

陕西及周边地区 I 群禽腺病毒hexon基因分型与序列分析

吴旭锦, 朱小甫

(咸阳职业技术学院畜牧兽医研究所, 动物疫病分子生物学诊断实验室, 陕西 咸阳 712000)

摘要: 对鸡群中感染的 I 群禽腺病毒hexon基因进行分型与序列分析, 以期明确 I 群禽腺病毒基因型的分布和hexon基因变异情况。参考GenBank上FAdV基因序列, 设计2对引物, 采用套式PCR技术扩增临床病料中 I 群禽腺病毒hexon基因, 测序后获得了8株FAdV hexon基因片段。构建系统发生树发现, 其中HM、SXFS、LQQD、HXGB、GSPL、DYQY与FP共7株属于FAdV-4型, 而GS株属于FAdV-1型。7株FAdV-4型毒株核苷酸同源性在99.9%~100%之间, 推导氨基酸序列同源性均为100%, 提示这7株FAdV-4型流行毒株高度同源。FAdV-1型的GS与CELO株核苷酸、推导氨基酸序列同源性均为99.2%, 提示GS与CELO株亲缘关系较高。在陕西及周边地区鸡群中发现存在FAdV-1型和FAdV-4型 I 群禽腺病毒, 各血清型毒株之间高度同源, 毒株遗传稳定性高。

关键词: I 群禽腺病毒; Hexon基因; 序列分析; 基因分型

中图分类号: S852.65+1

文献标识码: A

文章编号: 94047-(2018)01-020-04

近两年来, 在我国鸡群中出现了一种被称为“心包积液-肝炎综合征”的疾病, 经过初步研究, 认为该病是由 I 群禽腺病毒 (Fowl adenovirus, FAdV) 引起^[1-3]。目前已知 I 群禽腺病毒分为A~E共5个种, 每个种内的病毒根据交叉中和试验结果进一步分为12个血清型。

FAdV病毒粒子直径70~90nm, 无囊膜, 呈20面体对称结构, 对脂溶剂有抵抗力, 耐受pH3~9^[4]。I 群禽腺病毒既能水平传播, 又能垂直传播, 与该病毒有关的疾病有包涵体肝炎、心包积液综合征、肌胃糜烂症和心包积液-肝炎综合征, 还有报道该病毒能导致产蛋下降、饲料报酬下降以及呼吸道疾病^[5-7]。研究表明, 这些不同的临床表现由不同的血清型引起^[8-12]。I 群禽腺病毒六邻体是主要的衣壳蛋白, 由Hexon基因编码, 含有型、群和亚群特异性抗原决定簇, 与致病性密切相关。Hexon基因全长2829bp, 编码943个氨基酸, 用Hexon基因可区分特定的血清型^[13-15]。为调查陕西及周边省份鸡群 I 群禽腺病毒感染情况, 并分析病原血清型分布特点, 咸阳职业技术学院动物疫病分子生物学诊断实验室

采集了2015~2016年间疑似病例样品, 进行了Hexon基因序列分析, 为 I 群禽腺病毒的防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织病料 采集自疑似病例蛋鸡场或肉鸡场, 主要采集脾脏和肝脏, 取适量组织加灭菌PBS剪碎, 研磨破碎细胞后12000r/min离心10min, 收集上清液-70℃保存备用。样品来自陕西、甘肃和山西部分地区鸡场。

1.1.2 试剂 DNAiso核酸提取试剂、rTaq DNA聚合酶(5 U/μL)、dNTP(2.5mmol/L)、pMD18-T载体克隆试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司; UNIQ-10柱式DNA胶回收试剂盒购自生工生物工程(上海)有限公司; DH5α大肠埃希菌由动物疫病分子生物学诊断实验室保存。

1.1.3 引物设计与合成 参考GenBank上FAdV基因序列NC001720、EU979370、GU188428, 针对FAdV六邻体Hexon基因设计并合成了2对引物, FAdV-1F:

收稿日期: 2017-12-29

基金项目: 陕西省科技计划项目(2017NY-097); 咸阳市科技计划项目(2016k02-54); 咸阳职业技术学院2017年科学技术研究重大项目(2017KYA01)

作者简介: 吴旭锦(1979—), 女, 陕西西安人, 副教授, 博士, 主要从事动物疫病分子病原学与免疫学研究工作。

5' -TCAACCACCACCGTAACTG-3' (19802-19820); FAdV-1R: 5' -GGGAGTTGTTTGTGTACAT-3' (20956-20938); FAdV-2F: 5' -CACTTACGAGTGGTCCACAGA-3' (19935-19956); FAdV-2R: 5' -CCGGTGTCTTAACAACG-3' (20684-20667)。引物由生工生物工程(上海)有限公司合成, 均用DEPC处理水稀释到 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.2 方法

1.2.1 病料中总DNA的提取 吸取处理好的组织病料上清液 $200 \mu\text{L}$ 置于无菌EP管, 加入DNAiso Reagent $800 \mu\text{L}$, 上下颠倒混匀, 室温静置裂解10 min, 4°C 、 $12\ 000 \text{ r/min}$ 离心5 min, 吸取 $800 \mu\text{L}$ 上清液转移至另一无菌EP管, 加入 $600 \mu\text{L}$ 冰冷无水乙醇沉淀10 min, 4°C 、 $12\ 000 \text{ r/min}$ 离心10 min, 弃去上清液, 加入1 mL冰冷的70%乙醇清洗2次, 倒置干燥, 用 $40 \mu\text{L}$ 8mmol/L NaOH充分吹打溶解, 即得总DNA溶液。

1.2.2 套式PCR扩增Hexon基因 第1次扩增按照以下反应体系进行: DNA溶液 $2.0 \mu\text{L}$, 超纯水 $17.0 \mu\text{L}$, $10 \times$ PCR Buffer $2.5 \mu\text{L}$, dNTP $2.0 \mu\text{L}$, FAdV-1F/ FAdV-1R各 $0.5 \mu\text{L}$, rTaq 酶 $0.5 \mu\text{L}$, 总体积 $25.0 \mu\text{L}$ 。条件为: 95°C 预变性5 min, 94°C 50 s, 53°C 60 s, 72°C 60 s共进行35个循环, 最后 72°C 充分延伸10 min。取第1次扩增产物 $2.0 \mu\text{L}$ 作为模板进行第2次扩增, 体系同第1次扩增, 引物为FAdV-2F/ FAdV-2R。条件为: 95°C 预变性5 min, 94°C 40 s, 58°C 45 s, 72°C 45 s共35个循环, 最后 72°C 充分延伸10 min。取 $5.0 \mu\text{L}$ 第2次扩增产物, $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂糖凝胶中电泳, 凝胶成像系统中照相观察。

1.2.3 PCR产物的回收、克隆及测序 对PCR阳性产物进行纯化回收, 操作按照UNIQ-10柱式DNA胶回收试剂盒说明进行。回收产物与pMD18-T载体连接, 转化DH5 α 感受态细胞, 经Amp筛选, 挑取单个菌落, 37°C 摇动培养至饱和, 菌液PCR鉴定为阳性, 送阳性菌液至生工生物工程(上海)有限公司完成测序。

1.2.4 Hexon基因序列分析 共获得了8株Hexon基因序列, 用DNASTar软件将流行毒株与参考毒株进行核苷酸和氨基酸同源性比较分析, 并绘制系统发生树。参考毒株信息如下: CELO, GenBank登录号Z67970, FAdV-1型; SR48, GenBank登录号

EU979368, FAdV-2型; SR49, GenBank登录号EU979369, FAdV-3型; ON1, GenBank登录号GU188428, FAdV-4型; 340, GenBank登录号AF508952, FAdV-5型; CR119, GenBank登录号EU979372, FAdV-6型; YR36, GenBank登录号EU979373, FAdV-7型; TR59, GenBank登录号EU979374, FAdV-8a型; 764, GenBank登录号JN112373, FAdV-8b型; A02, GenBank登录号EU979376, FAdV-9型; GenBank登录号AY683551, FAdV10型; UF71, GenBank登录号EU979378, FAdV11型; GenBank登录号AY683553, FAdV12型; Kr-Yeju, GenBank登录号HQ709228; PP-01 GenBank登录号EU938324; SDSX, GenBank登录号KT899325。

2 结果与分析

2.1 Hexon基因套式PCR扩增

从采集的组织中成功扩增出了Hexon基因片段, 长度为750bp, 与预期大小相符(图1)。先后获得了8株病毒Hexon基因, 分别是HM株(陕西商洛市, 蛋鸡场)、SXFS株(山西繁峙县, 肉鸡场)、LQQD株(陕西礼泉县, 肉鸡场)、HXGB株(陕西户县, 蛋鸡场)、GSPL株(甘肃平凉, 蛋鸡场)、DYQY株(陕西大荔县, 蛋鸡场)、FP株(陕西富平县, 肉鸡场)和GS株(甘肃武威, 蛋鸡场)。

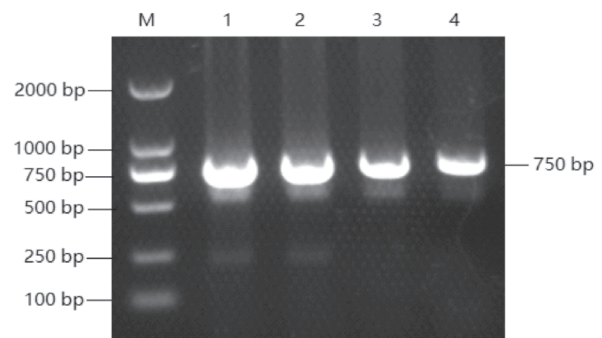


图1 Hexon基因套式PCR扩增电泳图

M. DL2000 DNA分子质量标准;

1~4. 部分FAdV阳性组织Hexon基因扩增

Fig.1 Nested PCR amplification electrophoresis of Hexon gene

M. DL2000 DNA marker; 1-4. The result of cloned

Hexon gene amplification of diseased tissue

2.2 Hexon基因系统发生树的构建

将所测定的8株序列和16株参考序列导入DNASTar软件, 采用MegAlign比较分析, 绘制出系统

发生树，对测定毒株进行分型，能够直观地表示毒株之间的进化关系，结果见图2。

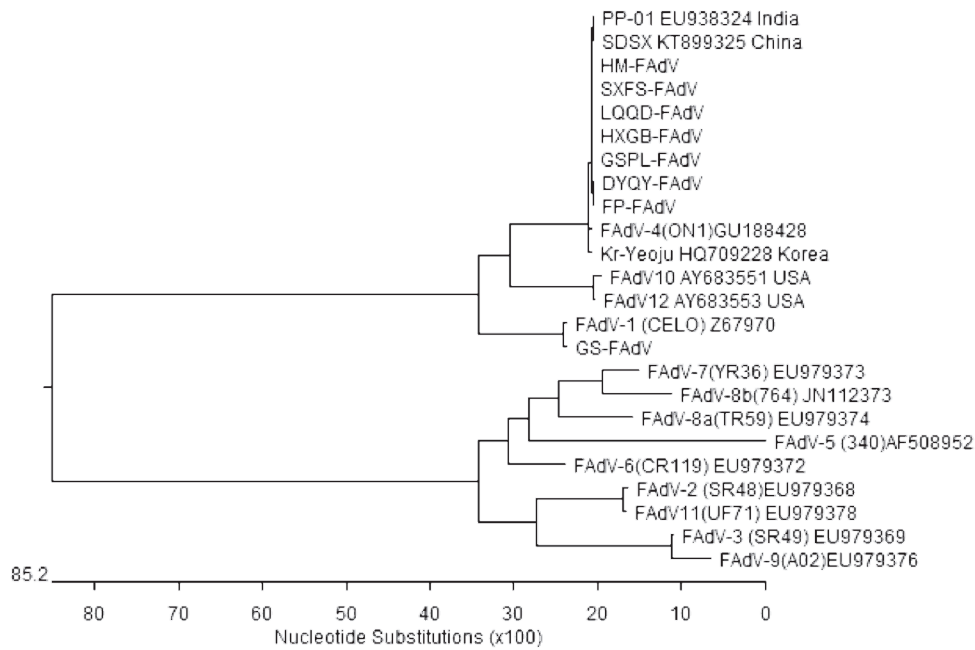


图2 基于Hexon基因绘制的系统发生树

Fig. 2 Phylogenetic tree of FAdV Hexon gene

从图2可见，参比毒株分为两个大群，1、4、10、12血清型组成一个大的分支，2、3、5、6、7、8a、8b、9、112血清型组成另一个大的分支。测定的流行毒株中，HM、SXFS、LQQD、HXGB、GSPL、DYQY、FP与FAdV-4型的ON1、PP-01、SDSX、Kr-Yeju株亲缘关系最近，因此这7株均属于FAdV-4型。

GS与CELO株亲缘关系最近，属于FAdV-1型。

2.3 Hexon基因核苷酸、氨基酸序列比较分析

由于获得的8个流行毒株分别属于FAdV-4型和FAdV-1型，因此选择相应参考毒株ON1、PP-01、SDSX、Kr-Yeju和CELO株进行核苷酸、氨基酸序列比对分析，同源性结果见表1。

表1 核苷酸、氨基酸序列同源性 (%)
Table 1 The sequence homology of nucleotide and amino acid (%)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1		99.2	79.3	100	79.3	99.9	99.9	99.9	98.9	99.9	99.7	99.7	99.9
2	99.6		79.2	99.2	79.2	99.3	99.3	99.3	99.2	99.3	99.2	99.2	99.3
3	89.2	89.6		79.3	99.2	79.2	79.2	79.2	79.3	79.2	79.1	79.1	79.2
4	100	99.6	89.2		79.3	99.9	99.9	99.9	98.9	99.9	99.7	99.7	99.9
5	89.2	89.2	99.2	89.2		79.2	79.2	79.2	79.3	79.2	79.1	79.1	79.2
6	100	99.6	89.2	100	89.2		100	100	99.1	100	99.9	99.9	100
7	100	99.6	89.2	100	89.2	100		100	99.1	100	99.9	99.9	100
8	100	99.6	89.2	100	89.2	100	100		99.1	100	99.9	99.9	100
9	99.6	100	89.6	99.6	89.2	99.6	99.6	99.6		99.1	98.9	98.9	99.1
10	100	99.6	89.2	100	89.2	100	100	100	99.6		99.9	99.9	100
11	100	99.6	89.2	100	89.2	100	100	100	99.6	100		100	99.9
12	100	99.6	89.2	100	89.2	100	100	100	99.6	100	100		99.9
13	100	99.6	89.2	100	89.2	100	100	100	99.6	100	100	100	

注：右上角为核苷酸同源性，左下角为氨基酸同源性。1-13分别为DYQY、ON1、CELO、FP、GS、GSPL、HM、HXGB、Kr-Yeju、LQQD、PP-01、SDSX、SXFS株。

表1中，属于FAdV-4型的HM、SXFS、LQQD、HXGB、GSPL、DYQY、FP、ON1、PP-01、SDSX和Kr-Yeju株核苷酸同源性在98.9%~100%之间，最低的是SDSX和Kr-Yeju株同源性为98.9%。

测定的7株FAdV-4型流行毒株中，DYQY与FP核苷酸同源性为100%，GSPL、HM、HXGB、LQQD和SXFS之间核苷酸同源性为100%，DYQY与GSPL核苷酸同源性为99.9%。测定的7株FAdV-4型流行毒

株推导氨基酸序列同源性均为100%，提示这7株FAAdV-4型流行毒株高度同源。属于FAAdV-1型的GS与CELO株核苷酸、推导氨基酸序列同源性均为99.2%，提示GS与CELO株亲缘关系较高。

推导氨基酸序列分析显示，在测定的250个氨基酸中，参比的FAAdV-4型11个毒株仅有1个氨基酸位点差异，即第60位ON1和韩国Kr-Yeaju株为缬氨酸，而测定的7个流行毒株、山东鸭源SDSX株以及印度PP-01株均为异亮氨酸。FAAdV-1型的GS与CELO株存在2个氨基酸位点差异，即第60位、149位CELO为缬氨酸和甘氨酸，而GS株分别为丙氨酸和丝氨酸。

3 讨论

从2015年起，我国鸡群中流行一种以心包积液和肝脏肿大的疾病，被称为心包积液-肝炎综合征^[5]。咸阳职业技术学院畜牧兽医研究所通过流行病学调查，发现在陕西及周边地区鸡群中同样存在类似疾病。解剖发现，主要病变为肝脏肿大，颜色变淡，为黄色或黄褐相间，质地变脆；心脏心包腔中有或多或少的淡黄色透明积液，心肌松弛；肾脏肿大呈花斑状；肌胃腺胃交界处有条带状出血。刘东等^[9]研究认为，目前国内I群腺病毒主要有两个血清型，临床表现包涵体肝炎的为FAAdV-8a/b型，表现为心包积液综合征的为FAAdV-4型。牛登云等^[12]通过测序分析发现，2015年国内主要流行I群禽腺病毒C和E两种基因型，4和8b两种血清型。通过本课题组设计的I群禽腺病毒通用nPCR方法，直接从病变组织中获得了Hexon基因片段，测序分析表明，获得的8个流行毒株中，HM、SXFS、LQQD、HXGB、GSPL、DYQY和FP株属于FAAdV-4型，仅有GS株属于FAAdV-1型。结果提示引起心包积液-肝炎综合征的主要病原为I群禽腺病毒FAAdV-4型，同时存在FAAdV-1型，肉鸡场和蛋鸡场中均有发生。FAAdV-4型是流行毒株的优势血清型，这和刘东等^[9]、牛登云等^[10]的研究结论一致，但FAAdV-1型感染引起心包积液-肝炎综合征尚未见到类似报道。

核苷酸序列比对分析表明，7个FAAdV-4型毒株中，核苷酸同源性为99.9%~100%，推导氨基酸序列同源性均为100%。与参考毒株相比较，仅有第60位ON1株和韩国Kr-Yeaju株为缬氨酸，而测定的7个流行毒株、山东鸭源SDSX株以及印度PP-01株

均为异亮氨酸，我国和韩国、印度等国外毒株同源性很高，结果提示这些流行毒株高度同源，推测在免疫原性上差异很小。FAAdV-1型的GS与CELO株核苷酸、推导氨基酸序列同源性均为99.2%，仅存在2个氨基酸位点差异，第60位、149位CELO为缬氨酸和甘氨酸，而GS株分别为丙氨酸和丝氨酸，提示GS与CELO株亲缘关系较高。本研究通过I群禽腺病毒的基因分型和Hexon基因序列分析，为进一步进行病毒分离、病毒生物学特性研究奠定了基础。

参考文献

- [1]袁万哲,李玉保,王建昌,等.鸡心包积液-肝炎综合征的初步研究[J].中国兽医科学,2016,46(2):157-160.
- [2]李桂喜,梁磊,严平,等.鸡心包积水综合征的流行病学调查及防治研究[J].家禽科学,2016,(6):46-47.
- [3]汪凯,蔡晓垚,叶建强,等.新型鸡心包炎一包涵体肝炎病毒的分离及鉴定[J].中国动物传染病学报,2016,24(4):1-6.
- [4]殷震,刘景华.动物病毒学[M].第2版.北京:科技出版社,1997.
- [5]刘东,刘红祥,于静,等.I亚群腺病毒在我国鸡群的流行病学调查[J].中国家禽,2015,37(15):70-73.
- [6]张磊,张宇,李巧,等.禽腺病毒4型感染的诊断与防控[J].安徽农学通报,2016,22(10):116-122.
- [7]罗思思,谢芝勋,邓显文,等.I群禽腺病毒分离鉴定及hexon基因的序列分析[J].畜牧与兽医,2012,44(1):52-56.
- [8]智海东,解生亮,杨志,等.禽腺病毒I型琼脂扩散抗原的研制及应用[J].中国兽医科学,2009,39(8):718-722.
- [9]韦悠,谢芝勋,刘加波,等.禽腺病毒I型抗体间接ELISA检测方法的建立[J].畜牧与兽医,2011,43(10):50-53.
- [10]张明明,钱琨,王小辉,等.鸡鸭鹅A型禽腺病毒的PCR检测和分析[J].中国动物传染病学报,2009,17(3):39-43.
- [11]袁万哲,张姗,陈萍,等.禽腺病毒4型PCR检测方法的建立与应用[J].中国动物检疫,2016,33(5):72-74.
- [12]牛登云,沈元,王蕊,等.2015年我国I群禽腺病毒分子流行病学调查[J].中国家禽,2016,38(9):65-68.
- [13]李佳,文鹏程,韩振海,等.新发鸡心包积液综合征研究进展[J].中国兽医杂志,2016,52(8):65-67.
- [14]黄庚明,辛朝安,孔德迎,等.禽腺病毒的分子生物学研究进展[J].中国兽医科技,1996,26(8):20-22.
- [15]Mittal D, Jindal N, Tiwari A, et al. Characterization of fowl adenoviruses associated with hydropericardium syndrome and inclusion body hepatitis in broiler chickens[J]. Virus Disease, 2014, 25(1):114-119.