

华北地区猪繁殖与呼吸综合征病毒变异分析

焦文强,白献晓*,徐引弟,王克领,郎利敏,朱文豪,李海利,
张青娴,张立宪,游一,王治方,许峰
(河南省农业科学院 畜牧兽医研究所 河南 郑州 450002)

摘要: 为了解华北地区猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)的遗传变异情况,通过对2014—2016年从河南、河北、山东、山西4省采集的疑似猪繁殖与呼吸综合征(PRRS)病料进行检测,将扩增得到的PRRS阳性样品的ORF5基因进行测序,分析华北地区2014—2016年PRRSV的变异情况。结果表明,2014—2016年华北地区流行毒株与国内外代表性毒株核苷酸同源性在84.6%~99.8%;抗原位点比对结果显示,变异株中和表位第37—44位氨基酸为SH(I/L/F)QLIY(N/K),诱骗表位27—30位氨基酸为(V/A)L(V/A)N;系统进化树分析表明,以CH-1a为代表的变异株、以VR-2332为代表的经典毒株以及NADC30毒株在华北地区同时存在。可见,华北地区PRRSV流行情况复杂。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合征病毒; ORF5; 序列分析; 进化

中图分类号: S855.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2017)10-0128-04

Variation Analysis of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Isolates in Northern China

JIAO Wenqiang, BAI Xianxiao*, XU Yindi, WANG Keling, LANG Limin, ZHU Wenhao, LI Haili,
ZHANG Qingxian, ZHANG Lixian, YOU Yi, WANG Zhifang, XU Feng
(Institute For Animal Husbandary and Veterinary Research, Henan Academy of
Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In order to elucidate the evolution of the porcine reproductive and respiratory virus (PRRSV) in northern China from 2014 to 2016, suspicious samples collected from Henan, Hebei, Shandong and Shanxi province were subject to PRRSV diagnosis, the positive samples were further subject to RT-PCR to obtain the sequence of ORF5. The sequence acquired were further aligned with the ORF5 sequence available in GenBank to construct phylogenetic tree. Also, antigenic sites of ORF5 compared to those of other isolates to analyse whether the antigenic sites has changed or not. Sequence comparison showed that the homology of ORF5 gene obtained in the present study was up to 84.6%—99.8%. Antigenic site comparison showed that neutralizing epitopes of the HP-PRRSV located at 37—44 were SH(I/L/F)QLIY(N/K), decoy epitope located at 27—30 were (V/A)L(V/A)N. Phylogenetic tree showed that HP-PRRSV with the representative strain CH-1a, together with classic PRRSV represented by VR-2332 and NADC30 strain have been circulating in northern China. In conclusion, the PRRSV has been increasingly complicated.

Key words: porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV); ORF5; sequence analysis; evolution

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

virus, PRRSV) 引起的一种以母猪流产、早产, 仔猪发生呼吸道疾病为特征的烈性传染病^[1-4]。该病于1987年首次在美国报道, 之后迅速蔓延至世界上大

收稿日期: 2017-04-28

基金项目: 河南省科技攻关项目 (162102110050, 162102110042); 河南省农业科学院自主创新基金项目 (2016ZC51, 2017ZC49)

作者简介: 焦文强 (1982-), 男, 河南新乡人, 助理研究员, 博士, 主要从事分子病毒学方面研究。

E-mail: wenqiangjiao@163.com

* 通讯作者: 白献晓 (1963-), 男, 河南南阳人, 研究员, 主要从事动物传染病诊断方面的研究。E-mail: 1030410210@qq.com

多数养猪国家^[5]。我国学者郭宝清于 1996 年首次从病料中分离到 PRRSV,证实了 PRRS 在我国的存在^[6]。2006 年,我国大多数养猪省份暴发了以母猪高烧、流产为主要特征的高致病性蓝耳病(HP-PRRS),并一直延续至今,严重威胁着我国养猪业的健康发展,其病原被认定为 PRRSV 变异株^[7-8]。

PRRSV 属于动脉炎病毒科(Arterivirus)动脉炎病毒属(Arteriviridae)成员,分为 2 个基因型:以 VR-2332 株为代表的北美洲型和以 LV 株为代表的欧洲型。PRRSV 基因组为单股正链 RNA,长度约为 15 kb,含 9 个开放阅读框(ORFs),编码 2 个非结构蛋白(NSPs)和 7 个结构蛋白(SP)。其中,ORF5 编码的 GP5 蛋白是变异最大的结构蛋白,成为分析 PRRSV 遗传变异和进化的首选对象^[9-10]。接种疫苗是目前防控 PRRS 最有效的办法,但 PRRSV 在免疫压力下发生变异,规避中和抗体的中和作用。PRRSV 整个生命周期中缺乏真核生物中复制酶 5'-3'的校正作用,使得 PRRSV 基因组存在较大可能的错配现象。此外,PRRSV 普遍存在缺失、插入以及重组现象^[11-13],以及由于某种不确定因素导致病毒生命周期意外终止而产生大量的准种,使得 PRRSV 同源重组、变异、突变情况变得异常复杂^[14-15]。同时 PRRSV 不同毒株间的交叉保护力非常差,且疫苗研发相对于病毒变异往往处于滞后的状态。因此,针对 PRRSV 主要结构蛋白,如 GP5 进行遗传变异检测就显得十分重要。

为深入了解华北地区 PRRSV 遗传变异情况,对 2014 年 11 月至 2016 年 8 月从河南、河北、山西、山东规模化猪场采集的样品进行检测,扩增 PRRSV ORF5 基因并进行测序分析,旨在为有效指导临床 PRRS 的防控工作提供参考。

1 材料和方法

1.1 供试病料

于 2014 年 11 月至 2016 年 8 月共采集河南、山西、河北、山东等地区疑似病料 553 份,包括肺脏、淋巴结、血液等。

1.2 主要试剂

Taq DNA 聚合酶、鼠源反转录酶(M-MLV)、RNA 酶抑制剂、pMD18-T Simple 载体、DL2000 Marker 均购自大连宝生物工程有限公司;Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司,琼脂糖购自 Oxoid 公司,其他试剂均为国产分析纯。

1.3 引物设计

参考 GenBank 中已发表的 PRRSV 毒株 ORF5 序列的保守区序列,应用 Primer Premier 5.0 软件设计引物,ORF5-F:5'-CCATTCTGGTGGCAATTTGA-3',

ORF5-R:5'-GGCATATATCATCACTGGCG-3'。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

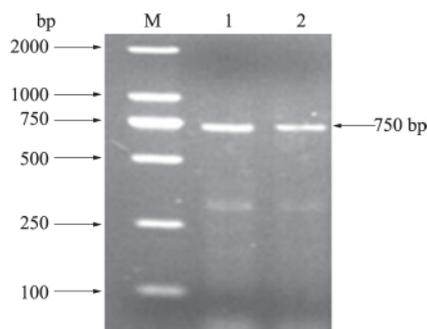
1.4 PRRSV ORF5 基因的克隆与测序

按照 Trizol 试剂操作说明书提取疑似样品的 RNA,随即合成 cDNA,反应条件为 42 °C 1.5 h,70 °C 10 min。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,反应程序为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 30 s,57 °C 30 s,72 °C 1 min,35 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。扩增结束后,取 5 μL PCR 产物于 1.0% 琼脂糖凝胶中电泳检测扩增结果,回收与预期大小一致的 PCR 产物,并与 pMD18-T Simple 载体连接,4 °C 连接过夜后转化至 JM109 感受态细胞,蓝白斑筛选后挑取单克隆进行培养并提取质粒,质粒送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。使用 MegAlign 软件将本研究得到的 PRRSV 序列与 GenBank 中收录的 PRRSV 序列进行核苷酸和氨基酸的比对,使用 MEGA 5.0 软件构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 PRRSV ORF5 基因的扩增结果

从图 1 可以看出,PCR 扩增 PRRSV ORF5 可得到 750 bp 大小的片段,符合预期大小。553 份待检样品中,有 127 份样品检测为 PRRSV 阳性,阳性率高达 22.97%。



M 为 DL 2000 Marker; 1、2 为待检样品

图 1 PRRSV ORF5 扩增结果

2.2 PRRSV ORF5 基因序列比对

本研究得到的 16 株(HEB-HD、HENAN-JIAOZ、HENAN-XINX、HENAN-XINX3、HEN-AY、HEN-AY2、HEN-KF、HEN-NY2、HEN-NY、HEN-PDS、HEN-PY、HEN-XC、HEN-ZHUMD、HEN-ZK、SHANDONG-DM、SHANXI-JINC) PRRSV 毒株均为北美洲型,与国内外分离毒株核苷酸同源性在 84.6%~99.8%,与 NADC30 毒株核苷酸同源性在 84.7%~96.4%(图 2)。

2.3 PRRSV ORF5 抗原位点比对结果

从图 3 可以看出,ORF5 的突变主要集中在第 3~17 位氨基酸、第 23~39 位氨基酸、第 121~128

位氨基酸、第 161 ~ 170 位氨基酸。其中,位于第 37—44 位氨基酸的中和表位,第 39 位氨基酸 I 大多突变为 L 或者 F,第 44 位氨基酸存在 N→K 的突变,

其氨基酸为 SH(I/F/L)QLIY(N/K);位于第 27—30 位氨基酸的诱骗表位,其氨基酸为 V(A)LA(V)N;第 13 位氨基酸中存在 R→Q 的突变。

相似性/%

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1	95.7	95.2	86.7	86.4	91.7	91.7	95.5	94.2	91.5	95.7	86.6	86.4	95.7	94.2	94.0	95.4	95.0	87.7	95.0	94.7	93.4	92.0	4
2	4.5	99.2	87.6	86.7	89.6	90.9	98.3	96.7	91.0	97.8	88.9	87.9	98.3	97.5	96.4	99.0	99.0	87.1	99.0	98.7	96.0	89.9	2
3	5.0	0.8	88.1	85.9	89.1	91.0	99.2	96.8	90.9	98.0	88.4	87.7	98.5	98.0	96.8	99.5	99.8	86.2	99.8	99.5	96.5	89.4	3
4	15.0	13.9	14.5	93.5	86.4	85.1	87.2	87.1	84.9	87.6	98.0	92.0	87.9	85.7	84.6	86.6	86.9	96.4	86.9	86.6	84.6	86.1	4
5	15.3	14.9	16.0	6.8	86.2	84.6	86.2	86.4	84.7	87.2	92.4	98.2	86.7	85.1	85.1	85.7	85.7	95.2	85.7	85.4	84.7	85.9	5
6	8.9	11.4	12.0	15.4	15.6	97.7	89.7	89.4	98.2	90.2	85.1	85.2	89.9	88.1	86.6	88.9	88.9	86.4	88.9	88.6	86.6	99.3	6
7	8.9	9.8	9.6	17.2	17.8	2.4	91.0	90.7	98.2	91.5	85.4	85.6	91.2	89.7	88.6	90.9	90.9	84.7	90.9	90.5	88.6	98.3	7
8	4.6	1.7	0.8	14.3	15.6	11.2	9.6	97.3	91.2	98.2	87.9	87.9	98.3	97.7	96.7	99.0	99.0	86.4	99.0	87.9	86.4	90.0	8
9	6.1	3.4	3.2	14.5	15.4	11.6	10.0	2.7	90.5	97.8	87.9	88.2	96.7	95.4	94.4	96.7	96.7	86.6	96.7	96.4	94.0	90.0	9
10	9.1	9.7	9.9	17.3	17.5	1.9	1.9	9.5	10.2	91.4	85.9	86.4	91.4	89.9	88.4	90.7	90.7	84.9	90.7	90.4	88.4	95.7	10
11	4.5	2.2	2.0	13.9	14.3	10.6	9.1	1.9	2.2	9.3	89.4	88.4	98.2	96.8	95.9	98.2	97.8	87.4	97.8	97.5	95.9	90.5	11
12	15.2	12.3	12.9	2.0	8.1	17.1	16.7	13.5	13.5	16.0	11.7	92.9	88.9	87.1	86.2	88.2	88.2	95.2	88.2	87.9	86.2	84.7	12
13	15.4	13.5	13.7	8.5	1.8	16.9	16.5	13.5	13.1	15.4	12.9	7.6	88.2	86.6	86.6	87.2	87.6	93.4	87.6	87.2	86.2	84.9	13
14	4.5	1.7	1.5	13.5	14.9	11.0	9.4	1.7	3.4	9.3	1.9	12.3	13.1	13.1	96.8	95.7	98.0	98.3	87.1	98.3	98.7	95.7	14
15	6.1	2.5	2.0	16.2	17.1	13.3	11.2	2.4	4.8	11.0	3.2	14.5	15.2	3.2	96.0	98.3	97.8	85.1	97.8	98.2	95.7	88.2	15
16	6.3	3.8	3.2	17.7	17.1	15.1	12.6	3.4	5.9	12.8	4.3	15.6	15.2	4.5	4.1	97.3	96.7	85.7	96.8	96.5	99.3	86.9	16
17	4.8	1.0	0.5	15.1	16.2	12.2	9.8	1.0	3.4	10.0	1.9	13.1	14.3	2.0	1.7	2.7	99.3	86.1	99.3	99.2	97.0	89.2	17
18	5.2	1.0	0.2	14.7	16.2	12.2	9.8	1.0	3.4	10.1	2.2	13.1	13.9	1.7	2.2	3.4	0.7	86.1	99.7	99.3	96.7	89.2	18
19	13.7	14.6	15.6	3.8	5.0	15.4	17.7	15.4	15.2	17.4	14.1	5.0	7.0	14.6	17.2	16.2	15.8	15.9	86.1	85.7	85.4	86.1	19
20	5.2	1.0	0.2	14.7	16.2	12.2	9.8	1.0	3.4	10.1	2.2	13.1	13.9	1.7	2.2	3.2	0.7	0.3	15.9	99.3	96.5	89.2	20
21	5.6	1.3	0.5	15.2	16.7	12.6	10.2	1.3	3.8	10.5	2.5	13.5	14.4	1.3	1.9	3.6	0.8	0.7	16.3	0.7	96.2	88.9	21
22	7.0	4.1	3.6	17.7	17.5	15.1	12.6	3.8	6.3	12.8	4.3	15.6	15.6	4.5	4.5	0.7	3.1	3.4	16.7	3.6	3.9	86.9	22
23	8.5	11.0	11.6	15.8	16.0	0.7	1.7	10.8	10.8	2.5	10.2	17.6	17.3	10.6	13.3	14.7	11.8	11.8	15.9	11.8	12.2	14.7	23
1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23

图 2 ORF5 核苷酸序列比对结果

MLGKCLTACC... (Sequence alignment showing amino acid differences between various PRRSV ORF5 strains. The alignment is shown in a grid format with amino acid codes (e.g., M, L, G, K, C, L, T, A, C, C, S, R, L, L, F, W, C, I, V, P, F, Y, L, A, V, L, A, N, A, S, H, N, S, S, H, I, Q, L, I, Y, N, L, T, L, C, E, I, G, T, D, W, L, A, Q, K, F, D, W, A, V, E, T, F, V, I, F, F, V, L, T, H, I, V, S, Y, G, A, L, T, T, S, H, F, L, D, V, G, L, A, T, V, S, T, A, G, Y, Y) and strain names listed on the right side of the alignment.

图 3 PRRSV ORF5 主要抗原位点比对结果

2.4 基于 PRRSV ORF5 构建的系统进化树

由图 4 可知,本研究得到的毒株均为北美洲型毒株,且 HEN - AY、HEN - NY、HENAN - XINX3 与 VR - 2332 毒株在一个分支,表明 HEN - AY、HEN - NY、HENAN - XINX3 属于经典毒株; HEN - PDS、HEN - PY、HENAN - JIAOZ、HENAN - XINX 与 NADC30 毒株在一个分支,表明 HEN - PDS、HEN - PY、HENAN - JIAOZ、HENAN - XINX 为 PRRSV NADC30 毒株;其他毒株与 CH - 1a 毒株在一个分支,均为高致病毒株。以 CH - 1a 为代表的变异株、以 VR - 2332 为代表的经典毒株以及 NADC30 毒株同时存在,表明华北地区 PRRSV 流行情况日益复杂。

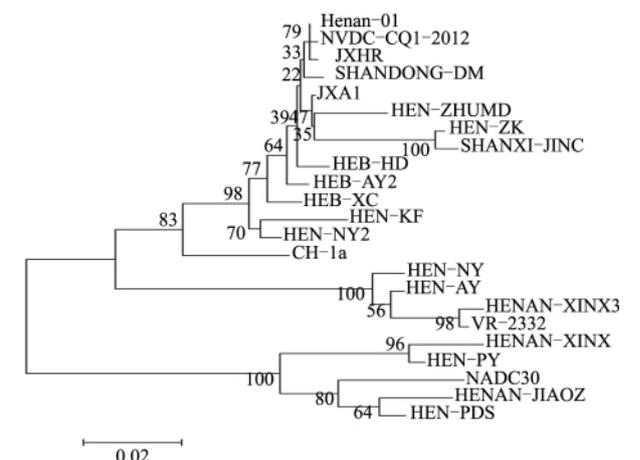


图 4 基于 ORF5 构建的系统进化树

3 结论与讨论

将本研究得到的 PRRSV ORF5 核苷酸序列与国内外毒株的序列进行比对,结果显示,核苷酸同源性在 84.6%~99.8%,分离到的流行毒株均为北美洲型毒株,且不同区域间的差异较大。R13 被认为与 PRRSV 的毒力存在某种潜在的联系,抗原位点的比对结果发现,分离株第 13 位氨基酸发生了 R→Q 的突变,在 NADC30 毒株中也存在同样的突变,该位点的突变与周峰等^[16]的研究相一致。

位于第 37—44 位氨基酸的中和性抗原位点目前已经确定存在于北美洲型 PRRSV 毒株中,中和抗体的识别位点是第 38、42、43、44 位氨基酸,而第 39、40、41 位氨基酸被认为是结合位点^[17]。本研究结果显示,分离株的中和抗体识别位点第 44 位氨基酸存在 N→K 突变,而中和抗体结合位点的第 39 位氨基酸存在 I→L 突变以及 I→F 突变。第 27—30 位氨基酸的诱骗表位可以推迟中和抗体的产生,其氨基酸为 V(A)LA(V)N,这些氨基酸的突变对于表位的影响还有待于进一步研究^[18]。这些位点的突变可能是 PRRSV 在疫苗压力下产生的应变,也可能是病毒自身随机重组产生,其突变可能导致中和抗体不能有效识别和结合 PRRSV,从而导致免疫失败。关于 R13 突变对于病毒毒力的影响,需要进一步研究。

系统进化树分析显示, HEN-AY、HEN-NY、HENAN-XINX3 与 VR-2332 毒株处于一个分支, HEN-PDS、HEN-PY、HENAN-JIAOZ、HENAN-XINX 与 NADC30 毒株处于同一个分支,其他毒株均为 PRRSV 高致病病毒株。综合上述情况,经典毒株与高致病病毒株同时存在,加之新近流行毒株 NADC30 的出现^[19],使得华北地区 PRRSV 流行情况日益复杂,PRRS 的防控更加困难。针对目前这种情况,单一的针对经典毒株、高致病病毒株或者 NADC30 毒株的疫苗很难达到令人满意的防控效果。采用基因工程方法,开发针对多种毒株、不同抗原位点的新型疫苗显得极为迫切。

参考文献:

- [1] 司朝朝,史西保,李恭贺,等.猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒非结构蛋白 nsp1 α 的表达及活性检测[J].河南农业科学,2015,44(1):126-129.
- [2] 赵孟孟,冯丽丽,张二芹,等.猪繁殖与呼吸综合征病毒 NSP9 蛋白的亚细胞定位与功能预测[J].河南农业科学,2016,45(12):138-142.
- [3] 侯婕,李睿,马红芳,等.猪繁殖与呼吸综合征病毒入

- 侵受体唾液酸黏附素的表达与纯化[J].河南农业科学,2016,45(3):130-134.
- [4] 孟帆,姚敬明,吴忻,等.猪群暴发猪瘟与蓝耳病混合感染的诊断与防控[J].山西农业科学,2010,38(6):66-68.
- [5] Keffaber K K. Reproductive failure of unknown etiology[J]. Am Assoc Swine Pract Newsl,1989,1:1-9.
- [6] 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(2):1-4.
- [7] Tian K G, Yu X L, Zhao T Z, et al. Emergence of fatal PRRSV variants: Unparalleled outbreaks of a typical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark[J]. PLoS One, 2007, 2(6): e526.
- [8] Zhou L, Yang H C. Porcine reproductive and respiratory syndrome in China[J]. Virus Res, 2010, 154: 31-37.
- [9] Key K F, Haqshenas G, Guenette D K, et al. Genetic variation and phylogenetic analysis of the ORF5 gene of acute porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolated[J]. Vet Microbiol, 2001, 83(3): 249-263.
- [10] Chen J, Liu T, Zhu C G, et al. Genetic variation of Chinese PRRSV strains based on ORF5 sequence[J]. Biochem Genet, 2006, 44(9/10): 425-435.
- [11] Goldberg T L, Hahn E C, Weigel R M, et al. Genetic geographical and temporal variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Illinois[J]. J Gen Virol, 2000, 81: 171-179.
- [12] Meng X J. Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: Implications for current vaccine efficacy and future vaccine development[J]. Vet Microbiol, 2007, 74(4): 309-329.
- [13] 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.
- [14] Stadejek T, Stankevicius A, Storggaard T, et al. Identification of radically different variants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Eastern Europe: Towards a common ancestor for European and American virus[J]. J Gen Virol, 2002, 83: 1861-1873.
- [15] 周海范,夏平安,崔保安,等.猪繁殖与呼吸综合征病毒河南分离株 ORF5 基因的克隆与变异分析[J].中国兽医学报,2007,27(6):810-813.
- [16] 周峰,常洪涛,赵军,等.2012—2013 年猪繁殖与呼吸综合征病毒河南流行株的分离鉴定及分子流行病学调查[J].中国兽医学报,2014,34(9):1398-1404,1410.
- [17] 王金凤.河北省 2007—2011 年猪繁殖与呼吸综合征病毒的分子流行病学调查[D].保定:河北农业大学,2011.
- [18] 韩一超,刘文俊,姚敬明,等.猪繁殖与呼吸综合征病毒 Shanxi-6 株全基因序列分析[J].华北农学报,2014,29(2):62-65.
- [19] 王林建,郭振华,乔松林,等.河南地区 NADC30-like PRRSV 毒株的增殖特性与遗传进化分析[J].河南农业科学,2017,46(3):122-128.