

# 豫西地区 PRRSV 新近流行株 *ORF 5* 基因变异及 *Nsp 2* 基因特征分析

张明亮<sup>1</sup>, 张春杰<sup>1\*</sup>, 程相朝<sup>1</sup>, 赵星灿<sup>2</sup>, 李银聚<sup>1</sup>, 吴庭才<sup>1</sup>, 李 正<sup>1</sup>, 杨宁宁<sup>1</sup>

(1. 河南科技大学 动物科技学院, 河南 洛阳 471003; 2. 洛阳市动物疫病预防控制中心, 河南 洛阳 471002)

**摘要:** 为研究豫西地区猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 新近流行株 *ORF5* 基因的变异情况及 *Nsp2* 基因的结构特征, 采用 RT-PCR 方法扩增了 26 份近期采自豫西地区猪场疑似 PRRS 猪肺脏样品中的 *ORF5* 全序列和 *Nsp2* 部分序列, 并对其生物信息学和结构进行了分析。结果表明: 成功扩增出的 21 株 PRRSV 流行株间 *ORF5* 全基因同源性为 96.6%~100%, 氨基酸同源性为 97.5%~100%; 与参考毒株 JXA1、MLV、VR-2332 和 LV 的核苷酸同源性分别为 96.6%~98.9%、88.4%~89.2%、88.0%~89.5% 和 66.8%~67.3%; 对阳性病料进行了部分 *Nsp2* 基因的扩增, 测序结果显示, 所有流行株的 *Nsp2* 基因与已报道的美洲株 VR-2332 相比, 不存在核苷酸的插入或突变, 但存在 2 个位点共 90 个碱基的缺失; 遗传衍化分析表明, 流行毒株属于美洲型。研究结果揭示了豫西地区新近流行的 PRRSV *ORF5* 基因的变异情况及 *Nsp2* 基因的特征, 为该地区的 PRRS 防控工作提供了理论依据。

**关键词:** 猪繁殖与呼吸综合征病毒; 流行株; *ORF 5* 基因; *Nsp 2* 基因; 变异分析

**中图分类号:** S858.28      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1004-3268(2012)01-0137-05

## Genetic Variations of the *ORF5* and *Nsp2* Genes of the Prevalent PRRSV Isolates from Western Henan Province

ZHANG Ming-liang<sup>1</sup>, ZHANG Chun-jie<sup>1\*</sup>, CHENG Xiang-chao<sup>1</sup>, ZHAO Xing-can<sup>2</sup>,  
LI Yin-ju<sup>1</sup>, WU Ting-cai<sup>1</sup>, LI Zheng<sup>1</sup>, YANG Ning-ning<sup>1</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China;

2. Luoyang Center of Prevention and Control of Animal Diseases, Luoyang 471002, China)

**Abstract:** To determine the genetic variations of the *ORF5* and *Nsp2* genes of prevalent PRRSV isolates from western Henan, the complete *ORF5* gene and subsequence for *Nsp2* gene of PRRSV were amplified by RT-PCR from lung samples of swine. A total of 21 complete *ORF5* and subsequence for *Nsp2* sequences were successfully amplified from 26 case samples. Homology for 21 complete *ORF5* gene and amino acids sequences are 96.5%–100% or 97.5%–100%, respectively. Compared to the reference strains JXA1, MLV, and VR-2332, the homology of gene were 96.5%–98.8%, 87.4%–89.1%, and 87.7%–89.4%. Subsequence for *Nsp2* sequence were amplified from positive samples and compared to other published sequences, two point deletions and 90 bp were deleted. It indicates that the prevalent PRRSV isolates from western Henan belong to Northern American genotype. Our study provides some basis for further controlling PRRS in this area.

**Key words:** PRRSV; prevalent strain; *ORF5* gene; *Nsp2* gene; variation analysis

收稿日期: 2011-07-16

基金项目: 洛阳市科技攻关项目 (0801048A)

作者简介: 张明亮 (1985-), 男, 河南驻马店人, 在读硕士研究生, 研究方向: 分子免疫学。E-mail: mingliang90909@163.com

\* 通讯作者: 张春杰 (1964-), 女, 河南南召人, 教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事动物疫病防控和分子免疫学研究。

E-mail: cjzhang@sina.com

猪繁殖与呼吸综合征(porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)是以持续感染和免疫抑制为主要特征的猪病毒性传染病,该病于 1987 年在美国首次发现,随后迅速在全世界蔓延,给养猪业造成了巨大的损失<sup>[1]</sup>。近年来,毒力增强的 PRRSV 变异毒株不断出现,给该病的预防和控制带来了新的挑战<sup>[2]</sup>。

PRRSV 为单股正链 RNA 病毒,大小约 15 kb,含有 8 个开放阅读框(ORF),其中 *ORF1* (包括 *ORF1a* 和 *ORF1b*)编码病毒 RNA 复制酶;*ORF2*—*7* 分别编码病毒结构蛋白 GP2、GP3、GP4、GP5、M 和 N 蛋白。*Nsp2* 基因编码的蛋白属非结构蛋白,其基因序列是整个 PRRSV 基因组中变异最大的区域之一,有报道指出,近年来夏秋流行的高热病与该段基因密切相关,该区 90 个碱基序列的缺失可能是造成 PRRSV 毒力增强的原因<sup>[3]</sup>。GP5 蛋白是 PRRSV 的主要结构蛋白<sup>[4]</sup>,且具有较高的免疫原性,能够诱导机体产生中和抗体。同时,也有学者指出,GP5 蛋白还参与了病毒粒子结合细胞膜受体的过程<sup>[5]</sup>。尽管 PRRSV 不同毒株之间各个 *ORF5* 开放阅读框都有一定的变异,但作为 PRRSV 的主要免疫抗原的 GP5 的遗传变异分析显然具有非常重要的流行病学意义。

本研究采集近期豫西地区疑似 PRRS 病料,通过 RT-PCR 方法分别扩增出 PRRSV 的 *ORF5* 和 *Nsp2* 基因,并对其生物信息学和结构进行分析,旨在了解该地区新近流行的 PRRSV 毒株的主要中和性抗原基因 *ORF5* 的变异情况及 *Nsp2* 基因的结构特征,为查找 PRRS 免疫失败的原因提供理论支持,进而为建立一套行之有效且较为完善的 PRRS 防控体系奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 病料采集

2010 年 11 月至 2011 年 4 月,在洛阳、平顶山、焦作、三门峡等市动物疫病预防控制中心无菌采集来自各县市的 26 份疑似 PRRS 的猪脾脏、肺脏、肺门淋巴结等组织,并于 -20℃ 保存备用。

### 1.2 引物设计

参照 PRRSV 美洲标准株 VR-2332(AY150564)的基因序列,设计合成 1 对针对 *ORF5* 基因(跨度 739 bp)的特异性引物 P1 和 P2,上下游引物 5'端分别添加 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切位点(引物中划线部分);参照文献<sup>[12]</sup>合成 *Nsp2* 基因(跨度 320 bp)的特异性引物 P3 和 P4。其序列为:

P1: 5'-GAATTCCATGAGGTGGGCAACT-GT-3'; P2: 5'-AAGCTTCACTGGCGTGTAGG-TAATAGAA-3'。P3: 5'-TGATGGGCGACAAT-GTCC-3'; P4: 5'-CGCAGACAAATCCAGAGG-3'。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

### 1.3 工具酶及试剂

Ex Taq HS 酶、pMD-18T、DL1000 Marker、Trizol 等试剂均购于宝生物工程(大连)有限公司;AMV 反转录酶,限制性内切酶 *Hind* III、*EcoR* I 购于 Promega 公司;DNA 凝胶回收试剂盒购于 Geneaid 公司;质粒(小量)提取试剂盒购于上海生工生物工程技术服务有限公司。

### 1.4 *ORF5* 基因和 *Nsp2* 基因的扩增

1.4.1 病料的处理 取 0.5 g 左右的肺脏组织置于匀浆器中,剪碎病料,并加入 1 mL 灭菌双蒸水(DEPC 处理),于冰浴中匀浆处理后转移至 1.5 mL EP 管中,-70℃ 反复冻融 3 次,5 000 r/min 离心 5 min,取上清-20℃ 保存备用。

1.4.2 RNA 的提取 按 Trizol 试剂盒操作说明书提取病料组织总 RNA。

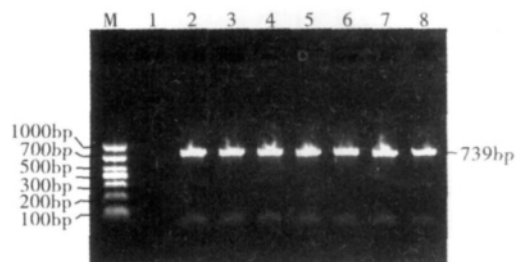
1.4.3 RT-PCR 扩增 以病料总 RNA 为模版,用 AMV 反转录酶和 Ex Taq HS 酶采用两步法扩增 *ORF5* 全序列和 *Nsp2* 部分基因。RT 为 10 μL 反应体积,包括 Oligo-dT 0.5 μL、dNTP Mixture 1 μL、MgCl<sub>2</sub> 2 μL、5×RT Buffer 2 μL、AMV 反转录酶 0.25 μL(10 U/μL)、RNase inhibitor 0.25 μL、RNA 1 μL、RNase Free H<sub>2</sub>O 3 μL。反应参数:42℃ 50 min,99℃ 5 min,5℃ 5min。PCR 反应体系如下:5×PCR Buffer 5 μL、Ex Taq HS 0.13 μL、P1(P3) 0.25 μL、P2(P4) 0.25 μL、cDNA 5 μL,用双蒸水补平总体积至 25 μL。*ORF5* 基因扩增参数如下:94℃ 预变性 3 min;94℃ 变性 30 s,57℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 45 s,35 个循环;然后 72℃ 后延伸 10 min。1%琼脂糖凝胶电泳观察扩增产物。

1.4.4 *ORF5* 基因和 *Nsp2* 基因的克隆及序列分析 PCR 产物用 Geneaid 公司的凝胶回收试剂盒回收,并与 pMD-18T 载体连接,转化至大肠杆菌 JM109 感受态细胞中,涂布于含 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 平板上,37℃ 培养 12~16 h。经蓝白斑筛选后,用质粒(小量)提取试剂盒提取质粒,用 *Hind* III 和 *EcoR* I 进行酶切鉴定。取 1 mL 经酶切鉴定正确的菌液送上海生工生物工程技术服务有限公司测序,并用 DNASTar 和 NCBI BLAST 软件分析测序结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 *ORF5* 基因的 RT-PCR 扩增结果

对采集的 26 份疑似 PRRS 病料进行 *ORF5* 基因的 RT-PCR 扩增,结果显示,21 份病料为阳性样品,依次编号为 YX-1—YX-21。琼脂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. DNA Marker DL1000; 1. 阴性对照; 2. YX-1; 3. YX-2;  
4. YX-3; 5. YX-4; 6. YX-5; 7. YX-6; 8. YX-7

图 1 部分疑似 PRRS 病料 *ORF5* 基因 RT-PCR 扩增结果

### 2.2 *ORF5* 基因核酸序列分析

对所得到的 21 份阳性病料的基因测序,均得到预期的 739 bp 的片段。将 21 个基因片段在 GenBank 上

比对显示,所得到的 *ORF5* 全基因不存在碱基的插入和缺失。分别截取各 *ORF5* 全基因 603 bp,用生物分析软件 DNASTar 将其与疫苗株 JXA1 及 MLV、美洲型代表毒株 VR-2332 进行比对分析。结果显示,21 个 *ORF5* 核酸序列间同源性的 96.5%~100%;与 JXA1、MLV、VR-2332 及 LV 的同源性分别为 96.6%~98.9%、88.4%~89.2%、88.0%~89.5%及 66.8%~67.3%。

### 2.3 *ORF5* 基因核酸遗传进化分析

为分析各毒株间在遗传进化上的距离,采用 DNASTar 软件将 21 个完整的 *ORF5* 全基因序列与 CH-1a、VR-2332、LV、MLV 和 JXA1 的 *ORF5* 基因序列进行比对,并构建了遗传进化树,如图 2 所示。

本研究所得到的 21 个 *ORF5* 全基因序列同源性很高,遗传进化分析表明,其与 JXA1 遗传距离最近,与 CH-1a 的遗传距离较近,与 VR-2332 及 MLV 的遗传距离较远,与 LV 遗传距离最远。可以推断,豫西地区 PRRSV 新近流行株所有 *ORF5* 基因同属于美洲株。所有 *ORF5* 基因与 JXA1 同位于一个分支上,且与 JXA1 有一定的遗传距离。

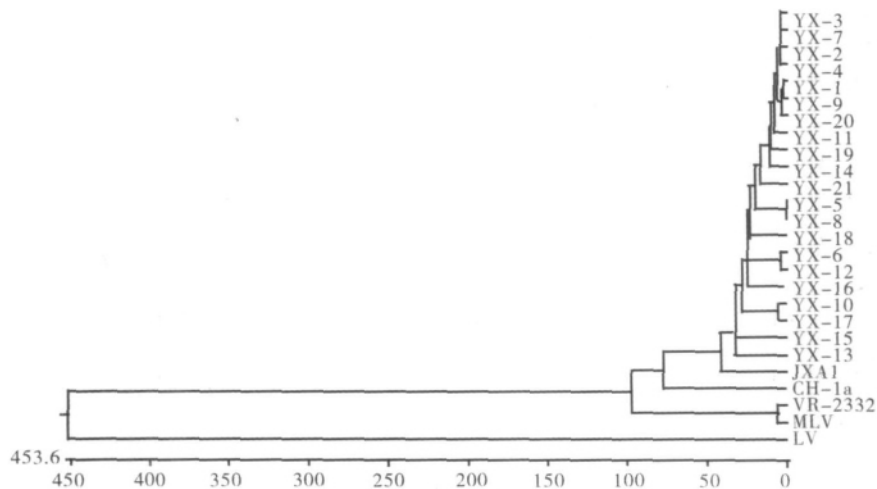


图 2 PRRSV *ORF5* 基因遗传进化分析

### 2.4 *ORF5* 基因编码的氨基酸序列比对分析

将得到的 21 个 *ORF5* 基因的核苷酸序列翻译成氨基酸,并将其与国内代表株 JXA1、美洲代表株 VR-2332 及欧洲代表株 LV 等进行比对。结果显示,所得毒株 *ORF5* 基因的核酸序列编码 200 个氨基酸,各毒株间氨基酸同源性为 97.5%~100%;与 VR-2332、MLV、CH-1a、JXA1 及 LV 的同源性分别为 93.6%~95.0%, 93.1%~94.6%, 95.5%~97.0%, 97.0%~98.5% 和 52.0%~

53.0%。21 个流行株的氨基酸序列均不存在氨基酸缺失,但存在多个位点的突变,如:第 34 位氨基酸由 Asp 变为 Ser,第 39 位氨基酸由 Leu 变为 Ile,第 137 位氨基酸由 Ala 变为 Ser 等。

### 2.5 *Nsp2* 基因的扩增与测序结果

用引物 P3 和 P4 扩增了 21 份阳性病料的 *Nsp2* 基因,测序结果表明,所得到的 21 个 PRRSV 流行株的 *Nsp2* 基因与已报道的美洲株 VR-2332 的 *Nsp2* 基因相比不存在核苷酸的插入或突变,但

存在 2 个位点共计 90 个碱基的缺失。

### 3 讨论

众多的研究表明,PRRSV 基因变异是一种多位点的积累效应,在时间、地理、宿主等众多因素的共同作用下,其基因组会产生广泛的变异或重组。*ORF5* 基因是 PRRSV 基因组中变异最大的基因区域之一。本研究发现,所得到的 21 个 *ORF5* 全基因序列与 JXA1 的 *ORF5* 序列高度同源,故认为豫西地区新近流行的 PRRSV 可能为 JXA1 株,但在多个碱基位点上已发生了突变,显示出了明显的地域进化特征。同时结果也提示,猪只的跨地区密切运输可能导致了此种情况的发生。GP5 蛋白是 *ORF5* 基因编码的囊膜糖蛋白,是病毒的 3 种主要结构蛋白之一,具有较高的免疫原性和中和活性<sup>[6]</sup>。研究表明,PRRSV 在猪体内增殖过程中可在 GP5 的多个位点发生变异,本研究所获得的 21 个流行株 *ORF5* 基因所编码的氨基酸序列变异点主要集中在 20 aa~24 aa, 32 aa~39 aa, 59 aa~62 aa 和 104 aa~127 aa。*ORF5* 的第 151 aa 位于 GP5 蛋白的一个高度保守基序的中心,该基序可能位于病毒粒子的表面,参与受体结合或其他重要功能,该位点的变化可能对病毒粒子毒力的变化有重要的影响<sup>[7]</sup>。根据国内外对 PRRSV 强弱毒株的氨基酸分析,强毒株 13 aa 和 151 aa 皆为 Arg,而弱毒株则分别为 Gln 和 Gly<sup>[8]</sup>。对本研究中所得到的 21 个氨基酸序列分析得出,其 13 aa 和 151 aa 位均为 Arg,推断所分离的毒株均为强毒株。同时,在决定病毒是否为准种的 34 aa 位置,YX-13 和 YX-15 由 Asp 突变为 Asn,而其他 19 株则由 Asp 突变为 Ser,提示所分离的该地区的 PRRSV 具有 2 个病毒亚群的特征;在区分病毒是否为野毒的 137 aa 处<sup>[9]</sup>,所获得的 21 个氨基酸序列均为 Ser,推断 21 株豫西地区 PRRSV 新近流行株均为野毒株。

抗原表位是影响病毒免疫特性的重要因素。目前,已确定美洲型 PRRSV 抗原表位有 3 个,其中一个是和抗原表位(37 aa~45 aa),另外 2 个为非中和表位(27 aa~30 aa, 180 aa~197 aa)<sup>[10]</sup>。经分析,本研究得到的 21 个氨基酸序列的 39 aa 均由 Leu 突变为 Ile,这一抗原中和表位的突变可能造成了已免疫猪只 YX-3、YX-12 和 YX-15 免疫的失败,这与赵秦等<sup>[11]</sup>的研究相符合。同时推断,这与该地区弱毒疫苗免疫后不能产生有效的抗体也有一定关系。

*Nsp2* 基因编码的蛋白属非结构蛋白,其基因序列也是整个 PRRSV 基因组中变异最大的区域之一。2007 年,郝晓芳等<sup>[12]</sup>首次报道了 *Nsp2* 基因序列第 482 位和 533~561 位分别有 1 个和 29 个氨基酸缺失。随后的研究中,有研究者认为上述 30 个氨基酸的缺失导致了 PRRSV 毒力的增强。本研究获取的 21 个 PRRSV 流行株 *Nsp2* 基因片段均存在 2 个位点 90 个碱基即 30 个氨基酸的缺失,但 30 个氨基酸的缺失是否导致了 PRRSV 毒力的增强,还有待于进一步的研究。因此,把鉴定 *Nsp2* 基因是否缺失作为 PRRSV 变异的一个条件更为合适<sup>[13]</sup>。

PRRSV 的分子流行病学调查对于追溯病毒来源和分析其变异规律具有重要的现实意义。笔者认为,近年来该地区 PRRS 的流行与病毒 *Nsp2* 基因的 90 个碱基的缺失有着直接的关系,但 PRRSV 主要抗原基因 *ORF5* 的抗原中和表位的突变对毒力的影响也不容忽视。因此,*ORF5* 基因和 *Nsp2* 基因的分子流行病学研究对于弄清 PRRSV 毒力增强原因,预防该地区 PRRS 的流行有着不可估量的作用。

### 参考文献:

- [1] Chen Changmu, Cui Shangjin, Zhang Chaofan, *et al.* Development and validation of reverse transcription loopmediated isothermal amplification for detection of PRRSV[J]. *Virus Genes*, 2010, 40: 76-83.
- [2] 李彬,何孔旺,温立斌,等等. 我国长江流域 PRRSV *ORF3* 基因的遗传变异分析[J]. *华北农学报*, 2011, 26(3): 204-209.
- [3] 董光志,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.
- [4] 刘焕,王一成,袁秀芳,等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP5 蛋白研究进展[J]. *动物医学进展*, 2007, 28(11): 66-70.
- [5] Xia P A, Dang Z G, Qiu H, *et al.* Function of PRRSV GP5 envelope protein by using pseudotyped virus[J]. *Veterinary Microbiology*, 2009, 138: 297-303.
- [6] Johnson C R, Yu Wanqin, Murtaugh M P. Cross-reactive antibody responses to *nsp1* and *Nsp2* porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Journal of General Virology*, 2007, 88: 1184-1195.
- [7] 汤德元,赵启祖,李春燕,等. 贵州猪繁殖与呼吸综合征病毒 *ORF5* 基因的变异分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2009, 40(8): 1271-1275.
- [8] I Kiss, L Sámi, S Kecskeméti, *et al.* Genetic variation of

the prevailing porcine respiratory and reproductive syndrome viruses occurring on a pig farm upon vaccination[J]. Arch Virol, 2006, 151(11): 2269-2276.

- [9] Kijona F K, Gholamreza H, Denis K G, *et al.* Genetic variation and phylogentic analyses of the ORF5 gene of acute porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates [J]. Veterinary Microbiology, 2001, 83(3): 249-263.
- [10] Plagemann P G. GP5 ectodomain epitope of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, strain

Lelystad virus[J]. Virus Res, 2004, 102(2): 225-230.

- [11] 赵秦,王永才,张森,等. 重庆地区流行的 PRRSV 的 ORF5 基因变异分析[J]. 中国预防兽医学报, 2009, 31(5): 403-406.
- [12] 郝晓芳,周艳君,田志军,等. 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒 RT-PCR 鉴别诊断方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(9): 704-709.
- [13] 张凤华,卢晓艳,徐红运,等. 感染 PRRSV *Nsp2* 基因部分缺失变异株的仔猪抗体变压规律[J]. 华北农学报, 2011, 26(3): 68-71.

(上接第 136 页) 植物资源比较丰富,有着极高的潜在开发价值。

2) 在历山自然保护区菊科野生药用植物的开发和利用中要走可持续发展的道路,在保护中开发,在开发中保护,合理、综合开发利用资源,全面提高经济效益和生态效益,实现资源的永续利用。同时,要积极开展药理学、生物学、生态学等相关的基础研究,筛选出适应推广、抗逆行强、药用价值高的种类,以造福人类。

#### 参考文献:

- [1] 吴国芳,冯志坚,马炜梁,等. 植物学[M]. 2 版. 北京:高等教育出版社, 2000.
- [2] 王长如,李红生,任立刚. 黄土高原菊科药用植物资源研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(8): 2273-2275, 2290.

- [3] 石瑛,王瑞祥,胡变芳. 山西省野生菊科药用植物资源研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(23): 12462-12466.
- [4] 张建民,张峰,樊龙锁. 山西历山种子植物区系研究[J]. 植物研究, 2002, 22(4): 444-452.
- [5] 山西植物志编委会. 山西植物志: 第 4 卷[M]. 北京:中国科学技术出版社, 2004.
- [6] 中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第 74、75、76(1)、76(2)、77(2)、78(1)、80(1)、80(2)卷[M]. 北京:科学出版社, 1979、1983、1985、1991、1999、1989、1987、1999、1996、1997、1999.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:化学工业出版社, 2005.
- [8] 陈仁寿. 国家药典中药实用手册[M]. 南京:江苏科学技术出版社, 2004.
- [9] 林有润. 菊科植物的系统分类与区系地理的初步探讨[J]. 植物研究, 1993, 13(2): 151-201.