

猪流行性腹泻病毒分子生物学特征

张强敏¹, 郭福生^{2**}, 尹燕博², 沈秋姑¹

(1. 江西农业大学动物科技学院, 江西南昌 330045; 2. 中华人民共和国农业部动物检疫所, 山东青岛 266032)

Molecular Biological Traits of Porcine epidemic diarrhea virus

ZHANG Qiang-min¹, GUO Fu-sheng^{2**}, YIN Yan-bo², SHEN Qiu-gu¹

(1. Animal Science and Technology College of Jiangxi Agriculture University, Nanchang 330045, China;

2. Animal Quarantine institute of Agriculture Ministry of the PRC, Qingdao 266032, China)

关键词: 猪流行性腹泻病毒; 基因; 结构蛋白

中图分类号: S852.65 文章标识码: A 文章编号: 1003-5125(2002)04-0381-04

猪流行性腹泻 (porcine epidemic diarrhea, PED) 是以水泻、呕吐和脱水为特征的一种急性病毒性腹泻。猪流行性腹泻现已成为世界范围内的猪病之一。猪流行性腹泻病毒 (*Porcine epidemic diarrhea virus*, PEDV) 是 PED 的致病因子, 是导致类似猪传染性胃肠炎 (porcine transmissible gastroenteritis, TGE) 临床症状的真正病原。迄今为止已发现 PEDV 与 TGEV^[1]、PEDV 与 PCV 混合感染猪^[2]。已有用蛋黄 IgY 预防 PED 效果的报道^[3], 还有用弱化的 PEDV 疫苗对仔猪进行免疫的报道^[4], 但都对其作用机制未作深入探讨。弄清 PEDV 的分子生物学特征, 针对 PED 进行特异性免疫, 必将对 PED 的诊断、治疗和综合防治产生深远影响。本文仅就 PEDV 的分子生物学特征作一综述。

1 基因组结构

病毒核酸为线形正义单链 RNA。整个基因组长度为 27 000~33 000 个核苷酸 (nt), 分子量为 $6 \times 10^6 - 8 \times 10^6$ 。基因组的 5' 端有一个帽子结构 (cap), 3' 端有一个 poly (A) 尾。基因组核酸有侵染性。基因组在胞浆中复制, 病毒粒子也在胞浆中成熟。PEDV 人工细胞培养困难, 在通过培养液中加入胰酶将 PEDV 适应 Vero 细胞后, PEDV 的分子生物学才得到了较快的发展。迄今为止, 已测定了 PEDV CV777 株完整的基因组序列, 基因组大小为

28 033bp^[5]。细胞培养野生型 PEDV 比较困难, 也未对其基因组进行过测序。对已适应细胞生长的 PEDV 基序组的测序已有多人报道, 但都不完整^[6,7]。PEDV 具有典型的冠状病毒结构 (见图 1) 属 I 群冠状病毒。适应细胞生长的 PEDV 与 I 群病毒有所不同, 其基因组缺少下游 N 基因的 ORF, 在相应的位置上 TGEV 有 ORF7, FIPV、猫肠道冠状病毒及 CCV (犬冠状病毒) 有 ORF6a 和 ORF6b。

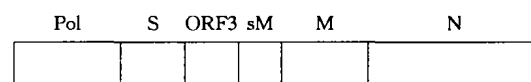


图 1 PEDV 基因组结构

Fig. 1 Genome of porcine epidemic diarrhoea virus

Pol, polymerase; S, spike; sM, small membrane; M, membrane; N, nucleocapsid.

PEDV 基因组靠近 3' 端 4kb 区域内有 4 个主要的开放阅读框 (ORF) (如图 1)。其中三个编码典型的冠状病毒结构蛋白 N (nucleocapsid), sM (small membrane) 和 M (membrane)。位于 sM 基因上游的 ORF, 命名为 ORF3, 编码一未知功能且具有多态性的产物^[8]。有学者还进一步鉴定了 ORF3 上游完整的 S (spike) 基因^[9]。

1.1 pol (polymerase) 基因

PEDV 基因组中 S 基因上游除编码多聚酶的基因外并无其它基因。这同缺乏 PEDV 相关的血细

收稿日期: 2002-01-28, 修回日期: 2002-03-06

作者简介: 张强敏 (1976-), 男, 硕士, 研究方向为动物蛋白质生物化学。E-mail: zhangqiangm@163.net

** 通讯作者。Correspondence author.

胞凝集酶活性结果一致。因为,如果冠状病毒基因组存在这样一种基因,它必定总是存在于S和多聚酶基因之间^[10]。Pol基因编码依赖于RNA的非结构蛋白,即RNA多聚酶。

1.2 S(spike)基因

PEDV S基因编码S(spike)蛋白。S基因的启动密码子通常并不是用于启动蛋白质的合成,而是翻译分子量(Mr)为151K的1383个氨基酸(aa)的多肽,该多肽含有29个潜在的糖基化位点。预测的PEDV S基因大多数糖基化位点都具有生物学意义。序列同一性比较表明,PEDV S基因与HCV229E的序列分别有60.6%(S2区)和37.0%(S1)相同;与TGEV,FIPV和CCV相比,S序列则分别有59.6%–60.0%(S1)和35.5%–35.9%(S2区)相同。PEDV和HCV229E旁侧序列KWP-WVWL相同,该序列与KWPWYVWL相比仅有一个氨基酸不同,后者在迄今所测定的所有S蛋白基因中都显示了保守性。

1.3 开放阅读框架 ORF3

处于116–784个核苷酸处,能编码223或224个氨基酸的多肽。ORF3编码的产物或许是一种未知的病毒包膜(envelope)蛋白,因为它与主要结构蛋白M非常相似,但这一结果未经证实。ORF3编码的产物有一6个His的尾。ORF3至少存在3个可变区,有短的核苷酸缺失(2–7个nt)。对PEDV的两个不同分离株CV777和Br1/87的测序后发现,这些核苷酸缺失两个分离株都有。同ORF编码的223个氨基酸参照多肽相比,任何一个缺失都会产生一个编码携带特别氨基酸多肽的ORF。可变区1(S1),仅见于分离株CV777,缺失2个核苷酸,编码208个氨基酸的多肽,与223个氨基酸参照多肽相比,后192个核苷酸相同;V2区有三种情形的核苷酸缺失;V3区有7个核苷酸的缺失,可产生213个氨基酸长的融合多肽。ORF3序列中还发现了两个功能基序(motif):精氨酸酶信号肽和ATP/GTP结合位点。由于ORF3中核苷酸缺失的存在,所以不能寄希望通过细胞培养复制ORF3产物。对PEDV CV777和Br1/87两个不同分离株的研究发现,虽然有时核苷酸缺失是在相同的位置,但缺失并不总是相同。可以认为,CV777和Br1/87起源于相同的病毒群,但以后各自进化了^[11]。将ORF3植入AKP基因,*E. coli*表达的ORF3为异源二聚体融合蛋白^[12]。ORF3具有多态性,其编码的产物究竟是

什么并具有何生物学意义仍有待于进一步研究。

1.4 sM(small membrane)基因

sM基因编码76个氨基酸多肽的冠状病毒结构蛋白sM。PEDV的sM基因序列与HCV229E和TGEV的相比,分别有54%和29%的同源性。PEDV两个病毒分离株CV777和Br1/87的sM基因严格保守。Northern杂交分析PEDV亚基因组RNA时发现,编码sM多肽的mRNA同预测的RNA5电泳迁移率相同^[11]。

1.5 M(membrane)基因

M基因为681个bp,编码226个氨基酸多肽的主要结构蛋白M。对M基因的序列比较分析表明,PEDV与HCV229E和TGEV分别有57%和53%的同源性。CV777和Br1/87核苷酸序列比较分析表明,在M基因上仅有2个核苷酸的差异。M基因非常保守,聚合酶链式反应(PCR)中检测PEDV的引物一般都是针对M基因设计的。

1.6 N(nucleocapsid)基因

N基因是PEDV已鉴定的ORF中最大的一个。N基因长达1700bp,编码一个441个氨基酸多肽的N(nucleocapsid)蛋白。用套式PCR扩增4个分离株PEDV N基因540bp的片段后发现,其核苷酸序列基本相同^[6],对PEDV CV777和Br1/87两个分离株N基因序列分析发现仅有2个碱基的差异。N基因1323个核苷酸的序列表明,PEDV与其它冠状病毒N基因序列有相当部分相同,但PEDV N基因明显比HCV229E和TGEV大。N基因在氨基酸和核苷酸水平上与HCV229E有很大的同源性。N基因还有一个336个核苷酸的ORF,编码富含Leu的蛋白。N基因处于PEDV基因组3'端,N基因的3'端和poly(A)尾之间有一个11个核苷酸的序列,这一序列在已测序的其它冠状病毒中都较保守。PEDV基因组的3'端这11个核苷酸的保守序列,是病毒复制过程中RNA负链合成的识别位点。N基因的5'端也存在一个类似于内部保守基因的7bp的序列。PEDV的N基因是最早被克隆的,所以对N基因的研究也较为详细。适应细胞生长的PEDV N基因含有三个内部开放阅读框(internal open reading frames, I ORF),分别命名为I-1(113个密码子),I-2(63个密码子)和I-3(72个密码子)。三个I ORF均绝对保守。其它冠状病毒已报道的N基因的mRNA序列分析也表明N基因中存在不同大小的I ORF。现在对这些

ORF 编码的蛋白质及其生物学作用还知之甚少^[8]。牛的冠状病毒(BCV)I ORF(208 个密码子)表达一个与膜有关的 23Kda 的蛋白,但其生物学作用仍有待测定。MHV 的 I ORF(207 个密码子)编码一结构蛋白,该蛋白与病毒复制无关^[13]。PEDV 所有 3 个 I ORF 的共同编码作用与 BCV 或 MHV 大约相当。野生型 PEDV CV777 分离株 3'端整个 N 基因和非编码区的 1800 个核苷酸序列分析表明,野生型 PEDV 同适应细胞生长的 PEDV 相似,N 基因下游未发现其它基因。病毒的细胞培养不会导致该基因组区任何核苷酸的变化,然而,适应细胞生长的 PEDV 对新生仔猪的致病力是明显减弱了^[14],这证明了该段基因及其基因产物对 PED 病毒致弱无关。

除了上述编码结构蛋白的基因外,PEDV 还有许多 ORF 编码非结构蛋白,这些 ORF 大多处于 S 和 sM 基因之间,但当前未能对其进行鉴定。

2 主要结构蛋白及其功能

目前为止,对 PEDV 的蛋白了解还很少。现在主要采用三种方法鉴定病毒蛋白质:一是通过代谢标记;二是通过合成多肽的抗血清和单克隆抗体;三是通过原核和真核生物表达系统^[15]。PEDV 的结构蛋白与其它冠状病毒相似,主要有糖基化纤突(spike)蛋白、糖基化囊膜(membrane)蛋白和 RNA 结合的未糖基化核衣壳(nucleocapsid)蛋白,其分子量分别为 85~135kD、20~32kD 和 55~58kD。

2.1 纤突(spike)S 蛋白

S 蛋白为 1383 个氨基酸,含有 29 个潜在的糖基化位点,同其它冠状病毒相似。PEDV S 蛋白缺乏蛋白水解位点,而 TGEV 在此位点上可产生氨基和羧基亚单位 S1 和 S2。亚单位的序列比较分析证实 PEDV 同 HCV229E 抗原相关。但 PEDV 还另外有 250 个残基的 N 端区,而这是 HCV229E 和 TGEV 的呼吸道变异株 PRCV 所缺乏的。S 蛋白在免疫介导中起着重要作用,S 蛋白还具有其它生物学作用,如识别靶细胞,促进病毒和细胞膜的融合。S 蛋白的 C 端有一疏水残基链(1322~1337 个氨基酸),预测在此处可形成 α 螺旋,起着膜受体的作用。S 蛋白氨基酸序列有一接近 90 个氨基酸残基链,PEDV 与 CCV、FIPV、TGEV、HCV229E 仅有 2 个残基(即 2.2%)保守,其余序列(除 N 端 250 个残基外)则至少有 20% 相同。TGEV S 蛋白也有一个这样的序列区,其中含有主要的中和介导抗原决定部

位。这 90 个氨基酸的序列区内所有的点突变都会使相关的单克隆抗体失效。当 pH 值为 4 时,S 蛋白溶解度最大,而 N 蛋白则要求 pH 为 9。制备的 S 蛋白和 N 蛋白可用作 ELISA 抗原,分别命名为 S-ELISA 和 N-ELISA。S-ELISA 比 N-ELISA 更为有效。感染 PEDV 猪血清中的抗 S 蛋白抗体比抗 N 蛋白抗体更为持久,即可在更长的时间中检测到抗 S 蛋白的抗体。

2.2 囊膜(membrane)M 蛋白

现已用兔抗肽血清鉴定了 PEDV M 蛋白,并用杆状病毒进行了表达。活性的 M 蛋白为 N 糖基化,分子量约为 27K,而重组体杆状病毒合成的 M 蛋白 Mr 为 23K,且与未糖基化的 M 蛋白有着相同的电泳迁移率^[15]。M 蛋白的 N 端区没有 TGEV 所具有的信号序列,从病毒粒子囊膜始可延伸 17 个氨基酸,且有一个 N 连糖基化位点。用特异性单克隆抗体 mcAb204 识别 PEDV 感染细胞裂解物中的 4 条多肽,其分子量分别为 27kD、24/23kD 和 19kD。可使用免疫印迹法和免疫沉淀法鉴定这些蛋白质。细胞培养接种后 6-8h 27kD 蛋白开始合成,然后是 24/23kD 蛋白和 19kD 蛋白。27kD 蛋白和 24/23kD 蛋白是糖基化蛋白;27kD 蛋白事实上就是 PEDV 囊膜蛋白 M。PEDV M 和 sM(small membrane)蛋白同其它冠状病毒比较,与 TGEV、FIPV 和 CCV 的同源性高于 MHV、BCV 和 IBV,这一结果同 N 蛋白得到的结论一致。水貂血清可同 PEDV、TGEV 的 M 蛋白,以及 CCV 的 M、N 蛋白反应。

2.3 核衣壳(nucleocapsid)N 蛋白

N 蛋白为磷蛋白,相对分子量为 57K。病毒感染细胞中 N 蛋白较丰富。N 蛋白等电点高,缺少糖基化和 RNA 结合位点。PEDV N 蛋白同其它冠状病毒 MHV、IBV、HCV OC43 和 BCV 的一致性为 12%~19%,同 FIPV、CCV、PRCV、TGEV 和 HCV229E 的一致性为 32%~37%。PEDV 与 HCV229E 的 N 蛋白最接近。N 蛋白氨基酸序列比较,PEDV 和 HCV229E 有 63 个相同的残基,而和 TGEV 有 49 个相同的残基。PEDV、TGEV、HCV229E 的 N 端序列的一致性比 C 端高。PEDV 完整的 N 蛋白等电点为 10.5,但 C 端 50 个残基的等电点很低,仅为 3.4,这是由于其 C 端残基通常是带负电荷或呈中性。N 蛋白能与病毒多聚酶作用;或许还有可能同细胞因子作用,从而改变宿主细胞的转录。N 蛋白是 PEDV 的主要结构蛋白之一,

M. Rosskopf还在 PEDV 感染的细胞核中发现了 N 蛋白(资料未公开),这一结果有待于进一步证实。

3 与其它冠状病毒的抗原相关性

免疫荧光(IFA)和免疫电镜(IEM)试验表明, PEDV 与 IBV、HEV、NCDCV、CCV、FIPV 没有抗原相关性。与 TGEV 进行交叉中和试验、ELISA 试验等,都证明 PEDV 和 TGEV 在抗原性上不同,无共同抗原。已鉴定的 PEDV ORF(M, sM 和 ORF3)与 HCV229E 比与 TGEV 的一致性高, N 蛋白中也得到了相同的结论。PEDV 与 HCV229E 抗原相关,根据 M 蛋白的氨基酸序列,可得出 PEDV 同其它冠状病毒的进化关系树(图 2)^[36]。

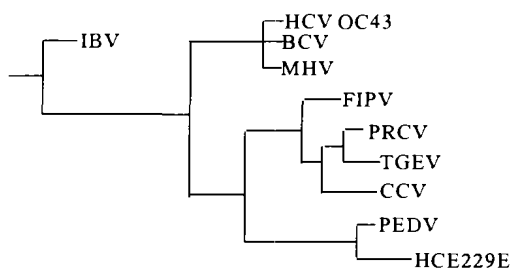


图 2 PEDV 同其它冠状病毒的进化关系树

Fig. 2 Phylogenetic analysis of PEDV and other coronaviruses

PEDV、FIPV、CCV、TGEV 可和水貂冠状病毒的 N 蛋白发生免疫印迹交叉反应,用多因子血清和单克隆抗体等其它血清学试验都未测出在 PEDV 和 TGEV 相关冠状病毒间有抗原交叉反应^[17]。

参考文献

- [1] Chae C, Kim O, Choi C, *et al.* Prevalence of porcine epidemic diarrhoea virus and transmissible gastroenteritis virus infection in Korean pigs[J]. *Vet Rec.* 2000, 147:606 - 608.
- [2] Hirai T, Nunoya T, Ihara T, *et al.* Dual infection with PCV - 2 and porcine epidemic diarrhoea virus in neonatal piglets[J]. *Vet Rec* 2001, 148:482 - 484.
- [3] Kweon C H, Kwon B J, Woo S R, *et al.* Immunoprophylactic Effect of chicken Egg Yolk Immunoglobulin(IgY) against porcine epidemic diarrhoea virus(PEDV) in piglets[J]. *J Vet Med Sci* 2000, 62:961 - 964.
- [4] Kweon C H, Kwon B J, Lee J G, *et al.* Derivation of attenuated porcine epidemic diarrhoea virus(PEDV) as candidate[J]. *Vaccine*, 1999, 17:2546 - 2553.
- [5] Kocherhans R, Bridgen A, Ackermann M, *et al.* Completion of the porcine epidemic diarrhoea coronavirus (PEDV) genome sequence. *Virus[J]*. *Genes*, 2001, 23:137 - 44.
- [6] Kubota S, Sasaki O, Amimoto K, *et al.* Detection of porcine epidemic diarrhoea virus using polymerase chain reaction and comparison of the nucleocapsid protein genes among strains of the virus [J]. *J Vet Med Sci* 1999, 61:827 - 830.
- [7] Bridgen A, Kocherhans R, Tobler K, *et al.* Further analysis of the genome of porcine epidemic diarrhoea virus[J]. *Adv Exp Med Biol*, 1998, 440:781 - 786.
- [8] Mahender Singh. A novel internal open reading frame product expressed from a polycistronic mRNA of porcine epidemic diarrhoea virus may not contribute to virus[J]. *J Gen Virol*, 1999, 80:1959 - 1963.
- [9] Duarte M, Laude H. Sequence of the spike protein of the porcine epidemic diarrhoea virus[J]. *J Gen Virol*, 1994, 75:1195 - 1200.
- [10] Utiger A, Rkosskopf M, Guscetti F, *et al.* Preliminary characterization of a monoclonal antibody specific for a viral 27kD glycoprotein family synthesized in porcine epidemic diarrhoea virus infected cells[J]. *Adv Exp Med Biol*, 1993, 342:197 - 202.
- [11] Duarte M, Tobler K, Bridgen A, *et al.* sequence analysis of the porcine epidemic diarrhoea virus genome between the nucleocapsid and spike protein genes reveals a polymorphic ORF[J]. *Virology*, 1994, 198:466 - 476.
- [12] Schmitz A, Tober K, Suter M, *et al.* Prokaryotic expression of porcine epidemic diarrhoea ORF3 [J]. *Adv Exp Med Biol*, 1998, 440:775 - 780.
- [13] Fischer F, Peng D, Hingley S, *et al.* The internal open reading frame within the nucleocapsid gene of mouse hepatitis virus encodes a structural protein that is not essential for viral replication [J]. *J Virol*, 1997, 71:996 - 1003.
- [14] Bernasconi C, Guscetti F, Utiger A, *et al.* Experimental infections of gnotobiotic piglets with a cell culture adapted porcine epidemic diarrhoea virus: clinical, histopathological and immunohistochemical findings[A]. in: *Immunobiology of Viral Infections* [C]. Edited by M Schwyzer & M, Ackermann Lyon, France: Fondation Marcel Merieux, 1995. 542 - 546.
- [15] Utiger A, Tobler K, Bridgen A, *et al.* Identification of protein specified by porcine epidemic diarrhoea virus. *Adv Exp Med Biol*, 1995, 380:287 - 290.
- [16] Duarte M, Gelfil J, Lambert P, *et al.* Genomic organization of porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV)[A]. in: *Coronaviruses: Molecular Biology and Virus - Host Interaction*[C], Edited by H. Larde and J. V. Vautherot, New York: Plenum, 1993.
- [17] Enjuanes L, Van der Zeijst B A M. Molecular basis of transmissible gastroenteritis virus epidemiology[A]. in: *the Coronaviridae*[C]. Edited by Siddell. New York: Plenum Press, 1995. 337 - 376.