

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.05.03

猪丁型冠状病毒的分离鉴定与基因分析

刘怀东^{1,2}, 孙 淼², 赵 炜², 薛青红², 魏春霞¹, 才学鹏², 陈 瑞³, 刘 灿^{3*}, 孙晓林^{1*}

(1. 甘肃农业大学, 兰州 730070; 2. 中国兽医药品监察所, 北京 100081; 3. 陕西诺威利华生物科技有限公司, 陕西杨陵 712100)

[收稿日期] 2018-03-20 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 05-0018-06 [中图分类号] S852.65

[摘 要] 对山东省某养殖场的腹泻病料进行检测, 确认为猪丁型冠状病毒(PDCoV)阳性。使用 ST 细胞分离到一株 PDCoV, 命名为 SD 株。全基因组序列测定以及与 GenBank 中其他 68 株 PDCoV 全基因组序列比对分析以及遗传进化分析结果表明: PDCoV SD 株的全基因组(不包括 3'poly(A)尾)序列长度为 25414 个核苷酸(nt), 与参考株 HKU15-155、CH/Sichuan/S27/2012 和 CH-HB-2014 的核苷酸同源性分别为 98.97%、99.06% 和 99.13%; 此外, 在 nsp2 区的 1739~1744 位(对应于 HKU15-44 序列)中的 6 nt(TTTGAA)缺失和 nsp3 区的 2810~2818 位的 9 nt(TCGGCAATG)缺失为特征性基因突变; 69 株 PDCoV 呈现出明显的地域特征, 其中美国与韩国的 PDCoV 毒株为一个大分支, 越南与泰国 PDCoV 毒株为另一个小分支, 中国的 23 株 PDCoV 则呈现出 4 个小分支, 充分展现了该病毒的基因多样性。试验可为中国 PDCoV 的流行病学和诊断研究以及进一步的疫苗开发提供参考。

[关键词] 猪丁型冠状病毒; 分离鉴定; 腹泻; 基因分析

Isolation, Identification and Genetic Analysis of Porcine Deltacoronavirus

LIU Huai-dong^{1,2}, SUN Miao², ZHAO Wei², XUE Qing-hong², WEI Chun-xia¹,CAI Xue-peng², CHEN Rui³, LIU Can^{3*}, SUN Xiao-lin^{1*}

(1. Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China; 2. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China;

3. Shaanxi Innolever Biotechnology Co. Ltd., Yangling, Shaanxi 712100, China)

Corresponding author: SUN Xiao-lin, E-mail: sunxl@gsau.edu.cn; LIU Can, E-mail: liucan009@126.com

Abstract: Diarrheal samples collected from a farm in Shandong Province, were detected and verified as PDCoV positive. Afterwards, a PDCoV strain was isolated by using the ST cell line and denominated as strain SD. Complete genome sequencing and alignment with other 68 strains of PDCoV in GenBank were performed, and the results showed that the complete genome sequence length of PDCoV SD strain was 25414 nucleotides (nt), excluding the 3'poly(A) tail. The nucleotide homology of SD strains with reference strains HKU15-155, CH/Sichuan/S27/2012, and CH-HB-2014 were 98.97%, 99.06%, and 99.13%, respectively, and there were several characteristic genetic mutations, such as 1739 to 1744 in the nsp2 region (corresponding to 6nt

基金项目: 国家重点研发计划课题“牛羊重大动物疫病的诊断与检测新技术研究(2016YFD0500901)”

作者简介: 刘怀东, 硕士研究生, 从事预防兽医学研究。

通讯作者: 孙晓林, E-mail: sunxl@gsau.edu.cn; 刘 灿, E-mail: liucan009@126.com

(TTTGAA) deletion in the HKU 15-44 sequence) and 9nt (TCGGCAATG) deletion in 2810 to 2818 in the nsp3 region. Phylogenetic analysis revealed that 69 PDCoV strains showed obvious regional characteristics. Among them, PDCoV strains in the United States and South Korea formed one large branch, and PDCoV strains in Vietnam and Thailand formed another small branch. Besides that, a number of 23 PDCoV in China shows four smaller branches, fully demonstrates the genetic diversity of PDCoV. These data will facilitate epidemiological and diagnostic studies of PDCoV in China, as well as further vaccine development.

Key words: porcine deltaconoravirus; identification; isolation; diarrhea; genetic analysis

猪丁型冠状病毒 (Porcine deltacoronavirus, PDCoV) 是近年来危害养猪业的重要病毒性腹泻病原,与猪流行性腹泻 (Porcine epidemic diarrhoea, PED) 的发病情况极为类似,临床上较难区分^[1]。发病初期仔猪表现为哺乳、吃食后出现呕吐,呕吐物呈黄色或乳白色,并常伴有水样腹泻。发病后期,病猪表现为脱水、行走蹒跚以及精神沉郁等,发病严重者可能死亡^[2-4]。

PDCoV 属于尼多病毒目内的冠状病毒科,为含有囊膜的单链正义 RNA 病毒^[8]。自 2013 年以来,在美国、韩国、中国、日本、欧洲等地检测到 PDCoV 的流行^[9-11]。为了进一步探究 PDCoV 在中国的具体流行情况,对 2014-2016 年间采集自河北、河南、山东、广东和陕西省的 56 份粪便和肠组织样本进行了多种腹泻病原检测,对确认为 PDCoV 阳性的样本进行了病毒分离、全基因序列测定、比对分析与遗传进化分析,以期为该病的防控提供基础支撑。

1 材料

1.1 样本 腹泻仔猪肠组织与粪便样品来自于 2014-2016 年间收集的河北、河南、山东、广东与陕西省等地养殖场。

1.2 细胞 ST 细胞由陕西诺威利华生物科技有限公司提供。

1.3 主要试剂 病毒 DNA/RNA 提取试剂盒、反转录酶 M-MLV、Ex Taq Premix 以及 PrimeSTAR Max Premix 为宝生物工程 (大连) 有限公司产品。

2 方法

2.1 病料前处理与核酸提取 取肠组织与粪便样品少量置于 15 mL 离心管,添加质量体积比为 1:5

的生理盐水,使用匀浆机进行匀浆处理,然后进行 3 次冻融,之后于 4 ℃ 低温离心机进行 12000 r/min 离心 15 min,取上清液,使用病毒 DNA/RNA 提取试剂盒,按说明书步骤进行核酸提取。

2.2 RT-PCR 检测 参考 Linda J. Saif 文献^[5] 合成针对 M 基因的检测引物 PDCoV-M541-F: 5'-CGCGTAATCGTGTGATCTATGT-3', PDCoV-M541-R: 5'-CCGGCCTTTGAAGTGCTTAT-3'。根据 M-MLV 反转录酶说明书进行反转录操作制备 cDNA,然后配制 PCR 反应液,其中 Premix Ex Taq 12.5 μL,上下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, cDNA 1 μL,补水至 25 μL。PCR 反应条件为:94 ℃ 5 min 预变性;然后 35 个循环进行 94 ℃ 30 s (变性), 55 ℃ 30 s (退火) 与 72 ℃ 30 s (延伸);最后延伸 72 ℃ 5 min。取 PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶中进行电泳,判定检测结果。同时参考 Song D 文献^[6] 合成用于检测猪流行性腹泻病毒 (PEDV)、猪传染性胃肠炎病毒 (TGEV) 与猪 A 群轮状病毒 (PRotA) 的检测引物,用于腹泻病料的检测。

2.3 病毒分离 将 PCR 检测为 PDCoV 阳性的腹泻样品匀浆液冻融三次,4 ℃ 低温离心机中 12000 r/min 离心 15 min 后,取上清液经过 0.22 μm 滤膜过滤后液体^[12],接种健康 ST 细胞,并持续观察细胞状态,接毒后 72~96 h 收毒,或待细胞病变为 80% 时收毒。

2.4 全序列测定与比对分析 参考 Wang L 文献^[2] 合成用于 PDCoV 全序列扩增测序的 16 对引物,分段扩增后送苏州金唯智生物科技有限公司,连接 pCR-Blunt 载体进行测序,并拼接测序结果,比对分析测序结果与其他 GenBank 中 PDCoV 序列。

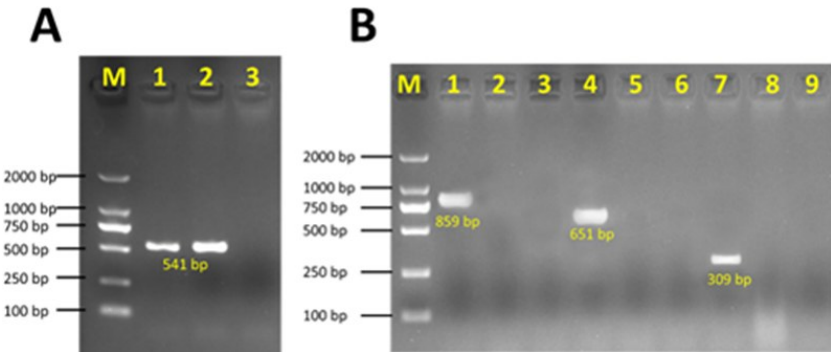
2.5 遗传进化分析 基于测定的 PDCoV SD 株全序列与 GenBank 中另外 68 株 PDCoV 全序列,绘制进化树,进行遗传进化分析。

3 结 果

3.1 RT-PCR 检测结果 RT-PCR 检测结果显示为 PDCoV 阳性(图 1A),同时检测 PEDV、TGEV、PRotaV 为阴性。PDCoV 阳性 PCR 产物送测序后,

比对测序结果确认为 PDCoV 的 M 基因序列。同时针对 PEDV、TGEV 与 PRotaV 的检测均为阴性(图 1B)。

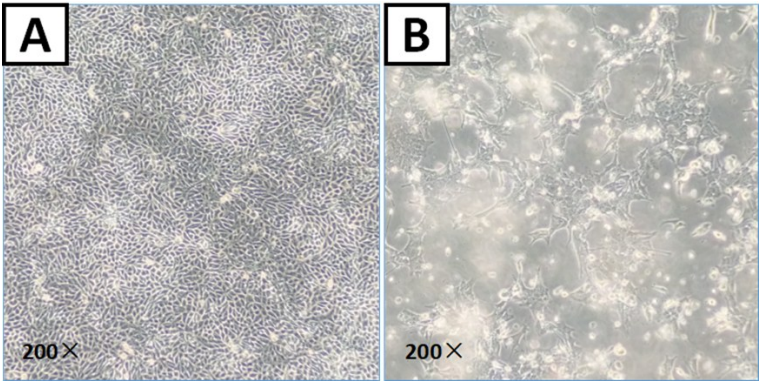
3.2 分离病毒结果 检测为 PDCoV 阳性的粪便样品,经离心取上清并过滤,接种 ST 细胞 48 h 后(48 hpi)出现明显的细胞病变(CPE)(图 2),同时该 PDCoV 毒株可在 ST 细胞上稳定传代 20 代以上。



A: M-DL2000 DNA Marker;1-检测为阳性的 PDCoV 粪便样品;2-阳性对照(根据检测引物合成的阳性质粒);3-阴性对照
B: M-DL2000 DNA Marker;1-TGEV 阳性对照(根据检测引物合成的阳性质粒);2-TGEV 阴性对照;3-粪便样品;
4-PEDV 阳性对照(根据检测引物合成的阳性质粒);5-PEDV 阴性对照;6-粪便样品;
7-PRotaV 阳性对照(根据检测引物合成的阳性质粒);8-PRotaV 阴性对照;9-粪便样品
A: M- DL2000 DNA Marker;1-Sample detected as PDCoV positive;2-Positive control;3- Negative control
B: M- DL2000 DNA Marker;1- TGEV positive control;2- Sample detected as TGEV negative;3- TGEV negative control;
4- PEDV positive control;5- Sample detected as PEDV negative;6- PEDV negative control;7- PRotaV positive control;
8- Sample detected as PRotaV negative;9-PRotaV negative control

图 1 腹泻样本 PCR 检测 PDCoV、TGEV、PEDV 与 PRotaV 电泳图

Fig 1 Detection of PDCoV, TGEV, PEDV and PRotaV with diarrheal sample



A:健康 ST 细胞;B:ST 细胞在感染 PDCoV 后 48 h 出现细胞病变(CPE)
A: Healthy ST cell; B: ST cell with CPE after infection with PDCoV (48hpi)

图 2 健康 ST 细胞与感染 PDCoV 的 ST 细胞

Fig 2 Healthy ST cell and ST cell infected with PDCoV

3.3 全序列测定与比对分析结果 PDCoV SD 株的完整基因组序列长度为 25414 个核苷酸(nt),不包括 3'polyA 尾,将全序列上传至 GenBank,登录号为 MF431743。SD 株与参考株 HKU15-155(2012 年分离)、CH/Sichuan/S27/2012 和 CH-HB-2014 的核苷酸同源性分别为 98.97%、99.06% 和 99.13%。此外,在 nsp2 区的 1739 至 1744 位(对应于 HKU15-44 序列)中的 6 nt(TTTGAA)缺失和 nsp3 区的 2810 至 2818 位的 9 nt(TCGGCAATG)缺失为首次出现。

将 PDCoV SD 株的 S 基因核苷酸序列以及对应氨基酸序列与另外一株分离自广东地区的 GD 株进行比对分析发现,SD 株与 GD 株的 S 基因上则存在约 60 个核苷酸点突变而无基因插入或缺失,对应 16 个氨基酸点突变,分别为 R40S、S43T、Y46H、Q106L、D109E、H122Y、Y162D、V171E、A230P、K484E、L488Q、S589A、V629A、K641Q、K800Q、D1085E。

3.4 遗传进化分析结果 基于 GenBank 上 69 株 PDCoV 全基因序列绘制进化树(图 3),分析进化树发现,69 株 PDCoV 具有明显的地域特征,可分为 3 个大的分支,第一分支主要为美国毒株以及少数韩国毒株,第二分支为中国毒株(23 株),第三分支为越南与泰国毒株(6 株)。其中中国 PDCoV 毒株呈现出 4~5 个小分支,充分展现了该病毒的基因多样性特征。

4 讨论

常见的造成猪腹泻的病毒类病原主要为猪源冠状病毒,其中包括 PEDV、TGEV 与 PDCoV,对于 PDCoV 最早的报道为 2012 年香港学者 Woo 等检测到 PDCoV HKU15-44 株与 HKU15-155 株,并完成了两株病毒的全基因序列测定^[4]。2014 年至今,中国大陆的田间 PDCoV 流行报道日趋增多,华中农业大学、华南农业大学、浙江大学、哈尔滨兽医研究所与河北农业大学等科研团队开展的 PDCoV 研究确认了 PDCoV 在我国各省的广泛流行,病毒

分离与返回感染动物试验确认了其仔猪腹泻的严重威胁^[9,12,13]。为了查明 PDCoV 流行病学历史,2015 年 Xiao 等对 2004-2014 年间 215 份腹泻样本进行回溯检测,发现 14 份(6.51%)为 PDCoV 核酸阳性,其中包括 2 份采集自 2004 年安徽省的腹泻样本,说明 PDCoV 的存在时间要早于其首次被检测确诊的时间^[13]。

PDCoV SD 株在基因特征上与众多中国大陆参考株全基因组序列同源性为 98.5%~99.3%,其中 S 基因编码的纤突蛋白被认为具有结合病毒受体与诱导产生中和抗体等作用,比对 SD 株与其他中国毒株 S 基因核苷酸序列可见较多基因突变,对应可见至少 16 个氨基酸位点突变,这些突变位点对于 PDCoV 病毒的增殖特性或致病性等表型的影响仍待后续研究;对于主要遗传进化分析结果显示包括 SD 株在内的中国大陆 PDCoV 与美国或东南亚其他毒株遗传关系相对较远,基于某一株 PDCoV 研发的弱毒疫苗或灭活疫苗的保护效果以及针对其他毒株的交叉保护效果仍处于未知状态,考虑到 PEDV 与 PDCoV 等腹泻病原对我国乃至全球养猪业每年所造成的巨大经济损失,对于该类传染病的持续性监测与防治研发需要有序而快速地推进。

其中对于疫病的监测方面,可以借鉴参考一些先进经验,比如,美国的首例 PDCoV 临床确诊是在 2014 年 1 月的俄亥俄州与伊利诺伊州养殖场,至 2014 年 6 月 3 日时,已确诊 12 个主要生猪养殖州均出现 PDCoV 感染,2014 年 6 月 5 日,美国农业部将 PEDV 与 PDCoV 纳入需要上报的疫病类型,并在农业部官网进行每周疫病流行更新报道^[14]。该举措对于美国养猪业 PEDV 流行的局部与整体防控意义重大。此外,对于猪丁型冠状病毒的治疗或预防仍然没有特效药或商品化疫苗,因此尽快研制出一种能够有效防治猪丁型冠状病毒病的疫苗,对于降低哺乳仔猪死亡率、减少养殖场经济损失具有重要的意义。



图 3 基于 69 株 PDCoV 全基因序列绘制的进化树

Fig 3 Phylogenic tree based on complete genome of 69 PDCoV strains

参考文献:

- [1] Wang L, Byrum B, Zhang Y. Detection and genetic characterization of deltacoronavirus in pigs, Ohio, USA, 2014[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2014, 20(7):1227.
- [2] Marthaler D, Jiang Y, Collins J, *et al.* Complete genome sequence of strain SDCV/USA/Illinois121/2014, a porcine deltacoronavirus from the United States[J]. *Genome Announcements*, 2014, 2(2). doi: 10.1128/genomeA.00218-14
- [3] 王逸雯,李 龙,黄耀伟. 猪腹泻新丁型冠状病毒中国株的初步检测及 N 基因序列分析[C]. 中国畜牧兽医学学会 2014 年学术年会论文集. 2014.
- Wang Y W, Li L, Huang Y W. Preliminary detection of diarrheal coronavirus strains in pigs and analysis of N gene sequences[C]. *Chinese Society of Animal Husbandry and Veterinary Medicine 2014 Annual Conference Proceedings*. 2014.
- [4] Ma Y, Zhang Y, Liang X, *et al.* Origin, Evolution, and virulence of porcine deltacoronaviruses in the United States [J]. *Mbio*, 2015, 6(2):e00064.
- [5] Jung K, Hu H, Eyerly B, *et al.* Pathogenicity of 2 porcine deltacoronavirus strains in gnotobiotic pigs [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2015, 21(4):650-4.
- [6] Song D S, Kang B K, Oh J S, *et al.* Multiplex reverse transcription-PCR for rapid differential detection of porcine epidemic diarrhea virus, transmissible gastroenteritis virus, and porcine group A rotavirus.[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians Inc*, 2006, 18(3):278-281.
- [7] 贺东生,陈小芬,王 飞,等. 我国集约化猪场新发猪丁型冠状病毒病的诊断[J]. *猪业科学*, 2015, 32(10): 76-77.
- He D S, Chen X F, Wang F, *et al.* Diagnosis of newly diagnosed porcine deltacoronavirus in intensive farms in China[J]. *Swine Industry Science*, 2015, 32(10): 76-77.
- [8] Homwong N, Jarvis M C, Lam H C, *et al.* Characterization and evolution of porcine deltacoronavirus in the United States [J]. *Preventive Veterinary Medicine*, 2016, 123(2):168-174.
- [9] 吴美洲,陈芳洲,朱银杏,等. 丁型冠状病毒我国猪源株的遗传变异分析[J]. *中国兽医科学*, 2016(6): 689-694.
- Wu M Z, Chen F Z, Zhu Y X, *et al.* Genetic variation analysis of porcine deltacoronavirus in China [J], *Chinese Veterinary Science*, 2016(6): 689-694.
- [10] 王逸雯,黄耀伟. 新发现的冠状病毒属——丁型冠状病毒 [J]. *生命的化学*, 2016(4): 514-518.
- Wang Y W, Huang Y W. A newly discovered coronavirus genus—deltacoronavirus[J]. *Chemistry of Life*, 2016(4): 514-518.
- [11] 陈小芬. PEDV/TGEV/PDCoV 快速检测方法的建立及 PEDV COE 基因和 ORF3 基因遗传变异研究[D]. 华南农业大学, 2016.
- Chen X F. Establishment of PEDV/TGEV/PDCoV rapid detection method and genetic variation of PEDV COE gene and ORF3 gene[D]. *Southern China Agricultural University*, 2016.
- [12] Liu B J, Zuo Y Z, Gu W Y, *et al.* Isolation and phylogenetic analysis of porcine deltacoronavirus from pigs with diarrhoea in Hebei province, China[J]. *Transboundary & Emerging Diseases*, 2018 (5): 1-9.
- [13] Nan D, Liurong F, Songlin Z, *et al.* Porcine deltacoronavirus in Mainland China [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2015, 21(12):2254-2255.
- [14] Niederwerder M C, Hesse R A. Swine enteric coronavirus disease: A review of 4 years with porcine epidemic diarrhoea virus and porcine deltacoronavirus in the United States and Canada[J]. *Transboundary & Emerging Diseases*, 2018;1-16. doi: 10.1111/tbed.12823

(编辑:李文平)