

鸭群中 REV 感染的流行病学调查

倪楠, 崔治中*

(山东农业大学动物医学院, 泰安 271018)

摘要: 【目的】了解网状内皮组织增生病毒(REV) 在鸭群中的感染状态。【方法】从山东省不同地区送检的病(死)鸭中, 随机采集法氏囊、脾脏和肝脏等 220 份样品。细胞培养分离病毒, 以提取的组织 DNA 为模板进行特异性斑点杂交、PCR 和 nest-PCR 检测。从不同地区阳性样品中任选一个进行克隆测序、同源性比较和进化树分析。【结果】从 35/39 份法氏囊、54/84 份脾脏和 32/97 份肝脏 DNA 样品中检出 REV(121/220)。其中法氏囊的检出率最高, 显著高于肝脏、脾脏($P < 0.01$), 但用细胞培养分离病毒、常规 PCR、组织 DNA 直接点杂交检测时, 均未检出 REV。YN-1 和 BZ-1 株 *env* 基因片段与美国分离的鸭源 SNV 株同源性高达 99.8%, LQ-1 株 *env* 基因片段与美国鸡源分离株的同源性为 100%, 均高于近几年中国鸡源分离株。【结论】在检测 REV 感染时, 应加强对法氏囊的检测, 但由于 REV 在感染鸭的组织中含量很低, 应采用更为敏感的 nest-PCR。同源性和进化树分析表明, 我国鸭源 REV 很可能是在引进未经对 REV 检疫的种鸭时引入的。

关键词: 网状内皮增生病毒; 巢式 PCR; 病原分离; 序列分析

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 04-0514-06

网状内皮组织增生病毒(Reticuloendotheliosis virus, REV)是一种不同于禽白血病病毒的反转录病毒, 世界各地均有 REV 感染的报道^[1-3]。通过病毒分离和特异性核酸探针杂交, 我国也陆续从鸡群中检出 REV^[4-8]。

REV 可感染火鸡、鸡、鸭、鹅、雉、日本鹌鹑、匈牙利鹌鹑及多种野鸟^[9,10]。发现 REV 时, 在 REV 代表株中就有两株来源于鸭, 即鸭脾坏死病毒(SNV)^[11]和鸭传染性贫血病毒(DIAV)^[12], 并从鸭的肿瘤病料中分离出 REV^[13]。但在我国, 除了疫苗污染外, 还没有关于鸭群中 REV 自然感染状态的报道。本研究用不同的检测方法阐明了我国鸭群中 REV 的感染状态。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病料来源: 组织样品分别来自山东省不同地区

鸭场, 5~40 日龄送检病(死)鸭, 97 只。分别随机采集肝脏、脾脏、法氏囊, 参照文献^[14]制备组织悬液, 提取组织 DNA。

1.1.2 主要试剂和仪器: PCR Kit 购于 TaKaRa 公司; DNA Digoxigenin 标记和检测试剂盒购自 Roche 公司; 胰酶购自德国 MERCK 公司; 凝胶回收试剂盒为美国 OMEGA 公司产品; T 载体 pMD18-T、T4DNA 连接酶、限制性内切酶 *Bam*H 和 *Pst*、凝胶回收纯化试剂盒、X-gal、IPTG 等均购自 TaKaRa 公司; REV 前病毒全基因组克隆质粒 Pb101 由本实验室保存; 其他常规试剂均为国产分析纯。

1.2 病毒的分离

从 YN、BZ、LQ 地区各抽检 10 只病鸭, 采集脾脏、肝脏、法氏囊, 将组织悬液用 MILLEX 一次性滤器 (0.22 μ m) 过滤除菌, 取 1mL 滤液接种到已长满 70% 的鸡

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划(2006BAD06A08)

*通讯作者。Tel: +86-538-8241560; Fax: +86-538-8241419; E-mail: zzcui@sdau.edu.cn

作者简介: 倪楠(1983-), 女, 山东泰安人, 在读硕士, 主要从事动物病毒学研究。E-mail: niba83@163.com

收稿日期: 2007-10-29; 修回日期: 2008-01-08

胚成纤维细胞(CEF)上, 维持 2 周后用 REV 特异性单抗 11B118 和 11B154 作间接免疫荧光实验(IFA)检测。

1.3 引物设计及 PCR、nest-PCR 扩增

根据 SNV 前病毒全基因组序列^[15], 设计合成 2 对巢式 PCR(nest-PCR)引物用于 REV *env* 基因扩增,

均由上海 Sangon 公司合成, 引物序列见表 1。

以 1.1.1 中提取的组织全基因组 DNA 为模板, 采用 25 μ L 反应体系进行 PCR 扩增。扩增条件为: 95 5min; 95 1min, 54 50s, 72 45s, 共 32 个循环; 最后 72 延伸 10min。取 5 μ L 此 PCR 产物, 用 0.8% 琼脂糖

表 1 用于扩增 REV-*env* 基因片段的 PCR 和 nest-PCR 引物
Table 1 Primers for PCR and nest-PCR in amplification of REV *env* gene fragments

Primers	Sequences 5'→3'	Positions in SNV genome	Fragment sizes/bp
<i>env</i> -F(forward)	AGCTAGGCTCGTATGAA	6504-6520	438
<i>env</i> -R(reverse)	TATTGACCAGGTGGGTTG	6940-6923	
<i>env</i> -nest-F(forward)	ATGAAGACGGGCCTAA	6515-6530	402
<i>env</i> -nest-R(reverse)	AAAGGGGAGGCTAAGA	6916-6901	

凝胶电泳鉴定。以上述 PCR 产物为模板, 在相同条件下做 nest-PCR, 扩增产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.4 探针标记及核酸杂交

以经典鸭源 SNV 株前病毒全基因组 cDNA 的感染性克隆质粒 pB101 DNA 为模板, 用表 1 中第一对引物扩增 *env* 基因片段。PCR 产物经测序验证无误后, 回收、纯化、定量(250ng/ μ L), 取 2 μ g 按 DIG-High prime DNA Labeling and Detection Starter Kit 说明书进行标记。

取 2 μ L 各组织 DNA 样品点样于硝酸纤维素膜上, 自然干燥后, 80 烘箱中烘烤 2h。按 DIG-High prime DNA Labeling and Detection Starter Kit 说明书进行预杂交、杂交、洗膜及显色。1.3 中获得的 PCR 产物也按同样方法进行预杂交、杂交、洗膜及显色^[16], 以确定 PCR 产物特异性。

1.5 目的基因片段克隆

随机选取不同地区来源的 PCR 阳性产物(标号为 YN-1、BZ-1、LQ-1), 回收后克隆入 pMD18-T 载体, 转入 TG1 感受态细胞, 经蓝白斑筛选的阳性克隆由上海生物工程技术有限公司进行 DNA 序列测定。

2 结果

2.1 样品中传染性 REV 的检测

将处理的组织样品接种到长满 70% 的鸡胚成纤维细胞(CEF)上维持 2 周后, 用 REV 特异性单克隆抗体 11B118 和 11B154 进行 IFA 检测, 结果均为阴性, 未检测到 REV。每次病毒分离时, 同样方法用 SNV 株接种 CEF 作阳性对照, IFA 检测, 明显可见黄绿色荧光(图 1)。

2.2 组织 DNA 直接斑点分子杂交

按照 1.1.1 介绍的方法提取 220 份样品的组织 DNA, 彻底变性后, 分别取 2 μ L 上述 DNA 点到经 20 \times SSC

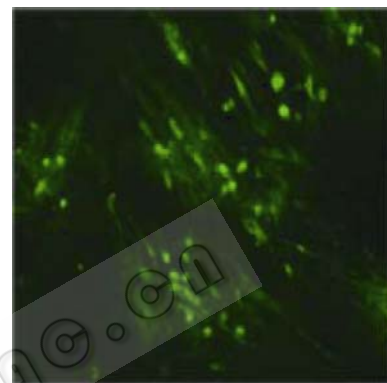


图 1 SNV 株感染 CEF 后 IFA 结果
Fig. 1 CEF infected with strain SNV.

处理的 NC 膜上, 按 DIG-High prime DNA Labeling and Detection Starter Kit 说明书进行预杂交、杂交、洗膜及显色。结果除阳性对照显色外, 阴性对照和待检样品均不显色(图略)。

2.3 PCR 及 nest-PCR 对 REV *env* 基因的检测结果

以提取的 220 份组织 DNA 为模板, 以 *env*-F 和 *env*-R 为引物做常规 PCR, 结果未出现与预期条带大小一致约 438bp 的目的片段。再以常规 PCR 扩增产物为模板, 用 *env*-nest 引物进一步做 nest-PCR, 结果有 121 份组织样品扩增出大小为 402bp 的 *env* 基因片段(图 2)。

2.4 nest-PCR 产物特异性验证

分别取 2 μ L 上述 nest-PCR 反应产物加到硝酸纤维素膜上, 用地高辛标记的 REV *env* 特异性探针做斑点分子杂交实验。结果 nest-PCR 为阴性者, 特异性点杂交也为阴性; nest-PCR 为阳性者, 在点杂交中绝大多数为阳性, 但部分电泳条带模糊的, 分子杂交为阴性(图 3)。以电泳条带模糊的产物为模板再做一次 nest-PCR, 结果 nest-PCR 产物的电泳条带非常清晰呈强阳性(图 4), 再次做点杂交也均为阳性(图 5)。

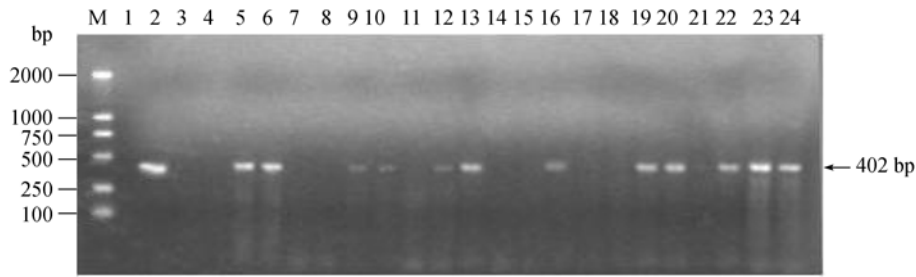


图2 器官组织 DNA 为模板的 nest-PCR 产物电泳图

Fig. 2 Gel electrophoresis of nest-PCR products for REV-*env* gene fragments from tissue DNA. M. DL-2000 marker; 1. negative control(DEF); 2. positive control ;3-24. samples.

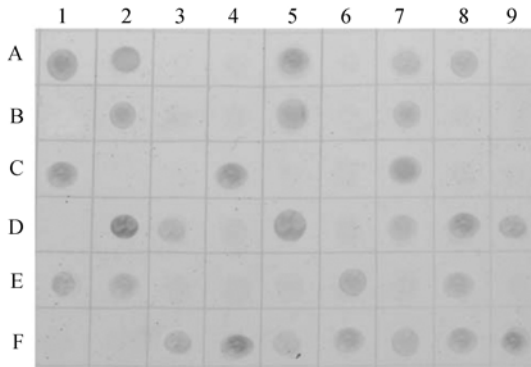


图3 nest-PCR 产物与 REV 特异性探针的斑点杂交

Fig. 3 Dot blot hybridization of nest-PCR products with REV *env*-specific probe. A1 Negative control; A2 Positive control; 1-9 samples.

2.5 不同器官与地区来源样品检出率比较

分别对不同地区、不同器官 REV 检测结果进行比较(表 2), YN、LQ、BZ 三个地区 REV 的检出率分别为 72%、54%、46%。用 Tukey 法^[17]进行统计学分析: YN 与 LQ 检出率差异显著($P < 0.05$), YN 与 BZ 检出率差异显著($P < 0.05$), LQ 与 BZ 检出率差异不显著($P > 0.05$)。肝脏、脾脏、法氏囊 REV 的检出率分别为 33%、64%、90%。法氏囊与肝脏检出率差异极显著($P < 0.01$),

法氏囊与脾脏检出率差异极显著($P < 0.01$), 肝脏、脾脏间检出率差异不显著($P > 0.05$)。

2.6 *env* 基因片段序列分析及同源性比较

分别从不同地区 nest-PCR 阳性样品中随机挑一个克隆测序, 均得到了 402bp 特异序列。将所得序列(标号为 YN-1、LQ-1、BZ-1, 登陆号分别为 EU246946、EU246947、EU246948)与已发表的 12 株参考毒株 *env* 基因核苷酸序列进行同源性比较并绘制出系统进化树(图 6)。

同源性分析表明: 检测样品 REV *env* 基因片段的核苷酸同源性在 96.5%~99.3%之间。YN-1、BZ-1 与美国经典鸭源 SNV 株同源性最高, 分别为 99.8%和 99.5%, 而样品 LQ-1 与美国鸡源分离株 FA 株和 TX-01 株同源性为 100%, 与中国鸡源的 RZ0406 株同源性高达 99.8%。样品中 REV *env* 基因片断与其它鸡源中国分离株的同源性差异较大(在 93.3~99.5%之间)。由图 6 看出 YN-1 株、BZ-1 株与美国经典鸭源 SNV 株处于同一分支, 具有较近的亲缘关系, 而与国内发现的鸡源 REV 毒株亲缘关系较远。LQ-1 株与美国经典鸭源 SNV 株的亲缘关系相对较远, 说明 LQ-1 株与 SNV 株相比已发生变异。

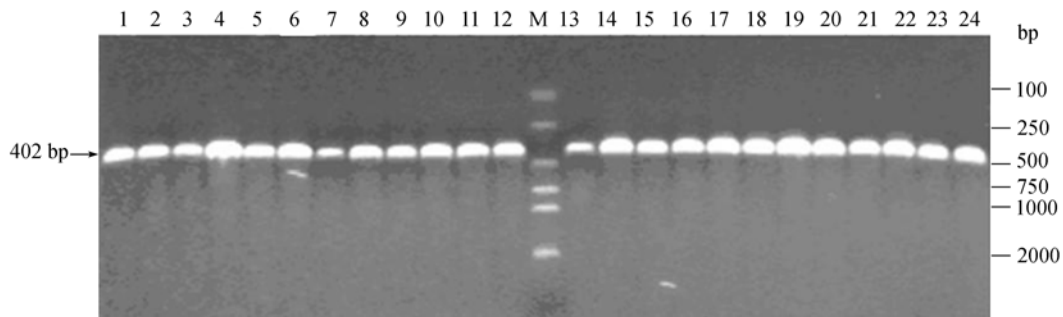


图4 重复 PCR 产物的电泳条带

Fig. 4 Gel electrophoresis of nest-PCR products in repeated experiments. M. DL-2000 marker; 1-24 samples.

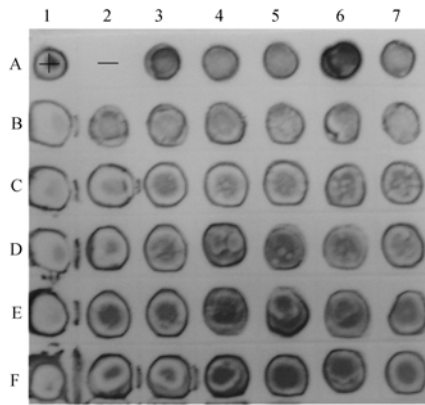


图 5 重复 nest-PCR 产物的点杂交特异性验证
Fig. 5 Dot blot hybridization of the repeated nest-PCR products. A1 Positive control; A2 Negative control; Others samples.

3 讨论

本研究随机采集来自 YN、BZ、LQ 地区 97 只鸭 220 份组织样品, 用 nest-PCR 从其中 121 份组织 DNA 中检出 REV 特异性核酸, 阳性率为 55%, 这说明山东省已有相当部分的鸭群感染或感染过 REV。这是国内首次对鸭群中 REV 感染状态的流行病学报道。对上述样品同时进行细胞培养分离病毒、点杂交和常规 PCR 检测, 但均为隐性。这与从鸡体内很容易检测或分离到 REV 显著不同^[5,8,16], 说明 REV 在感染鸭体内病毒含量很低, 或前病毒 DNA 与鸭基因组发生整合的机率比鸡低。本实验对肝脏、脾脏、法氏囊检出率

表 2 不同器官 REV 的检出率
Table 2 Positive ratio of REV in different organs

Tissues	Areas	Assays(Positive samples/total samples)				
		Virus Isolation	Dot Blot	PCR	Nest-PCR	Positive Rate/%
Liver	YN		0/20	0/20	10/20	50
	LQ	0/30	0/45	0/45	13/45	29
	BZ		0/32	0/32	9/32	28
	subtotal		0/97	0/97	32/97	33 a A
Spleen	YN		0/18	0/18	15/18	83
	LQ	0/30	0/37	0/37	25/37	68
	BZ		0/29	0/29	14/29	48
	subtotal		0/84	0/84	54/84	64 b A
Bursal	YN		0/8	0/8	8/8	100
	LQ	0/30	0/18	0/18	16/18	89
	BZ		0/39	0/39	11/13	85
	subtotal		0/65	0/65	35/39	90 c B
Total		0/90	0/220	0/220	121/220	55

Different small letters at the right of positive rates indicate difference was significant ($P<0.05$), different capital letters indicate difference was very significant($P<0.01$).

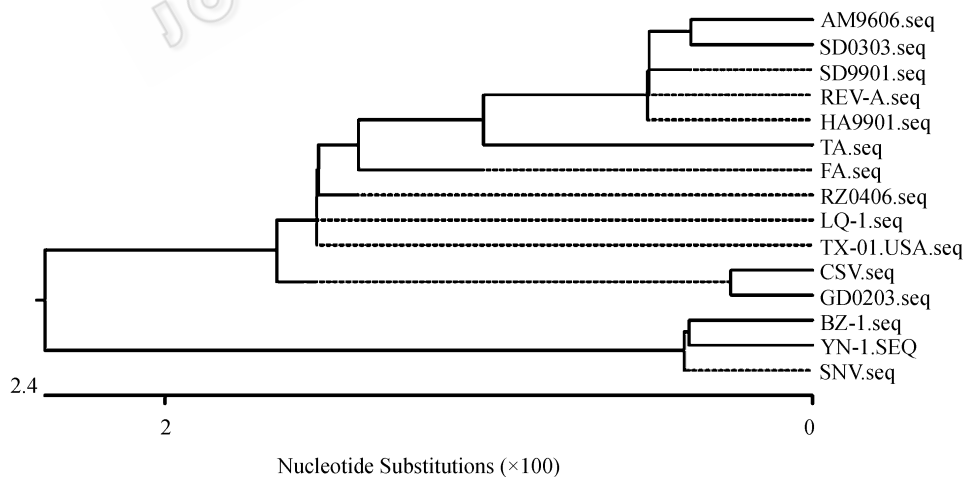


图 6 REV 不同毒株 env 基因进化树图谱

Fig. 6 Phylogenetic tree of the env gene of REV strains. Yinan-1, Linqu-1, Binzhou-1 respectively represents cloned and sequenced fragments of tissue DNA. REV-A represents isolated and purified REV-A supporting the proliferation of T strain^[18]. SNV represents classic duck calibration source of the virus genome-wide before the infection cDNA cloning plasmid was transfected to PB101 proceeding. FA represents REV integrated into the fowlpox virus vaccine strain^[19]. CS represents ChickSyncytiaVirus isolated from chickens suffering from Marek's disease^[20]. Am9606, TX-01 represent two REV strains isolated from chickens in USA. HA9901, SD9901, JN0001, GD0203, SD0303 and RZ0406 represent six chicken REV popular wild strain isolated from 1999 to 2004 in China.

的分析比较发现,法氏囊的检出率明显高于肝脏和脾脏,差异极显著($P < 0.01$)。因此,今后在检测鸭群的感染时,应加强对法氏囊的检测。

较高的敏感性是PCR的优点,但也常会出现非特异性的产物。因此,我们在常规PCR检测方法的基础上建立了nest-PCR检测方法,进一步提高了其敏感性和特异性。研究结果也表明,nest-PCR为阴性者,特异性点杂交也为阴性;nest-PCR为阳性者,在点杂交中绝大多数为阳性,但部分电泳条带模糊的,分子杂交为阴性(图3)。以电泳条带模糊的产物为模板再做一次nest-PCR,结果nest-PCR产物的电泳条带非常清晰,在点杂交中全部为阳性(图4、5),进而说明nest-PCR具有更高的敏感性和特异性。因此,在流行病学调查时(特别是隐性感染时),建议采用灵敏度更高、特异性更强的nest-PCR检测方法。

REV基因序列相对保守,无明显高变区,但囊膜糖蛋白基因(*env*)较REV其他结构基因如*gag*、*pol*较易发生变异,也是决定病毒抗原性的主要基因,因此我们选择*env*作为检测基因。通过三个地区样品REV*env*基因的序列分析发现,YN-1株、BZ-1株核酸序列与美国分离的经典鸭源SNV株同源性最高,LQ-1株与美国鸡源分离株同源性最高,而均与中国鸡源REV分离株的同源性相对较低。进化树分析也表明YN-1株、BZ-1株与经典鸭源SNV株处于同一分支,具有较近的亲缘关系;LQ-1株与FA株具有较近的亲缘关系;三者与国内分离的鸡源REV毒株亲缘关系较远。由此推断,我国鸭源REV很可能是在引进未经对REV检疫的种鸭时引入的。

参 考 文 献

- [1] Barbosa T, Zavala G, Cheng S, et al. Pathogenicity and transmission of reticuloendotheliosis virus isolated from endangered prairie chickens. *Avian Disease*, 2007, 51(1): 33–39.
- [2] Barbosa T, Zavala G, Cheng S, et al. Full genome sequence and some biological properties of reticuloendotheliosis virus strain APC-566 isolated from endangered Attwater's prairie chickens. *Virus Research*, 2007, 124(1-2): 68–77.
- [3] Chen IS, Mak TW, O'Rear JJ, et al. Characterization of reticuloendotheliosis virus strain T DNA and isolation of a novel variant of reticuloendotheliosis virus strain T by molecular cloning. *Journal of virology*, 1981, 40(3): 800–811.
- [4] 何宏虎, 陈溥言, 蔡宝祥. 禽网状内皮组织增生病毒病的分离鉴定. *中国预防兽医学报*(*Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*), 1988, 2(2): 1–2.
- [5] 赵文明, 丁家波, 崔治中. 不同方法对网状内皮组织增生病毒病的检测. *中国兽医学报*(*Chinese Journal of Veterinary Science*), 2003, 23(2): 133–135.
- [6] 崔治中, 杜岩. 禽网状内皮增生病毒感染和鸡群的免疫抑制. *中国兽药杂志*(*Chinese Journal of Veterinary Drug*), 2000, 34(4): 1–3.
- [7] 崔治中, 孙怀昌, 朱承如. 禽白血病及网状内皮增生病毒感染情况的调查. *中国预防兽医学报*(*Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*), 1987, 1: 37–38.
- [8] 张志, 崔治中等. 鸡肿瘤病料中马立克氏病病毒和禽网状内皮组织增生病毒共感染的研究. *中国预防兽医学报*(*Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*), 2003, 4: 274–278.
- [9] Trampel DW, Pepper TM, Witter RL. Reticuloendotheliosis in Hungarian Partridge. *Journal of Wildlife Disease*, 2002, 38(2): 438–442.
- [10] Bohls RL, Collisson EW, Gross SL, et al. Experimental infection of Attwater's/greater prairie chicken hybrids with the reticuloendotheliosis virus. *Avian Dis*, 2006, 50(4): 613–619.
- [11] Trager W. A new virus of ducks interfering with development of malaria parasite (*Plasmodium lophurae*). *Proc Soc Exp Biol Med*, 1959, 101: 578–582.
- [12] Ludford CG, Cox HW. Duck infectious anemia virus associated with plasmodium iophurae. *Experimental Parasitology*, 1972, 31: 29–38.
- [13] Li J, Calnek BW, Schat KA, et al. Pathogenesis of Reticuloendotheliosis virus infection in ducks. *Avian Dis*, 1983, 27(4): 1090–1105.
- [14] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 北京: 科学出版社, 2002.
- [15] 吉荣, 崔治中, 王锡乐, 等. 分子克隆化禽网状内皮组织增生病毒传染性及其前病毒全基因组序列研究. *病毒学报*(*Chinese Journal of Virology*), 2005, 06: 448–455.
- [16] 金文杰, 崔治中, 刘岳龙, 等. 传染性法氏囊病病料中MDV、CAV和REV的共感染检测. *中国兽医学报*(*Chinese Journal of Veterinary Science*), 2001, 21(2): 6–9.
- [17] Bernard, Rosena. 生物统计学基础. 孙尚拱等译. 北京: 科学出版社, 1997.
- [18] Hoelzer JD, Lewis RB, Wasmuth CR, et al. Hematopoietic cell transformation by reticuloendotheliosis virus: characterization of the genetic defect. *Journal of virology*, 1980, 100: 462–474.
- [19] Singh P, Kim T-J, Tripathy D N. Re-emerging fowpox: evaluation of isolates from vaccinated flocks. *Avian Pathol*, 2000, 29: 449–455.
- [20] Cook MK. Cultivation of a filterable agent associated with Marek's disease. *J Natl Cancer Inst*, 1969, 43: 203–212.

Reticuloendotheliosis Virus infection in ducks—an epidemiological Studies

Nan Ni, Zhizhong Cui

(College of Animal Science and Technology of Shandong Agricultural University, Tai'an 271018)

Abstract: [Objective] To study the epidemiological status of *reticuloendotheliosis virus (REV)* infection in ducks. **[Methods]** Two hundred and twenty tissue samples of the Bursa, spleens and livers were randomly collected from 97 sick or dead ducks from 3 areas in Shandong Province, China. REV infections were tested by virus isolation in cell cultures, direct dot blot hybridization, regular PCR and nest-PCR with tissue-extracted DNA as the templates. PCR products of *env gene* fragments were cloned and sequenced, sequences of *env gene* fragments were compared and analyzed. **[Results]** REV infections were detected in 35/39 (90%) bursal samples, 54/84 (64%) spleens and 32/97 (33%) livers by Nest-PCR. The positive rate of bursal samples was significantly higher than spleen and liver samples ($P < 0.01$). No positive sample was detected by virus isolation, direct dot blot hybridization or regular PCR from the same Bursa, spleen and liver samples. In sequence comparisons of amplified *env gene* fragments, Yinan-1 and Binzhou-1 had 99.8% of identity with reference SNV strain isolated from ducks in USA, and Linqu-1 had 100% identity with two other reference strains isolated from chickens in USA. However, they had lower homology with strains isolated from chickens in China. **[Conclusion]** More attention should be given to bursal samples in detection of REV. Since REV was existing only at a very low level in infected samples and difficult to be detected, nest-PCR should be conducted as the more sensitive assay. Sequence homology comparisons and phylogenetic tree analysis suggested that REV infections in these ducks may originally come from imported breeder ducklings without inspection for REV.





Keywords: *Reticuloendotheliosis virus (REV)*; nest-PCR; pathogeny isolation; sequence analysis

Supported by the National Science and Technology Supporting Program(2006BAD06A08)

*Corresponding author. Tel: +86-538-8241560; E-mail: zzcui@sdau.edu.cn

Received: 29 October 2007/ Revised: 8 January 2008

2008 年中国科学院微生物所期刊联合编辑部联合增订全面启动!

	《微生物学报》月刊(每月 4 日出版), 单价 55.00 元, 全年定价 660 元。刊号 :ISSN 0001-6209; CODEN WSHPA8。国内邮发代号 : 2-504; 国外邮发代号 : BM67。
	《生物工程学报》月刊(每月 25 日出版), 单价 65.00 元, 全年定价 780 元。刊号 : ISSN 1000-3061; CODEN SGXUED。国内邮发代号 : 82-13; 国外邮发代号 : BM5608。
	《微生物学通报》月刊(每月 20 日出版), 单价 48.00 元, 年价 576 元。刊号 : ISSN 0253-2654; CODEN WSWPDI。国内邮发代号 : 2-817; 国外邮发代号 : BM413。
	《菌物学报》双月刊(单月 15 日出版), 单价 80 元, 全年定价 480 元。刊号 :ISSN 1672-6472/Q, CODEN JXUUAЕ。国内邮发代号 : 2-499; 国外邮发代号 : Q723。
订阅	欢迎广大读者与本刊发行部联系订购, 我们将按期免费为您邮寄。
	汇款地址 : (100101)北京市朝阳区大屯路中国科学院微生物研究所 B401
	收信人 : 《×××》编辑部; 联系人 : 韩力; 电话 : (010)64807521; E-mail : hanl@im.ac.cn
	请在附言处注明“订刊费”及所订期刊名称、年代、卷、期和数量