

覃新云, 刘桂秀, 吕其壮, 等. 2010–2019 年中国猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV) *ORF5* 基因的遗传进化与重组分析[J]. 江苏农业学报, 2022, 38(1): 285-288.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2022.01.034

2010–2019 年中国猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV) *ORF5* 基因的遗传进化与重组分析

覃新云¹, 刘桂秀¹, 吕其壮^{1,2}, 邓家华³, 覃 婷¹, 龙金桃¹, 陈旭健¹

(1. 玉林师范学院生物与制药学院, 广西 玉林 537000; 2. 广西农产资源化学与生物技术重点实验室, 广西 玉林 537000; 3. 河南科技学院动物科技学院, 河南 新乡 453003)

关键词: 猪繁殖与呼吸综合征病毒; *ORF5* 基因; 遗传进化分析; 重组分析

中图分类号: S852.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2022) 01-0285-04

Genetic evolutionary and recombinant analysis of *ORF5* gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in China between 2010 and 2019

QIN Xin-yun¹, LIU Gui-xiu¹, LYU Qi-zhuang^{1,2}, DENG Jia-hua³, QIN Ting¹, LONG Jin-tao¹, CHEN Xu-jian¹

(1. College of Biology & Pharmacy, Yulin Normal University, Yulin 537000, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Agricultural Resources Chemistry and Biotechnology, Yulin 537000, China; 3. College of Animal Science and Technology, Henan Institute of Science and Technology, Xinxing 453003, China)

Key words: porcine reproductive and respiratory syndrome virus; *ORF5* gene; genetic evolutionary analysis; re-combination analysis

猪繁殖与呼吸综合征(PRRS), 俗称“猪蓝耳病”, 是由猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)引起的一种急性、具有高度传染性疾病, 其主要临床症状表现为持续高热、母猪繁殖障碍以及仔猪呼吸困难和高死亡率^[1-2]。PRRS 最早发现于美国的北卡罗来纳州, 随后世界各国陆续报道, 中国于

1996 年首次报道该病。2006 年出现了由高致病性 PRRSV 引起的“猪无名高热症”疫情的大面积暴发和流行, 导致猪群高发病率及高死亡率, 给养猪业造成了巨大的经济损失^[3]。

PRRSV 是一种单股正链 RNA 病毒, 其基因组长度约 14 500 bp, 编码区至少包括 10 个开放阅读框(ORF)^[4]。其中, *ORF5* 基因可以编码病毒的主要结构蛋白 GP5, 该蛋白质是一种糖基化囊膜蛋白质, 也是 PRRSV 诱导机体产生中和抗体的主要抗原^[5]。研究结果证实, GP5 蛋白是 PRRSV 中最容易发生变异的蛋白质之一, 常被用作评价 PRRSV 病毒是否发生变异的主要依据之一, *ORF5* 基因也因此成为序列分析的典型基因, 可作为 PRRSV 基因分型的重要依据, 在 PRRSV 流行性株遗传变异研究中发挥重要作用^[6]。当前在中国境内的 PRRSV 可分为 2 个血清型, 即 PRRSV2 (以 VR-2332 毒株为代表) 和 PRRSV1 (以 Lelystadvirus 毒株为代

收稿日期: 2021-05-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(31860708); 广西自然科学基金项目(2017GXNSFBA198025); 玉林师范学院大学生创新创业训练计划项目(202010606226)

作者简介: 覃新云(2000-), 男, 广西柳江人, 本科, 主要从事动物传染病病原学与流行病学研究。(E-mail) 18867024673@163.com。刘桂秀为共同第一作者。

通讯作者: 吕其壮, (E-mail) lvqizhuang062@163.com; 陈旭健, (E-mail) juanliu012@163.com

表),其中 PRRSV2 又可分为 5 个基因亚型(lineage 1、lineage 3、lineage 5、lineage 8、lineage 9), lineage 1 包含 NADC30、JL580 等毒株;lineage 3 包含 QYYZ、GM2 等近年来在华南地区流行的低致病毒株;lineage 5 包含 PRRSV2 代表毒株 VR-2332;lineage 8 包含以 TJ、JXA1、TA-12 等高致病毒株和以 CH-1a 等为代表的经典毒株及 2011 年于新疆地区发现的 lineage 9^[7-11]。

为研究中国近年来 PRRSV 流行毒株和变异特征,本研究从 GenBank 中随机取回分离于中国 2010–2019 年的 877 株 PRRSV 的 *ORF5* 基因序列,并对其进行遗传进化和重组分析,以期监测中国猪群中 PRRSV 的变异情况和防控 PRRS 提供参考。

1 材料与方法

1.1 PRRSV *ORF5* 基因序列的收集

从 GenBank 数据库中随机取回 877 株 2010–2019 年分离于中国 29 个省、市和自治区的 PRRSV 的 *ORF5* 全基因序列作为分析样本,同时,收集 24 株各 PRRSV 基因亚型的代表毒株和 22 株邻国毒株作为参考毒株。为了更好地呈现分析结果,在 877 株毒株中随机选取 98 株代表毒株用于后续分析。

1.2 PRRSV *ORF5* 基因的系统发育分析

采用 Neighbour-joining (NJ) 方法,参照文献[12]进行参数设置,利用软件 MEGA v.10.0.5 绘制本研究获得的 877 株 PRRSV 的 *ORF5* 基因序列与参考毒株 *ORF5* 基因序列的分子进化树,应用徐铮等^[13]提出的基因分型方法对毒株进行分类群划分并分析其进化关系及各基因亚型在中国的流行情况。

1.3 PRRSV *ORF5* 基因序列分析

利用 DNASTar 中的 MegAlign 程序将收集的 *ORF5* 基因序列与参考毒株的 *ORF5* 基因序列进行核苷酸同源性分析,并对 *ORF5* 基因推导的氨基酸序列进行对比分析,其中以 PRRSV2 代表毒株 VR-2332 为氨基酸序列比对时的标准毒株^[6,8]。

1.4 PRRSV *ORF5* 基因的重组分析

为研究所收集毒株之间的基因重组情况,利用软件 RDP4.0 中的 7 种检测算法[RDP (R)、MaxChi (M)、BootScan (B)、GeneConv (G)、3seq (T)、SiScan (S)和 Chimaera (C)]对获得的 *ORF5* 基因进行重组分析,并参照文献[14–15]中的判定依据对检测出的重组事件进行界定。

2 结果与分析

2.1 PRRSV *ORF5* 基因的核苷酸同源性比对及遗传演化分析

分析结果显示,PRRSV *ORF5* 基因序列的长度为 600 bp、603 bp 和 606 bp,核苷酸同源性为 59.6%~100.0%,与国

内外 46 株参考毒株的 *ORF5* 基因同源性为 59.4%~100.0%。*ORF5* 基因进化树分析结果表明,877 株 PRRSV 毒株中有 15 株为 PRRSV1,862 株为 PRRSV2 毒株。PRRSV2 又可进一步划分为多个不同基因亚型,其中高致病性毒株(亚型 1)有 517 株、经典毒株(亚型 2)有 74 株、广东新变异毒株(亚型 3)有 62 株、JXA-R 疫苗样毒株(亚型 4)有 29 株、NADC30/NADC34 样毒株(亚型 5)有 115 株以及分离于新疆地区的毒株(亚型 9)有 6 株。进一步分析发现,除上述 6 种已发表的基因亚型外,又出现几个与之明显不同的分支,将其分别命名为亚型 6(32 株)、亚型 7(4 株)、亚型 8(23 株)。

2.2 不同基因亚型 PRRSV GP5 蛋白的氨基酸序列对比

根据文献报道,当前 PRRSV2 GP5 蛋白中存在 1 个信号肽、2 个高变区(HVR1 和 HVR2)、3 个跨膜区(TM1、TM2 和 TM3)以及 5 个表位结构(DE、NE、T1、T2、TM3),另有位于第 13 位和 151 位氨基酸位点的 2 个毒力相关位点^[6,14-15]。本试验从 PRRSV1 和 PRRSV2 毒株 1~5 基因亚型中随机选取代表毒株与本试验获得的 98 株代表性分析毒株的 GP5 蛋白氨基酸序列进行对比分析。结果表明,中国 PRRSV GP5 蛋白的氨基酸序列中普遍存在变异。相比于 PRRSV2 的代表毒株 VR-2332、PRRSV1 毒株和亚型 7 均在第 33~34 位氨基酸位点处插入 2 个氨基酸;相比于 PRRSV1 的代表毒株,亚型 6 和亚型 7 分别在第 34 位氨基酸位点、58 位氨基酸位点处出现 1 个氨基酸缺失。而 Genotype 1 和 Subgenotype 7 毒株均在 33~34 位氨基酸位点处插入 2 个氨基酸,其余的突变主要表现为各氨基酸位点的点突变。

2.3 PRRSV *ORF5* 基因的重组分析

重组分析共检测到 11 个重组事件,其中,2 个是明确的重组事件,9 个是潜在的重组事件^[16-18]。在明确的重组事件中,重组事件 2 的重组体是毒株 MH422060 (NCBI 登录号:HLJ/HEB/2016/1031b),其主要亲本是毒株 KX815428 (NCBI 登录号:15SC3),次要亲本是毒株 MK450614 (NCBI 登录号:2018113Zhangshu6),重组区域大约发生在 *ORF5* 基因序列的 270~570 bp。

3 讨论

近年来,中国陆续报道新的突变毒株,使得中国的 PRRSV 流行毒株更加多样化,变异进程加快,防控更加复杂化^[16,19-21]。虽然中国已采取疫苗免疫的方法进行防控,但高致病性毒株减毒活疫苗的无序使用造成减毒活疫苗病毒的大量传播,使得 PRRS 仍然是严重危害中国养猪业的重要疫病之一^[22]。通过对 PRRSV 基因组特征和遗传进化分析发现,基于选择压力的变化和病毒自身进化的需要,PRRSV 不断发生变异和重组,尤其是在 NSP2 和 GP5 2 个最易变异的蛋白质上面,这给 PRRS 的防治带来了更大困难,因此 PRRSV NSP2 和 *ORF5* 基因也常被用作 PRRSV 各流行毒株间遗传进化分析的靶基因。

通过对新鉴定亚型进行地理区分分析,我们发现以 KY373214、MF133296 等为代表的新亚型 6 主要在广西、河南、四川、山东等地被检出;以 KC527830、KX815419 为代表的新亚型 7 主要在广东、浙江等地被检出;以 MK291407、KP998415 为代表的新亚型 8 主要在中国台湾地区被检出,且新亚型 6 与 PRRSV1,新亚型 7 与 lineage 3,新亚型 8 与 lineage 1 亲缘关系较近,表明目前中国的 PRRSV 呈现多基因亚型并存的局面,且基因亚型的种类有进一步增多的趋势。

通过对 PRRSV ORF5 基因编码蛋白质的变异分析发现,其存在多处点突变,个别基因型或基因亚型还存在碱基插入和缺失的情况,该情况可能导致已有的 PRRSV 疫苗免疫效果不佳或失败,更可能导致新型变异毒株的出现。此外,与毒力有关的第 13 位和第 151 位氨基酸位点的比对结果显示,这些毒力位点的突变有可能会引起 PRRSV 流行毒株毒力的改变,甚至会出现新的高致病性毒株。

对 PRRSV ORF5 基因的重组分析结果表明,基于中国不同地区的 877 株 PRRSV ORF5 基因共检测到 11 个可能的重组事件,但是根据 Tomitaka 等^[18]和 Li 等^[16]的结果判断原则,其中只有 2 个是明确的重组事件,虽然重组事件 1 中重组体 MK689083(新亚型 6)的主要亲本尚不明确,但其次要亲本 MT036931 却是亚型 4,即高致病性 PRRSV 减毒疫苗毒株或演化毒株。重组事件 2 中的重组毒株 MH422060(亚型 2,即经典毒株)来源于 KX815428(亚型 5,即 NADC30-like 毒株)和 MK450614(亚型 1,即高致病性毒株)的重组,这与陈盛楠等^[14]和 Xie 等^[19]对中国部分地区 PRRSV 变异分析的结果一致,说明中国 PRRSV 毒株间的重组频频发生是导致新的突变毒株出现的主要原因之一。特别值得注意的是,虽然利用 RDP4 软件并未检测到 PRRSV1 与 PRRSV2 毒株之间存在基因重组的情况,但通过氨基酸序列比对发现,亚型 7 的第 1~56 个氨基酸与 PRRSV2 代表株高度同源,其第 62~201 个氨基酸却又与 PRRSV1 代表株高度同源,提示亚型 7 可能来源于 PRRSV1 与 PRRSV2 毒株间的基因重组。众所周知,基因重组可能会导致病毒的抗原表位发生变化,从而导致病毒发生变异,这既是病毒发生变异产生新的亚群的一种方式,也是疫苗特异性免疫失败的一个重要原因^[23]。对重组事件进一步分析发现,所收集 877 株 PRRSV ORF5 基因的重组情况主要分布在广东、吉林、河南、浙江、江西、黑龙江、安徽等地,其中在河南检出最多,其次是山东,提示将来这些地方的 PRRSV 防控应以重组毒株为主。

本研究基于 877 株中国 2010-2019 年 PRRSV ORF5 基因序列对中国近年来 PRRSV 流行毒株的变异情况进行了分析,本研究结果为进一步研究中国 PRRSV 的遗传演化,筛选新的疫苗候选株和开发新型疫苗防控 PRRS 具有重要意义。

参考文献:

[1] HAN J,ZHOU L,GE X N, et al. Pathogenesis and control of the

Chinese highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 209:30-47.

[2] 邹伟斌,林梓栋,齐冬梅. 猪繁殖与呼吸综合征病毒的控制策略研究进展[J]. *中国兽医杂志*, 2018, 54(11):66-69.

[3] 杨宗照,方维焕. 猪瘟合并猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 和猪圆环病毒 2 型 (PCV2) 感染[J]. *中国兽医学报*, 2006, 26(3):240-242.

[4] LUNNEY J K, FANG Y, LADINIG A, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): pathogenesis and interaction with the immune system[J]. *Annual Review of Animal Biosciences*, 2016, 4(1):129-154.

[5] OSTROWSKI M, GALEOTA J A, JAR A M, et al. Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain[J]. *J Virol*, 2002, 76(13):4241-4250.

[6] 袁为锋,张帆帆,李龙显,等. 2016-2017 年江西地区猪繁殖与呼吸综合征病毒分子流行病学调查及 ORF5 基因变异分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2018, 45(10):2831-2839.

[7] WU Q W, LI Z L, ZHANG G Q, et al. Genetic diversity and phylogenetic analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in southern China from 2007 to 2014 [J]. *Journal of Veterinary Science*, 2017, 18(3):317-326.

[8] YU L Y, ZHAO P D, DONG J G, et al. Genetic characterization of 11 porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in south China from 2014 to 2015 [J]. *Virology Journal*, 2017, 14(1):139.

[9] GAO J C, XIONG J Y, YE C, et al. Genotypic and geographical distribution of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses in mainland China in 1996-2016[J]. *Veterinary microbiology*, 2017, 208(1):164-172.

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

[11] SHI M, LAM T, HON C, et al. Phylogeny-based evolutionary, demographical, and geographical dissection of north American Type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome viruses[J]. *Journal of Virology*, 2010, 84(17):8700-8711.

[12] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7):1870-1874.

[13] 徐 铮,周吉培,申翰钦,等. 2016-2017 年广东地区猪繁殖与呼吸综合征病毒的分子检测及 NSP2、ORF5 基因变异分析[J]. *中国兽医杂志*, 2019, 55(4):25-30, 34.

[14] 陈盛楠,张海龙,谢 博,等. 2018 年广东部分地区猪繁殖与呼吸综合征病毒流行毒株 ORF5 基因变异分析[J]. *动物医学进展*, 2020, 41(1):50-56.

[15] 许秀琼,查云峰,王福广,等. 广东省屠宰场猪群 PRRSV 感染状况调查及基因测序分析[J]. *中国动物检疫*, 2020, 37(9):40-45.

[16] LI G R, HE W T, ZHU H N, et al. Origin, genetic diversity, and

- evolutionary dynamics of novel porcine circovirus 3[J]. *Advanced Science*, 2018, 5(9): 1800275.
- [17] OHSHIMA K, TOMITAKA Y, WOOD J T, et al. Patterns of recombination in turnip mosaic virus genomic sequences indicate hotspots of recombination[J]. *Journal of General Virology*, 2007, 88(1): 298-315.
- [18] TOMITAKA Y, OHSHIMA K. A phylogeographical study of the turnip mosaic virus population in east Asia reveals an 'emergent' lineage in Japan[J]. *Molecular Ecology*, 2006, 15(14): 4437-4457.
- [19] XIE C Z, HA Z, NAN F L, et al. Characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (ORF5 RFLP 1-7-4 viruses) in northern China[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 140: 103941.
- [20] 孔 军, 朱国坡, 康 斌, 等. 2019 年四川省部分地区猪繁殖与呼吸综合征病毒 ORF5 基因的遗传变异分析[J]. *江苏农业科学*, 2021, 49(7): 68-73.
- [21] 江地科, 尹清清, 项明源, 等. 检测猪瘟病毒胶体金和量子点试纸条的初步研制[J]. *江苏农业学报*, 2020, 36(1): 116-121.
- [22] 杨汉春, 黄芳芳, 郭 鑫, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) BJ-4 株全基因组序列测定与分析[J]. *农业生物技术学报*, 2001, 9(3): 212-218.
- [23] VLASOVA A N, MARTHALER D, WANG Q H, et al. Distinct characteristics and complex evolution of PEDV strains, north America, May 2013-February 2014[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2014, 20(10): 1620-1628.

(责任编辑:陈海霞)