

新发猪流行性腹泻病毒 ORF3 基因的遗传进化分析

董世娟^{1,2} 朱于敏^{1,2} 于瑞嵩^{1,2} 司伏生^{1,2}
石明明^{1,2} 张源淑³ 李震^{1,2}

1. 上海市农业科学院畜牧兽医研究所, 上海 201106; 2. 上海市农业遗传育种重点实验室, 上海 201106;
3. 南京农业大学动物医学院, 南京 210095

摘要 从浙江地区分离的 2 株代表性样品与全国范围内流行的参考毒株进行比对和遗传进化分析, 结果分为 4 个组, 代表性样品与大部分国内的毒株落入 G4-2 组, 与国内早期 CH-S 毒株核苷酸(氨基酸)同源性为 98.4%~98.5% (99.1%~99.6%); 以华南地区为主的 2011—2012 年分离的毒株自成一组, 与中国其他地区的毒株的同源性为 95.0%~97.2%, 与其余 3 组比较有 9 个核苷酸的变异。遗传进化分析表明所分离毒株与大部分中国的流行毒株属于一个基因型; 以 2011—2012 年中国华南地区为主的毒株成为 PEDV 的一个新的基因型; 提示 2011—2012 年中国流行着 2 种 PEDV 的基因型。

关键词 猪流行性腹泻病毒; 分子流行病学; ORF3 基因; 遗传变异

中图分类号 S 852.65⁺1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2014)05-0085-08

猪流行性腹泻是由猪流行性腹泻病毒(PEDV)引起的, 以猪呕吐、腹泻、脱水为特征的急性高度接触性肠道传染病, 各种年龄的猪均可感染, 以哺乳仔猪发病和死亡最为严重。PEDV 属于冠状病毒科(Coronaviridae)冠状病毒属(*Coronavirus*), 基因组为不分节段的线性单股正链 RNA, 靠近 3' 端 5 kb 区域内有 5 个主要的开放阅读框, 编码有典型的冠状病毒结构蛋白: N 蛋白、M 蛋白、sM 蛋白和 S 蛋白; ORF3 蛋白位于 sM 蛋白和 S 蛋白之间, 编码 224 个氨基酸多肽, 是 PEDV 基因组编码的唯一 1 个辅助蛋白。该病于 1971 年首次在英国报道, 后相继在比利时、德国、瑞士、日本等国家报道, 我国在 1976 年首次报道并分离毒株。随后, 中国使用欧洲株 CV777 的灭活苗或减毒苗进行防控, 极大地减少了该病的发生^[1-2]。但自 2010 年冬至 2011 年初, 我国华南、华东和华北等地区开始暴发严重的仔猪腹泻疫情, 哺乳仔猪表现水样腹泻、呕吐等主要临床特征和肠道出血的主要病理特征, 发病猪场哺乳仔猪的发病率 100%, 死亡率在 80% 以上, 尤其是 5 日龄内的仔猪, 死亡率高达 100%, 给我国养猪业带来

巨大经济损失。为能更好地预防和控制该病暴发和流行, 有必要对该病原体 PEDV 进行基因遗传进化分析。Chen 等^[3]对 12 株中国不同地区的野毒株进行 ORF3 基因的分析, 表明中国毒株与韩国毒株有很近的遗传进化关系, 而且远离 PEDV 疫苗株。Yang 等^[4]分析 15 株 PEDV 毒株的 ORF3 基因和 M 基因, 表明在中国新近流行的 PEDV 毒株有了一定程度的变异和进化, 是一个新的基因型。Gao 等^[5]通过分析 15 株 PEDV 毒株的 S 基因和 M 基因发现, 新流行的毒株在 S 基因上有一个共同的特征。近几年, PEDV ORF3 蛋白的功能逐步被揭示, Wang 等^[6]证明其是一种离子通道蛋白, 当 ORF3 基因的表达受到抑制后, 病毒在 Vero 细胞上的产量明显降低; 当 PEDV 毒株适应细胞后, ORF3 基因发生改变, PEDV 的毒力也随之降低^[7]; Park 等^[8-9]通过 ORF3 基因的遗传进化树分析, 证明 ORF3 基因可以作为区分高度适应细胞的弱毒株与野毒株的遗传标记, 而且 ORF3 基因也可以作为猪流行性腹泻分子流行病学调查的一个有效的工具^[3,8-9]。由此可以看出, ORF3 基因的确与 PEDV

收稿日期: 2013-12-10

基金项目: 国际科技合作与交流专项(2013DFG32370)

董世娟, 副研究员。研究方向: 新发动物疫病的防控技术研究与应用。E-mail: dsjnm@163.com

通信作者: 李震, 博士, 研究员。研究方向: 新发动物疫病的防控技术研究与应用。E-mail: zhenli60@163.com

的毒力相关,采用 *ORF3* 基因研究新近流行 PEDV 毒株的遗传变异规律具有可行性。目前尚未见到对全国所有分离的 PEDV 流行毒株的遗传进化分析报道。笔者对浙江某地及全国范围内流行的 PEDV 毒株进行遗传进化分析,旨在了解国内 PEDV 流行毒株的遗传进化状况,为新发 PEDV 的研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验样品及处理

2011 年 12 月于浙江某猪场采集的 49 份腹泻仔猪的肛门拭子,用 pH 7.4 PBS 缓冲液适当稀释,反复冻融 3 次,−80 °C 保存备用。

1.2 引物设计与合成

基于 GenBank 上发表的 PEDV 的 *ORF3* 基因序列,利用 Primer premier 5.0 软件设计引物,上游引物:5′-CCTAGACTTCAACCTTACGA-3′,下游引物:5′-CAGGAAAAGAGTACGAAA-3′,扩增片段长度为 774 bp,引物由上海生工生物技术有限公司合成。

1.3 RNA 抽提

按照 Trizol reagent 说明书进行操作,抽提的 RNA 溶解在 20 μL RNase-free 的 DEPC 水中,并储存在−70 °C 冰箱。

1.4 *ORF3* 基因扩增

25 μL 反转录系统包含 PEDV RNA 10 μL, 10×Buffer 5 μL, 2.5 mmol/L dNTP 4 μL, PEDV 下游引物 1 μL, M-MLV 反转录酶 1 μL, RNA 酶抑制剂 0.5 μL, ddH₂O 3.5 μL, 室温下混匀后, 42 °C, 60 min; 72 °C, 15 min。PCR 总反应体系为 25 μL, 包含反转录产物 1 μL, *ORF3* 上游引物 1 μL (10 μmol/L), 下游引物 1 μL (10 μmol/L), dNTP 2 μL, Buffer 2.5 μL, EXTaq 0.25 μL, 然后用 ddH₂O 补足至 25 μL。反应条件: 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环, 72 °C 延伸 5 min。

1.5 PCR 产物克隆、测序以及 *ORF3* 基因遗传进化分析

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定后,克隆至 pMD18-T 载体中,转化后挑取阳性克隆,进行 PCR 和酶切鉴定,送至上海华大基因科技有限公司进行测序。测定结果与 GenBank 中登录的 65 条 PEDV 的 *ORF3* 基因的核苷酸和氨基酸序列进行同

源性分析,用 ClustalX 1.8 和 MEGA 3.1 等软件进行遗传进化树分析。

2 结果与分析

2.1 *ORF3* 基因的序列

采自浙江某地猪场的 49 份样品,经 PCR 扩增和测序后,41 份样品为 PEDV 阳性,序列经比对后同源率为 99.6%~100%。其中的 2 条序列 CH-HZ-11(KC688871)、CH-HZ-11-2(KC81653)已递交至 GenBank。

2.2 *ORF3* 基因进化树分析

2 株代表性样品与 GenBank 中参考序列(表 1)构建的系统进化树(图 1)表明:PEDV 共分成 4 组(G1、G2、G3、G4 及 G4 的 2 个亚组 G4-1、G4-2)。2011—2012 年主要来自广东、广西两省(区)的 9 条序列与其他省的 3 条序列组成独立的 G1 组,欧洲的 CV777 及兰州的毒株 LZC 毒株构成 G2 组,韩国的减毒疫苗株 atDR13、欧洲 CV777 疫苗株与中国 CH-GS111-07、SD-M 毒株构成 G3 组,在 G4 中,韩国的 14 个毒株(2003—2007 年)独立构成 G4-1 亚组,中国 2006—2012 年的毒株与 4 条韩国 2007 年的毒株构成 G4-2 亚组,本文所测代表性毒株属于 G4-2 亚组。

2.3 *ORF3* 基因遗传进化分析

本研究中扩增的 *ORF3* 基因片段长度为 774 bp,包含完整的 *ORF3* 阅读框,675 个核苷酸编码 224 个氨基酸片段。在 ATG 启动子上游有 46 个核苷酸的一个基序(CTAGAC)。经 DNASTar 软件进行核苷酸序列分析后,CH-HZ-11、CH-HZ-11-2 两个毒株与经典 CV777 毒株相比有 20 个变异位点,其中有 8 个位点导致氨基酸发生变化;与 DR13 毒株比较有 12 个变异位点,其中 1 个位点导致氨基酸发生变化;与 CV777 疫苗株相比(除了 CV777 疫苗株有大片段缺失外)有 12 个变异位点,与国内前期毒株 CH-S 相比有 12 个核苷酸变异位点,但无氨基酸的统一变化。

经核苷酸序列分析后,每组的序列都有特异、统一的变化(表 2),G1 组有 9 个核苷酸变化,其中 208 位的核苷酸变化导致氨基酸发生变化(I→V)。G2 组有 6 个核苷酸变化,其中有 4 处导致氨基酸发生变化(62 位 A→V, 160 位 V→I, 274 位 F→L, 301 位 T→A)。G3 主要是 DR13 的疫苗株 atDR13(EU054930)在 245~295 处有 51 个核苷酸的缺失,

CH-GSJ111-07、DBI855、SD-M 等毒株均在 247 ~ 295 处有 49 个核苷酸的缺失。G4 组中 2 个亚组在 393 bp 处(除 CH-GSJII-07 毒株外)有统一的核苷

酸变化。G4-1 与 G4-2 亚组相比(除了 CH-S 毒株外),有 2 个独特核苷酸的变异(63、237 处均是 G4-1 为 C,G4-2 为 T)。

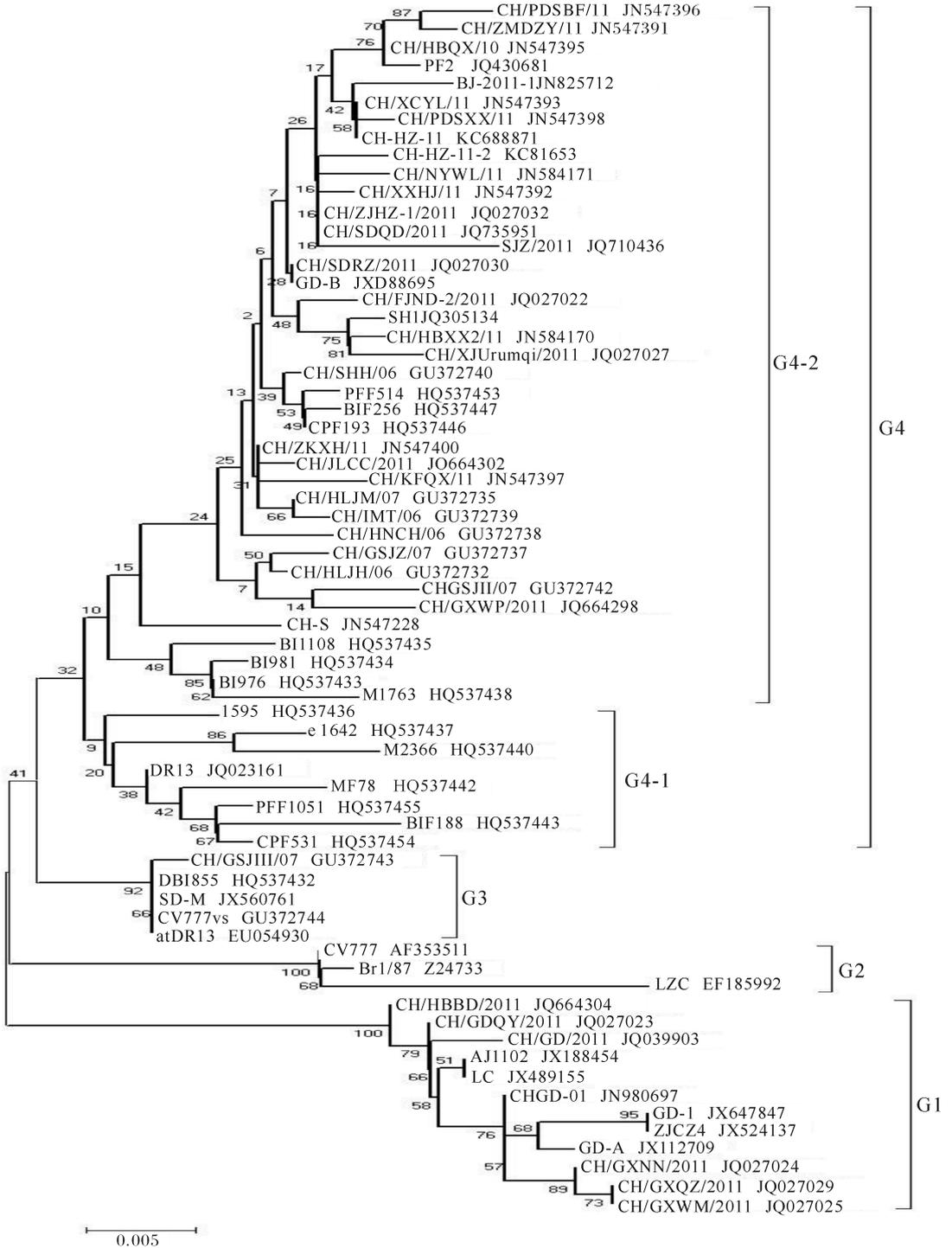


图 1 PEDV ORF3 基因遗传进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of nucleotide sequence of two Zhejiang PEDV field isolates (CH-HZ-11 and CH-HZ-11-2) and other PEDV reference strains based on the full-length ORF3 gene

表 1 PEDV 参考毒株

Table 1 PEDV strains used for sequence alignment and phylogenetic analysis

| 毒株名称 Reference strain | 登录号 Accession No. | 来源 Origin | 分离年份 Year of isolation | 毒株名称 Reference strain | 登录号 Accession No. | 来源 Origin | 分离年份 Year of isolation |
|--------------------------|----------------------|--------------|---------------------------|--------------------------|----------------------|--------------|---------------------------|
| GD-B | JX088695 | 中国 China | 2012 | SD-M | JX560761 | 中国 China | 2012 |
| PF2 | JQ430681 | 中国 China | 2012 | GD-A | JX112709 | 中国 China | 2012 |
| CH/FJND-2/2011 | JQ027022 | 中国 China | 2011 | CH/NYWL/11 | JN584171 | 中国 China | 2011 |
| CHGD-01 | JN980697 | 中国 China | 2011 | CH/PDSBF/11 | JN547396 | 中国 China | 2011 |
| CH/GD/2011 | JQ039903 | 中国 China | 2011 | CH/PDSXX/11 | JN547398 | 中国 China | 2011 |
| CH/GDQY/2011 | JQ027023 | 中国 China | 2011 | CH/SDQD/2011 | JQ735951 | 中国 China | 2011 |
| CH/GXNN/2011 | JQ027024 | 中国 China | 2011 | GD-1 | JX647847 | 中国 China | 2011 |
| CH/GXQZ/2011 | JQ027029 | 中国 China | 2011 | CH/JLCC/2011 | JQ664302 | 中国 China | 2011 |
| CH/GXWM/2011 | JQ027025 | 中国 China | 2011 | CH/HBBD/2011 | JQ664304 | 中国 China | 2011 |
| CH/GXWP/2011 | JQ664298 | 中国 China | 2011 | CH/HBQX/10 | JN547395 | 中国 China | 2011 |
| AJ1102 | JX188454 | 中国 China | 2011 | CH/KFQX/11 | JN547397 | 中国 China | 2011 |
| CH/HBXX2/11 | JN584170 | 中国 China | 2011 | BJ-2011-1 | JN825712 | 中国 China | 2011 |
| LC | JX489155 | 中国 China | 2011 | ZJCZ4 | JX524137 | 中国 China | 2011 |
| CH/XCYL/11 | JN547393 | 中国 China | 2011 | SJZ/2011 | JQ710436 | 中国 China | 2011 |
| CH/XJUrumsqi/2011 | JQ027027 | 中国 China | 2011 | CH/ZMDZY/11 | JN547391 | 中国 China | 2011 |
| CH/XXHJ/11 | JN547392 | 中国 China | 2011 | CH/ZJHZ-1/2011 | JQ027032 | 中国 China | 2011 |
| CH/SDRZ/2011 | JQ027030 | 中国 China | 2011 | CH/ZKXH/11 | JN547400 | 中国 China | 2011 |
| CV777vs | GU372744 | 中国 China | 2009 | CH/HLJM/07 | GU372735 | 中国 China | 2007 |
| CH/GSJII/07 | GU372742 | 中国 China | 2007 | CH/GSJ III /07 | GU372743 | 中国 China | 2007 |
| CH/GSJZ/07 | GU372737 | 中国 China | 2007 | CH/IMT/06 | GU372739 | 中国 China | 2006 |
| CH/HNCH/06 | GU372738 | 中国 China | 2006 | CH/HLJH/06 | GU372732 | 中国 China | 2006 |
| CH/SHH/06 | GU372740 | 中国 China | 2006 | CH/S | JN547228 | 中国 China | 1986 |
| LZC | EF185992 | 中国 China | 2006 | SH1 | JQ305134 | 韩国 Korea | 2011 |
| DR13 | JQ023161 | 韩国 Korea | 2009 | BIF256 | HQ537447 | 韩国 Korea | 2007 |
| PPF514 | HQ537453 | 韩国 Korea | 2007 | CPF193 | HQ537446 | 韩国 Korea | 2007 |
| MF78 | HQ537442 | 韩国 Korea | 2007 | BIF188 | HQ537443 | 韩国 Korea | 2007 |
| PPF1051 | HQ537455 | 韩国 Korea | 2007 | CPF531 | HQ537454 | 韩国 Korea | 2007 |
| M2366 | HQ537440 | 韩国 Korea | 2004 | BI981 | HQ537434 | 韩国 Korea | 2003 |
| M1763 | HQ537438 | 韩国 Korea | 2003 | 1595 | HQ537436 | 韩国 Korea | 2003 |
| BI976 | HQ537433 | 韩国 Korea | 2003 | BI1108 | HQ537435 | 韩国 Korea | 2003 |
| e1642 | HQ537437 | 韩国 Korea | 2003 | DBI865 | HQ537432 | 韩国 Korea | 2002 |
| atDR13 | EU054930 | 韩国 Korea | | CV777 | AF353511 | 比利时 Belgium | 1993 |
| Br1/87 | Z24733 | 英国 Britain | 1987 | | | | |

G1 组毒株和 G4-2 亚组的一个分支中的毒株同属于 2011—2012 年,但 G1 的毒株却自成一组,来源主要以广东、广西地区为主(除 AJ1102、CH/HBBD/2001 与 ZJCZ4 外)。G1 组与其余 3 组的遗传变异分析如下:G1 组和 G2 组相比有 21 个核苷酸差异(表 3),其中有 9 处导致氨基酸的变化(39 位 V→A,160 位 V→I,208 位 I→V,235V→I,274L→F,301A→T,320C→F,497N→S,502D→N)。G1 组和 G3 组相比,有 8 个核苷酸的差异(G3 组除了

大片段的核苷酸的缺失外)。G1 和 G4 相比有 2 个核苷酸的差异,其中 238 bp 处导致氨基酸发生变化 V→F。G1 和 G4-1 亚组相比有 2 个核苷酸的差异,但均没有氨基酸发生变化;与 G4-2 亚组相比有 2 个核苷酸的变化,其中 502 bp 处引起氨基酸发生变化 D→N,237 bp 处无氨基酸变化(除了 SJZ-2011 外)。

2.4 ORF3 基因的同源性分析

对本文的参考序列与代表性毒株序列进行核苷酸和相应氨基酸同源性分析(表 4),G1 组内所有核

苷酸(及氨基酸)序列同源性为 98.8%~99.9% (98.7%~100%),与 G2、G3、G4-1、G4-2 的核苷酸(及氨基酸)序列同源性分别为 94.5%~96.6% (93.3%~96.0%)、96.1%~97.6% (97.1%~98.6%)、95.6%~97.6% (96.0%~98.7%)、95.0%~97.2% (94.7%~98.2%)。G2 组内毒株间的同源性为 98.5%~100% (98.2%~100%),与 G3、G4-1、G4-2 的同源性分别为 96.3~98.1% (95.7%~97.6%)、95.6%~98.1% (94.2%~96.9%)、95.3%~97.5% (93.8%~96.9%)。G3 组内核苷酸同源性为 99.8%~100% (由于 CV777 疫苗株、CH/GSJIII/07、SD-M 毒株编码的是截短的蛋白,而 atDR13 (EU054930) 编码的是完整的

ORF3 阅读框,分析氨基酸序列同源性时只使用 at-DR13 (EU054930) 的序列和其他 3 组做了分析),与 G4-1、G4-2 亚组的同源性为 97.3%~98.9% (98.1%~99.5%)、97.0%~99.0% (98.1%~99.5%),G4 组同源性为 96.9%~100% (96.4%~100%),G4-1 与 G4-2 的同源性为 96.9%~99.1% (96.9%~100%)。

CH-HZ-11 与 CH-HZ-11-2 毒株序列的同源性为 99.6%,2 株序列与国内前期毒株 CH-S 的核苷酸(氨基酸)同源性为 98.4%~98.5% (99.1%~99.6%),与本文中 G1 组的同源性为 95.6%~96.7% (96.0%~97.8%)。分析 2 株序列与韩国经典毒株 DR13、欧洲毒株 CV777、CV777 疫苗株核苷

表 2 不同组核苷酸的变化¹⁾

Table 2 Nucleotide changes between groups

| 组别 Group | 4 组比较变异位点/bp Sites of mutation | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------|--------------------------------|-----|----------------|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----------------|-----|-----|
| | 62 | 135 | 160 | 208 | 238 | 243 | 274 | 301 | 318 | 320 | 336 | 360 | 381 | 393 | 480 | 497 |
| G1 | C | T | A | G | G | T | T | A | C | T | T | C | T | T | C | G |
| G2 | T | G | G | A | A | C | C | G | T | G | C | T | G | T | T | A |
| G3 | C | G | A | A | A | T | - | A | T | G | C | C | G | T | T | A |
| G4 | C | G | A ^a | A ^a | A | T | T | A | T | G | C | C | G | C ^b | T | A |

1)a:这两处除毒株 SJZ-2011 为 G 外,其余皆为 A。Nucleotide of SJZ-2011 strain position 160,208 is G, and other strains are A. b:除 CH-GSJ11-07 为 T 外,其余皆为 C。Nucleotide of CH-GSJ11-07 strain position 393 is T, and other strains are C. “-”G3 组在 274 bp 处有一个核苷酸的缺失。下同。“-” there is one nucleotide deletion at position 274 bp in G3 group. The same as below.

表 3 G1 组分别与 G2、G3、G4 组比较后核苷酸的变化

Table 3 Nucleotide changes between G1 group and other groups

| 组别 Group | 变异位点/bp Sites of mutation | | | | | | | | | | | |
|-------------|---------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 39 | 54 | 99 | 235 | 237 | 294 | 339 | 450 | 502 | 573 | 597 | |
| G1 | C | T | T | A | C | C | C | T | A | T | G | |
| G2 | T | G | C | G | C | T | C | G | G | T | G | |
| G3 | C | G | C | A | T | - | A | T | G | C | A | |
| G4 | G4-1 | T | A/G | C/T | A/G | C | T | C | T | G/A | T | G |
| | G4-2 | C/T | A/G | C | A/G | T | T | C/T | T/C | G | T/C | G/A |

表 4 PEDV 参考毒株与 CH-HZ-11 毒株基于 ORF3 基因分析后,组间核苷酸和氨基酸的同源性分析¹⁾

Table 4 Nucleotide and deduced amino acid sequence similarity based on the full-length ORF3 genes of the Zhejiang PEDV field isolates and PEDV reference strains

| 组别 Group | G1 | G2 | G3 | G4 | | % |
|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| | | | | G4-1 | G4-2 | |
| | | | | G1 | | |
| G2 | 94.5~96.6 | | 95.7~97.6 | 94.2~96.9 | 93.8~96.9 | |
| G3 | 96.1~97.6 | 96.3~98.1 | | 98.1~99.5 | 98.1~99.5 | |
| G4 | G4-1 | 95.6~97.6 | 95.6~98.1 | 97.3~98.9 | | 96.9~100.0 |
| | G4-2 | 95.0~97.2 | 95.3~97.5 | 97.0~99.0 | 96.9~99.1 | |

1)表格右上部三角形和左下部三角形分别为氨基酸同源性分析和核苷酸同源性分析 Upper and lower triangles indicate percent amino acid(aa) and nucleotide(nt) sequence similarity, respectively.

酸(氨基酸)同源性分别为 98.4%~98.5% (99.1%~99.6%)、96.7%~96.9% (96.0%~96.4%)、97.6%~97.8%。

3 讨论

2006年前,我国猪场使用 CV777 的弱毒苗或灭活苗预防 PED,使得 PED 处于可防控状态;2006年到 2010年间,免疫疫苗的猪场偶尔会暴发 PED^[10];2010年后,PED 在中国超过 10个省区流行,甚至用疫苗免疫的猪场也发病,这引起全国各地兽医学者的急切关注。

本研究中,采用 RT-PCR 方法对浙江某猪场 49份样品的 PEDV 的 ORF3 基因进行检测,结果有 41份样品为阳性,阳性率为 80%。测序后,选择 2株样品 CH-HZ-11、CH-HZ-11-2 的序列登录到 GenBank 中,所测序列包含完整的 ORF3 基因 675 bp,编码 224 个氨基酸。每条序列启动子 ATG 上游均含有 46 个核苷酸的基序。文献报道这些基序是亚基因组 mRNA 转录的起始位点^[11-12]。

本文把 CH-HZ-11、CH-HZ-11-2 毒株序列同 GenBank 中所有 ORF3 的序列进行比对,构建系统进化树,然后剔除 100%同源或同一地区高度同源的毒株序列,共 67 条序列进行遗传进化分析。此次分组地域性明显,共分成 4 组,主要以华南地区为主的毒株组成 G1 组;以 CV777 为代表的欧洲毒株组成 G2 组;韩国的 DR13、欧洲的 CV777 毒株的疫苗株组成 G3 组,其中包括中国最近分离的 1 株 SD-M,还有 2007 年分离的 CH-GSJ111-07 毒株。G4 组分为 2 个亚组(G4-1, G4-2),G4-1 亚组主要以韩国 2003—2009 年之间的毒株为主。G4-2 亚组以中国 2006—2012 年一些毒株为主,也包含了 3 株韩国 2007 年的毒株,其中中国 2006—2008 年的毒株自成一簇,而 2011 年到 2012 年的毒株自成一簇。由此可以看出,ORF3 基因除可以区分弱毒的疫苗株和强毒株,还可以区分中国、欧洲与韩国等不同国家的毒株。

韩国学者 Park 等^[9]报道通过 ORF3 基因序列分析,PEDV 分成 3 组(没有包含中国新发的毒株);Pan 等^[13]报道了 CHGD-01 毒株的全基因序列,并根据 ORF3 的氨基酸序列进行了分析,表明 CHGD-01 毒株为 1 个单独的分支,并列为单独的一组;Yang 等^[4]选了 15 株病毒进行分析,分成 3 组,从进

化树上,CHGD-01 毒株单独 1 个分支,由于两广地区的毒株就仅此一株,被分在和欧洲毒株 CV777 为 1 组。而本文中 G1 组的 CHGD-01 和其他两广地区(8 株)、河北(1 株)、浙江(1 株)、湖北(1 株)的毒株属于 1 个独立的分支,与其他 3 组相比有 9 个核苷酸的变异。G1 组有很明显的地域性,主要由两广地区毒株组成,结合 Pan 等^[13]的报道,证明华南地区 PEDV 毒株基因发生变异后,远离目前内地流行的毒株(同源性为 95.0%~97.2%),成为 1 个新的基因型。这个结论也得到了全基因序列分析的证实。Wei 等^[14]分析广东毒株 GD-1 的全基因序列,表明此株病毒与 GD-A 和 AJ1102 归为同一个组,与疫苗毒株 CV777 和其他国外毒株(包括 DR13)关系较远,成为 1 个新的基因型。施标等^[15]对 2011—2012 年国内新流行的毒株的全基因进行遗传进化分析,结果表明 GD-1、GD-A、CHGD-01、AJ1102 与 ZJCZ4 几个流行毒株单独形成 1 个大的分支,自成 1 组,表明新近流行毒株已成为 1 个新的基因型,与国内前期分离毒株亲缘关系较远。

本文所测毒株属于 G4-2 组,2 株序列核苷酸与氨基酸同源性均为 99.6%,与国内前期毒株 CH-S 的同源性高于与 G1 组的同源性,与 CH-S 相比有 12 个变异位点,有了一定的变异,与韩国毒株亲缘关系较近。相比较欧洲毒株,所有的中国毒株(G1, G4-2)都和韩国毒株亲缘关系比较近,在剔除 100%同源的序列时,中国 CH-HNHJ-08、CH-JL-08、CH-SHH-06 三个毒株同属 G4-2 组且和韩国的 CPF299 毒株 100%同源,从进化树分支上看,中国 2003—2009 年的毒株与韩国毒株更亲近。新近流行的部分毒株与中国 2003—2009 年流行的毒株属于同一组的不同分支,表明新近流行的毒株与 2009 年以前流行的毒株相比,有了一定的变异和进化;另外华南地区流行的一些毒株已进化成为 1 个新的基因型。本结论与 PEDV S、M 基因的遗传进化分析是一致的。Yang 等^[4]分析了华中地区的 15 株 PEDV 的 M 基因与 ORF3 基因,结果这些毒株与 2007 年后的中国毒株、泰国毒株以及韩国毒株关系密切,且所分析中国毒株分属于不同的亚组,表现出一定的遗传变异。Li 等^[16]分析了 2011 年收集的 9 个毒株的 S 基因序列,结果有 3 个毒株包括本文所用 CHGD-01 毒株自成 1 支,其他毒株与国内早期毒株归为 1 组。结合以上 S 基因及 M 基因的分析,本文认为

2011—2012年国内普遍流行于猪场的 PEDV 毒株有 2 个基因型。

同一地区同一年代的毒株经过 ORF3 基因的遗传进化分析后,落入不同的组,如广东毒株 GD-B、广西毒株 CH-GXWP-2011 毒株在 G4-2 组,而广东毒株 GD-A、广西毒株 CH-GXWM-2011 毒株在 G1 组,从而说明中国新近流行的 PEDV 毒株呈现多元化变异和进化,形成基因的多样性。不同地区之间的毒株之间存在差异,同一地区的毒株变异也大到属于不同的组。但是有一些不同分离地的毒株亲缘关系又很相近,有的几乎 100% 同源。如 G1 组 GD-1 与 ZJCZ4 100% 同源,剔除 100% 同源序列时,中国黑龙江毒株 CH/HLJHG/2011、北京毒株 CH/BJYQ/2011 与福建毒株 CH/FJND-2/2011ORF3 基因完全相同,同属于 G4-2 组。

Li 等^[17]通过 M 基因分析结果表明,中国华南地区的 PEDV 毒株与多数的韩国和泰国毒株关系密切,与疫苗毒株(CV777)关系较远,本文通过 ORF3 基因分析再次证实目前中国大部分地区流行的毒株已远离 CV777 疫苗株。从临床上看,本次分离的 CH-HZ-11 毒株的分离猪场已免疫 CV777 疫苗,而且很多已免疫疫苗的猪场也没能避免此次 PEDV 大流行^[4]。原因可能是 PEDV 基因经过多元化变异,导致 CV777 疫苗已无法达到应有的保护效果。

本文对中国新近流行 PEDV 毒株 ORF3 基因进行了遗传变异分析,分析表明 ORF3 基因除可以区分弱毒的疫苗株和强毒株,还可以区分中国、欧洲与韩国等不同国家的毒株,ORF3 基因可以作为区分 PEDV 基因型的遗传标记。

参 考 文 献

- [1] 马思齐,王明,冯力,等.猪传染性胃肠炎与猪流行性腹泻二联氢氧化铝细胞灭活疫苗的研究[J].中国畜禽传染病,1995(17):23-27.
- [2] 佟有恩,冯力,李伟杰,等.猪传染性胃肠炎与猪流行性腹泻病毒二联弱毒疫苗的研究[J].中国预防兽医学报,1999,21(6):406-410.
- [3] CHEN J, WANG C, SHI H, et al. Molecular epidemiology of porcine epidemic diarrhea virus in China[J]. Archives Virology, 2010, 155: 1471-1476.
- [4] YANG X, HUO J, CHEN L, et al. Genetic variation analysis of reemerging porcine epidemic diarrhea virus prevailing in Central China from 2010 to 2011[J]. Virus Genes, 2013, 46(2): 337-344.
- [5] 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.
- [6] WANG K, LU W, CHEN J F. PEDV ORF3 encodes an ion channel protein and regulates virus production[J]. FEBS Letters, 2012, 586: 384-391.
- [7] SONG D S, YANG J S, OH J S, et al. Differentiation of a vero cell adapted porcine epidemic diarrhea virus from Korean field strains by restriction fragment length polymorphism analysis of ORF 3[J]. Vaccine, 2003, 21: 1833-1842.
- [8] PARK S J, MOON H J, LUO Y, et al. Cloning and further sequence analysis of the ORF3 gene of wild- and attenuated -type porcine epidemic diarrhea viruses[J]. Virus Genes, 2008, 36: 95-104.
- [9] PARK S J, KIM H K, SONG D S, et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) field isolates in Korea[J]. Archives Virology, 2011, 156: 577-585.
- [10] CHEN J, SUN D, WANG C, et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of membrane protein genes of porcine epidemic diarrhea virus isolates in China[J]. Virus Genes, 2008, 36: 355-364.
- [11] DUARTE M, TOBLER K, BRIDGEN A, et al. Sequence analysis of the porcine epidemic diarrhea virus genome between the nucleocapsid and spike protein genes reveals a polymorphic ORF[J]. Virology, 1994, 198: 466-476.
- [12] LAI M M C. Coronavirus: organization, replication and expression of gene[J]. Annual Review of Microbiology, 1990, 44: 303-333.
- [13] PAN Y, TIAN X, LI W, et al. Isolation and characterization of a variant porcine epidemic diarrhea virus in China[J]. Virology Journal, 2012, 9: 195-204.
- [14] WEI Z Y, LU W H, LI Z L, et al. Complete genome sequence of novel porcine epidemic diarrhea virus strain GD-1 in China[J]. Journal of Virology, 2012, 86(24): 13824-13825.
- [15] 施标,董世娟,朱于敏,等.中国猪流行性腹泻病毒分子流行病学研究进展[J].中国农业科学,2013,46(20):4362-4369.
- [16] LI W, LI H, LIU Y, et al. New variants of porcine epidemic diarrhea virus, China[J]. Emerging Infectious Diseases, 2012, 18(8): 1350-1353.
- [17] LI Z, ZHU L, MA J, et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus field strains in South China[J]. Virus Genes, 2012, 45(1): 181-185.

ORF3 gene genetic variation analysis of porcine epidemic diarrhea virus prevailing in China

DONG Shi-juan^{1,2} ZHU Yu-min^{1,2} YU Rui-song^{1,2} SI Fu-sheng^{1,2}
SHI Ming-ming^{1,2} ZHANG Yuan-shu³ LI Zhen^{1,2}

1. *Animal Husbandry and Veterinary Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China;*
2. *Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Shanghai 201106, China;*
3. *College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China*

Abstract The geno-variation and genetic evolution of the *ORF3* gene of porcine epidemic diarrhea viruses (PEDV) prevailing in China were studied. Phylogenetic analysis of the *ORF3* gene from two representative PEDV isolates from Zhejiang area and 65 PEDV reference strains from other area in China were conducted. The results showed that the 67 *ORF3* sequences were clustered into four groups. The strains obtained from Zhejiang in the study fell into G4-2 subgroup, which included the majority of strains studied. The newly obtained strains in this study were highly homologue with the CH-S strain, with a nucleotide identity of 98.4%-98.5% and a deduced amino acid identity of 99.1%-99.6%. The *ORF3* gene of strains isolated from south China during 2011 and 2012 constituted G1 group, which had identities of 95.0% to 97.2% in nucleotide and unique nine nucleotide variations compared with other strains. In summary, the strains from Zhejiang area and most other strains studied were clustered into the G4-2 group, while the strains from Southern China were clustered into the G1 group, indicating that there were two different genotypes of PEDV prevailing in China during 2011 and 2012.

Key words porcine epidemic diarrhea virus; molecular epidemiology; *ORF3* gene; genetic variation

(责任编辑:边书京)