第 20 卷第2 期
2005 年4月
中 国 病 毒 学
VIROLOGICA SINICA
20(2):203-205
April 2005

猪繁殖与呼吸综合征病毒 cDNA 文库的构建及基因组序列的测定 *

唐 勇[1,2] , 陈焕春[1**] , 黄勤锋[1] , 姚清侠[1] , 赵 武[1]

(1. 华中农业大学动物医学院动物病毒室, 湖北武汉, 430070; 2. 暨南大学生命科技学院生物工程系, 广东广州, 510632)

The Construction of cDNA Library of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and the Sequence of Its Genome *

TANG Yong[1,2] , CHEN Huan-chun[1**] , HUAN Qin-feng[1] , YAO Qing-xia[1] , ZHAO Wu[1]

(1. *Laboratory of Animal Virology, College of Animal Medicinal Science, Huazhong Agricultural University, Wuhan* 430070, *China;* 2. *Department of biotechnology, Jinan University, Guangzhou* 510632, *China*)

Abstract: In this study, the RNA of PRRSV HN1 strain was isolated and the cDNA fragments were amplified by RT-PCR. These fragments were then inserted to T-vector and constructed the cDNA library. The genome of PRRSV HN1 strain was sequenced and submitted to the GenBank obtained the ID: AY457635. The homology between this HN1 and other strains was analyzed. HN1 strain has the lowest homology with the Netherlands isolate LV which is 56.0 %, and has the highest homology with the USA isolate *MLV* and *VR*2332 which is 99.1 % and 99.0 % respectively. The HN1 strain and MLV and VR2332 are on the same evolution branch, it proved that the HN1 strain is North America strain. In China, the HN1 strain has the highest homology with Beijing isolate BJ-4 (99.0 %) and the lowest homology with another Beijing isolate HB2 (89.0 %).

Key words: The porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV); cDNA library; Genome; Sequence

关键词:猪繁殖与呼吸综合征病毒;cDNA 文库;基因组;测序

中图分类号:S 852.65 **文献标识码**:A **文章编号**:1003-5125(2005)02-0203-03

猪繁殖与呼吸综合征自 1987 年首次在美国发现以来[1],几年之内便席卷了北美洲和欧洲大陆[2],后蔓延至许多亚太国家和地区[3,4]。我国 1995 年首次暴发此病,该病在我国普遍存在,给我国养猪业的健康发展造成巨大障碍[5]。目前国内外尚无理想防疫疫苗。当前用于预防的猪繁殖与呼吸综合征的主要疫苗是弱毒苗和灭活疫苗。灭活疫苗免疫效果差,弱毒苗能提供较好的免疫保护,但毒力返强的几率相当高,这一点已在几年前丹麦等国因广泛使用弱毒苗而导致该病大暴发中得以证实[6]。

猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus,PRRSV)分两种基因型,即美洲型和欧洲型。欧洲型与美洲型差异较大,Bautista EM 等用免疫荧光试验进行血清学实验调查时发现,欧洲株 LV 检测阳性率为 20 %的猪群,美洲株 VR2332 检测全为阴性;用 VR2332 检测阳性率为 44 %的猪群,LV 检测全为阴性[7]。同一基因型中不同的毒株的一些蛋白也具有不同的抗原性[8]。由于不同的 PRRSV 毒株的抗原性有差异,因此分离当地流行的 PRRSV 地方株,查明该分离株与其它分离株之间的亲源关系,从而选择当地流行株或与当地流行株相近的种毒研制疫苗是预防该病较为有效的方法。本研究以华中地区分离株 HN1 为材料测定了该毒株全基因组序列,分析了该

收稿日期:2004-09-23,修回日期:2004-11-22
* 基金项目:国家高技术研究发展计划(863)项目(2001AA213051)
作者简介:唐勇(1979-),男,湖南籍,博士,从事病毒分子生物学研究。Tel: 020-85223259, E-mail: ty0052_cn@sina.com.
** 通讯作者. Corresponding Author. E-mail:LHzauvat@public.wh.hb.cn.

© 1995-2006 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

毒株与其它基因组已测毒株之间的进化关系。为目前预防该地区 PRRS,选用和研制合适的疫苗提供参考依据。本研究构建的 PRRSV 的 cDNA 文库,为 PRRSV 的分子生物学基础研究提供了有利的条件;为 PRRSV 感染性克隆及新型疫苗的研究打下了基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

PRRSV HN1 野毒株为本室分离保存。Marc-145 细胞由德国巴伐利亚州动物疾病诊断中心 Czerny 博士赠送。大肠杆菌 DH5α 由本室保存。PCR 克隆载体 pMD18-T 购自大连宝生物公司。RNA 提取试剂盒为美国 OMEGA 公司产品。LA-RT-PCR 试剂盒、T_4 DNA 连接酶和各种限制性内切酶等工具酶均为大连宝生物公司产品。DNA 回收试剂盒为上海生工生物工程公司产品。DMEM 购自美国 GIBCO 公司。各类试剂均为国产分析纯。

1.2 引物

本研究中所用的寡核苷酸引物参照美国 16244B 株及其它 PRRSV 株的保守区合成,并考虑得到的 PCR 产物有利于全基因组的拼接。共设计引物五对: P_3:5′-GTGTTGGCTCTATGCCTCGGCATTTGTATTG-3′和 P_4:5′-AGAAGAAAACAGGGAGATGGGAGACGAGGTC-3′; P_5:5′-CGAGAAAACAGAAAATGTCGGCGAGATGGC-3′和 P_9:5′-GCTGTCAGAAGCCTGATCATCAGAATTTGC-3′; P_8:5′-TTATTTTGAATGAGGTTCTCCCAGCCGTCC-3′和 P_1:5′-GTCTGTTATTGCTGTCTTCTTTGGGTCCGTC-3′; P_2:5′-CCAATAACTTCATCGCACTAGCCCACCGAGC-3′和 P_6:5′-ACCACATCCAAACTACTAATGCGAGACAGC-3′; P_7:5′-GCTTTCACGGAGTTCTTGGTGTCATTGTTG-3′和 P_{m13}:5′-GTTTTCCCAGTCACGAC-3′。

1.3 PRRSV HN1 株基因组 RNA 的扩增和测序

将 PRRSV HN1 野毒株接种已长成单层的 Marc-145 细胞,37 ℃吸附 1h 后,加入维持液,并设正常细胞对照。37 ℃培养 3~5d,当细胞出现 80 %以上病变时,收获病毒悬液。按 OMEGA 公司试剂盒说明书提取基因组 RNA。LA-RT-PCR 采用两步法,按大连宝生物公司试剂盒说明书进行。用 DNA 快速回收试剂盒(上海生工)回收 DNA。其方法按其说明书进行。连接条件是 16 ℃水浴 2-24h。各片段克隆到 T 载体上后,送大连宝生物工程有限公司测序。PRRSV 进化树的绘制所用软件为 DNAstar,采用计算方法为邻近算法。

2 结果与讨论

2.1 PRRSV HN1 株基因组各片段的 RT-PCR 扩增

按材料和方法上的步骤来进行,分别以 P_3 和 P_4、P_9 和 P_5、P_8 和 P_1、P_2 和 P_6、P_7 和 P_{m13} 为上下游引物扩增,获得了大小分别为 3.9kb、2.8kb、3.0kb、3.8kb 和 3.3kb 左右的 P3,4 、P9,5 、P1,8 、P2,6 和 P7,m13 目的片段。本实验所用的 LA Taq DNA 聚合酶在 72 ℃每合成 1kb 需要 1-2min,在扩增较长的 DNA 片段时,由于扩增反应时间较长,在扩增后期 LA Taq DNA 聚合酶的酶活会逐步损失下降,合成同样长度的片段所需的时间也应有所增加。所以在本实验中,自扩增第 30 个循环后,设计每再循环一次其延伸时间在前一循环的基础上增加 10sec,结果有效的获得了扩增产物。

2.2 PRRSV HN1 株基因组各片段的克隆、鉴定及序列的测定

将获得的 P3,4、P9,5、P1,8、P2,6 和 P7,m13 纯化后连入 T 载体,提质粒筛选阳性转化子,酶切鉴定。阳性质粒分别命名为 TP3,4、TP9,5、TP1,8、TP2,6 和 TP7, m13(图略)。各鉴定好的质粒送大连宝生物公司测序,拼接而得 PRRSV 全基因序列(15423bp),输入 GenBank 获登陆号为:AY457635。随着反向遗传学的发展,学者们想到利用 PRRSV 的感染性克隆来研制 PRRS 的新型疫苗,国外学者分别于 1998 年和 2003 年成功研制出欧洲型 LV 株[9] 和美洲型 VR2332 株[10] 的感染性克隆,现已用于疫苗的研制并取得了良好的进展。我国目前还没有研制出 PRRSV 本地分离株的感染性克隆,本工作的完成为华中地区分离株 HN1 的感染性克隆的研制打下了基础。

2.3 PRRSV HN1 株基因组与其它已测 PRRSV 基因组同源性分析

基因组序列同源性分析发现(图 1),PRRSV HN1 株与美洲型各毒株同源性均在 89 %以上,与欧洲型同源性仅为 56 %,进化树上该毒株与所有美洲型同在一个大的分支,说明该毒株属于美洲型。在美洲型毒株之间的进化关系分析中,我们发现,同在我国分离的 PRRSV 毒株:BJ-4(北京)、HB-1(河北)、HB-2(河北)、CH-1A(哈尔滨)、HN1(湖南)之间的进化途径亦不一样。从进化树上可看出,HB-1(河北)、HB-2(河北)与 CH-1A(哈尔滨)进化关系较近,与美国分离的 NVSL 和 P129 同在一个

© 1995-2006 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

大的进化分支上。而我室分离的 HN1(湖南)与 BJ-4(北京)进化关系较近,与美洲标准株 VR2332 同在另一个大的进化分支上(图 1)。这说明我国的这两类不同的大分支上的毒株可能来源于两种同源性相对较远的美洲株。因此,在考虑研制或选用该地区的 PRRS 防疫疫苗时,可优先考虑选用针对 MLV、VR2332 或 BJ-4 的疫苗。

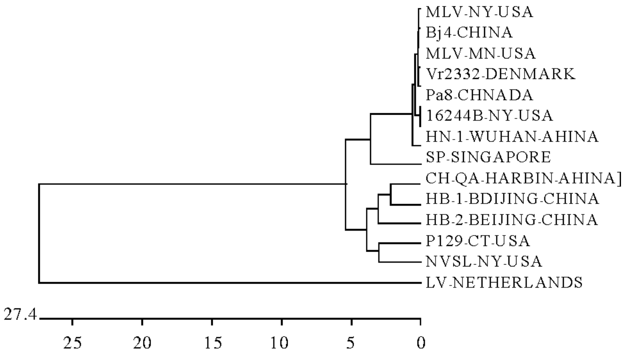

图 1　HN1 株在 PRRSV 进化树上的位置

Fig 1　The location of PRRSV HN1 strain on the evolutional tree

参考文献

[1]　Keffaber K K. Reproductive failure of unknown etiology [J]. American Association of Swine Practitioners Newsletter. 1989,1:1-19.

[2]　Ahl R, Pensaert M, Robertson I B, *et al*. Porcine reproduvtive and respiratory syndrome (PRRS or blue-eared disease) [J]. Vet Rec, 1992, 130: 87-89.

[3]　Zhang C C, Zhong W B, Lin M W, *et al*. The identification of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus 1 in Tai Wan[J]. Vet Sci, 1993, 19:268-276.

[4]　Hiroyoshi Kuwaahara. An outbreak of PRRS in Japan[J]. J Vet Med Sci, 1994, 56 901-909.

[5]　蔡雪晖, 柴文君, 翁长江,等. 猪繁殖与呼吸综合征及其在我国的现状与对策[J]. 中国预防兽医学报, 2000, 22:202-205.

[6]　方六荣. 猪繁殖与呼吸综合征自杀性 DNA 疫苗与病毒活载体疫苗的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2003.

[7]　Bautista E M, Goyal S M, Collins J E. Serologic survey for Lelystad and VR-2332 strains of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in U. S. swine herds [J]. J Vet Diagn Invest, 1993, 5: 612-614.

[8]　Wieczorek-Krohmer M, Weiland F, Conzelmann K, *et al*. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): monoclonal antibodies detect common epitopes on two viral proteins of European and U. S. isolates [J]. Vet Microbiol, 1996, 51: 257-266

[9]　Meulenberg J J M, Bos-de Ruijter J N A, van de Graaf R, *et al*. Infectious Transcripts from Cloned Genome-Length cDNA of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus [J]. J Virol, 1998, 72: 380-387.

[10]　Nielsen H S, Liu G, Nielsen J, *et al*. Generation of an Infectious Clone of VR-2332, a Highly Virulent North American-Type Isolate of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus [J]. J Virol, 2003, 77: 3702-3711.

© 1995-2006 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd.　All rights reserved.