

我国华东某省 HP-PRRSV 的分离鉴定 及全基因组序列分析

朱紫祥¹, 吴发兴², 王晶钰¹, 李平^{2,3}, 高许雷^{2,4}, 张燕霞²,
张 志², 刘 爽², 李晓成²

(1 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100; 2 中国动物卫生与流行病学中心, 山东 青岛 266032;

3 新疆农业大学 动物医学院, 新疆 乌鲁木齐 830052; 4 青岛农业大学 动物科技学院, 山东 青岛 266109)

[摘 要] 【目的】从我国华东地区某省 3 个不同市县的疑似猪繁殖与呼吸综合征(PRRS)发病猪场送检的病料中分离 PRRSV 毒株, 并对其全基因组进行测序, 进而对当前 PRRSV 流行毒株的分子特征和近几年我国 PRRSV 毒株的演化特点进行分析。【方法】采集养殖场病死猪的淋巴结和肺脏病料, 处理后进行 PRRSV 的 RT-PCR 检测。对 PRRSV 检测呈阳性的病料进行病原分离和免疫荧光试验(IFA)鉴定, 测定 IFA 鉴定呈阳性的 PRRSV 分离株的 TCID₅₀。参照 NCBI 基因数据库已提交的 PRRSV VR-2332、CH-1a、HB-2 及 JXA1 等毒株序列设计 6 对引物, 对所得分离毒株分别进行全基因组序列扩增、测序, 并将测序结果与 LV、VR-2332、JXA1 等国内外 16 个 PRRSV 毒株进行序列同源性和进化分析。【结果】试验共分离鉴定获得 3 株 PRRSV 毒株, 分别命名为 SDCXA/2008、SDWF、SDLY。全基因组 Blast 比对结果表明, 这 3 个分离株均为北美洲型毒株。序列分析发现, 3 个分离株的全基因组序列与欧洲株的同源性极低(61.6%~61.8%), 与 2006 年前分离的美洲型毒株的同源性较低(86.6%~97.1%), 与 2006 后分离的美洲型毒株同源性较高(98.3%~99.7%)。Nsp2 基因在 3 个易变区中变异最大, ORF5 次之, ORF3 相对最小; 推导氨基酸序列中变异最大的亦为 Nsp2。3 株 PRRSV 毒株 Nsp2 基因推导氨基酸的第 481 和 532~560 位处共存在 30 个氨基酸缺失, 与以 HUN4、JXA1 等为代表的国内高致病性分离株序列的同源性较高, 结合进化分析将其均划为与 JXA1 类似的高致病性猪蓝耳病毒株(HP-PRRSV)。【结论】分离到 3 株 HP-PRRSV 毒株, 其遗传特征相对稳定, 但同时也发生了一定的变异, 说明 PRRSV 还在不断地变异和演化。PRRSV 的分布无明显地域性。

[关键词] PRRSV; 同源性; RT-PCR; 进化分析

[中图分类号] S858.285.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2010)08-0025-08

Isolation, identification and genomic analysis of HP-PRRSV obtained from one province in east China

ZHU Zi-xiang¹, WU FA-xing², WANG Jing-yu¹, LI Ping^{2,3}, GAO Xu-lei^{2,4},
ZHANG Yan-xia², ZHANG Zhi², LIU Shuang², LI Xiao-cheng²

(1 College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao, Shandong 266032, China; 3 College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumchi, Xinjiang 830052, China; 4 College of Animal Science and Technology, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China)

Abstract: 【Objective】PRRSV strains from pig IFARms suspected to have broken out PRRS in 3 different regions of one province in middle east China were isolated. The genome of the obtained PRRSV isolates

* [收稿日期] 2010-01-13

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目(2007BAD86B04, 2007BAD86B05)

[作者简介] 朱紫祥(1985—), 男, 陕西定边人, 在读硕士, 主要从事分子病毒学与免疫学研究。E-mail: zhuzixiang@126.com

[通信作者] 王晶钰(1964—), 男, 陕西乾县人, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事预防兽医学研究。

E-mail: wjingyu2004@126.com

李晓成(1962—), 男, 陕西铜川人, 研究员, 主要从事兽医流行病学研究。E-mail: lxch20062006@163.com

was determined and then molecular characteristics of dominant strains was analyzed, the evolutionary law of PRRSVs isolated in China recent years according detailed sequences analysis was observed. 【Method】 Samples of lymph nodes and lungs from dead or sick pigs were collected, treated samples by PRRSV RT-PCR were determined, then the strains from positive samples were isolated. IFA was conducted after the isolation and TCID₅₀ of IFA-positive isolates was measured. 6 pairs of primers were designed based on PRRSV VR-2332, CH-1a, HB2 and JXA1 and other PRRSV strains available on NCBI Genbank. The genome of obtained PRRSV isolates were amplified and determined by these primers. Detailed sequences analysis and evolutionary relationship research among 3 obtained isolates and LV, VR-2332, JXA1 and other 13 domestic and foreign representative strains or isolates were carried out. 【Result】 3 PRRSV strains were obtained and were named as SDCXA/2008, SDWF and SDLY respectively. The Blast result of complete genome indicated that all 3 isolates were Amercian-type strains. According to the sequences analysis, the genome sequences of 3 isolates showed a very low identity of 61.6%—61.8% with Europe-type PRRSV, a relatively low identity of 86.6%—97.1% with American-type strains isolated before 2006, a high identity of 98.3%—99.7% with American-type strains isolated after 2006. *Nsp2* gene was the most variable labile gene compared with *ORF5* and *ORF3* gene. *ORF5* gene was more mutable than *ORF3* gene. The deduced aa of *Nsp2* gene was most variable too. The sequences analysis showed that all 3 isolates were high pathogenic PRRSV like representative HP-PRRSV strains of JXA1 and HUN4 having 30 discontinuous aa deletions at the position of 481 and 532—560 aa site in *Nsp2* deduced aa sequence. The sequences analysis with and phylogenetic tree was combined and 3 obtained HP-PRRSV strains were classfied into JXA1-like HP-PRRSV group. 【Conclusion】 3 HP-PRRSV strains were obtained, the genetic characteristics of 3 strains showed to be comparatively stable, but some mutations appeared in the genomes suggested that the PRRSVs would continually evolve with variation in future. The result also showed that there were no apparent relations between the distribution features of PRRSVs and the places.

Key words: PRRSV; homology; RT-PCR; 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 (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 引起的、以母猪繁殖障碍和仔猪呼吸衰竭为主要临床症状的一种传染病^[1], 该病的广泛传播给全球养猪业带来了巨大的危害。该病最早于 1986 年在美国发生, 1991 年在欧洲首次分离到病原^[2-3]; 1996 年, 郭宝清等^[4]证实我国也存在此病, 随后该病在我国呈蔓延趋势。2006-05 以来, 我国南方多个省市的猪场均暴发高致病性猪蓝耳病, 导致大量的养猪场停业、倒闭、破产。截止 2009-07, 我国先后有 26 个以上的省市报道有该病的发生和流行, 给我国养猪业造成了巨大的经济损失^[5]。

PRRSV 属套式病毒目 (Nidovirales)、动脉炎病毒科 (Arteriviridae)、动脉炎病毒属成员。病毒基因组为单股正链 RNA, 全长大约为 15 kb^[6], 全序列由 5'UTR-*ORF1a*-*ORF1b*-*ORF2*-*ORF3*-*ORF4*-*ORF5*-*ORF6*-*ORF7*-3'UTR 构成, 其中 *ORF1a* 和 *ORF1b*

编码病毒非结构蛋白, 其余 6 个基因分别编码病毒的结构蛋白^[7-8]。根据病毒基因组序列的差异, PRRSV 可分为 2 个基因型, 即欧洲型和北美洲型, 其代表株分别为 LV 株和 VR-2332 株, 2 个基因型间的氨基酸同源性仅为 78%~81%, 抗原性差异也较大^[9]。我国于 1996 年首次分离到 PRRSV, 命名为 CH-1a 株, 通过对 CH-1a 株全基因组的克隆、测序及分析证明, 其为北美洲型^[10]。而童光志等^[11]通过对 2006 年暴发的所谓“高热综合症”的猪场分离到的 PRRSV 毒株进行鉴定和测序分析发现, 这些毒株均有一个显著特征, 就是在基因组上存在 2 处缺失: 在 *Nsp2* 基因推导氨基酸序列的第 481 位氨基酸处存在一个缺失, 第 532~560 位氨基酸处存在 29 个缺失, 并将这类 PRRSV 毒株称为高致病性 PRRSV (HP-PRRSV)。为了明确我国当前 PRRSV 毒株的分子流行病学特征, 2008-12, 本研究对我国华东地区某省份送检的一些疑似猪蓝耳病病料进行了 PRRSV 的分离、鉴定, 并对所获毒株进行了全基因组序列的测定及分析, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 样品来源与处理 病料,2008 年采自华东某省份 3 个不同地区的发病猪场,主要包括肺脏、扁桃体和淋巴结等组织。处理方法是:分别取采集的淋巴结和肺脏少许,剪碎后加灭菌 PBS 液适量,转入无菌研磨器研磨,取研磨液反复冻融 3 次,分装,−70 ℃保存备用。

1.1.2 Marc 145 细胞 Marc 145 细胞由中国动物卫生与流行病学监测室保存并提供,外源检测纯净。

1.1.3 试剂和工具酶 Trizol LS Reagent 购自 Invitrogen 公司,Prime Script™反转录酶、RNA 酶抑

制剂 HPRI、LA Taq DNA 聚合酶、dNTPs、rTaq DNA 聚合酶、EcoR I、3′-Full RACE Core Set Ver. 2.0 试剂盒等相关 PCR 试剂均购自 TaKaRa 公司,猪繁殖与呼吸综合征免疫荧光抗体购自中国兽医药品监察所(批号:S0704)。其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.1.4 引 物 参照 GenBank 中收录的 PRRSV VR-2332 (U87392)、CH-1a (AY032626)、HB-2 (AY262352)、JXA1-06(EF112445)等毒株的基因序列,用 Primer Premier 5.0 软件设 1 对 PRRSV 检测引物(A)、5 对用于 HP-PRRSV 基因组序列扩增的引物(B–F)和 3′RACE 特异性引物(G),见表 1。

表 1 分离株检测引物及基因组序列扩增引物

Table 1 Primers for PRRSV detection and genome amplification

引物 Primer	扩增片段 Fragments	扩增产物长度/bp Length	引物序列(5′→3′) Primer sequences(5′→3′)
A	—	512	F:TTG ATG GGC GAC AAT GTC CCT AAC R:GAG CTG AGT ATT TTG GGC GTG TGA
B	b	195	F:ATG ACG TAT AGG TGT TGG CTC R:AGA CAT GGT TAA AGG GGT GGA
C	c	4 330	F:ATG ACG TAT AGG TGT TGG CTC R:GGC GAT CTC ATT AGG AGC AGT TC
D	d	3 860	F:ATG TGC TTT CTC AAG GTA GGT GT R:CAC TAG GGG TTT TGT AAG GTA TGT
E	e	4 377	F:ACC CTA GGA CCT GTG AAC TTA AAA R:GAT GAT ATC AAC AAT GGA CAC CAG
F	f	3 884	F:TGT GTA CCT CCC AGA CCT TGA A R:TCG CCC TAA TAG AAT AGG TGA CT
G	g	>800	F:GCC ATA GAA ACC TGG AAA TTC ATC R:TaKaRa 3′RACE Adaptor Primer

注:—,表示没有命名。
Note:—, Denotes there was no name.

1.2 病料的 PCR/RT-PCR 检测

分别提取样品中的病毒总 RNA 和 DNA,利用引物 A 进行 PRRSV 检测,同时参考中国动物卫生与流行病学中心流行病监测实验室建立的猪瘟病毒(CSFV)的 RT-PCR 方法和猪圆环病毒 2 型(PCV2)、猪伪狂犬病毒(PRV)、猪细小病毒(PPV)的 PCR 方法,分别对上述 4 种能引起母猪繁殖障碍或发热的病毒进行检测。

1.3 病毒的分离及初步鉴定

取−70 ℃冻存且经 RT-PCR 检测证实为 PRRSV 阳性的病料处理混悬液,4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min,取上清液用 0.22 μm 滤膜除菌,接种已长满单层的 Marc145 细胞,吸附 1.5 h 后弃去接种液,添加适量的含体积分数 1%新生牛血清的 DMEM 培养液,于体积分数 5%CO₂、37 ℃温箱中培养,连续观察 4~6 d,收获后反复冻融 3~4 次,继续接种 Marc145 细胞传代培养 3~5 代。传至第 5

代时,对第 5 代病毒分离物按常规方法分别进行 PRRSV RT-PCR 检测和免疫荧光试验(IFA)。

1.4 病毒 TCID₅₀的测定

取一个分离株 SDCXA/2008 的第 5 代细胞分离物,作 10^{−1}~10^{−8} 系列稀释后,分别接种长有 Marc145 细胞单层的 96 孔培养板,每个稀释度 8 孔,每孔 100 μL,同时设不加病毒的正常细胞作对照,置 37 ℃、体积分数 5%CO₂ 培养箱中培养,连续 7 d 观察记录细胞病变,按照 Reed-Muench 法计算 TCID₅₀。

1.5 PRRSV 分离株全基因组序列各片段的 RT-PCR 扩增

按照 Trizol LS Reagent 说明书,从分离细胞毒中提取病毒总 RNA,并按如下程序进行反转录:取下游反转录引物 PR 1 μL,2.5 mmol/L dNTPs 4 μL,RNA 模板 5 μL,轻轻混匀,65 ℃保温 5 min,迅速置冰上 2 min;离心数秒,将上述 10 μL 反应液凝集于 PCR 管

底,依次加入 5×Prime Script™ Buffer 4 μL,HPRI 0.5 μL,PrimeScript™ 反转录酶 0.5 μL,补加 DEPC 水至 20 μL;42 ℃ 保温 50 min,70 ℃ 15 min,迅速于冰上冷却,所得产物即为 cDNA 产物。

b 片段 PCR 反应程序:95 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 1 min,54 ℃ 50 s,72 ℃ 30 s,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。反应体系如下:cDNA 模板 2.0 μL,2.5 mmol/L dNTPs 2 μL,10×PCR Buffer (Mg²⁺ Plus) 2.5 μL,rTaq(5 U/μL) 0.5 μL,上下游引物各 0.5 μL,加灭菌双蒸水定容至 25 μL。c—f 片段 PCR 反应程序:95 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 1 min,53~57 ℃ (具体温度依引物而定)1 min,72 ℃ 5 min,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。反应体系如下:cDNA 模板 2.0 μL,2.5 mmol/L dNTPs 4 μL,10×LA PCR Buffer (Mg²⁺ Plus) 2.5 μL,LA Taq 酶 (5 U/μL) 0.5 μL,上下游引物各 0.5 μL,加灭菌双蒸水定容至 25 μL。3'UTR 序列则利用 TaKaRa 公司 3'-Full RACE 试剂盒提供的方法,用引物 G 进行 RT-PCR 扩增。所得 PCR 扩增产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳后,利用成像系统观察结果。

1.6 PRRSV 全基因组序列的测定与分析

分别切胶回收上述 B—G 引物扩增的 b—g 6 条片段,利用 MN 公司的 NucleoSpin Extract II 试剂盒纯化,将片段 b 和 g 连接在 pGEM-T easy Vector 上后转化 DH5α 大肠杆菌,蓝白斑筛选后挑菌,摇菌提取质粒,进行 *Eco*R I 酶切鉴定,将酶切阳性样品送上海生工测序;片段 c—f 直接送上海生工测序。测序结果通过 ContigExpress 软件拼接获得这 3 个毒株的全基因序列,结果用 Blast 和 DNASTar 软件分析,并与 LV (M96262)、VR-2332 (PRU87392)、EDRD-1 (AB288356)、LMY (DQ473474)、MLV (AF066183)、SP (AF184212)、CH-1a (AY032626)、BJ-4 (AF331831)、HB-1 (AY150312)、HB-2 (AY262352)、CC-1 (EF153486)、JXA1 (EF112445)、HUN4 (EF635006)、YN2008 (EU880435)、SX2007 (EU880434)、GS2008 (EU880431) 等 16 株 PRRSV(下划线毒株为 HP-PRRSV)进行核苷酸及氨基酸序列比较分析。

1.7 系统进化分析

为了进一步分析 3 个毒株与其他毒株在遗传进化上的关系,利用 Clustalx1.83 和 MEGA4 软件对这 3 株 PRRSV 的 *Ns*p2、*ORF*3、*ORF*5 及全基因组序列分别与上述 16 条 GenBank 中已发表的国内外主要经典毒株和流行毒株进行比对,并依此构建系

统遗传进化树。

2 结果与分析

2.1 病料的 RT-PCR 和 PCR 检测

病料 RT-PCR、PCR 检测结果显示,仅 PRRSV 呈阳性,而 CSFV、PCV-2、PRV 和 PPV 均为阴性。

2.2 病毒的分离与鉴定

接种病料上清的 Marc 145 细胞单层从第 2 代开始出现细胞病变,3 代后病变趋于稳定,表现为细胞圆缩、聚集成簇、脱落或呈片状脱落,4~5 代细胞与第 3 代病变基本一致。细胞在接种 48 h 后开始出现病变,72 h 后 75% 以上的细胞能产生典型病变。取第 5 代细胞分离物进行 PRRSV RT-PCR 检测,结果为阳性。IFA 结果显示,在荧光显微镜下可见 3 个毒株感染的 Marc 145 细胞中有特异荧光产生,而未感染的空白对照细胞中没有特异荧光出现。试验共分离鉴定获得 3 株 PRRSV 毒株,分别命名为 SDCXA/2008、SDWF、SDLY。

2.3 PRRSV 分离株 TCID₅₀ 的测定

将分离株 SDCXA/2008 第 5 代细胞培养物进行系列稀释,接种 Marc 145 细胞,连续观察 7 d,通过 Reed-Muench 法可得 TCID₅₀ 为 10^{-6.75}/0.1 mL。

2.4 目的基因的扩增

提取分离株第 5 代细胞培养物的总 RNA,利用引物 B—F 以及 3'RACE 引物分别进行 RT-PCR,扩增出片段 b—g,其长度分别为 195,4 330,3 860,4 377,3 884 和 813 bp(图 1),与预期结果(表 1)相符。

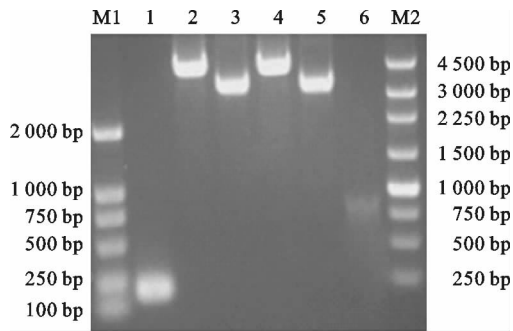


图 1 PRRSV 分离株 6 个基因片段的扩增结果

M1. DL2000 Marker;M2. DL250 Marker;

1~6. 分别为片段 b、c、d、e、f、g

Fig. 1 Amplification of 6 fragments of PRRSV isolate

M1. DL2000 Marker;M2. DL250 Marker;

1—6. Fragment b,c,d,e,f,g respectively

2.5 PRRSV 全基因组片段的测序及序列同源性分析

Blast 结果表明,3 个分离株均为北美洲型

PRRSV 毒株,其与 16 个参考毒株易变区 (*Nsp2*、*ORF3* 和 *ORF5*)及全基因组序列的核苷酸同源性比较结果见表 2。由表 2 可知,3 个分离株的全基因组序列与欧洲株(LV 株)的同源性极低(61.6%~61.8%),与 2006 年以前分离的北美洲型毒株(VR-2332、EDRD-1、CH-1a、BJ-4、HB-1、HB-2)的同源性

较低(86.6%~97.1%),与 2006 年及以后分离的 HP-PRRSV (JXA1、HUN4、SX2007、GS2008、YN2008)同源性较高(98.3%~99.7%)。*Nsp2* 基因在 3 个易变区中变异最大,*ORF5* 次之,*ORF3* 相对最小。

表 2 3 株 PRRSV 分离株与其他毒株主要基因及全基因组核苷酸序列的同源性比较

Table 2 Nucleotide identity comparison between 3 new isolates and other PRRSV strain

%

毒株 Strain	SDCXA/2008				SDWF				SDLY			
	<i>Nsp2</i>	<i>ORF3</i>	<i>ORF5</i>	G	<i>Nsp2</i>	<i>ORF3</i>	<i>ORF5</i>	G	<i>Nsp2</i>	<i>ORF3</i>	<i>ORF5</i>	G
LV	44.6	65.0	64.0	61.6	45.0	61.4	63.2	61.8	44.7	61.2	63.0	61.6
VR-2332	83.2	89.3	89.4	89.2	83.5	89.2	89.4	89.4	83.5	88.9	88.9	89.4
EDRD-1	80.0	87.9	90.1	86.6	80.8	87.2	89.7	86.8	80.4	87.5	89.6	86.9
LMY	80.7	88.0	87.4	87.6	81.1	87.8	87.4	87.8	81.2	87.8	86.9	87.8
MLV	83.1	89.2	89.1	89.2	83.5	89.0	89.1	89.4	83.5	88.8	88.6	89.4
SP	80.5	88.4	90.4	88.5	81.0	88.2	90.0	88.7	80.8	88.5	90.5	88.8
CH-1a	89.0	96.0	95.2	94.8	89.4	95.4	95.2	95.1	89.5	95.8	95.0	95.1
BJ-4	83.0	89.4	88.6	89.4	83.2	89.3	88.6	89.4	83.2	89.0	88.1	89.5
HB-1	94.6	96.0	96.7	96.8	95.9	95.4	96.7	97.0	95.2	95.8	96.8	97.1
HB-2	88.1	93.4	92.4	92.1	89.1	92.9	92.4	92.3	88.5	93.3	92.2	92.3
JXA1	98.2	99.3	99.5	98.9	99.7	99.5	99.8	99.7	99.2	99.5	99.3	99.4
CC-1	82.7	89.6	88.7	89.1	83.1	89.4	88.7	89.3	83.1	89.2	88.2	89.3
HUN4	98.4	99.3	99.7	99.1	99.5	99.2	99.7	99.5	99.4	99.5	99.5	99.5
SX2007	97.0	99.1	98.3	98.3	98.1	98.7	98.3	98.5	98.0	99.2	98.2	98.6
YN2008	97.7	99.1	98.7	98.4	98.7	99.0	98.7	98.8	98.7	99.2	98.5	98.8
GS2008	98.1	98.8	98.8	98.6	98.6	98.4	98.8	98.8	98.5	99.0	98.7	98.9
SDCXA/2008	—	—	—	—	98.4	98.8	99.3	98.9	98.2	99.3	99.2	99.0
SDWF	98.4	98.8	99.3	98.9	—	—	—	—	99.3	99.0	99.2	99.3
SDLY	98.2	99.3	99.2	99.0	99.3	99.0	99.2	99.3	—	—	—	—

注:G 代表全基因组。
Note:G denotes complete genome.

3 个易变区推导氨基酸序列的比较结果见表 3。由表 3 可知,3 个分离株 *Nsp2* 基因推导氨基酸序列与欧洲株的同源性极低(33.8%~34.0%),与 2006 年以前分离的北美洲型毒株的同源性较低(74.5%~94.2%),与 2006 年及以后分离的 HP-PRRSV 株的同源性较高(96.4%~99.0%)。*Nsp2* 基因推导氨基酸序列的变异大于 *ORF5* 和 *ORF3* 基因。3 个分离株的 *Nsp2* 基因推导氨基酸序列与 VR-2332 相比,第 481、532~560 位 2 处共缺失 30 个氨基酸,这与 JXA1、HUN4、YN-2008 的 *Nsp2* 基因推导氨基酸序列的变异情况类似。另外还发现,HP-PRRSV 毒株的第 153 位全部为 Val,而其他 PRRSV 毒株为 Gly;HP-PRRSV 毒株和 HB-1 第 316、514、744 和 817 位氨基酸分别为 Pro、Met、Ser、Cys,与其他毒株氨基酸明显不同;同时发现,*Nsp2* 基因编码的氨基酸第 213~214 位氨基酸为易变区,各个毒株间差异较大,3 个分离株之间也不相同。在 *ORF3* 基因编码的氨基酸位点上,HP-PRRSV 毒

株与其他 PRRSV 毒株的差异性明显,第 48、56、58、69、73、226 位点上 HP-PRRSV 毒株氨基酸均相同,而与其他毒株均不同。3 个分离株 *ORF5* 基因的推导氨基酸序列上的中和位点与 JXA1 完全一致,但 SDCXA/2008 株位于一个非常重要的线性非中和表位和跨膜基序上的第 170 位氨基酸由 Glu 变成了 Lys,还有 HP-PRRSV 毒株第 9 个氨基酸为 Cys,而其他毒株均为 Gly。HP-PRRSV 毒株与 HB-1 毒株第 24~25 位氨基酸均为 Tyr-Leu,这与其他毒株不相同。3 个分离株的 5'UTR 同源性为 100%,与 HUN4 和 JXA1 完全相同;3'UTR 与 JXA1 的同源性为 97.2%~98.9%。

2.6 系统进化分析结果

将 3 株 PRRSV 的 *Nsp2* 基因、*ORF3*、*ORF5* 及全基因组序列分别与上述 16 条 GenBank 中已发布的国内外主要经典毒株和流行毒株进行比对,并建立系统遗传进化树,结果见图 2。

表 3 3 株 PRRSV 分离株与其他毒株主要基因推导氨基酸序列的同源性比较
Table 3 AA identity comparison between 3 new isolates and other PRRSV strain

毒株 Strain	SDCXA/2008			SDWF			SDLY		
	<i>Nsp2</i>	<i>ORF3</i>	<i>ORF5</i>	<i>Nsp2</i>	<i>ORF3</i>	<i>ORF5</i>	<i>Nsp2</i>	<i>ORF3</i>	<i>ORF5</i>
LV	34.0	58.3	61.0	33.8	54.9	60.5	34.0	55.3	60.5
VR-2332	76.2	85.9	88.1	77.1	84.7	88.6	77.5	85.1	88.1
EDRD-1	75.3	85.5	89.1	75.7	84.3	88.6	76.0	84.7	89.1
LMY	74.5	88.2	85.6	75.5	87.8	86.1	76.1	87.8	85.6
MLV	76.1	86.3	87.1	76.9	85.1	87.6	77.4	85.5	87.1
SP	74.7	84.3	91.6	74.3	84.7	91.1	74.4	85.1	91.6
CH-1a	87.4	93.4	93.1	87.6	92.5	92.6	88.0	92.5	93.1
BJ-4	75.8	86.7	86.1	76.3	85.5	86.6	76.7	85.9	86.1
HB-1	93.6	93.4	94.1	93.9	92.5	93.6	94.2	92.5	94.1
HB-2	84.8	91.8	91.1	84.6	90.9	90.6	85.0	90.9	91.1
JXA1	97.1	98.4	99.0	99.4	99.2	99.5	98.9	98.4	99.0
CC-1	75.2	87.1	86.6	76.1	85.9	87.1	76.5	86.3	86.6
HUN4	97.2	98.8	99.5	98.7	98.8	99.0	99.0	98.8	99.5
SX2007	96.4	98.0	97.5	96.6	97.6	97.0	96.7	98.4	97.5
YN2008	95.8	98.0	97.5	97.0	98.0	97.0	97.3	98.0	97.5
GS2008	96.8	97.3	98.0	97.4	96.9	97.5	97.6	97.6	98.0
SDCXA/2008	—	—	—	97.1	97.6	98.5	97.2	98.4	99.0
SDWF	97.1	97.6	98.5	—	—	—	98.9	98.0	98.5
SDLY	97.2	98.4	99.0	98.9	98.0	98.5	—	—	—

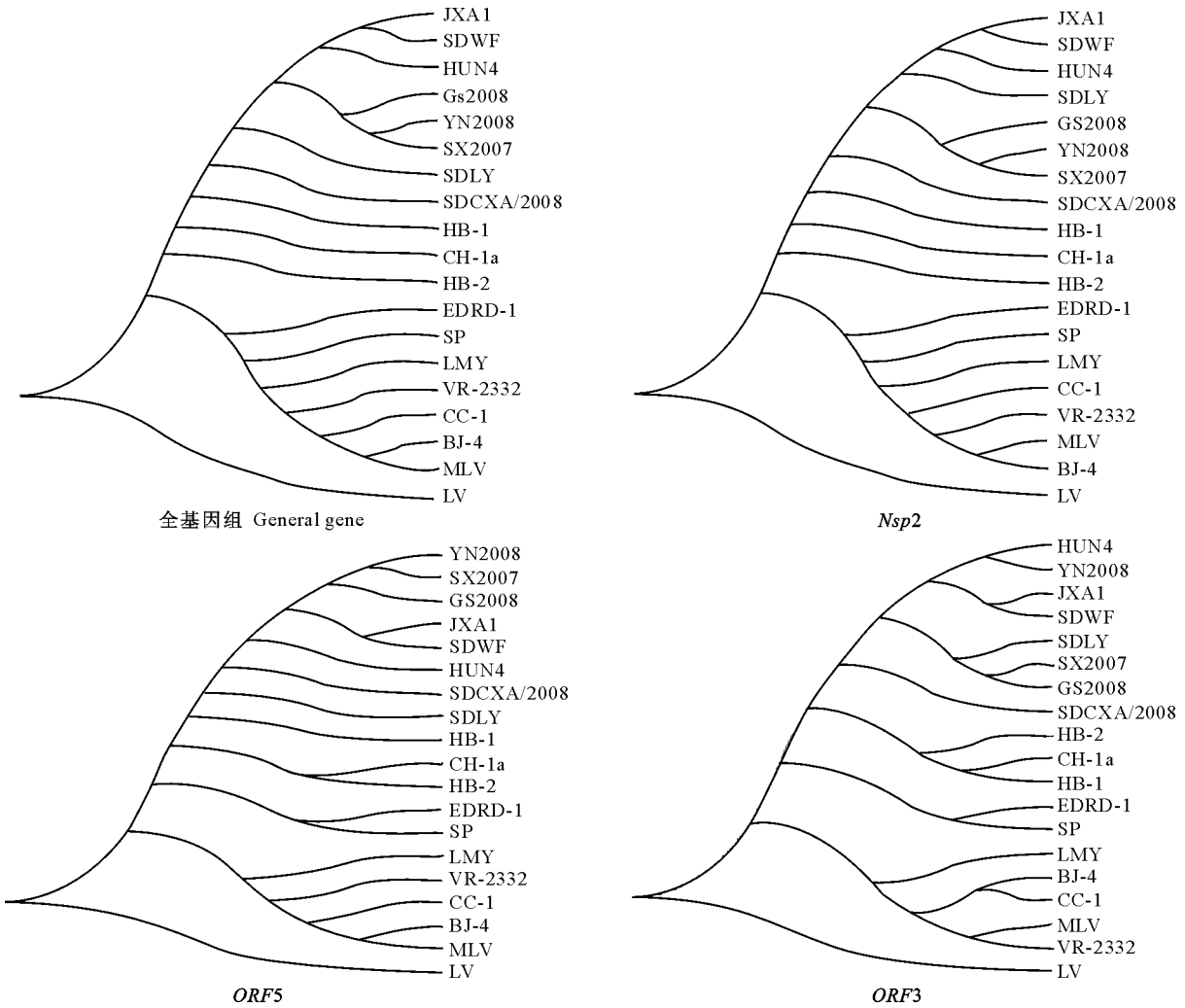


图 2 PRRSV 3 个分离株与其他毒株的遗传进化分析
Fig. 2 The phylogenetic analysis of 3 obtained isolates and other selected PRRSV strains

从图2可看出,3个毒株与欧洲型毒株关系较远,与北美洲毒株关系较近,故推断其为北美洲型毒株;同时其与JXA1、HUN4、YN2008、SX2007、GS2008等5株HP-PRRSV毒株的亲缘关系较近,推断其均为HP-PRRSV毒株;可见*Nsp2*基因的分析结果更接近于全基因组的分析结果。

3 讨论

PRRSV SDCXA/2008、SDWF 和 SDLY 株是2008-09-12从我国华东地区某省3个不同市县的猪场中分离得到的3株毒株,这几个猪场中均有数头仔猪断奶后(60日龄左右)出现体温升高至41℃左右,减食,消瘦,呼吸急促,四肢无力等症状,保育猪群发病率约为10%,病死率50%,病程约10d左右,而其他年龄段猪群未见异常。病死猪剖检可见肺部严重实变和脾出血性肿大、硬化,部分病死猪的胸腔粘连。实验室检测结果表明,这几个病例均为HP-PRRSV核酸阳性、胸膜肺炎等细菌病阳性。取经预处理的组织病料滤过除菌后,接种单层Marc145细胞上传代5次,结果从第2代开始出现细胞病变,第3代细胞病变趋于稳定。取第5代细胞培养物进行TCID₅₀测定及RT-PCR和IFA鉴定,结果表明,这3个分离株均为HP-PRRSV。细胞病变主要表现为:接种48h以后可产生明显CPE变化,细胞呈灶状变化、突起,72h后细胞皱缩、呈灶状脱落。

利用高保真DNA聚合酶对第5代分离毒进行RT-PCR扩增和序列测定,获得了3个分离株的全基因组序列,并与16个PRRSV参考毒株序列进行全基因组序列分析。结果显示,3个毒株与欧洲型代表株LV的序列同源性仅为61.6%~61.8%,与北美洲型代表株VR-2332同源性达89.2%~89.4%,表明获得的分离株均为北美洲型毒株。各毒株的非编码区非常保守,几乎无变异发生;而*Nsp2*、*ORF3*和*ORF5*变异程度较大,这与以往报道的结果一致^[12-13]。结合构建的遗传进化树分析可知,3个分离株与JXA1、HUN4、YN2008等HP-PRRSV株进化关系最近,无显著变异发生,说明在我国发生高致病性猪蓝耳病以来,每年分离到的PRRSV具有基本相同的遗传特点,毒株进化特征相对较为稳定。同时,从地域关系上分析,3个分离毒株来自不同市县,与JXA1、HUN4、YN2008、SX2007、GS2008等分离株在地域上相距较远,但进化关系接近,这证明PRRSV在进化过程中没有明

显的地域特点。

在进行分离株主要基因*Nsp2*、*ORF3*、*ORF5*的推导氨基酸变异分析中,作者发现,高致病性毒株除在*Nsp2*基因推导氨基酸序列上存在缺失外,还具有一些共同特点,如第153位全部为Val,而其他PRRSV毒株为Gly;HP-PRRSV毒株与HB-1株的第316,514,744和817位分别为Pro、Met、Ser、Cys,均与其他参考毒株氨基酸不同。本研究同时还发现,*Nsp2*推导氨基酸序列的第213~214位氨基酸为易变区,各个毒株间差异较大,3个分离株之间也各不相同。因为*Nsp2*基因编码的非结构蛋白不仅具有裂解GP5蛋白的半胱氨酸酶活性和催化GP5糖蛋白包被的功能^[14],而且具有抗原性,在不同毒株间存在很大的差异^[15-16]。故上述这些位点突变的意义,尚有待进一步深入研究。*ORF3*推导氨基酸序列位点上,高致病性毒株与其他毒株的差异性也比较明显,前者第48,56,58,69,73和226位氨基酸均相同,而与其他毒株均明显不同。3个分离株*ORF5*推导氨基酸序列上的中和位点同JXA1完全一致,但是SDCXA/2008株位于一个非常重要的线性非中和表位和跨膜基序上的第170位氨基酸由Glu变成了Lys,使得这个区域的抗原性相对于JXA1大大降低,这是SDCXA/2008毒株出现的新特征,或许也是病毒逃避免疫机制进化的结果。高致病性毒株*ORF5*的第9个氨基酸均为Cys,而其他毒株为Gly。高致病性毒株GP5蛋白信号肽裂解位点前面第24-25位氨基酸均为Tyr-Leu,这除了与HB-1相同外,与其他早期的毒株均不相同,证明高致病性毒株有可能是由HB-1进化而来的,而进化树的结果进一步证明,高致病性毒株的确是由HB-1进化而来的,因此该变异位点可以作为今后PRRSV毒株进化关系分析和毒株分群的一个重要参数指标。

[参考文献]

- [1] Meulenber J M. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) molecular characterization of the agent [C]//Nottingham University. Proceedings of 15th IPVS Congress. Birmingham, England; Nottingham University Press, 1998:149-157.
- [2] Paton D J, Brown I H, Edwards S, et al. "Blue ear" disease of pigs [J]. Vet Rec, 1991, 128: 617.
- [3] Kefl F, Aber K. Reproductive IFailure of unknown etiology [J]. Am Assoc Swine Pract Newsl, 1989, 1: 1-10.
- [4] 郭宝清, 陈章水, 刘文兴, 等. 从疑似 PRRS 流产胎儿分离 PRRSV 的研究 [J]. 中国畜禽传染病, 1996, 18(2): 1-4.

- Guo B Q, Chen Z S, Liu W X, et al. Isolation and identification of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus from aborted fetuses suspected of PRRS [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 1996, 18(2): 1-4. (in Chinese)
- [5] 刘长明, 危艳武, 张朝霞, 等. 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒分离鉴定及其体外传代遗传变异分析 [J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(5): 329-333.
- Liu C M, Wei Y W, Zhang C X, et al. Isolation and genetic analysis of a highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2008, 30(5): 329-333. (in Chinese)
- [6] Stadejek T, Stankevicius A, Storgaard T, et al. Identification of radically different variants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Eastern Europe: towards a common ancestor for European and American viruses [J]. Gen Virol, 2002, 83: 1861-1873.
- [7] Dea S, Gagnon C A, Mardassi H, et al. Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus; comparison of the North American and European isolates [J]. Arch Virol, 2000, 145: 659-688.
- [8] Meulenbergh J M, Hulst M M, de Meijer E J, et al. Lelystad virus, the causative agent of porcine endemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV [J]. Virology, 1993, 192: 62-72.
- [9] Forsberg R, Storgaard T, Nielsen H S, et al. The genetic diversity of European type PRRSV is similar to that of the North American type but is geographically skewed within Europe [J]. Virology, 2002, 299: 38-47.
- [10] 仇华吉, 郭宝清, 童光志, 等. 猪繁殖-呼吸道综合征病毒 (PRRSV) CH-1a 株基因型鉴定 [J]. 中国兽医学报, 1998, 18(2): 118-121.
- Qiu H J, Guo B Q, Tong G Z, et al. Genotyping of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain CH-1a isolated in China by RT-PCR and indirect immunofluorescence test [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 1998, 18(2): 118-121. (in Chinese)
- [11] 童光志, 周艳君, 都晓芳, 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): 321-326.
- Tong G Z, Zhou Y J, Du 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): 321-326. (in Chinese)
- [12] 尹彦涛, 夏平安, 崔保安, 等. 猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒河南分离株 ORF3~7 基因克隆与序列分析 [J]. 中国兽医学报, 2008, 28(5): 496-500.
- Yin Y T, Xia P A, Cui B A, et al. Cloning and sequencing of ORF3-7 genes for porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolated in Henan province [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2008, 28(5): 496-500. (in Chinese)
- [13] 薛青红, 张彦明, 刘湘涛, 等. 中国部分地区 2005—2007 年猪繁殖与呼吸综合征病毒分离株 ORF5 基因和 *Nsp2* 基因遗传变异分析 [J]. 中国农业科学, 2009, 42(5): 1805-1812.
- Xue Q H, Zhang Y M, Liu X T, et al. Genetic variations of ORF5 gene and *Nsp2* gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates from China in 2005—2007 [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2009, 42(5): 1805-1812. (in Chinese)
- [14] Nijder E J, van Tol H, Roos N, et al. Nonstructural proteins 2 and 3 interact to modify host cell membranes during the formation of the arterivirus replication complex [J]. J Gen Virol, 2001, 82: 985-994.
- [15] De Lima M, Pattnaik A K, Flores E F, et al. Serologic marker candidates identified among B-cell linear epitopes of *Nsp2* and structural proteins of a North American strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. Virology, 2006, 353: 410-421.
- [16] Fang Y, Schneider P, Zhang W P, et al. Diversity and evolution of a newly emerged North American Type1 porcine arterivirus; analysis of isolates collected between 1999 and 2004 [J]. Arch Virol, 2007, 152: 1009-1017.