

傅秋玲, 傅光华, 陈翠腾, 等. 半番鸭源鸭 1 型甲肝病毒亚型的分离鉴定及其 VP1 基因分析 [J]. 福建农业学报, 2017, 32 (8): 813—817.

FU Q-L, FU G-H, CHEN C-T, et al. Identification and Sequencing of Duck Hepatitis A Virus 1 Subtype a Isolated from Mule Ducklings [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2017, 32 (8): 813—817.

半番鸭源鸭 1 型甲肝病毒亚型的分离鉴定及其 VP1 基因分析

傅秋玲, 傅光华, 陈翠腾, 程龙飞, 万春和, 施少华, 陈红梅, 陈 珍,
朱春华, 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/

福建省禽病防治重点实验室, 福建 福州 350013)

摘 要: 自胰腺泛黄的雏半番鸭中分离获得 1 株病毒 (命名为 FJ1605 株), 经 RT-PCR 检测为鸭 1 型甲肝病毒, 通过鸭胚中和试验发现该株病毒可被鸭 1 型甲肝病毒亚型 (DHAV-1a) 高免血清特异性中和, 确定该株病毒为鸭 1 型甲肝病毒亚型。对该株病毒 VP1 基因进行分子特征分析, 发现其核苷酸大小为 714 bp, 与 GenBank 登录的 DHAV-1a 同源性为 98.1%~99.7%, 与 DHAV-1 FJ1220 毒株同源性最高达 99.7%; 而与鸭 2 型甲肝病毒 (DHAV-2)、鸭 3 型甲肝病毒 (DHAV-3) VP1 基因的核苷酸同源性仅分别为 65.7% 和 68.3% 左右。基于 VP1 基因的遗传进化分析表明, FJ1605 分离株属鸭 1 型甲肝病毒亚型谱系。以该株病毒对 7 日龄雏半番鸭进行人工感染试验, 可完全复制出同于临床病例的病变。以上结果显示, 雏半番鸭也可感染 DHAV-1a, 且表现为胰腺泛黄。

关键词: 鸭 1 型甲肝病毒亚型; 半番鸭源; VP1 基因

中图分类号: S 852.65

文献标识码: A

文章编号: 1008—0384 (2017) 08—813—05

Identification and Sequencing of Duck Hepatitis A Virus 1 Subtype a Isolated from Mule Ducklings

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

(Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences/
Fujian Animal Diseases Control Technology Development Center/Fujian Provincial Key Laboratory
for Avian Diseases Control and Prevention, Fuzhou, Fujian 350013, China)

Abstract: A strain of duck hepatitis A virus 1 subtype a (DHAV-1a), coded as FJ1605, was isolated from the mule ducklings with pancreatitis. It was identified by RT-PCR analysis and a neutralization test in duck embryos that showed the strain specifically being neutralized by the anti-DHAV-1a hyperimmune serum. Molecular characteristics of VP1 gene of the virus was analyzed to indicate the nucleotide to be 714 bp in length with a homology with those of other DHAV-1a isolates ranging from 98.1% to 99.7% and sharing the greatest similarity to strain FJ1220. On the other hand, the homology between FJ1605 and DHAV-2 was merely 65.7%; and, that between FJ1605 and DHAV-3, approximately 68.3%. Phylogenetic analysis on the VP1 gene also showed FJ1605 to be in the viral lineage of DHAV-1a. Furthermore, an animal infection test clearly displayed the same clinical symptoms as those shown in clinical cases. Thus, it was concluded that the pancreatitis in the mule ducklings was caused by DHAV-1a.

Key words: DHAV-1a; mule duckling; VP1 gene

收稿日期: 2017—06—12 初稿; 2017—07—10 修改稿

作者简介: 傅秋玲 (1985—), 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事水禽疫病研究 (E-mail: qiulingfu0822@163.com)

* 通讯作者: 黄瑜 (1965—), 男, 博士, 研究员, 主要从事动物传染病研究 (E-mail: huangyu_815@163.com)

基金项目: 现代农业产业体系建设专项 (CARS-43); 国家自然科学基金项目 (3147222); 福建省畜禽疫病防控技术重大研发平台 (2014N2003); 福建省科技计划项目——省属公益类科研院所基本科研专项 (2015R1023-3、2016R1102); 福建省自然科学基金项目 (2017J01058); 福建省农业科学院畜牧兽医研究所基金 (MYQJ2015-6)

鸭 1 型甲肝病毒病是由鸭 1 型甲肝病毒 (duck hepatitis A virus 1, DHAV-1) 引起的一种主要侵害 6 周龄内雏鸭的急性高度致死性疾病。该病的临床特征为角弓反张和肝脏肿大出血, 其发病率达 100%, 死亡率因感染鸭日龄的不同而有所不同^[1-2]。近年来, 随着该病毒的不断进化突变, 该病的致病特点发生了改变, 呈现新的致病特征。2011 年, 本研究室从以胰腺发黄或出血为特征的雏番鸭中分离到 1 株病毒, 经病原分离纯化鉴定、病毒全基因组序列测定与分析、致病性试验和血清交叉中和试验等一系列研究, 确定其病原为鸭 1 型甲肝病毒的亚型 (DHAV-1a)^[3-6]。

随着近年来对该病的监测, 2016 年 5 月, 在福建某半番鸭饲养场的雏半番鸭 (10 日龄) 发生以胰腺发黄或出血为典型特征的疫病, 该病的发病率及病死率分别为 15% 和 25% 左右。其特征性病理变化与傅光华等^[3]报道的雏番鸭感染胰腺型鸭 1 型甲肝病毒的特征相似, 因此初步推断其病原为胰腺型鸭 1 型甲肝病毒, 而后利用 RT-PCR 等分子学方法对该病原进行确诊, 且对其 VP1 基因遗传关系进行报道。

1 材料与方法

1.1 试验材料

10 日龄番鸭胚和 7 日龄雏半番鸭均来自漳州龙海非免疫种鸭场; DHAV-1a 阳性血清由福建省农业科学院畜牧兽医研究所禽病室研制并保存; 组织总 RNA 抽提试剂盒、DNA 琼脂胶回收试剂盒购自 QIAGEN 科技有限公司; 反转录试剂盒 (Reverse transcription kit) 和 DNA Maker 均购自 Thermo 生物科技有限公司; 高保真 DNA 聚合酶 (FastPfu DNA Polymerase)、dNTPs ($2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 pMD18-T 载体购自大连宝生物技术有限公司。

1.2 病料处理及核酸提取

采集胰腺发黄或出血的病死雏半番鸭胰腺, 按样品: PBS=1:3 的比例, 加入灭菌 PBS 缓冲液 (pH 7.2) 进行匀浆, 样品冻融 3 次后, $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清分成 2 份, 用组织总 RNA 抽提试剂盒对其中 1 份提取病料总 RNA, 具体步骤参照试剂盒操作说明书进行。将提取的 RNA 样品按反转录试剂盒操作说明书反转录为 cDNA, 且以此 cDNA 作为后续试验的模板。

1.3 RT-PCR 检测

参照傅光华等^[3]报道的一对扩增 DHAV-1

VP1 基因特异引物 (上游引物为 5'-GGTGATTCCAACCAGTTAGGGGAT-3' 和下游引物为 5'-TTCAATTTCCAGGTTGAGTTCA-3') 对病毒 cDNA 进行 PCR 扩增, 扩增目的片段大小为 714 bp, 由上海博尚生物技术有限公司合成。以上述制备的模板进行 PCR 扩增, 50 μL PCR 反应体系为: 10 \times Buffer 5 μL , dNTP ($2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 4 μL , Fast Pfu DNA polymerase 1 μL ($2.5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 引物各 1 μL , 模板 3 μL , 用 ddH₂O 补充体积为 50 μL , 分别参考文献 [3] 的 PCR 反应条件进行目的产物的扩增。扩增产物胶纯化后直接送上海博尚生物技术有限公司进行测序。

1.4 病毒的分离

取上述处理的病料上清 1 份经滤器 (直径为 0.22 μm) 抽滤后按每枚 0.2 mL 的剂量经尿囊腔接种 5 枚无母源抗体的 10 日龄番鸭胚, 37℃ 孵育, 每日观察 2 次, 弃去于 24 h 内死亡的胚, 5 d 后将接种鸭胚放入 4℃, 过夜无菌收取尿囊液。经无菌检验后, 以 10 日龄鸭胚连续传 3 代, 无菌条件收集含毒胚液, 同时对其进行 DHAV-1 的鉴定, -80℃ 保存。

1.5 鸭胚中和试验

按照文献 [7] 采用固定血清稀释病毒法进行鸭胚中和试验。将上述分离的病毒液按 10 倍梯度稀释, 取 $10^2 \sim 10^6$ 的 5 个稀释度病毒液等量分成 2 份, 其中 1 份与抗 DHAV-1a 阳性血清等量混合, 另 1 份与正常鸭阴性血清等量混匀, 每个稀释度的混合液于 37℃ 反应 1 h 后, 分别接种 5 枚 10 日龄番鸭胚, 每枚 0.2 mL, 同时分别设病毒和血清对照组, 置 37℃ CO₂ 培养箱培养 7 d, 每天观察且记录鸭胚死亡情况, 并按 Reed-Muench 法计算病毒中和组与病毒对照组的 ELD₅₀ 及其中和指数。

1.6 结构蛋白 VP1 基因的克隆与序列分析

将扩增产物经琼脂凝胶纯化回收后, 将目的片段克隆至克隆载体 pMD18-T 上, 而后筛选 5 个阳性克隆送生工生物上海工程有限公司进行测序。利用 Lasergene V 7.1 DNASTar 软件对测序结果进行编辑整理后, 用 MEG align 软件比较其结构蛋白 VP1 基因核苷酸序列与其他 19 株鸭肝炎病毒 (表 1) 的同源性, 并分析 VP1 基因核苷酸序列的遗传进化关系。同时使用 Lasergene V 7.1 DNASTar 中的 Protean 软件对 VP1 结构蛋白的亲水性、抗原性和表面展示进行分析。

表 1 参考毒株相关信息
Table 1 Information on reference viruses

登录号	名称	基因型	分离地	分离时间
KF924552	MPZJ1206	DHAV-1a	中国	2012
KC904272	FJ1220	DHAV-1a	中国	2012
KX507161	JX1405	DHAV-1a	中国	2014
KX507163	FJ1513	DHAV-1a	中国	2015
JQ804521	Du/CH/LGD/111238	DHAV-1a	中国	2011
DQ249299	03D	DHAV-1	中国	2005*
JX390984	FZ99	DHAV-1	中国	1999
GU9446771	MY	DHAV-1	中国	2006
JQ316452	X	DHAV-1	中国	2011*
DQ864514	C80	DHAV-1	中国	2006*
JX390983	FZ05	DHAV-1	中国	2005
DQ226541	R85952	DHAV-1	美国	2005*
DQ219396	DRL62	DHAV-1	韩国	2005*
JX390982	FZ86	DHAV-1	中国	1986
EF427899	CL	DHAV-1	中国	2007*
EF067924	90D	DHAV-2	中国	2007*
JF828996	Du/CH/LJS/090905	DHAV-3	中国	2009
EU755009	G	DHAV-3	中国	1999
DQ812093	AP-04114	DHAV-3	韩国	2003

注：* 表示基因序列提交时间。

1.7 动物回归试验

将 30 羽 7 日龄雏半番鸭随机分成 2 组（攻毒组和对照组），于相同条件下隔离饲养。对攻毒组以 $10^{5.5}$ ELD₅₀ 的病毒量肌肉注射接种病毒，接种剂量为 0.5 mL·羽⁻¹；对照组以同样方式接种同等剂量的高压灭菌 PBS（pH7.2）缓冲液。接种后连续观察 2 周，每天观察试验鸭的临床症状及死亡情况，对死亡鸭进行剖解观察病理变化，同时采集胰腺、肝脏和脾脏进行病原鉴定。

2 结果与分析

2.1 病毒 RT-PCR 鉴定

针对 DHAV-1 VP1 基因的特异性引物进行 RT-PCR 扩增，结果显示扩增的目的片段大小约 714 bp（图 1）。

2.2 病毒分离

将病料接种 10 日龄番鸭胚 48~84 h 后，番鸭胚全部死亡。收集的尿囊液盲传 2 代，第 3 代对 5 枚番鸭胚的致死率均为 100%。死亡胚体的病变为

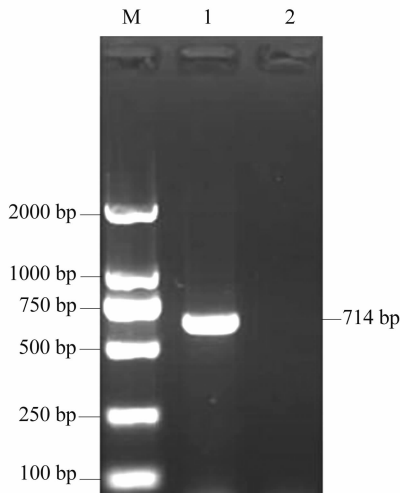


图 1 RT-PCR 检测结果

Fig. 1 Result of RT-PCR analysis

注：M 为 DNA 分子量标准；1 为分离株的扩增片段；2 为阴性对照。

体表出血与水肿。三代收集的尿囊液菌检均呈阴性。收集的含毒尿囊液经 DHAV-1 鉴定呈阳性，毒株命名为 FJ1605。

2.3 鸭胚中和试验

运用 Reed-Muench 法计算病毒中和组及病毒对照组的 ELD₅₀ 分别为 $10^{-2.69}$ /0.1 mL 和 $10^{-5.58}$ /0.1 mL，计算该血清中和指数为 $10^{2.89}$ ($10^{2.89} = 776.2$)，表明 FJ1605 株病毒能被 DHAV-1a 高免血清中和。

2.4 VP1 基因的分子特征

以 DHAV-1a 的 VP1 基因特异性引物从分离株（FJ1605）基因组中扩增出 714 bp 的条带，其大小与预期扩增产物大小一致。测序结果表明，所扩增的基因片段大小均为 714 bp，编码 238 个氨基酸。FJ1605 株与 GenBank 中登录的 DHAV-1 的 VP1 基因核苷酸同源性的 94.1%~99.7%，其中与 DHAV-1a 同源性介于 98.1%~99.7%，且与福建分离株的 DHAV-1 毒株（FJ1220）同源性最高（99.7%）；而与 DHAV-2 毒株 VP1 基因的核苷酸同源性仅为 65.7%，与 DHAV-3 毒株的同源性仅为 67.2%~68.3%（图 2）。

VP1 结构蛋白氨基酸序列的分析结果表明，FJ1605 株与其他 DHAV-1 毒株的 VP1 结构蛋白氨基酸残基的同源性为 95.5%~99.6%，其中与 DHAV-1a 同源性为 97.1%~99.6%，亦与福建分离株（FJ1220）同源性最高，而与 DHAV-2 和 DHAV-3 毒株的 VP1 结构蛋白氨基酸序列同源性仅分别为 69.8%和 75.2%左右。

3 讨论

胰腺型鸭1型甲肝病毒病是由鸭1型甲肝病毒亚型(DHAV-1a)引起的一种主要危害10~30日龄内雏(半)番鸭的传染性疾病^[3,7]。该病的临床特征为胰腺出血或胰腺坏死,其发病率为42.8%,病死率77.8%。相比较于经典的鸭肝炎病毒病,该病的易感动物发生了改变,由雏樱桃谷鸭和麻鸭变为雏番鸭和半番鸭^[9];且感染日龄亦有所差异,主要是侵害30日龄内的雏鸭,且随着雏番鸭日龄的增长其对DHAV-1a的易感性明显降低;另外其组织嗜性和特征肉眼病变均发生改变^[5,10]。该病除了在流行病学上存在差异,其病原在分子生物学特征上亦存在一定的差异。

DHAV-1a的基因组特征与DHAV-1相似,但存在一定的差异,主要体现在结构蛋白VP1基因及其5'-UTR^[4,11-13]。经分析FJ1605株的VP1基因发现,该株的VP1基因核苷酸和氨基酸序列与其他DHAV-1毒株的VP1基因同源性分别为94.1%~99.7%和95.5%~99.6%,其中与DHAV-1a的同源性分别为98.1%~99.7%和97.1%~99.6%。同时与福建分离株的DHAV-1毒株(FJ1220)同源性最高。经VP1基因遗传进化分析发现,FJ1605株病毒与番鸭源胰腺型DHAV-1a(MPJZ1206)共同构成了一个进化谱系,并与其他经典DHAV-1毒株处于DHAV-1进化大分支。因此,半番鸭源的DHAV-1a(FJ1605)VP1基因与其他DHAV-1a毒株的差异不大,表明该株病毒在结构蛋白VP1基因未发生明显的变异。且通过VP1基因遗传进化树结果进一步验证了FJ1605株属于DHAV-1a毒株。

结构蛋白VP1是DHAV-1a表面的衣壳蛋白,该蛋白是DHAV-1a体外中和作用的主要靶点,也是抗原表位的高度可变区,且具有中和活性。同时VP1基因及其编码蛋白在病毒基因和血清分型上起关键作用^[14-15]。因此,分析VP1基因的分子特征对分析DHAV-1a分子进化规律、疫病的流行特征、疫苗的筛选以及诊断抗原的研制具有重要的指导意义^[4]。本研究通过生物学软件对FJ1605株的VP1结构蛋白进行细胞抗原表位预测分析,为进

一步研究VP1结构蛋白的生物学特性奠定基础。

参考文献:

- [1] OWENS R A, DI S, LI S F, et al. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses [C] // Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 2011: 1221-1234.
- [2] SAIF Y M. 禽病学 [M]. 苏敬良, 高福, 索勋, 译. 11版. 北京: 中国农业出版社, 2005: 376-389.
- [3] 傅光华, 陈红梅, 黄瑜, 等. 雏番鸭胰腺型鸭1型甲肝病毒分离鉴定及VP1基因分析 [J]. 福建农业学报, 2012, 27 (9): 43-45.
- [4] 傅光华, 黄瑜, 傅秋玲, 等. 致胰腺泛黄鸭1型甲肝病毒全基因组分子特征 [J]. 微生物学报, 2014, 54 (9): 1082-1089.
- [5] 陈珍, 傅秋玲, 陈红梅, 等. 胰腺型、经典型1型甲肝病毒对雏鸭的致病性差异 [J]. 福建农业学报, 2013, 28 (10): 939-942.
- [6] 傅秋玲, 陈珍, 黄瑜, 等. 鸭1型甲肝病毒亚型的鉴定 [J]. 中国兽医杂志, 2015, 51 (7): 36-38.
- [7] 殷震, 刘景华. 动物病毒学: 第2版 [M]. 北京: 科学出版社, 1997: 343-354.
- [8] 傅秋玲, 刘伟, 黄瑜, 等. 鸭1型甲肝病毒亚型VP1蛋白单克隆抗体的研制及鉴定 [J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44 (2): 554-560.
- [9] 郭玉璞, 蒋金书. 鸭病 [M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1988: 30-31.
- [10] 陈红梅, 施少华, 程龙飞, 等. 鹅源鸭1型甲肝病毒的分离与鉴定 [J]. 福建农业学报, 2012, 27 (11): 1165-1168.
- [11] DING C, ZHANG D. Molecular analysis of duck hepatitis virus 1 [J]. Virology, 2007, 361: 9-17.
- [12] KIM M C, KWON Y K, JOH S J, et al. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 reveals a novel lineage close to the genus parechovirus in the family Picornaviridae [J]. J Gen Virol, 2006, 87: 3307-3316.
- [13] 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: 190-203.
- [14] KIM M C, KWON Y K, JOH S J, et al. Recent Korean isolates of duck hepatitis virus revealed the presence of a new genotype and serotype when compared to duck hepatitis virus type 1 type strain [J]. Arch Virol, 2007, 152: 2059-2072.
- [15] FU Y, PAN M, WANG X Y, et al. Molecular detection and typing of duck hepatitis A virus directly from clinical specimens [J]. Vet Microbiol, 2008, 131 (3/4): 247-257.

(责任编辑: 张 梅)