

野猪源与家猪源 PRRSV 陕西分离株全基因 测序与遗传进化分析

张 冲,武小椿,王 波,韩青松,杨增岐

(西北农林科技大学 动物医学院,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 **【目的】**研究野猪源与家猪源猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)陕西分离株的遗传变异情况及分子生物学特征。**【方法】**根据 VR-2332 和 HB-1(sh)/2002 毒株序列设计引物,对 2 株 PRRSV 陕西分离毒株 Shaanxi-1(家猪源)、Shaanxi-2(野猪源)全基因分段进行扩增并测序,将测序结果依次拼接得到病毒的全基因,然后进行序列的比对分析。**【结果】**PRRSV Shaanxi-1、Shaanxi-2 毒株高度同源且均属于美洲型毒株,它们与 2006 年以前分离的毒株相比存在明显差异(与 BJ-4 株的核苷酸同源性仅为 89%),而与健康致病性 PRRSV(HP-PRRSV)保持较高的同源性(相似率为 99%左右)。Shaanxi-1、Shaanxi-2 分别呈现不同的变异特点,Shaanxi-1 ORF3、ORF5 基因变异较大,ORF6、ORF7 较为保守;Shaanxi-2 ORF7 基因变异最大,ORF3~ORF6 较为保守。分析发现,Shaanxi-1、Shaanxi-2 具有 HP-PRRSV 的分子特征,但部分位点氨基酸的突变明显区别于 HP-PRRSV。**【结论】**不同来源的 Shaanxi-1、Shaanxi-2 毒株均属于 HP-PRRSV 演化中的一个分支,但其发生了部分变异,使其具备了新的特点。

【关键词】 猪繁殖与呼吸综合征病毒;野猪与家猪;全基因测序;遗传进化分析

【中图分类号】 S852.65

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2011)02-0009-08

Genomic sequencing and phylogenetic analysis of PRRSV isolated from domestic pig and wild boar in Shaanxi Province

ZHANG Chong, WU Xiao-chun, WANG Bo, HAN Qing-song, YANG Zeng-qi

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** The research was done to study genetic variation and molecular biological characteristics of PRRSV with different sources isolated from Shaanxi Province. **【Method】** Primers were designed according to VR-2332 and HB-1(sh)/2002 strains, genome of two PRRSV strains Shaanxi-1(source of domestic pig), Shaanxi-2(source of wild boar) isolated from Shaanxi Province was amplified and then sequenced, whole-genome sequence was obtained by splicing of correct sequencing and was aligned with other strains. **【Result】** The results showed that Shaanxi-1 had a high homology with Shaanxi-2 and both of them belonged to American-type strain. Even though they had significant differences from the strains isolated before 2006 (the homology only 89% compared with BJ-4), they shared close to 99% homology with HP-PRRSV. However, Shaanxi-1, Shaanxi-2 had different variation characteristics, Shaanxi-1 ORF3, ORF5 varied greatly, ORF6, ORF7 revealed more conservative; Shaanxi-2 ORF7 got more variation relatively, ORF3~ORF6 seemed more conservative. Analysis showed that Shaanxi-1, Shaanxi-2 had common molecular characteristics with HP-PRRSV, but mutations of a few amino acids different from HP-PRRSV also ex-

* [收稿日期] 2010-07-20

[基金项目] 陕西省“13115”科技创新工程重大科技专项(2007ZDKG-13)

[作者简介] 张 冲(1984—),男,云南昌宁人,在读硕士,主要从事分子病毒学及免疫学相关研究。E-mail:leofighting@163.com

[通信作者] 杨增岐(1963—),男,陕西岐山人,教授,博士生导师,主要从事预防兽医学研究。E-mail:yzq8162 @163.com

isted.【Conclusion】In summary, we could conclude that both Shaanxi-1, Shaanxi-2 from different sources are a branch of HP-PRRSV, however, part of the gene mutations enable them possess new features.

Key words: PRRSV; domestic pig and wild boar; genomic sequencing; phylogenetic analysis

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(PRRSV)引起的一种以妊娠母猪繁殖障碍和仔猪呼吸道疾病为特征的病毒性传染病。其病原 PRRSV 属套式病毒目、动脉炎病毒科成员,基因组全长约为 15 kb,含有 9 个开放阅读框(Open reading frame, ORF),其中 ORF1a 和 ORF1b 编码病毒的非结构蛋白,ORF2~ORF7 编码病毒的结构蛋白。按其遗传特征和抗原性差异,PRRSV 可分为欧洲型毒株与美洲型毒株。序列及抗原性分析表明,不同 PRRSV 分离毒株之间在毒力、基因序列和抗原性等方面都存在较大的差异^[1]。

2006 年夏秋季节,在我国南方部分省市相继暴发了“猪高热病”疫情,发病猪以持续性高热、高发病率、高死亡率为主要特征。该病传播迅速,在短短的半年内几乎传遍了大半个中国,给我国养猪业造成了巨大的经济损失。经诊断发现,该病的主要致病病原是高致病性 PRRSV (HP-PRRSV)^[2-4]。西北农林科技大学动物传染病实验室在调查陕西地区“猪高热病”的同时,从发病家猪和野猪上各分离得到 1 株 PRRSV,分别命名为 Shaanxi-1(家猪源)、Shaanxi-2(野猪源)。本研究对这 2 株分离毒株进行全基因测序,并将其与其他国内外典型的毒株进行序列比对,分析陕西地区 PRRSV 的遗传变异情况,以期为陕西 PRRSV 的分子流行病学研究提供有价值的参考资料。

1 材料与方法

1.1 毒株、细胞及菌种

PRRSV Shaanxi-1、Shaanxi-2 毒株由西北农林科技大学动物传染病实验室自陕西华县某猪场发病猪及西安野生动物园的发病野猪中分离得到。*E. coli* DH5 α 、Marc-145 细胞均由西北农林科技大学动物传染病实验室保存。

1.2 主要试剂

RNAiso Plus (提取 RNA 用)、PrimeScript RT reagent Kit 试剂盒(反转录用)、*Ex Taq* 酶(PCR 扩增用)、pMD18-T(克隆载体)、限制性内切酶等,为宝生物工程(大连)有限公司产品;DNA Marker,为北京全式金生物技术有限公司产品;凝

胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒,为威格拉斯生物技术(北京)有限公司产品。

1.3 PRRSV RNA 的提取及 cDNA 的合成

按 RNAiso Plus 使用说明从第 5 代 PRRSV 的增殖细胞中提取病毒 RNA,然后按 PrimeScript RT reagent Kit 使用说明将 RNA 反转录成 cDNA,反应体系如下:5 $\times$ PrimeScript Buffer 4.0 μ L, PrimeScript RT Enzyme Mix I 1 μ L, Oligo dT Primer(50 μ mol/L)1 μ L, Random 6 mers(100 μ mol/L)4.0 μ L, Total RNA(用 RNase Free ddH₂O 溶解)10 μ L。反应条件为:37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min,紧接着 85 $^{\circ}$ C 热激 5 s 将反转录酶失活。将反转录获得的 cDNA 置于-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4 引物的设计与合成

根据 GenBank 中 PRRSV 标准美洲毒株 VR-2332(登录号:U87392)和国内毒株 HB-1(sh)/2002(登录号:AY150312)基因序列设计引物,对所分离的 PRRSV 全基因进行扩增,引物序列见表 1,其中片段 A~J 为 ORF1a 引物(A 片段上游引物以 5'UTR 为起点),ORF1b A~ORF1b E 为 ORF1b 引物。

引物由北京奥科生物技术有限责任公司合成,用 TE 液稀释至终浓度为 20 pmol/mL, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.5 全基因的扩增

参照 TaKaRa *Ex Taq* 酶使用说明对各基因片段进行扩增,反应体系(25 μ L)如下:TaKaRa *Ex Taq* 酶(5 U/ μ L)0.25 μ L, 10 $\times$ *Ex Taq* Buffer (Mg²⁺ Plus) 2.5 μ L, dNTP Mixture 2 μ L, 模板 cDNA 1 μ L, 上游引物(20 pmol/mL)1 μ L, 下游引物(20 pmol/mL)1 μ L, 用 ddH₂O 补至 25 μ L。反应条件根据各个引物的不同选用最适的反应条件。PCR 产物采用 10 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳。

1.6 基因的克隆、测序及序列分析

从琼脂糖凝胶中回收目的条带,将目的基因连入 pMD18-T 载体,连接产物转化 DH5 α 感受态细胞。挑取单菌落,接种于含氨苄青霉素(100 μ g/mL)的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。取菌液进行 PCR,同时提取质粒进行酶切鉴定,筛选出含阳性重组质粒的菌液,送北京奥科生物技术

有限责任公司测序。根据各片段之间相互重叠的区域,用 DNAS[®]ar 将测序成功的各序列依次拼接,获得完整的全基因序列,然后将其与 GenBank 中发表的典型毒株(欧洲型标准毒株、美洲型标准毒株、疫苗株、弱毒株、高致病性毒株)的基因序列及推导的氨基酸序列进行同源性比对分析,构建系统进化树,分析所分离毒株的遗传变异特征。

表 1 根据 PRRSV VR-2332 和 HB-1(sh)/2002 序列设计的引物
Table 1 Primers designed according to VR-2332 and HB-1(sh)/2002

片段 Fragment	产物长度/bp Length	上游引物(5'→3') Upper primer	下游引物(5'→3') Lower primer
A	776	ATGACGTATAGGTGTTGGCTC	CCGCCACATACATGACGG
B	809	CCCTTTTGAGTGTGCTATGG	CGGAAATGCAGTGCCAACC
C	1 207	GGTTTGGCAGTCATAAGTGGT	TCCTCCTCCATCTGGTCTTTA
D	1 257	CAAGGTGACGAGGTTTCATCA	CCCGAGGATGCGTGGAACA
E	900	TACCTCACACGCTGCACCTTCCG	CCTTGAGAAAGCACATAAGC
F	894	GCAGCTTTTACTCTATTTTGC	ACCAAGGACGAGGTTCTGTGG
G	1 070	AGTGGTCAAAGTTTCCGCT	AGCATTTGATTGAAGCCGAC
H	873	ACTGCCGCACATGTCCTTACG	CACAACCATCATCCGGGGCAG
I	879	CACCTATGCCTTCTGCCCCG	GGATCAAAGTCGACAGGGTCG
J	449	GACAAGAATTCCGGTGATGTG	GGTGAAGGTCCGGTTGTGAA
ORF1b A	952	TTAAACTGCTAGCCGCCAGCG	GCACAGCCTGTGCGCACAGAAC
ORF1b B	1 742	GGCTGGAATA AATGGGAACAG	CATCAAGGTGATTGCAATACG
ORF1b C	807	GCCGGCGGTTGGTGTCTGG	CTGGGTTGTCACCACGGGCCAG
ORF1b D	1 009	CACGGTTGCT CAGGCTCTAGG	GAGAACTCCGCGCACGCCAG
ORF1b E	487	TGTACTTGGA CCCCTGCATG	ATGATATCAACAATGGACAC
ORF2	900	TGTCATTGAACCAACTTTAGG	CATCGGTCATGCCCTATCCTG
ORF3	824	TCATGATTTTCAGCAATGG	CAGAAGAATGTAAATAATTC
ORF4	622	AGGTCGACGGCGGCAATTG	AGCAATCGCGAGCAACAGC
ORF5	765	CCTGAGACCATGAGGTGGGC	TTTAGAGCATATATCATCACTGG
ORF6	637	GAGTTGTGCTTGATGTTCC	CACAGCTGATTGACTGGCTG
ORF7	417	AGCTGTTAAGCAGGGAGTGG	TGCCACCCATCATGCTGAG

2 结果与分析

2.1 PRRSV 陕西分离株全基因各片段的 RT-PCR 扩增

利用 RT-PCR 扩增出了 PRRSV Shaanxi-1、Shaanxi-2 全基因各片段,目的基因长度与预期长度基本一致(图 1、图 2)。

2.2 PRRSV 陕西分离株全基因序列的拼接及分析

测序结果用 DNAS[®]ar 进行拼接,并经 BLAST 验证得到 PRRSV 的全基因组。PRRSV Shaanxi-1、Shaanxi-2 毒株基因组各基因片段的长度及与其他毒株的比较结果见表 2。

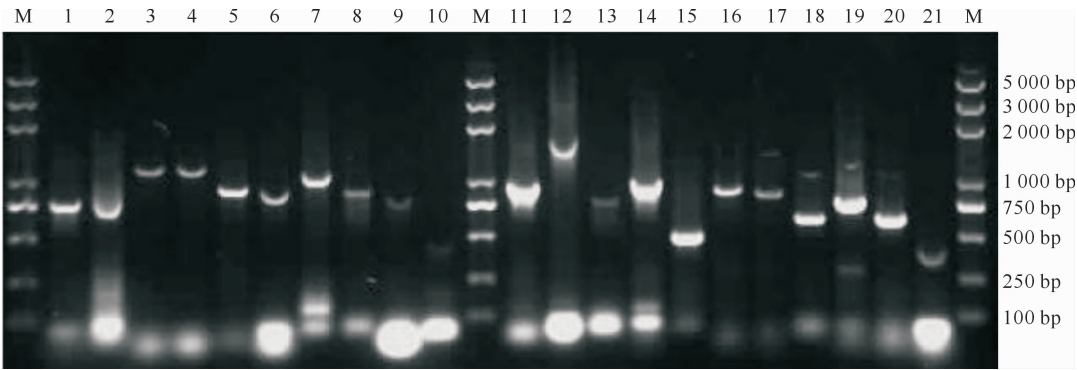


图 1 PRRSV Shaanxi-1 全基因各片段的 RT-PCR 扩增产物
M. Marker;1~10. A~J 片段;11~15. ORF1bA~ORF1bE 片段;16~21. ORF2~ORF7 片段
Fig. 1 RT-PCR products for all gene fragments of PRRSV Shaanxi-1
M. Marker;1-10. Fragment of A-J;11-15. Fragment of ORF1bA-ORF1bE;16-22. Fragment of ORF2-ORF7

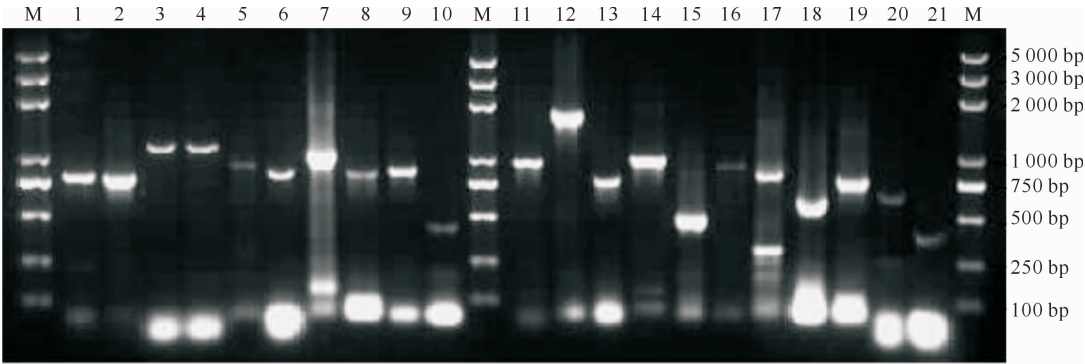


图 2 PRRSV Shaanxi-2 全基因各片段的 RT-PCR 扩增产物
M, Marker;1~10. A~J 片段;11~15. ORF1b A~ORF1b E 片段;16~21. ORF2~ORF7 片段

Fig. 2 RT-PCR products for all gene fragments of PRRSV Shaanxi-2
M, Marker;1-10. Fragment of A-J;11-15. Fragment of ORF1b A-ORF1b E ;16-21. Fragment of ORF2-ORF7

表 2 显示,PRRSV Shaanxi-1、Shaanxi-2 毒株与 LV 株相比,序列长度差异较大,与 BJ-4 及 VR-2332 序列长度较为接近。与早期分离的美洲型毒株 BJ-4、VR-2332、CH-1a 相比,PRRSV Shaanxi-1、Shaanxi-2 毒株在非结构蛋白编码区 ORF1a 出现了 90 个核苷酸的缺失,这一特征与 Henan-1、HUN4、JXA1 等 HP-PRRSV 相似。而结构蛋白编码区基因的长度,所有参比的美洲毒株都相同。

表 2 PRRSV Shaanxi-1、Shaanxi-2 株与其他毒株各基因片段长度的比较
Table 2 Comparison of gene length of Shaanxi-1,Shaanxi-2 and other strains nt

毒株 Strain	5'UTR	ORF1a	ORF1b	ORF2	ORF3	ORF4	ORF5	ORF6	ORF7
BJ-4	190	7 509	4 392	771	765	537	603	525	372
CH-1a	190	7 512	4 374	771	765	537	603	525	372
VR-2332	189	7 512	4 374	771	765	537	603	525	372
HB-1(sh)/2002	189	7 512	4 383	771	765	537	603	525	372
Henan-1	189	7 422	4 383	771	765	537	603	525	372
JXA1	189	7 422	4 383	771	765	537	603	525	372
HUN4	189	7 422	4 383	771	765	537	603	525	372
Shaanxi-1	189	7 422	4 383	771	765	537	603	525	372
Shaanxi-2	189	7 422	4 383	771	765	537	603	525	372
LV	—	7 191	4 392	750	798	552	606	522	387

2.3 PRRSV 陕西分离株全基因序列的比对分析

2.3.1 5'UTR 序列 PRRSV Shaanxi-1、Shaanxi-2 5'UTR 长度均为 189 nt,与欧洲型毒株核苷酸同源性差异较大,与 Americav PRRS 毒株的同源性仅为 20.1%;与美洲型毒株核苷酸同源性较高,其中与 BJ-4、CH-1a、VR-2332 毒株的核苷酸同源性为 93.7%~97.9%;与 SX2009、JXA1、Henan-1、Jiangxi-3、HUN4 等 HP-PRRSV 毒株的核苷酸同源性高达 100%(表 3)。PRRSV 陕西分离毒株 5'UTR 在第 120 位出现核苷酸“A”的缺失,但在 127 位并未像 BJ-4、VR-2332、PA8 等毒株发生核苷酸“G”的缺失。序列两端较为保守,在 3'末端存在 6 nt 高度保守的 TTAACC 转录调控序列(TRS)。

2.3.2 非结构蛋白基因序列 PRRSV Shaanxi-1、Shaanxi-2 毒株的非结构蛋白基因由 ORF1a 和 ORF1b 组成,其长度分别为 7 422,4 383 nt。在

ORF1a 中,PRRSV 陕西分离株与 2006 年以后分离的 HP-PRRSV 毒株 Henan-1、HUN4、Jiangxi-3、JXA-1、SX2009 的核苷酸同源性较高,均在 98.0% 以上(表 3);与传统的美洲型毒株 VR-2332、BJ-4、CH-1a 的核苷酸同源性为 87.5%~94.2%;与 LV 株核苷酸的同源性均为 59.2%。与 ORF1a 相比,ORF1b 较为保守,编码 1 460 个氨基酸,PRRSV 陕西分离株 ORF1b 与美洲型毒株核苷酸同源性均在 91% 以上,与 HUN4、Henan-1、Jiangxi-3、JXA1、SX2009 HP-PRRSV 毒株的同源性为 98.8%~99.5%。根据其他动脉炎病毒科病毒非结构蛋白基因的研究结果,ORF1a 共编码 9 个非结构蛋白(Nsp1α、Nsp1β、Nsp2~Nsp8),ORF1b 编码 4 个非结构蛋白(Nsp9~Nsp12)^[5]。序列比对发现,非结构蛋白中以 Nsp2 基因发生变异的程度最高,Shaanxi-1、Shaanxi-2 与 BJ-4、CH-1a、GD3 等 2006

年以前分离的毒株之间存在较大差异,推导氨基酸的序列同源性仅为 76.5%~92.7%,但与 HP-PRRSV 毒株保持高度相似,氨基酸序列同源性为 96.3%~98.3%。Shaanxi-1、Shaanxi-2 毒株 Nsp2 氨基酸序列区段具有 HP-PRRSV 毒株的分子特征,即在第 481 位出现了氨基酸“L”的缺失,第

533~561 位出现了 29 个氨基酸的连续缺失(图 3)。根据 Nsp2 基因推导的氨基酸系统进化树分析可知,Shaanxi-1、Shaanxi-2 与 Henan-1、HUN4、JXA1、HEB-1 等 HP-PRRSV 的亲缘关系较近,在 2006 年以前分离的毒株中,与 HB-1(sh)/2002、GD3 的亲缘关系较近(图 4)。

表 3 PRRSV Shaanxi-1、Shaanxi-2 株与其他毒株的核苷酸同源性

Table 3 Nucleotide homology between Shaanxi-1,Shaanxi-2 and other strains																			%
毒株 Strain	5'UTR		ORF1a		ORF1b		ORF2		ORF3		ORF4		ORF5		ORF6		ORF7		
	S-1	S-2	S-1	S-2	S-1	S-2	S-1	S-2	S-1	S-2	S-1	S-2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	
Amervac PRRS	20.1	20.1	59.3	59.1	61.4	61.4	65.3	65.6	60.7	61.0	69.1	70.0	63.3	63.7	69.7	69.0	63.4	64.0	
LV	—	—	59.2	59.2	61.3	61.3	67.3	67.5	61.0	61.4	66.7	67.8	62.9	63.0	69.3	68.6	65.9	65.3	
VR-2332	93.7	93.7	87.6	87.7	91.1	91.1	93.1	92.2	88.2	89.2	90.1	90.3	88.2	89.2	94.7	94.7	93.8	93.3	
BJ-4	93.7	93.7	87.5	87.5	91.1	91.2	92.7	91.4	88.4	89.3	90.1	90.3	87.4	88.4	94.9	94.9	93.8	93.3	
CH-1a	97.9	97.9	94.0	94.2	96.0	96.1	96.2	94.9	94.6	96.1	95.9	97.2	94.7	95.0	96.8	97.1	96.0	95.4	
CH-1R	96.3	96.3	94.0	94.1	96.0	96.0	95.8	94.2	94.0	95.4	95.7	97.0	93.9	94.2	96.4	96.8	96.0	95.4	
GD3	98.9	98.9	96.4	96.7	97.0	97.1	97.4	97.4	95.0	96.5	96.1	97.8	96.0	97.2	97.9	98.3	97.8	96.2	
Henan-1	100	100	99.1	99.4	99.3	99.4	98.6	98.1	98.3	99.5	98.3	99.6	98.0	99.5	99.2	99.6	99.7	98.7	
HUN4	100	100	99.1	99.4	99.3	99.4	98.6	98.1	98.3	99.5	98.3	99.6	98.0	99.5	99.2	99.6	99.7	98.7	
Jiangxi-3	100	100	98.6	99.0	99.3	99.4	98.7	98.4	97.9	99.3	98.0	99.6	97.5	99.0	98.9	99.2	99.7	98.7	
JXA1	100	100	98.9	99.2	99.4	99.5	98.6	98.4	98.3	99.5	97.8	99.1	97.8	99.7	99.2	99.6	99.7	98.7	
SX2009	100	100	98.0	98.3	98.8	98.8	98.1	98.1	97.5	99.0	97.6	99.3	97.2	98.7	99.2	99.6	99.5	98.4	
Shaanxi-1	—	100	—	99.4	—	99.8	—	98.2	—	98.0	—	98.0	—	97.5	—	98.9	—	98.4	

注:S-1、Shaanxi-1;S-2、Shaanxi-2;Amervac PRRS、LV 为欧洲型毒株,其余为美洲型毒株,其中 Henan-1、HUN4、Jiangxi-3、JXA-1、SX2009 为 HP-PRRSV 毒株。
Note:S-1 is Shaanxi-1,S-2 is Shaanxi-2;Amervac PRRS,LV belongs to Europe-type strain in the table,others belong to American-type strain and Henan-1,HUN4,Jiangxi-3,JXA1,SX2009 strain is HP-PRRSV strain.



图 3 PRRSV Shaanxi-1、Shaanxi-2 毒株 Nsp2 基因推导氨基酸序列的缺失位点
Fig.3 Deletion site of deduced amino acid in Nsp2 of Shaanxi-1,Shaanxi-2 strain

2.3.3 结构蛋白基因序列 表 3 显示,Shaanxi-1、Shaanxi-2 毒株各结构蛋白基因与欧洲型毒株的差异较大,对于保守性较高的 ORF6,Shaanxi-1、Shaanxi-2 与 LV 毒株的核苷酸同源性分别为 69.3%,68.6%。与 2006 年以前国内分离的美洲型毒株 BJ-4、CH-1a、GD3 相比,PRRSV 陕西分离株 ORF3、ORF5 基因的变异程度最大,核苷酸的同源性仅为 87.4%~97.2%,推导氨基酸同源性为

84.6%~95.0%;ORF2、ORF4 变异程度次之,核苷酸同源性为 90.1%~97.8%;ORF6、ORF7 较为保守,核苷酸同源性保持在 93.3%~98.3%。与 2006 年以后国内分离的 HP-PRRSV 毒株相比,Shaanxi-1、Shaanxi-2 结构蛋白基因发生变异的程度相对较小,但却呈现出不同的变化特点。Shaanxi-1 ORF3、ORF4、ORF5 基因变异程度均较高,ORF2 次之,

ORF6、ORF7 均较保守。Shaanxi-2 各个结构蛋白基因却表现得十分保守,与其他 HP-PRRSV 毒株的同源性均在 98.1%以上,ORF7 基因变异最大,ORF2 次之,ORF3~ORF6 相对保守。与非结构蛋白基因变异不同,Shaanxi-1、Shaanxi-2 毒株结构基因发生的变异为点突变,未发生碱基缺失或插入变异。

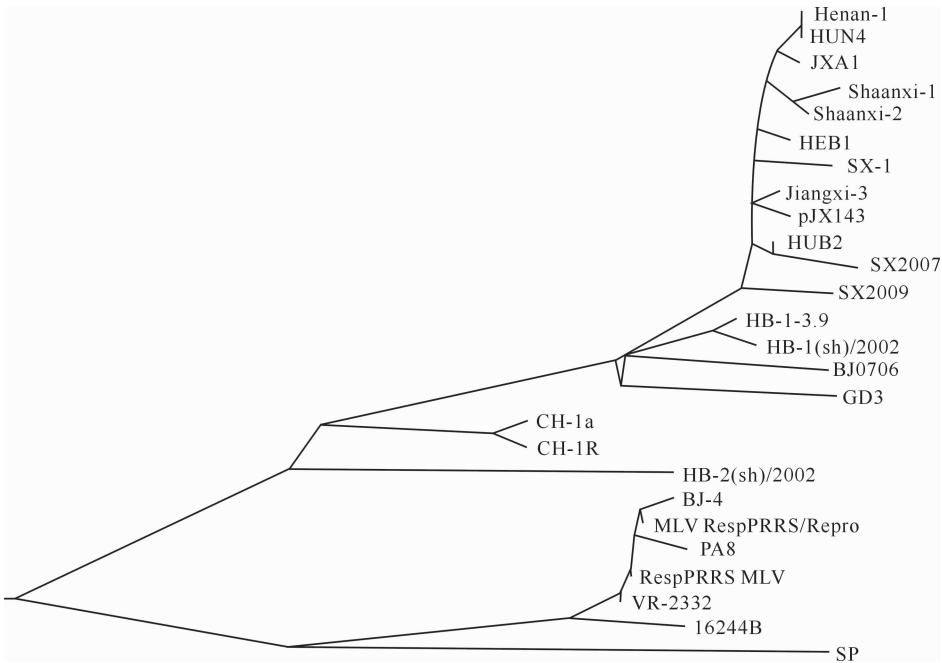


图 4 基于 PRRSV Nsp2 基因推导的氨基酸序列系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic analysis of partial isolates base on deduced amino acid sequence of PRRSV Nsp2

根据 Allende 等^[6]的研究报道,对 9 个潜在的与 PRRSV 毒力相关的氨基酸位点(ORF1a(331)、ORF1a(668)、ORF1a(952)、ORF1b(952)、ORF2(10)、ORF3(83)、ORF5(13)、ORF5(151)和 ORF6(16))进行比对发现,在这 9 个位点上,Shaanxi-1、Shaanxi-2 毒株与 HUN4、Jiangxi-3、JXA1 HP-PRRSV 毒株的氨基酸完全相同,且与 CH-1R、MLV RespPRRS/Repro、RespPRRS MLV 3 株疫苗株及 VR-2332、BJ-4、CH-1a 传统的弱毒株存在明显差异(表 4);序列比对同时发现,Shaanxi-1 毒株 ORF2(50)、ORF3(143,248)、ORF4(66,67)、ORF5(33,58,104)位点及 Shaanxi-2 毒株 ORF2(23)、ORF3(225)、ORF4(43)、ORF5(164)、ORF7(48,49)位点上的氨基酸与 HP-PRRSV 毒株不同,而与上述疫苗株及传统弱毒株相同(表 4)。

2.3.4 基于全基因的系统进化 由图 5 可以看出,欧洲型毒株 LV 株及 Amervac PRRS 株与美洲型毒

株的遗传关系较远,形成一个单独的分支。美洲型毒株可以分为遗传背景差异较大的 2 大亚群,其中第 1 亚群包括早期分离到的 BJ-4 株,其与美洲标准毒株 VR-2332、疫苗毒株 RespPRRS MLV 等的遗传关系较近;第 2 亚群包含有 CH-1a、HB-1(sh)/2002、GD3 等传统弱毒株以及 HUN4、Jiangxi-3、Henan-1 等众多 HP-PRRSV 毒株。第 2 亚群与第 1 亚群的遗传距离由传统弱毒株至 HP-PRRSV 毒株逐渐变远,其中 CH-1a、CH-1R 毒株与第 1 亚群的亲缘关系最近,HB-1(sh)/2002、GD3 等毒株进一步演化,与 HP-PRRSV 的亲缘关系逐渐接近,所有的 HP-PRRSV 毒株隶属于同一个大的进化分支,它们之间的遗传变异程度较小。Shaanxi-1、Shaanxi-2 毒株属于 HP-PRRSV 遗传进化中的一个小分支,二者的亲缘关系最近,而其又与 HUN4、JXA1、HEB-1 毒株的遗传距离较近。

表 4 Shaanxi-1、Shaanxi-2 毒株与其他毒株 9 个潜在与毒力相关的氨基酸位点的比对分析

Table 4 Comparative analysis of nine potential virulence-related amino acids sites of Shaanxi-1,Shaanxi-2 and other strains

毒株 Strain	ORF1a (331)	ORF1a (668)	ORF1a (952)	ORF1b (952)	ORF2 (10)	ORF3 (83)	ORF5 (13)	ORF5 (151)	ORF6 (16)
VR-2332	S	S	E	Y	L	G	R	G	Q
BJ-4	F	F	E	H	F	E	Q	G	E
CH-1a	S	S	E	H	L	G	R	R	Q
CH-1R	S	S	E	H	L	S	R	R	L
MLV RespPRRS/Repro	S	F	K	H	L	E	Q	G	E
RespPRRS MLV	F	F	E	H	F	E	Q	G	E
HB-2	S	S	E	Q	L	G	Q	R	Q
GD3	S	S	E	Y	L	G	R	R	Q
HUN4	S	S	E	Y	L	S	R	R	Q
JXA1	S	S	E	Y	L	S	R	R	Q
Jiangxi-3	S	S	E	Y	L	S	R	R	Q
Shaanxi-1	S	S	E	Y	L	S	R	R	Q
Shaanxi-2	S	S	E	Y	L	S	R	R	Q

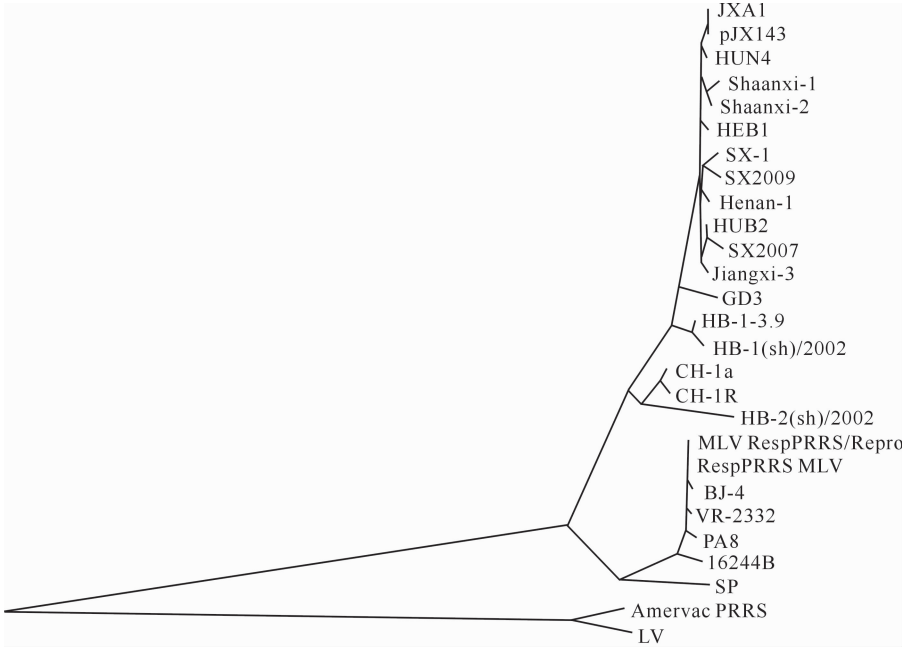


图 5 基于全基因的 PRRSV 系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic analysis of partial isolates based on complete genome

3 讨 论

2006 年夏秋季节,在我国南方部分省市相继暴发了“猪高热病”疫情,同年初冬陕西地区也连续出现了大批猪只死亡,其发病症状及流行病学特征与“猪高热病”相似。本实验室对陕西地区“猪高热病”疫情进行了流行病学调查,结果发现发病猪群,特别是病死猪主要发生了 PRRSV、猪瘟病毒(CSFV)、圆环病毒 2 型(PCV2)及一些细菌性病原的混合感染^[7]。同时,本实验室从陕西华县某猪场发病猪及西安野生动物园发病野猪上分离得到 2 株 PRRSV 毒株,对这 2 个毒株的全基因进行克隆及序列测定,

并与国内外典型的毒株进行比对,分析陕西地区 PRRSV 的遗传变异情况。

测序结果表明,Shaanxi-1、Shaanxi-2 均属于美洲型毒株,它们与 2006 年以前分离的毒株间存在明显的差异,而与 HP-PRRSV 毒株的基因同源性较高。序列比对发现,非结构蛋白 Nsp2 基因的变异程度最大,Shaanxi-1、Shaanxi-2 与国外美洲型毒株的同源性仅为 77%左右,与国内 2006 年以前分离的毒株同源性最高不超过 94%,与 HP-PRRSV 毒株同源性保持在 98%左右。与 2006 年以前的毒株相比,Shaanxi-1、Shaanxi-2 毒株结构蛋白 ORF3 和 ORF5 基因变异最大,但是与 HP-PRRSV 毒株相

比,Shaanxi-1、Shaanxi-2 的变异情况不同,Shaanxi-1 ORF3、ORF4、ORF5 基因变异程度均较高,ORF2 次之,ORF6、ORF7 较保守;Shaanxi-2 各个结构蛋白基因却都表现得十分保守,核蛋白基因 ORF7 变异相对最大,ORF2 次之,ORF3~ORF6 相对保守。Shaanxi-2 特殊的变异方式究竟是陕西流行毒株的正常变异,还是与宿主种属特异性^[8]有关,仍有待进一步研究证实。

对 PRRSV 陕西流行毒株的基因测序、分子特征分析鲜见研究报道。本试验从 GenBank 中下载了 2 株陕西及周边地区分离毒株(SX2007、SX2009)的基因序列,比对发现,Shaanxi-1、Shaanxi-2 与这 2 个毒株之间的核苷酸同源性低于与其他地区的分离毒株,推断这些毒株在陕西及周围地区这一特殊的气候条件、饲养环境、免疫压力下发生了广泛的变异,这给陕西及周边地区 PRRSV 的免疫提出了新的挑战。

Shaanxi-1、Shaanxi-2 毒株具备 Tian 等^[9]、Tong 等^[10-11]提出的 HP-PRRSV 流行毒株的分子特征,即 5'UTR 第 120 位发生核苷酸“A”的缺失,3'UTR 第 15 278 位发生核苷酸“G”的缺失,Nsp2 区段第 481 位发生氨基酸“L”的缺失及 533~561 位发生 29 个氨基酸的连续缺失。此外,本研究也对 Allende 等^[6]推测的与 PRRSV 毒力相关的 9 个氨基酸位点进行了比对,发现在这些位点上 Shaanxi-1、Shaanxi-2 株的氨基酸与 HP-PRRSV 保持高度一致,未发生变异,且与疫苗株、传统弱毒株有明显的差异。但本实验室将 2 株毒进行动物回归试验,结果发现,所有攻毒猪都出现了典型的 PRRS 临床症状,攻毒后一段时间内可以检测到 PRRSV 抗原及相应的抗体,但是发病猪均未出现严重及死亡的病例,在感染后期抗体水平上升得较高,猪只生长正常,增重较快,这一结果与 HP-PRRSV 的生物学特性不符。为何 Shaanxi-1、Shaanxi-2 与 HP-PRRSV 保持高度同源,但生物学特性却有如此大的差别,究竟哪些基因的变异会导致病毒的毒力变化,这有待于进一步研究。

Byungjoon 等^[12]研究发现,Nsp3~Nsp8 及 ORF5 是 PRRSV 毒力的主要决定区,Nsp1~Nsp3、Nsp10~Nsp12 及 ORF2 可能也与病毒毒力有关。Zhou 等^[13]对 PRRSV 基因变异与病毒毒力之间的关系进行了较深入的研究,他们通过反向遗传学操作,对推测的与毒力相关的基因进行缺失或互换,结果发现 HP-PRRSV Nsp2 区段中缺失的 30 个氨基

酸与 HP-PRRSV 毒力无关。通过对氨基酸序列比较,笔者发现,Shaanxi-1、Shaanxi-2 有明显区别于 HP-PRRSV 毒株的氨基酸变异,Shaanxi-1 ORF2 (50)、ORF3 (143,248)、ORF4 (66,67)、ORF5 (33,58;104) 及 Shaanxi-2 ORF2 (23)、ORF3 (225)、ORF4 (43)、ORF5 (164)、ORF7 (48,49) 位点上的氨基酸与疫苗株及传统弱毒株相同。这些位点氨基酸的突变是否是导致 Shaanxi-1、Shaanxi-2 毒力减弱的原因,需要进一步研究证实。

Tong 等^[11]通过比对分析了 67 株 PRRSV 基因的全长发现,所有的 HP-PRRSV 毒株都具有分子标志意义上的 4 个保守的缺失变异,根据这些缺失变异在 PRRSV 中出现的先后顺序及频率,他们推测所有的 HP-PRRSV 均起源于 CH-1a 样的 PRRSV,通过累积性的突变缓慢进化为 HP-PRRSV。Shaanxi-1、Shaanxi-2 符合 HP-PRRSV 的分子特征,系统进化分析结果也表明其与已发表的 HP-PRRSV 保持较近的遗传距离,然而它们的毒力与 HP-PRRSV 并不相同,推测 Shaanxi-1、Shaanxi-2 是 HP-PRRSV 在陕西特殊的气候、饲养和免疫环境下进一步进化衍生的毒株。新的毒株毒力不强,但是其感染导致机体免疫功能下降诱发的多种病原的混合感染,是陕西猪只大批死亡的根本原因。

[参考文献]

- [1] 韦祖樟,孙志,袁世山.猪繁殖与呼吸综合症病毒分子生物学研究进展[J].Microbiology,2008,35(3):408-413.
Wei Z Z,Sun Z,Yuan S S. Current advances on molecular biology of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. Microbiology,2008,35(3):408-413. (in Chinese)
- [2] 王旭荣,马红艳,祝卫国,等.高热病猪群中 PRRSV 的调查及其流行毒株的分离[J].中国兽医杂志,2008,44(3):39-40.
Wang X R,Ma H Y,Zhu W G,et al. Investigation and isolations of isolates of PRRSV in "Swine high fever disease" pig herds [J]. Chinese Journal of Veterinary,2008,44(3):39-40. (in Chinese)
- [3] 童光志,周艳君,郝晓芳,等.高致病性猪繁殖与呼吸综合症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 virus emerged in China [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine,2007,29(5):323-327. (in Chinese)