

李素芬, 汤学超, 周金柱, 等. 猪轮状病毒 G1P [7] 株分离鉴定及多克隆抗体制备 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (4): 101-107.

LI S F, TANG X C, ZHOU J Z, et al. Isolation, identification and preparation of polyclonal antibody against porcine rotavirus G1P [7] [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (4): 101-107.

猪轮状病毒 G1P [7] 株分离鉴定及多克隆抗体制备

李素芬^{1,2}, 汤学超², 周金柱², 王丹丹², 朱雪蛟², 陶然²,
李运川², 郭容利², 张雪寒^{2*}, 李彬^{1,2*}

(1. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095;

2. 江苏省农业科学院兽医研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 旨在明确猪场腹泻原因并分离猪轮状病毒 (PoRV)。采集腹泻猪粪便, 经 RT-PCR 检测为阳性的样品接种于单层细胞, 通过细胞病变 (CPE) 和间接免疫荧光 (IFA) 来检测病毒增殖; RT-PCR 扩增 VP4 和 VP7 基因并测序以确定 G/P 基因型, 生物信息学软件分析 VP4 和 VP7 基因的遗传进化特征; 传代病毒灭活后制备接种家兔制备多克隆抗体, 测定中和抗体, 并经 Western blot 和 IFA 鉴定其特异性。结果: 猪流行性腹泻病毒 (PEDV)、传染性胃肠炎 (TGEV)、猪德尔塔冠状病毒 (PDCoV)、伪狂犬病毒 (PRV) 和牛病毒性腹泻病毒 (BVDV) 均为阴性, 只有 PoRV 为阳性; 过滤粪便接种单层 MA104 细胞, 连续传 5 代均可观察到以细胞圆缩、最后瓦解脱落为特征的 CPE, IFA 检测到 PoRV 的特异性荧光, 表明病毒分离成功, 命名为 JSNJ2019; 分离株连续传代, 病毒滴度逐步升高, 介于 $10^5 \sim 10^{6.5}$ TCID₅₀/mL; 分离株 JSNJ2019 为 G1P [7] 基因型; 3 次免疫后家兔血清的中和抗体滴度最高可达 2^{11} , Western blot 出现特异性条带且 IFA 荧光亮而特异。本研究成功分离 PoRV JSNJ2019 (G1P [7]) 且免疫原性良好, 制备的多克隆抗体特异性强, 为研究 PoRV 致病机制奠定基础。

关键词: 猪轮状病毒; 分离鉴定; 基因型; 免疫原性, 多克隆抗体

中图分类号: S858.28

文献标志码: A

文章编号: 0529-5130(2024)04-0101-07

Isolation, identification and preparation of polyclonal antibody against porcine rotavirus G1P [7]

LI Sufen^{1,2}, TANG Xuechao², ZHOU Jinzhu², WANG Dandan², ZHU Xuejiao², TAO Ran²,
LI Yunchuan², GUO Rongli², ZHANG Xuehan^{2*}, LI Bin^{1,2*}

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. Veterinary Research Institute, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: This study was aimed to identify the causes of diarrhea in pig farms and to isolate porcine rotavirus (PoRV) in order to accumulate biological materials for the prevention and control of the disease. Feces samples were collected from pigs inflicted with diarrhea for RT-PCR detection. The positive samples were inoculated into monolayer cells and the virus proliferation was detected by the cytopathic effect (CPE) and indirect immunofluorescence (IFA). The VP4 and VP7 genes were amplified by RT-PCR and were sequenced to determine their G/P genotypes. The genetic evolution characteristics of VP4 and VP7 genes were analyzed by bioinformatics software. The rabbit polyclonal antibody prepared by immunizing with inactivated JSNJ2019 vaccine was evaluated by Western blot and IFA. The results showed that porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), transmissible gastroenteritis virus (TGEV), porcine coronavirus (PDCoV), porcine pseudorabies virus (PRV) and bovine viral diarrhea virus (BVDV) were all negative, and only PoRV was positive. A single layer of MA104 cells was inoculated with filtered fecal samples, the typical CPE was characterized by round contraction, and finally its collapse and shedding was observed after 5 successive generations. The specific fluorescence of PoRV was detected by IFA, indicating successful isolation of the virus, which was named JSNJ2019. The virus titers of the isolates increased gradually after successive passage, ranging from $10^5 \sim 10^{6.5}$ TCID₅₀/mL. The strain JSNJ2019 was of the G1P [7] genotype. After three times of immunization, the titer of the neutralizing antibody in the rabbit serum (SNT)

收稿日期: 2023-04-25; 修回日期: 2024-01-26

基金项目: 国家重点研发计划 (2022YFD1800601)

第一作者: 李素芬, 女, 硕士研究生

* 通信作者: 李彬, 研究员, 主要从事动物病毒学方面的研究, E-mail: libinana@126.com; 张雪寒, 研究员, 主要从事猪轮状病毒防控技术研究, E-mail: liuxuehan1996@hotmail.com。

was up to 2¹¹. Western blot showed specific bands, and IFA fluorescence was bright and specific. In this study, PoRV JSNJ2019 (G1P [7]) was successfully isolated with good immunogenicity, which enriched the epidemiological data of PoRV and laid the foundation for the development of vaccines. Moreover, the prepared polyclonal antibody had strong specificity, and could serve as a reliable test tool for studying the pathogenesis of PoRV.

Keywords: porcine rotavirus; isolation and identification; genotype; immunogenicity; polyclonal antibody

轮状病毒 (rotavirus, RV) 感染与多种哺乳动物和鸟类的肠炎和腹泻有关^[1]。RV 是非囊膜二十面体病毒颗粒, 包含 11 段双链 RNA 基因组^[1]。病毒粒子由 3 层病毒结构蛋白组成, VP2 构成核心, VP6 构成内层, VP7 和 VP4 构成外壳, 外壳包含血清型/基因型特异性表位。根据 VP6 蛋白的抗原性可将 RV 分类为 12 个血清群 (A~L)^[2-3], A、B、C、E 和 H 群 RV 已经被证实可感染猪, 其中感染人和动物最常见的为 A 群轮状病毒 (RVA)。

猪轮状病毒 A 群 (PoRVA) 感染仔猪呈世界流行, 各国猪场中 PoRVA 的阳性率呈明显走高趋势, 报道最高感染率可达 70% 以上, 引起世界各国重视^[4-5], 常与猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 等其他腹泻病原混合感染, 给世界养猪业造成严重的经济损失^[6-7]。2 种外衣壳蛋白 (VP7 和 VP4) 刺激中和抗体的产生, 形成了 RVA 菌株 G (糖蛋白) 和 P (蛋白酶敏感) 双基因分型系统的基础。这种双基因分型系统通常用于 RVA 分类, 并由轮状病毒分类工作组不断更新。根据这一分类体系, 全球已描述了 42 种 G 和 58 种 P 基因型^[8-9]。G/P 双基因组合的多样性是免疫保护的重要决定因素, 与疫苗研制高度相关^[8,10]。因此, 持续监测流行的 RVA 毒株对于了解区域流行病学信息和更新新型疫苗毒株非常重要。

小鼠 EDIM 毒株和猿猴 SA-11 毒株是能够在细胞培养中繁殖的第一批 RV 毒株^[11-12]。牛和人源 RV 分别于 1971 年和 1980 年在细胞培养中首次分离出来^[13-14]。本研究旨在从临床发病猪样品中分离 PoRV, 对分离毒株的 VP4 和 VP7 基因进行序列和遗传进化分析, 为疫苗研制储备生物学材料, 并且制备该分离毒株的多克隆抗体, 为 PoRV 致病机制研究提供可靠的工具。

1 材料与方法

1.1 病料来源

从江苏省南京市附近某猪场采集腹泻猪粪便, 将 3 份粪便与 1×MEM (含双抗, 其中青霉素浓度为 200 U/mL, 链霉素终浓度为 200 mg/mL), 按 1:3 进行均质化, 反复冻融 2 次, 低温 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液先后使用 0.45 μm 和 0.22 μm 滤器

过滤, 其中吸取部分用于 RNA 提取和 RT-PCR 检测, 剩余部分用于病毒分离。

1.2 主要试剂、细胞和动物

RNA 提取试剂盒 (Fast Pure Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit V2), HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper) 和 2×Green Taq Mix 预混液购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。MA104 细胞由江苏省农业科学院兽医所保存。MEM 和胰酶购自上海源培生物科技股份有限公司; 四季青胎牛血清购自浙江天杭生物科技股份有限公司; PoRVA 的 VP6 单克隆抗体由本实验室制备^[15]; His-sumo-VP4*P7 (26~231 aa) 重组蛋白由本实验室制备, 是将 VP4 基因完整阅读框的 78~693 位核苷酸序列克隆到 pCold-sumo 质粒, 大肠杆菌表达纯化所得, 浓度为 2 mg/mL; FITC-羊抗小鼠二抗、FITC-羊抗兔二抗和 HRP-羊抗兔二抗购自武汉博士德生物科技股份有限公司。新西兰大白兔 2 只, 体重 3 kg/只, 采购自金陵种兔场。

1.3 引物设计与合成

本研究使用引物主要用于检测 PEDV、传染性胃肠炎 (TGEV)、猪德尔塔冠状病毒 (PDCoV)、RV、伪狂犬病毒 (PRV) 和牛病毒性腹泻病毒 (BVDV), 委托南京金斯瑞生物科技有限公司合成, 如表 1。

1.4 病原的 RT-PCR 检测

吸取 1.1 中处理的上清液样品 100 μL, 参照核酸提取试剂盒说明书提取总 RNA 和 DNA。按照反转录试剂盒 HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper) 说明书进行反转录获得 cDNA。利用 2×Green Taq Mix 和 6 种腹泻相关病毒 (PEDV、TGEV、PDCoV、RV、PRV 和 BVDV) 的检测引物进行检测。PEDV 和 TGEV: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PDCoV: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PRV: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。BVDV 和 RV-VP6: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。

表 1 引物信息

引物名称	引物序列 (5'→3')	扩增大小/bp	退火温度/℃	参考文献
PEDV-M-F	CTATTCCCGTTGATGAGGTG	610	56	[16]
PEDV-M-R	GCTGAGTAGTCGCCGTGTT			
TGEV-N-F	GGAGTTGTCTGGGTTGCCAA	816	56	本研究
TGEV-N-R	GTTGCTTACCTCATCAATCAT			
PDCoV-N-F	CTGAACACCAGGCACATGTC	650	58	本研究
PDCoV-N-R	CTACTCATCCTCAGTTTCCT			
RV-VP6-F	CAGCGTACTGGATTCGTGTT	309	55	本研究
RV-VP6-R	TCTTGGGAAACTGAACCTCT			
RV-VP7-F	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGT	1 061	58	[17]
RV-VP7-R	GCTCACATCATAACAATTCTAATCT			
RV-VP4-F	ATGGCTTCDCTCATTAYAGACA	1 080	58	本研究
RV-VP4-R	GCTTGAGAATCRTCCARTA			
PRV-gD-F	CAGGAGGACGAGCTGGGGCT	216	60	本研究
PRV-gD-R	GTCCACGCCCGCTTGAAGCT			
BVDV-UTR-F	AGAGGCTAGCCATGCCCTTAGT	290	55	本研究
BVDV-UTR-R	TCAACTCCATGTGCCATGTAC			

1.5 病毒分离和传代

将长满单层的 MA104 细胞进行消化和传代，铺 1 块 6 孔板，待细胞长满单层后接毒。首先将 1.1 中过滤处理上清液预处理，加入终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胰酶，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 激活 30 min 后备用。先用 1 \times PBS 洗涤 6 孔板单层细胞，将前述预处理过上清液加入至 6 孔板中，于 5% CO_2 培养箱中使病毒与细胞孵育 1 h。之后取出 6 孔板，弃掉上清液，并用 1 \times PBS 洗涤 2 次，加入无血清、胰酶终浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 MEM 维持液，连续观察细胞病变 (CPE) 不少于 3 d，待细胞有 80% CPE 时收获病毒液，反复冻融 2 次，收获病毒。相同的方法连续传代。

1.6 间接免疫荧光 (IFA) 鉴定

将 MA104 细胞铺于 96 孔板中，按照 1.5 方法进行病毒感染，病毒感染后 24 h 左右即将出现细胞病变时，弃掉上清液，用预冷的 1 \times PBS 洗涤细胞 3 次后加入 200 μL 预冷的冰乙醇，4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 30 min；再 PBS 洗涤 3 次后加入 5% 脱脂奶粉封闭 1 h；弃掉封闭液，PBS 洗涤 3 次之后向孔中加入 50 μL 稀释的 PoRV VP6 蛋白单克隆抗体 (1 : 2 500)，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h；弃掉一抗，用 PBS 洗涤 3 次，加入 50 μL 稀释的 FITC-羊抗小鼠二抗 (1 : 2 000)，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 45 min；弃掉二抗，用 PBS 洗涤 3 次，显微镜下观察并拍照。

1.7 VP4 和 VP7 基因扩增和序列分析

RV-VP4-F 和 RV-VP4-R、RV-VP7-F 和 RV-VP7-R 扩增 VP4 和 VP7 基因片段，反应程序为：95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min；95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s，58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min 10 s，共 35 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。扩增产物送南京擎科生物科技有限公司进行测序。利用生物信息学软件 DNASTar 对 VP4 (表 2) 和 VP7 (表 3) 基因与 NCBI 中的 G 基因型和 P 基因型代表毒株序列进行核苷酸同源性分析和遗传进化分析。

表 2 RV P [7] (VP4 基因) 参考序列信息

物种	毒株	GenBank 登录号	来源	分离年份
猪	JL94	AY523636	中国	2004
熊猫	CH-1	HQ641296	中国	2009
猪	ESP/OSU-C5111/2010	KJ450845.1	西班牙	2010
牛	KJ25-1	HM988968.1	韩国	2010
猪	USA/NC117/2014	MN893656.1	中国	2014
猪	CHN-SD1703	OP454315	中国	2017
猪	CH/2020/OSU	MT066203	瑞士	2020

表3 RV G1 (VP7 基因) 参考序列信息

物种	毒株	GenBank 登录号	来源	分离年份
人	USA/DC4084/1988	KC580519	美国	1988
人	ARG1345	JQ710669.1	阿根廷	1997
人	Chi-84	DQ512997	中国	2007
熊猫	CH-1	GU188284	中国	2009
人	Iran/2016	MK050137	伊朗	2016
人	B5127/2018	MN836981.1	泰国	2018
人	BEL/F10411/2018	ON855136	比利时	2019

1.8 兔源多克隆抗体制备和效价测定

将灭活剂 β -丙内酯按照 0.05% 比例加入到 PoRV ($TCID_{50} = 10^6 / mL$) 病毒液中, 充分混匀后 4 °C 灭活 24 h, 经灭活检验合格后, 与 MONTANIDETM ISA 201VG 佐剂按照 1:1 混合乳化制备的免疫原, 背部皮下注射新西兰大白兔, 1 mL/只。共免疫 3 次, 首免和 2 次加强免疫之间分别间隔 21 d, 分别于免疫前和免疫后耳静脉采血测定抗体效价。

采用中和抗体方法测定抗体效价。首先将 200 $TCID_{50}$ 的病毒液与 10 倍比稀释的兔血清等体积混合, 放 37 °C 孵育 1 h, 然后加入到长满单层 MA104 的 96 孔板中, 5% CO_2 培养箱中继续孵育 1 h。然后弃掉病毒血清混合液后, 加入含有终浓度为 2 $\mu g/mL$ 胰酶的病毒维持液 (MEM), 继续培养。同时设置免疫前血清对照, 所有试验孔和对照孔都设置 3 个重复。每

日观察并统计细胞病变情况, 计算中和效价。

1.9 兔源多克隆抗体的反应性鉴定

Western blot 和 IFA 对多克隆抗体反应性鉴定。IFA 参照 1.6 方法操作, 将 PoRV VP6 单克隆抗体替换为兔源多克隆抗体 (1:10 000), 替换使用 FITC-羊抗兔荧光二抗 (1:2 000), 其他操作相同, 显微镜下观察并拍照。

Western blot 检测方法: 吸取实验室保存的 P7 血清型重组蛋白 His-sumo-VP4 * P7, 10 μL , 按照 1/5 (体积比) 加入 5 \times 上样缓冲液, 震荡混匀加热处理 10 min 后, 上样进行 SDS-PAGE 分析, 然后使用半干式转印仪进行免疫印迹操作。转印结束, 使用 5% 脱脂乳封闭醋酸纤维 (NC) 膜, 洗涤后加入兔源多克隆抗体 (1:20 000), 室温孵育 2 h, 弃掉一抗, 用 PBS 洗涤 3 次, 加入稀释的 HRP-羊抗兔二抗 (1:10 000), 室温孵育 1 h; 弃掉二抗并洗涤后, ECL 方法曝光显色并拍照。

2 结果

2.1 腹泻相关病原的检测

将腹泻样品提取 RNA, RT-PCR 分别检测 RV、PEDV、TGEV、PDCoV、PRV 和 BVDV, 只有 RV-VP6 引物成功扩增出长度为 309 bp 的条带 (图 1), 而 PEDV、TGEV、PDCoV 和 BVDV 核酸全为阴性。提取腹泻样品 DNA, PCR 扩增 PRV, 也呈现阴性扩增。扩增 6 种病毒阳性对照全部成立。

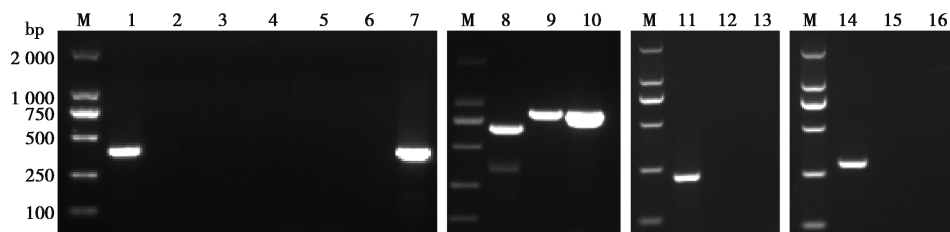


图1 RT-PCR 检测 6 种腹泻相关病毒

2.2 病毒分离、鉴定和传代培养

将 RV 阳性滤液接种单层 MA104 细胞, 初次接种 48 h 后, 显微镜下即可观察到融合、圆缩, 最后瓦解脱落的 CPE。按照相同方法传至第 5 代, VP6 基因检测均为阳性, 且都可以产生明显 CPE。通过 IFA 检测, 感染细胞呈现 RV VP6 蛋白特异性荧光 (图

2), 表明成功分离到 RV, 将其命名为 JSNJ2019 株。新分离病毒适应细胞需传代以提高病毒滴度。将 JSNJ2019 在 MA104 细胞上连续传到第 11 代 (P11), 并分别测定半数组织细胞感染量 ($TCID_{50}$), 病毒滴度从 P8 到 P11 逐步升高, 介于 $10^5 \sim 10^{6.5} TCID_{50}/mL$ (图 3)。

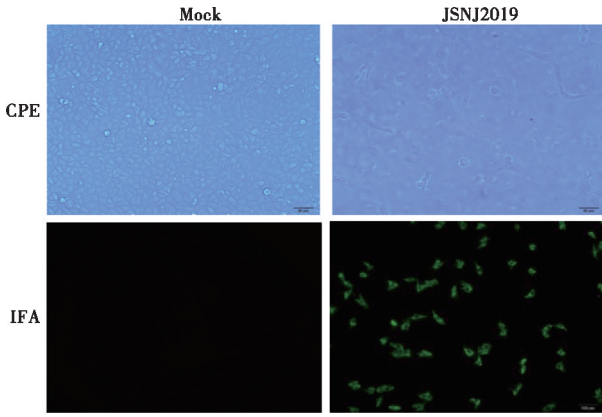


图2 PoRV 接种 MA104 细胞出现的病变

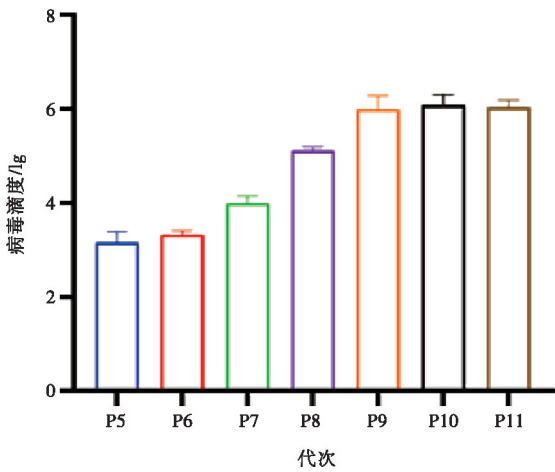


图3 PoRV JSNJ2019 不同代次滴度

2.3 VP4 和 VP7 基因扩增、序列同源性和遗传进化分析

VP4 基因决定 PoRV 的 P 基因型，设计引物采用 RT-PCR 扩增出特异性条带，测序后序列比较确定为 P [7] 基因型。利用 DNASTar 软件对 7 株 P [7] 基因型的 PoRV 的 VP4 基因进行序列相似性比对分析，发现本试验分离毒株 JSNJ2019 株与参考毒株的 PoRV VP4 基因核苷酸相似性为 91.8% ~ 99.8% (图 4)。使用 DNASTar 软件中的 Clustal W 方法对 7 个 NCBI 数据库来源和 JSNJ2019 株的 VP4 基因序列进行比对分析，并构建遗传进化树 (图 5)，发现 JSNJ2019 株单独形成 1 个进化分支，介于猪源与牛源之间的分支。

VP7 基因是决定 PoRV 的 G 基因型，设计引物采用 RT-PCR 扩增出特异性条带，测序后序列比较确定为 G1 基因型。利用 DNASTar 软件对 7 株 G1 基因型 PoRV 的 VP7 基因进行序列相似性比对分析，发现本试验分离毒株 JSNJ2019 株与参考毒株的 PoRV VP7 基因核苷酸相似性为 96.3% ~ 99.6% (图 6)。使用 DNASTar 软件中的 Clustal W 方法对 7 个 NCBI 数据库

来源和 JSNJ2019 株的 VP7 基因序列进行比对分析，并构建遗传进化树 (图 7)，发现 JSNJ2019 株与熊猫源的在同一进化分支。

综上，确定 JSNJ2019 毒株基因型是 G1P [7]。

		同源性/%									
		1	2	3	4	5	6	7	8		
差异性/%	1	■	99.5	99.4	99.7	91.8	99.7	99.2	99.5	1	AY523636
	2	0.5	■	99.3	99.4	91.9	99.4	99.2	99.4	2	HM988968.1
	3	0.6	0.7	■	99.5	91.8	99.5	99.2	99.5	3	HQ641296
	4	0.3	0.6	0.5	■	91.9	99.8	99.2	99.6	4	KJ450845.1
	5	8.9	8.7	8.9	8.7	■	91.9	91.8	92.0	5	MN893656.1
	6	0.3	0.6	0.5	0.2	8.7	■	99.2	99.6	6	MT066203
	7	0.9	0.8	0.9	0.8	8.8	0.8	■	99.4	7	OP454315
	8	0.5	0.6	0.5	0.4	8.6	0.4	0.6	■	8	JSNJ2019 ◀
		1	2	3	4	5	6	7	8		

注：◀为本研究分离株，下同。

图4 VP4 基因同源性分析

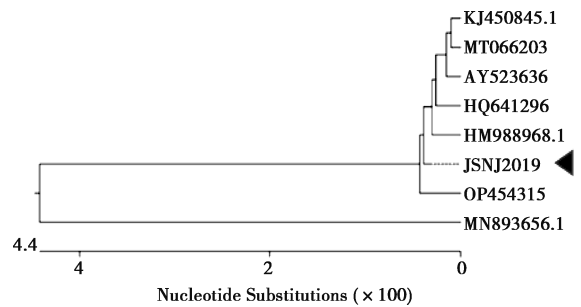


图5 VP4 基因遗传进化分析

		同源性/%									
		1	2	3	4	5	6	7	8		
差异性/%	1	■	86.5	94.8	86.3	94.7	93.7	93.6	94.3	1	DQ512997
	2	15.1	■	87.7	99.5	87.5	87.5	87.2	87.1	2	GU188284
	3	5.4	13.7	■	87.5	97.5	96.9	96.5	97.7	3	JQ719669.1
	4	15.4	0.5	14.0	■	87.3	87.3	87.0	96.9	4	JSNJ2019 ◀
	5	5.6	13.9	2.6	14.2	■	97.2	96.6	99.6	5	KC580519
	6	6.7	13.9	3.1	14.2	2.8	■	98.8	97.0	6	MK050137
	7	6.8	14.3	3.6	14.6	3.5	1.2	■	96.6	7	MN836981.1
	8	6.0	14.5	2.4	14.7	0.4	3.0	3.5	■	8	ON855136
		1	2	3	4	5	6	7	8		

图6 VP7 基因同源性分析

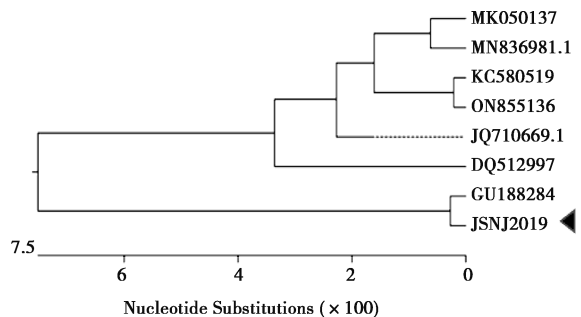


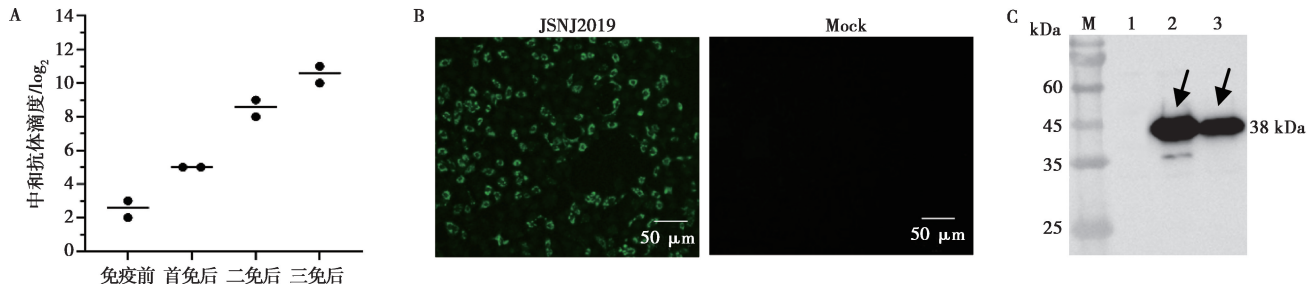
图7 VP7 基因遗传进化分析

2.4 高免血清制备和检测

以 JSNJ2019 全病毒灭活苗为免疫原制备的抗血

清, 2 倍比稀释后测定中和 JSNJ2019 的能力, 3 次免疫后中和抗体效价最高可达 2^{11} (图 8A)。同时取 JSNJ2019 第 10 代病毒接种单层 MA104 细胞, 进行 IFA

检测, 镜下可见明显的绿色荧光 (图 8B)。Western blot 检测显示, 只有 PoRV 重组蛋白 His-sumo-VP8 * P [7] 出现特异性条带, 分子量 38 kDa (图 8C)。



注: C 图中 M 为预染中分子量标准, 1 为 His-sumo 标签蛋白, 2~3 为 His-sumo-VP8 * P [7]。

图 8 PoRV G1P [7] 免疫后家兔中和抗体滴度 (A)、IFA (B) 和 Western blot (C) 检测

3 讨论

PoRV 是呼肠孤病毒科轮状病毒属的成员。到目前为止, 国内外流行病学数据显示 PoRV 的感染率逐年升高, 而且 A 群 PoRV 是猪场绝对优势的流行血清群^[18-19]。PoRVA 主要感染新生仔猪肠上皮细胞, 多与 PEDV 等猪腹泻病原混合感染而加重猪腹泻, 甚至死亡^[20], 粪便是腹泻相关病原的主要传播介质, 通过粪-口和接触传播方式感染其他猪^[21]。本研究采集腹泻猪新鲜粪便, 首先通过 RT-PCR 鉴别检测, 只有 PoRV 为阳性扩增且条带特异, 经测序分析进一步明确 VP6 基因型为 A 群 PoRV。

VP7 和 VP4 蛋白决定 PoRV 的 G 型与 P 型以及它的毒力^[2]。G/P 型之间会产生不同的组合, 不同组合型的 PoRVA 毒株诱导的交叉保护性低^[22-23]。因此, 加强不同 G/P 型的监测和毒株分离对系统了解 PoRVA 的遗传进化和研发时效疫苗非常重要。本研究从腹泻猪粪便中检测到 G1 和 P [7] 的组合基因型, 成功分离到毒株, 并可以稳定传代, 国内鲜见报道从猪体分离到猪源 G1P [7] 型, 丰富了国内 PoRVA 的资料, 有利于对国内 RVA 的监测。VP4 基因序列遗传进化分析发现 JSNJ2019 株单独形成 1 个进化分支, 介于猪源与牛源之间的分支; VP7 基因序列遗传进化进一步发现, JSNJ2019 株与我国 2009 年报道分离的熊猫来源的 CH-1 毒株在同一个进化分支。由此可见, PoRVA 不同 G/P 基因型组合具有明显的多样性和复杂性, 对有效防控 PoRVA 的流行和感染具有很大的挑战。

综上, 通过对南京附近猪腹泻样本主要流行腹泻病原的检测, 发现仅 PoRVA 为阳性, 通过系列分型检测和序列分析, 首次鉴定 G1P [7] 基因型组合在

猪群的流行; 进一步采用敏感细胞系传代培养和血清学鉴定成功分离得到 G1P [7] 型毒株 JSNJ2019, 并制备了高滴度的兔源多克隆抗体, 表现出优秀的免疫原性。因此, 本研究丰富了 PoRV 流行病学数据, 并为时效疫苗的研制奠定了物质基础。

参考文献:

- [1] ESTES M, GREENBERG H B. Rotaviruses [M] //KNIPE D M, HOWLEY P M, COHEN J I, et al. Fields Virology. sixth ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013: 1347-1400.
- [2] PARK G N, KIM D I, CHO E S, et al. Genetic diversity of porcine group a rotavirus strains from pigs in south Korea [J]. Viruses, 2022, 14 (11): 2522.
- [3] JOHNE R, TAUSCH S H, GRÜTZKE J, et al. Distantly related rotaviruses in common shrews, Germany, 2004-2014 [J]. Emerg Infect Dis, 2019, 25 (12): 2310-2314.
- [4] ABASS G, DUBAL Z B, RAJAK K K, et al. Molecular characterization of porcine rotavirus A from India revealing zoonoanthropotic transmission [J]. Anim Biotechnol, 2022, 33 (6): 1073-1085.
- [5] DING G, FU Y, LI B, et al. Development of a multiplex RT-PCR for the detection of majordiarhoeal viruses in pig herds in China [J]. Transbound Emerg Dis, 2020, 67 (2): 678-685.
- [6] DOERKSEN T, CHRISTENSEN T, LU A, et al. Assessment of porcine rotavirus-associated virome variations in pigs with enteric disease [J]. Vet Microbiol, 2022, 270: 109447.
- [7] WEN F, YANG J, LI A, et al. Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus in Guangdong, China, between 2018 and 2019 [J]. PLoS One, 2021, 16 (6): e0253622.
- [8] VLASOVA A N, AMIMO J O, SAIF L J. Porcine rotaviruses: epidemiology, immune responses and control strategies [J]. Viruses, 2017, 9 (3): 48.
- [9] XUE R, TIAN Y, ZHANG Y, et al. Diversity of group a rotavirus of porcine rotavirus in Shandong province China [J]. Acta Virol, 2018, 62 (3): 229-234.

- [10] PARK J G, ALFAJARO MM, CHO E H, et al. Development of a live attenuated trivalent porcine rotavirus a vaccine against disease caused by recent strains most prevalent in south Korea [J]. *Vet Res*, 2019, 50 (1): 2.
- [11] ADAMS W R, KRAFT L M. Epizootic diarrhea of infant mice: identification of the etiologic agent [J]. *Science*, 1963, 41: 359-360.
- [12] ALMEIDA J D, HALL T. The effect of trypsin on the growth of rotavirus [J]. *J Gen Virol*, 1978, 40: 213-218.
- [13] MEBUS C A, KONO M, UNDERDAHL N R, et al. Cell culture propagation of neonatal calf diarrhea (scours) virus [J]. *Can Vet J*, 1971, 12: 69-72.
- [14] WYATT R G, JAMES W D, BOHL E H, et al. Human rotavirus type 2: cultivation *in vitro* [J]. *Science*, 1980, 207: 189-191.
- [15] 李科芒, 周金柱, 周俊明, 等. 猪 A 群轮状病毒 VP6 单克隆抗体的制备和初步鉴定 [J]. *畜牧与兽医*, 2023, 55 (4): 79-85.
- [16] 赵娜, 刘艳成, 刘艳龙, 等. 猪伪狂犬病病毒、轮状病毒、传染性胃肠炎病毒和流行性腹泻病毒多重 PCR 的构建及应用 [J]. *当代畜禽养殖业*, 2022 (2): 8-12.
- [17] MOLINARI B L, POSSATTI F, LORENZETTI E, et al. Unusual outbreak of post-weaning porcine diarrhea caused by single and mixed infections of rotavirus groups A, B, C, and H [J]. *Vet Microbiol*, 2016, 193: 125-132.
- [18] TAO R, CHANG X, ZHOU J, et al. Molecular epidemiological investigation of group A porcine rotavirus in East China [J]. *Front Vet Sci*, 2023, 10: 1138419.
- [19] 周群, 陈小飞, 阚蕊慈, 等. 2017—2019 年四川地区猪 A 群轮状病毒的分子流行病学调查 [J]. *中国农业科学*, 2021, 54 (5): 1063-1072.
- [20] 常新见, 周金柱, 殷杰, 等. 2017—2019 年华东地区猪场主要病毒性腹泻病原调查 [J]. *畜牧兽医学报*, 2020, 51 (12): 3141-3150.
- [21] NIEDERWERDER M C, NIETFELD J C, BAI J, et al. Tissue localization, shedding, virus carriage, antibody response, and aerosol transmission of Porcine epidemic diarrhea virus following inoculation of 4-week-old feeder pigs [J]. *J Vet Diagn Invest*, 2016, 28 (6): 671-678.
- [22] HOSHINO Y, SERENO M M, MIDTHUN K, et al. Independent segregation of two antigenic specificities (VP3 and VP7) involved in neutralization of rotavirus infectivity [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985, 82 (24): 8701-8704.
- [23] SHEPHERD F K, DVORAK C M T, MURTAUGH M P, et al. Leveraging a validated *in silico* approach to elucidate genotype-specific vp7 epitopes and antigenic relationships of porcine rotavirus A [J]. *Front Genet*, 2020, 11: 828.