

## 鸭肝炎病毒新血清型基因组序列分析

施少华<sup>1,2</sup>, 程龙飞<sup>1,2</sup>, 傅光华<sup>1</sup>, 陈红梅<sup>1,2</sup>, 陈珍<sup>1</sup>, 杨维星<sup>3</sup>, 苏敬良<sup>4\*</sup>, 黄瑜<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 福建省农业科学院畜牧兽医研究所, 福州 350013)

(<sup>2</sup> 福建省畜禽疫病防治工程技术研究中心, 福州 350013)

(<sup>3</sup> 江西农业大学动物科学技术学院, 南昌 330045)

(<sup>4</sup> 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<sup>[1-2]</sup>。

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)<sup>[3-6]</sup>,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<sup>[7]</sup>。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)<sup>[8]</sup>。

虽然早在1950年Levine和Fabricant就分离到DHV-1<sup>[4]</sup>,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<sup>[9-11]</sup>。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<sup>[12-13]</sup>;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<sup>[8]</sup>。

**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, MgCl<sub>2</sub> 2 μL, 上、下游引物(20 pmol/μL)各 1 μL, GoTaq 酶 0.25 μL, dd H<sub>2</sub>O 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 | GGGCCATATGTGTCTTTGT        | 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 DH<sub>5</sub>α 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<sup>[9]</sup>。

### 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.

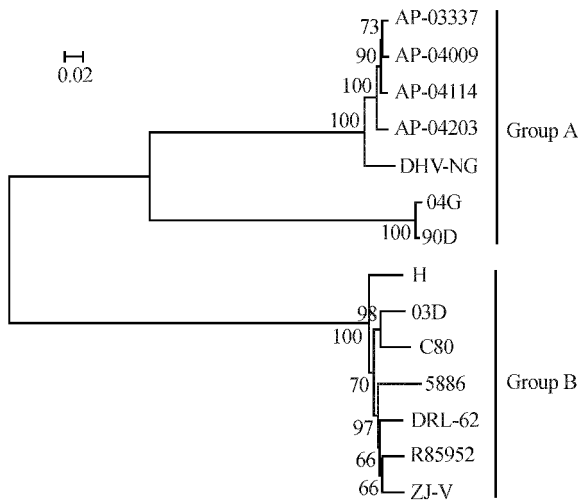


图 1 DHV-N 和 DHV-1 基因组的系统进化关系

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<sup>VP3</sup> 结合而启动基因组的复制<sup>[14]</sup>;DHV-N G 株 5' UTR 的第 650 ~ 656 位为 GCAAUGG,与 Kozak 序列 GxxAUGG<sub>x</sub> 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<sup>[15]</sup>。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<sup>[11]</sup>。

### 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<sup>pro</sup> 所识别并切割的一级或三级结构元件<sup>[16]</sup>。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<sup>[13]</sup>。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<sub>xxx</sub>[S/T]<sub>x</sub> 为非保守氨基酸)一样<sup>[17]</sup>,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  | KMKKWSRNHRPFGR    |
| C80 :     | RPIPGTSS--EATFGR-26aa | APTSTTSLRSGSNGVIPTL | DQSGDEVVDCHFCEICR | SKMKRRMWWKPKRGHFR |
| DRL-62 :  | RPIPGTSS--EATFGR-26aa | APTSTTSSRGSNDVIPTLN | QSGDEVVDCHFCEICR  | SKMKRRRWKPKRGHFR  |
| 5886 :    | RPIPGTSS--EATFGR-26aa | APTSTTSSRGSNDVIPTLN | QSGDEVVDCHFCEICR  | SKMKRRRWKPKRGHFR  |

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<sup>[18]</sup>;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<sup>[19]</sup>,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<sup>[14]</sup>,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<sup>[20]</sup>,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<sup>[12-13]</sup>,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<sup>[21]</sup>。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<sup>[22]</sup>,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<sup>[23]</sup>。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<sup>[13]</sup>。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)<sup>[12]</sup>。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<sup>pro</sup>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<sup>[24]</sup>。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<sup>[25]</sup>,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<sup>1,2</sup>, Longfei Cheng<sup>1,2</sup>, Guanghua Fu<sup>1</sup>, Hongmei Chen<sup>1,2</sup>, Zhen Chen<sup>1</sup>, Weixing Yang<sup>3</sup>, Jingliang Su<sup>4\*</sup>, Yu Huang<sup>1\*</sup>

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

(<sup>2</sup> Fujian Animal Diseases Control Technology Development Center, Fuzhou 350013, China)

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

(<sup>4</sup> 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