

猪流行性腹泻病毒变异株(CH/YNKM-8/2013) 的分离鉴定和全基因组序列分析

吴美洲 陈芳洲 李中华 万胜锋 叶十一 何启盖

农业微生物学国家重点实验室/华中农业大学动物医学院, 武汉 430070

摘要 为研究猪流行性腹泻病毒(PEDV)变异株特性,通过细胞培养、细胞病变(CPE)观察、RT-PCR、间接免疫荧光实验和透射电镜观察分离鉴定 1 株 PEDV 变异株(CH/YNKM-8/2013 株)并分析了全基因组序列。运用基因组分段扩增方法,测得该毒株的全基因组序列(GenBank 登录号为 KF761675.1)。该毒株 S 基因 N 端比 CV777 毒株 S 基因的 N 端长 9 bp,包括 15 bp 的插入和 6 bp 的缺失,表明 CH/YNKM-8/2013 为变异毒株。同源性分析显示,该毒株的基因组序列与我国广东 2011 年分离毒株 LC 的同源关系最近,相似性为 99.6%,与韩国毒株 KNU-1305 和美国毒株 USA/Minnesota84/2013 的序列相似性均为 99.0%,而与 CV777 疫苗毒株的相似性较低,为 96.7%。序列进化树分析表明该毒株和我国新近毒株、韩国及美国的变异毒株进化关系较近,而与我国之前流行的 PEDV 毒株以及疫苗毒株 CV777 处于不同分支。

关键词 猪流行性腹泻病毒; 变异毒株; 分离; 鉴定; 全基因组序列分析

中图分类号 S 852.65⁺1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)04-0093-07

猪流行性腹泻(porcine epidemic diarrhea, PED)是由猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)引起的一种急性、接触性和病毒性的猪肠道传染病,其临床特征为仔猪呕吐、腹泻、脱水及高致死率^[1-2]。本病于 20 世纪 70 年代在英国、比利时、匈牙利和德国等欧洲国家报道^[3-4]。从 2010 年末起,我国大范围暴发变异毒株引起的 PED,造成我国南方十多个省超过 100 万头仔猪的死亡,7 日龄仔猪的发病率可达 100%,死亡率为 80%~100%^[5]。2012 年初笔者所在实验室的李文涛等^[6]报道了我国中部和南部 12 个省市 PEDV 检出率为 61.11%(278/455),这些猪场 7 日龄仔猪的发病率为 60%~100%,死亡率为 100%,并确定病原为变异 PEDV,该变异毒株的特征是 S 基因 N 端比 CV777 毒株 S 基因的 N 端长 9 bp,包括 15 bp 的插入和 6 bp 的缺失。变异毒株已经成为我国 PEDV 的优势毒株^[7],并且从 2013 年 4 月起,类似的变异 PEDV 毒株引发了美国^[8]、韩国^[9]、德国、新西兰、中国台湾^[10]等地的 PED 暴发,对我国和世界生猪产业造成了严重的打击。

1984 年,宣华等^[11]成功地将 PEDV J 株(吉毒株)、H 株(华株)、CH 株(川毒株)成功培养于猪肠单层细胞。1988 年,瑞士学者用 Vero 细胞成功分离 PEDV^[1]。日本^[12]和韩国^[13]分别于 1992 和 1993 年报道了 PEDV 的分离,我国于 2005 年报道了经典 PEDV 毒株 LJB/03 的分离^[14],佟有恩等^[15]和马思奇等^[16]也分别报道了 CV777 弱疫苗和灭活疫苗有较好的保护效果,主动、被动免疫保护率分别为 95.92%、96.2%和 85%、97.6%。Gao 等^[17]报道了现有的来源于 CV777 毒株(GenBank 登录号: KT323979)的疫苗不能对变异 PEDV 毒株引起的 PED 起到足够的保护作用。2012 年云南某规模化猪场免疫了传统猪传染性胃肠炎-猪流行性腹泻二联苗,但新生仔猪仍然发生了严重的腹泻,我们从病料中分离了 1 株 PEDV 变异株并分析了其全基因组序列,旨在了解 PEDV 变异株特征,为 PED 疫苗研究打基础。

1 材料与方法

1.1 病料的来源和处理

病料于 2012 年 8 月采自云南省某规模化猪场

收稿日期: 2015-11-30

基金项目: 国家现代产业(生猪)技术体系项目(CARS-36);国家自然科学基金项目(31272572)

吴美洲,硕士,实验师。研究方向: 动物传染病诊断与临床疫病防控。E-mail: wumeizhou@mail.hzau.edu.cn

通信作者: 何启盖,博士,教授。研究方向: 动物疫病的防控技术研究和应用。E-mail: he628@mail.hzau.edu.cn

3 日龄腹泻仔猪的小肠。该场所有母猪在产前均免疫过某公司生产的猪传染性胃肠炎-猪流行性腹泻灭活疫苗,但仔猪暴发了腹泻,7 日龄内仔猪发病率为 95%,死亡率为 80%~100%。运用实验室建立的重重 RT-PCR 检测方法^[18],确定病原为猪流行性腹泻病毒。仔猪小肠按 1:9(体积比)加入生理盐水,捣碎、反复冻融 2 次,离心,2 000 r/min,4℃,15 min,收集上清,并按 100:1 加入 Gibco 公司的双抗,青霉素的终浓度为 100 U/mL,链霉素的终质量浓度为 100 μg/mL,放 4℃冰箱中过夜,然后再离心,10 000 r/min,4℃,15 min,取上清,经 0.22 μm 的滤膜过滤,保存于-80℃冰箱。

1.2 细胞、菌株和主要试剂

Vero 细胞(ATCC;CCL81)由笔者所在实验室保存;PEDV 单克隆抗体为本实验室制备,主要针对 PEDV S1D 蛋白(S1D 为 S 蛋白的 636~789 aa 区域);胎牛血清购自杭州四季青公司;PrimeScript™ RT Master Mix 反转录试剂盒,pMD-18T 载体,高保真 DNA 聚合酶,T4-DNA Ligase,大肠杆菌 DH5α 感受态细胞购自大连宝生物公司(TaKaRa 公司);Simply P 总 RNA 提取试剂盒和 DNA 胶回收试剂盒购自 BioFlux 公司;胰蛋白酶购自 Sigma 公司。

1.3 病毒分离

从-80℃冰箱中取出含病毒滤液,按 10 μg/mL 加入胰酶,放入 37℃培养箱中处理 60 min,最后按每管 1 mL 分装于不同 EP 管中备用。取生长状况良好的 Vero 单层细胞,弃去培养液,用 PBS 液清洗单层细胞 3 次。按照培养面积 25 cm² 培养瓶中加入 1 mL 处理好的样品,并按 10 μg/mL 的终质量浓度加入胰酶,在 37℃CO₂培养箱内吸附 1 h,其间轻摇 1 次。设立正常细胞作为对照,加入 1 mL 的无血清 DMEM,其他处理同接毒组。1 h 后弃去吸附液(第 2 代以后的吸附液可以不弃去),并补充加入不含血清、终质量浓度为 10 μg/mL 胰酶的 DMEM 维持液 5 mL,37℃培养。在倒置显微镜下观察接种病毒后 Vero 细胞的病变情况。接毒后 3 d 收毒,反复冻融 3 次,作为下次接毒的样品,连续传代 6 次后,病变稳定。测定 TCID₅₀,按照 Reed-Muench 法计算毒价。

1.4 病毒的鉴定

取在 Vero 细胞上传了 20 代的病毒种,运用三重 RT-PCR 检测方法、猪德尔塔冠状病毒(porcine

deltacoronavirus,PDCoV)检测方法^[19]和圆环病毒检测方法^[20],排除了 TGEV、RV、PDCoV 和圆环病毒的污染,接种 Vero 细胞,并于接种前、接毒 12 h 和 24 h 后,观察细胞病变情况。

间接免疫荧光试验:用 0.1 pfu 的 20 代的 PEDV 病毒接种 Vero 细胞,以未接种病毒的细胞为阴性对照,培养 12 h 后,用笔者所在实验室制备的单抗作为一抗,用 Southern Biotech 公司的 FITC 标记的羊抗鼠抗体作为荧光二抗,进行间接免疫荧光试验。

运用 RT-PCR 方法,扩增上述传代 20 次的 PEDV 毒种的 ORF3 和 S 基因,根据扩增产物大小和序列信息,确定该毒株的基因型。如果与 CV777 毒株(GenBank 登录号:AF353511)相比,PEDV 毒株在 ORF3 基因 245~293 bp 处有 49 bp 的缺失,判定该毒株为疫苗毒株。如果 S 基因 N 端长 9 bp (包括 15 bp 的插入和 6 bp 的缺失)判定为变异毒株,如果没有该特点的并且 ORF3 基因没有缺失的判定为经典毒株,所使用的引物如下(表 1)。

表 1 本研究中使用的引物

Table 1 The primers used in this study

引物名称 Primes	引物序列(5'-3') Sequence	扩增片段 长度/bp Length
SP1-F	CCACCATGAAGTCTTTAACTTAC	1 564
SP1-R	GAAATTGGCTGTTCATGAC	
SP2-F	ATGGTTTTTACCTATTTCTTC	1 468
SP2-R	CGATGAGAGACGCACTATAC	
SP3-F	GTTGTTGACGCTTGAGAAGC	1 507
SP3-R	TCACTGCACGTGGACCTTTTC	
JORF3-F	GTTGTTGTAGGGGTCTAGACT	761
JORF3-R	GCCAAAGTATAACATTAAGTACT	

透射电镜观察:细胞病变约 70%后收集细胞培养物,12 000 r/min 离心 5 min 去细胞碎片后,取上清经 27 000 r/min 离心 2 h,使用透射电镜观察该病毒的形态大小,特别是特征性的放射冠。

1.5 全基因组测序和序列分析

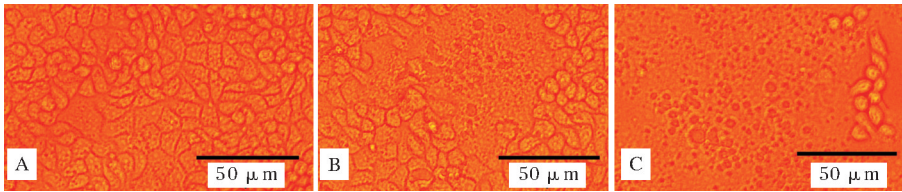
参考文献[21]报道的方法,运用 RT-PCR 方法扩增出 12 条片段,然后将这些片段连接 pMD-18T 进行克隆,挑选阳性克隆送南京金斯瑞公司进行测定,测得序列通过 MEGA5.05^[22]进行拼接,得到基因组序列,上传至 GenBank。以 GenBank 中的其他序列为参考,运用 MegAlign、MEGA5.05 和 Sim-Plot(版本 3.5.1)软件对该毒株的全基因组序列和 S 基因序列进行同源性、进化树和突变区域分析^[23-24]。

2 结果与分析

2.1 病毒的分离

病料在细胞上连续传 6 代后病变稳定,此时毒价较低,为 $10^{4.5}$ TCID₅₀/0.1 mL。连续传 20 代后,

毒价可达到 $10^{5.875}$ TCID₅₀/0.1 mL。将此时的病毒接种 Vero 细胞,接毒 12 h 和 24 h 后的细胞病变如图 1 所示。主要的表现是细胞互相融合,细胞间的界限不清,形成许多大小不同的空泡。且随着时间变化,细胞的病变不断加深。



A:接毒前细胞对照; B:接毒 12 h 时的细胞病变; C:接毒 24 h 时的细胞病变。A:Control; B:The CPE at 12 h post-inoculation; C:The CPE at 24 h post-inoculation.

图 1 Vero 细胞接种 CH/YNKM-8/2013 后 12 h 和 24 h 后的病变

Fig.1 The CPE of Vero cells infected with CH/YNKM-8/2013 at 12 h and 24 h post-inoculation

2.2 病毒的鉴定

从上述 20 代的毒种中提取 RNA,应用 RT-PCR 方法,使用表 1 中相应的引物,扩增出 ORF3 和 S 基因,扩增结果如图 2 所示,将产物测序,序列比对发现该毒株 ORF3 基因相对于 CV777 毒株没有缺失,其 S 基因与 CV777 S 基因相比,在 S 基因 N 端长 9 bp(包括 15 bp 的插入和 6 bp 的缺失),判定该毒株为变异毒株。

间接免疫荧光检测结果如图 3 所示,对照细胞没有荧光,而感染细胞中有绿色荧光,说明该毒株为 PEDV。

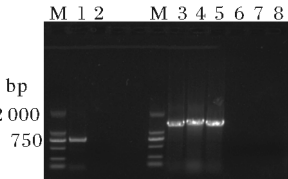
取新鲜的超速离心病料,利用透射电镜(Hita-chi H-7650,Japan)观察,如图 4 所示,可观察到直径约 100 nm、有特征性放射冠的 PEDV 颗粒。

2.3 全基因组的序列

成功测得该毒株的全基因组序列,已上传 Gen-Bank,登录号为 KF761675.1。

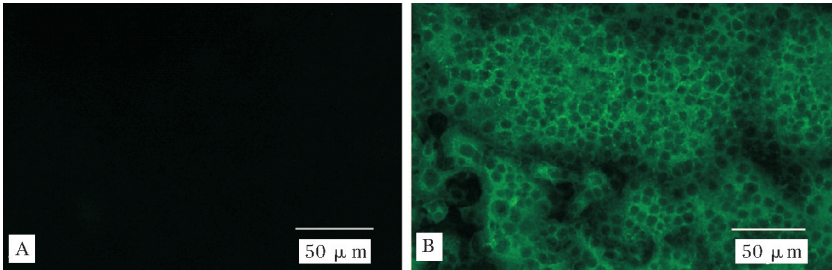
2.4 全基因组和 S 基因的同源性分析

全基因组序列比对发现,该毒株为典型 PEDV 变异株。在全基因组序列水平,该毒株与 2011 年 2 月广东省分离毒株 LC(JX489155)的同源关系最近,序列相似性为 99.6%,而与韩国毒株 KNU-1305 (KJ662670) 和美国毒株 USA/Minnesota84/2013 (KJ645707)的序列相似性较高,都为 99.0%,该毒株与我国 PED 疫苗毒株 CV777 的序列相似性较低,为 96.7%,与我国之前报道的 PEDV 经典毒株 LZC (EF185992)的序列相似性也较低,为 96.5%(图 5)。



M:DL 2000 DNA marker; 1:ORF3 基因扩增产物; 2:阴性对照; 3,4,5:SP1,SP2,SP3 基因扩增产物; 6,7,8:阴性对照。M:DL 2000 DNA marker; 1:The PCR product of ORF3 gene; 2:Negative control; 3,4,5:The PCR products of SP1,SP2, and SP3 gene; 6,7,8:Negative control.

图 2 PEDV 分离株 ORF3 和 S 基因片段的 RT-PCR 扩增结果
Fig.2 Amplification of PEDV ORF3 and S genes by RT-PCR



A:对照细胞;B:CH/YNKM-8/2013 感染细胞间接免疫荧光检测结果。A:Control; B:The IFA of Vero cells infected with CH/YNKM-8/2013.

图 3 间接免疫荧光检测结果

Fig.3 The result of indirect fluorecence immunoassay

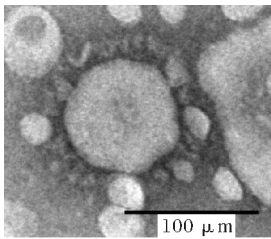


图 4 PEDV 的透射电镜照片

Fig.4 The morphology characterization of the isolated PEDV by transmission electron microscope (TEM)

在 S 基因水平,CH/YNKM-8/2013 和我国的 LC 株、2011 年 5 月江西分离毒株 AJ1102 的序列相似性最高,都为 99.0%,与我国经典毒株 LZC 的序列相似性最低(为 93.2%),而与疫苗毒株 CV777 和 DR13(JQ023161)的 S 基因的序列相似性都较低,分别为 93.6%和 93.4%(图 6)。这些结果表明,CH/YNKM-8/2013 为典型的变异毒株,与经典毒株以及经典毒株来源的疫苗毒株序列差异性较大。



图 5 PEDV 全基因组核苷酸序列同源性比对

Fig.5 Homology comparison of genomic sequence of PEDV



图 6 PEDV S 基因核苷酸序列同源性比对

Fig.6 Homology comparison of S gene sequence of PEDV

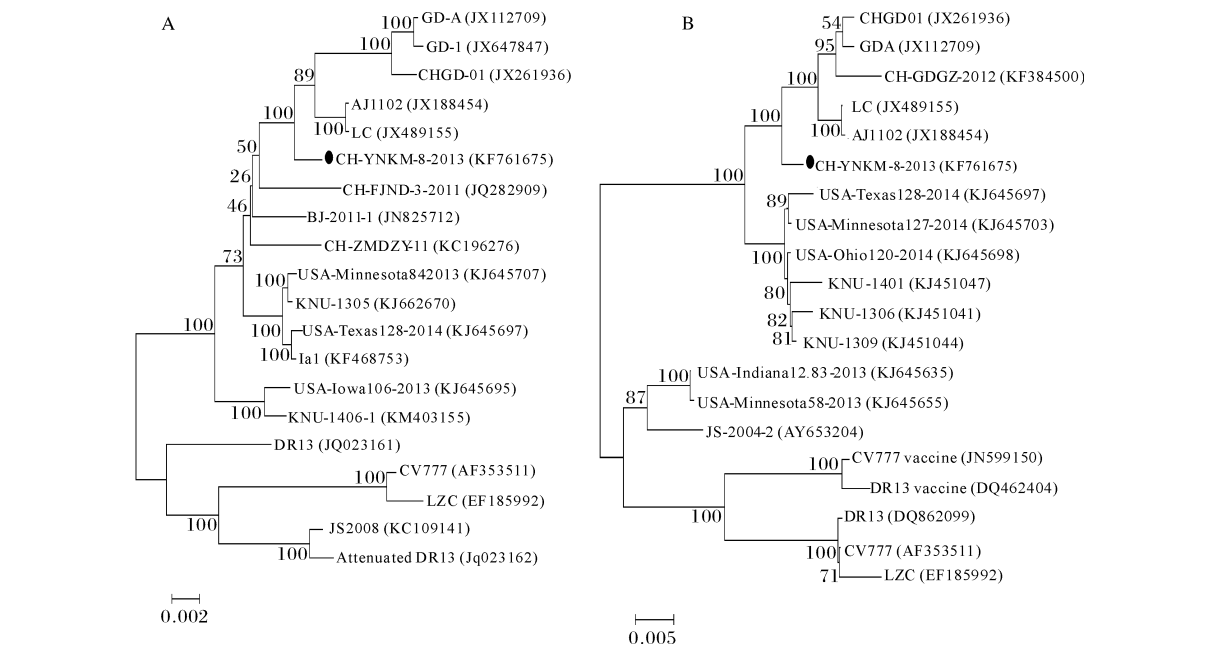
2.5 全基因组和全 S 基因的进化树分析

为进一步了解本毒株和其他 PEDV 毒株的进化关系,基于 PEDV 的全序列和 S 基因序列分别构建进化树,这 2 个进化树都表明 PEDV 主要分为 2 个群,其中 I 群主要由 CH/YNKM-8/2013/我国变异毒株以及美国韩国的变异毒株组成,而 II 群主要由经典毒株以及其衍生的疫苗毒株组成(图 7)。本毒株和美国、韩国的变异毒株的同源进化关系较近,而变异毒株是当今猪病病毒性腹泻的主要病因,因此,变异 PEDV 毒株对世界养猪业造成了巨大的威胁;另一方面,本毒株分离自免疫过 CV777 疫苗但依然

暴发 PED 的猪场,提示我们现有的来源于 CV777 毒株的疫苗不能对变异 PEDV 毒株引起的 PED 起到足够的保护作用。而 S 基因为基础的进化分析为解释上述现象提供参考依据。

2.6 CH/YNKM-8/2013 毒株、CV777 毒株和其他参考毒株全基因组和全 S 基因组序列突变位点分析

对其全基因组序列相似性分析发现(图 8A),与疫苗毒株 CV777 相比,流行的变异毒株的主要变异区域(序列相似性低于 92.0%的区域)是 101~141、18 661~18 721、20 621~21 361、22 101~22 221 bp 等区域以及分别在 1 721、2 301、3 301、21 641、



●:本研究中的 PEDV 毒株 CH/YNKM-8/2013; A:基于 PEDV 毒株全基因组构建的进化树; B:基于 PEDV 毒株全 S 基因构建的进化树 ●:The PEDV strain CH/YNKM-8/2013 used in this study; A:Full genome-based phylogenetic analysis of the PEDV; B:S gene-based phylogenetic analysis of the PEDV.

图 7 基于全基因组和 S 基因的 PEDV 进化树分析

Fig.7 The phylogenetic analysis of the full genome and full length of S gene

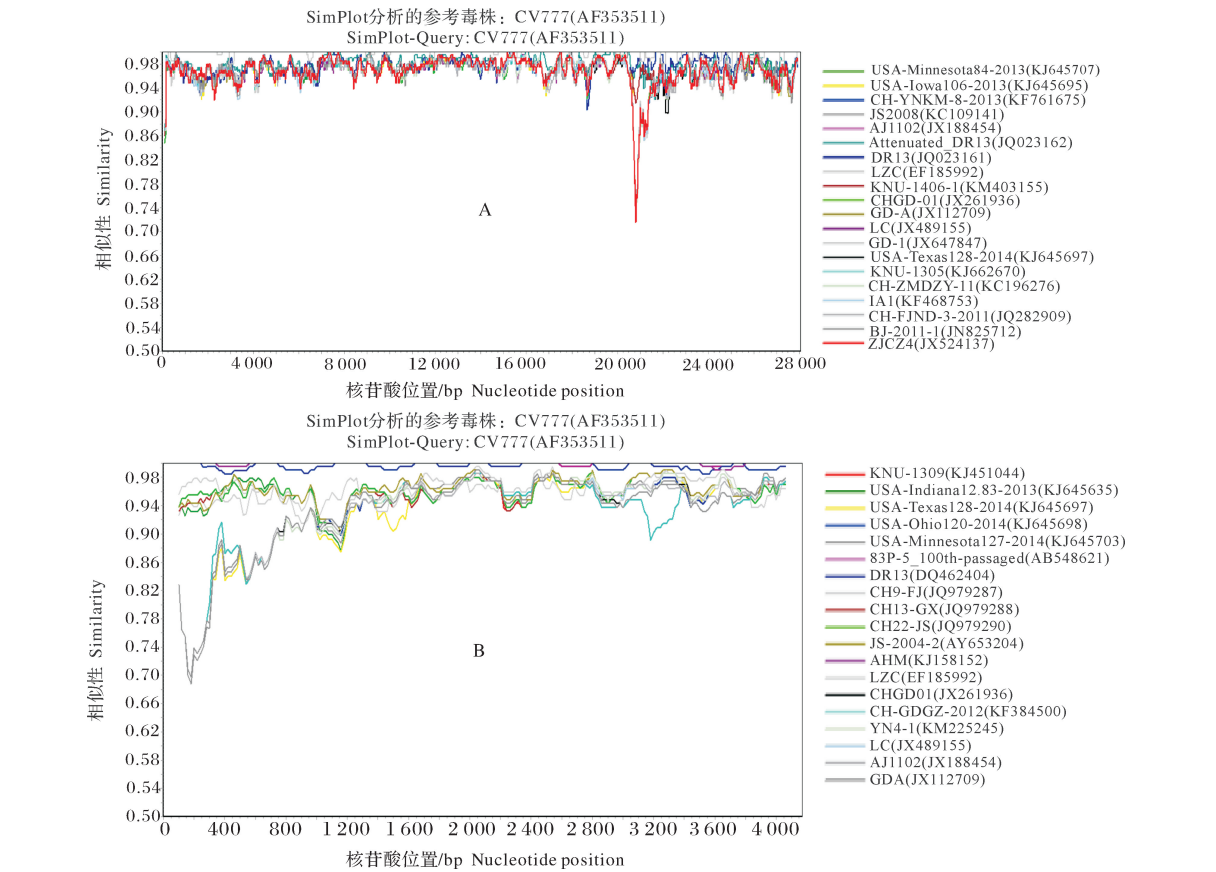


图 8 不同 PEDV 毒株全基因组序列(A)和全 S 基因(B)的相似性结果

Fig.8 The genetic similarities of different PEDV strains based on genome sequence (A) and full length S gene sequence (B)

24 621 bp 和 27 641 bp 附近,提示这些区域为潜在的突变热点。如图 8B 所示,S 基因中 1~1 180 bp 区域有较大变异,而该区域与 PEDV 和其受体结合相关^[25],另外 CHGD01(JX261936)、CH/GDGZ/2012(KF384500)、YN4-1(KM225245)、LC(JX489155)、AJ1102(JX188454)和 GDA(JX112709)等变异毒株在 3 587~3 589 bp 处有 3 bp 的缺失,提示该区域为一个易变区域。

3 讨 论

本研究成功分离到 1 株 PEDV 毒株,命名为 CH/YNKM-8/2013,通过观察引起的 Vero 细胞的病变、RT-PCR 检测、间接免疫荧光试验和 ORF 基因、S 基因和全基因组序列的测序,发现该毒株为变异毒株。对该毒株的同源性研究发现,该毒株与世界范围内变异毒株同源性较高,在 S 基因有特征性的变异,与我国经典野毒株以及经典疫苗毒株序列差异性较大。进一步对其进化关系研究表明,该变异毒株和我国近期变异毒株以及美国韩国的变异毒株组成一个特殊的分支,而经典毒株以及其衍生的疫苗毒株组成另外一个群。2010 年 Chen 等^[25]报道了我国免疫过 CV777 灭活疫苗的猪场仍然暴发 PED,这些变异毒株造成世界范围 PED 的暴发,因此变异毒株引起的 PED 已经成为一个世界性的难题。

PEDV 变异毒株的来源还不清楚,2009 年韩国首先报道了变异毒株的存在^[26],2010 年我国暴发变异毒株引起的 PED^[5],2013 年美国暴发的 PED 的病原怀疑来源于中国^[8],本研究从全基因组以及 S 基因的角度入手,展示了这些毒株的遗传进化关系。本试验分离到的 CH/YNKM-8/2013 在全基因组序列水平与 2011 年 2 月广东省分离毒株 LC 的同源关系最近,序列相似性为 99.6%。本研究揭示了这些变异毒株的变化热点。这些变化热点能为研究这 2 种毒株的表型的不同打下基础。特别在 S 基因 1~1 180 bp 区域有较大差异,而该区域与 PEDV 受体结合相关^[27],是否是由于变异病毒的受体结合性的差异而导致 PED 的大暴发,还需进一步研究;CHGD01、CH/GDGZ/2012、YN4-1、LC、AJ1102 和 GDA 等 PEDV 毒株的 S 蛋白在 1 197 aa 有 1 个氨基酸的缺失,该差异的生物学特性还需作进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] HOFMANN M R. Serologic study of the occurrence of epizootic viral diarrhea in swine in Switzerland [J]. Schweizer archiv fur tierheilkunde, 1987, 129(8): 437-442.
- [2] SONG D, PARK B. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines [J]. Virus genes, 2012, 44(2): 167-175.
- [3] PENSART M B, DEBOUCK P. A new coronavirus-like particle associated with diarrhoea in swine [J]. Archives of virology, 1987, 58: 243-247.
- [4] PENSART M B, YEO S G. Porcine epidemic diarrhea diseases of swine [M]. 9th Edition. Oxford: Blackwell, 2009: 367-372.
- [5] SUN R Q, CAI R J, CHEN Y Q, et al. Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China [J]. Emerging infectious diseases, 2012, 18: 161-163.
- [6] LI W T, LI H, LIU Y Y, et al. New variants of porcine epidemic diarrhea virus and their prevalence in China [J]. Emerging infectious diseases, 2012, 18: 1350-1353.
- [7] HAO J W, XUE C Y, HE L L, et al. Bioinformatics insight into the spike glycoprotein gene of field porcine epidemic diarrhea strains during 2011 - 2013 in Guangdong, China [J]. Virus genes, 2014, 49(1): 58-67.
- [8] HUANG Y W, DICKERMAN A W, PINEYRO P, et al. Origin, evolution, and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the United States [J]. MBio, 2013, 4(5): e00737-13. <http://mbio.asm.org/content/4/5/e00737-13.short>.
- [9] LEE S, LEE C. Outbreak-related porcine epidemic diarrhea virus strains similar to US Strains, South Korea, 2013 [J]. Emerging infectious diseases, 2014, 20(7): 1223-1226.
- [10] LIN C N, CHUNG W B, CHANG S W, et al. US-like strain of porcine epidemic diarrhea virus outbreaks in Taiwan, 2013-2014 [J]. The journal of veterinary medical science, 2014, 76(9): 1297.
- [11] 宣华, 刑德坤, 王殿瀛, 等. 应用猪胎肠单层细胞培养猪流行性腹泻病毒的研究 [J]. 中国人民解放军兽医大学学报, 1984, 4(3): 202-208.
- [12] KUSANAGI K, KUWAHARA H, KATO H, et al. Isolation and serial propagation of porcine epidemic diarrhea virus in cell cultures and partial characterization of the isolate [J]. Journal of veterinary medical science, 1992, 54(2): 313-318.
- [13] KWEON C H, KWON B J, JUNG T S, et al. Isolation of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in Korea [J]. Korean journal veterinary research, 1993, 33(2): 249-254.
- [14] 吴凌, 李一经. 猪流行性腹泻病毒 LJB/03 株的分离及膜蛋白基因的原核表达 [J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(10): 1095-1099.
- [15] 佟有恩, 冯力, 李伟杰. 猪流行性腹泻弱毒株的培育 [J]. 中国畜禽传染病, 1998, 20(6): 329-332.
- [16] 马思奇, 王明, 冯力, 等. 猪流行性腹泻病毒适应 Vero 细胞培养及以传代细胞毒制备氢氧化铝灭活疫苗免疫效力试验 [J]. 中国畜禽传染病, 1994, 16(2): 15-18.
- [17] GAO Y, KOU Q, GE X, et al. Phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus field strains prevailing recently in China [J]. Archives of virology, 2013, 158(3): 711-715.

[18] 张坤,何启盖.猪流行性腹泻病毒、猪传染性胃肠炎病毒和猪 A 群轮状病毒多重 RT-PCR 检测方法的建立及临床应用 [J].畜牧兽医学报,2010,41(8):1001-1005.

[19] CHEN F Z,ZHU Y X,WU M Z,et al.Full-length genome characterization of Chinese porcine deltacoronavirus strain CH/SXD1/2015 [J].Genome announcements,2015,3(5):e01284-15.<http://genomea.asm.org/content/3/5/e01284-15.short>.

[20] 严伟东,李文洁,李文涛,等.猪圆环病毒 2 型的分离鉴定及优化培养 [J].养猪,2012(4):125-128.

[21] PAN Y F,TIAN X Y,LI W,et al.Isolation and characterization of a variant porcine epidemic diarrhea virus in China [J].Virology journal,2012,9(1):195.

[22] KUMAR S,NEI M,DUDLEY J,et al.MEGA:a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences [J].Briefings in bioinformatics,2008,9:299-306.

[23] LOLE K S,BOLLINGER R C,PARANJAPE R S,et al.Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India,with evidence of intersubtype recombination [J].Journal of virology,1999,73:152-160.

[24] LEE D K,CHA S Y,LEE C.The N-terminal region of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein is important for the receptor binding [J].Korean journal of microbiology and biotechnology,2010,39(2):140-145.

[25] CHEN J F,WANG C,SHI H,et al.Molecular epidemiology of porcine epidemic diarrhea virus in China [J].Archives of virology,2010,155(9):1471-1476.

[26] LEE D K,PARK C K,KIM S H,et al.Heterogeneity in spike protein genes of porcine epidemic diarrhea viruses isolated in Korea [J].Virus research,2010,149(2):175-182.

[27] SATO T,TAKEYAMA N,KATSUMATA A,et al.Mutations in the spike gene of porcine epidemic diarrhea virus associated with growth adaptation in vitro and attenuation of virulence *in vivo* [J].Virus genes,2010,161:188-193.

Isolation,identification and full length genome sequence analysis of a variant porcine epidemic diarrhea virus-CH/YNKM-8/2013

WU Meizhou CHEN Fangzhou LI Zhonghua WAN Shengfeng YE Shiyi HE Qigai

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology/College of Animal Science and Veterinary Medicine , Huazhong Agricultural University , Wuhan 430070,China

Abstract To characterize the variant porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) and lay the foundation for prevention and control of porcine epidemic diarrhea (PED),a variant PEDV strain-CH/YNKM-8/2013 was isolated in 2013 in China.The strain was identified by cytopathic effects (CPEs),RT-PCR,IFA,and transmission electron microscope (TEM).The genome sequence of it was sequenced by segmented amplification method and was deposited at GenBank under the accession number of KF761675.1. The N-terminal of S gene of CH/YNKM-8/2013 was 9 bp longer than that of CV777 strain,including 15 bp insertions and 6 bp deletions,which suggested that CH/YNKM-8/2013 was a variant PEDV strain. The CH/YNKM-8/2013 had high sequence similarity of 99.6% with the Chinese strain LC (isolated in 2011 in Guangdong province),of 99.0% with the Korea strain KNU-1305 and the USA strain USA/Minnesota84/2013 and a lower sequence similarity of 96.7% with the vaccine strain-CV777,respectively.The phylogenetic analysis showed that CH/YNKM-8/2013 was clustered into the same group with Chinese,South Korea and USA variant PEDV strains,while it was clustered into different branch with former Chinese classical PEDV strains and the vaccine strain-CV777.

Keywords porcine epidemic diarrhea virus; variant strain; isolation; identification; full genome sequence analysis

(责任编辑:边书京)