

鸭细小病毒 04Nb 株的分离鉴定与 *rep* 基因测序与分析*

张彦鹏, 李 静, 寇 铮, 陈绳亮, 范兆军, 张 忠, 李天宪**

(中国科学院武汉病毒研究所 病毒学国家重点实验室, 湖北武汉 430071)

Isolation and Identification of Duck Parvovirus 04Nb Strain and Sequence Analysis of *rep* Gene

ZHANG Yan-peng, LI Jing, KOU Zheng, CHEN Sheng-liang, FAN Zhao-jun,
ZHANG Zhong, LI Tian-xian**

(The State Key Laboratory of Virology, Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)

Abstract : A severe contagious disease broke out in several duckeries in Ningbo, Zhejiang province with the symptoms of diarrhea and grasping. The liver tissues from the dead ducks were collected and inoculated into the allantoic cavity of the 11-day-old embryos. Through purification by sucrose density gradient centrifugation, a diameter of 20nm virions with typical *duck parvovirus* (DPV) characters was observed by electron microscopy. In the test of agar-gel immunodiffusion, the reaction between the stuff from dead embryos and positive serum was obvious. Through SDS-PAGE, three main segments were visible which coincided with DPV. In animal test, similar symptoms were also observed. Using the primers designed according to DPV genome, we acquired an anticipative 600bp DNA fragment, which was cloned into *E.coli* and sequenced. The sequence shared 98% identity with the representative DPV strain. From all above results, the pathologic agent was diagnosed as *Duck Parvovirus*. To acquire more information of the *rep* gene, we sequenced and aligned it with 4 other sequences of DPV or *goose parvovirus* (GPV) from GenBank. The result indicated the homology of *rep* gene was about 98% with DPV and 81% with GPV.

Key words : *Duck parvovirus*; Isolation and identification; *rep* gene; Homology

摘要 : 采集浙江宁波地区以腹泻、呼吸困难为主要症状的病鸭肝组织, 接种正常鸭胚尿囊腔增殖病毒。雏鸭感染试验显示发病症状及病理变化明显, 死亡率为 75%。电镜下可见纯化病毒直径约 20nm 左右的球形病毒粒子。免疫琼脂扩散实验结果显示与鸭细小病毒 (*duck parvovirus* DPV) 标准株阳性血清有明显沉淀线。经 SDS-PAGE 呈现 3 条结构蛋白带, 与 DPV 标准株一致; 参照 GenBank DPV 非结构蛋白基因序列设计引物, PCR 扩增反应获得目的条带, 克隆测序后, 与 DPV 代表株序列同源性达 98%。根据上述实验结果, 确定引起本次鸭场疫病的病原为 DPV。为进一步研究该分离株 *rep* 基因的序列特征, 对其 *rep* 基因克隆测序, 与 GenBank 中两株 DPV、两株鹅细小病毒 (GPV) 进行序列比对, 结果显示 *rep* 基因核苷酸序列与 DPV 参考毒株同源性为 98% 以上, 与 GPV 同源性为 80% 左右。

关键词 : 鸭细小病毒; 分离鉴定; *rep* 基因; 同源性

中图分类号: S831.7

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)02-0173-05

鸭细小病毒病由鸭细小病毒 (*Duck parvovirus*, DPV) 引起的一种急性病毒性传染病, 以雏鸭为易

感, 临床症状主要表现为渗出性肠炎, 死亡率约 50% ~ 80%^[1-5]。近 20 年来, 在我国福建、广东、

收稿日期: 2005-10-25, 修回日期: 2005-12-30

* 基金项目: 国家 863 计划项目 (2005AA219070)

作者简介: 张彦鹏 (1980-), 男, 山东德州籍, 硕士研究生, 从事动物病毒学研究。

** 通讯作者. Corresponding author. Tel: 027-87198465; E-mail: Litx@pentium.whiov.ac.cn

广西、浙江、台湾等地养鸭场经常爆发。法国、匈牙利、美国等地也频见报道^[6-11]。该病的流行是制约鸭养殖业发展的重要因素之一。

DPV 归属于细小病毒科细小病毒属,其基因组为单链线性 DNA,由 5132 个核苷酸组成,基因组含有两个开放阅读框架(ORF),左侧 ORF 编码非结构蛋白 REP,右侧 ORF 编码 3 个结构蛋白 VP1、VP2、VP3,两个 ORF 位于同一个读码框中^[9,12]。

2004 年 2~4 月间浙江省宁波地区多个鸭养殖场暴发了以呼吸急促、腹泻为主要症状的雏鸭急性传染性疫病,死亡率达 30%左右。本文对其病原进行了分离鉴定与初步研究,通过临床病理、病原生物学特征和 *rep* 基因序列分析等实验,确定引起该鸭场疫病的病原为 DPV,并将该分离株命名为鸭细小病毒 04Nb 株(DPV-04Nb 株),为该病毒病的防治提供了科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

鸭组织病料采集于宁波地区多个鸭养殖场;健康鸭胚,雏鸭购于武汉某鸭场;DPV 标准株购于广西畜牧兽医研究所,阳性血清由福建农科院陈少莺老师惠赠;PCR 相关试剂、DNA-marker(DL2000)、pMD18-T 载体购于购自大连宝生物公司;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自 Promega 公司,大肠杆菌 DH5 为本研究室保存。

1.2 雏鸭感染试验

取患病鸭肝组织,匀浆,用 0.01mol/L pH 7.4 PBS 按 1:10 稀释,离心 4 3000 r/min, 20min,取上清,加入氨苄青霉素、链霉素至终浓度为 1000U/mL,通过 0.45 μ m 孔径的微孔滤器过滤除菌,得到病肝组织悬液(-20 保存备用)。采用 5d 龄雏鸭,肌肉注射病肝组织悬液 0.2 mL/只(实验组),肌肉注射无菌 0.85%生理盐水 0.2 mL/只(对照组),分别饲养观察 7d。

1.3 病毒增殖与纯化

取患病鸭病肝组织液,以 0.2 mL/胚尿囊腔接种 10d 龄鸭胚,37 培养至 96h,弃除 24h 内死亡的鸭胚,收获 24~96h 的鸭胚尿囊液作为待检染毒尿囊液(同时观察胚体发育状态)^[14];对照组,以 0.2 mL/胚接种无菌 0.85%生理盐水。病毒的纯化采用蔗糖密度梯度离心的方法进行,纯化的病毒经 2%磷钨酸负染,在透射电子显微镜下观察。

1.4 免疫琼脂扩散实验

按常规方法制备 0.8%的琼脂糖平板,将待检染毒尿囊液作为待检抗原。中央孔滴加 DPV 标准毒株阳性血清,周围孔分别滴加待检染毒尿囊液、DPV 标准株染毒尿囊液,24h,37 平置保湿,观察免疫沉淀线。

1.5 SDS-PAGE 电泳:

分离胶 10%,浓缩胶 5%,考马斯亮蓝染色,按照 Lammeli 方法^[13]进行。

1.6 核酸提取

取病鸭肝组织悬液、待检和标准 DPV 株染毒尿囊液各 500 μ L,分别加入 DNA 抽提缓冲液按文献^[13]所述方法提取病毒核酸。

1.7 DPV-04Nb 株鉴定之 PCR 方法

参考 GenBank 发表的 DPV 基因组序列 *rep* 基因序列,借助 Primer Premier5.0 软件设计一对位于 Rep 蛋白编码区的引物 P1、P2,跨幅 600bp,由北京 Augct 公司合成。引物序列:P1: 5'-CAAACGGGGAGGGCAAATAAGA-3'; P2: 5'-GTGGTTCGAGGTCCGTAGAGC-3'。

PCR 反应参照文献方法^[13],并调整最佳反应条件。使用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收 PCR 产物,回收产物与 pMD18-T 载体连接,重组载体转化感受态大肠杆菌 DH5,感受态细胞的制备按参考文献^[13]的方法进行;挑取阳性克隆并扩大培养后,用碱裂解法提取质粒,经 PCR 和 *Bam*HI/*Hind* 双酶切鉴定重组质粒;测序由上海基康生物技术公司完成。

1.8 DPV-04Nb 株 *rep* 基因序列测定

根据 GenBank 内 DPV 序列,分 S1、S2、S3、S4 四段设计引物:

S1. U: (502-523) 5'-CATTTCGTTGCTCTGCTCTCACA-3'

L: (1008-987) 5'-GTCACGGTCTTATTTTGCCTC-3'

S2. U: (979-1002) 5'-CAAACGGGGAGGGCAAATAAGA-3'

L: (1566-1545) 5'-GTGGTTCGAGGTCCGTAGAGC-3'

S3. U: (1476-1497) 5'-ACCCTCAATATGTAGGGAGCGT-3'

L: (2143-2122) 5'-GAGCTCAGGGCTCGCTCTTAAT-3'

S4. U: (2116-2137) 5'-GGAGATATTAAGAGCGAGCCCT-3'

L: (2729-2708) 5'-CTGCCTTGAGCTGCTGGTTCGTA-3'

PCR 反应参照文献方法^[13],并调整最佳反应条件。各个克隆的制备及序列测定方法同上 1.7。

1.9 *rep* 基因序列分析

各片段序列使用 Dnastar 4.0 软件进行拼接和校对,得到全长 *rep* 基因;利用 Dnastar, Bioedit 分析软件,选用 GenBank 中不同地域的 DPV、鹅细小病毒(GPV)等代表株进行同源性比较。(参考毒株见表 1)

表 1 参考病毒株
Table1 Reference viruses

Strains	Location	Host	Accession number
DPV-04Nb*	Ningbo, China	Duck	DQ250134
DPV-Hu-1	Hungary	Duck	NC_006147
DPV-Hu-2	Hungary	Duck	X75093
GPV-Hu	Hungary	Goose	NC_001701
GPV-shh	Shanghai, China	Goose	AF416726

*DPV-04Nb: being detected strain.

2 结果

2.1 病毒增殖及雏鸭感染试验

接种鸭胚在 48-72h 内, 死亡率 95%, 接种病毒的鸭胚发育不良, 胚体充血水肿, 皮肤见散在出血点 (图 1 A, B)。

临床症状: 实验组雏鸭于 24h-48h 表现精神沉郁、厌食、脚软、喘气, 排便呈黄绿色, 48h~72h 死亡的病雏鸭出现神经症状, 直至死亡, 与鸭细小病毒病的症状相符。感染雏鸭在 48h 内发病率 100%, 72h 内死亡率为 75%。

病理解剖: 发病死亡雏鸭肝脏呈现针尖大的出血点 (图 1 C); 脾脏、肾脏、胰腺明显充血或出血, 且胰腺表面有灰白色坏死点。小肠肠壁变薄, 肠管膨大, 肠内粘膜剥落, 出现灰白色条索状的渗出物。

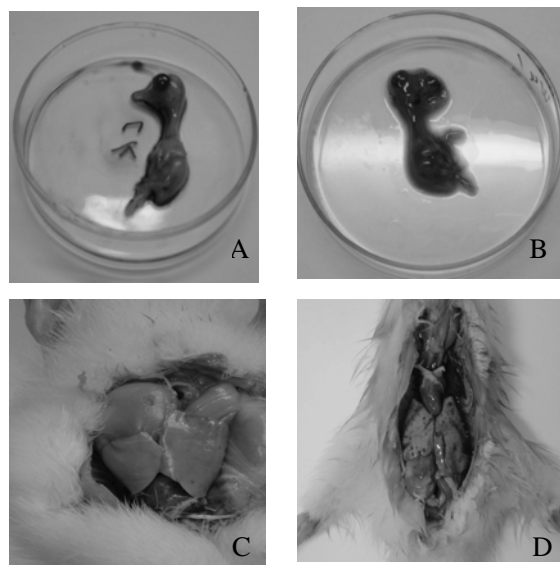


图1 感染实验结果

Fig.1 The result of infection experiment

A: Normal 13d duck embryo; B: Pathologic 13d duck embryo;
C: Normal liver tissue; D: Pathologic liver tissue

2.2 电镜观察

经纯化的病毒尿囊液电镜观察可见直径约 20nm 无囊膜的球形病毒粒子。(图 2)。

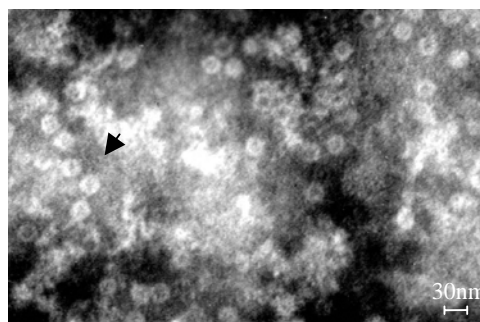


图2 病毒粒子电镜照片 (箭头所指即为DPV病毒粒子)

Fig 2 particles of Duck Parvovirus DPV virion shown by arrow.

2.3 免疫琼脂扩散实验

标准 DPV 阳性血清样品与 DPV 标准株、待检染毒尿囊液间可见有免疫沉淀线, 而与正常鸭胚尿囊液间无沉淀线。(图 3)

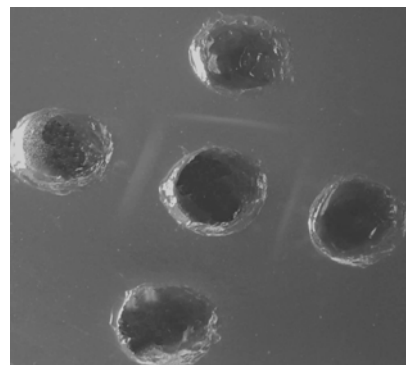


图 3 免疫琼脂扩散

Fig 3 Agargel immunodiffusion

Middle, Standard DPV positive serum; Upper and right, Being detected virus in allantoic fluids; Left, Standard DPV in allantoic fluids; Below, Normal allantoic fluids

2.4 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

待检染毒尿囊液的蛋白带与标准 DPV 染毒尿囊液的蛋白带型相似, 均为 3 条, 大小分别为 68kDa、58kDa、40kDa 左右 (图 4)。

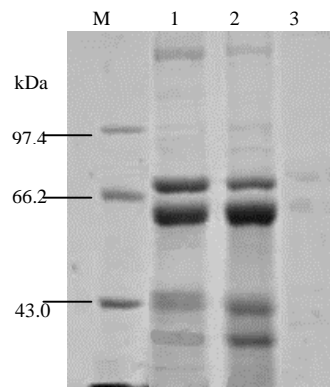


图 4 病毒粒子结构蛋白 SDS-PAGE

Fig.4 SDS-PAGE for structural protein of virus
M, Protein marker; 1, Allantoic fluids of the standard DPV; 2, Allantoic fluids of virus to be detected; 3, Normal allantoic fluids

2.5 DPV-04Nb 株 PCR 方法鉴定结果

使用基于 DPV *rep* 序列所设计的引物 P1 和 P2, 从病鸭肝组织悬液、待检染毒尿囊液和标准 DPV 染毒尿囊液中均扩增出片段大小约 600bp 的 DNA 片段, 与预期目的带相符 (图 5)。将所扩增片段克隆后测序, 所得序列采用 Blast (Basic Local Alignment Search Tool) 在 GenBank 中进行序列对比检索, 发现与其中的 DPV-Hu-1 株序列同源性为 98%。

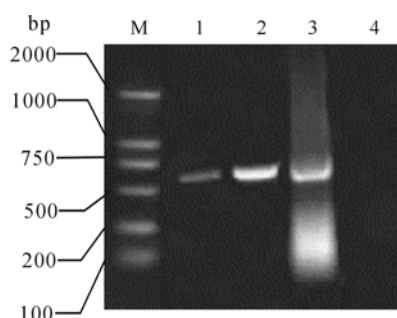


图 5 DPV-04Nb 株 PCR 鉴定

Fig.5 DPV-04Nb strain identification in PCR method
M, DL2000; 1, Allantoic fluids of virus to be detected; 2, Alla PCR ntoic fluids of standard virus to be detected; 3, Sick liver tissue to be detected; 4, Normal allantoic fluid

2.6 DPV 基因分段扩增

将 *rep* 基因分成 S1、S2、S3 和 S4 四段分段扩增, 在浓度为 1% 的琼脂糖凝胶上检测 PCR 结果 (图 6)。

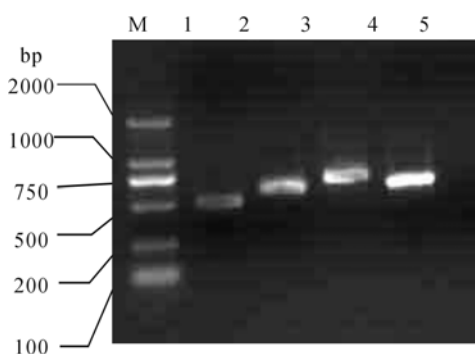


图 6 *rep* 基因分段扩增的检测

Fig.6 Agarose gel electrophoretic analysis of products of *rep* gene amplification
M, marker DL2000; 1, S1 segment; 2, S2 segment; 3, S3 segment; 4, S4 segment; 5, Normal allantoic fluids

2.7 DPV-04Nb *rep* 基因同源性比较

运用 Dnastar 4.0 软件同源性比较发现: DPV-04 Nb 株 *rep* 基因核苷酸序列与毒株 DPV-Hu-1, DPV-Hu-2, GPV-shh, GPV-Hu 同源性分别为 98%, 98%, 80% 和 82%; *rep* 基因推导所得的氨基酸序列与以上毒株的同源性依次为 97%, 96%, 88% 和 89%。

3 讨论

2004 年宁波地区多个鸭养殖场所暴发的急性传染性疫病, 其病症表现以及病理解剖都与鸭细小病毒病类似, 初步诊断为鸭细小病毒病, 病原经鸭胚尿囊腔接种增殖, 通过病毒粒子的形态观察、动物感染实验、病毒结构蛋白的 SDS-PAGE、免疫琼脂扩散实验及病毒 *rep* 基因的序列分析等鉴定指标, 可确认引起本次疫病的病原是鸭细小病毒, 命名为 DPV-04Nb 分离株。

为探讨我国 DPV 分离株与国外分离株间的异同以及 DPV 和 GPV 之间的亲缘关系, 本文参考 GenBank 中的 DPV 基因组序列分段设计引物, 应用 PCR 技术成功扩增得到 4 个核苷酸片段, 分别克隆后测序, 经拼接得到完整 *rep* 基因序列。经同源性比较发现: *rep* 基因核苷酸序列与毒株 DPV-Hu-1, DPV-Hu-2, GPV-shh, GPV-Hu 同源性分别为 98%, 98%, 80% 和 82%; *rep* 基因推导所得的氨基酸序列与以上参考毒株的同源性依次为 97%, 96%, 88% 和 89%。DPV *rep* 基因编码 DPV 的非结构蛋白 REP 蛋白, REP 蛋白是 DPV 基因组本身编码的一种反式激活蛋白, 对于其基因组的早期和晚期的转录都具有重要作用, 这是在我国首次对 DPV 分离株 *rep* 基因的序列进行测定和分析, 为诠释 DPV 致病机理和进一步研究鸭细小病毒病的防治方法提供了重要的科学依据。

References

- [1] Chen J H, Zhen J M (陈建红, 甄辑铭). The Illustration of Waterfowl Common Ailment (水禽常见病诊断图谱) [M]. Beijing: The China Agriculture Press, 2001.
- [2] Gan M H (甘孟侯). Avian Disease Sinica (中国禽病学) [M]. Beijing: The China Agriculture Press, 1999.
- [3] Liu H L, Li Z, Wang Y (刘惠莉, 李震, 王英). Isolation and Identification of a Muscovy Duckling Parvovirus [J]. Chin J Prevent Vet Med (中国预防兽医学报). 2000, 22: 98-100.
- [4] Huang A G, Jiang Y W, Pan B J (黄安国, 蒋玉雯, 盘宝进). Isolation and Identification of a Muscovy Duckling Parvovirus of Guangxi Province [J]. Guangxi Graziery Veterinary (广西畜牧兽医). 2002, 18 (6): 5-7.
- [5] Cheng Y Q, Lin T L (程由铨, 林天龙). Isolation and Identification of a Muscovy Duckling Parvovirus [J]. Chin J Virol (病毒学报). 1993, 9 (3): 228-235.
- [6] Lou H, Yang D W (娄华, 杨德威, 贺东升). Differential Diagnosis of a Muscovy Duck and Goose parvoviruses using

- Polymerase Chain Reaction [J]. Chin Preven Veter Med (中国预防兽医学报), 2000, 22 (6): 458-460.
- [7] Takehara K, Hyakutake K, Imamura T. Isolation, identification, and plaque titration of *parvovirus* from Muscovy ducks in Japan [J]. Avian Dis, 1994, 38(4):810-815.
- [8] Woolcock P R, Jestin V. Evidence of *Muscovy duck parvovirus* in Muscovy ducklings in California [J]. Vet Rec, 2000, 146 (3): 68-72.
- [9] G Le Gall-Reculé, V. Jestin. Biochemical and genomic characterization of *muscovy duck parvovirus* [J]. Arch Virol, 1994, 139: 121 - 131.
- [10] Fournier D, Gandvy D. *Muscovy Duck Parvovirus* (MDV) in France [A] in : Field vaccination Trials. Proceedings of the 9th international symposium on waterfowl. [c] Pisa:Italy. 1992, 16-18 September . 36-41.
- [11] Liu W B, Chai T J (刘文波, 柴同杰). The research progress of a *Muscovy Parvovirus* [J]. China Poultry (中国家禽). 2001, 23 (13): 33-35.
- [12] Zado ri Z, Stefaancsik R, Rauch T, *et al.* A nalysis of complete nucleotide sequence of *goose and mucovy duck parvoviruses* indicates common ancestral origin with adeno-associated virus. [J]. Virol. 1995, 212: 562-573.
- [13] Sambrook J, David W. Russell. *Moleccular Cloning* [M]: A Laboratory Manual (3rd ED).
- [14] Yin Z, Liu J H (殷震, 刘景华). *Animal Virology* (动物病毒学) [M]. 2nd ED, Beijing: The Press of Science. 1997. 804-806.

Notice of Inviting Contributions for English Version of *Virologica Sinica*

VIROLOGICA SINICA is an academic, professional periodical. It is published bimonthly by the Wuhan Institute of Virology, CAS and Chinese Society for Microbiology and distributed worldwide. It is the core issue in the biology and medicine science in China, and indexed and abstracted in Chemical Abstract (CA), BIOSIS previews (BA), Cambridge Science Abstracts(CSA), Life Sciences Collection, TOXLINE, Abstract Journal VINTI (AJ VINTI), Index of Copurnicus (IC), Excepta Media (EM) and some Chinese periodical citation abstracts and Databases.

VIROLOGICA SINICA will change its publishing language into English in 2007. It will be published for every 2 month. English manuscripts from any part of the world will be welcome, and should be sent to:

Editorial Office for *Virologica Sinica*,
Xiaohongshan Central 44,
Wuchang, Wuhan 430071,
CHINA

E-mail : bjb@wh.iov.cn