

感染 CDV 的犬病料 N、H、F 基因的克隆与序列分析

刘巧荣¹, 包新奇³, 孙明¹, 王芳¹, 乔明明¹, 李佳¹, 陈曦¹, 秦亚嫚¹, 陈西钊^{1, 2}

(1. 北京世纪元亨动物防疫技术有限公司, 北京 100085; 2. 中国动物疫病预防控制中心, 北京 100085;
3. 江苏省动物疫病预防控制中心, 南京 210036)

【摘要】 目的 了解病料中犬瘟热病毒(CDV)的变异情况,为犬瘟热的预防与治疗提供理论依据。方法 采用 RT-PCR 方法对犬病料中 CDV 的血凝素蛋白(H)、融合蛋白(F)和核衣壳蛋白(N)基因进行扩增,将扩增产物克隆到 pGEM-T-easy 载体中测序,并进行序列分析。结果 测定一株 CDV 的 H、F 和 N 基因大小分别为 1863 bp、1653 bp 和 2235 bp。同源性分析表明,未发现碱基的插入和缺失。该病毒的 H、F 和 N 基因分别与国内强毒株 BJ080127 株的 H 基因、GN 株的 F 基因和 HL 株的 N 基因亲缘关系最近,氨基酸同源性分别为 97.3%、97.7% 和 99.3%。与国外标准野毒株 A75-17 在核苷酸水平上同源性依次为 94.4%、93.8% 和 97.2%,与疫苗株 CDV3 在核苷酸水平上同源性分别为 88.5%、88.8% 和 93.9%。系统进化树表明该病毒与国内强毒株在同一谱系。糖基化分析显示,该病毒在 F 基因 3~5 位氨基酸处多出 1 个糖基化位点。结论 本研究从犬病料中成功克隆了犬瘟热病毒血凝素蛋白、融合蛋白和核衣壳蛋白,在 F 基因中新增了一个糖基化位点,为犬瘟热的遗传变异和流行病学研究提供了分子生物学依据。

【关键词】 犬瘟热;血凝素蛋白基因;融合蛋白基因;核衣壳蛋白基因;序列分析 S

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)04-0037-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.04.009

Cloning and Sequence Analysis of Canine Distemper Virus N, F and H Genes from the Samples Infected with CDV

LIU Qiao-rong¹, BAO Xin-qi³, SUN Ming¹, Wang Fang¹, QIAO Ming-ming¹, LI Jia¹,
CHEN Xi¹, QIN Ya-man¹, CHEN Xi-zhao^{1, 2}

(1. Beijing ANHEAL Laboratories Co. Ltd, Beijing 100085, China; 2. China Animal Disease Control Center, Beijing 100085;
3. Jiangsu Animal Disease Control Center, Nanjing 210036, China)

【Abstract】 Objective The aim of this study was to identify the variations of canine distemper viruses (CDV) obtained from clinical samples and provide a theoretical basis for the prevention and control of CDV infection. **Methods** The segments of hemagglutinin protein (H) gene fusion protein (F) gene and nucleocapsid protein (N) gene were amplified by RT-PCR. The amplicons were cloned into pGEM-T-easy vector and the recombination clones were sequenced. Subsequently the nucleotide and amino acid sequences were analyzed. **Results** The nucleotide lengths of H, F and N genes for the virus were 1863 bp, 1653 bp and 2234 bp, respectively. Sequence analysis did not present any nucleotide insertion or deletion. The three sequences determined in this study showed the high amino acid identities corresponding with three Chinese highly pathogenic CDV isolates BJ080127 (H gene), GN (F gene) and HL (N gene) which were 97.3%, 97.7% and 99.3% respectively. Meanwhile each of them displayed the nucleotide identity of 94.4%, 93.8% and 97.2% when compared with the CDV prototypic strain A75-17. In addition comparing with the CDV vaccine strain CDV3 they displayed the nucleotide similarities of 88.5%, 88.8% and 93.9%,

[作者简介] 刘巧荣(1979-)女,硕士。主要研究方向:动物疫病诊断。

[通讯作者] 陈西钊,博士,研究员,Email: chenxizhao@anheal.com。

respectively. The glycosylation sites analyses revealed a glycosylation site aimed at the 3 ~ 5 amino acids of F gene. The phylogenetic tree displayed that the virus had the closest relationship with the highly pathogenic CDV isolates identified in China.

Conclusion In this study we cloned the H, F and N genes of a CDV determined in canine samples and identified that the virus is a highly pathogenic CDV, which contains a novel glycosylation site in F gene. This study provides evidence in studies on the molecular mutation epidemiology of CDV infection.

【Key words】 Canine distemper virus; Hemagglutinin protein gene; Fusion protein gene; Nucleocapsid protein gene; Sequence analysis

犬瘟热 (canine distemper, CD) 是由犬瘟热病毒 (canine distemper virus, CDV) 引起的一种急性、高度接触性传染病。该病毒属于副粘病毒科、麻疹病毒属的单股负链 RNA 病毒。在自然状态下感染犬科、鼬科、浣熊科等多种动物。是养犬业、毛皮兽养殖业的主要传染病。目前, CDV 自然感染的动物范围还有不断扩大的趋势, 甚至已扩展到偶蹄目猪科及灵长类猕猴属等动物^[8]。也有日本学者报道 CDV 可感染人^[1], 其危害越来越大。因此, 本研究对 CDV 的有效防治具有重要意义。

CDV 基因组全长 15690 bp, 编码 6 种结构蛋白, 分别为核衣壳蛋白 (N)、膜蛋白 (M)、磷蛋白 (P)、融合蛋白 (F)、血凝素蛋白 (H)、大蛋白 (L)。其中 F、H 和 N 蛋白是主要的结构蛋白, 在机体免疫原性与致病性上发挥着重要作用。本研究从感染 CDV 的犬病料中克隆出 N、H、F 基因, 与国内外的 CDV 毒株进行遗传关系比较, 旨在分析其在基因水平上发生的遗传变化, 为 CDV 基因序列数据库的丰富和 CDV 分子流行病学的深入研究提供新的实验数据。

1 材料和方法

1.1 病料和毒株

病料由中国农业大学动物医学院提供。2008 年 12 月, 1 只 3 月龄喜乐蒂犬, 临床症状有疑似犬瘟热, 经过 RT-PCR 方法和胶体金试剂盒检测为阳性, 确诊为犬瘟热。

1.2 载体、菌株和主要试剂

pGEM-T-Easy 载体购自于 Promega 公司, JM109 感受态细胞购自于北京全式金生物技术有限公司。EX-Taq 酶为 TaKaRa 公司产品, 总 RNA 提取试剂盒为 Bioflux 公司产品, 胶回收试剂盒为 Omega 产品。

1.3 引物的设计与合成

根据 Genbank 上发表的 CDV 全基因序列, 针对 N、F、H 蛋白的全基因分别设计 3 对引物, 由上海英骏生物技术有限公司合成:

N-P1: 5'-GCCTTCTTAARAGCCT-3'

N-P2: 5'-TTGTTGGACCTGGGTCCTAAGT-3'

扩增 N 基因

F-P1: 5'-TAATCAAAACTTAGGGTCCAGGA-3'

F-P2: 5'-CTACCTGAGCCCTAAGTTTTCT-3'

扩增 F 基因

H-P1: 5'-GCTCAGGTACTCCARCAATGCT-3'

H-P2: 5'-GARATGTGTATCATYATACTGTCA-3'

扩增 H 基因。

1.4 RNA 的提取

将犬瘟热病料的肺组织研磨成匀浆, 8 000 r/min 离心 4 min, 取上清液 100 μ L, 按照 Bioflux RNA 提取试剂盒操作说明提取病毒总 RNA。

1.5 RT-PCR 反应

25 μ L 反应体系中加入 DEPC 处理的灭菌双蒸水 12.5 μ L, 5 \times PCR buffer 5 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 2.5 μ L, 10 pmol/L 引物 1.5 μ L, AMV 反转录酶 0.2 μ L (10 U/ μ L), RNA 酶抑制剂 0.3 μ L (40 U/ μ L), TaqDNA 聚合酶 1 μ L (5 U/ μ L), 模板 2 μ L。PCR 扩增程序如下: 42 $^{\circ}$ C 1 h, 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 45 s, 退火温度分别为 44 $^{\circ}$ C、46 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C 和 52 $^{\circ}$ C, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 各 10 循环; 72 $^{\circ}$ C 扩增 10 min。

1.6 扩增产物的克隆及测序

RT-PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后, 用胶回收试剂盒回收纯化扩增的目的基因片段, 按照 pGEM-T easy 载体操作手册进行连接, 转化至大肠杆菌 JM109 感受态细胞。用 PCR 筛选阳性克隆, 将阳性克隆送上海英骏生物技术有限公司进行测序。

1.7 目的基因序列同源性分析与比较

应用 DNAMAN 和 DNASTAR 生物软件分析目的基因序列, 并将 N、F、H 基因序列和推导的氨基酸序列与 GenBank 上的 CDV 代表毒株进行同源性分析比较, 绘制系统进化树。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 扩增结果

用设计的 3 对引物对感染肺组织的 RNA 进行

RT-PCR 扩增,得到了与 N、F、H 设计大小一致的目的片段,其片段长度分别约为 1 600 bp、2 200 bp 和 1 800 bp。与预期大小一致(图 1),将病毒命名为 CDV-WZ。

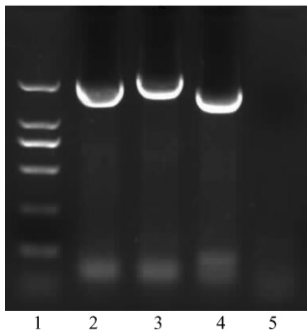


图 1 1 Marker; 2 H 基因; 3 F 基因; 4 N 基因; 5 阴性对照

Fig. 1 1:Marker; 2:H gene; 3:F gene; 4:N gene; 5:Negative control

2.2 克隆鉴定和测序结果

重组质粒经 PCR 鉴定显示,成功将 3 个基因片段克隆到 pGEM-T-Easy 载体中。阳性质粒经上海英骏生物技术有限公司测序表明,扩增的 H、F 和 N 大小分别为 1 863 bp、2 235 bp 和 1 653 bp,未发现碱基的插入和缺失。

2.3 序列同源性分析结果

N 基因与 Genbank 中 22 株 CDV 毒株在核苷酸水平上同源性为 (CDV3) 93.3% ~ 97.4% (HL),氨基酸水平上同源性为 (CDV3) 96.9% ~ 99.3% (HL)。该 CDV-WZ 和国外标准野毒株 A75-17 和 5804 核苷酸水平上同源性为 97.2% 和 96.3%,氨基酸水平同源性为 98.5% 和 97.7%;与国外疫苗株 Onderstepoort 核苷酸水平上同源性为 93.9%,氨基酸水平同源性为 97.1%,表明该病毒 N 基因相对保守,变异小。

F 基因与其他 CDV 毒株在核苷酸水平上同源性为 (CDV3 和 Onderstepoort) 88.8% ~ 98.7% (GN 和 SC01),氨基酸水平上同源性为 (Onderstepoort) 89.0% ~ 98.8% (TW-TN1)。该 CDV-WZ 和野毒株 Strain A75-17 和 Strain 5804 核苷酸水平上同源性为 93.8% 和 93.1%,氨基酸水平同源性均为 93.5%;与标准疫苗株 Onderstepoort 核苷酸水平上同源性为 88.8%,氨基酸水平同源性为 89.0%。另外,由 F 基因推导的氨基酸分析表明,F 蛋白含有 13 个半胱氨酸残基,7 个潜在的糖基化位点。

H 基因与其他 CDV 毒株在核苷酸水平上同源

性为 (Onderstepoort 和 Vaccine strain Japan) 88.1% ~ 97.6% (BJ080127),氨基酸水平上同源性为 (Convac vaccine strain) 89.1% ~ 97.3% (BJ080127)。该 CDV-WZ 和野毒株 Strain A75-17 和 Strain 5804 核苷酸水平上同源性为 94.4% 和 93.8%,氨基酸水平同源性为 94.4% 和 94.1%;与疫苗株 Onderstepoort 和 Strain CDV3 核苷酸水平上同源性为 88.1% 和 88.5%,氨基酸水平同源性为 89.7% 和 90.1%。另外,H 蛋白氨基酸分析结果显示,H 半胱氨酸残基数目及位置是保守的,没有变化,为 13 个;糖基化位点为 9 个。

2.4 系统进化树分析结果

将 N、H、F 三段基因推断的氨基酸序列和相应代表株进行比对,利用 DNAMAN 软件绘制进化树,在系统发生树上可分为强毒和弱毒两大谱系。CDV-WZ 位于强毒株谱系,与国内外使用疫苗株亲缘关系很远,可能对 CDV 免疫保护效果有一定影响。

N 蛋白与其他 CDV 毒株的系统进化树显示,CDV-WZ 与 2007 年黑龙江从狐狸分离的 HL 强毒株在一个分支。F 蛋白与其他毒株的系统进化树表明(图 3),CDV-WZ 和黑龙江 2007 年从浣熊分离的强毒株 GN 强毒株归为一组。而从 H 基因推导的氨基酸系统发生树上看,CDV-WZ 和北京新分离的 BJ080127 强毒株在同一分支,与辽宁 2007 年从浣熊分离的 LN(07)1、山东 2008 年从狐狸分离的 SD(08)1 以及 GN 毒株在同一大的分组;同时与近几

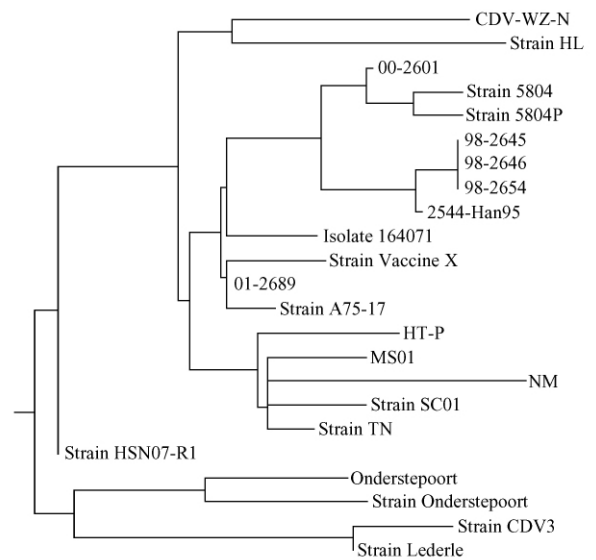


图 2 N 基因氨基酸系统进化树分析
Fig. 2 Phylogenetic tree of the N gene amino acids

年分离的 HeB(07)1、JL(08)1、HLJ(08)2 强毒株也很接近。

从系统进化树可以看出,最新分离的毒株通常在进化树的末端,但也有例外的,如山东 2008 年从狐狸分离的 HT-P 毒株就在进化树的较前部(图 4)。这基本说明 CDV 各毒株在不断地发生新的变异。从地域来看,国外和国内毒株还是存在较大差异,这可能与环境、原始毒株以及不同的选择免疫压力有关。从国内来看,南北差异不大,如新疆 2003 年分离的 TN、浙江 2008 年分离的 HZ026、湖北 2006 年分离的 BS0610、HLJ(08)2、JL(08)1 以及 HeB(07)1 又在同一大的分支上(图 3 和图 4)。此外,从不同种动物分离的毒株间的差异也在不断缩小。这可能与近年来区域间的频繁交流、不同动物的混养等有较大的关系。

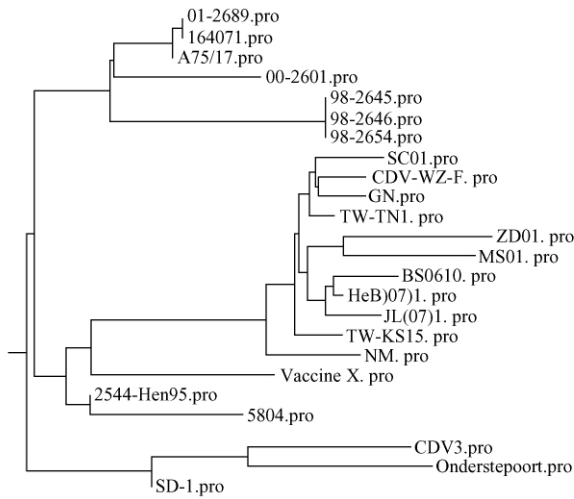


图 3 F 基因氨基酸系统进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree of the F gene amino acids

3 讨论

N 蛋白是保守性最强的免疫原性蛋白,含有 B 细胞和 T 细胞表位,在诊断和细胞免疫方面发挥着重要作用,对病毒装配、转录和复制过程起调控作用。F 蛋白介导囊膜和细胞膜融合,决定病毒在宿主体内扩散的能力,尽管该基因相对保守,但其微小的改变会对 CDV 毒力强弱产生影响。H 蛋白位于病毒粒子的表面,是诱导机体产生中和抗体的主要抗原之一,同时,H 蛋白决定着病毒感染宿主的特异性,并协助 F 蛋白使 CDV 进入宿主细胞^[6,7]。故 H 蛋白基因成为国内外学者研究 CDV 遗传变异规律的首选基因^[14,15]。

本研究病毒的 F 和 H 基因分别与 Strain

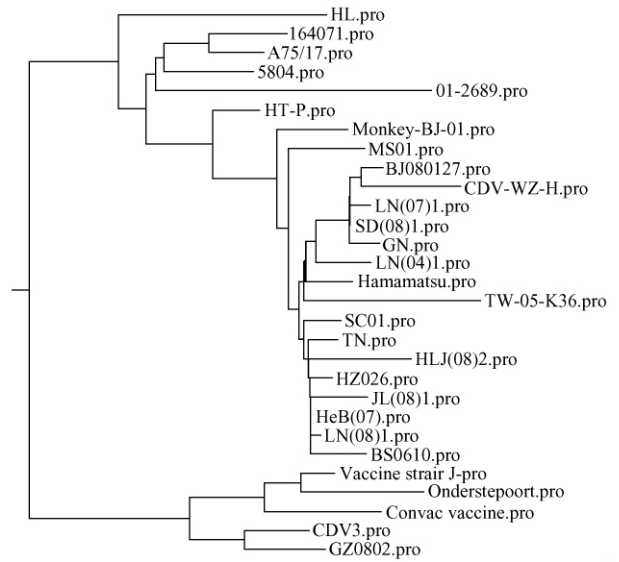


图 4 H 基因氨基酸系统进化树分析

Fig. 4 Phylogenetic tree of the H gene amino acids

BS0610、Strain GN、Strain SC01、Strain TW-TN1 和 BJ080127、Hamamatsu、HB062、TN 有较高的同源性,在系统分类上与野毒株较近,属于强毒株。用本研究病料接种 45 日龄健康比格犬,出现了明显的双相热,并出现了 100% 的死亡率,充分验证了 CDV-WZ 为强毒。F、H 基因及其推导的氨基酸和国内外疫苗株的同源性均较低,有可能对犬瘟热免疫保护有一定影响。这与王君玮等对狐、貉和水貂源共 5 株 CDV 野毒和疫苗株部分 H 基因氨基酸序列分析的结果相类似^[2]。近几年日本免疫犬暴发了犬瘟热,经研究表明,可能与 H 蛋白抗原性变化有关^[9]。

H 蛋白属于典型的 II 型糖蛋白,在病毒的吸附和侵入宿主细胞过程中起重要作用。文献报道,所有 CDV 野毒株 H 蛋白均存在 8~9 个潜在的 N-糖基化位点,而疫苗株为 4 个(Onderstepoort 株)或 7 个(Convac 株),H 蛋白 N-糖基化位点的差异可能影响病毒的抗原性^[8,9]。另有研究证实,在麻疹病毒属所有结构蛋白中,H 蛋白基因变异最大^[9,11-13],抗原变化最大^[15]。在免疫压力作用下,CDV 抗原表位可能发生漂移,较大的 H 蛋白极易发生变异,从而引起 CDV 毒力的变化^[16,17]。H 蛋白作为诱导机体产生中和抗体的主要保护性抗原,其抗原性的改变很可能导致 CDV 野毒逃避机体的免疫监视,共同特征之一是造成 CDV 在不同种动物之间,不同地区以不同毒株的形式大面积爆发^[18]。

在 CDV 所有结构蛋白中,N 蛋白是保守性最强的免疫原性蛋白。N 蛋白在 337~358 位或者 1~80

位的氨基酸存在 B 细胞表位,其中 1~80 位氨基酸是 N 蛋白转运到细胞核所必需的^[1]。281~289 位即 Y P A L G L H E F 连续 9 个氨基酸高度保守,是 T 细胞表位,在细胞免疫中发挥重要的功能^[10]。Pascal Cherpillod 等^[19]证实 CDV N 蛋白可以刺激机体产生强烈的抗体反应,当 H 和 F 蛋白的特异性抗体低于检测水平时,N 蛋白的特异性抗体仍可以检测到,这也揭示出 N 蛋白在 CDV 感染的检测中具有重要的意义。本研究克隆了整个开放阅读框,核苷酸和推导的氨基酸同源性分析显示,N 蛋白的保守性较 H 和 F 蛋白高,进一步验证了 N 蛋白较高的保守性。

F 蛋白是典型的 I 型糖蛋白,在病毒侵入机体和刺激机体产生免疫保护性反应中发挥着重要作用,其诱导的免疫反应能阻止病毒感染,抑制犬瘟热临床症状产生。F 蛋白的 T 细胞表位(288~302aa)和 B 细胞表位(404~414aa)构成嵌合多肽,能诱导保护性免疫反应^[3,4]。研究发现该蛋白基因相对比较保守^[5],在诊断上亦具有一定的价值。在 CDV-WZ 的 F 蛋白中,对蛋白的二级结构起着重要作用的 13 个 Cys 残基位置与其它毒株一致,对蛋白的裂解、稳定性和生物学活性都很重要的 4 个潜在的 N-联糖基化位点也完全保守。与其它大部分 CDV 毒株(糖基化位点 4~6 个)相比,在 CDV-WZ 氨基酸的 3~5 位置多出了 1 个糖基化位点。这对 F 抗原性的影响还有待进一步的研究。

参考文献:

[1] Yoshida E, Iwatsuki K, Miyashita N, et al. Molecular analysis of the nucleocapsid protein of recent isolates of canine distemper virus in Japan [J]. *Vet Microbiol*, 1998, 59 (2-3):237-244.

[2] 王君玮,姜平,王志亮,等. 貂、狐、貉源犬瘟热病毒分离株 H 和 N 基因的遗传多样性分析[J]. *南京农业大学学报*, 2007, 30(4):108-113

[3] Obeid OE, Partidos CD, Howard CR, et al. Protection against morbillivirus-induced encephalitis by immunization with a rationally designed synthetic peptide vaccine containing B- and T-cell epitopes from the fusion protein of measles virus [J]. *J Gen Virol*, 1995, 69(3):1420-1428.

[4] Barret T, Clorke DK, Evons SA, et al. The nucleotide sequence of gene encoding the F protein of canine distemper virus: a comparison of the deduced amino acid sequence with other paramyxovirus [J]. *Virus Res*, 1987, 8:373-386.

[5] Merz DC, Seheid A, Choppin PW, et al. Importance of antibodies to the fusion glycoprotein of paramyxoviruses in the prevention of spread of infection [J]. *J Exp Med*, 1980, 15:275-288.

[6] Kingsbury DW. Paramyxoviridae and their replication. In: B. N. Fields (Ed.), *Fields's Virology* [M]. Raven Press, New York (1990) 945-962.

[7] Wild TF. Mode of entry of morbilliviruses [J]. *Vet Microbiol*, 1995, 44:267-270.

[8] Boit G, Jensen TD, Gottschalck E, et al. Genetic diversity of the attachment (H) protein gene of current isolates of canine distemper virus [J]. *Gen Virol*, 1997, 78:367-372.

[9] Iwatsuki K, Miyashita N, Yoshida E, et al. Molecular and phylogenetic analyses of the haemagglutinin (H) proteins of field isolates of canine distemper virus from naturally infected dogs [J]. *Gen Virol*, 1997, 78(2):373-380.

[10] Beauverger P, Buckland R, Wild TF. Measles virus antigens induce both type-specific and canine distemper virus cross-reactive cytotoxic T lymphocyte in epitope [J]. *J Gen Virol*, 1993, 74:2357-2363.

[11] Blixenkron-Möller M, Svansson V, Appel M, et al. Antigenic relationships between field isolates of morbilliviruses from different carnivores [J]. *Arch Virol*, 1992, 123:279-294.

[12] Blixenkron-Möller M, Svansson V, Have P, et al. Studies on manifestations of canine distemper virus infection in an urban dog population [J]. *Vet Microbiol*, 1993, 37:163-173.

[13] Iwatsuki K, Tokiyoshi S, Hirayama N, et al. Antigenic difference in the H proteins of canine distemper viruses [J]. *Vet Microbiol*, 2000, 71:281-286.

[14] Haas L, Martens W, Greiser-Wilke I, et al. Analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper virus isolates from Germany. *Virus Res*, 1997, 48:165-171.

[15] Mochizuki M, Hasimoto M, Hagiwara S, et al. Genotypes of canine distemper virus determined by analysis of the hemagglutinin genes of recent isolates from dogs in Japan [J]. *Clinical Microbiol*, 1999, 37(9):2936-2942.

[16] 许莎琼,朱建国,傅志强,等. 犬瘟热病毒当前研究进展 [J]. *中国畜牧兽医学报*, 2006, 31:5-7.

[17] 莫小见,郭爱珍,陆承平. 犬瘟热病毒南京株 H 蛋白的克隆与表达 [J]. *中国病毒学*, 2004, 19(5):487-489.

[18] 赵建军,闫喜军,吴威. 犬瘟热病毒基因变异及其细胞受体研究进展 [J]. *微生物学报*, 2008, 48(7):986-991.

[19] Cherpillod P, Tipold A, Griot-Wenk M, et al. DNA vaccine encoding nucleocapsid and surface proteins of type canine distemper virus protects its natural host against distemper [J]. *Vaccine*, 2000, 18:2927-2936.

(修回日期)2010-10-12