

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.11.02

一株猪蓝耳病毒的分离鉴定及其全基因组序列的比较分析

罗修鑫, 张华伟, 郝根喜, 曾小燕, 周明光, 徐高原*

(武汉科前生物股份有限公司, 武汉 430070)

[收稿日期] 2020-06-09 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 11-0008-06 [中图分类号] S852.65

[摘要] 从湖北省某猪场分离了一株猪蓝耳病毒(CH-WH-19),其基因组全长是14993 bp。同源性分析结果显示CH-WH-19与NADC30、JXA1、CH-1a、VR-2332和GM2的相似性分别为91.9%、84.3%、83.9%、83.3%和80.5%,但是与欧洲型的毒株Lelystad virus相似性仅有58.9%。GP5基因和全基因组的进化树分析显示,CH-WH-19与NADC30毒株处于同一分支。Nsp2基因氨基酸比对结果发现,CH-WH-19和NADC30毒株与VR2332毒株相比具有不连续的131个氨基酸缺失的特征。同源性和进化树的结果都显示了CH-WH-19属于新变异的类NADC30毒株。GP5序列比对结果表明,CH-WH-19有一些氨基酸的突变,A137是疫苗株VR2332的标志,但CH-WH-19毒株突变成了S,N34是四个潜在的N-糖基化位点之一,突变成了D。试验表明,本研究分离了一株变异的NADC30毒株,生物学特性分析也表明属于类NADC30毒株。

[关键词] 猪蓝耳病毒;分离;鉴定;全基因组;进化树

Isolation and Identification of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and Genomic Comparative Analysis of the Virus

LUO Xiu-xin, ZHANG Hua-wei, HAO Gen-xi, ZENG Xiao-yan, ZHOU Ming-guang, XU Gao-yuan*

(Wuhan Keqian Biology Co. Ltd., Wuhan 430070, China)

Corresponding author: XU Gao-yuan, E-mail: xugaoyuan@163.com

Abstract: A new virulent strain of PRRS virus (PRRSV), CH-WH-19, was isolated in Hubei province, China. The genome of this new strain was 14993 nucleotides (nt) long, and comparative analysis revealed that CH-WH-19 exhibited 91.9%, 84.3%, 83.9%, 83.3% and 80.5% nucleotide similarity to NADC30, JXA1, CH-1a, VR-2332 and GM2, respectively, but only 58.9% identity with type 1 PRRSV Lelystad virus strain. Phylogenetic analysis of the GP5 and genome indicated that CH-WH-19 and NADC30 strains were in the same

基金项目: 武汉市企业技术创新专项(2019020702011378); 武汉市东湖高新区第十二批“3551 光谷人才计划”

作者简介: 罗修鑫, 中级兽医师, 硕士, 从事猪病毒的分离及猪病毒疫苗的研发。

通讯作者: 徐高原。E-mail: xugaoyuan@163.com

branch, in which CH - WH - 19 had the unique discontinuous 131 - amino acid deletion relative to that of the nonstructural protein 2 (Nsp2) of the VR2332 strain. Both homology and evolutionary tree results showed that CH - WH - 19 belonged to the newly mutated NADC30 strain. GP5 sequence alignment showed that CH - WH - 19 had some amino acid mutations, and A137 was the marker of vaccine strain VR2332, but CH - WH - 19 was mutated into S, one of the four potential N - glycation sites of N34, and mutated into D. In summary, a NADC30 - like PRRSV was isolated in this study, and the biological characteristics analysis also revealed that it was NADC30 - like PRRSV.

Key words: PRRSV; isolation; identification; complete genome; phylogenetic analysis

猪蓝耳病 (PRRS) 能够引起母猪流产、木乃伊胎、死产和所有猪呼吸系统疾病^[1]。从 20 世纪 80 年代传播以来给世界养猪业带来了巨大的经济损失^[2]。猪蓝耳病毒 (PRRSV) 是引起 PRRS 的病原,属于正链 RNA 病毒,动脉炎病毒科^[3]。PRRSV 基因组大概有 15 kb,至少有八个 ORF: ORF1a、ORF1b 和 ORFs2 - 7^[4]。ORF1a 和 ORF1b 编码多聚蛋白,可以裂解成非结构蛋白 (Nsps): Nsp1 α 、Nsp1 β 和 Nsp2 - 12^[5], ORFs2 - 7 编码结构蛋白 GP2、GP3 - 5、M 和 N^[6]。PRRSV 分成两个基因型: 欧洲型 (代表毒株 Lelystad virus, LV) 和美洲型 (代表毒株 VR - 2332), 可以引起相似的临床症状和病理变化^[7-8]。

自从 1996 年我国分离出 PRRSV, 该病毒就广泛存在我国猪场并引起 PRRS, 2006 年变异的高致病性 PRRSV (HP - PRRSV) 在中国南方爆发 PRRS, 引起高热、高发病和高死亡^[9-10]。该病毒的典型特征是在 Nsp2 区域有 30 个氨基酸缺失。尽管有减毒活疫苗控制 HP - PRRSV, 但仍有不同的 HP - PRRSV 变异毒株被发现^[11]。2008 年美国国家动物疾病研究中心 (NADC) 首次分离并命名 NADC30 毒株, 其病毒基因组特征与 VR - 2332 毒株相比, Nsp2 存在 131 个不连续的氨基酸缺失, 缺失模式为 “111 + 1 + 19”。2012 年开始, 我国分离到了与美国 NADC30 毒株同源性很高的毒株, 到 2014 年, NADC30 毒株呈现加剧的趋势, 我国东北和华中地区分离到了 NADC30 毒株^[12], 增加了我国 PRRSV 的复杂性和遗传多样性。目前, 我国 PRRSV 基因

突变率高引起更多新的突变毒株产生, 主要流行的美洲型毒株可以分成以 JXA1、CH - 1a、GM2、NADC30 和 VR - 2332 为代表的 5 个亚型^[13-16]。我国 PRRSV 的重组可以在野毒之间或者野毒和活疫苗毒株之间发生, 进一步增加了病毒的多样性。目前这样的重组毒株有 NADC30 类和 JXA1 类重组 (HENAN - HEB、JL580、HNhx、TJnh1501 和 FJ140) 等。本研究从湖北某免疫过 HP - PRRSV 疫苗的发病猪场采集病猪肺组织分离出病毒 (CH - WH - 19), 通过设计 12 对引物测出其全基因组序列并进行生物学特征分析。

1 材料与方法

1.1 试验病料 采自疑似猪繁殖与呼吸综合症的湖北某猪场发病猪的血液及淋巴结、肺脏、脾脏、肾脏等组织。

1.2 主要材料和试剂 Marc - 145 细胞由实验室冻存。DMEM 购自 Gibco 公司; 胎牛血清购自金源康公司; rTaq DNA 聚合酶 Mix 和反转录酶均购自宝生物。

1.3 引物设计 根据 GenBank 上已发表的 PRRSV 全基因序列设计 12 对引物 (表 1) 用于交叉扩增 CH - WH - 19 株全基因组。

1.4 病毒的分离与培养 采集病猪的肺脏用灭菌的生理盐水进行研磨, -80 °C 反复冻融 3 次, 12000 r/min 离心 5 min, 取上清, 用 0.22 μ m 的过滤器进行过滤除菌。将已长成单层的 Marc - 145 细胞, 弃去培养液, 用 PBS 缓冲液清洗一次, 接种 1 mL 已融化的滤液, 同时设正常 Marc - 145 细胞为空白对

照,置培养箱中吸附 1 ~ 2 h 之后取出培养瓶弃滤液,加 5 mL 含 2% 胎牛血清的 DMEM 维持液,于

37 °C 5% CO₂ 细胞培养箱中培养 3 d,每天观察细胞的状态,及时收集病变细胞。

表 1 CH - WH - 19 株全基因组扩增引物表

Tab 1 Full - length genomic sequencing primers of CH - WH - 19

引物名称	大小/bp	上游(5' - 3')	下游(5' - 3')	位置/bp
NA1	1525	AAGACGTATAGGTGTTGGCT	GAATACACCATCCGGTTGGC	1 - 1525
NA2	1384	GGCATTCCACAAGTGGTACGG	CACTCTGTGGCAATGCCAAA	1317 - 2700
NA3	1382	GAGGAATGAGCTTGGCGGTA	ACAAGATCCCCAACACTTT	2593 - 3974
NA4	1407	CAGTTACTGGCGGGGCAC	GAGGACCCGACCACATTGAC	3848 - 5254
NA5	1551	CTACTTGGCTGCCGTCGGCC	AGGTCAAAGATGCTGCCAACA	5117 - 6667
NA6	1416	GCACCATGGCCAAACTCGAG	TGCTCTGTCAACTGTTTAGGGC	6559 - 7974
NA7	1403	ATGGCGCTCCATATTGGCCA	CAGTGGGATACGGGGCTGAAG	7851 - 9253
NA8	1407	AAGGACGGTTACACTTTCCCC	GGAGCTCGACCCTTCCAGATC	9128 - 10534
NA9	1416	GGCAGCTGATTGTCTAGAC	GCAAAAATACCACCAACCATCCG	10391 - 11806
NA10	1435	AAATGGGGCCTTGCAGAGCA	AAATAATFCTCATCCGTCACGTTG	11658 - 13092
NA11	962	CCACTGGCGCAGCAAGTTCC	ACCATGAAGCACAACCTCTCTTG	12935 - 13897
NA12	1229	GTCCTGGCGCTACTCATGCA	AATTTGCGCCGATGGTTTT	13765 - 14993

1.5 RNA 的提取及反转录 RNA 的提取按照 RNA 提取试剂盒说明书进行操作。反转录体系为:5 × PrimeScript RT Master Mix 4 μL,模板 16 μL,37 °C 15 min。通过 12 对重叠的引物扩增 CH - WH - 19 全基因组序列。

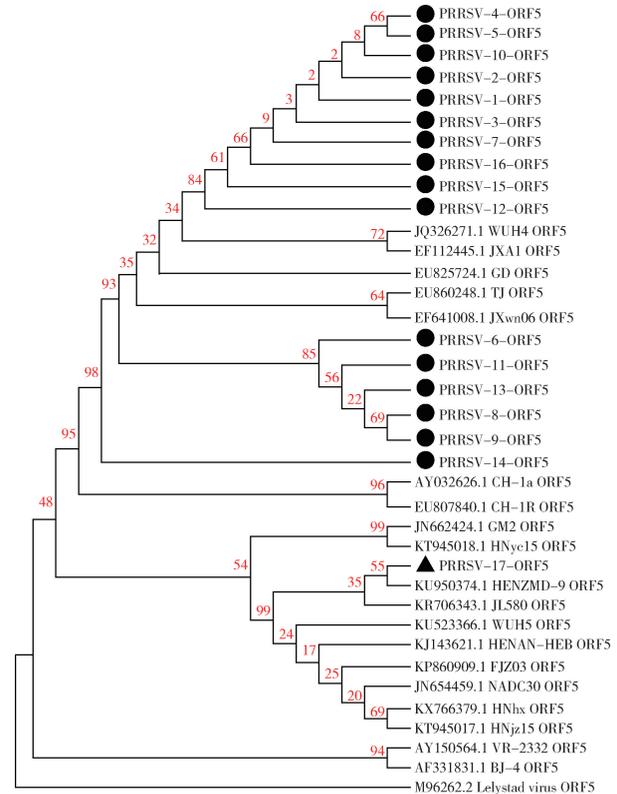
1.6 全基因组的测序比对分析及进化树分析 通过 BioEdit 和 MegAlign 软件比对分析序列,用 MEGA7 中的 N - J 法制作进化树。

2 结果与分析

2.1 病毒的分离结果 从临床收集疑似 PRRSV 的 56 份病料分离 17 株 PRRSV,扩增 GP5 基因测序并进行进化树分析,结果表明 PRRSV - 17 处于 NADC30 - like 毒株分支(图 1),将其命名 CH - WH - 19,测其 TCID₅₀ 为 10^{6.5}/mL。

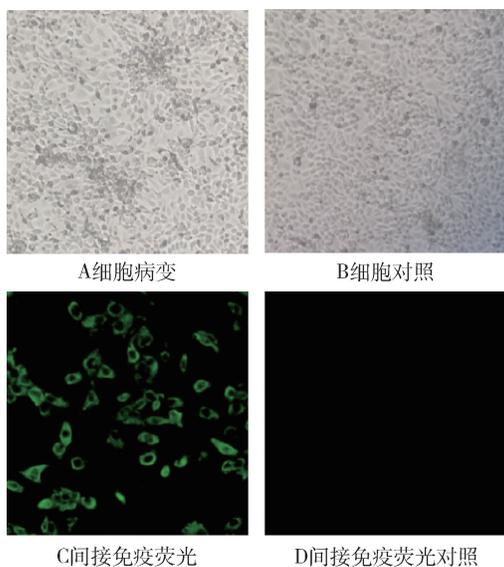
病毒分离过程中,盲传第三代出现病变,细胞圆缩,聚集,随着培养时间的延长细胞聚集成堆,最后细胞破碎,脱落,用间接免疫荧光检测出现特异的绿色荧光(图 2)。

2.2 基因组特征及同源性分析 CH - WH - 19 基因组全长 14993 bp,包括 5' UTR 189 bp,3' UTR 152 bp 和 8 个 ORF。与 NADC30、JXA1、CH - 1a、VR - 2332 和 GM2 的同源性分别为 91.9%、84.3%、83.9%、83.3% 和 80.5%,但是与欧洲型的毒株 Lelystad virus 相似性仅有 58.9%(表 2),说明



黑色圆圈表示分离的高致病性 PRRSV;
黑色三角表示分离的 NADC30 - like PRRSV
The black circle indicate HP - PRRSV strains;
The black triangle NADC30 - like PRRSV strains

图 1 分离的 17 株 PRRSV GP5 基因进化树分析
Fig 1 Phylogenetic analysis of 17 isolated PRRSV based on GP5



A: CH - WH - 19 感染 Marc - 145 细胞病变;
 B: 正常 Marc - 145 细胞;
 C: 间接免疫荧光检测感染 Marc - 145;
 D: 间接免疫荧光检测正常 Marc - 145
 A: Marc - 145 CPE of CH - WH - 19 infection;
 B: Normal Marc - 145 cell;
 C: Immunofluorescence detection of CH - WH - 19 infection;
 D: Immunofluorescence detection of normal Marc - 145 cell

图 2 CH - WH - 19 株的细胞病变及间接免疫荧光结果
 Fig 2 CPE and immunofluorescence of CH - WH - 19

表 2 CH - WH - 19 与其他毒株的同源性比较

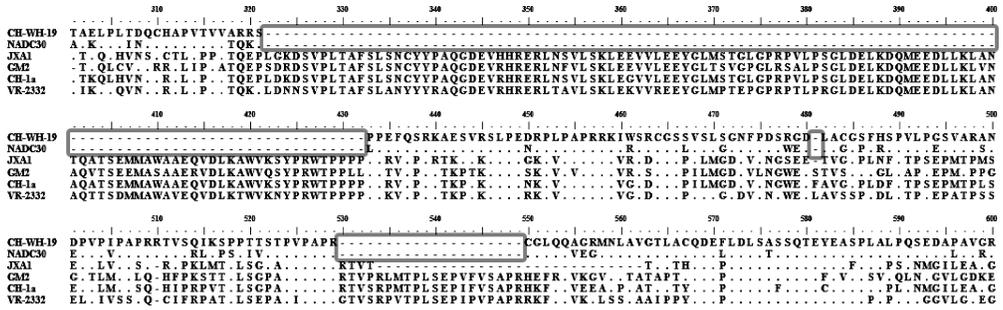
Tab 2 Nucleotide identity of CH - WH - 19 compared with other strains

	JXA1	VR-2332	CH-1a	NADC30	GM2	LV
CH-WH-19 全基因组	84.3	83.3	83.9	91.9	80.5	58.9
5' UTR	95.1	88.8	92.8	89.2	91.0	51.6
ORF1a	81.8	79.6	80.5	88.6	74.9	53.9
ORF1b	87.3	86.9	88.0	94.7	86.2	63.3
ORF2	85.0	87.2	85.4	93.9	84.3	64.2
ORF3	82.9	82.9	82.4	94.6	82.1	63.2
ORF4	84.8	86.8	85.5	95.8	85.3	65.8
ORF5	85.6	85.9	87.2	93.5	84.3	59.9
ORF6	87.2	87.2	85.3	95.2	89.1	70.1
ORF7	89.9	90.7	91.0	96.0	86.2	60.3
3' UTR	86.8	90.1	86.8	97.4	86.2	54.6

分离的毒株属于美洲型。为了分析分离的新毒株的基因特征,我们分别比较了 CH - WH - 19 与 NADC30、JXA1、CH - 1a、VR - 2332、GM2 和 LV 毒株的 5' UTR、3' UTR 和 8 个 ORF 的同源性,结果显示与 NADC30 和 JXA1 毒株不同 ORF 同源性较高,分别是 88.6% ~ 97.4% 和 81.8% ~ 94.7%, 与 CH - 1a 的同源性是 80.5% ~ 91.9%, 而与 GM2 和 VR - 2332 毒株的同源性较低分别是 74.9% ~ 90.0% 和 79.6% ~ 90.7% (表 2)。CH - WH - 19 ORF1a 和 ORF1b 的大小分别是 7095 bp 和 4383 bp, 分别与美洲型毒株的同源性是 74.9% ~ 88.6% 和 86.2% ~ 94.7%, 但与欧洲型 LV 毒株同源性仅 53.9% 和 63.3% (表 2)。CH - WH - 19 ORF2 ~ ORF7 大约占全基因组的 1/4, 编码结构蛋白(GP2 ~ GP7), 其中变异最大的结构蛋白基因 ORF2、ORF3 和 ORF5 与美洲型毒株的同源性分别是 84.3% ~ 93.9%, 82.1% ~ 94.6% 和 84.3% ~ 93.5% (表 2)。

2.3 Nsp2 基因分析 NADC30 基因型毒株的基因组特征主要表现为 Nsp2 存在“111 + 1 + 19”个氨基酸缺失, CH - WH - 19 毒株与参考毒株的 Nsp2 基因氨基酸比对结果显示, CH - WH - 19 与 NADC30 毒株一样分别在 322 ~ 432、481 和 530 ~ 549 的位置出现了“111 + 1 + 19”个氨基酸缺失(图 3)。

2.4 ORF5 基因分析 CH - WH - 19 毒株与参考毒株 ORF5 氨基酸序列比对存在一定的差异(图 4)。CH - WH - 19 毒株与参考毒株 ORF5 氨基酸序列 1 ~ 26 位置的 26 个氨基酸是信号肽, 63 ~ 83、95 ~ 102 和 110 ~ 127 分别是三个跨膜区(TM1、TM2 和 TM3)的位置。在 GP5 蛋白的第 13 和 151 位与毒力相关的氨基酸处, CH - WH - 19 在第 13 位与 JXA1、CH - 1a 和 VR - 2332 保持一致(R13), 但 151 位与 NADC30 和 GM2 保持一致(K151)。A137 是疫苗株 VR - 2332 的标志, 但分离的 CH - WH - 19 毒株突变成了 S。N30、N34、N44 和 N51 是四个潜在的 N - 糖基化位点, 一些研究表明与病毒感染和抗原特征有关系, CH - WH - 19 毒株 N34 突变成了 D, 其他的三个位点很保守。

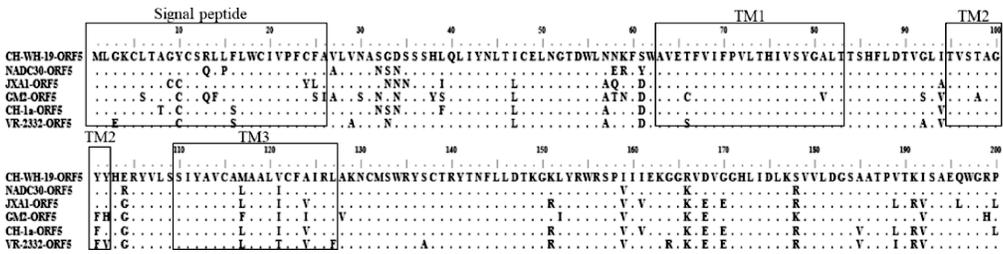


灰色方框内是 131 个氨基酸缺失的位置

Gray box areas indicate deletions of 131 amino acid

图 3 CH - WH - 19 与参考毒株部分 Nsp2 基因氨基酸比对

Fig 3 Alignment of the partial Nsp2 amino acid sequence of CH - WH - 19 with reference strains



黑色方框内分别是信号肽 TM1、TM2 和 TM3 跨膜区

The signal peptide and transmembrane (TM) domains are demarcated in black box respectively

图 4 CH - WH - 19 与参考毒株 GP5 基因氨基酸序列比对

Fig 4 Alignment of GP5 amino acid sequence of CH - WH - 19 with reference strains

2.5 进化树分析 为进一步研究 CH - WH - 19 与其他 PRRSV 毒株的基因关系制作了全基因组序列的进化树(图 5),结果显示所有的全基因组分成两个大分支美洲型和欧洲型,本研究 CH - WH - 19 和 NADC30 处于同一分支,表明 CH - WH - 19 属于 NADC30 型毒株。

3 讨论与结论

自从 1996 年中国分离到第一株蓝耳病毒 CH1a,猪蓝耳病毒引起猪严重疾病也给我国养猪产业带来严重经济损失。2006 年,我国南方大面积暴发高致病性猪繁殖与呼吸综合征,至今该病已在全国大范围存在,对我国的养猪业来说更是雪上加霜。本实验室从湖北某发病猪场分离到 1 株 PRRSV,命名为 CH - WH - 19,进行了全基因组测序,并分析它们的基因特征。同源性分析显示 CH - WH - 19 与美洲型标准毒株(VR - 2332)和欧

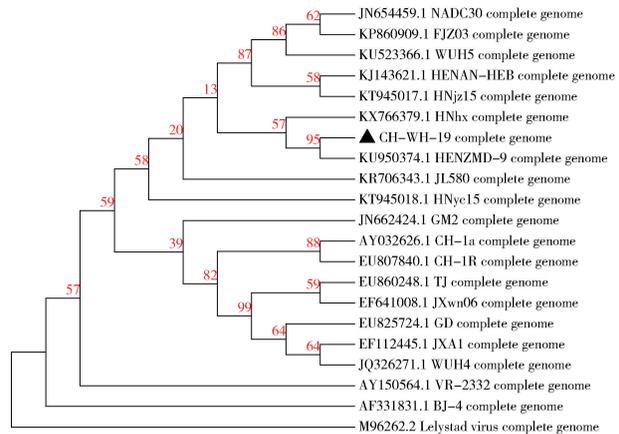


图 5 CH - WH - 19 和参考毒株全基因组进化树分析

Fig 5 Phylogenetic analysis of complete genome of CH - WH - 19 and reference strains

洲型标准毒株(LV)的相似性分别为 83.3% 和 58.9%,说明该毒株属于美洲型毒株。该毒株与 NADC30 型 PRRSV 毒株基因序列同源性高达

91.9% ,且进化树结果显示与 NADC30 毒株处于一个分支这都说明 CH - WH - 19 属于 NADC30 型毒株。CH - WH - 19 与参考毒株 Nsp2 基因的氨基酸比对发现,与 NADC30 毒株一样分别在 322 ~ 432、481 和 530 ~ 549 的位置出现了“111 + 1 + 19”的氨基酸缺失,也可以推测 CH - WH - 19 株属于 NADC30 型毒株。

由于 PRRSV 引起免疫抑制导致宿主很难彻底清除病毒。在免疫应答的过程中,PRRSV 为了抵抗机体产生的抗体,就会产生越来越多的变异。尽管现在有变异的毒株制备的疫苗预防猪蓝耳病,但猪蓝耳病仍然在不同的猪场流行,可能是由于 PRRSV 易突变引起 PRRSV 致病性的改变,因此蓝耳病毒的分离与基因分析仍然很重要。本研究分离的 CH - WH - 19 株属于 NADC30 型 PRRSV,目前还没有出现 NADC30 型的变异株疫苗,因此,本研究可为猪蓝耳病新疫苗的研发提供基础材料。

参考文献:

- [1] Albina E. Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an overview[J]. *Vet Microbiol*, 1997(55): 309 - 316.
- [2] Feng Y J, Zhao T Z, Tung Nguyen, *et al.* Porcine respiratory and reproductive syndrome virus variants, Vietnam and China, 2007[J]. *Emerg Infect Dis*, 2008. 14(11): 1774 - 1776.
- [3] 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(1): 62 - 72.
- [4] 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 (1): 329 - 339.
- [5] Bautista E M, Meulenberg J J, Choi C S, *et al.* Structural polypeptides of the American (VR - 2332) strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Arch Virol*, 1996, 141(7): 1357 - 1365.
- [6] Bautista EM, Faaberg KS, Mickelson D, *et al.* Functional

properties of the predicted helicase of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Virology*, 2002, 298 (2): 258 - 270.

- [7] Nelson E A, Christopher - Hennings J, Drew T, *et al.* Differentiation of U. S. and European isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by monoclonal antibodies[J]. *J Clin Microbiol*, 1993, 31(12): 3184 - 3189.
- [8] Forsberg R. Divergence time of porcine reproductive and respiratory syndrome virus subtypes[J]. *Mol Biol Evol*, 2005, 22 (11): 2131 - 2134.
- [9] Li Y, Zhou L, Zhang J L, *et al.* Nsp9 and Nsp10 contribute to the fatal virulence of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus emerging in China[J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10(7): 1 - 18.
- [10] Nelsen C J, Murtaugh M P, Faaberg K S. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents[J]. *J Virol*, 1999, 73(1): 270 - 280.
- [11] Zhou L, Yang H. Porcine reproductive and respiratory syndrome in China [J]. *Virus Research*, 2010(154): 31 - 37.
- [12] 杨汉春. 2014 年猪病流行情况与 2015 年流行趋势及防控对策[J]. *猪业科学*, 2015, 32(2): 38 - 40.
- [13] Yang H C. Epidemic situation of pig disease in 2014, epidemic trend and prevention a countermeasures in 2015 [J]. *Swine Industry Science*, 2015, 32(2): 38 - 40.
- [14] Li B, Fang L R, Guo X L, *et al.* Epidemiology and evolutionary characteristics of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in China between 2006 and 2010 [J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(9): 3175 - 3183.
- [15] Liu J K, Wei C H, Yang X Y, *et al.* Genetic diversity and evolutionary characterization of Chinese porcine reproductive and respiratory syndrome viruses based on Nsp2 and ORF5 [J]. *Arch Virol*, 2013(158): 1811 - 1816.
- [16] Xie J, Zhu W, Chen Y, *et al.* Molecular epidemiology of PRRSV in South China from 2007 to 2011 based on the genetic analysis of ORF5[J]. *Microb Pathog*, 2013(63): 30 - 36.
- [17] Zhou L, Yang X, Tian Y, *et al.* Genetic diversity analysis of genotype 2 porcine reproductive and respiratory syndrome viruses emerging in recent years in China[J]. *BioMed Research International*, 2014(2014): 1 - 13.

(编辑:李文平)