

引用格式:

柳泰, 胡兴业, 毛婉, 谢邵波, 尹德明, 余兴龙. 湖南一株猪非典型瘟病毒的鉴定及其 NS5B 和 E2 基因序列分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2024, 50(5): 98–103.

LIU T, HU X Y, MAO W, XIE S B, YIN D M, YU X L. Identification of a strain of atypical porcine pestivirus in Hunan Province and analysis of its NS5B and E2 gene sequence[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2024, 50(5): 98–103.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



湖南一株猪非典型瘟病毒的鉴定 及其 NS5B 和 E2 基因序列分析

柳泰, 胡兴业, 毛婉, 谢邵波, 尹德明*, 余兴龙

(湖南农业大学动物医学院, 湖南 长沙 410128)

摘要: 随机挑选湖南某规模化猪场出现“抖抖病”的新生仔猪, 采集血清样本, 用可扩增猪非典型瘟病毒(APPV)的 NS5B 基因和 E2 基因引物进行 RT-PCR 鉴定, 对 PCR 扩增产物测序。随后利用 MegAlign 软件分析 NS5B 和 E2 基因序列的同源性, 预测 E2 蛋白部分结构, 并使用 MEGA 5.0, 采用邻接法构建 NS5B 和 E2 基因的遗传进化树。结果表明, 发病仔猪为猪非典型瘟病毒(APPV)感染阳性。鉴定毒株 HN0626 与 GenBank 中 84 株参考毒株 NS5B 和 E2 基因序列的同源性分别为 81.68%~98.95%、81.14%~99.33%, 通过预测 E2 蛋白部分结构, 推导其潜在的 B 细胞抗原表位。系统发育分析显示, HN0626 毒株属于基因 1 型, 是全球猪群中的主要流行毒株, 其 E2、NS5B 基因序列在 GenBank 中的登录号分别为 OR936135、OR936136。

关键词: 猪非典型瘟病毒; NS5B 基因; E2 基因; 抗原表位预测; 湖南

中图分类号: S858.280.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2024)05-0098-06

Identification of a strain of atypical porcine pestivirus in Hunan Province and analysis of its NS5B and E2 gene sequence

LIU Tai, HU Xingye, MAO Wan, XIE Shaobo, YIN Deming*, YU Xinglong

(College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China)

Abstract: We collected serum samples from the randomly selected “dancing pigs” from a large-scale pig farm in Hunan Province, and identified them by RT-PCR using primers for the NS5B and E2 genes that can amplify the atypical porcine pestivirus(APPV), and then sequenced the PCR amplified products. Subsequently, the homology of NS5B and E2 gene sequences was analyzed using MegAlign software to predict part of the structure of the E2 protein, and the genetic evolution tree of NS5B and E2 genes was constructed using the neighbor-joining method, using MEGA 5.0. It indicated that the affected piglets were positive for the atypical porcine pestivirus(APPV) infection. The homology of the gene sequences of strain HN0626 with those of 84 reference strains of NS5B and E2 in GenBank was identified as 81.68%-98.95% and 81.14%-99.33%, respectively, and its potential B-cell antigenic epitopes were successfully deduced. Phylogenetic analysis showed that strain HN0626 belongs to genotype 1, which is the main prevalent strain in the global swine population, and its E2 and NS5B gene sequences were accessed in GenBank with the accession numbers OR936135 and OR936136, respectively.

收稿日期: 2023-12-28

修回日期: 2024-06-08

基金项目: 湖南省重点研发计划项目(2022NK2049)

作者简介: 柳泰(1998—), 男, 湖南岳阳人, 硕士研究生, 主要从事病原分子生物学及免疫学研究, 1556917863@qq.com; *通信作者, 尹德明, 硕士, 研究员, 主要从事动物疾病防控研究, 2397151997@qq.com

Keywords: atypical porcine pestivirus; NS5B gene; E2 gene; antigenic epitope prediction; Hunan

猪非典型瘟病毒(atypical porcine pestivirus, APPV)是引起仔猪先天性震颤(congenital tremor, CT) A-II 型的主要病原^[1-2]。母猪感染 APPV 后无明显症状,但其繁殖性能会降低,并可通过胎盘传播^[3]。仔猪感染 APPV 后会出现全身或局部肌肉阵发性挛缩而导致吃乳困难。母猪感染 APPV 所产仔猪的发病率可在 50%以上,且首胎仔猪发病率最高;仔猪死亡率通常较低,但偶尔可能接近 20%^[4-6]。当前中国已有 15 个以上省区发现 APPV^[7]。

APPV 为单股正链 RNA 病毒,属于黄病毒科瘟病毒属中 K 型瘟病毒(Pestivirus K)成员^[8],具有 4 种结构蛋白(C、E^{ms}、E1、E2)和 8 种非结构蛋白(N^{pro}、P7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B)。分析 APPV 的全基因组序列,APPV 毒株可以分为 3 个基因型。基于 E^{ms}、E2 及 NS5A、NS5B 基因的进化树分析与基于全长 CDS 基因的遗传进化分析结果一致,故可以使用这 4 个基因来进行 APPV 基因的分型,而不需要使用全长 CDS^[9-10]。

E2 是 APPV 的主要包膜糖蛋白,类似于其他瘟病毒,E2 蛋白在介导病毒入侵及毒力方面发挥作用^[11-12],同时又是主要免疫原性蛋白,可诱导保护性中和抗体的产生,是开发亚单位疫苗的主要靶点^[13]。

NS5B 作为瘟病毒的功能蛋白,在病毒复制和增殖过程中至关重要。NS5B 蛋白与病毒基因组的 3'非编码区(3' UTR)之间的特异性相互作用对于病毒基因组的复制调控不可或缺^[14-15]。

2023 年 10 月,湖南省某规模化猪场部分新生仔猪出现“抖抖病”,此次母猪群为头胎生产母猪,新生仔猪发病窝数占 80%。每窝新生仔猪中,大多出现发抖或者八字腿现象,但病猪体温、脉搏和呼吸均无明显变化。大约 5 d 染病仔猪即恢复正常。笔者采集该场发病仔猪的血清,通过设计引物进行 RT-PCR,扩增了其中 APPV 阳性病料的 NS5B 基因和 E2 基因片段,测序后进一步分析鉴定毒株与 GenBank 中登录的 84 株 APPV 的 NS5B 基因序列的同源性及其遗传进化关系,对 E2 蛋白抗原表位进行预测,以期了解 APPV 在湖南的流行及毒株变异情况,为后续该病的诊断及疫苗的研发提供依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2023 年 10 月,从湖南某规模化猪场随机挑选 4 头八字腿及全身震颤的新生仔猪,无菌采集它们的血液样本,放置 2 h 后,5 000 r/min 离心 5 min,收集血清。

1.2 方法

1.2.1 仔猪 APPV 的鉴定

1) 引物设计。通过 DNASTar11 中 MegAlign 软件对比 GenBank 中已登录完整全基因组序列的 APPV 毒株,在 NS5B 基因的高度保守序列区域设计特异性引物 5'-GGAATCAACCGGAAAGGAG C-3'和 5'-GGCACTTCCTCCATCATGGC-3', Primer-BLAST 对引物进行初步验证,该引物能扩增 GenBank 中(数据截止至 2023 年 10 月 30 日)已上传完整全基因组序列的所有 84 个 APPV 毒株,且无其他非特异性扩增。同时,参照文献^[16],用引物 5'-GGCCAG TGGGTATGCGTGAAA-3'和 5'-AGGTAGATCAAG AAAGGGGTTCC-3'扩增 E2 基因。引物均交由擎科生物技术有限公司合成。

2) 核酸提取与反转录。取患病新生仔猪血清 100 μ L,参照简石生物技术(北京)有限公司柱式病毒 DNA/RNA 提取试剂盒说明书提取病毒核酸。使用南京巨匠生物科技有限公司反转录试剂盒配制 20 μ L 反应体系:5 \times ATGScript RTMix 4 μ L、RNase-free ddH₂O 11 μ L、核酸 5 μ L,于 50 $^{\circ}$ C 孵育 15 min、85 $^{\circ}$ C 孵育 2 min,得到病毒 cDNA,置于-20 $^{\circ}$ C 备用。

3) RT-PCR 鉴定。以病毒核酸的反转录产物为模板,进行 RT-PCR 鉴定。NS5B 基因扩增体系:2 \times Mix 25 μ L、ddH₂O 20 μ L、模板 2 μ L、上下游引物各 1.5 μ L。扩增程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,53 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。E2 基因的扩增参照文献^[16]方法进行。NS5B 基因和 E2 基因的 PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,切取对应的阳性产物片段,参照 OmegaBio-Tek 公司切胶回收试剂盒说明书进行纯化,交由擎科生物技术有限公司测序。

1.2.2 基于 NS5B 基因和 E2 基因进化树的构建

在 NCBI 上对测序所得 NS5B 基因和 E2 基因序列进行 BLAST, 下载所有同源性较高的 84 个毒株序列, 使用 DNAStar11 中 MegAlign 软件进行同源性比对; 再利用 MEGA 5.0 软件进行遗传进化分析, 并使用邻接法构建系统进化树(自展值设置为重复 1 000 次)。

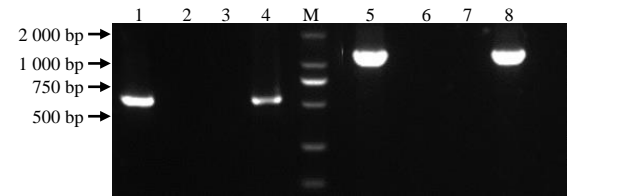
1.2.3 E2 蛋白结构及抗原表位预测

利用 DNAStar11 中 Protean 软件, 用 Kyte-Doolittle、Emini 和 Jameson-Wolf 方法分析 E2 蛋白的亲水性、表面可及性、柔性区域和抗原指数, 并结合 BepiPred-2.0 对 E2 蛋白抗原表位进行预测。

2 结果与分析

2.1 仔猪 APPV 的鉴定结果

使用 2 对引物对 4 份患病仔猪血清样本进行 RT-PCR 鉴定, 其中 1、4 号样本为阳性(图 1), NS5B 基因和 E2 基因的扩增产物序列长度分别约为 518 bp 和 1 232 bp, 与目标条带基本一致。PCR 产物经过测序, 证实是属于 APPV 同一毒株的基因序列。将鉴定的 APPV 命名为 HN0626。



M DL 2000 Marker; 1~4 NS5B 基因扩增结果; 5~8 E2 基因扩增结果。

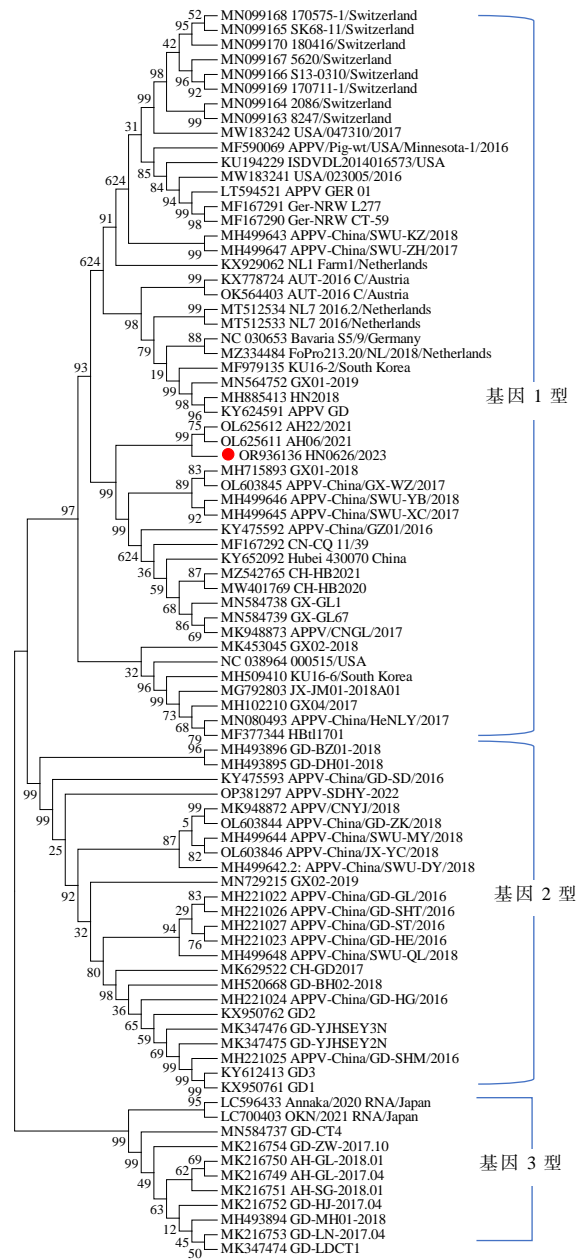
图 1 仔猪血清 APPV 的 NS5B 基因和 E2 基因的 RT-PCR 扩增结果

Fig. 1 RT-PCR amplification of NS5B and E2 genes of APPV from piglet serum

2.2 基于 NS5B 基因和 E2 基因的遗传进化树

将测序成功得到的 NS5B 基因片段序列上传至 GenBank, 登录号为 OR936136。将获得的序列与 GenBank 中已公布完整基因组序列的参考毒株序列进行同源性比对, HN0626 毒株 NS5B 基因序列与 84 株参考毒株的同源性为 81.68%~98.95%, 其中, 与 AH06/2021 (OL625611)同源性最高, 为 98.95%; 与 OKN/2021 RNA(LC700403) 同源性最低, 为 81.68%。E2 基因序列与 84 株参考毒株的同源性为

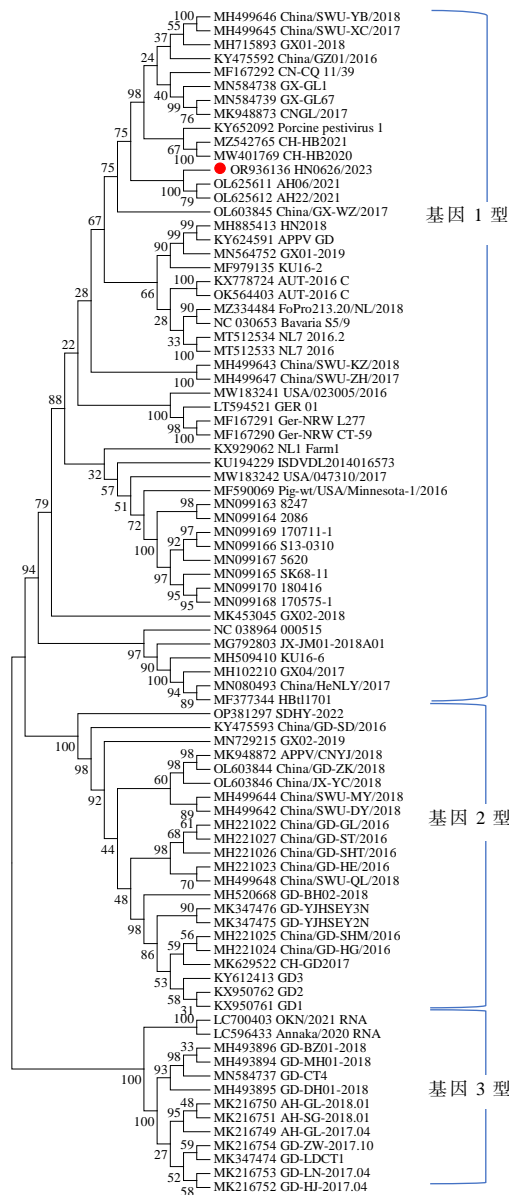
81.14%~99.33%, 其中, 与 AH22/2021(OL625612.1)的同源性最高, 为 99.33%; 与 Annaka/2020 RNA (LC596433.1)的同源性最低, 为 81.14%。基于 NS5B 基因和 E2 基因序列构建的系统遗传进化树分别如图 2 和图 3 所示, HN0626 毒株的遗传进化树属于基因 1 型, 与安徽株 AH22/2021(OL625612)和 AH06/2021(OL625611)属于同一分支且亲缘关系最近, 与近几年发现并鉴定的部分 APPV 中国毒株属于同一个最小的分支; 同时与 000515/USA、NL1 Farm1/Netherlands、APPV GER 01 等绝大多数国外发现的毒株属于同一大分支。



●为扩增测序获得样本的NS5B基因部分序列。

图 2 基于 APPV NS5B 基因构建的遗传进化树

Fig.2 Phylogenetic tree based on APPV NS5B gene



●为扩增测序获得样本的E2基因序列。

图 3 基于 APPV E2 基因构建的遗传进化树

Fig.3 Phylogenetic tree based on APPV E2 gene

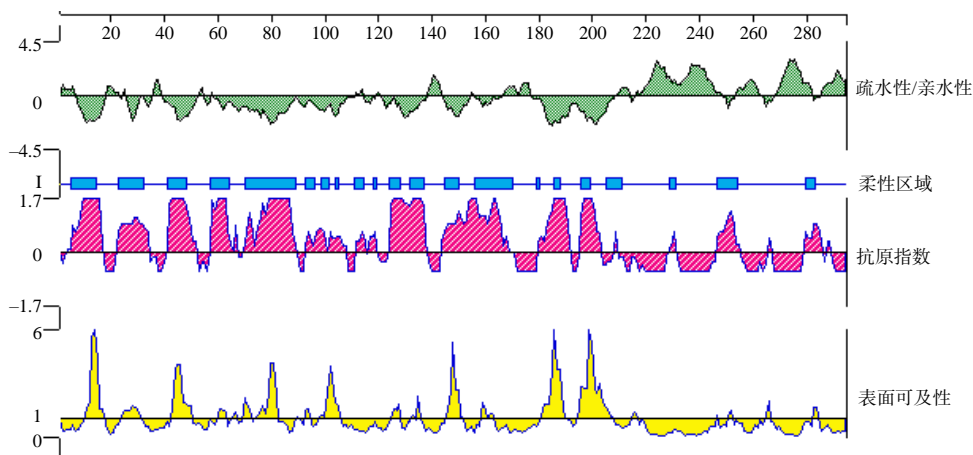


图 4 预测的 APPV-E2 蛋白结构

Fig.4 Predicted structure of APPV E2 protein

从已经上传至 GenBank 的 APPV 毒株的地理位置信息来看, 基因 1 型 APPV 在中国、美国、德国、奥地利、日本、荷兰、韩国、瑞士等国家被发现, 流行于亚洲、欧洲、北美洲, 分布最广泛; 而基因 2 型和基因 3 型 APPV 除 OKN/2021(LC700403)和 Annaka/2020(LC596433)毒株在日本被发现之外, 其余毒株仅出现在中国。由此可见, APPV 在各生猪养殖大国均有传播且不断进化, 在中国呈现出较高的多样性。

2.3 E2 蛋白结构及 B 细胞抗原表位的预测结果

将 E2 基因序列上传至 GenBank, 登录号为 OR936135。分析 E2 结构蛋白的亲水性/疏水性, 发现氨基酸序列的 273 位最大, 亲水指数为 4.4, 疏水性最强; 在 87 位最小, 亲水指数为 4.17, 亲水性最强。APPV E2 蛋白的氨基酸大部分为亲水性氨基酸, 所以多肽链表现为亲水性。预测结构蛋白的可及性区域, 发现 13、44、80、102、148、186 和 198 残基周围可及性程度相对较高, 可能位于 APPV E2 蛋白表面。氨基酸残基 5~14、23~32、40~48、70~89、156~171 和 246~254 区域可能具有一定的柔韧性。预测蛋白的抗原指数, 发现第 7~16、第 40~49、第 57~63、第 76~87、第 124~137、第 145~165、第 182~190 和第 195~201 aa 为抗原指数较高区域。

结合 APPV-E2 蛋白结构的预测结果(图 4), 推测其 B 细胞抗原表位区域可能位于第 6~12、第 25~29、第 42~48、第 59~62、第 72~99、第 102~104、第 108~110、第 114~116、第 128~134、第 147~168、第 182~187、第 207~211、第 248~252 aa 区域。

3 结论与讨论

对2015—2017年中国22个省、市、自治区的93个猪场进行回溯性调查,285份非健康猪群血清中有71份为APPV阳性,阳性率约为24.91%^[14];2016—2018年间采集中国不同地区疑似APPV发病的127个猪场猪的不同阶段和类型的病料样品共1367份,APPV感染的阳性率为10.90%^[17],这些都表明中国猪群中APPV感染已较为普遍。

笔者从湖南省某疑似APPV感染的猪场采集患病新生仔猪血清样本,经过PT-PCR检测鉴定为APPV阳性。前期已经对该场中送检的样本进行了多种猪病病原的检测,结果表明该场无其他常见病原感染,再结合发病仔猪临床症状与RT-PCR检测,可以确诊该猪场仔猪发生的病症是由APPV感染所致。对NS5B基因的片段进行同源性分析,发现该毒株属于基因1型且与安徽株AH22/2021及AH06/2021聚为同一分支,属于全球主要流行毒株。后期通过下载GenBank中APPV的全基因组序列进行分析验证,发现基于全基因组的遗传进化分析结果与E2基因和NS5B基因分析结果基本一致。

对NCBI中所有APPV全基因组序列的同源性分析结果表明,与安徽株AH22/2021及AH06/2021同源性最高的毒株共有11株,均在中国被发现,同源性在92.94%以上,分布于广西、湖北、四川及广东等地。在这些高同源性的毒株中,最先发现的为广东株China/GZ01/2016(GenBank登录号KY475592.1),最近发现的为湖北株CH-HB2021(GenBank登录号MZ542765.1)。这些毒株均属于基因1型,且共同聚为其中1个小分支,但不属于当前主要流行毒株。由此可看出,APPV的流行情况比较复杂,且基因1型毒株最多。

对HN0626毒株的E2蛋白结构及B细胞抗原表位进行预测,发现E2蛋白是检测APPV特异性抗体的合适靶抗原,与使用其他毒株预测的结果^[18]一致。E2蛋白被证明是诱导产生中和抗体的主要靶蛋白^[13],这表明APPV E2蛋白具有较强的免疫原性。有研究表明,E2蛋白与Fc片段融合表达制备

的APPV亚单位疫苗能诱导仔猪产生有效的体液和细胞免疫反应^[19];另一项研究显示,E^{ms}蛋白与E2蛋白组装的病毒样颗粒可以抑制APPV在小鼠体内的复制^[20],这些结果都表明E2糖蛋白作为特异性抗体,可以用于开发安全有效的基因工程疫苗。

APPV毒株在遗传上具有高度序列变异性,在中国具有较高的多样性^[21]。但当前业界对该病的重视并不够,对该病毒的研究相对较少,病毒基因尚无疫苗应对,对规模化生猪养殖形成严峻挑战,故需着力研究APPV的流行特点及其致病性,采取有效措施,防控猪非典型猪瘟。

参考文献:

- [1] ARRUDA B L, ARRUDA P H, MAGSTADT D R, et al. Identification of a divergent lineage porcine pestivirus in nursing piglets with congenital tremors and reproduction of disease following experimental inoculation[J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0150104.
- [2] HAUSE B M, COLLIN E A, PEDDIREDDI L, et al. Discovery of a novel putative atypical porcine pestivirus in pigs in the USA[J]. *The Journal of General Virology*, 2015, 96(10): 2994–2998.
- [3] DE GROOF A, DEIJS M, GUELEN L, et al. Atypical porcine pestivirus: a possible cause of congenital tremor type A-II in newborn piglets[J]. *Viruses*, 2016, 8(10): 271.
- [4] SCHWARZ L, RIEDEL C, HÖGLER S, et al. Congenital infection with atypical porcine pestivirus(APPV) is associated with disease and viral persistence[J]. *Veterinary Research*, 2017, 48(1): 1.
- [5] STENBERG H, JACOBSON M, MALMBERG M. A review of congenital tremor type A-II in piglets[J]. *Animal Health Research Reviews*, 2020, 21(1): 84–88.
- [6] GATTO I R H, HARMON K, BRADNER L, et al. Detection of atypical porcine pestivirus in Brazil in the central nervous system of suckling piglets with congenital tremor[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2018, 65(2): 375–380.
- [7] MA H L, LI W T, ZHANG M J, et al. The diversity and spatiotemporally evolutionary dynamic of atypical porcine pestivirus in China[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 937918.
- [8] SMITH D B, MEYERS G, BUKH J, et al. Proposed revision to the taxonomy of the genus *Pestivirus*, family *Flaviviridae*[J]. *The Journal of General Virology*, 2017,

- 98(8): 2106–2112.
- [9] REN X J, QIAN P, HU Z H, et al. Genetic characterization of atypical porcine pestivirus from neonatal piglets with congenital tremor in Hubei Province, China[J]. *Virology Journal*, 2022, 19(1): 51.
- [10] YUAN F F, WANG L Y. Genotyping atypical porcine pestivirus using NS5A[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2021, 92: 104866.
- [11] RISATTI G R, BORCA M V, KUTISH G F, et al. The E2 glycoprotein of classical swine fever virus is a virulence determinant in swine[J]. *Journal of Virology*, 2005, 79(6): 3787–3796.
- [12] WANG Z, NIE Y C, WANG P G, et al. Characterization of classical swine fever virus entry by using pseudotyped viruses: E1 and E2 are sufficient to mediate viral entry[J]. *Virology*, 2004, 330(1): 332–341.
- [13] CAGATAY G N, MEYER D, WENDT M, et al. Characterization of the humoral immune response induced after infection with atypical porcine pestivirus (APPV)[J]. *Viruses*, 2019, 11(10): 880.
- [14] XIAO M, GAO J F, WANG W, et al. Specific interaction between the classical swine fever virus NS5B protein and the viral genome[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2004, 271(19): 3888–3896.
- [15] LI W W, WU B X, SOCA W A, et al. Crystal structure of classical swine fever virus NS5B reveals a novel N-terminal domain[J]. *Journal of Virology*, 2018, 92(14): e00324–18.
- [16] 吴伟鑫, 黄金, 周磊, 等. 2015—2017年我国部分地区猪非典型瘟病毒的遗传变异分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2020, 51(8): 1939–1948.
- [17] 石坚. 猪非典型瘟病毒的流行病学调查、遗传进化及致病性研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2018.
- [18] ZHANG H W, WEN W, HAO G X, et al. A subunit vaccine based on E2 protein of atypical porcine pestivirus induces Th2-type immune response in mice[J]. *Viruses*, 2018, 10(12): 673.
- [19] REN X J, QIAN P, LIU S D, et al. Fc-mediated E2-dimer subunit vaccines of atypical porcine pestivirus induce efficient humoral and cellular immune responses in piglets[J]. *Viruses*, 2021, 13(12): 2443.
- [20] LIU J X, ZHANG P T, CHEN Y J, et al. Vaccination with virus-like particles of atypical porcine pestivirus inhibits virus replication in tissues of BALB/c mice[J]. *Archives of Virology*, 2021, 166(10): 2733–2741.
- [21] RIEDEL C, AITKENHEAD H, EL OMARI K, et al. Atypical porcine pestiviruses: relationships and conserved structural features[J]. *Viruses*, 2021, 13(5): 760.

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 罗维