

网络出版时间:2012-06-08 15:59

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120608.1559.008.html>

陕西省猪瘟流行毒株 *E0* 和 *E2* 全基因分子特征分析

吴旭锦¹, 朱小甫¹, 徐德乾¹, 杨 萍², 程养善²,
文耀武³, 鲁万民³, 乔志博⁴, 熊忙利¹

(1 咸阳职业技术学院 生物科技系, 动物疫病分子生物学诊断实验室, 陕西 咸阳 712000; 2 咸阳市动物疫病预防控制中心, 陕西 咸阳 712000;
3 旬邑县动物疫病预防控制中心, 陕西 旬邑 711300; 4 泾阳博信牧业有限公司, 陕西 泾阳 713700)

[摘 要] **【目的】**分析目前陕西省猪瘟病毒(CSFV)流行毒株的 *E0*、*E2* 全基因分子特征, 为猪瘟防控提供参考。**【方法】**根据 CSFV Shimen 株及 HCLV 株全基因序列, 设计并合成了 4 对引物, 采用 RT-PCR 方法, 从采自陕西不同地区的猪瘟病料中扩增 *E0*、*E2* 全基因并进行序列测定分析。**【结果】**从采集的病料中成功扩增了 5 株猪瘟流行毒株的 *E0*、*E2* 全基因, 这 5 株流行毒株 *E0* 基因核苷酸同源性在 94.4%~99.8%, 与参考毒株 ALD、Alfort187、Brescia、CAP、Glentorf、GPE、GXWZ02、HCLV、Paderborn、Rimes 和 Shimen 的核苷酸同源性在 80.4%~96.3%, 氨基酸同源性在 86.5%~99.3%。5 株流行毒株 *E2* 基因核苷酸同源性在 91.1%~98.0%, 与参考毒株的核苷酸同源性在 77.7%~94.6%, 氨基酸同源性在 85.2%~95.9%。5 株流行毒株 *E0* Rnase 活性区域氨基酸基序位点没有变异, 但导致流行毒株发生免疫逃逸的 *E2* 蛋白关键位点中有 3 个发生了变异。**【结论】**测定的陕西省猪瘟流行毒株 *E0*、*E2* 基因序列变异明显, 其中 *E2* 蛋白关键位点变异较大。

[关键词] 猪瘟; 流行毒株; *E0* 基因; *E2* 基因; 分子特征

[中图分类号] S852.65⁺1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2012)07-0025-07

Molecule character analysis of gene *E0* and *E2* of virulent classical swine fever virus isolates in Shaanxi province

WU Xu-jin¹, ZHU Xiao-fu¹, XU De-qian¹, YANG Ping², CHENG Yang-shan²,
WEN Yao-wu³, LU Wan-min³, QIAO Zhi-bo⁴, XIONG Mang-li¹

(1 Animal Epidemic Disease Diagnostic Laboratory of Molecular Biology, Department of Biology Science & Technology, Xianyang Vocational Technical College, Xianyang, Shaanxi 712000, China; 2 Xianyang Animal Epidemic Disease Prevention and Control Centre, Xianyang, Shaanxi 712000, China; 3 Xunyi Animal Epidemic Disease Prevention and Control Centre, Xunyi, Shaanxi 711300, China; 4 Jingyang Boxin Husbandry Ltd., Jingyang, Shaanxi 713700, China)

Abstract: **【Objective】**The analysis on gene *E0* and *E2* molecular character of the virulent strain of classical swine fever in Shaanxi province was done to provide a reference for the prevention and control of classical swine fever. **【Method】**According to Shimen and HCLV strains gene sequence, we designed and synthesized four pairs of primers using RT-PCR method, amplified and analyzed the gene sequence of gene *E0* and *E2* from the collection of disease tissue. **【Result】**The results showed that the five strains gene *E0* nucleotide homology was between 94.4%—99.8%. Compared with reference strains of ALD, Alfort187, Brescia, CAP, Glentorf, GPE, GXWZ02, HCLV, Paderborn, Rimes and Shimen, nucleotide homology was

* [收稿日期] 2011-12-19

[基金项目] 咸阳市 2011 年科技计划项目(2011K04-12)

[作者简介] 吴旭锦(1979—), 女, 陕西西安人, 讲师, 博士, 主要从事纳米药物开发和动物疫病分子病原学研究。

E-mail: wuxujin@yahoo.com.cn

between 80.4%—96.3%, amino acid homology 86.5%—99.3%, genes *E2* nucleotide homology 91.1%—98.0%, and compared with the reference strain nucleotide homology was between 77.7%—94.6%, and amino acid homology 85.2%—95.9%. *E0* RNase active site motifs were not mutated, and *E2* protein had three key sites of mutation leading to immune escape of the virulent strain. 【Conclusion】 Gene *E0* and *E2* sequence of virulent strains of Shaanxi province variation was significant, especially in key sites of *E2* larger variation.

Key words: classical swine fever; virulent strains; gene *E0*; gene *E2*; molecular character

猪瘟疫(Classical swine fever, CSF)旧称猪霍乱(Hog cholera, HC),是一种由猪瘟疫病毒(Classical swine fever virus, CSFV)引起的高度接触性传染病,CSF 在世界范围内流行并造成巨大的经济损失,是猪病中最为重要的病毒性传染病之一。

CSFV 的基因组为单股正链 RNA,全长 12.3 kb,含有 1 个大的开放阅读框,编码蛋白的顺序依次为 N^{PRO}、C、E0、E1、E2、P7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B^[1-2],其中 C、E0、E1 和 E2 为 4 种结构蛋白,其余 8 种为非结构蛋白。在这些蛋白中,能够刺激机体产生中和抗体的只有 E0 和 E2,因而 E0 和 E2 基因及其编码的蛋白成为 CSFV 研究的重要对象。E0 囊膜糖蛋白由 227 个氨基酸残基组成,分子量为 44~48 ku^[3]。有研究表明,E0 蛋白具有 RNA 酶活性,通过对 C 株的 E0 基因突变分析发现,E0 蛋白 RNA 酶活性消失后的突变重组株会使宿主细胞产生病变,并诱导细胞凋亡,提示 E0 可能是病毒能持续存在于天然宿主体内的原因^[4-6]。E2 囊膜糖蛋白是 CSFV 中最重要的保护性抗原,是中和抗体的主要诱导蛋白,在 CSFV 编码的多聚前体蛋白中定位于 690~1 062 位。在 E2 蛋白内存在 A、B、C 和 D 4 个独特的抗原结构域,定位于 690~866 位氨基酸处。由于近年来我国免疫猪群时有猪瘟免疫失败的现象出现,免疫耐受和带毒综合征表现突出,许多学者针对这一问题进行研究后认为,我国 CSF 流行现状与 CSFV 遗传变异特别是 E0、E2 的基因变异有关^[7-10]。为进一步了解 CSFV 流行毒株 E0 和 E2 基因的遗传变异情况,明确其在自然界的衍化以及二者的相关规律,本研究对获得的陕西省 5 株 CSFV 流行毒株进行了 E0 和 E2 基因全序列的测序分析,以期对我国 CSFV 的分子流行病学研究提供资料,为制定 CSF 防制计划提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料 从陕西咸阳市、宝鸡市、渭南市采

集疑似 CSF 的猪脾脏、肾脏和淋巴结,将组织病料充分研磨后于 12 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,−70 ℃ 保存备用。

1.1.2 试剂 TRIzol LS Reagent,为美国 Invitrogen 公司产品;AMV 反转录酶(5 U/μL)、HPRI RNA 酶抑制剂(40 U/μL)、DEPC 处理水、rTaq DNA 聚合酶(5 U/μL)、dNTP(2.5 mmol/L)、pMD18-T 载体克隆试剂盒、BamHI(15 U/μL)及 Hind III(15 U/μL)限制性内切酶,均为 TaKaRa 公司产品;UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒,购自生工生物工程(上海)有限公司;DH5a 大肠杆菌,由咸阳职业技术学院动物疫病分子生物学诊断实验室保存。

1.1.3 引物的设计与合成 根据 GenBank 上发表的 CSFV Shimen 株(登录号 AF092448)及 HCLV 株(登录号 AF531433)全基因序列,参考文献[9]合成了 E0DF/E0DR(用于第 1 次扩增)、E0EF/E0ER(用于第 2 次扩增)、E2AF/E2AR(用于第 1 次扩增)和 E2BF/E2BR(用于第 2 次扩增)4 对引物,序列分别为: E0DF. 5'-AACCACCAGAATCTAG-GAAG-3'(第 1 089~1 108 位); E0DR. 5'-GT-GTTTTTGGGGAGGCAAGC-3'(第 1 941~1 922 位); E0EF. 5'-AAAGCCCTATTGGCATGGG-3'(第 1 118~1 136 位); E0ER. 5'-GGTGCAGTTGT-TAGTGTACC-3'(第 1 919~1 900 位); E2AF. 5'-ATCAACCACGGCAT-3'(第 2 344~2 357 位); E2AR. 5'-CTGCCAACCGCCATCTATC-3'(第 3 793~3 775 位); E2BF. 5'-CATTCCTCATCT-GCTTGA-3'(第 2 355~2 372 位); E2BR. 5'-CACTGTTATAGTCTT-3'(第 3 736~3 750 位)。引物由生工生物工程(上海)有限公司合成,E0、E2 基因预计扩增长度分别为 801 和 1 380 bp。

1.2 CSFV 总 RNA 的提取及第一链 cDNA 反转录

取 1.1.1 中病料上清液 250 μL,参照 TRIzol LS Reagent 试剂说明分别提取其总 RNA,空气中自然干燥后,分别用于进行 E0 和 E2 基因模板第一链 cDNA 的反转录。取干燥后的核酸样品 1 份,用

10.0 μL DEPC 处理水充分溶解,加入 25.0 $\mu\text{mol/L}$ 下游引物(E_0 、 E_2 基因分别用 $E_0\text{DR}$ 、 $E_2\text{AR}$ 引物反转录)1.0 μL ,置 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min,取出后立即冰浴 5 min,再分别加入 dNTP 4.0 μL ,5 $\times$ AMV Buffer 4.0 μL ,AMV 反转录酶 0.5 μL ,HPR I RNA 酶抑制剂 0.5 μL ,总体积 20.0 μL 。42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反转录 90 min 后取出,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3 CSFV E_0 和 E_2 全基因的巢式 PCR 扩增及鉴定

以第一链 cDNA 为模板进行 PCR 反应,反应体系为:第一链 cDNA 4.0 μL ,10 $\times$ PCR Buffer 5.0 μL ,dNTP 4.0 μL ,上、下游引物(25.0 $\mu\text{mol/L}$)各 1.0 μL ,r *Taq* DNA 聚合酶 1.0 μL ,加超纯水 34.0 μL 至总体积 50.0 μL 。 E_0 基因第 1 次 PCR 扩增条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 50 s,54 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,共 35 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。 E_2 基因第 1 次扩增 PCR 条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 50 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,共 35 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。第 2 次扩增体系中,模板为 10 倍稀释的第 1 次扩增产物 4.0 μL ,其余组分同第 1 次 PCR。 E_0 基因第 2 次 PCR 扩增条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 50 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,共 35 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。 E_2 基因第 2 次 PCR 条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 50 s,52 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,共 35 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10

min。反应完毕后取 PCR 产物 5.0 μL 于 10 g/L 琼脂糖凝胶中电泳,凝胶成像系统中观察照相。

1.4 CSFV E_0 和 E_2 全基因 PCR 产物的回收、克隆及测序

PCR 产物纯化按照 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒说明进行。将回收产物与 pMD18-T 载体连接,转化 DH5 α 感受态细胞,经 Amp、IPTG、X-gal 筛选,挑取白色单个菌落,37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 12 h,对菌液进行 PCR 鉴定。提取 PCR 鉴定阳性克隆的质粒,进行 *Bam*H I、*Hind* III 双酶切鉴定,并送上海生工进行测序。

1.5 CSFV E_0 和 E_2 全基因核苷酸和氨基酸序列的比较与分析

将上海生工测得的序列进行拼接,得到完整的 E_0 、 E_2 基因,利用 DNASTAR 软件,将 5 株 CSFV E_0 和 E_2 全基因序列与 GenBank 中发表的国内外古典猪瘟代表毒株分别进行核苷酸和氨基酸同源性比较分析,并绘制系统发生树。

2 结果与分析

2.1 CSFV E_0 和 E_2 全基因的扩增

按照本研究的试验方法成功地从采集的病料中先后扩增出了 5 株 CSFV 的 E_0 (801 bp)和 E_2 (1 380 bp)全基因(图 1)。

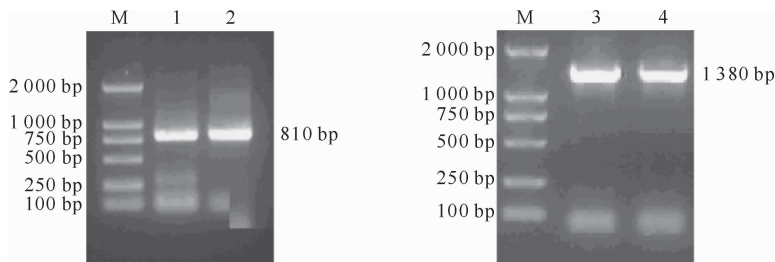


图 1 部分病料中 CSFV E_0 、 E_2 基因的巢式 PCR 扩增结果

M. DL2000 DNA 分子质量标准;1,2. 部分病料中扩增 E_0 基因;3,4. 部分病料中扩增 E_2 基因

Fig. 1 Result of cloned gene E_0 and E_2 by nested PCR

M. DL2000 DNA Marker;1,2. Cloned gene E_0 from tissue;3,4. Cloned gene E_2 from tissue

2.2 CSFV E_0 和 E_2 基因阳性质粒的酶切鉴定与测序结果

E_0 、 E_2 基因阳性质粒经 *Bam*H I、*Hind* III 双酶切鉴定,获得了预期长度的片段(图 2)。经过测序,获得了 5 株 CSFV 流行毒株的 E_0 和 E_2 全基因序列,将这 5 株病毒分别命名为 FJ221、FJ237、FJ279、FJ288、FJ292。

2.3 CSFV 流行毒株与参考毒株 E_0 基因核苷酸及氨基酸序列的比较

将所测得的 FJ221、FJ237、FJ279、FJ288、FJ292

E_0 基因与 GenBank 上发表的 ALD(登录号 D49532)、Alfort187(登录号 X87939)、Brescia(登录号 AF091661)、CAP(登录号 X96550)、Glentorf(登录号 U45478)、GPE(登录号 D49533)、GXWZ02(登录号 AY367767)、HCLV(登录号 AF531433)、Pad-erborn(登录号 AY072924)、Rimes(登录号 AY259122)和 Shimen(登录号 AF092448) CSFV 参考毒株进行比较,结果表明,这 5 株 CSFV 流行毒株 E_0 基因的核苷酸同源性在 94.4%~99.8%,其中 FJ221 与 FJ292 同源性最高,为 99.8%;FJ237 与

FJ279 最低,为 94.4%。与参考毒株相比,FJ221 与 GXWZ02 同源性最高,达 96.3%;FJ237 与 Rimes 的同源性最低,只有 80.4%。5 株流行毒株 E0 氨基酸序列比较结果表明,FJ221 与 FJ292 的氨基酸同源性最高,为 99.3%;FJ237 与 FJ279 同源性最低,为 95.5%;其他流行毒株的氨基酸同源性介于

95.5%~99.3%。5 株流行毒株与参考毒株 E0 的氨基酸同源性在 86.5%~99.3%,其中抗原性最接近的是 FJ221 与 GXWZ02,二者同源性为 99.3%;抗原性相差最远的是 FJ279 和 Rimes,二者同源性仅为 86.5%。

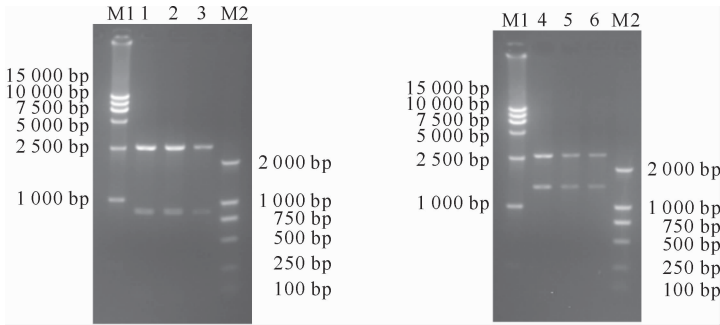


图 2 部分 CSFV E0、E2 基因阳性质粒的酶切鉴定
M1. DL15000 DNA 分子质量标准;M2. DL2000 DNA 分子质量标准;
1~3. E0 基因阳性质粒 *Bam*H I、*Hind* III 双酶切产物;4~6. E2 基因阳性质粒 *Bam*H I、*Hind* III 双酶切产物

Fig. 2 Electrophoresis result of enzyme digest recombinant plasmids of E0 and E2

M1. DL15000 DNA Marker;M2. DL2000 DNA Marker;1—3. Enzyme digest recombinant plasmids of E0 by *Bam*H I, *Hind* III;
4—6. Enzyme digest recombinant plasmids of E2 by *Bam*H I, *Hind* III

2.4 CSFV 流行毒株与参考毒株 E2 基因核苷酸及氨基酸序列的比较

将 5 株流行毒株 E2 基因与 2.3 中的参考毒株进行比较,结果显示,5 株流行毒株 E2 基因核苷酸同源性在 91.1%~98.0%,其中同源性最高的是 FJ221 与 FJ279,同源性最低的是 FJ288 与 FJ292,分别为 98.0%和 91.1%。与参考毒株相比,核苷酸同源性最高的是 FJ279 与 GXWZ02,达 94.6%;最低的是 FJ288 与 HCLV、Rimes,仅为 77.7%。5 株流行毒株 E2 氨基酸序列比较结果表明,同源性最高的是 FJ221 与 FJ279,达 96.5%;最低的是 FJ288

与 FJ292,为 89.8%,其他流行毒株同源性介于 89.8%~96.5%。5 株流行毒株与参考毒株 E2 氨基酸同源性在 85.2%~95.9%,其中 FJ237 与 GXWZ02、Paderborn 的同源性均最高,为 95.9%;FJ288 与 Rimes 的最低,为 85.2%。可知氨基酸比较和核苷酸比较结果基本一致。

2.5 CSFV 5 株流行毒株和参考毒株 E0、E2 基因系统发生树的绘制

利用 DNASTAR 软件分别比较测得的 5 株流行毒株以及 11 株参考毒株 E0 和 E2 基因,绘制系统发生树,结果见图 3。

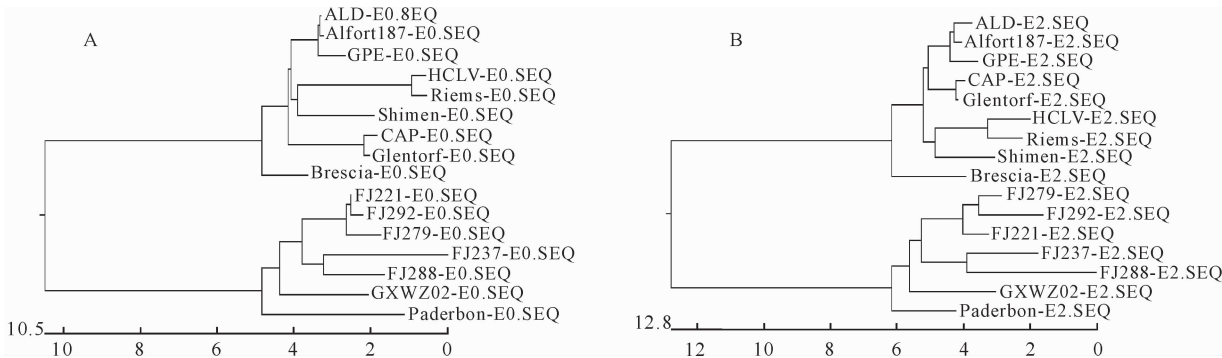


图 3 5 株 CSFV 流行毒株与参考毒株 E0(A)、E2 基因(B)的系统发生树

Fig. 3 Phylogenetic tree of 5 virulent strains and reference strains gene E0 (A) and E2 (B)

从图 3 可以看出,E0 基因和 E2 基因的系统发 生树均明显的分为 2 大群,其中 ALD、Alfort187、

Brescia、CAP、Glentorf、GPE、HCLV、Rimes 和 Shimen 属于基因 I 群,这些毒株均为 20 世纪 50~80 年代分离的毒株;而 FJ221、FJ237、FJ279、FJ288、FJ292、GXWZ02 和 Paderborn 属于基因 II 群,其中 GXWZ02 和 Paderborn 分别是我国与德国近年的流行毒株,本试验中获得的 5 个毒株与之同群,提示陕西省近年 CSFV 流行以基因 II 群毒株为主;在基

因分群上,E0 与 E2 基因分群结果是一致的。

2.6 CSFV 流行毒株与参考毒株 E0 蛋白 Rnase 活性区域氨基酸基序的比较

E0 蛋白中存在 2 个具有 Rnase 活性的氨基酸基序 SLHGIWPE 和 EWNKHGWC,其在陕西省 5 株流行毒株的氨基酸序列中分别位于第 47~54 位和第 94~101 位(图 4)。

S L H G I W P E								E W N K H G W C							
50								100							
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	FJ221-E0.DEQ
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	FJ237-E0.DEQ
-	-	-	-	-	-	-	-	Q	-	-	-	-	-	-	FJ279-E0.DEQ
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	FJ288-E0.DEQ
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	FJ292-E0.DEQ
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ALD-E0.DEQ
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Alfort187-E0.DEQ
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Brescia-E0.DEQ
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CAP-E0.DEQ
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Glentorf-E0.DEQ
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	GPE-E0.DEQ
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	GXWZ02-E0.DEQ
-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	HCLV-E0.DEQ
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Paderborn-E0.DEQ
-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	Riems-E0.DEQ
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Shimen-E0.DEQ

图 4 CSFV 流行毒株与参考毒株 E0 2 个 Rnase 活性区域氨基酸基序的比较

Fig. 4 Comparison of deduced amino acid sequences of two domains of Rnase activity

从图 4 可以看出,5 株流行毒株的 SLHGIWPE 基序没有发生变异,尤其是对 Rnase 活性最为关键的 49 位和 98 位的氨基酸(H),均没有任何变异。

2.7 CSFV 流行毒株与参考毒株 E2 蛋白免疫逃逸关键位点的比较

Van Rijin 等^[11]研究证实,在 E2 蛋白 B 区和 C

区的 705,710,713,729,734 位等位点的氨基酸变异会导致流行毒株发生免疫逃逸,这 5 个位点在 HCLV 株中分别为 N、L、G、N 和 K。在本试验所测定的 5 株流行毒株 E2 蛋白氨基酸序列中,上述 5 个位点相对应定位于 44,49,52,68 和 73 位(图 5)。

N E I G L L G A G G L T T T W K E Y N H D L Q L N D G T V K A T C T A G S																								Majority
50												60												
-	-	-	P	-	-	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	D	-	I	R	-	FJ221-E2.DEQ
-	-	-	P	-	-	E	-	-	-	-	R	-	-	-	-	G	-	-	D	-	-	R	-	FJ237-E2.DEQ
-	-	-	P	-	-	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	P	D	-	I	R	-	FJ279-E2.DEQ
-	-	-	P	-	-	E	-	-	-	-	R	-	S	-	-	G	-	-	D	-	-	R	-	FJ288-E2.DEQ
-	-	-	P	-	-	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	D	-	I	R	-	FJ292-E2.DEQ
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	ALD-E2.DEQ
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	Alfort187-E2.DEQ
-	-	-	-	-	-	E	-	-	-	-	-	Q	-	-	-	Q	-	-	-	-	-	E	-	Brescia-E2.DEQ
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	A	-	CAP-E2.DEQ
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	Glentorf-E2.DEQ
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	GPE-E2.DEQ
-	-	-	P	-	-	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	D	-	-	R	-	GXWZ02-E2.DEQ
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	V	HCLV-E2.DEQ
-	-	-	P	-	-	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	D	-	-	R	-	Paderborn-E2.DEQ
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	V	Riems-E2.DEQ
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	Shimen-E2.DEQ

图 5 CSFV 流行毒株与参考毒株 E2 氨基酸变异位点的比较

Fig. 5 Amino acid variation sites of E2 protein

由图 5 可见,E2 蛋白氨基酸序列中,第 44 和 49 位氨基酸没有变异,第 52,68 及 73 位分别发生了 G→E、N→D 和 K→R 变异。

3 讨 论

CSFV E0 囊膜糖蛋白的 Rnase 活性在 CSFV

的复制中具有重要作用,推测这种 Rnase 活性可能与 CSFV 的持续性感染有关。在体外免疫抑制试验中,E0 能够完全抑制由刀豆蛋白 A 诱导的猪、牛、羊和人的淋巴细胞增殖,这表明 E0 能够诱导这些种属动物的淋巴细胞的凋亡^[4]。由于 CSFV 感染的一个显著特点就是白细胞减少和免疫抑制,因此 E0 可能在 CSFV 的致病性方面有重要的作用^[12]。另外,E0 蛋白能够刺激机体产生保护性抗体,因而研究 E0 基因和蛋白的变异情况,对于明确目前我国 CSF 流行现状有重要意义。将本研究获得的陕西省 5 株 CSFV 流行毒株与我国疫苗株 HCLV E0 基因核苷酸序列进行比较,结果显示,FJ221、FJ237、FJ279、FJ288、FJ292 与 HCLV 的同源性分别为 82.8%、80.5%、82.1%、81.6%和 82.4%,氨基酸同源性分别为 89.1%、87.6%、87.3%、88.4%和 88.4%;与我国广西参考流行毒株 GXWZ02 的核苷酸同源性分别为 96.3%、93.3%、95.5%、95.0%和 96.0%,氨基酸同源性分别为 99.3%、96.6%、97.4%、98.1%和 98.5%。表明这 5 株流行毒株与 HCLV 差异较大,而与近年的流行毒株 GXWZ02 亲缘关系密切。对 E0 蛋白 Rnase 活性的氨基酸基序比较发现,第 54 位除疫苗株 Rimes 和 HCLV 为 G 外,其他株均为 E,这一差异对 CSFV 的影响机理尚不清楚;基序 EWNKHGWC 比较结果表明,只有 FJ279 的 94 位氨基酸为 Q,其他毒株均为 E,这一不同之处如何影响 FJ279 的生物活性,还需进一步深入研究。

由于 E2 蛋白是 CSFV 中的主要保护性抗原,国内外对 E2 的研究最为深入。研究证实,E2 蛋白可划分为 A、B、C 和 D 4 个功能区域,A 区又分为 A1、A2 和 A3 3 个亚区,其中 A1 亚区、B 区和 C 区均能诱导机体产生中和抗体^[13-14]。本研究获得的陕西省 5 株 CSFV 流行毒株 FJ221、FJ237、FJ279、FJ288、FJ292 与 HCLV E2 基因的核苷酸同源性分别为 80.9%、79.5%、80.1%、77.7%和 78.3%,氨基酸同源性分别为 88.5%、88.0%、88.0%、85.7%和 86.5%;与 GXWZ02 的核苷酸同源性分别为 94.1%、94.0%、94.6%、91.7%和 94.0%,氨基酸同源性则分别为 95.2%、95.9%、95.7%、92.8%和 94.3%。从比较结果可见,这 5 株流行毒株 E2 基因的核苷酸序列与 HCLV 相比差异大,呈现比较明显的变异,其变异程度较 E0 基因大;但是氨基酸序列与 HCLV 相比差异较小,提示核苷酸的变异多为同义变异。与 GXWZ02 相比,这 5 株流行毒株 E2

的核苷酸和氨基酸同源性均较高。在 E2 蛋白与免疫逃逸相关的 5 个关键位点中,第 52、68 及 73 位分别发生了 G→E、N→D 和 K→R 变异,这 3 个氨基酸位点的变异对 FJ221、FJ237、FJ279、FJ288 和 FJ292 流行毒株的致病性及免疫机制有何影响,尚需要进一步的研究证实。

从以上 E0、E2 基因比较结果来看,本研究中的 5 株流行毒株在核苷酸水平上均发生了比较明显的变异,与经典毒株的氨基酸同源性均较高,但在一些关键性位点上 E2 发生了变异。这些变异的积累有可能会对我国目前的疫苗免疫防控策略构成威胁,需要密切关注 CSFV 流行毒株的基因变异态势,及时为猪瘟的预防控制提供参考。另外,由于我国 CSFV 分子流行病学研究起步较晚,目前积累的资料不多,今后还应在流行毒株变异株的地理分布及免疫应答关系方面进行深入研究。

[参考文献]

- [1] Meyers G, Rumenapf T, Thiel H J. Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus [J]. *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 [J]. *Virology*, 1990, 177: 184-198.
- [3] Rumenapf T, Unger G, Strauss J H, et al. Processing of the envelope glycoprotein of pestivirus [J]. *Journal of Virology*, 1993, 67: 3288-3294.
- [4] Hulst M M, Panoto F E, Hoekman A, et al. Inactivation of the Rnase activity of glycoprotein Erns of classical swine fever virus in a cytopathogenic virus [J]. *J Virol*, 1998, 72(1): 151-157.
- [5] Meyers G, Saalmuller A, Buttner M. Mutations abrogating the Rnase activity in glycoprotein Erns of the pestivirus classical swine fever virus lead to virus attenuation [J]. *J Virol*, 1999, 73(12): 10224-10235.
- [6] Iqbal M, Flick-Smith H, McCauley J W. Interaction of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein Erns with cell surface glycosaminoglycans [J]. *J Gen Virol*, 2000, 81: 451-459.
- [7] 朱小甫, 吴旭锦. 陕西省部分地区猪瘟流行毒株与疫苗毒株 E2 基因主要抗原区序列变异分析 [J]. *上海交通大学学报: 农业科学版*, 2011, 29(6): 24-28.
Zhu X F, Wu X J. Sequence analysis of E2 gene of virulent classical swine fever virus isolates in Shaanxi Province and vaccine strains [J]. *Journal of Shanghai Jiaotong University: Agricultural Science*, 2011, 29(6): 24-28. (in Chinese)
- [8] 朱小甫, 吴旭锦. 我国猪瘟病毒分子流行病学研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2009, 30(11): 105-109.
Zhu X F, Wu X J. Progress on molecular epidemiology of classical swine fever virus in China [J]. *Progress in Veterinary Med-*

icine,2009,30(11):105-109. (in Chinese)

[9] 吴旭锦,朱小甫,陈德坤. 2006—2007 年陕西省古典猪瘟流行毒株 E0 基因的克隆及序列分析 [J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版,2010,36(1):16-22.

Wu X J,Zhu X F,Chen D K. Cloning and sequence analysis of E0 gene of virulent classical swine fever virus isolates in Shaanxi Province in 2006—2007 [J]. Journal of Zhejiang University, Agric & Life Sci,2010,36(1):16-22. (in Chinese)

[10] 王 琴,宁宜宝,王在时,等. 猪瘟病毒流行株与疫苗株 Erns 基因的序列分析 [J]. 中国农业科学,2004,37(3):446-452.

Wang Q,Ning Y B,Wang Z S,et al. Sequence analysis of the Erns gene of field isolates and vaccine strains of hog cholera virus [J]. Scientia Agricultura Sinica,2004,37(3):446-452. (in Chinese)

[11] Van Rijn P A, Van Gennip H G P, Demeijer E J, et al. Epitope mapping of envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus strain Brescia [J]. J Gen Virol, 1993, 74(10):2053-2066.

[12] Krol E, Wandzik I, Szcja W, et al. *In vitro* antiviral activity of some uridine derivatives of 2-deoxy sugars against classical swine fever virus [J]. Antiviral Res, 2010, 86(2):154-162.

[13] Fernandez-Sainz I, Holinka L G, Gavrilov B K, et al. Alteration of the N-linked glycosylation condition in E1 glycoprotein of classical swine fever virus strain Brescia alters virulence in swine [J]. Virology, 2009, 386(1):210-216.

[14] Riedel C, Lamp B, Heimann M, et al. Characterization of essential domains and plasticity of the classical swine fever virus Core protein [J]. J Virol, 2010, 84(21):11523-11531.

(上接第 24 页)

[7] Calizo L H, Flanagan L M. Hormonal-neural integration in the female rat ventromedial hypothalamus: Triple labeling for estrogen receptor- α , retrograde tract tracing from the periaqueductal gray, and mating-induced fos expression [J]. Endocrinology, 2003, 144(12):5430-5440.

[8] Yamamoto M, Ingalls T H. Delayed fertilization and chromosome anomalies in the hamster embryo [J]. Science, 1972, 176:518-521.

[9] Ali A F N, Karen E W, Carlos G G, et al. Oocyte quality in lactating dairy cows fed on high levels of n-3 and n-6 fatty acids [J]. Reproduction, 2009, 138:771-781.

[10] 严兴荣,余树民,雷安民,等. 父系遗传背景对小鼠超排效果及孤雌胚胎体外发育的影响 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2008;36(6):1-4.

Yan X R, Yu S M, Lei A M, et al. Effects of paternal genetic background on efficiency of superovulation and development of mouse parthenogenetic embryos *in vitro* [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2008;36(6):1-4. (in Chinese)

[11] Basak B B S, Bulent M D, Aycan S M S, et al. Blastocyst quality affects the success of blastocyst-stage embryo transfer [J]. Fertility and Sterility, 2000, 74(2):282-287.

[12] Ishikawa H, Endo A. Prolongation of duration of ovulation in ageing mice [J]. J Reprod Fertil, 1996, 108:167-170.

[13] 李子义,谭景和,孙兴参,等. 昆明小鼠早期胚胎发育时程 [J]. 中国兽医学报,1999,19(6):597-601.

Li Z Y, Tan J H, Sun X C, et al. The chronological events of early embryonic development in Kunming mice [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 1999, 19(6):597-601. (in Chinese)

[14] Zhang J, Huang X Q, Liu J J. Observation and analysis on productive capacity of BALB/c mouse [J]. Sichuan Journal of Zoology, 2006, 25(1):179-181.

[15] Gillian M R, Peters A R, Lamming G E. Induction of pulsatile LH release, FSH release and ovulation in post-partum acyclic beef cows by repeated small doses of Gn-RH [J]. J Reprod Fert, 1981, 63:559-565.

[16] 严兴荣,雷安民,沈文正,等. 小鼠不同卵龄卵母细胞纺锤体位置及对去核效率的影响 [J]. 中国农学通报, 2005, 21(9):9-12.

Yan X R, Lei A M, Shen W Z, et al. Effects of mouse oocyte ages on spindles location and enucleation efficiency [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2005, 21(9):9-12. (in Chinese)

[17] Ma W, Zhang D, Hou Y, et al. Reduced expression of MAD2, BCL2, and MAP kinase activity in pig oocytes after *in vitro* aging are associated with defects in sister chromatid segregation during meiosis II and embryo fragmentation after activation [J]. Biol Reprod, 2005, 72:373-383.

[18] Qiao T W, Liu N, Miao D Q, et al. Cumulus cells accelerate aging of mouse oocytes by secreting a soluble factor(s) [J]. Mol Reprod Dev, 2008, 75:521-528.