

鸭肝炎病毒新血清型基因组序列分析

施少华^{1,2}, 程龙飞^{1,2}, 傅光华¹, 陈红梅^{1,2}, 陈珍¹, 杨维星³, 苏敬良^{4*}, 黄瑜^{1*}

(¹ 福建省农业科学院畜牧兽医研究所, 福州 350013)

(² 福建省畜禽疫病防治工程技术研究中心, 福州 350013)

(³ 江西农业大学动物科学技术学院, 南昌 330045)

(⁴ 中国农业大学动物医学院, 北京 100094)

摘要 【目的】为了揭示鸭肝炎病毒新血清型(DHV-N)G株的演化及其与DHV-1的基因序列差异。【方法】运用RT-PCR结合5'-/3'-RACE策略对DHV-N G株基因组进行扩增,克隆测序后进行序列分析。【结果】DHV-N G株全基因组序列除12 nt poly(A)尾外全长共7774 nt,含有一个大的开放阅读框,编码2251 aa的蛋白前体,其基因组结构5' UTR-L-VP0-VP3-VP1-2A1-2A2-2B-2C-3A-3B-3C-3D-3'UTR 3'UTR长为366 nt,比1型鸭肝炎病毒C80株多52 nt,VP1蛋白与DHV-1相比发生较大的变异,特别在其第140~221位;其基因组与DHV-1、韩国DHV-N和台湾DHV-N的同源率分别为72.8%~73.4%、96.3%~96.5%和78.3%。【结论】DHV-N G株基因组结构与DHV-1存在明显差异,在DHV-N成员DHV-N G株与韩国DHV-N关系更为密切。

关键词: 鸭肝炎病毒,新血清型,序列分析

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)03-0309-07

鸭肝炎(Duck hepatitis, DH)是危害雏鸭的一种急性、高度致死性传染病,其特点是发病急、病程短、传播快和死亡率高,主要侵害3周龄内的雏鸭,病死鸭多呈角弓反张样外观,其肝脏常有特征性出血性病变^[1-2]。

鸭肝炎的病原包括1型鸭肝炎病毒(*Duck hepatitis virus type 1*, DHV-1)及其变异株(1a型)鸭星状病毒(*Duck astrovirus*)和3型鸭肝炎病毒(DHV-3)^[3-6],其中1型鸭肝炎病毒呈世界性分布。在我国,自1958年发生鸭肝炎至2001年, DHV的血清型为1型^[7]。但近几年来,国内一些学者对我国DHV血清型的流行状况提出了一些新的看法,1999年苏敬良等从发病的北京鸭和樱桃谷鸭中分离到2株与DHV-1和DHV-3无血清学相关性的鸭肝炎病毒新

血清型(Duck hepatitis virus new serotype, DHV-N)^[8]。

虽然早在1950年Levine和Fabricant就分离到DHV-1^[4],但长期以来国内外对DHV-1的分子生物学研究甚少且不够深入,对DHV-N的基因结构和遗传进化分析更是空白,其与DHV-1基因水平上的差异分析也尚未触及。直到近几年,国内外才陆续开展有关DHV-1基因组序列及结构的研究,成功克隆了一些DHV-1全基因组序列,这些数据为深入解析鸭肝炎病毒提供了宝贵的资料^[9-11]。几乎同时, Tseng等(2007)和Kim等(2007)在研究DHV-1过程中还发现了在血清学和基因水平与之相差甚远的DHV-N,表明台湾地区和韩国DHV-N的存在^[12-13];但我国大陆至今仍仅对DHV-N进行病毒分离鉴定、组织病理学和血液生化等方面的研究,还尚未从基

资助项目: 国家自然科学基金(30471283)

* 通信作者。黄瑜, Tel/Fax: +86-591-87572396, E-mail: huangyu_815@163.com; 苏敬良, Tel: +86-10-62732312, E-mail: jingslu@yahoo.com

作者简介: 施少华(1977-)男,福建莆田人,助理研究员,硕士,主要从事兽医微生物学研究。E-mail: shaohua115@163.com

收稿日期: 2008-10-16; 修回日期: 2008-12-11

因层面上对所分离的 DHV-N 的分类地位进行精确界定,其与台湾、韩国的 DHV-N 以及 DHV-1 有无直接的亲缘关系也亟需进一步研究证实。为探究其中的关系,本研究以苏敬良等自广西北京鸭群中分离的 DHV-N G 株为材料,对其基因组序列进行分析,以期确定 DHV-N G 株与台湾、韩国的 DHV-N 以及 DHV-1 的亲缘关系和分类地位。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒:鸭肝炎病毒新血清型广西株(DHV-N G 株)由苏敬良、黄瑜等从广西类似感染 DHV-1 北京中分离,经中和试验证明与 DHV-1 和 DHV-3 无血清学相关性^[8]。

1.1.2 主要试剂和仪器:TRIzol 由 Invitrogen 公司提供;反转录酶 M-MLV 和 GoTaq 酶购自 Promega 公司;pMD 18-T 载体、5'-Full RACE Core Set 和 3'-Full RACE Core Set 购自宝生物工程(大连)有限公司;超速离心机 Optima L-80 XP 为 Beckman coulter 产品。

1.2 病毒 RNA 的提取

取 DHV-N G 株感染的鸭胚尿囊液于 6009 × g (Beckman, Ti 19) 4 °C 离心 20 min 以去除杂质,收集上清液,117629 × g (Beckman, Ti 70) 4 °C 离心 3 h,沉淀用适量的 PBS 重悬。RNA 提取根据 TRIzol 说明

书操作,最后每 250 μL 尿囊浓缩液的病毒 RNA 用 20 μL DEPC 水溶解。

1.3 RT-PCR

根据 GenBank 上登录的 DHV-N AP-03337 (DQ256132)、AP-04009 (DQ256133)、AP-04114 (DQ812093)和 AP-04203(DQ256134)基因组序列,应用 Oligo 6.24 软件设计 5 对引物(见表 1)。反转录按 M-MLV Reverse Transcriptase 说明书进行,具体如下:将制备好的 RNA 5 μL,加入 200 pmol/μL 随机引物 1 μL, M-MLV RT 5 × Buffer 4 μL, 2.5 mmol/L dNTP mixture 8 μL, 40 U/μL Ribonuclease Inhibitor 1 μL, 200 U/μL M-MLV Reverse Transcriptase 1 μL 混匀后按以下程序进行 RT:30 °C 10 min, 37 °C 60 min, 99 °C 5 min, 保存于 4 °C。取 2 μL 反转录产物, 5 × GoTaq Buffer 5 μL, 2.5 mmol/L dNTP mixture 2 μL, MgCl₂ 2 μL, 上、下游引物(20 pmol/μL)各 1 μL, GoTaq 酶 0.25 μL, dd H₂O 补齐至 25 μL 后按以下程序进行 PCR:94 °C 5 min, 94 °C 1 min, 50 °C ~ 56 °C 1 min, 72 °C 75 s, 共 35 循环,最后 72 °C 10 min, 保存于 4 °C。PCR 产物用 1.0%(w/v) 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 5'和 3'末端的扩增

基因组的 5'和 3'末端的扩增按 5'-Full RACE Core Set 和 3'-Full RACE core set 说明书进行(引物见表 1)。

表 1 RT-PCR 和 5'-/3'-RACE 扩增引物

Table 1 Oligonucleotide primers for RT-PCR and 5'-/3'-RACE amplification in this study

Primers	Nuclotide sequences(5'→3')	Primers of RACE	Nuclotide sequences(5'→3')
P1 7U20	AGCGGCTGTGGTGTAGATCAA	5'RACE RT	P'-TAGTGGAGGGTA
P1 1451L20	GGAGGGCTCTTTGGTTTATG	5' RACE outer U	GCGCTTGGCTCAGCCAGTAT
P2 1292U20	GGGCCCATATGTGTCTTTGT	5' RACE outer L	GTTGAATTAAGGGGTTTGGG
P2 3009L22	ATCTGTGTAGTTGTGTGAGTG	5' RACE inner U	AAACCCCTTAATCAACG
P3 2789U20	CGCCCAATTCGCTTCTGTTT	5' RACE inner L	CAAGCAGACTGTGGTGAG
P3 5008L20	GGCCCAACCCACCAATGTCA	3'RACE outer U	CAGGACACCGTAGAGCAACTT
P4 4967U20	ATGAGGGATGGCAGTCTACA	3' RACE inner U	AGAGCAACTGCCAGTGTGGTCCC
P4 6159L19	CGCTGGTCATTGATAGAAA		
P5 6045U20	AAGGAGCCATTGTTGAGAAA		
P5 7700L22	GAAAGTGGAGATTAGGTGTGTT		

Letter U and L represented the upper primers and lower primers, respectively. RT represented the primer for reverse transcription during 5' RACE.

1.5 克隆测序

按胶回收试剂盒说明书回收目的片段并连接到 pMD18-T 载体,转化入 DH₅α 感受态细胞,涂布于含氨苄青霉素的 LB 平板上,37 °C 培养 12 ~ 16 h,挑取单个菌落接种于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基,37 °C、200 r/min 振荡过夜,取 2 μL 菌液按方法 1.3 进行 PCR 鉴定,阳性克隆送至上海英骏生物公司进行测序。

1.6 序列分析

应用 DNASTAR 软件的 SeqMan 程序对所获得的测序结果进行拼接;用 MegAlign 程序进行基因组序列比对,并以 Gendoc 软件将结果输出;通过 MEGA4.0 软件构建基因组、2C 蛋白和 3D 蛋白的系统进化树,分析所用病毒及其 GenBank 登录号见表 2。

表2 分析所用病毒及其 GenBank 登录号

Table 2 Viruses used in the analyses and their accession numbers in GenBank

Genus	Species(strain)	Abbreviation	Accession No.
Unclassified	Duck hepatitis virus new serotype(G)	DHV-N G	EU755009
	Duck hepatitis virus new serotype(AP-03337)	AP-03337	DQ256132
	Duck hepatitis virus new serotype(AP-04009)	AP-04009	DQ256133
	Duck hepatitis virus new serotype(AP-04114)	AP-04114	DQ812093
	Duck hepatitis virus new serotype(AP-04203)	AP-04203	DQ256134
	Duck hepatitis virus new serotype(90D)	90D	EF067924
	Duck hepatitis virus new serotype(04G)	04G	EF067923
	Unclassified	Duck hepatitis virus type 1(C80)	C80
Duck hepatitis virus type 1(ZJ-V)		ZJ-V	EF382778
Duck hepatitis virus type 1(03D)		03D	DQ249299
Duck hepatitis virus type 1(R85952)		R85952	DQ226541
Duck hepatitis virus type 1(5886)		5886	DQ249301
Duck hepatitis virus type 1(H)		H	DQ249300
Duck hepatitis virus type 1(DRL-62)		DRL-62	DQ219396
Parechovirus		Ljungan virus (87-012)	LV87-012
	Ljungan virus (145SL)	LV145SL	AF327922
	Human parechovirus 1(Harris)	HPeV1	S45504
	Human parechovirus 2(Gregory)	HPeV2	NC_001897
	Human parechovirus 4(K251176-02)	HPeV4	DQ315670
Hepatovirus	Hepatitis A virus (HM175)	HAV	M59810
Enterovirus	Human enterovirus A (G-10)	HEV-A	U05876
	Poliovirus (Mahoney)	PV	NC_002058
	Porcine enterovirus A	PEV-A	AF406813
Rhinovirus	Human rhinovirus A	HRV-A	X02316
Teschovirus	Porcine teschovirus 1(F65)	PTV	NC_003985
Kobuvirus	Aichi virus (A846/88)	AiV	AB010145
	Bovine kobuvirus(U-1)	BKV	AB084788
Erbovirus	Equine rhinitis B virus 1(P1436 /71)	ERBV	X96871
Cardiovirus	Encephalomyocarditis virus (Ruckert)	EMCV	M81861
	Theiler 's murine encephalomyelitis virus	ThV	M20562
Aphthovirus	Foot-and-mouth disease virus	FMDV	AF308157
	Equine rhinitis A virus(PERV)	ERAV	X96870

2 结果和分析

2.1 DHV-N G 株基因组序列

序列分析表明, DHV-N G 株基因组(GenBank 登录号 EU755009)具有典型的小 RNA 病毒特征,除了 3'末端 12 nt 的 poly(A)尾外,由 7774 nt 组成,比 1 型鸭肝炎病毒 DHV-C80 基因组多 97 nt, DHV-N G 株基因组仅含有一个 6756 nt 的大的开放阅读框,可编码 2251 aa 的蛋白质前体,在开放阅读框之前为 652 nt 的 5' 非翻译区(untranslated region, UTR)后接 366 nt 的 3'UTR 和 12 nt 的 poly(A)尾。基因组含 27.6% 的腺嘌呤(A), 22.4% 的鸟嘌呤(G), 20.8% 的胞嘧啶(C)和 29.3% 的尿嘧啶(U)。G + C 含量为 43.2%, 与韩国和台湾 DHV-N(43.3% ~ 43.7%)、1 型鸭肝炎病毒(43.3% ~ 43.6%)、Ljungan 病毒(41.6% ~ 42.5%)、禽脑脊髓炎病毒(44.8%)、人副

肠孤病毒(39.0% ~ 39.5%)和人鼻病毒(39.0%)很接近^[9]。

2.2 DHV-N G 株与 DHV-1、台湾及韩国 DHV-N 基因组序列比较

基因组核苷酸的序列比较表明, DHV-N G 株、台湾及韩国 DHV-N 与 DHV-1 参考株的同源率为 72.8% ~ 73.7%, 其中 DHV-N G 株与 DHV-1 参考株的同源率为 72.8% ~ 73.4%; 通过系统进化树分析发现 DHV-N G 株、台湾及韩国 DHV-N 与 DHV-1 明显处在不同的分支上, 可将 DHV-N 与 DHV-1 分为 A、B 两个群(DHV-N 为 A 群, DHV-1 为 B 群)(见表 3, 图 1)。

DHV-N 成员之间的基因组序列也存在较大的差异。DHV-N G 株基因组序列与韩国 DHV-N 同源率为 96.3% ~ 96.5%, 但与台湾 DHV-N 04G 和 90D 的同源率均仅为 78.3%, 而韩国 4 株 DHV-N 与台湾

DHV-N 的同源率也仅 78.4% ~ 78.6% ,表明鸭肝炎病毒新血清型病毒株之间在核苷酸组成上也存在很

大差异,可将 DHV-N 再细分为更小的分支,究其原因需待做进一步的研究(见表 3,图 1)。

表 3 DHV-N G 株与 DHV-1、DHV-N 参考株基因组序列比较

Table 3 Pair-wise comparison of the genomic nucleotide sequence from DHV-N G strain and present members of DHV-1 and DHV-N

	DHV-N G	AP-03337	AP-04009	AP-04114	AP-04203	04G	90D	03D	ZJ-V	5886	C80	DRL-62	H	R85952
DHV-N G		96.4	96.3	96.4	96.5	78.3	78.3	73.2	73.2	72.8	73.2	73.4	73.4	73.2
AP-03337	3.7		96.3	99.3	98.8	78.4	78.5	73.4	73.5	73.0	73.5	73.7	73.5	73.4
AP-04009	3.9	0.7		99.1	98.6	78.5	78.6	73.4	73.4	73.0	73.4	73.6	73.5	73.4
AP-04114	3.7	0.7	0.9		98.7	78.6	78.6	73.5	73.4	73.2	73.2	73.6	73.6	73.4
AP-04203	3.6	1.2	1.4	1.3		78.5	78.5	73.5	73.4	73.3	73.3	73.6	73.6	73.4
04G	26.0	26.1	25.8	25.8	25.9		99.6	73.2	73.1	73.0	72.9	73.3	73.3	73.0
90D	25.8	26.0	25.8	25.7	25.8	0.4		73.2	73.1	73.0	72.9	73.3	73.4	73.0
03D	33.7	33.4	33.5	33.4	33.4	34.5	34.4		95.8	95.1	96.5	95.8	95.6	96.0
ZJ-V	33.7	33.3	33.3	33.3	33.3	34.3	34.2	4.3		95.4	95.7	96.6	95.4	97.0
5886	34.2	33.9	33.9	33.8	33.8	34.9	34.7	5.2	4.8		94.5	95.7	94.5	95.9
C80	33.8	33.5	33.7	33.5	33.6	34.7	34.6	3.6	4.4	5.8		95.4	95.3	95.8
DRL-62	33.7	33.2	33.4	33.3	33.3	34.3	34.2	4.4	3.4	4.4	4.7		97.1	
H	33.5	33.2	33.2	33.2	33.2	34.2	34.1	4.6	4.8	5.7	4.9	4.8		95.8
R85952	33.7	33.3	33.5	33.3	33.3	34.5	34.4	4.1	3.0	4.3	4.4	3.0	4.4	

Upper right represented identity of nucleotides of genome, lower left showed divergence of nucleotides of genome.

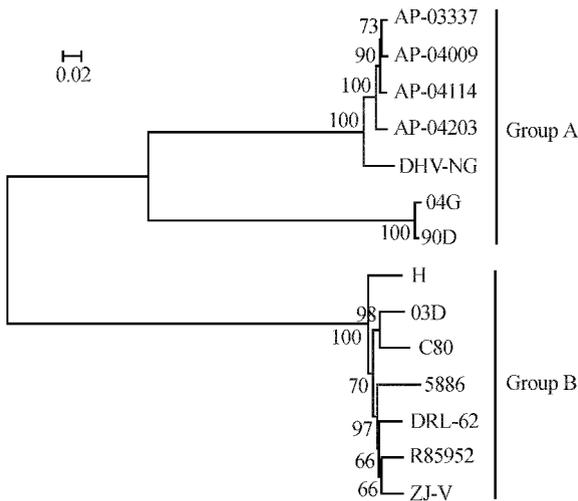


图 1 DHV-N 和 DHV-1 基因组的系统进化关系

Fig.1 Phylogenetic relationship between DHV-N and DHV-1 strains. The relationship was examined by the unrooted neighbour-joining tree. Numbers at nodes represent percentage of 1000 bootstrap value. All DHV strains in this study could be divided into two different clusters, Group A and B.

2.3 5'UTR 和 3'UTR 序列分析

DHV-N G 株基因组的 5' 最末端 2 个碱基为 pUU。在小 RNA 病毒中,基因组 5' 末端第一个 U 的 5' 磷酸可与引物蛋白 3B^{VP3} 结合而启动基因组的复制^[14];DHV-N G 株 5' UTR 的第 650 ~ 656 位为 GCAAUGG,与 Kozak 序列 GxxAUGCx 为非保守氨基酸相符,证实了 AUG 为 DHV-N G 株开放阅读框的起始密码子^[15]。与 DHV-1 相比,DHV-N G 株的 5' UTR 明显更长,其中多出 DHV-C80 达 30 nt,位于

DHV-N G 株 5'UTR 的第 157 位 DHV-N 插入 17 nt,第 187 位插了 4 nt;同样,DHV-N G 株的 3' UTR 也比 DHV-1 长,譬如比 1 型鸭肝炎病毒 DHV-C80 多出 52 nt,在 3' UTR 的第 7430 位 DHV-N G 株插入 21 nt,第 7462 位插入 8 nt,第 7482 位插入 34 nt,使 DHV-N 成为小 RNA 病毒科中 3'UTR 最长的病毒^[11]。

2.4 多聚蛋白切割的预测

小 RNA 病毒多聚蛋白拥有内部连接位点,多处位点含有被 3C^{pro} 所识别并切割的一级或三级结构元件^[16]。由于通过 Cluster W 比对结果表明,DHV-N G 株与 Ljungan 病毒和人副肠孤病毒的多聚蛋白同源性最高,所以 DHV-N G 株切割位点的预测即根据 DHV-N G 株与 Ljungan 病毒和人副肠孤病毒的多聚蛋白的蛋白序列比对而获得。DHV-N G 株蛋白切割位点预测 Q/G 位于 VP0/VP3、VP3/VP1、2C/3A、3B/3C 和 3C/3D,Q/S 位于 2A/2B、2B/2C 和 3A/3B,而 VP1/2A 切割位点则是 E/S。在 DHV-N G 株的 2A 蛋白上有典型的口蹄疫病毒样切割位点 NPG ↓ P,在此位点上可将 NHV-N G 的 2A 蛋白切割成结构不同 2A1 和 2A2,此预测结果与 Kim 等的报道一致^[13]。正如 Ljungan 病毒和多数小 RNA 病毒 VP4/VP0 的 N 端存在豆蔻酰化信号序列(G_{xxx}[S/T]_x 为非保守氨基酸)一样^[17],在 DHV-N G 株多聚蛋白前体位点 L/G 间(第 30 ~ 31 位)亦发现有该信号序列(GAVES),据此推测 DHV-N G 株聚蛋白的 N 端有一个长度为 30 aa 的前导蛋白(Leader protein,L)。因此,DHV-N G 株基因组:5'UTR-L-VP0-VP3-VP1-2A1-2A2-2B-2C-

3A-3B-3C-3D-3'UTR.

2.5 结构蛋白分析

DHV-N G 株和 DHV-1 的结构蛋白具有一些共同特征,如 VP0 的 N 端存在豆蔻酰化信号序列 ($G_{xx}[S/T]_x$ 为非保守氨基酸),两者都缺乏介导细胞-细胞和病毒-宿主相互作用的 Arg-Gly-Asp (RGD)

	140	180	200	220
DHV-N G :	RMPASQGGGLTFGR-26aa	APTYTHTLLNKIKTMN	HDQSDQPDCHLCEICR	KMKKWSRNHRPFRR
C80 :	RPIPGTSS--EATFGR-26aa	APTSTTSLRSGSNGVIPTL	DQSGDEVVDCHFCEICR	SKMKRRMWWKPKRGHFR
DRL-62 :	RPIPGTSS--EATFGR-26aa	APTSTTSSRGSNDVIPTLN	QSGDEVVDCHFCEICR	SKMKRRRWWKPKRGHFR
5886 :	RPIPGTSS--EATFGR-26aa	APTSTTSSRGSNDVIPTLN	QSGDEVVDCHFCEICR	SKMKRRRWWKPKRGHFR

图2 DHV-N G 株和 DHV-1 VP1 蛋白氨基酸序列比较

Fig.2 Comparison of the VP1 amino acid sequences between DHV-N G and DHV-1 strains.

2.6 非结构蛋白分析

DHV-N G 株的一些非结构蛋白,特别是 $2C^{ATPase}$ 、 $3B^{VPg}$ 、 $3C^{pro}$ 和 $3D^{pol}$,含有其它小 RNA 病毒的特征性基序。位于 DHV-N G 株 $2C^{ATPase}$ 蛋白的第 145 ~ 152 位氨基酸是高度保守的基序 $G_{xx}G_xGK(S/T)$ (x , 非保守氨基酸),这个基序可见于所有小 RNA 病毒中,可能介导解旋酶的功能^[18];在另一个保守基序 $DDL_x(Q_x)$ (非保守氨基酸)基序中,第 194 位的亮氨酸(L)被苯丙氨酸(F)所代替而形成了基序 $DDFGQ$ 。DHV-N G 的 $3B^{VPg}$ 蛋白的第 3 位氨基酸为酪氨酸,它通过共价结合基因组 5' 末端 U 而发挥引物蛋白的作用。小 RNA 病毒的 $3C^{pro}$ 具有蛋白酶作用,依赖于由组氨酸(H)、天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)、半胱氨酸(C)组成的催化三分体^[19],在 DHV-N G 株的 $3C^{pro}$ 中三分体存在于 H44-D75-C150;基序 G_xCG 在爱知病毒参与组成蛋白酶活性位点,它位于 DHV-N G 株 $3C^{pro}$ 的第 148 ~ 151 位 ($GSCG$)。小 RNA 病毒 $3D^{pol}$ 蛋白是 RNA 依赖的 RNA 聚合酶,有保守的基序 $KDEL_R$ 、 $FLKR$ 和 $YGDD$,序列分析发现,这 3 种基序分别位于 DHV-N G 的第 150 ~ 154 位,第 265 ~ 268 位和第 317 ~ 320 位氨基酸,而另一基序 PSG 在 DHV-N G 株的第 280 ~ 282 位中脯氨酸(P)被半胱氨酸(C)所替代 (CSG)。

2.7 遗传进化分析

通过多聚蛋白的切割后可产生 2C 和 3D 蛋白,本研究应用 DNASTAR 软件中 MegAlign 程序和 MEGA4.0 软件从属间和属内的角度对小 RNA 病毒科成员 2C 和 3D 蛋白的氨基酸同源性进行分析。结果表明,小 RNA 病毒科 9 个属成员形成聚类,只有肠病毒属与鼻病毒属发生了交叉;而 DHV-N 和 DHV-1 则另聚成一个大的分支,且均有较高的解靴

基序等。但 DHV-N G 株和 DHV-1 的衣壳蛋白也存在较大的差异,其中 VP1 蛋白变异最大,其第 140 ~ 221 位区域为高变区;虽然都缺乏 RGD 基序,但 DHV-1 取而代之的是 Ser-Gly-Asp (SGD),而 DHV-N G 株则为 Ser-Asp (SD) 位于 DHV-N G 株 VP1 蛋白第 198 ~ 199 位 (见图 2)。

带值的支持,与 LV 和 HPeV 处于相邻位置。

3 讨论

本研究通过对 DHV-N G 株基因组进行了克隆测序,分析表明 DHV-N G 株基因组具有典型的小 RNA 病毒特征,如基因组仅含有一个大的开放阅读框、5' 和 3' 末端为非翻译区、3' 末端还有一 poly(A) 尾等结构。通过基因组核苷酸序列建立的进化树分析发现 DHV-N 与 DHV-1 明显处在不同的分支上,而且在 DHV-N 成员内部也存在较大的差异,DHV-N G 株与发表的韩国 DHV-N 有很高的序列同源性,但两者与台湾 DHV-N 的同源性较低,究其原因需待做进一步的研究。在小 RNA 病毒中,3' UTR 与负链 RNA 的合成起始有关^[14],poly(A) 则是合成负链 RNA 的模板,其长度与负链 RNA 的合成效率及病毒 RNA 的感染力有关^[20],DHV-N G 株与 DHV-1 的 5' UTR 和 3' UTR 相比,发生较大的插入与缺失现象,这是否会导致病毒复制的差异尚未清楚。

本研究预测在 DHV-N G 株多聚蛋白前体的 N 端可切割出一个短的前导蛋白 L,L 蛋白的切割将暴露 VP0 豆蔻酰化信号序列 (GAVES),说明 DHV-N 的形态发生可能依赖于 VP0 的豆蔻酰化及 L 蛋白的同步切割。虽然在其他 6 株 DHV-N 多聚蛋白前体 N 端的第 31 ~ 35 位均存在相同的序列 (GAVES),但 Tseng 等和 Kim 等却认为,DHV-N VP0 缺乏豆蔻酰化信号^[12-13],DHV-N 蛋白前体 N 端的 30 aa 是否为 L 蛋白,需进行研究加以确定。

在小 RNA 病毒中,VP1 蛋白暴露于病毒粒子的表面,具有参与病毒的吸附及介导宿主发生免疫反应的功能^[21]。与 DHV-1 相比发现,在 DHV-N G 株 VP1 蛋白出现高度变异,提示 DHV-N G 株的 VP1 蛋

白上存在与 DHV-1 完全不同的抗原表位,这可能是免疫 DHV-1 疫苗或抗体后仍发生新血清型鸭肝炎的原因所在,VP1 蛋白的 RGD 基序通过结合细胞整合素受体参与病毒的吸附, RGD 多肽基序改变成 SGD 或 RGS D 将会改变病毒子与细胞受体的关系,可使 FMDV A24 形成蚀斑和复制能力的减弱^[22],虽然 DHV-N G 株与 DHV-1 都缺乏 RGD 基序,但 DHV-1 取而代之的是 SGD,而 DHV-N G 株则缺失 G 而为 SD,说明 DHV-N G 株与 DHV-1 可能存在不尽相同的病毒吸附机制和复制能力。

在 DHV-N G 株的 2A 蛋白上有典型的口蹄疫病毒样切割位点 NPG↓P,多聚蛋白通过一种共翻译切割的核糖体跳跃机制将 2A 蛋白酶解成一个系列不连续的多肽骨架^[23]。和 LV 相似, DHV-N 的 2A 蛋白由结构不同的蛋白组成。本研究的预测结果与 Kim 等的报道一致,即 DHV-N 的 2A 蛋白是由 2 种不同的 2A 小蛋白(2A1 和 2A2)串联而成^[13]。而 Tseng 等则认为,除了形成一种成熟的蛋白(2A2)外,2A 还形成另一种成熟蛋白(2A3)^[12]。但是, Tseng 等预测的 2A2 和 2A3 之间的切割位点 G/H 并非典型的 3C^{pro}作用位点,故有待做一步研究加以验证。

虽然已从血清学和分子生物学方面明确了 DHV-N G 株与 DHV-1 之间存在显著的差异,但 DHV-N G 株与 DHV-1 在小 RNA 病毒科中是存在属内还是属间的遗传关系还不十分明朗。众所周知,2C 和 3D 蛋白是小 RNA 病毒科中最保守的 2 种蛋白,其氨基酸序列常被用作分析不同属间遗传进化关系^[24]。小 RNA 病毒科 9 个属成员形成聚类,只有肠病毒属与鼻病毒属发生了交叉,这源于 2 类病毒间有较高的氨基酸同源性,这与 ICTV 的第八次分类一致^[25],而 DHV-N 与 DHV-1 关系密切,共同占据一个独立的分支,相对于其它小 RNA 病毒而言, DHV-N 和 DHV-1 与副肠孤病毒属成员之间具有更近的遗传进化关系,但遗传距离仍然较大,尚处于属间的水平。因此 DHV-N 与 DHV-1 虽存在显著差异,但两者仍处于小 RNA 病毒科中新属的不同分支上。

参考文献

- [1] Saif YM. 禽病学. 苏敬良,高福,索勋,等译. 第 11 版. 北京:中国农业出版社,2005:376-389.
- [2] 郭玉璞,蒋金书. 鸭病. 北京:北京农业大学出版社,1988:30-31.
- [3] Levine PP, Fabricant J. A hitherto-undescribed virus disease of ducks in North America. *Cornell Veterinarian*, 1950, 40:71-86.
- [4] Sandhu TS, Calnek BW, Zeman L. Pathologic and serologic characterization of a variant of duck hepatitis type I virus. *Avian Diseases*, 1992, 36:932-936.
- [5] Monroe SS, Carter MJ, Herrmann J, et al. *Astroviridae*. // Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, et al. Virus taxonomy. Eighth report of the international committee on taxonomy of viruses. San Diego:Elsevier Academic Press, 2005:859-864.
- [6] Haider SA, Calnek BW. In vitro isolation, propagation and characterization of duck hepatitis virus type III. *Avian Diseases*, 1979, 23(3):715-729.
- [7] 李芙蓉,王永坤. 国内雏鸭病毒性肝炎的研究进展. *动物科学与动物医学(Animal Science and Veterinary Medicine)* 2003, 20(11):62-63.
- [8] 苏敬良,黄瑜,贺荣连,等. 新型鸭肝炎病毒的分离及初步鉴定. *中国兽医科技(Chinese Journal of Veterinary Science and Technology)*, 2002, 32(1):15-16.
- [9] Kim MC, Kwon YK, Joh SJ, et al. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 reveals a novel lineage close to the genus parechovirus in the family Picornaviridae. *Journal of General Virology*, 2006, 87(11):3307-3316.
- [10] Tseng CH, Knowles NJ, Tsai HJ. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 indicates that it should be assigned to a new genus. *Virus Research*, 2007, 123(2):190-203.
- [11] Ding C, Zhang D. Molecular analysis of duck hepatitis type 1. *Virology*, 2007, 361(1):9-17.
- [12] Tseng CH, Tsai HJ. Molecular characterization of a new serotype of duck hepatitis virus. *Virus Research*, 2007, 26(126):19-31.
- [13] Kim MC, Kwon YK, Joh SJ, et al. Recent Korean isolates of duck hepatitis virus reveal the presence of a new genotype and serotype when compared to duck hepatitis virus type 1 type strains. *Archives of Virology*, 2007, 152(11):2059-2072.
- [14] Xiang WK, Paul AV, Wimmer E. RNA signals in Enterovirus and Rhinovirus genome replication. *Seminars in Virology*, 1997, 8(3):256-273.
- [15] Kozak M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*, 1986, 44:283-292.
- [16] Dougherty WG, Semler B L. Expression of virus encoded proteinases: functional and structural similarities with cellular enzymes. *Microbiological Reviews*, 1993, 57:781-822.
- [17] Chow M, Newman JF, Filman D, et al. Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature*, 1987, 327(6122):482-486.

- [18] Ito M, Yamashita T, Tsuzuki H, et al. Isolation and identification of a novel human parechovirus. *Journal of General Virology*, 2004, 85: 391 – 398.
- [19] Ryan MD, Flint M. Virus-encoded proteinases of the picornavirus super-group. *Journal of General Virology*, 1997, 78: 699 – 723.
- [20] Silvestri LS, Parilla JM, Morasco BJ, et al. Relationship between poliovirus negative-strand RNA synthesis and the length of the 3' poly(A) tail. *Virology*, 2006, 345(2): 509 – 519.
- [21] Logan D, Abu-Ghazaleh R, Blakemore W, et al. Structure of a major immunogenic site on foot-and-mouth disease virus. *Nature*, 1993, 362: 566 – 568.
- [22] Fry EE, Newman JW, Curry S, et al. Structure of foot-and-mouth disease virus serotype A1061 alone and complexed with oligosaccharide receptor: receptor conservation in the face of antigenic variation. *Journal of General Virology*, 2005, 86: 1909 – 1920.
- [23] Donnelly ML, Luke G, Mehrotra A, et al. Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein 'cleavage' mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: a putative ribosomal 'skip'. *Journal of General Virology*, 2001, 82: 1013 – 1025.
- [24] Gromeier M, Wimmer E, Gorbalenya AE. Genetics, pathogenesis and evolution of picornaviruses. // Domigo E, Webster RE, Holland JJ. Origin and Evolution of viruses. San Diego: Academic Press, 1999: 287 – 343.
- [25] Stanway G, Brown F, Christian P, et al. *Picornaviridae*. // Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, et al. Virus taxonomy. Eighth report of the international committee on taxonomy of viruses. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005: 757 – 778.

Genomic sequence of a new serotype duck hepatitis virus

Shaohua Shi^{1,2}, Longfei Cheng^{1,2}, Guanghua Fu¹, Hongmei Chen^{1,2}, Zhen Chen¹, Weixing Yang³, Jingliang Su^{4*}, Yu Huang^{1*}

(¹ Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China)

(² Fujian Animal Diseases Control Technology Development Center, Fuzhou 350013, China)

(³ College of animal science and technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

(⁴ College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract : [**Objective**] A strain of highly pathogenic duck hepatitis virus was isolated in south China from a Pekin duck flock in 1999. No cross reaction with type 1 and 3 duck hepatitis virus was found by serum neutralization. We suggested the strain should be classified as a new serotype of duck hepatitis virus and named it as DHV-N G strain in our previous study. We wanted to reveal the evolution of this virus in molecular level and gene sequence differences between it and DHV-1 strains. [**Methods**] We used RT-PCR and 5'-'3'-RACE to amplify the complete genome sequence of DHV-N G strain and compared it with other picornaviruses. [**Results**] The genome of DHV-N G consists of 7774 nucleotides excluding a poly(A) tail of 12 nucleotides. It contains a single large open reading frame encoding a polypeptide of 2251 amino acid residues. The length of 3' UTR of DHV-N G is 366 nucleotides, which is 52 nucleotides longer than that of DHV-1 C80 strain. Significant amino acid variation was found in the protein VP1, especially at the position of 140 – 221 comparing with DHV-1. The DHV-N G genome shares 72.8% – 73.4%, 96.3% – 96.5% and 78.3% similarity with DHV-1 strains, Korea's and Taiwanese DHV-N strains, respectively. [**Conclusion**] The genome structure of DHV-N G strain is obviously different with that of DHV-1 strains. The homologies of genome among the DHV-N group are variable, therein DHV-N G strain is more homologous with Korea's strains than with Taiwanese.

Keywords : duck hepatitis virus ; new serotype ; sequence analysis

(本文责编 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30471283)

* Corresponding authors. Yu Huang, Tel/Fax : + 86-591-87572396, E-mail : huangyu_815@163.com ; Jingliang Su, Tel : + 86-10-62732321, E-mail : jinglsu@yahoo.com

Received : 16 October 2008 / Revised : 11 December 2008