

猪繁殖与呼吸综合征病毒 TP 株 P4、P60、P90 基因组遗传变异分析及动物致病力试验

招丽婵, 苏润环, 邓雨修, 王东东, 杨明柳, 李春梅, 罗小飞, 宋延华*

(广东温氏食品集团有限公司研究院, 新兴 527400)

摘要: 本研究旨在对猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) TP 株 P4、P60、P90 三个代次毒株进行全基因组序列测定, 分析其遗传变异特性。通过分段 RT-PCR、5' RACE 和 3' RACE 法扩增病毒基因组, 并运用生物信息学软件和动物致病力试验进行相关分析。结果表明: TP 株 P4、P60、P90 株基因组全长分别为 15 346、15 394 和 15 393 bp。3 个代次病毒的基因组序列中 ORF1a 基因和 3'-UTR 区域变异较大, 尤以 Poly(A) 尾序列碱基数差异显著, 分别为 26、74 和 73 bp。3 个代次毒株基因组序列比对发现 TP P90 与 TP P4 差异较大, 共有 58 个核苷酸位点和 27 个氨基酸位点发生突变, P90 GP5 蛋白抗原指数和表面亲和力与 TP P4 和 TP P60 相比呈增加趋势, 动物致病力试验表明 TP P4 毒株致病力较 TP P60 和 TP P90 强。结果提示: TP P4、P60、P90 3 个代次毒株基因组序列存在着一定的差异, 主要集中在 4~60 代致弱阶段, 遗传进化关系上该病毒分属于 PRRSV 美洲株分支, 并与高致病性 PRRSV JXA1 株亲缘关系最为接近, 相似性高达 99.5%、99.2% 和 99.3%。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合征病毒; 基因组; 序列测定; 遗传变异分析; 动物致病力

中图分类号: S852.659.6

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)06-0717-09

Genetic Variation Analysis and Animal Pathogenicity Test for PRRSV TP Strain P4, P60, P90 Genome

ZHAO Li-chan, SU Run-huan, DENG Yu-xiu, WANG Dong-dong,

YANG Ming-liu, LI Chun-mei, LUO Xiao-fei, SONG Yan-hua*

(Guangdong Wen's Foodstuffs Group Co. LTD, Guangdong Wen's Group Academy, Xinxing 527400, China)

Abstract: The aim of this experiment was to study the genetic variability of the three different generations of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) TP strain, P4, P60, P90. RT-PCR, 5' RACE and 3' RACE were employed to amplify the virus genome of the three generations of PRRSV TP strain, and the genomic analyses were conducted using some bioinformatics software including the clustalx and DNASTar, and the animal pathogenicity test. The sequences of the TP strain P4, P60, P90 were 15 346, 15 394 and 15 393 bp, respectively. The variations of the ORF1a gene and 3'-UTR were obvious in these three generations genome sequences, especially the poly(A) tails in the 3'-UTR region, they were 26, 74 and 73 bp, respectively. Comparing the genome sequences of TP P90 strain with TP P4 strain, there found 58 nucleotide mutations that resulted in 27 amino acid changes. The antigenic index and surface probability of GP5 protein of TP P90 strain were increasing than P4 and P60. Moreover, the virulence test indicated that the pathogenicity of TP P4 is stronger than the TP P60, P90 strain. The re-

收稿日期: 2009-09-14

基金项目: 广东省农业攻关项目(2008A020100020)

作者简介: 招丽婵(1982-), 女, 广东佛山人, 硕士, 主要从事动物传染病防制研究, E-mail: zlc0425@163.com, Tel: 0766-2986213。苏润环对本文研究工作作出相同贡献, 并列为一作者

* 通讯作者: 宋延华, E-mail: yanhua_song@163.com

sults showed that the genome sequences of the three different generations has some variations, especially between passage 4 and 60. The PRRSV TP P4, P60, P90 all belong to the PRRSV America strain branch, and display the highest nucleotide identity to the high pathogenic PRRSV JXA1 strain, 99.5%, 99.2% and 99.3%, respectively.

Key words: porcine reproductive and respiratory syndrome virus; genome; sequencing; genetic variation analysis; animal pathogenicity

猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine productive and respiratory syndrome virus, PRRSV)属于动脉炎病毒属,其基因组为单股正链 RNA,全长约 15 kb,含有 9 个开放阅读框(ORFs),是目前危害世界养猪业的重要病原之一,可引起母猪妊娠后期的早产、流产、产弱胎、死胎、木乃伊胎及仔猪肺炎、免疫力下降等,造成严重的经济损失^[1-4]。PRRSV 基因组高度易变,其非结构蛋白编码区域 ORF1a、ORF1b 和 ORF2 是整个基因组的高度变异区域,根据病毒基因组的差异,可将 PRRSV 分为 2 个基因型:欧洲株(Leystad 株为代表株)和美洲株(ATCC VR-2332 株为代表株),两者氨基酸相似性仅为 78%~81%^[5-6]。

不同国家和地区分离的病毒毒株其致病性和病毒基因组间存在差异,目前已出现多种基因亚型。从美国中西部分离的 10 株 PRRSV 的 ORF2~ORF7 序列的核苷酸同源性在 92%~97.5%^[7-12]。在细胞传代致弱过程中,不同代次 PRRSV 间的毒力、基因序列和抗原性等方面都存在着较大的差异。吴国军等^[13]研究发现 PRRSV CH-1R 株致弱过程中 ORF5 基因发生了多位点的核苷酸与氨基酸变异。Han 等^[14]对 2006 年分离自我国江西的 JXA1 株 12 个不同致弱代次的病毒基因组进行了深入分析,发现该毒株在致弱过程中基因组均发生了不同程度的变化,致弱到第 70、80 代次时在 13 782—13 793 位核苷酸出现了 12 个碱基片段的插入。

本研究对自广东某地区分离并鉴定的高致病性 PRRSV TP 株通过 Marc-145 细胞传代致弱,利用 RT-PCR 方法和 RACE 技术分别对 TP 株 P4、P60、P90 进行全基因组序列测定、毒力位点、抗原指数分析和动物致病力试验,分析 TP 株致弱过程中的遗传变异情况,旨在进一步丰富中国的 PRRSV 基因序列数据库,寻求病毒的变异机制,为 PRRSV 的分子诊断与预防、基因工程疫苗的研制提供参考数据。

1 材料与方法

1.1 材料来源

Marc-145 细胞由作者实验室保存;高致病性 PRRSV TP 株 P4、P60、P90 分别为作者实验室 TP 株在 Marc-145 细胞连续传至第 4、60、90 代所获得的毒株;pMD18-T Vector、TOP10 菌株、PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase、PrimeScript[™] Reverse Transcriptase(RNase H-),5'-Full Race Kit、3'-Full Race Core Set Ver. 2.0、DNA Marker DL15000 均为宝生物工程(大连)有限公司产品、TRIzol Reagent 为 Invitrogen 公司产品。

1.2 引物

参照 GenBank 中 PRRSV JXA1、VR-2332 的基因序列,设计 12 对扩增基因组内部片段的引物、3 条扩增病毒基因组 5'UTR 的引物和 1 条扩增基因组 3'UTR 的引物(表 1)。

1.3 病毒 RNA 提取

参照 TRIzol 试剂盒说明书提取 P4、P60、P90 病毒 RNA。

1.4 RT-PCR

运用表 1 引物,按照 TaKaRa 公司两步法 RT-PCR 试剂说明配制反应体系,其中反应参数:42 °C 反转录 45 min,95 °C 灭活反转录酶 5 min,获得 cDNA 后 94 °C 2 min;94 °C 变性 30 s,55~59 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 2 min,循环扩增 30 次;72 °C 延伸 10 min 结束反应。内部片段的扩增分别参照 PrimeScript[™] Reverse Transcriptase (RNase H-) 和 PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase 说明书进行,5'UTR 和 3'UTR 的扩增参照 5'-Full Race Kit 和 3'-Full Race Core Set Ver. 2.0 说明书进行。同时设立 Ingelvac PRRS MLV、未感染病毒的 Marc-145 细胞培养液为阴性对照。

1.5 PCR 产物目的片段的克隆测序

PCR 产物经回收、纯化、克隆、转化和鉴定后,阳性样品送大连宝生物公司进行序列测定。

表 1 PRRSV 全基因组分段扩增引物

Table 1 Primers for PCR amplification of the complete genome of PRRSV

扩增片段 Amplified fragment	扩增位置 Amplified position	引物序列 Primer sequences
1	44—1 330	5'-CAGGAGCTGTGACCATTGGC-3' 3'-CACCGTACCACCTRTTGACTGC-5'
2	1 261—4 600	5'-AGGGTTGAGYCYAAYACGTC-3' 3'-CTGAGYGACCACAGTYCTAG-5'
3	4 548—5 896	5'-CGRAGYCCCATTGAGCAACC-3' 3'-TTCRACGCCAGAGGATGTYAG-5'
4	5 750—7 000	5'-GATTGCCCGAATTGGCAAGG-3' 3'-TGCCACGGTATCRGCAAAAG-5'
5	6 885—7 595	5'-GAGGAATGCAGCGGGYCAAT-3' 3'-TCGCCGTGACGTTTCATCAT-5'
6	7 524—8 500	5'-TCCCCGYCAACCCYGAGAAT-3' 3'-TAGGCCTGACTGCCYTAACAG-5'
7	8 360—9 623	5'-TAGGCCTGACTGCCYTAACAG-3' 3'-CCCGCACAYTCTSGACTTCT-5'
8	9 460—10 726	5'-CTCATGGACAGCTGTGCTTG-3' 3'-GCCTGTGTGGGTCATACAC-5'
9	10 452—11 400	5'-GGRCAGAATATCTGTGATGCCA-3' 5'-GACYACCGCAACTGATTCCCTT-3'
10	11 300—12 453	5'-AGTCCCTCCCACAYGCTTCAT-3' 3'-GCCTCGCTCACCACCTGTTTC-5'
11	12 254—13 344	5'-TGCGCGCYCTRCCRTTAC-3' 3'-CCGAAAGACTCGAACTGAAAC-5'
12	13 427—14 330	5'-GYCCYTTCTTTTCTCBTGTT-3' 3'-CGGAACCATCAAGCACAAC-5'
13	N 端-251-271	5'-ATCGTGTGCAGTAGACTGGC-3'
14	5'RACE Inner Primer C 端-14 243 3'RACE Outer Primer	5'-CGCGGATCCACAGCCTACTGATCAGTCGTAT-3' 5'-CTATCGTTGGCGGTGCGCYGTCA-3' 5'-TACCGTCTGTTCCACTAGTGATTT-3'

Y、R、B 为简并碱基代码,其中 Y 代表 C 和 T, R 代表 A 和 G, B 代表 G、T 和 C

Y, R, B is the code of degenerate bases. Y stands for C and T, R stands for A and G, B stands for G, C and T

1.6 全基因序列拼接比对及抗原性差异分析

利用 DNASTar、DNAMAN 等生物信息学软件对 TP P4、P60、P90 3 个代次的病毒基因组分段完成测序和拼接,获得全基因组序列并登录 GenBank,并与 GenBank 收录的 17 株 PRRSV 全基因序列进行比较分析,绘制全基因系统进化树。同时选取 TP P4、P60、P90 3 个代次毒株的 ORF2、ORF5 和 ORF7,利用 DNASTar 软件的 Protean 程序推断氨基酸序列柔韧性、亲水性、抗原性和表面活性指数。

1.7 不同传代毒株猪体回归试验

选取 PRRSV 抗原、抗体检测均为阴性的散养户 35 日龄仔猪为试验猪,随机分成 4 组,每组 8 头猪,分别为 P4、P60、P90 试验组和空白对照组。TP 株 P4、P60、P90 病毒每组接种 10^6 TCID₅₀ · mL⁻¹ 各 2 mL;空白对照组 8 头猪接种正常细胞液。注射方式均为颈部肌肉注射,1 mL · 头⁻¹,滴鼻 1 mL。各组均设置 2 头猪同居混合饲养,作为同居感染观察。

预饲 1 周后,于免疫前 3 天、后 5 天连续测量各组猪的体温,免疫后 1 周开始采血,每周 1 次,直到免疫后第 28 天,PCR 检测病毒血症及抗体水平,免疫后每天观察猪只的精神状况、采食量等临床症状。及时剖解死亡猪,剩余猪于接种病毒后 14 d 解剖,分别观察肺脏、淋巴结、肾脏、脾脏、扁桃体、大脑、胃和肠道等处的病理变化,采样,记录结果,并根据肺部及各器官病变程度进行综合评分,具体操作参照文献[15-16]进行。

2 结果

2.1 病毒基因组各片段的克隆与鉴定

利用 RT-PCR 和 RACE 法分别扩增出了含 PRRSV TP 毒株 P4、P60、P90 代全基因组的 14 个 cDNA 片段,琼脂糖凝胶电泳鉴定显示扩增条带大小与预期片段大小基本一致(电泳图谱略)。

2.2 全基因组序列拼接及系统进化分析

通过对 PRRSV TP P4、P60、P90 株全基因组进行分段 RT-PCR 扩增和 RACE 法扩增测序,利用基因之间的重叠部分进行拼接,最终获得 PRRSV TP 毒株 P4、P60、P90 代次的基因组全序列 (TP P4、P60、P90 株 GenBank 登录号分别为 EU864233、GU232736、GU232737)。测序结果显示 TP P4、P60、P90 株全基因组序列组成一致,但长度不尽相同,全基因全长分别为 15 346、15 394 和 15 393 bp,包含 9 个 ORF。

全基因组核苷酸序列进化树 (图 1) 表明,PRRSV 可分为两大主群,分别为以 Lelystad virus

和 LV4.2.1 为代表的欧洲株和以 VR-2332 和 RespPRRS MLV 为代表的美洲株。其中美洲株根据遗传背景差异,可进一步分为 2 个遗传背景差异较大的亚群:JXA1 株、TJ 株为代表的 2006 年以后新分离的 PRRSV 毒株归属于亚群 1,亚群 2 则以 S1、BJ-4 和 CC-1 为代表,并与 VR-2332 及 RespPRRS MLV、韩国分离株 LMY 和新加坡分离株 SP 类聚于同一分支。TP P4、P60、P90 株隶属于国内分离的高致病性 PRRSV 变异毒株簇群,尤其与 JXA1 株亲缘关系最为接近,相似性分别高达 99.5%、99.2% 和 99.3%,与 TJ、HEB1 株的相似性次之。

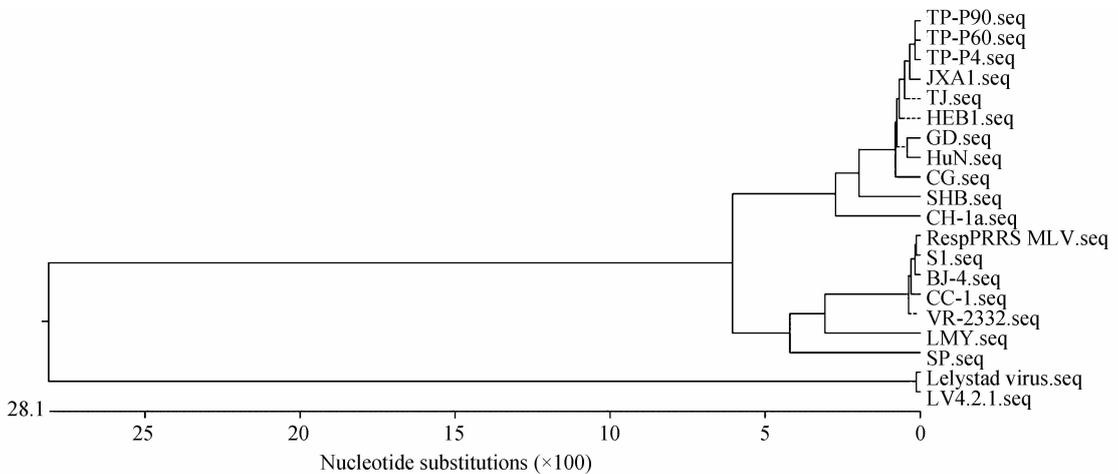


图 1 不同代次 PRRSV TP 株与其它参考毒株的全基因组序列系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of the complete genome of different generations of TP strain and other published PRRSV isolates

2.3 不同代次病毒全基因组遗传变异分析

2.3.1 基因组两端非编码区核苷酸序列分析

5'UTR 位于 ORF1a 起始密码子上游,TP P4、P60 和 P90 株 5'UTR 均为 189 bp,其核苷酸高度保守,均未发生变异。TP P4 与 VR-2332、RespPRRS MLV 及 BJ-4 相比,起始位置缺失 1 个 T,与 CH-1a、LV、LMY 和 SP 等一致。此外,TP P4、P60、P90 毒株均在 5'UTR 编码区的 3'端含有 6 bp 高度保守的 TTAACC 转录调控序列 (TRS)。

TP 株不同代次 3'UTR 编码区核苷酸序列长度则差异较大,TP P4 为 176 bp,而经传代致弱后 P60、P90 毒株的 3'UTR 增加至 224 和 223 bp。其中 Poly(A) 尾分别由 P4 代的 24 aa 增加至 74 和 73 aa。与其它参考毒株相比,不同毒株间 Poly(A) 尾差异显著,其中 BJ-4 株 Poly(A) 尾达 94 aa,而 RespPRRS MLV 株、S1 株和 SP 株则不存在 Poly(A)

尾。比较发现 TP P60、P90 株与 TP P4 株在 3'UTR 编码区同时存在 2 处核苷酸突变,第 6 位碱基均由 C 突变为 T,第 118 位碱基由 A 突变为 G。与此同时,Poly(A) 尾上游的八核苷酸病毒复制酶识别结合基序 5'-CCGAAATT-3' (图 2) 在 TP P4、P60 和 P90 3 个代次毒株中均未发生改变,高度保守,与选取的 PRRSV 参考毒株相比较,该序列也表现出高度的保守性,参考毒株中仅有 CC-1 株发生 1 个碱基的改变。

2.3.2 ORF1a 与 ORF1b 接合区的滑动序列分析

TP P4、P60、P90 株的 ORF1a-ORF1b 接合区滑动序列位置相同,均位于 7 599—7 605 位核苷酸。序列分析结果显示,这一区域的序列在各 PRRSV 分离株间高度保守,均含有相同的滑动序列:5'-TTTAAAC-3',与之相隔 3 个碱基后是 ORF1a 的终止密码子。



图 2 3'UTR 核苷酸序列比较

Fig.2 Alignment of nucleotide sequence of the virus 3' UTR

2.4 各开放阅读框序列比较差异分析

将 PRRSV TP 株 3 个不同代次的病毒基因组各 ORF 编码区核苷酸及氨基酸序列进行比较,发现致弱不同代次的毒株中各 ORF 间核苷酸、氨基酸的变化差异较大。

TP P90 与 TP P4 相比,共有 58 个核苷酸位点发生了变异,其中 27 个为有义突变,变异位点主要集中在非结构蛋白基因 ORF1a、ORF1b 和 ORF2 编码区,结构蛋白编码区变异较少。TP P60 与 TP P4 相比,分别有 41 处核苷酸位点和 20 个氨基酸位点发生改变。而 TP P60 和 TP P90 间核苷酸和氨基酸差异则相对较少,分别为 39 和 18 个。

此外,对国内外参考毒株的 Nsp2 序列比对发现,这 3 个代次毒株与 VR-2332、LMY、RespPRRS MLV、SP 以及国内分离的 BJ-4、CC-1、S1、CH-1a 株的差异较大,序列中间存在高变区,氨基酸同源性为 31.3%~88.2%。TP P90 与 TP P4 株的 ORF1a 推导的氨基酸序列比较,共发生了 12 处变异,其中 8 处变异位于 Nsp2 蛋白,1 处位于 Nsp3

表 2 毒力相关氨基酸的推测与变异分析

Table 2 Comparison of predicted amino acids mutations involved in pathogenesis

毒株	ORF1a	ORF1a	ORF1a	ORF1b	ORF2	ORF3	ORF5	ORF5	ORF6
Strain	331	668	952	952	10	83	13	151	16
RespPRRS MLV	F	F	K	H	L10	E	Q	G	E
VR-2332	S	S	E	Y	L10	G	R	R	Q
LV 4.2.1	S(337)	S	-	F(951)	-	E	W	R(153)	Q(15)
LMY	S	F	E	Y	L10	G	Q	R	Q
SP	S	S	E	Y	L10	E	R	R	Q
CH-1a	S	S	E	H	L10	G	R	R	Q
JXA1	S	K(638)	E(922)	Y(949)	L10	S	R	R	Q
TP P4	S	K(638)	E(922)	Y(949)	L10	S	R	R	Q
TP P60	S	K(638)	E(922)	Y(949)	F10	S	R	R	Q
TP P90	S	K(638)	E(922)	Y(949)	F10	S	R	R	Q

2.6 不同代次毒株氨基酸序列与抗原性差异分析

根据 ORF2 基因的高度变异特性和潜在毒力

蛋白,1 处位于 Nsp4 蛋白,1 处位于 Nsp7 蛋白。

比较 TP P4、P60、P90 3 个代次毒株结构蛋白核苷酸及氨基酸序列发现,编码各结构蛋白的基因中糖蛋白 GP2、GP3、GP4 和囊膜蛋白 GP5 变异较大,而 M 蛋白和 N 蛋白则较为保守。其中,3 个代次毒株的 ORF5 氨基酸序列与欧洲分离株 Lelystad virus 和 LV4.2.1 株差异较大,其同源性仅为 58.7%,与 VR-2332、LMY、RespPRRS MLV、SP、BJ-4、CC-1、S1 的同源性介于 85%~87.5%,而与国内 2006 年后分离的 GD、HEB1、TJ 等 PRRSV 变异株同源性则高达 99%。

2.5 毒力相关氨基酸的推测与变异分析

Allende 等通过对 VR2332、MLV RespPRRS/Repro 及强毒株 16244B 进行序列比较发现有 9 个氨基酸的突变可能与 PRRSV 的毒力相关,其中 4 个位于非结构蛋白,5 个位于结构蛋白^[17]。作者对 TP P4、P60、P90 3 个代次毒株的及部分国内外分离株的这 9 个氨基酸位点进行了比较分析,结果见表 2。

位点突变结果,进一步的氨基酸序列比对发现,TP P4、P60、P90 3 个代次毒株 ORF2 基因共发生了 5

处氨基酸位点的改变,分别为亮氨酸突变为苯丙氨酸(L10→F10),酪氨酸变为苯丙氨酸(Y50→F50),异亮氨酸变为缬氨酸(I118→V118),缬氨酸变为异亮氨酸(V221→I221),苏氨酸变为异亮氨酸(T250→I250)。有趣的是,以上氨基酸位点的变化,均以第60代分为分界点,第60代和第90代相应的位点变化趋于一致。根据抗原指数和对应的亲水性、柔韧性能(图3),可以看出P4与P60、P90在192—204 aa和239—250 aa存在明显差异,抗原性有减弱的趋势;而柔韧性、亲水性和表面活性则基本一致。

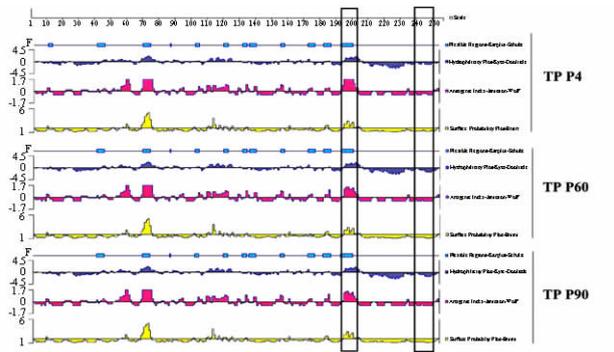


图3 TP P4、P60、P90 3个代次毒株 ORF2 基因抗原性比较
Fig. 3 Antigenicity comparison of PRRSV ORF2 gene among TP P4, P60 and P90

2.7 不同传代毒株猪体回归试验

感染 PRRSV TP P4 株试验组猪接种后 24 h 即出现病态,主要表现为体温升高快且明显,接种后第 2 天体温升至 40 °C 以上,并逐渐出现食欲减退、精神沉郁、全身皮肤发红、眼结膜发红肿胀、神经症状等临床表现。解剖见全身淋巴结肿胀,肺呈实质性病变,病变面积占整个肺部的 40%~70%。PRRSV TP P60 和 P90 试验组猪只精神状况良好,

表 3 病毒猪体回归试验检测结果

Table 3 Results of the animal regression experiment

组别 Groups	临床症状 Clinical symptom		发病率 Morbidity ^b
	症状 Symptom ^a	死亡 Death	
TP P4	+++	2/8	8/8
TP P60	+	0/8	1/8
TP P90	+	0/8	0/8
正常细胞液 Marc-145	-	-	0/8

a. 临床:“-”无明显临床异常表现;“+”除体温升高外,出现 1~5 d 食欲下降;“++”除体温升高外,出现 5~10 d 食欲下降,有呼吸道症状,眼结膜炎;“+++”除体温升高外,出现 11 d 后食欲下降,明显呼吸道症状,眼结膜炎,后肢无力,耳发紫。b. 发病率:分母为每组总试验猪头数,分子为每组发病和死亡猪数

a. Clinical symptom:“-” means no unusually clinical behavior;“+” means besides body temperature rising, appearing 1-5 days appetite drops;“++” means besides body temperature rising, appearing 5-10 days appetite drops, respiratory tracts symptom, eyes conjunctivitis;“+++” means besides body temperature rising, appearing 11 days appetite drops, respiratory tracts symptom, eyes conjunctivitis, unable hind leg, ear blue. b. Morbidity: the denominator is the count of test pigs, the numerator is the numbers of illness and dead pigs for every group

而对 ORF5 主要抗原基因氨基酸序列的比对则发现,TP P4、P60、P90 3 个代次毒株的 ORF5 基因氨基酸序列有很大相似性,仅仅存在 134 和 173 位氨基酸位点的差异。抗原指数图谱(图 4)显示, P4、P60 与 P90 在 127—144 aa 和 P4 与 P60、P90 的 171—183 aa 差异明显,抗原性和表面活性呈现增强的趋势;而柔韧性和亲水性则基本一致。编码 N 蛋白的 ORF7 基因高度保守,在核苷酸和氨基酸上均未因毒株在细胞的传代致弱发生任何改变。

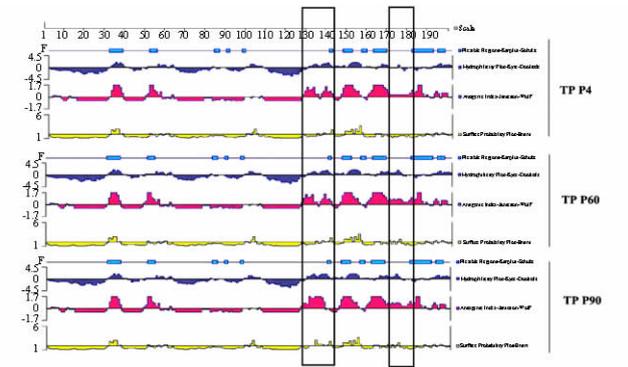


图4 TP P4、P60、P90 3个代次毒株 ORF5 基因抗原性比较
Fig. 4 Antigenicity comparison of PRRSV ORF5 gene among TP P4, P60 and P90

仅见个别猪出现轻微的体温升高和采食量下降,但持续时间较短,接种后 1~2 d 恢复正常,解剖见轻微的组织器官病理变化。正常细胞液对照组体温均正常,无明显的临床症状和不良反应,详见表 3。接种后 7~28 d 采血,其中 TP P4 组病毒血症最为严重,TP P4 和 P60 同居猪均有病毒血症出现,而正常细胞液对照组则均为阴性,详见表 4。

表 4 攻毒后病毒血症变化情况

Table 4 Development of viremia in challenged animals

组别 Groups	攻毒后时间/d Days post-challenge(DPC)				
	0	7	14	21	28
TP P4	0/8	8/8	8/8	6/8	0/8
TP P60	0/8	2/8	6/8	4/8	0/8
TP P90	0/8	6/8	4/8	0/8	0/8
正常细胞液 Marc-145	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8

3 讨论

PRRSV TP 毒株系通过 Marc-145 细胞分离培养,并经连续噬斑纯化而获得,后经体外细胞连续传代致弱,获得不同代次的病毒。本研究选取传代致弱过程中 3 个不同代次的病毒液,利用高保真 DNA 聚合酶以及 RT-PCR 和 RACE 方法扩增了 PRRSV TP 株 P4、P60、P90 全基因序列并登录至 GenBank,并对该基因序列进行了抗原指数分析的潜在毒力位点突变推测,在分子水平上深入分析了不同代次病毒基因组的遗传变异特征,一定程度上丰富了病毒资源库。

PRRSV 各分离株间基因组存在广泛的变异。目前,国内外已经完成多株 PRRSV 的全基因组序列测定。本研究对 PRRSV TP 毒株 P4、P60、P90 代序列比较结果表明,PRRSV 的变异分布于整个基因组,核苷酸位点的变异主要存在于 4~60 代的致弱传代阶段,并以编码非结构蛋白的 ORF1a 和 Poly(A)尾的长度差异最为显著。刘光清等^[12]报道 Poly(A)尾的上游具有一个高度保守的 8 核苷酸序列 5'-CCGAAATT-3',该保守基序在病毒的复制过程中可能作为复制酶识别并结合的区域,从而在病毒的复制过程中启动负链 RNA 的合成。通过比较可以看出,TP 毒株 P4、P60、P90 3 个代次的高度保守的 8 核苷酸序列均未发生改变,由此推测不同代次病毒在复制过程中识别结合并启动负链 RNA 合成的能力未发生变化。此外,不同代次病毒 3'UTR 编码区 Poly(A)尾的核苷酸序列长度差异较大。Poly(A)尾分别由 P4 代的 24 个增加至 P60 代的 74 个和 P90 代的 73 个。研究认为,Poly(A)尾在真核生物 mRNA 中的主要作用是稳定 mRNA 和提高 mRNA 的翻译效率^[18]。在单股正链 RNA 病毒,基因组的 Poly(A)尾参与构成该假结,一定长度的 Poly(A)尾对维持 3'端假结完整性及发挥假结功能是不可缺少的,短的 Poly(A)突变体复制能力低,无 Poly

(A)则不发生复制^[19]。袁海峰等认为当 PRRSV 基因组 Poly(A)尾小于 10 时不具有感染性,可能是由于过短的 Poly(A)尾不能使病毒基因组 RNA 有效与宿主蛋白 PABP 结合,抑制基因组 RNA 的翻译起始^[20]。本研究发现 P4、P60、P90 代次的病毒 Poly(A)差别较大,同一毒株高代次的 Poly(A)尾比低代次的长,结合病毒在细胞上的稳定传代和细胞病变分析,笔者推测这可能与病毒在细胞上的传代适应性和稳定性增强有关,此外,可能与病毒传代过程中毒力的变化也存在一定的关系。但 PRRSV 基因组中 Poly(A)尾巴对病毒基因组的翻译、复制以及毒力等作用仍有待进一步深入研究。

有研究表明,某些编码氨基酸的改变可能导致其相应毒株毒力的改变。因此本研究根据 Allende 等^[17]通过对 VR2332、MLV RespPRRS/Repro 及 16244B 等进行序列比较发现 9 个潜在的毒力氨基酸位点,对 TP P4、P60、P90 开展了相应的比较分析。结果显示 3 个不同代次的 TP 毒株与国内分离的高致病性 PRRSV 变异株(如 JXA1 等)与经典 PRRSV 毒株(如 CH-1a)和 VR-2332 相比较,有 7 个位点完全一致,仅在 ORF1a(Nsp2 区域)的 K638 位氨基酸,GP3 的 S83 处与 CH-1a 和 VR-2332 不同。国内分离株 CH-1a、JXA1、TP 与 LMY、SP、LV 4.2.1 以及 RespPRRS MLV 的毒力氨基酸位点差异主要集中在 ORF1a 第 668(638)位、ORF3 第 83 位和 ORF5 第 151 位氨基酸位点。由高致病性 PRRSV 强毒 TP P4 经细胞传代致弱的 TP P60 与 TP P90 仅仅在 ORF2 第 10 位氨基酸存在差异,由亮氨酸(L)突变为苯丙氨酸(F),其它位点均未发生变化(表 2)。3 个代次毒株 ORF2 和 ORF5 基因氨基酸序列比对及抗原性、柔韧性、亲水性和表面活性等指数表明,随着病毒细胞传代次数的增加,高变区 ORF2 基因的变化主要体现在抗原性,其氨基酸位点的变异发生在 P60 代次,P60 和 P90 代较为一致;而 ORF5 基因则呈现抗原性和表面亲和性明显增

加的趋势,笔者认为 GP5 蛋白氨基酸突变趋势可能与病毒毒株致病力强弱相关。结合 TP P4、P60、P90 各个代次毒株的猪回归试验分析表明,TP P4 毒株对亲本动物的致病力最强,病毒血症持续时间最长,至接种后 28 d 仍可见病毒血症的存在,另临床症状及病理变化明显,而经过细胞传代后获得的 P60、P90 毒株,其动物致病力相对减弱,接种后 28 d 后病毒血症消失,未见明显临床症状。因此,笔者推断,TP P60、P90 与 P4 毒株在 ORF2 第 10 位氨基酸的差异,有可能是病毒毒力的重要靶位点;与此同时,高代次毒株 Poly(A)尾的增长也是一个值得关注的病毒毒力相关区域,这有待进一步深入研究。

目前国内外的商品化 PRRSV 的弱毒疫苗毒株多数采用细胞传代致弱的方法获得。Han 等^[14]对国内 PRRSV 变异代表毒株 JXA1 株在 Marc-145 细胞上传代致弱的 12 个代次病毒基因组的分析结果表明,病毒在致弱过程中基因组发生了不同程度的变化,至第 80 代次时共计发生了 108 个核苷酸和 45 个氨基酸的变异,并在第 70~80 代子代病毒基因组中出现了 12 个核苷酸的插入,其突变频率远远高于 Grebennikova 等^[21]对 PRRSV NADC-8 株和 Yuan 等^[22]对 PRRSV VR-2332 株致弱后发现的 50 和 44 个核苷酸改变。本研究对分离的 PRRSV TP 毒株进行了相应的 Marc-145 细胞传代致弱,并对其中的 3 个代次病毒基因组进行了测序,TP P90 株与亲本强毒 TP P4 差别较大,存在有 58 个核苷酸位点和 27 个氨基酸位点的变异,突变频率较 JXA1 株低。同时,在传代致弱过程中,TP P60 和 TP P90 均未发现与 JXA1 致弱过程中类似的单一或连续核苷酸插入现象。自从 2006 年暴发“高热病”后,我国 PRRSV 的基因缺失主要表现在以 JXA1 株为代表的第 482 位和第 534—562 位氨基酸发生了 30 个氨基酸的缺失,TP P4、P60、P90 3 个代次毒株与 2006 年以后分离的高致病性的 PRRSV 毒株在相应位置均发生了相同的缺失区域。有趣的是,TP P60 和 TP P90 株与 JXA1 株 12 个不同代次致弱毒株一样,Nsp2 482 位和第 534—562 位 30 个氨基酸的共有缺失未曾改变。此现象与最近有研究者认为 PRRSV Nsp2 区域氨基酸的插入和缺失在亲本强毒和致弱疫苗毒株有共同表型的结论相吻合^[9-10,23]。基于此,可认为这 30 个氨基酸的缺失并不与病毒的高致病力相关。因而,笔者认为病毒毒力在体外细胞传代致弱与病毒基因组生物学特征的

相关性颇有意义,值得进一步深入探讨分析。

参考文献:

- [1] WENSVOORT G, TERPSTRA C, POL J M, et al. Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus [J]. *Vet Quart*, 1991, 13 (3): 121-130.
- [2] COLLINS J E, BENFIELD D A, CHRISTIANSON W T, et al. Isolation of swine in-fertility and respiratory syndrome virus(isolate ATCC VR-2332)in North America and experimental reproduction of disease in gnotobiotic pigs[J]. *J Vet Diagn Invest*, 1992, 4 (2): 117-126.
- [3] TERPSTRA C, WENSVOORT G, POL J M. Experimental Reproduction of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease) by infection with Lelystad virus: Koch's postulates fulfilled [J]. *Vet Quart*, 1991, 13(3):131-136.
- [4] KRANKER S, NIELSEN J, BILLE-HANSEN V, et al. Experimental inoculation of swine at various stages of gestation with a Danish isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) [J]. *Vet Microbiol*, 1998, 61(1-2):21-31.
- [5] CAVANAGH D. Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae [J]. *Arch Virol*, 1997, 142:629-633.
- [6] CONZELMANN K K, VISSER N, VAN WOENSEL P, et al. Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the arterivirus group [J]. *Virology*, 1993, 193:329-339.
- [7] MEULENBERG J J, HULST M M, DE MEIJER E J, et al. Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV [J]. *Virology*, 1993, 192:62-72.
- [8] 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, 140:1451-1460.
- [9] GAO Z Q, GUO X, YANG H C, et al. Genomic characterization of two Chinese isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Arch Virol*, 2004, 149(7):1341-1351.
- [10] SHEN S, KWANG J, LIUW, et al. Determination of the complete nucleotide sequence of a vaccine strain of porcine reproductive and respiratory syndrome vi-

- rus and identification of the Nsp2 gene with a unique insertion[J]. *Arch Virol*, 2000,145(5):871-883.
- [11] 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.
- [12] 刘光清,薛强,仇华吉,等.猪繁殖与呼吸综合征病毒 CH-1a 猪非结构基因的分子克隆及其基因特征的研究[J].中国预防兽医学报,2002,24(2):81-87.
- [13] 吴国军,蔡雪辉,刘永刚,等.猪繁殖与呼吸综合征病毒 CH-1R 株致弱过程中 ORF5 基因遗传变异分析[J].中国预防兽医学报,2007,29(9):665-669.
- [14] HAN W, WU J J, DENG X Y, et al. Molecular mutations associated with the *in vitro* passage of virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Virus Genes*, 2009,38:276-284.
- [15] WANG Y, LIANG Y J, HAN J, et al. Attenuation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain MN184 using chimeric construction with vaccine sequence [J]. *Virology*, 2008, 371(2):418-429.
- [16] TIAN Z J, AN T Q, ZHOU Y J, et al. An attenuated live vaccine based on highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus (HP-PRRSV) protects piglets against HP-PRRS [J]. *Vet Microbiol*, 2009, 138(1-2):34-40.
- [17] ALLENDE R, LEWIS T L, LU Z, et al. North american and european porcine reproductive and respiratory syndrome virus differ in non-structural protein coding regions [J]. *J Gen Virol*, (Pt2) 1999, 80:307-315.
- [18] JACOBSON A, PELTZ S W. Interrelationships of the pathways of mRNA decay and translation in eukaryotic cells [J]. *Annu Rev Biochem*, 1996, 65:693-739.
- [19] EDGIL D, HARRIS E. End-to-end communication in the modulation of translation by mammalian RNA viruses [J]. *Virus Res*, 2006, 119:43-51.
- [20] 袁海峰,姚火春,高飞,等. Poly(A)尾对猪繁殖与呼吸综合征病毒基因组感染性的影响[J].中国预防兽医学报,2008,30(2):86-90.
- [21] GREBENNIKOVA T V, CLOUSER D F, VORWALD A C, et al. Genomic characterization of virulent, attenuated, and revertant passages of a North American porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain [J]. *Virology*, 2004, 321(2):383-390.
- [22] YUAN S S, MICKELSON D, MURTAUGH M P, et al. Complete genome comparison of porcine reproductive and respiratory syndrome virus parental and attenuated strains [J]. *Virus Research*, 2001, 79(1-2):189-200.
- [23] FANG Y, KIM D Y, ROPP S, et al. Heterogeneity in Nsp2 of European-like porcine reproductive and respiratory syndrome viruses isolated in the United States [J]. *Virus Res*, 2004, 100(2):229-235.

(编辑 白永平)