

# 犬瘟热病毒临床流行野毒株 F 蛋白信号肽区分析

王凤雪 闫喜军\* 柴秀丽 吴 威 邵西群 罗国良 张海玲 易 立 赵建军

(中国农业科学院特产研究所 吉林 132109)

**摘 要:** 根据 GenBank 上发表的犬瘟热病毒(CDV)融合蛋白基因(F)序列, 设计引物扩增 F 蛋白部分信号肽区, 片段长 369 bp。对 2005 年~2007 年收集的犬瘟热阳性的水貂、狐、貉实质脏器、血液、尿液等样品进行扩增, 获得了 13 个 CDV F 蛋白部分信号肽区基因片段。序列分析发现, CDV 野毒 F 蛋白该区段核苷酸与氨基酸序列与目前我国使用疫苗株 CDV<sub>3</sub> 及其他国内外疫苗株比较存在较大差异, 与 CDV<sub>3</sub> 对应区段的核苷酸同源性在 80.7%~83.2%之间, 而推导的对应氨基酸序列同源性只有 64.8%~71.3%。部分信号肽区的氨基酸疏水性分析, 推测其调控功能也发生变化, 本研究为 CDV 遗传变异和分子流行病学提供理论数据。

**关键词:** 犬瘟热病毒, 融合蛋白, 信号肽

## Analysis of Signal Peptide Fragment of Canine Distemper Virus Wild-type Strain Fusion Protein

WANG Feng-Xue YAN Xi-Jun\* CHAI Xiu-Li WU Wei SHAO Xi-Qun  
LUO Guo-Liang ZHANG Hai-Ling YI Li ZHAO Jian-Jun

(Institute of Special Wild Economic Animal and Plant Science CAAS, Jilin 132109)

**Abstract:** A pairs of primers were designed according to the fusion protein (F) gene sequences of canine distemper virus (CDV) in GenBank. A 369 bp fragment aimed signal peptide fragment of F gene was amplified. The PCR products from viscera samples, blood, urine of fur animals including foxes, minks and racoon dogs, which collected in the years 2005–2007, were cloned to pMD18-T Vector and sequenced. We obtained 13 positive signal peptide fragments from wild-type strains. The results indicated there was obviously genetic diversity between the wild-type strains and CDV<sub>3</sub> and other vaccine strains. The homology with CDV<sub>3</sub> is 80.7% - 83.2% in nucleotide, and 64.8% - 71.3% in amino acid. The analysis for the hydrophobic regions indicated the function of signal peptide fragment may be changed. This study can offer academic data to research of CDV genetic variation and epidemiology.

**Keywords:** Canine distemper virus, Fusion protein, Signal peptide

犬瘟热病毒(Canine Distemper Virus, CDV)属于副粘病毒科麻疹病毒属成员, 基因组为单股负链线性 RNA, 总长约 15.69 kb; 病毒粒子中主要蛋白有

核衣壳蛋白(N)、磷蛋白(P)、膜蛋白(M)、融合蛋白(F)、血凝素蛋白(H)、大蛋白(L)。F 和 H 为糖蛋白, 是产生中和抗体的主要保护性抗原, 在病毒免疫中

占有重要地位。F 蛋白和 H 蛋白在病毒囊膜上形成纤突, 两个蛋白与病毒的入侵和细胞毒性直接相关。F 蛋白被认为是介导病毒与细胞、细胞与细胞融合的<sup>[1]</sup>, 多数副粘病毒融合蛋白(F)属于 I 型糖蛋白, 在靠近翻译起始密码子下游有一个短的亲水先导序列。Veronika 等指定 CDV F 蛋白 1~135 位残基作为潜在的长的信号肽, 通过实验证明带有这段疏水前导短肽的 F 蛋白合成更稳定, 具有较少活性。说明前导短肽有调控 CDV F 蛋白的功能<sup>[2]</sup>。

目前我国犬瘟热频繁发生, 尤其在水貂、狐、貉等动物体内经常检测到 CDV 感染, CDV 的毒力与 F 蛋白的融合活性有密切关系。我们对近两年内收集的 CDV 野毒 F 蛋白信号肽区进行了调查分析, 期望能为 CDV 遗传变异和分子流行病学提供信息。

## 1 材料和方法

### 1.1 病料样品

犬瘟热病料分别采自黑龙江、吉林、辽宁、河北和山东等省份的水貂、狐、貉养殖场, 采集患病动物的血液、肝脏及肺脏等组织, 经 RT-PCR 检测<sup>[3]</sup>为阳性的样品。

### 1.2 毒株和疫苗

犬瘟热疫苗株 CDV3, 由中国农业科学院特产研究所人兽共患病研究室鉴定和保存; 含有犬瘟热病毒的疫苗分别为吉林五星制药厂生产的犬五联苗 (Five Star), 以及市场购买的进口联苗: 英特威犬四联苗、维克犬六联苗、Norden 犬四联苗和海博东七联苗, 分别由 Holland、France、USA 和 Spain 等国家生产; 非洲绿猴肾细胞 (Vero), 购自中国兽药监察所。

### 1.3 载体、菌株及试剂

pMD18-T 载体、AMV 反转录酶、RNA 酶抑制剂、dNTPs、Oligod(T)、exTaq 酶、限制性内切酶和质粒抽提试剂盒购于 TaKaRa 公司; 纯化试剂盒、Simply P 总 RNA 抽提试剂盒为 Bioflux 公司产品; 大肠杆菌感受态 DH5 $\alpha$  菌株为本研究室保存; 其他化学试剂均为国产分析纯。

### 1.4 引物的设计与合成

根据 GenBank 上发表的 CDV (Onderstepoort 株) 全基因序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计一对特异性引物, 扩增含有 F 蛋白大部分信号肽区的片段部分信号肽区, 长度大小为 369 bp。P1 (5'-CACA

TACCCAACAAGACCG-3'); P2 (5'-GAGCCTTGGAACAAAGAAAG-3'), 引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

### 1.5 病毒 RNA 制备

按试剂盒说明书从含有犬瘟热病毒的细胞培养物或组织中提取病毒 RNA, 获得的 RNA 可直接用于 RT-PCR 反应, 也可保存于 -70℃ 备用。

### 1.6 F 蛋白部分信号肽区片段扩增、克隆及鉴定

按照文献[3]的步骤 RT-PCR 扩增 F 蛋白部分信号肽区, 退火温度 50.3℃, PCR 产物电泳观察。阳性 RT-PCR 产物回收纯化, 克隆到 T 载体, *EcoR* + *Sal* 双酶切鉴定重组质粒。

### 1.7 野毒分离株及疫苗株部分信号肽区序列分析

克隆 T 载体的阳性质粒送交上海英骏生物技术有限公司测序。扩增获得的 13 个 CDV F 蛋白部分信号肽区序列与报道的标准野毒 A75/17、标准疫苗株 Onderstepoort、国内疫苗 CDV3 株和 Five Star 及 USA、France、Spain 和 Holland 联苗中的 CDV F 蛋白部分信号肽区的相应核苷酸及氨基酸序列比对, 分析这些野毒 F 蛋白信号肽区基因变化规律及氨基酸的衍化特点。

## 2 结果

### 2.1 RT-PCR 条件优化

以 CDV3 弱毒株反转录产物为模板, P1、P2 为引物进行优化, RT-PCR 扩增获得了清晰特异的条带 (图 1), 大小 369 bp。

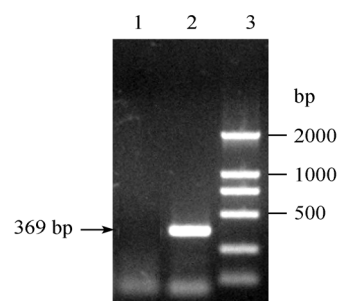


图 1 PCR 条件优化

Fig. 1 Optimization of PCR condition

1: Vero 对照; 2: 扩增产物 369 bp; 3: DL2000

1: Vero cell control; 2: Product 369 bp; 3: DL 2000

### 2.2 CDV 野毒 F 蛋白部分信号肽区扩增、克隆

犬瘟的动物组织病料或疫苗溶液扩增 F 蛋白部分信号肽区的电泳结果见图 2, 对应阳性样品分别

命名为 HBCL1、HBCL2、HBCL3、HBCL4、HBCL5、HBSN1、HBSN2、HBSN3、HBSN4、HBSN5、LNHS、SDWD1 和 SDWD2。扩增产物克隆到 T 载体，HBCL1~5 和 HBSN~5 这 10 个分离野毒 F 蛋白部分信号肽区克隆质粒酶切鉴定如图 3，另外 3 个克隆的酶切鉴定结果没有在图中显示。

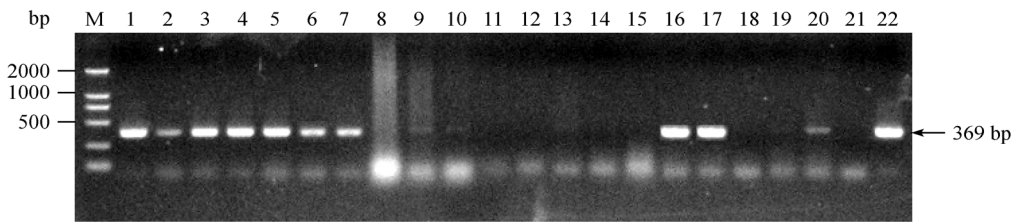


图 2 病料扩增 CDV F 蛋白部分信号肽区结果

Fig. 2 Result of signal peptide fragments of CDV fusion protein in specimens  
M: DL2000; 1~7,9,10,16,17,20,22: 阳性样品 HBCL1、HBCL2、HBCL3、HBCL4、HBCL5、HBSN1、HBSN2、HBSN3、HBSN4、HBSN5、LNHS、SDWD1 和 SDWD2 中扩增的部分信号肽区带  
M: DL2000; 1-7,9,10,16,17,20,22: The products from positive samples HBCL1、HBCL2、HBCL3、HBCL4、HBCL5、HBSN1、HBSN2、HBSN3、HBSN4、HBSN5、LNHS、SDWD1 and SDWD2

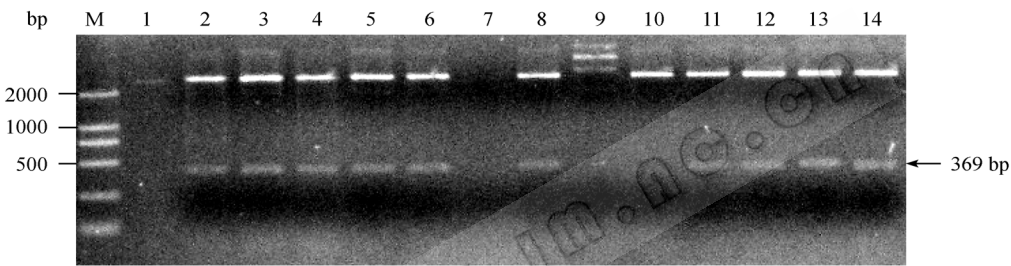


图 3 部分病料 CDV F 蛋白部分信号肽区克隆质粒酶切鉴定

Fig. 3 Verification of plasmid of cloned signal peptide of CDV F in specimens by RFLP  
M: DL2000; 2~6,8,11~14: 样品 HBCL1、HBCL2、HBCL3、HBCL4、HBCL5、HBSN1、HBSN2、HBSN3、HBSN4、HBSN5 对应的 T 载体阳性克隆酶切结果  
M: DL2000; 2-6,8,11-14: The RFLP results of positive T clones of HBCL1、HBCL2、HBCL3、HBCL4、HBCL5、HBSN1、HBSN2、HBSN3、HBSN4、HBSN5

2.3 CDV 野毒 F 蛋白部分信号肽区的核苷酸及氨基酸序列与其他毒株和疫苗株的比较

我们将标准野毒 A75/17、国内哈尔滨分离的 MS01 株作为毒株比较序列，CDV<sub>3</sub>、Five Star 等作为疫苗株比较序列。比对发现分离的多个 CDV 野毒 F 蛋白部分信号肽区在 70 多个位置都与标准疫苗株不同，从表 1 可见，分离的这些 CDV 野毒的部分信号肽区核苷酸与疫苗株 CDV<sub>3</sub> 对应区段的核苷酸同源性在 83.5%~84.8%之间，而推导的对应氨基酸序列同源性只有 64.8%~67.2%。与 CDV<sub>3</sub> 相比较，13 例 CDV 野毒部分信号肽区核苷酸有 39 个位置均有相同的变化，氨基酸水平在 30 个位置有相同变化。而与标准疫苗株 Onderstepoort 比较核苷酸水平上 41 个位置都是相同的变化，氨基酸水平上有 27 个位置有相同变化。与其他疫苗株相比也有相似情况。13

例野毒 F 蛋白部分信号肽区与我国哈尔滨分离的 CDV MS01 株在核苷酸水平同源性在 92.1%~95.9%之间，而与标准毒株 A75/17 的同源性只有 87.8%~89.7%；但氨基酸同源性的变化范围较大：与 MS01 比较，在 85.2%~92.6%范围内；与 A75/17 比较，同源性在较低的 77.0%~82.8%范围内。另外还发现比较特殊的地方，我们分离的这些 CDV 野毒 F 蛋白部分信号肽区与 USA 联苗中的病毒株有较高的同源性（核苷酸 90.8%~94.3%，氨基酸 82.0%~91.0%），明显不同于它们与 CDV<sub>3</sub> 等其它疫苗株的对应序列比对结果。并且，发现 HBSN3、HBSN4、HBSN5 和 LNHS 与 USA 联苗中 CDV F 信号肽区的核苷酸及氨基酸的相近程度比毒株 MS01 还高。

分析 F 蛋白部分信号肽区序列的氨基酸，发现

表 1 13 株 CDV 野毒 F 蛋白部分信号肽区与其他毒株及疫苗株核苷酸及氨基酸对应序列比较结果  
Table 1 Comparison of amino acid of the signal peptide of F protein among 13 CDV isolates and other isolates or vaccines

同源性 Homo- geny(%)		核 苷 酸 Nucleic acid																						样品 Simple
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
氨基酸 Amino acid	1		94.3	94.3	98.6	97.6	94.6	94.3	98.1	97.3	97.3	98.9	98.9	96.5	93.2	89.7	93.2	84.6	84.8	85.1	84.0	84.6	84.3	HBCL1
	2	90.2		100	93.5	93.5	99.7	99.5	93.0	92.7	92.7	92.7	94.3	93.5	95.7	87.8	90.8	83.5	83.5	84.0	82.9	83.5	84.0	HBCL2
	3	90.2	100		93.5	93.5	99.7	99.5	93.0	92.7	92.7	92.7	94.3	93.5	95.7	87.8	90.8	83.5	83.5	84.0	82.9	83.5	84.0	HBCL3
	4	97.5	89.3	89.3		97.3	93.8	93.5	97.8	97.0	97.0	97.0	98.6	96.2	93.0	89.4	93.0	84.3	84.6	84.8	83.7	84.3	84.0	HBCL4
	5	94.3	89.3	89.3	93.4		93.8	93.5	97.8	97.6	97.6	97.6	98.6	96.7	93.2	88.9	92.4	84.3	84.3	84.6	83.7	84.0	84.0	HBCL5
	6	90.2	100	100	89.3	89.3		99.7	93.2	93.0	93.0	93.0	94.6	93.8	95.9	88.1	91.1	83.7	83.7	84.3	83.2	83.7	84.3	HBSN1
	7	89.3	99.2	99.2	88.5	88.5	99.2		93.0	92.7	92.7	92.7	94.3	93.5	95.7	87.8	90.8	83.5	83.5	84.0	82.9	83.5	84.0	HBSN2
	8	95.9	87.7	87.7	95.1	95.1	87.7	86.9		99.2	99.2	99.2	98.6	97.8	92.4	89.4	93.5	84.8	84.6	84.8	84.3	84.3	84.0	HBSN3
	9	93.4	86.9	86.9	92.6	94.3	86.9	86.1	97.5		100	100	98.4	97.6	92.1	88.9	93.0	84.3	84.0	84.3	83.7	83.7	83.5	HBSN4
	10	93.4	86.9	86.9	92.6	94.3	86.9	86.1	97.5	100		100	98.4	97.6	92.1	88.9	93.0	84.3	84.0	84.3	83.7	83.7	83.5	HBSN5
	11	93.4	86.9	86.9	92.6	94.3	86.9	86.1	97.5	100	100		98.4	97.6	92.1	88.9	93.0	84.3	84.0	84.3	83.7	83.7	83.5	LNHS
	12	97.5	91.0	91.0	96.7	96.7	91.0	90.2	96.7	95.9	95.9	95.9		97.6	93.8	89.7	93.2	84.6	84.8	85.1	84.0	84.6	84.3	SDWD1
	13	94.3	89.3	89.3	93.4	95.1	89.3	88.5	96.7	95.9	95.9	95.9	96.7		93.0	87.8	91.9	84.0	84.3	84.6	83.5	84.0	83.2	SDWD2
	14	88.5	92.6	92.6	87.7	87.7	92.6	91.8	86.1	85.2	85.2	85.2	89.3	87.7		88.6	90.8	84.0	83.5	84.0	83.5	83.5	84.6	MS01
	15	82.8	77.9	77.9	82.0	80.3	77.9	77.0	82.0	80.3	80.3	80.3	82.0	78.7	77.0		94.3	85.9	84.8	85.4	85.4	84.8	86.4	A75/17
	16	87.7	82.8	82.8	86.9	85.2	82.8	82.0	88.5	86.9	86.9	86.9	86.9	85.2	81.1	91.0		89.2	89.7	90.2	88.6	89.7	88.1	USA
	17	68.9	68.0	68.0	68.0	68.0	68.0	67.2	68.9	68.0	68.0	68.0	68.9	68.9	68.0	71.3	76.2		95.7	95.7	98.6	95.7	96.7	Unders- tepoort
	18	67.2	65.6	65.6	66.4	66.4	65.6	64.8	67.2	66.4	66.4	66.4	67.2	67.2	66.4	67.2	75.4	91.0		99.5	95.7	99.5	94.6	CDV3
	19	68.0	67.2	67.2	67.2	67.2	67.2	66.4	68.0	67.2	67.2	67.2	68.0	68.0	67.2	68.9	77.0	91.0	98.4		95.7	99.5	94.6	Five Star
	20	68.0	67.2	67.2	67.2	67.2	67.2	66.4	68.0	67.2	67.2	67.2	68.0	68.0	67.2	70.5	75.4	96.7	90.2	90.2		95.7	96.2	France
	21	67.2	66.4	66.4	66.4	66.4	66.4	65.6	67.2	66.4	66.4	66.4	67.2	67.2	67.2	68.0	75.4	91.8	98.4	98.4	91.0		94.6	Spain
	22	68.9	68.0	68.0	68.0	68.0	68.0	67.2	67.2	66.4	66.4	66.4	68.9	67.2	68.0	71.3	74.6	94.3	88.5	88.5	91.8	89.3		Holland

毒株与疫苗株在所选信号肽区段氨基酸的 6~26、61~90、34~59、91~101 之间有较大的区别, 有多处连续 3 个氨基酸都有不同, 大多数毒株的目的基因内均含有一个潜在的 N 连接糖基化位点 NRT, 符合 Asn-X-Thr/Ser 糖基化位点序列子结构, 对应 F 蛋白氨基酸 62 位处(在本实验部分信号肽区的 49 位)。分离的这 13 株野毒都含有这个潜在的 N 连接糖基

化位点, 而标准野毒 A75/17 和标准疫苗株 Onderstepoort 及 France 中 CDV F 蛋白的部分信号肽区中都没有该位点, 见图 4。蛋白分析软件发现所有野毒的 F 蛋白部分信号肽区氨基酸亲水性均较强, 但峰没有疫苗株的明显, 而 HBSN3、HBSN4、HBSN5、LNHS、SDWD1 和 SDWD2 的峰较其他野毒的稍明显。

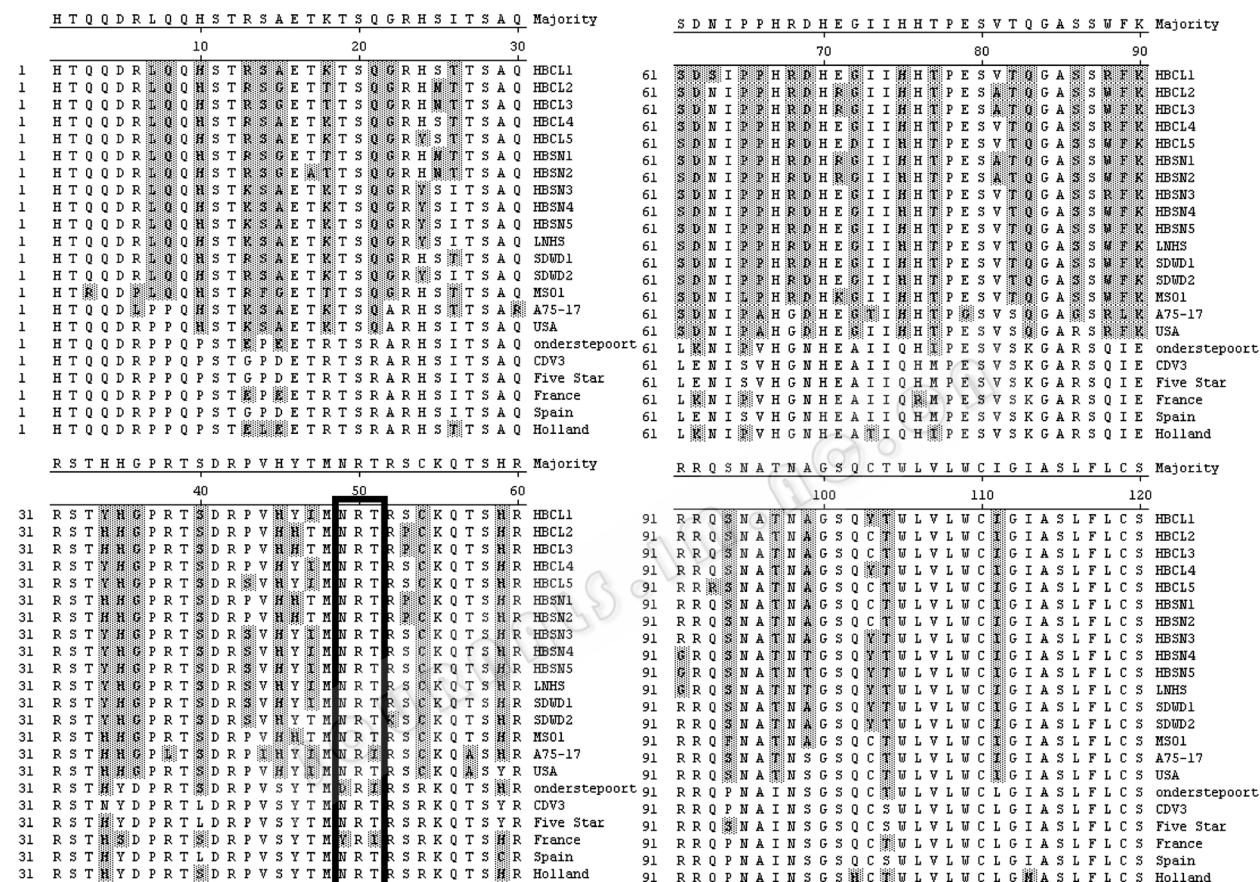


图 4 分离 CDV 野毒 F 蛋白部分信号肽区氨基酸与其他毒株疫苗株的比对结果

Fig. 4 Comparison of amino acid of the signal peptide of F protein among the isolates CDV and other isolates or vaccines

注: 阴影标记的为不同于 CDV<sub>3</sub> 的氨基酸残基, 分析推测在 49 位为 F 蛋白的一个 N 连接糖基化潜在位点, 即黑框内的 NRT

Note: The shadow regions indicate the amino acid different from CDV<sub>3</sub>. We analyze that one site locating at amino acid 49 in F protein is an N-glycosylation site, which is enclosed by black box

### 3 结论与讨论

利用设计的特异引物成功扩增到疫苗株 CDV<sub>3</sub> 和其他联苗中的 CDV F 蛋白部分信号肽区基因片段, 在临床疑似犬瘟热的狐、貉、貂等动物的血液、肺脏和肝脏组织中扩增到 13 个阳性片段, 这些病料来自河北、辽宁和山东等地。

从这 13 例分离野毒株的核苷酸和推导氨基酸

与我国毒株 MS01、标准毒株、我国疫苗株 CDV<sub>3</sub>、Five Star 及各国的联苗中 CDV 疫苗的序列比较结果来看, 这些野毒与疫苗株之间有较大不同, 核苷酸同源性在 82% 左右, 而推导的对应氨基酸序列同源性在 66% 左右, 这些野毒与疫苗株之间有 30 多处具有相同的变化; 而与我国分离野毒 MS01 及标准毒株 A75/17 有较高的同源性, 但也有多处不同。

我们利用蛋白分析软件分析发现, 这些 CDV 野

毒 F 蛋白部分信号肽区均具有较强的亲水性,但野毒的峰值明显没有疫苗株的明显,毒株之间也有不同,这些差异是否导致部分信号肽区对 F 蛋白的调控表现不一,进而使病毒的 F 蛋白融合活性有所变化,有待进一步试验验证。

副粘病毒融合蛋白对病毒侵入和细胞到细胞的传播是至关重要的<sup>[4]</sup>。Onderstepoort 株 F 蛋白开放阅读框潜在编码 662 个氨基酸的蛋白<sup>[5]</sup>。经典 CDV 毒株 A75/17 在狗原代脑细胞培养物(DBCC)中不产生病变,在细胞间用病毒敏感性微融合传播方式引起持续性感染<sup>[6]</sup>,而疫苗株 Onderstepoort 在 DBCC 和其他细胞中产生高度溶细胞感染,以巨合胞体的形成为特征。并且,大量 Onderstepoort 子代病毒通过细胞膜出芽方式从感染细胞中释放,在细胞培养液中几乎检测不到感染性子代病毒粒子,而出芽在 A75/17 株却很少出现<sup>[7]</sup>。Onderstepoort 宿主细胞特异性的丢失可能与黏附蛋白的改变有关,而该病毒合胞体形成的增多可能由于融合蛋白 F 的改变引起的<sup>[8]</sup>。

研究认为,典型 型糖蛋白的进程包括信号肽识别粒子对信号肽的识别, F 蛋白的信号肽缺失将导致融合蛋白活性增强,说明其具有调控功能<sup>[2]</sup>。最近也有试验研究证实 CDV F 蛋白信号肽控制细胞内及表面蛋白的表达,间接调控融合活性<sup>[9]</sup>。核苷酸、氨基酸比较及亲水性分析显示我们分离的 13 例 CDV 临床野毒株的 F 蛋白部分信号肽区与疫苗株有很大区别,推测野毒 F 蛋白部分信号肽区对其功能的负调控导致其融合活性没有疫苗株的强,这个设想需要病毒分离、培养试验来验证。

这些 CDV 野毒的部分信号肽区与疫苗株 Onderstepoort、CDV<sub>3</sub>、FiveStar、France、Spain 对应区段氨基酸同源性不到 70%,氨基酸水平上的这些显在变化可能是导致信号肽区结构变化的根本原因,信号肽区多处连续氨基酸的变化会引起空间结构的变化,从而可以改变蛋白信号肽调控功能,最终表现为细胞融合能力的改变。至于 USA 联苗中

CDV F 信号肽,从我们的进化树分析结果来看,其属于野毒分支,但进化上比 A75/17 更早。F 蛋白信号肽区序列比对、潜在的 N 联接糖基化位点 NRT 和氨基酸亲水性的比较结果,给我们提供一个信息就是,CDV 野外分离株与疫苗株在 F 蛋白信号肽功能上有所不同。

## 参 考 文 献

- [1] Choppin PW, Scheid A. The role of viral glycoproteins in adsorption, penetration, and pathogenicity of viruses. *Rev Infect Dis*, 1980, 2(1): 40–61.
- [2] Veronika von M, Cattaneo R. Amino-Terminal Precursor Sequence Modulates Canine Distemper Virus Fusion Protein Function. *J Virol*, 2002, 76(9): 4172–4180.
- [3] 王凤雪, 闫喜军, 邵西群, 等. 毛皮动物犬瘟热 RT-PCR 方法的建立与应用. *特产研究*, 2005, 27(4): 14–17.
- [4] Merz DC, Scheid A, Choppin PW. Importance of antibodies to the fusion glycoprotein of paramyxoviruses in the prevention of spread of infection. *J Exp Med*, 1980, 151(2): 275–288.
- [5] Barrett T, Clarke DK, Evans SA, *et al*. The nucleotide sequence of the gene encoding the F protein of canine distemper virus: a comparison of the deduced amino acid sequence with other paramyxoviruses. *Virus Res*, 1987, 8(4): 373–386.
- [6] Lescar J, Roussel A, Wien MW, *et al*. The Fusion glycoprotein shell of Semliki Forest virus: an icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH. *Cell*, 2001, 105(1): 137–148.
- [7] Zurbriggen A, Graber HU, Wagner A, *et al*. Canine distemper virus persistence in the nervous system is associated with noncytolytic selective virus spread. *J Virol*, 1995, 69(3): 1678–1686.
- [8] Pascal C, Karin B, Andreas Z, *et al*. Sequence Analysis and Expression of the Attachment and Fusion Proteins of Canine Distemper Virus Wild-Type Strain A75/17. *J Virol*, 1999, 73(3): 2263–2269.
- [9] Plattet P, Cherpillod P, Wiener D, *et al*. Signal peptide and helical bundle domains of virulent canine distemper virus fusion protein restrict fusogenicity. *J Virol*, 2007, 81(20): 11413–11425.