

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.12.01

新型鸭呼肠孤病毒广东分离株 σ C 蛋白基因序列分析

张思远¹, 卢秀娴^{1*}, 云 鹄¹, 梁昭平¹, 潘俊斌², 林举攀¹, 叶贺佳¹

(1. 广州市华南农大生物药品有限公司, 广州 510300; 2. 华南农业大学, 广州 510642)

[收稿日期] 2019-08-29 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 12-0001-06 [中图分类号] S852.65

[摘 要] 从广东湛江某肉鸭养殖场发生脚软、关节肿大为临床特征和脾脏肿大、肝脏有坏死灶为病变的樱桃谷鸭病料中分离到一株新型鸭呼肠孤病毒, 命名为 GD693。对新型鸭呼肠孤病毒 GD693 株 σ C 蛋白基因进行 RT-PCR 扩增、克隆和测序, 并与参考毒株 σ C 蛋白基因序列进行比对分析。结果显示: GD693 株与新型呼肠孤病毒 (NDRV) 代表毒株处于进化树的同一大分支, 但却处于一个单独的分支, 同属于基因 2 型, 具有相近的遗传演化关系; 与 NDRV 代表毒株 091 株、TH11 株的 σ C 蛋白基因序列进行比较分析, 存在核苷酸和氨基酸的序列改变, 毒株有可能发生变异或毒力增强。

[关键词] 新型鸭呼肠孤病毒; 分离鉴定; σ C 蛋白基因; 序列分析

Sequence Analysis of Sigma C of Novel Duck Reovirus Isolated from Guangdong Province

ZHANG Si-yuan¹, LU Xiu-xian^{1*}, YUN Ao¹, LIANG Zhao-ping¹,PAN Jun-bin², LIN Ju-pan¹, YE He-jia¹

(1. Guangzhou South China Biological Medicine Co. Ltd, Guangzhou, China, 510300, China;

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

Corresponding author: LU Xiu-xian, E-mail: 1287396702@qq.com

Abstract: A strain of novel duck reovirus (GD693) was isolated from cherry valley duck that was affected by soft feet, enlarged joints, enlarged spleen and necrotic liver lesions in a meat duck farm from Guangdong province. The sigma C protein gene of the novel duck reovirus strain was amplified, cloned and sequenced by RT-PCR, and compared with the reference strain sigma C protein gene sequence. The results showed that GD693 was in the same branch of the evolutionary tree as the novel reovirus (NDRV), but they were in a single branch, which belonged to the gene type 2 and had similar genetic evolutionary relationships. Compared with the sequence of sigma C protein gene of NDRV representative strain 091 strain and TH11 strain, there were nucleotide and amino acid sequence changes, and the strain may be mutated or virulence enhanced.

Key words: a novel duck reovirus; isolation identification; sigma c protein gene; sequence analysis

作者简介: 张思远, 硕士研究生, 从事禽病学诊断研究。

通讯作者: 卢秀娴。E-mail: 1287396702@qq.com

近年来,一种新型鸭呼肠孤病毒(NDRV)疾病,称为北京鸭“脾坏死”病,在我国多个地区流行,该病的主要特征病变为肝、脾脏不规则出血、坏死与心肌、腔上囊出血,发病没有明显季节^[1],与传统的番鸭呼肠孤病毒(MDRV)相比,具有更广泛的宿主,不同品种鸭均易感,发病率与病死率有较大差异,被感染的病鸭日龄越小,发病、病死率越高^[2]。

2018 年下半年,广东湛江某肉鸭养殖场樱桃谷肉鸭发病,临床主要表现为脚软、关节肿大等临床特征,解剖发现主要为肝脏肿大、脾脏有坏死灶等病变特征,该肉鸭群主要是 1~2 周龄的雏鸭发病,最早可见于 3~5 日龄,发病率 60% 以上,死亡率 40% 左右。根据临床诊断初步怀疑该病是由鸭呼肠孤病毒引起的疾病,但该病所引起的死亡率却不同于经典的北京鸭“脾坏死”病。本研究对采集的病死鸭病料进行了病原分离鉴定,对分离株的 σ C 蛋白基因进行了克隆、测序和序列基因遗传变异分析,以期了解该病毒的变异情况,为该病的防控和诊断提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料 病料为广东湛江某肉鸭养殖场临床发生“肝脾坏死症”死亡雏鸭的肝脏和脾脏;50 枚 9 日龄健康樱桃谷鸭胚购自广东某健康种鸭养殖场,40 只 1 日龄健康樱桃谷鸭购自广东某健康种鸭养殖场。

1.2 主要试剂 核酸提取试剂盒(9766)、pMD19-T 载体(6013)购自 TaKaRa 公司、DL2000 DNA Marker(BM101-01)购自北京全式金公司;2 × Gotap Master Mix(M711)购自 Promega 公司;核酸染料(RT210)和反转录试剂盒(KP103)均购自 TIANGEN 公司。

1.3 病料处理 将病料剪碎研磨,与 PBS 按 1:3 的比例制成组织匀浆液,将匀浆液置于冰箱-20℃ 冷冻并反复冻融 3 次,离心后取上清液过滤除菌、分装,分装量为 1 mL/管,于-70℃ 及以下保存。

1.4 病原传代培养 病料滤液经尿囊腔接种 9 日龄鸭胚,0.2 mL/胚,收集接种后 24~108 h 死亡鸭胚,收获胚液,继续传代至鸭胚规律性死亡止。检

测胚液对 1% 鸡红细胞悬液的血凝性。

1.5 RT-PCR 检测 分别用以下 4 对引物对病料滤液及收获的胚液体进行 RT-PCR 检测。根据 GenBank 中已发表的番鸭细小病毒(MPV)、新型鸭呼肠孤病毒(NDRV)、番鸭呼肠孤病毒(MDRV)、鸭瘟(DPV)的基因序列,用 Oligo7.0 软件设计特异性检测引物,由上海生工生物工程有限公司合成,引物序列见表 1。

表 1 RT-PCR 检测引物

Tab 1 RT-PCR detection primers		
引物名称	引物序列(5'→3')	片段长度/bp
MPV-F	AGAGAAAGAAAACCCGT	600
MPV-R	GTTGCCTCCAAAGGAGG	
NDRV-F	CTCAGGATATCGCTGAAACT	500
NDRV-R	CTCCATCCCTGCAGCACATG	
MDRV-F	GCACTCTGGATCCAGTAC	438
MDRV-R	CAATGGAGAAGCGAAC	
DPV-F	AGACGAAGCGCGGTATG	563
DPV-R	CGTATTGGTTTCTGAG	

1.6 组织切片病理观察 患鸭的脾脏和肝脏固定于 10% 的多聚甲醛溶液 48 h,经脱水、透明、石蜡包埋、切片、H. E. 染色,观察病理变化。

1.7 对鸭胚的半数致死量 胚液的 10⁻²、10⁻³、10⁻⁴和 10⁻⁵稀释度分别经尿囊腔接种 9 日龄鸭胚各 6 枚,0.2 mL/胚,用蜡封孔,于 37℃ 静置孵育,记录各稀释度 24~108 h 死亡鸭胚数,按 Reed-Muench 法计算 ELD₅₀。

1.8 动物回归实验 40 只 1 日龄健康樱桃谷鸭,随机分为 2 组,攻毒组 30 只经皮下接种病毒液,接种剂量 0.5 mL/只;对照组 10 只以同样的方式和剂量接种 PBS。每日观察雏鸭的临床症状和死亡情况,观察 10 日后扑杀解剖 2 组雏鸭。

1.9 分离毒 σ C 蛋白基因序列测定 根据 σ C 基因两端外的保守序列设计 1 对扩增 σ C 全长基因的引物,引物序列:P1(上游):5'-TTGAAAAGTGAACAAAGA-3',P2(下游):5'-CCATACTAA-

CATAAGGGCA-3',预期扩增片段大小为 986 bp。经 RT-PCR 扩增 σC 基因全序列,回收 RT-PCR 产物,与 pMD19-T 载体相连转化至 DH5α,经 PCR 鉴定后挑取阳性菌送华大基因公司广州测序部进行基因全长序列的测定。

1.10 病毒 σC 蛋白基因序列分析 利用 DNASTar

等软件将病毒株基因序列与 GenBank 中登录的禽源呼肠孤病毒参考毒株进行比较。

2 结果与分析

2.1 病毒分离 将病料接种鸭胚,培养 96~108 h 后胚胎死亡,胚胎体表充血、出血;死亡胚尿囊液清亮,胚胎蜷缩,见图 1。该分离毒不能凝集 1% 鸡的红细胞。



a:正常胚;b(1-2):死亡胚全身出血
a: normal embryo; b(1-2): dead embryo systemic hemorrhage

图 1 死亡鸭胚胚体变化

Fig 1 Death embryo body changes

2.2 RT-PCR 检测结果 RT-PCR 鉴定应用 NDRV 特异性引物能从病料滤液和分离的胚液种扩增到 500 bp 目的片段(图 2),应用其他 3 种鸭的病毒特异引物不能从病料中扩增到目的片段,均为阴性。分离到的毒株命名为 GD693。

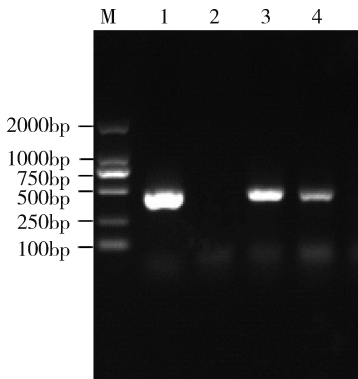
2.3 组织切片病理观察 脾红骨髓界限不清,组织结构崩解,被膜下形成炎症反应带;肝脏组织间出现大量的红细胞、出现局灶性坏死,空泡变性(图 3)。

2.4 病毒半数鸭胚致死量(ELD₅₀) 测定结果为:ELD₅₀ = 10⁻⁴/0.2 mL。

2.5 动物回归实验 攻毒组鸭在接毒的第 5 天开始出现精神萎靡,排白色稀粪,食欲减退,观察期满 10 d 后剖检发现鸭出现与临床自然发病樱桃谷鸭一致的病理变化(图 4);第 2 组对照无异常。

2.6 σC 蛋白基因片段 RT-PCR 扩增结果 结果显示:NDRV σC 蛋白基因扩增的片段长度约 986 bp,与预期的结果一致(图 5)。

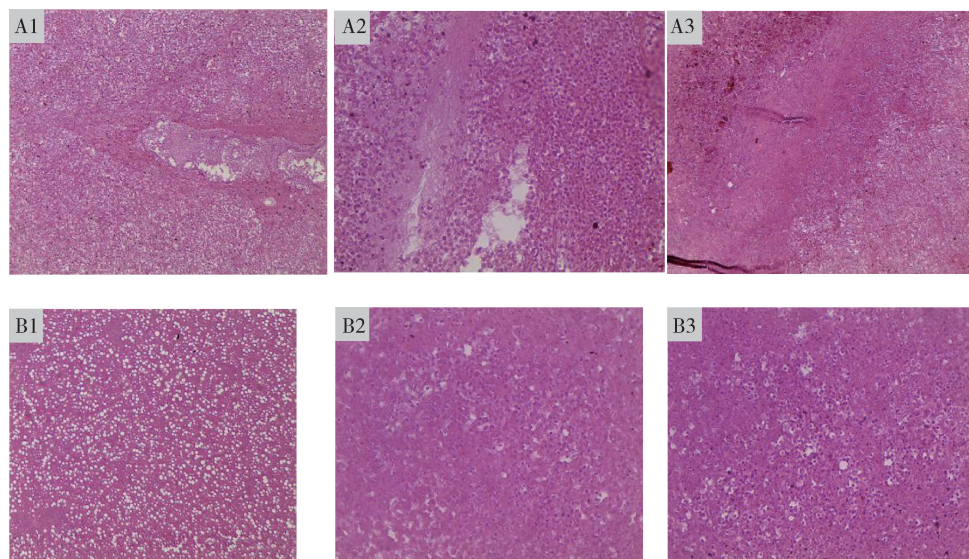
2.7 σC 蛋白基因序列测定与遗传进化分析 σC 蛋白基因开放阅读框(ORF)为 966 bp,编码 321 个氨基酸,是新型鸭呼肠孤病毒 S1 基因组第 3 个 ORF 编码的。GD693 株与参考毒株 σC 基因核苷酸序列及推导氨基酸序列同源性比较结果表明, GD693 株与 MDRV 毒株 D1546 株的同源性为 60%~61% 之间;与 NDRV 代表毒株 091、NP03、TH11 株的同源性为 96.7%~98.6% 之间。



M:DL2000 DNA Marker;1:NDRV 阳性对照;
2. NDRV 阴性对照;3. 胚液;4. 病料

图 2 分离毒株 RT-PCR 检测结果

Fig 2 RT-PCR results of isolated strains



A(1-3) 脾脏: 严重坏死, 组织结构崩解, 被膜下形成炎症反应带;

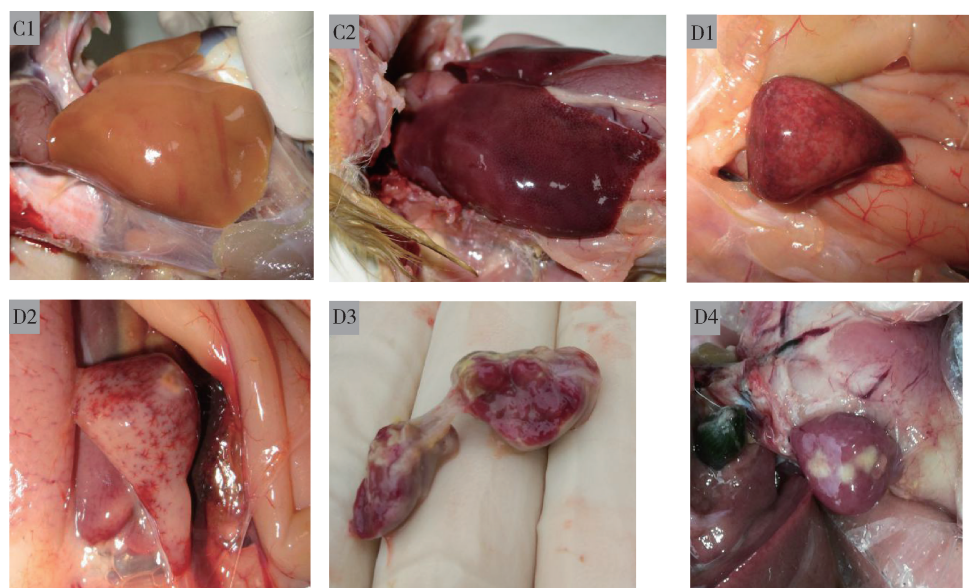
B(1-3) 肝脏: 肝细胞肿胀, 空泡变性

A(1-3) spleen: severe necrosis, disintegration of the tissue structure, and formation of an inflammatory reaction zone under the capsule;

B(1-3) liver: hepatocyte swelling, vacuolar degeneration

图 3 病死鸭脾脏、肝脏组织病理切片图

Fig 3 Histopathological section of the spleen and liver of dead duck



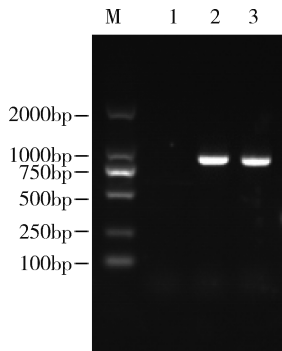
C 肝脏: C1 肝脏呈土黄色、质脆, C2 充血、点状出血; D(1-4) 脾脏: 充血、肿大、有黄色坏死点

C liver: C1 liver is yellowish, brittle, C2 liver is hyperemia, a little bit bleeding;

D(1-4) spleen: congestion, swelling, yellow necrosis

图 4 动物回归实验

Fig 4 Animal regression experiment



M. DL 2000 DNA Marker;1. 以 ddH₂O 为模板的阴性对照;
2. 阳性对照;3. σC 蛋白基因片段

图 5 σC 蛋白基因片段 RT-PCR 扩增结果

Fig 5 RT-PCR results of σC protein gene segment

将 GD396 株与 NDRV 代表毒株 091、TH11 株的 σC 蛋白基因序列进行比较, GD396 株核苷酸及氨基酸序列存在差异位点, 氨基酸差异位点分别位于第 25 (T→K)、64 (E→D)、65 (L→M)、91 (L→L)、132 (T→S)、138 (R→Q)、150 (P→S) 位氨基酸。核苷酸和氨基酸的序列改变, 有可能会导导致毒力相关位点发生改变, 从而使毒株的毒力发生变化。

各毒株 σC 蛋白基因遗传进化树分析结果(图 6)

显示, 可将水禽源呼肠孤病毒分为两个基因型, 经典的 MDRV 和 GRV 属于基因 1 型, 而 NDRV 及 N-GRV 属于基因 2 型。GD693 毒株与 NDRV 代表毒株处于进化树的同一大分支, 但却处于一个单独的分支, 同属于基因 2 型, 具有相近的遗传演化关系; 与其他毒株处于进化树的不同分支, 亲缘关系相对较远。

3 讨论与结论

本研究从临床表现为脚软、关节肿大的病死鸭中分离到 NDRV, 该病以脾脏坏死, 肝脏点状或斑块状出血为主要特征的。经动物回归试验, 可以复制出与临床自然病死鸭相似的病变。NDRV 属于呼肠孤病毒科正呼肠孤病毒属, 没有囊膜, 呈二十四面体的双层衣壳结构, 核酸是线性双链 RNA, 基因组由 10 个双链 RNA 基因片段组成, 大片段 (L1-L3)、中片段 (M1-M3) 和小片段 (S1-S4)^[3-4]。呼肠孤病毒在抗原致病性、基因编码蛋白的顺序及病毒基因间的同源性方面上完全不同于之前的 MDRV 和鸡呼肠孤病毒 (ARV)^[5-6], 宿主更加广泛, 对各种品种鸭均有致病性^[7], 给我国水禽养殖业造成了一定程度的经济损失。

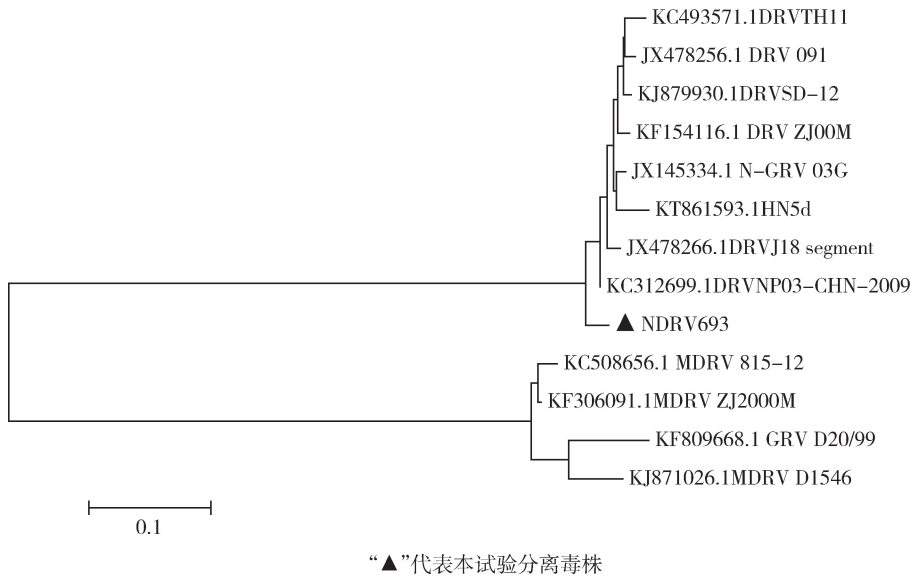


图 6 NDRV GD693 株与参考毒株 σC 蛋白基因序列的遗传进化树

Fig 6 Inheritance of NDRV GD693 strain and reference strain σC protein gene sequence tree

不同水禽源呼肠孤病毒之间存在较高的序列变异性,外衣壳蛋白(μ B、 σ B 和 σ C)编码基因片段表现出更高的序列变异性,适合于不同禽源毒株的鉴别,其中变异性最大的是 σ C 蛋白编码基因,而它在病毒的致病过程中发挥重要作用^[8]。 σ C 蛋白是一种结构蛋白,是由 NDRV S1 基因编码的,在呼肠孤病毒基因组编码的所有 σ 类蛋白中是最小的,同时是病毒的主要免疫蛋白,负责宿主细胞的附着,通过受体介导的方式对靶细胞进行识别与结合来启动病毒感染过程,可诱导机体产生特异性保护性中和抗体^[9]。NDRV 的 σ C 基因在分子大小和基因同源性方面与鸡呼肠孤病毒(鸡病毒性关节炎)存在很大的差异^[10]。

将 GD693 株的 σ C 蛋白基因序列与参考毒株进行了比对分析,结果显示,所分离的 GD693 株与 MDRV 毒株的同源性比较低(90% ~ 92%),而与 NDRV 代表毒株同源性则较高(95% ~ 97%)。遗传进化树显示,GD693 株与 MDRV 则处于不同的分支,而与 NDRV 代表毒株处于同一进化大分支,但又处于不同的小分支,表明可能它们来源于共同的祖先,但在病毒流行过程中形成了不同分支。将 GD396 株与 NDRV 代表毒株 091、TH11 株的 σ C 蛋白基因序列进行比较,GD396 株及氨基酸序列存在 6 个差异位点,可能会使病毒对鸭的致病性增强,据此推测 GD693 株可能是对鸭具有较高致病性的变异株,关于毒力的增强机制,仍需进一步研究。

本研究通过对 NDRV 的毒力、致病性及主要抗原 σ C 蛋白的变异分析,为今后新型鸭呼肠孤病毒分子流行病学研究、疾病防控和诊断提供参考依据。疫苗免疫是预防本病的主要防控措施,但目前还没有商品化的疫苗,因此研发新疫苗对该病的防控非常必要。

参考文献:

- [1] 陈宗艳,朱英奇,王世传,等. 一株新型鸭源呼肠孤病毒(TH11 株)的分离与鉴定[J]. 中国动物传染病学报, 2012(1): 10-15.
Chen Z Y, Zhu Y Q, Wang S C, *et al.* Isolation and identification

- of a new duck - derived reovirus (TH11 strain) [J]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases, 2012(1): 10-15.
- [2] Chen Z, Zhu Y, Li C, *et al.* Outbreak - associated novel duck Reovirus, China, 2011 [J]. Emerging Infectious Diseases, 2012, 18(7): 1209-1211.
- [3] 陈仕龙,陈少莺,程晓霞,等. 新型鸭呼肠孤病毒分离株的致病性研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2010(4): 14-18.
Chen S L, Chen S Y, Cheng X X, *et al.* Pathogenicity of a novel duck reovirus isolates [J]. Journal of Northwest A&F University, 2010(4): 14-18.
- [4] 黄瑜,苏敬良,施少华,等. 我国鸭呼肠孤病毒感染相关的疫病[J]. 中国兽医杂志, 2009, 45(7): 57-59.
Huang Y, Su J L, Shi S H, *et al.* Diseases related to duck reovirus infection in China [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2009, 45(7): 57-59.
- [5] 陈少莺,陈仕龙,林锋强,等. 新型鸭呼肠孤病毒的分离与鉴定[J]. 病毒学报, 2012, 28(3): 224-230.
Chen S Y, Chen S L, Lin F Q, *et al.* Isolation and identification of a novel duck reovirus [J]. Acta Virol Sinica, 2012, 28(3): 224-230.
- [6] 王劭,陈少莺,陈仕龙,等. 新型鸭呼肠孤病毒 NP03 株 S3 基因序列分析[J]. 农业生物技术学报, 2010, 18(3): 567-572.
Wang S, Chen S Y, Chen S L, *et al.* Sequence analysis of S3 gene of a new type of duck reovirus NP03 strain [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2010, 18(3): 567-572.
- [7] 胡奇林,陈少莺,林锋强,等. 番鸭呼肠孤病毒的鉴定[J]. 病毒学报, 2004, 20(3): 242-248.
Hu Q L, Chen S Y, Lin F Q, *et al.* Identification of Muscovy duck reovirus [J]. Chinese Journal of Virology, 2004, 20(3): 242-248.
- [8] Bi Z L, Zhu Y Q, Chen Z Y, *et al.* Induction of a robust immunity response against novel duck reovirus in ducklings using a subunit vaccine of sigma C protein [J]. Scientific Reports, 2016, 6(6): 39092.
- [9] 林锋强,程晓霞,陈仕龙,等. 新型鸭呼肠孤病毒在番鸭体内分布和排毒规律[J]. 中国家禽, 2018, 40(3): 53-55.
Lin F Q, Cheng X X, Chen S L, *et al.* Identification of reovirus in Muscovy duck [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2004, 20(3): 242-248.
- [10] 于可响,路晓,刘存霞,等. 山东地区新型鸭呼肠孤病毒致病特点与变异分析[J]. 中国动物传染病学报, 2018, 26(4): 24-28.
Yu K X, Lu X, Liu C X, *et al.* Analysis of pathogenic characteristics and variation of novel duck reovirus in Shandong region [J]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases, 2008, 26(4): 24-28.

(编辑:李文平)