

# 牛传染性鼻气管炎病毒内蒙古分离株 *gB*、*gC*、*gD* 基因的分子克隆与序列分析

胡文兵<sup>1,2</sup>, 关平原<sup>1,4\*</sup>, 郝瑞峰<sup>1</sup>, 赵鹏伟<sup>1</sup>, 乌日罕<sup>3</sup>

(1. 内蒙古农业大学兽医学院, 呼和浩特 010018; 2. 巴州动物卫生监督所, 库尔勒 841000;

3. 内蒙古动物疫病预防控制中心, 呼和浩特 010010; 4. 农业部动物疾病临床诊疗技术重点实验室, 呼和浩特 010018)

**摘要:** 对牛传染性鼻气管炎病毒(IBRV)内蒙古分离株 *gB*、*gC*、*gD* 基因进行克隆和序列测定, 结果表明 IBRV 内蒙古分离株 *gB*、*gC*、*gD* 基因序列分别为 2 850、1 723、1 559 bp, 编码 933、508、417 个氨基酸组成的完整开放阅读框。序列比较和系统进化树分析结果显示: 内蒙古分离株与其他毒株 *gB*、*gC*、*gD* 基因核苷酸序列的相似性为 94.9%~99.9%, 其推导的氨基酸相似性在 90.3%~99.7%, 不同 IBRV 毒株 *gB*、*gC*、*gD* 基因在核苷酸和氨基酸水平上高度保守。在系统进化树中内蒙古分离株与瑞典毒株亲缘关系较近, 属于同一个分支。

**关键词:** 牛传染性鼻气管炎病毒; *gB* 基因; *gC* 基因; *gD* 基因; 分子克隆; 序列分析

中图分类号: S852.659.1

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)06-0965-07

## Cloning and Sequence Analysis of the *gB*, *gC*, *gD* Genes of IBRV from Inner Mongolia

HU Wen-bing<sup>1,2</sup>, GUAN Ping-yuan<sup>1,4\*</sup>, HAO Rui-feng<sup>1</sup>, ZHAO Peng-wei<sup>1</sup>, Wurihan<sup>3</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China;

2. Xinjiang Bazhou Animal Health Inspection Institute, Korla 841000, China; 3. Center of Prevent and Control of Animal Disease of Inner Mongolia, Hohhot 010010, China; 4. Key Laboratory of Clinical Diagnosis and Treatment Technology in Animal Disease, Ministry of Agriculture, Hohhot 010018, China)

**Abstract:** The *gB*, *gC* and *gD* genes of Inner Mongolia IBRV strain were cloned and sequenced. The results showed that the *gB*, *gC* and *gD* genes were 2 850, 1 723 and 1 559 bp, respectively. And the 3 genes contained their corresponding open reading frames (ORF) which encoding 933, 508 and 417 amino acids, respectively. The *gB*, *gC* and *gD* genes of Inner Mongolia strain shared 94.9% to 99.9% homology in nucleotide with others strain from GenBank, and shared 90.3% to 99.7% homology in deduced amino acid sequence by the sequences and phylogenetic analysis. The *gB*, *gC* and *gD* genes were highly conserved among IBRV strains. Phylogenetic tree of IBRV revealed that the Inner Mongolia strain was consistently located in the same lineages with Sweden strain.

**Key words:** Bovine infectious rhinotracheitis virus; *gB* gene; *gC* gene; *gD* gene; molecular cloning; sequence analysis

牛传染性鼻气管炎病毒(Infectious bovine rhinotracheitis virus, IBRV)亦称牛疱疹病毒 I 型

(Bovine herpes virus 1, BHV-1),能够引起牛广泛的临床症状,严重的传染性鼻气管炎(IBR)、传染性

收稿日期: 2011-09-05

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金资助项目(20080404MS0408)

作者简介: 胡文兵(1979-),男,山东人,讲师,主要从事动物传染病学研究, Tel: 0996-2683001, E-mail: hwb848636@163.com

\* 通讯作者: 关平原, E-mail: gpynm@yahoo.com.cn

化脓性外阴阴道炎、流产、关节炎、脑膜脑炎和生殖系统损害均可能与 IBRV 有关<sup>[1]</sup>。IBRV 是导致养牛业重大经济损失的一种重要病原,因此,牛传染性鼻气管炎被世界动物卫生组织(OIE)规定为法定上报疾病。IBRV 与其他疱疹病毒一样,病毒囊膜中存在多个病毒-细胞相互作用的糖蛋白。gB 能引起细胞融合和多核体形成,对病毒复制是必需的<sup>[2-3]</sup>;gC 是 IBRV 最为重要的吸附蛋白之一,病毒吸附细胞需要 gC 与细胞肝素样受体协同作用<sup>[4]</sup>。此外,疱疹病毒的 gC 基因与细胞表面的糖蛋白作用,能够产生大量的中和抗体<sup>[5]</sup>;gD 是病毒粒子表面和病毒感染细胞的主要分子,抗此糖蛋白的单克隆抗体在病毒吸附后中和病毒,并显示出较高的中和效价。鼠和牛的免疫试验显示,gD 能够引起比 gB、gC 更强而持久的细胞免疫<sup>[6-7]</sup>。

笔者对内蒙古地区分离的 IBRV 的 gB、gC 和 gD 基因进行扩增、克隆、序列分析,为进一步研究 IBRV 理化特性和分子特征,进行 IBRV 的流行病学调查及研究基因工程亚单位疫苗、基因疫苗奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 毒株

IBRV 内蒙古分离株(简写 IBRV/NM06),由内蒙古农业大学动物传染病课程组分离并保存<sup>[8]</sup>。

### 1.2 病毒培养及核酸提取

病毒接种于长成单层的 MDBK 细胞后,待完全出现病变时收毒。按照 V-gene 公司 DNA 提取试剂盒说明提取总 DNA。

### 1.3 参考毒株基因序列

参考毒株序列均来自 GenBank。

### 1.4 试剂

DNA 提取试剂盒, pMD19-T 载体, LA Taq 酶, GC buffer 缓冲液, dNTPs, DNA Marker, Xba I、Sal I 等均购自宝生物工程(大连)有限公司;胶回收试剂盒,质粒提取试剂盒为 Axygen 产品;X-gal, IPTG 和氨苄青霉素购自 Sigma 公司。克隆菌株 *E. coli* DH5 $\alpha$  由内蒙古大学生命科学院惠赠。

### 1.5 引物的设计与合成

根据 GenBank 发表的 IBRV 序列(NC\_001847),设计了 4 对特异性引物分别对 gB、gC、gD 基因扩增,其中 gB 基因分 2 段。gB 基因预扩增片段大小为 2 850 bp, gC 基因预扩增片段大小为 1 723 bp, gD 基因预扩增片段大小为 1 559 bp。引

物序列由宝生物工程(大连)有限公司合成,灭菌 ddH<sub>2</sub>O 稀释浓度为 20 pmol ·  $\mu\text{L}^{-1}$ ,分装存于 -70 °C 备用。

### 1.6 PCR 扩增及产物的回收

在 PCR 管中依次加入 2 × GC Buffer II 12.5  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 9  $\mu\text{L}$ , 引物各 0.5  $\mu\text{L}$ , dNTP 1  $\mu\text{L}$ , 模板 1  $\mu\text{L}$ , LA Taq 0.5  $\mu\text{L}$ , 建立 25  $\mu\text{L}$  的扩增反应体系,瞬时离心混匀,同时作一阴性对照。gB、gC、gD 基因 PCR 反应参数:

gB1 片段:95 °C 5 min, 95 °C 60 s, 66 °C 45 s, 72 °C 50 s; 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min。

gB2 片段:95 °C 5 min, 95 °C 60 s, 64 °C 60 s, 72 °C 60 s; 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min。

gC 片段:95 °C 5 min, 95 °C 60 s, 62 °C 60 s, 72 °C 60 s; 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min。

gD 片段:95 °C 4 min, 95 °C 60 s, 63 °C 45 s, 72 °C 50 s; 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min。

反应结束后, PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析,切胶后用凝胶回收试剂盒回收并纯化。

### 1.7 PCR 产物的克隆与鉴定

将纯化的目的 DNA 片段与 PMD19-T 载体 16 °C 连接过夜,按常规方法<sup>[9]</sup>将连接产物转化至 DH5 $\alpha$  感受态细胞中,在含氨苄、X-gal、IPTG 的 LB 平板培养基 37 °C 培养 14 h。选择白色菌落接种 LA 培养基过夜培养,提取质粒后进行 PCR 鉴定和酶切鉴定。

### 1.8 DNA 序列测定和分析

将 PCR、酶切鉴定含阳性重组质粒的菌液送宝生物工程(大连)有限公司测序,测定结果用 DNA Star 软件进行序列的同源性比较分析,并构建进化树。

## 2 结果

### 2.1 gB、gC、gD 基因 PCR 扩增结果

PCR 扩增后,产物经凝胶电泳于紫外凝胶成像仪上观察,结果 gB1、gB2、gC、gD 分别约在 1 260、1 743、1 723、1 559 bp 处可见清晰条带(图略),片段大小与预期相一致。

### 2.2 重组质粒的鉴定

对 gB1、gB2、gC、gD 基因 PCR 扩增产物进行克隆,随机选取无重叠的单一白色菌落进行重组质粒的 PCR 鉴定。结果显示, gB1、gB2、gC、gD 重组质粒分别在 1 260、1 743、1 723、1 559 bp 左右的位置出现目的条带(图略),与预期结果一致,说明

*gB1*、*gB2*、*gC*、*gD* 基因已经成功插入载体中,成功地被克隆。

### 2.3 重组质粒的酶切鉴定结果

*gB1*、*gB2*、*gC* 和 *gD* 基因的重组质粒经 PCR 鉴定后提取质粒,用 *Xba* I 酶和 *Sal* I 酶分别对质粒进行酶切鉴定,结果显示,大约在 1 260、1 743、1 723、1 559 bp 的位置出现目的条带和约 2 692 bp 质粒载体条带,说明目的基因片段克隆正确。

### 2.4 序列的拼接与比较分析

对测得的 *gB1*、*gB2*、*gC* 和 *gD* 序列片段利用 SeqMan 软件进行拼接、校正。结果测定的 *gB* 基因长 2 850 bp,包含 1 个 2 802 bp 的完整开放阅读框,编码区共编码 933 个氨基酸;测定的 *gC* 基因长 1 723 bp,包含 1 个 1 527 bp 的完整开放阅读框,编码区共编码 508 个氨基酸;测定的 *gD* 基因长 1 559 bp,包含 1 个 1 254 bp 的完整开放阅读框,编码区

共编码 417 个氨基酸,与预期的结果完全一致。*gB*、*gC* 和 *gD* 基因的 GenBank 登录号分别是 JN787952、JN787953、JN787954。

利用 MegAlign Clustal W 方法对 IBRV/NM06 的 *gB*、*gC* 和 *gD* 基因核苷酸序列及其推导的氨基酸序列与参考毒株基因核苷酸序列及其推导的氨基酸序列进行同源性比较分析。

#### 2.4.1 *gB* 基因及其推导氨基酸序列分析结果

核苷酸同源性比较结果显示:*gB* 基因与瑞典的 Can kao 株、Colorado-1 株、Cooper 株及 Jura 株相似性最高,均为 99.8%;与巴西的 SV507/99 株的 5 型疱疹病毒的核苷酸相似性最低,为 93.5%。氨基酸同源性比较分析结果显示:*gB* 基因推导氨基酸与瑞典的 Can kao 株、Colorado-1 株、Cooper 株和 Jura 株氨基酸相似性最高,均为 99.4%;与巴西的 P8-2 株氨基酸相似性最低,为 91.6%。结果见表 1。

表 1 IBRV 内蒙分离株 *gB* 基因核苷酸序列及其推导的氨基酸序列同源性比较(Clustal W)

Table 1	The comparison of nucleotide and amino acid sequences between NM06 and other <i>gB</i> gene of IBRV (Clustal W)													%
	NM06	Can kao	A7	B6	BH54	Colorado	Cooper	Jura	K22	LD19	P8-2	N565	SV507/99	
NM06	* *	99.8	99.5	93.9	99.3	99.8	99.8	99.8	99.5	99.6	99.1	93.8	93.5	
Can kao	99.4	* *	99.7	94.0	99.4	100.0	100.0	100.0	99.7	99.8	99.2	93.9	93.6	
A7	98.9	99.5	* *	93.9	99.1	99.7	99.7	99.7	100.0	99.6	98.9	93.9	93.6	
B6	93.1	93.5	93.1	* *	93.5	93.9	93.9	94.0	93.9	93.9	92.9	98.4	98.6	
BH54	97.9	98.4	98.0	92.3	* *	99.4	99.4	99.4	99.1	99.2	98.7	93.4	93.0	
Colorado-1	99.4	99.9	99.5	93.5	98.4	* *	100.0	100.0	99.7	99.8	99.2	93.9	93.6	
Cooper	99.4	99.9	99.5	93.5	98.4	99.9	* *	100.0	99.7	99.8	99.2	93.9	93.6	
Jura	99.4	99.9	99.5	93.6	98.4	99.9	99.9	* *	99.7	99.8	99.3	94.0	93.7	
K22	98.9	99.5	99.9	93.1	98.0	99.5	99.5	99.5	* *	99.6	98.9	93.9	93.6	
LD19	99.1	99.6	99.1	93.3	98.1	99.6	99.6	99.6	99.1	* *	99.1	93.9	93.6	
P8-2	91.6	91.9	91.5	86.6	90.6	91.9	91.9	92.1	91.5	91.8	* *	93.2	92.9	
N565	92.9	93.6	93.1	98.2	92.2	93.6	93.6	93.5	93.1	93.1	87.0	* *	99.3	
SV507/99	92.7	93.1	92.7	98.7	91.9	93.1	93.1	93.3	92.7	92.9	86.5	98.4	* *	

右上部分为核苷酸相似性,左下部分为氨基酸相似性,下表同

Upper right represented identity comparison of nucleotide for *gB* gene, low left showed identity comparison of putative amino acid for *gB* gene. The same as below

2.4.2 *gB* 基因遗传演化分析结果 从进化树(图 1)中可以看出,BHV-1 分离株与 BHV-5 分离株形成 2 个明显独立的进化分支。IBRV/NM06 和瑞典的 BH54、Can kao、Colorado-1、Cooper、Jura 的亲缘关系最近,它们位于同一个分支;加拿大的 B6 株则与 5 型疱疹病毒位于一个较大的进化分支。

#### 2.4.3 *gC* 基因及其推导氨基酸序列分析结果

核苷酸序列比较结果显示:*gC* 基因与瑞典的 Can kao 株、Colorado-1 株、Cooper 株和荷兰的 LAM 株之间有很高的同源性,其相似性为 99.7%;与巴西的 SV507/99 株、美国的 BHV-5 株相似性为 86.0%和 85.8%;与意大利的山羊 1 型疱疹病毒相似性为 72.8%。氨基酸同源性比较分析表明:*gC* 基因推导氨基酸与瑞典的 Colorado-1 株、Cooper 株氨基酸相

似性最高,为 99.2%;与巴西的 SV507/99 株和美国的 BHV-5 株基因推导氨基酸相似性为 79.3%和 78.3%。结果见表 2。

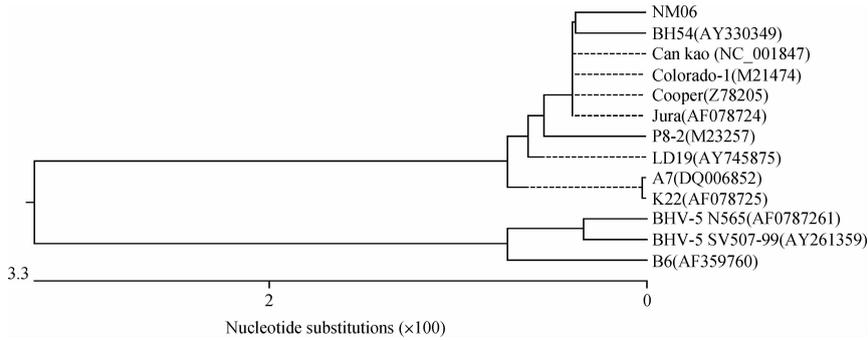


图 1 IBRV gB 基因遗传进化树  
Fig. 1 Phylogenetic tree of IBRV gB gene

表 2 IBRV 内蒙分离株 gC 基因核苷酸序列及其推导的氨基酸序列同源性比较 (Clustal W)

Table 2 The comparison of nucleotide and amino acid sequences between NM06 and other gC gene of IBRV (Clustal W) %

	NM06	Can kao	BH83	Colorado	Cooper	LAM	PDR	SV/63/06	Zurich	SV507/99	BHV-5	CapHV-1
NM06	* *	99.7	97.2	99.7	99.7	99.7	99.0	98.0	98.4	86.0	85.8	72.8
Can kao	99.0	* *	97.4	100.0	100.0	100.0	99.2	98.3	98.6	86.3	86.1	73.0
BH83	95.3	95.9	* *	97.4	97.4	97.4	96.7	96.8	97.5	84.8	84.8	72.6
Colorado	99.2	100.0	96.1	* *	100.0	100.0	99.2	98.3	98.6	86.3	86.1	73.0
Cooper	99.2	100.0	96.1	100.0	* *	100.0	99.2	98.3	98.6	86.3	86.1	73.0
LAM	99.0	99.8	95.9	100.0	100.0	* *	99.2	98.3	98.6	86.3	86.1	73.0
PDR	98.2	99.0	95.1	99.2	99.2	99.0	* *	97.5	97.8	86.0	85.8	71.0
SV/63/06	96.3	97.1	93.9	97.2	97.2	97.1	96.3	* *	98.0	86.2	85.8	73.1
Zurich	97.8	98.6	96.3	98.8	98.8	98.6	97.8	96.7	* *	86.7	86.4	73.7
SV507/99	79.3	80.1	77.0	80.1	80.1	80.1	79.5	78.6	80.3	* *	98.2	73.8
BHV-5	78.3	79.1	75.2	79.1	79.1	79.1	77.9	76.6	78.3	97.5	* *	75.8
CapHV-1	59.7	60.3	58.0	60.4	60.4	60.3	59.0	59.1	60.7	61.2	61.1	* *

2.4.4 gC 基因遗传演化分析 从进化树(图 2)中可以看出,牛传染性鼻气管炎病毒与 5 型疱疹病毒和山羊 1 型疱疹病毒是 3 个独立的遗传谱系。牛传染性鼻气管炎病毒分离株其遗传进化趋向于 4 个

分支:NM06、Can kao、PDR、LAM、Cooper 和 Colorado-1 组成进化分支 I;BH83 为分支 II;SV-63-06 为分支 III;Zurich 为分支 IV。

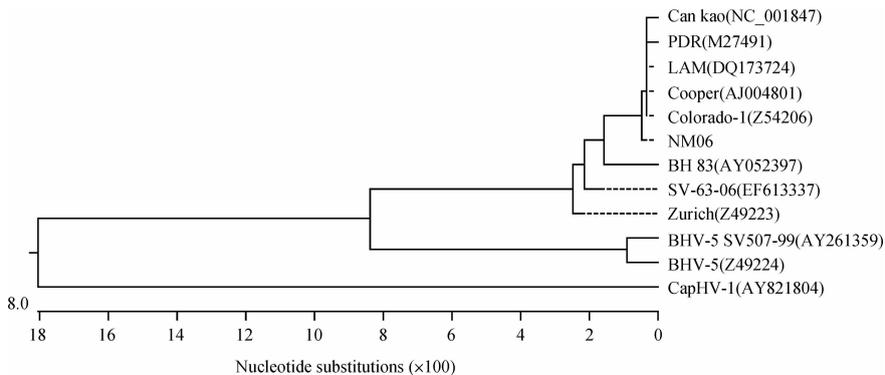


图 2 IBRV gC 基因遗传进化树  
Fig. 2 Phylogenetic tree of IBRV gC gene

2.4.5 *gD* 基因其推导氨基酸序列比较分析结果  
核苷酸序列比较结果显示:*gD* 基因与瑞典的 Can kao 株、Clone 株、Cooper 株、Jura 株的相似性最高,为 99.9%;与巴西 SV507-99 株和美国的 TX89 株相似性都为 85.2%;与加拿大山羊 1 型疱疹病的相似性最低,为 82.3%。氨基酸同源性比较

分析结果显示:*gD* 基因推导氨基酸与瑞典的 Can kao 株、Clone 株、Cooper 株、Jura 株和中国的 Luojingzhu 株氨基酸相似性最高,均为 99.5%;与巴西 SV507-99 株和美国的 TX89 株基因推导氨基酸相似性在 80.9%和 80.8%;与加拿大山羊 1 型疱疹病毒基因推导的氨基酸相似性为 73.0%。结果见表 3。

表 3 IBRV 内蒙分离株 *gD* 基因核苷酸序列及其推导的氨基酸序列同源性比较(Clustal W)

Table 3	The comparison of nucleotide and amino acid sequences between NM06 and other <i>gD</i> gene of IBRV (Clustal W)											%
	NM06	Can kao	Clone	Cooper	Jura	K22	Luojing	ST	Abu-Hammad	SV507/99	TX89	CapHV-1
NM06	* *	99.9	99.9	99.9	99.9	98.6	99.8	98.6	99.1	85.2	85.2	82.3
Can kao	99.5	* *	100.0	100.0	100.0	98.7	99.9	98.6	99.2	85.2	85.3	82.4
Clone	99.5	99.8	* *	100.0	100.0	98.7	99.9	98.6	99.2	85.2	85.3	82.4
Cooper	99.5	99.8	99.8	* *	100.0	98.7	99.9	98.6	99.2	85.2	85.3	82.4
Jura	99.5	99.8	99.8	99.8	* *	98.7	99.9	98.6	99.2	85.2	85.3	82.4
K22	93.5	93.8	93.8	93.8	93.8	* *	98.6	97.8	97.9	84.9	85.1	81.9
Luojing	99.5	99.8	99.8	99.8	99.8	93.8	* *	98.6	99.1	85.3	85.4	82.2
ST	97.6	97.8	97.8	97.8	97.8	93.3	97.8	* *	98.0	85.5	85.6	82.6
Abu-Hammad	90.3	90.6	90.6	90.6	90.6	88.6	90.3	86.4	* *	84.0	84.4	81.6
SV507/99	80.9	81.1	81.1	81.1	81.1	76.3	81.1	80.1	73.1	* *	99.4	86.4
TX89	80.8	81.1	81.1	81.1	81.1	76.5	80.8	80.1	72.9	99.5	* *	86.8
CapHV-1	73.0	73.2	73.2	73.2	73.2	71.1	73.9	73.0	64.5	73.7	74.1	* *

2.4.6 *gD* 基因遗传演化分析 遗传进化树显示:IBRV/NM06 与分离自瑞典的 Can kao 株、Clone 株、Cooper 株、Jura 株和中国 Luojingzhu 株

亲缘关系最近,从进化树(图 3)中可以看出,牛传染性鼻气管炎病毒与 5 型疱疹病毒是 2 个独立的遗传谱系。

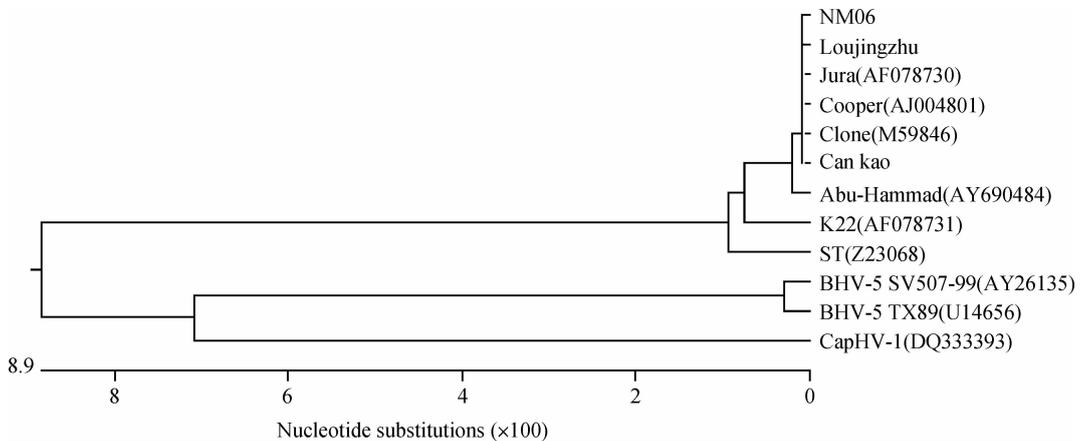


图 3 IBRV *gD* 基因遗传进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of IBRV *gD* gene

### 3 讨论

本试验通过 PCR 扩增、克隆和序列测定,成功

地扩增了 IBRV 内蒙古分离株的 *gB*、*gC*、*gD* 基因。从以上分析不难发现,IBRV/NM06 株 3 个基因的核苷酸和氨基酸序列与 IBRV 瑞典毒株相应的核苷

酸和氨基酸相似性均很高,在 99.6% 和 98.9% 以上,说明 NM06 株与瑞典株亲缘关系最近,变异不明显,遗传较为稳定,这一点与遗传进化树分析的结果一致。

IBRV 各分离株各基因片段与 BHV-5 和 CapHV-1 基因的核苷酸及推导氨基酸有较高同源性。国外学者报道 BHV-1 和 BHV-5 除由于其基因序列和免疫水平差异而导致致病性和流行特性不同外,2 种病毒具有明显相关性<sup>[10]</sup>。Gomes 等通过对 BHV-5 全基因的扩增、序列分析和交叉杂交试验发现,BHV-1 和 BHV-5 的相似性大约在 85% 左右;他指出 BHV-5 病毒在复制时所需的元素和 BHV-1 相似,进一步的研究是验证病原在致病途径中扮演的角色<sup>[11]</sup>。Six 等研究发现,BHV-1 能感染山羊而 CapHV-1 也能感染犊牛,说明 2 种病毒都能感染异源宿主,并造成潜伏感染,但 BHV-1 在山羊体内能再被激活,而 BHV-1 在犊牛体内的再激活却没能检测到,他们研究得出的结论山羊是 BHV-1 的潜在“储藏库”,说明 BHV-1 在病毒演化中具有适应性和突变性<sup>[12]</sup>。

核苷酸序列分析表明:NM06 株 *gB* 基因与 Can kao、Colorado-1、Cooper、K22 及 A7 毒株序列相比,在 529—531 位核苷酸多出 3 个碱基(TAC),编码 Tyr 蛋白,这种长度的变异一般是由于编码区基因的插入或缺失型突变所造成的,应该是病毒长期累积进化的结果;*gC* 基因与其它毒株比较时,在 1—84 位核苷酸内完全相同,*gC* 蛋白膜外区第 659、666 和 669 位变异程度大,第 659 位导致错义突变(A→G, Asp→Gly,中性 aa→疏水性 aa),666 和 669 位为同义替换(T→C, T→C);*gD* 基因与其它毒株比较,只有 1 个核苷酸的差异(第 766 位 T→C),导致氨基酸变化(256 aa 由 Pro→Ser,疏水性 aa→中性 aa)。分析序列时发现,NM06 株 3 个基因均有多个 CG-GCCC 的重复高变区。这个重复高变区编码的氨基酸为 Arg 和 Pro 间隔排列区,呈现高度亲水性。Petovskis 等研究 *gD* 基因的重复高变区发现,该区在 *gD* 基因中位于第 6 个保守的 Cys 与跨膜区之间的亲水区的中心,并在 *gD* 的外表面形成 1 个高度亲水结构,其功能尚待阐明<sup>[13]</sup>。其他疱疹病毒的 *gD* 由于 GC 含量低而缺少这一富含 Arg 和 Pro 的重复高变区。

氨基酸序列分析:NM06 株 *gB* 有丰富的亲水区域,在 N 端的膜外区域 559~580 aa 存在一个亮

氨酸拉链结构 6L6L6L (TMFSRLAT-SWCLLQNKERALWAEAAKLNPSAAASA),在 675~683 aa 位存在 1 个酪氨酸激酶结合位点 (HKRYFRFGADYVYYENYAYVRR; *gC* 位于 375~382 aa 酪氨酸激酶结合位点(RPPELRVY)和位于 185~187 aa 的细胞吸附序列(RGD)十分保守,这对基因的吸附渗透和蛋白质的合成起重要的作用。另外位于膜外区 8 个 Cys 残基和 2 个潜在的 N-糖基化位点是保守的,位于 208~211 aa 的 N-糖基化位点发生变异,在 T 细胞表位主要抗原位点 211 aa 发生了 I-V,这种变化可能导致免疫性质的改变,其具体功能不详;*gD* 蛋白膜外区 190~220 aa 变异较大,但位于 168~173 aa 酪氨酸激酶结合位点十分保守。另外位于膜外区的 2 个潜在的 N-糖基化位点和 6 个 Cys 残基是保守的,这 6 个 Cys 排列构成了一定的二硫键走向(cys1→5, cys2→6, cys3→4),对于维持 *gD* 蛋白空间构象和保证其生物学活性是至关重要的<sup>[7]</sup>。

在 IBRV 的基因中,基因极为偏嗜 G 和 C,总体 G+C 含量为 72.4%。在 *gB*、*gC*、*gD* 基因的 ORF 中,三密码子中含有 G 或 C 碱基的占 97.2%~98.4%,Whitbeck 等<sup>[14]</sup>认为这种情况是病毒在进化过程中受某种选择压力的影响所造成的。

#### 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: 988-1030.
- [2] GIBBS E P J, RWEYEMAMU M M. Bovine herpesvirus[J]. *Vet Bull*, 1997, 47: 317-343.
- [3] TIKOO S K, CAMOPS M, BABIUK L A. Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis, and control[J]. *Adv Virus Res*, 1995, 45: 191-223.
- [4] VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S, BABIUK L A. Synthesis and processing of bovine herpesvirus 1 glycoproteins[J]. *J Virol*, 1986, 59 (2): 401-410.
- [5] ABDELMAGID O Y, ORTEN D J, XUE W, et al. Anti-idiotypic antibodies to bovine herpesvirus-1 inhibit virus infection in cell cultures [J]. *Arch Virol*, 1992, 122(1-2): 163-173.
- [6] OMAR Y A, MAHMOUD M M, HARISH C M, et al. Evaluation of baculovirus-expressed bovine herpesvirus-1 (BHV-1) glycoproteins for detection and analysis of BHV-1-specific antibody responses[J]. *Vet Micro*, 1998, 61: 249-259.

- [7] LYAKU J R, MCKENNA P K, FREDRICKSON R A, et al. Characterization of monoclonal antibodies against bovine herpesvirus-1 gD fusion protein expressed in *E. coli*[J]. *J Virol Methods*, 1999, 83(1-2):83-89.
- [8] 张鹏飞. 内蒙古地区牛传染性鼻气管炎病毒的分离与鉴定[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2006.
- [9] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁译. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002:96-99.
- [10] ROCHA M A, BARBOSA E F, GUEDES R M C, et al. Detection of BHV-1 in a Naturally Infected Bovine Fetus by a Nested PCR assay [J]. *Vet Res Commun*, 1998, (23): 133-141.
- [11] GOMES L I, ROCHA M A, SOUZA J G, et al. Bovine herpesvirus 5 in bull semen: Amplification and sequence analysis of the *US4* Gene[J]. *Vet Res Commun*, 2003, 27:495-504.
- [12] SIX A, BANKS M, ENGELS M, et al. Latency and reactivation of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) in goats and of caprine herpesvirus 1 (CapHV-1) in calves [J]. *Arch Virol*, 2001, 146(7):1325-1335.
- [13] PETOVSKIS E A, TIMMINS J G, ARMENTROUT M A, et al. DNA sequence of the gene for BHV-1 virus gp50, a glycoprotein without N-linked glycosylation[J]. *J Virol*, 1986, 59(2):216-223.
- [14] WHITBECK J C, BELLO L J, LAWRENCE W C. Comparison of the bovine herpesvirus 1 *gI* gene and the herpes simplex virus type 1 *gB* gene[J]. *J Virol*, 1988, 62(9):3319-3327.

(编辑 白永平)