

长沙 9 个犬细小病毒毒株的分离与鉴定

肖博仁, 罗维, 刘崇灵, 李润成, 余兴龙*

(湖南农业大学 动物医学院, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 从感染犬细小病毒(CPV)的长沙病犬粪便中分离 CPV, 采用同步接毒方式, 将病毒悬液接种到猫肾细胞(F81), 经 PCR 鉴定, 从 10 份阳性样品中分离到 9 株 CPV, 血凝试验显示 9 株 CPV 均能凝集猪红细胞, 血凝价均超过了 2^7 。为进一步分析 CPV 长沙毒株的 VP2 分子生物学特征及抗原变异规律, 对 9 个 CPV 毒株的 VP2 基因进行克隆、测序及序列分析, 结果表明: CPV 长沙毒株与全国及世界各地 CPV 毒株相比, 其 VP2 基因序列同源性超过 97%, 其 VP2 基因推导的氨基酸序列同源性超过 94%; 其 VP2 基因推导的氨基酸序列有独特的变异, 且有独特变异的毒株在基因进化树上处于同一个分支。

关 键 词: 犬细小病毒; 分离; 鉴定; 变异; 长沙

中图分类号: S852.65⁺5

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2012)03-0296-04

Isolation and identification of nine canine parvovirus CS strains

XIAO Bo-ren, LUO Wei, LIU Chong-ling, LI Run-cheng, YU Xing-long*

(College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: Nine strains of canine parvovirus (CPV) were isolated using F81 cell from CPV positive feces collected from sick dogs in Changsha (CS), the CPV strains were confirmed by PCR and hemagglutination assay showed all the virus isolates could agglutinate red blood cell of pigs with the titers all above 2^7 . To further identify molecular and biological characteristics and the antigen variation of these isolates, VP2 gene was cloned, sequenced and analyzed. The results showed that the identities of gene sequence and the deduced amino acid sequence of CPV between the isolated strains and other reference strains were above 97% and 94%, respectively. And there were specific amino acid mutations in the VP2 of canine parvovirus CS strains.

Key words: canine parvovirus; isolation; identification; mutation; Changsha

犬细小病毒(canine parvovirus, CPV)属于细小病毒科细小病毒属, 其基因组为负义、单链、线性的 DNA, 全长 5 233 bp, 能引起犬的急性传染病, 以剧烈呕吐、出血性肠炎、白细胞显著减少为主要特征^[1]。1980 年中国开始出现犬细小病的疑似病例, 1983 年徐汉坤等^[2]首先报道了该病的流行。近几年, 中国很多地区均有该病的流行^[3-7]。犬细小病毒的基因变异是造成其广泛流行的一个主要原因。由于变异毒株的存在, 各地分离株的抗原性均有一定的差异^[8]。VP2 是决定 CPV 抗原差异和宿主范围的关键基因, 其基因全长 1 755 bp, 编码的 VP2 蛋白是

CPV 的主要衣壳蛋白, 决定其抗原性和毒力, 可诱导机体产生中和抗体^[9-10], 因此, 对 CPV 的研究主要集中在对 VP2 进行研究。笔者从湖南长沙的宠物医院收集疑似犬细小病毒病的病犬粪便, 分离获得 9 株 CPV 病毒, 并对其 VP2 进行克隆及序列分析, 旨在为 CPV 的分子生物学特性及抗原差异研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 CPV 样品和细胞

病犬粪便收集于湖南长沙的宠物医院, 经胶体

收稿日期: 2012-02-27

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30972167)

作者简介: 肖博仁(1986—), 男, 苗族, 湖南邵阳人, 硕士, 主要从事病原分子生物学及免疫学研究, xiaoboren2008@yahoo.com.cn;

*通信作者, xlyu999@126.com

金快速诊断试纸条检测,结果显示为 CPV 阳性。

猫肾传代细胞(F81)由中国农业大学刘维全惠赠。

1.2 主要仪器与试剂

Taq DNA 聚合酶购自天根生化科技(北京)有限公司; dNTP 和 pMD18-T Simple vector 购自大连宝生物技术工程有限公司; 凝胶回收试剂盒购自爱思进生物技术(杭州)有限公司; 大肠杆菌 DH5 α 菌株感受态细胞由湖南农业大学动物医学分子免疫学与分子微生物学实验室保存; 其他常规试剂均为国产, 分析纯。

1.3 样品处理

从 CPV 阳性病犬粪便中随机取 10 份粪便, 每份取 0.1 g; 加 1 mL 无菌生理盐水, 用旋涡混合仪振荡 1 min 后, 以转速 5 000 r/min 离心 3 min, 取上清; 加入等量氯仿, 振荡 3 min 后, 以转速 5 000 r/min 离心 5 min, 无菌取上清, 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱贮存。

1.4 犬细小病毒的分离培养

用同步接种法, 将处理好的 10 份病毒悬液以 1 100、1 200、1 500、1 1 000 共 4 个梯度同步接种到猫肾细胞(F81), 同时设阴性对照(不加病料上清液), 以观察细胞病变。将接种 CPV 的 F81 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱静置培养 24 h 后, 将细胞生长液(含 6% 新生牛血清的 DMEM)换成细胞维持液(含 2% 新生牛血清的 DMEM), 12 h 观察 1 次细胞病变, 3 d 后细胞收毒, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.5 病毒鉴定

1.5.1 血凝试验

血凝试验参照文献[3]进行操作。

1.5.2 PCR 检测

参照 GenBank 犬细小病毒 VP2 基因的 DNA 序列, 设计 1 对特异性引物(上游引物 CPV-Fp: CCGGTGCAGGACAAGTAAAAAGAG; 下游引物 CPV-Rp: GGTGCACTATAACCAACCTC AGC), 扩增 VP2 基因的部分序列, 扩增目的片段长 1 059 bp。引物送上海生工生物工程技术有限公司合成。

将收毒细胞反复冻融 3 次后取 300 μL , 用蛋白酶 K-酚、氯仿抽提法提取 DNA 作模板^[11]。

PCR 扩增体系(50 μL): 10 \times Reaction Buffer 5 μL , dNTPs (2.5 mmol/L) 1 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μL , DNA 模板 2 μL , *Taq* DNA 聚合酶 1 μL , 双蒸水 39 μL 。反应参数: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s; 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min; 共 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。

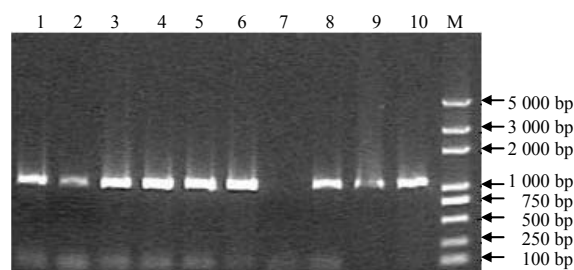
1.5.3 VP2 基因的序列分析

用 *Pfu* 酶和引物 CPV-Fp 和 CPV-Rp, 从 CPV 阳性样品中扩增出 VP2 基因的部分 DNA 序列, 连入 pMD18-T 载体中, 转化 DH5 α , 于深圳华大基因公司将菌落进行 PCR 鉴定及测序。将测得的 CPV 毒株的 VP2 部分核苷酸序列与 GenBank 中 CPV 参考株的 VP2 序列进行多重序列比对分析, 并将核苷酸序列推导成氨基酸序列, 进行同样的多重对比分析。

2 结果与分析

2.1 犬细小病毒的分离与鉴定结果

于 F81 接毒后 72 h 收毒, 连续传至 7 代, 未见明显的细胞病变; 对细胞毒液进行 PCR 检测, 有 9 份细胞培养物扩增出了预期大小的 DNA 片段, 其长为 1 059 bp(图 1)。10 份病毒培养物中, PCR 阳性的 9 份均能凝聚猪红细胞, 且血凝价均超过了 2⁷。通过 PCR 检测和血凝试验验证, 10 份送检病料中共分离到了 9 株 CPV, 将其依次命名为 HN-1、HN-2、HN-3、HN-4、HN-5、HN-6、HN-7、HN-8、HN-9, 其序列登录号依次为 JQ513211、JQ513212、JQ513213、JQ513214、JQ513215、JQ513216、JQ513217、JQ513218、JQ513219。



M DNA 相对分子质量标准物 DL5000; 1~10 分别为病毒培养物。

图 1 PCR 扩增结果

Fig.1 Detection of CPV from samples by PCR amplification

2.2 犬细小病毒 VP2 基因序列分析结果

将测定的 VP2 基因序列及其推导的氨基酸序列与已报道的 CPV 参考株进行比较分析,发现从长沙分离到的 CPV 毒株 VP2 基因序列与北京、新疆、长春、南京、广州和四川、中国台湾地区以及韩国、日本、意大利、巴西、美国、波兰等国分离的 CPV

毒株核苷酸序列的同源性很高(97%)。VP2 基因系统进化树(图 2)表明:本试验中分离到的 9 株犬细小病毒毒株有 2 个分支,其中有 7 株为 1 个分支,与北京毒株 EF011664 和新疆毒株 EU170352 的亲缘关系较近;另外 2 株为 1 个分支,与日本分离毒株 AB054221、AB054224 的亲缘关系较近。

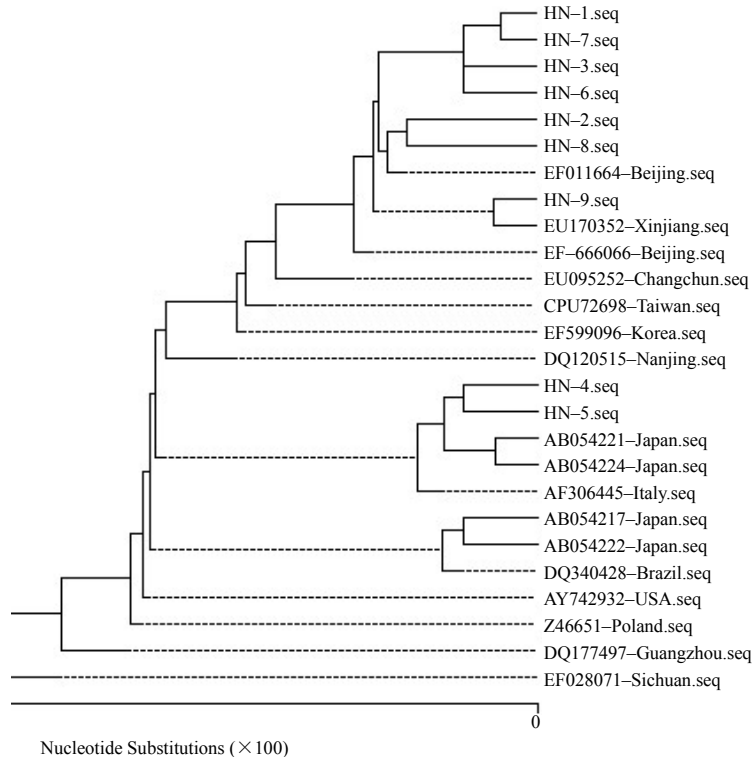


图 2 VP2 核苷酸序列系统进化树

Fig.2 Phylogenetic analysis of VP2 nucleotide sequences

2.3 犬细小病毒 VP2 基因推导氨基酸序列分析结果

氨基酸比对结果表明:由 9 株 CPV 毒株 VP2 基因推导的氨基酸序列与北京、新疆、长春、南京、广州和四川、中国台湾地区以及韩国、日本、意大利、巴西、美国、波兰等国分离的 CPV 毒株的同源性均超过 94%,且氨基酸的变异集中在 7 处,其中有 4 处为本次长沙分离株所特有,有 3 处为长沙分离株与其他毒株共有。长沙分离株特有的 4 处分别为:VP2 第 33 个氨基酸发生了 G→D 改变(HN-1 株);第 309 个氨基酸发生了 Q→H 改变(HN-3 株);第 223 个氨基酸发生了 T→N 改变(HN-3 株);第 39 个氨基酸发生了 G→R 改变(HN-8 株)。长沙分离株与其他毒株共有的 3 处为:VP2 第 267 个氨基酸发生了 Y→F 改变(HN-2、HN-8、HN-9 株);第

291 个氨基酸发生了 L→I 改变(HN-8 株);第 324 个氨基酸发生了 I→Y 改变(HN-4、HN-5 株)。

3 结论与讨论

CPV 可以用 F81、CrFK 和 MDCK 细胞分离培养^[3,12-13],其复制主要发生于宿主细胞的 S 期晚期和 G2 早期^[14]。本研究用 F81 细胞,通过同步接毒方式,从阳性的病犬粪便分离到 9 株犬细小病毒。分离的 CPV 在 F81 细胞上均不产生明显细胞病变。这与有关报道^[3-6]不符。此现象可能与毒株的不同有关。

长沙 9 个 CPV 毒株的 VP2 基因与北京、新疆、长春、南京、广州和四川、中国台湾地区以及韩国、日本、意大利、巴西、美国、波兰等国分离的分离毒株的核苷酸同源性均在 97%以上,推导的氨基酸

序列同源性在94%以上。系统进化树显示9个毒株处于不同的分支,说明长沙地区流行的CPV有一定的差异,这可能与犬群的流动及犬的免疫状况等有关。

本次发现的CPV毒株VP2氨基酸的7个变异中,2个长沙毒株特有的变异可能对CPV的抗原特性有影响:HN-3株VP2第309个氨基酸的变异(Q→H)位于VP2基因的N端及该基因蛋白转角结构的loop1和loop3区,这是VP2重要的B细胞抗原表位区,可诱导机体产生中和性抗体,此区域氨基酸残基的变化可导致CPV毒株产生抗原漂移^[15];HN-5株VP2第223个氨基酸残基发生的突变(T→N)与第VP2蛋白抗原位点A的关键氨基酸(第224个氨基酸)^[16]相邻。

对9个CPV长沙毒株的分离鉴定及测序分析表明,与其他毒株相比,长沙毒株有其独特的变异,且有独特变异的毒株在基因进化树上处于同一个分支。这是否就是长沙毒株的变异趋势,有待分离更多的病毒进行证实。

参考文献:

- [1] 蔡宝祥. 家畜传染病学[M]. 5版. 北京:中国农业出版社, 2006: 422-425.
- [2] 徐汉坤, 郭宝发, 金淮, 等. 血凝和血凝抑制试验在犬群爆发犬细小病毒肠炎中的应用[J]. 中国预防兽医学报, 1983(4): 43-45.
- [3] 刘静, 陈祥, 陆江, 等. 犬细小病毒TZ2[#]株的分离与鉴定[J]. 畜牧与兽医, 2010, 42(1): 58-60.
- [4] 赵世华, 宋爱军, 陈伟, 等. 犬细小病毒(CPV)内蒙古分离株的体外培养特性研究[J]. 畜牧与饲料科学, 2010, 31(9): 168-169.
- [5] 刘志强, 张小莺, 黄新, 等. 新疆石河子地区犬细小病毒的分离鉴定与基因型分析[J]. 中国兽医杂志, 2010, 46(8): 44-46.
- [6] 戈锐, 彭广能, 夏咸柱, 等. 犬细小病毒四川株的分离与鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(11): 836-839.
- [7] 金霞, 任一鸣, 张宇, 等. 河南省犬细小病毒病的流行病学调查及诊疗研究[J]. 养犬, 2010(1): 3-7.
- [8] Decaro N, Martella V, Desario C, et al. First detection of canine parvovirus type 2c in pups with haemorrhagic enteritis in Spain[J]. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, 2006, 53(10): 468-472.
- [9] Langeveld J P, Casal J I, Vela C, et al. B-cell epitopes of canine parvovirus distribution on the primary structure and exposure on the viral surface [J]. J Virol, 1993, 67(2): 765-772.
- [10] Strassheim M L, Gruenberg A, Veijalainen P, et al. Two dominant neutralizing antigenic determinants of canine parvovirus are found on the threefold spike of the virus capsid [J]. Virology, 1994, 198(1): 175-184.
- [11] 李晶, 余兴龙, 李润成, 等. 猪巨细胞病毒的PCR检测及其gB基因特征分析[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版, 2009, 35(5): 521-525.
- [12] 王洪林, 谭斌, 陈微晶, 等. 犬细小病毒BJ5株分离和VP2序列分析[J]. 特产研究, 2009(2): 8-11.
- [13] 郭伟, 商晓桂, 单同领, 等. 犬细小病毒上海分离株全基因的克隆及进化树分析[J]. 中国动物传染病学报, 2009, 17(3): 27-32.
- [14] Parrish C R, Oconnel P H, Evermann J F, et al. Natural variation of canine parvovirus[J]. Science, 1985, 230(4729): 1046-1048.
- [15] 董江丽, 李淑芬, 张鹤龄. 犬细小病毒中国内蒙株VP2基因克隆及序列分析[J]. 中国病毒学, 2000, 15(4): 379-381.
- [16] Parker J S, Parrish C R. Canine parvovirus host range is determined by the specific conformation of an additional region of the capsid[J]. J Virol, 1997, 71(12): 9214-9222.

责任编辑: 王赛群