

中华人民共和国国家标准

农业部 1485 号公告—2—2010

转基因微生物及其产品成分检测 猪伪狂犬 TK⁻/gE⁻/gI⁻毒株 (SA215 株) 及其产品定性 PCR 方法

Detection of genetically modified microorganisms and derived products—
Qualitative PCR method for TK⁻/gE⁻/gI⁻ deleted porcine pseudorabies
virus(SA215 strain)and its derived products

2010-11-15 发布

2011-01-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业部科技教育司提出。

本标准由全国农业转基因生物安全管理标准化技术委员会(SAC/TC 276) 归口

本标准起草单位:农业部科技发展中心、中国兽医药品监察所、四川农业大学。

本标准主要起草人:沈青春、段武德、宁宜宝、郭万柱、李飞武、刘信。

转基因微生物及其产品成分检测

猪伪狂犬 TK⁻/gE⁻/gI⁻ 毒株(SA215 株)及其产品定性 PCR 方法

1 范围

本标准规定了猪伪狂犬 TK⁻/gE⁻/gI⁻ 毒株(SA215 株)及其产品的定性 PCR 检测方法。
本标准适用于猪伪狂犬疫苗中 TK⁻/gE⁻/gI⁻ 毒株(SA215 株)的检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB 2828 计数抽样检验程序

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

野毒株 wild strain

从田间自然感染动物或动物尸体内分离的病毒毒株。

3.2

亲本毒株 parental strain

某病毒毒株经物理、化学或基因工程方式改造而得到了具有新的病毒学特性的新毒株,则该毒株为新毒株的亲本毒株。

3.3

TK 基因 thymidine kinase gene

编码猪伪狂犬病毒胸苷激酶的基因。

3.4

gE 基因 envelope glycoprotein E gene

编码猪伪狂犬病毒囊膜糖蛋白 E 的基因。

3.5

gI 基因 envelope glycoprotein I gene

编码猪伪狂犬病毒囊膜糖蛋白 I 的基因。

4 原理

根据猪伪狂犬疫苗毒株 SA215 与其亲本毒株之间的两处序列(包含 TK、gE 和 gI 三个基因)上的差异,设计三对引物进行 PCR 扩增,通过比较扩增条带的差异,确定猪伪狂犬疫苗中是否含有 SA215 株,参见附录 A

5 试剂和材料

除非另有说明,仅使用分析纯试剂和重蒸馏水或符合 GB/T 6682 规定的一级水。

- 5.1 无水乙醇。
- 5.2 氯仿。
- 5.3 异戊醇。
- 5.4 Tris 平衡酚(pH 8.0)。
- 5.5 平衡酚—氯仿—异戊醇溶液(25+24+1)。
- 5.6 体积分数为 70%的乙醇溶液。
- 5.7 琼脂糖。
- 5.8 10 g/L 溴化乙锭溶液:称取 1.0 g 溴化乙锭(EB),溶于 100 mL 水中,避光保存。
注:溴化乙锭有致癌作用,配制和使用时宜戴一次性手套操作并妥善处理废液。
- 5.9 10 mol/L 氢氧化钠溶液:在 160 mL 水中加入 80.0 g 氢氧化钠(NaOH),溶解后再加水定容至 200 mL。
- 5.10 1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷—盐酸溶液(pH 8.0):称取 121.1 g 三羟甲基氨基甲烷(Tris)溶解于 800 mL 水中,用盐酸调 pH 至 8.0,加水定容至 1 000 mL,在 103.4 kPa(121℃)条件下灭菌 20 min
- 5.11 500 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠溶液(pH 8.0):称取 18.6 g 乙二胺四乙酸二钠(EDTA - Na₂),加入 70 mL 水中,再加入适量氢氧化钠溶液(5.9),加热至完全溶解后,冷却至室温,用氢氧化钠溶液(5.9)调 pH 至 8.0,加水定容至 100 mL。在 103.4 kPa(121℃)条件下灭菌 20 min
- 5.12 TE 缓冲液(pH 8.0):分别量取 10 mL 三羟甲基氨基甲烷—盐酸溶液(5.10)和 2 mL 乙二胺四乙酸二钠溶液(5.11),加水定容至 1 000 mL。在 103.4 kPa(121℃)条件下灭菌 20 min
- 5.13 50×TAE 缓冲液:称取 242.2 g 三羟甲基氨基甲烷(Tris),先用 300 mL 水加热搅拌溶解后,加入 100 mL 乙二胺四乙酸二钠溶液(5.11),用冰乙酸调 pH 至 8.0,然后加水定容到 1 000 mL。使用时用水稀释成 1×TAE。
- 5.14 加样缓冲液:称取 250.0 mg 溴酚蓝,加 10 mL 水,在室温下溶解 12 h;称取 250.0 mg 二甲苯腈蓝,用 10 mL 水溶解;称取 50.0 g 蔗糖,用 30 mL 水溶解。混合以上三种溶液,加水定容至 100 mL,在 4℃下保存。
- 5.15 病毒 DNA 提取试剂盒。
- 5.16 引物序列:见表 1
- 5.17 Taq DNA 聚合酶及 PCR 反应缓冲液:适用于高 GC 含量的 DNA 片段扩增。
- 5.18 DNA 分子量标准:可以清楚地区分 200 bp~3 000 bp 的 DNA 片段。
- 5.19 dNTPs 混合溶液:将浓度为 10 mmol/L 的 dATP、dTTP、dGTP、dCTP 四种脱氧核糖核苷酸溶液等体积混合。
- 5.20 引物溶液:用 TE 缓冲液(5.12)分别将上述引物稀释到 10 μmol/L
- 5.21 石蜡油。
- 5.22 PCR 产物回收试剂盒。

表 1 PCR 引物序列及目的片段长度

引物名称	引物序列	扩增产物预期片段大小, bp		目的基因名称
		猪伪狂犬 SA215 的亲本毒株和野毒株	猪伪狂犬 SA215 株	
TK - F	5'- CATCCTCCGGATCTACCTCGACGGC - 3'	957	681	TK
TK - R	5'- CACACCCCATCTCCGACGTGAAGG - 3'			
gIE - F	5'- CCCTGGACGCGAACGGCACGAT - 3'	2 948	296	gI、gE
gIE - R	5'- CTCCGAGGAGCGCAGCACACGTGTT - 3'			
gIME - F	5'- CATGGTGCTGGGGCCCACGATCGTC - 3'	531	—	gI、gE
gIME - R	5'- CGTTGAGGTCGCCGTCAGGTCAT - 3'			

6 仪器和设备

- 6.1 分析天平:感量 0.1 g 和 0.1 mg。
- 6.2 重蒸馏水发生器或超纯水仪。
- 6.3 PCR 扩增仪:升降温速度 $>1.5^{\circ}\text{C}/\text{s}$,孔间温度差异 $<1.0^{\circ}\text{C}$
- 6.4 电泳槽、电泳仪等电泳装置。
- 6.5 紫外透射仪。
- 6.6 凝胶成像系统或照相系统。
- 6.7 其他相关仪器和设备。

7 操作步骤

7.1 抽样

按 GB 2828 的规定执行。

7.2 DNA 模板制备

7.2.1 采用下述方法,或经验证适用于病毒 DNA 提取的试剂盒方法

取 1.0 mL 疫苗样品稀释物或细胞培养液置于 2.5 mL 离心管中,反复冻融三次后, 4°C 下 12 000 g 离心 5 min,取上清液,加入 0.5 mL Tris 平衡酚,颠倒震荡 2 min, 4°C 下 8 000 g 离心 2 min,取上清液,加入 0.5 mL 平衡酚—氯仿—异戊醇溶液,颠倒震荡 2 min, 4°C 下 12 000 g 离心 5 min,取上清液,加入等体积的异丙醇混匀,置于一 20°C 沉淀 1 h, 4°C 下 12 000 g 离心 10 min,弃上清,加入 1.0 mL 70%乙醇溶液洗涤一次后晾干,加入 50 μL TE 缓冲液溶解 DNA,置于一 20°C 冻存。

7.2.2 DNA 溶液纯度测定和保存

将 DNA 适当稀释或浓缩,使其 OD_{260} 值应在 0.1~0.8 的区间内,测定并记录其在 260 nm 和 280 nm 的吸光度。以 1 个 OD_{260} 值相当于 50 mg/L DNA 浓度来计算纯化 DNA 的浓度,DNA 溶液的 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 值应在 1.7~2.0 之间。依据测得的浓度将 DNA 溶液稀释到 25 mg/L -20°C 保存备用。

7.3 PCR 反应

7.3.1 试样 PCR 反应

7.3.1.1 每个试样 PCR 反应设置 3 次重复。

7.3.1.2 在 PCR 反应管中按表 2 依次加入反应试剂,混匀,再加 25 μL 石蜡油(有热盖设备的 PCR 仪可不加)。

表 2 PCR 反应体系

试 剂	终浓度	体 积
水		—
PCR 缓冲液	1×	—
25 mmol/L 氯化镁溶液	2.5 mmol/L	2.5 μL
dNTPs 混合溶液(各 2.5 mmol/L)	各 0.2 mmol/L	2 μL
10 $\mu\text{mol/L}$ 上游引物	0.8 $\mu\text{mol/L}$	2 μL
10 $\mu\text{mol/L}$ 下游引物	0.8 $\mu\text{mol/L}$	2 μL
Taq 酶	0.05 U/ μL	—
25 mg/L DNA 模板	2 mg/L	2.0 μL
总体积		25.0 μL

注:根据 Taq 酶的浓度和 PCR 缓冲液的倍数分别确定其体积,相应调整水的体积,使反应体系总体积达到 25.0 μL 。
如果 PCR 缓冲液中含有氯化镁,则不加氯化镁溶液,加等体积水。

7.3.1.3 将 PCR 管放在台式离心机上,500 g~3 000 g 离心 10 s,然后取出 PCR 管,放入 PCR 仪中,设定热盖温度为 99℃

7.3.1.4 进行 PCR 反应。引物 TK-F/R 和 gIME-F/R 反应程序为:95℃预变性 5 min;94℃变性 40 s,68.5℃退火 40 s,72.0℃延伸 55 s,共进行 35 个循环;72℃延伸 5 min。引物 gIE-F/R 反应程序为:95℃预变性 5 min;94.0℃变性 30 s,67.0℃退火 30 s,72.0℃延伸 30 s,共进行 35 个循环,72℃延伸 5 min

7.3.1.5 反应结束后取出 PCR 管,对 PCR 反应产物进行电泳检测。

7.3.2 对照 PCR 反应

在试样 PCR 反应的同时,应设置阴性对照、阳性对照和空白对照。

以猪伪狂犬 SA215 株的亲代 Fa 株 SPF 鸡成纤维细胞毒(蚀斑数 $\geq 10^4$ PFU/mL)冻干制品提取的 DNA 作为阴性对照;以猪伪狂犬 SA215 株 SPF 鸡成纤维细胞毒(蚀斑数 $\geq 10^4$ PFU/mL)冻干制品提取的 DNA 作为阳性对照;以 SPF 鸡成纤维细胞培养物制备成冻干制品作为空白对照。

各对照 PCR 反应体系中,除模板外,其余组分及 PCR 反应条件与 7.3.1 相同。

7.4 PCR 产物电泳检测

按 10 g/L 的质量浓度称取琼脂糖,加入 1×TAE 缓冲液中,加热溶解,配制成琼脂糖溶液。每 100 mL 琼脂糖溶液中加入 5 μ L EB 溶液,混匀,适当冷却后,将其倒入电泳板上,插上梳板,室温下凝固成凝胶后,放入 1×TAE 缓冲液中,垂直向上轻轻拨去梳板。取 12 μ L PCR 产物与 3 μ L 加样缓冲液混合后加入点样孔中,同时在其中一个点样孔中加入 DNA 分子量标准,接通电源在 2 V/cm~5 V/cm 条件下电泳检测。

7.5 凝胶成像分析

电泳结束后,取出琼脂糖凝胶,置于凝胶成像仪或紫外透射仪上成像。根据 DNA 分子量标准估计扩增条带的大小,将电泳结果形成电子文件存档或用照相系统拍照。如需通过序列分析确认 PCR 扩增片段是否为目的 DNA 片段,按照 7.6 和 7.7 的规定执行。

7.6 PCR 产物回收

按 PCR 产物回收试剂盒说明书,回收 PCR 扩增的 DNA 片段。

7.7 PCR 产物测序验证

将回收的 PCR 产物克隆测序,与猪伪狂犬病毒 SA215 株相应序列(参见附录 B)进行比对,确定 PCR 扩增的 DNA 片段是否为目的 DNA 片段。

8 结果分析与表述

8.1 对照检测结果分析

阳性对照 PCR 反应中,TK-F/R 和 gIE-F/R 分别扩增出 681 bp 和 296 bp 的片段,gIME-F/R 引物没有扩增片段,阴性对照中 TK-F/R 扩增出 957 bp 片段,gIME-F/R 扩增出 531 bp 片段;空白对照三对引物均没有任何扩增片段,表明 PCR 反应体系正常工作,否则需重新检测。

8.2 样品检测结果分析和表述

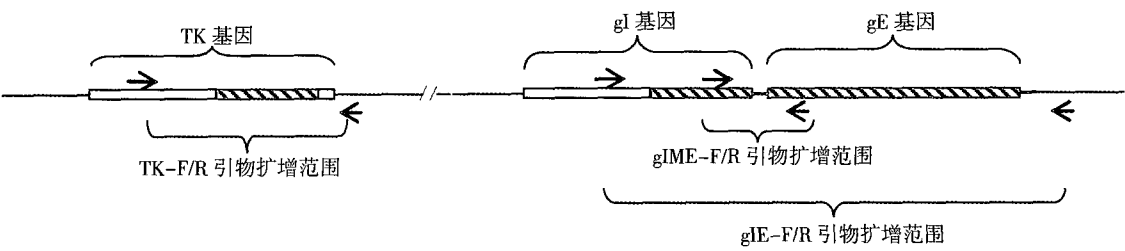
8.2.1 TK-F/R 引物扩增出 681 bp 的条带,gIE-F/R 引物扩增出 296 bp 的条带,表明样品中检测出猪伪狂犬病毒 SA215 株,检测结果为阳性。

8.2.2 TK-F/R 引物未扩增出 681 bp 的条带,gIE-F/R 引物未扩增出 296 bp 的条带,表明样品中未检测出猪伪狂犬病毒 SA215 株,检测结果为阴性。

8.2.3 TK-F/R 引物扩增出 957 bp 的条带,gIME-F/R 引物扩增出 531 bp 条带,表明样品中检测出猪伪狂犬 SA215 的亲本毒株或野毒株。

附 录 A
(资料性附录)

猪伪狂犬病毒 SA215 株和其亲本毒株基因结构及检测引物所在位置示意图



注：“▨”部分为猪伪狂犬病毒 SA215 株不具有而其亲本毒株和野毒株具有的序列，即缺失部分的序列，SA215 株在 TK 基因处的缺失长度为 276 bp，而在 gI 和 gE 基因处缺失长度为 2 652 bp。

附 录 B
(资料性附录)

猪伪狂犬病毒 SA215 株缺失部分核苷酸序列及其在亲本毒株 Fa 株的相应序列

B.1 TK 基因缺失处的核苷酸序列

1 GGATCCCCGC CCGGAAGCGC GCCGGGATGC GCATCCTCCG GATCTACCTC GACGGCGCCT
61 ACGGCACCGG CAAGAGCACC ACTGCCCCGG TGATGGCGCT CGGCGGGGCG CTGTACGTGC
121 CCGAGCCGAT GGCGTACTGG CGCACTCTGT TCGACACGGA CACGGTGGCC GGTATTTACG
181 ATGCGCAGAC CCGGAAGCAG AACGGCAGCC TGAGCGAGGA GGACGCGGCC CTCGTACAGG
241 CGCAGACCA GGCCGCCTTC GCGACGCCGT ACCTGCTGCT GCACACGCGC CTGGTCCCCG
301 TCTTCGGGCC CGCGGTCGAG GGCCCGCCCG AGATGACGGT CGTCTTTGAC CGCCACCCGG
361 TGGCCGCGAC GGTGTGCTTC CCGCTGGCGC GCTTCATCGT CGGGGACATC AGCGCGGCGG
421 CCTTCGTGGG CCTGGCGGCC ACGTGCCCG GGGAGCCCC CGGCGGCAAC CTGGTGGTGG
481 CCTCGCTGGA CCCGGACGAG CACCTGCGGC GCCTGCGCGC CCGCGCGCGC GCCGGGGAGC
541 ACGTGACGC GCGCCTGCTC ACGGCCCTGC GCAACGTC TA CGCCATGCTG GTCAACACGT
601 CGCGCTACCT GAGCTCGGGG CGCCGCTGGC GCGACGACTG GGGGCGCGCG CCGCGCTTCG
661 ACCAGACCGT GCGCGACTGC CTCGCGCTCA ACGAGCTCTG CCGCCCGCGC GACGACCCCG
721 AGCTCCAGGA CACCCTCTTC GGCCGTACA AGGCGCCCGA GCTCTGCGAC CGGCGCGGGC
781 GCCCGCTCGA GGTGCACGCG TGGGCGATGG ACGCGCTCGT GGCCAAGCTG CTGCCGCTGC
841 GCGTCTCCAC CGTCGACCTG GGGCCCTCGC CGCGCGTCTG CGCCGCGGCC GTGGCGGCGC
901 AGACGCGCGG CATGGAGGTG ACGGAGTCCG CGTACGGCGA CCACATCCGG CAGTGCCTGT
961 GCGCCTTCAC GTCGGAGATG GGGGTGTGAC CCTCGCCCCC CCCACCCGCG CCGCGGCCAG
1021 ATGGAGACCGCGACGGAGGCAACGACGACGGCGTGGGAGG GGGCTCGGGG CGCGTATAAA
1081 GCTATGTGTA TGTCATCCCA ATAAAGTTTG CCGTGCCCGT CACCATGCCC GCGTCGTCCG
1141 TGCGCCTCCC GCTGCGCCTC CTGACCCTCG CGGGCCTCCT GGCCCTCGCG GGGGCCGCCG
1201 CCCTCGCCCC CGGCGCGCCG CAGGGTGGGC CGCCCT

注：单下划线为 TK - F/R 引物所在位置；

□部分的序列为猪伪狂犬病毒 SA215 株缺失部分的序列。

B.2 gI 和 gE 基因缺失处的核苷酸序列

1 ATGATGATGG TGGCGCGCGA CGTGACCCGG CTCCCCGCGG GGCTCCTCCT CGCCGCCCTG
61 ACCCTGGCCG CCCTGACCCC GCGCGTCGGG GGCGTCCTCT TCAGGGGCGC CGGCGTCAGC
121 GTGCACGTCG CCGGCAGCGC CGTCCTCGTG CCCGGCGACG CGCCCAACCT GACGATCGAC
181 GGGACGCTGC TGTTTCTGGA GGGGCCCTCG CCGAGCAACT ACAGCGGGCG CGTGAGCTG
241 CTGCGCCTCG ACCCCAAGCG CGCCTGCTAC ACGCGCGAGT ACGCCGCCGA GTACGACCTC
301 TGCCCCCGCG TGCACCACGA GGCCTTCCGC GGCTGTCTGC GCAAGCGCGA GCCGCTCGCC
361 CGGCGCGCGT CCGCCGCGGT GGAGGCGCGC CGGCTGCTGT TCGTCTCGCG CCCGGCCCCG
421 CCGGACGCGG GGTGCTACGT GCTGCGGGTC CGCGTGAACG GGACCACGGA CCTCTTTGTG
481 CTGACGGCCC TGGTGCCGCC CAGGGGGCGC CCCCACCACC CCACGCCGTC GTCCGCGGAC

541 GAGTGCCGGC CCGTCGTGG ATCGTGGCAC GACAGCCTGC GCGTCGTGGA CCCC GCCGAG
 601 GACGCCGTGT TCACCACGCC GCCCCGATC GAGCCAGAGC CGCCGACGAC CCCC GCCGCC
 661 CCCC GGGGACCGGCGCCACCCCCGAGCCC CGCTCCGACG AAGAGGAGGA GGACGAGGAG
 721 GGGGCGACGA CGGCGATGAC CCCGGTGCCC GGGACCCTGG ACGCGAACGG CACGATGGTG
 781 CTGAACGCCA GCGTCGTGTC GCGCGTCTTG CTCGCCCGCC CCAACGCCAC GCGGGGCGCC
 841 CGGGGCCCCG GGAAGATAGC CATGGTGCTG GGGCCCACGA TCGTCGTCTT CCTGATCTTC
 901 TTGGGCGGGG TCGCCTGCGC GGCCCGGCGC TCGCGCGGGA ATCGCATCTA CCGGCCGCGA
 961 CCGGGGCGCG GCCCGGCGGT CCACGCGCCG CCCC GCCGGC GCGCGCCCC CAGCCCCGTC
 1021 GCGGGGCGCG CCGTCCCCCA GCCAAGATG ACGTTGGCCG AGCTTCGCCA GAAGCTGGCC
 1081 ACCATCGCAG AGGAACAATA AAAAGGTGGT GTTTGCATAA TTTTGTGGGT GCGTTTTAT
 1141 CTCCGTCCCG GCCGTTTTAA ACCTGGGCAC CCCC GCCGAGT CTCGCACACA CCGGGGTGTA
 1201 GACCATGCGG CCCTTTCTGC TGCGCGCCGC GCAGCTCTTG GCGCTGCTGG CCCTGGCGCT
 1261 CTCCACCGAG GCCCCGAGCC TCTCCGCCGA GACGACCCCG GGCCCCGTCA CCGAGGTCCC
 1321 GAGTCCCTCGGCCGAGGTCT GGGACCTCTC CACCGAGGCC GCGGACGATG ACCTCGACGG
 1381 CGACCTCAACGGCGACGACC GCCGCGCGGG CTTCGGCTCG GCCCTCGCCT CCCTGAGGGA
 1441 GGCACCCCCG GCCCATCTGG TGAACGTGTC CGAGGGCGCC AACTTCACCC TCGACGCGCG
 1501 CGGCGACGGC GCCGTGGTGGCCGGATCTG GACGTTCTTG CCCGTCCGCG GCTGCGACGC
 1561 CGTGGCGGTG ACCATGGTGT GCTTCGAGAC CGCTGCCAC CCGGACCTGG TGCTGGGCCG
 1621 CGCCTGCGTC CCGAGGGCCCCGGAGCGGGG CATCGGCGAC TACCTGCCGC CCGAGGTGCC
 1681 GCGGCTCCAG CGCGAGCCGC CCATCGTCAC CCGGAGCGG TGGTCGCCGC ACCTGACCGT
 1741 CCGGCGGGCC ACGCCCAACGACACGGGCTCTACACGCTG CACGACGCTT CCGGGCCCGC
 1801 GGCCGTGTTT TTTGTGGCGG TGGGCGACCG GCCGCCCGCG CCGTGGCCC CCGTGGGCC
 1861 CGCGCGCCAC GAGCCCCGCT TCCACGCGCT CGGCTTCCAC TCGAGCTCTT TCTGCCCGG
 1921 GGACACGTTT GACCTGATGC CGCGCGTGGT CTCGGACATG GCGACTCGC GCGAGAACTT
 1981 CACCGCCACG CTGGACTGGT ACTACGCGCG CGCGCCCCCG CCGTGCCTGC TGACTACGT
 2041 GTACGAGCCC TGCATCTACC ACCCGCGCGC GCCCGAGTGC CTGCGCCCGG TGGACCCGGC
 2101 GTGCGACTTC ACCTCGCCGG CGCGCGCGCG GCTGGTGGCG CGCCGCGCGT ACGCCTCGTG
 2161 CAGCCCGCTG CTCGGGGACC GGTGGCTGAC CGCCTGCCCC TTCGACGCTT TCGGCGAGGA
 2221 GGTGCACACG AACGCCACCGCGGACGAGTC GGGGCTGTAC GTGCTCGTGA TGACCCACAA
 2281 CGGCCACGTC GCCACCTGGG ACTACACGCT CGTCGCCACC GCGGCCGAGT ACGTCACGGT
 2341 CATCAAGGAGCTGACGGCCCCGGCCCGGGC CCCGGGCACC CCGTGGGGCC CCGGCGGCGG
 2401 CGACGACGCGATCTACGTGGACGGCGTCAC GACGCCGGCG CCGCCCGCGC GCCCGTGGAA
 2461 CCCGTACGGC CGGACGACGC CCGGGCGGCT GTTTGTGCTG GCGCTGGGCT CCTTCGTGAT
 2521 GACGTGCGTC GTCGGGGGGG CCGTCTGGCT CTGCGTGCTG TGCTCCCGCC GCCGGGCGGC
 2581 CTCGCGGCCG TTCCGGGTGC CGACGCGGGC GGGGACGCGC ATGCTCTCGC CCGTGTACAC
 2641 CAGCCTGCCCACGACGAGGACTACTACGACGGCGACGAC GACGACGAGG AGGCGGGCGA
 2701 CGCCCGCCGGCGGCCCTCTT CCCCCGCGG GGACAGCGGC TACGAGGGGC CGTACGTGAG
 2761 CCTGGACGCCGAGGACGAGTTCAGCAGCGACGAGGACGAC GGGCTGTACG TGCGCCCCGA
 2821 GGAGGCGCCC CGCTCCGGCTTCGACGTCTG GTTCCGCGAT CCGGAGAAAC CGGAAGTGAC
 2881 GAATGGGCCC AACTATGGCG TGACCGCCAG CCGCCTGTTG AATGCCCGCC CCGCTTAAAT
 2941 ACCGGGAGAA CCGGCCCGCC CGCATTCGA CATGCCCGCC GCCGCCCGCC CCGACATGGA
 3001 CACGTTTCGAC CCCAGCGCCC CCGTCCCGAC GAGCGTCTT AACC CGGCCG CCGACGTCTT
 3061 GCTGGCCCCC AAGGGACCCC GCTCCCCGCT GCGCCCCAG GACGACTCGG ACTGCTACTA

3121 CAGCGAGAGCGACAACGAGACGCCCAGCGAGTTCCTGCGCCGCGTGGGAC GCCGGCAGGC
3181 GGCGCGCCGG AGACGCCGCC GCTGCCTGAT GGGCGTCGCG ATCAGCGCCG CCGCGCTGGT
3241 CATCTGCTCG CTGTGGCGC TGATCGGGG CATCATCGCC CGGCACGTGT AGCGAGCGGG
3301 TGGTGGCCGCCCGCCCCGCCGCGCCCAGGAGGGGGGGTCCGGGGGGGCGA AGCGGGCGGA
3361 GGAGAGCGAG CCACGTGGTT GTGGGCTCGG ACTTGTACA ATAAATGGGC CCCGGCGCAC
3421 CCGGGCGCAC ACAGAGCCT TCCTCGTCTC CGCGTCTCTG CTGTTCTCT CGTCGGTCTT
3481 CTCCCACTCC GCCGTGCGA ACGCGCTCGC G CATGGGGG TGACGGCCAT CACCGTGGTC
3541 ACGCTGATGG ACGGGTCCGG GCGCATCCCC GCCTTCGTGG GCGAGGCGCA CCCGGACCTG
3601 TGAAGGTGC TCACCGAGTG GTGCTACGCG TCGCTGGTGC AGCAGCGGCG GCCGCCGAC
3661 GAGGACACGC CGCGGCAACA CGTGGTGCTG CGCTCCTCGG AGATCGCCCC CGGCTCGCTG
3721 GCCCTGCTGCCGCGCGCCAC GCGCCCCGTC GTGCGGACAC GGTCCGACCC CACGGCGCCG
3781 TTCTACATCA CCACCGAGAC GCACGAGCTG ACGCGGCGCC CCCC GGCGGA CGGCTCGAAG
3841 CCCGGGGAGC CCCTCCGTAT CAGCCCGCCC CCGCGGCTGG ACACGGAGTG GTCCTCCGTC
3901 ATCAACGGGA TCC

注:单下划线为 gIE - F/R 引物所在位置;

双下划线为 gIME - F / R 引物所在位置;

□部分的序列为猪伪狂犬病毒 SA215 株缺失部分的序列。