

291-296

14

大熊猫犬瘟热病毒附着或血凝蛋白基因的序列分析*

585-2-68

何洪彬², 李金中¹, 夏咸柱¹, 余春¹, 范泉水¹, 黄耕¹, 邱薇¹, 殷震¹¹(解放军农牧大学军事兽医研究所, 长春 130062)²(东北农业大学生命科学院, 哈尔滨, 150030)

摘要:首次对犬瘟热病毒(CDV)大熊猫(GP)毒株附着或血凝蛋白(H)基因进行了序列测定并与疫苗株 Onderstepoort 进行了比较。我们设计合成了4对引物,对GP株进行了RT-PCR扩增与测序。H蛋白基因全长为1946 bp,开放阅读框架(ORF)始于21-23位的ATG,终止于1842-1844位的TGA,编码607个氨基酸,该基因序列已被GenBank收录。将GP毒株与GenBank中疫苗弱毒株 Onderstepoort 进行比较,二者核苷酸序列的同源性为91.4%,推导的氨基酸序列的同源性为90.2%。GP和Onderstepoort株H蛋白的半胱氨酸残基数目均为12个且相对位置不变;疏水性有一定的变化,但推测的穿膜区位置(约35-55位氨基酸)是一致的;Onderstepoort株的H蛋白潜在的N-联糖基化位点为4个,GP株H蛋白为9个,糖基化位点的不同可能对GP株H蛋白的抗原性产生影响。

关键词:大熊猫;犬瘟热病毒;附着或血凝蛋白基因;序列分析

中图分类号:S852.65,Q78 文献标识码:A 文章编号:1003-5125(2000)03-0291-06

犬瘟热病毒(Canine distemper virus, CDV)是副粘病毒科麻疹病毒属的重要成员,主要引起犬科、鼬科和浣熊科动物犬瘟热(CD)的发生,但是伴随生态环境的变化和CDV对动物流行病因素的适应,它的自然感染宿主范围在不断扩大,就连大熊猫科的大熊猫也不能幸免。1983年张振兴等^[1]报道了大熊猫发生犬瘟热(CD)感染。我们实验室在对四川某动物园送检的2只死亡大熊猫的肝脏病料的检验中,发现犬瘟热病毒(CDV)感染是这2只大熊猫致死的主要原因之一^[2]。由于CDV附着蛋白(haemagglutinin, H)在病毒的致病性、免疫原性以及分类上均具有重要意义^[3,4],为了进一步研究大熊猫CD的预防、诊断和治疗,我们对CDV大熊猫(GP)株的H蛋白基因进行了序列分析,大熊猫CDV H基因的序列测定尚属首次,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 病毒 CDV GP株来源于四川某动物园死亡大熊猫的肝脏病料

1.2 引物 我们对GenBank中已有的CDV融合蛋白(F)基因、H基因、大蛋白(L)基因的保守序列进行分析后,设计合成了8条引物,见表1。

收稿日期:1999-05-31,修回日期:1999-10-18

* 基金项目:军队“八五”医药卫生基金重点课题(91-0205)

作者简介:何洪彬(1967年-),男,汉族,黑龙江省讷河市,讲师,博士,主要从事分子病毒学研究。

1.3 RNA 的制备 参照 Chomcxycki, P. 等^[5]报道的“异硫氰酸胍-酚-仿抽提分离 RNA 的一步法”进行。

1.4 RT-PCR

1.4.1 RT 反应 取 2 μg 提取的总 RNA, 加入 20 μL 的 RT 反应液 50 mmol/L Tris-HCl (pH8.3, 室温); 50 mmol/L KCl; 10 mmol/L MgCl_2 ; 10 mmol/L DTT; 0.5 mmol/L 鱼精子; 0.25 U/ μL AMV 反转录酶; 0.5 mmol/L dATP、dGTP、dCTP 和 dTTP; 1 U/ μL RNA 酶抑制剂; 1 $\mu\text{mol/L}$ 引物 P1 或 P5; 于 42 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1-1.5 h。

表 1 引物序列及其在 CDV mRNA 上的位置

Table 1 The sequences of the primers and sites in mRNA sense

引物 primer	位置 site	序列(5'→3') sequence	引物 primer	位置 site	序列(5'→3') sequence
P1	F(2051-2067)	AAATCCTATGTGAGATC	P2	H(635-616)	TAATGAGACTGATAGGGGGA
P3	H(436-455)	GCATTAACCCGCCTAGTAAG	P4	H(1013-994)	AATGTGATCCATAGGTGTTG
P5	H(901-920)	CCTTGTGTGTAGAAGAGAGC	P6	H(1661-1642)	ATAAGAAATCGTCCGGATTG
P7	H(1599-1618)	ATATCCCGGGGCGATCATGC	P8	L(74-56)	ATCTAGATGGACCTCAGGG

1.4.2 PCR 反应 取 2 μL RT 产物, 加入 48 μL 扩增反应液 [0.2 mmol/L dATP、dGTP、dCTP 和 dTTP; 50 mmol/L KCl; 2.5 mmol/L MgCl_2 ; 10 mmol/L Tris-HCl (pH8.3, 室温); 0.01% 明胶; 上游引物 1 $\mu\text{mol/L}$, 下游引物 1 $\mu\text{mol/L}$; 0.03 U/ μL Taq 酶]。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 50 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s, 共 35 个循环。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 使用的引物配对是 P1-P2、P3-P4、P5-P6、P7-P8, 依次对应的反转录时所使用引物分别是 P1、P1、P5 和 P5。

1.5 PCR 产物测序

1.5.1 PCR 产物的纯化 按日本宝生物工程(大连)公司的 PCR Fragment Recovery Kit 试剂盒使用说明书操作。

1.5.2 纯化的 PCR 产物的序列测定 由日本宝生物工程(大连)公司完成的。

1.6 CDV H 基因及其推导的 H 蛋白的序列分析 应用分子生物学软件 GOLDKEY 对 CDV GP 株 H 蛋白完整基因的测序结果进行了分析, 并与疫苗弱毒株 Onderstepoort 进行了比较。

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增结果

用引物 P1-P2、P3-P4、P5-P6 和 P7-P8 对大熊猫 CDV 病料进行扩增, 均得到了阳性扩增结果, 扩增片段的理论值分别为 792、578、761 和 423 bp。图 1 为大熊猫 CDV 的 RT-PCR 扩增结果。



图 1 大熊猫 CDV 的 RT-PCR 扩增结果

1: DNA Marker (1 500, 1 000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp); 2: P1-P2; 3: P3-P4; 4: P5-P6; 5: P7-P8

Fig. 1 Electrophoresis of RT-PCR products amplified from giant panda. Lane 1, 100 bp DNA ladder (1 500, 1 000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp) used as a marker, from lane 2 to lane 5, products of P1-P2, P3-P4, P5-P6 and P7-P8, respectively.

2.2 大熊猫 CDV 株 H 基因的序列测定结果

将大熊猫 CDV 基因的 4 个 PCR 片段所测序列拼接后,得到一个由 2180 个核苷酸组成的基因序列,去掉侧翼的 F 基因 3' 端和 L 基因 5' 端序列,得到了 H 蛋白的全基因序列(图 2),该序列已被 GenBank 收录,登记号为 AF178038。H 基因全长为 1 946 bp,开放阅读框架始于 21-23 位的 ATG,终止于 1 842-1 844 位的 TGA,编码 607 个氨基酸。

```

1  AGGGCTCAGG TAGTCCAACA ATGCTCTOCT ACCAAGACAA GGTGGGTGCC TTCTATAAAG ATAATGCAAG AGCTAATTCA TCCAAGCTGT
91  CCTTAGTGAC AGAAGAGCAA GGGGGCAGGA GACCACCTTA TTTGCTGTTT GTCCTTCTCA TCTACTGGT TGGAAATCAT GCCTTACTTG
181 CTATCACTGG AGTCCGATTT CACCAAGTAT CACTAGCAA TATGGAATTT AGCAGATTGC TGAAGAGAA TATGAGAAA TCAGAGGCCG
271 TACATCACCA AGTCATAGAT GTCTTGACAC CGCTCTTCAA AATTATGGGA GATGAGATTG GGTACCGGTT GGCACAAAAA CTAACCGAGA
361 TCAACAATT TATTCTTCAA AAGACAAACT TCTTCAATOC GACAGGGAA TTOGACTTCC GOGATCTCCA CTGGTGCATT AACCCGCCA
451 GTAAGATCAA GGTGAATTTA ACTAATTACT GOGATACAAT TGGGCTCAGA AAATCTATTG CATGGGCAGC AAATCCCATC CTTTTATCAG
541 CACTCTCCAG AGGCAGAGGT GACATATTCC CACCATACAG ATGCAGTGGG GCTACTACTT CAGTAGGCAG ATTTTTDCCC CTATCAGTAT
631 CATTGTCCAT GTCTTTGATC TCAAGAACAT CAGAGATAAT CAATATGCTA ACGGCTATCT CAGACGGAGT GTATGGTAAA ACCTATTTGC
721 TAGTGCCTGA TTATATTGAA GGGGAGTTCC ACACGCAAAA GATTGGAGTC TTGAGATAG GGTTCATCAA ACGGTGBCGC AATGACATGC
811 CATCACTCCA GACAACCAAC TATATGGTCC TCCCGGAGAA TTCCAAGGC AAGGTATGTA CTATAGCAGT GGGCGAGTTG ACACTGGCTT
901 CCTTGTGTGT AGATGAGAGC ACGGTATTGT TATATCATGA CAGCAATGGT TCACAAGATG GTATTCTAGT AGTGACATTG GGAATATTTG
991 GGGCAACACC TATGGATCAA GTTGAAGAGG TGATACCTGT CCCTCAOCCA TCAGTGGAGA GAATACATAT AACAATACAC CGTGGGTCCA
1081 TAAAGATTCC AATAGTAACC TGGATGGTGC CTGCATTGGT CTCTGAGAAA CAGAGGAGC AAAAAACTG TCTGGAGTGC GCTTGTCTAA
1171 GAAATCCTA CCTATGTGC AACCAAGGT CATGGAAAC CTTTGAGCCA GGACAGTGC CTCTTATGG GCGGTTGACA TTACCTCTAG
1261 ATCCANGCAT TGAOCTTCAA CTTAACATAT CATTACATA TGGTCCGGTT ATACTGAAGG GAGAAGGTAT GGATTATTAT GAAAGCCAC
1351 TTTTGGACTC CGGATGGGTT ACCATAOCTC CCAAGAAOGB AACAGTCTT GGATTCATAA ACAAGCCAAG TAGAGGAGAC CAGTTCACTG
1441 TGACCCOCCA TGTGTTGACA TTTGCGOCCA GAGAATCAG TGAATTTGT TATTTACCTA TTCAAAATC CCAGATTATG GATAAAGATG
1531 TCTTACTGA GTCCAATTTA GTGGTATTAC CTACACAGAA TTTTAGATAT GTCGTAGCAA CATATGATAT ATDCCGGGGC GATCATGCAA
1621 TTGTTTATTA TGTTTATGAC CCAATCCGGA CGATTTCTTA TACATACCCA TTTAGACTAA CTACCAAGGG TAGAOCCTGAT TTCTTAOGBA
1711 TTGAATGTTT TGTGTGGGAT GADGATTTGT GGTGTACCA ATTTACCGA TTAGAGGCTA ACATCACTAA CTCTACAAND AGTGTGAGA
1801 ATTTAGTCCG TATAAGATTG TCATGTAATC GTTCAAAACC TGGTATGAT GATGATACAC ATCTCAATTG AACTGAGGGA TGATGACGT
1891 GGTANGAAT CCTTACCGA CGATTGCATT AAGGCATCTC CAGATTATA AAAAA

```

图 2 大熊猫 CDV H 基因的核苷酸序列

Fig. 2 Nucleotide Sequence of haemagglutinin gene of CDV giant panda strain.

注:21-23 位的 ATG 和 1 842-1 844 位的 TGA 分别为开放阅读框架的起始密码子和终止密码子被加了底纹

Note: The start codon (ATG) at position 21-23 and the termination codon (TGA) at position 1 842-1 844 are shaded

2.3 推导的大熊猫(GP)CDV 与疫苗弱毒 Onderstepoort (Ond) 株 H 蛋白的分子生物学特性的差别

利用 GOLDKEY 软件分析了 CDV GP 株和疫苗弱毒 Ond 株 H 蛋白的亲水性和疏水性(图 4)、糖基化位点(图 3)、半胱氨酸残基(图 3)。

GP	1	MLSYQDKVGFYKDNARANSKLSLVTEQGGRRPPYLLFVLLILLVGINALLAITGVRPHQVSTSNMEFSRLLKENMEKSEAVHHQVTD
OND	1	--P-----T-----GH-----L-----D-----
GP	91	YLTPLFKIIGDEIGSRLPQKLNIEIKQFLLQKTNFFNPNRDFDRDLHWCINPPSKIHKVNLITNYCDTIGLRKSIASAANPILLSALSRCRG
OND	91	-----L-----TY--F--ES--I--A-----G--
GP	181	DIFPPYRCSGATTSVGRFFPLSVLSMSLISRSEIINMLTAISDGVYGKTYLLVPDYIEGEFDTQKIRVFEIGFIKRWLNDMPSLQTTN
OND	181	---H-----KV-----V-----D--R--RE-----L---
GP	271	YMYLPENSKAKVCTTAVGELTLASLCYDESTYLLYHDSMGSQGGILVYTLGIFGATPMDQVEEVIPIVAHPSYERIHITNHRGFIKDSIVT
OND	271	---K-----E-----S-----W---HI-----MKK-----A-
GP	361	WNVPAVSEKQEEQKNCLESACQRKSYPCNQTSTWEPFGGQQLPSYGRLLPLDPSIDLQNLISFTYGPVILNGDGMDDYIESPLLDGWL
OND	361	---A---G---T---A---R-----A-V-----N---
GP	451	TIPPKNGTYLGLINKASRGDQFTYTPHYLTFAPRESSGNCYLP1QTSQINDKDYLTESNLVYLPTQNFRIYYVATYDISRGDHAIVYYVYD
OND	451	---D--IS---G---L-----RR--I--I---SI--I---S-----
GP	541	PRTISITYPPRLTTRGRPDFLRTFCFVWDDLWCHQFYRREANETNSTTSYENLVRIKFSCHNSKPK
OND	541	-----H-----N-----D-A-----

图3 推导的 CDV GP 株和 Onderstepoort 株 H 蛋白氨基酸序列的比较

注: N-X S/T 是潜在的 N-糖基化位点标志, 字符被加上了底纹。

Fig. 3 Comparison of deduced amino acid sequences of the H proteins of CDV GP and Onderstepoort strains.

The N-linked potential glycosylation sites are shaded.

3 讨论

本文首次测定了大熊猫 CDV H 蛋白基因序列, 并与疫苗株 Onderstepoort 进行了比较, 二者核苷酸序列的同源性为 91.4% (1 778/1 946), 推导的氨基酸序列的同源性为 90.2% (545/604), GP 和 Onderstepoort 株 H 蛋白的半胱氨酸残基数目及其位置是保守的, 均为 12 个且相对位置不变; 疏水性和二级结构均有一定的变化, 但推测的穿膜区位置 (约 35 位至 55 位氨基酸) 是一致的, 胞质内 34 个氨基酸, 露在外面的糖蛋白骨架分别为 552 和 549 个氨基酸; Onderstepoort 株的 H 蛋白潜在的 N-糖基化位点为 4 个 (19-22, 149-152, 422-424, 587-589 位氨基酸), 其中 2 个位于 N 末端 2/3 处 (一个位于推测的胞质部分, 不能利用), 而另 2 个位于蛋白质 C 末端的 1/3 处, GP 株 H 蛋白潜在的 N-糖基化位点为 9 个 (19-22, 149-152, 309-312, 391-393, 422-425, 456-458, 585-587, 587-589, 603-605), 其中 4 个与 Onderstepoort 的 N-糖基化位点完全相同, 但另外 5 个是 Onderstepoort 株所不具有的, Iwatsuki. k 等^[3]认为 N-糖基化位点不同可能影响 H 蛋白抗原性的不同。

综上所述, 大熊猫 CDV 与疫苗弱毒 Onderstepoort 株 H 蛋白的同源性较低, 同时 GP 病毒株 H 蛋白疏水性和糖基化位点与 Onderstepoort 株比较已发生了某些变化, 至于上述变化对 GP 株的抗原性、致病性会产生什么样的影响, 以及使用现有弱毒疫苗究竟能否有效地预防大熊猫犬瘟热的发生, 尚待进一步的研究。

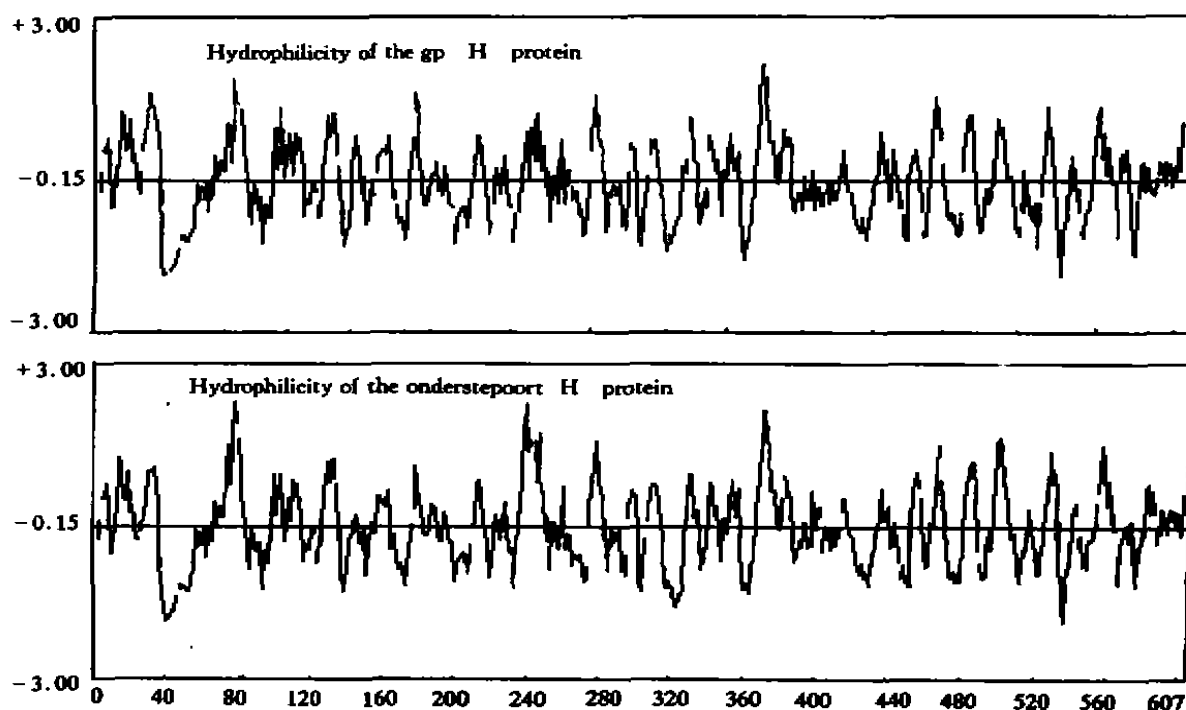


图4 推导的CDV GP株和Onderstepoort株H蛋白的亲水性图

注:推测的跨膜区位置约在35-55位氨基酸之间

Fig.4 Predicted H protein hydrophilicity profile of the GP and Onderstepoort strains.

Note: The predicted transmembrane position at 35-55 amino acid residues

参 考 文 献

- [1] 张振兴,高繁兰,徐福南,等.一起中国熊猫瘟热病的实验报告[J].畜牧与兽医,1983,(4):3-9
- [2] 胡桂学,夏成柱,李金中,等.大熊猫犬瘟热致死性感染的首次报告[C].见:第七届全国养犬学和第三届广东小动物医学联合会学术研讨会论文集,1997,172-174
- [3] Iwatsuki K, Miyashita N, Yoshida M, *et al.* Molecular and phylogenetic analyses of the haemagglutinin (H) proteins of field isolates of canine distemper virus from naturally infected dog [J]. J Gen Virol, 1997, 78:373-380
- [4] Kovames J, Blixenkron-Moller M, Norrby E. The nucleotide and predicted amino acid sequence of the attachment protein of canine distemper virus [J]. Virus Research, 1991, 19:223-234
- [5] Chomczynski P and Sacchi N. Single stepo method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-choloroform extraction [J]. Analytical Biochemistry, 1987, 162:156-159

Nucleotide sequence Analysis of the Haemagglutinin Protein Gene of Giant Panda Strain of Canine Distemper Virus

HE Hong-bin², LI Jin-zhong¹, XIA Xian-zhu¹, YU Chun¹,
FAN Quan-shui¹, HUANG Geng¹, QIU Wei¹, YEN Zhen¹

¹(The Veterinary Institute, University of Agriculture and Animal Science, Changchun, 130062, China)

²(Department of Biological Science, Northeastern Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: The sequence analysis of the haemagglutinin (H) protein gene of giant panda strain of canine distemper virus (CDV) from giant panda in China was conducted and compared with Onderstepoort vaccine strain. Four pairs of primers were designed and synthesized. The PCR products amplified from GP strain were directly sequenced after they were purified. There are 1 946 nt of the complete H gene. The H gene of the GP strain showed that the largest open reading frame (ORF) encoding a protein of 607 amino acid residues started at the ATG at position 21-23 and extended to a termination codon (TGA at position 1 842-1 844). The deduced amino acid sequence of the H protein of the GP strains was compared with the CDV vaccine Onderstepoort strain extracted from the GenBank database. The sequence of the H gene and deduced H protein of the GP strain showed an identity of 91.4% and 90.2% with Onderstepoort strain, respectively. All the 12-cysteine residues found in the GP strain H protein were conserved in Onderstepoort strain. Although predicted hydrophilicity of the GP strain differed from that of the Onderstepoort strain, the predicted transmembrane position at 35-55 amino acid residues was conserved in both strains. Out of the 4 potential N-linked glycosylation sites of Onderstepoort H protein, two were located in the N-terminal 2/3 of the protein (one located in the putative cytoplasmic part and is probably not used), while the remaining 2 sites were located in the C-terminal 1/3 of the protein. Four of the 9 potential N-linked glycosylation sites of GP H protein were conserved in the Onderstepoort, but the other five sites are unique to GP, the extra glycosylation sites may influence antigenicity of the GP.

Key word: Giant panda; Canine distemper virus; Haemagglutinin gene sequence analysis