

# 贵州省猪繁殖与呼吸综合征病毒 ORF5 基因的变异分析

汤德元<sup>1\*</sup>, 赵启祖<sup>2\*</sup>, 李春燕<sup>1</sup>, 刘霞<sup>1</sup>, 邹兴启<sup>2</sup>, 范运峰<sup>2</sup>, 曾智勇<sup>1</sup>, 朱永兴<sup>1</sup>

(1. 贵州大学动物科学学院, 贵阳 550025; 2. 中国兽药药品监察所, 北京 100081)

**摘要:** 为了调查猪繁殖与呼吸综合征病毒 ORF5 基因的变异情况, 笔者收集了贵州省 16 家规模化养殖场 153 份疑似 PRRS 的样品, 通过 RT-PCR 检测和 ORF5 基因序列的测定, 结果表明: 所有样品之间 ORF5 基因的同源性为 98.7%~100%, 氨基酸的同源性为 98.5%~100%; 与美洲型代表毒株 VR-2332、国内标准毒株 CH-1a 和欧洲型代表毒株 LV 基因序列的同源性分别为 89.2%~90%、94.8%~95.6%、59.7%~60.2%, 氨基酸序列同源性分别为 88.8%~89.3%、92.7%~94.2%、54.9%~55.3%, 遗传衍化关系分析表明流行毒株属于美洲型。ORF5 基因发生离散性变异, 可以分为 3 个簇, 与中国其他地区分离的高致病性 PRRS 病毒关系密切, 而与早期分离的 PRRS 毒株关系疏远, 说明猪繁殖与呼吸综合征病毒 ORF5 基因存在变异现象。

**关键词:** 猪繁殖与呼吸综合征; ORF5 基因; 变异分析

中图分类号: S852.659.6

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)08-1271-05

## Variation Analysis of ORF5 Gene of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Isolates from Guizhou Province

TANG De-yuan<sup>1</sup>, ZHAO Qi-zu<sup>2\*</sup>, LI Chun-yan<sup>1</sup>, LIU Xia<sup>1</sup>, ZHOU Xing-qi<sup>2</sup>,  
FAN Yun-feng<sup>2</sup>, ZENG Zhi-yong<sup>1</sup>, ZHU Yong-xing<sup>1</sup>

(1. College of Animal Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China;

2. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

**Abstract:** To investigate variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) ORF5 gene, 153 suspected samples of PRRSV were collected from 16 large-scale farms of Guizhou province. With RT-PCR detecting and ORF5 gene sequencing, results show that among all these samples the homology of ORF5 gene was up to 98.7%—100%, and the homology of amino acids was up to 98.5%—100%; compared with VR-2332, CH-1a and LV, the homologies of gene sequence were up to 89.2%—90%, 94.8%—95.6%, 59.7%—60.2% respectively, and the deduced amino acid homologies were up to 88.8%—89.3%, 92.7%—94.2%, 54.9%—55.3% respectively. It indicates that the epidemic strains are from the same origin and belong to Northern American genotype. The ORF5 gene from the variant can be separated into three clusters. The relationship is closed to the highly pathogenic PRRSV that separated at other parts of China, but alienate from PRRSV strain separated early. Our results indicated that the ORF5 gene of PRRSV existed variation.

**Key words:** porcine reproductive and respiratory syndrome; ORF5 gene; variation analysis

猪繁殖与呼吸综合征 (Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 是由猪繁殖与呼

收稿日期: 2008-10-06

基金项目: 国家“十一五”科技支撑项目(2007BAD86B06-4); 贵州省贵阳市 2005 年畜牧科技专项基金项目资助[(2005)筑科农字第 4-11 号]; 2007 年贵州省科技厅项基金项目资助[黔科合 J 字(2007)2068 号]

作者简介: 汤德元(1964-), 男, 教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事动物病毒分子生物学及中西兽医结合研究, E-mail: tdyuan@163.com

\* 通讯作者: 赵启祖, E-mail: zhaoqizu@ivdc.gov.cn

吸综合征病毒(PRRSV)引起的一种以母猪繁殖障碍和仔猪呼吸道疾病为特征的一种新的传染病。该病在临床上主要表现为感染猪体温升高、厌食,妊娠母猪晚期流产、早产、产死胎、弱胎和木乃伊胎,断奶仔猪肺炎、育肥猪生长迟缓,传染性强,常继发细菌和其它病毒感染,是目前造成我国养猪业严重经济损失的重要疾病之一。

PRRSV为一种有囊膜的单股正链RNA病毒,病毒基因组约15 kb,含9个开放阅读框架(ORFs)。研究表明:PRRSV的变异分布于整个基因组,但以结构蛋白中ORF5基因的变异最大<sup>[1]</sup>,对ORF5基因变异的分析在一定程度上可以反映整个病毒基因组序列变异的情况,因而ORF5基因可作为分子流行病学调查的对象。本研究参考PRRSV的LV、VR-2332毒株的核酸序列,设计1对特异性引物,对采集的病料进行RT-PCR扩增,以检测PRRSV是否存在,并对30个PRRSV毒株ORF5基因序列的测定结果进行了核苷酸序列、氨基酸序列和遗传进化树比较分析,借以探讨PRRSV的遗传变异规律,丰富我国的PRRSV的分子流行病学资料,进而为PRRS的防制提供一定的参考依据。

## 1 材料

### 1.1 病料的采集及处理

病料样品来自贵州多个地方养猪场和养猪户<sup>[2]</sup>。检测样品无菌采集于16家规模化养殖场48份疑似PRRS猪(含流产死胎)的心、肝、脾、肺、淋巴结和肾的病变组织、血液、血清,取每一病例各病变组织混和病料1.0~2.0 g,加少量MEM,用无菌研磨器研磨至糊状,再用MEM按1:4的体积比稀释成乳剂,用液氮反复冻融3次,12 000 r/min、4℃离心10 min,取上清,置-20℃冰箱保存。血清样品来自16个规模化猪场,共105份,无菌采血,分离血清,置-20℃冰箱保存待检。样品采集时间为2006年8月—2007年12月。样品编号分别为ZJ1(8份)、ZJ2(7份)、AS1(6份)、AS2(5份)、AS3(3份)、MJ1(5份)、MJ2(7份)、MJ3(2份)、GY1(3份)、GY2(2份)、GY3(4份)、GY4(3份)、RH1(6份)、RH2(5份)、RH3(3份)、QN1(8份)、QN2(9份)、QN3(6份)、QN4(5份)、QN5(3份)、QN6(3份)、QN7(7份)、QN8(1份)、QN9(6份)、QN10(5份)、QN11(4份)、QN12(2份)、QN13(3份)、QN14(3份)、QN15(4份)、QN16(5份)、QN17(4份)、

QN18(3份)和QN19(3份),共计153份。

### 1.2 试剂

TRIzol LS<sup>®</sup> Reagent 购自 Invitrogen 公司; AMV 反转录酶、RNase Inhibitor、Taq DNA 聚合酶、dNTPs、DTT、DL2000 DNA Marker 等均购自大连宝生物工程有限公司。

### 1.3 引物

根据 GenBank 中收录的 PRRSV ATCC VR-2332、PRRSV LV 和中国标准株 CH-1a 的基因序列,应用生物软件 DNASTar,设计1对针对 ORF5 全基因的特异性引物,扩增产物预期大小为 748 bp。引物序列如下,Primer F 5'-GAGACCAT-GAGGTGGGCAAC-3';Primer R 5'-GCATATAT-CATCACTGGCGTG-3'。

### 1.4 病毒总 RNA 的提取

取上述-20℃冰箱保存各处理病料的上清液、血液或血清 250 μL,按 Invitrogen 公司的 TRIzol LS<sup>®</sup> Reagent 试剂盒操作说明书提取病毒总 RNA,在生物安全柜中 37℃干燥 15~20 min,加入 2 μL DTT、7 μL DEPC 处理水、1 μL RNase inhibitor,充分溶解混匀,65℃溶解 5 min后,冰浴 1 min,及时进行 RT-PCR,也可于-80℃保存待检,但保存时间不能太长。

### 1.5 RT-PCR 检测

首先进行 RT 反应:取 5 μL RNA、5× MLV buffer 2 μL、0.1 mol·L<sup>-1</sup> DTT 0.5 μL、10 μmol·L<sup>-1</sup> dNTP 0.5 μL、RNase-Inhibitor 0.25 μL、M-MLV 0.5 μL、10 mmol·L<sup>-1</sup> primer R 1.25 μL、42℃ 1 h,即得 cDNA 模板。再进行 PCR 检测,其 PCR 反应体系:10× PCR Buffer 5 μL、10 μmol·L<sup>-1</sup> dNTPs 1 μL、上下游引物各 2.5 μL、TaqE 1 μL、cDNA 2 μL,加水至 50 μL。反应条件:94℃变性 90 s;94℃ 30 s,52℃ 30 s,72℃ 1 min,共 35 个循环;72℃延伸 10 min,反应结束。取 5 μL PCR 产物与 1 μL 6×loading buffer 混合,用 1%琼脂糖凝胶、100 V、30~50 min 电泳,观察结果,并拍照,取电泳检测呈阳性的 RT-PCR 产物送 Invitrogen 公司测序。

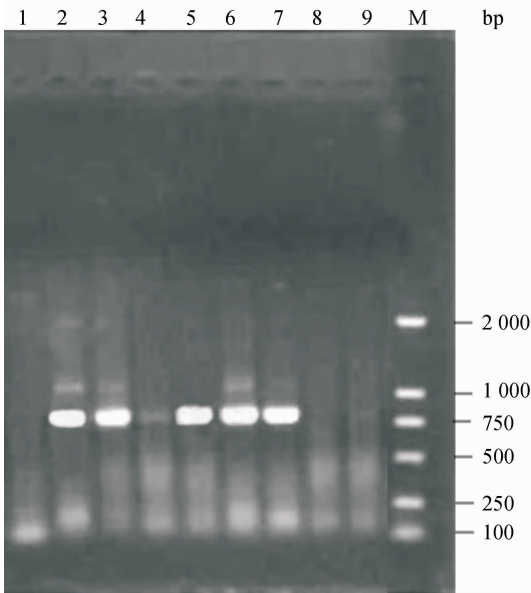
### 1.6 序列分析

将获得的 PRRSV 流行毒株 ORF5 基因与国内已发表的 PRRSV ORF5 基因序列进行核苷酸和推导的氨基酸同源性比较,建立系统发育树,分析 ORF5 基因进化情况。

## 2 结 果

### 2.1 RT-PCR 检测结果

收集的各病料 RT-PCR 检测结果,阳性的样品为 ZJ1、ZJ2、AS1、AS2、MJ1、MJ2、MJ3、GY1、GY2、GY3、RH1、RH2、RH3、QN1、QN2、QN3、QN4、QN5、QN6、QN7、QN9、QN10、QN12、QN13、QN14、QN15、QN16、QN17、QN18 和 QN19。琼脂糖凝胶电泳检测结果与预期的目的片段相符,部分样品电泳结果如图 1。



M. DL2000 DNA 相对分子质量标准; 1. 阴性对照; 2. ZJ1 病料; 3. AS1 病料; 4. ZJ2 病料; 5. AS2 病料; 6. GY1 病料; 7. GY2 病料; 8. AS3 病料; 9. GY4 病料  
M. DL2000 DNA Marker; 1. Negative control; 2. ZJ1 sample; 3. AS1 sample; 4. ZJ2 sample; 5. AS2 sample; 6. GY1 sample; 7. GY2 sample; 6. AS3 sample; 7. GY4 sample

图 1 部分病料 RT-PCR 检测结果

Fig. 1 RT-PCR products of part samples

### 2.2 ORF5 基因核苷酸序列分析

自动测序仪测得 PCR 产物为 715 bp,分别截取 ORF5 基因 603 bp。用生物分析软件 DNASTar 将所得核苷酸序列与美洲型代表毒株 VR-2332、国内标准毒株 CH-1a 等代表毒株进行比较,结果显示 ORF5 基因全长 603 bp,所得毒株 ORF5 基因序列的同源性为 98.7%~100%;与美洲型代表毒株 VR-2332、国内标准毒株 CH-1a 和欧洲型代表毒株 LV 基因序列的同源性分别为 89.2%~90%、94.8%~95.6%、59.7%~60.2%。

### 2.3 氨基酸序列比较结果

用生物分析软件 DNASTar 将 30 个含 PRRSV 病料所测得的 ORF5 基因的核苷酸序列翻译成氨基酸,将 30 个流行毒株的 ORF5 基因氨基酸与美洲型代表毒株 VR-2332、欧洲型代表毒株 LV 和国内标准毒株 CH-1a 等代表毒株进行对比。结果显示 ORF5 基因全长 603 bp,包含完整的开发阅读框,编码 200 个氨基酸,所得毒株 ORF5 基因的氨基酸序列同源性为 98.5%~100%;与美洲型代表毒株 VR-2332、国内标准毒株 CH-1a 和欧洲型代表毒株 LV 氨基酸序列同源性分别为 88.8%~89.3%、92.7%~94.2%、54.9%~55.3%;30 份病料 PRRSV ORF5 PCR 扩增测序分析表明,仅有 6 个氨基酸发生变异,第 29 位氨基酸,在 II 簇由 Ala 变为 Val,第 106 位氨基酸,在 III 簇的 9 份样品由 Tyr 变为 His,第 185 位氨基酸在 MJ1-3 中由 Ala 变为 Val,其他变异均为单样品突变,如:QN19 样品的第 10 位(Cys-Phe),QN1 样品的第 35 位(Asn-Ser),RH1 样品的第 59 位(Lys-Arg)。

### 2.4 遗传进化树分析

为了分析毒株间在遗传进化关系上的距离,将本研究所得 30 株毒株的 ORF5 基因序列与 VR-2332、CH-1a、RespPRRS、BJ4、PrimePac、HB2sh、HB1sh、HNIVDC、HEB1 株的基因序列进行对比,采用 Phylips 软件包中的 N-J 方法绘制遗传进化树,如图 2 所示。目前世界上流行 PRRSV 分为美洲型和欧洲型 2 个基因型。本研究所得 30 株毒株基因序列之间的同源性为 98.7%~100%,氨基酸序列同源性为 98.5%~100%,表明它们可能为同一来源,且同属于美洲型。

## 3 讨 论

由于 PRRSV 存在着广泛的变异性,给疫苗的生产带来了极大的不便。GP5 在 PRRSV 毒株结构蛋白中是变异最大的,国外对 PRRSV 毒株 GP5 的变异进行了大量研究,表明欧、美 2 型毒株间氨基酸同源性只有 52%~55%,同型毒株氨基酸相似性为 88%~99%;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 aa)<sup>[3]</sup>。

中国农业大学农业部预防兽医学重点开放实验室对国内 PRRSV 流行毒株进行了变异和分子流行病学分析,从 26 份 PRRSV 阳性组织材料中获得

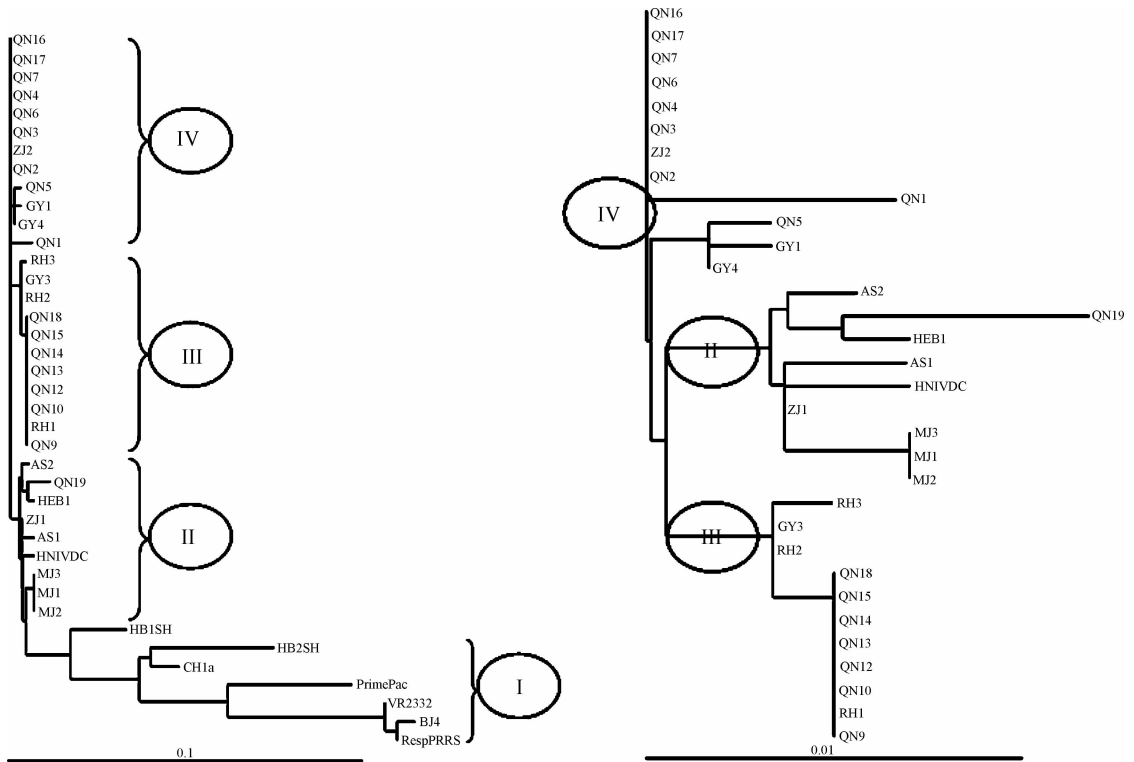


图2 PRRSV ORF5 基因、氨基酸遗传进化树分析

Fig. 2 Phylogenetic tree analysis of nucleotide and amino acid sequences of PRRSV ORF5

ORF5 基因片段,进行了序列测定与分析,表明流行毒株的 ORF5 基因序列核苷酸的相似性为 84.1%~99.8%,与 VR2332 株的相似性为 86.4%~99.5%。对 ORF5 基因序列进行的遗传演化分析结果表明,美洲型 PRRSV 可分为 4 个亚群,我国目前流行的 PRRSV 毒株属于其中的 3 个亚群,即以 PRRSV BJ-4 为代表的毒株属于亚群 1;以 CH-1a、HB-1(sh)/2002 和 HB-2(sh)/2002 株为代表的毒株属于亚群 2;以 BJ-13 为代表的毒株属于亚群 4。推导编码氨基酸的比较结果表明,分属于不同亚群的国内不同地区流行的 PRRSV 毒株在 ORF5 基因编码蛋白的潜在糖基化位点数目(2~4 个)、表位区域(27-30aa,38-54aa 和 180-197aa)和与毒力相关的氨基酸(13 位 aa 和 151 位 aa)等方面均存在着变异<sup>[4]</sup>。对于抗原表位的变异,目前已确定的美洲型毒株的表位有 3 个,2 个为非中和表位(27-30aa 和 180-197aa),1 个为中和表位(37-45aa)<sup>[5]</sup>。

遗传演化关系分析显示 2006—2007 年收集病料可以分为 3 个簇,从采样地来看他们有一定的地域差别,其中 MJ1、MJ2 和 MJ3 为同一地区的病料,

AS1 和 AS2 为另一地区的病料,ZJ1 和 QN19 分别为另外两个地区的病料,他们同属于 II 簇;QN9、QN10、QN12、QN13、QN14、QN15 和 QN18 为同一地区的病料,RH1、RH2 和 RH3 为另一地区的病料,GY3 也为另一地区的病料,他们同属于 III 簇;QN1、QN2、QN3、QN4、QN6、QN7、QN17 和 QN16 为同一地区的病料,GY1 和 GY4 为另一地区的病料,ZJ2 也为另一地区的病料,他们同属于 IV 簇;II、III、IV 为我国分离高致病性毒株,这与当年实际的发病情况基本一致;2006 年动物疾病控制中心和中国兽医监察所分离测定的 2 个毒株属于 II 簇。

将 30 份病料测定结果、2 株高致病性毒株(HEB1、HNIVDC)与美洲株标准毒株、2 个国外弱毒疫苗毒株以及我国(哈尔滨兽医研究所和中国农业大学)早期分离测定 4 个毒株进行遗传演化关系分析,可以将这些毒株分为 4 个簇(I 簇为美洲株标准毒株、弱毒疫苗毒株以及我国早期分离毒株、II、III 和 IV 簇为我国分离高致病性毒株以及贵州病猪分离材料)。氨基酸序列分析发现 I 簇毒株和其他 3 个簇毒株之间有 4 个氨基酸完全不同,9 位(Gly-

Cys)、16 位 (Phe-Ser)、35 位 (Asn-Ser) 和 184 位 (Ala-Val), 其中 184 位氨基酸的变化导致非中和表位的变化, 进而引起病毒受体结合位点或抗原位点的变化, 但不会导致病毒毒力的变化, 因为与 VR2332 株和 16244B 株相比, 疫苗株 13 位 aa 处的 R 突变为 Q 及 151 位 aa 处的 R 突变为 G 时才可能与疫苗株毒力致弱有关。毒株的潜在的糖基化位点及变异有待于进一步研究。

关于我国高致病性 PRRSV 的来源问题, 不同学者有不同的观点, 但由于病毒在田间的遗传变异造成毒力增强已普遍被大家接受, 作者分析了 2006—2007 年的 30 个临床样品, 在很短的时间里毒株在贵州已发生了变异, 可以分为不同的 3 个簇, 我国 2006 年流行毒株位于 II 簇, 毒株传入贵州后发生变异, 分出 2 个簇。我国主要流行美洲毒株, 弱毒株疫苗已在国内广泛使用, 我国分离的 BJ4 毒株和疫苗毒株 RespRRS 关系密切, BJ4 系列毒株在猪群传播, 经过遗传变异演变出致病性的 HB2sh 和 Ch1a 毒株, 该毒株在猪体形成持续感染分离出 HB1sh 毒株, 持续感染毒株在猪群经过若干年遗传演化, 变异出高致病性毒株, 序列分析发现处于 I 簇和高致病性毒株簇的 HB1sh GP5 有 5 位氨基酸和高致病性毒株一致, 而与 I 簇毒株不同, 分别是 24 位 (Tyr-Cys)、25 位 (Leu-Phe)、101 位 (Tyr-Phe)、102 位 (Tyr-Val) 和 161 位 (Val-Ile)。PRRSV 遗传演化和毒力变异是一个复杂的科学问题, 不能以点带面推断演化关系, 但通过多位点多基因的分析研究可以确定毒力基因、明确遗传演化关系。目前世界各国对 PRRSV 做了大量的研究, 但仍有许多重要问题尚不清楚, 如不同地区毒株之间的抗原差异性, PRRSV 的分子免疫基础及其对免疫系统的抑制机理等, 为了提供可靠的疫苗, 有待于人们进一步研究<sup>[6~12]</sup>。

PRRSV 的分子流行病学研究对于追溯病毒来源和分析其变异规律, 以及指导免疫预防均具有十分重要的理论和实践意义。以病毒的基因序列为切入点, 着眼于病毒的遗传演化变异的研究, 有助于阐释 PRRSV 的起源、流行规律及其变异规律, 因此进行 PRRSV 的分子流行病学研究, 对于弄清我国 PRRSV 的变异规律和控制猪繁殖与呼吸综合征具有很重要的意义。

## 参考文献:

- [1] 高志强. 猪繁殖与呼吸综合征病毒全基因组分子遗传特征分析[D]. 北京: 中国农业大学, 2003.
- [2] 汤德元, 曾智勇, 李春燕, 等. 猪场爆发猪繁殖与呼吸综合征的临床诊断及实验检测[J]. 中国兽药杂志, 2008, 42(7): 8—12.
- [3] 杨汉春, 严安, 高志强, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒分子流行病学研究进展[C]. 中国畜牧兽医学学会 2005 年学术年会, 2005.
- [4] 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.
- [5] PERSH S. Proc 2 nd. International symposium on PRRSV [M]. Copenhagen Denmark, 1995.
- [6] WENSVOORT G, DEKLUYVER E P, LUIJTZE E A, et al. Antigenic comparison of Lelystad virus and swine infertility and respiratory syndrome virus[J]. *J Vet Dign Invest*, 1992, 4 (2) : 134—138.
- [7] NELSON E A, CHRISTOPHER - HENNING J, DREW T, et al. Differentiation of US and European isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by Monoclonal antibodies[J]. *J Clinical Microbiology*, 1993, 31(12): 3184—3189.
- [8] 刘文兴, 蔡雪晖, 郭宝清. 猪生殖-呼吸道综合征病毒 (PRRSV) 分离鉴定及其与欧、美 PRRSV 抗原的比较[J]. 中国畜禽传染病, 1998, 20 (4): 193—195.
- [9] GAO Z Q, GUO X, YANG H C. Genomic characterization of two Chinese isolates of porcine respiratory and respiratory syndrome virus[J]. *Arch Virol*, 2004, 149: 1341—1351.
- [10] NIELSEN H S, OLEKSIEWICZ M B, FORSBERG R, et al. Reversion of a live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine investigated by parallel mutations[J]. *J Gen Virol*, 2001, 82: 1263—1272.
- [11] ALLENDE R, KUTISH G F, LAEGREID W, et al. Mutations in the genome of porcine reproductive and respiratory syndrome virus responsible for the attenuation phenotype[J]. *Arch Virol*, 2000, 145: 1149—1161.
- [12] FARSBERG 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.