



# 一株马冠状病毒的分离鉴定及遗传演化分析

景然<sup>1,2,4#</sup>, 张梦佳<sup>1,2,4#</sup>, 张梦迪<sup>1,2,4</sup>, 朱文龙<sup>1,2,4</sup>, 赵珊<sup>3\*</sup>, 李文涛<sup>1,2,4,5\*</sup>

- 1 华中农业大学动物医学学院, 湖北 武汉 430070
- 2 华中农业大学 农业微生物资源发掘与利用全国重点实验室, 湖北 武汉 430070
- 3 四川农业大学动物医学院, 四川 成都 611130
- 4 华中农业大学动物疫病诊断中心, 湖北 武汉 430070
- 5 湖北洪山实验室, 湖北 武汉 430070

景然, 张梦佳, 张梦迪, 朱文龙, 赵珊, 李文涛. 一株马冠状病毒的分离鉴定及遗传演化分析[J]. 微生物学报, 2024, 64(5): 1483-1493.

JING Ran, ZHANG Mengjia, ZHANG Mengdi, ZHU Wenlong, ZHAO Shan, LI Wentao. Isolation, identification, and phylogenetic analysis of an equine coronavirus strain[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(5): 1483-1493.

**摘要:** 马冠状病毒病是由马冠状病毒(equine coronavirus, ECoV)引起的一种马新发胃肠道病毒病, 成年马感染后主要出现发烧、腹痛和腹泻等症状。1975年, 马冠状病毒感染首次在美国出现, 此后在多个国家和地区均有流行, 此前我国仅从山东腹泻驴的小肠样品中分离得到了一株重组马冠状病毒。【目的】了解 ECoV 中国毒株的基因组成、亲缘关系以及生物学特性, 可以为我国 ECoV 流行现状和遗传演化趋势提供依据, 为 ECoV 防控产品的研发提供材料。【方法】对湖北省武汉市黄陂区腹泻马匹的粪便样品进行 RT-PCR 检测, 对检测阳性样品进行病毒分离, 并利用靶向 ECoV S1 蛋白的单克隆抗体通过间接免疫荧光光试验(indirect immunofluorescence assay, IFA)对分离的病毒进行验证。根据 ECoV-JL 株全基因组测序结果, 对全基因组、N 基因和 NS2 基因进行了基因组系统发育分析和同源性比较。【结果】成功分离到一株 ECoV, 并命名为 ECoV-JL。透射电镜(transmission electron microscopy, TEM)观察分离到的病毒颗粒呈球状, 且具有囊膜和冠状病毒典型的纤突结构。该分离株感染 HRT-18 细胞 72 h 后病毒滴度可到达峰值, 半数组织培养感染剂量(tissue culture infectious dose 50%, TCID<sub>50</sub>)约为 10<sup>6.16</sup> TCID<sub>50</sub>/mL。ECoV-JL 毒株可以在人回盲肠癌(human ileocecal cancer-18, HRT-18)细胞、人结直肠腺癌(human colorectal adenocarcinoma-2, Caco-2)细胞和人肝癌(human liver cancer cells, Huh7)细胞上稳定传代。ECoV-JL 株与 GenBank 中

资助项目: 中央高校基本科研业务费专项资金(2662023DKPY004)

This work was supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (2662023DKPY004).

#These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding authors. E-mail: ZHAO Shan, shanzhao@sicau.edu.cn; LI Wentao, wentao@mail.hzau.edu.cn

Received: 2023-11-12; Accepted: 2024-02-02; Published online: 2024-02-22

现有的 ECoV 全基因组序列相似性为 97.9%–99.0%，系统发育分析发现 ECoV-JL 株属于单独的演化分支，与其他毒株的亲缘关系较远，说明 ECoV-JL 株可能是重组变异而来，其中 NS2 基因突变较多，NS2 基因编码的差异是造成 ECoV-JL 株与其他毒株同源性较差的主要原因。【结论】本研究从腹泻马的粪便样品中成功分离并鉴定了一株 ECoV，将其命名为 ECoV-JL 株，对该毒株生物学特性和亲缘关系的研究反映了湖北地区流行毒株的特点，为我国 ECoV 流行现状和演化趋势提供重要依据。

关键词：马冠状病毒；分离鉴定；遗传演化分析

## Isolation, identification, and phylogenetic analysis of an equine coronavirus strain

JING Ran<sup>1,2,4#</sup>, ZHANG Mengjia<sup>1,2,4#</sup>, ZHANG Mengdi<sup>1,2,4</sup>, ZHU Wenlong<sup>1,2,4</sup>, ZHAO Shan<sup>3\*</sup>, LI Wentao<sup>1,2,4,5\*</sup>

1 College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China

2 National Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China

3 College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan, China

4 Huazhong Agricultural University Animal Disease Diagnostic Center, Wuhan 430070, Hubei, China

5 Hubei Hongshan Laboratory, Wuhan 430070, Hubei, China

**Abstract:** Equine coronavirus (ECoV) is an emerging virus attacking the gastrointestinal tract in horses, and the infected adult horses mainly present fever, abdominal pain, and diarrhea. In 1975, ECoV infection first appeared in the United States, and since then it has been prevalent in many countries and regions. Only one recombinant strain of ECoV was isolated from the small intestine of a donkey experiencing diarrhea in Shandong Province, China. **[Objective]** Understanding the genetic composition, genetic relationship, and biological characteristics of ECoV strains in China can lay a foundation for unveiling the epidemic status and genetic evolution trend of ECoV and provide materials for the research and development of products for the prevention and control of ECoV. **[Methods]** RT-PCR was employed to detect the stool samples from a horse experiencing diarrhea in Huangpi District, Wuhan City, Hubei Province. The virus was isolated from the positive samples and verified by indirect immunofluorescence assay (IFA) with monoclonal antibodies targeting the S1 protein of ECoV. Based on the whole genome sequencing results of the isolate, the phylogenetic analysis and sequence alignments of the whole genome, N gene, and NS2 gene were performed. **[Results]** An ECoV strain was successfully isolated and named ECoV-JL. Transmission electron microscopy (TEM) showed that the isolated virus particles were spheroidal and had a capsule membrane and a typical spiroid structure of coronaviruses. The tissue culture infectious dose 50% (TCID<sub>50</sub>) of ECoV-JL reached a peak of 10<sup>6.16</sup> TCID<sub>50</sub>/mL 72 h post infection in HRT-18 cells. ECoV-JL strains could infect three human cell lines: HRT-18 (human ileocecal cancer cells), Caco-2

(human colorectal adenocarcinoma cells), and Huh7 (human liver cancer cells). The genome sequence of ECoV-JL and the ECoV genome sequences in GenBank showed the similarity within the range of 97.9%–99.0%. ECoV-JL was in a separate branch of the phylogenetic tree and far related to other strains, which indicated that ECoV-JL might be derived from recombination mutations. The NS2 gene presented more mutations, and the difference in NS2 gene was the main reason for the poor homology between ECoV-JL and other strains. **[Conclusion]** We isolated and identified an ECoV strain from the stool samples of horses with diarrhea and named it ECoV-JL. The study about the biological characteristics and phylogenetic relationship of this strain reflected the characteristics of the epidemic strains in Hubei Province, providing a clue for the epidemic status and evolution trend of ECoV in China. **Keywords:** equine coronavirus; isolation and identification; phylogenetic analysis

Zhang 等研究表明马冠状病毒 (equine coronavirus, ECoV) 通过粪口传播, 成年马患病后多表现为发烧、嗜睡、厌食、腹痛和腹泻<sup>[1]</sup>。1975 年, Bass 等在美国马群中发现了 40 多例以水样腹泻、发烧和淋巴组织病变为特征的传染性疾病, 通过血清学研究和电子显微镜观察, 将这些症状归因于马的冠状病毒感染, 标志着马中首次出现 ECoV 感染<sup>[2]</sup>。直至 2000 年, Guy 等首次在美国北卡罗来纳州腹泻马驹的粪便中分离到一株 ECoV 病毒<sup>[3]</sup>。近期, ECoV 在亚洲 (日本、韩国) 和欧洲的一些国家也有报道<sup>[2,4]</sup>。目前, 我国对于 ECoV 病毒感染的报道较少, 仅在山东省某驴场腹泻病驴的小肠中鉴定并分离到一株 ECoV 病毒, 证实了该病毒已经开始在中国传播<sup>[5]</sup>。

ECoV 感染症状温和, 多表现为胃肠道症状, 临床症状不具有特征性, 部分马感染后表现为无症状, 但用 qPCR 方法可从粪便中检测出马冠状病毒。目前该病原诊断主要依靠血清学实验、PCR 检测和病毒分离鉴定。Tsunemitsu 等、Pusterla 等、Fielding 等和 Nemoto 等分别建立了 RT-PCR 和 qPCR 方法检测 ECoV<sup>[6-9]</sup>。虽然我国仅有一例马冠状病毒的报道, 但是仇钰等用自主研发的酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked

immuno sorbent assay, ELISA) 检测方法检测了 711 份国内马血清样品, 其中阳性血清 13 份 (1.83%)<sup>[10]</sup>, 该结果说明马冠状病毒可能以隐性感染的方式存在于我国的马群中。马冠状病毒病还没有有效的疫苗或抗病毒药物, 因此预防该疾病只能通过实施检疫、严格隔离协议和保持环境卫生等措施来实现。ECoV 的成功分离对于开发治疗或预防 ECoV 相关有效抗病毒药物或疫苗, 以及进行各种 ECoV 研究至关重要。

ECoV 是单股正链, 不分节段, 有囊膜的 RNA 病毒, 属于冠状病毒科正冠状病毒亚科, 包含一个单链正链 RNA 基因组, 大小为 27–32 kb。病毒 RNA 具有 5' 端帽结构, 其后是一个先导 RNA 序列和 200–400 bp 的未翻译区 (untranslated region, UTR) 核苷酸; 3' 端有一个 200–500 bp 的核苷酸非翻译区 (UTR) 和 poly(A) 尾。分别编码 2 个复制酶多聚蛋白、5 个结构蛋白 (血凝素酯酶、纤突、囊膜、膜蛋白和核衣壳) 和 4 个辅助蛋白 (NS2、p4.7、p12.7 和 I)。有研究表明编码的 2 个复制酶多聚蛋白被由 3 个病毒编码的蛋白酶分解为 16 个非结构蛋白 (nsp1–16)<sup>[11]</sup>。

本研究采集湖北地区马场腹泻马的粪便样品, 经分离鉴定后确定为 ECoV 感染, 并将分离得到的毒株命名为 ECoV-JL 株, 进一步对分

离株进行了生物学特性和遗传进化分析, 本研究结果为湖北地区可能流行的 ECoV 毒株提供了参考, 为我国 ECoV 研究提供了重要材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 病料及细胞系

本研究采用的粪便样品来源于湖北省武汉市黄陂区腹泻病马, 粪便样品于 2022 年 8 月寄送本实验室; HRT-18、Caco-2、HeLa-R19、Huh7、HEK293T、NPT<sub>r</sub>、PK-15 和 Vero-CCL81 细胞均由实验室保存。

### 1.2 主要试剂

胶回收试剂盒购自 BioFlux 公司; PrimeSTAR HS DNA Polymerase、DL2000 DNA Mmaker 购自 TaKaRa 公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自 BI 公司; Dulbecco 改良的 Eagle 培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)、胰蛋白酶购自 Gibco 公司; 鼠源抗 ECoV-S1 蛋白的杂交瘤细胞由本实验室制备保存; 辣根过氧化物(horseradish peroxide, HRP)标记的羊抗鼠 IgG 二抗购自 ABclonal 公司; DyLight™ 594 山羊抗小鼠 IgG (H+L)二抗购自赛默飞世尔科技公司。

### 1.3 引物设计及合成

根据 GenBank 上 NC99 株全基因(登录号: EF446615), 利用 NCBI 网站 Pick Primers 工具针对 N 基因设计一对特异性引物 EcoV-F (5'-GC CGACCAGTCCGACCAG-3')和 EcoV-R (5'-TCA GAGTTATCTTCGGTGAGGG-3')。

### 1.4 病料处理

无菌采取约 1 g 粪便, 加入 1 mL DMEM 研磨混匀, 反复冻融 3 次, 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液经 0.45 μm 的过滤器过滤后于 -80 °C 保存。

### 1.5 病毒核酸提取和 PCR 鉴定

取上述病料上清液 200 μL 与 1 mL TRIzol

裂解液混合, 室温静置 5 min, 加入 200 μL 氯仿后混合均匀, 冰上静置 10 min。4 °C、12 000 r/min 离心 10 min 收集上清, 与等体积异丙醇混匀, 冰上静置 10 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min。弃去上清, 加入 1 mL 95%乙醇洗涤, 7 600 r/min 离心风干。最后, 将 RNA 溶解在不含 RNase 的水中, 将提取出的 RNA 保存在 -80 °C。将总 RNA 反转录为 cDNA, 用 N 基因特异性引物进行扩增, 预期片段大小为 1 256 bp, PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 15 s, 56 °C 30 s, 72 °C 60 s, 扩增 35 个循环。

### 1.6 病毒的分离和鉴定

将过滤后的悬液接种于 HRT-18 细胞, 放入 37 °C, 含 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。吸附 1 h 后, 加入含 1% 血清的 DMEM, 随后每 5 d 使用显微镜检查培养物以观察细胞病变效应(cytopathic effect, CPE), 如发现病变, 将剩余上清接种 HRT-18 细胞进行传代培养, 盲传 3 代并通过 RT-PCR、间接免疫荧光试验(indirect immunofluorescence assay, IFA)及透射电镜(transmission electron microscopy, TEM)观察进行进一步鉴定。

### 1.7 JL 株的透射电镜观察

HRT-18 细胞经 0.01 的病毒感染复数(multiplicity of infection, MOI)感染 96 h 后收集病毒液, 12 000 r/min 离心 30 min 后通过 0.45 μm 的过滤器过滤。加入 30% 的蔗糖, 30 000 r/min 超速离心 2 h, 用 PBS 重悬后再次用 20%、30%、45%、60% 的蔗糖溶液梯度超速离心脱糖。再次重悬后将重悬液滴加在覆有支持膜的铜网上, 5 min 后从铜网边缘吸去多余液体, 室温风干, 滴加 2% 磷钨酸(pH 7.2)负染 2 min, 用滤纸吸去多余的染色液, 室温风干, 干燥后于透射电镜(电压 200 kV)下观察。

### 1.8 单克隆抗体轻、重链扩增及抗体制备

提取由本实验室保存的靶向 S1 蛋白的杂交瘤细胞 RNA, 并且用罗氏反转的方法将总 RNA 反转录为 cDNA, 方法同 1.5。以 cDNA 为模板, 设计引物扩增得到本株单克隆抗体的轻、重链序列, 并构建表达质粒, 利用 293F 细胞表达, 经 SDS-PAGE 鉴定, 将成功表达的抗体命名为 S1-mAb。

### 1.9 间接免疫荧光试验

将 JL 以 0.1 的病毒感染复数(MOI)感染 HRT-18 细胞, 感染后 96 h 收取细胞样品。PBS 洗涤 1 次, 4%多聚甲醛室温固定 15 min, 0.1% Triton X-100 透化 15 min, 5%牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA)封闭 2 h, 4 °C EcoV-S1-mAb 孵育过夜。用 PBST 洗涤 3 次后, 用 DyLight™ 594 山羊抗小鼠 IgG (H+L)在 37 °C 下孵育 45 min。最后用 PBST 洗涤细胞 3 次, 用 4',6-二氨基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色液孵育 7 min。倒置荧光显微镜下观察图像。

### 1.10 半数组织培养感染剂量(tissue culture infectious dose 50%, TCID<sub>50</sub>)的测定

提前 24 h 以  $5 \times 10^3$  cell/mL 的细胞密度将 HRT-18 细胞铺于 96 孔细胞板中准备感染, 将 JL 株进行连续 10 倍比稀释, 然后将稀释好的病毒加入各细胞孔中, 每孔 100  $\mu$ L, 每个稀释度重复 8 个孔, 同时设置不加病毒的正常细胞作对照。37 °C 培养 96 h 后弃去上清, 采用间接免疫荧光试验进行 TCID<sub>50</sub> 的测定, 步骤同 1.9。最后用 Reed-Muench 的方法计算 TCID<sub>50</sub>。

### 1.11 病毒生长曲线的绘制

按 0.01 的病毒感染复数(MOI)感染 HRT-18 细胞, 于 37 °C 细胞培养箱中培养, 设置 12-96 h 共 8 个收毒时间点取样, 对不同时间点收取的样品进行 TCID<sub>50</sub> 测定, 96 h 后用间接免疫荧光

试验读取细胞病变孔数。应用 Reed-Muench 法计算每个时间点的病毒滴度 TCID<sub>50</sub>, 步骤同 1.9, 以收毒时间点为横坐标, TCID<sub>50</sub> 的对数为纵坐标建立病毒的一步生长曲线。

### 1.12 细胞嗜性

依照 5 的病毒感染复数(MOI)将分离得到的病毒接种到不同的细胞系, 包括 HRT-18、PK-15、Caco-2、NPTc、Huh7、HeLa-R19、Vero-CCL81 和 HEK293T 细胞。病毒感染 96 h 后, 用间接免疫荧光试验观察病毒感染情况。

### 1.13 全基因组序列扩增及序列测定

参照 GenBank 上已上传的 ECoV 毒株序列, 在保守区域分段设计 5 对引物。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min。扩增片段连接平末端载体 pEASY-Blunt 后, 转化 *Escherichia coli* DH10 $\beta$  感受态细胞。12 h 后挑取单克隆菌落进行菌落 PCR 鉴定, 阳性菌液送武汉擎科生物科技有限公司测序。

### 1.14 全基因组序列、N 基因序列和 NS2 序列对比及遗传演化分析

使用 MEGA 7.0 软件对新分离毒株和已经上传的 ECoV 参考毒株的全基因组, N 基因和 NS2 基因进行对比, 分析其核苷酸差异位点, 绘制遗传进化树进行遗传演化分析。本研究中应用的 GenBank 上已经上传的 ECoV 参考序列见表 1。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 鉴定结果

将处理后的样品进行 RT-PCR 检测, 结果显示, 扩增得到 1 000-2 000 bp 之间的特异性条带, 阴性对照样品中未检测到特异性的条带 (图 1A); 经进一步测序分析, 扩增的基因为 ECoV N 基因 (图 1B), 表明粪便样本中存在马冠状病毒。

表 1 文章中应用的 GenBank 已经上传的 ECoV 参考序列

Table 1 The ECoV reference sequence that has been uploaded on GenBank applied in the article

Name	GenBank	Country	Host	Year
ECoV Obihiro12-2	LC061274.1	Korea	Equus caballus	2012
ECoV Obihiro12-1	LC061273.1	Japan	Equus caballus	2012
ECoV CH-CVP3	ON453891.1	Switzerland	Equus caballus	2021
ECoVCH-ZH39	ON453890.1	Switzerland	Equus caballus	2015
ECoV CH21	MZ562881.1	Switzerland	Equus caballus	2021
ECoV Tokachi09	LC061272.1	Japan	Equus caballus	2009
ECoV Tokyo2020	LC592689.1	Japan	Equus caballus	2020
ECoV 2021/464693	OL770366.1	China	Donkey	2021
ECoV 2020/7881	OM937885.1	China	Donkey	2020
ECoV NC99	EF446615.1	USA	HRT-18 cells	2015

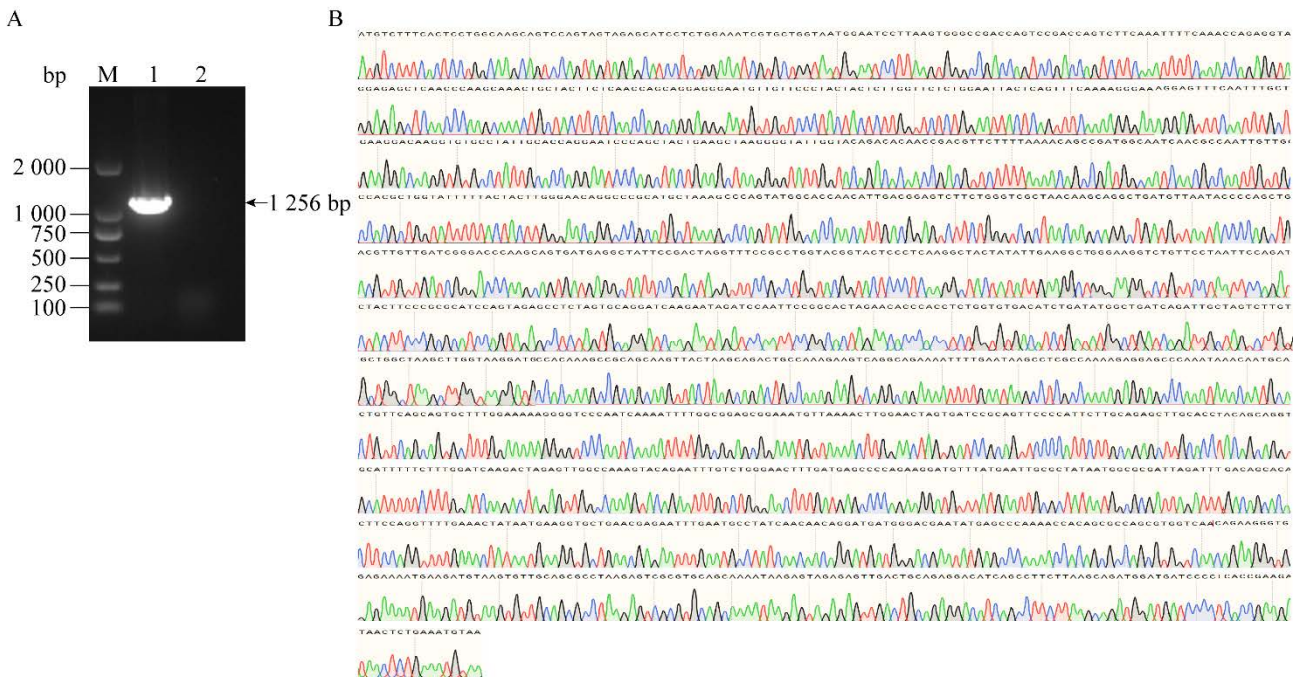


图 1 粪便样品中马冠状病毒 N 基因 PCR 扩增结果及 Sanger 测序结果 A: 粪便样品中马冠状病毒 N 基因 PCR 扩增结果. M: DL2000 DNA Marker; 1: 粪便样品中 ECoV 特异性 N 基因引物 PCR 扩增产物; 2: ECoV 特异性 N 基因引物 PCR 扩增产物阴性对照. B: Sanger 测序结果

Figure 1 PCR amplification result of equine coronavirus N gene in fecal samples and sanger sequencing results. A: PCR amplification result of equine coronavirus N gene in fecal samples. M: DL2000 DNA Marker; 1: PCR amplification of ECoV-N gene primers in fecal samples; 2: Negative control of PCR amplification products of ECoV-N gene primers. B: Sanger sequencing results.

## 2.2 病毒分离鉴定

处理 ECoV 检测阳性粪便样本, 用 HRT-18 细胞分离病毒。将病毒盲传至第三代, 在感染

后第 4 天, 收集分离到的病毒, 并感染 HRT-18 细胞, 未在 HRT-18 细胞上观察到冠状病毒诱导的典型细胞病变, 即细胞聚集和合胞体形成。

### 2.3 单克隆抗体轻、重链扩增及抗体制备

为了对分离到的病毒进行进一步检测, 从实验室杂交瘤细胞中扩增得到抗体的轻、重链, 并且用 293F 细胞表达, 图 2 为间接免疫荧光试验(IFA)和 SDS-PAGE 结果。

### 2.4 ECoV-JL 株的透射电镜观察

如图 3 所示, 透射电镜观察结果显示, ECoV 为球形病毒粒子, 具有囊膜, 囊膜上具有明显的纤突, 呈现有短的棒状突起, 直径约为 100 nm, 与报道的 ECoV 形态一致, 属于冠状病毒的典型结构。

### 2.5 ECoV-JL 株在 HRT-18 细胞上的生长特性

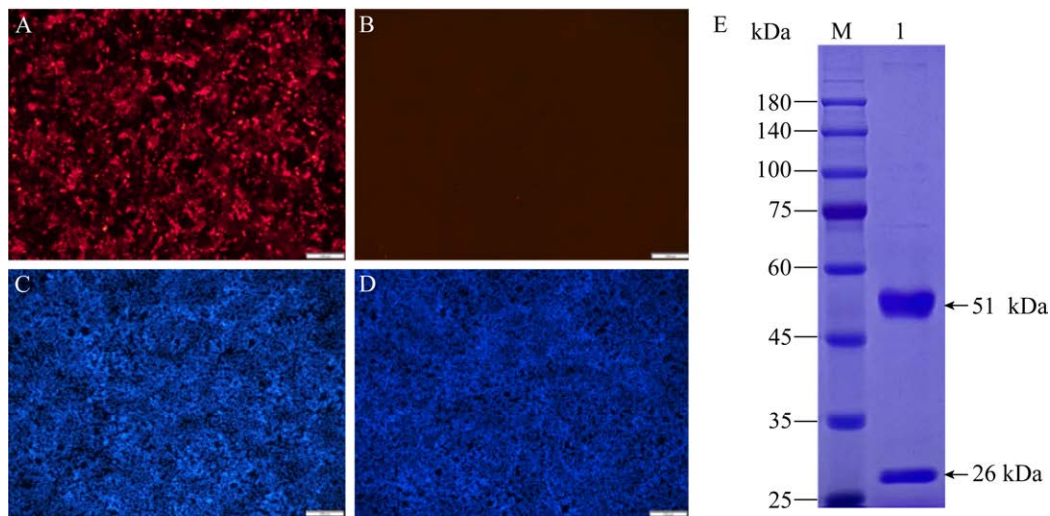
根据 Reed-Muench 法测定, 增殖动态监测显示其接种 HRT-18 细胞后病毒滴度在 24–72 h 逐渐提高, 在 72 h 病毒滴度达到峰值, 约为  $10^{6.16}$  TCID<sub>50</sub>/mL, 随后开始缓慢下降(图 4)。

### 2.6 细胞嗜性

在病毒感染不同细胞 96 h 后, 收取细胞样品并进行 IFA 检测, 检测结果说明, ECoV 可以在 3 种人源细胞 HRT-18 细胞(人回盲肠癌细胞)、Caco-2 细胞(人结直肠腺癌细胞)和 Huh7 细胞(人肝癌细胞)上稳定传代。细胞嗜性研究的间接免疫荧光试验结果显示, ECoV-JL 株在 HRT-18 细胞上感染效率最高(图 5)。

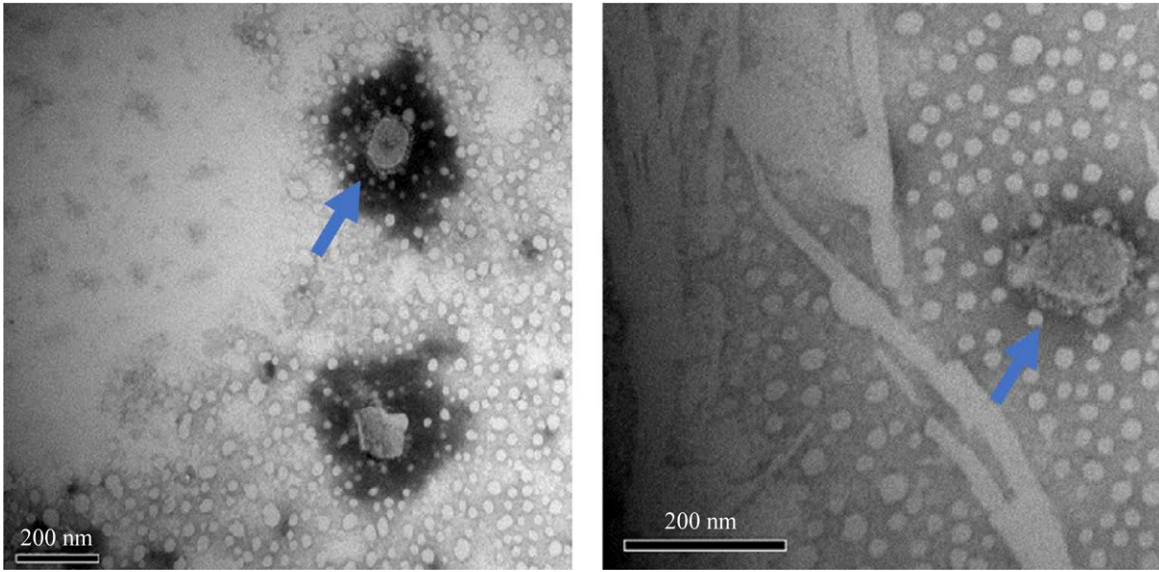
### 2.7 ECoV-JL 株基因序列的遗传演化分析

本研究分离得到的 ECoV-JL 株基因组全长 30 892 bp, 经二代测序和基因组序列比对, 其结构大致为: ORF1ab (172–21 560 bp)、NS2 (21 575–22 411 bp)、HE (22 423–23 694 bp)、S (23 709–23 800 bp)、E (28 357–28 611 bp)、M (28 626–29 318 bp)、N (29 328–30 668 bp)和 I (29 389–30 009 bp)。对 ECoV-JL 株全基因组核苷酸序列进行分析, ECoV-JL 株与 GenBank 中



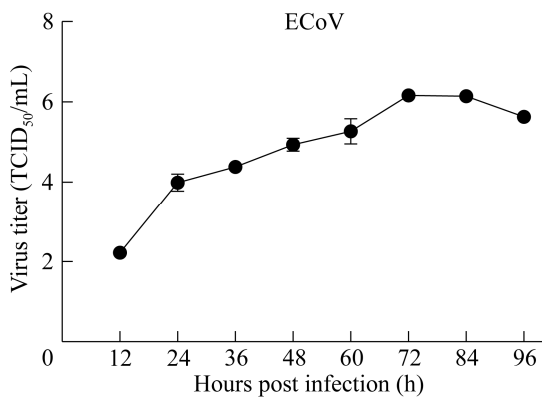
**图 2 ECoV-JL 株在 HRT-18 细胞上的间接免疫荧光结果(比例尺为 100  $\mu$ m)和单克隆抗体 SDS-PAGE 检测结果** A: 分离毒株第四代病毒 IFA 红色荧光. B: 阴性对照. C: 分离毒株第四代病毒 IFA DAPI 结果. D: 阴性对照 DAPI. E: 单克隆抗体 SDS-PAGE 检测结果

Figure 2 Indirect immunofluorescence results of prepared monoclonal antibody with isolated strain ECoV-JL in HRT-18 cells (scale bar is 100  $\mu$ m) and monoclonal antibody SDS-PAGE test result. A: Fourth generation isolated strain virus IFA red fluorescence. B: Negative control. C: Fourth generation isolated strain virus DAPI IFA. D: Negative control DAPI. E: Monoclonal antibody SDS-PAGE test result.



**图 3** 透射电镜观察 ECoV-JL 株分离物形态图(磷钨酸负染, 比例尺为 200 nm) 箭头所指为病毒粒子  
**Figure 3** Observation of the ECoV-JL isolate by transmission electron microscopy (phosphotungstic acid negative dye, scale bar is 200 nm). Arrows refer to virus particles.

现有的 ECoV 全基因组序列相似性为 97.9%–99.0%。ECoV-JL 株与 GenBank 中上传的 10 株 ECoV 均具有 97% 以上的遗传相似性。ECoV-JL 株与美国报道的马冠状病毒 NC99 (GenBank 登录号: EF446615.1) 相似性最高, 一致性为 99%; 与来源于驴的 ECoV 2021/464693 和 ECoV 2020/7881 遗传亲缘性较低。全基因组

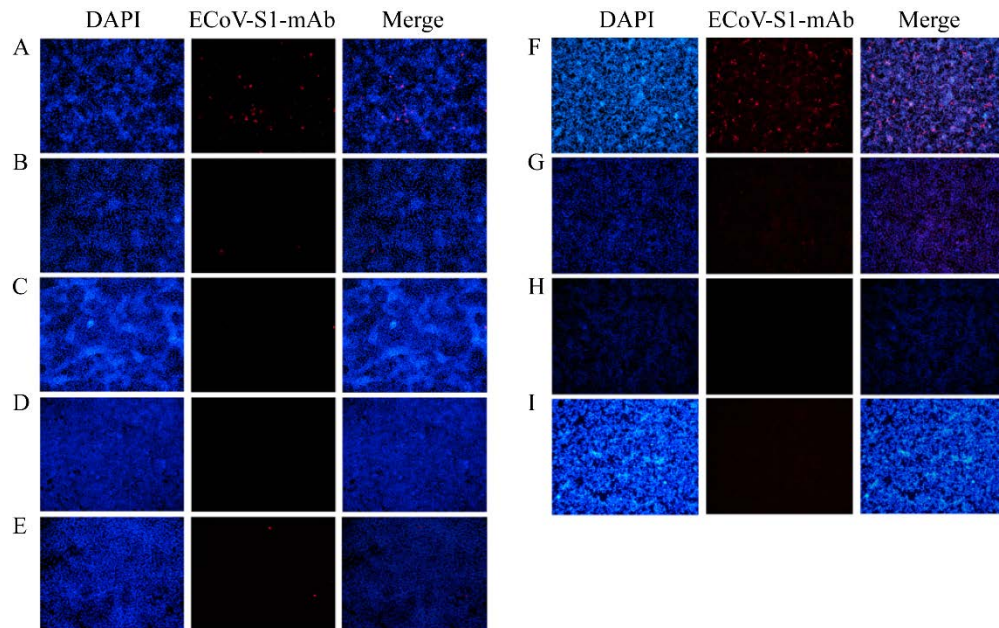


**图 4** ECoV-JL 在 HRT-18 细胞中增殖动态  
**Figure 4** Proliferation of ECoV-JL in HRT-18 cells.

的系统进化树分析表明, ECoV-JL 株单独属于一个演化分支, 所处的分支与 ECoV NC99 (GenBank 登录号: EF446615.1) 毒株分支亲缘关系较近。然而, 对 N 基因的分析结果表现出不同的结果, ECoV-JL 株与 ECoV 2021/464693 (GenBank 登录号: OL770366.1) 和 ECoV 2020/7881 (GenBank 登录号: OM937885.1) 的相似性最高, 亲缘关系与 ECoV 2021/464693 (GenBank 登录号: OL770366.1) 毒株较近。

对基因组 NS2 同源性和系统进化树的分析结果表明, 与 GenBank 中登记的其他毒株相比, NS2 基因突变较多, 与分离株同源性最低的是 ECoV 2021/464693 (OL770366.1) 和 ECoV 2020/7881 (OM937885.1) 株, 一致性仅为 49.5%。根据 NS2 基因系统进化树分析, ECoV-JL 株与 ECoV NC99 (GenBank 登录号: EF446615.1) 和 ECoV Tokachi09 (GenBank 登录号: LC061272.1) 同处一个大的分支, 亲缘关系较近(图 6)。





**图 5 ECoV-JL 细胞嗜性(比例尺为 100  $\mu\text{m}$ )** A: ECoV-JL 株感染 Caco-2 细胞后 IFA 检测. B: ECoV-JL 株感染 NPTTr 细胞后 IFA 检测. C: ECoV-JL 株感染 PK15 细胞后 IFA 检测. D: ECoV-JL 株感染 HEK293T 细胞后 IFA 检测. E: ECoV-JL 株感染 Vero-CCL81 细胞后 IFA 检测. F: ECoV-JL 株感染 HRT-18 细胞后 IFA 检测. G: ECoV-JL 株感染 Huh7 细胞后 IFA 检测. H: ECoV-JL 株感染 PK1 细胞后 IFA 检测. I: ECoV-JL 株感染 HeLa-R19 细胞后 IFA 检测

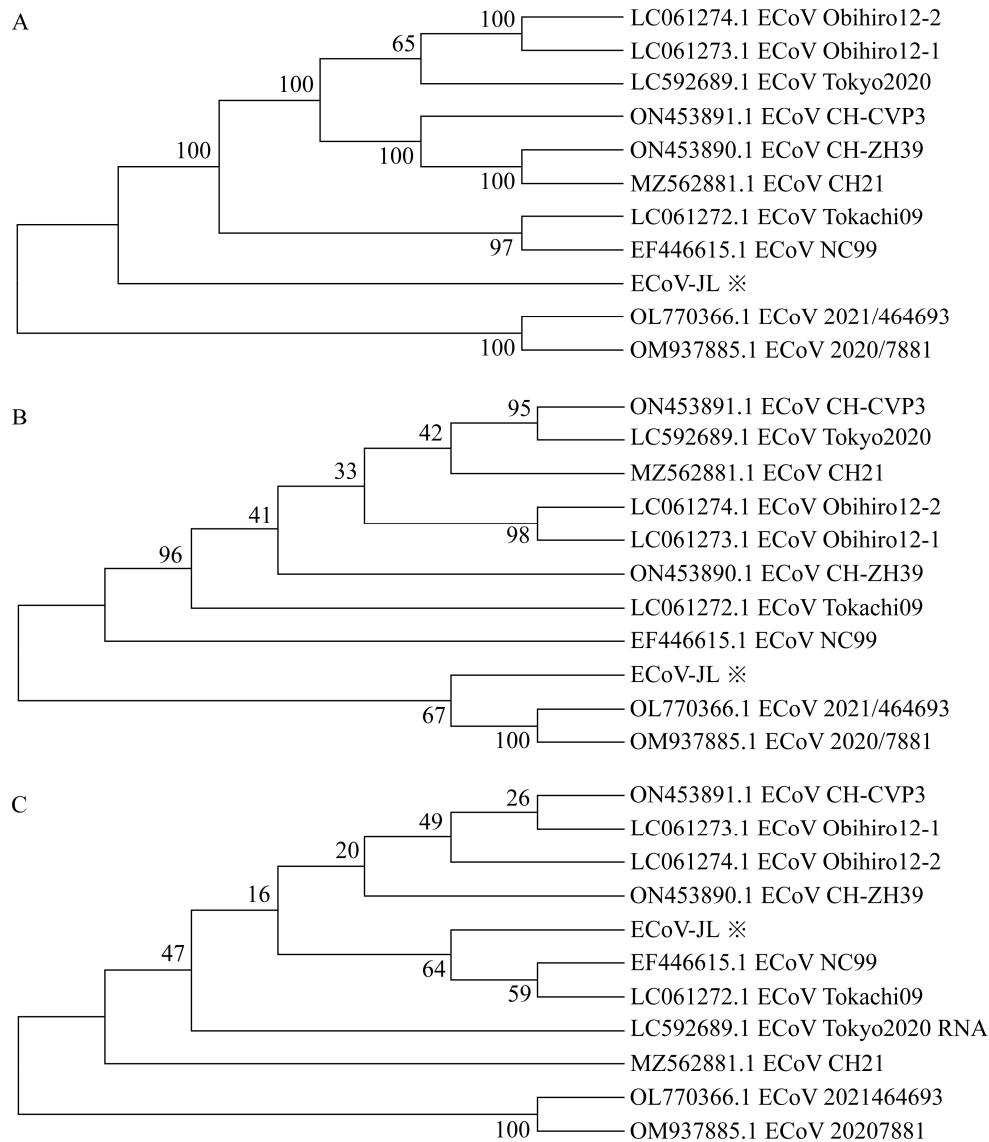
Figure 5 ECoV-JL strain cell cytotropism (scale bar=100  $\mu\text{m}$ ). A: IFA detection of Caco-2 cells infected with ECoV-JL strain. B: IFA detection of NPTTr cells infected with ECoV-JL strain. C: IFA detection of PK15 cells infected with ECoV-JL strain. D: IFA detection of HEK293T cells infected with ECoV-JL strain. E: IFA detection of Vero-CCL81 cells infected with ECoV-JL strain. F: IFA detection of HRT-18 cells infected with ECoV-JL strain. G: IFA detection of Huh7 cells infected with ECoV-JL strain. H: IFA detection of PK1 cells infected with ECoV-JL strain. I: IFA detection of HeLa-R19 cells infected with ECoV-JL strain.

### 3 讨论与结论

ECoV 是一种主要发生于成年马匹的病毒性传染病, 目前已经在多个国家流行, 造成很大的经济损失。根据有限的文献, ECoV 可能以无症状感染的形式在全球范围内的马中广泛分布<sup>[1]</sup>。2022 年, Qi 等<sup>[5]</sup>从山东省某驴场中分离得到一株马冠状病毒, 并对该毒株进行了生物学分析, 这也是我国第一次分离得到该病毒, 结合之前的研究结果, 认为马冠状病毒可能已经在中国流行, 导致潜伏感染。本研究从马的

粪便中分离得到了 ECoV 新毒株, 并且对该毒株进行全基因组测序和病毒特性研究, 由于 ECoV 感染 HRT-18 细胞后光学显微镜观察未见典型的细胞聚集和合胞体现象, 所以需要借助间接免疫荧光对分离毒株的病毒学特性展开研究, 因此实验室原核表达并且纯化了 ECoV-S1 蛋白, 制备了 ECoV-S1 蛋白的单克隆抗体, 为检测 ECoV 感染的细胞提供了便捷的工具。

本研究首先通过 RT-PCR 检测成功鉴定到粪便样品中存在病毒, 但是盲传至第三代细胞仍然未产生典型的细胞病变, 认为可能是 RT-PCR



**图 6 基于 ECoV-JL 基因组核苷酸序列的演化分析** A: 全基因组核苷酸序列遗传演化分析. B: N 基因核苷酸序列遗传演化分析. C: NS2 基因核苷酸序列遗传演化分析

Figure 6 Phylogenetic analysis based on the nucleotide sequences corresponding to the whole genome sequence. A: Genetic evolution analysis of whole genome nucleotide sequences. B: Genetic evolution analysis of N gene nucleotide sequences. C: Genetic evolution analysis of NS2 gene nucleotide sequences.

检测较为灵敏，但实际病毒含量较低，不足以产生典型的细胞病变，于是决定利用间接免疫荧光和电子显微镜观察进行进一步检测，最终确定样品中确实存在 ECoV 病毒。

分析全基因组测序结果，来自不同地理区

域的毒株基因组序列存在显著差异，本研究分离得到的毒株基因组序列与在美国分离得到的 ECoV NC99 株的同源性最高，但是与中国距离最近的韩国和日本相似性较低。对全基因组进行系统进化树分析，发现 ECoV-JL 株属于单独

的演化分支, 与其他毒株的亲缘关系较远。这些结果均表明, 研究分离的病毒产生了变异, 这种变异可能是由其他毒株重组造成的, 认为这些变异可能是由于远距离传播和不同地区实施的不同疾病预防措施造成的基因突变。

根据以往的研究, ECoV 可以编码 2 种 NS2 基因, 按照所编码的 NS2 基因长度可以分为 837 nt 和 585 nt 两种<sup>[1]</sup>, 本研究分离到的 ECoV-JL 株可以编码长度为 837 nt 的 NS2 基因, 除此之外 ECoV CH21、Tokyo2020、Tokachi09 和 NC99 毒株也可以编码 837 nt 长度的 NS2 基因, 与分离得到的 ECoV-JL 株同源性较高, 一致性约为 98%。NS2 蛋白主要参与病毒的自我切割和亚细胞定位, 与病毒的自噬密切相关, NS2 基因编码的差异是造成 ECoV-JL 株与部分毒株同源性较差的主要原因。

本研究从湖北省某马场中鉴定并分离到了一株马冠状病毒, 将其命名为 ECoV-JL 株, 通过二代测序、生物学鉴定和遗传进化分析, 该毒株的分离鉴定一定程度上反映了湖北地区流行毒株的特点, 为我国 ECoV 流行现状和演化趋势提供重要依据。

## 参考文献

- [1] ZHANG JQ, GUY JS, SNIJDER EJ, DENNISTON DA, TIMONEY PJ, BALASURIYA UBR. Genomic characterization of equine coronavirus[J]. *Virology*, 2007, 369(1): 92-104.
- [2] BASS EP, SHARPEE RL. Coronavirus and gastroenteritis in foals[J]. *Lancet*, 1975, 2(7939): 822.
- [3] GUY JS, BRESLIN JJ, BREUHAUS B, VIVRETTE S, SMITH LG. Characterization of a coronavirus isolated from a diarrheic foal[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38(12): 4523-4526.
- [4] NEMOTO M, SCHOFIELD W, CULLINANE A. The first detection of equine coronavirus in adult horses and foals in Ireland[J]. *Viruses*, 2019, 11(10): 946.
- [5] QI PF, GAO XY, JI JK, ZHANG Y, YANG SH, CHENG KH, CUI N, ZHU ML, HU T, DONG X, YAN B, WANG CF, YANG HJ, SHI WF, ZHANG W. Identification of a recombinant equine coronavirus in donkey, China[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2022, 11(1): 1010-1013.
- [6] TSUNEMITSU H, SMITH DR, SAIF LJ. Experimental inoculation of adult dairy cows with bovine coronavirus and detection of coronavirus in feces by RT-PCR[J]. *Archives of Virology*, 1999, 144(1): 167-175.
- [7] PUSTERLA N, MAPES S, WADEMAN C, WHITE A, BALL R, SAPP K, BURNS P, ORMOND C, BUTTERWORTH K, BARTOL J, MAGDESAN KG. Emerging outbreaks associated with equine coronavirus in adult horses[J]. *Veterinary Microbiology*, 2013, 162(1): 228-231.
- [8] FIELDING CL, HIGGINS JK, HIGGINS JC, McINTOSH S, SCOTT E, GIANNITTI F, METE A, PUSTERLA N. Disease associated with equine coronavirus infection and high case fatality rate[J]. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2015, 29(1): 307-310.
- [9] NEMOTO M, OUE Y, MORITA Y, KANNO T, KINOSHITA Y, NIWA H, UENO T, KATAYAMA Y, BANNAI H, TSUJIMURA K, YAMANAKA T, KONDO T. Experimental inoculation of equine coronavirus into Japanese draft horses[J]. *Archives of Virology*, 2014, 159(12): 3329-3334.
- [10] 仇钰, 孙谦, 秦爱建, 金文杰, 邵红霞, 顾炳泉. 马冠状病毒抗体的间接 ELISA 检测方法的建立[J]. *中国预防兽医学报*, 2009, 31(2): 122-126.
- [11] QIU Y, SUN Q, QIN AJ, JIN WJ, SHAO HX, GU BQ. Development of indirect ELISA for detection of antibodies against equine coronavirus[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2009, 31(2): 122-126 (in Chinese).
- [11] KOOIJMAN LJ, MAPES SM, PUSTERLA N. Development of an equine coronavirus-specific enzyme-linked immunosorbent assay to determine serologic responses in naturally infected horses[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2016, 28(4): 414-418.