

doi:

猪传染性胃肠炎病毒的分离与鉴定

李嘉琛, 吴华伟*, 陈晓春, 邓永, 曹明慧, 韩爽, 夏业才*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2017-04-13 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 03-0000-00 [中图分类号] S852.65

[摘要] 将经胶体金试纸条和 RT-PCR 鉴定为猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)阳性的内蒙古某猪场的粪便样品,经 ST 细胞分离培养后,得到一株能产生明显细胞病变的毒株。纯净性检测结果显示,该毒株无细菌生长,无支原体及无外源病毒污染。特异性检测结果表明:该分离株能被 TGEV 特异性阳性血清中和,且能被 TGEV FA 荧光抗体识别。采用 TGEV N 基因特异性引物,经 RT-PCR 可扩增出 1215 bp 特异性片段,将该片段测序后与 GenBank 中已发表的 13 株 TGEV N 基因的序列进行同源性比较,同源性为 98.1%~100%,其中与我国分离的 H16、JS2012 以及 Miller M6 毒株同源性关系最近,均为 100%。结果表明,分离到的毒株为 TGEV,命名为 TGEV NMG 株。

[关键词] 猪传染性胃肠炎病毒;分离;特异性;纯净性

Isolation and Identification of Porcine Transmissible Gastroenteritis Virus

LI Jia-chen, WU Hua-wei*, CHEN Xiao-chun, DENG Yong, CAO Ming-hui, HAN Shuang, XIA Ye-cai*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: XIA Ye-cai, E-mail: xiayecai@ivdc.org.cn; WU Hua-wei, E-mail: wuhuawei@ivdc.org.cn

Abstract: The feces of diarrheal piglets was detected by GIA and RT-PCR, the result showed that the sample was infected with TGEV. A strain of TGEV was isolated from ST cell, obvious cytopathic effect developed in the cell monolayer. The purity test indicated that the virus was free from the bacteria, mycoplasma and extra viruses infection. The specification test manifested that the strain could be neutralized by anti-TGEV serum and recognized by direct immunofluorescence antibody assay. The target fragment (1215 bp) was amplified by RT-PCR and sequenced, and its sequence was compared with other 13 TGEV strains in GenBank database. The result showed that the nucleotide homology is in 98.1%~100%, and the NMG strain showed 100% identity to strains H16, JS2012 and Miller M6. These results showed that a strain of TGEV was isolated, and named TGEN NMG.

Key words: transmissible gastroenteritis virus; isolation; specification; purity

猪传染性胃肠炎(Porcine transmissible gastroenteritis, TGE)是由猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)引

起的一种高度接触传染性肠道疾病^[1]。所有年龄猪群均为易感机体,2周龄以内仔猪最为易感,被感

作者简介:李嘉琛,硕士研究生,从事预防兽医学研究。

通讯作者:夏业才, E-mail: xiayecai@ivdc.org.cn; 吴华伟, E-mail: wuhuawei@ivdc.org.cn

染机体临床表现为呕吐、水样腹泻等症状,死亡率高达 100%,但 5 周龄以上仔猪的死亡率较低。Doyle 和 Hutchings 1946 年首次在美国报道该病,随后大多数国家均报道了该病的发生^[2]。近年来,TGE 在我国的发病率呈上升趋势,疫区逐步扩大^[3],甘肃、黑龙江及上海等地区均有 TGEV 病例的报道^[4-6],并且临床样品中经常监测到与猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)和猪轮状病毒(Porcine Rotavirus, PoRV)的混合感染病例,是严重威胁养猪业的主要腹泻病原之一。对疑似感染猪传染性胃肠炎的临床粪便样品在 ST 细胞进行传代培养,成功分离出一株猪传染性胃肠炎病毒(命名为 TGEV NMG 株),并进行了纯净性和特异性检验,为开展猪传染性胃肠炎疫苗和诊断试剂的研究奠定基础。

1 材料

1.1 病料 内蒙古地区某猪场猪腹泻粪便样品。

1.2 细胞 猪睾丸(ST)细胞,由中国兽医药品监察所病毒室保存。

1.3 主要试剂 DMEM、0.25%胰酶,GIBCO 公司;青霉素、链霉素、庆大霉素,Solarbio 公司;TRIzol Reagent,Invitrogen 公司;One-step RT-PCR kit,TAKARA 公司;猪传染性胃肠炎快速抗原检测试剂盒,BioNote 公司;猪传染性胃肠炎病毒 FA 试剂,VMRD 公司;猪传染性胃肠炎病毒单阳性血清(中和效价 1:512),由中国兽医药品监察所病毒室保存。

1.4 引物设计 参照 TGEV (GenBank No. EU074218)、PEDV (GenBank No. AF353511) 和 PoRV (GenBank No. JQ343835) 序列,分别设计引物特异性扩增 TGEV N 基因、PEDV M 基因和 PoRV VP7 基因(表 1),引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。

表 1 特异性引物序列

Tab 1 Primers used for amplifying the target gene

引物名称	引物序列	扩增片段长度
TGEV-N F	GAACGTGATAATTTGAGTGAGC	1215bp
TGEV-N R	GCATCTCGTTTAGTTCGTTAC	
PEDV-M F	TCGGAATTCATGTCTAACGGTTCT	681bp
PEDV-M R	ACGCTCGAGTTAGACTAAATGAAG	
PoRV-vp7 F	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTC	1062bp
PoRV-vp7 R	GGTCACATCATAACAATTCTAATCT	

2 方法

2.1 样品处理 将腹泻仔猪粪便样品用 DMEM 培养液 2 倍稀释,加入青、链霉素(终浓度 200 U/mL)和庆大霉素(终浓度 100 μg/mL)于 4 ℃过夜,3000 r/min 离心 20 min 后取上清,以 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌后,置-70 ℃保存。

2.2 样品鉴定

2.2.1 胶体金检测试剂盒检测 采用猪传染性胃肠炎病毒胶体金抗原检测试剂盒对粪便样品进行检测,操作步骤以及结果判定参照说明书。

2.2.2 RT-PCR 检测 将处理的粪便样品用 TRIzol 试剂进行 RNA 提取,One-step RT-PCR kit 以表 1 中 TGEV、PEDV 和 PoRV 引物进行 RT-PCR 检测,反应程序:50 ℃反转录 30 min;95 ℃预变性 3 min;94 ℃变性 45 s,55 ℃退火 45 s,72 ℃延伸 60 s,共进行 35 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min。然后将 PCR 产物用 1.2%琼脂糖凝胶进行电泳分析。

2.3 病毒的分离 将鉴定为 TGEV 阳性的病料,按 10%的比例接种已长成单层的 ST 细胞,37 ℃吸附 1 h,吸弃接种物,加含 10 μg/mL 胰酶的 DMEM 营

养液,置 37 °C 培养 72 h。细胞病变达 75% 以上时,收获病毒液。如无细胞病变出现,继续盲传。

2.4 TCID₅₀ 测定 将 F5 ~ F10 代细胞培养物分别进行 10 倍系列稀释,接种至长成单层的 ST 细胞 96 孔板,每个稀释度接种 8 孔,每孔 100 μL,置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养 72 h,记录 CPE 情况,按 Reed-Muench 法计算病毒 TCID₅₀。

2.5 纯净性鉴定 将 TGEV 的 F5 代细胞培养物,按照《中国兽药典》方法^[7] 分别进行无菌检验、支原体检验和外源病毒检验。

2.6 特异性鉴定

2.6.1 病毒中和实验 将 F5 代细胞培养物用 DMEM 培养液稀释成 200 TCID₅₀/0.1mL,与等体积的 TGEV 阳性血清混匀后置 37 °C 中和 1 h,分别接

种至已长成良好单层 ST 细胞 24 孔板,同时设置阳性对照和阴性对照。置 37 °C 5% CO₂ 的培养箱中培养 96h。

2.6.2 直接免疫荧光鉴定 将 F5 代细胞培养物,进行 10 倍梯度稀释(10⁻¹ ~ 10⁻⁸),接种至长满单层的 ST 细胞 96 孔板,每稀释度 8 孔,每孔 100 μL,置于 37 °C 二氧化碳培养箱中培养 48 h,弃上清,用 80%冷丙酮 2 ~ 8 °C 固定 30 min 后,按照 VMRD TGE FA 试剂说明书进行直接免疫荧光检测。

2.6.3 N 基因的克隆与序列分析 用表 1 中 TGEV N-F/R 引物,对 TGEV 的 F5 代细胞培养物进行 RT-PCR 扩增,并将扩增产物送至北京六合华大基因科技股份有限公司测序,然后利用 DNASTar 软件与 GenBank 上参照序列(表 2)进行比对分析。

表 2 TGEV 参考毒株及序列信息

Tab 2 Reference strains of TGEV and their sequence information

毒株名	登录号	地区	时间	毒株名	登录号	地区	时间
Purdue	DQ811789	美国	2007	H16	FJ755618	中国	2009
Purdue P115	DQ811788	美国	2007	Attenuated H	EU074218	中国	2010
Miller M6	DQ811785	美国	2009	WH-1	HQ462571	中国	2010
Miller M60	DQ811786	美国	2009	SHXB	KP202848	中国	2014
SC-Y	DQ443743	中国	2006	TH-98	KU729220	中国	2016
TS	DQ201447	中国	2006	JS2012	KT696544	中国	2012
HX	KC962433	中国	2013				

3 结果与分析

3.1 样品鉴定 采用猪传染性胃肠炎病毒胶体金抗原检测试剂盒对粪便样品进行检测,结果为阳性。RT-PCR 可扩增出 1215 bp 目的条带(图 1A),与预期大小相符。而 PEDV 和 PRoV 未扩增出相应特异性条带(图 1B 和 1C)。表明该样品为仅含有 TGEV,无 PEDV 和 PoRV 污染。

3.2 病毒的分离培养结果 将样品接种 ST 细胞连续传至第 10 代,结果盲传至第 5 代开始均出现细胞圆缩、聚集,并出现脱落、崩解(图 2A)等典型 TGEV 病变,而细胞对照正常(图 2B)。

3.3 TCID₅₀ 测定 F5 ~ F10 代 TCID₅₀ 测定结果见

表 3。随着传代次数增加,病毒滴度逐渐升高,说明该分离毒株已逐步适应 ST 细胞。

3.4 纯净性鉴定结果 将 F5 代细胞培养物,参照《中国兽药典》方法^[7] 进行检验,结果显示无菌生长、无支原体且无外源病毒污染。

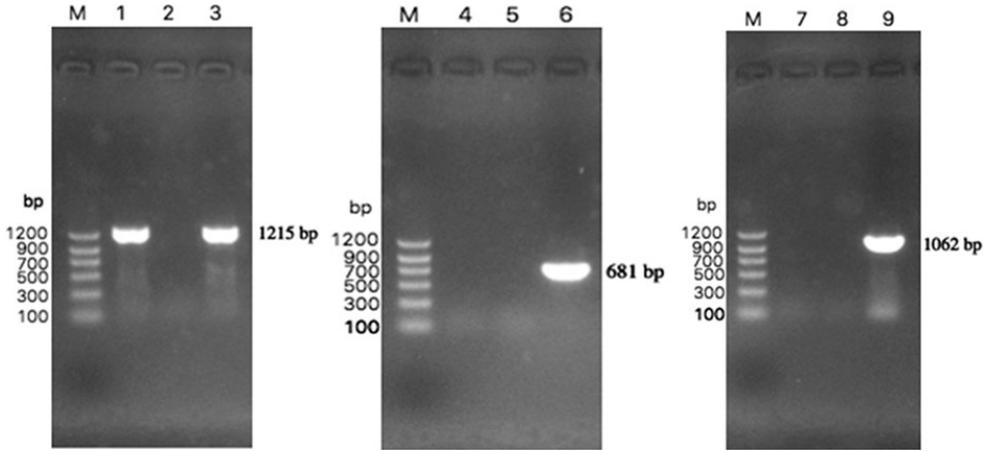
3.5 特异性鉴定结果

3.5.1 病毒中和试验结果 图 3 结果显示,病毒对照组出现 CPE,病毒中和组和空白对照组细胞均正常,证明分离毒株为 TGEV。

3.5.2 直接免疫荧光检测结果 将 TGEV 的 F5 代细胞培养物进行直接免疫荧光染色,可观察到 TGEV 特异性荧光,而 ST 细胞对照无荧光(图 4)。

3.5.3 N 基因的克隆与序列分析 RT-PCR 结果表明, F5 代细胞培养物可扩增出 1215 bp 特异性条

带(图 5), 扩增结果清晰, 无杂带, 与预期目的条带一致。

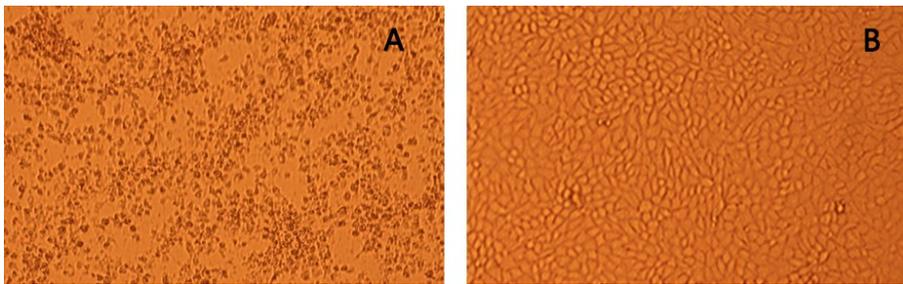


A.TGEV 鉴定结果;B.PEDV 鉴定结果;C.PoRV 鉴定结果

M. DNA Marker; 1,4,7. 粪便样品; 2,5,8. 阴性对照(RNA-free H₂O); 3. TGEV 阳性对照; 6. PEDV 阳性对照; 9. PoRV 阳性对照
 M. DNA Marker; 1,4,7. Feces Samples; 2,5,8. Negative Control(RNA-free H₂O);
 3. Positive Control of TGEV; 6. Positive Control of PEDV; 9. Positive Control of PoRV

图 1 RT-PCR 鉴定结果

Fig 1 Identification by RT-PCR



A:接种 TGEV 72h;B:ST 细胞对照

A:72h after inoculated TGEV;B:ST Control

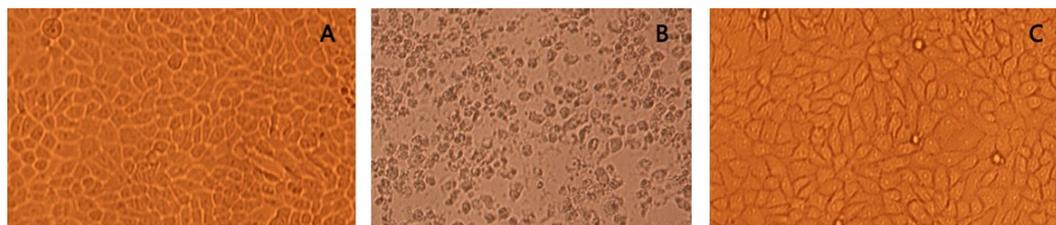
图 2 分离株 TGEV 接种 ST 细胞的 CPE(100×)

Fig 2 CPE of ST cell after inoculated TGEV(100×)

表 3 TGEV-NMG 株不同代次的 TCID₅₀

Tab 3 TCID₅₀ of TGEV-NMG different generations

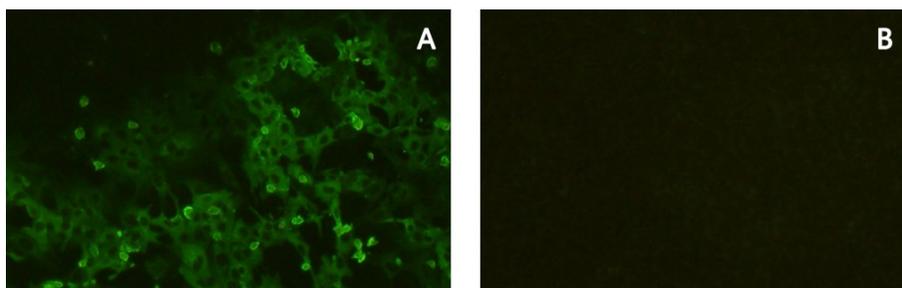
代次	F5	F6	F7	F8	F9	F10
TCID ₅₀ /mL	10 ^{5.0}	10 ^{5.5}	10 ^{5.75}	10 ^{6.0}	10 ^{6.3}	10 ^{6.5}



A: 病毒中和组; B: 病毒对照组; C: 细胞对照组
A: Virus neutralization; B: Virus Control; C: Cell control

图 3 TGEV 中和试验观察结果 (200×)

Fig 3 TGEV neutralization test (200×)

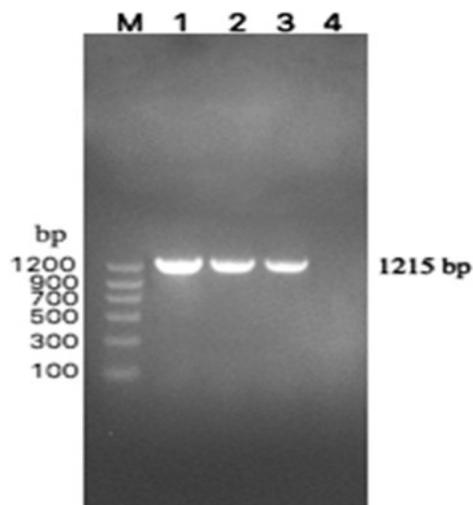


A: TGEV 感染细胞; B: ST 细胞对照

A: Cell infected TGEV ; B: ST cell control

图 4 TGEV FA 观察结果 (100×)

Fig 4 Identification of TGEV by FA (100×)



M: DNA Marker; 1-3: F5 代; 4: 阴性对照

M: DNA Marker; 1-3: F5; 4: Negative Control

图 5 TGEV NMG 株 RT-PCR 鉴定结果

Fig 5 Identification of TGEV NMG strain by RT-PCR

TGEV 参考毒株的 N 基因进行了比对分析。结果显示, NMG 株 N 基因全长 1149 bp, 与 13 株参考毒株的同源性在 98.1% ~ 100% 之间, 其中与 H16、JS2012、Miller M6 同源性最高, 达 100% (图 6)。TGEV N 基因的进化分析表明, NMG 与 TS、JS2012、H16、attenuated H、Miller M6、Miller M60 的亲缘关系较近, 处于同一分群 (图 7)。

4 讨论

TGEV 的分离较为困难, 往往需要选择较为敏感的细胞 (或细胞系), 且需要在培养液中加入胰酶以提高细胞对病毒的敏感性^[8]。目前较为常用的细胞为猪肾传代细胞 (PK-15) 和猪睾丸传代细胞 (ST)。研究表明, ST 细胞对于 TGEV 初代培养更加敏感^[9]。使用 ST 细胞进行分离培养, 且在培养液中添加了终浓度为 10 μg/mL 的胰酶, 经连续培养 5 代后, 出现了较为明显的细胞病变, 且随着传代代次的增加, 病毒滴度逐渐升高, 表明该分离株已逐步适应了 ST 细胞。但也有研究表明在 TGEV

3.5.4 N 基因的同源性及进化树分析 使用 DNASTar 中的 MegAlign 对 TGEV NMG 株以及 13 株

		Percent Identity															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
Divergence	1	■	99.9	100.0	100.0	99.8	98.3	98.1	98.1	98.2	99.9	98.3	98.2	100.0	98.2	1	NMG
	2	0.1	■	99.9	99.9	99.7	98.2	98.0	98.0	98.1	99.8	98.2	98.1	99.9	98.1	2	attenuated H
	3	0.0	0.1	■	100.0	99.8	98.3	98.1	98.1	98.2	99.9	98.3	98.2	100.0	98.2	3	JS2012
	4	0.0	0.1	0.0	■	99.8	98.3	98.1	98.1	98.2	99.9	98.3	98.2	100.0	98.2	4	Miller M6
	5	0.2	0.3	0.2	0.2	■	98.1	97.9	97.9	98.0	99.7	98.1	98.0	99.8	98.0	5	Miller M60
	6	1.8	1.9	1.8	1.8	1.9	■	99.8	99.8	99.9	98.2	99.7	99.9	98.3	99.9	6	Purdue P115
	7	1.9	2.0	1.9	1.9	2.1	0.2	■	99.8	99.9	98.0	99.7	99.9	98.1	99.9	7	SC-Y
	8	1.9	2.0	1.9	1.9	2.1	0.2	0.2	■	99.9	98.0	99.7	99.9	98.1	99.9	8	SHXB
	9	1.9	1.9	1.9	1.9	2.0	0.1	0.1	0.1	■	98.1	99.7	100.0	98.2	100.0	9	TH-98
	10	0.1	0.2	0.1	0.1	0.3	1.9	2.0	2.0	1.9	■	98.2	98.1	99.9	98.1	10	TS
	11	1.8	1.9	1.8	1.8	1.9	0.3	0.3	0.3	0.3	1.9	■	99.7	98.3	99.7	11	virulent Purdue
	12	1.9	1.9	1.9	1.9	2.0	0.1	0.1	0.1	0.0	1.9	0.3	■	98.2	100.0	12	WH-1
	13	0.0	0.1	0.0	0.0	0.2	1.8	1.9	1.9	1.9	0.1	1.8	1.9	■	98.2	13	H16
	14	1.9	1.9	1.9	1.9	2.0	0.1	0.1	0.1	0.0	1.9	0.3	0.0	1.9	■	14	HX
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		

图 6 14 株 TGEV N 基因的同源性比较

Fig 6 Sequence homology of 14 strains TGEV based on N gene

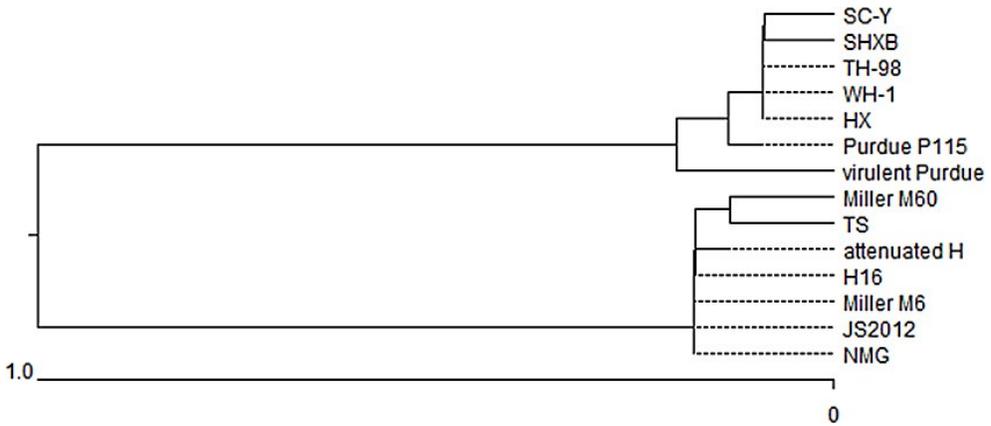


图 7 14 株 TGEV N 基因序列的进化树

Fig 7 The phylogenetic tree of 14 strains TGEV based on N gene sequences

病毒分离时可不添加胰酶,如宋振辉等认为在分离 TGEV 时添加牛血清有利于病毒的增殖^[9]。因此,对于 TGEV 分离时是否需要添加胰酶,建议在进行分离时可尝试两种方法同步进行,以期找到适合分离毒株的最适方法,并节省时间,提高分离的成功率。

N 蛋白为核衣壳蛋白,其在同属病毒之间同源性较低,但在同种病毒之间具有高度的保守型^[10]。TGEV NMG 毒株的同源性分析结果印证了此点。从 TGEV NMG 毒株的同源性比较结果看,该毒株与 GenBank 中已发表的 13 株 TGEV N 基因的序列同源性为 98.1%~100%,且与我国分离的 H16、JS2012 毒株以及经典疫苗毒株 Miller M6 同源性高达 100%,与近年我国分离的 TGEV 毒株同源性

均在 98.1% 以上。鉴于 N 蛋白的保守性,且可在感染的早期就能产生高水平的 N 蛋白抗体,因此在血清学或病原学的诊断中具有重要意义,这为下一步开展 TGE 诊断试剂的研究奠定了基础。

参考文献:

[1] Jeffrey J, Locke A, Alejandro R, et al. Disease of swine [M]. 10th Edition, 2012:523-525.

[2] Doyle L P, Hutchings L M. A transmissible gastroenteritis in pigs [J]. Journal of the American Veterinary Medical Association, 1946, 108: 257-259.

[3] 谢立兰,方六荣,方华为,等.免疫学和分子生物学技术在猪传染性胃肠炎诊断中的应用进展[J].中国兽药杂志,2016,50(2):56-62.

- Xie L L, Fang L R, Fang H W, *et al.* Progress on the application of immunology and molecular biology techniques in diagnosing of transmissible gastroenteritis [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2016, 50(2): 56-62.
- [4] Hu W W, Yu Q H, Zhu L Q, *et al.* Complete genomic sequence of the coronavirus transmissible gastroenteritis virus SHXB isolated in China[J]. Arch Virol, 2014, 159: 2295-2302.
- [5] Hu X L, Li N N, Tian Z G, *et al.* Molecular characterization and phylogenetic analysis of transmissible gastroenteritis virus HX strain from China[J]. BMC Veterinary Research, 2015, 11:12.
- [6] Li J Q, Cheng J, Lan X, *et al.* Complete genomic sequence of transmissible gastroenteritis virus TS and 3' end sequence characterization following cell culture[J]. Virologica Sinica, 2010, 25(3): 213-224.
- [7] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典[S]. 2010 年版三部. Chinese Committee of Pharmacopoeia for Animal. China Veterinary Pharmacopoeia[S]. 2010, Volume III.
- [8] Bridger J C. Cell culture techniques for the identification of enteric viruses - present possibilities [M]// Laboratory Diagnosis in Neonatal Calf and Pig Diarrhea. Springer Netherlands, 1981:12-21.
- [9] 宋振辉, 郭万柱. 猪传染性胃肠炎病毒的分离鉴定及全基因组序列分析[J]. 病毒学报, 2008, 24(5): 367. Song Z H, Guo W Z. Isolation and genomic sequence analysis of porcine transmissible gastroenteritis virus [J]. Chinese Journal of Virology, 2008, 24(5): 367.
- [10] Hou X L, Yu L Y, Liu J. Development and evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant nucleocapsid protein for detection of porcine epidemic diarrhea antibodies[J]. Veterinary Microbiology, 2007, 123(1): 86-92.

(编辑:李文平)