



家养野猪源流行性腹泻病毒的分子鉴定及其 S1 基因的遗传变异分析

常洪涛¹, 郭占达¹, 刘慧敏², 陈陆¹, 赵军¹, 李鸿雁¹, 宋品¹, 王川庆^{1*}

(1. 河南农业大学牧医工程学院, 河南 郑州 450002;

2. 中国科学院动物研究所, 北京 100101)

摘要: 采用 RT-PCR 方法对河南省某猪场送检的家养野猪病料进行检测, 表明其病原为猪流行性腹泻病毒 (PEDV), 命名为 JZ0801, 并对其 S1 基因克隆后进行序列比较和遗传变异分析。结果显示: JZ0801 与 PEDV 参考毒株的核苷酸序列同源性为 86.8%~99.0%, 与疫苗株 CV777 的核苷酸同源性仅为 87.1%; PEDV 可分为 I、II 和 III 群, 2011 年后流行的 PEDV 主要分布在 I 群和 II 群; JZ0801 分布于 I 群, 与国内猪源分离株 HN6-201211 和 HBMC2012 亲缘关系最近, 而与日本、韩国毒株在遗传关系上关系较远。研究结果证实, 家养野猪源 PEDV 与目前我国各地流行 PEDV 的主要类群相一致; PEDV 可感染家养野猪并发病, 提醒在进行野生动物养殖活动中要充分考虑疫病传播的生态学; PEDV 存在较大的地域差异。

关键词: 家养野猪; 猪流行性腹泻病毒; S1 基因; 遗传变异

中图分类号: S852.65 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2014)07-0065-04

猪流行性腹泻 (porcine epidemic diarrhea, PED) 是由猪流行性腹泻病毒 (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 引起猪的一种以水样腹泻、呕吐、脱水和哺乳仔猪高致死率为主要临床特征的肠道传染病^[1-2]。1978 年英国、比利时首次发现该病^[3-4], 随后, 加拿大、日本、德国、法国等国相继报道。1984 年国内证实该病的存在^[5], 多年来一直严重威胁着我国养猪业的健康发展。PEDV 为单股正链 RNA 病毒, 属冠状病毒科、冠状病毒亚科、甲型冠状病毒属, 其基因组全长约 28 kb, 包括至少 7 个开放阅读框、5' 端非编码区和 3' 端非编码区^[6]。其中位于 5' 端编码的非结构蛋白占据基因组全长的 2/3, 而 3' 端则主要是编码纤突 (S) 蛋白、小膜 (E) 蛋白、膜 (M) 蛋白和核衣壳 (N) 蛋白的基因, 在 S 基因和 E 基因之间还有编码非结构蛋白的 ORF3 基因。S 蛋白位于病毒粒子的最表面, 含有主要的抗原决定簇, 在病毒与细胞表面受体结合后通过膜融合侵入宿主细胞和在感染宿主体内介导中和抗体产生的过程中发挥重要生物学作用^[7]。另外 S 蛋白的变异也将导致其毒力、宿主范围和细胞培养特性等发生改变。最新研究发现, S 蛋白可分为 S1 (第 1~735 位氨基酸) 和 S2 (第 736~1383 位氨基酸) 2 个结构域^[8-9], 且其突变多集中于 S1 区。因此, 开展针对 S1 基因及其编码蛋白的研究已成为 PEDV 研究领域的最大热点之一。

2010 年 11 月至今, 以 PED 为主要致病因素的新生仔猪急性腹泻疫情在全国范围内大暴发, 主要感染 1 周龄以内 (尤其是 2~3 天) 的初生仔猪, 发病率高达 90% 以上, 死亡率几乎为 100%, 同时具有发病急、传播速度极快、反复发作、疫苗保护率极低及药物完全无效等特征。河南省是养猪大省, 年出栏量多年稳居全国前列, 也是此次疫情发生和流行最为严重的省份之一, 经济损失惨重。本研究旨在对河南省焦作市某综合生态养猪场送检的家养野猪源 PEDV 疑似病料进行 S1 基因扩增、克隆、测序和遗传演化分析, 以期在分子水平上对其进行鉴定、分型, 并在分子流行病学研究、快速诊断和新型疫苗研制等方面提供重要参考依据。

1 材料与方法

1.1 病料样品

待检样品采集自 2012 年 8 月份河南省焦作市某综合生态养猪场送检的发病家养野猪的肠道内容物, 冻存待用, 并将其命名为 JZ0801。

1.2 主要试验试剂

RNA 提取用 TRIzol LS Reagent 购自 Invitrogen 公司; Taq DNA 聚合酶、M-MLV 反转录酶、DL2000 DNA marker 等购自宝生物工程 (大连) 有限公司。

1.3 引物设计

利用 Primer Premier 5.0 软件, 参考 PEDV CV777 疫苗株 (GenBank 登录号: AF353511) 基因序列, 设计并合成 1 对特异性引物, 预计扩增片段大小为 1 052 bp。引物序列如下: P1: 5'-TGTACTGGGCGGTTATCT-3'; P2: 5'-TTTCCCTGACGGTAGGAG-3'。

收稿日期: 2013-10-30; 修回日期: 2014-05-07

作者简介: 常洪涛 (1978-), 男, 博士研究生, 讲师

* 通信作者: 王川庆, 教授, 主要从事动物传染病免疫防治研,

E-mail: wehuanq@163.com

1.4 病料处理及总 RNA 提取

取疑似 PEDV 肠内容物，用 Hank's 液做 10 倍稀释，反复冻融 2 ~ 3 次，3 000 r/min 离心取上清，12 000 r/min 4 °C 离心 5 min，收集上清，按照 TRIzol 使用说明书，提取总 RNA。

1.5 RT-PCR 及测序

应用下游引物将提取的总 RNA 反转录成 cDNA，并以其为模板按照以下参数进行 PCR 扩增：95 °C 预变性 5 min；94 °C 变性 1 min，61 °C 退火 1 min，72 °C 延伸 1 min，30 个循环；72 °C 加长延伸 10 min。将 PCR 产物胶回收纯化后与 pMD18-T 载体连接，转化 DH5 α ，筛选阳性克隆经 PCR 鉴定后，送至宝生物工程（大连）公司测序。

1.6 S1 基因同源性比较与系统进化分析

运用 DNA Star 软件包中的 MegAlign 程序，将 JZ0801 与从 NCBI GenBank 下载的其他 PEDV 参考毒株（表 1）的 VP1 基因核苷酸序列进行同源性分析，并构建系统进化树。

表 1 用于序列比较和分析的 PEDV 参考毒株信息

登录号	毒株来源	毒株名称	时间
JX163294	中国，湖北	HBMC2012	2012
KC242911	中国，湖北	HN6-201211	2012
JX435304	中国，北京	HB-2012-3	2012
JX070672	中国，黑龙江	CH/FJXM 2/2012	2012
JQ239435	中国，湖北	CH7	2011
JQ239433	中国，湖北	CH5	2011
JQ638923	中国，黑龙江	CH/JLGZL/2011	2011
JQ517274	中国，湖南	HuN	2011
JQ771752	中国，山东	ZB	2011
JQ627654	中国，河南	CH/CG/11	2011
JQ627653	中国，河南	CH/AY/11	2011
EU031893	中国，甘肃	DX	2007
AY653204	中国，江苏	JS-2004-2	2004
AB548622	日本	KH	2010
AB548618	日本	83P-5	2010
DQ462404	韩国	DR13	2006
AF353511	比利时	CV777	1988

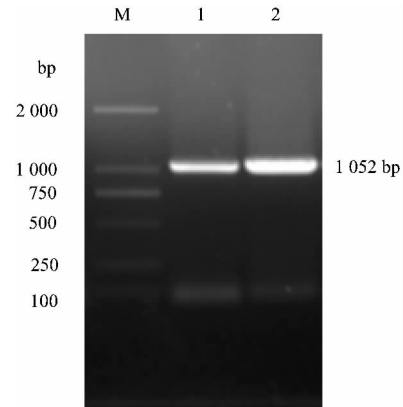
1.7 蛋白特性分析

运用 DNASTar 软件包中的 Protean 程序对 JZ0801 S1 蛋白的亲水性（Kyte-Doolittle 法预测）、表面可能性（Emimi 法预测）和抗原指数（Jameson-Wolf 法预测）进行分析，预测抗原表位。

2 结果与分析

2.1 S1 基因 RT-PCR 扩增及 PCR 鉴定

利用所设计引物，应用 RT-PCR 技术扩增出 1 条长度约为 1 052 bp 的基因片段，得到与预期目的片段大小一致的扩增产物，经 PCR 鉴定，表明成功获得 JZ0801 S1 基因的重组质粒（图 1）。



M. DL2000 DNA marker; 1. JZ0801 S1 基因; 2. JZ0801 S1 基因重组质粒

图 1 JZ0801 S1 基因的 RT-PCR 扩增结果和重组质粒 PCR 鉴定结果

2.2 S1 基因序列

对重组质粒中插入的 S1 基因目的片段进行测序后，获得 JZ0801 的 S1 基因序列，其长度为 1 052 bp，已收录到 GenBank（KF413895）。

2.3 S1 基因同源性分析

将 JZ0801 S1 基因核苷酸序列与其他参考毒株进行同源性比较（图 2），可见 JZ0801 与 PEDV 参考毒株的核苷酸序列同源性为 86.8% ~ 99.0%，与疫苗株 CV777 的核苷酸同源性仅为 87.1%。

2.4 S1 基因系统进化分析

基于 JZ0801 S1 基因核苷酸序列，使用 DNASTar 软件对 JZ0801 和 17 个 PEDV 参考毒株，绘制系统发育进化树（图 3）。可见 PEDV 可分为 I、II 和 III 群。2011 年后流行的 PEDV 主要分布在 I 群和 II 群，本研究中的家养野猪源 PEDV JZ0801 分布于 I 群，与国内猪源分离株 HN6-201211 和 HBMC2012 亲缘关系最近，而与 83P-5（日本）、KH（日本）和 DR13（韩国）毒株在遗传关系上关系较远，与疫苗株 CV777 关系也较远。

2.5 蛋白特性分析及其抗原表位预测

JZ0801 的 S1 蛋白由 350 aa 组成，综合其亲水性、表面可能性和抗原指数等参数，预测有 7 个潜在

的抗原表位 (图4), 分布在 E₅₁ PFDPSG、K₆₄ AT-NGNTNA、T₉₀ ANNDVTT、F₁₃₈ KNDW、D₁₇₆ GTSYQ、S₃₀₃ NSSD 和 D₃₃₁ TYNST。CH5、DR13、KH 也有7个, 83P-5、CH7、CH/FJXM-2/2012 和 CH/JLGZL/2011 有8个, CH/AY/11、DX 和 JS-2004-2 有6

个, CH/CG/11、HB-2012-3、HuN 和 ZB 有5个, HBMC2012 和 HN6-201211 有4个。与 CV777 疫苗株相比, 在 47~53 位、78~83 位、134~138 位和 145~149 位缺失1个抗原位点, 在 90~97 位和 176~181 位增加了2个抗原位点。

		Percent Identity																			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18		
Divergence	1	█	94.4	94.5	96.3	96.2	99.6	99.1	96.3	94.2	94.3	94.2	94.4	96.3	96.7	95.1	94.4	87.5	1	83P-5	
	2	6.0	█	97.9	95.4	95.1	95.0	94.1	93.6	95.0	98.2	98.3	99.3	95.5	95.7	94.4	98.2	98.9	2	CH-AY-11	
	3	5.9	2.1	█	96.6	95.8	95.2	94.2	93.7	95.5	98.6	98.8	98.5	97.9	96.2	96.4	94.4	98.8	97.8	3	CH-CG-11
	4	3.9	4.8	3.6	█	98.2	97.5	96.0	95.7	97.7	96.2	96.4	96.0	95.4	98.6	98.7	93.6	96.4	88.9	4	CH-FJXM-2-2012
	5	4.0	5.2	4.4	1.8	█	97.6	95.9	95.6	97.3	95.5	95.5	95.0	98.2	98.3	93.3	95.6	88.9	5	CH5	
	6	4.0	5.3	5.1	2.6	2.4	█	95.8	95.5	97.2	94.9	94.9	95.0	95.1	97.5	97.8	93.2	95.1	88.4	6	CH7
	7	0.4	6.3	6.1	4.1	4.2	4.3	█	99.5	96.0	94.0	94.0	94.0	94.1	96.0	96.4	94.9	94.1	87.1	7	CV-777-s
	8	0.8	6.6	6.4	4.4	4.5	4.6	0.5	█	95.5	93.5	93.8	93.5	93.6	95.7	96.1	94.3	93.6	86.8	8	DR13
	9	3.8	5.0	4.5	2.4	2.8	2.9	4.1	4.4	█	95.1	90.0	95.2	95.1	97.8	98.1	93.4	95.3	89.6	9	DX
	10	6.1	1.8	1.4	4.0	4.7	5.5	6.4	6.7	4.9	█	99.1	98.7	98.1	95.9	96.0	94.2	99.4	98.5	10	HB-2012-3
	11	5.9	1.7	1.2	3.7	4.6	5.3	6.2	6.4	4.7	0.9	█	99.0	98.4	96.1	96.2	94.3	99.2	99.0	11	HBMC2012
	12	6.1	1.8	1.6	4.2	4.7	5.4	6.4	6.7	4.8	1.3	1.0	█	98.3	96.0	96.1	94.2	98.9	99.0	12	HN6-201211
	13	6.0	0.7	2.1	4.8	5.3	5.3	6.3	6.6	4.9	1.9	1.7	1.7	█	95.5	95.7	94.4	98.2	98.9	13	HuN
	14	3.8	4.8	3.9	1.4	1.8	2.5	4.1	4.4	2.2	4.3	4.1	4.2	4.8	█	99.1	93.4	96.1	89.0	14	JLGZL
	15	3.4	4.5	3.7	1.4	1.7	2.2	3.7	4.0	1.9	4.2	3.9	4.0	4.5	0.9	█	93.8	96.2	89.1	15	JS-2004-2
	16	5.1	6.0	5.9	6.7	7.1	7.4	5.3	5.7	6.7	6.1	5.9	6.1	5.9	6.9	6.6	█	94.3	92.2	16	KH
	17	5.9	1.8	1.2	3.7	4.5	5.2	6.2	6.5	4.7	0.6	0.8	1.1	1.8	4.0	4.0	6.0	█	98.9	17	ZB
	18	12.9	1.2	2.2	11.3	11.3	11.7	12.9	13.2	10.3	1.5	1.0	1.1	1.1	11.1	11.0	8.6	1.2	█	18	JZ0801

图2 JZ0801 与 PEDV 参考株的同源性比较结果

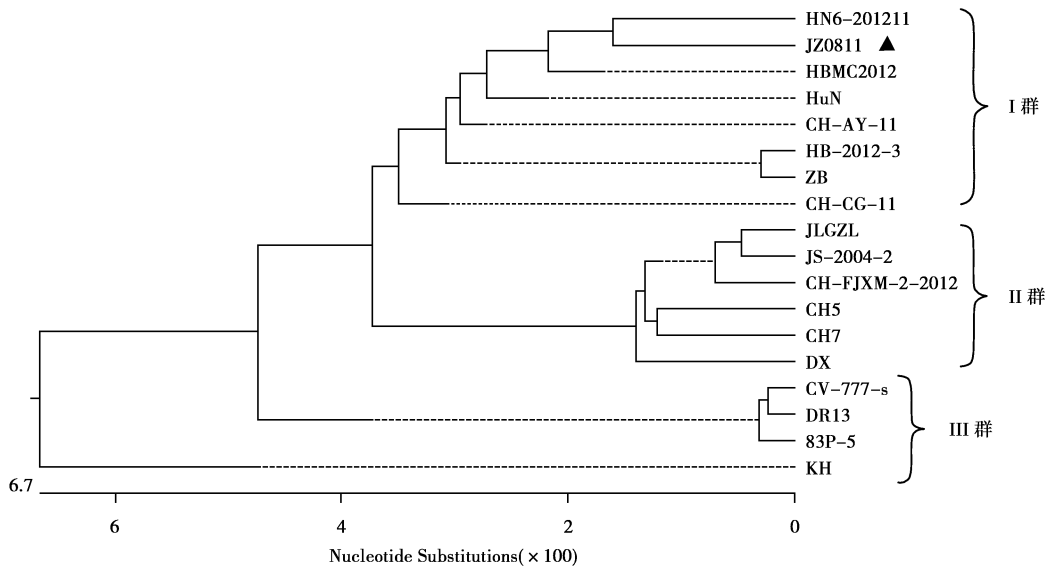


图3 基于 PEDV S1 基因核苷酸序列的系统进化树

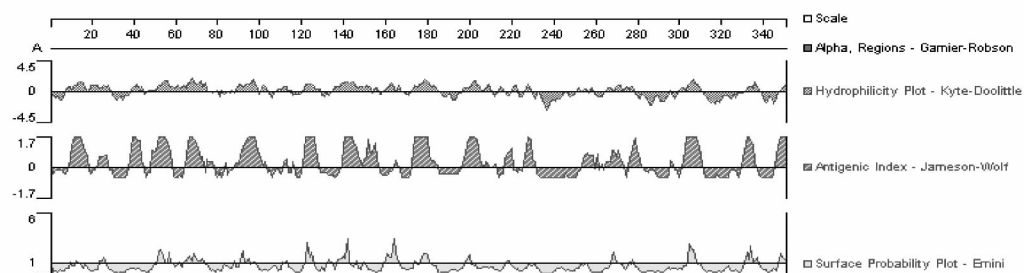


图4 JZ0801 株 S1 蛋白特性预测

3 讨论

近年来,野猪相关产品作为绿色食品的重要来源之一,因其独特的营养价值和风味而日益备受青睐,国内各地都在进行野猪资源的开发利用,如野猪家养或作为父本经济杂交以满足人们的消费需求。但随之而来的问题是,由于野生生态环境改变,接触家猪机会频繁以及屠宰、加工、消费环节中存在的风险因素,都使得野猪和家猪彼此交叉感染 PEDV 变成可能。目前国内已报道有大量家猪 PEDV 的基因遗传信息^[10],但有关家养野猪源 PEDV 的研究尚不多见。因此开展对家养野猪源 PEDV 地方流行毒株的分子鉴定和遗传演化工作,可为研究其分子流行病学特征、分子生态学、疫苗毒株筛选和制定综合防控措施提供科学依据。

现有研究得知,组成 PEDV S 蛋白的 2 个多肽中 S1 负责识别细胞的受体,也是病毒基因组中极易发生变异的区域。鉴于 PEDV 当前流行毒株极难分离,其血清学鉴定和疫苗研发等工作难以开展,因此我们利用从家养野猪疑似病料中测得的 S1 基因作为研究对象,分析其与相关家猪源毒株间的亲缘关系,以判断该病毒在不同猪种中新生物学特点,为选择和构建针对性更强的疫苗候选株奠定理论基础。本研究中 JZ0801 与 PEDV 国内外参考毒株的核苷酸序列同源性为 86.8%~99.0%,与 2012 年测定的河南地方分离株 HN6-201211 和河北地方分离株 HBMC2012 同源性高达 99.0%,均属于 I 群,这也是目前我国各地流行的 PEDV 的主要类群,也是急需研制新型疫苗的一个基因型。另外,值得警惕的是,我国湖北、黑龙江等地的部分流行毒株属于 II 群,提示我国当前广泛流行的 PEDV 应具有不同的感染来源,从而提醒我们在研制新型疫苗时应充分考虑 PEDV 不同地域流行株的异质性。另外, JZ0801 与国内 2011 年后 PEDV 主要流行毒株高度同源,提示此次家养野猪疫情可能是由家猪源 PEDV 传播而来,其交叉感染机制仍有待于进一步验证,但此类问题提醒我们在进行野生动物养殖活动中要充分考虑疫病传播的生态学;而 JZ0801 与日本、韩国分离株的亲缘关系较远,从而提示 PEDV 存在较大的地域差异。

该发病猪场曾接种过猪传染性胃肠炎-猪流行性腹泻二联灭活疫苗,但并未使免疫野猪群获得有效保护,其主要原因在于 JZ0801 的 S1 基因与疫苗毒株

CV777 的同源性仅为 87.1%,已发生大幅度变异,难以使疫苗产生作用;其次, PEDV 免疫是以局部黏膜免疫为主,一般认为只有弱毒活苗才能在乳腺等局部产生可有效抵抗 PEDV 感染的 sIgA,但我国目前并未批准活疫苗推广使用,而经肌肉注射或后海穴注射的灭活疫苗其抗体类型主要是 IgG,并不能产生确切的免疫效果。本研究证实 PEDV 也能感染家养野猪并导致发病,从而在一定程度上改变了“野猪抗病性强”的传统认识,并提醒我们在进行野生动物开发利用中应充分考虑规模化饲养所带来的疫病防控问题。同时,通过生物软件分析、处理、模拟和预测,准确得知 JZ0801 S1 蛋白的优势抗原表位,和疫苗株 CV777 相比已有较大差异,从而新型疫苗研发提供理论指导。

参考文献:

- [1] Debouck P, Pensaert M. Experimental infection of pigs with a new porcine enteric coronavirus, CV777 [J]. *Am J Vet Res*, 1980, 41 (2): 219-223.
- [2] Debouck P, Pensaert M, Coussement W. The pathogenesis of an enteric infection in pigs, experimentally induced by the coronavirus-like agent, CV777 [J]. *Vet Microbiol* 1981, 6(2): 157-165.
- [3] Chasey D, Cartwright S F. Virus-like particles associated with porcine epidemic diarrhea [J]. *Res Vet Sci*, 1978, 25 (2): 255-256.
- [4] Pensaert M B, Debouck P. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine [J]. *Arch Virol*, 1978, 58 (3): 243-247.
- [5] 宣华, 邢德坤, 王殿瀛, 等. 应用猪胎肠单层细胞培养猪流行性腹泻病毒的研究 [J]. *兽医大学学报*, 1984, (3): 202-208.
- [6] Kocherhans R, Bridgen A, Achkermann M, et al. Completion of the porcine epidemic diarrhea coronavirus (PEDV) genome sequence [J]. *Virus Genes*, 2001, 23(2): 137-144.
- [7] Duarte M, Lued H. Sequence of the spike protein of the porcine epidemic diarrhea virus [J]. *J gen Virol*, 1994, 75: 1195-1200.
- [8] Jackwood M W, Hilt D A, Callison S A, et al. Spike glycoprotein cleavage recognition site analysis of infectious bronchitis virus [J]. *Avian Dis*, 2001, 45(2): 366-372.
- [9] Struman L S, Holmes K V. Proteolytic cleavage of peplomer glycoprotein E2 of MHV yields two 90K subunits and activates cell fusion [J]. *Adv Exp Med Biol*, 1984, 173: 25-35.
- [10] 郑逢梅, 霍金耀, 赵军, 等. 2010—2012 年华中地区猪流行性腹泻病毒分子特征和遗传进化分析 [J]. *病毒学报*, 2013, 29(2): 197-204.