

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.05.02

# 猪伪狂犬病毒流行株 JL1 株主要基因的遗传变异分析

张姗姗, 冷雪, 时坤, 李健明, 官庆龙, 刘艺, 孙志博, 刘亚东, 杜锐\*

(吉林农业大学, 长春 130118)

[收稿日期] 2017-11-13 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 05-0007-11 [中图分类号] S852.65

**[摘要]** 为了解我国吉林省某地区猪伪狂犬病毒流行株 JL1 株的遗传变异情况, 对 PRV JL1 株 TK、gI、gD、gE 和 gB 基因进行克隆测序, 并与 GenBank 上发表的国内外毒株进行序列分析和遗传进化分析。结果显示, JL1 株 TK、gI、gD、gE 和 gB 基因与国内外其他参考毒株的核苷酸同源性为 99.6%~100%, 96.4%~99.9%, 98.8%~99.9%, 98.1%~99.9%, 98.4%~99.9%; 氨基酸同源性为 99.4%~100%, 94.3%~99.7%, 97.3%~99.8%, 95.7%~99.5%, 97%~99.7%。氨基酸多序列比对发现, PRV JL1 株 gE 基因第 48 位和 496 位各插入一个天冬氨酸(D), 与流行变异株的基因特征一致; 同时 gD 基因、gI 基因和 gB 基因分别有不同数量的氨基酸的插入和缺失。遗传进化分析表明, JL1 株与国内近年来分离的流行毒株亲缘关系较近, 尤其与 JS-2012 流行毒株亲缘关系相对最近, 而与国外分离的经典毒株亲缘关系较远。通过对 PRV JL1 流行毒株的重要基因进行遗传变异分析, 进一步了解 PRV 变异情况, 可为当前流行的猪伪狂犬病防控以及疫苗的研究提供参考依据。

**[关键词]** 猪伪狂犬病病毒; 变异; 遗传变异分析

## Genetic Variation Analysis of Major Genes of JL1 Strain of Porcine Pseudorabies Virus

ZHANG Shan-shan, LENG Xue, SHI Kun, LI Jian-ming, GONG Qing-long,

LIU Yi, SUN Zhi-bo, LIU Ya-dong, DU Rui\*

(Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Corresponding author: DU Rui, E-mail: 104974602@qq.com

**Abstract:** To investigate the genetic variation of JL1 strain of Porcine pseudorabies virus from Jilin province in China. TK, gI, gD, gE and gB genes of JL1 strain were cloned, sequenced and analyzed with domestic and foreign strains from Genbank. The results showed that the nucleotide homology of TK, gD, gI, gE and gB genes of JL1 strain with reference strains were 99.6%~100%, 96.4%~99.9%, 98.8%~99.9%, 98.1%~99.9%, 98.4%~99.9%, respectively. Amino acid homology were 99.4%~100%, 94.3%~99.7%, 97.3%~99.8%, 95.7%~99.5%, 97%~99.7%, respectively. Amino acid sequence alignment results showed, there were two insertion of amino acids at position 48(D) and 496(D) in gE of JL1 strain, which was consistent with that of the epidemic

基金项目: 国家自然科学基金(31372436); 吉林省科技厅科技支撑计划(20160209006YY)

作者简介: 张姗姗, 硕士, 从事经济动物疫病病学。

通讯作者: 杜锐。E-mail: 104974602@qq.com

variant strains. At the same time, there are different numbers of amino acid insertion and deletion in gD, gI and gB gene, respectively. Phylogenetic analysis showed that PRV JL1 strain was closely related to the epidemic strains isolated from China in recent years, and it was far from the classical strains from foreign-country. In this study, genetic variation analysis of important genes of PRV JL1 isolated from Jilin province was conducted to further understand the variation of PRV in order to provide a reference for the current prevention and control of PRV and vaccines development.

**Key words:** porcine pseudorabies virus; variation; genetic variation analysis

猪伪狂犬病毒 (Porcine Pseudorabies Virus, PRV) 是猪伪狂犬病病原体<sup>[1]</sup>, 可引起新生仔猪的致命感染、育肥猪呼吸道症状和母猪繁殖障碍, 给养猪业造成严重经济影响<sup>[2]</sup>。PRV 的一些主要糖蛋白参与病毒复制和传播, 其中 gE 和 gI 基因是 PRV 增殖的非必需蛋白, 同时具有协同控制毒力的功能, gE 基因还可作为鉴别野毒感染和疫苗免疫的重要蛋白<sup>[3-5]</sup>。gD 和 gB 糖蛋白是病毒复制所必需的糖蛋白, 同时也是 PRV 重要的免疫原性蛋白, 诱导机体产生中和抗体和细胞免疫反应<sup>[6-7]</sup>。TK 基因 (胸苷激酶) 是 PRV 的非必需和主要的毒力基因, 对病毒在中枢神经系统中的复制起重要作用<sup>[8]</sup>。

自 2012 年以来, 中国许多 Bartha-K61 疫苗免疫猪场再次爆发猪伪狂犬病, 特别是在猪群密集地区广泛传播。在我国多个省份的猪伪狂犬病疫苗免疫猪场的发病率和死亡率呈不断上升趋势, 研究表明一些重要的糖蛋白在多个方面有一定程度的变异, 出现了新的发病特征, 存在毒力增强的情况,

疫情更加难以控制, 给养猪业构成了严重的经济负担。为了解吉林省某地区分离的 PRV JL1 株的遗传变异情况, 对其主要基因进行克隆测序及遗传变异分析, 以期为今后吉林省 PRV 新型疫苗的研制和猪伪狂犬病的预防和净化提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 病毒与试剂 PRV JL1 流行毒株, 实验室保存; 大肠杆菌 JM109 感受态细胞, pMD18-T Vector, Ex Taq DNA 聚合酶, PrimeSTAR HS DNA Polymerase, Marker DL2000, 250 bp DNA Ladder 均购自 TaKaRa 公司; DNA Virus Kit 购自 OMGEA 公司; 凝胶回收试剂盒及质粒提取试剂盒购自 Oxygen 公司。

1.1.2 引物设计与合成 按照 GenBank 登录号为 BK001744 中的 PRV TK、gD、gI、gE 和 gB 全基因序列设计 5 对特异性引物 (表 1), 扩增目的片段大小分别为 963、1101、1203、1734 和 2742 bp。引物均由库美生物工程有限公司合成。

表 1 引物序列

Tab 1 The sequences of primers

引物 Primer	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	片段长度/bp Size/bp
TK-F	5'-ATGCGCATCTCCGGATCTAC-3'	963
TK-R	5'-TCACACCCCATCTCCGACG-3'	
gI-F	5'-ATGATGATGGTGGCCGCC-3'	1101
gI-R	5'-TTATTGTTCTCTGCGATGGTGG-3'	
gD-F	5'-ATGCTGCTCGCAGCGCTATTG-3'	1203
gD-R	5'-CTACGGACCGGCTCGGCT-3'	
gE-F	5'-ATCGGCCCTTTCTGCTGCG-3'	1734
gE-R	5'-TTAAGCGGGCGGGCATTCA-3'	
gB-F	5'-CTACAGGGCGTGGGGTCTCGCTCTC-3'	2742
gB-R	5'-ATGCCCGCTGGTGGCGTCTTTGG-3'	

1.2 方法

1.2.1 病毒基因组 DNA 提取及 PCR 扩增 按照 OMGEA 公司的 Viral DNA Kit 说明书提取 DNA,并以提取的 PRV 基因组 DNA 为模板,对实验室保存的 JL1 毒株的 TK、gI、gD、gE 和 gB 基因分别进行 PCR 扩增,反应体系为:Ex Taq 酶 0.25 μL,GC buffer I 12.5 μL,dNTP 4 μL,DNA 模板 2 μL,上、下游引物各 0.5 μL,DEPC 水补足于 25 μL。PrimeSTAR HS DNA Polymerase 25 μL,GC buffer 12.5 μL ,dNTP 2 μL,DNA 模板 1 μL,上、下游引物各 0.5 μL,DEPC 水补足于 25 μL。TK、gD、gI 基因的 PCR 反应程序:95 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 45 s,59 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min,35 个循环;72 °C 延伸 10 min。gE、gB 基因 PCR 反应程序:98 °C 变性 10 s,60 °C 退火 5 s,72 °C 延伸 1 min 40 s/2 min 40 s,30 个循环。反应结束,取 3~5 μL PCR 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定并观察其目的条带

大小。将剩余 PCR 产物送生工生物公司进行测序鉴定。

1.2.2 目的基因克隆测序 用 DNA 凝胶回收试剂盒纯化回收目的片段,并与 pMD18-T 克隆载体于 16 °C 下连接过夜,次日转入大肠杆菌感受态细胞 JM109 中,涂布于含氨苄青霉素(终浓度为 100 μL/mL)的 LB 平板上,37 °C 培养 12~16 h。经蓝白斑筛选后,挑取单个菌落于 6 mL 含氨苄青霉素(终浓度为 100 μL/mL)的 LB 液体培养基中,37 °C 200 r/min 振荡培养 12~16 h。经 PCR 鉴定正确的阳性质粒送上海生工生物公司进行测序。

1.2.3 遗传变异分析 利用 DNASTAR MegAlign 软件将 PRV JL1 毒株与 GenBank 数据库中具有代表性的参考毒株(表 2)序列进行核苷酸及氨基酸同源性分析以及多序列比对分析,再利用 Mega6.0 软件的邻近法构建遗传进化树。

表 2 序列分析用 PRV 参考毒株

Tab 2 PRV reference strains for sequence analysis

毒株 strain	序列号 Accession number	来源 Country	分离年代 Year	参与比对基因 Compared gene
Bartha	JF797217.1	Hungary	1961	TK、gD、gB
Becker	JF797219.1	USA	1970	TK、gI、gD、gE、gB
Kaplan	JF797218.1	Hungary	1971	TK、gI、gD、gE、gB
NIA3	KU900059.1	Spain	1959	TK、gI、gD、gE、gB
BJ/YT	KC981239.1	China	2013	TK、gI、gD、gE、gB
TJ	KJ789182.1	China	2012	TK、gI、gD、gE、gB
JS-2012	KP257591.1	China	2012	TK、gI、gD、gE、gB
HB1201	KU057086.1	China	2012	TK、gI、gD、gE、gB
HeN1	KP098534.1	China	2012	TK、gI、gD、gE、gB
Ea	KU315430.1	China	1998	TK、gI、gD、gE、gB
Fa	KM189913.1	China	2001	TK、gI、gD、gE、gB
SC	KT809429.1	China	1987	TK、gI、gD、gE、gB
Kolchis	KT983811.1	Greece	2010	TK、gI、gD、gE、gB
DUL34gfp	JQ809329.1	Germany	2012	TK、gI、gD、gE、gB
HNB	KM189914.3	China	2012	TK、gI、gD、gE、gB
DL1408	KU360259.1	China	2014	TK、gI、gD、gE、gB
HLJ8	KT824771.1	China	2013	TK、gI、gD、gE、gB
LY	KP259824.1	China	2014	TK
LY	KP259827.1	China	2014	gI

续表

毒株 strain	序列号 Accession number	来源 Country	分离年代 Year	参与比对基因 Compared gene
LY	KP259831.1	China	2014	gD
LY	KP259830.1	China	2014	gE
LY	KP710980.1	China	2014	gB
YY	KP259815.1	China	2014	TK
YY	KP259819.1	China	2014	gI
YY	KP259814.1	China	2014	gD
YY	KP259821.1	China	2014	gE
YY	KP710982.1	China	2014	gB
GA	KP259832.1	China	2013	TK
GA	KP259835.1	China	2013	gI
GA	KP259837.1	China	2013	gE
GA	KP710979.1	China	2013	gB
HN-DZ	KT948043.1	China	2014	gE、gB
GD-YF	KT936473.1	China	2015	gE、gB
GD-JM	KT936470.1	China	2015	gE、gB
JL1	MG733282	China	2015	TK
JL1	MG733281	China	2015	gI
JL1	MG733279	China	2015	gD
JL1	MG733280	China	2015	gE
JL1	MG733278	China	2015	gB

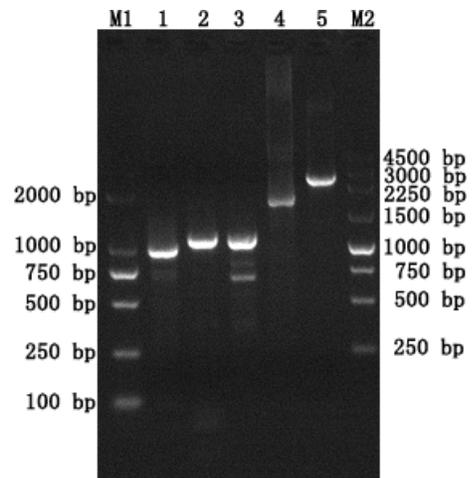
## 2 结果与分析

### 2.1 PRV TK、gI、gD、gE 和 gB 基因的 PCR 鉴定

以提取的 PRV JL1 株 DNA 为模板,使用 TK、gI、gD、gE 和 gB 基因特异性引物进行的 PCR 扩增,结果如图 1 所示,TK 基因约 963 bp、gI 基因约 1101 bp、gD 基因约 1203 bp、gE 基因约 1734 bp、gB 基因约 2742 bp,结果出现与目的条带预期结果一致的条带。

### 2.2 TK、gI、gD、gE 和 gB 基因的序列分析

2.2.1 同源性分析 核苷酸和氨基酸同源性比对结果显示,JL1 株 TK、gI、gD、gE 和 gB 基因与 2012 年以后国内分离的流行毒株如 BJ/YT、JS-2012、TJ、HeN1 等 PRV 变异株的核苷酸同源性为 99.7%~100%;其氨基酸同源性为 99%~100%。与国内经典毒株(如 Ea、Fa 和 SC)的核苷酸同源性为 99.3%~100%;其氨基酸同源性为 98.9%~100%。



M1. Marker DL 2000;1-5. JL1 株 TK、gI、gD、gE 和 gB 基因扩增产物; M2. 250 bp DNA Ladder

M. Marker DL 2000;1-5. TK、gI、gD、gE 和 gB 基因 PCR 扩增产物 of JL1 strain; M2. 250 bp DNA Ladder

图 1 JL1 株 TK、gI、gD、gE 和 gB 基因 PCR 鉴定  
Fig 1 PCR amplification of PRV TK、gI、gD、gE and gB gene from JL1 strain

与国外毒株(如 Bartha、Becker、Kaplan)的核苷酸同源性为 96.4%~99.7%;其氨基酸同源性为 94.3%~99.7%(表 3-表 7)。

结果表明,PRV JL1 株与国内新流行变异毒株同源性较高,与国内早期经典毒株次之,而与国外经典毒株同源性较低。

表 3 PRV JL1 株 TK 基因的核苷酸及推导的氨基酸序列同源性比较

Tab 3 The nucleotide and deduced amino acid sequence homology of TK gene of PRV JL1 strain

毒株	同源性/%										
	JL1	BJYT	HeN1	JS-2012	TJ	Fa	Ea	SC	Bartha	Kaplan	Becker
JL1		100	100	100	100	100	99.8	99.7	99.7	99.7	99.6
BJYT-2013-China	100		100	100	100	100	100	99.4	99.4	99.7	99.4
HeN1-2012-China	100	100		100	100	100	100	99.4	99.4	99.7	99.4
JS-2012-China	100	100	100		100	100	100	99.4	99.4	99.7	99.4
TJ-2012-China	100	100	100	100		100	100	99.4	99.4	99.7	99.4
Fa-2001-China	100	100	100	100	100		100	99.4	99.4	99.7	99.4
Ea-1998-China	100	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8		99.4	99.4	99.7	99.4
SC-1987-China	99.4	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.5		100	99.7	100
Bartha-1961-Hungary	99.4	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.5	100		99.8	99.9
Kaplan-1959-Hungary	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.5	99.8	99.7		99.7
Becker-1970-USA	99.4	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.9	100	99.7	

右上角为核苷酸的同源性比较,左下角为氨基酸同源性比较(表 4-表 7 同)

表 4 PRV JL1 株 gI 基因的核苷酸及推导的氨基酸序列同源性比较

Tab 4 The nucleotide and deduced amino acid sequence homology of gI gene of PRV JL1 strain

毒株	同源性/%										
	JL1	BJYT	HeN1	JS-2012	TJ	Ea	Fa	SC	Becker	Kaplan	NIA3
JL1		99.7	99.9	99.8	99.7	99.5	99.6	99.6	96.4	96.4	96.5
BJYT-2013-China	99.5		99.8	99.9	99.8	99.6	99.7	99.7	96.3	96.3	96.4
HeN1-2012-China	99.7	99.7		99.9	99.8	99.6	99.7	99.7	96.4	96.5	96.5
JS-2012-China	99.7	99.7	100		99.9	99.7	99.8	99.8	96.4	96.4	96.5
TJ-2012-China	99.5	99.5	99.7	99.7		99.6	99.7	99.7	96.5	96.4	96.5
Ea-1998-China	99.5	99.5	99.7	99.7	99.5		99.9	99.9	96.5	96.5	96.5
Fa-2001-China	99.7	99.7	100	100	99.7	99.7		100	96.5	96.6	96.6
SC-1987-China	99.7	99.7	100	100	99.7	99.7	100		96.5	96.6	96.6
Becker-1970-USA	94.3	94.3	94.5	94.6	94.8	94.3	94.6	94.5		99	99
Kaplan-1959-Hungary	94.3	94.2	94.5	94.5	94.3	94.3	94.5	94.5	98.1		98.9
NIA3-1971-Spain	94.6	94.5	94.8	94.8	95.1	94.6	94.8	94.8	98.6	98.6	

表 5 PRV JL1 株 gD 基因的核苷酸及推导的氨基酸序列同源性比较

Tab 5 The nucleotide and deduced amino acid sequence homology of gD gene of PRV JL1 strain

毒株	同源性/%											
	JL1	BJYT	HB1201	HeN1	JS-2012	TJ	Ea	Fa	SC	Bartha	Becker	Kaplan
JL1		99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.3	99.5	99.5	98.8	99.2	99
BJYT-2013-China	99.8		100	100	100	100	99.4	99.6	99.6	98.9	99.3	99.1
HB1201-China	99.8	100		100	100	100	99.4	99.6	99.6	98.9	99.3	99.1
HeN1-2012-China	99.8	100	100		100	100	99.4	99.6	99.6	98.9	99.3	99.1
JS-2012-China	99.8	100	100	100		100	99.4	99.6	99.6	98.9	99.3	99.1
TJ-2012-China	99.8	100	100	100	100		99.4	99.6	99.6	98.9	99.3	99.1
Ea-1998-China	99.3	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5		99.8	99.8	98.6	98.8	98.8
Fa-2001-China	99.5	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.5		100	98.7	99	98.8
SC-1987-China	99.5	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.5	100		98.7	99	98.8
Bartha-1961-Hungary	97.3	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97	97.3	97.3		98.9	99.8
Becker-1970-USA	98.8	99	99	99	99	99	98.5	98.8	98.8	97.5		99.1
Kaplan-1959-Hungary	97.8	98	98	98	98	98	97.5	97.8	97.8	99.5	98	

表 6 PRV JL1 株 gE 基因的核苷酸及推导的氨基酸序列同源性比较

Tab 6 The nucleotide and deduced amino acid sequence homology of gE gene of PRV JL1 strain

毒株	同源性/%											
	JL1	BJYT	HeN1	JS-2012	TJ	XiangA	SC	Ea	Fa	Becker	Kaplan	NIA3
JL1		99.9	99.9	99.8	99.8	99.8	99.7	99.7	99.7	98.3	98.1	98.1
BJYT-2013-China	99.5		99.7	99.9	99.9	99.9	99.8	99.8	99.8	98.1	98	98
HeN1-2012-China	99	99.3		99.8	99.7	99.8	99.5	99.5	99.5	98.2	98	98
JS-2012-China	99.1	99.7	99.7		99.8	99.9	99.7	99.7	99.7	98	97.9	97.9
TJ-2012-China	99.3	99.8	99.1	99.5		99.9	99.7	99.7	99.7	98.2	98	98
XiangA-2012-China	99.3	99.8	99.5	99.8	99.7		99.7	99.7	99.7	98.1	97.9	97.9
SC-1987-China	99	99.5	98.8	99.1	99.3	99.3		100	100	98.1	98	98
Ea-1998-China	99	99.5	98.8	99.1	99.3	99.3	100		100	98.1	98	98
Fa-2001-China	99	99.5	98.8	99.1	99.3	99.3	100	100		98.1	98	98
Becker-1970-USA	95.8	96.2	96.2	95.9	96.4	96	96	96	96		99.3	99.7
Kaplan-1959-Hungary	96	96.4	96.4	96	96.5	96.2	96.2	96.2	96.2	99		99.1
NIA3-1971-Spain	95.7	96	96	95.7	96.2	95.9	95.9	95.9	95.9	99.5	98.8	

表 7 PRV JL1 株 gB 基因的核苷酸及推导的氨基酸序列同源性比较

Tab 7 The nucleotide and deduced amino acid sequence homology of gB gene of PRV JL1 strain

毒株	同源性/%												
	JL1	BJYT	HeN1	HB1201	JS-2012	TJ	Ea	Fa	SC	Bartha	Becker	Kaplan	NIA3
JL1		99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.6	99.7	99.7	98.4	98.6	98.7	98.6
BJYT-2013-China	99.7		100	100	100	100	99.7	99.8	99.8	98.4	98.5	98.6	98.5
HeN1-2012-China	99.7	100		100	100	100	99.7	99.8	99.8	98.4	98.5	98.6	98.5
HB1201-China	99.7	100	100		100	100	99.7	99.8	99.8	98.4	98.5	98.6	98.5

续表

毒株	同源性/%												
	JL1	BJYT	HeN1	HB1201	JS-2012	TJ	Ea	Fa	SC	Bartha	Becker	Kaplan	NIA3
JS-2012-China	99.7	100	100	100		100	99.7	99.8	99.8	98.4	98.5	98.6	98.5
TJ-2012-China	99.7	100	100	100	100		99.7	99.8	99.8	98.4	98.5	98.6	98.5
Ea-1998-China	98.9	99.2	99.2	99.2	99.2	99.2		99.9	99.9	98.2	98.3	98.4	98.3
Fa-2001-China	99.1	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.8		100	98.3	98.4	98.5	98.4
SC-1987-China	99.1	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.8	100		98.3	98.4	98.5	98.4
Bartha-1961-Hungary	97	96.9	96.9	96.9	96.9	96.9	96.4	96.6	96.6		99.1	99.5	99.1
Becker-1970-USA	97.6	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	96.9	97.2	97.2	98.6		99.2	99.9
Kaplan-1959-Hungary	97.5	97.4	97.4	97.4	97.4	97.4	96.8	97	97	99.3	99		99.2
NIA3-1971-Spain	97.5	97.4	97.4	97.4	97.4	97.4	96.8	97	97	98.5	99.7	98.9	

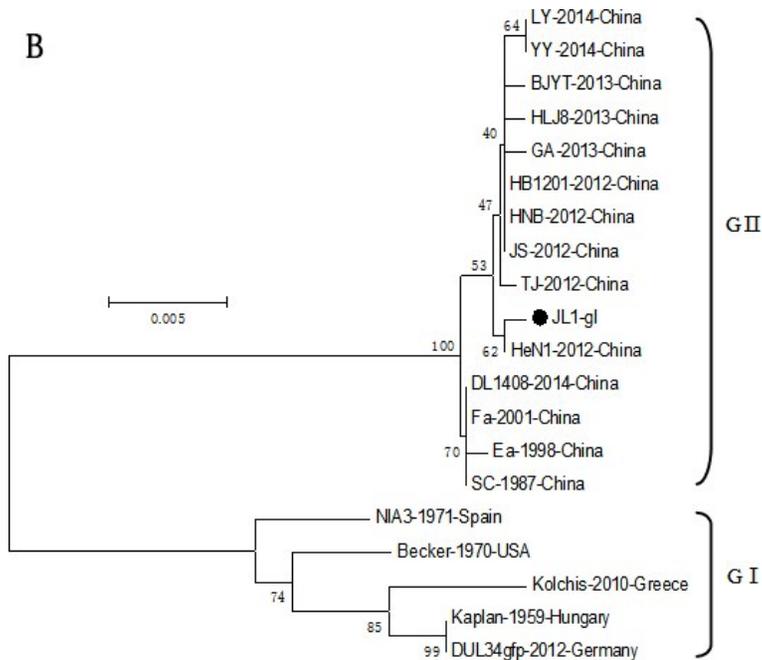
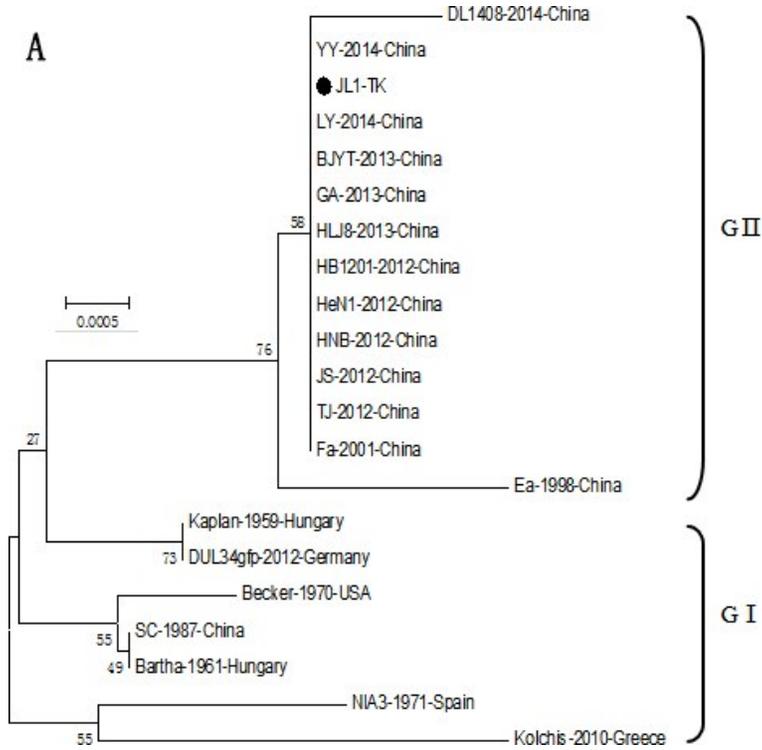
2.2.2 多序列比对分析 通过对 JL1 株 TK、gI、gD、gE 和 gB 基因进行氨基酸多序列比对分析,结果显示,与国外经典毒株 Kaplan 比较,TK 基因有 1 个氨基酸发生突变,与 Bartha-K61 相比有 2 个氨基酸发生突变,与国内近年来里流行株 JS-2012 株相比没有氨基酸发生突变,TK 基因较为保守。与国外毒株 Kaplan 和 Bartha 比较,gD 基因在第 278 位和 279 位插入两个氨基酸,即精氨酸(R)和脯氨酸(P),同时有 8 个氨基酸发生突变,与国内流行株 JS-2012 毒株具有相同的氨基酸插入和缺失。与国外经典毒株 Kaplan 比较,gI 基因在第 172 位缺失一个组氨酸(H),第 238 位插入一个甘氨酸(G),gI 基因这两处发生的缺失和插入与国内流行株 JS-2012 毒株相同,此外还发现 19 个氨基酸发生点突变。与国外经典毒株 Kaplan 比较,gE 基因在第 48 位插入一个天冬氨酸(D),第 496 位插入一个天冬氨酸(D),gE 基因这两处的插入与国内新流行株 JS-2012 株具有相同氨基酸插入,该位置发生的变异与国内报道的流行毒株变异特征相一致,此外还有 16 个氨基酸发生突变。与国外毒株 Bartha、Kaplan 相比,gB 基因在第 75~77 位缺失 3 个氨基酸,即丝氨酸(S),脯氨酸(P)和甘氨酸(G),在第 94 位插入一个甘氨酸(G),gB 基因这两处发生的缺失和插入与国内新流行株 JS-2012 毒株相同,另外在 119~122 位插入 4 个氨基酸(AAVR),gB 基

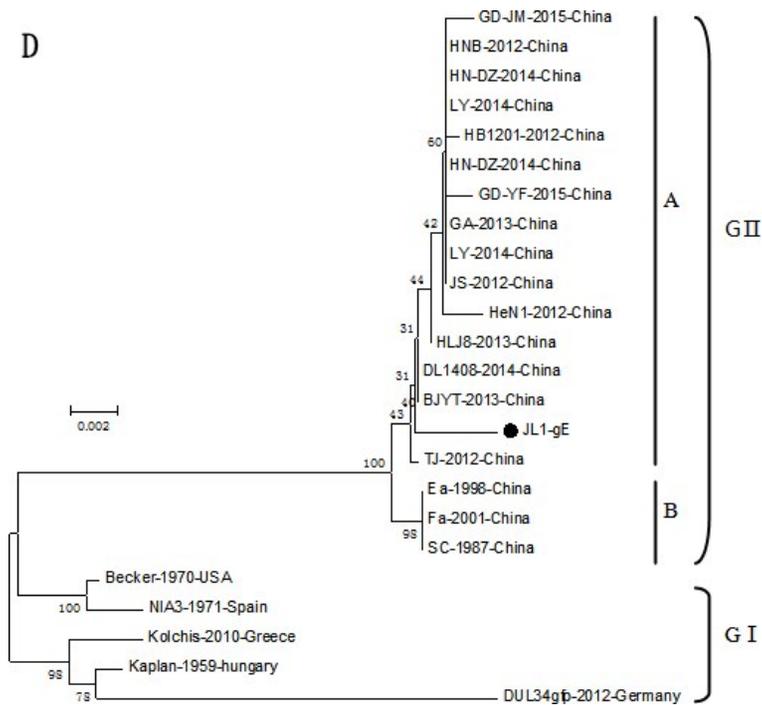
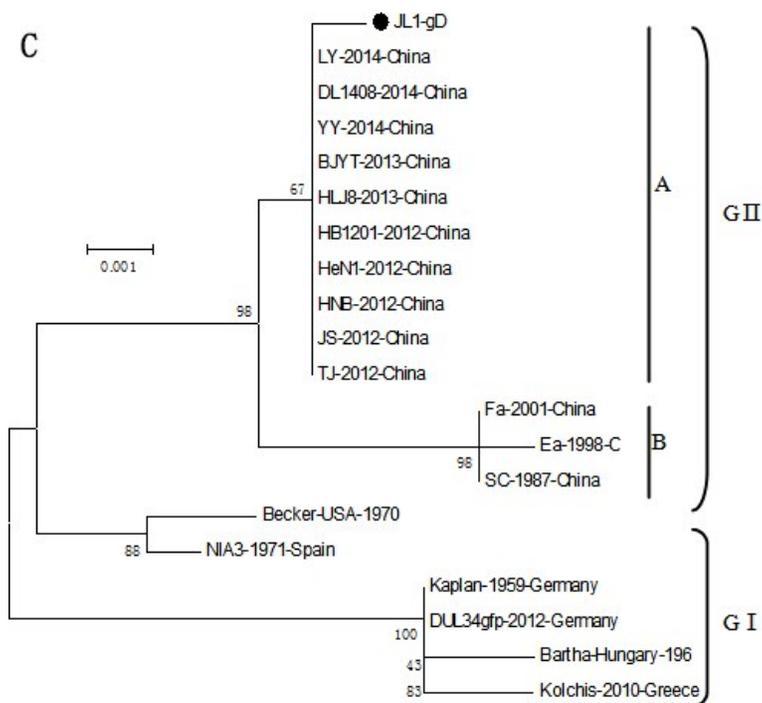
因该处发生的插入与德国分离的 DUL34gfp 毒株具有相同插入,此外还有 20 个氨基酸发生突变,该 gB 基因多处位置发生较大的变异,可能导致其抗原性发生变化。以上多序列比对结果表明,除去部分氨基酸变异,JL1 株的变异与 JS-2012 株相同。

2.2.3 遗传进化分析 如图 2 所示,将 JL1 株 TK、gI、gD、gE 和 gB 主要基因与 GeneBank 上其他参考毒株进行遗传进化树分析,PRV 根据不同国家分离的毒株可分为 2 个基因型,欧美毒株属于 G I 型,而国内毒株属于 G II 型。TK 基因遗传进化树结果如图 2A 所示,PRV JL1 毒株与中国新流行毒株处于一个分支(除了 SC 株),尤以与 LY、YY 和 BJ/YT 新流行毒株遗传关系较近,而与国外欧美毒株遗传关系相对较远。gI 基因遗传进化树结果如图 2B 所示,PRV JL1 株与国内 2012 年分离的 HeN1 变异毒株处于一个相对独立的小分支,遗传关系较近,而与欧美毒株处于不同的分支,遗传关系相对较远。gD 基因遗传进化树结果显示,欧美毒株中 Becker 和 NIA3 毒株又处于一个独立的小分支;中国毒株又可根据分离的年代不同分为 A 和 B 两个亚型,A 型包括 PRV JL1 株和国内 2012 年以后分离的新型变异毒株,B 型包括国内早期经典毒株;由图 2C 可见,JL1 毒株与中国新流行变异毒株遗传关系较近,而与欧美毒株处于不同的分支,遗传关系相对较远。gE 基因遗传进化树结果显示,国

外毒株 Becker 和 NIA3 毒株又处于一个小分支; 中国毒株又可根据其分离的年代不同分为 A 和 B 两个亚型, PRV JL1 株与国内 2012 年以后分离的新型变异毒株属于 A 亚型, 而国内早期经典毒株属于 B 亚型; 由图 2D 可见, PRV JL1 株与中国新流行毒

株 BJ/YT 和 TJ 变异毒株遗传关系较近, 而与欧美毒株处于不同的分支, 遗传关系相对较远。gB 基因遗传进化树结果如图 2E 所示, PRV JL1 株与国内 2012 年以后分离的变异毒株遗传关系较近, 而与欧美毒株处于不同的分支, 遗传关系相对较远。





### 3 讨论

2012 年以来,新型猪伪狂犬病已经发生在中国大部分 Bartha-K61 疫苗免疫猪场。由于新型的 PRV 变异株的出现导致中国猪场感染 PRV 局势日

益恶化,对养猪业造成巨大的影响。研究报道<sup>[9-11]</sup>表明,这些新出现的 PRV 变异株的致病性高于以前 PRV 分离株,其免疫原性也不同于 Bartha-K61 疫苗,造成传统疫苗不能对变异株提供有效的免疫

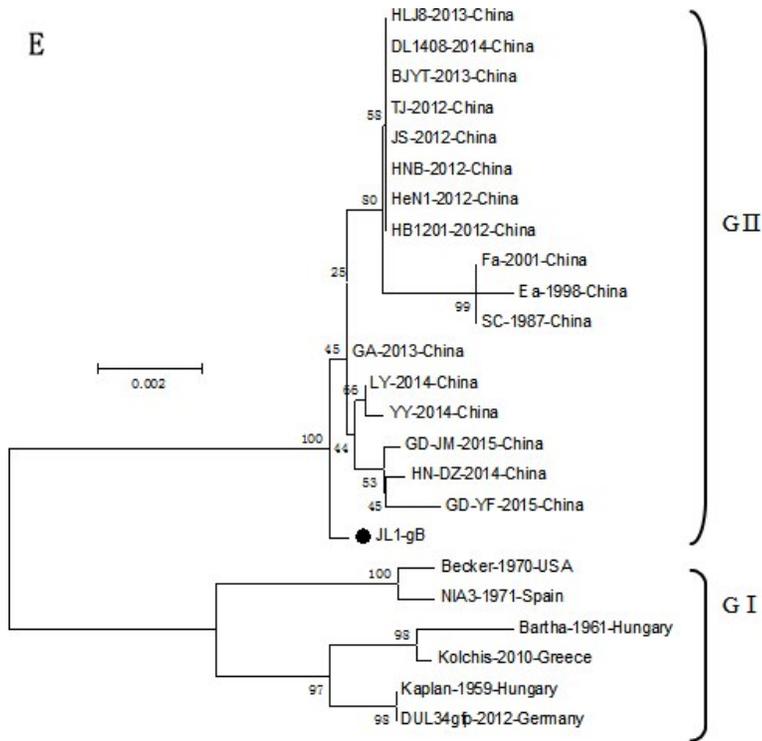


图 2 JL1 株 TK、gI、gD、gE 和 gB 基因系统进化树分析图

Fig 2 Phylogenetic tree analysis for TK (A) , gI (B) , gD (C) , gE (D) , gB (E) genes of PRV JL1 strain

保护。不同毒株遗传进化分析表明,PRV 可根据区域的不同划分为 2 种不同的基因类型,中国分离株属于基因 II 型,欧美国家分离株属于基因 I 型。这些新爆发的 PRV 变异毒株之间的亲缘关系较近而与欧美国家分离的 Bartha 株遗传关系较远,这可能也解释了 PRV 再次出现在 Bartha-K61 疫苗免疫猪场的原因。另外,中国近几年分离的 PRV 变异株与以前分离株相比,新流行毒株在基因和蛋白水平上发生了变异,进而导致现有疫苗保护率降低,疫病难以防控,这些基因变异可能也是导致传统猪伪狂犬病疫苗接种失败的一个关键因素。

为更好了解吉林省某地区 PRV 流行及遗传变异情况,对 PRV JL1 株 TK、gD、gI、gE 和 gB 基因进行了克隆测序,与 Genbank 上已发表参考毒株在核苷酸和氨基酸水平上进行同源性比对和多序列比对分析,并绘制了遗传进化树。其中核苷酸和氨基酸同源性比对表明,PRV JL1 毒株与国内近几年新流行 PRV 毒株在核苷酸和氨基酸水平上同源性较高,而与国外经典毒株同源性较低。遗传进化树分

析表明,PRV JL1 株与中国近年来不同地区分离的新型 PRV 变异株遗传关系密切相关,而与国外经典毒株遗传关系较远,表明 JL1 毒株属于中国 PRV 新流行的变异毒株。氨基酸多序列比对表明,与 GenBank 中其他的参考毒株相比,PRV JL1 毒株表现了广泛的变化,包括在大多数病毒蛋白发生替换、插入和或缺失。其 gD 基因在第 278 位和 279 位插入两个氨基酸(RP),gI 基因在第 172 位缺失一个组氨酸(H)和第 238 位插入一个甘氨酸(G),gE 基因在第 48 位和第 496 位各插入一个天冬氨酸(D),gE 基因该两处的插入为近几年 PRV 变异株特征变异位点,该位置发生的变异与国内范克伟<sup>[12]</sup>和 Fan<sup>[13]</sup>报道的流行毒株变异特征相一致,这也表明该 JL1 毒株属于我国近几年的新流行毒株。gB 基因在第 75 ~ 77 位缺失 3 个氨基酸(SPG),第 94 位插入一个甘氨酸(G),另外在 119~122 位插入 4 个氨基酸(AAVR),gB 基因该处发生的插入与德国分离的 DUL34gfp 毒株具有相同插入。因此,PRV JL1 株重要基因的变异可能导致

PRV 毒力和抗原性发生变化。

总而言之,通过对 PRV JL1 毒株重要基因 (TK、gI、gD、gE、gB) 的遗传变异分析表明 PRV JL1 毒株不同于以前的分离株,具有 PRV 新流行变异株独特的变异特征。但这些氨基酸残基的变异对 PRV 变异株毒力及免疫原性的影响是否是导致中国近几年猪群 PRV 广泛流行的原因有待进一步研究。

## 参考文献:

- [1] Klupp B G, Hengartner C J, Mettenleiter T C, *et al.* Complete, annotated sequence of the pseudorabies virus genome[J]. *J Virol*, 2004, 78: 424-440.
- [2] Trusczyński M, Pejsak Z. Epizootic importance of the reservoir of Aujeszky's disease virus in feral swine and wild boars[J]. *Journal of Mathematical Analysis & Applications*, 2008, 357 (2): 385-402.
- [3] 杨涛涛, 赵墩, 刘崇灵, 等. 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[J]. *中国畜牧兽医*, 2016, 43(1): 50-57.
- Yang T T, Zhao D, Liu C L, *et al.* Isolation and identification of four strains of pseudorabies virus in Hunan province and sequence analysis of their related genes of immunity and virulence [J]. *Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2016, 43(1): 50-57.
- [4] 冷依伊, 任梅彦, 蒙正群, 等. 猪伪狂犬病病毒致病机理及其变异的研究进展[J]. *养猪*, 2016, (5): 121-126.
- Leng Y Y, Ren M S, Meng Z Q, *et al.* Progress in the pathogenesis and variation of the pseudorabies virus [J]. *Swine Production*, 2016, 5: 121-126.
- [5] 孙佳楠, 王楠楠, 王瑞, 等. 猪伪狂犬病病毒 LN1301 株分离鉴定及其 gE 和 TK 基因的变异分析[J]. *中国兽医学报*, 2016, 36(8): 1324-1329.
- Sun J N, Wang N N, Wang R, *et al.* Isolation and identification of porcine pseudorabies virus LN1301 strain and analysis of the variation of gE and TK genes [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2016, 36(8): 1324-1329.
- [6] 祖立闯, 沈志强, 郭广君, 等. 猪伪狂犬病病毒 gD 蛋白的截短

表达与 PPA-ELISA 抗体检测方法的建立[J]. *家畜生态学报*, 2014, 35(1): 54-60.

- Zu L C, Shen Z Q, Guo G J, *et al.* The expression of gD protein of porcine pseudorabies virus and establishment of a method for the detection of antibody against PPA-ELISA [J]. *Acta Ecologica Animalis Domastici*, 2014, 35(1): 54-60.
- [7] 任卫科, 池晶晶, 李秀丽, 等. 伪狂犬病毒主要毒力基因的研究进展[J]. *畜牧兽医学报*: 电子版, 2017, (8): 12-13.
- Ren W K, Chi J J, Li X L, *et al.* Process in research on the major virulence genes of pseudorabies [J]. *Graziery Veterinary Sciences*, 2017, 8: 12-13.
- [8] 樊振华, 孟帆, 吴忻, 等. 猪伪狂犬病病毒山西株胸苷激酶基因序列分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2014, 41(4): 12-17.
- Fan Z H, Meng F, Wu X, *et al.* Sequence analysis of thymidine kinase gene of porcine pseudorabies virus strain Shanxi [J]. *Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary*, 2014, 41 (4): 12-17.
- [9] Wu R, Bai C, Sun J, *et al.* Emergence of virulent pseudorabies virus infection in northern China [J]. *J Vet Sci*, 2013, 14: 363-365.
- [10] Luo Y, Li N, Cong X, *et al.* Pathogenicity and genomic characterization of a pseudorabies virus variant isolated from Bartha-K61-vaccinated swine population in China [J]. *Vet Microbiol*, 2014, 174: 107-115.
- [11] Yang Q Y, Sun Z, Tan F F, *et al.* Pathogenicity of a currently circulating Chinese variant pseudorabies virus in pigs [J]. *World Journal of Virology*, 2016, 5(1): 23.
- [12] 范克伟, 戴爱玲, 李晓华, 等. 猪源伪狂犬病病毒福建龙岩分离株的鉴定及其 TK 基因和 gE 基因的分子特征[J]. *中国兽医学报*, 2015, 10: 1021-1030.
- Fan K W, Dai A L, Li X H, *et al.* Identification of porcine pseudorabies virus Fujian Lonyan isolate and its molecular characteristics of TK genes and gE gene [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2015, 10: 1021-1030.
- [13] Fan J, Zeng X, Zhang G, *et al.* Molecular characterization and phylogenetic analysis of pseudorabies virus variants isolated from Guangdong province of southern China during 2013-2014 [J]. *Journal of Veterinary Science*, 2016, 17(3): 369-375.