

2007~2008年川渝部分地区鸭圆环病毒感染情况调查及其序列分析

杨晓伟, 张忠丽, 谭雅文, 叶虹才, 陈欢, 赵光伟^{*} (西南大学荣昌校区, 重庆 402460)

摘要 [目的]研究鸭圆环病毒病在川渝地区的流行情况。[方法]在无茵条件下采集川渝地区18只病死麻鸭的肝脏、肺脏、脾脏、淋巴和心脏等组织,提取DNA。根据鸭圆环病毒的保守序列设计引物进行PCR扩增,对扩增产物进行序列测定和同源性分析。[结果]在18只病死麻鸭中发现1例阳性病例,经PCR扩增得到1条228 bp左右的条带;阳性病例的PCR产物连接到PMD18-T载体上,转入大肠杆菌JM109,PCR鉴定正确;阳性病例PCR产物与DQ166838、EF370476、EF451157、EU344807、NC005053、AY228555的同源性分别为96.5%、95.3%、90.6%、89.8%、89.4%、89.4%。[结论]鸭圆环病毒病在川渝地区的感染水平较低。

关键词 鸭圆环病毒;感染情况;序列分析

中图分类号 S851.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)18-08383-02

Investigation on Duck *Circovirus* Infection Situation in Sichuan and Chongqing Partial Area in 2007-2008 and Analysis on its Sequence

YANG Xiao-wei et al (Rongchang Campus of Southwest University, Rongchang, Chongqing 402460)

Abstract [Objective] The aim was to study the epidemic situation of duck circovirus in Sichuan and Chongqing area. [Method] 18 died sheldrake in Sichuan and Chongqing area were selected, and the DNA in their liver, lung, spleen, lymph and heart was extracted at sterile condition. The primer was designed according to the conserved sequence of Duck Circovirus for PCR amplification, the sequence of amplified product was determined and its homology was analyzed. [Result] One positive sample was found in 18 died sheldrake. After PCR amplification, a strain with about 228 bp was obtained. The PCR product of positive sample was inserted into PMD18-T vector and transferred into *Escherichia coli* JM109, its sequence was correct detected by PCR, and its homologies with DQ166838, EF370476, EF451157, EU344807, NC005053, AY228555 were 96.5%, 95.3%, 90.6%, 89.8%, 89.4% and 89.4% resp. [Conclusion] The infection level of duck circovirus in Sichuan and Chongqing area was low.

Key words Duck *Circovirus*; Infection situation; Sequence analysis

圆环病毒科(Circoviridae)是最近发现的新病毒家族,该科病毒较小、无囊膜,呈球形,是唯一具有环形单股DNA的动物病毒,也是目前已知最小的动物病毒。根据2004年国际病毒委员会(ICTV)分类报告,圆环病毒科(Circoviridae)包括3个属:环病毒属(Gyrovirus)、圆环病毒属(Circovirus)和Anellovirus属,现已报道的鸽圆环病毒(Pigeon circovirus)、鹅圆环病毒(Goose circovirus)、鸚鵡喙羽病病毒(Beak and feather disease virus)和金丝雀圆环病毒(Canary circovirus)等均属于圆环病毒属^[1]。

鸭圆环病毒最早于2003年由德国学者Hattermann^[2]通过PCR和电镜从番鸭的法氏囊组织中发现。2004年Soike等^[3]研究发现,感染圆环病毒42日龄的半番鸭临床上表现为羽毛紊乱、生长迟缓、体况消瘦,组织病理学检测显示,鸭法氏囊内淋巴细胞减少、法氏囊出现坏死、组织细胞增多,这与其他动物圆环病毒引起的病毒诱导性淋巴组织损伤类似,由此推测该病毒可能具有免疫抑制作用。傅光华等^[4]于2008年成功克隆了鸭圆环病毒的全基因序列。

近几年来,对鸭、鹅等水禽仅呈隐形感染的疾病也可导致水禽死亡,一些曾经免疫过禽流感疫苗的鸭也爆发流感,对此,很多研究者认为是水禽感染了某种或某几种能够产生免疫抑制的病原,导致其机体免疫力下降,从而对禽流感等病原二次感染的机会增加,其中圆环病毒是最重要的病原之一。

川渝地区是我国西南地区水禽养殖较集中的地区,水禽疾病的检测和控制十分重要,为此,笔者对重庆荣昌、大足以及四川泸州、泸县等周边地区11个乡镇鸭圆环病毒病的发

病情况进行了调查,以期了解该病在川渝地区的流行情况,为防治水禽疾病提供可靠的信息。

1 材料与方法

1.1 材料 在重庆荣昌县、大足县以及四川泸州、泸县共18家养鸭户无菌采集病死麻鸭的肝脏、肺脏、脾脏、淋巴结和心脏等组织, -20℃保存备用。试剂:蛋白酶K、琼脂糖购于上海生物工程技术服务有限公司;PCR扩增试剂盒购于IN-VITROGEN公司;切胶回收试剂盒购于OMEGA公司;PMD18-T载体购于Takara公司;JM109大肠杆菌由该实验室保存;引物由上海英骏生物公司合成;其余化学试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 病料处理。将收集到的病料用玻璃匀浆器制成匀浆,用无菌PBS(pH=7.2)按1:5稀释,在常温与-20℃条件下反复冻融3次,4℃、12 000 r/min离心5 min,取上清液置于灭菌离心管中,4℃、12 000 r/min离心5 min,取上清液备用。

1.2.2 病毒DNA的提取。取上清液于95℃水浴中加热5 min,然后冰浴5 min;取处理后的上清液540 μl,加入20 μl 20 mg/ml的蛋白酶K和60 μl 10%的SDS,混匀后放入56℃水浴中2 h;加入等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),混匀,4℃、12 000 r/min离心15 min;取上清液置于新的灭菌离心管中,加等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),混匀,4℃、12 000 r/min离心15 min;取上清液置于新的灭菌离心管中,加入1/10体积3 mol/L(pH=5.2)的醋酸钠、2倍体积的无水乙醇,混匀,-20℃过夜;12 000 r/min离心15 min;弃上清,室温干燥除去乙醇,加入20 μl ddH₂O溶解DNA作为模板,-20℃保存备用。

1.2.3 鸭圆环病毒特异片段的PCR扩增与检测。参考台湾学者Chen^[5]根据鹅圆环病毒(GoCV)和鸭圆环病毒(DuCV)

基金项目 西南大学荣昌校区“青苗基金”项目(08QM06)。

作者简介 杨晓伟(1980-),女,吉林通化人,硕士,讲师,从事预防兽医学教学与科研工作。^{*}通讯作者。

收稿日期 2009-03-09

共同的保守序列设计的1对通用引物,在上海英骏生物技术有限公司合成1对PCR扩增引物:上游引物P1:5'-TATTAT-TACGGGCGCTGTA-3';下游引物P2:5'-TCAGGAATCCCT-GAAGGTGA-3'。目的片段大小为238 bp。

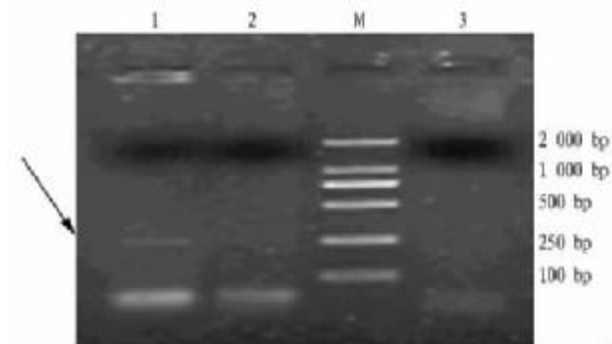
25 μ l PCR反应体系:10 \times PCR buffer 2.5 μ l, dNTP mixture (2.5 mmol/L) 2.5 μ l, 10 pmol上下游引物各1.0 μ l, Taq酶0.5 μ l, 模板DNA 1.0 μ l, 用ddH₂O补充至25 μ l。PCR反应条件:95 $^{\circ}$ C预变性3 min, 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 55 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸30 s, 35个循环, 扩增结束后72 $^{\circ}$ C延伸10 min, 4 $^{\circ}$ C保存终止反应。PCR产物用1.0%的琼脂糖凝胶进行电泳, 电泳结果用凝胶成像系统及其软件进行扫描与分析。

1.2.4 PCR产物的序列测定及分析。参照OMEGA公司切胶回收试剂盒说明书对PCR产物进行回收, 并将其连接到PMD18-T载体上, 连接反应体系为:PCR回收产物2.5 μ l, Solution Buffer 3 μ l, PMD18-T载体0.5 μ l, 16 $^{\circ}$ C水浴连接4 h。将连接产物转入JM109大肠杆菌感受态细胞中, 涂布氨苄平板, 挑取阳性克隆, 经PCR鉴定阳性后, 送上海生工公司测序。

1.2.5 圆环病毒部分序列的比对分析。应用www.ncbi.nlm.nih.gov中的Neclotide blast和DNA STAR分子生物学软件, 对测序结果与GenBank中已发表的圆环病毒的基因序列进行同源性比较, 比对病毒分别为AY228555(德国株), DQ166838(台湾株), EF370476(山东株), EF451157(福建1株), EU344807(福建2株)和NC005053(美国株)。

2 结果与分析

2.1 PCR检测结果 提取的病毒基因组DNA PCR产物经1.0%的琼脂糖凝胶(90 V, 25 min)电泳后, 凝胶上出现1条约为228 bp左右的条带, 与预计结果相符(图1)。



注:1为阳性病料;2,3为阴性病料;M为DL2 000 Marker。
Note:1. Positive specimen; 2,3. Negative specimen; M. DL2 000 Marker.

图1 病料PCR检测结果

Fig.1 Detection results of PCR specimen

2.2 感染情况调查结果 由表1可知, 调查中共发现1例阳性病例。

2.3 圆环病毒部分基因序列测序结果 将阳性病例的PCR产物连接到PMD18-T载体上, 转入大肠杆菌JM109, 经PCR鉴定正确后进行序列测定。结果表明, 该阳性病例与台湾地区(DQ166838)的同源性最高, 为96.5%; 与山东株(EF370476)、福建1株(EF451157)、福建2株(EU344807)、美国株(NC005053)、德国株(AY228555)的同源性分别为

95.3%、90.6%、89.8%、89.4%、89.4%(图2、图3)。由此可见, 该试验检测到的圆环病毒与Genebank中已发表的国内外其他地区毒株的相似性较高, 可确诊为鸭圆环病毒病。

表1 感染情况调查

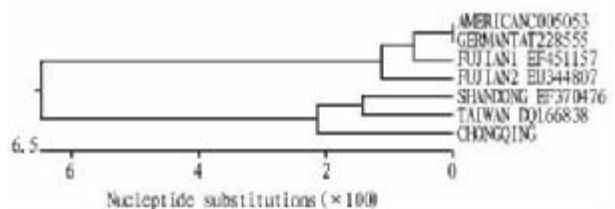
Table 1 Investigation of infected situation

病料采集地	病料数	阳性数
Specimen collected places	Specimen numbers	Positive numbers
峰高 Fenggao	1	1
广顺 Guangshun	2	0
吴家 Wujia	1	0
安富 Anfu	1	0
大足 Dazu	2	0
云龙 Yunlong	2	0
盘龙 Panlong	3	0
昌元 Changyuan	2	0
清升 Qingsheng	1	0
泸县 Lu county	1	0
泸州 Luzhou	2	0



图2 鸭圆环病毒重庆株与其他6地区毒株部分基因序列的同源性比较

Fig.2 Homology comparison of partial gene sequence of duck circovirus infection in Chongqing and other six strains



注:CHONGQING 为峰高病料;AMERICA NC005053 为美国株(NC005053);FUJIAN1 EF451157 为福建1株(EF451157);FUJIAN2 EU344807 为福建2株(EU344807);GERMANY AY228555 为德国株(AY228555);SHANDONG EF370476 为山东株(EF370476);TAIWAN DQ166838 为台湾株(DQ166838)。

Note: CHONGQING. Peak specimen; AMERICA NC005053. America (NC005053); FUJIAN1 EF451157. Fujian 1 plant (EF451157); FUJIAN2 EU344807. Fujian 2 plant (EU344807); GERMANY AY228555. Germany plant (AY228555); SHANDONG EF370476. Shandong plant (EF370476); TAIWAN DQ166838. Taiwan plant (DQ166838).

图3 鸭圆环病毒重庆株与其他6地区毒株部分基因序列的系统进化树
Fig.3 Phylogenetic tree of partial gene sequence of duck circovirus infection in Chongqing and other six strains

3 结论与讨论

圆环病毒是一种免疫抑制病原, 不仅可使畜禽机体发生原发性感染甚至死亡, 还会使畜禽的免疫功能受到损害, 导

(下转第8388页)

- Nature,2002,420(6914):439-445.
- [3] PERSENGIEV S P, ZHU X, DIXIT B L, et al. TRF3, a TATA-box-binding protein-related factor, is vertebrate-specific and widely expressed[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2003,100(25):14887-14891.
 - [4] DANTONEL J C, WURTZ J M, POCH O, et al. The TBP-like factor: an alternative transcription factor in metazoa? [J]. Trends Biochem Sci, 1999,24(9):335-339.
 - [5] KIMMINS S, KOTAJA N, DAVIDSON I, et al. Testis-specific transcription mechanisms promoting male germ cell differentiation [J]. Reprod,2004,128(1):5-12.
 - [6] ZHANG D, PENTTILA T L, MORRIS P L, et al. Spermatogenesis deficiency in mice lacking the *Tcf 2* gene [J]. Science,2001,292(5519):1153-1155.
 - [7] MARTIANOV I, FIMIA G M, DIERICH A, et al. Late arrest of spermatogenesis and germ cell apoptosis in mice lacking the TBP-like TLF/*Tcf 2* gene [J]. Mol Cell,2001,7(3):509-515.
 - [8] MARK D, RABENSTEIN, SHARLEEN ZHOU, JOHN T LIS, et al. TATA box-binding protein (TBP)-related factor 2 (*Tcf 2*), a third member of the TBP family [J]. Proc Natl Acad Sci, 1999,96(9):4791-4796.
 - [9] DANTONEL J C, QUINTIN S, LAKATOS L, et al. TBP-like factor is required for embryonic RNA polymerase II transcription in *C. elegans* [J]. Mol Cell,2000,6(3):715-722.
 - [10] KALTENBACH L, HORNER M A, ROTHMAN J H, et al. The TBP-like factor CeTLF is required to activate RNA polymerase II transcription during *C. elegans* embryogenesis [J]. Mol Cell,2000,6(3):705-713.
 - [11] OHBAYASHI T, KISHIMOTO T, MAKINO Y, et al. Isolation of cDNA, chromosome mapping, and expression of the human TBP-like protein [J]. Biochem Biophys Res Commun,1999,255(1):137-142.
 - [12] SHIMADA M, OHBAYASHI T, ISHIDA M, et al. Analysis of the chicken TBP-like protein (*tlp*) gene: evidence for a striking conservation of vertebrate TLPs and for a close relationship between vertebrate *tlp* and *tlp* genes [J]. Nucleic Acids Res,1999,27(15):3146-3152.
 - [13] VEENSTRA G J, WEEKS D L, WOLFFE A P. Distinct roles for TBP and TBP-like factor in early embryonic gene transcription in *Xenopus* [J]. Science,2000,290(5500):2312-2315.
 - [14] MOORE P A, OZER J, SALUNEK M, et al. TATA binding protein-related protein with altered DNA binding specificity inhibits transcription from multiple promoters and activators [J]. Mol Cell Biol,1999,19(11):7610-7620.
 - [15] OHBAYASHI T, SHIMADA M, NAKADAI T, et al. Vertebrate TBP-like protein (TLP/*Tcf 2*/TLF) stimulates TATA-less terminal deoxynucleotidyl transferase promoters in a transient reporter assay, and TFIIA-binding capacity of TLP is required for this function [J]. Nucleic Acids Res,2003,31(8):2127-2133.
 - [16] ORPHANIDES G, LAGRANGE T, REINBERG D. The general transcription factors of RNA polymerase II [J]. Genes Dev,1996,10(21):2657-2683.
 - [17] ROEDER R G. The role of general initiation factor in transcription by RNA polymerase II [J]. Trends Biochem Sci,1996,21(9):327-335.
 - [18] OHBAYASHI T, SHIMADA M, NAKADAI T, et al. TBP-like protein (TLP/TLF/*Tcf 2*) artificially recruited to a promoter stimulates basal transcription in vivo [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001,285(3):616-622.
 - [19] MIHO SHIMADA, TOMOYOSHI NAKADAI, TAKA-AKI TAMURA. TATA-binding protein-like protein (TLP/*Tcf 2*/TLF) negatively regulates cell cycle progression and is required for the stress-mediated G2 checkpoint [J]. Mol Cell Biol,2003,12:4107-4120.
 - [20] HOCHHEIMER A, ZHOU S, ZHENG M C, et al. *Tcf 2* associates with DREF and directs promoter-selective gene expression in *Drosophila* [J]. Nature,2002,420(6914):439-445.
 - [21] MARTIANOV I, FIMIA G M, DIERICH A, et al. Late arrest of spermatogenesis and germ cell apoptosis in mice lacking the TBP-like TLF/*Tcf 2* gene [J]. Mol Cell, 2001,7(3):509-515.
 - [22] MARTIANOV I, BRANCORSINI S, GANSMULLER A, et al. Distinct functions of TBP and TLF/*Tcf 2* during spermatogenesis: requirement of TLF for heterochromatic chromocenter formation in haploid round spermatids [J]. Development,2002,129(4):945-955.
 - [23] MATSUMOTO T, TURESSON I, BOOK M, et al. p38 MAP kinase negatively regulates endothelial cell survival, proliferation, and differentiation in FGF-2-stimulated angiogenesis [J]. J Cell Biol,2002,156(1):149-160.

(上接第 8384 页)

致畜禽机体抵抗力下降,从而继发感染其他疾病,造成巨大的经济损失^[6]。2005年 Fringuelli 等^[7]运用 PCR 方法从患病或死亡鸭中检出圆环病毒的阳性率为 84%;2006年 Chen 等^[5]从台湾地区采集的样品中检出圆环病毒的阳性率为 38.2%;2007年 Banda 等^[8]研究显示,圆环病毒在美国长岛地区饲养的鸭群中检出率较低,而我国至今未见相关报道。因此在渝西荣昌养鸭比较集中的地区对该病的感染情况进行调查对防止该病的发展蔓延具有一定的指导意义。

该试验对川渝部分地区 11 个乡镇的 18 份病料进行 PCR 检测,仅发现 1 例阳性病例,说明圆环病毒在该地区的感染水平较低。该试验所采集的病料均为成年鸭,而国内外相关研究所采集的病料均为幼龄雏鸭,由此推测圆环病毒的感染率可能随着鸭年龄的增长而下降,这一结论还需进一步验证。

另外,该试验所采集的病料均为川渝地区的麻鸭,而国内外相关研究所采集的病料均为番鸭或北京鸭,说明不同品种的鸭对此病毒的抵抗力可能存在一定差异。此外,不同的饲养条件和管理方式也是造成本地区鸭圆环病毒感染率较

低的一个重要因素。

对于鸭圆环病毒病目前尚无可靠的疫苗和防治药物,只能采取预防的方法,改善饲养条件,加强管理,防止继发感染其他疾病。

参考文献

- [1] 余旭平,郑新添,何世成,等. 鹅圆环病毒浙江永康株全基因组的克隆及序列分析 [J]. 微生物学报,2005,45(6):860-864.
- [2] HATTERMANN K, SCHMITT C, SOIKE D, et al. Cloning and sequencing of duck circovirus (DuCV) [J]. Arch Virol,2003,148:2471-2480.
- [3] SOIKE D, ALBRECHT K, HATTERMANN K, et al. Novel circovirus in Mulard ducks with developmental and feathering disorders [J]. Vet Res, 2004,154:792-793.
- [4] 傅光华,程龙飞,施少华,等. 鸭圆环病毒全基因组克隆与序列分析 [J]. 病毒学报,2008,24(2):138-143.
- [5] CHEN C L, WANG P X, LEE M S, et al. Development of a polymerase chain reaction procedure for detection and differentiation of duck and goose circovirus [J]. Avian Dis,2006,50:92-95.
- [6] 蔡宝祥. 圆环病毒与禽鸟免疫抑制 [J]. 中国家禽,2001,19(23):6-9.
- [7] FRINGUELLI E, SCOTT A N J, BECKETT A, et al. Diagnosis of duck circovirus infections by conventional and realtime polymerase chain reaction tests [J]. Avian Pathol,2005,34:495-500.
- [8] BANDA A, GALLOWAY-HASKINS R I, SANDHU T S, et al. Genetic analysis of a duck circovirus detected in commercial Pekin ducks in New York [J]. Avian Dis,2007,51:90-95.