

网络出版时间:2016-12-26 11:04 DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2017.02.005
网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20161226.1104.010.html

犬瘟热病毒 *H* 基因的序列分析

李丹丹^{1,2}, 戚伟强², 李传峰², 刘柱^{1,2},
陈宗艳², 张淼涛¹, 刘光清²

(1 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100; 2 中国农业科学院 上海兽医研究所, 上海 200241)

[摘要] 【目的】探索犬瘟热病毒 (Canine distemper virus, CDV) 基因的遗传变异情况, 为 CDV 的防控提供理论依据。【方法】收集 2014—2015 年流行于上海和安徽两地的 CDV 野毒株, 用 RT-PCR 方法克隆其血球凝集素蛋白基因 (*H*), 从分子水平上讨论 CDV *H* 基因的流行规律、遗传进化特性和变异情况。【结果】分离的 5 株 CDV 之间 *H* 基因核苷酸和氨基酸序列的同源性分别为 97.5%~99.9% 和 97.5%~99.2%, 其与 CDV 疫苗株 CDV3 和 Onderstepoort *H* 基因核苷酸的同源性为 90.9%~99.9%, 氨基酸的同源性为 90.4%~99.6%。进化树分析结果表明, 分离到的 5 株 CDV 野毒株均属于亚洲 I 型, 与大部分的亚洲 I 型处于同一分支。CDV *H* 基因有 9 处潜在的天冬氨酸糖基化位点; *H* 基因整体的同义突变概率与非同义突变概率的比例, 即 $ds/dn=5.8870$ 。【结论】选择压力并未作用于分离到的 CDV 毒株, 而是在中性选择作用下进化的。

[关键词] 犬瘟热; *H* 基因同源性; 进化方式; 天冬酰胺糖基化位点

[中图分类号] S852.65⁺5

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2017)02-0031-06

Genetic analysis of *H* gene of canine distemper virus

LI Dandan^{1,2}, QI Weiqiang², LI Chuanfeng², LIU Zhu^{1,2},
CHEN Zongyan², ZHANG Miaotao¹, LIU Guangqing²

(1 College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy Sciences, Shanghai 200241, China)

Abstract: 【Objective】This article discussed the genetic characteristics and regularity of *H* gene from canine distemper virus (CDV) in molecular level. 【Method】CDV strains from Shanghai and Anhui in 2014—2015 were collected and their *H* genes were cloned by RT-PCR. Then, the regularity and genetic characteristics were analyzed in molecular level. 【Result】The nucleotide and amino acid similarities of *H* gene between the 5 wild strains were 97.5%—99.9% and 97.5%—99.2%, respectively. The nucleotide and amino acid similarities of *H* gene between the 5 wild strains and vaccine strains CDV3 and Onderstepoort were 90.9%—99.9% and 90.4%—99.6%. Phylogeny tree showed that the collected 5 CDV lineage belonged to Asia-I, like most of the other *H* protein genes of Asia-I. There are 9 potential N-glycosylation sites and ds/dn ratio was 5.8870. 【Conclusion】The selection process did not affect isolated CDV stains and the evolution occurred with a neutral evolution pattern.

Key words: canine distemper disease; similarities of *H* gene; evolution pattern; N-glycosylation sites

[收稿日期] 2015-10-08

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31270194); 上海市科委创新项目(13391901600)

[作者简介] 李丹丹(1991—), 女, 吉林白山人, 在读硕士, 主要从事犬瘟热病毒研究。E-mail: sumoli2015@163.com

[通信作者] 张淼涛(1963—), 男, 陕西咸阳人, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事动物病毒分子生物学及动物生理学研究。E-mail: 504888520@qq.com

犬瘟热病毒(Canine distemper virus, CDV)属于副黏病毒科(Paramyxoviridae)麻疹病毒属(*Morbillivirus*),为单股不分节段的负链 RNA 病毒。CDV 基因组由 15 690 个核苷酸组成,编码 6 个结构蛋白,即核衣壳蛋白(N)、磷蛋白(P)、聚合酶蛋白(L)、基质蛋白(M)、融合蛋白(F)及血球凝集素蛋白(H),其中 H 蛋白和 F 蛋白是病毒的抗原决定蛋白并聚集在病毒的表面^[1]。CDV 能引起狐、貂等动物的犬瘟热疾病,近年也有犬瘟热感染大熊猫的报道^[2]。犬瘟热病是一种急性、高度接触性传染病,严重危害当前养犬业和皮毛动物养殖业的发展^[3]。虽然疫苗的应用缓解了犬瘟热的发展,但是近年来不断有接种疫苗犬只患病的报道,犬瘟热的宿主范围也在不断扩大,这可能是新型犬瘟热病毒能够逃避旧疫苗株的免疫所致^[4]。为了分析新型病毒株的遗传特征,对犬瘟热病毒的收集和分析显得尤为重要^[5]。

鉴于 CDV 血球凝集素蛋白(H)在病毒免疫原性、致病性以及分类上的重要作用,本研究对 CDV 安徽和上海分离株的 H 基因进行了克隆及序列分析,以期了解 CDV 的分子流行病学特点^[6],进而为 CDV 的监控和预防提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 病料与菌株

犬瘟热阳性病料(肺、脾、脑),来自于 2014—2015 年收集的上海和安徽两地的临床宠物犬病例,共 5 份,其中上海 4 份(SH1401、SH1402、SH1403、SH1503),安徽 1 份(AH)。大肠杆菌(*E. coli*)基因工程菌 Trans5 α 和克隆载体 T5Zero,均购自北京全式金生物技术有限公司。

1.2 试剂

RNA 提取试剂盒,购自上海生工生物技术有限公司;反转录酶 M-MLV、LA Taq DNA 聚合酶和 PCR 相关试剂,购自大连宝生物科技有限公司;DNA 标样,购自北京全式金生物技术有限公司。PCR 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒,购自爱思进生物技术(杭州)有限公司。

1.3 病毒 RNA 的提取、反转录及 H 基因的克隆

参照 RNA 提取试剂盒的使用说明提取 CDV 病料中的 RNA,用随机引物将 RNA 反转录合成 cDNA,参考 NCBI 中的 CDV 序列,设计 1 对用于扩增 H 基因的引物,其中上游引物序列为:5'-CCCAAGCTTGGGATGCTCTCCTACCAAGAC-

AAGGT-3',下游引物序列为:5'-TCAAGGTTTTGAACGGTTACATGACCGCTCGAGCGG-3',预期扩增的片段长度为 1 926 bp,引物由上海杰李生物科技有限公司合成。PCR 反应体系 50 μ L:上、下游引物各 1.0 μ L, cDNA 模板 2.0 μ L, LA Premix 缓冲液(10 $\times$)25 μ L, ddH₂O 21 μ L。PCR 程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;95 $^{\circ}$ C 30 s, 53 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min。取 PCR 产物,用 1%琼脂糖凝胶进行电泳检测。用凝胶试剂盒回收 PCR 扩增片段,并与 T5Zero 连接,构建重组质粒 SH1401-H-T5Zero、SH1402-H-T5Zero、SH1403-H-T5Zero、SH1503-H-T5Zero 和 AH-H-T5Zero,进行 Hind III 和 BamH I 双酶切鉴定。将构建的重组质粒分别转化宿主菌 Trans5 α ,涂布氨苄平板,以菌液 PCR 方法筛选阳性克隆。获得的阳性菌液于 37 $^{\circ}$ C 摇菌提取质粒,送上海生工生物科技有限公司测序,将测序正确序列提交到 NCBI 获得登录号。

1.4 序列分析

利用 DNASTar 软件,分析分离到的 CDV H 基因及 CDV3(中国)疫苗株(GenBank 登录号 EU726269)和 Onderstepoort(美国)疫苗株(GenBank 登录号 AF378705)之间的同源性;从 GenBank 数据库中下载已发表的世界范围内的参考毒株序列,对 H 基因开放阅读框(ORF)进行分析,利用 MEGA 软件的 Clustal W 方法进行比对,用最大似然法构建系统进化树;用 SNAP v2.1.1(<http://hcv.lanl.gov/content/sequence/SNAP/SNAP.html>)分析 CDV H 基因的遗传变异情况^[7];用 N-Glycsite(<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/GLYCOSITE/glycosite.html>)分析 H 蛋白潜在的天冬氨酸(Gly)糖基化位点^[8]。

2 结果与分析

2.1 CDV H 基因的 RT-PCR 扩增

反转录获得的 cDNA 经 PCR 扩增后,得到如图 1 所示的 1 926 bp 的片段,与预期结果一致。

2.2 CDV H 基因重组克隆质粒的鉴定

将回收纯化的 H 基因的 RT-PCR 产物连接到 T5Zero 载体,提取质粒测序,结果显示,各 CDV 株的 H 基因已成功克隆到 T5Zero 上。对重组质粒用 Hind III 和 BamH I 进行双酶切,获得了 1 926 bp 的目的条带(图 2),与预期结果一致,表明成功获得了含 H 基因的重组质粒。

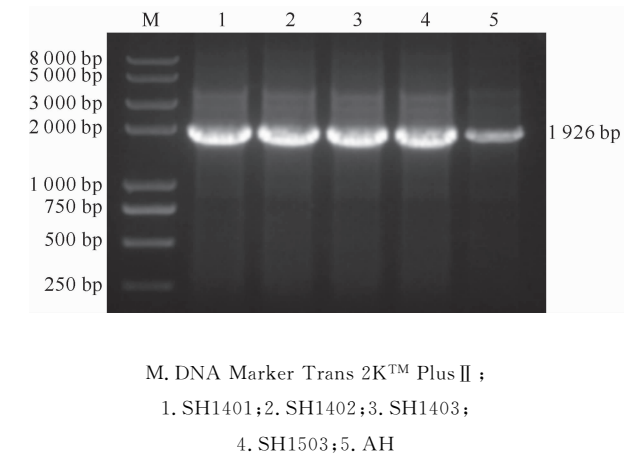


图 1 犬瘟热病毒 *H* 基因的 RT-PCR 扩增
Fig. 1 RT-PCR amplification of *H* gene of CDV

2.3 CDV *H* 基因的同源性分析

测序结果显示,分离到的 5 株 CDV *H* 基因的 ORF 均为 1 824 bp,编码 607 个氨基酸。将获得的 SH1401、SH1402、SH1403、SH1503、AH 等 5 株 CDV *H* 基因序列提交到 GenBank^[8],获得的登录号依次为 KT341044、KT341045、KT341046、KT341047、KT341048。序列分析结果表明,5 株 CDV 之间 *H* 基因核苷酸和氨基酸序列的同源性分别为 97.5%~99.9%和 97.5%~99.2%,而与疫苗株 CDV3 和 Onderstepoort *H* 基因核苷酸和氨基酸的同源性分

表 1 不同基因型 CDV *H* 基因潜在的天冬酰胺糖基化位点

Table 1 Distribution of protential N-glycosylation sites of <i>H</i> gene in different genotypes of CDV										
CDV 毒株 CDV strain	基因型 Genotype	潜在的天冬酰胺糖基化位点 Potential N-glycosylation site								
		19	149	309	391	422	456	584	587	603
Gi/167614365(EU296488)	亚洲Ⅰ型 Asia-I	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Gi/129770825(EF445053.1)	亚洲Ⅱ型 Asia-II	N	N	N	N	N	N	—	N	N
Gi/224579344(FJ705238)	欧洲型 Europe	N	N	N	N	N	N	—	N	N
Onderstepoort(EU14373)	疫苗株 Vaccines	N	N	—	—	N	—	—	N	—
CONVAC(Z35493)		N	N	—	N	N	N	—	N	N
Lederle(EF418782)		N	N	—	N	N	N	—	N	N
Gi/6594288(AB025271.2)	北极型 Arctic	N	N	N	N	N	N	—	N	N
Gi/121486033(DQ903854.1)	美洲Ⅰ型 America-I	N	N	—	N	N	N	—	N	—
Gi/34328597(AY297453.1)	美洲Ⅱ型 America-II	N	N	N	N	N	N	—	N	N

注:“N”:潜在的天冬酰胺糖基化位点;“—”:阴性;表中反映的是 CDV 亚洲 I 型、亚洲 II 型、欧洲型、疫苗株、北极型、美洲 I 型、美洲 II 型大部分毒株的潜在 Gly 糖基化位点,毒株一栏仅给出 1 种作为代表。
Note:“N”:Potential N-glycosylation site. “—”:Negative. The table shows the most potential N-glycosylation sites of Asia-I, Asia-II, Europe, Vaccines, Arctic, America-I and America-II, only one of the strains is shown for representation.

为了了解所获得毒株的进化模式,作者对分离到的 5 株 CDV 野毒株 *H* 基因所编码氨基酸的同义突变和非同义突变进行了分析^[10],结果表明,整个 *H* 基因编码氨基酸发生同义突变的概率远远大于非同义突变,其中同义突变概率(*ds*)为 0.0435,非

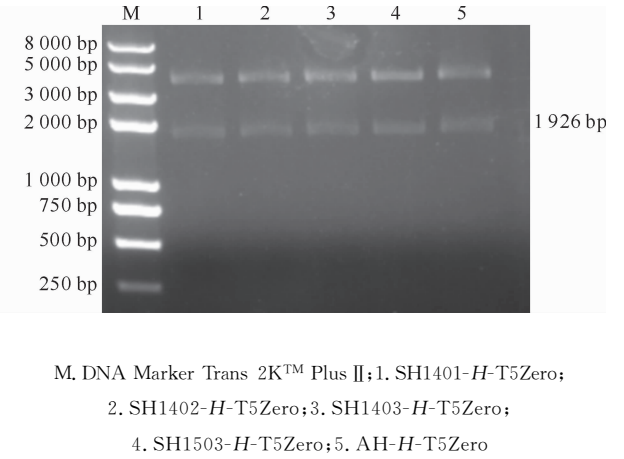


图 2 CDV *H* 基因重组质粒的 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切鉴定
Fig. 2 Recombined plasmid of *H* gene of CDV digestion with *Hind* III and *Bam*H I

别为 90.9%~99.9%和 90.4%~99.6%。

2.4 CDV *H* 基因氨基酸序列分析

对不同基因型 CDV *H* 基因的氨基酸进行天冬氨酸糖基化位点预测^[9],结果见表 1。由表 1 可知,第 19,149,422,587 位是 7 种基因型都含有的潜在氨基酸糖基化位点;疫苗株中除 Onderstepoort 外均含有 7 个潜在的糖基化位点;本研究的 5 株(亚洲 I 型)野毒株的潜在糖基化位点相同,均在第 19,149,309,391,422,456,584,587 和 603 位。

同义突变概率(*dn*)为 0.007 0,*ds/dn*=5.887 0。
2.5 CDV *H* 基因的遗传进化分析
基于 CDV *H* 基因核苷酸序列所构建的系统发生树见图 3。由图 3 可知,本研究收集到的 5 株 CDV 野毒株均属于亚洲 I 型。

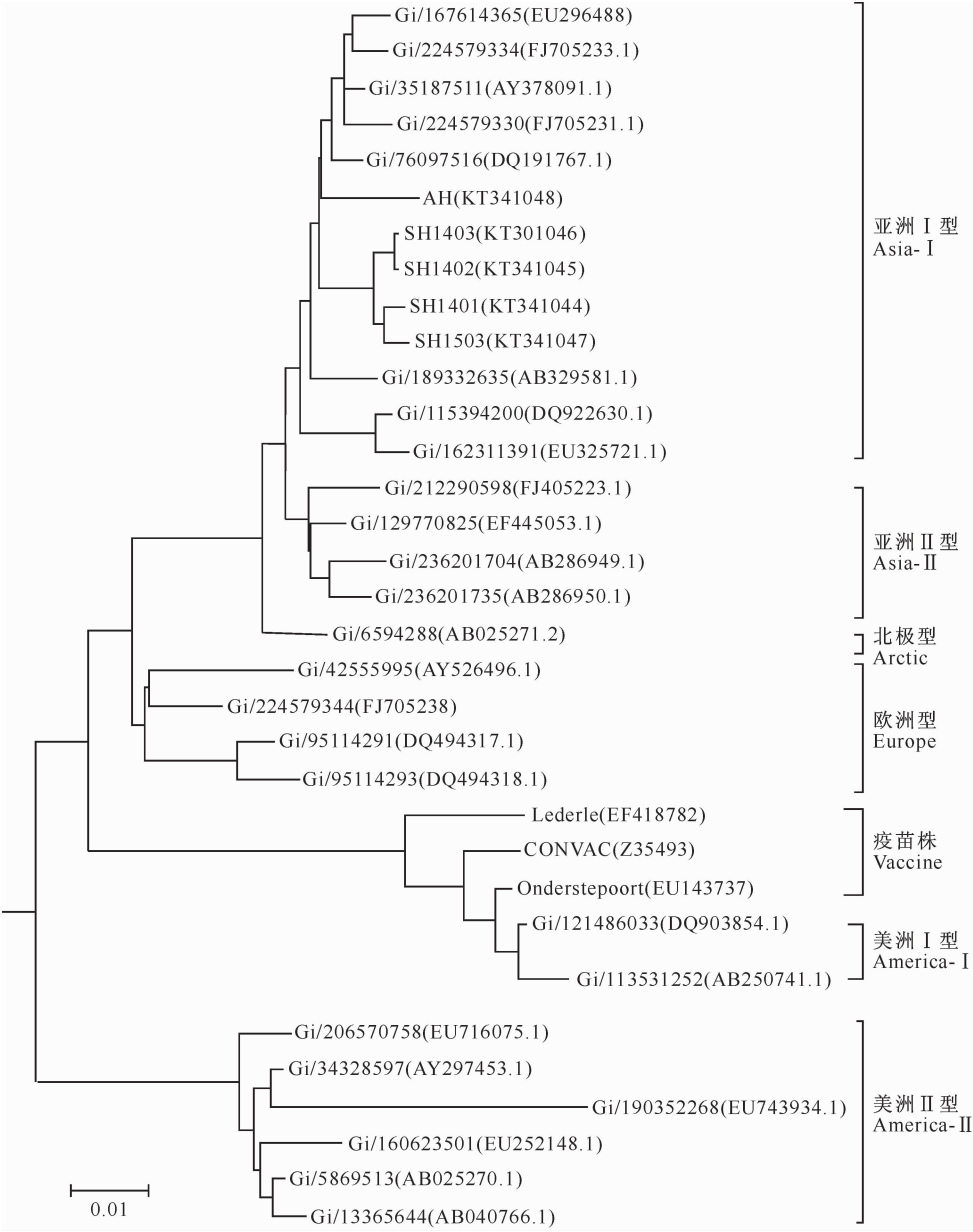


图 3 基于 *H* 基因核苷酸序列构建的 CDV 株的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on the nudeotide sequences of *H* gene ORF of CDV strains

3 讨 论

H 蛋白是 CDV 囊膜表面重要的糖蛋白之一，作为一种吸附蛋白，其是 CDV 病毒重要的毒力蛋白和保护性抗原，是可激发机体产生中和抗体的蛋白之一^[11]。CDV 通过 H 蛋白吸附到细胞表面受体上，因此 H 蛋白成为决定 CDV 宿主特异性的主要因素^[12]。在宿主的免疫压力下，CDV 的抗原表位可发生漂移，H 蛋白尤其易变，从而引起 CDV 毒力的变化^[13]。在麻疹病毒属中，H 蛋白潜在的天冬酰胺糖基化位点在激发和中和抗体中发挥着关键的作

用，因此 *H* 基因的抗原变异也就成为研究 CDV 变异的首选^[14]。基于此，本试验对临床分离的 CDV *H* 基因进行了克隆分析，结果表明，第 19,149,422,587 位是 7 种基因型都含有的潜在氨基酸糖基化位点；584 位天冬酰胺糖基化位点只在亚洲 I 型野毒株中被发现，这可能是因为疫苗株与野毒株存在碱基和编码氨基酸序列之间的差异所致，还可能与亚洲 I 型病毒的抗原性与其他基因型不同有关^[15]。目前对天冬酰胺糖基化位点的研究尚不成熟，还有待于进一步探索。

本试验对 5 株 CDV 野毒株 *H* 基因编码氨基酸

序列的同义突变和非同义突变进行了分析,发现同义突变的概率远远大于非同义突变,表明选择压力并未作用于分离到的毒株^[16],这些毒株是在中性选择作用下进化的^[17]。

对分离到的 5 株野毒株的同源性分析以及野毒株与疫苗株的同源性比较分析可以看出,5 株 CDV 之间 *H* 基因的核苷酸及推导氨基酸序列的同源性分别为 97.5%~99.9%和 97.5%~99.2%,而分离到的 CDV 野毒株与疫苗株 CDV3 和 Onderstepoort *H* 基因核苷酸之间的同源性为 90.9%~99.9%,氨基酸之间的同源性为 90.4%~99.6%,二者核苷酸和氨基酸的同源性均较高。分析 CDV 毒株的遗传进化关系可以发现,其基因型的分布大体上遵循地理分布的原则^[18],与宿主和时间的进化关系不明显^[19]。因此,加强不同地区动物流动的管理和外来动物的检疫是 CDV 防控的重要一环^[20]。

【参考文献】

[1] 赵建军,柴秀丽,王凤雪,等.水貂犬瘟热 CDV₃ 疫苗株基因组序列测定及 *H* 基因遗传稳定性分析 [J]. 经济动物学报,2009,13(1):13-20.

Zhao J J,Chai X L,Wang X F,et al. Genomic sequence determination and genetic stability of minks canine distemper virus vaccine CDV₃ strain [J]. Journal of Economic Animal,2009,13(1):13-20.

[2] 金艺鹏,刘巧荣,孙明,等.大熊猫源犬瘟热病毒基因组遗传特征分析 [J]. 中国农业科学,2015,7(6):1445-1452.

Jin Y P,Liu Q R,Sun M,et al. Genomic characterization of the newly emerged canine distemper virus in giant panda [J]. Scientia Agricultura Sinica,2015,7(6):1445-1452.

[3] 郭玲,雷燕,陈世界,等.基于 *H* 蛋白基因的犬瘟热病毒遗传变异分析 [J]. 畜牧兽医学报,2012,43(1):98-104.

Guo L,Lei Y,Chen S J,et al. Genetic variation analysis of the canine distemper virus based on its *H* protein gene [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica,2012,43(1):98-104.

[4] Nicolás S,Ruben P,Jaime A,et al. Molecular typing of canine distemper virus strains reveals the presence of a new genetic variant in South America [J]. Virus Genes,2014,483(2):373-380.

[5] 朱春生,赵建军,白雪,等.水貂狐狸及貉源犬瘟热病毒 *H* 基因的克隆与序列分析 [J]. 中国兽医科学,2014,44(2):134-139.

Zhu C S,Zhao J J,Bai X,et al. Cloning and sequence analysis of hemagglutinin(*H*) gene of canine distemper virus strains from minks,foxes and raccoon dogs in China [J]. Chinese Veterinary Science,2014,44(2):134-139.

[6] Li W K, Li T S,Liu Y X,et al. Genetic characterization of an isolate of canine distemper virus from a Tibetan Mastiff in China [J]. Virus Genes,2014,491(6):2753-2761.

[7] Mochizuki M,Hashimoto 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]. Journal of Clinical Microbiology,1999,379(3):399-401.

[8] Marina G C,Patricia R,Osvaldo P,et al. Detection by RT-PCR and genetic characterization of canine distemper virus from vaccinated and non-vaccinated dogs in Argentina [J]. Veterinary Microbiology,2007,1253(2):45-53.

[9] 王君玮. 貂、狐、貉源犬瘟热病毒分离鉴定与分子生物学特性研究 [D]. 南京:南京农业大学,2008.

Wang J W. Isolation and identification of canine distemper virus originated from raccoon dog, fox and mink, and study on their molecular biology properties [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University,2008.

[10] Bolt G,Jensen T D,Gottschalck E,et al. Genetic diversity of the attachment (*H*) protein gene of current field isolates of canine distemper virus [J]. The Journal of General Virology,1997,78(2):512-516.

[11] 程悦宁. 犬瘟热病毒 SY-12 株的分离鉴定及其全基因组序列测定与分析 [D]. 长春:吉林农业大学,2014.

Cheng Y N. Isolation, Identification and genome sequencing of the canine distemper virus SY-12 strain [D]. Chuangchun: Jilin Agricultural University,2014.

[12] Stern L B,Greenberg M,Gershoni J M,et al. The hemagglutinin envelope protein of canine distemper virus (CDV) confers cell tropism as illustrated by CDV and measles virus complementation analysis [J]. Journal of Virology,1995,693(4):137-142.

[13] Nielsen L,Jensen T H,Kristensen B,et al. DNA vaccines encoding proteins from wild-type and attenuated canine distemper virus protect equally well against wild-type virus challenge [J]. Archives of Virology,2012,157(10):1887-1896.

[14] 宗春苗. 水貂犬源犬瘟热病毒的分离鉴定及 *H* 基因的序列分析 [D]. 长春:吉林农业大学,2007.

Zong C M. Isolation and identification on mink canine distemper virus and sequence analysis of its *H* gene [D]. Chuangchun: Jilin Agricultural University,2007.

[15] Kóvamees J,Blixenkrone-Möller M,Norrbý E. The nucleotide and predicted amino acid sequence of the attachment protein of canine distemper virus [J]. Virus Research,1991,192(6):34-42.

[16] 李天松. 不同宿主来源犬瘟热病毒遗传分析与生物学特性研究 [D]. 长春:吉林农业大学,2012.

Li T S. The analysis of genetic evolution and bionomics of canine distemper viruses isolated different hosts [D]. Changchun: Jilin Agricultural University,2012.

[17] Bi Z W,Xia X X,Wang Y S,et al. Development and characterization of neutralizing monoclonal antibodies against canine distemper virus hemagglutinin protein [J]. Microbiol Immunol,2015,594(7):222-229.

[18] 胡嘉欣,温永俊,霍志云,等. 犬瘟热病毒研究概况 [J]. 动物医学进展,2012,6(3):134-139.

Hu J X,Wen Y J,Huo Z Y et al. RNA Interference and its re-
search progress in animal infectious diseases [J]. Progress in
Veterinary Medicine,2012,6(3):134-139.

[19] Emi Y,Kiyoko I,Naoko M,et al. Molecular analysis of the
nucleocapsid protein of recent isolates of canine distemper vi-
rus in Japan [J]. Veterinary Microbiology,1998,592(8):986-
991.

[20] Martella V,Pratelli A,Cirone F,et al. Detection and genetic
characterization of canine distemper virus (CDV) from free-
ranging red foxes in Italy [J]. Molecular and Cellular Probes,
2002,161(9):45-53.

(上接第 30 页)

[24] Sau S K,Paul B N,Mohanta K N,et al. Dietary vitamin E re-
quirement,fish performance and carcass of rohu (*Labeo rohi-
ta*) fry [J]. Aquaculture,2004,240:359-368.

[25] 邵 辉. 吉富罗非鱼对维生素 E 和胆碱需要量的研究
[D]. 武汉:华中农业大学,2013.

Shao H. The dietary vitamin E and choline requirement of
GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*) [D]. Wuhan:Huazhong
Agriculture University,2013.

[26] 魏玉婷,麦康森,艾庆辉. 饲料中的维生素 E 对大菱鲂
幼鱼生长、脂肪过氧化及抗氧化能力的影响 [J]. 中国海洋大
学学报,2011,41(6):45-50.

Wei Y T,Mai K S,Ai Q H. Effect of dietary vitamin E on
growth,tissue lipid peroxidation,and tissue antioxidant capac-
ity of juvenile Turbot,*Scophthalmus maximus* [J]. Periodical
of Ocean University of China,2011,41(6):45-50.

[27] 周立斌,张 伟,王安利,等. 饲料维生素 E 添加量对
花鲈生长、组织维生素 E 积累量和免疫指标的影响 [J]. 水产
学报,2009,33(1):96-100.

Zhou L B,Zhang W,Wang A L,et al. Effects of dietary vita-
min E supplement on growth,tissue vitamin E concentration
and immune responses of Japanese seabass (*Lateolabrax ja-
ponicus*) [J]. Journal of Fisheries of China,2009,33(1):96-
100.

[28] 刘 丽,赵会宏,张国良,等. 肌肽对奥尼罗非鱼生长性
能的影响 [J]. 水生生物学报,2008,32(5):643-648.

Liu L,Zhao H H,Zhang G L,et al. Effects of dietary
carnosine levels on growth performance of tilapia,*Oreochro-
mis niloticus* × *O. aureus* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica,
2008,32(5):643-648.

[29] Musalmah M,Fairuz A H,Gapor M T,et al. Effect of
vitamin E on plasma malondialdehyde, antioxidant enzyme
levels and therates of wound closures during wound healing in
normal and diabetic rats [J]. Asia Pacific Journal of Clinical
Nutrtrion,2002,11:448-451.

[30] Tacher D R,Mouemte G. Effects of dietary vitamin E
on antioxidant defence mechanisms of juvenile rockfish(*Se-
bastes schlegeli*) [J]. Aquaculture Nutrition,2002,8(3):195-
207.