

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.08.02

# 禽腺病毒 12 个血清型代表毒株的 分子生物学鉴定研究

侯力丹<sup>1,2</sup>, 宋佳诚<sup>1</sup>, 刘丹<sup>1</sup>, 毛娅卿<sup>1</sup>, 杨亚希<sup>3</sup>,  
黄小洁<sup>1</sup>, 吴应凯<sup>3</sup>, 王嘉<sup>1\*</sup>, 李俊平<sup>1\*</sup>

(1. 中国兽医药品监察所, 北京 100081; 2. 中国农业大学动物医学院, 北京 100193;

3. 国家兽用药品工程技术研究中心, 河南洛阳 471000)

[收稿日期] 2021-03-03 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2021) 08-0012-10 [中图分类号] S855.3

**[摘要]** 为建立和完善禽腺病毒(FAdV)标准毒株库, 针对 FAdV 不同种的纤突(Fiber)和六邻体(Hexon)序列设计引物, 对中国兽医药品监察所保藏的 FAdV 12 个血清型代表毒株进行 PCR 扩增和遗传进化分析, 完成了对毒株的分型鉴定, 再结合同种不同血清型病毒 Hexon 序列上酶切位点的特征, 用酶切法验证了毒株不存在同种中不同血清型之间的交叉污染。试验结合遗传进化分析和酶切法对 FAdV 12 个血清型毒株进行了系统分型鉴定, 明确其遗传背景、血清型信息及纯净性, 建立了系统完整的 FAdV 代表毒株毒种库, 为 FAdV 鉴定及相关生物制品的研发和评价奠定了物质基础。

**[关键词]** 禽腺病毒; 代表毒株; 分子生物学

## Molecular Biological Identification of 12 Strains of Fowl Adenovirus

HOU Li-dan<sup>1,2</sup>, SONG Jia-cheng<sup>1</sup>, LIU Dan<sup>1</sup>, Mao Ya-qing<sup>1</sup>, YANG Ya-xi<sup>3</sup>,

HUANG Xiao-jie<sup>1</sup>, WU Ying-kai<sup>3</sup>, WANG Jia<sup>1\*</sup>, LI Jun-ping<sup>1\*</sup>

(1. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China; 2. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University,

Beijing 100193, China; 3. National Research Center for Veterinary Medicine, Luoyang, Henan 471000, China)

Corresponding authors: WANG Jia, E-mail: 44613623@qq.com; LI Jun-ping, E-mail: lijunping03@163.com

**Abstract:** In order to establish and improve the standard strain library of avian adenovirus (FAdV), primers were designed for Fiber and Hexon sequences of different species of FAdV. PCR amplification and genetic evolution

**基金项目:** 国家重点研发计划“畜禽重大疫病防控与高效安全养殖综合技术研发”重点专项(2016YFD0500800, 2016YFD0500809)

**作者简介:** 侯力丹, 助理研究员, 硕士研究生, 从事病毒类生物制品检验及研究。

**通讯作者:** 王嘉, E-mail: 44613623@qq.com; 李俊平, E-mail: lijunping03@163.com

analysis were performed on 12 representative strains of FAdV serotypes stored in China Institute of Veterinary Drug Control, and genotype and identification were completed. Combined with the characteristics of the enzyme cleavage sites on the Hexon sequence of different serotypes, the cross contamination between different serotypes of the same virus strain was verified by enzyme cleavage method. In summary, 12 serotypes of FAdV were systematically classified and identified by genetic evolution analysis and enzyme digestion method. The genetic background, serotype information and purity of FAdV serotypes were clarified, and a systematic and complete library of representative strains of FAdV was established, which laid a material foundation for the identification of FAdV and the development and evaluation of related biological products.

**Key words:** fowl adenovirus; representative strain; molecular biology

禽腺病毒(Fowl adenovirus, FAdV)属于腺病毒科禽腺病毒属,曾称为 I 群 FAdV,可根据其分子生物学特征及限制性内切酶片段图谱等方法分为 A~E 共 5 个种,12 个血清型<sup>[1]</sup>,其多个种和血清型的特征为 FAdV 的鉴定、检验及诊断方法建立和相关疫苗评价等带来很大挑战。FAdV 可引起鸡包涵体肝炎 (IBH)、心包积液综合征 (HPS) 和肌胃糜烂 (GE) 等病症,严重影响养禽业<sup>[2-4]</sup>。自 2015 年 6 月以来,我国山东、河南、河北等省份的部分地区鸡群中发生了由血清 4 型 FAdV 引起的以心包积液和肝脏肿大为特征的传染病,被称为鸡心包积液-肝炎综合征 (HHS)<sup>[5-7]</sup>。近期也报道了血清 4 型的 I 群 FAdV 在水禽中的感染病例<sup>[8]</sup>。除血清 4 型外, FAdV-8a、FAdV-8b、FAdV-10 及 FAdV-11 等血清型在我国鸡群中均有流行和感染,对我国养禽业造成严重影响<sup>[9-10]</sup>。目前,我国尚无商品化 FAdV 疫苗及诊断制品。因此,建立 12 个血清型 FAdV 代表毒株库对于 FAdV 疫苗及诊断制品研发、评价等具有重要意义。

我国于 20 世纪 70 年代从国外引进了 12 个血清型毒株<sup>[11]</sup>,但一直未进行系统鉴定。本研究针对 FAdV 不同种的 Hexon 和 Fiber 序列设计引物,拟经 PCR 扩增和遗传进化分析,对 12 个毒株进行基因分种鉴定。再结合同一种中不同血清型病毒 Hexon 序列上酶切位点的特征,通过限制性内切酶进行酶切,得到不同的酶切片段,确定同一种内不同血清型的病毒毒株种是否纯净,进一步完善 12

个血清型代表毒株毒种库。

## 1 材料和方法

1.1 毒株和试剂 FAdV 的 12 个血清型毒株由中国兽医药品监察所国家兽医微生物菌种保藏管理中心保存。Axy Prep 体液病毒 DNA/RNA 小量试剂盒购自康宁生命科学有限公司。快捷型琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 II 型购自北京百泰克生物技术有限公司。TOP10 感受态细胞、质粒小提试剂盒(离心柱型)购自天根生化科技(北京)有限公司。LB 琼脂、LB 肉汤购自北京中海生物科技有限公司; pESAY-Blunt Simple Cloning Vector 购自北京全式金生物技术有限公司。Acc65 I、Hpa-I、BsaB I、AluN I、Sac II 限制性内切酶购自 NEB(北京)有限公司。KOD FX Neo 购自东洋纺(上海)生物科技有限公司。2×Taq PCR Master Mix 购自北京博迈德生物技术有限公司。

1.2 引物设计与合成 根据 GenBank 上 FAdV 不同型的参考毒株(表 1)序列设计引物,用于扩增不同种 FAdV 的 Hexon 基因和 Fiber 基因全长片段,引物信息分别见表 2 和表 3。引物由北京六合华大基因科技有限公司合成。

1.3 FAdV Hexon 基因和 Fiber 基因的 PCR 扩增 使用 DNA 提取试剂盒分别提取 12 个血清型病毒 DNA。以提取的 DNA 为模板,每对 Fiber 引物扩增所有毒株,Hexon 引物扩增对应种的毒种。PCR 反应体系为上下游引物各 3 μL, KOD FX Neo 1 μL, KOD FX Neo buffer 25 μL, dNTP 10 μL, ddH<sub>2</sub>O 9 μL。

表 1 FAdV 的 12 种血清型参考毒株信息

Tab 1 Information of 12 serotypes of reference strains of FAdVs

不同血清型毒株	GenBank 编号	英文缩写
Fowl adenovirus 1 (CELO)	U46933	FAdV-1
Fowl adenovirus 2 (SR48)	KT862806	FAdV-2
Fowl adenovirus 3 (SR49)	KT862807	FAdV-3
Fowl adenovirus 4 (KR5)	HE608152.1	FAdV-4
Fowl adenovirus 5 (TR22-CK8)	AF508953.1	FAdV-5
Fowl adenovirus 6 (CR119)	KT862808	FAdV-6
Fowl adenovirus 7 (YR36)	KT862809	FAdV-7
Fowl adenovirus 8a (TR-59)	KT862810	FAdV-8a
Fowl adenovirus 8b (764)	KT862811	FAdV-8b
Fowl adenovirus 9 (A-2A)	AF083975	FAdV-9
Fowl adenovirus 10 (C2B)	KT717889	FAdV-10
Fowl adenovirus 11 (380)	KT862812	FAdV-11

表 2 针对 FAdV 不同种 Hexon 全长基因扩增所需引物序列

Tab 2 Primer sequences required for amplification of Hexon full-length genes of different FAdVs

种型	不同种引物名称	引物序列	目的片段长度/bp	退火温度/℃	血清型
A 型	FAdV AF	5' - AGGCTCTCATTTCAGGCC - 3'	3390	57	1
	FAdV AR	5' - GCGAACCCGATCCACTGC - 3'			
B 型	FAdV BF	5' - CCACCAGACGCACCAACA - 3'	3311	57	5
	FAdV BR	5' - TCCGAACGGGTGGAACAT - 3'			
C 型	FAdV CF	5' - GAGATGGTGACGGAGGTG - 3'	3139	56.1	4,10
	FAdV CR	5' - AAGCGGTGACGAGGATGC - 3'			
D 型	FAdV CF	5' - GAGATGGTGACGGAGGTG - 3'	3286	55	2, 3, 9, 11
	FAdV DR	5' - TTGGGATCGAGGAACCCG - 3'			
E 型	FAdV EF	5' - GCGAAGAGGAGACGAAAGC - 3'	3185	57	6, 7, 8a, 8b
	FAdV ER	5' - CGAACACGCCCAAGAACC - 3'			

表 3 针对 FAdV 不同种 Fiber 全长基因扩增所需引物序列

Tab 3 Primer sequences required for amplification of Fiber full-length genes of different FAdVs

种型	不同种引物名称	引物序列	目的片段长度/bp	退火温度/℃	血清型
A 型	FAdV Af1F	5' - TGGTGGAATCTCGGAACG - 3'	2415 (Fiber1)	57.4	1
	FAdV Af1R	5' - GTGGGAGCGGCTACTTGG - 3'			
	FAdV Af2F	5' - CGATCCCAATGCCTCCTC - 3'	1516 (Fiber2)	54.9	
	FAdV Af2R	5' - TGATGTTGATTTGGACAGC - 3'			
B 型	FAdV BfF	5' - CTACGCAGCCAGAACAGC - 3'	1863	55	5
	FAdV BfR	5' - TCAAGCACGAGAACAGACC - 3'			
C 型	FAdV C4f1F	5' - TCTAAACTTGCCTCTCAACC - 3'	1516 (Fiber1)	55.9	4,10
	FAdV C4f1R	5' - GCCACGTAATCGAAAGGA - 3'			
	FAdV CfF	5' - GCAGACTTCCGGCTCCAA - 3'	1640 (Fiber2)	57.7	
	FAdV CfR	5' - GGACGCGGGAACAAAGGA - 3'			
D 型	FAdV DfF	5' - TCATTATTACCGTTCGC - 3'	1902	52.7	2, 3, 9, 11
	FAdV DfR	5' - CGTGGTTCGTGGAGGCTG - 3'			
E 型	FAdV EfF	5' - GTTCCCGCTCGTTATG - 3'	1840	53.5	6, 7, 8a, 8b
	FAdV EfR	5' - AGTGGACAGACTGATGG - 3'			

PCR 反应条件为 94 ℃ 预变性 2 min, 98 ℃ 15 s, 退火 30 s, 68 ℃ 按 2000 bp/min 延伸, 共 35 个循环, 68 ℃ 延伸 10 min, 4 ℃ 保存, 同时设置阴性对照。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后使用胶回收试剂盒对目的片段进行回收。

1.4 FAdV Hexon 基因和 Fiber 基因序列测定及遗传进化分析 将上一步得到的 FAdV Hexon 基因和 Fiber 基因全长片段的 PCR 产物送北京六合华大基因科技有限公司测序, 并用 DNA STAR 软件对序列进行遗传进化分析。将待检毒株序列与参考毒株序列进行同源性比较和分析。

1.5 *Hexon* 基因的酶切鉴定 由于表 3 中的 *Fiber* 基因引物具有种特异性,所以前期通过对 *Fiber* 基因的 PCR 扩增,可实现对毒株种的分型和确定种的纯净性,并实现对血清 1 型(A 种)和血清 5 型(B 种)毒株的特异性和纯净性鉴定。通过 PCR 方法与酶切方法对 *Hexon* 基因全长进行鉴定,从而鉴定某一毒株内是否存在同种不同血清型污染。将 1.3

中各毒株 *Hexon* 基因的 PCR 产物进行胶回收,再使用不同的限制性内切酶将 C、D、E 种内不同血清型进行分型(表 4)。选取 *Acc65 I* 分型 C4 与 C10,选取 *Hpa I* 与 *BsaB I* 分型 D2、D3、D9、D11,选取 *AluN I* 和 *Sac II* 分型 E6、E7、E8a、E8b。酶切体系为:胶回收产物 20  $\mu$ L,限制性内切酶 1  $\mu$ L,10  $\times$  NEB Buffer 5  $\mu$ L,H<sub>2</sub>O 24  $\mu$ L。

表 4 对 FAdV 进行纯净性分析所用限制性内切酶信息

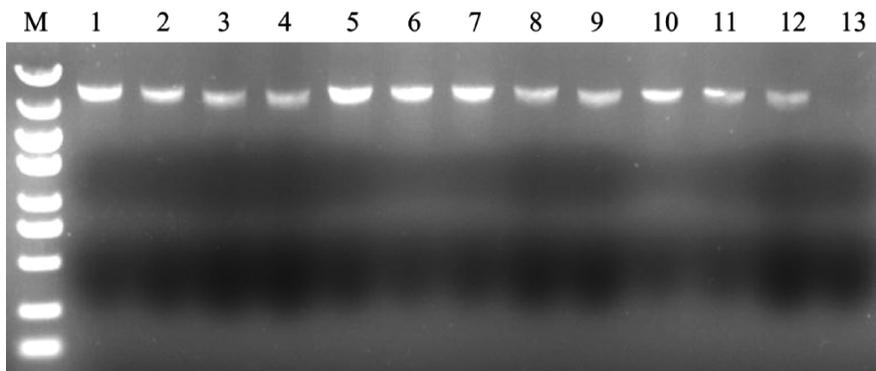
Tab 4 Information of restriction enzyme used for purity analysis of FAdVs

种型	血清型	酶 1 名称	酶切后片段大小	酶 2 名称	酶切后片段大小
C	4	<i>Acc65 I</i>	1505,935,700	/	/
	10		2439,700		
D	2	<i>Hpa I</i>	2332,555,400	<i>BsaB I</i>	3286
	11		2331,555,401		2717,571
	3		3299	/	/
	9		1159,2136	/	/
E	6	<i>AluN I</i>	3189	/	/
	7		932,1238,1021	<i>Sac II</i>	273,2918
	8a		939,1232,1021		277,2368,547
	8b		2162,1024	/	/

## 2 结果与分析

2.1 目的基因 *Hexon* 的 PCR 扩增 利用本试验设计的 *Hexon* 基因和 *Fiber* 基因种特异性引物(表 2、表 3)对 12 个血清型 FAdV 毒株的 *Hexon* 和 *Fiber* 基因 ORF 全长进行 PCR 扩增,分别得到与预期目

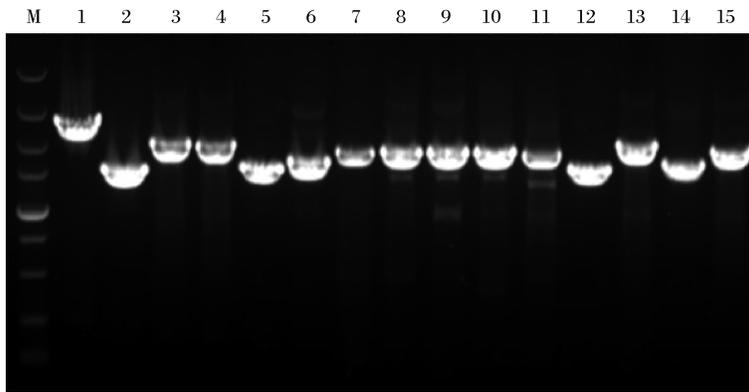
的片段大小一致的基因片段,阴性对照无特异性扩增,结果见图 1 和图 2。而用 *Fiber* 其他种的引物扩增各毒株,结果均为阴性,证明各毒株无其他种病毒污染,且表 3 中的 *Fiber* 引物具有种特异性。



M: DL5000 DNA Marker; 1: A1 - Hexon; 2: B5 - Hexon; 3: C4 - Hexon; 4: C10 - Hexon; 5: D2 - Hexon; 6: D3 - Hexon; 7: D9 - Hexon; 8: D11 - Hexon; 9: E6 - Hexon; 10: E7 - Hexon; 11: E8a - Hexon; 12: E8b - Hexon; 13: Negative control

图 1 FAdV *Hexon* 基因 PCR 扩增结果

Fig 1 PCR amplification results of FAdV *Hexon* gene



M: DL5000 DNA Marker; 1: A1 - Fiber1; 2: A1 - Fiber2; 3: D2 - Fiber; 4: D3 - Fiber; 5: C4 - Fiber1;  
6: C4 - Fiber2; 7: B5 - Fiber; 8: E6 - Fiber; 9: E7 - Fiber; 10: E8a - Fiber;  
11: E8b - Fiber; 12: D9 - Fiber; 13: C10 - Fiber1; 14: 10 - Fiber2; 15: D11 - Fiber

图 2 FAdV *Fiber* 基因 PCR 扩增结果

Fig 2 PCR amplification results of FAdV *Fiber* gene

2.2 不同种毒株 *Fiber* 的遗传进化分析 *Fiber* (*Fiber2*) 基因 ORF 全长的核苷酸序列分析(图 3、图 4)显示, A1、D2、D3、D11、E8a、E8b 六个毒株与相应参考毒株的同源性高达 100%, E6、E7、D9 三个毒株与相应参考毒株的同源性达 99.9%, C4 毒株与相应参考毒株的同源性为 99.3%, B5 毒株与相应参考毒株的同源性为 95.8%, C10 毒株与相应参考毒株的同源性为 99.1%。同时, 同种毒株间 C4 和 C10 同源性高, 为 96.9%, D3 和 D11 同源性最低, 为 72.5%。而不同种毒株间表现为较低的同源性, 其中 A1 与 E7、E8a、E8b 之间同源性最低, 为 4.9%。根据 *Fiber* 引物的特异性扩增结果, 可对 A1 和 B5 型的毒株进行分型鉴定。

2.3 不同种毒株 *Hexon* 基因的遗传进化分析 将 *Hexon* 基因 ORF 全长的 PCR 产物进行测序, 并用 DNA STAR 软件进行分析(图 5、图 6)。结果显示, C10、D2、D3、D11、E8a、E8b 六个毒株与 FAdV 参考毒株的同源性高达 100%, 其余毒株与参考毒株之间的同源性在 99.1% 到 99.9% 之间。B5 与参考毒株 340 株的同源性相对较低, 为 77.3%。同时, 同一种各毒株间 D2 和 D11 同源性最高, 为 99.1%, D2 与 D3 或 D11 同源性最低, 为 80.4%。而不同种毒株间表现为较低的同源性, 其中 B5 与 C4 同源性最低, 为 71.4%, 与其余血清型毒株的同源性最

高为 76.6%。

2.4 不同血清型毒株 *Hexon* 基因的酶切鉴定分析

2.4.1 FAdV - C 种 *Hexon* 基因酶切结果 FAdV - C4 - *Hexon* 与 FAdV - C10 - *Hexon* 的 PCR 回收使用 *Acc65* I 酶切后, FAdV - C4 - *Hexon* 被切成三段, 长度分别为 1505 bp、935 bp、700 bp, 而 FAdV - C10 - *Hexon* 被切成两段, 长度分别为 2439 bp 和 700 bp, 与预期片段大小相符, 酶切图谱见图 7。

2.4.2 FAdV - D 种 *Hexon* 基因酶切结果 FAdV - D2 - *Hexon*、FAdV - D3 - *Hexon*、FAdV - D9 - *Hexon*、FAdV - D11 - *Hexon* 使用 *Hpa* I 酶切后, FAdV - D3 - *Hexon* 未被切开, FAdV - D9 - *Hexon* 切为 1159 bp 和 2136 bp 两条带, FAdV - D2 - *Hexon*、FAdV - D11 - *Hexon* 被切成 2331 bp、500 bp 和 400 bp 三条带。再将 FAdV - D2 - *Hexon* 和 FAdV - D11 - *Hexon* 使用 *BsaB* I 酶切, FAdV - D2 - *Hexon* 未被切开而 FAdV - D11 - *Hexon* 被切成 2717 bp 和 571 bp, 与预期片段大小相符。酶切图谱见图 8。

2.4.3 FAdV - E 种 *Hexon* 基因酶切结果 FAdV - E6 - *Hexon*、FAdV - E7 - *Hexon*、FAdV - E8a - *Hexon*、FAdV - E8b - *Hexon* 使用 *AlwN* I 酶切后 FAdV - E6 - *Hexon* 未被切开, FAdV - E8b - *Hexon* 切为 2162 bp 和 1024 bp 两条带, FAdV - E7 - *Hexon*、

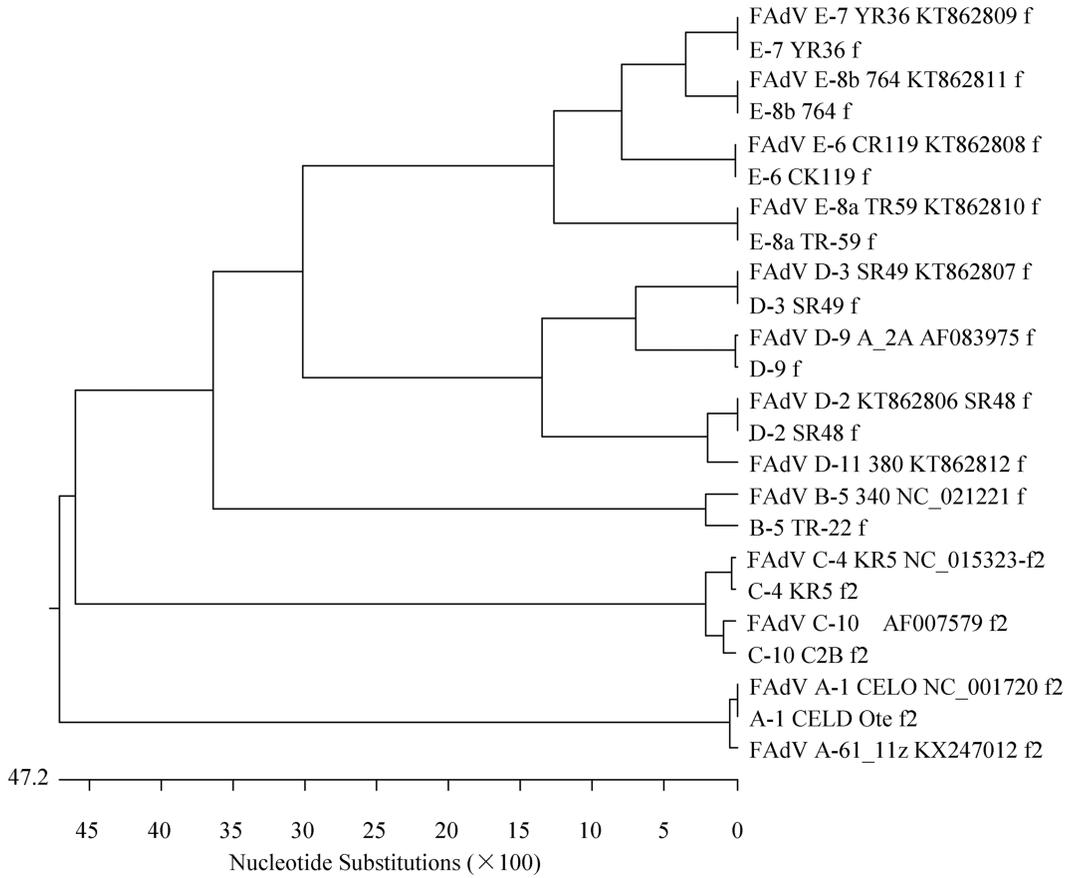


图 3 FAdV 不同血清型毒株 *Fiber* 基因遗传进化分析

Fig 3 Genetic evolution analysis of *Fiber* genes of different FAdV serotypes

		Percent Identity																										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25		
Divergence	1	100.0	98.9	26.3	26.8	41.7	41.6	41.1	40.9	8.3	8.3	7.1	7.1	6.8	6.8	6.7	6.7	12.1	12.1	4.9	4.9	4.9	4.9	4.9	4.9	4.9	1	A-1 CELD Ote f2
	2	0.0	98.9	26.3	26.8	41.7	41.6	41.1	40.9	8.3	8.3	7.1	7.1	6.8	6.8	6.7	6.7	12.1	12.1	4.9	4.9	4.9	4.9	4.9	4.9	4.9	2	FAdV A-1 CELO NC_001720 f2
	3	1.1	1.1	98.9	26.4	26.8	41.7	26.9	26.0	25.6	8.3	8.3	7.1	7.1	6.8	6.8	8.2	8.2	12.1	12.1	4.9	4.9	4.9	4.9	4.9	4.9	3	FAdV A-61_11z KX247012 f2
	4	110.1	110.1	110.5	95.8	44.6	45.1	32.4	25.8	53.9	53.9	52.4	52.4	53.4	53.5	53.7	53.7	53.8	53.8	54.0	54.0	56.6	56.6	54.7	54.7	4	B-5 TR-22 f	
	5	112.1	112.1	112.6	4.3	99.1	41.4	29.4	27.6	54.4	54.4	53.3	53.3	53.5	53.6	53.3	53.3	54.3	54.3	54.1	54.1	56.1	56.1	54.7	54.7	5	FAdV B-5 340 NC_021221 f	
	6	79.3	79.3	79.5	96.6	95.6	99.3	96.9	96.2	24.7	24.7	23.3	23.3	24.2	24.2	24.2	24.2	36.5	36.6	34.4	34.4	36.9	36.9	36.9	36.9	6	C-4 KR5 f2	
	7	79.2	79.2	79.5	96.4	95.4	0.6	96.4	94.8	24.8	24.8	23.6	23.6	24.5	24.5	37.1	37.1	36.9	37.0	34.9	34.9	37.5	37.5	37.4	37.4	7	FAdV C-4 KR5 NC_015323-f2	
	8	79.2	79.2	79.5	97.6	95.8	3.1	3.6	99.1	24.4	24.4	23.5	23.5	24.4	24.4	24.2	24.2	36.6	36.7	36.3	36.3	36.7	36.7	36.6	36.6	8	C-10 C2B f2	
	9	79.7	79.7	79.9	100.2	98.8	4.1	4.5	1.2	99.1	15.2	15.2	10.7	10.7	9.2	9.2	14.9	14.9	35.9	35.9	35.7	35.8	36.0	36.0	36.2	36.2	9	FAdV C-10 AF007579 f2
	10	103.4	103.4	103.5	72.9	71.7	85.7	85.1	85.7	89.1	100.0	73.4	73.4	81.6	81.7	95.7	95.7	61.5	61.3	32.1	32.1	61.0	61.0	61.2	61.2	10	D-2 SR48 f	
	11	103.4	103.4	103.5	72.9	71.7	85.7	85.1	85.7	89.1	0.0	73.4	73.4	81.6	81.7	95.7	95.7	61.5	61.3	32.1	32.1	61.0	61.0	61.2	61.2	11	FAdV D-2 KT862806 SR48 f	
	12	100.4	100.4	101.0	75.3	74.4	92.9	92.1	92.1	95.0	34.0	34.0	100.0	86.9	87.0	72.5	72.5	61.3	61.2	61.2	61.1	62.3	62.3	61.4	61.4	12	D-3 SR49 f	
	13	100.4	100.4	101.0	75.3	74.4	92.9	92.1	92.1	95.0	34.0	34.0	0.0	86.9	87.0	72.5	72.5	61.3	61.2	61.2	61.1	62.3	62.3	61.4	61.4	13	FAdV D-3 SR49 KT862807 f	
	14	102.5	102.5	102.9	77.3	76.3	92.0	91.1	91.0	93.8	21.4	21.4	14.0	14.0	99.9	83.3	83.3	61.3	61.5	60.3	60.3	61.0	61.0	61.1	61.1	14	D-9 f	
	15	102.4	102.4	102.7	77.1	76.0	92.1	91.2	91.1	93.9	21.4	21.4	14.0	14.0	0.0	83.3	83.3	61.5	61.5	60.4	60.4	61.1	61.1	61.3	61.3	15	FAdV D-9 A_2A AF083975 f	
	16	104.5	104.5	104.6	74.0	73.1	89.7	88.6	89.5	93.2	4.2	4.2	34.0	34.0	19.2	19.1	100.0	60.8	60.6	59.4	59.4	60.1	60.1	60.0	60.0	16	D-11 f	
	17	104.5	104.5	104.6	74.0	73.1	89.7	88.6	89.5	93.2	4.2	4.2	34.0	34.0	19.2	19.1	0.0	60.8	60.6	59.4	59.4	60.1	60.1	60.0	60.0	17	FAdV D-11 380 KT862812 f	
	18	104.4	104.4	104.2	72.9	74.4	85.6	85.1	84.3	85.8	61.5	61.5	62.1	62.1	60.4	60.3	61.3	61.3	99.9	85.6	85.7	78.5	78.5	85.9	85.9	18	E-6 CK119 f	
	19	104.2	104.2	104.0	73.1	74.6	85.7	85.2	84.4	86.0	61.4	61.4	62.1	62.1	60.3	60.2	61.2	61.2	0.0	85.5	85.5	78.5	78.5	85.6	85.6	19	FAdV E-6 CR119 KT862808 f	
	20	107.2	107.2	106.6	71.5	71.6	84.3	83.2	83.6	84.7	62.3	62.3	61.9	61.9	61.7	61.4	62.6	62.6	15.7	15.8	99.9	78.5	78.5	92.7	92.7	20	E-7 YR36 f	
	21	107.3	107.3	106.7	71.5	71.7	84.4	83.3	83.7	84.8	62.3	62.3	62.0	62.0	61.7	61.5	62.6	62.6	15.7	15.8	0.0	78.5	78.5	92.8	92.8	21	FAdV E-7 YR36 KT862809 f	
	22	106.4	106.4	106.4	73.4	73.2	86.8	85.5	86.9	87.9	58.6	58.6	58.4	58.4	58.8	58.8	60.6	60.6	25.8	25.8	25.4	25.4	100.0	78.9	78.9	22	E-8a TR-59 f	
	23	106.4	106.4	106.4	73.4	73.2	86.8	85.5	86.9	87.9	58.6	58.6	58.4	58.4	58.8	58.8	60.6	60.6	25.8	25.8	25.4	25.4	0.0	78.9	78.9	23	FAdV E-8a TR59 KT862810 f	
	24	110.4	110.4	110.6	70.8	70.5	85.9	84.6	84.5	85.8	59.8	59.8	60.0	60.0	60.3	60.2	60.1	60.1	16.1	16.1	7.2	7.2	25.4	25.4	100.0	24	E-8b 764 f	
	25	110.4	110.4	110.6	70.8	70.5	85.9	84.6	84.5	85.8	59.8	59.8	60.0	60.0	60.3	60.2	60.1	60.1	16.1	16.1	7.2	7.2	25.4	25.4	0.0	25	FAdV E-8b 764 KT862811 f	

图 4 FAdV 不同血清型毒株 *Fiber* 基因同源性比较

Fig 4 Homology comparison of *Fiber* genes among different FAdV serotypes

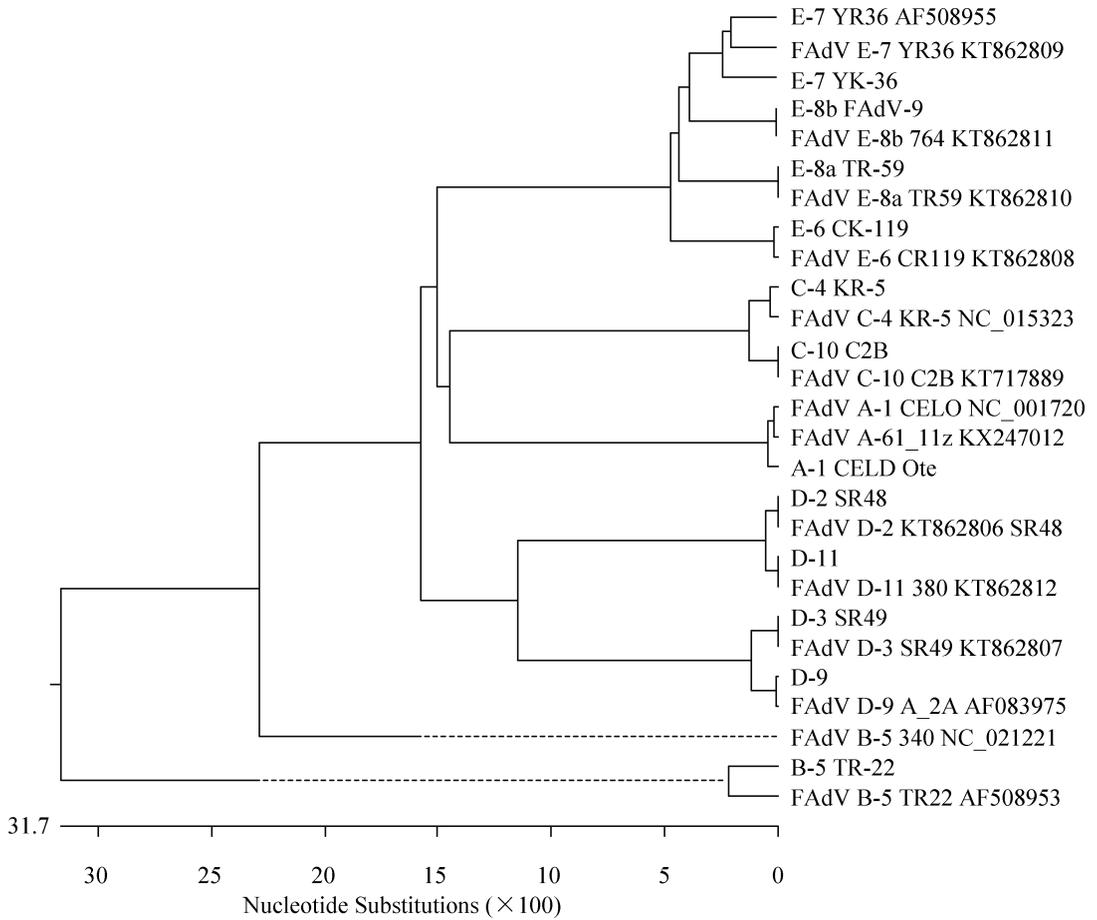


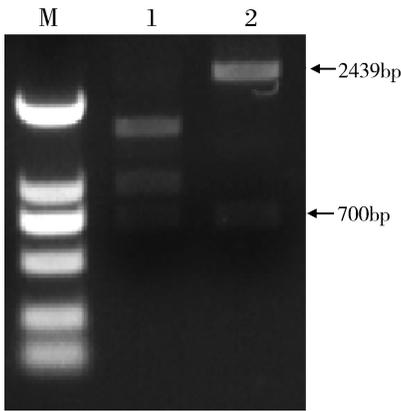
图 5 FAdV 不同血清型毒株 Hexon 基因遗传进化分析

Fig 5 Genetic and evolutionary analysis of Hexon genes of different FAdV serotypes

		Percent Identity																												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27		
Divergence	1	■	99.2	99.3	73.1	69.4	75.5	76.7	76.6	76.5	76.5	74.4	74.4	73.6	73.6	73.3	73.2	74.3	74.3	76.9	77.0	78.2	72.4	78.0	77.6	77.6	77.5	77.6	1	A-1 CELD Ote
	2	0.8	■	99.7	73.2	69.3	75.4	76.5	76.4	76.4	76.4	74.4	74.4	73.5	73.5	73.2	73.2	74.3	74.3	76.7	76.8	78.1	72.5	77.9	77.6	77.6	77.4	77.5	2	FAdV A-1 CELO NC_001720
	3	0.7	0.3	■	73.3	69.5	75.5	76.5	76.4	76.4	76.4	74.4	74.4	73.7	73.7	73.4	73.3	74.4	74.4	76.8	76.8	78.2	72.7	78.0	77.7	77.7	77.5	77.6	3	FAdV A-61_11z KX247012
	4	36.1	36.1	35.9	■	99.1	77.3	71.4	71.4	71.8	71.8	74.6	74.6	75.7	75.7	75.4	75.4	74.7	74.7	76.1	76.1	76.3	72.4	76.0	76.6	76.6	76.4	76.4	4	B-5 TR-22
	5	42.0	42.2	41.8	0.8	■	73.5	67.0	67.2	68.2	68.2	71.1	71.1	74.0	74.0	72.8	72.8	71.5	71.5	73.4	73.4	73.2	73.4	73.2	73.4	73.4	73.5	73.7	5	FAdV B-5 TR22 AF508953
	6	32.2	32.3	32.2	28.0	33.4	■	74.7	74.9	74.6	74.6	77.4	77.4	75.7	75.7	75.4	75.4	77.5	77.5	79.8	79.7	79.8	74.5	79.2	79.4	79.4	79.5	79.5	6	FAdV B-5 340 NC_021221
	7	28.6	28.8	28.8	39.2	46.3	34.3	■	99.4	97.7	97.7	73.1	73.1	71.2	71.2	70.9	70.9	72.9	72.9	75.9	75.7	76.4	69.3	76.6	76.4	76.4	76.1	76.2	7	C-4 KR-5
	8	28.7	28.9	28.9	39.2	46.0	34.1	0.6	■	97.4	97.4	73.1	73.1	71.3	71.3	71.0	71.0	72.9	72.9	75.8	75.7	76.3	69.5	76.4	76.3	76.3	76.0	76.0	8	FAdV C-4 KR-5 NC_015323
	9	29.0	29.2	29.2	38.8	44.7	34.5	2.3	2.7	■	100.0	73.4	73.4	71.5	71.5	70.9	70.9	73.1	73.1	76.3	76.2	76.6	69.5	76.7	76.5	76.5	76.2	76.3	9	C-10 C2B
	10	29.0	29.2	29.2	38.8	44.7	34.5	2.3	2.7	0.0	■	73.4	73.4	71.5	71.5	70.9	70.9	73.1	73.1	76.3	76.2	76.6	69.5	76.7	76.5	76.5	76.2	76.3	10	FAdV C-10 C2B KT717889
	11	34.6	34.6	34.5	31.9	37.3	29.0	36.3	36.2	35.7	35.7	■	100.0	80.4	80.4	80.4	80.4	99.1	99.1	79.5	79.3	79.3	76.2	79.2	79.8	79.8	79.3	79.3	11	D-2 SR48
	12	34.6	34.6	34.5	31.9	37.3	29.0	36.3	36.2	35.7	35.7	0.0	■	80.4	80.4	80.4	80.4	99.1	99.1	79.5	79.3	79.3	76.2	79.2	79.8	79.8	79.3	79.3	12	FAdV D-2 KT862806 SR48
	13	34.7	35.0	35.0	31.2	32.6	31.8	39.1	39.2	38.8	38.8	23.0	23.0	■	100.0	97.7	97.6	80.4	80.4	77.3	77.4	76.9	74.3	77.1	76.9	76.9	77.0	77.1	13	D-3 SR49
	14	34.7	35.0	35.0	31.2	32.6	31.8	39.1	39.2	38.8	38.8	23.0	23.0	0.0	■	97.7	97.6	80.4	80.4	77.3	77.4	76.9	74.3	77.1	76.9	76.9	77.0	77.1	14	FAdV D-3 SR49 KT862807
	15	35.0	35.3	35.2	31.5	34.4	31.9	40.0	40.0	39.6	39.6	23.0	23.0	2.3	2.3	■	99.9	80.5	80.5	77.1	77.3	77.2	74.6	77.1	76.7	76.7	76.9	76.9	15	D-9
	16	35.1	35.4	35.3	31.5	34.4	31.9	40.0	40.0	39.6	39.6	23.0	23.0	2.4	2.4	0.1	■	80.5	80.5	77.1	77.3	77.2	74.6	77.1	76.7	76.7	76.9	76.9	16	FAdV D-9 A_2A AF083975
	17	34.7	34.7	34.6	31.7	36.6	29.0	36.8	36.6	36.3	36.3	0.9	0.9	22.8	22.8	22.8	■	100.0	79.2	79.1	78.9	75.6	78.8	79.5	79.5	79.0	79.0	17	D-11	
	18	34.7	34.7	34.6	31.7	36.6	29.0	36.8	36.6	36.3	36.3	0.9	0.9	22.8	22.8	22.8	0.0	■	79.2	79.1	78.9	75.6	78.8	79.5	79.5	79.0	79.0	18	FAdV D-11 380 KT862812	
	19	29.1	29.3	29.2	30.3	34.1	25.3	31.5	31.6	30.9	30.9	25.0	25.0	28.1	28.1	28.2	28.2	25.3	25.3	■	99.6	93.4	88.9	93.3	91.7	91.7	91.4	91.5	19	E-6 CK-119
	20	29.0	29.2	29.1	30.3	34.1	25.4	31.7	31.7	31.2	31.2	25.2	25.2	28.0	28.0	28.1	28.1	25.6	25.6	0.4	■	93.2	88.9	93.2	91.6	91.6	91.2	91.2	20	FAdV E-6 CR119 KT862808
	21	27.2	27.3	27.2	30.1	34.2	26.2	29.7	29.8	29.4	29.4	25.3	25.3	28.5	28.5	28.5	28.5	25.8	25.8	7.1	7.4	■	99.8	98.7	93.3	93.3	96.0	96.0	21	E-7 YK-36
	22	36.1	36.0	35.6	35.4	33.9	32.5	40.7	40.5	40.9	40.9	29.5	29.5	31.9	31.9	31.9	31.9	30.4	30.4	12.1	12.1	0.2	■	99.8	88.5	88.5	91.2	91.3	22	FAdV E-7 YR36 AF508955
	23	27.6	27.7	27.6	30.3	34.2	26.2	29.9	30.1	29.8	29.8	25.1	25.1	28.5	28.5	28.5	28.5	25.6	25.6	7.0	7.1	1.3	0.2	■	94.3	94.3	94.6	94.7	23	FAdV E-7 YR36 KT862809
	24	28.1	28.2	28.1	29.6	33.7	25.8	30.1	30.2	29.9	29.9	24.3	24.3	29.3	29.3	29.4	29.4	24.7	24.7	8.9	8.9	7.1	12.9	6.0	■	100.0	93.5	93.6	24	E-8a TR-59
	25	28.1	28.2	28.1	29.6	33.7	25.8	30.1	30.2	29.9	29.9	24.3	24.3	29.3	29.3	29.4	29.4	24.7	24.7	8.9	8.9	7.1	12.9	6.0	0.0	■	93.5	93.6	25	FAdV E-8a TR59 KT862810
	26	28.2	28.2	28.2	29.9	34.0	26.6	30.1	30.2	29.9	29.9	25.6	25.6	28.8	28.8	28.7	28.7	26.0	26.0	9.3	9.6	4.1	9.1	5.4	6.9	6.9	■	100.0	26	E-8b FAdV-9
	27	28.2	28.2	28.2	29.9	34.0	26.6	30.1	30.2	29.9	29.9	25.6	25.6	28.8	28.8	28.7	28.7	26.0	26.0	9.3	9.6	4.1	9.1	5.4	6.9	6.9	0.0	■	27	FAdV E-8b 764 KT862811

图 6 FAdV 不同血清型毒株 Hexon 基因同源性比较

Fig 6 Homology comparison of Hexon genes in different FAdV serotypes

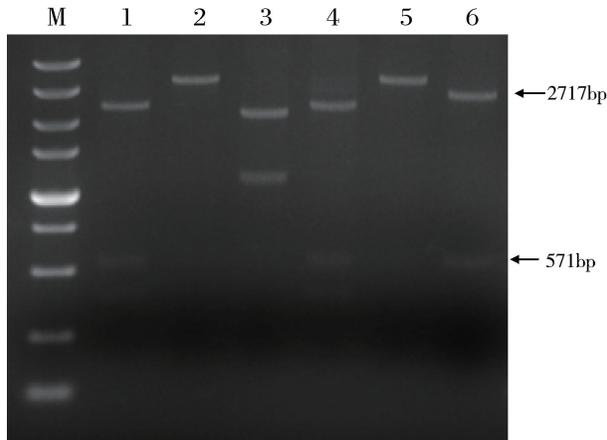


M: DNA Marker 2000; 1: FAdV - C4 - Hexon *Acc65* I 酶切片段;  
2: FAdV - C10 - Hexon *Acc65* I 酶切片段

M: DNA Marker 2000; 1: FAdV - C4 *Acc65* I enzyme fragment;  
2: FAdV - C10 *Acc65* I enzyme fragment

图 7 FAdV - C 种 *Hexon* 基因酶切结果

Fig 7 Results of enzyme digestion of FAdV - C *Hexon* gene



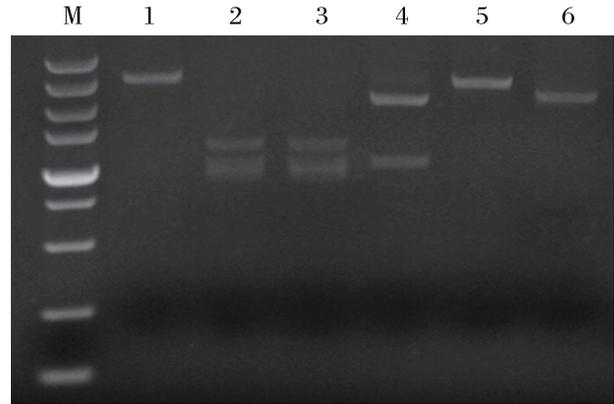
M: DNA Marker 5000; 1: FAdV - D2 *Hpa* I 酶切片段;  
2: FAdV - D3 *Hpa* I 酶切片段; 3: FAdV - D9 *Hpa* I 酶切片段;  
4: FAdV - D11 *Hpa* I 酶切片段; 5: FAdV - D2 *BsaB* I 酶切片段;  
6: FAdV - D11 *BsaB* I 酶切片段

M: DNA Marker 5000; 1: FAdV - D2 *Hpa* I enzyme fragment;  
2: FAdV - D3 *Hpa* I enzyme fragment; 3: FAdV - D9 *Hpa* I enzyme fragment;  
4: FAdV - D11 *Hpa* I enzyme fragment; 5: FAdV - D2 *BsaB* I enzyme fragment;  
6: FAdV - D11 *BsaB* I enzyme fragment

图 8 FAdV - D 种 *Hexon* 基因酶切结果

Fig 8 Results of enzyme digestion of FAdV - D *Hexon* gene

FAdV - E8a - Hexon 被切成 1232 bp、1021 bp 和 932 bp 三条带。再将 FAdV - E7 - Hexon 和 FAdV - E8a - Hexon 使用 *Sac* II 酶切后, FAdV - E7 - Hexon 被切为 273 bp 和 2918 bp 两条带,而 FAdV - E8a - Hexon 则被切成 2368 bp、547 bp 和 277 bp 三条带,与预期片段大小相符。酶切图谱见图 9。



M: DNA Marker 5000; 1: FAdV - E6 *AluN* I 酶切片段;  
2: FAdV - E7 *AluN* I 酶切片段; 3: FAdV - E8a *AluN* I 酶切片段; 4: FAdV - E8b *AluN* I 酶切片段;

5: FAdV - E7 *Sac* II 酶切片段; 6: FAdV - E8a *Sac* II 酶切片段  
M: DNA Marker 5000; 1: FAdV - E6 *AluN* I enzyme fragment;  
2: FAdV - E7 *AluN* I enzyme fragment; 3: FAdV - E8a *AluN* I enzyme fragment; 4: FAdV - E8b *AluN* I enzyme fragment;  
5: FAdV - E7 *Sac* II enzyme fragment; 6: FAdV - E8a *Sac* II enzyme fragment

图 9 FAdV - E 种 *Hexon* 基因酶切结果

Fig 9 Results of enzyme digestion of FAdV - E *Hexon* gene

### 3 讨论与结论

病毒分离鉴定、PCR 及测序分析、琼脂扩散试验、病毒中和试验等病原学和血清学方法是 FAdV 鉴定及感染诊断的常用方法<sup>[1,12]</sup>。相关方法的建立和验证等需要背景清楚且纯净的 FAdV 相关标准毒株、核酸及特异性血清,其中标准毒株是基础。Hexon 蛋白作为禽腺病毒的主要结构蛋白之一,具有种及血清型特异性抗原决定簇,也与致病性密切相关。同时,在病毒感染中 Fiber 最先与细胞表面的受体结合,且具有较好的免疫原性,所以常被用

于亚单位疫苗和检测试剂盒的研究<sup>[13]</sup>。FAV 的种与血清型的对应关系中, A 种对应血清 1 型, B 种对应血清 5 型, C 种对应血清 4、10 型, D 种对应血清 2、3、9、11 型, E 种对应血清 6、7、8a、8b 型。有关种与血清型对应关系的分子生物学分析方法, 有关学者已进行了多种尝试, 获得了非常有意义的参考依据<sup>[14]</sup>。相比 *Hexon* 基因, *Fiber* 基因在不同基因型毒株之间保守性更低, 而在不同基因型内不同血清型间保守性相对较高, 因此, 用于分型鉴定研究更具参考价值。本研究首次设计了针对 5 个种的 *Fiber* 基因鉴定引物, 通过对 12 个血清型毒株 *Fiber* 基因全长序列进行 PCR 扩增, 来区分不同种的 FAV, 证明了毒株种的特异性, 且各毒株不存在种间交叉。进一步对 12 个毒株 *Hexon* 基因和 *Fiber* 基因测序结果的遗传进化分析, 结果表明菌种库引进的毒株中 B5 与 B 种参考毒株 340 株之间同源性为 95.8%, 其余 11 个毒株与对应参考毒株 *Fiber* 同源性在 99.1% 至 100% 之间。由于 GeneBank 中未见 B 种 TR22 毒株相应的基因参考序列, 目前菌种库中标注的 TR22 毒株 *Fiber* 序列与 340 毒株序列同源性为 95.8%, 与其它种的同源性仅为 25.8% 至 56.6%, 初步判定其为 B 种 FAV。而 *Hexon* 基因的分析结果表明, B5 与参考毒株 340 株的同源性为 77.3%, 其余 11 个毒株与对应参考毒株 *Hexon* 基因同源性在 99.1% 至 100% 之间, 进一步证明我所保存的毒株标注名称与参考毒株名称一致。

为确定毒株中是否污染同一种的其他血清型毒株, 用酶切法对 C、D、E 种毒株的纯净性进行鉴定。根据不同血清型 *Hexon* 基因序列中酶切位点所在位置的差异, 选取 *Acc65* I、*Hpa* I、*Bsa*B I、*Alw*N I、*Sac* II 五种限制性内切酶, 可以将 C、D、E 种的 10 个血清型毒株切为不同大小的片段样态, 以此来实现对不同毒株的区分和鉴定。通过酶切产物片段的大小可知, 各毒株均未污染本种中其他血清型的毒株, 纯净性良好。与之前研究中只用 *Hexon* 基因进行分型的方法相比<sup>[1]</sup>, 遗传进化分析结合酶切法对 FAV 12 个血清型毒株的 *Hexon* 基因和 *Fiber* 基因进行系统

特异性和纯净性分析更为准确。

本研究表明, 我国兽医微生物菌种保存中心保存的 FAV 12 个血清型毒株纯净性好, 且与国际参考毒株一致, 遗传背景清晰可靠, 为相应特异性血清制备、疫苗研发和相关检验诊断方法的建立提供了重要菌种资源。

## 参考文献:

- [1] David E S. Diseases of poultry[M]. 14<sup>th</sup> ed. Hoboken: John Wiley&Sons, Inc., 2020: 321-347.
- [2] Chen H, Dou Y, Zheng X, et al. Hydropericardium hepatitis syndrome emerged in cherry valley ducks in China[J]. Transbound Emerg Dis, 2017, 64: 1262-1267.
- [3] Li H, Wang J, Qiu L, et al. Fowl adenovirus species C serotype 4 is attributed to the emergence of hepatitis - hydropericardium syndrome in chickens in China[J]. Infect Genet Evol, 2016, 45: 230-241.
- [4] Zhang T, Jin Q, Ding P, et al. Molecular epidemiology of hydropericardium syndrome outbreak - associated serotype 4 fowl adenovirus isolates in central China [J]. Virol J, 2016, 13 (1): 188.
- [5] Liu Y, Wan W, Gao D, et al. Genetic characterization of novel fowl aviadenovirus 4 isolates from outbreaks of hepatitis - hydropericardium syndrome in broiler chickens in China[J]. Emerg Microbes Infect, 2016, 5 (11): e117. doi: 10.1038/emi.2016.115.
- [6] Pan Q, Liu L, Wang Y, et al. The first whole genome sequence and pathogenicity characterization of a fowl adenovirus 4 isolated from ducks associated with inclusion body hepatitis and hydropericardium syndrome[J]. Avian Pathol, 2017, 46(5): 571-578.
- [7] Chen L, Yin L, Zhou Q, et al. Epidemiological investigation of fowl adenovirus infections in poultry in China during 2015-2018 [J]. BMC Vet Res, 2019, 15(1): 271.
- [8] Wei Z, Liu H, Diao Y, et al. Pathogenicity of fowl adenovirus (FAV) serotype 4 strain SDJN in Taizhou geese [J]. Avian Pathol, 2019, 48(5): 477-485.
- [9] Niu Y J, Sun W, Zhang G H, et al. Hydropericardium syndrome outbreak caused by fowl adenovirus serotype 4 in China in 2015 [J]. J Gen Virol, 2016, 97(10): 2680-2690.
- [10] Zhao J, Zhong Q, Zhao Y, et al. Pathogenicity and complete genome characterization of fowl adenoviruses isolated from chickens

- associated with inclusion body hepatitis and hydropericardium syndrome in China[J]. *PloS One*, 2015, 10(7): e0133073.
- [11] 范书才, 黄建华, 赵兵, 等. 鸡腺病毒的保存与鉴定[J]. 中国兽药杂志, 2002, 36(4): 27-29.
- Fan S C, Huang J H, Zhao B, *et al.* Identification and conservation of fowl adenovirus[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2002, 36(4): 27-29.
- [12] Saifuddin M, Wilks C R. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect and quantify adenovirus in chicken tissues[J]. *Avian Diseases*, 1990, 34(2): 239.
- [13] 扈荣良. 现代动物病毒学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2014: 667-683.
- Hu R L. *Modern animal virology*[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2014: 667-683.
- [14] Wang X, Tang Q, Chu Z, *et al.* Immune protection efficacy of FAdV-4 surface proteins fiber-1, fiber-2, hexon and penton base[J]. *Virus Res*, 2018, 245: 1-6.

(编辑:李文平)