

# 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

薛青红<sup>1,2</sup>, 张彦明<sup>1</sup>, 刘湘涛<sup>3</sup>, 郎洪武<sup>2</sup>, 邹敏<sup>4</sup>, 高金源<sup>2</sup>, 邓永<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>西北农林科技大学动物医学院, 陕西杨凌 712100; <sup>2</sup>中国兽医药品监察所, 北京 100081; <sup>3</sup>中国农业科学院兰州兽医研究所, 兰州 730046; <sup>4</sup>青岛易邦生物工程有限公司, 山东青岛 266032)

**摘要:**【目的】为分析 2005—2007 年间中国部分省区猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 流行毒株的分子生物学特征, 了解其遗传演化规律, 查明中国目前 PRRSV 流行毒株现状。【方法】应用病毒分离方法从中国 4 个省份在 2005—2007 年间采集的 81 份疑似蓝耳病病料中分离到 36 株猪繁殖与呼吸综合征病毒, 应用 RT-PCR 方法对 36 株 PRRSV 现地分离株的 ORF5 基因和 Nsp2 基因进行扩增和序列分析。【结果】36 株现地分离株均属于美洲型 PRRSV, ORF5 基因全长均为 603 bp, 未发现有基因缺失或插入, 编码约 200 个氨基酸, 分离株推导氨基酸序列变异主要发生在 9~39 位; 36 个分离株中有 15 株 PRRSV Nsp2 基因全长为 2 940 bp, 21 株 PRRSV Nsp2 基因全长为 2 850 bp; 发生 Nsp2 缺失的 PRRSV 在 Nsp2 基因第 481 位、532~560 位发生了不连续缺失, 共缺失 30 个氨基酸。与 GeneBank 中收录的 14 个 PRRSV ORF5、Nsp2 基因进行核苷酸及氨基酸序列比较和分析, 系统进化关系显示, 除 B02-2005 株可能与疫苗株有关外, 多数现地分离株与 Ch-1a 株遗传距离较近, 不同年份分离到的毒株与早期 PRRSV 分离株的同源性逐年降低。【结论】根据氨基酸变异情况对 PRRSV 现地分离株进行亚群聚类分析, 发现 36 株现地分离株分别归属于以 VR-2332 为代表的 4 亚群, 以 BJ-4 为代表的 1 亚群和以 Ch-1a 为代表的 2 亚群。进化关系表明 PRRSV ORF5、Nsp2 基因及其推导的氨基酸序列均发生了较大变异, 不同地区 PRRSV 分离株的遗传关系存在交叉现象, 地域特征不明显。

**关键词:** 猪繁殖与呼吸综合征病毒; 病毒分离; ORF5 基因; Nsp2 基因; 遗传变异

## Genetic Variations of ORF5 Gene and Nsp2 Gene of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Isolates from China in 2005-2007

XUE Qing-hong<sup>1,2</sup>, ZHANG Yan-ming<sup>1</sup>, LIU Xiang-tao<sup>3</sup>, LANG Hong-wu<sup>2</sup>, ZOU Min<sup>4</sup>,  
GAO Jin-yuan<sup>2</sup>, DENG Yong<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>College of Veterinary Medicine, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling 712100, Shaanxi; <sup>2</sup>China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081; <sup>3</sup>Lanzhou Veterinary Research Institute; Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046; <sup>4</sup>Qingdao Yebio Biological Engineering Co., Ltd., Qingdao 266032, Shandong)

**Abstract:** 【Objective】 PRRSV were isolated from China in 2005-2007 to recognize the molecular biology character, phylogenetic relationship and the state quo of PRRSV prevalent isolates. 【Method】 36 PRRSV isolates were isolated from 81 suspected clinical samples in 4 provinces which suffered PRRS in China in 2005-2007, ORF5 and Nsp2 genes of these isolates were sequenced and analyzed. 【Result】 36 isolates are North America PRRSV, which of ORF5 genes were composed of 603 nucleotides, encoded polypeptides of 200 amino acid residues, no gene deletion or inseration. Variations of the deduced amino acids of ORF5 gene mainly occurred at positions of 9 to 39. Nsp2 genes of PRRSV isolates were composed of 2940 or 2850 nucleotides. Compared

收稿日期: 2008-07-06; 接受日期: 2009-01-22

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (“973” 项目) (973-2005CB523201)、国家科技支撑计划项目 (2006BAD06A03)

作者简介: 薛青红 (1977—), 女, 内蒙古奈曼旗人, 博士研究生, 研究方向动物病毒类生物制品的检验及研究。E-mail: xueqinghong@ivdc.gov.cn。  
通信作者张彦明 (1956—), 男, 陕西南郑人, 教授, 博士, 研究方向分子病原学与病毒致病机理研究。E-mail: ylzhangym@sohu.com。  
刘湘涛 (1962—), 男, 湖南衡阳人, 研究员, 博士, 研究方向动物病毒分子学方面研究。E-mail: hnxiangtao@163.com

with 15 PRRSV isolates, Nsp2 genes deletions of 21 PRRSV isolates were occurred at positions of 481 and 532-596 amino acid. Compared with 14 PRRSV ORF5 and Nsp2 genes recorded by GenBank, most isolates show a close distance evolutionary relationship with Ch-1a, except for B02-2005, which may respect with PRRS vaccine virus. PRRSV isolates from different times show descendant homology compared with earlier isolates. 【Conclusion】 Based on amino acid sequence phylogenetic tree of ORF5 gene and Nsp2 gene, the 36 PRRSV isolates partly belong to subgroup IV represented by VR-2332, partly to subgroup I represented by BJ-4, and partly to subgroup II represented by Ch-1a. PRRSV ORF5, Nsp2 nucleotides and amino acids have taken place a larger variation, the genetic relationship of PRRSV isolates from different regions exist cross-cutting phenomenon, no obvious geographical characteristics.

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

## 0 引言

【研究意义】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, 俗称“猪蓝耳病”, 临床上以妊娠母猪繁殖障碍 (后期流产、死胎、木乃伊胎、弱胎)<sup>[1-3]</sup>、各种年龄猪特别是仔猪呼吸道疾病 (间质性肺炎) 为特征<sup>[4-6]</sup>。本病于 20 世纪 80 年代首发于美国, 1990 年 6 月在欧洲出现, 中国于 1995 年发生该病<sup>[7-10]</sup>。目前, 全世界所有养猪的国家和地区均有本病的发生与流行, 给当地养猪业造成了极大的经济损失, 严重阻碍了国际间的生猪及其产品贸易, 已成为威胁全球养猪业健康发展的主要疫病之一<sup>[11-13]</sup>。截至 2007 年, 中国已有 25 个以上的省份发生了 PRRS 疫情, 超过二百万头猪被感染, 其中 40 万头猪死亡, 给养猪业造成了巨大损失<sup>[14]</sup>。目前, 虽然该病毒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 的防制带来了极大的困难。【前人研究进展】PRRSV 是尼多病毒目、动脉炎病毒科、动脉炎病毒属成员, 基因组为不分节段、单股、正链 RNA, 长约 15kb, 含有 9 个开放阅读框 (ORF), 每个 ORF 与相邻的 ORF 均发生部分重叠。5' 端的 ORF1 (ORF1a 和 ORF1b) 长约 12kb, 约占病毒基因组的 80%, 编码 RNA 复制酶和转录相关蛋白。ORF2~ORF7 基因编码病毒的结构蛋白 GP2~GP5(E)、M 以及 N<sup>[15-18]</sup>。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, 依据血清学试验和基因序列分析结果, 将 PRRSV 划分为两种基因型, 即美洲型 (代表毒株为 VR-2332) 和欧洲型 (代表毒株为 LV), 两者核苷酸序列同源性为 60%, 其中 ORF5 同源性仅为

54%<sup>[19-20]</sup>。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) 半胱氨酸蛋白酶结构域, 拥有大量线性 B 细胞表位, 具有较强的免疫原性, 能在病毒感染期间激发机体产生特异性抗体, 是 PRRSV 的免疫原之一<sup>[21]</sup>。田克恭等研究发现, 中国新近分离的 PRRSV 变异株与经典毒株的 Nsp2 基因同源性较低, 出现了非连续性的 90 个碱基缺失, 但对碱基缺失与病毒毒力间的关系尚未完全阐明<sup>[14]</sup>。PRRSV ORF5 基因编码病毒的囊膜糖蛋白 GP5 (E 蛋白), 是 PRRSV 的 3 种主要结构蛋白之一, 具有较高的免疫原性和中和活性, 参与体液免疫和细胞免疫; 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<sup>[22-25]</sup>。【本研究切入点】为了解中国不同地区 PRRSV 分离株间的遗传变异关系, 分析中国 PRRSV 流行毒株 ORF5 和 Nsp2 基因的分子生物学特征及其遗传演化规律, 查明中国目前 PRRSV 流行毒株现状。【拟解决的关键问题】本研究对 2005—2007 年间分离自中国部分省区的 36 株 PRRSV 分离株的 ORF5 基因和 Nsp2 基因进行了分子流行病学研究, 以期对 PRRS 的防控进行必要的基础研究和技术储备。

## 1 材料与方法

### 1.1 病料来源及处理

81 份病料 (主要为肺脏、脾脏、淋巴结等) 采集自 2005 年至 2007 年间中国中、东部 4 个省份的疑似蓝耳病发病猪场。病料处理方法: 称取病料约 2.0 g, 加少量灭菌 PBS (含青、链霉素 100 U·m<sup>-1</sup>), 研磨至糊状, 用适量 PBS (pH 7.2) 稀释成乳剂, 反复冻融 3 次, 8 000 r/min、4℃离心 10 min, 取上清, 用 0.22 μm 滤膜过滤, -70℃保存备用。

### 1.2 细胞

Marc-145 细胞由中国兽医药品监察所培养、保存, 外源病毒检测结果为纯净。

### 1.3 主要试剂

克隆载体 pMD18-T、PCR 反应试剂、DL 2000 DNA Marker、受体菌 DH5 $\alpha$  均购自宝生物工程(大连)有限公司。TRIzol、鼠源反转录酶 SuperScript<sup>TM</sup> II、Rnase-Inhibitor 购自 Invitrogen 公司。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA 片段快速纯化/回收试剂盒、质粒纯化试剂盒为 Promega 公司产品。

### 1.4 引物

根据 GenBank 中收录的 PRRSV 美洲型毒株比对结果, 分别设计了用于扩增 Nsp2 和 ORF5 基因的引物。其中, Nsp2 上下游引物序列为: Nsp2-1: 5'-CGGTGCCGAAAGAGAGCAA-3', Nsp2-2: 5'-CGCCCAGTAACCTGCCAAGA-3', 预期扩增片段大小 2 945 bp; ORF5 上下游引物序列为: ORF5-1: 5'-CATTTTCATGACACCTGAGACCAT-3', ORF5-2: 5'-AGAGCATATATCATCACTGGCGT-3', 预期扩增片段大小为 718 bp。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

### 1.5 病毒分离鉴定

取-70℃保存备用的病料上清各 1 ml, 分别接种已长满单层的 Marc-145 细胞, 37℃吸附 2 h, 弃去接种液, 加入含 2%犊牛血清的 DMEM 培养液 (pH 7.2) 10 ml, 置 CO<sub>2</sub> 培养箱培养, 同时设正常细胞对照。盲传 3~5 代, 待细胞出现病变后, 用 PRRSV RT-PCR 试剂盒和细胞中和试验进行鉴定。收集细胞培养的病毒液, 置-70℃保存备用。传 5 代仍无 CPE 者, 作病毒分离阴性处理。

### 1.6 分离毒总 RNA 提取

取-70℃保存备用的各分离株病毒液, 按 TRIzol 试剂盒操作说明书提取病毒基因组 RNA, 用适量 DEPC 水溶解, -20℃冻存备用。

### 1.7 RT-PCR

取 10  $\mu$ l RNA, 加入下游引物 1  $\mu$ l (20 pmol $\cdot\mu$ l<sup>-1</sup>)、3.5  $\mu$ l dNTP (2.5 mmol $\cdot\mu$ l<sup>-1</sup>)、0.5  $\mu$ l Rnase-Inhibitor (40 u $\cdot\mu$ l<sup>-1</sup>)、1  $\mu$ l SuperScript<sup>TM</sup> II、4  $\mu$ l 5 $\times$ AMV Buffer, 42℃水浴 1 h 进行反转录, 获得 cDNA 模板。配制 PCR 反应体系如下: 10 $\times$ PCR Buffer 2.5  $\mu$ l、dNTPs 2  $\mu$ l、上下游引物各 0.5  $\mu$ l、Ex-Taq 0.5  $\mu$ l、cDNA 2  $\mu$ l、加水至 25  $\mu$ l。Nsp2 基因 PCR 反应程序为: 95℃变性 5 min、35 $\times$  (94℃ 50 min, 56℃ 1 min, 72℃ 3 min)、72℃延伸 10 min; ORF5 基因 PCR 反应程序为 95℃变性 5 min、35 $\times$  (94℃ 50 min, 57℃ 40 s, 72℃ 1 min)、72℃延伸 10 min。反应结束, 分别取

5  $\mu$ l PCR 产物进行常规电泳检测。

### 1.8 目的基因的克隆与鉴定

切胶后按照 Promega 公司胶回收试剂盒说明书回收目的基因片段, 与 pMD18-T 载体连接, 转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 挑白斑, 接种于 LB 液体培养基 (Amp<sup>+</sup>) 振荡培养, 微量法提取质粒用 BamH I、Hind III 双酶切鉴定。阳性菌液保存备用。

### 1.9 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。将测得的分离株 ORF5 基因和 Nsp2 基因序列用 DNASTar 软件 (Version 7.0) 与 GenBank 中收录的 14 个 PRRSV 的 ORF5 基因和 Nsp2 基因序列分别进行核苷酸及氨基酸序列同源性分析, 应用 ClustalX、Mega 4.1 软件绘制系统进化树。

## 2 结果与分析

### 2.1 病毒分离与鉴定

利用 Marc-145 细胞从疑似蓝耳病病料中分离到 36 株病毒, 分别按年代、地理等依次编号。36 株分离株在 Marc-145 细胞上均可致典型 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)。RT-PCR 检测结果为 PRRSV 阳性, 中和试验测得其中和指数均大于 100 (大于 50 判定为阳性), 证明分离到的病毒为美洲型 PRRSV。

### 2.2 分离毒 ORF5、Nsp2 基因 RT-PCR 扩增及酶切鉴定

从经 Marc-145 细胞传代分离到的病毒液中提取病毒总 RNA, 用 RT-PCR 方法扩增 ORF5、Nsp2 基因, ORF5 片段大小约 700 bp, Nsp2 片段大小约为 2 800 bp 或 2 900 bp, 酶切鉴定符合预期结果。

### 2.3 DNA 序列测定及比对

登录 NCBI, 将所测得的 36 株分离株的 ORF5 基因序列和 Nsp2 基因序列与 GenBank 中收录的 PRRSV 毒株 ATCC VR-2332、CH-1a 以及 LV 的相应序列进行 Blast 比对, 分析结果表明所测序列均属于美洲型 PRRSV 基因序列。

### 2.4 分离株 ORF5、Nsp2 基因核苷酸序列及推导氨基酸同源性分析

将测得的 36 个分离株的 ORF5 基因与 GenBank 中收录的 14 个国内外 PRRSV ORF5 基因用 DNASTar 软件 (Version 7.0) 进行了核苷酸及推导氨基酸序列同源性分析, 发现 36 个分离株 ORF5 基因核苷酸序列与 LV (欧洲型代表株) ORF5 基因核苷酸序列同源性为 53.6%~56.7%, 与 13 个美洲型毒株 ORF5 基因核苷

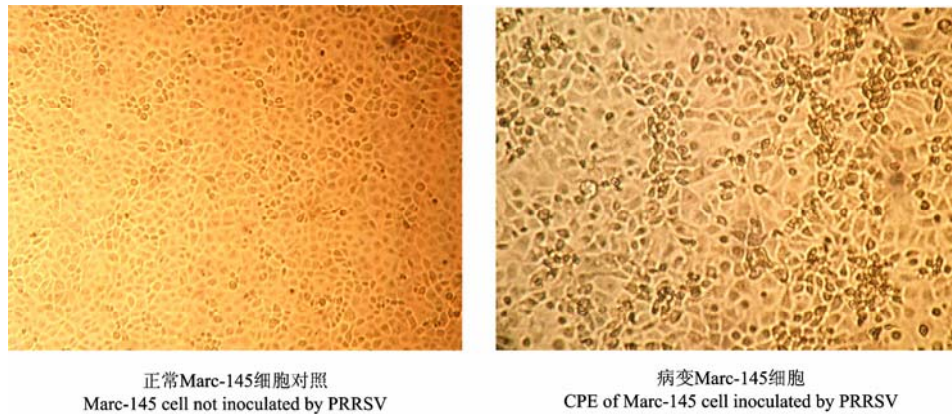


图 1 蓝耳病病料接种 Marc-145 后所产生的细胞病变

Fig. 1 CPE of Marc-145 cell inoculated by PRRSV

酸序列同源性的 85.1%~99.8%，36 个分离株间 ORF5 基因核苷酸序列同源性的 86.2%~100%；36 个分离株 ORF5 基因与 LV ORF5 基因推导氨基酸序列同源性的 53.7%~56.2%，与 13 个美洲型毒株 ORF5 基因推导氨基酸序列同源性的 84.1%~99.0%，36 个分离株 ORF5 基因推导氨基酸序列同源性的 85.6%~99.5%。

36 株分离株中有 21 株为 Nsp2 基因缺失毒株。经测序发现 21 株基因缺失毒株的 Nsp2 基因全长为 2 850 bp，与 VR-2332 比较，其 481 位、532~560 位的氨基酸发生缺失，这与 JXA1 Nsp2 基因长度及缺失位置均相同。21 株分离株间 Nsp2 基因核苷酸序列同源性的 98.7%~99.7%，编码氨基酸序列同源性的 98.5%~99.8%，与 VR-2332 Nsp2 同源性的 83.3%~83.6%，编码氨基酸序列同源性的 83.1%~83.4%，与 JXA1 Nsp2 同源性的 98.7%~99.6%，编码氨基酸序列同源性的 98.5%~99.7%。

## 2.5 分离株 ORF5、Nsp2 基因核苷酸序列及推导氨基酸序列变异性分析

36 株分离株的 ORF5 基因全长均为 603 bp，编码约 200 个氨基酸，未发现基因缺失或插入，分离株推导氨基酸序列的变异主要发生在 9~39 位（图 2），其它区域相对保守，仅个别毒株氨基酸发生替换。36 株 PRRSV 分离株中，34 株的 ORF5 推导氨基酸序列含有 3 个糖基化位点（位于 33、44 和 51 位 aa 处），D02-2005 具有 4 个潜在的糖基化位点（分别位于 30、33、44 和 51 位 aa 处），而 B02-2005 的 GP5 虽然也具有 3 个潜在的糖基化位点，但糖基化位点所在位置与其它分离株不同（分别位于 30、44 和 51 位 aa 处）。PRRSV 分离株 GP5 推导氨基酸序列经 DNASTar 软件

分析发现，分离株 N 端亲水性较差，含一个信号肽序列（1-31aa）；多数分离株 GP5 含 3 个跨膜区，主要位于 62~83aa、90~106aa、113~130aa 处，这 3 处序列均比较保守。

在 36 株 PRRSV 分离株中，有 15 株分离株的 Nsp2 基因序列全长为 2 940 bp，编码 980 个氨基酸，有 21 株分离株的 Nsp2 基因在第 481 位、532~560 位发生不连续的 30 个氨基酸缺失，其它编码区域未见较大变异或缺失。利用 DNASTar 软件分析可知 21 株 Nsp2 基因缺失株与 JXA1 株核苷酸、氨基酸序列同源性的 98.5% 以上（图 3）。

## 2.6 系统进化树

根据测得的 36 株分离株的 ORF5、Nsp2 基因序列，按照 Neighbor-Joining 法用 Mega 4.1 软件绘制系统进化树（图 4、图 5）。Nsp2、ORF5 基因系统发育树分析表明，本研究所分离到的毒株均属于美洲型，其中 B02-2005 与疫苗株 MLV 遗传关系较近，推测其可能来源于疫苗毒，其余分离株分别与 CH-1a、JXA1 的亲缘关系较近，属野毒株。所有 Nsp2 基因发生缺失的 PRRSV 毒株的遗传关系较近，属于同一分支；与 HB-1 株遗传关系最近，具有年度特征，无明显的地域特征。

## 3 讨论

3.1 1992 年 Collins 等报告 MA-104、Marc-145 等细胞系适用于 PRRSV 的分离，但不同毒株对上述细胞的敏感性不一<sup>[6]</sup>。本研究用 Marc-145 细胞分离到部分 PRRSV 毒株，接种 PRRSV 后传 2~3 代可致 Marc-145 细胞产生细胞病变（CPE），自第 3 代开始

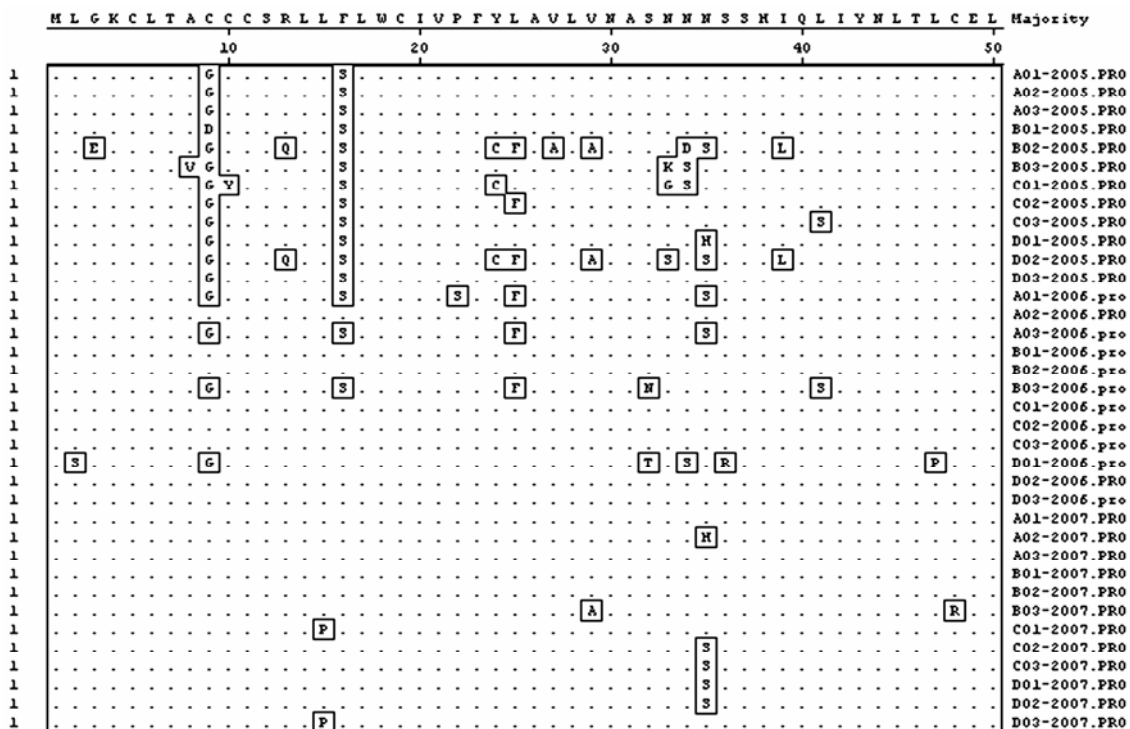


图 2 36 株 PRRSV 分离株 ORF5 基因推导氨基酸主要差异比较  
Fig. 2 Main amino acid differences of ORF5 gene among 36 PRRSV isolates



图 3 21 株 PRRSV 分离株 Nsp2 基因推导氨基酸主要差异比较  
Fig. 3 Main amino acid differences of Nsp2 gene among 21 PRRSV isolates

病变趋于稳定。一般在接种 48 h 后可产生明显 CPE，细胞皱缩、呈灶状变化、折光性增强（视野变暗）；接种后 3~4 d 细胞病变发展迅速。尤其是在 2006 年，从中国多个省份流行具有“高热”特征的病例分离

PRRSV 过程中发现，细胞病变多发生在第二代，这可能是在环境和免疫压力作用下，PRRSV 分离株对细胞嗜性增强。同时，研究发现部分经 RT-PCR 检测为阳性的样品接种 Marc-145 细胞后，未分离到病毒，这可



图 4 PRRSV 中国分离株与参考毒株 ORF5 基因系统进化树分析

Fig. 4 Phylogenetic tree based on the ORF5 gene of 36 Chinese PRRSV isolates and PRRSV reference strains

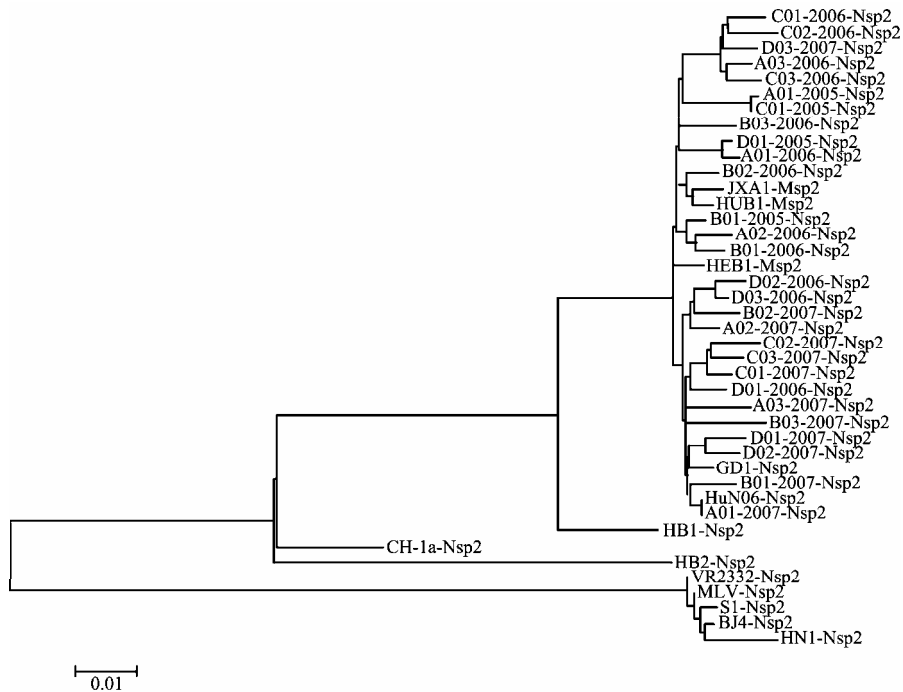


图 5 PRRSV 中国分离株与参考毒株 Nsp2 基因系统进化树分析

Fig. 5 Phylogenetic tree based on the Nsp2 gene of Chinese PRRSV isolates and PRRSV reference strains

能是因为样品在运送和保存过程中处置不当, 而 PRRSV 又对温度、湿度和有机溶剂敏感, 感染性易受 pH 影响, 故可能导致病毒失活。鉴于上述状况, 用细胞分离 PRRSV 时, 应尽可能选择新鲜样品和病毒比较富集的脏器, 或选择对病毒更为敏感的细胞系。

**3.2 PRRSV 基因组编码至少 7 种结构蛋白, 其中 GP5、M、N 蛋白为主要结构蛋白。GP5 蛋白由 ORF5 基因编码, 是一种糖基化的囊膜蛋白, 含有多个中和表位, 与病毒的感染性密切相关。在 PRRSV 所有结构蛋白中, GP5 蛋白变异最大, 因此本研究将其作为进化分析的基因, 通过其遗传演化特点说明目前中国流行毒株的演变规律, 揭示中国目前 PRRSV 流行毒株趋势以及毒株与世界毒株间的遗传相关性。本研究发现 36 株 PRRSV 分离株 ORF5 基因序列与 LV (欧洲型代表株)ORF5 基因序列同源率为 53.6%~56.7%, 与 13 个美洲型毒株 ORF5 基因序列同源率为 85.1%~99.8%, 分离株 ORF5 基因序列间同源率为 86.2%~100%; 36 个分离株 ORF5 基因与 LV ORF5 基因推导氨基酸序列同源率为 53.7%~56.2%, 与 13 个美洲型毒株 ORF5 基因推导氨基酸序列同源率为 84.1%~99.0%, 36 株分离株 ORF5 基因氨基酸序列同源率为 85.6%~99.5%, 分析表明目前国内流行毒株在 ORF5 基因区域变异较大。36 个分离株中, B02-2005 与 MLV 遗传关系较近, 推测该分离株可能与疫苗毒株有关; D02-2005 与 VR-2332 遗传距离较近, 推测其可能与 VR-2332 强毒株有关, 其余分离株与野毒株 Ch-1a 遗传距离较近, 属同一进化分支。进一步分析发现, 不同年份分离到的病毒与中国较早分离到的毒株 Ch-1a、BJ-4、HB-1、HB-2 的同源性逐年降低, 降低速率约为 1%。参考严安等的方法<sup>[26]</sup>, 根据 13、34、137 及 151 位的 aa 变异情况对分离株进行亚群聚类分析, 发现 36 株分离株中, D02-2005 归属于以 VR-2332 为代表的 4 亚群, B02-2005 属于以 BJ-4 为代表的 1 亚群, 其余 34 株分离株归属于以 Ch-1a 为代表的 2 亚群, 未发现有属于 3 亚群的分离株。进化树分析发现, 同一地区的 PRRSV 分离株存在不同的进化分支中, 不同地区的 PRRSV 分离株存在于同一进化分支中, 说明目前中国 PRRSV 流行毒株的遗传进化关系存在交叉现象, 地域特征不明显。**

**3.3 PRRSV 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 B 细胞表位, 是 PRRSV 的免疫原之一<sup>[22]</sup>。在非结构蛋白区域, 变异最大的为 NSP2 区域。Tian 等<sup>[14]</sup>研究发现,**

中国新近分离的 PRRSV 变异株与 PRRSV 经典毒株的 Nsp2 基因同源性较低, 出现了非连续性的 90 个碱基缺失。本研究分离的 36 株 PRRSV 分离株中, 15 株 PRRSV 未发生 Nsp2 基因缺失, 多分离于 2005 年; 其余 21 株 Nsp2 基因缺失株均分离于 2006 年下半年至 2007 年中国 PRRS 流行期间。研究表明国内 PRRSV 流行毒株在 Nsp2 中部变异较大, 目前 Nsp2 区域缺失的氨基酸并不影响病毒的生存, 但对 PRRSV 生物学特性的影响尚有待于进一步证实。

## 4 结论

对中国 2005—2007 年间分离的 PRRSV 部分生物学特性研究表明, PRRSV 在其生物学特性方面已发生变化, 包括细胞嗜性、致病力等, 但与变化相对应的分子生物学基础尚不清楚。本研究分析发现, 2005—2007 年间分离到的 36 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否为 PRRSV 生物学特性发生改变的原因, 且目前该病致病机理和免疫特性尚不十分清楚, 已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、监测及病原变异趋势的研究工作, 深入开展致病机制和免疫机理等基础研究, 为中国研发更具针对性、安全、高效的疫苗提供科学依据。

## References

- [1] Dea S, Bilodeau R, Sauvageau R, Martineau G P. Outbreaks in quebec pig farms of respiratory and reproductive problems associated with encephalomyocarditis virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1991, 3: 275-282.
- [2] Nelson E A, Christopher-Hennings J, Drew T, Wensvoort G, Collins J E, Benfield D A. Differentiation of U. S. and European isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by monoclonal antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, 1993, 31(12): 3184-3189.
- [3] Goyal S M. Porcine reproductive and respiratory syndrome. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1993, 5: 656-664.
- [4] Christianson W T, Chang-Soo C, Collins J E, Molitor T W, Morrison R B, Han-Soo J. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in mid-gestation sows and fetuses. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 1993, 57: 262-268.
- [5] Gagnon C A, Milane G, Carman D S, Charbonneau G. Isolation of a distinct serotype of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in Ontario. *The Canadian Veterinary Journal*, 1995, 36:

- 777-778.
- [6] Collins J E, Benfield D A, Christianson W T, Harris L, Hennings J C, Shaw D P, Sagar M G, Sam McCullough, Robert B. Morrison, Han Soo Joo, David Gorecyca, Dan Chladek. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1992, 4: 117-126.
- [7] Halbur P G, Paul P S, Meng X J, Lum M A, Andrews J J, Rathje J A. Comparative pathogenicity of nine US porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates in a five-week-old cesarean-derived colostrum-deprived pig model. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1996, 8: 11-20.
- [8] Lager K M, Ackermann M R. Pulmonary lesions in fetuses exposed in utero to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1994, 6: 480-483.
- [9] Dea S, Bilodeau R, Athanassious R, Sauvageau R, Martineau G P. Swine reproductive and respiratory syndrome virus in Quebec: isolation of an enveloped virus serologically-related to Lelystad virus. *The Canadian Veterinary Journal*, 1992, 33: 801-808.
- [10] López A, Yason C, Burton S. Serologic evidence of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *The Canadian Veterinary Journal*, 1994, 35: 53.
- [11] Rossow K D, Morrison R B, Goyal S M, Singh G S, Collins J E. Lymph node lesions in neonatal pigs congenitally exposed to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1994, 6: 368-371.
- [12] 郭宝清, 陈章水, 刘文兴, 崔益洙. 从疑似 PRRS 流产胎儿分离 PRRSV 的研究. *中国畜禽传染病*, 1996, 87(2): 1-4.  
Guo B Q, Chen Z S, Liu W X, Cui Y Z. The study of PRRSV isolated from suspected PRRS abortive fetuses. *Chinese Journal of Animal and Poultry Infections Diseases*, 1996, 87(2): 1-4. (in Chinese)
- [13] 郭宝清, 陈章水, 刘文兴, 崔益洙. 应用间接免疫荧光法从国内生殖障碍综合征猪群中检测生殖和呼吸综合征阳性抗体的研究. *中国兽医科技*, 1996, 26(3): 3-5.  
Guo B Q, Chen Z S, Liu W X, Cui Y Z. The Detection of PRRSV positive antibody in Chinese PRRSV swinery by IFA. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 1996, 26(3): 3-5. (in Chinese)
- [14] Tian K G, Yu X L, Zhao T Z, Feng Y J, Cao Z, Wang C B, Hu Y, Chen X Z, Hu D M, Tian X S, Liu D, Zhang S, Deng X Y, Ding Y Q, Yang L, Zhang Y X, Xiao H X, Qiao M M, Wang B, Hou L L, Wang X Y, Yang X Y, Kang L P, Sun M, Jin P, Wang S J, Yoshihiro Kitamura, Yan J H, Gao G F. Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark. *PLoS ONE*, 2007, 2(6): 526-539.
- [15] Wissink E H J, Kroese M V, Maneschijn-Bonsing J G, Meulenberg J J M, van Rijn P A, Rijsewijk F A M, Rottier P J M. Significance of the oligosaccharides of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus glycoproteins GP2a and GP5 for infectious virus production. *Journal of General Virology*, 2004, 85: 3715-3723.
- [16] Ansari I H, Kwon B, Osorio F A, Pattnaik A. Influence of N-linked glycosylation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 on virus infectivity, antigenicity, and ability to induce neutralizing antibodies. *Journal of Virology*, 2006, 80: 3994-4004.
- [17] Snijder E J, van Tol H, Pedersen K W, Raamsman M J B, de Vries A A F. Identification of a novel structural protein of arteriviruses. *Journal of Virology*, 1999, 73(8): 6335-6345.
- [18] Wu W H, Fang Y, Farwell R, Steffen-Bien M, Rowland R R R, Christopher-Hennings J, Neilson E A. A 10-kDa structural protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by ORF2b. *Virology*, 2001, 287(1): 183-191.
- [19] Mardassi H, Mounir S, Dea S. Identification of major differences in the nucleocapsid protein genes of a Québec strain and European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of General Virology*, 1994, 75: 681-685.
- [20] Meng X J, Paul P S, Halbur P G. Molecular cloning and nucleotide sequencing of the 3'-terminal genomic RNA of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of General Virology*, 1994, 75: 1795-1801.
- [21] Mateu E, Diaz I. The challenge of PRRS immunology. *The Veterinary Journal*, 2008, 177: 345-351.
- [22] Pirzadeh B, Dea S. Monoclonal antibodies to the ORF5 product of porcine reproductive and respiratory syndrome virus define linear neutralizing determinants. *Journal of General Virology*, 1997, 78: 1867-1873.
- [23] Pirzadeh B, Dea S. Immune response in pigs vaccinated with plasmid DNA encoding ORF5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of General Virology*, 1998, 79: 989-999.
- [24] Weiland E, Wiczorek-Krohmer M, Kohl D, Conzelmann K K, Weiland F. Monoclonal antibodies to the GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus are more effective in virus neutralization than monoclonal antibodies to GP4. *Veterinary Microbiology*, 1999, 66: 171-186.
- [25] Zhang Y J, Sharma R D, Paul P S. Monoclonal antibodies against conformationally dependent epitopes on porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary Microbiology*, 1998, 63: 125-136.
- [26] 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)