

# 我国鸭肝炎病毒分离株基因组的测定与分析

马秀丽<sup>1,2</sup>, 宋敏训<sup>2</sup>, 于可响<sup>2</sup>, 廖明<sup>1</sup>, 辛朝安<sup>1</sup>

(1 农业部养禽与禽病防治重点开放实验室 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642;

2 山东省农业科学院 家禽研究所, 山东 济南 250023)

**摘要:**对我国鸭病毒性肝炎病毒(Duck hepatitis virus, DHV)分离株 YZ 和 CL 的全基因组进行了序列测定分析. 结果表明, 2 分离株的基因组全长分别为 7 713 nt 和 7 709 nt, 包括 626 nt 的 5'UTR、6 747 nt 的 ORF、314 nt 的 3'UTR 以及 23 nt 和 19 nt 的 poly(A)尾. 结构蛋白 VP0 含有保守的四肽 CPRP, VP3 的 N 端存在一段约 20 个氨基酸的碱性氨基酸富集区域; VP1 缺少 RGD(Arg-Gly-Asp)基序. DHV 2 分离株存在 3 个不相关的 2A 蛋白基序, 其中 2A1 蛋白类似口蹄疫病毒属的 2A 蛋白, 2A2 蛋白与 AIG1 蛋白(拟南芥)和 GTPase 更为相似, 2A3 蛋白则与副肠孤病毒属的 2A2 蛋白类型相似; 2C 蛋白含有保守基序 EPxxxxxxGxxGxGK(S/T)、QxxxxxDDxxQ 和 KGxxxxSxxxxS/T. 3C 蛋白含有催化三联体 H38-D69-C144; 3D 蛋白包含 KDELR、DxxxxD、GxxSGxxxTxxxNx、YGDD 和 FLKR 等 RNA 聚合酶的特征基序. 基于多聚蛋白、VP1、2C 和 3C 蛋白的进化关系分析结果均表明, DHV 分离株与副肠孤病毒属的遗传关系最近, 但占据一个清晰的独立遗传谱系, 应将 DHV 单独划属.

**关键词:**鸭病毒性肝炎病毒(DHV); 分离株; 基因组测序; 基因组分析

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2009)01-0074-07

## Sequencing and Analysis of the Genome of Duck Hepatitis Virus Isolated from China

MA Xiu-li<sup>1,2</sup>, SONG Min-xun<sup>2</sup>, YU Ke-xiang<sup>2</sup>, LIAO Ming<sup>1</sup>, XIN Chao-an<sup>1</sup>

(1 Key Laboratory of Poultry Freeding & Disease Control of the Ministry of Agriculture, College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 Institute of Poultry Science of Shandong Academy of Agricultural Science, Jinan 250023, China)

**Abstract:** The genome sequences of duck hepatitis virus type 1 (DHV-1) strains YZ and CL isolated from China were determined and analysed. The length of the genomes were 7 709 or 7 713 nt and contained 626 nt of 5' untranslated region (UTR), a single, large open reading frame of 6 747 nt, 314 nt of 3' untranslated region. Analysis of the amino acid sequences of DHV with other picornavirus indicated that conserved motif CPRP existed in DHV capsid polypeptide VP0, a 20 aa region with rich basic amino acid in VP3 protein, and the Arg-Gly-Asp (RGD) motif was not present in VP1 protein. The 2A1 protein of DHV-1 was an aphthovirus-like 2A protein; the 2A2 protein contained a putative conserved AIG1 domains and exhibited a significant similarity to GTPase of immunity associated protein (GIMAP) family; the 2A3 protein was similar to the 2A2 protein of *Parechovirus*. The 2C sequence EPxxxxxxGxxGxGK(S/T), QxxxxxDDxxQ and KGxxxxSxxxxS/T, which conform with the conserved nucleic acid binding domain of the putative picornavirus helicase. The 3C<sup>pro</sup> contained a catalytic triad formed by histidine, aspartate and cysteine, at position 38, 69, 144 respectively. Predicted domains of eight RNA-dependent RNA polymerase motifs were aligned in 3D RNA dependent RNA polymerase region, motifs KDELR, DxxxxD, GxxSGxxxTxxxNx, YGDD and FLKR of were highly conserved. Phylogenetic and evolutionary analysis showed that DHV-1 belongs to a new group of the family *Picornaviridae* that may form a separate genus most closely related to the genus *Parechovirus*.

**Key words:** duck hepatitis virus; isolates; genome sequencing; genome analysis

收稿日期: 2008-04-30

作者简介: 马秀丽(1978—), 女, 助理研究员, 博士; 通讯作者: 廖明(1968—), 男, 教授, 博士, E-mail: mliao@scau.edu.cn

基金项目: 广东省科技计划项目(2006A20301001); 广东省农业厅动物防疫专项经费(粤农[2006](264)); 山东省自然科学基金(Z2006D06)

鸭病毒性肝炎(Duck hepatitis, DH)是一种传播迅速、高度致死性的传染病,该病有3种类型,其中1型鸭肝炎呈世界性分布,而2型和3型鸭肝炎仅见于英国和美国等国家<sup>[1]</sup>。鸭病毒性肝炎病毒(Duck hepatitis virus, DHV)属小RNA病毒科,尚未定属,其基因组为+ssRNA,5'UTR和3'UTR之间含有一个较大的阅读框架(ORF),为多聚蛋白编码区<sup>[2]</sup>。其中P1区编码4种衣壳蛋白(VP4、VP2、VP3和VP1),VP1作为主要的免疫原蛋白,携带主要的抗原位点并具有主要的型特异性中和位点;P2区编码3种非结构蛋白,即2A、2B和2C;P3区编码4种非结构蛋白,即3A、3B(VPg)、蛋白酶3C和RNA聚合酶3D,3D蛋白负责病毒RNA的复制<sup>[3]</sup>;而3'UTR与负链RNA的合成起始有关,可能与RNA复制时RNA聚合酶的结合有关。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的感染能力有关<sup>[4]</sup>。由于DHV的分子生物学研究起步较晚,目前有关DHV的研究主要集中在基因组结构特点分析上<sup>[5-8]</sup>。笔者在对2株1型DHV分离株(YZ株和CL株)的前期研究中发现,YZ株和CL株对雏鸭的致死率较强,分别为80%和87.5%。为进一步认识DHV的分子特征,本研究对上述2株致病性DHV毒株的全基因组进行了测定与分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒

1型DHV分离株YZ株由扬州大学王永坤教授惠赠;1型DHV分离株CL株由山东家禽研究所分离并保存。

### 1.2 病毒RNA的提取

采用Trizol试剂盒(Invitrogen)并按说明书中的步骤,从尿囊液中提取RNA。

### 1.3 RT-PCR

RT: Mg<sup>2+</sup> (25 mmol/L) 1.2 μL, dNTP (10 mmol/L) 2.0 μL, 5 × RT 缓冲液 4.0 μL, 下游引物 (20 pmol/μL) 1 μL, RNA 酶抑制剂 (40 U/μL) 0.5 μL, RNA 模板 10.3 μL。反应条件: 70 °C 5 min, 42 °C 40 min, 95 °C 2 min, 42 °C 时加 M-MLV (200 U/μL) 1 μL。合成的cDNA 作为 PCR 扩增的模板。

PCR 扩增: cDNA 5 μL, 上游引物 (20 pmol/μL) 1.0 μL, 10 × ExTaq Buffer 4 μL, Mg<sup>2+</sup> (25 mmol/L) 1.4 μL, dNTP (2.5 mmol/L) 2.0 μL, ExTaq 酶 (5 U/μL) 0.5 μL, 补灭菌水至 50 μL。反应条件: 94 °C 3 min, 然后 94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 2.5 min, 进行 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物进行电泳检验。不同片段采用不同的上、

下游引物,引物配对使用见表1。

5'和3'末端的扩增:采用5'和3'cDNA末端快速扩增(RACE)试剂盒(TaKaRa)说明书的步骤稍作改动,进行病毒RNA 5'和3'末端序列的扩增。

表1 PCR 扩增引物

Tab.1 Primers for PCR amplification and cloning

扩增片段	引物名称	位置	引物序列
	5' RACE 反转引物	1 483-1 500	5'P AGTTTGAAAGGTTTGCTG 3'
A	A1	686-703	5' AGAAAAGCTGCAGCAAGC 3'
	S1	555-572	5' ATCAGGCAGCTGTAGGTTA 3'
	A2	878-899	5' TCTGCTACAGGACAGTGGGTT 3'
	S2	377-394	5' ACAACGAAGACCATTAGC 3'
B	P2(sense)	24-41	5' CCATTTTCCAGCACAGGT 3'
	P2(anti-sense)	1 483-1 500	5' AGTTTGAAAGGTTTGCTG 3'
C	P3(sense)	1 091-1 108	5'CTACTGCCGGTCTTATC 3'
	P3(anti-sense)	3 491-3 508	5'TTCCACTTCTCCTCCTG 3'
D	P4(sense)	3 017-3 034	5' GCGGAAGAAGGTACAGAT 3'
	P4(anti-sense)	4 860-4 877	5' AAGCGAATAGCGAAACG 3'
E	P5(sense)	4 743-4 761	5' CCAAAGGCAAGTGTAGAGG 3'
	P5(anti-sense)	5 885-5 902	5' CAGGAACCAGGTCCAGTC 3'
	3'RACE 反转引物		5'CTGATCTAGAGGTACCGGATCCTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3'
F	P6(sense)	5 745-5 762	5'GACTATCGTGGTAATGCC 3'
	P6(anti-sense)		5'CTGATCTAGAGGTACCGGATCC 3'

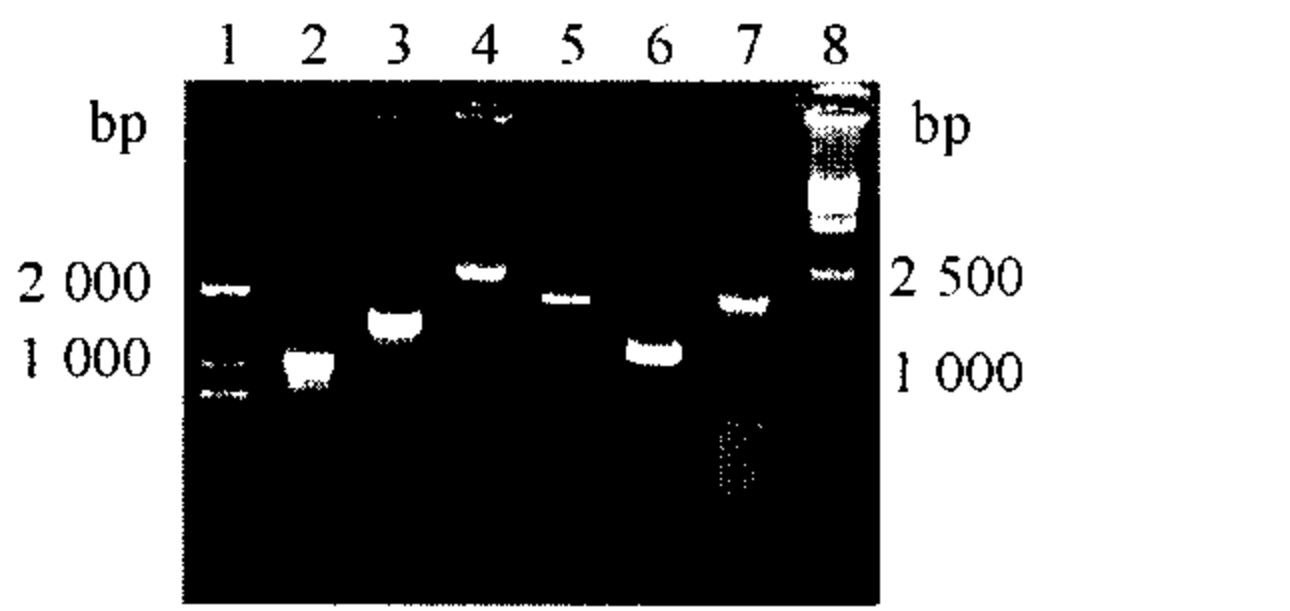
### 1.4 PCR 产物的克隆与测序分析

用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(TIANGEN)回收 PCR 产物,克隆至 pGM-T 载体,酶切法鉴定阳性重组子,由上海生物工程有限公司完成测序。序列拼接和分析用 DNASTar v6.13 软件进行。采用 MEGA4.0 软件对拼接的 DHV 序列(YZ, EF427899; CL, EF427900)和 GenBank 登录的小 RNA 病毒科代表毒株的序列(AEV, NC\_003990; HAV, NC\_001489; AiV, NC\_001918; BKV, NC\_004421; EMCV, DQ464062; TEV, DQ401688; ERBV, NC\_003983; ERV-3, NC\_003077; FM-DV-A, NC\_011450; FMDV-C, NC\_002554; FMDV-O, NC\_004004; HEV-B, NC\_001472; HEV-C, NC\_001428; PV, NC\_002058; HRV2, X02316; LV145SL, AF327922; LV174F, AF327921; LV, NC\_003976; PTV1, NC\_003985)进行比较和遗传关系分析, GeneDoc 程序分析序列之间的保守性。RNA draw 1.1b2 软件预测 DHV 2 株分离株的 RNA 二级结构。

## 2 结果

### 2.1 基因组扩增克隆

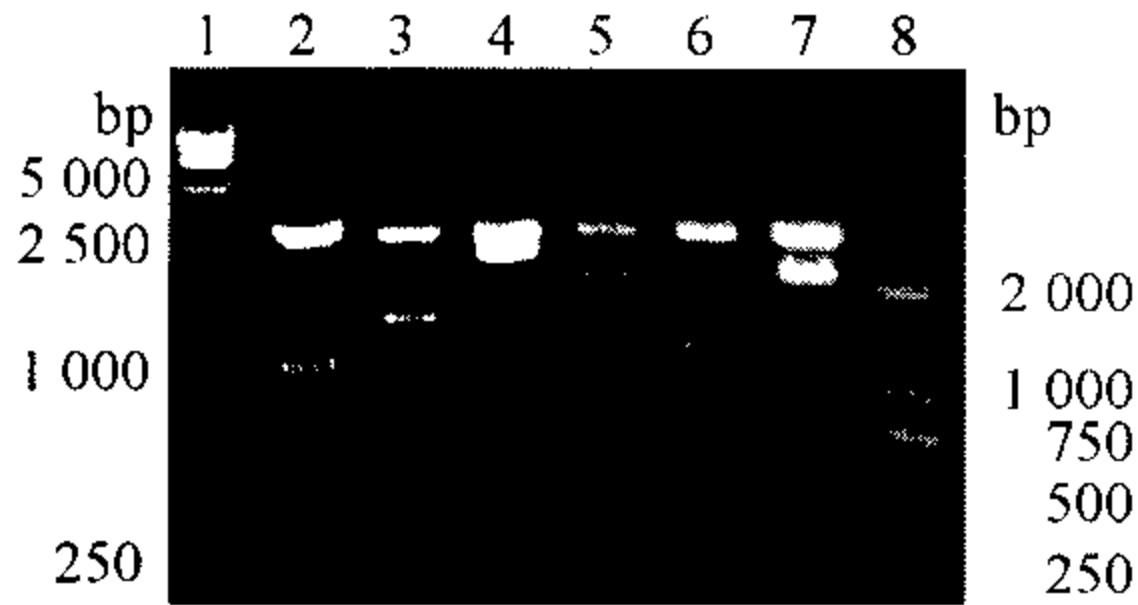
用所设计的特异引物,从 DHV 分离株 YZ 株和 CL 株均扩增出大小分别为 1 012、1 478、2 418、1 861、1 160 和 1 976 bp 的 A~F 片段(图 1),重组质粒 A~F 酶切鉴定结果见图 2。



1: DNA Marker DL2000; 2: A 片段; 3: B 片段; 4: C 片段; 5: D 片段; 6: E 片段; 7: F 片段; 8: DNA Marker DL15000

图1 DHV 各基因片段的扩增

Fig. 1 RT-PCR amplification of DHV genome



1: DNA Marker DL15000; 2~7: 分别为重组质粒 A、B、C、D、E、F; 8: DNA Marker DL2000

图2 DHV 各基因重组质粒的酶切鉴定

Fig. 2 Digestion of recombinant plasmid by restriction enzymes

### 2.2 基因组测序分析

DHV 分离株 YZ 株和 CL 株的基因组全长分别为 7 713 nt 和 7 709 nt, 包括 626 nt 的 5'UTR、6 747 nt 的 ORF、314 nt 的 3'UTR 以及 23 nt 和 19 nt 的 poly (A) 尾. 使用 Mfold3. 2 软件<sup>[9]</sup> 进行 RNA 二级结构预测, 发现 2 株分离株 5'端缺少一个长的多聚嘧啶, 形成 4 个分离的茎环结构(图 3a), 3'端形成 5 个分离的茎环结构(图 3b).

### 2.3 基因组序列分析

利用 MEGA4. 0 软件的 Clustal W 方法对小 RNA

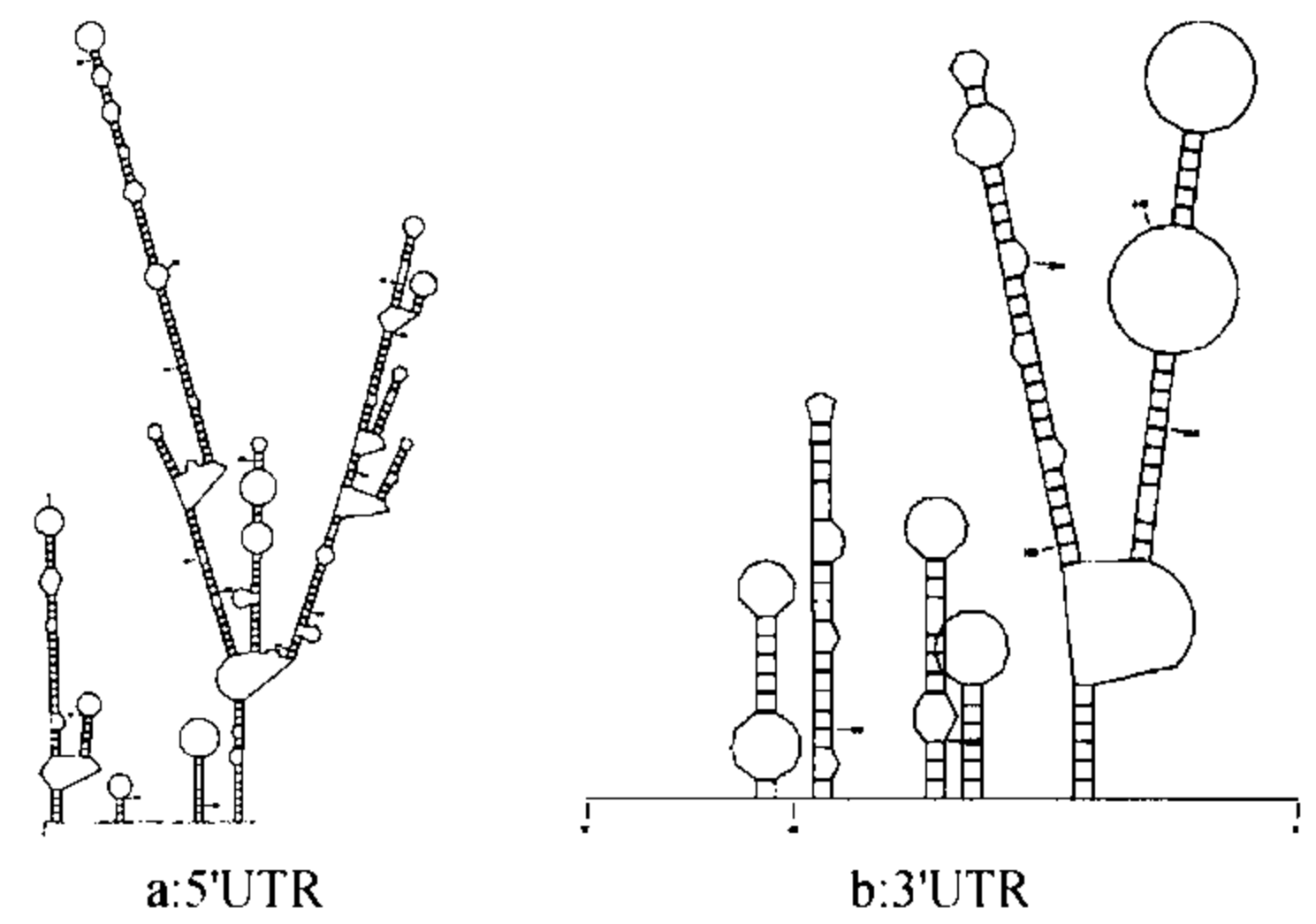


图3 YZ 株 5'UTR 及 3'UTR 二级结构预测

Fig. 3 Predication of secondary structure of the 5'UTR and 3'UTR of strain YZ

病毒科代表病毒的氨基酸序列进行比较发现, CL 株与 YZ 株各蛋白之间的序列相似性均很高, 为 94. 1% ~ 99. 7%; CL 株与小 RNA 病毒各蛋白之间的序列相似性较低, 其中与副肠孤病毒属的序列相似性最高, 达 38. 0%. P1 区 VP3 蛋白序列相似性高于 VP0 和 VP1, P2 区 2C 蛋白序列相似性高于 2A 和 2B, P3 区以 3D 蛋白的保守性最高. 结构蛋白之间没有明显的保守基序, 而非结构蛋白 2A1、2A2、2A3、2C、3C 和 3D 之间存在较多的保守基序或结构域, 详见图 4~7.

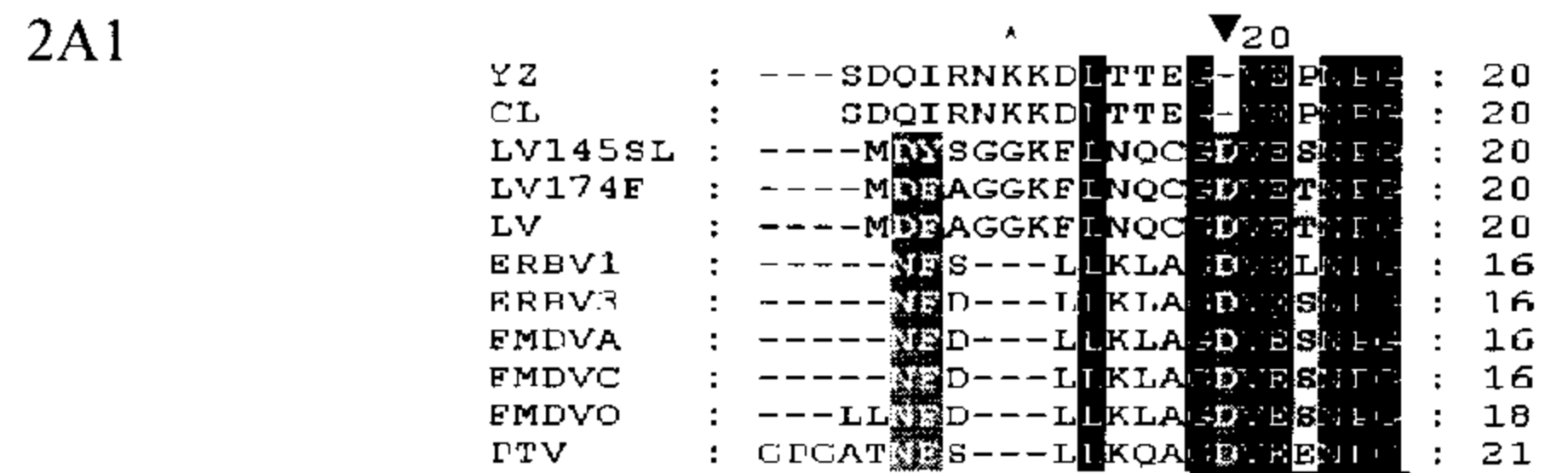


图4 DHV 分离株 YZ 株和 CL 株与其他小 RNA 病毒 2A1 基因的氨基酸序列比较

Fig. 4 Alignment of the amino acid sequences of 2A1 gene of DHV strains YZ and CL with other Picornaviridae virus

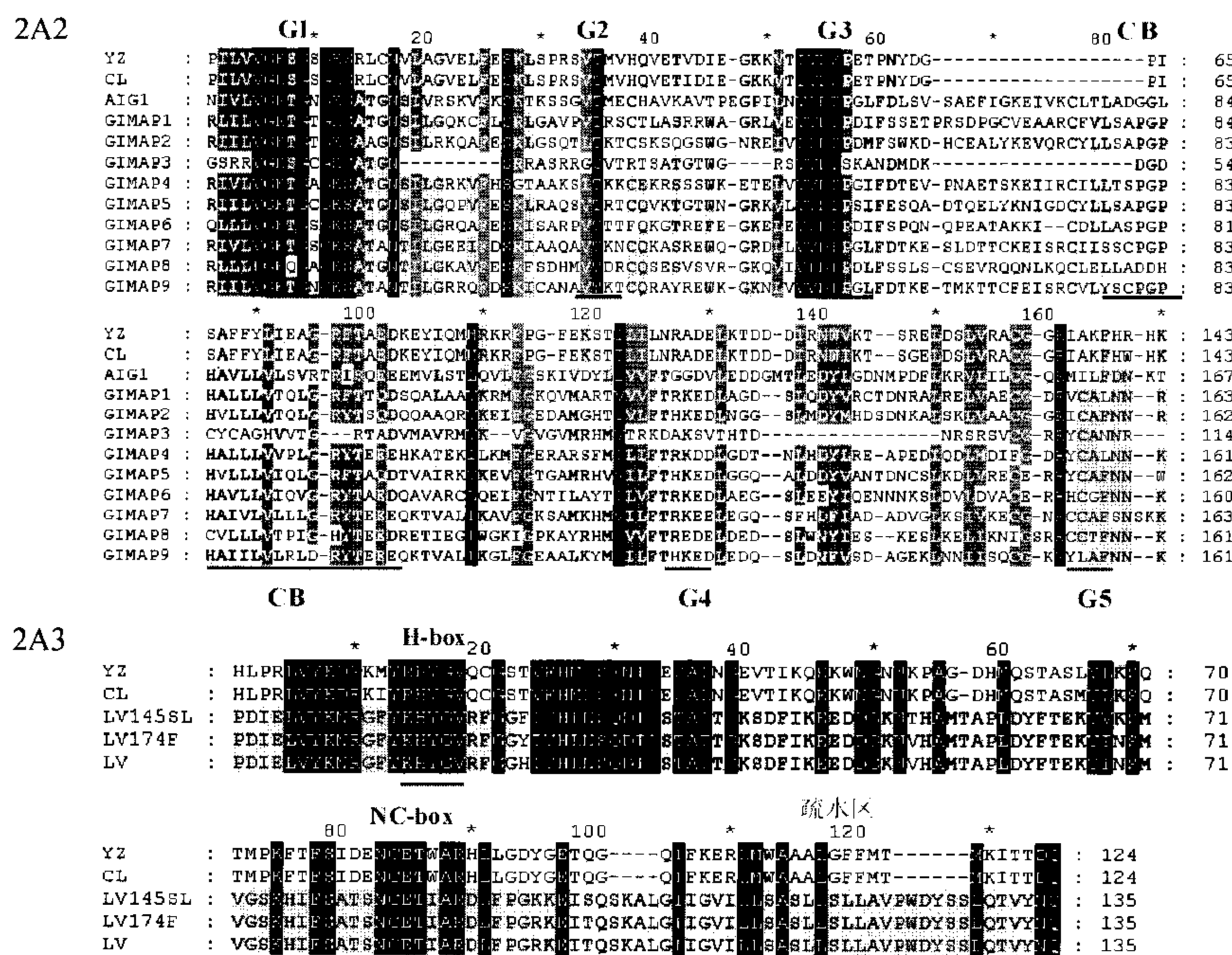


图5 DHV 分离株 YZ 株和 CL 株与其他小 RNA 病毒 2A2 和 2A3 基因的氨基酸序列比较

Fig. 5 Alignment of the amino acid sequences of 2A2 and 2A3 gene of DHV strains YZ and CL with other Picornaviridae virus

2C

```

      80          *          100          *          120          *          140
YZ : KDYICEHNTRPKHQRLVEMVSGTLNQLQGIS SAR-ELAARLQHVNLKHLQVNF-EPELEWTHP... : 146
CL : KDYICEHNTRPKHQRLVEMVSGTLNQLQGIS SAR-ELAARLQHVNLKHLQVNF-EPELEWTHP... : 146
AEV : ITTSDHSEGEIECLKLVRISIQSVIRGEESLKELAGELRAVGFHVLNKLGRDLK--PNAPLV... : 133
HAV : VEKFEQYQKGVLDLQKLRVHSMQVDPNLMVHLSPLRDCIARVHQKLNKLS--INQAMVT... : 144
A1V : LALGSEKLPIDHITKSI SRRELVSIAQEAKSGP--HSSFLNQAVRNYS LAISQHRK... : 132
BKV : AALGSERTPI SAITDAISRRELKVAADARSAP--HSSFLNQALRNQALTONRMADAG... : 132
EMCV : SCLRNGMAAYVECKESPDEFKLYNQAVKERTG--IAAVCEKFRQK-----HDHATA... : 120
TEMV : MDMRNGRKAYCECTASPKYFDLYNLAVTCKRIP--LASLCEKFKNR-----HDHATA... : 122
ERBV1 : MTP-----SAQKELYLONHYDAVEAGLNS--IAAAMKDLAN-----KCYAYS... : 111
ERBV3 : MTP-----SAQKKEFYLONHYDAVEAGLNS--IAAAMKDLAN-----KCYAYS... : 111
FMDVA : NDPS-----KYKAKEWLDNARQACLKSGNVH--IANLCKVVAP-----APSKS... : 111
FMDVC : NDPS-----KYKAKEWLDNARQACLKSGNVH--IANLCKVVAP-----APSKS... : 111
FMDVO : NDPS-----KYKAKEWLDNARQACLKSGNVH--IANLCKVVAP-----APSKS... : 111
HEVB : EQSAPSQSQDQQLFSNQYFAHYCRKYAELVAAE--AKRVEFLEKMS---NYIQFKSK... : 130
HEVC : HQSCPSQEQEILFNVRWLAQSRREAPLYAVE--ARRISKMESTIN----NYIQFKSK... : 130
PV : HQSCPSQEQEILFNVRWLSIQSRREAPLYAVE--AKRIQKLEHTIN----NYIQFKSK... : 130
HRV2 : R--VADMKTKQEKIMEIDTLHDLRKLFLYASE--AKRIKTYIKCD----NIIKQK--... : 126
LV145SL : KQQRNPK-TIEEYFDVLKMKPLVSLCIKVPAPST--KFSQVFRLYSEMKNVVRVPANT... : 141
LV174F : KEQRKAL-TIEEYFEVLKQKPLVSLCMKVPAPST--KFSQVFRLYSEMKNVVRVPANT... : 141
LV : KEQRAS-TIEEYFEVLKQKPLVSLCMKVPAPST--KFSQVFRLYSEMKNVVRVPANT... : 141
PTV : YKCANRYRHRDRTEVANYFKMKRCAAHVNPRLMGMPPEFDESPEDP-----TE... : 119

```

```

      *          160          *          180          *          200          *          220
YZ : PAVRSEFLSNYLVKELAKLK--HWK-SIANT--TGSKHML... : 215
CL : PAVRSEFLSNYLVKELAKLK--HWK-SIANT--TGSKHML... : 215
AEV : RAGSGLASMAAVKCKELGLSHVEG... : 206
HAV : RAGSGLSTIAATKCKHYGVEPKNE... : 217
A1V : PAVRSEFLSNYLVKELAKLK--HWK-SIANT--TGSKHML... : 215
BKV : PAVRSEFLSNYLVKELAKLK--HWK-SIANT--TGSKHML... : 215
EMCV : AAVRSEFLSNYLVKELAKLK--HWK-SIANT--TGSKHML... : 191
TEMV : AAVRSEFLSNYLVKELAKLK--HWK-SIANT--TGSKHML... : 193
ERBV1 : AAVRSEFLSNYLVKELAKLK--HWK-SIANT--TGSKHML... : 182
ERBV3 : AAVRSEFLSNYLVKELAKLK--HWK-SIANT--TGSKHML... : 182
FMDVA : SAAVSEFLSNYLVKELAKLK--HWK-SIANT--TGSKHML... : 183
FMDVC : SAAVSEFLSNYLVKELAKLK--HWK-SIANT--TGSKHML... : 183
FMDVO : SAAVSEFLSNYLVKELAKLK--HWK-SIANT--TGSKHML... : 183
HEVB : PAAVSEFLSNYLVKELAKLK--HWK-SIANT--TGSKHML... : 199
HEVC : PAAVSEFLSNYLVKELAKLK--HWK-SIANT--TGSKHML... : 199
PV : PAAVSEFLSNYLVKELAKLK--HWK-SIANT--TGSKHML... : 199
HRV2 : PAAVSEFLSNYLVKELAKLK--HWK-SIANT--TGSKHML... : 192
LV145SL : PAAVSEFLSNYLVKELAKLK--HWK-SIANT--TGSKHML... : 211
LV174F : PAAVSEFLSNYLVKELAKLK--HWK-SIANT--TGSKHML... : 211
LV : PAAVSEFLSNYLVKELAKLK--HWK-SIANT--TGSKHML... : 211
PTV : PAAVSEFLSNYLVKELAKLK--HWK-SIANT--TGSKHML... : 190

```

```

      *          240          *          260          *          280
YZ : ITERSSEARLTOGRRLV... : 274
CL : ITERSSEARLTOGRRLV... : 274
AEV : RLNANSEARLTOGRRLV... : 265
HAV : RLNANSEARLTOGRRLV... : 278
A1V : IVERSSEARLTOGRRLV... : 269
BKV : IVERSSEARLTOGRRLV... : 270
EMCV : LPMASSEARLTOGRRLV... : 263
TEMV : LPMASSEARLTOGRRLV... : 263
ERBV1 : LPEVADLAH... : 253
ERBV3 : LPEVADLAH... : 253
FMDVA : IPEMASSEARLTOGRRLV... : 253
FMDVC : IPEMASSEARLTOGRRLV... : 253
FMDVO : IPEMASSEARLTOGRRLV... : 253
HEVB : VPEMASSEARLTOGRRLV... : 268
HEVC : IPEMASSEARLTOGRRLV... : 267
PV : IPEMASSEARLTOGRRLV... : 268
HRV2 : IPEMASSEARLTOGRRLV... : 262
LV145SL : TVEMADTE... : 271
LV174F : TVEMADTE... : 270
LV : TVEMADTE... : 270
PTV : IPEMASSEARLTOGRRLV... : 255

```

3C

```

      80          *          100          *          120          *          140
YZ : TGLAAGKNVTFG... : 86
CL : TGLAAGKNVTFG... : 86
AEV : NGLCYDYI... : 99
HAV : NALGKDDW... : 101
A1V : SGFY... : 87
BKV : SALLY... : 99
EMCV : TCLR... : 97
TEMV : SCLR... : 106
ERBV1 : CGTY... : 143
ERBV3 : CGTY... : 142
FMDVA : CATG... : 101
FMDVC : CATG... : 101
FMDVO : CATG... : 101
HEVB : TMLG... : 98
HEVC : TMLG... : 98
PV : TMLG... : 98
LV174F : HCAA... : 97
LV : HCAA... : 97
PTV : TVLF... : 99
HRV2 : TGLG... : 98
LV145SL : HCAA... : 97

```

```

      *          160          *          180          *          200          *          220
YZ : LIAT--EDYRNG--... : 145
CL : LIAT--EDYRNG--... : 145
AEV : HEST--EENIRRAEGMPGT... : 171
HAV : HEIK--KGDVPRALNRLAT... : 173
A1V : FICA--HPYP--... : 144
BKV : ELGS--HPYP--... : 146
EMCV : KFKAGDVLPTG--AADVT... : 160
TEMV : KFCNKDDPAR--NDVT... : 169
ERBV1 : HLA--STLEIR--GKPV... : 205
ERBV3 : HLA--YTLPT--GKPV... : 204
FMDVA : HER--DTARMKKT... : 164
FMDVC : HER--DVARMKKT... : 164
FMDVO : HER--DVARMKKT... : 164
HEVB : FLAK--EEVEVN--... : 148
HEVC : HIPT--QITEFN--... : 148
PV : HIPT--QITEFN--... : 148
LV174F : YTT--EVGKET--... : 155
LV : YTT--EVGKET--... : 155
PTV : NFII... : 159
HRV2 : YIPN--NEDDYF--... : 149
LV145SL : YTT--EVGKET--... : 155

```

图 6 DHV 分离株 YZ 株和 CL 株与其他小 RNA 病毒 2C 和 3C 基因的氨基酸序列比较

Fig. 6 Alignment of the amino acid sequences of 2C and 3C gene of DHV strains YZ and CL with other Picornaviridae virus

3D

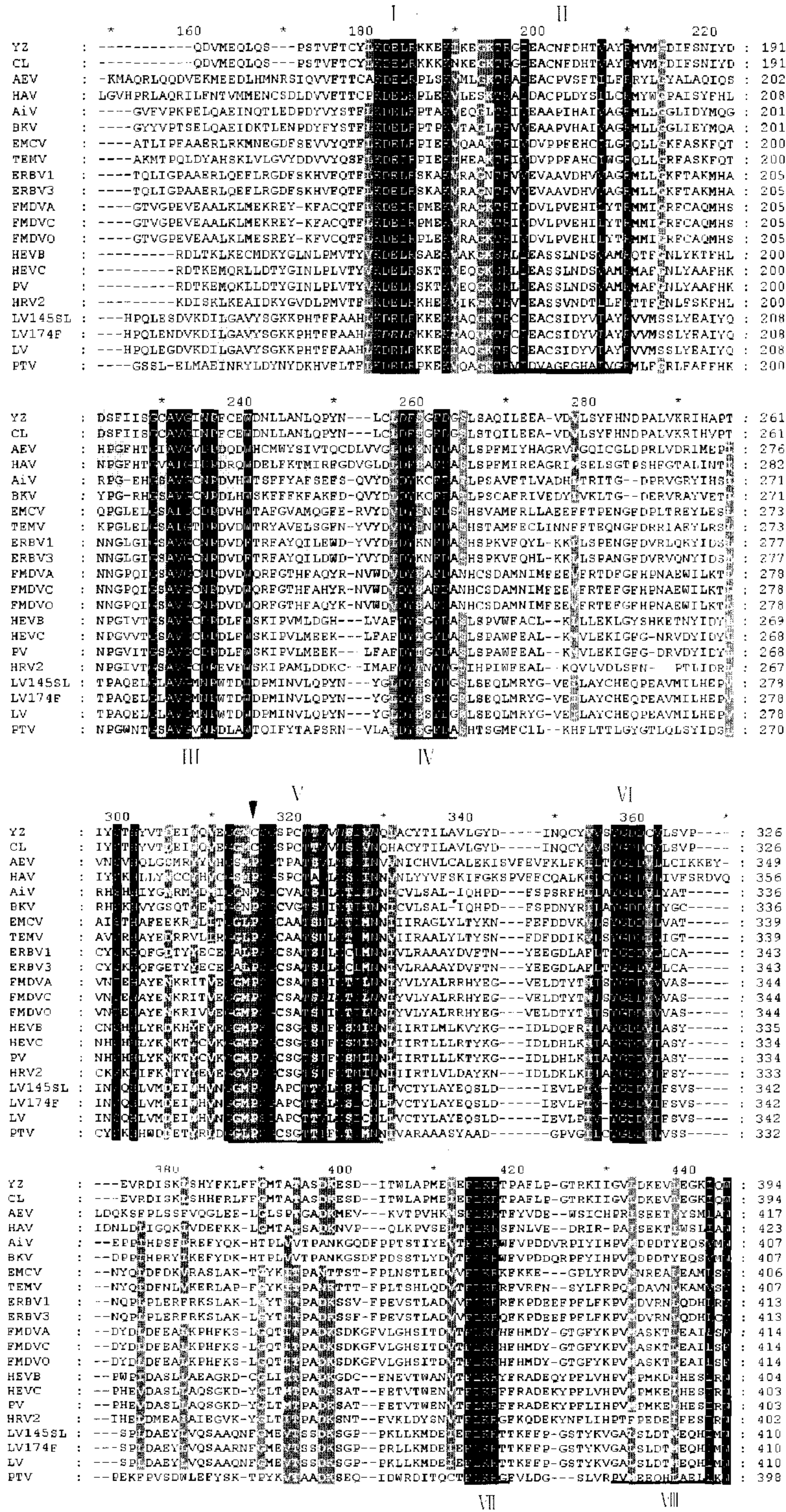


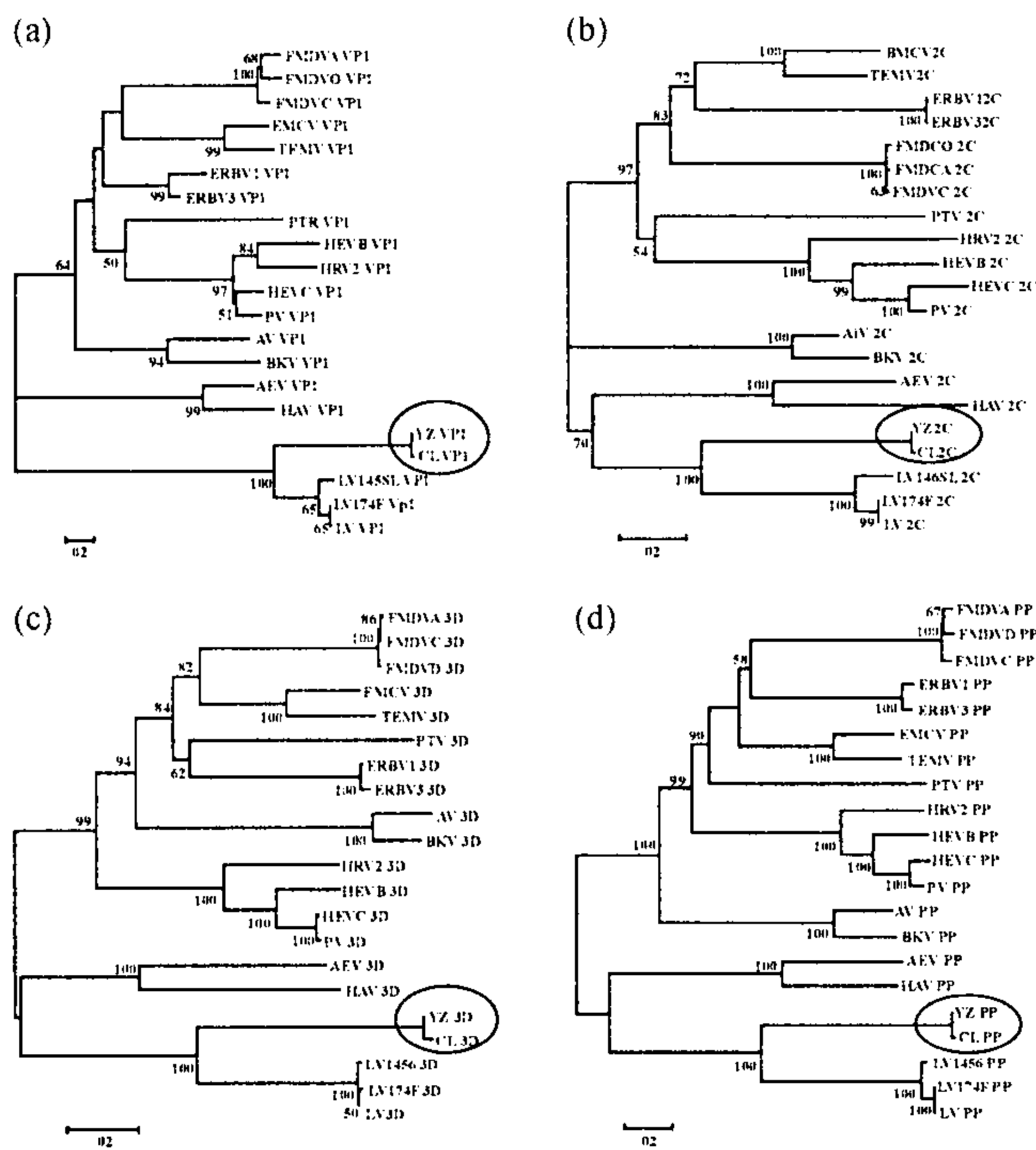
图7 DHV 分离株 YZ 株和 CL 株与其他小 RNA 病毒 3D 基因的氨基酸序列比较

Fig. 7 Alignment of the amino acid sequences of 3D gene of DHV strains YZ and CL with other Picornaviridae virus

2.3 系统发育分析

应用 MEG4.0 软件对小 RNA 病毒的多聚蛋白、VP1、2C 和 3D 等基因的氨基酸序列进行比较,构建了 N-J 遗传关系树(图 8)。可以看出,小 RNA 病毒的遗传分组与已知各属的分类相一致,基于多聚蛋

白、VP1、2C 和 3D 的遗传关系分析结合各基因氨基酸序列相似性结果均表明,DHV 毒株与副肠孤病毒属关系最为密切,分布在同一个群中,但 DHV 毒株占据一个清晰的遗传谱系。



a: VP1 基因; b: 2C 基因; c: 3D 基因; d: 多聚蛋白基因  
图 8 DHV 与小 RNA 病毒之间的遗传关系分析

Fig. 8 Phylogenetic relationship of DHV with representative species of other Picornaviridae virus

### 3 讨论

#### 3.1 非编码区(UTR)

小 RNA 病毒 5'UTR 中的内部核糖体进入位点(IRES)共分为 I、II、III 和 IV 4 种类型<sup>[10]</sup>, DHV 分离株 YZ 株和 CL 株的 5'非编码区所含的基序 Yn-Xm-AUG 为 Y5-X68-AUG-CA-AUG, 不同于小 RNA 病毒 II 型 IRES, Ding 等<sup>[8]</sup>的研究认为 DHV 的 IRES 应属于 IV 型 IRES. 小 RNA 病毒的 3'UTR 一般为 40 nt ~ 237 nt<sup>[11]</sup>, 而 DHV 分离株的 3'UTR 的长度为 314 nt, 为小 RNA 病毒中最长的 3'UTR. DHV 在 3'UTR 的长度以及折叠模式上与其他小 RNA 病毒存在显著差异, 推断有 5 个茎环结构. poly(A) 的长度与负链 RNA 的合成效率及病毒 RNA 的感染能力有关<sup>[4]</sup>, 一般认为 poly(A) 链越长, 感染能力越强. 本研究发现, YZ 株有 23 个 polyA 尾, CL 株有 19 个 polyA 尾, 但 YZ 株对雏鸭的致病力较 CL 株偏弱, 所以 poly(A) 链的长度与其感染能力的关系有待进一步研究.

#### 3.2 结构蛋白

DHV 2 株分离株的 VP0 蛋白均含有一保守的四肽 CPRP, 而在大多数小 RNA 病毒的 VP1 蛋白中也发现有 CPRP, 这表明小 RNA 病毒不同的衣壳蛋白可能参与一些保守的功能<sup>[12]</sup>. VP3 蛋白的 N 端存在富含碱性氨基酸、约 20 aa 长的区域(GKRKPRRRPI-

HKPKNPPQEP), 副肠孤病毒中的类似区域被证实具有很强的免疫原性<sup>[13]</sup>. DHV 2 株分离株的 VP1 蛋白缺少 RGD(Arg-Gly-Asp) 基序, 而部分小 RNA 病毒的 RGD 基序能介导细胞之间及病毒-宿主之间的相互作用<sup>[14]</sup>. 小 RNA 病毒中 VP1 蛋白作为主要的宿主保护蛋白, 编码主要的抗原位点并具有主要的型特异性中和位点<sup>[15]</sup>, 因此结构蛋白中以 VP1 变异最大. 但因 DHV 2 株分离株血清型均为 1 型, 所以 VP1 蛋白之间仅有 9 个氨基酸发生改变, 氨基酸序列相似性高达 96.2%.

#### 3.3 非结构蛋白

YZ 和 CL 分离株的 P2 区存在 3 个不相关的 2A 蛋白基序, 其中 2A1 蛋白与 2A2 蛋白之间含有类口蹄疫病毒属的 2A 蛋白裂解位点 NPG ↓ P<sup>[12]</sup>. DHV 的 2A2 蛋白由 161 个氨基酸组成, 经 NCBI Blast 比对, 该蛋白表现出与 GTPase 免疫相关蛋白家族(GI-MAP1-9)十分相似的特征, 含有 GxxxxGKS(G1), xTx(G2), DxxG(G3), NKxD(G4), xCAx(G5) 等基序, 基序 G1-G5 具有 GTP 结合域的特征. GTPase 和 GTP 结合蛋白随时都能进行表达以调节细胞的生理过程. 此外, 该蛋白还包含了 AIG1 蛋白(AAG52213)独特的保守区域 CB(LSxPGPHALLLVxQLG-Rx-TxED)<sup>[16]</sup>. 而邻近的 2A3 蛋白则与副肠孤病毒属、AEV 和 AiV 等病毒的 2A2 蛋白类型相似, 含有 3 个结构域, 一个保守的组氨酸及两侧氨基酸(H-box: RHYGV), 一个天冬酰胺-半胱氨酸-谷氨酸-苏氨酸形成的二肽(NCET). 已证实小 RNA 病毒的 H-NC 2A 蛋白可能在控制细胞生长方面起作用<sup>[17]</sup>. 小 RNA 病毒的 2A 蛋白在进化过程中功能已发生了改变<sup>[18]</sup>, 因此, DHV 2A 蛋白的功能尚需进一步研究. YZ 和 CL 分离株的 2C 蛋白含有螺旋酶的保守基序 EPxxxxxxGxxGxGK(S/T), QxxxxxDDxxQ 和 KGxxxx-SxxxxxS/T, 但 KGxxxxSxxxxxS/T 基序中的 S 改变为 G, 2C 蛋白具有 ATP 酶活性, 尚不确定是否具有螺旋酶的活性<sup>[19]</sup>. 小 RNA 病毒的 3C 蛋白含有由组氨酸、天门冬氨酸/谷氨酸和半胱氨酸组成的催化三联体, 参与裂解大部分多聚蛋白的裂解功能. YZ 和 CL 分离株的 3C 蛋白分别位于 H38-D69-C154, 半胱氨酸残基位于 GSCG 基序中, 保守基序 GxCG 在小 RNA 病毒科其他病毒属中被认为是 3C 蛋白酶的活性位点<sup>[20]</sup>. 此外, 在 3C 蛋白中还存在高度保守的基序 GxHxxG, 该基序的功能尚不清楚. 所测定的 YZ 和 CL 分离株的 3D 蛋白含有 8 个基序, 其中 KDELR(基序 I)、YGDD(基序 VI)和 FLKR(基序 VII)是高度保守的, 而 GxAxGxxPxxxW/F(基序 III)、DxxxxxD(基序 IV)、GxxxSGxxxTxxxNx(基序 V)相对保守, 这些严格保守的残基可能形成小 RNA 病毒科 RdRp 二级三级结构的关键部位. 其他小 RNA 病毒的 GxxxSGxxx-

TxxxNx 基序均为 PSG, 而 YZ 和 CL 分离株的该基序为 CSG, 该处氨基酸 P→C 的改变与 3D 蛋白功能的相关性值得关注。

### 3.4 分类地位

目前 DHV 在小 RNA 病毒科中的分类地位尚不明确, 如何才能较为准确的确定 DHV 的分类地位值得讨论. 在小 RNA 病毒科中, 2C 和 3D 作为保守性较强的功能蛋白常被用于分析小 RNA 病毒不同属之间的遗传关系. 而 VP1 变异最大, 也适合于小 RNA 病毒属和种之间的遗传关系分析<sup>[21]</sup>. Oberste 等<sup>[22]</sup>曾报道以 VP1 基因的核苷酸和氨基酸的序列相似性来鉴定肠道病毒属的血清型, 如果氨基酸序列相似性达到 34%~55% 或核苷酸序列相似性达到 44%~58% 即可划为同一属. 而 DHV 分离株与副肠孤病毒属 VP1、2C 和 3D 基因之间的氨基酸序列相似性最高, 分别为 27.8%~28.3%, 33.3%~34.8% 和 37.7%~38.0%, 均达不到上述标准, 所以不能将 DHV 划为副肠孤病毒属. 基于小 RNA 病毒多聚蛋白、结构蛋白 VP1 和非结构蛋白 2C、3D 的系统进化树也表明, DHV 虽与副肠孤病毒属关系最为密切, 但 DHV 占据一个清晰的独立遗传谱系, 结合 DHV 基因组 5' 和 3'UTR 独特的长度和结构特点, 建议将 DHV 单独划属.

#### 参考文献:

- [1] SAIF Y M. 禽病学[M]. 11 版. 北京: 中国农业出版社, 2004:376-384.
- [2] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1997:468-478.
- [3] CAMERON C E, GOHARA D W, ARNOLD J J. Poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol): structure, function, and mechanism[M]//SEMLER B L, WIMMER E. Molecular biology of picornaviruses. Washington: ASM Press, 2002:255-267.
- [4] SIVESTRI L S, PARILLA J M, MORASCO B J, et al. Relationship between poliovirus negative-strand RNA synthesis and the length of the 3' poly (A) tail[J]. Virology, 2006, 345(2):509-519.
- [5] KIM M C, KWON Y K, JOH S J, et al. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 reveals a novel lineage close to the genus parechovirus in the family Picornaviridae[J]. J Gen Virol, 2006, 87:3307-3316.
- [6] TSENG C H, TSAI H J. Molecular characterization of a new serotype of duck hepatitis virus[J]. Virus Res, 2007, 126(2):19-31.
- [7] TSENG C H, KNOWLE N J, TSAI H J. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 indicates that it should be assigned to a new genus[J]. Virus Res, 2007, 123(2):190-203.
- [8] DING C Y, ZHANG D B. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1[J]. Virology, 2007, 361(1):9-17.
- [9] ZUKER M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction[J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31(13):3406-3415.
- [10] CHARD L S, KAKU Y, JONES B, et al. Functional analyses of RNA structures shared between the internal ribosome entry sites of hepatitis C virus and the picornavirus porcine teschovirus 1 Talfan[J]. J Virol, 2006, 80(3):1271-1279.
- [11] YAMASHITA T, SAKAE K, TSUZUKI H, et al. Complete nucleotide sequence and genetic organization of Aichi virus, a distinct member of the Picornaviridae associated with acute gastroenteritis in humans[J]. J Virol, 1998, 72(10):8408-8412.
- [12] JOHANSSON E S, NIKLASSON B, MAIZEL J, et al. Molecular analysis of three Ljungan virus isolates reveals a new, close-to-root lineage of the Picornaviridae with a cluster of two unrelated 2A proteins[J]. J Virol, 2002, 76(17):8920-8930.
- [13] JOKI-KORPELA P, ROIVAINEN M, LANKINEN H, et al. Antigenic properties of human parechovirus 1[J]. J Gen Virol, 2000, 81:1709-1718.
- [14] BOONYAKIAT Y, HUGHES P J, GHAZI R, et al. Arginine-glycine-aspartic acid motif is critical for human parechovirus 1 entry[J]. J Virol, 2001, 75(20):10000-10004.
- [15] MUIR P, KAMMERER U, KORN K, et al. Molecular typing of enteroviruses: current status, future requirements[J]. Clin Microbiol Rev, 1998, 11(1):202-227.
- [16] SPRANG S R. G protein mechanisms: insights from structural analysis[J]. Annu Rev Biochem, 1997, 66:639-678.
- [17] HUGHES P J, STANWAY G. The 2A proteins of three diverse picornaviruses are related to each other and to the H-rev107 family of proteins involved in the control of cell proliferation[J]. J Gen Virol, 2000, 81:201-207.
- [18] HUGHES A L. Phylogeny of the Picornaviridae and differential evolutionary divergence of picornavirus proteins[J]. Infect Genet Evol, 2004, 4(2):143-152.
- [19] PRISTER T, JONES K W, WIMMER E. A cysteine-rich motif in poliovirus protein 2C (ATPase) is involved in RNA replication and binds zinc in vitro[J]. J Virol, 2000, 74(1):334-343.
- [20] YAMASHITA T, SAKAE K, TSUZUKI H, et al. Complete nucleotide sequence and genetic organization of Aichi virus, a distinct member of the Picornaviridae associated with acute gastroenteritis in humans[J]. J Virol, 1998, 72(10):8408-8412.
- [21] MULDER M N, SALMINEN M, KALKKINEN N, et al. Molecular epidemiology of coxsackievirus B4 and disclosure of the correct VP1/2Apro cleavage site: evidence for high genomic diversity and long-term endemicity of distinct genotypes[J]. J Gen Virol, 2000, 81:803-812.
- [22] OBERSTE M S, MAHER K, PALLANSCH M A. Molecular phylogeny and proposed classification of the simian picornaviruses[J]. J Virol, 2002, 76(3):1244-1251.

【责任编辑 柴 焰】