

公猪精液 PRRSV 变异株检测及 NSP2、ORF5 基因序列分析

王连想^{1,2}, 孙彦伟¹, 马静云², 张冠群², 谢青梅², 陈 锋², 毕英佐², 于康震³

(1 广东省动物防疫监督总所, 广东 广州 510230; 2 华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642; 3 中国兽医药品监察所, 北京 100081)

摘要:用荧光 RT-PCR 方法从某猪场精液中检测到猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)变异株(NSP2 1 594 ~ 1 680 bp 缺失)核酸阳性. 提取 1 份阳性样品病毒核酸测定和分析其 NSP2 和 ORF5 全基因序列, 结果表明 NSP2 基因由 950 个氨基酸组成, 与 CH-1a、VR-2332 等经典 PRRSV 相比 481 位缺失 1 个氨基酸、532 ~ 560 位连续缺失 29 个氨基酸, 与 JXA1、HUN4 等毒株具有相同的缺失特性; ORF5 基因第 13、151 位为具有强毒特性的精氨酸(R), 存在 4 个潜在的糖基化位点, 分别位于 30 ~ 32、35 ~ 37、44 ~ 46 和 51 ~ 53 位氨基酸. 遗传进化分析表明, 测定序列与 JX-A1、HUN4 等毒株关系最近, 与 CH-1a、NVSL 等同属一个大分支, 而与 BJ-4、PI29、RespPRRS MLV、VR-2332 等处于不同分支. 研究证实公猪精液可携带 PRRSV 变异株, 因此猪场(群)在人工授精和引进精液时必须强化检疫和生物安全措施.

关键词:精液; 猪繁殖呼吸综合征病毒; 变异株; NSP2 基因; ORF5 基因

中图分类号: S852. 65

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2009)02-0109-03

Detection of PRRSV Variant Strain in Boar Semen and Sequence Analysis of NSP2 and ORF5 Genes

WANG Lian-xiang^{1,2}, SUN Yan-wei¹, MA Jing-yun², ZHANG Guan-qun²,
XIE Qing-mei², CHEN Feng², BI Ying-zuo², YU Kang-zhen³

(1 Guangdong Provincial Institute of Animal Prevention and Supervision, Guangzhou 510230, China;

2 College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

3 China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Abstract: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) variant strains (NSP2 1 594 – 1 680 deletion) were identified by real-time RT-PCR from boar semen of a pig farm. cDNA of NSP2 and ORF5 genes of one strain named GDTS were cloned and sequenced. The results showed that NSP2 gene was composed of 950 amino acids, which had 1 amino acid deletion at the positions of 481 and 29 amino acids deletion at the positions of 532-560 compared with that of CH-1a and VR-2332, which had the same deletion compared with that of JXA1 and HUN4. Arginines at the positions of 13 and 151 of ORF5 gene were found and indicated high pathogenicity of the virus. Four glycosylation sites, 30 – 32, 35 – 37, 44 – 46 and 51 – 53 amino acids were found in ORF5 gene. These results proved PRRSV variant (NSP2 1 594 – 1 680 deletion) could be transmitted by boar semen and therefore more control strategies should be taken in artificial insemination.

Key words: boar semen; porcine reproductive and respiratory syndrome virus; variant; NSP2 gene; ORF5 gene

收稿日期: 2008-06-22

作者简介: 王连想(1975—), 男, 博士; 通讯作者: 毕英佐(1944—), 男, 教授, 硕士, E-mail: yzbi@scau.edu.cn

基金项目: 广东省科技计划项目(2005A20902001); 广东省农业厅 2007 年动植物防疫检疫研究专项

2006年以来在我国多个省份暴发流行并造成生猪大量死亡的猪“高热病”疫情原发病原被证实为猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)变异株(NSP2 1 594~1 680 bp 缺失)^[1]. 该毒株感染猪群可引起高发病率、高死亡率,并在全国多数省份广泛存在. PRRSV可通过交配或精液输入而引起母猪感染并垂直传播,带毒母猪妊娠后病毒通过胎盘屏障感染胎儿,所产下的仔猪不断产毒、排毒,污染环境而导致其他健康猪感染. 本研究对某发病猪场临床健康种猪精液进行 PRRSV 变异株核酸检测,探索该毒株可能的传播途径,并测定和分析 NSP2、GP5 全基因序列,补充和丰富 PRRSV 基因组信息数据,为科学监测和综合防控提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 样品来源

种公猪精液来源于广东省某发病猪场,保育舍仔猪大量死亡,种公猪未见明显临床症状. 无菌采集9头生产种公猪精液样品, -20℃保存备用.

1.2 载体、菌种、酶与其他试剂

pMD18-T Vector, 一步法 RT-PCR 试剂盒、连接试剂盒、DNA 胶回收试剂盒均为 TaKaRa 公司产品; 颗粒酶购自深圳匹基生物工程有限公司; 大肠杆菌 DH5 α 由华南农业大学动物科学学院基因工程实验室保存.

1.3 临床样品荧光 RT-PCR 检测

PRRSV 变异株(NSP2 1 594~1 680 bp 缺失)荧光 RT-PCR 检测试剂盒由广东省动物防疫监督总所实验室开发. 引物: 上游 5'-CAGGATGAGCCTCTG-GATTTG-3', 下游 5'-CCTCCAGGATGCCCATGTT-3'; 探针 FAM-CGGAATATGAGGCTTTCCCCCTAGCA-TAMRA.

1.4 NSP2 和 ORF5 全基因的克隆与测定

设计 NSP2、ORF5 全基因的引物. NSP2 上段引物: 5'-GAGGCTGCAAGTTAATGG-3', 5'-TGAACCTT-GGTGGAGGG-3'; 下段引物: 5'-AGCTTAAAGAC-CAGATGGA-3', 5'-AAGATCCCCAGCACTTTT-3'. ORF5 引物: 5'-AGGGATTCAAAGTGGTGT-3', 5'-ACGGCATCTGGAGGTGAT-3'. 一步法 RT-PCR 反应条件: 50℃ 30 min, 94℃ 3 min, 然后 94℃ 45 s, 55℃ 45 s, 72℃ 2 min, 40 个循环. PCR 产物经回收、连接 T 载体、转化、筛选和鉴定后测序.

1.5 序列分析

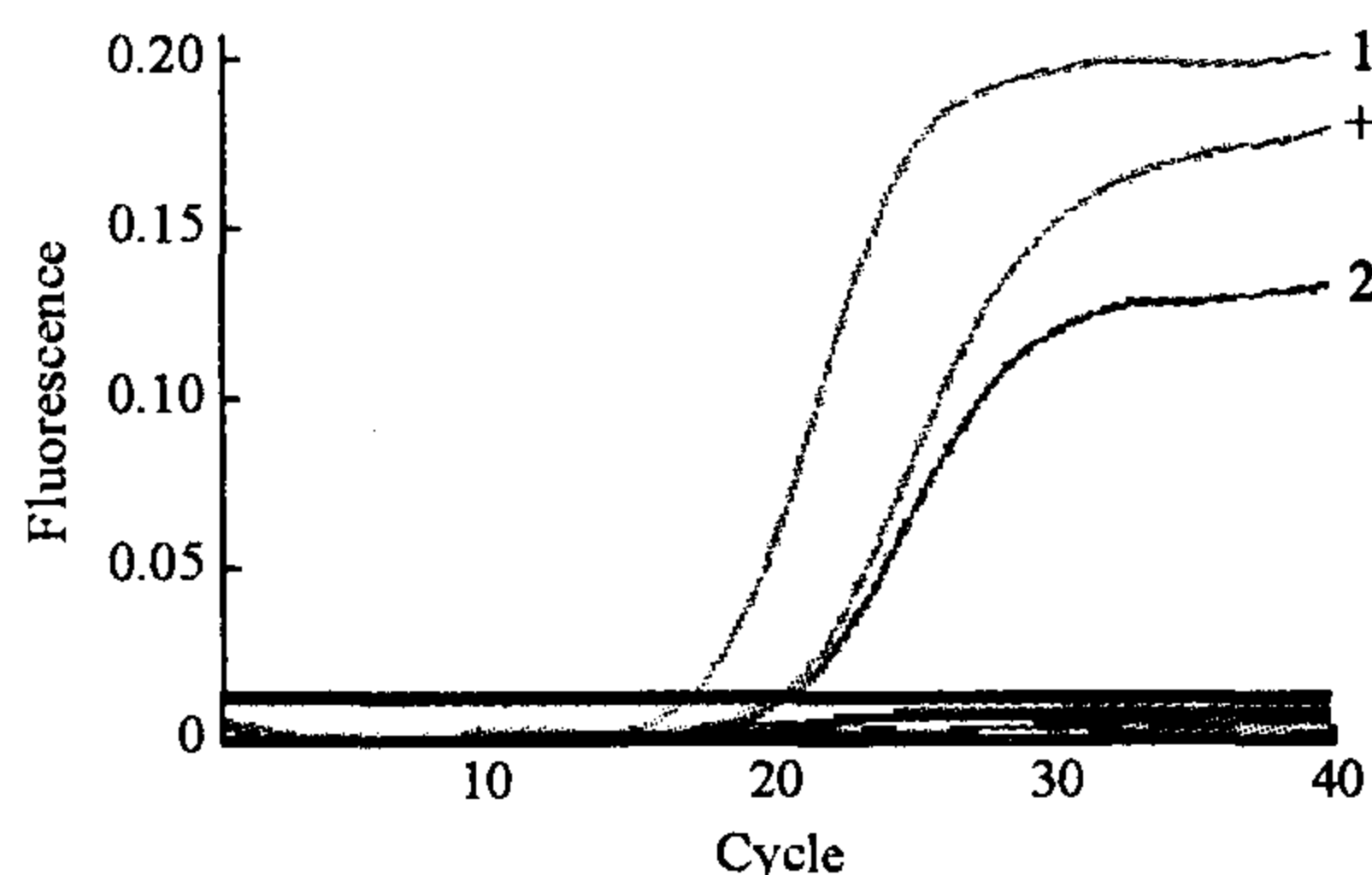
使用 DNASTar 分析测序结果, 并与国内外主要

美洲型 PRRSV 氨基酸序列比较.

2 结果与分析

2.1 临床样品荧光 RT-PCR 检测

利用设计的引物、探针配制反应体系, 经过 40 个循环后, 9 份精液样品中 4、7 号样品和阳性对照出现荧光值增长, 为 PRRSV 变异株核酸阳性, 而其他 7 份精液样品和阴性对照均无荧光值增长(图 1).



1:4 号样品; 2:7 号样品; +:阳性对照

图1 荧光 RT-PCR 方法检测精液样品 PRRSV 变异株扩增荧光曲线图

Fig. 1 Real-time RT-PCR amplification curve of specification for PRRSV (NSP2 1 594 -1 680 deletion)

2.2 NSP2 和 ORF5 全基因序列测定和分析

提取 4 号样品 RNA, 测定获得 NSP2 全基因序列(编号 GDTSNSP2)和 ORF5 全基因序列(编号 GDTSJY). GDTSNSP2 由 2 850 bp 组成, 编码 950 氨基酸, 与经典 PRRSV 毒株 CH-1a、VR-2332 等相比 481 位缺失 1 个氨基酸、532~560 位连续缺失 29 个氨基酸, 与 2006 年后分离的高致病性 PRRSV 代表株 JXA1 和 HUN4 等^[2]具有相同的缺失特性(图 2). 相似性分析表明, GDTSNSP2 与 JX-A1、HUN4 等高度相似, 与 CH-1a 相似性为 87.5%, 而与 BJ-4、Resp-PRRS MLV、P129、VR-2332 等相似性仅为 76.1%~77.3%(图 3). 遗传进化分析表明, GDTSNSP2 与 JX-A1、HUN4 等关系最近; 与 CH-1a、NVSL 等关系较近, 同属一个大分支; 而与 BJ-4、P129、RespPRRS MLV、VR-2332 等处于不同分支.

GDTSJY 由 603 bp 组成, 编码 200 个氨基酸, 与美洲型 PRRSV 相比未出现缺失. 相似性分析表明, GDTSJY 与 JX-A1、HUN4 等高度相似, 相似性为 99.0%~99.5%, 与 CH-1a 相似性为 93.0%, 而与 BJ-4、RespPRRS MLV、P129、VR-2332 等相似性仅为 86.1%~88.1%. 遗传进化分析表明, GDTSJY 与 JX-A1、HUN4 等关系最近; 与 CH-1a、NVSL 等关系较近, 同属一个大分支; 而与 BJ-4、P129、RespPRRS MLV、VR-2332 等处于不同分支. GDTSJY 存在 4 个潜

在的糖基化位点,分别位于 30~32、35~37、44~46 和 51~53 位氨基酸。ORF5 基因组第 13、151 位氨基酸变异可能影响毒株毒力^[3],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),GDTSJY 第 13、151 位均为精氨酸(R),具有强毒特性。

11 Sequences	0	480	490	500	510	520	530	540	550	560
VR-2332		GGDVPNSWEDLAVSSPFDLPTPEPATPSSSELVIVSSPQCIFRPATPLSEPAIPAPRGTVSRPVTPLSEPIPVPAAPRRKFQOVKRLSSAAAIPPYQD								
BJ-4		GGDVPNSWEDLAVSSPFDLPTPELATPSSSELVIVSSPQCIFRPATPLSEPAIPAPRGTVSRPVTPLSEPIPVPAAPRRKFQOVKRLSSAAAIPPYQN								
MLV RespPRR		GGDVPNSWEDLAVSSPFDLPTPEPATPSSSELVIVSSPQCIFRPATPLSEPAIPAPRGTVSRPVTPLSEPIPVPAAPRRKFQOVKRLSSAAAIPPYQN								
RespPRRS ML		GGDVPNSWEDLAVSSPFDLPTPEPATPSSSELVIVSSPQCIFRPATPLSEPAIPAPRGTVSRPVTPLSEPIPVPAAPRRKFQOVKRLSSAAAIPPYQN								
CH1a		GDNVPNGWEDFAVGGPLDFPTPEPATPSSSELVIVSSPQCIFRPATPLSEPAIPAPRGTVSRPVTPLSEPIPVPAAPRRKFQOVKRLSSAAAIPPYQD								
P129		GGDVPNSWEDLAVSSPFDLPTPEPATPSSSELVIVSSPQCIFRPATPLSEPAIPAPRGTVSRPVTPLSEPIPVPAAPRRKFQOVKRLSSAAAIPPYQN								
NVSL		GDNVPDGREDLTVGGPLDLSTPPEPATPSSSELVIVSSPQCIFRPATPLSEPAIPAPRGTVSRPVTPLSEPIPVPAAPRRKFQOVKRLSSAAAIPPYQN								
HPBEDV		GDNVPNG-EE-TVGGPLNFPTPEPATPSSSELVIVSSPQCIFRPATPLSEPAIPAPRGTVSRPVTPLSEPIPVPAAPRRKFQOVKRLSSAAAIPPYQN								
HUN4		GDNVPNG-EE-TVGGPLNFPTPEPATPSSSELVIVSSPQCIFRPATPLSEPAIPAPRGTVSRPVTPLSEPIPVPAAPRRKFQOVKRLSSAAAIPPYQN								
JXA1		GDNVPNG-EE-TVGGPLNFPTPEPATPSSSELVIVSSPQCIFRPATPLSEPAIPAPRGTVSRPVTPLSEPIPVPAAPRRKFQOVKRLSSAAAIPPYQN								
GDTSNSP2		GDNVPNG-EE-TVGGPLNFPTPEPATPSSSELVIVSSPQCIFRPATPLSEPAIPAPRGTVSRPVTPLSEPIPVPAAPRRKFQOVKRLSSAAAIPPYQN								

图2 NSP2 推导氨基酸序列与国内外毒株的序列比较

Fig. 2 Comparison of deduced amino acid of NSP2 gene with those of native and foreign PRRSV strains

Percent Identity											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	100	98.9	99.7	99.7	81.9	99.7	80.0	76.8	76.9	76.8	77.3
2	0.8	100	99.0	99.0	80.8	99.0	79.1	75.7	75.8	75.7	76.1
3	0.3	0.7	100	99.8	81.6	99.8	79.9	76.5	76.6	76.5	76.9
4	0.3	0.7	0.2	100	81.6	100.0	79.9	76.7	76.8	76.7	77.2
5	20.7	21.8	21.1	21.1	100	81.6	88.6	87.3	87.5	87.3	87.5
6	0.3	0.7	0.2	0.0	21.1	100	79.9	76.7	76.8	76.7	77.2
7	23.3	24.2	23.5	23.5	12.4	23.5	100	82.7	82.7	82.9	82.9
8	27.0	28.1	27.4	27.1	13.2	27.1	18.9	100	99.2	100.0	98.3
9	26.8	27.9	27.3	27.0	13.0	27.0	18.9	0.8	99.2	99.2	98.3
10	27.0	28.1	27.4	27.1	13.2	27.1	18.9	0.0	0.8	99.2	98.3
11	26.4	27.5	26.8	26.5	13.0	26.5	18.6	1.7	1.7	1.7	100

图3 NSP2 推导氨基酸与国内外毒株的相似性比较

Fig. 3 Similarity comparison of deduced amino acid of NSP2 gene with those of native and foreign PRRSV strains

3 讨论

PRRSV 可通过水平接触和空气传播,也可通过母猪胎盘和公猪精液垂直传播,而直接接触感染猪是 PRRSV 传播的主要途径。从精液中检出 PRRSV 的报道数见不鲜。周斌等^[4]对 2003—2004 年间江苏等省市 17 个猪场 186 份种公猪精液进行检测,发现 PRRSV 阳性率为 9.68%,PRRSV 和猪瘟病毒混合感染阳性率为 5.91%。覃芳芸等^[5]对广西部分种猪场精液 328 份进行 PRRSV 带毒情况调查,PRRSV 阳性样品 38 份,阳性率为 11.59%,说明带毒比较严重,并认为近年来 PRRSV 的发生及日趋复杂化可能与公猪精液带毒传播有关。孙泉云^[6]等 2006 年对 30 个猪场和人工授精站精液 355 份进行 PRRSV 等 6 种病毒检测,6 份 PRRSV 阳性,阳性率为 1.69%。本研究证实无明显临床症状公猪精液可携带 PRRSV 变异株。当前人工授精技术普遍,临床上不表现症状的种公猪若携带 PRRSV 变异株,可通过精液传播给同场其他母猪或者其他猪群,造成因 PRRSV 变异株(NSP2 1 594~1 680 bp 缺失)感染引起 PRRS 的扩散和蔓延,并导致猪群重大损失。因此种猪场(群)在引进公猪精液时必须强化检疫和生物安全措施。

PRRSV NSP2 基因序列 1 594~1 680 位核苷酸缺失是 2006 年我国暴发所谓“高热病”以来猪场 PRRSV 分离株的一个显著特征,且不同省市猪场流行的 PRRSV 相互之间高度相似,这些基因的缺失和结构蛋白基因序列的突变,可能与毒力的改变具有非常重要的相关性^[2]。本研究获得的 NSP2 全基因组由 950 氨基酸组成,与 PRRSV 经典株 CH-1a、VR-2332 相比,在 481 位和 532~560 位氨基酸发生缺失,与 2006 年以来全国流行的 PRRSV 变异株 JXA1、HUN4、HPDEBV 等高度相似,且其 ORF5 基因组第 13、151 位均为精氨酸(R),具有强毒特性。

参考文献:

- [1] TIAN Ke-gong, YU Xiu-ling, ZHAO Tie-zhu, 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):1-10.
- [2] 童光志,周艳君,都晓芳,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,2007,25(9):323-327.
- [3] ANSARI I H, KWON B, OSORIO F A, et al. Influence of N-linked glycosylation of porcine reproductive and respiratory syndrome GP5 on virus infectivity, antigenicity and ability to induce neutralizing antibody[J]. J Virol, 2006, 80:3994-4004.
- [4] 周斌,吴增坚,贾赟,等.种公猪精液中猪瘟和蓝耳病毒混合感染的快速检测[J].畜牧与兽医,2005,37(5):1-3.
- [5] 覃芳芸,黄夏,陈义祥,等.广西部分种猪场公猪精液中猪瘟和 PRRS 带毒情况的调查[J].畜牧与兽医,2007,39(12):52-53.
- [6] 孙泉云,周锦萍,张维谊,等.种公猪精液中与繁殖障碍有关的 6 种病毒的检测[J].动物医学进展,2007,28(11):30-33.

【责任编辑 柴 焰】