

猪流行性腹泻病毒基因及其疫苗的研究

王 凤, 汤德元*, 李春燕, 王 彬, 张晓杰, 甘振磊, 刘志杰
(贵州大学动物科学学院, 贵州 贵阳 550025)

摘 要: 猪流行性腹泻是由猪流行性腹泻病毒引起猪的一种急性肠道传染病。该病由猪流行性腹泻病毒感染猪而引起, 以发热、厌食、水样腹泻、呕吐、严重脱水、消化道黏膜发炎及糜烂和食欲下降为主要特征, 俗称冬季拉稀病。该病已成为世界流行性的疾病, 是各养猪国家导致仔猪早期死亡的重要疫病之一, 给养猪业造成严重的经济损失。近几年来, 随着分子生物学的发展, 人们对猪流行性腹泻病毒的基因结构、基因功能、分子致病机理, 检测手段以及疫苗预防方法有了更深入的认识。而对猪流行性腹泻的预防和控制以接种疫苗为主, 笔者主要针对猪流行性腹泻病毒基因结构、功能以及疫苗等方面的研究进展进行综述, 为猪流行性腹泻病毒基因的深入研究和预防提供一些参考。

关键词: 猪流行性腹泻; 病毒基因; 结构及功能; 疫苗研究

猪流行性腹泻 (PED) 是由猪流行性腹泻病毒 (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 引起猪的一种急性肠道传染病。猪流行性腹泻病毒属于冠状病毒科 (coronaviridae) 冠状病毒属 (coronavirus) 的成员。主要引起猪流行性腹泻。各种年龄、各个品种猪均可感染发病, 哺乳仔猪、架子猪、育肥猪的发病率可达 100%, 成年母猪发病率为 15% ~ 90%。其发病特点是: 日龄小, 症状重, 日龄大, 症状轻。1 周龄哺乳仔猪常在腹泻 3 ~ 4 d 后脱水死亡, 病死率达 50%。断奶猪、育肥猪症状较轻, 腹泻可持续 4 ~ 7 d, 成年猪仅发生呕吐和厌食。PEDV 与猪传染性胃肠炎病毒 (TGEV) 同属于尼多病毒目冠状病毒科冠状病毒属, 2 种病毒感

染后所引起发病猪的临床症状、流行特点和病理变化都极其相似, 均给养猪业带来严重危害。当前 PED 发生率居高不下, 发病情况也越来越复杂, 出现混合感染的现象时有发生, 目前倍受广大研究者的重视。本文主要针对 PEDV 的基因组结构、功能和 PED 疫苗的研究进展进行了综述, 为猪流行性腹泻基因的深入研究及对 PED 的预防提供参考。

1 PEDV 的基因组结构及功能

PEDV 基因组是单股正链具有感染性的 RNA, 与其他冠状病毒相似, 其基因组 5' 端有一个帽子结构 (cap), 3' 端有一个 Poly(A) 尾, 基因组全长为 28 033 nt (PEDV CV777 毒株)。基因组 5' 端非翻译区 (5' UTR) 位于复制酶多聚蛋白基因



上游, 长 296 nt; 5' UTR 内含有长为 65 ~ 98 nt 的前导序列 (L) 和一个 AUG 为起始密码子并拥有 Kozak 序列 (GUU Caa G C) 和编码 12 个氨基酸的开放阅读框架 (ORF)。目前, 除人冠状病毒 HCV229E 外, 已知的其他冠状病毒成员都有 Kozak 序列, 但序列有所差异。基因组 3' 端非翻译区 (3' UTR) 长度为 334 nt, 末端连有 Poly(A) 序列, 3' UTR 内含有由 8 个碱基 (GGAAGAGC) 组成的保守序列, 起始于 poly(A) 上游的 73 nt 处, 所有冠状病毒成员都包含这个序列, 只是在基因组中位置不同。剩余

资助项目: 贵州省贵阳市 2005 年畜牧科技专项基金项目资助 [编号: (2005) 筑科农字第 4-11 号];

作者简介: 王凤 (1985-), 女, 硕士研究生, 主要从事动物传染病病原分子病毒学的科研学习。

* 通讯作者: 汤德元 (1964-), 男, 教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事动物传染病病原分子生物学和中西兽医结合的教学科研工作。

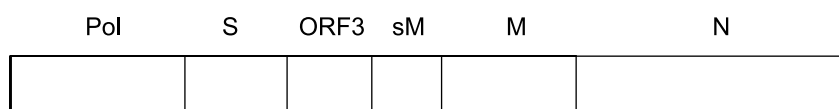


图1 PEDV 基因组结构

基因组序列包括6个ORFs(见图1),从5'→3'端依次为编码复制酶多聚蛋白lab(pp1ab)、纤突蛋白(S)、ORF3蛋白、小膜蛋白(E)、膜糖蛋白(M)和核衣壳蛋白(N)的基因。复制酶多聚蛋白基因占全基因组2/3,长20346nt,包括ORF1a(12354nt)和ORF1b(8037nt)2个开放阅读框架,二者之间有46nt的重叠序列,重叠处有滑动序列(UUUAAC)和假结节结构,它们能使核糖体进行移码阅读(frameshifting)从而保证基因1的正确翻译。S基因、E基因、M基因和N基因分别编码病毒的结构蛋白,长度分别为4152nt、231nt、681nt、1326nt。ORF3基因长675nt,编码非结构蛋白,在每两个相邻基因之间有基因间隔序列(interval sequence, IS),它与基因组和亚基因组mRNA的L序列3'端有7~18nt相同,在病毒基因组复制和翻译过程中发挥重要作用。

1.1 Pol 基因

Pol基因编码依赖于RNA的非结构蛋白,即复制酶多聚蛋白1ab(pp1ab),为RNA多聚酶。复制酶多聚蛋白分子质量约为753ku,有13个预测蛋白酶切割位点。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。多聚酶基因由2个大的重叠的开放性阅读框架ORF1a(12354nt)和ORF1b(8037nt)组成,其中ORF1a和ORF1b共有46个核苷酸的重叠,重叠区有一特异性7核苷酸序列(UUUAAC)和一假结节结构。多聚

酶基因翻译成2个多蛋白前体,即pp1a和pp1ab,较大的蛋白pp1ab则是通过核糖体移码机制合成,并需要特异性7核苷酸序列和假结节结构。ORF1a主要编码蛋白水解酶,包括分别切割复制酶多聚蛋白N端和C端的类木瓜蛋白酶(PL-PRO)和类脊髓灰质炎病毒3C蛋白酶(3CL-PRO)。PL-PRO的切割活性对锌具有强依赖性。3CL-PRO识别底物的核心序列是(ILMF)-Q-I-(SAGC)。另外,ORF1a编码蛋白还含有3个转膜域(TM)。ORF1b主要编码RNA依赖性RNA聚合酶(RdRp),同时有3个蛋白结构域分别是锌指蛋白域(Z)也称金属结合域、螺旋酶域(He1)和保守序列域(C)。

复制酶多聚蛋白经共转译处理后产生与病毒基因组复制相关的一系列蛋白质,主要功能包括负链RNA、前导RNA、sgmRNA(亚基因组RNA)和子代病RNA的转录作用以及对多聚蛋白切割产生具有功能产物的蛋白酶切割作用。因此,在病毒感染早期发挥重要作用^[2]。

1.2 S (Spike) 基因

PEDV S基因的启动密码子通常并不是用于启动蛋白质的合成,而是翻译分子量为180~220ku的1383个氨基酸的多肽,即S蛋白,该多肽含有29个潜在的N-连接的糖基化位点,是PEDV的1个重要的结构蛋白,是位于病毒粒子表面的纤突糖蛋白,并有与其他冠状病毒纤突蛋白相似的结构特点。序列同一性比较表明,PEDV S基因与HCV229E(人冠状病毒)的序列分别有60%(S2区)和37.0%(S1区)的同源性;与FIPV(猫传染性腹膜炎病毒)、TGEV、和CCV(犬冠状病毒)

的S序列分别有59.0%~60.0%(S1区)和35.5%~35.9%(S2区)的同源性。PEDV和HCV229E旁侧序列在迄今所测定的所有S蛋白基因中都显示了保守性。

S蛋白在免疫反应中起重要作用,在病毒感染宿主机体后介导中和抗体产生的过程中发挥重要生物学作用,如识别靶细胞、促进病毒和细胞膜融合的作用^[3],故S蛋白被认为是发展有效抵抗冠状病毒的主要靶抗原。

此外,S蛋白有27~29个潜在的糖基化位点,在低渗非离子溶剂中溶解度最大。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。

1.3 ORF3 基因

ORF3基因能编码ORF3蛋白。ORF3蛋白为223个氨基酸的多肽,分子质量为25.3ku,是一种非结构蛋白,其位置在116~784个核苷酸之间。ORF3基因编码的产物存在一个含6个His的尾。ORF3基因至少存在3个可变区,有短的核苷酸缺失(2~7nt)。对PEDV的2个不同分离株CV777和Br1/87的测序后发现,这些核苷酸缺失2个分离株都有。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基因中核苷酸缺失的存在,所以不能通过细胞培养复制ORF3基因产物。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。

Park等(2007)对PEDV DR13强、弱毒的ORF3序列进行了分析,发现致

弱的 DR13 在 ORF3 有 17 个氨基酸的缺失, 为强、弱毒鉴别诊断方法的建立提供了依据。说明 ORF3 基因与病毒毒力有关^[4]。

1.4 sM (small membrane) 基因

sM 基因编码 E 蛋白, E 蛋白是 PEDV 最小的结构蛋白, 由 76 个氨基酸组成, 预测分子量为 8.8 ku, 其散在分布于病毒囊膜上, 在病毒的自我组装和出芽过程中起至关重要的作用。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 2 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 (成熟的病毒粒子中的第 5 个 RNA 组分) 电泳迁移率相同。目前, 研究者将 PEDV 的 sM 基因和 M 基因导入甲病毒载体 (pS ~ FV), 在 BHK-21 细胞中得到了成功的表达, 为进一步探讨 E 蛋白和 M 蛋白在抗病毒中的作用奠定了基础。

1.5 M (Membrane) 基因

M 基因编码 M 蛋白, M 蛋白是一种穿膜蛋白, 由 226 个氨基酸组成, 分子量介于 27 ~ 32 ku 之间。对 M 基因的序列比较分析表明, PEDV 与 HCV229E 和 TGEV 的同源性分别为 57% 和 53%。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, PCR 检测时 PEDV 的引物一般都是针对 M 基因而设计的。

M 蛋白在病毒粒子的组装和出芽过程中具有重要作用, 同时也是病毒刺激机体产生免疫保护的重要结构蛋白。另外, M 蛋白能介导机体产生干扰素, 所以 M 蛋白可以作为 PEDV 基因工程疫苗的候选基因^[5]。因此获得 M 基因在体外有效的蛋白表达产物, 无论是对 PEDV 感染增殖的基础性研究, 还是利用 M 蛋白进行病原鉴定或疾病免疫预

防, 均具有重要的理论和实践意义。现已用兔抗豚血清鉴定 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 27 ku, 而重组体杆状病毒合成的 M 蛋白 (相对分子质量) Mr 为 23ku, 且与未糖基化的 M 蛋白有着相同的电泳迁移率。

1.6 N (nucleocapsid) 基因

PEDV N 基因编码 N 蛋白。N 蛋白是 PEDV 的主要结构蛋白之一, 主要作用是形成核衣壳, 相对分子量为大小为 55 ~ 58 ku, 由 441 个氨基酸组成。对 PEDV CV777 和 Br1/87 2 个分离株 N 基因序列分析发现仅有 2 个碱基的差异, 用套式 PCR 扩增 4 个分离株 PEDV N 基因 540 nt 的片段后发现, 其核苷酸序列基本相同。N 基因 1 323 个核苷酸的序列表明, PEDV 与其他冠状病毒 N 基因序列有相当部分相同。但 PEDV N 基因明显比 HCV229E 和 TGEV 大, 其中有一段大约 135 nt 的潜在插入存在, 其可能位于 N 基因中央。PEDV 与 TGEV、HCV229E 的 N 蛋白的明显不同之处就是在 PEDV N 蛋白中央部分有一段接近 40 个氨基酸的特别残基, 其中富含天门冬酰胺, 丝氨酸和精氨酸。N 基因在氨基酸和核苷酸水平上与 HCV229E 有很大的同源性, 其序列与 MHV、IBV、HCV 的同源性为 12% ~ 19%, 与 FIPV、CCV、PRCV、TGEV、HCV229E 的同源性较高, 为 32% ~ 37%。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。

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 个核苷酸的保守序列, 这一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为 7 nt 的序列。N

基因还有一个 336 个核苷酸的 ORF, 编码富含 Leu 的蛋白。适应细胞生长的 PEDV N 基因含有 3 个内部开放阅读框 (internal open reading frames, IORF), 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), 3 个 IORF 均绝对保守。而牛的冠状病毒 (BCV) IORF (208 个密码子) 表达一个与膜有关的 23 Ku 的蛋白, 但其生物学作用仍有待测定。MHV (鼠肝炎病毒) 的 IORF (207 个密码子) 编码一结构蛋白, 该蛋白与病毒复制无关。PEDV 所有 3 个 IORF 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 1 800 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 基因下游未发现其他基因。病毒的细胞培养不会导致该基因组任何核苷酸的变化, 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, 这证明了该段基因及其基因产物对 PED 病毒致弱无关。

不同冠状病毒 N 蛋白比较显示: 在 PEDV N 蛋白中央有相当长的亲水区域。另外 N 蛋白除和基因组 RNA 缠绕形成核糖核蛋白 (Ribonucleoprotein, RNP) 复合体外, 还参与病毒的复制和转录^[6]。N 蛋白等电点高, 缺少糖基化和 RNA 结合位点, 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。病毒感染细胞中 N 蛋白较丰富, 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 蛋白有 6 ~ 7 个潜在的磷酸化位点, 在 pH 9.0 低渗非离子溶剂中溶解度最大。N 蛋白有 3 个相对保守的结构域, 位于中间的是一个能与病毒 RNA 前导序列结合的 RNA 结合域。

此外, 在对冠状病毒一些成员 N 蛋白亚细胞定位的研究中表明 N 蛋白在

细胞核(或核仁)中定位的特征,进而也阐明了N蛋白的一些功能,N蛋白作为一个调节蛋白起作用,能够干扰宿主细胞周期,参与细胞通信,N蛋白还可以抑制干扰素的产生,诱导细胞凋亡。而对PEDV N蛋白亚细胞定位特征的研究还没有报道。N蛋白在PEDV的结构蛋白中所占比例最大,在感染的细胞中能大量表达。猪在感染PEDV的早期,体内就能产生抗N蛋白的高水平抗体。又鉴于其冠状病毒N蛋白保守性强,所以利用N蛋白来建立PEDV分子生物学诊断技术具有很好的应用前景^[7]。

2 PED疫苗的研究

对PED的预防和控制应以接种疫苗为主,国内外的研究者在PED疫苗的研究方面已经做了大量的工作,但到目前为止还没有研制出特别有效的疫苗可以控制PED疾病的发生。下面仅就猪流行性腹泻各类疫苗的研究应用现状及前景进行概述。

2.1 灭活疫苗

灭活疫苗包括组织灭活疫苗和细胞灭活疫苗。由于组织灭活疫苗效果很好,目前应用最为广泛。哈尔滨兽医研究所、上海农科院牧医所和江苏农科院牧医所等单位试生产。王明等^[8]用PED沪株研制氢氧化铝灭活苗接种后海穴,以0.1mL/头主动免疫3日龄仔猪,保护率为77.28%;以0.5mL/头主动免疫接种3~22日龄猪,保护率为85%;以5mL/头被动接种妊娠母猪,其所产3日龄仔猪的保护率为97.06%。接种疫苗后14d开始产生免疫力,免疫期可达6个月。

细胞灭活疫苗制备方便,应用也越来越广泛。马思奇等^[9](1994)研制的氢氧化铝细胞灭活疫苗的主动免疫试验和被动免疫试验的保护率分别为88.89%及90.7%,并研制了猪传染性胃肠炎与猪流行性腹泻病毒二联氢氧化铝细胞灭活疫苗,灭活前毒价均为107.0~107.5TCID₅₀/0.3mL,主

动免疫保护率:TGE为100%、PED为92%,被动免疫保护率:TGE为87.9%、PED为82.4%,免疫期均为6个月。疫苗保存期1年,田间试验保护率92%~96.35%。

2.2 细胞弱毒苗

由于灭活苗产生完全免疫力需要2周时间,且剂量偏大,不利于紧急预防与降低疫苗费用,所以又研制了细胞弱毒苗。国外Park等^[10]将PEDV经Vero细胞致弱后的毒株DR13,通过口服和肌肉注射两种途径免疫晚期妊娠母猪,观察所产仔猪的发病率。结果口服免疫组的发病率(13%)远低于肌肉注射免疫组(60%),且口服免疫组仔猪抗PEDV的SIgA含量明显高于肌肉注射免疫组。研究表明,可应用PEDV细胞弱毒苗经口免疫晚期妊娠母猪,从而有效预防PEDV感染。Kweon等^[11]用分离到的野毒株(命名为KPEDV-9),使之适应Vero细胞并连续传代至93代,进行主动免疫试验、被动免疫试验以及安全性试验,结果都证实可作为弱毒苗使用。适应Vero细胞并连续传代至93代的KPEDV-9,接种妊娠母猪,ELISA检测结果表明,母猪免疫应答水平大幅度提高,且新生仔猪可抵抗PEDV野毒感染。国内佟有恩等^[12]用CV777株强毒株适应Vero细胞系,并在83代后适应了仔猪肾原代细胞。以104~124代细胞适应毒制备5批疫苗,主动免疫试验的总保护率为95.92%;以106~139代细胞适应毒制备的8批疫苗,主动免疫试验的总保护率为96.2%。在与TGEV弱毒组合制备的二联弱毒苗的初步田间试验中取得良好效果。

2.3 乳酸杆菌疫苗

乳酸杆菌作为微生态制剂中的主要益生菌,广泛应用于食品、饲料加工业。构建乳酸杆菌质粒载体,表达在黏膜系统中增殖的病原微生物的保护性抗原基因,制备绿色环保、可食用的多功

能黏膜免疫的微生态制剂疫苗应用前景广阔。而黏膜免疫恰恰是防治TGE和PED的主要途径。因此,研制刺激肠道黏膜免疫系统的TGE和PED基因工程乳酸杆菌疫苗有重要意义。目前,有的实验室正在开展乳酸杆菌表达TGEV、PEDV主要保护性抗原基因的研究。此研究拟从健康猪体内分离鉴定出乳酸杆菌,并进一步筛选出thyA基因缺陷型乳酸杆菌,构建含有TGEV或PEDV主要保护性抗原基因的以thyA基因为选择压力的非抗性乳酸杆菌表达载体,转化乳酸杆菌,制备基因工程乳酸杆菌疫苗。目前已筛选出2株thyA基因缺陷型乳酸杆菌,并已初步鉴定。TGEV、PEDV的S基因的克隆扩增工作亦已结束^[13]。

2.4 转基因植物疫苗

Yang等^[14](2003)将PEDV的S基因转入烟草中,提取转基因植物蛋白给小鼠注射,进行血清蚀斑减数中和测定,证明其具有免疫原性。给小鼠饲喂这种转基因植物可诱导小鼠产生全身免疫和黏膜免疫。Yang等^[15](2005)相继应用农杆菌介导的蛋白转入法将PEDV的S基因的主要抗原位点(命名为K-COE)和合成的PEDV中和抗原表位在烟草中表达,前者重组体蛋白占转基因烟草叶片总可溶性植物蛋白含量的0.1%,后者含量则为2.1%。这些研究为研制PEDV口服转基因植物疫苗提供了新的思路。目前,在以烟草花叶病毒为载体的无烟草植物中PEDV的S蛋白中和表位得到了成功表达,用表达蛋白免疫接种后,对仔猪具有良好的保护作用,为PEDV转基因植物疫苗的研究奠定了基础。一些研究者将PEDV的E基因和M基因导入甲病毒载体中,在BHK-21细胞中得到了成功表达,这为进一步探讨E蛋白和M蛋白在抗病毒中的作用奠定了基础。植物的多种优越性均可被用于研究转基因疫苗,并且已经取得了很大的进展。但仍有一些

障碍必须克服,如蛋白在植物中的表达水平低、表达产物在植物中的稳定性差、转基因口服疫苗在产生免疫反应之前在胃肠道内有时被消化等,科学家就这些问题进行了研究并正在加以解决。

2.5 核酸疫苗

核酸疫苗又称为基因疫苗、DNA疫苗,是20世纪90年代初从基因治疗研究领域发展起来的一种全新疫苗,与传统的弱毒或灭活疫苗相比,DNA疫苗具有不散毒、不返强的优点。DNA疫苗还具有可以制成标记性疫苗,便于临床诊断监测;疫苗性质稳定,便于储存和运输;应用范围广,不仅可用于传染病和寄生虫病的免疫预防,而且还能够用于肿瘤、自身免疫、过敏反应等疾病的治疗等优点。另外,与亚单位疫苗相比,具有能长期激发机体体液和细胞免疫反应、制备工艺简单和费用低廉(不用纯化蛋白)的优点。虽然核酸疫苗兼具亚单位疫苗的安全性及减毒活疫苗的有效性,但核酸疫苗也存在整合到宿主染色体、致突变、产生抗菌素DNA抗体等危险性,其安全性还有待于进一步观察。猪流行性腹泻核酸疫苗的研究还处于起步阶段,是今后研究的热点之一。

2.6 多价联合疫苗

TGEV和PEDV均属冠状病毒,致病机理相似,组织嗜性相同。因此,研制联苗亦是可行的。尤其在我国的猪病毒性腹泻广泛流行,研制多联苗更是十分必要的。

2.6.1 TGEV与PEDV二联疫苗

该系列产品包括猪传染性胃肠炎(TGE)和猪流行性腹泻(PED)二联灭活苗、二联活疫苗和弱毒二联疫苗,二联灭活苗和二联活疫苗是由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所的马思奇、佟有恩共同主持完成的。该二联疫苗的特点是:毒价高,后背穴接种(是对常规免疫途径的突破),增强了免疫保护力,一次接种即可,省时、省力。经国内外

联机检索新证明,该二联苗是国际领先研制成功的,并在技术上有原始创新。两种疫苗可用于主动免疫保护不同年龄的猪只,但主要用于妊娠母猪的被动免疫以保护仔猪。其中二联灭活苗主动免疫保护率为96%,被动免疫保护率为85.1%;二联活疫苗主动免疫保护率为97.7%,被动免疫保护率为98%。2种二联疫苗的免疫期均为6个月,仔猪被动免疫期是哺乳期至断奶后1周。二联灭活疫苗在免疫后14d产生免疫力;二联活疫苗免疫后7d产生坚强的保护。PED和TGE弱毒二联疫苗是用猪流行性腹泻弱毒疫苗株PEDV-G1P83和猪传染性胃肠炎弱毒疫苗株TGEV-AG1制成。用该弱毒二联疫苗进行了保存期试验、安全效力、免疫期试验和区域试验。结果表明,试验疫苗在-20℃保存4个月,经4个月保存的疫苗免疫效力未见下降。4℃保存48h对疫苗病毒的毒价没有明显影响。用该弱毒二联疫苗按程序免疫妊娠母猪,对妊娠母猪安全,其仔猪获得了良好的被动免疫。其对PEDV强毒、TGEV强毒和2种强毒混合攻击的免疫效力分别达90.48%、93.75%和87.5%。用二联弱毒疫苗免疫8~10日龄的哺乳仔猪证明安全,28日龄时(25日龄断奶)分别用PEDV强毒、TGEV强毒和2种混合强毒攻击,免疫效力分别为100%、99.9%和73.3%。结果表明,该弱毒二联疫苗能够安全地对妊娠母猪和哺乳仔猪进行免疫,免疫后能有效地保护初生仔猪、断奶猪和肥育猪抵抗TGEV和PEDV强毒的攻击。该弱毒二联疫苗在区域试验中能显著降低猪病毒性腹泻的发病率和死亡率。

2.6.2 PEDV、TGEV、RV三联灭活苗

上海农科院畜牧兽医研究所钱永清等^[17]采用猪流行性腹泻病毒(PEDV)、猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)和猪轮状病毒(RV)细胞培养物制备了三联灭活

疫苗。实验室免疫结果表明,妊娠母猪和育肥猪免疫后15d达到较高的免疫水平,免疫有效期超过6个月,妊娠母猪所产仔猪可获得高水平的被动免疫保护。试验场应用结果表明,母猪保护率达98%,仔猪被动免疫保护率达93%。

综上所述,PEDV的基因组为不分节段的单股正链RNA。其中Pol基因在病毒感染早期发挥重要作用,S基因被认为是发展有效抵抗冠状病毒的主要靶抗原ORF3基因与病毒毒力有关,sM基因在病毒自我组装和出芽过程中起至关重要的作用,M基因编码的M蛋白可以作为PEDV基因工程疫苗的候选抗原,又鉴于冠状病毒N蛋白保守性强,所以利用N基因编码的N蛋白来建立PEDV分子生物学诊断技术具有很好的应用前景。但猪流行性腹泻病毒全基因组结构还需要深入研究。疫苗研制的最佳构想应该包括安全、有效果、多价、成本低及保存和使用方便等,但要达到上述目标还需要一个漫长的过程。PED疫苗的研究已经取得了一些可喜的进展,随着人们对病毒致病源认识的不断深入,研制的PED疫苗也在不断完善,相信不久的将来科学家们会研制出特别有效的疫苗来控制PED疾病的发生。

参考文献

- [1] Brian D A, Baric R S. Corona virus genome structure and replication[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2005, 287: 1-30.
- [2] Knipe D M, Howley P M, Griffin D E, et al. Fields virology(5thed)[M]. Phi-ladelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007: 707-736.
- [3] Kang T J, Seo J E, Kim D H, et al. Cloning and sequence analysis of the Korean strain of spike gene of Porcine epidemic diarrhea virus and

- expression of its neutralizing epitope in plants[J]. Protein Expr Purif, 2005, 41 (2) : 378-383.
- [4] H.F.Egberink, J. Ederveen, P.Callebaut, et al. Characterization of the structural proteins of porcine epizootic diarrhea virus, strain CV777, Am.J. Vet.Res.49 (1988) : 1320-1324.
- [5] Fan J H, Li Y J. Cloning and sequence analysis of the M gene of Porcine epidemic diarrhea virus LJB/03[J]. Virus Genes. 2005, 30 (1) : 69-73.
- [6] Lee H K, Yeo S G. Cloning and sequence analysis of the nucleocapsid gene of Porcine epidemic diarrhea virus Chinju99[J]. Virus Genes, 2003, 26 (2) : 207-212.
- [7] 余丽芸, 侯喜林. 流行性腹泻病毒 M 基因与甲病毒载体重组 RNA 的构建 [J]. 动物医学进展, 2005, 26 (5) : 73-76.
- [8] 王明, 马思奇, 等. 猪流行性腹泻灭活疫苗的研究 [J]. 中国畜禽传染病, 1993, (5) : 17-19.
- [9] 马思奇, 王明, 冯力, 等. 猪流行性腹泻病毒适应 vero 细胞培养及以传代细胞毒制备氢氧化铝灭活疫苗免疫效力试验 [J]. 中国畜禽传染病, 1994 (2) : 15-18.
- [10] Song DS, Park BK, et al. Oral efficacy of Vero Cell Attenuated Porcine Epidemic Diarrhea Virus DR13 Strain[J]. Res Vet Sci, 2007, 82(1) : 134-140.
- [11] Kweon C H, Kang Y B, Kwon B J, et al. Derivation of Attenuated Porcine Epidemic Diarrhea Virus(PEDV) as Vaccine Candidate[J]. Vaccine, 1999, 17 (20/21) : 2546-2553.
- [12] 佟有恩, 冯力, 马思奇, 等. 猪流行性腹泻弱毒株的培育 [J]. 中国畜禽传染病, 1998, 209 (6) : 329-332.
- [13] 刘岩, 柏亚铎, 鲁娜, 等. 猪传染性胃肠炎和猪流行性腹泻疫苗研究进展 [J]. 2007, 41 (2) : 44-45.
- [14] Bae J L, Jang YS, Yang MS, et al. Induction of Antigen-specific Systemic and Mucosal Immune Responses by Feeding Animals Transgenic Plants Expressing the Antigen[J]. Vaccine, 2003, 21 (25/26) : 4052-4058.
- [15] Kang T J, Jang Y S, Yang M S, et al. Expression of the Synthetic Neutralizing Epitope Gene of Porcine Epidemic Diarrhea Virus in Tobacco Plants without Nicotine[J]. Vaccine, 2005, 23 (17/18) : 2294-2297.
- [16] 钱永清, 邹勇, 唐永兰, 等. 猪流行性腹泻、猪传染性胃肠炎和猪轮状病毒三联苗免疫试验 [J]. 江西农业大学学报, 2005, 27(10) : 107-109.

(收稿日期 : 2010-12-10)

大鸿畜牧打造金牌品质

汇聚全面优势



大鸿畜牧为您提供各种优质饲养设备



各种优质栏体



干料自动饲喂系统



各种塑料铸铁地板



环控设备



人工授精系列



各种测定仪器

免费服务热线: 400-818-0038



北京总社: 010-62617878 010-62618478 传真: 010-62618478 地址: 北京市海淀区中关村大街8-8号
广州分公司: 020-62675676 13570119918 传真: 020-62675676 地址: 广州市白云区钟落潭镇
江西分公司: 0791-5705990 13479188803 传真: 0791-5705997 地址: 南昌进贤南大街216号
湖南分公司: 010-62615657 010-62615657