

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%。临床上表现特征为神经症状和肝脏肿大出血^[1]。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^[2], 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^[3], DHAV-3 则为韩国型鸭肝炎病

毒^[2,4-5]。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 Omega 公司; 大肠杆菌 DH5 α 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 \cdot min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液用 0.22 μ 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 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4 尿囊液毒的 PCR 检测

取 200 μ 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^[6-12]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 μ L, 其中 25 μ L 2 \times GoTaq Master Green Mix、1 μ L 上下游引物 (20 μ m \cdot mL⁻¹)、1 μ L cDNA 模板, 补充灭菌去离子水至总体积 50 μ L。反应程序是 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s、53 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 45 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。取 5 μ 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 α , 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 DHAV 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 DHAV-1 的同源性最高。

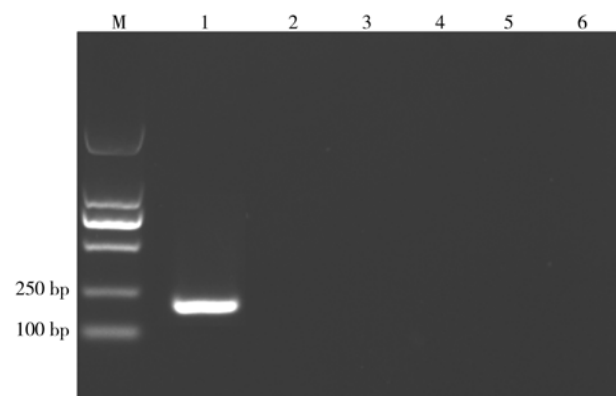


图 1 HeN1403 株 RT-PCR 检测结果

Fig. 1 RT-PCR products of isolated HeN1403 strain

注: M 为 Maker (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 的同源性很

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

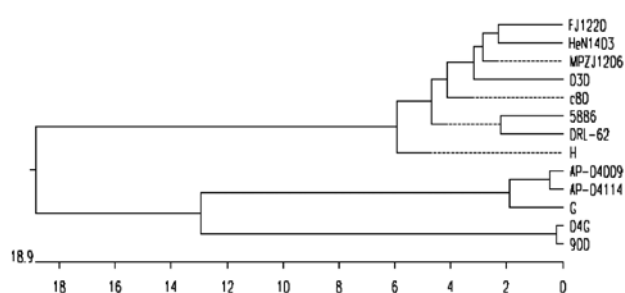


图 2 HeN1403 株 VP1 基因片段的遗传进化树分析

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, 是个高度可变的区域, 因此扩增与分析 VP1 基因可为 DHAV 的遗传变异研究提供理论基础^[12-13]。经过对 HeN1403 株的 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 Microbio Rev*, 1998, 11 (1): 202—227.

(责任编辑: 张 梅)