

中国猪瘟疫化弱毒株(C株)兔脾组织毒主要保护性抗原 E2(gp55) 基因序列分析

韩雪清¹, 李红卫², 刘湘涛¹, 李小兵², 马军武¹, 涂长春², 胡弘博¹,
殷震², 蒋帅³, 刘伯华³, 赵启祖¹, 李健强³, 李忠润¹, 谢庆阁¹

(1. 中国农业科学院兰州兽医研究所, 兰州 730046; 2. 解放军农牧大学; 3. 西北农业大学)

摘要: 利用反转录(RT)及套式 PCR(N-PCR)方法扩增了中国猪瘟疫化弱毒株(C株)兔脾组织毒主要保护性抗原 E2(gp55)基因, 成功地将其克隆并测定了核苷酸序列, 与国内外已发表的猪瘟疫毒(HCV) E2 基因序列比较的结果是: C株兔脾毒与 C株细胞(SK6)毒、C株疫苗(犊牛睾丸细胞, HCLV-C)毒、HCV-SM株(石门)毒、Brescia株(荷兰)毒、Alfort株(德国)毒的 E2 核苷酸序列同源性分别为 98.87%、98.34%、94.58%、91.00%、80.78%; 氨基酸同源性分别为 98.95%、97.37%、94.22%、91.60%、89.23%。对 C株兔脾毒与 C株细胞毒、经典强毒及国内流行野毒 E2 上的 A、B、C 三个中和性抗原区的氨基酸组成进行了比较, 其结果为: C株兔脾毒与 C株细胞毒的差异很小甚至没有差异, 而与流行野毒及经典强毒在 B、C 区有较大的差异。我国经典强毒石门毒与国内 80 年代和 90 年代流行毒之间有明显的差异, 表明我国猪瘟疫流行毒株发生了变化。

关键词: 猪瘟疫; C株; E2 基因; 序列分析

中图分类号: S852.65⁺1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0366-6964(2001)01-0052-06

猪瘟疫病毒(HCV)为黄病毒科瘟疫病毒属成员, 基因组为单股正链 RNA, 长度 12.3 Kb, 仅含一个大的开读框架, 编码一个含 3898 个氨基酸残基的多聚前体蛋白^[1,2], 目前已定位的蛋白有 5 种: N^{pro}、C、E0、E1 和 E2, 它们的编码区均在 HCV 5' 端侧。除 N^{pro} 外, 其它 4 种蛋白为 HCV 的结构蛋白^[3]。C 为 HCV 的核衣壳蛋白。其它三种均为糖蛋白。E2 的 N 端为 Arg690, C 端位于多聚蛋白的 1060 氨基酸附近, E2 携带有能刺激产生 HCV 中和抗体的抗原决定簇, 是 HCV 主要的保护性抗原, 参与病毒的感染过程, 诱发机体产生中和抗体。继 Meyer 和 Moormann 分别发表了 HCV 强毒 Brescia 株和 Alfort 株的全序列后, Rijn^[4]发表了 C 株(SK6 细胞)毒全序列。我国的赵启祖^[5]、李红卫^[6]等也先后发表了 HCV-SM 株和 HCLV-C 疫苗株的 E2 基因序列, 以上工作为开展对猪瘟疫病毒分子水平研究及毒株间的遗传关系分析奠定了基础。

猪瘟疫(HC)是由 HCV 引起的猪的重要传染病之一, 被国际兽疫局列为家畜第一类传染病。在 60 年代, 由我国研制的中国猪瘟疫化弱毒兔组织毒疫苗(C株)以其良好的免疫保护力成功地控制了当时猪瘟疫呈全国性流行的严重局面, 至今仍是世界公认的最好的猪瘟疫弱毒疫苗^[7]。

收稿日期: 1999-03-13

基金项目: 国家 B 类攀登计划资助项目(85-44); 甘肃省自然科学基金(ZS981-A21-040-N)。

作者简介: 韩雪清(1962-), 女, 保安族, 甘肃省人, 副研究员, 博士在读, 研究方向: 动物病毒学和分子生物学。

在 30 余年的生产应用中, 国内外许多厂家纷纷将 C-株兔组织毒适应到各种原代和传代细胞上, 用以生产疫苗, 由于传代次数, 传代方式和宿主细胞种类等方面存在很大差别, 抗原漂变程度令人关注。近年来, 经常发生免疫失败或免疫无效现象, 有些地区和大型猪厂已将每头猪的免疫量提高至 3~4 头份剂量, 仍不能抵御野毒的感染, 烈性猪瘟又开始出现并呈区域性流行。

鉴于 C-株兔组织毒疫苗在国内外的重大影响和防制猪瘟中的重要作用及在早期使用的良好效果和近年来 C-株细胞毒疫苗在使用中时有发生的免疫失败现象, 我们对 C-株兔组织毒 E2 基因序列进行了分析, 并对 C-株(兔组织)毒、C-株(细胞)毒、国内流行野毒及 HCV-SM Alfort Brescia 等经典强毒株的中和抗原位点 A、B、C 三区的氨基酸进行了分析比较。

由于 C-株兔脾组织毒毒价低, 病毒难以提纯, 至今还没有人发表过 C-株兔脾组织毒的 E2 基因序列。本研究首次完成了 C-株兔脾毒的 E2 基因的克隆和序列测定, 通过与不同来源的 C-株毒 E2 基因的序列比较, 除达到正本清源之目的外, 还明确了一些淤积已久的疑问。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒: 在液氮中保存的出現典型定型热反应的兔脾(HCV1997.4/6481代)组织。引自中国兽药监察所。

1.1.2 所用试剂: RNA 提取试剂盒为 GIBCOBRL 公司产品; T 载体克隆试剂盒、反转录试剂、PCR 试剂、RNA 酶抑制剂、限制性内切酶均为 Promega 公司产品; DNA 纯化试剂盒为 Boehringer Mannheim 公司产品; DH5 α 大肠杆菌(*E. Coli*)为农牧大学军事兽医研究所病毒室保存。

1.1.3 有关仪器: 高速台式离心机为 Sigma 产品; PCR 仪、电泳仪、恒温箱、恒温摇床、紫外透射灯均购自国内有关公司。枪尖及移液枪、Eppendorf 管均为进口。

1.2 引物的设计和合成

根据 Brescia Alfort 和 C 株(SK6 细胞毒)核酸序列利用 Goldkey 软件, 设计 5 条引物。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。合成引物 5 条, 其中正链引物 3 条, 负链引物 2 条。引物序列、位置及长度见表 1。

表 1 引物编号、序列、位置及长度

Table 1 The code, sequence, position and length of the primers

编号 Code	序 列 Sequence	位置 Position	长度(nt) Length
1	4E 5' TATGTGTGTGTTAGACCAGACTGG3'	正链 2216~ 2240	24
2	W3 5' ACCACTGGCTCGCCTTTCAC3'	负链 3025~ 3005	20
3	W4 5' GAAGTGGTA/GAAG/AACCTTCAG3'	正链 2888~ 2908	20
4	W2 5' AGATTGGATCCCTGTAGACCAGCGGCGAGTTGTTCTG3'	负链 3577~ 3540	37
5	上 A 5' AACTGCAGCCAGGCACCATCTATCTT3'	负链 3799~ 3773	20

1.3 RT-PCR 全部程序参照^[8]所采用方法进行

用试剂盒进行异硫氰酸胍一步法提取总 RNA, 琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性。取所提 RNA 分别加下游引物进行反转录。以反转录产物作模板进行 PCR(一扩), 用一扩 PCR 产物

(稀释 50 倍)作模板再进行 PCR(二扩),见表 2。

表 2 RT-PCR 及 N-PCR 反应的引物模式和 2 个扩增片段的长度

Table 2 The primer model of RT-PCR and N-PCR reaction and the length of two amplified fragments

项目 Item	4E-W3	W2-W4
RT	上 A	上 A
PCR	4 E-上 A	4 E-上 A
N-PCR	4 E-W3	W4-W2
长度(bp) length(bp)	765	632

1.4 PCR 产物的酶切鉴定

分别用内切酶 Hinf I 和 BG I - II 切 4 E-W3 及 W4-W2。

1.5 PCR 产物的克隆与测序

用 Agarose Gel DNA extraction kit 纯化 PCR 产物,然后采用 pGEM-T 载体进行克隆。克隆后用 ABI PRISM 377 DNA SEQUENCER 对扩增片段进行序列测定。

2 结果

2.1 总 RNA 的提取鉴定 提取的总 RNA 经电泳可见 18 s 和 28 s 两条清晰的带,而且 28 s 带比 18 s 带要亮,表明 RNA 未降解。

2.2 RT-PCR 扩增 经套式扩增后,电泳扩增产物与 MARKER 比较,表明成功地扩出预计长度相符的交叉重叠的 DNA 片段,即 4 E-W3、W4-W2,长度分别为 765 bp 和 632 bp。(电泳图略)。

2.3 扩增片段的酶切鉴定 酶切物经电泳分析结果显示:4 E-W3、W4-W2、均切出预计大小的片段。(电泳图略)。

2.4 核苷酸序列测定 对提取的重组质粒经测定序列后,除去重叠部分,得到 1575 bp(4 E-W2)的 cDNA 核苷酸序列。

2.5 核苷酸序列与氨基酸序列分析 对完整的 E2 基因共 1113 个碱基及所编码的 371 个氨基酸(690-1060 氨基酸)进行了比较。结果为 C-株兔脾组织毒与 C-株 SK6 细胞毒、C-株细胞疫苗毒(HCLV-C)、HCV-SM 株、Brescia 株和 Alfort 株 E2 的核苷酸序列同源性分别为 98.87%、98.34%、94.58%、91.00%、80.78%;氨基酸同源性分别为:98.95%、97.37%、94.22%、91.60%、89.23%。

2.6 疏水性及抗原性预测的比较 在疏水性上 G-株与 C 株(SK6 细胞毒)没有变化,与 HCLV-C 只有一处不同。与其它三株有多处改变,抗原性预测也基本相同,C-株与 C 株(SK6 细胞毒)有很少的差异而与 HCLV-C 两处有差异,与其它三株多处不同。

2.7 中和性抗原区的氨基酸比较 在 A、B、C 三个中和性抗原区上,C-株毒与近期国内流行野毒及 HCV-SM 株、Brescia 株、Alfort 株在 A1-A2 亚区十分保守,而在 B、C 二区有多个氨基酸差异,见图 1。

A1-A2 区 (795-815Aa)

C 株 (兔脾) 毒 DTSPVVKGKYNTLLNGSAFY

C 株 (SK6) 毒 _____

HCLV-C 毒 _____

中国石门 毒 _____

吉林(80) 毒 _____

甘肃(97) 毒 _____

甘肃(98) 毒 -T _____

Brescia 毒 _____

Alfort 毒 _____ I _____

B 区 (691 723Aa)

C 株 (兔脾) 毒 LACKEDYRYAISSTDEIGLLGAGGLTTTWKEYN

C 株 (SK6) 毒 _____

HCLV-C 毒 _____

中国石门 毒 _____ N _____ S

吉林(80) 毒 _____ N _____ E _____ S

甘肃(97) 毒 _____ N _____ E _____ S

甘肃(98) 毒 -S _____ N _____ P _____ E _____

Brescia 毒 _____ H _____ T-N _____ H _____ E _____

Alfort 毒 _____ N _____ E _____ S

C 区 (691 800Aa)

C 株 (兔脾) 毒 LACKEDYRYAISSTDEIGLLGAGGLTTTWKEYNHDLQLNDGTVKASCVAGSFKVTALNVVSR

C 株 (SK6) 毒 _____

HCLV-C 毒 _____

中国石门 毒 _____ N _____ S _____ I _____

吉林(80) 毒 _____ N _____ E _____ S-G _____ I-I _____

甘肃(97) 毒 _____ N _____ E _____ S- _____ D _____ T-I _____

甘肃(98) 毒 -S _____ N _____ P _____ E _____ -G _____ D _____ R-I-T _____ I _____

Brescia 毒 _____ N _____ E _____ S-G _____ D _____ V-T _____

Alfort 毒 _____ H _____ T-N _____ H _____ E _____ N _____ D _____ I-M _____ C _____

C 株 (兔脾) 毒 YLASLHKKALPTSVTFELLDGNTNPSTEEMGDDFRSGLCPFDTSPPV

C 株 (SK6) 毒 _____

HCLV-C 毒 _____ I _____ E-L _____

中国石门 毒 _____ C-L-A _____ GF _____

吉林(80) 毒 _____ R _____ L _____ S-VI _____ GF _____

甘肃(97) 毒 _____ R _____ S-VI _____ GF _____

甘肃(98) 毒 _____ R _____ S-AI _____ GF _____ T _____

Brescia 毒 _____ R _____ -AI _____ D _____ GF _____ I _____

Alfort 毒 _____ D _____ S-L _____ GF _____ Y _____

图 1 C 株(兔)毒与另外八株毒 E2 基因 A、B、C 三个中和性抗原区的氨基酸比较

Fig. 1 Comparison of the amino acids of C-strain and the other eight strains in enutralized antigenic domains A, B and C of E2 gene

3 讨论

HCV 主要保护性抗原 E2 基因是中度可变区,其抗原结构分 A、B、C、D4 个区, A 区又分 A1、A2、A3 三个亚区^[9]。具中和作用的区为 B 区(691-723 氨基酸处)、C 区(691-800 氨基酸)和 A1、A2 相连亚区(795-815 氨基酸)。B、C 区为非保守, A1、A2 亚区为保守。本研究结果表明: C-株与 C-株被适应于 SK6 细胞的细胞毒在诱导产生中和抗体的 A、B、C 三个抗原区内无一氨基酸差异,在疏水性预测的结果上二者也完全一致。C-株与 C-株适应于犊牛睾丸细胞(国内现用疫苗, HCLV-C)的细胞毒有一些细微差异,在 C 区有三处氨基酸不同,尤其是在 785 处 C-株是中性甘氨酸而 HCLV-C 是酸性谷氨酸,在疏水性上仅有一处差异,说明 C-株兔组织毒适应于异种细胞后其抗原区的变异很小甚至没有变异,屡有发生的 C-株细胞毒疫苗免疫失败现象很可能并非由疫苗毒抗原基因漂变所致。

C-株与近期国内流行野毒及 HCV-SM 株、Brescia 株、Alfort 株在 A1-A2 区十分保守,而在 B、C 二区有多个氨基酸差异。中国经典强毒石门毒与 80 年代流行野毒(吉林)及 90 年代流行野毒(甘肃 97, 98)之间有多个氨基酸不同,表明国内猪瘟流行毒株发生了变化。

构成抗原区的氨基酸一级结构的变化将导致其疏水性和二级结构的改变,从而使它们在抗原性上也产生一定的差异,但其是否影响 HCV 的感染过程以及免疫应答还不能定论。但与 HCV 同属的 BVDV(牛病毒性腹泻病毒)正是由于其主要保护性抗原 gp53(在 HCV 中称 E2)的变化,致使该病毒能够逃脱宿主的免疫保护系统^[10]。本项研究成功地克隆并分析出了 C-株兔组织毒 E2 基因的序列,为进一步分析和研究 C-株疫苗毒与国内外流行毒株及经典毒株的遗传关系、抗原保护性差异以及 E2 基因的功能和应用打下了基础。

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, Warmordam 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] Stark R, Rumenapf G, Meyers, et al. Genomic localization of hog cholera virus glycoproteins [J]. *Virology*, 1990, 174: 286~ 289.
- [4] Van Rijn P A, Van Gennip H G P, Demeijer E J. Epitope mapping of envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus strain Brescia [J]. *Gen Virology*, 1993, 74: 2053~ 2060.
- [5] 赵启祖, 谢庆阁. 抗猪瘟基因工程研究 [J]. 兰州大学学报(自然科学版) 1994, 30(增刊), 169~ 170.
- [6] 李红卫, 涂长春, 吕宗吉, 等. 两个猪瘟病毒野毒株 gp55 基因抗原编码区序列的分析及比较 [J]. *中国病毒学*, 1997, 12(4): 354~ 357.
- [7] 刘湘涛, 赵启祖, 李忠润, 等. 猪瘟病毒和猪瘟的防制. 谢庆阁, 瞿中和主编. 畜禽重大疫病免疫防制研究进展 [M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1996, 52~ 63.
- [8] 韩雪清, 李红卫, 刘湘涛, 等. 中国猪瘟兔化弱毒兔脾组织毒部分基因序列分析 [J]. *中国兽医科技*, 1998, 28(6): 12~ 16.
- [9] 李红卫. 猪瘟病毒保护性抗原 E2 基因的克隆、序列分析及在大肠杆菌中的表达 [D]. 博士论文. 1997, 16~ 17.
- [10] Ridpath J F, et al. Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes [J]. *Virology*, 1994, 205: 66.

**SEQUENCE ANALYSIS OF MAJOR PROTECTIVE ANTIGEN E2(gp55)
GENE OF CHINESE HOG CHOLERA LAPINISED VIRUS DIRECTLY
FROM RABBIT SPLEEN TISSUE(C-STRAIN)**

Han Xueqing, Li Hongwei, Liu Xiangtao, Li Xiaobing, Ma Junwu, et al.
(Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy
of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046)

Abstract: The major protective antigen E2 gene of Chinese Hog Cholera Lapinised Virus(C-strain) directly from rabbit spleen tissue, was amplified by reverse transcription (RT) and nested-polymerase chain reaction(N-PCR) and successfully cloned, it's sequence was determined and compared with those of other virulent strains of HCV published natively or abroad. The result showed that, the nucleotide homologies of E2 gene of C-strain directly from rabbit spleen tissue with C strain(adapted to SK6 cell), C-strain(adapted to calf testicle cell, HCLV-C), HCV-SM strain(virulent strain Shimen), virulent strain Brescia(Netherlands) and virulent strain Alfort(Germany), were 98.87%, 98.34%, 94.58%, 91.00% and 80.78% respectively. The amino acid homologies were respectively 98.95%, 97.37%, 94.22%, 91.60% and 89.23%. In three neutralized antigenic domains A、B、C of E2 gene compared with the strain described aboved and epidemic virulent strain, there was very little difference or even no difference between C-strain from rabbit spleen and C-strain adapted to cells, while the difference between C-strain form rabbit spleen and epidemic virulent strain, classic virulent strain in B、C domains was great. Moreover compared with chinese classic virulent strain Shimen, there was great difference between our country's virulent strains in 1980s and those in 1990s, this showed that the epidemic virulent strains of hog cholera virus have changed in our country.

Key words: E2 gene; C-strain; Sequence analysis