

Comparison of the gB and gD Sequences of Feline Infectious Rhinotracheitis Virus

Jian Liu, Feng Xu, Xianchao Yang, Xin Li, Dequan Yang, Bo Deng, Houbin Ju, Jinping Zhou*

Shanghai Animal Disease Prevention and Control Center, Shanghai
Email: 403856321@qq.com, *shzjpvvet@163.com

Received: Jan. 2nd, 2018; accepted: Jan. 16th, 2018; published: Jan. 23rd, 2018

Abstract

[Objective] To compare the gB and gD sequences of the Feline Infectious Rhinotracheitis virus. [Methods] The gB and gD sequences of 5 isolates and 1 vaccine strain of Feline Infectious Rhinotracheitis virus were sequenced, and the nucleotides and amino acids of them were compared. [Results] The gB sequences of the isolates were partially mutated and were highly homologous to the vaccine strain. The amino acids of the isolates were also partially mutated. The gD sequences were not mutated. [Conclusion] The gB sequences of Feline Infectious Rhinotracheitis virus isolates were mutated, but they were homologous with vaccine strain.

Keywords

Feline Infectious Rhinotracheitis Virus, gB, gD, Sequence

猫传染性鼻气管炎病毒gB和gD序列比对

刘健, 徐锋, 杨显超, 李鑫, 杨德全, 邓波, 鞠厚斌, 周锦萍*

上海市动物疫病预防控制中心, 上海
Email: 403856321@qq.com, *shzjpvvet@163.com

收稿日期: 2018年1月2日; 录用日期: 2018年1月16日; 发布日期: 2018年1月23日

摘要

【目的】比较猫传染性鼻气管炎病毒gB和gD序列差异。【方法】采用测序方法对传染性鼻气管炎病毒5株分离株和1株疫苗株的gB和gD序列进行序列测定, 并比较核苷酸和氨基酸差异。【结果】结果表明分离株gB序列发生了部分变化, 并且与疫苗株高度同源, 其氨基酸也同样发生部分变化, gD序列没有变化。

*通讯作者。

文章引用: 刘健, 徐锋, 杨显超, 李鑫, 杨德全, 邓波, 鞠厚斌, 周锦萍. 猫传染性鼻气管炎病毒 gB 和 gD 序列比对[J]. 亚洲兽医病例研究, 2018, 7(1): 8-13. DOI: 10.12677/acrpvm.2018.71002

【结论】猫传染性鼻气管炎病毒分离株gB序列有变化，但与疫苗株同源性一致。

关键词

猫传染性鼻气管炎病毒，gB，gD，测序

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

猫传染性鼻气管炎(Feline Infectious Rhinotracheitis)是由疱疹病毒科甲型疱疹病毒亚科的猫疱疹病毒 I 型(Feline Herpesvirus Type 1, FHV-1)引起的以急性上呼吸道症状为特征的猫高度接触性传染病[1]，猫传染性鼻气管炎为非烈性传染病，从分离病毒到现在已有半个多世纪。作为猫的重要传染病，至今尚无特效药控制其发生和复发，在诊断和预防方面没有简便快速的方法。其病毒基因组编码多种蛋白质，其中包括 7 种糖蛋白，分别是 gB、gC、gD、gG、gH、gI 和 gE [2]。在这些糖蛋白中，gB 是主要免疫原性蛋白，在哺乳动物细胞中表达，引起细胞融合和多核体形成，是病毒复制必需的；gD 在病毒与细胞牢固吸附中起主要作用，在机体免疫中是主要的中和抗体[3]。他们在临床诊断和疫病预防方面具有重要意义，近几年也是研究的热点。

本研究通过对已分离鉴定的 5 株 FHV-1 病毒进行 gB 和 gD 序列测定，分析其核苷酸和氨基酸同源性差异，并比较了分离株与疫苗株之间的差异。

2. 材料与方法

2.1. FHV-1 分离株和疫苗株

FHV-1 分离株为本实验室保存，毒株编号分别为 FHV-1/cat/Shanghai/01/2014、FHV-1/cat/Shanghai/02/2014、FHV-1/cat/Shanghai/03/2014、FHV-1/cat/Shanghai/04/2014 和 FHV-1/cat/Shanghai/05/2014；疫苗株为商品化的疫苗。

2.2. 试剂

DNA 提取试剂盒购自上海睿安生物科技有限公司，批号：DN-VR-100；10 × 缓冲液、dNTP、rTaq 聚合酶、限制性内切酶 *Xba*I、*Hind* III、DL2000 Marker 均购自 TaKaRa 大连生物工程有限公司；质粒提取试剂盒购自北京博大泰克生物基因技术有限责任公司，批号：20150309。

2.3. DNA 提取

- 1) 取 200 μ L 待检样品于 1.5 mL 离心管中，加入 400 μ L Lysis Buffer，振荡混匀，室温孵育 10 分钟；
- 2) 加入 450 μ L Binding Buffer (已加无水乙醇)，振荡混匀，将 600 μ L 混合液转移到吸附柱中，12,000 rpm 离心 1 分钟。弃掉废液，将吸附柱放入同一收集管中。
- 3) 将剩余的混合液转移到吸附柱中，12,000 rpm 离心 1 分钟。将吸附柱放入新的收集管中。
- 4) 加入 400 μ L WB1，12,000 rpm 离心 30 秒，弃掉废液，将吸附柱放入同一收集管中。
- 5) 加入 600 μ L WB2 (已加无水乙醇)，12,000 rpm 离心 30 秒，弃掉废液，将吸附柱放入同一收集管

中, 12,000 rpm 空柱离心 3 分钟。

6) 将吸附柱放入一个干净的 1.5 mL 离心管中, 在吸附柱的膜中央小心加入 50 μ L Elution Buffer, 室温静置 2 分钟。12,000 rpm 离心 1 分钟收获纯化的核酸溶液, -20°C 保存备用。

2.4. gB 和 gD 片段的扩增

根据 GenBank 中的 FHV-1 已知 gB 和 gD 序列(S49775.1 和 FW654040)设计 3 对特异性引物用于扩增 gB 和 gD 片段[4], 引物序列见表 1。均由上海鼎安生物工程有限公司合成, 用 DEPC 水稀释至 25 pmol/L, -20°C 保存备用。

PCR 反应采用 50 μ L 反应体系, 其中 $10\times$ 缓冲液(Mg^{2+} free) 5.0 μ L; MgCl_2 (25 mM) 4.0 μ L; dNTP (2.5 mM) 4.0 μ L; 上游引物($25\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 1.0 μ L; 下游引物($25\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 1.0 μ L; cDNA 10.0 μ L; Taq DNA 聚合酶 5 个单位, 加 DEPC 水至 50.0 μ L。

反应条件: 94°C 预变性 3 min; 94°C 变性 50 s, 退火 45 s, 72°C 延伸 90 s, 共 34 个循环; 72°C 延伸 10 min 后, 4°C 保存。

2.5. 目的条带的克隆及鉴定

将扩增出的目的条带进行胶回收, 按照 DNA 胶回收试剂盒的操作要求进行, 并取回收产物与 T 载体连接。连接反应体系为: 胶回收的产物 7 μ L, $10\times$ 连接缓冲液 1 μ L, T 载体 1 μ L, DNA 连接酶 1 μ L, 4°C 连接过夜, 然后转化至感受态细胞, 在 IPTG、X-gal 诱导下 37°C 培养 12~16 h。挑取白斑菌落接种 LB 液体培养基, 培养过夜后提取质粒, 将质粒用限制性内切酶 *Xba*I 和 *Hind* III 进行阳性重组子的双酶切鉴定。

2.6. gB 和 gD 核苷酸序列的测定

取上述经双酶切鉴定的阳性重组质粒送上海桑尼生物技术有限公司进行测序, 利用 DNASTAR 软件将测序结果同已发表的序列进行比对, 确定各 FHV-1 分离株与已发表的毒株和疫苗株核苷酸序列的同源性, 同时绘制核苷酸系统进化树。

3. 结果

3.1. gB 和 gD 序列核苷酸同源性

5 个分离株与疫苗株 gB 序列同源性的为 100%, 与 S49775.1 同源性为 99.9%。gD 序列同源性都为 100% (见图 1 和图 2)。

3.2. gB 氨基酸突变位点

分离株和疫苗株与已公开株相比, 出现 3 个突变位点(见图 3)。

3.3. gB 系统发育树

5 株分离株与疫苗株在同一分支上, 与已公开株处于不同分支(见图 4)。

4. 讨论

研究表明, FHV-1 的 gB 序列核苷酸有变化, 测序的 5 株病毒的 gB 同源性为 100%, 与疫苗株的同源性也为 100%, 但是与已公布的分离株 FW564040 同源性为 99.9%。核苷酸存在 4 个位点的改变, 其中 1367 位的 G 变为 C, 1451 位的 T 变为 C, 2232 位的 C 变为 A, 以及 2487 位的 G 变为 C, 相应的

引起了3个氨基酸的改变,氨基酸456位由半胱氨酸(C)变为丝氨酸(S),484位由缬氨酸(V)变为丙氨酸(A),744位由天冬氨酸(D)变为谷氨酸(E)。对 FHV-1 糖蛋白的研究表明,纯化的 gB 在小鼠体内能诱导产生高滴度的病毒来中和抗体,表达 gB 的痘苗病毒在家兔体内也能刺激产生相当高滴度的病毒来中和抗体。Spatz 等[5]用表达 FHV-1 gB 的质粒肌肉注射免疫小鼠,也能诱导产生 gB 的特异性抗体。因此, gB 可作为抗 FHV-1 感染的亚单位疫苗中的非常重要的研究对象。本研究的分离株 gB 序列发生了部分变化,并

		Percent Identity							
		1	2	3	4	5	6	7	
Divergence	1	■	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	1 S49775.1 gB
	2	0.1	■	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	2 FHV-1catShanghai012014
	3	0.1	0.0	■	100.0	100.0	100.0	100.0	3 FHV-1catShanghai022014
	4	0.1	0.0	0.0	■	100.0	100.0	100.0	4 FHV-1catShanghai032014
	5	0.1	0.0	0.0	0.0	■	100.0	100.0	5 FHV-1catShanghai042014
	6	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	■	100.0	6 FHV-1catShanghai052014
	7	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	■	7 VACCINE
		1	2	3	4	5	6	7	

Figure 1. Percent identity of FHV-1 isolate gB genes
图 1. FHV-1 分离株 gB 序列同源性

		Percent Identity							
		1	2	3	4	5	6	7	
Divergence	1	■	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1 FHV-1catShanghai012014
	2	0.0	■	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	2 FHV-1catShanghai022014
	3	0.0	0.0	■	100.0	100.0	100.0	100.0	3 FHV-1catShanghai032014
	4	0.0	0.0	0.0	■	100.0	100.0	100.0	4 FHV-1catShanghai042014
	5	0.0	0.0	0.0	0.0	■	100.0	100.0	5 FHV-1catShanghai052014
	6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	■	100.0	6 FW564040.gD
	7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	■	7 VACCINE
		1	2	3	4	5	6	7	

Figure 2. Percent identity of FHV-1 isolate gD genes
图 2. FHV-1 分离株 gD 序列同源性

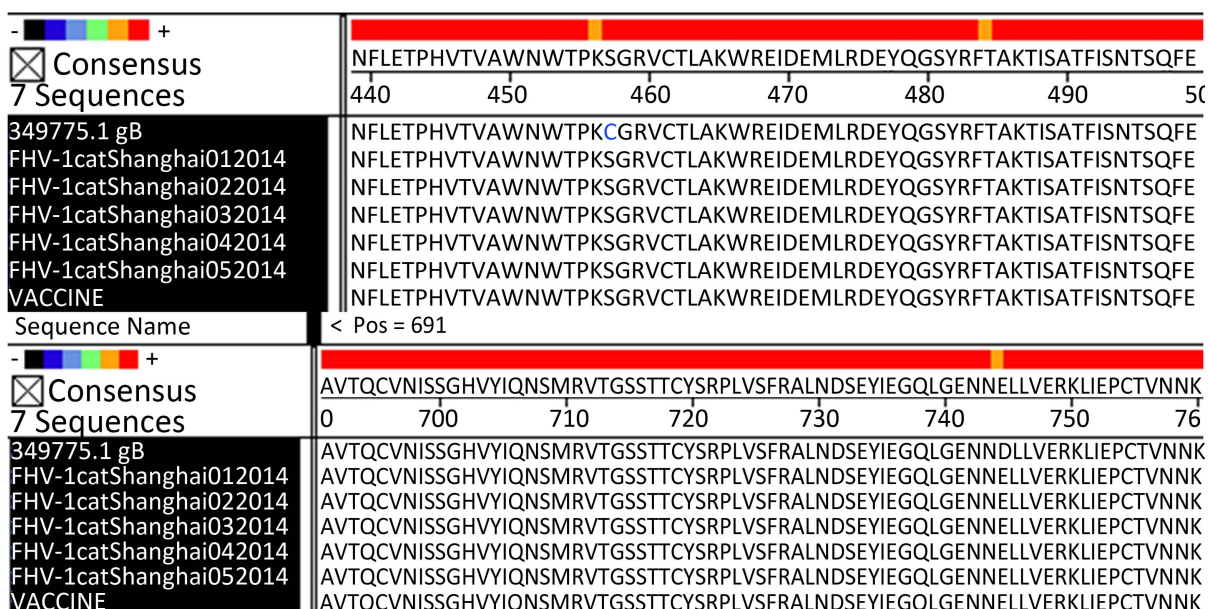


Figure 3. FHV-1 isolates gB amino acid mutation sites
图 3. FHV-1 分离株 gB 氨基酸突变位点

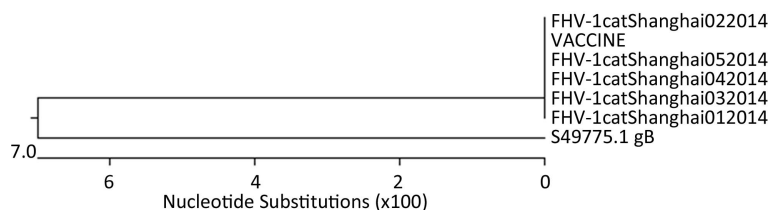


Figure 4. FHV-1 isolates phylogenetic tree of gB genes
图 4. FHV-1 分离株 gB 基因进化树

且与疫苗株高度同源，但是根据分离株背景调查[6]，病毒来源于非免疫猫，且为出现典型症状的疑似病例，所以可以排除分离株来源于疫苗的可能。

FHV-1 的 gD 序列核苷酸同源性都为 100%，没有任何的改变。而 gD 蛋白具有血凝特性，能产生血凝与血凝抑制作用[7]。Maeda 等[8]发现表达猫疱疹病毒 I 型 gD 蛋白的昆虫细胞可吸附猫的细胞，但不吸附牛、猪和犬的细胞，而且这种吸附可以被相对应的单克隆抗体抑制，此外，猫疱疹病毒 I 型 gD 蛋白和犬疱疹病毒 gD 蛋白只能凝集各自宿主的红细胞[7]，由此推测，这表明 gD 蛋白在病毒感染的宿主细胞选择上具有特异性。本研究的分离株对猫红细胞没有血凝作用[6]，在 gD 蛋白没有发生改变的情况下，是什么原因引起其血凝特性的丧失还需要进一步的研究。

FHV-1 潜伏于三叉神经造成潜伏感染和散毒，患病动物可终身带毒，给 FHV-1 的防治带来很大困难。因此，本病作为主要问题而持续存在，给我们带来的危害是不可预测的，大部分国家对其控制和消灭的计划仍然任重道远。随着分子生物学的不断发展，人们对 FHV-1 的认识越来越深刻，在基因组结构域分子生物学功能和基因表达调控等方面的研究不断取得进展，大大加快了开发高效、无毒副作用的基因工程疫苗的研究进程，并显示出良好的前景[9]。gB 蛋白作为主要的囊膜蛋白，应充分发挥其 gB 蛋白相关 ELISA 诊断方法和 gB 亚单位疫苗等的研究；gD 蛋白作为研究疱疹病毒亚单位疫苗常选择的靶蛋白，具有较好的免疫原性[10]。本研究揭示了上海地区 FHV-1 流行株 gB 和 gD 序列的部分特征，对 FHV-1 的防控、快速检测试剂的研制，及其新型疫苗的开发具有重要的意义和价值。

5. 结论

本研究的结果表明，上海地区猫传染性鼻气管炎病毒分离株 gB 序列有变化，但与疫苗株同源性一致。

基金项目

上海市市级农口系统青年人才成长计划(沪农青字(2015)第 2-8 号)；上海市农业基础性项目(沪农科攻字(2014)第 7-3-3 号)。

参考文献 (References)

- [1] 黄明. 猫传染性鼻气管炎研究进展[J]. 山东畜牧兽医, 2013, 34(9): 80-82.
- [2] Maeda, K., Horimoto, T. and Mikami, T. (1998) Properties and Functions of Feline Herpesvirus Type 1 Glycoproteins. *Journal of Veterinary Medical Science*, **60**, 881-888. <https://doi.org/10.1292/jvms.60.881>
- [3] 张继一, 王竹, 刘宝山. 猫疱疹病毒 I 型部分糖蛋白的研究进展[J]. 养殖技术顾问, 2013(5): 212-213.
- [4] 林颖, 刘宝山, 任会军, 等. 猫传染性鼻气管炎 PCR 检测方法的建立[J]. 现代畜牧兽医, 2010(8): 71-73.
- [5] Spatz, S.J. and Maes, R.K. (1993) Immunological Characterization of the Feline Herpesvirus-1 Glycoprotein B and Analysis of Its Deduced Amino Acid Sequence. *Virology*, **197**, 125-136. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1573>
- [6] 刘健, 李鑫, 徐锋, 等. 猫传染性鼻气管炎病毒的分离与鉴定[J]. 中国动物传染病学报, 2016, 24(1): 22-26.
- [7] 张硕, 李纯玲, 汪葆玥, 等. 猫疱疹病毒 I 型的分离与鉴定[J]. 实验动物科学, 2010, 27(2): 21-25.

-
- [8] Maeda, K., Ono, M., Yokoyama, N., *et al.* (1996) Expression and Properties of Felineherpesvirus Type 1 gD (Hemagglutinin) by a Recombinant Baculovirus. *Virus Research*, **46**, 75-80.
[https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(96\)01376-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(96)01376-7)
- [9] 刘宝山, 林颖, 尹荣焕, 等. 猫疱疹病毒 1 型 PCR 检测方法的建立[J]. 畜牧与兽医, 2010, 42(1): 74-76.
- [10] Maes, R. (2012) Felid Herpesvirus Type 1 Infection in Cats: A Natural Host Model for Alphaherpesvirus Pathogenesis. *ISRN Veterinary Science*, **2012**, Article ID: 495830.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2169-8880, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>
期刊邮箱: acrpvm@hanspub.org