

网络出版时间:2014-09-10 18:19

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.10.037

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.10.037.html

# 猪瘟病毒 RT-nPCR 检测方法的建立及陕西部分地区 猪瘟病毒 E0 基因分子特征分析

吴旭锦,朱小甫

(咸阳职业技术学院 畜牧兽医研究所,动物疫病分子生物学诊断实验室,陕西 咸阳 712000)

**【摘要】** **【目的】** 建立一种基于 E0 基因高保守性的猪瘟病毒(CSFV)RT-nPCR 检测方法,为临床诊断提供一种可靠方法,同时对获得的陕西猪瘟病毒 E0 基因进行序列分析,揭示猪瘟病毒基因的分子衍化特征,为防控猪瘟提供参考。**【方法】** 根据 GenBank 中的猪瘟病毒参考序列,设计并合成了 2 对引物,建立猪瘟 RT-nPCR 检测方法,并对该方法的灵敏度和特异性进行检测。用该方法对采自陕西部分猪场的 32 份疑似猪瘟病料进行检测,并对获得的 8 株流行毒株 E0 基因进行测序及同源性分析。**【结果】** 建立了猪瘟病毒 RT-nPCR 检测方法,该方法检测 CSFV cDNA 含量的最低极限为  $6.7 \times 10^{-5}$  ng/L,从 BVDV、PRRSV、PCV-2、PRV 和 PPV 等参考毒株中提取或反转录获得的 DNA/cDNA 中不能扩增出目的条带,提示方法灵敏度高、特异性强。对 32 份疑似猪瘟组织病料的检测发现,有 12 份呈现阳性,阳性率为 37.5%。序列分析表明,8 株流行毒株间 E0 核苷酸、氨基酸同源性分别在 97.0%~99.3% 和 94.8%~98.5%。与参考毒株的核苷酸同源性为 83.4%~95.4%,氨基酸同源性为 85.8%~98.1%。流行毒株与我国疫苗毒株 HCLV、C HVRI 的核苷酸同源性仅为 83.4%~85.1%,氨基酸同源性仅为 86.1%~89.1%,呈现出较明显的远离疫苗株的变异趋势。进化树分析发现,8 个流行毒株均属于基因 II 群。首次发现了 1 株流行毒株(SXWN02 株)E0 Rnase 活性基序位点第 94 位由 E 变异为 K,其他位点未发生变异。**【结论】** 建立的 RT-nPCR 检测方法灵敏度高、特异性强,可作为猪瘟病毒的临床诊断方法。陕西部分地区猪场猪瘟感染仍较严重,需要做好防控工作。流行毒株 E0 基因发生较大变异,尤其是在关键位点上出现变异毒株,需要密切关注。

**【关键词】** 猪瘟;RT-nPCR 方法;E0 基因;分子特征

**【中图分类号】** S852.65<sup>+</sup>1

**【文献标志码】** A

**【文章编号】** 1671-9387(2014)10-0015-07

## Establishment of RT-nPCR method for detection of CSFV and analysis of CSFV E0 gene in some areas of Shaanxi province

WU Xu-jin, ZHU Xiao-fu

(Animal Epidemic Disease Diagnostic Laboratory of Molecular Biology, Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Xianyang Vocational Technical College, Xianyang, Shaanxi 712000, China)

**Abstract:** **【Objective】** This study established an E0 gene based RT-nPCR method for detection of CSFV for reliable clinical diagnosis, and analyzed CSFV E0 gene sequences in some areas of Shaanxi province to reveal molecular characteristics of CSFV E0 gene and provide basis for CSFV prevention and control. **【Method】** According to CSFV reference sequences in GenBank, we designed and synthesized two pairs of primers, and established a classical CSFV RT-nPCR detection method. Its detection sensitivity and specificity were tested before being used to test suspected swine fever tissues collected from farms in Shaanxi

**【收稿日期】** 2013-08-04

**【基金项目】** 陕西省科学技术研究发展计划项目(2014K02-06-03);咸阳职业技术学院重点科研项目(2013KYA02)

**【作者简介】** 吴旭锦(1979—),女,陕西西安人,副教授,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@aliyun.com

province. The *E0* gene sequences of obtained 8 strains were measured and homology analysis was conducted. 【Result】 RT-nPCR detection method for CSFV was established with the detection limit of  $6.7 \times 10^{-5}$  ng/L. Target genes could not be amplified using DNA/cDNA obtained from BVDV, PRRSV, PCV-2, PRV and PPV, indicating that the established method had high sensitivity and specificity. 12 out of 32 suspected swine fever tissues were found positive, with the positive rate of 37.5%. Sequence analysis shows that nucleotide homology and amino acid homology of 8 prevalent strains *E0* were 97.0%–99.3% and 94.8%–98.5%, respectively. Compared to the reference strains, the nucleotide homology was 83.4%–95.4%, and amino acid homology was 85.8%–98.1%. The nucleotide homology with vaccine strains HCLV and C HVRI was only 83.4%–85.1% and the amino acid homology was only 86.1%–89.1%, showing a significant variation trend away from the vaccine strain. Phylogenetic analysis reveals that the 8 pandemic strains belonged to genotype II group. A pandemic strain (SXWN02) with mutated E→K at the 94th site of *E0* Rnase active motifs was found for the first time. Other sites did not mutate. 【Conclusion】 The established RT-nPCR method had high sensitivity and specificity and can be used for clinical diagnosis. CSFV infection was serious in some areas of Shaanxi province and prevention and control should be well conducted. We found a greater mutation of pandemic strain *E0* gene, especially variant strains appeared at key sites, which needs close attention.

**Key words:** classical swine fever; RT-nPCR method; *E0* gene; molecular characteristics

猪瘟疫(Classical swine fever, CSF)是由猪瘟疫毒(Classical swine fever virus, CSFV)引起的一种高度接触传染性疫病,发病率和死亡率高,广泛分布于世界各国,严重威胁着养猪业的发展<sup>[1]</sup>。CSFV 是黄病毒科、瘟病毒属成员,为单股正链 RNA 病毒。CSFV 基因组长度约为 12.3 kb,编码 1 个独立的多聚蛋白,自氨基端到羧基端排列顺序为 N<sup>pro</sup>-C-E0-E1-E2-P7-NS2.3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B<sup>[2]</sup>。多聚蛋白被宿主蛋白酶修饰后可转变成不同的成熟蛋白,在这些蛋白中,E0 蛋白能诱导机体产生中和性抗体,也是 CSFV 感染细胞后惟一可以分泌到细胞培养上清液中的糖蛋白<sup>[3]</sup>。研究发现,E0 蛋白具有 RNA 酶活性,且 E0 可能是导致病毒持续感染宿主的重要原因<sup>[4]</sup>。由于猪瘟疫对养猪业有重要影响,多年来发展出了多种猪瘟疫诊断技术,在病原诊断上主要有免疫荧光技术、酶联免疫吸附试验、免疫胶体金技术和 RT-PCR 技术,其中以 RT-PCR 技术最为敏感,是现代诊断重点技术之一<sup>[5-6]</sup>。CSFV *E0* 基因相对保守,是 CSFV 分子诊断的重要候选基因。长期以来,我国在猪瘟疫防控上一直坚持疫苗免疫为主的策略,但随着时间的推移,许多学者发现猪瘟疫病毒已经发生了变异,并怀疑猪瘟疫流行形势的变化与基因变异有关<sup>[7-8]</sup>。因此,本研究拟建立一种 RT-nPCR 扩增 *E0* 基因的检测方法,同时进行 *E0* 序列分析,以期临床提供一种快速、灵敏、特异的诊断手段,并通过序列分析了解 CSFV 分子衍化情况,为

猪瘟疫防控提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 病毒 猪瘟疫病毒参考株为疫苗毒株,参照毒株牛病毒性腹泻黏膜病病毒(BVDV)XY08 株、蓝耳病病毒(PRRSV)CH-1R 株、圆环病毒(PCV-2)SD06 株、伪狂犬病毒(PRV)Bartha-K61 株、细小病毒(PPV)ZJ05 株为疫苗毒或分离毒株,均由咸阳职业技术学院畜牧兽医研究所动物疫病分子生物学诊断实验室保存。

1.1.2 组织病料 疑似猪瘟疫组织病料由动物疫病分子生物学诊断实验室采集,共计 32 份,分别来自咸阳市(11 份)、西安市(5 份)、宝鸡市(9 份)、渭南市(5 份)和汉中市(2 份)猪场。组织病料包括脾脏、肝脏、肾脏、淋巴结和扁桃体,研磨处理后,12 000 r/min 高速离心 10 min,取上清液于-70 ℃保存备用。

1.1.3 主要试剂 TRIzol Reagent 为 Invitrogen 公司生产;反转录酶(AMV)、RNA 酶抑制剂、DEPC 处理水、rTaq 酶、dNTP、EcoR I、UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒均购自生工生物工程(上海)有限公司;pMD18-T 载体克隆试剂盒、BamH I 及 Hind III 限制性内切酶均为 TaKaRa 公司产品;DH5α 大肠杆菌由动物疫病分子生物学诊断实验室保存。

1.1.4 引物设计与合成 根据 GenBank 上发表的猪瘟疫病毒 HCLV 株(GenBank 登录号:AF531433)、Shimen 株(GenBank 登录号:AF092448)全基因序列,设计 2 对引物,采用 RT-nPCR 方法扩增 E0 基因,引物序列如下,E0-1F:5'-AACCACCAGAATC TAGGAAG-3',E0-1R:5'-GTGTTTTTGGGGAG GCAAGC-3';E0-2F:5'-AAAGCCCTATTGGCAT GGG-3',E0-2R:5'-GGTGCAGTTGTTAGTGTAC C-3'。预期扩增片段 801 bp,引物由生工生物工程(上海)有限公司合成,用 DEPC 处理水溶解,终浓度为 25  $\mu\text{mol/L}$ , $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

## 1.2 方法

1.2.1 CSFV 总 RNA 的提取及反转录 取 CSFV 疫苗毒 250.0  $\mu\text{L}$ ,用 TRIzol Reagent 提取总 RNA,空气中自然干燥。RNA 干燥过程中,配制反转录反应液,组成为:DEPC 处理水 12.5  $\mu\text{L}$ , $5\times$  AMV Buffer 4.0  $\mu\text{L}$ ,dNTP 2.0  $\mu\text{L}$ ,下游引物 E0-1R(10  $\mu\text{mol/L}$ )1.0  $\mu\text{L}$ ,AMV 0.25  $\mu\text{L}$ ,RNA 酶抑制剂 0.25  $\mu\text{L}$ ,总体积 20.0  $\mu\text{L}$ 。待 RNA 干燥后用配制好的反转录反应液充分溶解,4 000 r/min 瞬时离心 5 s,置  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴反转录 90 min,取出后立即冰浴,用微量紫外分光光度计测定 cDNA 浓度。

1.2.2 CSFV RT-nPCR 检测方法的建立 以已知浓度的 cDNA 溶液作为模板,摸索扩增条件。第 1 次扩增反应体系中,cDNA 2.0  $\mu\text{L}$ , $10\times$ PCR Buffer 2.5  $\mu\text{L}$ ,dNTP 1.0  $\mu\text{L}$ ,E0-1F、E0-1R(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 0.5  $\mu\text{L}$ ,改变 *rTaq* DNA 聚合酶用量(0.25~1.0  $\mu\text{L}$ )和  $\text{Mg}^{2+}$  用量(0.5~3.0  $\mu\text{L}$ ),用超纯水补足 25.0  $\mu\text{L}$ 。条件设定为  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;进入循环后  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  50 s 变性,退火温度由  $52\text{ }^{\circ}\text{C}$  至  $58\text{ }^{\circ}\text{C}$  退火 1 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min,共 30 个循环;最后  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。第 2 次扩增反应体系中,取 2.0  $\mu\text{L}$  第 1 次扩增产物作为模板,体系及条件同第 1 次扩增,引物为 E0-2F、E0-2R。摸索出反应体系和反应条件的最佳组合。

1.2.3 RT-nPCR 方法的灵敏度试验 将已知浓度的 cDNA 溶液做 10 倍梯度稀释,按照摸索出的最优体系与条件进行 RT-nPCR 反应,取 5.0  $\mu\text{L}$  第 2 次扩增产物,进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,于凝胶成像系统中照相观察。

1.2.4 RT-nPCR 方法的特异性试验 提取 CSFV、PRRSV、BVDV 等 RNA 病毒的核酸并反转录获得 cDNA;按照 DNazol Reagent 试剂说明提取 PCV-2、PRV 和 PPV 等 DNA 病毒的 DNA 模板,用

E0-1F/E0-1R、E0-2F/E0-2R 引物对分别进行第 1 次和第 2 次扩增,用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.2.5 病料中 E0 基因的 PCR 扩增 用以上建立的检测方法对收集的 32 份组织病料进行检测。选取不同地区 E0 基因阳性 PCR 产物,用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒回收 PCR 扩增条带,与 pMD18-T 载体进行连接,然后转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞,经 Amp<sup>+</sup> 平板筛选,挑取单个菌落,摇动培养后进行菌液 PCR 鉴定。提取阳性菌质粒,进行 *Bam*H I 及 *Hind* III 双酶切鉴定,将阳性质粒送生工生物工程(上海)有限公司进行测序。

1.2.6 E0 基因序列及推导氨基酸序列的比对分析 用 DNASTar 软件,将获得的 8 株猪瘟疫病毒 E0 基因序列与 GenBank 中发表的 ALD(登录号 D49532)、Alfort187(X87939)、Brescia(AF091661)、C HVRI (AY805221)、GXWZ02 (AY367767)、HCLV (AF531433)、Paderborn (AY072924)、Rimes(AY259122)和 Shimen(AF092448)等国内外猪瘟疫代表毒株,进行核苷酸和氨基酸同源性比对分析,绘制系统发生树。

## 2 结果与分析

### 2.1 CSFV RT-nPCR 检测方法的建立

通过改变反应体系中 *rTaq* DNA 聚合酶用量和  $\text{Mg}^{2+}$  用量,改变反应条件中的退火温度,优化反应体系和反应条件,最终确定最优体系和条件为:第 1 次扩增 cDNA 2.0  $\mu\text{L}$ ,超纯水 16.25  $\mu\text{L}$ , $10\times$ PCR Buffer 2.5  $\mu\text{L}$ , $\text{Mg}^{2+}$  2.0  $\mu\text{L}$ ,dNTP 1.0  $\mu\text{L}$ ,E0-1F、E0-1R(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 0.5  $\mu\text{L}$ ,*rTaq* DNA 聚合酶 0.25  $\mu\text{L}$ ,总体积 25.0  $\mu\text{L}$ 。条件为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  50 s, $54\text{ }^{\circ}\text{C}$  1 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  1 min,共进行 30 个循环;最后  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。第 2 次扩增时,取 2.0  $\mu\text{L}$  第 1 次扩增产物作为模板,体系同第 1 次扩增,引物为 E0-2F/E0-2R。条件为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  50 s, $58\text{ }^{\circ}\text{C}$  1 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  1 min,共 30 个循环;最后  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。

### 2.2 CSFV RT-nPCR 检测方法的灵敏度

测定反转录第一链 cDNA 含量为 670 ng/L,10 倍梯度稀释后进行套式扩增。从图 1 可见,用所建立的方法能够扩增出可见目的条带的最大稀释度为  $10^7$ ,即检测的 cDNA 含量极限为  $6.7\times 10^{-5}$  ng/L,表明此方法灵敏度高,完全满足 CSFV 临床检测需要。

### 2.3 CSFV RT-nPCR 检测方法的特异性

用所建立的方法对 CSFV、PRRSV、BVDV、PCV-2、PRV 和 PPV 阳性毒进行扩增,结果只有

CSFV 扩增出了 801 bp 的目的条带(图 2),与预期条带长度一致,其他 5 种毒均未扩增出条带,提示所建立的方法特异性较好。

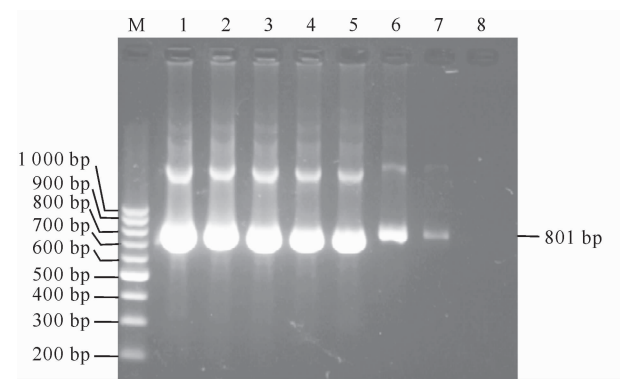


图 1 CSFV *E0* 基因 RT-nPCR 检测方法的灵敏度  
M. DNA Marker (100~1 000 bp);1~8. 依次为  
 $670\times10^{-1}\sim670\times10^{-8}$  ng/L cDNA PCR 结果  
Fig.1 Sensitivity test of CSFV *E0* gene RT-nPCR method  
M. DNA Marker(100—1 000 bp);1—8 are CSFV *E0* cDNA  
PCR results at  $670\times10^{-1}\sim670\times10^{-8}$  ng/L, respectively

### 2.4 疑似病料的 CSFV 检测

用建立的 RT-nPCR 方法,检测采集的陕西省部分地区 32 份疑似猪瘟的淋巴结、脾脏、肝脏、肾脏和扁桃体等组织病料,结果有 12 份病料呈现阳性,阳性率为 37.5%,部分病料检测结果见图 3。

### 2.5 *E0* 基因序列的测定

选取陕西不同地区 8 株 CSFV 毒株的 *E0* 克隆基因,回收产物连接 pMD18-T 载体,转化感受态细

图 2 CSFV *E0* 基因 RT-nPCR 检测方法的特异性  
M. DNA Marker (100~1 000 bp);1~6. 分别为 CSFV、  
PRRSV、PCV-2、PRV、PPV、BVDV, respectively  
Fig.2 Specialization test of CSFV *E0* gene RT-nPCR method  
M. DNA Marker(100—1 000 bp);1—6 are RT-nPCR results of  
CSFV, PRRSV, PCV-2, PRV, PPV, and BVDV, respectively

胞后提取阳性质粒,经 *Bam*H I 及 *Hind* III 双酶切鉴定,获得一个完整的 801 bp 片段或 538 bp 和 263 bp 2 个小片段,原因是部分 *E0* 基因中存在 *Hind* III 酶切位点(图 4)。测序后获得 8 株 CSFV 流行毒株 *E0* 基因序列,分别命名为 SXXY01-*E0*、SXXY02-*E0*、SXXB01-*E0*、SXWN01-*E0*、SXWN02-*E0*、SXXA01-*E0*、SXXA02-*E0* 和 SXHZ01-*E0*。

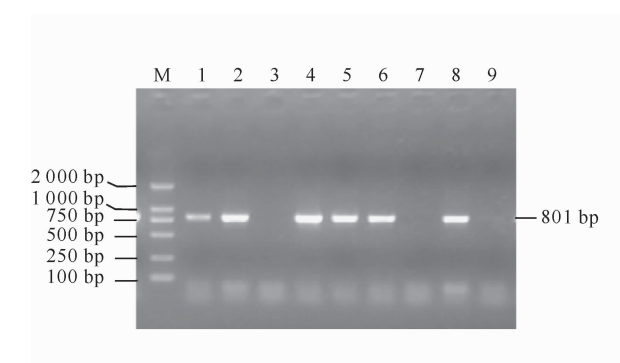


图 3 部分疑似 CSF 病料中 CSFV *E0* 基因的检测  
M. DL2000 DNA Marker;1~9. 部分病料  
Fig.3 Results of CSFV *E0* gene detection from  
some suspicious tissues  
M. DL2000 DNA Marker;1—9 are detection  
results of some tissues

### 2.6 *E0* 基因及推导氨基酸序列的比对分析

将获得的 8 株 *E0* 基因核苷酸序列、推导氨基

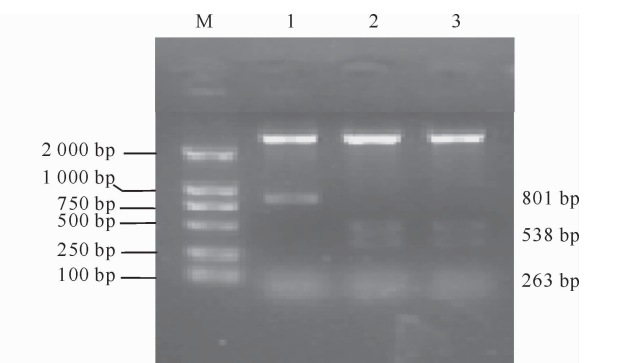


图 4 部分 CSFV 阳性质粒双酶切鉴定  
M. DL2000 DNA Marker;1~3. 部分阳性质粒双酶切,  
1 获得 801 bp 片段,2,3 获得 538 和 263 bp 2 个片段  
Fig.4 Enzyme digestion results of some CSFV positive plasmids  
M. DL2000 DNA Marker;1—3 are enzyme digestion of  
some positive plasmids,1 and 2,3 obtained  
801 bp and 538,263 bp fragments

酸序列与 9 株参考毒株进行比对分析,同源性见表 1,系统发生树见图 5。

从表 1 可以看出,8 株 CSFV 流行毒株 E0 核苷酸及其编码氨基酸同源性最高的是 SXXA02-E0 与 SXHZ01-E0,分别为 99.3%和 98.5%,最低的是 SXXY01-E0 与 SXWN02-E0,分别为 97.0%和 94.8%,其他各株间的同源性介于此范围内;这 8 个流行毒株之间的同源性较高。与参考毒株相比,核

苷酸同源性最高的是 SXXA02-E0 与 GXWZ02,为 95.4%,最低的是 SXWN02-E0 与 HCLV,为 83.4%;氨基酸同源性最高的仍为 SXXA02-E0 与 GXWZ02,为 98.1%,最低的是 SXXA01-E0 与 Rimes,仅为85.8%。

表 1 不同 CSFV 毒株 E0 核苷酸、氨基酸序列同源性比对  
Table 1 Homology of E0 nucleotide and amino acid sequences

| 毒株<br>Strains | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   | 13   | 14    | 15   | 16   | 17   |
|---------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|------|------|------|
| 1             |      | 97.6 | 98.3 | 97.4 | 97.0 | 97.3 | 99.0 | 98.8 | 94.6 | 84.4 | 92.6 | 84.4 | 85.3 | 85.9  | 86.0 | 86.8 | 84.5 |
| 2             | 95.5 |      | 97.4 | 98.8 | 98.4 | 98.6 | 98.1 | 97.9 | 94.8 | 83.8 | 93.0 | 83.8 | 84.9 | 85.8  | 85.9 | 86.4 | 83.9 |
| 3             | 96.3 | 96.3 |      | 97.1 | 96.8 | 97.0 | 98.8 | 98.5 | 94.6 | 84.5 | 92.5 | 84.5 | 85.6 | 86.0  | 86.1 | 86.9 | 84.6 |
| 4             | 95.9 | 98.1 | 97.4 |      | 98.6 | 98.9 | 97.9 | 97.6 | 94.8 | 84.0 | 93.3 | 84.0 | 85.0 | 86.0  | 86.1 | 86.6 | 84.1 |
| 5             | 94.8 | 97.0 | 95.5 | 97.4 |      | 98.5 | 97.5 | 97.3 | 94.6 | 83.4 | 93.1 | 83.6 | 84.3 | 85.1  | 85.3 | 85.8 | 83.5 |
| 6             | 95.1 | 97.4 | 95.9 | 97.8 | 96.6 |      | 97.8 | 97.5 | 94.6 | 83.6 | 92.9 | 83.6 | 84.6 | 85.5  | 85.6 | 86.1 | 83.8 |
| 7             | 97.4 | 97.4 | 98.1 | 97.8 | 96.6 | 97.0 |      | 99.3 | 95.4 | 85.0 | 93.1 | 85.0 | 85.9 | 86.5  | 86.6 | 87.4 | 85.1 |
| 8             | 96.6 | 96.6 | 97.4 | 97.0 | 95.9 | 96.3 | 98.5 |      | 94.9 | 84.9 | 92.9 | 84.9 | 85.5 | 86.1  | 86.3 | 87.0 | 85.0 |
| 9             | 95.9 | 96.6 | 96.6 | 97.0 | 95.9 | 96.3 | 98.1 | 97.0 |      | 84.0 | 94.1 | 84.0 | 84.9 | 85.8  | 85.9 | 86.5 | 84.1 |
| 10            | 86.9 | 86.9 | 88.0 | 87.3 | 86.1 | 86.5 | 88.8 | 88.4 | 88.4 |      | 83.8 | 99.3 | 94.9 | 95.9  | 95.8 | 94.8 | 99.9 |
| 11            | 94.4 | 95.1 | 95.1 | 95.5 | 94.8 | 94.8 | 96.3 | 95.5 | 97.8 | 88.4 |      | 83.5 | 84.4 | 85.0  | 85.1 | 85.8 | 83.9 |
| 12            | 86.1 | 86.1 | 87.3 | 86.5 | 86.1 | 85.8 | 88.0 | 87.6 | 87.6 | 98.5 | 88.0 |      | 94.9 | 95.9  | 95.8 | 94.8 | 99.4 |
| 13            | 88.0 | 88.0 | 89.1 | 88.4 | 87.3 | 87.6 | 89.9 | 89.5 | 90.3 | 94.8 | 90.3 | 94.0 |      | 97.3  | 97.1 | 96.4 | 95.0 |
| 14            | 87.6 | 88.4 | 88.8 | 88.8 | 87.6 | 88.0 | 89.5 | 89.1 | 89.9 | 94.4 | 90.6 | 93.6 | 97.4 |       | 99.9 | 97.4 | 96.0 |
| 15            | 87.6 | 88.4 | 88.8 | 88.8 | 87.6 | 88.0 | 89.5 | 89.1 | 89.9 | 94.4 | 90.6 | 93.6 | 97.4 | 100.0 |      | 97.5 | 95.9 |
| 16            | 89.5 | 89.5 | 90.6 | 89.9 | 88.8 | 89.1 | 91.4 | 91.0 | 91.4 | 95.1 | 91.4 | 94.4 | 98.1 | 97.8  | 97.8 |      | 94.9 |
| 17            | 87.3 | 87.3 | 88.4 | 87.6 | 86.5 | 86.9 | 89.1 | 88.8 | 88.8 | 99.6 | 88.8 | 98.9 | 95.1 | 94.8  | 94.8 | 95.5 |      |

注:表格右上角为核苷酸同源性,左下角为氨基酸同源性;1~17 分别代表 SXXY01-E0、SXXY02-E0、SXXB01-E0、SXWN01-E0、SXWN02-E0、SXXA01-E0、SXXA02-E0、SXHZ01-E0、GXWZ02、HCLV、Paderborn、Rimes、Shimen、ALD、Alfort187、Brescia、C HVRI。

Note:Top right of the diagonal is for nucleotide homology,while lower left was for amino acid. 1—17 represent SXXY01-E0,SXXY02-E0,SXXB01-E0,SXWN01-E0,SXWN02-E0,SXXA01-E0,SXXA02-E0,SXHZ01-E0,GXWZ02,HCLV,Paderborn,Rimes,Shimen,ALD,Alfort187,Brescia,and C HVRI, respectively.

从进化树(图 5)可以看出,所有比对毒株分为 2 大基因群, HCLV、Rimes、Shimen、ALD、Alfort187、Brescia 和 C HVRI 形成一个大的分支,为

基因 I 群;而本研究获得的 8 个(CSFV)流行毒株与 GXWZ02、Paborn 形成另一个大的分支,为基因 II 群。

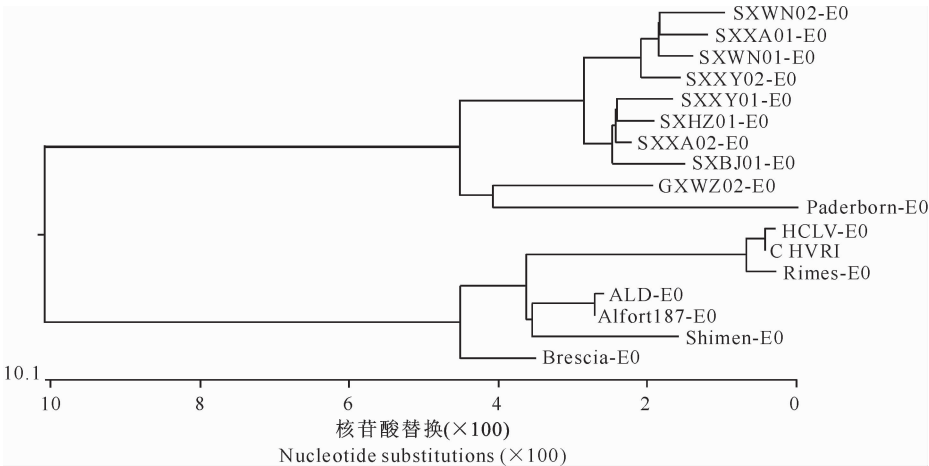


图 5 CSFV 流行毒株与参考毒株 E0 基因的系统发生树

Fig. 5 Phylogenetic tree of E0 gene between CSFV strains in the study and the reference strains

E0 蛋白中,氨基酸基序 SLHGIWPE 和 EWNKHGWC 具有 Rnase 活性,分别定位于第

47~54 位和第 94~101 位(图 6)。比较发现,8 个 CSFV 流行毒株 E0 蛋白的 SLHGIWPE 基序相同,

与参考毒株相比,第 54 位的氨基酸大多数为 E,但 C HVRI、HCLV 和 Rimes 3 个疫苗株均为 G(图 6 左)。EWNKHGWC 基序比较发现,除 SXWN02 第

94 位由 E 变异为 K 外,其他毒株均未发生任何变异(图 6 右)。

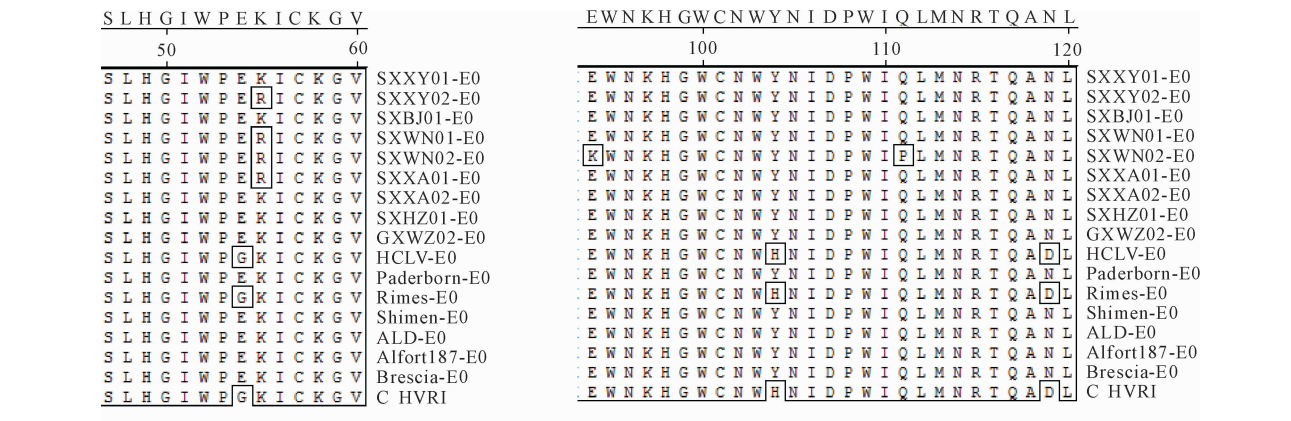


图 6 CSFV E0 蛋白 2 个 Rnase 活性区域的氨基酸序列比较

Fig. 6 Comparison of deduced amino acid sequences of two Rnase active domains of CSFV E0

3 讨论

猪瘟是猪群重大疫病之一,其快速诊断方法的建立对于防控猪瘟具有重要作用。目前诊断猪瘟的主要方法有荧光抗体染色、兔体中和试验、酶联免疫吸附试验、免疫胶体金技术和 RT-PCR 等技术。在这些方法中,RT-PCR 技术具有快速、灵敏、特异的优点,适合大批量检测。许多学者也针对 CSFV 的不同基因建立了 RT-PCR 诊断方法,主要针对 E2、NS5B、3'-UTR 等区域<sup>[9]</sup>。本研究选取 E0 作为靶基因,建立了 CSFV 的 RT-nPCR 检测方法,原因是 E0 基因相对保守,便于扩增,并且扩增产物可直接进行回收测序,对研究 E0 基因的变异有重要意义。试验表明,所建立方法检测 cDNA 含量的极限为 6.7×10<sup>-5</sup> ng/L,在常见的猪群疫病病毒中仅有 CSFV 可扩增出特异性条带,提示建立的方法灵敏度高、特异性好。

应用所建立的方法对采集的陕西省部分地区 32 份疑似猪瘟病料进行检测发现,有 12 份病料呈现阳性,阳性率为 37.5%,表明所建立的方法能够很好地检测组织病料。此外,本试验结果显示,在陕西部分猪场猪瘟感染强度仍然较高,猪瘟仍是猪场防控的重点疫病,这一结果与其他学者近年的研究观点<sup>[10]</sup>相似。

近年来,猪瘟免疫失败的报道屡见不鲜,有许多研究认为,CSFV 在长期免疫压力下基因变异是导致这一现象的原因之一<sup>[11-12]</sup>。E0 蛋白具有 Rnase

活性,与病毒持续感染机体有直接关系,因而研究 E0 基因的变异趋势有重要意义<sup>[13-14]</sup>。本研究发现,测定的 8 株流行毒株 E0 基因与我国疫苗毒株 HCLV、C HVRI 的同源性仅为 83.4%~85.1%,氨基酸同源性仅为 86.1%~89.1%,呈现出较明显的远离疫苗株的变异趋势。E0 蛋白中具有 Rnase 活性的氨基酸基序 SLHGIWPE 和 EWNKHGWC,且 8 个流行毒株 E0 蛋白的 SLHGIWPE 基序相同。不同的是,3 个疫苗株 C HVRI、HCLV 和 Rimes 第 54 位的氨基酸均为 G,其他毒株均为 E,这一变异是否与毒株的毒力有关,尚需进一步研究。比较发现,除 SXWN02 株 EWNKHGWC 基序第 94 位由 E 变异为 K 外,其他毒株均未发生任何变异。SXWN02 株的这一变异为首次发现,尚未见到相似的公开报道,这一变异对毒株毒力、致病性有何影响,值得深入研究。

总之,本研究建立了一种特异性好、灵敏度高的猪瘟病毒 RT-nPCR 检测方法,并对克隆的 E0 基因进行了序列分析。以前研究认为,E0 蛋白中具有 Rnase 活性的氨基酸基序高度保守,未发现变异<sup>[4,9-10,14]</sup>,但本研究首次发现了 Rnase 活性氨基酸基序的变异现象,值得关注。综合多位学者的研究成果,CSFV 基因变异并逐渐远离疫苗株已成为普遍现象,且在一些关键位点上呈现变异增多的趋势。这一情况需要引起高度重视,虽然目前疫苗尚能保护猪群<sup>[15]</sup>,但随着病毒变异的积累,其后果难以预料。因此,我国需要做好针对流行毒株的新疫苗开

发工作。

## [参考文献]

- [1] Barbara E S, Jeffrey J Z, Sylvie D A, 等. 猪病学 [M]. 9 版. 赵德明, 张仲秋, 沈建忠, 译. 北京: 中国农业大学出版社, 2008: 325-335.
- Barbara E S, Jeffrey J Z, Sylvie D A, et al. Diseases of swine [M]. 9th ed. Zhao D M, Zhang Z Q, Shen J Z, translation. Beijing: China Agricultural University Press, 2008: 325-335. (in Chinese)
- [2] Meyers G, Thiel H J. Molecular characterization of pestiviruses [J]. Advance Virus Research, 1996, 47: 53-118.
- [3] Rumenapf T, Unger G, Strauss J H, et al. Processing of the envelope glycoprotein of pestivirus [J]. Journal of Virology, 1993, 67(5): 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]. Journal of Virology, 1998, 72(1): 151-157.
- [5] 朱小甫, 张 志, 李晓成, 等. 猪瘟疫毒 RT-nested PCR 检测方法的优化和应用 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007, 35(6): 11-14.
- Zhu X F, Zhang Z, Li X C, et al. Optimization and application of RT-nested PCR detection for classical swine fever virus [J]. Journal of Northwest A&F University: Nat Sci Ed, 2007, 35(6): 11-14. (in Chinese)
- [6] 朱小甫, 李晓成, 陈德坤, 等. 猪瘟诊断技术研究进展 [J]. 中国动物检疫, 2007, 24(2): 45-47.
- Zhu X F, Li X C, Chen D K, et al. Progress of swine fever diagnostic techniques [J]. China Animal Quarantine, 2007, 24(2): 45-47. (in Chinese)
- [7] Wirz B, Trascbin J D, Muler H. Detection hog cholera virus by polymerase chain reaction [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1993, 31: 1148-1154.
- [8] 王 波, 张 鹏, 杨增岐, 等. 陕西省 PRRSV 与 CSFV, PCV2, PRV 混合感染的检测 [J]. 西北农业学报, 2009, 18(5): 27-30.
- Wang B, Zhang P, Yang Z Q, et al. Detections of the co-infection of PRRSV, CSFV, PCV2 and PRV in Shaanxi Province [J]. Acta Agriculturae Boreali-occiaentalis Sinica, 2009, 18(5): 27-30. (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. 猪瘟疫毒流行株与疫苗株 E<sup>ms</sup> 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 E<sup>ms</sup> gene of field isolates and vaccine strains of hog cholera virus [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2004, 37(3): 446-452. (in Chinese)
- [11] 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)
- [12] 万 婧, 陈 宁, 童 超, 等. 猪瘟疫毒浙江分离株体外生长特性及其囊膜糖蛋白 E2 分子的变异分析 [J]. 中国兽医科学, 2011, 41(8): 794-798.
- Wan J, Chen N, Tong C, et al. Growth characteristics of classical swine fever virus strains isolated in Zhejiang and genetic variations of their envelope glycoprotein E2 [J]. Chinese Veterinary Science, 2011, 41(8): 794-798. (in Chinese)
- [13] Fernandez-Sainz I, Holinka L G, Gavrillov 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] Meyers G, Saalmuller A, Buttner M. Mutations abrogating the Rnase activity in glycoprotein E<sup>ms</sup> of the pestivirus classical swine fever virus lead to virus attenuation [J]. Journal of Virology, 1999, 73(12): 10224-10235.
- [15] 王在时, 丘惠深, 郎洪武, 等. 猪瘟疫毒流行株与疫苗株主要抗原编码基因差异研究 [J]. 中国兽药杂志, 2001, 35(1): 1-3.
- Wang Z S, Qiu H S, Lang H W, et al. Studies on the essential antigen coding gene difference of the field isolate strains and vaccine strain of hog cholera virus [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2001, 35(1): 1-3. (in Chinese)