

【畜牧兽医】

猪繁殖与呼吸综合征病毒基因组遗传变异研究进展

高志强 郭鑫 杨汉春

(中国农业大学动物医学院 北京 100094)

摘要 猪繁殖与呼吸综合征是目前严重危害养猪业的一种传染病,呈世界性流行。该病的病原为猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV),不同 PRRSV 分离株核苷酸序列存在广泛而明显的变异,这给 PRRS 的准确检测和有效控制带来困难。本文综述了近年来国内外关于该病毒不同分离株的遗传和变异情况,从基因组水平阐述了与病毒致病性关系较大的结构域,其中 5'UTR、ORF1 中的 Nsp2 及 ORF3 和 ORF5 为变异较大的区域。

关键词 猪繁殖与呼吸综合征病毒 基因组 遗传变异

中图分类号:S851.34+7.1 **文献标识码**:A

文章编号:1008-0864(2002)06-0064-04

猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine respiratory and reproductive syndrome virus, PRRSV)是套式病毒目(Nidovirales)动脉炎病毒科(Arterividae)动脉炎病毒属(Arterivirus)的成员,与其同属的还有马动脉炎病毒(EAV)、小鼠乳酸脱氢酶增高症病毒(LDV)及猴出血热病毒(SHFV)。PRRSV 基因组大小约 15kb,含 9 个开放阅读框,即 ORF1a、ORF1b、ORF2a、ORF2b、ORF3、ORF4、ORF5、ORF6 和 ORF7。其中 ORF1 约占病毒基因组全长的 3/4,为病毒的非结构蛋白编码区,ORF2-7 编码病毒的结构蛋白^[1]。

PRRSV 不同分离株核苷酸序列存在广泛而明显的变异,依据血清学试验及结构基因序列分析结果可将 PRRSV 划分为两种基本的基因型,即欧洲型和美洲型,前者主要流行于欧洲地区,而后者主要流行于美洲和亚太地区。欧洲型的代表株为 LV 株,美洲型的代表株为 VR2332 株,两者的核苷酸序列同源性约为 60%。欧洲型分离株间的差异较小,而美洲型分离株间的差异相对较大,故有学者建议美洲型毒株还应划分为几个亚型^[2]。PRRSV 在猪体内持续感染过程中,会有准种或病毒亚群的出现^[3]。近几年来,由于弱毒苗在某些国家的广泛使用,造成 PRRS 的暴发,一些学者对从这样的猪场分离到的 PRRSV 及疫苗

毒进行了序列测定与分析,表明疫苗毒在选择压力的作用下,会发生返强突变^[4,5]。本文拟在分析不同 PRRSV 分离株基因组序列差异的基础上,对该病毒的遗传动态做一综述。

1 5'非编码区(5'UTR)引导序列的遗传变异

许多 RNA 病毒的 5'UTR 与病毒基因组的复制、转录及 mRNA 的翻译密切相关。根据其它相关病毒(如冠状病毒)的分子生物学知识,一些学者认为 PRRSV 的 5'UTR 中或许也存在毒力决定区^[6]。欧洲型与美洲型毒株的 5'UTR 差异很大,同源性仅约 50%,其中欧洲型毒株的 5'UTR 包含 221-223 个核苷酸,而美洲型毒株的 5'UTR 序列包括 190 或 189 个核苷酸。多数美洲型毒株间的 5'UTR 序列相对保守,仅有个别碱基的置换或缺失,有些弱毒疫苗株的 5'UTR 同其父本毒株(VR2332)相比,在 12nt 起始的引导基元序列前缺失一个 U,但 LV 株相应位置处亦缺失这一 U,故从现有资料不能说明这一缺失与毒力有关^[7]。另外,16244B(1997 年分离自内布拉斯加州的致病性毒株)及 PA8(加拿大分离株)与 VR2332 虽然同为美洲型毒株,但它们起始位置的核苷酸为 C,而且前 10 个核苷酸与 VR2332 也完全不同,但 16244B 与 PA8 起始处的核苷酸序列一致^[8,9],推测 PA8 株可能是由 16244B 株变异而来。PRRS 毒株 12nt 引导基元序列可出现如此大差异,很有必要对其功能进行研究。欧、美型毒株 5'UTR 近 3' 端的 40 个核苷酸序列高度保守,其中嵌有一个 8-11-9 的保守核苷酸序列。此外,序列中还有一个 9nt 的含 CAC-CC 位点的保守基元,已知 EB 病毒与人 T 细胞白血病病毒的 CACCC 基元对病毒与 Sp1 和类 Kruppel 转录因子的互作起调控作用,但此基元在非逆转录 RNA 病毒的作用还不清楚^[7]。毫无疑问,这些保守基

收稿日期:2002-01-16

作者简介:高志强,男,1974 年生,博士研究生,研究方向为动物分子病毒学与免疫学。

基金项目:重大畜禽疫病病原的分子生物学研究(973 项目)

元对调控 PRRSV 的复制及介导 RNA 与蛋白的相互作用方面有重要作用,因而在长期的流行过程中得以保留。S. Shen 等报道,从来源于 VR2332 的疫苗株 SP 的引导序列可推测出 5 个茎环结构,但其 121, 128 和 129 位核苷酸的变异发生在第四个茎环结构内,推测这四个突变可降低环的稳定性,或许会影响病毒的复制^[10]。

2 ORF1 的遗传变异

欧、美型毒株的序列比较显示,ORF1 序列的差异也很大,同源率约为 60%。其中 ORF1a 的变异最为明显,是在 PRRSV 的 9 个 ORF 中变异最大的一个。各美洲型毒株间的 ORF1 差异虽然比较小,但 ORF1a 的变异也相对较大。根据 EAV 多聚蛋白水解过程的资料,通过序列比较推测 PRRSV 的 ORF1 编码的多聚蛋白可水解为 13 个非结构蛋白,即 Nsp1 α , Nsp1 β 及 Nsp2-12^[11]。其中 Nsp1 α 和 Nsp1 β 包含两个类木瓜蛋白酶的半胱氨酸蛋白酶区,已证实可从 1a 和 1ab 多聚蛋白上自动切割下来^[9]。R. Allende 等报道 VR2332 与 RespPRRS/Repro 疫苗株同 16244B 相比,ORF1a 中推测的非保守氨基酸的改变主要集中在 Nsp1 β 和 Nsp2,但都不在特定的催化或切割位点处,进一步比较发现,Nsp1 β 中 331 位的氨基酸,Nsp2 中 668 位的氨基酸及 952 位的氨基酸很可能和该病毒的毒力相关,RespPRRS/Repro 疫苗株在这三个位置处的氨基酸分别为 Phe、Phe 和 Lys,而 16244B 这三个位置处的氨基酸则分别为 Ser、Ser 及 Glu^[4]。Henriette S 等从丹麦暴发 PRRS 的猪场分离到有或怀疑有致病性的毒株若干,PCR 及单抗鉴定表明它们由 Ingelvac PRRS 疫苗株突变而来,经序列

比较亦发现了 331 位 Phe 到 Ser 的恢复突变,但没有发现 668 位和 952 位的氨基酸突变^[5]。Nsp1 β 中第 331 位的氨基酸距离其催化位点仅 8 个氨基酸,此处的突变很可能会影响到切割位点的催化效率,从而影响病毒的复制。Nsp2 为各毒株间差异较大的一个编码区,具有种特异性,与 PRRSV 对细胞或组织的嗜性有关,在遗传关系很近的毒株间也可有较大差异,故有学者建议可依据此区序列的差异对主要的北美毒株进行分类。Nsp2 的 N 端较保守,含有推测的催化残基 Cys^{1a437} 和 His^{1a506},中间及 C 端有三个高变区。SP 疫苗株(来源于 VR2332)同 VR2332 及 16244B 相比,其 Nsp2 靠近 C 末端的高变区有 36 个氨基酸的插入,此外还有 158 个氨基酸的置换。鉴于 PRRSV 的快速进化给该病原的控制增加了难度,发展一种依据 Nsp2 基因序列来了解 PRRSV 遗传进化的监测手段将很有意义^[9]。

ORF1a 与 ORF1b 间存在一个伪节结构,不同毒株间此处的核苷酸差异很小,经计算,RespPRRS/Repro 疫苗株同 16244B 及 Iowa 株相比此处两个核苷酸的改变会使伪节结构更牢固一些,疫苗株的该处序列与 VR2332 一致,表明此处核苷酸的微小变异与毒力无关^[4]。

各毒株的 ORF1b 的序列保守性相对更高一些,即便在欧、美型毒株间也是如此,但两型毒株 Nsp12 的序列差异非常大。RespPRRS/Repro 与 Ingelvac PRRS 之 Nsp10 第 952 位的氨基酸为 His,但几乎所有具有致病性毒株此位置的氨基酸均为 Tyr,说明此位置的氨基酸与毒力相关。Nsp10 为假定的螺旋酶代码区,经与其为同一超家族的大肠杆菌螺旋酶比较,显示 952 位的氨基酸位于一个非保守的 β 折叠片中,但此处的氨基酸突变不会改变这一 β 折叠片结构^[4,5]。

由于 ORF1 是病毒的复制酶基因,因此与催化活性有关的序列基元均非常保守。虽然现有的研究结果普遍认为,欧、美型毒株的差异是由于同一祖先在两个大陆长期演化

表 1 LV 株与不同养猪国家和地区的 PRRSV 参考株及一些动脉炎病毒结构蛋白推导氨基酸的同源率

Table 1 Percentages of amino acid identity of structural genes of LV with those of PRRSV strains from other countries and other arteriviruses (%)

LV 结构基因 Structural gene of LV	毒株及其来源 Virus strains and origin								
	PRRSV-10	VR2332	IAF-Klop	DK111-92	Olot 91	BJ-4	MD-001	LDV	EAV
	德国 Germany	美国 US	加拿大 Canada	丹麦 Denmark	西班牙 Spain	中国 China	台湾地区 Taiwan area	C 株 Strain	Bucyrus 株 C Bucyrus
ORF2a	99	63	59	94	97	62	60	32	<20
ORF3	99	60	54	88	94	57	55	28	<20
ORF4	99	70	68	91	94	67	67	30	<20
ORF5	99	55	52	93	93	57	54	47	<20
ORF6	100	79	81	94	97	77	79	53	23
ORF7	100	64	59	97	99	65	59	44	20

形成的,但序列中有关催化活性的基元仍相当保守,特别是 Nsp9(编码依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶)保守性最高。尽管如此,在非保守区的变异还是广泛存在的,而且有些变异会对毒力造成影响,但由于选择压力的存在,在生存环境改变的情况下,某些位点还会发生回复突变。如一些疫苗株为 VR2332 在 Marc145 细胞系上连续传代后获得,但当用于猪群后,在猪体内多次传代后,毒力即可返强。对此,比较公认的看法是 PRRSV 是以准种(或病毒亚群)的形式存在,这样在选择压力改变时,即将优势变异株选择出来。

3 结构蛋白编码区的遗传变异

结构蛋白编码区由 8 个开放阅读框组成,其中 ORF5-7 编码病毒的优势蛋白,ORF2a-4 编码次要蛋白。现将 LV 株与来自各不同养猪国家和地区的 PRRSV 参考株及其它一些动脉炎病毒各结构蛋白推导氨基酸的同源率总结于表 1^[10,11]。

由表 1 的序列分析显示 PRRSV 和 LDV 的亲源关系要近于它与 EAV 的关系,欧洲型毒株间的变异明显小于美洲型毒株间的变异,而且 ORF3 和 ORF5 是结构蛋白编码区中保守性最差的两个阅读框。

美洲型毒株 GP2a 蛋白的推导氨基酸序列的同源性在 91%-99%,GP3 为 86%-98%,GP4 为 92%-99%。GP3 是 PRRSV 各毒株间保守性最差的蛋白之一,在欧、美型毒株间推导氨基酸的同源率为 54%-60%,而且多数变异发生在 N 末端。尽管如此,GP3 之 N 端潜在的糖基化位点及疏水性是保守的。另外,同 LV 相比,北美型毒株的 GP3 中 C 端的推导氨基酸有 12 个残基的缺失。ORF3 和 ORF4 的重叠区有一疏水的高变区,即 GP4 的 N 端存在这样一个高变区。据报道,LV 的这个高变区含有一个推测的中和位点,其中由 9 个氨基酸构成的基元(59-67)构成了此中和位点的核心,此处的突变可造成 GP4 蛋白的抗原性发生改变^[12]。此外,美洲型毒株 ORF2a 第 10 位的 Leu 突变为 Phe 与 ORF3 第 83 位的 Gly 突变为 Glu 可能与疫苗株的毒力致弱有关^[4]。

同型毒株 GP5 推导氨基酸的同源率在 88%-99%之间。而欧、美型毒株 GP5 推导氨基酸的同源率在 52%-55%之间,此差异已相当于它们与 LDV 的差异。普遍认为,PRRSV 和 LDV 的 ORF5 蛋白包含一段信号肽(翻译后被移走)、一个外区、一个三次跨膜区及一个内区。同型毒株间 GP5 推导氨基酸的置

换主要发生在邻近信号肽序列外区近端的高变区内(26-39),N 端潜在的糖基化位点为 0-3 个,EAV 和 LDV 的相应蛋白中也存在这样的高变区,而且 LDV 的研究资料显示主要囊膜糖蛋白的糖基化位点数同毒株的病原性有关。有学者发现 PRRSV 的 VR2332 株在猪体内传代过程中,经组织 PCR 可鉴定出以 ORF5 蛋白 34 位氨基酸由 Asp 突变为 Asn 为特征的病毒亚群(或准种),此氨基酸正好位于外区的高变区中^[3]。序列比较显示,美洲型毒株 13 位的 Arg 突变为 Asn 及 151 位的 Arg 突变为 Gly 可能与疫苗株毒力致弱有关。13 位的突变属保守突变,位于 GP5 推测的信号肽序列中,而 151 位的氨基酸位于糖蛋白的疏水区^[4]。Wesley RD 等于 1998 年报道对 ORF5 的 RT-PCR 产物用 MluI 进行 RFLP 分析,可区分疫苗株和其它北美分离株,这是由于疫苗株 ORF5 第 137 位的氨基酸为 Ala,而其它野毒株的第 137 位的氨基酸为 Ser^[13]。但是随后,D. S. Cheon 等报道,这种单纯的 RFLP 方法难以区别朝鲜分离株和美国来源于 VR2332 的弱毒疫苗株^[14]。这可能由于 PRRSV 的毒力变异是一种多位点的累积效应。

欧、美型毒株间 M 蛋白的推导氨基酸序列最为保守,同源率在 78%-81%。而同型毒株 M 蛋白推导氨基酸的同源率大于 96%。但用针对 M 蛋白的特异性单抗仍可以鉴定出各型毒株间的抗原变异。此外,美洲型毒株 ORF6 第 16 位的 Asp 突变为 Asn 可能与疫苗株的毒力致弱有关^[4]。N 蛋白基因也是非常保守的,北美毒株间 N 蛋白推导氨基酸序列的同源率在 96%-100%,而欧洲型毒株间同源率在 94%-99%,但将美洲型毒株与欧洲原型毒株 LV 比较时,ORF7 的核酸序列与推导氨基酸同源率分别为 63%和 59%,此差异是由大量核苷酸的置换、插入和缺失造成的,美洲型毒株的 N 蛋白的推导氨基酸比 LV 毒株少 5 个,而且欧洲型毒株 N 蛋白的 N 端和 C 端有两个氨基酸延伸区(STAPM 和 SQGAS),美洲型毒株缺少这样的序列^[11]。

4 3' 非编码区的遗传变异

美洲型毒株的 3' 非编码区序列比欧洲型毒株的此序列长 22 个核苷酸,同源率为 59%。此外各毒株的 poly(A)的数量也可能有差异,或许与病毒复制密切相关^[9]。

综上所述,PRRSV 的变异在整个基因组中广泛存在,这给 PRRS 的准确检测和有效控制带来很

大困难,因而尝试应用不同的技术手段对 PRRSV 的遗传变异规律进行综合分析对于阐明序列中各元件的具体功能将具有实际意义。

参 考 文 献

- 1 Eric J. Snijder, Janneke J. M. Meulenberg. The molecular biology of arteriviruses. *J Gen Virol*, 1998, 79: 961-979
- 2 X. J. Meng et al. Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. *Vet Microbiol*, 2000, 74: 309-329
- 3 Raymond R. R. Rowland, et al. The evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: Quasispecies and emergence of a virus subpopulation during infection of pigs with VR-2332. *Virology*, 1999, 259: 262-266
- 4 R. Allende, et al. Mutation in the genome of porcine reproductive and respiratory syndrome virus responsible for the attenuation phenotype. *Arch Virol*, 2000, 145: 1149-1161
- 5 Henriette S. et al. Reversion of a live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine investigated by parallel mutations. *J Gen Virol*, 2001, 82: 1263-1272
- 6 Tahara SM, et al. Coronavirus translational regulation: leader affects mRNA efficiency. *Virology*, 1994, 202: 621-630
- 7 M. B. Oleksiewicz, et al. Determination of 5'-leader sequences from radically disparate strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus reveals the presence of highly conserved sequence motifs. *Arch Virol*, 1999, 144: 981-987
- 8 Wootton, S., Yoo, D. and Rogan, D. Full-length sequence of a Canadian porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolate. *Arch Virol*, 2000, 145: 2297-2323
- 9 S. Shen, et al. Determination of the complete nucleotide sequence of a vaccine strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and identification of the Nsp2 gene with a unique insertion. *Arch Virol*, 2000, 145: 871-883
- 10 黄芳芳, 杨汉春等. PRRS 病毒 BJ-4 株全基因组序列测定与分析. *中国预防兽医学报*, 2000, S1: 172
- 11 S. Dea, et al. Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. *Arch Virol*, 2000, 145: 659-688
- 12 Meulenberg JJM, et al. Post-translational processing and identification of a neutralization domain of the GP4 protein encoded by ORF4 of Lelystad virus. *J Virol*, 1997, 71: 6061-6067
- 13 Wesley RD, et al. Differentiation of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine strain from North American field strains by restriction fragment length polymorphism analysis of ORF5. *J Vet Diagn Invest*, 1998, 10: 140-144
- 14 D. S. Cheon, C. Chae. Restriction fragment length polymorphism analysis of open reading frame 5 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in Korea. *Arch Virol*, 2000, 145: 1481-1488

Advancement in Heredity and Variation of the Genome of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV)

Gao Zhiqiang Guo Xin Yang Hanchun

(The College of Veterinary Medicine, China Agriculture University Beijing 100094)

Abstract The porcine reproductive and respiratory syndrome is an infectious disease that damages porcine herds seriously all over the world. The cause of disease is the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). The nucleotide sequence varied extensively and obviously between different isolates of PRRSV, so it is difficult to detect and control PRRSV effectively at present. The heredity and variation of the genome was reviewed in this paper. The 5'UTR, the Nsp2 of ORF1, ORF3 and ORF5 can endure more differences than others. It may be relates to the pathogenicity of the virus.

Key words Porcine reproductive and respiratory syndrome virus Genome Heredity and variation

随着国家经济建设向西部战略转移,对于黄土高原的治理,已不再是单纯控制水土流失为前提,特别对生态环境建设提出了更高的要求。1997年10月,科技部启动了“黄土高原中部丘陵区中尺度生态农业建设综合研究”国家攻关专题。其目的在于克服以往研究区域资源环境的单一性,产业布局的局限性,治理与开发的非均衡性,加快治理与建设之步伐。由过去片面追求短期效益,掠夺自然资源,转变为恢复优化生态环境,建设生态农业;由以小流域为基本单元的治理,转变为中尺度或以县域为单元全面规划、集中连片、综合治理;由单纯防护性治理,转变为以治理带开发,以开发促治理,治理与开发相互结合、互为依托。同时,对综合治理的规模、速度、效益等方面提出了更高的全新要求。

摘自《农业科技攻关动态》2000年合订本