

犬瘟热病毒 TN 株血凝基因的克隆与序列分析

孟庆玲^{1*} 乔 军¹ 陈创夫²

(塔里木农垦大学动物科技学院 阿拉尔 843300)¹ (石河子大学动物科技学院 石河子 833200)²

摘要: 用 RT-PCR 方法对分离的 TN 野毒株 H 基因进行了扩增, 并将其克隆到 pGEM-T 载体上, 进行核苷酸序列测定。结果 TN 野毒株 H 基因 ORF 全长 1,815 bp, 编码 604 个氨基酸。与 GenBank 中已报道的 7 个 CDV 毒株相比, H 基因核苷酸序列的同源性在 92% ~ 99% 之间, 推导的 H 蛋白氨基酸序列的同源性在 91% ~ 99% 之间。TN 株 H 蛋白潜在的 N-糖基化位点为 8 个, 而 Onderstepoort 弱毒株 H 蛋白为 4 个; 其中 N 端第 19 ~ 21、309 ~ 311、584 ~ 586 位氨基酸所形成的 3 个潜在的糖基化位点是野毒株拥有而疫苗株所没有的。预测的 TN 株和 Onderstepoort 株 H 蛋白的疏水性及抗原表位存在一定差异, 研究结果提示 TN 野毒株 H 蛋白免疫原性可能与弱毒株有较大差别, 这可能是造成 CD 免疫失败的原因之一。

关键词: 犬瘟热病毒, TN 野毒株, 血凝蛋白基因, 序列分析

中图分类号: S852.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 06-0006-05

Cloning and Sequence Analysis of Haemagglutinin Protein Gene of Canine Distemper Virus Strain TN

MENG Qing-Ling^{1*} QIAO Jun¹ CHEN Chuang-Fu²

(Department of Animal Science and Technology, Tarim Agricultural University, Alaer 843300)¹

(Department of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 8332000)²

Abstract: H gene of wild strain TN was amplified by RT-PCR and cloned into pGEM-T. The correct positive recombinant was used for sequencing. The open reading frame of H gene of CDV TN was 1815 bp and encoded 604 amino acids. The homology of nucleic acid and amine acid among the 8 strains of CDV reported by GenBank database ranged from 92 to 99 percent and from 91 to 99 percent, respectively. There are obviously different in potential N-glycosylation sites. The strain TN owned 8 potential N-glycosylation sites but 4 potential sites for Onderstepoort strain. Three potential N-glycosylation sites which located in the position of 19 ~ 21, 309 ~ 311, 584 ~ 586 amino acids were unique to yield isolates. Moreover, there were some differences in the hydrophobicity and antigenic index between two strains, which may be one of important reasons for immune failure of CD.

Key words: Canine distemper virus, TN strain, Haemagglutinin gene, Sequence analysis

犬瘟热 (Canine Distemper, CD) 是由犬瘟热病毒 (Canine Distemper Virus, CDV) 引起犬的一种急性、高度接触性传染病。该病毒属于副粘病毒科麻疹病毒属成员, 为负链单股不分节的 RNA 病毒。病毒的结构蛋白主要包括核衣壳 (N) 蛋白、磷 (P) 蛋白、基质膜 (M) 蛋白、融合 (F) 蛋白、血凝 (H) 蛋白、大 (L) 蛋白 6 种, 其中 F 和 H 糖蛋白是诱导机体产生中和抗体的两种保护性抗原^[1,2]。尽管目前 CD 弱毒疫苗的广泛应用已大量地减少了 CD 的爆发, 但免疫过的犬发生 CD 的病例也时有发生, 2000 年我们曾从一只用犬瘟热疫苗免疫过两次的病死犬肺脏中分离出一株 CDV 野毒株^[3]。

* 联系人 Tel: 0997-4680465, E-mail: xjmqqj@sohu.com

收稿日期: 2003-12-22, 修回日期: 2004-04-04

为了从分子水平阐明是否因 CD 流行野毒株与疫苗株之间的差异而导致目前 CD 免疫失败现象的发生,我们对临床症状疑似 CD 的病犬中分离的 CDV TN 株 H 基因进行了全基因的克隆与序列分析,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 病毒

CDV TN 野毒株是本实验室用 DK 传代细胞从一只临床症状疑似 CD 的病犬肺脏中分离而得到的,经系统的病毒学鉴定后保存。

1.2 质粒、菌株及主要试剂

反转录酶 M-MLV、Rnase inhibitor 及 dNTP 购自 MBI 生物公司。Taqplus DNA 聚合酶和 DNA 片段快速回收试剂盒均购自上海生物工程公司。pGEM-T 载体购自 Promega 公司。

1.3 引物设计

根据 GenBank 中报道的 CDV Onderstepoort 株 H 基因序列,利用 DNASIS 软件设计了一对 CDV 特异性引物。

上游引物 P1: 5' -ACGGTACCGGCTCAGGTAGTCCAACAATGCTC-3';

下游引物 P2: 5' -ACGCGGCCGCCAAGGTTTTGAACGGTTACATGAG-3'。

为下一步克隆需要,分别在上下游引物中引入 *Kpn*I 和 *Not* I 酶切位点。引物由大连宝生物工程公司合成。

1.4 总 RNA 的提取

参照 Chomczynski 等报道的异硫氰酸胍-酚-氯仿抽提分离 RNA 的一步法进行^[5]。

1.5 RT-PCR

RT 反应参照文献[4]进行。反应体系 50 μ L。取反转录产物 2 μ L, 10 \times PCR buffer 5 μ L、25 mmol/L MgCl₂ 4 μ L、引物 P1 (25 pmol/ μ L)、P2 (25 pmol/ μ L) 各 1 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 4 μ L, 水 32.7 μ L Taqplus DNA 聚合酶 0.3 μ L (5 U/ μ L) 混匀。反应条件为 96 $^{\circ}$ C 预变性 200 s; 94 $^{\circ}$ C, 40 s; 54 $^{\circ}$ C, 50 s; 72 $^{\circ}$ C, 150 s, 35 个循环; 然后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。PCR 产物用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.6 CDV TN 株 H 基因的克隆与序列分析

用 DNA 片段快速回收试剂盒回收 PCR 产物,并将其克隆入 pGEM-T 载体中,构建重组质粒 pTH; 经酶切和 PCR 鉴定后送上海联合基因有限公司测序^[6]。应用 DNAMAN 和 DNASTar 软件对所测的 CDV TN 株 H 基因测序结果及其推导的氨基酸序列与 GenBank 收录的国际标准疫苗株及标准野毒株的 H 基因及其推导的氨基酸序列进行比较。

2 结果

2.1 CDV TN 株 H 基因 RT-PCR 扩增结果

经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳, CDV TN 株 RT-PCR 产物大小为 1,856 bp, 与预期结果相符 (见图 1)。

2.2 CDV TN 株 H 基因 cDNA 序列测定及推导的氨基酸序列

重组质粒 pTH 经序列测定表明, CDV

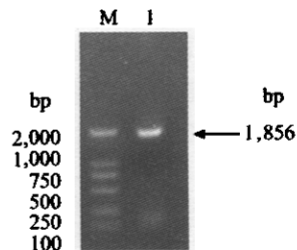


图 1 CDV TN 野毒株 H 基因 RT-PCR 扩增结果
M L-2000, 1 CDV TN 株

TN株H蛋白基因阅读框全长1,815 bp, 读框编码604个氨基酸, 与Onderstepoort株H蛋白大小相同, 比Convac株少3个氨基酸。此信息已被GenBank收录, 其登录号(Accession number)为AY390347。用DNAMAN对所测序列进行了分析。与GenBank中已发表的6个CDV毒株H基因相比, 核苷酸的同源性在92%~99%; 推导的氨基酸序列的同源性在91%~99%之间。TN株与Onderstepoort株H蛋白的半胱氨酸残基数日均为12个且位置保守, 推测的穿膜区位置也相同, 都位于35~55位氨基酸之间。Onderstepoort株H蛋白含有由4个潜在的N-联糖基化位点, 而TN野毒株推导的H蛋白氨基酸序列中则含有8个潜在的糖基化位点(19~21、149~151、309~311、391~393、422~424、456~458、584~586、587~589); 其中位于19~21、309~311和584~586位氨基酸所形成的潜在糖基化位点是TN野毒株拥有而弱毒株所没有的(见图2)。

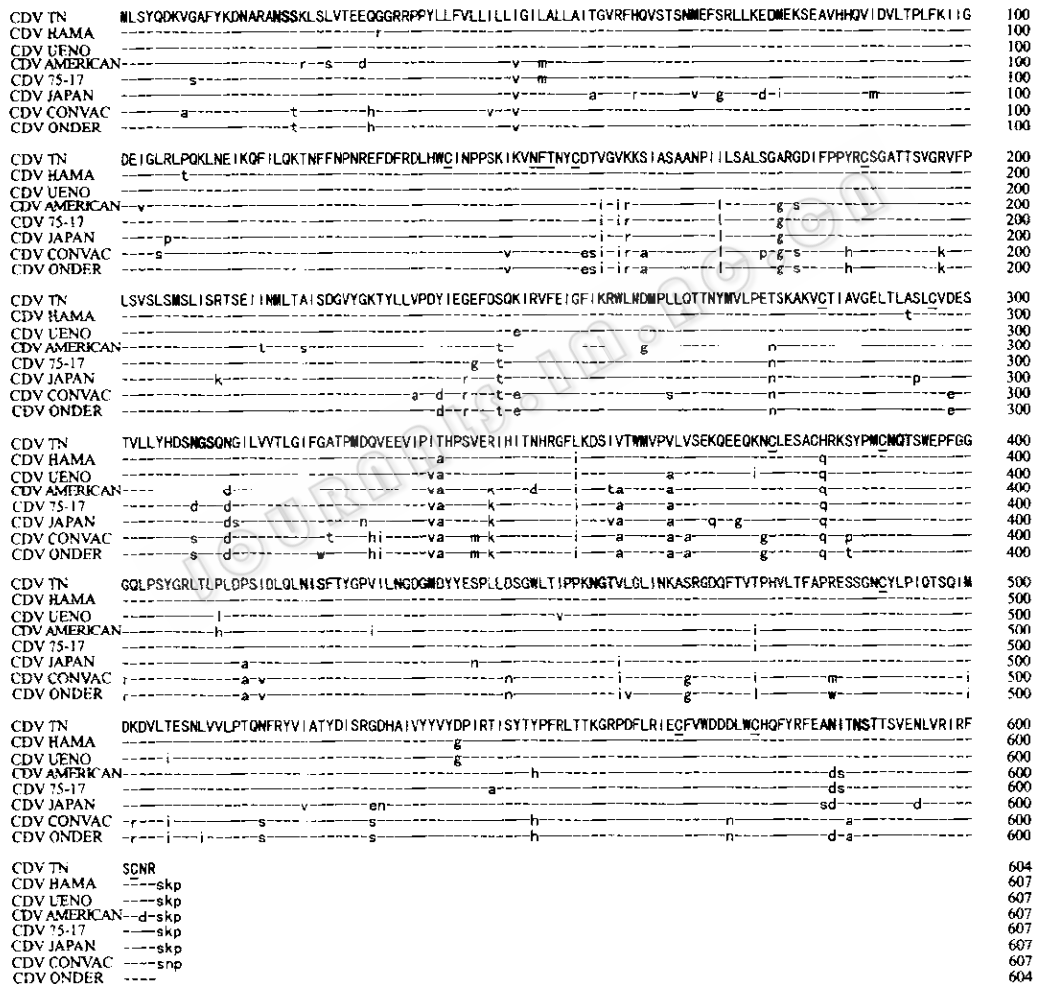


图2 CDV不同毒株H蛋白氨基酸序列的比较

注: TN株H蛋白氨基酸序列是我们测定H基因后推导的, 其它病毒株的H蛋白氨基酸序列则引自GenBank TN, AY390347; HAMA, D85754; UENO, D85753; AEMERICAN, Z47762; JAPAN, D85755; 75, AF164967; CONVAC, Z35493; ONDER, D00758; 阴影部分为潜在的N-联糖基化位点; 下划线为半胱氨酸残基; 其中第19~21、309~311、584~586位氨基酸所形成的潜在的糖基化位点是野毒株拥有而弱毒株所没有的

2.3 CDV H 基因及其蛋白系统进化树分析

用 DNAMAN 对 8 个 CDV 毒株 H 基因聚类结果来看, CDV H 基因从系统发生上可分为强、弱毒两大谱系, 这两大谱系之间核苷酸存在 92% 的同源性 (图 3)。CDV TN 株与野毒株 HAMA 的亲缘关系最近, 核苷酸及推导的氨基酸序列同源性均可达 99%; 而与弱毒株 Onderstepoort 及 Convac 株的亲缘关系最远 (见图 4); Onderstepoort 株是 30 年代从北美养狐农场分离出来后经雪貂传代, 又经数代鸡胚传代后的标准弱毒株, 而 HAMA 则是目前公认的标准强毒株。聚类分析表明, TN 株是一株 CDV 强毒, 这与我们进行的动物接种试验结果完全一致。因此, 可以以此分析方法来大致确定某一新分离毒株的毒力强弱。

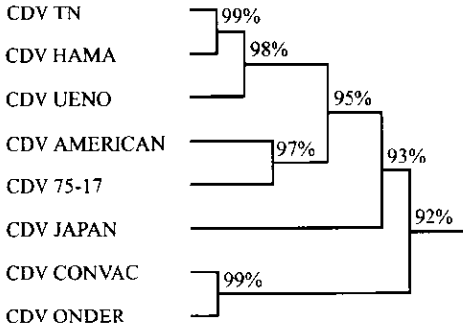


图 3 基于 H 基因序列同源性的系统进化树

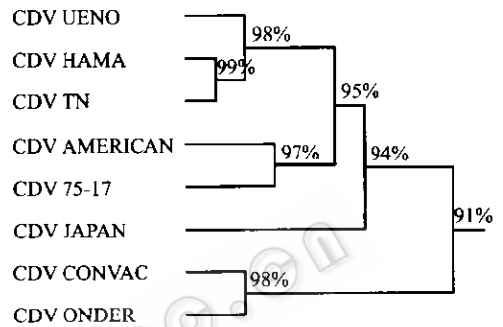


图 4 基于推导的 H 蛋白序列同源性的系统进化树

2.4 推导的 CDV TN 株 H 蛋白疏水性及抗原表位分析

用 DNASTar 软件对 CDV TN 和 Onderstepoort 株 H 蛋白进行了疏水性及抗原表位预测分析。结果发现 CDV TN 株推导的 H 蛋白在疏水性与标准弱毒株 Onderstepoort 株有一定的差异。通过对 Jameson-Wolf 优势抗原表位的预测分析, 发现 CDV TN 野毒株在 430-450 位氨基酸处与 Onderstepoort 株有明显的差异, 这种差异提示该毒株 H 蛋白免疫原性可能与弱毒株有较大差别。

3 讨论

在犬瘟热病毒结构蛋白中, H 蛋白是诱导机体产生中和抗体的主要蛋白之一, 是抗 CDV 免疫中很重要的抗原; 同时 H 蛋白决定着病毒感染的宿主特异性。由于该基因变异最大, 因此是研究 CDV 变异最合适的基因。根据 GenBank 中 CDV Onderstepoort 株 H 基因序列设计合成了一对引物, 对 TN 野毒株 H 基因进行 RT-PCR 扩增并进行了测序。将测序得到的 H 基因序列与 GenBank 中已有的 CDV 毒株 H 基因进行了比较, 结果发现 CDV TN 株与野毒株 HAMA 的亲缘关系最近, 核苷酸及推导的氨基酸序列同源性均可达 99%; 而与弱毒株 Onderstepoort 及 Convac 株的亲缘关系最远。不同 CDV 毒株 H 蛋白基因序列的系统发生分析表明, CDV 存在不同的基因型, 与 Bolt 等人的研究结果一致^[7]。TN 株 H 蛋白潜在的 N- 联糖基化位点为 8 个, 其中 4 个与 Onderstepoort 株完全相同, 但有 3 个是 Onderstepoort 株所没有的。Iwatsuki 等认为 N- 联糖基化位点不同可能影响 H 蛋白抗原性^[8]。由于 Onderstepoort 株是从 30 年代北美爆发 CD 的狐狸病料中分离致弱而用于世界各地的减毒活苗, 其在传代过程中变异的长期积累与受生态环境、CDV 对动物

流行病因素的适应以及大量种间传播等因素影响的野毒株的变异的长期积累可能是不同的, 所以 CDV 疫苗株可能已经不能对所有的 CDV 流行株产生有效的保护。日本东京地区 2 个动物医院的调查表明, 被诊断为 CD 的犬中, 有 2/3 的犬已接种疫苗, 并且它们中的多数对 Onderstepoort 株有较高的 SN 抗体滴度, 而对野毒株则很低, 表明野毒株和疫苗株 Onderstepoort 之间与 SN 抗体滴度有关的囊膜蛋白的表位抗原有所不同, 因为 H 蛋白在细胞吸附中起作用, 并且在免疫压力下最可能变异, 中和能力的改变意味着 H 蛋白抗原性的改变。我们的研究发现 TN 株 H 蛋白及其基因与 Onderstepoort 疫苗株确实存在差别; 糖基化位点的较大差异可能会使 TN 野毒株 H 蛋白的免疫原性发生改变, 这种改变可能是造成目前 CDV 免疫失败的原因之一。

参考文献

- [1] 殷震, 刘景华主编. 动物病毒学(第2版). 北京: 科学出版社, 1997. 671~703.
- [2] 夏咸柱主编. 养犬大全. 长春: 吉林人民出版社, 1993. 549~553.
- [3] 乔军, 孟庆玲, 夏咸柱, 等. 微生物学通报, 2002, 1: 56~59.
- [4] 乔军, 孟庆玲, 夏咸柱, 等. 西南农业学报, 2002, 15(1): 93~95.
- [5] Chomczynski P, Sacchi N. Analytical Biochemistry. 1987, 162: 156~159.
- [6] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T 著. 金冬雁, 黎孟枫, 侯云德, 等译校. 分子克隆实验指南(第2版). 北京: 科学出版社, 1998. 34~66.
- [7] Bolt G, Jensen T D, Gottschalk E, et al. J Gen Virol, 1997, 78(2): 367~372.
- [8] Iwatsuki K, Miyashita N, Yoshida E, et al. J Gen Virol, 1997, 78(2): 373~380.