

林俊, 陈冰, 覃绍敏, 等. 广西伪狂犬病毒流行株的分离鉴定及遗传变异分析[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(1): 142-150.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.01.022

广西伪狂犬病毒流行株的分离鉴定及遗传变异分析

林俊¹, 陈冰¹, 覃绍敏¹, 曹颖颖¹, 刘金凤¹, 石永胜², 白安斌¹, 赵武¹, 吴健敏¹

(1. 广西壮族自治区兽医研究所, 广西 南宁 530001; 2. 北海市动物疫病预防控制中心, 广西 北海 536000)

摘要: 为了更好防控广西伪狂犬病, 本研究采集广西北海发生疑似伪狂犬病疫情(AD)猪场的犬和猪样品进行病毒分离, 通过动物接种试验、电镜观察及核酸检测, 证实分离到2株PRV毒株。2毒株与GenBank上登录的参考毒株gE和gC基因核苷酸序列同源率为97.4%~100.0%和91.3%~99.8%; 氨基酸序列同源率为95.1%~100.0%和86.6%~99.5%。基于gE基因和gC基因的进化分析显示, 2株分离毒与国内不同时期的毒株在进化树上共同构成一个进化分支, 与欧洲和美洲的毒株亲缘关系较远。对氨基酸序列的分析结果显示, 2株分离毒的gE基因决定毒力的关键位点未发生突变。基于gE蛋白质与gC蛋白质的分析结果显示, 虽然与国外毒株(Rice和Bartha)相比存在多个氨基酸位点的变异, 但与国内的分离毒, 尤其是2011年后的流行毒株, 变异情况基本一致。

关键词: 伪狂犬病毒; 分离鉴定; gE基因; gC基因; 遗传变异分析

中图分类号: S852.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)01-0134-09

Identification and genetic variation of pseudorabies virus in Guangxi province

LIN Jun¹, CHEN Bing¹, QIN Shao-min¹, CAO Ying-ying¹, LIU Jin-feng¹, SHI Yong-sheng², BAI An-bin¹, ZHAO Wu¹, WU Jian-min¹

(1. Guangxi Veterinary Research Institute, Nanning 530001, China; 2. Beihai Center for Animal Disease Control and Prevention, Beihai 536000, China)

Abstract: Two pseudorabies viruses (PRV) were isolated from the dead canines and pigs in a Beihai farm of Guangxi. The two types of animals were suspicious of dying of Aujeszky's disease (AD). The isolates were detected by animal infection test, observed by transmission electron microscope observation and analyzed by PCR. The two isolates shared homologies of 97.4%~100.0% with gE and 91.3%~99.8% with gC in nucleotide sequence on GenBank, and 95.1%~100.0% with gE and 86.6%~99.5% with gC in amino acid sequence. The isolates and other Chinese isolates were classified into the same clade and showed distant relation with foreign isolates, based on the genetic analysis of gE gene and gC gene. Two isolates did not show mutation in the key site of amino acid. Compared to foreign strains, the amino acid sequences of the two isolates presented multiple mutations, however, the mutations were similar to those in China's strains especially those isolated after year 2011.

Key words: pseudorabies virus; isolation and identification; gE gene; gC gene; genetic analysis

收稿日期: 2015-06-30

基金项目: 国家农业科技成果转化基金项目(2013GB2E100373); 广西自然科学基金项目(2011GXNSFA018086); 广西基本科研业务费专项(桂科专项13-4)

作者简介: 林俊(1986-), 男, 广西南宁人, 硕士, 研究实习员, 主要从事动物传染病与分子免疫学研究。(Tel) 0771-3120373; (Email) spirit1899@hotmail.com

伪狂犬病(Aujeszky's disease, AD)是由伪狂犬病毒(Pseudorabies virus, PRV)引起的动物烈性自然疫源性疾病, 典型的临床表现为病畜出现神经症状、

局部奇痒、呼吸症状乃至繁殖障碍^[1-2]。PRV 的宿主除偶蹄兽、啮齿兽外,还包括某些灵长类(恒河猴等)及禽类,但只有猪是它的原始宿主及贮藏宿主^[1-3]。2011 年以来,中国各省先后暴发 AD 疫情,特别是许多已注射了 PRV 疫苗的猪场仍然发生疫情^[4-5]。现有的研究结果显示,当前流行的 PRV 在病原性上发生了新的变化^[6-10]。本研究通过对采集自广西某猪场疑似 PRV 感染的动物样品进行病毒分离鉴定和序列分析,以期对广西 PRV 新流行毒株的防控提供有益参考。

1 材料与方法

1.1 病料来源

2013 年广西北海某猪场发生疑似 AD 疫情,导致猪场内犬和仔猪死亡。为进一步确诊,采集病死动物的淋巴结、肺、肝、脾等器官,进行诊断。病料研磨后反复冻融 3 次,12 000 r/min 离心 5 min。上清液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。样品编号分别为 GXBH1(犬)和 GXBH2(猪)。

1.2 标准毒株、试验动物、细胞、菌株和载体

PRV 标准毒、猪肾传代细胞(PK-15)及大肠杆菌感受态(*Escherichia coli* DH5 α)由广西壮族自治区兽医研究所畜禽疫病诊治中心保存;健康家兔购自广西大学兔场;PMDTM 18-T Vector Cloning Kit 为宝生物工程(大连)有限公司产品。

1.3 主要试剂

GIBCO[®] MEM 培养基为 Thermo Fisher Scientific 公司产品;胎牛血清为浙江天杭生物科技有限公司产品;AxyPrep 体液病毒 DNA/RNA 小量制备试剂盒为康宁生命科学(吴江)有限公司产品;Prime-STAR[®] GXL DNA Polymerase 和 DNA A-Tailing kit 为宝生物工程(大连)有限公司产品;琼脂糖凝胶回收试剂盒为天根生化科技(北京)有限公司产品。

1.4 病毒分离

1.4.1 动物接种试验 GXBH1 和 GXBH2 样品以大腿内侧肌肉注射途径各接种 1 只家兔,1 只 2 ml;另有 1 只家兔注射等量灭菌生理盐水作为阴性对照。接种后,试验动物每 12 h 测 1 次体温并观察临床症状,及时剖检死亡家兔。

1.4.2 病毒的细胞培养 取死亡家兔的脑组织,研磨后反复冻融 3 次,12 000 r/min 离心 5 min。上清液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后,接种于 PK-15 细胞

单层。逐日观察细胞病变(CPE),连续观察 7 d。在 CPE 达到 70%时收获,并在 PK-15 细胞上连续传 3 代,反复冻融后, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.4.3 病毒滴度测定 第 4 代细胞培养物和 PRV 标准毒分别进行 10^{-1} ~ 10^{-7} 稀释后,每组分别加入预先制备了 PK-15 细胞单层的 96 孔板,1 孔 100 μl ,每个稀释度重复 4 个孔。置 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养;逐日观察 CPE,在细胞对照成立的前提下,连续观察 7 d,记录结果。按照股震的方法计算病毒 0.1 ml 的 $TCID_{50}$ ^[11]。

1.5 病毒粒子的电镜观察

第 4 代细胞培养物在 CPE 达到 50%时,倾去细胞培养液,刮取细胞单层重悬于 1 ml PBS 缓冲液中,冻融 3 次,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液送广西医科大学电镜室通过透射电镜观察病毒粒子形态。

1.6 病毒核酸扩增及序列分析

1.6.1 引物及 PCR 反应体系 参照文献[6, 12-13] 分别合成针对 PRVgE 基因的检测引物 F/R、PRV gE 全基因扩增引物 gE F/R 及 gC 基因扩增引物 gC F/R。引物由北京博迈德生物科技公司合成,引物序列见表 1。PCR 反应体系:5 \times Prime STAR GXL Buffer 10 μl , dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 4 μl , 上/下游引物 (20 mmol/L) 各 1 μl , DNA 模板 5 μl , Prime STAR GXL DNA Polymerase 1 μl , 补水至 50 μl 。gE 基因的反应程序:98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 退火 15 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸, 35 个循环; 68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。其中引物 F/R 退火温度 65 $^{\circ}\text{C}$, 延伸时间 1 min; 引物 gE F/R 退火温度 64 $^{\circ}\text{C}$, 延伸时间 2 min。gC 基因的反应程序为:98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 67 $^{\circ}\text{C}$ 退火 10 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 50 s, 8 个循环; 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 64 $^{\circ}\text{C}$ 退火 10 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 50 s, 27 个循环; 68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。

1.6.2 病毒核酸检测 用 AxyPrep 体液病毒 DNA/RNA 小量制备试剂盒,取第 4 代细胞培养物提取核酸,用引物 F/R 进行 PCR。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6.3 病毒 gE 和 gC 基因的克隆及序列分析 分别用引物 gE F/R 和 gC F/R 进行 PCR 扩增,产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,回收目的片段。用 DNA A-Tailing kit 在目的片段的 3' 末端添加 A 尾后,连接 PMDTM 18-T 载体进行 TA 克隆。阳性质粒送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

表1 PRV 检测引物及 *gE* 和 *gC* 基因扩增引物Table 1 The primers for detecting PRV and amplification of *gE* and *gC* genes

引物名	引物序列(5'→3')	片段长度(bp)
F	AGGCCCCGAGCCTCTCCGCCGAGAC	947
R	GAAGGCGTCGACGGGTCAGGCGGT-CAG	
<i>gE</i> F	GACGGATCCCCATGCGGCCCTTTCT-GCTGCGCGCC	1 767
<i>gE</i> R	GCCAAGCTTCGGAATGCGGGCGGAC-CGGTTCTCCC	
<i>gC</i> F	GTTTCCTGATTCACGCCACGC	900
<i>gC</i> R	GAAGGGCTCACCGAAGAGGAC	

下载 GenBank 上 30 个同时上传了 *gE* 和 *gC* 基因的毒株序列(表 2),用 BioEdit 7.2.5 软件分析序列间的同源性,用 Mega 6.06 软件中的最大似然法(Maximum likelihood)进行遗传进化分析。

2 结果

2.1 动物接种试验

无论是猪源还是犬源病料接种家兔后,家兔均在 36~48 h 死亡。死亡家兔呈现角弓反张的症状(图 1A、图 1B),接种部位因啃咬导致溃烂。剖检可见死亡家兔均发生脑水肿(图 1C、图 1D)。对照组家兔在试验期间无任何临床症状。

2.2 细胞培养结果

取家兔脑组织匀浆接种 PK-15 细胞,盲传到第 3 代时,接毒后 20 h,PK-15 细胞出现明显 CPE,表现为细胞折光性增强,肿胀,变圆,脱落;连续传至第 8 代,CPE 均稳定出现,且出现时间缩短至 12 h,其中,GXBH1 产生的 CPE 较 GXBH2 明显(图 2)。

2.3 病毒滴度测定

按 Kärber 法计算,GXBH1 及 GXBH2 的滴度分别为 $1 \text{ ml } 10^{6.5} \text{ TCID}_{50}$ 和 $1 \text{ ml } 10^{6.25} \text{ TCID}_{50}$,均低于 PRV 标准毒的 $1 \text{ ml } 10^{7.25} \text{ TCID}_{50}$ 。

2.4 病毒粒子的电镜观察

通过透射电镜观察,GXBH1 和 GXBH2 第 4 代细胞培养物中均观察到成熟的病毒粒子。病毒粒子呈椭圆形,直径约 150 nm,有囊膜(图 3)。

2.5 病毒核酸检测

以 F/R 为引物,GXBH1 和 GXBH2 均检测到 PRV *gE* 基因核酸(图 4),由于目前临床上普遍使用

PRV *gE* 基因缺失疫苗,本研究中死亡犬也没有免疫过 PRV 疫苗,所以检测出 PRV *gE* 基因可认为 2 株病毒为 PRV 野毒株。

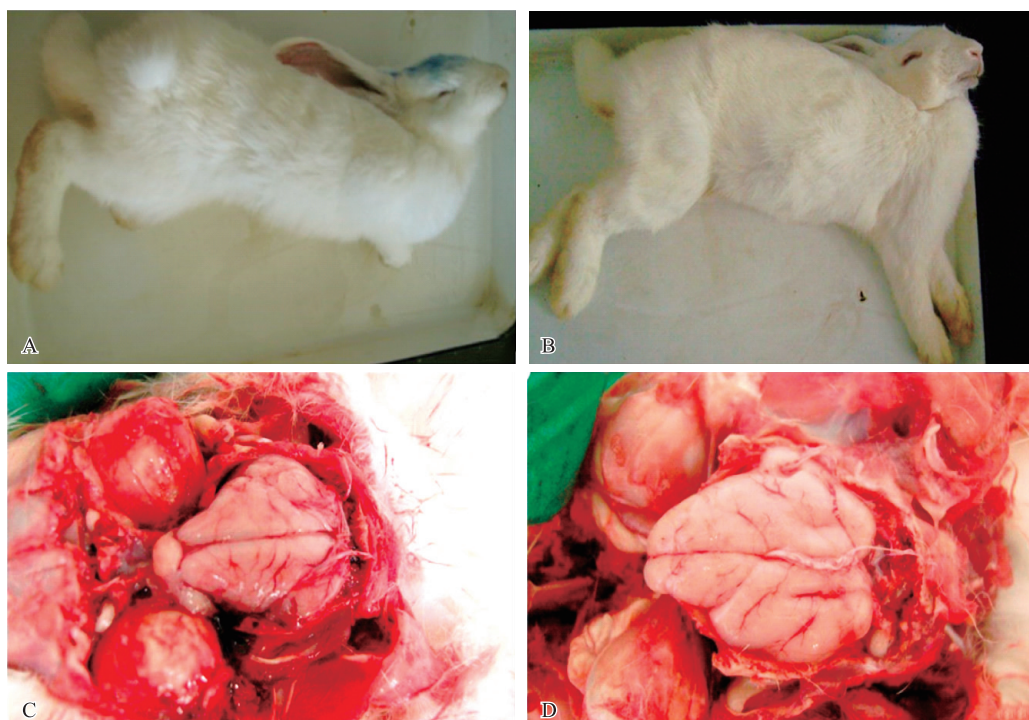
表2 PRV *gE/gC* 基因参考序列Table 2 The reference sequence of PRV *gE* and *gC* genes

毒株	国家/宿主/年份	GenBank(<i>gE/gC</i>)
Becker	美国/猪/1967	JF797219.1 *
BJ/RD	中国/犬/2013	KF017275.1/ KF017273.1
BJ/YT	中国/犬/2012	KC981239.1 *
CL/15	阿根廷/猪/1988	JF460026.1/ JF460030.1
Ea	中国/猪/1996	AF171937.1/AF158090.1
GY	中国猪/2012	KF042383.1/KF997103.1
HNHB2012	中国/猪/2012	KF010500.1/ KF010494.1
HNQX2012	中国/猪/2012	KF010502.1/ KF010496.1
HuNXT2012	中国/猪/2012	KF010503.1/ KF010497.1
JY	中国/猪/2012	KF017615.1/KF997104.1
Kaplan	匈牙利/猪/na	JF797218.1 *
LGX	中国/猪/2012	KF042384.1/ KF997098.1
LXB6	中国/猪/na	GQ926932.1/ GQ926931.1
LXB88	中国/猪/na	GQ926933.1/ GQ926930.1
M5	中国/猪/2012	KF130880.1/ KF997095.1
Min-A	中国/牛/1962	AY170318.1/AF403051.1
MZ1	中国/猪/2012	KF130881.1/ KF997097.1
MZ2	中国/猪/2012	KF130882.1/ KF997099.1
NiA3	北爱尔兰/猪/1971	EU502923.1/D49437.1
NY	中国/猪/2012	KF130883.1/ KF997096.1
P-PRV	马来西亚/猪/2003	FJ176390.1/ EU915280.1
Rice	na/na/na	M14336.1 **
TJ	中国/猪/2012	KJ789182.1 *
WY	中国/猪/2013	KF130884.1/ KF997094.1
YY	中国/猪/2013	KF130885.1/KF997101.1
ZJ01	中国/猪/2012	KM061380.1 *
ZJNB2012	中国/猪/2012	KF010504.1/ KF010498.1
ZK	中国/猪/2012	KF130886.1/KF997100.1
ZM	中国/猪/2012	KF130887.1/KF997102.1
Bartha	匈牙利/猪/1961	JF797217.1 ***

na 表示信息未知;* 表示该登录号为全基因序列;** 表示该毒株仅有 *gE* 基因;*** 表示仅有 *gC* 基因。

2.6 PRV *gE* 基因扩增及遗传变异分析

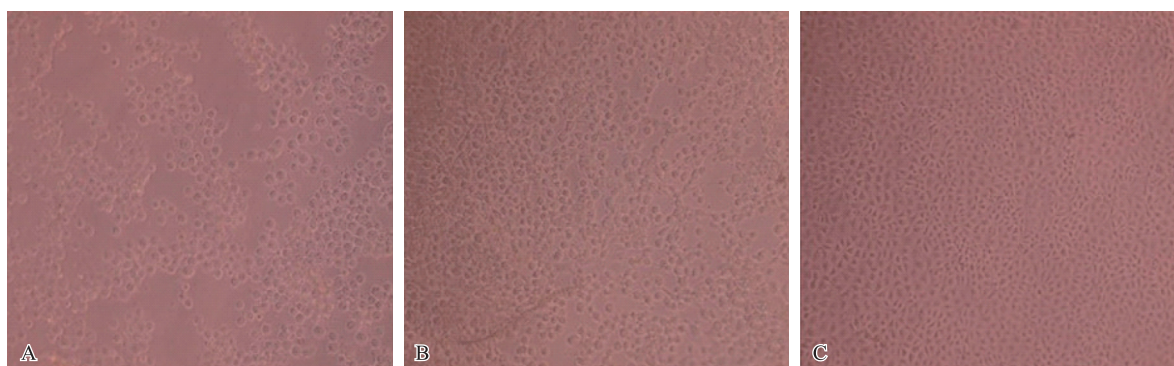
用引物 PRV *gE* F/R,扩增 2 株分离毒的 *gE* 全基因序列并进行克隆测序,获得的 *gE* 基因全长



A;GXBH1 感染家兔出现角弓反张;B;GXBH2 感染家兔出现角弓反张;C;GXBH1 感染家兔出现脑水肿;D;GXBH2 感染家兔出现脑水肿。

图 1 家兔感染试验

Fig.1 Experiment of rabbit infection



A;GXBH1;B;GXBH2;C:正常 PK-15 细胞。

图 2 GXBH1 和 GXBH2 在 PK-15 细胞上的细胞病变(×20)

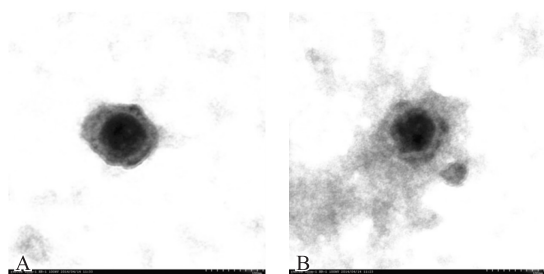
Fig.2 Cytopathic effects of GXBH1 and GXBH2 in PK-15 cell (×20)

1 740 bp,编码 580 个氨基酸(图 5)。分析显示,GXBH1 和 GXBH2 的同源性为 100%,提示 2 株分离毒可能为同一毒株。2 株分离株与 29 条参考序列的核苷酸同源性为 97.4%~100.0%,氨基酸同源性为 95.1%~100.0%。其中,与国内外经典强毒 Rice 株和 Min-A 株同源性分别为 97.4%和 98.9%,氨基酸同源性分别为 95.3%及 98.2%。

将 2 分离株的 *gE* 基因核苷酸序列及推导的氨

基酸序列分别与 Rice 株、Min-A 株、Ea 株及 ZJ01 株等国内外不同时期经典强毒进行比对分析。2 分离株 *gE* 基因核苷酸序列均存在碱基的插入、替换及颠换,导致氨基酸序列发生改变(表 3),但是,序列中半胱氨酸残基(C)的分布却与参考株基本一致。

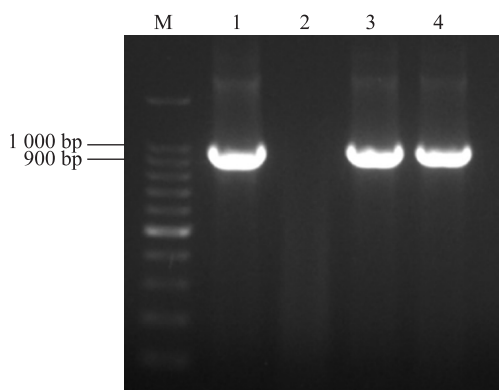
基于 *gE* 基因的进化分析结果(图 6)显示,PRV 可分为 2 群。其中,GXBH1、GXBH2 和以 ZJ01 株为代表的 2011 年以后国内新分离的流行株位于 1 个



A: GXBH1 的病毒粒子; B: GXBH2 的病毒粒子。

图 3 病毒粒子形态学观察(×100 nm)

Fig.3 The morphologies of two viruses under electron microscope(×100 nm)



M: 100 bp DNA ladder; 1: 阳性对照; 2: 阴性对照; 3: GXBH1; 4: GXBH2。

图 4 *gE* 基因检测

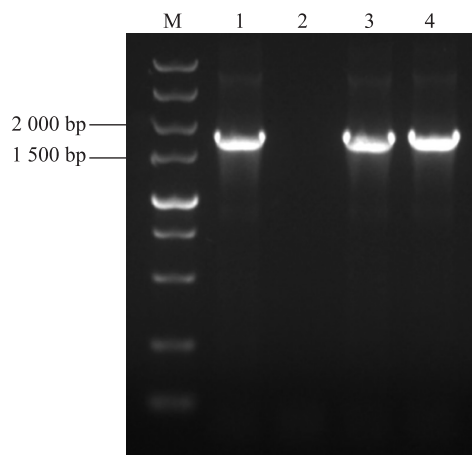
Fig.4 Detection of *gE* gene with primer F/R

独立的进化分支,与国内早期的分离株共同构成 I a 亚群,亲缘关系较近。它们与 2003 年马来西亚的毒株 P-PrV 共同构成基因 I 群,而欧洲及美洲的分离株则构成基因 II 群(图 6)。

2.7 PRV *gC* 基因扩增及遗传变异分析

用引物 *gC* F/R 扩增 GXBH1 和 GXBH2 的 *gC* 基因部分片段,扩增出的片段大小约为 900 bp(图 7)。测序结果显示,扩增的片段包含了 *gC* 基因编码区 1~780 bp 序列。分析结果显示,2 株分离株之间核苷酸序列同源性为 100.0%,与 29 条参考序列的核苷酸序列同源性为 91.3%~99.8%,氨基酸序列同源性为 86.6%~99.5%。其中,与 Bartha 株和 Min-A 株核苷酸序列的同源性分别为 91.3%、98.7%,氨基酸序列同源性分别为 86.6%、96.6%。

将 2 株分离株的 *gC* 基因核苷酸序列和推导氨基酸序列与经典疫苗 Bartha 株,以及 Min-A 株、Ea



M: DL5000 DNA marker; 1: 阳性对照; 2: 阴性对照; 3: GXBH1; 4: GXBH2。

图 5 *gE* 全基因扩增

Fig.5 Amplification of the complete sequence of *gE* gene

株和 ZJ01 株等国内不同时期分离毒株进行比对分析。较之 Bartha 株,2 株分离株 *gC* 基因序列存在多处的碱基替换及颠换,导致氨基酸序列发生改变(表 4)。值得注意的是,与 Bartha 株相比,包括 2 株分离株在内的国内不同年代代表株均在 59 位氨基酸序列插入了 7 个氨基酸残基“GTTGAAA”,紧接着出现 4 个位点的连续突变,由 PEAG 突变为 STPA。

基于 *gC* 基因片段的遗传进化分析结果显示,与 *gE* 基因类似,2 株分离株与国内大部分的分离株同处 1 个进化分支,而 Min-A 和 2003 年马来西亚的毒株 P-PrV 处于另一个小的分支,上述毒株共同构成了 PRV 基因 I 群,而欧洲和美洲的分离株则构成基因 II 群,与基于 *gE* 基因的进化分析一致(图 8)。

3 讨论

本研究从发病的犬和猪身上分离到 2 株病毒,经核酸检测和电镜观察,证实分离到的病毒为 PRV 野毒。2 株病毒 *gE* 全基因同源性为 100.0%;结合临床资料,发病犬与病猪有密切接触史,因此,推断犬源毒株 GXBH1 与猪源毒株 GXBH2 可能为同一株病毒,2 毒株病毒滴度的差异可能与原始病料中病毒载量及样品的保存条件有关。

2011 年以来,国内先后已从免疫 Bartha-K61 疫苗后爆发 AD 疫情的猪群中分离到 PRV 野毒株,这些新流行毒株较之国外经典强毒 Rice 株,在 *gE* 基因的第 58 位和第 495 位氨基酸附近均插入了 1 个天

表 3 分离株与参考株 *gE* 蛋白质氨基酸序列差异
Table 3 The difference between the isolates and the reference strain in the deduced amino acid sequence of *gE* gene

位点	毒株					位点	毒株				
	Rice	Min-A	Ea	ZJ01	GXBH1		Rice	Min-A	Ea	ZJ01	GXBH
48	-	-	D	D	D	400	G	D	G	G	G
54	G	G	G	D	D	403	A	A	P	A	A
59	D	N	N	N	N	448	V	V	V	I	I
63	N	D	D	D	D	471	G	R	R	R	R
106	V	L	L	L	L	473	R	H	H	H	H
122	A	S	S	S	S	496	-	D	-	D	D
125	M	T	T	T	T	497	-	D	-	-	-
130	T	A	T	T	T	502~503	DA	VI	VI	VI	VI
133	H	Y	H	H	H	508	S	A	A	A	A
149	R	M	M	M	M	511	G	G	G	S	S
163	Q	R	R	R	R	519	P	P	S	P	P
179	T	S	S	S	S	521	V	A	A	A	A
181	R	L	L	L	L	525	A	P	P	P	P
215~216	LA	AD	AD	AD	AD	543	E	K	E	E	E
309	-	-	-	R	-	572	S	N	N	N	N
310	A	R	R	R	R	576~577	NA	MS	MS	MS	MS
347	A	T	A	A	A						

“-”表示此位点出现基因缺失。

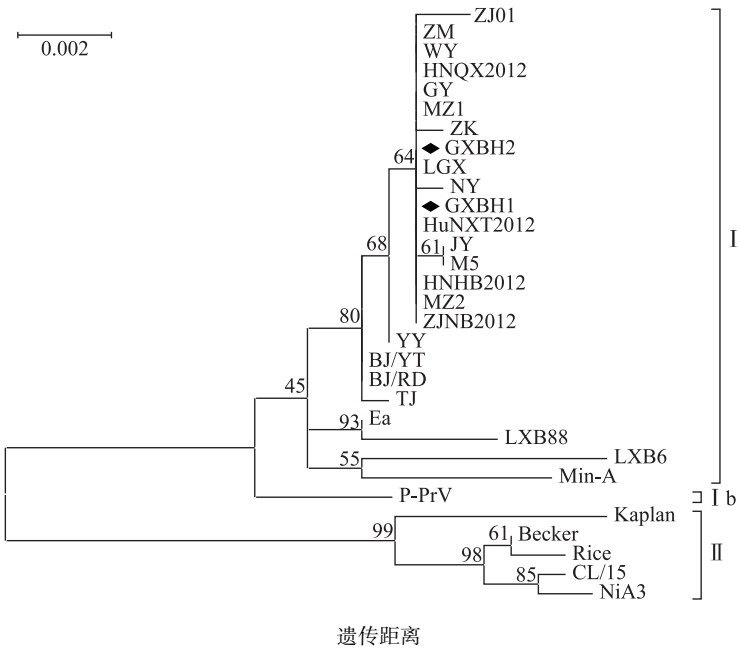


图 6 基于 *gE* 基因的系统进化树
Fig.6 Phylogenetic tree based on the *gE* gene

氨酸残基(D)^[5-10]。本研究分离到的2株PRV毒株 *gE* 基因序列同样具有上述特征。同时,遗传进

化分析也证实2株PRV与2011年后新流行的优势毒株亲缘关系更近,表明,本研究分离的2株PRV

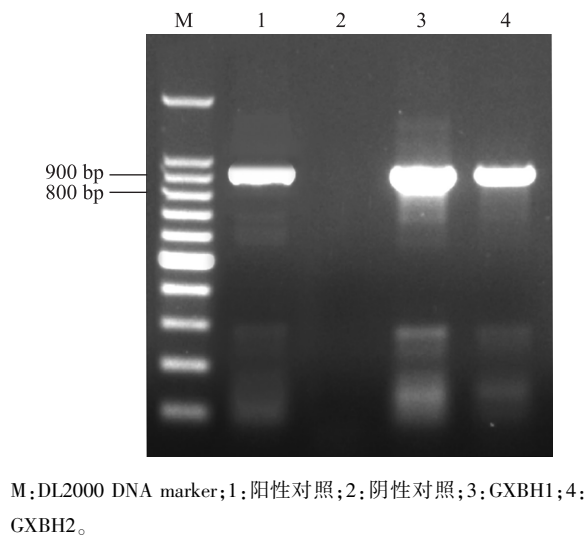


图 7 *gC* 基因片段扩增
Fig.7 Amplification of the partial sequence of *gC* gene

为近年来引起 AD 疫情的 PRV 新流行毒株。
gE 基因是 PRV 主要的毒力基因,其编码病毒的囊膜糖蛋白质,对病毒神经嗜性及神经毒性有重要影响^[8]。其中,第 125 位的 V 和第 126 位的 C 被认为是决定病毒毒力的关键位点,缺失这 2 个位点对病毒毒力的影响与缺失整个 *gE* 蛋白质无异^[14]。本研究的 2 株 PRV 由于 48 位插入了 D,使 2 个关

键位点变为 126 和 127,但没发生缺失,提示 2 株分离株的毒力可能未发生明显改变。

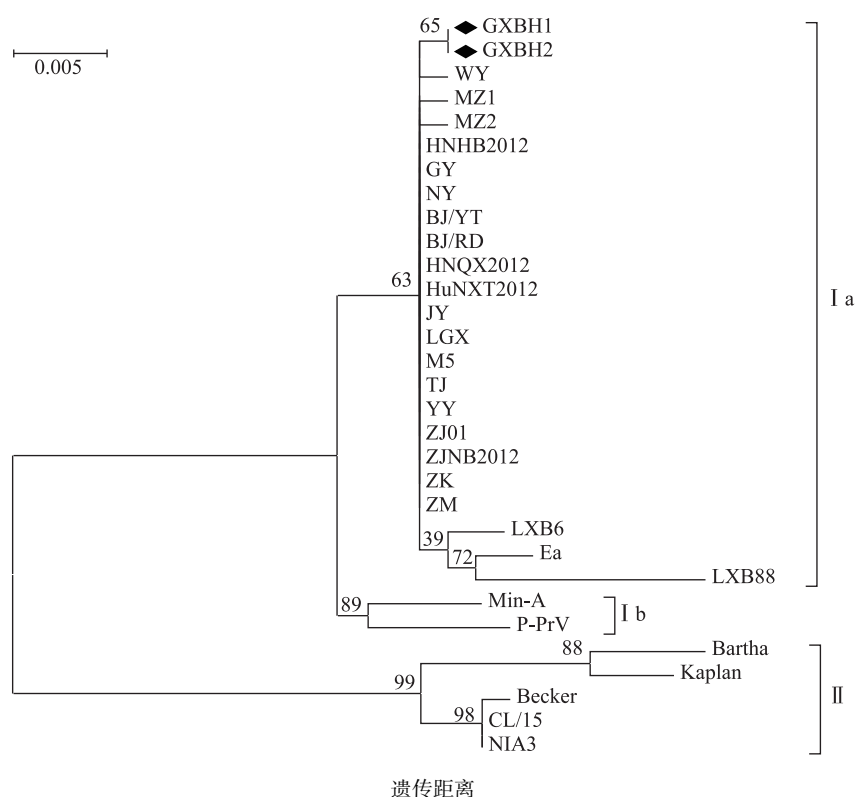
氨基酸序列中的 C 残基对蛋白质的空间构象有重要影响,PRV *gE* 氨基酸序列中 C 残基的保守分布提示分离株 *gE* 蛋白质的空间构象未发生明显改变。*gE* 蛋白质共有 6 个抗原表位区,其中 5 个集中位于 N 端胞外区的 52~238 位氨基酸^[15]。与国外经典强毒 Rice 株相比,本研究中的 2 株分离毒在上述区域出现了多个位点的变异,变异位点主要位于 C 抗原表位区和 E 抗原表位区(78~238 位氨基酸)。已有研究结果表明,感染 PRV 后,猪体产生的抗体大多数是针对 E 抗原表位区^[16]。这些区域的变异提示,较之 Rice 株,本研究分离毒 *gE* 蛋白质的抗原性可能已发生了改变。但是,2 株分离毒 *gE* 蛋白质抗原表位区变异与国内不同时期分离株的变异情况基本一致,说明当前的 PRV 流行毒株与国内早期毒株相比,*gE* 蛋白质的免疫原性没有明显改变。

gC 蛋白质是猪体免疫应答的主要靶目标,可诱导机体产生中和抗体^[17]。本研究结果表明,包括 2 株分离毒在内的 PRV 国内流行株 *gC* 基因在 175~206 位核苷酸之间存在碱基的集中突变,使相应的氨基酸序列在 59~69 位出现 1 个高变区,与早前的报道

表 4 分离株与参考株 *gC* 蛋白质氨基酸序列部分差异位点
Table 4 The difference between the isolate and reference strains in the deduced amino acid sequence of *gC* gene

位 点	毒株					位点	毒株				
	Bartha	Min-A	Ea	ZJ01	GXBH		Bartha	Min-A	Ea	ZJ01	GXBH
14	P	L	L	L	L	90	N	G	G	G	G
16	A	T	T	T	T	99	K	R	E	K	K
25	T	T	S	S	S	102	A	S	S	S	S
28	A	V	A	A	A	103	H	R	H	H	H
34	N	N	T	N	N	108	I	I	I	I	T
52	P	S	S	S	S	130	F	V	V	V	V
55	A	E	E	E	E	142	Y	Y	C	C	C
57	A	V	V	V	V	163	S	P	P	P	P
59~65	-	GTTGAAA	GTTGAAA	GTTGAAA	GTTGAAA	186~188	TPV	ASA	ASA	ASA	ASA
66~69	PEAG	STPA	STPA	STPA	STPA	190~191	ED	VV	VV	VV	VV
75	R	P	R	R	R	194	G	E	G	E	E
76	A	V	V	V	V	204	E	K	E	E	E
87	P	Q	Q	Q	Q	240	L	V	V	V	V

“-”表示该位点基因缺失。

图8 基于 *gC* 基因的系统进化树Fig.8 Phylogenetic tree based on the *gC* gene

一致^[18]。资料显示,病毒中和抗体的结合位点位于N端65~99位氨基酸,该区域还存在2个肝素结合区域(76~81位、96~100位),特别是第1个位点,是介导体液免疫的潜在位点^[19]。与国内常用疫苗株Bartha相比,由于63位7个氨基酸残基的插入,2分离毒的抗原-抗体结合区域位置后移,结合域序列出现了多处的变异,提示与Bartha株相比,本研究分离毒*gC*蛋白质的免疫原性可能发生了改变。虽然本研究仅扩增了*gC*基因部分片段,2株分离毒与国内流行毒株的变异情况,尤其是在氨基酸序列高变区(59~74位氨基酸)的变异高度一致。

基于*gE*蛋白质与*gC*蛋白质的分析结果均表明,虽然与国外经典强毒Rice及经典疫苗毒Bartha相比存在多个氨基酸位点的变异,但是国内不同年代的分离毒变异情况却基本一致,提示,中国境内的PRV可能形成了一个独立的进化群,这与基于*gE*基因和*gC*基因的遗传进化分析结果一致。

参考文献:

[1] CRAMER S D, CAMPBELL G A, NJAA B L, et al. Pseudorabies

virus infection in Oklahoma hunting dogs[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2011, 23(5): 915-923.

[2] 郭广富, 曹军平, 朱爱萍, 等. 猪伪狂犬病毒泰州株的分离鉴定[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(3): 200-202.

[3] PEDERSEN K, BEVINS S N, BAROCH J A, et al. Pseudorabies in feral swine in the United States, 2009-2012[J]. Journal of Wildlife Diseases, 2013, 49(3): 709-713.

[4] YU X, ZHOU Z, HU D, et al. Pathogenic pseudorabies virus, China, 2012[J]. Emerging Infectious Diseases, 2014, 20(1): 102.

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

[6] 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.

[7] 赵鸿远, 彭金美, 安同庆, 等. 猪伪狂犬病毒变异株的分离鉴定及其*gE*基因的分子特征[J]. 中国预防兽医学报, 2014, 36(7): 506-509.

[8] 余秋颖, 常洪涛, 陈文定, 等. 2012—2013年新流行猪伪狂犬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, 34(10): 1573-1578.

[9] 童武, 郑浩, 单同领, 等. 伪狂犬病毒变异株(JS-2012)对仔猪的致病性研究[J]. 中国动物传染病学报, 2014, 22(5): 10-14.

[10] LUO Y, LI N, CONG X, et al. Pathogenicity and genomic character-

- ization of a pseudorabies virus variant isolated from Bartha-K61-vaccinated swine population in China[J]. *Veterinary Microbiology*, 2014, 174(1):107-115.
- [11] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 1997.
- [12] 王仰杰, 刘芳, 华俊, 等. 猪伪狂犬病病毒 GXBB 株的分离鉴定及 *gE* 基因的克隆分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2008, 35(11): 32-35.
- [13] 张克山, 刘永杰, 孔汉金, 等. 绵羊伪狂犬病病毒的鉴定及序列分析[J]. *中国兽医科学*, 2013, 43(3): 221-224.
- [14] JACOBS L, RZIHA H J, KIMMAN T G, et al. Deleting valine-125 and cysteine-126 in glycoprotein gI of pseudorabies virus strain NIA-3 decreases plaque size and reduces virulence in mice[J]. *Archives of Virology*, 1993, 131(3-4): 251-264.
- [15] JACOBS L, MELOEN R H, GIELKENS A L J, et al. Epitope analysis of glycoprotein I of pseudorabies virus[J]. *Journal of General Virology*, 1990, 71(4): 881-887.
- [16] JACOBS L, KIMMAN T G. Epitope-specific antibody response against glycoprotein E of pseudorabies virus[J]. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 1994, 1(5): 500-505.
- [17] BEN-PORAT T, DEMARCHI J M, LOMNICZI B, et al. Role of glycoproteins of pseudorabies virus in eliciting neutralizing antibodies[J]. *Virology*, 1986, 154(2): 325-334.
- [18] 王键义, 郭万柱, 徐志文, 等. 猪伪狂犬病病毒 *gC* 基因的克隆及其部分生物学特性的分析[J]. *中国兽医科学*, 2008, 38(10): 830-836.
- [19] OBER B T, TEUFEL B, WIESMÜLLER K H, et al. The porcine humoral immune response against pseudorabies virus specifically targets attachment sites on glycoprotein gC[J]. *Journal of Virology*, 2000, 74(4): 1752-1760.

(责任编辑: 袁伟)