

PRV 广东株 gE 基因去信号肽片段的克隆与序列测定^{*}

敖敬群¹, 娄高明², 杨 林¹, 龙紫新¹, 王²章¹

(1. 中山大学生物防治国家重点实验室, 广东 广州 510275;

2. 广东省兽医生物技术重点实验室, 广东 广州 510640)

摘 要: 根据伪狂犬病病毒 (PRV) Rice 株 gE 基因的序列设计并合成了 1 对引物, 以我国 PRV 地方毒株广东株的基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 方法获得了一大约 1.6 kb 的 DNA 片段, 并将其克隆到 pMD18-T 载体上进行测序. 序列测定结果显示, 该片段长 1 665 bp, 编码 555 个氨基酸, 与 PRV Rice 株 gE 基因的核苷酸序列同源性为 97.7%, 氨基酸序列同源性为 95.9%.

关键词: 伪狂犬病病毒; gE 基因去信号肽片段; PCR 扩增; 序列分析

中图分类号: Q781 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2001) 06-0115-03

伪狂犬病 (Pseudorabies, PR) 是可感染多种家畜及野生动物的一种传染病, 该病已给世界畜牧业尤其是养猪业造成了巨大的经济损失^[1], 美国 1990 年因伪狂犬病的流行造成的损失达 6 亿美元, 我国自 1947 年首次发现猫的伪狂犬病以来, 已有 24 个省市报道了该病的流行, 猪场的血清阳性检出率逐年上升, 广东省 1988—1995 年间发病猪场的数量为建国后 40 年总和的 8.7 倍^[2].

疫苗接种是防制伪狂犬病的重要手段, 目前广泛使用的疫苗有灭活疫苗和弱毒疫苗 (包括基因缺失疫苗), 但没有一种能够完全阻止 PRV 的感染及潜伏感染, 因此无法达到根除伪狂犬病的目的. 利用缺失一个或多个伪狂犬病病毒 (Pseudorabies virus, PRV) 生长复制非必需基因的基因缺失疫苗免疫动物, 结合使用能检测缺失蛋白抗体的血清学方法, 可将疫苗接种动物与野毒感染动物区分开来, 在感染早期甚至潜伏感染期就将患病动物清除出动物群, 阻断伪狂犬病的流行, 使根除该病成为可能^[3]. gE 基因是 PRV 在体外复制的非必需基因, 也是一种毒力参与基因^[4]. 结合使用 gE 基因缺失的 PRV 疫苗与高效灵敏的 gE-ELISA 检测方法是伪狂犬病防制工作的一项重要策略. 本文利用 PCR 方法成功地获得了 PRV 广东株的 gE 基因去信号肽片段, 为今后在真核表达系统中大量表达 gE 基因产物并

进而建立 gE-ELISA 检测方法打下了基础.

1 材料与方法

1.1 实验材料 非洲绿猴肾细胞 (Vero 细胞) 由广东省动植物检验检疫局惠赠; 伪狂犬病病毒广东株 (GD 株) 由华南农业大学动物医学系林绍荣教授惠赠.

1.2 主要试剂 哺乳动物细胞培养用 DMEM 培养基购自 GIBCO 公司; 无菌小牛血清购自上海天达生物工程有限公司.

Taq DNA 聚合酶、dNTPS、pMD18-T 载体、DL2000、DL15000 分子 Marker 及限制性内切酶 *Eco*RI 与 *Pst*I 购自 Takara 公司; 200 bp DNA 分子梯度购自华美生物工程公司; *Bst*E II 为 NEB 产品; 回收胶试剂盒购自 QIAGEN 公司.

1.3 方法

(1) 病毒的培养及模板的制备. 参见文献 [5].

(2) 引物设计与合成. 参照 PRV Rice 株 gE 基因的序列^[6] 设计了 1 对扩增 PRV gE 基因去信号肽片段的引物. 引物序列为 P₁: 5'—CGGGATCCGAGGCCCGAGCCTCTCCGCCGAG—3'; P₂ 为: 5'—CGGAATTCAGCGGGCGCGCATTCACAGG—3', 由上海生工生物工程有限公司合成. 引物跨度约 1.6 kb, 包括 PRV Rice 株去除了信号肽及终止密码子的 gE 基因片段.

^{*} 基金项目: 国家“九五”科技攻关资助项目 (96-C01-04-03); 国家自然科学基金资助项目 (39600109); 广东省自然科学基金资助项目 (990517); 广东省科技攻关资助项目 (2KM03507N)

收稿日期: 2001-03-07; 作者简介: 敖敬群 (1975—), 女, 博士研究生; 通讯联系人: 王²章¹.

(3) PCR 扩增及片段回收. 扩增反应体积 50 μL , 模板 DNA 0.5 μL (约 200 ng), 10 mmol/L dNTPs 1 μL , P_1 、 P_2 各 1 μL (20 mmol/L), $10\times$ buffer 5 μL , Mg^{2+} 1.5 mmol/L, 甘油 $\varphi=10\%$. 98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min 后加 Taq DNA 酶 0.5 μL , 循环参数为 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 65 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2.5 min, 30 个循环后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min. 全部反应结束后于 $w=0.8\%$ 琼脂糖凝胶中电泳, 用 QIA-GEN 公司 Gel Extaction Kit 试剂盒回收 PCR 片段.

(4) PCR 产物克隆及序列测定. PCR 扩增片段回收后按操作手册与 Takara 公司 pMD18 T 载体在 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜. 连接产物转化 XL1 blue 菌株, 筛选阳性克隆子 pMD18 T GD, 并送至上海基康生物技术有限公司测序.

2 结 果

2.1 PCR 扩增与重组质粒的酶切鉴定 PCR 反应结束后, 取 5 μL 反应液与 200 bp DNA 分子梯度同时电泳, 可见在 1 600 与 1 800 bp 之间有一明显扩增带 (见图 1). PCR 产物经纯化回收后, 与 pMD18 T 载体连接, 获得的阳性克隆子 pMD18 T GD 经 *EoR* I、*Pst* I、*Bst*E II 等酶切后获得的酶切片段与 PRV Rice 株 gE 基因经同种酶切的片段大小基本一致.

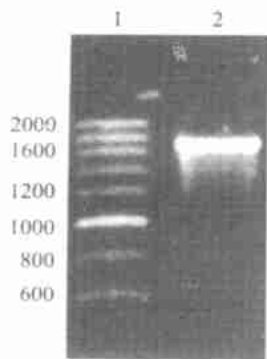


图 1 PCR 扩增

Fig. 1 The result of PCR amplification
1 200 bp DNA 分子梯度; 2 PCR 产物

2.2 PRV 闽 A 株 gE 基因去信号肽片段的序列测定结果 利用 pMD18 T 载体上的 M13 测序引物对重组质粒 pMD18 T GD 上的克隆片段进行序列测定, 测序结果显示, 该片段全长 1 665 bp, 编码 555 个氨基酸 (见图 2), 与 PRV Rice 株 gE

基因的核苷酸序列同源性为 97.7%, 编码的氨基酸序列同源性为 95.9%. 实验所得序列已登录 GenBank, 登录号为 AF403050.

3 讨 论

通过 PCR 技术特异性地扩增了我国 PRV 地方毒株广东株去除了信号肽及终止密码子的 gE 基因片段. 与 Rice 株 gE 基因相比, 该片段有 35 个核苷酸发生了变异, 且在 940~942 bp 处存在 3 个碱基的缺失. 这些碱基的变异导致了 22 个氨基酸的改变及 1 个氨基酸的缺失 (第 324 位, 见图 2). 运用 ExPASy 在线蛋白分析软件对 PRV 广东株 gE 基因去信号肽片段编码的氨基酸序列进行分析发现, 该片段含 5 个潜在的 N-糖基化位点及 12 个潜在的 O-糖基化位点, 糖基化位点的数目及位置与 Rice 株的完全一样, 说明这些氨基酸的改变没有影响到蛋白的免疫原性. 蛋白结构域分析显示, 第 408~430 位氨基酸组成蛋白的疏水性跨膜区, 第 1~407 位为蛋白的胞外区, 431 位以后为胞质区. 推测的二级结构全为 α -螺旋及 β -折叠, 主要为 β -折叠, 占 62.6%.

参考文献:

[1] 娄高明, 郭万柱, 徐兰芳. 集约化养猪技术与疾病防治[M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 1998. 441—442.
[2] 娄高明, 杜伟贤. 伪狂犬病防治制策略及我国应采取的对策[A]. 珠海: 中南地区微生物学发展前沿与应用新技术学术研讨会论文集[C], 2000, 248—251.
[3] VAN ORISCHOT J T, HOUWERS D J, RZIHA H J, et al. Development of an ELISA to detect antibodies to glycoprotein I of Aujeszky's disease virus: a method for the serological distinction between infected and vaccinated pigs[J]. J Virological Method, 1988, 22: 191—206.
[4] JACOLS L, MULDER W A M, VAN ORISCHOT J T, et al. Deleting two amino acids in glycoproteing I of pseudorabies virus decrease virulence and neurotropism for pigs but does not affect immunogenicity[J]. J General Virology, 1993, 74: 2201—2206.
[5] 娄高明, 费恩阁, 宣华, 等. PRV 闽 A 株 BamHI 片段的克隆及其第七片段的鉴定[J]. 中国兽医学报, 1996, 16(2): 108—112.
[6] PETROVSKIS E A, TIMMINS J G, POST L E. Use of λ gt11 to isolate genes for two pseudorabies virus glycoproteins with homology to Herpes Simplex Virus and

Varicella—Zoster virus glycoproteins[J] . J Virology, 1986, 60(1) : 185—193.

GD	* * * * *	39
Rice	MRPFL LRAA QLLA LLALALSTEAPSLSAETTPGPVTEVPSPSAEVWDLSTEAGDDDLGD	60
GD	...D.....L.....	99
Rice	LNGDDRRAGFGSALASLREAPPAHLVNVSEGANFTLDARGDCAVVAGIWTFLPVRGCDV	120
GD	S.....T.....M.....R.....S.....	159
Rice	AV T MVCF ETACHPDLVLGRACVPEAPERGIGDYLPEVPRLQREPIVTPERWSPHLTVR	180
GD	RD.....	219
Rice	RATPNDTCLYTLHDASCPRAVFFVAVGDRPPAPLAPVGPAPRHEPRFHALGFHSQFSPGD	240
GD	A.....	279
Rice	TFDLMPRVSDMGDSRENFTATLDWYYARAPPRCLLYVYEPYHPRAPECLRPVDPAC	338
GD	G.....*	338
Rice	SFTSPARAALVARRAYASCSPLLGDRLTACPFDAFGEEVHTNATADESGLYVLVMTHNG	360
GD		398
Rice	HVATWDYTLVATAAEYVTVIKELTAPARAPCTPWGPGGDDAIYVDGVTTAPPARPWNP	420
GD	A.....K...H.....	458
Rice	YGRTPGRLFVIALGSFVMTCCVVGAVWLCVLCSSRRRAASRPFRVPTRAGTRMLSPVYTS	480
GD	G.....VI.....A.....P.....	518
Rice	LPTHEDYYDGGDDDEEAGDARRRPSSPGCDSCYEGPYVSLDAEDEFSSDEDDGLYVRPEE	540
GD	555	
Rice	APRSGFDVWFRDPEKPEVTNGPNYGVTASRLNARPA	577

注: ...代表氨基酸相同; * 代表氨基酸缺失

图 2 PRV 广东株与 Rice 株 gE 基因去信号肽片段编码的氨基酸序列比较

Fig. 2 The comparison of deduced amino acid sequences of PRV gE gene fragment exclude signal peptide between the Guangdong strain and Rice strain

Cloning and Sequencing of gE Gene Fragment Exclude Signal Peptide of Pseudorabies Virus Guangdong Strain

AO Jing qun¹, LOU Gao ming², YANG Lin¹, LONG Qing xin¹, WANG Xun zhang¹
(1. The State Key Laboratory for Biocontrol, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China;
2. The Guangdong Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: A fragment about 1. 6 kb was amplified by PCR technique from the genome DNA of PRV Guangdong strain, using primers designed and synthesized according to the gE gene fragment exclude signal peptide of PRV Rice strain. This PCR product was then cloned into pMD18 T vector and sequenced. The sequencing result showed that the PCR product spanned 1 665 bp, encoding 555 amino acids. The homology of DNA sequence and amino acid sequence between it and gE gene of Rice strain was 97. 7% and 95. 9% respectively. **Keywords:** pseudorabies virus; gE gene fragment exclude signal peptide; PCR amplification; sequencing