

猪捷申病毒 HB 株的分离与全基因序列分析

张晓杰^{1,2}, 刘业兵^{1*}, 汤德元^{2*}, 朱向博¹

(1. 中国兽医药品监察所, 北京 100081; 2. 贵州大学动物科学学院, 贵阳 550025)

摘要: 为分析河北省某规模化猪场猪捷申病毒(PTV)的遗传变异和进化关系, 作者成功分离到 PTV HB 株, 对其进行了毒力测定和动物回归试验, 设计引物进行了全基因序列测定, 并与国内外 42 株 PTV 全基因序列进行了同源性比较。结果表明猪捷申病毒 HB 株病毒滴度为 $10^{-6.4}$ TCID₅₀ · mL⁻¹, 健康仔猪接毒 28 d 后均出现明显猪捷申病症状, 该毒株全基因组序列长度为 7 090 bp。系统进化树分析表明, 猪捷申病毒 HB 株(JQ664746)属于 PTV-8 型血清型, 和国内分离的 PTV-jilin/2003 株(GQ293092)同源性最高, 从而为进一步研究该毒株的遗传变异提供参考。

关键词: 猪捷申病毒 HB 株; 病毒分离; 全基因序列分析

中图分类号: S852.659.6

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)06-0937-06

Isolation and Sequence Analysis of Complete Genome of Porcine Teschovirus HB Strain

ZHANG Xiao-jie^{1,2}, LIU Ye-bing^{1*}, TANG De-yuan^{2*}, ZHU Xiang-bo¹

(1. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China; 2. College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: This experiment was conducted to study the genetic variation and phylogenetic analysis of Porcine teschovirus (PTV) HB strain isolated from a pig farm in Hebei Province. ST cells and animal infection experiments were conducted after the virus was originated from clinical tissue samples successfully, and the genome sequence of PTV HB strain had been determined, comparative genome analysis was performed with other 42 PTV strains in GenBank. The virus titer was $10^{-6.4}$ TCID₅₀ · mL⁻¹, and the infected pigs showed the same clinical signs and homological changes as natural infected ones after 28 days, and the complete genome sequence was composed of 7 090 nucleotides. Phylogenetic tree analysis demonstrated that PTV HB strain (JQ664746) belonged to serotype 8 and had a very closely genetic relationship with PTV-jilin/2003 strain (GQ293092) isolated from Jilin Province, China. Our results provided an essential reference for investigating the genetic variation of PTV HB strain.

Key words: porcine teschovirus HB strain; virus isolation; complete genome sequence analysis

猪捷申病又称塔尔凡病(Talfan disease)和脑脊髓炎, 是由猪捷申病毒(Porcine teschovirus, PTV)引起的猪脑脊髓灰质炎、繁殖障碍、肺炎、下痢、心包炎和心肌炎、皮肤损伤及无症状等多种表现的一种病毒性传染病^[1-2]。1929 年该病最先发现于原捷克斯洛伐克的捷申地区, 并具有高病死率(90%

以上)。在过去的 30 多年, 该病主要发生于欧洲, 亚洲、北美洲及大洋洲等地区均有报道, 非洲也有散发, 该病的广泛传播给工业化养猪带来了巨大的经济损失^[3-4]。PTV 呈广泛的隐性感染状态, 对外界环境的抵抗力较强, 可以在猪舍中长期存在, 该病毒和圆环病毒 2 型(PCV2)共同感染可以引起断奶仔

收稿日期: 2011-11-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(31172341; 31172349); 十一五国家科技支撑计划项目(2007BAD86B04)

作者简介: 张晓杰(1985-), 男, 河北沧州人, 硕士生, 主要从事动物传染病分子病毒与免疫学研究工作, E-mail: xiaojiezhang_sci@163.com

* 通讯作者: 刘业兵, 副研究员, E-mail: liuyebing@ivdc.gov.cn; 汤德元, 教授, E-mail: tdyuan@163.com。1、2 单位并列, 作用均等

猪的多系统衰竭综合征^[2],并且易与猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)、猪伪狂犬病毒(PRV)、猪细小病毒(PPV)、口蹄疫病毒(FMDV)和猪瘟病毒(CSFV)等混合感染,从而引起感染猪群出现更严重与复杂的临床症状^[5]。

PTV属于小RNA病毒科(Picornaviridae)捷申病毒属(Teschovirus)成员,基因组为单股正链RNA,长约7.2 kb,仅含有1个完整的开放阅读框(ORF)。ORF编码1个多聚蛋白,该产物可被蛋白水解酶裂解为结构蛋白L、VP1、VP2、VP3、VP4和非结构蛋白2A、2B、2C、3A、3B、3C、3D^[6-8]。2003年,哈尔滨兽医研究所在我国内蒙古自治区首次分离到了猪捷申病毒 Swine/CH/IMH/03株^[9],王斌、崔尚金等^[10-11]分别在我国黑龙江省和吉林省分离到了PTV JF613株和jilin/2003株,并进行了全基因组测定与分析。作者对实验室在河北省某规模化猪场发现的猪捷申病毒HB株进行了分离、毒力测定和动物回归试验,并将其全基因组测序结果与国内外分离鉴定的毒株进行了同源性比较分析,为深入研究该病毒在我国的遗传变异与进化关系提供了参考。

1 材料与方法

1.1 细胞及试剂

ST细胞由中国兽医药品监察所提供,Trizol、PfuUltra™ II Fusion HS DNA Polymerase、SuperScript™ III Reverse Transcriptase 购自Invitrogen公司;pGEM-T-Easy Vector 购自Promega公司;Ex Taq®聚合酶购自TaKaRa公司。

1.2 病料来源

2010年9月于河北省某规模化猪场采集了病死仔猪的肺脏、肝脏、淋巴结等组织。

1.3 病料的核酸提取及RT-PCR检测

将病变组织的匀浆液用Trizol Reagent试剂充分重悬,然后参照试剂盒说明书提取核酸,获得病料组织的总RNA后,用常规反转录体系反转录并进行PCR鉴定。参考GenBank上PTV基因组全长序列中L基因的保守区域,通过Primer 5.0生物软件设计1对特异性引物,其中上游引物为P1:5'-GACAGAGTACAGAAGAGCAAGT-3',下游引物为P2:5'-TGACTATACAAAGTACAGACGG-3',利用Ex Taq®聚合酶进行扩增。PCR反应条件:95℃预变性5 min;94℃ 30 s,53℃ 30 s,72℃ 30 s,

共进行35个循环;72℃延伸10 min。扩增后取8.0 μL PCR产物进行2%琼脂糖凝胶电泳。

1.4 PCR产物的克隆与测序

从2%琼脂糖凝胶回收特异的扩增片段与pGEM-T-Easy载体16℃过夜连接,将连接产物转化TOP10感受态细胞,经Amp、IPTG、X-gal筛选,挑取单个白色菌落扩大培养,送阳性菌液至英潍捷基(上海)贸易有限公司测序。

1.5 病毒的分离

按常规方法,用DMEM营养液将仔猪病料组织匀浆化,无菌处理后离心取上清,接种于ST细胞,37℃培养5 d,每日观察细胞病变(CPE)。盲传3代,收集出现细胞病变的培养物,-20℃保存。

1.6 病毒TCID₅₀的测定

用DMEM维持液将分离的病毒做 10^{-3} ~ 10^{-8} 倍梯度稀释,分别接种于长满单层ST细胞的96孔板,每个稀释度接种5孔,每孔接种100 μL。同时设定2排细胞孔加入维持液作为阴性对照,于37℃细胞培养箱静置培养5 d,观察细胞病变,按Reed Muench法计算病毒的TCID₅₀。

1.7 动物回归试验

选择10头6周龄SPF健康仔猪,分成2组,每组5头。第1组每头猪肌肉注射3 mL、口鼻滴入2 mL病毒液;第2组每头猪肌肉注射3 mL、口鼻滴入2 mL生理盐水,作为对照,隔离饲养。每日测量体温,观察并记录猪的精神、食欲等状况。饲养28 d后全部剖杀,观察病变,并用上述RT-PCR方法检测肺脏、肝脏和淋巴结等组织中是否存在PTV。

1.8 分离病毒基因组序列的测定

1.8.1 核酸提取及RT-PCR扩增 按1.3步骤提取分离病毒的RNA,并反转录成cDNA,设计6对引物(见表1),利用Pfu Ultra™ II Fusion HS DNA Polymerase对PTV HB株的基因组片段进行PCR扩增。

1.8.2 PCR产物克隆及测序 凝胶回收特异的扩增片段,经末端加A后与pGEM-T-Easy载体连接,转化TOP10感受态细胞,并利用菌落PCR以及Not I单酶切进行鉴定,阳性菌液送英潍捷基(上海)贸易有限公司测序。

1.8.3 序列分析 利用DNASar生物学软件拼接所得各个基因的测序结果以获得全基因序列,并与GenBank上的PTV参照序列进行比对,绘制系统进化树。

表 1 全基因扩增引物一览表

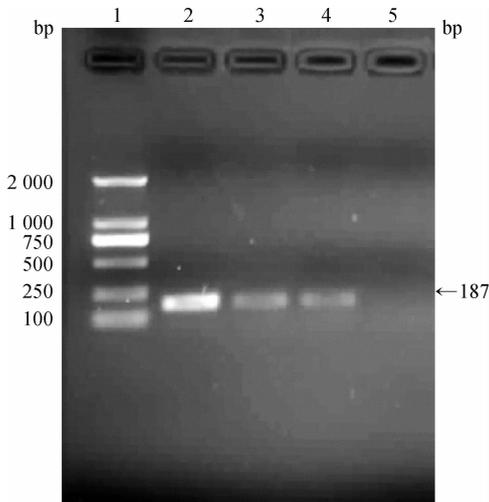
Table 1 Primers used in experiment

片段 Segment	引物 Primer	序列(5'-3') Sequence (from 5' to 3')	片段/bp Size
S1	S1-F	CTCCCTTGAATTTGTAA	600
	S1-R	TCATACTCAACTTCAGCA	
S2	S2-F	GGACTGGACTTGTGCTGCC	1 264
	S2-R	CCCACGGGCAATGAACAGT	
S3	S3-F	AACCCACCTCCCAACAATA	2 358
	S3-R	TCCATTCTGCACCCTTCAA	
S4	S4-F	AGAATGGATTTTGGAGCCG	1 873
	S4-R	CCACAAATGCCTTTCCAAC	
S5	S5-F	GCGGCAATACCGTGACAT	1 744
	S5-R	CAACAGGCAGAAAATCACTAAACT	
S6	S6-F	TTAAACGGGGATTTGTACTGG	287
	S6-R	CAGAAAATCACTAAACTGCTCAC	

2 结果

2.1 RT-PCR 检测及测序

设计的 1 对特异性引物分别对病死仔猪的肺脏、肝脏、淋巴结及阴性样本的核酸进行扩增,扩增条带长度约为 187 bp,与目的条带相符(图 1)。将该 PCR 产物测序结果与 PTV 基因组 *L* 基因序列比对,相似性达 100%,初步判定为 PTV 阳性。



1. DL2 000 DNA 相对分子质量标准;2. 肺脏;3. 肝脏;
4. 淋巴结;5. 阴性对照

1. DL2 000 DNA marker;2. Lung sample;3. Liver sample;4. Lymph node sample;5. Negative sample

图 1 RT-PCR 产物电泳分析

Fig. 1 Electropherogram of RT-PCR products

2.2 病毒的分离与 TCID₅₀ 测定

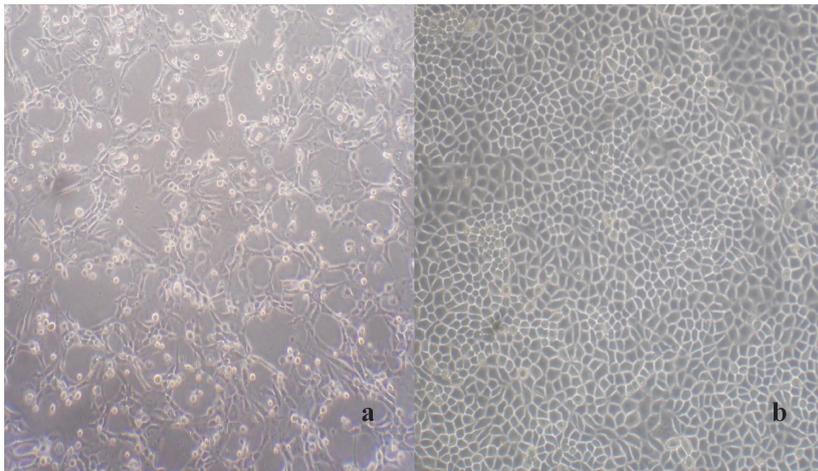
将无菌处理后的病料接种 ST 细胞,盲传 3 代后可观察到明显的细胞病变。纯化后的病毒感染 ST 细胞 48 h 后便出现病变,主要表现为细胞间距变大,折光性增强,逐渐呈拉网状,最后破裂、崩解、成片脱落(图 2)。利用长满单层 ST 细胞的 96 孔板对其进行毒价测定,TCID₅₀ 为 $10^{-6.4} \cdot \text{mL}^{-1}$,并命名该毒株为 PTV HB 株。

2.3 动物回归试验

第 1 组 SPF 仔猪接毒 3 d 后均出现体温升高,平均体温最高达 41 °C,接毒 7 d 后陆续出现猪捷申病典型临床症状:体温升高、食欲下降,精神沉郁,腹泻,排黄色水样稀便等。仔猪接毒 28 d 后剖检可见肺脏坏死严重,肺前区有灰红色突变区,肺泡和支气管中有渗出液,肝脏淤血,结肠肠壁变薄,肠道出血,肠腔中充满黄色水样内容物(图 3)等病变状况。提取病变组织核酸进行 RT-PCR 检测,电泳后均出现 187 bp 目的条带,而第 2 组猪饲养期间体温正常,剖杀后未发现异常病变组织(图 3),RT-PCR 检测为阴性。

2.4 PTV HB 株全基因组克隆与序列分析

2.4.1 PTV HB 株核酸片段的扩增 以 ST 细胞增殖的 PTV HB 株第 8 代的核酸为模板,应用 6 对特异性引物分别进行 PCR 扩增,经琼脂糖凝胶电泳后,分别获得 287、600、1 264、1 744、1 873、2 358 bp 的目的条带,与预期大小一致(图 4)。

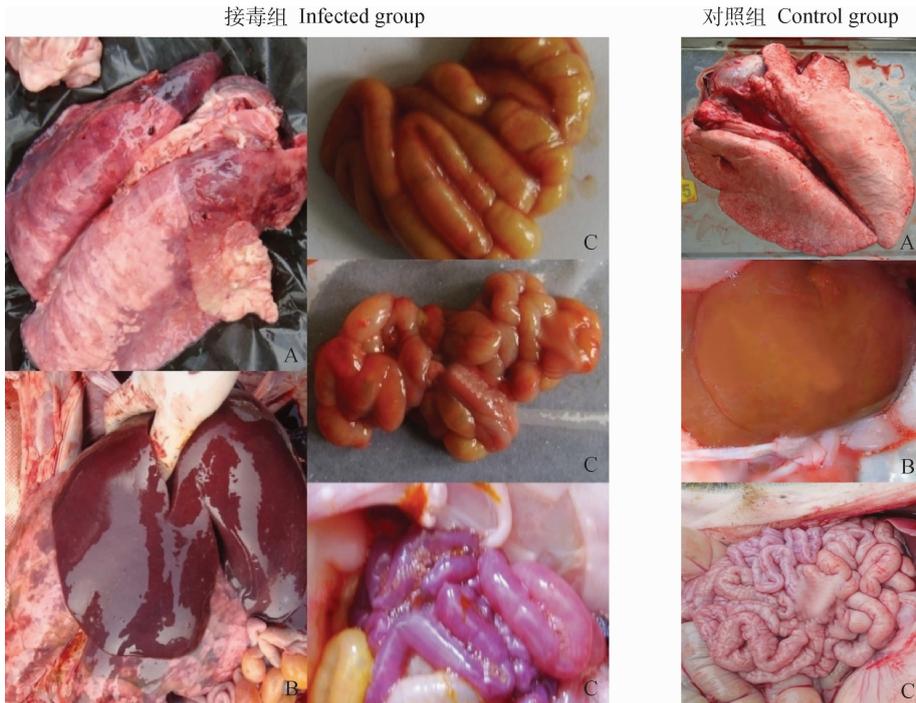


a. 感染 PTV HB 株的 ST 细胞; b. 正常的 ST 细胞

a. Infected PTV ST cells HB; b. Normal ST cells

图 2 ST 细胞感染 PTV 后产生的细胞病变 (100×)

Fig. 2 CPE in ST cells post infection



A. 肺脏; B. 肝脏; C. 小肠

A. Lungs; B. liver; C. Intestine

图 3 接毒和对照组仔猪 28 d 后主要组织的病变状况

Fig. 3 Pathological examination of pigs infected with or without PTV-HB strain after 28 days

2.4.2 PCR 产物的克隆与测序 将 6 段 PCR 产物电泳回收后接入 pGEM-T-Easy 克隆载体, 利用菌落 PCR 和单酶切手段筛选阳性克隆, 送鉴定好的阳性菌液测序, 拼接测序结果, 获得了 HB 株基因组全序列, 长度为 7 090 bp。

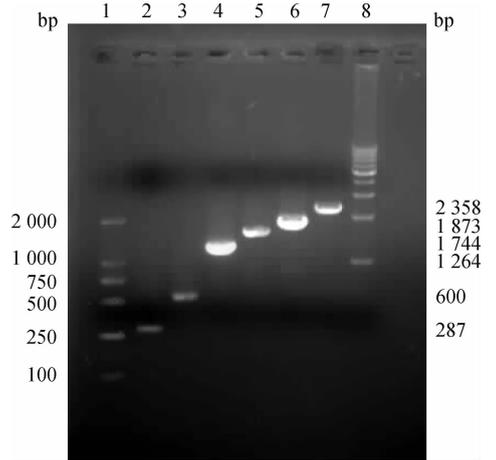
2.4.3 系统进化分析 利用 Mega 3.1 软件, 将测序结果分别与国内外 PTV 毒株 11 种血清型的 42 个全序列样本进行了系统进化树分析(图 5), 结果表明 PTV HB 株(JQ664746)属于 PTV-8 血清型, 与崔尚金等分离的 jilin/2003 株(GQ293092)遗传关系最近,

核苷酸相似性达 99%，而与国内分离的 Swine/CH/IMH/03 株(DQ355222)和 JF613 株(GU446660)遗传关系较远,核苷酸相似性分别为 81%和 85%。

3 讨 论

PTV 共有 11 个血清型^[12],不同型毒株不仅基因组存在明显差异,而且感染猪群后产生的临床症状也略有不同,严重者可造成猪群的大批量死亡,轻微者则无明显临床症状。1930—1950 年,PTV 毒株使欧洲养猪业蒙受了巨大的经济损失,但随后其毒力下降,高致病性的毒株被弱毒株所取代,虽然毒力不强,但此病毒仍不容忽视^[13]。本实验室分离的 PTV HB 株属于 PTV-8 血清型,病毒毒力较高,细胞接毒 48 h 就出现明显的 CPE 现象,利用长满单层 ST 细胞的 96 孔板对其进行毒价测定,TCID₅₀为 10^{-6.4} · mL⁻¹。接毒 1 d 后就有 2 头仔猪出现体温升高现象,接毒 7 d 后所有仔猪陆续出现体温升高、食欲下降,精神沉郁,腹泻,排黄色水样稀便等临床症状,接毒 28 d 后剖检可见肺脏坏死严重,肺前区

有灰红色突变区,肺泡和支气管中有渗出液,PCR 检测表明仔猪肺脏病毒含量要明显高于其他组织。



1. DL2000 DNA 相对分子质量标准;2~7. PCR 扩增产物;8. 1 kb DNA Ladder 相对分子质量标准
1. DL2000 DNA marker; 2-7. PCR products; 8. 1 kb DNA Ladder marker

图 4 PTV HB 株 6 个片段的琼脂糖电泳
Fig. 4 The electrophoresis image of six fragments of PTV HB strain

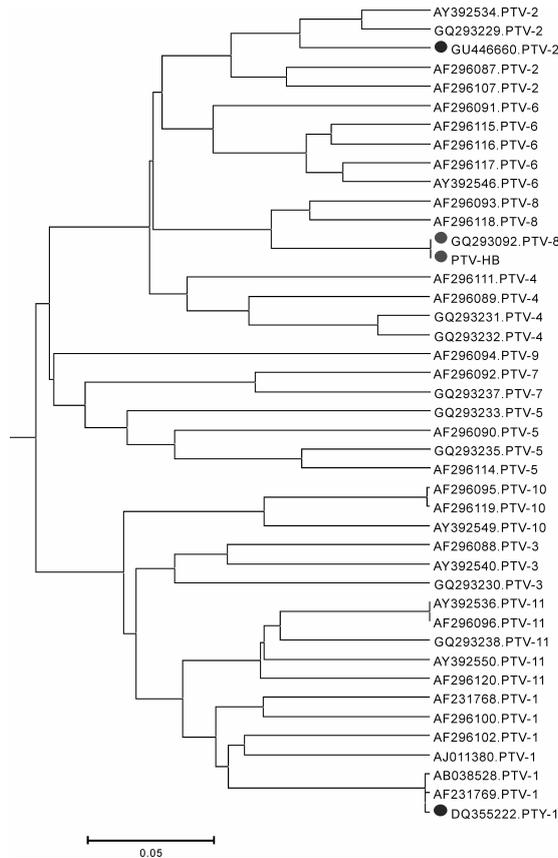


图 5 PTV HB 株系统进化树结构
Fig. 5 Phylogenetic tree analysis of HB strain whole genome sequence

哈尔滨兽医研究所分离鉴定的 Swine/CH/IMH/03 株属于 PTV-1 血清型,其核苷酸同源性和 Talfan 最高^[9]。吴波平等^[14]成功构建了 Swine/CH/IMH/03 株全长 cDNA 克隆,并对其基因组结构、功能及免疫机理进行了一定的研究。王斌等^[10]分离到的 JF613 株属于 PTV-2 血清型,序列分析表明 JF613 基因组出现不同程度自然状态下的重组,该重组有可能在 PTV 进化中起到有力的促进作用。本实验室在我国河北省某规模化猪场分离鉴定并保存的 PTV HB 株与崔尚金等^[11]分离到的 jilin/2003 株同属于 PTV-8 血清型,系统进化树分析表明两毒株遗传关系最近,核苷酸相似性高达 99%,与国外分离鉴定的 PTV-8 血清型毒株全基因序列(AF296093;AF296118)比较发现,核苷酸发生了明显的遗传变异,相似性分别为 86%和 87%。Cano 等^[15]指出对 PTV VP1 蛋白基因组的比较分析有可能是鉴别不同毒株血清型的一个方法,于是作者将 PTV HB 株与国内分离的 jilin/2003 株、Swine/CH/IMH/03 株、JF613 株的 VP1 蛋白全基因序列进行了比对,核苷酸相似性分别为 100%、66%和 73%,从而为进一步深入研究猪捷申病毒在我国的遗传变异及其与生物学特性的关系提供参考。

参考文献:

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 第2版. 北京:科学出版社,1997.
- [2] LA ROSA G, MUSCILLO M, DI GRAZIA A, et al. Validation of RT-PCR assays for molecular characterization of porcine teschoviruses and enteroviruses [J]. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 2006, 53(6):257-265.
- [3] YAMADA M, KOZAKURA R, KAKU Y, et al. Immunohistochemical distribution of viral antigens in pigs naturally infected with porcine teschovirus [J]. *J Vet Med Sci*, 2008, 70(3): 305-308.
- [4] YAMADA M, KOZAKURA R, IKEGAMI R, et al. Enterovirus encephalomyelitis in pigs in Japan caused by porcine teschovirus [J]. *Vet Rec*, 2004, 155: 304-306.
- [5] AHASHI M, YUKIO M S, SEKI Y, et al. A piglet

with concurrent polioencephalomyelitis due to porcine teschovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome [J]. *J Vet Med Sci*, 2008, 70(5): 497-500.

- [6] KRUMBHOLZ A, WURM R, SCHECK O, et al. Detection of porcine teschovirus and enteroviruses by Lightcycler real-time PCR [J]. *J Virol Methods*, 2003, 113:51-63.
- [7] PALMQUIST J, MUNIR S, TAKU A, et al. Detection of porcine teschovirus and enterovirus type II by reverse transcription-polymerase chain reaction [J]. *J Vet Diagn Invest*, 2002, 14:476-480.
- [8] ROLAND Z, SIMONE S, ANDREA S H, et al. Linkage map of protein-protein interactions of Porcine teschovirus [J]. *J Gen Virol*, 2005, 86:2763-2768.
- [9] FENG L, SHI H Y, LIU S W, et al. Isolation and molecular characterization of a porcine teschovirus 1 isolate from China [J]. *Acta Virol*, 2007, 51(1): 7-11.
- [10] ZHANG C F, CUI S J, HU S P, et al. Isolation and characterization of the first Chinese strain of porcine Teschovirus-8 [J]. *J Virol Methods*, 2010, 167:208-213.
- [11] WANG B, TIAN Z J, GONG D Q, et al. Isolation of serotype 2 porcine teschovirus in China: evidence of natural recombination [J]. *Vet Microbiol*, 2010, 146(1-2):138-143.
- [12] ZELL R, DAUBER M, KRUMBHOLZ A, et al. Porcine teschoviruses comprise at least eleven distinct serotypes: molecular and evolutionary aspects [J]. *Virology*, 2001, 75:1620-1631.
- [13] KAKU Y, SARAI A, MURAKAMI Y. Genetic reclassification of porcine enteroviruses [J]. *J Gen Virol*, 2001, 82:417-424.
- [14] 吴波平,冯力,时洪艳等.猪捷申病毒 Swine/CH/IMH/03 全长 cDNA 克隆的构建[J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(12):929-933
- [15] CANO G C, PALERO F, BUITRAGO M D, et al. Analyzing the genetic diversity of teschoviruses in Spanish pig populations using complete VP1 sequences [J]. *Infect Genet Evol*, 2011, 11(8): 2144-2150.

(编辑 白永平)