

鴨病毒性肝炎病毒之核酸定序與毒力因子分析

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC- 90-2313-B-002-312

執行期間： 90 年 8 月 1 日至 91 年 7 月 31 日

計畫主持人：蔡向榮

共同主持人：

計畫參與人員：

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：國立台灣大學獸醫學系

中華民國 91 年 12 月 23 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫編號：NSC- 90-2313-B-002-312

執行期限：90 年 8 月 1 日至 91 年 7 月 31 日

主持人：蔡向榮 執行機構及單位名稱：國立台灣大學獸醫學系

題目：鴨病毒性肝炎病毒之核酸定序與毒力因子分析

中文摘要

完成鴨病毒性肝炎 (Duck Viral Hepatitis) 病毒基因體 8,283 bp 之核酸定序，由核酸定序之結果顯示此 DVH 病毒應屬 *Picornaviridae* 之一員，但應是一新的病毒屬。DVH 病毒基因體是由一 6,978 bp 之核酸序列組成之單一開放讀碼區，其轉譯成 2,325 個氨基酸之 polyprotein。於 polyprotein 5 端之 5' NTR (Non-Translation-Region) 全長為 1,007 bp，3 端之 3' NTR 全長為 235 bp，至於 poly-A tail 則為 67 bp。DVH 病毒之 polyprotein 氨基酸序列經由比對之結果顯示，其與 *Picornaviridae* 之 9 個病毒屬中之 *enterovirus* 及 *rhinovirus* 較為相似，但一致性也分別只有 25.5% 及 24.3%。而且於 DVH 病毒之 polyprotein 序列中具有一 268 個氨基酸之 L 蛋白質，此為 *enterovirus* 及 *rhinovirus* 所未具備的。此外以 DHV 病毒之 3D 及 polyprotein 之氨基酸序列行演化樹之分析，結果發現 DVH 病毒均應為一獨立之病毒屬，而且其 bootstrap 值均高達 99% 與 100%，因

此我們相信 DVH 病毒應為 *Picornaviridae* 的一個新的病毒屬。

關鍵詞：

鴨病毒性肝炎：Duck Viral Hepatitis， 基因體：Genome， 小核糖核酸
病毒：*Picornaviridae*

Abstract

In this project, complete genome sequence of non type 1 duck viral hepatitis virus (DHV) was resolved for the first time. It was showed that the genome of the DHV composed of 8,283 bp, and the virus should be belonged to a new genus in *Picornaviridae*. The virus had a 6,978 bp long open reading frame which was translation into a polyprotein with 2,325 aa. The 3' NTR (non-translation-region) of the polyprotein was 235 bp in size and the poly A tail a size if 67 bp. It was showed that the amino acid sequence of DHV was most similar to enterovirus and rhinovirus in the *Picornaviridae* family, but only with 25.5% and 24.3% homology. Besides, DHV possessed a 268 aa L protein which was lacking in both enterovirus and rhinovirus. Pylogenetic analysis of the amino acid sequence of the 3D and the polyprotein region, it was showed by a bootstrap value of 99% and 100%

that DHV should be belonged to a new genus in *Picornavirudae*.

Keywords: Duck Viral Hepatitis, Genome, *Picornavirudae* .

二、緣由與目的

鴨病毒性肝炎 (Duck Viral Hepatitis; DVH) 主要發生在幼鴨，為一高死亡率、快速傳播的病毒性疾病，並以肝炎為主要病變特徵，鴨病毒性肝炎病毒(DHV)可分成三型，其中 DHV 1，病原性最強，感染 3 週齡以內小鴨可造成感染鴨隻 90%之致死率。台灣曾分別於 1972 與 1990 年爆發兩次大流行。鴨病毒性肝炎第 1 型病毒 (DHV 1) 之分類目前暫定為 *Picornaviridae*，目前已發現具有血清學上相異的變異株 (variant) 產生。第 2 型之病原為 *astrovirus*，第 3 型的病原則同第 1 型為 *Picornavirus* 但彼此間抗原性並無相關。DVH 第 1 型的發病率可達 100% ，而死亡率則依年齡不同而異。病鴨常在症狀發生後一小時內死亡。死後剖檢，病變主要在肝臟，以肝細胞的壞死為主。鴨病毒性肝炎自 1949 年於美國長島首次發生造成小鴨大量急速死亡，至今已經過半個世紀，但是尚無對 DHV 核酸與蛋白質研究之報告，因此進行 DHV 核酸與蛋白質之分析對 DHV 之診斷及控制是必要的。

三、材料與方法

依據 *Picornaviridae* 各病毒屬之胺基酸序列比對 (alignment) 之結果，於

較穩定 (conserve) 之 VP2 N 端及 3D 部份，分別設計 degenerate primer，以 RT-PCR 方式分別增幅出 VP2 N 端 (terminal) 及 3D 部份之核酸產物，以 LD RT-PCR (long distance) 增幅出 VP2 至 3D 之 5,204 bp 之核酸產物，再以 primer walking 方式完成定序。以 5' 及 3' Rapid Amplification of cDNA ends (RACE) 方式完成 DHV 1 之 5' 及 3' 兩端之序列，最後以 Guanylation of mRNA 方式完成 3' 之 poly-A 長度之確認，並以 in vitro transcription 之 DHV 1 cRNA 轉染 (transfection) 鴨腎臟細胞以確認完成完整的 DHV 基因體序列。

四、結果與討論

本試驗已完成完整之 DHV 病毒基因體 8,283 bp 之核酸定序。DHV 之 polyprotein 胺基酸序列經由比對 (alignment) 之結果顯示，其與 *Picornaviridae* 之 9 個病毒屬中之 *enterovirus* 及 *rhinovirus* 較為相似，但一致性也分別只有 25.5% 及 24.3%。而且於 DHV 病毒之 polyprotein 序列之 N 端前具有一個由 268 個胺基酸組成之 L 蛋白質，此為 *enterovirus* 及 *rhinovirus* 所未具備的。此外以 DHV 病毒之 3D 及 polyprotein 之胺基酸序列行演化樹之分析，結果均發現 DHV 病毒應為一獨立之病毒屬，而且其重現性 (bootstrap value) 分別高達 99% 與 100%，因此我們相信 DHV 1 應為 *Picornaviridae* 的一個新的病毒屬。由蛋白質電泳之結果顯示 DHV 具有

4 個結構蛋白，與 *Picornaviridae* 的結構是符合的，此外以原核表達系統已順利表達 DHV 之 VP1 結構蛋白。

五、計畫成果自評

本計畫第二年，已將鴨病毒性肝炎病毒之基因體全長定序完成，此為目前已知之鴨病毒性肝炎病毒之首段核酸序列，且經比對分析結果顯示本病毒應屬於 *Picornaviridae* 中之一個新的病毒屬，對促進對 *Picornaviridae* 之了解有相當之貢獻。此外藉由此段核酸序列之資料，可繼續發展本病之反轉錄聚合酶鏈反應（RT-PCR）及核酸探針雜交等的快速診斷方法之建立，以解決目前對鴨病毒性肝炎病毒分離之耗時費力的困擾。

六、參考文獻

1. Ahmed AA, El-Abdin TZ, Hamza S. 1975. Effect of experimental duck virus hepatitis infection on some biochemical constituents and enzymes in the serum of white Peking ducklings. *Avian Dis* 19: 305-310.
2. Davis D. 1987. Duck hepatitis virus: adaptation of a plaque assay to determine 50 per cent end points with duck sera. *Res Vet Sci* 42: 167-169.
3. Davis D, Woolcock PR. 1986. Passage of duck hepatitis virus in cell cultures derived from avian embryos of different species. *Res Vet Sci* 41: 133-134.
4. Fitzgerald JE, Hanson LE. 1996. Certain properties of a cell-culture-modified duck hepatitis virus. *Avian Dis* 10: 157-161.

5. Fitzgerald JE, Hanson LE, Simon J. 1969. Histopathologic changes induced with duck hepatitis virus in the developing chicken embryo. *Avian Dis* 13: 147-157.
6. Friend M, Trainer DO. 1972. Experimental duck virus hepatitis in the mallard. *Avian Dis* 16: 692-699.
7. Gough RE, Wallis AS. 1986. Duck hepatitis type I and influenza in mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Vet Rec* 24: 602.
8. Gow JW, McGill MM, Behan PO. 1996. Long RT-PCR amplification of full-length enterovirus genome. *Biotechniques* 20: 582-582.
9. Hwang J. 1975. Thermostability of duck hepatitis virus. *Am J Vet Res* 36: 1683-1684.
10. Jonassen Tø, Elisabeth K, Bjørn G. 1993. Detection of human astrovirus serotype 1 by the polymerase chain reaction. *J Virol Meth* 44: 83-88.
11. Leister D, Thompson R. 1996. Production of full-length cDNA from a picornaviral genome by RT-PCR. *Trends in Genetics* 12: 11.
12. Lu YS, Lin DF, Lee YL, Liao YK, Tsai HJ. 1993. Infectious bill atrophy syndrome caused by parvovirus in a co-outbreak with duck viral hepatitis in ducklings in Taiwan. *Avian Dis* 37: 591-596.
13. Lu YS. 1983. Epidemiological studies on duck viral hepatitis. *Jour Chinese Soc Vet Sic* 9:11-18.
14. Mason RA, Tauraso NM, Ginn RK. 1972. Growth of duck hepatitis virus in chicken embryos and in cell culture derived from infected embryos. *Avian Dis* 16: 973-979.
15. Olive DM, Al-Mufti S, Al-Mulla W, Khan MA, Pasca A, Stanway G, Al-Nakib W. 1990. Detection and differentiation of picornaviruses in clinical samples following genomic amplification. *J Gen Virol* 71: 2141-2147.

16. Sajjad AH, Bruce WC. 1979. In vitro isolation, propagation, and characterization of duck hepatitis virus type III. *Avian Dis* 23: 715-729.
17. Sandhu TS, Calnek BW, Zeman L. 1992. Pathologic and serologic characterization of variant of duck hepatitis type I virus. *Avian Dis* 36: 932-936.
18. Tauraso NM, Coghill GE, Klutch MJ. 1969. Properties of the attenuated vaccine strain of duck hepatitis virus. *Avian Dis* 13: 321-329.
19. Woolcock PR, Creighton GW. 1979. Duck virus hepatitis: serial passage of attenuated virus in ducklings. *Vet Rec* 105: 715-729.
20. Zhao XL, Phillips RM, Li GD, Zhong AQ. 1991. Studies on detection of antibody to duck hepatitis virus by enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Dis* 35: 778-782.

Table 1. Genome Features of DHV virus (DHV TW90)

Nucleotide sequence

Gene	Start	End	Length
5'NTR	1	1007	1007
Polyprotein	1008	7985	6978
P1	1008	4274	3267
P2	4275	5663	1389
P3	5664	7985	2322
L	1008	1811	804
VP4	1812	1979	168
VP2	1980	2738	759
VP3	2739	3440	702
VP1	3441	4274	834
2A	4275	4340	66
2B	4341	4664	324
2C	4665	5663	999
3A	5664	5972	309
3B	5973	6038	66
3C	6039	6593	555
3D	6594	7985	1392
3'NTR	7986	8220	235

amino acid sequence

Gene	Start	End	Leng
Polyprotein	1	2325	2325
P1	1	1089	1089
P2	1090	1552	463
P3	1553	2325	773
L	1	268	268
VP4	269	324	56
VP2	325	577	253
VP3	578	811	234
VP1	812	1089	278
2A	1090	1111	22
2B	1112	1219	108
2C	1220	1552	333
3A	1553	1655	103
3B	1656	1677	22
3C	1678	1862	185
3D	1863	2325	463

