



一株鸭瘟病毒的分离鉴定和基因组特征

宋晓飞¹, 李 振¹, 彭建云¹, 贾爱琴¹, 王苗利², 李法凯², 李 磊¹, 赵依晴¹, 秦绪伟¹,
赵 妮¹, 李富金¹, 张青婵¹, 刘华春¹, 张连秀^{1*}

(1. 齐鲁动物保健品有限公司, 济南 250100;

2. 山东省动物疫病预防与控制中心(山东省人畜共患病流调监测中心), 济南 250100)

摘 要: 2023—2024年, 江苏省某肉鸭养殖场的10~20日龄肉鸭疑似感染鸭瘟病毒(duck plaque virus, DPV)。本研究旨在分离鉴定该病毒并分析基因组特征。本研究对病料进行病毒分离、动物回归和基因组测序分析。结果显示: 在内脏组织中检测到鸭瘟病毒, 并成功分离一株鸭瘟毒株, 命名为QL2312。与强毒株CV株具有同等致病力。通过基因组序列分析发现, QL2312株的UL56/LORF5基因与强毒株CV株相同, 而UL2基因与疫苗株C-KCE株相同。本研究成功分离到一株鸭瘟变异株, 为相关疾病的进一步研究提供基础。

关键词: 鸭瘟病毒; 分离鉴定; 基因组分析

中图分类号: S852.659.1

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)02-1171-06

Isolation, Identification and Genomic Characterization of a Duck Plague Virus

SONG Xiaofei¹, LI Zhen¹, PENG Jianyun¹, JIA Aiqin¹, WANG Miaoli², LI Fakai², LI Lei¹,
ZHAO Yiqing¹, QIN Xuwei¹, ZHAO Ni¹, LI Fujin¹, ZHANG Qingchan¹,
LIU Huachun¹, ZHANG Lianxiu^{1*}

(1. Qilu Animal Health Products Co. Ltd., Jinan 250100, China; 2. Shandong Provincial Animal Disease Prevention and Control Center Shandong Provincial Animal Disease Prevention and Control Center
[Shandong Provincial Zoonotic Disease Surveillance Center], Jinan 250100, China)

Abstract: From 2023 to 2024, 10-20-day-old ducks in a meat duck farm in Jiangsu Province, were suspected of being infected with duck plague virus (DPV). This study aims to isolate and identify the virus and analyze genomic characteristics. Viral isolation and genome sequencing analysis were performed on the disease material in this study. Results were as follows: Duck plague virus was detected in visceral tissue, and a duck plague strain was successfully isolated, named QL2312. It has the same pathogenicity as the virulent strain. Sequence analysis of the isolate genome revealed that the UL2 gene of QL2312 strain was the same as that of the vaccine strain C-KCE strain, while the UL56/LORF5 gene was the same as the classical strain CHv and CV strains. This study successfully isolated a duck plague mutant strain, providing a basis for further research on related diseases.

Keywords: duck plague virus; separation and identification; genome analysis

* **Corresponding author:** ZHANG Lianxiu, E-mail: lianxiu.zhang@qilu-pharma.com

收稿日期: 2025-04-24

基金项目: 山东省重点研发计划(重大科技创新工程)(2023CXGC010704)

作者简介: 宋晓飞, 高级工程师, 硕士, 主要从事兽药疫苗研发工作, E-mail: xiaofei.song@qilu-pharma.com; Tel: 0531-83129728

* 通信作者: 张连秀, 主要从事兽药疫苗研发工作, E-mail: lianxiu.zhang@qilu-pharma.com

鸭瘟病毒(duck plaque virus, DPV)是引起鸭、鹅和天鹅等禽类急性发病、败血性和高度致死性的一种传染病病原^[1]。该病毒疱疹病毒科 α 疱疹病毒亚科马立克病毒属鸭甲疱疹病毒 I 型成员,基因组结构为 UL-IRS-US-TRS,即长独特区域(unique long, UL)、内部反向重复序列(inverted repeat short, IRs)、短独特区域(unique short, US)及末端反向重复序列区域(terminal repeat short, TRs),长度 158~162 kb 的双链线性 DNA, G+C 含量 44.9%,共编码 78 个开放阅读框(open reading frame, ORF)^[2]。

傅光华等^[3]对 2016—2017 年福建省 37 份鸭瘟病料分析,发现 UL56/LORF5 基因、TK/gH 基因和 UL2 基因均未出现基因片段缺失,与我国鸭瘟强毒株 CHv 株、CV 株(AV1221)的序列相似性均在 99% 以上,但是经分子系统进化分析发现毒株与我国参考强毒株处于不同进化分支。张瑞等^[4]在 2020 年福建省半番鸭中分离到鸭瘟病毒株的 UL2 基因与强毒株 CHv 株、CV 株和 2085 株的核苷酸相似性为 97.8%~99.0%;与疫苗株 VAC 株弱毒株相比,在 UL2 基因中存在 528 bp 的核苷酸插入。本研究从江苏省某鸭养殖场分离出一株鸭瘟毒株,通过对该毒株致病力和基因组特征分析,以明确近年来在江苏省鸭群中新流行的鸭瘟分子特征,为鸭瘟的快速确切诊断和防控提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂、细胞和实验动物

DMEM 培养基、胎牛血清和胰蛋白酶等均购自 Gibco 生物公司,病毒核酸提取试剂盒购自杭州博日科技股份有限公司,DNA Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司,2×Taq Master Mix(Dye Plus)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司,SPF 鸭胚购自山东昊泰实验动物繁育有限公司,4 周龄麻鸭购自山东省济南市某鸭养殖场,常见病原检测均为阴性。

1.2 病毒的分离

1.2.1 病料来源和样品处理 病料来源:2023—2024 年江苏省某肉鸭养殖场疑似感染鸭瘟的 10~20 日龄肉鸭。样品处理:将病料按照 1:5 比例加入无菌生理盐水,研磨制成匀浆,−70℃ 以下反复冻融 3 次,4℃ 10 000 ×g 离心 10 min,加双抗作用

30 min,取上清液转入无菌离心管中,置于−70℃ 以下保存备用。

1.2.2 引物的设计和合成 根据 CV 株基因组序列合成引物(DPV-F:3′-GCAAGCTTGGCTGGTATGCGTGACAT-5′;DPV-R:3′-TTCTGCAGGTATTGGTTTCTGAGTTGGC-5′)用于鉴定鸭瘟病毒;合成引物(UL2-F:3′-TGCAATCACGTTGCGTTGTACT-5′;UL2-R:3′-GATTTCTGGGTTTTTGCTGGAC-5′)用于扩增鸭瘟病毒的 UL2 基因。合成引物(UL56-F:3′-ATCTATCCTGTCTACCTCCG-5′;UL56-R:3′-CTGGCCTTGGATATCATTTGTC-5′)用于扩增鸭瘟病毒的 UL56/LORF5 基因。引物均由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3 病毒的细胞培养和鉴定

将处理后的病料上清液接种 6 孔板单层 DEF 细胞,置 37℃、含 5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 1 h,弃掉培养液,更换含 1% 青霉素和链霉素、1% 胎牛血清的 DMEM 细胞维持液。每天观察细胞状态,持续观察 4 d,把接毒的细胞反复冻融 3 次,吸取 400 μL 上清液转移到新的单层细胞上,挑取出现细胞病变(CPE)的样品 PCR 鉴定。

按照病毒核酸提取试剂盒(MagaBio plus 病毒 DNA/RNA 纯化试剂盒Ⅲ)说明书操作步骤提取核酸(DNA 和 RNA),按照 2×Taq Master Mix(Dye Plus)试剂盒说明书鉴定样品。扩增引物见“1.2.2”,扩增条件反应体系为 50 μL:上下游引物各 2 μL,DNA 2 μL,2×Prime STAR Max 25 μL,加水至 50 μL。反应程序:98℃ 5 min;98℃ 15 s;53℃ 15 s;72℃ 50 s;30 个循环;72℃ 延伸 10 min。PCR 产物用 0.8% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测,DPV 阳性条带 602 bp。

1.4 动物回归试验

取 20 只 4 周龄麻鸭肌肉注射接种 QL2312 株细胞毒,鸭瘟强毒株 AV1221 株,剂量为 0.2 mL·只⁻¹,接种后隔离饲养,每日观察记录鸭的临床表现,连续观察 7 d。解剖并观察气管、肝、肾和法氏囊等脏器病变情况。

1.5 病毒基因组测序、比对和分析

由上海生工工程有限公司完成全基因组测序和组装。利用 MEGA11 软件进行同源性分析和绘制遗传演化进化树。

2 结 果

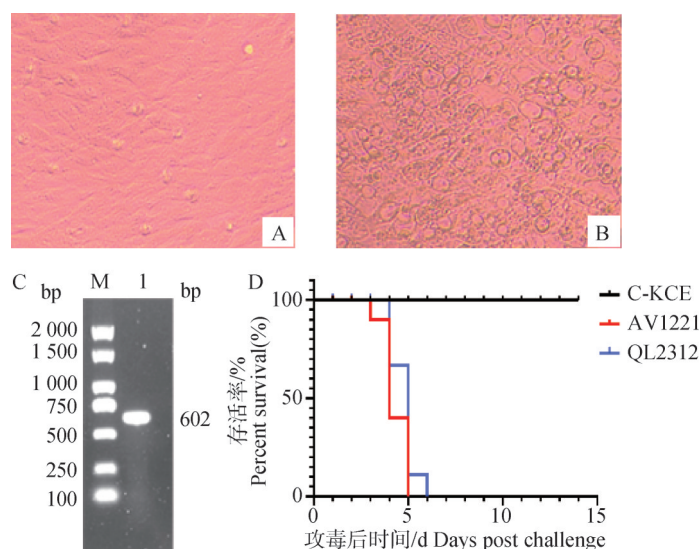
2.3 病毒的分离与鉴定

取阳性病料上清液接种 DEF 单层细胞,盲传至第 3 代,显微镜下可见 DEF 细胞出现局灶性圆缩及空泡化病变,随病变区域逐渐扩大并伴随细胞脱落、死亡(图 1B)。提取基因组 PCR 鉴定为鸭瘟病

毒性(图 1C),命名为 QL2312。

2.4 动物回归试验

麻鸭接种 QL2312 后 3 d 出现精神沉郁、行走迟缓及喜卧等症状,第 4 天死亡 4/10,第 6 天全部死亡,发病率和死亡率均为 100%(图 1D)。剖检见肝脏、脾脏、肺、法氏囊等实质脏器出血、淤血,食道弥漫性出血,肠道见出血环,气管有出血点。



A. 正常 DEF 细胞;B. DPV 致病变细胞;C. PCR 鉴定(M. DL2000 DNA 相对分子量标准;1. DPV);D. 分别用 C-KCE、AV1221 和 QL2312 株攻毒鸭的 Kaplan-Meier 存活曲线

A. DEF normal cells; B. DPV pathogenic cells; C. PCR identification (M. DL2000 DNA marker, 1. DPV); D. Kaplan-Meier survival curves of duck challenged with C-KCE, AV1221 and QL2312

图 1 QL2312 株的细胞分离、PCR 鉴定和动物回归试验

Fig. 1 Cell isolation, PCR identification and animal regression test of QL2312 strain

2.5 全基因组序列比对分析

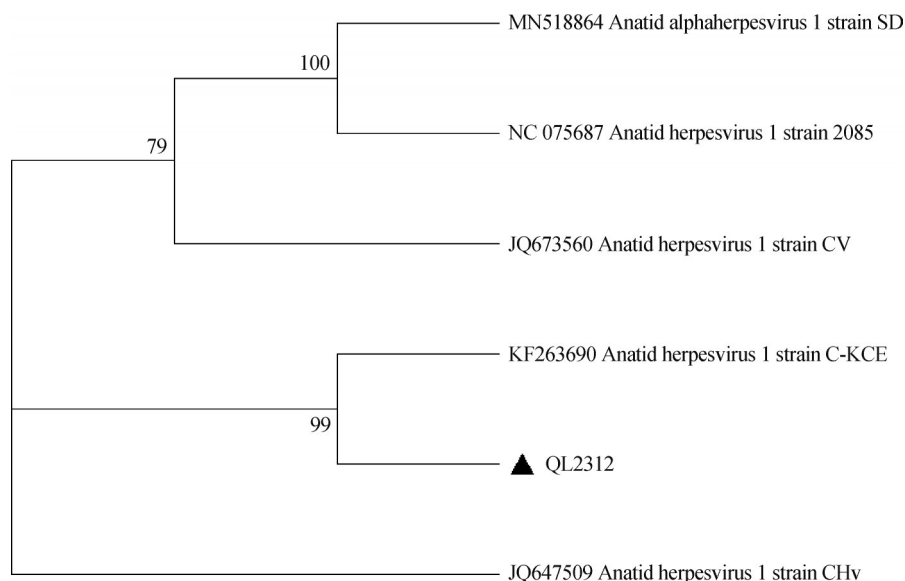
QL2312 株基因组全长 162 128 bp, GC 含量 44.6%。利用 MEGA11 软件将 QL2312 全基因序列与 GenBank 数据库中的部分 DPV 参考序列进行核酸同源性及演化分析。全基因组比对显示,该毒株与强毒株 CHv 株(JQ647509)、CV 株(JQ673560)、2085 株(NC075687)和 SD 株(MN518864)的核苷酸

相似性分别为 99.71%、99.70%、93.33%、98.85%;与鸡胚疫苗株 C-KCE 株(KF263690)的核苷酸相似性为 97.37%(表 1)。基于全基因核苷酸序列构建的系统进化树表明,QL2312 与 CHv 株(JQ647509)、CV 株(JQ673560)、2085 株(NC075687)和 SD 株(MN518864)分属不同的分支,而与 C-KCE 株(KF263690)亲缘关系较近,归属同一分支(图 2)。

表 1 六株鸭瘟基因组核苷酸相似性分析

Table 1 Homology matrix of 6 duck plague virus sequences

毒株 Strain	SD	C-KCE	CV	2085	CHv	%
C-KCE	96.64					
CV	99.15	97.37				
2085	93.07	92.22	93.60			
CHv	99.10	97.37	99.95	93.58		
QL2312	98.85	97.37	99.70	93.33	99.71	



标注黑三角(▲)的毒株为本研究分离株,图中树结处的数字为 Bootstrap 检验置信值(1 000 次重复)

Virus marked with black triangle (▲) were isolated in this study, numbers on the tree node represented confidence values from bootstrap test (1 000 replicates)

图2 QL2312株的系统进化树分析

Fig. 2 Phylogenetic tree analysis of QL2312 strain

2.6 病毒基因组结构分析

2.6.1 *UL56/LORF5* 基因序列分析 *UL56/LORF5* 基因位于 DPV 基因组 UL 区起始端,弱毒株(如 C-KCE 株)中称 *LORF11* 基因。该基因对 DPV 细胞间传播至关重要,并且不同毒株的 *LORF5* 具有明显差异,能够区分强毒株和弱毒株。扩增 CV 株、C-KCE 株和 QL2312 株的 *UL56/LORF5* 基因,结果显示,QL2312 株与强毒株 CV 株扩增产物均为 4 603 bp,而疫苗株 C-KCE 扩增产物仅 1 090 bp,存在 3 513 bp 核苷酸的连续缺失(图 3B)。测序发现 *LORF11* 基因的 A 段(647 bp)和 B 段(181 bp)分别与 *UL56* 基因的 5'端和 *LORF5* 的 3'端相似性 100%。

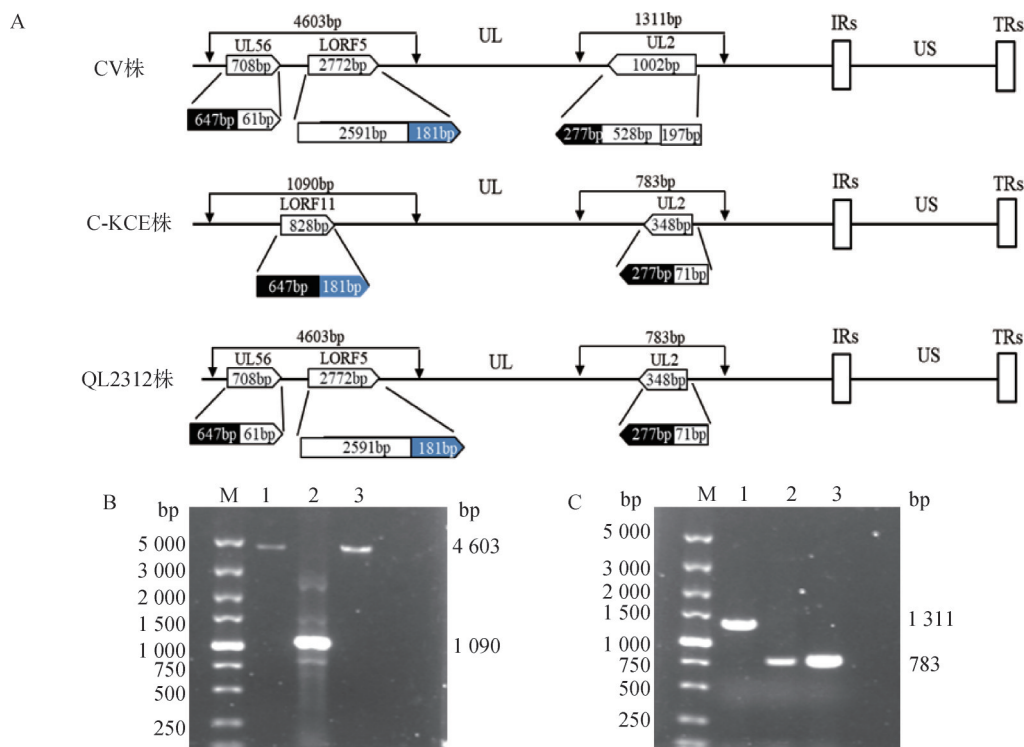
2.6.2 *UL2* 基因序列分析 *UL2* 基因编码尿嘧啶 DNA 糖基化酶,在神经元中的有效复制起重要作用,并且在强、弱毒株间同样存在显著差异。PCR 结果显示,CV 株 *UL2* 基因扩增产物为 1 311 bp; QL2312 株和 C-KCE 株 *UL2* 基因的扩增产物为 783 bp,较 CV 株缺失 528 bp 核苷酸(图 3C)。测序发现 QL2312 株、C-KCE 株和 CV 株的 *UL2* 基因 3'端具有 277 bp 序列的同源性 100%。

3 讨论

鸭瘟是鸭瘟病毒引起的一种禽类急性、热性、

败血性传染病。目前国内外尚无针对该病的有效治疗药物,主要依赖疫苗免疫防控。然而,近年来临床频繁出现免疫疫苗后仍发病的现象,提示可能病毒变异导致免疫保护失败。2016 年,张红丽等^[5]从浙江省某免疫失败的蛋鸭场分离出 ZJ2016 株,研究发现其 *LORF11*、*UL2*、*UL12*、*UL41*、*UL47*、*US10* 等基因特征均与强毒株 CHv 特征高度一致;但与疫苗株 C-KCE 相比,*LORF11*、*UL2*、*UL12* 及 *US10* 基因存在碱基插入,导致基因结构及氨基酸改变。Shen 等^[6]研究表明 DPV 基因组中的 *LORF5* 基因介导病毒在细胞间的移动,该基因可显著促进病毒增殖。推测弱毒株 *UL2* 基因缺失 528 bp 后不影响病毒在体外培养中的复制,但是导致病毒在体内神经元中无法有效复制、潜伏和再激活,从而降低了病毒的致病性^[7-8]。

本研究从病料中成功分离出鸭瘟病毒 QL2312 株。结合病毒分离、动物回归试验和基因组测序分析,发现该毒株所致临床症状和剖检病变与强毒株 CV 株高度相似,其全基因组与强毒株 CHv 株和 CV 株核苷酸相似性 > 99.7%。QL2312 株的 *UL56/LORF5* 基因与 CV 株序列一致性达 100%,复制传播能力等同强毒株;*UL2* 基因存在 528 bp 缺失,与 C-KCE 株相似性 100%。综上,QL2312 为兼具强毒特征(*UL56/LORF5* 基因序列未出现缺失)与弱



A. 鸭瘟病毒 CV 株、C-KCE 株和 QL2312 株的基因组结构; B. *UL56/LORF5* 基因 PCR 鉴定; C. *UL2* 基因 PCR 鉴定; 1. CV; 2. C-KCE; 3. QL2312

A. Genome structure map of CV, C-KCE and QL2312; B. PCR identification of *UL56/LORF5*; C. PCR identification of *UL2*; 1. CV; 2. C-KCE; 3. QL2312

图 3 鸭瘟病毒基因组结构图

Fig. 3 Genome structure map of duck plague virus

毒株特征(*UL2* 基因序列出现缺失 528 bp)的 DPV 变异强毒株。

4 结 论

本研究从江苏省鸭场疑似鸭瘟病料中成功分离出鸭瘟病毒 QL2312 株,通过病毒分离、动物回归和基因组测序分析表明该毒株为变异强毒株,后续需要加强对该病毒的分子流行病学实时监测,避免鸭养殖业遭受巨大损失。

参考文献 (References):

- [1] 于江玮,程慧敏,林健,等. 鸭瘟病毒 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 畜牧兽医学报, 2025, 56(2): 765-773.
- YU J W, CHENG H M, LIN J, et al. Establishment and application of TaqMan fluorescent quantitative PCR detection method for duck plague virus[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2025, 56(2): 765-773. (in Chinese)

- [2] AASDEV A, PAWAR S D, MISHRA A, et al. First complete genome characterization of duck plague virus from India[J]. *Virus disease*, 2021, 32(4): 789-796.
- [3] 傅光华,陈翠腾,刘荣昌,等. 鸭瘟病毒新近分离毒株部分基因变异分析[J]. 畜牧兽医学报, 2018, 49(10): 2215-2222.
- FU G H, CHEN C T, LIU R C, et al. Genetic variability of partial genes of duck plague viruses currently isolated in ducks[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2018, 49(10): 2215-2222. (in Chinese)
- [4] 张瑞,刘荣昌,陈长福,等. 一例半番鸭感染鸭瘟的病原分离鉴定及病理组织学观察[J]. 福建农业学报, 2021, 36(3): 312-318.
- ZHANG R, LIU R C, CHEN C F, et al. Pathogen identification and tissue histopathology on plague virus-infected mule ducks[J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2021, 36(3): 312-318. (in Chinese)
- [5] 张红丽,黄靖,刘霞,等. 鸭瘟病毒 ZJ2016 强毒株部分基因序列的测定与分析[J]. 浙江农业学报,

- 2020,32(2):226-233.
- ZHANG H L, HUANG J, LIU X, et al. Sequencing and analysis of several genes of a virulent duck enteritis virus strain ZJ2016[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2020,32(2):226-233. (in Chinese)
- [6] SHEN B, LI Y, CHENG A, et al. The *LORF5* gene is non-essential for replication but important for duck plague virus cell-to-cell spread efficiently in host cells [J]. *Front Microbiol*, 2021,12:744408.
- [7] 蒋 思. I 型单纯疱疹病毒 *UL2* 蛋白核输入信号和核输入机制的鉴定及其重组病毒的构建[D]. 广州: 广州医科大学, 2018.
- JIANG S. Identification of the subcellular import signal, nuclear import mechanism of herpes simplex virustype I *UL2* and construction of its recombinant virus[D]. Guangzhou: Guangzhou Medical University. 2018. (in Chinese)
- [8] 杨伏春, 刘 芮, 李晓涵, 等. 鸭肠炎病毒 *UL41* 基因缺失株的构建及其体外增殖能力分析[J]. 畜牧兽医学报, 2022,53(8):2689-2696.
- YANG F C, LIU R, LI X H. et al. Construction of *UL41* gene deletion strain of duck enteritis virus and analysis of its replication ability *in vitro* [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2022,53(8):2689-2696. (in Chinese)

(编辑 白永平)