

不同型犬腺病毒纤突蛋白基因序列的比较分析*

范泉水¹, 夏咸柱², 邱薇¹, 黄耕², 何洪彬³,
余春⁴, 乔军⁵, 武银莲², 殷震²(1. 成都军区联勤部军事医学研究所, 昆明 650032; 2. 中国人民解放军农牧大学军事兽医研究所, 长春 130062;
3. 东北农业大学, 哈尔滨 150030; 4. 北京军区军犬队, 北京昌平 100021; 5. 塔里木农垦大学, 塔里木 843300)

Comparison and Analysis of The CAV Fiber Protein Gene

FAN Quan-shui¹, XIA Xian-zhu¹, QIU Wei¹, HUANG Geng¹, HE Hong-bin³,
YU Chun⁴, QIAO Jun⁵, WU Yin-lian², ZHOU Xiao-huan², YIN Zhen²

(1. The Military Medical Institute of Cheng-Du Military Area, Kunming 650032, China; 2. The Veterinary Institute, University of Agriculture and Animal Science, Changchun 130062 China; 3. The Northeastern Agriculture University, Harbin 150030, China; 4. The Military dog troop of Beijing Military Area, Beijing Changping 100021, China; 5. The Talimu Agriculture University, Talimu 843300, China)

Abstract: According to CAV Fip genes sequence, 4 pairs of primer were designed to amplify the Fip genes with PCR method. Complete Fip gene sequences of all CAV strains were shown to be consisted of 1 629nt and 1 631nt and encoded 542 and 543 amino acids from ATG start codon. The deduced amino acid sequences of the Fip of the CAV-2 strains were compared one another and with standard CAV strain extracted from the GenBank database. There are point mutation (transversion) occurring in attenuated SY-V60 and SY-V5. The Fip genes of CAV of virulent strain of different area were sequenced. There are less differences among domestic CAV-1 strains but more differences with foreign CAV-1 strains. Homology of Fip between CAV-1 and CAV-2 is 80.48%.

Key words: Canine adenovirus; Fiber protein gene

摘要: 根据已发表的 CAV 纤突基因序列, 用 PCR 方法, 对 4 个 CAV-2 毒株和 4 个 CAV-1 毒株的纤突基因进行了扩增和测序, 测定的核苷酸序列经推导得到分别编码 543 和 542 个氨基酸的 CAV 纤突蛋白全序列。测定的 CAV-2 比较表明, 我国流行的 CAV-2 SY 强毒株与国外标准强毒株 Toronto A26/61 株相同, 其驯化致弱的毒株与驯化前相比在 1134 位发生碱基颠换。测定的 CAV-1 比较表明, 我国流行的 CAV-1 株与标准强毒 RI261 株差异相对较大, 而国内 CAV-1 毒株互相之间相对差别较小。CAV-2 与 CAV-1 纤突基因的同源性为 80.48%。

关键词: 犬腺病毒; 纤突基因; 纤突蛋白

中图分类号: S852.655 文章标识码: A 文章编号: 1003-5125(2002)01-0082-05

犬腺病毒同其它腺病毒一样, 其基因组为线状、双股 DNA^[1]。其纤突直径为 2nm, 长度随腺病毒型而不同, CAV-2 的纤突为 35~37nm, 比 CAV-1 的纤突长 10nm 左右。纤突的远端部分为腺病毒型特异性抗原, 纤突的基部为亚群特异性抗原。纤突顶端

为一个 4nm 直径的球形物(又称 knob), 这是病毒感染细胞时结合于细胞受体的部分, 血凝素也在球部, 两型犬腺病毒在血凝方面的差别和纤突结构有关, 在和红细胞发生凝集时, 两者可能使用不同的或不完全相同的 RBC 表面受体。纤突的氨基酸保守区

收稿日期: 2001-05-14, 修回日期: 2001-07-23

* 基金项目: 全军医学科研“九五”青年基金项目(960019)

作者简介: 范泉水(1964-), 男, 山西夏县籍, 博士, 副研究员, 从事病毒研究 E-mail: fqsgyp@public.km.yn.cn

为底部(又叫 tail),与五邻粒基底相连,远离壳粒的一端为 C 末端,中间部分是由脯氨酸和疏水氨基酸残基组成(又叫 shaft),含有多个重复序列,但其氨基酸组成却不保守,这与腺病毒不同血清型的抗原特异性相关。纤突蛋白和某些非结构蛋白均系糖基化蛋白。另外纤突蛋白可阻断腺病毒大分子合成,抑制病毒繁殖^[2,3]。

1995 年 Rasmussen 对编码纤突蛋白的基因进行了测序和分析^[3],CAV-1 与 CAV-2 之间的蛋白质有 80% 同源性序列,纤突蛋白在病毒吸附到细胞表面受体的感染过程中起着决定性作用,CAV-1 与 CAV-2 纤突基因的不同性预示着,两者在毒力和对不同的细胞亲嗜性上存在着差异,CAV-1 对血管内皮细胞有较强的亲嗜力,因此引起犬的致死性肝炎,而 CAV-2 则引起上呼吸道感染和肠道感染。

早在 1925 年 Green 就报道由犬 CAV-1 引起的狐狸脑炎,说明 CAV-1 至少在 1925 年以前就存在,直到 1962 年, Ditchfield 在一次爆发犬传染性喉气管炎期间从犬呼吸道中分离获得单纯引起呼吸道病变(喉气管炎)而不引起肝炎的腺病毒,即 A26 株(Toronto A26/61)^[5]。而在这期间病毒学发展非常迅速,如果 CAV-2 1962 以前很流行的话,应该早有报道和研究,但是直到 1962 年 Ditchfield 才从患呼吸道疾病的犬中分离获得,并且报道仅感染小狗导致传染性喉气管炎(小狗咳嗽),在此以后 CAV-2 才在世界各地流行开来。由于 CAV-2 在形态结构、理化特性及抗原结构及核酸序列方面与 CAV-1 都很相似,随后并发现,1 型病毒也能引起单纯的呼吸道疾病,因此认为 2 型是 1 型的一个变异株。最早发现 CAV-2 引起单纯的呼吸道疾病,23 年以后,直到 1985 年 Hamelin 和 1988 年 Macartney 又证实 CAV-2 除引起狗上呼吸道疾病,并在呼吸道上皮复制外,病毒也能在消化道上皮中增殖导致狗发生腹泻^[4-9]。这也可能与 CAV-2 发生变异有关。我们所分离克隆驯化的 CAV-2 也是从患有肠炎犬的肠道中分离获得的,后来证实该毒株既能引起呼吸道症状又能引起肠道症状,为了证实在我国 CAV-2 是否也发生其亲嗜性变异从呼吸道转变为肠道,或者说两者兼而有之,为此我们有必要进行犬肠病毒的分子流行病学调查,为进一步的免疫研究奠定基础。

对我们分离和系统鉴定的 CAV-2 SY 株在犬肾细胞 MDCK 上进行传代驯化在传到 40 多代以后,发现该毒株已丧失原来的毒力,对犬表现为好的安

全性和免疫原性,这可能是由于 CAV-2 丢失一些毒力相关基因或者说与毒力相关的某些基因发生变异的结果,驯化的弱毒的最重要的问题是该毒株的遗传稳定性问题,我们驯化的毒株在易感犬上传 5 代后对犬仍然安全,这说明 SY 毒株在驯化过程中丢失了一些毒力相关基因或与毒力相关的某些变异的基因是不可逆的不能发生回复突变,但尚未从基因水平上对此进行确证。

目前我国用于预防 CAV 所用的疫苗大部分为国外疫苗的复制品,因毒种背景不清以及在细胞上传代次数较多,免疫原性和安全性均难以得到保证。目前我国已免疫过 CAV 的地区仍有 CAV 感染的发生,这是否因我国流行的毒株与国外流行的毒株并不完全相同,或国外疫苗复制品中的弱毒株由于传代次数过多所致。为此我们通过对犬腺病毒毒力、细胞亲嗜性、抗原性相关的纤突基因的序列分析来研究我国犬腺病毒的变异情况和规律,以探索我国流行强毒株与国外毒株相比的变异情况、驯化致弱毒株在驯化前后及犬体上又传 5 代以后的遗传稳定性问题、我国流行的毒株与目前我们所用的国外疫苗的同源性问题,以及我国流行的 CAV-1 在不同畜主和不同地区基因水平上的变异情况。本文对 CAV8 个毒株的纤突基因进行了扩增和序列测定,利用分子生物学软件与国外已发表的 CAV 纤突基因序列进行了比较和分析,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 病毒

犬 2 型腺病毒有以下毒株:1)沈阳分离株第 5 代毒(SY-V5);2)经蚀斑克隆驯化的犬斑第 60(SY-V60)代弱毒;3)SY-V60 在易感犬体上传 5 代的回收毒(SY-CP5);4)美国疫苗毒,原代次不清,在我们手中传 20 代(US-V20)。犬 1 型腺病毒有以下强毒株:1)长春犬株 CCC-V6;2)昆明犬株 KMC-V4;3)吉林狐狸株-V7;4)云南熊株 YNB 和经蚀斑克隆驯化的第 60(SY2-V60)代毒弱毒-V5。以上毒株均为本课题组保存并经系统鉴定的毒株。

1.2 引物

我们分析了 GenBank 中已有的 CAV 的纤突基因序列,选择纤突基因两侧及中间的相对保守区,利用分子生物学计算机软件 GOLDKEY,设计合成了 4 对 8 条引物,P1~P4 扩增 CAV-1 的纤突基因;P5~P8 扩增 CAV-2 的纤突基因。引物详见下表 1:

1.3 PCR 反应

取 2 μ L 细胞培养液, 加入 48 μ L 扩增反应液 (0.2mmol/L dATP、dGTP、dCTP 和 dTTP; 50mmol/L KCL; 2.5mmol/L MgCl₂; 10mmol/L Tris-HCl; pH8.3 室温); 0.01% 明胶; 上游引物 1 μ mol/L, 下游引物 1 μ mol/L; 0.03U/ μ L Taq 酶)。PCR 反应条件为: 96 $^{\circ}$ C 变性 50s, 52 $^{\circ}$ C 退火 60s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60s, 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 P5-P6、P7-P8。

表 1 计算机设计的 CAV 两个型纤突基因引物
Table 1 CAV Flp gene primers is designed by computer

引物名 Name	位置 Position	序列 Sequence
CAV-1 P1	5' primer	25874 CAACACCAAAGCCATGAAGC
CAV-1 P2	3' primer	26820 ATATGGGAAAAGTCCAGGTCC
Amplified length		966 Melting temperature: 82.150
CAV-1 P3	5' primer	26776 GGAGTGGCTTAAGAGTATCC
CAV-1 P4	3' primer	27614 AGTGACTTTTCTGGAAGGCG
Amplified length:		858 Melting temperature: 78.760
CAV-2 P5	5' primer	26495 TTGGTACTTCCACTTGTGCG
CAV-2 P6	3' primer	27423 TAGGCAAAGGTTAAGGGTGG
Amplified length:		948 Melting temperature: 82.859
CAV-2 P7	5' primer	27386 GTCTGTACAAAACAACGCC
CAV-2 P8	3' primer	28278 TAACITTTCTGGAAGGCGGC
Amplified length:		912 Melting temperature: 80.748

1.4 PCR 产物测序和犬腺病毒纤突基因的序列分析

按购自日本宝生物工程(大连)公司的 PCR Fragment Recovery Kit 试剂盒使用说明进行 PCR 产物的纯化。由日本宝生物工程(大连)公司完成序列测定。应用 GOLDKEY、DNASIS 和 PROSIS 等分子生物学软件对犬 2 型腺病毒 SY-V5; SY-V60; SY-CP5; US-V20 的纤突蛋白基因的测序结果进行了分析。

1.5 犬腺病毒纤突基因的序列分析

应用 GOLDKEY、DNASIS 和 PROSIS 等分子生物学软件对犬 2 型腺病毒 SY-V5; SY-V60; SY-CP5; US-V20、CCC-V6、KMC-V4、JLF-V7; YNB-V5。纤突蛋白基因的测序结果进行了分析。

2 结果

2.1 PCR 扩增结果

用引物 P1-P2、P3-P4、P5-P6 和 P7-P8 对 CAV-1(CCC1-V6)和 CAV-2(SY2-V5)株的 MDCK 细胞培养物进行扩增, 均得到了阳性扩增结果, 扩增片段的理论值分别为 966、858、948 和 912bp(见图 1)。

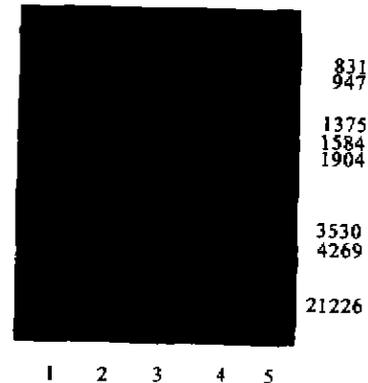


图 1 CAV-1(CCC1-V6)和 V2(SY2-V5)株的 PCR 扩增结果
Fig. 1 PCR products of CAV-1(CCC1-V6) and V2(SY2-V5)
1, P3-P4; 2, P1-P2; 3, P5-P6; 4, P7-P8; 5, Marker(λ DNA Hind III + EcoR I)

2.2 犬腺病毒纤突蛋白基因的序列测定与比较结果

应用 GOLDKEY 软件将 CAV-2 和 CAV-1 的每个毒株纤突基因的各 4 个 PCR 片段所测序列拼接后, 去掉纤突基因 3' 端和 5' 端基因序列, 得到了一个由 1629 和 1632 个核苷酸组成的纤突蛋白的全基因序列。分别编码 542 和 543 个氨基酸, SY-V60 与 CCC-V6 比较结果见图 2。

3 讨论

3.1 从纤突基因变异看我国 CAV 的流行和预防

比较测定的犬腺病毒 CCC-V6、KMC-V4、JLF-V7、YNB-V5 与 GenBank 中发表的由 Morrison 测定的犬 CAV-1 的标准强毒 RI261 株的纤突蛋白基因序列的比较表明: 我国流行的 CAV-1 株之间相对变异较少, 与 Morrison 测定的犬 CAV-1 的标准强毒 RI 261 株变异相对较多, 这可能预示着我国流行毒株与国外流行的毒株并不十分相同; 从 CAV-1 感染引起的宿主差异和地域差异上看, 长春 CCC-V6 和昆明 KMC-V4 两个犬源株有 3 个共同变异位; 吉林狐狸和云畔熊源株有 2 个共同变异位; 昆明犬源

KMC-V4 株和云南熊源 YNB-V5 株有 2 个共同变异位点;长春犬源 CCC-V6 株和吉林狐 JLF-V7 有 2 个共同变异位点。我们所测定的犬 2 型腺病毒的

SY-V60 CCC-V6	1	MKRTRRALPANYDPVYPYDAPGSSTQPPFFNNKQCLTESPPGTLAVNVSPLTFSTLGAIKLSTGPGTLNENKQLQASLG S-----F-----QKP-----DRK-----S-----I-----N-----A-----I-----K-----E-----NI-----
SY-V60 CCC-V6	81	PGLITNTEGQITVENYNKVLSTFPLHKNENTVSLALGDGLEDENGLKVTFTPTPPPLQFSPLTKTGGTVSLPLQDSM --T--Q-----KDSDG--T-----I-----SI--E-----S-----N--S-----L-----AEA-----E--
SY-V60 CCC-V6	161	QVTNGKLGKVPPTYAPPLKKTQVSLQVGSGLTVINEQLQAVQPATTYNEPLSKTNSVSLQVQAGLAVQSGALVATP --E-----S--Q-----R--P-----L--G-----K-----LE--E-----K-----D-----
SY-V60 CCC-V6	241	PPPLTFTSPLKKNENTVSLQVAGLSVQNNALVATPPPPLTFAYPLYKNDNHVALSAGSGLRISGGSLTVATGPGLSHQN -NV--SA-----G--A--VR-----I--G-----TS--T-----I--N--IT-----V-----F-----
SY-V60 CCC-V6	321	GTIGAVVCGAGLKFENNAILAKLGNGLTIRDGAIEAT QPPAAPITLWTGPGPSINGFIKDTPVIRCFICLTRDSNLVTV --A--I-----VAP--SFT--V-----D--NV--AS--G-----S--S-----
SY-V60 CCC-V6	401	NASVFGEGGYRIVSPTQSQFSLIMEFDQFQQLMSTGNINSITTWGEKPPWGNNTVQPRPSHTWKLCPNREVYSTPAATIS -----T--S--QS-----L--N-----VQ-----LT-----
SY-V60 CCC-V6	481	RCGLDSIAVDGAPSRSIDCMLIINKPKGVATYTLTFRFLNFNRLSGGTLFKTDVLTFTTYVGENQH# S--N--H--N-----LA--A-----K--SS--V-----

图 2 犬腺病毒 1、2 型纤突蛋白之间氨基酸序列比较

Fig. 2 Comparison of the CAV-1 and CAV-2 fiber protein amino acids

SY-V5;SY-V60;SY-CP5;US-V20 株与 GenBank 中的 Toronto A26/61 标准的 CAV-2 强毒株纤突蛋白基因序列的比较结果表明,美国疫苗毒株 US-V20 与我国流行的强毒株(SY-V5)差异较大,有 11 个碱基发生变化,而我们驯化克隆的毒株与我国的强毒株(SY-V5)差异较小,仅 1 个碱基发生变化,如果用我们驯化和克隆的毒株来预防我国的 CAV 应该更好一些,已进行的实际免疫效果证实了这一推测。

3.2 驯化疫苗株与原强毒株及国外疫苗株的纤突基因比较

病毒在其产生传播和增殖过程中,不断发生变异。动物病毒的许多毒力变异株是人工培育的结果,细胞适应性变异是目前病毒研究中的重要方法,也是目前应用于弱毒株筛选中的主要手段。CAV-1 病毒疫苗株是通过猪肾细胞培养获得的,CAV-2 疫苗株是通过犬肾和猪肾细胞培养获得的。我们将 CAV-2 在犬肾细胞上进行了几十代次的人工传代培养,从理论上讲病毒的突变率是很高的。虽然 CAV-2 的基因组有 30kb,但与毒力相关基因却占少数,本文通过对与犬腺病毒毒力、细胞亲嗜性、抗原性相关的纤突基因的序列分析来研究犬腺病毒的变异情况,通过在犬肾细胞上连续的传代导致与毒力相关基因的变异从而达到驯化致弱的目的。驯化病毒动物试验表明 SY-V60 已发生了明显不同于 SY-V5 的变异。

从分子生物学水平上探讨病毒核酸的正常和异

常配对情况表明, H 与邻近 N 或 O 原子的氢键结合是碱基配对的基础。据此在 DNA 复制过程中,腺嘌呤与胸腺嘧啶配对,而在转录或 RNA 复制过程中,腺嘌呤与尿嘧啶配对;鸟嘌呤则与胞嘧啶配对。这些特异性配对通常是严格地执行的,但在一定条件下,核酸碱基的结构又允许 H 原子从一个原子向另一个邻近原子转移,从而可能发生不同的碱基配对,例如胸腺嘧啶中的 N-3 上的一个 H 原子可能转移到 C-4 上,从而改变 C-4 的酮基为烯醇基,并改变碱基配对,以致胸腺嘧啶可能与鸟嘌呤而不是与腺嘌呤配对。鸟嘌呤同样也可发生酮式—烯醇式变化。N-1 氢转移至 C-6 氧上,从而使鸟嘌呤可与胸腺嘧啶配对。我们驯化克隆的毒株 SY-V60 株与驯化前的 SY-V5 相比,在 1134 位发生碱基颠换,一个胸腺嘧啶被一个腺嘌呤替代发生点突变,从而导致由原来的天冬酰胺(N)变为赖氨酸(K),美国疫苗株在此发生同样的变异,在此部位的变异导致位于 379-381 的氨基酸所形成的潜在糖基化位点发生改变,驯化株致弱的 SY-V60 与美国疫苗均没有此潜在糖基化位点,而 Toronto 与 SY-V5 强毒株有,因此我们分析这个部位的点突变可能与病毒的致弱有关,由于犬腺病毒与毒力相关基因不止纤突一个部位,对其它部位我们没有进行核酸序列比较,尚不能确定这个突变在毒力方面的意义。

突变是可逆的,通常把野生型到变异型的突变称为正突变(forward mutation),而将由变异型向野

生型的突变称为回复突变(back mutation)。我们将 SY-V60 在犬体上连续传了 5 代,以观察 SY-V60 是否发生回复突变,并把在犬体上传代毒也进行了纤突基因的序列测定,结果与 SY-V60 相同,没有发生 1134 位的回复突变及其它部位的变异,这也能进一步说明发生在 1134 位的点突变可能与毒力有关。

3.3 据纤突基因进行的犬腺病毒分型

对 CAV-1 的报导最早出现在 1925 年,直到 1962 年 Dithfield 在一次爆发犬传染性喉气管炎期间从犬呼吸道中分离获得单纯引起呼吸道病变而不引起肝炎的腺病毒 CAV-2^[5],由于 CAV-2 在形态结构、理化特性及抗原结构及核酸序列方面与 CAV-1 很相似,随后发现,1 型病毒也能引起单纯的呼吸道疾病,因此认为 2 型是 1 型的一个变异株。一般认为犬 2 型腺病毒只能感染狗导致呼吸道疾病和腹泻。犬 1 型腺病毒除能感染狐和狗外,还能感染狼、貉、山狗、黑熊、负鼠和臭鼬,其中狗、山狗、狼、貉、负鼠和臭鼬主要表现肝炎症状,而狐狸和黑熊主要表现脑炎变化。本文对引起犬肝炎的犬源株和引起熊和狐狸脑炎的狐狸株和熊株,及引起犬肠炎和喉气管炎的犬源株的纤突基因进行了序列测定,从测定的核苷酸序列及推导的氨基酸序列结果来看,引起犬肝炎的犬源株和引起熊和狐狸脑炎的狐狸株和熊株,三者之间的亲缘关系比较接近其基因和氨基酸的同源性高于 99%;而引起犬肠炎和喉气管炎的犬源沈阳株,和国外 CAV-2 疫苗株及标准 CAV-2 的强毒株 Toronto 株之间的亲缘关系比较接近,其基因和氨基酸的同源性高于 99%;而引起犬肝炎和熊

和狐狸脑炎的病毒株,与引起犬肠炎和喉气管炎的病毒株的纤突基因及推导的氨基酸序列之间的同源性仅为 80.5% 左右。从纤突基因的同源性来看,我们比较的毒株可以明显地分为二个型,引起犬肝炎的犬源株和引起熊和狐狸脑炎的狐狸株和熊株为一个型即 CAV-1,而引起犬肠炎和喉气管炎的沈阳犬源株和 Toronto 为另一个型即 CAV-2。

参考文献

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 第 2 版,北京:科学出版社,1997,1104-1130.
- [2] 钟志. 狐狸脑炎病毒的分离鉴定和流行病学调查[D]. 长春:中国人民解放军兽医大学,1989.
- [3] Rasmussen U B, Schlesinger Y, Pavrani A, *et al*. Sequence analysis of the canine adenovirus 2 fiber-encoding gene[J]. *Gene*, 1995, 159(2):279-280.
- [4] 夏咸柱,钟志宏,林青年,等. 犬传染性肝炎病原、诊断与实验免疫研究[J]. *中国畜禽传染病*, 1990, 6:38-40.
- [5] 范泉水,齐桂凤,王度林,等. 熊脑炎病毒的分离鉴定[J]. *中国畜禽传染病*, 1994, 1:2-4.
- [6] Wango L J, Wooding W L Jr, Binn L N A, *et al*. Comparison of the pathogenesis and antigenicity of infectious canine hepatitis virus and the A26-61 virus strain (Toronto)[J]. *J Am Vet Med Assoc*. 1970, 156(12):1687-1696.
- [7] Fairchild G A. Comments on infectious canine hepatitis and Toronto A26-61 virus[J]. *J Am Vet Med Assoc*. 1970, 156(12):1697-1699.
- [8] Appel M, Bemis D A. The canine contagious respiratory disease complex (kennel cough)[J]. *Cornell Vet* 1978, 68(17):70-75.
- [9] Powell K W. Use of canine adenovirus type 2 vaccine to control kennel cough syndrome[J]. *Vet Med Small Anim Clin*, 1979, 74(6):801-804.