

福建地区 2 株猪嗜病毒 VP1 基因的克隆及遗传进化分析

张永军¹, 胡永浩^{2*}

(1. 中农威特生物科技股份有限公司, 甘肃兰州 730046; 2. 甘肃农业大学动物医学院, 甘肃兰州 730070)

摘要 [目的] 调查猪嗜病毒在福建地区腹泻猪群中的流行和变异情况。[方法] 根据 GenBank 中登陆的猪嗜病毒 (porcine kobuvirus, PKoV) 结构蛋白 VP1 基因序列设计特异性引物, 采用 RT-PCR 方法从某猪场采集腹泻小肠样品中扩增猪嗜病毒 VP1 基因, 将扩增后的目的片段克隆后进行序列测定。应用生物信息学软件, 将获得的 2 株猪嗜病毒 VP1 和 GenBank 的猪嗜病毒株 VP1 基因序列进行对比分析。[结果] 猪嗜病毒 CH/FJNP/12L/2015 与匈牙利株 K-30-HU/2008/HUN(GQ249161) 的核苷酸同源性最高, 为 88.1%, 氨基酸同源性为 95.3%。CH/FJNP/12W1/2015 与越南株 714441/CAOLANH-VH/2012-2-21(KT266058) 的核苷酸同源性最高, 为 88.2%, 氨基酸同源性为 96.1%, 同源重组分析显示, 2 株毒株均无明显同源重组发生。[结论] 频繁的畜禽国际贸易, 以及如今便捷的现代化交通工具, 人们生活提供方便的同时, 也加速了猪嗜病毒毒性的传播。

关键词 猪嗜病毒; VP1 基因; 同源性

中图分类号 S852.65⁺1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2016)14-149-03

Cloning of Porcine Kobuvirus VP1 in Fujian province and Phylogenetic analysis

ZHANG Yong-jun¹, HU Yong-hao^{2*} (1. China Agricultural Vet. Bio. Science and Technology Co., Lanzhou, Gansu 730046; 2. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070)

Abstract [Objective] The current situation of the epidemic and genetic variation of the porcine Kobuvirus (PKV) in diarrhea pigs in Fujian province were investigated. [Method] The special primer was designed according to the sequence of PKV deposited in GenBank. The VP1 gene of PKV in intestinal samples collected from pig-raising farm was amplified with RT-PCR method, and then, the amplified target fragment was cloned and sequenced. The sequences of two PKV strains were analyzed and compared by means of bioinformatics software. [Results] The results showed that there was high nucleotide homology between VP1 gene of CH/FJNP/12L/2015 and K-30-HU/2008/HUN, which was 88.1%; amino acid homology, 95.3%. The homology in the nucleotide and amino acid of CH/FJNP/12W1/2015 with 714441/CAOLANH-VH/2012-2-21 was 88.2% and 96.1%, respectively. The two isolates had no obvious homologous recombination occurred with other strains. [Conclusion] speculated that the frequent international livestock trade, and is now a modern and convenient means of transport, in convenience to our lives, but also accelerate the spread of swine crest virus strains. [Conclusion] It is speculated that it resulted from the frequent international trade of livestock and poultry, and convenient modern transportation tools, which also accelerated the transmission of PKV.

Key words Porcine kobuviruses; VP1 gene; Homology

嗜病毒属小 RNA 病毒科嗜病毒属成员, 病毒粒子呈球形, 无囊膜, 直径为 27~30 nm。其衣壳呈二十面体, 由 3 种结构蛋白 (VP0、VP3 和 VP1) 组成的 60 个不对称亚单位构成。病毒基因组为单股正链 RNA, 其标准毒株人爱知病毒 (Aichi virus, AiV)、牛嗜病毒 (Bovine kobuvirus, BKoV)、猪嗜病毒 (Porcine kobuviruses, PKoV) 和已公布羊嗜病毒 (Sheep kobuvirus, SKoV)、狗嗜病毒 (Canine kobuvirus, CKoV)。2007 年匈牙利学者最早在猪粪便中检测诺瓦克 (Norovirus) 和札幌病毒病毒 (Sapovirus) 时发现了猪嗜病毒 (S-1-HUN/2007/Hungary), 并对其全基因组进行生化测序^[1]。我国猪库博病毒的最早报道为 2009 年, 研究者对 2006~2007 年收集自河北省 322 份 <15 日龄仔猪的粪便样品进行检测发现有 97 份猪库博阳性, 阳性检出率为 30%^[2]。研究发现, 病毒在无腹泻临床表现的健康猪中也频繁被检出, 且随猪龄的增长, 病毒在粪便中的检出率降低。研究表明, 猪库博病毒的传播与猪腹泻直接相关^[3], 猪血清中检测到病毒 RNA 和易感病毒粒子也说明库博病毒血症的存在, 通过对病毒全基因组序列比较分析病毒 nt/aa 的变异, 表明病毒与宿主发生了很好的相互适应^[4]。Jin 等^[5]对江苏省样品进行调查,

结果发现, 腹泻样品猪嗜病毒阳性率为 64.8% (59/91), 健康样品中猪嗜病毒阳性率为 19.8% (25/126), 说明猪嗜病毒在江苏省普遍流行, 推测猪嗜病毒是潜在的仔猪腹泻诱因。

猪嗜病毒与小 RNA 病毒科其他病毒相似, 蛋白之间的裂解位点多位于 Glu 和 Gly、Ala 之间, 据此划分了已知的各嗜病毒标准株基因组。所有嗜病毒都有相似的基因组结构: VPg-5'UTR-(L 蛋白)-结构蛋白 P1 (VP0-VP3-VP1)-非结构蛋白 (P2-P3)-3'UTR-poly(A)。VP1 蛋白是小 RNA 病毒科变异最为频繁的结构蛋白, 其含有主要的抗原表位。笔者以 2015 年福建地区腹泻严重的规模化猪场为研究对象, 选取代表性猪场猪嗜病毒的 VP1 基因序列与参考序列进行遗传进化分析, 以期为该病毒在自然界进行和流行病学研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 样品采集与处理 2015 年收集福建 2 个不同地区的规模化猪场 4~7 日龄表现呕吐、水样腹泻和严重脱水的仔猪肠内容物, 按照 1:5 比例加入 PBS, 然后置于 QIAGEN TissueLyserII 研磨, -80℃ 反复冻溶 2 次, 8 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清, 冻存备用。

1.2 主要试剂 PrimeSTAR HS DNA Polymerase, T4 DNA 快速连接酶购自 Promega 公司; MiniBest Plasmid Purification Kit, Agarose Gel DNA Purification Kit, DH5 α 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 感受态细胞限制性内切酶等均为大连宝生物工程有限公司 (TaKaRa) 产品。

基金项目 中国农业产业体系 (CARS-39)。

作者简介 张永军 (1982-), 男, 甘肃靖远人, 兽医师, 从事动物疫病监测与防治研究。* 通讯作者, 教授, 博士, 博士生导师, 从事预防兽医学研究。

收稿日期 2016-04-22

1.3 猪嗜病毒 Real-time PCR 检测 根据已建立的猪嗜病毒 Real-time PCR 检测方法。Kub-F:5'-AGATATGGA-CAAACCCTGGCCC-3', Kub-R:5'-GATCGCCTCCTCCAT-TGTCAGA-3'。Kub-Probe:5'-ACTCGAGGCGGCCG-CGACG-3'(5'HEX,3'TAMRA)。以 RNA 提取物为模板进行 RT-PCR 扩增,25 μ L 反应体系:2 \times One Step RT-PCR Buffer III(含 dNTP Mixture, Mg^{2+})12.5 μ L, TaKaRa Ex Taq HS (5 U/ μ L)0.5 μ L, PrimeScript RT Enzyme Mix II 0.5 μ L, RNase Free dH_2O 7.5 μ L, 上游引物 0.5 μ L, 下游引物 0.5 μ L, Probe 1.0 μ L, RNA 2.0 μ L。PCR 扩增采用 Agilent Technologies-Mx3005p PCR 扩增仪, 反应程序:42 $^{\circ}C$ 5 min, 95 $^{\circ}C$ 10 s, 1 个循环(反转录)95 $^{\circ}C$ 10 s, 55 $^{\circ}C$ 30 s, 72 $^{\circ}C$ 30 s, 40 个循环(PCR 扩增), 其中, 荧光信号收集设置在每一循环的 72 $^{\circ}C$ 30 s 末。

1.4 猪嗜病毒 VP1 基因扩增及测序 将上述检测为阳性的不同猪场 RNA 样品各选取 3 份, 参考文献[6]引物及 PCR 扩增条件进行 VP1 基因扩增, 用一步法反转录扩增试剂盒, 50 μ L 体系用扩增 VP1 引物得到预期 1 100 bp 大小的目的基因, 并将其克隆到 pMD20-T 载体, 每个克隆不少于 3 个克隆进行测序。

1.5 遗传进化分析 用 DNASTar 软件将猪嗜病毒 VP1 基因和 GenBank 数据库中参考株的 VP1 基因进行比对分析, 利用 MEGA 6.0 中的 NJ(Neighbor-joining)法构建系统发育进化树。

1.6 重组分析 用 simplot 3.5.1 软件将分离的 2 株猪嗜病毒 VP1 基因和比对同源性最高的参考序列进行同源重组分析, 分析毒株间是否发生同源重组。

2 结果与分析

2.1 猪嗜病毒检测 检测样品均为福建 2 个不同地区的规模化猪场 4~7 日龄的腹泻仔猪肠内容物, 每个地区选取 10 份病料, 用 Real-time PCR 检测, 结果发现病料均为猪嗜病毒阳性。

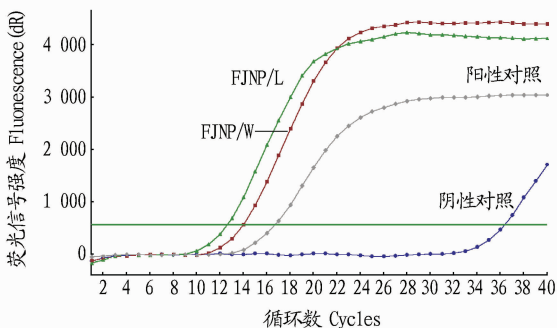
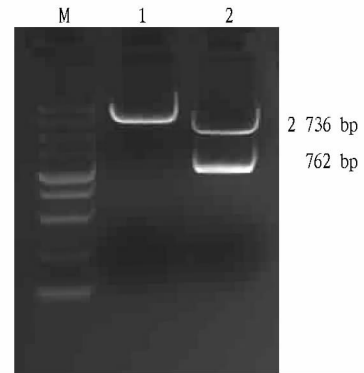


图1 Real-time PCR 病料检测结果

Fig.1 Result of Epidemic Material with Real-time PCR

2.2 猪嗜病毒 VP1 基因的扩增及酶切鉴定 应用特异性引物, 以提取的病毒总 RNA 为模板, 对上述毒株进行 RT-PCR, 经琼脂糖凝胶电泳检测, 扩增出大小为 762 bp 的特异性目的条带, 纯化回收后与 pMD20-T 克隆载体连接、转化, 用 *NdeI/BamHI* 进行双酶切后, 得到 2 个大小约 2.7 kb 与

762 bp 的片段, 对应于载体和目的基因 VP1 的大小(图 2), 表明重组质粒为阳性。



注:1. 重组质粒单酶对照;2. 重组质粒双酶切产物;M. 5 000 DNA 分子量标准。

Note:1. Recombinant plasmid with *NdeI* 2. Recombinant plasmid with *NdeI* and *BamHI* M. DL DNA Marker(5 000 3 000 2 000 1 500 1 000 750 500 250 100)

图2 含有 VP1 的重组质粒 *NdeI/BamHI* 双酶切鉴定结果

Fig.2 Result of Recombinant Plasmid with *NdeI* and *BamHI*

2.3 猪嗜病毒 VP1 基因分析及遗传进化分析 从 4~7 日龄的腹泻仔猪肠内容物样品中各选取一株为代表株, 分别命名为 CH/FJNP/12W1/2015 和 CH/FJNP/12L/2015, 其序列登陆至 GenBank。将上述 2 株分别与已公布的我国其他地区的猪嗜病毒 VP1 序列进行比对, 结果显示, CH/FJNP/12W1/2015 与我国其他地区的核苷酸同源性 81.1%~87.5%, 与 GS-2/2012-CH 的同源性最高为 87.5%。CH/FJNP/12L/2015 与我国其他地区的核苷酸同源性为 81.2%~87.3%, 与 CH/DX/2012 的同源性最高为 87.3%。遗传进化分析显示所有已知的猪嗜病毒 VP1 序列形成 2 个主要分支, 分离自福建 2 株毒株分别位于 2 个分支(图 3)。

2.4 同源重组分析 将分离的 2 株猪嗜病毒 VP1 基因 CH/FJNP/12L/2015 和 CH/FJNP/12W1/2015, 和进化分析比对同源性最高的 714441/CAOLANH-VH/2012-2-21(KT266058)、K-30-HU/2008/HUN(GQ249161)和 S-1-HUN 2007 Hungary(EU787450)进行同源重组分析, 结果显示, CH/FJNP/12L/2015 和 CH/FJNP/12W1/2015 分别作为研究父本, 与参考序列同源重组比对均无明显重组。

3 结论与讨论

猪嗜病毒属于小 RNA 病毒科的成员, 其基因组序列在与外界环境适应的过程中容易发生变异, 国内外研究表明, 发生腹泻的仔猪其猪嗜病毒检出率明显高于未发生腹泻的猪群, 因此推测猪嗜病毒在仔猪腹泻中扮演着一定的作用, 但是因为猪流行性腹泻病毒的大规模流行, 加速猪嗜病毒在猪群中的感染, 还是猪嗜病毒协同猪流行性腹泻病毒从而导致仔猪腹泻的大范围暴发, 仍需要 2 种病毒的分离及致病性试验才能定论。

该研究分离的 2015 年福建猪嗜病毒 VP1 序列 CH/FJNP/12W1/2015 与越南株 714441/CAOLANH-VH/2012-

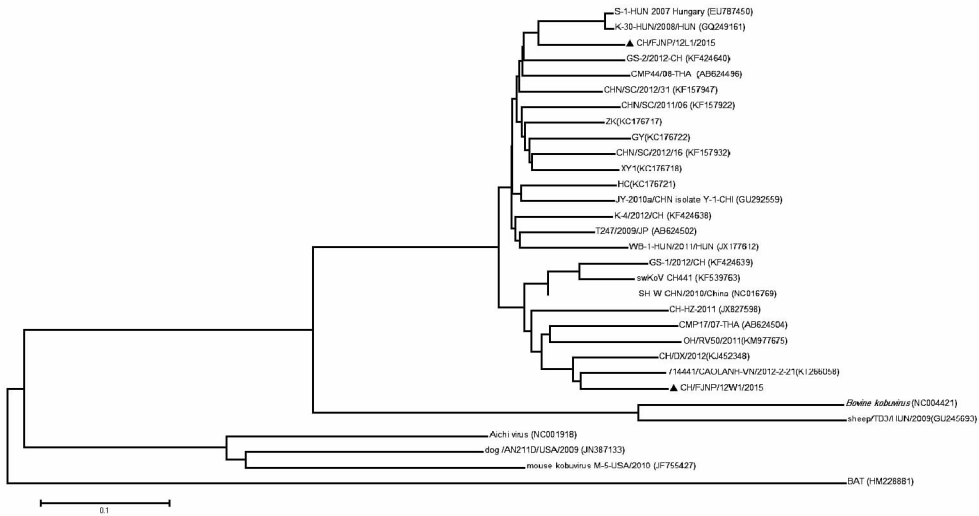
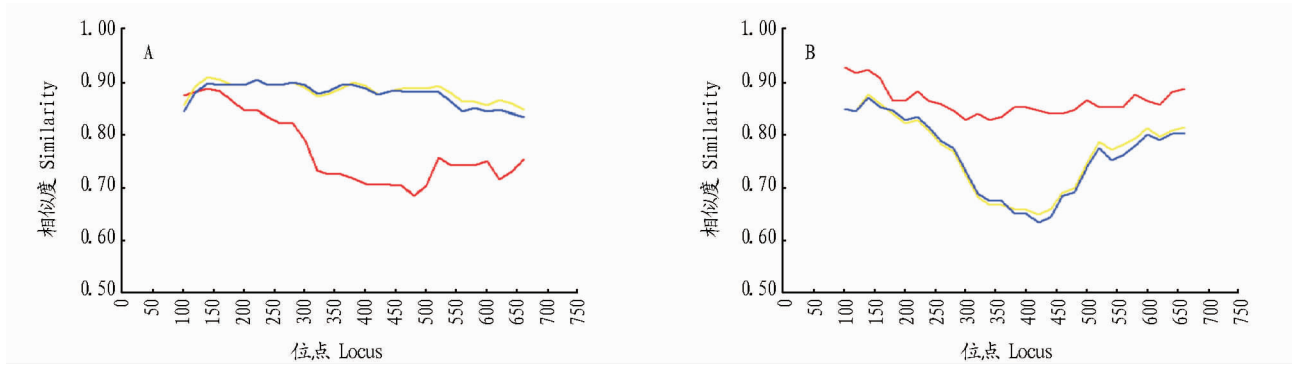


图 3 基于猪嗜病毒已公布和福建地区毒株 VP1 基因遗传进化分析

Fig. 3 Genetic evolution analysis of VP1 in Fujian based on swine viruses published



注: A. CH/FJNP/12L/2015 作为父本, B. CH/FJNP/12W1/2015 作为父本。

Note: CH/FJNP/12L/2015 as parental strain in A, CH/FJNP/12W1/2015 as parental strain in B.

图 4 同源重组分析

Fig. 4 Analysis of homologous recombination

2-21 (KT266058) 的核苷酸同源性最高, 为 88.2%, 氨基酸同源性为 96.1%。越南为我国邻国, CH/FJNP/12W1/2015 与越南毒株高度同源, 推测可能是两国频繁的畜禽贸易, 促进了猪嗜病毒毒株的传播。另一株猪嗜病毒 CH/FJNP/12L/2015 与匈牙利株 K-30-HU/2008/HUN(GQ249161) 的核苷酸同源性最高, 为 88.1%, 氨基酸同源性为 95.3%。匈牙利为欧洲中部内陆国家, 2015 年出现与匈牙利具有高度同源性的猪嗜病毒, 推测可能也是频繁的畜禽国际贸易, 及如今便捷的现代化交通工具, 在给人们生活提供方便的同时, 也为猪嗜病毒毒株的传播提供了条件。该研究对我国福建地区腹泻仔猪猪嗜病毒的感染状况进行初步调查, 并对 VP1 基因序列遗传进化生物分析, 以期为该病毒在自然界进化和流行病学研究提供参考。

参考文献

- [1] REUTER G, BOLDIZSAR A, PANKOVICS P. Complete nucleotide and amino acid sequences and genetic organization of porcine kobuvirus, a member of a new species in the genus Kobuvirus, family Picornaviridae [J]. Archives of virology 2009, 154(1): 101-108.
- [2] YU J M, JIN M, ZHANG Q, et al. Candidate porcine Kobuvirus, China [J]. Emerging infectious diseases, 2009, 15(5): 823-825.
- [3] PARK S J, KIM H K, MOON H J, et al. Molecular detection of porcine kobuviruses in pigs in Korea and their association with diarrhea [J]. Archives of virology, 2010, 155(11): 1803-1811.
- [4] REUTER G, KECSKEMETHI S, PANKOVICS P. Evolution of porcine kobuvirus infection, Hungary [J]. Emerging infectious diseases, 2010, 16(4): 696-698.
- [5] JIN W J, YANG Z, ZHAO Z P, et al. Genetic characterization of porcine kobuvirus variants identified from healthy piglets in China [J]. Infection, genetics and evolution, 2015, 35: 89-95.
- [6] WANG C, LAN D, CUI L, et al. Molecular characterization of a porcine kobuvirus strain in China [J]. Archives of virology, 2012, 157(3): 573-578.