

网络出版时间:2013-03-27 15:47

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20130327.1547.008.html>

吉林地区高致病性 PRRSV JL-04/12 株的 分离鉴定与全基因组测序

王凤雪,郭 利,温永俊,宋 妮,杨艳玲,张淑琴,谭 斌,武 华

(中国农业科学院特产研究所,吉林省特种经济动物分子生物学重点实验室,吉林 长春 130112)

【摘 要】 【目的】确定吉林省某疑似高致病性 PRRS 猪场的病原,研究其基因特性。**【方法】**采集疑似感染高致病性 PRRSV 病猪的脏器组织,处理后接种 MARC-145 细胞,观察细胞病变,分离 PRRSV;应用 RT-PCR 方法检测和确定分离毒株的基因型,采用间接免疫荧光、电镜观察和全基因组测序检测分离的病毒。**【结果】**分离毒株为北美洲型 PRRSV,命名为 JL-04/12,其基因组全长为 15 320 bp(不包括 PolyA),可使 MARC-145 细胞产生典型的细胞病变。序列比对结果表明:JL-04/12 株与经典毒株 VR-2332 和 CH-1a 的核苷酸同源性分别为 89.5%和 94.9%;与高致病性毒株 JXA1、HUN4 的核苷酸同源性为 99.1%。分离毒株 JL-04/12 编码的 2 个非结构蛋白和 GP2~GP4 的氨基酸序列与 HUN4 株同源性较高,在 97.2%~99.3%,而 JL-04/12 编码的 GP5 的氨基酸序列与 JXA1 株同源性较高,为 98.5%;JL-04/12 编码的 GP6 和 N 蛋白的氨基酸序列与高致病性 PRRSV 毒株 JXA1 和 HUN4 的同源性均为 100%。PRRSV JL-04/12 株的 Nsp2 不连续缺失 30 个氨基酸,与高致病性 PRRSV 毒株 JXA1 和 HUN4 的同源性最高,均为 97.8%,判定该分离株为变异的高致病性 PRRSV。**【结论】**从吉林省分离到 1 株高致病性 PRRSV,说明高致病性 PRRS 变异病毒在吉林省仍然存在。

【关键词】 猪繁殖与呼吸综合征病毒;分离鉴定;全基因组测序

【中图分类号】 S852.65+9.2

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2013)04-0037-08

Isolation, identification and sequencing of PRRSV JL-04/12 strain with high pathogenicity from Jilin, China

WANG Feng-xue, GUO Li, WEN Yong-jun, SONG Ni, YANG Yan-ling,
ZHANG Shu-qin, TAN Bin, WU Hua

(State Key Laboratory for Molecular Biology of Special Economic Animals, Institute of Special Economic Animal and
Plant Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun, Jilin 130112, China)

Abstract: 【Objective】 The study was to determine the causative pathogen of diseased swine with suspected high pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome in Jilin province, and examine its genetic characteristics. **【Method】** The tissues infected were disposed and inoculated with MARC-145 cells. CPE was observed and virus was isolated. Virus detection and genotype identification were conducted by RT-PCR. Then the virus was determined by immunofluorescence, electron microscopy testing and genome sequencing. **【Result】** The results showed that the isolate was proved to be North American type PRRSV, and named JL-04/12 strain. The full-length of genome was 15 320 bp (PolyA not included). CPE can be ob-

【收稿日期】 2012-07-12

【基金项目】 国家“863”项目“新型重大动物疫病疫苗与诊断试剂创制及生产工艺创新”(2011AA10A213)

【作者简介】 王凤雪(1978—),女,山东潍坊人,助理研究员,博士,主要从事动物病毒分子生物学研究。

E-mail: wangfx_vet@163.com

【通信作者】 武 华(1960—),男,辽宁凌源人,研究员,博士生导师,主要从事动物病毒疫苗与分子免疫学研究。

E-mail: wuhua@sinovetah.com

served on MARC-145 cells. Sequence alignment results indicated that the nucleotide homologies between JL-04/12 strain and classic isolates VR-2332 and CH-1a were 89.5% and 94.9%, respectively while that between both JXA1 and HUN4 were 99.1%. The homologies of the amino acid sequence in two non-structural proteins and GP2—GP4 between JL-04/12 and HUN4 were among 97.2%—99.3%, and that of GP5 between JL-04/12 and JXA1 was 98.5%. However, GP6 and N protein of JL-04/12 were same as HP-PRRSV JXA1 and HUN4 (homology was 100%). Discontinuous loss of 30 amino acids existed in JL-04/12 Nsp2. Homologies of Nsp2 between both HP-PRRSV JXA1 and HUN4, were 97.8%. Thus, the isolate was a variant of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome. 【Conclusion】 We obtained an isolate of HP-PRRSV in Jilin, China. It was indicated that high pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus existed in Jilin, China.

Key words: porcine reproductive and respiratory syndrome virus; isolation and identification; genome sequencing

猪繁殖与呼吸综合征 (Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 又称蓝耳病, 在北美首次发生^[1], 1990 年在欧洲的荷兰分离到第 1 例猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV)^[2], 1996 年我国首次分离到该病毒^[3]。PRRSV 出现后, PRRS 几乎在所有的生猪养殖国家迅速传播, 给全球生猪养殖业造成了巨大的经济损失^[4]。

PRRSV 为有囊膜的单股正链 RNA 病毒, 为动脉炎病毒属成员^[5]。PRRSV 拥有 5' 帽子结构和 3' PolyA 尾巴, 基因组大小约 15 kb, 组成结构为 5' UTR-ORF1a-ORF1b-ORF2a-ORF2b-ORF3-ORF4-ORF5-ORF6-ORF7-3' UTR^[6-7]。其中 ORF1a 和 ORF1b 编码复制酶蛋白, 被酶解为 13 个非结构蛋白 (Nsps); ORF2a、ORF2b 及 ORF3~ORF7 分别编码 GP2a、E、GP3、GP4、GP5 和 M 等 6 个囊膜蛋白和 1 个核衣壳蛋白 (N)^[8]。

PRRSV 存在欧洲型 (以 LV 株为代表株) 和北美洲型 (以 ATCC VR-2332 株为代表株) 2 个基因型。我国猪群中主要流行的是美洲型。2006 年以来, 在我国多个省份相继分离到高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒 (Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus, HP-PRRSV)^[9-10], 但吉林省未见有分离株的报道, 本研究于疑似发生 PRRS 的病猪肺脏中分离到 1 株 HP-PRRSV, 并对其进行了生物学和基因组学特性鉴定, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料和易感细胞系 病料为采自吉林省某猪场疑似 PRRS 发病死亡猪的脏器 (肺脏、肝脏、脾

脏、淋巴结等) 组织。猴肾细胞系 (MARC-145), 由中国兽医药品监察所引进, 中国农业科学院特产研究所吉林省特种经济动物分子生物学重点实验室常规传代培养并保存。HP-PRRSV TJ 株由中国农业科学院特产研究所吉林省特种经济动物分子生物学重点实验室分离传代并保存。

1.1.2 主要试剂 新生牛血清 (Fetal bovine serum, FBS), 购自兰州荣晔生物科技有限责任公司; MEM、胰蛋白酶, 购自 Hy clone 公司; Taq 聚合酶、Marker DL2000、RACE 试剂盒, 购自宝生物 (大连) 有限公司; PRRSV 病原检测试剂盒, 购自 IDEXX 公司; Trizol、反转录试剂盒, 购于 Invitrogen 公司; 胶回收试剂盒, 购于 AXYgen 公司; 兔抗猪 IgG-FITC, 购自 Sigma 公司; PRRSV 高免血清, 由中国农业科学院特产研究所人兽共患病研究室制备保存。

1.2 PCR 引物

参照 PRRSV 经典毒株 CH-1a 株基因组全长序列 (GenBank 号: AY032626) 和 HP-PRRSV TJ 株序列 (GenBank 号: EU860248), 设计 P1/P2、P3/P4、P5/P6、P7/P8、P9/P10、P11/P12、P13/P14 等 7 对引物, 用于扩增 PRRSV 全长基因组, 引物序列见表 1。引物由英潍捷基 (上海) 贸易有限公司合成。

1.3 毒株的分离与鉴定

1.3.1 毒株分离 无菌采集吉林省某猪场疑似感染 PRRSV 死亡仔猪的心、肝、脾、肺、肾、淋巴结等组织样品, 液氮冷冻后, 用灭菌 PBS 研磨, 并以 10 000 U 抗生素作用 2 h, 以杀灭或抑制可能存在的细菌。利用 IDEXX ELISA 检测试剂盒检测组织研磨上清, 阳性样品进行下一步的病毒分离。培养 MARC-145 细胞, 选择形态正常、生长良好的细胞

消化后,铺 6 孔板,37 ℃ 温箱培养至单层,弃除培养液,用维持液(含体积分数 2% FBS 的 MEM)洗细胞表面 2 次,然后接种处理好的病毒材料,500 μL/孔,静置于 37 ℃ 温箱内吸附 1 h(期间轻摇 2~3 次,使病毒与整个细胞面充分接触),弃去接毒液,PBS 清洗 2 次,加维持液(含体积分数 2% FBS 的

MEM)2 mL/孔,继续置 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养 4~5 d,每隔 12 或 24 h 镜检 1 次,观察细胞病变发生情况。培养 4~5 d 至细胞出现病变时,收获病毒液,置于-70 ℃ 冰箱,反复冻融分装作为 F₁ 代。将收获病毒液继续传代至 F₆ 代,保存备用。

表 1 PRRSV 基因组全长序列扩增引物(不含 PolyA)

Table 1 Oligonucleotide primer sequences utilized to generate the full-length genome of PRRSV (PolyA not included)

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence	理论产物长度/bp Expected product	引物位置 Primers location
P1	ATGACGTATAGGTGTTGGCTCTATGCCATGGCAAT	2 831	0—35 nt
P2	CACGTCGCGACGCGGCACAAGTACGGGCTCACTC		2 832—2 866 nt
P3	CGCGTCGCGACGTGTCCCAAGCTGATGACACC	3 622	2 853—2 888 nt
P4	GGTGCTTAAGTTCATTACCACCTGTAACGGATGCC		6 439—6 474 nt
P5	TGAACTTAAGCACCTATGCTTTCTGCCCCGGATG	1 156	6 461—6 495 nt
P6	GGCGGCTAGCAGTTTAAACACTGCTCCTTAGTCAG		7 479—7 588 nt
P7	AACTGCTAGCCGCCAGCGCTTGACCCGCTGTGGT	2 502	7 603—7 657 nt
P8	CTGGAACGTTGAACCGGCACGTCCCCAAAGCCCTA		10 070—10 104 nt
P9	GTTCAACGTTCCAGCAGGTACAACGCTGCAATTCC	1 803	10 091—10 125 nt
P10	TTCTGGCGCGCCCGAAACGCATCATTGTAATCCTC		11 859—11 893 nt
P11	TTCGGGCGCGCCAGAAAAGGAAAAATTTATAAAGCT	2 341	11 878—11 912 nt
P12	ATCAGGTGACCTTCGACCTCAACCTTACCCCTTT		14 184—14 218 nt
P13	CGAAGGTCACCTGATCGACCTCAAGAGAGTTGTGC	1 131	14 207—14 238 nt
P14	CGGCCGCATGGTTCTCGCC		15 291—15 320 nt
ORF7U	CGTGTGTTGGGTGGCAGAA	506	14 746—14 763 nt
ORF7L	TTAGAGGCACAGTGTC AATCAG		

1.3.2 毒株鉴定 (1)ORF7 的 RT-PCR 扩增。取 F₂ 代细胞毒为材料,按照 Trizol 试剂盒说明提取病毒 RNA。取提取的 RNA,使用检测引物 ORF7U/ORF7L(表 1)进行 RT-PCR 扩增,同时设不加模板作阴性对照,PRRSV TJ 株模板作阳性对照,电泳检测扩增结果。20 μL 反转录体系中,含反转录引物 Oligo dT 1 μL、RNA 5 μL,70 ℃ 加热 10 min,冰浴 10 min;再加入 5 倍 AMV buffer 4 μL,10 mmol/L dNTP 1.5 μL,RNasin 0.5 μL,AMV 反转录酶 1 μL,DEPC H₂O 7 μL,充分混合后 3 000 r/min 离心 1 min,经 42 ℃ 60 min,95 ℃ 灭活 AMV 反转录酶,立即于冰上冷却后,进行 PCR。PCR 体系为:反转录产物 5 μL,10 倍 PCR buffer 5 μL,2.5 mmol/L dNTP 4 μL,上下游引物各 1 μL,Ex Taq DNA Polymerase 0.5 μL,加水补足 50 μL。PCR 反应程序为:95 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,54.4 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。取 5 μL PCR 产物,进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。

(2)基因型的鉴定。以检测为阳性的组织病料为材料,提取其 RNA 作为模板,RT-PCR 扩增病毒的 *Nsp2* 全基因,反转录体系同(1),PCR 体系为:反转录产物 5 μL,10 倍 PCR buffer 10 μL,2.5

mmol/L dNTP 8 μL,上下游引物各 2 μL,Ex Taq DNA Polymerase 1 μL,加水补足 100 μL。PCR 反应程序为:95 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,56.6 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳切胶回收,并克隆到 pMD18-T 载体后提交到英潍捷基(上海)贸易有限公司测序,在 GenBank 中利用 Blastn 分析病毒基因型。

(3)间接免疫荧光检测。将分离的 PRRSV F₄ 代感染 MARC-145 细胞,培养 48 h 后,用体积分数 4% 的甲醛固定细胞,室温 30 min,PBS-T 洗涤 3 次后,每孔分别加 1:100 稀释的 PRRSV 高免血清 50 μL,37 ℃ 温育 60 min,用 PBS-T 洗涤 3 次,每次 5 min;每孔加体积比 1:2 000 稀释的兔抗猪 IgG-FITC 50 μL,37 ℃ 温育 45 min,用 PBS-T 洗涤 3 次,每次 5 min;于倒置荧光显微镜下观察,拍片记录结果。

(4)电镜检测。将分离的 PRRSV F₆ 代病毒液冻融 1 次,12 000 r/min 离心 1 min,取细胞沉淀按常规方法进行磷钨酸负染,电镜观察。

1.4 病毒全基因组序列分析

鉴定了基因型后,采用设计的分段扩增引物,

RT-PCR 扩增病毒基因组各片段,克隆鉴定后送英潍捷基(上海)贸易有限公司测序,将各片段测序结果通过 Lasergene 中的 Seqman 进行拼接,然后利用生物学软件包 Lasergene 中的 Megalign,与经典毒株和流行毒株的序列进行比对分析。

1.5 病毒 TCID₅₀的测定

用密度为 $1.2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 的 MARC-145 细胞铺 96 孔细胞培养板,取分离病毒 F₁ 代、F₃ 代、F₆ 代冻融液,分别用维持液(含体积分数 2% FBS 的 MEM)进行 10 倍梯度稀释,接种于 96 孔板,每个病毒稀释度接种 8 孔,100 μL /孔。置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养观察 5 d,按 Spearman-Kärber 法^[11]计算病毒 TCID₅₀。

1.6 病毒噬斑试验

用密度为 $1.2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 的 MARC-145 细胞铺 6 孔细胞培养板,每孔 3 mL,24 h 后细胞生长至单层,用维持液(含体积分数 2% FBS 的 MEM)将分离病毒 F₃ 代冻融液进行 10 倍梯度稀释,以

$10^{-1} \sim 10^{-5}$ 的稀释毒液分别感染 MARC-145 细胞,37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO₂ 培养箱内作用 1 h,灭菌 PBS 清洗 3 次,铺低熔点琼脂糖培养基(含体积分数 3% FBS 和 75 g/L 低熔点琼脂糖的 MEM 培养基)1.5 mL,培养 48 h 后,继续铺含 1 g/L 中性红的低熔点琼脂糖培养基 1.5 mL,然后培养 5~7 d,观察病毒噬斑。

2 结果与分析

2.1 病毒分离结果

将采集的病猪心、肝、脾、肺、肾、淋巴结分别研磨处理后接种 MARC-145 细胞,传代后发现,F₂ 代病毒能够产生典型的 PRRSV 病变,表现为细胞变圆、聚集、空泡化,最后裂解,形成花式病变痕迹(图 1),其中肺脏接种细胞病变尤为明显。继续传代至 F₅ 代,病变形态和病变时间稳定,表明成功分离到了 1 株 PRRSV 毒株,命名为 JL-04/12。

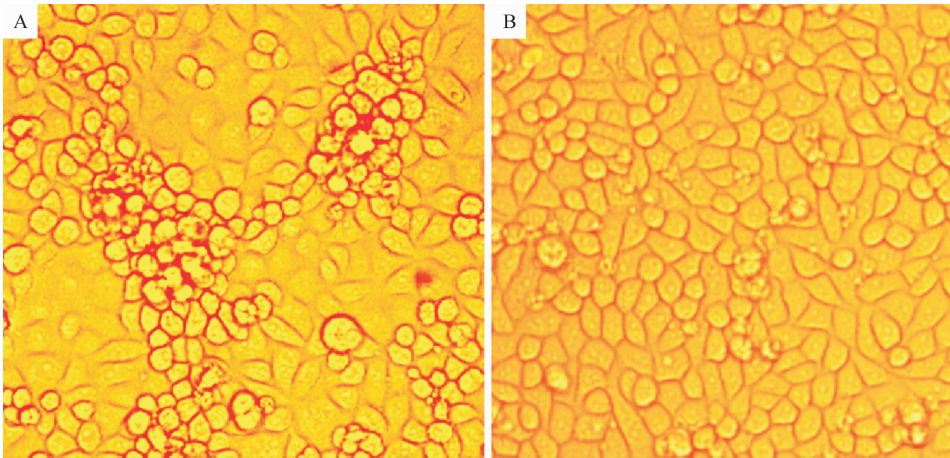


图 1 PRRSV JL-04/12 株在 MARC-145 细胞上形成的病变(100 $\times$)

A. PRRSV 接种 MARC-145 细胞;B. 正常 MARC-145 细胞

Fig. 1 CPE of PRRSV JL-04/12 on MARC-145 cells under a microscope(100 $\times$)

A. The MARC-145 cells inoculated by PRRSV;B. Normal MARC-145 cells

2.2 病毒鉴定结果

2.2.1 病原核酸检测 利用针对 PRRSV ORF7 的引物扩增出了 506 bp 左右的条带,阴、阳性对照成立,说明鉴定结果为阳性(图 2A)。

2.2.2 基因型鉴定 RT-PCR 扩增 PRRS 阳性病料中的 PRRSV *Nsp2* 全基因,经电泳检测显示,成功扩增获得 3 622 bp 左右条带,与预期片段长度相符(图 2B)。将测序结果与 GenBank 中的序列进行比对,结果证明分离到的 PRRSV 为北美洲型,分离毒株与 HP-PRRSV JX143 株亲缘关系较近(图

2C)。

2.2.3 间接免疫荧光鉴定 利用 PRRSV 高免血清作为一抗,进行间接免疫荧光试验检测分离病毒,可见病毒感染细胞的胞质呈黄绿色,对照无黄绿色荧光细胞(图 3)。

2.2.4 电镜检测结果 将分离的 PRRSV F₆ 代细胞培养物处理后,在电镜下观察,可见到球形、有囊膜、约 60 nm 的病毒粒子(图 4),与资料中描述的 PRRSV 形态^[12]相符。

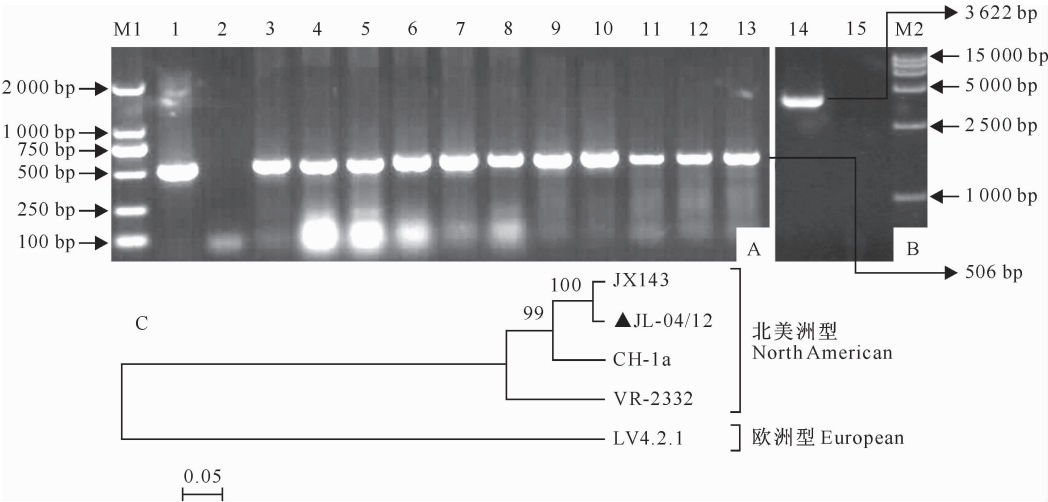


图 2 PRRSV JL-04/12 株 ORF7 和 *Nsp2* 的 RT-PCR 和基于 *Nsp2* 序列的基因型鉴定

A. ORF7 扩增;B. *Nsp2* 全基因扩增;C. 基于 *Nsp2* 基因的分型结果;M1. DNA Marker DL2000;

1. 阳性对照;2. 阴性对照;3~13. 组织病料;M2. DNA Marker DL15000;14. 病料中扩增的 *Nsp2* 基因;15. 阴性水对照

Fig. 2 Identification of virus by RT-PCR of ORF7 and *Nsp2* gene and genotype based on *Nsp2* sequence

A. ORF7 PCR result;B. *Nsp2* PCR result;C. Genotype based on *Nsp2*;M1. DNA Marker DL2000;

1. Positive control;2. Negative control;3~13. Tissue samples;M2. DNA Marker DL15000;

14. *Nsp2* gene amplicated from tissue simples;15. Negative control

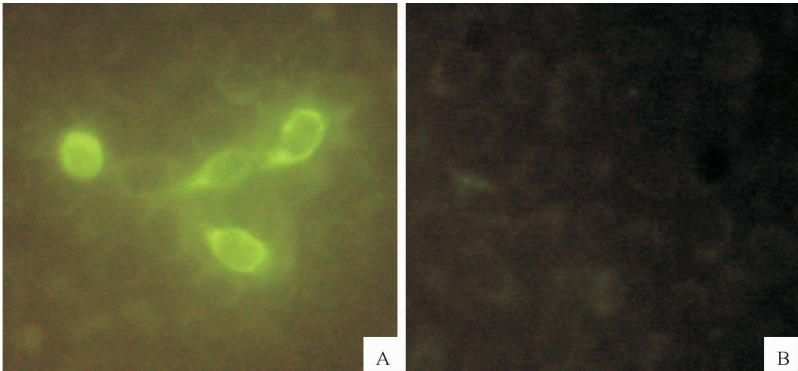


图 3 PRRSV JL-04/12 株感染 MARC-145 细胞的间接免疫荧光检测

A. 感染病毒的 MARC-145 细胞;B. 正常 MARC-145 细胞

Fig. 3 IFA detection of MARC-145 cells infected by PRRSV JL-04/12 strain

A. MARC-145 cells infected virus;B. Normal MARC-145 cells

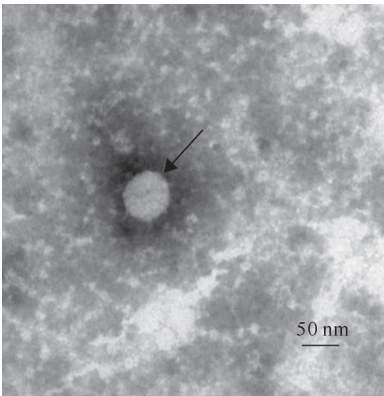


图 4 PRRSV JL-04/12 株的电镜观察结果

Fig. 4 Result of PRRSV JL-04/12 by electron microscope

2.3 PRRSV JL-04/12 株全长基因序列的比对结果

PRRSV 分离毒株 JL-04/12 的全长 cDNA 序列为 15 320 bp(不含 PolyA),将序列信息提交至 GenBank,获得登录号为 JX177644。PRRSV JL-04/12 株全基因组序列与 PRRSV 经典毒株 VR-2332 和我国早期流行的 CH-1a 株的核苷酸同源性分别为 89.5%和 94.9%;与高致病性毒株 JXA1、HUN4 的核苷酸同源性均为 99.1%。分离的 PRRSV JL-04/12 株编码的 2 个非结构蛋白和 GP2~GP4 的氨基酸序列与 HUN4 株的同源性较高,在97.2%~99.3%;而 JL-04/12 编码的 GP5 的

氨基酸序列与 JXA1 株的同源性较高,为 98.5%; JL-04/12 编码的 GP6 和 N 蛋白的氨基酸序列与高致病性 PRRSV 毒株 JXA1 和 HUN4 的同源性均为 100%(表 2)。Nsp2 不连续缺失 30 个氨基酸,与高

致病性 PRRSV 毒株 JXA1 和 HUN4 的同源性最高,均为 97.8%,判定该分离株为变异的高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒。

表 2 PRRSV JL-04/12 株与其他毒株蛋白编码区的同源性比对

Table 2 The homologies of the protein coding regions between PRRSV JL-04/12 strain and other strains					%
ORF	VR-2332	CH-1a	HP-PRRSV JXA1	HP-PRRSV HUN4	
非结构蛋白 1a Nonstructural protein 1a	86.1	92.4	98.6	98.6	
非结构蛋白 1b Nonstructural protein 1b	96.7	98.0	99.2	99.3	
GP2	93.0	95.3	98.0	97.7	
GP3	86.6	93.3	98.4	98.8	
GP4	89.3	96.6	95.5	97.2	
GP5	89.0	92.0	98.5	98.0	
GP6	97.7	97.7	100.0	100.0	
N	95.1	95.1	100.0	100.0	

2.4 PRRSV JL-04/12 株 TCID₅₀ 的测定

利用 Karber 法计算的分离毒株 PRRSV JL-04/12 F₁ 代、F₃ 代、F₆ 代的 TCID₅₀ 分别为 10^{3.25}, 10^{5.0} 和 10^{6.25} mL⁻¹。

2.5 PRRSV JL-04/12 株的噬斑试验

用 10⁻¹ 和 10⁻² 稀释的 PRRSV JL-04/12 株 F₃ 代病毒液感染 MARC-145 细胞单层 5 d 后,可形成均匀、清晰、中等大小的圆形噬斑,到第 7 天时,10⁻¹ 稀释液接种孔的噬斑出现融合(图 5)。

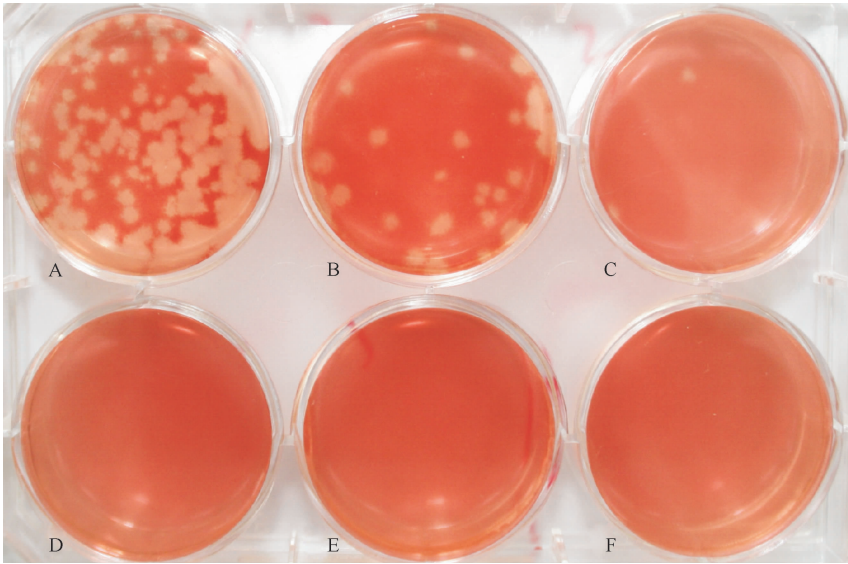


图 5 PRRSV JL-04/12 株 F₃ 代的 MARC-145 细胞噬斑试验
A—E. 10⁻¹~10⁻⁵ 稀释的 F₃ 代 PRRSV JL-04/12 株;F. MARC-145 细胞对照

Fig. 5 Plaque assay of PRRSV JL-04/12 strain on MARC-145 cells

A—E. Passage F₃ of PRRSV JL-04/12 strain diluted 10⁻¹—10⁻⁵, respectively;F. MARC-145 cells control

3 讨 论

在过去的 5 年中,高致病性 PRRSV 给养猪业造成了巨大的经济损失^[13-14],随着管理措施的改进和新疫苗的预防接种,该病在多数生猪养殖地区均得到很好的控制,但有些地区还偶有发病的情况。本研究从吉林省某发病猪场采集的病猪肺脏中成功

分离到 1 株 PRRSV,并采用 RT-PCR 方法、间接免疫荧光和电镜观察对其进行了鉴定。该 PRRSV 分离株能够在 MARC-145 细胞上产生典型病变,并可稳定传代。经基因型鉴定,分离毒株属北美洲型,全基因测序证明,本研究分离的 JL-04/12 毒株与 HP-PRRSV 流行株 HUN4 的同源性较高,可能是目前流行的 HP-PRRSV。

RNA病毒往往在传代细胞上很难分离,Wensvoort等^[2]首次在原代的猪肺巨噬细胞(PAM)上分离到欧洲型PRRSV,我国直到1996年才成功分离第1株PRRSV^[3]。本研究在MARC-145传代细胞系上分离到的PRRSV JL-04/12株较易适应传代细胞,这与多数高致病性毒株的特性相同^[15-19]。PRRSV JL-04/12株在病毒形态和基因特性方面均与2006年以来出现的HP-PRRSV相似,噬斑形态为圆形;病毒滴度TCID₅₀在F₆代达到10^{6.25} mL⁻¹;与PRRSV变异株JXA1和HUN4相比,非结构蛋白1a,结构蛋白GP2~GP5变异较大,而GP6和N蛋白无任何变化,说明高致病性变异株在遗传衍化过程中,变异主导基因位于ORF1a和ORF2~ORF5。

PRRSV是变异率较高的RNA病毒,ORF1a中的Nsp2是PRRSV高变基因之一^[20-23],近几年出现的HP-PRRSV就是Nsp2变异毒株。Nsp2基因的变异在PRRSV的变异衍化过程中起到重要作用,无论是北美洲型还是欧洲型的Nsp2,均有不同程度的遗传变异,存在点突变、核苷酸插入^[21,24-25]或缺失^[6,20,26-27]等多种基因变化。本研究分离的PRRSV JL-04/12株与流行的HP-PRRSV一样,存在Nsp2蛋白的30个不连续氨基酸的缺失,另外在整个基因组中有散在不规律的碱基和氨基酸的突变。分离的PRRSV JL-04/12株虽然在基因和氨基酸水平上与流行的HP-PRRSV相近,但对动物的致病性还需要进一步的动物回归试验进行研究。

本研究在吉林地区分离到1株PRRSV,其能够使MARC-145细胞产生花式病变,基因型鉴定属于北美洲型,且与流行的高致病性毒株相近,证明在我国吉林地区仍然有HP-PRRSV的流行。

[参考文献]

- [1] Keffaber K K. Reproductive failure of unknown etiology [J]. Am Assoc Swine Pract Newsl, 1989, 1:1-10.
- [2] Wensvoort G, Terpstra C, Pol J M, et al. Mystery swine disease in the Netherlands: The isolation of Lelystad virus [J]. The Veterinary Quarterly, 1991, 13(3): 121-130.
- [3] 郭宝清, 陈章水, 刘文兴, 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): 1-5.
Guo B Q, Chen Z S, Liu W X, et al. Isolation and identification of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus from aborted fetuses suspected of PRRS [J]. China Poultry Infectious Diseases, 1996(2): 1-5. (in Chinese)
- [4] Neumann E J, Kliebenstein J B, Johnson C D, et al. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States [J]. J Am Vet Med Assoc, 2005, 227(3): 385-392.
- [5] Snijder E J, Meulenbergh J J. The molecular biology of arteriviruses [J]. J Gen Virol, 1998, 79(Pt5): 961-979.
- [6] Ropp S L, Wees C E, Fang Y, et al. Characterization of emerging European-like porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the United States [J]. J Virol, 2004, 78(7): 3684-3703.
- [7] Wootton S, Yoo D, Rogan D. Full-length sequence of a Canadian porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolate [J]. Arch Virol, 2000, 145(11): 2297-2323.
- [8] Meulenbergh J J, Petersen-den Besten A, De Kluyver E P, et al. Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus [J]. Virology, 1995, 206(1): 155-163.
- [9] 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(5): 323-327.
Tong G Z, Zhou Y J, Hao X F, et al. Identification and molecular epidemiology of the highly virulent porcine reproductive and respiratory syndrome viruses emerged in China [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2007(5): 323-327. (in Chinese)
- [10] 姜晓晨, 刘业兵, 王晶钰, 等. 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒分离株HLJ-09感染仔猪的组织病理学和电镜观察 [J]. 中国兽医杂志, 2011(9): 27-30.
Jiang X C, Liu Y B, Wang J Y, et al. The histopathological and electron microscopic observation of piglets infected by highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates HLJ-09 [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2011(9): 27-30. (in Chinese)
- [11] Fung K P, Wong T W. Estimation of quantal dose response of drugs by the Spearman-Kärber method: A computer program written in BASIC [J]. J Singapore Paediatr Soc, 1989, 31(3/4): 129-132.
- [12] 殷震, 刘景华. 动物病毒学 [M]. 2版. 北京: 科学出版社, 1997.
Yin Z, Liu J H. Animal virology [M]. 2nd edition. Beijing: Science Press, 1997. (in Chinese)
- [13] Tian K G, Yu X L, Zhao T Z, 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.
- [14] 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.
- [15] 王金凤, 张岭岭, 王娇, 等. 高致病性PRRSV河北地方株的分离鉴定及部分Nsp2基因变异分析 [J]. 动物医学进展, 2010, 31(S1): 90-93.
Wang J F, Zhang L L, Wang J, et al. Isolation and identification of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus TS strain and sequence analysis of partial Nsp2 genes [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2010, 31

- (S1):90-93. (in Chinese)
- [16] 张金强, 吴家强, 朱向福, 等. PRRSV Sx-1 株的分离与 Nsp2 和 ORF5 基因的克隆及变异分析 [J]. 家畜生态学报, 2009, 30(5):24-28.
Zhang J Q, Wu J Q, Zhu X F, et al. Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and mutation analysis of its Nsp2 and ORF5 gene [J]. Acta Ecologiae Animalis Domastici, 2009, 30(5):24-28. (in Chinese)
- [17] 朱紫祥, 吴发兴, 王晶钰, 等. 我国华东某省 HP-PRRSV 的分离鉴定及全基因组序列分析 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2010, 38(8):25-32.
Zhu Z X, Wu F X, Wang J Y, et al. Isolation, identification and genomic analysis of HP-PRRSV obtained from one province in east China [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2010, 38(8):25-32. (in Chinese)
- [18] 段博芳, 沈艳萍, 杨贵树, 等. PRRSV 云南株的分离与鉴定 [J]. 动物医学进展, 2010, 31(4):11-15.
Duan B F, Shen Y P, Yang G S, et al. Isolation and identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from Yunnan province [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2010, 31(4):11-15. (in Chinese)
- [19] 冷 雪, 温永俊, 齐巧玲, 等. 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒 TJ 株的分离与鉴定 [J]. 吉林农业大学学报, 2008, 30(6):862-865.
Leng X, Wen Y J, Qi Q L, et al. Isolation and identification of the highly virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) TJ strain [J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2008, 30(6):862-865. (in Chinese)
- [20] Fang Y, Kim D Y, Ropp S, et al. Heterogeneity in Nsp2 of European-like porcine reproductive and respiratory syndrome viruses isolated in the United States [J]. Virus Res, 2004, 100(2):229-235.
- [21] Yoshii M, Okinaga T, Miyazaki A, et al. Genetic polymorphism of the Nsp2 gene in North American type-porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. Arch Virol, 2008, 153(7):1323-1334.
- [22] Kedkovid R, Nuntawan Na Ayudhya S, Amonsin A, et al. NSP2 gene variation of the North American genotype of the Thai PRRSV in central Thailand [J]. Virol J, 2010, 7:340.
- [23] 王凤雪, 冷 雪, 李真光, 等. 高致病性 PRRSV TJ 株 Nsp2 蛋白的缺失及其二级结构预测 [J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2011, 37(4):429-435.
Wang F X, Leng X, Li Z G, et al. Deletion of Nsp2 protein in highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus TJ strain and its secondary structure prediction [J]. Journal of Hunan Agricultural University: Natural Sciences, 2011, 37(4):429-435. (in Chinese)
- [24] Allende R, Lewis T L, Lu Z, et al. North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions [J]. J Gen Virol, 1999, 80(Pt2):307-315.
- [25] Shen S, Kwang J, Liu W, et al. Determination of the complete nucleotide sequence of a vaccine strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and identification of the Nsp2 gene with a unique insertion [J]. Arch Virol, 2000, 145(5):871-883.
- [26] Gao Z Q, Guo X, Yang H C. Genomic characterization of two Chinese isolates of porcine respiratory and reproductive syndrome virus [J]. Arch Virol, 2004, 149(7):1341-1351.
- [27] Han J, Wang Y, Faaberg K S. Complete genome analysis of RFLP 184 isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. Virus Res, 2006, 122(1/2):175-182.

(上接第 36 页)

- [12] 沈 雷, 张博爱, 贾延劫, 等. 盐酸法舒地尔对体外培养大鼠神经干细胞分化的影响 [J]. 山东医药, 2010, 50(9):28-29.
Shen L, Zhang B A, Jia Y J, et al. Effect of fasudil hydrochloride on inducing marrow neuron stem cells *in vitro* [J]. Shandong Medical Journal, 2010, 50(9):28-29. (in Chinese)
- [13] 彭 涛, 滕军放, 关文娟, 等. 盐酸法舒地尔体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞向神经样细胞分化的可行性 [J]. 郑州大学学报: 医学版, 2010, 45(4):559-562.
Peng T, Teng J F, Guan W J, et al. Feasibility of fasudil hydrochloride inducing rat bone marrow mesenchymal stem cells to differentiate into neuron-like cells [J]. Journal of Zhengzhou University: Medical Sciences, 2010, 45(4):559-562. (in Chinese)
- [14] Pacary E, Legros H, Valables, et al. Synergistic effects of coel (2) and Rock inhibition on mesenchymal stem cell differentiation into neuro-like cells [J]. J Cell Sci, 2006, 119(13):2667-2678.
- [15] McBeath R, Pirone D M, Nelson C M. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment [J]. Dev Cell, 2004, 6:483-495.
- [16] Toshio M, Jin W Z, Shunsuke I. The role of ATF-2 family transcription factors in adipocyte differentiation: Antiobesity effects of p38 inhibitors [J]. Mol Cell Biol, 2010, 30(3):613-625.