

伪狂犬病毒 *gI* 基因的克隆表达及其对病毒增殖的影响*

肖少波¹ 方六荣^{1,2} 王革非¹ 陈焕春^{1,2} 洪文洲¹

(¹ 华中农业大学畜牧兽医学院动物病毒室 武汉 430070)

(² 华中农业大学农业部农业微生物重点实验室 武汉 430070)

摘 要: 从伪狂犬病毒(PRV)国内地方分离 Ea 株基因组 DNA 片段中克隆了完整的 *gI* 基因, 序列分析结果表明, *gI* 基因编码区全长 1101bp, 可编码 366 个氨基酸残基, 二级结构预测具有典型 I 型膜蛋白特征。与 GenBank 中收录的国外 Rice 株的同源比较发现, Ea 株 *gI* 在核苷酸和氨基酸水平上均存在多处突变, 尤其是潜在胞浆区中连续两个碱基的缺失导致移码突变, 致使 *gI* 基因的读码框架后移, 从而导致 Ea 株 *gI* 较 rice 株长 16 个氨基酸残基。将 *gI* 基因克隆到真核表达载体 pcDNA3.1+ 中的人巨细胞病毒早期启动子下游, 构建的真核表达质粒转染 PK-15 细胞, 间接免疫荧光检测证实 *gI* 获得正确表达。进一步测定天然缺失 *gI* 的 PRV 弱毒 Bartha 株在表达 *gI* 细胞系和空白载体转染的对照细胞系中的蚀斑形成单位(pfu)和组织细胞培养半数感染量(TCID₅₀)结果显示, Bartha 株在表达 *gI* 细胞系中的 pfu 和 TCID₅₀ 分别为对照细胞系的 164% 和 200%。说明 *gI* 具有促进病毒增殖的功能。

关键词: 伪狂犬病病毒, *gI*, 序列分析, 体外表达, 增殖

中图分类号: S852.65 Q78 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2002)03-0281-07

伪狂犬病毒(Pseudorabies Virus, PRV)属疱疹病毒科 α -疱疹病毒亚科, 能引起多种家畜及野生动物的伪狂犬病, 尤其是猪的伪狂犬病, 已成为危害当今养猪业的最严重的传染病之一。PRV 基因组为线状双链 DNA 分子, 大小为 150kb, 可编码 70~100 种蛋白质。由于糖蛋白对 PRV 的复制、毒力、诱发保护性免疫等方面具有十分重要的作用, 对糖蛋白的研究一直是 PRV 分子生物学研究的重点^[1]。目前, 已有 11 种糖蛋白(*gB*、*gC*、*gD*、*gE*、*gH*、*gI*、*gL*、*gK*、*gM*、*gN*)被鉴定^[2]。同其它几种重要的免疫原性糖蛋白(如 *gB*、*gC*、*gD*、*gE*)相比, 对 *gI* 的结构与功能研究相对滞后。但近年来的研究发现, *gI* 不仅是一个重要的毒力决定因素, 而且还促进或协同其它糖蛋白在毒力、神经嗜性等方面有作用, 如 *gI*、*gC* 单独缺失时毒力均有所下降, 但 *gC*、*gI* 双缺失的重组病毒的毒力几乎完全丧失^[3]; *gD* 缺失的病毒在神经系统中的侵染与野毒并无差别, 单独的 *gI* 缺失病毒也可侵染一、二级神经元, 而当 *gD*、*gI* 同时缺失时, 双缺失病毒在初级神经元的复制便受到制约, 但 *gD* 与 *gI* 的相互作用机制尚不清楚^[4]; *gI* 还能与 *gE* 形成非共价复合体, 并可能以一个完整的功能性单位行使功能^[5], 而 *gE* 不仅是 PRV 最重要的毒力决定因素, 已成为研究疱疹病毒在中枢神经系统增殖与分布的良好模型, 通过对 *gI* 以及 *gI/gE* 复合体的研究有望阐明 PRV 的神经致病机

* 国家自然科学基金(39970559)和“九五”国家科技攻关计划生物技术项目(96-C01-04-03)资助

作者简介: 肖少波(1970-)男, 湖北仙桃人, 博士, 主要从事动物病毒的分子生物学研究。

收稿日期: 2001-07-09, 修回日期: 2001-11-15

理,而且由于 *gE* 在伪狂犬病根除计划中一直是鉴别诊断的靶蛋白,利用 *gI/gE* 复合体作诊断抗原有望提高鉴别诊断特异性和敏感性^[6]。为了今后深入研究 *gI* 的结构与功能并建立 *gI/gE* 鉴别诊断方法,本研究对国内地方分离 *Ea* 株的 *gI* 基因进行了克隆、序列分析,建立了表达 *gI* 的细胞系并对 *gI* 在病毒增殖方面的作用进行了初步探讨。

1 材料和方法

1.1 毒株与细胞

缺失 *gI* 的伪狂犬病毒弱毒 Bartha 株由本室保存。猪肾传代细胞 PK-15 细胞由中国(武汉)典型培养物保藏中心提供。

1.2 质粒和毒株

质粒 pSKB4.5 含伪狂犬病毒 *Ea* 株 *gD* 基因部分编码序列, *gI*、*gE*、*11k* 基因全序列,以及 *28k* 基因部分序列,由作者构建^[7]。克隆载体 pBluescript II SK+、表达载体 pcDNA3.1+(人巨细胞病毒早期启动子)大肠杆菌 DH5 α 均由本室保存。

1.3 酶与试剂

各种限制性内切酶均为宝生物(大连)公司产品;羊抗猪 IgG-FITC 为 SBA 公司产品;脂质体转染试剂盒 Lipofectin、T₄DNA 连接酶、CIAP、Klenow I Large Fragment 均为 GIBCO 公司产品;DNA 快速回收试剂盒、G418 为 Clontech 公司产品。

1.4 *gI* 基因的克隆与序列分析

1.4.1 *gI* 基因的克隆: *Dra*I 酶切质粒 pSKB4.5,回收 2.2kb 左右的片段,继续用 *Cpo*I 酶切该片段, *Klenow* I 补平,同经 *Sma*I 线性化、CIAP 去磷酸化的克隆载体 pBluescript II SK+ 连接,转化 DH5 α 感受态,涂布含 X-gal 和 IPTG 的 Amp 抗性平皿,蓝白斑筛选阳性菌落,碱裂解法小量制备质粒,重组质粒经酶切鉴定。选取正向插入的重组质粒作进一步研究,该重组质粒命名为 pSB205-1。

1.4.2 序列分析: 采用双脱氧末端终止法进行 DNA 测序,测序结果提呈 GenBank 并运用 Blast 软件在 GenBank 中搜索和比对。氨基酸序列分析采用 DNASIS 软件进行。

1.5 *gI* 基因在 PK-15 细胞中的表达与检测

1.5.1 真核表达质粒的构建: *Hind*III 和 *Bam*HI 酶切 pSB205-1,回收含 *gI* 基因的 1.2kb 片段,克隆到 pcDNA3.1+ 的相应位点,重组质粒命名为 pSB209。

1.5.2 正常 PK-15 细胞系最适 G418 耐受浓度测定: 按本实验室已建立的方法^[8]进行。

1.5.3 表达质粒转染 PK-15 细胞: 大量制备表达质粒 pSB209 和表达载体 pcDNA3.1+ 并用 PEG8000 纯化。PK-15 细胞以 1×10^5 个细胞/cm² 密度接种 6 孔板,待细胞长至 40%~60% 融合时,脂质体法分别转染 PK-15 细胞,转染按试剂盒说明书进行。待转染细胞长成单层后,1:2 传代并用最适浓度 G418 连续多次筛选阳性细胞克隆。当正常 PK-15 细胞全部死亡时,扩大培养阳性细胞克隆。

1.5.4 表达产物的检测: 飞片法培养表达质粒 pSB209 和载体 pcDNA3.1+ 转染的 G418 抗性细胞,长成单层后,取出盖玻片,PBS(pH7.2)洗两次,冰预冷的甲醇-20℃固定 30min。以猪抗伪狂犬病毒抗血清为第一抗体,异硫氰酸荧光素(Fluorescein isocyanate, FITC)标记的羊抗猪 IgG 为第二抗体进行免疫荧光检测,具体操作按文献^[9]进行。

1.6 病毒蚀斑形成单位的测定

将表达 *gI* 细胞系与转染了空白 pcDNA3.1+ 载体的 PK-15 细胞系以 2×10^5 个细胞/孔进行传代,待细胞长成单层后,将 PRV Bartha 株病毒按适当的量稀释,加入细胞表面吸附 1h,用 PBS (pH7.4) 洗 3 次以除净未吸附上的病毒粒子。用含 6% 犊牛血清的 $2 \times$ DMEM 与 1.6% 的低熔点琼脂糖等体积混匀,覆盖在细胞表面。37°C, 5% CO₂ 培养,每日观察,待细胞出现明显病变时,用 0.01% 的中性红在 37°C 避光染色 1h,空斑记数。

1.7 病毒组织细胞培养半数感染量(TCID₅₀)测定

将 PRV Bartha 株病毒用 DMEM 维持液按 10 倍系列稀释,从 10^{-3} 至 10^{-8} 等共 8 个梯度,将 100μL 不同稀释度的病毒液加入已长满单层的 *gI* 表达细胞和对照细胞的 96 孔培养板中,每个稀释度 8 孔,置 37°C, 5% CO₂ 培养箱中培养,每日观察 2 次,记录细胞病变孔,按 Reed-Muench 两氏法^[10]计算 TCID₅₀。

2 结果

2.1 *gI* 基因的克隆与鉴定

按图 1 所示路线克隆完整 *gI* 基因,重组质粒 pSB205-1 经限制性内切酶 *Hind* III、*Bam* HI、*Nco* I 酶切分析(图 2),证实含完整 *gI* 基因。

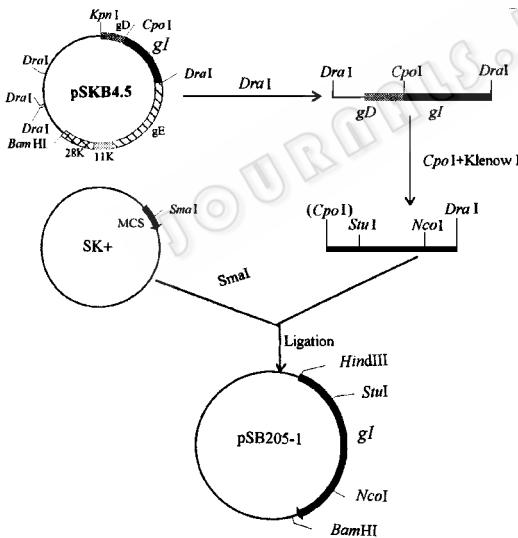


图 1 重组质粒 pSB205-1 的构建

Fig. 1 Construction of the plasmids pSB205-1

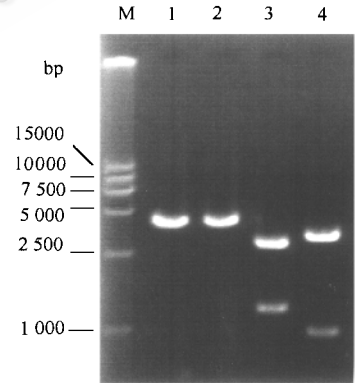


图 2 重组质粒 pSB205-1 的酶切分析

Fig.2 Restriction analysis of the recombinant plasmid pSB205-1

M :DNA marker(DL-15000);

1 : pSB205-1/ *Hind* III ;

2 : pSB205-1/ *Bam* HI ;

3 : pSB205-1/ *Hind* III + *Bam* HI ;

4 : pSB205-1/ *Hind* III + *Nco* I .

2.2 序列分析与同源比较

由于伪狂犬病毒基因组 DNA 平均 G + C 含量为 73% ,为了保证序列测定结果的客观性,利用 *gI* 基因内部的 *Stu* I 和 *Nco* I 将 1.2kb 的 *gI* 基因片段分三段进行亚克隆,构建三个测序质粒,即 pSB206(*Hind* III - *Stu* I) (3kb),pSB207(*Stu* I - *Nco* I) (0.6kb),pSB208(*Nco* I -

*Bam*HI (0.3kb)。双脱氧末端终止法对三个测序质粒进行双链测序。序列测定结果显示,所克隆的含 *gI* 基因的片段全长 1187bp,包含一个 1011bp 的大的阅读框架,可编码 366 个氨基酸残基。DNASIS 软件对推导的氨基酸序列结构预测结果表明,N 端存在 23 个疏水性氨基酸组成的信号肽,24~285 位氨基酸为胞外区,并含有 6 个潜在的 N-糖基化位点(NXS/T),286-308 位氨基酸是一段疏水性氨基酸,可能是跨膜区,309~366 主要是亲水性氨基酸,是潜在的胞浆区。上述结构表明 *gI* 属典型的 I 型膜蛋白。

将核苷酸及推导的氨基酸序列提呈 GenBank(GenBank accession no :AF306511)并运用 Blast 软件同 GenBank 中收录的其它 PRV 毒株的 *gI* 进行同源比较,只搜索到 PRV Rice 株的全序列。二者比较发现 Ea 株 *gI* 在核苷酸水平上均存在 48 处点突变、两处缺失突变、两处插入突变,在起始密码子(ATG)后第 940、941 处较 Rice 株连续缺失两个碱基(GG),导致读码框架向后移了 48 个碱基。对核苷酸推导的氨基酸序列进行同源性分析表明,移码突变发生在潜在的胞浆区。此外,在其它功能区如信号肽、跨膜区均无大的突变,而且胞外区的 6 个潜在的 N-糖基化位点相当保守(图 3)。

Ea	MMMVARDVTRLPAGLLLAALTLAALTPRVGGVLFRRGAGVSVHVAGSAVLVPGDAPNLTID	60
Rice	-----	60
Ea	GTLLFLEGSPSPNSYSGRVELLRDPKRCACYTREYAAEYDLCPRVHIEAFRGCRLRKRREPLA	120
Rice	-----	120
Ea	RRASAAVEARRLLFVSRPASGSDAGSYVVRVVRVNGTTDLFVLTALVPPRGRPV*PTSPPAD	179
Rice	-----PP-----HH-PSS--	180
Ea	ECRPVVGSWHDSLRVVDPAEDAVFTTQPPP*EPEPPTTPAPPRGTGATPEPRSEEEEGD	238
Rice	-----*--I-----DE	239
Ea	AETTTPTLTPAPGTLDANGTMVLNASVVSRLVLAANAATAGARS ^{SPGKI} AMVLGPTIVVLL	298
Rice	EGA--AM*--V-----G-----	298
Ea	IFLGGTACVARRCARNRIYRPRPGRGSAVHAAPP ^{RRRPP} NPVAGAPVPQPKMTLAE ^{LRQK}	358
Rice	----V--A-----GIAS ^{TGRDPGAARRSTRRR} PGARPP ^{TSPGPR} SPSPRT	350
Ea	LATIAEEQ	366
Rice		

图 3 PRV Ea 株 *gI* 氨基酸序列及其与 Rice 株的同源比较

Fig.3 The amino acid sequences of the *gI* of PRV strain Ea and comparison with those of PRV strains Rice
 - indicated the similar amino acids. * indicated the absence of the amino acid.
 The mutant amino acids were shaded. The potential N-glycosylation sites were underlined

2.3 真核表达质粒的构建

将重组质粒 pSB205-1 中含 *gI* 基因的 *Hind*III - *Bam*H I 片段定向克隆到 pcDNA3.1 + 的相应位点,构建了 *gI* 的真核表达质粒 pSB209,并用 *Hind*III - *Bam*H I 限制性内切酶进行分析,证实构建正确(图 4)。

2.4 *gI* 基因在 PK-15 细胞中的表达与检测

脂质体法转染的细胞长成单层后,1:2 传代,经含 600μg/mL G418 的培养基连续筛选三次,在显微镜下,可以看到界限分明的阳性克隆,扩大培养,经间接免疫荧光检测,转染的 pSB209 细胞在细胞表面有极强的一圈特异性的荧光(图 5),而对照质粒 pcDNA3.1 + 转染细胞呈阴性,未观察到特异性荧光,只有极少量未洗净的非特异性荧光斑点(图略),证

明 *gI* 基因在 PK-15 细胞中表达了 *gI* 蛋白, 并被修饰、加工、转运细胞膜上。

2.5 *gI* 对病毒 pfu 的影响

为方便空斑计数和大小的测定, 在进行空斑试验前, 先对 Bartha 株病毒进行梯度稀释, 选择在对照细胞出现 50 ~ 100 个空斑为适宜稀释度, 结果当病毒原液稀释到 2×10^{-5} 时, 病毒在空白载体 pcDNA3.1 转染细胞系中的空斑约为 75 个左右, 符合实验设计要求。

将表达 *gI* 的 PK-15 细胞系和空白载体 pcDNA3.1 + 转染细胞系分别转入六孔板中, 待长成单层后, 将 Bartha 株病毒按 2×10^{-5} 稀释后接毒。按 1.6 节所述进行培养、覆盖、染色。空斑出现后, 发现其大小并无明显区别, 但空斑形成数目上, *gI* 表达细胞系明显高于对照细胞(表 1)。同批病毒液重复三次的平均空斑数分别为 119.8 ± 3.9 和 73.0 ± 3.2 , 根据公式换算成空斑形成单位则分别为 5.99×10^7 和 3.65×10^7 。二者比较, Bartha 株在表达 *gI* 的细胞系的空斑形成单位约为空白载体 pcDNA3.1 转染细胞系的 164%。



图 5 *gI* 在 PK-15 细胞中表达

Fig.5 Expression of the *gI* in PK-15 cell(10×40)

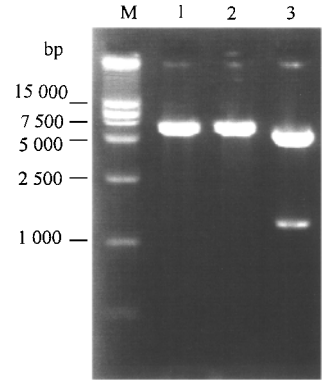


图 4 表达质粒 pSB209 酶切鉴定

Fig.4 Identification of the expression plasmid pSB209

M :DNA marker(DL-15000);

1 : pSB209/ *Hind* III ;

2 : pSB209/ *Bam* H I ;

3 : pSB209/ *Hind* III + *Bam* H I .

表 1 Bartha 株病毒在 *gI* 表达细胞与正常细胞上的空斑数比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The plaques number of Bartha in cell lines expressing *gI* ($\bar{x} \pm s$)

Cell line	1	2	3	Mean
PK ^{gI}	120 ± 4.6	122 ± 3.6	117.3 ± 3.5	119.8 ± 3.9
PK ^{control}	76 ± 3.0	71.7 ± 3.1	71.3 ± 1.5	73.0 ± 3.2

Note :PK^{gI} and PK^{control} are the PK-15 cell lines expressing *gI* and the cell lines transfection pcDNA3.1 + respectively.

2.6 *gI* 对病毒 TCID₅₀ 的影响

用表达 *gI* 的细胞系和相应的对照细胞系对同一批增殖的 PRV Bartha 株病毒的组织细胞培养半数感染量(TCID₅₀)测定结果发现, 缺失 *gI* 基因的 PRV Bartha 株病毒, 在表达 *gI* 的 PK-15 细胞系和对照细胞系中增殖的滴度分别为 $10^{-7.6}/0.1\text{mL}$ 和 $10^{-7.3}/0.1\text{mL}$, 前者约为后者的两倍($10^{-7.3}/10^{-7.6} = 1.998$)。

3 讨论

本研究以我国 PRV 地方分离株 Ea 株为材料, 运用酶切方法从基因组 DNA 片段中克隆到完整的 *gI* 基因, 由于伪狂犬病毒 *gI* 基因 G + C 含量高达 78%, 有的区域高达 90% 以上, 用 PCR 方法克隆全基因可能会导致碱基误配, 运用酶切方法克隆保证了其忠实性, 这为今后更加客观、深入地研究该基因的功能奠定了基础。

PRV Ea 株 *gI* 基因的核苷酸序列与氨基酸序列同国外 Ric 株相比均存在很大程度的

差异,尤其是其潜在的胞浆区存在移码突变,并导致 Ea 株 gI 编码的氨基酸较 Rice 株 gI 长 16 个。有意义的是, Husak 等^[11]最近发现 gI 的胞浆区是 gI 的一个十分重要的功能区, gI 的胞浆区通过改变 gI/gE 复合体胞外区的构象,促进病毒在神经系统的传播。当用 gI 胞浆区失活的突变病毒攻击大鼠的视网膜时发现 gI/gE 复合体的活性很难被激活, PRV 在视觉中枢的感染产生缺陷。此外, gI 的胞浆区对 gI、gE 翻译后的加工修饰有很重要的影响。缺失 gI 的胞浆区后,影响 gI 穿入内质网,并进一步影响 gE 在胞浆区的磷酸化与去磷酸化。PRV Ea 株 gI 胞浆区的突变是否会影响其功能,这是值得进一步探讨的问题。

Dingwell 等^[12]曾将与 PRV 同亚科的人单纯疱疹病毒 I 型(HSV-1)的 gI 缺失,发现 gI 缺失突变株在多种细胞中形成的空斑只有亲本株所产生的空斑大小的 85%,而在表达 HSV-1 gI 的补偿细胞系中,空斑大小同野毒无差异。本研究最初设计利用表达 PRV gI 的补偿细胞系观察 gI 天然缺失的 Bartha 株的空斑大小是否与对照细胞存在差异,结果空斑染色后很难用肉眼观察出空斑大小的差异,但却意外发现 Bartha 株病毒在 gI 表达细胞系上的空斑数目明显多于在正常阴性细胞中的空斑数目,进一步测定 TCID₅₀ 也得到相似的结果。因此, gI 可能具有促进病毒增殖的功能,目前尚未见相关报道。但其作用机理还有待于进一步研究。

伪狂犬病是目前利用基因缺失标志疫苗同时结合鉴别诊断方法对该病进行根除取得巨大成功的动物病毒性疫病之一,并成为其它动物疫病制订和实施根除计划的良好模型。在根除计划实施的早期阶段,广泛采用 TK⁻/gE⁻ 双缺失疫苗和针对 gE 的鉴别诊断 ELISA,但随着根除计划的深化,阳性检测率越来越低,这就要求更特异、更敏感诊断方法来巩固根除计划的前期成果。单纯的 gE 鉴别诊断 ELISA 将难以满足上述要求。鉴于 gI 与 gE 能形成非共价复合体,因此,有学者提出在根除计划后期采用更安全的 TK⁻/gE⁻/gI⁻ 缺失疫苗并利用 gI/gE 复合体作为诊断抗原^[6]。目前,本研究室已构建了 PRV Ea TK⁻/gE⁻/gI⁻ 三缺失疫苗株(另文发表),并在克隆了 gE^[7]、gI 基因的基础上,正在杆状病毒中表达 gI/gE 复合体,有望近期开发出我国自行研制的新一代的基因缺失疫苗和与之配套的诊断试剂,加快我国猪伪狂犬病根除计划的进程。

参 考 文 献

- [1] Mettenleiter T C. *Vet Res*, 2000, **33**(1) 99 ~ 115.
- [2] Nauwynck H J. *Vet Microbiol*, 1997, **55** 3 ~ 11.
- [3] Kritas S K, Pensaert M, Mettenleiter T C. *Vet Microbiol*, 1994, **40** 323 ~ 334.
- [4] Mulder W, Pol J, Kimman T, et al. *J Virol*, 1996, **70**(4) 2191 ~ 200.
- [5] Tirabassi R S, Enquist L W. *J Virol*, 1998, **72**(6) 4571 ~ 4579.
- [6] Gut M, Jacobs L, Tyborowska J, et al. *Vet Microbiol*, 1999, **69**(4) 239 ~ 249.
- [7] He Q G, Xiao S B, Fang L R, et al. Proceeding in 16th congress of international pig veterinary society, Melbourne, 2000, 556.
- [8] 肖少波, 陈焕春, 方六荣, 等. 中国生物化学与分子生物学报, 2001, **17**(2) :198 ~ 202.
- [9] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 著(金冬雁, 黎孟枫等译). 分子克隆实验指南. 第二版. 北京: 科学出版社, 1996.
- [10] 殷震, 刘景华. 动物病毒学. 第二版. 北京: 科学出版社, 1997.
- [11] Husak P J, Kuo T, Enquist L W. *J Virol*, 2000, **74**(23) 10975 ~ 10983.

[12] Dingwell K S , Brunetti C R , Hendricka R L , et al . *J Virol* , 1994 **68** 834 ~ 845 .

Cloning , Expression of the *gI* Gene of Pseudorabies Virus Ea Strain and Its Effect to Viral Replication*

Xiao Shaobo¹ Fang Liurong^{1 2} Wang Gefei¹ Chen Huanchun^{1 2} Hong Wenzhou¹

(¹ *Laboratory of Animal Virology , College of Animal Science and Veterinary Medicine ,
Huazhong Agricultural University , Wuhan 430070 , China*)

(² *Huazhong Agricultural University , key laboratory of Agro-Microbiology , Ministry of Agriculture , Wuhan 430070 , China*)

Abstract : The complete *gI* was cloned from the genomic DNA of Pseudorabies virus (PRV) Ea strain and the DNA sequence was determined by Sanger 's sequencing technique . The nucleotide and deduced amino acids sequences indicated that the *gI* gene of PRV Ea strain is composed of 1101 base pairs and could encode 366 amino acids residues . The result of predicted II class structure showed that *gI* is a typical I class envelope protein . When compared with PRV Rice strain , there were multiple mutations in the *gI* gene of PRV Ea strain and the diversity of amino acid residues also existed , especially the deletion of two bases which results in the change of the reading frame and there were additional 16 amino acids residues in the potential cytoplasmic domains of Ea strain . The fragment containing the complete *gI* gene was further sub-cloned into the downstream of CMV promoter of eukaryotic expression vector pcDNA3.1+ , resulting in a recombinant expression plasmid pSB209 . pSB209 was transfected into PK-15 cell lines and the cells expressing *gI* were obtained in the selection of G418 . Expressed protein was further detected by Indirect Immunofluorescence Assay (IFA) . In order to explore the function of *gI* in the viral replication , the attenuated live vaccine strain , Bartha in which the *gI* is deleted , was chosen to determine the plaques forming units (pfu) and the tissue culture infectious dose (TCID₅₀) in PK-15 cell lines expressing the *gI* (PK^{*gI*}) . The data showed that the pfu and TCID₅₀ in PK^{*gI*} were 164% and 200% of those in control cell lines respectively . The above results indicated that the *gI* involve in and accelerate the viral replication .

Key words : Pseudorabies Virus , Glycoprotein I , Sequence analysis , Expression , Replication

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (39970559) , Project of Chinese National 95 ' Biotechnology Program for Science & Technology Department (96-C01-04-03)