

韦应芳, 冀池海, 孙彦阔, 等. 2017 年福建地区 PRRSV 分子检测及 *ORF5* 基因变异分析 [J]. 华南农业大学学报, 2019, 40(3): 14-19.
WEI Yingfang, JI Chihai, SUN Yankuo, et al. Molecular detection of PRRSV and variation analysis of *ORF5* gene in Fujian province in 2017[J]. Journal of South China Agricultural University, 2019, 40(3): 14-19.

2017 年福建地区 PRRSV 分子检测及 *ORF5* 基因变异分析

韦应芳¹, 冀池海¹, 孙彦阔¹, 韩晓亮¹, 陈 尧², 张桂红¹

(1 国家生猪种业工程技术研究中心/广东省动物源性人兽共患病预防与控制重点实验室/
华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642; 2 江苏恒丰强生物技术有限公司, 江苏 南通 226100)

摘要:【目的】研究 2017 年福建地区中小规模猪场猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 毒株的分子流行情况。【方法】从福建地区中小规模猪场收集 83 份疑似蓝耳阳性病料, 对编码 GP5 蛋白的 *ORF5* 基因进行了 RT-PCR 检测和遗传进化分析。【结果】采集的 83 份疑似蓝耳病料中阳性率为 73%, 测得的序列之间 *ORF5* 的核苷酸相似性达 80.3%~100.0%, 其中所测的各个分支毒株与其所属分支的代表毒株 NADC30、GM2 和 JXA1 的核苷酸相似性分别为 92.6%~93.9%、89.8%~93.0% 和 93.4%~99.3%, 检测到新分支中新出现的毒株与 JXA1 的核苷酸相似性为 91.0%~93.0%。GP5 氨基酸比对结果显示不同亚群 GP5 信号肽区、诱导表位、主要中和表位及高变区等功能区发生了显著变异。【结论】福建地区出现了 PRRSV 新分支, 使福建 PRRSV 变异种类更加多样化, 建议加强 PRRSV 流行及变异的监测。

关键词: 猪繁殖与呼吸道综合征; 蓝耳病; 分子流行病学; *ORF5* 基因; 遗传变异
中图分类号: S855.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2019)03-0014-06

Molecular detection of PRRSV and variation analysis of *ORF5* gene in Fujian province in 2017

WEI Yingfang¹, JI Chihai¹, SUN Yankuo¹, HAN Xiaoliang¹, CHEN Yao², ZHANG Guihong¹

(1 National Engineering Research Center for Breeding Swine Industry/Key Laboratory of Zoonosis Prevention and Control of Guangdong Province/College of Veterinary, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;
2 Jiangsu Hengfengqiang Biotechnology Co., Ltd., Nantong 226100, China)

Abstract: 【Objective】To study the molecular prevalence of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) strain in small and medium-sized pig farms of Fujian province in 2017. 【Method】We collected 83 suspected blue ear positive disease materials from small and medium-sized pig farms in Fujian province. RT-PCR detection and genetic evolution analysis of *ORF5* gene which encoded GP5 protein was performed. 【Result】The positive rate of 83 suspected blue ear disease samples was 73%, and the nucleotide similarity among the measured *ORF5* sequences was 80.3%–100.0%. The nucleotide similarities between tested strains of different branches and the representative strains of those branches, NADC30, GM2 and JXA1, were 92.6%–93.9%, 89.8%–93.0% and 93.4%–99.3%, respectively. The new identified strain in the new branch had nucleotide similarity of 91.0%–93.0% to JXA1. The GP5 amino acid alignment showed significant variation in

收稿日期:2018-10-18 网络首发时间:2019-04-16 09:12:00
网络首发地址:<http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20190412.1740.028.html>
作者简介:韦应芳 (1994—), 女, 硕士研究生, E-mail: 1764479177@qq.com; 通信作者: 张桂红 (1968—), 女, 教授, 博士, E-mail: guihongzh@scau.edu.cn
基金项目:国家重点研发计划项目 (2018YFD0501200); 国家生猪现代农业产业技术体系项目 (CARS-35); 国家自然科学基金 (31272564)

functional regions such as GP5 signal peptide region, induction epitope, principal neutralizing epitope and hypervariable region in different subgroups. 【Conclusion】 A new branch of PRRSV has emerged in Fujian area, making the PRRSV variants in Fujian more diverse. It is necessary to strengthen the monitoring of PRRSV epidemics and mutations.

Key words: porcine reproductive and respiratory syndrome; blue ear disease; molecular epidemiology; *ORF5* gene; genetic variation

猪繁殖与呼吸综合征病毒 (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 是单股正链 RNA 病毒, 有囊膜, 直径在 50~70 nm, 全基因组 1.5 kb 左右^[1-3]。PRRSV 是猪繁殖与呼吸道综合征 (PRRS) 的主要病原, PRRS 是一种在世界范围内广泛存在的烈性传染病, 对全球养猪业造成了重大危害。1987 年首次在美国被发现, 之后在加拿大及其他北美地区出现。2006 年夏季由高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒 (Highly Pathogenic PRRSV, HP-PRRSV) 引起的“无名高热”综合征, 相较 2006 年之前的毒株可引起仔猪的高发病率与高死亡率, 给我国养猪业带来了沉重的经济损失^[4-6]。感染猪通常会产生免疫抑制, 从而继发感染其他细菌和病毒。临床表现主要有两方面: 一是母猪严重的繁殖障碍, 包括流产死胎、木乃伊胎及弱仔; 二是各年龄段猪感染后均出现呼吸系统症状, 常伴随非特异性的间质性肺炎^[7]。

福建地处沿海, 生猪产业发展迅速。在全国生猪优势区域布局规划中, 福建确定为我国生猪产业的优势区域布局和发展重点区域, 在生猪产业中具有生产基础、市场竞争、产品加工等优势, 与此同时福建也是我国的生猪主销区之一, 养猪业的健康发展对福建省的经济发展起着重要的作用^[8]。PRRSV 新现毒株与国内经典毒株的重组导致出现新的高致病性 PRRSV, 这让我国 PRRS 的防治工作更是雪上加霜^[9]。在福建地区陆续有 PRRSV 新毒株的出现, 如 NADC30-like 和欧洲 I 型毒株^[10-11], 尤其 NADC30-like 毒株, 已有研究证明现有商业化蓝耳病疫苗不能对其提供完全保护^[12]。近年来福建省陆续出台相关政策, 对畜禽养殖要求提高门槛, 同时将大力支持可养区生猪养殖场实施标准化改造^[13-14]。这种趋势有助于提升猪场生物安全防控能力, 对于猪场疫病防控起到一定的促进作用。

中小型养猪场与大型规模化、标准化养猪场相比, 因其规模小、设施和管理相对比较落后、生物安全措施较薄弱, 往往是疫病高发区。通过有针对性地对福建地区各中小型养猪场进行 PRRSV 流行病学调查, 有助于了解 PRRSV 在该地区的流行情况,

为 PRRSV 的防控提供借鉴。因 PRRSV 的 GP5 蛋白是诱导产生中和抗体的主要结构蛋白, 编码 GP5 蛋白的 *ORF5* 基因在一定程度上能反映 PRRSV 的遗传变异情况, 所以本试验主要是以 GP5 蛋白的流行程度来反映 PRRSV 的流行情况。

1 材料与方法

1.1 样品收集

2017 年 83 份疑似感染 PRRSV 的病料收集于福建龙岩、南平、漳州、福州、宁德等县市各中小型猪场。样品类型包括猪肺脏、淋巴结等, 其中龙岩地区收集了 12 份, 南平 21 份, 漳州 17 份, 福州 9 份, 泉州 5 份, 三明 15 份, 宁德 4 份。将采集的组织样品研磨并于-70 ℃ 条件下保存, 由国家生猪种业工程技术研究中心实验室留存。

1.2 主要试剂

RNA 抽提试剂盒购自上海飞捷生物技术有限公司, RNA 酶抑制剂、dNTP 混合物 (2.5 mmol/L)、TaKaRa ExTaq DNA 聚合酶、DNA Marker DL 2 000 和克隆载体 pMD18-T 购自 TaKaRa 公司; DNA 凝胶回收试剂盒购自 OMEGA 公司; 感受态细胞大肠埃希菌 DH5α 购自北京天根生化科技有限公司。

1.3 引物设计与合成

根据 GenBank 中收录的 JXA1 的基因序列 (EF112445.1) 与国内外流行的 PRRSV 毒株基因序列的比对结果, 设计 2 套扩增 PRRSV *ORF5* 基因的引物, 引物序列见表 1。

1.4 病毒总 RNA 的提取

取-70 ℃ 保存备用的病料处理上清液, 按上海

表 1 引物和扩增片段长度		
Table 1	Primer and amplified fragment length	
引物名称	引物序列(5'→3')	长度/bp
Primer name	Primer sequence	Length
ORF5-1-F	TGAGACCATGAGGTGGGC	726
ORF5-1-R	GAAAACGCCAAAAGCACC	
ORF5-2-F	TGCTCCATTTCATGACAC	
ORF5-2-R	GCATCTGGAGGTGATGAAT	
		974

飞捷生物技术有限公司的 RNA 抽提试剂盒操作说明书提取病毒 RNA, 用适量 RNase free 水溶解, -20 ℃ 条件下保存备用。

1.5 RT-PCR 扩增

以 20 μL 为反转体系, 分别加入制备好的 RNA 9.5 μL, 5×MLV Buffer 4.0 μL, MLV 反转录酶 1.0 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 4.0 μL, RNase Inhibitor (20 U/μL) 0.5 μL, 反转录随机引物 1.0 μL, 混匀后, 置于恒温水浴锅中 42 ℃ 反应 1 h 后获得 cDNA 模板。将 cDNA 用于 PCR 反应。采用 50 μLPCR 体系, 分别加入 TaKaRa Ex -*Taq* DNA 聚合酶 25 μL, cDNA 模板 2 μL, 上下游引物 (20 pmol/μL) 各 2 μL, 加 ddH₂O 至终体系 50 μL。反应参数: 95 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s, 56 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s (*ORF5* 片段为 1 min), 共 30 个循环; 最后 72 ℃ 延伸 10 min。反应结束后, 用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳观察。

1.6 *ORF5* 基因的克隆和测序

参照 DNA Purification Kit 说明书回收扩增的目的片段后, 于 16 ℃ 将目的基因与 pMD18-T 载体过夜连接, 连接产物转化到 DH5a 感受态细胞, 37 ℃ 条件下倒置培养 10~16 h, 挑菌, 经 PCR 鉴定为阳性的菌液送英潍捷基 (上海) 贸易有限公司进行序列测定。

1.7 *ORF5* 基因的进化树以及 GP5 蛋白的氨基酸序列分析

将各片段的测序结果, 利用 DNASTarLasergne 软件进行人工拼接, 得到 PRRSV *ORF5* 基因序列。从 GenBank 已上传毒株序列中选择具有代表性的 26 株 PRRSV 毒株, 其中 1 株欧洲毒株, 7 株美国毒株和 18 株中国毒株。用 MEGA6.0 软件进行遗传进化树的绘制, 用 DNA Star 7.0 软件进行氨基酸序列相似性的比较。

2 结果与分析

2.1 2017 年福建地区 PRRSV 样品检测结果

2017 年在福建南平、宁德、三明、漳州、福州、泉州、龙岩等地区 70 个中小规模猪场采集 83 份疑似蓝耳阳性样品, 阳性检出率为 73%(置信度为 95.0%, 置信区间为 62.1%~82.2%), 在 NCBI 上比对 GP5 遗传进化树显示分离毒株仍以 JXA1 亚群为主, 占 61%, GM2 为代表毒株的分支检出率为 17%, 出现新的分支占 15%, NADC30 分支毒株占 7%。南平、宁德、三明、福州、龙岩、泉州和漳州市的阳性率分别为 26.50%、9.56%、15.47%、11.45%、

12.58%、8.38% 和 17.76%。

2.2 PRRSV GP5 氨基酸序列分析

比较不同 PRRSV 毒株的氨基酸序列, 结果如图 1 所示。GP5 各个区域的功能依次为信号肽区 1~26 aa、诱导表位 [27A(I/V)VLV29]、主要中和表位 [37 H(F/L)QLIYNL45]、高变区、转膜区以及细胞表位, 毒力相关位点为 R13 和 R151^[15-16]。本试验 NADC30 为参考毒株亚群, 以 R13Q 为主, 其他分离株亚群以 R13 为主, 仅有 2 株 R13H 突变, 而 R151 氨基酸位点在各个分离株亚群中不变, 以 JXA1 毒株为参考毒株的第 I 亚群和第 II 亚群出现了广泛的位点突变, 包括信号肽区 (L14S、F16S、A26T)、诱导表位 (L28P、V29A), 高变区 1 (S32N、N33Q) 和高变区 2 (A28N/K) 等突变位点, 在细胞表位功能区的突变与其他亚群基本保持一致。GM2 亚群大部分毒株与参考毒株相比在主要中和表位发生了 H28Y 和 L29S 突变, 同时新出现的亚群与其他亚群相比在信号肽区 (C10Y、L17S)、诱导表位区 (A21V)、高变区 1(N23T/A D24S)、主要中和表位 (L41S) 和高变区 2(A57V) 等具有特征性的位点, 在其他位点仅少数存在氨基酸置换。通过糖基化分析预测, 不同亚群糖基化位点也存在着一定的差异, JXA1 亚群 I 有 4 个糖基化位点, 亚群 II 只有 3 个, GM2 和 NADC30 据推测也只有 3 个糖基化位点, 新出现的亚群存在 4 个糖基化位点。

2.3 PRRSV *ORF5* 遗传进化分析和基因的相似性

GeneBank 上选取 PRRSV 的参考毒株与 2017 年测得的序列进行遗传进化分析, 结果如图 2 所示, 所有毒株均属于美洲型毒株, 与参考毒株划分为不同的亚群, 其中以 JXA1 毒株为代表的高致病性亚群仍为主要检出毒株, 并与以往不同的是进化为 2 个不同的分支。以 GM2 为代表毒株的分支检出 7 株, 且有新的进化分支形成。有 3 株分布在 NADC30 毒株为代表的分支上。经典株 CH-1a、美洲型疫苗株 VR2332 和高致病性与经典毒株过渡株亚群未检出。其中共有 6 株毒株分布于新出现的分支中, 与以往国内报道的毒株不同。

ORF5 的核苷酸序列分析显示, *ORF5* 的核苷酸序列相似性达 80.3%~100.0%, 通过遗传进化树可以看到, 各分支毒株与其所属分支的代表毒株 NADC30、GM2 和 JXA1 的核苷酸序列相似性分别为 92.6%~93.9%、89.8%~93.0% 和 93.4%~99.3%。其中新出现的分支与 CH-1a、JXA1 和 GM2 的核苷酸序列相似性分别为 91.7%~92.1%、92.4%~93.0% 和 81.9%~82.2%。在遗传进化树上独立形成分支的毒株 FJNP-

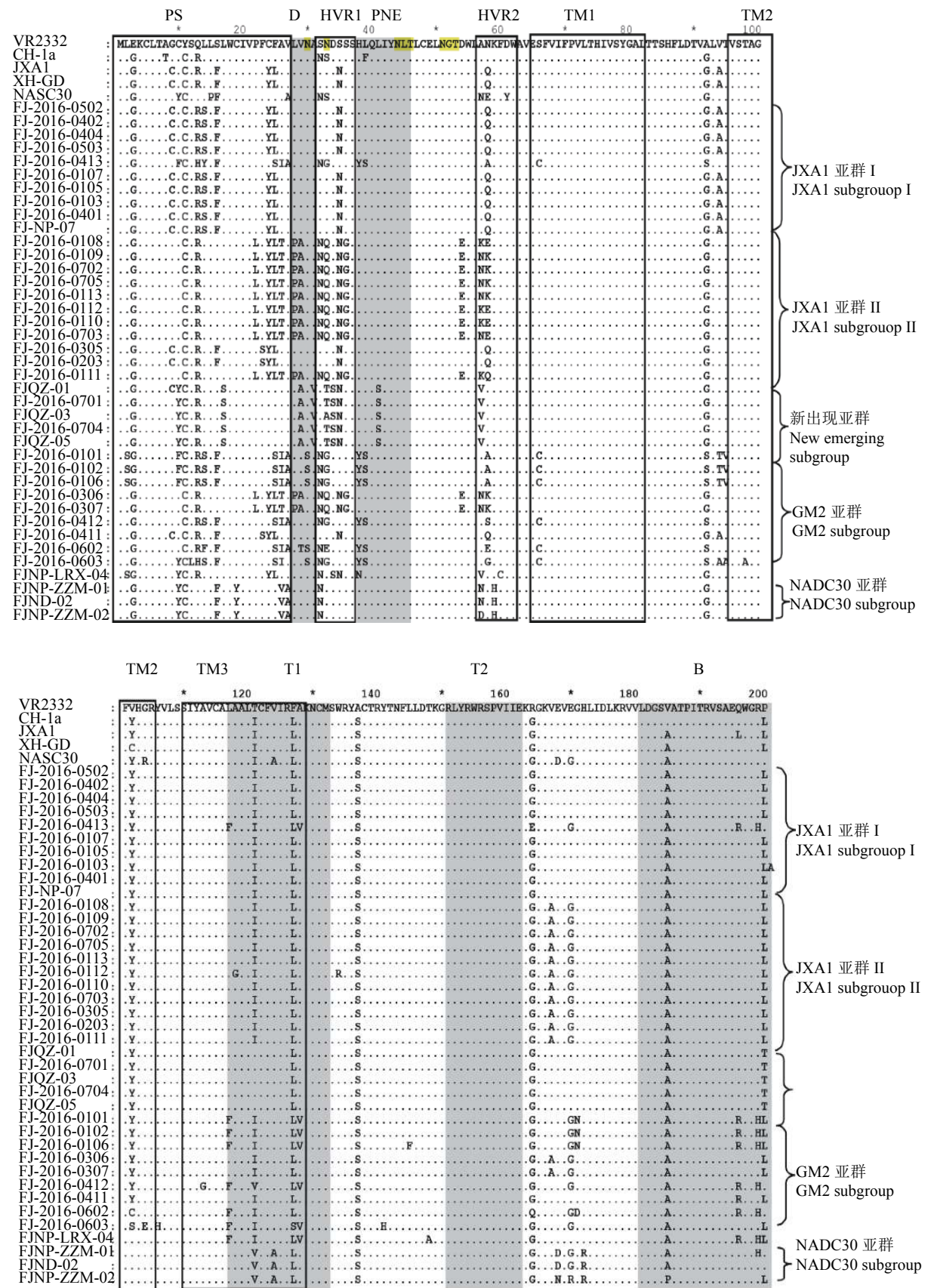


图 1 PRRSV GP5 氨基酸序列比对分析结果

Fig. 1 Comparison analysis of amino acid locus variation in PRRSV GP5

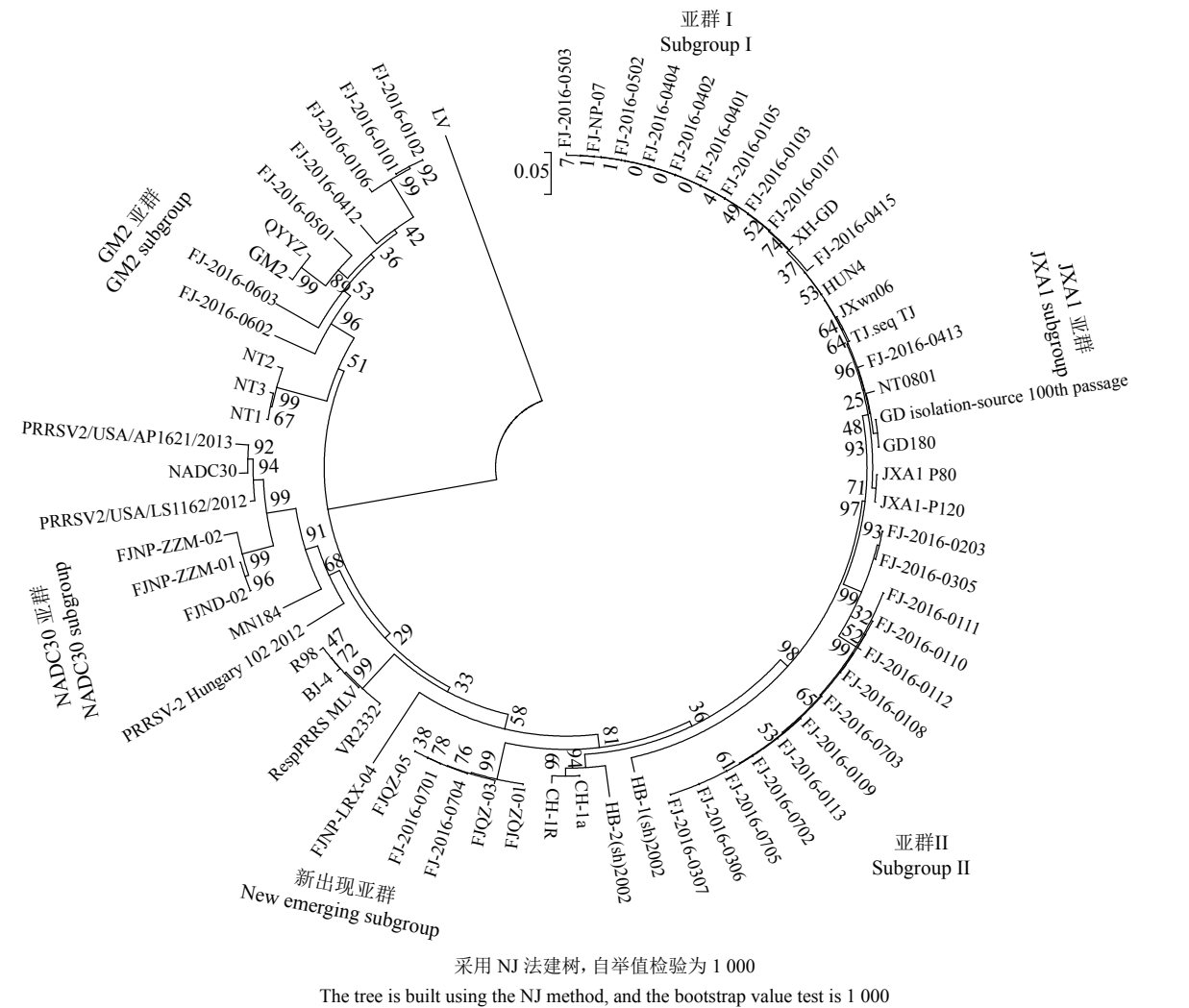


图 2 *ORF5* 基因遗传进化分析

Fig. 2 Genetic evolution analysis of the *ORF5* gene

LRX-04 与以上参考毒株相比核苷酸序列相似性为 82.7%~87.2%，其中相似性最高的参考毒株是 JXA1，相似性为 87.2%。

3 讨论与结论

本试验采集了福建地区几个市县 PRRSV 疑似蓝耳阳性病料，且收集了来源于福建地区中小规模养殖场的病料，所以本次试验覆盖地区广，有一定的代表性。福建地区送检猪场阳性率为 73%，根据 *ORF5* 基因遗传进化分析显示，福建地区的毒株具有多样性，分布在 5 个大的分支上，检出以 JXA1 亚群为主，且分化呈两大分支的形式存在。以 GM2 为代表的 lineage 3 分支毒株在多地猪场都有检出，该支系毒株 90 年代最早出现在中国香港和台湾。有研究表明：GM2 毒株在一些猪场长期存在，并且有不断扩大流行的趋势^[17-18]。通过临床观察和统计，流行 GM2 毒株的猪场怀孕母猪流产率在 10% 左右，仔猪临床表现以高热为主，死亡率在 10%~25%

之间。以类 NADC30 为参考毒株的亚群检出率为 7%，推测可能类 NADC30 毒株在福建地区尚未成为流行毒株。

通过遗传进化分析显示，新出现的毒株亚群分支的 GP5 氨基酸位点出现了一些新的特征，这些氨基酸变化在其他亚群中没有出现，其对毒株的生物学特征的影响需要进一步试验验证。该类型毒株分布于福建部分县市猪场，且没有呈现明显的地域特征。其中检测到 FJNP-LRX-04 等新毒株与流行参考毒株 JXA1 *ORF5* 基因序列相似性为 92%~93%，是否会成为流行毒株需要进一步研究。病毒囊膜上的糖基化位点，会屏蔽相关的抗原表位，造成免疫逃逸^[19]，以 JXA1 为代表的高致病性毒株存在 4 个糖基化位点，而新出现的分支亚群也有同样特点，所以可能会出现对现有疫苗免疫逃逸。

本研究通过对福建地区中小规模猪场 PRRSV 的分子检测及 *ORF5* 基因的变异分析，初步了解了福建地区中小规模猪场 PRRSV 毒株流行情况，并

且对引种或跨区域传播引起的风险提供了一定的参考。

参考文献:

[1] SNIJDER E J, KIKKERT M, FANG Y. Arterivirus molecular biology and pathogenesis[J]. *J Gen Virol*, 2013, 94(10): 2141-2163.

[2] FENG Y, ZHAO T, NGUYEN T, et al. Porcine respiratory and reproductive syndrome virus variants, Vietnam and China, 2007[J]. *Emerg Infect Dis*, 2008, 14(11): 1774-1776.

[3] 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): e526.

[4] TONG G Z, ZHOU Y J, HAO X F, et al. Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome, China[J]. *Emerg Infect Dis*, 2007, 13(9): 1434-1436.

[5] ZHOU Y J, HAO X F, TIAN Z J, et al. Highly virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus emerged in China[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2008, 55(3/4): 152-164.

[6] 宁宜宝, 郑杰, 张纯萍, 等. 我国南方猪高热病的研究: II: 猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒的分离、鉴定和致病性测定 [J]. *中国兽药杂志*, 2007(1): 14-18.

[7] LUNNEY J K, FANG Y, LADINIG A, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): Pathogenesis and interaction with the immune system[J]. *Annu Rev Anim Biosci*, 2016, 4: 129-154.

[8] 邓蓉, 郑文堂, 肖红波. 中国生猪生产区域布局与经营规模分析 [J]. *现代化农业*, 2016(10): 44-46.

[9] ZHAO K, YE C, CHANG X, et al. Importation and recombination are responsible for the latest emergence of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in China[J]. *J Virol*, 2015, 89(20): 10712-10716.

[10] ZHANG Q, JIANG P, SONG Z, et al. Pathogenicity and antigenicity of a novel NADC30-like strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus emerged in China[J]. *Vet Microbiol*, 2016, 197: 93-101.

[11] LIU J K, WEI C H, DAI A L, et al. Complete genomic characterization of two European-genotype porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in Fujian province of China[J]. *Arch Virol*, 2017, 162(3): 823-833.

[12] BAI X, WANG Y, XU X, et al. Commercial vaccines provide limited protection to NADC30-like PRRSV infection[J]. *Vaccine*, 2016, 34(46): 5540-5545.

[13] 张金辉. 生猪禁养政策持续加码, 养猪企业何去何从?[J]. *猪业科学*, 2016(11): 142-143.

[14] 王亚辉, 彭华, 李娟. 我国 21 个地区公布畜禽禁养时间表 2016 年环保政策将更严 [J]. *中国猪业*, 2016(5): 13-18.

[15] 刘岳. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP5 蛋白分段表达及鉴定 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2010.

[16] XIE J, CUI T, CUI J, et al. Epidemiological and evolutionary characteristics of the PRRSV in Southern China from 2010 to 2013[J]. *Microb Pathog*, 2014, 75: 7-15.

[17] SHI M, LAM T T, HON C C, et al. Molecular epidemiology of PRRSV: A phylogenetic perspective[J]. *Virus Res*, 2010, 154(1/2): 7-17.

[18] LU W H, TUN H M, SUN B L, et al. Re-emerging of porcine respiratory and reproductive syndrome virus (lineage 3) and increased pathogenicity after genomic recombination with vaccine variant[J]. *Vet Microbiol*, 2015, 175(2/3/4): 332-340.

[19] 申思. HP-PRRSV 囊膜糖蛋白 5 糖基化位点突变及功能初探 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2016.

【责任编辑 庄 延】