

6株鹅细小病毒的分离及其VP3基因序列分析

周彩显,吴昊,于晶,阳丽媛,姚望远,赵健,伊淑帅,董浩,胡桂学*

(吉林农业大学动物科学技术学院,长春 130118)

[收稿日期] 2016-01-02 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 03-0001-05 [中图分类号] S854.4⁺3

[摘要] 为了解吉林省不同地区小鹅瘟流行情况,从吉林省磐石、白城、九台、德惠、辽源与镇赉地区鹅养殖场采集疑似小鹅瘟雏鹅的肠管,处理后接种 SPF 鹅胚成功分离到 6 株病毒(暂命名为 PSH、BCH、JLJT、DH、LY 与 ZL 株),经 PCR 鉴定为鹅细小病毒。VP3 基因序列分析结果显示,分离到的 6 株鹅细小病毒 VP3 基因与近年来国内流行毒株同源性较高,核苷酸与氨基酸同源性分别为 93.1%~99.6% 与 95.9%~99.4%。其中,BCH 株、JLJT 株与 LY 株属同一分支,与浙江和扬州等地区分离的鹅细小病毒相似性较高,达到 99.4%~99.6%;ZL 株、DH 株与 PSH 株属同一分支,相似性较低。试验表明,吉林省流行的鹅细小病毒与我国南方地区流行毒株同源性较高,与其他地区流行毒株存在一定差异。

[关键词] 鹅细小病毒;分离;VP3 基因

Isolation of 6 Strains of Goose Parvovirus and Analysis of VP3 Gene

ZHOU Cai-xian, WU Hao, YU Jing, YANG Li-yuan, YAO Wang-yuan,

ZHAO Jian, YI Shu-shuai, DONG Hao, HU Gui-xue*

(College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: In order to evaluate the epidemic development of goose parvovirus (GPV) in different district of Jilin province, intestines of suspected goose were collected from poultry farm in different regions including Panshi, Baicheng, Jiutai, Dehui, Liaoyuan and Zhenlai city of Jilin province, and 6 strains named respectively PSH, BCH, JLJT, DH, LY and ZL, were isolated with inoculating SPF goose embryos. The detection of PCR showed that all six samples were positive for goose parvovirus. The result of sequence analysis of VP3 gene showed that the 6 isolated strains shared high identities with the domestic popular strains in recent years, with 93.1%~99.6% and 95.9%~99.4% homology. Among them, BCH, JLJT and LY located in the same branch, all three strains had a high homology at 99.4%~99.6% with isolated strains from Zhejiang and Yangzhou; ZL, DH and PSH located in the same branch, but the homology was low. This assay indicate that the epidemic GPV strain in Jilin province possessed high identities with epidemic strain of the southern China, and different from strains in other areas.

Key words: goose parvovirus; isolation; VP3 gene

基金项目:吉林农业大学国家级大学生创新创业训练计划项目(201410193016);吉林省科技发展计划项目(20130522086JH)

作者简介:周彩显,从事动物病原学研究。

通讯作者:胡桂学。E-mail:huguixue901103@163.com

鹅细小病毒病又称小鹅瘟, 是一种由鹅细小病毒(Goose parvovirus, GPV)引起的以雏鹅和雏番鸭出血性、败血性纤维素性肠炎为主要特征的急性或亚急性高度接触性传染病, 具有传播速度快与死亡率高等特点, 对鹅养殖业造成了严重威胁^[1-2]。自1956年, 我国学者方定一发现小鹅瘟后, 该病相继在各个地区均有报道。20世纪80年代以后, 在国内几乎每个地区具有该病的出现, 对鹅养殖业带来了严重的经济损失^[3-4]。吉林省作为我国鹅养殖大省, 小鹅瘟的流行成为制约养鹅业发展的主要因素。近年来, 吉林省磐石、德惠、九台与镇赉地区大型鹅养殖场相继暴发小鹅瘟疫情, 对养殖业造成了严重的经济损失。因此, 了解吉林省不同地区小鹅瘟的流行情况, 对小鹅瘟的防治意义重大。本试验通过尿囊腔接种鹅胚从吉林省不同地区小鹅瘟疑似病料种分离到6株病毒, 经PCR初步鉴定为鹅细小病毒。对分离株的VP3基因进行序列测定与分析, 并与近年来国内流行毒株进行同源性分析, 以期为指导本地小鹅瘟的防治工作提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 GPV标准毒株B株由吉林省畜牧兽医科学研究院惠赠; Viral DNA Extraction kit, DNA Gel Extraction kit, Plasmid Mini Preparation kit 购自OMEGA公司; Ex Taq 酶、dNTP、10×buffer、DL 2000 maker、pMD-18T质粒、DH5 α 感受态等均购自大连宝生物公司。MikRo 22R高速冷冻离心机(德国HETTICH公司)、MCO-18AIC恒温孵化箱(日本SANYO公司)、TC-25/H PCR仪(BIOER公司)、DYY-6B电泳仪凝胶成像系统(BIO-RAD公司)等。

1.2 病料来源及处理 疑似小鹅瘟雏鹅的肠管采集自吉林省九台、磐石、白城、镇赉、辽源、德惠地区鹅养殖场的发病鹅群。采集的病料使用含1%双抗溶液的生理盐水进行组织匀浆, 反复冻融3次后, 10000 r/min离心10 min, 收集上清液, 经0.22 μ m纤维滤膜过滤后保存备用。

1.3 病毒分离 10日龄鹅胚由吉林农业大学鹅养殖中心提供, 按照0.2 mL/胚的剂量分别将6个地区处理过的病料组织匀浆液经尿囊腔接种鹅胚, 接种后每隔12 h观察鹅胚的存活状态, 连续观察5 d, 无菌收集24 h~120 h内死亡鹅胚的尿囊液与

-80℃保存, 并按照上述方法连续盲传5代, 收集尿囊液并保存。

1.4 病毒鉴定 使用Viral DNA Extraction kit提取盲传第5代尿囊液中病毒的DNA, 以病毒DNA为模板, 去离子水、GPV标准株B株DNA为阴、阳对照, 采用胡桂学等^[5]建立的GPV检测体系及条件进行PCR扩增, 扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.5 VP3基因的扩增及序列分析 以提取的盲传第5代尿囊液病毒DNA为模板, 根据本实验室设计的VP3扩增引物^[6]扩增分离株VP3基因片段, 预期片段大小为1605 bp。扩增条件为95℃预变性5 min, 94℃变性30 s, 59℃退火30 s, 72℃延伸30 s, 72℃终延伸10 min, 共30个循环。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳进行检测, 经胶回收后连接pMD-18T载体, 转化DH5 α 感受态大肠杆菌, 挑取阳性菌落提取质粒分别命名为T-JLJT-VP3、T-PSH-VP3、T-BCH-VP3、T-ZL-VP3、T-LY-VP3与T-DH-VP3, 并送往上海生工有限公司测序。

将测序结果进行拼接构成完整的VP3基因序列, 查找近年来于GenBank上发表的GPV VP3基因序列, 使用MegAlign软件进行基因序列及氨基酸序列同源性分析并绘制进化树。

2 结果

2.1 病毒分离及传代 采集自吉林省磐石、镇赉、白城、九台、德惠、辽源地区的疑似小鹅瘟病料经处理后接种10日龄鹅胚, 72 h~120 h内鹅胚全部死亡, 尿囊液连续盲传5代仍能致死鹅胚, 证明成功分离到6株病毒, 暂命名为磐石株(PSH)、镇赉株(ZL)、白城株(BCH)、九台株(JLJT)、德惠株(DH)与辽源株(LY)。

2.2 病毒PCR鉴定结果 利用GPV鉴定引物GPV F/GPV R, 对提取的盲传第5代尿囊液病毒DNA进行特异性扩增, 经1%琼脂糖凝胶电泳检测得到特异性目的条带, 与预期结果一致, 片段大小约为375 bp(图1)。经序列测定以及在线Blast比对, 与GPV同源性为95.7%~99.6%, 初步确定分离到的6株病毒均为GPV。

2.3 VP3基因扩增结果 以6株病毒盲传第5代尿囊液提取的DNA为模板, 本实验室设计的VP3

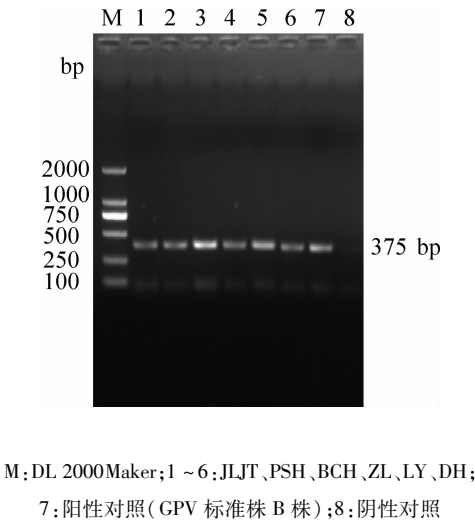


图1 病毒 PCR 鉴定结果

扩增引物 VP3 F/VP3 R 对 6 株病毒的 VP3 基因进行特异性扩增,扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳得到特异性目的条带,结果如图 2 所示。6 株病毒均在 1605 bp 左右出现目的条带,与预期结果一致。

2.4 VP3 基因序列测定及遗传进化分析 将 6 株

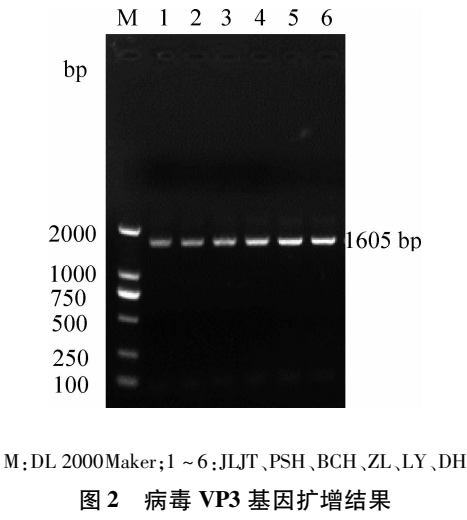


图2 病毒 VP3 基因扩增结果

病毒的阳性克隆质粒送往上海生工生物工程公司测序,测序结果经拼接后均为 1605 bp。根据近年来 GenBank 上发表的 GPV VP3 基因序列,应用 MegAlign 软件分析 6 株 GPV 分离株 JLJT、PSH、BCH、ZL、LY、DH 与已发表 GPV 毒株的同源性,并绘制系统进化树(图 3)。

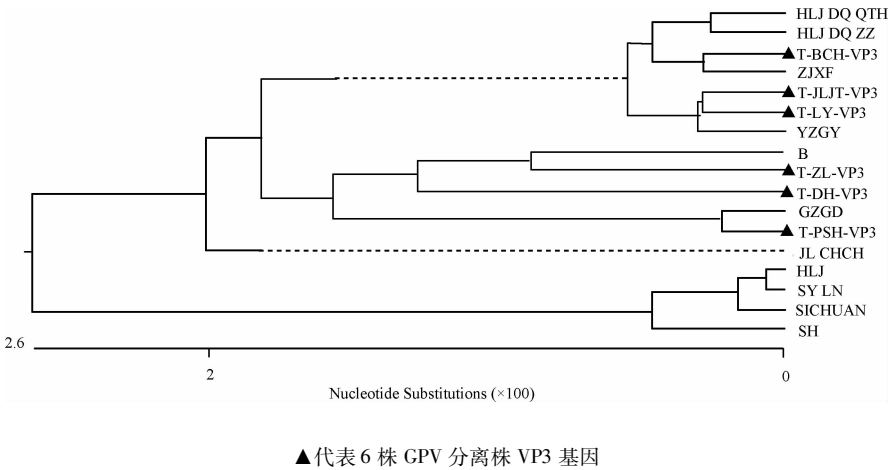
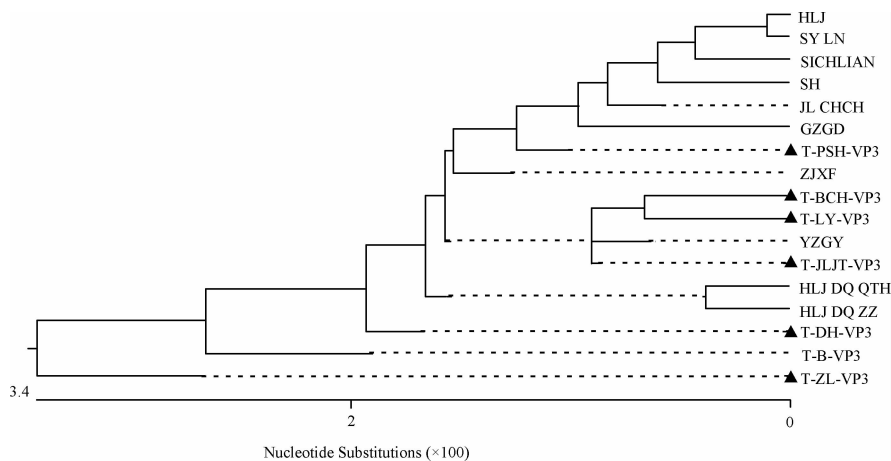


图3 GPV 分离株 VP3 基因核苷酸系统进化树分析

遗传进化分析结果表明,6 株 GPV 分离株 VP3 基因与近年来国内流行的 GPV 以及 GPV 标准毒株 B 株 VP3 基因同源性均在 93.1% ~ 99.6% 之间。其中,BCH 株、JLJT 株、LY 株属同一分支,JLJT 株与 LY 株相似性最高,达到 99.4%,JLJT 株与 2013 年扬州分离株 YZGY 同源性高达 99.6%,BCH 株与 2013 年浙江分离株 ZJXF 同源性达到 99.4%。ZL 株、DH 株、PSH 株属同一分支,3 株病毒相互之间同源关系较远,但是 PSH 株与 2007 年广东分离

株 GZGD 同源性较高,达到 99.6%。

2.5 VP3 基因推导氨基酸序列分析 根据 6 株 GPV 分离株 VP3 基因序列推导 VP3 氨基酸序列,VP3 基因序列为 1605 bp,编码 534 个氨基酸。应用 MegAlign 软件对推导出的氨基酸序列进行遗传进化分析,并绘制系统进化树(图 4)。结果表明,6 株 GPV 分离株 VP3 基因推导出的氨基酸序列与其余 11 株 GPV VP3 基因氨基酸序列同源性介于 95.9% ~ 99.4% 之间,其中,BCH 株、JLJT 株、LY 株与扬州分离株 YZGY 属于同一



▲代表6株GPV分离株VP3基因推导氨基酸序列

图4 GPV分离株VP3基因推导氨基酸序列系统进化树分析

分支, JLJT株与YZGY株同源性最高, 达到99.4%; PSH株与广东分离株GZGD属于同一分支, 同源性为98.7%, DH株、ZL株与其余毒株同源性较远, 但也达到95.9%~98.3%。

3 讨论

GPV主要侵害1~20日龄的易感雏鹅与雏番鸭, 引起雏鹅与雏番鸭感染发病, 具有发病快、发病率高与死亡率高的特点。GPV感染后2~5 d就可以波及整个鹅群, 造成雏鹅大批量死亡, 对鹅养殖业造成了严重的威胁^[7]。因此, GPV毒株的分离成为研究GPV遗传进化特点、生物学特性及疫苗研发的重点。目前, 使用鹅胚或鹅胚成纤维细胞进行GPV的分离是最为普遍的方法。王建等通过鹅胚接种成功分离到4株GPV, 并将分离株接种鸡胚, 鸡胚未发生病变^[8]; 邱娜等使用不同代次的鹅胚成纤维细胞连续培养YN株GPV, 获得了高滴度的鹅细小病毒细胞适应株^[9]。本试验通过尿囊腔接种鹅胚成功分离到6株病毒, 通过PCR验证所分离的病毒均为GPV, 并暂命名为PSH株、ZL株、BCH株、JLJT株、DH株、LY株。此外, 通过连续盲传的方法, 获得了稳定的GPV毒株。

鹅细小病毒结构蛋白VP3基因具有相对较高的保守性, 同时可以诱导机体产生中和抗体, 是GPV的保护性抗原, 常作为GPV分子生物学诊断以及遗传进化分析的依据^[10-11]。胡桂学^[5]、布日额^[12]、Limn^[13]、赵妍^[14]等许多学者均针对GPV的

VP3基因建立了小鹅瘟PCR检测方法, 且均有很好的特异性及敏感度。其中, 布日额、Limn建立的PCR检测方法是根据GPV的VP1与VP3基因设计的扩增引物, 检测准确率高, 但检测过程较为繁琐; 赵妍建立的检测方法为二重PCR, 可以同时检测鸭瘟病毒与番鸭细小病毒, 不适于检测鹅源细小病毒; 胡桂学建立的小鹅瘟PCR检测方法特异性与敏感性均较高, 并在吉林地区鹅细小病毒流行病学调查中得到了充分的验证^[15]。因此, 本试验采用胡桂学建立的GPV PCR检测方法对6株病毒分离株进行了PCR检测, 结果均在375 bp左右出现了目的条带, 与预期结果一致。通过序列测定及在线Blast比对, 与GPV同源性为95.7%~99.6%, 确定分离到的6株病毒均为GPV。

根据VP3基因及所对应的氨基酸序列进行进化分析, 分析毒株间亲缘关系, 也可以对不同毒株引起的疫病流行情况进行系统的分析。本试验通过对6株GPV分离株VP3基因与国内近年来流行的GPV毒株以及GPV标准毒株B株同源性比较, 结果核苷酸与氨基酸同源性均较高, 分别为93.1%~99.6%, 95.9%~99.4%。其中, BCH株、JLJT株、LY株属同一分支, 与2013年扬州分离株YZGY的核苷酸同源性较高。ZL株、DH株、PSH株属同一分支, 3株病毒相互之间同源关系较远, 但是PSH株与2007年广东分离株GZGD同源性较高。PSH株与广东分离株GZGD株, BCH株、JLJT株、

LY 株与扬州分离株 YZGY 为同一株病毒,是南方 GPV 毒株在传播过程中的变异毒株。造成这一现象的原因可能是由于近年来吉林省鹅养殖规模不断扩大,由南方地区引入的种鹅数量也随之增多,从而导致南方鹅群携带的 GPV 毒株进入吉林省并发生变异造成大规模流行。通过本试验对吉林省不同地区的 GPV 毒株流行情况进行了调查,并证明分离到的 6 株 GPV 毒株与近年来我国南方流行毒株同源性较近,推测为南方 GPV 毒株的变异毒株,可为吉林省不同地区鹅细小病毒的研究与防治提供依据。

参考文献:

[1] 金文杰,吕亚楠,王芳,等. 我国小鹅瘟研究进展及成就[J]. 微生物学通报, 2014, 41(3): 504-510.

[2] Shein J, wang Y, Chen C, *et al.* Identification of sequence changes in live attenuated goose parvovirus vaccine strains developed in Asia and Europe [J]. Avian Pathology, 2008, 37(5): 499-505.

[3] 赵刚,郭宇翔. 黑龙江省小鹅瘟的流行病学调查[J]. 养殖技术顾问, 2013, 5: 74-75.

[4] 牛小会. 小鹅瘟的流行、症状与防治[J]. 现代畜牧科技, 2015, 4: 66-67.

[5] 胡桂学,逢博,高凤山,等. 小鹅瘟 PCR 诊断方法的建立和初步应用[J]. 经济动物学报, 2003, 2: 50-53.

[6] 徐浩. 鹅细小病毒的分离鉴定及其全基因测序及结构蛋白

的表达[D]. 长春: 吉林农业大学, 2014.

[7] Shao H, Lv Y, Ye J, *et al.* Isolation of a goose parvovirus from swan and its molecular characteristics [J]. Acta Virologica, 2014, 58(2):194-198.

[8] 王建,王华琴,徐泽锋,等. 五常地区小鹅瘟病毒的分离与鉴定[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2014, 06: 10-12.

[9] 邱娜,刘明,白小飞,等. 鹅细小病毒鹅胚成纤维细胞适应病毒株的培育及序列分析[J]. 中国预防兽医学报, 2014, 11(36): 898-900.

[10] Liu H M, Wang H, Tian X J, *et al.* Complete genome sequence of goose parvovirus Y strain isolated from Muscovy ducks in China [J]. Virus Genes, 2014, 48(1):199-202.

[11] Zadori Z, Judith E, Nagy J, *et al.* Characteristics of the genome of goose parvovirus[J]. Avian Pathology, 1994, 23(2):359-364.

[12] 布日额,王君伟,吴金花,等. GPV 野毒株的分离及 PCR 检测方法的应用[J]. 中国预防兽医学报, 2003(6): 469-472.

[13] Limn C K, Yamada T, Nakamura M, *et al.* Detection of goose parvovirus genome by polymerase chain reaction: distribution of goose parvovirus in Muscovy ducklings [J]. Virus Research, 1996, 42(1/2): 167-172.

[14] 赵妍,王君伟,邢明伟,等. 二重 PCR 检测鸭瘟病毒和鹅细小病毒的初步研究[J]. 中国预防兽医学报, 2007, 9(29): 710-713.

[15] 于靖平. 待宰鹅新城疫和小鹅瘟的流行病学调查及新城疫病毒的分离与鉴定[D]. 吉林农业大学, 2014.

(编辑:李文平)