

部分地区猪传染性胃肠炎病毒株 ORF7 基因的序列分析

满朝来¹, 于晓龙²

(1. 哈尔滨师范大学 生命科学与技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150025; 2. 黑龙江省农业科学院 畜牧研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:猪传染性胃肠炎(Porcine Transmissible Gastroenteritis, TGE)是猪的一种高度接触性肠道疾病。以不同地区猪传染性胃肠炎病毒株的 ORF7 基因为靶序列, 序列分析不同地区 TGEV 病毒株 ORF7 基因的同源性和进化性关系, 序列分析包括同源性比较、进化树分析和碱基替换分析等。结果表明: ORF7 基因在 TGEV 不同毒株间高度保守, 但 ORF7 基因存在腺嘌呤碱基(A)向胸腺嘧啶(T)突变的倾向。通过对 TGEV ORF7 基因核苷酸序列分析可为深入研究 TGEV 的毒力变化和流行病学提供参考。

关键词:猪; 传染性胃肠炎病毒; ORF7 基因; 序列分析

中图分类号: S852.65⁺1

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2011)08-0041-03

猪传染性胃肠炎病毒(Transmissible Gastroenteritis virus of swine, TGEV)属冠状病毒属成员, 可导致猪传染性胃肠炎(Transmissible Gastroenteritis, TGE), 该病是猪的一种急性高度接触性传染病。各种年龄都可发病, 2 周龄以内仔猪病死率高达 100%, 5 周龄以上的死亡率很低, 成年猪几乎没有死亡^[1-2]。在北半球, 特别是 N30° 以北的温带至寒带地区均有分布^[3]。从 20 世纪 60 年代末期, 我国就有了关于此病的报道, 近年来疫区更为扩大, 并与猪轮状病毒、猪流行性腹泻混合感染, 给养猪业造成严重的经济损失。TGEV 的 ORF7 基因位于病毒基因组的 3' 端, 在 TGEV 感染细胞中检测到了 ORF7 编码 9.1 ku 的疏水蛋白, 它可与 mRNA 翻译的合成肽血清发生反应, 是属于冠状病毒族特异性基因。当病毒感染细胞并与细胞吸附时, 该蛋白分子定位于内质网和细胞外膜, 促进其插入细胞膜内。该蛋白分子最后定位于细胞核, 其作用可能是为了 TGEV 在动物体内克服宿主抵抗或影响细胞的分裂周期, 进而影响病毒的致病性, 所以 ORF7

基因在防治 TGEV 疾病中可能具有重要功能^[4-6]。现通过分析国内外不同地区代表性 TGEV 病毒株 ORF7 基因序列, 应用同源性比较和进化性分析等生物信息学方法, 获得 TGEV ORF7 基因的遗传和进化规律, 以期对预防和控制 TGEV 感染提供指导和参考。

1 材料与方法

1.1 不同区域 TGEV 病毒 ORF7 基因的获得

分别从 Genbank 数据库查找获得国内外不同地区代表性 TGEV 毒株 ORF7 基因全长编码序列(见表 1)。

表 1 供试 TGEV 病毒株

毒株名	分离地区	Genbank 收录编号
H16	黑龙江省	FJ755618
TH-98	黑龙江省	AY337931
DAE	韩国	EF100897
133	韩国	EF100896
KT2-H	韩国	EF100895
KT2-L	韩国	EF100894
96-1933	英国	AF104420
SC-1	四川省	DQ437507
SC-Y	四川	DQ437506

1.2 同源性分析

利用 DNAMAN 软件, 对获得不同地区 TGEV 毒株 ORF7 基因进行核苷酸序列和氨基酸序列同源性比较分析。

1.3 遗传进化性分析

利用 Lasergene 和 CLUSTAL X 2.0 软件, 分别对不同地区 TGEV 毒株 ORF7 基因核苷酸

收稿日期: 2011-05-24

基金项目: 黑龙江省自然科学基金重点资助项目(ZJN0602-02)

第一作者简介: 满朝来(1976-), 男, 满族, 黑龙江省双城市人, 博士, 讲师, 从事细胞与病毒分子生物学研究。E-mail: manchaolai@126.com。

通讯作者: 于晓龙(1965-), 男, 黑龙江省哈尔滨市人, 博士, 副研究员, 从事病毒分子生物学研究。E-mail: yuxiaolong2003@yahoo.com。

序列和氨基酸序列进行遗传距离测定、进化树分析和碱基替换等分析。

2 结果与分析

2.1 ORF7 基因的组成性分析

序列分析表明:不同地区 TGEV 各毒株 ORF7 基因开放阅读框除 KT2-H 株含有 231 个碱基(122-127 位置缺失 6 个碱基)外,其它各毒株 ORF7 基因全长编码序列均为 237 nt。TGEV 毒株 ORF7 基因碱基含量范围及所占比例区间分别为:腺嘌呤(A):69~73 nt,29.1%~30.8%;胞嘧啶(C):30~42 nt,12.7%~17.7%;鸟嘌呤(G):32~33 nt,13.5%~13.9%;胸腺嘧啶(T):90~106 nt,38.0%~44.7%。序列比较分析表明:ORF7 基因 AT 碱基含量介于 67.1%~75.5%,GC 碱基含量位于 26.2%~31.6%,ORF7 基因属于 AT 碱基高含量基因。

2.2 ORF7 基因的同源性分析

将不同地区的 ORF7 基因核苷酸序列进行同源性比较分析,结果表明:不同地区 TGEV ORF7 基因的核苷酸序列保守性较高,核苷酸同源性均在 90% 以上(见图 1),氨基酸同源性在 88% 以上。

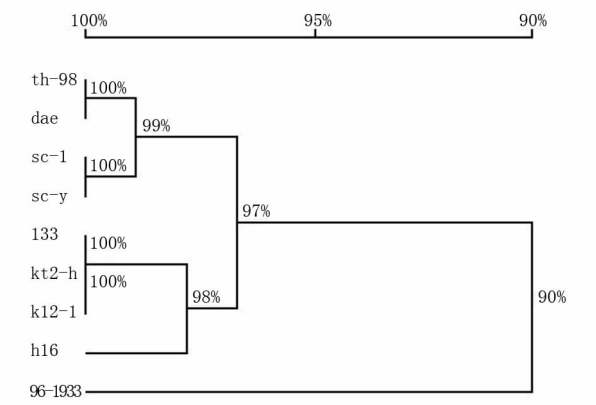


图 1 不同地区 TGEV ORF7 基因核苷酸序列同源性系统树分析

2.3 ORF7 基因的进化性分析

为了分析不同地区 TGEV 各毒株间的进化关系,利用 CLUSTAL X 2.0 软件的距离法构建了进化树(见图 2)。从进化距离上看,不同地区分离获得的 TGEV 病毒株 ORF7 基因的进化距离存在一定差异。按相对进化距离和各毒株在进化树中的分布位置,供试毒株大体上可分为 3 组,如 TH-98、DAE、SC-1、SC-Y 和 H16 这组进化亲缘关系较近;133、KT2-H 和 KT2-L 进化亲缘关系较近;而 96-1933 与其它各毒株进化亲缘关系

较远。

碱基替换分析表明:各毒株 ORF7 基因间腺嘌呤碱基(A)向其它碱基突变频率最高,其中以 A 到 T 为最高;此外,其它碱基突变成胸腺嘧啶(T)也具有较高频率,其中也以 A 到 T 为最高。总之,在各毒株 ORF7 基因中,A 最容易突变为其它碱基,而 4 种碱基中突变为 T 的频率最高。

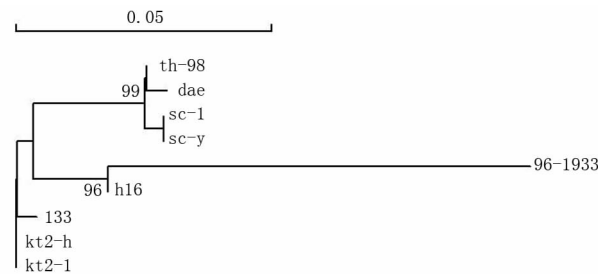


图 2 不同地区 TGEV ORF7 基因核苷酸序列进化树分析
进化树采用最大似然法构建(自举值为 1 000),分支上的数值为自举置信水平(BCL)值。

3 结论与讨论

TGEV 基因组为单股正链不分段的 RNA,大小为 2.86×10^4 bp,平均分子质量为 6.8×10^6 ($6.4 \times 10^6 \sim 7.2 \times 10^6$),分为 7 个区,每个区有一个或多个开放阅读框架(ORFs),亚基因组 mRNA 的保守基因组间序列将基因组 RNA 分开。编码 4 种结构蛋白和 3 种非结构蛋白,其顺序为 5'-ORF1a-ORF1b-S-3a-3b-Sm-M-N-7-3',mRNA7 编码一条 9.1 Ku 的多肽蛋白^[7-10]。该研究序列分析表明:TGEV 的 ORF7 基因是一个高 AT 含量的核苷酸序列,GC 含量明显低于保守 N 基因的 GC 含量(41.8%~43.3%),而 ORF7 蛋白(Hp)是影响 TGEV 致病性和毒力的主要蛋白之一,所以高 AT 含量的 ORF7 基因是否与 TGEV 的毒力变异相关联有待于深入研究。

以 TGEV ORF7 基因构建的系统进化树分析表明:不同地区 TGEV 的变异率较低,保守性高,各毒株间保持着高度的同源性,这为开发以 ORF7 蛋白(Hp)为基础的诊断试剂用于检测 TGEV 感染提供了理论依据。同源性和进化性分析结果表明,虽为韩国地区的 DAE、133、KT2-H 和 KT2-L 的不同毒株却分到同一组别,表明国内外不同地区的 TGEV 可能存在跨区域病毒入侵现象,这可能与候鸟迁移、交通运输、猪源和

非猪源病毒携带者的引入等多种因素有关。

为深入研究各地区不同 TGEV 分离株的毒力关系,基于 ORF7 基因核苷酸序列进化树分析表明,供试 9 个病毒株基本形成 3 个进化分支,即 TH-98、DAE、SC-1、SC-Y 和 H16 构成一分支;133、KT2-H 和 KT2-L 组成另一分支;第三分支只包括 96-1933 一个毒株。ORF7 基因进化分析表明:虽然整体上各毒株遗传距离较近,但随着环境筛选压力、遗传突变和重组等多种长期的压力选择过程,进而形成现有毒株的多样性。

碱基替换分析表明,虽然 ORF7 基因在 TGEV 不同毒株间仍高度保守,由于进化和选择过程,ORF7 基因的突变位点中存在 A 高频突变为 C、G 和 T 的情况,而 A、C 和 G 又存在高频突变为 T 的现象,所以长期筛选和进化过程,使得在 TGEV 的 ORF7 基因中 A 向 T 突变的倾向尤为显著,这种现象是否与病毒毒力改变和环境筛选压力等因素相关有待于深入研究。

参考文献:

- [1] Schwegmann-Wessels C, Zimmer G, Schroder B, et al: Binding of transmissible gastroenteritis coronavirus to brush border membrane sialoglycoproteins[J]. J. Virol, 2003, 77: 118461-1848.
- [2] Jones T, Pritchard G, Paton D. Transmissible gastroenteritis of pigs[J]. Vet. Rec., 1997, 141: 427-428.
- [3] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1997.
- [4] Herrewegh A A, Vennema H, Horzinek M C, et al. The Molecular Genetics of Feline Coronaviuses; Comparative Sequence Analysis of ORF7a/7b Transcription Unit of Different Biotypes[J]. Virol, 1995, 212: 622-631.
- [5] Takahide Taniguchi, Rie Taniguchi. Sequence Comparison of the ORF7 Region of Transmissible Gastroenteritis Viruses Isolated in Japan[J]. Virol, 2004, 66: 717-719.
- [6] La Bonnardiere C, H Laude. Interferon induction in rotavirus and coronavirus infection; a review of recent results[J]. Ann. Rech. Vet., 1983, 14: 507-511.
- [7] Paul B, Kevin W. The cloning and sequencing of the virion protein genes from a British isolate of PRCV: comparison with TGEV [J]. Journal of virus Research, 1991, 21: 181-198.
- [8] Eleouet J F, Rasschaert D, Lambert P, et al. Complete sequence (20 Kilobases) of the polyprotein-encoding gene 1 of transmissible gastroenteritis [J]. Virus virol, 1995, 206: 817-822.
- [9] Britton P, Page K W. sequence of the S gene from a virulent British field isolate of transmissible gastroenteritis virus[J]. Virus Res., 1990, 18: 71-80.
- [10] Wesley R, Woods R, Cheung A K. Nucleotide sequence of the E2-peplomer gene and partial nucleotide sequence of upstream polymerase gene of transmissible gastroenteritis virus (Miller Strain) [J]. Adv. Exp. Med. Biol., 1990, 276: 301-306.

Sequence Analysis of ORF7 Gene of Transmissible Gastroenteritis Virus Isolated from Different Regions

MAN Chao-lai¹, YU Xiao-long²

(1. Life Science and Technology College of Harbin Normal University, Harbin, Heilongjiang 150025; 2. Animal Husbandry Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: Porcine Transmissible gastroenteritis (TGE) is an acute highly contagious disease of pigs caused by transmissible gastroenteritis virus (TGEV). ORF7 gene sequences of several TGEV strains derived from different regions were analyzed for the homology and evolution by Sequence analysis, which including measurement of sequence homology, phylogenetic tree analysis and residue substitution analysis. The results showed that the ORF7 genes were highly conservative between each TGEV strains, but there existed the tendency of adenine nucleotide (A) mutation to thymidine nucleotide (T). It also showed that the nucleotide sequence analysis could form a base or further study on the virulence and epidemiological study of TGEV infections.

Key words: pig; transmissible gastroenteritis virus; ORF7 gene; sequence analysis