

猪源和鼠源脑心肌炎病毒分离株基因组的比较分析

赵 婷, 张家龙, 盖新娜, 郭 鑫, 周 磊, 陈艳红, 查振林, 杨汉春*

(中国农业大学动物医学院, 农业部人畜共患病重点开放实验室, 北京 100193)

摘要: 为了分析猪源和鼠源脑心肌炎病毒(EMCV)基因组的差异, 对分离自同一猪场猪临床样本和鼠组织样本的 2 株病毒(GX0601 和 GX0602)进行了全基因组序列测定和比较分析。结果显示, 2 个分离毒株的基因组全长(包含 poly A)分别为 7 729 和 7 725 nt, 核苷酸和氨基酸同源性均在 99.8% 以上。与国外毒株及国内已报道的分离株的序列比较结果表明, 2 个毒株与 BJC3 和 HB1 的核苷酸同源性为 98.18%~99.41%, 推导的氨基酸序列同源性为 99.5%~99.7%, 与国外分离株的核苷酸序列和氨基酸序列的同源性分别介于 80.53%~99.57% 和 93.1%~99.5%。基于基因组开放阅读框推导的氨基酸序列的系统进化分析表明, 我国分离毒株与国外毒株 PEC9、CBNU、BEL-2887A/91 和 EMCV-R 的同源性较高, 位于同一个亚群。研究结果提示, 猪源与鼠源毒株的基因组具有很高的同源性, 鼠是猪场 EMCV 感染的传染来源。

关键词: 脑心肌炎病毒; 猪源和鼠源毒株; 基因组; 序列测定; 进化分析

中图分类号: S852.659.6

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)06-0873-06

Comparative Analysis of the Genomes of Encephalomyocarditis Virus Isolates from Porcine and Mouse Origin

ZHAO Ting, ZHANG Jia-long, GE Xin-na, GUO Xin, ZHOU Lei,

CHEN Yan-hong, ZHA Zhen-lin, YANG Han-chun*

(Key Laboratory of Zoonosis of Ministry of Agriculture, College of Veterinary
Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: The complete genomes of two strains of encephalomyocarditis virus (EMCV) (GX0601 and GX0602), isolated from clinical tissue samples of pig and mouse in a pig farm in Guangxi province, were sequenced and analyzed in order to investigate the differences between the genomes of viruses from different host origin. The results showed that the genome sizes of the two viruses were 7 729 and 7 725 nt, respectively, including poly (A) tail. The complete genomic nucleotide and amino acid identity between the two viruses were above 99.8%. Compared with foreign and domestic strains, the two viruses had 98.18%-99.41% identity in nucleotide and 99.5%-99.7% identity in deduced amino acid with BJC3 and HB1, while 80.53%-99.57% identity in nucleotide and 93.1%-99.5% identity in deduced amino acid with foreign strains. Phylogenetic tree based on the amino acid sequences of the entire ORF revealed that the Chinese isolates clustered together with PEC9, CBNU, BEL-2887A/91 and EMCV-R. Our results revealed that the complete genome between the viruses from pig and mouse origin had higher homology, suggesting that mouse might be the source of EMCV infection in pig farm.

Key words: encephalomyocarditis virus (EMCV); strains from pig and mouse origin; genome; sequencing; phylogenetic analysis

收稿日期: 2009-02-20

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(30530550); 教育部长江学者和创新团队发展计划(IRT0866)

作者简介: 赵 婷(1982-), 女, 汉族, 硕士生, 主要从事兽医微生物学与免疫学研究

* 通讯作者: 杨汉春, E-mail: yanghanchun1@cau.edu.cn

脑心肌炎病毒(Encephalomyocarditis virus, EMCV)属于微RNA病毒科心病毒属的成员。EMCV感染可引起断奶仔猪的急性心肌炎、突然死亡和母猪的繁殖障碍^[1-5]。EMCV可感染多种宿主动物,其中猪是感染最普遍,也是最严重的动物^[6],而鼠类是EMCV的自然储存宿主^[7]。许多国家猪群中曾暴发过EMCV感染^[6],鼠类可能在疾病的暴发中扮演了重要角色。

EMCV为单股正链RNA病毒,基因组全长约7.8 kb,有1个大的开放阅读框(ORF),其基因组结构与其他微RNA病毒相似。盖新娜等^[8]率先从我国猪群的临床组织样本中分离到EMCV,张家龙等^[9]相继应用酶联免疫吸附试验从血清学角度揭示了我国猪群中EMCV感染的普遍存在。Zhang等^[10]完成了国内2株猪源EMCV分离毒株的全基因组测序。然而,国内鼠源毒株的基因组序列,以及与猪源毒株间的差异尚未见报道。本研究对分离自同一猪场猪源和鼠源EMCV毒株进行了全基因组序列测定与分析,以期了解猪源和鼠源毒株在基因组分子特征上的差异。

1 材料与方法

1.1 病毒

EMCV GX0601和GX0602分别是2006年作者实验室从广西某一猪场分离到的猪源和鼠源毒

株。GX0601分离自猪的临床脾脏样本,GX0602分离自猪场捕杀鼠的心脏和脾脏组织。2株病毒分别在BHK-21细胞上增殖传至第4代用于全基因组序列测定。

1.2 细胞与载体

BHK-21传代细胞系由本实验室保存;Mach-T1 phage resistant感受态细胞和克隆载体pGEM-T-easy、pGEM-blunt购于北京全式金生物技术有限公司。

1.3 主要试剂

TRIzol[®] LS Regent购自Invitrogen公司。RT007 AMV Reverse Transcriptase(含5×Buffer)购自Promega公司。TaKaRa PrimeSTAR[™] HS酶、TaKaRa LA Taq with GC buffer酶、DL2000 DNA Ladder购自宝生物工程(大连)有限公司。RNasin购自华美生物工程公司。dNTPs购自北京天为时代公司。B型小量DNA片段快速胶回收试剂盒购自博大泰克生物科技公司。

1.4 用于序列比较分析的毒株

研究中用于序列比较和分析的14个EMCV毒株的全基因组序列均下载自GenBank(见表1)。

1.5 EMCV全基因组的RT-PCR扩增与克隆测序

利用Primer Premier 5.0软件,参考GenBank上登录的EMCV毒株的全基因组序列,设计合成6对引物(表2),进行毒株基因组的分段扩增和克隆^[10]。

表1 用于序列比较和分析的EMCV毒株

Table 1 EMCV reference strains used in this study

登录号 GenBank accession No.	来源 Origin	动物 Species	病毒名称 Virus designation
DQ464062	China	Pig	BJC3
DQ464063	China	Pig	HB1
M81861(NC_001479)	U. S. A	Chimpanzee	EMCV-R
M37588	Panama	Pig	D variant
AY296731	U. S. A	Pig	EMCV-30
AF356822	Belgium	Pig	BEL-2887A/91
DQ517424	Korea	Pig	CBNU
X74312	Germany	Pig	PV21
X87335	Germany	Pig	PV2
M22457	Canada	Pig	EMC-B
M22458	Canada	Pig	EMC-D
L22089	Uganda	Monkey	Mengo-M
DQ288856	U. S. A	Mouse	PEC9
DQ294633	U. S. A	Mouse	Mengo-Rz-pMwt

方法简述如下:取细胞培养后的病毒上清液,提取总 RNA。RNA 在 65 °C 水浴 5 min 后,置于冰中急冷 1 min,之后 55 °C 水浴或 42 °C 反转录 90 min 合成 cDNA。以 cDNA 为模板,按“98 °C 1 min;98 °C 10 s,54.5~56.5 °C 13 s,72 °C 1~2 min;30 个循环后

72 °C 延伸 10 min”的程序进行 PCR 扩增。PCR 产物回收后克隆于载体中,转化 Mach1-T1 phage resistant 感受态细胞,阳性克隆经 PCR 鉴定后送北京英俊公司测序。

表 2 用于病毒全基因组 RT-PCR 扩增的引物

Table 2 Oligonucleotide primers for RT-PCR amplification and cloning

引物 Primer	扩增片段位置 Position for amplified fragments	引物序列 (5'→3') Primer sequence	扩增片段/bp Amplified fragment
Em1F	1-1 177	TTGAAAGCCGGGGTGGGAG	1 177
Em1R		TAGGTTCTGGGTGGGTC	
Em2F	1 039-2 464	ATTCCACCTCCTCAGACA	1 426
Em2R		TCCCAAATCGCATAAGT	
Em3F	2 184-4 256	ATCCCTAATGCTGTCCC	2 073
Em3R		CACTGCTATTGTCATCCCT	
Em4F	4 175-5 973	AGAAACACTAAACAACCCAG	1 799
Em4R		AGAGGCGGATGAAAGATA	
Em5F	5 445-7 557	CAGCAAGCGACAGATGA	2 113
Em5R		CTGGACGATAGTATGACAACA	
Em6R	7 015-7 835	AGCGTGTCTACGATGTGG	~830
3sites Adaptor primer		CTGATCTAGAGGTACCGGATCC	

1.6 序列拼接与分析

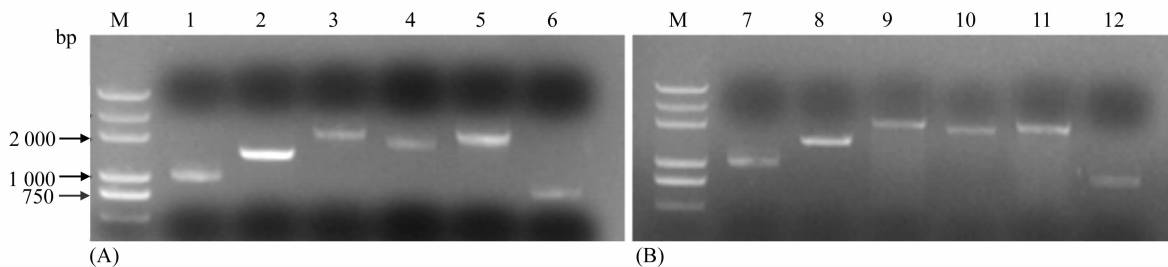
应用 DNAMAN 软件将各片段测序结果顺次拼接成病毒全基因组序列,并与 GenBank 中登录的 EMCV 毒株的全基因组序列进行比较分析。根据核苷酸序列推导出氨基酸序列,使用 Clustalx 软件进行氨基酸序列比对。基于病毒完整的 ORF 编码的氨基酸序列,用 Mega3.1 软件以 Neighbor-join-

ing 方法绘制病毒的系统进化树。

2 结果与分析

2.1 毒株的全基因组分段扩增

利用设计的引物,采用 RT-PCR,扩增出 EMCV 分离毒株 GX0601 和 GX0602 全基因组的 6 个片段,扩增片段与预期大小相符(图 1)。



M. DNA Marker;1-6. Different fragments of GX0601;7-12. Different fragments of GX0602

图 1 EMCV GX0601(A)和 GX0602(B)基因组各片段 RT-PCR 扩增结果

Fig. 1 The amplified genomic cDNA fragments of EMCV GX0601 and GX0602 by RT-PCR

2.2 毒株的全基因组序列比较分析

通过序列拼接,猪源毒株 GX0601 和鼠源毒株 GX0602 的基因组全长分别为 7 729 和 7 725 nt,包

括 poly(A)尾,其全基因组序列已收录到 GenBank (FJ604852、FJ604853)。2 个毒株的全基因组的同源率为 99.82%,编码氨基酸的开放阅读框(ORF)

2.3 毒株的进化分析

基于 EMCV 的完整 ORF 编码的氨基酸序列,使用 Mega3.1 软件针对 GX0601、GX0602 以及国内外 14 个 EMCV 毒株,绘制系统进化树(图 2)。图 2 显示,EMCV 可分为 3 个不同的亚群,其中, Mengo-M 株与 Mengo Rz-pMwt 病毒位于一个独立的亚群(Mengo 病毒的完整 ORF 为 2 293 aa,其他毒株均为 2 292 aa),明显不同于其他 EMCV 毒

株;EMCV-B、D、PV2、D variant 的亲缘关系较近,形成一个亚群;GX0601、GX0602 和国内分离株 BJC3、HB1 与其他 EMCV 毒株形成另一个大的亚群(该亚群中 EMCV-30 形成一个小的分支)。我国的 4 个 EMCV 分离株亲缘关系较近,其中 GX0601 和 GX0602 亲缘关系最近。我国分离株与韩国的分离毒株 CBNU 的亲缘关系较近,其次为 BEL-2887A/91。

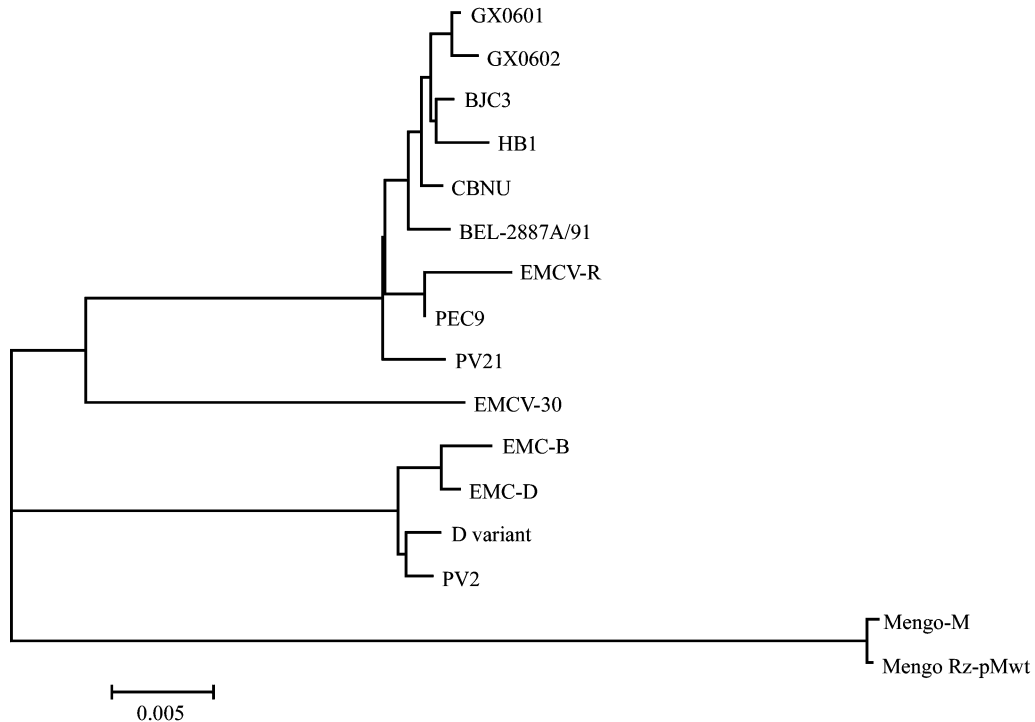


图 2 基于 EMCV ORF 氨基酸序列绘制的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree constructed based on amino acid sequences encoded by complete ORF of EMCV

3 讨论

尽管已有研究表明,我国猪群中存在较高的脑心肌炎病毒(EMCV)感染率,血清学阳性率很高^[10],但其对养猪生产的危害性还不突出。实际生产中,EMCV 主要表现亚临床感染,可能在猪的多病原感染中具有一定的作用。然而,分析 EMCV 变异以及猪场鼠在传播 EMCV 中的作用具有潜在的价值。本研究中,作者对分离自同一猪场的猪源和鼠源 EMCV 毒株进行了全基因组序列测定,并与国内外毒株进行了比较分析,结果显示,猪源毒株 GX0601 与鼠源毒株 GX0602 的全基因组序列尽管高度同源,但也存在一定的差异。这就提示鼠可能

是猪群 EMCV 感染的一个重要传染源。从它们之间基因组的微小差异来看,EMCV 从鼠到猪体内有可能会发生一些变异,以适应新的宿主。虽然我国的 4 株 EMCV 之间的亲缘关系较近,全基因组以及各基因片段的同源性都很高,但已出现了 VP1 蛋白、2A 蛋白中的少数氨基酸的变异。

遗传进化分析表明,来自同一猪场鼠源毒株 GX0602 与猪源毒株 GX0601 的亲缘关系最近,国外鼠源毒株 PEC9 与我国及大部分国外猪源毒株的亲缘关系较近,处于进化树的同一亚群,而且我国的 EMCV 毒株与韩国毒株 CBNU 的亲缘关系较近,提示 EMCV 存在一定的地域差异。Knowles 等将意大利不同地区不同时期分离到的 9 株猪源或鼠源

EMCV 毒株与其他国家的 EMCV 毒株进行序列比对和进化分析,发现意大利存在的猪源与鼠源 EMCV 毒株同源性较高,处在同一进化群上^[11]。

已有的研究表明,EMCV 在猪只之间传播能力有限,猪群暴发疾病可能依赖于一些特定的条件,而鼠在猪群 EMCV 的传播过程中可能有重要的作用^[12]。本研究的结果表明,鼠源毒株和猪源毒株间基因组同源性高达 99.93%,说明他们存在极高的亲缘关系,从而暗示 EMCV 在鼠和猪之间存在互相传播的可能性。但要揭示鼠在 EMCV 传播中的地位以及 EMCV 在猪群中的传播途径仍需做进一步的研究。

参考文献:

- [1] LOVE R J, GREWAL A S. Reproductive failure in pigs caused by encephalomyocarditis virus [J]. *Aust Vet J*, 1986, 63: 128-129.
- [2] DEA S, BILODEAU R, SAUVAGEAU R, et al. Outbreaks in Quebec pig farms of respiratory and reproductive problems associated with encephalomyocarditis virus [J]. *J Vet Diagn Invest*, 1991, 3: 275-282.
- [3] KOENEN F, DE C K, LEFEBVRE J, et al. Reproductive failure in sows following experimental infection with a Belgian EMCV isolate [J]. *Vet Microbiol*, 1994, 39: 111-116.
- [4] BILLINIS C, PASCHALERI — PAPADOPOULOU E, PSYCHAS V, et al. Persistence of encephalomyocarditis virus (EMCV) infection in piglets [J]. *Vet Microbiol*, 1999, 70: 171-177.
- [5] GELMETTI D, MERONI A, BROCCHI E, et al. Pathogenesis of encephalomyocarditis experimental infection in young piglets: a potential animal model to study viral myocarditis [J]. *Vet Res*, 2006, 37: 15-23.
- [6] KOENEN F. Encephalomyocarditis virus [M]// Straw B E, Zimmerman J J, Allaire S D, et al. *Diseases of Swine*. Iowa: Blackwell Publishing Professional, 2006.
- [7] SEAMAN JT, BOULTON J G, CARRIGAN M J. Encephalomyocarditis virus disease of pigs associated with a plague of rodents [J]. *Aust Vet J*, 1986, 63: 292-294.
- [8] 张家龙, 盖新娜, 马良, 等. 规模化猪场脑心肌炎病毒的血清学调查 [J]. *中国兽医杂志*, 2007, 43(1): 7-9.
- [9] 盖新娜, 杨汉春, 郭鑫, 等. 猪脑心肌炎病毒的分离与鉴定 [J]. *畜牧兽医学报*, 2007, 38(1): 59-65.
- [10] ZHANG G Q, GE X N, GUO X, et al. Genomic analysis of two porcine encephalomyocarditis virus strains isolated in China [J]. *Arch Virol*, 2007, 152: 1209-1213.
- [11] KNOWLES N J, DICKINSON N D, WILSDEN G, et al. Molecular analysis of encephalomyocarditis viruses isolated from pigs and rodents in Italy [J]. *Virus Res*, 1998, 57: 53-62.
- [12] MAURICE H, NIELEN M, STEGEMAN J A, et al. Transmission of encephalomyocarditis virus (EMCV) among pigs experimentally quantified [J]. *Vet Microbiol*, 2002, 88: 301-314.