

向柯宇,潘 慧,吉艺宽,等.猪伪狂犬病病毒新流行株主要糖蛋白的分子特征分析[J].华南农业大学学报,2016,37(3):23-28.

猪伪狂犬病病毒新流行株主要糖蛋白的分子特征分析

向柯宇,潘 慧,吉艺宽,王 雨,张宝石,罗永文,琚春梅
(华南农业大学 兽医学院/广东省动物源性人兽共患病预防与控制重点实验室,广东 广州 510642)

摘要:【目的】进一步了解猪伪狂犬病病毒新流行株的遗传特征。【方法】对从安徽某猪场分离的1株猪伪狂犬病病毒(PRV)AH株进行遗传进化分析及主要糖蛋白gB、gC、gD、gE的序列分析。【结果】PRV AH株与国内2011年以来的流行毒株非常相似,但与Bartha株及其他国外毒株遗传关系较远;国内流行毒株与Bartha株及其他国外毒株相比,其主要糖蛋白均存在明显的连续氨基酸的缺失和插入,且部分突变位点位于这些糖蛋白的重要功能区。【结论】从分子水平上解析了PRV新流行株与疫苗株Bartha株的遗传差异,为进一步深入研究Bartha株疫苗免疫失败的原因提供了理论依据。

关键词:伪狂犬病病毒;新流行株;糖蛋白;分子特征
中图分类号:S852.65 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2016)03-0023-06

Molecular characteristics of major glycoproteins of the novel pseudorabies virus causing a severe epidemic in China

XIANG Keyu, PAN Hui, JI Yikuan, WANG Yu, ZHANG Baoshi, LUO Yongwen, JU Chunmei
(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University /Key Laboratory of Zoonosis Prevention and Control of Guangdong Province, Guangzhou 510642, China)

Abstract:【Objective】In order to study the genetic characteristics of the novel epidemic pseudorabies virus (PRV). 【Method】A PRV strain named PRV AH was isolated from a pig farm in Anhui Province, the phylogenetic tree was constructed and the glycoproteins gB, gC, gD and gE of this strain were analyzed. 【Result】PRV AH was very similar to an epidemic strain which had caused a severe PRV outbreak in China since 2011, but was distantly related to Bartha or other foreign strains. Compared with Bartha and other foreign strains, all PRV strains in China had obvious deletions and insertions of continuous amino acids in the glycoproteins, and some mutations were found in the critical functional regions of the glycoproteins. 【Conclusion】This study analyzes the genetic differences between the novel epidemic PRV strain and Bartha strain at the molecular level, which provides a theoretical basis for further clarification of the immunization failure of Bartha-K61 vaccine.

Key words:pseudorabies virus; novel epidemic strain; glycoprotein; molecular characteristics

伪狂犬病病毒(Pseudorabies virus, PRV)属疱疹病毒科,α疱疹病毒亚科,对世界养猪业危害巨大。

疫苗免疫是防控猪伪狂犬病的重要措施。在我国,许多猪场采用 Bartha 株疫苗预防猪伪狂犬病且取得了显著效果,但自 2011 年以来,许多 Bartha 株疫苗免疫猪场重新爆发了猪伪狂犬病疫情^[1]。将新流行株接种 Bartha 株疫苗免疫的猪和羊,结果显示猪和羊均发病,表明 Bartha 株疫苗对新毒株不能提供完全保护^[1-5]。

伪狂犬病毒的糖蛋白不仅在病毒的侵入、释放以及细胞间扩散等过程中起重要作用,而且也是参与机体免疫反应的主要靶蛋白^[6]。因此,对这些糖蛋白进行深入分析有助于了解新毒株的致病性及免疫原性。本研究在成功分离猪伪狂犬病毒新流行株的基础上,对其进行了遗传进化分析及主要糖蛋白 gB、gC、gD、gE 的序列分析,以期从分子水平上解析现阶段猪伪狂犬病疫情爆发的可能原因。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料和细胞 病料采自安徽某猪场流产胎儿的脑组织,经 PCR 检测为 PRV gE 阳性。PK-15 细胞由华南农业大学兽医微生物学与免疫学教研室保存。

1.1.2 试剂 LA Taq 酶、DNA Marker、琼脂糖、

pMD18-T 载体均为 TaKaRa 公司产品,DMEM 培养液为 Gibco 公司产品,胎牛血清为 Hyclone 公司产品。

1.1.3 试验动物 5 周龄的雌性昆明小鼠购自南方医科大学实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 病毒的分离 将病料在 DMEM 中充分研磨后,于 4 ℃ 条件下 $6\,800\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min,收集上清液。将上清液用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 的滤器过滤,接种至 PK-15 单层细胞中,观察到细胞出现明显病变时,将细胞反复冻融 3 次后收集病毒,通过 PCR 鉴定病毒。

1.2.2 致病性试验 将 30 只 5 周龄的昆明小鼠分成 6 组,分别接种 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 稀释度的 PRV AH 病毒液 100 μL ,另外 2 组分别接种未稀释的病毒液 100 μL 作阳性对照和 DMEM 100 μL 作阴性对照,每天对小鼠的临床症状和死亡情况进行观察,最后计算出病毒的 LD_{50} 。

1.2.3 引物设计 参照 GenBank 发布的 PRV 序列 (GI:32187339)设计 4 对引物分别扩增 PRV gB、gC、gD、gE 基因序列,引物由生工生物工程股份有限公司合成。

1.2.4 PCR 扩增 用 LA Taq 酶扩增 gB、gC、gD、gE 4 段基因序列,其引物见表 1。

表 1 扩增主要糖蛋白基因的引物序列

Tab. 1 Primer sequences of genes encoding the major glycoproteins

基因	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
<i>gB</i>	CCGCTGTTCCTCTTCG	TGGTCCGTCAGTGAGTT
<i>gC</i>	GGGGGGCCATTCGCA	GCGGGGGCGTCACAG
<i>gD</i>	GCCATGCTGCTCGCA	CTGCGGAGGCTACGG
<i>gE</i>	GGGGTTGAGACCATGCGG	CGGTTCTCCCGGTATTTA

PCR 反应条件为:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 45 s,退火温度条件下 45 s,72 ℃ 延伸 2 min,循环 30 次;72 ℃ 末次延伸 10 min,4 ℃ 保存。gB、gC、gD、gE 基因的 PCR 扩增最适退火温度分别为:50、56、58、55 ℃。

1.2.5 遗传进化分析 用 MEGA5.0 软件将 PRV AH 和部分国内外经典的 PRV 毒株的 gC、gE 基因序列进行比对分析,并采用邻位相连法绘制系统发育树。

1.2.6 主要糖蛋白的序列分析 将 PRV AH 与 PRV 其他毒株的 gB、gC、gD、gE 氨基酸序列进行比对分析,以解析新流行株与其他毒株的差异。

2 结果与分析

2.1 病毒分离

将流产胎儿脑组织样品接种到 PK-15 单层细胞

<http://xuebao.scau.edu.cn>

上,在接种 48 h 后观察到了明显细胞病变,提取病变细胞总 DNA 为模板,利用 PRV gE 特异性引物进行 PCR 检测,结果显示可以扩增出 gE 特异性条带(图略),证实病料中含有伪狂犬病毒,并命名为 PRV AH。

2.2 致病性试验

所有接种 10^{-1} 和 10^{-2} 稀释度病毒液的小鼠都在 72 ~ 84 h 内死亡,有 3 只接种 10^{-3} 稀释度病毒液的小鼠在 72 ~ 84 h 内死亡。接种 10^{-4} 稀释度病毒液的小鼠未发生死亡。所有接种死亡的小鼠都表现典型的伪狂犬病症状,如神经症状和奇痒症状,小鼠在接种不同稀释度的病毒液后的死亡情况见表 2。在 PK-15 细胞中测得 PRV AH 分离株的 TCID_{50} 为 $10^{-7.4}/0.1\text{ mL}$ 。经寇氏法测得病毒对小鼠的 LD_{50} 为 $10^{4.3}\text{TCID}_{50}$ 。

表 2 分离株 PRV AH 对小鼠的致病性试验

Tab.2 The pathogenicity of PRV AH to mice

病毒稀释度	病毒滴度	$t_{死亡}/h$	死亡率
原液	$10^{7.4}$ TCID ₅₀	72 ~ 84	5/5
10^{-1}	$10^{6.4}$ TCID ₅₀	72 ~ 84	5/5
10^{-2}	$10^{5.4}$ TCID ₅₀	72 ~ 84	5/5
10^{-3}	$10^{4.4}$ TCID ₅₀	72 ~ 84	3/5
10^{-4}	$10^{3.4}$ TCID ₅₀	...	0/5
空白	0	...	0/5

2.3 遗传进化分析

分别以 PRV *gC* 和 *gE* 基因对新流行株与其他毒株进行遗传进化分析。在 PRV *gC* 基因的遗传进化分析中,采用了 30 株国内不同年代或不同地点分离的 PRV 毒株和 5 株国外分离的 PRV 毒株,结果表明,除 2008 年分离的 7 株毒株外,其他国内毒株都位于同一个分支,且 2011 年 PRV 重新大流行以来新分离毒株的遗传关系更近,这些毒株与国外毒株及疫苗毒株 Bartha 株遗传关系较远(图 1),这与 Fonseca 等^[7]的结果相符。本研究中所分离的毒株 PRV AH 与 2011 年 PRV 重新大流行以来分离的 PRV 毒株位于同一分支,因此归属于新流行株。

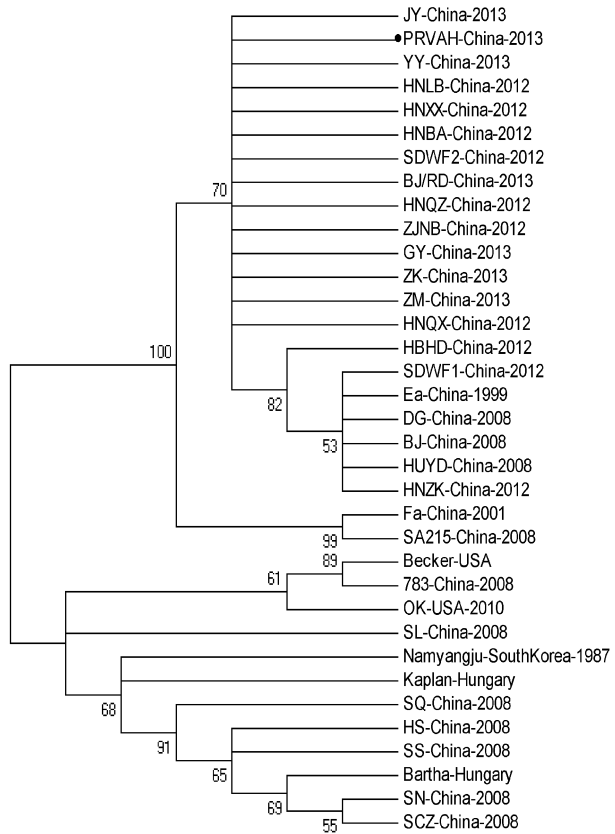


图 1 PRV *gC* 基因的遗传进化分析

Fig.1 Phylogenetic analysis based on PRV *gC*

PRV *gE* 基因的遗传进化分析结果与 *gC* 基因的相似。在 PRV *gE* 基因的遗传进化分析中,采用了 14 株国内不同年代或不同地点分离的 PRV 毒株和 9 株国外 PRV 毒株,结果显示,所有国内毒株与国外毒株(P-PrV-Malaysia 株除外)分属于不同分支,说明国内分离毒株遗传关系较近,而与国外毒株存在较大差异(图 2)。

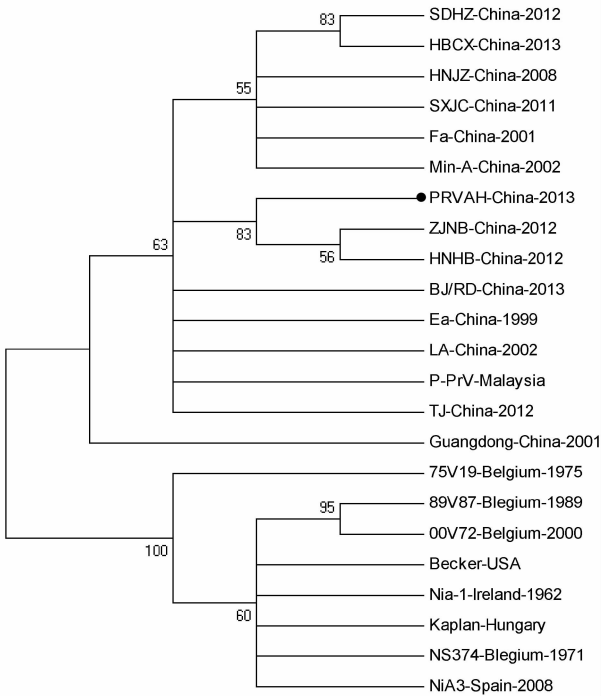


图 2 PRV *gE* 基因的遗传进化分析

Fig.2 Phylogenetic analysis based on PRV *gE*

2.4 PRV 主要糖蛋白的序列分析

将 PRV 国内分离株的主要糖蛋白序列与 Bartha 株及国外分离株进行比较,结果显示,国内株都存在明显的氨基酸的缺失或插入。在糖蛋白 *gB* 区域,所有国内株在 75 ~ 78 氨基酸处存在 4 个氨基酸的缺失,在 93 ~ 94 氨基酸处存在 2 个氨基酸的插入(图 3)。在糖蛋白 *gC* 区域,国内毒株(除 2008 年分离的 7 株毒株外)在 62 ~ 69 氨基酸处都存在 8 个连续氨基酸的插入(图 4)。与 Bartha 株相比较,多数国内株在糖蛋白 *gD* 的 275 ~ 276 氨基酸处存在 2 个氨基酸的插入,而 PRV Ea 株在 275 ~ 279 氨基酸处存在 5 个连续氨基酸的插入(图 5)。在糖蛋白 *gE* 区域,不同分离株的区别主要位于 48 氨基酸和 495 ~ 498 氨基酸处,如与国外经典毒株 Kaplan 株和 Becker 株相比较,国内新分离株(除 HNHB 株外)在 496 ~ 498 位置均存在 1 ~ 3 个氨基酸的插入,部分国内株在 48 氨基酸处还存在 1 个氨基酸的插入(图 6)。

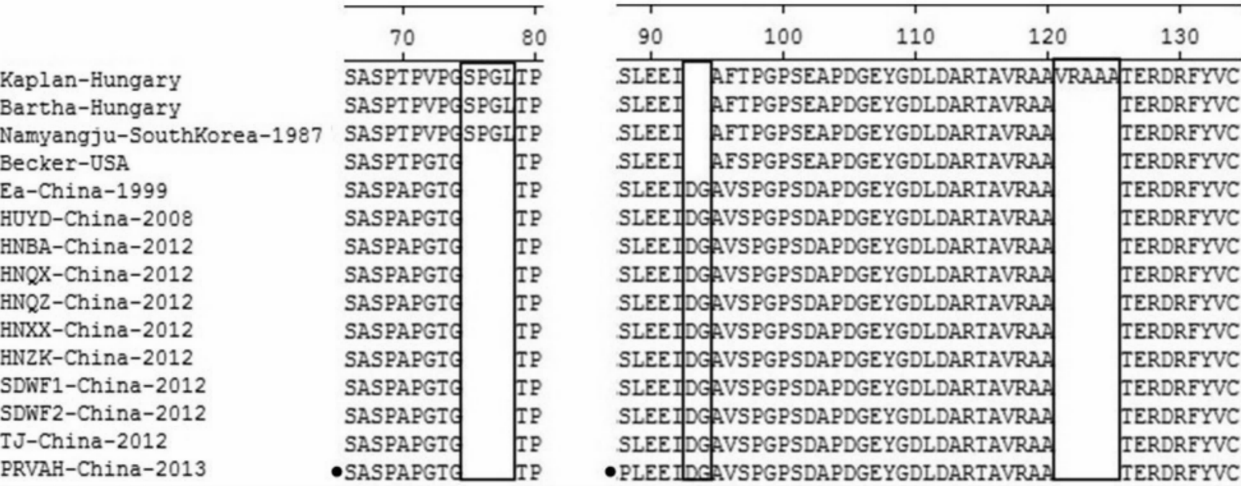


图 3 不同 PRV 毒株 gB 氨基酸的序列比对分析

Fig. 3 Comparison of gB glycoprotein amino acid sequences of different PRV strains

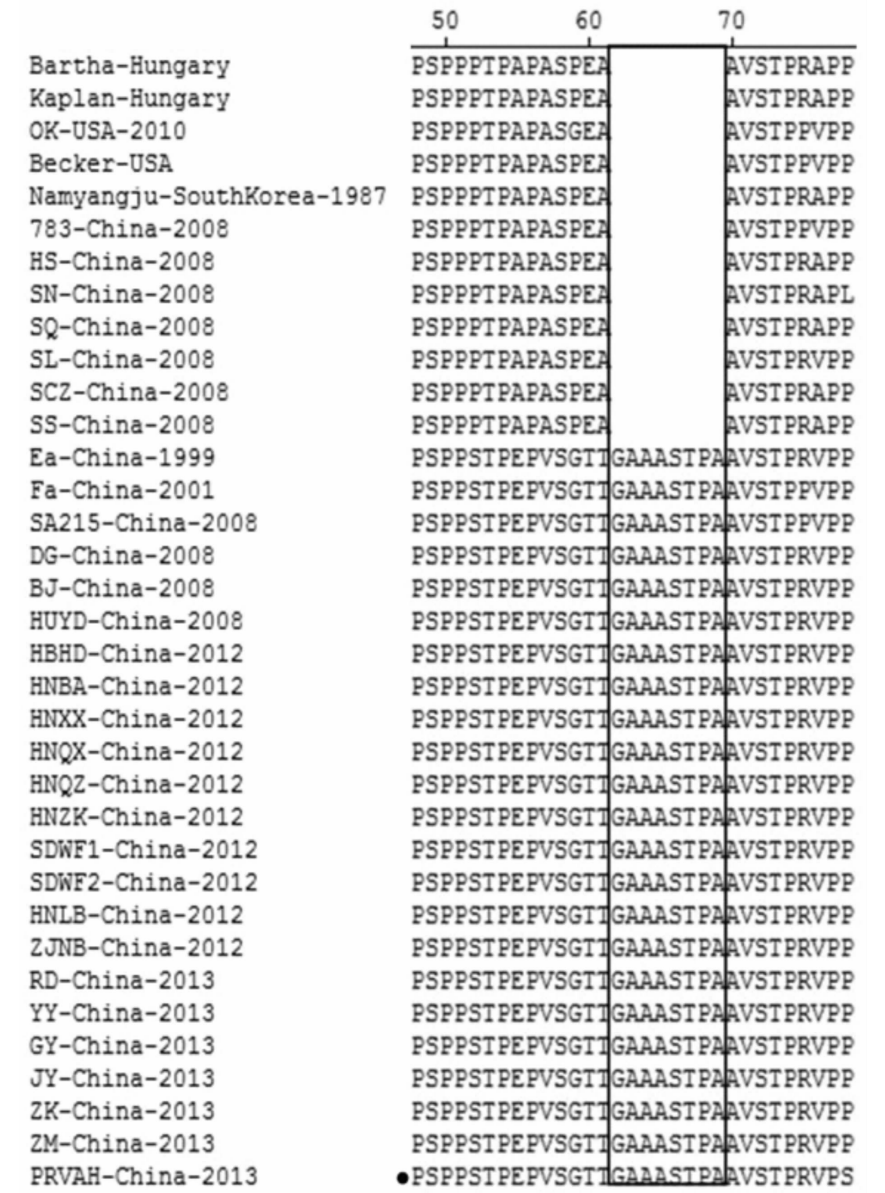


图 4 不同 PRV 毒株 gC 氨基酸的序列比对分析

Fig. 4 Comparison of gC glycoprotein amino acid sequences of different PRV strains

	270	280	290
Kaplan-Hungary	SPRPRFRPR	REKPEPAPVT	PAP
Bartha-Hungary	SPRPRFRPR	REKPEPAPVT	PAP
Namyangju-SouthKorea-1987	SPRPRFRPR	REKPEPAPVT	PAP
Becker-USA	SPRPRFRPRFR	REKPEPAPAT	PAP
Ea-China-1999	SPRPRFRPRFRPS	REKPEPAPAT	PAP
Fa-China-2001	SPRPRFRPRFR	REKPEPAPAT	PAP
Min-A-China-2002	SPRPRFRPRFR	KPEPAPAT	PAP
LA-China-2002	SPRPRFRPR	REKPEPAPAT	PAP
FZ-China-2005	SPRPRFRPR	REKPEPAPAT	PAP
SA215-China	SPRPRFRPRFR	REKPEPAPAT	PAP
TJ-China-2012	SPRPRFRPRFR	REKPEPAPAT	PAP
QXX-China-2013	SPRPRFRPRFR	REKPEPAPAT	PAP
QXY-China-2013	SPRPRFRPRFR	REKLEPAPAT	PAP
QYY-China-2013	SPRPRFRPRFR	REKPEPAPAT	PAP
QBA-China-2013	SPRPRFRPRFR	REKPEPAPAT	PAP
RD-China-2013	SPRPRFRPRFR	REKPEPAPAT	PAP
PRVAH-China-2013	•SPRPRFRPRFR	REKPEPAPAT	PAP

图5 不同PRV毒株gD氨基酸的序列比对分析

Fig. 5 Comparison of gD glycoprotein amino acid sequences of different PRV strains

	40	50	490	500
P-PrV-Malaysia	EVFSPSAEVND	LSTEAGDD	DYYDGGDD	EAGVVR
Becker-USA	EVFSPSAEVND	LSTEAGDD	DYYDGGDD	EAGDARR
Kaplan-Hungary	EVFSPSAEVND	LSTEAGDD	DYYDGGDD	EAGVARR
Nia-1-Ireland-1962	EVFSPSAEVND	LSTEAGDD	DYYDGGDD	EAGVARR
NS374-Blegium-1971	EAPSPSAEVND	LSTEAGDD	DYYDGGDD	EAGIARR
75V19-Belgium-1975	EVFSPSAEVND	LSTEAGDD	DYYDGGDD	EAGVARR
89V87-Blegium-1989	EVFSPSAEVND	LSTEAGDD	DYYDGGDD	EAGDARR
00V72-Belgium-2000	EVFSPSAEVND	LSTEAGDYD	DYYDGGDD	EAGDARR
Ea-China-1999	EVFSPSAEVND	LSTEAGDD	DYYDGGDD	EAGVIRR
LA-China-2002	EVFSPSAEVND	LSTEAGDD	DYYDGGDD	EAGVIRR
Guangdong-China-2001	EVFSPSAEVND	LSTEAGDD	DYYDGGDD	EAGVIRR
Fa-China-2001	EVFSPSAEVND	LSTEAGDD	DYYDGGDD	EAGVIRR
Min-A-China-2002	EVFSPSAEVND	LSTEAGDD	DYYDGGDD	EAGVIRR
HNJZ-China-2008	EVFSPSAEVND	LSTEAGDD	DYYDGGDD	EAGVIRR
NiA3-Spain-2008	EVFSPSAEVND	LSTEAGND	DYYDGGDD	EAGVARR
SKJC-China-2011	EVFSPSAEVND	LSTEAGDD	DYYDGGDD	EAGVIRR
SDHZ-China-2012	EVFSPSAEVND	LSTEAGDD	DYYDGGDD	EAGVIRR
HBCX-China-2013	EVFSPSAEVND	LSTEAGDD	DYYDGGDD	EAGVIRR
ZJNB-China-2012	EVFSPSAEVND	LSTEAGDD	DYYDGGDD	EAGVIRR
HNHB-China-2012	EVFSPSAEVND	LSTEAGDD	DYYDGGDD	EAGVIRR
TJ-China-2012	EVFSPSAEVND	LSTEAGDD	DYYDGGDD	EAGVIRR
RD-China-2013	EVFSPSAEVND	LSTEAGDD	DYYDGGDD	EAGVIRR
PRVAH-China-2013	•EVFSPSAEVND	LSTEAGDD	•DYYDGGDD	EAGVIRR

图6 不同PRV毒株gE氨基酸的序列比对分析

Fig. 6 Comparison of gE glycoprotein amino acid sequences of different PRV strains

3 讨论

PRV AH株从安徽某Bartha株疫苗免疫猪场的流产胎儿脑组织中分离得到,经动物试验测得其毒力较强,对小鼠LD₅₀可达10^{4.3} TCID₅₀。为了了解PRV AH株和国内外其他PRV毒株的关系,我们分别以PRV gC和gE基因进行了遗传进化分析,结果显示PRV AH株和2011年造成国内PRV大流行的毒株十分相似。

伪狂犬病毒的糖蛋白不仅在病毒的侵入、释放以及细胞间传播等过程中起重要作用,而且也是参与机体免疫反应的主要靶蛋白。因此,对这些糖蛋白进行深入分析有助于了解新毒株的致病性及免疫原性等。对PRV gB、gC、gD、gE糖蛋白的序列分析表明,国内不同时期分离的毒株,特别是新毒株序列基本相似,但与Bartha株存在明显差异,主要表现为

多个连续氨基酸的插入或缺失,且部分差异区域位于这些糖蛋白的重要功能区。

在PRV gB糖蛋白N端的59~126氨基酸序列存在3个连续的抗原表位区,这一区域的氨基酸序列具有高柔韧性、易接近性和亲水性,具有抗体结合位点(ABD)的特征^[8]。在本研究中,与Bartha株相比,所有国内毒株均存在4个氨基酸的缺失(75~78氨基酸)和2个氨基酸的插入(93~94氨基酸),这些突变都在59~126氨基酸区域,可能会影响抗原-抗体的结合。

PRV gC基因在诱导感染动物体液免疫和细胞免疫中起着重要作用。在猪群,无论是野毒感染还是弱毒疫苗免疫,机体诱导产生的PRV中和抗体主要是针对gC糖蛋白。此外,gC糖蛋白是介导病毒与靶细胞的黏附所必须,主要通过其表面的3个肝素结合区域(HBDs)与靶细胞表面硫酸乙酰肝素糖胺聚糖链结合。HBDs区域同时也是gC糖蛋白N端的抗体结合区域(44~290氨基酸)的一部分,用gC特异性抗体结合该区域可干扰病毒的黏附作用^[9]。在本研究中,与Bartha株相比,国内新毒株的gC氨基酸序列在ABD区域均存在8个连续氨基酸的插入,这可能会改变该区的环状结构,从而影响gC抗体与其有效结合。这可能也是造成Bartha株疫苗对当前PRV流行株免疫效果低下的原因之一。

PRV gD糖蛋白可介导细胞间的融合,主要通过与细胞表面被称为疱疹病毒侵入介质(Herpessvirus entry mediators, Hve)的受体发生结合,以稳定病毒与细胞的相互作用。gD糖蛋白也是诱导产生中和抗体的靶蛋白之一,这种抗体可减少PRV侵入细胞,从而在抗病毒免疫中发挥重要作用^[10]。在本研究中,与Bartha株相比,国内PRV新毒株的gD氨基酸序列在267~276氨基酸处存在(Pro-Arg)₅序列,而在Bartha株是(Pro-Arg)₄序列,且在这一区域脯氨酸的连续间隔排列可以在蛋白表面形成严格的亲水结构,从而有利于蛋白之间的相互作用^[11]。这些特殊氨基酸序列在PRV感染中的具体作用尚不清楚。国内毒株在gD蛋白中的这些突变是否会影响其与Bartha株疫苗抗体的有效结合尚需进一步证实。

PRV gE糖蛋白在介导细胞融合、病毒扩散和释放等方面起着重要作用^[12-13],同时gE基因也与PRV的毒力相关^[14-15]。在本研究中,国内毒株gE氨基酸序列的主要区别在于48位和496~498位存在不同数量氨基酸的插入,这些插入可能会导致病毒毒力的改变。

综上所述,与Bartha株相比,国内PRV毒株的

<http://xuebao.scau.edu.cn>

主要免疫原性蛋白 gB、gC、gD 均存在明显差异,这也可能是影响 Bartha 株疫苗在国内猪场免疫效果不佳的原因之一。在 2011 年后国内分离的 PRV 毒株中,除 gE 蛋白外,糖蛋白 gB、gC、gD 无明显突变,且与国内经典毒株 Ea、Fa、SA215 等基本相似。因此,国产疫苗,如由 Ea 株致弱的 HB-98 毒株,可能可以提供更好的免疫保护,但国产疫苗生产工艺等方面仍需改进以提高疫苗的质量。此外,疫苗的免疫效果很大程度上取决于猪群本身的状况,例如疾病、营养缺乏和药物滥用等因素导致动物机体的免疫抑制也可能导致疫苗免疫失败。

参考文献:

[1] AN T Q, PENG J M, TIAN Z J, et al. Pseudorabies virus variant in Bartha-K61-vaccinated pigs, China, 2012[J]. Emerg Infect Dis, 2013, 19(11): 1749-1755.

[2] YU X, ZHOU Z, HU D, et al. Pathogenic pseudorabies virus, China, 2012 [J]. Emerg Infect Dis, 2014, 20(1): 102-104.

[3] WU R, BAI C, SUN J, et al. Emergence of virulent pseudorabies virus infection in Northern China[J]. J Vet Sci, 2013, 14(3): 363-365.

[4] WANG C, YUAN J, QIN H, et al. A novel gE-deleted pseudorabies virus (PRV) provides rapid and complete protection from lethal challenge with the PRV variant emerging in Bartha-K61-vaccinated swine population in China[J]. Vaccine, 2014, 32(27): 3379-3385.

[5] 彭金美, 安同庆, 赵鸿远, 等. 猪伪狂犬病病毒新流行株的分离鉴定及抗原差异性分析[J]. 中国预防兽医学报, 2013, 35(1): 1-4.

[6] POMERANZ L E, REYNOLDS A E, HENGARTNER C J. Molecular biology of pseudorabies virus: Impact on neurovirology and veterinary medicine[J]. Microbiol Mol Biol R, 2005, 69(3): 462.

[7] FONSECA A J, CAMARGOS M F, DE OLIVEIRA A M, et al. Molecular epidemiology of Brazilian pseudorabies vi-

ral isolates [J]. Vet Microbiol, 2010, 141 (3/4): 238-245.

[8] ZARIPOV M M, MORENKOV O S, FODOR N, et al. Distribution of B-cell epitopes on the pseudorabies virus glycoprotein B[J]. J Gen Virol, 1999, 80(3): 537-541.

[9] OBER B T, TEUFEL B, WIESMUELLER K, et al. The porcine humoral immune response against pseudorabies virus specifically targets attachment sites on glycoprotein gC [J]. J Virol, 2000, 74(4): 1752-1760.

[10] ELOIT M, BOUZGHAIA H, TOMA B. Identification of antigenic sites on pseudorabies virus glycoprotein gp50 implicated in virus penetration of the host cell [J]. J Gen Virol, 1990, 71(9): 2179-2183.

[11] PETROVSKIS E A, TIMMINS J G, ARMENTROUT M A, et al. DNA sequence of the gene for pseudorabies virus gp50, a glycoprotein without N-linked glycosylation[J]. J Virol, 1986, 59(2): 216-223.

[12] ZSAK L, METTENLEITER T C, SUGG N, et al. Release of pseudorabies virus from infected cells is controlled by several viral functions and is modulated by cellular components[J]. J Virol, 1989, 63(12): 5475-5477.

[13] 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.

[14] KIMMAN T G, DE WIND N, OEI-LIE N, et al. Contribution of single genes within the unique short region of Aujeszky's disease virus (suid herpesvirus type 1) to virulence, pathogenesis and immunogenicity[J]. J Gen Virol, 1992, 73(2): 243-251.

[15] TIRABASSI R S, TOWNLEY R A, ELDRIDGE M G, et al. Characterization of pseudorabies virus mutants expressing carboxy-terminal truncations of gE: Evidence for envelope incorporation, virulence, and neurotropism domains [J]. J Virol, 1997, 71(9): 6455-6464.

【责任编辑 柴 焰】