

广西猪瘟疫行毒与C-株疫苗毒gp55(E₂) 主要抗原区DNA序列差异的比较*

张永国^{1,2}, 刘湘涛¹, 韩雪清¹, 张彦明², 薛青红²

(1 中国农业科学院 兰州兽医研究所, 甘肃 兰州 730046; 2 西北农林科技大学 畜牧兽医学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘要] 采用反转录PCR(RT-PCR)和套式PCR(nest Polymerase Chain Reaction, nPCR)扩增出3株广西省近期(1999~2000年)猪瘟疫行野毒的E₂基因, 将其分别克隆于PMD-18T载体上并进行了核苷酸序列测定, 根据C株及Brescia和Alfort株确定起始氨基酸三联体的正确位置后进行氨基酸序列推导, 同时进行了同源性比较及E₂糖蛋白结构的分析。结果表明, 所测3株HCV E₂基因的长度均为1170 bp, 编码的氨基酸序列均包括完整信号肽序列和部分跨膜序列, 共由384个氨基酸组成。3株流行毒的E₂基因核苷酸序列同源性为90.10%~98.54%, 相应的氨基酸序列同源性为89.59%~97.92%。这3株流行毒与C-株兔脾组织毒(疫苗种毒)E₂基因的核苷酸序列同源性为82.87%~83.99%, 相应的氨基酸序列同源性为86.98%~90.10%, 表明近期猪瘟疫行毒与C-株疫苗毒的gp55蛋白之间存在一定的差异。

[关键词] 猪瘟疫行毒; E₂基因; 糖蛋白; 序列分析

[中图分类号] S813.3; S852.65+1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2782(2002)01-0079-06

猪瘟疫行(Hog Cholera 或 Classical Swine Fever, HC/CSF)是由猪瘟疫行毒(HCV)引起的猪的一种重要传染病, 给养猪业造成了巨大经济损失^[1]。HCV属黄病毒科(Flaviviridae)瘟病毒属(*Pestivirus*), 基因组为一具有感染性的线形RNA分子, 分子质量约 4×10^6 u, 长度约为12.3 kb。HCV基因组5'端无帽子结构, 3'端无PolyA尾巴结构, 由5'端非编码区(5'-NTR), 1个大的ORF和3'端非编码区(3'-NTR)3部分组成。HCV的RNA的5'-NTR相对较长, 约360~363个碱基(nt), 这一部分是HCV不同毒株间基因组结构中最为保守的部分; 3'-NTR约含229~243个碱基(nt), 3'端序列在HCV种内非常保守; HCV基因组的中间部分是编码1条大的多聚蛋白的ORF, 从其5'~3'顺序依次为N^{pro}、C、E₀(E^{ms})、E₁、E₂、E₇、NS₂、NS₃、NS_{4A}、NS_{4B}、NS_{5A}和NS_{5B}的编码区, 分别编码病毒结构蛋白C、E₀、E₁、E₂和非结构蛋白N^{pro}、NS₂、NS₃、NS_{4A}、NS_{4B}、NS_{5A}和NS_{5B}。目前已经定位的HCV蛋白质有N^{pro}、C、E₀、E₁和E₂5种, 他们均由HCV的RNA ORF5'端所编码, 除N^{pro}外, 其他4种均为HCV的结构蛋白^[2~4]。猪瘟疫行E₂基因编码的gp55蛋白是引起

动物产生保护性免疫的主要抗原蛋白, 将该蛋白通过基因工程技术生产并用作疫苗, 对猪可产生良好的免疫保护^[1]。有人利用中和单抗、基因重组及点突变技术阐明了gp55蛋白的抗原结构及中和性抗原决定簇的位置^[4~6]。鉴于对猪瘟疫行毒已有的认识, 通过比较猪瘟疫行毒与疫苗毒E₂基因编码的氨基酸序列, 建立可分析出猪瘟疫行毒与疫苗毒的抗原结构及中和性抗原决定簇的差异程度的方法, 进而预测C-株疫苗对流行毒的免疫保护水平。

1 材料与方法

1.1 病毒

3株猪瘟疫行野毒, 分别采自广西亚热带作物研究所(GXYR), 广西金象饲料厂(GXJX), 广西玉林市(GXYL), 经兔体交互免疫试验确证。

1.2 试剂

RNA提取采用GBCOBR的TRL ZOL^R LS Reagent试剂盒; 反转录酶(AMV)及反转录试剂TaqDNA聚合酶及PCR试剂RNA酶抑制剂PMD-18T载体为大连宝生物工程有限公司产品; 纯化试剂盒为BOEHRINGER MANNHEIM公司

* [收稿日期] 2001-03-07
[基金项目] 国家B类攀登计划项目(85-44)
[作者简介] 张永国(1976-), 男, 山东菏泽人, 在读硕士生, 主要从事动物病毒学研究。

产品;DH5a 由本室保存。

1.3 引物设计及合成

参照 HCV A lfort 株^[2]、Brescia 株^[7]和 C-株^[8]

序列,设计 6 条引物,其中正负链各 3 条,引物位置(参照 C-株)及序列见表 1。

表 1 引物的序列、位置及长度

Table 1 The sequence, location and length of primer

编号 No.	序列 Sequence	位置 Location	长度/nt Length
E ₁	5 TGTA TTA GACCA GACTGG3	2 222~ 2 239	18
E ₁	5 CTGCCAACCGCGTCTA TCTT 3	3 793~ 3 773	21
X ₆	5 A GGGATTTAACTA GGGTCTGG3	2 315~ 2 336	21
T ₈	5 GCA TGGAACA GCA GTA GTA TCC3	3 702~ 3 681	22
E ₂	5 A GGGGACA GA TCGTGCAA 3	2 367~ 2 384	18
E ₂	5 GGCGA GTTGTCTGTAG3	3 553~ 3 536	18

1.4 RNA 提取

参照试剂盒操作进行。

1.5 RT-PCR 和 nPCR

1.5.1 反转录合成 cDNA 在 Eppendorf 管中加入上述提取的总 RNA 11.5 μL , 片段下游引物 E₁ (0.2 g/L) 1 μL , 在 65 $^{\circ}\text{C}$ 预热 10 min, 立即冰浴 5 min 后加入 5 倍的反转录缓冲液 4 μL , 10 mmol/L dNTP 2 μL , Rnasin (40 mol/(L · min)) 0.5 μL , AMV (5 mol/(L · min)) 1 μL , 使总体积为 20 μL , 在 42 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h。

1.5.2 PCR 扩增 采用全套式 PCR 扩增。一扩: 取上述反转录产物 5 μL , 10 倍的 PCR 缓冲液 5 μL , 25 mmol/L MgCl₂ 3 μL , 10 mmol/L dNTP 4 μL , 引物 E₁, E₁ 各 1 μL , 加无 RNase 水至 49.5 μL , 再加入灭菌的液体石蜡 10 μL 放在 PCR 仪中扩增。98

8 min 后加 0.5 μL TaqDNA 聚合酶, 反应总体积 50 μL 。反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 48 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 120 s, 35 个循环, 最后在 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。第 1 次套式扩增: 取 50 倍稀释的一扩产物 5 μL , 加入引物 X₆, T₈ 各 1 μL 。反应条件为: 98 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 100 s, 35 个循环, 最后在 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。其余条件及步骤均同一扩。第 2 次套式扩增: 取 50 倍稀释的第 1 次套式扩增产物 5 μL , 加入引物 E₂, E₂ 各 1 μL 。反应条件为: 98 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 80 s, 35 个循环, 最后在 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。其余条件及步骤均同一扩。扩增结束后取第 2 次套式扩增产物 5 μL 在 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 扩增产物的纯化

参照试剂盒操作进行。

1.7 扩增产物的克隆

取适量纯化后的 PCR 产物, 加入 PMD-18T 载

体, 高效连接液 Ligation Solution I, 于 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接 3 h。取连接好的产物 5 μL 转化感受态 DH5a, 涂布于含安苄西林钠 (100 mg/L) 的 LB 琼脂平皿上, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜后挑选白色菌落接种于 3 mL LB 含安苄西林钠 (100 mg/L) 的细菌培养瓶中, 在摇床上以 220 r/min 振培 10~12 h 后少量提取质粒(转化及质粒提取参考文献[9]进行)。

1.8 重组质粒的 PCR 鉴定

以 E₂, E₂ 为引物, 以一扩条件进行 PCR 扩增鉴定。

1.9 核酸序列测定

采用自动化测序仪测序, 由大连宝生物工程有限公司完成。

1.10 序列分析

用核酸序列分析软件 Goldkey 对所测序列的结构特点、功能区进行分析, 并进行同源性比较研究。

2 结果

2.1 3 株猪瘟流行野毒株 E₂ 基因的核苷酸和相应的氨基酸序列

琼脂糖凝胶电泳表明, 以 E₁, E₁, X₆, T₈ 和 E₂, E₂ 为引物, 扩增出与预期片段 (1 170) 大小相符的片段。克隆后测序, 所测核苷酸序列与 C-株相应核苷酸序列相比较见图 1。由核苷酸序列推导氨基酸序列与 C-株相应的氨基酸序列相比较, 其氨基酸序列包括由完整信号肽序列和部分 TMR 序列的 384 个氨基酸残基构成的肽链, 结果见图 2。

2.2 核苷酸和氨基酸序列同源性比较

用 Goldkey 软件比较 3 株猪瘟流行野毒株与 C-株间的核苷酸及氨基酸序列的同源性, 结果见表 2。

C-ST	1	<u>AGGGGACAGATCGTGCAAGGTGTGGTATGGCTGTACTAGTAAC</u> <u>TGGGGC</u>	51	<u>ACAAGGCCGGCTAGCCTGCAAGGAAGATTACAGGTACGCAATATCGTCAA</u>
GXYR	1	-----A-AA-----T-C---G-G-C-----	51	-----G---T-GT---T-----T-G-----A----
GXJX	1	-----A-AA-----AC-G--G--G--C--A--	51	T-----G---T-----T-----C-----T--G-----A----
GXYL	1	-----A-AA-----T-AC---G-G-C-----	51	-----T-GT---T-----T-----T-G-----A----
C-ST	101	<u>CCGATGAGATAGGGCTACTTGGGGCCGGAGGTCTCACCACCACCTGGAAG</u>	151	<u>GAATACAACCACGATTGCAACTGAATGACGGGACCGTCAAGGCCAOTTG</u>
GXYR	101	-----G-----G-A---T-A-----A	151	-----T-G-----G--G-----T---G-----T---
GXJX	101	--A-----G--G---T-A-----T-----A	151	--A---T-G---T-G-C---G--G-----T---
GXYL	101	-----G-----G-A---T-A-----A	151	-----T-G-----G--G-----T---G-----T---
C-ST	201	<u>CGTGGCAGGTTCTTTAAAGTCACAGCACTTAATGTGGTCAGTAGGAGGT</u>	251	<u>ATTTGGCGTCATTGCATAAGAAGGCTTTACCCACTCCGTGACATTGAG</u>
GXYR	201	-ACT----G-----T---T-----T---A-C---	251	-CC---A---A---C---G---C-G---T---C---A---A---T---A
GXJX	201	-A-T---GG-T-----C-----T-----A---	251	-CC-A-A-----G---C---C---A---A---T---A
GXYL	201	-ACT----G-----CT---T-----A-C---	251	-CC---A---A---C-----C-G---T---C---A---A---T---
C-ST	301	<u>CTCCTGTTCGACGGGACCAACCACTCAACTGAGGAAATGGGAGATGACTT</u>	351	<u>CAGGTCCGGGCTGTGCCGTTTGATACGAGTCTGTGTAAAGGGGAAGT</u>
GXYR	301	---A--T-T-----GT--G--T---G-----	351	TG-A-TT--A-----T---C--A-T---G--C--A-----
GXJX	301	---T-A--T-----G---GT--T---G---G-----	351	TG--TA--A-----A---C---C--A--G--C--A-----
GXYL	301	---A--T-T-----G---G--T---G-----	351	TG-A-TT--A-----T---C--A-T---G--C--A-----
C-ST	401	<u>ACAATACGACCTTGTGAACGGTAGTGCTTTCTATCTTGTCTGCCAATA</u>	451	<u>GGGTGGACGGGTGTCATAGAGTGACAGCAGTGAGCCCAACACTCTGAG</u>
GXYR	401	-----C--T--A--A-----C-----C--A-----	451	-A-----A-----A-----C-----CT---
GXJX	401	---C--C--T--A--A-----C-----A-----	451	--A-----T---T---C-----C-----
GXYL	401	-----C--T--A--A-----C-----C--A-----	451	-A-----A-----A-----C-----CT---
C-ST	501	<u>GACAGAACTGGTAAAGACCTTCAGGAGAGACAAGCCCTTTCCGCACAGAA</u>	551	<u>TGGATTGTGTGACCACCATAAGTGGAAAATGAAGACTTATCTATTGTAAG</u>
GXYR	501	A-----G-----A-----G---T-C-----G	551	---GC-C-----T---A---A---C-G---C-AC---
GXJX	501	-----G---T-T-----GG---T---T-T---G	551	---GC-C-----T---A---A---C-G---C-C---
GXYL	501	A-----G-----A-----G---T-C-----G	551	---GC-C-----T---A---A---C-G---C-C---
C-ST	601	<u>TTGGGGGGCAACTGGACATGTGTGAAAGGCGAGCCAGTGTTTTACACAGG</u>	651	<u>GGGGGTAGTAAACAATGTAGATGGGTGTGGCTTCGACTTCGATGGGCCCTG</u>
GXYR	601	-----T-T-----A-----ACC---G-T---	651	---CA-----C-G---C-T-T---C-A-G-A---C-
GXJX	601	---A--T-T-----A-----T-G-C-ACC---	651	---CA-----C-G---T-T---A-G-A---
GXYL	601	-----T-T-----A-----ACC---G---	651	---CA-----C-G---C-T-T---A-G---C-
C-ST	701	<u>ACGGACTCCCGCATTACCCCATAGGTAAGTGCATTTGGCAAATGAGACA</u>	751	<u>GGTTACAGAATAGTAGATTCAACGGACTGTAAACAGAGATGGCGTTGTAAW</u>
GXYR	701	-T-G-----A--C-----C-----CC-A-----G	751	-----GG---G---CG-A---C-----C--T---
GXJX	701	---G---A--C-----C--A---CC-A-----	751	-----G--G--G---C--A--G--C-----T---T---
GXYL	701	---G-----C-----C---C---CC-A-----G	751	-----GG---G---C--A---C-----C--T---
C-ST	801	<u>CAGCACAGAGGGGAGTCATGAGTGTGATCGGTAACACGACTGTCAAGG</u>	851	<u>TGCATGCATCAGATGAAAGACTGGGCCCTATGCCATGCAGACCFAAAGAG</u>
GXYR	801	-----T--A--AGAA-C-----T--C---C--C--T---	851	---C--G-TG---G-----C-----G---A---
GXJX	801	A---C--A--GAA-----T--C--T--A--C-----	851	---G--T--C--G-----G-----C--G--A---
GXYL	801	-----T--A--AGAA-C-----T--C---C--C--T---	851	---C--G-TG---G-----C-----G---A---
C-ST	901	<u>ATCGTCTCTAGTGTCTGCTCTGTAATGAAACCTCCTGTACATTCAACTA</u>	951	<u>CACAAAACTTTGAAGAGCAAGTACTATGAGCCAGGGACAGCTACTTCC</u>
GXYR	901	-----C--G--G-----G-----T-----T-----	951	-----G---C-A-GA-A-----A-----T---
GXJX	901	-----G--A-----G-----T-----G-----	951	-----G---C--GA-AT-A-----T-----
GXYL	901	-----C--G--G-----G-----T-----T-----	951	-----G---C-A-GA-A-----A-----T---
C-ST	1001	<u>AGCAATATATGCTTAAGGGTGTGATCAGTACTGGTTTGACTGGATGCG</u>	1051	<u>ACTGACGCCCACTCGGATTACTTCGCAGAAATTTGTGTCTTGGTGGTGGT</u>
GXYR	1001	-----C-----C---C--A-----T---C--T---	1051	---G--A---A---C-----T---A-----
GXJX	1001	-----C-----C---A-----A-----T---C--T---	1051	--C---A---A--A--C---T---T-----
GXYL	1001	-----C-----C---A-----T---C--T---	1051	-----A---A---C-----A-----
C-ST	1101	<u>AGCACTGTTAGGAGGAAGATATGTCCTGTGGCTGATAGTGACCTACGTAG</u>	1151	<u>TTCTAACAGAACAACTCGCC</u>
GXYR	1101	G-----A-----G-----G--C--T--A-----A-----TA---	1151	-----
GXJX	1101	---G--A-----G-----G--C--G--A-----A-----TA-T---	1151	-----
GXYL	1101	G-----A-----G-----G--C--T--A-----A-----TA---	1151	-----

图 1 E₂ 基因编码区核苷酸序列及比较

- . 相同的核苷酸; 下划线者为引物

Fig 1 Nucleotide sequence of E₂ gene coding region and comparison within them

- . Indicates same nucleotide; the underlined indicates the primer



```

C-STP      1  GVVWLLLVTGAQGR LACKEDYRYAISSTDEIGLLGAGGLTTTWKEYNHDL
GX YRP     1  -II-----S-----V-----E-----G-
GXJXP     1  -II-----S-----N-----S-----
GX YLP     1  -II-----S-----V-----E-----G-

C-STP      51  QLNDGTVKASCVAGSFKVTALNVVSRRYLASLHKKALPTSVTFELLFDDGT
GX YRP     51  -D-----R-I-T-----K-T-----R-----Q-----
GXJXP     51  -D-----I-I-A-----R-----Q-----
GX YLP     51  -D-----R-I-T-----A-----K-T-----R-----Q-----

C-STP      101  NPSTEEMGDDFRSGLCPFDTSFVVKGKYNTLLNGSAFYLVCPIGWTGVI
GX YRP     101  S-AI-----GF-----I-----
GXJXP     101  S-VI-----G-GL-----
GX YLP     101  S-VI-----GF-----I-----

C-STP      151  ECTAVSPTTMRTEVVKTFRRDKPFPHRMDCVTTIVENEDLFYCKLGGNWT
GX YRP     151  -----L-----K-E-----VG-----K-----Y-----
GXJXP     151  -----L-----G---Y-V-----M-K-----H-----
GX YLP     151  -----L-----K-E-----VG-----K-----

C-STP      201  CVRGEPVFYTGGVVKQCRWCGFDFDGPDLPHYPIGKCILANETGYRIVD
GX YRP     201  ---K--T-A--Q-----SKE-----V--
GXJXP     201  ---D-AT--Q-----KE-----M--
GX YLP     201  ---K--T-A-Q-----SKG-----L-----V--

C-STP      251  STDCNRDGVVISTEGSHECLIGNTTVKVHASDERLGPMPCRPKKIVSSAG
GX YRP     251  -A-----E-----L-G-A-----
GXJXP     251  -G-----E-----L-G-A-----
GX YLP     251  -T-----E-----L-G-A-----

C-STP      301  PVMKTSCTFN YTKTLKNKYIEPRDSYFQQYMLKGEYQYWFDDL DATDRHSD
GX YRP     301  --R-----K-----V-GH-TH
GXJXP     301  --R-----F-----V--H-TH
GX YLP     301  --R-----K-----V-DH-TH

C-STP      351  YFAEFVVLVVVALLGGRYVLWLIIVTYVVLTEQLA
GX YRP     351  ---I-----I-----
GXJXP     351  ---I-----I-----
GX YLP     351  ---I-----I-----

```

图 2 3 株流行野毒株和 C-株的 E₂ 基因编码区氨基酸序列及其比较

P. 蛋白质; - . 相同的氨基酸

Fig. 2 Comparison of amino acid sequence of E₂ gene among 3 prevalent virulent strain and C-strain

P. Protein; - . Indicates the same amino acid

表 2 C-株兔脾组织毒与 3 株流行野毒株间核苷酸序列及氨基酸序列的同源性比较

Table 2 The homology of virus E₂ genes of C-strain and 3 other prevalent virulent strains

%

核苷酸 Nucleotide	氨基酸 Amino acid			
	C-ST	GXYR	GXJX	GXYL
C-ST		87.76	90.10	86.98
GXYR	82.87		89.84	97.92
GXJX	82.96	90.79		89.59
GXYL	83.99	98.54	90.10	

注: 左下部分为核苷酸序列同源性, 右上部分为氨基酸序列同源性。

Note: The left lower part and the right upper part show nucleotide homology and deduced amino acid homology respectively.

3 讨论

3.1 3 株 HCV E₂ 基因核苷酸序列及氨基酸序列同源性分析

E₂ (gp55) 是 HCV 最具抗原性的糖蛋白基因, 而且是全基因组中最易变异的部分之一。对 3 株流行野毒 E₂ 基因及所推导的氨基酸序列进行比较, 发

现 3 株流行野毒之间核苷酸序列同源性为 90.10% ~ 98.54%, 所推导氨基酸序列同源性为 89.59% ~ 97.92%。3 株流行野毒 E₂ 基因与 C-株疫苗毒 E₂ 基因的核苷酸序列同源性为 82.87% ~ 83.99%, 所推导氨基酸序列同源性为 86.98% ~ 90.10%, 说明近期流行猪瘟与 C-株疫苗毒之间存在一定差异。

3.2 3株HCV E₂糖蛋白抗原区氨基酸变异分析

近年来,证实了E₂分子存在4个独特的抗原结构域A、B、C、D,位于E₂N末端的690~866位氨基酸处。A区位于766~866位氨基酸处,A区又分为3个功能区A₁、A₂和A₃,A₁、A₂亚区相连,位于A区C端的795~851位,是E₂蛋白的中心部位,为一段保守区,A₁亚区能诱导产生中和抗体;A₃亚区靠近B、C区,位于766~813位,无保守性,也不诱导

产生中和抗体;B区位于690~773位,C区位于690~800位,两者均为非保守区,是诱导产生中和抗体的主要部位;D区位于766~800位,既不保守也不诱导产生中和抗体。根据上述划分,将测得的3株流行野毒和C-株E₂糖蛋白抗原的各功能区氨基酸变异的数目进行交叉比较分析,其结果见表3。这些氨基酸的变异是否对抗原性有影响,还要进一步进行点突变的分析。

表3 3株流行野毒株与C-株E₂蛋白抗原区氨基酸序列差异数

Table 3 Variable numbers of amino acid of antigenic domain of C-strain and three prevalent virulent strains of HCV E₂

	C/GXYR	C/GXJX	C/GXYL	GXYR/ GXJX	GXYR/ GXYL	GXJX/ GXYL
抗原区 177AA 差异 Difference in the antigen domain 177AA (690~866)	24	19	25	20	2	22
A区 101AA 差异 Difference in the A domain 101AA (766~866)	13	12	13	11	1	11
A ₁ A ₂ 区 57AA 差异 Difference in the A ₁ A ₂ domain 57AA (795~851)	4	1	4	4	0	4
A ₃ 区 48AA 差异 Difference in the A ₃ domain 48AA (766~813)	7	7	7	4	1	3
B区 83AA 差异 Difference in the B domain 83AA (690~773)	12	8	12	11	1	12
C区 110AA 差异 Difference in the C domain 110AA (690~800)	18	14	18	15	2	15
D区 35AA 差异 Difference in the D domain 35AA (766~800)	7	7	7	4	1	3

3.3 3株HCV E₂糖蛋白的信号肽序列和TMR序列的分析

通过对E₂信号肽的结构分析,在E₂N末端690AA有8个氨基酸(从683~690位)编码E₂蛋白的信号肽序列WLLLV TGA,预测的信号肽酶切割位点是Gly689和Ala690之间,其作用是引导糖蛋白前体进入细胞内质网进行进一步加工。扩增的3株HCV E₂基因编码的氨基酸序列均包括完整的信号肽序列。E₂蛋白C末端的TMR序列位于1030~1063位氨基酸处,是一段保守序列,TMR对E₂糖蛋白的免疫原性十分重要,笔者所测的3个E₂包括TMR的部分序列。其中GXYR和GXYL有2个氨基酸发生变异,GXJX有1个氨基酸发生变异,其影响有待于进一步研究。此外,在C-株的E₂糖蛋白753~759位氨基酸处有一段非常保守的序列为RYLA SLH,其抗原性峰值在整个E₂抗原谱中最高,其位置正好处于最具抗原性的B区690~773位和C区690~800位,B区和C区是诱导产生中和抗体最为重要的一部分。同时,李红卫等^[10]所测的石门株、吉林野毒,刘湘涛等^[1]所测的陕西野毒,其

E₂蛋白在相同区域均无一氨基酸发生变异,而所测的GXYR、GXYL第754位氨基酸处酪氨酸(Tyr)-苏氨酸(Thr),是否对E₂糖蛋白抗原性变异起一定作用有待于进一步研究。

4 结论

E₂基因所编码的gp55蛋白空间结构是由3个疏水区和3个N端的链内二硫键构成,这3个疏水区在病毒囊膜上形成两个抗原结构域,其一为保守的中和抗原区,另一为易变的抗原区。在疏水区,3株野毒同C株组织毒有4个氨基酸的差异。在高频突变中和性抗原位点B、C区的氨基酸中,与C-株疫苗毒相应氨基酸相比,GXYR、GXYL有18个氨基酸发生差异,GXJX有14个氨基酸发生差异。对gp55蛋白抗原性、疏水性及抗原表位预测也发现流行毒与C-株毒在保护性抗原上有程度不同的差异,这些差异能否使流行野毒逃脱中和单抗或免疫血清的中和作用;能否影响C-株疫苗的免疫保护力,尚待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 刘湘涛, 赵启祖, 李忠润, 等. 猪瘟病毒和猪瘟的防治[A]. 谢庆阁, 翟中和. 畜禽重大疫病免疫研究进展[C]. 北京: 中国农业科技出版社, 1996: 321- 338.
- [2] Meyers G, Rumeaupf T, Thil H J. Molecular cloning and nucleotide of the genome of hog cholera virus[J]. *Virology*, 1989, 171: 555-567.
- [3] Van Rijin P A, Van Gennilo H G P, DeMeijer E L, et al. A preliminary map of epitopes on envelope glycoprotein E₁ of HCV strain Brescia [J]. *Veterinary Microbiology*, 1992, 33: 212- 230.
- [4] Van Rijin P A, Miedema G W K, Wensvoort G, et al. Antigen structure of envelope glycoprotein E₁ of hog cholera virus[J]. *Journal of General Virology*, 1994, 68: 3934- 3942.
- [5] Lowings P, Iбата G, Paton D, et al. Classical swine fever virus diversity and evolution[J]. *J Gen Virol*, 1996, 77: 1211- 1221.
- [6] Lin M, Lin F, Mallory M. Deletions of structure of envelope glycoprotein E₂ classical swine fever virus strain alfort/187 resolve a linear epitope of monoclonal antibody WH303 and the minimal N-term domain essential for binding immunoglobulin G antibodies of a pig hyperimmune serum [J]. *J Virology*, 2000, 15: 74(24): 11619- 11625.
- [7] Moorman R J M, Wamerdam P M, Hulst M M, et al. Molecular cloning and nucleotide sequence of hog cholera virus strain Brescia and mapping of the genome region encoding envelop protein E₁[J]. *Virology*, 1990, 177: 184- 198.
- [8] 李红卫, 涂长春, 殷震, 等. 异源猪瘟 C-株 E₂ 基因保护抗原编码区序列分析与比较[J]. *中国兽医学报*, 1996, 18(2): 112- 114.
- [9] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 [M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1995.
- [10] 李红卫, 涂长春, 殷震, 等. 吉林省两个猪瘟病毒野毒株囊膜糖蛋白 E₂ 基因抗原决定区的序分析与其它毒株的比较[A]. 谢庆阁, 翟中和. 畜禽重大疫病免疫研究进展[C]. 北京: 中国农业科技出版社, 1997: 27- 32.

Amino-acid difference in the main antigen domain GP55 (E₂) of the C-strain and the Guangxi prevalent strains hog cholera virus (HCV)

ZHANG Yong-guo^{1,2}, LIU Xiang-tao¹, HAN Xue-qing¹, ZHANG Yan-ming², XUE Qing-hong²

(1 Lanzhou Veterinary Research Institute, Lanzhou, Gansu 730046, China;

2 Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The E₂ gene of three prevalent virulent strains of Hog Cholera Virus (HCV) from Guangxi China were amplified by reverse transcription (RT) and the nested Polymerase Chain Reaction (nPCR). The amplified E₂ fragments of three HCV strains were all 1 170 bp in length by agarose gel electrophoresis. Three E₂ fragments were cloned respectively into PMD-18T vector. 1 170 bp cDNA fragments of three prevalent virulent E₂ gene were sequenced, and based on the amino acid sequences of C-strain, Brescia and Alfort strain 384 residues, amino acid sequences of E₂ were deduced. The nucleotide homology among three prevalent virulents were 90.10% to 98.54%; and that of amino acid were 89.59% to 97.92%. The nucleotide identity of C-strain from spleen tissue of rabbit with that of three Chinese prevalent virulent strains were 82.87% to 83.99%, and that of amino acid were 86.98% to 90.10%. This showed that there was some differences between gp55 of C-strain and the 3 prevalent virulent strains.

Key words: hog cholera virus; E₂ gene; glycoprotein; sequence analysis