

2007—2009 年部分猪群 PRRSV *ORF5* 和 *Nsp2* 基因的克隆与序列分析

邹敏^{1,2}, 吴发兴³, 王福军¹, 李金积¹, 冯阳¹, 刘蕾¹, 李明义¹,
陈克正², 范根成¹, 李晓成³

(1 青岛易邦生物工程有限公司, 山东 青岛 266032; 2 青岛科技大学 材料科学与工程学院, 山东 青岛 266061;

3 中国动物卫生与流行病学中心, 山东 青岛 266032)

【摘要】 【目的】了解 2007—2009 年部分猪群中猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)株的遗传演化规律。【方法】按常规方法,从 2007—2009 年收集的疑似蓝耳病猪群组织样品中分离 PRRSV,应用 RT-PCR 方法,对分离的 10 株 PRRSV 的 *ORF5* 和 *Nsp2* 基因进行扩增,测序后与 19 个 PRRSV 参考毒株的 *ORF5*、*Nsp2* 基因进行核苷酸、氨基酸序列比较及遗传进化分析。【结果】分离到的 SDWF5、SDCX1、LN3、LN8、LN12、SD2、SD5、SD14、ZB1、ZB2 共 10 株 PRRSV 均属于美洲型 PRRSV 变异株,其 *ORF5* 基因全长均为 603 bp,编码约 200 个氨基酸,其推导氨基酸序列变异主要发生在 9~39 位;SDWF5、SDCX1、LN3、LN12、SD2、SD5、SD14、ZB2 等 8 个分离株的 *Nsp2* 基因全长为 2 845 bp,编码 950 个氨基酸,与代表毒株 VR-2332 相比,8 个分离株在 *Nsp2* 基因推导氨基酸序列的 480 和 532~560 位发生了不连续的 30 个氨基酸缺失。与 19 个 PRRSV 参考毒株的 *ORF5*、*Nsp2* 序列进行比较后发现,10 个分离株的 *ORF5*、*Nsp2* 基因核苷酸序列及其推导氨基酸序列均发生了较大变异。遗传进化分析发现,10 个分离株与以 CH-1a 为代表的国内流行毒株处于同一分支,与 JXA1 等变异毒株的遗传距离较近。【结论】来源于不同猪群的 10 个 PRRSV 分离株的遗传关系存在交叉,没有明显的地域特征,但可能具有相同的始祖 Ch-1a。

【关键词】猪繁殖与呼吸综合征病毒变异株;*ORF5* 基因;*Nsp2* 基因;遗传变异

【中图分类号】Q785;S858.28

【文献标识码】A

【文章编号】1671-9387(2010)10-0007-08

Cloning and sequence analysis of *ORF5* and *Nsp2* genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from some pig farms in 2007—2009

ZOU Min^{1,2}, WU Fa-xing³, WANG Fu-jun¹, LI Jin-ji¹, FENG Yang¹, LIU Lei¹,
LI Ming-yi¹, CHEN Ke-zheng², FAN Gen-cheng¹, LI Xiao-cheng³

(1 Yebio Bio-Engineering Co., Ltd., of Qingdao, Qingdao, Shandong 266032, China; 2 College of Materials Science and Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao, Shandong 266061, China; 3 China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao, Shandong 266032, China)

Abstract: 【Objective】The study was to understand the genetic evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) strains from different pig farms in 2007—2009. 【Method】10 PRRSV isolates were isolated from 10 pig farms suffered PRRS in 2007—2009, *ORF5* and *Nsp2* genes of these isolates were amplified, sequenced, compared and phylogenetic analysed with 19 reference PRRSV. 【Result】

* [收稿日期] 2010-03-04

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目“重大动物疫病病原快速检测技术研究和开发”(2006BAD06A11)

[作者简介] 邹敏(1975—),女,四川荣县人,兽医师,在读硕士,主要从事兽用生物制品研究。E-mail: zouminxj@163.com

[通信作者] 李明义(1966—),男,河南鹤壁人,教授,博士,主要从事兽用生物制品研究。

陈克正(1965—),男,山东平度人,教授,博士,主要从事生物新材料研究。

SDWF5,SDCX1, LN3, LN8, LN12, SD2, SD5, SD14, ZB1, ZB2 10 are variant strains of North America PRRSV, of which *ORF5* genes were composed of 603 nucleotides, encoded polypeptides of 200 amino acid residues, variations of the deduced amino acids of *ORF5* gene mainly occurred at positions of 9 to 39. *Nsp2* genes of 8 PRRSV isolates were composed of 2 845 nucleotides, encoded polypeptides of 950 amino acid residues. Relative to the representative strains VR-2332, there are two deletions of 30 amino acid in *Nsp2* protein 480, 532—560 aa of SDWF5, SDCX1, LN3, LN12, SD2, SD5, SD14, ZB2 PRRSV isolates. Compared with *ORF5* and *Nsp2* gene nucleotide and amino acid sequence of 19 reference PRRSV, 10 isolates of *ORF5* and *Nsp2* genes and their deduced amino acid sequence have occurred in a larger variation. Phylogenetic analysis based on gene sequence of *ORF5* and *Nsp2* showed that all isolates sharing a close distance evolutionary relationship with CH-1a, and showed a closer distance evolutionary relationship with JXA1. 【Conclusion】 There is a cross-cutting phenomenon on the genetic relationship of PRRSV isolates which isolated from 10 different pig farms, and no obvious geographical characteristics. We can assumed that they have a common ancestor Ch-1a.

Key words: variant strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus; *ORF5* gene; *Nsp2* gene; genetic variation

猪繁殖与呼吸综合征(Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)是由猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)引起的一种高度传染性疾病,主要以母猪繁殖障碍、呼吸系统疾病以及哺乳仔猪的高死亡率为特征^[1]。1987年该病首次发生于美国,随后传遍全球几乎所有养猪的国家和地区^[2]。1996年,郭宝清等^[3]首次证实该病传入我国大陆,2006年我国南方部分省份暴发了主要由 PRRSV 变异株(高致病性猪蓝耳病病毒)引起的“猪高热病”疫情,截至 2008 年,中国已有 25 个以上的省份发生了 PRRS 疫情,并造成巨大损失^[4-5]。目前,对该病毒的病原学特征、致病机理和免疫特性尚不十分清楚,但已有商品化的弱毒疫苗和灭活苗应用于 PRRS 的防制。但由于疫苗自身的不足,均不能对 PRRS 流行毒株提供有效的免疫保护,给 PRRS 的防制带来了巨大挑战。

PRRSV 为有囊膜的单股正链 RNA 病毒,为尼多病毒目、动脉炎病毒科、动脉炎病毒属成员,其基因组 RNA 长约 15 kb,有 9 个开放阅读框(*ORF*)^[6]。其中 *ORF1* 占整个基因组的 80%,编码病毒 RNA 复制酶多聚蛋白,并在自剪切蛋白酶的作用下产生 13 种非结构蛋白(*Nspl* α 、*Nspl* β 、*Nsp2*~*Nsp12*)^[7]。*ORF2a*、*ORF2b*、*ORF3*~*ORF5* 分别编码病毒的 5 种囊膜相关蛋白 GP2a、GP2b、GP3~GP5, *ORF6* 编码非糖基化基质(M)蛋白, *ORF7* 编码核衣壳(N)蛋白^[8]。国内外研究表明, PRRSV 分离株间的核苷酸序列存在明显差异,尤

其是 *Nsp2*、*ORF5* 变异较大。PRRSV *Nsp2* 基因序列高度变异, *Nsp2* 蛋白具有糜蛋白酶样(或小 RNA 病毒 3C 样)半胱氨酸蛋白结构域,拥有大量线性 B 细胞表位,具有较强的免疫原性,是 PRRSV 的免疫原之一^[9]。囊膜糖蛋白 GP5 是 PRRSV 的 3 种主要结构蛋白之一,具有较高的免疫原性与中和活性,参与体液免疫和细胞免疫^[10]。在环境和免疫压力作用下, *ORF5* 基因极易发生变异,不同国家和地区 PRRSV 分离株的 *ORF5* 基因同源性差异较大^[11]。为查明我国当前 PRRSV 的流行现状,了解不同猪群中 PRRSV *ORF5*、*Nsp2* 基因的遗传演化规律,本研究对分离自 2007—2009 年 10 个不同规模猪场的 PRRSV *ORF5*、*Nsp2* 基因序列进行了测定及分析,以期探明现阶段我国猪群中 PRRS 的遗传演化特点,为 PRRS 的防控提供必要的技术储备。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品与细胞 2007—2009 年,共收集来自 10 个猪场的疑似蓝耳病猪群组织样品共 24 份,每份样品主要包括肺脏、扁桃体、淋巴结、脾脏等。处理方法是:取 5 g 病料,加少量灭菌 PBS(含青霉素、链霉素 100 U/mL)用无菌研磨器研磨至糊状,再用 PBS 按 1:4 的体积比稀释,反复冻融 3 次,4℃、8 000 r/min 离心 10 min,取上清液,再用 0.22 μ m 孔径的滤膜过滤, -70℃ 保存备用。

Marcl45 细胞,由青岛易邦生物工程有限公司技术中心保存,外源病毒检测纯净。细胞营养液为

含体积分数 8% 犊牛血清的 MEM(购自美国 HY-CLONE 公司),按常规方法培养。

1.1.2 主要试剂 RT-PCR 反应试剂、pMD18-T 载体、DH5α 大肠杆菌、DL2000 DNA Marker 等均购自 TaKaRa 分司,TRI_{ZOL} LS[®] Reagent 试剂盒购自 Invitrogen 公司,UNIQ-10 DNA 胶回收试剂盒购自上海生工生物工程有限公司。

1.2 引物设计与合成

根据 GenBank 中收录的 PRRSV 美洲型毒株基因序列比对结果,设计了 1 对扩增 Nsp2 基因的引物,Nsp2F:5'-CGGTGCCCGGAAAGAGAGCAA-3',Nsp2R:5'-CGCCCAGTAACCTGCCAAG-3';扩增 ORF5 基因的引物(ORF5F、ORF5R)根据文献[12]设计。引物交由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,稀释成 20 pmol/L 于-20 ℃保存备用。

1.3 病毒分离

取处理过的病料上清液 1 mL,分别接种已长成单层的 Marcl45 细胞,37 ℃吸附 2 h 后,弃去接种液,加入含体积分数 2% 犊牛血清、体积分数 1% 谷氨酰胺和 100 U/mL 青霉素、链霉素的 MEM 培养液(pH 7.2)10 mL,置 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 培养箱中继续培养,并设正常细胞作为对照。每天早晚各观察 1 次细胞有无病变,连续观察 3~5 d。然后收获细胞并于-20 和 37 ℃反复冻融 2 次,置灭菌离心管中 4 ℃、8 000 r/min 离心 10 min,收获培养物上清液,再继续盲传。当细胞出现明显细胞病变(CPE)时收毒,-70 ℃保存备用。传 4 代仍无病变者,作病毒分离阴性处理。

1.4 分离病毒总 RNA 的提取

取-70 ℃保存备用的各分离病毒液,按 Invitrogen 公司的 TRI_{ZOL} LS[®] Reagent 试剂盒操作说

明书提取病毒总 RNA,用适量焦碳酸二乙酯(DEPC)水溶解,-20 ℃冻存备用。

1.5 目的基因的 RT-PCR

取 10 μL RNA,加入 ORF5R 1 μL (20 pmol/μL)、3.5 μL dNTP (2.5 mmol/μL)、0.5 μL RNase-Inhibitor (40 U/μL)、1 μL AMV、4 μL 5×AMV Buffer,42 ℃水浴 1 h,即得 cDNA 模板,将其于-20 ℃保存备用。Nsp2、ORF5 基因 PCR 扩增体系均为:10×PCR buffer 2.5 μL,dNTP (2.5 mmol/μL) 2 μL,上、下游引物各 0.5 μL (20 pmol/μL),cDNA 模板 3 μL,EX-Taq 0.5 μL,最后以灭菌双蒸水补至 25 μL。Nsp2 基因的 PCR 扩增程序为:95 ℃ 5 min;94 ℃ 50 s,56 ℃ 1 min,72 ℃ 3 min,35 个循环;72 ℃ 10 min。ORF5 基因的 PCR 扩增程序为:95 ℃ 5 min;94 ℃ 50 s,57 ℃ 40 s,72 ℃ 1 min,35 个循环;72 ℃ 10 min。反应结束后取 5 μL PCR 产物,用 10 g/L 琼脂糖凝胶,于 100 V 电泳 45 min,检查扩增结果。

1.6 目的基因的克隆与鉴定

切胶后,按照 UNIQ-10 DNA 胶回收试剂盒说明书电泳回收目的基因片段,将其与 pMD18-T 载体连接,转化 DH5α 感受态细胞,挑白斑,接种于 LB 液体培养基(含氨苄青霉素钠)振荡培养,微量法提取质粒,进行重组质粒 PCR 鉴定。阳性菌液于-20 ℃保存备用。

1.7 序列测定及分析

取阳性菌液送宝生物工程(大连)有限公司进行测序,获得分离株 ORF5、Nsp2 基因序列,用 DNASTar 软件(Version 7.0)与表 1 中所列的 19 个 PRRSV 参考毒株的 ORF5、Nsp2 基因分别进行核苷酸及推导氨基酸序列比对,采用 ClustalX 1.83、Mega 4.1 软件绘制系统进化树。

表 1 序列比较分析所用 PRRSV 参考毒株序列及来源

Table 1 Details of PRRSV reference strains used for analysis

毒株 Strains	登录号 GenBank accession number	登录年份 Accession year	毒株 Strains	登录号 GenBank accession number	登录年份 Accession year
LV	M96262	2000	HUB1	EF075945	2006
VR-2332	U87392	2000	CC-1	EF153486	2006
MLV	AF066183	2005	S1	DQ459471	2007
CH-1a	AY032626	2001	HuN06	—	2007
BJ-4	AF331831	2001	Em2007	EU262603	2008
HN1	AY457635	2003	SD-JN	FJ422123	2008
HB-1	AY150312	2004	SD-LC1	FJ765744	2009
HB-2	AY262352	2004	SD-4	GQ222229	2009
JXA1	EF112445	2006	SD0612	GU233504	2010
HEB1	EF112447	2006			

2 结果与分析

2.1 PRRSV 的分离与鉴定

用 Marc145 细胞从疑似蓝耳病病料中依次分离到 SDWF5、SDCX1、LN3、LN8、LN12、SD2、SD5、SD14、ZB1、ZB2 共 10 株 PRRSV。这 10 个分离株

能使 Marc145 细胞产生典型的 CPE,主要表现为细胞聚集、边缘模糊、折光性增强、灶状脱落、视野内呈现空洞等(图 1)。按照 OIE 2009 版陆生动物诊断及疫苗手册中第 2.8.7 节所述 RT-PCR 方法^[13],证实分离到的病毒为美洲型 PRRSV。

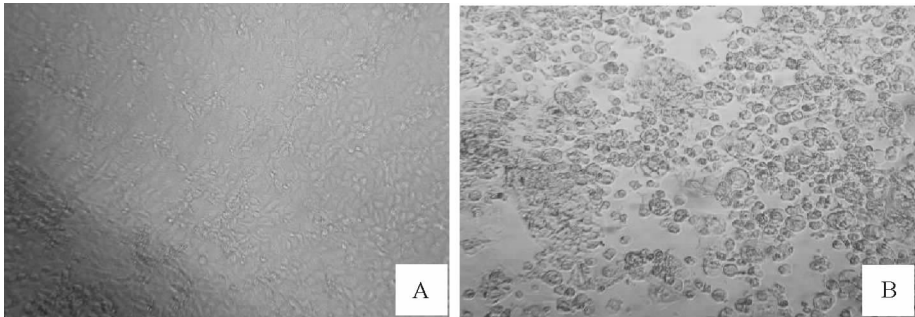


图 1 蓝耳病病料接种 Marc145 后产生的细胞病变
A. 正常 Marc145 细胞;B. 病变 Marc145 细胞

Fig. 1 CPE of Marc145 cell inoculated by PRRSV

A. Marc145 cell not inoculated by PRRSV; B. CPE of Marc145 cell inoculated by PRRSV

2.2 PRRSV 分离株 ORF5、*Nsp2* 基因的 RT-PCR 扩增及鉴定

用 RT-PCR 方法扩增获得了 PRRSV 分离株 *ORF5*、*Nsp2* 目的基因片段,*ORF5* 大小约为 750

bp,*Nsp2* 约为 2 850 bp。将 PCR 产物回收后进行连接、转化,挑白斑克隆进行菌落 PCR 鉴定,结果均出现了预期的目的条带(图 2)。

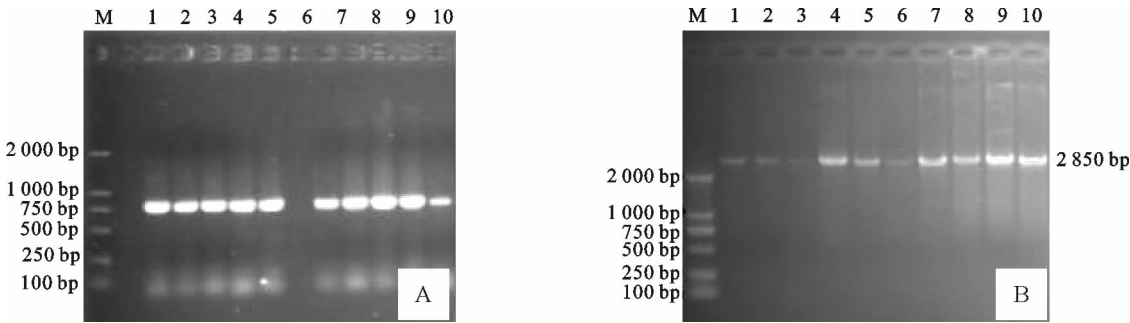


图 2 10 个 PRRSV 分离株 *ORF5* 和 *Nsp2* 基因的 RT-PCR 鉴定

A. *ORF5* 基因;B. *Nsp2* 基因;M. DL2000 Marker;1~10. 10 个 PRRSV 分离株

Fig. 2 PCR identification result of *Nsp2* and *ORF5* genes recombinants of 10 PRRSV

A. *ORF5* gene;B. *Nsp2* gene;M. DL2000 Marker;1~10. 10 PRRSV isolates

2.3 目的基因的序列测定与分析

将阳性克隆的测序结果登陆 GenBank 进行 Blast 比对,证实所得 18 个基因序列皆为 PRRSV 的基因序列。应用 DNASTar 软件中的 SeqMan 子软件进行拼接,最后获得了 10 株 PRRSV 分离株中的 *ORF5* (603 bp)和 8 株的 *Nsp2* (2 845 bp)基因序列。本研究所得 10 个 PRRSV 分离株的 *ORF5* 基因与美洲型 PRRSV 代表毒株 VR-2332 的 *ORF5* 基因核苷酸序列同源性均高于 87.2%,而与欧洲型代表毒株 LV 的同源性仅在 63.2%~63.8%,说明

本研究所获分离株均为美洲型 PRRSV。10 个 PRRSV 分离株的 *ORF5* 基因之间的核苷酸及推导氨基酸序列同源性分别为 96.2%~100%和 94%~100%。与 2006 年以来分离的 JXA1 等国内其他变异毒株之间的核苷酸与推导氨基酸同源性分别为 91.4%~99.5%和 90.5%~98.5%;与 VR-2332、CH-1a、BJ-4、HB-1、HB-2 等传统毒株的核苷酸与推导氨基酸序列同源性分别为 87.2%~96.7%和 83.6%~94.5%。本研究所获得的 10 个 PRRSV 分离株中的 SDWF5、SDCX1、LN3、LN12、SD2、

SD5、SD14、ZB2 之间,*Nsp2* 基因核苷酸与推导氨基酸序列同源性分别为 97.5%~99.5%和 95.9%~99.3%。与 2006 年以来陆续分离的 JXA1 等国内其他变异毒株的核苷酸与推导氨基酸同源性分别为 97.8%~99.7%和 97.4%~99.8%;而与 VR-2332、BJ-4、CH-1a、HB-1、HB-2 等传统毒株的核苷酸、推导氨基酸的同源性分别为 82.8%~96.2%和

76.1%~94.7%。
2.4 PRRSV 分离株 ORF5、*Nsp2* 基因及推导氨基酸序列的变异分析

用 DNASTar 软件包中的 Protean 子软件对 10 个 PRRSV 分离株 ORF5 基因的推导氨基酸序列进行分析,结果见图 3。

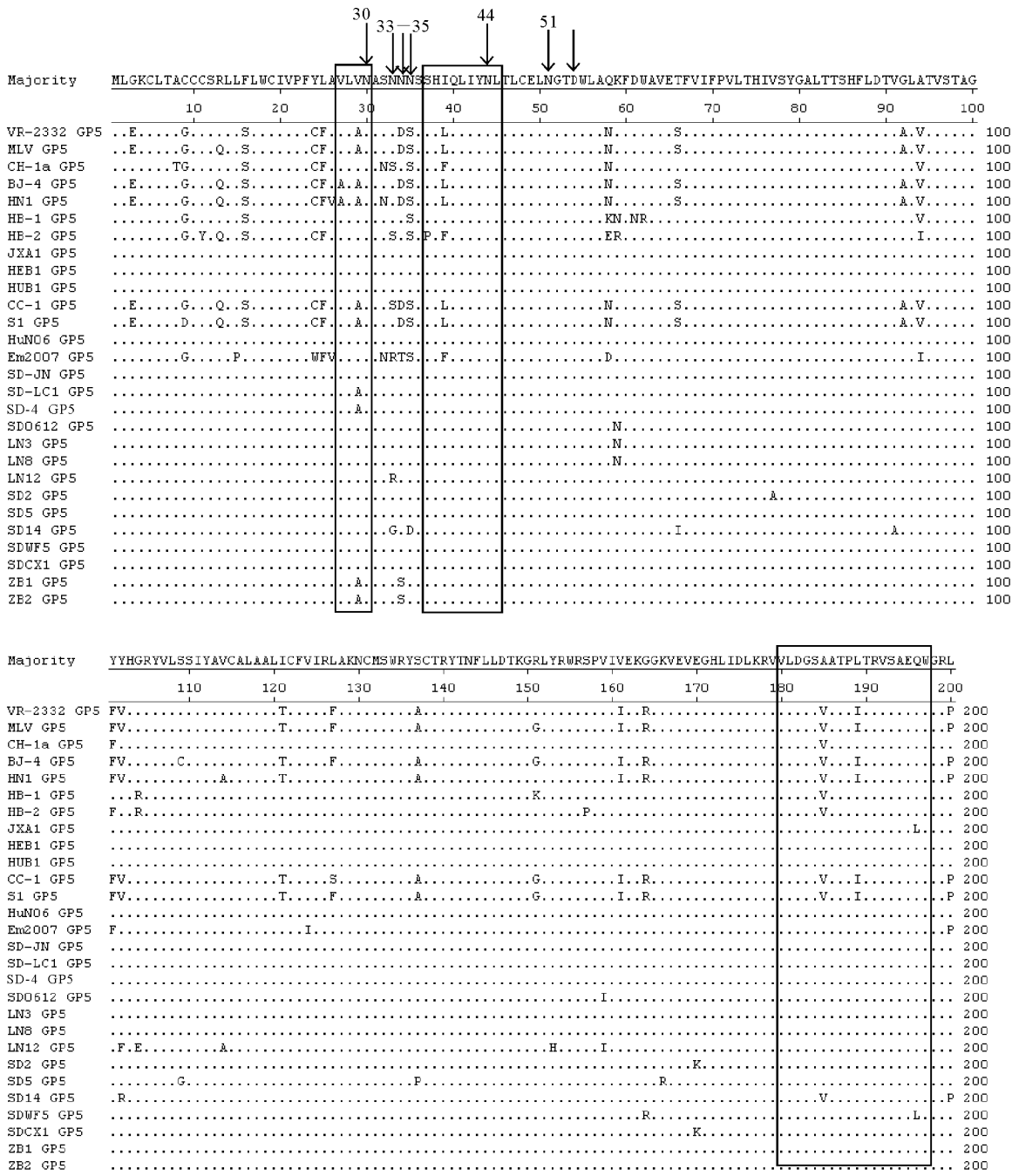


图 3 10 个 PRRSV 分离株 ORF5 基因推导氨基酸序列的比较

Fig. 3 Main amino acid differences of ORF5 gene among 10 PRRSV isolates

10 个 PRRSV 分离株的 ORF5 基因序列全长均为 603 bp,编码 200 个氨基酸(aa)。与 2006 年之前

的国内外参考毒株相比,分离株 ORF5 基因编码蛋白 GP5 的推导氨基酸序列变异主要发生在 9~39

aa,在 GP5 N 端 1~31 aa 是一个长 31 aa 的信号肽序列,在 N 端 30~51 aa 处分别有 4~6 个 N-糖基化位点,分别位于 30,33,34,35,44 和 51 位 aa 处,但所有分离株在 30,44 和 51 位 aa 的 N-糖基化位点均未发生改变。在目前已经确定的 3 个美洲型 PRRSV GP5 蛋白抗原表位中,10 个分离株的中和性表位(37~45 位 aa)、非中和性表位(27~30 位 aa 和180~197 位 aa)均发生了氨基酸水平的点突变,中和性表位 S37H(F/L)QLIYN 是 PRRSV 的主要中和抗原表位^[14],其 H38 与 I42Y43N44 被认为是中和抗体的识别位点,L39Q40L41 被认为是中和抗体的结合位点^[15],但 PRRSV 分离株 39 位的 F/L 突变为 I。有研究发现,R13、R151 位点与病毒毒力密切相关^[16],但本研究 10 个 PRRSV 分离株在这 2

个位点均未发生变异,参考来源于疫苗株(MLV)的 137 位 aa 为 A、野毒株 137 位 aa 主要是 S 的这一判断标准,可以间接证实本研究所获得的 10 个 PRRSV 分离株均为野毒株。

10 个 PRRSV 分离株的 *Nsp2* 基因序列全长均为 2 845 bp,编码 950 个 aa。对 SDWF5、SDCX1、LN3、LN12、SD2、SD5、SD14、ZB2 8 个分离株 *Nsp2* 基因推导氨基酸序列进行分析,结果(图 4)发现,与美洲型 PRRSV 代表毒株 VR-2332 相比,8 个分离株的 *Nsp2* 基因推导氨基酸序列在 480,532~560 位发生了不连续的 30 个氨基酸缺失,同时在其他编码区域存在大量点突变。氨基酸序列同源性分析表明,8 个 PRRSV 分离株与 2006 年分离到的 JXA1 推导氨基酸序列的同源性高达 98.5%以上。

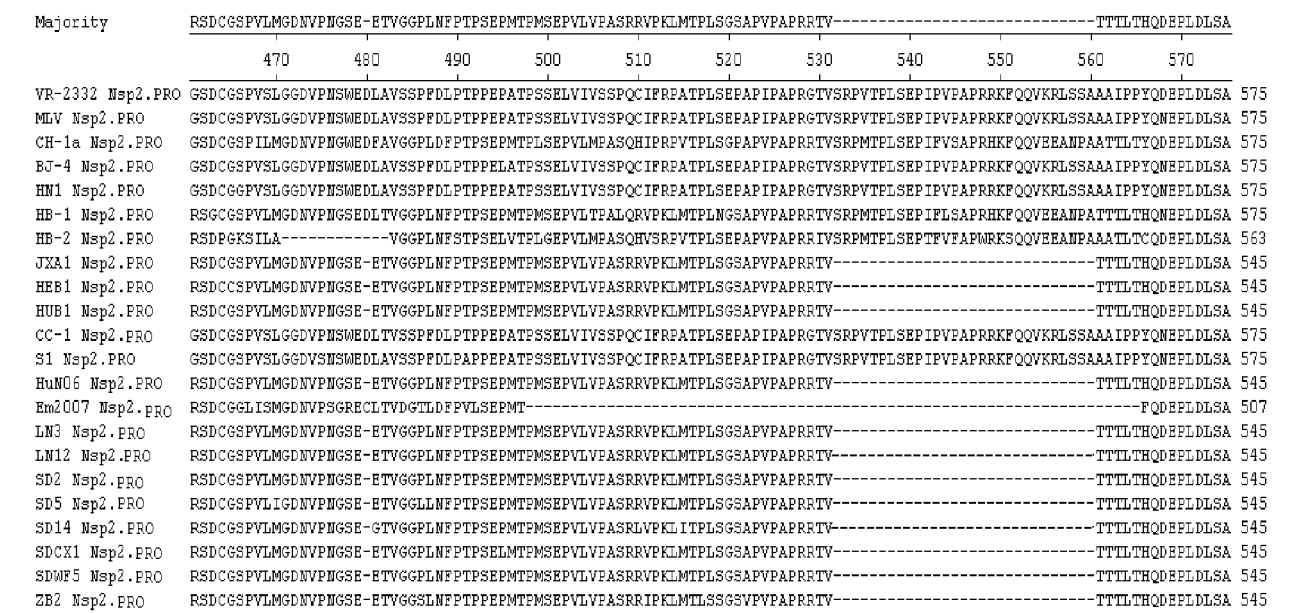


图 4 8 个 PRRSV 分离株 *Nsp2* 基因变异区域推导氨基酸序列的比较

Fig. 4 Comparison of deduced *Nsp2* amino acid sequence of 8 PRRSV isolates

2.5 PRRSV 分离株 ORF5、*Nsp2* 基因的遗传进化树分析

由图 5 可知,本研究所获得的 10 个 PRRSV 分离株属于以 CH-1a 为代表的同一个分支,与 JXA1 等变异毒株遗传距离较近,而与 VR-2332、MLV、BJ-4 等国内外分离株遗传距离较远。结合核苷酸及推导氨基酸序列的同源性,推测这 10 个分离株具有相同的起源,可能在自然选择压力(包括自身变异、免疫和环境压力等)下由 CH-1a 逐渐变异而来。

3 讨论

1992 年,Collins 等^[17]报道,MA104、Marc145 等细胞系适宜用于 PRRSV 的分离,但不同毒株对

上述细胞的敏感性不一致。本研究用 Marc145 细胞分离到的 PRRSV 毒株,在接种后传 2~3 代可致 Marc145 细胞产生 CPE,自第 3 代开始 CPE 趋于稳定。PRRSV 致 Marc145 细胞 CPE 的主要表现为:细胞皱缩、呈灶状变化、折光性增强(视野变暗)。SDCX1 等分离株在第 2 代,即可致 Marc145 细胞产生稳定 CPE,且细胞病变发展迅速。这可能是由于环境和免疫压力作用使 PRRSV 分离株对细胞嗜性增强所致。同时,本研究发现,部分经 RT-PCR 检测为阳性的样品接种 Marc145 细胞后,未分离到病毒,这可能与样品在运送和保存过程中处置不当有关。PRRSV 对温度、湿度和有机溶剂敏感,且其感染性易受 pH 值影响,可能导致病毒失活。因此,在

分离 PRRSV 时,应尽可能选择新鲜样品和病毒比较富集的组织(如肺脏、淋巴结、血清),或选择对病毒更为敏感的猪肺泡巨噬细胞(PAMs)。

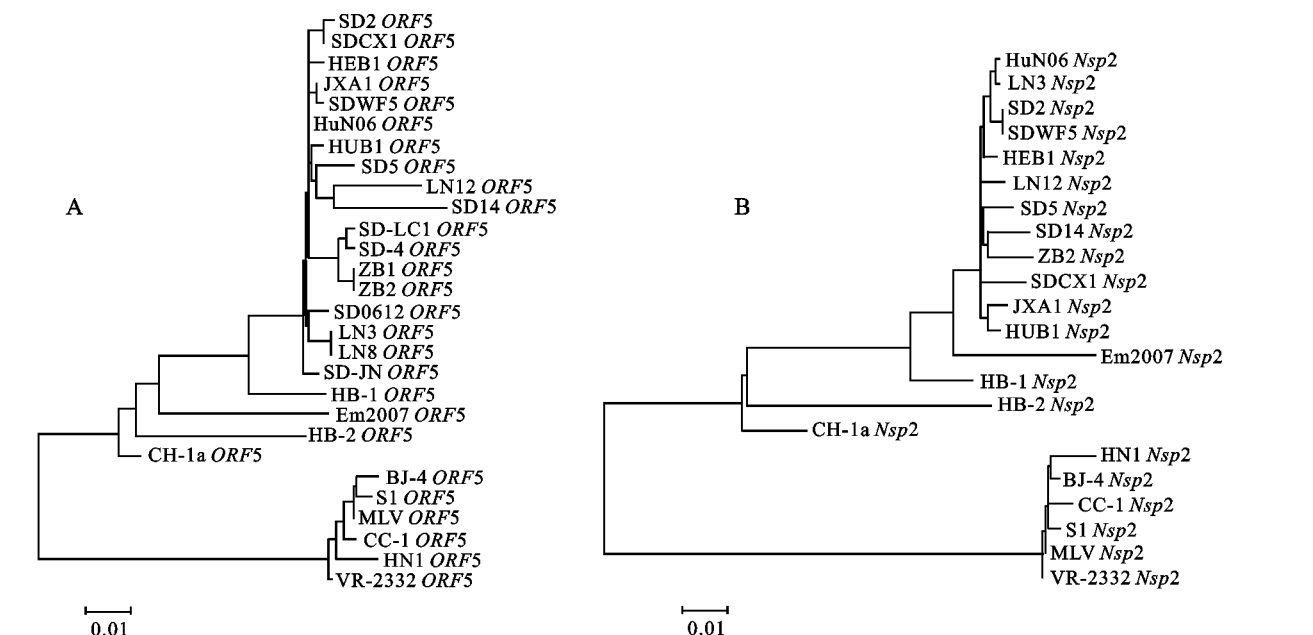


图 5 PRRSV 分离株 ORF5(A)和 *Nsp2*(B)基因的遗传进化树
Fig. 5 Phylogenetic tree of PRRSV ORF5(A)and *Nsp2*(B)gene

ORF5 是 PRRSV 基因组中的高变区之一,其编码蛋白 GP5 又是 PRRSV 主要的宿主保护性抗原,ORF5 基因序列,特别是 GP5 氨基酸序列的变异将直接降低 PRRS 疫苗株的交叉保护率^[18]。本研究发现,10 个 PRRSV 分离株与传统毒株的 ORF5 基因核苷酸和推导氨基酸序列同源性分别为 87.2%~96.7%和 83.6%~94.5%,差别较大。Ostrowski 等^[14]研究表明,位于 GP5 第 29 位的非中和表位能够延缓机体产生中和抗体达 3 周之久,从而延缓中和抗体对病毒的中和作用,促进了病毒逃避机体的体液免疫应答。而本研究获得的 GP5 蛋白氨基酸序列的该表位除 ZB1、ZB2 外,其余 8 个分离株都发生了变异,这可能也是这些变异毒株产生严重临床症状的原因之一。

与传统 PRRSV 相比,本研究 8 个分离株 *Nsp2* 基因的推导氨基酸序列,均在 480,532~560 位存在不连续的 30 个氨基酸缺失,与 JXA1 等国内其他变异毒株核苷酸和推导氨基酸的同源性分别高达 97.8%~99.7%和 97.4%~99.8%,这与童光志等^[19]的研究结果基本一致,说明所有分离株都是变异毒株。有报道显示,*Nsp2* 某些功能区可能与 PRRSV 的组织嗜性有关^[5]。本研究 8 个分离株 *Nsp2* 基因推导氨基酸序列中,30 个氨基酸的缺失可能会改变 PRRSV 的细胞嗜性和组织嗜性,众多

散在点突变本身的累积效应或者与缺失突变的叠加累积效应,也可能引起 PRRSV 毒力的改变,这还需要进一步通过致病性试验及反向遗传技术等加以验证。本研究对 *Nsp2* 基因序列进行分析还发现,分离时间不同,PRRSV 分离株与参考毒株的同源性也存在一定差异。2007 年 PRRSV 分离株的核苷酸与推导氨基酸序列的同源性普遍高于 2008—2009 年的分离株,其与 2006 年后的参考毒株的同源性差异普遍高于 0.5%,可能与长期的疫苗选择压力、广泛的自然变异等有关,但这种变异趋势还有待于深入研究。

由本研究的遗传进化树可知,10 个 PRRSV 分离株与 Ch-1a、HB1、HB2 属于同一亚群,且与 JXA1 等变异毒株亲缘关系较近,可以推测这些变异毒株很可能是由 CH-1a 进化而来的。不同猪群 PRRSV 分离株的遗传关系存在交叉,但没有明显的地域特征,进一步说明存在于猪群中的 PRRSV 可能与带毒猪的跨地域流动传播密切相关。

PRRSV 具有广泛的变异性,这种变异不仅存在于两大基因型内,即使是同一基因的不同 PRRSV 毒株之间也存在较大的变异性。本研究分析发现,2007—2009 年分离到的 10 株 PRRSV ORF5、*Nsp2* 基因,在自然环境及免疫压力作用下,随着时间的推移均发生了较大变异,但尚不能证实该变异是

PRRSV 生物学特性发生改变的原因。目前,该病致病机理和免疫特性尚不十分清楚,现有商品化的疫苗尚不能提供有效的免疫保护。因此,为有效地控制 PRRS,应加强对该病的分子流行病学调查、监测及病原变异规律的研究工作,深入开展致病机制和免疫机理等基础研究,为我国研发更具针对性、安全、高效的疫苗提供科学依据。

[参考文献]

- [1] Bilodeau R, Dea S, Martineau G P, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome in Quebec [J]. *Vet Res*, 1991, 129: 102-103.
- [2] 仇华吉, 童光志. 猪生殖-呼吸道综合征 [M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 2000.
Qiu H J, Tong G Z. Porcine reproductive and respiratory syndrome [M]. Changchun: Jilin Science and Technology Press, 2000. (in Chinese)
- [3] 郭宝清, 陈章水, 刘文兴, 等. 从疑似 PRRSV 感染的流产胎儿分离 PRRSV 的研究 [J]. 中国畜禽传染病, 1996, 87(2): 1-4.
Guo B Q, Chen Z S, Liu W X, et al. The study of PRRSV isolated from suspected PRRS abortive fetuses [J]. *Chinese Journal of Animal and Poultry Infections Diseases*, 1996, 87(2): 1-4. (in Chinese)
- [4] Tian K G, Yu X L, Zhao T Z, et al. Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark [J]. *PLoS ONE*, 2007, 2(6): 526-539.
- [5] 田克恭, 吴佳俊, 赵铁柱, 等. 高致病性 PRRSV 分离株分子特征与遗传变异分析 [C]//金宁一. 第三届猪病防控学术研讨会会议论文集. 大连: 中国畜牧兽医学学会动物传染病学分会, 2008.
Tian K G, Wu J J, Zhao T Z, et al. Analysis of molecular characteristics, genetic and variation of the very virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates [C]//Jin N Y. Proceeding of the third swine disease prevention and control. Dalian: Animal Infectious Diseases Branch of China Association of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2008. (in Chinese)
- [6] Wissink E H J, Kroese M V, Maneschijn-Bonsing J G, et al. Significance of the oligo-sacchafides of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus glycoproteins GP2a and GP5 for infectious virus production [J]. *Journal of General Virology*, 2004, 85: 3715-3723.
- [7] Ansari I H, Kwon B, Osofio F A, et al. Influence of N-linked glycosylation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 on virus infectivity, antigenicity, and ability to induce neutralizing antibodies [J]. *Journal of Virology*, 2006, 80: 3994-4004.
- [8] Snijder E J, Van Tol H, Pedersen K W, et al. Identification of a novel structural protein of arteriviruses [J]. *Journal of Virology*, 1999, 73(8): 6335-6345.
- [9] Yan Y L, Guo X, Ge X N, et al. Monoclonal antibody and porcine antisera recognized B-cell epitopes of *Nsp2* protein of a Chinese strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Virus Res*, 2007, 126: 207-215.
- [10] Mateu E, Diaz I. The challenge of PRRS immunology [J]. *The Veterinary Journal*, 2008, 177: 345-351.
- [11] 严安. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 *Nsp2* 基因和 *ORF5* 基因变异分析 [D]. 北京: 中国农业大学, 2004: 27-30.
Yan A. Variation of *Nsp2* gene and *ORF5* gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [D]. Beijing: China Agricultural University, 2004: 27-30. (in Chinese)
- [12] 吴发兴, 解生亮, 张燕霞, 等. 我国南方某省猪繁殖与呼吸综合征病毒分离株分子流行病学分析 [J]. 中国动物检疫, 2008, 25(8): 23-25.
Wu F X, Xie S L, Zhang Y X, et al. Molecular epidemiological analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in south China [J]. *Chinese Journal of Animal Quarantine*, 2008, 25(8): 23-25. (in Chinese)
- [13] Kleiboeker S B, Schommer S K, Lee S M, et al. Simultaneous detection of North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome virus using realtime quantitative reverse transcriptase-PCR [J]. *J Vet Diagn Invest*, 2005, 17: 165-170.
- [14] Ostrowski M, Galeota J A, Jar A M, et al. Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain [J]. *Journal of Virology*, 2002, 76: 4241-4250.
- [15] Verheije M H, Olsthoom R C, Kroese M V, et al. Kissing interaction between 3' noncoding and coding sequences is essential for porcine arterivirus RNA replication [J]. *J Virol*, 2002, 76: 1521-1526.
- [16] Allende R, Kutish G F, Laegreid W, et al. Mutation in the genome of porcine reproductive and respiratory syndrome virus responsible for the attenuation phenotype [J]. *Arch Virol*, 2000, 145: 1149-1161.
- [17] Collins J E, Benfield D A, Christianson W T, et al. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus(isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs [J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1992, 4: 117-126.
- [18] Tjeerd G K, Lisette A C, Rob J M, et al. Challenges for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccinology [J]. *Vaccine*, 2009, 27(28): 3704-3718.
- [19] 童光志, 周艳君, 郝晓芳, 等. 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒的分离鉴定及其分子流行病学分析 [J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(5): 323-327.
Tong G Z, Zhou Y J, Hao X F, et al. Identification and molecular epidemiology of the very virulent porcine reproductive and respiratory syndrome viruses emerged in China [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2007, 29(5): 323-327. (in Chinese)