

# TGEV 的 sM、M 和 N 基因克隆及特征分析

程 杰<sup>1,2</sup>, 柳纪省<sup>1\*</sup>, 吴 润<sup>3</sup>, 殷相平<sup>1</sup>, 李宝玉<sup>1</sup>, 兰 喜<sup>1</sup>, 王 辉<sup>1</sup>

(1. 中国农业科学院兰州兽医研究所, 兰州 730046; 2. 兰州大学, 兰州 730000; 3. 甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070)

**摘 要:** 参照 GenBank 中收录的 TGEV sM、M 和 N 基因序列各设计 1 对特异引物, 经 RT-PCR 扩增获得了 TS 株的相应基因片段, 分别约为 346 932 和 1 217 bp, 其大小与预计的目的片段相符。与其他毒株的相应基因相比较, 并经剪接后, TS 株的 sM、M 和 N 基因全长分别为 248 789 和 1 149 bp, 各编码 82 个、262 个和 382 个氨基酸; TS 株与 Purdue 株、TFI 株和 96-1933 株的 sM 基因核苷酸序列同源性分别为 95.2%、92.7% 和 90.2%; 推导氨基酸的同源性分别为 95.9%、97.2%、98.8%; 与 Purdue 株、TFI 株、TGEV H 株和 96-1933 株的 M 基因核苷酸序列同源性分别为 95.2%、98.0%、99.6% 和 95.0%; 推导氨基酸的同源性分别为 97.0%、97.3%、98.5%、93.5%; 与 Purdue 株、TFI 株、FS722/70 株、Korea 株、TO14 株、TGEV H 株和 96-1933 株的 N 基因核苷酸序列同源性分别为 98.1%、97.7%、99.0%、98.3%、99.2%、99.0% 和 95.9%, 推导氨基酸的同源性分别为 97.9%、98.4%、99.0%、97.7%、99.5%、96.2%、96.6%。并对 TS 株基因间的保守序列和 sM、M 和 N 基因及其编码的相应氨基酸的结构特征进行了分析, 发现 sM 和 N 基因在 TGEV 中保守; 并提示在我国不仅存在有 2 个不同亚基因型的 TGEV, 而且我国的 TGEV 可能是输入性的。

**关键词:** 猪传染性胃肠炎病毒; TGEV TS 株; sM 基因; M 基因; N 基因; 克隆

**中图分类号:** S852.659.6; Q785

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0366-6964(2005)07-0695-06

猪传染性胃肠炎(Transmissible Gastroenteritis of Swine, TGE)是由猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)所致的以呕吐、严重腹泻、脱水和对 2 周龄以内仔猪高度致死率(通常可达 100%)为特征的高度接触性肠道传染病。各种年龄的猪都可发病, 主要危害新生仔猪。我国台湾省于 1958 年首次报道了本病, 1973 年上海、辽宁、吉林、黑龙江等地陆续报道了该病的发生<sup>[1]</sup>, 至 2000 年我国大部分省市(区)均有本病的流行, 并呈上升趋势。姜成刚等<sup>[2]</sup>采用体外细胞培养技术, 筛选出中草药对 TGEV 抗吸附、直接灭活和对病毒复制的抑制作用进行了研究。

TGEV 最早于 1946 年分离证实, 隶属于冠状病毒科冠状病毒属, 为不分节段的单股正链 RNA 病毒。研究发现 TGEV 具有 4 种结构蛋白, 过去主要集中于研究其主要免疫原蛋白(S 蛋白)<sup>[1]</sup>, 而对另 3 种结构蛋白(sM 蛋白、M 蛋白和 N 蛋白)及其基因的研究颇少。

由长 1 149 bp 的 N 基因编码的 N 蛋白是一种

磷酸化的酸性蛋白, 存在于病毒粒子内与病毒基因组紧密结合构成了病毒的核衣壳<sup>[3]</sup>。N 蛋白不仅可诱导机体产生细胞免疫, 还在病毒基因组 RNA 复制和转录的加工过程中具有重要作用, 并且构成 N 蛋白的氨基酸具有很强的保守性<sup>[4]</sup>, 这为以 N 基因及其编码蛋白用作 TGE 的诊断提供了理论依据。由长为 789 bp 的 M 基因编码的 M 蛋白是一种 N-端和 C-端被糖基化的完整膜蛋白, 是构成病毒粒子不可缺少的成分, 转译后的 M 蛋白经切除信号肽, 共转译糖基化而成熟。目前的研究结果表明, 成熟的 M 蛋白不仅影响病毒的变异, 决定病毒子的装配位点, 还可诱导  $\alpha$  干扰素( $\alpha$ -IFN)和介导补体依赖性中和抗体的产生及 TGEV 的膜融合<sup>[1,5]</sup>。而对于后来发现仅由 82 个氨基酸残基构成的 sM 蛋白究竟有何功能, 尚无定性的结论。

通过对 sM、M 和 N 基因的分子克隆, 为进一步研究其结构及功能提供了分子基础, 为建立 TGEV 的快速而准确的诊断建立了理论依据, 并有助于对其他冠状病毒的研究。

收稿日期: 2004-05-10

基金项目: 重大基础研究“973”前期专项(2004CCA00500)

作者简介: 程 杰(1975-), 男, 甘肃通渭人, 硕士, 主要从事兽医微生物学与实验动物学研究。E-mail: chengjielzh@163.com

\* 通讯作者: 柳纪省, Tel: 0931- 8342682

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 毒株与细胞 TGEV TS 株第 15 代细胞毒和 PK15 细胞由兰州兽医研究所传染病室提供并保

存。

1.1.2 菌种与质粒 JM109 由兰州兽医研究所传染病室提供, pMD18-T Vector 购于大连宝生物工程有限公司。

1.1.3 主要试剂 TRIZOL LS Reagents 为 GIBCO 公司产品; AMV、限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶、dNTP 购自 Promega 公司; 胶中 DNA 纯化回收试剂盒为上海新芝产品; 其余试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 病毒的增殖与收获 在 PK15 细胞长至单层后, 弃去营养液, 用无 Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> 的 Hank's 液洗涤培养瓶壁 3 次, 取 0.5 mL TS 株的第 15 代病毒液和终浓度 5 μg/mL 的胰酶接种于单层细胞上, 于 37 °C 吸附 1 h, 再加入含 2% 犊牛血清的 MEM 维持液, 37 °C 下培养 48~72 h, 观察细胞病变。约有 80% 的细胞出现病变时收获病毒培养液, 于 -20 °C 保存备用。

1.2.2 病毒 RNA 的提取 按 TRIZOL 试剂盒说明操作。

1.2.3 sM、M 和 N 基因的克隆 TS 株 sM、M 和 N 基因的克隆参照文献[6]中的方法进行。

1.2.3.1 引物的设计与合成: 参照文献[7]中公布的 Purdue 株基因序列, 应用 Primer 5.0 及 Oligo 6.0 分别设计用来扩增 sM、M 和 N 基因的特异性引物 (见表 1), 由大连宝生物工程有限公司合成。

表 1 sM、M 和 N 基因扩增引物

Table 1 Amplification primers for the sM, M and N gene

片段名称 Gene fragment	引物名称 Primer	引物序列 Primer sequence
sM	C <sub>1</sub>	5'-GCG GTT CTA AAC GAA ATT GAC-3'
	C <sub>2</sub>	5'-CAT GCA ATC ACA CAC GCT AAT-3'
M	M <sub>1</sub>	5'-GTT GCA ATT TAG GAA GGA CAG-3'
	M <sub>2</sub>	5'-TTG GCC ATT TAG AAG TTT AGT-3'
N	N <sub>1</sub>	5'-GAA CTG ATA ATT TGA GTG AGC-3'
	N <sub>2</sub>	5'-GCA TCT CGT TTA GTT CGT TAG-3'

下标为偶数的为反转录引物

Primer C<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> and M<sub>2</sub> for reverse transcription reaction

1.2.3.2 RT-PCR 及克隆鉴定: 分别以 C<sub>2</sub>、M<sub>2</sub> 和 N<sub>2</sub> 作为反转录引物, 合成含有 sM、M 和 N 基因的 cDNA。在 0.5 mL 微量离心管中加入 5 × AMV buffer 5.0 μL、dNTP Mix (10 mmol/L) 1.0 μL、RNasin (50 U/μL) 1.0 μL、AMV (10 U/μL) 1.5 μL、RNA 10.0 μL、C<sub>2</sub> 或 M<sub>2</sub> 或 N<sub>2</sub> (50 pmol/L) 1.0 μL, 加 DEPC 水至总体积为 25.0 μL; 轻轻混匀离心后, 42 °C 反应 1 h。最后, 在 95 °C 下反应 10 min, 冰浴 1 min, 进行 PCR 或 -20 °C 保存备用。

按常规方法对 PCR 扩增条件进行选择优化后, 分别扩增 sM、M 和 N 基因, 扩增参数见表 2, 同时设以水为模板的阴性对照。所得 PCR 产物以标准

表 2 sM、M 和 N 基因的 PCR 扩增参数

Table 2 Cycle parameters for the sM, M and N gene amplification

引物 Primers	预变性 Predenaturing	变性、退火、延伸 Denaturing, annealing and extension	循环数 Cycles	延伸 Last extension
C <sub>1</sub> /C <sub>2</sub>		94 °C 1 min 51 °C 1 min 72 °C 40 s		
M <sub>1</sub> /M <sub>2</sub>	95 °C 5 min	94 °C 1 min 52 °C 1 min 72 °C 1 min	35	72 °C 5 min
N <sub>1</sub> /N <sub>2</sub>		94 °C 1 min 51.6 °C 1 min 72 °C 1.5 min		

DNA Marker 作为分子质量参照物, 经凝胶电泳鉴定后, 用低熔点琼脂糖凝胶纯化回收 PCR 产物。回收产物在 16 °C 与 pMD18-T Vector 进行连接, 产物转化 JM109 感受态细胞后, 用小量碱法快速提取重组质粒, 并用 PCR 和酶切方法鉴定筛选的阳性质粒。

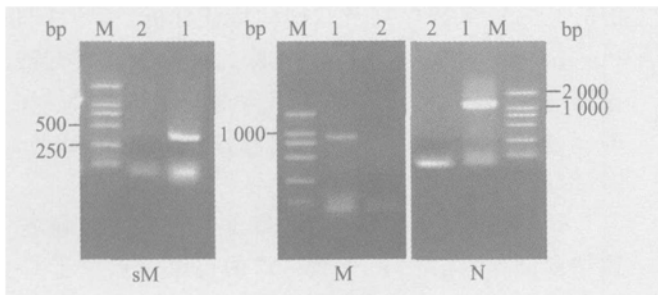
1.2.4 核苷酸序列测定与分析 采用 Sanger's 双脱氧末端终止法对经酶切和 PCR 扩增鉴定的重组质粒进行测序, 由大连宝生物工程有限公司完成。应用 DNA club、DNAsar 和 DNAsis 等分子生物学软件, 就 TS 株的 sM、M 和 N 基因核苷酸序列和推导氨基酸序列与已公布的其他 TGEV 毒株相应基

因序列进行比较,并对其结构特征进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 RT-PCR 扩增产物

利用所设计的 3 对特异性引物,经 RT-PCR 扩增出 sM、M 和 N 各目的片段,大小分别为 346、932 和 1 217 bp,与预期目的片段大小相符,阴性对照无扩增产物(见图 1)。



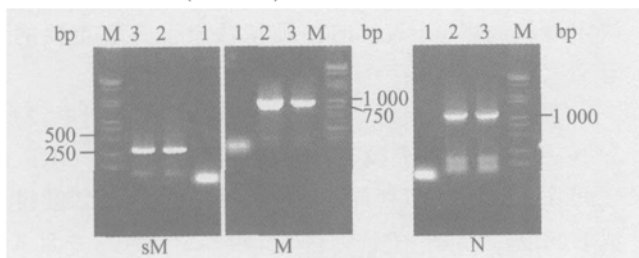
1. 扩增产物; 2. 以水为模板的阴性对照;  
M. DL2000 DNA marker

1. PCR products; 2. Negative control (H<sub>2</sub>O);  
M. DL2000 DNA Marker

图 1 TS 株 sM、M 和 N 基因的 RT-PCR 产物电泳  
Fig. 1 Electrophoresis of PCR products  
of sM, M and N gene

### 2.2 重组质粒的鉴定

2.2.1 重组质粒的 PCR 鉴定 重组质粒的 PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后均有与预期大小一致的基因片段(大小分别为 346 bp、932 bp 和 1 217 bp 左右),而以阴性质粒为模板的对照均没有相应大小的扩增产物片段(见图 2)。

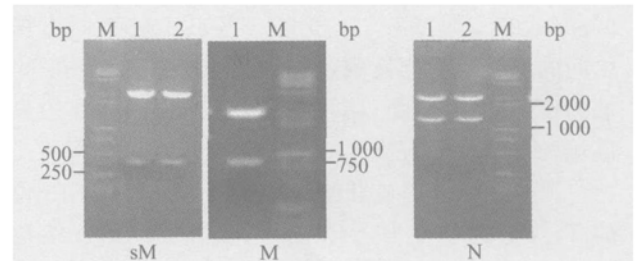


1. 以阴性质粒为模板的对照;  
2、3. 重组质粒的 PCR 产物;  
M. DL2000+ DL15000 DNA Marker

1. Negative control; 2, 3. PCR identify of recombinant plasmid; M. DL2000+ DL15000 DNA Marker

图 2 TS 株 sM、M 和 N 基因的重组质粒 PCR 鉴定  
Fig. 2 Identification of sM, M and N gene  
recombinant plasmids by PCR

2.2.2 重组质粒的酶切鉴定 采用 *Eco*R I 和 *Hind* III 酶切重组质粒电泳后,其大片段与经 *Eco*R I 酶切后的载体质粒大小相一致,小片段则与预期的 sM、M 和 N 相符(见图 3)。



1、2. 为重组质粒用 *Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切;  
M. DL2000+ DL15000 DNA Marker

1, 2. Digestion of recombinant plasmids by *Eco*R I  
and *Hind* III; M. DL2000+ DL15000 DNA Marker

图 3 TS 株 sM、M 和 N 基因重组质粒的酶切鉴定  
Fig. 3 Restriction analysis of sM, M and N gene  
recombinant plasmids

经上述 2 种方法鉴定所筛选出的重组质粒,表明含有所需要的目的基因片段,从而表明成功地克隆并获得了 TS 株 sM、M 和 N 全基因。

### 2.3 测序结果及拼接

根据所设计引物在基因组中的位置,切除 TS 株 sM、M 和 N 各基因片段之间的重叠部分,并依次相连,得到了 TS 株基因组 3'-端包含 sM、M 和 N 基因在内的长为 2 268 nt 的核苷酸序列及基因间的核心保守序列,sM、M 和 N 基因大小分别为 248 nt、789 nt、1 149 nt,分别编码 82 个、262 个和 382 个氨基酸,均为 1 个完整的 ORF(分别为 ORF<sub>4</sub>、ORF<sub>5</sub> 和 ORF<sub>6</sub>),其大小与参照毒株 Purdue 株相一致。在 sM 基因上游第 37 位处具有 1 个 GAA,而在 22 位则有 4 个连续的 GAA。该序列已登陆 GenBank,序列号为 AY335549。

### 2.4 基因组中保守序列的分析

和其他冠状病毒一样,在 TS 株基因组中,特别是在 2 个相邻的基因之间,均有核心保守序列 CUAAAC,分别位于 sM、M 和 N 基因上游第 43-38、9-4 和 12-7 位,在 cDNA 中为 5'-CTAAAC-3',该保守序列也存在于 mRNA 中。

### 2.5 TS 株 sM、M 和 N 基因的序列及其结构特征分析

2.5.1 M 基因序列及其结构特征分析 应用 DNASTAR 将 TS 株 M 基因的核苷酸序列及其推导

氨基酸序列与不同毒株的 M 基因相比较,可知 TS 株与 Purdue 株、TFI 株、TGEV H 株及 96-1933 株核苷酸序列的同源性分别为 95.2%、98.0%、99.6% 和 95.0%,推导氨基酸同源性分别为 97.0%、97.3%、98.5% 和 93.5%。比较不同毒株之间的氨基酸序列发现,其 C-端极为保守,而在 N-端的信号肽区之后不同毒株之间稍有变化,在中央区域的同源性则较高。

TS 株 M 基因核苷酸序列中第 308 位和 513 位的 T、A 分别突变为 A 和 G,使其编码的第 102 位和 171 位的氨基酸由易溶于水且不带电荷的 Asn(N)变为碱性的 Lys(K)和酸性的 Glu(E)转为介于极性和非极性之间的 Gly(G)。更为有趣的是与 TS 株遗传关系最为密切的弱毒株 H 株却在其第 46 位的氨基酸由酸性的 Asp(D)突变为带有 1 个羟基的 Tyr(Y),而在 TS 株、Purdue 株、TFI 株和 96-1933 株中均为 Asp(D)。

与已公布的 TGEV 的 M 基因序列<sup>[7,8]</sup>比较,TS 株的 M 蛋白在 N-端有 1 个由 17 个氨基酸组成的信号肽区,该区含有 3 个 AC 重复(分别在 8-9、12-13、14-15 位),第 17 位的 Glu(E)为信号肽的切割位点;在 N-端含有 3 个 Cys(C)(分别位于第 20、30 和 38 位的氨基酸残基处)使 TGEV 的 M 蛋白的结构比 IBV 和 MHV 更为复杂。M 蛋白的 N-端有 3 个糖基化的位点,分别为第 32、43 和 55 位氨基酸处的 Asn-Ser-Thr、Asn-Gly-Gly 和 Asn-Phe-Ser,C-端第 251 位氨基酸处有一个糖基化位点 Asn-Leu-Ser;位于第 46 位的 Asp(D)为 M 蛋白进入囊膜的位点,而第 57~77 位的 SWSIILHIFITVLQ-YGRPQFS、第 83~101 位的 IKMLIMWLLWPIV-LALTIF 和第 114~134 位的 MFGFSIAGAIVT-FVLWIMYFV 氨基酸为其在囊膜中的跨膜区;第 242~262 位的 DYSTEARTDNLSEQEKLLHMV 氨基酸是 M 蛋白突出于或进入囊膜的部分。M 蛋白的 2 个抗原位点分别位于 N-端和 C-端。

2.5.2 N 基因序列及其结构特征分析 将测定的 TS 株的 N 基因核苷酸序列与已公布的 Purdue 株、TFI 株、FS722/70 株、Korea 株、TO14 株、TGEV H 株及 96-1933 株进行比较,其同源性分别为 98.1%、97.7%、99.0%、98.3%、99.2%、99.0% 及 95.9%,推导氨基酸序列的同源性分别为 97.9%、98.4%、99.0%、97.7%、99.5%、96.2% 和 96.6%。

在 TS 株的 N 基因中第 173 位核苷酸由 A 变

为 G,致使第 58 位的氨基酸由 Lys(K)变为 Arg(R),其他 3 个核苷酸为同义密码子之间的转变。推导氨基酸序列中,Asp(D)和 Gln(Q)含量极高,特别是 C-端的 Asp(D)和 Gln(Q)含量比较高(约占该段氨基酸总数的 8%~9%);有 4 个 QQ 重复(分别在 42-43、65-66、180-181、324-325 位)和 1 个 QQQ 重复(208~210 位);共含 39 个 Ser(S),其为 N 蛋白的专一磷酸化位点。

2.5.3 sM 基因序列及其结构特征分析 TS 株与 Purdue 株、TFI 株和 96-1933 株的 sM 基因核苷酸序列进行比较,其同源性分别为 95.2%、92.7% 和 90.2%,推导氨基酸序列的同源性分别为 95.9%、97.2% 和 98.8%。

sM 蛋白中 64-AYKNF-68 是抗 sM 单克隆抗体结合位点的核心序列,而 sM 的抗原位点位于 C-末端。N-端的 19~40 位 HFWFLLIHILLILLSIALLNII 氨基酸残基形成 1 个疏水的  $\alpha$ 螺旋区。第 56、57 位的氨基酸 Val-Pro 在 TFI 株中缺失或变异。

### 3 讨论

与其他 TGEV 一样,TS 株的 4 个结构蛋白,除主要免疫原 S 蛋白外,其余的 3 个结构蛋白分别由位于 3'-端彼此相邻的 sM、M 和 N 基因来编码,均为 1 个完整的 ORF,分别为 ORF<sub>4</sub>、ORF<sub>5</sub> 和 ORF<sub>6</sub>。各 ORF 之间具有冠状病毒共同核心保守序列 5'-CUAAAC-3',并在 mRNA 亚基因组引导序列中也存在,可能是引导序列-聚合酶复合体在 2 个 ORFs 之间的识别位点及作为转录 mRNA 的起始信号,且每个 mRNA 转译的活跃部分均与该序列相对应,在决定冠状病毒 mRNA 的种类和数量上有着重要的意义<sup>[8,9]</sup>。

TS 株 3'-端长为 2 268 bp 的核苷酸序列中,M 和 N 基因之间几乎没有间隔,而在 ORF<sub>3</sub> 和 ORF<sub>4</sub> 之间除核心保守序列外,还有 1 个由 36 个核苷酸组成的间隔区,其中有 5 个 GAA 和 2 个 GAC,并且 4 个 GAA 是连续重复的。假如该区域中的 GAA 和 GAC 恰好为 1 个密码子,其编码产物为酸性 Glu(E),在这 12 个氨基酸的间隔区中,Glu 就占了 7 个,氨基酸的这种分布对基因组的转录和转译以及结合位点的选择有何影响,尚未见到报道。从而可知在 TGEV 基因组中编码区的位置非常接近,整个基因组紧密包装,几乎没有重叠现象。

TS 株 M 基因推导氨基酸序列的第 102 位和

171 位氨基酸由易溶于水且不带电荷的 Asn(N) 变为碱性的 Lys(K) 和酸性的 Glu(E) 转为介于极性和非极性之间的 Gly(G), 而其他核苷酸的突变均为同义密码子间的转化。这种氨基酸的突变对 M 蛋白的功能有何影响, 还有待于进一步的研究。而在弱毒株 TGEV H 株中<sup>[10]</sup>, M 蛋白的第 46 位氨基酸由酸性的 Asp(D) (在 Purdue 株、TGEV H 株、TFI 株和 93-1933 株中均为 Asp(D)) 突变为带有 1 个羟基的 Tyr(Y), 第 47 位非极性的 Leu(L) 是 M 蛋白初次进入脂质双层的位点, 这种变化能否成为 TGEV 毒力减弱的一个标志, 值得探讨, 因为 TGEV 的 M 蛋白不仅影响病毒的变异, 并决定了冠状病毒的装配位点。

分析认为 TS 株 M 蛋白 C-端应突出于囊膜外<sup>[11,12]</sup>, 因为在 TGEV M 蛋白的 C-末端不仅有 1 个糖基化位点, 而且针对 C-末端的特异性单克隆抗体可以中和 TGEV, 并可介导补体依赖型 TGEV 的细胞融合, 确定 M 蛋白的 C-末端位置, 对于研究其抗原性有着重要的意义。

同其他冠状病毒一样, TS 株的 N 基因高度保守<sup>[13,14]</sup>, 除第 58 位的氨基酸由 Lys(K) 变为 Arg(R) 外, 其他 3 个核苷酸的改变均为同义密码子之间的变化, 这种转变对毒株遗传稳定性有无影响, 值得探讨。而在弱毒株 TGEV H 株中由于第 723 和 873 位处的核苷酸缺失, 致使由其编码的第 291 位氨基酸缺失。推测这种缺失可能与 TGEV 致病性降低有关, 尚有待研究证实。在 TGEV TS 株的核苷酸推导氨基酸中 Asp(D) 和 Gln(Q) 含量极高, 可能是使整个 N 蛋白呈酸性的主要原因; N 蛋白除了对病毒 RNA 合成有调节作用外, 还在病毒的致病性、复制和转译中起着重要的作用。

TGEV TS 株的 sM 基因和其他毒株比较没有变化, 而 TFI 株 sM 基因的第 163~165 位核苷酸缺失, 导致 sM 蛋白第 55 位的氨基酸 Ile(I) 缺失。sM 蛋白是 TGEV 有效复制的必需成分, 在调控病毒装配和/或释放中起重要作用, 并为有效的抗原, 但 sM 蛋白在抗 TGEV 感染的体液和细胞免疫中的功能至今还不清楚, 值得更进一步探讨。

由 4 种结构蛋白基因核苷酸序列推导的氨基酸序列同源性比较可见, 现已经测序分析的 TGEV 可分为 2 个不同的亚基因型, TS 株和 TGEV H 株之间的同源性最高, 属于同一个亚基因型, 而 TH-98 株和 NEB72-RT 株则属于另一基因亚型。

通过对 TS 株 sM、M 和 N 蛋白氨基酸序列的比较和分析, 发现 TS 株在遗传关系上与欧洲的流行株之间较为密切, 同北美洲流行毒株之间的遗传距离较远(Miller 株除外), 而与我国 TGE 流行的同一地区不同时期分离的 TH-98 株(此毒株的 N 蛋白和 TS 株之间氨基酸同源性仅为 65.7%, 而与一些来源于北美洲的毒株 N 蛋白之间的同源性均在 97.0% 以上)却不相同, 这即提示我国的 TGEV 可能是输入性的。

#### 参考文献:

- [1] 殷 震, 刘景华. 动物病毒学 [M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1997. 681~688.
- [2] 姜成刚, 张秀英, 龙忠臣. 中药复方制剂抗猪传染性胃肠炎病毒活性的研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2004, 35(5): 587~589.
- [3] Hubert L, Denis R, Bernard D, et al. Molecular biology of transmissible gastroenteritis virus [J]. Vet Microbiol, 1990, 23: 147~154.
- [4] Kenji M, Tsutomu H, Hiroshi H, et al. Comparison of the amino acid sequence and phylogenetic analysis of the peplomer, integral membrane and nucleocapsid protein of feline, canine and porcine coronavirus [J]. Microbiol Immunol, 1996, 40(6): 425~433.
- [5] Godet M, L'Haridon R, Vauterot J F, et al. TGEV corona virus ORF4 encodes a membrane protein that is incorporated into virions [J]. Virology, 1992, 188: 666~675.
- [6] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆试验指南 [M]. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等译. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [7] Almazan F, Gonzalez J M, Penzes Z, et al. Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome [J]. Proc Natl Acad Sci, 2000, 97(10): 5516~5521.
- [8] Sara A, Ander I, Isabe S, et al. Transcription regulatory sequences and mRNA expression levels in the coronavirus transmissible gastroenteritis virus [J]. J Virol, 2002, 76(3): 1293~1308.
- [9] Myungsoo J, Shinji M. Mutagenic analysis of coronavirus intergenic consensus sequence [J]. J Virol, 1992, 66(11): 6330~6337.
- [10] 冯 力, 佟有恩, 刘胜旺, 等. 猪传染性胃肠炎毒株主要结构基因的分子克隆与序列分析 [A]. 中国畜牧兽医学会传染病分会. 中国畜牧兽医学会家畜传染病学会第五届全国会员代表大会暨第九次学术研讨会论文

- 集[C]. 山东:烟台,2001.492~497.
- [11] Risco C, Anton I M, Enjuanes L, et al. The transmissible gastroenteritis coronavirus contains a spherical core shell consisting of M and N proteins[J]. *J Virol*, 1996, 70(7): 4 773~ 4 777.
- [12] Cristina R, Ines M A, Carlos S, et al. Membrane protein molecules of transmissible gastroenteritis coronavirus also expose the carboxy-terminal region on the external surface of the viron[J]. *J Virol*, 1995, 69(9): 5 269~ 5 277.
- [13] 唐丽杰,师东方,李一经,等. 猪传染性胃肠炎病毒核衣壳N蛋白基因的克隆与鉴定[J]. *中国兽医科技*, 2002, 32: 8~ 10.
- [14] 唐丽杰,李一经,贾永清,等. 猪传染性胃肠炎病毒核衣壳(N)蛋白基因的克隆与表达[J]. *畜牧兽医学报*, 2002, 33(6): 611~ 614.

### Cloning and Structural Characterization Analysis on the sM, M and N Genes of Porcine Transmissible Gastroenteritis Virus

CHENG Jie<sup>1,2</sup>, LIU Jixing<sup>1\*</sup>, WU Run<sup>3</sup>, YIN Xiangping<sup>1</sup>, LI Bao-yu<sup>1</sup>, LAN Xi<sup>1</sup>, WANG Hui<sup>1</sup>  
 (1. Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China; 2. Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 3. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** Three structure protein genes of strain TS of transmissible gastroenteritis virus(TGEV), sM (small membrane protein), M (integral membrane protein) and N (nucleocapsid protein) genes were obtained by RT-PCR using primers designed according to their published nucleotide sequence in GenBank, and they are 346 bp, 932 bp, 1 217 bp, respectively. After splicing, the respective lengths of the sM, M and N genes of strain TS of TGEV is 248 bp, 789 bp and 1 149 bp and their predicted corresponding protein has 82, 262 and 382 amino acids(aa), respectively. The homology at the nucleotide levels for the sM gene between strain TS and Purdue, TFI, 96-1933 was found to be 95.2%, 92.7%, 90.2% respectively, and that of the deduced aa sequence was 95.9%, 97.2%, 98.8% correspondingly. The nucleotide sequence homology of M gene of strains TS shared 95.2%, 98.0%, 99.6%, 95.0% nucleotide identity and 97.0%, 97.3%, 98.5%, 93.5% deduced amino acid with that of strains Purdue, TFI, TGEV H, 96-1933. The nucleotide sequence homology of N gene between strain TS and Purdue, TFI, FS722/70, Korea, TO14, TGEV H, 96-1933 is 98.1%, 97.7%, 99.0%, 98.3%, 99.2%, 99.0%, 95.9% and putative amino acid homology is 97.9%, 98.4%, 99.0%, 97.7%, 99.5%, 96.2%, 96.6%, respectively. Sequence analysis indicated that sM and N genotypes of TGEV are conservative, there are two kinds sub-genes of TGEV in China and their origins are probably from abroad.

**Key words:** TGEV; TS strain; sM gene; M gene; N gene; cloning

\* Corresponding author