

湖南省 4 株伪狂犬病病毒的分离鉴定及其免疫与毒力相关基因的序列分析

杨涛涛, 赵 墩, 刘崇灵, 屈泰龙, 余兴龙*

(湖南农业大学动物医学院, 长沙 410128)

摘要: 为了解湖南省近年来伪狂犬病病毒(PRV)的分子流行病学情况,更好地控制伪狂犬病,2012—2014 年从湖南平江、汨罗、浏阳、长沙 4 地的 4 个规模化猪场送检的病料(脑组织)中检测到 PRV 野毒。将脑组织接种 PK-15 细胞,经 PCR 和动物接种鉴定为 PRV。4 个毒株分别命名为 PRV-XiangA、PRV-GA、PRV-YY 和 PRV-LY。对这 4 株 PRV 的免疫(gB、gG、gH、gI、gL、gM)与毒力(gE、PK、TK)相关基因进行序列分析,结果显示这 4 株 PRV 的免疫与毒力相关基因核苷酸同源性为 99.8%~100.0%,说明分离得到的 4 株 PRV 变异极小;将这 4 株 PRV 与国内外的主要毒株进行序列比对,结果表明这 4 株 PRV 与国内的分离毒株同源性很高,与 BJ-YT 株和 TJ 株的亲缘关系最近,核苷酸同源性为 99.8%~100.0%,说明当前国内流行的 PRV 毒株变异较小。

关键词: 伪狂犬病病毒;分离鉴定;同源性;免疫与毒力相关基因;序列分析

中图分类号:S852.65⁺9.1

文献标识码:A

文章编号:1671-7236(2016)01-0050-08

Isolation, Identification and Sequence Analysis of Immune and Virulence Genes of Four Pseudorabies Virus Strains from Hunan Province

YANG Tao-tao, ZHAO Dun, LIU Chong-ling, QU Tai-long, YU Xing-long*

(College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: To investigate molecular epidemiology of pseudorabies virus (PRV) in recent years in Hunan province and control pseudorabies more better, four wild-type PRV strains were detected from porcine brain tissues, which were collected from four farms of Pingjiang, Miluo, Liuyang and Changsha in Hunan province during 2012—2014. The four PRV strains were isolated by inoculating porcine brain tissues to the PK-15 cells, identified by PCR test and animal inoculation, and named PRV-XiangA, PRV-GA, PRV-YY and PRV-LY, respectively. The results showed the nucleotide homology among the four strains was 99.8% to 100.0%, by aligning the immune (gB, gG, gH, gI, gL and gM) and virulence genes (gE, PK and TK) of the four PRV strains, which indicated that these strains displayed almost no differences. The results of nucleotide alignment between the four strains and main strains isolated at home and abroad showed that the four strains had a high homology with PRV main strains isolated from China, with displaying nucleotide identity of 99.8% to 100.0% to BJ-YT and TJ strains, which revealed that the epidemic PRV strains in China had a little variation currently.

Key words: pseudorabies virus; isolation and identification; homology; immune and virulence genes; sequence analysis

收稿日期:2015-08-13

基金项目:长沙市科技成果产业化重点课题(K1308135-31)

作者简介:杨涛涛(1991-),男,湖南常德人,硕士,研究方向:动物病原分子学与免疫学,E-mail:yangtt1010@126.com

*通信作者:余兴龙(1965-),男,湖南岳阳人,博士,研究方向:动物病原分子学与免疫学,E-mail:xlyu999@126.com

伪狂犬病是由伪狂犬病病毒(pseudorabies virus, PRV)引起的一种高度接触性急性传染病,以发热、奇痒(猪除外)及脑脊髓炎为主要特征^[1]。猪伪狂犬病是猪群重要传染病之一,严重危害养猪业的健康发展,并对养猪业造成巨大的经济损失。

从近年临床情况了解到,自 2011 年起全国各地一些猪场纷纷暴发伪狂犬病^[2-4],部分猪场仔猪出现神经症状、呕吐、腹泻,甚至死亡;怀孕母猪出现流产等现象。据湖南省部分规模化猪场 PRV 野毒感染流行病学调查显示伪狂犬病仍然在湖南省呈地方性流行,感染压力仍然偏高^[5]。2012—2014 年动物病原分子学与免疫学实验室从湖南省多个猪场检测到 PRV 野毒并从其中 4 个规模化养猪场分离到 4 株 PRV 野毒,对这 4 株 PRV 的免疫与毒力相关基因进行测序,通过与 GenBank 收录的 PRV 毒株重要基因序列进行同源性比对,并从该角度分析目前湖南省 PRV 流行毒株的流行情况,为能更好的控制伪狂犬病的流行提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料 2012—2014 年从湖南平江、汨罗、浏阳、长沙 4 地的 4 个规模猪场采集病料,这 4 个猪场 7~15 日龄发病仔猪表现出明显的神经症状、昏睡、鸣叫、呕吐、拉稀,最后死亡;剖检可见脑膜及肺脏有明显出血点,肝脏、脾脏有白色坏死点,肾脏有针尖状出血点,采集发病仔猪的脑组织及肝脏进行检测和病毒分离。

1.1.2 主要试剂 MEM 培养基(含 EBSS 及 L-谷氨酰胺)购自 HyClone 公司;新生犊牛血清、0.5% Trypsin-EDTA 均购自 Gibco 公司;细胞培养板购自 Corning 公司;配制双抗用青霉素钠(80 万单位)购自哈药集团制药总厂;配制双抗用硫酸链霉素(100 万单位)购自瑞阳制药有限公司;柱式病毒 DNAout 试剂盒、即用型 PCR 试剂盒均购自北京天恩泽基因科技有限公司;DM2000 Plus DNA Marker 购自康为世纪公司;Fast-Pfu DNA 聚合酶购自北京全式金生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 病毒的分离培养 无菌取约 1 g 病料剪碎后加入 5 mL 含 1% 双抗的 MEM 培养基,用组织匀浆机研碎病料;于 4 °C 条件下 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液用 0.22 μm 微孔滤器过滤除菌,将

滤液 10 倍梯度稀释后接种单层 PK-15 细胞,37 °C 感作 1 h 后弃病毒液,加入含 2% 新生牛血清的 MEM 培养基,置于 37 °C 细胞培养箱(含 5% CO₂) 孵育 3~5 d,观察细胞病变(cytopathic effect, CPE) 情况,并设正常对照组,出现 CPE 者,连续传代 3 次后经 PCR 进一步鉴定;未出现 CPE 者,盲传 3~5 代再经 PCR 鉴定。

1.2.2 病毒的鉴定 PCR 鉴定:分别取接种病料的细胞培养物上清、未接毒对照细胞培养物及 PRV 阳性病料研磨上清,参照柱式病毒 DNAout 试剂盒说明书提取病毒基因组 DNA,并用即用型 PCR 试剂盒配制体系并扩增。用动物病原分子学与免疫学实验室提供的 gE 基因检测引物进行鉴定,引物序列:上游引物:5'-TTGTGGGTGGCGT-TTTATCTCCGTC-3';下游引物:5'-AAGTTGGC-GCCCTCGGACACGTTC-3'。PCR 反应条件:98 °C 预变性 2 min;98 °C 变性 20 s,68 °C 退火 20 s,72 °C 延伸 30 s,共 25 个循环;72 °C 延伸 5 min。取 5 μL PCR 产物在 0.8% 琼脂糖凝胶进行电泳鉴定。

家兔接种试验:取 12 只家兔分成 6 组,A~D 组分别接种不同分离株的细胞培养物,E 组接种 PRV 商品疫苗,F 组作为空白对照组不接种任何物质。具体操作:A、B、C、D 组按 200 μL/只注射家兔;E 组则按疫苗说明书稀释好疫苗后每只家兔接种 10 头份生猪剂量的疫苗即可。所有家兔均采用皮下接种方法进行接种,接种后定期观察家兔状况。

1.2.3 PRV 免疫与毒力相关基因的引物设计与合成 根据 GenBank 上已公布的 PRV 基因组全长序列比对分析后,选择保守序列设计扩增免疫相关基因(gB、gG、gH、gI、gL、gM)和毒力相关基因(gE、PK、TK)的 9 对引物,引物均由上海铂尚生物技术有限公司合成。引物信息见表 1。

1.2.4 PRV 免疫与毒力相关基因 PCR 扩增、测序

PCR 反应体系 50 μL:5×Fast Pfu Buffer 10 μL,2.5 mmol/L dNTPs 5 μL,上、下游引物各 1 μL,Fast-Pfu DNA 聚合酶 1 μL,5×Stimulant 10 μL,模板 DNA 2 μL,去离子水 20 μL。PCR 反应条件:98 °C 预变性 2 min;98 °C 变性 20 s,退火 20 s(各引物退火温度见表 1),72 °C 延伸 15 s/kb(各片段扩增长度见表 1),共 35 个循环;72 °C 延伸 5 min。取 5 μL PCR 产物在 0.8% 琼脂糖凝胶进行电泳鉴定,其余产物送上海铂尚生物技术有限公司进行序列测定。

表 1 PCR 扩增所需引物信息

Table 1 Primers information for PCR amplification

目的基因 Genes	引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequences	退火温度(°C) Annealing temperature	产物大小(bp) Product size
<i>gB</i>	gBF1	TTGCAGTCTTCAGGTCCGTCTT	61	1 175
	gBR1	TTACCAGTCCCAGGCCACCGTGAAGTG		
	gBF2	GGCCCATCGGAGGCCCCCGAC	72	1 499
	gBR2	GCTGGGGTTCAGGCGGACATCTC		
	gBF3	GACCACATCCAGGCGCACGTGAAC	61	1 165
	gBR3	CAAGCGCATCTTTATTGTTTCCC		
<i>gG</i>	gGF1	ATGAGATACTCAACTTTGGAATGT	59	1 695
	gGR1	TAAGCAAGCCGTACGCAA		
<i>gH</i>	gHF1	CGCGACGGAGGCAACGACGA	61	2 307
	gHR1	GATGTCATCCCGCCGTCTCC		
<i>gL</i>	gLF1	CGGCACGTGGCACGTATTTT	57	685
	gLR1	GCGGCGGTGGCGGCGTTA		
<i>gM</i>	gMF1	GGGAGGTGCAACCGTATAG	59	1 433
	gMR1	GGGCGAGATGGAATGGCACA		
<i>gI</i>	gIF1	CGTGTGCGTCTACATCTTCTTC	57	1 321
	gIR1	AACCCCGGTGTGTGCGAGA		
<i>TK</i>	tkF1	TTCAAAGGCCAGGGTCAAGGA	59	1 212
	tkR1	ATGACATACACATAGCTTTATACG		
<i>gE</i>	gEF1	TTTGTGGGTGGCGTTTATCTC	59	1 994
	gER1	AGCAGTCCGAGTCGTCCTGG		
<i>PK</i>	pkF1	TTCCTTATACCTTGCCGGGCTC	63	1 199
	pkR1	TCTCTGGCCACGACGGTGCG		

本试验分 3 段扩增 *gB* 全基因序列,最后将其 3 段序列拼接

gB complete gene was divided into three parts to amplify, the sequence of *gB* gene was three sequences patchwork

1.2.5 PRV 免疫与毒力相关基因序列分析 将已测得的序列用 DNASTar 软件推导出其氨基酸序列进行分析,且与 GenBank 中收录的 PRV 参考毒株(表 2)的各免疫与毒力相关基因进行同源性比对

分析,绘制系统进化树;并分别用 Prosite 数据库及 GOR IV 预测方法对蛋白质功能位点及二级结构进行预测及分析。

表 2 PRV 参考毒株信息

Table 2 Information of PRV reference strains

毒株名称 Strain name	GenBank 登录号 GenBank accession No.	分离信息 Isolated information
TJ	KJ789182	中国天津,2012 年
BJ-YT	KC981239	中国北京,2013 年
Ea ^{gB/gG/gI/gL/gM/gE/PK/TK}	AF257079/AY319929/AF306511/AF448456/ AF310617/AF171937/AY319929/AF080571	中国湖北,1998 年
Bartha	JF797217	匈牙利,1961 年
Kaplan	JQ809328	德国,1959 年

Ea 株在 GenBank 未上传 *gH* 基因序列;Bartha 株缺失 *gE* 基因

gH gene of Ea strain didn't accession in GenBank;Bartha strain deleted *gE* gene

2 结果与分析

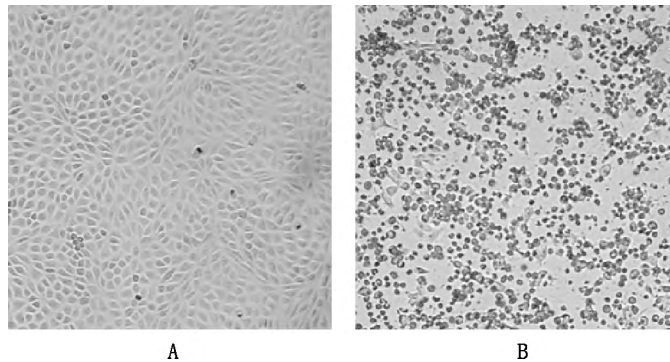
2.1 病毒分离与鉴定

将病料匀浆上清接种单层 PK-15 细胞 24 h 后可见细胞出现圆缩、集聚,48 h 后出现明显细胞拉网现象,到 72 h 可见大部分细胞脱落,而正常细胞对照组未出现病变(图 1)。

将收获的细胞培养物冻融后,取细胞液上清提取 DNA 进行 PCR 检测,并分别设 PRV 阳性病料匀浆上清及未接种 PRV 的细胞培养物为 PRV 阳性及 PRV 阴性对照,可见接种病料匀浆上清的细

胞及 PRV 阳性对照组均扩增出了约 363 bp 的特异性条带,而 PRV 阴性对照组未见到任何条带(图 2)。将分离到的 4 株 PRV 分别命名为 PRV-XiangA、PRV-GA、PRV-YY、PRV-LY。

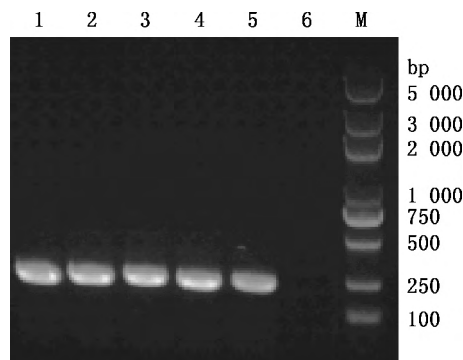
4 株 PRV 分离株细胞培养物接种家兔后出现了典型的 PRV 症状:接毒后 48 h 发病兔出现了瘙痒症状,撕咬接种部位,导致局部被毛脱落、皮肤出血及撕裂,继而四肢麻痹、角弓反张,最后死亡;未接毒的对照组家兔及疫苗接种家兔均无任何临床症状,说明分离的 4 株 PRV 都为强毒株。



A, 正常 PK-15 细胞;B, 病变的 PK-15 细胞
A, Normal PK-15 cells; B, Cytopathic PK-15 cells

图 1 PRV 分离毒株产生的细胞病变(400×)

Fig. 1 CPE produced by PRV isolated strain (400×)



1~4, PRV 分离株;5, 阳性对照;6, 阴性对照;M, DM2000 Plus DNA Marker

1-4, PRV isolated strains;5, Positive control;6, Negative control;M, DM2000 Plus DNA Marker

图 2 PRV 分离株 PCR 鉴定

Fig. 2 PCR identification of PRV isolated strains

2.2 PRV 分离株免疫与毒力相关基因的扩增结果及其序列分析

2.2.1 PRV 分离株免疫与毒力相关基因的扩增结果

4 株 PRV 免疫与毒力相关基因的 9 个 PCR 扩增产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳,紫外观察可见特异性条带,大小与预期相符。将 4 株 PRV 免疫与毒力相关基因的扩增序列在 GenBank 中注册,各基

因注册登录号结果见表 3。

2.2.2 PRV 分离株免疫与毒力相关基因的序列分析

2.2.2.1 4 株 PRV 分离株免疫相关基因序列及系统进化树分析 将 PRV GA 株、LY 株、XiangA 株、YY 株、TJ 株、BJ-YT 株、Ea 株、Bartha 株及 Kaplan 株的 *gB*、*gG*、*gH*、*gI*、*gL*、*gM* 基因进行核苷酸

序列和推导氨基酸序列的同源性比对分析,其中 *gB* 基因核苷酸序列与推导氨基酸序列同源性比对见表 4。结果显示,4 株 PRV 分离株的 *gB*、*gG*、*gH*、*gI*、*gL*、*gM* 基因核苷酸同源性分别为 99.9%~100.0%、99.9%~100.0%、99.9%~100.0%、99.8%~100.0%、100.0%及 100.0%,氨基酸同源性分别为 99.9%~100.0%、99.9%~100.0%、99.4%~100.0%、99.5%~100.0%、100.0%及 100.0%。这 4 株 PRV 分离株与国内的 BJ-YT 株、TJ 株和 Ea 株的同源性较高,其中与 BJ-YT 株 *gB*、*gG*、*gH*、*gI*、*gL* 及 *gM* 基因核苷酸同源性分别为 99.9%、99.9%、99.9%~100.0%、99.8%~99.9%、100%及 100%,氨基酸同源性分别为 99.8%~99.9%、99.8%~99.9%、99.6%~100.0%、99.5%~

99.7%、100%及 100%;与 TJ 株 *gB*、*gG*、*gH*、*gI*、*gL* 及 *gM* 基因核苷酸同源性分别为 99.9%、99.9%、99.8%~99.9%、99.8%~99.9%、100%及 100%,氨基酸同源性分别为 99.8%~99.9%、99.8%~99.9%、99.4%~99.7%、99.5%~99.7%、100%及 100%;与 Ea 株 *gB*、*gG*、*gI*、*gL* 及 *gM* 基因核苷酸同源性分别为 99.7%、99.7%、99.6%~99.7%、100%及 99.2%,氨基酸同源性分别为 99.1%~99.2%、99.1%~99.2%、99.5%~99.7%、100.0%及 98.7%。通过绘制 *gB* 基因系统进化树,结果显示分离的 4 株 PRV 与国内的 Ea 株、BJ-YT 株和 TJ 株处于同一个分支,而国外的 Bartha 株和 Kaplan 株在另一分支(图 3)。其他基因绘制的系统进化树结果与 *gB* 基因系统进化树结果相同。

表 3 PRV 分离株扩增基因序列的 GenBank 登录号

Table 3 GenBank accession No. of PRV isolated strains

目的基因 Target genes	GenBank 登录号 GenBank accession No.	目的基因 Target genes	GenBank 登录号 GenBank accession No.
XiangA- <i>gB</i>	KP710981	YY- <i>gB</i>	KP710982
XiangA- <i>gG</i>	KF711985	YY- <i>gG</i>	KP259820
XiangA- <i>gH</i>	KF711986	YY- <i>gH</i>	KP259813
XiangA- <i>gI</i>	KF711987	YY- <i>gI</i>	KP259819
XiangA- <i>gL</i>	KF711988	YY- <i>gL</i>	KP259818
XiangA- <i>gM</i>	KF711989	YY- <i>gM</i>	KP259823
XiangA- <i>PK</i>	KF711990	YY- <i>PK</i>	KP259822
XiangA- <i>TK</i>	KF711991	YY- <i>TK</i>	KP259815
XiangA- <i>gE</i>	KJ463839	YY- <i>gE</i>	KP259821
LY- <i>gB</i>	KP710980	GA- <i>gB</i>	KP710979
LY- <i>gG</i>	KP259829	GA- <i>gG</i>	KP259836
LY- <i>gH</i>	KP259828	GA- <i>gI</i>	KP259835
LY- <i>gI</i>	KP259827	GA- <i>gL</i>	KP259834
LY- <i>gL</i>	KP259826	GA- <i>gM</i>	KP259817
LY- <i>gM</i>	KP259825	GA- <i>PK</i>	KP259833
LY- <i>PK</i>	KP259816	GA- <i>TK</i>	KP259832
LY- <i>TK</i>	KP259824	GA- <i>gE</i>	KP259837
LY- <i>gE</i>	KP259830		

2.2.2.2 4 株 PRV 分离株毒力相关基因序列及系统进化树分析 将 PRV GA 株、LY 株、XiangA 株、YY 株、BJ-YT 株、TJ 株、Ea 株、Bartha 株及 Kaplan 株的 *gE*、*PK*、*TK* 基因进行核苷酸序列及推导氨基酸序列的同源性比对分析。其中 4 株 PRV 分离株的 *gE*、*PK* 及 *TK* 基因核苷酸同源性分别为 99.9%~100.0%、100%及 99.9%~100.0%,氨基酸同源性分别为 99.8%~100.0%、100.0%及 99.7%~100.0%。这 4 株 PRV 分离株与国内的

BJ-YT 株、TJ 株、Ea 株的同源性较高,其中与 BJ-YT 株 *gE*、*PK* 及 *TK* 基因的核苷酸同源性分别为 99.9%、100.0%及 99.9%~100.0%,氨基酸同源性分别为 99.7%~99.8%、100.0%及 99.7%~100.0%;与 TJ 株 *gE*、*PK* 及 *TK* 基因的核苷酸同源性分别为 99.8%~99.9%、100.0%及 99.9%~100.0%,氨基酸同源性分别为 99.5%~99.7%、100.0%及 99.7%~100.0%;与 Ea 株 *gE*、*PK* 及 *TK* 基因的核苷酸同源性分别为 99.7%、99.0%及

99.7%~99.8%,氨基酸同源性分别为 99.6%、98.5%及 99.7%~100.0%(表 5~7)。绘制 *gE*、*PK* 和 *TK* 基因系统进化树,分离的 4 株 PRV 与国内的 Ea 株、BJ-YT 株和 TJ 株处于同一个分支,而国外的 Bartha 株和 Kaplan 株在另一分支。通过对 PRV GA 株、LY 株、XiangA 株、YY 株、BJ-YT 株、TJ 株、Ea 株 *gE*、*TK* 和 *PK* 基因的蛋白功能位点

和二级结构的预测分析,结果发现 PRV GA 株、LY 株、XiangA 株、YY 株、BJ-YT 株、TJ 株、Ea 株 *gE*、*TK* 和 *PK* 基因的二级结构均包含 α -螺旋、 β -折叠和无规则卷曲,各毒株相同基因形成这 3 种二级结构的位置相同;各个毒株的 *gE*、*TK* 和 *PK* 基因蛋白功能位点(包括磷酸化位点、酰基化位点、糖基化位点)均相同。

表 4 PRV 分离株与各参考株 *gB* 基因的核苷酸序列及推导的氨基酸序列同源性比对(%)

Table 4 Homology comparison of nucleotide sequences and deduced amino acid sequences of PRV *gB* gene

	Bartha	BJ-YT	TJ	Ea	Kaplan	GA	LY	XiangA	YY
Bartha		98.4	98.4	98.3	99.5	98.4	98.4	98.4	98.4
BJ-YT	96.9		100.0	99.7	98.6	99.9	99.9	99.9	99.9
TJ	96.9	100.0		99.7	98.6	99.9	99.9	99.9	99.9
Ea	96.6	99.2	99.2		98.5	99.7	99.7	99.7	99.7
Kaplan	99.3	97.4	97.4	97.0		98.7	98.6	98.6	98.6
GA	97.0	99.9	99.9	99.2	97.5		100.0	100.0	99.9
LY	96.9	99.8	99.8	99.1	97.4	99.9		99.9	100.0
XiangA	97.0	99.9	99.9	99.2	97.5	100.0	99.9		99.9
YY	96.9	99.8	99.8	99.1	97.4	99.9	100.0	99.9	

右上角为核苷酸的同源性比对;左下角为氨基酸的同源性比对。下同

Top right corner on the table was homology comparison of nucleotide sequences; Lower left corner on the table was homology comparison of amino acid sequences. The same as below

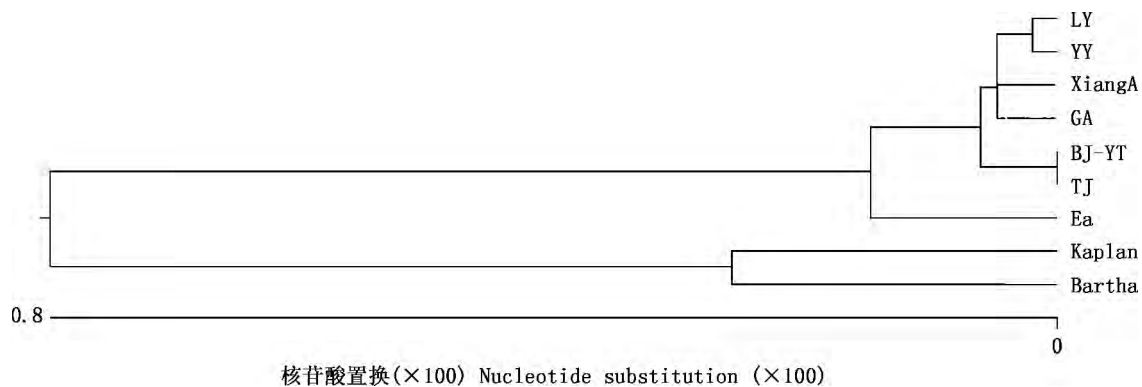


图 3 PRV 分离株 *gB* 基因系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of *gB* gene of PRV isolated strains

表 5 PRV 分离株与参考株 *gE* 基因的核苷酸序列和推导的氨基酸序列同源性比对(%)

Table 5 Homology comparison of nucleotide sequences and deduced amino acid sequences of PRV *gE* gene

	BJ-YT	TJ	Ea	Kaplan	GA	LY	XiangA	YY
BJ-YT		99.9	99.7	97.9	99.9	99.9	99.9	99.9
TJ	99.8		99.6	98.1	99.8	99.8	99.9	99.8
Ea	99.6	99.2		97.7	99.7	99.7	99.7	99.7
Kaplan	96.4	96.5	96.3		97.8	97.8	97.8	97.8
GA	99.7	99.5	99.6	96.0		100.0	99.9	100.0
LY	99.7	99.5	99.6	96.0	100.0		99.9	100.0
XiangA	99.8	99.7	99.6	96.2	99.8	99.8		99.9
YY	99.7	99.5	99.6	96.0	100.0	100.0	99.8	

表6 PRV分离株与各参考株PK基因的核苷酸序列和推导的氨基酸序列同源性比对(%)

Table 6 Homology comparison of nucleotide sequences and deduced amino acid sequences of PRV PK gene

	Bartha	BJ-YT	TJ	Ea	Kaplan	GA	LY	XiangA	YY
Bartha		98.7	98.7	97.9	99.8	98.7	98.7	98.7	98.7
BJ-YT	97.3		100.0	99.0	98.5	100.0	100.0	100.0	100.0
TJ	97.3	100.0		99.0	98.5	100.0	100.0	100.0	100.0
Ea	95.8	98.5	98.5		97.7	99.0	99.0	99.0	99.0
Kaplan	100.0	97.3	97.3	95.8		98.5	98.5	98.5	98.5
GA	97.3	100.0	100.0	98.5	97.3		100.0	100.0	100.0
LY	97.3	100.0	100.0	98.5	97.3	100.0		100.0	100.0
XiangA	97.3	100.0	100.0	98.5	97.3	100.0	100.0		100.0
YY	97.3	100.0	100.0	98.5	97.3	100.0	100.0	100.0	

表7 PRV分离株与各参考株TK基因的核苷酸序列和推导的氨基酸序列同源性比对(%)

Table 7 Homology comparison of nucleotide sequences and deduced amino acid sequences of PRV TK gene

	Bartha	BJ-YT	TJ	Ea	Kaplan	GA	LY	XiangA	YY
Bartha		99.7	99.7	99.5	99.8	99.7	99.7	99.6	99.7
BJ-YT	99.4		100.0	99.8	99.7	100.0	100.0	99.9	100.0
TJ	99.4	100.0		99.8	99.7	100.0	100.0	99.9	100.0
Ea	99.4	100.0	100.0		99.5	99.8	99.8	99.7	99.8
Kaplan	99.7	99.7	99.7	99.7		99.7	99.7	99.6	99.7
GA	99.4	100.0	100.0	100.0	99.7		100.0	99.9	100.0
LY	99.4	100.0	100.0	100.0	99.7	100.0		99.9	100.0
XiangA	99.1	99.7	99.7	99.7	99.4	99.7	99.7		99.9
YY	99.4	100.0	100.0	100.0	99.7	100.0	100.0	99.7	

3 讨论

PRV糖蛋白对病毒侵染宿主起着重要的作用,不仅介导感染宿主细胞,而且还是被宿主免疫系统所识别的主要抗原,PRV包含有11种糖蛋白^[6],其中gB是PRV囊膜蛋白的一个重要组分,是PRV糖蛋白中最为保守的蛋白之一,针对gB的单克隆抗体呈现补体依赖性与非补体依赖性体外病毒中和活性,并能保护小鼠和猪抵抗PRV的致命性感染;gG是病毒增殖中大量释放的一种糖蛋白,且具有结合趋化因子的作用,导致机体不易识别侵入的病毒;gH对病毒侵入靶细胞及被感染细胞与邻近未感染细胞的融合是必需的;gL是病毒体外感染和复制的必需糖蛋白之一;gM对病毒体内增殖是非必需的,但对病毒在自然宿主中生长和传播可能有重要作用^[7];gI基因具有协同控制PRV毒力的功能,gI蛋白与gE蛋白形成复合体促进PRV在细胞间扩散^[8]。gE、TK、PK基因与PRV的毒力相关,对PRV毒力有决定性作用,其中gE基因是一个主要的毒力基因,影响PRV在猪体内的组织趋向性,从

而有助于PRV向神经系统扩散,是PRV经三叉神经侵入中枢神经组织所必需的^[9-10]。本试验选取的9个基因均为PRV主要免疫及毒力相关基因,对于病毒复制、侵入及保护性免疫均有重要影响,通过对这些基因的序列比对来分析近年来PRV的变异情况,为更好的控制PRV的暴发提供理论依据。

2012—2014年动物病原分子学与免疫学实验室在湖南省境内相继分离到4株PRV,并对这4株PRV的免疫与毒力相关基因的序列进行分析,发现此次新分离的4株PRV与国内的Ea株、BJ-YT株和TJ株在系统进化树上处于同一个分支,同源性较高,而国外的Bartha株和Kaplan株在另一分支,其中与Ea株同源性在99.0%以上,与BJ-YT株和TJ株的亲缘关系最近为99.8%以上。说明近年来湖南省流行的PRV变异极小,且与国内的流行的毒株亲缘关系较近。

国内有研究人员对近年来分离到的PRV进行gE、gD及TK基因同源性分析,结果表明国内分离的PRV毒株同源性均较高^[11-12],在此基础上本试验对湖南省分离的4株PRV的9个基因进行同源性比对分析,更加系统、全面的阐明湖南省流行

PRV 的变异情况。将此次新分离的 4 株 PRV 与 2011—2013 年分离的 PRV 毒株 *gE*、*TK* 和 *PK* 基因核苷酸序列进行比对, 结果发现这 4 株 PRV 与 2011—2013 年分离的 PRV 毒株 *gE*、*TK* 和 *PK* 基因的核苷酸序列同源性在 99.1% 以上。将 2011 年以前全国各地分离 PRV 毒株与动物病原分子学与免疫学实验室分离的 4 株 PRV 各基因进行同源性比对, 结果发现 *gB*、*gG*、*gI*、*gH*、*gM*、*gL*、*TK* 基因核苷酸同源性为 99.1%~100.0%, 氨基酸同源性为 98.4%~100.0%; 各毒株与这 4 株 PRV *gE* 基因比对, 除 2010 年贵州分离 GZ-Z1 株核苷酸同源性为 97.7% 外, 其余毒株核苷酸同源性为 99.0%~99.7%; 各毒株与这 4 株 PRV *PK* 基因比对, 核苷酸比对同源性为 97.7%~99.8%, 氨基酸同源性为 92.8%~99.7%。这些数据表明 2011—2013 年全国各地分离的毒株之间变异较小, 而 2011 年以前分离的毒株同样存在同源性较高的毒株, 说明近年来国内流行 PRV 变异较小。

将此次新分离的 4 株 PRV 与国内 PRV 常用疫苗株 (Bartha-K61 株及 HB-98 株) 的免疫与毒力相关基因进行同源性比对, 结果发现这 4 株 PRV 与 Bartha-K61 株 (缺失 *gE/gI*) 各基因氨基酸序列同源性为 94.9%~99.3%, 这 4 株 PRV 与 HB-98 株 (缺失 *gG/TK*) 各基因氨基酸序列同源性为 98.5%~100.0%。虽然新流行毒株与疫苗株 (Bartha-K61 株) 有些许变异, 但从临床上了解到大部分猪场都能通过加强免疫 Bartha-K61 株和 HB-98 株弱毒疫苗控制猪场 PRV 疫病。整体来看 PRV 野外流行毒株与近年来 PRV 的流行有直接的关系, 但现有的疫苗株诱导的免疫应答仍然能对 PRV 野外流行毒株产生免疫保护作用。

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.
- [2] 黄艺珠, 张渊魁, 魏建超, 等. 猪伪狂犬病毒 SD 株的

分离鉴定及 *TK* 基因序列分析[J]. 畜牧与兽医, 2013, 45(4): 62-67.

- [3] 张士强, 易悦, 徐志文, 等. 猪伪狂犬病病毒 SL 株 *TK* 基因的克隆与生物信息学分析[J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(6): 26-30.
- [4] 曾智勇, 周莉, 汤德元, 等. 猪伪狂犬病病毒 GZ-Z1 株的分离鉴定[J]. 中国兽医科学, 2011, 41(5): 459-463.
- [5] 邱美珍, 傅胜才, 杜丽飞, 等. 湖南省部分规模猪场伪狂犬病野毒血清流行病学系统监测与净化分析[J]. 养猪, 2012, 3: 89-92.
- [6] Mettenleiter T C. Molecular biology of pseudorabies (Aujeszky's disease) virus[J]. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 1991, 14(2): 151-163.
- [7] Cheung A K W R D. Pseudorabies virus deletion mutants involving the *EPO* and *LLT* genes[J]. *Biotechnology Advances*, 1995, 13(4): 819.
- [8] Van de Walle G R, Favoreel H W, Nauwynck H J, et al. Antibody-induced internalization of viral glycoproteins and *gE-gI* Fc receptor activity protect pseudorabies virus-infected monocytes from efficient complement-mediated lysis[J]. *J Gen Virol*, 2003, 84(4): 939-948.
- [9] 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.
- [10] Kimman T G, De Wind N, De Bruin T, et al. Inactivation of glycoprotein *gE* and thymidine kinase or the US3-encoded protein kinase synergistically decreases *in vivo* replication of pseudorabies virus and the induction of protective immunity[J]. *Virology*, 1994, 205(2): 511-518.
- [11] 余秋颖, 常洪涛, 陈文定, 等. 2012—2013 年新流行猪伪狂犬病病毒的分离鉴定及其 *gE*、*TK*、*gD* 基因序列分析[J]. 中国兽医学报, 2014, 10: 1573-1578.
- [12] 钟承, 张乐天, 王巨实, 等. 犬源伪狂犬病毒 BJ/RD 株的分离鉴定及 *gE* 基因分析[J]. 中国动物传染病学报, 2013, 40(5): 1-6.

(责任编辑 董晓云)