

陈如敬, 吴学敏, 车勇良, 等. 猪嵴病毒福建株 3D 基因的克隆及遗传进化分析 [J]. 福建农业学报, 2012, 27 (9): 941-944.

CHEN R-J, WU X-M, CHE Y-L, et al. Cloning and Evolution Analysis of the 3D Gene of Porcine Kobuvirus in Fujian [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2012, 27 (9): 941-944.

## 猪嵴病毒福建株 3D 基因的克隆及遗传进化分析

陈如敬, 吴学敏, 车勇良, 王隆柏, 魏 宏, 庄向生, 刘玉涛, 严 山, 周伦江

(福建省农业科学院畜牧兽医研究所/福建省畜禽疫病防治工程技术研究中心, 福建 福州 350013)

**摘要:** 根据 GenBank 中登录的猪嵴病毒 (porcine kobuvirus, PKV) 3D 基因序列特征设计特异性引物, 采用 RT-PCR 方法从福建省某猪场采集腹泻粪便样品和小肠组织混合物中扩增猪嵴病毒 3D 基因, 将扩增后的目的片段克隆后进行序列测定。结果表明, 所扩增的目的片段编码有完整的 3D 开放阅读框, 全长为 1 407 bp, 编码有 468 个氨基酸。运用生物信息学软件, 将获得 3D 基因序列和 GenBank 的猪嵴病毒株 3D 基因序列进行分析比较, 该毒株的 3D 基因序列和 SH-W-CHN/2010/China 毒株的核苷酸同源性最高, 为 93.6%, 与 WH1 株核苷酸同源性最低, 为 92%。从遗传进化上看, 猪嵴病毒和其他中国株在遗传进化上处在一个同一分支, 匈牙利分离株处在另一分支, 表明猪嵴病毒可能在欧亚大陆上各自独立进化。

**关键词:** 猪嵴病毒; 3D 基因; 遗传进化分析

中图分类号: S 852

文献标识码: A

### Cloning and Evolution Analysis of the 3D Gene of Porcine Kobuvirus in Fujian

CHEN Ru-jing, WU Xue-min, CHE Yong-liang, WANG Long-bai, WEI Hong, ZHUANG Xiang-sheng,

LIU Yu-tao, YAN Shan, ZHOU Lun-jiang

(Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine/Fujian Animal Diseases Control Technology Development Center, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350013, China)

**Abstract:** The 3D gene of porcine kobuvirus was amplified by RT-PCR from tissues of piglets association with diarrhea from Fujian and then sequenced. The results showed that the porcine kobuvirus 3D gene was 1 407 bp in length, coding an open reading frame (ORF) containing 468 amino acids. Compared with the published PKV 3D genes by the bioinformatics software, the sequenced gene shared the highest homogeneity with SH-W-CHN/2010/China strain of 93.6%. In the phylogenetic tree, the porcine kobuvirus Fujian strain was at the same branch with other strains isolated in China while the Hungarian isolates share another branch, which indicated that the porcine kobuvirus had its own evolution status in different continents.

**Key words:** porcine kobuvirus; 3D gene; evolution analysis

猪嵴病毒 (porcine kobuvirus, PKV) 属于微小核糖核酸病毒科 (Picornaviridae), 该科病毒为单股正链无囊膜的小 RNA 病毒, 目前分为 12 个属<sup>[1]</sup>。其中嵴病毒属<sup>[2]</sup>主要有 2 个代表: Aichi 病毒 Aichi virus<sup>[3]</sup> 与牛嵴病毒 bovine kobuvirus<sup>[4]</sup>, 还有一个候选中猪嵴病毒 (porcine kobuvirus, PKV)<sup>[5]</sup>。此外, 在绵羊和山羊等中均有检测到猪嵴病毒<sup>[6-7]</sup>。

猪嵴病毒最早由匈牙利学者在猪粪便中检测到, 并测定其全基因序列<sup>[8]</sup> (S-1-HUN strain, GenBank 号 EU787450), 随后在中国<sup>[9-10]</sup>、泰国<sup>[11]</sup>、比利时<sup>[12]</sup>、日本<sup>[13]</sup>和韩国<sup>[14]</sup>等地均有相关报道。嵴病毒全基因组长度在 8.2~8.4 kb, 其基因组由 5' 非编码区 (5' untranslated region, 5' UTR)、3' 非编码区 (3' untranslated region, 5' UTR) 和 1 个大的单一开放阅读框 (open reading

收稿日期: 2012-07-10 初稿; 2012-08-02 修改稿

作者简介: 陈如敬 (1984-), 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 动物传染病 (E-mail: fjchenrujing@163.com)

通讯作者: 周伦江 (1973-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 畜禽传染病 (E-mail: lunjiang@163.com)

基金项目: 国家公益性行业 (农业) 科研专项 (NYHZX07-034); 福建省财政专项——福建省农业科学院科技创新团队建设项目 (STIF-Y02)

frame, ORF) 组成, 开放阅读框经剪切为结构蛋白 (VP0、VP1、VP2) 和非结构蛋白 (2A、2B、2C、3A、3B、3C、3D)<sup>[2-3,8]</sup>。

本研究设计针对猪嵴病毒 3D 基因的特异性引物, 通过 RT-PCR 方法从福建省某腹泻严重猪场仔猪粪便样品和小肠组织混合物中检测到猪嵴病毒, 克隆得到猪嵴病毒福建株 3D 基因并进行生物信息学分析, 为明确猪嵴病毒 3D 基因编码蛋白的结构与功能及我省猪嵴病毒遗传进化特征提供重要参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 病料收集与处理

采集自福建某猪场表现呕吐、腹泻和脱水严重的仔猪粪便、十二指肠、空肠和肠系膜淋巴结, 置于乳钵剪碎后研磨, 加入双抗 (100 IU · mL<sup>-1</sup>) 的 PBS 按照 1 : 5 比例进行匀浆, 反复冻融 4 次, 8 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min 后吸取上清液, 冻存备用。

### 1.2 试验试剂

MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver. 4.0、Takara RNA PCR Kit (AMV) Ver 3.0、pMD18-T、DL2000 Marker、胶回收试剂盒、质粒小量抽提试剂盒均购自大连宝生物公司, GoTaq Master Green Mix 购自 Promega, DH5 $\alpha$  大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 感受态细胞购自北京全式金公司。

### 1.3 猪嵴病毒福建株 3D 基因的克隆

1.3.1 猪嵴病毒 3D 基因引物设计 参照 GenBank 登录的猪嵴病毒 3D 基因序列设计引物, 预期扩增的目的片段大小约为 1 422 bp, 上游引物: 5'-AACAAATCCATCATCATTCTG-3', 下游引物: 5'-ATCTGGTGTCTCACGCTGCCAA-3', 引物由大连宝生物公司合成。

1.3.2 猪嵴病毒 3D 基因的扩增 参考文献 [15], 用 MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver. 4.0 提取核酸, 并用 Takara RNA PCR Kit (AMV) Ver 3.0 进行 RT-PCR。扩增体系为 100  $\mu$ L, 其中 2  $\times$  GoTaq Master Green Mix 50  $\mu$ L、上下游引物 (20  $\mu$ mol · mL<sup>-1</sup>) 各 2  $\mu$ L、cDNA 模板 2  $\mu$ L, 补充灭菌去离子水至终体积 100  $\mu$ L。反应条件为 94°C 5 min 预变性后进入循环, 循环参数为 94°C 50 s, 55°C 30 s, 72°C 90 s, 30 个循环后, 72°C 延伸 10 min。取 PCR 产物 5  $\mu$ L, 在 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳。经胶回收试剂盒切胶

回收纯化后与 pMD18-T 载体连接, 转化 DH5 $\alpha$  大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 感受态细胞, 随机选择 3 份阳性重组质粒均送由大连宝生物公司进行序列测定。

### 1.4 猪嵴病毒福建株 3D 基因的生物信息学分析

将测序结果经 DNASTar 软件进行拼接, 分析猪嵴病毒福建株 3D 基因和 GenBank 中登录的猪嵴病毒 3D 基因进行核苷酸同源性比较和遗传进化分析, 绘制遗传进化树。

## 2 结果与分析

### 2.1 PKV 3D 基因目的片段的 RT-PCR 鉴定

用所设计的特异性引物进行 RT-PCR 扩增, 结果显示扩增片段大小约 1 400 bp (图 1)。

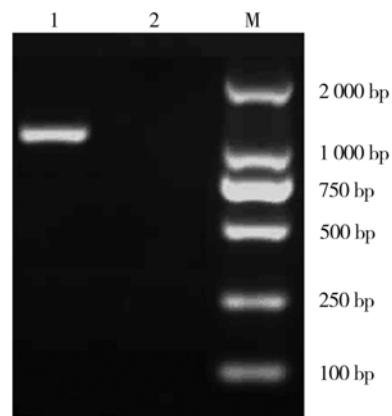


图 1 目的片段的 RT-PCR 扩增

Fig. 1 The target product for the 3D gene of PKV

注: 1 为引物片段; 2 为阴性对照; M 为 DNA Marker 2000

### 2.2 PKV 3D 基因序列分析

利用 DNASTar 软件对测序结果进行分析比较和拼接, 结果表明: 猪嵴病毒福建株的 3D 基因全长为 1 407 bp, 编码有完整的开放阅读框, 由 468 个氨基酸组成, 分子量约为 53.39 kD, 等电点为 6.224。所得的序列向 GenBank 提交, 获得的登录号为 JX676145。

将猪嵴病毒福建株 3D 基因和 GenBank 中登录的猪嵴病毒株进行核苷酸和氨基酸同源性比较 (表 1), 猪嵴病毒福建株 3D 基因核苷酸和氨基酸同源性最高的均为 SH-W-CHN/2010/China, 分别为 93.6% 和 98.3%; 核苷酸同源性最低的是 WUH1 株, 为 92.0%; 而氨基酸同源性最低的是 S-1-HUN 株, 为 97.9%。

### 2.3 PKV 3D 遗传进化分析

将猪嵴病毒福建株 3D 基因和 GenBank 中登录

的猪嵴病毒株 Y-1-CHI、WUH1、SH-W-CHN/2010/China、K-30-HUN/2008/HUN、S-1-HUN, 以 Aichi 病毒为对照, 应用 DNASTar 软件绘制遗

传进化树。结果表明, PKV 在遗传进化上呈 2 个明确的分支, 我国的 4 个分离株和匈牙利分离株分处不同的 2 支。

表 1 猪嵴病毒福建株 3D 基因核苷酸和氨基酸同源性比较

Table 1 Homology analysis for the 3D gene of PKV

	Y-1-CHI	WUH1	SH-W-CHN/2010/China	K-30-HUN/2008/HUN	S-1-HUN
GenBank 登录号	GU292559	JQ692069	JN630514	GQ249161	EU787450
核苷酸同源性/%	92.4	92.0	93.6	92.9	93.0
氨基酸同源性/%	98.1	98.1	98.3	98.1	97.9

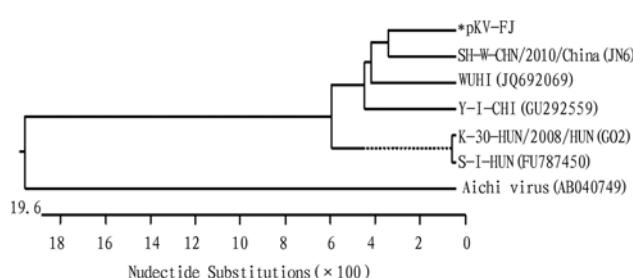


图 2 猪嵴病毒福建株 3D 基因遗传进化

Fig. 2 Phylogenetic tree for the 3D gene of PKV

### 3 讨论与结论

2010 年底, 我国华南地区爆发哺乳小猪“顽固性腹泻”疾病, 并迅速蔓延至全国。该病主要导致哺乳小猪出现水样腹泻、呕吐等主要临床特征和肠道出血, 具有流行范围广、发病地区多、发病率高和死亡率高等特点。福建省于 2011 年 2 月初在沿海地区首先出现, 随后向内陆城市逐步发展, 发病猪场哺乳小猪的发病率 100%, 死亡率在 80% 以上, 尤其是 5 日龄内的仔猪, 死亡率达到 100%, 给养猪业发展造成沉重的打击。但该病病因复杂, 有专家认为是猪流行性腹泻<sup>[15]</sup>或猪传染性胃肠炎, 也有专家认为可能是博卡病毒、猪嵴病毒 (PKV) 或者是新出现的病毒, 或者是多种因素协同致病的结果<sup>[16]</sup>。

科赫法则 (Koch's postulates) 是病毒鉴定金标准, 但是猪嵴病毒至今尚未见有成功培养的报道, 临幊上无法复制该病, 这极大地限制了对该病的深入研究。匈牙利学者 Reuter 等研究结果表明, 临幊上无腹泻症状的猪群, PKV 感染阳性率很高 (26.6%), 病毒感染不仅限于肠道, 可引起病毒血症<sup>[2,5,8,17]</sup>。韩国学者 Park 等研究表明, 在韩国腹泻猪群中普遍存在 PKV 感染, PKV 可能对猪胃肠

炎有协同致病作用<sup>[14,18]</sup>。

猪嵴病毒 3D 含有高度保守的氨基酸模体 (KEDLR、YGDD 和 FLKR), 为病毒 RNA 依赖的 RNA 聚合酶, 推测其与病毒 RNA 的复制增殖有关<sup>[2]</sup>。本研究通过 RT-PCR 方法成功获得猪嵴病毒福建株 3D 全基因序列, 通过核苷酸同源性比较发现, 其 3D 基因较为保守, 核苷酸同源性在 92.0% 以上, 氨基酸同源性在 97.9% 以上, 和本属 Aichi 病毒 (GenBank 登录号 AB040749)<sup>[19]</sup> 的 3D 基因核苷酸同源性仅为 70.1%。从猪嵴病毒 3D 基因遗传进化关系可见, 猪嵴病毒中国分离株和匈牙利分离株分别处在不同的遗传进化分支, 提示猪嵴病毒在欧亚两地可能存在完全独立的进化。

### 参考文献:

- [1] International Committee on Taxonomy of Viruses. Virology Division-IUMS. <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> version=2009 & bhc=1.
- [2] REUTER G, BOROS A, PANKOVICS P. Kobuviruses-a comprehensive review [J]. Rev Med Virol, 2011, 21 (1): 32–41.
- [3] YAMASHITA T, SAKAE K, TSUZUKI H, et al. Complete nucleotide sequence and genetic organization of Aichi virus, a distinct member of the Picornaviridae associated with acute gastroenteritis in humans [J]. J Virol, 1998, 72 (10): 8408–8412.
- [4] REUTER G, EGYED L. Bovine kobuvirus in europe [J]. Emerg Infect Dis, 2009, 15 (5): 822–823.
- [5] REUTER G, BOLDIZS R A, KISS I, et al. Candidate new species of Kobuvirus in porcine hosts [J]. Emerg Infect Dis, 2008, 14 (12): 1968–1970.
- [6] LEE M, JEOUNG H, LIM J, et al. Kobuvirus in South Korean black goats [J]. Virus Genes, 2012, DOI: 10.1007/s11262-012-0745-6.
- [7] REUTER G, BOROS A, PANKOVICS P, et al. Kobuvirus in domestic sheep, Hungary [J]. Emerg Infect Dis, 2010, 16 (5): 869–870.

- [8] REUTER G, BOLDIZS R 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]. *Arch Virol*, 2009, 154 (1): 101–108.
- [9] YU J, JIN M, ZHANG Q, et al. Candidate porcine Kobuvirus, China [J]. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15 (5): 823–825.
- [10] WANG C, LAN D, HUA X. Porcine kobuvirus from pig stool specimens in Shanghai, China [J]. *Virus Genes*, 2011, 43 (3): 350–352.
- [11] KHAMRIN P, MANEEKARN N, KONGKAEW A, et al. Porcine kobuvirus in piglets, Thailand [J]. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15 (12): 2075–2076.
- [12] MAUROY A, SCIPIONI A, MATHIJS E, et al. Molecular detection of kobuviruses and recombinant noroviruses in cattle in continental Europe [J]. *Arch Virol*, 2009, 154 (11): 1841–1845.
- [13] KHAMRIN P, MANEEKARN N, HIDAKA S, et al. Molecular detection of kobuvirus sequences in stool samples collected from healthy pigs in Japan [J]. *Infect Genet Evol*, 2010, 10 (7): 950–954.
- [14] 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]. *Arch Virol*, 2010, 155 (11): 1803–1811.
- [15] 陈如敬, 吴学敏, 车永良, 等. 猪流行性腹泻病毒 FJ-11A 株的分离与 ORF3 基因序列分析 [J]. 福建农业学报, 2011, 26 (6): 947–951.
- [16] 沈素芳, 汤赛冬, 孙泉云, 等. 猪 Kobu 病毒感染概况 [J]. 动物医学进展, 2012, 33 (1): 115–116.
- [17] REUTER G, KECSKÉMETI S, PANKOVICS P. Evolution of porcine kobuvirus infection, Hungary [J]. *Emerg Infect Dis*, 2010, 16 (4): 696–698.
- [18] PARK S J, KIM H K, SONG D S, et al. Molecular detection and genetic characterization of kobuviruses in fecal samples collected from diarrheic cattle in Korea [J]. *Infect Genet Evol*, 2011, 11 (5): 1178–1182.
- [19] SASAKI J, KUSUHARA Y, MAENO Y, et al. Construction of an infectious cDNA clone of Aichi virus (a new member of the family Picornaviridae) and mutational analysis of a stem-loop structure at the 5' end of the genome [J]. *J Virol*, 2001, 75 (17): 8021–8030.

(责任编辑: 柯文辉)