

董波,李静楠,曹雪珍,等. 闽西地区猪流行性腹泻病毒 *N* 基因分子进化及序列分析[J]. 江苏农业科学,2019,47(17):59-62.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.17.014

闽西地区猪流行性腹泻病毒 *N* 基因 分子进化及序列分析

董波^{1,2}, 李静楠¹, 曹雪珍³, 安永帅¹, 戴爱玲^{1,2}, 李晓华^{1,2}, 杨小燕^{1,2}

(1. 龙岩学院生命科学学院, 福建龙岩 364012; 2. 福建省生猪疫病防控工程技术研究中心, 福建龙岩 364012;

3. 华南农业大学兽医学院, 广东广州 510642)

摘要:分析闽西地区猪流行性腹泻病毒(PEDV)*N* 基因的遗传进化特征,收集闽西地区猪流行性腹泻病例组织样品 8 份,用逆转录 PCR(RT-PCR)扩增 *N* 基因,连接至 pMD-18T 载体进行测序,并与国内外已知参考毒株序列进行比对及遗传进化分析。结果显示,8 株闽西流行毒株之间 *N* 基因核苷酸的同源性为 9.8%~100.0%,推导的氨基酸序列的同源性为 99.5%~100.0%,而闽西毒株与早期疫苗毒株 CV777 和 SM98 的同源性较远。氨基酸序列分析表明,闽西毒株氨基酸序列存在 15 处突变,与 2010 年后中国流行毒株变异位点相同。提示闽西地区毒株为目前国内流行毒株,与疫苗毒株亲缘关系较远,可能导致机体针对疫苗毒株产生的抗体不能够有效抵抗变异毒株,不能给猪群提供很好的免疫保护,因此需要基于变异毒株研究出有针对性的疫苗来预防 PEDV。

关键词:猪流行性腹泻病毒;*N* 基因;遗传分析

中图分类号: S852.65⁺1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)17-0059-04

猪流行性腹泻(porcine epidemic diarrhea,简称 PED)是由猪流行性腹泻病毒引起的一种高度接触性传染病,以腹泻、呕吐为主要临床特征,冬、春季多发^[1]。该病在世界大多数国家均有报道,尤其对韩国、中国、日本、菲律宾、泰国等亚洲国家造成了严重经济损失,引起养猪业的广泛关注^[2]。2010 年末,我国暴发的 PED 影响了河北、安徽、广西、广东、浙江、江西、四川、湖南、福建等省份的养猪业^[3]。此次疫情造成的损失惨重,甚至之前接种过猪流行性腹泻病毒(PEDV)疫苗的猪群也同样发病,究其原因,可能是由于流行毒株变异或者毒力增强,使现有疫苗难以提供免疫保护^[4]。

猪流行性腹泻病毒为冠状病毒科冠状病毒属成员,为单股正链 RNA 病毒,编码 2 个复制酶多聚蛋白 ppla 和 pplab,1 个非结构蛋白 ORF3 和 4 个结构蛋白纤突蛋白(spike,简称 S)、膜蛋白(membrane,简称 M)、核衣壳蛋白(nucleocapsid,简

称 N)和小膜蛋白(small membrane,简称 E)^[5]。其中,*N* 蛋白由 1 326 个核苷酸组成,编码 442 个氨基酸。*N* 蛋白是一种多功能磷酸化蛋白质,能够与细胞膜和磷脂结合,改变宿主细胞的转录,促使 RNA 复制体的形成和病毒组装^[6]。*N* 基因在诱导免疫和病毒感染的致病机制中起重要作用,*N* 蛋白的表达可抑制细胞 RNA 和蛋白质 G2/M 期的合成从而促进病毒的繁殖^[7]。在早期感染 PEDV 时,宿主体内就能产生抗 *N* 蛋白高水平的抗体,因此 *N* 蛋白可作为早期检测发病猪是否感染 PEDV 的免疫靶细胞^[8]。

近年来,PEDV 的流行趋势不断增长,给养猪业造成严重的影响。因此,对 PEDV 的遗传变异情况进行监测是防控的重要环节。本研究收集闽西地区 PEDV 流行毒株,利用逆转录 PCR(RT-PCR)扩增 *N* 基因,将 PEDV *N* 基因序列进行同源性比较,绘制系统发育进化树,理清闽西地区 PEDV 与国内外流行毒株以及疫苗毒株之间的遗传进化关系,为如何做好 PEDV 的防控提供资料参考。

1 材料与方法

1.1 样品

样品选取 2013 年 1 月至 2016 年 12 月闽西地区规模化养猪场的 PEDV 阳性样品 8 份。

收稿日期:2018-06-12

基金项目:福建省高校自然科学基金青年重点项目(编号:JZ160481);福建省教育厅中青年科技项目(编号:JAT160483)。

作者简介:董波(1983—),男,天津人,博士,讲师,主要从事动物病毒学研究。E-mail:1906834157@qq.com。

通信作者:杨小燕,教授,研究方向为预防兽医学。Tel:(0597)2797255。

[7]刘靖宇,宋秀高,叶夏,等.香菇菌株遗传多样性 ISSR、RAPD 和 SRAP 综合分析[J].食用菌学报,2011,18(3):1-8.

[8]卓英,谭琦,陈明杰,等.香菇主要栽培菌株遗传多样性的 AFLP 分析[J].菌物学报,2006,25(2):203-210.

[9]Hu J G, Vick B A. Target region amplification polymorphism: a novel marker technique for plant genotyping[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2003, 21(3): 289-294.

[10]郭春芳,唐玉海,孙云,等.11 个茶树品种遗传多样性的 ISSR 和 TRAP 比较分析[J].中国农学通报,2008,24(1):340-346.

[11]Miklas P N, Hu J G, Grunwald N J, et al. Potential application of TRAP (targeted region amplified polymorphism) markers for mapping and tagging disease resistance traits in common bean[J]. Crop Science, 2006, 46(2): 910-916.

1.2 主要试剂

AxyPrep 总 RNA 小量制备试剂盒、AxyPrep 质粒 DNA 小量试剂盒、AxyPrep 凝胶回收试剂盒,购自康宁生命科学(吴江)有限公司;dNTP、反转录酶 M - MLV、5 × M - MLV buffer、pMD18 - T Vector,购自宝生物工程(大连)有限公司;DL2000 DNA marker、10 × loading buffer,购自广州瑞真生物技术有限公司;Oligo (dT) 18、Murine RNase Inhibitor、T4 DNA Ligase、10 × Ligase Buffer,购自南京诺唯赞生物科技有限公司;胰蛋白酶 (tryptone)、酵母 (yeast extract), 购自 OXOID 公司;Ampicillin (氨苄西林) (100mg/mL)、NaCl、琼脂粉, 购自 Biowest 公司;异丙醇、三羟甲基氨基甲烷 (Tris 碱)、溴化乙锭 (EB)、三氯甲烷、乙二胺四乙酸 (EDTA)、乙醇、十二烷基硫酸钠 (SDS)、DEPC (焦碳酸二乙酯) 水,购自广东省汕头市西陇化工股份有限公司。

1.3 提取病毒总 RNA 及逆转录

按照试剂盒提供的操作手册,从试验猪小肠组织及内容物中提取总 RNA。取洁净 EP 管,加入 RNA 11 μL、Oligo (dT) 18 1 μL、12 000 r/min 离心 40 s,于 70 ℃ 水浴 10 min,加入 5 × M - MLV Buffer 5 μL、M - MLV 1 μL、dNTP 1 μL、DEPC 水 6 μL,混匀后,42 ℃ 水浴 30 min,95 ℃ 水浴 10 min。cDNA 于 -80 ℃ 下保存。

1.4 E 基因的扩增

参考 GenBank 上已发表的 PEDV 毒株 *N* 基因序列,使用 Premier Premier 5.0 生物软件设计合成 1 对特异性引物, PEDV - N - F: GGATCCATGGCTTCTGTCAGCTTTC; PEDV -

N - R: CTCGAGTTTCAACGGCCGTATCACC。以 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增。PCR 反应程序如下:95 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s,56 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 1 min,35 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min。使用琼脂糖凝胶电泳进行鉴定,观察并记录结果。

1.5 重组质粒的构建和鉴定

采用 AxyPrep 凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物,将纯化产物与 pMD18 - T Vector 连接,16 ℃ 水浴 4 h。将 10 μL 连接产物转化入 DH5α 感受态细胞,37 ℃ 培养过夜。提取质粒,进行鉴定。将阳性质粒送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.6 序列分析

8 株闽西毒株分别命名为 LY201301、LY201302、LY201401、LY201402、LY201501、LY201502、LY201601 和 LY201602。采用表 1 中标准毒株的基因库登录号,获取参考毒株 *N* 基因序列。通过 DNASTar 和 MEGA 5.2 分子生物学分析软件对 8 株闽西地区的 PEDV *N* 基因序列与国内外已发表的毒株进行同源性分析,绘制 PEDV 基因系统遗传进化树。

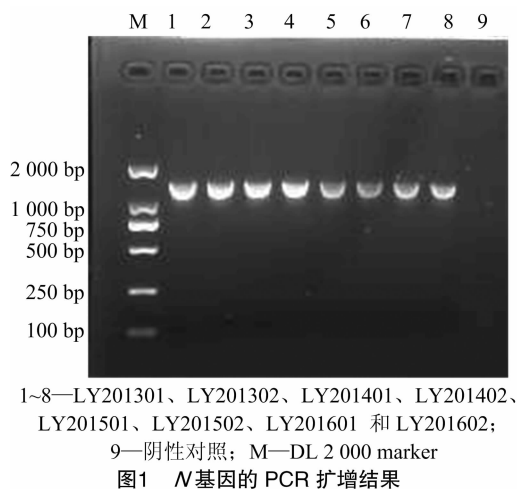
2 结果与分析

2.1 *N* 基因的扩增、纯化、克隆及测序

采用 RT - PCR 技术,对 8 份样品的 *N* 基因进行扩增,产物经凝胶电泳鉴定,由图 1 可知,获得大小约为 1 326 bp 的基因片段。将纯化后的 PCR 产物连接到 pMD18 - T 载体上,送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序,序列结果正确。

表 1 序列比对及系统发育分析中引用的 PEDV 毒株

毒株	基因库登录号	国家	公布年份
CV777	AF353511	瑞士	1978
virulent DR13	JQ023161	韩国	1999
Attenuated DR13	JQ023162	韩国	2003
SM98	GU937797	韩国	1998
IA2	KF468754	美国	2013
ISU13 - 19338E - IN - homogenate	KF650370	美国	2013
MN	KF468752	美国	2013
USA - Iowa - 18984 - 2013	KF804028	美国	2013
CH - S	JN547228	中国	1986
LZC	EF185992	中国	2006
JS2008_KC109141	KC109141	中国	2008
JS2008_KC210146	KC210146	中国	2008
SD - M	JX560761	中国	2012
CHGD - 01	JX261936	中国	2011
LC	JX489155	中国	2011
AJ1102	JX188454	中国	2011
BJ - 2011 - 1	JN825712	中国	2011
GD - B	JX088695	中国	2012
GD - 1	JX647847	中国	2011
CH - FJZZ - 9 - 2012	KC140102	中国	2012
KC189944	KC189944.	中国	2012
CH - FJND - 3 - 2011	JQ282909	中国	2011
JS - HZ2012	KC210147	中国	2012
AH2012	KC210145	中国	2012
CH - ZMDZY - 11	KC196276	中国	2011
XY2013	KR818832	中国	2014



2.2 N 基因的序列比对及同源性分析

闽西毒株 N 基因核苷酸序列之间的同源性为 99.8% ~ 100.0%，与 26 株引用毒株之间的同源性为 94.3% ~ 99.8%。闽西毒株与 2010 年以后中国分离毒株的同源性均在 99% 以上，与 2013 年美国毒株的同源性也均在 99% 以上。由图 2 可知，经遗传进化分析，34 株毒株可分成 3 大组，I 组包括疫苗株 CV777、2 株韩国毒株 (Attenuated DR13 和 SM98) 及 6 株早期中国毒株；II 组包括 2013 年分离的 4 株美国毒株、1 株韩国毒株、2010 年后分离的中国流行毒株以及 8 株闽西毒株。系统发育分析显示，闽西毒株与经典毒株 CV777、2010 年前中国分离毒株以及韩国毒株 (Attenuated DR13 和 SM98) 的亲缘性较远，与 2010 年以后中国分离毒株的亲缘性较高，与 2013 年美国毒株的亲缘性也较高，说明闽西毒株与目前国内以及美国流行毒株可能来自同一祖先。

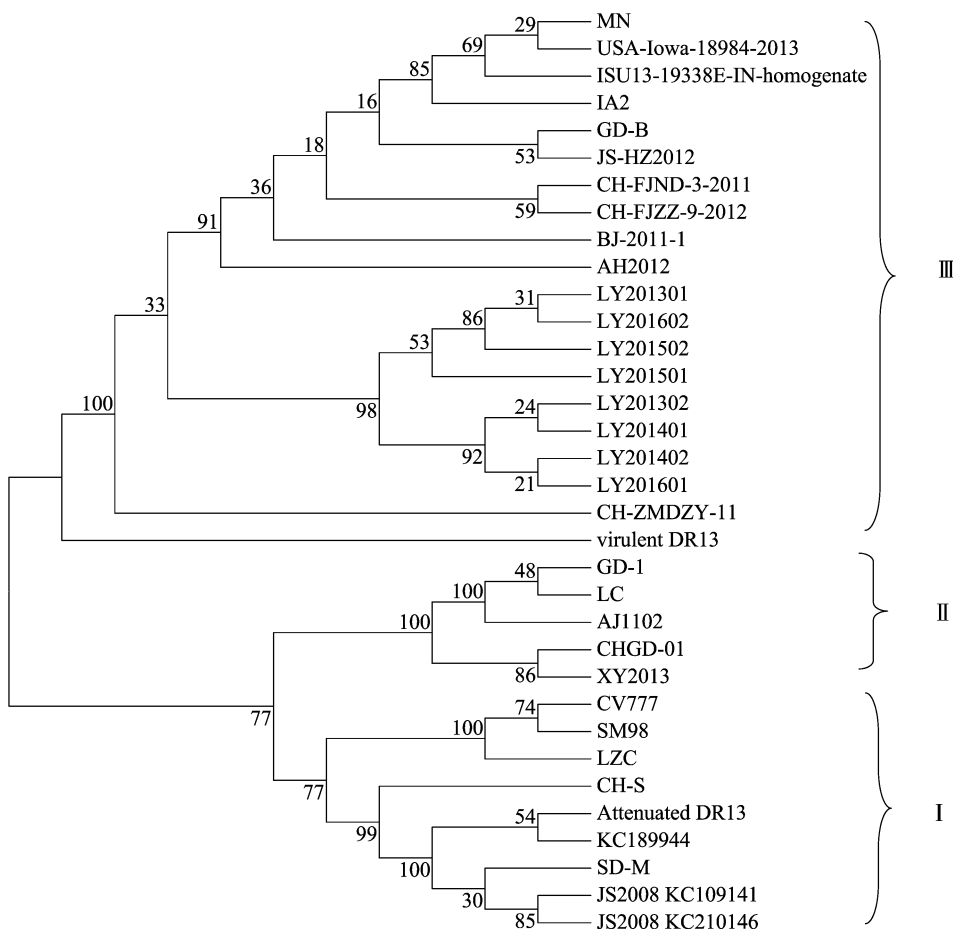


图2 PEDV N基因系统发育分析

2.3 N 基因的氨基酸结构特征

由表 2 的序列比对结果可知，N 基因全长为 1 326 bp，编码 442 个氨基酸，包含 1 个完整的阅读框架。闽西毒株与疫苗毒株 CV777 相比，氨基酸序列仅存在 15 处突变。这些突变位置与 2010 年后的中国变异毒株一致。

3 讨论

在 PEDV 的 RNA 合成过程中，N 蛋白能与细胞膜磷脂结

合，促进病毒的组装和 RNA 复制体的形成^[9]。另外，在 PEDV 的结构蛋白中，N 蛋白所占比例最大，它能在感染的细胞中大量表达，并且在感染初期，动物体内就能产生较高水平的抗 N 蛋白的抗体^[10]。N 蛋白具有高度保守的特性，可以作为早期诊断的靶蛋白，可利用 N 蛋白建立 PEDV 的分子生物学诊断技术^[11]。因此，选择 N 基因进行 PEDV 遗传进化分析，有助于了解病毒的流行趋势与进化规律，对于病毒的防控和疫苗的研制具有重要意义^[12]。本研究收集 8 株闽西毒株，

表 2 N 基因易变位点

样品	变异位点														
	84aa	123aa	142aa	204aa	242aa	242aa	252aa	255aa	380aa	395aa	397aa	400aa	413aa	416aa	422aa
CV777	G	K	A	N	H	R	K	N	L	L	Q	E	V	A	T
LY201301	A	N	T	K	L	K	R	S	P	Q	L	D	S	D	—
LY201302	A	N	T	K	L	K	R	S	P	Q	L	D	S	D	—
LY201401	A	N	T	K	L	K	R	S	P	Q	L	D	S	D	—
LY201402	A	N	T	K	L	K	R	S	P	Q	L	D	S	D	—
LY201501	A	N	T	K	L	K	R	S	P	Q	L	D	S	D	S
LY201502	A	N	T	K	L	K	R	S	P	Q	L	D	S	D	—
LY201601	A	N	T	K	L	K	R	S	P	Q	L	D	S	D	—
LY201602	A	N	T	K	L	K	R	S	P	Q	L	D	S	D	—

注:G 为甘氨酸,A 为丙氨酸,K 为赖氨酸,N 为天门冬酰胺,T 为苏氨酸,H 为组氨酸,L 为亮氨酸,R 为精氨酸,S 为丝氨酸,P 为脯氨酸,Q 为谷氨酰胺,E 为谷氨酸,D 为天门冬氨酸,V 为缬氨酸,S 为丝氨酸。

利用 PCR 扩增获得 8 株病毒 N 基因,使用生物信息学软件进行系统发育分析,有助于从分子水平阐明闽西 PEDV 毒株与国内外毒株的亲缘关系。

同源性分析结果显示,闽西毒株之间的核苷酸同源性为 99.8%~100.0%,与 2010 年后中国分离毒株的进化关系较近,说明闽西毒株与目前国内流行毒株具有很高的同源性。然而,闽西 PEDV 流行毒株与疫苗毒株 CV777 的核苷酸同源性为 94.0%~95.4%,遗传进化关系较远,提示以 CV777 为免疫原设计的疫苗,在防治 PED 方面可能作用不显著,成为控制 PEDV 暴发的主要隐患。另外,闽西毒株与 2013 年美国流行毒株的同源性较高,亲缘性较近,均属于Ⅲ组,说明闽西流行毒株与 2010 年后中国分离毒株以及 2013 年后美国分离毒株可能来自同一祖先。并且由遗传进化树可见,早期韩国毒株(virulent DR13)也处于Ⅲ组,提示该毒株和目前国内外流行毒株存在着潜在关系,需要进一步分析。8 株闽西毒株 N 基因无特有的片段缺失和插入,存在 15 处相同突变,这些突变位点与 2010 年后中国分离毒株的突变位点一致,进一步证实了闽西毒株属于 2010 年后中国流行毒株,也表明 N 基因相对保守,在目前国内外的流行毒株中基本没有出现变异。

总之,本研究结果证实闽西 PEDV 毒株属于目前国内外的流行毒株,与疫苗毒株(CV777)的进化关系较远,可能导致由 CV777 设计的疫苗对当前流行毒株的保护力不够,不能给猪群提供很好的免疫保护,因此需要设计有针对性的疫苗来预防 PEDV。并且氨基酸序列分析表明,闽西毒株 N 基因与疫苗毒株 CV777 相比存在 15 处基因改变,但是与目前流行毒株相比没有明显变化,证明 N 基因是高度保守的,因而可以作为疫苗候选基因。本研究结果希望能从分子水平阐明闽西地区 PEDV 的遗传进化特征,同时希望为 PEDV 疫苗的设计提供资料基础。

参考文献:

[1]殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 北京:科学出版社,1985.

[2]Chen J,Wang C H,Qiu H,et al. Molecular epidemiology of porcine epidemic diarrhea virus in China[J]. Archives of Virology,2010,155(9):1471-1476.

[3]Pan Y F,Tian X Y,Li W,et al. Isolation and characterization of a variant porcine epidemic diarrhea virus in China[J]. Virology Journal,2012,9(1):1-9.

[4]Stevenson G W,Hoang H,Schwartz K J,et al. Emergence of porcine epidemic diarrhea virus in the United States; clinical signs, lesions, and viral genomic sequences[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation,2013,25(5):649.

[5]吕茂杰,陈建飞,时洪艳,等. 猪流行性腹泻病毒核衣壳蛋白与感染细胞核磷蛋白的共定位分析[J]. 微生物学报,2011,61(5):643-647.

[6]Li B X,Ge J W,Li Y J. Porcine aminopeptidase N is a functional receptor for the PEDV coronavirus[J]. Virology,2007,365(1):166-172.

[7]Lee H-K,Yeo S-G. Cloning and sequence analysis of the nucleocapsid gene of porcine epidemic diarrhea virus Chinju99[J]. Virus Genes,2003,26(2):207-212.

[8]孙东波,冯力,时洪艳,等. 猪流行性腹泻病毒分子生物学研究进展[J]. 动物医学进展,2006,27(10):11-14.

[9]李好磊,李叶珍,赵顾,等. 猪流行性腹泻病毒 N 基因重组真核质粒构建及其表达[J]. 浙江农业学报,2017,29(7):1103-1109.

[10]吴玉璐,朱建平,杨莘,等. 猪流行性腹泻病毒 N 基因的表达及抗原性分析[J]. 中国预防兽医学报,2013,35(4):299-303.

[11]易新健,刘准,张翠翠,等. 一株猪流行性腹泻病毒 S、M、N 基因的遗传变异分析[J]. 动物医学进展,2017,38(2):12-16.

[12]祁光宇,刘斌,赵兴绪,等. 猪流行性腹泻病毒 HB2015 分离株 N 基因表达及单克隆抗体的制备[J]. 江苏农业学报,2018,34(1):76-80.