

22株猪霍乱病毒E2基因部分编码序列的序列分析*

赵耘 王在时 王琴 李博 丘惠深

(中国兽药监察所 北京 100081)

摘要: 利用 RT-PCR 方法获得了 13 株猪霍乱病毒分离株、石门系强毒、中国 C 株及法国温度敏感株 Thiverval 株的 E2 基因部分编码序列的扩增片段, 并对其进行了测序, 得到了 251bp 的 E2 基因部分编码序列。利用 DNASTar 软件对其中 224bp 的片段进行了序列分析, 并与已发表的 Alfort、Brescia 等毒株进行比较, 结果 13 株猪霍乱分离株所测片段均为猪霍乱病毒 E2 基因的序列, 与石门系强毒的序列相比所有毒株的碱基替换随机地分布于整个序列, 无碱基缺失和碱基插入。其中变化较大的区域位于序列的 3' 端。22 株 HCV E2 基因部分编码序列的核苷酸及氨基酸同源性范围分别为: 78.1% ~ 100%、78.4% ~ 100%, 其中 13 株猪霍乱病毒流行毒株的核苷酸及氨基酸同源性范围分别为: 78.1% ~ 100%、78.4% ~ 100%, 4 株 70 ~ 80 年代分离的毒株的核苷酸及氨基酸同源性范围分别为: 79.0% ~ 88.3%、81.1% ~ 87.8%, 9 株 90 年代分离的毒株的核苷酸及氨基酸同源性范围分别为: 80.8% ~ 100%、83.8% ~ 100%; 说明猪霍乱病毒流行株的变异呈现一定的多样性。

关键词: 猪霍乱病毒, 序列分析, 同源性, 变异

中图分类号: S852.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 05-0042-07

SEQUENCE ANALYSIS OF THE PARTICAL CODING SEQUENCE OF E2 GENE OF 22 HOG CHOLERA VIRUS STRAINS

ZHAO Yun WANG Zai-Shi WANG Qin LI Bo QIU Hui-Shen

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081)

Abstracts: The partical coding sequence of E2 gene of 13 Hog Cholera Virus (HCV) field isolates, Shimen strain, Chinese vaccine strain (C strain) and Thiverval strain attenuated by low temperature in France, were obtained by reverse transcriptase -polymerease chain reation (RT-PCR) and sequenced. All size were 251bp. The obtained 224bp sequences were analysed by DNA star and compared with the previously published sequences of Alfort strain, Brescia strain and other references strains. The results showed that those sequencing fragments of 13 HCV field strains were the sequence of E2 gene of HCV. Compared with Shimen strain, the base substitute of all stains were randomly distributed in the entire sequence, and had not base insert and base gap. The variation most occurred at 3' end. The identity of nucleotide sequence and amino acid sequence of 22 HCV strains were 78.1% ~ 100%、78.4% ~ 100%. The identity of nucleotide sequence and amino acid sequence of 13 HCV field strains were 78.1% ~ 100%、78.4% ~ 100%. The identity of nucleotide sequence and amino acid sequence of 4 HCV field strains isolated in the 1970s - 1980s were 79.0% ~ 88.3%、81.1% ~ 87.8%. The identity of nucleotide sequence and amino acid sequence of 9 HCV field strains isolated in the 1990s were 80.8% ~ 100%、83.8% ~ 100% respectively. This paper showed that the genetic variation of HCV was diversity.

key words: Hog Cholera Virus (HCV), Sequence Analysis, Identity, Variation

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39893290-1-2)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 39893290-1-2)

收稿日期: 2000-05-09, 修回日期: 2001-1-15

猪瘟 (Hog Cholera, HC) 是猪的一种由猪瘟病毒 (Hog Cholera Virus, HCV) 引起的高度接触性传染病, 其特征是小血管的变性所导致的内脏器官中的多发性出血、坏死和梗塞。近几年猪瘟的流行特点发生了重大变化, 以温和型猪瘟和母猪持续感染引起的流产、死胎、新生仔猪死亡为主。HCV 属于黄病毒科 (Flaviviridae), 瘟病毒属 (Pestivirus), 是单股正链的 RNA 病毒, 约 1.23×10^4 kb, 含一个大的读码框, 由 11 个编码结构蛋白和非结构蛋白的基因组成。E2 基因编码的是 HCV 的 gp55 囊膜糖蛋白, 该蛋白参与病毒感染细胞的过程及激活中和抗体产生, HCV 的中和性表位都在 gp55 糖蛋白上, 因而 E2 在 HCV 的研究中倍受重视。已经证明在 E2 分子上存在 4 个独特的抗原结构域 A、B、C、D。其中 A 包括 3 个亚抗原结构域 A1、A2、A3。A1 与 A2 在猪瘟病毒中最为保守, A3、B、C、D 具有一定的可变性。A、B、C 对诱导中和抗体具有重要意义^[1]。本文旨在利用 RT-PCR 方法, 对我所近期分离的猪瘟流行毒株的 E2 基因部分编码区段进行扩增和测序, 并对其序列进行分析, 为揭示我国猪瘟流行的多样性、变异性及其生态分布规律奠定必要的理论基础, 这对了解我国猪瘟流行病学特点及猪瘟在我国的防制具有十分重要的意义。

1 材料与方法

1.1 病毒

HCV SM 株 (HCVSM/97) 细胞毒由中国兽药监察所繁殖、鉴定; HCV C 株 (HCLV/99) 细胞毒由广东生药厂提供; HCV 法国 Thiverval 株细胞毒由中国兽药监察所繁殖、鉴定和保存; 共收集 HCV 流行毒株 13 株, 编号分别为: SCCD1/79 (四川); HeNZZ1/82 (郑州); LN1/84 (辽宁); SZGM1/85 (深圳); GDGZ1/95 (广东); HeB-HH1/95 (河北); HeBHH2/95 (河北); BJCY1/96 (北京); BJSY2/96 (北京); BJTX3/96 (北京); HeNXH2/98 (河南); JL1/94 (吉林); GXBH1/98 (广西)。其中 GDGZ1/95、HeBHH1/95、BJCY1/96、BJSY2/96、BJTX3/96 为细胞毒, 由本所分离鉴定; JL1/94、GXBH1/98 由长春兽大分离鉴定, 本所进行了细胞和本动物传代; 其它均为血毒。

1.2 病毒的直接荧光抗体 (HCFA) 鉴定

将可疑病料抹片或制成乳剂接种 PK-15 细胞, 随后用 HCFA 检测。

1.3 细胞毒的纯化

参照丘惠深等^[2]的方法进行, 取冻融 3 次的 HCV 细胞培养物, 8 000r/min 4℃ 离心 30min, 去沉淀。上清中加入终浓度为 7% 的 PEG6000 及 0.3mol/L 的 NaCl, 4℃ ~ 8℃ 缓慢搅拌过夜。8 000r/min 4℃ 离心 30min, 去上清。沉淀用 0.05mol/L 的 TEN 悬浮, 4℃ 缓慢搅拌 5h, 8 000r/min 4℃ 离心 30min, 上清即为粗提病毒。

1.4 病毒 RNA 的提取

取 HCFA 检测阳性的提取病毒 RNA, 方法参照 Gibco 公司 TRIZOL 试剂的说明书进行。取粗提病毒或血毒 200 μ L 于洁净的 Eppendorf 管中, 加入 1mL TRIZOL 试剂, 充分混匀, 室温静置 5 ~ 10min。加入 200 μ L 氯仿, 充分混匀, 室温静置 2 ~ 5min。12, 000 \times g 4℃ 15min, 取水相于另一洁净的 Eppendorf 管中, 加入 500 μ L 异丙醇, 室温沉淀 10min, 12, 000 \times g 4℃ 10min。弃上清, 加入 75% 的乙醇, 悬起沉淀, 12 000 \times g 4℃ 8min, 弃上清, 沉淀于超净台无菌干燥, 最后用 20 μ L DEPC 处理的双蒸水悬浮, 加入 1 μ L RNasin。

1.5 引物的设计与合成

根据 Alfort 和 Brescia 株核酸序列设计而成, 引物设计时考虑到氨基酸对框。由大连宝生物工程公司合成。引物的序列如下:

PZD1 5'tc (ga) (at) caaccaa (tc) gagataggg 3

PZD2 5'cacag (ct) cc (ag) aa (tc) cc (ag) aagtcac 3

1.6 反转录合成 cDNA

在 0.5mL 的离心管中加入上述提取的总 RNA 10 μ L, 再加入下游引物 (PZD2) 1.5 μ L (0.2 μ g/ μ L), 65 $^{\circ}$ C 预热 10min, 冰浴 2min, 然后与下面的几种溶液混合: 5 倍的反转录缓冲液 4 μ L, 100mmol/L DDT 2 μ L, 10mmol/L dNTPs 1 μ L, Scrip II 反转录酶 (200u/ μ L) 1 μ L, RNasin 0.5 μ L, 42 $^{\circ}$ C 60min, 70 $^{\circ}$ C 15min, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.7 PCR 扩增及测序

在 0.5mL 的离心管中加入上述反转录产物 7 μ L, 加入 33 μ L 双蒸水, 98 $^{\circ}$ C 5min, 冰浴 2min, 然后与下面的几种溶液混合: 10 倍的 PCR 缓冲液 5 μ L, 上下游引物各 1 μ L (0.2 μ g/ μ L), 10mmol/L dNTPs 2 μ L, Taq DNA 聚合酶 (2.5u/ μ L) 1 μ L, 再加入灭酶的液体石蜡 100 μ L, 放置 PCR 仪中扩增。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 50s, 58 $^{\circ}$ C 60s, 72 $^{\circ}$ C 35s, 40 个循环, 然后 72 $^{\circ}$ C 5min, 4 $^{\circ}$ C 60min, 取 5~8 μ L 扩增产物于 1.5% 的琼脂糖凝胶上进行电泳, 片段大小合适者利用 Promega 公司的 PCR 纯化试剂盒进行纯化, 然后送百灵克公司测序。

1.8 序列分析

利用序列分析软件 DNASTar 对 E2 基因部分编码序列进行分析, 并与猪瘟病毒标准强毒 Alfort 株^[3]、Brescia 株^[4]、Ald 株及弱毒株 Gpe 株、Thiverval 株、C 株进行同源性比较。

2 结果

2.1 22 株 HCV E2 基因部分编码序列的核苷酸序列及推导的氨基酸序列分析

2.1.1 22 株 HCV E2 基因部分编码序列的核苷酸序列分析: 用 RT-PCR 获得 13 株猪瘟病毒流行毒株、石门系强毒、中国 C 株及法国 Thiverval 株共 16 株 E2 基因部分编码序列的扩增片段, 并完成了测序, 均获得了 251bp 的 E2 基因部分编码序列 (图略), 利用 DNASTar 软件对其中 224bp 的片段进行了序列分析, 并与已发表的 Alfort^[3]、Brescia^[4] 等毒株的序列进行比较, 结果见图 1。从图 1 可以看出与石门系强毒的序列相比所有毒株的碱基替换随机的分布于整个序列, 无碱基缺失和碱基插入。其中变化较大的区域位于序列的 3 端。

2.1.2 推导的 22 株 HCV E2 基因部分编码序列的氨基酸序列比较: 根据所测的核苷酸序列推导出氨基酸序列, 并与标准毒株进行了比较, 结果见图 2。推导的氨基酸序列长 75 个氨基酸, 氨基酸差异主要分布于 5 个区域: 1-5aa、15-21aa、22-24aa、53-56aa 及 66-75aa, 所有毒株与石门系强毒相比均无氨基酸的缺失和插入。

2.2 22 株 HCV E2 基因部分编码序列的核苷酸序列及氨基酸序列的同源性比较

2.2.1 22 株 HCV E2 基因部分编码序列的核苷酸序列的同源性比较: 利用 DNASTar 软件分析了 22 株 HCV E2 基因的核苷酸部分编码序列, 结果见表 1。从表 1 可以看出 22 株 HCV E2 基因部分编码序列的核苷酸同源性范围为: 78.1% ~ 100%, 其中 13 株猪瘟病

1CTACTCGGGCCGGAGGTCTCACTACCACCTGGAAAGAATACAGCCACGATTGCAACTGTATGACGGGACCCTT	HCVSM/97. seq
1.....C.....A.....A.....A.....	Ald. seq
1..G..G..C..T..A.....C..T.....G.....G.....G..C.....A.....	Alfort. seq
1.....AT.....A.....A.....A.....G.....T.....C.....	Brescia. seq
1.....T.....C.....G.....A.....A.....	HCLV/99. seq
1.....T.....C.....G.....A.....A.....	c. seq
1.....G.....C.....G.....A.....	cw. seq
1.....C.....A.....C.....A.....	Gpe. seq
1.....C.....A.....A.....A.....	hiverval. seq
1.CG..A.....T..A.....C.....A.....G.....G.....G..C.....C.....	SCCD1/79. seq
1.....A.....A.....A.....A.....	HeNZ1/82. seq
1..G..A.....T..A.....C..T..A.....G.....T..G.....G.....G.....C.....	LN1/84. seq
1.CG..A.....T..A.....C..C.....T..G.....G.....G.....A.....	SEGM1/85. seq
1..G..G.....T..A.....C.....C..T..G.....T..G.....G.....A.....	JL1/94. seq
1.....T.....C.....G.....A.....A.....	HeBHH1/95. seq
1..G..G.....T..A.....C.....C..T..G.....T..G.....G.....A.....	HeBHH2/95. seq
1.....A.....A.....A.....	GDGZ1/95. seq
1.....A.....A.....A.....	BJTX3/96. seq
1.....T.....C.....G.....A.....A.....	BJSY2/96. seq
1.....T.....C.....G.....A.....A.....	BJCY1/96. seq
1..G..G.....T..A.....C..T..A.....A.....T..G.....G.....A.....	GXBH1/98. seq
1.....T.....C.....A.....A.....A.....	HeNXH2/98. seq
76AAGGCCATTGCGTGGCAGGTTCCTTTAAGTACACAGCACTTAATGTGGTCACTAGGAGGTATTGGCATCATTTG	HCVSM/97. seq
76.....G..C.....ACT.....G.....C.....T.....C..A.....	Ald. seq
76.....C..A.....T.....C.....A.....	Alfort. seq
76.....G.....G.....G.....	Brescia. seq
76.....G.....G.....	HCLV/99. seq
76.....G.....G.....	c. seq
76.....G.....G.....	cw. seq
76.....G.....G.....	Gpe. seq
76.....ACT.....G..T.....T..T.....C.....T.....CC.....A.....	Thivervalseq
76.....ACT.....G..T.....T..T.....C.....T.....CC.....A.....	SCCD1/79. seq
76.....A..T.....G..T.....A.....T.....CC..A.....	HeNZ1/82. seq
76.....TACT.....G.....A.....A.....C..A..T.....	LN1/84. seq
76.....A..T.....G..T.....C.....T.....A.....CC..A.....	SEGM1/85. seq
76.....G.....A..T.....G..T.....C.....T.....A.....CC..A.....G.....	JL1/94. seq
76.....A..T.....G..T.....C.....T.....A.....CC..A.....G.....	HeBHH1/95. seq
76.....A..T.....G..T.....C.....T.....A.....CC..A.....G.....	HeBHH2/95. seq
76.....G.....G.....G.....	GDGZ1/95. seq
76.....G.....G.....G.....	BJTX3/96. seq
76.....G.....G.....G.....	BJSY2/96. seq
76.....A..T.....G..T.....G.....C.....T.....CC..A.....G.....	BJCY1/96. seq
76.....G.....A..T.....G..T.....G.....C.....T.....CC..A.....G.....	GXBH1/98. seq
76.....G.....A..T.....G..T.....G.....C.....T.....CC..A.....G.....	HeNXH2/98. seq
151CATAGGGGGCTTACTCACTTCCGTGACATTGAGCTCCTGTTTCGACGGGACCAACCCATCAACCGAAGAAAT	HCVSM/97. seq
151.....A.....C.....T.....T..G.....	Ald. seq
151..C..A.....C..C..C..A.....T.....A..T.....G.....T.....G..G.....	Alfort. seq
151.....AC.....C.....C.....G.....T..G.....G.....	Brescia. seq
151.....AA.....C.....T..G.....	HCLV/99. seq
151.....AA.....C.....T..G.....	c. seq
151.....A.....C.....T.....T.....	cw. seq
151.....A.....C.....T.....T.....	Gpe. seq
151.....A.....C.....G.....T..T.....A.....CT..CTATTTC.....A.....	Thiverval. seq
151..C..A.....G..C..C..A.....T..A.....A..T..T.....G.....G.....T..T..GTAG.....	SCCD1/79. seq
151.....A.....C.....C.....A.....G.....	HeNZ1/82. seq
151.....A.....C.....C.....AAG.....T..A.....T..A.....T..C.....G.....GTCTTAAG.....TTCC.....	LN1/84. seq
151.....A.....C.....CT.....A.....T..A.....A..T.....G.....GT..CTT..GAG..T.....	SEGM1/85. seq
151.....A.....C.....C.....A.....T..A.....T..A.....T..T.....G.....GT.....TT.....	JL1/94. seq
151.....AA.....C.....C.....T.....G.....	HeBHH1/95. seq
151.....A.....C.....C.....C..A.....T..A.....T..A.....T..T.....G.....GT.....TT..TTC..G..C.....	HeBHH2/95. seq
151.....G.....G.....G.....	GDGZ1/95. seq
151.....G.....G.....G.....	BJTX3/96. seq
151.....AA.....C.....T.....G.....	BJSY2/96. seq
151.....A.....C.....C.....C..A.....T..A.....T..A.....T.....G.....GT.....TT.....	BJCY1/96. seq
151.....A.....C.....C.....C..A.....T..A.....T..A.....T.....G.....GT.....TT.....	GXBH1/98. seq
151.....AA.....C.....C.....T.....G.....	HeNXH2/98. seq

图1 22株猪霍乱病毒E2基因的部分编码序列的核苷酸序列比较

毒流行毒株的核苷酸同源性范围为：78.1%~100%，4株70~80年代分离的毒株的核苷酸同源性范围为：79.0%~88.3%，9株90年代分离的毒株的核苷酸同源性范围为：80.8%~100%；与石门系强毒（HCVSM/97）及C株（HCLV/99）的核苷酸序列相比所有毒株核苷酸同源性范围分别为：79.0%~99.1%和78.1%~100%，其中4株70~80

LGAGGLTTWKEYSHDLQLYDGYVKAICVAGSFKVYALNVVSRRYLASLHKGALLT#VTFELLFDGNTNPSTEEI	HCVSM/97.seq
.....N.....N.....E.S	Ald.seq
.....K.....G.....D.....V.T.....R.P.....AI	Alfort.seq
.....H.E.....N.N.....D.....M.....D.P.....S.L	Brescia.seq
.....N.....N.....S.....K.P	HCLV/99.seq
.....N.....N.....S.....K.P	c.seq
.....Q.....N.....L	cw.seq
.....N.....N.....R.P	Gpe.seq
.....N.....N.....E.P.....A.....F.K.LLFSN	Thiverval.seq
P.....E.....N.G.....D.....T.....I.....R.P.....S.AIGR	SCCD1/79.seq
.....N.....	HeNZE1/82.seq
.....E.....G.G.....D.....I.....R.P.....R.....A.....S.VLRVP	LN1/84.seq
P.....E.....P.....G.....E.....T.....V.....R.SP.....S.VL.RS	SEGM1/85.seq
.....E.....G.....N.....I.....K.....R.P.....S.VI	JL1/94.seq
.....N.....N.....S.....K.P	HeBHH1/95.seq
.....E.....G.....N.....I.....K.....R.P.....S.VIVQT	HeBHH2/95.seq
.....N.....	GDGZ1/95.seq
.....N.....	BJTX3/96.seq
.....N.....N.....S.....K.P	BJSY2/96.seq
.....E.....G.....N.....I.....R.P.....S.VI	BJCY1/96.seq
.....N.....N.....S.....K.P	GXBH1/98.seq
.....N.....N.....S.....K.P	HeNKH2/98.seq

图 2 由 HCV E2 基因部分编码序列推导的氨基酸序列比较

年代分离的毒株的核苷酸同源性范围分别为：79.0% ~ 99.1% 和 78.1% ~ 94.2%，9 株 90 年代分离的毒株的核苷酸同源性范围分别为：81.9% ~ 99.1% 和 80.8% ~ 100%；与 Alfort 株（法国）及 Brescia 株（意大利）的核苷酸序列相比所有毒株核苷酸同源性范围分别为：79.9% ~ 89.8% 和 79.0% ~ 91.1%，其中 4 株 70 ~ 80 年代分离的毒株的核苷酸同源性范围分别为：84.8% ~ 87.4% 和 79.0% ~ 90.6%，9 株 90 年代分离的毒株的核苷酸同源性范围分别为：83.0% ~ 9.8% 和 79.9% ~ 91.1%。

2.2.2 推导的 22 株 HCV E2 基因部分编码序列的氨基酸序列的同源性比较：比较结果见表 1。从表 1 可以看出 22 株 HCV E2 基因部分编码序列的氨基酸同源性范围为：78.4% ~ 100%，其中 13 株猪瘟疫病毒流行毒株的核苷酸同源性范围为：78.4% ~ 100%，4 株 70 ~ 80 年代分离的毒株的氨基酸同源性范围为：81.1% ~ 87.8%，9 株 90 年代分离的毒株的氨基酸同源性范围为：83.8% ~ 100%；与石门系强毒（HCVSM/97）及 C 株（HCLV/99）的氨基酸序列相比所有毒株的氨基酸同源性范围分别为：81.1% ~ 98.6% 和 79.7% ~ 100%，其中 4 株 70 ~ 80 年代分离的毒株的氨基酸同源性范围分别为：81.1% ~ 98.6% 和 79.7% ~ 94.6%，9 株 90 年代分离的毒株的氨基酸同源性范围分别为：83.8% ~ 98.6% 和 83.8% ~ 100%；与 Alfort 株（法国）及 Brescia 株（意大利）的氨基酸序列相比所有毒株的氨基酸同源性范围分别为：81.1% ~ 93.1% 和 82.4% ~ 89.2%，其中 4 株 70 ~ 80 年代分离的毒株的氨基酸同源性范围分别为：86.5% ~ 90.5% 和 82.4% ~ 86.5%，9 株 90 年代分离的毒株的氨基酸同源性范围分别为：87.5% ~ 93.1% 和 85.1% ~ 88.9%。

3 讨论

HCV E2 基因所编码的囊膜糖蛋白 gp55 已证明是 HCV 的主要结构蛋白，其能诱导机体的保护性反应，并参与病毒感染细胞的过程^[1]。RNA 病毒具有变异性强的特点，主要原因是 RNA 聚合酶缺乏校正能力，HCV 也已证明有同样的特点^[1-4]。E2 基因即是 HCV 基因组中较易变异的部分，本研究中利用 RT-PCR 方法调取的 HCV E2 基因部分编码序列就是位于 E2 基因中的高变区，这一段序列包括 HCV E2 基因的 B、C 抗原区，其

表 1 22 株猪瘟病毒 E2 基因部分编码序列的核苷酸及氨基酸序列同源性比较

核苷酸同源性	氨基酸同源性																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1	96.4	84.4	84.4	91.1	94.2	95.1	98.2	96.0	90.6	80.6	99.1	79.0	81.6	81.9	94.2	80.4	99.1	99.1	94.2	99.1	82.4	94.2
2	94.6	85.1	83.9	90.6	96.0	96.9	95.5	96.9	91.5	81.5	96.4	78.1	83.0	82.4	96.0	80.8	96.4	96.4	96.0	96.4	82.9	96.0
3	87.8	85.1	83.0	83.0	83.0	83.9	83.5	84.4	79.9	87.4	84.8	85.7	87.4	89.4	83.0	87.9	84.8	84.8	83.0	84.8	89.8	83.0
4	86.5	86.5	87.8	87.8	91.1	91.1	90.6	90.2	86.2	81.5	90.6	79.0	80.3	81.5	91.1	79.9	90.6	90.6	91.1	90.6	81.9	91.1
5	93.2	94.6	87.8	87.8	100.	99.1	93.3	96.4	90.2	81.5	94.2	78.1	81.2	82.4	100.	80.8	94.2	100.	94.2	100.	82.9	100.
6	95.9	93.2	86.5	87.8	91.9	91.9	94.2	95.1	90.6	79.7	98.2	79.5	81.6	82.4	99.1	80.8	95.1	95.1	99.1	95.1	82.9	99.1
7	94.6	95.9	89.2	89.2	97.3	97.3	93.2	86.5	89.1	82.0	96.0	78.6	82.5	82.9	96.4	81.2	96.0	96.0	96.4	96.0	83.3	96.4
8	81.1	87.8	81.1	83.8	87.8	87.8	86.5	89.1	91.1	79.7	90.6	78.6	80.7	81.5	90.2	79.9	90.6	90.6	90.2	90.6	81.9	90.2
9	85.1	87.8	81.1	83.8	87.8	87.8	86.5	89.1	91.1	79.7	90.6	78.6	80.7	81.5	90.2	79.9	90.6	90.6	90.2	90.6	81.9	90.2
10	81.1	81.1	81.1	86.5	82.4	82.4	79.7	85.1	81.1	81.1	80.2	86.5	88.3	89.8	81.5	88.3	80.2	80.2	81.5	80.2	89.4	81.5
11	98.6	95.9	87.8	86.5	94.6	94.6	97.3	95.9	86.5	81.1	81.1	79.0	84.3	82.4	94.2	81.2	100.	100.	94.2	100.	82.9	94.2
12	81.1	81.1	86.5	85.1	81.1	81.1	79.7	82.4	82.4	86.5	81.1	85.1	84.3	87.0	81.2	84.8	81.2	81.2	81.2	81.2	87.5	81.2
13	81.1	81.1	86.5	85.1	81.1	81.1	79.7	82.4	82.4	86.5	81.1	85.1	84.3	87.0	81.2	84.8	81.2	81.2	81.2	81.2	87.5	81.2
14	86.1	84.7	91.7	87.5	86.1	86.1	86.1	88.9	84.7	90.3	87.5	91.7	88.9	86.1	86.1	80.8	82.4	82.4	82.4	82.4	97.2	82.4
15	93.2	94.6	89.2	85.1	83.8	83.8	83.8	86.5	82.4	87.8	85.1	89.2	86.5	86.5	82.4	87.8	82.4	82.4	82.4	82.4	82.9	100.
16	83.8	82.4	89.2	85.1	83.8	83.8	83.8	86.5	82.4	87.8	85.1	89.2	86.5	86.5	82.4	87.8	82.4	82.4	82.4	82.4	82.9	100.
17	98.6	95.9	87.8	86.5	94.6	94.6	97.3	95.9	86.5	81.1	100.	81.1	81.1	81.1	87.5	94.6	85.1	85.1	80.8	81.2	97.2	80.8
18	98.6	95.9	87.8	86.5	94.6	94.6	97.3	95.9	86.5	81.1	100.	81.1	81.1	81.1	87.5	94.6	85.1	85.1	80.8	81.2	97.2	80.8
19	93.2	94.6	87.8	87.8	100.	100.	91.9	97.3	87.8	82.4	94.6	81.1	79.7	86.1	100.	83.8	94.6	94.6	94.2	100.	82.9	94.2
20	98.6	95.9	87.8	86.5	94.6	94.6	97.3	95.9	86.5	81.1	100.	81.1	81.1	81.1	87.5	94.6	85.1	85.1	80.8	81.2	97.2	80.8
21	87.5	86.1	93.1	88.9	87.5	87.5	87.5	90.3	86.1	91.7	88.9	93.1	90.3	98.6	87.9	98.6	88.9	88.9	87.5	88.9	87.5	82.9
22	93.2	94.6	87.8	87.8	100.	100.	91.9	97.3	87.8	82.4	94.6	81.1	79.7	86.1	100.	83.8	94.6	94.6	94.6	100.	82.9	94.2

1 HCVSM/97.seq, 2 Ald.seq, 3 Alfort.seq, 4 Brescia.seq, 5 HCLV/99.seq, 6 c.seq, 7 cv.seq, 8 Gpe.seq, 9 Therval.seq, 10 SCCD1/79.seq,

11 HeNZ1/82.seq, 12 LNI/84.seq, 13 SZGM1/85.seq, 14 JLI/94.seq, 15 HeBHH1/95.seq, 16 HeBHH2/95.seq, 17 GDGZ1/95.seq, 18 BFTX3/96.seq,

19 BJSY2/96.seq, 20 BJCE1/96.seq, 21 GBHH1/98seq, 22 HeNXH2/98.seq

是病毒的主要中和抗原区^[1]，本研究的目的旨在对这一段序列进行比较和分析，以找出猪瘟病毒流行毒株间的变异规律，为猪瘟的防制提供必要的理论基础。

已经证明 HCV E2 基因 N 端一侧的抗原区是非保守区，其中氨基酸序列变异较大的

区域大约在 702-742 氨基酸残基之间。本研究的目的片段包括这段高变区, 从图 1 可以看出与石门系强毒相比 E2 基因核苷酸变化较大区域为: 2-6bp、12-14bp、24-30bp、44-50bp、82-90bp、138-144bp、163-178bp、184-199bp、204-224bp, 相应氨基酸变化较大的几个区域是: 1-5aa、15-21aa、22-24aa、53-56aa 及 66-74aa。在氨基酸序列中前 3 个变化较大区域即是位于 E2 基因的高变区内。Van Rijn 等证明在 B、C 区域中 705、710、713、729 和 734 等位点氨基酸的变异将导致毒株逃脱与特定单抗的免疫反应。本研究目的片段包括除 705 位点以外的其它位点。与 Brescia 株相比, 734 位点所有毒株均无变化; 710 位点变化为 His→Leu, 22 株流行毒株完全一样; 713 位点变化为: 22 株中有 14 株毒株 Glu→Gly, 14 株毒株包括 7 株流行毒株及石门系强毒和 C 株; 729 位点变化为 Asp→Asn、Glu、Tyr, 大多数流行毒株呈现 Asp→Asn 的变化, 只有 szgm85 株表现 Asp→Glu 的变化, 石门系强毒 (HCVSM/97) 表现 Asp→Tyr 的变化, 这些变化与 Van Rijn 所报道的略有不同, 其是否也能引起抗原性的变化尚有待于进一步的探讨。E2 基因所编码的氨基酸序列中共包括 15 个半胱氨酸残基 (Cys), 其数量及位置具有一定的保守性, 而本研究的目的片段上只包括 1 个 Cys, 其在 22 个毒株上的位置完全相同。

石门系强毒是我国 40 年代分离的强毒株, 本研究分别对 70~80 年代分离的毒株及 90 年代分离的毒株与其进行了比较, 结果 4 株 70~80 年代分离的毒株与其核苷酸及氨基酸的同源性分别为: 79%~99.1%、81.1%~98.6%; 9 株 90 年代分离的毒株的核苷酸及氨基酸同源性范围分别为: 81.9%~99.1%、83.8%~98.6%, 其与前者相差不大。同时从表 1 可以看到 70~80 年代分离的 HeNZZ1/82 株及 90 年代分离的 GDGZ1/95、BJTX3/96 和 BJCY1/96 与石门株核苷酸同源性达到 99.1%, 氨基酸同源性达到 98.6%, 说明即使在高变区猪瘟病毒的变异在某种程度上仍然呈现一定的稳定性。

猪瘟兔化弱毒 C 株是我国 50 年代培育成功用于猪瘟免疫的疫苗株, 其对我国猪瘟的防制起了很重要的作用。本文分别对 70~80 年代分离毒株及 90 年代分离的毒株与 C 株进行了比较, 结果 4 株 70~80 年代分离的毒株与其核苷酸及氨基酸的同源性分别为: 78.1%~94.2%、79.7%~94.6%; 而 9 株 90 年代分离的毒株的核苷酸及氨基酸同源性范围分别为: 80.8%~100%、83.8%~100%。从表 1 可以看到在 90 年代分离的毒株中有 3 株 (HeBHH1/95 株 GHBH1/98 株、HeNXH2/98 株) 与 C 株的核苷酸及氨基酸的同源性均为 100%。从而说明猪瘟病毒流行株的变异呈现一定的多样性, 并不仅向远离疫苗株的方向变异。这个结果与李红卫等、韩雪清等的结果有一定的差异, 其原因有待于进一步分析探讨。

参 考 文 献

- [1] Stark R, Rummenapf G, Meyer, *et al.* Virology, 1990, 174: 286~289.
- [2] 丘惠深, 王在时, 郎洪武, 等. 畜禽重大疫病免疫防制研究进展. 北京: 中国农业科技出版社, 1997, 105.
- [3] Meyers G, Rummenapf T, Thiel H J, *et al.* Virology, 1989, 171: 555~567.
- [4] Moormann R J M, Warnerdam P A M, Van Der Meer B, *et al.* Virology, 1990, 177: 184~198.
- [5] 韩雪清, 刘湘涛, 赵启祖, 等. 中国兽医科技, 1999, 6 (29): 3~6.
- [6] 李红卫, 涂长春, 金扩世, 等. 畜禽重大疫病免疫防制研究进展. 北京: 中国农业出版社, 1997: 22~26.