

狐源犬瘟热病毒核衣壳蛋白基因的 克隆与序列分析

吕 品¹ 胡传伟² 杨笃宝¹ 谢之景^{1*} 刘海防¹

(1. 山东农业大学动科院 泰安 271018)

(2. 辽宁出入境检验检疫局技术中心 大连 116001)

摘要: 根据 GenBank 上发表的犬瘟热病毒(CDV)N 基因核酸序列, 设计一对 CDV N 基因特异性引物, 采用 RT-PCR 扩增狐源 CDV 泰安分离株(CDV-FOX-TA)的 N 基因, 将 PCR 产物克隆入 pMD18-T 载体, 进行测序分析。结果表明, CDV-FOX-TA N 基因含有 1 个 ORF, 全长 1572 bp, 共编码 523 个氨基酸。CDV-FOX-TA N 基因与 CDV 疫苗株 Onderstepoort、Convac 的 N 基因的同源性分别为 96.0%和 95.9%, 与 CDV 野毒株 N 基因的同源性在 98.4%~98.9%之间。CDV-FOX-TA N 蛋白含有 Tyr-Pro-Ala-Leu-Gly-Leu-His-Glu-Phe 九肽序列, 是 T 细胞表位, 可致敏靶细胞, 在 CDV N 蛋白中高度保守。对 CDV N 基因进行系统发生分析, 结果发现 CDV-FOX-TA 与 CDV 强毒株的亲缘关系较为密切。

关键词: 狐, 犬瘟热病毒, N 基因

Cloning and Sequence Analysis of the N Gene of Canine Distemper Virus Tai'an Isolate in a Fox

LV-Pin¹ HU Chuan-Wei² YANG Du-Bao¹ XIE Zhi-Jing^{1*} LIU Hai-Fang¹

(1. Animal Science and Technology Institute, ShanDong Agricultural University, Tai'an 271018)

(2. Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001)

Abstract: One pair of primers was designed according to the N genes of canine distemper virus strains reported in GenBank. The N protein gene of CDV-FOX-TA was amplified with the primers by RT-PCR. The PCR product was cloned into pMD18-T. And the positive recombinant was identified, sequenced and analyzed. As a result, the large open reading frame of the N gene of CDV-FOX-TA included 1572 bp, which encoded 523 amino acids. The nucleotide homology of the N genes between CDV-FOX-TA and CDV Onderstepoort strain was 96.0%, and it was 95.9% between CDV-FOX-TA and CDV Convac strain. However, the nucleotide homologies of the N genes of CDV-FOX-TA and the CDV wild strains, was from 98.4% to 98.9%. A nine-peptide sequence in the N protein of CDV-FOX-TA was Tyr-Pro-Ala-Leu-Gly-Leu-His-Glu-Phe, which was T lymphocyte defined antigen and sensitized target cells. On the basis of phylogenetic analysis, it implied that CDV-FOX-TA and the CDV wild strains had the same

ancestor.

Keywords: Fox, Canine distemper virus, N gene

犬瘟热(Canine distemper, CD)是由犬瘟热病毒(Canine distemper virus, CDV)感染引起的一种急性、高度接触性致死性传染病^[1],以双向热、卡他性鼻炎、支气管炎、气管炎、严重的胃肠炎、神经症状为主要临床特征^[2]。CDV是副粘病毒科麻疹病毒属成员,单股负链RNA病毒,基因组全长 15690 bp,共编码核衣壳蛋白(N)、磷蛋白(P)、基质膜蛋白(M)、融合蛋白(F)、血凝蛋白(H)和大蛋白(L)6个结构蛋白^[3]。CDV N蛋白是病毒结构中含量最多的结构蛋白,在病毒装配、转录和复制过程中起调控作用,并且能刺激机体产生强烈的抗体反应,即使当抗H蛋白和F蛋白的特异性抗体低于检测水平时,抗N蛋白的特异性抗体仍能被检测到^[4],这对于CDV的早期诊断和预防有重要意义。CDV不但可感染犬、狐、水貂等毛皮动物引起发病,而且还感染多种野生动物,严重危害我国养犬业、毛皮动物养殖业以及野生动物的健康发展^[5]。本研究采用分子生物学技术对狐源CDV泰安株(CDV-FOX-TA)N基因进行了克隆与序列分析,发现CDV-FOX-TA与CDV强毒株的亲缘关系较为密切,这为预防CDV-FOX-TA的爆发流行提供了实验数据。

1 材料和方法

1.1 病毒与工程菌

CDV-FOX-TA由本实验室分离,按培养量的1/10接种MDCK细胞,37℃ 5% CO₂条件下培养4d,待出现75%~80%细胞病变(CPE)时收毒,-20℃保存备用。工程菌DH5 α 购自宝生物(大连)工程有限公司。

1.2 试剂与仪器

TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit、TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit、AMV Reverse Transcriptase、反转录酶抑制剂(RNasin)、T4 DNA 连接酶、pMD18-T、DNA Marker、限制性内切酶 *Bgl* II、*Xba* I 等常规分子生物学试剂均购自宝生物(大连)工程有限公司, Taq plus DNA polymerase 购自上海生工公司,裂解液购自香港太太基因公司。

1.3 引物的设计与合成

根据GenBank上发表的CDV N基因序列,利用DNASTar软件设计一对CDV N基因特异性引物,在上下游引物分别引入酶切位点*Kpn* I/*Xho* I。上游引

物,5'-GGTACCAGGGTTCAGACCTACCAATATG-3',下游引物5'-CTCGAGGGTCTTGAATATTTA-ATTGAGTAGC-3',扩增片段1603 bp。

1.4 CDV-FOX-TA RNA 的提取

取200 μ L CDV-FOX-TA的MDCK细胞培养物,加入600 μ L裂解液和200 μ L氯仿,剧烈震荡,充分混匀后,4℃12000 r/min离心15 min;吸取上清500 μ L至另一离心管内,加入500 μ L -20℃预冷的异丙醇,上下颠倒5~6次,混匀,4℃12000 r/min离心15 min,弃上清,加入600 μ L -20℃预冷的75%乙醇,上下颠倒5~6次,混匀,4℃12000 r/min离心10 min,弃上清,在超净工作台内自然晾干,加入20 μ L DEPC水溶解RNA沉淀。

1.5 CDV-FOX-TA N基因的RT-PCR扩增

取CDV-FOX-TA RNA 10 μ L,加入20 pmol/L上游引物1.5 μ L,置70℃水浴5 min,取出置冰上,随后加入5 \times RT-buffer 2 μ L,10 mmol/L dNTP 2 μ L,5 U/ μ L AMV Reverse Transcriptase 1 μ L,40 U/ μ L RNasin 0.5 μ L,补加DEPC水至总体积为25 μ L。将反应体系置42℃作用1 h,进行反转录,之后70℃作用15 min灭活AMV,即可得到cDNA。

PCR反应体系:10 \times PCR-buffer 5 μ L,2.5 mmol/L dNTP 8 μ L,20 pmol/L上、下游引物各1 μ L,cDNA 5 μ L,Taq plus DNA polymerase 0.3 μ L,补加灭菌三蒸水至50 μ L。PCR反应参数:94℃预变性40 s,94℃变性3 min,55℃退火50 s,72℃延伸120 s,共进行35个循环,最后72℃再延伸10 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳确定其大小,回收目的片段。

1.6 CDV-FOX-TA N基因的克隆与序列分析

将纯化的目的片段与pMD18-T载体16℃连接过夜,转化宿主菌DH5 α ,按试剂盒操作步骤提取质粒获得重组子pCDV/TA-N。用限制性内切酶*Bgl* II、*Xba* I对pCDV/TA-N进行酶切鉴定,筛选阳性克隆,送宝生物(大连)工程有限公司测序,应用DNASTar软件对测序结果进行分析。

2 结果

2.1 CDV-FOX-TA N基因的RT-PCR、克隆与鉴定

CDV-FOX-TA N基因的RT-PCR扩增片段为1603 bp,与理论值一致,琼脂糖凝胶电泳结果见图1。将CDV-FOX-TA N基因的扩增片段连接到

pMD18-T 载体上, 获得 pCDV/TA-N。分别用限制性内切酶 *Bgl* II、*Xba* I 对 pCDV/TA-N 进行酶切鉴定, *Bgl* II 切出 3328bp+967bp 大小的片段, *Xba* I 切出 4295bp 大小的片段, 结果与预期结果一致(见图 2)。

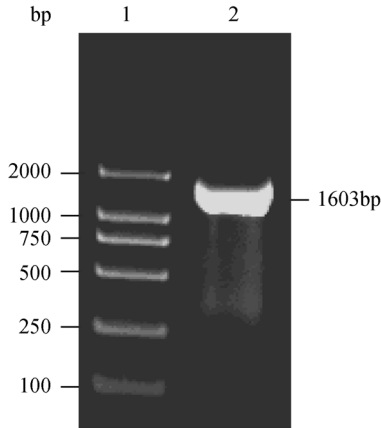


图 1 RT-PCR 扩增结果

Fig. 1 The result of RT-PCR.

1: DL2000 Marker; 2: CDV-FOX-TA N 基因的 RT-PCR 产物

1: DL2000 Marker; 2: The RT- PCR product of CDV-FOX-TA N gene

2.2 CDV-FOX-TA N 基因的同源性分析

CDV-FOX-TA N 基因与 2 个 CDV 疫苗株 Onderstepoort、Convac N 基因的同源性分别为 96.0%和

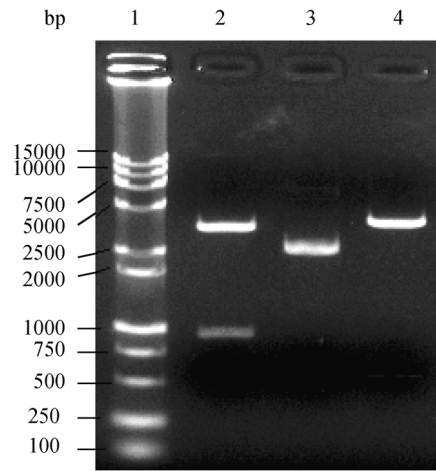


图 2 pCDV/TA-N 酶切鉴定结果

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pCDV/TA-N by restriction endonuclease digestion.

1: DL15000+DL2000 Marker; 2: pCDV/TA-N/*Bgl* II ; 3: pCDV/TA-N; 4: pCDV/ TA-N / *Xba* I

95.9%; 与标准强毒株 A75-17 N 基因的同源性为 98.6%, 与 CDV 小熊猫株(CDV LP)^[6] N 基因的同源性为 98.7%, 与其他 CDV 野毒株 N 基因的同源性在 98.4%~98.9% 之间(见表 1)。

2.3 CDV-FOX-TA N 基因系统发生分析

CDV N 基因系统发生分析结果, CDV 可分为两大谱系, 一大谱系由 CDV 疫苗株构成, 另一大谱系由 CDV 野毒株构成(见图 3)。CDV-FOX-TA 与 CDV 野毒株的亲缘关系较为密切。

表 1 CDV-FOX-TA N 基因序列同源性分析结果

Table 1 The homology analysis result of the N genes of CDV-FOX-TA and the other CDV strains

| | | 同源性(Percent identity) | | | | | | | | | | |
|---------------------|----|-----------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| 差异性 (Divergence) | 1 | | 94.7 | 93.8 | 93.8 | 94.7 | 94.9 | 94.8 | 94.7 | 94.8 | 96.0 | 99.5 |
| | 2 | 5.6 | | 97.7 | 97.7 | 99.5 | 98.5 | 98.5 | 98.5 | 99.8 | 98.6 | 94.6 |
| | 3 | 6.5 | 2.4 | | 99.9 | 98.2 | 98.2 | 98.2 | 98.2 | 97.9 | 98.7 | 93.7 |
| | 4 | 6.5 | 2.4 | 0.1 | | 98.2 | 98.2 | 98.2 | 98.2 | 97.9 | 98.8 | 93.7 |
| | 5 | 5.6 | 0.5 | 1.9 | 1.9 | | 98.8 | 98.8 | 98.8 | 99.6 | 98.9 | 94.6 |
| | 6 | 5.3 | 1.6 | 1.9 | 1.9 | 1.2 | | 99.7 | 99.7 | 98.6 | 98.7 | 94.8 |
| | 7 | 5.5 | 1.6 | 1.9 | 1.9 | 1.2 | 0.2 | | 99.9 | 98.6 | 98.4 | 94.6 |
| | 8 | 5.6 | 1.6 | 1.9 | 1.9 | 1.2 | 0.2 | 0.1 | | 98.6 | 98.6 | 94.5 |
| | 9 | 5.5 | 0.2 | 2.1 | 2.1 | 0.4 | 1.4 | 1.4 | 1.4 | | 98.9 | 94.7 |
| | 10 | 4.0 | 1.5 | 1.4 | 1.2 | 1.1 | 1.3 | 1.6 | 1.5 | 1.1 | | 95.9 |
| | 11 | 0.7 | 5.7 | 6.6 | 6.6 | 5.7 | 5.5 | 5.6 | 5.7 | 5.6 | 4.3 | |

1: Onderstepoort; 2: A75-17; 3: CDV-LP; 4: CDV-5804; 5: CDV-00-2601; 6: CDV-98-2645; 7: CDV-98-2654; 8: CDV-98-2646; 9: CDV-01-2689; 10: CDV-FOX-TA; 11: Convac

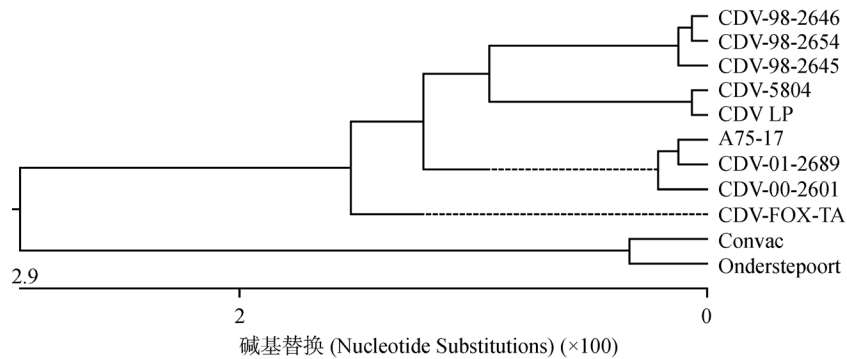


图3 CDV N 基因系统发生树

Fig. 3 Phylogenetic tree of the CDV N genes

3 讨论

CDV N 蛋白是CDV结构中含量最多的结构蛋白,含有T淋巴细胞表位与B淋巴细胞表位,在细胞免疫和体液免疫中发挥重要的作用。CDV-FOX-TA有一个ORF,全长1572 bp,编码523个氨基酸。CDV N 蛋白分为三个区,N端可变区、C端可变区和中间高度保守区^[4,7]。CDV-FOX-TA与其他CDV毒株的差异主要表现在N端和C端可变区,408-519位氨基酸呈现高变态势,但这些差异并不影响CDV的生物学特性^[8-11]。CDV N 蛋白含有一个Tyr-Pro-Ala-Leu-Gly-Leu-His-Glu-Phe九肽序列,可致敏靶细胞^[12,13],使细胞溶解产生CTL反应,为N蛋白L^d限制表位,是T细胞表位,在N蛋白中高度保守,但是不同的CDV毒株间也会出现个别氨基酸的变异,但目前尚不清楚变异对整个CDV N蛋白的结构及功能的影响,在CDV-FOX-TA N蛋白的相同位置也存在这个九肽序列。对CDV N基因进行同源性分析表明,CDV-FOX-TA N基因与CDV强毒株N基因的同源性相对较高,与CDV疫苗株N基因的同源性相对较低;对CDV N基因进行系统发生分析,发现CDV-FOX-TA与CDV强毒株的亲缘关系较为密切。

CDV N蛋白是相对保守的,这对CDV的繁殖生存有重要意义。CDV N蛋白在CDV的装配、转录和复制过程中起调控作用^[14,15],与CDV的毒力密切相关^[16,17],如发生较大的变异则不利于CDV的繁殖和生存,即使CDV N基因序列发生变异,大多数突变是同义突变,不会影响氨基酸序列,相应的生物学功能也不会发生改变。

CDV分布广泛,并不断进化,能在种间传播流行,CDV宿主范围不断扩大^[18,19],给CD的防治带来困难。目前,CDV疫苗接种是控制CDV流行的主要

手段,因CDV N蛋白相对保守,所以CDV N基因是研制CDV基因工程疫苗的首选基因。并且,CDV N蛋白能刺激机体产生免疫反应,特别是当抗H蛋白和F蛋白的特异性抗体低于检测水平时,抗N蛋白的特异性抗体仍能被检测到,所以CDV N蛋白在CDV早期诊断中具有重要的意义,我们对本实验室分离的CDV-FOX-TA N基因进行了克隆及序列分析,为以后开发CDV的诊断试剂和研制有效的基因工程疫苗提供了实验资料,并为防治CDV-FOX-TA的爆发流行提供了分子流行病学资料。

参考文献

- [1] 何洪彬,夏咸柱. 犬瘟热的诊断及其预防免疫的研究进展. 动物医学进展, 2001, 22(1): 12-21.
- [2] 殷震,刘景华. 动物病毒学. 北京: 科技出版社, 1997, pp.756-762.
- [3] 周洁,李昌文,张洪英,等. 犬瘟热病毒A株核衣壳蛋白基因的克隆、表达及特性分析. 中国预防兽医学报, 2006, 28(4): 485-488.
- [4] Yoshida E, Iwatsuki K, Miyashita N, *et al.* Molecular analysis of the nucleocapsid protein of recent isolates of canine distemper virus in Japan. *Vet Microbiol*, 1998, 59(2-3): 237-244.
- [5] 柏亚铎,王晓佳,张灿,等. 犬瘟热病毒融合蛋白七肽重复区基因的克隆表达. 中国兽医杂志, 2005, 41(9): 6-8.
- [6] 闫芳,夏咸柱,谢之景,等. 犬瘟热病毒小熊猫株H、F和N基因的克隆及表达. 中国兽医学报, 2006, 26(2): 129-132.
- [7] Cherpillod P, Tipold A, Griot-Wenk M, *et al.* DNA vaccine encoding nucleocapsid and surface proteins of wild type canine distemper virus protects its natural host against distemper. *Vaccine*, 2000, 18(26): 2927-2936.
- [8] Nielsen L, Andersen MK, Jensen TD, *et al.* Changes in the

- receptor binding haemagglutinin protein of wild-type morbilliviruses are not required for adaptation to Vero cells. *Virus Genes*, 2003, **27**(2): 157–162.
- [9] Seki F, Ono N, Yamaguchi R, *et al.* Efficient Isolation of wild strains of canine distemper virus in vero cells expressing canine SLAM(CD150) and their adaptability to marmoset B95a cells. *J Virol*, 2003, **77**(18): 9943–9950.
- [10] Stein VM, Czub M, Schreiner N, *et al.* Microglial cell activation in demyelinating canine distemper lesions. *J Neuroimmunol*, 2004 Aug; **153**(1-2): 122–131.
- [11] von Messling V, Zimmer G, Herrler G, *et al.* The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. *J Virol*, 2001, **75**(14): 6418–6427.
- [12] 高娃, 杨敬, 陈振文. 犬瘟热病毒分子生物学研究进展. *中国比较医学杂志*, 2004, **14**(4): 241–244.
- [13] Haberman RP, Samulski RJ, Mccown T J. Attenuation of seizures and neuronal death by adeno-associated virus vector galanin expression and secretion. *Nat Med*, 2003, **9**(8): 1076–1080.
- [14] Switonski M, Szczerbal I, Nowacka. The dog genome map and its use in mammalian comparative genomics. *J Appl Genet*, 2004; **45**(2): 195–214.
- [15] Maes RK, Wise AG, Fitzgerald SD, *et al.* A canine distemper outbreak in Alaska: diagnosis and strain characterization using sequence analysis. *J Vet Diagn Invest*, 2003, **15**(3): 213–220.
- [16] Dimakopoulos AC, Mayer RJ. Aspects of neurodegeneration in the canine brain. *J Nutr*, 2002; **132**(6 Suppl 2): 1579–1582.
- [17] Tongiorgi E, Armellin M, Giulianini PG, *et al.* Brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein are targeted to discrete dendritic laminae by events that trigger epileptogenesis. *J Neurosci*, 2004, **24**(30): 6842–6852.
- [18] 朱军莉, 余旭平, 张登详, 等. 犬瘟热病毒Guizhou株血凝素基因的克隆及序列分析. *中国兽医学报*, 2006, **26**(1): 17–19.
- [19] 莫小见, 郭爱珍, 陆承平. 犬瘟热病毒南京株H蛋白基因的克隆与表达. *中国病毒学*, 2004, **19**(5): 487–489.

编辑部公告

关于《微生物学通报》2008年度开始专题刊申请的通知

当前, 随着生物技术的飞速发展, 微生物学涵盖的领域越来越广, 交叉学科的研究也越来越受到关注。除了已有的微生物学、病毒学、基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程之外, 基因组学、代谢工程、纳米科学、生物炼制、生物质能等也逐步成为微生物学研究的热门领域。为了更加系统、集中地反映各个领域的研究成果, 以及该领域学科的热点难点问题, 充分发挥《微生物学通报》的学科引领和导向作用, 促进学科发展, 为某个领域的科研人员提供一个交流的平台, 《微生物学通报》编委会决定自2008年起, 每年出版一定数量的专题刊。专题刊将系统地反映微生物学相关领域或新学科生长点的最新进展, 及时介绍国内外微生物相关前沿领域的突破性成果, 以及面向国家和社会发展需要并具有重大应用前景的研究成果。真诚欢迎本领域各学科的学术带头人, 申请并组织专题刊。申请得到编委会批准后, 申请人将被邀请担任本专题刊的特约编辑, 负责组织稿件、确定审稿专家, 并撰写专题刊序言。

根据专刊工作计划, 编辑部已开始接受2008年度专题刊申请, 现将有关事项通知如下:

1. 专刊申请的有关规定附在通知的下面, 请申请者仔细阅读;
2. 提交形式: 请到我刊主页(<http://journals.im.ac.cn>)的“下载专区”下载专题刊申请表; 填写好之后, 以E-mail附件的形式发送到编辑部信箱: tongbao@im.ac.cn, 请在邮件主题中注明: “专题刊申请”字样;
3. 申请者如有疑问, 请咨询编辑部, 联系方式: 邮件tongbao@im.ac.cn 或电话010-64807511

《微生物学通报》编辑部

2007年8月29日