

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

郭容利,倪艳秀,温立斌,李彬,王小敏,俞正玉,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 江苏 南京 210014)

摘要: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得到一株病毒,并对该病毒进行 RT-PCR、直接免疫荧光与动物回归等试验,证实该病毒为猪传染性胃肠炎病毒(TGEV),命名为 JS2012 株。应用 PCR 方法克隆出其初代(PITS)与 50 代(P50TS)的 S 基因片段,进行序列测定,并将该基因序列与已发表的 18 个不同来源的 TGEV 毒株进行同源性和亲缘关系的比较分析。结果表明,各毒株间核苷酸同源性为 96.0%~99.9%,氨基酸的同源性为 96.5%~99.9%。TGEVJS201PITS 株与中国江苏省 HN2002 株和美国 Miller M6 亲缘较近,表明不同地区分离毒株的 S 基因差异不大,而与 PITS 相比,P50TS 的 S 基因在 1 124~1 129 位置有 6 个碱基的缺失,对比发现,这种变异接近于弱毒株 Purdue P115 株所发生的变异,提示所发生的缺失可能与病毒毒力的减弱相关。

关键词: TGEV; 分离鉴定; S 基因; 序列分析; 缺失

中图分类号: S858.285.3; S852.659.6 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2013)05-0074-06

Isolation and Identification of Porcine Transmissible Gastroenteritis Virus JS2012 Strain and Clone and Sequence Analysis of Its S Complete Genome

GUO Rong-li, NI Yan-xiu, WEN Li-bin, LI Bin, WANG Xiao-min,
YU Zheng-yu, HE Kong-wang

(Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agriculture Sciences, Key Laboratory of Animal Diseases Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing 210014, China)

Abstract: By serial passaging on ST cells, a transmissible gastroenteritis virus (TGEV) strain (TGEV JS2012) was obtained from intestinal contents of died piglets with clinical diarrhea symptom. This virus was proved to be TGEV by RT-PCR, direct immunofluorescence and animal regression test. The S gene of TGEV JS2012 strain primary passages (PITS) and the fifth passages (P50TS) were amplified by PCR and then sequenced. Comparison of the S gene sequences of PITS and P50TS with 18 published TGEV strains with different origins showed that they can share 96.0%~99.9% homology of nucleotide sequences and 96.5%~99.9% homology of amino acids. Furthermore, the results of the phylogenetic tree analysis demonstrated that there was a close genetic relationship between PITS strain and HN2002 or Miller M6 strain isolated from China and America respectively. Generally the result indicated the variation of S gene between strains of different origins was not so obvious. The result also showed that a deletion of six bases happened in 1 124~1 129 location of the S gene of P50TS seemed to be similar to Purdue P115 strain which is an attenuated strain, indicating this deletion perhaps is related to the reduced virulence of TGEV.

Key words: TGEV; Isolation and identification; S Complete genome; Sequence analysis; Deletion

猪传染性胃肠炎 (Porcine transmissible gastroenteritis, TGE) 是猪的一种具有高度接触传染性的病毒性疾病,临床症状为严重腹泻、呕吐和脱水,不

同年齡和品种的猪都易感,但 2 周以内仔猪的病死率很高,5 周以上的猪很少死亡。1946 年,在美国 Doyle 等确定本病的病原体为病毒,并作了比较详细

收稿日期: 2013-07-12

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金项目 (CX(12)3076)

作者简介: 郭容利 (1974-), 女, 湖北天门人, 硕士, 助理研究员, 主要从事动物疫病防控研究。

通讯作者: 何孔旺 (1963-), 男, 安徽枞阳人, 研究员, 博士, 主要从事人兽共患病原和重大家畜疾病的研究。

的报道^[1]。此后,世界上许多国家相继报道了本病^[2]。我国从 60 年代起就有 TGE 的报道,此病在猪场中广泛流行,给养猪业造成了很大的经济损失。TGEV 有 4 个主要结构蛋白,分别为 S 蛋白(纤突蛋白)、M 蛋白(膜蛋白)、N 蛋白(核蛋白)和 sM 蛋白(小膜蛋白)^[3]。其中编码 S 蛋白的 S 基因全长约 4 300 bp, S 蛋白位于病毒粒子表面,能黏附于宿主细胞受体并通过细胞融合渗入细胞,并且可以刺激和诱导中和抗体的产生^[4-6]。此外, S 蛋白对病毒的毒力、组织嗜性、受体结合位点、血凝性等生物活性功能起着重要作用^[7-9],而且大量的研究证明, S 基因包含 A、B、D、C 这 4 个主要的抗原位点,不同的 TGEV 分离株 A、B、D 位点高度保守, C 位点稍有差异^[7]。所以, S 蛋白在 TGEV 基因工程疫苗和诊断技术等方面研究中最重要的是一个靶蛋白。

本试验采集江苏盐城某猪场腹泻仔猪的小肠病料,通过 RT-PCR 检测 TGEV 阳性,并在 ST 细胞上传代分离,对分离的病毒进行鉴定,同时对其初代与适应细胞后 50 代的 S 基因进行了扩增、克隆及序列对比分析,以期为该病毒在致病、疫苗免疫、诊断以及分子生物学等方面的研究奠定一定的基础。

1 材料和方法

1.1 细胞、菌株、多抗

猪睾丸细胞(ST, ATCC)、大肠杆菌 DH5 α 、Anti-TGE-FITC(VMRD),由农业部兽用生物制品工程技术重点实验室保存。

1.2 主要试剂与培养基

Trizol LS Reagent 为美国 Invitrogen 公司产品;反转录酶(AMV)、RNA 酶抑制剂(RNasin)、dNTP 为美国 Promega 公司产品;AxyPrepTM Plasmid Mini-prep kit、Agarose Gel DNA Purification Kit 购自 Axygen 公司;pMD18-T 载体克隆试剂盒、DNA Marker DL 2000 等均购自 TaKaRa 公司;HSTMMix 购自东盛公司;DMEM 培养基为 GIBCO 公司产品。

1.3 病毒分离

1.3.1 腹泻病料的处理 将采集到江苏某猪场临床上表现为腹泻症状的病死仔猪肠内容物病料,加入 PBS 液,用研钵研碎,制成 1:5 的悬液,冻融 3 次,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,用直径为 0.22 μ m 的一次性滤器过滤除菌,滤液置 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3.2 病毒的培养与病毒细胞半数感染量(TCID₅₀)的测定 将过滤除菌的上述病毒液与 10 μ g/mL DMEM 等量混合接种于长满单层的 ST 细

胞,于 37 $^{\circ}$ C 吸附 1 h 后加入细胞维持液(DMEM 2% FBS),置 37 $^{\circ}$ C 培养箱培养 3~5 d,收获细胞培养液,冻融 3 次,再盲传多代,每次传代前将细胞培养液 2 500 r/min 离心 5 min,除去细胞碎片。病毒连续传代后对其 10、20、40、50 代进行病毒细胞半数感染量(TCID₅₀)的测定^[1]。

1.4 病毒的鉴定

1.4.1 直接免疫荧光试验 将分离的病毒接种于生长良好,长成单层的 ST 细胞瓶中,37 $^{\circ}$ C 吸附 1 h,37 $^{\circ}$ C 培养箱培养 24 h 左右,待有细胞病变但细胞未脱落时停止培养,按照 Anti-TGE-FITC 多抗说明书进行直接免疫荧光试验。丙酮常温固定;加一抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min;PBS 漂洗;甘油与 PBS1:1 液封闭;荧光显微镜下观察。

1.4.2 RT-PCR 扩增 病毒总 RNA 的提取:取分离的病毒液 200 μ L 加入 TRIzol 800 μ L,振荡混匀后,室温放置 5 min,加入氯仿 200 μ L,剧烈振荡后,室温放置 10 min,4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 10 min,取上清,加入等量异丙醇,混匀,-20 $^{\circ}$ C 放置 2 h 以上,4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 15 min,去上清,沉淀用 1 mL 75% 的无 RNA 酶的乙醇洗涤,4 $^{\circ}$ C 7 500 r/min 离心 5 min,弃上清,室温干燥 RNA 沉淀 20 min,加入 DEPC 水 20 μ L,使充分溶解,-20 $^{\circ}$ C 冻存备用。

引物的设计与合成:引物设计参照 GenBank 上登录的 TGEV Purdue 毒株(DQ811789)基因 cDNA 序列,利用 Primer 软件设计 4 对引物(引物由上海英骏基因公司合成),由于 S 基因长达约 4.3 kb,一次扩增出此片段有难度,故将其分成 4 个相互有交叠的基因片段(S1、S2、S3、S4)分别进行扩增测序,然后将其进行拼接,得到完整的 TGEV S 基因。S1、S2、S3、S4 基因片段大小依次为 1 117、1 039、1 456、1 311 bp。TGEV S1、S2、S3、S4 基因引物见表 1。

S1、S2、S3 和 S4 基因的克隆与测序:RT 反应:按 20 μ L 体系进行:10 \times 反转录缓冲液 2 μ L, dNTP (10 mmol/L) 2 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 3 μ L, RNasin 0.5 μ L, AMV 反转录酶 0.5 μ L, 随机引物 1.0 μ L, RNA 4 μ L, 加无 RNA 酶的 ddH₂O (DEPC 水) 至终体积为 20 μ L, 瞬间离心混匀。反应条件:25 $^{\circ}$ C 反应 15 min, 42 $^{\circ}$ C 孵育 60 min, 95 $^{\circ}$ C 5 min, cDNA 产物于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

PCR 反应:在 25 μ L 反应体系中, 2 \times HSTM Mix 12.5 μ L, 每个片段引物对 0.5/0.5 μ L, cDNA 2 μ L, 加无 RNA 酶的 ddH₂O (DEPC 水) 至终体积为 25 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min 30 s, 38 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

其中扩增 S1、S2、S3、S4 片段的引物对所对应的退火温度分别为 52、54、54、54 °C。其他条件不变。PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳观察。S1、S2、S3 和 S4 片段的 PCR 产物用胶回收试剂盒纯化,然后分别与 pMD18-T 载体连接,转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,涂布含氨苄青霉素 (50 μ g/mL) LB 平板,37 °C 培养

12 h,挑取单个菌落接种含氨苄青霉素 (50 μ g/mL) 的 LB 液体培养基,37 °C 摇菌 12 h,菌落 PCR 鉴定阳性克隆。选样送至上海英骏有限公司进行测序,应用 DNASTAR 中的 Seqman 完成拼接,得到 TGEVJS2012 的初代 P1TS、传代后 50 代 P50TS 毒株 S 基因的全基因序列。

表 1 引物序列

Tab. 1 Sequences of all primers

引物 Primer	引物序列 Sequence of PCR primer	PCR 产物长度/bp Length of PCR product	退火温度/°C Annealing temperature
SF1	5'-ATTGGATTACTAAGGAAGGGT-3'	1 117	52
SR1	5'-TTAAGGTTGAACCTAATGACG-3'		
SF2	5'-ATAGCTCCACGTTGTTAGTG-3'	1 039	54
SR2	5'-ACAGGACTCAACGACAAAACAG-3'		
SF3	5'-TACTTGTCTTTCTCATTTC-3'	1 456	54
SR3	5'-AAGACCTCGTGATGTTTGAT-3'		
SF4	5'-GCTCTACAAACTGATGTATTG-3'	1 311	54
SR4	5'-CTGTAATGACTCGTAAAGTTTA-3'		

1.4.3 S 基因核苷酸与氨基酸序列分析
TGEVJS2012 的初代 P1TS、传代后 50 代 P50TS 毒株 S 基因的全基因序列,结合 GenBank 中所选取的有代表性的 18 株 TGEV 参考毒株的 S 基因的全基因序列(表 2),应用 DNASTAR 分析各毒株核苷酸及氨基酸的同源性。并绘制了 S 基因序列系统进化树。使用 CLUSTALW 方法,将 TGEVJS2012 P50TS 和弱毒株 Purdue P115 与其相对应的初代 P1TS, virulent

Purdue S 蛋白的氨基酸序列进行比较,分析病毒传代后氨基酸变异情况。

1.4.4 动物试验 取未吃初乳的血清 TGE 抗体为阴性初生仔猪 6 头,随机分为 3 组隔离饲养,分离株第 10 代攻毒组 2 头,第 50 代攻毒组 2 头,对照组 2 头。将病毒液经口服接种,接种剂量为 10 000 TCID₅₀,对照组仔猪用同样的方法接种无血清的 DMEM 2 mL,观察病毒对仔猪的致病性。

表 2 主要毒株来源

Tab. 2 The source of Main strain

毒株 Strains	登录号 GenBank number	来源 Source	毒株 Strains	登录号 GenBank number	来源 Source
WH-1	HQ462571	中国 武汉	HN2002	AY587882	中国 江苏
H	EU074218	中国 哈尔滨	TSX	DQ001167	中国 陕西
H16	FJ755618	中国 哈尔滨	TS	DQ201447	中国 兰州
TH-98	AF494337	中国 哈尔滨	PUR46-MAD	AJ271965	美国
AYU2009	HM776941	中国 上海	SC-Y	DQ443743	中国 四川
TOY56-165	M94103	西班牙	TO14	AF302263	日本
X53128	FS77270	英国	TFI	Z35758	台湾
Purdue P115	DQ811788	美国	virulent Purdue	DQ811789	美国
Miller M60	DQ811786	美国	Miller M6	DQ811785	美国
P1TS	TGEVJS2012 分离株初代	中国 江苏	P50TS	TGEVJS2012 分离株 50 代	中国 江苏

2 结果与分析

2.1 病毒分离与培养

经处理后的疑似 TGVE 病毒液接种 ST 细胞,在 ST 细胞上盲传 3 代后开始出现细胞病变(CPE),产生病变的时间随传代代次的增加而缩短,从开始的 5 d 缩短至 1 d。并从第 10 代 CPE 开始稳定。CPE 表现为:细胞开始变圆、变亮,折光性增强,随着时间

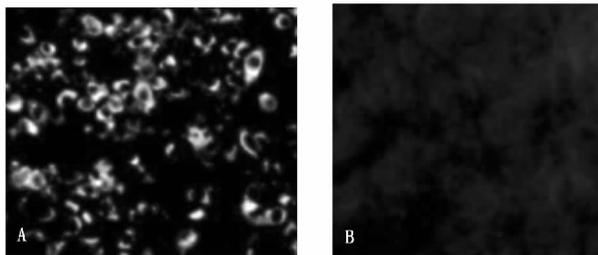
的推移,细胞出现融合,固缩,堆积成小丘状,视野变暗,颗粒明显增多,细胞慢慢脱落,最后完全脱壁。

2.2 病毒 TCID₅₀的测定

纯化培养的病毒在不同的代次接种 ST 细胞测定的 TCID₅₀不同,10、20、40、50 代接种 ST 细胞测定的 TCID₅₀分别为 10^{3.75}/0.1, 10^{5.5}/0.1, 10^{5.875}/0.1, 10^{7.275}/0.1 mL。

2.3 病毒的鉴定

2.3.1 直接免疫荧光试验 病毒接种 ST 细胞 20 h 后,直接免疫荧光方法检测结果显示:感染病毒的阳性细胞呈现绿色的荧光,均匀散在分布,病毒的抗原主要集中在细胞核周围的细胞质中,而细胞核不染。阴性对照细胞正常,未见绿色荧光(图 1)。

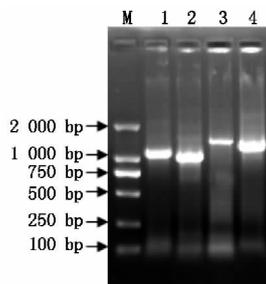


A. 感染病毒的 ST 细胞(400×); B. 未感染病毒的 ST 细胞(400×)。
A. ST cell infected by virus; B. Non-infected ST cell.

图 1 直接免疫荧光检测结果

Fig. 1 The detection results of DFA

2.3.2 RT-PCR 鉴定 分离的 TGEVJS2012 病毒 S1、S2、S3、S4 基因片段扩增产物在 1% 琼脂糖上电泳后在紫外灯下观察,可以见到清晰的与预计大小相仿的条带,与设计的预期结果完全相符且目的带特异性较高(图 2)。



M. DNA Marker DL2000; 1. TGEV S1; 2. TGEV S2; 3. TGEV S3; 4. TGEV S4.

图 2 TGEV S1、S2、S3、S4 基因片段 RT-PCR 电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of TGEV

S1, S2, S3, S4 segments by RT-PCR

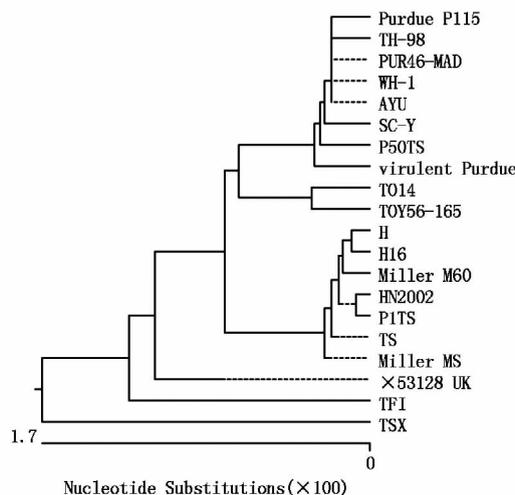
2.4 S 基因核苷酸序列与氨基酸序列分析

测序结果表明, TGEVJS2012 的初代 P1TS S 蛋白基因全长 4 351 nt, P50TS S 蛋白基因全长 4 345 nt, P50TS 在 S 基因 1 124~1 129 位缺失 6 个核苷酸(T、A、A、T、G、A) 还有 54 处核苷酸的突变,两者之间核苷酸的同源性为 98.6%,氨基酸的同源性为 98.2%,与其他 18 株参考毒株同源性分别为 97.0%~99.9% 和 96.2%~99.7%,氨基酸的同源性为 97.5%~99.8% 和 97.0%~99.7%。从而证明本实验室所分离的毒株为 TGEV。各毒株间核苷酸同源性为 96.0%~99.9%,氨基酸的同源性为 96.5%~99.9%。表明不同地区分离毒株的 S 基因差异不大。

2.5 S 基因系统进化树分析

如图 3 所示,来自英国的 X53128,来自中国陕

西 TSX 和来自台湾 TFI 这 3 株分别形成独立的进化分支, TGEVJS2012 分离株初代 P1TS 与毒株 H, H16, Miller M60, Miller M6, HN2002 TS 组成一个大的分支, TGEVJS2012 分离株 50 代 P50TS 与 Purdue 株、Purdue115 弱毒株、SC-Y、WH-1、TH-98、PUR46-MAD、AYU2009 共同组成另外一个大的分支, TGEVJS2012 分离株初代 P1TS 与 50 代 P50TS 分属于不同的分支, TGEVJS2012 分离株 P1TS 株与中国江苏 HN2002 株和美国 Miller M6 亲缘较近,而在 ST 细胞上连续传代 50 代后其核苷酸多处发生突变, P50TS 株与 Purdue115 弱毒株同源性较高,处于同一分支。



标有箭头的毒株为分离毒株 TGEVJS2012 P1TS、P50TS。
Arrows shows the strains of isolates TGEVJS2012 P1TS, P50TS.

图 3 TGEVJS2012 分离株的 S 基因组系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree base on the S gene Nucleotide sequences of TGEVJS2012 Isolates

2.6 TGEVJS2012 和 Purdue 株 S 蛋白氨基酸的位点差异分析

将 TGEVJS2012 P50TS 和弱毒株 Purdue P115 与其相对应的初代 P1TS, virulent Purdue S 蛋白的氨基酸序列进行比较分析,结果表明: TGEVJS2012 P50TS 相比于其初代 S 蛋白的氨基酸总共有 32 个氨基酸的点突变,弱毒株 Purdue P115 和其初代 virulent Purdue 比较,发现有 23 个氨基酸位点发生突变,在这 2 组对应的突变中,有 9 个位点突变相同,即 32(H-Q)、208(L-F)、376(D-缺失)、403(L-H)、496(L-I)、562(N-H)、585(S-A)、675(L-V)、1109(I-T), TGEVJS2012 P50TS 与 Purdue P115 在 375、376 位点有相同的 2 个氨基酸的缺失(表 3)。

2.7 动物试验

第 10 代攻毒组 2 头仔猪在接种病毒 20 h 后出现典型的水样腹泻症状、呕吐;第 50 代攻毒组 2 头接种病毒 44 h 后才出现水样腹泻症状;对照仔猪

均表现正常。对发病仔猪进行剖解观察,病变特征为:肠管高度扩张,充满黄色液体,小肠壁透明稀薄,空肠、回肠绒毛明显萎缩,肠壁变薄,肠黏膜皱褶减

少,肠内容物多呈液状、腥臭。利用 RT-PCR 方法检测试验的 6 头仔猪的肠内容物发现,攻毒组均为病毒阳性,对照组呈阴性。

表 3 TGEVJS2012 和 Purdue 株 S 蛋白氨基酸的位点差异分析

Tab. 3 Amino acid differences in proteins of TGEV JS2012 and purdue strains

氨基酸位置		毒株 Strains			氨基酸位置		毒株 Strains		
aa Position	PITS	P50TS	Virulent Purdue	Purdue P115	aa Position	PITS	P50TS	Virulent Purdue	Purdue P115
32*	H	Q	H	Q	496*	L	I	L	I
48	S	P	P	P	536	G	G	D	G
72	N	D	D	D	562*	N	H	N	H
86	L	V	V	V	585*	S	A	S	A
97	S	L	W	W	590	V	I	I	I
100	K	R	R	R	621	F	L	L	L
184	A	E	E	E	649	D	E	E	E
208*	L	F	L	F	675*	L	V	L	V
218	T	V	V	V	815	L	F	F	F
316	S	S	X	S	942	E	E	G	E
375	N	-	Y	-	951	D	H	H	H
376*	D	-	D	-	967	A	D	D	D
384	S	F	F	F	977	V	A	V	V
389	M	I	I	I	1007	D	G	G	G
403*	L	H	L	H	1109*	I	T	I	T
417	P	P	P	L	1234	P	A	A	P
418	I	S	S	S	1239	S	L	S	S
487	Y	H	H	H	1243	R	C	R	R

注: * . 表示 9 个相同位点突变。

Note: * . Indicates nine identical mutation.

3 讨论

本研究应用 ST 细胞从临床表现腹泻的病死仔猪肠内容物分离到 1 株病毒,经病毒血清学试验、RT-PCR 鉴定、基因序列测定和比较,确认该分离毒为猪传染性胃肠炎病毒,命名为 TGEVJS2012 株。并对第 8 代的该病毒进行外源病毒检测,主要包括猪流行性腹泻病毒(PEDV)、轮状病毒(RV)、猪瘟病毒(CSFV)、猪繁殖呼吸障碍综合症病毒(PRRSV)、猪细小病毒(PPV)、猪圆环病毒 II 型(PCV-2)、猪伪狂犬病毒(PRV),用上述病毒的特异性引物进行了 PCR 鉴别扩增,结果均为阴性,排除了分离毒中其他病毒混合的可能性。目前,该病毒在 ST 细胞上已连续传代到 50 代,TCID₅₀在传代的过程中逐步升高,已经达到 10^{7.275}/0.1 mL,为将来 TGEV 疫苗的制备提供了有利条件。

TGEV S 基因的突变与病毒的发病机制、毒力、免疫反应及亲嗜性有关,其表达的 S 蛋白是决定该病毒宿主和组织嗜性的关键蛋白质,在病毒感染过程中发挥极其重要的作用^[8-11]。因此,对 S 基因进行遗传变异分析,将有助于研究 TGEV 的遗传演化

规律和毒力改变的致病机制,具有较大的研究价值。

本试验对 TGEV JS2012 株 S 基因的全基因序列进行测序,并与 GenBank 上发表的来自不同地方 18 个 TGEV 毒株的 S 基因全基因序列进行亲缘关系的比较,结果表明,分离株 TGEVJS2012 的初代 PITS、传代后 50 代 P50TS 之间核苷酸的同源性为 98.6%,氨基酸的同源性为 98.2%,与其他 18 参考毒株核苷酸同源性分别为 97.0%~99.9% 和 96.2%~99.7%。氨基酸的同源性为 97.5%~99.8% 和 97.0%~99.7%。从而证明本实验室所分离的毒株为 TGEV。各毒株间核苷酸同源性为 96.0%~99.9%,氨基酸的同源性为 96.5%~99.9%。表明不同地区分离毒株的 S 基因差异不大。

S 基因序列系统进化树表明:TGEVJS2012 分离株初代 PITS 与毒株 H, H16, Miller M60, Miller M6, HN2002 TS 组成一个大的分支, TGEVJS201PITS 株与中国江苏 HN2002 株和美国 Miller M6 亲缘较近;在 ST 细胞上连续传代 50 代后其核苷酸多处发生突变, P50TS 株与 Purdue115 弱毒株、SC-Y、WH-1、TH-98、PUR46-MAD、AYU2009 共同组成另外一个大的分支,这 7 个毒株在 S 基因的 1 124~1 129 位置较其他的参考毒株以及 TGEVJS2012 PITS 基因相应部

位缺失 6 个核苷酸(即 T、A、A、T、G、A)。先前有文献^[12]报道: 在弱毒株 Purdue P115 S 基因(nt 1 122 to 1 127 aa 375 ~ 376) 有 6 个碱基的缺失, 而在其初代 Virulent purdue 则没有, 这 6 个碱基可能与病毒的毒力减弱有关, 弱毒株 PUR46-C8 和 PUR46-MAD 也有同样的缺失, 而在强毒株 PUR46-C11 则无此缺失。本研究中 TGEVJS2012 传代后 50 代 P50TS 相比于其初代 P1TS, 在相同的位置也有同样的缺失, 这预示着 P50TS 在基因水平上有着毒力减弱的趋势。

TGEVJS2012 P50TS 和弱毒株 Purdue P115 与其相对应的初代 P1TS、virulent Purdue S 蛋白的氨基酸序列比较分析, 细胞适应株相对于其初代都发生许多氨基酸位点的突变, 在这 2 组对应的突变中, 有 9 个位点突变相同, 即 32(H-Q)、208(L-F)、376(D-缺失)、403(L-H)、496(L-I)、562(N-H)、585(S-A)、675(L-V)、1 109(I-T), TGEVJS2012 P50TS 与 Purdue P115 在 375、376 位点有相同的 2 个氨基酸的缺失。其中 562(N-H)、585(S-A) 在 S 蛋白 A 抗原位点(aa538 ~ 591), 以及氨基肽酶受体的位置(aa 522 ~ 744)^[7, 13], 表明这些变异对病毒与动物细胞受体的结合或中和抗体的产生可能有很大的影响。动物试验表明, P50TS 与 P1TS 接种仔猪后, 仔猪的发病时间明显滞后, 证实了 P50TS 毒力有所减弱。但是, 是否还有其他基因的变异, 从而导致病毒致病力的减弱, 需要进一步的研究。

中国猪传染性胃肠炎病毒的疫苗株 H165 是野毒株 H16 在体外通过传代而来, 两者在基因组序列上无碱基缺失或插入, 但 H165 菌株与菌株 H16 相比, 发现有 27 个核苷酸的突变, 毒株 H165 已被证明是安全的^[14]。另外, 还有 2 个猪传染性胃肠炎病毒毒力减弱的报道^[15], 即本研究提到的参考株 Miller M6 与 Miller M60\virulent Purdue 与 Purdue P115, 而本实验室通过基因序列与氨基酸序列分析表明, 分离的毒株 TGEVJS2012 P50TS 更接近于 Purdue P115 株的变异, 其 S 基因核苷酸同源性达到 99.7%。动物试验表明 TGEVJS2012 在传代 50 代后毒力减弱, 但仍具有一定的致病性, 未完全致弱。这进一步表明, 病毒在适应细胞传代的过程中发生的这种碱基突变或缺失与其毒力密切相关。

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: 681 - 690.
- [2] 斯特劳, 阿莱尔, 蒙加林, 等. 赵德阳, 张中秋, 沈建中,

译. 猪病学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2000: 316 - 319.

- [3] Sturman L S, Holmes N V. The molecular biology of coronaviruses[J]. *Adv Virus Res*, 1983(28): 35 - 112.
- [4] 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 spikeglycoprotein S[J]. *J Gen Virol*, 1990, 71: 1313 - 1323.
- [5] 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.
- [6] 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: 7607 - 7618.
- [7] Riffault S, Grosclaude J, Vayssier M, *et al.* Reconstituted corona virus TGEV virosomes lose the virus ability to induce porcine interferon- α production [J]. *Vet Res*, 1997, 28(2): 105 - 114.
- [8] Taguchi F, Fleg J O. Comparison of six different murine coronavirus J H M variants by monoclonal antibodies against the E2 glycoprotein [J]. *Virol*, 1989, 169: 223 - 235.
- [9] Jenes T, Shenk T. Transmissible gastroenteritis virus of pigs. *Veterinary Record* [J]. 1997, 141(16): 427 - 428.
- [10] Yin J C, Ren X F, Tian Z J, *et al.* Assembly of pseudorabies virus genome based transfer vehicle carrying major antigensites of S gene of transmissible gastroenteritis virus: Potential per spective for developing live vector vaccines [J]. *Biologicals*, 2007, 35(1): 55 - 61.
- [11] 苏君鸿, 李云岗, 陈树林, 等. 以乳酸杆菌为载体的猪传染性胃肠炎病毒 S 基因 A、D 抗原位点 DNA 疫苗的构建 [J]. *动物医学进展*, 2009, 30(8): 19 - 23.
- [12] Penzes Z, Gonzalez J M, Calvo E, *et al.* Complete genome sequence of transmissible gastroenteritis coronavirus PUR46-MAD clone and evolution of the Purdue virus cluster [J]. *Virus Genes*, 2001, 23(1): 105 - 118.
- [13] Delmas B, Gelfi J, Kut E, *et al.* Determinants essential for the transmissible gastroenteritis virus-receptor interaction reside within a domain of aminopeptidase-N that is distinct from the enzymatic site [J]. *Virol*, 1994, 68(8): 5216 - 5224.
- [14] Chengbao Wang, Jianfei Chen, Hongyan Shi, *et al.* Molecular characterization of a Chinese vaccine strain of transmissible gastroenteritis virus: mutations that may contribute to attenuation [J]. *Virus Genes*, 2010, 40: 403 - 409.
- [15] Xinsheng Zhang, Mustafa Hasoksuz, David Spiro, *et al.* Complete genomic sequences a key residue in the spike protein and deletions in nonstructural protein 3b of US strains of the virulent and attenuated coronaviruses, transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus [J]. *Virology*, 2007, 358: 424 - 435.