

5 株水禽细小病毒全基因组序列分析

贺亦龙, 邵周伍林, 白小飞, 张云*

(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, 哈尔滨 150001)

摘要: 利用 PCR 技术扩增鹅细小病毒(GPV) ZJ、G3 和 LJY 毒株与番鸭细小病毒(MDPV) DK 和 DYL 毒株全基因组。序列分析结果表明,除 LJY 毒株非结构基因(NS)编码 626 个氨基酸外,其余 4 株 NS 全长 1 884 bp,编码 627 个氨基酸;5 株的结构基因(VP)全长均为 2 199 bp,编码 732 个氨基酸。GPV、MDPV NS 蛋白不同毒株之间相似性分别为 95.9%~99.8%和 96.8%~99.0%;而 GPV 与 MDPV NS 蛋白之间相似性为 88.9%~90.4%。GPV、MDPV VP 蛋白不同毒株之间的相似性分别为 90.2%~100.0%和 96.9%~99.3%,而 GPV 与 MDPV VP 蛋白之间的相似性为 79.5%~81.6%,表明 GPV 抗原性不同于 MDPV。MDPV 与 GPV NS 蛋白均含有 4 个潜在的糖基化位点;在结构蛋白区域,MDPV VP 含有 8 个潜在的糖基化位点,而 GPV 为 6 个糖基化位点,G3 与 LJY 毒株分别缺失 582—584 NTT 和 703—705 NRT 潜在的糖基化位点。5 株水禽细小病毒的进化分析表明,GPV、MDPV 在进化上形成两个独立的分支,各个基因片段之间未发生重组。

关键词: 鹅细小病毒;番鸭细小病毒;NS 基因;VP 基因;序列分析

中图分类号:S852.659.2

文献标志码:A

文章编号:0366-6964(2014)11-1837-07

Complete Genomic Sequences Analysis of Five Waterfowl Parvoviruses

HE Yi-long, SHAOZHOU Wu-lin, BAI Xiao-fei, ZHANG Yun*

(State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China)

Abstract: The full genome of waterfowl parvoviruses were amplified by using polymerase chain reaction (PCR) method. The gene fragments were sequenced and analyzed with goose parvovirus (GPV) ZJ, G3, and LJY strains and Muscovy duck parvovirus (MDPV) DK and DYL strains. Sequence analysis demonstrated that NS gene of four isolates is 1 884 bp in length, encoding 627 amino acids, while NS gene of LJY strain has three nucleotide deletions, resulting 626 amino acids in length. The VP gene is 2 199 bp in length, encoding 732 amino acids. The NS protein among GPVs or MDPVs showed 95.9%-99.8% and 96.8%-99.0% homologies, respectively, while the NS between GPVs and MDPVs showed 88.9%-90.4% identities. The VP protein among GPVs or MDPVs showed 90.2%-100.0% and 96.9%-99.3% homologies, respectively, while the VP protein between GPV and MDPV showed only 79.5%-81.6% identities, indicating that antigenicity might be different between GPV and MDPV. Both MDPVs and GPVs have 4 common potential glycosylation sites in NS protein. In VP protein, MDPV DK and DYL strains have 8 potential glycosylation sites, while GPV have only 6. GPV G3 and LJY strains showed deletion of 582-584 NTT and 703-705 NRT potential glycosylation sites, respectively. Phylogenetic analysis of waterfowl parvoviruses indicates that GPVs and MDPVs form two separate evolutionary branches, and recombination does not occur between MDPV and GPV strains.

Key words: goose parvoviruses; muscovy duck parvoviruses; NS gene; VP gene; sequence analysis

收稿日期:2014-03-07

基金项目:现代农业水禽产业技术体系岗位科学家专项(CARS-43-10);国家自然科学基金面上项目(31072132);公益行业专项(201003012)

作者简介:贺亦龙(1988-),男,蒙古族,哈尔滨人,硕士生,主要从事水禽病诊断与预防研究

*通信作者:张云,女,副研究员,主要从事水禽病诊断与预防研究, E-mail:yunzhang03@yahoo.com

鹅或番鸭细小病毒均属于细小病毒科、细小病毒属,是目前动物病毒中较小的一类单链 DNA 病毒。基因组大小 5 kb 左右,病毒粒子直径 20~22 nm,均为圆形或六角形,无囊膜,呈二十面体对称^[1]。

鹅细小病毒病又称小鹅瘟,或 Derzsy's 病,是世界禽类学会为纪念匈牙利学者 Derzsy 而命名的^[2]。在我国,该病是由方定一教授于 1956 年首次在江苏省发现,于 1961 年经鹅胚分离得到^[3]。该病主要侵害 3~20 日龄的雏鹅和雏番鸭,是急性亚急性败血性传染病,可于回盲口形成“香肠样”纤维素性栓塞物^[5]。该病具有病程短促、传播快、传染性强和死亡率高等特点,给水禽养殖业带来了巨大的经济损失,是影响禽业的主要疾病之一。

番鸭细小病毒病俗称“三周病”^[6],主要侵害 1~3 周龄的雏番鸭,是以腹泻、气喘及胰坏死和出血为主要特征的急性传染病,其发病率与死亡率可高达 40%~50%,是番鸭饲养业中危害最严重的传染病之一。由于番鸭细小病毒(MDPV)与鹅细小病毒(GPV)非常相似,最初被认为是 GPV;随后经过病原的分离鉴定,于 1988 年国际上首次明确了 MDPV 并非 GPV^[7]。

1995 年 Z. Zádori 等首次发表了 GPV 与 MDPV 的全基因序列,基因组全长分别为 5 106 和 5 132 kb^[8]。基因组均含有 2 个开放阅读框架(ORF)。左侧 ORF 编码 2 个非结构蛋白(NS1 和 NS2),主要参与病毒 DNA 的复制及调节基因的表达;右侧 ORF 编码 3 个结构蛋白(VP1、VP2 和 VP3),其中 VP3 为衣壳蛋白,是主要的免疫保护性抗原,能诱导产生中和抗体。作者利用 PCR 技术扩增 GPV ZJ、G3 和 LJY 毒株与 MDPV DK 和 DYL 毒株全基因组,并进行了序列分析。

1 材料与方法

1.1 毒株与试剂

MDPV DK、DYL 株和 GPV ZJ、G3、LJY 株均为本实验室保存。DNA 提取试剂盒和质粒小提纯化试剂盒均购自杭州爱思进生物技术有限公司,rTaq DNA 聚合酶,胶回收试剂盒购自上海华舜生物技术有限公司,pMD18-T 购自大连宝生物工程有限公司,大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞为本实验室保存。

1.2 MDPV 和 GPV 参考毒株的基本信息

GenBank 中收录的鹅细小病毒与番鸭细小病

毒参考毒株见表 1。

1.3 引物设计

根据 GenBank 中 MDPV 和 GPV 全基因组序列,分别设计 5 对引物(表 2)。引物均由博仕生物技术有限公司合成。

1.4 病毒核酸片段的 PCR 扩增

根据 DNA 提取试剂盒说明书中所示方法提取病毒 DNA,-20℃ 保存备用。PCR 扩增采用 50 μ L 体系,病毒 DNA 3 μ L,相应上、下游引物(20 pmol \cdot L⁻¹)各 1 μ L,rTaq 酶 25 μ L,ddH₂O 补充至 50 μ L。扩增程序:94℃ 5 min;94℃ 30 s,54℃ 30 s,72℃ 1 min,30 个循环;72℃ 10 min,4℃ 保存。由于每对引物退火温度相差不多,并且每对引物扩增的片段长度在 800~1 000 bp,故而选用同一个反应条件进行反应。

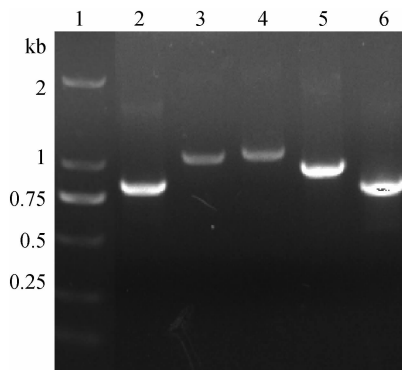
1.5 病毒基因的克隆、序列测定与分析

PCR 产物的纯化回收参照胶回收试剂盒说明书中所示方法进行,纯化的 PCR 产物按照 pMD18-T 载体说明书进行连接,连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,涂布含有氨苄抗性的 LB 琼脂平板,37℃ 倒置培养 12~16 h,PCR 方法鉴定重组质粒,阳性质粒送博仕生物测序。用 DNASTar(LaserGene v 7.1)软件进行序列拼接,并与 GenBank 收录的其他水禽细小病毒基因序列进行比对分析。

2 结果

2.1 PCR 扩增结果

利用 5 对引物扩增的 PCR 产物分别为 800、1 000、1 100、900 和 800 bp,扩增结果与预期相符(图 1)。



M. DL2000 DNA 相对分子质量标准;2~6. 5 段 PCR 扩增产物
M. DL2000 DNA marker;2-6. Five amplified fragments
图 1 PCR 扩增结果

Fig. 1 Results of PCR products

表 1 鹅细小病毒与番鸭细小病毒全基因参考毒株

Table 1 Information of reference GPV and MDPV strains in GenBank

| 病毒 Virus | 毒株 Strain | 宿主 Host | 基因组/bp Genome | 来源 Origin | 登录号 Accession number |
|-------------|----------------|--------------|------------------|--------------|-------------------------|
| GPV | YG | Goose | 4 101 | Shanghai | AF416726 |
| | DY | Muscovy duck | 4 101 | Sichuan | EF515837 |
| | 82-0321v | Goose | 4 980 | Taiwan | EU583389 |
| | 82-0321 | Goose | 5 050 | Taiwan | EU583390 |
| | 06-0329 | Goose | 5 054 | Taiwan | EU583391 |
| | VG32/1 | Goose | 5 104 | Germany | EU583392 |
| | GDaGPV | Goose | 5 106 | Fujian | HQ891825 |
| | SH | Goose | 5 106 | Shanghai | JF333590 |
| | Y | Muscovy duck | 5 106 | Anhui | KC178571 |
| | E | Goose | 5 125 | Anhui | KC184133 |
| | SHFX1201 | Swan | 5 050 | Shanghai | KC478066 |
| | SYG61v | Goose | 5 102 | China | KC996729 |
| | YZ99-6 | Goose | 5 046 | China | KC996730 |
| MDPV | B | Goose | 5 106 | Hungary | U25749 |
| | P | Muscovy duck | 4 265 | Shanghai | JF926697 |
| | P ₁ | Muscovy duck | 4 234 | Fujian | JF926698 |
| | FM | Muscovy duck | 5 132 | Hungary | U22967 |

表 2 鹅细小病毒与番鸭细小病毒基因组扩增所需引物序列

Table 2 The primer sequences used for PCR amplification of goose and muscovy duck parvoviruses

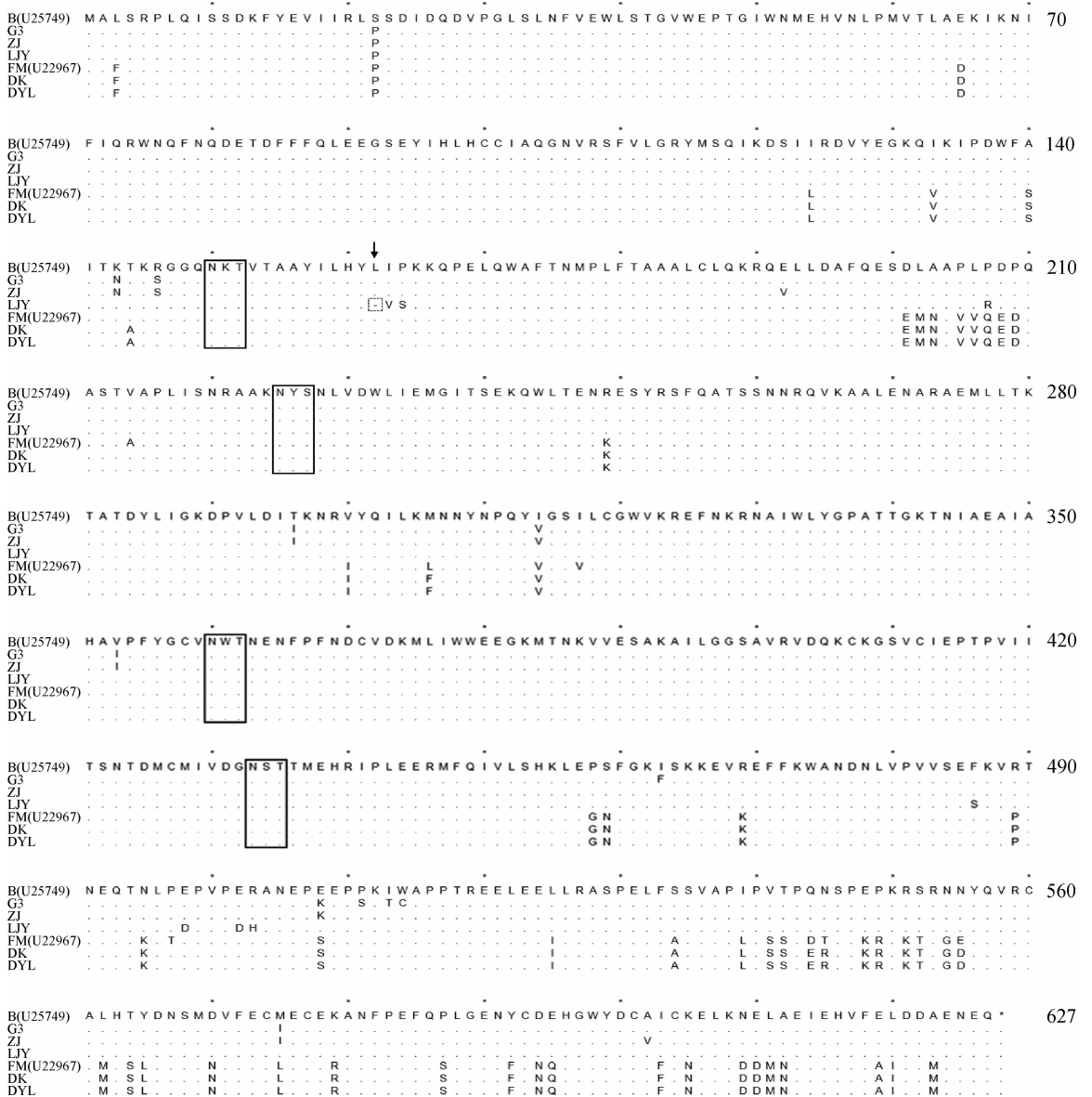
| 上游引物 Upstream Primer | 引物序列 Sequence | 下游引物 Downstream Primer | 引物序列 Sequence | 理论扩增长 度/bp Amplified Fragment |
|----------------------------|----------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|--|
| GPVF ₁ | 5'-CGCATGCCGCGGGTCAGCCCAAT-3' | GPVR ₁ | 5'-TATGTATGCTGCAGTCACGGTCTT-3' | 813 |
| GPVF ₂ | 5'-TAAGACCGTGACTGCAGCATAAC-3' | GPVR ₂ | 5'-TTCGCTCGTTCAGGAACGGGCTCTG-3' | 1 064 |
| GPVF ₃ | 5'-CAGAGCCCGTTCCCTGAACGAG-3' | GPVR ₃ | 5'-CAITTCAGATGCTGCCACAGGTTTCG-3' | 1 109 |
| GPVF ₄ | 5'-CGAACCTGTGGCAGCATCTGAAATG-3' | GPVR ₄ | 5'-GTCACTTATTCCTGCTGTAGTGTGCTG-3' | 986 |
| GPVF ₅ | 5'-CAGCACTACAGCAGGAATAAG-3' | GPVR ₅ | 5'-CGCATGCCGCGGGTCAGCCCAATAG-3' | 836 |
| MDPVF ₁ | 5'-TGGCCGGAATAACGTCATCAAAG-3' | MDPVR ₁ | 5'-ATCGGGCGCATGCGCCCGATCTGCC-3' | 815 |
| MDPVF ₂ | 5'-CTGCATTACCTGATTCCTAAAAAAC-3' | MDPVR ₂ | 5'-GGAAGGCTCATTCGCTCGTTCAGGA-3' | 1 049 |
| MDPVF ₃ | 5'-TCCTGAACGAGCGAATGAGCCTTCC-3' | MDPVR ₃ | 5'-TTCCTGAGGCATACCCACTCCATC-3' | 1 145 |
| MDPVF ₄ | 5'-GATGGAGTGGGTAATGCCCTCAGGAA-3' | MDPVR ₄ | 5'-CCTGATCTTCTGTATGTGTAGTAGC-3' | 933 |
| MDPVF ₅ | 5'-GCTACTACACATACAGAAGATCAGG-3' | MDPVR ₅ | 5'-ACCGGAAGTTACGTCACTTCCC-3' | 782 |

2.2 序列分析

应用 DNASTar 软件进行序列拼接,分别获得 GPV 4.6 kb 和 MDPV 4.5 kb;利用 MegAlign 中的 Clustal W 方法,比较分析 5 株病毒与其他 GenBank 中 17 株参考毒株的基因组(其中,GPV 序列 14 个,MDPV 序列 3 个)结构蛋白和非结构蛋白的核苷酸及推导出来的氨基酸序列(图 2、图 3)。

非结构蛋白包括 NS1 和 NS2 两部分,其编码基因由 1 884 个和 1 356 个核苷酸组成,分别编码 627 个和 451 个氨基酸,他们共用同一个终止密码

子。GPV 不同毒株间 NS 基因核苷酸和氨基酸序列的相似性分别为 93.5%~99.8%和 95.9%~99.8%,MDPV 不同毒株之间 NS 基因的核苷酸与氨基酸序列的相似性分别在 98.7%~100.0%和 98.6%~100.0%;而 GPV 与 MDPV NS 基因相似性在 80.0%~83.0%和 88.9%~90.4%。除 ZJ 毒株 NS 基因末端的终止密码子为 TAG 外,其余毒株终止密码子均为 TAA;LJY 毒株 NS 基因在 484—486 位缺失 3 个碱基,即在 162 位缺失 1 个氨基酸(图 2)。



实线框内为潜在糖基化位点,箭头下方虚线方框内为氨基酸缺失,下图同

Boxed area are the potential glycosylation sites,dashed boxed area (under arrow) is amino acid deletion. The same as below

图 2 水禽细小病毒非结构蛋白比对结果

Fig. 2 Comparison of nonstructural protein NS of waterfowl parvoviruses

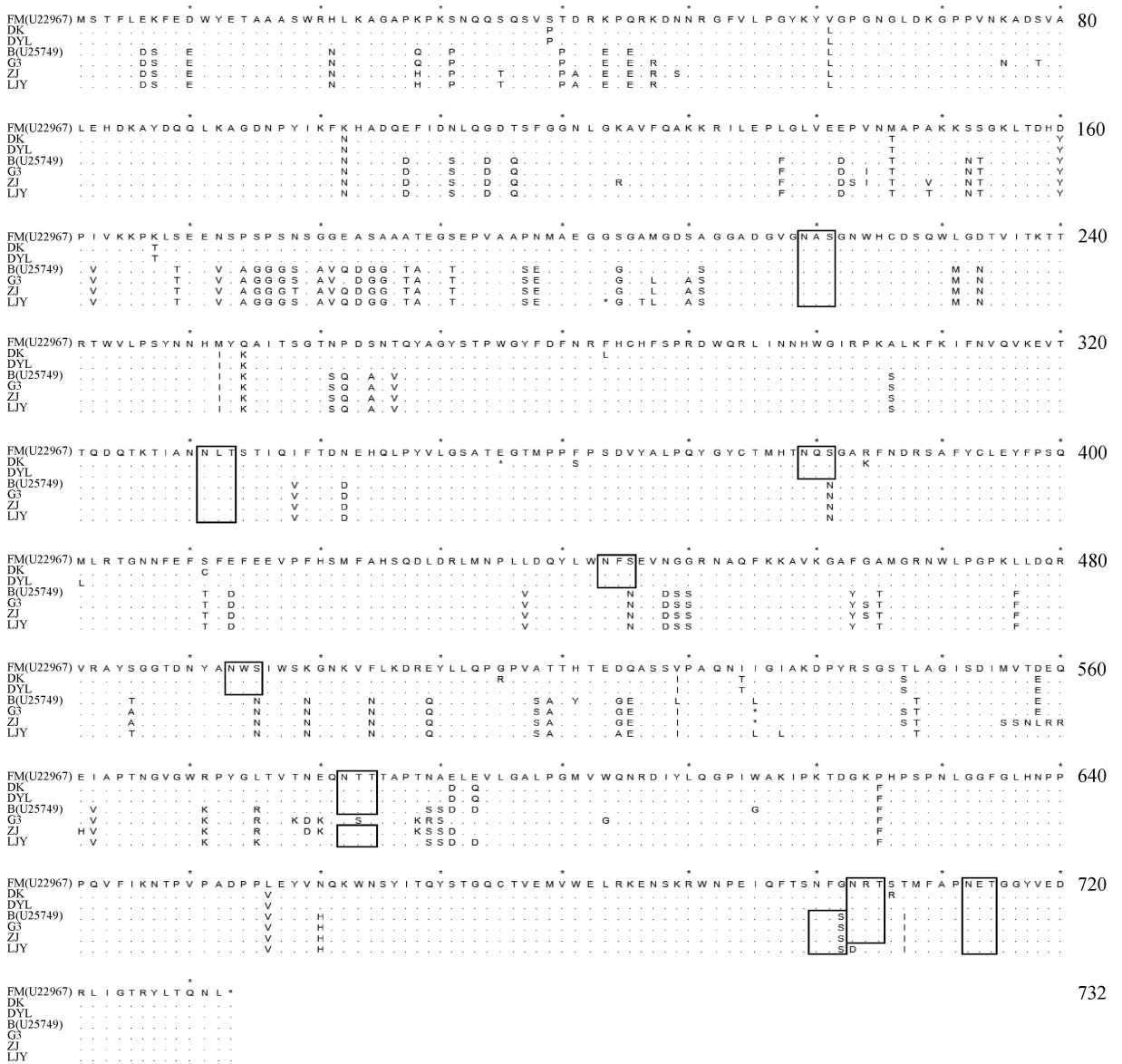


图 3 水禽细小病毒结构蛋白比对结果

Fig. 3 Comparison of structural protein of waterfowl parvoviruses

细小病毒结构蛋白包括 VP1、VP2 和 VP3，终止于同一个密码子，其编码基因长度分别为 2 199、1 764 和 1 605 bp，分别编码 732、587 和 534 个氨基酸。GPV VP 基因之间核苷酸与氨基酸序列相似性分别在 88.8%~99.9% 和 90.2%~100.0%，MDPV 之间相似性在 98.0%~99.5% 和 96.9%~99.3%；GPV 和 MDPV VP 基因之间的相似性大多低于 90%，MDPV DK 毒株与 GPV YG 毒株核苷酸相似性仅为 79.5%，GPV ZJ 毒株与 MDPV FM 株的氨基酸相似性为 85.1%。

GPV 毒株 VP3 蛋白之间核苷酸与氨基酸序列的相似性为 90.3%~99.8% 和 95.0%~100.0%，

中国 GPV 流行毒株 G3、ZJ 和 LJY 株之间的相似性在 96.3%~98.8%；MDPV 毒株 VP3 蛋白之间核苷酸与氨基酸序列的相似性都在 96% 以上，DK 与 DYL 之间氨基酸的相似性为 98.5%；而 GPV 与 MDPV 之间核苷酸和氨基酸的相似性分别为 79.9%~85.4% 和 88.4%~91.6%；MDPV DK 株与 GPV YG、GDaGPV 株的核苷酸相似性仅为 79.9%。

2.3 5 株水禽细小病毒 NS 和 VP 区的糖基化位点特征

通过 NetNGlyc 1.0 Server 软件预测潜在在糖基化位点，所有 GenBank 参考毒株 NS 区均存在以下

4 个糖基化位点,即 150—152 NKT、225—227 NYS、360—362 NWT 和 433—435 NST,而本研究中的 5 个分离株中,除 GPV LJY 株由于在 162 位缺失 1 个氨基酸而导致后三个糖基化位点的位置改变外,其余毒株与参考毒株完全相同。具体见图 2。

MDPV 均含有 8 个潜在的糖基化位点,包括本研究中的 2 个分离株 DK 和 DYL;GPV 毒株只有 4~6 个糖基化位点,GPV 与 MDPV 存在相同的 2 个潜在的糖基化位点(即 219—221 NAS 和 331—333 NLT),通常不同 GPV 毒株在 VP 区缺少 1~2 个位点,GPV 3 个分离株中,ZJ 株存在全部 6 个潜在的糖基化位点,而 G3 和 LJY 株存在 5 个糖基化位点,分别缺少 582—584 NTT 和 703—705 NRT 潜在的糖基化位点。具体见图 3。

2.4 进化分析

利用 Mega5.2 软件分别绘制非结构蛋白和结构蛋白的遗传进化树,非结构蛋白 NS 基因的遗传进化分析表明,GPV NS 基因形成 2 个独立的亚群(图 4、5),G3、ZJ 和 LJY 均分布于第 1 个亚群,其中 G3、ZJ 株与 DY 株亲缘关系较近,而 LJY 株与 YZ99-6 株亲缘关系最近;同样 MDPV NS 基因也形成 2 个独立的亚群,DK 和 DYL 株分布在第 2 个亚群中,与 P 株亲缘关系最近。

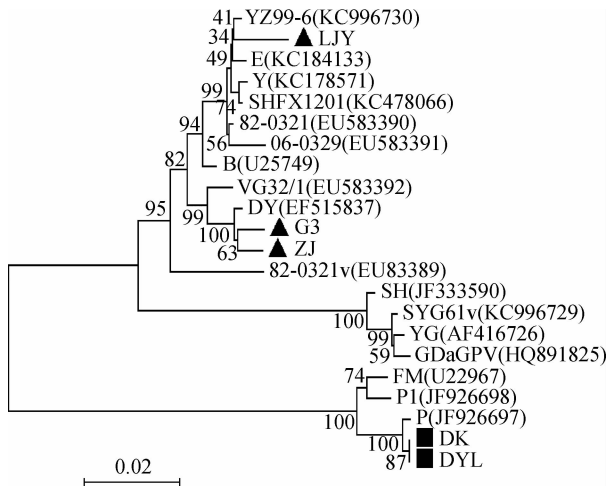


图 4 非结构蛋白 NS1 基因的遗传进化树
Fig. 4 Phylogenetic tree of nonstructural protein NS1 gene

在结构蛋白基因水平上,GPV 均形成独立的 a 亚群和 b 亚群(图 6~8)。a 亚群主要包括中国大陆各地区以及中国台湾地区的毒株,LJY 株属于这一亚群;b 亚群包含中国台湾、匈牙利以及德国的毒株,G3 和 ZJ 株位于这一亚群,与 VG32/1 株亲缘关

系最近。MDPV 的 DK 和 DYL 株结构蛋白与 P 株亲缘关系最近。

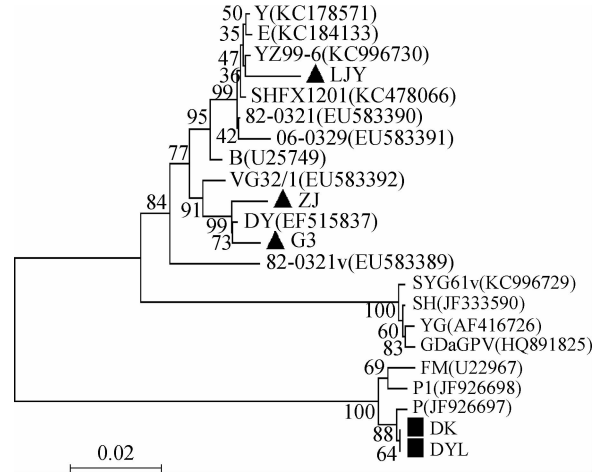


图 5 非结构蛋白 NS2 基因的遗传进化树
Fig. 5 Phylogenetic tree of nonstructural protein NS2 gene

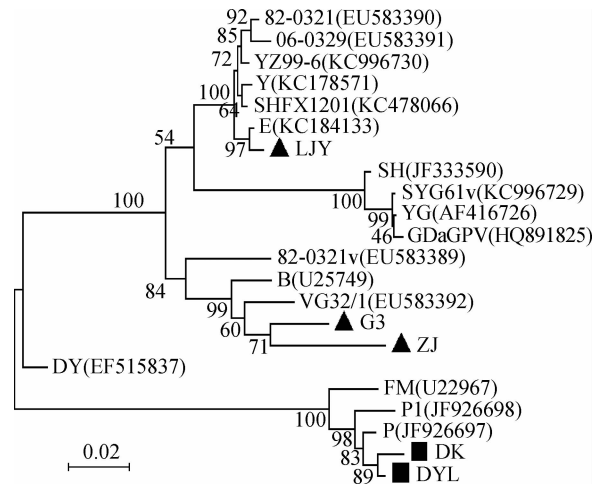


图 6 结构蛋白 VP1 基因的遗传进化树
Fig. 6 Phylogenetic tree of structural protein VP1 gene

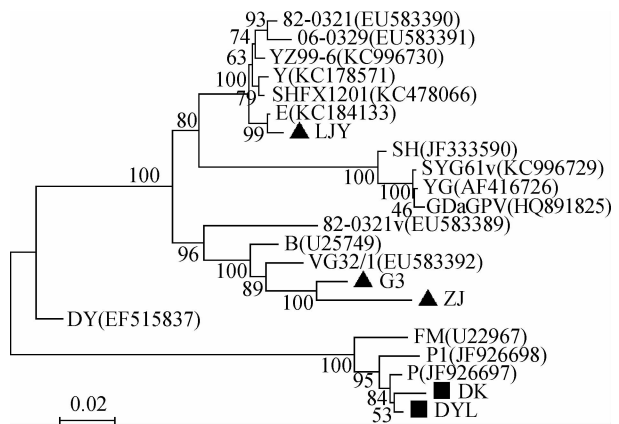


图 7 结构蛋白 VP2 基因的遗传进化树
Fig. 7 Phylogenetic tree of structural protein VP2 gene

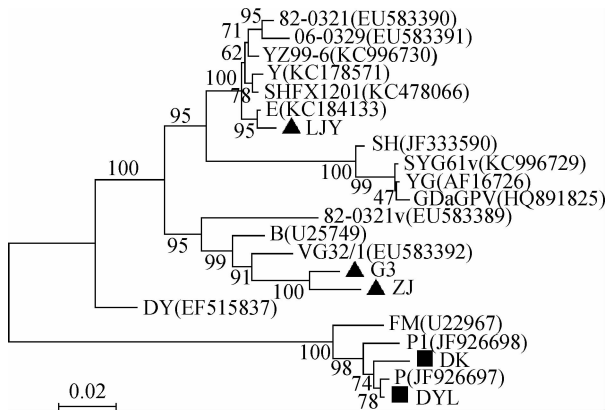


图 8 结构蛋白 VP3 基因的遗传进化树

Fig. 8 Phylogenetic tree of structural protein VP3 gene

3 讨论

GPV 与 MDPV 非结构蛋白 NS 同源性较高,表明 NS 基因进化速度较慢,高度保守;且 GPV 与 MDPV NS 基因在进化上形成 2 个不同的分支,表明 GPV 与 MDPV 起源于共同的祖先。GPV 与 MDPV 结构蛋白 VP 同源性较低,表明 VP 蛋白进化速度较快;结构蛋白中最重要的免疫原性蛋白为 VP3,GPV 与 MDPV VP3 蛋白同源性最低,表明其抗原性存在差异,提示 GPV 疫苗不能完全保护 MDPV 的感染;GPV 与 MDPV 结构蛋白 VP 在进化上也形成 2 个独立的分支;进化分析表明,GPV 与 MDPV 起源于共同的祖先,随着进化过程的推进,不断演变成两个独立的病毒群,未发生基因重组现象。

NS1 蛋白与病毒的致病性、病毒复制及表达相关,NS2 蛋白能促进 NS1 蛋白对细胞的毒性作用,还与病毒 DNA 和蛋白合成以及病毒增殖有关^[8]。本研究首次发现 GPV LJJ 毒株 NS 基因在核苷酸 484—486 位缺失 3 个碱基,即在 162 位缺失 1 个氨基酸,该蛋白的缺失是否与病毒的致病性和病毒的增殖有关,还需要进一步研究。

结构蛋白糖基化位点是病毒黏附宿主细胞重要的位置,是病毒感染宿主必不可少的区域;研究表明糖基化位点的不同,可能与病毒感染宿主的特异性有一定关系^[9],即产生不同的宿主范围。现有研究还表明糖基化位点的改变和数目的增减影响病毒毒

力^[10]。本研究结果表明,MDPV 有 8 个糖基化位点,而 GPV 只有 4~6 个。GPV 相对于 MDPV 糖基化位点的减少,推测是否 GPV 更容易逃避宿主免疫系统攻击,从而导致 GPV 可以感染鹅与番鸭,而 MDPV 只能感染番鸭;该推测需要进一步研究来验证。另外,在糖基化位点数目相同的情况下,缺失或插入不同糖基化位点对毒株毒力的影响有待进一步研究。总之,对水禽细小病毒进行分子进化分析,可为今后对其生物学特性和致病机制的研究奠定基础。

参考文献:

- [1] 张云,耿宏伟,郭东春,等. 鹅和番鸭细小病毒全基因克隆与序列分析[J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(6): 415-419.
- [2] 阮二垒,陈芳艳,陈瑞爱,等. 鹅细小病毒 NS2 基因的克隆和序列分析[J]. 中国动物检疫, 2009, 26(10): 32-33.
- [3] 方定一. “小鹅瘟”的介绍[J]. 中国兽医杂志, 1962(8): 19-20.
- [4] 贺云霞,王君伟,王立群,等. 鹅细小病毒 H1 株 VP2 基因的克隆和序列分析[J]. 中国预防兽医学报, 2003, 25(5): 330-333.
- [5] 丁轲,程安春,张智信,等. 鹅细小病毒 CHv 强毒株 VP3 基因克隆及遗传进化[J]. 河南科技大学学报: 自然科学版, 2011, 32(6): 59-63.
- [6] 赵明军,谌南辉. 番鸭细小病毒分子生物学研究进展[J]. 山东家禽, 2003(8): 43-44.
- [7] 侯学新. 番鸭细小病毒生物学特性的研究进展[J]. 中国家禽, 2003, 25(4): 37-38.
- [8] ZÁDORI Z, STEFANCSIK R, RAUCH T, et al. Analysis of the complete nucleotide sequences of goose and muscovy duck parvoviruses indicates common ancestral origin with adeno-associated virus [J]. *Virology*, 1995, 212(2): 562-573.
- [9] 孔宪刚,李桂霞,刘胜旺,等. 鹅细小病毒分离株 HG5/82 的分子特征分析[J]. 中国病毒学, 2005, 20(1): 28-32.
- [10] VIGERUST D J, SHEPHERD V L. Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions [J]. *Trends Microbiol*, 2007, 15(5): 211-218.

(编辑 白永平)