

郭容利, 李 彬, 范宝超, 等. 猪传染性胃肠炎病毒分离株 JS2012 全基因组序列分析[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(6): 1351-1358.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2016.06.024

猪传染性胃肠炎病毒分离株 JS2012 全基因组序列分析

郭容利, 李 彬, 范宝超, 温立斌, 茅爱华, 周 萍, 何孔旺

(江苏省农业科学院兽医研究所/农业部兽用生物制品工程技术重点实验室/国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏南京 210014)

摘要: 设计 32 对 PCR 引物分片段扩增猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)江苏分离株 JS2012 全基因组, 扩增产物克隆到 pMD19-T 载体并测序。用 DNASTAR 软件将 JS2012 全基因组序列与 GenBank 中其他 13 株 TGEV 株和猪呼吸道冠状病毒(PRCV-ISU-1)序列进行比对以及同源性分析, 并绘制基因进化树。JS2012 基因组序列全长 28 542 bp, 不包括 polyA。基因组的排列为 TGEV 典型的基因排列序: 5'-ORF1a-ORF1b-S-3a-3b-E-M-N-7-3'。TGEV JS2012 株的 ORF3 基因和 Miller 组病毒一样有 2 个大片段的缺失。JS2012 的 S 基因和 Miller M6 以及 Virulent Purdue 2 个强毒株有同样的序列特征。除 Virulent Purdue 外, 其余 Purdue 株在 1 123 ~ 1 128 bp 处均有 6 bp 的缺失, JS2012 与所有 Miller 株及 Virulent Purdue 一样, 此处没有缺失。JS2012 与其他 TGEV 毒株之间的碱基序列同源性为 98.6% ~ 99.9%, 与 Miller M6 的碱基序列同源性最高, 亲缘关系最近, 同属于 Miller 组, 与 Purdue 组相对较远。

关键词: 猪传染性胃肠炎病毒(TGEV); 全基因组; 序列分析

中图分类号: S858.285.3; S852.659.6

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2016)06-1351-08

The complete genome analysis of porcine transmissible gastroenteritis virus strain JS2012

GUO Rong-li, LI Bin, FAN Bao-chao, WEN Li-bin, MAO Ai-hua, ZHOU Ping, HE Kong-wang

(Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Animal Diseases Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture/National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Nanjing 210014, China)

Abstract: Thirty-two pairs of primers were designed to amplify the genome of porcine transmissible gastroenteritis virus (TGEV) strain JS2012 in segments by PCR, and PCR products were cloned into pMD19-T vector and subsequently sequenced. The complete genome of strain JS2012 was compared with other 13 strains of TGEV published in GenBank database and porcine respiratory coronavirus (PRCV-ISU-1) by DNASTAR software. The sequencing results showed that the complete genome of the JS2012 strain was 28 542 bp in length, excluding the poly(A) tail. The genome organization was similar to those of other reported TGEVs, with the typical gene order 5'-ORF1a-ORF1b-S-3a-3b-E-M-N-7-3'. There were two deletions in the ORF3a/b gene of both TGEV strain JS2012 and Miller strains. No mutation was detected in the S gene of

strain JS2012 and virulent strains Miller M6 and Virulent Purdue. There were 6-bp deletions at 1 123 - 1 128 bp in all Purdue strains except for Virulent Purdue which showed no deletion as well as all Miller strains and JS2012. JS2012 shared 98.6% - 99.9% homology of nucleotide sequences with other TGEV strains, and the highest homology was with Miller M6, indicative of the closest relationship. JS2012 was phylogenetically far from strains Purdue.

收稿日期: 2016-01-29

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目(CX(15)1056)

作者简介: 郭容利(1974-), 女, 湖北天门人, 硕士, 副研究员, 主要从事动物疫病防控研究。(Tel) 025-84390331; (E-mail) guorl1974@163.com

通讯作者: 何孔旺, (Tel) 025-84390748; (E-mail) kwh2003@263.com

Key words: genome of transmissible gastroenteritis virus (TGEV); the complete genome; sequence analysis

猪传染性胃肠炎病毒(Transmissible gastroenteritis virus, TGEV)属于冠状病毒科(Coronaviridae)冠状病毒属(Coronavirus),引起猪急性、高度接触性传染性胃肠炎(Transmissible gastroenteritis, TGE),不同品种和年龄的猪均易感染,2周龄以下仔猪主要症状为呕吐、严重腹泻、脱水和高死亡率等^[1],5周龄以上的猪死亡率较低,成年猪一般无死亡现象。1945年,Doyle在美国首次对TGE进行了报道。此后,该病在世界上许多国家和地区相继报道,包括英国、日本、比利时、加拿大、朝鲜和菲律宾^[2-3]。中国从60年代起就有TGE的报道,此病的流行给养猪业造成了严重的经济损失。

TGEV基因组全长大约28 500 bp,包含9个开放性阅读框,编码4种结构蛋白(S、E、M、N)和5种非结构蛋白(复制酶1a、复制酶1b、3a、3b、7),其基因组排序为:5'-ORF1a-ORF1b-S-3a-3b-E-M-N-7-3',较大的ORF1由ORF1a和ORF1b组成,长约20 000 bp,编码病毒复制酶-转录酶,介导病毒的复制、转录和翻译^[4]。

S蛋白含有1 447~1 449个氨基酸。目前研究结果证明S蛋白包含A、B、D、C 4个主要的抗原位点。不同分离株A、B和D位点高度保守,C位点则稍有差异^[5]。S蛋白具有多种生物学功能:携带主要的B淋巴细胞抗原决定簇,诱导中和抗体的产生,为机体提供免疫保护;决定TGEV的致病性和血凝作用;含有宿主细胞氨肽酶受体(PAPN)的识别位点,决定宿主细胞的亲嗜性;使病毒蛋白进入细胞浆,具有细胞融合作用^[6-11]。弱毒株猪呼吸道冠状病毒PRCV-ISU-1的S基因有大量片段的缺失,导致其S蛋白失去了B和C 2个主要抗原位点^[12]。由此推断,S基因的缺失与突变可能影响病毒的组织嗜性和毒力,因此,S蛋白在TGEV基因工程疫苗、诊断技术和分子生物学等方面研究中是最重要的一个靶蛋白,也是用于评价猪传染性胃肠炎病毒的组织嗜性和毒力的重要指标。

E蛋白是一种跨膜蛋白,是TGEV有效复制的必需成分,参与调控病毒粒子的装配和释放^[13];M蛋白是一种膜结合蛋白,主要嵌在病毒脂质囊膜中,在病毒的装配期起重要作用^[14];N蛋白是一种磷酸化蛋白,位于病毒粒子的内部,以核糖核蛋白复合

形式存在,参与RNA复制加工过程,在病毒的复制及转录过程中发挥重要作用^[15]。

ORF3由ORF3a和ORF3b组成,ORF3a在猪呼吸道冠状病毒(PRCV)和许多变异的TGEV中都有不同程度的缺失^[12],删除该基因可能影响病毒的毒力^[16]。基因ORF7是病毒繁殖的非必需基因,其编码的蛋白对宿主细胞的防御有消极作用,影响病毒的致病性^[17]。

本研究拟对TGEV新分离株JS2012全基因组进行测序,并在分子生物学水平上对TGEV分离株JS2012与国内外的TGEV以及猪呼吸道冠状病毒PRCV-ISU-1的碱基序列和氨基酸序列之间的差异进行对比研究,了解冠状病毒演变的规律,为TGEV遗传工程疫苗的研制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞、培养基及主要试剂

猪睾丸细胞(ST)来自ATCC公司,培养基DMEM和新生牛血清(FBS)为GIBCO公司产品,Trizol LS Reagent为Invitrogen公司产品,反转录试剂盒、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase试剂盒、PMD-T19、Escherichia coli DH5a、DNA Marker DL 2000均为TaKaRa产品,胶回收试剂盒是Axygen公司产品。

1.2 病毒及病毒的培养

应用ST细胞,从临床上表现为腹泻症状的病死仔猪肠内容物中分离获得1株TGEV病毒JS2012^[18],用含10% FBS的DMEM细胞培养液培养ST细胞,病毒液与含20 μg/ml胰酶的DMEM 1:1混合后接种长满单层的ST细胞,37℃孵育1 h,弃上清病毒液后加入2% FBS DMEM细胞维持液,置37℃,5% CO₂培养箱中培养,待病变达到90%左右收获,病毒连续传代12代。

1.3 JS2012基因组RNA提取与RT-PCR及测序

取培养的TGEV病毒液200 μl提取RNA,参照反转录试剂盒说明书得到cDNA^[18]。参照GenBank上登录的TGEV WH-1毒株(HQ462571.1)基因组cDNA序列,利用Primer软件设计32对引物(引物由上海英骏基因公司合成),全长被分为32个片段,每个片段之间有100~300 bp重叠,PCR反应按照PrimeSTAR GXL DNA Polymerase试剂盒说明书,

50 μ l 总体系: $5 \times$ PrimeSTAR GXL buffer 10 μ l, 2.5 mmol/L dNTP MiXture 4 μ l, 上、下游引物各为 1 μ l (10 ~ 15 pmol), PrimeSTAR GXL DNA Polymerase 1 μ l, cDNA 3 μ l, 加 DEPC 水至 50 μ l。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 55 $^{\circ}$ C 或 60 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 68 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 68 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳观察。用胶回收试剂盒回收 PCR 产物, 连接 PMD-T19 载体, 然后转化到 *E. coli* DH5a, 选取 3 个阳性克隆送上海英骏生物科技有限公司测序。

1.4 序列分析

利用 DNASTAR 软件 SeqMan 方法对序列片段进行拼接, 应用 MegAlign 中的 Clustal W 方法对分离株 JS2012 全基因组序列和基因与 GenBank 登录的 13 株 TGEV 全基因组序列以及 PRCV-ISU-1 (DQ811787.1) 全基因组序列进行比对以及同源性分析, 并绘制基因进化树。13 株 TGEV 登录号分别是: Virulent Purdue (DQ811789)、Purdue P115 (DQ811788)、PUR46-MAD (NC002306)、Miller M60 (DQ811786)、Miller M6 (DQ811785)、SC-Y (DQ443743)、TS (DQ201447)、H16 (FJ755618)、Attenuated H (EU07421)、WH-1 (HQ462571.1)、SHXB (KP202848)、HX (KC962433.1)、AYU (HM776941.1)。

2 结果

2.1 分离株 JS2012 的全基因组结构

分离株 JS2012 测序结果显示 JS2012 基因组全长为 28 542 bp, 不包括 polyA, 包括 9 个阅读框, 其排序为 5'-*ORF1a-ORF1b-S-3a-3b-E-M-N-7-3'*。5' 端与 3' 端的非编码区长度分别为 314 bp 和 274 bp; *ORF1a* (315 ~ 12 368 bp) 和 *ORF1b* (12 326 ~ 20 368 bp) 共同编码 RNA 依赖的 RNA 聚合酶; *S* (20 365 ~ 24 714 bp)、*E* (25 818 ~ 26 066 bp)、*M* (26 077 ~ 26 865 bp) 和 *N* (26 878 ~ 28 026 bp) 分别编码结构蛋白纤突蛋白 S、外膜蛋白 E、膜蛋白 M 和核衣壳蛋白 N; *ORF3a* (24 817 ~ 25 035 bp)、*ORF3b* (25 097 ~ 25 831 bp)、*ORF7* (28 029 ~ 28 268 bp) 分别编码 3 个非结构蛋白: 3a、3b 和 7。分离株 JS2012 病毒全基因组的 GenBank 登录号为: KT696544。

2.2 非结构基因序列比对分析

分离株 JS2012 RNA 聚合酶基因由 *ORF1a* 与

ORF1b 组成, 和其他 TGEV 一样, 分别含有 4 017 个和 2 698 个密码子 (不包括终止子), *ORF1b* 有 43 个碱基重叠于上游阅读框 *ORF1a* 内, 并包含一个典型的冠状病毒属滑动位点 (5'-UUUAAAC-3', 12 333 ~ 12 339 bp), 其中 TGEV *ORF1a* 的碱基序列具有较大的变异性。而 TGEV *ORF1b* 比较保守。碱基序列分析结果表明, 分离株 JS 2012 和所有 TGEV 毒株的 *ORF1a*、*ORF1b* 区域没有缺失或插入, 而 PRCV-ISU-1 的 *ORF1a* 在位于 2 949 ~ 2 954 bp 和 3 041 ~ 3 043 bp 的位置分别有 6 个和 3 个碱基的缺失。

分离株 JS2012 的 *ORF3a* 和 *ORF3b* 分别编码 71 和 244 个氨基酸, 与 Miller 组病毒 (Miller M6、Miller M60、Attenuated H、H16、TS) 一样, 相对于 Purdue 组病毒 (Virulent Purdue、Purdue P115、PUR46-MAD、SC-Y、WH-1、SHXB、HX), 在 *ORF3a* 起始密码子 ATG 前有 16 个碱基缺失, 在 *ORF3a* 终止密码子 TAA 前有 29 个碱基缺失。Miller M60 在 *ORF3b* 有连续 531 个碱基缺失, 只编码 67 个氨基酸截短蛋白, PRCV-ISU-1 相对应的 *ORF3a* 基因缺失 184 个碱基, 不能完整地表达非结构蛋白 3a。此外, 在此缺失部位的上下游均有 3 个和 5 个碱基的缺失, *ORF3b* 基因缺失 117 个碱基, 其编码的氨基酸比 TGEV 的短。非结构蛋白 3a 基因从起始密码子 1 bp ATG 开始, 结束于对应的 Miller 组 M6 和 M60 247 bp 和普渡组 215 bp。非结构蛋白 3b 基因从 310 bp 开始到 1 043 bp 结束 (图 1)。分离株 JS2012 与所有 TGEV 毒株及 PRCV-ISU-1 的 3a/3b 基因缺失情况见图 1。

2.3 结构基因比对分析

分离株 JS2012 *S* 基因的碱基序列长 4 350 bp, 编码 1 450 个氨基酸, 在所有 TGEV 毒株的 655 bp 位置碱基是 G (图 2a), 显示了 TGEV 的肠嗜性; 在 *S* 基因 1 123 ~ 1 128 bp 的位置, Purdue P115、PUR 46-MDA、SC-Y、WH-1、SHXB、HX、AYU 各有 6 个碱基的缺失, 从而导致 *S* 蛋白有 2 个氨基酸的缺失, 而分离株 JS2012 与 Virulent Purdue Miller M6、Miller M60、Attenuated H、H16、TS 株未见缺失 (图 2c); 而且在 *S* 基因 1 753 bp 的位置 JS2012 和 Virulent Purdue、Miller M6、TS 的碱基是 T, 其余毒株在此位置碱基是 G (图 2b), 从而编码的氨基酸不同。在 *S* 基因 2 386 ~ 2 388 bp 的位置, Miller M60、Attenuated H、H16 多有 3 个碱基的缺失, 而包括 JS2012 株在内的其他毒株都未缺失 (图 2d), 序列分析结果表明, PRCV-ISU-1 在 *S*

基因的 5'端有 681 bp 的缺失。所有 TGEV、PRCV-ISU-1 的 *E* 基因和 *N* 基因没有碱基的缺失与插入,在 *M* 基因 70 ~ 72 bp 位置 PRCV-ISU-1 有 3 个碱基的缺

失(图 2e),在 *M* 基因 119 ~ 204 bp 的位置 Miller M60 有 6 个碱基的插入(图 2f)。

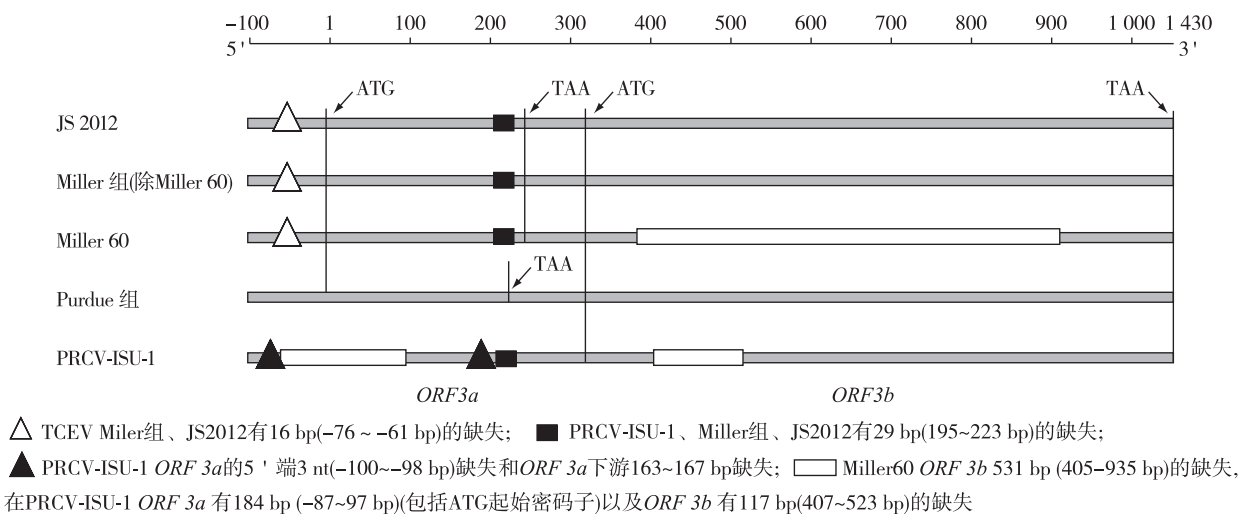
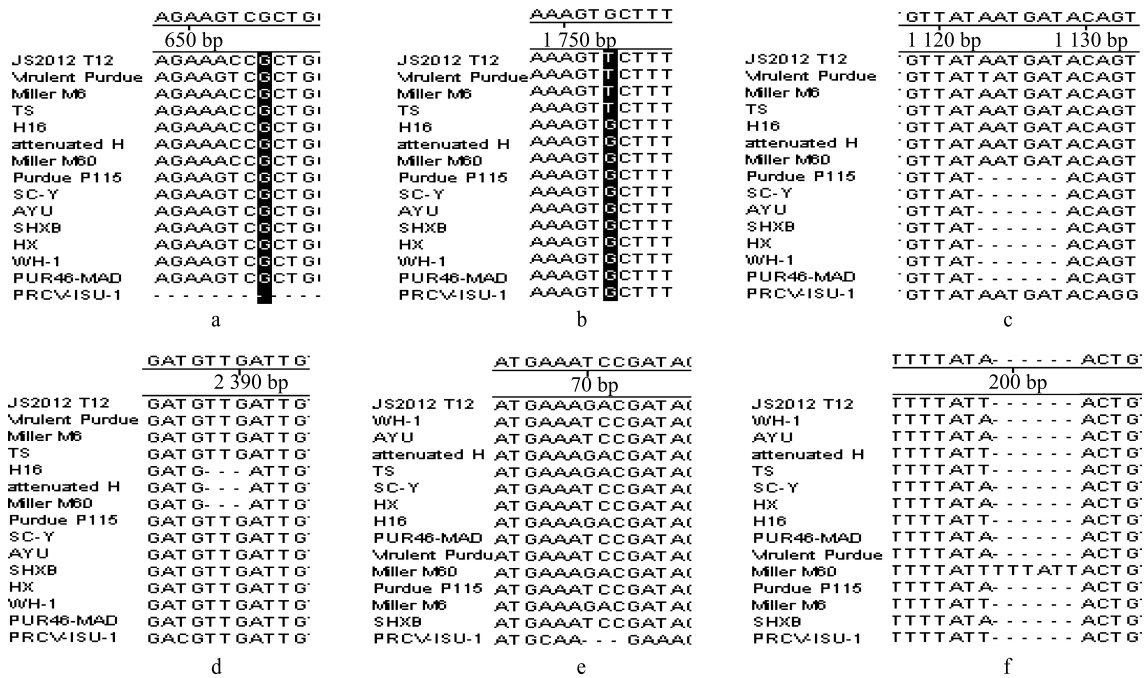


图 1 *ORF3a/3b* 基因缺失示意图
Fig. 1 Schematic diagram of *ORF3a/3b* gene deletion



a ~ d; *M* 基因; e ~ f; *S* 基因。
图 2 *S*、*M* 基因突变、缺失、插入
Fig. 2 Mutation, deletion and insertion of *S* and *M* genes

2.4 同源性分析

将分离株 JS2012 其他 TGEV 以及 PRCV-ISU-1

的结构基因与非结构基因碱基序列及其编码的氨基酸序列进行同源性分析,结果(表 1)显示分离株

JS2012 株与其他 TGEV 和 PRCV-ISU-1 在 *ORF1*、*S*、*ORF3a*、*ORF3b*、*E*、*M*、*N*、*ORF7* 核苷酸序列的同源性分别是 97.6% ~ 99.7%、96.6% ~ 99.6%、90.7% ~ 100.0%、97.6% ~ 99.9%、98.4% ~ 100.0%、97.7% ~ 100.0%、97.4% ~ 100.0%、96.2% ~ 100.0%；氨基酸序列的同源性分别是 97.7% ~ 99.7%、98.3% ~ 99.4%、90.4% ~ 100.0%、94.7% ~ 99.6%、95.2% ~ 100.0%、97.7% ~ 100.0%、98.2% ~ 100.0%、93.8% ~ 100.0%。JS2012 全基因组碱基序列与 TGEV 各毒株及 PRCV-ISU-1 碱基序列同源性为 98.6% ~ 99.9%，与 Miller 组毒株高度同源，其中与 Miller M6 的同源性高达 99.9%，此外基因 *ORF3a*、*M*、*N* 的碱基序列与 Miller M6 同源性达到 100.0%。

表 1 JS2012 基因组与其他 TGEV 毒株以及 PRCV-ISU-1 的碱基序列和氨基酸序列的同源性

Table 1 Nucleotide and amino acids sequence identity of the genomes of JS2012 to other TGEV strains and PRCV-ISU-1

毒 株	ORF1 同源性 (%)		S 同源性 (%)		ORF3a 同源性 (%)		ORF3b 同源性 (%)		E 同源性 (%)		M 同源性 (%)		N 同源性 (%)		ORF7 同源性 (%)	
	碱基序列	氨基酸序列	碱基序列	氨基酸序列	碱基序列	氨基酸序列	碱基序列	氨基酸序列	碱基序列	氨基酸序列	碱基序列	氨基酸序列	碱基序列	氨基酸序列	碱基序列	氨基酸序列
PUR46-MAD	99.7	99.7	98.7	98.4	90.7	90.4	98.8	97.2	98.8	96.4	98.4	98.1	98.2	98.4	96.2	93.8
Purdue P115	99.6	99.6	98.7	98.3	90.7	90.4	98.9	97.6	98.8	96.4	98.4	98.1	98.3	98.7	96.2	93.8
Virulent Purdue	99.6	99.6	98.8	98.5	90.7	90.4	99.0	98.0	99.2	97.6	98.5	98.5	98.3	98.2	96.2	93.8
AYU	99.6	99.7	98.7	98.3	90.7	90.4	98.8	97.2	98.8	96.4	98.2	97.7	98.2	98.4	96.2	93.8
WH-1	99.7	99.7	98.7	98.4	90.7	90.4	98.9	97.6	98.8	97.6	98.4	98.1	98.2	98.4	96.2	93.8
SHXB	99.7	99.6	98.7	98.4	90.7	90.4	99.9	97.6	98.8	96.4	98.2	97.7	98.1	98.2	97.5	96.2
SC-Y	99.2	98.9	98.5	98.0	90.7	90.4	99.9	97.6	98.8	96.4	98.2	97.7	98.1	98.2	96.2	93.8
HX	99.6	99.5	98.7	98.3	90.7	90.4	98.8	97.2	98.8	96.4	98.2	97.7	98.2	98.4	96.2	93.8
TS	99.1	98.8	99.6	99.4	99.1	97.3	99.5	98.4	100.0	100.0	99.7	99.2	99.9	99.7	100.0	100.0
Attenuated H	99.2	99.1	99.3	98.7	99.5	98.6	99.7	99.2	98.4	95.2	99.9	99.6	99.9	100.0	100.0	100.0
H16	99.1	99.1	99.4	98.8	100.0	100.0	99.9	99.6	99.2	97.6	99.9	99.6	100.0	100.0	100.0	100.0
Miller M60	99.2	99.2	99.5	99.2	99.5	98.6	97.6	98.6	99.6	98.8	99.4	100.0	99.8	99.7	99.6	98.8
PRCV-ISU-1	97.6	97.7	96.6	98.3			97.6	94.7	98.4	100.0	97.7	98.1	97.4	98.4	97.9	100.0
Miller M6	99.3	99.3	99.5	99.2	100.0	100.0	99.9	99.6	99.6	98.8	100.0	100.0	100.0	100.0	99.6	100.0

2.5 系统进化树分析

TGEV 全基因组碱基序列的系统进化树分析结果(图 3)显示:所有 TGEV 毒株分成 2 组,一个是由 Virulent Purdue、Purdue P115、PUR46-MAD、SC-Y、WH-1、SHXB、HX 和 AYU 组成的 Purdue 组,另一个由分离株 JS2012 与 Miller M6、Miller M60、Attenuated H、H16、TS 组成的 Miller 组。同时 S 基因碱基序列的系统进化树分析结果显示同样的分组,分离株 JS2012 属于 Miller 组,与 Miller M6、H16 的亲缘关系最近,与 Purdue 组亲缘关系相对较远。PRCV-ISU-1 属于另外一个大的分支,和 TGEV 毒株由共同的祖先基因进化演变而来。

3 讨论

相对猪流行性腹泻病毒(PEDV)而言,TGEV 在 GeneBank 登录的全基因组碱基序列是很有限的,目前为止,大约有 13 个全基因组碱基序列的报道。已经有研究人员对一些 TGEV 基因组碱基序列的比较结果进行了较为详细的报道^[12,19],这些结果为分析分离株 JS2012 毒力的变化提供有价值的参考。本研究对 TGEV 分离株 JS2012 进行全基因组测序,并与其他 TGEV 及 PRCV 的基因碱基序列进行对比分析,了解该病毒基因组结构、遗传变异和演化规律,特别是中国冠状病毒的流行特点及趋势。

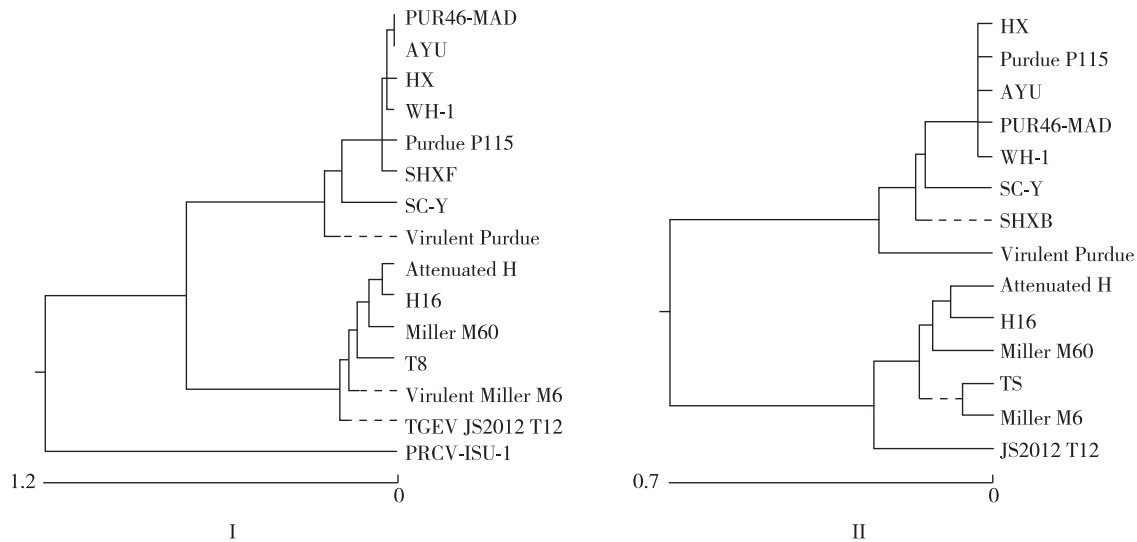


图 3 JS2012 的全基因组 (I) 以及 S 基因 (II) 的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of TGEV JS2012 based on complete genome sequence(I) and S gene sequences(II)

有研究表明,在 TGEV 5'端与 3'端的非编码区的碱基对病毒的复制和转录至关重要^[20],分离株 JS2012 5'端与 3'端的非编码区没有碱基的缺失或插入,这表明 JS2012 的复制和转录机制没有改变。

S 基因碱基点突变可能对病毒的组织嗜性和毒力的改变有一定的影响。有研究结果证实 S 基因第 655 个碱基 G 突变可引起病毒从肠道到呼吸道组织嗜性的转变,在培养传代猪传染性胃肠炎病毒 TOY56 株时 S 基因发生点突变,导致病毒的肠道嗜性转移到呼吸道嗜性^[21]。本研究序列比对结果表明在 S 基因 655 碱基位置,除了毒株 PRCV-SU-1,其他猪传染性胃肠炎的菌株均含有 1 个 G,显示出 TGEV 分离株 JS2012 毒株的肠嗜性。比较 Miller M6 和 M60 以及 Virulent Purdue 和 Purdue115 两对强弱毒株,在 S 基因第 1 753 碱基的共同变化是 T 到 G 突变引起在氨基酸序列中第 585 个氨基酸由丝氨酸到丙氨酸突变,突变发生在 TGEV S 蛋白主要的抗原位点 A 和 B 的区域,这种变化影响病毒受体结合或中和抗体相互作用,从而影响病毒抗原性。因此,这一突变可能是 TGEV 毒力减弱的标志^[22]。而 JS2012 在此处与 Miller M6 以及 Virulent Purdue 2 个强毒株一样没有突变,保留其基因强毒株特性。Purdue 组中 8 个毒株除 Virulent Purdue 外,其余 7 个在 S 基因 1 123 ~ 1 128 bp 的位置有 6 个碱基的缺失,从而导致 S 蛋白有 2 个氨基酸的缺失,这可能是

病毒在体外经过多次传代后而出现 6 个碱基 (1 223 ~ 1 228 bp) 缺失,从而导致病毒毒力减弱所致^[22],这是细胞适应型 Purdue 株与野生型 Purdue 株的区分标志,而分离株 JS2012 与 Virulent Purdue 以及 Miller 组 5 个毒株一样未见缺失,保持其 S 基因的完整性。

JS2012 与 H16、H、TS、野生型 Miller 和 Miller M60 毒株一样,在 *ORF3a*、*ORF3b* 有 2 个大片段的缺失。2 个大的缺失仅存在 Miller 组而不存在 Purdue 组,这种现象可以用来区分二者。一些研究人员发现,在 *ORF3a*、*ORF3b* 碱基大片段缺失可能会影响猪传染性胃肠炎病毒的毒力,但不影响病毒复制^[16]。野生型 Miller M6 在传代到 60 代,*ORF3b* 出现连续 531 个碱基缺失,而其对仔猪的致病性明显减弱,似乎证实 S 基因某些碱基突变是致病性减弱的重要原因这一观点^[22]。本试验分离的 JS2012 来源于腹泻致死的仔猪肠组织,测序分析结果显示其与 Miller M6 虽然在 *ORF3a* 中有 2 个大片段的缺失,但低代次的分离病毒动物回归试验结果证明其对初生的仔猪具有很强的致病性^[18]。

基因的突变和重组促进冠状病毒进化与演变,导致新的冠状病毒产生,并且可能改变它们的致病性、组织嗜性,甚至跨越宿主物种之间的屏障。近几年来在亚洲及美洲爆发的流行性腹泻病 (PED)^[23-24],是因为 S 基因发生部分碱基的插入与缺失而导致新的流行性腹泻病毒对仔猪的致病力增

强。TGEV 传代后某些碱基的突变也可能导致其组织嗜性的转变。有研究结果表明在人类中流行的 2 个严重急性呼吸综合征 SARS 和 MERS 可能是蝙蝠的 SARS 冠状病毒编码 S 蛋白的某些基因突变和重组而导致跨物种传播感染人类^[25]。同源性比较和系统发育分析结果有助于我们了解 TGEV 分离株 JS2012 碱基序列的演变。同源性比较结果表明 JS2012 与 Miller M6、Miller M60、H、H16、TS 高度相似,结构蛋白和非结构蛋白氨基酸序列的同源性及其基因碱基序列的同源性分别为 95.2% ~ 100.0% 和 97.6% ~ 100.0%,表明物种特异性显著。JS2012 S 基因第 655 个碱基 G 显示其肠嗜性,动物试验结果^[18]进一步证实其对仔猪的肠嗜性和致病性。系统发育分析结果也表明,所有的 TGEV 毒株很明显的分为 Purdue 组和 Miller 组 2 个组,全基因组序列与 S 基因序列系统发育为同样的分组方式,这与 Hu Weiwei 等^[19]报道的结果一致,但所有 TGEV 毒株与 PRCV-ISU-1 由共同的祖先基因进化演变而来。

本研究将 JS2012 与其他 TGEV 毒株的基因碱基序列和氨基酸序列比对分析,对 JS2012 的基因组结构与演化规律有了一定的了解,TGEV 的遗传与变异主要发生在 S 和 *ORF3a*、*ORF3b* 基因,JS2012 在 S 基因易突变区与 Virulent Purdue、Virulent Miller M6 有相同基因特性,而且在基因 *ORF3a*、*M*、*N*,其碱基序列与 Miller M6 的同源性达到 100%,动物试验结果证明,JS2012 低代次病毒对仔猪具有明显的致病性^[18],可以推断本研究中分离的野毒株 JS2012 是 1 株强毒株。

参考文献:

- [1] SIRINARUMITR T, SIDDLE S, GRAHARE F, et al. Porcine transmissible gastroenteritis virus induced apoptosis in swine testes cell culture[J]. Archives of Virology, 1998, 143(12): 2471-2485.
- [2] SASAHARA J, HARADA K, HAYASHI S, et al. Studies on transmissible gastroenteritis in pigs in Japan[J]. J Vet Sci, 1958, 20: 1-6.
- [3] PRITCHARD G C. Transmissible gastroenteritis in endemically infected breeding herds of pigs in East Anglia, 1981-1985[J]. The Veterinary Record, 1987, 120(10): 226-230.
- [4] MASTERS P S. The molecular biology of coronaviruses[J]. Adv Virus Res, 2006, 66: 193-292.
- [5] DELMAS B, DENIS R, GODET M, et al. Four major antigenic site of the corona virus transmissible gastroenteritis virus are located on the amino terminal half of spike glycoprotein S[J]. J Gen Virol, 1990, 71(6): 1313-1323.
- [6] JIMENEZ G, CORREA I, MELGOSA M P. Critical epitopes in transmissible gastroenteritis virus neutralization[J]. Journal of Virol, 1986, 60(1): 131-139.
- [7] CARLOS M, SANCHEZ, IZETA A, et al. Targeted recombination demonstrates that the spike gene of transmissible gastroenteritis coronavirus is a determinant of its enteric tropism and virulence[J]. Journal of Virol, 1999, 73(9): 7607-7618.
- [8] BALLESTEROS L, SANCHEZ C, ENJUANES L. Two amino acid changes at the N-terminus of TGEV spike protein result in the loss of enteric tropism[J]. Journal of Virol, 1997, 227(2): 378-388.
- [9] CHRISTINE K, GRAHAM D, YOLKEN R, et al. Point mutations in the S protein connect the sialic acid binding activity with the enteropathogenicity of TGEV[J]. Journal of Virol, 1997, 71(4): 3285-3287.
- [10] COLLINS A R, KNOBLER R L, POWELL H. Monoclonal antibodies to murine hepatitis virus-4 (strain JHM) define the viral glycoprotein responsible for 46 attachment and cell-cell fusion[J]. Virology, 1982, 119(2): 358-371.
- [11] XIAO H, XU L H, YAMADA Y, LIU D X. Coronavirus spike protein inhibits host cell translation by interaction with eIF3f[J]. PLoS One, 2008, 3(1): e1494.
- [12] KIM L, HAYES J, LEWIS P, et al. Molecular characterization and pathogenesis of transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) and porcine respiratory coronavirus (PRCV) field isolates co-circulating in a swine herd[J]. Arch Virol, 2000, 145(6): 1133-1147.
- [13] GODET M, L HARIDON R, VANTHEROT J F, et al. TGEV coronavirus ORF4 encodes a membrane protein that is incorporated into virions[J]. J Virol, 1992, 188(2): 666-675.
- [14] KLUMPERMAN J, LOCKER J K, MEIJER A, et al. Coronavirus M proteins accumulate in the Golgi complex beyond the site of virion budding[J]. Journal of Virology, 1994, 68(10): 6523-6534.
- [15] STOHLMAN L M, BARIC R, NELSON G N, et al. Specific interaction between coronavirus leader RNA and nucleocapsid protein[J]. Journal of Virol, 1988, 62(11): 4288-4295.
- [16] SOLA I, ALONSO S, ZUNIGA S, et al. Engineering the transmissible gastroenteritis virus genome as an expression vector inducing lactogenic immunity[J]. J Virol, 2003, 77(7): 4357-4369.
- [17] ORTEGO J, SOLA I, ALMAZAN F, et al. Transmissible gastroenteritis coronavirus gene 7 is not essential but influences in vivo virus replication and virulence[J]. Virology, 2003, 308(1): 13-22.
- [18] 郭容利,倪艳秀,温立斌,等.猪传染性胃肠炎病毒江苏株的分离与鉴定及其 S 基因序列分析[J].华北农学报, 2013, 28(5): 74-79.
- [19] HU W W, YU Q H, ZHU L Q, et al. Complete genomic sequence of the coronavirus transmissible gastroenteritis virus SHXB isolated

- in China[J]. Arch Virol, 2014, 159(9): 2295-2302.
- [20] ELEOUET J F, RASSCHAERT D, LAMBERT P, et al. Complete sequence (20 kilobases) of the polyprotein-encoding gene *1* of transmissible gastroenteritis virus[J]. Virology, 1995, 206(2): 817-822.
- [21] SANCHEZ C M, GEBAUER F, SUNE C, et al. Genetic evolution and tropism of transmissible gastroenteritis coronaviruses[J]. Virology, 1992, 190(1): 92-105.
- [22] ZHANG X, HASOKSUZ M, SPIRO D, et al. Complete genomic sequences, a key residue in the spike protein and deletions in non-structural protein 3b of US strains of the virulent and attenuated coronaviruses, transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus[J]. Virology, 2007, 358(2): 424-435.
- [23] LUO Y, ZHANG J, DENG X, et al. Complete genome sequence of a highly prevalent isolate of porcine epidemic diarrhea virus in South China[J]. Journal of Virology, 2012, 86(17): 9551.
- [24] OKA T, SAIF L J, MARTHALER D, et al. Cell culture isolation and sequence analysis of genetically diverse US porcine epidemic diarrhea virus strains including a novel strain with a large deletion in the spike gene[J]. Veterinary Microbiology, 2014, 173(3): 258-269.
- [25] LU G, WANG Q, GAO G F. Bat-to-human: spike features determining 'host jump' of coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, and beyond[J]. Trends in Microbiology, 2015, 23(8): 468-478.

(责任编辑:王 妮)