



水貂肠炎病毒山东株分离鉴定及生物学特性分析

于永乐^{1#*}, 姚延珠^{2#}, 张传美¹, 秦志华¹, 杨瑞梅¹, 张洪亮¹, 段笑笑³, 单虎^{1*}

- 1 青岛农业大学动物医学院, 山东省预防兽医学重点实验室, 山东 青岛 266109
- 2 青岛农业大学植物医学学院, 山东 青岛 266109
- 3 青岛市动物疫病预防控制中心, 山东 青岛 266000

于永乐, 姚延珠, 张传美, 秦志华, 杨瑞梅, 张洪亮, 段笑笑, 单虎. 水貂肠炎病毒山东株分离鉴定及生物学特性分析. 微生物学报, 2022, 62(5): 1832–1842.

Yu Yongle, Yao Yanzhu, Zhang Chuanmei, Qin Zhihua, Yang Ruimei, Zhang Hongliang, Duan Xiaoxiao, Shan Hu. Isolation and biological characterization of mink enteritis virus in Shandong province. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(5): 1832–1842.

摘要:【目的】本研究旨在研究水貂肠炎病毒(mink enteritis virus, MEV)的基因组遗传进化特征。【方法】对采自山东境内水貂养殖场的 109 份水貂腹泻样品进行 MEV 的分离和鉴定, 利用血凝和血凝抑制试验、多步生长曲线绘制以及蛋白的三级结构模拟等, 对分离毒株生物学特性进行分析, 通过重叠 PCR 对分离株进行全基因扩增, 使用 MegAlign 进行序列同源性比对分析, 利用 DNAMAN V6 对基因组 5'末端和 3'末端回文结构进行预测, 应用 MEGA V6 进行遗传进化分析。【结果】共分离得到 5 株病毒, 经电镜观察和间接免疫荧光试验鉴定为 MEV 毒株, 分别命名为 MUTQS-1–5, GenBank 登录号分别为 OK275645、OK275646、OK275647、OK275648 和 OK275649; 各分离株 5'-和 3'-UTR 分别由长回文序列组成, 具有典型的细小病毒基因组末端的茎环样结构, NS1 和 VP2 基因的推导氨基酸序列存在多个非同义突变位点, 其中 NS1 蛋白的 E/Q545V 位氨基酸突变, 以及 VP2 蛋白的 F267Y、Y324I 位氨基酸突变为首次在 MEV 上发现; 生物学特性分析表明, 上述突变并未明显改变病毒的血凝及血凝抑制效价、生长趋势和病毒粒子的空间构象。全基因组序列系统发育进化树也显示, 本次分离株处于同一分支上, 与山东分离株 SDNH 亲缘关系最近。【结论】本研究报道了包含新型变异位点的 MEV 毒株的基因组特征, 试验初步证实了新型变异位点的出现并未改变病毒的血凝性、抗原性以及易感细胞内的增殖能力。以上研究结果为进

基金项目: 在青岛高校服务青岛重点学科(兽医学)(025/1119002); 青岛农业大学高层次人才科研基金(663/1120015) Supported by the Key Discipline of Serving Qingdao Industry Development in Qingdao Universities (Veterinary Medicine) (025/1119002) and by the Research Fund for High-Level Talents of Qingdao Agricultural University (663/1120015)

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. SHAN Hu, Tel: +86-532-58957552, E-mail: shanhu67@163.com; YU Yongle, Tel: +86-532-58957537, E-mail: 1511832711@qq.com

Received: 28 September 2021; Revised: 9 November 2021; Published online: 25 February 2022

一步开展病毒的流行病学与变异规律研究奠定了基础。

关键词: 水貂肠炎病毒; 遗传变异; 生物学特性

Isolation and biological characterization of mink enteritis virus in Shandong province

YU Yongle^{1#*}, YAO Yanzhu^{2#}, ZHANG Chuanmei¹, QIN Zhihua¹, YANG Ruimei¹, ZHANG Hongliang¹, DUAN Xiaoxiao³, SHAN Hu^{1*}

1 Shandong Provincial Key Laboratory of Preventive Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong, China

2 College of Plant Health and Medicine, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong, China

3 Qingdao Animal Disease Prevention and Control Center, Qingdao 266000, Shandong, China

Abstract: [Objective] This study aims to investigate the genomic characteristics of mink enteritis virus (MEV) in Shandong province, China. **[Methods]** A total of 109 fecal samples were collected from mink farms for the isolation and identification of MEV strains. Biological characterization of the isolates was carried out based on hemagglutination and hemagglutination inhibition tests, multistep growth curves, and protein structure prediction. The genomic DNA sequences of the isolates were amplified, cloned, and sequenced. MegAlign was employed for multiple sequence alignment and DNAMAN V6 for the prediction of the inverted terminal repeats of 5'-untranslated region (UTR) and 3'-UTR. The neighbor-joining phylogenetic tree was constructed in MEGA V6. **[Results]** Five strains were isolated and identified as MEV by electron microscopy and indirect immunofluorescence assay (IFA), which were named as MUTQS-1, MUTQS-2, MUTQS-3, MUTQS-4, and MUTQS-5, respectively. The genomic sequences were submitted to GenBank and got the accession numbers OK275645, OK275646, OK275647, OK275648, and OK275649, respectively. The 5'- and 3'-UTRs consisted of long palindromic sequences with a typical stem-loop-like structure at the end of parvovirus genome. The deduced amino acid sequences of NS1 and VP2 genes had several nonsynonymous mutations, among which E/Q545V in NS1 protein and F267Y and Y324I in VP2 protein had not been reported. Biological characterization showed that the above mutations did not significantly alter the hemagglutination and hemagglutination inhibition titers, growth trend, and spatial conformation of viral particles. The phylogenetic tree suggested that the five MEV isolates shared the same clade and were closely related to the Shandong isolate SDNH. **[Conclusion]** We reported the genomic characteristics of MEV strains containing novel mutation sites and confirmed that the presence of these sites did not alter the hemagglutination, antigenicity, or proliferation in susceptible cells.

Keywords: mink enteritis virus; genetic variation; biological characteristics

水貂肠炎细小病毒(mink enteritis virus, MEV)是引起水貂病毒性肠炎的重要病原, 由加拿大学者 Schofield 于 1949 年首次报道^[1]。

MEV 可在肠系膜淋巴结和肠上皮细胞中有效复制, 导致腹泻、厌食和呕吐。感染后病貂逐渐脱水、虚弱, 最终引发死亡^[2]。MEV 基因组是

长约 5 kb 的线性单股负链 DNA, 包含 2 个主要的开放阅读框, 分别是 ORF-L 和 ORF-R, 前者编码非结构蛋白 NS1 和 NS2, 后者编码决定宿主范围和抗原性的衣壳蛋白 VP1 和 VP2。编码序列的两侧是末端反向重复序列(ITR), 可自发折叠成发夹结构, 在病毒复制过程中发挥重要作用^[3-5]。

MEV 属于细小病毒科, 细小病毒属的可自主复制细小病毒, 与猫泛白细胞减少症病毒(feline panleukopenia virus, FPLV)和犬细小病毒(canine parvovirus, CPV)基因组序列同源性高达 98%以上^[6], 仅在非结构蛋白 NS1 和衣壳蛋白 VP2 上某几个氨基酸位点存在差异, 这些氨基酸位点的突变也决定了细小病毒与不同宿主细胞受体相互作用的能力, 从而使其能够跨物种感染不同宿主^[7]。因此, NS1 基因和 VP2 基因的某些突变可能会扩大病毒吸附、感染和进入不同动物细胞的能力, 并引发相关疾病^[8]。

目前, GenBank 数据库仅收录了 11 条 MEV 全基因组序列, 其中包含发夹末端的完整基因组序列只有 4 条, 全基因组序列测定对病毒基因变异有监测作用, 尤其是山东省作为主要水貂养殖区, 更需要大规模且长期监测研究, 才能阐明 MEV 的基因变异及进化规律^[9]。为了解山东貂场 MEV 的基因组变异情况, 本文针对水貂腹泻样品中 MEV 阳性病料进行病毒分离鉴定和全基因组扩增, 并对基因组序列变异位点进行详细比较分析, 为研究 MEV 遗传变异规律和制定有效防控策略提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞、毒株及主要试剂

MEV-QN 株病毒由本实验室分离保存^[10]; 猫肾细胞系(crandell reese feline kidney, CRFK)、鼠抗 MEV-VP2 单克隆抗体由本实验室制备保

存; FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG (H&L)、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG (H&L) 购自 Abcam 公司; DMEM 细胞培养液、胎牛血清、胰蛋白酶均为 Gibco 产品; MiniBEST 病毒 DNA 提取试剂盒、D1000 plus DNA Ladder、D2000 plus DNA Marker、2×PrimeSTAR Max Premix、PrimeSTAR HS DNA Polymerase with GC Buffer、pMD19-T 载体、DNA 连接酶、DH5 α 感受态细胞均购自北京宝生物(TaKaRa)工程有限公司; 0.22 μ m 滤器购自 Millipore 公司; PEG-8000 购自 Sigma 公司; pEASY-Blunt Cloning Kit 购自北京 Transgen 公司; QIAEX II 胶回收试剂盒购自上海玉博生物科技公司; 质粒小量快速提取试剂盒购自艾德莱生物科技有限公司。

1.2 病料采集和处理

采集的病料为来自山东潍坊、威海和临沂养殖场腹泻水貂粪便样品, 共计 109 份, 等比例加入灭菌 PBS 缓冲液溶解, 同时加入等体积氯仿溶液充分振荡, 8 000 r/min 离心 5 min, 取上清液用 MiniBEST 病毒 DNA 提取试剂盒提取 DNA。MEV 的检测参照刘维全等建立的肉食兽细小病毒通用 PCR 诊断技术^[11]进行。

1.3 病毒分离

将稀释后的阳性样品的上清液通过 0.22 μ m 的滤器过滤, 同步接种到猫肾细胞(CRFK)上, 进行病毒分离。当观察到典型细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)后, 将细胞培养瓶冻融 3 次, 无菌收集冻融细胞悬液, 然后继续同步接种至新的 CRFK 细胞, 并再次重复这一过程 3-4 次至 CPE 稳定出现。最后对细胞上清液进行 PCR 检测以确认分离成功, 并储存在-80 °C 冰箱备用。

1.4 电镜观察

首先配制 PEG8000 浓缩液, 称取 PEG8000

25 g、NaCl 5.0 g 溶解在 100 mL 超纯水中, 高压蒸汽灭菌后, 取 5 mL 浓缩液, 按照 1:3 比例加入第 3 代细胞培养上清液, 4 °C 浓缩过夜, 8 000 r/min 离心 10 min 后收集沉淀, 送青岛农业大学电子显微镜室进行负染观察。

1.5 间接免疫荧光试验(IFA)

将分离株以 MOI=0.1 的接种量感染 CRFK 细胞, 在感染后 36 h 进行 IFA 鉴定。具体操作如下: CRFK 细胞用冷 PBS (pH 7.4) 洗涤 3 次, 并在冷固定液(丙酮:甲醇=3:1)中固定 10 min。然后用含有 1% 牛血清白蛋白(BSA)的 PBS 在 37 °C 下封闭 30 min, PBS 洗涤 3 次后, 将细胞与抗 MEV-VP2 单克隆抗体在 37 °C 下孵育 1 h, 然后用异硫氰酸荧光素(FITC)偶联的山羊抗小鼠 IgG 抗体在 37 °C 下孵育 1 h。再用 PBS 洗涤 3 次后, 用荧光显微镜观察细胞。

1.6 血凝和血凝抑制试验(HA-HI)

血凝和血凝抑制试验详细步骤参照文献[12]进行。HA 试验结果判定: 以完全凝集猪红细胞的病毒最高稀释度为该 MEV 毒株的血凝效价; HI 试验用固定病毒稀释血清法, 第 1 孔加入

MEV 待测血清, 混匀后吸取相同体积至第 2 孔, 依次倍比稀释至第 22 孔, 第 23 孔为 MEV 阳性对照, 第 24 孔为猪红细胞阴性对照。

1.7 多步生长曲线的绘制

将分离株以 MOI=0.1 的接种量感染 CRFK 细胞, 在感染后 0、12、24、36、48、72 和 96 h 收毒, 测定各时间点病毒滴度(TCID₅₀)。最后根据不同时间点病毒 TCID₅₀ 数值绘制多步生长曲线。TCID₅₀ 测定步骤参照文献[13]进行。

1.8 全基因扩增引物设计与合成

参考 GenBank 登录的 4 株 MEV 全基因组序列, 利用 Primer Premier 5 软件, 设计 7 对 PCR 扩增引物, 引物序列由青岛志远生物工程有限公司合成, 序列信息详见表 1。

1.9 PCR 扩增、克隆及序列测定

MEV 5'UTR 和 3'UTR PCR 反应体系为 25 μL, 其中 PrimeStar HS DNA polymerase 1.0 μL, 2×GC buffer 12.5 μL, dNTPs Mixture 2.0 μL, DNA 模板 2.0 μL, 上、下游引物(10.0 μmol/L)各 1.5 μL, ddH₂O 4.5 μL。PCR 反应分 3 步进行: (1) 将 2×GC buffer 12.5 μL、dNTPs Mixture 2.0 μL、上游引物 1.5 μL、DNA 模板 2.0 μL 和

表 1 本研究所用引物序列信息

Table 1 Information of primer sequences

No.	Primers	Primer sequences (5'→3')	Fragment size/bp
1	5'-UTR	F: CGCCACCTTTTCCC GCCGAA R: GCTGCCTACGGCAGTCACACGTCA	102
2		F: AGGCAGCGCGCAGCGC R: ACTCCCTCCATAATTCCTCAG	258
3	FM1	F: GGAAAAGGTGGCGGGCTAA R: GTCATAATTACTGGAGTTG	1 572
4	FM2	F: TTGGATTGAAGAAGCTGGT R: GGAGTTGGTATGGTTGGTT	1 812
5	FM3	F: TTAAAGACTGTTTCAGAAATC R: TTATGGTAAGGTTAGTTCAC	1 643
6	3'-UTR	F: ATGTATTGTAAACTATTAATGT R: TAGCGGTCTGGTTGATTAAGCGC	248
7		F: TACGCGGTCTGGTTGATTAAGCAG R: CCTTAAAGACAGATTGATACTT	102

ddH₂O 4.5 μL 混匀于 98 °C 加热 5 min 后, 立即冰浴 5 min; (2) 加入 PrimeStar HS DNA polymerase 1.0 μL, 72 °C 延伸 5 min; (3) 加入下游引物 1.5 μL, 98 °C 变性 10 s, 60°C 退火 5 s, 72 °C 延伸 35 s, 32 个循环; 72 °C 延伸 5 min。

MEV 基因组 CDS 区(FM1/FM2/FM3)PCR 反应体系为 50 μL, 其中 2×primeSTAR Max Premix 25 μL, DNA 模板 6.0 μL, 上、下游引物(10.0 μmol/L)各 2.0 μL, ddH₂O 15 μL。PCR 反应条件为 98 °C 5 min; 98 °C 10 s, 56°C 15 s, 72 °C 40 s, 34 个循环; 72 °C 10 min。

扩增完成后, 取 6 μL PCR 扩增产物在 2%

的琼脂糖凝胶上进行电泳, 观察照相, 并对所有扩增产物进行胶回收, 连接到 pEASY-Blunt 克隆载体, 转化 DH5α 感受态细胞, 筛选出的重组质粒, 将 PCR 鉴定的阳性质粒送 Personalbio 公司测序。

1.10 序列比对分析、拼接及进化分析

序列测定后的各片段进行 NCBI BLAST 比对分析; 采用 DNASTAR 中的 Seqman 程序进行拼接、组装, Megalign 程序对碱基及氨基酸序列进行同源比较; DNAMAN V6 软件对 5'UTR 和 3'UTR 茎环样结构进行预测; MEGA V6 软件进行遗传进化分析, 并构建系统发育进化树。各毒株信息见表 2。

表 2 参考毒株信息

Table 2 The background of reference strains

Strains	GenBank No.	Year	Country
MEV-LT18	MK333230	2018	China
MEV-HLJ	MH006576	2017	China
MEV-L	KM017745	2010	China
MEV-SDNH	JX535284	2009	China
MEV SD12/01	KC713592	2012	China
MEV/LN-10	KX228695	2010	China
MEVB	FJ592174	2008	China
MEV-HB18	MN747143	2018	China
MEV-LHV	KT899745	2014	China
MEV SMPV-11	KP008112	2011	China
MEV Abashiri	D00765	1991	Japan
FPV HF1	MT614366	2019	China
FPV Cat 1	MW926314	2019	England
FPV Cat 2	MW926315	2019	England
FPV Cat 3	MW926316	2019	England
FPV TH091305	KP019621	2013	Thailand
FPV GX01	MG924893	2016	China
FPV HH-1/86	KX900570	1986	China
FPV gpfe016par01-5	MW331496	2020	China
FPV-SH2003	MW811187	2020	China
CPV-N	M19296	1988	America
CPV Laika-1993	JN033694	1993	Russia
CPV-YH	KY403998	2008	China
CPV-SH14	KT382542	2014	China
CPV Y1	D26079	1993	Japan
CPV-AHcf4	MT648210	2019	China

1.11 病毒蛋白三级结构模拟

使用在线软件 SWISS-MODEL 进行蛋白质三级结构分析, 模拟 MEV 各突变株 NS1 蛋白和 VP2 蛋白的三级结构, 并与 MEV-QN 株进行比较分析。

2 结果与分析

2.1 MEV 山东株分离及鉴定结果

从 109 份送检病料中, 共分离得到 5 株病毒, 感染 CRFK 细胞 48 h 后可产生典型的 CPE, 经电镜观察和 IFA 试验证实所分离到的病毒为 MEV, 将其分别命名为 MUTQS-1、MUTQS-2、MUTQS-3、MUTQS-4 和 MUTQS-5 (图 1)。

2.2 全基因组扩增与序列分析结果

对分离到的 5 株 MEV 毒株进行全基因组扩增, 其中基因组 CDS 区采用扩增引物 FM1、FM2 和 FM3 进行 PCR 扩增, 末端非编码区采用

扩增引物 5'-UTR 和 3'-UTR 进行扩增。最终通过序列比对分析及拼接, 获得 5 条完整的 MEV 全基因序列, 序列具体信息如表 3 所示。5 个分离株全基因序列长度基本一致, 其中 5'-UTR 序列高度保守, 而 3'-UTR 序列有所差异。利用 DNAMAN V6 对基因组 5'-UTR 和 3'-UTR 茎环样结构进行预测, 均可见较长反向互补序列, 可形成典型的细小病毒基因组末端茎环样二级结构。

此外, 使用 MegAlign 对 GenBank 登录的所有 MEV 毒株的 NS1 和 VP2 基因序列以及推导的氨基酸序列进行比对分析发现, NS1 的氨基酸序列中有 5 个非同义突变位点, 分别为 K217S、T248I、N361S、V540A 和 E/Q545V 等; VP2 的氨基酸序列中有 4 个非同义突变位点, 分别为 T236S、F267Y、V300D 和 Y324I 等(表 4)。其中, NS1 蛋白的 E/Q545V 位氨基酸突变, 以及 VP2 蛋白的 F267Y、Y324I 位氨基酸突变尚未见报道。

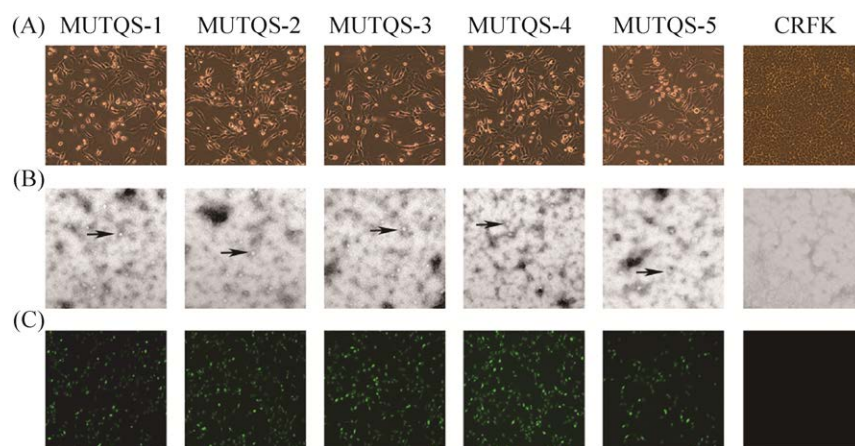


图 1 MEV 突变株分离及鉴定结果

Figure 1 Isolation and identification of MEV strains. A: CPE; B: MEV viron under electron microscopy; C: results of IFA test.

表 3 分离株全基因组序列简要信息

Table 3 The genome sequences of five MEV isolates in this study

Strains	GenBank No.	Genome/bp	5'-UTR/bp	3'-UTR/bp	NS1/bp	VP2/bp
MUTQS-1	OK275645	5 110	312	531	2 007	1 755
MUTQS-2	OK275646	5 110	312	531	2 007	1 755
MUTQS-3	OK275647	5 110	312	529	2 007	1 755
MUTQS-4	OK275648	5 111	312	531	2 007	1 755
MUTQS-5	OK275649	5 112	312	533	2 007	1 755

2.3 HA-HI 试验结果

通过 HA-HI 试验检测各突变株 HA/HI 效

价，并与 MEV-QN 株进行比较，由图 2A 可知，各毒株 HA 效价均可达 512-1 024，差异不

表 4 分离株 NS1 和 VP2 蛋白氨基酸序列中非同义突变位点

Table 4 Amino acid sequence variations in the NS1 and VP2 proteins of five MEV strains

Strain	NS1						VP2						
	217	248	361	540	545	547	232	236	267	297	300	324	562
MUTQS-1	S	T	N	V	V	I	V	S	Y	S	V	I	V
MUTQS-2	S	I	N	V	V	I	V	S	Y	S	D	I	V
MUTQS-3	S	T	N	V	E	I	V	S	F	S	V	I	V
MUTQS-4	S	T	S	V	V	I	V	S	F	S	V	Y	V
MUTQS-5	S	I	N	A	V	I	V	S	F	S	V	Y	V
MEV-LT18	K	T	N	A	E	T	V	S	F	S	V	Y	V
MEV-HLJ	K	T	N	V	Q	T	V	S	F	S	V	Y	V
MEV-L	K	T	N	V	E	V	I	T	F	S	P	Y	L
MEV-SDNH	S	T	S	A	E	I	V	S	F	S	I	Y	V
MEV SD12/01	K	T	N	A	E	I	V	S	F	S	V	Y	V
MEV/LN-10	K	I	N	A	E	I	V	T	F	S	V	Y	V
MEVB	K	T	N	V	Q	V	I	T	F	S	V	Y	V
MEV-HB18	K	I	N	V	Q	T	I	T	F	S	D	Y	V
MEV-LHV	K	T	N	A	E	I	V	T	F	S	V	Y	V
MEV SMPV-11	K	T	N	A	E	I	V	S	F	S	V	Y	V
MEV Abashiri	K	T	N	V	E	V	I	T	F	S	A	Y	L

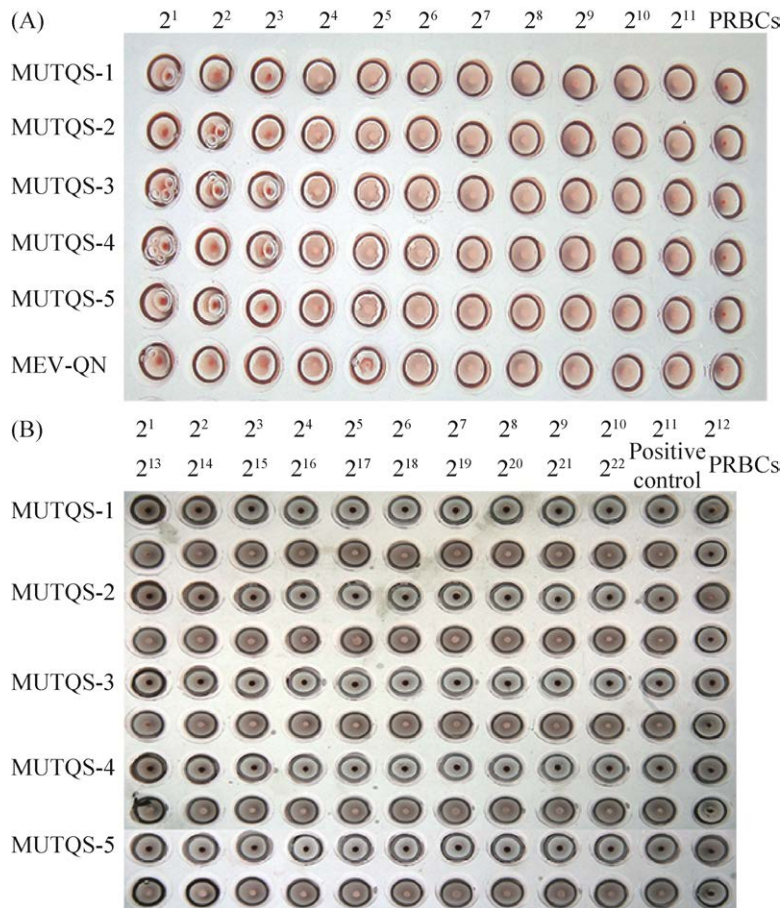


图 2 HA-HI 试验结果

Figure 2 Results of HA-HI test of the five MEV isolates. A: titers of HA; B: titers of HI.

大, 说明上述突变并未影响病毒血凝特性; 而各毒株 HI 效价可达 2 048–4 096 (图 2B), 表明上述突变并未改变病毒的抗原位点, 各变异株具有良好的抗原性。

2.4 突变株生长曲线比较

通过绘制各突变毒株生长曲线, 并与 MEV-QN 株进行比较, 如图 3 所示, 突变株生长曲线趋势与 MEV-QN 基本一致, 感染至 48 h 达到最大病毒滴度, 且最高滴度均在 $10^{-5.75}$ – $10^{-6.25}$ TCID₅₀/mL。与 MEV-QN 相比, MUTQS-1、MUTQS-2 和 MUTQS-3 在各时间点病毒滴度均有升高; 而 MUTQS-4 和 MUTQS-5 与 MEV-QN 生长曲线相似, 未见明显差异。

2.5 遗传进化分析结果

将 5 个分离株基因组与细小病毒科细小病毒属中的其他动物细小病毒基因组进行进化分析, 由图 4 可知, 本研究所有分离株聚集成一

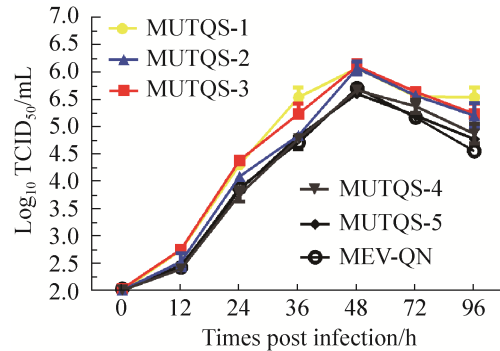


图 3 各突变株多步生长曲线

Figure 3 Multistep growth curves of the five MEV isolates.

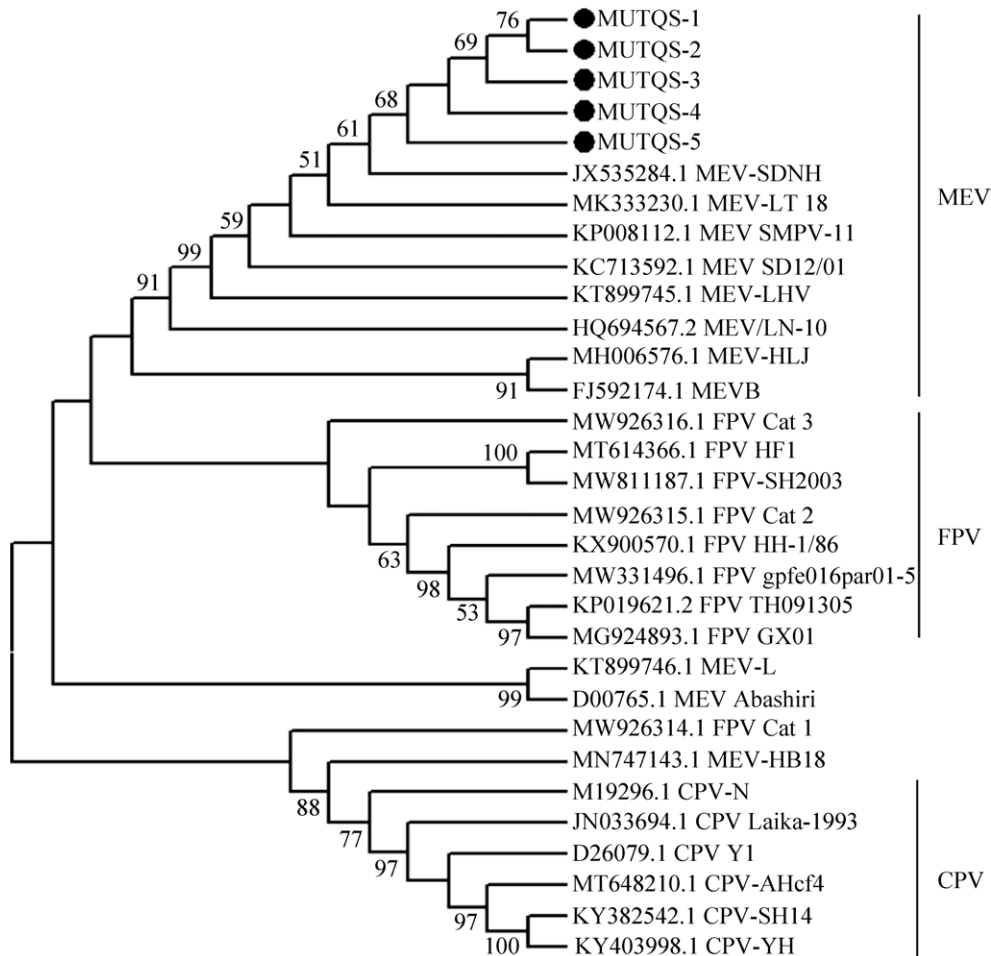


图 4 分离株基因组进化分析结果

Figure 4 Phylogenetic analysis based on genome sequences of the five MEV strains.

个大的分支，与山东株 SDNH 和 SD12/01，河北株 LT18 聚类关系较近处于一个分支上，而与参考毒株 Abashiri 以及疫苗株 MEVB 较远。与 CPV 和 FPV 毒株进化关系逐渐变远。

2.6 MEV NS1 和 VP2 蛋白三级结构模拟结果

使用在线软件 SWISS-MODEL 模拟 MEV 各突变株 NS1 和 VP2 蛋白的三级结构，通过与 MEV-QN 进行比较，如图 5 所示，NS1 蛋白的 E/Q545V 位氨基酸突变，以及 VP2 蛋白的 F267Y、Y324I 位氨基酸突变，并未对 NS1 和 VP2 蛋白的整体空间构象造成影响。

3 讨论

由 MEV 感染引起的水貂病毒性肠炎被认为是严重危害水貂养殖业的三大疫病之一，在我国已流行多年，给水貂养殖业及毛皮制造业都造成了较大的经济损失。尽管前人对 MEV

流行病学、诊断方法、遗传进化以及疫苗等方面进行了深入研究，但由 MEV 感染导致的水貂病毒性肠炎时有发生，尤其是幼貂感染后死亡率较高，严重阻碍了毛皮动物养殖业的健康发展^[14]。

本研究对 2019–2020 年收集的，来自山东主要水貂养殖地区的水貂腹泻样品，进行病毒分离、全基因组扩增以及突变株生物学特性分析，结果发现本次分离株基因组 5'-UTR 序列高度保守，反向折叠形成典型的“Y 型”发夹结构，可作为 DNA 复制起点，参与病毒复制，这与文献报道是一致的^[15]；而 3'-UTR 序列存在个别碱基差异，但并不影响“U 型”发夹结构的形成。细小病毒基因组末端特有的发夹结构在病毒复制和装配过程中发挥重要作用，同时，完整的发夹序列是成功构建感染性克隆的必备条件^[16]。本研究成功克隆了 5'-和 3'-UTR 序列，可为下一步构建 MEV 感染性克隆提供数据支撑。

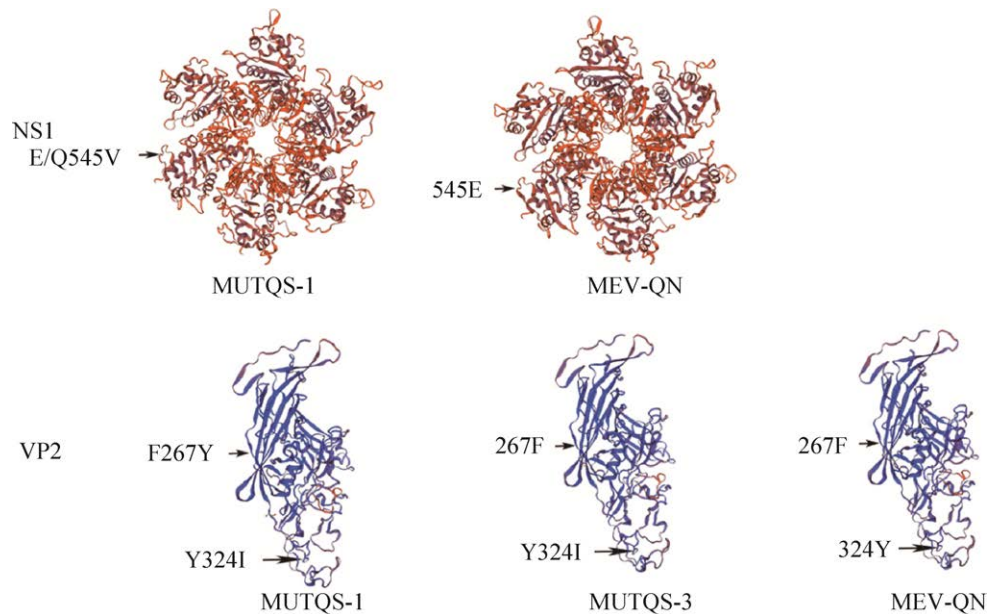


图 5 MEV-QN 及各突变株 NS1 和 VP2 蛋白三级结构模拟

Figure 5 Ribbon model of the NS1 and VP2 proteins in MEV-QN or the five isolates.

VP2 蛋白是 MEV 主要的抗原蛋白, 其氨基酸的非同义替换也是近年来的研究热点, 前期研究表明第 101、300 和 411 位氨基酸残基的改变会影响病毒的复制和致病性^[17]。本次分离株除了第 232、236、300 位等几个常见的突变外, 最值得注意的是第 267 位氨基酸 F→Y 突变和第 324 位氨基酸 Y→I 突变为首次在 MEV 上发现, 第 267 位氨基酸并未展示在病毒粒子表面, 也未参与抗原决定簇的形成, 该位点的突变是否能稳定存在, 仍需要重点监测; 而第 324 位氨基酸紧邻第 323 位氨基酸, 后者已被证实是 CPV 宿主范围决定的关键位点, 通过本研究结果证实了上述两处位点突变并未影响 VP2 蛋白的空间构象, 也未对病毒的血凝性和抗原性产生明显改变, 但从生长曲线分析, 在一定程度上提高了病毒的复制及增殖能力。由于第 324 位点暴露于病毒粒子外侧, 突变后对 MEV 毒力以及宿主范围是否有直接的影响则有待进一步研究^[18-19]。此外, NS1 蛋白第 545 位氨基酸 E/Q→V 突变也是首次报道, 先前研究表明 NS1 蛋白功能多样, 主要参与病毒 DNA 早期复制过程, 调控 VP2 蛋白的表达以及诱导宿主细胞凋亡等^[20-21], 该位点的突变虽然未影响 VP2 蛋白的空间构象, 但相邻的 546 位点 S→P 的突变已有报道^[22], 这些突变能否对上述功能产生影响, 需要进一步试验证实。

总之, 本研究分离到的 5 株 MEV 变异株, 其中 NS1 蛋白的第 545 位氨基酸 E/Q→V 突变、VP2 蛋白的第 267 位氨基酸 F→Y 突变以及第 324 位氨基酸 Y→I 突变均为首次发现, 但这些新位点突变并未明显改变病毒的血凝性、抗原性、病毒粒子空间构象以及在易感细胞内的增殖能力; 是否能改变病毒的致病性, 仍需进一步动物试验验证。截至目前 NCBI 数据库中 MEV 序列信息较少, 无法准确分析 MEV 遗传

变异情况, 急需开展全面、深入的病毒分子流行病学研究, 为更准确地实时监测病毒和更有效地进行疫病防控奠定基础。

参考文献

- [1] Schofield FW. Virus enteritis in mink. *North American Veterinarian*, 1949, 30: 651–654.
- [2] Wills CG. Notes on infectious enteritis of mink and its relationship to feline enteritis. *Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science*, 1952, 16(12): 419–420.
- [3] Li L, Cotmore SF, Tattersall P. Maintenance of the flip sequence orientation of the ears in the parvoviral left-end hairpin is a nonessential consequence of the critical asymmetry in the hairpin stem. *Journal of Virology*, 2012, 86(22): 12187–12197.
- [4] Li L, Cotmore SF, Tattersall P. Parvoviral left-end hairpin ears are essential during infection for establishing a functional intranuclear transcription template and for efficient progeny genome encapsidation. *Journal of Virology*, 2013, 87(19): 10501–10514.
- [5] Cotmore SF, Tattersall P. Parvoviruses: small does not mean simple. *Annual Review of Virology*, 2014, 1(1): 517–537.
- [6] Parrish CR. The emergence and evolution of canine parvovirus—an example of recent host range mutation. *Seminars in Virology*, 1994, 5(2): 121–132.
- [7] Calatayud O, Esperón F, Cleaveland S, Biek R, Keyyu J, Eblate E, Neves E, Lembo T, Lankester F. Carnivore parvovirus ecology in the serengeti ecosystem: vaccine strains circulating and new host species identified. *Journal of Virology*, 2019, 93(13): e02220–e02218.
- [8] Lin YC, Chiang SY, Wu HY, Lin JH, Chiou MT, Liu HF, Lin CN. Phylodynamic and genetic diversity of canine parvovirus type 2c in Taiwan. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(12): 2703.
- [9] Mao YP, Wang JG, Hou Q, Xi J, Zhang XM, Bian DW, Yu YL, Wang X, Liu WQ. Comparison of biological and genomic characteristics between a newly isolated mink enteritis parvovirus MEV-LHV and an attenuated strain MEV-L. *Virus Genes*, 2016, 52(3): 388–396.
- [10] 陈童, 杨瑞梅, 单虎. 山东地区水貂肠炎病毒 VP₂ 基因的克隆和测序分析. *中国兽医杂志*, 2016, 52(12): 28–30, 34.
Chen T, Yang RM, Shan H. Cloning and sequencing of

- VP₂ gene of mink enteritis parvovirus in Shandong province. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2016, 52(12): 28–30, 34. (in Chinese)
- [11] 刘维全, 范泉水, 江禹, 夏咸柱, 黄耕, 王吉贵, 房金波, 王蕾. 肉食兽细小病毒通用 PCR 诊断技术的建立. *中国兽医学报*, 2001, 21(3): 249–251.
Liu WQ, Fan QS, Jiang Y, Xia XZ, Huang G, Wang JG, Fang JB, Wang L. Establishment of a commonly used PCR technique for detection of carnivore parvoviruses. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2001, 21(3): 249–251. (in Chinese)
- [12] 高窦, 梁琳, 卞赛赛, 周灵, 王静, 杨双双, 雷程红, 崔尚金, 刘维全. 水貂肠炎细小病毒及犬瘟热病毒灭活后的联合免疫效果. *中国生物制品学杂志*, 2018, 31(1): 5–8.
Gao D, Liang L, Bian SS, Zhou L, Wang J, Yang SS, Lei CH, Cui SJ, Liu WQ. Combined immune efficiency of inactivated mink enteritis virus and canine distemper virus in rats. *Chinese Journal of Biologicals*, 2018, 31(1): 5–8. (in Chinese)
- [13] Hou Q, Su J, Wang JG, Li ZL, Mao YP, Wang S, Xi J, Liu WQ. The phosphorylation of Ser221 in VP₂ of mink enteritis virus and its roles in virus amplification. *Virus Research*, 2016, 217: 76–84.
- [14] 简莹娜, 张学勇, 李秀萍, 赵海龙, 王光华, 王戈平, 马利青. 雪豹源水貂肠炎病毒分子鉴定及 NSI 基因进化分析. *青海大学学报:自然科学版*, 2021, 39(3): 27–33.
Jian YN, Zhang XY, Li XP, Zhao HL, Wang GH, Wang GP, Ma LQ. Molecular identification and NSI gene evolution of mink enteritis virus from snow leopard. *Journal of Qinghai University: Natural Science*, 2021, 39(3): 27–33. (in Chinese)
- [15] Kariatsumari T, Horiuchi M, Hama E, Yaguchi K, Ishiguro N, Goto H, Shinagawa M. Construction and nucleotide sequence analysis of an infectious DNA clone of the autonomous parvovirus, mink enteritis virus. *The Journal of General Virology*, 1991, 72 (Pt 4): 867–875.
- [16] Yuan DL, Wang JG, Li ZL, Mao YP, Sun JZ, Xi J, Wang S, Hou Q, Yi B, Liu WQ. Establishment of a rescue system for an autonomous parvovirus mink enteritis virus. *Virus Research*, 2014, 183: 1–5.
- [17] Wang Y, Hu B, Lu RG, Ma FS, Lv S, Zhang HL, Bai X, Zhang L, Shi N, Li XT, Fan SN, Lian SZ, Yan XJ, Zhu YZ. Pathogenicity comparison of the SMPV-11 and attenuated mink enteritis virus F61 in mink. *Virus Research*, 2021, 294: 198294.
- [18] Wang JK, Cheng SP, Yi L, Cheng YN, Yang S, Xu HL, Zhao H, Yan XJ, Wu H. Evidence for natural recombination between mink enteritis virus and canine parvovirus. *Virology Journal*, 2012, 9: 252.
- [19] Wang JK, Lin P, Zhao H, Cheng YN, Jiang Z, Zhu HW, Wu H, Cheng SP. Continuing evolution of canine parvovirus in China: isolation of novel variants with an Ala5Gly mutation in the VP₂ protein. *Infection, Genetics and Evolution*, 2016, 38: 73–78.
- [20] Lin P, Cheng YN, Song SS, Qiu JM, Yi L, Cao ZG, Li JR, Cheng SP, Wang JK. Viral nonstructural protein 1 induces mitochondrion-mediated apoptosis in mink enteritis virus infection. *Journal of Virology*, 2019, 93(22): e01249–e01219.
- [21] Yang SS, Wang JG, Li ZD, Cui SJ, Liu WQ. The 5' untranslated region of the capsid protein 2 gene of mink enteritis virus is essential for its expression. *Journal of Virology*, 2018, 92(18): e00787–e00718.
- [22] Zhu Q, Yuan P, Li ZJ, Diao FF, Kang S, Li LJ, Jiang SJ, Xie ZJ. Nucleotide sequences of the infectious DNA clones of two mink enteritis virus isolates exhibit the diversity of the terminal palindromic sequences and predicted secondary structures. *Virus Research*, 2021, 305: 198574.

(本文责编 李磊)