

吴旭锦, 朱小甫. 猪瘟病毒 SXYL2006 株全基因组序列特征分析[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(1): 133-141.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2016.01.021

猪瘟病毒 SXYL2006 株全基因组序列特征分析

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: 为了对分离到的猪瘟流行毒株 SXYL2006 进行全基因组序列克隆分析, 揭示其遗传变异特征, 为猪瘟分子流行病学研究提供素材, 为猪瘟防控提供理论参考, 根据 GenBank 上发表的古典猪瘟 Shimen 毒株及 HCLV 株全基因组序列, 参考有关文献合成了 12 对引物, 应用 RT-PCR 技术, 从陕西省猪瘟流行毒株 SXYL2006 中成功扩增出了 11 段 cDNA, 测序后拼接得到全长 12 295 bp 全基因组序列, 提交 GenBank 获得登录号 GQ122383。将 SXYL2006 与参考毒株进行比较, 结果表明 SXYL2006 与毒株 39、ALD、Alfort187、Brescia、CAP、Glentorf、GPE、GXWZ02、HCLV、LPC、Paderborn、Riems 和 Shimen 核苷酸序列同源性分别为 88.2%、85.5%、85.4%、85.0%、85.1%、85.0%、85.2%、95.6%、84.4%、83.8%、94.8%、84.7% 和 85.1%, 氨基酸序列同源性分别为 94.2%、92.9%、92.9%、92.9%、92.1%、92.0%、92.5%、97.4%、91.6%、90.6%、97.5%、92.0% 和 92.5%。系统发生树分析结果表明 SXYL2006 与 GXWZ02 在进化上距离最近, 亲缘关系最为密切, 两者与德国流行毒株 Paderborn 同处于基因 II 群。与 HCLV 株相比, SXYL2006 株 E0 蛋白中, 具有 Rnase 活性的 2 个主要氨基酸序列没有发生任何变异; 在 E2 蛋白中, 与免疫逃逸相关的 5 个位点有 3 个发生变异; 已发现的 26 个 T 细胞表位中, 有 14 个表位 27 个氨基酸位点变异。SXYL2006 在遗传特性和抗原性上与经典强毒株 Shimen、疫苗毒株 HCLV 差异较大。

关键词: 猪瘟病毒; 全基因组; 序列分析; SXYL2006

中图分类号: S855.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)01-0133-09

Complete genome sequence analysis of classical swine fever virus strain SXYL2006

WU Xu-jin, ZHU Xiao-fu

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

Abstract: To clone and analyze the complete genome sequence of classical swine fever virus strain SXYL2006 and reveal the genetic variation and molecular epidemiology of classical swine fever, eleven cDNA segments were amplified from SXYL2006 by RT-PCR with 12 pairs of primers synthesized according to the genome sequences of classical swine fever strains Shimen and HCLV published in GenBank. After sequencing and splicing, a full-length 12 295-bp genome sequence was obtained (GenBank accession number GQ122383). Compared with reference strains 39, ALD, Alfort187, Brescia, CAP, Glentorf, GPE, GXWZ02, HCLV, LPC, Paderborn, Riems and Shimen, the nucleotide of SXYL 2006 shared homologies of 88.2%, 85.5%, 85.4%, 85.0%, 85.1%, 85.0%, 85.2%, 95.6%, 84.4%, 83.8%, 94.8%, 84.7% and

85.1%, respectively, and amino acid sequence shared 94.2%, 92.9%, 92.9%, 92.9%, 92.1%, 92.0%, 92.5%, 97.4%, 91.6%, 90.6%, 97.5%, 92.0% and 92.5% homologies, respectively. Phylogenetic tree analysis showed that SXYL2006 and GXWZ02 were the closest evolutionarily, and the two strains and German vir-

收稿日期: 2015-06-11

基金项目: 陕西省科学技术研究发展计划项目 (2014K02-06-03); 咸阳市科学技术研究计划项目 (2014K02-21)

作者简介: 吴旭锦 (1979-), 女, 陕西西安人, 博士, 副教授, 主要从事动物疫病分子病原学研究工作。(Tel) 029-33680108; (E-mail) yaoyuanwj@163.com

ulent strain Paderborn were classified into gene group II, compared with HCLV strains. There was no variation in the two major amino acid sequences with RNase activity in protein E0 encoded by SXYL2006. Three out of five sites related to immune escape in protein E2 mutated. There were 27 amino acid mutated sites in 14 out of 26 T cell epitopes. SXYL2006 differed from strains Shimen and HCLV in genetic characteristics and antigenicity.

Key words: swine fever virus; complete genome; sequence analysis; SXYL2006

猪瘟(Classical swine fever, CSF)是一种严重危害世界养猪业的烈性传染病, 中国农业部将其列为一类动物疫病。现已明确, 猪瘟的病原是猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV), 分类上属于黄病毒科、瘟病毒属。猪瘟病毒基因组为单股正链RNA, 长度约为12.3 kb, 仅含有1个大的开放阅读框(ORF), 编码1个含3 898个氨基酸残基的多聚前体蛋白, 其前体蛋白被加工成CSFV蛋白的顺序依次为N^{PRO}、C、E0、E1、E2、P7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B^[1-2]。在结构蛋白中, 只有E0和E2两种囊膜糖蛋白能够诱导机体产生中和抗体。E0蛋白是感染细胞后惟一可以分泌到细胞培养上清液中的糖蛋白, 并具有RNA酶活性, 对于病毒感染宿主细胞有重要意义^[3]。E2是CSFV的主要保护性抗原蛋白, 是猪瘟病毒研究的热点区域。随着分子生物学技术的飞速发展, 猪瘟病毒基因序列不断被上传到GenBank, 为猪瘟病毒致病机理研究、新型疫苗开发奠定了坚实的理论基础。1987年, Meyers等首先测定了Alfort株的基因组全序列, 随后在GenBank上相继发表了Brescia、GPE、ALD、Shimen和C株基因组全序列^[1,4-6]。这些研究结果揭示了CSFV在世界范围的流行变异情况, 推动了CSFV的致病机理、免疫机理研究, 为CSF的控制和扑灭提供了坚实的理论支撑。目前, 中国猪瘟仍时有发生, 免疫失败经常出现, 成为当前中国猪瘟防治中的一大难题。很多学者研究认为这一现象与CSFV遗传变异有关。本研究旨在通过CSFV流行毒株的基因序列测定与分析, 了解CSFV流行毒株的基因变异情况, 分析CSFV的遗传进化关系, 为CSF防治提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 病毒

脾脏和淋巴结于2006年采集自陕西省咸阳市杨陵区某一散养户发病猪, 猪瘟临床症状典型。病料研磨处理后12 000 r/min离心10 min, 取上清液加

青霉素和链霉素至300 IU/ml, 接种于ST细胞, 盲传3代收获病毒。采用本实验室建立的猪群疫病RT-PCR/PCR检测方法, 证实细胞液中仅含有猪瘟病毒, 无蓝耳病毒、伪狂犬病毒、圆环病毒、细小病毒、流行性腹泻病毒和传染性胃肠炎病毒, 将此猪瘟病毒命名为SXYL2006株, 置-70℃保存备用。

1.2 所用试剂

TRIzol LS Reagent为Invitrogen公司产品, AMV反转录酶(5 U/μl)、HPR I RNA酶抑制剂(40 U/μl)、DEPC处理水、*rTaq* DNA聚合酶(5 U/μl)、dNTP(2.5 mmol/L)、pGEM-T Easy载体克隆试剂盒为Promega公司产品, *EcoR* I (15 U/μl)限制性内切酶为TaKaRa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, DH5α大肠杆菌由本实验室保存。

1.3 引物的设计和合成

根据GenBank上发表的CSFV Shimen株(AF092448)及C株(AF531433)全基因序列, 参考文献[7]设计了12对引物, 分11个片段(A、B、C、D、E、F、G、H、I、J和K段)扩增CSFV全基因序列。引物均由生工生物工程(上海)有限公司合成, 序列位置及扩增长度见表1。

1.4 参考毒株

研究所用参考毒株信息见表2。

1.5 病毒总RNA的提取与反转录第一链cDNA的获得

分别取11份病毒传代细胞液, 每份250 μl用于提取总RNA, 参照TRIzol LS Reagent试剂说明进行总RNA的提取, 空气中自然干燥RNA。在核酸干燥过程中, 在冰上配制反转录反应液: DEPC处理水10.0 μl, dNTP 4.0 μl, 5×AMV Buffer 4.0 μl, 各段下游引物(I段采用巢式PCR扩增, 用IIR反转录)1.0 μl, AMV 0.5 μl, HPR I 0.5 μl, 总体积20.0 μl。核酸干燥后用反应液反复吹打核酸, 充分溶解后置42℃水浴进行反转录, 90 min后取出, -20℃保存备用。

表 1 引物名称、序列、位置及长度

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

引物名称	碱基序列(5'→3')	相对 Shimen 株位置	扩增长度(bp)
AF	TATACGAGGTTAGCTCGTCCTCG	1~23	1 110
AR	TTCTTCCTAGATTCTGGTGCT	1 110~1 090	
BF	ATAGCCCCAAAAGAGCATGA	944~963	1 555
BR	GCCCTATCGCATTGGTTGATGA	2 498~2 477	
CF	GACCAGATTGGTGGCCGTATGAAAC	2 229~2 253	1 329
CR	CAGCGGCGAGTTGTTCTGTTAGAAC	3 557~3 533	
DF	CACGAGTGTGTTGATTGGCAAC	3 199~3 219	1 545
DR	CAGCGGACCATTACTTCATT	4 743~4 724	
EF	CACCATGTTGCCATTGATC	4 450~4 468	1 135
ER	TGATGCTGTCACACAGGTGAA	5 584~5 564	
FF	CATCAGTTCAGTGGACCATGT	5 329~5 349	1 276
FR	CGTCACTATGAAGGGCATCTT	6 604~6 584	
GF	TTACATCGCAGTCCCCTTACGTGGT	6 460~6 484	1 425
GR	CTAAAGCCGGTTCAACTATCTTGAC	7 883~7 858	
HF	GCGACTTACACATACAAAAGCTGGA	7 820~7 844	1 317
HR	TGTGTAAGCCAGCCAGTTGTAAC	9 136~9 113	
I1F	GGTTCATTTCTCTGCAGAAATAAATTC	8 661~8 687	2 077
I1R	TCAGGCGGTCCAGTCATCATT	10 737~10 721	
I2F	CTTATGACTTATCCCTTCACAACC	9 024~9 047	1 401
I2R	CCCTTATGCTTGATGGAAGTTGG	10 424~10 401	
JF	CCTGAGGACCAAACACATGTGAACC	10 240~10 265	1 349
JR	TCAGTGGGTTCAGGACTACATCAG	11 586~11 564	
KF	ACGGAAGGGGACAAGATGAAAGTG	11 350~11 373	948
KR	GGGCCGTAAATTACCTTAGTC	12 297~12 273	

表 2 猪瘟疫病毒参考毒株基本信息

Table 2 The basic information of classical swine fever virus reference strains

毒株名称	GenBank 登录号	序列长 (bp)	分离时间	国家	毒力
39	AF407399	12 297	—	中国	流行毒株
ALD	D49532	12 298	1964	日本	流行毒株
Alfort187	X87939	12 298	1968	法国	中等毒力毒株
Brescia	AF091661	12 297	1945	意大利	强毒株
CAP	X96550	12 297	1996	瑞士	—
Glentorf	U45478	12 278	1968	德国	流行毒株
GPE	D49533	12 298	—	日本	疫苗株
GXWZ02	AY367767	12 296	2002	中国	流行毒株
HCLV	AF531433	12 310	1954	中国	疫苗株
LPC	AF352565	12 344	1950	中国台湾	疫苗株
Paderborn	AY072924	12 229	1997	德国	流行毒株
Riems	AY259122	12 289	—	德国	疫苗株
Shimen	AF092448	12 298	1945	中国	强毒株

1.6 各 cDNA 片段的 PCR 扩增

取各段第一链 cDNA 4.0 μl 作为模板进行 PCR 反应,反应体系中其他成分为:超纯水 34.0 μl , $10\times$ PCR Buffer 5.0 μl , dNTP 4.0 μl , 各段上下游引物各 1.0 μl (25.0 $\mu\text{mol/L}$), *rTaq* DNA 聚合酶 1.0 μl , 总体积 50.0 μl 。其中 A、C、D、E、F、H 及 K 段 PCR 条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 50 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,共 35 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。B、G 及 J 段 PCR 条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 50 s,53 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,共 35 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。I 段采用巢式 PCR 进行扩增,第 1 次扩增引物为 I1F/I1R,PCR 条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 50 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 120 s,共 35 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min;第 2 次扩增引物为 I2F/I2R,取第 1 次 PCR 扩增产物 2.0 μl 作为模板,PCR 条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 50 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,共 35 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。反应完毕后取 5.0 μl PCR 产物于 15 g/L 琼脂糖凝胶中电泳,凝胶成像系统中观察照相。

1.7 各段 PCR 产物的回收、克隆及测序

PCR 产物纯化按照 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒说明进行。回收产物与 pGEM-T Easy 载体连接,转化 DH5 α 感受态细胞,经 Amp、IPTG、X-gal 筛选,挑取白色单个菌落,37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 摇动培养至饱和,菌液 PCR 鉴定为阳性,提取质粒,*EcoR* I 酶切鉴定,阳性质粒由生工生物工程(上海)有限公司进行测序。

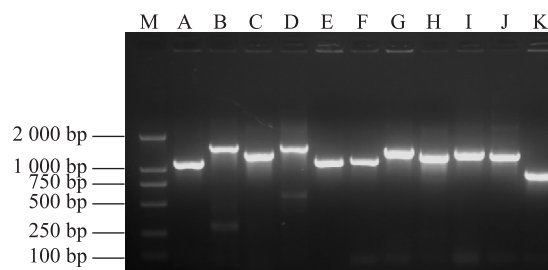
1.8 流行毒株全基因序列的拼接和比较分析

用 DNASTar 软件对测得的 SXYL2006 流行毒株各段序列进行拼接,将拼接完成的 SXYL2006 株全基因组序列提交 GenBank,并与 CSFV 参考毒株进行核苷酸序列、氨基酸序列比较,绘制系统进化树。

2 结果

2.1 SXYL2006 株各片段 PCR 结果

SXYL2006 株 A、B、C、D、E、F、G、H、I、J 和 K 段这 11 个片段预期长度分别为 1 109 bp、1 555 bp、1 329 bp、1 545 bp、1 135 bp、1 276 bp、1 425 bp、1 317 bp、1 401 bp、1 349 bp 和 948 bp。从图 1 可见这 11 个片段与预期的大小相符合,说明 RT-PCR 扩增成功。



M: DL2000 DNA 分子质量标准;A~K: 全基因各段 PCR 产物。

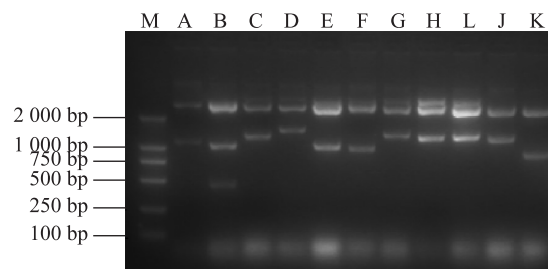
图 1 CSFV 基因各段 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig.1 The profiling of PCR products of CSFV gene

2.2 SXYL2006 株 11 个片段重组阳性质粒酶切鉴定结果

将 11 个 PCR 片段与 pGEM-T Easy 载体连接构建 SXYL2006 株 11 个阳性质粒。为了验证重组质粒目的片段插入的正确性,选用 pGEM-T Easy 载体上的 *EcoR* I 限制性内切酶酶切位点进行单酶切鉴定,结果见图 2。

从图 2 可以看出,这 11 个阳性质粒均被 *EcoR* I 限制性内切酶切成载体条带和目的条带,其中 A、C、D、E、F、G、H、I、J 和 K 段重组质粒被切成 2 个条带,即载体条带和目的条带;只有 B 段重组质粒被切成 3 个条带,1 个载体条带,2 个目的条带。根据测序分析结果,B 段中存在 *EcoR* I 酶切位点 GAATTC,因此 B 段被切为 1 078 bp 和 477 bp 2 个片段。



M: DL2000 DNA 分子质量标准;A~K: 全基因各段 PCR 产物。

图 2 SXYL2006 株 11 个片段重组阳性质粒酶切电泳结果

Fig.2 The enzymatic digestion of 11 recombinant plasmids of SXYL2006

2.3 SXYL2006 株全基因序列

利用 DNASTar 软件对各段序列进行拼接,剔除重叠部分序列以及引物序列(引物 AF 和 KR 序列除外),得到 SXYL2006 株全基因组序列,全长 12 295 bp,5' UTR 长 372 bp,3' UTR 长 226 bp;ORF 长 11 697 bp,编码 3 898 个氨基酸。将全基因序列提

交 GenBank, 获得登录号 GQ122383。

2.4 SXYL2006 株全基因组序列的比较分析

将 SXYL2006 株全基因组序列与 13 株古典猪瘟病毒参考毒株 39、ALD、Alfort187、Brescia、CAP、Glentorf、GPE、GXWZ02、HCLV、LPC、Paderborn、Riems 和 Shimen 全基因组核苷酸序列与 ORF 编码氨基酸序列进行比较, 结果见表 3。

从表 3 中可知, SXYL2006 株与 GXWZ02 株同源性最高(为 95.6%), 与 Paderborn 同源性次之(为 94.8%), 与 HCLV、LPC 和 Shimen 的同源性分别为 84.4%、83.8%和 84.7%, 与其他参考毒株 39、ALD、

Alfort187、Brescia、CAP、Glentorf、GPE 和 Riems 的同源性分别为 88.2%、85.5%、85.4%、85.0%、85.1%、85.0%、85.2%和 85.1%。比较 ORF 推导氨基酸序列, SXYL2006 株与 Paderborn 同源性最高(为 97.5%), 与 GXWZ02 同源性次之(为 97.4%), 与 LPC 株的同源性最低(为 90.6%), 与疫苗 HCLV 株的同源性仅为 91.6%, 与其他参考毒株 39、ALD、Alfort187、Brescia、CAP、Glentorf、GPE、Riems 和 Shimen 株的同源性分别为 94.2%、92.9%、92.9%、92.9%、92.1%、92.0%、92.5%、92.0%和 92.5%。

表 3 SXYL2006 株与 13 株参考毒株序列的同源性
Table 3 The homology between SXYL2006 and 13 reference strains

毒株	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1		90.2	90.2	89.8	89.6	89.3	89.9	88.5	88.7	88.0	88.5	88.8	90.5	88.2
2	95.3		98.6	97.1	97.4	97.2	98.2	85.7	96.0	94.7	85.5	96.2	97.6	85.5
3	95.3	99.4		97.2	97.6	97.5	99.2	85.6	95.7	94.4	85.5	96.0	97.8	85.4
4	95.3	98.7	98.7		96.4	96.2	96.7	85.7	94.8	93.7	85.1	95.2	96.9	85.0
5	94.6	98.2	98.4	97.7		99.5	97.2	85.4	95.0	93.7	85.6	95.4	97.0	85.1
6	94.4	98.1	98.3	97.6	99.4		97.1	85.3	95.1	93.7	85.1	95.3	96.9	85.0
7	95.0	98.8	99.2	98.2	97.8	97.7		85.4	95.3	94.1	85.2	95.6	97.3	85.2
8	94.2	93.0	93.0	93.1	92.3	92.3	92.6		84.6	84.3	94.8	84.8	85.4	95.6
9	93.9	97.3	97.2	96.8	96.3	96.2	96.8	91.7		95.1	84.3	98.7	95.3	84.4
10	92.6	95.8	95.9	95.4	94.9	94.9	95.4	90.6	96.2		83.6	95.1	93.6	83.8
11	94.8	93.8	93.7	93.7	93.0	92.9	93.4	97.7	92.5	91.2		85.0	85.7	94.8
12	94.4	97.7	97.7	97.2	96.7	96.6	97.3	92.1	98.9	96.7	92.8		95.5	84.7
13	95.2	98.6	98.5	98.3	97.6	97.5	98.0	92.6	96.8	95.2	93.4	97.1		85.1
14	94.2	92.9	92.9	92.9	92.1	92.0	92.5	97.4	91.6	90.6	97.5	92.0	92.5	

注: 右上角为核苷酸序列同源性(%), 左下角为氨基酸序列同源性(%). 毒株 1~14 分别代表 39、ALD、Alfort187、Brescia、CAP、Glentorf、GPE、GXWZ02、HCLV、LPC、Paderborn、Riems、Shimen 和 SXYL2006 株。

2.5 SXYL2006 株系统进化树

利用 MEGA 软件绘制 SXYL2006 株系统进化树(图 3), 参考毒株包括上述 13 个参考毒株、欧盟猪瘟参考实验室亚型已知的 CSFV 参考毒株(GenBank 登录号 AJ781111, Subgroup1.2; GenBank 登录号 AY450284, Subgroup2.1; GenBank 登录号 L36167, Subgroup2.2; GenBank 登录号 L36170, Subgroup2.3; GenBank 登录号 AF521708, Subgroup3.2; GenBank 登录号 AF24169, Subgroup3.3; GenBank 登录号 AY526731, Subgroup3.4), 以及 11 株陕西省 2015 年登录的参考毒株(KM233874~KM233884)。从图 3 可

见, SXYL2006 与 KM233874~KM233884 这 11 株陕西省近年测定的 CSFV 毒株序列亲缘关系密切, 共同形成一个小的进化分支。从基因分群上看, SXYL2006 属于基因Ⅱ群。而 39、ALD、Alfort187、Brescia、CAP、Glentorf、GPE、HCLV、LPC、Riems 和 Shimen 共 11 株同处于基因Ⅰ群, 这些毒株均是上个世纪 50~80 年代分离的代表性毒株, 属于经典毒株。

2.6 SXYL2006 株分段基因比较

将 SXYL2006 株与中国参考毒株 Shimen、HCLV 的各段编码结构蛋白和非结构蛋白基因进行核苷酸和氨基酸序列比较, 结果见表 4。

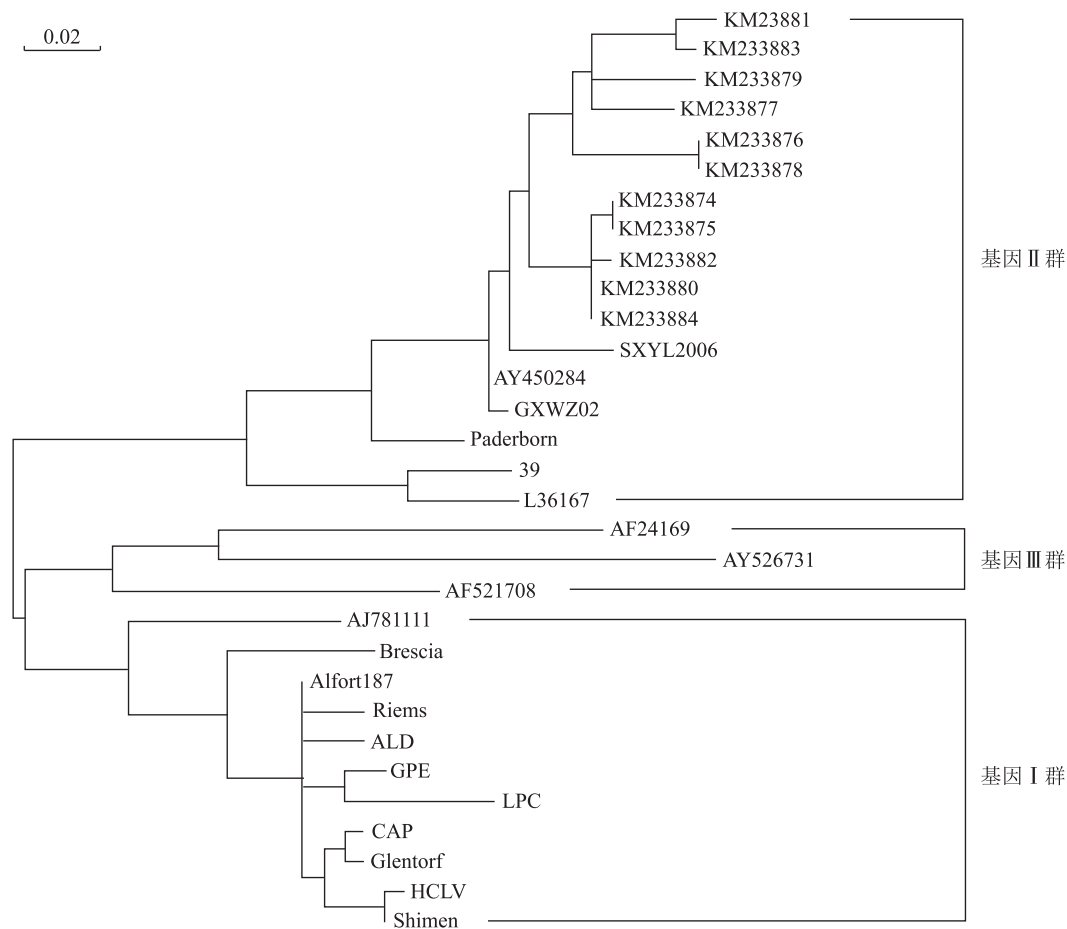


图 3 猪瘟疫病毒系统进化树
Fig.3 Phylogenetic tree of CSFV strains

表 4 SXYL2006 与中国参考毒株基因分段比较
Table 4 The nucleotide sequence homology and amino acid sequence homology between SXYL2006 and Chinese reference strains

比对序列	各分段基因核苷酸序列及编码的氨基酸序列同源性 (%)											
	<i>N^{PRO}</i>	<i>C</i>	<i>E0</i>	<i>E1</i>	<i>E2</i>	<i>P7</i>	<i>NS2</i>	<i>NS3</i>	<i>NS4A</i>	<i>NS4B</i>	<i>NS5A</i>	<i>NS5B</i>
SXYL2006/Shimen	86.3	84.5	82.4	81.9	82.0	76.0	81.8	86.4	84.9	87.4	83.0	83.1
SXYL2006/HCLV	84.3	83.8	80.9	82.1	80.3	78.1	81.8	85.3	87.0	86.0	81.1	83.1
SXYL2006/Shimen	93.5	91.9	89.4	92.8	89.8	89.1	90.5	98.4	98.4	96.3	86.6	91.8
SXYL2006/HCLV	93.5	90.9	87.7	89.7	88.5	89.1	90.5	97.1	96.9	94.5	85.3	92.3

上两行为核苷酸序列同源性(%),下两行为推导氨基酸序列同源性(%).

2.7 T 细胞表位比较分析

Ishikawa 等^[8]人工合成了 573 条 15 肽片段,这些多肽覆盖了 Glentorf 株 82%CSFV ORF 编码基因,经过实验确定了其中 26 个 T 细胞表位。在表 5 中列出了 HCLV 株的这 26 个 T 细胞表位氨基酸序列及 SXYL2006 株相应的变异位点。

3 讨论

猪瘟是世界上最为重要的猪群疫病之一,各国对猪瘟的防控均极为重视,学者们致力于研究猪瘟病原、流行病学、诊断技术与疫苗开发等各个方面,并取得了丰硕成果^[12-15]。中国于 1954 年研制成功猪瘟兔化弱毒疫苗,为中国乃至世界许多国家控制、

表 5 SXYL2006 株 T 细胞表位的变异位点
Table 5 Mutation sites on T cell epitopes of SXYL2006

位置	定位基因	氨基酸序列 (HCLV 株)	SXYL2006 变异位点
381-395	<i>E0</i>	CRYDKDADINVTQA	DA→NT; I→V
406-420	<i>E0</i>	KKGKNFSFAGTVIES	E→D
566-580	<i>E1</i>	TASALYLILHYVIPQ	A→T; V→A
651-665	<i>E1</i>	TRVWNSASTIAFLIC	I→T
661-675	<i>E1</i>	AFLICLIKVLRGQIV	V→T; I→V
666-680	<i>E1</i>	LIKVLRGQIVQG V VW	V→T; I→V; VV→II
696-710	<i>E2</i>	DYRYAISSTNEIGLL	L→P
736-750	<i>E2</i>	ICVAGSFKVTALNVV	V→T; VT→AI
806-820	<i>E2</i>	TTLLNGSAFYLVCP	
996-1010	<i>E2</i>	YEPRDSYFQQYMLKG	
1001-1015	<i>E2</i>	SYFQQYMLKGEYQYW	
1296-1310	<i>NS2-3</i>	ALILILPTYELTKLY	A→T; T→A
1366-1380	<i>NS2-3</i>	KAILISC V SNKWQFI	V→I; F→L
1431-1445	<i>NS2-3</i>	KKFFLLSSRVKELII	F→Y; I→V
1446-1460	<i>NS2-3</i>	KHKVRNEVMVRWFGD	MV→VA
1476-1490	<i>NS2-3</i>	ATLSKNKH C ILCTVC	
1676-1690	<i>NS2-3</i>	VVCQSNKMTDESEY	
2031-2045	<i>NS2-3</i>	SQSPYVVVATNAIES	
2186-2200	<i>NS2-3</i>	EPIQLAYNSYETQVP	
2271-2285	<i>NS2-3-NS4A</i>	GLSTAENALLVALFG	
2276-2290	<i>NS4A</i>	ENALLVALFGYVGYQ	
2281-2295	<i>NS4A</i>	VALFGYVGYQ A LSKR	
2346-2360	<i>NS4B</i>	EAMTNYAREGIQFMK	M→V
2676-2690	<i>NS4B-NS5A</i>	SEGK V RQLSSNYILE	V→I
2681-2695	<i>NS4B-NS5A</i>	RQLSSNYILELLYKF	
2801-2815	<i>NS5A</i>	VELYYKGATIKLDFN	

扑灭猪瘟做出了杰出贡献^[11]。到目前为止,中国虽然没有出现猪瘟大规模流行,但点状散发、小范围流行一直没有停止,距离扑灭猪瘟仍然遥远。为找出根源,许多学者从不同角度进行探讨,其中对病原进行研究是方向之一。有人认为,中国长期采取疫苗接种为主的防控策略,在猪群抗体的压力下,猪瘟病毒发生了逃避疫苗免疫的变异,许多研究结果亦支持这一观点^[12-13]。在 CSFV 序列分析上,多数变异集中在 *E0*、*E2* 基因上,但流行毒株全基因资料缺乏^[14-15]。本研究分离了陕西省 1 株猪瘟流行毒株 SXYL2006,并通过分段测序、拼接,获得了全基因序

列,提交 GenBank,获得登录号 GQ122383。

猪瘟病毒基因组全长约 12 300 bp,分段扩增能大大降低难度。扩增长度最好不超过 1 600 bp,超过这个长度用 *rTaq* 酶扩增难度很大。另外,合适长度的 PCR 产物与 pGEM-T Easy 载体连接的效率较高,有利于阳性菌落的筛选。在 I 段的扩增中,起初用 IF2/IR2 引物对扩增,经过多次不同条件的摸索都不能扩增出目的片段,之后合成了 IF1/IR1 引物,进行套式 PCR,大大提高了反应的灵敏度,成功扩增出了 1 401 bp 的目的片段。此外,A 段用 AF/AR 扩增时目的条带很弱,回收困难,最终解决问题的方

法:将 AF/BR 作为 1 对引物,用 BR 反转录的 cDNA 做模板,进行第 1 次 PCR 扩增,条件为 95 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 50 s,54 ℃ 60 s,72 ℃ 90 s,35 个循环,最后 72 ℃ 延伸 10 min,取第 1 次扩增产物 2.0 μl 作为模板,再用 AF/AR 引物对进行第 2 次扩增,得到了 1 110 bp 的目的片段。因此,在全基因组的克隆测序时,对于难以扩增或扩增效率不高的片段,可以考虑通过合成或组合引物对进行巢式或半巢式 PCR,可大大提高反应的灵敏度,得到高质量的 PCR 产物。

序列分析结果表明,SXYL2006 株与中国经典强毒株 Shimen、疫苗毒株 HCLV 核苷酸序列同源性分别仅为 84.4% 和 84.7%,与中国广西地区近年的流行毒株 GXWZ02 的同源性为 95.6%,与上述 3 株氨基酸序列同源性分别为 92.5%、91.6% 和 97.4%,提示流行毒株与上世纪经典毒株亲缘关系较远,变异较明显,与疫苗毒株同样差异较大,这一结论同国内许多研究结果一致。

基因分段比较发现,*E0*、*E2*、*P7*、*NS2* 和 *NS5A* 基因变异较大,尤其是 SXYL2006 株中这几个基因和 HCLV 株的同源性分别只有 80.9%、80.3%、78.1%、81.8% 和 81.1%;相对而言,*N^{PRO}*、*C*、*NS3*、*NS4A* 和 *NS4B* 这几个基因同源性较高,提示这几个基因相对保守。从氨基酸水平来讲,*N^{PRO}*、*C*、*NS2*、*NS3*、*NS4A*、*NS4B* 和 *NS5B* 这几个蛋白质变异较小。需要指出的是 SXYL2006 和 HCLV 相比,*P7* 基因核苷酸序列同源性只有 78.1%,但是氨基酸序列同源性却高达 89.1%,*NS2* 核苷酸序列同源性为 81.8%,氨基酸序列同源性却为 90.5%,提示 *P7* 和 *NS2* 基因核苷酸变异多为同义变异。

在 CSFV 结构蛋白中,*E0*、*E2* 为 CSFV 的囊膜糖蛋白,对病毒感染宿主细胞、免疫识别都有重要意义。有研究表明,*E0* 蛋白具有 RNA 酶活性,通过对 C 株的 *E0* 基因突变分析,发现 *E0* 蛋白 RNA 酶活性消失后的突变重组株会使宿主细胞产生病变,并诱导细胞凋亡,提示 *E0* 可能是病毒能持续存在于天然宿主体内的原因^[16-18]。序列分析结果表明,SXYL2006 株与 HCLV 株相比,*E0* 基因的核苷酸序列同源性为 80.9%,氨基酸同源性为 87.7%,SXYL2006 的 *E0* 基因变异较大。*E0* 蛋白中具有 Rnase 活性的主要氨基酸基序为 SLHGIWPE 和 EWNKHGWC,在推导的氨基酸序列中分别位于第 295~302

位和第 342~349 位^[17]。SXYL2006 的 *E0* 蛋白这 2 个重要区域没有发生任何变异,尤其是对于 Rnase 活性所必需的 297 位和 346 位的 H,均没有发生任何变化,这与刘湘涛等^[14]、王琴等^[19]的研究结果相同。*E0* 氨基酸序列中,第 302 位的氨基酸均为 E,但参考毒株 LPC、HCLV 和 Rimes 第 302 位均为 G,这 3 株都是弱毒疫苗株,这一变化对 Rnase 活性有何影响尚不清楚。

SXYL2006 株与 HCLV 株相比,*E2* 基因核苷酸序列同源性为 80.3%,氨基酸序列同源性为 88.5%,变异较大。Van Rijin 等^[20]的研究结果表明在 *E2* 蛋白质的 B 区和 C 区内 705 位、710 位、713 位、729 位、734 位等位点的氨基酸变异会导致流行毒株发生免疫逃逸,这 5 个位点在 HCLV 株中分别为 N、L、G、N 和 K,SXYL2006 株中 713 位发生 G→E 变异,729 位发生 N→D 变异,734 位发生 K→R 变异。这些位点的变异对疫苗株免疫保护力的影响,需要进一步研究。

在 CSFV 的免疫中细胞免疫发挥着重要作用,尤其是细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL),在抵抗 CSFV 感染上具有重要意义。T 细胞的活化过程中,需要 T 细胞抗原受体(TCR)识别抗原递呈细胞表面的 MHC/抗原肽复合物;而 B 细胞要活化成为分泌抗体的浆细胞,需要活化的 Th 细胞辅助并需 Th 细胞识别 B 细胞递呈的 MHC/抗原肽。在 26 个 T 细胞表位中,相对于 HCLV 株而言,SXYL2006 株有 14 个表位 27 个氨基酸位点变异。Elisenda 等^[8]进一步的研究结果表明位于非结构蛋白 NS2-3 中 1 446~1 460 位是一个细胞毒性 T 细胞表位,在这个表位上 SXYL2006 株 1 454~1 455 位的 MV 变异为 VA。这些位点的变异可能会对 CSFV 疫苗株的免疫保护力存在一定影响。

参考文献:

- [1] 李文良,毛立,杨蕾蕾,等.猪瘟疫病毒糖基化 E2 蛋白和 E0 蛋白的协同免疫保护作用[J].江苏农业学报,2015,31(2):357-361.
- [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] 赵永前,左建新,孙华伟,等.某规模猪场猪瘟疫抗体水平的监测与分析[J].江苏农业科学,2015,43(11):299-300.
- [4] MOORMANN R J M, WARMERDAM 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.
- [5] 覃 军, 梁珠民, 李军成. 规模化猪场主要疫病抗体监测与免疫效果分析[J]. *江苏农业科学*, 2015, 43(10): 264-266.
- [6] RUMENAPF T, UNGER G, STRAUSS J H, et al. Processing of the envelope glycoprotein of pestivirus[J]. *Journal of Virology*, 1993, 67: 3288-3294.
- [7] RUGGLI N, TRATSCHIN J, MITTELHOLZER C, et al. Nucleotide sequence of classical swine fever virus strain Alfort187 and transcription of infectious RNA from stably cloned full-length cDNA[J]. *J Virol*, 1996, 6: 3478-3487.
- [8] ISHIKAWA K, NAGAI H, KATAYAMA K, et al. Comparison of the entire nucleotide and deduced aminoacids equences of the attenuated hog cholera vaccine strain GPE and the wild type parental strain ALD[J]. *Archivrol*, 1995, 140: 1385-1391.
- [9] MOORMANN R J M, VAN GEN H G P, MIEDEMA G K W, et al. Infectious RNA transcribed from on engineered full-length cDNA template of the genome of apestivirus[J]. *J Virol*, 1996, 2: 736-770.
- [10] 吴旭锦, 朱小甫, 朱 辉. 1 株山东猪瘟疫流行毒株全基因组克隆与序列分析[J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2009, 37(11): 7-12.
- [11] ELISENDA A, KARL-HEINZ W, DANIEL W, et al. Identification of T-cell epitopes in the structural and non-structural proteins of classical swine fever virus[J]. *Journal of General Virology*, 2002, 83: 551-560.
- [12] 赵永前, 孙华伟, 何孔旺, 等. 后备母猪入群前的抗体筛查在某规模化猪场的应用[J]. *江苏农业科学*, 2015, 43(12): 249-250.
- [13] 涂长春. 猪瘟疫国际流行态势、我国现状及防制对策[J]. *中国农业科学*, 2003, 36(8): 955-960.
- [14] 刘金凤, 吴健敏, 覃绍敏, 等. 抗猪瘟疫病毒单链抗体基因的构建及其推导的蛋白质三级结构的分子模拟[J]. *江苏农业学报*, 2015, 31(4): 817-823.
- [15] KADEN V, LANGE E, STEYER H. Does multiple oral vaccination of wild boar against classical swine fever (CSF) have a positive influence on the immunity? [J]. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 2004, 111(2): 63-67.
- [16] 仇华吉, 童光志, 沈荣显. 猪瘟疫免疫弱毒疫苗--半个世纪的回顾[J]. *中国农业科学*, 2005, 38(8): 1675-1685.
- [17] 王 琴, 王在时, 赵 耘, 等. 12 株猪瘟疫病毒 E2 基因主要抗原区域的序列差异分析[J]. *微生物学报*, 2000, 40(6): 614-621.
- [18] 吴显实, 罗廷荣, 廖素环, 等. 广西猪瘟疫流行毒株全基因组的克隆与序列分析[J]. *中国兽医学报*, 2005, 25(2): 125-127.
- [19] 刘湘涛, 韩雪清, 刘伯华, 等. 猪瘟疫流行野毒 E^{ms} 基因的序列分析[J]. *中国农业科学*, 2000, 33(4): 75-81.
- [20] 赵 耘, 王在时, 王 琴, 等. 22 株猪瘟疫病毒 E2 基因部分编码序列的序列分析[J]. *微生物学通报*, 2001, 28(5): 42-48.
- [21] HULST M M, PANOTO F E, HOEKMAN A, et al. Inactivation of the Rnase activity of glycoprotein E^{ms} of classical swinefever virus in a cytopathogenic virus[J]. *J Virol*, 1998, 72(1): 151-157.
- [22] MEYERS G, SAALMULLER A, BUTTNER M. Mutations abrogating the Rnase activity in glycoprotein E^{ms} of the pestivirus classical swine fever virus lead to virus attenuation[J]. *J Virol*, 1999, 73(12): 10224-10235.
- [23] IQBAL M, FLICK-SMITH H, MCCAULEY J W. Interaction of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E^{ms} with cell surface glycosaminoglycans[J]. *J Gen Virol*, 2000, 81: 451-459.
- [24] 王 琴, 宁宜宝, 王在时, 等. 猪瘟疫病毒流行株与疫苗株 E^{ms} 基因的序列分析[J]. *中国农业科学*, 2004, 37(3): 446-452.
- [25] VAN RIJIN P A. Antigen structure of envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus [J]. *Journal of General Virology*, 1994, 68: 3934-3942.

(责任编辑: 张震林)