

猪伪狂犬病毒湖北株 gE 基因的克隆与序列分析

郭锐^{1,2}, 田永祥^{1,2*}, 周丹娜^{1,2}, 段正赢^{1,2}, 杨克礼^{1,2}, 裴小英³, 王红⁴, 廖仁芳⁵, 罗咏梅⁶, 刘心建⁷
(1. 湖北省农业科学院畜牧兽医研究所,湖北武汉 430064; 2. 动物胚胎工程及分子育种湖北省重点实验室,湖北武汉 430064;3. 武汉市动物卫生监督所,湖北武汉 430061;4. 山东安池集团,山东济南 250100;5. 荆门市畜牧兽医局,湖北荆门 448000;6. 襄阳市动物卫生监督所,湖北襄阳 442110;7. 江夏区动物疫病预防控制中心,湖北武汉 430200)

摘要 [目的] 通过对从湖北省某猪场分离获得的伪狂犬病毒的 gE 基因克隆和测序,分析其遗传变化规律。[方法] 参考 GenBank 中猪伪狂犬病病毒(Porcine pseudorabies Virus,PRV)gE 基因的序列设计 1 对引物,对 PRV 湖北株 gE 基因进行 PCR 扩增和序列分析,PCR 产物克隆到 pMD 18-T 载体。对重组质粒进行限制性内切酶分析和基因测序,与 GenBank 收录的国内外其他地区标准参考毒株进行同源性分析和比较。[结果] 与标准参考毒株的核苷酸序列同源性为 95.0%~98.0%,进化树分析表明,PRVHBXS2014 株与河南焦作株 EU561349-China 同属于一个分支,亲缘关系较近,但存在个别位点的基因突变。[结论] 为有效防控该病提供参考。
关键词 猪伪狂犬病毒;gE 基因;PCR 扩增;克隆;序列分析
中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)25-08502-02

Cloning of Hubei Strain gE Gene of Porcine Pseudorabies Virus and Sequence Analysis
GUO Rui, TIAN Yong-xiang et al (Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Hubei Academy of Agricultural Science, Wuhan, Hubei 430064; Hubei Key Laboratory of Animal Embryo Engineering and Molecular Breeding, Wuhan, Hubei 430064)
Abstract [Objective] Based on cloning and sequencing of Hubei strain gE gene of porcine pseudorabies virus isolated from a pig farms in Hubei Province, their genetic variation was analyzed. [Method] A pairs of primers were designed and the sequence of gE gene of pseudorabies virus in the reference GenBank,PCR amplification and sequence analysis of PRV Hubei strain gE gene was done, and the PCR product was cloned into pMD 18-T vector. By restriction enzyme analysis and sequencing of recombinant plasmid, homology analysis and comparison with the other regions included in GenBank standard reference strains at home and abroad. [Result] The results showed that with the standard reference strains, the nucleotide sequence homology of 95.0%~98.0%, phylogenetic tree analysis showed that,PRVHBXS2014 strain and Jiaozuo EU561349-China in Henan strain belonged to the same branch, close relationship, but there are some gene mutation, and the results were consistent with the reported in the literature. [Conclusion] The study provided a reference for effective prevention and control of the disease.
Key words Porcine pseudorabies virus;gE gene;PCR amplification;Cloning;Sequence analysis

伪狂犬病(Pseudorabies,PR)是由伪狂犬病毒(PRV)引起的多种家畜和野生动物均可感染的急性传染病,以发热、流产、死产、奇痒(猪除外)和脑脊髓炎为主要症状,其中对猪的危害最大,且猪是唯一的自然宿主^[1]。

PRV 属于疱疹病毒科、 α -疱疹病毒亚科,为双链 DNA,全长约 100 kb,基因组 GC 含量最高达 73%,包括 70 多个开放性阅读框,可以编码 70~100 种病毒蛋白。gE 基因对 PRV 体内毒力表达、侵袭神经和沿着神经传递起着决定性的作用。目前 gE 缺失疫苗在病毒侵入神经系统方面被认为比其他单个非必需糖蛋白缺失苗更安全,同时 gE 不会影响病毒的复制和中和抗体的产生,且 gE 是所有野毒株均表达的一类糖蛋白。因此 gE 可作为 PR 净化过程中标志基因,可区别感染动物和接种动物,以剔除阳性的野毒感染动物^[2-3]。

2012 年以来,我国许多省市暴发临床症状疑似伪狂犬病的传染病,尤其一些免疫过 gE 缺失疫苗的猪场也暴发病,主要表现为猪群 gE 抗体阳性率显著升高,母猪产弱仔、死胎,仔猪出现神经症状及死亡等,给我国的养猪业造成了巨大的经济损失。笔者通过对从湖北省某猪场分离获得的伪狂犬病毒的 gE 基因继续克隆和测序,分析其遗传变化规律,

基金项目 湖北省农业科技创新中心资助项目(2011-620-001-03);动物胚胎工程及分子育种湖北省重点实验室开放课题项目(2014ZD150)。
作者简介 郭锐(1981-),男,湖北武汉人,助理研究员,硕士,从事动物疫病防控研究。*通讯作者。
收稿日期 2014-07-21

为有效防控该病提供参考。

1 材料与方法

1.1 病毒与细胞 伪狂犬湖北株 PRVHBXS2014 株(武汉大学菌种库保藏号:CCTCC V201420),BHK21 细胞与大肠杆菌 DH5 α 均为湖北省农业科学研究院动物胚胎工程分子育种湖北省重点实验室冻存。

1.2 主要试剂 细胞培养基 MEM 和无菌小牛血清购自 GIBCO 公司;2 $\times$ EasyTaq PCRMix 购自全式金生物技术有限公司;限制性内切酶 BamH I 和 Hind III、pMD 18-T 载体及其连接试剂、DL2000 Marker 购自大连宝生物工程有限公司;琼脂糖购自北京鼎国生物技术有限公司;胶回收试剂盒和 DNA 小提试剂盒购自爱思进生物技术有限公司。

1.3 病毒培养 将伪狂犬毒株用 BHK21 细胞培养,培养液为含 10% 小牛血清的 MEM 培养液,维持液为含 2% 小牛血清的 MEN 培养液。待细胞长至 90% 以上时加入适量病毒液,37 $^{\circ}$ C 吸附 1 h,加入适量维持液,37 $^{\circ}$ C 培养,在细胞病变达到 80% 以上时停止培养,反复冻融 3 次后收获病毒培养液。

1.4 引物的设计与合成 参考 GenBank 中已报道的猪伪狂犬病毒 gE 基因序列设计,上游引物 P1:5' GCGGCCCTTTCT-GCTGCG3';下游引物 P2:5' AGCGGGCAGGACATCAA3'。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.5 DNA 的提取 采用爱思进生物技术有限公司 DNA 小提试剂盒提取并于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.6 PCR 扩增 PCR 反应体系体积为 50 μ l,其中 10

μmol/L上下引物各 1 μl,DNA 模板 5 μl,2 × EasyTaq PCRMix 25 μl,剩下添加 ddH₂O 至 50 μl。反应程序:97 ℃ 10 min,72 ℃ 4 min;95 ℃ 1 min,65 ℃ 退火 2 min,72 ℃ 2.5 min,34 个循环;72 ℃ 10 min。

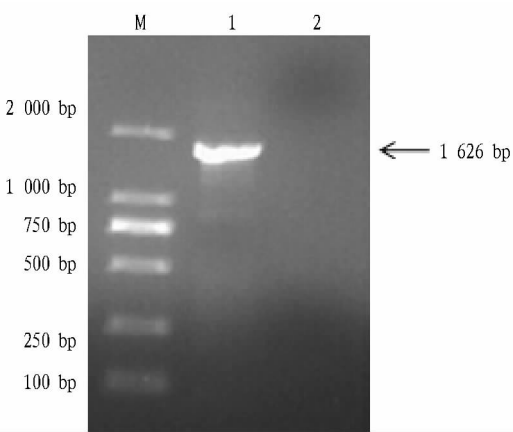
1.7 PCR 产物克隆和测序 PCR 产物的克隆与鉴定连接反应体系为 10 μl,依次加入 PCR 产物 5 μl、pMD18-T 载体 1 μl、连接缓冲液 4 μl,16 ℃ 连接 4 h。取 5 μl 连接产物转化至制备好的 DH5α 感受态细胞,涂于含氨苄青霉素的 LB 平板,37 ℃ 培养 12 ~ 16 h。从平板上挑取单菌落接种于 3 ml 含氨苄青霉素的 LB 培养液,37 ℃ 振荡培养 16 ~ 20 h。提取质粒,用 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切质粒后电泳,按分子量大小初步筛选阳性菌株,鉴定阳性重组质粒。将酶切鉴定为阳性的重组质粒送到上海生工生物工程有限公司测序,然后利用基因分析软件 DNASTar 对测序结果进行分析比较。

2 结果与分析

2.1 gE 基因的 PCR 扩增 以伪狂犬病毒湖北株 DNA 为模板,进行 PCR 扩增后得到 1 626 bp 的片段,与预期相符(图 1)。

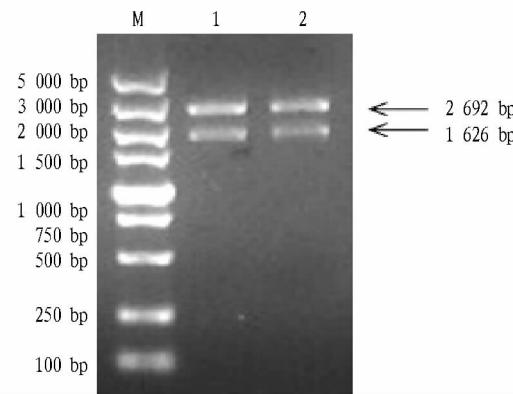
2.2 重组质粒的酶切鉴定 提取重组质粒后选用限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Hind* III 双酶切后,获得 2 条大小为 2 692 和 1 626 bp 左右的片段,分别与预期基因片段大小相符(图 2)。

2.3 gE 基因的序列测定及其分析 利用 DNASTar 软件将测出的 HBXS2014-gE 基因全序列(图 3)与国内外报道的 PRV 分离株(AY183124、湖北 Ea 株 AF171937、广东 SH 株 EF552427、AF207700、美国 Becker 株 AY368490、FJ605135、JF460026、JX417716、Fa 株 AF403049、河南焦作株 EU561349-China、Malaysia 株 FJ176390、GZ-Z1 株 HQ832846、西班牙 NiA3 株 EU502923、Rice 株 M14336、MIN-A 株 AY170318)进行核苷酸同源性比较分析。



注:M. DNA 分子量标准;1. PRV gE 基因;2. 阴性对照。

图 1 PRVgE 基因 PCR 扩增



注:M. DNA 分子量标准;1、2. PRV gE 基因。

图 2 PRVgE 基因双酶切

由图 4 可知,HBXS2014 株与 EU561349-China 株同属于一个分支,亲缘关系最近,同源性达到 98%。

```
ACCGAGGCCCGGAGCCTCTCCGCCGAGACGACCCCGGCCCGCTACCCGAGGTCGCCAGTCCCTCGGCCGAGGTCGTGGGACGACCTCTCCACCGAGGCCG 100
ACGACGATGACCTCAACGGCGACCTCGACGGCGACGACGCCGCCGCGGGCTTCGCGCTCGGCCCTCGCATCCCTGAGGGAGGGCGCCCGGCCCTATCTGGT 200
GAACGTGTCCGAGGGCGGCCAATTCACCTCGACGCGCGCGGGCGACGGCGCGCTGCTGGCCGGGATCTGACGATTTCTGCCCCGTCCGCGGCTGCGACGCGC 300
GTGTCTGGTGACCGAGGTCGTCTTCGAGACCGCGTGCCACCCGAGACCTGGTGTCTGGGCCGCGCCTGCATCCCGAGGCCCGGAGATGGGATCGGCGACT 400
ACCTGCCGCCCGAGGTCGCCGCGCTCCGGCGCGAGCCGCCATCCTGTCACCCCGAGCGGTGGTCGCCGCACTGAGCGCTCTGCGGGCCACGCCCAACGA 500
CAGGGGCTCTACACGCTGACGACGCGCTCGGGGCTCGGGGCTGCTCTTGTGGGCGTGGGCGACCGGCCCGCGCCGCGGACCCGCTGGGGCCCC 600
GCGCGCCACGAGGCCCGCTTCCACGCGCTCGGCTTCCACTCGCAGCTCTTCTCGCCCGGGGACACGTTGACCTGATCGCCGCGCTGCTCTCGGACATGG 700
GCGACTCGCGCGAGAACTTTASCGCCACGCTGGAATGATGACTACGCGCGCGCGCCCCCGGGTGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 800
CCCCGCGCGCGCYCGAGTGCTTCCGCCCGGGTGGACCCCGCGCTGCAAGCTTCACTCTCGYCGCGCGCGCGCGGGCTGGTGGCGCGCGCGCGCTACGCTCTG 900
AGCCCCGTGCTCGGGGACCGGTGGCTGACCGCCTTCCCGCTTCGACGCGCTTCGGCGAGGAGGTGCACACGACGCCACCGCGGACGAGTCGGGGCTGTACG 1000
TGCTCTGTATGACCCCAACGCGCCACGTGCCACCTGGGACTACACGCTCGTCGCCACCGCGCGGACGATACGTACGGTTCATCAAGGAGCTGACGCGCCCC 1100
GGCCCGGGCCCCGGGACCCCGTGGGGCCCCCGCGCGCGCGCGACGACGCGATCATGTTGGACGCGCTCACGACGCCGCGCGCGCCGCCGCGCGCGCTGGAAC 1200
CCGTACGCGCGGACGACGCCCGGGCGGCTGTTTGTGCTGGCGCTGGGCTCCTTCGTGATGACGTGCGTCTGTCGGGGGGGCCATCTGGCTCTGCGTGTGCT 1300
GCTCCCGCGCGGGCGGCTCGCGGCCGTTCGGGTTGCCGACGCGGGCGCGGACGACATGCTCTCTCCGGTGTACACCGCCTGCCACGCGACGAGGA 1400
ACTCTACGACGCGACGACGACGACGAGGAGGCGGGCGTATCCGCCGCGCGGCCCGCTCCCGCGCGGAGACAGCGGCTACGAGGGGCGGTACGCG 1500
CGCTTGGACCCCGAGGACGAGTTACGACGACGAGGACGAGGCTATACGTGACCCCGAGGAGGCGCCCGCTCCGGCTTCGACGCTGTGGTTCCGCG 1600
ATCCGGAGAAACCGGAAGTGAAGAAAT 1626
```

图 3 猪伪狂犬病毒湖北株 gE 基因的核酸序列

3 讨论

近年来,猪伪狂犬病席卷全国大部分省份,临床病例呈逐渐上升趋势。目前表现为临床症状不明显,仔猪少见神经症状,母猪主要表现为流产和死胎,发病出现急性死亡,犬猫大量死亡;免疫不同厂家不同毒株疫苗依然发病;临床抗体检测免疫效果好的猪场依然发病;猪伪狂犬病毒野毒的感染率在 70% ~ 80%。目前已给我国养猪业造成了巨大的经济损失。

该研究通过 PCR 技术成功克隆出了 PRVHBXS2014 株

的 gE 基因,序列全长为 1 626 bp,通过与国内外已公布序列对比发现,该毒株与 EU561349-China 株同源性最高,同属于一个分支,通过核苷酸序列对比发现存在一定的基因突变现象。对比发现主要突变点在 140 ~ 150 位之间增加了 GAC 3 个碱基,166 位 G→A,233 位 C→A,248 位 A→G,432 位 G→A,506 位 T→C,1496 ~ 1498 位缺失了 CGA 3 个碱基,1541 位 G→A,1615 位 G→A,1622 位 A→G,1624 位 G→A,1632 位 A→G,1662 位 C→T,1690 位 C→A。序列分析核苷酸序列同

(下转第 8515 页)

精液的来源鉴定,克隆牛的鉴定,牛谱系的扩展重建及新物种形成的鉴定时,都具有重要作用。传统方法是根据动物外貌特征、染色体特征及血液蛋白多态等进行分析。但这些方法均受到自身各方面的限制,阻碍了它们的进一步发展,特别是用外形相似、染色体特征相同、亲缘关系较近的动物进行识别时效率很低。近年来,分子标记的发展为动物个体或群体识别注入了新活力。其中微卫星(Short tandem repeat, STR)标记由于其多态程度高、分布广泛、且在近缘物种间有一定的同源性,受到广大学者的偏爱^[1]。目前,STR 标记已在家牛、水牛、马、狗、鸡等畜禽、家禽个体或群体识别中得到应用。然而,随着分子生物学的发展,作为第三代分子标记,单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)标记具有遗传稳定、数量丰富、判型错误率低、检测自动化、操作方便的优点,适用于大规模群体的亲子鉴定。高通量 SNP 检测技术的发展和成本的降低,极大地推动了 SNP 相关研究的发展速度。目前,研究 SNP 标记应用于人类或家畜亲子鉴定的报道也越来越多,主要集中于开发不同途径的 SNPs 位点组合,构建实用型复合 SNP 检测系统。对于牛个体识别而言,应用于牛种质资源鉴定、盗窃、走失等的权属争议案件,以及育种中系谱的扩展重建等。研究表明,各国牛群平均系谱错误率可达 11% 左右^[2]。而错误的系谱对牛育种规划的实施和遗传改良工作有显著的不良影响,造成不必要的损失^[3]。因此,利用分子标记技术对牛进行个体识别具有很重要的意义。

随着 SNP 检测成本的下降,其在牛亲子鉴定中有取代微卫星标记之势^[4]。HEATON 等^[5]利用 32 个 SNP 标记实现了对美国安格斯牛群体的亲子鉴定分析,周磊^[6]通过比较微卫星和单核苷酸多态标记对奶牛亲子鉴定的效率,结果表明,

(上接第 8503 页)

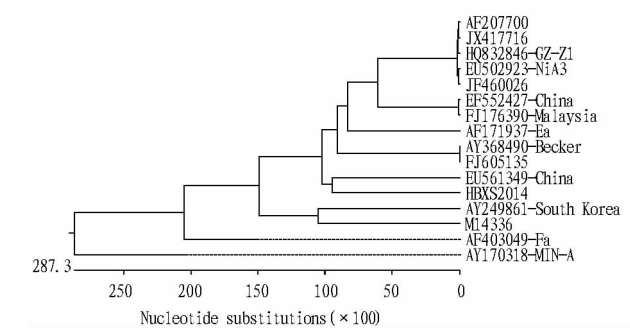


图4 HBXS2014 株与部分毒株 gE 基因的核苷酸序列同源性分析

源性很高但存在部分位点的基因突变,与占松鹤等^[4]、陆芹章等^[5]、郭小参等^[6]、童武等^[7]目前相关文献报道的结果基本一致,但就其这些基因突变位点是否是导致目前疫苗免疫

单个微卫星标记的推断效率一般高于单个 SNP 标记,但当 SNP 标记达到一定数目后,其推断效率能够达到甚至超过微卫星。目前,美国、加拿大等国家已建立了适合本国荷斯坦牛和肉牛的 SNP 亲子鉴定体系;我国也已形成了荷斯坦牛微卫星亲子鉴定技术体系,但还没有开展肉牛亲子鉴定相关研究。该研究收集我国著名三大本地黄牛品种(南阳牛、秦川牛、郑县红牛)遗传多态性数据,共筛选出 38 个符合标准的 SNP 标记,分别位于 24 条染色体上,最低 PIC 为 0.299 8 和最高 PIC 为 0.375。累计个体识别力达到小数点后 13 个 9 的准确度,平均观察杂合度为 0.478 0,能够进行个体识别分析。经分析多态信息含量、个体识别力及累计个体识别力均符合等位基因数、杂合度、个体识别力等方面的要求。可用于我国大规模肉牛厂进行 SNP 个体识别鉴定需求。在该研究的基础上,可以进行无相关个体的试验研究,从而更准确地进行我国黄牛的个体识别鉴定。

参考文献

- [1] BRUFORD M W, WAYNE P K. Microsatellite and their applications to population genetic studies [J]. Current Opinion in Genetics and Development, 1993, 3: 939 - 943.
- [2] BANOS G, WIGGANS G R, POWELL R L. Impact of paternity errors in cow identification on genetic evaluations and international comparisons [J]. J Dairy Sci, 2011, 84: 2523 - 2529.
- [3] ISRAEL C, WELLER J I. Effect of misidentification on genetic gain and estimation of breeding value in dairy cattle populations [J]. J Dairy Sci, 2009, 83: 181 - 187.
- [4] 李东. 利用 SNP 标记进行奶牛亲子鉴定的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2010.
- [5] HEATON M P, HARHAY G P, BENNETT G L, et al. Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in US beef cattle [J]. Mamm Genome, 2002, 13: 272 - 281.
- [6] 周磊. 利用微卫星和 SNP 标记信息进行奶牛亲子鉴定的模拟研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2010.

失败的原因尚需进一步试验验证。此外, PRVHBXS2014 株 gE 基因的成功克隆, 也为今后对 gE 基因的蛋白表达、相关基因功能研究和新的 gE 基因特异性诊断方法奠定基础。

参考文献

- [1] STRAW B E, ZIMMERMAN J J, D'ALLARE S, 等. 猪病学[M]. 赵德明, 张仲秋, 沈建忠, 译. 北京: 中国农业大学出版社, 2008: 423 - 445.
- [2] BARBARA G K, RALF N, THOMAS C M. Pseudorabies Virus Glycoprotein M Inhibits Membrane Fusion[J]. J Virol, 2000, 74(15): 6760 - 6768.
- [3] METTENLEITER T C. PRV: the virus and molecular Pathogenesis[J]. Vet Res, 2000, 31: 99 - 115.
- [4] 占松鹤, 殷冬冬, 姜安安, 等. 猪伪狂犬病毒安徽株 gE 基因的克隆和序列分析[J]. 中国动物传染病学报, 2013, 21(5): 63 - 67.
- [5] 陆芹章, 覃广胜, 黄伟坚, 等. 伪狂犬病病毒广西 B、W 株 gE 基因的扩增、克隆及序列分析[J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(10): 1106 - 1110.
- [6] 郭小参, 高晓云, 陈红英, 等. 猪伪狂犬病毒原阳株 gE 全基因的克隆与序列分析[J]. 国外畜牧学 - 猪与禽, 2014, 34(2): 58 - 60.
- [7] 童武, 张青占, 郑浩, 等. 免疫后发病仔猪中伪狂犬病毒的分离和鉴定[J]. 中国动物传染病学报, 2013, 21(3): 1 - 7.