

CSFV 陕西分离株 SXCDK 全基因的克隆与分析

李玲伟^{1,2}, 张 志², 吴发兴², 程 伟^{1,2}, 杨若松^{1,2}, 张燕霞²,
刘 爽², 郑 辉², 李晓成², 陈德坤¹

(1 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100;

2 中国动物卫生与流行病学中心, 山东 青岛 266032)

【摘 要】 【目的】分离猪瘟疫病毒(CSFV)SXCDK 株,测定其全基因组序列,研究其分子特性及与其他毒株的亲缘关系,为猪瘟疫病毒分子流行病学研究积累材料。**【方法】**从陕西省西安市采集疑似猪瘟疫病料进行病毒分离,获得猪瘟疫病毒 SXCDK 株。根据 GenBank 上发表的猪瘟疫病毒全基因序列及相关参考文献,合成 11 对引物,应用 RT-PCR 技术分 11 段扩增 CSFV 分离株 SXCDK 基因,拼接后获得其全基因组(GenBank 登录号:GQ923951)。利用 DNASTar、ClustalX 1.83 和 Mega 4.1 等软件,对分离株 SXCDK 与其他猪瘟疫病毒毒株的核苷酸和氨基酸序列进行比较分析。**【结果】**CSFV 陕西分离株 SXCDK 基因组全长 12 296 nt,由 373 nt 的 5'非翻译区、编码 3 899 个氨基酸的 11 697 nt 开放阅读框和 226 nt 的 3'非翻译区组成。分离株 SXCDK 和其他毒株的核苷酸序列同源性为 83.6%~96.2%,氨基酸序列的同源性为 91.3%~97.8%。从进化的角度来看,分离株 SXCDK 与台湾分离株 96TD 的亲缘关系最近,两者之间的进化距离为 0.038,分离株 SXCDK 与 2006 年陕西省分离株 SXYL2006 进化距离较远,两者之间的进化距离为 0.065。CSFV SXCDK 株属于 2.1a 亚群毒株。**【结论】**分离株 SXCDK 是我国内地首株已确定全基因序列的猪瘟疫病毒 2.1a 亚群毒株,与同亚群的 96TD 亲缘关系最近。

【关键词】猪瘟疫病毒;全基因;分离株 SXCDK;序列分析;2.1a 亚群

【中图分类号】 S852.651

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2011)01-0001-07

Cloning and analysis of the complete genome of CSFV isolate SXCDK from Shaanxi province

LI Ling-wei^{1,2}, ZHANG Zhi², WU Fa-xing², CHENG Wei^{1,2}, YANG Ruo-song^{1,2},
ZHANG Yan-xia², LIU Shuang², ZHENG Hui², LI Xiao-cheng², CHEN De-kun¹

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

2 China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao, Shandong 266032, China)

Abstract: 【Objective】 The study was to isolate CSFV strain SXCDK, determine the whole genome sequence, study its molecular characteristics and the relationship with other strains, accumulated research data for molecular epidemiology of classical swine fever epidemic strain virus. **【Method】** The CSFV strain SXCDK was obtained after virus isolation from a suspected pathological material of CSF collected from Xi'an, Shaanxi province. According to the genome sequences of classical swine fever virus (CSFV) published in GenBank and the reference, eleven pairs of specific primers were synthesized. By using RT-PCT, the genome of a CSFV isolate SXCDK was gained after eleven fragments had been successfully amplified

* [收稿日期] 2010-04-24

[基金项目] 农业部动物疫情防治与监测项目(NY200609-03)

[作者简介] 李玲伟(1983—),男,河南南阳人,在读硕士,主要从事分子病原学与免疫学研究。E-mail:llw666@163.com

[通信作者] 陈德坤(1964—),男,陕西渭南人,教授,博士生导师,主要从事分子病原学与免疫学研究。

E-mail:chendekun163@163.com

李晓成(1958—),男,陕西耀县人,研究员,主要从事预防兽医学和动物流行病学研究。

E-mail:lxch20062006@163.com

(GenBank accession:GQ923951). Genome comparison of the SXCDK isolate with other known CSFV isolates was performed and analyzed by using software such as DNASTar, ClustalX 1.83 and Mega 4.1. 【Result】 The genome of a CSFV isolate SXCDK, isolated from Shaanxi province, is 12 296 nt in length. It is composed of a 373 nt 5' terminal untranslated region (UTR), a 11 697 nt open reading frame (ORF) encoding a polyprotein of 3 899 amino acids (aa), and a 226 nt 3' UTR. SXCDK and other reported strains share 83.6%—96.2% identity at the nucleotide level and 91.3%—97.8% identity at the amino acid level. From an evolutionary point of view, isolate SXCDK is closely related to Taiwan isolate 96TD, with a pairwise distance of 0.038, distantly related to the isolate SXYL2006, which is also isolated from Shaanxi province, with pairwise distance 0.065. 【Conclusion】 Isolate SXCDK is the first CSFV subgroup 2.1a strain whose genome sequence has been determined in the mainland of China, has the highest genetic relationship with 96TD, which also belongs to this subgroup.

Key words: CSFV; complete genome; isolate SXCDK; sequence analysis; subgroup 2.1a

猪瘟(Classical swine fever, CSF)是由猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)引起的一种高度传染性和致死性的疾病,给养猪业造成巨大的经济损失。CSFV是具有囊膜的单股正链RNA病毒,基因组全长约12.3 kb,由位于中间的一个连续的大开放阅读框(ORF)和2个分别位于5'和3'端的非编码区(UTR)构成^[1]。CSFV全基因组可以提供猪瘟病毒的进化来源、遗传变异、抗原差异等重要信息,具有重要的分子流行病学价值。通过对猪瘟病毒流行毒株全基因组进行测序,分析不同毒株以及流行毒株与疫苗株序列的差异,可以推动猪瘟致病机制、免疫特性及疫苗株的致弱机理等研究,进而为预防和控制猪瘟奠定基础。

自Meyers等^[2]完成CSFV Alfort/T全基因组序列测定以来,提交到GenBank和文献报道过的CSFV全基因序列已接近50条,其中由我国学者提交和报道的超过一半。在我国学者测定全序列的CSFV中,以与弱毒疫苗株、标准强毒Shimen株同源性较高的1.1亚群毒株最多,而对我国流行毒株中占主导地位的2.1亚群毒株的测序较少。同时,我国内地提交到GenBank的4株2.1亚群毒株GXWZ02、SXYL2006、ZJ0801、HEBZ均属于2.1b亚群,尚未见提交2.1a亚群全基因序列,这是我国内地CSFV基因型多样性研究的一个空白。

为进一步掌握我国猪瘟流行动态,完善CSFV分子研究资料,2009年笔者从采集自陕西某猪场的疑似猪瘟病料中分离到1株CSFV,命名为SXC-DK,并进行了全基因组序列测定和分析,明确了我国内地存在2.1a亚群CSFV毒株,并向GenBank提交了全基因序列(登录号为:GQ923951),现将有关研究报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源 脾脏、淋巴结、扁桃体等供试样品,来自陕西省西安市某散养户未免疫猪瘟疫苗的疑似猪瘟发病猪群。

1.1.2 试剂 TRIzol LS Reagent为Invitrogen公司产品,RT-PCR试剂均为TaKaRa公司产品,pGEM-T easy载体为Promega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,其他所用试剂为进口或国产分析纯。PK15细胞、DH5 α 大肠杆菌由中国动物卫生与流行病学中心保存。

1.2 方法

1.2.1 病毒的分离与鉴定 取病料5 g,剪碎成糊状,加适量无菌PBS,用组织研磨器充分研磨,收集悬液,4℃、12 000 r/min离心10 min,取上清液用0.22 μ m滤膜滤过除菌,再接种已长满单层的PK15细胞,吸附1 h后弃去接种液,添加适量的含体积分数1%新生牛血清的DMEM培养液,于体积分数5%CO₂、37℃温箱中培养,至细胞长满后传代,连续传至第5代收毒。根据参考文献[3]的方法,采用针对E2基因的RT-PCR方法对分离病毒进行鉴定,目的条带长度为272 bp,同时设立阴性对照。

1.2.2 引物的合成 根据E2测序结果,确定分离毒株属于2.1亚群。根据Paderborn株和96TD株等2.1亚群毒株全基因序列,对文献[4]中的引物序列进行适当调整,合成11对引物(表1),用于分离株全基因的扩增。引物由生工生物工程(上海)有限公司合成,稀释成20 pmol/L后-20℃保存备用。

1.2.3 总RNA的提取 按照TRIzol LS Reagent

试剂说明书提取 CSFV 细胞毒总 RNA,用 20 μL DEPC 处理水溶解后于-20 ℃保存备用。

表 1 试验所用引物

Table 1 Primers used in this research

片段 Fragment	正向引物(5'→3') Sense primer	反向引物(5'→3') Antisense primer	在 Shimen(AF092448)株的位置 Shimen (AF092448) position
A	GTATACGAGGTTAGTTCATTCTC	TTCTTCCTAGATTCTGGTGGT	1-23,1 110-1 090
B	ATAGCCCCAAAAGAGCATGA	GCCCTATCTCATTGGTTGATGA	944-963,2 498-2 477
C	GACCAGATTGGTGGCCGTATGAAAC	CAGCAGCGAGTTGTTCTGTTAGAAC	2 229-2 253,3 557-3 533
D	CAYGAGTGCTTGATTGGCAAC	CAGCGGRCCACTACTTCATT	3 199-3 219,4 743-4 724
E	CACCATGTTGCCGTTGATC	TGATGCTGTCAYACAGGTGAA	4 450-4 468,5 584-5 564
F	CATCAGCTCAGTTGACCATGT	CGTCACTATGAAGGGCATCTT	5 329-5 349,6 604-6 584
G	TTACATCGCAGTCCCCTTACGTGGT	CTAAAGCCGGTTCAACTATCTTGGAC	6 459-6 483,7 883-7 858
H	GCRACCTAYACATACAAAAGCTGGA	TGTGTAGGCCAGCCAGGTTGTAAC	7 820-7 844,9 136-9 113
I	CTTATGACTTATCCCTCCACAACC	CCCTTATTGCTTGATGGAAGTTGG	9 024-9 047,10 424-10 401
J	CCTGAGGACCAAACATGTTGAACC	TCAGTGGGTTCCAGGAGTACATCAR	10 240-10 265,11 586-11 564
K	ACGGAAGGGGAYAAGATGAAAGTG	GGGCCGTTAGGAAATTACCTTAGTC	11 350-11 373,12 296-12 272

注:与文献[3]中引物不同的核苷酸用下划线标出。
Note: The letter underlined represents the different nucleotide compared with the primers in reference [3].

1.2.4 反转录 反转录体系为 20 μL:DEPC 处理水 6.0 μL,dNTP 4.0 μL,5×AMV Buffer 4.0 μL,下游引物 1.0 μL,AMV 反转录酶 0.5 μL,HPR I RNA 酶抑制剂 0.5 μL,RNA 模板 4 μL。反应程序为:42 ℃水浴 60 min,取出后-20 ℃保存备用。

1.2.5 全基因各段的 PCR 扩增 扩增体系:超纯水 34.5 μL,10×PCR Buffer 5.0 μL,dNTP 4.0 μL,上、下游引物各 1.0 μL,rTaq DNA 聚合酶 0.5 μL,模板 4.0 μL,总体积 50 μL。反应条件:95 ℃预变性 3 min;94 ℃ 40 s,56 ℃ 60 s,72 ℃ 90 s,35 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min。

1.2.6 克隆及测序 根据 UNIQ-10 柱式 DNA 胶

回收试剂盒说明对各扩增片段分别回收,并与 pGEM-T easy 载体连接。连接产物转化 DH5α 大肠杆菌感受态细胞,经 Amp、IPTG、X-gal 筛选,挑取白色菌落于 5 mL LB 液体培养基中培养 16 h,提取质粒,用 EcoR I 限制性内切酶进行酶切鉴定,将鉴定为阳性的质粒送往生工生物工程(上海)有限公司进行测序。

1.2.7 序列分析 将测序获得的全基因序列用 DNA star 软件(Version 7.0)与表 2 中所列的 28 株 CSFV 全基因参考序列分别进行核苷酸及推导氨基酸序列分析,应用 ClustalX 1.83、Mega 4.1 软件绘制系统进化树。

表 2 28 株 CSFV 参考毒株的相关信息

Table 2 Twenty-eight referenced strains used in this experiment

毒株 Strain	GenBank 登录号 Accession	基因型 Genotype	毒株 Strain	GenBank 登录号 Accession	基因型 Genotype	毒株 Strain	GenBank 登录号 Accession	基因型 Genotype
96TD	AY554397	2.1a	Brescia	AF091661	1.2	CS	AF099102	1.2
Paderborn	AY072924	2.1a	JL1	EU497410	1.1	GPE	D49533	1.1
TWN2004	AY568569	2.1b	Shimen2004	AY775178	1.1	CAP	X96550	1.1
GXWZ02	DQ127910	2.1b	Shimen1999	AF092448	1.1	Glentorf	U45478	1.1
SXYL2006	GQ122383	2.1b	ALD	D49532	1.1	HCLV	AF091507	1.1
HEBZ	GU592790	2.1b	Eystrup	AF326963	1.1	CWH	AY663656	1.1
Zj0801	FJ529205	2.1b	cF114	AF333000	1.1	Riems98	AY259122	1.1
AlfortTu	J04358	2.3	Alfort187	X87939	1.1	Riems96	U45477	1.1
SP01	FJ265020	2.3	AlfortA19	U90951	1.1			
TWN2007	AY646427	3.4	SWH	DQ127910	1.1			

2 结果与分析

2.1 CSFV 的分离与鉴定

由于猪瘟病毒在 PK15 细胞中生长不会引起细胞病变,本研究通过 RT-PCR 检测来鉴定病毒分离结果,提取分离毒第 5 代细胞培养物的总 RNA,进

行 RT-PCR,结果扩增条带长度为 272 bp,与目的条带长度一致,同时阴性对照成立(图 1),表明病毒分离成功,命名为 SXCDK 株。

2.2 扩增及测序结果分析

经过 PCR 扩增,获得了预期长度的特异性片段(图 2)。将测定过的 SXCDK 株 11 个基因片段序列

用 DNASTar 软件进行拼接,得到了 SXCDK 株全基因组 cDNA 序列,将其提交到 GenBank,获得登录号 GQ923951。SXCDK 株基因全长为 12 296 nt,其

中 5' UTR 长 373 nt;ORF 长 11 697 nt,编码 3 899 个氨基酸,编码区没有碱基插入或缺失;3' UTR 长 226 nt。

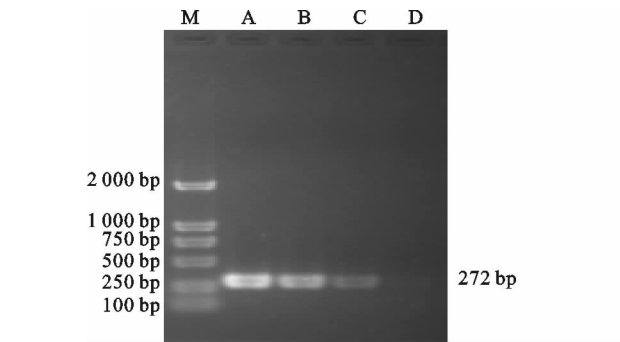


图 1 分离病毒的 PCR 鉴定

M. DNA Marker; A—C. 分离病毒; D. 阴性对照

Fig. 1 Identification of virus isolated by PCR

M. DNA Marker; A—C. Isolated virus; D. Negative control

2.3 CSFV SXCDK 株与参考毒株核苷酸和氨基酸的序列同源性分析

为了说明 SXCDK 与各亚群参考毒株(表 2)的关系,本研究比较了 SXCDK 与各亚群参考毒株全基因组核苷酸和氨基酸序列的同源性,结果见表 3。由表 3 可知, SXCDK 与 1. 1 亚群毒株核苷酸和氨基酸同源性分别为 84. 6%~85. 8%和 91. 8%~93. 2%;与 1. 2 亚群毒株核苷酸和氨基酸同源性分别为 85. 3%~85. 8%和 92. 7%~93. 3%;与 2. 1a 亚群毒株核苷酸和氨基酸同源性分别为 95. 2%~

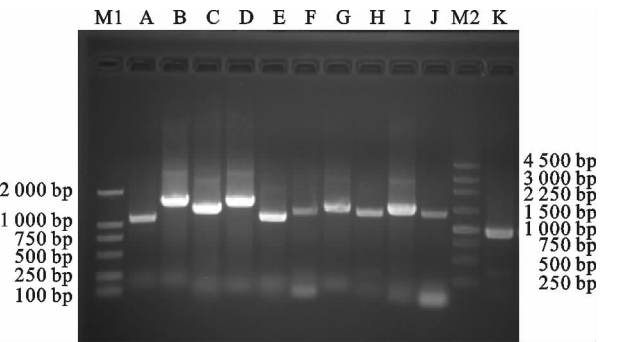


图 2 分离株 SXCDK 全基因 11 个片段的扩增

M1. DL2000 Marker; M2. DL250 Marker. A—K. 11 个片段

Fig. 2 Amplification of 11 fragments of isolate SXCDK

M1. DL2000 Marker; M2. DL250 Marker; A—K. The 11 fragments

96. 2%和 97. 7%~97. 8%;与 2. 1b 亚群毒株核苷酸和氨基酸同源性分别为 93. 2%~94. 1%和 96. 2%~97. 0%;与 2. 3 亚群毒株核苷酸和氨基酸同源性分别为 88. 9%~90. 0%和 95. 1%~95. 6%;与 3. 4 亚群毒株(TWN2007)核苷酸和氨基酸同源性分别为 83. 6%和 91. 3%。通过分析可见, SXCDK 与 2. 1a 亚群毒株 96TD 同源性最高,氨基酸和核苷酸同源性分别为 96. 2%和 97. 8%,与中等毒力毒株 Paderborn 同源性也较高,与 3. 4 亚群毒株 TWN2007 同源性最低。

表 3 CSFV SXCDK 株与 28 个参考毒株的同源性

Table 3 Homology of SXCDK compared with 28 referenced strains

参考毒株 Reference strain	核苷酸 Nucleotide	氨基酸 AA	参考毒株 Reference strain	核苷酸 Nucleotide	氨基酸 AA	参考毒株 Reference strain	核苷酸 Nucleotide	氨基酸 AA
96TD	96. 2	97. 8	Brescia	85. 8	93. 3	CS	85. 3	92. 7
Paderborn	95. 2	97. 7	JL1	85. 6	93. 2	GPE	85. 4	92. 6
TWN2004	93. 7	97. 0	Shimen2004	85. 7	93. 2	CAP	85. 4	92. 4
GXWZ02	94. 1	96. 8	Shimen1999	85. 5	93. 1	Glentorf	85. 1	92. 3
SXYL2006	93. 5	96. 5	ALD	85. 8	93. 1	HCLV	84. 6	92. 3
HEBZ	93. 2	96. 3	Eystrup	85. 7	93. 1	CWH	84. 7	92. 0
Zj0801	93. 2	96. 2	cF114	85. 6	93. 0	Riems98	84. 9	91. 9
AlfortTu	90. 0	95. 6	Alfort187	85. 7	93. 0	Riems96	84. 9	91. 8
SP01	88. 9	95. 1	AlfortA19	85. 6	92. 8			
TWN2007	83. 6	91. 3	SWH	85. 3	92. 7			

2.4 CSFV SXCDK 株细胞表位分析

由表 4 可知,在猪瘟疫病毒已经精确定位的 9 个细胞表位中, SXCDK 株有 5 个细胞表位完全保守,有 4 个细胞表位与报道序列存在差异,发生了氨基酸替换。在 4 个存在氨基酸替换的细胞表位中,位于 E0、E2 和 NS2-3 上的细胞表位与报道的表位存在差异,这是由于报道这些序列的学者在研究中所

参考的毒株为 1. 1 亚群毒株 HCLV 或 Shimen 株,与 2. 1 亚群毒株差异较大。经过与 2. 1 亚群流行株分析比较,发现这些表位在 2. 1 亚群流行株之间相当保守。在这 4 个表位中,最值得注意的是存在于 E0 上的 DKNR(Q)G 表位基序,此基序中 KN 为单抗 b4-22 和 24/16 识别的相同基序, RN 是否也可以被这 2 个单抗识别,尚有待于进一步研究。

表 4 CSFV SXCDK 株表位与已报道细胞表位的差异

Table 4 Difference between CSFV SXCDK epitopes and reported cell epitopes

蛋白 Protein	报道表位 Reported epitope	表位类型 Epitope type	在 Shimen 株位置 Shimen position	SXCDK 株表位 SXCDK epitope	参考文献 Reference
E0	D <u>K</u> NR(Q)G	B 细胞表位 B cell epitope	384—386	D <u>R</u> NR(Q)G	Zhang 等 ^[5]
E0	TWFGAY <u>A</u>	B 细胞表位 B cell epitope	488—494	TWFGAY <u>A</u>	Christmann 等 ^[6]
E2	TTWKEYSH <u>H</u>	B 细胞表位 B cell epitope	717—724	TTWKEY <u>N</u> H	肖昌等 ^[7]
E2	LLFD <u>L</u>	B 细胞表位 B cell epitope	771—774	LLFD <u>L</u>	Chang 等 ^[8]
E2	LFDGT <u>N</u> NP	B 细胞表位 B cell epitope	772—778	LFDGT <u>S</u> P	Peng 等 ^[9]
E2	TAVSPTTL <u>R</u>	B 细胞表位 B cell epitope	929—937	TAVSPTTL <u>R</u>	Lin 等 ^[10]
E2	YYEP <u>P</u>	B 细胞表位 B cell epitope	995—998	YYEP <u>P</u>	Yu 等 ^[11]
NS2-3	KHKVRNEV MVHWFD <u>D</u>	T 细胞表位 T cell epitope	1 446—1 460	KHKVRNEV VARWFD <u>D</u>	Armengol 等 ^[12]
NS3-NS4A	ENALLVALF	T 细胞表位 T cell epitope	2 276—2 284	ENALLVALF	Pauly 等 ^[13]

注:与报道细胞表位不同的氨基酸位点用下划线标出。

Note:The letters underlined represent the different amino acid sites compared with reported cell epitopes.

2.5 CSFV SXCDK 株系统进化分析

将 SXCDK 株的 E0、E2、NS5B 基因及全基因

组序列分别与 28 个参考毒株进行比对,并建立系统遗传进化树,结果见图 3。

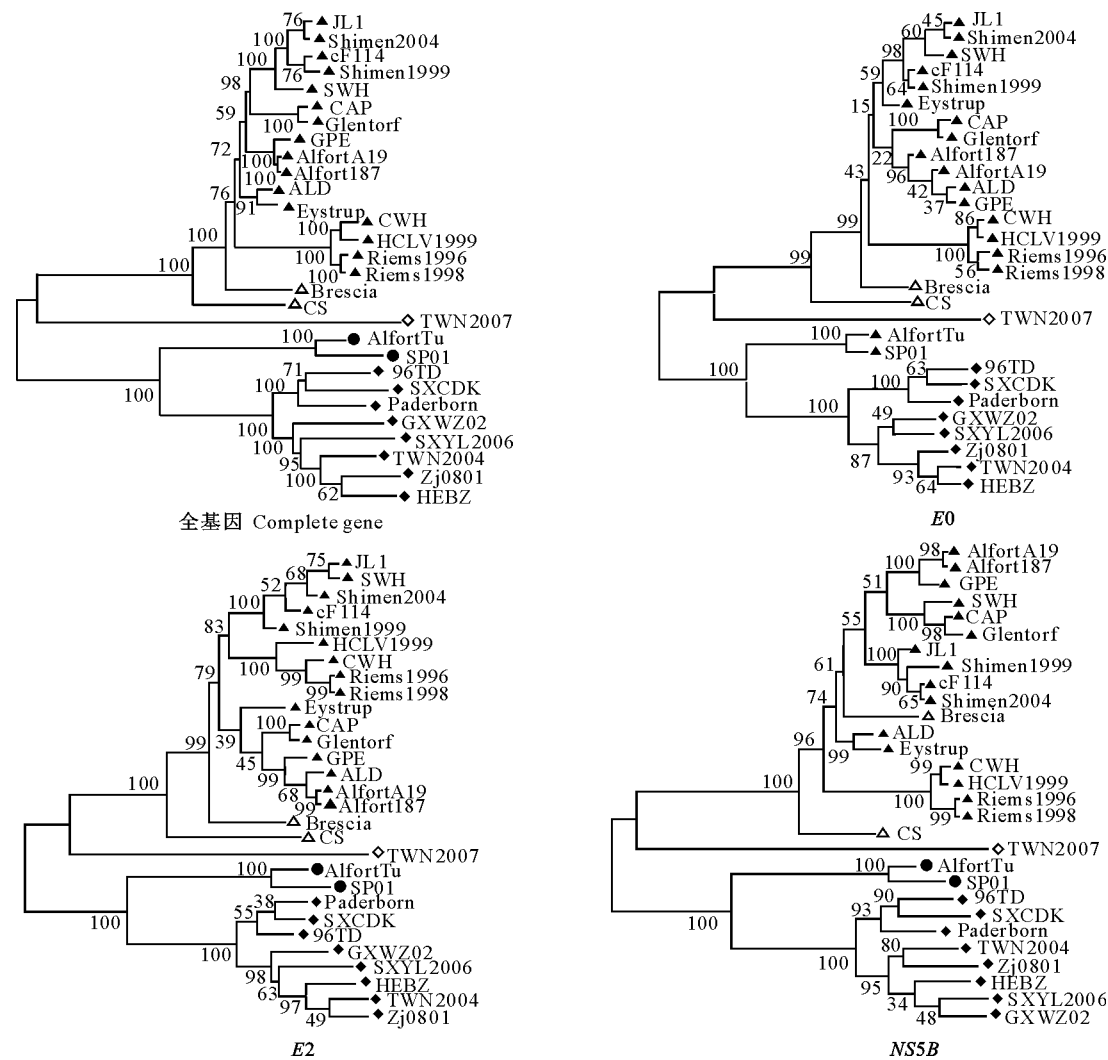


图 3 CSFV SXCDK 株的系统进化分析

▲. 1.1 亚群; △. 1.2 亚群; ◆. 2.1 亚群; ●. 2.3 亚群; ◇. 3.4 亚群

Fig. 3 Phylogenetic analysis on CSFV strain SXCDK

▲. Subgroup 1.1; △. Subgroup 1.2; ◆. Subgroup 2.1; ●. Subgroup 2.3; ◇. Subgroup 3.4

由图 3 可见,在根据不同序列构建的进化树中, SXCDK 均定位于 2.1a 亚群,与 96TD 和 Paderborn 株进化距离较近。

3 讨论

3.1 SXCDK 株全基因的扩增策略

在对 SXCDK 株全基因扩增前,先对其 E2 基因片段进行测序分析,在确定其与 Paderborn 株同源性较高的基础上,选用吴显实^[4]根据 Paderborn 株设计的 11 对引物进行扩增,11 对引物扩增片段最长为 1 555 bp,易于和载体连接;扩增的 B 和 C 2 个片段中分别包含 E0 和 E2 全长,克隆片段可以作为以后试验的基因文库。在实际测序中发现, D 段、E 段、F 段、I 段和 H 段扩增比较困难,将引物与 2.1 亚群毒株序列进行比对,发现所用 11 对引物中某些位点与该亚群流行毒株存在差异。本研究根据 2.1 亚群毒株序列对引物中的一些位点进行了修改,顺利扩增出了 SXCDK 株全基因序列,表明这 11 对引物经适当修改后仍是扩增猪瘟流行株全基因的较好选择。在全基因测序中,各片段均采用双向测通,保证了测序数据的准确性。

3.2 SXCDK 株与参考毒株的进化关系

SXCDK 株与 2.1a 亚群 96TD 和 Paderborn 株核苷酸同源性最高,分别为 96.2% 和 95.2%,表明 SXCDK 在进化上属于 2.1a 亚群,同时也说明三者进化来源上关系密切。Paderborn 株是中等毒力毒株,猪群感染 SXCDK 株后病程可达 30 d,推测 SXCDK 株也是中等毒力毒株。

与 2.1a 亚群相比,2.1b 亚群与 SXCDK 株的同源性较低,二者相差在 1.1%~3.0%,表明 2.1a 和 2.1b 毒株虽然都属于 2.1 亚群,但还是存在着差异。SXCDK 株与 SXYL2006 株之间的进化距离为 0.065,这 2 个毒株都分离自陕西省,从进化角度来看,二者亲缘关系较远,进化来源可能不同。吴旭锦等^[14]对 2006—2007 年陕西 9 个猪瘟毒株 E0 基因进行分析,结果表明 1 株为 1.1 亚群毒株,8 株为 2 亚群毒株(其中 7 株为 2.1b 亚群,1 株为 2.2 亚群)。这些结果表明,陕西省猪瘟流行情况相当复杂,1.1 亚群、2.1a 亚群、2.1b 亚群和 2.2 亚群毒株同时存在。

SXCDK 株与 1.1 亚群毒株同源性较低,核苷酸同源性为 84.6%~85.8%,与 HCLV 核苷酸和氨基酸同源性分别为 84.6% 和 92.3%,存在较大差异。但从细胞表位分析结果来看,9 个细胞表位中

有 5 个与报道的细胞表位完全一致,有 4 个与报道有差异,这 4 个表位也在以前的流行毒株中出现过,并未发生新的变异,因此 SXCDK 株细胞表位与 HCLV 的差异不足以对猪瘟疫苗免疫效果造成影响。

3.3 以 SXCDK 株为代表的 2.1a 亚群在我国的流行情况

涂长春^[15]首次证明,我国 CSFV 分为基因 1 群和基因 2 群,其中基因 2 群在我国猪瘟流行中占主导地位。2007 年,张磊^[16]对我国 10 个省区 CSFV E0 基因序列进行了测定和分析,结果同样表明基因 2 群为优势流行株。2008 年,朱妍^[17]对我国 10 个省市 CSFV 流行毒株 E2 基因主要抗原编码区进行了分析,结果表明 2.1 亚群毒株占 79.3%。2.1 亚群毒株在我国猪瘟流行中占有重要地位,应对其进行深入研究。根据上传到 GenBank 上的 CSFV 序列及报道来看,我国内地流行的 2.1 亚群毒株以与 GXWZ02 同源性较高的 2.1b 亚群为主,2.1a 亚群比较少见。Chen 等^[18]对我国东南部省份的 34 株猪瘟病毒流行株 E2 基因进行了分析,结果显示有 33 株属于 2.1b 亚群,1 株属于 2.2 亚群,没有发现 2.1a 亚群毒株,这表明了 2003—2007 年 2.1b 亚群毒株仍然是我国东南部省份猪瘟流行的主要毒株。本研究在对 2009 年 11 个流行株 E0 基因测序分析时发现,包括 SXCDK 株在内的 4 个流行株与 96TD 同源性较高(96.3%~96.6%),进化树分析显示这 4 个流行株与台湾株 96TD、欧洲株 Paderborn 的进化距离较近,属于 2.1a 亚群,表明以往在我国比较少见的 2.1a 亚群毒株有增多趋势。

对 CSFV SXCDK 株进行了全基因测序与分析,结果表明, SXCDK 株与台湾毒 96TD 株同源性最高,属于 2.1a 亚群毒株,两者之间的进化距离为 0.038。2.1a 亚群毒株于 1994 年入侵中国台湾地区,1995 年爆发,并取代 3.4 亚群成为台湾地区的主要流行毒株^[19]。在台湾地区流行的 2.1 亚群中,起初 2.1a 和 2.1b 同时存在,最后 2.1a 占据主导地位,在我国内地也同时存在着这 2 个亚群毒株,就目前情况来看,以 2.1b 为主,但在二者更长时间的竞争中,是否会出现 2.1a 亚群取代 2.1b 亚群而主导我国猪瘟流行,及此取代发生时是否会引发新的猪瘟疫情,这些问题均需要长期监测。本研究首次完成了我国内地 1 株 2.1a 亚群毒株的全序列测定,并对其序列特征和细胞表位进行了分析,对以后监测、分析进而预防和控制我国内地 2.1a 亚群毒株的流

行具有重要参考价值。

[参考文献]

[1] Meyers G, Thiel H J. Molecular characterization of pestiviruses [J]. Adv Virus Res, 1996, 47: 53-118.

[2] 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.

[3] Tu C C, Lu Z J, Li H W, et al. Phylogenetic comparison of classical swine fever virus in China [J]. Virus Research, 2001, 81: 29-37.

[4] 吴显实. 广西猪瘟流行毒株全基因组的克隆与序列分析 [D]. 广西南宁: 广西大学, 2003.

Wu X S. Cloning and sequence analysis of genome of classical swine fever virus epidemic in Guangxi [D]. Nanning, Guangxi: Guangxi University, 2003. (in Chinese)

[5] Zhang F, Yu M, Weiland E, et al. Characterization of epitopes for neutralizing monoclonal antibodies to classical swine fever virus E2 and Erns using phage-displayed random peptide library [J]. Arch Virol, 2006, 151(1): 37-54.

[6] Christmann A, Wentzel C, Meyer G, et al. Epitope mapping and affinity purification of monospecific antibodies by *Escherichia coli* cell surface display of gene-derived random peptide libraries [J]. Journal of Immunological Methods, 2001, 257: 163-173.

[7] 肖 昌, 余兴龙, 张茂林, 等. 利用随机肽库鉴定猪瘟病毒 E2 蛋白抗原表位 [J]. 中国兽医学报, 2005, 25(5): 449-453.

Xiao C, Yu X L, Zhang M L, et al. Identification of a novel epitope on CSFV E2 protein by using phage peptide libraries [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2005, 25(5): 449-453. (in Chinese)

[8] Chang C Y, Huang C C, Lin Y J, et al. Antigenic domains analysis of classical swine fever virus E2 glycoprotein by mutagenesis and conformation-dependent monoclonal antibodies [J]. Virus Res, 2010, 149(2): 183-189.

[9] Peng W P, Hou Q, Xia Z H, et al. Identification of a conserved linear B-cell epitope at the N-terminus of the E2 glycoprotein of classical swine fever virus by phage-displayed random peptide library [J]. Virus Res, 2008, 135(2): 267-272.

[10] Lin F, Lin M, Mallory M, et al. Deletions of structural glycoprotein E2 of classical swine fever virus strain alfort/187 resolve a linear epitope of monoclonal antibody WH303 and the minimal N-terminal domain essential for binding immunoglobulin G antibodies of a pig hyperimmune serum [J]. J Virol, 2000, 74: 11619-11625.

[11] Yu M, Wang L F, Shiell B J, et al. Fine mapping of a C-terminal linear epitope highly conserved among the major envelope glycoprotein E2 (gp51 to gp54) of different pestiviruses [J]. Virology, 1996, 222: 289-292.

[12] Armengol E, Wiesmüller K H, Wienhold D, et al. Identification of T-cell epitopes in the structural and non-structural proteins of classical swine fever virus [J]. J Gen Virol, 2002, 83: 551-560.

[13] Pauly T, Elbers K, König M, et al. Classical swine fever virus-specific cytotoxic T lymphocytes and identification of a T cell epitope [J]. J Gen Virol, 1995, 76: 3039-3049.

[14] 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)

[15] 涂长春. 中国猪瘟流行病学现状与防制研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2004.

Tu C C. Epidemiological status of classical swine fever in China and its control measures [D]. Beijing: China Agricultural University, 2004. (in Chinese)

[16] 张 磊. 中国部分省区猪瘟 E0 基因的分子流行病学研究 [D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2007.

Zhang L. The molecular epidemiology study on E0 gene of swine fever in parts of China [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University, 2007. (in Chinese)

[17] 朱 妍. 中国猪瘟病毒流行毒株遗传多样性及抗原性研究 [D]. 吉林长春: 吉林大学, 2008.

Zhu Y. Molecular epidemiology and antigenic differentiation of classical swine fever virus in China [D]. Changchun, Jilin: Jilin University, 2008. (in Chinese)

[18] Chen N, Hu H X, Zhang Z F, et al. Genetic diversity of the envelope glycoprotein E2 of classical swine fever virus: Recent isolates branched away from historical and vaccine strains [J]. Veterinary Microbiology, 2007, 127: 286-299.

[19] Deng M C, Huang C C, Huang T S, et al. Phylogenetic analysis of classical swine fever virus isolated from Taiwan [J]. Vet Microbiol, 2005, 106(3/4): 187-193.