

刘晶英, 李炜, 杨勃, 等. 1株犬冠状病毒山西株变异与遗传进化特征 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (4): 85-92.

LIU J Y, LI W, YANG B, et al. Gene variation and genetic evolution characteristics of a canine coronavirus strain in Shanxi Province [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (4): 85-92.

1株犬冠状病毒山西株变异与遗传进化特征

刘晶英¹, 李炜², 杨勃², 孙子龙², 张鼎^{2*}

(1. 山西医科大学基础医学院, 山西 太原 030001;

2. 山西农业大学动物医学学院, 山西 太谷 030801)

摘要: 旨在阐明分离自山西省的1株犬冠状病毒 (CCoV) 基因变异与遗传进化特征。将疑似 CCoV 感染犬粪便接种犬肾传代细胞系 (MDCK), 收毒后扩增 CCoV 山西株纤突蛋白 (S) 基因、膜蛋白 (M) 基因, 分别利用 DNASTAR、ESPrnt 3. x 和 MEGA-X 软件分析基因、氨基酸相似性以及遗传进化关系。结果: CCoV 山西株 S 基因与已公布参考序列的相似性为 88.6%~98.3%, M 基因相似性为 83.6%~96.3%; CCoV 山西株 S 蛋白、M 蛋白均存在部分氨基酸位点变异, 其中 S 蛋白主要为氨基酸点突变, M 蛋白第 10~40 位点呈现高频氨基酸突变区; 邻近法 (Neighbor-Joining) 构建遗传进化树结果显示, CCoV 山西株属于 CCoV II 型毒株, 与越南分离株 LC190907 处于同一分支。综上, S 基因、M 基因分析结果一致, 均表明该 CCoV 山西株属于 CCoV II 型毒株, 存在不同程度的核苷酸、氨基酸变异, 与越南分离株亲缘关系最近。本研究结果为山西省 CCoV 相关疾病的防控提供了重要的参考。

关键词: 犬冠状病毒; 纤突蛋白基因; 膜蛋白基因; 同源性; 遗传进化

中图分类号: S852.65 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2025)04-0085-08

Gene variation and genetic evolution characteristics of a canine coronavirus strain in Shanxi Province

LIU Jingying¹, LI Wei², YANG Bo², SUN Zilong², ZHANG Ding^{2*}

(1. School of Basic Medicine, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China;

2. College of Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: To elucidate the homology and genetic variation of a canine coronavirus (CCoV) strain in Shanxi Province, the present study amplified the S gene and the M gene of the CCoV Shanxi strain, analyzing the gene, amino acid homology and genetic evolution of the CCoV Shanxi strain using the DNASTAR, ESPrnt 3. x and MEGA-X softwares, respectively. The results showed that the S gene homology of the CCoV Shanxi strain with published reference sequences was 88.6%–98.3%, and its M gene homology was 83.6%–96.3%. The S protein and M protein of the CCoV Shanxi strain had partial amino acid site variation, among which the S protein was mainly amino acid point mutation, and the M protein showed a continuous amino acid mutation region at sites of 10 to 40. The genetic evolutionary tree constructed using the Neighbor-Joining method showed that the CCoV Shanxi strain belonged to the CCoV type II strain, which was in the same branch with that of the CCoV isolated in Vietnam (LC190907). In summary, The analysis results of the S gene and M gene were consistent, which indicated that the CCoV Shanxi strain belonged to CCoV type II strain, with different degrees of gene and amino acid variation, and was closely related to the strain isolated in Vietnam. The findings of the present study provided an important theoretical reference for the study of CCoV etiology and disease control in Shanxi Province.

Keywords: canine coronavirus; S gene; M gene; homology; genetic evolution

犬冠状病毒病是由犬冠状病毒 (canine coronavirus, CCoV) 引起的高度接触性传染病, 各年龄段犬均可发生^[1-2]。幼龄犬发生冠状病毒病症状最

为明显, 主要表现为呕吐、腹泻和脱水, 严重时可致死亡^[3]。犬冠状病毒病呈世界范围分布, 在我国一直广泛流行^[4-7]。流行病学调查显示, 四川省 117 只犬样本中 CCoV 阳性率高达 34.2%, 广东等省份 231 份犬粪便中 CCoV 感染率达 23.94%^[8-9]。CCoV 属于冠状病毒科、 α 冠状病毒属成员, 是一种单股 RNA 病毒, 全长 27~32 kb, 编码纤突蛋白 (S)、膜蛋白 (M)、包膜蛋白 (E) 和核衣壳蛋白 (N) 4 种结构

收稿日期: 2024-04-14; 修回日期: 2025-01-18

基金项目: 山西省回国留学人员科研资助项目 (2023-094)

第一作者: 刘晶英, 女, 硕士, 实验师

* 通信作者: 张鼎, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为环

境刺激与机体应激, E-mail: zdlucky2014@sina.com。

蛋白^[10]。S 蛋白携带 CCoV 主要的抗原决定簇，通过与宿主小肠细胞受体结合，介导病毒与细胞膜融合，在病毒入侵过程中发挥关键作用^[11-12]。M 蛋白是一种嵌入在 CCoV 包膜内的跨膜蛋白，参与病毒粒子组装和释放，具有 B 细胞和 T 细胞识别的抗原表位，可介导体液和细胞免疫^[13-14]。CCoV 可分为 I 和 II 两种不同的基因型，典型的 CCoV 参考毒株序列属于基因型 II^[15]。

近期研究发现，CCoV 可以与猫冠状病毒 (FCoV) 受体蛋白 APN 结合，提示 CCoV 存在跨物种传播的风险^[16]。此外研究发现，CCoV 可以与 FCoV 进行重组，形成能够感染人的新型重组病毒，该重组病毒已在马来西亚、海地等国的人群中被检出，表明 CCoV 在犬和人之间跨物种传播屏障已逐渐被打破^[17-18]。明确 CCoV 变异性和遗传进化特征对防治犬冠状病毒病和保障人类健康具有重要意义。因此，本试验通过分离 CCoV 山西株，分别扩增 CCoV 山西株 S 和 M 基因，明确 CCoV 山西株变异水平与遗传进化特征，为 CCoV 病原和疫苗研究提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 细胞和病料

犬肾传代细胞系 (MDCK) 为山西农业大学病原与宿主互作实验室保存；病料收集自临床宠物医院 20 只 3 月至 3 岁不同品种疑似 CCoV 感染犬的粪便，病犬临床症状表现为精神不振、呕吐、持续腹泻，排暗褐色粥样或水样粪便。

1.2 主要试剂

病毒基因组 RNA 提取试剂盒，购自天根生化科技 (北京) 有限公司；cDNA 反转录试剂盒，购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司；DMEM 培养基，购自赛默飞世尔科技公司；胎牛血清，购自上海逍鹏生物科技有限公司；胰蛋白酶，购自赛维尔生物科技有限公司；Premix *Ex Taq*、RT Reagent Kit 和 DNA Marker，购自宝生物工程 (大连) 有限公司；PCR 产物回收试剂盒，购自杭州昊鑫生物公司；琼脂糖和中性红指示剂，购自北京索莱宝生物科技有限公司。

1.3 主要仪器

PCR 仪，购自北京兰杰柯科技有限公司；低温离心机、-80 °C 超低温冰箱，购自海尔生物医疗有限公司；CO₂ 培养箱，购自力康医疗器械有限公司；核酸电泳槽和电泳仪，购自北京龙方科技有限公司；倒

置生物显微镜，购自中显光电有限公司；UVP 凝胶成像系统，购自美国思博明公司；生物安全柜，购自上海博讯医疗生物仪器股份有限公司。

1.4 细胞培养

将 MDCK 细胞冻存管从 -80 °C 冰箱迅速转入 37 °C 水浴锅，水浴的同时不停摇动，待冻存液全部化开后将细胞转移到 15 mL 离心管，1 000 r/min 离心 5 min。弃去上清液，加入 2 mL 提前预热的含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基重悬。将细胞悬液转移至 T25 瓶并将培养基补至 5 mL，置于 37 °C 含 5% CO₂ 的恒温培养箱中培养。

1.5 病毒分离

取疑似 CCoV 感染犬粪便，病毒基因组 RNA 提取试剂盒提取粪便中总 RNA，反转录为 cDNA。设计 CCoV S 基因鉴定引物，F: 5' - CTAAGTCATTA-ATTTCACCAGTC - 3'; R: 5' - ATTCTGTGGTAATGG-TACACATT-3'，对病料进行初步鉴定，PCR 产物长度 417 bp。取阳性病料进行病毒分离和扩增。将 CCoV 感染犬粪使用 PBS 稀释，吸取上清液用 0.45 μm 滤器过滤。取生长至单层的 MDCK 细胞，弃去培养基，用 PBS 润洗细胞 3 次。向细胞培养瓶中加入 200 μL 过滤原液和 2 mL 无血清 DMEM 培养基，37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 2 h，其间每 30 min 晃动细胞培养瓶 1 次。弃去培养基，添加含 2% 胎牛血清的 DMEM 培养基继续培养，设立正常细胞作为对照，培养 2~3 d，每 12 h 观察细胞病变 (CPE)。待细胞出现 80% CPE 时反复冻融细胞 3 次，5 000 r/min 离心 10 min，取上清液于 -80 °C 冻存备用。

1.6 PCR 扩增

用病毒基因组 RNA 提取试剂盒从分离扩增得到的病毒悬液中提取病毒 RNA，反转录试剂盒合成 cDNA。分别设计 CCoV S 基因、M 基因特异性引物进行 PCR 扩增，引物序列见表 1。PCR 扩增程序为：95 °C 预变性 5 min；95 °C 变性 1 min，56 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 1 min，35 个循环。反应结束后，用 1.5% 琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行电泳检测。DNA 回收试剂盒回收 PCR 产物，将 PCR 产物连接到 pEASY-T3 载体，转化入 DH5α 感受态细胞。用氨苄青霉素 (Amp) 抗性的 LB 培养板筛选阳性细胞，扩大培养后提取重组质粒进行基因测序，测序交由上海美吉生物医药科技公司完成。

表1 引物序列

基因	引物序列 (5'→3')	产物大小/bp	退火温度/℃
S	F: TGCATTTGTGCTCAGACTT	694	56
	R: CCAAGGCCATTTTACATAAG		
M	F: CCTTGTGTTGAACTAAACAAAATGAAG	836	56
	R: TCCCTGAGAGGCCATTTAGA		

1.7 同源性分析

利用 DNASTAR Lasergene 软件分别将 CCoV 山西株 S 基因、M 基因序列与 GenBank 数据库中参考株靶基因序列进行比对, 分析 S 基因、M 基因核苷酸序列同源性。利用 ESPript 3. x 在线软件分析 CCoV 山西株 S 蛋白、M 蛋白与参考株蛋白氨基酸序列的差异。

1.8 遗传进化关系分析

分别将 CCoV 山西株 S 基因、M 基因序列及参考株靶基因序列整理为 fasta 文本导入 MEGA-X 软件, 用软件 MUSCLE 程序对齐基因序列, 采用邻近法 (Neighbor-Joining) 构建 CCoV 遗传进化树, CCoV 参考毒株信息见表 2。

表2 CCoV 参考毒株信息

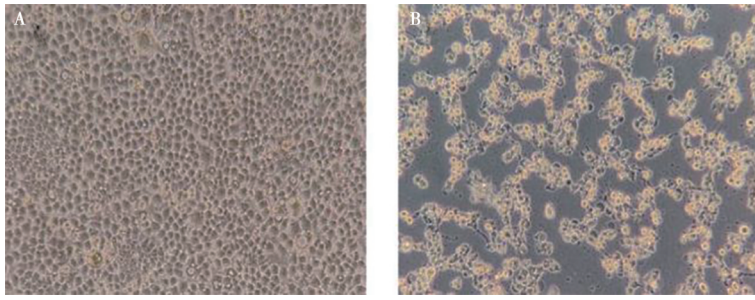
序号	毒株	GenBank 登录号	分离年代	分离地点
1	HLJ-071	KY063616	2016	中国
2	HLJ-072	KY063617	2016	中国
3	B020	MT114551	2018	中国
4	B135	MT114544	2019	中国
5	B203	MT114542	2020	中国
6	NTU336-F	GQ477367	2008	中国
7	K378	KC175340	1978	美国
8	S378	KC175341	1978	美国
9	TN-449	JQ404410	2012	美国
10	A76	JN856008	2011	美国
11	430-07	EU924790	2007	意大利
12	341-05	EU856361	2005	意大利
13	23-03	KP849472	2003	意大利
14	Elmo-02	AY307020	2003	意大利
15	HCM47	LC190907	2015	越南
16	fc1	AB781790	2013	日本
17	1-71	JQ404409	2012	希腊
18	68-09	HQ450377	2009	希腊
19	BGF10	AY342160	2003	英国
20	171	KC175339	2014	德国

2 结果

2.1 CCoV 山西株的分离与鉴定

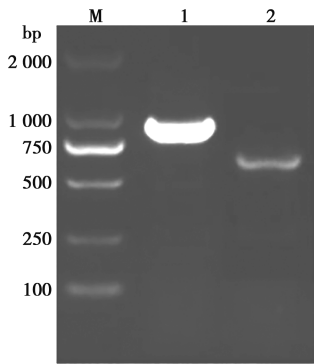
MDCK 细胞大小均一, 细胞紧密排列 (图 1A); 接种 CCoV 病料处理液 48 h 后细胞出现明显的 CPE, 其特征为细胞聚团、折光性增强、细胞变圆和脱落、

细胞轮廓不清晰 (图 1B)。PCR 扩增 S 基因、M 基因均出现单一、清晰条带, 其中 M 基因 PCR 产物长度为 836 bp, S 基因 PCR 产物长度为 694 bp (图 2), 表明试验成功分离到 CCoV 山西株, 命名为 SX-2021-01。



A. 对照组; B. 病料处理组。

图 1 细胞病变观察 (100×)



M. Marker; 1. M 基因; 2. S 基因。

图 2 CCoV 山西株 M、S 基因 PCR 扩增

2.2 CCoV 山西株的 S 基因同源性

SX-2021-01 株 S 基因与已公布的 CCoV I 型参考毒株 23-03、Elmo-02 相似性分别为 54.6% 和

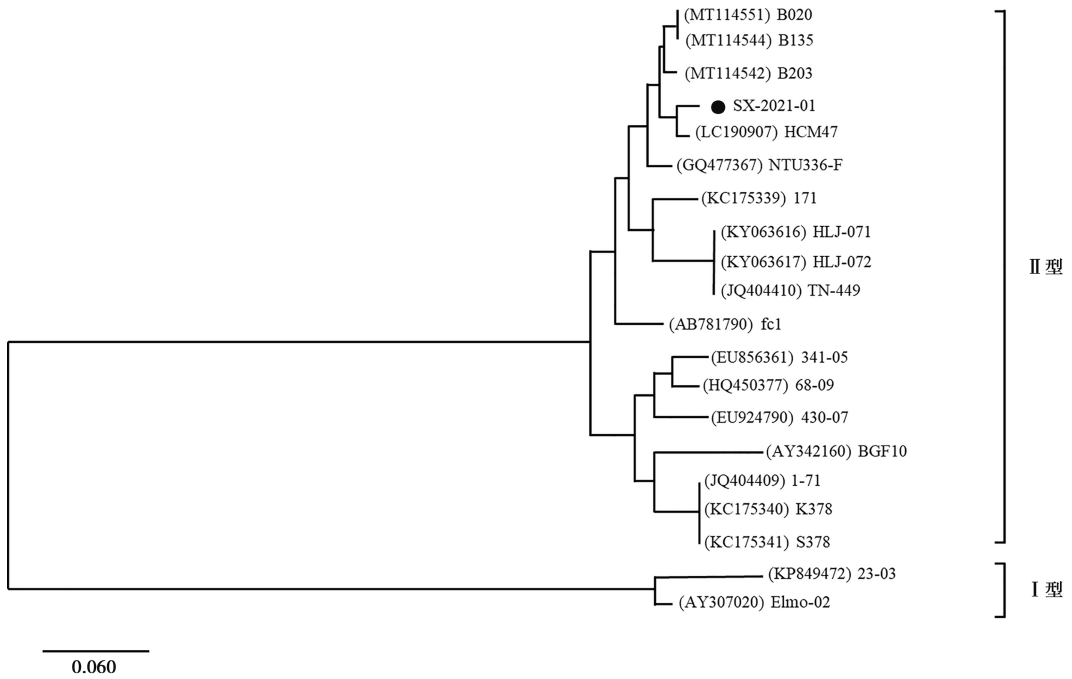
54.9%。SX-2021-01 株与 CCoV II 型参考毒株 S 基因相似性为 88.6% ~ 98.3%，其中与英国分离株 (BGF10) 相似性为 88.6%，与越南分离株 (HCM47) 相似性为 98.3%，与我国广东等地方分离株 (B020、B135 和 B203) 相似性为 97.3% (图 3)。以上结果表明 SX-2021-01 株与 CCoV II 型参考毒株高度同源，与越南分离株相似性最高。

2.3 CCoV 山西株 S 基因遗传进化特征

S 基因遗传进化分析结果显示，CCoV I 型参考毒株与 II 型参考毒株分属两个大的分支，SX-2021-01 株与 CCoV II 型毒株处于同一分支。SX-2021-01 株与我国分离毒株 MT114551 B020、MT114544 B135 和 MT114542 B203 亲缘关系较近，与越南分离株 (LC190907) 处于同一小的分支 (图 4)。以上结果表明 SX-2021-01 株属于 CCoV II 型毒株，与越南分离株遗传关系最近。

		Percent Identity																					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
Divergence	1	■	93.6	93.6	94.8	90.9	90.8	90.3	95.0	97.3	97.3	88.6	98.3	96.4	91.8	91.8	93.5	97.3	94.7	54.6	54.9	1	SX-2021-01
	2	6.7	■	100.0	95.3	92.7	92.7	92.4	96.4	94.2	94.2	89.5	93.3	94.2	93.2	93.2	99.8	93.9	93.5	53.7	54.4	2	HLJ-071
	3	6.7	0.0	■	95.3	92.7	92.7	92.4	96.4	94.2	94.2	89.5	93.3	94.2	93.2	93.2	99.8	93.9	93.5	53.7	54.4	3	HLJ-072
	4	5.4	4.9	4.9	■	92.0	91.7	91.2	96.2	95.5	95.5	90.0	94.4	95.0	92.7	92.7	95.2	94.8	93.3	54.6	54.6	4	1-71
	5	9.5	7.6	7.6	8.5	■	94.5	96.1	93.9	90.6	90.6	92.0	90.5	91.2	92.9	92.9	92.6	91.2	92.9	54.6	55.8	5	430-07
	6	9.7	7.6	7.6	8.8	5.7	■	97.0	93.2	91.4	91.4	91.2	90.9	91.5	93.9	93.9	92.6	91.1	93.2	55.4	56.9	6	68-09
	7	10.3	7.9	7.9	9.4	4.1	3.1	■	92.4	90.6	90.6	92.9	90.5	90.9	94.7	94.7	92.3	90.9	92.6	54.7	55.7	7	341-05
	8	5.2	3.8	3.8	3.9	6.2	7.1	8.0	■	95.6	95.6	90.0	95.5	95.6	93.2	93.2	96.2	95.9	94.4	54.4	55.2	8	A76
	9	2.8	6.1	6.1	4.7	9.9	9.2	9.9	4.6	■	100.0	88.5	97.9	97.1	91.7	91.7	94.1	98.5	95.5	54.6	55.0	9	B020
	10	2.8	6.1	6.1	4.7	9.9	9.2	9.9	4.6	0.0	■	88.5	97.9	97.1	91.7	91.7	94.1	98.5	95.5	54.6	55.0	10	B135
	11	11.8	10.9	10.9	10.2	7.9	9.1	7.2	10.2	11.8	11.8	■	87.9	89.1	93.3	93.3	89.4	88.3	89.7	54.7	55.7	11	BGF10
	12	1.7	6.9	6.9	5.9	10.1	9.5	10.1	4.7	2.2	2.2	12.6	■	97.0	91.4	91.4	93.2	97.9	95.2	54.0	54.3	12	HCM47
	13	3.8	6.1	6.1	5.2	9.2	9.0	9.5	4.6	3.0	3.0	11.3	3.0	■	92.0	92.0	94.1	97.4	95.0	55.5	55.4	13	NTU336-F
	14	8.5	7.3	7.3	7.8	7.4	6.4	5.6	7.3	8.8	8.8	6.9	9.0	8.5	■	100.0	93.0	91.4	91.8	53.7	55.0	14	K378
	15	8.5	7.3	7.3	7.8	7.4	6.4	5.6	7.3	8.8	8.8	6.9	9.0	8.5	0.0	■	93.0	91.4	91.8	53.7	55.0	15	S378
	16	6.9	0.2	0.2	5.1	7.8	7.8	8.1	3.9	6.2	6.2	11.1	7.1	6.2	7.4	7.4	■	93.8	93.3	53.7	54.4	16	TN-449
	17	2.8	6.4	6.4	5.4	9.2	9.3	9.5	4.2	1.5	1.5	12.0	2.2	2.6	9.2	9.2	6.6	■	95.6	54.7	55.2	17	B203
	18	5.4	6.7	6.7	6.9	7.4	7.3	7.7	5.7	4.6	4.6	10.6	4.9	5.1	8.7	8.7	6.9	4.4	■	54.7	55.7	18	fc1
	19	46.4	48.9	48.9	46.7	47.3	46.0	46.9	47.7	46.1	46.1	47.3	47.1	44.2	48.2	48.2	49.2	45.7	46.1	■	94.5	19	23-03
	20	44.9	46.7	46.7	46.5	44.5	43.1	44.8	45.6	44.3	44.3	45.1	45.2	43.7	45.4	45.4	47.0	44.0	44.0	5.6	■	20	Elmo-02

图 3 CCoV 山西株的 S 基因同源性分析



注：●为本试验分离株，下同。

图4 CCov 山西株的 S 基因遗传进化树

2.4 CCov 山西株 S 蛋白氨基酸变异性

氨基酸序列分析显示，CCov I 型参考毒株与 II 型参考毒株 S 蛋白氨基酸序列存在显著的差异性，

SX-2021-01 株与 CCov II 型毒株 S 蛋白氨基酸序列高度同源，与参考株氨基酸序列存在部分氨基酸差异位点（图 5）。

毒株	位点/aa											
	1 220	1 224	1 246	1 280	1 281	1 303	1 325	1 331	1 334	1 351	1 365	1 369
SX-2021-01	V	S	D	A	A	I	R	A	L	D	E	I
B020	I	T	D	A	A	I	R	V	L	D	E	I
B135	I	T	D	A	A	I	R	V	L	D	E	I
B203	I	S	D	A	A	I	R	A	L	D	E	I
HCM47	V	S	D	A	A	I	R	A	L	D	E	I
NTU336-F	I	S	D	A	A	I	R	V	L	D	E	I
171	I	T	D	V	A	I	R	V	F	D	E	I
HLJ-071	I	T	D	V	A	I	R	V	L	D	E	I
HLJ-072	I	T	D	V	A	I	R	V	L	D	E	I
TN-449	I	T	D	V	V	I	R	V	L	D	E	I
fc1	I	S	D	A	A	I	R	V	L	D	E	I
341-05	I	T	D	V	A	I	R	V	L	N	E	V
68-09	I	T	Y	V	A	I	R	V	L	N	E	V
430-07	I	T	D	V	A	I	R	V	L	D	E	I
BGF10	I	T	N	V	A	I	R	V	L	N	E	T
1-71	I	T	D	V	A	I	R	V	L	N	E	I
K378	I	T	D	V	A	I	R	V	L	N	E	I
S378	I	T	D	V	A	I	R	V	L	N	E	I
23-03	L	T	-	K	P	T	S	I	F	D	N	E
Elmo-02	L	T	-	K	P	T	S	I	F	D	N	E

图5 CCov 山西株与参考毒株 S 蛋白氨基酸差异位点

2.5 CCoV 山西株的 M 基因同源性

SX-2021-01 株 M 基因与已公布的 CCoV I 型参考毒株 (KP84947223-03) 相似性为 83.6%, 与 CCoV II 型参考毒株相似性为 88.3%~96.3%。SX-2021-01 株与我国黑龙江分离株 (HLJ-071、HLJ-072) 相似性为 88.3%, 与我国广东等地方分离株

B135、B203 相似性分别为 95.9% 和 96.2%, 与越南分离株 HCM47 相似性为 96.3% (图 6)。以上结果表明 SX-2021-01 株 M 基因与 CCoV II 型参考毒株高度同源, 存在一定的基因变异, 与越南分离株相似性最高。

		Percent Identity																			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18		
Divergence	1	■	88.3	88.3	88.1	88.0	88.3	87.9	87.9	95.9	96.2	85.3	96.3	93.5	88.7	88.1	88.1	88.3	83.6	1	SX-2021-01
	2	8.7	■	97.6	90.2	90.9	90.0	90.0	91.7	89.1	88.7	86.2	88.5	89.4	90.8	90.2	90.2	97.6	83.0	2	HLJ-071
	3	8.7	0.0	■	90.2	90.9	90.0	90.0	91.7	89.1	88.7	86.2	88.5	89.4	90.8	90.2	90.2	97.6	83.0	3	HLJ-072
	4	8.8	6.4	6.4	■	90.9	94.1	94.2	90.6	88.7	88.8	87.7	88.4	89.5	93.6	97.2	97.2	90.2	83.6	4	1-71
	5	8.4	5.5	5.5	5.1	■	92.2	92.3	92.0	88.4	88.3	87.6	88.0	90.2	89.7	90.9	90.9	90.9	83.5	5	341-05
	6	8.6	6.6	6.6	3.3	3.5	■	96.4	89.9	87.9	88.4	88.1	87.8	90.2	93.5	94.1	94.1	90.0	83.0	6	430-07
	7	8.8	6.4	6.4	3.2	3.2	0.8	■	89.9	87.8	88.3	88.0	87.7	89.9	93.6	94.2	94.2	90.0	82.9	7	68-09
	8	9.0	5.1	5.1	5.9	4.7	6.8	6.6	■	88.5	88.7	86.3	88.6	89.2	90.7	90.6	90.6	91.7	83.7	8	A76
	9	1.6	8.0	8.0	8.2	8.0	8.8	8.7	8.4	■	96.4	85.5	96.0	94.3	89.3	88.7	88.7	89.1	83.1	9	B135
	10	1.3	8.0	8.0	8.1	7.8	8.5	8.4	8.0	1.0	■	85.3	97.0	94.0	89.0	88.8	88.8	88.7	83.3	10	B203
	11	11.3	10.5	10.5	9.1	9.3	8.5	8.7	10.3	11.1	11.3	■	85.1	85.8	87.2	87.7	87.7	86.2	83.8	11	BGF10
	12	1.2	8.4	8.4	8.5	8.2	8.9	8.8	8.1	1.3	0.6	11.6	■	93.8	89.0	88.4	88.4	88.5	83.4	12	HCM47
	13	4.2	7.6	7.6	7.3	6.0	6.2	6.4	7.6	3.3	3.5	10.7	3.7	■	90.0	89.5	89.5	89.4	83.0	13	NTU336-F
	14	8.2	5.6	5.6	3.7	6.4	3.8	3.7	5.8	7.7	7.8	9.5	8.0	6.9	■	93.6	93.6	90.8	84.1	14	fc1
	15	8.8	6.4	6.4	0.0	5.1	3.3	3.2	5.9	8.2	8.1	9.1	8.5	7.3	3.7	■	97.2	90.2	83.6	15	K378
	16	8.8	6.4	6.4	0.0	5.1	3.3	3.2	5.9	8.2	8.1	9.1	8.5	7.3	3.7	0.0	■	90.2	83.6	16	S378
	17	8.7	0.0	0.0	6.4	5.5	6.6	6.4	5.1	8.0	8.0	10.5	8.4	7.6	5.6	6.4	6.4	■	83.0	17	TN-449
	18	13.8	12.8	12.8	13.0	12.6	13.6	13.7	12.5	14.2	14.1	12.4	14.1	14.3	12.6	13.0	13.0	12.8	■	18	23-03
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18			

图 6 CCoV 山西株的 M 基因同源性分析

2.6 CCoV 山西株的 M 基因遗传进化特征

M 基因遗传进化分析结果显示, CCoV I 型参考毒株与 II 型参考毒株分属两个大的分支, SX-2021-01 株与 CCoV II 型毒株处于同一分支。SX-2021-01 株与我国分离毒株 MT114544 B135 和 MT114542 B203

亲缘关系较近, 与越南分离株 (LC190907) 处于同一小的分支 (图 7)。以上结果表明, 与 S 基因分析结果一致, SX-2021-01 株属于 CCoV II 型毒株, 与越南分离株遗传关系最近。

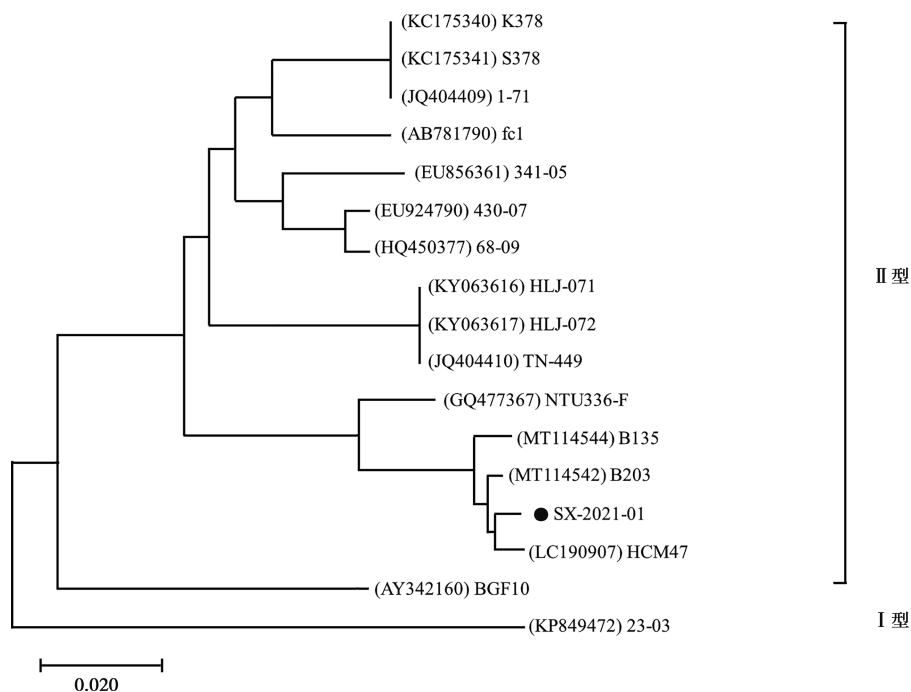


图 7 CCoV 山西株的 M 基因遗传进化树

2.6 CCoV 山西株的 M 蛋白氨基酸变异性

氨基酸序列分析显示, CCoV I 型参考毒株与 II 型参考毒株 M 蛋白氨基酸序列具有较高的相似性,

存在部分位点的氨基酸差异; 不同参考毒株 M 蛋白氨基酸突变位点主要集中在第 10~40 位氨基酸 (图 8)。

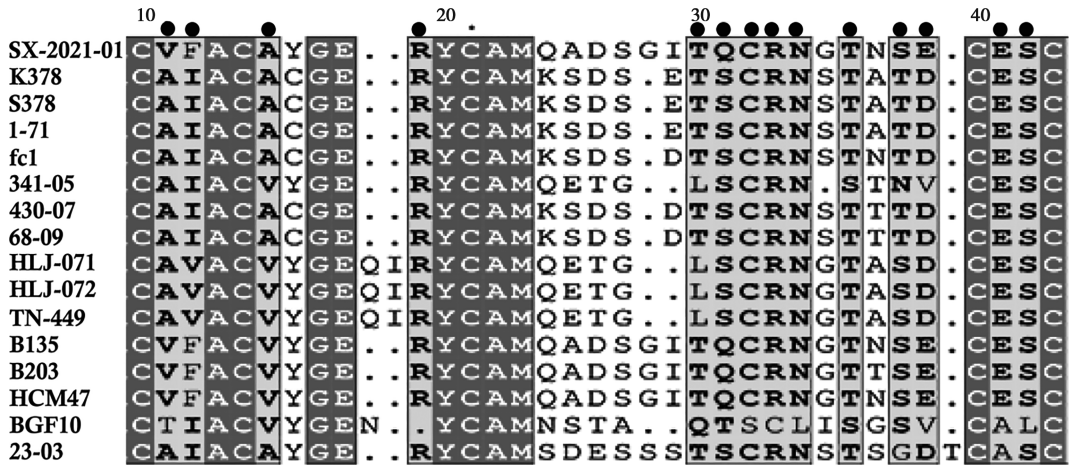


图 8 CCoV 山西株与参考毒株 M 蛋白氨基酸差异位点

3 讨论

作为一种 RNA 病毒, 冠状病毒具有较高的变异风险^[19]。冠状病毒不仅威胁动物健康, 由于其跨物种传播的风险, 对公共卫生安全也带来巨大挑战。重组 CCoV 感染人的出现表明 CCoV 传播已给人类健康构成严重威胁^[17-18]。S 蛋白是冠状病毒的主要结构蛋白, 介导病毒入侵和诱导宿主中和抗体的产生, 阐明 S 基因变异情况, 对揭示冠状病毒的致病机理和疫苗研究至关重要^[20-21]。本试验基于 S 和 M 基因揭示了 CCoV 山西株变异性和遗传发育特征。CCoV 山西株与已公布参考毒株 S 基因相似性为 88.6%~98.3%, 与近年来我国其他地区报道结果相似, 如广东等 5 省分离的 16 株 CCoV S 基因与参考毒株相似性为 87.94%~88.53%^[22], 江苏省分离的 2 株 CCoV 与参考株相比 S 蛋白相似性为 83.1%~95.2%^[23]。

M 蛋白也是 CCoV 的重要结构蛋白, 参与病毒粒子组装和释放, 同时介导机体体液和细胞免疫, 其序列同样常被用于 CCoV 变异分析。CCoV 山西株 M 基因与参考毒株 M 基因相似性为 83.6%~96.3%, 基因、氨基酸存在一定程度的变异。韩国 CCoV 分离株 M 基因与参考毒株相似性为 87.7%~97.8%^[24], 希腊分离株 M 基因与参考毒株相似性为 94.6%^[25]。在我国, CCoV 成都分离株 M 基因与参考毒株相似性为 78.7%~99.7%^[8], 华北地区 CCoV M 基因与参考毒株氨基酸同源性为 97.7%~99.6%^[26], 江苏省 CCoV 分离株 M 基因与参考毒株相似性为 88.5%~99.2%^[23]。本试验 S 基因、M 基因遗传进化关系分析均表明 CCoV 山西株属于 CCoV II 型毒株, 与我国

部分地区分离株处于同一分支, 与越南分离株亲缘关系最近, 具有共同的祖先。Gan 等^[23]基于 M 基因、N 基因分析 CCoV 江苏株遗传进化关系, 同样显示分离株与台湾、越南参考株具有高度的亲缘关系, 提示犬冠状病毒病防控需要密切关注 CCoV 外源性输入的风险。

综上, 本试验从患犬中分离到 1 株 CCoV 山西株, 基于 S、M 双基因分析显示该山西株属于 CCoV II 型毒株, 存在一定程度的基因变异, 与越南分离株亲缘关系最近。研究结果为 CCoV 病原及疫苗研究提供了重要的参考。

参考文献:

- [1] 刘可欣, 谭斌, 张傲, 等. 犬冠状病毒 II 毒株的分离鉴定及其基因的遗传进化分析 [J]. 中国动物传染病学报, 2024, 32 (4): 104-110.
- [2] 王静, 秦彤, 由欣月, 等. 北京地区犬冠状病毒的分离鉴定及遗传进化分析 [J]. 中国兽医科学, 2019, 49 (1): 92-98.
- [3] DONG B, ZHANG X D, BAI J Y, et al. Epidemiological investigation of canine coronavirus infection in Chinese domestic dogs: a systematic review and data synthesis [J]. Prev Vet Med, 2022, 209: 105792.
- [4] SOMA T, OHINATA T, ISHII H, et al. Detection and genotyping of canine coronavirus RNA in diarrheic dogs in Japan [J]. Res Vet Sci, 2011, 90 (2): 205-207.
- [5] NTAFAIS V, MARI V, DECARO N, et al. Canine coronavirus, Greece. Molecular analysis and genetic diversity characterization [J]. Infect Genet Evol, 2013, 16: 129-136.
- [6] 李毅恒, 刘凤军, 张玉玲, 等. 泛嗜性犬冠状病毒的研究进展 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017, 293 (11): 64-67.

- [7] LU S, ZHANG D, ZHOU J, et al. Prevalence and phylogenetic characterization of canine coronavirus from diseased pet dogs in Beijing, China [J]. *Sci China Life Sci*, 2016, 59 (8): 860–862.
- [8] WU S S, HE X, ZHANG B C, et al. Molecular epidemiology and genetic diversity of canine coronavirus from domestic dogs in Chengdu, China from 2020 to 2021 using a multiplex RT-PCR [J]. *Infect Genet Evol*, 2023, 112: 1–10.
- [9] HE H J, ZHANG W, LIANG J, et al. Etiology and genetic evolution of canine coronavirus circulating in five provinces of China, during 2018–2019 [J]. *Microb Pathog*, 2020, 145: 104209.
- [10] BUONAVOGLIA A, PELLEGRINI F, DECARO N, et al. A one health perspective on canine coronavirus: a wolf in sheep's clothing? [J]. *Microorganisms*, 2023, 11 (4): 921.
- [11] HAO Y F, LI S H, ZHANG G Z, et al. Establishment of an indirect ELISA - based method involving the use of a multiepitope recombinant S protein to detect antibodies against canine coronavirus [J]. *Arch Virol*, 2021, 166 (7): 1877–1883.
- [12] 廖锦浩, 张奕婷, 祝欣欣, 等. 冠状病毒刺突蛋白变形介导细胞感染并可发生多种变异 [J]. *生理科学进展*, 2023, 54 (6): 551.
- [13] 吕海峰. 犬冠状病毒 M 蛋白单克隆抗体的制备及其在胶体金检测试纸条上的应用 [D]. 扬州: 扬州大学, 2022.
- [14] 田晓彦, 吕海峰, 熊文斌, 等. 犬冠状病毒 JS1706 株 M 基因分子特性与真核表达 [J]. *畜牧与兽医*, 2020, 52 (4): 86–90.
- [15] TIMURKAN M O, AYDIN H, DINCER E, et al. Molecular characterization of canine coronaviruses; an enteric and pantropic approach [J]. *Arch Virol*, 2021, 166 (1): 35–42.
- [16] ZHANG G, LI B, YOO D, et al. Animal coronaviruses and SARS-CoV-2 [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2021, 68: 1097–1110.
- [17] LEDNICKY J A, TAGLIAMONTE M S, WHITE S K, et al. Isolation of a novel recombinant canine coronavirus from a visitor to Haiti; further evidence of transmission of coronaviruses of zoonotic origin to humans [J]. *Clin Infect Dis*, 2022, 75 (1): e1184–e1187.
- [18] VLASOVA A N, DIAZ A, DAMTIE D, et al. Novel canine coronavirus isolated from a hospitalized patient with pneumonia in East Malaysia [J]. *Clin Infect Dis*, 2022, 74: 446–454.
- [19] SU S, WONG G, SHI W, et al. Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses [J]. *Trends Microbiol*, 2016, 24 (6): 490–502.
- [20] 李亚飞, 罗春雨, 石哲芳, 等. 新型冠状病毒 Omicron 变异株密码子偏爱性及其进化分析 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2022, 38 (7): 559–565.
- [21] 黄昭阳, 张炎华, 朱颖, 等. 应用于抗体中和试验的假型化新型冠状病毒的构建 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2023, 39 (9): 857–864.
- [22] HE H J, ZHANG W, LIANG J, et al. Etiology and genetic evolution of canine coronavirus circulating in five provinces of China, during 2018–2019 [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 145: 104209.
- [23] GAN J, TANG Y, LV H, et al. Identification and phylogenetic analysis of two canine coronavirus strains [J]. *Animal Diseases*, 2021, 1 (1): 10–18.
- [24] JEOUNG S Y, ANN S Y, KIM H T, et al. M gene analysis of canine coronavirus strains detected in Korea [J]. *J Vet Sci*, 2014, 15 (4): 495–502.
- [25] NTAFFIS V, MARI V, DECARO N, et al. Isolation, tissue distribution and molecular characterization of two recombinant canine coronavirus strains [J]. *Vet Microbiol*, 2011, 151 (3/4): 238–244.
- [26] MA G, WANG Y, LU C, et al. Molecular characterization of the 9.36 kb C-terminal region of canine coronavirus 1-71 strain [J]. *Virus Genes*, 2008, 36 (3): 491–497.