

李朝阳, 郝晨琳, 曾权, 等. 猪萨佩罗病毒 HNHB-01 株 VP1 基因的表达与分子特征 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (1): 83-90.

LI Z Y, HAO C L, ZENG Q, et al. Expression and molecular characteristics of VP1 gene of porcine sapelovirus HNHB-01 strain [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (1): 83-90.

猪萨佩罗病毒 HNHB-01 株 VP1 基因的表达与分子特征

李朝阳¹, 郝晨琳¹, 曾权¹, 马洪滨², 祖少坡^{1,3}, 胡慧^{1,3}, 张红垒^{1,3*}

(1. 河南农业大学动物医学院, 河南 郑州 450002;

2. 解放军总医院第五医学中心, 北京 100071;

3. 河南省动物性食品安全重点实验室, 河南 郑州 450002)

摘要: 猪萨佩罗病毒 (PSV) VP1 蛋白是位于病毒粒子表面的结构蛋白, 发挥主要的抗原效应。为了弄清 PSV HNHB-01 株 VP1 基因的表达与分子特征, 本研究设计针对 VP1 基因的特异性引物, 通过 RT-PCR 扩增获得 VP1 基因, 并重接到真核表达载体 pCAGGS 上, 经 Western blot、间接免疫荧光鉴定, 成功表达 VP1 蛋白。随后基于 PSV HNHB-01 株全基因序列以及 VP1 基因序列与其他参考毒株的基因序列构建遗传进化树, 分析遗传进化关系。结果表明: 实验室分离的 HNHB-01 株与 2017 年分离的 HNXX-01 株亲缘关系最近, 与日本株 JPSV-1315 关系接近; HNHB-01 株 VP1 基因与国内 2016-2017 年流行的毒株 HNXX-01、PSV-A2、JXXY-a2 的 VP1 基因高度同源, 与国外 2009 年流行的日本毒株 JPSV1315 的 VP1 基因亲缘关系较近; HNHB-01 株 VP1 氨基酸与 HNXX-01 株 VP1 氨基酸同源性最高, 同源性为 99.32%。三级结构分析表明, VP1 蛋白存在 3 条位于蛋白结构外侧的抗原表位区, 对应的氨基酸序列分别为 20~30 aa、90~100 aa 和 265~275 aa。本研究为 PSV 感染的诊断与预防提供依据, 并为今后研究 VP1 基因的功能和开发疫苗奠定基础。

关键词: 猪萨佩罗病毒; VP1 基因; 分子特征; 真核表达

中图分类号: S852.65

文献标志码: A

文章编号: 0529-5130(2024)01-0083-08

Expression and molecular characteristics of VP1 gene of porcine sapelovirus HNHB-01 strain

LI Zhaoyang¹, HAO Chenlin¹, ZENG Quan¹, MA Hongbin², ZU Shaopo^{1,3}, HU Hui^{1,3}, ZHANG Honglei^{1,3*}

(1. College of Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. The Fifth Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100071, China;

3. Key Laboratory for Animal-derived Food Safety of Henan Province, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Porcine sapelovirus (PSV) VP1 protein is a structural protein located on the surface of viral particles and exerts a major antigenic effect. In order to clarify the expression and molecular characteristics of the VP1 gene of the PSV HNHB-01 strain, the present study was conducted to design primers specific to the VP1 gene to obtain the VP1 gene and recombine it into the eukaryotic expression vector pCAGGS. Western blot and indirect immunofluorescence identification showed that we successfully constructed the eukaryotic expression vector plasmid pCAGGS-VP1. Subsequently, we constructed a genetic evolution tree based on the whole gene sequence of PSV HNHB-01 and the gene sequences of the VP1 gene with those of other reference strains, and analyzed the homology and the relationship between the genetic evolutions. The results showed that the HNHB-01 isolate isolated in the laboratory was similar to the HNXX-01 isolate isolated in 2017. The HNXX-01 strain isolated in 2017 is the closest relative and close to the Japanese strain. The JPSV-1315. HNHB-01 VP1 gene is highly homologous to the VP1 genes of the domestic strains HNXX-01, PSV-A2 and JXXY-a2 that were prevalent in 2016-2017, and is close to the VP1 genes of the Japanese strain JPSV1315 prevalent in 2009 abroad. The amino acids of VP1 of HNHB-01 and HNXX-01 were the most homologous, as high as 99.32%. The tertiary structural analysis of the VP1 protein showed that there were three antigenic epitopes located on the outer side of the protein structure, corresponding to the amino acid sequences of 20-30 aa, 90-100 aa, and 265-275 aa, respectively. This study provides a new basis for diagnosis and prevention of PSV and lays a foundation for future research on the function of the VP1

收稿日期: 2023-02-16; 修回日期: 2023-10-27

基金项目: 河南省杰出青年基金项目 (202300410192); 河南省科技攻关项目 (212102110363)

第一作者: 李朝阳, 男, 硕士研究生

* 通信作者: 张红垒, 副教授, 研究方向为动物病毒学与免疫学, E-mail: hongleizhang2012@163.com.

gene and the development of vaccines.

Keywords: porcine sapelovirus; VP1 gene; molecular characteristics; eukaryotic expression

猪萨佩罗病毒 (porcine sapelovirus, PSV) 属单股正链 RNA 病毒, 没有囊膜结构, 2014 年国际病毒分类委员会 (ICTV) 将其归为微 RNA 病毒科萨佩罗病毒属^[1-5]。该病毒传播迅速, 通过消化道扩散、蔓延, 亦可通过猪相互接触传播。各年龄段猪均可感染 PSV, 以仔猪感染最为严重。发病后会出现各种临床症状, 如脑脊髓灰质炎、繁殖障碍、腹泻、肺炎等。PSV 在临床上易与其他病毒混合感染, 如猪瘟病毒 (classical swine fever virus, CSFV), 猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 和猪细小病毒 (porcine parvovirus, PPV) 等^[6], 导致病情复杂严重, 大量仔猪死亡, 降低了同期生猪出栏率, 严重制约了畜牧养殖业的发展。

PSV 基因组大小为 7.5~8.3 kb, 仅有 1 个开放阅读框, 编码 1 个多聚蛋白^[7-9]。PSV 的蛋白结构组成与其他微 RNA 病毒类似, VP4、VP2、VP3 和 VP1 组成了该病毒的衣壳^[10], 其中 VP2、VP3、VP1 蛋白均位于核衣壳外部, 发挥主要的抗原效应, 而短的 VP4 蛋白则位于核衣壳内部, 不参与免疫应答^[11]。RNA 病毒的衣壳蛋白可保护病毒 RNA 不被环境中的 RNA 酶水解, 以及将病毒 RNA 包装进入衣壳和将病毒 RNA 释放到宿主细胞的功能^[12]。此外, 病毒衣壳蛋白还可通过与宿主细胞膜上的受体结合介导最初的感染, 决定宿主的范围; 与整合素受体结合从而激发受体途径或线粒体途径的细胞凋亡^[13-14]。

上世纪 60 年代, PSV 在英国暴发^[15], 而后在中国、西班牙、巴西、韩国等国家迅速传播^[12,16-18], 截至目前, 相关疫苗或抗病毒药物尚未被研发。我国 PSV 呈现多发、散发态势, 近年来该病毒检出率不断提高, 严重影响生猪生产性能, 给养猪业带来重大损失。PSV 在传播疾病的同时常常伴随着 VP1 基因的变异。VP1 蛋白作为核衣壳组成成分之一, 具有免疫原性, 可作为血清学检测方法建立的候选蛋白。此外, VP1 蛋白能诱导产生中和抗体, 而中和抗体

水平是研发疫苗的关键性指标之一, 因此 VP1 是研发 PSV 疫苗的理想候选蛋白^[19-21]。

本研究利用真核表达系统成功表达 VP1 蛋白, 并通过构建 PSV 遗传进化树, 揭示了 PSV 在全球范围内的流行情况, 进一步以 VP1 基因为基础构建进化树, 分析 HNHB-01 株与参考毒株间的遗传进化关系, 随后对 VP1 进行同源性和蛋白结构预测。本研究不仅为 PSV 的诊断与预防提供依据, 并且为今后研究 VP1 基因的功能和开发疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 病毒

猪萨佩罗病毒 HNHB-01 株由河南省动物性食品安全重点实验室保存。

1.2 主要材料

人胚肾上皮细胞 (HEK-293T)、pCAGGS 载体均由本实验室保存; DH5 α 感受态细胞购自北京擎科生物科技有限公司; PSV VP1 单抗由本实验室制备; FITC 标记的羊抗鼠二抗购自 SIGMA 公司; 2 \times Rapid Taq Master Mix、DNA Marker 购自南京诺唯赞生物科技有限公司; NEB T4 DNA 连接酶、NEB Sma I、NEB Xho I 内切酶均购自宝日医生物技术 (北京) 有限公司; 质粒提取试剂盒购自 OMEGA 公司; DNA 凝胶回收试剂盒购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司。

1.3 主要仪器

NanoDrop-2000 超微量紫外分光光度仪购自美国 Thermo Forma 公司; PCR 核酸扩增仪购自美国 Thermo 公司; 电泳仪购自北京六一仪器厂; 紫外凝胶成像系统购 Proteinsimple 公司。

1.4 引物的设计与合成

基于 GenBank 上载录的 PSV (登录号: MN939541) 基因序列, 运用 Primer Premier 5.0 软件, 设计靶向 VP1 基因的特异性引物 (表 1), 送至武汉奥科公司合成。

表 1 VP1 基因的引物序列

引物名称	引物序列 (5'→3')	大小/bp
VP1 F	CCGGAATTCGGAGATGTGAAAGACGAGGTCCAAG (<i>EcoR</i> I)	34
VP1 R	CCGCTCGAGTAATTGTTCTGCGGGATAAAAGCCT (<i>Xho</i> I)	34

注: 斜体部分为酶切位点。

1.5 重组质粒的构建与鉴定

用 TRIzol 法提取 RNA, 反转录为 cDNA 后, 以 cDNA 为模板, 通过 PCR 扩增 VP1 基因, 反应总体积为 25 μL : 2 \times Rapid Taq Master Mix 13 μL , ddH₂O 9 μL , 上、下游引物各 0.5 μL , 模板 2 μL 。扩增程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 35 个循环。通过琼脂糖凝胶电泳, 胶回收纯化 PCR 产物, 然后利用 *Sma* I 和 *Xho* I 对 pCAGGS 载体和 VP1 基因进行双酶切, 产物回收纯化, 利用 T4 DNA 连接酶将连接产物转化至 DH5 α 感受态细胞, 在含有 Amp^r 的 LB 培养皿上 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 14~16 h, 挑取白色单菌落, 利用通用引物进行 PCR 鉴定, 随后提取重组质粒, 对质粒进行双酶切鉴定, 筛选出阳性重组质粒, 送至武汉奥科公司测序, 测序正确的质粒命名为 pCAGGS-VP1。

1.6 Western blot 检测 VP1 蛋白表达

首先将 pCAGGS-VP1 转染至 HEK-293T 细胞中, 转染 36 h 后吸弃培养液, 用 1 mL 预冷 PBS 洗细胞, 加入 RIPA 细胞裂解液, 置于冰上 10 min, 收集 VP1 蛋白于 EP 管中, 加入 25 μL 5 \times SDS loading buffer, 95 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min。经 12% SDS-PAGE 后, 在 400 mA 1 h 条件下将蛋白转印至 NC 膜上; 使用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h; 以鼠源 VP1 单克隆抗体作为一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育; 以 TBST 缓冲液清洗 5 次, 每次 5 min, 然后加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 二抗, 室温孵育 2 h; 以 TBST 缓冲液清洗 5 次, 每次 5 min; 最终使用 ECL 成像系统进行检测。

1.7 间接免疫荧光 (IFA) 检测 VP1 蛋白表达

以 HEK-293T 细胞铺设 12 孔细胞培养板, 待细胞长至 80% 时, 将 pCAGGS-VP1 质粒转染至 HEK-293T 细胞中, 36 h 后吸弃维持液, 用 PBS 洗涤 2 次, 以预冷的无水乙醇 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜; 加入 5% BSA 室温封闭 2 h; 以鼠源 VP1 单克隆抗体作为一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 以 0.05% PBST 洗 5 次, 每次 5 min, 然后加入 1:100 稀释的 FITC 标记的羊抗鼠二抗, 室温孵育 1 h; 以 0.05% PBST 洗 5 次, 每次 5 min; 加入含 DAPI 的封片剂染细胞核, 置于荧光显微镜下观察拍照。

1.8 基于 PSV 全基因组遗传进化分析

从 NCBI 中选择各个国家具代表性的毒株序列, 共 33 株 (表 2), 运用 MEGA 7 软件的 Neighbor-Joining 算法 (邻系接合法), 基于 Bootstrap method 参数模式, 自展值设置为 1 000 个重复, 将 HNHB-01 毒株序列与 NCBI 上下载的 32 株毒株序列进行比对, 而后建立 PSV 全基因组遗传进化发育树。

表 2 PSV HNHB-01 与其他 PSV 参考毒株信息

毒株名称	国家	分离时间	登录号
HNHB-01	中国	2016	MH422121
HNXX-01	中国	2017	MN939542
PSV-A2	中国	2016	MG732813
JXXY-a2	中国	2017	MH626634
HuN1	中国	2015	KX354740
SHCM2019	中国	2019	MN685785
PSV2020	中国	2020	ON146286
esh	中国	2009	HQ875059
QT2013	中国	2013	KJ463384
GS012021	中国	2021	OM328111
HNNY-01	中国	2018	MN755875
YC2011	中国	2011	JX286666
JD2011	中国	2011	KF539414
YN02-C1	中国	2017	MK378966
HaN01-CH2019	中国	2019	MT080999
OPY-1-Corsica	中国	2017	MH513612
Jpsv1315	日本	2009	LC326555
HgOg11	日本	2018	LC425417
KS04105	韩国	2005	KJ821019
C6	印度	2015	KY053835
WB-76-te	印度	2018	MN241819
V13	英国	2001	NC003987
IA33375	美国	2015	KX574284
ISU-SHIC	美国	2016	KX810827
IA33375	美国	2015	KX574284
len-7546-cov-13.051395	美国	2018	MW504511
SwPSV75B02012	意大利	2012	MN836683
DIAPD5469-10	意大利	2015	MK497044
BSF2	南非	2021	OM105030
SZ1M-F	匈牙利	2013	MN807752
NGR	尼日利亚	2017	MN784122
PC45-BC24-PSV-88-6580	澳大利亚	2018	MZ515498
XTND	越南	2018	LC493088
PSV-46-B	赞比亚	2018	LC508234

1.9 基于 VP1 基因遗传进化分析

运用 MEGA 7 软件的 Neighbor-Joining 算法, 基于 Bootstrap method 参数模式, 自展值设置为 1 000 个重复, 从表 2 挑选 17 株参考毒株, 建立 VP1 基因的遗传进化树, 并对所得结果进行分析。

1.10 基于 VP1 抗原表位氨基酸突变分析

应用 DNAMAN 软件对代表性参考毒株 PSV VP1 蛋白氨基酸序列与 HNHB-01 VP1 蛋白氨基酸序列进

行比对，分析抗原表位氨基酸的突变情况。

1.11 VP1 蛋白三级结构预测

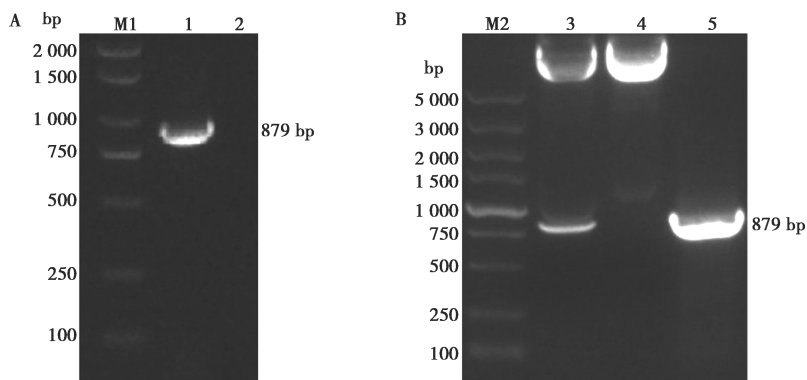
登陆在线网址 <http://www.iedb.org/> 对 VP1 蛋白的抗原表位进行预测，然后登陆在线网址 <https://swissmodel.expasy.org/>，预测 VP1 蛋白三级结构。

2 结果

2.1 pCAGGS-VP1 重组质粒的构建与鉴定

以 cDNA 为模板，通过 PCR 扩增 VP1 基因，获

得了 879 bp 的 VP1 基因条带 (图 1A)。将连接产物转化至 DH5 α 感受态细胞，经培养后挑取单菌落，通过 PCR 筛选出含有 VP1 目的基因的菌落，随后提取质粒，用限制性内切酶 *Sma* I 和 *Xho* I 进行双酶切鉴定，结果显示，酶切产物出现 2 条带，其中 879 bp 处有目的条带，符合预期结果 (图 1B)。进一步测序结果表明，PSV VP1 基因被成功构建入 pCAGGS 载体中。



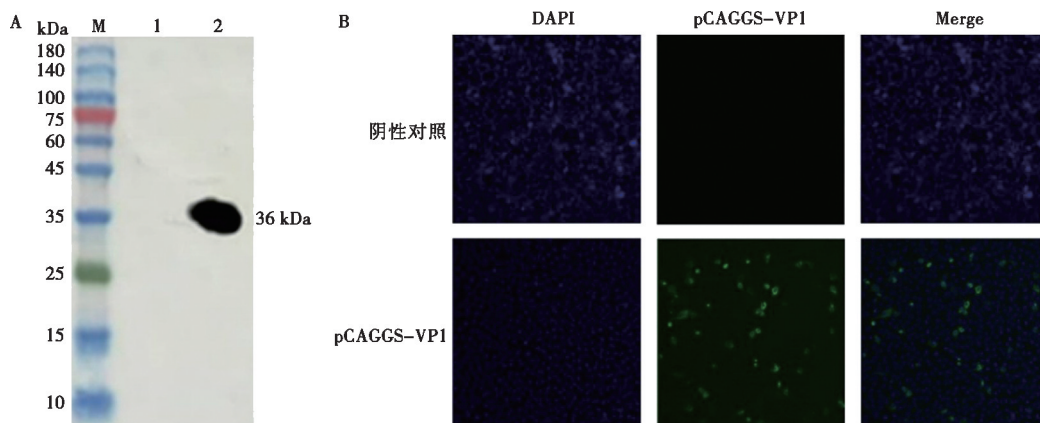
M1. DNA 标准 DL2000; 1. VP1 基因 PCR 产物; 2. 阴性对照; M2. DNA 标准 DL5000; 3. 双酶切产物; 4. 阴性对照; 5. VP1 基因 PCR 产物

图 1 VP1 基因 PCR 扩增 (A) 和重组质粒 pCAGGS-VP1 的双酶切鉴定 (B)

2.2 Western blot 和 IFA 检测 VP1 蛋白表达

将空载体 pCAGGS 和重组质粒分别转染 HEK-293T 细胞，转染 36 h 后裂解细胞，通过 Western blot 检测蛋白表达，结果显示 (图 2A)，表达的 VP1 蛋白为 36 kDa，符合预期结果。而后将空载体 pCAGGS

(阴性对照) 和重组质粒 pCAGGS-VP1 分别转染 HEK-293T 细胞，36 h 后通过间接免疫荧光检测 VP1 蛋白的表达情况，结果显示 (图 2B)，阴性组未见绿色荧光，而试验组存在大量绿色荧光。以上试验表明 VP1 蛋白成功表达。



M. 蛋白 Marker; 1. 转染 pCAGGS 空载体 HEK-293T 细胞裂解物; 2. 转染 pCAGGS-VP1 质粒 HEK-293T 细胞裂解物。

图 2 Western blot (A) 和 IFA (B) 鉴定 VP1 蛋白

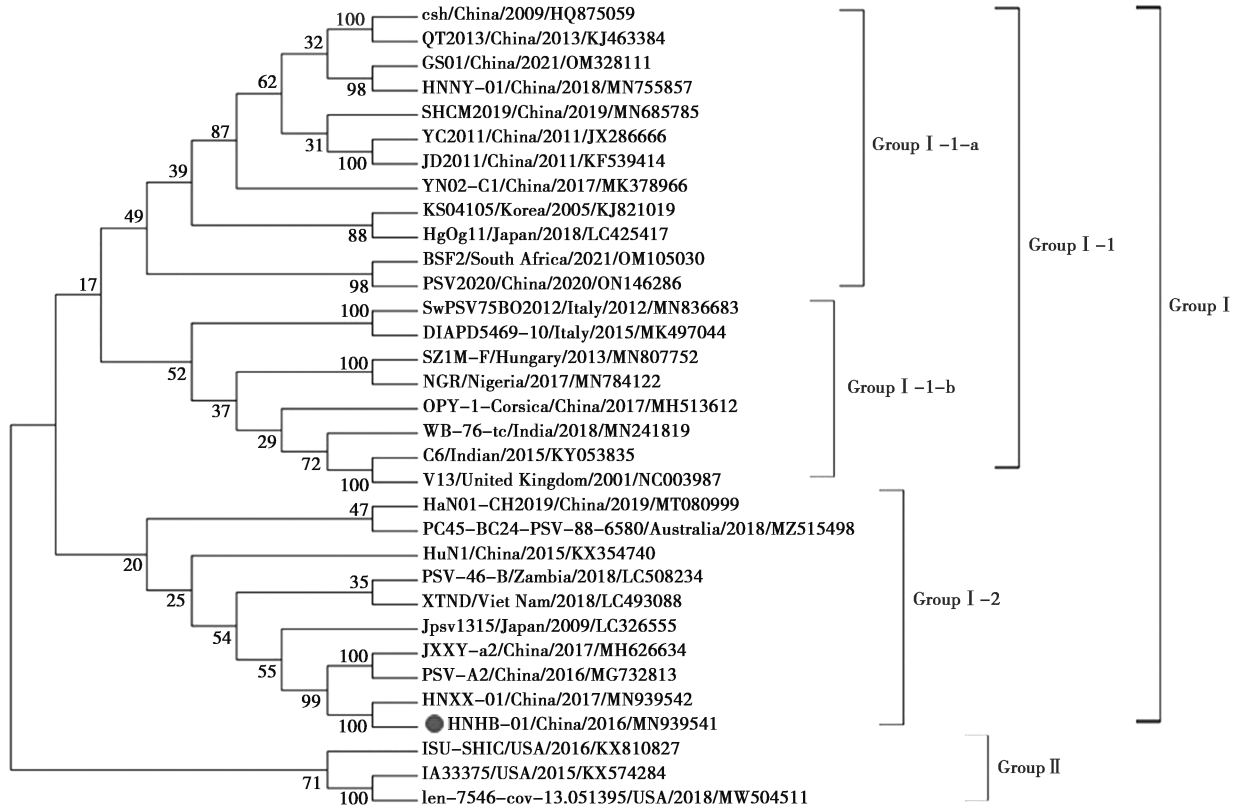
2.3 基于 PSV 全基因组遗传进化分析

为揭示 PSV 在全球范围内的流行情况，应用

MEGA 7 软件的 Neighbor-Joining 算法，将 HNHB-01 株和从 NCBI 上下载的 32 株参考毒株建立遗传进化

树(图3)。结果显示,所有的PSV全基因序列被分为2个大的亚群: Group I 和 Group II, 实验室分离的HNHB-01株位于 Group I-2, 与2017年分离的HNXX-01株亲缘关系较近, 其次与2017年流行的JXXY-a2株、2016年流行的PSV-A2株关系较近, 说明河南毒株与2016—2017年流行的毒株可能为同一来源, 而与2015年流行的HUN1株关系较远, 与中国当前2019—2021年流行的毒株SHCM2019、

PSV2020、GS01关系较远, 同时与中国首次分离毒株csh关系更远, 说明HNHB-01株与中国其他地区分离株进化程度具有差异, 我国PSV存在地区间交叉感染。另外HNHB-01株与日本株JPSV-1315关系接近, 而与印度株、韩国株、美国株、意大利株、英国株等处在不同的亚分支, 亲缘关系较远, 推测我国PSV可能从日本传入。



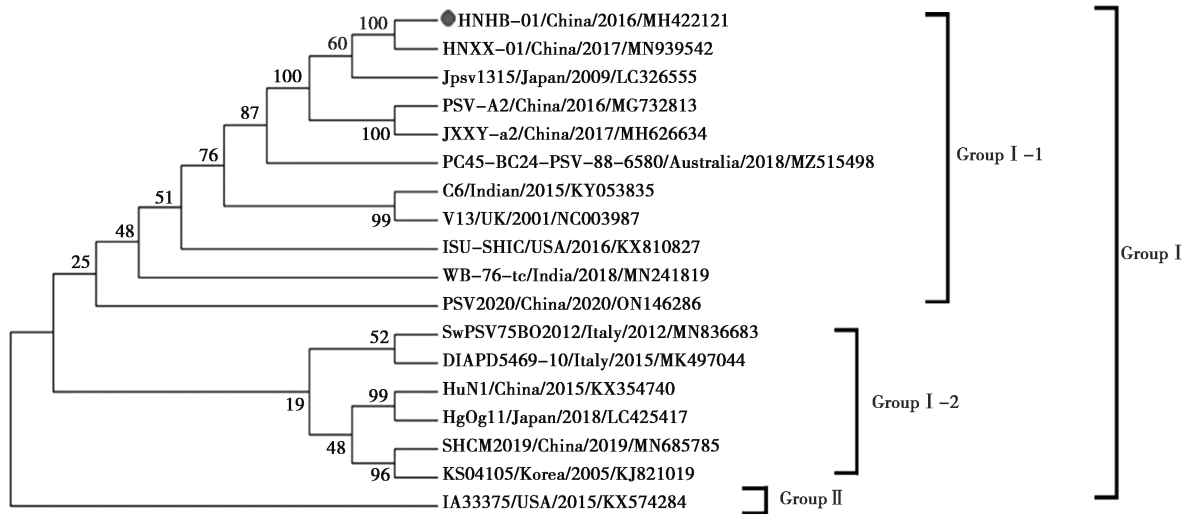
注: ●代表HNHB-01株。

图3 基于PSV全基因序列构建的系统进化树

2.4 基于VP1基因遗传进化分析

研究表明, 微RNA病毒VP1基因变异性最大, 容易发生突变和缺失, 所以进一步以PSV的外层衣壳蛋白VP1基因为基础构建进化树, 分析HNHB-01株VP1基因与17株参考毒株VP1基因间的遗传进化关系。如图4所示, PSV VP1基因序列被分为2个大群: Group I 和 Group II, 其中 Group I 又分为 Group I-1、Group I-2 两大亚群, HNHb-01 VP1基因位于 Group I-1, 与国内2016—2017年流行的毒株HNXX-01、PSV-A2、JXXY-a2的VP1基因高度同源, 而与HNXX-01株VP1基因位于同一分支, 与国

外2009年流行的日本毒株JPSV1315的VP1基因亲缘关系较近, 推测我国PSV可能为日本传入, 与印度株同属 Group I-1 亚群, 具有一定的亲缘关系, 但与韩国、美国、意大利等国外毒株亲缘关系较远。值得注意的是, HNHb-01株VP1基因与2019—2020年国内流行SHCM2019株、PSV2020株VP1基因亲缘关系较远, 说明PSV在长期流行传播过程中, 出现一定程度的变异, 地缘性特征明显, HNHb-01株与当前国内PSV流行株存在明显遗传分化, 研发疫苗时可考虑选择流行株为对象, 以期提高疫苗保护力。



注：●代表 HNHB-01 株 VP1。

图 4 基于 PSV VP1 基因序列构建的系统进化树

2.5 基于 VP1 抗原表位氨基酸突变分析

为了研究 VP1 蛋白特征，将 16 株参考毒株的 PSV VP1 基因编码的氨基酸序列与 HNHB-01 株 VP1 氨基酸序列的抗原表位区进行分析比较，结果显示，2016—2017 年国内流行的 4 株毒株（HNHB-01、HNXX-01、PSV-A2、JXXY-a2）的 VP1 氨基酸高度同源，均不存在氨基酸的插入和缺失，但存在部分突变。HNHB-01 株与 HNXX-01 株 VP1 氨基酸同源性最高，为 99.32%；HNHB-01 株 VP1 氨基酸与 PSV2020 株 VP1 氨基酸同源性最低，为 80.13%；PSV-A2 株 VP1 氨基酸序列与 JXXY-a2 株 VP1 氨基酸序列完全一致，表明两者来源为同一祖先。

与国内 4 株 PSV 分离株的 VP1 氨基酸相比，SHCM2019 株 VP1 氨基酸共有 24 处突变，而 PSV2020 株的 VP1 氨基酸共有 33 处突变，且在 B、C 区域有一高变区，两者共同突变有 16 处，散布于 A、B、C 3 个区域。值得注意的是，PSV2020 株的 VP1 氨基酸在第 287~290 存在连续 4 个氨基酸插入，这可能会影响 PSV 整体的功能（图 5）。与 2001 年世界上首次分离的英国株 V13 VP1 氨基酸对比，国内 4 株 PSV 分离株的 VP1 氨基酸共有 20 处共同突变，以上数据表明近年来 VP1 蛋白变异频率越来越快。VP1 蛋白作为 PSV 中核衣壳的组分之一，不仅可诱导产生高中和抗体，而且在病毒入侵增殖过程发挥着关键作用。PSV VP1 蛋白的主要抗原表位在 10~70 aa、

90~105 aa、155~170 aa、205~215 aa、230~240 aa、265~285 aa 处，其中最优势抗原位点位于 20~30 aa、90~100 aa、265~275 aa，氨基酸变异位点主要集中在 10~70 aa、205~285 aa 区段。本研究分析出的集中突变区正好位于此区域内，VP1 蛋白抗原表位区域氨基酸的突变是导致其毒力及抗原性发生改变的根本原因。以上种种数据表明，2019 年后中国 PSV 流行株与国内其他分离株相比存在明显变异，出现了 PSV 变异株。

2.6 VP1 蛋白三级结构预测

衣壳蛋白 VP1 与病毒逃逸宿主免疫有关，对致病性尤为关键。对 VP1 蛋白进行三级结构预测，以期进一步了解 VP1 蛋白功能。首先登录网址 <http://www.iedb.org/> 对 VP1 蛋白抗原表位进行预测，VP1 蛋白存在多个潜在的抗原表位（如图 6A），挑选出 3 条最优势抗原表位氨基酸序列，然后登陆在线网址 <https://swissmodel.expasy.org/>，利用 SWISS-MODEL 程序进行同源建模，预测 VP1 蛋白三级结构，在所预测的 VP1 蛋白上，标记并放大 3 条抗原表位对应的氨基酸序列，分别为 20~30 aa、90~100 aa、265~275 aa（图 6B）。结果显示，3 条抗原表位区对应的氨基酸均位于蛋白结构外侧，更易与抗体结合。Ramachandran 评价显示蛋白结构稳定性均良好，表明预测结果成功。此次预测缩小了定位表位的范围，为抗体制备、免疫检测提供了一定的理论基础。

参考文献:

- [1] TSENG C, TSAI H. Sequence analysis of a duck picornavirus isolate indicates that it together with porcine enterovirus type 8 and simian picornavirus type 2 should be assigned to a new picornavirus genus [J]. *Virus Res*, 2007, 129 (2): 104-114.
- [2] ANDI K, MALTE D, ANDREAS H, et al. Sequencing of porcine enterovirus groups II and III reveals unique features of both virus groups [J]. *J Gen Virol*, 2002, 76 (11): 5813-5821.
- [3] DOUGLAS M, LINDSEY R, YIN J, et al. Rapid detection, complete genome sequencing, and phylogenetic analysis of porcine deltacoronavirus [J]. *Emerg Infect Dis*, 2014, 20 (8): 1347-1350.
- [4] 张忠信. ICTV 第九次报告对病毒分类系统的一些修改 [J]. *病毒学报*, 2012, 28 (5): 595-599.
- [5] 赵婷婷, 李晶娇, 沈小娟, 等. 猪萨佩罗病毒研究进展 [J]. *上海交通大学学报 (农业科学版)*, 2017, 35 (6): 62-66.
- [6] CHEN J, FENG C, ZHOU Q, et al. Complete genome sequence of a novel porcine sapelovirus strain YC2011 isolated from piglets with diarrhea [J]. *J Gen Virol*, 2012, 86 (19): 10898-10899.
- [7] RUECKERT R, WIMMER E. Systematic nomenclature of picornavirus proteins [J]. *J Gen Virol*, 1984, 50 (3): 957-959.
- [8] KUSHIRO M, SHIMIZU M, TOMITA K I, et al. Molecular cloning and sequence determination of the tuf gene coding for the elongation factor Tu of *Thermus thermophilus* HB8 [J]. *J Biochem*, 1988, 170 (1/2): 93-98.
- [9] SCHOCK A, GURRALA R, FULLER H, et al. Investigation into an outbreak of encephalomyelitis caused by a neuroinvasive porcine sapelovirus in the United Kingdom [J]. *Vet Microbiol*, 2014, 172 (3/4): 381-389.
- [10] KNOWLES N. Porcine enteric picornaviruses [J]. *Diseases of Swine*, 2006 (9): 337-345.
- [11] HONDA E, HATTORI I, OOHARA Y, et al. Sero- and CPE-types of porcine enteroviruses isolated from healthy and diarrheal pigs: possible association of CPE type II with diarrhea [J]. *J Vet Sci*, 1990, 52 (1): 85-90.
- [12] LAN D, JI W, YANG S, et al. Isolation and characterization of the first Chinese porcine sapelovirus strain [J]. *Arch Virol*, 2011, 156 (9): 1567-1574.
- [13] FORMAN A J, PASS D A, CONNAUGHTON I D, et al. The characterisation and pathogenicity of porcine enteroviruses isolated in Victoria [J]. *AUST Vet J*, 1982, 58 (4): 136-142.
- [14] 陈俊伟, 张祥斌, 张云静, 等. 猪萨佩罗病毒 YC2011 株 1D 基因的克隆及原核表达 [J]. *动物医学进展*, 2014, 35 (1): 68-72.
- [15] LAMONT P H, BETTS A O. Studies on enteroviruses of the pig-IV: the isolation in tissue culture of a possible enteric cytopathogenic swine orphan (ECSO) virus (V13) from the faeces of a pig [J]. *Res Vet Sci*, 1960, 1 (2): 152-159.
- [16] CANO-GÓMEZ C, GARCÍA-CASADO M A, SORIGUER R, et al. Teschoviruses and sapeloviruses in faecal samples from wild boar in Spain [J]. *Vet Microbiol*, 2013, 165 (1): 115-122.
- [17] DONIN D G, LEME R D A, ALFIERI A F, et al. First report of porcine teschovirus (PTV), porcine sapelovirus (PSV) and enterovirus G (EV-G) in pig herds of Brazil [J]. *Trop Anim Health Prod*, 2014, 46 (3): 523-528.
- [18] SON K Y, KIM D S, MATTHIJNSSENS J, et al. Molecular epidemiology of Korean porcine sapeloviruses [J]. *Arch Virol*, 2014, 159 (5): 1175-1180.
- [19] 纪文艳, 张合润, 孙美平, 等. 流行性乙型脑炎减毒活疫苗免疫效果观察 [J]. *中国预防医学杂志*, 2008, 9 (8): 755-756.
- [20] 王瑶, 田志军, 王斌, 等. 一株猪捷申病毒的分离鉴定及血清学初步调查 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2011 (3): 14-17.
- [21] 兰道亮, 吉文汇, 王长松, 等. 华东部分地区猪群中猪萨佩罗病毒分子流行病学 [J]. *动物医学进展*, 2012, 33 (12): 116-121.