

大熊猫源犬瘟热病毒基因组遗传特征分析

金艺鹏¹, 刘巧荣², 孙明², 乔雁超¹, 乔明明², 刘伯华², 林德贵¹, 陈西钊²

(¹ 中国农业大学动物医学院, 北京 100193; ² 北京世纪元亨动物防疫技术有限公司, 北京 100094)

摘要: 【目的】对首次暴发的大熊猫源性犬瘟热病毒 (panda derived-canine distemper virus, P-CDV) 全基因组进行克隆测序, 以了解大熊猫源 CDV 的全基因组遗传变异情况, 进一步追踪感染源, 为大熊猫犬瘟热防控提供理论依据。【方法】根据 GenBank 公布的 CDV 全基因组序列设计 17 对特异性引物, 利用 RT-PCR 技术, 从感染犬瘟热病毒的大熊猫肺渗出液中分片段扩增 CDV 全基因组序列, 并克隆到 pMD19-T 载体中; 经测序、拼接, 获得第一个 P-CDV 全长 cDNA 序列; 利用 DNAMAN 生物学分析软件分别对全基因组序列、H 蛋白基因序列、F 蛋白基因序列、P 蛋白基因序列、M 蛋白基因序列等进行遗传变异分析, 构建系统进化树。【结果】经序列测序和拼接, 大熊猫源犬瘟热病毒全基因组长 15 690 nt, GenBank 登录号为 KP677502, 主要编码 6 种蛋白, 分别是 N 蛋白、P 蛋白、M 蛋白、F 蛋白、H 蛋白和 L 蛋白, 在各个基因及间隔区中未发现碱基插入和缺失。遗传进化分析显示, P-CDV 全基因组与 20 株代表性 CDV 全基因组序列同源率为 91.5%—98.7%, P-CDV 与强毒株 MKY-KM08 (HM852904)、PS-HLJ1-06 (JX681125)、Hebei (KC427278) 以及 AC96I-H358 (AB753776) 在一个大的分支上, 与 PS 株 (JN896331) 亲缘关系最近, 同源率为 98.7%, 与标准野毒株 Strain A75-17 (AF164967) 同源率为 95.7%, 与疫苗株 CDV3 (EU726268) 亲缘关系较远, 同源率为 91.5%。H 蛋白氨基酸序列分析和系统进化树表明, 大熊猫源犬瘟热病毒属于强毒株, 基因型为 Asia-I 型。P-CDV 各蛋白基因与 20 株代表性的毒株相比有 9 处氨基酸发生了变异, 与 GenBank 上现有的 CDV 序列相比, 其中 3 处是独有的, 分别是: F 蛋白基因的 208 位由 N (Asn, 天冬酰胺, 强毒株多为 N) 或 K (Lys, 赖氨酸, 弱毒株多为 K) 变成了 S (Ser, 丝氨酸), 第 215 位由 S 变成了 A (Ala, 丙氨酸), P 蛋白基因的 58 位由 Q (Gln, 谷氨酰胺) 变成 K (Lys, 赖氨酸)。【结论】成功克隆了大熊猫源犬瘟热病毒的全基因, 并完成了序列分析, 发现了在 F、P 基因上碱基的重要变异。这些数据将为研究大熊猫犬瘟热的遗传变异和流行特征提供分子生物学依据。

关键词: 犬瘟热病毒; 大熊猫; 全基因组测序; 序列分析

Genomic Characterization of the Newly Emerged Canine Distemper Virus in Giant Panda

JIN Yi-peng¹, LIU Qiao-rong², SUN Ming², QIAO Yan-chao¹, QIAO Ming-ming², LIU Bo-hua²,
LIN De-gui¹, CHEN Xi-zhao²

(¹College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193; ²Beijing Anheal Laboratories Co., Ltd, Beijing 100094)

Abstract: 【Objective】The objective of this study is to analyze the genetic variation of the newly emerged giant panda canine distemper virus by sequencing its full-length genome, thereby to track the source of infection and provide a theoretical basis for the prevention and control of giant panda CDV infection. 【Method】According to the CDV genomic sequences published in GenBank, 17 pairs of oligonucleotide primers were designed, the overlapping fragments spanning whole genome of CDV were amplified by RT-PCR from lung exudate of the infected giant panda and then cloned into vector pMD19-T and sequenced, respectively, the determined sequences were spliced and assembled by using biological software DNAMAN. Based on

收稿日期: 2015-02-12; 接受日期: 2015-03-06

联系方式: 金艺鹏, E-mail: yipengjin@sina.com; 刘巧荣, Tel: 010-82898320; E-mail: liuqiaorong@anheal.com. 金艺鹏与刘巧荣为同等贡献作者。
通信作者林德贵, Tel: 010-62731274; E-mail: csama@sina.com; 通信作者陈西钊, Tel: 010-82898320; E-mail: chenxizhao@anheal.com

above efforts, the first complete genome sequence of P-CDV isolated from giant panda was accomplished, and was further characterized by alignment with 20 published CDV whole-genome sequences from GenBank. Moreover, to track the source of infection, different phylogenetic trees were constructed according to complete genome as well as genes H, F, P and M, respectively. **【Result】** The genome of the giant panda CDV is 15 690 nucleotides in length (GenBank accession No. KP677502), and mainly encodes six genes in the order of 3'-N-P-M-F-H-L-5'. No nucleotides insert and deletion were observed in encoding and intergenic regions compared to other CDV complete genome sequences. Phylogenetic analysis of the giant panda CDV genome showed 91.5%-98.7% nucleotide identity with 20 representative CDV isolates. Along with virulent strains MKY-KM08 (accession no. HM852904), PS, HLJ1-06 (accession no. JX681125), Hebei (accession no. KC427278) and AC96I-H358 (accession no. AB753776), P-CDV belongs to one large homogeneous clade, and is phylogenetically most closely related to the isolate PS with 98.7% identity at nucleotide. It shares 95.7% nucleotide identity with wild strain A75-17, and exhibits the lowest nucleotide similarity with standard vaccine strain CDV3 (91.5%). Sequence analysis based on H gene indicates that the giant panda CDV is a virulent strain, it belongs to genotype Asia-I. There are a total of nine amino acid (aa) substitutions, among them three amino acid substitutions were firstly found and are unique to the giant panda CDV. Of these 3 aa substitutions, 2 substitutions (N/K208S, S215A) occur in F open reading frame (ORF), one substitution (Q58K) occurs in P ORF. **【Conclusion】** The complete genomic sequence of this newly emerged giant panda CDV was successfully characterized, the key site mutations in F and P genes were recognized. The data will provide valuable theoretical reference for the prevention and control of giant panda CDV infection.

Key words: canine distemper virus; giant panda; genomic characterization; gene sequence analysis

0 引言

【研究意义】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, 为单股负链 RNA 病毒。在自然状态下可感染犬科、鼬科、浣熊科等多种动物。随着生态环境的变化和 CDV 对动物流行病因素的适应, 加之 CDV 变异株的出现, 目前犬瘟热的发病率和致死率均有所升高。特别是国宝大熊猫等珍稀动物以及猕猴等灵长类动物的 CDV 感染, 使 CDV 的地位日益突出^[1-3]。因此, 有必要对 CDV 基因组的遗传变异情况进行深入的探讨研究, 为大熊猫 CDV 的流行病学调查以及有效防治提供科学的依据。**【前人研究进展】**过去大熊猫犬瘟热多呈零星散发。1983 年, 张振兴等^[4]首次报道了中国大熊猫疑似感染犬瘟热的病例; 胡贵学等^[5]于 1997 年报道了大熊猫犬瘟热致死性感染病例。随之, 何洪斌等^[6]和李金中等^[7]通过基因序列分析确定了大熊猫的犬瘟热感染。高玉伟等^[8]和王斌^[9]检测到了大熊猫血清中中和抗体的存在。1997 年, 军事兽医研究所病毒二室从病死的小熊猫体内分离出一株犬瘟热病毒, 并对其犬瘟热病毒全基因进行了测定, 发现, 他们分离的小熊猫源 CDV 属于强毒株, 基因型属于 Asia-I。**【本研究切入点】**到目前为止, 仅有大熊猫源 H 基因序列在 GenBank 上能检索到, 国内外尚未见关于大熊猫源犬瘟热病毒全基因序列的报道。

【拟解决的关键问题】从暴发感染犬瘟热病毒死亡的大熊猫肺渗出液中克隆 CDV 全基因组序列, 并对其与代表性的 CDV 强毒株和弱毒株进行序列分析, 了解大熊猫源 CDV 与其他动物源 CDV 全基因组序列变异情况。

1 材料与方法

1.1 病料与毒株

病料由陕西省珍稀野生动物抢救饲料研究中心提供, 中国农业大学动物医学院保存。病况简述: 2014 年 12 月至 2015 年 2 月, 陕西珍稀野生动物抢救饲养研究中心共确诊感染 CDV 的大熊猫 4 只, 经医治无效, 先后死亡。取其中一只死亡大熊猫 (死亡时间为 2015 年 1 月 4 日) 肺渗出液, -70℃ 冰箱保存备用。

1.2 载体、菌株和主要试剂

pMD19-T 克隆载体、Ex-Taq 酶购自于大连 TaKaRa 公司; DH5a 感受态细胞购自于北京全式金生物技术有限公司; 总 RNA 提取试剂盒为 Bioflux 公司产品, 胶回收试剂盒为 OMEGA 产品; AMV Reverse Transcriptase 和 RNasin Ribonuclease Inhibitor 为 Promega 公司产品。

1.3 引物的设计与合成

根据 Genbank 上发表的 CDV 全基因序列, 设计 17 对引物, 由上海英骏生物技术有限公司合成, 见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 The sequence of the primers

扩增片段 Amplified fragment	上游引物 (5'→3') Forward primer	下游引物 (5'→3') Reverse primer	产物位置 Site
P1	ACCAGAMAAAGTTGGCTAWGGATAG	CAAATCATTTCAGCAATTCTAGGC	1-850
P2	CTGGCTTGATATTGTTAGAAACAG	GGACCYGGGTCCTAAGTTTTTTATAATG	750-1750
P3	ATGGAAGCAATCGCCAAGATGAG	GATCGAAGTCGTACACCTCAGTCA	1575-3456
P4	ATAAAAACTTAGGACACAARAGCCT	CATCTCCCTCAACTTGAATGGTGAC	3390-4020
P5	GAGCATCACTCGACTATCAGACGATG	GTTTCATGAACTRATGATTTAGAGAA	3910-4455
P6	AGYGATGATCAGGGTCTTTT	CCCAATMGTTGACAAATTATTC	4395-5370
P7	GCCAGTCTCTTTCTTTGTTT	AGTTCTGGCTACAAATGGCTGA	5290-6318
P8	AAGGGGGTTATAGTCCACAG	GAGCATTGYTGGACTACCTGAG	6145-7085
P9	AAAACCTTAGGGCTCAGGTAGTCC	GCTCTCWCTACACACAAGGAAGC	7039-7975
P10	ATTCGAGTCTTTGARATAGGGTT	CTGAAATCTCTCTTTGATATTACG	7820-9190
P11	GGTCCATCTAGATAGCCCAATTG	CCATGTCATCCCGATAACCGT	9065-10245
P12	TCTGTGGGATAATYATTAACGG	GATCGACTGTTCCAATCTTCT	10189-11140
P13	TTGCACCAGTAGAAGAGAAGAC	GATCGGATCATTGTTGAGGT	10950-11940
P14	ATCGGGGATCCCGTGACATCTT	CATCATCACCATAGGCCATGA	11885-12785
P15	ACAGAAGAAAGAACAGACATGAA	CGGTGATAATGAATTTCAAAGC	12685-13535
P16	CAATGTGCTGCAATCAACTG	GAAATCTCTCGTTGTCAGTTCT	13480-14505
P17	GATGTTATTATAACAGTGGTGTGTC	ACCAGACAAAGCTGGGTATGATA	14440-15690

1.4 病毒基因组 RNA 提取

按照 Bioflux 公司的总 RNA 提取试剂盒操作说明提取病毒基因组总 RNA, -20℃ 保存备用。

1.5 基因扩增

采用 RT-PCR 扩增 CDV 全基因组序列。扩增使用 25 μL 体系, 依次加入 10×ExTaq Buffer 2.5 μL、10 mmol·L⁻¹ dNTPs 2.5 μL、ExTaq 1 μL、AMV Reverse Transcriptase 0.3 μL、RNasin Ribonuclease Inhibitor 0.2 μL, 上下游引物各 1 μL (10 pmol·μL⁻¹)、灭菌纯水 14 μL, CDV 总 RNA 2 μL。扩增程序: 42℃ 反转录 60 min, 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 53℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 2 min, 35 个循环后, 72℃ 延伸 10 min。RT-PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定正确后用 OMEGA 公司胶回收试剂盒回收纯化扩增的目的基因片段。分别利用病料进行 3 次 RT-PCR 扩增反应, 以排除扩增造成的错配。

1.6 扩增产物的克隆及测序

分别将第一次 RT-PCR 扩增得到的 17 个片段连接到 pMD19-T 中, 然后转化至大肠杆菌 DH5a 感受态细胞。用 PCR 方法筛选阳性克隆, 将初步鉴定的阳性克隆送上海美吉生物医药科技有限公司进行测序。同时

对第二和第三次扩增产物进行测序。

1.7 CDV 全基因组拼接以及序列同源性分析

应用 DNAMAN 和 DNASTAR 生物软件将测序成功的 17 段基因进行拼接, 并将其与 GenBank 上登录的国内外有代表性的 CDV 全基因组序列进行序列同源性分析、比对, 找出基因组序列中开放阅读框数目及位置, 分析其序列特征。并对其主要的囊膜糖蛋白 H 和附着蛋白 F 与代表性的 CDV 毒株的氨基酸进行序列分析, 绘制系统进化树。

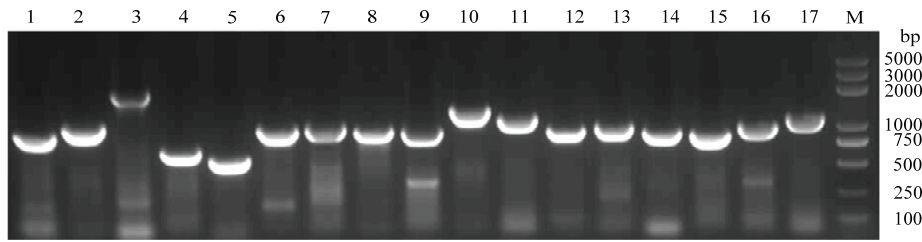
2 结果

2.1 RT-PCR 扩增结果

用设计的 17 对特异性引物进行 RT-PCR 扩增, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 得到了与预期大小相符的 17 个目的片段, 其片段长度分别约为 850、1 000、1 900、620、550、970、1 010、940、930、1 370、1 180、940、990、900、850、1 020 和 1 250 bp (图 1)。

2.2 克隆鉴定和测序

重组质粒经 PCR 鉴定显示, 成功将 17 个基因片段克隆到 pMD19-T 载体中。阳性质粒经测序、拼接, 获得了大熊猫源 CDV 全基因组序列, 序列全长



1—17 分别为 1—17 对引物，M 为 DNA 分子量 Marker 1 到 17, products of 1 to 17, respectively. M: DL2000 DNA Marker

图 1 全基因组扩增

Fig. 1 RT-PCR products amplified from exudate of the infected giant panda

15 690 nt, 未发现碱基的插入和缺失。该序列已经提交到 GenBank 上, 登录号为 KP677502, 将该病毒命名为 Louguantai 1。

2.3 基因组序列同源性分析

利用 DNAMAN 生物分析软件对大熊猫源 CDV 全基因组序列进行比较分析, 并绘制系统进化树。发现, 大熊猫源 CDV 全基因与 GenBank 上有代表性的 19 株 CDV 全基因组序列同源性为 91.5%—98.7%。其中与 PS 株亲缘关系最近, 同源性为 98.7%, 与标准野毒株 A75-17 同源性为 95.7%, 与 Asia-I 型标准疫苗株 CDV3 亲缘关系较远, 同源性为 91.5%。全序列分析结果显示, 与 GenBank 上登录的 32 个犬瘟热病毒基因组对比, 共有 91 处核苷酸发生了新的变异(图略)。系统进化分析显示, 大熊猫源犬瘟热病毒 Louguantai 1 和强毒株 MKY-KM08、PS、HLJ1-06、Hebei 以及

AC96I-H358 在一个大的分支上(图 2)。

2.4 H 基因遗传进化分析

大熊猫源犬瘟热病毒 H 基因与其他代表性的 H 基因序列同源性 87.1%—98.6%, 其中与 Onderstepoort 株同源性最低为 87.1%, 与 PS 株同源性最高为 98.6%。氨基酸同源性为 89.2%—98.4%, 与疫苗株 Onderstepoort 和 Onderstepoort 株同源性最低为 89.2%, 与强毒株 PS (貉子, 2010 年) 株同源性最高为 98.6%。与标准强毒株 A75-17 氨基酸同源性为 95.1%。与小熊猫源 CDV (GenBank 序列号为 AF178039) 和大熊猫源 CDV (GenBank 序列号为 AF178038) H 氨基酸同源性均为 94.4%。

从 H 基因氨基酸序列进化分析图可知, CDV 可以分为疫苗株和野毒株两个大的独立分支, 大熊猫源 CDV Louguantai 1 和强毒株 MKY-KM08 (狐狸, 2008

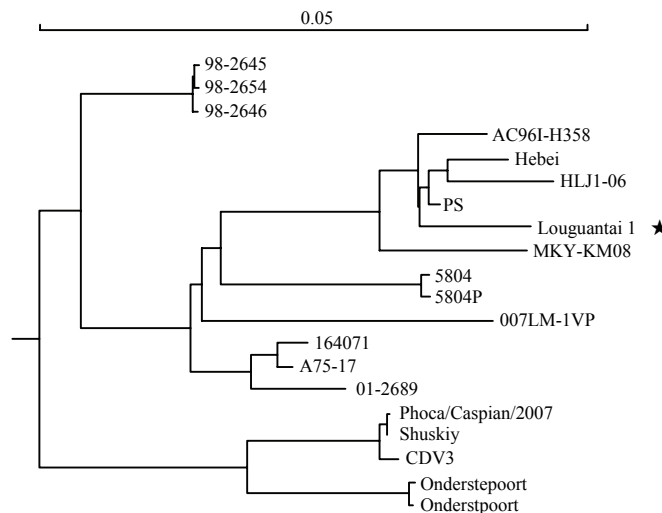


图 2 不同 CDV 毒株全基因组序列遗传进化分析

Fig. 2 The phylogenetic tree of CDV strains based on complete genome sequence

年, 中国)、PS (貉子, 2010 年, 中国)、HLJ1-06 (狐狸, 2006 年, 中国)、Hebei (水貂, 2008 年, 中国) 以及 AC96I-H358 (犬属, 2012 年, 日本) 在一个大分支上, 亲缘关系最近, 属于强毒株, 基因型属于 Asia-I。相对 PS、HLJ1-06、Hebei 和 AC96I-H358 毒株, Louguantai 1 独自形成一个新的小分支。具体

见图 3。糖基化位点分析显示, 该毒株的 H 基因有 9 个 N-糖基化位点, 与其他强毒株一致。与 21 株有代表性的 CDV 毒株相比, 有两处氨基酸发生了新的变异, 分别是第 300 位氨基酸由 S (Ser, 丝氨酸) 变成了 N (Asn, 天冬酰胺); 第 340 位氨基酸由 P (Pro, 脯氨酸) 变成了 Q (Gln, 谷氨酰胺)。

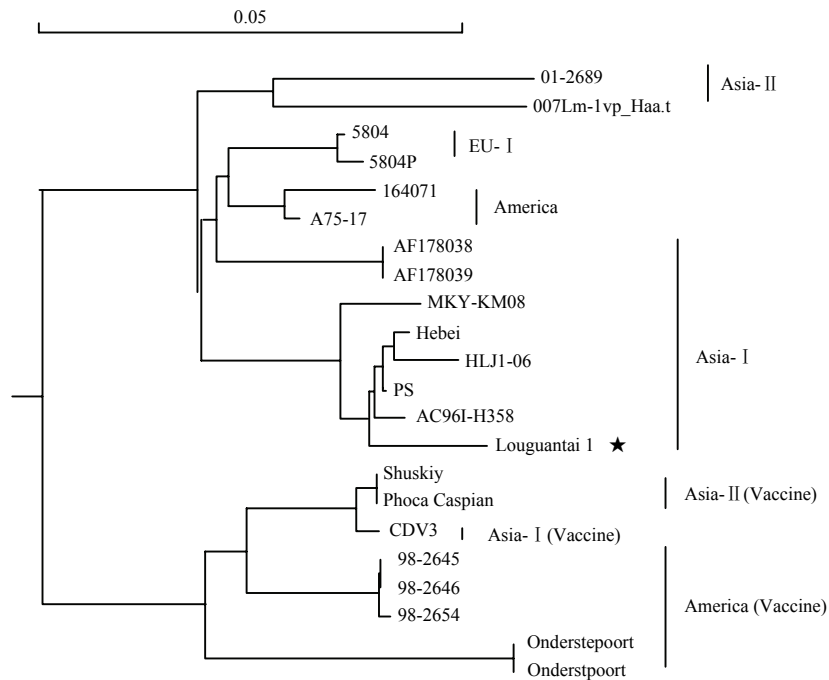


图 3 不同 CDV 毒株 H 基因氨基酸序列遗传进化分析

Fig. 3 The phylogenetic tree of CDV strains based on H gene amino acid sequence

2.5 F 基因序列分析

F 基因序列同源性分析显示, 大熊猫源犬瘟热病毒 F 基因与 20 种有代表性的犬瘟热病毒 F 基因核苷酸同源性为 88.5%—98.9%, 氨基酸同源性为 89.6%—98.9%。其中与强毒株 Ac96I-H358 株和 PS 株同源性最高为 98.9%, 与 Onderstepoort 疫苗株氨基酸同源性为 89.6%。与标准强毒株 A75-17 同源性为 94%。F 基因氨基酸序列进化树分析结果显示, 与 H 基因系统进化树基本一致, Louguantai 1 与强毒株 MKY-KM08、PS、HLJ1-06、Hebei 以及 AC96I-H358 在一个大的分支上, 同属于强毒株 (图 4)。糖基化位点分析显示, F 基因存在 6 潜在的 N-糖基化位点, 与其他强毒株一致。与其他 20 株 CDV 毒株相比, 有 3 处氨基酸发生了新的变异, 分别是氨基酸第 116 位由 C (Cys, 半胱氨酸) 变成了 Y (Tyr, 酪氨酸),

第 127 位由 A (Ala, 丙氨酸) 变成了 T (Thr, 苏氨酸), 208 位由 N (Asn, 天冬酰胺。强毒株多为 N) 或 K (Lys, 赖氨酸。弱毒株多为 K) 变成了 S (Ser, 丝氨酸), 第 215 位由 S (Ser, 丝氨酸) 变成了 A (Ala, 丙氨酸)。与 GenBank 上 CDV 所有的相应序列相比, 208 位和 215 位属于新的变异。

2.6 其他主要蛋白的氨基酸同源性分析

N 蛋白、M 蛋白和 P 蛋白氨基酸序列同源性分析显示, 该毒株 N 蛋白氨基酸序列与其他 20 株代表性的 CDV 毒株 N 蛋白氨基酸序列同源性为 97.15%—99.4%; M 蛋白氨基酸同源性为 96.7%—100%; P 蛋白氨基酸同源性为 92.7%—98.8%。与这 20 株 CDV 相比, N 蛋白在 504 位氨基酸位置由 S (Ser, 丝氨酸) 变成了 I (Ile, 异亮氨酸); P 蛋白在 34 位由 S (Ser, 丝氨酸) 变成了 N (Asn, 天冬酰胺), 在 58 位由 Q (Gln,

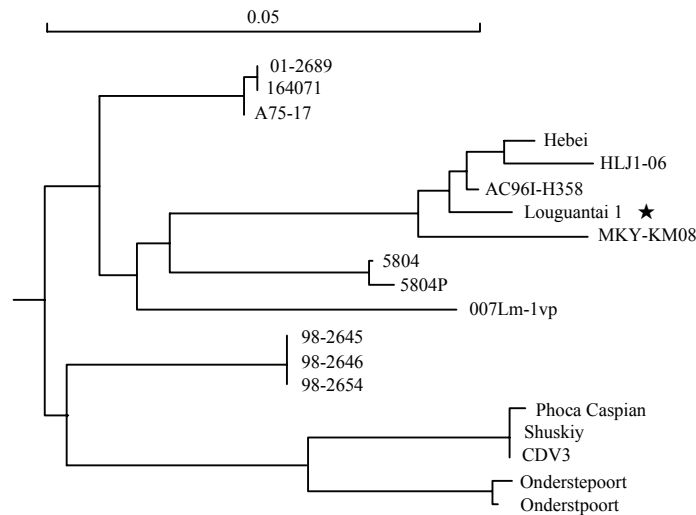


图 4 不同 CDV 毒株 F 基因序列进化分析

Fig. 4 The phylogenetic tree of CDV strains based on F gene nucleotide sequence

谷氨酰胺)变成 K (Lys, 赖氨酸), 在 90 位由 L (Leu, 亮氨酸)变成了 P (Pro, 脯氨酸)。与 GenBank 上 CDV 所有的相应序列相比, P 蛋白的 58 位发生了新的变异, 由 Q (Gln, 谷氨酰胺)变成 K (Lys, 赖氨酸)。

3 讨论

犬瘟热对各国养犬业、毛皮动物养殖业和野生动物保护业造成了不可估量的损失。现已发现 CDV 的自然感染宿主由传统的犬科、鼬科及浣熊科扩展到了肉食目所有 8 个科, 偶蹄目猪科、灵长目的猕猴属和鳍足目海豹科等多种动物, 且可在大量不相关的动物种类间交叉感染, 其危害也越来越大^[2-3]。2014 年 12 月, 陕西省珍稀野生动物抢救饲料研究中心的大熊猫感染了 CDV, 截止到 2015 年 2 月 4 日, 该中心共确诊大熊猫 CDV 阳性 4 例, 并先后死亡。本次大熊猫感染 CDV 一个很明显的特点就是: 发病急, 死亡快。

到目前为止, 国内外尚无专门针对大熊猫犬瘟热的有效疫苗、预防或治疗性药物。据王成东研究, 犬用犬瘟热等六联弱毒疫苗难以有效刺激大熊猫产生 CDV 中和抗体^[10]。在此之前, 中国一直没有发现大熊猫群发感染 CDV 的病例, 可能是现在流行的 CDV 还未适应大熊猫这个新的群体。随着病毒不断变异, 如今的 CDV 一旦在大熊猫这个群体中适应, 就有可能引起大范围快速传播。

全基因组序列分析和系统进化树显示, 本次感染大熊猫并致死的 CDV 与强毒株 MKY-KM08 (狐狸)、

PS (貉子)、HLJ1-06 (狐狸)、Hebei (水貂) 以及 AC96I-H358 (犬属) 在一个大分支上, 亲缘关系较近, 属于强毒株, 基因型属于 Asia-I; 而 CDV 的基因型与动物种属来源没有明显的关联, 只与地域有一定的关系^[11]。至于 CDV 本次对大熊猫的感染的集中性、致死性高的原因, 可能与 CDV 病毒本身较强的毒力, 大熊猫血清中没有较高的中和抗体, 以及 CDV 的不断变异后已经适应在大熊猫体内迅速增殖致病有关。

CDV 主要蛋白氨基酸序列分析显示, N 和 M 蛋白相对比较保守, H、F 和 P 蛋白变异较大。H 和 F 蛋白是宿主免疫系统的主要目的抗原, 是产生中和抗体的重要抗原之一。二者在病毒吸附和侵入宿主细胞过程中起作用。在麻疹病毒属所有结构蛋白中, H 蛋白基因变异最大^[12-15], 抗原变化最高^[16]。在免疫压力作用下, CDV 抗原表位可能发生漂移, 尤其是 H 蛋白极易发生变异, 从而引起 CDV 毒力的变化^[17-18]。而 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, 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^[19]。F 蛋白主要介导囊膜和细胞膜融合, 是感染性病毒粒子进入宿主细胞的重要环节, 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。F 分为 3 个主要功能区, 即附着区 (F2)、融合区 (F1) 和穿膜区 (F0), 前两个区位于病毒粒子的外侧, 理论上这些部位的微小变化都可能导致病毒生物学特性的改变。本研究发现,

与现有的 CDV 氨基酸序列相比, F 蛋白有两处发生了变异, 即在 208 位由 N (强毒株多为 N) 或 K (弱毒株多为 K) 变成了 S, 第 215 位由 S 变成了 A, 这两处正好为附着区, 可能是引起病毒毒力增强的原因之一。另外笔者发现在 P 蛋白的 58 位由 Q 变成 K, 这个位置属于 V 蛋白, V 蛋白是一种非结构蛋白。据 Veronik 研究, V 蛋白对 CDV 在粘膜组织和淋巴器官的淋巴细胞中的快速入侵起主要作用, 可诱导机体产生严重的出疹现象^[20]。那么这个出现在 V 蛋白上的新的氨基酸变异和 F 蛋白上氨基酸变异是否是引起本次大熊猫犬瘟热感染并致死的原因值得进一步深入研究。

4 结论

首次成功对大熊猫源 CDV 进行了全基因组测序。基因组遗传分析结果显示, 该毒株与 PS (貉子) 株亲缘关系最近, 是强毒株, 基因型属于 Asia-I。氨基酸序列分析显示, 该毒株有 3 个点发生了特有的变异: F 蛋白基因的 208 位由 N (强毒株多为 N) 或 K (弱毒株多为 K) 变成了 S, 第 215 位由 S 变成了 A, P 蛋白基因的 58 位由 Q 变成 K。

References

- [1] 王磊, 王照, 李天松, 刘玉秀, 冯娜, 王胜乐, 许薇薇, 姜雪, 高玉伟, 王铁成, 杨松涛, 夏咸柱. 小熊猫源犬瘟热病毒全基因组序列的克隆及序列分析. *中国畜牧兽医*, 2011, 38(11): 77-82.
Wang L, Wang Z, Li T S, Liu Y X, Feng N, Wang S L, Xu W W, Jiang X, Gao Y W, Wang T C, Yang S T, Xia X Z. Genomic sequence determination and analysis of lesser panda canine distemper virus. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2011, 38(11): 77-82. (in Chinese)
- [2] Deem S L, Spelman L H, Yates R A, Montali R J. Canine distemper in terrestrial carnivores: a review. *Journal Zoo Wildlife Medicine*, 2000, 31(4): 441-451.
- [3] Yoshikawa Y, Ochikubo F, Matsubara Y, Tsuruoka H, Ishii M, Shiota K, Nomura Y, Sugiyama M, Yamanouchi K. Natural infection with canine distemper virus in a Japanese monkey (*Macaca fuscata*). *Veterinary Microbiology*, 1989, 20(30): 193-205.
- [4] 张振兴, 高索兰, 徐福南, 秦爱霞, 虞蕴如, 秦志清. 一起中国熊猫瘟热病的实验报告. *畜牧与兽医*, 1983, 4(5): 147-153.
Zhang Z X, Gao S L, Xu F N, Qin A X, Yu W R, Qin Z Q. An experimental report of Chinese pandas suffering from distemper disease. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 1983, 4(5): 147-153. (in Chinese)
- [5] 胡贵学, 夏咸柱, 李金中. 大熊猫犬瘟热致死性感染的首次报道//中国微生物学会兽医微生物学学术论文集, 1997, 109-110.
Hu G X, Xia X Z, Li J Z. The first report of lethal infection of canine distemper in giant pandas//*Academic Symposium of Veterinary Microbiology of Chinese Microbiology Institute*, 1997, 109-110. (in Chinese)
- [6] 李金中, 夏咸柱, 何洪斌, 余春, 胡贵学, 范泉水, 郑先春, 黄耕, 武银莲. 基因序列分析确诊大熊猫的犬瘟热病毒感染. *中国兽医学报*, 1999, 19(5): 448-450.
Li J Z, Xia X Z, He H B, Yu C, Hu G X, Fan Q S, Zheng X C, Huang G, Wu Y L. Gene sequence analysis diagnosis of giant pandas infected by canine distemper virus. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 1999, 19(5): 448-450. (in Chinese)
- [7] 何洪斌, 李金中, 夏咸柱, 余春, 范泉水, 黄耕, 邱薇, 殷震. 大熊猫犬瘟热病毒附着或血凝素蛋白基因的序列分析. *中国病毒学*, 2000, 15(3): 291-295.
He H B, Li J Z, Xia X Z, Yu C, Fan Q S, Huang G, Qiu W, Yin Z. Nucleotide sequence analysis of the haemagglutinin protein gene of giant panda strain of canine distemper virus. *Virologica Sinica*, 2000, 15(3): 291-295. (in Chinese)
- [8] 高玉伟, 夏咸柱, 鞠会艳, 贺文琦, 杨松涛, 黄耕, 李德生, 王鹏彦. 大熊猫血清犬瘟热病毒中和抗体调查//第十一次全国养犬学术研讨会论文集, 2005: 240-243.
Gao Y W, Xia X Z, Ju H Y, He W Q, Yang S T, Huang G, Li D S, Wang P Y. Serologic investigation of distemper in relation to giant panda//*The Symposium of the Eleventh National Kennel Academic Seminar*, 2005: 240-243. (in Chinese)
- [9] 王斌. 大熊猫病毒性疾病 PCR 检测方法的建立及流行病学调查[D]. 成都: 西南民族大学, 2013.
Wang B. Establishment of PCR methods for detecting viral diseases in giant panda and the epidemiologic investigation[D]. Chengdu: Southwest University for Nationalities, 2013. (in Chinese)
- [10] 王成东, 杨松涛, 吴开波, 高玉伟, 张志和, 罗婵, 王承宇, 王铁成, 严玉宝, 胡娟, 杨智, 兰景超. 犬瘟热弱毒疫苗对大熊猫的免疫效果评价. *兽类学报*, 2008, 28(2): 212-216.
Wang C D, Yang S T, Wu K B, Gao Y W, Zhang Z H, Luo L, Wang C Y, Wang T C, Yan Y B, Hu J, Yang Z, Lan J C. Serological evaluation of the efficacy of the multivalent canine distemper attenuated live vaccines on giant pandas. *Acta Theriologica Sinica*, 2008, 28(2): 212-216. (in Chinese)
- [11] 程悦宁. 犬瘟热病毒 SY-12 株的分离鉴定及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]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2014. (in Chinese)
- [12] Iwatsuki K, Miyashita N, Yoshida E. Molecular and phylogenetic analyses of the haemagglutinin(H) proteins of field isolates of canine distemper virus from naturally infected dogs. *Journal of General Virology*, 1997, 78(2): 373-380.
- [13] Blixenkron Mollor M, Svanson V, Appel M, Krogsrud J, Have P, Örvell C. Antigenic relationships between field isolates of morbilliviruses from different carnivores. *Archives of Virology*, 1992, 123: 279-294.
- [14] Blixenkron M M, Svanson B, Have P. Studies on manifestations of canine distemper virus infection in an urban dog population. *Veterinary Microbiology*, 1993, 37: 163-173.
- [15] Iwatsuki K, Tokiyoshi S, Hirayama N. Antigenic difference in the H proteins of canine distemper viruses. *Veterinary Microbiology*, 2000, 71: 81-286.
- [16] Mochizuki M, Hasimoto M, Hagiwara S. Genotypes of canine distemper virus determined by analysis of the hemagglutinin genes of recent isolates from dogs in Japan. *Clinical Microbiology*, 1999, 37(9): 2936-2942.
- [17] 许莎琼, 朱建国, 傅志强, 吴祖立, 华修国. 犬瘟热病毒当前研究进展. *上海畜牧兽医通讯*, 2006(1): 5-7.
- Xu S Q, Zhu J G, Fu Z Q, Wu Z L, Hua X G. Study on current progress of canine distemper virus. *Shanghai Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2006(1): 5-7.(in Chinese)
- [18] 莫小见, 郭爱珍, 陆承平. 犬瘟热病毒南京株 H 蛋白基因的克隆与表达. *中国病毒学*, 2004, 19(5): 487-489.
- Mo X J, Guo A Z, Lu C P. Cloning and expression of the H protein gene fragment of canine distemper virus Nanjing strain. *Virologica Sinica*, 2004, 19(5): 487-489.(in Chinese)
- [19] 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. *微生物学报*, 2008, 48(7): 986-991.
- Zhao J J, Yan X J, Wu W. Genetic variations and cellular receptors of Canine distemper virus - A review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(7): 986-991. (in Chinese)
- [20] Veronika M, Nicholas S, Roberto C. Receptor (SLAM[CD150]) recognition and the V protein sustain swift lymphocyte-based invasion of mucosal tissue and lymphatic organs by a morbillivirus. *Virology*, 2006, 80(12): 6084-6092.

(责任编辑 林鉴非)