

一株高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒变异毒株的基因组特征

杨小蓉, 荫硕焱, 潘 梦, 周 磊, 盖新娜, 陈艳红, 郭 鑫, 杨汉春*

(中国农业大学动物医学院 农业部动物流行病学与人兽共患病重点实验室, 北京 100193)

摘要: 为了监测我国近年来流行的高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)的变异情况, 采用 RT-PCR 分段扩增, 对 2009 年从山东发病猪场分离到的 1 株 PRRSV SD0901 的全基因组进行了序列测定和分析。结果表明, 不包括 Poly(A)尾, 该毒株的基因组全长为 15 320 nt; 与高致病性 PRRSV 毒株间的全基因组核苷酸相似性为 98.6%~98.7%; 该毒株基因组的 Nsp2 编码区除存在与高致病性毒株相同的 30 个氨基酸的不连续缺失外, 还存在 468 位的氨基酸缺失和在 585—586 位间插入 1 个氨基酸, 同时, 该毒株的结构蛋白 GP2、GP3、GP4 和 M 编码区分别存在 1 个氨基酸的突变。演化分析表明, 该毒株尽管与高致病性毒株属于同一亚群, 但形成一个独立的小分支。由此表明, 该毒株为高致病性 PRRSV 的变异毒株, 说明我国的高致病性 PRRSV 在流行过程中已出现变异。笔者的研究结果为监测和分析我国的高致病性 PRRSV 的变异与演化提供了有价值的基因组信息数据。

关键词: 高致病性繁殖与呼吸综合征病毒; 全基因组; 序列测定; 变异分析

中图分类号: S852.659.6

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)02-0263-07

Genomic Characterization of a Variant of Highly Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus

YANG Xiao-rong, YIN Shuo-yan, PAN Meng, ZHOU Lei, GE Xin-na, CHEN Yan-hong, GUO Xin, YANG Han-chun*

(Key Laboratory of Animal Epidemiology and Zoonosis of Ministry of Agriculture, College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: In order to monitor the variation of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory virus (PRRSV) prevailing in recent years, the complete genome of a strain of PRRSV SD0901 isolated from one pig farm with clinical outbreak of PRRS was sequenced and analyzed by RT-PCR amplification. The results showed that the genome size of the virus was 15 230 nucleotides, excluding the poly (A) tail. Comparative analysis of the whole genomic sequences revealed that the virus shared 98.6%–98.7% identity with the representative strains of highly pathogenic PRRSV, and exhibited additional one amino acid deletion and insertion at the position 468 and 585–586 respectively, besides 30-amino acid deletion within its Nsp2-coding region. In addition, one amino acid variation was found in GP2, GP3, GP4 and M-coding regions of its genome, respectively. Phylogenetic analysis showed that the virus formed an individual branch although it belonged to the same subgroup as highly pathogenic PRRSV strains. These findings indicate that the virus is a variant of highly pathogenic PRRSV, implying that the variation of highly pathogenic PRRSV have occurred during its prevailing. Our study provides valuable genomic data for monitoring and analyzing genetic variation and evolution of highly pathogenic PRRSV.

收稿日期: 2011-07-25

基金项目: 国家杰出青年基金项目(30825031); 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-36)

作者简介: 杨小蓉(1985-), 女, 四川崇州人, 硕士生, 主要从事兽医微生物学与免疫学研究, E-mail: yxr3816@163.com

* 通讯作者: 杨汉春, E-mail: yanghanchun1@cau.edu.cn

Key words: highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus; complete genome; sequencing; variation analysis

猪繁殖与呼吸综合征(Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS), 俗称“猪蓝耳病”, 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各阶段猪呼吸道疾病为特征的一种高度传染性疫病, 已成为危害全球养猪生产的重要经济性疫病之一^[1]。自我国 1995 年底暴发该病以来, PRRS 已成为困扰养猪生产的一大问题^[2], 尤其是 2006 年以基因组非结构蛋白 Nsp2 编码区不连续 30 个氨基酸缺失为特征的高致病性 PRRSV 的出现和广泛流行, 给我国养猪业造成了巨大的经济损失^[3-5]。而且, 已有的研究表明, 高致病性 PRRSV 已成为近年来引发我国 PRRS 疫情的优势流行毒株^[6]。

广泛的变异性和毒株的多样性是 PRRSV 显著的特征之一^[7], 成为控制猪繁殖与呼吸综合征所面临的难题。我国的高致病性 PRRSV 已流行数年, 该毒株在流行过程中是否发生变异值得关注。本研究对从山东地区发生猪繁殖与呼吸综合征的猪场分离到的 1 株 PRRSV 进行了全基因组序列测定, 比较分析了其基因组特征, 以期为高致病性 PRRSV 的变异监测和分子流行病学分析提供必要的科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒毒株 PRRSV SD0901 株, 由本实验室于 2009 年利用 MARC-145 细胞从山东地区发生 PRRS 猪场病猪的血清样本中分离, 第 5 代病毒的细胞培养物用于全基因组 cDNA 扩增和序列测定。

1.1.2 载体与菌株 克隆载体 pEASY-Blunt Cloning Vector、宿主菌 *E. coli* Trans 5 α , 均购自全式金公司。

1.1.3 主要试剂 Dulbecco's Modified Eagle Medium, 购自 Invitrogen 公司; Hyclone 胎牛血清, 购自赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司; RNA 提取试剂, 购自北京全式金生物技术有限公司; 反转录酶 MLV, 购自 Promega 公司; PrimeSTAR™ HS

DNA 聚合酶, 购自宝生物工程(大连)有限公司; DNA 快速纯化回收试剂盒, 购自北京全式金生物技术有限公司; 5' Full RACE Kit 和 3' Full RACE Kit, 均购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 病毒培养 将保存的 PRRSV SD0901 第 4 代毒接种于生长良好的单层 MARC-145 细胞, 37 ℃ 吸附 1 h 后, 弃去上清, 加入 5% DMEM 维持培养液, 置 37 ℃ 温箱培养 96 h, 收获病毒培养物, 冻融 3 次, -80 ℃ 保存。

1.2.2 病毒 RNA 提取 用 RNA 提取试剂, 按照说明书提取细胞总 RNA, 溶于 DEPC 水后, 置 -80 ℃ 保存备用。

1.2.3 引物设计 采用文献[8]报道的引物序列, 由 Invitrogen 公司合成 14 对相互重叠的特异性引物, 用于扩增 PRRSV SD0901 全基因组 cDNA 片段。基因组的 5' 端和 3' 端扩增分别采用 5' Full RACE kit 和 3' Full RACE kit。

1.2.4 基因组 cDNA 片段的 RT-PCR 扩增、克隆与测序 取 12 μL 制备好的 RNA 溶液作为模板, 加入各个扩增片段的下游引物(10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 2 μL 、dNTPs(10 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$) 1 μL 、RNase 抑制剂(40 U $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) 0.5 μL 、MLV 反转录酶(200 U $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) 0.5 μL 、5 \times Reaction Buffer 4 μL , 反应体系为 20 μL , 42 ℃ 反应 1 h, 反转录合成 cDNA, 作为 PCR 模板。建立 50 μL PCR 反应体系: 5 \times Buffer 10 μL , dNTP Mixture(2.5 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$) 5 μL , 上下游引物(10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 1 μL , DNA 聚合酶(2.5 U $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) 0.5 μL , cDNA 2 μL , 加双蒸水至 50 μL 。PCR 反应程序: 98 ℃ 预变性, 98 ℃ 变性 10 s, 53~58 ℃ 退火 15 s, 72 ℃ 延伸 1~2 min, 共 30 个循环。用 1% 琼脂凝胶电泳检查 PCR 扩增产物, 然后对 PCR 产物进行纯化回收, 按常规方法将 PCR 回收产物克隆于 pEASY-Blunt 载体上, 经鉴定后, 送北京擎科生物技术有限公司进行测序。

1.2.5 全基因组序列拼接与分析 应用 DNASTar、ClustalX、GeneDoc 等生物学软件进行毒株的全基因组序列拼接, 与 GenBank 收录的国内外参考毒株进行比对与分析。用于本研究分析的毒株见表 1。

表 1 用于本研究分析的 PRRSV 毒株

Table 1 PRRSV strains used in the present study

毒株 Strains	GenBank 收录号 GenBank No.	参考文献 References
VR-2332	U87392	Murtaugh et al [9]
CH-1a	AY032626	Tong et al [10]
HB-1(sh)/2002	AY150312	Gao et al [11]
HB-2 (sh)/2002	AY262352	Gao et al [11]
HB-1/3, 9	EU360130	Zhou et al [8]
JXA1	EF112445	Tian et al [3]
HUN4	EF635006	Zhou et al [5]
SY0608	EU144079	Li et al [4]
JXwn06	EF641008	Zhou et al [6]
NX06	EU097706	Zhou et al [6]
BJsy06	EU097707	Zhou et al [6]
JX143	EU708726	Lv et al [12]
HEB1	EF112447	Tian et al [3]
BJ-4	AF331831	杨汉春等 [13]
NVSL 97-7895	AY545985	Truong et al [14]
MN184A	DQ176019	Faaberg et al [15]
BJ0706	GQ351601	Zhou and Yang [2]

2 结果

2.1 PRRSV SD0901 全基因组各基因片段的扩增

应用设计的 14 对特异引物,对 PRRSV SD0901 株进行全基因组 RT-PCR 扩增,得到 14 个 cDNA 片段,大小与预期相符(图 1)。

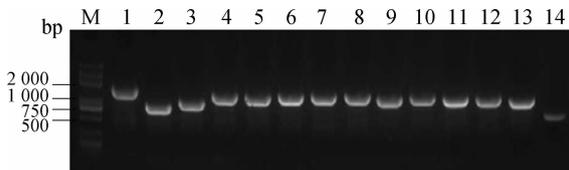


图 1 PRRSV SD0901 株全基因组 14 个片段的 RT-PCR 扩增

Fig. 1 Amplification of genomic fragments of PRRSV SD091 by RT-PCR

2.2 PRRSV SD0901 全基因组序列拼接与同源性比较

全基因组序列拼接结果表明,不包括 Poly (A),PRRSV SD0901 的基因组全长为 15 320 nt,

GenBank 收录号为 NJ256115。与 GenBank 收录的参考毒株相比,PRRSV SD0901 与高致病性 PRRSV 分离毒株高度同源,与 HuN4、JX143 和 SY0608 的全基因组核苷酸相似性为 98.7%,与 JXwn06、JXA1、NX06、BJsy06 和 HEB1 的全基因组核苷酸相似性为 98.6%。与北美洲型代表毒株 VR2332 和我国早期分离毒株 CH-1a、HB-1(sh)/2002 的全基因组相似性分别为 89.2%、94.6%和 96.5%。

2.3 5'端 UTR 序列分析

对 PRRSV SD0901 5'端非编码(UTR)的序列分析表明,该毒株的 5' UTR 为 189 nt,与高致病性毒株 JXwn06、HuN4、JXA1、NX06、SY0608、HEB1 和 BJsy06 序列完全相同,相似性为 100%,与高致病性毒株 JX143 的 5' UTR 相似性为 99.5%,差异在于 JX143 的 163 位碱基为 T,而 SD0901 和其他高致病性毒株为 C。

2.4 非结构蛋白基因序列及其推导的氨基酸变异分析

对 PRRSV SD0901 非结构蛋白编码区序列分

2.6 3'端 UTR 序列分析

PRRSV SD0901 3'端 UTR 大小为 150 nt,与高致病性毒株 JXA1、HuN4、JXwn06、NX06、

BJsy06、JX143、SY0608 和 HEB1 的核苷酸相似性介于 94.05%~99.3%,仅存在个别碱基的点突变(图 3)。

NX06	TGGGCTGGCATTCTTTGGCACCTCAGTGTAGAAATGGGAGAATGTGTGGTGAATGGCACTGATTGACACTGTGCCCTCTAAGTCACCT
HEB1G.....
JXA1
JX143
HuN4
SY0608T.....
BJsy06T.....
JXwn06T.....C.....C.....T.....
SD0901G.....T.....

NX06	ATTCAATTAGGGCGACCGTGTGGGGTAAAGTTTAATTGGCGAGAACCATGCGGCCGTAATT
HEB1
JXA1
JX143
HuN4
SY0608
BJsy06
JXwn06G.G.....G.....
SD0901

- 表示保守的碱基
- , Conserved nucleotide

图 3 PRRSV SD0901 3'UTR 与其他高致病性毒株的序列比对

Fig. 3 Alignment of the 3'UTR of PRRSV SD0901 with other highly pathogenic PRRSV strains

2.7 PRRSV SD0901 的演化分析

基于 PRRSV SD0901 和 GenBank 中的代表性毒株的非结构蛋白 Nsp2 基因推导编码的氨基酸序列,绘制进化树(图 4)。结果表明,虽然 SD0901 与高致病性毒株 JXA1、HuN4、JXwn06、NX06、BJsy06、JX143、SY0608 和 HEB1 属于同一个亚群(图 4),但形成一个独立的小分支。

3 讨论

PRRSV 的基因组全长约 15 kb,含有 9 个开放阅读框(ORFs)—ORF1a、ORF1b 和 ORFs 2(2a 和 2b)~7,以及 5'和 3'非编码区(UTR)。ORF1a 和 ORF1b 占病毒基因组的 80%,编码病毒的非结构蛋白,参与基因组的转录和复制,而 ORF2a、ORF2b 和 ORFs 3~7 分别编码病毒的结构蛋白 GP2、E、GP3、GP4、GP5、M 和 N。变异是 PRRSV 的最大特征,已有的研究表明,PRRSV 的非结构蛋白 Nsp2 编码区、编码结构蛋白 GP5 和 GP3 的 ORF5、ORF3 是基因组的易变区域,特别是 Nsp2 编码区、ORF5 基因的变异反映出 PRRSV 毒株的多样性^[6, 16-21]。PRRSV 的易变性、遗传多样性和致病性差异给该病的防控增加了难度^[2, 22]。

2006 年我国高致病性 PRRSV 的出现和流行,引起广泛关注。已有的研究揭示了高致病性 PRRSV 是近几年来我国的优势流行毒株^[6],也是引发疫情的主要毒株。因此,高致病性 PRRSV 变异的监测对于该病的防控具有重要的科学指导意义。在本研究中,作者对从山东发生 PRRS 疫情的猪场分离到的 1 株 PRRSV 毒株——SD0901 进行了全基因组序列测定。分析结果表明,在全基因组核苷酸水平上该毒株与我国已报道的高致病性毒株

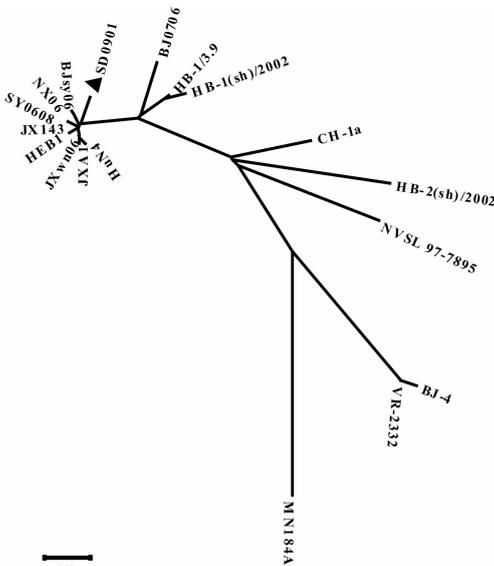


图 4 基于 Nsp2 基因推导编码的氨基酸序列绘制的进化树

Fig. 4 Phylogenetic analysis of PRRSV SD0901 based on the deduced amino acid sequence of Nsp2-coding region

高度同源,相似性为 98.6%~98.7%,结合猪场的临床发病情况,属于高致病性毒株。与高致病性毒株 JXA1、HuN4、JXwn06、BJsy06、NX06、JX143、SY0608 和 HEB1 相比,SD0901 特征性的变异在于非结构蛋白 Nsp2 编码区,该毒株除了存在与高致病性毒株相同的 481 位和 533—561 位的 30 个氨基酸的缺失外,还分别在 468 位存在 1 个氨基酸(异亮氨酸)的缺失和 585—586 位间插入 1 个氨基酸(脯氨酸)。此外,作者从 SD0901 结构蛋白编码区推导的氨基酸序列比对分析发现,在其 GP2、GP3、GP4 和 M 编码区分别存在 1 个氨基酸的突变,与包括 JXA1、HuN4、JXwn06、BJsy06、NX06、JX143、SY0608 和 HEB1 在内的高致病性毒株不同。基于 Nsp2 编码区推导的氨基酸序列的演化分析,提示 PRRSV SD0901 尽管与高致病性毒株同属一个亚群,但已形成一个独立的小分支。因此,可以认为 PRRSV SD0901 是一株高致病性毒株的变异毒株。由此说明我国高致病性 PRRSV 毒株在流行过程中会发生变异,无疑将增加毒株的多样性。

我国高致病性 PRRSV 的分子致病机制是目前重要的研究课题,虽然从前期利用反向遗传操作技术的研究已证实,高致病性毒株 Nsp2 编码区 30 个氨基酸的缺失与其毒力无关^[8],但确切的致病机制仍有待阐明。本研究中,SD0901 在 Nsp2 编码区的额外的缺失和插入,以及在结构蛋白 GP2、GP3、GP4 和 M 的氨基酸的突变,有何生物学意义以及与毒株的致病性和毒力的关系,很值得深入研究和分析。

参考文献:

- [1] NEUMANN E J, KLIEBENSTEIN J B, JOHNSON C D, et al. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States [J]. *J Am Vet Med Assoc*, 2005, 227 (3): 385-392.
- [2] ZHOU L, YANG H C. Porcine reproductive and respiratory syndrome in China [J]. *Virus Res*, 2010, 154 (1-2): 31-37.
- [3] TIAN K G, YU X, ZHAO T, 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: e526.
- [4] LI Y, WANG X, BO K, et al. Emergence of a highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the Mid-Eastern region of China [J]. *Vet J*, 2007, 174(3): 577-584.
- [5] ZHOU Y J, HAO X F, TIAN Z J, et al. Highly virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus emerged in China [J]. *Trans Emerg Dis*, 2008, 55: 152-164.
- [6] ZHOU L, CHEN S X, ZHANG J L, et al. Molecular variation analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in China [J]. *Virus Res*, 2009, 145 (1): 97-105.
- [7] MENG X J. Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: Implication for current vaccine efficacy and future vaccine development [J]. *Vet Microbial*, 2000, 74: 309-329.
- [8] ZHOU L, ZHANG J L, ZENG J W, et al. The 30-amino-acid deletion in the Nsp2 of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus emerging in China is not related to its virulence [J]. *J Virol*, 2009, 83 (10): 5156-5167.
- [9] MURTAUGH M P, ELAM M R, KAKACH L T. Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus [J]. *Arch Virol*, 1995, 140(8): 1451-1460.
- [10] TONG G Z, QIU H J, ZHOU Y J, et al. Molecular analysis of genes encoding for the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain CH-1a [J]. *Sci Sinica*, 2000, 10: 147-153.
- [11] GAO Z Q, GUO X, YANG H C. Genomic characterization of two Chinese isolates of porcine respiratory and reproductive syndrome virus [J]. *Arch Virol*, 2004, 149 (7): 1341-1351.
- [12] LV J, ZHANG J, SUN Z, et al. An infectious cDNA clone of a highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus variant associated with porcine high fever syndrome [J]. *J Gen Virol*, 2008, 89 (PT 9): 2075-2079.
- [13] 杨汉春, 黄芳芳, 郭鑫, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)BJ-4 株全基因组序列测定与分析 [J]. *农业生物技术学报*, 2001, 9: 212-218.
- [14] TRUONG H M, LU Z, KUTISH G F, et al. A highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus generated from an infectious cDNA clone retains the in vivo virulence and transmissibility properties of the parental virus [J]. *Virology*, 2004, 325 (2): 308-319.

- [15] FAABERG K S, HAN J, WANG Y. Molecular dissection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus putative nonstructural protein 2 [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2006, 581: 73-77.
- [16] MENG X J, PAUL P S., HALBUR P G, et al. Sequence comparison of open reading frames 2 to 5 of low and high virulence United States isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *J Gen Virol*, 1995, 76: 3181-3188.
- [17] AN T Q, ZHOU Y J, LIU G Q, et al. Genetic diversity and phylogenetic analysis of glycoprotein 5 of PRRSV isolates in mainland China from 1996 to 2006: coexistence of two NA-subgenotypes with great diversity [J]. *Vet Microbiol*, 2007, 123: 43-52.
- [18] FANG Y, SCHNEIDER P, ZHANG W P, et al. Diversity and evolution of a newly emerged North American Type 1 porcine arterivirus: analysis of isolates collected between 1999 and 2004 [J]. *Arch Virol*, 2007, 152: 1009-1017.
- [19] LI B, FANG L, XU Z, et al. Recombination in vaccine and circulating strains of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses [J]. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15: 2032-2035.
- [20] 高志强, 郭鑫, 杨汉春, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒缺失变异株的基因组特征 [J]. *畜牧兽医学报*, 2005, 36(6): 578-584.
- [21] ZHOU Y J, YU H, TIAN Z J, et al. Genetic diversity of the ORF5 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in China from 2006 to 2008 [J]. *Virus Res*, 2009, 144: 136-144.
- [22] LUNNEY J K, BENFIELD D A, ROWLAND R R. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: an update on an emerging and re-emerging viral disease of swine [J]. *Virus Res*, 2010, 154(1-2): 1-6.

(编辑 白永平)