第14卷第2期 1999 年 6 月



Vol. 14 No 2 Jun. 1999

174-180

5852.655

大熊猫犬瘟热病毒融合蛋白基因 3′端的序列测定

李金中 夏咸柱 何洪彬 胡桂学 余 春 范泉承 郑先春 黄 耕 武银莲

(解放军农牧大学军事兽医研究所,长春 130062)

摘 要 从死亡大熊猫的肝脏中直接提取细胞总 RNA, 经反转录后, 用犬瘟热病毒的两对引物, 分两段扩增出融合蛋白基因 3′端的片段。经序列分析表明: 此片段的长度为 693 bp; 此毒株在核苷酸和氨基酸水平与某疫苗弱毒株、Onderstepcort 弱毒株、海豹瘟热病毒 2 型毒株和海豹瘟热病毒 1 型的同源性分别为 97.5%和 96.2%、88.6%和 94.5%、92.9%和 95.6%、63.2%和 76.5%; 大熊猫毒株与其它毒株融合蛋白 3′端疏水性和二级结构均有一定差异; 其非编码区比国外报道的 Onderstepcort 弱毒株多 9 个碱基, 在非编码区最后 58 个碱基, 两毒株仅有 17 个相同。至于这种差异的生物学意义尚待进一步的研究。

关键词 大熊猫, 犬瘟热病毒, 序列测定

食肉目大熊猫科的大熊猫是我国特有的濒危物种,近年来人们在研究大熊猫的生态环境、生理特性、繁殖特点等方面均取得了显著的成绩^[1]。然而在大熊猫疾病的研究,尤其是在病毒性传染病的研究方面却非常落后。目前仅有两次关于应用常规方法检验大熊猫的病毒性感染的报道^[2,3]。我们应用电子显微镜、PCR 和基因序列分析等方法,将一起大熊猫的死因确诊为犬瘟热病毒和冠状病毒混合感染^[4],为了进一步研究感染大熊猫的病毒的特点,为今后大熊猫病毒性疾病的防治提供依据,测定了大熊猫犬瘟热病毒融合蛋白基因 3′端的序列。现将结果报道如下。

1 材料和方法

- 1.1 病料 某动物园送检的死亡大熊猫的肝脏 2 份。
- 1.2 RT-PCR 按照李金中等报道的方法(5.6),从大熊猫肝脏中提取细胞总 RNA 并进行反转录,应用一对能 扩增出融合蛋白穿膜区(P1 和 P2)和一对能扩增出含融合蛋白 3′端非编码区基因的引物(P3 和 P4),分两段 扩增犬瘟热病毒融合蛋白基因的 3′端。引物的序列及在相应基因中的位置如下:

P1(F 1502~1522) 5'GGCGACACTTCATCCTTGTGC 3'

P2(F 2113~2096) 5'ctggatccAAACCTGGCAATCAAGCG 3'

(5 端的小写字母为保护性碱基和 Sac I 的酶切位点)

P3(F 2051~2067) 5'AAATCCTATGTGAGATC 3'

P4(H 635~616) 5' TAATGAGACTGATAGGGGGA 3'

收稿日期:1998-05-11,修回日期:1998-08-17

* 军队"八五"医药卫生基金重点课题

维普资讯 http://www.cqvip.com

P1 和 P2 扩增片段的理论长度为 620 bp。

P3 和 P4 扩增片段的理论长度为 792 bp(除含 F 基因的 3 末端外,还包括 H 基因的 5 末端)。

- 1.3 PCR 产物的纯化 将 PCR 产物用 1% 普通琼脂糖电泳, 切下相应的条带后, 用 Promega 公司生产的 DNA 纯化试剂盒, 回收相应 DNA 片段。
- 1.4 基因序列分析 该纯化片段用两端特异性引物进行序列分析,由日本宝生物工程大连分公司完成。
- 1.5 基因序列的计算机分析与比较 应用 DNASIS 和 PROSIS 软件,将此序列结果与某疫苗弱毒株 (JPF3')、犬瘟热的 Onderstepoort 疫苗弱毒株 (ONF3')^[6]、海豹瘟热病毒 2 型(PDV2F3')^[7]和海豹瘟热病毒 1 型(PDV1F3')^[8]进行分析与比较,比较其基因和氨基酸序列并绘制系统发生树,分析该蛋白氨基酸的硫水性和二级结构。

2 结果

2.1 PCR 扩增结果 经 PCR 扩增后,用含溴化乙锭的琼脂糖凝胶电泳,分别得到两个与其理论片段大小相似即约 620 bp 和 790 bp 的片段,如图 1 所示。



图 1 从大熊猫扩增的两种 PCR 产物的电泳结果

- 1. 为 P3 和 P4 的 PCR 产物; 2. 为 Marker(分子量从下至上依次为 100,200,300,400,500,600,700,800,900,1000,1500 bp); 3. P1 和 P2 的 PCR 产物。
- Fig. 1 The electricphoresis of the 2 kinds PCR products amplified from the Giant Panda.
- The PCR product of P3 and P4; 2. Marker (The sizes of Marker are respectively 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500 bp from the below to top).
 The PCR product P1 and P2.
- 2.2 基因片段的序列分析结果 经序列分析大熊猫犬瘟热病毒融合蛋白基因的3 端共含693 bp, 其中编码区为550 bp, 编码183个氨基酸, 非编码区为143个碱基。
- 2.3 序列分析与比较结果 图2为大熊猫毒株融合蛋白基因 3′端与其它相关毒株的核苷酸序列比较结果;表 1 为大熊猫毒株与相关病毒株在核苷酸和氨基酸水平上差异和同源性;图 3 为根据各毒株核苷酸和氨基酸序列绘制的系统发生树;图 4 为根据其氨基酸序列进行的疏水性和二级结构预测。

表 1 大熊猫毒株与相关病毒株在核苷酸和氨基酸水平上差异和同源性

Table 1 The varation numbers and homology of fusion protein gene 3' end of different

CDV relative viruses strains in nucleotide and amino acid

	GP	IP	ON	PDV2	PDV1
GP		14(97.5%)	78(88.6%)	45(92.9%)	252(63.2%)
JP	7(96.2%)	- , ,	15(97.4%)	41(92.8%)	168(70.5%)
ON	10(94.5%)	7(96.2%)		50(92.1%)	231(66.2%)
PDV2	8(95.6%)	9(95.1%)	6(96.7%)		198(71.1%)
PDV1	43(76.5%)	43(76.5%)	42(77.0%)	39(78.7%)	

相比较的核苷酸数目为两个相比序列中较短的一个、氨基酸数目为 183 个氨基酸的比较;空白斜线上方为核苷酸,空白斜线下方为氨基酸;括号外为差异的数量,括号内为同源性。

第14卷

The compared numbers of nucleotide are the shorter one between 2 nucleotide fragments. There are 183 amino acids. Numbers above the diagonal indicate nucleotides. Numbers below the diagonal indicate the amino acids. Numbers outside parentheses indicate difference between the nucleotide sequences and the amino acid sequences. Numbers in parentheses indicate the similarity between the nucleotide sequences and the amino acid sequences.

*** INPUT INFORMATION ***

. CM	FILE NAME	BP	A	C	G	T/U	SEQUENCE POS	ITION
1	GP3'.DNA	693	204	148	144	197	1 -	693
2	JPF3'.DNA	569	159	119	123	168	1 -	5 69
3	ON3'.DNA	684	198	147	139	200	1 -	684
4	PDV2F3'.DNA	635	181	141	129	184	1 -	635
5	PDV1F3'.DNA	685	203	136	130	216	1 -	685

*** SEQUENCE LIST ***

		10	20	3.0	40	50	
GP3 N. DNA	1	TCGGACCTTG					5
JPF3'.DNA		*******					5
ON3'.DNA	1	******	*****	*******	*******	**G*****	5
PDV2F3'.DNA		******					5
PDV1F3'.DNA	1	*A*A**TC*T	**C**A***	*AT*A****	***G**C**C	T******G*	5
		60	70	80	90	100	
GP3', DNA	51	GTAACATCGT	CGCAAATTGT	GCGTCTATAC	TATGTAAGTG	TTATGGCACA	10
JPF3'.DNA	51	********	*******	*****	******	****A****	10
ON3' DNA		****T****					10
PDV2F3' DNA		****T****					10
PDV1F3'.DNA	51	*A*****TA*	T**C*****	**T*****CT	*G * * * * * A * *	*C**A****C	10
		110	120			150	
GP3'.DNA		AGCACAATTA					15
JPF3 DNA		******					15
ON3 ' . DNA		******					15
PDV2F3'.DNA		*****					15
PDV1F3', DNA	101	****AG**C*	*C**C**A**	******C**A	***TTA**C*	******	15
		1.60	170			222	
CESI DVA		160	170			200	
GP3'.DNA		CGATACCTGC					20
JPF3 DNA		*****					20
ON3'.DNA		******					20
PDV2F3'.DNA		*****					20
FDV1F3'.DNA	151	******T***] * - 1 - W * - G =	-G.zzzzCzz	Garlassari	*********GA	20
		210	220	220	240	250	
GP3'.DNA	201	GCAGGCAATA					25
JPF3 DNA		******					25
ON3'.DNA		******					25
PDV2F3',DNA		*******					25
PDV1F3'.DNA		*T*****G**					25
PDVIF3 .DMA	201	-1	11	G CG -		-C-C1G	23
		260	270	280	290	300	
GP3'.DNA	251	GCTATATCAC					30
JPF3 DNA		******					30
ON3 DNA		********					30
PDV2F3'.DNA		*******					30
PDV1F3'.DNA		*+A*****G*					30
					~		

	3	10 32	0 330	340	350	
GP3'.DNA	301 TAAGAAAC	TG GACGATGCT	A AGGTACTGAT	' AGACTCTTCT	AACCAGATCC	3.5
JEF3' DNA		** **T*****		******	*****	35
ON3 LDNA		** **T****				3 5
PDV2F3' DNA		*A **T*****				3.5
PDV1F3 DNA		*A **T****				3 5
15.115 242.			•		•	
	7	60 37	C 3AO	390	400	
GP3 ' DNA		GT TAGGCGCTC				40
JPF3 DNA		** ******				4.0
ON3' DNA		** ******				40
		** ******				40
PDV2F3', DNA		** **AAAAT**				40
PDV1F3' DNA	321 ****C***	T. T.MAMAIT	3 .W1W.GC.	-4	-M-10CMC-C	40
		10 420	430	440	450	
ona i Dire		10 420 'AA GTGGTACAG				4.5
GF3'.DNA						45
JPF3' DNA		** ****				
ON3'.DNA		** **T******				45
PDV2F3'.DNA		** *CT*****				45
PDV1F3' DNA	401 **GG***C	T* 1C**ATT**0	3 ***AAT***A	T*AC**T***	***GI.**C**	45
	_					
		60 470				
GP3'.DNA	451 TAAAAGAC	GC TACCAACAGA	A CACTCAAGCG	GAATGCTAAG	GTCGATCCGG	5 C
JPF3' DNA		** *****				50
ON3'.DNA		** ******				50
ANG.'E72VCG		** **1*****				50
PDV1F3' DNA	451 *****AG*	*A **T*****C	T * T * T * G T * A	ATC*A****	* * T * C C * * T *	50
	5	10 520	530	540	550	
GP3' DNA	501 CAATTAAA	CC TGATCTAACI	GGAACTTCGA	AATCCTATGT	GAGATCACTC	55
JPF3'.DNA	501 ******	** ********	******	****	****	55
ON3', DNA	501 **T****	** *******	*****	****	****	5 5
PDV2F3'.DNA	501 **T****	** *****G***	* *G*****T*	****	A******	55
PDV1F3 '.DNA	501 T*T*C**G	** ****T*G***	**C****A*	****T****	C*****T**A	55
	5	60 570	580	590	600	
GP3', DNA	551 TGAAGCAT	TO TEGTOACACE	TCTTACCCGA	TTGTTAGGCT	TGAAATCTCT	60
JPF3'.DNA	551 *****T**	** ******T*T.				60
ON31.DNA	551 *****T**	64 4*4+64T*T&	* * * CG * TT * *	***CC***T*	********	60
PDV2F3'.DNA	55) ****T**C	** ******	*****	*******	********	60
PDV1F3'.DNA		CA GT*C***TT*				60
12/2/3 12/3/	2-3 0.112	,	- 31. 11			
	6	10 620	630	640	650	
GP3'.DNA	-	CC CAATTTTCTT				65
JPF3 DNA						65
ON3'.DNA		** *******				65
PDV2F3'.DNA		** ********GC				65
PDV1F3'.DNA	601 C*ICAG*A	AT TC*****TG*	-1-1CAGA	16.61.6.16	CCAGAC ~CAI	65
	r.	-n	600		704	
CD3 L Dava		670		690	700	20
GP3'.DNA		AG AGGACTGACT				70
JPF3'.DNA						70
ANG. ENO		SA CCATGATTAC				70
PDV2F3'.DNA	651			11111111		70
PDV1F3' DNA	- 651 *A**AATA0	* *TATGGTC*C	TACTA+TAA+	G* *AA		70

图 2 大熊猫犬瘟热病毒融合蛋白基因 3 端的序列及相关病毒的比较

Fig. 2 The nucleotide sequence of the 3' end of fusion protein gene in CDV giant panda strain and comparison with other relative viruses

通过序列比较发现大熊猫毒株融合蛋白基因在 3′端编码区的长度与其它毒株相同,而非编码区 143 bp 的基因,则比犬瘟热 Onderstepoort 弱毒株的 134 bp 多 9 个碱基,两毒株在非编码区则有 57 个碱基的不同,其中在最后的 58 个碱基中就有 41 个碱基不同,但在 3′最末端的 10 个碱基则是完全相同。大熊猫毒株 3′端非编码区的这个序列与我们测定的小熊猫及一中国狗野毒株的相应片段的长度相同,它与小熊猫株和中国狗野毒株则分别仅有 1 个和 7 个碱基的不同。

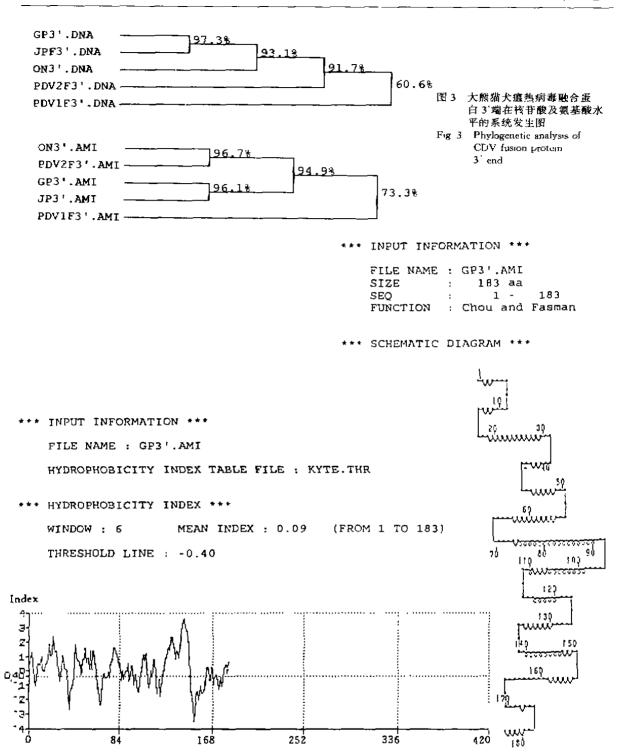


图 4 大熊猫犬瘟热病毒融台蛋白 3 端的疏水性和二级结构

Fig. 4 The hydropathy profiles and the second structure of CDV giant panda strain in fusion protein 3' end

通过比较大熊猫毒株和其它毒株的疏水性和二级结构发现,大熊猫毒株与其它毒株均存在着一定的差异,尤其是二级结构的差异更为明显。

3 讨论

本实验测定了大熊猫犬瘟热病毒融合蛋白基因的 3′端序列,并分析了此毒株与其它已知序列毒株之间的关系,这些毒株之间在核苷酸和氨基酸水平上的亲缘关系是不同的。本实验所得的各毒株之间的亲缘关系,与对该毒株融合区基因的序列分析所得出各毒株之间的亲缘关系有一定的差异(文章待发表)。至于大熊猫犬瘟热病毒准确的进化地位,以及与我国境内其它动物犬瘟热病毒的关系,尚待进一步的研究。本研究还发现我国境内的三个毒株在融合蛋白非编码区基因的长度相同,且同源性亦很高,而与国外测定 CDV Onderstepoort 弱毒株的长度不同,且同源性很低,尤其是在近3′端的58个碱基中仅有17个相同。我国境内的犬瘟热毒株与国外毒株的这种差异虽然不会影响编码氨基酸的变化,但这种变化可能对附着蛋白mRNA 的转录有一定影响,至于这种差异的生物学意义有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 高罐亭, 哺乳动物分类名录—食肉目(八卷). 科学出版社, 1987,111~112
- 2 张振兴,高素兰,徐福南等. 一起中国熊猫瘟热病的实验报告. 畜牧与兽医,1983(4):3~9
- 3 何爱华、杜胜芳、林桂华等。首次从腹泻熊猫粪便中检出冠状病毒简报。中国人兽共患病杂志、1988、4(3):4
- 4 胡贵学、夏咸桂、李金中等,大熊猫犬瘟热致死性感染的首次报告,中国微生物学会兽医微生物学学术年会论文集,1997,10:109~110
- 5 李金中、夏咸柱, 股震等、犬瘟热病毒野毒株融合蛋白主要功能区基因的变异研究,中国兽医学报、1996, 16(6):519~
- 6 Barrett T, Clarke D K, Evans S A et al. The nucleotide sequence of the gene encoding the F protein of canine distemper virus: a comparison of the deduced amino acid sequence with other paramyxoviruses. Virus Research, 1987, 8:373 ~ 386
- 7 Visser H K G, Heijden R W, Bildt M W et al. Fusion protein gene nucleotide sequence similarities, shared antigenic sites and phylogenetic analysis suggest that phocide distemper virus type 2 and canine distemper virus belong to the same virus entity. Journal of Gerneral Virology, 1993, 74:1989~1994
- 8 Currans M D, Lu Y J, Rima B K et al. The Iusion protein gene of phocine distemper virus; nucleotide and deduced amino acid sequences and a comparison of morbillivirus Iusion proteins. Arch Virol, 1992, 126(1~4):159~169

The Nucleotide Sequence of the 3' End of Fusion Protein Gene of Canine Distemper Virus Giant Panda Strain

Li Jinzhong Xia Xianzhu He Hongbin Hu Guixue Yu Chun Fan Quanshui Zheng Xianchun Huang Geng Wu Yinlian

(The Veterinary Institute of Changehun University of Agriculture and Animal Sciences, Changehun 130062)

Abstract The cellular total RNA was isolated from livers of the died giant panda, then the templates were produced by reverse transcription reaction. Two couple primers were applied to amplify the 3' end of fusion protein gene of canine distemper virus (CDV) giant panda strain. About 620 bp and 780 bp fragments were amplified. The fragments were purified and sequenced. There were 693 base pairs in the 3' end of fusion protein gene of CDV giant panda strain. Its homology with CDV vaccine attenuated strain, CDV Onderstepoort attenuated strain, phocine distemper virus type 2 (PDV-2) and phocine distemper virus type 1 (PDV-1) in nucleotide and amino acid were 97.5% and 96.2%, 88.6% and 94.5%, 92.9% and 95.6%, 63.2% and 76.5%, respectively. The hydropathy profile and the second structure of the fusion protein gene in the 3' end of CDV giant panda strain were different from other strains. The numbers of the non-encoding region nucleotides of CDV giant panda strain were 9 nucleotides longer than CDV Onderstepoort strain in the same region. There were only 17 nucletides homology in the lastest 3' end 58 bp between the two CDV strains.

Key words Giant panda, Canine distemper virus, Nucleotide sequence