



疾病诊断与防控 Disease Diagnosis, Treatment and Prevention

大熊猫源猫泛白细胞减少症病毒
VP2基因的测序及遗传进化分析李家奇^{1,2}, 张羽^{2,3}, 丛海洋^{1,2}, 祖萱¹,
李元果², 王铁成^{2,3}, 冯娜^{1,2,3*}, 夏咸柱²

(1. 吉林农业大学动物医学院, 长春 130118;

2. 中国农业科学院长春兽医研究所, 病原微生物生物安全全国重点实验室, 吉林省人兽共患病预防控制重点实验室, 长春 130122;

3. 山东师范大学生命科学学院, 济南 250358)

稿件运行过程

收稿日期: 2025-06-23

修回日期: 2025-08-20



摘要

关键词: 猫泛白细胞减少症病毒;
VP2基因;
遗传进化分析;
大熊猫;
A91S突变;
分子流行病学

Keywords: Feline panleukopenia virus;
VP2 gene;
Genetic evolutionary analysis;
Giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*);
A91S mutation;
Molecular epidemiology

中图分类号: S855.3; Q78

文献标志码: A

文章编号:

2310-1490(2026)-01-0048-07

DOI: 10.12375/ysdwx.202506018

为探究大熊猫源猫泛白细胞减少症病毒(Feline panleukopenia virus, FPV)流行毒株的分子流行特征,本研究对一例腹泻大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)粪便样本进行检测。通过PCR成功扩增并测定了FPV VP2基因全长序列(命名为Giant panda/AB/2025)。遗传进化分析显示,该毒株属于FPV G1基因型,与FPV参考毒株核苷酸同源率为99.2%~99.9%,与研究团队2018年分离的大熊猫源FPV株同源率可达99.4%。关键氨基酸位点分析发现,决定宿主特异性的位点(80、93、103、323、564和568)均与典型FPV一致,但其91位氨基酸由A突变为S(A91S)。蛋白3D结构模型预测显示,A91S突变导致VP2蛋白表面Loop区局部构象改变。结果表明,我国部分地区的大熊猫种群中已存在携带A91S突变的FPV变异株感染,需加强持续监测。本研究结果为大熊猫FPV的流行病学和疫苗研发提供了数据参考。

基金项目: 国家重点研发计划项目(2023YFF1305400)

第一作者简介: 李家奇(2000—),女,硕士研究生;主要从事分子病毒学研究。E-mail: 1469672677@qq.com

*通信作者: 冯娜, E-mail: fengna0308@126.com

Sequencing and Genetic Evolution Analysis of VP2 Gene of Feline panleukopenia virus in Giant Panda

LI Jiaqi^{1,2}, ZHANG Yu^{2,3}, CONG Haiyang^{1,2}, ZU Xuan¹,
LI Yuanguo², WANG Tiecheng^{2,3}, FENG Na^{1,2,3*}, XIA Xianzhu²

(1. College of Veterinary Medicine, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2. Changchun Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Key Laboratory of Jilin Province for Zoonosis Prevention and Control, Changchun 130122, China;

3. College of Life Sciences, Shandong Normal University, Jinan 250358, China)

Abstract: To investigate the molecular epidemiological characteristics of Feline panleukopenia virus (FPV) strains prevalent in giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*), the faecal samples were detected from a diarrhoeic giant panda. The full-length sequence of the FPV VP2 (Viral capsid protein, VP) gene was successfully amplified and determined by PCR (designated Giant panda/AB/2025). Genetic evolutionary analysis indicated this strain belonged to the FPV G1 genotype, and nucleotide homology was 99.2%–99.9% with the FPV reference strain, and homology 99.4% with the giant panda-derived FPV strain isolated in 2018. Analysis of key amino acid sites revealed that the determining host specificity sites (80, 93, 103, 323, 564, and 568) all corresponded to those of the typical FPV, except for an A91S mutation at position 91. Prediction of the protein 3D structural model indicated that the A91S mutation induced a local conformational alteration in the surface Loop region of the VP2 protein. Results showed that infection with the FPV variant carrying the A91S mutation were already present within some areas of giant panda populations in China, and continuous surveillance should be strengthened. The findings of this study provide data reference for the epidemiology and vaccine development of FPV in giant pandas.

猫泛白细胞减少症病毒(Feline panleukopenia virus, FPV)又称猫瘟热病毒、猫传染性肠炎病毒或猫细小病毒,是引起猫科(Felidae)动物猫泛白细胞减少症(feline panleukopenia)的主要病原体。该病临床特征为高热、呕吐、严重白细胞减少和肠炎^[1]。FPV宿主范围广泛,可感染猫科、灵猫科(Viverridae)、犬科(Canidae)、鼬科(Mustelidae)、浣熊科(Procyonidae)、獾科(Herpestidae)、猴科(Cercopithecidae)和熊科(Ursidae)的多种动物,其宿主范围呈持续扩大趋势^[2-3],鉴于其广泛的传染性和致病性,猫泛白细胞减少症已被普遍认定为一种值得高度关注的严重传染病^[4]。FPV为无囊膜单股DNA病毒,病毒颗粒呈二十面体对称,直径为20~24 nm^[5-7]。其基因组长度5~6 kb,包含两个主要开放阅读框(ORF),分别编码非结构蛋白(NS1、NS2)和结构蛋白(VP1、VP2)^[8-9]。其中,VP2作为主要衣壳蛋白,

在病毒侵染与宿主免疫应答中起关键作用。

大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)作为我国珍稀保护动物,其健康备受关注,而FPV已成为其重要威胁。1986年,某动物园一只成年雌性大熊猫因严重出血性肠炎死亡,3个月后,又有3只大熊猫感染发病,首次证实大熊猫可以自然感染细小病毒并引发致命性肠炎^[10];2012年,四川一只大熊猫发生腹泻死亡,从其肠内容物中分离获得一株细小病毒,其基因组具有犬细小病毒(Canine parvovirus, CPV)和FPV的重组特征,且VP2基因与FPV有较高的相似性^[11];2018年我国首次从圈养大熊猫中分离出FPV,表明FPV已经从猫扩散至大熊猫等不同物种,实现了跨物种传播和适应性进化^[12];2020年5月,4只圈养大熊猫出现腹泻,其中一只经两周治疗后死亡,病原学检测确认FPV感染为主要死因^[3]。这些事件凸显FPV对大熊猫种群安全的持续风险。

随着我国野生动物保护力度加强,针对大熊猫病原体的深入调查和传播风险评估显得尤为迫切。本研究采集了临床表现腹泻的疑似猫泛白细胞减少症的大熊猫粪便样本,通过PCR扩增技术鉴定出细小病毒感染后,成功获取VP2基因全长序列。在此基础上,进行了同源性比对、遗传进化分析,并对VP2关键氨基酸位点变异及蛋白构象进行了预测,旨在明确大熊猫FPV的分子流行病学特征,为制定科学有效的防控策略提供科学依据,以保障大熊猫种群的生态安全。

1 材料与方法

1.1 样品来源及处理

样品来源于某大熊猫饲养单位2024年5月采集的4份大熊猫腹泻粪便(表1)。取适量粪便样品加入PBS缓冲液,4℃研磨5 min,5 000×g离心取上清,用0.22 μm的滤膜过滤,于-80℃保存备用。

表1 大熊猫个体基本信息

Table 1 Basic information of giant panda individuals

编号 No.	出生年份 Year of birth	性别 Sex	年龄 Age
1#	2022	♂	3
2#	2022	♂	3
3#	2022	♀	3
4#	2022	♂	3

1.2 引物设计与合成

根据GenBank上已发表的FPV和CPV基因序列,利用Premier 6.0软件设计VP2基因特异性引物。上游引物为5'-AGACAATCTTGACCAA-3',下游引物为5'-AGGTGCTAGTTGATATG-3',预期的扩增片段长度约为1 815 bp。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 VP2基因的扩增

将处理后的粪便样品吸取适量上清液,按病毒基因组DNA提取试剂盒说明书提取总核酸。使用上述VP2基因特异性引物对提取的基因组DNA进行PCR扩增。PCR反应体系(50 μL):2×Phanta Max Master Mix 25 μL,上、下游引物各2 μL, DNA模板5 μL, ddH₂O 16 μL。PCR反应程序:95℃预变性3 min;95℃变性15 s,55℃退火15 s,72℃延伸1 min,共35个循环;最后72℃终延伸5 min。PCR产物经

1%琼脂糖凝胶电泳检测后,参照胶回收试剂盒的操作步骤进行胶回收。纯化产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.4 基因同源性和遗传进化分析

参考GenBank公布的FPV和CPV VP2基因序列,使用SeqMan软件拼接阳性样本测序结果。随后,使用MegAlign软件对获得的FPV VP2基因核苷酸及氨基酸序列进行同源性比对分析。采用MEGA 11软件,基于VP2基因序列,使用邻近法(neighbor-joining)构建系统发育树,以分析本研究获得的VP2序列与参考基因组序列间的亲缘关系。

1.5 关键氨基酸位点变异分析

VP2蛋白的关键氨基酸位点变异是病毒适应宿主环境的重要因素。为明确流行毒株的特征,对VP2基因(共编码584个氨基酸)进行了关键位点分析。选择12个FPV经典参考毒株与本研究获得的毒株Giant panda/AB/2025进行比对,重点分析决定宿主特异性与血凝性的关键氨基酸位点。

1.6 蛋白构象预测

先用PDB数据库检索出FPV蛋白的结构,然后将本研究测定的大熊猫源FPV毒株的VP2序列输入SWISS-MODEL(<https://www.swissmodel.expasy.org/interactive>)软件进行蛋白构象的预测,将预测结果和PDB数据库中的参考结构进行对比,并利用Py-MOL软件可视化分析关键氨基酸位点的变异。

2 结果

2.1 PCR扩增结果

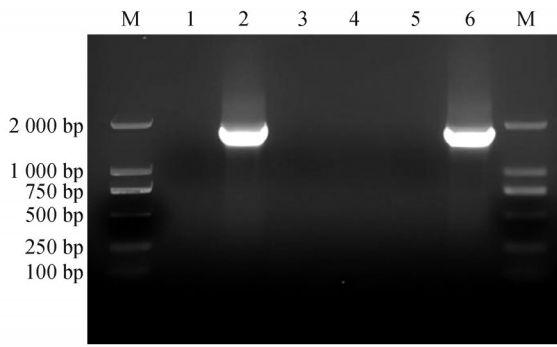
以提取的基因组DNA为模板进行PCR扩增,扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测。结果显示,在4份粪便样本中,仅1份样本成功扩增出预期大小的特异性条带(图1),表明成功获取了FPV VP2基因的全长序列。对该阳性样本的测序结果进行拼接与校正后,序列已提交至GenBank数据库,命名为Giant panda/AB/2025,登录号为PV693405。

2.2 VP2基因遗传进化分析

系统发育树显示,FPV VP2可分为G1、G2和G3三个分支。Giant panda/AB/2025株序列与最常见的FPV毒株序列处于一个大分支,均属于G1分型基因群,亲缘关系较近(图2)。

2.3 VP2基因同源性分析

序列同源性比对结果(图3)显示,Giant panda/



M. DL2000 DNA Marker; 1~4. 粪便样本; 5. 阴性对照; 6. 阳性对照。

M. DL2000 DNA Marker; 1-4. Stool samples; 5. Negative control; 6. Positive control.

图1 VP2基因PCR扩增结果

Figure 1 PCR amplification results of VP2 gene

AB/2025 株的 VP2 基因与 FPV 参考株的同源性最高 (99.2% ~ 99.9%), 其中与本研究团队 2018 年分离的大熊猫源毒株 (MZ322607) 的同源性达到 99.4%。表明 Giant panda/AB/2025 株在遗传上属于典型的 FPV, 且与近期大熊猫中流行的毒株关系极为密切。

2.4 关键氨基酸位点变异分析

选择 12 株 FPV 经典参考毒株, 与 Giant panda/AB/2025 株进行 VP2 蛋白关键氨基酸位点对比分析。结果表明, 在与宿主特异性相关的第 80、93、103、323、564、568 位点, Giant panda/AB/2025 株的氨基酸序列与 FPV 参考株相同; 与血凝性及抗原特性相关的第 87、300、305、426 位点均未发生突变, 仅其第 91 位氨基酸位点由 A 突变为 S (表 2)。

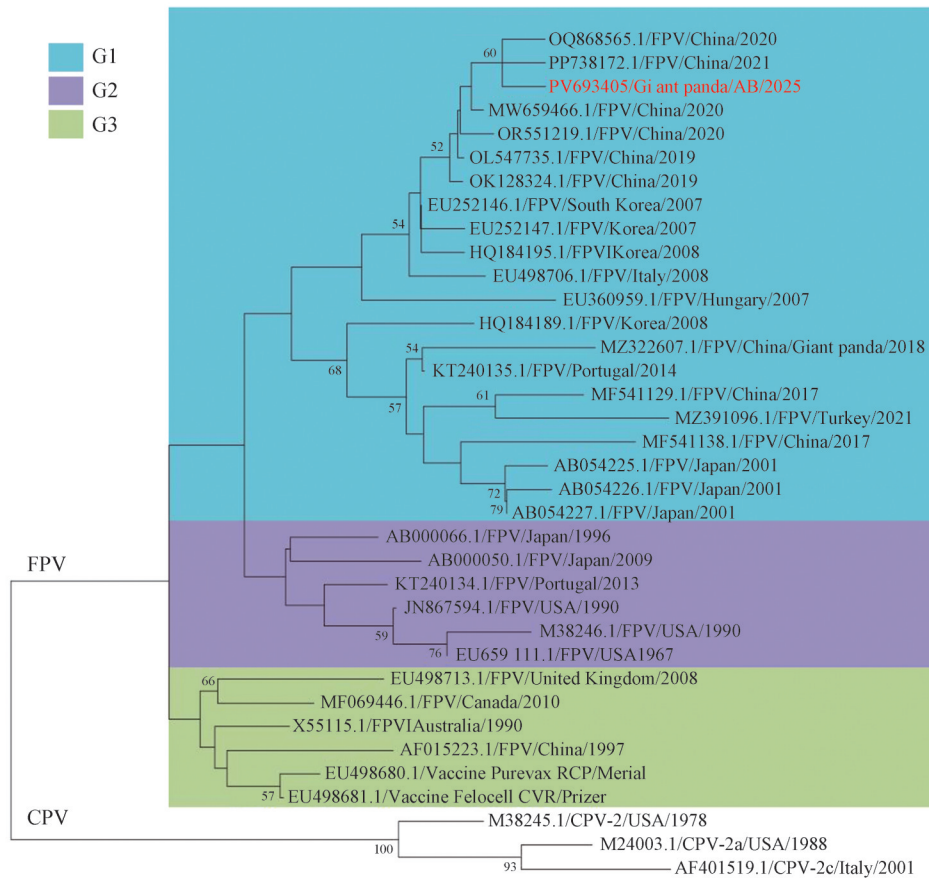


图2 VP2 基因系统遗传进化分析

Figure 2 Analysis of VP2 gene system genetic evolution

2.5 VP2 蛋白构象预测

VP2 蛋白构象预测结果显示, Giant panda/AB/2025 株与 2018 年分离的大熊猫源 FPV 参考株的 VP2 蛋白均由 8 段反向平行的 β 折叠 (反折叠片) 组成, 表面由突出的 Loop 环相互连接 (图 4)。Giant

panda/AB/2025 株位于 Loop 1 的尖端突起处的 91 位点发生突变, A 突变为 S (A91S 突变), 导致 91 ~ 92 位氨基酸变为无规则卷曲, 进而改变了 VP2 蛋白的局部构象。

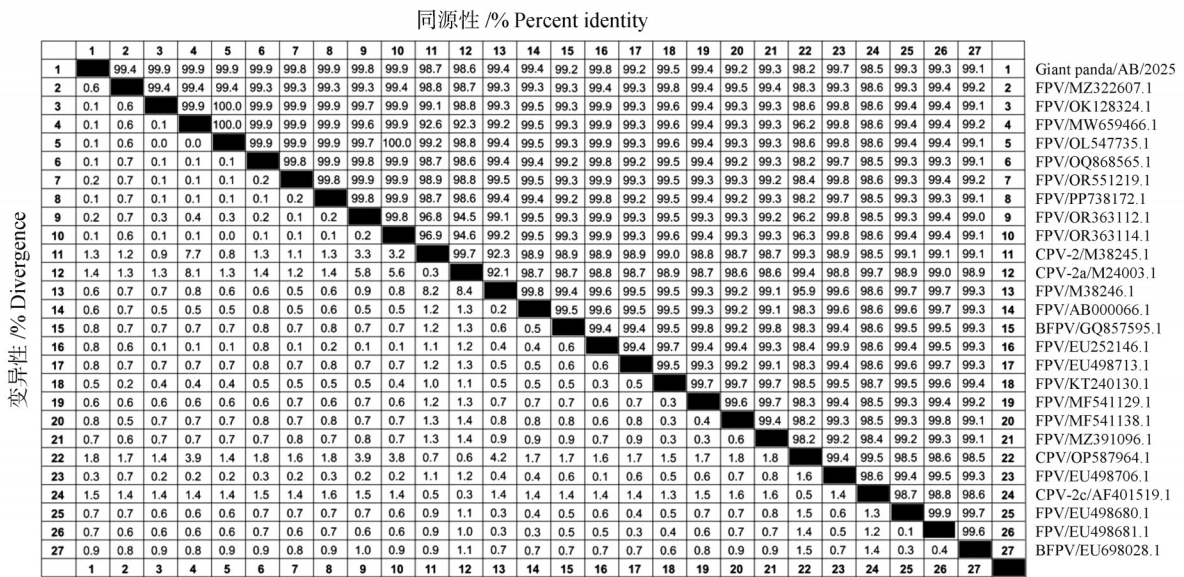


图3 VP2基因同源性对比

Figure 3 Comparison of VP2 gene homology

表2 VP2蛋白关键氨基酸位点分析

Table 2 Analysis of key amino acid sites of VP2 protein

毒株 Strain	氨基酸位点 Amino acid site												
	80	87	91	93	103	232	299	300	305	323	426	564	568
Giant panda/AB/2025(PV693405)	K	M	S	T	V	V	G	M	D	D	N	N	A
Giant panda/CD/2018(MZ322607.1)	K	M	A	T	V	V	E	M	D	D	N	N	A
Giant panda/2018/China(MZ357122)	K	M	A	K	V	V	G	A	D	D	N	N	D
Giant panda/AMPV2020(MZ712026)	K	M	A	T	V	V	E	M	D	D	N	N	A
ZJHZ-2202(OP796710)	K	M	S	K	V	V	G	M	D	D	N	N	A
SH-118(MW017625)	K	M	A	K	V	V	G	M	D	D	N	N	A
SH-21G5(OP796709)	K	M	S	K	V	V	G	M	D	D	N	N	A
F10-1(PP619436)	K	M	S	I	V	V	G	M	D	D	N	N	A
CU-4(M38246, USA)	K	M	A	I	V	V	G	M	D	D	N	N	A
Purevax Merial vaccine(EU498680)	K	M	A	I	V	I	G	M	D	D	N	N	A
Felocell Pfizer vaccine(EU498681)	K	M	A	T	V	I	G	M	D	D	N	N	A
TU-2(AB000066, Japan)	K	M	A	T	V	V	G	M	D	D	N	N	A
Change2007(FJ936171, China)	K	M	A	T	V	I	G	M	D	D	N	N	A

3 讨论与结论

猫泛白细胞减少症是已知最古老的猫病毒性疾病,具有高发病率和高死亡率,其病原体FPV的宿主范围已扩大至多种珍稀野生动物,给我国野生动物保护工作带来严峻挑战^[13-14]。尽管已有有效疫苗,但FPV在全球动物群体中的感染率仍居高不下^[15]。

研究表明^[3],FPV关键位点的基因突变是导致其宿主范围扩大的重要因素,致使变异毒株能够感染猫科动物以外的多种野生动物。这一现象直到Yi *et al.*^[12]证实大熊猫存在FPV感染症状并首次获得大熊猫源FPV的基因组序列后,才引起广泛关注。

本研究从大熊猫腹泻样本中成功获得一株FPV流行株(Giant panda/AB/2025)的完整VP2基因序列。

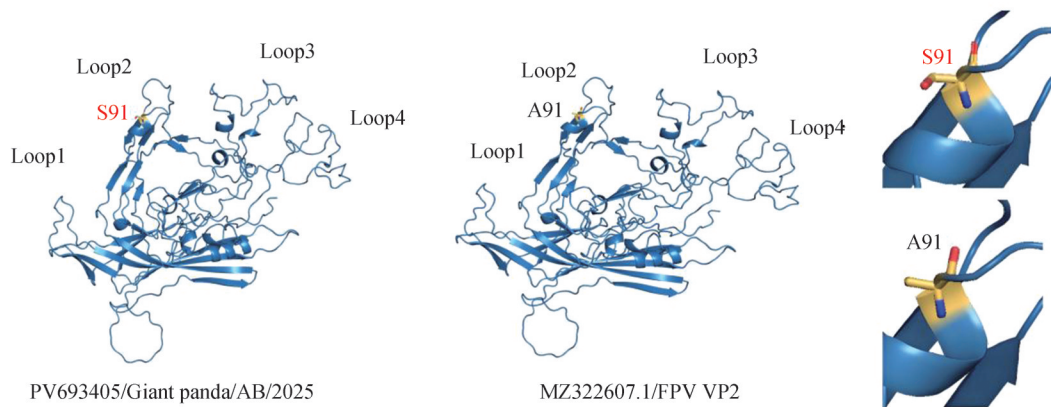


图4 Giant panda/AB/2025 VP2 蛋白构象

Figure 4 Conformation of VP2 protein in Giant panda/AB/2025

遗传进化分析显示,该毒株归属于全球最主要的 FPV 分支——G1 基因型^[16],其 VP2 核苷酸序列与 FPV 参考株的同源性高达 99.2%~99.9%,符合 DNA 病毒相对保守的进化特征。关键氨基酸位点对比发现,Giant panda/AB/2025 株与其他 FPV 参考株在决定宿主特异性的第 80、93、103、323、564、568 位点及决定血凝性、抗原特性的第 87、300、305、426 位点^[16-17]均未发生改变,仅第 91 位氨基酸位点由 A 突变为 S(A91S),说明在 FPV 演化历程中上述位点近年保持相对稳定,形成了独特的遗传变异模式。据报道,A91S 变异株于 2005 年被首次分离,2017 年开始在我国猫科动物中流行(检出率 8.33%),2019 年呈现出超过经典 FPV 的流行趋势(检出率 62.16%)^[18]。本研究首次通过测序证实,大熊猫种群中同样存在 A91S 变异株感染,表明该变异株已实现从猫科动物到大熊猫的跨物种传播。

VP2 蛋白是 FPV 衣壳蛋白的主要成分,其关键氨基酸位点的突变会影响病毒的抗原特性和宿主范围。VP2 蛋白的三级结构由三折叠单元纤突肩部和顶部构成,该单元由 4 个环形结构(Loop 1~Loop 4)围绕 8 条反向平行的 β 折叠片形成,与病毒的血凝性和致病性密切相关^[18-19]。其结构中的 Loop 1 区(尤其是第 91~92 位)是关键的表面柔性区域,直接参与病毒与宿主受体的结合^[20-22]。本研究中 Giant panda/AB/2025 株在位于 Loop 1 尖端突起处的 91 位点发生 A91S 突变,该突变可能导致 91~92 位点构象转变为无规则卷曲,进而改变了 VP2 蛋白的局部构象,并通过变构效应影响周围功能结构域的稳定性。这一结构变化很可能改变了病毒与受体的互作

模式^[18],进而增强了毒株对包括大熊猫在内的新宿主的适应能力。

本研究的蛋白构象预测表明,大熊猫感染 FPV 的风险很可能源于与携带病毒的野猫、宠物猫或相关饲养人员的间接接触。因此,必须加强对大熊猫饲养环境中流浪动物及人员活动的管理。考虑到病毒可能通过共享生境的野生动物传入大熊猫种群,有必要加强对同一生境中野生动物携带病原的监测和防控。

本研究揭示,大熊猫源 FPV 流行株(Giant panda/AB/2025)在遗传进化上属于 G1 基因型,其携带的 A91S 突变是该毒株一个关键的分子特征。这一发现不仅证实了 A91S 变异株的宿主范围已扩展至大熊猫,也为深入理解 FPV 的跨物种传播机制与分子进化规律提供了重要线索,同时为我国大熊猫种群 FPV 的流行病学监测和针对性疫苗研发提供了科学依据和数据支持。

参考文献:

- [1] 杨松涛. 猫泛白细胞减少症病毒 VP2 基因遗传进化及其重组蛋白免疫原性研究 [D]. 长春:吉林大学, 2006.
YANG S T. Study on phylogeny of VP2 gene of Feline panleukopenia virus and the immunogenicity of recombinant proteins [D]. Changchun: Jilin University, 2006.
- [2] ALLISON A B, KOHLER D J, FOX K A, *et al.* Frequent cross-species transmission of parvoviruses among diverse carnivore hosts [J]. *Journal of Virology*, 2013, 87(4): 2342-2347.
- [3] 杨雨晴. 大熊猫源猫泛白细胞减少症病毒(FPV)的分离鉴定及基因组分析 [D]. 雅安:四川农业大学, 2022.
YANG Y Q. Identification of a feline panleukopenia virus from giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*) and its phylogenetic analysis [D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2022.

- [4] 王志强, 任建炜, 温建新. 猫细小病毒病的研究进展 [J]. 青岛农业大学学报(自然科学版), 2021, 38(1): 47-49; 64.
WANG Z Q, REN J W, WEN J X. The research progress of Feline parvovirus disease [J]. Journal of Qingdao Agricultural University (Natural Science), 2021, 38(1): 47-49; 64.
- [5] COTMORE S F, AGBANDJE-MCKENNA M, CANUTI M, *et al.* ICTV virus taxonomy profile: Parvoviridae [J]. The Journal of General Virology, 2019, 100(3): 367-368.
- [6] 饶家辉, 王玉平, 雷连成. 猫细小病毒、犬细小病毒、貂细小病毒的特征比较 [J]. 中国畜牧兽医, 2009, 36(7): 166-168.
RAO J H, WANG Y P, LEI L C. Characteristic comparison of Feline panleukopenia virus, Canine parvovirus and Mink enteritis virus [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2009, 36(7): 166-168.
- [7] TIJSSSEN P, PÉNZES J J, YU Q, *et al.* Diversity of small, single-stranded DNA viruses of invertebrates and their chaotic evolutionary past [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2016, 140: 83-96.
- [8] RAAB U, BECKENLEHNER K, LOWIN T, *et al.* NS1 protein of parvovirus B19 interacts directly with DNA sequences of the p6 promoter and with the cellular transcription factors Sp1/Sp3 [J]. Virology, 2002, 293(1): 86-93.
- [9] PARRISH C R. Pathogenesis of Feline panleukopenia virus and canine parvovirus [J]. Baillière's Clinical Haematology, 1995, 8(1): 57-71.
- [10] 邹捷, 曹国文, 姜永康, 等. 大熊猫自然感染细小病毒的血清学调查 [J]. 中国畜牧兽医, 1988, 10(2): 38-39.
WU J, CAO G W, JIANG Y K, *et al.* Serological investigation of natural infection of giant pandas with parvovirus [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 1988, 10(2): 38-39.
- [11] 梁萌. 大熊猫源细小病毒的分离鉴定与遗传进化分析 [D]. 长春: 吉林大学, 2013.
LIANG M. Isolation and identification of a parvovirus strain from a giant panda and phylogenetic analysis [D]. Changchun: Jilin University, 2013.
- [12] YI S S, LIU S R, MENG X Y, *et al.* Feline panleukopenia virus with G299E substitution in the VP2 protein first identified from a captive giant panda in China [J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2022, 11: 820144.
- [13] JENKINS E, DAVIS C, CARRAI M, *et al.* Feline parvovirus seroprevalence is high in domestic cats from disease outbreak and non-outbreak regions in Australia [J]. Viruses, 2020, 12(3): 320.
- [14] ZHAO S, HU H Y, LAN J C, *et al.* Characterization of a fatal Feline panleukopenia virus derived from giant panda with broad cell tropism and zoonotic potential [J]. Frontiers in Immunology, 2023, 14: 1237630.
- [15] EGBERINK H, FRYMUS T, HARTMANN K, *et al.* Vaccination and antibody testing in cats [J]. Viruses, 2022, 14(8): 1602.
- [16] 邹畅, 胡月, 李海花, 等. 保定地区猫泛白细胞减少症病毒 VP2 基因的遗传进化分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2025, 52(2): 823-831.
ZOU C, HU Y, LI H H, *et al.* Genetic evolution analysis of VP2 gene of Feline panleukopenia virus in Baoding area [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 52(2): 823-831.
- [17] 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.
- [18] CHEN X, WANG J L, ZHOU Y X, *et al.* Circulation of heterogeneous Carnivore protoparvovirus 1 in diarrheal cats and prevalence of an A91S Feline panleukopenia virus variant in China [J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2022, 69(5): e2913-e2925.
- [19] SIMPSON A A, CHANDRASEKAR V, HÉBERT B, *et al.* Host range and variability of calcium binding by surface loops in the capsids of canine and Feline parvoviruses [J]. Journal of Molecular Biology, 2000, 300(3): 597-610.
- [20] HUEFFER K, PARKER J S L, WEICHERT W S, *et al.* The natural host range shift and subsequent evolution of canine parvovirus resulted from virus-specific binding to the canine transferrin receptor [J]. Journal of Virology, 2003, 77(3): 1718-1726.
- [21] ALLISON A B, ORGANTINI L J, ZHANG S, *et al.* Single mutations in the VP2 300 loop region of the three-fold spike of the carnivore parvovirus capsid can determine host range [J]. Journal of Virology, 2016, 90(2): 753-767.
- [22] AGBANDJE M, MCKENNA R, ROSSMANN M G, *et al.* Structure determination of Feline panleukopenia virus empty particles [J]. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 1993, 16(2): 155-171.