

方谱县,刘康,张蕙畅,等.猪 $\delta$ 冠状病毒的分离鉴定及其遗传进化分析[J].华中农业大学学报,2021,40(6):168-175.

DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2021.06.021

## 猪 $\delta$ 冠状病毒的分离鉴定及其遗传进化分析

方谱县,刘康,张蕙畅,夏思进,张健淞,任杰,肖少波,方六荣

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室/华中农业大学动物医学院/  
湖北省生猪健康养殖协同创新中心,武汉 430070

**摘要** 通过 RT-PCR 对采集自河北省 2 个猪场的 5 份腹泻仔猪小肠内容物进行检测,结果均为猪 $\delta$ 冠状病毒(PDCoV)阳性。将病料处理后接种 LLC-PK1 细胞,从 2 个猪场的病料中各成功分离到 1 株 PDCoV,分别命名为 PDCoV CHN-HeB-A1 株和 CHN-HeB-B2 株。通过间接免疫荧光试验(IFA)、Western blot 和电镜观察对分离的病毒进一步鉴定,IFA 和 Western blot 结果证实 2 株病毒都能与 PDCoV M 蛋白的单克隆抗体发生特异性反应,电镜下可观察到直径 100~150 nm、呈典型皇冠状的病毒粒子,证实所分离的病毒为 PDCoV。全基因组测序以及遗传进化分析结果表明,2 株 PDCoV 与中国大陆毒株相似性较高,为 98.7%~99.1%,与中国香港毒株处于同一簇。

**关键词** 猪 $\delta$ 冠状病毒;分离;鉴定;基因组测序;遗传进化

**中图分类号** S 852.65<sup>+</sup>9.6 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2021)06-0168-08

猪 $\delta$ 冠状病毒(porcine deltacoronavirus, PDCoV)是近年来新发现的一种猪肠道致病性冠状病毒,主要感染新生仔猪,临床症状与猪流行性腹泻(porcine epidemic diarrhea, PED)和猪传染性胃肠炎(porcine transmissible gastroenteritis, TGE)相似,以腹泻、呕吐、脱水为主要特征<sup>[1-3]</sup>。自 2014 年初在美国暴发后,加拿大、韩国、中国、泰国、越南、老挝、日本等国家也相继从猪腹泻样品中检测到 PDCoV,给养猪业造成了较大的经济损失<sup>[4]</sup>。临床上 PDCoV 常与其他病毒混合感染,比如 PEDV、TGEV 以及 PRRSV<sup>[5-6]</sup>。最近研究表明 PEDV 和 PDCoV 混合感染比单一病毒感染具有更严重的临床症状,这给肠道病毒的防控带来很大的挑战<sup>[7]</sup>。目前,尚无商品化的疫苗可用,病毒的分离培养对 PDCoV 诊断方法的建立和疫苗的研制及致病机制的研究具有十分重要的意义。

PDCoV 为单股正链 RNA 病毒,基因组大小约为 25.4 kb,属于冠状病毒科、 $\delta$ 冠状病毒属成员,具有其他冠状病毒类似的基因分布(5' UTR-ORF1a-ORF1b-S-E-M-NS6-N-NS7-NS7a-3' UTR)。其中,ORF1a 和 ORF1b 编码 2 个多聚蛋白 pp1a、pp1ab,

被自身编码的木瓜样蛋白酶(nsp3)和 3C 样蛋白酶(nsp5)加工成 15 个非结构蛋白;3'端基因组编码 4 个结构蛋白[刺突蛋白(S),小膜蛋白(E),膜蛋白(M),核衣壳蛋白(N)]以及 3 个辅助蛋白(NS6, NS7, NS7a)<sup>[8-10]</sup>。目前,PDCoV 是唯一通过体外细胞培养成功分离的 $\delta$ 冠状病毒属成员,是研究 $\delta$ 冠状病毒属病毒的良好模型。研究发现 PDCoV 具有非常广泛的宿主嗜性<sup>[11]</sup>,对牛、鸡、小鼠以及火鸡易感,甚至还可以感染人<sup>[12-15]</sup>,提示该病毒具有跨种传播的能力,给动物和人类健康带来危险。

PDCoV 和 PEDV 都属于不容易分离培养的病毒,在体外培养中往往需要添加外源性胰蛋白酶<sup>[16]</sup>。相对于 PEDV,可在体外培养传代的 PDCoV 毒株仍然很少,尽管近年来 PDCoV 生物学功能等基础研究获得较多的研究进展<sup>[17-19]</sup>,但是对该病毒的起源、进化以及具有广泛的宿主嗜性的机制尚不清楚。因此,加大其流行病学调查、临床上毒株的分离以及免疫致病机制的研究具有重要意义。本研究采集了河北省某 2 个猪场发生腹泻的仔猪小肠内容物,经过病毒分离、鉴定和培养,获得 2 株 PDCoV,分别命名为 PDCoV CHN-HeB-A1 株和 CHN-

收稿日期:2021-05-28

基金项目:国家自然科学基金项目(32072846);国家自然科学基金青年科学基金项目(31902247)

方谱县, E-mail: pxfang1990@163.com

通信作者:方六荣, E-mail: fanglr@mail.hzau.edu.cn

HeB-B2株,对其体外增殖能力、全基因组测序和遗传进化进行了分析,以期为后续疫苗的研发和诊断试剂的研制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 病料、细胞及主要试剂

病料为河北省某2个猪场发生腹泻仔猪的小肠内容物,其中有3份样品采自A猪场,2份样品采自B猪场。肾小管上皮细胞LLC-PK1由笔者所在实验室保存。抗PDCoV M蛋白单克隆抗体为笔者所在实验室自制保存。FITC标记的羊抗鼠IgG购自上海碧云天生物技术有限公司。RNA反转录试剂、限制性内切酶、T4 DNA连接酶、Taq DNA聚合酶、高保真DNA聚合酶、DNA Marker、pGEM-T Easy克隆载体等购自大连宝生物公司。Trizol总RNA提取试剂盒为Omega公司产品。

### 1.2 病料处理

采集的小肠内容物中加入3~5倍体积的MEM培养液、青霉素200 U/mL和链霉素200 μg/mL,经搅拌混匀,在-20℃冻融3次,于4℃12 000 r/min离心10 min,收集上清,-80℃保存备用。

### 1.3 RNA提取与RT-PCR分析

根据PDCoV CHN-HN-2014株(GenBank登录号:KT336560)、PEDV AJ1102株(GenBank登录号:JX188454)、TGEV WH-1株(GenBank登录号:HQ462571)全基因组序列,设计特异性引物分别检测PDCoV M基因、PEDV N基因和TGEV N基因(表1)。提取处理后的病料总RNA,经反转录获得cDNA,以cDNA为模板,利用各引物对进行PCR扩增,产物经DNA试剂盒回收,克隆至pGEM-T Easy载体中进行测序鉴定。

表1 PEDV、PDCoV和TGEV检测引物序列

Table 1 Primer sequences for detection of PEDV, PDCoV and TGEV

名称 Name	序列 Sequence	基因 Gene	长度/bp Length
PEDV-F	GCAACAACAGGTCCAGAT	N	563
PEDV-R	CTCACGAACAGCCACATT		
PDCoV-F	CATCTAAGAAGGACGCAGTT	M	437
PDCoV-R	TGAAGTGGTTATGGTGTGAA		
TGEV-F	GTGGTTCTTCTACTACTTAGGT	N	730
TGEV-R	TGGACGAGCATAGGCATT		

### 1.4 病毒的分离

取2 mL上述RT-PCR检测为PDCoV阳性的

样品悬液,用0.22 μm滤器过滤除菌后,接种至长满单层的LLC-PK1细胞,在37℃5%CO<sub>2</sub>的条件下吸附2~3 h后,弃去培养基,加入10 mL维持液(含7.5 μg/mL胰酶的MEM培养液),于37℃5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养2~3 d后收毒,若未观察到细胞病变,则于-20℃冻融2~3次后再接种LLC-PK1细胞进行盲传,并对收集的每代病毒液进行RT-PCR检测,若传到第5代(F5)仍无细胞病变则弃掉。

### 1.5 病毒的鉴定

1)间接免疫荧光分析。将PDCoV接种24孔细胞培养板中的LLC-PK1细胞,同时,设立不接毒对照组。待细胞出现病变后,PBS洗涤3次,室温下4%多聚甲醛固定15 min;再用预冷的甲醇透化10 min,PBS洗涤3次,5%牛血清封闭45 min,PDCoV M单克隆抗体37℃孵育1 h。PBS洗涤3次,加入FITC标记的山羊抗鼠IgG,37℃孵育45 min,PBS洗涤3次,加入1:2 000稀释的DAPI(4',6-二脒基-2-苯基吡啶)进行核染色15 min,PBS洗3次,通过荧光显微镜观察并拍照。

2)Western blot分析。将PDCoV感染LLC-PK1细胞,待细胞出现明显的病变后收集细胞样品,同时设立不接毒细胞对照组。将细胞样品进行SDS-PAGE电泳分析,将凝胶中的蛋白转印至硝酸纤维素膜上,经过10%的脱脂奶粉封闭2 h,PDCoV M单克隆抗体室温孵育2 h,HRP标记的山羊抗鼠IgG室温作用1 h,最后,通过BIO-RAD化学发光成像仪进行显色分析。

3)PDCoV病毒粒子的超离纯化与电镜观察。病毒液经过离心和0.45 μm滤器过滤去除细胞碎片,加入终浓度为0.5 mol/L的NaCl和质量分数为5%的PEG6000,充分混匀后置于4℃沉淀24 h,8 000 r/min离心1.5 h,弃去上清,沉淀中加入少量Tris-EDTA-氯化钠缓冲液(TEN/STE),于4℃溶解过夜;上述溶液经30%、45%和60%梯度蔗糖溶液离心,在30%~45%分层处和45%~60%分层处分别取样;30 000 r/min离心4 h弃去上清去除蔗糖,在沉淀中加入少量STE于4℃溶解过夜。将获得的病毒悬液样品分别滴到铜网上吸附5 min,用滤纸轻轻吸取病毒悬液,待干燥后滴加20 g/L的磷钨酸进行负染1 min,弃掉磷钨酸,待干燥后在日立H-7000FA电子显微镜下观察并拍照。

### 1.6 病毒的TCID<sub>50</sub>测定

将病毒用含7.5 μg/mL胰酶的MEM培养液

在 1.5 mL EP 管中作 10 倍系列稀释,将每个稀释度的病毒液接种到单层 LLC-PK1 的 96 孔细胞培养板中,每个稀释度接种 8 孔,每孔接种 100  $\mu$ L。同时,设立 MEM 培养液作阴性对照。将 96 孔细胞培养板置于 37  $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,12 h 后开始观察,记录细胞产生 CPE 孔数,直至细胞病变稳定。以上实验重复 3 次,按 Reed-Muench 法计算病毒的 TCID<sub>50</sub>。

### 1.7 PDCoV 全基因组序列测定与分析

参照文献[20]和 PDCoV 全基因组序列,设计 16 对扩增引物将 PDCoV 全基因组序列分为 16 个 1 500~1 900 bp 的基因片段进行扩增,所用引物序列见表 2。将各片段克隆至 pGEM-T Easy 载体中,并送至武汉擎科生物公司测序。使用 SeqMan 软件

将 16 个基因片段序列拼接为完整的 PDCoV 全基因组序列。使用 MegAlign 软件对 PDCoV 全基因组序列进行分析,利用 MEGA 7.0 软件对全基因组序列进行遗传进化分析。

## 2 结果与分析

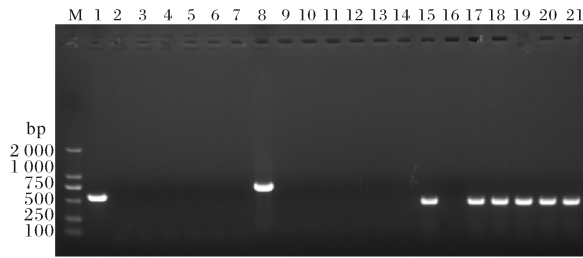
### 2.1 病料的 RT-PCR 检测

利用合成的特异性引物(表 2)通过 RT-PCR 对临床上常见的 3 种猪肠道冠状病毒(PEDV、TGEV 和 PDCoV)进行检测,核酸凝胶电泳分析结果显示 5 份样品经 RT-PCR 分析均获得大小约 437 bp 的 PDCoV M 基因特异性条带,而对 PEDV 和 TGEV 检测均为阴性(图 1),说明腹泻样品为 PDCoV 阳性。

表 2 PDCoV 全基因组引物序列

Table 2 Primer sequences used to generate the full-length genome of PDCoV

名称 Name	序列 Sequence	位置 Position	长度/bp Length
PDCoV-1-F	ACATGGGGACTAAAGATAAAAATTATAGC	1~1 610	1 610
PDCoV-1-R	AGACGGGCAATTTTGACCG		
PDCoV-2-F	TGATGATGTTCTGCTAGCCT	1 481~3 300	1 820
PDCoV-2-R	GCTCATCGCCTACATCAGTG		
PDCoV-3-F	CGGATTTAAAACCACAGACT	3 091~4 860	1 770
PDCoV-3-R	ACGACTTTACGAGGATGAAT		
PDCoV-4-F	CTCCTGTACAGGCCTTACAA	4 741~6 420	1 680
PDCoV-4-R	TCACACGTATAGCCTGCTGA		
PDCoV-5-F	CTCAATGCAGAAGACCAGTC	6 291~8 060	1 770
PDCoV-5-R	CAGCTTGGTCTTAAGACTCT		
PDCoV-6-F	GGTACTGCTTCTGATAAGGAT	7 920~9 660	1 741
PDCoV-6-R	TAGGTACAGTTGTGAACCGA		
PDCoV-7-F	CTCTGCCATTATCATGCCT	9 541~11 040	1 500
PDCoV-7-R	AAAGAGAGGCATTTTGCTGG		
PDCoV-8-F	ACTTGGACCCTCCTATGCGC	11 021~12 840	1 820
PDCoV-8-R	GGCTCAAGGTACTIONTATCTGC		
PDCoV-9-F	TATGCAGGATGGTGAACGG	12 721~14 400	1 280
PDCoV-9-R	TCACAATAAATCGCAGTGCC		
PDCoV-10-F	TGTTACGCAGACTACACATA	14 281~16 020	1 740
PDCoV-10-R	TCATAGCCGCAGCGCTTAAA		
PDCoV-11-F	TGTGGTGTTTAGGCAGGCAA	15 901~17 760	1 860
PDCoV-11-R	GTGGCGGTTACGCCTAAACC		
PDCoV-12-F	CAAACCTTTTCGACAACCGCA	17 641~19 200	1 560
PDCoV-12-R	GCTAAAGGAGAATAGGTTGGTG		
PDCoV-13-F	CTGAACATTCATTCTCACCC	18 981~20 910	1 930
PDCoV-13-R	GAAGGTGGTGGCATTGTGG		
PDCoV-14-F	GTCTTACCGTGTGAAACCC	20 761~22 440	1 680
PDCoV-14-R	AACATCCCACTGAGGAGGTG		
PDCoV-15-F	TTTTACAACACAACCGCTGC	22 321~24 004	1 684
PDCoV-15-R	GGCCATGATAGATTGGTGTC		
PDCoV-16-F	ATGGTGAGCCTTTACTGCTT	23 881~25 417	1 537
PDCoV-16-R	TGCTCCATCCCCCTATAAG		



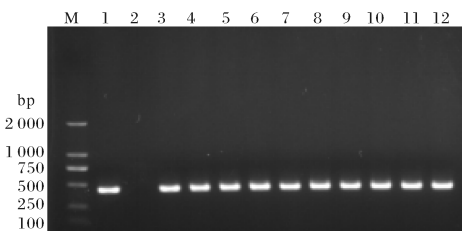
M:代表 DNA Marker; 1~7:RT-PCR 检测 PEDV; 8~14:RT-PCR 检测 TGEV; 15-21:RT-PCR 检测 PDCoV; 3-7、10-14、17-21:代表 5 份腹泻样品; 1、8、15:阳性对照; 2、9、16:阴性对照; M:DNA Marker; 1-7:Detection of PEDV by RT-PCR; 8-14:Detection of TGEV by RT-PCR; 15-21:Detection of PDCoV by RT-PCR; 3-7、10-14、17-21:Five diarrhea samples; 1,8,15:Positive control; 2,9,16:Negative control.

图 1 腹泻仔猪肠道内容物的 RT-PCR 检测

Fig.1 RT-PCR assay for the intestinal contents from diarrhea piglets

## 2.2 PDCoV 的分离

将处理好的 5 份 PDCoV 阳性样品接种长满单层的 LLC-PK1 细胞,发现接种后第 3 天有 2 份样品(分别来源于 2 个猪场)接种的细胞产生病变,主要表现为细胞变圆、聚集、裂解、脱落,与 PDCoV 所致的病变一致,收集细胞培养物。将此 2 份细胞培养物在 LLC-PK1 细胞上传至 F5,结果每代都能稳定地引起细胞病变。提取每代病毒的 RNA,通过 RT-PCR 方法扩增 PDCoV 的 M 基因,结果均能获得大小约 437 bp 的特异性条带(图 2)。说明所获得的 2 株病毒均能在细胞上稳定传代,分别命名为 CHN-HeB-A1 和 CHN-HeB-B2 株。



M:代表 DNA Marker; 1:阳性对照; 2:阴性对照; 3-7:第 1 代至第 5 代 CHN-HeB-A1 株; 8-12:第 1 代至第 5 代 CHN-HeB-B2 株。M:DNA 2000 Marker; 1: Positive control; 2: Negative control; 3-7:CHN-HeB-A1 strain from F1 to F5; 8-12:CHN-HeB-B2 strain from F1 to F5.

图 2 PDCoV CHN-HeB-A1 株、CHN-HeB-B2 株传代后 RT-PCR 检测

Fig.2 RT-PCR detection of PDCoV CHN-HeB-A1 and CHN-HeB-B2 strain after serial passages

## 2.3 PDCoV 分离株的鉴定

将 PDCoV CHN-HeB-A1 和 CHN-HeB-B2 株

分别接种于 24 孔板培养的 LLC-PK1 细胞,待细胞出现病变时,收获细胞样品进行 IFA 和 Western blot 分析。IFA 结果显示 2 株病毒感染的细胞均可观察到特异性绿色荧光,而对照组没有绿色荧光(图 3A);Western blot 结果表明 PDCoV M 单克隆抗体特异性识别病毒表达的 M 蛋白条带(图 3B)。进一步通过超离纯化和电镜观察,结果显示采集 30%、45%蔗糖分层处的样品可以观察到病毒粒子,病毒粒子成球形,直径 100~150 nm,表面有囊膜和纤突,完整的病毒粒子呈典型的皇冠状(图 3C)。这些结果证实这 2 株病毒均为 PDCoV。

## 2.4 PDCoV 感染细胞的动力学分析

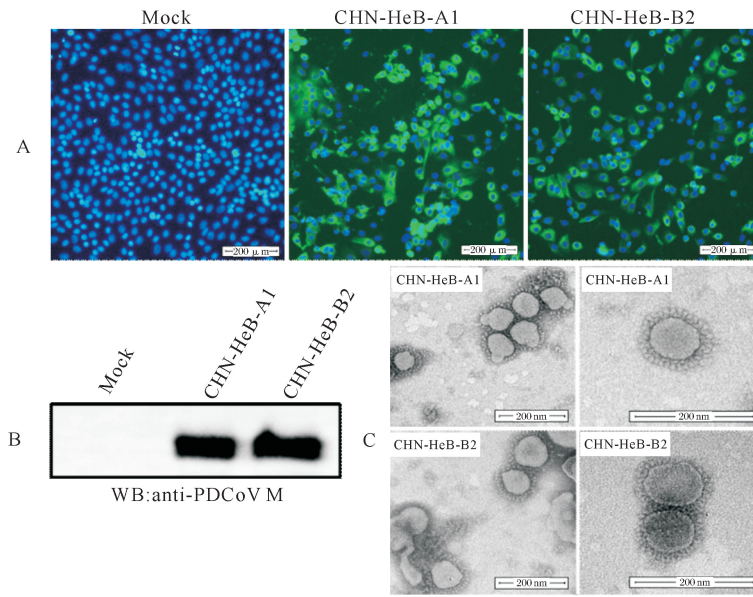
为了分析 2 株病毒在 LLC-PK1 细胞上的增殖情况,将 PDCoV CHN-HeB-A1 株和 CHN-HeB-B2 株分别以感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 0.1 的剂量接种 LLC-PK1 细胞,于接种后 6、12、18 和 24 h 收取培养物,进行间接免疫荧光实验,结果如图 4A 所示,PDCoV CHN-HeB-A1 株和 CHN-HeB-B2 株感染细胞 6 h 时均可观察到少量的特异性绿色荧光,随着感染时间的延长,含有绿色荧光的细胞逐渐增多,24 h 后由于细胞出现脱落,绿色荧光数量减少,整个实验中对照组细胞均无特异性绿色荧光。

同时,将 2 株病毒分别以相同剂量(0.1 MOI)接种 LLC-PK1 细胞,于接种后 4、8、12、16、20、24 h 分别收取细胞培养物进行 TCID<sub>50</sub> 检测,绘制病毒的一步生长曲线。结果如图 4B 所示,感染后 4 h,即可检测到较低滴度的病毒,随着感染时间的延长,病毒滴度也逐渐升高。在感染 24 h 后,两分离株具有相当的病毒滴度。这些结果表明 2 株 PDCoV 具有相似的体外增殖曲线。

## 2.5 PDCoV 全基因组测序与序列分析

提取病毒 RNA,反转录成 cDNA,以 cDNA 为模板,利用 16 对引物进行 PCR 扩增,结果显示分别扩增出覆盖 PDCoV CHN-HeB-A1(图 5A)和 CHN-HeB-B2 株(图 5B)全基因组的 16 个片段,与预期片段大小相符。将各片段克隆至 pGEM-T Easy 克隆载体,送至武汉擎科生物技术有限公司测序,利用 SeqMan 软件对所获得的序列进行拼接,最终获得 2 株 PDCoV 的全基因组序列。由于 2 毒株核苷酸相似性极高,达 99.95%,提交了其中 1 个毒株(CHN-HeB-A1)全基因序列至 GenBank,核酸序列号为 MG242062。

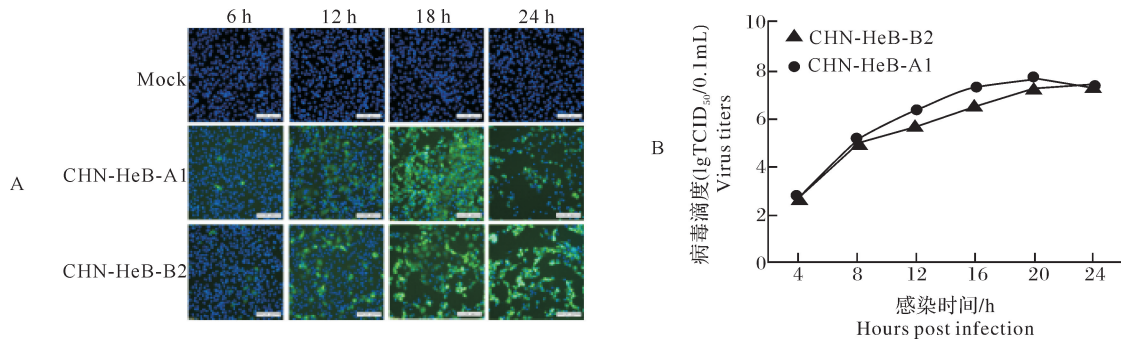




A:IFA 检测 PDCoV; B:Western blot 检测 PDCoV; C:电镜观察 PDCoV。A:PDCoV detection via IFA; B:PDCoV detection via Western blot; C:PDCoV detection via electron micrograph.

图 3 PDCoV 分离株的鉴定

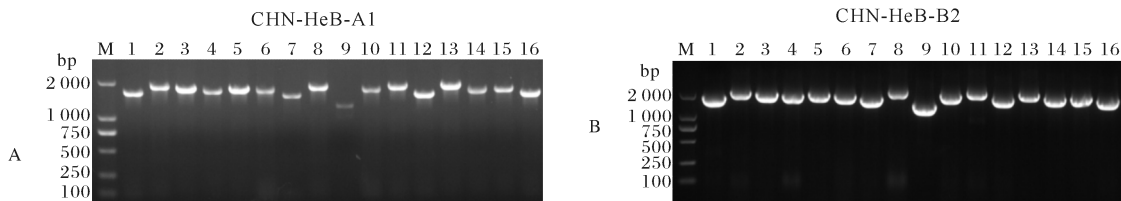
Fig.3 Identification of PDCoV isolations



A:IFA 检测 PDCoV 感染; B:PDCoV 在 LLC-PK1 细胞上的一步生长曲线。A:Detection of PDCoV infection via IFA; B:One-step growth curve of PDCoV in LLC-PK1 cells.

图 4 PDCoV 分离株在 LLC-PK1 细胞上的增殖情况

Fig.4 Proliferation of PDCoV isolates in LLC-PK1 cells



M:代表 DNA Marker; A:扩增的 PDCoV CHN-HeB-A1 株 16 个基因片段; B:扩增的 PDCoV CHN-HeB-B2 株 16 个基因片段。M:DNA 2000 Marker; A:16 gene fragments amplified from PDCoV CHN-HeB-A1 strain; B:16 gene fragments amplified from PDCoV CHN-HeB-B2 strain.

图 5 PDCoV CHN-HeB-A1 株和 CHN-HeB-B2 株全基因组片段扩增

Fig.5 Amplification of genome fragments of PDCoV CHN-HeB-A1 and CHN-HeB-B2

利用 MegAlign 软件对已报道的 28 株代表性毒株全基因组进行序列分析,结果显示所有毒株相似性在 97.0~99.9%,且 PDCoV CHN-HeB-A1 株和 CHN-HeB-B2 株序列与国内部分地区报道的毒

株序列相似性相对较高,为 98.7%~99.1%;与美日韩毒株的相似性为 98.3%~98.8%,与东南亚毒株相距最远,相似性为 97.4%~97.7%(表 3)。利用 MEGA 7.0 软件对 PDCoV CHN-HeB-A1 和 CHN-HeB-B2 株与其他 GenBank 已发表的 102 株 PD-CoV 全基因组序列进行全基因组的遗传进化分析,

并利用 ITOL 网站(<http://itol.embl.de/>)对树形图进行美化,结果显示中国大陆毒株(包括分离的 CHN-HeB-A1 株和 CHN-HeB-B2 株)与中国香港毒株处于同一簇;美国、韩国、日本毒株处于一簇;东南亚毒株单独成簇(图 6)。

表 3 全基因组核苷酸相似性分析

Table 3 Nucleotide similarity assay of complete genomic sequence

序列简称 Abbreviation	CHN-HeB-A1	CHN-HeB-B2	序列简称 Abbreviation	CHN-HeB-A1	CHN-HeB-B2
CHN-HB-2014	99.1	99.1	OhioCVM1-2014	98.7	98.8
CHN-HN-2014	98.8	98.9	Thailand-S5011-2015	97.4	97.4
CHN-JS-2014	99.0	99.1	Thailand-S5015L-2015	97.4	97.4
CHN-Tianjing-2016	98.8	98.8	USA-Arkansas61-2105	98.7	98.7
CH-Sichuan-S27-2012	99.0	99.1	Illinois136-2014	98.7	98.8
GNM-2-JPN-2014	98.7	98.7	Indiana453-2014	98.8	98.8
HKD-JPN-2016	98.3	98.3	Michigan448-2014	98.8	98.8
KY4813	98.8	98.8	Minnesota454-2014	98.8	98.8
HKU15-44	98.7	98.7	Vietnam-Binh21-2015	97.7	97.8
HKU15-155	99.0	99.0	Vietnam-HaNoi6-2015	97.7	97.7
HKU14-04	98.7	98.8	2016-Lao	97.5	97.5
KNU16-07-P5	98.7	98.7	8734-USA-IA/2014	98.7	98.8
OH1987	98.8	98.8	CHN-AH-2004	98.7	98.7
OH11846	98.7	98.8	CHN-GD-2016	98.8	98.9

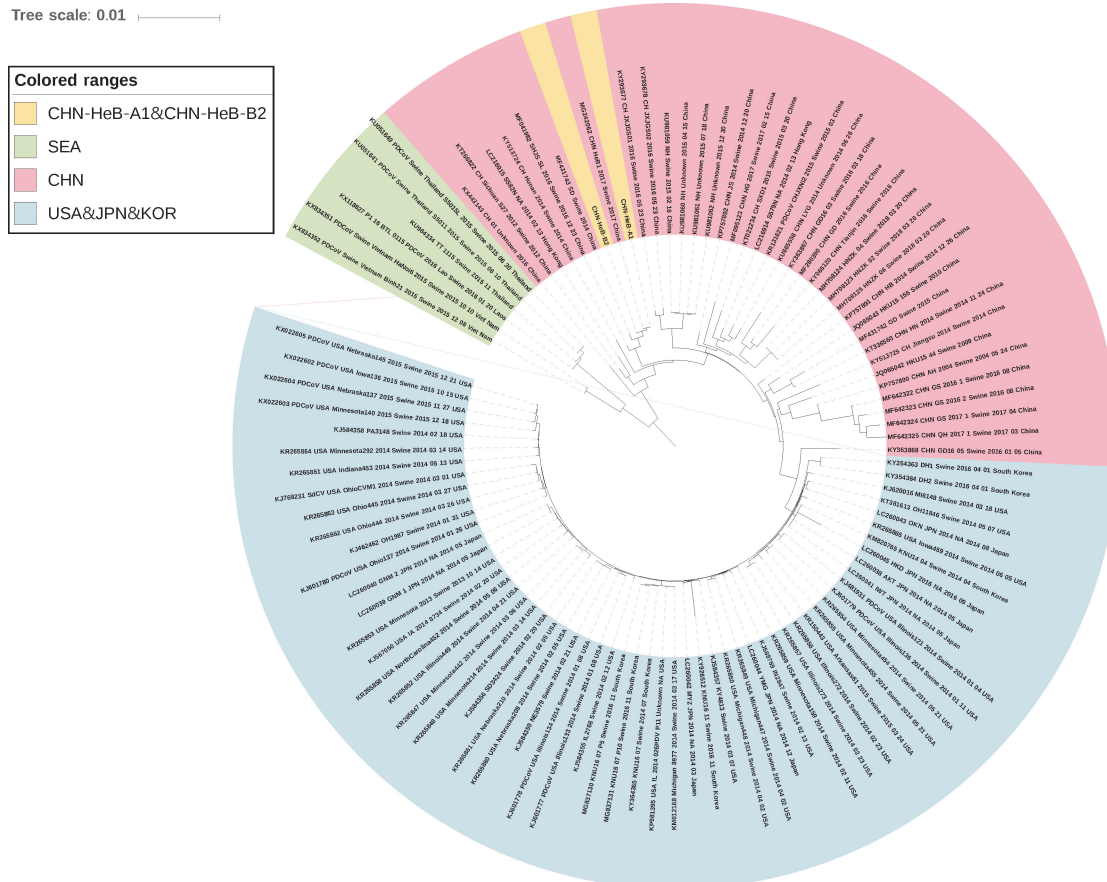


图 6 PDCoV 全基因组序列的系统发育树分析

Fig.6 Phylogenetic tree analysis of the genomic sequences of PDCoVs

### 3 讨 论

由于 PDCoV 在 LLC-PK1 细胞上增殖的病毒滴度要高于在 ST 细胞上的增殖滴度,本研究选用了 LLC-PK1 细胞进行病毒的分离和培养,成功分离获得了 2 株可以稳定传代的 PDCoV,并进一步通过 IFA、Western blot 分析和电镜观察得到全面鉴定。为了获得增殖滴度高的病毒,对 PDCoV CHN-HeB-A1 与 PDCoV CHN-HeB-B2 株进行了克隆纯化。同时为了尽量减少病毒的传代次数,选择了 F3 代病毒用于空斑纯化,经过 3 轮空斑纯化,获得了病毒滴度较高 ( $10^{8.0}$  TCID<sub>50</sub>/mL 以上) 的 F6 代病毒,用于后续研究。已有研究报道 PDCoV 分离株主要分为 3 个大的分支,包括东南亚(泰国、老挝、越南)毒株、中国毒株、美日韩(美国、日本、韩国)毒株<sup>[21-22]</sup>。本研究中 PDCoV 分离株 CHN-HeB-A1 与 CHN-HeB-B2 属于中国毒株这一分支,全基因组进化分析表明这 2 个毒株与中国香港毒株处于同一簇。我们也对 S 基因序列进行了进化树分析,结果与全基因组进化树基本一致。

通过 IFA 和 Western blot 分析表明本研究分离到的 2 株 PDCoV 与笔者所在实验室前期利用 PDCoV CHN-HN-2014 株 M 蛋白制备的单克隆抗体有很好的免疫反应,其致病性和免疫原性有待进一步研究。

#### 参考文献 References

[1] ZHANG J L, CHEN J F, LIU Y, et al. Pathogenicity of porcine deltacoronavirus (PDCoV) strain NH and immunization of pregnant sows with an inactivated PDCoV vaccine protects 5-day-old neonatal piglets from virulent challenge [J]. *Transboundary and emerging diseases*, 2020, 67(2): 572-583.

[2] XU Z C, ZHONG H L, ZHOU Q F, et al. A highly pathogenic strain of porcine deltacoronavirus caused watery diarrhea in newborn piglets [J]. *Virologica sinica*, 2018, 33(2): 131-141.

[3] 刘秋歌, 王洪峰, 范前进, 等. 猪德尔塔冠状病毒 BJ 株的分离鉴定与致病性分析 [J]. *中国预防兽医学报*, 2020, 42(12): 1287-1291. LIU Q G, WANG H F, FAN Q J, et al. Isolation, identification and pathogenesis of porcine deltacoronavirus BJ strain [J]. *Chinese journal of preventive veterinary medicine*, 2020, 42(12): 1287-1291 (in Chinese with English abstract).

[4] ZHANG J Q. Porcine deltacoronavirus: overview of infection dynamics, diagnostic methods, prevalence and genetic evolution [J]. *Virus research*, 2016, 226: 71-84.

[5] 陈志雄, 王洪海, 张峰. 规模猪场哺乳仔猪混合感染 PEDV 和 PDCoV 暴发腹泻的综合防控 [J]. *中国猪业*, 2019, 14(5): 85-

88. CHEN Z X, WANG H H, ZHANG F. Comprehensive prevention and control of suckling piglets diarrhea caused by coinfection of PEDV and PDCoV on large-scale pig farms [J]. *China swine industry*, 2019, 14(5): 85-88 (in Chinese).

[6] 冯宇, 徐志文, 朱玲. 猪繁殖与呼吸综合征与猪  $\delta$  冠状病毒病混合感染的诊断 [J]. *猪业科学*, 2018, 35(12): 78-79. FENG Y, XU Z W, ZHU L. Diagnosis of coinfection of porcine reproductive and respiratory syndrome and porcine deltacoronavirus disease [J]. *Swine industry science*, 2018, 35(12): 78-79 (in Chinese).

[7] ZHANG H L, HAN F F, SHU X L, et al. Co-infection of porcine epidemic diarrhoea virus and porcine deltacoronavirus enhances the disease severity in piglets [J/OL]. *Transboundary and emerging diseases*, 2021: tbed.14144 [2021-05-28]. <https://doi.org/10.1111/tbed.14144>.

[8] WOO P C Y, LAU S K P, LAM C S F, et al. Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus [J]. *Journal of virology*, 2012, 86(7): 3995-4008.

[9] FANG P X, FANG L R, HONG Y Y, et al. Discovery of a novel accessory protein NS7a encoded by porcine deltacoronavirus [J]. *The journal of general virology*, 2017, 98(2): 173-178.

[10] FANG P X, FANG L R, LIU X R, et al. Identification and subcellular localization of porcine deltacoronavirus accessory protein NS6 [J]. *Virology*, 2016, 499: 170-177.

[11] LI W T, HULSWIT R J G, KENNEY S P, et al. Broad receptor engagement of an emerging global coronavirus may potentiate its diverse cross-species transmissibility [J]. *PNAS*, 2018, 115(22): E5135-E5143.

[12] JUNG K, HU H, SAIF L J. Calves are susceptible to infection with the newly emerged porcine deltacoronavirus, but not with the swine enteric alphacoronavirus, porcine epidemic diarrhea virus [J]. *Archives of virology*, 2017, 162(8): 2357-2362.

[13] BOLEY P A, ALHAMO M A, LOSSIE G, et al. Porcine deltacoronavirus infection and transmission in poultry, United States [J]. *Emerging infectious diseases*, 2020, 26(2): 255-265.

[14] LIANG Q Q, ZHANG H L, LI B X, et al. Susceptibility of chickens to porcine deltacoronavirus infection [J/OL]. *Viruses*, 2019, 11(6): 573 [2021-05-28]. <https://doi.org/10.3390/v11060573>.

[15] LEDNICKY J A, TAGLIAMONTE M S, WHITE S K, et al. Emergence of porcine delta-coronavirus pathogenic infections among children in Haiti through independent zoonoses and convergent evolution [J/OL]. *MedRxiv*, 2021 [2021-05-28]. <https://doi.org/10.1101/2021.03.19.21253391>.

[16] 陈建飞, 王潇博, 焦贺勋, 等. 国内首株猪德尔塔冠状病毒 (Porcine deltacoronavirus) 的分离鉴定 [J]. *中国预防兽医学报*, 2016, 38(3): 171-174. CHEN J F, WANG X B, JIAO H X, et al. Isolation and identification of the first porcine deltacorna-

- virus strain in China[J].Chinese journal of preventive veterinary medicine,2016,38(3):171-174(in Chinese with English abstract).
- [17] WANG B,LIU Y,JI C M,et al.Porcine deltacoronavirus engages the transmissible gastroenteritis virus functional receptor porcine aminopeptidase N for infectious cellular entry[J/OL]. Journal of virology,2018,92(12):e00318-18[2021-05-28].https://doi.org/10.1128/jvi.00318-18.
- [18] YIN L D,CHEN J F,LI L,et al.Aminopeptidase N expression, not interferon responses, determines the intestinal segmental tropism of porcine deltacoronavirus[J/OL].Journal of virology,2020,94(14):e00480-20[2021-05-28].https://doi.org/10.1128/jvi.00480-20.
- [19] ZENG Z,DENG F,SHI K,et al.Dimerization of coronavirus nsp9 with diverse modes enhances its nucleic acid binding affinity[J/OL].Journal of virology,2018,92(17):e00692-18[2021-05-28].https://doi.org/10.1128/jvi.00692-18.
- [20] DONG N,FANG L R,YANG H,et al. Isolation,genomic characterization,and pathogenicity of a Chinese porcine deltacoronavirus strain CHN-HN-2014 [J]. Veterinary microbiology,2016,196:98-106.
- [21] ZHAO Y J,QU H,HU J F,et al.Characterization and pathogenicity of the porcine deltacoronavirus isolated in southwest China[J/OL]. Viruses,2019,11(11):1074[2021-05-28].https://doi.org/10.3390/v11111074.
- [22] YE X,CHEN Y J,ZHU X Y,et al.Cross-species transmission of deltacoronavirus and the origin of porcine deltacoronavirus [J].Evolutionary applications,2020,13(9):2246-2253.

## Isolation, identification and genetic evolution analysis of porcine deltacoronavirus

FANG Puxian, LIU Kang, ZHANG Huichang, XIA Sijin,  
ZHANG Jiansong, REN Jie, XIAO Shaobo, FANG Liurong

*State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University/  
College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University /The Cooperative Innovation  
Center for Sustainable Pig Production, Wuhan 430070, China*

**Abstract** Porcine deltacoronavirus (PDCoV) is a newly emerged enteric coronavirus. In this study, five samples of piglet intestinal contents with diarrhea from two pig farms in Hebei Province were identified to be positive for PDCoV by RT-PCR assay, followed by the virus isolation through inoculation of treated samples on LLC-PK1 cells. The result showed that two PDCoV strains from various pig farms were successfully isolated and named as PDCoV CHN-HeB-A1 and CHN-HeB-B2 strains respectively, which were further identified by indirect immunofluorescence test (IFA), Western blot and electron microscopy assay. The results of IFA and Western blot confirmed that both virus strains can specifically react with monoclonal antibodies against PDCoV M protein. Virus particles with a diameter of 100-150 nm and a typical crown shape were obviously observed under electron microscopy, verifying both virus strains to be PDCoV. The results of whole genome sequencing and genetic evolution analysis showed that both PDCoV strains were homologous to the Chinese strain, with the similarity ranging from 98.7% to 99.1%, which were in the same cluster as the Hong Kong strain.

**Keywords** porcine deltacoronavirus; isolation; identification; genome sequencing; genetic evolution

(责任编辑:边书京)