

曹宗喜, 贺冬梅, 叶保国, 等. 鸭坦布苏病毒的分离和 PCR 鉴定[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(5): 152–153.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.05.043

# 鸭坦布苏病毒的分离和 PCR 鉴定

曹宗喜<sup>1</sup>, 贺冬梅<sup>1,2</sup>, 叶保国<sup>1</sup>, 张艳<sup>1</sup>, 杨少雄<sup>1</sup>, 陈朝喜<sup>2</sup>, 林哲敏<sup>1</sup>

(1. 海南省农业科学院畜牧兽医研究所, 海南海口 571100; 2. 西南民族大学生命科学与技术学院, 四川成都 610041)

**摘要:**鸭坦布苏病是危害养鸭业最严重的传染病之一。从某鸭场的疑似鸭坦布苏病病死鸭中分离到 1 株病毒, 并对该毒株进行 PCR 鉴定和序列分析。结果显示, 分离株的序列与 GenBank 上登录的 DTMUV 序列的同源性在 99% 以上, 表明分离的病毒为鸭坦布苏病毒。

**关键词:**鸭坦布苏病毒; 分离; PCR 鉴定

**中图分类号:** S858.325.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)05-0152-01

鸭坦布苏病毒病 (duck tembusu virus disease) 是由鸭坦布苏病毒 (duck tembusu virus, DTMUV) 感染所致的蛋鸭、种鸭以产蛋率和采食量突然下降为主要特征的传染病<sup>[1-2]</sup>。该病自 2010 年在福建省、浙江省、江苏省、安徽省、山东省、河北省等地区的鸭群中相继暴发, 约导致 1.2 亿羽蛋鸭和 1 500 万羽肉鸭发病, 经济损失达数十亿元, 对我国鸭养殖业造成了巨大损失<sup>[3-5]</sup>。鸡、鸭以及养殖场周围的麻雀、蚊子均有被感染的报道<sup>[6-8]</sup>, 这为该病的防控提出了新挑战。本研究以鸭坦布苏病疑似样品为研究对象进行病原分离鉴定, 为鸭坦布苏病毒的进化关系及其致病性的进一步研究提供了参考。

## 1 材料

RNAiso Plus、Ex Taq DNA 聚合酶、dNTP Mixture (2.5 mmol/L)、DL 2 000 DNA marker 均购自 TaKaRa 公司。

## 2 方法

### 2.1 病料采集与处理

从国内主要鸭养殖区收集鸭坦布苏病疑似样品。无菌采集病鸭的肝脏、脾脏等病变组织, 取病料约 1.0 g 并置于灭菌研磨器中, 加入 5 倍体积含抗生素的 PBS 缓冲液研磨制成混悬液, 反复冻融 3 次, 以 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液经 0.22 μm 滤膜除菌, 置于 -20 ℃ 下保存备用。

### 2.2 病毒分离

将处理好的病料接种于 9~11 d 的鸭胚, 每个胚接种 0.2 mL, 每天观察鸭胚。如果无死亡鸭胚则 7 d 收获, 盲传 5 代仍无病变且用 PCR 方法检测为阴性者, 作为病毒分离阴性。

### 2.3 引物设计与合成

参照胡旭东等的引物<sup>[9]</sup>进行设计, F: 5′-GCCACG-

GAATTAGCGGTTGT-3′; R: 5′-TAATCCTCCATCTCAGCGTGTAG-3′。引物由英潍捷基 (上海) 贸易有限公司合成, 采用灭菌超纯水稀释至 10 μmol/L, 于 -20 ℃ 下保存备用。

### 2.4 PCR 鉴定

RNA 抽提和反转录按照试剂盒说明书进行操作。扩增体系及程序分别以反转录的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。反应体系 (20 μL) 为: 10 × Ex Taq buffer 2 μL、上游及下游引物各 1 μL、dNTP Mixture 2 μL、Ex Taq 酶 0.1 μL、cDNA 2 μL, 加水补足至 20 μL。扩增反应程序为: 94 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s, 30 个循环; 72 ℃ 延伸 7 min。取 PCR 产物 5 μL, 采用 1% 琼脂糖凝胶电泳观察并分析 PCR 产物。按凝胶回收试剂盒说明书纯化回收 PCR 产物, 由英潍捷基 (上海) 贸易有限公司进行测序, 采用 Lasergene 7.10 软件对所测序列进行 Blast 比对分析。

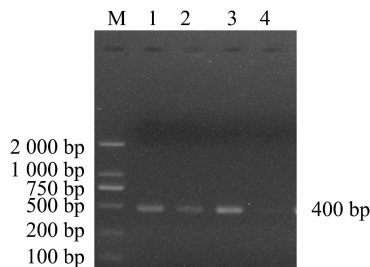
## 3 结果与分析

### 3.1 病毒分离

病毒分离时, 试验组鸭胚于 3~7 d 内部分死亡, 可见胚胎出血水肿、发育不良。

### 3.2 PCR 扩增

取 PCR 产物, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 分离株出现 400 bp 的条带 (图 1), 与预期目的条带相符。



M—DL 2 000 DNA marker; 1~3—疑似鸭坦布苏病毒分离株; 4—阴性对照

图1 疑似鸭坦布苏病毒分离株 PCR 检测结果

### 3.3 基因序列测定与分析

采用 Lasergene 7.10 软件对测序结果进行同源性分析, 所扩增序列与 GenBank 上登录的 DTMUV 序列的同源性在

收稿日期: 2016-01-06

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31402224); 海南省农业科学院农业科技创新专项 (编号: CXZX201413); 现代农业产业技术体系专项 (编号: CARS-43)。

作者简介: 曹宗喜 (1982—), 男, 博士, 副研究员, 主要从事动物传染病学研究。E-mail: caozongxi@163.com。

通信作者: 林哲敏, 研究员, 主要从事兽医医学研究。E-mail: lizmin01@126.com。

赵燕,何俊,金俊杰,等. 马站红鸡生长与繁殖性状的主成分分析[J]. 江苏农业科学,2017,45(5):153-156.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.05.044

# 马站红鸡生长与繁殖性状的主成分分析

赵燕<sup>1</sup>,何俊<sup>1</sup>,金俊杰<sup>1</sup>,卢立志<sup>2</sup>

(1. 温州市农业科学研究院动物科学研究所,浙江温州 325006; 2. 浙江省农业科学院畜牧兽医研究所,浙江杭州 310021)

**摘要:**选取 130 d 马站红鸡母鸡 70 羽、公鸡 20 羽,测定其体质量与体尺指标,对该 70 羽母鸡开产后第 31~115 天的产蛋量、蛋质量进行记录,并测定第 110~115 天共计 92 枚鸡蛋的蛋品质,在此基础上应用典型相关分析原理与主成分分析方法对体质量、体尺与产蛋性能及蛋品质各指标进行分析。结果表明,体质量( $y$ )与体斜长( $x_1$ )、龙骨长( $x_2$ )、胸深( $x_3$ )、胸宽( $x_4$ )、胫长( $x_5$ )、胫围( $x_6$ )、骨盆宽( $x_7$ )、蛋质量( $x_8$ )呈极显著相关( $P<0.01$ );蛋质量与体质量、体斜长、胫围呈极显著相关( $P<0.01$ ),与蛋黄颜色、蛋白高度呈显著正相关( $P<0.05$ ),与蛋黄比率呈极显著负相关( $P<0.01$ );蛋壳强度与蛋壳厚度呈极显著正相关( $P<0.01$ ),哈氏单位与蛋白高度呈极显著正相关( $P<0.01$ );最佳回归方程为  $y = -2.291 + 0.047x_2 + 0.137x_4 + 0.090x_5 + 0.272x_6 + 0.115x_7$ ;体质量、体尺与产蛋性能 10 个指标综合 6 个主成分,累计贡献率达 87.337%。

**关键词:**马站红鸡;体质量;体尺;产蛋性能;蛋品质

**中图分类号:** S831.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)05-0153-04

体质量、体尺指标是家禽选育的重要表型性状,与产肉性能直接相关,蛋品质是衡量家禽产蛋性能的主要指标,对家禽产蛋性能选育工作具有重要意义。前人将体质量与体尺相关度作为肉鸡选育的重要指标之一<sup>[1-4]</sup>,魏彩霞等分别对灵昆鸡蛋、淮南麻黄鸡蛋品质进行了研究,为灵昆鸡、淮南麻鸡蛋

用系的选育奠定了基础<sup>[5-6]</sup>。关于鸡生长与繁殖性状关系的研究尚未见报道。马站红鸡是浙江省温州市苍南县马站平原著名的土鸡品种,也是苍南县县志中唯一记载的土鸡品种。母鸡羽毛为红棕色,公鸡羽毛黑红发亮,皮、肉、内脏均为黑色。红鸡具有体大、胫长、耐粗饲、肉质好等特点,属蛋肉兼用品种。改革开放后马站红鸡濒临灭绝,2008 年苍南县畜牧局工作人员开始收集、扩繁马站红鸡种质资源,2013 年温州市农业科学院对马站红鸡进行选育。笔者采用典型相关分析原理与主成分分析方法对马站红鸡体质量、体尺及产蛋性能与蛋品质进行了统计分析,揭示了各性状间的内在关联,以期今后马站红鸡种质资源选育提供理论依据。

收稿日期:2016-01-04

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(编号:201503231);温州市公益性项目(编号:N20150025)。

作者简介:赵燕(1982—),女,浙江温州人,硕士,讲师,从事家禽营养与选育研究。E-mail: yanzhao\_wk@163.com。

通信作者:卢立志,从事家禽营养与选育研究。E-mail: lulizhibox@163.com。

99% 以上,表明分离的病毒为鸭坦布苏病毒。

## 4 讨论

鸭坦布苏病是危害养鸭业最严重的传染病之一<sup>[3,5]</sup>。对某鸭场发病鸭根据流行病学、临床特征、剖检特点初步诊断为鸭坦布苏病,经过病毒分离,获得病毒分离株。通过 PCR 扩增出与预期大小相符的 400 bp 目的片段,对扩增片段进行测序及 Blast 分析,确定分离病原为鸭坦布苏病毒。本试验为鸭坦布苏病毒进化关系及其致病性的进一步研究奠定了基础。

## 参考文献:

- [1] Su J, Li S, Hu X, et al. Duck egg-drop syndrome caused by BYDV virus, a new Tembusu-related flavivirus[J]. PLoS One, 2011, 6(3): e18106.
- [2] Yan P X, Zhao Y S, Zhang X, et al. An infectious disease of ducks caused by a newly emerged Tembusu virus strain in mainland China[J]. Virology, 2011, 417(1): 1-8.
- [3] Cao Z Z, Zhang C, Liu Y E, et al. Tembusu virus in ducks, China

- [J]. Emerging Infectious Diseases, 2011, 17(10): 1873-1875.
- [4] Li L L, An H J, Sun M H, et al. Identification and genomic analysis of two duck-origin Tembusu virus strains in Southern China[J]. Virus Genes, 2012, 45(1): 105-112.
- [5] Zhu W J, Chen J D, Wei C Y, et al. Complete genome sequence of duck tembusu virus, isolated from muscovy ducks in Southern China[J]. Journal of Virology, 2012, 86(23): 13119.
- [6] Liu M, Chen S, Chen Y, et al. Adapted tembusu-like virus in chickens and geese in China[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2012, 50(8): 2807-2809.
- [7] Tang Y, Diao Y, Chen H, et al. Isolation and genetic characterization of a tembusu virus strain isolated from mosquitoes in Shandong, China[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2015, 62(2): 209-216.
- [8] Tang Y, Diao Y, Yu C, et al. Characterization of a tembusu virus isolated from naturally infected house sparrows (passer domesticus) in Northern China[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2013, 60(2): 152-158.
- [9] 胡旭东, 路浩, 刘培培, 等. 我国发现的一种引起鸭产蛋下降综合征的新型黄病毒[J]. 中国兽医杂志, 2011, 47(7): 43-47.