

陈红梅, 陈珍, 程龙飞, 等. 樱桃谷种鸭鸭 1 型甲肝病毒的分离鉴定及其 VP1 基因的序列分析 [J]. 福建农业学报, 2014, 29 (11): 1066-1069.

CHEN H-M, CHEN Z, CHENG L-F, et al. Identification and Sequence Analysis of Duck Hepatitis Virus A Type 1 Isolated from Cherry Valley Breeding Duck [J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2014, 29 (11): 1066-1069.

## 樱桃谷种鸭鸭 1 型甲肝病毒的分离鉴定及其 VP1 基因的序列分析

陈红梅, 陈珍, 程龙飞, 傅光华, 施少华, 万春和, 傅秋玲, 黄瑜\*

(福建省农业科学院畜牧兽医研究所/福建省畜禽疫病防治工程技术研究中心, 福建 福州 350013)

**摘要:** 从某樱桃谷种鸭场病死樱桃谷种鸭的肝脏中分离到 1 株病毒 (命名为 HeN1403), 该病毒能在 79 h 内致死 10 日龄番鸭胚, 对 8 日龄雏番鸭的致死率为 33.3%。应用鸭 1 型甲肝病毒特异性引物对 HeN1403 分离株进行 RT-PCR 检测, 可扩增到约 200 bp 的目的条带, 并对分离株的 VP1 基因进行扩增, 得到 714 bp 的基因片段。通过软件对分离株 VP1 基因序列与 GenBank 上发表的 12 株不同基因型鸭 1 型甲肝病毒的 VP1 基因核苷酸序列的同源性进行比对和遗传进化分析, 确定该分离株为鸭 1 型甲肝病毒。

**关键词:** 樱桃谷种鸭; 鸭 1 型甲肝病毒; VP1 基因

中图分类号: S 852

文献标识码: A

### Identification and Sequence Analysis of Duck Hepatitis Virus A Type 1 Isolated from Cherry Valley Breeding Duck

CHEN Hong-mei, CHEN Zhen, CHENG Long-fei, FU Guang-hua, SHI Shao-hua, WAN Chun-he,  
FU Qiu-ling, HUANG Yu\*

(Animal Husbandry and Veterinary Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences/  
Fujian Animal Disease Control Technology Development Center, Fuzhou, Fujian 350013, China)

**Abstract:** A virus strain, named HeN1403, was isolated from the liver of dead Cherry Valley Breeding ducks. The virus killed 10 days Muscovy duck embryo within 79 hours and showed 33.3% of mortality rate to eight-day-old Muscovy ducklings. HeN1403 was characterized by specific RT-PCR primers which target to duck hepatitis virus A type 1, and it turned out to be a 200 bp fragment. A 714-bp fragment gene was obtained by using a set of primers aimed at VP1 ORF gene. Genetic analysis showed that the isolated virus was one of pancreatitis-type duck hepatitis virus A type 1.

**Key words:** Cherry Valley Breeding duck; duck hepatitis virus a type 1; VP1 gene

鸭病毒性肝炎主要是由鸭甲肝病毒 (duck hepatitis A virus, DHAV) 引起的一种急性、高度致死性传染病。一般感染 3 周龄以内的雏鸭, 病死率可达 90% 以上, 甚至 100%。临幊上表现特征为神经症状和肝脏肿大出血<sup>[1]</sup>。DHAV 属小 RNA 病毒科禽肝病毒属成员, 基因型分为 3 种: DHAV-1, DHAV-2 和 DHAV-3<sup>[2]</sup>, 其中 DHAV-1 为经典的血清 1 型鸭肝炎病毒, DHAV-2 为台湾新型鸭肝炎病毒<sup>[3]</sup>, DHAV-3 则为韩国型鸭肝炎病

毒<sup>[2,4-5]</sup>。DHAV 主要从雏鸭中分离, 而从种鸭中分离的较为少见。2014 年 1 月, 从某樱桃谷种鸭场的 465 日龄病死樱桃谷种鸭中分离到 1 株病毒 (命名为 HeN1403), 经过 RT-PCR 检测与遗传进化分析, 确定该分离毒株为鸭 1 型甲肝病毒。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

GoTaq Master Green Mix 购自 Promega 公

收稿日期: 2014-09-03 初稿; 2014-10-27 修改稿

作者简介: 陈红梅 (1979—), 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事畜禽传染病研究 (E-mail: chenhmei052@126.com)

\* 通讯作者: 黄瑜 (1965—), 男, 博士, 研究员, 主要从事畜禽传染病研究 (E-mail: huangyu\_815@163.com)

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-43); 福建省自然科学基金项目 (2011J01113); 福建省种业创新与产业化工程项目 (2011FJZY-9); 新世纪“百千万人才工程”国家级人选科研补助资金 (NCNCMTPC-2009)

司；Trizol Reagent 购自 Invitrogen 上海有限责任公司；OMEGA Gel extraction Kit、Blood DNA/RNA extraction kit 购自厦门泰京生物技术有限公司；AMV 反转录酶购自大连宝生物工程有限公司；琼脂糖凝胶回收小量试剂盒购自 Omiga 公司；大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞自制。

## 1.2 试验胚与试验动物

试验胚为 10 日龄番鸭胚，购自福建莆田某孵化场；试验雏鸭为 1 日龄雏番鸭，购自福建莆田某番鸭孵化场，鸭 1 型甲肝病毒抗体检测为阴性。

## 1.3 临床样品的采集、处理和病毒的分离

采集病死樱桃谷种鸭的肝脏，按常规的方法研磨，即将肝脏剪碎后按重量比 1:5 加入灭菌 PBS 研磨成乳状，反复冻融 3 次，10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min，取上清液用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤。再将无菌的滤液经尿囊腔途径接种 10 日龄番鸭胚，每枚接种 0.5 mL，每天观察 3 次，丢弃 24 h 内死亡鸭胚，并收集 24 h 后死亡鸭胚的尿囊液毒，经无菌检验后，盲传 3 代，用 1% 的红细胞悬液，对每一代收集的尿囊液毒进行凝集试验，-20℃ 保存备用。

## 1.4 尿囊液毒的 PCR 检测

取 200  $\mu\text{L}$  尿囊液毒，使用 OMEGA 公司的 Blood DNA/RNA extraction kit 分别提取尿囊液毒的总 DNA 和 RNA，获得的 RNA 再按照反转录酶使用说明书进行反转录合成 cDNA。主要检测的病毒有产蛋下降综合症病毒、禽流感病毒和新城疫病毒等有血凝活性的病毒，以及鸭坦布苏病毒、鸭呼肠孤病毒、鸭瘟病毒、番鸭细小病毒、小鹅瘟病毒和鸭甲肝病毒等无血凝活性的病毒，参照文献<sup>[6-12]</sup>合成鉴定鸭常见病毒的检测引物，并根据尿囊液毒血凝试验结果来选择检测的病毒，扩增体系为 50  $\mu\text{L}$ ，其中 25  $\mu\text{L}$  2×GoTaq Master Green Mix、1  $\mu\text{L}$  上下游引物（20  $\mu\text{m} \cdot \text{mL}^{-1}$ ）、1  $\mu\text{L}$  cDNA 模板，补充灭菌去离子水至总体积 50  $\mu\text{L}$ 。反应程序是 94℃ 5 min；94℃ 30 s、53℃ 30 s、72℃ 45 s，35 个循环；72℃ 10 min。取 5  $\mu\text{L}$  PCR 产物进行电泳，通过凝胶成像系统进行观察和拍照。应用胶回收试剂盒将 PCR 产物回收纯化后，与载体 pMD18-T 相连接，转化至感受态细胞 DH5 $\alpha$ ，使用 PCR 方法来鉴定重组质粒，确定的阳性重组质粒送至上海生工生物工程有限公司进行序列测定。

## 1.5 衣壳蛋白基因的克隆与序列分析

参照文献[7]合成鸭 1 型甲肝病毒衣壳蛋白基

因（VP1 基因）的引物，按照 1.4 的方法对 VP1 基因进行克隆和序列测定，并通过 Lasergene V 7.1 DNASTar 软件对 HeN1403 株 VP1 基因序列进行分析。

## 1.6 雏番鸭人工感染试验

将 30 只饲养至 8 日龄的雏番鸭随机分为对照组与试验组，15 只一组，分开饲养。对照组肌肉注射灭菌 PBS，每只 0.5 mL；试验组肌肉注射第三代尿囊液毒，每只 0.5 mL。连续观察 15 d，每天观察 2 次，记录其发病及死亡情况。对发病死亡的雏番鸭进行剖检观察，同时取肝脏无菌接种 10 日龄番鸭胚，进行病原的分离与鉴定。

## 2 结果与分析

### 2.1 病毒的分离

病料接种 10 日龄番鸭胚后 79 h 番鸭胚全部死亡。无菌条件下收集死亡番鸭胚的尿囊液毒（暂定名为 HeN1403），经菌检为阴性后冻存备用。按常规血凝试验方法测定收获的三代 HeN1403 株病毒，结果显示，三代 HeN1403 株病毒都不凝集鸡的红细胞和鸭（番鸭）的红细胞，可排除有血凝活性的病毒。

### 2.2 分离毒株的 PCR 鉴定

用常见鸭病毒检测引物对分离毒株进行 PCR 检测，结果显示，扩增到鸭甲肝病毒约 200 bp 的片段，即为 DHA1 阳性，其余病毒检测为阴性（图 1）。将测序结果至 GenBank 中比对后，得出该序列与 DHA1 的同源性最高。

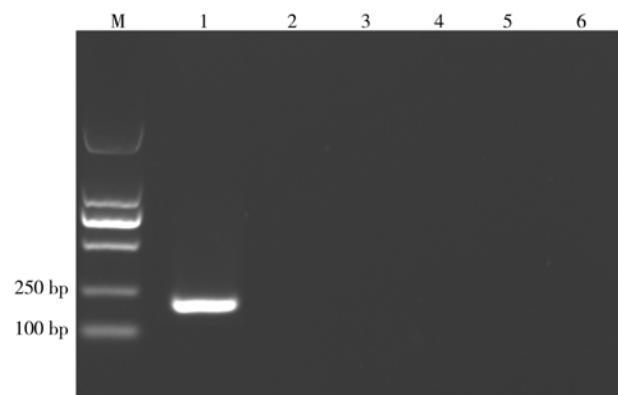


图 1 HeN1403 株 RT-PCR 检测结果

Fig. 1 RT-PCR products of isolated HeN1403 strain

注：M 为 Marker (DL2000)；1 为鸭甲肝病毒；2 为鸭呼肠孤病毒；3 为鸭瘟病毒；4 为番鸭细小病毒；5 为小鹅瘟病毒；6 为鸭坦布苏病毒。

### 2.3 衣壳蛋白基因的序列测定与分析

通过衣壳蛋白基因特异性引物扩增得到 700 bp 左右的条带, 测序结果得知, HeN1403 株衣壳蛋白基因序列长度为 714 bp, 编码 238 个氨基酸。使用 Lasergene V 7.1 DNASTar 软件对 HeN1403 株病毒 VP1 基因序列与 GenBank 上发表的 12 株不同基因型 DHAV 的 VP1 基因序列进行核苷酸序列同源性比对(表 1)。结果表明, HeN1403 株病毒的 VP1 基因核苷酸序列与 DHAV-1 的同源型很

高, 为 90.7%~97.2%, 而与 DHAV-2 和 DHAV-3 的同源性很低, 仅为 64.9%~66.5%; 从遗传进化图(图 2)上可清楚地看到两大分支, 其中 DHAV-1 毒株形成一大分支, DHAV-2 与 DHAV-3 各自独立联合形成另一支, HeN1403 株病毒与 DHAV-1 的遗传关系很近, 而与 DHAV-2 与 DHAV-3 遗传关系较远, 由此可进一步推断所分离的 HeN1403 株为 DHAV-1。

表 1 HeN1403 株病毒与其他 DHAV 的 VP1 基因的核苷酸同源性比较

Table 1 Homology analysis on nucleotides between HeN1403 and other DHAV strains

序号	GenBank 号	毒株	来源地	基因型	同源性 /%
1	DQ249299	03D	中国	DHAV-1	93.0
2	KC904272	FJ1220	中国	DHAV-1	97.2
3	KF924552	MPZJ1206	中国	DHAV-1	97.2
4	DQ864514	C80	中国	DHAV-1	93.8
5	DQ219396	DRL62	韩国	DHAV-1	91.8
6	DQ249230	H	英国	DHAV-1	92.4
7	DQ249301	5886	美国	DHAV-1	90.7
8	EF067924	90D	中国	DHAV-2	64.9
9	EF067923	04G	中国	DHAV-2	65.1
10	EU755009	G	中国	DHAV-3	66.5
11	DQ812093	AP-04114	韩国	DHAV-3	65.8
12	DQ256133	AP-04009	韩国	DHAV-3	65.7

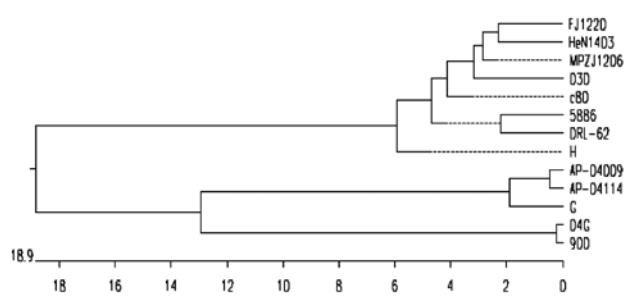


图 2 HeN1403 株 VP1 基因片段的遗传进化树分析

Fig. 2 Phylogenetic tree of isolated HeN1403 strain

### 2.4 雏番鸭人工感染试验结果

试验组接种 44 h 后, 雏番鸭开始出现食欲不振, 运动失调, 75 h 后开始出现死亡, 经过两周的继续观察, 试验组共死亡 5 只番鸭, 死亡率为 33.3%, 而对照组雏番鸭均健康。采集病死鸭的肝脏, 接种 10 日龄番鸭胚, 回收到病毒, 经鸭 1 型甲肝病毒特异性引物扩增能检测到目的条带。可见 HeN1403 分离株为鸭 1 型甲肝病毒。

### 3 讨 论

众所周知, 鸭 1 型甲肝病毒主要侵害 3 周龄以内的雏鸭, 尤其是 1 周龄内的雏鸭, 成年鸭可感染但不发病。2014 年 1 月, 从某樱桃谷鸭场的病死樱桃谷种鸭中分离得到 1 株病毒, 经过 RT-PCR 检测方法鉴定为鸭 1 型甲肝病毒。通过动物的回归试验, 雏番鸭的死亡率为 33.3%, 并能重新从死亡的雏鸭肝脏分离到该病毒, 动物试验表明分离株对雏番鸭具有一定的致病性。

鸭甲肝病毒有 3 种功能性结构蛋白, 分别是 VP0、VP1 和 VP3, 其中 VP1 蛋白位于病毒衣壳表面, 编码主要的抗原位点, 是一个高度可变的区域, 因此扩增与分析 VP1 基因可为 DHA 的遗传变异研究提供理论基础<sup>[12~13]</sup>。经过对 HeN1403 株的 VP1 基因序列与 GenBank 上发表的 12 株不同基因型 DHA 的 VP1 基因序列进行核苷酸序列的同源性比对, 结果表明, HeN1403 株病毒的 VP1

基因核苷酸序列与 DHAV-1 的同源型最高,由此可证明 HeN1403 分离株属于鸭 1 型甲肝病毒。

#### 参考文献:

- [1] SAIF Y M. 禽病学 [M]. 苏敬良, 高福, 索勋, 译. 12 版. 北京: 中国农业出版社, 2012: 431—436.
- [2] WANG L, PAN M, FU Y, et al. Classification of duck hepatitis virus into three genotypes based on molecular evolutionary analysis [J]. Virus Genes, 2008, 37: 52—59.
- [3] 苏敬良, 黄瑜, 贺荣莲, 等. 新型鸭肝炎病毒的分离及初步鉴定 [J]. 中国兽医科技, 2002, 32 (1): 15—16.
- [4] 杨维星, 施少华, 陈红梅, 等. 3 株鸭肝炎病毒 1 型全基因序列分析 [J]. 中国农学通报, 2010, 26 (14): 8—12.
- [5] 施少华, 程龙飞, 江斌, 等. 韩国型鸭肝炎病毒福建株的分离与鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2010, 42 (12): 9—12.
- [6] 马秀丽, 宋敏训, 黄兵, 等. 型鸭病毒性肝炎病毒 RT-PCR 检测方法的建立 [J]. 家禽科学, 2006, (11): 11—13.
- [7] 刘友生, 彭春香, 傅光华, 等. 2010~2011 年中国部分地区禽坦布苏病毒感染调查及分子变异分析 [J]. 中国动物传染病学报, 2012, (1): 47—53.
- [8] PLUMMER P J, ALEFANTIS T, KAPLAN S, et al. Detection of duck enteritis virus by polymerase chain reaction [J]. Avian Disease, 1998, 42 (3): 554—564.
- [9] 傅光华, 施少华, 程龙飞, 等. 种番鸭产蛋下降综合征病毒的分离及其 PCR 鉴定 [J]. 福建农业学报, 2007, 22 (1): 43—45.
- [10] 许秀梅, 苏敬良, 黄瑜, 等. 两株鸭源禽呼肠孤病毒 s3 基因序列分析 [J]. 中国兽医杂志, 2008, 44 (1): 12—14.
- [11] 宋永峰, 温纳相, 宋延华, 等. 应用 PCR 快速诊断番鸭细小病毒病和小鹅瘟 [J]. 动物医学进展, 2009, 30 (5): 49—52.
- [12] TSENG C H, KNOWLES N J, TSAI H J. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 indicates that it should be assigned to a new genus [J]. Virus Res, 2007, 123 (2): 190—203.
- [13] MUIR P, KAMMERER U, KOM K, et al. Molecular typing of enteroviruses: current status, future requirements [J]. Clin Microbiol Rev, 1998, 11 (1): 202—227.

(责任编辑: 张 梅)