

周峰,郭龙飞,刘红英,等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 XINX 株的分离及 NSP2 基因的遗传进化分析[J]. 江苏农业科学,2014,42(9):180-182.

猪繁殖与呼吸综合征病毒 XINX 株的分离及 NSP2 基因的遗传进化分析

周峰¹, 郭龙飞¹, 刘红英¹, 陈陆¹, 赵军¹, 王新卫¹, 常洪涛¹, 王川庆¹, 杨霞¹, 王永强²

(1. 河南农业大学禽病研究所, 河南郑州 450002; 2. 河南省安阳市畜牧局, 河南安阳 455001)

摘要:为了了解猪繁殖与呼吸综合征病毒在河南地区猪体内的进化情况, 笔者采集了河南新乡地区出现的疑似猪繁殖与呼吸综合征的流产猪胎, 并进行了病毒的分离鉴定, 同时对分离病毒株的 NSP2 基因部分序列进行遗传进化分析。结果共分离并鉴定出 1 株美洲型猪繁殖与呼吸病毒 XINX, 且 NSP2 基因部分序列的分析显示, 该毒株与以往的分离毒株不同, 其 NSP2 基因存在 393 bp 的不连续缺失, 同国内之前报道的经典毒株和高致病性毒株间均存在较大差异, 目前在国内尚数首次出现。研究结果为进一步研究猪繁殖与呼吸综合征病毒的分子进化提供了重要信息。

关键词:猪繁殖与呼吸综合征病毒; Marc-145; NSP2; 遗传进化分析

中图分类号: S855.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)09-0180-03

猪繁殖与呼吸综合征 (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 是猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 引起的一种猪的重要传染病, 该病以怀孕母猪流产、早产和死胎以及仔猪和育肥猪发生呼吸道疾病为主要特征。PRRS 于 1987 年在美国首次被发现, 现已波及全球, 给世界养猪业造成了巨大经济损失^[1-2]。我国于 1996 年首次在流产的猪胎中分离到 PRRSV, 并相继发现了多种变异毒株^[3-5]。目前, PRRSV 主要包括以 Lelystad virus (LV) 为代表的欧洲型 (type1, European type) 和以 VR-2332 为代表株的北美洲型 (type2, North American type) 2 种基因型, 在中国主要流行美洲型。PRRSV 病毒基因组为单股正链 RNA, 全长约为 15 kb, 包括 10 个开放阅读框 (ORFs) 和 2 个非编码区 (UTRs)^[6]。ORF1a、ORF1b 大约占了病毒基因组的 80%, 分别编码 pp1a、pp1ab 这 2 个复制多聚蛋白, 并最终被 ORF1a 编码的蛋白水解酶切割成 14 个非结构蛋白 (non-structure protein, NSP)^[7-8]; ORF2a、ORF2b 分别编码病毒的结构蛋白 GP2a、GP2b; ORF3-7 分别编码病毒的结构蛋白 GP3、GP4、GP5、M、N 蛋白^[9]。研究表明, NSP2 是 PRRSV 基因组中最容易发生变异的基因^[10], 高致病性 PRRSV (HP-PRRSV) 的 NSP2 基因在第 482 位和第 533~561 位缺失 30 个不连续的氨基酸^[11-14], 这些缺失可能与 2006 年中国出现的 HP-PRRSV 的毒力有关。基于这个原因,

NSP2 已经成为 PRRSV 流行病学调查和系统进化分析中的一个重要标记^[14]。本研究首先采集疑似病料并进行病毒的分离鉴定; 然后在 NSP2 基因序列测定与分析的基础上证实, 所分离毒株为 PRRSV 变异株, 将其命名为 XINX。研究结果为防控河南新乡地区 PRRS 的发生及进一步开展该病毒分子流行病学规律、遗传变异及疫苗研制等提供了理论支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 样品 试验样品为 2012 年采自河南新乡地区某猪场疑似 PRRS 的流产猪胎, 样品置于 -70 °C 保存备用。

1.1.2 试剂 Marc-145 细胞, 河南农业大学牧医工程学院传染病实验室保存; 胎牛血清, 购自北京四季青公司; Taq DNA 聚合酶、鼠源反转录酶 (M-MLV)、RNA 酶抑制剂 (Rnase Inhibitor)、dNTP、pMD18-T 载体, 购自大连宝生物工程有限公司; DEPC, 购自 Amresco 公司; Trizol Reagent, 购自 Invitrogen 公司; 琼脂糖, 购自 Sigma 公司。

1.1.3 引物 参考 PRRSV VR2332 株 (GenBank 登录号 EF536003) 和 JXA1 (GenBank 登录号 EF112445) NSP2 全基因序列, 应用 Primer5.0 软件设计针对 NSP2 高变区的特异性引物, 详见表 1。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

表 1 PRRSV NSP2 基因扩增引物

| 引物名称及序列(5'→3') | 扩增区域 | 目的基因 | 片段长度(bp) |
|---|-----------|------|----------|
| NSP2-F: ACCCTTCYGAAGAGTRAG; NSP2-R: CCTCATATTCMGTCTGTGAGGAHGC | 1388~2915 | NSP2 | 1 528 左右 |

1.2 试验方法

1.2.1 病毒分离 取适量流产猪胎的脾、肺、淋巴结, 剪碎后用 PBS 稀释后研磨, 冻融 3 次, 8 000 r/min 离心 10 min 后取上清, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 分装后于 -70 °C 保存备用。取单层铺满 90% 的 Marc-145 细胞, 用上述处理的病料接种细胞, 37 °C 吸附 1 h 后, 加入含有 2% 胎牛血清的维持液, 于 37 °C CO₂ 细胞培养箱中培养, 若无典型细胞病变 (CPE), 则

收稿日期: 2013-11-15

基金项目: 国家农业科技成果转化资金 (编号: 30500254)。

作者简介: 周峰 (1988—), 男, 河南固始人, 硕士研究生, 主要研究方向为分子病原学。E-mail: 290679317@qq.com。

通信作者: 杨霞, 副教授, 研究方向为分子病原学。E-mail: yangxia66@163.com。

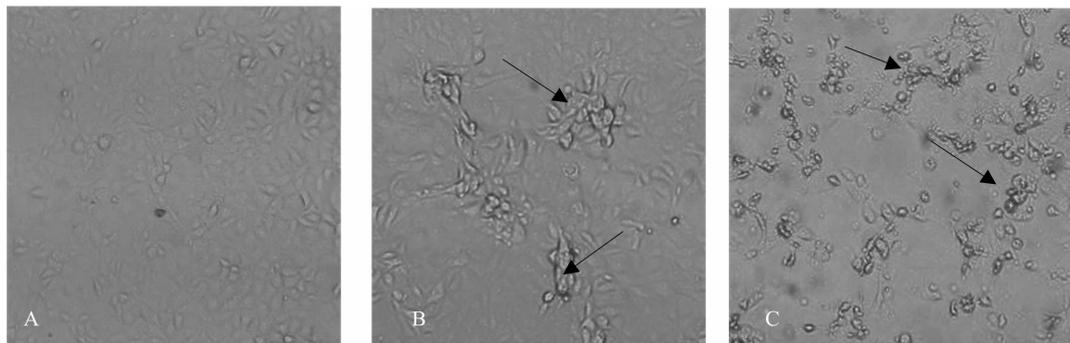
根据细胞培养状态在接毒后 4~5 d 进行收毒,继续盲传直至出现典型的 PRRSV CPE。当 CPE 达到 80% 左右时进行收毒,于 -20 °C 经 3 次反复冻融后,8 000 r/min 室温离心 2 min,取上清按上述方法继续接种到 Marc-145 细胞进行病毒传代。

1.2.2 病毒液 RNA 的提取 取上清参照 Trizol reagent 说明书进行操作,所提取基因组 RNA 用 30 μ L 1% DEPC 水溶解, -70 °C 保存备用。

1.2.3 PRRSV *NSP2* 基因 RT-PCR 扩增与测序。提取上述部分阳性样品中的总 RNA,以 20 μ L 体系进行反转录: 13 μ L RNA 模板,4 μ L 5 \times buffer,1 μ L dNTP (10 mmol/ μ L), 1 μ L 随机引物 (20 pmol/ μ L), 0.5 μ L RNA 酶抑制剂 (40 U/ μ L), 0.5 μ L 反转录酶 M-MLV (200 U/ μ L)。反应条件:42 °C 1 h,95 °C 5 min,将得到的 cDNA 用于 PCR 扩增。

PCR 按 50 μ L 反应体系进行:5 μ L 10 \times buffer, 5 μ L MgCl₂ (25mmol/ μ L), 5 μ L 反转录产物 (cDNA), 1 μ L dNTP (10 mmol/ μ L), 0.5 μ L *Taq* DNA 聚合酶,各 1 μ L 上下游引物,补加灭菌双蒸水至 50 μ L。反应循环参数:95 °C 5 min; 95 °C 1 min,56 °C 1 min,72 °C 1.5 min,共 32 个循环;72 °C 10 min。反应产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,经连接转化后,将阳性克隆送北京华大基因公司测序。

1.2.4 序列分析 所得序列经过 NCBI 网站上的 BLAST 比对后,运用 DNASTar 中的 MegAlign 将测序结果与参考毒株 (表 2) 的 *NSP2* 基因进行序列比对和同源性分析。运用



A. 正常的 Marc-145 细胞(400 \times); B. 接毒 48 h 后的 Marc-145 细胞(400 \times); C. 接毒 72 h 后的 Marc-145 细胞(400 \times)

图1 PRRSV分离株引起的 Marc-145 细胞病变情况

2.2 PRRSV *NSP2* 基因部分序列的鉴定

以病变细胞悬液总 RNA 为模板,经 RT-PCR 扩增获得 1 条比 1 528 bp 低 400 bp 左右的 DNA 片段 (图 2)。将 PCR 产物经胶回收、连接、转化后,提取阳性质粒送北京华大基因公司测序,测序结果显示,扩增片段大小为 1 124 bp。目前序列已提交至 GeneBank,登录号为 KF000084。

2.3 *NSP2* 基因部分序列分析

在美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 网站的 BLAST 结果显示,*NSP2* 与国外流行毒株 NADC30 的核苷酸序列相似性最高。用 DNASTar 中的 MegAlign 进行序列比对和同源性分析,结果表明,与经典毒株 VR2332 比较,XINX 分别在第 964~1 296、1 452~1 454、1 515~1 571 位共计缺失 393 个核苷酸。*NSP2* 与经典毒株参考毒株 VR2332、BJ-4、CH-2a 的核苷酸序列相似性为 67.6%,与 HP-PRRSV 参考毒株

表 2 所有用于序列比对和遗传进化分析的毒株

| 毒株 | 分离地,分离时间 | 登录号 |
|-----------------|-----------|-------------------|
| BJ-4 | 中国,2001 年 | AF331831 |
| CH-1a | 中国,2001 年 | AY032626 |
| MN184C | 美国,2008 年 | EF488739 |
| HEB1 | 中国,2007 年 | EF112447 |
| HuN4 | 中国,2007 年 | EF635006 |
| NADC30 | 美国,2008 年 | JN654459 |
| HENAN-XINX* | 中国,2013 年 | KF000084/KF416329 |
| TJ* | 中国,2012 年 | EU860248 |
| JXA1* | 中国,2007 年 | EF112445 |
| VR2332* | 美国,2008 年 | EF536003 |
| 09HEN1* | 中国,2011 年 | JF268684 |
| Hawkeye2_After* | 美国,2008 年 | EF532810 |
| Lelystad virus* | 荷兰,2000 年 | M96262 |

注:在本研究中进行测序的毒株用“*”标记。

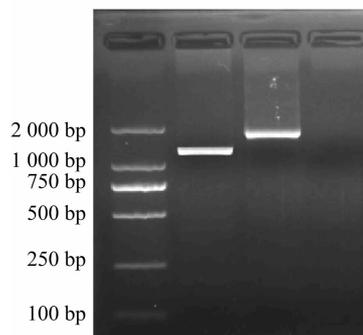
Mega4.0 邻接法绘制进化树。

2 结果与分析

2.1 病毒分离

将病料滤液接种到 Marc-145 细胞上,盲传至第 7 代时,可产生稳定、典型的 PRRSV 细胞病变 (CPE),即接毒 48 h 左右可见少量轻微的细胞聚集,72 h 左右有大量的细胞聚集成堆,80% 以上细胞出现明显 CPE (图 1)。

M 1 2 3



M—DL2000 DNA marker; 1—XINX 分离株; 2—阳性对照; 3—阴性对照

图2 *NSP2* 基因的 RT-PCR 扩增结果

JXA1、TJ、HUN4、HEB1、09HEN1 的核苷酸序列相似性为 63.8%~64.4%，与欧洲型参考毒株 Lelystad virus 核苷酸序列的相似性为 45.6%；而与国外流行毒株 NADC30 核苷酸序列相似性最高，为 95.2%。利用 Mega 4.0 中的邻接法 (Neighbor - Joining; bootstrap values of 1000 replicates) 对 *NSP2* 基因推导的氨基酸序列进行遗传进化分析，结果表明，XINX 与美洲型 PRRSV 处于同一分支，但是既不与经典毒株处于同一分支，又与 HP - PRRSV 的亲缘关系相差较远，而是与国外流行毒株 NADC30 处于同一进化分支 (图 3)。

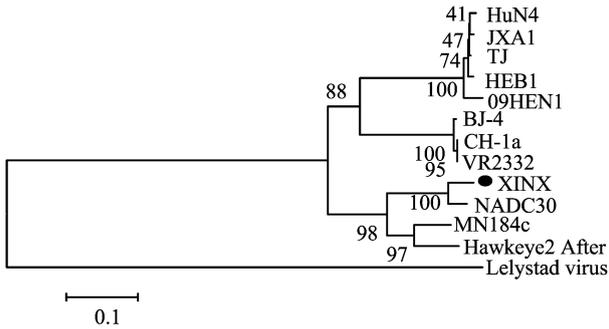


图3 PRRSV XINX株*NSP2*基因推导的氨基酸序列遗传进化分析

3 结论

PRRS 是一种对世界养猪业都具有重大影响的猪传染性疾病，它能够引起怀孕母猪流产和新生仔猪的呼吸道疾病。该病于 1987 年在美国和加拿大首次被发现，随后在日本、德国以及其他国家相继被发现。我国于 1995 年首次发现该病，并导致了重大经济损失。2006 年春季，在我国东部地区暴发了一场以高发病率和高死亡率为特点的 PRRS，随后开始向全国蔓延。近些年来，PRRS 对河南省养猪业也造成了巨大的经济损失，因此对 PRRSV 进行严密监视显得尤为重要。

NSP2 基因作为 PRRSV 整个基因组中最容易变异的区域，具有明显的多样性，它在同一基因型中和不同基因型之间的变异都很大，且具有很高的耐缺失和插入的能力；此外，由于 *NSP2* 的蛋白酶活性，使其能在调节宿主免疫和病毒复制方面具有至关重要的作用。因此 *NSP2* 常常作为监视 PRRSV 变异的重要标记。

PRRSV XINX 分离株是从河南省新乡地区某县养猪场疑似 PRRS 引起的流产猪胎中分离出来的，*NSP2* 基因序列比对结果表明，该毒株既不属于经典毒株，又与 HP - PRRSV 有很大差别，而与国外流行毒株 NADC30 序列相似性却很高，其 393 个核苷酸的缺失在国内也属首次出现。表明有新的 PRRSV 缺失毒株在我国出现，且有外来毒株的可能性，提示需要进一步加强对于猪及其相关产品的入境检疫。此外，通过了解和持续监测发现，免疫活疫苗的该猪场，经典的 PRRSV 和以缺失 30 个氨基酸为特点的 HP - PRRSV 检出率很低，而 XINX 毒株的阳性率却很高，提示该病毒可能通过某

种途径逃避宿主免疫监视，但该缺失变异是否与毒株的毒力、生长特性等生物学特征相关，尚需进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Keffaber K. Reproductive Failure of Unknown Etiology [N]. Am Assoc Swine Pract, 1989, 1: 1 - 10.
- [2] 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]. Journal of the American Veterinary Medical Association, 2005, 227 (3): 385 - 392.
- [3] 郭宝清, 陈章水, 刘文兴, 等. 从疑似 PRRS 流产胎儿分离 PRRSV 的研究 [J]. 中国畜禽传染病, 1996, 87 (2): 3 - 7.
- [4] Gao Z Q, Guo X, Yang H C. Genomic characterization of two Chinese isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. Archives of Virology, 2004, 149 (7): 1341 - 1351.
- [5] Chen J, Liu T, Zhu C G, et al. Genetic variation of Chinese PRRSV strains based on ORF5 sequence [J]. Biochemical Genetics, 2006, 44 (9/10): 421 - 431.
- [6] Benfield D A, Nelson E, Collins J E, et al. Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR - 2332) [J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc, 1992, 4 (2): 127 - 133.
- [7] Snijder E J, Van Tol H, Roos N, et al. Non - structural proteins 2 and 3 interact to modify host cell membranes during the formation of the arterivirus replication complex [J]. Journal of General Virology, 2001, 82 (5): 985 - 994.
- [8] Kimman T G, Cornelissen L A, Moormann R J, et al. Challenges for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccinology [J]. Vaccine, 2009, 27 (28): 3704 - 3718.
- [9] Meulenber J J, Petersen - Den Besten A, De Kluyver E P, et al. Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus [J]. Virology, 1995, 206 (1): 155 - 163.
- [10] Allende R, Lewis T L, Lu Z, et al. North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non - structural protein coding regions [J]. Journal of General Virology, 1999, 80 (2): 307 - 315.
- [11] Tian K G, Yu X L, Zhao T Z, 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 (6): e526.
- [12] Tong G Z, Zhou Y J, Hao X F, et al. Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome, China [J]. Emerging Infectious Diseases, 2007, 13 (9): 1434 - 1436.
- [13] 童光志, 周艳君, 郝晓芳, 等. 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒的分离鉴定及其分子流行病学分析 [J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29 (5): 323 - 327.
- [14] 韦祖樟, 孙志, 袁世山. 猪繁殖与呼吸综合征病毒分子生物学研究进展 [J]. 微生物学通报, 2008, 35 (3): 408 - 413.