

# 圈养狐貉源犬瘟热病毒地方分离株 H 基因的遗传变异分析

曾祥伟 刘澜澜 华育平\*

(东北林业大学野生动物资源学院, 哈尔滨 150040)

**摘要:** 本研究于 2004~2006 年从人工饲养的发病狐貉中分离到 6 个 CDV 分离株, 用 RT-PCR 方法扩增了其 H 蛋白基因片段, 并对其进行了克隆和测序。测序结果表明, 6 个 CDV 分离株 H 基因阅读框全长均为 1 824 bp, 编码 607 个氨基酸, 未发现碱基的插入和缺失。与 Genbank 中的 34 株 CDV 参考毒株的 H 基因序列进行比较和分析, 现有的 CDV 毒株可以分为 Asia-1、Asia-2、America-1、America-2、Europe 和 Arctic 6 个基因型, 本实验中的分离株 HL 为 Arctic 基因型, 与来自意大利的 194/97 株、丹麦的 Green 株同分在一组, 其余 5 株分离株与来自日本的 HAMA、UENO、Tanu96 等毒株以及来自中国的 TN 株、GP 株 (大熊猫株) 分在一组同属 Asia-1 型, 表现出一定的地理位置相关性; 6 个分离株均与 Onderstepoort、Convac 等疫苗株差异较大、关系较远, 提示病毒变异可能是造成目前已免疫动物仍然发生犬瘟热流行的原因之一。

**关键词:** 犬瘟热病毒; 血凝素蛋白基因; 遗传变异

中图分类号: S851.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-1050 (2008) 02-0217-04

## Genetic variations of haemagglutinin protein gene of canine distemper virus isolated from breeding fox and raccoon dog

ZENG Xiangwei, LIU Lanlan, HUA Yuping\*

(College of Wildlife Resources, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

**Abstract:** Haemagglutinin (H) protein genes of six CDV strains isolated from fox and raccoon dog between 2004 and 2006 were amplified by RT-PCR, and then were cloned and sequenced. Their sequences were also compared with those of 34 CDV reference strains in Genbank. The results show that the ORF of H genes of six strains are all composed of 1 824 nucleotides, encoding a polypeptide of 607 amino acid residues. Deletion and insertion were not found in the H genes of the six isolates. Phylogenetic tree based on nucleotide sequences of H genes from six isolates and 34 reference strains show all these strains are classified into six majority genetic lineages, designated Asia-1, Asia-2, America-1, America-2, Europe, Arctic. HL isolate has high homology with Italy strain 194/97 and Danmark strain Green, and belongs to Arctic genetic lineage. The other five isolates have high homology with Japan strains HAMA, UENO, Tanu96 and China strains TN, GP, and belong to Asia-1 genetic lineage, this shows a certain extent geographical relativity. The six isolates have lower homology with vaccins strains Onderstepoort and Convac, it shows that virus variation may be one of important reasons for prevalence of CD in vaccinated animals.

**Key words:** Canine distemper virus; Genetic variation; Hemagglutinin protein gene

犬瘟热病毒 (Canine distemper virus, CDV) 为副粘病毒科、麻疹病毒属的单股负链 RNA 病毒。近年来 CDV 自然感染宿主范围不断扩大, 除了引起犬的大规模发病死亡外, 还可以感染狮 (*Panthera leo*)、虎 (*Panthera tigris*)、大熊猫 (*Ailu-*

*ropoda melanoleuca*)、小熊猫 (*Ailures fulgens*) 等珍稀野生动物 (Appel *et al.*, 1994; Roelke-Parker *et al.*, 1996), 甚至可以感染灵长类猕猴 (*Macaca mulatta*) 等, 危害越来越严重。同时对于我国数量巨大的人工圈养的狐 (*Vulpes*)、貉 (*Nyctereutes*

**基金项目:** 黑龙江省博士后基金资助项目 (LBH-Z06153); 黑龙江省青年科技专项资金资助项目 (QC07C33); 国家林业局野生动植物保护管理资助项目

**作者简介:** 曾祥伟 (1976-), 男, 博士, 讲师, 主要从事野生动物疾病的研究。

**收稿日期:** 2007-08-09; **修回日期:** 2008-03-12

\* 通讯作者, corresponding author, E-mail: yuping\_hua@126.com

*procyonoides*)、水貂 (*Mustla vison*) 等毛皮动物种群来说,犬瘟热一直是危害最严重的传染病之一,该病的有效控制关系到我国驯养毛皮动物产业的健康发展。

CDV 的基因组共编码核蛋白 (Nucleocapsid protein, N)、磷蛋白 (Phosphoprotein, P)、膜蛋白 (Matrix protein, M)、大蛋白 (Large protein, L)、血凝素蛋白 (Haemagglutinin protein, H) 和融合蛋白 (Fusion protein, F) 6 种蛋白。其中 H 蛋白位于病毒粒子表面,并且是诱导机体产生中和抗体的主要抗原之一,同时 H 蛋白决定着病毒感染宿主的特异性,因此, H 蛋白基因成为国内外学者研究 CDV 遗传变异规律的首选基因 (Haas *et al.*, 1997; Mochizuki *et al.*, 1999)。与家犬来源的 CDV 研究相比,国内外对圈养条件下狐、貉、水貂等毛皮动物来源的 CDV 分子水平上的研究资

料不是很全面和系统。2004 至 2006 年,我们从发病毛皮动物中获得的部分 CDV 分离株的 H 基因进行克隆与序列分析,力求找出圈养毛皮动物种群中主要流行毒株,从分子水平比较分离株间及与疫苗株间的差异,确定免疫失败的可能原因,同时为 CDV 的分子流行病学的研究积累资料。该研究的实施不仅有利于经济动物产业的可持续发展,还将保护经济动物纳入野生动物保护的系统建设工程中,为经济动物资源的有效保护及合理利用奠定良好基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒株

黑龙江省、内蒙古等地区毛皮动物饲养场送检已免疫的狐、貉,临床症状疑似犬瘟热,猝死后取内脏和肠内容物,采用常规方法分离鉴定,具体背景见表 1。

表 1 CDV 分离株的背景  
Table 1 Background of CDV isolates

序号 No.	病毒分离株 CDV isolate	分离地点 Location	分离时间 Time of isolation	宿主动物 Host	序列登录号 Genbank accession number
1	MS01	黑龙江 Heilongjiang	2005	狐 Fox	DQ922630
2	SC01	黑龙江 Heilongjiang	2006	貉 Raccoon dog	EF042818
3	ZD01	黑龙江 Heilongjiang	2006	狐 Fox	EF445051
4	NM	内蒙古 Inner Mongolia	2004	狐 Fox	EF445053
5	GN	黑龙江 Heilongjiang	2006	貉 Raccoon dog	EF445054
6	HL	黑龙江 Heilongjiang	2005	狐 Fox	EF445052

### 1.2 载体、菌株及试剂

PMD 18-T 载体、Marker (DL2000)、Ex Taq 酶、AMV 反转录酶、DNA 片段纯化试剂盒购自 Takara 公司; TRIzol Reagent RNA 提取试剂盒购自 Invitrogen 公司; DH5 $\alpha$  菌株由本实验室保存。

### 1.3 引物设计与合成

根据 Genbank 上已发表的弱毒株和野毒株的 H 蛋白基因序列,选择保守区域设计合成了一对引物,用于扩增 H 蛋白基因整个阅读框架,理论长度 1 861 bp。

P1: 5' - CCAGCAATGCTCCCCTAC - 3'

P2: 5' - AATTGAGATGTGTATCATCA - 3'

### 1.4 总 RNA 的提取

将疑似犬瘟热病料的肺、肝等内脏研磨制成匀浆,反复冻融 3 次后,按 RNA 提取试剂盒的说明进行操作,最后将 RNA 沉淀溶于无 RNA 酶的灭菌水中。

### 1.5 RT-PCR 反应

#### 1.5.1 反转录 (RT)

取 10  $\mu$ l 上述 RNA 溶液与 1  $\mu$ l 引物 P1 (20 mmol/L) 混合, 70 $^{\circ}$ C 水浴 5 min 后, 冰浴 3 min, 依次加入 5  $\times$  Buffer 4  $\mu$ l、10 mmol/L dNTP 3  $\mu$ l、RNasin 1  $\mu$ l、AMV 1  $\mu$ l, 总反应体积 20  $\mu$ l, 混匀后置于 42 $^{\circ}$ C 水浴中作用 1 h, 最后于 95 $^{\circ}$ C 5 min 终止反应。

#### 1.5.2 PCR 扩增

采用 25  $\mu$ l 反应体系, 取 RT 产物 3  $\mu$ l 作为模板, 加入 10  $\times$  Ex Buffer 2.5  $\mu$ l、10 mmol/L dNTP 2  $\mu$ l、20 mmol/L 引物 P1、P2 各 1  $\mu$ l, Ex Taq 0.5  $\mu$ l, 用灭菌纯水补足到 25  $\mu$ l。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 50 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 32 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。取 PCR 产物 5  $\mu$ l, 1% 琼脂糖凝胶电泳, 观察扩增结果。

### 1.6 H 基因的亚克隆与序列分析

PCR 产物经 DNA 片段纯化试剂盒回收纯化后, 按照 PMD 18-T 载体操作手册进行连接反应, 并

转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中。碱裂解法提取质粒, 经 PCR 鉴定后, 每个毒株随机选取 3 个阳性质粒送至上海英骏公司测序。应用 DNASTar 软件包 MegAlign 软件的 Clustal V 方法对所测的 6 个分离株的 H 基因序列结果及其推导出的氨基酸序列与已发表的 CDV 疫苗株和野毒株核苷酸和氨基酸序列进行比较分析, 并绘制进化树。

## 2 结果

### 2.1 CDV 各分离株 H 基因的序列

RT-PCR 分别扩增得到了与预期相符的大小约 1.9 kb 的片段。将这些 PCR 产物分别克隆到 PMD18-T 载体进行测序。序列测定结果表明, 6 株 CDV 分离株的 H 蛋白基因均含有一个长 1 824 bp 的开放阅读框架, 编码 607 个氨基酸。这些序列已登录 Genbank, 登录号见表 1。

### 2.2 CDV 分离株与各 CDV 参考毒株 H 基因序列同源性分析

通过序列比较发现, CDV 各分离株与 HAMA、A75/17、UENO 等标准强毒株的 H 基因的核苷酸序列高度同源, 同源率可达 95% ~ 99%, 而与疫苗株 Onderstepoort、Convac、CDV3 等的同源率相对较低, 在 90% ~ 91% 之间。CDV 分离株 MS01、SC01、ZD01、NM、GN 之间核苷酸序列的同源率较高, 在 97.6% ~ 99.8% 之间; 而分离株 HL 则与其它各分离株同源率相对较低, 在 93.4% ~ 93.6% 之间。

### 2.3 CDV H 基因系统进化树分析

利用 DNASTar 的 MegAlign 生物软件, 对 6 株 CDV 分离株 H 基因序列与 Genbank 数据库中 CDV 参考毒株的 H 基因序列建立了系统进化树 (图 1)。从图中可以看出, CDV H 基因从系统发生上可分为野毒株和疫苗株两大谱系。从基因型分类上看, 所有的 CDV 毒株可以分为 Asia-1、Asia-2、America-1、America-2、Europe 和 Arctic 6 个基因型, 其中 America-1 型主要包括 Onderstepoort、Convac、CDV3 等疫苗株和少数毒株; Asia-1、Asia-2、America-2、Europe、Arctic 等 5 个基因型则与疫苗株相差较远, 均属野毒株。分离株 MS01、SC01、ZD01、NM 和 GN 与来自日本的 HAMA、UENO、Tanu96 等毒株, 来自中国的 TN 株、GP 株 (大熊猫株) 分在一组同属 Asia-1 型。而分离株 HL 为 Arctic 基因型, 与来自意大利的 194/97 株、丹麦的 Green 株同分在一组。

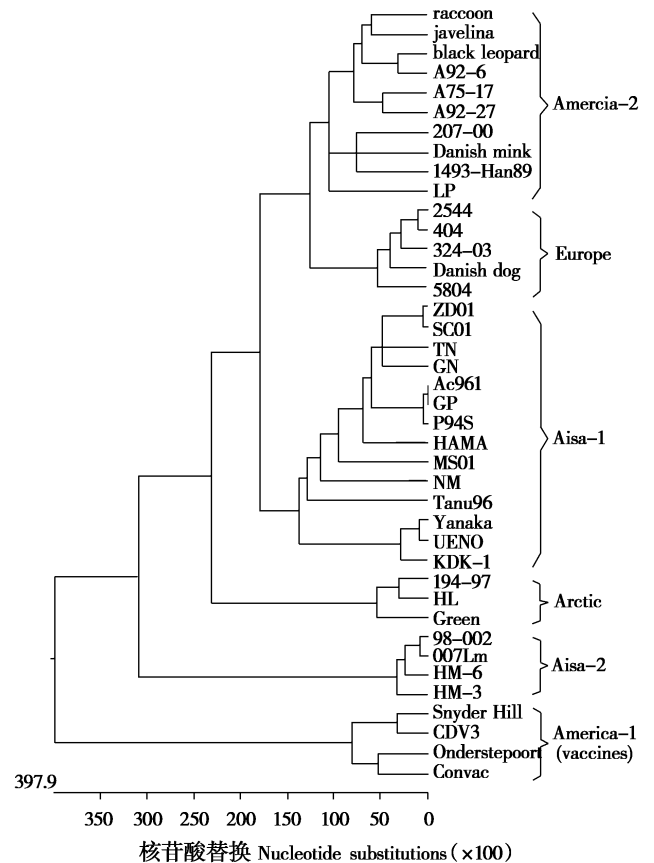


图 1 CDV 分离株与参考毒株 H 基因系统进化树分析

Fig. 1 Phylogenetic tree based on the nucleotide alignment of H protein genes of CDV isolates and reference CDV strains

## 3 讨论

对不同地区、不同种属动物 CDV 分离株基因的序列分析表明 H 基因正在不断发生变异, 因此对 CDV 进行全面深入的分子流行病学研究, 弄清 CDV 主要的流行株的种类和分布, 对分析生产实践中免疫失败的原因、有针对性地采取相应的防治措施、最终有效控制该病有着重大的实际应用意义。本研究分离到的 6 株 CDV 分离株与 HAMA、A75/17、UENO 等野毒株的同源率较高, 在系统发生上与野毒株较近, 均是强毒株, 这与发病狐、貉临床中表现的高死亡率相符; 而与 Onderstepoort 株、Convac 等疫苗株亲缘关系较远。Iwatsuki 等 (1997) 报道 H 蛋白抗原性的变化可能是近年来日本已免疫犬暴发犬瘟热的重要原因, 我们推测分离到这 6 株 CDV 的毛皮动物群体也存在类似的疫苗免疫问题。野毒株的不断出现和变异的长期积累, 可能使得现有的 CDV 疫苗不能为某些 CDV 流行株的感染提供完全有效的保护, 这也许是造成目前 CDV 免疫失败的重要原因之一。

目前 CDV 可以分为 Asia-1、Asia-2、America-1、America-2、Europe、Arctic 等 6 个主要的基因型 (Bolt *et al.*, 1997; Martella *et al.*, 2002), 我们所作的系统进化树表明, 现有的 CDV 毒株也分为这 6 个群, 与国内外学者报道的一致。2004 年到 2006 年, 获得的 6 株病毒分离株没有一株是 America-1 基因型 (疫苗组) 的, 近 50 年很少检测和分离到这种古老的类疫苗 CDV (Martella *et al.*, 2007), 但在发病的野生动物中分离到与疫苗株高度同源的毒株 (Lednicky *et al.*, 2004), 这提示我们尽管 America-1 基因型毒株已不是主要的流行毒株, 但仍然存在该类毒株发生变异或与其它毒株发生重组造成危害的可能。CDV 分离株 MS01、SC01、ZD01、NM、GN 与国内的 TN 株、GP 株同属 Asia-1 型, 这在一定程度上反映了目前国内 CDV 流行的部分特征。值得一提的是, 分离株 HL 属于 Arctic 基因型; 该基因型的 CDV 分离株过去一直被认为只在北极生态中存在, 后来先后在美国和欧洲分离到 Arctic 基因型毒株 (Pardo *et al.*, 2005); 这些不同寻常的毒株从何而来值得进一步深入研究。

从系统进化树看, 野毒株的基因型与动物的种属 (家养犬和圈养毛皮动物、野生动物) 没有明显的关联, 但总体上却表现出一定的地理位置相关性, 这与 Harder 等 (1996) 的研究结果一致; 但随着犬、毛皮动物养殖业的跨国跨地区频繁引种和野生动物贸易的全球化, 为同一种基因型病毒分离株在不同国家和地区流行提供了可能, 使得基因型与地理位置的相关性又不是绝对的。因此加强对跨国引入动物的检疫也是犬瘟热防控体系中的一个重要环节。

## 参考文献:

- Appel M J G, Yates R A, Foley G L, Bernstein J J, Santinelli S, Spelman L H, Miller L D, Arp L H, Anderson M, Barr M. 1994. Canine distemper epizootic in lions, tigers, and leopards in North America. *J Vet Diagn Invest*, **6** (3): 277-288.
- Bolt G, Jensen T D, Gottschalck E, Arctander P, Appel M J G, Buckland R, Blixenkrone-Møller M. 1997. Genetic diversity of the attachment (H) protein gene of current field isolates of canine distemper virus. *J Gen Virol*, **78**: 367-372.
- Haas L, Martens W, Greiser-Wilke I, Mamaev L, Butina T, Maack D, Barrett T. 1997. Analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper virus isolates from Germany. *Virus Res*, **48**: 165-171.
- Harder T C, Kenter M, Vos H, Siebelink K, Huisman W, van Amerongen G, Rvell C, Barrett T, Appel M J G, Osterhaus A D M E. 1996. Canine distemper virus from diseased large felids: biological properties and phylogenetic relationship. *J Gen Virol*, **77**: 397-405.
- Iwatsuki K, Miyashita N, Yoshida E, Gemma T, Shin Y S, Mori T, Hirayama N, Kai C, Mikami T. 1997. Molecular and phylogenetic analyses of the haemagglutinin (H) proteins of field isolates of canine distemper virus from naturally infected dogs. *J Gen Virol*, **78**: 373-380.
- Lednicky J A, Dubach J, Kinsel M J, Meehan T P, Bocchetta M, Hungerford L L, Sarich N A, Witecki K E, Braid M D, Pedrak C, Houde C M. 2004. Genetically distant American Canine distemper virus lineages have recently caused epizootics with somewhat different characteristics in raccoons living around a large suburban zoo in the USA. *Virol J*, **1**: 1-14.
- Martella V, Pratelli A, Cirone F, Zizzo N, Decaro N, Tinelli A, Foti M, Buonavoglia C. 2002. Detection and genetic characterization of canine distemper virus (CDV) from free ranging red foxes in Italy. *Mol Cell Probes*, **16** (1): 77-83.
- Martella V, Cirone F, Elia G, Lorusso E, Decaro N, Campolo M, Desario C, Lucente M S, Bellacicco A L, Blixenkrone-Møller M, Carmichael L E, Buonavoglia C. 2006. Heterogeneity within the haemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy. *Vet Microbiol*, **116**: 301-309.
- Martella V, Elia G, Lucente M S, Decaro N, Lorusso E, Banyai K, Blixenkrone-Møller M, Lan N T, Yamaguchi R, Cirone F, Carmichael L E, Buonavoglia C. 2007. Genotyping canine distemper virus (CDV) by a hemi-nested multiplex PCR provides a rapid approach for investigation of CDV outbreaks. *Vet Microbiol*, **122**: 32-42.
- Mochizuki M, Hashimoto M, Hagiwara S. 1999. Genotypes of canine distemper virus determined by analysis of the hemoagglutinin genes of recent isolates from dogs in Japan. *J Clin Microbiol*, **37**: 2936-2942.
- Pardo I D, Johnson G C, Kleiboeker S B. 2005. Phylogenetic characterization of canine distemper viruses detected in naturally infected dogs in North America. *J Clin Microbiol*, **43**: 5009-5017.
- Roelke-Parker M, Munson L, Packer C, Kock R, Cleaveland S, Carpenter M, O'Brien S J, Pospischil A, Hofmann-Lehmann R, Lutz H, Mwamengele G L M, Mgasa M N, Machange G A, Summers B A, Appel M J G. 1996. A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (*Panthera leo*). *Nature*, **379**: 441-445.