

传染性喉气管炎病毒烟台株 gE 基因的克隆与序列分析*

刘文波¹, 黄兵^{1,2}, 马秀丽², 张素芳¹, 张秀美², 陈溥言¹

(1 南京农业大学 农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 江苏 南京 210095;

2 山东省农业科学院 家禽研究所, 山东 济南 250023)

[摘要] 根据传染性喉气管炎病毒(LTV) gE 基因序列设计并合成 1 对引物, 以烟台株为模板, 用 PCR 法扩增出 1 条 1.5 kb 的基因片段, 并将其克隆至 pMD18-T 载体中。经电泳分析、酶切鉴定, 将得到的重组质粒命名为 pMD-gE 并进行序列测定。将测序结果与 LTV 美国标准攻毒毒株和中国王岗株, BHV-1, EHV-1, FHV-1, HHV-2, HHV-3, HVT, MDV-1, MDV-2, PRV 的 gE 基因比较, 发现核苷酸和氨基酸的同源性分别为 99.7%~11.9% 和 99.4%~15%。结果表明, 不同 LTV 毒株之间 gE 基因还是比较保守的, 但不同疱疹病毒之间, gE 基因的同源性较低。

[关键词] 传染性喉气管炎病毒; 烟台株; gE 基因; 克隆; 序列分析

[中图分类号] S852.65⁺.9.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)08-0026-05

传染性喉气管炎病毒(Infectious laryngotracheitis virus, LTV)属于疱疹病毒科 α 病毒亚科, 可引起鸡的急性上呼吸道传染病, 表现为呼吸困难、产蛋鸡产蛋下降和较高的死亡率, 是危害养禽业的重要病毒之一^[1]。LTV 基因组为典型的D型结构, 为双股线状DNA, 大小约 155 kb, 包括 120 kb 的UL区(长独特区)和 17 kb 的US区(短独特区)。US 右侧为末端重复序列(TRS), 在UL区和US区之间还有一个反向重复序列(IRS)。二者序列相同, 但方向相反, 各为 9 kb, 这种结构与其他疱疹病毒相似^[2,3]。现已确定的 LTV 编码基因有UL区的TK, gB, gC, gK, ICP27 和 DNA 螺旋酶基因, US 区的gD, PK, gX, gp60 基因及反向序列的 ICP4 和 P40 基因。

gE 基因位于US区, 是疱疹病毒的一种囊膜糖蛋白基因。对大多数疱疹病毒而言, 它不是病毒复制的非必需基因, 但却是疱疹病毒重要的毒力相关基因。目前, 国内外对 LTV gE 的基因序列和结构功能报道还比较少^[4,5]。为此, 本研究对 LTV 烟台株的 gE 基因进行了克隆和序列结构功能分析, 并与已报道的 LTV 毒株及同属 α 疱疹病毒亚科的其他毒株 gE 基因进行了核苷酸和氨基酸的序列比较分

析, 丰富了国内 LTV gE 基因序列研究, 为进一步研究 gE 基因的功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 质粒载体、工程菌和试验毒株

pMD18-T 载体购自大连宝生物公司, 宿主菌 DH5 α 由南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室保存, LTV 烟台株由山东省农科院家禽研究所禽病室惠赠。

1.2 鸡胚

SPF 鸡胚由山东省农科院家禽研究所 SPF 鸡场提供。

1.3 酶和试剂

Taq 酶, 限制性内切酶 *Pst* I 和 *Bam* H I 购自大连宝生物公司, DNA 胶回收试剂盒购自上海生工公司。

1.4 引物设计与合成

根据已发表的 LTV 序列^[5]设计了 1 对引物。P1: 5'-CTC TGC A GG TAG GCT TGG GAG CAT AT-3'; P2: 5'-GGC GGA TCC CTA CTA GCT ATC CAT ATT C-3'。扩增 gE 基因长 1.5 kb, 引物

* [收稿日期] 2004-11-29

[作者简介] 刘文波(1976-), 男, 山东商河人, 在读博士, 主要从事动物分子病毒学和免疫学研究。

[通讯作者] 陈溥言(1941-), 男, 江苏南京人, 教授, 硕士, 博士生导师, 主要从事畜禽传染病研究。

由大连宝生物公司合成。

1.5 病毒增殖及其核酸的提取

将 LTV 烟台株经绒毛尿囊膜接种于 10 日龄 SPF 鸡胚, 收集 72~120 h 富含痘斑的鸡胚尿囊膜和尿囊液, 参照文献[6]的方法提取病毒 DNA 作为 PCR 模板。

1.6 PCR 扩增

在 PCR 管中加入 10 × PCR Buffer 5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 4 μL, 10 mmol/L dNTP 1 μL, 上下游引物各 20 pmol, 模板 1 μL, Taq DNA 聚合酶 0.5 μL, 加超纯水补至 50 μL, 置 PCR 仪上按下述条件进行扩增: 94 °C 预变性 5 min, 然后 94 °C 45 s, 64 °C 1 min, 72 °C 延伸 90 s, 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。取 5 μL PCR 产物于 10 g/L 琼脂糖凝胶上电泳并分析结果。

1.7 PCR 产物的克隆与鉴定

取 15 μL PCR 产物在 10 g/L 琼脂糖凝胶上电泳并回收目的条带, 再将其连接到 pMD18-T 载体

中, 转化 DH5α 大肠杆菌。挑取数个单菌落进行培养, 用常规法提取质粒, 并用 *Pst*I 和 *Bam*H I 进行双酶切鉴定。鉴定正确的阳性克隆送大连宝生物公司测序。

1.8 序列与功能分析

用 DNA Star 软件对得到的 gE 基因序列、GenBank 收录的 LTV 及其他疱疹病毒的 gE 基因序列进行核苷酸和氨基酸的序列及结构功能分析。

2 结果与分析

2.1 LTV gE 基因的扩增

应用设计的引物扩增出 1 条 1.5 kb 左右的条带, 符合目的片段大小(图 1)。

2.2 目的基因的克隆及酶切分析

对提取的质粒用 *Pst*I 和 *Bam*H I 进行双酶切, 均出现 1 条 2.7 和 1.5 kb 左右的条带(图 2), 表明 gE 基因已克隆到 pMD18-T 载体中, 将得到的重组质粒命名为 pMD-gE。

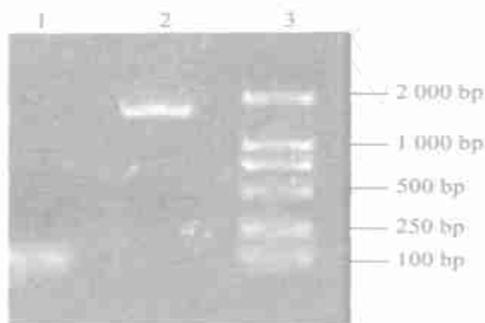


图 1 PCR 扩增的 LTV gE 基因

1. 阴性对照; 2 PCR 产物; 3 DL 2 000 marker

Fig 1 Amplified gE gene by PCR

1. Negative control; 2 PCR product; 3 DL 2 000 marker

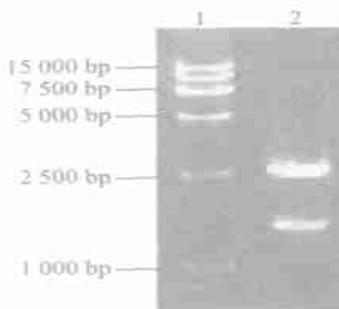


图 2 重组质粒 pMD-gE 的酶切鉴定

1. DL 15 000 marker; 2 重组质粒

Fig 2 Identification of the recombinant pMD-gE plasmid by digestion with *Pst*I and *Bam*H I

1. DL 15 000 marker; 2 The recombinant plasmid

2.3 DNA 序列测定与比较分析

经测序, LTV 烟台株 gE 基因序列包括 1 个 1 500 bp 的完整阅读框架。将该序列与在 GenBank 上查到的 LTV 美国标准攻毒毒株 (GenBank No: U 28832), 已发表的中国王岗株的 gE 基因序列及其他疱疹病毒的 gE 基因序列进行比较, 结果发现该毒株的 gE 基因序列与美国标准攻毒毒株的相比只有 4 个核苷酸发生了变异: A₃₄₀ G, G₆₂₉ A, G₁₁₅₆ A, T₁₄₉₇ G, 核苷酸的同源性高达 99.7%。与中国王岗株相比较, 则有 8 个核苷酸发生了变异:

A₃₀ T, A_{127,340} G, G_{629,1003} A, C_{800,944} T, T₁₄₉₇ G, 核苷酸的同源性为 99.5% (图 3 涂阴影者为变异核苷酸)。由于烟台株已证实为一强毒株^[7], 而中国王岗株和美国标准攻毒毒株也是强毒株, 可见他们之间核苷酸的变异对其毒力影响不大。但该序列与 BHV-1, EHV-1, FHV-1, HHV-2, HHV-3, HVT, MDV-1, MDV-2 和 PRV 等其他疱疹病毒的 gE 基因序列同源性并不高, 核苷酸的同源性分别为 20.4%, 22.5%, 11.9%, 33.2%, 13.7%, 17.3%, 31.1%, 30.2% 和 30.4%。

ATGAACATGTTAGTGATAGTTCTCGCCTCTTGTCTTTCGCGCCTAACTTTTTCGACGCGACACGTCTCT T TT TTGGAAGGC80
 ACTCAGGCTGTCTCGGGGAAGATGATCCCAGAAACGTTCCGGAAGGGACTGTAATCAAATGGACAAAAGTCTCGGG160
 AACCGGTGCAAGATGAAGGCGGCCGATGTCTGCTCTTCGCCTAACTATTGCTTTTCATGATTTAATTTACGACGGAGGAAA 240
 GAAAGACTGCCCCCGCGGGACCCCTGTCTGCAAACCTGGTAATTTTACTAAAGCGCGGGCGAAAGCTTCGTCGTGCTG 320
 GGTTCGCGGCTACACAACAGCGATATACTAATATCATGTGGACAGAGTACGGAGGCCTGCTCTTTGATCCTGTAACCTG 400
 TTGGACGAGGGAATCTATTTTCGACGGATCTCTCAGCCAGATCTGGCCATGGAACTACATCGTACAACGTCAGCGTTCT 480
 TTCGCACGTAGACGAGAAGGCTCCAGCACCGCACGAGGTGGAGATAGACACCATCAAGCCGTCAGAGGCCACGCGC 560
 ACGTGGAATTACAAATGCTGCCGTTTCATGAACTCAACGACAACAGCCCCACCTATGTGACCCCTGTTCTTAAAGTCTTC 640
 CCACCGACCGAGCACGTAATAATTTAACGTTACGTATTCGTGGTATGGGTTTGATGTCAAAGAGGAGTGCGAAGAAGTGA 720
 AACTGTTTCGAGCCGTGCGTATACCATCTACAGACGGCAAATGTCAGTTTCCCGCAACCAACCAGAGATGCCTCATAGG 800
 ATCGCGTGCCGAACCTACGGTTCGATTTCGGACTCTCCGAGTCACGCGCAGGCCTGGTGATCAGTCTCTTATAGCCATC 960
 CCCAAAGTTTTGATTATAGTCGTTTCCGACGGAGACATTTTGGGATGGAGCTACACGGTGCTCGGGAAACGTAACAGTC 1040
 CGCGCGTAGTAGTCGAAACGCACATGCCCTCGAAGGTCCCGATGAACAAAGTAGTAATTGGCAGTCCCGGACCAATGG 1120
 ACGAAACGGGTAATAAAAATGTAATTCGTCGTCGCGGGGGTGACCGCGACGTGCGTAATTTCTTACATGCGCTCTGCT 1200
 TGTGGGGAAGAAAGTGCACCGCACCAATGGGTACTTTTTCCAAGACCGAACCATTTGTACGCGCCGCTCCCCAA 1280
 AAACGAGTTTGAGGCCGGCGGGCTTACGACGATGAGGAAGTGATTTATGACGAAGTATACGAACCCCTATTTTCGCGGC1360
 TACTGTAAGCAGGAATTCGCGAAGATGTGAATACCTTTTTTCGGTTCGGTCTGGAGGGAGAAAGGGCTTAACTTTA1440
 AATCCGCCATCGCATCAATGGCAGATCGCATCTGGCAAATAAAAAGCGGCAGAAGGAATATGGATAGCTAGTAG 1500

(A)

MNMLVIVLAS[□]LARLTFATRHVLFLEGTQAVLGEDDPRNVEPTVIKWKVLRNA[□]KMKAADV[□]SSPNY[□]FHDLIYDGGKKD
[□]PPAGPLSANLVILLKRGESFVVLGSLHNSDITNIMWTEYGGLLFDPVTRSEGIYFRRISQPDLMETTSYNVSVLSHVDEKAP
 APHEVEIDTIKPEAHAVHELQMLPFHELNDNSPTYVTPVLKVFPPTEHVKNV[□]TYSWYGFVDVKEECEEVKLFEPVCVYHPTDGK
 CQFPATNQRCLIGSVLMAEFLGAASLLDCSRDITLEDCHENRVPNLRFDLSRLSESRAGLVISPLIAPKVLIVVSDGDILGWSYTVLG
 KRNSPRVVVETHMPKVP MNKVVIGSPGPMDETGNKYMFVAVGTATCVILTALLVGGKKCPAHQMGTFSKTEPL[□]YAPL[□]PK
 NEFEAGGLTDDEEVIYDEV[□]YEP[□]FRGYCKQEFREDVNTFFGAVVEGERALNFKSAIASMADRILANKSGRRNMDS

(B)

图 3 gE 基因核苷酸序列(A)和推导的氨基酸序列(B)

Fig 3 Nucleotide sequence (A) and deduced amino acid sequence (B) of gE gene (five highly conserved Cysteine residues and two motif are indicated by box, the potential glycosylation sites are underlined)

2.4 gE 蛋白氨基酸序列同源性比较

LTV 烟台株 gE 基因所含完整的开放阅读框架编码 498 个氨基酸, 分子质量约为 55.3 ku, 等电点为 5.444。与美国标准攻毒毒株 gE 蛋白氨基酸序列相比, 同源性为 99.4%, 只有 3 个氨基酸发生了变化, 分别是 A_{sn115} A_{sp}, A_{rg210} Lys, A_{la386} Thr, 与其核苷酸差异基本一致。与中国王岗株相比, 则有 6 个氨基酸发生了变化: A_{rg43} Gly, A_{sn115} A_{sp}, A_{rg210} Gln, A_{la268} Val, Phe₃₁₅ Leu, Gly₃₃₅ Ser, 核苷酸的同源性为 98.8%。但烟台株 gE 蛋白的氨基酸序列与 BHV-1, EHV-1, FHV-1, HHV-2, HHV-3, HVT, MDV-1, MDV-2 和 PRV 等其他疱疹病毒的 gE 氨基酸序列相比, 同源性仅为 21.9%, 16.1%, 15%, 21.2%, 16.5%,

17.4%, 18.2%, 17.4% 和 19.8%。

由于 LTV 烟台株 gE 基因核苷酸序列第 1497 个碱基由 T 变为 G, 其编码的氨基酸也就由 Thr 变为终止密码子, 使得烟台株 gE 蛋白编码的氨基酸序列比美国标准攻毒毒株和中国王岗株 gE 蛋白氨基酸序列少了 1 个氨基酸。同时, 由于烟台株 gE 蛋白第 115 个氨基酸由 A_{sn} 变为 A_{sp}, 从而使其比美国标准攻毒毒株和中国王岗株少了 1 个 N 糖基化位点, 这将有可能改变其功能表位。用 DNA Star 软件对 LTV gE 蛋白分析结果表明, 其抗原表位主要集中在 gE 蛋白一级结构的中部。

3 讨论

本研究结果表明, LTV 烟台株 gE 基因与中国

王岗株 gE 基因相比,核苷酸同源性为 99.5%,氨基酸同源性为 98.8%;与美国标准攻毒毒株 gE 基因相比,核苷酸同源性高达 99.7%,氨基酸同源性为 99.4%。由于这 3 个毒株分别来自不同的地方,说明 LTV 不同毒株之间 gE 基因有着高度的保守性。由于 gE 基因在 LTV 基因组中并不是最保守的基因,但是 LTV 本身遗传变异性不大,这不仅体现在 LTV 只有一个血清型,而且也体现在基因水平上。gE 基因的高同源性在一定程度上也体现了基因组的保守性。本研究同时也发现,尽管同属禽类疱疹病毒,但 LTV 和 MDV 及 HVT 之间 gE 基因核苷酸的同源性也不高,这与 Johnson 等^[8]的研究是一致的。根据用 DNA Star 软件绘制的遗传进化树分析发现, LTV 烟台株和美国标准攻毒毒株间的关系更近一些,而且两者 gE 基因无论是核苷酸还是氨基酸的同源性都较高。

本研究所做的氨基酸序列分析表明,尽管不同 α 疱疹病毒之间氨基酸序列同源性较低,但它们均具有相似的排列和结构:其 N 端约 30 多个疏水氨基酸为信号肽,保守的氨基酸集中在该蛋白的中部,在 C 端最后的几十个氨基酸则全部为亲水性的,构成 gE 蛋白的膜内区。对 LTV 烟台株 gE 蛋白进行分析,发现其也具有相似的结构:紧接启动子的一段

氨基酸为疏水性的氨基酸(第 1~18 位),为信号肽序列,在 C 端(第 378~402 位)包含很强的疏水残基代表跨膜片段,其后的亲水氨基酸(第 403~498 位)则构成膜蛋白的胞内区(图 4)。由此可以看出,该蛋白属典型的 I 型膜蛋白。另外,所比较的 10 种不同 α 疱疹病毒 gE 蛋白的氨基酸序列均在 N 端相应位置具有相同数目的半胱氨酸残基。在 LTV 烟台株 gE 蛋白氨基酸序列的 N 端相应位置也发现了这 5 个保守的半胱氨酸残基。极端保守的半胱氨酸残基位置常与含有二硫键的保守性有关,而二硫键对于蛋白质的稳定性、三级结构以及蛋白质的生物学功能有重要作用。对 PRV gE 糖蛋白研究还表明^[9]:其胞内区存在 2 个保守的特征性的氨基酸残基,基序为 YXXL,其中 Y 为酪氨酸,X 为任意氨基酸,L 为大的疏水性氨基酸,该序列对病毒糖蛋白在细胞膜上的分布及信号在细胞内的传导有重要作用,尤其是近膜端的第 478 位和 517 位的酪氨酸残基。在 LTV 和其他 α 疱疹病毒 gE 蛋白氨基酸序列相应的位置也发现了这 2 个保守的氨基酸序列(LTV 为第 418 位和 443 位),这一切都表明 LTV gE 蛋白可能与其他 α 疱疹病毒 gE 蛋白具有一些共同的生物学功能。

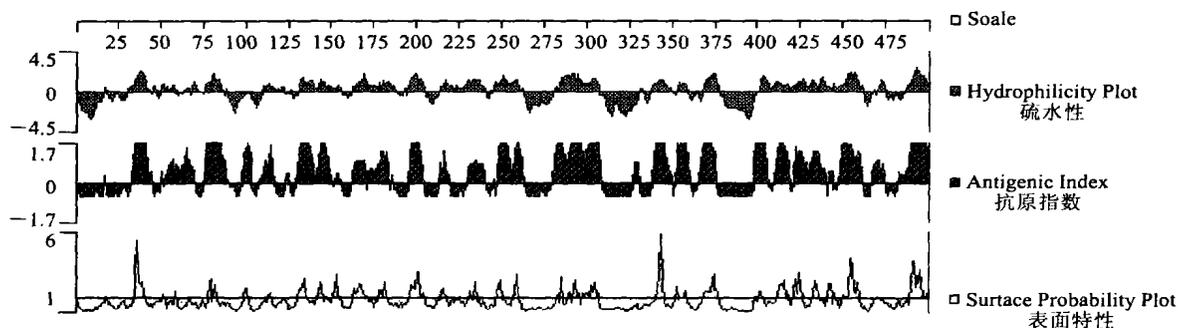


图 4 LTV 烟台株 gE 蛋白的基本特性

Fig 4 Basic characteristics of LTV Yantai strain gE protein

gE 基因的获得为下一步在大肠杆菌或毕赤酵母中表达 gE 糖蛋白,建立 LTV gE 特异性诊断方

法以及进一步研究 gE 基因的功能奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Calnek B W, Barnes H J, Beard C W, et al Disease of Poultry[M]. 10th ed Ames, Iowa: Iowa State University Press, 1997.
- [2] Johnson M A, Prideaux C T, Kongsuwan K, et al Gallid herpesvirus 1 (infectious laryngotracheitis virus): cloning and physical maps of the SA-2 strain[J]. Arch Viro1, 1991, 119: 181- 198.
- [3] Leib D A, Bradbury J M, Hart C A. Genome isomerism in two alphaherpesviruses: Herpesvirus samiri-1 (Herpesvirus tamarinus) and avian infectious laryngotracheitis virus[J]. Arch Viro1, 1987, 93: 287- 294.

- [4] 何召庆, 童光志, 徐宾蕊, 等. 鸡传染性喉气管炎病毒王岗株 gE 基因的克隆及序列分析[J]. 中国兽医科技, 2002, 32(8): 20- 22
- [5] Wild M A, Cook S, Cochran M. A genomic map of infectious laryngotracheitis virus and the sequence and organization of genes present in the unique short and flanking regions[J]. *Virus Genes*, 1996, 12(2): 107- 116
- [6] Myung Guk Han, Sun Joong Kim. A analysis of Korean strains of infectious laryngotracheitis virus by nucleotide sequences and restriction fragment length polymorphism [J]. *Veterin Microbiol*, 2001, 83: 321- 331.
- [7] 张秀美, 艾武, 王莉莉, 等. 鸡传染性喉气管炎的诊断与病毒分离鉴定[J]. 山东农业科学, 1997, (6): 32- 36
- [8] Johnson M A, Tyack S G. Molecular evolution of infectious laryngotracheitis virus (LTV; gallid herpesvirus 1): an ancient example of the Alphaherpesvirid [J]. *Veterin Microbiol*, 1995, 46: 221- 231.
- [9] Tirabassi R S, Enquist L W. Mutation of the YXXL endocytosis motif in the cytoplasmic tail of pseudorabiesvirus gE [J]. *J Virol*, 1999, 73(4): 2717- 2728

Cloning and Sequence Analysis of the Glycoprotein E (gE) Gene of Infectious Laryngotracheitis Virus Yantai Strain

LIU Wen-bo¹, HUANG bin^{1,2}, MA Xiu-li²,
ZHANG Su-fang¹, ZHANG Xiu-mei², CHEN Pu-yan¹

(1 Key Laboratory of Animal Diseases Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China;

2 Institute of Poultry Science, Shandong Academy of Agricultural Science, Jinan, Shandong 250023, China)

Abstract A pair of primers flanking the gE gene were designed according to the published nucleotide sequence of the LTV. The Glycoprotein E (gE) gene of the wild Chinese LTV Yantai strain was obtained by polymerase chain reaction and was cloned into pMD18-T vector. Based on the gel electrophoresis and digestion with restrict enzyme, the identified positive recombinant plasmid was named pMD-gE and was sequenced. The results of sequence analysis showed that the homology of the gE gene and the deduced amino acid of LTV Yantai strain with that of LTV USA challenge strain, LTV China Wanggang strain, BHV-1, EHV-1, FHV-1, HHV-2, HHV-3, HVT, MDV-1, MDV-2 and PRV were between 99.7% - 11.9% and 99.4% - 15% respectively. These data suggested that gE gene was conservative among different LTV strains, and there existed very low homologous between different herpesvirus.

Key words: infectious laryngotracheitis virus; Yantai strain; glycoprotein E gene; clone; sequence analysis