

# 传染性喉气管炎病毒烟台株TK 基因 序列测定及TK 蛋白功能初步分析<sup>\*</sup>

刘文波<sup>1</sup>, 周 斌<sup>1</sup>, 黄 兵<sup>1,2</sup>, 张秀美<sup>2</sup>, 张素芳<sup>1</sup>, 陈溥言<sup>1</sup>

(1 南京农业大学 农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 江苏 南京 210095;

2 山东省农科院 家禽研究所, 山东 济南 250023)

**[摘 要]** 根据传染性喉气管炎病毒(ILT V)美国632株TK 基因序列设计并合成1对引物,以ILT V 烟台株DNA 为模板扩增了TK 基因,并对其进行了序列测定。将ILT V 烟台株的TK 基因和TK 蛋白分别与ILT V 美国632株,英国Thorne 株,Beijing E2 株,BHV-1, EHV-1, EHV-2, FHV-1, HHV-1, HHV-2, HHV-3, HHV-4, HVT, MDV-1, MDV-2, PRV 和SHV-2 的TK 基因和TK 蛋白比较后发现,其TK 基因的核苷酸和TK 蛋白的氨基酸同源性分别为24.6%~99.5%和15.1%~98.9%,表明不同ILT V 毒株之间TK 基因和TK 蛋白相对保守,但与其他 $\alpha$ -疱疹病毒的TK 基因和TK 蛋白同源性则较低。

**[关键词]** 传染性喉气管炎病毒; 烟台株; TK 基因; 同源性分析

**[中图分类号]** S858.315.3

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2005)10-0075-05

传染性喉气管炎病毒(Infectious laryngotracheitis virus, ILTV)属于疱疹病毒科, $\alpha$ -病毒亚科,可引起鸡的急性上呼吸道感染,病鸡表现为呼吸困难、产蛋率下降和较高的死亡率,是危害养禽业的重要病毒之一<sup>[1]</sup>。ILT V 基因组为双股线状DNA,长约155 kb。到目前为止,完整的基因组序列仍然未见报道,但已有对基因组中114 kb 的序列进行测序分析的报道,包括其整个短独特区<sup>[2~4]</sup>。

胸苷激酶(Thymidine kinase, TK)基因是疱疹病毒的主要毒力基因之一,也是大多数疱疹病毒复制的非必需基因。由TK 基因编码的胸苷激酶是胸腺嘧啶合成补救途径中的关键酶,能够转移ATP 上的 $\gamma$ -磷酸到脱氧胸苷的5'羟基上,从而生成脱氧胸苷5'单磷酸和ADP<sup>[5]</sup>。该酶还可使病毒在中枢神经系统中复制,导致疱疹病毒具有神经潜伏能力。TK 基因的缺失可使毒株毒力下降和潜伏感染能力降低。国外已对ILT V 美国632株和英国Thorne 株的TK 基因序列和结构功能进行了研究,但国内对ILT V 各地方株的TK 基因序列和结构功能报道还较少,且报道的序列多不完整<sup>[6,7]</sup>。为此,本试验对ILT V 烟台株的TK 基因进行了扩增、克隆和测序,并对ILT V 烟台株的TK 基因和TK 蛋白与已报道

的ILT V 毒株及同属 $\alpha$ -疱疹病毒亚科的其他毒株的TK 基因核苷酸和TK 蛋白氨基酸序列进行了比较分析,以期为进一步研究TK 基因的功能以及研制TK 基因缺失的ILT V 基因工程疫苗奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒载体、工程菌和试验毒株

pMD18-T 载体,购自大连宝生物公司;宿主菌DH5 $\alpha$ ,由本室保存;ILT V 烟台株,由山东省农科院家禽研究所禽病室惠赠。

### 1.2 鸡 胚

SPF 鸡胚,由山东省农科院家禽所 SPF 鸡场提供。

### 1.3 酶和试剂

Taq 酶、限制性内切酶Pst I 和BamH I,均购自大连宝生物公司;DNA 胶回收试剂盒,购自上海生工公司。

### 1.4 引物的设计与合成

根据已发表的ILT V 序列<sup>[6]</sup>设计并合成1对引物,序列为P1: 5'-ATA CTG CAG GTC TTG CCC GCA GAG ATG-3'; P2: 5'-GCC GGA TCC CAT TAC GAA CCC CAT AAT CAG-3'。引物由大连宝

<sup>\*</sup> [收稿日期] 2005-02-28

[作者简介] 刘文波(1976-),男,山东商河人,在读博士,主要从事动物分子病毒学和免疫学研究。

[通讯作者] 陈溥言(1941-),男,江苏南京人,教授,博士生导师,主要从事畜禽传染病研究。

生物公司合成,扩增 $TK$ 基因长约1.1 kb。

### 1.5 病毒增殖及其核酸的提取

将 $LTV$ 烟台株接种于10日龄SPF鸡胚的绒毛尿囊膜,收集72~120 h富含痘斑的鸡胚尿囊膜和尿囊液,参照文献[8]的方法提取病毒DNA,作为PCR模板。

### 1.6 PCR扩增

在PCR管中加入 $10 \times$  PCR Buffer 5  $\mu$ L, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 4  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTP 1  $\mu$ L, 上下游引物各20 pmol, 模板1  $\mu$ L,  $Taq$  DNA聚合酶0.5  $\mu$ L, 用超纯水补至50  $\mu$ L, 置PCR仪上进行扩增。扩增方法为: 94 预变性5 min; 然后94 45 s, 65 1 min, 72 延伸1 min, 30个循环; 最后72 延伸10 min。取5  $\mu$ L PCR产物于10 g/L琼脂糖凝胶上进行电泳并分析结果。

### 1.7 PCR产物的克隆与鉴定

取15  $\mu$ L PCR产物, 在10 g/L琼脂糖凝胶上电泳, 并用DNA胶回收试剂盒回收目的片段条带。将回收的目的片段连接到pMD18-T载体中, 转化DH5 $\alpha$ 大肠杆菌。挑取单个菌落在LB(含50  $\mu$ g/mL Amp)培养基中培养, 然后提取质粒用 $Pst$  I和 $Bam$  H I进行双酶切鉴定, 对鉴定为阳性的克隆测序。

### 1.8 序列与功能分析

用DNA Star软件, 对测序结果与GenBank收录的 $LTV$ 和其他 $\alpha$ -疱疹病毒的 $TK$ 基因核苷酸序列及推导出的 $TK$ 蛋白氨基酸序列作同源性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 $LTV$ $TK$ 基因的扩增

应用设计的引物, 以 $LTV$ 烟台株的DNA为模板扩增出1条约1.1 kb的条带, 大小与目的片段相符, 见图1。

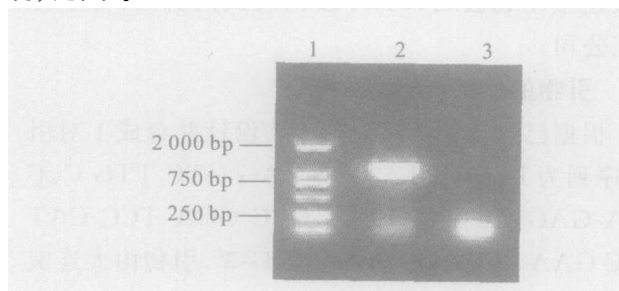


图1 PCR扩增的 $LTV$   $TK$ 基因

1 DL 2 000 marker; 2 PCR产物; 3 阴性对照

Fig 1 Amplified  $TK$  gene by PCR

1 DL 2 000 marker; 2 PCR product; 3 Negative control

### 2.2 目的基因的克隆与酶切分析

从扩增片段与pMD18-T载体连接产物转化DH5 $\alpha$ 大肠杆菌得到的阳性菌落中, 挑取数个进行培养。采用常规法提取质粒后, 用 $Pst$  I和 $Bam$  H I进行双酶切, 结果在约2.7 kb和1.1 kb处各得1条带(图2), 表明 $TK$ 基因已成功克隆到pMD18-T载体中。将得到的重组质粒命名为pMD-TK。

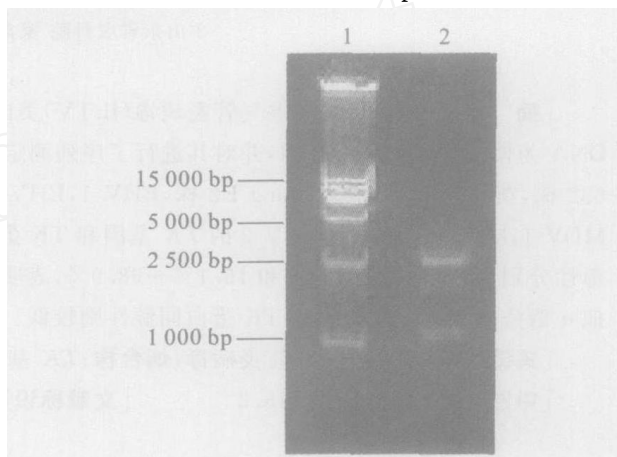


图2 重组质粒pMD-TK的酶切鉴定

1 DL 15 000 marker; 2 重组质粒

Fig 2 Identification of the recombined pMD-TK plasmid by digestion with  $Pst$  I and  $Bam$  H I

1 DL 15 000 marker; 2 The recombined plasmid

### 2.3 DNA序列比较分析

经测序, 发现该 $TK$ 基因序列包括1个1 089 bp的阅读框架。将该基因序列(GenBank No: A Y741134)与从GenBank上查到的 $LTV$ 美国632株、英国Thorne株和Beijing E2株的 $TK$ 基因序列及其他疱疹病毒的 $TK$ 基因序列相比较, 结果发现, 该毒株的 $TK$ 基因序列与美国632株相比有6个核苷酸发生了变异, 其分别是: T<sub>172</sub> → A, C<sub>397, 545, 555</sub> → T, T<sub>563</sub> → G, A<sub>1027</sub> → C, 核苷酸的同源性高达99.5%; 与英国的Thorne株和Beijing E2株相比, 核苷酸变异相同, 均有10个核苷酸发生了变异, 其分别是: T<sub>171</sub> → A, C<sub>302</sub> → G, G<sub>303</sub> → T, G<sub>304</sub> → C, T<sub>305, 566</sub> → G, C<sub>399, 547, 557</sub> → T, A<sub>1030</sub> → C; 另外, 第302, 303和308个核苷酸缺失, 核苷酸的同源性为98.9%; 与其他疱疹病毒BHV-1, EHV-1, EHV-2, FHV-1, HHV-1, HHV-2, HHV-3, HHV-4, HVT, MDV-1, MDV-2, PRV和SHV-2等的 $TK$ 基因序列同源性不高, 分别为27.6%, 39.6%, 31.3%, 38.8%, 39.7%, 39.7%, 24.6%, 31.4%, 34.0%, 39.6%, 27.4%, 30.1%和26.3%。上述与 $LTV$ 烟台株 $TK$ 基因进行比较的其他 $TK$ 基因在GenBank中的序列号详见表1。

表 1 疱疹病毒 TK 基因在 GenBank 中的序列号

Table 1 GenBank accession No. of TK gene of herpesvirus

| 病毒简称<br>Abbreviation   | 病毒全称<br>Full name    | 序列号<br>Accession | 病毒简称<br>Abbreviation | 病毒全称<br>Full name             | 序列号<br>Accession |
|------------------------|----------------------|------------------|----------------------|-------------------------------|------------------|
| L TV 632 strain        |                      | S83714           | HHV -2               | Human herpesvirus 2           | Z86099           |
| L TV Thorne strain     |                      | D00565           | HHV -3               | Human herpesvirus 3           | NC-001348        |
| L TV Beijing E2 strain |                      | AF435453         | HHV -4               | Human herpesvirus 4           | NC-001345        |
| BHV -1                 | Bovine herpesvirus 1 | NC-001847        | HV T                 | Herpesvirus of turkey         | A 06151          |
| EHV -1                 | Equine herpesvirus 1 | NC-001491        | MDV -1               | M arek's Disease virus type 1 | D 13956          |
| EHV -2                 | Equine herpesvirus 2 | NC-001650        | MDV -2               | M arek's Disease virus type 2 | AB049735         |
| FHV -1                 | Feline herpesvirus 1 | S64566           | PRV                  | Pseudo rabies virus           | A Y217095        |
| HHV -1                 | Human herpesvirus 1  | AY426828         | SHV -2               | Saim irine herpesvirus 2      | NC-001350        |

为了更好地了解 L TV 毒株的遗传学特性及与其他疱疹病毒的亲缘关系, 在分析各毒株 TK 基因序列同源性的基础上, 绘制了系统发生进化树, 见图 3。由图 3 可以看出, 参试的 17 株疱疹病毒被分为 3 个特定的组: 禽类疱疹病毒组(包括 L TV, MDV 和 HV T)、水痘疱疹病毒组(包括 BHV -1, EHV -1, PRV

和 FHV -1 等)和人疱疹病毒组(包括 HHV -2, HHV -4 和 SHV -2 等), 其中禽类疱疹病毒组和水痘疱疹病毒组关系相对较近, 二者又组成了一个大的独立分支, L TV 与禽类疱疹病毒组的 MDV 和 HV T 亲缘关系最近, 与其他疱疹病毒关系则较远。

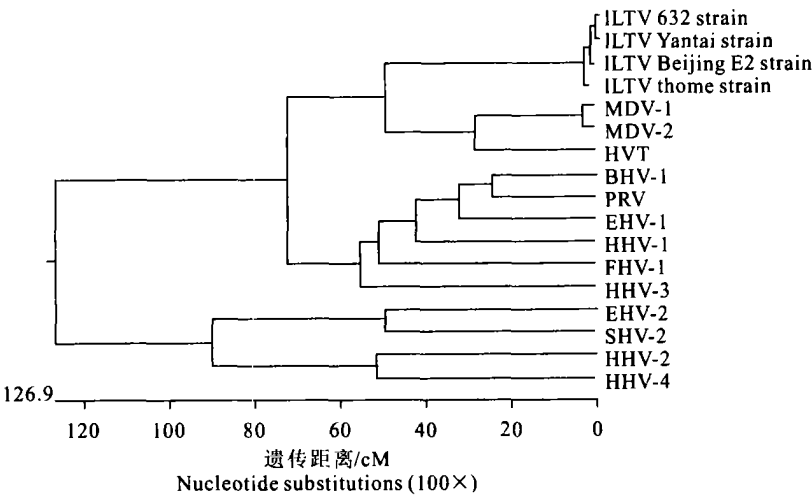


图 3 17 株疱疹病毒 TK 基因的遗传进化树

Fig 3 Phylogentic tree of 17 herpesvirus TK genes

2 4 氨基酸序列比较分析

将推导出的 L TV 烟台株 TK 蛋白氨基酸序列和美国 632 株 TK 蛋白氨基酸序列进行比较, 发现二者同源性为 98.9%, 有 4 个氨基酸发生了变化, 分别是: Pro<sub>182</sub> → Ser, Ser<sub>185</sub> → Phe, Val<sub>188</sub> → Gly, Lys<sub>343</sub> → Gln。与 Beijing E2 株和英国 Thorne 株的 TK 基因核苷酸序列相比, 由于烟台株发生了较大变异并且缺失了 3 个碱基, 所以其 TK 蛋白的氨基酸序列变异也较大, 分别是: Pro<sub>101</sub> → Arg, Ala<sub>103</sub> → Arg, Pro<sub>183</sub> → Ser, Ser<sub>186</sub> → Phe, Val<sub>189</sub> → Gly, Lys<sub>344</sub> → Gln, 且第 102 个氨基酸缺失, 同源性为 97.8%。L TV 烟台株 TK 蛋白的氨基酸序列和 BHV -1, EHV -1, EHV -2, FHV -1, HHV -1, HHV -2, HHV -3, HHV -4, HV T,

MDV -1, MDV -2, PRV 和 SHV -2 的 TK 蛋白氨基酸序列同源性分别为 26.9%, 27.9%, 23.2%, 35%, 15.1%, 25.6%, 25.9%, 23.5%, 26.5%, 21.3%, 30.4%, 28.4% 和 24.5%。

对氨基酸序列进行分析后发现, 尽管不同疱疹病毒 TK 蛋白氨基酸序列的同源性不高, 但其均有共同的保守序列, 即位于 N 端的 -DGXXGXGK- 和 -DRH- (图 4)。这正是所有疱疹病毒 TK 蛋白催化结构域中的亚结构域, 即 ATP 结合结构域和核苷酸结合结构域。由图 4 可知, 核苷酸结合结构域 (-DRH-) 在所有疱疹病毒的 TK 蛋白中是最保守的, ATP 结合结构域 (-DGXXGXGK-) 在人、鸡、痘苗病毒和禽痘病毒的胸苷激酶中也是非常保守的。

|    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |       |
|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-------|
| 8  | L | R | V | V | R | I | Y | L | D | G | A | H | G | L | G | K | T | T | T | G | R | A | L | A | A | A | S | T | BHV-1 |
| 23 | V | T | I | V | R | I | Y | L | D | G | V | Y | G | I | G | K | S | T | T | G | R | V | M | A | S | A | A | S | EHV-1 |
| 1  | M | R | I | L | R | I | Y | L | D | G | A | Y | G | T | G | K | S | T | T | A | R | V | M | A | L | G | G | A | PRV   |
| 47 | P | T | L | L | R | V | Y | I | D | G | P | H | G | M | G | K | T | T | T | T | Q | L | L | V | A | L | G | S | HHV-1 |
| 10 | M | G | V | L | R | I | Y | L | D | G | A | Y | G | I | G | K | T | T | A | A | E | E | F | L | H | H | F | A | HHV-3 |
| 29 | R | R | V | V | L | L | Y | V | D | G | P | F | G | V | G | K | T | V | T | A | K | T | L | M | Q | M | P | N | ILTV  |
| 19 | A | Q | L | I | R | V | Y | L | D | G | S | M | G | I | G | K | T | S | M | L | N | E | I | P | T | H | S | L | MDV-1 |
| 8  | P | T | L | T | R | V | Y | L | D | G | P | F | G | I | G | K | T | S | I | L | N | A | M | P | D | H | T | P | HVT   |

A

|     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |       |
|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-------|
| 123 | A | P | G | G | T | V | T | L | V | F | D | R | H | P | V | A | A | C | L | C | Y | P | F | A | R | V | C | L | R | E | BHV-1 |
| 128 | G | T | R | P | D | L | T | V | V | F | D | R | H | P | V | A | S | A | V | C | F | P | A | A | R | Y | L | I | G | D | EHV-1 |
| 98  | E | G | P | P | E | M | T | V | V | F | D | R | H | P | V | A | A | T | V | C | F | P | L | A | R | F | I | V | G | D | PRV   |
| 201 | T | N | I | V | L | G | A | L | P | E | D | R | H | I | D | R | L | A | K | R | Q | R | P | G | E | R | L | D | L | A | HHV-1 |
| 119 | N | K | E | P | Y | K | I | M | L | S | D | R | H | P | I | A | S | T | I | C | F | P | L | S | R | Y | L | V | G | D | HHV-3 |
| 136 | S | G | P | D | D | V | L | F | L | V | D | R | H | P | L | A | A | C | L | C | F | P | V | A | Q | Y | L | S | G | A | ILTV  |
| 120 | R | G | N | P | S | L | I | L | I | L | D | R | H | P | I | S | A | T | V | C | F | P | I | A | R | H | L | T | G | D | MDV-1 |
| 111 | C | D | T | P | A | I | I | L | M | L | D | R | H | P | V | A | A | I | L | C | F | P | I | T | R | Y | L | L | G | E | HVT   |

B

图4 LTV TK蛋白与其他 $\alpha$ 疱疹病毒TK蛋白中高度保守的氨基酸残基

A. ATP结合结构域; B. 核苷酸结合结构域

Fig. 4 The highly conserved amino acid residues in the TK protein of LTV and other alphaherpesviruses

A. ATP binding site; B. Nucleotide binding site

### 3 讨论

本试验对LTV不同毒株和 $\alpha$ 疱疹病毒亚科其他病毒间的TK基因和TK蛋白分别进行了核苷酸和氨基酸序列比较分析。结果表明, LTV各分离毒株间的TK基因和TK蛋白还是比较保守的, 但与同科其他疱疹病毒相比, TK基因和TK蛋白的同源性则较低。与LTV Thorne株和Beijing E2株相比, 烟台株在ATG下游第302, 303和308位的核苷酸缺失, 使该段碱基序列由CCG GTT GCC变成了CGT CGC, 对应的氨基酸序列也由P(Pro)-V(Val)-A(Ala)变为R-Arg。烟台株为一强毒株<sup>[9]</sup>, 而Beijing E2株也是国内的强毒株, 可见这种缺失对其毒力并无太大影响。虽然LTV与MDV和HVT同属禽类疱疹病毒, 但其TK基因和TK蛋白间的同源性并不高。根据绘制的遗传进化树发现, 在4个不同的LTV毒株中, 烟台株和美国632株亲缘关系最近, 推测两毒株有可能是同一起源。

本试验所做的氨基酸序列分析表明, 在所有的禽类疱疹病毒TK蛋白中都有2个共同的保守氨基酸序列, 即位于N端的ATP结合结构域: -DGP FGV GK-(LTV为35~42位, MDV为25~32位, HVT为16~23位)和核苷酸结合结构域: -DRH-。其是所有疱疹病毒TK蛋白的活性中心, 其中的D35(Asp), G36, 39, 41(Gly)和K42(Lys)在所有的 $\alpha$ 疱疹

病毒中是非常保守的。在疱疹病毒中, 只有MDV的第37位氨基酸为S(Ser), 并且只有禽类的疱疹病毒38位氨基酸为M(Met)或F(Phe)。另外, 在疱疹病毒中, 共有6个病毒的TK蛋白37位氨基酸为P(Pro), 而LTV和HVT就是其中的2个, 这些都表明禽类疱疹病毒的TK蛋白可能具有底物结合特异性。ATP结合结构域的氨基酸基序(-DGP FGV GK-)是疱疹病毒TK蛋白氨基酸的核心序列, 其形成了一个疏水的袋状构象, 以便与ATP腺嘌呤环结合, 在所有的疱疹病毒中均保守的3个氨基酸残基(G), 则形成这个疏水口袋的可变口部, 其氨基端含有酸性和芳香族氨基酸残基。该结构域的氨基酸序列对疱疹病毒的毒力具有很大影响, 如果其3个氨基酸残基(G)中的一个发生突变, 则会影响TK蛋白的构象及其与ATP的结合, 导致TK蛋白活性丧失而致弱。由于LTV烟台株和Beijing E2株及英国Thorne株之间的氨基酸变异并不在该结构域, 所以这种变异对其毒力的影响并不大。核苷酸结合结构域(-DRH-)在所有疱疹病毒中是最保守的, 其中的天冬氨酸残基是结合Mg-ATP的前体, 其前有一疏水的 $\beta$ 折叠片。该天冬氨酸残基对TK蛋白的催化活性至关重要。

另外, 本试验在4株LTV的TK蛋白氨基酸序列中, 也发现了其他疱疹病毒均有的5个保守的半胱氨酸残基(C), 这些半胱氨酸残基可能是通过形

成二硫键来维持 TK 蛋白氨基酸的功能构象,使 ATP 结合结构域与核苷酸结合结构域在空间上相互重叠,并与底物靠近,发生反应,从而发挥 TK 蛋白的功能<sup>[10]</sup>。

以前人们对 LT V TK 基因功能的了解是根据其他疱疹病毒 TK 基因进行推测,2002 年 Han 等<sup>[11]</sup>

首次通过试验证明,LT V TK 基因同其他疱疹病毒的 TK 基因一样,是病毒的毒力基因之一,且是其复制的非必需基因。TK 基因缺失后,可使毒株的毒力明显下降,但并不影响毒株的免疫原性。因此,假如构建出 LT V TK 疫苗,或许可以解决当前使用的传染性喉气管炎弱毒疫苗所存在的一些问题。

### [参考文献]

- [1] Calnek B W, Barnes H J, Beard C W, et al Disease of poultry[M]. 10th ed Ames, Iowa: Iowa State University Press, 1997. 527- 539
- [2] Johnson M A, Prideaux C T, Kongsuwan K, et al Gallid herpesvirus 1(infectious laryngotracheitis virus): cloning and physical maps of the SA -2 strain[J]. Arch Virol, 1991, 119: 181- 198
- [3] Johnson M A, Tyack S G, Prideaux C T, et al Nucleotide sequence of the left-tem inus of infectious laryngotracheitis virus (Gallid herpesvirus 1) SA -2 strain[J]. Arch Virol, 1997, 142: 1903- 1910
- [4] Wild M A, Cook S, Cochran M. A genomic map of infectious laryngotracheitis virus and the sequence and organization of genes present in the unique short and flanking regions[J]. Virus Genes, 1996, 12: 107- 116
- [5] Kit S Thymidine kinase[J]. Microbiol Sci, 1985, 2: 369- 375
- [6] Keeler C L, Kingsley D H, Burton C R. Identification of the thymidine kinase gene of infectious laryngotracheitis virus [J]. Avian Dis, 1991, 35(4): 920- 929
- [7] Griffin A M, Boursnell M E. Analysis of the nucleotide sequence of DNA from the region of the thymidine kinase gene of infectious laryngotracheitis virus; potential evolutionary relationships between the herpesvirus subfamilies[J]. J Gen Virol, 1990, 71(4): 841- 850
- [8] Han M G, Sun J K. Analysis of Korean strains of infectious laryngotracheitis virus by nucleotide sequences and restriction fragment length polymorphism [J]. Vet Microbiol, 2001, 83: 321- 331
- [9] 张秀美, 艾武, 王莉莉, 等. 鸡传染性喉气管炎的诊断与病毒分离鉴定[J]. 山东农业科学, 1997, 6: 32- 36
- [10] Graham R R, Miller W J. Evolution of the herpes thymidine kinase: identification and comparison of the equine herpesvirus 1 thymidine kinase gene reveals similarity to a cell-encoded thymidine kinase[J]. Nuc Ac Res, 1988, 16: 11303- 11317
- [11] Han M G, Kwon C H, Mo I P, et al Pathogenicity and vaccine efficacy of a thymidine kinase gene deleted infectious laryngotracheitis virus expressing the green fluorescent protein gene[J]. Arch Virol, 2002, 147: 1017- 1031

## Cloning, sequencing and function analysis of the thymidine kinase gene and its protein of infectious laryngotracheitis virus Yantai strain

L IU Wen-bo<sup>1</sup>, ZHOU Bin<sup>1</sup>, HUANG Bing<sup>1,2</sup>, ZHANG Xiu-mei<sup>2</sup>, ZHANG Su-fang<sup>1</sup>, CHEN Pu-yan<sup>1</sup>

(1 Key laboratory of Animal Diseases Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture,

Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China;

2 Institute of Poultry Science, Shandong Academy of Agricultural Science, Jinan, Shandong 250023, China)

**Abstract** A pair of primers flanking the TK gene were designed according to the published nucleotide sequence of the LT V USA 632 strain. The thymidine kinase (TK) gene of the wild Chinese LT V Yantai strain was obtained by polymerase chain reaction and the PCR products were cloned into pMD18-T vector and the nucleotides of the TK gene was sequenced. By analyzing with DNA Star software, we found that the homology of the TK gene and the deduced amino acid of LT V Yantai strain with that of LT V USA 632 strain, England Thorne strain, Beijing E2 strain, BHV-1, EHV-1, EHV-2, FHV-1, HHV-1, HHV-2, HHV-3, HHV-4, HVT, MDV-1, MDV-2, PRV and SHV-2 were between 24.6% - 99.5% and 15.1% - 98.9%. The results showed that the TK gene was very conserved among different LT V strains, but very low between different herpesvirus.

**Key words:** infectious laryngotracheitis virus; Yantai strain; thymidine kinase gene; homology analysis