

文章编号: 1001-411X(2002)04-0071-04

# PRV gE 抗原表位基因的序列分析

石迎新, 罗满林, 黄毓茂, 刘镇明

(华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

**摘要:** 设计、合成了 1 对特异性引物, 以 PRV-MinA 和 PRV-YueA 株的病毒基因组为模板扩增 gE 的抗原表位基因, 均获得了约 560 bp 的特异性产物. 将 PCR 产物克隆到 pUCm-T 载体上, 构建重组质粒 pUCMAGe 和 pUCYAGe. 经菌落 PCR 和质粒酶切鉴定后, 将目的基因进行序列测定. 结果表明: 目的基因均由 558 bp 组成, 编码 186 个氨基酸; 核酸序列和推导的氨基酸序列的同源性分析表明, PRV-YueA 和 PRV-MinA 株具有相对较低的同源性, 分别为 96.9% 和 92.5%.

**关键词:** 伪狂犬病毒; gE 抗原表位基因; 序列分析

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

伪狂犬病病毒(pseudorabies virus, PRV; 又名猪疱疹病毒 I 型, 奥叶兹基氏病病毒)属于疱疹病毒科、单纯疱疹病毒属, 可引起多种家畜和野生动物以发热、奇痒(猪除外)及脑脊髓炎为主要症状的一种疾病<sup>[1]</sup>. 为了预防伪狂犬病, 已研制出效果良好的基因缺失弱毒疫苗. gE 基因是伪狂犬病毒复制的非必需基因, 含 gE 基因缺失的弱毒疫苗已广泛应用, 而且欧盟和美国已规定只准使用含 gE 基因缺失的疫苗<sup>[2]</sup>. 欧美研究人员通过调查和对比, 所收集的 1 200 多个伪狂犬病野毒株全部含有 gE 基因. 这说明, gE 可以作为鉴别野毒株和疫苗株的依据之一. 目前, 国外已成功研制出商品化的 gE/gI 野毒株/疫苗株鉴别诊断试剂盒. 本研究目的在于扩增 PRV gE 抗原表位基因, 进而比较国内猪源毒株与牛源毒株、国内毒株与国外毒株的差异, 寻找有代表性的 PRV 流行株, 为进一步研制适合于国内实际的 gE 野毒株/疫苗株鉴别诊断抗原奠定基础.

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒、细胞

PRV 闽 A(MinA)株、粤 A(YueA)株由华南农业大学兽医学院传染病室提供. HS-2h 细胞由广州出入境检验检疫局惠赠.

### 1.2 质粒、菌株

pUCm-T 载体质粒为上海 Sangon 公司产品, *E. coli* DH5a 由华南农业大学兽医学院传染病室保存.

### 1.3 主要试剂

限制性内切酶 *Bam*HI、*Nde*I、*Taq* 酶、dNTPs、PCR

产物纯化试剂盒为宝生物工程(大连)有限公司产品. T<sub>4</sub> DNA 连接酶、λDNA *Eco*RI/*Hand*III、Amp、IPTG、X-gal 购自华美生物工程公司. DMEM(high glucose)培养基购自 Gibco BRL 公司.

### 1.4 PRV 增殖和病毒基因组的提取

HS-2h 细胞培养和病毒增殖以及病毒基因组的提取, 参照刘镇明等<sup>[3]</sup>和罗满林等<sup>[4]</sup>的方法进行.

### 1.5 引物的设计、合成

设计 1 对引物<sup>[5]</sup>, 编号为引物 2s 和 2x, 用来扩增 PRV gE 的抗原表位基因, 分别在 5' 端引入 *Nde*I 和 *Bam*HI 限制性酶切位点. 引物 2s: 5' CATATGGCC-GACGATGACCTC 3', 引物 2x: 5' GGATCCT-CATCAGGGGAGAGAAGAGCTG 3'. 引物由上海 Sangon 公司合成.

### 1.6 gE 抗原表位基因的 PCR 扩增

在微量离心管中依次加入 5 μL 10×PCR 反应缓冲液, 4 μL dNTPs(各 2.5 mol/L), 引物 2s(20 μmol/L) 2.5 μL, 引物 2x(20 μmol/L) 2.5 μL, DMSO 5 μL、灭菌 ddH<sub>2</sub>O 29.75 μL、*Taq* 酶 0.25 μL、病毒基因组(模板)1 μL, 总体积为 50 μL. 同时设立灭菌 ddH<sub>2</sub>O 作对照. PCR 程序: 先 94 °C 预变性 4 min, 再 94 °C 3 s, 58 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共运行 25 个循环, 72 °C 延伸 7 min, 4 °C 保存. PCR 产物以 10 g/L TBE 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 紫外透射仪下观察结果. PRV-MinA 和 PRV-YueA 株的 PCR 产物分别记作 MAgE 和 YAGe.

### 1.7 PCR 产物的克隆

1.7.1 感受态细胞制备 参照 F. 奥斯伯等<sup>[6]</sup>方法.

1.7.2 PCR 产物与 pUCm-T 载体的连接 用 PCR 产

收稿日期: 2001-12-07

作者简介: 石迎新(1974-), 硕士, 现在深圳出入境检验检疫局动检处工作.

通讯作者: 刘镇明(1946-), 男, 副教授.

基金项目: 广东省科技攻关资助项目(ZKM03507N), 国家自然科学基金资助项目(39770033). <http://www.cnki.net>

物回收试剂盒纯化 MAgE 和 YAgE. 在 2 个微量离心管中依次加入 10× T<sub>4</sub> DNA 连接酶缓冲液 1 μL、pUCm-T 载体 1 μL、灭菌 ddH<sub>2</sub>O 5 μL、T<sub>4</sub> DNA 连接酶 1 μL. 其中一管加 MAgE 纯化产物 2 μL, 另一管加 YAgE 纯化产物. 混匀, 置 4 °C 冰箱连接过夜.

1.7.3 连接产物的转化 参照 F. 奥斯伯等<sup>[6]</sup>的方法, 将上述连接产物转化 DH5α 感受态细胞, 涂布于含 Amp、X-gal 和 IPTG 的 LB 琼脂平板中, 37 °C 培养 14 ~ 16 h.

1.8 重组质粒的鉴定

经菌落 PCR 方法筛选阳性克隆菌株, 再参照 J. 萨姆布鲁克<sup>[7]</sup>的方法, 抽提重组质粒. 用 BamHI 单酶切以及 NdeI 和 BamHI 双酶切鉴定.

1.9 gE 抗原表位基因的序列测定和序列比较

经上述鉴定正确的重组质粒送上海基康生物技术公司进行序列测定, 测序引物为 M13F(-21)通用引物. 查找在 GenBank 注册的 PRV gE 全基因序列, 分析其 gE 抗原表位基因序列, 并进行核酸序列比较. 根据核酸序列推导 gE 抗原表位的氨基酸序列, 并加以比较.

2 结果

2.1 gE 抗原表位基因的 PCR 扩增结果

以抽提的 PRV-MinA 株、PRV-YueA 株病毒基因组为模板, 经上述方法进行 PCR 扩增后, 10 g/L 琼脂

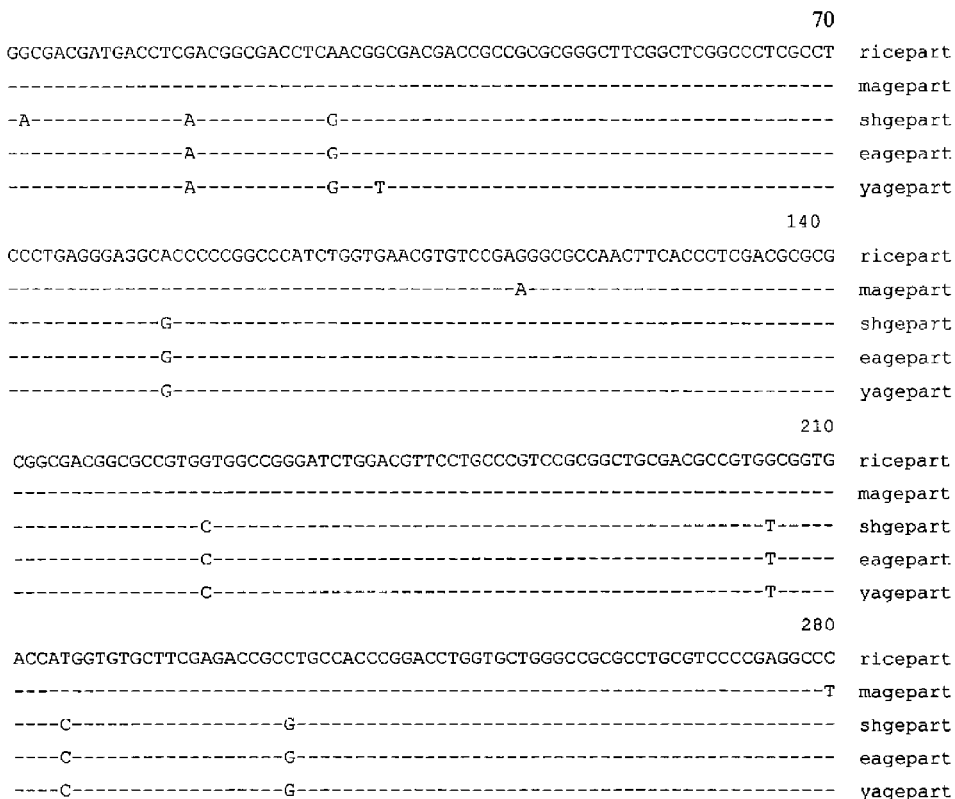
糖凝胶电泳观察可见特异的大约 560 bp 的条带, 与预期大小相符合.

2.2 重组质粒的酶切鉴定

pUCMA gE、pUCYA gE 重组质粒经 BamHI 单酶切、NdeI+BamHI 双酶切 2.5 h 后, 经 8 g/L 的琼脂糖凝胶电泳, 观察到均切出与预期大小相一致的条带.

2.3 PRV gE 抗原表位基因的序列测定和序列比较结果

经上述方法测序, 扩增出的 PRV-MinA 与 PRV-YueA 株的 gE 抗原表位基因均为 558 bp, 在 GeneBank 注册的 3 个毒株 PRV-Rice、PRV-SH (中国上海) 和 PVR-Ea (华中农业大学) 的 gE 抗原表位基因也是 558 bp, 说明了 PVR gE 基因具有一定的保守性, 这与冉智光等<sup>[8]</sup>报道的一致. 借助 DNASTAR 4.0 生物学分析软件, 比较 PVR-SH、PRV-Ea、PRV-YueA、PRV-MinA、PRV-Rice 5 个毒株 gE 抗原表位基因序列之间的关系, 发现 PVR-SH、PRV-Ea、PRV-YueA 之间的同一性均大于 99.3%, 其中 PRV-Ea 与 PRV-YueA 之间为 99.8%, 同一性最高. PRV-MinA 和 PRV-Rice 之间的同一性达 99.3%, 但 PRV-Rice 与 PVR-SH、PRV-Ea、PRV-YueA 之间的同一性较低, 分别为 97.3%、97.6% 和 97.6%, 而 PRV-MinA 与三者之间的同一性分别为 96.5%、96.9% 和 96.9%, 同一性最小. 核酸序列比较见图 1.



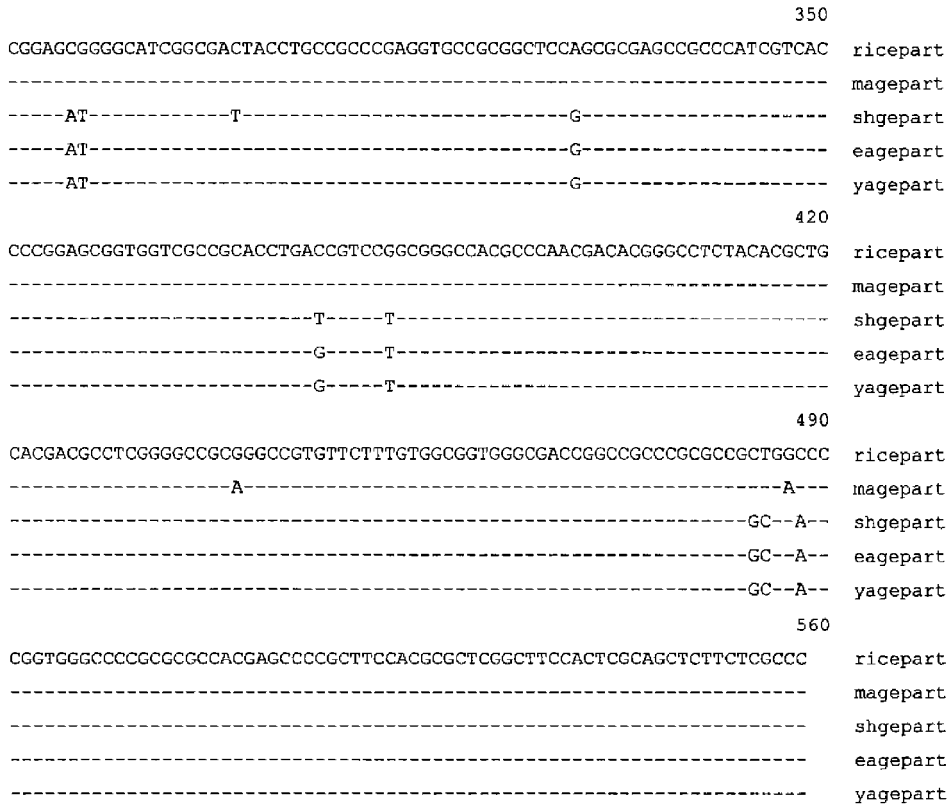


图 1 PRV 抗原表位基因的核酸序列比较

Fig. 1 Nucleotide sequence comparison of PRVgE antigen epitope genes

2.4 推导的 gE 抗原表位氨基酸顺序比较结果

借助 DNASTAR4.0 生物学分析软件, 推导 5 个病毒株的 gE 抗原表位的氨基酸序列, 比较五者之间的序列关系看出, PVR-SH、PRV-Ea 和 PRV-YueA 之间的氨基酸序列同一性均大于 98.4%, 其中 PRV-Ea 和 PRV-YueA 的同一性最高, 为 99.5%。PRV-Rice 与

PRV-MinA 之间的氨基酸序列同一性较高, 为 98.4%。PRV-Rice 与 PVR-SH、PRV-Ea、PRV-YueA 株比较, 氨基酸序列同一性在 93.5%~94.1%之间, 而 PRV-MinA 与这 3 株的同一性最低, 在 92.5%~93.0%之间。推导的氨基酸顺序比较见图 2。

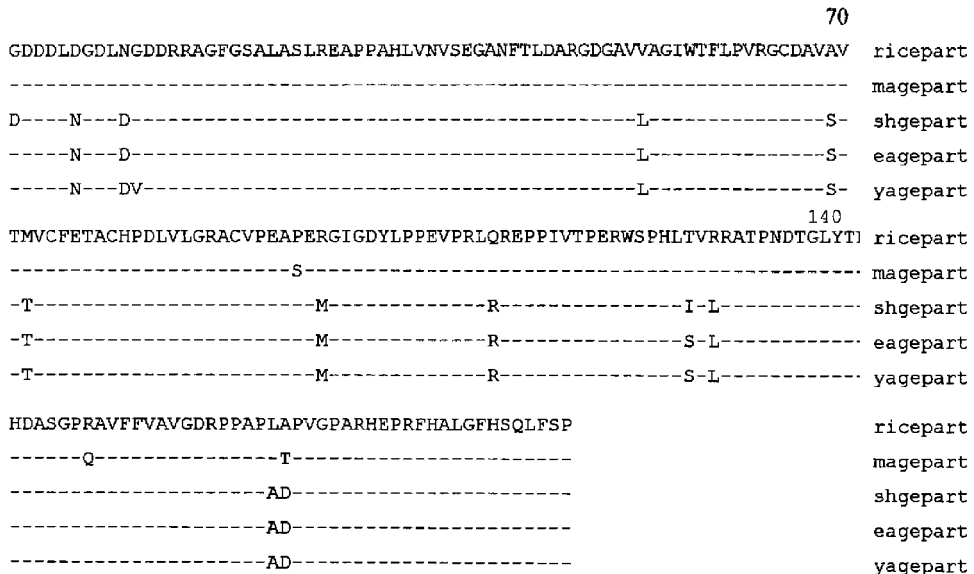


图 2 推导的 PRVgE 抗原表位氨基酸顺序比较

Fig. 2 Amino acid sequence comparison of PRV gE antigen epitope genes

### 3 讨论

PRV-MinA 株是早期从患病耕牛中分离得到的, PRV-SH 株于 1999 年左右、PRV-YueA 株于 1998 年左右、PRV-Ea 株于 1990 年从患病的猪只中分离得到。尽管 5 个毒株 gE 抗原表位基因之间和推导氨基酸序列之间的同一性均较高, 但 PRV-MinA 株与国内其他猪源毒株的同一性相对于猪源毒株之间的同一性还是较低; 从推导的氨基酸残基顺序分析, PRV-YueA 和 PRV-MinA 株 gE 的第 58、121、124、146、148、178、180、199、214 和 215 位等共有 11 个氨基酸发生变异, 这些氨基酸的改变是否会造成抗原表位在空间构象上的变化, 从而影响免疫原性和反应原性, 需要构建表达不同 PRV 毒株 gE 抗原表位基因的重组质粒, 获得不同毒株的 gE 抗原表位, 做进一步的比较。序列同一性更高的毒株, 以其为材料来探索适合于中国的 PRV gE 鉴别诊断方法, 也需要进一步探索。

参考文献:

[1] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第2版. 北京: 科学

出版社, 1997. 998-1002.

- [2] 陈陆, 郭万柱. 猪伪狂犬病毒潜伏感染检测方法研究进展[J]. 四川畜牧兽医, 2000, 27(增刊): 103-105.
- [3] 刘镇明, 蓝天, 罗满林, 等. 猪伪狂犬病毒粤A株的分离与鉴定[J]. 华南农业大学学报, 2000, 21(2): 76-78.
- [4] 罗满林, 丁建华, 王加富, 等. 伪狂犬病毒蛋白激酶基因的PCR扩增及其克隆鉴定[J]. 中国病毒学, 1996, 11(4): 360-363.
- [5] JACOBS L, MELOEN R H, GIELKENS A L, et al. Epitope analysis of glycoprotein I of pseudorabies virus[J]. Gen Virol, 1990, 71: 881-887.
- [6] [美] 奥斯伯 F, 金斯顿 R E, 塞德曼 J G, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1998. 50-60.
- [7] [美] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 金科雁, 黎孟枫, 等译. 北京: 科学出版社, 1993. 56-60.
- [8] 冉智光, 童光志, 张绍杰, 等. 伪狂犬病病毒 Min-A 株 gE 基因序列分析及其真核表达质粒的构建[J]. 西南农业大学学报, 1999, 12(2): 1-6.

## Sequence Analysis of gE Antigen Epitope Genes of Pseudorabies Virus

SHI Ying-xin, LUO Man-lin, HUANG Yu-mao, LIU Zhen-ming

(College of Veterinary Medicine, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** A pair of primers were designed and synthesized. Using the whole genomes of strain PVR-MinA and PRV-YueA as templates, specific products were obtained as expected by PCR amplification and cloned into pUCm-T vector. Recombinants were confirmed by colony PCR and restriction enzyme digestion. The inserts were sequenced, and the results revealed that each of both inserts composed of 558 nucleotides, coding for 186 amino acids. Comparison of the target genes showed 96.9% nucleotide sequence homology and 92.5% amino acid sequence homology between strain PRV-YueA and PRV-MinA, which is relatively low.

**Key words:** pseudorabies virus; gE antigen epitope gene; sequence analysis

【责任编辑 柴 焰】