

猪繁殖与呼吸综合征病毒华东地区分离株 RT-PCR-RFLP 分析*

邓雨修, 姜平**, 李玉峰, 王先炜, 蒋文明, 汤景元

(南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 江苏南京, 210095)

Analysis of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Isolates
from Eastern China with RT-PCR-RFLPDENG Yu-xiu, JIANG Ping, LI Yu-feng, WANG Xian-wei, JIANG Wen-ming, TANG Jing-yuan
(Key Laboratory of Animal Diseases Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agriculture University,
Nanjing 210095, China)**Abstract:** Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates identified in samples from 50 field cases originated from eastern China herds were studied. ORF5 gene of PRRSV isolates was amplified by reverse transcript polymerase chain reaction (RT-PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns for enzymes *Mlu* I, *Hinc* II and *Sac* II were determined on these ORF5 genes. The RFLP pattern obtained from 39 isolates was 2-2-1 (78%), 3 isolates was 1-1-1 (6%) and 8 isolates identified in 2003 was 1-3-1 (16%). The results showed PRRSV strains have variations and existed no less than 3 gene subtypes in the area.**Key word:** PRRSV; RT-PCR; RFLP**关键词:** 猪繁殖与呼吸综合征病毒; RT-PCR; 限制性片段长度多态性

中国分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2004)04-0398-03

猪繁殖与呼吸综合征病毒 (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 是猪的一种重要传染性疾病病原, 已给世界养猪业带来了巨大的经济损失。其主要临床表现为妊娠期母猪的早产、流产、产死胎、弱胎、木乃伊胎, 新生仔猪肺炎、生长迟缓。PRRSV 为动脉炎病毒科动脉炎病毒属成员。病毒有囊膜、呈球形, 基因组为单股正链 RNA, 大小约 15kb, 含有 8 个开放阅读框 (ORF), 其中 ORF1 (包括 ORF1a 和 ORF1b) 编码病毒 RNA 复制酶; ORF2-7 分别编码病毒结构蛋白: GP2、GP3、GP4、GP5、M 和 N 蛋白。目前, 欧美和亚洲许多国家和地区都从爆发 PRRS 的猪场分离到许多 PRRSV 毒株, 根据病毒血清交叉中和试验和病毒基因序列分析, PRRSV 分为欧洲型和美洲型, 而美洲型毒株又可分为多个基因亚型^[1]。我国自 1996

年证实有该病存在以来, 已有不少关于我国 PRRSV 分离株的报道^[1]。探讨 PRRSV 各分离株基因之间的相互关系及变异规律成为研制有效的 PRRS 疫苗的关键。不同的 PRRSV 分离株之间在毒力、基因序列和抗原性等方面都存在较大的差异^[2], 但有关病毒变异或分子流行病学研究尚少有报道。本实验通过对国内 50 株 PRRSV 分离株的 RT-PCR-RFLP 分析, 研究 PRRSV 的基因变异和基因亚型, 为防治我国 PRRS 提供理论依据。同时, 通过确定 PRRSV 的 RFLP 模式, 为 PRRSV 分子流行病学调查提供了有利的工具; 而且, 在多株 PRRSV 混合感染时, 为鉴定该毒株基因类型也起重要作用^[3]。

1 材料与方法

1.1 实验材料

收稿日期: 2004-01-07, 修回日期: 2004-03-03

* 基金项目: 本研究获浙江省攻关项目 (021102529); 国家自然科学基金 (30270990); 江苏省高新技术项目 (BG2002317); 教育部优秀青年教师资助计划及回国人员资助项目 (G200211) 资助

作者简介: 邓雨修 (1978-), 男, 广东省籍, 硕士, 研究方向为动物传染病防治。

** 通讯作者: 姜平 (1964-), 男, 江苏省籍, 教授, 博士生导师, 研究方向为动物分子病毒学与免疫学。
Corresponding author. Tel: 025-84395504, E-mail: pingjiang 2000 @ yahoo.com.

50 株 PRRSV 分离株由本实验室从具有较明显 PRRS 症状患猪的肺脏、脾脏和淋巴结中分离, 都来自华东地区。反转录酶 M-MLV、PCR 试剂均为 Promega 公司产品; *Mlu* I、*Hinc* II 和 *Sac* II 限制性内切酶为 TaKaRa 公司产品; TRIZOL 试剂为 Invitrogen 公司产品; 100 bp DNA Ladder 为华美生物公司产品。其余试剂均为分析纯产品。

1.2 引物设计

根据 PRRSV 美洲标准毒株 ATCC VR-2332 的基因序列设计合成一对针对 ORF5 基因的特异性引物, 两引物间的跨幅为 620bp。(引物由大连 TaKaRa 公司合成)。其序列为:

AdGP5.1 : 5' -GCCGGTACCACCATGTTGGAGA-AATGCTTGAC-3'; AdGP5.2 : 5' -GCACTC-GA GCTAAGGACGACCC- C ATTGTTC-3'。

1.3 RT-PCR

用 TRIZOL 试剂按常规方法提取病毒分离株总 RNA。RT 为 10 μ L 反应体积, 包括 AdGP5.2(50 mmol/L):0.5 μ L、dNTP(10mmol/L): 0.25 μ L、5 \times 反转录 buffer:2 μ L、RNA:7 μ L, 65 $^{\circ}$ C 水浴作用 10min; 然后加入 M-MLV 反转录酶 50U, 37 $^{\circ}$ C 水浴作用 1h。PCR 反应体系如下: AdGP5.1(50 nmol/L): 0.5 μ L、Mg²⁺C25mmol/L):1.5 μ L、10 \times buffer:2.5 μ L、AdGP 5.2 (50nmol/L):0.5 μ L、dNTP(2.5mmol/L):2 μ L、rTaq 酶: 2.5U、cDNA:1 μ L, 用灭菌双蒸水补至总体积

25 μ L。反应循环参数: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3min; 94 $^{\circ}$ C 变性 45s; 59 $^{\circ}$ C 退火 45s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 60s, 共进行 35 循环; 然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。琼脂糖凝胶电泳观察扩增产物。

1.4 限制性片段长度多态性 (RFLP) 分析。

取 RT-PCR 产物 7 μ L, 分别依次加入限制性内切酶 *Mlu* I、*Hinc* II、*Sac* II 各 2.5U 及相对应的 10 \times buffer 各 3 μ L, 然后用灭菌水补加至体积 30 μ L。37 $^{\circ}$ C 水浴作用 3h, 酶切产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分析。RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism) 模式分类参照 Ronald D.Wesley^[4]方法。

2 结果与讨论

以提取的总 RNA 反转录产物作为模板, 用 RT-PCR 方法扩增出大小为 620bp 的基因片段, 其大小与预期的扩增片段大小相符(见图-1)。

RT-PCR 扩增产物依次经 *Mlu* I、*Hinc* II 和 *Sac* II 三种限制内切酶作用后, 得到 3 种不同的 RFLP 模式(见图-1)。50 株 PRRSV 分离株中, 有 39 株的 RFLP 模式为 2-2-1, 占 78%; 有 3 株的 RFLP 模式为 1-1-1, 占 6%; 有 8 株的 RFLP 模式为 1-3-1, 占 16%。以来源地分析, 江苏、山东和上海出现的 PRRSV 均有 3 个基因亚型, 江西和浙江有 2 个基因亚型, 安徽有 1 个基因亚型。以时间分析, 8 个 1-3-1 基因亚型均出现于 2003 年。

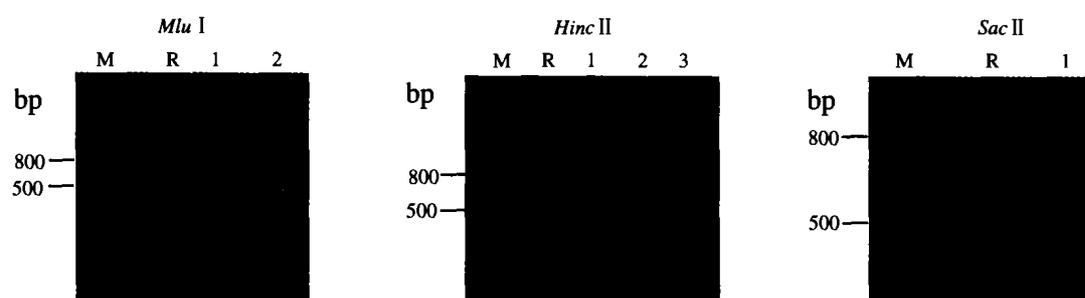


图 1 PRRSV RFLP 模式类型

Fig.1 General types of RFLP patterns for PRRSV isolates

PCR products(620bp) were digested with restriction enzymes *Mlu* I, *Hinc* II and *Sac* II. There are 2 types of RFLP patterns for *Mlu* I; 3 different patterns for *Hinc* II; and 1 pattern for *Sac* II. M, Marker(100bp DNA ladder); R, RT-PCR products; 1/2/ 3, Different types of RFLP patterns.

本研究在通过对 GenBank 数据库中 PRRSV ORF4-6 基因序列分析的基础上, 设计合成了一对 PCR 引物, 建立了 RT-PCR, 对来自国内 50 株 PRRSV 分离株进行了 PCR 扩增, 结果均获得大小约 620bp 的 DNA 片段, 表明该对引物具有很好的通用性, 可用于临床病例的 PRRSV 检测或病毒分离株的鉴定。

限制性片段长度多态性分析 (RFLP) 方法, 具有操作简便, 适合临床调查等优点, 在 PRRSV 流行病学调查中已被普遍采纳, 且该方法常用于 PRRSV 基因分型。通过对 PRRSV ORF5 基因的 PCR 扩增产物进行 RFLP 模式分析, 能区分 RespPRRS 疫苗株和其它疫苗株, 以及不同基因亚型的野毒株^[4]。本研究结果发现, 50 株 PRRSV 分离株中有 3 种不同的

RFLP模式。其中2-2-1模式最为常见,所占比率最大,而1-1-1和1-3-1模式分别只占6%和16%。这表明近几年来国内许多猪场流行的主要是2-2-1模式的PRRSV毒株。该基因亚型的毒株在华东地区各省市存在,尤其上海市、江苏省、浙江省、山东省的诸多猪场已普遍流行。而1-1-1模式的3株PRRSV分别来自江苏省、山东省和上海市3个不同省市的猪场,表明其所波及的猪场也较广。1-3-1模式基因亚型毒株也分布在华东地区的诸多猪场,且都出现于2003年。从研究中我们还发现,上海市的某一猪场在同一年内流行了两种基因亚型的PRRSV。表明该地区PRRSV已出现变异。

当然,RT-PCR-RFLP分析尚不能区分Resp弱毒疫苗株和VR2332野毒株^[4],因为两者都具有相同的2-2-1模式。RFLP模式相同的野毒株,它们之间的碱基序列可能存在较大差异;相反,基因序列同源性很高的毒株其RFLP模式可能不同^[5]。本研究收集的病例尽管多具有母猪繁殖障碍和仔猪呼吸道症状的临床表现,但仍有因使用Resp-PRRSV弱毒疫苗,而可能分离出弱毒疫苗株,因此,2-2-1型模式毒株的毒力及3种不同基因亚型的PRRSV的ORF5基因序列尚待进一步分析。而且,近几年

来国内许多猪场都有爆发PRRS的现象,加强该病毒分子流行病学研究十分必要。

参考文献

- [1] 仇华吉,童光志.猪生殖呼吸道综合征[M].吉林:吉林科技出版社,2000.
- [2] Andreyer V G, Wesley R D, Mengelong W L, *et al.* Genetic variation and phylogenetic relationships of 22 porcine reproductive and respiratory syndrome virus(PRRSV)field strain based on sequence analysis of reading frame 5[J]. Arch Virol, 1997, 142: 993-1001.
- [3] Key F K, Hagshenas G, Guenette D K, *et al.* Genetic variation and phylogenetic analyses of the ORF5 gene of acute porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates[J]. Veterinary Microbiology, 2001, 83:249-263.
- [4] Wesley R D, Mengelong W L, Lager K M, *et al.* Differentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine strain from North America field strains by restriction fragment length polymorphism analysis of ORF5[J]. Vet Diagn Invest, 1998, 10: 140-144.
- [5] Laroche R, D'Allaire S, Magar R. Molecular epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome virus(PRRSV) in Quebec[J]. Virus Research, 2003, 96:3-14.