

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.02.01

2019 年我国部分地区鸭圆环病毒基因 序列测定与分析研究

卢秀娴¹, 张思远^{1*}, 梁昭平², 林举攀¹, 云 鹜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] 2019-09-07 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 02-0001-06 [中图分类号] S852.65

[摘 要] 为了解近年鸭圆环病毒流行毒株的基因遗传特点和变异情况, 通过采用 PCR 的方法对我国部分地区的 30 份鸭圆环病毒阳性样品进行全基因组扩增与克隆、序列测定及遗传进化分析。结果显示: 30 株 DuCV 流行毒株之间的全基因序列同源性为 85.8% ~ 99.9%, 其中 26 株 DuCV 的全基因序列长为 1993 ~ 1995 bp, 与德国代表株处于同一进化分支, 属于基因 1 型, 4 株 DuCV 的全基因序列仅有 1988 bp, 与中国台湾代表株属于同一进化分支, 属于基因 2 型; Cap 蛋白和 Rep 蛋白的氨基酸序列的变异分析表明 Cap 蛋白的变异程度要显著高于 Rep 蛋白。

[关键词] 鸭圆环病毒; 全基因克隆; 序列分析

Sequence Analysis and Analysis of Duck Circovirus Genes in Some Regions of China in 2019

LU Xiu-xian¹, ZHANG Si-yuan^{1*}, LIANG Zhao-ping², LIN Ju-pan¹, YUN Ao¹, YeHe-jia¹

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

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

Corresponding author: ZHANG Si-yuan, E-mail: yuzhs003@163.com

Abstract: In order to understand the genetic characteristics and variation of the duck circovirus strains in recent years, the comp genome amplification, cloning, sequence analysis and genetic evolution analysis of 30 duck circovirus positive samples in some regions of China were carried out by PCR. The results showed that the full gene sequence homology between the 30 strains of DuCV strains were 85.8% ~ 99.9%, and the full-length sequence of 26 DuCV were 1993 ~ 1995 bp, which were in the same evolutionary branch with the German representative strain. They belong to gene type 1, and the full-length sequence of 4 DuCV were only 1988 bp, which belong to the same evolutionary branch as the representative strain of Taiwan, and belong to gene type 2;

基金项目: 广州市民生科技攻关计划项目 (项目编号: 706075994049)

作者简介: 卢秀娴, 助理兽医师, 硕士, 从事禽病分子生物学诊断。

通讯作者: 张思远。E-mail: yuzhs003@163.com

the variation analysis of the amino acid sequences of Cap protein and Rep protein indicated that the degree of variation of Cap protein was significant. Higher than Rep protein.

Key words: duck circovirus; complete genome; sequence analysis

鸭圆环病毒(Duck circovirus, DuCV)属于圆环病毒科圆环病毒属的成员之一,是一类无囊膜、二十面体对称的单链环状最小的 DNA 病毒^[1],该病毒目前还不能直接进行体外分离培养,主要侵害动物免疫系统并造成免疫抑制,各日龄、品种的鸭均易感染^[2],临床症状表现为羽毛紊乱、生长迟缓、体况消瘦等^[3],该病毒感染后容易导致其他禽类疾病的并发或继发感染,从而给养鸭业造成严重的经济损失。

DuCV 是近年来新发现畜禽病毒之一,最早于 2003 年由德国学者 Hatterman^[4]从番鸭的法氏囊组织中研究发现;2008 年傅光华等首次在我国大陆地区成功克隆了鸭圆环病毒的全基因序列^[5],此后,在国内各地区鸭群中陆续检测到 DuCV 的感染^[6],混合感染病例增多,近年来已经在我国大部分地区广泛流行。

为进一步了解鸭圆环病毒在我国部分地区的感染与流行情况,了解其分子生物学特性,通过对山东、河南、江苏、安徽等地区 30 份鸭圆环病毒感染的阳性病料进行鸭圆环病毒的全基因组的克隆和序列测定,对毒株的核苷酸分子特点进行分析,以期了解国内部分地区 DuCV 的流行毒株的基因型及遗传变异情况,为鸭圆环病毒感染的防控和诊断提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料 2019 年 1 月至 6 月,从山东、河南、江苏等省份发病鸭场采集疑似鸭圆环病毒感染的病料 30 份,其发病鸭出现羽毛脱落、生长迟缓等症状,剖检可见肝脏肿大、脾肿大充血、有坏死灶等。采集肝、脾、等内脏组织, - 20℃ 保存,经华南生物动物疫病诊断中心 PCR 检测均为 DuCV 阳性样品。

1.1.2 试剂 DNA 提取试剂盒(9781)、pMD19 - T 载体(6013)、DL2000 DNA Marker(3427A)购自 TaKaRa 公司、TransStart KD Plus DNA Polymerase

(AP301 - 11)、购自北京全式金公司;琼脂糖凝胶回收试剂盒(DP103)、核酸染料(KP103)为天根公司产品。

1.2 方法

1.2.1 病料的处理及 DNA 的提取 将病料组织剪碎,在研钵研磨成糊状,按 1:5 - 10 的比例加入灭菌 PBS,反复冻融三次,7000 ~ 8000 rpm/min 离心 10 ~ 15 min,取上清液用 TaKaRa 核酸抽提试剂盒抽提基因组 DNA。

1.2.2 引物设计与合成 参照 Genbank 中登录的鸭圆环病毒基因组序列,设计合成了 2 对扩增产物首尾相连且相互重叠的引物,用于鸭圆环病毒全基因组核苷酸的扩增,引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成见表 1。

表 1 DuCV 全基因组扩增引物序列

Tab 1 Primer sequences of whole - genome amplification of DuCV

引物名称	引物序列(5' - 3')	目的产物大小/bp
DuCV - P1	F: 5GCTTGCTACTCCGCTACTCC R: GCAGGTCATCGTAAGGTA	700bp
DuCV - P2	F: AGTGGTGGGACGGTTACT R: CTGTGCGGCTCTTTTAT	1350bp

1.2.3 鸭圆环病毒基因组全长的 PCR 扩增与序列测定 以上提取的 DNA 为模板,用以上 2 对引物分别进行 PCR 扩增,PCR 程序为:94 ℃ 预变性 3 min; 94 ℃ 30 s, 53 ℃ 45 s, 72 ℃ 45 s, 共 34 个循环。扩增完成后,两者 PCR 产物取 5 μL 经 1% 琼脂糖凝胶电泳,观察结果,PCR 产物经胶回收,连接到 pMD19 - T 载体,转化宿主菌 DH5α 感受态细胞,经培养筛选,挑取单个转化菌落于 LB 培养液(Amp +)过夜培养,PCR 鉴定阳性克隆菌送至上海金唯智股份有限公司进行测序。测序结果用 DNASTar,进行拼接分析。

1.2.4 DuCV 全基因组序列分析 运用 DNASTar

和 MEGA7.0 将获得的 DuCV 全基因序列,与 Gen-Bank 参考株基因组序列比对,进行同源性比较和基因进化树分析。本研究用于核酸序列分析参考的毒株(表 2)。

表 2 用于序列分析和比较的参考毒株信息

Tab 2 The reference strain information for sequence analysis and comparison							
登录号	登录时间	来源地	基因大小/bp	登录号	登录时间	来源地	基因大小/bp
AY228555	2003	德国	1996	EU344806	2007	中国福建	1992
NC005053	2003	德国	1996	EU022374	2007	中国山东	1988
JQ740362	2011	韩国	1995	EF451157	2007	中国福建	1995
AY394721	2002	中国台湾	1988	DQ166836	2009	中国台湾	1988
KU844857	2014	中国哈尔滨	1988	KC460532	2012	中国广西	1995
MF627690	2016	中国山东	1995	GU168779	2008	中国福建	1995
KF726087	2011	中国福建	1988	GU320569	2009	中国江西	1821
GQ423740	2008	中国福建	1996	AF252610	2000	德国	2037
GU014543	2009	中国江苏	1995	AF071879	1998	美国	1758
GQ334371	2008	中国浙江	1995	AF027217	1998	加拿大	1768
KC460530	2012	中国广西	1993	AY633653	2007	中国浙江	1820
GU131341	2008	中国山东	1988	AF418552	2001	中国台湾	1821
DQ100076	2007	美国	1991	NC001427	1991	美国	2319

1.2.5 鸭圆环病毒 Cap 和 Rep 蛋白氨基酸序列分析 采用 DNAMEND 软件预测和分析 30 株 DuCV 的 Cap 蛋白抗原位点的分布情况,采用 NetNG – Lys1.0 在线软件和 NetPhos 2.0 软件预测和分析 Cap 蛋白 N – 糖基化位点。

2 结果

2.1 鸭圆环病毒全长基因组测序结果 测序结果通过应用 DNASTar 软件中的 SeqMan 对序列进行拼接,获得 30 株 DuCV 的全基因序列。鸭病毒基因组为环形,基因组包含 4 个 200 bp 以上的 ORF,即 V1(49 ~ 927 bp)、C1(1157 ~ 1930 bp)、C2(1377 ~ 1739 bp)、C3(164 ~ 400 bp),但大多数 DuCV 只有 2 个主要的阅读框 ORF V1 和 ORF C1,分别编码与病毒复制有关的 Rep 蛋白和核衣壳蛋白 Cap 蛋白,ORF C3 为新发现的可编码引起机体的淋己损伤及细胞润亡的阅读框。26 株 DuCV 的全基因序列长为 1993 ~ 1995 bp,4 株 DuCV 的全基因序列仅有 1988 bp,缺失了 ORF C2、ORF C3。全基因组序列存在 2 个与滚环复制相关的保守区域,还存在可启

动滚环复制过程中酶促反应的 dNTP 结合域。

2.2 鸭圆环病毒基因同源性分析 使用 DNASTar 软件 MegAlign 对 30 株 DuCV 基因核苷酸和氨基酸序列进行分析,毒株之间的核苷酸和氨基酸序列同源性为 85.8% ~ 99.9%,30 株与其他国内外不同时间的 DuCV 参考毒株的全基因组序列的同源性为 83% ~ 99.3%,与 2010 年之后的 DuCV 参考毒株同源性较高,达 90% 以上;26 株 DuCV 与 MH25 株和 YS07 株等中国大陆毒株的同源性最高,核苷酸序列同源性大于 96%;4 株 DuCV 与 WF0802 和 TC1/2002 等毒株的同源性较高,核苷酸同源性为 90% ~ 97.3% 左右。将 30 株 DuCV 全基因序列与圆环病毒科中其他动物圆环病毒基因组序列进行比对发现,从不同动物中分离得到的圆环病毒,其同源性差异比较大。与鸡圆环病毒(鸡贫血病病毒 CIAV)同源性最低,仅为 2.4%,与鹅圆环病毒的同源性在 65% 左右,与鸽子、猪等圆环病毒的同源性则为 22.5% ~ 28.2%。

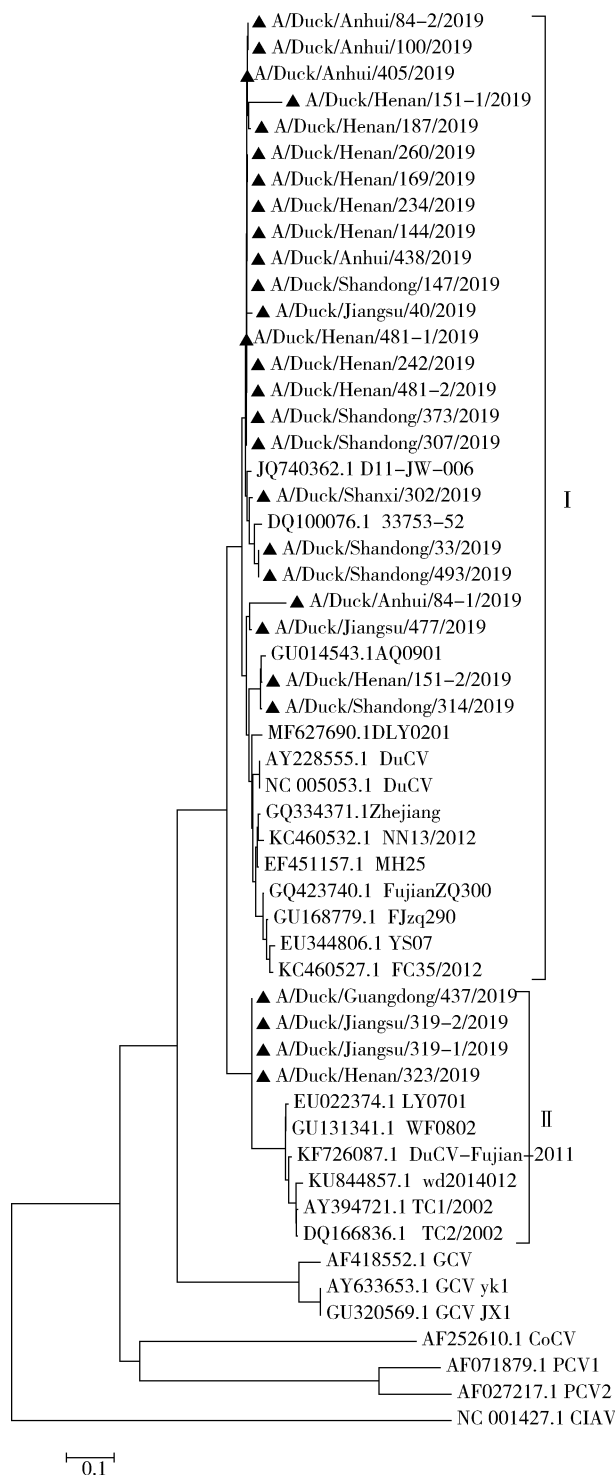
2.3 鸭圆环病毒基因组的遗传进化树分析 采用

MEGA7.0 软件对获得的 30 株 DuCV 全基因组序列与参考毒株序列绘制基因遗传进化树,按现行的 DuCV 分型方法,根据 DuCV 的 Cap 蛋白基因在某些区域氨基酸差异较大,并以 1988bp 作为分界点, DuCV 分为 1 型、2 型两个基因型^[7],分别是以德国株为代表的 DuCV - 1 型和以台湾株为代表的 DuCV - 2 型。本试验获得的 30 株 DuCV 序列,其中 26 株属于 DuCV - 1 型,与 YS07 株等中国大陆 DuCV 毒株的遗传距离最近;4 株为属于 DuCV - 2 型,则与我国大陆毒株 WF080 株关系较近;与其他动物圆环病毒处在不同的进化分支上,与鹅圆环病毒的亲缘关系较近,其次是鸽圆环病毒(COCV),猪圆环病毒(PCV1 和 PCV2),而与鸡圆环病毒(鸡贫血病病毒 CIAV)遗传距离较远。

2.4 鸭圆环病毒 Cap 和 Rep 蛋白氨基酸序列分析

对采用 DNAMEND 对 30 株 DuCV 各自编码 Cap 蛋白和 Rep 蛋白的氨基酸序列进行分析,与不同时间的 DuCV 参考毒株比较,Cap 蛋白的氨基酸的变化区域集中在:30 ~ 64,104 ~ 124,233 ~ 238,与 DuCV 基因组划分基因型序列的变异是相同的;Rep 蛋白的氨基酸的变化区域则集中在:105 ~ 133,200 ~ 230,275 ~ 285。Cap 蛋白构成 DuCV 的核衣壳,是主要的结构蛋白,存在有抗原位点及糖基化位点,通过对 Cap 蛋白抗原位点析,发现 DuCV - 1 型的 26 株 DuCV 均有 8 个抗原表位区域,分别位于 35 ~ 42、64 ~ 70、108 ~ 116、118 ~ 132、139 ~ 145、173 ~ 189、208 ~ 220 和 243 ~ 251;而 DuCV2 型的 4 株 DuCV 则存在 5 个抗原表位区域,分别位于 31 ~ 35、108 ~ 134、177 ~ 187、208 ~ 220、243 ~ 251;预测 Cap 蛋白的糖基化位点的结果与相关研究一致^[8],不同地区与基因型的 DuCV 分别在第 206、211 和 231 位氨基酸处存在 N2 糖基化位点,大部分 DuCV 毒株的 Cap 蛋白氨基酸糖基化位点在第 211 出现 NCT→NCS 和 231 出现 NTT→NAT 变动。相关研究表明,由于 Cap 衣壳蛋白存在可变区,即氨基酸序列的差异,用以区分基因组分型,当 DuCV - 1 型和 DuCV - 2 型的抗原表位及糖基化位点的氨基酸序列出现变化时,可能会造成 DuCV - 1 型的抗原

性稍强于 DuCV - 2 型的抗原化^[9],其所受到的免疫压力可能更大,其致病性也可能出现差异^[10]。



注:▲为本试验分离株

图 1 30 株 DuCV 全基因组序列基因进化树分析

Fig 1 Phylogenetic tree analysis of DuCV genome - wide sequence

3 讨论与结论

DuCV 与其他圆环病毒属成员一样,常常以隐性潜伏感染存在^[11],具有免疫抑制特性和感染的持续性。当病毒入侵机体的免疫系统,导致免疫功能下降,影响机体对其他疫苗的免疫效果,抵抗病原体的能力下降,从而继发感染其他疾病,而一旦发生混合感染,感染鸭的死亡率就会增加,特别是不同地区的 DuCV 的广泛流行使我国的鸭圆环病毒疫情变得更加复杂,防控难度增大。

30 株 DuCV 全基因序列分析结果显示,26 株 DuCV 的全基因序列长为 1993 ~ 1995 bp,4 株 DuCV 的全基因序列仅有 1988 bp;全基因组序列的 5' 端均存在 DuCV 基因结构的特征^[12],9 个保守碱基组成顶端的茎环结构,下游存在与病毒基因组滚环复制有关的 2 个正向的 6 个碱基序列。同源性比较显示,获得的 30 株 DuCV 全基因序列之间的同源性为 83.7% ~ 99.9%,同一基因型全基因组序列差异较小,而 DuCV - 1 与 DuCV - 2 两个基因型全基因组序列之间差异较大,可达 13% ~ 16.3%;与其他国内外不同时间的 DuCV 参考毒株的全基因组序列的同源性比较,与 2010 年之后的 DuCV 参考毒株同源性较高;与圆环病毒科中其他动物圆环病毒基因组同源性差异比较大。对 DuCV 流行毒株分子遗传变异情况分析显示,且两个基因型之间差异较显著,在遗传进化上分为两个明显的分支,表明近几年来同时流行了两种基因型的 DuCV,在全国各地均有分布,DuCV 在同一年代同一区域的分离株之间的相似性比较高,有非常近的遗传距离并聚集成簇,具有趋同进化的倾向;DuCV - 1 型的流行毒株与不同时间的 DuCV 参考毒株在遗传进化总体上没有明显的分布地区和流行时间;DuCV - 2 型流行毒株与参考毒株在系统发育上关系接近却又独立分支,说明 DuCV 可能存在一定的变异;所有流行毒株与其他动物圆环病毒处在不同的进化分支上,亲缘关系较远。对 Cap 蛋白和 Rep 蛋白的氨基酸序列的变异分析表明 Cap 蛋白的变异程度要显著高于 Rep 蛋白,这可能是由于 Cap 蛋白为病毒最主要的致病性蛋白,需要快速大量的产生变异来

保证生存^[13]。另外,在长期进化过程中与选择压力下,鸭圆环病毒的分子进化中也容易发生突变。

现有的病毒增殖体系难以增殖 DuCV,对于 DuCV 的研究主要局限在检测和基因组序列分析等方面^[14]。对于鸭圆环病毒病在实际工作中主要以预防为主,药物治疗方法效果较差,因此需要从加强鸭群饲养管理和生物安全措施,改善养殖环境,提高鸭群对 DuCV 的抗病能力,防止继发感染其他疾病。该研究对 2019 年上半年的 DuCV 流行毒株进行了遗传变异分析,旨在为研究鸭圆环病毒分子流行病学的流行株和分布情况提供参考依据,为更好地调查和防控该病提供了科学依据。

参考文献:

- [1] Zhang X X, Liu S N, Xie Z J, *et al.* Complete genome sequence analysis of duck circovirus strains from Cherry Valley duck [J]. *Virology*, 2012, 27(3): 154 - 164.
- [2] 黄瑜,万春和,彭春香,等. 鸭圆环病毒感染的临床症状 [J]. *中国家禽*, 2013, 35(5): 47 - 48.
Hang Y, Wang C H, Peng C X, *et al.* Clinical symptoms of duck circovirus infection [J]. *Chinese Poultry*, 2013, 35(5): 47 - 48.
- [3] Zhang Z, Jia R, Lu Y, *et al.* Identification genotyping and molecular evolution analysis of duck circovirus [J]. *Gene*, 2013, 529(2): 288 - 295.
- [4] 黎敏,宋延华,温纳相,等. 广东省新兴县鸭圆环病毒感染的 PCR 诊断及序列分析 [J]. *中国兽医科学*, 2009, 39(2): 164 - 167.
Li M, Song Y H, Weng N X, *et al.* PCR diagnosis and sequence analysis of duck circovirus infection in xinxi county, guangdong province [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2009, 39(2): 164 - 167.
- [5] 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(2): 138 - 143.
Fu G H, Chen L F, Shi S H, *et al.* Whole genome cloning and sequence analysis of duck circovirus [J]. *Journal of Virology*, 2008(2): 138 - 143.
- [6] 栗艳琼,郑敏,张步炯,等. 广西鸭圆环病毒流行毒株遗传变异分析 [J]. *动物医学进展*, 2015, 36(10): 20 - 25.
Li Y Q, Zheng M, Zhang B X, *et al.* Genetic variation analysis of endemic strains of guangxi duck circovirus [J]. *Advances in Animal Medicine*, 2015, 36(10): 20 - 25.

- [7] 马力,杨丽梅,梅建国,等.鸭圆环病毒感染的实验室诊断方法研究进展[J].动物医学进展,2014,35(3):105-108.
Ma L, Yang L M, Mei J G, *et al.* Research progress in laboratory diagnostic methods for duck circovirus infection [J]. *Advances in Animal Medicine*, 2014, 35(3):105-108.
- [8] Wen H, Wu Y, Yang C, *et al.* Comments on duck circovirus (DuCV) genotype definition [J]. *Gene*, 2014, 538(1): 207-208.
- [9] 张志龙.鸭圆环病毒四川毒株的进化分析及感染性分子克隆的构建[D].四川农业大学.2014.
Zhang Z L. Evolutionary analysis of duck circovirus strain Sichuan strain and construction of infectious molecular clone [D]. Sichuan Agricultural University. 2014.
- [10] Yang C, Xu Y, Jia R, *et al.* Prokaryotic expression of a codon-optimized capsid gene from duck circovirus and its application to an indirect ELISA. [J]. *Journal of Virological Methods* Volume, 2017, 247(7):1-5.
- [11] Huang J, Yang C, Jia R, *et al.* Induction of a protective response in ducks vaccinated with a DNA vaccine encoding engineered duck circovirus Capsid protein. [J]. *Veterinary Microbiology* 2018, 225(9):40-47.
- [12] 杨晓伟,张忠丽,谭雅文,等.2007年~2008年川渝部分地区鸭圆环病毒病感染情况调查及其序列分析[J].安徽农业科学,2009,37(18):8383-8384,8388.
Yang X W, Zhang Z L, Tan Y W, *et al.* Investigation on the infection status of duck circovirus disease in some areas of Sichuan and Chongqing from 2007 to 2008 and its sequence analysis [J]. *Anhui Agricultural Science*, 2009, 18(37):8383-8384,8388.
- [13] 刘玲凤,黎振标,司兴奎,等.鸭圆环病毒实时荧光定量PCR检测方法的建立及初步应用[J].中国家禽,2017,39(7):15-19.
Liu L F, Li Z B, Si X K, *et al.* Establishment and preliminary application of quantitative real-time PCR method for detection of duck circovirus [J]. *China poultry*, 2017, 39(7): 15-19.
- [14] 李志国,王鑫,张瑞华,等.检测2种基因型鸭圆环病毒双重PCR方法的建立与应用[J].中国兽医学报,2015,35(7):1060-1063.
Li Z G, Wang X, Zhang R H, *et al.* Establishment and application of double PCR method for detection of two genotypes of duck circovirus [J]. *Chinese journal of veterinary medicine*, 2015, 35(7): 1060-1063.
- [15] 刘新勃,孙嘉,吴少鹏,等.鸭圆环病毒的PCR鉴定及分子特点分析[J].山东畜牧兽医,2018,253(2):5-7.
Liu X B, Sun J, Wu S P, *et al.* PCR identification and molecular characteristics analysis of duck circovirus [J]. *Shandong Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2018, 253(2):5-7.

(编辑:陈希)