维普资讯 http://www.cqvip.com

379-387 (13)

犬细小病毒中国内蒙株 VP2 基因克隆及序列分析*

董江丽[1]，李淑芬[2]，张鹤龄[1]

[1](内蒙古大学生命科学院，呼和浩特 010021)
[2](内蒙古农业大学生物工程系，呼和浩特 010018)

S852.655

摘要：从我国内蒙古地区流行的犬细小病毒病病犬的肠溶物中分离提纯犬细小病毒(CPV)。提取病毒基因组DNA，并以此DNA为模板，采用人工合成的引物进行PCR扩增，PCR产物经 *Bam*HI、*Sac*I 双酶切后，克隆于 pUC19 质粒的 *Bam*HI/*Sac*I 位点。重组质粒 pUCVP2 经 PCR 鉴定、限制酶切分析和序列分析，结果表明：获得了犬细小病毒内蒙株(CPV-IM)VP2 基因的全长克隆，VP2 基因全长 1 755 nt，与国外报道的美国 1 株(CPV-N)、美国 2 株(CPV-B)和猫全白细胞减少症病毒(FPLV)的核苷酸序列同源性分别为 99.32%、98.29%、98.52%，氨基酸序列同源性分别为 98.87%、97.09%、97.77%。

关键词：犬细小病毒；VP2 基因；序列分析 中国内蒙株

中图分类号：S852.655 **文献标识码**：A **文章编号**：1003-5125(2000)04-0379-09

犬细小病毒(Canine Parvovirus, CPV)属自主复制的细小病毒，该病毒可引起犬细小病毒病，又称犬细小病毒性肠炎。本病以剧烈呕吐、出血性肠炎、白细胞显著减少为主要特征，不同品种和年龄的犬都易感，幼犬在16周出现心肌炎、死亡率高达20%～100%[1]。目前，国内主要采用CPV灭活疫苗和犬五联弱毒疫苗进行免疫预防，由于母源抗体的干扰及CPV毒株在强大的免疫压力下产生抗原漂移，常导致免疫失败。1993年，布日古德等用HA和HI调查内蒙警犬基地的CPV感染，结果表明，在正常接种下，感染率高达26%[2]。

细小病毒是目前动物病毒中最小、最简单的一类单链线状DNA病毒。CPV病毒粒体直径为25 nm，无囊膜，呈二十面体，其基因组为单链、负链DNA，全长5 323 nt。基因组包括两个开放阅读框架(ORF)、3′端ORF编码结构蛋白、5′端ORF编码非结构蛋白。由晚期启动子起始转录的结构蛋白基因包括VP1和VP2，VP2位于VP1的C端，且二者终止于同一密码子[3]。Langeveld等的研究表明：CPV粒体表面由60个结构蛋白亚单位装配而成，其中VP2占到50个以上，VP1不足10个。VP2基因的N端及该基因上的蛋白转角结构区loop1和loop3是重要的B细胞抗原表位区，可诱导机体产生中和性抗体，这些区域氨基酸残基的变化是导致CPV毒株抗原漂移的主要原因[1]。我们从内蒙古地区的病犬肠溶物中分离提纯CPV，扩增并克隆了CPV VP2基因，进行了序列分析，比较了我国CPV毒株与国外CPV毒株[3,4]间及其与同属的FPLV[5]在核苷酸和氨基酸序列上的差异，为进一步研制新型疫苗打

收稿日期：1999-07-05，修回日期：1999-09-06
* 基金项目：内蒙古自然科学基金资助项目(980202)
作者简介：董江丽(1971年-)，女，内蒙古包头市人，硕士研究生，内蒙古大学讲师。

维普资讯 http://www.cqvip.com

下基础。国内尚未见有关 CPV VP2 基因序列分析的报道。

1 材料与方法

1.1 毒株、菌株与载体

犬细小病毒病犬肠溶物由内蒙古农业大学兽医系布日古德老师提供，由本室分离鉴定。菌株 *E. coli* DH5α 由本室保存。质粒载体 pUC19 购自北京华美生物工程公司。

1.2 主要试剂

Taq DNA 聚合酶、*Bam* H I、*Sac* I、*Bgl* II、T4DNA 连接酶、X-gal、IPTG 及 λDNA/*Hin*d III marker 等均购自北京华美生物工程公司。

1.3 引物设计与合成

根据国外报道的 CPV 美国 1 株(CPV-N)和美国 2 株(CPV-B)基因组全序列[3,4]，设计合成一对特异性引物。为了便于基因操作，引物 1 和引物 2 的 5′端分别引入了 *Bam* H I 和 *Sac* I 限制性酶切位点。

Primer 1 (26 mer)：5′CCGGATCCAGAGACAATCTTGCACCA 3′(+)，

Primer 2 (26 mer)：5′CGCGAGCTCTATATCAAATACAAGTA 3′(−)。

引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.4 病毒提纯与鉴定

取病犬肠溶物 25 mL，组织匀浆器充分研磨，加入 2 倍体积 PBS 和 1/5 体积氯仿，冰浴乳化 30 min，10 000 r/min 离心 30 min，上清中加入 10% 聚乙二醇(6 000)，充分溶解后置 4 ℃ 静置过夜。8 000 r/min 离心 30 min 取沉淀，沉淀回溶于 5 mL PBS 并充分研磨，5 000 r/min 离心 15 min 取上清，上清液经 38 000 r/min 离心 2 h，沉淀回溶于 1 mL 10 倍稀释的 PBS 中，2% PTA 负染，电镜观察病毒形态。

病毒鉴定采用猪红细胞凝集试验和酶联免疫吸附测定。

1.5 病毒 DNA 提取

采用 SDS-酚-氯仿抽提法[6]，从提纯的犬细小病毒中提取基因组 DNA，琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 大小。

1.6 PCR 扩增

以提纯的 CPV DNA 为模板，加入 PCR 缓冲液、特异性引物 1 和引物 2、dNTP、TaqDNA 聚合酶，石蜡油覆盖。于 94 ℃ 1 min，50 ℃ 2 min，72 ℃ 3 min，扩增 30 个循环，于 72 ℃ 延伸 10 min。取 10 μL PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.7 克隆与序列分析

PCR 产物的克隆按常规方法[6]。用 *Bam* H I 和 *Sac* I 分别消化 pUC19 质粒和经酚、氯仿抽提后的 PCR 产物，低熔点琼脂糖凝胶回收所需片段，连接并转化 *E. coli* DH5α，提取重组质粒，经 PCR 及酶切法鉴定阳性克隆。重组质粒交由大连宝生物工程公司测序。对已测序的 CPV-IM 株与国外其它 CPV 分离株及 FPLV 进行核苷酸和氨基酸序列比较。

2 结果

2.1 病毒的提纯与鉴定

以自然感染的病犬肠溶物上清液为材料，经研磨乳化，10% 聚乙二醇沉淀和差速离心法提纯犬细小病毒。经 PTA 染色、电子显微镜观察，获得了直径 25 nm 的球状病毒(图 1)。血凝试验和 ELISA 结果均表明该球状病毒为犬细小病毒。

2.2 PCR 产物的获得

从提纯的犬细小病毒中提取基因组 DNA，以此 DNA 为模板，加入人工合成的引物 1 和引物 2 进行 PCR 扩增，琼脂糖凝胶电泳结果表明：获得了 1.88 kb 的特异性条带(图 2)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

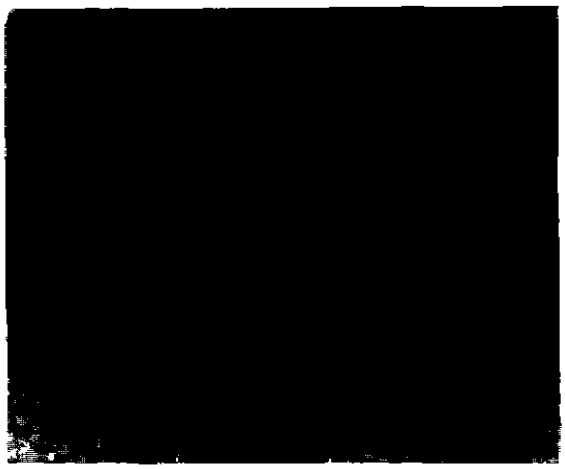

图1　提纯的犬细小病毒(×40000)

Fig.1　Purified Canine Parvovirus(×40000)

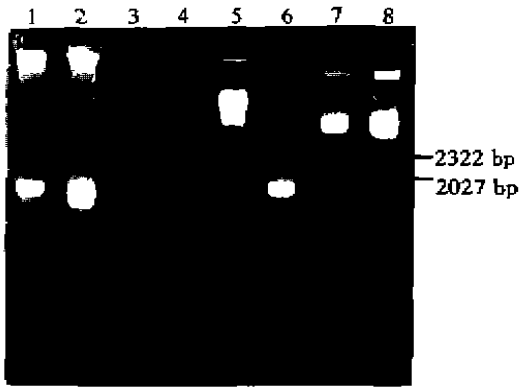

图2　重组质粒的 PCR 鉴定

1.2. 重组质粒经 PCR 扩增的产物(1.88 kb)；3. CPV 基因组 DNA 经 PCR 扩增的产物(1.88 kb)；4. pUC19 质粒经 PCR 扩增的产物(阴性对照)；5. λDNA/*Hin*dⅢ marker；6. pUC19 质粒；7.8. 阳性重组质粒

Fig 2　Identification of recombinant plasmid by PCR

1.2. Amplified product of 1.88 kb from recombinant plasmid; 3. Amplified product of 1.88kb from CPV genome DNA; 4. Amplified product from pUC19 plasmid; 5. λDNA/*Hin*dⅢ marker; 6. pUC19 plasmid; 7, 8. Positive recombinant plasmid.

2.3　阳性克隆的鉴定

将扩增得到的 CPV VP2 区 1.88 kb 的片段，插入 pUC19 质粒的多克隆位点 *Bam*HI 和 *Sac*I 之间，获得的重组质粒用 PCR 鉴定，琼脂糖凝胶电泳结果表明：得到了预期的 1.88 kb 的条带(图2)。限制酶切分析表明：该阳性克隆具有 *Bgl*Ⅱ 单酶切位点，与国外报道的相同(图3)。

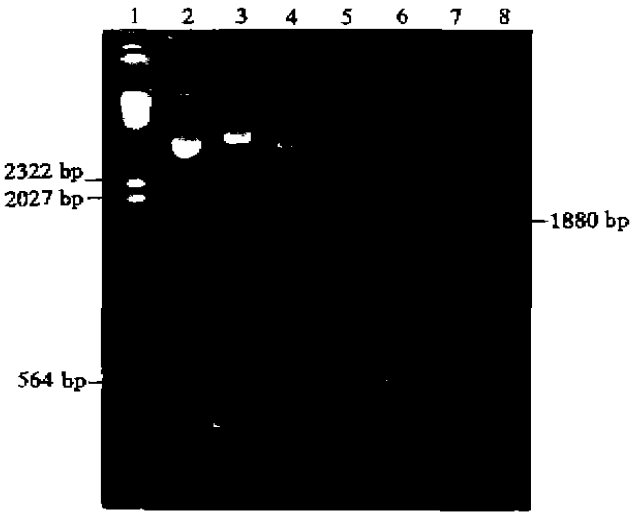

图3　重组质粒的酶切鉴定

1.8. λDNA/*Hin*dⅢ marker；2. 阳性重组质粒；3. 重组质粒经 *Bgl*Ⅱ 消化；4. 重组质粒经 *Bam*HI、*Bgl*Ⅱ 消化；5. 重组质粒经 *Bam*HI、*Sac*Ⅰ 消化；6. PCR 阴性对照；7 PCR 阳性对照(1.88 kb)。

Fig.3　Restriction mapping of recombinant plasmid

1.8. λDNA/*Hin*dⅢ marker; 2. Positive recombinant plasmid; 3. Recombinant plasmid digested by *Bgl*Ⅱ; 4. Recombinant plasmid digested by *Bam*HI、*Bgl*Ⅱ; 5. Recombinant plasmid digested by *Bam*HI、*Sac*Ⅰ; 6. Negative PCR control; 7. Positive PCR control.

维普资讯 http://www.cqvip.com


```
CPV-IM    1 ATGAGTGATG GAGCAGTTCA ACCAGACGGT GGTCAGCCTG CTGTCAGAAA TGAAAGAGCT
CPV-N     1 ---------- ---------- ---------- -----A---- ---------- ----------
CPV-B     1 ---------- ---------- ---------- -----A---- ---------- ----------
FPLV      1 ---------- ---------- ---------- -----A---- ---------- ----------

CPV-IM   61 ACAGGATCTG GGAACGGGTC TGGAGGCGGG GGTGGTGGTG CTTCTGGGGG TGTGGGGATT
CPV-N    61 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
CPV-B    61 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
FPLV     61 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

CPV-IM  121 TCTACGGGTA CTTTCAATAA TCAGACGGAA TTTAAATTTT TGGAAAACGG ATGGGTGGAA
CPV-N   121 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
CPV-B   121 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
FPLV    121 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

CPV-IM  181 ATCACAGCAA ACTCAAGCAG ACTTGTACAT TTAAATATGC CAGAAAGTGA AAATTATAGA
CPV-N   181 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
CPV-B   181 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---GG-----
FPLV    181 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- --------A-
                                                Pst I
CPV-IM  241 AGAGTGGTTG TAAATAATTT GGATAAAACT GCAGTTAACG GAAACATGGC TTTAGATGAT
CPV-N   241 ---------- --------A- ---------- ---------- ---------- ----------
CPV-B   241 ---------- --------A- ---------- ---------- ---------- ----------
FPLV    241 -----A---- --------A- ---------- --------A- ---------- ---------C

CPV-IM  301 ACCCATGCAC AAATTGTAAC ACCTTGGTCA TTGGTTGATG CAAATGCTTG GGGAGTTTGG
CPV-N   301 -TT------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
CPV-B   301 -TT------- ---------- ---------- ---------- ---------- --AT------
FPLV    301 --T----T-- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

CPV-IM  361 TTTAATCCAG GAGATTGGCA ACTAATTGTT AATACTATGA GTGAATTGCA TTTAGTTAGT
CPV-N   361 ---------- ---------- ---------- ---------- ----G----- ---- -----
CPV-B   361 ---------- ---------- ---------- ---------- ----G----- ----------
FPLV    361 ---------- ---------- ---------- ---------- ----G----- ----------

CPV-IM  421 TTTGAACAAG AAATTTTTAA TGTTGTTTTA AAGACTGTTT CAGAATCTGC TACTCAGCCA
CPV-N   421 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
CPV-B   421 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
FPLV    421 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

CPV-IM  481 CCAACTAAAG TTTATAATAA TGATTTAACT GCATCATTGA TGGTTGCATT AGATAGTAAT
CPV-N   481 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
CPV-B   481 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
FPLV    481 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
                                                Bgl II
CPV-IM  541 AATACTATGC CATTTACTCC AGCAGCTATG AGATCTGAGA CATTGGGTTT TTATCCATGG
CPV-N   541 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
CPV-B   541 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
FPLV    541 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
```

维普资讯 http://www.cqvip.com


```
CPV-IM  601 AAACCAACCA TACCAACTCC ATGGAGATAT TATTTTCAAT GGGATAGAAC ATTAATACCA
CPV-N   601 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
CPV-B   601 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
FPLV    601 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
                          Spe I
CPV-IM  661 TCTCATACTG GAACTAGTGG CACACCAACA AATATATACC ATGGTACAGA TCCAGATGAT
CPV-N   661 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
CPV-B   661 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
FPLV    661 ---------- ---------- ---------- --------T- ---------- ----------

CPV-IM  721 GTTCAATTTT ATACTATTGA AAATTCTGTG CCAGTACACT TACTAAGAAC AGGTGATGAA
CPV-N   721 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
CPV-B   721 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
FPLV    721 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

CPV-IM  781 TTTGCTACAG GAACATTTTT CTTTGATTGT AAACCATGTA GACTAACACA TACATGGCAA
CPV-N   781 ---------- ---------- T--------- ---------- ---------- ----------
CPV-B   781 ---------- ---------- T--------- ---------- ---------- ----------
FPLV    781 ---------- ---------- T--------- ---------- ---------- ----------

CPV-IM  841 ACAAATAGAG CATTGGGCTT ACCACCATTT CTAAATTCTT TGCCTCAAGC TGAAGGAGGT
CPV-N   841 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------T- --------C-
CPV-B   841 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------T- --------C-
FPLV    841 -----C---- ---------- ---------- ---------- ---------T- --------C-

CPV-IM  901 ACTAACTTTG GTTATATAGG AGTTCAACAA GATAAAAGAC GTGGTGTAAC TCAAATGGGA
CPV-N   901 ---------- --G------- ---------- ---------- ---------- ----------
CPV-B   901 ---------- --G------- -----C---- -------A-- ---------- ----------
FPLV    901 ---------- --G------- ---------- ---------- ---------- ----------
                                                     Pvu II
CPV-IM  961 AATACAAACT ATATTACTGA AGCTACTATT ATGAGACCAG CTGAGGTTGG TTATAGTGCA
CPV-N   961 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
CPV-B   961 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
FPLV    961 ------G--- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

CPV-IM 1021 CCATATTATT CTTTTGAGGC GTCTACACAA GGACCATTTA AAACA^^^CCTAT TGCAGCAGGA
CPV-N  1021 ---------- ---------- ---------- --G------- -----^^^----- ----------
CPV-B  1021 ---------- ---------- ---------- --G------- -----CTA----- ----------
FPLV   1021 ---------- --------A-- ---------- --G------- ---T-^^^----- ----------

CPV-IM 1081 CGGGGGGGAG CGCAAACAGA TGAAAATCAA GCAGCAGATG GTGATCCAAG ATATGCATTT
CPV-N  1081 ---------- --------T- ---------- ---------- ---------- ----------
CPV-B  1084 ---------- ---------- ---------- ---------- --A--^^^-- ----------
FPLV   1081 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

CPV-IM 1141 GGTAGACAAC ATGGTCAAAA AACTACCACA ACAGGAGAAA CACCTGAGAG ATTTACATAT
CPV-N  1141 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
CPV-B  1141 ---------- -----A---- ---------- ---------- ---------- ----------
FPLV   1141 ---------- ---------- ------T--- ---------- ---------- ----------
```

维普资讯 http://www.cqvip.com


```
                                        EcoR V
CPV-IM 1201 ATAGCACATC AAGATACAGG AAGATATCCA GAAGGAGATT GGATTCAAAA TATTAACTTT
CPV-N  1201 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
CPV-B  1201 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
FPLV   1201 ---------- ---------- ---------- -C-------- ---------- ----------

CPV-IM 1261 AACCTTCCTG TAACAAATGA TAATGTATTG CTACCAACAG ATCCAATTGG AGGTAAAACA
CPV-N  1261 ---------- ----G----- ---------- ---------- ---------- ----------
CPV-B  1261 ---------- ---------- ---------- -------T-- ---------- ----------
FPLV   1261 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

CPV-IM 1321 GGAATTAACT ATACTAATAT ATTTAATACT TATGGTCCTT TAACTGCATT AAATAATGTA
CPV-N  1321 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
CPV-B  1321 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
FPLV   1321 -----C---- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

CPV-IM 1381 CCACCAGTTT ATCCAAATGG TCAAATTTGG GATAAAGAAT TTGATACTGA CTTAAAACCA
CPV-N  1381 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
CPV-B  1381 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
FPLV   1381 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

CPV-IM 1441 AGACTTCATG TAAATGCACC ATTTGTTTGT CAAAATAATT GTCCTGGTCA ATTATTTGTA
CPV-N  1441 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
CPV-B  1441 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
FPLV   1441 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

CPV-IM 1501 AAAGTTGCGC CTAATTTAAC AAATGAATAT GATCCTGATG CATCTGCTAA TATGTCAAGA
CPV-N  1501 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
CPV-B  1501 --GT-G---- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
FPLV   1501 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

CPV-IM 1561 ATTGTAACTT ACTCAGATTT TTGGTGGAAA GGTAAATTAG TATTTAAAGC TAAACTAAGA
CPV-N  1561 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
CPV-B  1561 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
FPLV   1561 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

CPV-IM 1621 GCCTCTCATA CTTGGAATCC AATTCAACAA ATGAGTATTA ATGTAGATAA CCAATTTAAC
CPV-N  1621 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
CPV-B  1621 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
FPLV   1621 --A------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

CPV-IM 1681 TATGTACCAA GTAATATTGG AGGTATGAAA ATTGTATATG AAAAATCTCA ACTAGCACCT
CPV-N  1681 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
CPV-B  1681 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -------GG-
FPLV   1681 ---C------ A--------- --C------- ---------- ---------- ----------

CPV-IM 1741 AGAAAATTAT ATTAACATAC TTACTATGTT TTTATGTTTA TTACATAT^^ ^^^^^^^^^^
CPV-N  1741 ---------- --***----- ---------- ---------- --------CA ACTAGCACCT
CPV-B  1741 ---------- --***----- ---------- ---------- --------CA ACTAGCACCT
FPLV   1741 ---------- --***1755
CPV-IM 1789 ^^^^^^^^^^ ^^^^^^^^^^ ^^^^^^^^^^ ^^^^^^^^^^ ^^^^^^^^^^ TATTTTAAGA 1798
CPV-N  1801 AGAAAAATTA TATTAATATA CTTACTATGG TTTTTATGTT TATTACATAT ---------- 1860
CPV-B  1801 AGAAAA^TTA TATTAATATA CTTACTATG^ TTTTTATGTT TATTACATAT ---------- 1858
```

维普资讯 http://www.cqvip.com

图4　CPV-IM 株 VP2 基因 DNA 互补链(+)序列(5′→3′)与其它分离株及 FPLV 病毒对应序列的比较("－"表示核苷酸与 CPV-IM 相同；"A"表示核苷酸缺失；"＊＊＊"表示 VP2 基因终止密码)

Fig.4　Comparison of VP2 gene complementary strand (+) DNA sequence of CPV-IM strain with corresponding sequence of other CPV isolates and FPLV

1-40	MSDGA	VQPDG	GQIAV	RNERA	TGSGN	GSGGG	GGGGS	GGVGI
41-80	STGTF	NNQTE	FKFLE	NGWVE	ITANS	SRLVH	LNMPE	SENYR
81-120	RVYYN	NLDKT	AVNGN	MALDD	THAQI	VTPWS	LVDAN	AWGVW
121-160	FNPGD	WQLIV	NTMSE	LHLVS	FEQEI	FNVVL	KTVSE	SATQP
161-200	PTKVY	NNDLT	ASLMV	ALDSN	NTMPF	TPAAM	RSETL	GFYPW
201-240	KPTIP	TPWRY	YFQWD	RTLIP	SHTGT	SGTPT	NIYHG	TDPDD
241-280	VQFYT	IENSV	PVHLL	RTGDE	FATGT	FFFDC	KPCRL	THTWQ
281-320	TNRAL	GLPPF	LNSLP	QAEGG	TNFGY	IGVQQ	DKRRG	VTQMG
321-360	NTNYI	TEATI	MRPAE	VGYSA	PYYSF	EASTQ	GPFKT	PIAAG
361-400	RGGAQ	TDENQ	AADGD	PRYAF	GRQHG	QETTT	TGETP	ERFTY
401-440	IAHQD	TGRYP	EGDWI	QNINF	NLPVT	NDNVL	LPTDP	IGGKT
441-480	GINYT	NIFNT	YGPLT	ALNNV	PPVYP	NGQIW	DKEFD	TDLKP
481-520	RLHVN	APFVC	QNNCP	GQLFV	KVAPN	LTNEY	DPDAS	ANMSR
521-560	IVTYS	DFWWK	GKLVF	KAKLR	ASHTW	NPIQQ	MSINV	DNQFN
561-584	YVPSN	IGGMK	IVYEK	SQLAP	RKLY＊			

图5　推导的 CPV-IM 株 VP2 基因氨基酸序列

Fig.5　Deduced amino acid sequence of VP2 gene of CPV-IM strain

2.4　CPV-IM 株 VP2 基因 DNA 互补链(+)的序列(5′→3′方向)及分析

测序结果表明：CPV-IM 株 VP2 基因由 1755 个核苷酸组成，编码 584 个氨基酸。与国外报道的两株 CPV 分离物 CPV-N 和 CPV-B 及一株 FPLV 对应序列相比较，其核苷酸数目及编码的氨基酸数目是相同的，核苷酸同源率分别为 99.32%、98.29%、98.52%，氨基酸同源率分别为 98.97%、97.09%、97.77%(图 4、图 5、图 6)。四株分离物 VP2 基因氨基酸序列比较结果表明：编码的 584 个氨基酸中共有 27 个氨基酸发生改变，CPV-IM 与 CPV-N、CPV-B、FPLV 相比，分别有 6、17、13 个氨基酸不同，CPV-IM 与 CPV-N 的同源率最高。值得一提的是，就 VP2 基因而言，CPV-B 与其它 CPV 分离株之间的差异大于 FPLV 与其它 CPV 分离株间的差异，CPV-B 的氨基酸序列在 355-356 位之间插入了一个亮氨酸(CTA)，而在 380 位缺失了一个脯氨酸(CCA)(图 6)。

3　讨论

本文以内蒙古地区自然感染犬细小病毒病的病犬肠溶物上清液为材料，提纯犬细小病毒，并从病毒粒体中提取基因组 DNA，用于基因克隆并获得成功。这一方法与常规的猫肾传代细胞增殖病毒相比，具有简便、快速、经济等优点。

本文获得的 CPV-IM 株 VP2 基因由 1 755 个核苷酸组成，编码 584 个氨基酸，与国外报道的 CPV 其它分离株相同[3,4]。但是从 VP2 终止密码附近(本文图 4 的 1 729 处)开始，CPV-N

维普资讯 http://www.cqvip.com

氨基酸No.	CPV-IM	CPV-N	CPV-B	FPLV
78	N	N	K	N
79	Y	Y	D	Y
80	R	R	R	K
87	L	M	M	M
93	N	N	N	K
101	T	I	I	T
103	A	A	A	V
118	G	G	D	G
297	A	S	S	S
300	G	A	A	A
305	Y	D	D	D
309	Q	Q	P	Q
313	R	R	K	R
323	N	N	N	D
355	T	T	T	I
355-356间	Deleted	Deleted	L	Deleted
367	D	Y	D	D
375	D	D	N	D
380	P	P	Deleted	P
386	Q	Q	K	Q
411	E	E	E	A
433	T	T	I	T
502	V	V	L	V
562	V	V	V	L
564	S	S	S	N
568	G	G	G	A
580	P	P	G	P

图6 CPV-IM、CPV-N、CPV-B及FPLV VP2基因氨基酸变化的比较

Fig.6 Comparison of amino acid changes of VP2 gene between CPV-IM, CPV-N, CPV-B and FPLV

分离株出现紧邻的62 bp重复，CPV-B分离株出现60 bp的重复，而CPV-IM株没有核苷酸重复现象(图4)。分析其原因，我们认为主要是由于病毒宿主细胞的不同造成的。CPV DNA的复制是在细胞核内进行的，完全依赖宿主细胞DNA的复制机制。经猫肾传代细胞增殖病毒获得的CPV-N和CPV-B分离株与从病犬肠溶物中提纯病毒获得的CPV-IM株相比，因宿主细胞不同而导致5′非编码区的重复。Rhode的研究表明，将大鼠H1细小病毒培养在NB细胞上传代，其5′非编码区出现重复现象[7]。

参 考 文 献

[1] Langeveld J P M, Casal J I, Vele C, *et al*. B-cell epitopes of canine parvovirus: distrbution on the primary structure and exposure on the viral surface [J]. *J Virol*, 1993, 67:765～772

维普资讯 http://www.cqvip.com

[2] 布日古德,某警犬基地犬细小病毒感染的血清学调查[J]. 内蒙古兽医,1993,4:7-8

[3] Reed A P, Jones E V, Miller T J, *et al*. Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus [J]. J Virol, 1988, 62:266-276

[4] Rhode S L Ⅲ, Nucleotide sequence of the coat protein gene of canine parvovirus [J]. J Virol, 1985, 54:630-633

[5] Carlson J K, Rushlow I, Maxwell F, *et al*. Cloning and sequence of DNA encoding structural proteins of the autonomous parvovirus feline panleukopenia virus [J]. J Virol, 1985, 55:574-582

[6] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[7] Rhode S L Ⅲ. Replication process of the parvovirus, H-1. X. Isolation of a mutant defective in replicative-from DNA replication [J]. J Virol, 1978, 25:215-223

Molecular Cloning and Sequencing of VP2 Gene of Canine Parvovirus Inner Mongolia Isolate (CPV-IM)

DONG Jiang-li[1], LI Shu-fen[2], ZHANG He-ling[1]

[1](*College of Life Sciences, Inner Mongolia University, Huhehaote*, 010021 *China*)

[2](*Inner Mongolia Agricultural University, Huhehaote* 010018, *China*)

Abstract: The DNA of Canine Parvovirus Inner Mongolia isolate (CPV-IM) was isolated from the enteric lysate of virus-infected dog showing enteritis symptoms. The VP2 gene of CPV-IM was amplified by PCR using designed and synthesized two primers and cloned into plasmid pUC19 at *Bam* H I/*Sac* I sites. Recombinant plasmid pUCVP2 was identified by PCR and restriction enzymes analysis and nucleotide sequence analysis. Results show that the full-length VP2 gene clone of CPV-IM was obtained. VP2 gene of CPV-IM isolate consists of 1 755 nt, and there is a high homology in nucleotide sequence and amino acid sequence in comparison with CPV-N, CPV-B and Feline Panleukopenia Virus (FPLV). The rate of nucleotide sequence homology is 99.32%, 98.29%, 98.52%, and the rate of amino acid homology is 98.97%, 97.09%, 97.77%, respectively.

Key words: Canine Parvovirus; VP2 gene; Nucleotide sequence