

Identification and Genetic Diversity of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Isolated from Chongqing

Lu Wang¹, Hong Xiao², Jiyu Chen², Pan Gu¹, Kangsen Zhou¹, Lingling Wang¹, Qian Huang³, Xiaomin Li², Jiali Cai^{1*}

¹Chongqing University of Technology School of Pharmacy & Bioengineering, Chongqing

²Animal Science and Technology College, Southwest University, Chongqing

³Chongqing Three Gorges University, Chongqing

Email: 15215063924@163.com, *cjl@cqut.edu.cn

Received: Apr. 25th, 2015; accepted: May 8th, 2015; published: May 12th, 2015

Copyright © 2015 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

The visceral organs were collected from swines at a farm in Chongqing. Once the pathogen was identified as the porcine reproductive and respiratory syndrome virus via RT-PCR identification, we used reverse transcription to make cDNA. Both NSP2 and GP5 gene were amplified by PCR, and then they were sequenced. The NSP2 sequence analysis indicated that homology between CQ and classical VR-2332 strain was 66.7%, while it was as high as 98.8% compared with HP-PRRSV variation SD and JXA1 in nucleotide. And the GP5 sequence analysis indicated that there were variations in individual bases. It was suggested that the CQ strain was a HP-PRRSV variation. At the same time, the patho-material was inoculated in Marc-145 cells, and then the CPE appeared. The viral titer is $10^{-5.67}$ TCID₅₀/0.1mL by Reed-Muench. The separation of CQ strain offers basis for epidemiology investigations of PRRSV.

Keywords

PRRSV, Viral Identification, NSP2, GP5, Viral Variation

*通讯作者。

高致病性猪蓝耳病病毒重庆株的分离鉴定及其变异性分析

王璐¹, 肖红², 陈脊宇², 顾盼¹, 周康森¹, 王玲玲¹, 黄倩³, 黎晓敏², 蔡家利^{1*}

¹重庆理工大学药学与生物工程学院, 重庆

²西南大学动物科技学院, 重庆

³重庆三峡学院, 重庆

Email: 15215063924@163.com, cjl@cqut.edu.cn

收稿日期: 2015年4月25日; 录用日期: 2015年5月8日; 发布日期: 2015年5月12日

摘要

从重庆某猪场采集病死猪病料, 经RT-PCR初步鉴定其病原为猪繁殖与呼吸综合征病毒后, 利用反转录合成cDNA, 设计NSP2和GP5基因片段的特异性引物, 并对其扩增, 序列测序, 分析鉴定。结果表明, 该分离株的NSP2基因与经典毒株VR-2332核苷酸同源性仅为66.7%, 与高致病变异株SD、JXA1的核苷酸同源性高达98.8%, GP5基因在个别碱基上也存在变异, 由此表明该毒株为高致病性蓝耳病变异株。同时将该病料接种于Marc-145细胞, 可观察到典型的细胞病变(CPE), 经Reed-Muench计算该分离株的病毒滴度为 $10^{-5.67}$ TCID₅₀/0.1mL。该毒株的分离鉴定, 为进行猪繁殖与呼吸综合征流行病学的调查研究提供了依据。

关键词

PRRSV, 病毒鉴定, NSP2, GP5, 病毒变异

1. 引言

猪繁殖与呼吸综合征(Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)俗称蓝耳病, 是由猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)引起的一种接触性的传染病, 主要引起母猪流产及仔猪呼吸系统障碍[1]。该病1986年首次发生于美国[2], 次年研究者从流产胎儿的体内分离得到病原 PRRSV [3]。我国于1995年在北京养猪场首次爆发此病, 1996年由郭宝清分离出病原, 命名为Ch-1 α [4]。2006年, 我国江西、浙江、湖南、湖北、江苏等地爆发高热病, 此后该病在我国呈现不断蔓延的趋势, 对养猪业造成了严重的危害和巨大的经济损失。

PRRSV属于套式病毒目, 动脉炎病毒科, 有囊膜, 囊膜表面有纤突, 是单股正链RNA病毒。整个基因组长15 Kb, 含有8个开放性的阅读框[5]。ORF1编码RNA复制酶和转录相关蛋白[5], 其中NSP2蛋白是最容易变异的一个蛋白, 很多学者都认为, 近几年出现的高致病性变异毒株就是由NSP2基因的不连续缺失造成的[6]。ORF2-7编码病毒的结构蛋白, 其中M蛋白最保守, 其次N蛋白, GP5蛋白变异最显著, 又由于GP5蛋白是病毒最重要的保护性蛋白[7], 故其成为基因疫苗和亚单位疫苗研究的主要对象。由于PRRSV高度变异性, 我们从重庆某发病猪场进行了病毒的分离鉴定和基因分析, 对PRRS流行病学的研究和疫苗的研制具有重要意义。

2. 材料和方法

2.1. 病料来源

重庆市某猪场送检的 5 份病死猪的心、肝、脾、肺、肾、淋巴结。该猪场 2014 年 4 月出现病猪体温 41℃ 以上，新生仔猪呼吸困难，发病率和死亡率都很高；剖检可见：猪的肺脏有点状出血。

2.2. 主要试剂

Ex Taq 酶、小量胶回收试剂盒、逆转录试剂盒均购自 TaKaRa 公司；病毒 RNA 提取试剂盒购自 TIANGEN 公司；新生牛血清、DMEM，胰蛋白酶，0.2 μm 过滤器购自北京鼎国生物试剂公司。

2.3. 毒株的分离

2.3.1. 病料处理

采集病猪的肺脏用灭菌的生理盐水进行研磨，-80℃ 反复冻融 3 次，1000 rpm 离心 5 min，取上清，用 0.2 μm 的过滤器进行过滤，收集滤液于灭菌的青霉素瓶里，按 5% 的比例加入双抗，-80℃ 保存备用。

2.3.2. 病毒分离和细胞鉴定

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 细胞为阴性对照，置培养箱中吸附 30 min，之后取出培养瓶弃滤液，加 8 mL 含 10% 胎牛血清的 DMEM 维持液，于 37℃，5% CO₂ 培养箱中培养 3 天，每天观察细胞的状态，及时收集病变细胞。

2.3.3. 病毒 TCID₅₀ 的测定

将 Marc-145 细胞铺于 96 孔组织培养板中(10⁵ 细胞/孔)，培养过夜待细胞铺满时开始试验；第四代毒液用无血清 DMEM 细胞培养液作连续的 10 倍稀释至 10⁻⁹；将 96 孔组织培养板中的培养液弃去，用 1xPBS 洗 2 遍；将稀释好的病毒液加入 96 孔组织培养板中，100 μL/每孔，每个稀释度做 6 个重复，37℃ 恒温生化培养箱中作用 1 h；弃去 96 孔组织培养板的病毒液，用 1xPBS 洗 2 遍；于 96 孔组织培养板加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 维持液 100 μL 每孔，置于 37℃ CO₂ 培养箱中培养，72 h 后观察并记录细胞病变孔数，按世界卫生组织规定的方法计算组织细胞培养半数感染剂量(50% tissue culture infective dose, TCID₅₀)。

2.4. 毒株的鉴定

2.4.1. 引物的设计与合成

参考 GenBank 已发表的中国大陆地区 PRRSV 毒株的基因序列，设计针对 PRRSV 引物的设计 NSP2，GP5 的特异性引物，产物大小分别为 168 bp, 750 bp。NSP2 上游引物：5'-CTGTCGGTGGTCCCTCAA-3'，下游引物：5'-GGTGCATCAGCGTTGTTG-3'。GP5 上游引物：5'-GTTTACCCAACGCTCCTTA-3'，下游引物：5'-ACTGGCGTGTAGGTAATGG-3'。

2.4.2. RT-PCR 检测

按照 TIANGEN 病毒 RNA 提取试剂盒说明书提取 RNA，并按照 TaKaRa 逆转录试剂盒说明书将其逆转录成 cDNA，用基因的特异性引物进行扩增。扩增条件为：NSP2：95℃ 5 min；94℃ 30 s，53℃ 30 s，72℃ 30 s，共 35 个循环；72℃ 10 min。GP5：95℃ 5 min；94℃ 30 s，56℃ 45 s，72℃ 30 s，共 35 个循环；72℃ 10 min。扩增结束后取 5 μL PCR 产物进行琼脂糖电泳检测。

2.4.3. 基因序列分析

将鉴定为阳性的 PCR 产物送苏州金维智公司测序，将测序结果与经典毒株及其他变异株的基因序列

用 DNAMAN 生物学软件在亲缘关系方面进行比较。

3. 结果

3.1. 病毒分离结果

将处理后的滤液接种于 Marc-145 细胞中，培养至第二代开始出现明显的病变，细胞变圆，膨大，聚集成团，最后慢慢脱落(如图 1、图 2 所示)。

3.2. 毒株 TCID₅₀ 检测结果

经检测，结果如表 1 所示。

按照 Reed-Muench 法计算，该分离株的病毒滴度为 $10^{-5.67}$ TCID₅₀/0.1mL。

3.3. 基因 RT-PCR 扩增结果

将处理后的样品做 RT-PCR 检测，扩增产物通过 1.0%的琼脂糖凝胶电泳在紫外凝胶成像系统下可见特异性片段条带，大小符合预期结果(如图 3 所示)。

3.4. 序列分析结果

将 NSP2 和 GP5 的测序结果分别与已发表的国内分离株及欧洲型、美洲型标准毒株进行核苷酸同源性分析，经过序列比对发现所分离的毒株 NSP2 基因与经典美洲型毒株 VR-2332 的核苷酸同源性为 66.7%，与近年来流行的高致病性毒株 SD, JXA1 同源性达到 98.8% (如表 2 所示)。经 DNAMAN 软件建立的进化树显示，该分离株与 HUB1 类聚同一分支上，与其亲缘关系最近(如图 4 所示)。而 GP5 基因在个别碱

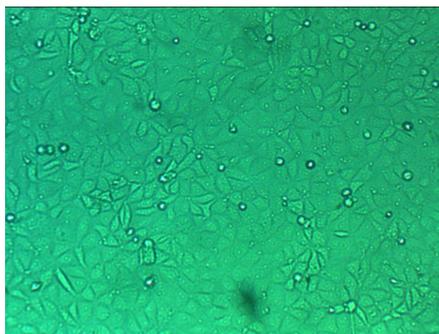


Figure 1. Normal Marc-145 cell
图 1. 正常的 Marc-145 细胞(10×)

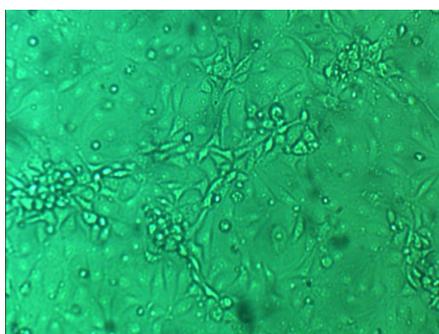


Figure 2. Marc-145 cells infected after 72 h
图 2. 感染 72 h 后的 Marc-145 细胞(10×)

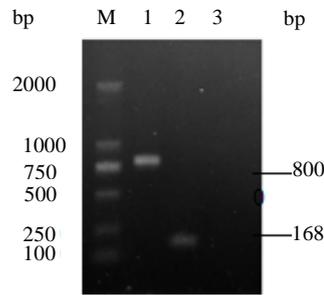


Figure 3. The result of PCR. M: DL-2000 DNA Marker; 1: purpose strip of GP5; 2: purpose strip of NSP2; 3: Negative control
图 3. 毒株 PCR 鉴定结果。M: DL-2000 DNA Marker; 1: GP5 基因 PCR 产物; 2: NSP2 基因 PCR 产物; 3: 阴性对照

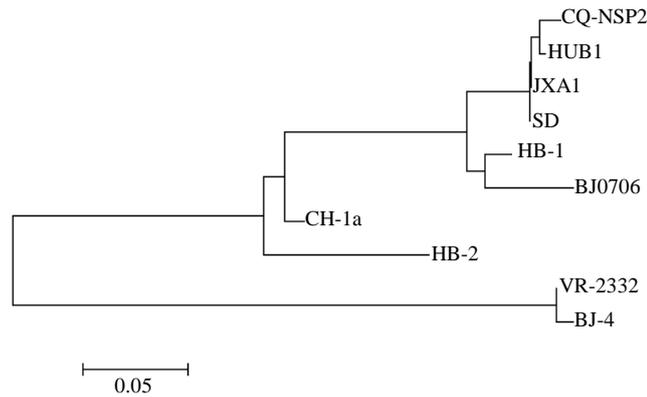


Figure 4. The systemic cladogram analysis of the genomes between PRRSV strains
图 4. 分离株 NSP2 基因与国内其他毒株的遗传进化树

Table 1. The result of CPE
表 1. 毒株 CPE 观察结果

病毒液稀释度	细胞孔观察结果		累计细胞孔数		出现 CPE 孔数所占细胞孔总数的百分数(%)
	CPE 孔数	无 CPE 孔数	CPE 孔数	无 CPE 孔数	
10 ⁻¹	6	0	31	0	100 (31/31)
10 ⁻²	6	0	25	0	100 (25/25)
10 ⁻³	6	0	19	0	100 (19/19)
10 ⁻⁴	3	3	13	3	81.3 (13/16)
10 ⁻⁵	3	3	10	6	62.5 (10/16)
10 ⁻⁶	3	3	7	9	43.8 (7/16)
10 ⁻⁷	2	4	4	13	23.5 (4/17)
10 ⁻⁸	2	4	2	17	10.5 (2/19)
10 ⁻⁹	0	6	0	23	0 (0/23)

Table 2. The nucleotides homologies between different PRRSV strains
表 2. 分离株与 10 株 PRRSV 毒株核苷酸序列同源性比对结果(%)

毒株	CH-1α	VR-2332	JXA1	HB-1	HB-2	HUB-1	BJ-0706	BJ-4	SD
NSP2	87.5	66.7	98.8	94.0	81.5	98.8	91.1	66.1	98.8
GP5	95.0	89.6	99.0	97.5	92.2	98.5	97.7	88.7	98.2

基上也存在变异。

4. 讨论

本研究从重庆某猪场成功分离到一株 HP-PRRSV 病毒, 并对其进行鉴定。该病毒感染 Marc-145 细胞, 使细胞出现明显病变, 按照 Reed-Muench 的方法计算第四代病毒的滴度为 $10^{-5.67}$ TCID₅₀/0.1mL。用 RT-PCR 从处理过的滤液中扩增出 PRRSV 的 NSP2 和 GP5 基因片段, 序列分析表明该毒株的 NSP2 基因与经典型的 VR-2332 核苷酸同源率为 66.7%, 与高致病性变异毒株 SD, JAX1 核苷酸同源率可达到 98.8%, 本实验结果表明从重庆某猪场发病猪中分离得到的毒株为高致病性蓝耳病变异株。

虽然不同的 PRRSV 分离株在形态学和生物学特性上十分相似, 但其基因型和抗原性明显属于两个亚型, 一种是以 VR-2332 为代表的美洲型, 一种是以 LV 代表的欧洲型, 二者的核苷酸同源率很低仅有 60% [8]。无论是美洲型的毒株还是欧洲型的毒株, 都有一个显著的特点, 病毒本身具有高度变异性。其中变异最为显著的就是 NSP2、GP5、GP3 蛋白。

PRRSV 的非结构蛋白 NSP2 由 ORF1a 编码, 参与病毒的复制过程并与对细胞或组织的嗜性有关[9]。从 2006 年分离到 PRRSV 起, HP-PRRSV 基因组上均显示 NSP2 基因存在不连续氨基酸的缺失[6], 成为高致病性变异株的标志。通过对 NSP2 序列分析发现, 该毒株的 NSP2 序列与 JXA1, BJ0706, SD 毒株的同源性最高, 遗传进化方面与 HUB1 关系最近, 同时显示该蛋白存在 30 个不连续氨基酸的缺失, 由此可以推测该毒株可能由 JXA1, BJ0706 或 SD 变异而来, 且为高致病性变异毒株。

GP5 属结构蛋白, 基因位于 ORF5 上, 全长 603 bp, 是病毒主要的保护性抗原, 在结构蛋白中突变率最高。同型毒株间, GP5 氨基酸序列相似性在 88%~99% 之间[10]。测序结果显示, 该毒株的 GP5 基因与 JXA1 的同源性最高, 在基因的第 135、201、300、456 及 600 位发生突变。

2006 年 11 月 28 日, 重庆市首次爆发蓝耳病, 2007 年该病的发病率和死亡率分别达到 6.11% 和 2.06% [11], 随着疫苗的使用以及养殖户防范意识的增强, 该病的发病率有所下降, 但其仍是危害我市猪场的主要疾病之一。该病流行范围广, 病原污染严重, 一年四季均可发病, 以 5~7 月多发。临床表现和病理变化不典型, 同时主要以混合感染为主[12], 这就使临床诊断困难加大。目前, 该病无有效的特效药治疗, 仍以预防免疫为主。实际应用中主要免疫灭活疫苗和弱毒疫苗, 但其存在免疫效果差和返毒等潜在缺点, 均不是理想的疫苗。因此开发安全有效的新型疫苗势在必行。

5. 展望

近年来, 随着基因工程和细胞工程技术的发展, 通过基因敲除或外源表达蛋白等技术, 研制更加安全高效的疫苗已成为可能。目前已有研究表明基因缺失疫苗散毒水平低, 返强机率小, 而且效力不减[13]; 病毒样颗粒疫苗不含核酸物质, 安全性高, 且能引发机体强效的免疫反应[14]等疫苗成为了新型疫苗的研究方向。总之, 猪繁殖与呼吸综合征的新型疫苗研究取得了很大的进步, 对 PRRS 的防控奠定了基础。

基金项目

重庆市科技攻关计划项目(cstc2012gg-yyjs80014), 重庆市科技人才培养计划项目(cstc2013kjrc-1jrcpy80001)。

参考文献 (References)

- [1] Goyal, S.M. (1993) Porcine reproductive and respiratory syndrome. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **5**, 656-664.
- [2] Zimmerman, J.J., Yoon, K.J., Wills, R.W., et al. (1997) General overview of PRRSV: A perspective from the United States. *Veterinary Microbiology*, **55**, 187-196.

- [3] Han, K., Seo, H.W., Oh, Y., et al. (2012) Effects of North American porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-based modified live vaccines on preimmunized sows artificially inseminated with European PRRSV-spiked semen. *Clinical and Vaccine Immunology*, **19**, 319-324.
- [4] 郭宝清, 陈章水, 刘文兴, 等 (1996) 从疑似 PRRS 流产胎儿分离 PRRSV 的研究. *中国畜禽传染病*, **2**, 1-4.
- [5] Bautista, E.M., Meulenber, J.J.M., Choi, C.S. and Molitor, T.W. (1996) Structural polypeptides of the American (VR-2332) strain of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Archives of Virology*, **141**, 1357-1365.
- [6] Oleksiewicz, M.B., Botner, A., Toft, P., et al. (2001) Epitope mapping porcine reproductive and respiratory syndrome virus by phage display: The nsp2 fragment of the replicase polyprotein contains a cluster of B-cell epitopes. *Journal of Virology*, **75**, 3277-3290.
- [7] 刘光清, 蔡雪辉, 仇华吉, 等 (2001) 猪生殖和呼吸系统综合征的研究进展. *中国预防兽医学报*, **1**, 72-76.
- [8] Oleksiewicz, M.B., Botner, A. and Normann, P. (2002) Porcine B-cells recognize epitopes that are conserved between the structural proteins of American and European type porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *The Journal of General Virology*, **83**, 1407-1418.
- [9] 王旭荣, 马红艳, 祝卫国, 等 (2008) 高热病猪群中 PRRSV 的调查及其流行毒株的分离. *中国兽医杂志*, **3**, 39-40.
- [10] Ostrowski, M., Galeota, J.A., Jar, A.M., et al. (2002) Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain. *Journal of Virology*, **76**, 4241-4250.
- [11] 米自由, 熊仲良, 等 (2013) 重庆地区高致病性猪蓝耳病病原变异及免疫防控技术研究. 国家科技成果.
- [12] 杨泽林, 曾政, 等 (2010) 重庆市高致病性猪蓝耳病流行病学调查. *中国动物检疫*, **12**, 56-58.
- [13] 邢海云, 梅林, 等 (2011) 猪繁殖与呼吸综合征弱毒疫苗的安全性及新型疫苗的研究进展. *中国生物制品学杂志*, **2**, 237-240.
- [14] Nam, H.-M., Chae, K.-S., et al. (2013) Immune responses in mice vaccinated with virus-like particles composed of the GP5 and M proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Archives of Virology*, **158**, 1275-1285.