

PRV FB 弱毒株与FA 株 gE , gI 基因的同源性研究

车勇良^{1,2}, 俞伏松¹, 陈少莺^{1,2}, 陈仕龙¹,
程晓霞¹, 王隆柏¹, 魏 宏¹, 胡奇林^{1,2}

(1 福建省农业科学院 畜牧兽医研究所, 福建 福州 350013;

2 福建省畜禽疫病防治工程技术研究中心, 福建 福州 350013)

[摘要] 用PCR方法扩增了PRV FB弱毒株和PRV FA野毒株的 gE , gI 基因,对FB弱毒株的 gE , gI 基因进行克隆和测序,并将其与GenBank中收录的PRV FA的 gE , gI 基因进行了比较。结果发现,PRV FB和PRV FA株的 gE 基因有2处碱基发生了点突变,同源性为99%; gI 基因有7处碱基发生了突变,其中1处发生了3个碱基的插入突变,同源性为98%。表明PRV FB在传代过程中发生了遗传性变异。

[关键词] 伪狂犬病病毒; 基因克隆; 序列分析

[中图分类号] S852.65

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)11-0037-05

伪狂犬病病毒(Pseudo rabies Virus, PRV)属于疱疹病毒I型,可以引起多种家畜和野生动物的亚临床和临床感染^[1]。猪是本病毒的唯一自然宿主,妊娠母猪可发生流产、死胎、木乃伊胎等繁殖障碍,仔猪出现神经症状,乳猪患病死亡率高达100%。自1902年A ujeszky在匈牙利发现此病以来,世界上已有40多个国家和地区发现此病^[2]。许多国家已把本病列为动物重大疫病之一,我国自1947年刘永纯首次从猫体内分离出PRV以来,已有20多个省市报道有此病发生,并分离出伪狂犬病病毒闽A株(PRV FA)、鄂A株(PRV EA)、鲁A株(PRV LA)等毒株。为了防治本病,发达国家已研制出多种疫苗,我国袁庆志等^[3]引进匈牙利Barta-K51弱毒疫苗株,并试制成伪狂犬病弱毒冻干苗。福建省农业科学院畜牧兽医研究所于1978年首次研制成牛、羊伪狂犬病灭能苗,由于应用范围窄,近年来又继续采用蚀斑纯化和温度诱变相结合的技术,在伪狂犬病病毒FA株的基础上育成了PRV FB弱毒株^[4]。为了鉴定此弱毒株的基因变化,本研究利用PCR技术扩增PRV FB的 gE , gI 基因序列并对其进行了测序,并与PRV FA野毒株的 gE , gI 基因进行了比较,现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 病毒和细胞

PRV FA野毒株、PRV FB弱毒株均由福建省农业科学院畜牧与兽医研究所保存;鸡胚成纤维细胞(CEF)按常规方法制备。

1.2 主要试剂及酶

重蒸饱和酚、氯仿、异戊醇、DMEM培养基、RPMI1640培养基均购自华美生物工程有限公司;pMD-18T载体、蛋白酶K、Ex-Taq酶和dNTP均购自宝生物工程有限公司。

1.3 引物设计与合成

根据GenBank已发表PRV的 gE , gI 基因序列,设计了2对引物: $gE1$: 5'-TCG CAC ACA CCG GGG TTG A GA -3', $gE2$: 5'-GGC GGT GGG CA T GTC GGA AT G-3',预计扩增片段大小为1 808 bp; $gI1$: 5'-CGC GCG ACG TGA CCC GGC TC-3', $gI2$: 5'-CGG GTC GCG GCC GGT A GA TG-3',预计扩增片段为953 bp。引物均由宝生物工程有限公司合成。

1.4 伪狂犬病病毒培养与收获

分别将不同的PRV毒株接种于已长成单层的

· [收稿日期] 2005-08-31

[基金项目] 福建省科技计划项目(2002N048)

[作者简介] 车勇良(1976-),男,江西抚州人,研究实习员,主要从事预防兽医学研究。E-mail: zhonghuagongheguo@tom.com

[通讯作者] 陈少莺(1962-),女,福建长乐人,研究员,主要从事预防兽医学研究。E-mail: chensy58@163.com

CEF 中,待细胞病变达 80% 以上时,置-20 条件下冻融 3 次,收获细胞毒备用。

1.5 病毒DNA 的提取及PCR 扩增

吸取细胞毒 400 μL , 分别加入终浓度为 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的蛋白酶 K 和 10 mg/mL 的 SDS, 常规方法提取 DNA^[5], 最后用 40 μL 的 TE 溶解沉淀, -20 条件下保存备用。

1.6 *gE*, *gI* 基因的PCR 扩增与电泳

将 1.5 提取的 DNA 1.1 μL 于 0.2 mL 反应管中, 加入 12 μL 灭菌三蒸水, 2 μL PCR 缓冲液, 1 μL MgCl₂ (20 mmol/L), 0.8 μL dNTP, 上游、下游引物 (50 $\text{Pmol}/\mu\text{L}$) 各 0.4 μL , 0.3 μL Taq DNA 聚合酶和 2 μL 二甲亚砜 (DM SO)。反应程序为: 94 预变性 10 min; 94 1 min, 64 1 min, 72 2 min, 35 个循环; 最后 72 延伸 10 min, 4 条件下保存。10 mg/mL 琼脂糖凝胶电泳 (100 V, 30 min) 后成像分析。

1.7 PCR 产物的克隆与筛选

将 1.6 得到 *gE* 和 *gI* 基因的 PCR 电泳产物, 经 DNA 回收试剂盒回收后溶于 ddH₂O 中, 取 2.0 μL

回收产物与 1.0 μL 的 pMD-18T 载体混合, 加高效连接缓冲液 1 μL , 补 ddH₂O 至总体积为 10 μL , 于 16

反应 30 min 后, 全部转化新鲜制备的感受态大肠杆菌 DH5 α , 涂布于含 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的琼脂 LB 平板上, 通过异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) (24 mg/mL) 诱导和 X-gal 显色进行初步筛选。

1.8 重组质粒的PCR 鉴定与序列分析

挑取白色克隆菌落进行 PCR 鉴定。再挑取 PCR 鉴定为阳性的菌落接入含氨苄青霉素 (60 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 液体培养基中, 于 37 条件下剧烈振荡过夜, 送大连宝生物工程有限公司测序。

2 结果与分析

2.1 PRV FB 株 *gE* 基因的PCR 扩增与重组质粒的PCR 鉴定结果

将 PRV FB 株 *gE* 基因 PCR 扩增产物在 10 g/L 琼脂糖凝胶上进行电泳发现, 在约 1 800 bp 处有预期的电泳条带 (图 1); 在 PRV FB 株 *gE* 基因转化的蓝白菌落中挑选白色克隆菌落, 进行 PCR 鉴定, 在约 1 800 bp 处得到预期的电泳条带 (图 2)。

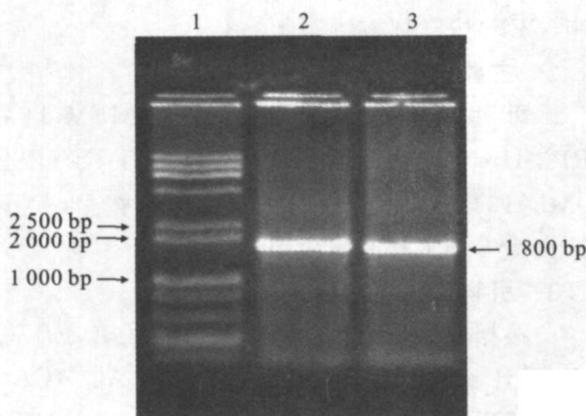


图 1 PRV FB 株 *gE* 基因 PCR 产物的电泳结果

1. DNA Marker; 2. PRV FA 株 *gE* 基因扩增条带;
3. PRV FB 株 *gE* 基因扩增条带

Fig. 1 Result of PCR electropherogram
of *gE* gene of PRV FB

1. DNA Marker; 2. *gE* gene of
PRV FA; 3. *gE* gene of PRV FB

2.2 PRV FB 株 *gI* 基因的PCR 扩增与重组质粒的PCR 鉴定结果

将 PRV FB 株 *gI* 基因的 PCR 扩增产物在 10 g/L 琼脂糖凝胶上进行电泳发现, 在 953 bp 处有预期

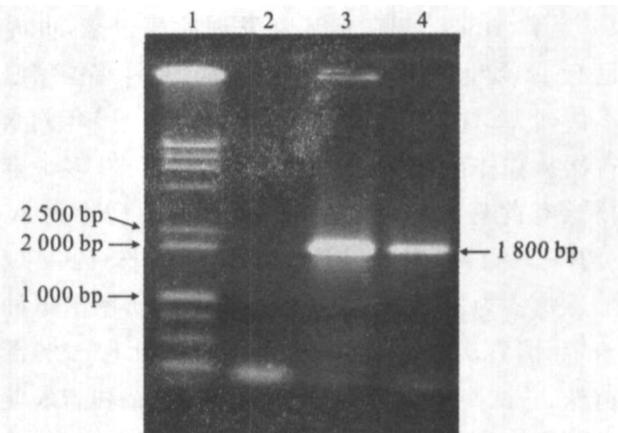


图 2 PRV FB 株 *gE* 基因阳性克隆菌落的 PCR 鉴定结果

1. DNA Marker; 2. PRV FB 株 *gE* 基因阴性克隆;
3, 4. PRV FB 株 *gE* 基因阳性克隆

Fig. 2 Result of PCR identification of the
positive clone colony with *gE* gene of PRV FB

1. DNA Marker; 2. Negative clone colony of PRV FB;
3, 4. Positive clone colony of PRV FB

的电泳条带 (图 3); 在 PRV FB 株 *gI* 基因转化的蓝白菌落中挑选白色克隆菌落, 进行 PCR 鉴定, 在 953 bp 处得到预期的电泳条带 (图 4)。

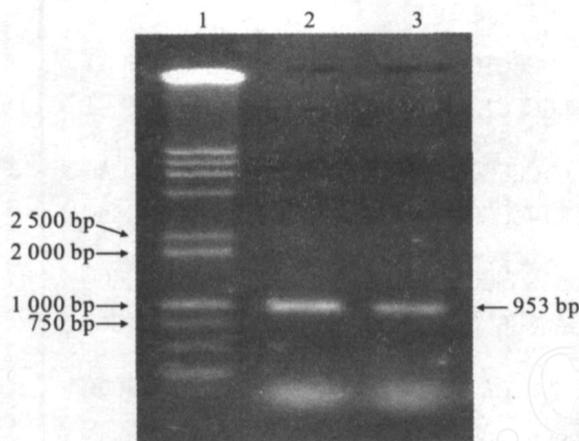


图3 PRV FB 株 *gI* 基因 PCR 产物的电泳结果

1. DNA Marker; 2 PRV FA 株 *gI* 基因扩增条带;
3 PRV FB 株的 *gI* 基因扩增条带

Fig. 3 Result of PCR electropherogram of *gI* gene of PRV FB

1. DNA Marker; 2 *gI* gene of PRV FA;
3 *gI* gene of PRV FB

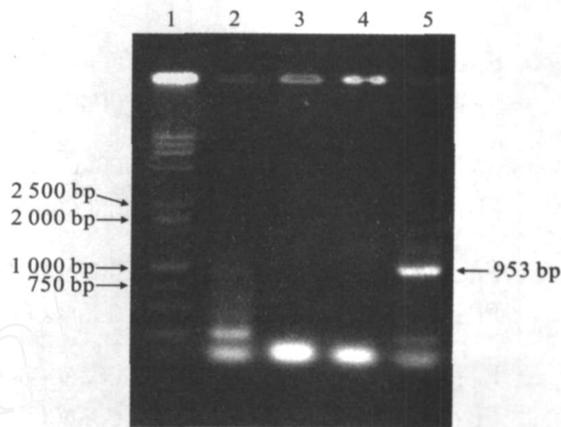


图4 PRV FB 株 *gI* 基因阳性克隆菌落的 PCR 鉴定结果

1. DNA marker; 2, 3, 4 PRV FB 株 *gI* 基因阴性克隆;
5 PRV FB 株 *gI* 基因阳性克隆

Fig. 4 Result of PCR identification of the positive clone colony with *gI* gene

1. DNA Marker; 2, 3, 4 Negative clone of *gI* gene of PRV FB; 5. Positive clone of *gI* gene of PRV FB

2.3 PRV FB 株与 PRV FA 株 *gE* 基因序列的同源性比较

挑选 PCR 鉴定阳性的克隆菌落, 接种于 LB 液体培养基扩大培养, 送大连宝生物工程有限公司进

行测序。将测得的 PRV FB 株 *gE* 基因序列与从 GenBank 中查找出的 PRV FA 株 *gE* 基因全序列进行比较可知, *gE* 基因仅有 2 处碱基发生点突变(图 5), 同源性为 99%。

FA: GCGCGCGTAGTACCAGTCCAGCGTGGCCGTAAAGTTCTCGCGGAGTCGCCATGTCCGAGACCACGCGG
 FB: GCGCGCGTAGTACCAGTCCAGCGTGGCAGTAAAGTTCTCGCGGAGTCGCCATGTCCGAGACCACGCGG

FA: GCATCAGGTGAAACGTGTCCCCGGGCGAGAAGAGCTGCGAGTGAAGCCGAGCGCGTGAAGCGGGGCTCGTG
 FB: GCATCAGGTGAAACGTGTCCCCGGGCGAGAAGAGCTGCGAGTGAAGCCGAGCGCGTGAAGCGGGGCTCGTG

FA: GCGCGCGGGGCCACCGGGTCCGCCGGCGGGCGGGCGGGTCCGCCACCGCCACAAAGAACACGGCCCGCGGC
 FB: GCGCGCGGGGCCACCGGGTCCGCCGGCGGGCGGGCGGGTCCGCCACCGCCACAAAGAACACGGCCCGCGGC

FA: CCCGAGGCGTCGTGCAGCGTGTAGAGGCCCGTGTGCGTTGGGCGTGGCCCGCAGGACGCTCAGGTGCGGCGACC
 FB: CCCGAGGCGTCGTGCAGCGTGTAGAGGCCCGTGTGCGTTGGGCGTGGCCCGCAGGACGCTCAGGTGCGGCGACC

FA: ACCGCTCCGGGTGACGATGGGCGGCTCGCGCCGAGCCGCGGCACCTCGGGCGGCAGGTAGTCGCCGATGCC
 FB: ACCGCTCCGGGTGACGATGGGCGGCTCGCGCCGAGCCGCGGCACCTCGGGCGGCAGGTAGTCGCCGATGCC

FA: CATCTCCGGGGCCTCGGGACGCAGGCGGGCCAGCACCAGTCCGGGTGGCACGCGGTCTCGAAGCACACC
 FB: CATCTCCGGGGCCTCGGGACGCAGGCGGGCCAGCACCAGTCCGGGTAGCACGCGGCCTCGAAGCACACC

图5 PRV FA 株与 PRV FB 株的 *gE* 基因序列同源性比较
— 突变碱基

Fig. 5 Blast of *gE* gene of PRV FA and PRV FB
— Mutation base

2.4 PRV FB 株与 PRV FA 株 *gI* 基因序列的同源性比较

挑选 PRV FB 株 *gI* 基因 PCR 鉴定阳性的克隆

菌落, 接入 LB 液体培养基扩大培养, 送大连宝生物工程有限公司进行测序, 将测序结果与从 GenBank 中查找出 PRV FA 株 *gI* 基因全序列进行比较可知,

gI 基因有 7 处碱基发生了点突变, 且其中 1 处发生了 3 个碱基的插入突变(图 6), 同源性为 98%。

FA: CGCGGACGTGACCCGGCTCCCCGGGGCTCCTCCTCGCCGCCCTGACCCTGGCCGCCCTGACCCCGCGGT
 FB: CGCGGACGTGACCCGGCTCCCCGGGGCTCCTCCTCGCCGCCCTGACCCTGGCCGCCCTGACCCCGCGGT

FA: CGGGGGCTCCTCTTACAGGGCGCCGGCTCAGCGTGCACGTGCGCGGACGCGCTCCTCGTGCCGGCGAC
 FB: CGGGGGCTCCTCTTACAGGGCGCCGGCTCAGCGTGCACGTGCGCGGACGCGCTCCTCGTGCCGGCGAC

FA: GCGCCCAACCTGACGATAGACGGGACGCTGCTGTTTCTGGAGGGGCCCTCGCCGAGCAACTACAGCGGGCGG
 FB: GCGCCCAACCTGACGATAGACGGGACGCGCTGTTTCTGGAGGGGCCCTCGCCGAGCAACTACAGCGGGCGG

FA: TGGAGCTGCTGCGCCTCGACCCCAAGCGCGCTGCTACACGCGGAGTACGCCGCCGAGTACGACCTCTGCC
 FB: TGGAGCTGCTGCGCCTCGACCCCAAGCGCGCTGCTACACGCGGAGTACGCCGCCGAGTACGACCTCTGCC

FA: CCGCGTGCACCACGAGGCCTTCCGGGCTGCTGCGCAAGCGGAGCGCTCGCCCGGCGCGCTCCGCCGG
 FB: CCGCGTGCACCACGAGGCCTTCCGGGCTGCTGCGCAAGCGGAGTCGCTCGCCCGGCGCGCTCCGCCGG

FA: GTGGAGGCGCGCGGCTGCTGTTGCTCTCGCGCCGGCCTCGGGGACGCGGGTCTGACGTGGTGGGGTCC
 FB: GTGGAGGCGCGCGGCTGCTGTTGCTCTCGCGCCGGCCTCGGGGACGCGGGTCTGACGTGGTGGGGTCC

FA: GCGTGAACGGGACCACGGACCTCTTTGTGCTGACGGCCCTGGTGGCGGAGGGGGCGCCCGTCCCCACGTC
 FB: GCGTGAACGGGACCACGGACCTCTTTGTGCTGACGGCCCTGGTGGCGGAGGGGGCGCCCGTCCCCACGTC

FA: GCCCGCCGCGGACGAGTGCCGGCCGCTGCTCGGATCGTGGCAGCAGCCTGCGCGTCTGGACCCCGCCGAG
 FB: GCCCGTCCGCGGACGAGTGCCGGCCGCTGCTCGGATCGTGGCAGCAGCCTGCGCGTCTGGACCCCGCCGAG

FA: GACGCGGTGTTACACCCAGCCCCGCCCCGAGCCCGAGCCCGGACGACCCCGCGCCCCCGGGGACCG
 FB: GACGCGGTGTTACACCCAGCCCTCGCCGAGCCCGAGCCCGGACGACCCCGCGCCCCCGGGGACCG

FA: GCGCCACCCCGAGCCCGATCGGACGAGGAGGAGG GTGACGCGGAGACGACGACGCGGACGCTGAC
 FB: GCAACACCCCGAGCCCGATCGGACGAGGAGGAGGAGCGGTGACGCGGAGACGACGACGCGGACGATGAC

FA: CCCGGCGCCCGGACCCTGGACGCGAACGGCAGGATGGTGTGAACGCCAGCGTCTGTGCGCGTCTGCTC
 FB: CCCGGCGCCCGGACCCTGGACGCGAACGGCAGGATGGTGTGAACGCCAGCGTCTGTGCGCGTCTGCTC

FA: GCCCGCCCAACGCCACGGCGGGCGCCCGAGCCCGGGAAGATAGCCATGGTGCCTGGGGCCACGATCGTCC
 FB: GCCCGCCCAACGCCACGGCGGGCGCCCGAGCCCGGGAAGATAGCCATGGTGCCTGGGGCCACGATCGTCC

FA: TCCTCCTGATCTTCTGGCGGGATCGCTGCGTGGCCCGCGCTGCGCGGGAATCGCATCTACCGCCCGG
 FB: TCCTCCTGATCTTCTGGCGGGATCGCTGCGTGGCCCGCGCTGCGCGGGAATCGCATCTACCGCCCGG

FA: ACCCG
 FB: ACCCG

图 6 PRV FA 株与 PRV FB 株的 *gI* 基因序列同源性比较
— 突变碱基; □. 插入碱基

Fig 6 Blast of *gI* gene of PRV FA and PRV FB
— Mutation base; □. Inserted base

3 讨 论

gE 和 *gI* 基因均是 PRV 的非必需基因, 其所编码的蛋白均是 PRV 的囊膜糖蛋白, 其中 *gE* 基因编码的蛋白是一种促进细胞融合的糖蛋白, 能促进感

染细胞与临近非感染细胞的融合, 从而促进病毒在细胞之间扩散。 *gE* 糖蛋白能影响 PRV 的生长特性, 而且这种影响具有细胞特异性。同时 *gE* 糖蛋白还能影响 PRV 在猪体内的组织趋向性, 从而有助于 PRV 向中枢神经系统扩散^[5-7]。W healy 等^[8] 和



Mettenleiter 等^[9]均证实了PRV 的 *gI* 和 *gE* 糖蛋白在内质网中合成后几分钟内就形成了二聚体, 该二聚体是 *gI* 和 *gE* 糖蛋白从内质网到高尔基体必需的功能单位。在成熟的病毒囊膜内, *gI* 和 *gE* 糖蛋白也是以二聚体的形式存在的, 但其是以疏水性的非共价键形式结合成 *gI/gE* 复合体, 而不是以二硫键形式结合的。以此种形式结合的 *gI/gE* 复合体能影响病毒的生长及病毒的释放, 这种影响具有高度的细胞特异性。 *gI* 基因缺失的突变株在 CEF 上有生长优势, 但在 PK-15, RK 和 MDBK 细胞上则无这种优势^[8], 这说明 *gI* 基因表达对病毒在 CEF 中的繁殖有

害。有研究^[10-11]表明, *gI* 基因在疱疹病毒中是非常保守的基因。在本试验中, 利用 3 末端带单碱基 T 的通用 T 载体 pMD-18T 载体, 与 Ex-Taq 酶扩增出 3 末端带有 1 个突变碱基 A 的 *gE*、*gI* 基因互补连接。将 PRV FB 株 *gE*、*gI* 基因的序列与 PRV FA 株的 *gE*、*gI* 基因比较发现, PRV FB 株和 PRV FA 株 *gE* 基因的同源性达到了 99%, 仅 2 处碱基发生了点突变; *gI* 基因有 7 处碱基发生了突变, 且其中 1 处发生了 3 个碱基的插入突变, 表明这两株病毒虽然来源相同, 但 PRV FA 株在传代过程中可能已发生了一些遗传变异, 值得进一步研究。

[参考文献]

- [1] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2001: 411-483
- [2] 殷 震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 988-1009
- [3] 袁庆志, 吴裕祥, 李亚香, 等. 伪狂犬病免疫的研究 I. 伪狂犬病弱毒疫苗的研究[J]. 家畜传染病, 1983(1): 1-6
- [4] 魏振明, 程由铨, 翁文林, 等. 伪狂犬病弱毒疫苗研究[J]. 中国兽医科技, 1989(5): 6-8
- [5] Lydy S L, Compans R W. Role of the cytoplasmic domains of viral glycoproteins in antibody-induced cell surface mobility[J]. J Virol, 1993, 67(10): 6289-6294
- [6] Tirabassi R S, Enquist L W. Mutation of the YXXL endocytosis motif in the cytoplasmic tail of pseudorabies virus *gE* [J]. J Virol, 1999, 73(4): 2717-2728
- [7] Tirabassi R S, Enquist L W. Role of envelope protein *gE* endocytosis in the pseudorabies virus life cycle[J]. J Virol, 1998, 72(6): 4571-4579
- [8] Whealy M E, Card J P, Robbins A K, et al. Specific pseudorabies virus infection of the rat visual system requires both *gI* and *gp63* glycoproteins[J]. J Virol, 1993, 67(7): 3786-3797.
- [9] Mettenleiter T C, Klupp B G, Weiland F, et al. Characterization of a quadruple glycoprotein deleted pseudorabies virus mutant for use as a biologically safe live virus vaccine[J]. J Gen Virol, 1994, 75(7): 1723-1733
- [10] Jacobs L, Mebren R H, Gielkens A L, et al. Epitope analysis of glycoprotein I of pseudorabies virus[J]. J Gen Virol, 1990, 71(4): 881-887.
- [11] Zsak L, Zuckermann F, Sugg N, et al. Glycoprotein *gI* of pseudorabies virus promotes cell fusion and virus spread via direct cell-to-cell transmission[J]. J Virol, 1992, 66(4): 2316-2325

Study on the homology between PRV FB low virulent strain and *gE* and *gI* of PA strain

CHE Yong-liang^{1,2}, YU Fu-song¹, CHEN Shao-yang^{1,2}, CHEN Shi-long¹,
CHENG Xiao-xia¹, WANG Long-bai¹, WEI Hong¹, HU Qi-lin^{1,2}

(1 Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agriculture Sciences, Fuzhou, Fujian 350013, China;

2 Fujian Animal Disease Control Technology Development Center, Fuzhou, Fujian 350013, China)

Abstract: The *gI* and *gE* gene of PRV FB (low virulent strain) and PRV FA (high virulent strain) were amplified by PCR, then the *gI* and *gE* gene of PRV FB were cloned and sequenced. Compared with *gE* and *gI* gene of PRV FA from GenBank, 2 bases in *gE* were found to have point mutation, and the homology was over 99%; Meanwhile, 7 bases in *gI* resulted in point mutation and 3 bases were inserted, and the homology was over 98%. These mutation revealed PRV FB occur in heritage mutation and deserve further research.

Key words: Pseudorabies virus; gene cloning; sequence analysis