

非洲猪瘟病毒的分子生物学研究进展*

常 华¹ 花群义^{2* * *} 段 纲¹

(云南农业大学动物科技学院 昆明 650201) (深圳出入境检验检疫局技术中心 深圳 518045)

摘要 非洲猪瘟是一类动物传染病,致死率高达 100%,在我国虽未发现该病,但一旦发生会给畜牧养殖业带来巨大经济损失。文中概述了非洲猪瘟病毒的分类、形态、基因组特征、主要结构蛋白,以及分子生物学诊断技术的研究进展。为进一步研究该病毒的复制机理、毒力、致病机理及疫苗的开发提供参考依据。

关键词 非洲猪瘟病毒,分子生物学,研究进展

中图分类号 S852.65+1 文献标识码:A 文章编号 0253-2654(2007)03-0572-04

The Advancement on Molecular Biology of African Swine Fever Virus

CHANG Hua¹ HUA Qun-Yi^{2* * *} DUAN Gang¹

(College of Animal Science and Technology, YNAU, Kunming 650201)

(Shenzhen Exit-entry Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518045)

Abstract In this view, the present advancement on Molecular Biology of African Swine Fever Virus was summarized, including the taxonomy, morphology, genome features and molecular biology diagnostic technique. In order to understand the knowledge for further probing into the replication, virulence, pathogenesis of the virus and the development of vaccine.

Key words African Swine Fever Virus, Molecular biology, Advancement

非洲猪瘟(African swine fever, ASF)是由非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)引起猪的一种急性、热性、高度接触传染性疾病。在 1921 年肯尼亚首次发现,截至目前已在非洲、欧洲和美洲等数十个国家流行,而且有不断蔓延趋势。其特征为病程短、病死率高,可高达 100%,临床症状和病理变化均类似于急性猪瘟,在诊断时极易误诊,表现高热、皮肤充血、流产、水肿及脏器出血。世界动物组织(OIE)列为 A 类疫病,我国规定为动物一类疾病,受到世界各国的高度重视^[1]。非洲猪瘟病毒分子生物学的研究在快速诊断技术和疫苗研制方面具有重要意义。

1 分子病原学

1.1 分类

非洲猪瘟在国际病毒分类委员会第四次报告中归于虹彩病毒科,在该委员会第五次报告中将其列在痘病毒科之下,置于该科的脊椎动物痘病毒亚科及昆虫痘病毒亚科之外^[2]。但 DNA 序列分析表明,ASF 病毒具有介于痘病毒和虹彩病毒之间的特征,ASFV 的这一特性表明它不属于国际

病毒分类委员会所核定的任何一科,是个新科,1995 年第 9 次国际病毒分类委员第六次报告,将非洲猪瘟病毒列入“类非洲猪瘟病毒属”,非洲猪瘟是唯一已知的代表种^[3]。

1.2 培养特性

该病毒能在鸡胚卵黄囊内生长,某些毒株,尤其是兔体适应株,可在 6d~7d 内致死鸡胚;能在猪的单核细胞、骨髓细胞和白细胞内生长,也能在牛肾细胞、BHK-21、MS 细胞、CV 细胞和 Vero 细胞中生长^[4,5]。

1.3 毒株

大多数非洲猪瘟分离毒株,经感染猪单核或巨噬细胞后,其细胞表面具有特殊的猪红血球吸附现象,因此血球吸附试验可供非洲猪瘟的确诊。但有少数非洲猪瘟分离毒株并无血球吸附特性。这些无血球吸附特性的病毒株,一般虽毒力较低,但偶尔也会引起发病。通过对 23 株 ASFV 分离株分析发现存在同源基因的复杂重复序列,这可能与病毒逃避宿主免疫系统的机制有关,也可能是造成不同毒株 DNA 限制性内切酶图谱分析发现的在 ASFV 核酸的两端各存在的 1 个可变区内之间差异的原因^[6,7]。

* 国家重大科技攻关项目(No. 2001BA804A48)

** 通讯作者 Tel: 0755-25572533; E-mail: cihua@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-07-28, 修回日期: 2006-10-20

1.4 抗原性

目前发现非洲猪瘟病毒至少有 8 个血清型。进行红细胞吸附抑制实验发现具有一定的株特异性;补体结合实验呈群特异性;琼扩实验表明具有一定的株特异性。由强毒感染的猪,其淋巴结、脾脏以及肝、肾脏中的抗原浓度最高。但用弱毒株或无毒株接种的猪体内检查不出抗原性^[3]。

2 ASFV 基因及基因组特征

ASFV 是一种直径为 200nm 的正 20 面体病毒,其含有直径 70nm~100nm DNA 核心,外周是直径 172nm~191nm 的衣壳和含类脂的囊膜。衣壳呈二十面对称,对应有 1892~2172 个壳粒(每个壳粒直径为 13nm),中心有 1 孔,呈六棱镜状,壳粒间的距离为 7.4nm~8.1nm^[2]。

ASF 病毒的 *bcl-2* 和 *jip* 基因是凋亡基因,而 LMW5-HL/179L 和 A 224L 是凋亡基因 *bcl-2* 和 *jip* 的抑制物。ASF 病毒氨基酸序列 HB 1 片段的 GLy 突变为 ALa,使得人白血病细胞系 K 562 细胞不能产生细胞凋亡,揭示 GLy 是 ASF 病毒 *bcl-2* 抑制物 A 179L 氨基酸序列所必需的氨基酸。ASF 病毒引起细胞凋亡的机制可能是病毒作用于细胞时,使细胞因子(例如 TNFa 和 IL 等)发生变化而引起的^[5]。

ASFV 基因组为末端共价闭合的单分子线状双链 DNA,大小 170kb~190kb。整个基因组含有 151 个 ORF,可以编码 150~200 种蛋白质。已从 ASFV 感染的细胞中分离鉴定出 86 种病毒蛋白多肽。ASF 病毒基因组有 5 个编码基因,包括假定膜蛋白、分泌性蛋白、参与核苷酸和核酸代谢(DNA 修复)以及蛋白修饰的酶^[5]。基因组的两端通过部分碱基配对形成发夹环。靠近发夹环部位有末端重复序列和可变区^[2]。

3 ASFV 的主要结构蛋白

ASF 病毒可以编码 34 种以上的结构蛋白,现将几种主要的结构蛋白介绍如下:

3.1 P54 蛋白

由 ASFV E183L 基因编码 P54 蛋白,约 25kD 的多肽,含有一段跨膜区域,主要集中在衍生的内质网膜处。P54 蛋白可以在体外培养,并能感染细胞。而且在感染细胞后在内质网膜处短暂表达。P54 蛋白的跨膜结构在病毒蛋白经内质网膜转化成病毒包膜前体时起着十分重要的作用^[8]。另外 ASFV P54 蛋白与 8kD 的轻链细胞质动力蛋白 DLC8 存在特殊的交叉反应,并在细胞内摄作用及病毒加工过程中起重要作用。感染病毒后复制早期,病毒可激活细胞凋亡蛋白酶而诱发细胞脱噬作用^[9]。为了分析结构蛋白 P54 在细胞脱噬中所起的作用,2004 年 Hernaez B 和 Diaz-Gil G 将其在非洲绿猴肾细胞内短暂表达,实验表明可激活细胞凋亡蛋白酶,诱发细胞脱噬作用。但 P54 的突变体缺失 13aa 而失去激活细胞凋亡蛋白酶的功能^[10,11]。

3.2 VP73 蛋白

VP73 蛋白是 ASFV 主要的抗原性结构蛋白,能够诱导机体产生中和抗体,而且抗原性极为稳定,可作为 ASFV 的主要诊断试剂。在经 MS 细胞传代的 ASFV 抗原蛋白的分析发现,某些蛋白传代后可发生变异,如 P54,而结构蛋白 VP73 经传代后仍相当稳定^[12]。

3.3 VP72 蛋白

VP72 蛋白也是 ASFV 的主要结构蛋白。1998 年 Odemuyiwa SO 和 Adebayo IA 等研究在尼日利亚爆发的非洲猪瘟,经病毒分离分析非洲西部国家非洲猪瘟毒株 VP72 基因的分子特征,先将 VP72 基因中约 280bp 的片段进行 PCR 扩增并测序分析,然后将 1900bp 的 VP72 基因完整扩增测序分析,结果表明与乌干达地区、多米尼加共和国、西班牙所分离到的毒株同源性分别为 92.2%、92.4%、97.2%,而在 VP72 蛋白高度保守区域中 426~516 氨基酸发生了突变^[13]。

3.4 P72 蛋白

P72 蛋白是 ASFV 的主要结构蛋白。1996 年 Yu M, Morrissy CJ, Westbury HA 研究了非洲猪瘟不同毒株 P72 蛋白的高度保守区域的同源性及其 P72 的抗原性。结果表明乌干达和多米尼加共和国的非洲猪瘟毒株 P72 基因与 ASFV 毒株 BA71V 和 E70 同源性高达 97.8%~100%。表明了 P72 蛋白抗原性稳定,为 ASFV 的血清学诊断提供了很好的抗原^[14]。

3.5 I14L 蛋白

Goatley LC, Marron MB 扩增了 18 株不同的非洲猪瘟毒株,不同毒株的 I14L 基因片段大小不同,经测序表明都是保守区域,短的片段在 N 端缺少 14 个氨基酸,主要是精氨酸和赖氨酸的短缺,这导致片段长的基因集中于细胞核内,而短的片段虽在细胞核内,但并不是集中分布^[15]。

3.6 j5R 蛋白

孙怀昌译 Linda K Dixon, Parkhouse R M E 等在蛋白多肽二级结构的电脑预测实验得知,非洲猪瘟病毒的 j5R 阅读框编码 12.9kD 膜蛋白。在蛋白 C 末端含有一个潜在抗原决定簇,针对其合成肽的抗体能在 ASFV 感染细胞和病毒颗粒中检测到 23kD 或 25kD(取决于不同毒株)特异蛋白。经免疫荧光实验表明, j5R 蛋白主要位于感染细胞的病毒复制部位。并经油水两相分离和细胞分级分离试验结果证明 j5R 蛋白是膜相关蛋白^[16]。

3.7 其他蛋白

非洲猪瘟病毒可以持续感染自然宿主以及家猪,即使康复猪也有少量病毒存在于体内,这可能是由于病毒可以破坏机体的免疫系统机制。A238L 是重要的免疫调节蛋白,它抑制机体 NFkappaB 转录因子的活性和钙调磷酸酶的活性,及钙调磷酸酶磷酸酶的活性旁途径其包括激活 T 细胞核因子转录蛋白的激活。非洲猪瘟病毒编码的 CD2v 蛋白与宿主的 CD2 蛋白相似,CD2v 蛋白在 T 细胞和 NK 细

胞中表达。这些病毒表达的蛋白质能使病毒感染的细胞及细胞外病毒颗粒吸附红细胞。而病毒在家猪间传播也是由于 CD2v 蛋白的表达,同时该蛋白损坏了淋巴细胞的功能^[17]。

4 ASFV 分子生物学诊断技术

4.1 DNA 原位杂交技术

20 世纪 90 年代建立了关于检测 ASFV 病毒的 DNA 原位杂交技术。原位杂交 PCR 首先将 ASFV 的样品组织切片或细胞涂片,然后固定在载玻片上,适当预处理后,将细胞核内的 DNA 加热变性形成两条单链 DNA。针对待检测的选定序列设计一对引物,直接将引物、dNTP 缓冲液及 Taq DNA 聚合酶加到载玻片上,在原位聚合酶仪内进行 PCR 扩增,反应完后将 PCR 产物固定在载玻片上,用相应的检测信号系统进行检测,可以检测组织细胞中微量 DNA 或 RNA,且可精确定位。用生物素标记的核酸探针可用于临床样品和培养细胞的 ASF 病毒原位杂交检测^[5]。

4.2 常规 PCR 检测法

在生物科学众多领域日趋广泛应用 PCR 检测技术,该方法具有特异性高、灵敏度高、简单快速、对标本的纯度要求低等优点,为许多疫病的诊断和检测提供了有效的技术支持。在病原方面,应用 PCR 技术可直接从各种组织、体液中检测到病毒,不需分离培养,可检出百万分之一的感染细胞,可同时进行不同病原或同一病原不同株的检测。

应用常规 PCR 方法对 ASFV 进行诊断的报道很多,与分离病毒和血凝试验相比,PCR 方法更快速、敏感,可用于感染猪器官、培养细胞的检测。另外 PCR 选择扩增的区域位于基因组的保守区,因此可用于不同 ASF 病毒株的检测。2003 年 M Agüero J 和 Fernández L 等利用热启动 PCR 方法检测非洲猪瘟,实验结果表明该方法可以快速诊断检测非洲猪瘟病毒,监控 ASFV 的发生,及时采取有效的防治措施^[18]。

4.3 巢式 PCR 检测法

套式 PCR (nested PCR) 又称做巢式 PCR,这种方法的特点是需要设计两对引物,一对引物扩增稍长片段,在这一扩增范围内再设计一对引物,扩增的产物是以第一对引物的产物为模板。它比普通 PCR 及病毒分离更加敏感,大大提高了检测的敏感性。巢式 PCR 的使用降低了扩增多个靶位点的可能性,因为同两套引物都互补的靶序列很少。而使用同样的引物对进行总数相同的循环会扩增非特异性靶位点。巢式 PCR 可以增加有限量靶序列(如稀有 mRNA)的灵敏度,并且提高了 PCR 的特异性。2005 年 Basto AP 和 Portugal RS 将采集的病料进行病毒分离及 PCR,对呈阴性的疑似病料再进行巢式 PCR 的实验,60 份阴性样品中 16 份是阳性,可见该方法可靠,为存在 ASFV 的流行地区又提供一种诊断方法^[19]。

4.4 入侵检查方法

1999 年由 Third Wave Technologies 公司研究人员发明了 Invader assay。该方法特点是只有两个探针与模板完全配对后才可形成 invasive complex 的结构,因此其检测结果比简单杂交的准确性好。Flap endonucleases 的切割特异性非常高。酶切产物是均一的寡聚核苷酸,易与其它杂质成分区分,且检验无需电泳。在检测前模板不用进行 PCR 扩增,消除了 PCR 引入突变导致假阳性的因素。Bernt Hjertner 和 Brian Meehan 等在 2005 年利用 VP73 的侵入检测方法检测 ASFV 的 DNA 病毒,结果表明该方法灵敏度高,在仪器设备不充分的条件下可快速检测^[20]。

4.5 实时荧光定量 PCR 技术

荧光 PCR 将荧光与 PCR 技术结合起来,大大提高了检测的敏感性。而且在荧光 PCR 仪中反应,电脑对整个反应进行实时监测,避免了交叉污染。本方法比普通 PCR 及巢式 RT-PCR 法灵敏度高。通过连接电脑分析 PCR 过程中产生的荧光信号,实现了实时监测 PCR 扩增过程而无需对 PCR 扩增产物进行后处理,从而彻底克服了传统 PCR 技术易污染的缺点,是一种重要的检测手段^[21-22]。Scott M Reidb 和 Geoffrey H 等在 2003 年以 ASFV VP72 为目的基因,建立了实时荧光定量 PCR 检测技术,将荧光探针与 PCR 方法结合起来,使实验更加快速灵敏简便,可用于快速检测疑似非洲猪瘟的病例,作为鉴别诊断的有效方法^[23]。2004 年 L Zsak 和 M V Borca,等用荧光定量 PCR 技术检测感染猪,实验表明该方法耗时不足 2h,而且灵敏特异性强,可用于亚临床症状的非洲猪瘟诊断及非洲猪瘟爆发时的紧急处理措施^[24]。

4.6 其它方面对 ASFV 的检测研究

Caballero R G 等人经核酸杂交和限制性内切酶实验表明 ASF Cla I-H 片段是保守片段。1999 年张兹钧在建立 PCR 检测方法时设计了结构蛋白 P72 基因中的一段为模板,而 P72 基因又正好位于 ASFV Cla I-H 片段之中,则该模板也就具有保守性。这种保守性保证了建立的 PCR 的扩增片段具有特异性^[25]。孙怀昌译 Linda K Dixon 和 Parkhouse R M E 等于 1998 年经蛋白多肽二级结构的电脑预测实验表明,非洲猪瘟病毒(MalawiLIL 20/1 株)k8R 基因编码带有多条疏水氨基酸小区的 27 kD 蛋白质。并将该基因克隆入质粒 pGET-2T,在大肠杆菌中表达 42kD ~ 54kD 不溶性 GST-k8R 融合蛋白,而此表达蛋白能被针对不同非洲猪瘟病毒株的猪免疫血清识别^[26]。

5 结语

近年来,猪链球菌病、高致病性禽流感的流行,对我国的畜牧业带来严重危害,可见疫病的监测在传染病的传播过程中显得尤为重要。非洲猪瘟病毒在我国尚未分离到病原体,属于外来病,但在我国是进出口贸易中监测的重要疫病,建立并实施非洲猪瘟病毒的监测技术至关重要。

ASFV 基因组编码结构蛋白中的许多基因已被克隆和表达。但有关 VP73 蛋白的克隆表达在我国还未报道。根据非洲猪瘟的 VP73 蛋白是 ASFV 主要的抗原性结构蛋白,能够诱导机体产生中和抗体这一特性,可以通过基因工程原核或真核表达系统表达 VP73 蛋白,获得高纯度的 VP73 表达蛋白后制备单克隆抗体或多克隆抗体,从而为建立快速、特异的血清学诊断技术和疫苗研究奠定基础。

参考文献

- [1] 孙怀昌. 中国预防兽医学报, 1999 **21**(2):117 ~ 119.
- [2] 殷 震, 刘景华. 动物病毒学. 北京: 科学出版社, 1997. pp. 1197 ~ 1206.
- [3] 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所. 兽医微生物学. 北京: 中国农业出版社, 1998. pp. 294 ~ 296.
- [4] 赵德明, 张中秋, 沈建忠, 等. 猪病学. 北京: 中国农业大学出版社, 2000. pp. 89 ~ 105.
- [5] 曲连东, 于康震. 中国兽医科技, 1998 **28**(11):42 ~ 43.
- [6] 孙书华, 孙淑芳. 中国兽医学报, 1996 **16**(9):447 ~ 448.
- [7] Claudio L, Carlos A, Aleiandro B, *et al.* Virology, 1992, **189**: 368 ~ 373.
- [8] Rodriguez JM, Garcia-Escudero R. J Virol, 2004, **78**(8):4299 ~

4313.

- [9] Alonso C, J Miskin B. J Virol, 2001, **75**: 9819 ~ 9827.
- [10] Hernaez B, Diaz-Gil G. FEBS Lett, 2004 **569**(1-3):224 ~ 228.
- [11] Alejo A, G Andrés, M L Salas. J Virol, 2003 **77**: 5571 ~ 5577.
- [12] Tabares E, Martinez J. Arch Virol, 1980 **66**(2):119 ~ 132.
- [13] Odemuyiwa SO, Adebayo IA, *et al.* Virus Genes, 2000 **20**(2):139 ~ 142.
- [14] Odemuyiwa SO, Adebayo IA. Virus Genes, 2000 **20**(2):139 ~ 142.
- [15] Goatley LC, Marron MB. J Gen Virol, 1999 **80**(3):525 ~ 535.
- [16] 孙怀昌. 中国病毒学报, 1999 **14**(3):236 ~ 243.
- [17] Dixon LK, Abrams CC. Vet Immunol Immunopathol, 2004 **100**(3-4):117 ~ 134.
- [18] M Agüero J Fernández. J Clin Microbiol, 2003, **41**(9):4431 ~ 4434.
- [19] Basto AP, Portugal RS. Arch Virol, 2006 **151**(4):819 ~ 826.
- [20] Hjertner B, Meehan B. J Virol Methods, 2005 **124**(1-2):1 ~ 10.
- [21] Bastos A D, M L Penrith C. Arch Virol, 2003 **148**: 693 ~ 706.
- [22] Gonzague M, C Plin L. Mol Cell Probes, 2002 **16**: 237 ~ 242.
- [23] King DP, Reid SM. J Virol Methods, 2003 **107**(1):53 ~ 61.
- [24] King D P, S M Reid. J Virol Methods, 2003 **107**: 53 ~ 61.
- [25] 张兹钧, 金由辛, 陈士友. 动植物检疫, 1999 **29**(2):3 ~ 7.
- [26] 孙怀昌. 江苏农学院学报, 1998 **19**(2):1 ~ 7.