

# 猪繁殖与呼吸综合征病毒 Shanxi-6 株 全基因序列分析

韩一超<sup>1</sup>, 刘文俊<sup>1</sup>, 姚敬明<sup>1</sup>, 吴忻<sup>1</sup>, 王娟萍<sup>1</sup>, 武守艳<sup>1</sup>, 陈剑波<sup>1</sup>,  
孟帆<sup>1</sup>, 郭慧慧<sup>1</sup>, 杨丽华<sup>1</sup>, 雷宇平<sup>2</sup>, 樊振华<sup>1</sup>

(1. 山西省农业科学院 畜牧兽医研究所, 山西 太原 030032; 2. 山西省动物疫病预防控制中心, 山西 太原 030024)

**摘要:** 采用 RT-PCR 方法, 分段扩增出猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) Shanxi-6 株 15 个基因片段, 并将这 15 个片段分别连接到 pMD18-T 载体上进行克隆测序、拼接后, 得到 PRRSV Shanxi-6 株全基因组长 15 320 bp (不包含 PolyA 尾), 包含 9 个开放阅读框, 5'UTR 长 189 bp, 3'UTR 长 150 bp。基因组序列分析结果表明, Shanxi-6 株与欧洲型代表毒株 LV 的核苷酸序列同源性为 54.35%, 与美洲型代表毒株 VR-2332 的核苷酸序列同源性为 88.80%, 与 HP-PRRSV 毒株 (JXA1、HUN4、HuN、HUB1) 亲缘关系最近, 核苷酸序列同源性高达 97.44%~97.74%, 且在非结构蛋白 Nsp2 上有 30 个氨基酸的缺失。

**关键词:** 猪繁殖与呼吸综合征病毒; 基因组; 序列分析

**中图分类号:** Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2014)02-0062-04

## Sequence Analysis of Whole Genome of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Shanxi-6 Strain

HAN Yi-chao<sup>1</sup>, LIU Wen-jun<sup>1</sup>, YAO Jing-ming<sup>1</sup>, WU Xin<sup>1</sup>,  
WANG Juan-ping<sup>1</sup>, WU Shou-yan<sup>1</sup>, CHEN Jian-bo<sup>1</sup>, MENG Fan<sup>1</sup>,  
GUO Hui-hui<sup>1</sup>, YANG Li-hua<sup>1</sup>, LEI Yu-ping<sup>2</sup>, FAN Zhen-hua<sup>1</sup>

(1. Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030032, China; 2. Shanxi Veterinary Prevention and Treatment Station, Taiyuan 030024, China)

**Abstract:** The fifteen gene fragments of Shanxi-6 strain of porcine reproductive and respiratory syndrome were amplified respectively by RT-PCR, cloned into pMD18-T vector and sequenced. The genome of Shanxi-6 strain in length was 15 320 bp excluding PloyA tail, containing 9 open reading frames (ORFs), the 5'UTR in 189 bp and the 3'UTR in 150 bp. The complete genomic analysis showed that Shanxi-6 strain shared 54.35% of nucleotide homology with European genotype (LV) and shared 88.80% homology with American genotype (VR-2332). Shanxi-6 strain has correlative genetic relationship and shared 97.44%~97.74% homology with highly pathogenic PRRSV (JXA1, HUN4, HuN, HUB1). 30 amino acids deletion was exhibited in Nsp2 protein of Shanxi-6 strain.

**Key words:** PRRSV; Complete genome; Sequence analysis

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 (PRRSV) 引起的一种高度传染性疾病, 临床上以母猪发热、厌食、早产、流产、木乃伊胎、死胎、弱仔等繁殖障碍及各种年龄猪的呼吸困难和仔猪的高

死亡率为特征<sup>[1-2]</sup>。PRRSV 属于动脉炎病毒属, 有 2 种基因型, 即以 VR-2332 毒株为代表的美洲型和 Lelystad Virus (LV) 为代表的欧洲型<sup>[3]</sup>。PRRSV 基因组为单股正链 RNA, 全长约 15 kb, 含 9 个相互重叠的开放阅读框 (ORFs), 从 5'端到 3'端依次为: ORF1a、

收稿日期: 2013-11-26

基金项目: 山西省科技攻关项目 (20090311034); 山西省基础研究项目 (青年科技研究基金) (2012021028-1); 山西省重点项目 (2013131020)

作者简介: 韩一超 (1960-), 男, 山西太原人, 研究员, 主要从事动物疫病研究。

通讯作者: 刘文俊 (1979-), 男, 山西天津人, 助理研究员, 硕士, 主要从事动物疾病分子生物学研究。

ORF1b、ORF2a、ORF2b 和 ORF3 ~ ORF7,其中,ORF1a 和 ORF1b 编码 PRRSV 的 RNA 复制酶和聚合酶,ORF2a、ORF2b 和 ORF3 ~ ORF7 依次编码病毒的结构蛋白 GP2a、GP2b、GP3、GP4、GP5、M 和 N 蛋白<sup>[4]</sup>。该病自 1987 年美国暴发以来,已分布到世界大多数养猪国家。1996 年郭宝清等<sup>[5]</sup>首次在国内分离到 PRRSV,2006 年春夏之际,我国南方暴发了猪“高热病”疫情,该疫情是由高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒(Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome, HP-PRRSV)引起的,HP-PRRSV 与经典毒株的最主要的差异是 HP-PRRSV 在 Nsp2 蛋白中存在有 30 个氨基酸的缺失<sup>[6-7]</sup>。

为了查清山西省 PRRSV 流行变异情况,本研究通过对分离的 PRRSV Shanxi-6 株进行全基因测序,并将测得的序列与 GenBank 登录的国内外代表性毒株的全基因序列进行比较分析,旨在为山西地区防控 PRRS 提供理论依据,为研究 PRRSV 在我国流行及遗传变异情况提供参考数据。

## 1 材料和方法

### 1.1 毒株

PRRSV Shanxi-6 株由山西省农业科学院畜牧兽医研究所动物基础医学研究室从山西某猪场疑似 PRRS 病猪体内分离并鉴定。

### 1.2 主要试剂

TRIzol LS Reagent, 购自 Invitrogen 公司; AMV 反转录酶、RNA 酶抑制剂、LA Taq 和 pMD18-T Vector 购自大连宝生物工程有限公司; DH5 $\alpha$  菌株购自天根生物科技(北京)有限公司; DNA 胶回收试剂盒、普通质粒小提取试剂盒购自上海生工生物工程有限公司。

### 1.3 病毒 RNA 的提取

按照 TRIzol 说明书操作,从保存的 PRRSV Shanxi-6 株病毒液中提取病毒总 RNA,用无 RNase 的灭菌双蒸水溶解后分装, -70  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.4 引物的设计与合成

参考 GenBank 中登录的 PRRSV JXA1 株全长基因序列,用 Primer Permier 5.0 软件,设计出 15 对特异性引物,由上海生工生物工程有限公司合成。引物序列如表 1 所示。

### 1.5 PRRSV 全基因组的扩增

将提取的 RNA 作为模板,反转录合成 cDNA,并以其为模板进行 PCR 扩增。

反转录体系(20  $\mu\text{L}$ ): RNase free ddH<sub>2</sub>O 8  $\mu\text{L}$ , 5  $\times$  Reaction Buffer 4  $\mu\text{L}$ , RNase Inhibitor 1  $\mu\text{L}$ , dNTP 2  $\mu\text{L}$ , 特异性下游引物 1  $\mu\text{L}$  (20  $\mu\text{mol/L}$ ), AMV RT 2  $\mu\text{L}$ , 总 RNA 2  $\mu\text{L}$ 。反应条件: 42  $^{\circ}\text{C}$  60 min, 85  $^{\circ}\text{C}$  5 min, 置于冰上放置。

表 1 扩增 PRRSV Shanxi-6 株全基因的引物序列

Tab. 1 The primers sequences of amplification of PRRSV Shanxi-6 strain

引物 Primers	引物序列(5'-3') Sequences	引物位置 Position	产物大小/bp Product size
F1	ATGACGTATAGGTGTGGCTCTAT	1 ~ 24	548
R1	TGTAGAGTCTTTAGAACTGTAGGG	524 ~ 548	
F2	GCTGGCTTTCTGCGATTTTTC	416 ~ 436	1 373
R2	GCCCTTATGCTCACAACAACCC	1 767 ~ 1 788	
F3	CCTTGGACAGGAACGGCGCTTG	1 646 ~ 1 667	1 011
R3	CCACCAAGAGTTCAACCTCGAA	2 635 ~ 2 656	
F4	CGACTTCAGAAATGATGGCCTG	2 546 ~ 2 567	1 484
R4	CTTTGCTGTGGTCTGTCAAG	4 007 ~ 4 029	
F5	GTTACAGTTACCCATTCTCGG	3 911 ~ 3 932	1 281
R5	GCTAGTTATGTTGGGTACCTC	5 170 ~ 5 191	
F6	CCTTGGTCGTTTGTATTTTGT	5 081 ~ 5 102	1 224
R6	AAGATAGCACAAACATCCCAAAG	6 282 ~ 6 304	
F7	GGCAGTCACATAATTAAAGACACAT	6 061 ~ 6 085	1 232
R7	TGGACCTCCTCATAAAACACAT	7 271 ~ 7 292	
F8	CCGTTTGAACAAGAAGAAGAGG	7 173 ~ 7 194	1 513
R8	CCTGGGTAACACCACTCAACG	8 665 ~ 8 685	
F9	TTCCAACCAAGGACATTCAGA	8 491 ~ 8 511	1 196
R9	GCACTCACTACAAGAACCAGAA	9 665 ~ 9 686	
F10	GGAAAACTCAGGTCCAATCAT	9 503 ~ 9 524	1 146
R10	TGTGGGTCATACACGAAGATAG	10 627 ~ 10 648	
F11	CATTCAACCAGATTACAGGGAC	10 385 ~ 10 406	1 116
R11	GTCTTGTCTTCCATACCATCA	11 479 ~ 11 500	
F12	AGCGAGAAGTTGCTGAGTCCTT	11 209 ~ 11 230	1 202
R12	TCCAAACCACTAATCGAGACA	12 389 ~ 12 410	
F13	TACTCCGTGCGCGCTCTAC	12 157 ~ 12 175	1 122
R13	TCTGATGCTGCGGTGGTGTT	13 259 ~ 13 278	
F14	GTTTCGTGTTTCTCAGGCGTTC	13 191 ~ 13 213	1 024
R14	AGGTTGAGGTCCAAGGTCACC	14 194 ~ 14 214	
F15	ACTAAGGGCAGACTCTATCGTT	14 139 ~ 14 160	1 193
R15	TTTTTTTTTTAATTACGGCC	15 311 ~ 15 331	

PCR 反应体系(50  $\mu$ L): ddH<sub>2</sub>O 32.5  $\mu$ L, dNTP Mixture 8  $\mu$ L, 10  $\times$  LA PCR Buffer 5  $\mu$ L, 上、下游引物(20  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L, LA *Taq* 0.5  $\mu$ L, cDNA 2  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 3 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 55  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 90 s, 33 个循环; 72  $^{\circ}$ C 7 min。取 PCR 产物 10  $\mu$ L, 用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.6 PCR 产物的克隆与测序

从琼脂糖凝胶回收特异的扩增片段, 分别与 pMD18-T 载体 16  $^{\circ}$ C 连接过夜。连接产物转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 经验证有目的基因插入后, 将阳性菌液送上海生工生物工程有限公司进行测序。

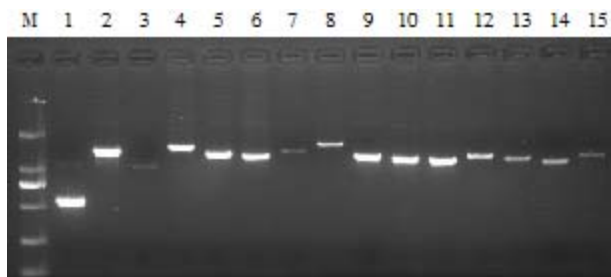
### 1.7 序列比较与分析

将分段完成测序的基因序列进行拼接得到 PRRSV Shanxi-6 株的全基因序列。利用 DNASTar 软件对 Shanxi-6 株的核苷酸序列和推导的氨基酸序列进行分析, 同时与 GenBank 登录的 11 株 PRRSV 全基因序列进行比较, 并构建进化树。

## 2 结果与分析

### 2.1 PRRSV Shanxi-6 株全基因扩增结果

Shanxi-6 株经 RT-PCR 扩增, 获得 15 个片段, 各片段长度均与预期大小一致, 结果如图 1 所示。



M. DNA 分子质量标准; 1~15. PRRSV Shanxi-6 株各片段的扩增产物。  
M. DL 2000 DNA Marker; 1-15. The 15 amplified fragments of PRRSV Shanxi-6 strain.

图 1 PRRSV Shanxi-6 株全基因各片段的 RT-PCR 扩增

Fig. 1 The amplifications of 15 fragments of PRRSV Shanxi-6 strain

### 2.2 PRRSV Shanxi-6 株全基因序列测定结果

将各片段的测序结果经拼接校正, 获得 PRRSV Shanxi-6 株全基因序列。该毒株全基因组序列长度为 15 320 bp(不包含 PolyA 尾), 5'UTR 长 189 bp, 3'UTR 长 150 bp, ORF1a~ORF7 各片段与 HP-PRRSV 毒株(JXA1、HUN4、HuN、HUB1)片段长度相同。

### 2.3 PRRSV Shanxi-6 株全基因序列同源性和进化树分析

将 Shanxi-6 株全基因序列与 11 株参考毒株进行同源性比较, Shanxi-6 株与欧洲型代表毒株 LV 的

核苷酸序列同源性为 54.35%, 与美洲型代表毒株 VR-2332 的核苷酸序列同源性为 88.80%。Shanxi-6 株与 HP-PRRSV 毒株(JXA1、HUN4、HuN、HUB1)的核苷酸序列同源性为 97.44%~97.74%, 与其他美洲型 CH-1a、BJ-4、S1、HB-1(sh) 和 HB-2(sh) 同源性为 88.66%~95.62%。

从 Shanxi-6 株与 11 株参考毒株的全基因序列构建的进化树(图 2)可以看出, PRRSV 毒株分为 2 个基因型(欧洲型和美洲型), 欧洲型代表株 LV 与其他毒株距离都很远, 为单独一群; Shanxi-6 株与美洲型代表株 VR-2332 关系较近, 与其他参考毒株同属于美洲型。国内分离的美洲型毒株分为 2 个亚群: 第 1 亚群包括 Shanxi-6 株、HP-PRRSV 毒株(JXA1、HUB1、HuN、HUN4)、CH-1a、HB-1(sh) 和 HB-2(sh); BJ-4 和 S1 株属于第 2 亚群。

### 2.4 PRRSV Shanxi-6 株 *Nsp2* 基因序列分析

Shanxi-6 株 *Nsp2* 基因长 2 850 bp, 编码 950 个氨基酸。将 *Nsp2* 基因序列和推导的氨基酸序列与参考毒株比较分析, 结果表明, Shanxi-6 株 *Nsp2* 蛋白在第 482 位和第 533~561 位共缺失 30 个氨基酸, 与 HP-PRRSV 毒株缺失位置一样。Shanxi-6 株与 HP-PRRSV 毒株(JXA1、HuN、HUN4、HUB1) 同源性最高, 核苷酸序列同源性为 97.7%~99.3%, 氨基酸序列同源性为 96.6%~98.5%; 与其他美洲型 CH-1a、BJ-4、HB-1(sh)、HB-2(sh) 和 S1 毒株参考毒株同源性较低, 核苷酸和氨基酸同源性分别为 82.1%~93.8% 和 75.9%~92.4%。

### 2.5 PRRSV Shanxi-6 株 *GP5* 基因序列分析

Shanxi-6 株 *GP5* 基因长 603 bp, 编码 200 个氨基酸。将 *GP5* 核苷酸序列和推导的氨基酸序列与参考毒株比较分析, 与欧洲型代表株 LV 核苷酸序列同源性为 63.5%, 氨基酸序列同源性为 57.7%; 与美洲型代表株 VR-2332 核苷酸序列同源性为 89.1%, 氨基酸序列同源性为 88.1%; 与 HP-PRRSV 毒株(JXA1X、HuN、HUN4、HUB1) 同源性最高, 核苷酸和氨基酸同源性分别为 98.0%~98.3%, 97.0%~97.5%; 与其他美洲型 CH-1a、BJ-4、HB-1(sh)、HB-2(sh) 和 S1 毒株参考毒株同源性较低, 核苷酸和氨基酸同源性分别为 95.4%~88.2% 和 86.1%~92.0%。ORF5 第 13, 151 位氨基酸变异可能影响毒株毒力<sup>[8]</sup>, 强毒株均为精氨酸(R), 弱毒株分别为谷氨酰胺(Q)和甘氨酸(G), Shanxi-6 株第 13, 151 位均为精氨酸(R), 具有强毒的特性。

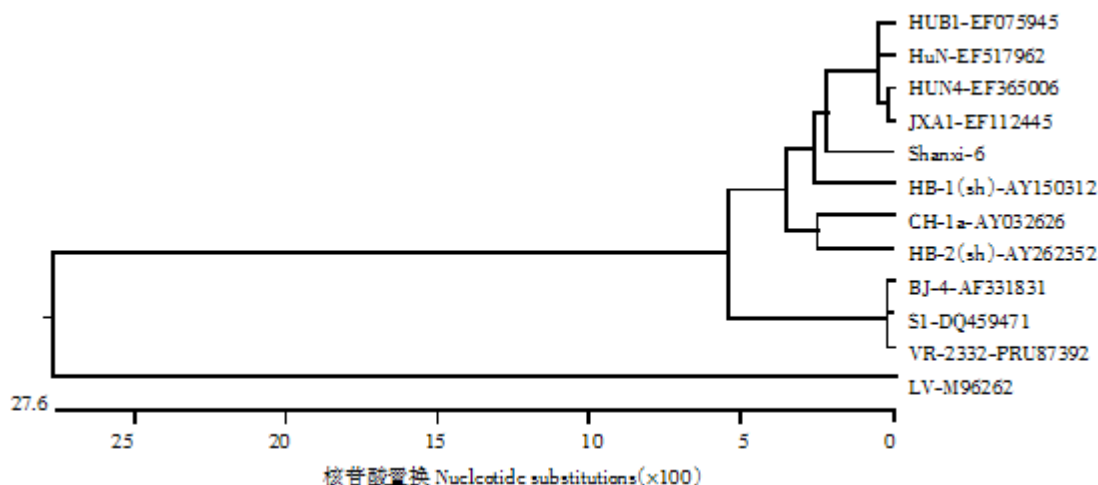


图2 根据 PRRSV 全基因序列绘制的进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of PRRSV

### 3 讨论

猪 PRRS 自 20 世纪 80 年代发生以来,给世界养猪业造成了巨大的损失,并且一直未得到有效控制,其主要原因是由于猪繁殖与呼吸综合征病毒基因组的快速变异。PRRSV 变异分布于整个基因组,但以 *Nsp2* 和 *ORF5* 这 2 个基因变异最大。

*Nsp2* 为整个基因组中变异最大的区域,PRRSV Shanxi-6 株的 *Nsp2* 基因在第 482 位和第 533 ~ 561 位缺失 30 个氨基酸,与 HP-PRRSV 缺失位置相同,而且同源性高达 97.7% ~ 99.3%。在 PRRSV 结构蛋白中,GP5 蛋白最易发生变异,其是机体的主要保护性抗原<sup>[9-10]</sup>,其中的诱骗表位 A 位于中和表位 B 之前,从而延迟了中和抗体的产生<sup>[11]</sup>。氨基酸序列第 27 ~ 30 位为 A 表位,属于高度可变区,Shanxi-6 株与 BJ-4、S1、VR-2332 毒株该表位为 27VLAN30,而 HB-1(sh)和 HP-PRRSV 毒株的为 27VLVN30,第 29 位氨基酸的点突变产生的影响目前还不清楚,还有待进一步研究。

对山西分离的 Shanxi-6 株全基因序列与参考毒株的序列进行了比较分析,查清了山西 PRRSV 遗传变异情况,为山西地区防控 PRRS 提供了参考依据,丰富了我国 PRRSV 分子流行病学的资料。

#### 参考文献:

- [1] Hall W V. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus a significant disease of pigs[J]. Aust Vet J, 2005, 83(5): 260 - 261.
- [2] Barbara E Straw, Jeffery J Zimmerman, Sylvie D'Allaire, 等. 猪病学[M]. 9 版. 赵德明, 张仲秋, 沈建忠, 等译. 北京: 中国农业大学出版社, 2008: 423 - 463.
- [3] Murtaugh M P, Elam M R, Kakach L T. Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus[J]. Arch Virol, 1995, 140(8): 1451 - 1460.
- [4] Dea S, Gagnon C A, Mardassi H, et al. Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates[J]. Arch Virol, 2000, 145(4): 659 - 688.
- [5] 郭宝清, 陈章水, 刘兴文, 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.
- [6] 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 - 326.
- [7] Tian K, Yu X, Zhao T, 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): 526.
- [8] Ansari I H, Kwon B, Osorio F A, et al. Influence of N linked glycosylation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 on virus infectivity, antigenicity, and ability to induce neutralizing antibodies[J]. J Virol, 2006, 80(8): 3994 - 4004.
- [9] Gonin P, Pirzadeh B, Gagnon C A, et al. Seroneutralization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus correlates with antibody response to the GP5 major envelope glycoprotein[J]. J Vet Diagn Invest, 1999, 11(1): 20 - 26.
- [10] 周宏专, 徐福洲, 王金洛, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 ORF5 基因不同编码区的表达和反应原性鉴定[J]. 华北农学报, 2007, 22(3): 12 - 15.
- [11] Ostrowski M, Galeota J A, Jar A M, et al. Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain[J]. J Virol, 2002, 76(9): 4241 - 4250.