

## 猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒河南 09 分离株 *ORF5* 基因的克隆及结构分析

杨春华<sup>1,2</sup>, 韩志涛<sup>2</sup>, 胡慧<sup>2</sup>, 钟毅<sup>1</sup>, 王冬<sup>2</sup>, 祝建新<sup>1\*</sup>

(1.江西出入境检验检疫局 检验检疫综合技术中心, 江西 南昌 330002; 2.河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002)

**摘 要:** 参照 GenBank 上登录的猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒(PRRSV)美洲型 AF494042 株 *ORF5* 基因序列, 设计 1 对特异性引物, 应用 RT-PCR 扩增出 PRRSV 河南 09 分离株(HN-09)的 *ORF5* 基因, 经与 pGEM-T Easy 载体连接后, 筛选出阳性重组质粒进行序列测定, 并利用 DNASTAR 软件对序列进行分析。结果表明, 扩增片段长度为 721 bp, 与预期目的片段大小一致, 测序验证其为 PRRSV 的 *ORF5* 基因。序列分析表明, HN-09 株与 AF494042 的同源性为 93.5%, 与山西、山东近年分离株的同源性为 97.8%~99.2%, 与河北、安徽、黑龙江等省分离株的同源性为 93.4%~98.7%, 但与 2004 年河南分离株的亲缘关系较远, 其同源性为 88.7%。用 ANTHEPROT 软件分析 HN-09 株和 AF494042 株编码蛋白质氨基酸的组成和二级结构的含量及分布, 结果表明, HN-09 株中碱基的突变, 导致其氨基酸序列与美洲型有所不同, 形成的二级结构略有差异, 但二级结构元件的大致分布与美洲型相同。

**关 键 词:** 猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒; *ORF5* 基因; 克隆; 序列分析; 结构分析

中图分类号: S828 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)01-0073-05

## Cloning and structure analysis of *ORF5* gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus of HN-09 strain

YANG Chun-hua<sup>1,2</sup>, HAN Zhi-tao<sup>2</sup>, HU Hui<sup>2</sup>, ZHONG Yi<sup>1</sup>, WANG Dong<sup>2</sup>, ZHU Jian-xin<sup>1\*</sup>

(1.Jiangxi Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau of China, Nanchang 330002, China; 2.College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** A pair of the special primers were designed and synthesized according to the *ORF5* sequence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) AF494042 strain published in GenBank. The *ORF5* gene of field virulent strain that was collected from Henan province was amplified by RT-PCR and cloned into pGEM-T Easy vector. The nucleotide sequence was determined by sequencing and compared with other *ORF5* genes in GenBank, and the structure of *ORF5* gene was analyzed too. The results showed that the amplified fragment length was 721 bp. Compared with the corresponding region with other PRRSV strains, the results showed that the nucleotide sequence homology was 93.5% with AF494042 strain. There have high homologies when compared with Shanxi and Shandong isolates, from 97.8% to 99.2%; and the nucleotide sequence homologies were from 93.4% to 98.7% when compared with Hebei, Anhui and Heilongjiang isolates; while there has the lowest homology when compared with the Henan 2004 isolates, just 88.7%. The further analysis of the field strain was done by the phylogenetic tree. In all of the PRRSV isolates, the HN-09 sequenced strain has closer relation with Shanxi and Shandong isolates, but it showed distant relationship with the Henan isolates in 2004. The composition of amino acid and percentage of secondary structure of GP5 protein were

收稿日期: 2010-07-05

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局项目(2009IK029)

作者简介: 杨春华(1980—), 女, 内蒙古赤峰人, 博士研究生, 助理研究员, 主要从事动物分子病原学与免疫学研究; \*通信作者, zhuxinjian@163.com

compared analyse between HN-09 and AF494042 isolate using the ANTHEPROT software. The results showed that the composition of amino acid and secondary structure of HN-09 isolate have some difference when compared with AF494042 isolate, but the distribution of secondary structure unit did not change too much.

**Key words:** porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV); *ORF5* gene; cloning; sequence analysis; structure analysis

猪繁殖与呼吸障碍综合征(porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)是由猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)引起的一种高度接触性传染病<sup>[1]</sup>。PRRSV 包括2个基因亚型,分别为以 ATCC VR-2332 株为代表的美洲型和以 LV 株为代表的欧洲型。中国的多是美洲型,且存在变异株<sup>[2-3]</sup>。该病 1987 年在美国首次报道,现已遍及世界各地,严重危害世界养猪业。目前该病毒已成为中国猪病的主要病原之一<sup>[4-6]</sup>。2006 年以来由 PRRSV 变异株引起的“高热病”给中国养猪业造成了巨大的经济损失<sup>[7-8]</sup>。PRRS 与 PCV-2、CSFV、PRV 等病毒的混合感染也时有发生,使该病变得更为复杂<sup>[2]</sup>。PRRSV 基因组大小约为 15 kb,包括 9 个开放阅读框架,可编码 6 种结构蛋白和 2 种非结构蛋白,其中 ORF5 编码的糖基化囊膜蛋白(又称 gp5 或 E 蛋白)是该病毒主要的结构蛋白,也是一种多功能性蛋白<sup>[9]</sup>。不同国家和地区分离株的 *ORF5* 基因差异较大,已有利用其序列差异性来研究 PRRSV 遗传进化的报道<sup>[10-13]</sup>。不同 PRRSV 分离株在毒力、基因序列和抗原性等方面都存在较大差异,找出各株之间的关系和变异规律,已成为当前研制 PRRSV 疫苗和了解 PRRSV 致病机理及流行趋势的关键。2009 年,河南省北部暴发了以“蓝耳病”症状为特征的疫情。为探寻引起该病的病原,从河南省漯河市某猪场采集了临床诊断为感染 PRRSV 的病料,对 PRRSV 的 *ORF5* 基因进行克隆、序列和结构分析,并与往年分离提取的几种分离株的核苷酸序列进行比对,在 GeneBank 查询并下载了河北、山东、山西、安徽、黑龙江等省和典型美洲型的 19 个 *ORF5* 序列,利用 DNASTAR 软件对以上序列进行了比较分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 病料采集及预处理

病料采自河南省漯河市某猪场,临床检测初步

诊断为 PRRSV 感染。无菌条件下取病死仔猪的淋巴结、肺脏、脾脏等,剪碎,加入适量的 PBS 液研磨,将研磨后的样品移入 1.5 mL 的离心管中, - 20 °C 保存,备用。

### 1.2 主要试剂及仪器

pGEM-T Easy 载体、反转录试剂盒和 *T*<sub>4</sub> DNA 连接酶均购自 Promega 公司;限制性内切酶、PCR 相关试剂、DNA Marker、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)、5-溴-4-氯-3-甲氧基半乳糖苷(X-gal)购自大连宝生物公司,DNA 凝胶回收试剂盒购自杭州维特洁生物技术有限公司,质粒提取试剂盒购自北京博大泰克生物公司。PCR 仪(PTC 200)为美国 MJ 公司产品。其他常规试剂及仪器均由河南省动物性食品安全实验室提供。

### 1.3 引物的设计与合成

根据 GenBank 发表的 PRRSV 的 *ORF5* 基因序列,应用 Primer 5.0 软件设计 1 对引物。上游引物 P<sub>1</sub>: 5'-CCGTTGTAGCTTGTCTTT-3';下游引物 P<sub>2</sub>: 5'-GGCGTGTAGATACTGGAA-3'。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

### 1.4 疑似 PRRS 病料 RNA 的提取

用 Invitrogen 公司的 TRIzol 试剂,按其说明书和文献[14]的方法提取病毒总 RNA。提取的 RNA 用 20 μL 无 RNase 水溶解沉淀, - 20 °C 保存,备用。

### 1.5 模板 cDNA 的制备和 PCR

以提取的 RNA 为模板,按照反转录说明书进行反转录。将反转录后的 cDNA 置于 - 20 °C 保存。PCR 反应体系(50 μL): 10×PCR 缓冲液 5 μL, MgCl<sub>2</sub>(25 mmol/μL)4 μL, dNTPs 3 μL (25 mmol/μL), *Taq* 酶 1 U,引物为 1 μL(50 pmol/μL),反转录 cDNA 液 5 μL。最后用双蒸水补至 50 μL,将 EP 管置 PCR 仪,按如下程序进行扩增 94 °C 预变性 5 min, 98 °C 变性 50 s, 55 °C 退火 50 s, 72 °C 延伸 100 s, 35 个循环, 72 °C

延伸 10 min。反应结束后,取 5  $\mu$ L 扩增产物琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.6 目的基因的克隆

以合成的 cDNA 为模板,用合成的上、下游引物扩增目的片段,扩增产物经电泳鉴定后,用胶回收试剂盒回收目的片段,然后将目的片段与 pGEM-T Easy 载体连接,将其转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞<sup>[12]</sup>,挑取疑似阳性菌落进行培养,提取重组质粒,对重组质粒进行 PCR 和酶切鉴定。

### 1.7 核酸序列测定及分析

将鉴定正确的重组菌液送大连宝生物公司测序,并利用 DNASTAR 软件,将所测核酸序列与 GenBank 上登录的相应序列进行比较分析。

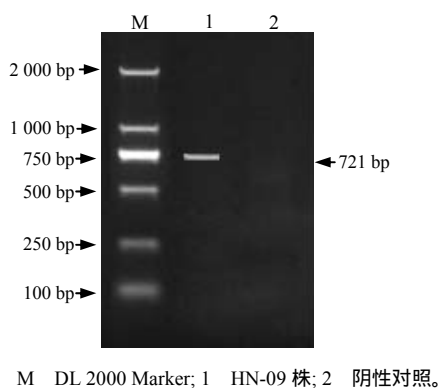
### 1.8 GP5 蛋白结构分析

用 ANTHEPROT 对河南 09 分离株 HN-09 株和美洲型 AF494042 株编码的 GP5 蛋白质进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 PRRSV 的 *ORF5* 全基因 RT-PCR 扩增结果

将提取的总 RNA 作为模板,用设计合成的引物进行 RT-PCR 扩增。经 1%琼脂糖凝胶电泳检测,均获得了约 721 bp 的扩增产物(图 1),与预期扩增的 DNA 片段大小相符。



M DL 2000 Marker; 1 HN-09 株; 2 阴性对照。

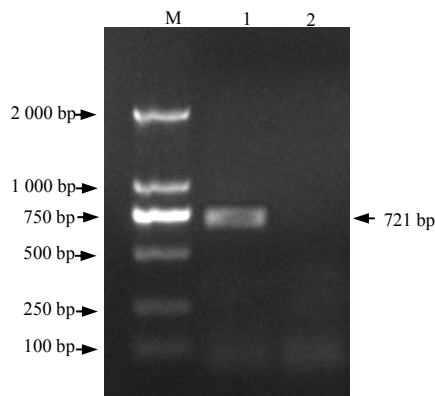
图 1 PRRSV 的 *ORF5* 基因扩增结果

Fig.1 PCR result of *ORF5* gene of PRRSV

### 2.2 *ORF5* 基因的克隆与酶切鉴定

将纯化的 PCR 产物与 pGEM-T Easy 载体连接、转化后,筛选阳性重组菌,提取质粒<sup>[13]</sup>。以该质粒为模板,以 P1、P2 为引物进行 PCR 扩增,得到约

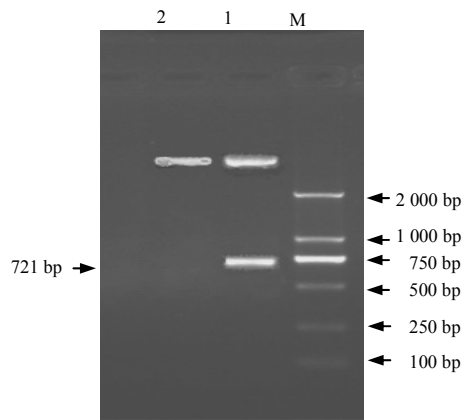
721 bp 的目的片段(图 2);对重组质粒进行酶切鉴定,所得片段与预期片段的大小相符(图 3),表明目的基因已插入到载体中。



M DL 2000 Marker; 1 重组质粒; 2 阴性对照。

图 2 重组质粒的 PCR 扩增结果

Fig.2 PCR result of recombinant plasmid



M DL 2000 Marker; 1 重组质粒; 2 pGEM-T Easy 载体。

图 3 重组质粒的酶切鉴定结果

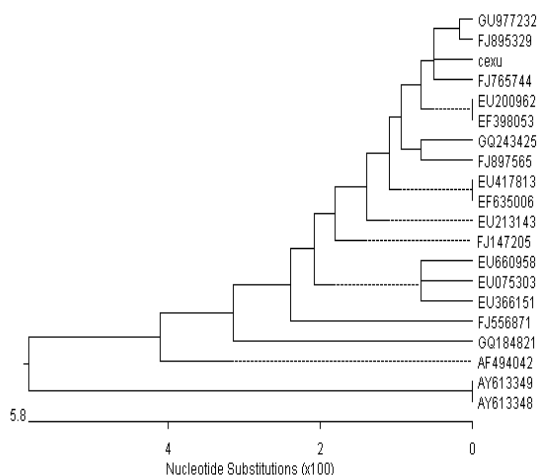
Fig.3 Result of recombinant plasmid by restriction endonuclease

### 2.3 PRRSV 的 *ORF5* 基因同源性分析

本试验扩增出了 PRRSV 的 *ORF5* 基因,片段长度为 721 bp,命名为 HN-09,其中,603 bp 的碱基编码 GP5 蛋白序列。由表 1 可见,该分离株与山西分离株的同源性最高,为 99.2%,它们之间的亲缘关系较近。与典型美洲型 AF494042 株核苷酸的同源性为 93.5%;与山东分离株 GU977232 和 FJ765744 的同源性分别为 98.8%和 98.7%,遗传关系也较近;与河南 2004 年 2 个分离株的同源性较低,均为 88.7%,遗传关系较远。核苷酸进化树(图 4)也反映出了与此相同的结果。

**Table 1 Homology analysis of *ORF5* nucleotide sequence of PRRSV of different strains**

		Percent Identity																					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
Divergence	1	■	93.5	98.7	98.7	97.8	95.7	88.7	88.7	97.7	96.4	97.3	98.8	98.3	99.2	97.5	97.5	93.4	97.7	98.3	1	cevu	
	2	6.9	■	94.4	94.4	94.8	94.5	91.4	94.2	93.5	93.4	93.9	94.0	94.2	94.5	94.4	93.5	93.5	96.7	94.2	94.5	2	AF494042
	3	1.3	5.9	■	100.0	98.8	96.7	89.1	89.1	98.3	97.7	98.7	99.2	99.3	99.7	99.5	98.8	98.8	94.7	99.0	99.7	3	EU200992
	4	1.3	5.9	0.0	■	98.8	96.7	89.1	89.1	98.3	97.7	98.7	99.2	99.3	99.7	99.5	98.8	98.8	94.7	99.0	99.7	4	EF398053
	5	2.2	5.9	1.2	1.2	■	96.5	89.1	89.1	98.0	97.3	98.3	98.0	98.2	99.2	98.3	97.7	97.7	94.9	98.5	99.2	5	FJ147205
	6	4.5	5.7	3.4	3.4	3.6	■	89.2	89.2	96.4	96.0	96.7	96.2	96.4	97.6	96.5	95.9	95.9	94.7	96.7	97.0	6	FJ556871
	7	12.5	9.3	12.0	12.0	12.0	11.8	■	100.0	89.7	88.9	89.4	88.7	89.2	89.1	89.1	88.2	88.2	91.2	89.2	89.1	7	AY613349
	8	12.5	9.3	12.0	12.0	12.0	11.8	0.0	■	89.7	88.9	89.4	88.7	89.2	89.1	89.1	88.2	88.2	91.2	89.2	89.1	8	AY613348
	9	2.4	6.9	1.7	1.7	2.0	3.8	11.2	11.2	■	98.3	99.0	97.8	98.0	98.7	98.2	97.5	97.5	94.0	98.3	98.7	9	EU366151
	10	3.8	7.0	2.4	2.4	2.7	4.1	12.2	12.2	1.7	■	98.7	96.8	97.0	98.0	97.2	96.8	96.8	93.9	97.7	98.0	10	EU609598
	11	2.7	6.5	1.3	1.3	1.7	3.4	11.6	11.6	1.0	1.3	■	97.8	98.0	99.0	98.2	97.8	97.8	94.4	98.7	99.0	11	EU075303
	12	1.2	6.3	0.8	0.8	2.0	3.9	12.4	12.4	2.2	3.2	2.2	■	99.2	98.8	99.7	98.0	98.0	93.9	98.2	98.8	12	GU977232
	13	1.3	6.1	0.7	0.7	1.9	3.8	11.8	11.8	2.0	3.1	2.0	0.8	■	99.0	99.5	98.2	98.2	94.4	98.3	99.0	13	FJ765744
	14	1.7	5.7	0.3	0.3	0.8	3.1	12.0	12.0	1.3	2.0	1.0	1.2	1.0	■	99.2	98.5	98.5	95.0	99.3	100.0	14	EU417813
	15	0.8	5.9	0.5	0.5	1.7	3.6	12.0	12.0	1.9	2.9	1.9	0.3	0.5	0.8	■	98.3	98.3	94.2	98.5	99.2	15	FJ895329
	16	2.5	6.8	1.2	1.2	2.4	4.3	13.0	13.0	2.5	3.2	2.2	2.0	1.8	1.5	1.7	■	98.7	93.9	98.2	98.5	16	GQ243425
	17	2.5	6.9	1.2	1.2	2.4	4.3	13.1	13.1	2.5	3.2	2.2	2.0	1.9	1.5	1.7	1.3	■	93.9	98.2	98.5	17	FJ897565
	18	7.0	3.4	5.6	5.6	5.4	5.6	9.5	9.5	6.3	6.5	5.9	6.5	5.9	5.2	6.1	6.4	6.5	■	94.9	95.0	18	GQ184821
	19	2.4	6.1	1.0	1.0	1.5	3.4	11.8	11.8	1.7	2.4	1.3	1.9	1.7	0.7	1.5	1.8	1.9	5.4	■	99.3	19	EU213143
	20	1.7	5.7	0.3	0.3	0.8	3.1	12.0	12.0	1.3	2.0	1.0	1.2	1.0	0.0	0.8	1.5	1.5	0.2	0.7	■	20	EF635006
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		



1 HN-09 株(cexu), 河南, 2009; 2 AF494042, 美洲型;  
3 EU200962, 河南, 2007-11-11; 4 EF398053, 河南, 2007-02-28;  
5 FJ147205, 河南, 2008-09-24; 6 FJ556871, 河南, 2009-01-21;  
7 AY613349, 河南, 2004-07-06; 8 AY613348, 河南, 2004-07-06;  
9 EU366151, 河北, 2008-01-21; 10 EU660958, 河北, 2008-05-19  
11 EU075303, 河北, 2007-08-28; 12 GU977232, 山东, 2010-04-20;  
13 FJ765744, 山东, 2009-05-17; 14 EU417813, 山东, 2008-02-06;  
15 FJ895329, 山西, 2009-05-03; 16 GQ243425, 安徽, 2009-07-13;  
17 FJ897565, 安徽, 2009-05-12; 18 GQ184821, 黑龙江, 2010-01-07;  
19 EU213143, 黑龙江, 2009-09-10; 20 EF635006, 黑龙江, 2007-06-27.

蛋白质的二级结构包括  $\alpha$  螺旋、 $\beta$  折叠、 $\beta$  转角和无规则卷曲。由于 HN-09 株中碱基的突变, 造成其氨基酸序列与美洲型有所不同, 形成的二级结构有一定的差异, 但二级结构元件大致分布与美洲型相同,  $\beta$  折叠和  $\beta$  转角主要分布在 N 端和中间部分,  $\alpha$  螺旋主要分布在中间及 C 端。该蛋白在 N 端存在 3 个潜在的信号肽切割位点, 分别在第 25 ~ 27 位、第 28 ~ 30 位和第 33 ~ 35 位。

### 3 结论与讨论

河南 PRRSV HN-09 株 *ORF5* 基因全长为 721 bp, 其中编码 GP5 蛋白的 *ORF* 为 603 bp, 共编码 200 个氨基酸残基。该毒株的 *ORF5* 序列与山东、山西的同源性较高, 为 99.2%~99.8%。与其他不同地方近几年的分离株同源性也较高, 为 93.4%~98.7%; 与美洲型 AF494042 的同源性为 93.5%, 各地分离株与美洲型的同源性为 93.4%~96.7%; 与河南 2004 年分离株的同源性较低, 为 88.7%。近几年河南省流行的 PRRSV 毒株与周边省份分离的毒株均为美洲型变异株, 具有高致病性的生物学特征。虽然与各地分离株的 *ORF5* 都有一定的差异, 但总体变异不大, 引起 2009 年河南漯河该猪场 PRRS 疫情的原因可能来自疫苗株变异或在猪体内毒力返强。

本试验中分离的 HN-09 株序列编码 200 个氨基酸残基, 其编码的 GP5 蛋白的相对分子质量大约为  $2.2 \times 10^4$ 。信号肽序列位于 N 端变异区内, 其切割位点可能在第 33~35 位(N)。二级结构中  $\beta$  折叠含量最高达 41%, 无规则卷曲含量较少, 为 14%, 与美洲型 AF494042 相比,  $\beta$  转角数量有所减少,  $\beta$  折叠和无规则卷曲含量增加。变化主要分布在 N 端(前 74 个氨基酸), 而在第 74 位氨基酸以后, HN-09 株和美洲型的氨基酸序列基本一致, 形成的二级结构的数量和分布大致相同, 说明该分离株所编码的 GP5 的主要功能区域氨基酸残基没有发生较大的变异, 不影响该蛋白在病毒粒子中的功能。由于氨基酸中 Ala、Asn、Pro 等的含量增加, Gly、Ser、Thr 等的含量减少, 导致  $\beta$  转角的数量减少,  $\beta$  折叠、无规则卷曲数量增加。在第 9 位上氨基酸残基由 Gly 变为 Cys, 导致此部位的  $\beta$  转角变成  $\beta$  折叠; 第 29 位的 Gly 变为 Ala、第 30 位的 Ser 变为 Asn, 在此形成  $\alpha$  螺旋结构; 在第 58 位由 Lys 变成 Gln 后,  $\alpha$  螺旋断裂, 形成无规则卷曲, 并在第 61 位和第 62 位出现一个  $\beta$  转角。由这些变化可推测 HN-09 株的突变主要集中在 N 端。此区域可能包含了一个信号肽序列, 至于信号肽区的改变对该蛋白产生的影响, 还需进一步研究。

### 参考文献:

- [1] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 1998: 1137-1182.
- [2] 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, 29(5): 323-326.
- [3] Snijder E J, Meulenberg J J. The molecular biology of arboviruses[J]. Gen Virol, 1998, 79: 961-979.
- [4] Hall W V. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus a significant disease of pigs[J]. Aust Vet J, 2005, 83 (5): 260-261.
- [5] 李志杰, 丁壮, 孟轲音, 等. PRRSV 缺失变异毒株 JL/07/ SW 株的分离鉴定及序列分析[J]. 中国兽医学报, 2009, 29(7): 830-835.
- [6] An T Q, Zhou Y J, Liu G Q, et al. Genetic diversity and phylogenetic analysis of glycoprotein 5 of PRRSV isolates in mainland China from 1996 to 2006: Coexistence of two NA-subgenotypes with great diversity [J]. Vet Microbiol, 2007, 123: 43-52.
- [7] Chen J, Liu T, Zhu C G, et al. Genetic variation of Chinese PRRSV strains based on *ORF5* sequence[J]. Biochem Genet, 2006, 44: 425-435.
- [8] Hermann J, Hoff S, Muñoz-Zanzi C, et al. Effect of temperature and relative humidity on the stability of infectious porcine reproductive and respiratory syndrome virus in aerosols[J]. Vet Res, 2007, 38: 81-93.
- [9] Lopez O J, Osorio F A. Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2004, 102(3): 155-163.
- [10] Nelsen C J, Murtaugh M P, Faaborg K S. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: Divergent evolution on two continents[J]. J Virol, 1999, 73(1): 270-280.
- [11] 尹彦涛, 夏平安, 崔保安, 等. 猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒河南分离株 *ORF3~7* 基因克隆与序列分析[J]. 中国兽医学报, 2008, 28(5): 496-500.
- [12] 黄泽彬, 李润成, 尹德明, 等. 高致病性 PRRSV 缺失变异株 *Nsp2* 基因的克隆与遗传变异分析[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2008, 34(6): 680-685.
- [13] 李大志, 邓子牛, 熊兴耀, 等. 番茄组织总 RNA 提取方法研究[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2007, 33(5): 572-575.

责任编辑: 王赛群

英文编辑: 罗文翠