

# 乌鸡传染性法氏囊病毒的分离鉴定与分子生物学特性研究

李道敏<sup>1</sup>, 李婉涛<sup>2</sup>, 张春杰<sup>1</sup>, 李银聚<sup>1</sup>, 吴庭才<sup>1</sup>, 程相朝<sup>1</sup>

(1 河南科技大学, 河南 洛阳 471003; 2 郑州牧业工程高等专科学校)

**摘要:** 从一群精神不振、拉白色稀粪便为特征的乌鸡中分离到 1 株病毒。经血清学试验、鸡胚接种试验、动物回归试验等鉴定为法氏囊病毒。该病毒与鸡法氏囊病毒的血清型无明显差异。根据 IBDV 的 VP2 基因序列设计了一对特异性引物, 应用 RT-PCR 法从中扩增出了一条 0.72kb 的 VP2 基因高变区片段。序列分析表明, 片段长 0.72kb, 编码 240 个氨基酸, 与其他毒株的 VP2 基因序列比较分析, 该毒株符合 IBDV 超强毒的特征。虽然有 4 处氨基酸发生了变化, 但没有引起其抗原性的改变。

**关键词:** 乌鸡; 法氏囊病毒; 分离; 鉴定; 序列分析

**中图分类号:** S858.31    **文献标识码:** A    **文章编号:** 1004-3268(2004)09-0079-03

## Studies on Isolation and Identification of Dark-bone Chicken Infectious Bursal Disease and Its Molecular Biology Characters

LI Dao-min<sup>1</sup>, LI WAN-Tao<sup>2</sup>, ZHANG Chun-jie<sup>1</sup>, LI Yin-ju<sup>1</sup>, WU Ting-cai<sup>1</sup>, CHENG Xiang-chao<sup>1</sup>

(1 Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China;

2 Zhengzhou College of Animal Husbandry Engineering)

**Abstract:** A field virus isolated from the dark-bone chicken determined to be an infectious bursal disease virus (IBDV) by chicken embryo inoculation test, agar-gel diffusion test and animals test. The virus serotype had no obvious difference with chicken IBDV. A cDNA encoding IBDV VP2 was cloned from this virus strain by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Sequence analysis showed that a part of variable VP2 region of IBDV was 720bp and encoded 240 amino acids. Compared with very-virulent IBDV, the VP2 gene sequence of dark-bone chicken strain possessed completely the characteristics of very-virulent IBDV. The amino acids varied at 4 sites didn't cause the change of antigenicity.

**Key words:** Dark-bone chicken; Infectious bursal disease virus (IBDV); Isolation; Identification; Sequence analysis

传染性法氏囊病病毒(IBDV)是引起禽免疫抑制性疾病的主要病原体。主要表现为法氏囊肿大、充血、出血, 胸肌、腿肌呈斑块状或条纹状出血, 肌胃和腺胃交界处条纹状出血等病理变化。

临床表现为腹泻、颤抖、极度虚弱。病程短、发病率高, 呈尖峰式死亡, 对养禽业危害极大。IBDV有两个血清型, I型对鸡有致病性, 麻雀、鹌鹑偶可感染发病, 火鸡感染而不发病, 鸭、鹅不易感

收稿日期: 2004-02-18

基金项目: 河南省中青年骨干教师资助项目(2001193)

作者简介: 李道敏(1966-), 女, 河南社旗人, 在读硕士, 主要从事畜禽疫病防治及其产品质量评价的教学和科研工作。

染<sup>[1]</sup>；Ⅱ型未发现致病的报道。由于Ⅰ型又分多个亚型，变异株和强毒株不断出现，其他禽类法氏囊病的发生也逐渐增多<sup>[2]</sup>。为此，从当地发病的乌鸡病例中对IBDV进行了分离、鉴定，并对VP2高变区的基因变化进行了研究，旨在从分子水平对IBDV分子生物学特性及其对不同品种鸡的致病特点进行探索。

## 1 试验材料

发病乌鸡来源于洛阳郊区某鸡场的35日龄乌鸡。鸡胚为无IBD母源抗体的乌鸡种蛋，自孵至10日龄；雏鸡为无IBD母源抗体的土种雏鸡。IBDVⅠ型标准阳性血清及标准抗原取自哈尔滨兽医研究所。0.5%红细胞悬液，利用健康鸡血液分离制备。EcoRI、PstI及RNA提取试剂盒为华美生物工程公司产品；一步法RT-PCR扩增试剂盒为大连宝生物工程公司产品。其他所用试剂均为分析纯。

## 2 试验方法

### 2.1 病毒的分离

无菌取法氏囊、脾脏，加5倍PBS液研碎，反复冻融3次，4℃条件下4 000 r/min离心30 min，取上清液加双抗（青霉素、链霉素各2 000 IU/mL），菌检呈阴性后，接种于10日龄鸡胚绒毛尿囊膜表面，0.2 mL/枚；同时以生理盐水作对照组。继续孵化，取36 h后死亡胚（尿囊液混浊者不用）及72~96 h未死胚，无菌取水肿增厚的绒毛尿囊膜，加5倍的PBS研碎制成悬液，反复冻融3次，4℃条件下以4 000 r/min离心30 min，取上清液备用。

### 2.2 病毒的鉴定

2.2.1 琼扩试验 按常规方法进行。在琼脂平皿上梅花形打孔，每孔直径3 mm。中间孔内加IBDVⅠ型标准阳性血清，①、④孔加标准抗原，②、⑤孔加生理盐水，③、⑥孔加被检抗原。待孔中液体吸收完全后，倒置于湿盒中，37℃温育，48~72 h判断结果。

2.2.2 氯仿敏感试验 分离的病毒悬液与氯仿按1:1(v/v)混合振荡15 min。4℃条件下以4 000 rpm/min离心20 min，取上清液；经绒毛尿囊膜途径接种于10日龄无母源抗体的鸡胚中，

0.2 mL/枚，每日照蛋观察。

2.2.3 红细胞凝集试验 按常规方法进行。

2.2.4 回归试验 取隔离饲养至20日龄后无IBD母源抗体土种雏鸡60只，将分离的病毒悬液按1:5倍稀释处理。每只鸡滴鼻、口服0.5 mL。观察记录发病情况及病理变化。

2.2.5 防治试验 对发病乌鸡群注射高免卵黄液1 mL/只，连用2 d，跟踪观察治疗效果。

2.2.6 IBDV VP2基因高变区的克隆与序列分析 将绒毛尿囊膜剪碎，加入变性液继续捣碎，按RNA提取试剂盒的要求提取总RNA。按一步法RT-PCR扩增VP2高变区基因并克隆到PMD18-T载体，经鉴定后送大连宝生物工程公司测序。

## 3 结果

### 3.1 病毒分离

鸡胚接种后48~96 h陆续出现死亡胚。具有水肿、皮肤充血、点状出血，绒毛尿囊膜水肿增厚等相似的病变。对照组则无相应的病理变化。

### 3.2 病毒鉴定结果

3.2.1 琼扩试验 72 h后观察琼脂平皿，①、④、③、⑥各孔与中间孔之间均形成白色致密沉淀线，②、⑤孔与中间孔之间没有沉淀线出现，说明抗原抗体间特异的结合，被检抗原为IBDV。

3.2.2 氯仿敏感试验 分离到的病毒以氯仿处理后接种鸡胚，72~96 h陆续出现死亡。鸡胚全身水肿，皮肤出血，尿囊膜增厚。说明分离到的病毒对氯仿不敏感，与IBDV的理化特性相符。

3.2.3 红细胞凝集试验 没有出现血凝现象，排除了新城疫病毒感染的可能性。

3.2.4 回归试验 供试雏鸡接种被分离病毒48 h后，陆续出现精神不振，饮水增多现象。72 h左右有不同程度的法氏囊增大，个别囊内有黄色干酪样物；7只在胸肌、腿肌有斑块状出血，9只鸡肌胃、腺胃交界处有条纹状出血。

3.2.5 防治试验 发病鸡接种高免卵黄液后，第1天死亡明显减少，第3天病情基本得到控制。说明高免卵黄对乌鸡IBD有明显疗效。

3.2.6 病毒VP2基因高变区核苷酸序列与氨基酸序列分析 将克隆的IBD-VP2基因送大连宝生物工程公司进行序列测定。将所测得的VP2基因序列及其推导的氨基酸序列分别与标准血清

I 型毒株 STC、超强毒株 UK661 和从当地发病鸡群中分离的超强毒株 HN01 进行比较分析。与 UK661 相比发现在 248 位(L→F)、256 位(V→I)、320 位(Q→H)及 349 位(V→I)4 处氨基酸发生了变异。与 HN01 相比,在 320 位(Q→H)、349 位(V→I)、375 位(P→S)及 381 位(K→R)4 处氨基酸发生了变异。

4 讨论

从当地乌鸡发病鸡群中分离到 1 株毒株,经鸡胚接种、血清学试验、氯仿敏感试验、动物回归试验及防治试验,证明了分离到的毒株为 IBDV。乌鸡 IBD 在流行病学、临床症状和病理学变化等方面与鸡的 IBD 较为相似。这与有关的报道<sup>[3]</sup>一致。在血清学试验中,所应用的阳性血清来源于鸡,鸡胚接种为乌鸡鸡胚,动物回归试验及治疗性试验选用雏鸡。对试验结果分析,乌鸡 IBDV 与鸡 IBDV 在血清型上无明显差异。通过对乌鸡 IBDV VP2 高变区的核苷酸和氨基酸序列分析发现,该毒株的第 222、249、254、279、284、294 和 299 位上的氨基酸分别为 A、Q、G、D、A、I 和 S,且七肽区的氨基酸序列为 SWSASGS。这些都具有超强毒株的主要分子生物学特征<sup>[4~6]</sup>。由此说明,试验分离到的乌鸡 IBDV 为超强毒株,与分离于当地鸡的 IBDV VP2 基因高变区相比有 4 个氨基酸差异,这些差异可能影响到病毒的毒力。但

血清学试验表明,这些氨基酸变化没有导致其抗原性的改变。从而提示我们,在目前 IBD 流行过程中,以强毒株为主。虽然乌鸡 IBD 在流行病学、临床症状和病理变化与鸡有相似的改变,但其分子生物学特性不尽相同。随着病毒在不同宿主中的适应性增强,最终可能导致变异株的出现和抗原性的改变。因此,对不同品种鸡 IBDV 分子生物学跟踪研究,对治疗和控制 IBD 将起到十分重要的作用。

参考文献:

[ 1 ] 蔡宝祥. 家畜传染病学[ M] . 北京: 中国农业出版社, 2002. 321— 324.  
[ 2 ] 甘肃农业大学. 兽医微生物学[ M] . 北京: 中国农业出版社, 2000. 363.  
[ 3 ] 周碧君, 李永民, 吴彤, 等. 乌骨种鸡群暴发传染性法氏囊病[ J] . 中国畜禽传染病, 1994(5): 28— 29.  
[ 4 ] 曹永长, 毕英佐, 罗文新, 等. 传染性法氏囊病毒变异株主要免疫原基因 cDNA 的克隆及鉴定[ J] . 中国兽医杂志, 1997, 23(9): 3— 5.  
[ 5 ] 曹永长, 毕英佐, 梁志清, 等. 超强 IBD 毒株宿主保护抗原分子特征[ J] . 中国兽医学报, 1998, 18(6): 521— 526.  
[ 6 ] Dormitorio TV, Giambron J J, duck L W. Sequence Comparisons of the Variable VP2 region of infectious bursal disease virus isolates[ J] . Avian Dis 1997, 41 (1): 36— 44.

《植物遗传资源学报》简介

《植物遗传资源学报》是中国农业科学院和中国农学会联合主办的专业性学术期刊, 由中国工程院院士董玉琛研究员担任主编。2000 年创刊, 2003 年国内外公开发行。国内刊号 CN11— 4996/S, 国际统一刊号 ISSN 1672— 1810。

报道内容: 大田、园艺作物, 观赏、药用植物, 林用植物、草类植物及其一切经济植物的有关植物遗传资源基础研究、应用研究方面的研究成果、创新性学术论文和高水平综述或评论。诸如, 种质资源的考察、收集、保存、评价、利用、创新、信息学、管理学等; 以及起源、演化、分类等系统学; 基因发掘、鉴定、克隆、基因文库建立、遗传多样性研究。

读者对象: 从事植物遗传资源科学研究工作的人员, 各有关大专院校的师生, 农业行政和推广人员。  
季刊, 大 16 开本, 2005 年由 96 页扩版至 108 页。定价仍为 10 元, 全年 40 元。各地邮局发行, 邮发代号: 82— 643。

本刊编辑部常年办理订阅手续, 如需邮挂每期另加 2 元。  
地 址: 北京市中关村南大街 12 号 中国农业科学院《植物遗传资源学报》编辑部。  
联系电话: 010— 62186657 62180279(兼传真) 邮 编: 100081  
电子信箱: zwyczyxb2003@sina.com zwyzyxb2003@163.com