

## 3株鸭肝炎病毒I型结构基因VP1的 克隆及序列分析

甘一迪<sup>1</sup>, 刘家森<sup>1,2</sup>, 姜 骞<sup>1</sup>, 郭东春<sup>1</sup>, 司昌德<sup>1</sup>, 孟庆文<sup>1</sup>, 韩凌霞<sup>1</sup>, 刘 娣<sup>2\*</sup>, 曲连东<sup>1,2\*</sup>

(1. 中国农业科学院 哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室/  
实验动物中心, 哈尔滨 150001; 2. 黑龙江省农业科学院, 哈尔滨 150001)

**摘要:** 通过 RT-PCR 方法扩增鸭肝炎病毒 DHV-1:161/79/V、YH、HN 株的 VP1 基因的核苷酸序列。系统发育分析表明, 3 株病毒与已发表的 DHV-1 结构基因 VP1 核苷酸和氨基酸的同源性分别为 92.7%~96.9% 和 95.4%~96.6%, 与 DHV-1 变异株核苷酸和氨基酸序列的相似性均分别低于 75% 和 88%, 表明 3 株病毒属于 DHV-1, 与变异株是不同的血清型。强毒 DHV-1:161/79/V 的 VP1 蛋白第 49 和第 183 位氨基酸为 T 和 H, 弱毒 DHV-1:YH、HN 为 S 和 Q, 推测这 2 处位点的改变可能与病毒的强弱有关; DHV-1 和其变异株的 VP1 蛋白均没有保守的 RGD 序列; 变异株 N-DHV:90D、04G 在第 50 和 51 位比 DHV-1 多 2 个氨基酸(Q 和 D), 在第 147 和 185 位各缺失 1 个氨基酸(E 和 L), 而在变异株 DHV:AP-03337、AP-04009、AP-04114、AP-04203 的第 145 和 146 位比 DHV-1 多了 2 个氨基酸(G、G); 不同血清型的鸭肝炎病毒在 46-64 位、95-149 位、180-223 位抗原指数差别较大, 推测这些位点的改变可能影响病毒的生物学特性。

**关键词:** 鸭肝炎病毒(DHV); VP1 基因; 序列分析

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)06-0952-06

### Cloning and Sequence Analysis of VP1 Gene of Three Strains of Duck Hepatitis Virus Type 1

GAN Yi-di<sup>1</sup>, LIU Jia-sen<sup>1,2</sup>, JIANG Qian<sup>1</sup>, GUO Dong-chun<sup>1</sup>, SI Chang-de<sup>1</sup>, MENG Qing-wen<sup>1</sup>,  
HAN Ling-xia<sup>1</sup>, LIU Di<sup>2\*</sup>, QU Lian-dong<sup>1,2\*</sup>

(1. National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology / Experimental  
Animal Center, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy  
of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China; 2. Heilongjiang Academy  
of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China)

**Abstract:** VP1 gene was successfully cloned by RT-PCR from DHV-1 of strain 161/79/V, YH and HN. Phylogenetic and evolutionary analysis of VP1 gene revealed that the homology of the nucleic acid and amino acid sequences were 92.7% - 96.9% and 95.4% - 96.6% between the three strains and DHV-1 respectively, and were below 75% and 88% between the three strains and the mutant strains. The three strains were belong to DHV-1 and were different from mutant strains. The amino acid sequences of virulent strain 161/79/V of DHV-1 were T<sub>49</sub> and H<sub>183</sub>, which mutated as S<sub>49</sub> and Q<sub>183</sub> in avirulent strain YH and strain HN. The mutation would potentially lead to the changes of virulence. DHV-1 and mutant strains lacked the conservative peptide motif RGD. Strain 90 and strain 04G of N-DHV procured two more amino acids Q<sub>50</sub> and D<sub>51</sub> than DHV-1, but lost two amino acids, E<sub>147</sub> and L<sub>185</sub>. The strains AP-03337, AP-04009, AP-04114 and

收稿日期: 2008-02-25

基金项目: 黑龙江省科技计划项目(GC06TS102)

作者简介: 甘一迪(1982-), 女, 黑龙江哈尔滨人, 硕士生, 主要从事动物疫病诊断研究, E-mail: yidi\_gan@163.com

\* 通讯作者: 曲连东, E-mail: qld@hvri.ac.cn; 刘 娣, E-mail: liudi1963@sohu.com

AP-04203 of DHV procured two more amino acids  $G_{145}$  and  $G_{146}$  than DHV-1. Different serotypes of DHV had different antigenic index at 46-64aa, 95-149aa and 180-223aa, which impacted on biological characteristic potentially.

**Key words:** duck hepatitis virus(DHV); VP1 gene; sequence analysis

鸭病毒性肝炎(Duck viral hepatitis, DVH)是引起雏鸭的一种传播迅速、高度致死性的传染病,以肝炎为主要症状。DVH 至少由 3 种不同类型的病毒引起,分别为鸭肝炎病毒(Duck hepatitis virus, DHV) I 型、II 型和 III 型<sup>[1]</sup>。近年来,鸭病毒性肝炎在世界各地不断发生,其发病率和死亡率均呈上升趋势,养鸭比较集中的地区均遭受了巨大的经济损失和严重的威胁,我国主要流行 I 型 DHV。

此前学者们从形态学上将鸭肝炎病毒 I 型(DHV-1)归为小 RNA 病毒科、肠道病毒属。近来陆续有研究人员测定了 DHV-1 和其变异株的基因组序列,分析表明它们具有典型小 RNA 病毒的基因组结构特征,但其确切的分类地位仍没有确定。DHV-1 基因组为单股正链的 RNA,只有 1 个开放读码框(ORF),形成 1 个多聚蛋白,P1 区编码结构蛋白 VP0、VP3 和 VP1;P2 和 P3 区编码非结构蛋白 2A1、2A2、2B、2C、3A、3B、3C 和 3D<sup>[2]</sup>。小 RNA 病毒的结构蛋白中,VP1 位于壳体的表面,含有主要的抗原决定簇,能够诱导病毒产生中和抗体,与病毒基因型和血清型的多样性有关。在分子流行病学调查中,常用 VP1 的序列差异作为建立遗传变异系谱树的依据<sup>[3]</sup>。因此,VP1 基因序列的测定,不但可以揭示核苷酸和氨基酸多肽链的组成,还可用于遗传变异分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

强毒株 DHV-1:161/79/V,为鸭胚适应毒,由东北农业大学王君伟教授惠赠;DHV-1:YH、HN 为笔者实验室保存弱毒株,均为鸡胚适应毒。感受态细胞 *E. coli* TG1 为笔者实验室保存。AMV 反转录酶、5×AMV 反转录酶缓冲液、RNA 酶抑制剂、LA Taq DNA 聚合酶等试剂购于 TaKaRa 公司。

### 1.2 病毒 RNA 的提取

病毒分别用相适应鸭胚和鸡胚增殖,收获胚体,研磨后反复冻融 3 次,3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,取上清,用 TRIzol 提取病毒 RNA。

### 1.3 引物设计

根据在 GenBank 登录的 DHV-1:03D(登录号为 DQ249299)的 VP1 核苷酸序列设计引物,分别在上游引物引入 *EcoR* I 酶切位点,下游引物引入 *Xho* I 酶切位点。上游引物 P1: 5'-CCGGAAT-TCGGTGATTCCAACCAGTTG-3';下游引物 P2: 5'-CCGCTCGAGTTATTCAATTTCCAGATTG-AG-3'。

### 1.4 VP1 基因的扩增

用随机引物 6mer 反转录合成 cDNA,体系为 20 μL,反应过程按说明书进行操作。取上述反应的 cDNA 为模板,用合成的引物 P1、P2 进行 PCR 扩增,反应条件:94 °C 5 min;94 °C 30 s,50 °C 30 s,72 °C 1 min,30 个循环;72 °C 10 min。以 1%的琼脂糖凝胶电泳分析。

### 1.5 序列测定与分析

扩增出的基因片段克隆到 pMD18-T 载体中,经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定正确的重组质粒,送北京英骏公司测序。测序结果用 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)在线进行同源搜索。核酸和氨基酸序列分别用 DNASTar 中 MegAlign 程序的 Clustal W 运算,结果用 GeneDoc2.6 (<http://www.psc.edu/biomed/genedoc/>)进行遗传进化分析。用 DNASTar 中 Protean 程序分析抗原指数。

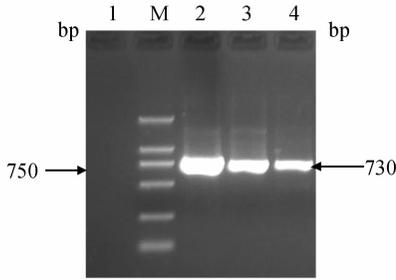
## 2 结果

### 2.1 VP1 基因扩增结果和酶切鉴定

从 DHV-1:161/79/V、YH、HN 中均扩增出约 730 bp 的目的片段(图 1)。目的片段回收后,克隆到 pMD18-T 载体,得到的重组质粒经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定正确(图 2)。

### 2.2 序列分析

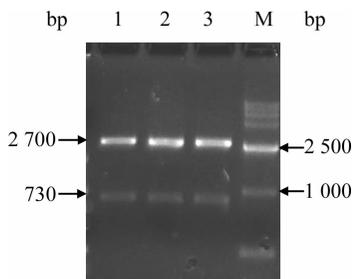
测序结果表明 DHV-1:161/79/V、YH、HN 的 VP1 基因均为 714 bp,推导氨基酸序列的同源性比对结果显示克隆的基因均为 DHV-1 的结构基因 VP1,且与小 RNA 病毒科最相近。3 株病毒的 VP1 基因与小 RNA 病毒其它 9 个属成员的 VP1 基因进



1. 阴性对照; M. DL2000 DNA marker ; 2. 161/79/v VP1 基因扩增产物; 3. YH VP1 基因扩增产物; 4. HN VP1 基因扩增产物  
 1. Negative control; M. DL2000 DNA marker; 2. VP1 gene product of strain 161/79/v; 3. VP1 gene product of strain YH; 4. VP1 gene product of strain HN

图 1 VP1 基因 RT-PCR 扩增结果

Fig. 1 Product of VP1 gene detected by RT-PCR



M. DL15000 DNA marker; 1. 161/79/v 重组质粒的酶切产物; 2. YN 重组质粒的酶切产物; 3. HN 重组质粒的酶切产物  
 M. DL15000 DNA marker; 1. Digested product of recombinant plasmid 161/79/v; 2. Digested product of recombinant plasmid YN; 3. Digested product of recombinant plasmid HN

图 2 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 2 Digested identification of recombinant plasmid

行同源性比较,结果显示它们与双埃柯病毒属 (*Parechovirus*) 的同源性最高,在 23.5%~25.6% (双埃柯病毒属自身成员间同源性可以达到 45% 左右)(图 3),但是它们核苷酸与氨基酸序列的一致性要比双埃柯病毒属本成员间的序列一致性低很多,因此 DHV-1 应列为小 RNA 病毒科新的病毒属。

3 株病毒的 VP1 基因序列与近来发表的 DHV-1 及其变异株 (N-DHV: 90D、04G 和 DHV: AP-03337、AP-04009、AP-04114、AP-04203)(表 1) 序列进行同源性比较,结果显示:3 个毒株核苷酸序列的同源性以及与已发表 DHV-1 的核酸序列同源性分别为 96.8%~98.9% 和 92.7%~96.9%,氨基酸

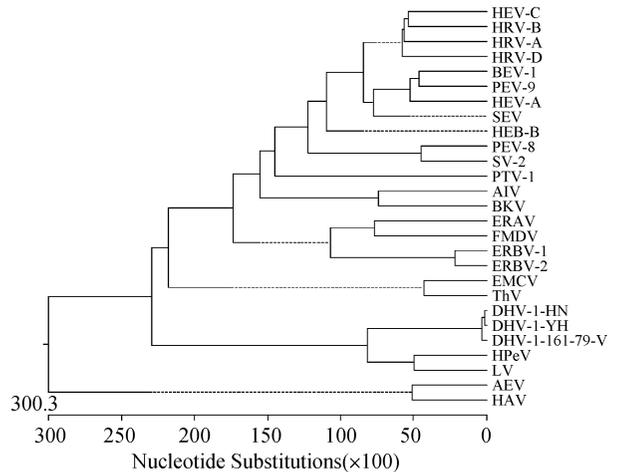


图 3 DHV-1 与小 RNA 病毒 9 个属的 27 个病毒的系统进化关系

Fig. 3 Phylogenetic relationship of DHV-1 with 27 representative species of nine picomavirus genera

序列的同源性分别为 98.7%~99.6% 和 95.4%~96.6%,说明 3 株病毒均为 DHV-1。分析 DHV-1 与发表的变异株序列的同源性,核苷酸序列的同源性为 69.3%~73.2%,氨基酸同源性为 70.6%~76.1%,低于同一血清型序列间核苷酸同源性  $\geq 75\%$ 、氨基酸同源性  $\geq 88\%$  的比例(表 2);进化树分析显示:所测 3 个毒株与 DHV-1 亲缘关系较近,位于同一分支上,而变异株 N-DHV:90D 与 04G 位于一个分支上, DHV: AP-03337、AP-04009、AP-04114、AP-04203 位于另一个分支上(图 4)。由此说明 3 个毒株与 DHV-1 属于同一血清型,而与变异株为不同血清型。进一步比对变异毒株 2 个分支序列间氨基酸同源性,发现只有 70.2%~76.9%,远远低于它们各自分支内的同源性(99.2%~99.6%)。通过用 GeneDoc2.6 软件输出氨基酸序列比对结果,发现位于同一分支的 N-DHV:90D、04G 在第 50 和 51 位比 DHV-1 多 2 个氨基酸(Q 和 D),在第 147 和 185 位各缺失 1 个氨基酸(E 和 L);而另一分支的 DHV: AP-03337、AP-04009、AP-04114、AP-04203 在第 145 和 146 位比 DHV-1 多了 2 个氨基酸(G 和 G)(图 5)。这进一步证明了 DHV-1 与变异株的两个分支间存在较大差异,属于不同的血清型。

在小 RNA 病毒结构蛋白 VP1 中,有保守的氨基酸序列 RGD。而在 DHV-1 及其变异株 (N-DHV: 90D、04G 和 DHV: AP-03337、AP-04009、AP-04114、AP-04203) 中, RGD 序列变为 SGD 序列

(195-197aa)和 QSD(位于 195-197aa 或 197-199aa) (图 6)。氨基酸序列分析表明,强毒 DHV-1:161/79/V 的第 49 和第 183 位氨基酸分别为 T 和 H,弱

毒 DHV-1:YH、HN 中为 S 和 Q(图 7)。推测这 2 处位点的改变可能与病毒的强弱有关。

表 1 序列分析用到的小 RNA 病毒毒株及其在 GenBank 的登录号

Table 1 Virus strains and accession numbers of GenBank used in the analysis

| 属 Genus              | 种 Species                                   | 毒株 Strain           | 登录号 Accession number |
|----------------------|---|---------------------|----------------------|
| <i>Parechovirus</i>  | <i>Ljungan virus</i>                        | 87-012              | NC_003976            |
|                      | <i>Human arechovirus</i>                    | HPeV-1; Harris      | L02971               |
| <i>Enterovirus</i>   | <i>Bovine enterovirus</i>                   | BEV-1; VG/5/7       | NC 001859            |
|                      | <i>Human enterovirus A</i>                  | HEVV-A16; G-10      | NC 001612            |
|                      | <i>Human enterovirus B</i>                  | HEV-B1; Japan       | NC 001472            |
|                      | <i>Human enterovirus C</i>                  | HEV-A21; Coe        | NC 001428            |
|                      | <i>Human enterovirus D</i>                  | HEV-70; J670/71     | NC 001430            |
|                      | <i>Porcine enterovirus B</i>                | PEV-9; UKG/410/73   | NC 004441            |
|                      | <i>Simian enterovirus A</i>                 | SEV-A1; A-2 plaque  | NC 003988            |
| <i>Rhinovirus</i>    | <i>Human rhinovirus A</i>                   | HRV-89; 41467-Gallo | NC 001617            |
|                      | <i>Human rhinovirus B</i>                   | HRV-14; 1059        | NC 001490            |
| <i>Aphthovirus</i>   | <i>Equine rhinitis A virus</i>              | ERAV; PERV          | NC 003982            |
|                      | <i>Foot-and-mouth disease virus</i>         | FMDV-O; Taiwan/97   | NC 004004            |
| <i>Cardiovirus</i>   | <i>Encephalomyocarditis virus</i>           | EMCV; Rueckert      | NC 001479            |
|                      | <i>Theilovirus</i>                          | ThV; GD VII         | NC 001366            |
| <i>Hepatovirus</i>   | <i>Hepatitis A virus</i>                    | HAV; HM-175         | NC 001489            |
|                      | <i>Avian encephalomyelitis-like viruses</i> | AEV; Calnek         | NC 003990            |
| <i>Teschovirus</i>   | <i>Porcine teschovirus</i>                  | PTV-1; F65          | NC 003985            |
| <i>Kobuvirus</i>     | <i>Aichi virus</i>                          | AiV; A846/88        | NC 001918            |
|                      | <i>Bovine kobuvirus</i>                     | BKV; U-1            | NC 004421            |
| <i>Erbovirus</i>     | <i>Equine rhinitis B virus</i>              | ERBV-1; P1436/71    | NC 003983            |
|                      |   | ERBV-2; P313/75     | NC 003077            |
| Unassigned           | Duck hepatitis virus type 1                 | DHV-1;H             | DQ249300             |
|                      | Duck hepatitis virus type 1                 | DHV-1;5886          | DQ249301             |
|                      | Duck hepatitis virus type 1                 | DHV-1;03D           | DQ249299             |
|                      | Duck hepatitis virus type 1                 | DHV-1;C80           | DQ864514             |
|                      | Duck hepatitis virus type 1                 | DHV-1;DRL-62        | DQ219396             |
|                      | Duck hepatitis virus type 1                 | DHV-1;R85952        | DQ226541             |
|                      | Duck hepatitis virus type 1                 | DHV-1;161/79/V      |                      |
|                      | Duck hepatitis virus type 1                 | DHV-1;YH            |                      |
|                      | Duck hepatitis virus type 1                 | DHV-1;HN            |                      |
|                      | Duck hepatitis virus new type               | N-DHV;90D           | EF067924             |
|                      | Duck hepatitis virus new type               | N-DHV;04G           | EF067923             |
|                      | Duck hepatitis virus                        | DHV;AP-03337        | DQ256132             |
|                      | Duck hepatitis virus                        | DHV;AP-04009        | DQ256133             |
|                      | Duck hepatitis virus                        | DHV;AP-04114        | DQ812093             |
| Duck hepatitis virus | DHV;AP-04203                                | DQ256134            |                      |

表 2 15 株 DHV 参考毒株 VP1 同源性

Table 2 Amino acid identities of DHV VP1 proteins among fifteen strains %

|    | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   | 13   | 14   | 15     |          |
|----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--------|----------|
| 1  | 98.7 | 99.6 | 96.2 | 96.2 | 95.8 | 70.6 | 71.0 | 95.8 | 76.1 | 76.1 | 76.1 | 76.1 | 95.0 | 96.6 | 1      | YH       |
| 2  | 1.3  | 98.2 | 96.2 | 96.6 | 96.2 | 70.6 | 71.0 | 95.4 | 76.1 | 76.1 | 76.1 | 76.1 | 95.0 | 96.6 | 2      | 161-79-v |
| 3  | 0.4  | 0.8  | 96.6 | 96.6 | 96.2 | 70.6 | 71.0 | 95.8 | 76.1 | 76.1 | 76.1 | 76.1 | 95.4 | 97.1 | 3      | HN       |
| 4  | 3.9  | 3.9  | 3.4  | 97.5 | 97.9 | 70.6 | 70.2 | 95.4 | 76.5 | 76.5 | 76.5 | 76.9 | 96.6 | 96.6 | 4      | H        |
| 5  | 3.9  | 3.4  | 3.4  | 2.8  | 96.6 | 71.0 | 70.6 | 94.5 | 76.9 | 76.9 | 76.9 | 77.3 | 94.5 | 95.9 | 5      | R85952   |
| 6  | 4.3  | 3.9  | 3.9  | 2.1  | 3.4  | 99.2 | 69.7 | 78.2 | 78.6 | 78.2 | 78.2 | 71.0 | 70.2 | 7    | 03D    |          |
| 7  | 36.3 | 36.3 | 36.3 | 37.0 | 36.3 | 37.0 | 0.8  | 70.2 | 77.7 | 78.2 | 77.7 | 77.7 | 70.6 | 70.6 | 8      | 04G      |
| 8  | 36.3 | 36.3 | 36.3 | 37.0 | 36.3 | 37.0 | 0.8  | 70.2 | 77.7 | 78.2 | 77.7 | 77.7 | 70.6 | 70.6 | 8      | 90D      |
| 9  | 4.3  | 4.8  | 4.3  | 4.8  | 5.7  | 4.3  | 37.7 | 37.7 | 75.2 | 75.2 | 75.2 | 75.6 | 95.4 | 97.9 | 9      | 5886     |
| 10 | 28.9 | 28.9 | 28.9 | 28.3 | 27.7 | 28.3 | 25.0 | 25.0 | 30.1 | 99.6 | 99.6 | 99.6 | 76.5 | 76.5 | 10     | AP-03337 |
| 11 | 28.9 | 28.9 | 28.9 | 28.3 | 27.7 | 28.3 | 24.4 | 24.4 | 30.1 | 0.4  | 99.2 | 99.2 | 76.5 | 76.5 | 11     | AP-04009 |
| 12 | 28.9 | 28.9 | 28.9 | 28.3 | 27.7 | 28.3 | 25.0 | 25.0 | 30.1 | 0.4  | 0.8  | 99.2 | 76.5 | 76.5 | 12     | AP-04114 |
| 13 | 28.9 | 28.9 | 28.9 | 27.7 | 27.1 | 27.7 | 25.5 | 25.5 | 29.5 | 0.4  | 0.8  | 0.8  | 76.9 | 76.9 | 13     | AP-04203 |
| 14 | 5.2  | 5.2  | 4.8  | 3.4  | 5.7  | 2.6  | 36.3 | 36.3 | 4.8  | 28.3 | 28.3 | 27.7 | 95.8 | 14   | C80    |          |
| 15 | 3.4  | 3.4  | 3.0  | 3.4  | 4.3  | 3.0  | 37.0 | 37.0 | 2.1  | 28.3 | 28.3 | 27.7 | 4.3  | 15   | DRL-62 |          |

2.3 抗原指数分析

通过 DNASTar 中 Protean 程序分析了 5 株鸭肝炎病毒 (DHV-1: 161/79/V、HN、YH; N-DHV: 90D; DHV: AP-03337) 结构蛋白 VP1 的抗原指数 (图 8), DHV-1: 161/79/V 与 HN、YH 差异不大, 只是在 46—53 位氨基酸略有不同。但是这 3 个毒株又与变异株 N-DHV: 90D 和 DHV: AP-03337 在

46—64 位、95—149 位、180—223 位抗原指数差异更大, 且这些位点的抗原指数也比较高, 推测它们可能是 VP1 基因的主要抗原位点, 且易变异。

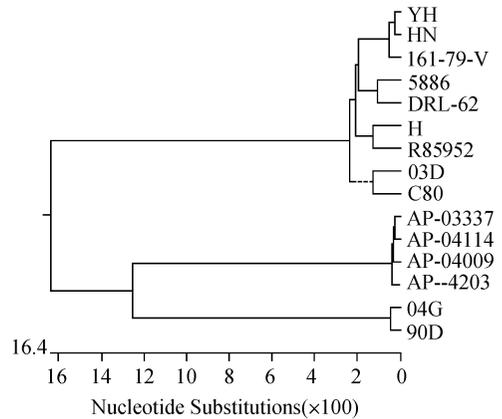


图 4 15 株鸭肝炎病毒 VP1 基因编码氨基酸序列进化关系

Fig. 4 Phylogenetic relationship of amino acid sequences of the VP1 proteins from fifteen DHV strains

|          | 50                             | 140                    | 150           | 190              |
|----------|--------------------------------|------------------------|---------------|------------------|
| YH       | : -44nt- VQHAS--TVQELDL -80nt- | PTRPIEGTS--EATFGRLEFMW | -26nt- TSTILS | QKSKDVI -45nt-   |
| 161-79-v | : -44nt- VQHAT--TVQELDL -80nt- | PTRPIEGTS--EATFGRLEFMW | -26nt- TSTILS | SHKSNVDI -45nt-  |
| HN       | : -44nt- VQHAS--TVQELDL -80nt- | PTRPIEGTS--EATFGRLEFMW | -26nt- TSTILS | QKSNVDI -45nt-   |
| 90D      | : -44nt- VQHDADGVOELDL -80nt-  | PTRPTDRR---TPEGRLYIW   | -26nt- TYTA-  | LHVNHIET -45nt-  |
| 04G      | : -44nt- VQHDADGVOELDL -80nt-  | PTRPTDRR---TPEGRLYIW   | -26nt- TYTA-  | LRVNHIEI -45nt-  |
| AP-04114 | : -44nt- VQHTG--EVQEMDL -80nt- | PTRPMEASQGGGLTFGRLYIW  | -26nt- TYTAP  | TRSNALIEI -45nt- |
| AP-04203 | : -44nt- VQHTG--EVQEMDL -80nt- | PTRPMEASQGGGLTFGRLYIW  | -26nt- TYTAP  | TRSNGLIEI -45nt- |
| AP-03337 | : -44nt- VQHTG--EVQEMDL -80nt- | PTRPMEASQGGGLTFGRLYIW  | -26nt- TYTAP  | TRSNGLIEI -45nt- |
| AP-04009 | : -44nt- VQHTG--EVQEMDL -80nt- | PTRPMEASQGGGLTFGRLYIW  | -26nt- TYTAP  | TRSNGLIEI -45nt- |

图 5 3 个血清型 9 株鸭肝炎病毒 VP1 基因编码氨基酸序列比较

Fig. 5 Comparison of amino acid sequences of the VP1 proteins of nine DHV strains from three serotypes

|          | 200                   | 210 |
|----------|-----------------------|-----|
| YH       | : IPTLNQSGDEVDCHFCEI( |     |
| 161-79-v | : IPTLNQSGDEVDCHFCEI( |     |
| HN       | : IPTLNQSGDEVDCHFCEI( |     |
| 03D      | : IPTLDQSGDEVDCHFCEI( |     |
| H        | : IPTLDQSGDEVDCHFCEI( |     |
| R85952   | : IPTLDQSGDEVDCHFCEI( |     |
| C80      | : IPTLDQSGDEVDCHFCEI( |     |
| DRL-62   | : IPTLNQSGDEVDCHFCEI( |     |
| 5886     | : IPTLNQSGDEVDCHFCEI( |     |
| 04G      | : TLALHDQSDTVDCHICDL( |     |
| 90D      | : TLALHNQSDTVDCHICDL( |     |
| AP-03337 | : IMNLHEQSDQPDCHLCKI( |     |
| AP-04009 | : IMNLHEQSDQPDCHLCKI( |     |
| AP-04114 | : IMNLHEQSDQPDCHLCKI( |     |
| AP-04203 | : IMNLHEQSDQPDCHLCKI( |     |

图 6 15 株鸭肝炎病毒 VP1 蛋白氨基酸序列的比较

Fig. 6 Alignment of amino acid sequences of VP1 from fifteen duck hepatitis virus strains

3 讨论

小 RNA 病毒结构蛋白 VP0、VP3 和 VP1 构成病毒粒子的衣壳, 决定了小 RNA 病毒的生物学和血清学特性, 适合用于在种属和血清型方面进行系统发生分析。其中 VP1 蛋白频繁用于小 RNA 病毒 (HAV、FMDV 等) 的分子流行病学和发生史分析 [4-5]。其标准如下: 核苷酸序列的一致性, ≥75% 和/或氨基酸序列的一致性 ≥88% 为同一血清型 [6]。本试验中作者所测得的 3 个毒株与 DHV-1 属于同一血清型, 且 DHV-1 与其变异株的 2 个分支分别属于 3 个不同的血清型。

|            |            |         |         |          |          |
|------------|------------|---------|---------|----------|----------|
|            |            | 50      |         | 180      | 190      |
| 161-79-v : | LVRTVQHAT  | TVQELDL | -121nt- | TSTILSHK | SNDVIPTL |
| YH :       | LVRTVQHAST | TVQELDL | -121nt- | TSTILSQK | SKDVIPTL |
| HN :       | LVRTVQHAST | TVQELDL | -121nt- | TSTILSQK | SNDVIPTL |

图 7 3 株鸭肝炎病毒 VP1 基因编码氨基酸序列比较

Fig. 7 Comparison of amino acid sequences of the VP1 proteins from three strains of DHV

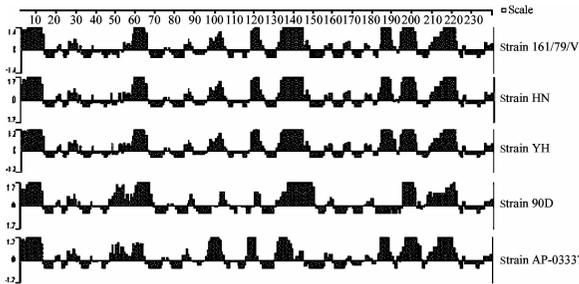


图 8 5 株鸭肝炎病毒 VP1 蛋白抗原指数的比较

Fig. 8 Results of antigenic index of VP1 protein of five DHV strains

在小 RNA 病毒中,结构蛋白 VP1 是小 RNA 病毒的主要免疫原<sup>[5]</sup>,诱导中和抗体的产生,具有抗原高变区。测得的 3 株病毒的 VP1 蛋白的抗原指数较高,且各株差异不大,只是在 46—53 位抗原指数略有不同。但是这 3 个毒株与其变异株 N-DHV:90D 和 DHV:AP-03337 在 46—64 位、95—149 位和 180—223 位 3 个区域抗原指数差异更明显,推测这些区域可能是 DHV-1 与变异株间 3 个血清型抗原位点的高变区,它们的改变也许会影响 3 个血清型病毒的抗原性和生物学特性,这也可能是不同血清型之间不能产生交叉保护的原因。

小 RNA 病毒的结构蛋白 VP1 有保守的氨基酸序列 RGD,它履行着吸附细胞与细胞受体结合的重要功能<sup>[7]</sup>。在 FMDV 的 VP1 中,该基序位于 G-H loop 中,而在 CAV-9、HPeV-1 和 HPeV-2 中,该基序位于 VP1 的羧基端<sup>[8-9]</sup>。一般来讲,当 RGD 肽序变异为 SDG 或者 RGS D 就会改变病毒粒子与细胞受体的关系。例如,当 FMDV-A24 株的 RGD 序列被 SGD 取代时,病毒形成空斑的能力和其复制能力就会减弱<sup>[10]</sup>。序列分析表明,在 DHV-1 中该序列为 SGD (195—197aa),在其变异株为 QSD(195—197aa 或 197—199aa),而不是保守的 RGD 序列,可以推测鸭肝炎病毒可能并不是像 FMDV、CAV-9、HPeV-1 和 HPeV-2 一样通过 RGD 与细胞受体结合的。

总之,随着鸭肝炎病毒基因组序列的发表,其结构和功能也会陆续揭示,人们对该病毒的生物学特

性将有更深入的认识。

#### 参考文献:

- [1] SAIF Y M. 禽病学[M]. 高福,苏敬良,索勋,译. 第 11 版. 北京:中国农业出版社,2004:376-384.
- [2] TSENG C H, KNOWLES N J, TSAI H J. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 indicates should be assigned to a new genus[J]. *Virus Research*, 2007, 123(2):190-203.
- [3] LINDBERG A M, JOHANSSON S. Phylogenetic analysis of Ljungan virus and A-2 plaque virus, new members of the Picornaviridae [J]. *Virus Res*, 2002, 85(1):61-70.
- [4] KNOWLES N J, SAMUEL A R. Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus[J]. *Virus Res*, 2003, 91:65-80.
- [5] RODRIGO M J, DOPAZO J. Evolutionary analysis of the picornavirus family[J]. *J Mol Evol*, 2002, 40: 362-371.
- [6] OBERSTC M S, MAHER K, PALLANSCH M A. Genomic evidence that simian virus 2 and six other simian picornaviruses represent a new genus in Picornaviridae[J]. *Virology*, 2003, 314:283-293.
- [7] ROSSMAN M G, ARNOLD A, ERICKSON J W, et al. Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses [J]. *Nature*, 1985, 317:145-153.
- [8] BOONYAKIAT Y, HUGHES P J, GHZI E, et al. Arginine-glycine-aspartic acid motif is critical for human parechovirus 1 entry [J]. *J Virol*, 2001, 75: 10000-10004.
- [9] WILLIAM P R, KAJANDER T, HYYPIA T, et al. Intergrin alpha v beta 6 is an RGD-dependent receptor for coxsack-icivirus A9 [J]. *J Virol*, 2004, 78: 6967-6973.
- [10] RIEDER E, HENRY T, DUQUE H, et al. Analysis of a foot-and-mouth disease virus type A24 isolate containing an SGD receptor recognition site in vitro and its pathogenesis in cattle [J]. *J Virol*, 2005, 79: 12989-12988.