

传染性喉气管炎病毒河南株 gB 基因的

克隆与序列分析

陈红英^{1,2}, 崔保安^{1,2}, 李新生¹, 赵丽^{1,2}, 郑兰兰^{1,2}, 管倩^{1,2}

(¹河南农业大学牧医工程学院, 河南郑州 450002; ²河南省动物性食品安全重点实验室, 河南郑州 450002)

摘要: 根据传染性喉气管炎病毒 (ILTV) gB 基因的核苷酸序列, 设计、合成 1 对引物, 应用 PCR 扩增鸡 ILTV 河南株 (ILTV-CG) gB 基因。将扩增片段克隆入 pGEM-T Easy 载体后, 经蓝白斑筛选, 菌液 PCR 和酶切鉴定为阳性的重组菌进行测序。结果表明克隆到 ILTV-CG 株 gB 基因, 全长为 2 629 bp, 包含一个完整的开放阅读框, 共编码 873 个氨基酸的多肽, 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。序列分析表明, ILTV-CG 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 基因核苷酸序列同源性的 99% 以上, 与 ILTV-SA2 株 gB 基因比较发现, ILTV-CG 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。

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

中图分类号: S858. 31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-411X(2007)02-0099-04

Cloning and Sequence Analysis of gB Gene of Chicken Infectious

Laryngotracheitis Virus Henan Isolate

CHEN Hong-ying^{1,2}, CUI Bao-an^{1,2}, LI Xin-sheng¹, ZHAO Li^{1,2}, ZHENG Lan-lan^{1,2}, GUAN Qian^{1,2}

(¹ College of Animal Husbandry and Veterinary Engineering, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China ;

² Animal Food Safety Key Laboratory, Henan Province, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: One pair of primers was designed and synthesized based on the nucleotide sequence (M64927) of chicken infectious laryngotracheitis virus (ILTV) gB gene published in the GenBank. gB gene of ILTV Henan isolate (ILTV-CG) was amplified by PCR. The purified PCR product was inserted into pGEM-T Easy vector, and then transformed competent cell JM109. By identification of blue-white colony screening, plasmid PCR and enzyme digestion, positive clones were sequenced. The sequencing results indicated that gB gene nucleotide sequence of ILTV -CG strain was 2 629 bp in length, which included one open-reading frame (2 622 bp, encoding 873 amino acid residues, with eight potential N-glycosylation sites and twelve cysteines in deduced amino acid sequence. Comparison of the gB gene nucleotide sequence with that of the ILTV 632 strain, SA2 strain, Throne strain, Yantai strain and Liaoning strain published previously in GenBank, revealed similarity of more than 99%. When compared with ILTV-SA2 strain, ILTV-CG 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. This study provided foundation for the development of recombinant vaccine against ILTV.

Key words: the infectious laryngotracheitis virus; gB gene; polymerase chain reaction; sequence analysis

收稿日期: 2006-09-01

作者简介: 陈红英 (1965—), 女, 博士; 通讯作者: 崔保安 (1948—), 男, 教授, E-mail: baoancui@henau.edu.cn.

基金项目: “十五”国家食品安全重大攻关专项 (2001BA804A30-11)

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传染病. 初次感染时发病率接近 100%, 死亡率高达 70%, 平均为 10% ~ 40%, 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]. 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 的防控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, 它编码的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, *gB* 糖蛋白能够诱导体液免疫, 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 [3-5]. 为了研制 ILTV 基因工程疫苗, 我们成功地克隆了 ILTV 河南株的 *gB* 基因, 并进行了序列分析.

1 材料与方法

1.1 材料

ILTV 河南株 (ILTV-CG) 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 载体为 Promega 公司产品. Premix Ex Taq DNA 聚合酶, DNA Maker DL2000, X-gal 和 IPTG, *Sal* I、*Pst* I 等为宝生物工程 (大连) 有限公司产品.

1.2 ILTV 增殖与 DNA 的提取

将 ILTV-CG 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鸡胚尿囊液, 剪碎研磨后用尿囊液制成悬液. 反复冻融 3 次, 然后在 4 °C 7 000 r/min 离心 30 min, 取上清液按娄高明 [6] 的方法提取病毒 DNA.

1.3 *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, 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.

*gB*1: 5'-GGACGTTATTGACATGGCTAGCTTG-3',

*gB*2: 5'-GGTGGACTCTTATTCGTCTTCGCTT-3'.

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 °C 预变性 5 min、94 °C 1 min、54 °C 50 s、72 °C 3.5 min, 36 个循环, 最后 72 °C 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.

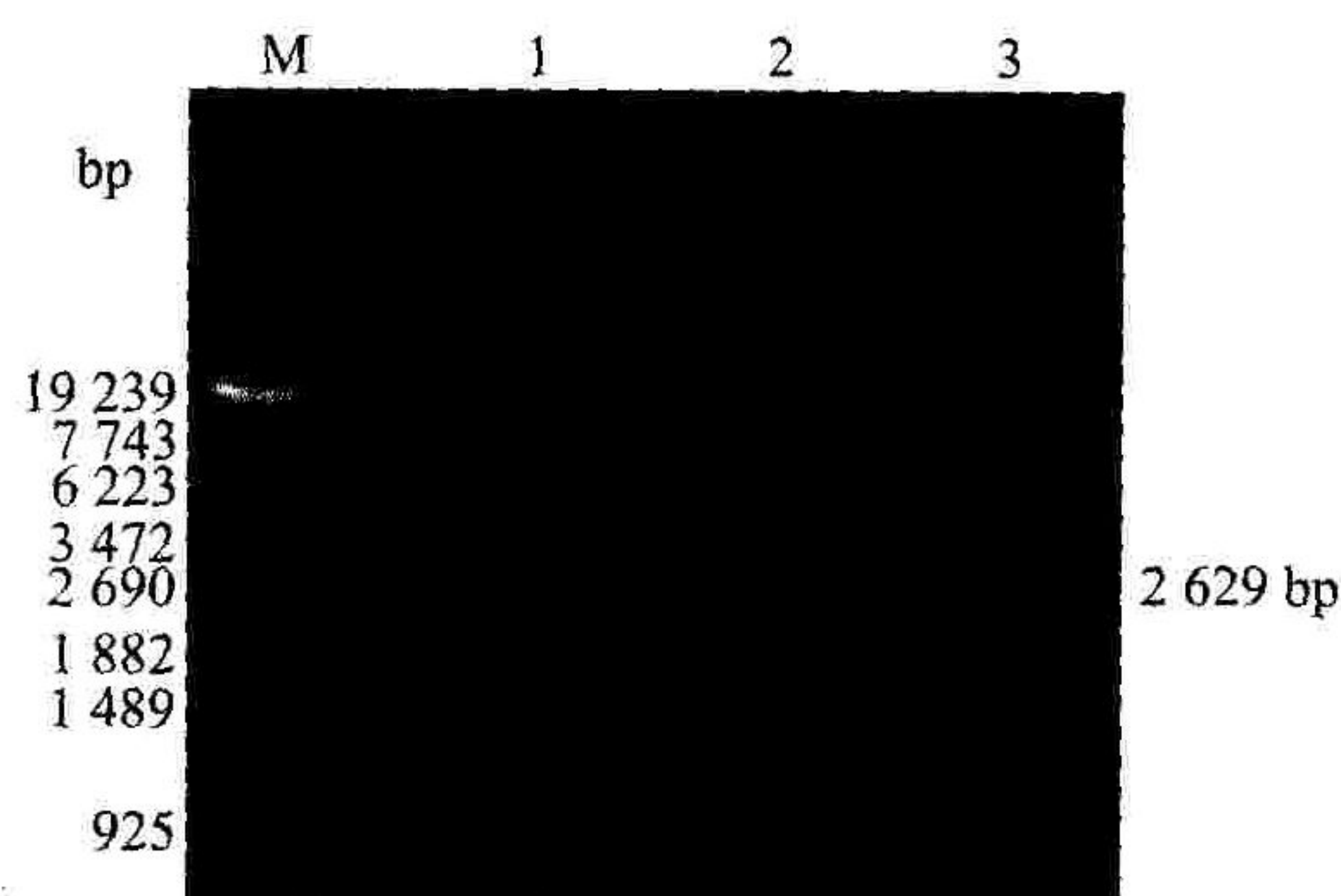
1.4 *gB* 基因的克隆、测序及分析

将纯化的 PCR 产物与 pGEM-T Easy 载体进行连接反应, 转化 *E. coli* JM109 感受态细胞, 在含有 X-gal、IPTG 和 Amp^r 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 °C 振荡培养 12 ~ 16 h, 提取重组质粒进行 PCR 和酶切鉴定. 挑选阳性克隆进行测序, 并与 GenBank 中读取的 ILTV *gB* 基因进行序列分析.

2 结果

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-CG 基因组 DNA 中扩增出 1 条约为 2 600 bp 的特异带, 与预期扩增的 DNA 片段大小相符 (图 1). 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, 出现 1 条长约 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)、电泳出现 2 条带: 一条大小约 2 000 bp, 另一条为约 3 600 bp; 经 *Pst* I 酶切 (*gB* 基因序列中在 1 317 位为 *Pst* I 位点)、电泳也出现 2 条带: 一条大小约 1 300 bp, 另一条约为 4 300 bp, 与预期结果相吻合 (图 2). 表明获得了 ILTV-CG 株 *gB* 基因的重组质粒, 阳性重组质粒命名为 pGEM-ILTV *gB*.



M: λ -EcoT14 I DNA Marker; 1, 2: PCR 产物; 3: 阴性对照

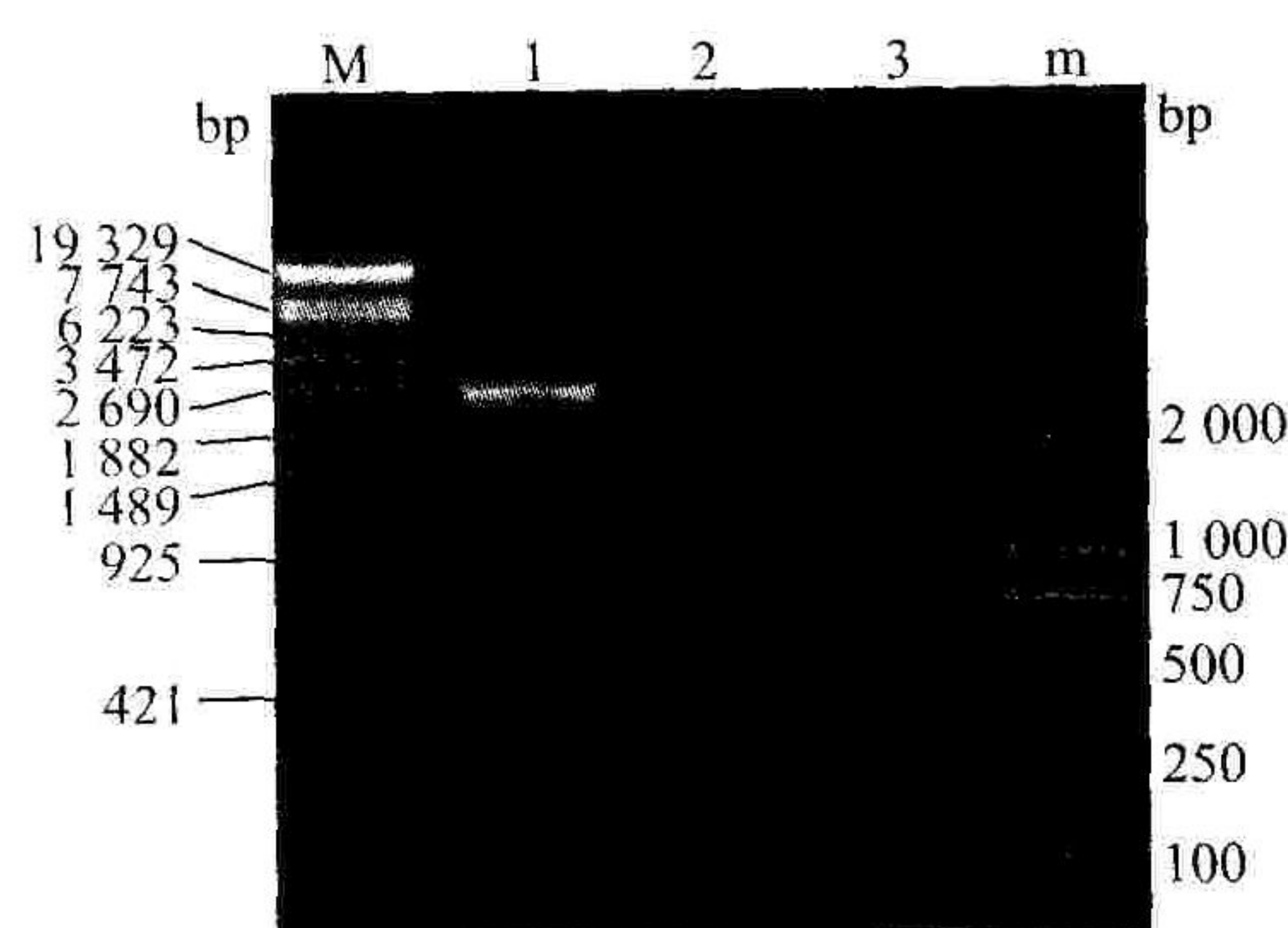
M: λ -EcoT14 I DNA Marker; 1, 2: PCR product; 3: negative control

图 1 PCR 产物电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products of ILTV *gB* gene

2.2 *gB* 基因的序列测定及分析

测序报告的 ILTV-CG 株 *gB* 基因核苷酸序列为 2 629 bp (图 3), 包含一个完整的开放阅读框, (G +

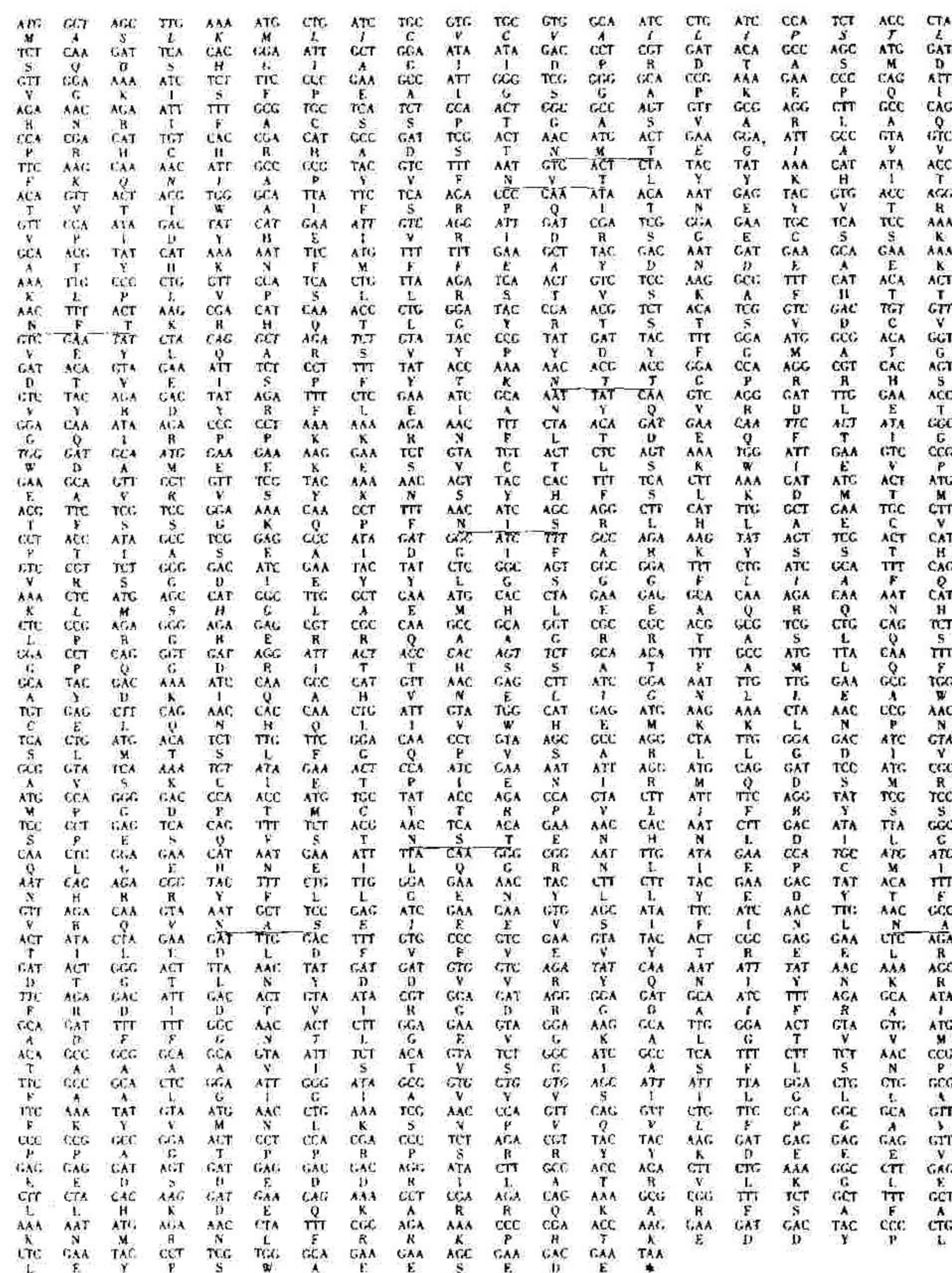


M: λ -EcoT14 I DNA Marker; 1: 重组质粒 PCR 产物; 2: *Sal* I 酶切重组质粒; 3: *Pst* I 酶切重组质粒; m: DNA Marker DL2000

M: λ -EcoT14 I DNA Marker; 1: recombinant plasmid PCR product; 2: recombinant plasmid digestion by *Sal* I ; 3: recombinant plasmid digestion by *Pst* I ; m: DNA Marker DL2000

图2 重组质粒的 PCR 和酶切鉴定图

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid by enzymatic digestion (*Pst* I, *Sal* I) and PCR amplification



下划线氨基酸代表糖基化位点,斜体部分代表信号肽序列,*代表终止密码子

The underlined residues represent potential N-glycosylation sites, the amino acid sequence italicized represents signal peptide sequence, and the asterisk indicates the stop codon

图3 ILTV-CG株 *gB* 基因核苷酸序列及推导的氨基酸序列
Fig.3 The nucleotide sequence of ILTV-CG *gB* gene and its deduced amino acids

C)%为44.66%,共编码873个氨基酸的多肽,相对分子质量为99 000. *gB* 基因推导的氨基酸序列有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,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. 将 ILTV-CG 株 *gB* 基因序列注册 GenBank,登陆号为 DQ812546,详情见 [www. ncbi. nlm. nih. gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

2.3 *gB* 基因核苷酸及推导的氨基酸序列比较

通过 Dnastar 软件 Clustal 程序将 ILTV-CG 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, ILTV-CG 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) *gB* 基因核苷酸同源性分别为 99.7%、99.5%、99.7%、99.1%、99.7%。当与 ILTV-SA2 株相比时, ILTV-CG 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 4)。ILTV-CG 株 *gB* 基因还存在多处点突变, ILTV-CG 和 SA2 株 *gB* 基因氨基酸同源性为 98.4%。

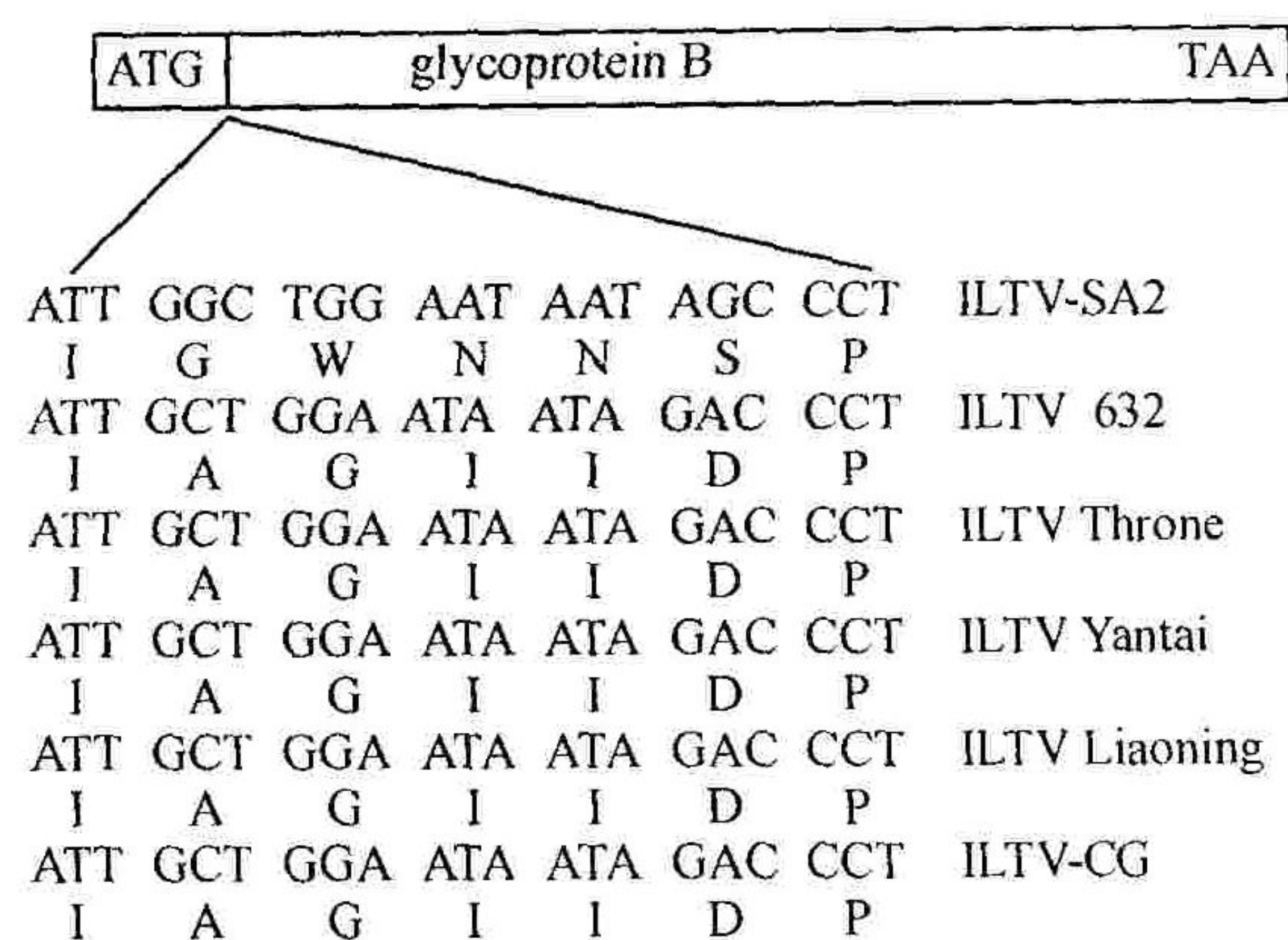
图4 ILTV 强弱毒株 *gB* 基因序列比较分析

Fig. 4 Comparative analysis of *gB* gene sequence of ILTV

3 讨论

ILT 给养鸡业造成了严重的危害,目前国内外用于防治 ILT 的弱毒疫苗存在以下缺点^[7]:①毒力普遍偏强,ILTV 的毒力和免疫力有相关性,如毒力降低,免疫原性也随之下降;②毒力易于返强;③弱毒疫苗和强毒一样也能导致潜伏感染,疫苗免疫不能阻止继发的强毒感染,免疫鸡常成为潜在的传染源;④强弱毒无法进行鉴别诊断. 用传统的方法已无法

解决这些问题,利用生物技术方法来研制基因工程疫苗,如基因缺失疫苗和病毒载体疫苗是发展的趋势. ILTV *gB* 基因是该病毒的糖蛋白基因,它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,是病毒感染所必须的,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].

本研究成功克隆了鸡 ILTV-CG 株 *gB* 基因. 序列分析表明,ILTV-CG 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 99% 以上; 与 ILTV-SA2 株相比,ILTV-CG 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. 本研究结果为研制 ILTV 基因工程疫苗提供了理

想的基因材料.

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 Disease, 1999, 43: 98-105.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 张晶, 王云峰, 智海东, 等. 传染性喉气管炎病毒 *gB* 基因的主要免疫原片段在大肠杆菌中的表达[J]. 中国预防兽医学报, 2006, 28(2): 156-159.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 张绍杰, 倪健强, 孟松树, 等. 鸡传染性喉气管炎病毒 (ILTV) 王岗株糖蛋白 *gB* 基因在重组杆状病毒的表达[J]. 中国预防兽医学报, 2001, 23(5): 321-324.

【责任编辑 柴 焰】

(上接第 68 页)

- [12] SOKAL R R, ROHLF F J. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research [M]. 3rd ed. San Francisco: W. H. Freeman and Company, 1995: 423-427.
- [13] BEAUDET M, MESSIER C. Variation in canopy openness and light transmission following selection cutting in northern hardwood stands: an assessment based on hemispherical photographs [J]. Agricultural and Forest Meteorology, 2002, 110: 217-228.
- [14] SCHNITZLER A, CLOSSET D. Forest dynamics in unexploited birch (*Betula pendula*) stands in the Vosges (France): structure, architecture and light patterns [J]. Forest Ecology and Management, 2003, 183: 205-220.
- [15] YOSHIDA T, YANAGISAWA Y, KAMITANI T. An empirical model for predicting the gap light index in an even-aged oak stand [J]. Forest Ecology and Management, 1998, 109: 85-89.
- [16] ISHIDA M, PETERS R. Effect of potential PAR on shoot extension in juveniles of the main tree species in a Japanese temperate forest [J]. Ecological Research, 1998, 13: 171-182.
- [17] GRISCOM H P, ASHTON P M S, BERLYN G P. Seedling survival and growth of native tree species in pastures: Implications for dry tropical forest rehabilitation in central Panama [J]. Forest Ecology and Management, 2005, 218: 306-318.
- [18] SIZER N, TANNER E V J. Responses of woody plant seedlings to edge formation in a lowland tropical rainforest, Amazonia [J]. Biological Conservation, 1999, 91: 135-142.

【责任编辑 李晓卉】