV 不是对猪的所有细胞均有 CPE 作用,而是只对与 CSFV 具有高度亲和力的细胞有致 CPE 作用。因此,CSFV 对宿主细胞的致病性是许多研究者感兴趣的问题。对瘟病毒基因组的深入研究,促进了在分子水平上对其在细胞培养中产生 CPE 机制的认识。感染 CSFV 的病猪的临床症状主要是全身组织器官出现出血斑点,脾边缘出血性梗死,并有明显的淋巴组织坏死。小血管的变性,毛细血管内皮细胞发生肿胀、变性和坏死,毛细血管通透性增高是导致全身组织器官出现出血斑点并引起淋巴坏死的主要原因^[13]。同时 CSFV 不但在猪体内感染并破坏血管内皮细胞,而且在体外培养的血管内皮细胞中能进行复制、包装及增殖,致使血管内皮细胞发生病变。因此,猪脐静脉血管内皮细胞为研究 CSFV 对宿主细胞的致病机理提供了很好的细胞模型。

本实验通过对在猪脐静脉血管内皮细胞多次传代的猪瘟病毒石门株脾毒 E2 基因的核苷酸和 E2

蛋白的氨基酸序列分析发现,各代细胞毒之间的核苷酸同源性为 99.4%~99.9%,氨基酸同源性为 98.9%~99.8%,各代细胞毒与标准猪瘟病毒石门株的核苷酸同源性为 98.9%~99.3%,氨基酸同源性为 98.9%~99.2%。其中氨基酸发生突变的位点分别为 707,709,715,728,729,747,947,993,994 和 1 009 等位点。结果表明,猪各代脐静脉血管内皮细胞中的 CSFV E2 基因无明显的差异,这说明 CSFV 石门株脾毒在猪血管内皮细胞的传代过程中,其 E2 基因在遗传上保持稳定;各代细胞毒中的 E2 基因与标准猪瘟病毒石门株稍有差异,可能是标准猪瘟病毒石门株在猪体多次传代后发生了一定的变异。以上结果说明,猪瘟病毒石门株在猪血管内皮细胞上传代的过程中,E2 基因无明显的变异,能保持遗传的稳定性。

[参考文献]

[1] Dong X N,Chen Y H. Spying the neutralizing epitopes on E2 N-terminal by candidate epitope-vaccines against classical swine fever virus [J]. Vaccine,2006,24:4029-4034.
[2] 冶贵生,张彦明,徐 浩.载体介导的 shRNA 抑制猪瘟病毒在 PK-15 细胞中增殖特性的研究 [J]. 畜牧兽医学报,2007,38(5):500-505.
Ye G S,Zhang Y M,Xu H. Inhibition of CSFV's propagation in PK-15 cells by shRNA expression vector [J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences,2007,38(5):500-505. (in Chinese)

- [3] Liliianne G, Maritza B. A DNA vaccine expressing the E2 protein of classical swine fever virus elicits T cell responses that can prime for rapid antibody production and confer total protection upon viral challenge [J]. *Vaccine*, 2005, 23: 3741-3752.
- [4] Li N, Zhao H P, Zhao J J, et al. Protection of pigs from lethal challenge by a DNA vaccine based on an alphavirus replicon expressing the E2 glycoprotein of classical swine fever virus [J]. *Journal of Virological Methods*, 2007, 144: 73-78.
- [5] Risatti G R, Holinka L G, Carrillo C, et al. Identification of a novel virulence determinant within the E2 structural glycoprotein of classical swine fever virus [J]. *Virology*, 2006, 355: 94-101.
- [6] Van Rijn P A, van Gennip H G P, de Meijer E J, et al. Epitope mapping of envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus strain Brexia [J]. *J Gen Virol*, 1993, 74: 2053-2060.
- [7] Van Rijn P A, Miedema G K W, Wensvoort G, et al. Antigenic structure of envelope enviloprotein E1 of hog cholera virus [J]. *Journal of virology*, 1994, 68(6): 3934-3942.
- [8] Gualandi G L, Ferrari M, Cardeti G, et al. Protection tests in pigs vaccinated with the lapinized Chinese strain of hog cholera virus (HCV) previously adapted in a minipig kidney (MPK) cell line, to challenge infection with virulent HCV [J]. *Microbiologica*, 1991, 14(3): 213-217.
- [9] 洪海霞, 张彦明. 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.
- Hong H X, Zhang Y M. Segregation and culture of endothelial cells from swine umbilicus veins [J]. *Journal of Northwest A & F University: Natural Science Edition*, 2004, 32(5): 1-4. (in Chinese)
- [10] Wensvoort G. Topographical and functional mapping of epitopes on hog cholera virus with monoclonal antibodies [J]. *J Gen Virol*, 1989, 70: 2865-2876.
- [11] 王 镇, 陆 宇, 丁明孝. 猪瘟病毒中国兔化弱毒疫苗株在原始牛睾丸细胞中增殖特性的研究 [J]. *中国病毒学*, 2000, 15(2): 170-178.
- Wang Z, Lu Y, Ding M X. Some multiplication properties of the lapinized Chinese strain (C strain) of classical swine fever virus in primary bovine testicular cells [J]. *Virologica Sinica*, 2000, 15(2): 170-178. (in Chinese)
- [12] 王 镇, 陆 宇, 周鹏程, 等. 猪瘟病毒在 PK 细胞和 MPK 细胞中繁殖过程的研究 [J]. *微生物学报*, 1999, 39(3): 189-195.
- Wang Z, Lu Y, Zhou P C, et al. The morphological structure of classical swine fever virus and some characteristics of its multiplication [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 1999, 39(3): 189-195. (in Chinese)
- [13] van Rijn P A, van Gennip H G P, Moormann R J M. An experimental marker vaccine and accompanying serological diagnostic test both based on envelope glycoprotein E2 of classical swine fever virus (CSFV) [J]. *Vaccine*, 1999, 17: 433-440.