

传染性喉气管炎病毒河南株 *gB* 基因的克隆、序列
分析及其真核表达载体的构建

廖仲磊^{1,2}, 陈红英², 李新生², 崔保安², 李祥瑞¹

(1 南京农业大学 兽医学院, 江苏 南京 210095; 2 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002)

【摘 要】 【目的】构建传染性喉气管炎病毒(ILTV)的真核表达载体。【方法】从传染性喉气管炎病毒河南株(ILTV-XY)感染的鸡胚绒毛尿囊膜中提取病毒 DNA,进行 PCR 扩增,PCR 产物进行 T-A 克隆与测序,获得了鸡 ILTV-XY *gB* 全基因序列;对 ILTV-XY 株 *gB* 基因与 GenBank 中读取的 5 株 ILTV *gB* 基因核苷酸序列及推导的氨基酸序列进行了比较分析;并将该基因片段克隆到真核表达载体 pcDNA3.1 中,对构建的重组质粒 pcDNA3.1/*gB* 进行酶切、测序鉴定。【结果】序列测定表明,*gB* 全基因核苷酸长度为 2 629 bp,编码 873 个氨基酸,推导氨基酸序列有 8 个潜在的 N-糖基化位点,有 12 个与二硫键形成有关的半胱氨酸。与 GenBank 中读取的澳大利亚 SA2 疫苗株、辽宁疫苗株、烟台株、美国 632 强毒株、英国 Throne 强毒株 *gB* 基因进行比较,核苷酸序列同源性为 99% 以上,与 ILTV-SA2 株 *gB* 基因比较发现,ILTV-XY 株 *gB* 基因核苷酸序列在第 89 位均缺失 1 个碱基 G,而在第 102 位又都插入 1 个碱基 A,从而引起该毒株 *gB* 基因推导的氨基酸序列中第 28~32 位 5 个氨基酸的移码突变。构建的重组质粒 pcDNA3.1/*gB* 经酶切、测序鉴定,证实含有目的片段,且连接、构建正确。【结论】成功构建了 ILTV 的真核表达质粒 pcDNA3.1/*gB*,为 ILTV 核酸疫苗的研究奠定了基础。

【关键词】 传染性喉气管炎病毒;*gB* 基因;聚合酶链反应;序列分析;真核表达载体

【中图分类号】 S852.65;Q782 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-9387(2008)10-0029-05

Gene cloning, sequence analysis and eukaryotic expression vector
construction of *gB* gene of chicken infectious
laryngotracheitis virus Henna isolate

LIAO Zhong-lei^{1,2}, CHEN Hong-ying², LI Xin-sheng², CUI Bao-an², LI Xiang-rui¹

(1 College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China;
2 College of Animal Husbandry and Veterinary, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China)

Abstract: 【Objective】 The research was done to construct eukaryotic expression vector of ILTV. 【Method】 One pair of primers was designed and synthesized according to the chicken infectious laryngotracheitis virus (ILTV) *gB* gene nucleotide sequence (M64927) published in GenBank. *gB* gene of ILTV henan isolate (ILTV-XY) was amplified by PCR from viral DNA extracted from chicken chorioallantoic membrane infected by ILTV-XY. The purified PCR product was inserted into pGEM-T Easy vector, transforming competent cell JM109. By identification of blue-white spot screening, plasmid PCR and enzyme digestion, positive clones were sequenced. *gB* gene of ILTV-XY strain was compared with *gB* gene nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of 5 ILTV strains published in GenBank. Then, the *gB* gene was

* [收稿日期] 2008-04-08
[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划专项(2006BAD06A08)
[作者简介] 廖仲磊(1969—),男,河南汝南人,兽医师,在读博士,主要从事分子病毒学和分子免疫学研究。
[通讯作者] 李祥瑞(1958—),男,河南获嘉人,教授,博士生导师,主要从事动物细胞因子及寄生虫分子免疫学研究。

subcloned into the eukaryotic expression vector pcDNA3.1 to construct recombinant plasmid pcDNA3.1/gB, recombinant plasmid pcDNA3.1/gB was identified for PCR and enzyme digestion. 【Result】 The sequencing results indicate *gB* gene nucleotide sequence of LTV-XY strain is 2 629 bp in length, which includes one open-reading frame (2 622 bp), encoding 873 amino acid residues, eight potential N-glycosylation sites and twelve cysteines in deduced amino acid sequence. Comparison of the *gB* gene nucleotide sequence with that of ILTV 632 strain, SA2 strain, Throne strain, yantai strain, liaoning strain, published previously in GenBank, revealed over 99.0% similarity. When compared with ILTV SA2 strain, ILTV-XY strain had one base deletion of G at 89 nt and one base insertion of A at 102 nt within *gB* gene resulting in five amino acid frame shift mutation. Recombinant plasmid was confirmed that the sequence of recombinant plasmid pcDNA3.1/gB in the reading frame and the ligation part was correct by identification of plasmid PCR, enzyme digestion and sequencing. 【Conclusion】 The result showed that the recombinant plasmid pcDNA3.1/gB was constructed correctly, which paved the way of DNA vaccine.

Key words: infectious laryngotracheitis virus; *gB* gene; polymerase chain reaction; sequence analysis; eukaryotic expression vector

传染性喉气管炎(Infectious Laryngotracheitis, ILT)是由传染性喉气管炎病毒(Infectious laryngotracheitis virus, ILTV)^[1]引起的高度接触性上呼吸道感染病。初次感染时发病率接近 100%, 死亡率高达 70%, 可致产蛋鸡产蛋量明显下降, 是危害养禽业的重要疫病之一。自 1925 年 May 在美国洛岛发现该病以来, 现已遍及世界各地^[2-3]。我国在 20 世纪 50 年代发现本病, 1988~1990 年曾在许多省份流行, 1992 年以后在我国一些地区又呈地方性流行。洁净地区一旦发生本病, 将引起 ILT 爆发, 导致重大损失, 所以 ILT 的防制已成为世界养禽业面临的难题。ILTV 属于疱疹病毒科 α 疱疹病毒亚科, 其基因组为 155 kb 的双链线性 DNA 分子。基因组分为长独特区、短独特区、反向重复序列和末端重复序列。*gB* 基因位于长独特区, 其编码的 *gB* 糖蛋白位于病毒粒子表面, 是病毒感染所必需的主要糖蛋白, 也是该病毒的主要保护性抗原。因此, *gB* 基因是目前 ILTV 研究的热点^[4-10]。给鸡接种 ILTV 弱毒疫苗是预防 ILT 的主要措施, 但由于目前使用的弱毒疫苗对雏鸡仍有一定毒力, 且毒力易于返强, 可引起潜伏性感染及疫情扩散, 使 ILT 不能得到有效控制, 所以新型 ILT 疫苗的研制势在必行。本研究对 ILTV 河南株的 S1 基因进行克隆与序列测定, 并构建 *gB* 基因的真核重组表达质粒, 以期为我国 ILTV 的分子流行病学研究及其核酸疫苗的研制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

ILTV 河南株(ILTV-XY)由河南省动物性食品

安全重点实验室分离保存; 9~11 日龄 SPF 鸡胚购自北京梅里亚维通实验动物技术有限公司; pGEM-T Easy Vector 购自 Promega 公司; Premix Ex Taq DNA 聚合酶, DNA marker DL2000, X-gal 和 IPTG, 限制性内切酶 *Sal* I、*Pst* I、*Hind* III、*Eco*R I 和 *Xho* I 等均购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 ILTV 的增殖与 DNA 的提取

将 ILTV-XY 经绒毛尿囊膜接种 10 日龄 SPF 鸡胚, 收集 72~120 h 含痘斑的鸡胚尿囊膜和尿囊液, 剪碎研磨后用尿囊液制成悬液。室温至 -20 ℃ 反复冻融 3 次, 4 ℃ 下 7 000 r/min 离心 30 min, 取上清液按娄高明^[11]的方法提取病毒 DNA。

1.3 ILTV *gB* 基因的扩增

参考 GenBank 发表的 ILTV *gB* 基因核苷酸序列, 应用 Primer (Version 5.0) 基因分析软件设计 1 对引物, 上、下游引物分别加入 *Eco*R I 和 *Xho* I 酶切位点(下划线部分)。上游引物为: 5'-GAG GAATTCAATGGCTAGCTTG-3'; 下游引物为: 5'-GCGTCTCTCGAGTTATTCGTCTTC-3'。该引物理论跨幅为 2 629 bp, 跨越 *gB* 全基因(2 622 bp), 引物本身不形成发夹结构, 2 条引物间不形成二聚体。引物由上海生工生物工程公司合成。

以提取的病毒 DNA 为模板进行目的基因的扩增, 反应体系为: 25 μ L Premix Ex Taq DNA 聚合酶, 2 μ L 模板 DNA, 上、下游引物各 1 μ L, 补超纯水至 50 μ L。扩增条件为: 95 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 1 min, 54 ℃ 50 s, 72 ℃ 3.5 min, 36 个循环; 最后 72 ℃ 延伸 10 min。反应结束后, 取 5 μ L PCR 产物作

电泳检查,并进行目的片段纯化。

1.4 ILTV *gB* 基因的克隆、测序与分析

将纯化的 PCR 产物与 pGEM-T Easy 载体进行连接反应,构建重组质粒 pGEM-*gB*,并按常规方法^[12]转化 *E. coli* JM109 感受态细胞,在含有 X-gal (40 μg/mL)、IPTG (40 μg/mL) 和氨苄青霉素 (Amp, 50 μg/mL) 的 LB 琼脂培养基上培养 12~16 h,挑取白斑菌落接种含有 Amp 的 LB 肉汤,37 ℃ 振荡培养 12~16 h,提取重组质粒进行 PCR 鉴定和用 *Sal* I、*Pst* I 进行酶切鉴定。挑选阳性克隆送上海生工生物工程技术有限公司进行测序,并与 GenBank 中读取的 ILTV *gB* 基因进行序列分析。

1.5 ILTV *gB* 基因真核重组表达质粒的构建

用 *Eco*R I 和 *Xho* I 酶切重组质粒 pGEM-*gB*,将 *gB* 片段释出,定向克隆到同样处理的 pcDNA3.1 载体中,将 *gB* 基因片段定向插入到同样处理的真核表达载体 pcDNA3.1 中,构建重组表达质粒 pcDNA3.1/*gB*。转化 *E. coli* JM109 感受态细胞,涂布于含 Amp(50 μg/mL)的 LB 琼脂板上,37 ℃ 温箱培养 12~16 h。挑选白色菌落接种于含有 Amp(50 μg/mL)的 LB 肉汤培养基上,37 ℃ 振荡培养 12~16 h。用碱性裂解法小量提取重组质粒进行 PCR 鉴定,并用 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切及 *Bam*H I 和 *Hind*III 单酶切进行鉴定。最后将 PCR 鉴定和酶切鉴定为阳性的重组质粒送上海生物工程有限公司进行序列测定,验证重组质粒读码框的正确性。

2 结果与分析

2.1 ILTV *gB* 的扩增与克隆

电泳结果显示,用 ILTV *gB* 基因特异引物从 ILTV-XY 基因组 DNA 中扩增出 1 条约 2 600 bp 的特异带,与预期扩增的 DNA 片段长度相符(图 1)。

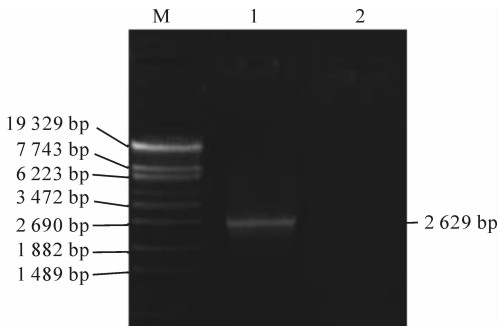


图 1 ILTV *gB* 基因的 PCR 扩增结果

M. DNA Marker λ-EcoT14 I;1. PCR 产物;2. 阴性对照

Fig. 1 PCR result of *gB* gene of ILTV-XY strain

M. DNA Marker λ-EcoT14 I;1. PCR product;2. Negative control

纯化的 PCR 产物与 pGEM-T Easy 载体连接、转化后,抽提重组质粒进行 PCR、电泳,结果出现 1 条约 2 600 bp 的特异条带;重组质粒经 *Sal* I 酶切(*gB* 基因序列中在 654 位为 *Sal* I 位点)、电泳后出现 2 条带:一条长约 2 000 bp,另一条约 3 600 bp;经 *Pst* I 酶切(*gB* 基因序列在 1 317 位为 *Pst* I 位点)、电泳也出现 2 条带:一条长约 1 300 bp,另一条约 4 300 bp,与预期结果一致(图 2)。表明获得了 ILTV-XY 株 *gB* 基因的重组质粒,阳性重组质粒命名为 pGEM-ILTV *gB*。

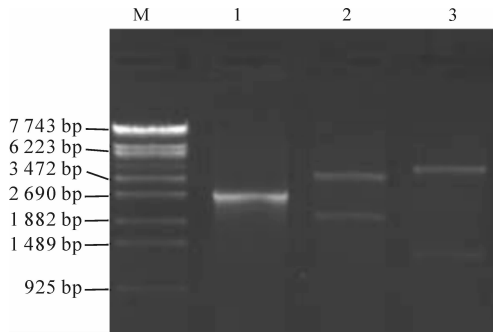


图 2 重组质粒 pGEM-*gB* 的 PCR 和酶切鉴定结果

M. DNA Marker λ-EcoT14 I;1. 重组质粒 pGEM-*gB* 的 PCR 产物;

2. *Sal* I 酶切重组质粒 pGEM-*gB*;3. *Pst* I 酶切重组质粒 pGEM-*gB*

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pGEM-*gB*

by digestion (*Pst* I, *Sal* I) and PCR

M. DNA Marker λ-EcoT14 I;1. PCR product of recombinant

plasmid pGEM-*gB*;2. Recombinant plasmid pGEM-*gB* digested by

Sal I;3. Recombinant plasmid pGEM-*gB* digested by *Pst* I

2.2 ILTV *gB* 基因序列的测定与分析

序列测定结果表明,ILTV-XY 株 *gB* 基因核苷酸序列长为 2 629 bp,包含一个完整的开放阅读框,(G+C)含量为 44.66%,共编码 873 个氨基酸的多肽,分子质量为 99 ku。*gB* 基因推导的氨基酸序列有 8 个潜在的 N-糖基化位点,位于第 92,111,201,252,350,569,625 和 639 位点上,分别为“-NMT-”、“-NVT-”、“-NFT-”、“-NTT-”、“-NIS-”、“-NST-”、“-NAS-”和“-NAT-”,有 12 个与二硫键形成有关的半胱氨酸。其亲水性分析发现,该多肽 N 端前 21 个氨基酸残基构成一段强疏水区域,推测为 *gB* 糖蛋白信号肽。

2.3 ILTV *gB* 基因核苷酸及推导的氨基酸序列比较

通过 Dnastar 软件 Clustal 程序,对 ILTV-XY 株 *gB* 基因与基因库中读取的 5 株 ILTV *gB* 基因核苷酸序列进行比较分析(图 3),ILTV-XY 株 *gB* 基因与辽宁疫苗株(No. AY704730)、烟台株(No.

DQ118666)、美国 632 强毒株(No. X56093)、澳大利亚 SA2 疫苗株(No. M64927)、英国 Throne 强毒株(No. D00818)的 *gB* 基因核苷酸同源性分别为 99.7%,99.5%,99.7%,99.1%和 99.7%。

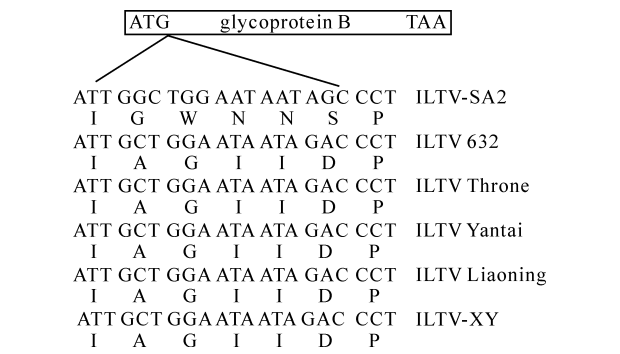


图 3 ILTV 强弱毒株 *gB* 基因序列比较分析

Fig. 3 Comparative analysis of *gB* gene sequence of ILTV

与 ILTV-SA2 株相比,ILTV-XY 株 *gB* 基因核苷酸序列在第 89 位缺失 1 个碱基 G,而在第 102 位又插入 1 个碱基 A,从而引起该毒株 *gB* 基因推导

的氨基酸序列中第 28~32 位 5 个氨基酸的移码突变,即 ILTV-SA2 株的甘氨酸(G)、色氨酸(W)、天冬酰胺(N)、天冬酰胺(N)和丝氨酸(S)变成了该毒株的丙氨酸(A)、甘氨酸(G)、异亮氨酸(I)、异亮氨酸(I)和天冬氨酸(D)(图 3)。ILTV-XY 株 *gB* 基因还存在多处点突变,ILTV-XY 与 SA2 株的 *gB* 基因氨基酸同源性为 98.4%。

2.4 ILTV *gB* 基因重组表达质粒的构建

图 4 表明,对重组表达质粒 pcDNA3.1/*gB* 进行 PCR、电泳,结果出现 1 条 2.6 kb 的特异条带。经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切、电泳出现 2 条带:一条长约 5.4 kb,另一条长约 2.6 kb;经 *Hind* III 酶切、电泳出现 2 条带(*gB* 序列中在 500 bp 有一 *Hind* III 酶切位点):一条长约 7.5 kb,另一条长约 0.5 kb;用 *Bam* H I 酶切、电泳出现 1 条约 8.0 kb 的带。测序结果表明,该转化菌的质粒中确实含有目的基因片段,且读码框正确,说明重组质粒 pcDNA3.1/*gB* 构建成功。

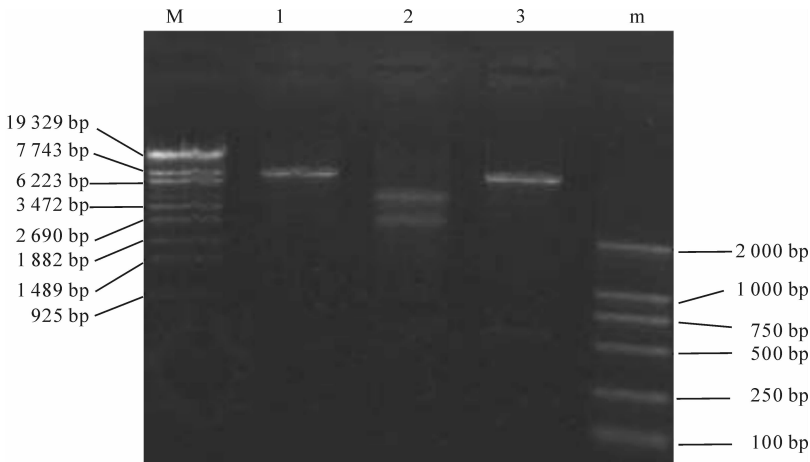


图 4 重组质粒 pcDNA3.1/*gB* 的酶切鉴定结果

M. DNA Marker λ -EcoT14 I digest;1. *Bam*H I 单酶切;2. *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切;3. *Hind* III 单酶切;m. DNA Marker DL2000

Fig. 4 Identification of recombinant plasmid pcDNA3.1/*gB* by digestion

M. DNA Marker λ -EcoT14 I digest;1. Digested by *Bam*H I ;2. Digested by *Eco*R I and *Xho* I ;3. Digested by *Hind* III ;m. DNA Marker DL2000

3 讨论

鸡传染性喉气管炎(ILT)是由传染性喉气管炎病毒(ILTV)引起的一种鸡急性上呼吸道传染病,呈全球性流行,是危害养禽业的重要疫病之一。目前,ILT 的防制都是使用减毒活疫苗,这些疫苗的毒力普遍偏强,可以在鸡体内潜伏感染,而且在鸡体传代过程中毒力返强^[13]。因此,用传统方法已无法解决这些问题,利用生物技术来研制基因工程疫苗,如基因疫苗、基因缺失疫苗和病毒载体疫苗是防制 ILT

的趋势。ILTV *gB* 基因是该病毒的糖蛋白基因,其编码的糖蛋白复合物是一种跨膜蛋白,位于病毒粒子的外层囊膜上,是病毒感染所必需的,在病毒接触和进入宿主细胞时起关键作用。糖蛋白 *gB* 能诱导体液免疫和细胞免疫,由其制备的亚单位疫苗免疫鸡,可 100%抵抗强毒的攻击而不引起发病,且对强毒复制也有抑制作用,是该病毒的主要保护性抗原基因^[4,8,14]。

本研究成功克隆了鸡 ILTV-XY 株 *gB* 基因。序列分析表明,ILTV-XY 株 *gB* 基因与 GenBank

中读取的澳大利亚 SA2 疫苗株、辽宁疫苗株、烟台株、美国 632 强毒株、英国 Throne 强毒株 *gB* 基因核苷酸同源性在 99% 以上; 与 ILTV-SA2 株相比, ILTV-XY 株、烟台株、美国 632 强毒株、英国 Throne 强毒株和辽宁疫苗株 *gB* 基因核苷酸序列均在第 89 位缺失 1 个碱基 G, 而在第 102 位又都插入 1 个碱基 A, 从而引起这些毒株 *gB* 基因推导的氨基酸序列中第 28~32 位 5 个氨基酸的移码突变, 即 ILTV-SA2 株的甘氨酸(G)、色氨酸(W)、天冬酰胺(N)、天冬酰胺(N)和丝氨酸(S)变成了这些毒株的丙氨酸(A)、甘氨酸(G)、异亮氨酸(I)、异亮氨酸(I)和天冬氨酸(D), 表明此变异与病毒的毒力无关, 进一步证明 *gB* 基因是非常保守的, 这与 *gB* 基因是该病毒复制的必需基因是一致的, 与张绍杰等^[15] 的研究结果相同。

应用 PCR 技术从 ILTV-XY 感染的鸡胚绒毛尿囊膜中分离 *gB* 基因全基因, 并将其插入 pcDNA3.1(+) 构建重组真核表达质粒。选用的真核表达载体 pcDNA3.1(+) 是研制基因核酸疫苗普遍采用的一种载体, 含有 CMV 启动子及 BGH 终止信号, 可保证外源基因的高效起始表达及有效终止。*gB* 基因真核重组表达质粒的构建, 为从分子水平上防制 ILT 开辟了新的途径, 同时也为研制控制其他畜禽传染病的基因疫苗探索出了一条新途径。

[参考文献]

[1] Guo P, Scholz E, Turek J, et al. Assembly pathway of Avian Infectious Laryngotracheitis Virus [J]. Am J Veterinary Research, 1993, 54(2): 2031-2089.

[2] Curtis P E, Wallis A S. Infectious laryngotracheitis [J]. Avian Dis, 1999, 43: 98-105.

[3] Gulacti I, Eroksuz Y, Bulut H, et al. Outbreak of clinical infectious laryngotracheitis in Turkey [J]. Vet Rec, 2007, 60(16): 554-555.

[4] Ojkic D, Swinton J, Vallieres M, et al. Characterization of field isolates of infectious laryngotracheitis virus from Ontario [J]. Avian Pathol, 2006, 35(4): 286-292.

[5] Fuchs W, Veits J, Helferich D, et al. Molecular biology of avian infectious laryngotracheitis virus [J]. Vet Res, 2007, 38(2): 261-279.

[6] Poulsen D J, Keeler C L Jr. Characterization of the assembly and processing of infectious laryngotracheitis virus glycoprotein B [J]. J Gen Virol, 1997, 78 (Pt 11): 2945-2951.

[7] Veits J, Mettenleiter T C, Fuchs W. Five unique open reading frames of infectious laryngotracheitis virus are expressed dur-

ing infection but are dispensable for virus replication in cell culture [J]. J Gen Virol, 2003, 84(Pt 6): 1415-1425.

[8] 智海东, 王云峰, 孙永科, 等. 表达传染性喉气管炎病毒 *gB* 基因和新城疫病毒 *F* 基因重组鸡痘病毒疫苗免疫持续期试验 [J]. 中国预防兽医学报, 2006, 28(1): 13-15.

Zhi H D, Wang Y F, Sun Y K, et al. Co-expression of glycoprotein B (*gB*) of infectious laryngotracheitis virus and fusion protein of Newcastle disease virus in a recombinant fowlpox virus [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2006, 28(1): 13-15. (in Chinese)

[9] 郑海洲, 杨虹, 柏佳宁, 等. 鸡传染性喉气管炎病毒 *gB* 基因的克隆及其在耻垢分枝杆菌中的表达 [J]. 微生物学报, 2004, 44(6): 830-833.

Zheng H Z, Yang H, Bai J N, et al. Cloning and expression of *gB* gene of infectious laryngotracheitis virus in *M. Smegmatis* [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2004, 44(6): 830-833. (in Chinese)

[10] 郑海洲, 柏佳宁, 边艳青, 等. 鸡传染性喉气管炎病毒 *gB* 基因的克隆及其原核表达 [J]. 中国兽医学报, 2005, 25(4): 343-345.

Zheng H Z, Bai J N, Bian Y Q, et al. Cloning the *gB* gene of ILTV vaccine strain and its in prokaryotic expression [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2005, 25(4): 343-345. (in Chinese)

[11] 娄高明. 检测伪狂犬病的 PCR 方法的建立及其在临床诊断中的应用 [J]. 病毒学报, 2002, 28(2): 171-176.

Lou G M. The establishment and application of PCR to clinical diagnosis of pseudorabies [J]. Chinese Journal of Virology, 2002, 28(2): 171-176. (in Chinese)

[12] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[13] Rodriguez-Avila A, Oldoni I, Riblet S, et al. Replication and transmission of live attenuated infectious laryngotracheitis virus (ILTV) vaccines [J]. Avian Dis, 2007, 51(4): 905-911.

[14] 张绍杰, 童光志, 王柳, 等. 鸡传染性喉气管炎病毒 ILTV 糖蛋白 *gB* 在重组痘病毒中的表达 [J]. 中国预防兽医学报, 2000, 22(3): 205-207.

Zhang S J, Tong G Z, Wang L, et al. Construcion of recombinant fowlpox expressing glycoprotein B of infectious laryngotracheitis virus [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2000, 22(3): 205-207. (in Chinese)

[15] 张绍杰, 孟松树, 仇华吉, 等. 鸡传染性喉气管炎病毒 (ILTV) *gB* 基因序列比较分析 [J]. 中国兽医学报, 2000, 20(6): 544-547.

Zhang S J, Meng S S, Qiu H J, et al. Sequence analysis of *gB* gene of avian infectious laryngotracheitis virus strain Wang-gang [J]. Chinese Journal of veterinary science, 2000, 20(6): 544-547. (in Chinese)