

杜宗沛, 杜乐伦. 江苏 1 株鸡传染性贫血病毒的分离鉴定及其编码区基因序列[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(9): 244–246.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.09.081

# 江苏 1 株鸡传染性贫血病毒的分离鉴定 及其编码区基因序列

杜宗沛<sup>1</sup>, 杜乐伦<sup>2</sup>

(1. 江苏农牧科技职业学院, 江苏泰州 225300; 2. 福建农林大学, 福建福州 350002)

**摘要:**利用 MDCC-MSB1 细胞系从江苏省泰州市发病鸡中分离获得 1 株病毒, 通过间接荧光抗体试验 (IFA) 确定该病毒为鸡传染性贫血病毒 (CAV)。利用 PCR 扩增、电泳、克隆、核酸测序得到全长 2 324 bp 的基因编码区序列, 该序列碱基完整, 无缺失和插入。经遗传学方法分析发现, 该株序列与 GenBank 中已收录的可见 CAV 序列同源性为 96.5%~99.8%。CAV 的 3 个编码基因序列 VP1 (1 315 bp)、VP2 (643 bp)、VP3 (366 bp) 均有不同程度变异, 以 VP1 变异程度最大。使用电子显微镜观察到病毒粒子与鸡传染性贫血病毒一致, 证实该病毒为鸡传染性贫血病毒新亚型, 将其命名为 CAV MY1305-30 株并提交至 GenBank, 编号为 KF318725、KF318726。

**关键词:** 鸡; 传染性贫血病毒; 分离鉴定; 基因序列; 编码

**中图分类号:** S855.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)09-0244-03

鸡传染性贫血病 (Chicken infectious anemia, CIA) 最早被称为贫血综合征、贫血-皮炎综合征、出血性贫血病、贫血因子病等, 其病原于 1979 年被首次分离并确定, 早期称其为鸡贫血因子 (chicken anemia agent, CAA)、鸡传染性贫血病毒 (chicken infectious anemia virus, CIAV), 之后逐渐统一称作鸡贫血病毒 (chicken anemia virus, CAV)。CAV 的核酸为环状单股负链 DNA, 在 1995 年第 6 次国际病毒分类大会上将其与猪圆环病毒 (PCV)、长尾鹦鹉喙羽病病毒 (PBFDV) 一起归属于圆环病毒科 (Circoviridae), 该科病毒是已知最小的动植物病毒, 因此很少有人能通过电子显微镜观察到 CAV。从 CAV 感染的 MDCC-MSB1 (鸡马立克氏病成淋巴细胞样细胞系) 细胞培养液中纯化的病毒粒子, 经负染后在电子显微镜下呈直径约为 20 nm 的球状。CAV 对乙醚、三氯甲烷均有抵抗力; 对酸 (pH 值为 3) 作用 3 h 后仍保持稳定; 对 56 ℃ 下 120 min、70 ℃ 下 60 min、80 ℃ 下 15 min 的处理均有抵抗力。鸡传染性贫血病的特征性病理变化为骨髓黄化和胸腺萎缩。发病鸡骨髓中的红髓组织被脂肪组织替代, 呈黄色; 胸腺严重萎缩, 其大小仅为正常鸡的 1/10。鸡传染性贫血病广泛流行于世界各地, 呈垂直和水平传播<sup>[1]</sup>。

## 1 材料

### 1.1 待检样品

1 日龄雏鸡来自江苏省泰州市, 用间接酶联免疫吸附 (ELISA) 检测其父母代种鸡群血清, CAV 阳性率高达 87%。

### 1.2 试剂和细胞

exTaq DNA 聚合酶、rTaq DNA 聚合酶、dNTP、DL2 000 DNA Marker、酚氯仿异戊醇、蛋白酶 K 均购于大连宝生物工

程有限公司; 无水乙醇、三氯甲烷均购于天津市富宇精细化工有限公司; 琼脂糖购于上海英俊生物技术有限公司; EB 替代物购于北京普利莱基因技术有限公司; 工程菌 DH5 $\alpha$ 、单克隆抗 MDCC-MSB1 细胞、CAV 毒株阳性对照均由笔者所在实验室保存与提供。细胞培养液配方为 83% RPMI 1640、15% 胎牛血清、1% 双抗、1% 谷氨酰胺; 细胞维持液配方为 93% RPMI 1640、5% 胎牛血清、1% 双抗、1% 谷氨酰胺; 细胞冻存液配方为基础培养液、30%~40% 胎牛血清、10% DMSO。

## 2 方法

### 2.1 样品的采集与处理

于江苏省泰州市发生鸡传染性贫血病的某鸡场采集 10~50 日龄的病鸡或病死鸡, 在生物安全实验室内对其进行剖检, 采集雏鸡的肝、脾、胸腺等组织脏器, 充分研磨后用灭菌生理盐水制成悬浊液, 加入终浓度为 1 000 U/mL 的双抗, 于 37 ℃ 下感作 60 min。将其反复冻融 3 次后进行超声波处理, 将 1 000 g 离心 4 min 后取上清, 于 70 ℃ 水浴处理 5 min, 再经体积分数 50% 的三氯甲烷处理 15 min, 离心并取上清, 经 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜过滤除菌后, 置于 -70 ℃ 保存待检。其中一份用于 PCR 的初步检测, 另一份用于病毒的分离培养。

### 2.2 回归试验

将分离毒株的第 4 代至第 6 代 MSB1 细胞培养物分别腹腔接种于 1 日龄 SPF 鸡 0.2 mL/羽。于接种后 14 d 迫杀, 测定 HCT 值, 并进行病理剖检及病理组织学检查。

### 2.3 MDCC-MSB1 细胞培养分离

将含病毒样品接种 MDCC-MSB1 细胞, 每 2~3 d 盲传 1 代, 每日观察细胞病变 (CPE), 当 70%~80% 的细胞崩解或代谢停止时收毒<sup>[2]</sup>, 并置于 -20 ℃ 保存备用。

### 2.4 免疫荧光染色试验

取分离毒株细胞培养物和 T K5803 分别接种 MDCC-MSB1 细胞 ( $3.0 \times 10^5$  个/mL), 于 48 h 后收集细胞培养物, 以

收稿日期: 2014-08-15

基金项目: 江苏农牧科技职业学院重点课题 (编号: ZD201203)。

作者简介: 杜宗沛 (1962—), 男, 黑龙江哈尔滨人, 研究员, 主要从事动物病原体分离鉴定的研究。E-mail: dzp7050@aliyun.com。

1 000 r/min 离心 5 min,将细胞沉淀用 PBS 洗 3 次并涂于载玻片,干燥后用冷丙酮固定 10 min。接种 1 日龄 SPF 鸡的组织切片,也按同样方法固定后作为待测抗原,进行间接免疫荧光染色,并用荧光显微镜观察。

2.5 分离毒株的 CAV 抗原检测

将 1 株分离毒株的细胞培养物经超声波破碎后离心,除去细胞碎片,用 PEG 浓缩后负染,进行电子显微镜观察。

2.6 样品的 PCR 初步检测

2.6.1 引物设计 根据已发表的 CAV Cux-1、TR20 等毒株的基因组序列设计并合成检测引物,用于样品的 PCR 检测。扩增靶基因的理论长度为 582 bp,引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。

2.6.2 组织 DNA 的提取 采用蛋白酶 K 裂解法提取组织中的核酸,操作步骤如下:(1)取 200  $\mu$ L 组织研磨液移至 1.5 mL 的 EP 管中;(2)向 EP 管中依次加入 300  $\mu$ L PBS、5  $\mu$ L 蛋白酶 K、60  $\mu$ L 10% SDS,于 56  $^{\circ}$ C 水浴消化 1 h 后,至微波炉中高火处理 1~2 min,使其透明澄清;(3)向各管加入等体积的酚氯仿异戊醇,以 12 000 r/min 离心 10 min;(4)将上清液移至新的 1.5 mL EP 管中,重复步骤(3);(5)取上清液并加入等体积三氯甲烷,以 12 000 r/min 离心 10 min;(6)取上清液并加入 2 倍体积的无水乙醇、1/10 体积的 NaAc (3 mol/L),于室温下静置 1 h 后,以 12 000 r/min 离心 10 min;(7)弃上清并加入 500  $\mu$ L 70% 乙醇,以 12 000 r/min 离心 15 min;(8)弃上清,干燥 5 min 后加入 40  $\mu$ L Elution Buffer 使其溶解。

2.6.3 PCR 检测 以病毒 DNA 为模板,用引物 CAV-R、CAV-F 扩增所需目的基因。按反应体系(表 1)配制好后混匀并置于 PCR 扩增仪中,运行如下程序:95  $^{\circ}$ C 5 min;95  $^{\circ}$ C 30 s,56  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 40 s,循环 35 次;72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min,结束后于 4  $^{\circ}$ C 保存。

表 1 PCR 25  $\mu$ L 反应体系

| 组分                         | 加入体积( $\mu$ L/支) |
|----------------------------|------------------|
| 10 $\times$ Buffer         | 2.5              |
| DNTP(2.5 mmol/L)           | 2.0              |
| 引物 CAV-R(20.0 mmol/L)      | 1.0              |
| 引物 CAV-F(20.0 mmol/L)      | 1.0              |
| rTaq 酶                     | 0.5              |
| ddH <sub>2</sub> O         | 15.5             |
| DNA 模板(1 $\mu$ g/ $\mu$ L) | 2.0              |
| 合计                         | 25.0             |

2.6.4 PCR 扩增电泳 操作步骤如下:(1)称取 1 g 琼脂糖,与 100 mL 的 1  $\times$  TAE 缓冲液配成 1% 琼脂糖溶液。(2)溶解后冷却 5~10 min,加入 14  $\mu$ L EB 替代物并混匀。(3)架好梳子,倒入琼脂糖溶液,静置 30 min 使其凝固,移去梳子。(4)将 PCR 扩增产物与 Loading Buffer 缓冲液按 5:1 的比例混匀,并将混匀后的液体加至电泳槽小孔中。(5)重复步骤(4),加入其他剩余 PCR 扩增产物。(6)选用 DL2000 的 Marker,加至电泳槽小孔中。(7)接通电源,红色为正极,黑色为负极,将电压调至 180 V。(8)电泳条带至 1/3 位置时即可停止,电泳时间约为 10~15 min。(9)使用凝胶成像系统进行拍摄并保存。

3 结果与分析

3.1 病毒的分离鉴定

感染 CAV 的 MDCC-MSB1 传代细胞呈 IFA 阳性(图 1)。分离株 CAV 经电子显微镜观察,与以往发现的 CAV 结构一致(图 2)。分离株与 CAV 阳性对照的电泳条带处于同一点位(图 3)。

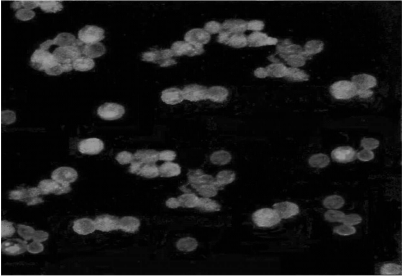


图1 MDCC-MSB1 传代细胞 IFA 阳性

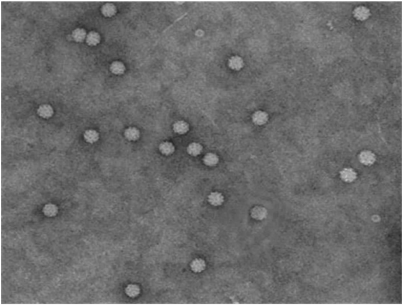


图2 电子显微镜下的 CAV

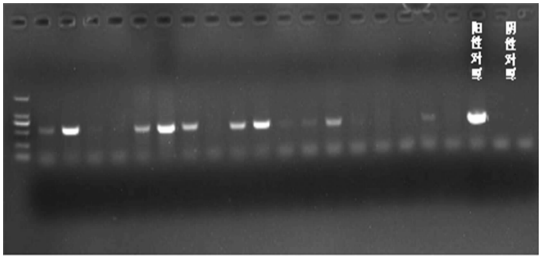


图3 PCR扩增电泳结果

3.2 序列测定结果

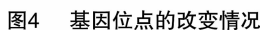
CAV MY1305-30 株基因编码区全长为 2 324 bp,碱基完整,无缺失和插入。与国际基因库中可见 CAV 序列进行同源性、亲缘关系的比对分析,结果发现,其同源性为 96.5%~99.8%。CAV 的 3 个编码基因序列 VP1 (1 315 bp)、VP2 (643 bp)、VP3 (366 bp) 均有不同程度变异,其中 VP1 的变异程度最大。

3.3 核苷酸和氨基酸位点的改变

由 VP1 基因比对序列结果可知,MY1305-30 属于 A3 亚分支。在 683 位核苷酸中该点为 T,而 JAPAN-ABO46590 则为 G(图 4)。

3.4 遗传进化关系分析

将 CAV MY1305-30 株基因与国际基因库中可见 CAV 序列进行遗传进化比对分析,绘制遗传进化树。CAV MY1305-30 株 VP1 基因属于以 Majority 为代表的基因群,与



Phylogenetic tree showing relationships between various isolates. The tree is rooted on the left and branches out to the right. Bootstrap values are indicated at the nodes. The isolates are listed on the right side of the tree.

Isolates and their bootstrap values (from top to bottom):

- AH9410-Japan-AB046590 (90)
- GD4-12-China-KF224933 (61)
- CAT-CAV-China-KC414026 (99)
- CH CK04-12GD1139-AM407881 (72)
- TJBD40-China-AY 846844 (66)
- BL-5-Malaysia-AF527037 (100)
- BL-5P90-Malaysia-AY 150576 (100)
- A2C15-Japan-AB248708 (100)
- A2-Japan-AB031296 (13)
- 82-2-Japan-CAECA123 (28)
- ConnB-USA-CAU69548 (99)
- CUX-1-USA-A48606 (83)
- Cuxhaven-1-UNITED KINGDOM-AJ401053 (99)
- MY 1305-30 (57)
- BD-3-Bangladesh-AF395114 (59)
- CIA-1-USA-CAEPOLYPEP (77)
- CH CK05-01HN592-China-AM407852 (76)
- China-China-JQ690762 (99)
- L-028-USA-CAU69549 (100)
- CL37-Chile-JQ308213 (99)
- CL52-Chile-JQ308214 (67)
- G6-Japan-AB119448 (92)
- TR20-Japan-AB027470 (100)

图5 VP1 基因树

■ A2 CHINA AY843527 TJBD33.seq  
 vp2.seq  
 ■ A2 USA AF311892.seq  
 ▲ A3 JAPAN AB046590.seq  
 ■ A2 India AY583755 CAV-A.seq  
 ■ A2 Malaysia AF390038.seq  
 ■ A2 japan AB031296.seq  
 ▽ B JAPAN D31965.seq  
 MY1305-30 vp2.seq  
 ● A1 India AY583756 CAV-B.seq  
 ■ A2 Malaysia AF527037.seq  
 ■ A2 malaysia AY150576 BL-5P90.seq  
 ● A1 india AY583758 CAV-P.seq  
 ■ A2 harbin AF475908.seq  
 ● A1 AN-China 23 HQ872030.seq  
 ■ A2 HU-China 50 HQ872023.seq  
 ● A1 AN-China 34 HQ872032.seq  
 ▽ B JS-China 73.seq  
 ● A1 AN-China HQ872031.seq  
 ▲ A3 HU-China 13 HQ872025.seq  
 ▽ D1 USA AF311900.seq  
 ▽ D1 HU-China 10 HQ872028.seq  
 ▽ D1 HU-China 6 HQ872027.seq  
 ▽ D2 Japan AB027470 TR20.seq  
 ▽ D2 Malaysia AF285882 SMSC-1.seq  
 ▽ D2 India AY583757 CAV-E.seq  
 ▽ D2 Japan AB119448.seq  
 ● A1 Bangladesh AF395114.seq  
 ■ A2 CHINA AY846844 TJBD40.seq  
 ▽ C Australia AF227982.seq  
 ▽ C Australia EF683159.seq

图6 VP2 基因树

## 4 结论与讨论

基因序列分析对比表明,江苏分离株 CAV MY1305-30 与其他 32 株 CAV 病毒编码区的核苷酸基因同源性为 96.5%~99.8%; 与 vp1. seq、B\_JS - China\_73. seq、A3 JAPAN AB046590. seq 株相对比,VP1 序列仅有 1 个碱基不同。单一比对 VP1、VP2、VP3 的生物开放阅读框架 (ORF), CAV MY1305-30 与其他 32 株 CAV 毒株的核苷酸同源性分别达 95.7%、99.1%、98.7% 以上,表明该分离株变异不大,且 CAV 病毒本身变异很小。

由进化树分析结果可见,CAV VP1 所对比的 32 个毒株分为两大分支,各分支中均有亚洲、欧美的毒株存在,并无明显的地域区分性。CAV VP2 所对比的 32 个毒株也没有明显的地域区分性,两大分支中各有亚洲、欧美的毒株存在。

## 参考文献:

- [1] Yassir M, Eltahir, et al. Molecular epidemiology of chicken anemia virus in commercial farms in China[J]. Virology Journal, 2011, 8: 145-152.
- [2] 刘婉思, 高宏雷, 秦立廷, 等. 1 株野鸭源鸡贫血病病毒的分离鉴定及其编码区基因序列分析[J]. 中国兽医学报, 2013, 33(5): 654-658, 679.