

7株鸭肝炎病毒分离株及疫苗株的全基因组序列测定与变异分析

马秀丽¹, 于可响¹, 吴静¹, 宋敏训¹, 廖明^{2*}, 辛朝安²

(1. 山东省农业科学院家禽研究所 山东省禽病诊断与免疫重点实验室, 济南 250023;

2. 华南农业大学兽医学院 农业部养禽与禽病防治重点实验室, 广州 510642)

摘要: 为了分析中国鸭肝炎病毒(DHV)的遗传变异和进化关系, 作者测定了中国不同地区分离的7株DHV及1株疫苗株的全基因组序列, 并与公布的40株DHV序列进行比较分析。结果发现VP1变异程度较大, 高变区主要集中在180-194位和213-219位; 不同毒株的潜在N-糖基化位点存在较大差异。多数基因的进化分析均表现出一致的结果, 测序的8个毒株均分布在同一个遗传谱系, 属基因A型, 与基因B型和基因C型遗传距离较远, 不在同一分支上。而JYZ02株与R85952株的遗传距离最近, 属同一个亚支, 提示JYZ02株可能由毒株R85952演化而来。结合氨基酸序列相似性分析和代表毒株的血清交叉中和和试验结果, 表明近年分离并测序的上述7个毒株未发生抗原变异。从多毒株进化分析结果可以看出, 血清1型DHV仍是我国流行的优势血清型。

关键词: 鸭肝炎病毒; 遗传变异; 进化分析

中图分类号: S852.659.6

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)08-1209-06

Complete Genome Sequencing and Variations Analysis of Seven Isolated Strains and One Vaccine Strain of Duck Hepatitis Virus

MA Xiu-li¹, YU Ke-xiang¹, WU Jing¹, SONG Min-xun¹, LIAO Ming^{2*}, XIN Chao-an²

(1. Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250023, China;

2. South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: This experiment was conducted to study the genetic variations and phylogenetic analysis of Duck Hepatitis Virus(DHV) in China. The complete nucleotide sequences of 7 isolated strains and 1 vaccine strain of DHV-1 had been determined and comparative genome analysis with other DHV strains available in GenBank was performed. The results showed that the VP1 was the most variant gene and hypervariable regions were found in 180-194aa and 213-219aa of VP1 protein. Variant N-Linked glycosylation sites were found in different strains. Phylogenetic and evolutionary analysis showed that our sequencing strains belonged to genotype A, which were on different branches from genotype B and C. Strain JYZ02 had a very close relationship with strain R85952 which suggested that strain JYZ02 was evolved from strain R85952. The results of amino acid sequence identity and virus neutralization test proved that there was no antigenic variation occurred in the seven strains we determined. Phylogenetic analysis revealed that the dominant serotype of epidemic DHV in China was type 1 at present.

Key words: duck hepatitis virus; genetic variations; phylogenetic analysis

鸭病毒性肝炎(Duck viral hepatitis, DVH)是一种急性、高度致死性和接触性传染病, 主要危害3

周龄以下的雏鸭。该病有3个血清型, 其中1型鸭病毒性肝炎呈世界性分布^[1], 给养鸭业造成巨大危

收稿日期: 2008-12-01

基金项目: 山东省自然基金项目(Z2006D06); 家畜疫病病原生物学国家重点实验室开放课题

作者简介: 马秀丽(1978-), 女, 山东省广饶县人, 助理研究员, 博士, 主要从事家禽病原分子生物学研究, E-mail: maxiuli1978@163.com

* 通讯作者: 廖明, E-mail: mliao@scau.edu.cn

害。随着 DHV 全基因组的测序成功,对 DHV 的分类地位和基因组结构特征有了新的认识。近年来,血清学上不同于 1 型 DHV 的报道逐渐增多^[6-12],给防治鸭肝炎带来了巨大挑战,从分子水平揭示 DHV 的变异情况以及不同毒株之间的进化关系,对我国今后开展鸭病毒性肝炎的监测和综合防控具有重要的指导意义。因此,作者针对近几年收集的不同地区的 7 株 DHV 分离株及 1 株疫苗株进行全基因组序列测定,比较分析了各毒株遗传进化及流行变异情况。

1 材料与方法

1.1 DHV 毒株

SCL03 株(2003 年)、SJH04 株(2004 年)、SJH06 株(2006 年)、SYN06 株(2006 年),由山东家禽研究所分离并保存;JYZ02 株(2002 年),扬州大学王永坤教授惠赠;GFS00 株(2000 年),由华南农业大学王林川教授惠赠;HZZ04 株(2004 年),由山东滨州畜牧兽医研究院沈志强研究员惠赠。疫苗株 AV2111,佛山科技学院张济培教授惠赠,原购于中国兽医药品监察所。

1.2 RT-PCR

根据已发表的 DHV 基因组序列设计多对特异性引物,按常规 RT-PCR 方法扩增不同 DHV 毒株的相应区域^[13]。采用 5' 和 3' cDNA 末端快速扩增(Rapid amplification of cDNA ends, RACE)方法扩增病毒 RNA 的 5' 和 3' 末端序列^[13]。

1.3 PCR 产物的克隆与测序分析

将 PCR 产物克隆至 pMD18-T 载体中,双酶切法鉴定阳性重组子,由北京博尚有限公司完成测序,DNASar v6.13 软件进行序列拼接,并登入 GenBank。

分别对测定的 8 株 DHV(JYZ02, EF427899; SCL03, EF427900; SJH04, EU395436; SJH06, EU395435; SYN06, EU395437; GFS00, EU395438; HZZ04, EU395439; AV2111, EU395440)与从 Gen-

Bank 中下载的 40 株参考株(R85952, DQ226541; DRL-62, DQ219396; S, EF417871; ZJ1, EF382778; H, DQ249300; JX1, EF093502; O3D, DQ249299; 5886, DQ249301; C80, DQ864514; R, EF585200; A66, DQ886445; E53, EF151313; HP-1, EF151312; 90D, EF067924; HSS, DQ812092; 04G, EF067923; AP-03337, DQ256132; AP-04009, DQ256133; AP-04203, DQ256134; F, EU264072; HS, DQ812094; HDHV1-HB, FJ157180; HDHV1-GD, FJ157179; HDHV1-SH, FJ157178; HDHV1-HN, FJ157177; HDHV1-ZJ, FJ157176; HDHV1-GS, FJ157175; HDHV1-SC, FJ157174; HDHV1-JX, FJ157173; HDHV1-BJ, FJ157172; GZ, EU888310; FS, EU877916; ZJ, EU841005; C-GY, EU352805; G, EU755009; 161-79-V, EU753359; B63, EU747874; JX, EU371557; YYF-2008, DQ812093; AP, NC_009750)进行各基因氨基酸序列分析,用 Boot-strap 法(Replication 值为 1 000)计算遗传距离并绘制 N-J 进化树,其中 Bootstrap 值小于 50% 的数值未显示,分析当前国内 DHV 的流行情况及不同毒株氨基酸的变异程度。

1.4 血清交叉中和试验

选取山东、江苏、广东和河南等 4 个地区的代表毒株(SCL03 株、JYZ02 株、GFS00 株和 HZZ04 株)及疫苗株 AV2111,分别制备相应毒株的抗血清,并进行交叉中和试验,计算血清中和指数和鸡胚交叉中和抗原同源性^[14]。

2 结果

2.1 DHV 基因组的总体特征

测序的 7 株 DHV 分离株和 AV2111 疫苗株的基因组全长为 7 707~7 713 nt,包括 626 nt 的 5' 非编码区、6 747 nt 的开放阅读框(627—7 376 nt)和 314 nt 的 3' 非编码区及 17~23 nt 的 poly(A)尾。各毒株的基因组全长及 poly(A)尾的长度有所不同(表 1)。

表 1 DHV 各毒株基因组及 poly(A)尾长度

Table 1 Length of genome and poly(A) of DHV strains

毒株 DHV strains	SCL03	JYZ02	SJH04	SJH06	SYN06	GFS00	HZZ04	AV2111
基因组全长/nt	7 709	7 713	7 708	7 708	7 708	7 707	7 708	7 711
poly(A)尾长度/nt	19	23	19	18	18	17	18	21

2.2 各基因的氨基酸序列相似性分析

分析 48 株 DHV 毒株的全基因组序列发现,以台湾新型 04G、90D 和韩国新型 AP、AP03337、AP04009、AP04203 等为代表的 DHV 与 1 型 DHV 之间的非编码区核苷酸序列相似性较低,均低于 74.6%;P1 区以 VP1 基因的变异最大,氨基酸序列相似性为 68.6%~76.9%;P2 区中 2A2 基因氨基酸的改变最多,序列相似性为 60.9%~67.7%;P3 区中 3A 和 3B 基因的氨基酸序列相似性较低,分别为 68.8%~73.1%和 73.5%~82.4%,而 3C 和 3D 基因相对保守,序列相似性可达 89%~91.7%和 87.2%~89%。除新型 DHV 外的 37 株 DHV 多聚蛋白之间氨基酸序列相似性较高,均在 93%以上。

2.3 氨基酸变异位点分析

对 48 株 DHV 各基因推导的氨基酸序列比较发现,VP0、VP3、VP1 和 3D 基因推导序列中不少于 3 个氨基酸变异的位点分布较多,其中 VP0 的高变区集中在 91-98 位、163-169 位和 207-212 位;VP3 在 78、91、101、102、144 和 186 位氨基酸种类较多;VP1 中多于 3 个氨基酸变异位点分布较多,高变区主要集中在 180-194 位和 213-219 位;3D 在 7 和 421 位氨基酸变异程度较大;2A3、3A、3B 和 3C 中不少于 3 个氨基酸变异的位点分布很少,保守性较强;而 2A1 最为保守,不存在多个氨基酸变异的位点。

2.4 潜在糖基化位点分析

通过细致分析 DHV 的糖基化程度,发现不同毒株潜在 N-糖基化位点数量有所差异。其中高度保守的糖基化位点包括 VP0 蛋白 2 个,位于 47 和 78 位;VP3 蛋白 3 个,位于 32、35 和 201 位;VP1 蛋白 1 个,位于 84 位;3C 蛋白 2 个,位于 15 和 166 位。与疫苗株 AV2111 比较,SCL03、SYN06 和 GFS00 等毒株的 VP0 10 位增加 1 个糖基化位点,JYZ02 株 VP0 209 位增加 1 个糖基化位点,VP1 193 位缺失 1 个糖基化位点。台湾新型 DHV 04G 和 90D 株的 VP0 112 位以及 VP1 121 和 193 位各缺失 1 个糖基化位点,VP0 228 位、VP3 176 位、VP1 99 位和 2C 289 位各增加 1 个糖基化位点。韩国新型 DHV AP、AP03337、AP04009 和 AP04203 等毒株 VP0 112 和 228 位以及 VP1 193 位各缺失 1 个糖基化位点,VP3 176 位、VP1 99 和 112 位以及 2C 289 位各增加 1 个糖基化位点。上述糖基化位点的改变与 DHV 抗原变异及生物学功能之间的关系尚不清楚,值得进一步深入研究。

2.5 DHV 血清交叉中和试验

由表 2 可见,5 株血清针对不同病毒的中和指

数均在 50 以上,可判为阳性。5 株 DHV 鸡胚中和交叉抗原同源性分析发现,各毒株之间的相关程度均较高(>0.8)(表 3)。

表 2 DHV 不同毒株间的中和指数

Table 2 Neutralization index among different DHV strains

毒株 DHV strains	JYZ02*	SCL03*	GFS00*	HZZ04*	AV2111*
JYZ02**	186	240	115	66	112
SCL03**	191	282	127	81	135
GFS00**	181	238	114	73	112
HZZ04**	141	151	107	69	110
AV2111**	120	135	103	60	102

* 代表血清; ** 代表病毒。表 3 同

*. Serum; **. Virus, the same as below

表 3 DHV 不同毒株间鸡胚中和交叉抗原同源性

Table 3 Correlations rates of embryo neutralization assays among different DHV strains

毒株 DHV strains	JYZ02*	SCL03*	GFS00*	HZZ04*	AV2111*
JYZ02**	1.00				
SCL03**	0.93	1.00			
GFS00**	0.99	0.97	1.00		
HZZ04**	0.90	0.80	0.99	1.00	
AV2111**	0.84	0.80	0.99	0.97	1.00

2.6 DHV 遗传进化分析

将测序的 8 株 DHV 与 40 株 GenBank 中登录的 DHV 毒株的各基因氨基酸序列进行比较分析后绘制 N-J 系统进化树,除 VP0、3A 和 3B 基因外,多聚蛋白、VP3、VP1、2A、2B、2C、3C 和 3D 基因的进化分析均表现出基本一致的结果,这里仅列出以多聚蛋白基因(图 1)和变异最大的 VP1 基因(图 2)绘制的进化树。

3 讨论

3.1 血清交叉中和试验

作者对不同地区(山东、河南、江苏、广东)的代表毒株及疫苗株进行了交叉中和试验,结果表明不同的 DHV 抗原和血清之间中和指数存在一定的差异,反映出 DHV 在抗原性上的变化,其中 SCL03

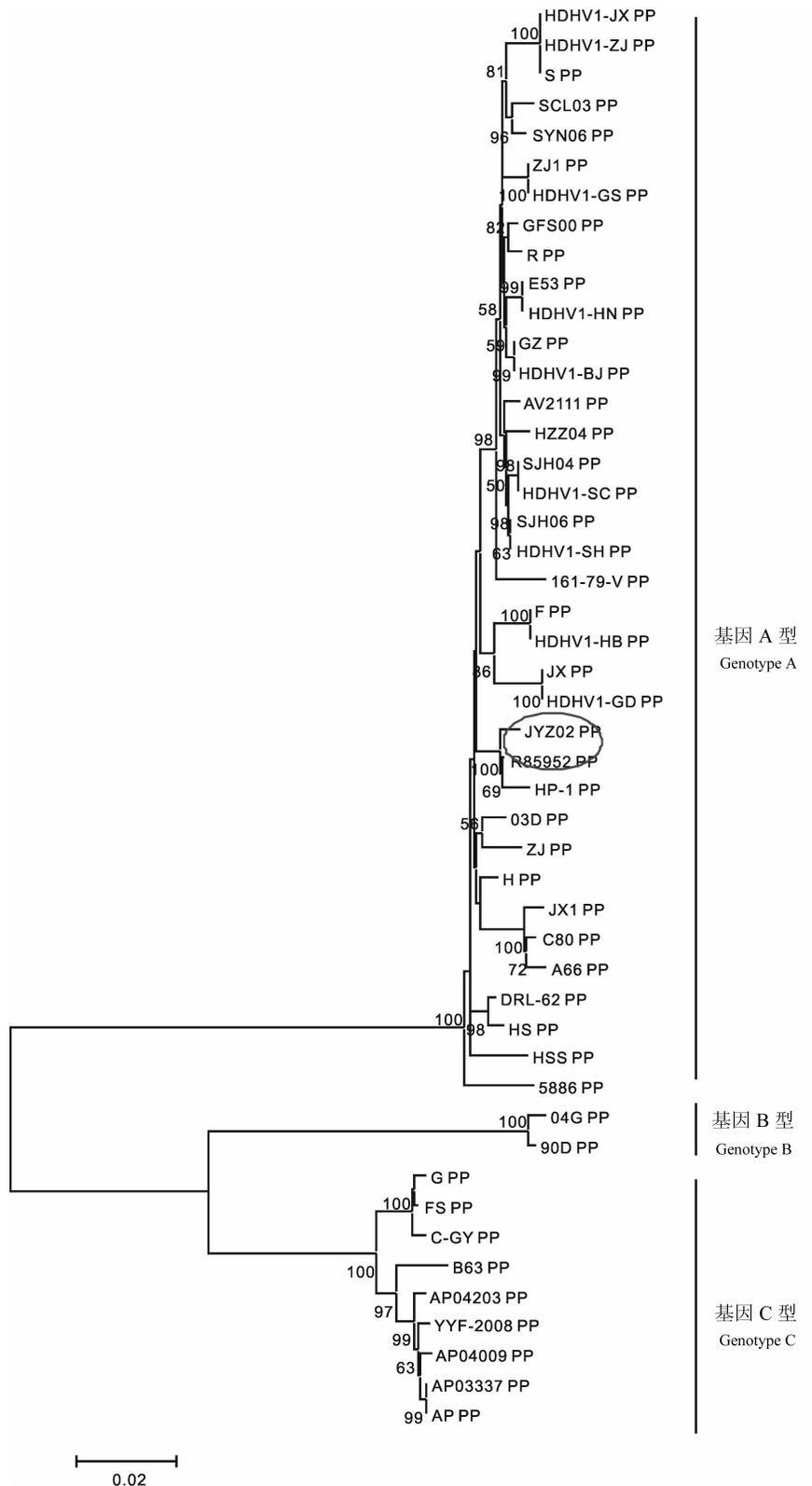


图 1 基于多聚蛋白基因氨基酸序列的 DHV 进化分析

Fig. 1 Analysis of genetic relationship based on polyprotein gene of DHV

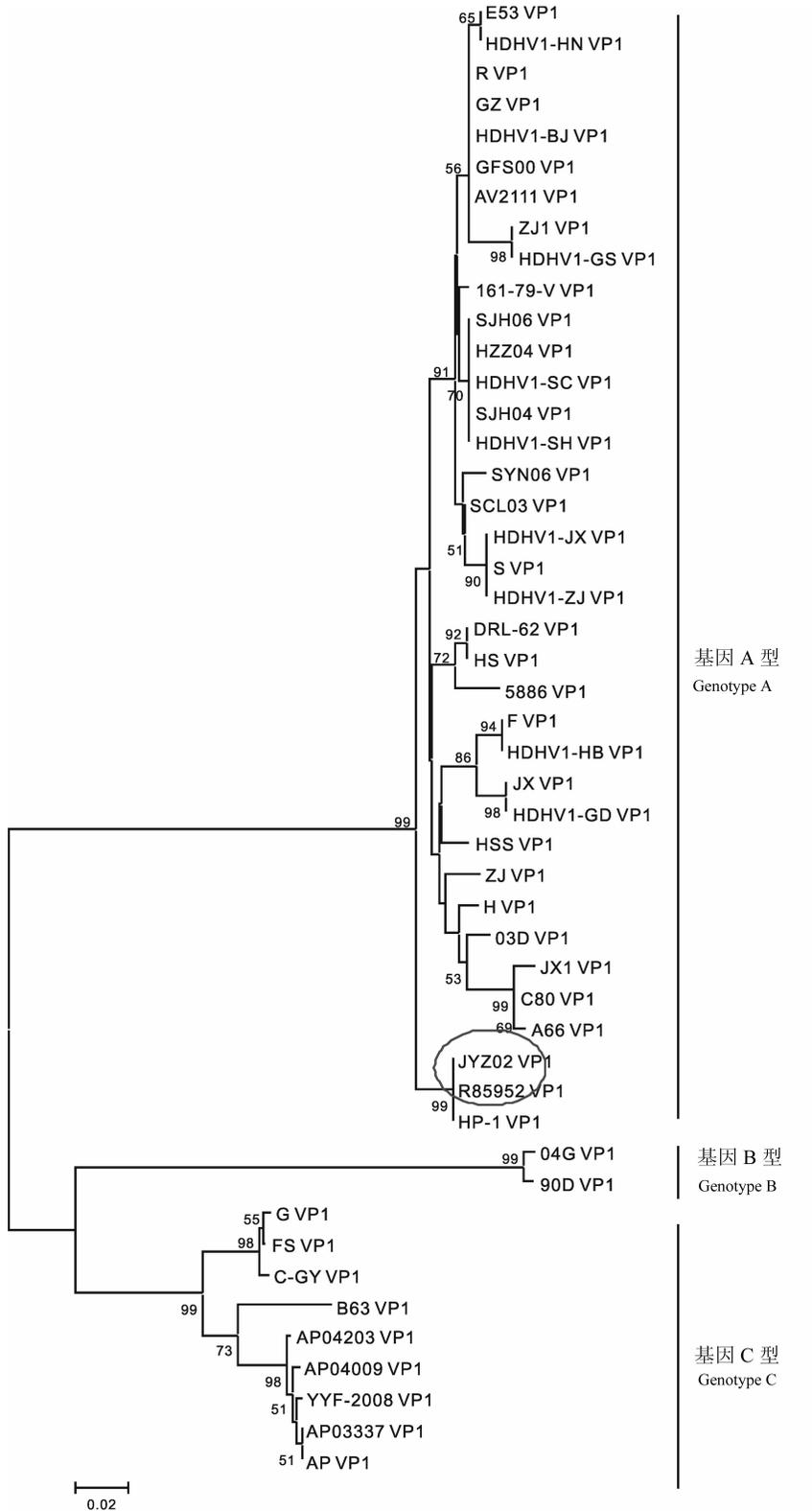


图 2 基于 VP1 基因氨基酸序列的 DHV 进化分析

Fig. 2 Analysis of genetic relationship based on VP1 gene of DHV

株、JYZ02株、GFS00株和AV2111株血清对不同地区的毒株均有较高的中和指数,保护能力较好(一般中和阈值为100,高于100具有较好的保护能力,低于50则保护能力较差),说明其可能具有较好的免疫原性。因HZZ04株血清制备时仅免疫过2次,效价略低,所以该血清对其他毒株和本身的中和指数均偏低。但结合各株病毒鸡胚中和交叉抗原同源性分析发现,各毒株之间的相关程度均较高(>0.8),显示出较强的交叉保护能力。

3.2 DHV 遗传变异及进化分析

随着水禽养殖业的迅猛发展,水禽饲养密度逐渐增大,雏鸭病毒性肝炎的危害日益严重。目前国内鸭肝炎的发生屡见不鲜,不少地区报道免疫过的雏鸭不能安全度过危险期,甚至有些地区雏鸭发病后使用高免血清或高免卵黄抗体治疗效果很差或无效,给鸭肝炎的防治带来了巨大挑战。为此,作者选取山东、江苏、广东和河南等地不同年代分离的7个代表毒株与疫苗株进行全基因组序列测定,并与已公布的40株DHV序列进行分析,旨在从分子水平揭示近年来我国众多地区鸭肝炎免疫失败的原因。通过对新型DHV与1型DHV各基因的氨基酸序列比较发现,结构基因存在较大的变异,主要抗原VP1的变异最为突出,高变区主要集中在180-194位和213-219位;此外,新型DHV的VP1较1型DHV出现了明显的插入/缺失现象,其中台湾新型DHV在50-51位出现2个氨基酸的插入,145位和182位各缺失了1个氨基酸;韩国新型DHV在143-144位也出现2个氨基酸的插入;由于VP1中这些氨基酸位点的变异导致了新型DHV的抗原性发生了改变,因此表现出与1型DHV的交叉反应性很低或无交叉中和反应^[6-7]。新型DHV非结构基因中也存在一些氨基酸变异位点,但不少于3个氨基酸变异的位点分布较少。非编码区核苷酸序列之间存在大量碱基突变和插入/缺失,这种插入/缺失对DHV的复制功能的影响有待深入研究。而测序的8株DHV各基因之间的氨基酸序列相似性较高,均在93%以上,与血清交叉中和试验的结果相吻合。

除VP0、3A和3B基因外,多聚蛋白、VP3、VP1、2A、2B、2C、3C和3D基因的进化分析均表现出一致的结果,所分析的48株DHV中,以R85952为代表的37个毒株(包括本研究测序的8毒株)遗传距离较近,分布在同一个遗传谱系,均为血清1型DHV,属基因A型;而台湾新型DHV(04G和90D株)与其余毒株的遗传关系均较远,占据一个独立的遗传谱系,属基因B型;仅有G、FS、C-GY、B63、YYF-2008等5株DHV与AP、AP04009、AP03337和AP04203等韩国新型DHV遗传距离最近,属基因C型;与报道的DHV分型结果相符合^[7-8]。本研究中测序的8个毒

株虽属同一个遗传谱系,但各毒株之间的亲缘关系也不尽相同。根据多聚蛋白、VP1、2A、2B和3A、3B基因的进化分析,JYZ02株与R85952株的遗传距离最近,属同一个亚支,表明JYZ02株可能由毒株R85952演化而来。结合氨基酸序列相似性分析和代表毒株的血清交叉中和试验结果,表明此次测序的7个毒株未发生抗原变异。虽然我国已出现基因C型DHV,但血清1型DHV仍是我国流行的优势血清型。本研究结果对于今后中国鸭病毒性肝炎的科学防控具有指导意义。

参考文献:

- [1] SAIF Y M. 禽病学[M]. 苏敬良,高福,索勋,主译.第11版.北京:中国农业出版社,2004:376-384.
- [2] 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.
- [3] DING C Y, ZHANG D B. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1[J]. *Virology*, 2007,361(1):9-17.
- [4] LIU G Q, WANG F, NI Z, et al. Complete genomic sequence of a Chinese isolate of duck hepatitis virus[J]. *Virol Sinica*, 2007, 22(5):353-359.
- [5] TSENG C H, KNOWLE 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.
- [6] TSENG C H, TSAI H J. Molecular characterization of a new serotype of duck hepatitis virus[J]. *Virus Res*, 2007,126(2):19-31.
- [7] KIM M C, KWON Y K, JOH S J, et al. Recent Korean isolates of duck hepatitis virus revealed the presence of a new geno- and sero-type when compared to duck hepatitis virus type 1 type strain[J]. *Arch Virol*, 2007, 152:2059-2072.
- [8] 王丽艳,付余,潘梦,等.鸭肝炎病毒的基因分型[C]//中国畜牧兽医学学会禽病学分会第十四次学术研讨会论文集.江苏扬州,2008:171-172.
- [9] 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.
- [10] 许力干,赵武,陈泽祥,等.广西部分地区鸭肝炎流行及防治现状调查[J].广西农业科学,2002,(3):142.
- [11] 刘建,苏敬良,张克新,等.新型鸭肝炎病毒流行病学调查及免疫防治试验[J].中国兽医杂志,2006,42(2):3-6.
- [12] 郑献进,张大丙,曲丰发,等.I型鸭肝炎病毒变异株的鉴定[J].中国兽杂志,2006,42(5):15-16.
- [13] 马秀丽,宋敏训,于可响,等.我国鸭肝炎病毒分离株基因组的测定与分析[J].华南农业大学学报,2009,30(1):74-80.
- [14] 杜念兴.兽医免疫学[M].第2版.北京:中国农业出版社,1998.