

猪瘟流行野毒株 E₂ 基因编码的 gp55 蛋白模拟分析^{*}

张永国¹, 张彦明¹, 邢福珊¹, 许信刚¹, 胡建和¹, 刘湘涛², 韩雪清²

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

[摘要] 利用 RT-PCR 和 PCR 技术扩增出近期猪瘟流行野毒株的 E₂ 基因, 将其克隆到载体上测定核苷酸序列, 根据 A lfort 株和 Brescia 株 C-株确定起始氨基酸三联体的正确位置后推导出其氨基酸序列, 结果表明近期流行的猪瘟毒株与疫苗毒株和强毒株之间存在一定差异; 利用 DNA star 软件分析 E₂ 基因编码的 gp55 蛋白的疏水性、抗原性和二级结构, 并与猪瘟疫苗毒株(C-株)进行比较, 结果表明, 目前流行的猪瘟病毒与疫苗毒的 gp55 蛋白在抗原性、二级结构上存在一定的差异, 而 C 末端疏水性差异不大。

[关键词] 猪瘟; E₂ 基因; gp55 蛋白; 疏水性; 抗原性; 二级结构

[中图分类号] S852.65⁺ 1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)05-0128-05

猪瘟(classical swine fever, CSF)是由猪瘟病毒(CSFV)引起的严重危害养猪业的重要传染病。国际兽疫局(OIE)将猪瘟列入A类15种法定传染病中,我国农业部1999-02-12发布的96号公告中,也将猪瘟列为一类传染病。在我国,由于C-株疫苗的长期使用,有效地控制了猪瘟的发生和流行,但到20世纪70年代末和80年代初,我国猪瘟的流行特点发生了很大的变化^[1]。猪瘟病毒为黄病毒科(Flaviviridae)瘟病毒属(Pestivirus)成员,是有囊膜单股正链RNA病毒,基因组大小约12.3 kb,含一个大的开放阅读框(ORF),由11个编码结构蛋白与非结构蛋白的基因组成^[2,3]。在猪瘟病毒基因组中,E₂基因编码gp55蛋白参与病毒感染细胞的过程,并引起猪的保护性免疫,猪瘟病毒的中和性抗原表位在gp55蛋白上。gp55蛋白诱导的免疫反应足以抵抗野毒的攻击,而且E₂基因也是猪瘟病毒中最易突变的基因^[4,5]。本研究将所获得的猪瘟流行野毒株gp55蛋白与国内外发表的参考毒株gp55蛋白序列同源性进行比较,分析了猪瘟流行野毒株的变异程度,通过对流行野毒株和疫苗毒株(C-株)gp55蛋白的疏水性、抗原性和二级结构的比较,旨在从分子

角度探讨猪瘟流行毒株与疫苗毒株间存在的差异,为分析目前猪瘟仍频繁发生的原因提供依据。

1 材料与方法

1.1 病毒

猪瘟流行野毒采自陕西省周至县(编号SXZZ),取发病后症状典型猪的脾脏。

1.2 试剂和软件

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载体均购自宝生物(大连)工程有限公司;DNA纯化试剂盒为BOEHRINGER MANNHEIM公司产品;DNA star分析软件由农业部畜禽病毒病重点实验室(兰州兽医研究所)提供。

1.3 引物设计及合成

参照CSFV A lfort 株^[2]、Brescia 株^[3]和C-株^[6]序列,设计4条引物,引物由宝生物(大连)工程有限公司合成,引物位置(参照C-株)及序列见表1。

1.4 猪瘟病毒流行野毒 E₂ 基因的获取

1.4.1 RNA 提取 参照试剂盒操作进行。

1.4.2 RT-PCR 和 nPCR RT-PCR 反应 体积为20 μL,反应条件为42 1 h;PCR反应体积为50

* [收稿日期] 2002-11-11

[基金项目] 陕西省科技攻关项目(2001K-02-G9-2);陕西省农业分子生物学重点实验室重点项目(2002-06)

[作者简介] 张永国(1976-),男,山东菏泽人,在读博士生,主要从事分子病毒学研究。

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

μL, 反应条件为 98 热变性 8 m in 后, 98 50 s, 50 s, 55 30 s, 72 90 s, 35 个循环, 72 延
48 60 s, 72 120 s, 35 个循环, 72 延伸 10 伸 10 m in, 其余条件及步骤均同 PCR。
m in; nPCR 反应条件为: 98 热变性 8 m in 后, 98

表 1 引物的编号、序列、位置和长度

Table 1 The code, sequence, location and length of the primers			
编号 Primer	序列 Sequence	位置 Location	长度/nt Length
E ₁	5 †GTA TTA GACCA GACTGG3 ′	2 222~ 2 239	18
E ₁ ′	5 †TGCCAACCGCCGTCTA TCTT 3 ′	3 793~ 3 773	21
E ₂	5 †GGCTA GCCTGTAA GGAA GA 3 ′	2 442~ 2 461	20
E ₂ ′	5 †GGTCGCCGCTCAACAA GACA 3 ′	3 540~ 3 560	21

1 5 猪瘟病毒流行野毒 E₂ 基因序列测定

猪瘟病毒流行野毒 E₂ 基因与 PMD-18T 连接
产物转化、涂板、挑菌, 小量制备质粒, 经酶切、PCR
鉴定出阳性克隆, 送宝生物(大连)工程有限公司测
序。

1 6 猪瘟病毒 E₂ 基因编码的 gp55 蛋白抗原性分
析

利用 DNA star 中 Jameson-Wolf 关于蛋白抗原
性分析软件进行 gp55 蛋白抗原性分析。

1 7 猪瘟病毒 E₂ 基因编码的 gp55 蛋白疏水性分
析

利用 DNA star 中 Kyte-Doolittle 关于蛋白疏水
性分析软件进行 gp55 蛋白疏水性分析。

1 8 猪瘟病毒 E₂ 基因编码的 gp55 蛋白二级结构
分析

利用 DNA star 中 Garnier-Robson 关于蛋白二
级结构分析软件进行 gp55 蛋白二级结构分析。

2 结 果

2 1 猪瘟病毒流行野毒 E₂ 基因的克隆

用 E_A、E₂ 为引物进行 nPCR, nPCR 产物与
PGEM-T easy 载体连接后重组质粒 PCR、酶切鉴
定产物电泳结果见图 1。由图 1 可以看出, nPCR 扩
增产物的片段与预测的大小(1 119 bp)相符, PCR
及酶切鉴定产物均有与预测大小相符(1 119 bp)的
片段。

表 2 猪瘟病毒 gp55 蛋白氨基酸同源性比较

Table 2 Comparison of the amino-acid sequence gp55 p protein of CSFV							
毒株 Strain	氨基酸同源性 Homology of the amino-acid						
	A lfort	Brescia	C	SXZZ	GXYR	HN KF	Shimen
A lfort		93.8	94.4	89.5	89.0	87.4	96.8
Brescia			90.3	90.3	89.9	87.9	92.8
C				86.9	86.3	84.7	93.8
SXZZ					98.4	97.3	88.7
GXYR						95.7	88.2
HN KF							86.3

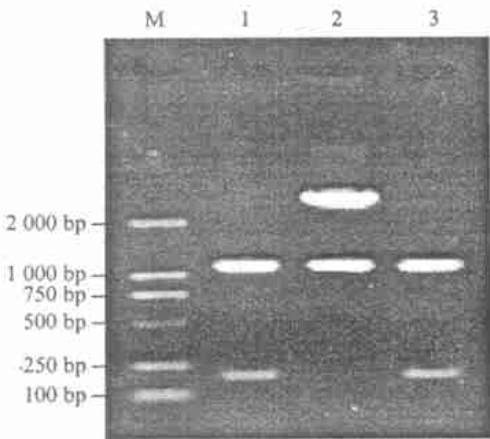


图 1 nPCR 产物、重组质粒的 PCR 和酶切鉴定
M. 标准分子量 DL 2000; 1 以 E₂、E₂ 为
引物的 nPCR 扩增产物; 2 重组质粒的酶切鉴定;
3 重组质粒的 PCR 鉴定

Fig 1 nPCR product, PCR and restriction
analysis of recombinant plasmid
M. DNA marker DL 2000; 1. PCR product amplified
with primers E₂ and E₂ ′; 2. Restriction analysis
of recombinant plasmid; 3. PCR identification
of recombinant plasmid

2 2 猪瘟病毒 gp55 蛋白氨基酸同源性比较

猪瘟病毒流行野毒 E₂ 基因编码 gp55 蛋白核苷
酸测序结果及氨基酸序列结果, 均证明获得了猪瘟
病毒 E₂ 基因编码 gp55 蛋白。猪瘟病毒 gp55 蛋白氨
基酸序列同源性见表 2。

猪瘟病毒流行野毒株(SXZZ 株)gp55 蛋白与近期流行的野毒株氨基酸同源性为 98.4% (GXYY)^[7] 和 97.3% (HNKF)^[8], 与疫苗毒株(C-株)的氨基酸同源性为 86.9%, 与经典强毒株的氨基酸同源性为 88.7% (Shimen)^[9], 89.5% (Alfort)^[12] 和 90.3% (Brescia)^[13]。近期流行的猪瘟野毒株 gp55 蛋白之间同源性较高, 而与疫苗毒株和经典强毒株之间氨基酸同源性较低, 表明近期流行的猪瘟毒株与疫苗毒株和经典强毒株之间存在一定的差异。

2.3 猪瘟病毒 E₂ 基因编码的 gp55 蛋白的抗原性

猪瘟 gp55 蛋白作为病毒粒子囊膜上的主要结构糖蛋白之一, 是抗猪瘟中和抗体的主要诱发者, 是猪瘟病毒的主要保护性抗原。近年来, 利用单抗竞争结合和抗原捕捉实验结果对 gp55 蛋白抗原结构的分析表明, gp55 蛋白上存在 A、B、C、D 4 个抗原区, 这 4 个区均位于 gp55 蛋白 N 端氨基酸残基 690~866, 而 C 端氨基酸残基 866~1 007 的部分不是其抗原表位必需的, 不参与这些表位构像的形成, 因此氨基酸残基 690~866 的部分似乎是 gp55 蛋白最具抗原性的部分。其中 A 区位于 766~866 位氨基酸

残基, A 区又分为 3 个功能区, 即 A₁、A₂ 和 A₃; B 区位于 690~773 位氨基酸残基; C 区位于 690~800 位氨基酸残基; D 区位于 766~800 位氨基酸残基。功能上, A₁ 亚区、B 区和 C 区与猪瘟病毒的中和过程有关, 是中和性抗原域, A₂、A₃ 亚区和 D 区不参与病毒的中和, 是非中和抗原域^[4,5]。利用 DNA star 中 Jameson-Wolf 关于蛋白抗原性分析软件进行 gp55 蛋白抗原性分析, 得到猪瘟病毒 E₂ 基因编码的 gp55 蛋白的抗原性图谱(图 2, 图中标为 1 的氨基酸残基相当于 gp55 蛋白 N 端 690 位氨基酸残基)。由图 2 可见, 疫苗毒株(C-株)在 690~709, 720~738, 774~793, 801~807, 833~858, 862~867 位氨基酸残基之间抗原指数较高, 而流行野毒株(SXZZ 株)在 690~699, 703~709, 722~734, 751~756, 782~789, 801~806, 835~856, 880~884 位氨基酸残基之间抗原指数较高。结果表明, C-株和流行野毒株在 gp55 蛋白的主要抗原结构域 690~866 氨基酸残基抗原性存在差异, 不同区域差异对抗原性的影响程度, 要利用点突变的方法进行分析。

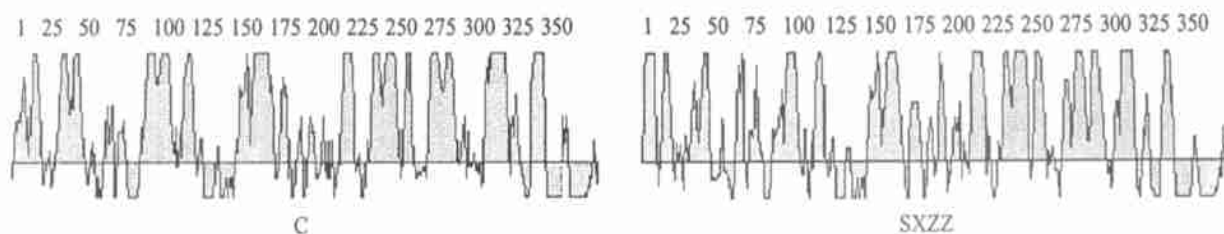


图 2 猪瘟病毒 E₂ 基因编码的 gp55 蛋白的抗原性

Fig. 2 Antigenicity of E₂ gene code gp55 protein of CSFV

2.4 猪瘟病毒 E₂ 基因编码的 gp55 蛋白的疏水性

在感染细胞中, 猪瘟病毒 gp55 蛋白主要以同源二聚体或与 gp33 蛋白形成异源二聚体的形式存在于感染细胞或病毒离子的表面。这是因为猪瘟病毒的 gp55 蛋白的 C 末端含有至少由 40 个疏水性氨基酸残基构成的跨膜区(transmembrane region, TMR), 由 18 个疏水性氨基酸残基构成的疏水延伸区, 该伸展区作为跨膜区在病毒囊膜的脂质双层固

定 gp55 蛋白^[10,11]。利用 DNA star 中 Kyte-Doolittle 关于蛋白疏水性分析软件进行 gp55 蛋白疏水性分析, 得到猪瘟病毒 E₂ 基因编码的 gp55 蛋白的疏水性图谱见图 3(图中标为 1 的氨基酸残基相当于 gp55 蛋白 N 端 690 位氨基酸残基)。由图 3 可见, 疫苗毒株(C-株)和流行野毒株(SXZZ 株)C 末端疏水性差异不大。

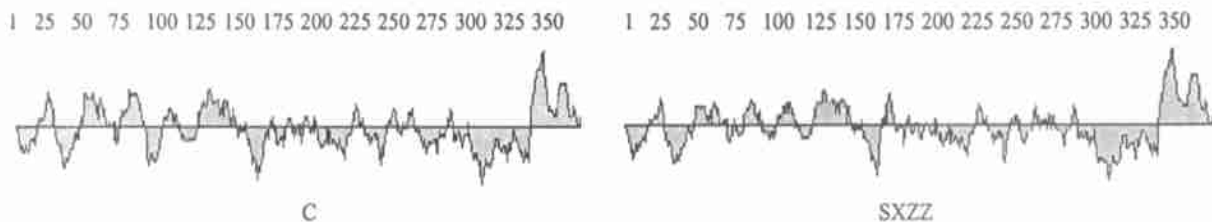


图 3 猪瘟病毒 E₂ 基因编码的 gp55 蛋白的疏水性

Fig. 3 Hydrophobicity of E₂ gene code gp55 protein of CSFV

2.5 猪瘟疫病毒 E₂ 基因编码的 gp55 蛋白的二级结构

Wensvoort G^[12]于1989年提出了一种 gp55 蛋白的可能的结构模型,根据该模型, gp55 蛋白具有抗原性的部分形成 2 个相对独立的结构单位,一个由 B、C 抗原区组成,另一个由高度保守的 A、D 抗原区组成。2 个结构单位均含有中和性表位,并且这些中和性抗原表位是构像依赖型的。利用 DNA star

中 Gamier-Robson 关于蛋白二级结构分析软件进行 gp55 蛋白二级结构分析,得到猪瘟疫病毒 E₂ 基因编码的 gp55 蛋白的二级结构图谱见图 4(图中标为 1 的氨基酸残基相当于 gp55 蛋白 N 端 690 位氨基酸残基)。由图 4 可见,猪瘟疫病毒 gp55 蛋白二级结构有 α 螺旋结构、 β 结构、无规卷曲,疫苗毒株(C-株)和流行野毒株(SXZZ 株)二级结构存在差异,二级结构的差异可能引起抗原表位的差异。

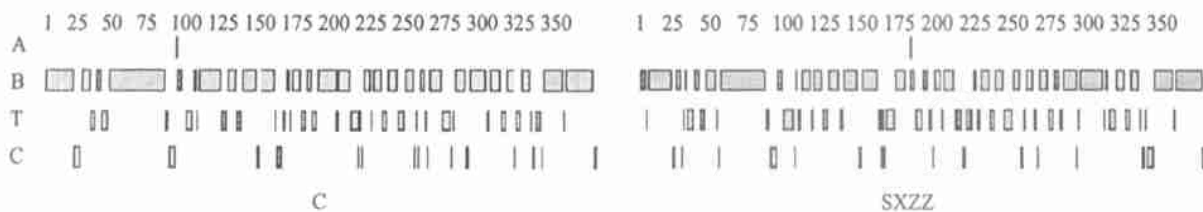


图 4 猪瘟疫病毒 E₂ 基因编码的 gp55 蛋白的二级结构

Fig 4 Secondary structure of E₂ gene code gp55 protein of CSFV

3 讨论

测序技术的快速发展,使人们获得大量的核酸和蛋白质序列,但由于蛋白质结构测定技术的相对滞后,使得现在分子数据库中的序列数据量与结构数据量形成了巨大的反差。开发有效的数据分析工具,将序列信息转换成生物化学和生理学知识,弄清它们所蕴含的结构和功能信息,最终了解它们所代表的生物学意义成为这一领域现阶段的首要任务。Jones 等^[13]利用 Jameson-Wolf 蛋白抗原性分析软件对疟原虫的 MSA 2 (51 ku) 基因进行抗原性分析,利用单抗技术证明所预测的抗原性与实际符合。Deleage 等^[14]利用二级结构预测方法对 59 种蛋白进行二级结构的预测,发现正确率为 72%,但一般认为经典的蛋白质二级结构预测方法,其准确性只能达到 65%,这是因为用作统计二级结构构象趋势的蛋白质空间结构数据库中,非同源蛋白的数量还

不够多。Froshauer 等^[15]利用 Kyte-Doolittle 关于蛋白疏水性分析软件对大肠杆菌的 mal F 蛋白进行疏水性分析发现,蛋白可能含有 2~3 个跨膜区,已证明其中有 2 个为跨膜区。利用数据分析工具对已知的蛋白质序列进行分析,所获得的结果与实际可能存在一定的差异,但有助于人们对蛋白结构的了解,为进一步的试验研究提供重要参考价值。

猪瘟疫病毒 gp55 蛋白是猪瘟疫的主要保护性抗原,本试验利用分子生物学技术克隆得到 gp55 蛋白的氨基酸序列,与国内外已发表的猪瘟疫病毒 gp55 蛋白的同源性进行比较,表明近期流行的猪瘟疫毒株与疫苗毒株和经典强毒株之间存在一定的差异。利用生物信息学有关知识对 gp55 蛋白的抗原性、疏水性、二级结构进行模拟预测分析,表明近期流行的猪瘟疫毒株与疫苗毒株 gp55 蛋白在抗原性、二级结构上存在一定差异,而 C 末端疏水性差异不大。

[参考文献]

- [1] 刘湘涛,赵启祖,李忠润,等.猪瘟疫病毒和猪瘟疫的防治[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, Rumenapf T, Thie H. Molecular cloning and nucleotide sequence of hog cholera virus[J]. Virology, 1989, 171: 555-567.
- [3] Moormann R J M, Wamsterdam P M, Hulst M M, et al. Molecular cloning and nucleotide sequence of hog cholera virus strain B rescia and mapping of the genome region encoding envelope protein E₁[J]. Virology, 1990, 177: 184-198.
- [4] Van Rijin P A. A preliminary map of epitopes on envelope glycoprotein E₁ of HCV strain B rescia[J]. Veterinary Microbiology, 1992, 33: 212-230.
- [5] Van Rijin P A. Antigen structure of envelope glycoprotein E₁ of hog cholera virus[J]. Journal of General Virology, 1994, 68: 3934-3942.
- [6] 韩雪清,李红卫,刘湘涛,等.中国猪瘟疫化弱毒(HCLV)兔脾组织毒部分基因的序列分析—gp55、p54、p80 等基因测序方法的研究和 p54

- 基因的序列分析[J]. 中国兽医科技, 1998, 28(6): 13- 17.
- [7] 张永国, 刘湘涛, 韩雪清, 等. 广西猪瘟流行毒与 C-株疫苗毒 gp55(E₂) 主要抗原区 DNA 序列差异的比较[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2002, 30(1): 79- 84.
- [8] 薛青红, 刘湘涛, 韩雪清, 等. 河南省猪瘟流行毒 E₂ 基因的序列分析和基因分型[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2002, 30(2): 37- 42.
- [9] 王家富. 猪瘟病毒免化弱毒株和石门强毒株基因组结构分析[D]. 武汉: 武汉大学, 2000.
- [10] Hulst M M, Panoto F E, Hoekman A, et al. Inactivation of the RNase activity of glycoprotein E^{ms} of classical swine fever virus results in a cytopathogenic virus[J]. J Virol, 1998, 72(1): 151- 157.
- [11] Wang C, Sarnow P, Siddiqui A. Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by a internal ribosome binding mechanism[J]. J Virol, 1993, 67: 2228- 2244.
- [12] Wensvoort G. Topographical and functional mapping of epitopes on hog cholera virus with monoclonal antibodies[J]. J Gen Virol, 1989, 70: 2865- 2876.
- [13] Jones G L, Edmundson H M, Lord R, et al. Immunological fine structure of the variable and constant regions of a polymorphic malarial surface antigen from *Plasmodium falciparum* [J]. Mol Biochem Parasitol, 1991, 48(1): 1- 9.
- [14] Deleage G, Roux B. An algorithm for protein secondary structure prediction based on class prediction[J]. Protein Eng, 1987, 1(4): 289- 294.
- [15] Froshauer S, Beckwith J. The nucleotide sequence of the gene for malF protein, an inner membrane component of the maltose transport system of *Escherichia coli*[J]. J Biol Chem, 1984, 259(17): 10896- 10903.

Simulation analysis of E₂ gene code gp55 protein of classical swine fever virus

ZHANG Yong-guo¹, ZHANG Yan-ming¹, XING Fu-shan¹,

XU Xin-gang¹, HU Jian-he¹, LIU Xiang-tao², HAN Xue-qing²

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou, Gansu 730046, China)

Abstract: The E₂ gene of prevalent virulent strain of classical swine fever virus was amplified by the RT-PCR and PCR. The amplified fragments was cloned into vector and then sequenced, based on the amino-acid sequences of Alfort and Brescia strains, amino-acid sequence of gp55 protein were deduced. The results showed that there were some differences among recently prevalent virulent strains, C-strain and virulent strains. Antigenicity, hydrophobicity and secondary structure of E₂ gene code gp55 protein of classical swine fever virus were analysed using DNA star software. The prevalent virulent strain and C-strain antigenicity, hydrophobicity and secondary structure were compared. The results showed that antigenicity and secondary structure were different between the prevalent virulent strain and C-strain, the C-terminal hydrophobicity has little difference between the prevalent virulent strain and C-strain.

Key words: classical swine fever virus; E₂ gene; gp55 protein; antigenicity; hydrophobicity; secondary structure