

15 株猪流行性腹泻病毒河南株 ORF3 全基因的 克隆与序列分析

朱前磊¹, 侯华琳², 韩昊莹², 郑慧华², 李新生², 陈红英^{2*}

(1. 河南省动物疫病预防控制中心, 郑州 450008; 2. 河南农业大学牧医工程学院, 郑州 450002)

摘要: 为调查近年来河南省猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 的遗传变异情况, 从 2015—2017 年河南部分地区猪场患腹泻仔猪的小肠组织及内容物中克隆了 15 株 PEDV ORF3 基因, 并对其进行了序列测定及分析。结果显示, 15 株 PEDV 河南株 ORF3 基因序列长度均为 675 bp。15 株 PEDV 分离株之间核苷酸同源性为 94.4%~99.9%, 与经典毒株 CV777、弱毒株 attenuated DR13 核苷酸同源性分别为 95.7%~97.0% 和 96.6%~98.1%。遗传进化分析显示, PEDV 分为两大群, 3 株分离株属于 G1 群, 单独成一个小的分支。其余 12 株分离株与往年河南流行株、大部分国内分离株、韩国、日本、美国及法国毒株位于 G2 群, 亲缘关系较近, 而与经典毒株 CV777 亲缘关系较远。表明河南省 PEDV 有变异和进化趋势, 为河南省 PED 的防控和疫苗的研制提供技术支持。

关键词: 猪流行性腹泻病毒; 河南株; ORF3 基因; 克隆; 序列分析

中图分类号: S858.285.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2019)06-0936-06

Cloning and sequence analysis of the ORF3 gene of fifteen porcine epidemic diarrhea virus strains from Henan Province

ZHU Qianlei¹, HOU Hualin², HAN Haoying², ZHENG Huihua², LI Xinsheng², CHEN Hongying²

(1. Henan Center for Animal Disease Control and Prevention, Zhengzhou 450008;

2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002)

Abstract: In order to investigate recent genetic variations of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), ORF3 genes of 15 PEDV Henan strains were cloned and analyzed from intestinal tissues and contents of piglets with diarrhea from various areas in Henan Province from 2015 to 2017. The results showed that fifteen PEDV ORF3 sequences had 675 bp in length. The nucleotide homologies of the 15 isolates were 94.4%-99.9%, and they shared 95.7%-97.0% and 96.6%-98.1% nucleotide sequence identity to classical strain CV777 and attenuated strain DR13, respectively. Phylogenetic tree based on the ORF3 genes showed that PEDV strains could be divided into two groups, and three isolates identified in this study belonged to group 1, and formed a small branch. Other twelve PEDV isolates were located in group 2, and they seemed to be closely related to domestic strains, Korean strains, Japanese strains, American strains as well as France strains, whereas differed genetically from classical strain CV777. The results provided a new support of preventive and control and vaccine study of PEDV.

Key words: porcine epidemic diarrhea virus; Henan strains; ORF3 gene; cloning; sequence analysis

猪流行性腹泻 (porcine epidemic diarrhea, PED) 是由猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 引起的一种高度接触性急性肠道传染病, 以严重水样腹泻、呕吐、脱水和高死亡率等为特征, 各种年龄的猪均可感染发病^[1]。PED 于 1971 年首次在英国出现, 随后欧洲

和亚洲许多猪场相继发生该病, 其中以日本、韩国和中国尤为严重^[2-4]。2010 年底以来, PED 在我国大部分地区规模化猪场呈现暴发流行, 哺乳仔猪致死率高达 80%~100%, 并且在免疫猪场中也常有发生^[5], 给我国养猪业造成巨大经济损失。

收稿日期: 2019-03-09

基金项目: 河南省高校科技创新团队支持计划 (19IRTSTHN007) 和河南省科技开放合作项目 (182106000048) 共同资助。

作者简介: 朱前磊, 兽医师。E-mail: zhuqianlei123@126.com

* 通信作者: 陈红英, 教授。E-mail: chhy927@163.com

PEDV 为单股正链 RNA 病毒, 属于冠状病毒科、冠状病毒属的成员^[6]。PEDV 基因组全长约 28 kb, 包括 7 个阅读框架, 编码非结构蛋白(复制酶多聚蛋白 1a、1b 和辅助蛋白)和结构蛋白(纤突蛋白 S、小包膜蛋白 E、膜蛋白 M 和核蛋白 N)^[1]。ORF3 基因是 PEDV 基因组中唯一的辅助蛋白基因, 与病毒毒力有关, 而且 PEDV 野毒株 ORF3 蛋白具有离子通道活性并影响病毒的复制^[7]。PEDV 弱毒株 ORF3 基因中 49~51 bp 的缺失并没有影响病毒在体外的复制能力, 但对自然宿主的致病力却显著减弱, 并且不具有离子通道活性, 沉默 ORF3 可明显降低 PEDV 感染 Vero 细胞的能力^[8]。ORF3 基因有很高序列同源性, 但不同毒株存在功能差异^[9]。因此, 对 ORF3 基因分析具有重要意义。

本研究对 2015 年至 2017 年采集自河南省新乡、平顶山、开封等地猪场患腹泻的仔猪肠道组织及内容物进行 PEDV ORF3 全基因的克隆和测序, 采用 MegAlign(DNAStar)和 MEGA 6.0 软件将克隆的序列与 GenBank 收录的 PEDV ORF3 全基因序列进行同源性比较、构建遗传进化树, 旨在阐明河南省猪群中 PEDV 流行毒株的遗传变异情况, 为探讨河南省 PED 发生规律以及制定有效防控措施提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 临床样品

2015 年 3 月至 2017 年 3 月, 将 15 份采自河南省新乡、平顶山、开封等地区猪场患猪流行性腹泻仔猪的肠道组织及内容物进行研磨, -80°C 反复冻融 3 次, $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清于 -80°C 保存备用。

1.2 主要试剂

柱式 RNA 抽提纯化试剂盒、Ex Taq DNA 聚合酶、pMD18-T 载体等购自宝生物工程有限公司; 反转录试剂盒 HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 购自南京诺唯赞生物科技有限公司; DNA 凝胶回收试剂盒购自康为世纪生物科技有限公司。

1.3 引物设计与合成

参考 GenBank 中登录的 PEDV 经典株 CV777 株(AF353511)的 ORF3 基因, 利用 Primer Premier 5.0 (DNA Star) 设计 1 对特异引物, 上游引物: 5'-GGCGTCCTAGACTTCAACCTT-3'; 下游引物: 5'-GGACTGCGCTATTACACAACC-3', 用于扩增 ORF3 全基因, 预期扩增长度为 849 bp。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.4 PEDV ORF3 基因的克隆与测序

采用柱式 RNA 抽提纯化试剂盒提取样品总 RNA, 利用反转录试剂盒进行反转录制备 cDNA。以 cDNA 为模板, PCR 扩增 ORF3 基因, 扩增体系如下: $2\times\text{Taq Master Mix}$ 12.5 μL , 上下游引物各 0.5 μL , 模板 3 μL , 补 ddH₂O 至 25 μL 。反应程序: 95°C 5 min, 95°C 45 s, 53°C 45 s, 72°C 1 min, 共 35 个循环; 72°C 10 min, 4°C 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。将纯化回收的 PCR 产物克隆于 pMD18-T 载体中, 阳性重组质粒由上海生工生物工程技术有限公司进行测序。

1.5 PEDV ORF3 基因序列分析

利用 MegAlign (DNAStar) 软件, 对克隆的 PEDV ORF3 全基因与 GenBank 中欧洲、美洲和亚洲(韩国、日本、中国等)地区的 32 株 PEDV ORF3 参序列(表 1)进行比对分析, 并用 MEGA 6.0 软件 Boot-strapped Neighbor-Joining 算法构建遗传进化树。

2 结果与分析

2.1 PEDV ORF3 全基因的克隆与序列测定

利用 PEDV ORF3 全基因特异引物, 从患腹泻仔猪的小肠组织及内容物 cDNA 中扩增出约 850 bp 的特异性条带, 与预期片段大小相一致(图 1)。测序结果显示, 克隆到 15 株 PEDV 河南株 ORF3 基因, 序列长度均为 849 bp, 包含一个完整阅读框 675 bp, 编码 224 个氨基酸残基。将克隆的河南株 ORF3 基因序列均已上传 GenBank, 病毒名称和登录号分别为, 2015 年: CH/HJ/2015 (KU645771)、CH/HY/2015 (KU645772)、CH/JY/2015 (KU645773)、CH/KF/2015 (KU645774)、CH/LY/2015 (KU645775)、CH/PDS/2015 (KU645778); 2016 年: XX1 (MF522839)、XX3 (MF522840) 和 2017 年: XUN XIAN (MF522834)、XZ1 (MF522835)、XZ2 (MF522836)、XZ3 (MF522837)、YY1 (MF522838)、QX-01 (MF488978)、QX-02 (MF489759)。

2.2 ORF3 基因序列分析

利用 Megalign (DNAStar) 对克隆得到的 15 条 PEDV 河南株 ORF3 序列与 32 条参考序列(表 1)进行同源性比对, 结果显示, 15 株河南株之间核苷酸同源性为 94.4%~99.9%, 氨基酸同源性为 93.3%~100%, 15 株河南株与参考毒株核苷酸同源性也为 94.4%~99.9%, 氨基酸同源性为 91.6%~100%, 其中与经典毒株 CV777、疫苗株 attenuated DR13 核苷酸同源性分别为 95.7%~97.0%、96.6%~

98.1%，氨基酸同源性分别为 93.3%~96.4%、96.2%~99.0%。

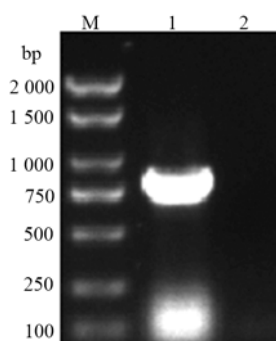


图 1 PEDV ORF3 基因的 RT-PCR 扩增结果
Figure 1 RT-PCR amplification results of PEDV ORF3 gene

M. DNA Marker DL2000; 1. RT-PCR amplification product of PEDV ORF3 gene; 2. Negative control

图 1 PEDV ORF3 基因的 RT-PCR 扩增结果

Figure 1 RT-PCR amplification results of PEDV ORF3 gene

序列分析发现，与毒株 CV777 相比，克隆的 15 条 ORF3 序列在 4 个位点发生相同的氨基酸置换 (V21A、V54I、V79I 和 N166S)，14 条序列在第 92 位均发生 L92F (除 CH/HY/2015 外)，13 条序列在第 101 位均发生 A101T (除 QX-01 和 QX02 外)，12 条序列在第 80 和 182 位均发生 F80V 和 H182Q (除 QX-01、QX-02 和 YY1 外)，QX-01、QX-02 和 YY1 在 5 个位点发生相同的氨基酸置换 (L25S、I70V、L81I、C107F 和 D168N)。此外，PEDV 毒株

中还存在特有的氨基酸突变 (表 2)。与疫苗毒株 Truncated CV777 和 Attenuated DR13 相比，15 条 ORF3 序列不存在 17 个氨基酸的连续缺失现象。

2.3 ORF3 基因遗传进化分析

PEDV ORF3 基因核苷酸序列绘制的遗传进化树如图 2 所示，将 PEDV 毒株分两大群 G1 和 G2，除 YY1、QX-01、QX-02 外的 12 个毒株均属于 G2 群，其中毒株 CH/KF/2015、CH/PDS/2015、CH/HJ/2015、XX1、XX3、XUN XIAN、XZ1、XZ2 和 XZ3 位于 G2-1 群，与往年河南流行毒株 CH/WZ2/2014，国内流行毒株 JSCZ1601、CH/SXYC 和 YC2014，韩国毒株 KNU-141112-P10，日本毒株 KCH-2/JPN/2014、MYZ-1/JPN/2013，美国毒株 USA/IA/2013/20849 及法国毒株 FR/001/2014 均有较近的亲缘关系，而与毒株 DR13、Attenuated DR13 处于一个较大的分支中，亲缘关系较远。

来自 2015 年的 CH/HY/2015、CH/JY/2015、CH/LY/2015 分别位于 G2-2、G2-3、G2-4 群，分别与河南近年分离毒株 CH/HNZMD、CH/HNNY-3、CH/KFQX/11 处于同一个小分支，亲缘关系较近。2017 年的 YY1、QX-01、QX-02 属于 G1 群，并且单独成一个小的分支 (G1-1 群)，与近年中国毒株 A J1102 和 JS201603 和越南毒株 HUA-PED63 处于一个较小的分支中，亲缘关系较近；而与经典毒株 CV777、2006 年中国流行毒株 LZC 处于一个较大的分支中，亲缘关系较远。

表 1 本研究所需要的 PEDV 参考株

Table 1 PEDV reference strains/isolates used in the study

毒株名称 Strain name	分离地点 Separation location	登录号 Accession number	毒株名称 Strain name	分离地点 Separation location	登录号 Accession number
CH/HeN/XC-2014	河南, 中国	KR078318	GD-B	广东, 中国	JX088695
CH/HNNY-3	河南, 中国	KU977494	JSCZ1601	江苏, 中国	KY070587
CH/HNZMD	河南, 中国	KU977499	JS-HZ2012	江苏, 中国	KC210147
CH/HBQX/10	河南, 中国	JN547395	LZC	甘肃, 中国	EF185992
CH/KFQX/11	河南, 中国	JN547397	NJ	黑龙江, 中国	KJ642645
CH/HeN/PY-2015	河南, 中国	KR078319	DR13	韩国	EU054929
CH/WZ2/2014	河南, 中国	KU645784	Attenuated DR13	韩国	EU054930
CH/HeN/JZ-2013	河南, 中国	KM048303	KNU-141112-P10	韩国	KR873435
CH/HeN/CY-2013	河南, 中国	KM048299	HUA-PED63	越南	KP455972
CH/XC/12	河南, 中国	JX501333	KCH-2/JPN/2014	日本	LC063845
AH2011	安徽, 中国	KC161186	MYZ-1/JPN/2013	日本	LC063846
AJ1102	湖北, 中国	JX188454	V1PED0108	泰国	KC344846
YC2014	江苏, 中国	KU252649	SPPED1211	泰国	KC344844
BJ-2011-1	北京, 中国	JN825712	CV777	瑞士	AF353511
CH/SXYC	陕西, 中国	KU977500	FR/001/2014	法国	KR011756
JS201603	江苏, 中国	KY607768	USA/IA/2013/20849	美国	KM975739

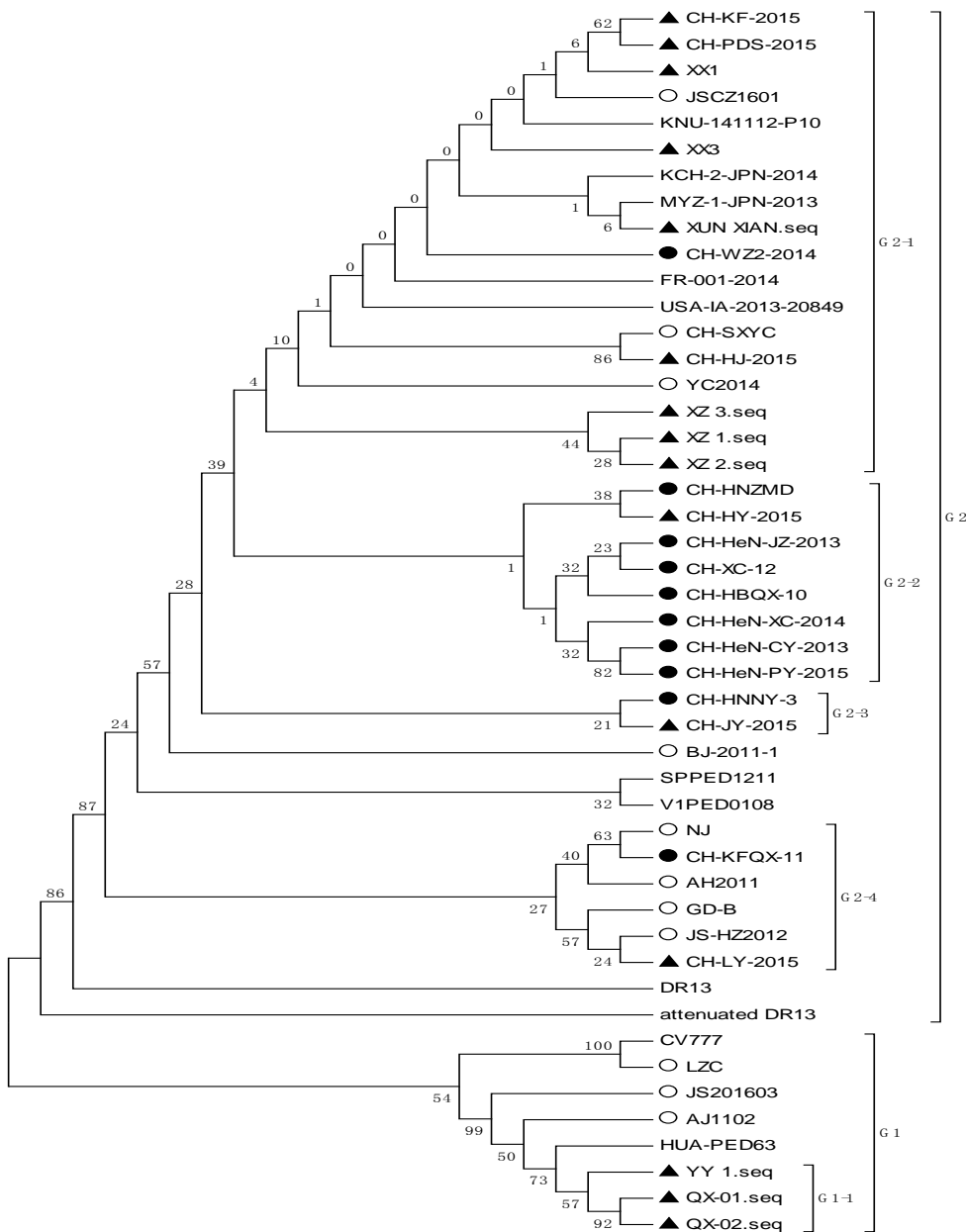


图 2 PEDV ORF3 基因核苷酸序列进化树

Figure 2 Phylogenetic tree of PEDV strain based on ORF3 gene nucleotide sequence

3 讨论

自 20 世纪 80 年代我国首次分离到 PEDV 以来, 主要以散发流行, 但是 2010 年以后, PEDV 在我国的流行日趋严重^[10]。2013 年, PED 在台湾地区大肆流行, 引起哺乳仔猪大批感染和死亡, 造成养殖业严重的经济损失^[11], 因此应加强对 PEDV 流行情况的调查和病原学及基因序列的监测。

序列分析发现, 克隆的河南株之间氨基酸同源性为 93.3%~100%, 其中 2015 年的 CH-PDS-2015 和 2017 年的 YY1 氨基酸同源性最低为 93.8%。克隆的河南株与河南省往年流行毒株氨基酸同源性为

95.1%~100%, 其中 2017 年的 QX-02 和 YY 1 与河南省往年流行毒株氨基酸同源性最低为 95.1%~96.0%。2017 年的 QX-01 和 QX-02 核苷酸同源性为 99.9%, QX-01 和 QX-02 与 YY 1 株核苷酸同源性分别为 99.3%和 99.1%。QX-01、QX-02 和 YY 1 与其余的 12 株河南株核苷酸同源性仅在 94.4%~96.0%之间, 与河南省往年流行毒株核苷酸同源性为 95.3%~95.9%, 与国内外毒株核苷酸同源性为 94.4%~99.1%, 其中与越南毒株 HUA-PED63 同源性最高, 分别为 99.1%、99.0%和 98.7%, 与泰国毒株 SPPED1211 同源性最低, 分别为 94.5%、94.4%和 94.4%。这 3 个毒株与经典毒株 CV777 核苷酸同

源性分别为 96.0%、95.9%和 95.9%，与 Attenuated DR13 核苷酸同源性分别为 96.8%、96.8%和 96.6%。

表明 PED 在河南地区的流行呈现逐年进化和变异趋势。

表 2 PEDV ORF3 基因推导的氨基酸与经典毒株 CV777 比较发生的氨基酸置换

Table 2 Amino acid substitutions in ORF3 protein of PEDV strains compared with classical strain CV777

毒株名称 Strain name	氨基酸位点/ Amino acid position												
	21	25	31	36	44	54	60	70	79	80	81	85	92
CV777	V	L	L	V	V	V	F	I	V	F	L	L	L
DR13	A	I	.	.	I	V	.	.	F
HUA-PED63	.	S	.	.	.	I	.	V	I	.	.	.	F
JS201603	A	S	F	.	.	F	.	V	I	.	.	.	F
CH/XC/12	A	I	.	.	I	V	.	.	F
QX-01	A	S	.	.	.	I	.	V	I	.	I	.	F
QX-02	A	S	.	.	.	I	.	V	I	.	I	.	F
YY1	A	S	.	.	.	I	.	V	I	.	I	.	F
XUN XIAN	A	I	.	.	I	V	.	.	F
XZ1	A	I	.	.	I	V	.	.	F
XZ2	A	I	.	.	I	V	.	.	F
XZ3	A	.	S	F	A	I	.	.	I	V	.	.	F
XX1	A	I	.	.	I	V	.	.	F
XX3	A	I	.	.	I	V	.	.	F
CH/PDS/2015	A	I	L	.	I	V	.	I	F
CH/HJ/2015	A	I	.	.	I	V	.	.	F
CH/HY/2015	A	.	.	F	.	I	.	.	I	V	F	I	.
CH/JY/2015	A	I	.	.	I	V	.	I	F
CH/KF/2015	A	I	.	.	I	V	.	I	F
CH/LY/2015	A	I	.	.	I	V	.	.	F

氨基酸位点/ Amino acid position																			
98	101	106	107	109	111	124	154	159	160	164	165	166	168	182	194	197	212	214	217
I	A	L	C	V	V	F	I	S	F	V	S	N	D	H	K	V	D	I	D
.	T	S
.	T	.	F	S	N
.	T	.	F	S	.	Q
.	T	S	.	Q	.	A	.	.	.
.	I	.	F	S	N
V	I	.	F	S	N
.	T	.	F	.	.	L	.	.	L	.	.	S	N
.	T	S	.	Q
.	T	.	.	.	L	S	.	Q
.	T	F	S	.	Q
.	T	P	.	.	.	L	.	P	.	.	.	S	.	Q
.	T	S	.	Q
.	T	S	.	Q
.	T	.	.	F	I	S	N	Q	.	.	.	L	H
.	T	A	.	S	.	Q	.	.	Y	.	.
.	T	S	.	Q
.	T	S	.	Q
.	T	S	.	Q	R
.	T	S	.	Q

注：·表示与经典毒株 CV777 氨基酸相同 Note: ·same amino acid as classical strain CV777

与毒株 CV777 相比，克隆的 15 条 ORF3 基因序列无缺失和插入现象，但存在 70 处碱基突变，从

而引起推导的氨基酸序列中有 33 处发生置换。另外，与疫苗毒株 Truncated CV777 和 Attenuated

DR13 相比, 不存在 17 个氨基酸的连续缺失现象。2017 年的 QX-01、QX-02、YY1 与国内 PEDV 株 JS201603 在 3 个位点发生相同的氨基酸置换(L25S, I70V 和 C107F), 该 3 个毒株与越南毒株 HUA-PED63 在 4 个位点发生相同的氨基酸置换(L25S、I70V、C107F、D168N)。遗传进化树显示, 克隆的 PEDV 毒株中有 9 株河南株位于 G2-1 群, 而河南省往年流行毒株几乎全部落在 G2-2 群中。QX-01、QX-02 及 YY1 位于 G1 群, 与近年中国毒株 AJ1102、JS201603 和越南毒株 HUA-PED63 处于一个较小的分支中, 亲缘关系较近。表明河南省 PEDV 的变化呈现易变异性和多样性。

虽然 PEDV 只有一个血清型, 但是免疫 PED 疫苗仔猪的发病率仍很高, 说明疫苗不能为现有的流行毒株提供有效的免疫保护^[12], 这给我国 PED 的防控带来了挑战。对 PEDV 流行毒株的主要抗原基因的分子流行动态进行监测, 在预防和控制该病中具有重要的意义。

参考文献:

- [1] 高君恺, 刘浩飞, 杨倩, 等. 猪流行性腹泻病毒的研究进展[J]. 南京农业大学学报, 2014, 37(1): 1-5.
- [2] SUN M, MA J L, WANG Y N, et al. Genomic and epidemiological characteristics provide new insights into the phylogeographical and spatiotemporal spread of *Porcine epidemic diarrhea virus* in Asia[J]. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(5): 1484-1492.
- [3] HORIE M, KABEMURA M, MASATANI T, et al. Isolation and molecular characterization of *Porcine epidemic diarrhea viruses* collected in Japan in 2014[J]. *Arch Virol*, 2016, 161(8): 2189-2195.
- [4] CHUNG H, NGUYEN V G, MOON H, et al. Isolation of *Porcine epidemic diarrhea virus* during outbreaks in South Korea, 2013-2014[J]. *Emerg Infect Dis*, 2015, 21(12): 2238-2240.
- [5] WANG D, FANG L R, XIAO S B. *Porcine epidemic diarrhea* in China[J]. *Virus Res*, 2016, 226: 7-13.
- [6] LIN C M, SAIF L J, MARTHALER D, et al. Evolution, antigenicity and pathogenicity of global *Porcine epidemic diarrhea virus* strains[J]. *Virus Res*, 2016, 226: 20-39.
- [7] WANG K, LU W, CHEN J F, et al. PEDV ORF3 encodes an ion channel protein and regulates virus production[J]. *FEBS Lett*, 2012, 586(4): 384-391.
- [8] 焦点, 孙杰, 俞正玉, 等. 江苏及周边地区猪流行性腹泻病毒的检测及其 ORF3 基因序列分析[J]. 畜牧与兽医, 2018, 50(10): 88-94.
- [9] WONGTHIDA P, LIWNAREE B, WANASEN N, et al. The role of ORF3 accessory protein in replication of cell-adapted *Porcine epidemic diarrhea virus* (PEDV)[J]. *Arch Virol*, 2017, 162(9): 2553-2563.
- [10] CHEN X, YANG J X, YU F S, et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of *Porcine epidemic diarrhea virus* (PEDV) samples from field cases in Fujian, China[J]. *Virus Genes*, 2012, 45(3): 499-507.
- [11] LIN C N, CHUNG W, CHANG S W, et al. US-like strain of *Porcine epidemic diarrhea virus* outbreaks in Taiwan, 2013-2014[J]. *J Vet Med Sci*, 2014, 76(9): 1297-1299.
- [12] 单颖, 刘子琦, 施杏芬, 等. 浙江及周边地区猪流行性腹泻病毒 S 基因分子特征分析[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2018, 44(5): 610-618.