

王隆柏, 张志灯, 车勇良, 等. 变异型 PRRSV-FJ09A 毒株 ORF5 和 NSP2 基因的遗传变异分析及致病性 [J]. 福建农业学报, 2012, 27 (10): 1032—1038.

WANG L-B, ZHANG Z-D, CHE Y-L, et al. Genetic Variations of ORF5, NSP2 of Variant PRRSV-FJ09A strain and It's Pathogenicity [J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2012, 27 (10): 1032—1038.

## 变异型 PRRSV-FJ09A 毒株 ORF5 和 NSP2 基因的遗传变异分析及致病性

王隆柏<sup>1</sup>, 张志灯<sup>2</sup>, 车勇良<sup>1</sup>, 吴学敏<sup>1</sup>, 陈如敬<sup>1</sup>, 邵良平<sup>3</sup>, 庄向生<sup>1</sup>, 周伦江<sup>1</sup>

(1. 福建省农业科学院畜牧兽医研究所/福建省畜禽疫病防治工程技术研究中心, 福建 福州 350013;

2. 福建出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 福建 福州 350003;

3. 福建农林大学动物科学学院, 福建 福州 350002)

**摘要:** 采用 RT-PCR 方法及动物回归试验, 对 PRRSV-FJ09A 毒株的 ORF5 与 NSP2 基因组进行遗传变异分析和致病性研究。结果表明: (1) 与 PRRSV-VR2332 标准毒株比较, ORF5 基因片段的核苷酸及推导的氨基酸的同源性分别为 87.6% 和 88.1%, PRRSV-FJ09A 毒株存在多个氨基酸发生突变, 主要集中在抗原表位、毒力相关位点和糖基化位点; NSP2 基因片段的核苷酸及推导的氨基酸的同源性分别为 80.9% 和 77.0%, PRRSV-FJ09A 毒株分 3 处共缺失 31 个氨基酸。(2) 与国内 2006 年后流行的变异型 PRRSV 毒株比较, PRRSV-FJ09A 毒株 ORF5 基因片段的核苷酸及推导的氨基酸的同源性分别为 98.5%~99.7% 和 97.5%~99.5%, NSP2 基因片段的核苷酸及推导的氨基酸的同源性分别为 98.4%~99.3% 和 97.3%~98.9%, PRRSV-FJ09A 毒株在 NSP2 基因片段多一处缺 1 个苯丙氨酸 (F)。结论: PRRSV-FJ09A 毒株为美洲型毒株, 与国内流行的变异型 PRRSV-FJ06A 毒株的亲缘关系比较近。该毒株对 30 日龄的仔猪具有高致病性。

**关键词:** 变异型繁殖与呼吸综合征; ORF5 基因; NSP2 基因; 遗传变异; 致病性

中图分类号: S 858

文献标识码: A

### Genetic Variations of ORF5, NSP2 of Variant PRRSV-FJ09A strain and It's Pathogenicity

WANG Long-bai<sup>1</sup>, ZHANG Zhi-deng<sup>2</sup>, CHE Yong-liang<sup>1</sup>, WU Xue-min<sup>1</sup>, CHEN Ru-jing<sup>1</sup>, SHAO Liang-ping<sup>3</sup>, ZHUANG Xiang-sheng<sup>1</sup>, ZHOU Lun-jiang<sup>1</sup>

(1. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fujian Animal Disease Control Technology Development Center, Fuzhou Fujian 350013, China;  
2. Fujian Entry-exit Inspection and Quarantine Inspection and Quarantine Technology Center, Fuzhou, Fujian 350003, China; 3. College of Animal Science, Fujian Agricultural and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

**Abstract:** To fully understand the knowledge of variant porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) genetic variation and pathogenicity, the ORF5 and NSP2 genomes of PRRSV-FJ09A strain were amplified by RT-PCR and sequenced. Comparing with PRRSV-VR2332, ORF5 gene shared 87.6% of nucleotide homologies and 88.1% of the deduced amino acid homologies, there were point mutations within deduced amino acids, focus on amino acids of associated with virulence, epitope and N-glycosylation sites; NSP2 gene shared 80.9% of nucleotide homologies and 77.0% of the deduced amino acid homologies, and it shared a common feature of 31 amino acids deletion in three places which one place more of a phenylalanine (F) than other local reports. Comparing these sequences with Chinese PRRSV strains published after 2006, ORF5 gene shared 98.5%—99.7% of nucleotide homologies and 97.5%—99.5% of the deduced amino acid homologies, NSP2 gene shared 98.4%—99.3% of nucleotide homologies and 97.3%—98.9% of the deduced amino acid homologies. The phylogenetic tree revealed

收稿日期: 2012-08-26; 2012-10-11 修改稿

作者简介: 王隆柏 (1977—), 男, 助理研究员, 研究方向: 动物传染病学 (E-mail: wanglongbai@163.com)

通讯作者: 周伦江 (1973—), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 动物病毒学与分子生物学 (E-mail: lunjiang@163.com)

基金项目: 福建省农业科学院科技计划项目 (B2009-01); 福建省农业科学院科技下乡“双百”行动项目 (sbmx1202)

PRRSV-FJ09A strain isolated had closer relationship with PRRSV-FJ06A strain. According to the animal experiment PRRSV-FJ09A had a high pathogenicity to 30 d pigs.

**Key words:** variant porcine reproductive and respiratory syndrome; ORF5 gene; NSP2 gene; genetic variations; pathogenicity

猪繁殖与呼吸综合征 (Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)，是由猪繁殖与呼吸综合征病毒 (Porcine reproductive and respiratory syndrome Virus, PRRSV) 引起种猪繁殖障碍及商品猪呼吸道症状和高死亡率为特征的传染性疾病。PRRSV 是一种单股正链 RNA 病毒，属尼多病毒目 (Nidovirales) 动脉炎病毒科 (Arteriviridae)，基因组全长约 15 kb，含有 9 个开放阅读框，分别命名为 ORF1a、ORF1b、ORF2a、ORF2b 和 ORFs3~7<sup>[1]</sup>。不同地域分离毒株的序列分析结果表明，PRRSV 有 2 种基因型，即以 VR2332 毒株为代表的美洲型和以 Lelystadivirus (LV) 为代表的欧洲型<sup>[2]</sup>。研究表明<sup>[3]</sup>，同一基因型的分离毒株之间也存在明显序列差异，尤其是基因组 ORF1a 和 ORF5 的变异程度很大，这些变异一定程度上反映了 PRRSV 整个基因组的变异情况。2006 年以来，在我国暴发的“猪高热病”证实是由 PRRSV 的 NSP2 蛋白中发生 30 个氨基酸不连续缺失的变异株引起<sup>[4~5]</sup>，给养猪业造成了重大损失。本研究对 2009 年从疑似猪“高热病”的

病料中分离到的 1 株 PRRSV-FJ09A 毒株进行了 ORF5 及 NSP2 基因的遗传变异分析及致病性研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒和主要试剂

变异型 PRRSV-FJ09A 毒株由本实验室分离、鉴定和保存。AMV 酶、dNTP、MgCl<sub>2</sub> 和 DNA Marker-2000 购自 TaKaRa 公司，TRIzol 购自 Invitrogen 公司，GoTaq Green Master Mix 和 Nuclease-Free Water 购自 Promega 公司，胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自 OMEGA 公司。

### 1.2 试验猪

6 头 30 日龄 PRRSV 抗体检测为阴性的仔猪由福州某猪场提供。

### 1.3 引物设计与合成

按参考文献 [5] 设计 4 对引物，扩增片段为 NSP2 和 ORF5，其中 NSP2 分为 3 段扩增 (NSPa、NSPb、NSPc)，引物由宝生物工程 (大连) 有限公司合成，序列见表 1。

表 1 引物的序列  
Table 1 Sequence of primer

| 片段名称 | 上下游引物                                       | 目的片段长度/bp |
|------|---|-----------|
| NSPa | Up Primer: 5'-GTGGTACGGCGCTGGAAAGAG-3'      | 1119      |
|      | Low Primer: 5'-CATGAGCCCATATTCTTC-3'        |           |
| NSPb | Up Primer: 5'-GAATATGGGCTCATGTCCACTG-3'     | 919       |
|      | Low Primer: 5'-ACATGCGAGAGAGCCACTCCTG-3'    |           |
| NSPc | Up Primer: 5'-CGAGGCATGTGATGCGAC-3'         | 967       |
|      | Low Primer: 5'-GTGCAGATGCAGCGTGC C-3'       |           |
| ORF5 | Up Primer: 5'-GGATCCGTATGTTGGGAAATGCTTG-3'  | 602       |
|      | Low Primer: 5'-CTCGAGCTATCATGGCAAAGTCGTC-3' |           |

### 1.4 RNA 提取

按常规方法提取 PRRSV-FJ09A 毒株的 RNA，具体操作如下：取 200 μL 病毒培养细胞上清液，加入 800 μL Trizol 试剂，上下剧烈摇匀后室温静置 5 min，加 200 μL 氯仿：异戊醇 (24:1) 和 70 μL 醋酸钠，上下剧烈颠倒混匀，室温静置 10 min，12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min，吸取上清 600

μL 转入另一离心管中，加入等体积的异丙醇，-20℃ 放置 45 min，12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min，弃上清，70% 乙醇洗涤沉淀，离心弃上清，在超净台内自然干燥 45 min，加 25 μL DEPC 水溶解 RNA 沉淀，-70℃ 冰箱冻存。

### 1.5 ORF5 和 NSP2 基因的扩增、克隆及测序

按参考文献 [6] 进行，PCR 反应的退火温度

为 52~58℃。

### 1.6 基因序列比较分析

将测序结果采用 DNASTar 软件进行分析，并与在 GenBank 公布的代表性 24 株 PRRSV 毒株进行序列比对，分析 ORF5 和 NSP2 基因的核苷酸与推导氨基酸序列的同源性，并绘制 ORF5 和 NSP2 基因系统进化树。

### 1.7 动物回归试验

将 6 头仔猪分为 2 组，其中试验组 4 头经鼻、肌注途径每头接种  $2 \times 10^{-5.25}$  TCID<sub>50</sub> 的 PRRSV-FJ09A 病毒，对照组 2 头接种正常细胞培养物作为阴性对照，隔离饲养，每日测量体温，并观察其采食、饮水、精神状况等临床表现。采集病死猪的肺脏和淋巴结等组织，用作 RT-PCR 或 PCR 检测样品。

## 2 结果与分析

### 2.1 目的基因的克隆与鉴定

用合成的 4 对引物分别对 ORF5 和 NSP2 基因片段进行 RT-PCR 扩增，获得与预期大小相符的特异性片段，扩增的电泳结果见图 1。PCR 产物回收后进行连接、转化，对白斑克隆做菌酶切鉴定，结果都出现预期的目的条带。

### 2.2 ORF5、NSP2 基因核苷酸序列与推导氨基酸同源性分析

测序结果经登录 GenBank 进行 Blast 分析，证实均为 PRRSV 的基因序列。序列已登录 GenBank，登录号为 bankit1288122。与国内外代

表性的 24 株 PRRSV 进行比较分析（图 2 和图 3）发现 PRRSV-FJ09A 毒株的 ORF5 基因的核苷酸及推导的氨基酸与美洲型 PRRSV-VR2332 毒株的同源性分别为 87.6% 和 88.1%，与国内其他高致病性 PRRSV 毒株之间核苷酸及推导的氨基酸的同源性分别为 98.5%~99.7% 和 97.5%~99.5%，与 LV 欧洲株的核苷酸及推导的氨基酸的同源性分别为 55.7% 和 56.2%。PRRSV-FJ09A 毒株的 NSP2 基因的核苷酸及推导的氨基酸与美洲型 VR2332 毒株的同源性分别为 80.9% 和 77.0%，与国内其他高致病性 PRRSV 毒株之间核苷酸及推导的氨基酸的同源性分别为 98.4%~99.3% 和 97.3%~98.9%，与 LV 欧洲株的核苷酸及推导的氨基酸的同源性分别为 58.8% 和 10.7%（图 4 和图 5）。

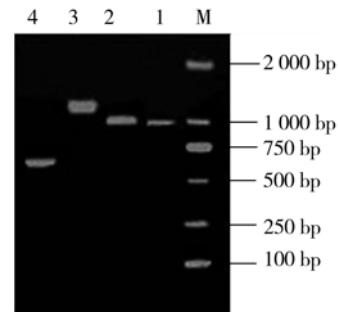


图 1 PRRSV-FJ09A 毒株 PCR 电泳图

Fig. 1 PCR products of 4 fragments from PRRSV-FJ09A

注：M 为 Marker；1~3 分别为扩增 NSPc~NSPa 片段；4 为 ORF5 片段。

|            | Percent identity |      |      |      |      |      |      |      |       |       |      |      |      |      |       |      |       |      |       |       |      |      |        |          |       |
|------------|------------------|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|------|------|------|------|-------|------|-------|------|-------|-------|------|------|--------|----------|-------|
| Divergence | 2                | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10    | 11    | 12   | 13   | 14   | 15   | 16    | 17   | 18    | 19   | 20    | 21    | 22   | 23   | 24     |          |       |
| 99.2       | 99.5             | 99.3 | 99.5 | 99.2 | 99.7 | 99.3 | 98.8 | 99.5 | 99.5  | 99.7  | 99.5 | 99.5 | 99.5 | 99.7 | 99.0  | 99.5 | 98.5  | 99.5 | 99.7  | 87.6  | 95.4 | 55.7 | 1      | FJ09A    |       |
|            | 99.2             | 98.8 | 99.0 | 98.7 | 99.2 | 98.8 | 98.3 | 99.0 | 99.0  | 99.2  | 99.0 | 99.0 | 99.0 | 99.2 | 98.5  | 99.0 | 98.0  | 99.0 | 99.2  | 87.1  | 94.5 | 55.4 | 2      | FJ06A    |       |
| 0.8        | 99.5             | 99.7 | 99.3 | 98.8 | 99.5 | 99.0 | 98.7 | 99.7 | 98.8  | 99.7  | 99.7 | 99.7 | 99.7 | 99.8 | 99.2  | 99.7 | 99.7  | 99.8 | 99.7  | 87.1  | 94.9 | 55.7 | 3      | 08HuN    |       |
| 1.2        | 0.5              | 99.5 | 99.2 | 99.7 | 99.3 | 99.2 | 99.3 | 99.8 | 99.7  | 99.8  | 99.5 | 99.5 | 99.7 | 99.8 | 99.5  | 99.5 | 99.5  | 99.5 | 99.7  | 87.2  | 94.7 | 55.2 | 4      | 08SDWf   |       |
| 1.0        | 0.3              | 0.5  | 99.3 | 98.8 | 99.5 | 99.0 | 99.7 | 99.7 | 99.8  | 99.7  | 99.7 | 99.7 | 99.7 | 99.8 | 99.2  | 99.7 | 99.7  | 99.7 | 99.8  | 87.2  | 94.9 | 55.8 | 5      | BJSY-1   |       |
| 1.3        | 0.7              | 0.8  | 0.7  | 99.5 | 99.2 | 98.7 | 99.3 | 99.3 | 99.5  | 99.3  | 99.3 | 99.3 | 99.3 | 99.5 | 99.8  | 99.3 | 99.3  | 99.3 | 99.3  | 86.7  | 94.5 | 55.4 | 6      | CWZ-1-F3 |       |
| 0.8        | 0.2              | 0.3  | 0.2  | 0.5  | 99.7 | 99.2 | 99.8 | 99.6 | 100.0 | 99.8  | 99.8 | 99.8 | 99.8 | 99.8 | 99.3  | 99.8 | 98.8  | 99.8 | 99.8  | 100.0 | 87.2 | 95.0 | 55.6   | 7        | GDQY1 |
| 1.2        | 0.5              | 0.7  | 0.5  | 0.8  | 0.3  | 99.8 | 99.5 | 99.5 | 99.7  | 99.5  | 99.5 | 99.5 | 99.7 | 99.7 | 99.5  | 99.5 | 99.5  | 99.5 | 99.7  | 87.2  | 94.7 | 55.6 | 8      | henan-1  |       |
| 1.7        | 1.0              | 0.8  | 1.0  | 1.3  | 0.8  | 1.2  | 99.8 | 99.3 | 99.2  | 99.3  | 99.0 | 99.0 | 99.2 | 98.5 | 99.0  | 98.0 | 99.0  | 99.2 | 86.1  | 94.2  | 54.8 | 9    | HN2007 |          |       |
| 1.0        | 0.3              | 0.5  | 0.3  | 0.7  | 0.2  | 0.5  | 1.0  | 99.5 | 99.8  | 99.5  | 99.7 | 99.7 | 99.8 | 99.2 | 99.7  | 99.7 | 99.7  | 99.7 | 87.1  | 94.9  | 55.7 | 10   | HN-HW  |          |       |
| 1.0        | 0.3              | 0.2  | 0.3  | 0.7  | 0.2  | 0.5  | 0.7  | 0.3  | 99.8  | 100.0 | 99.7 | 99.7 | 99.8 | 99.2 | 99.7  | 99.7 | 99.7  | 99.7 | 87.1  | 94.9  | 55.2 | 11   | HPBEDV |          |       |
| 0.8        | 0.2              | 0.3  | 0.2  | 0.5  | 0.0  | 0.3  | 0.8  | 0.2  | 0.2   | 99.8  | 99.8 | 99.8 | 99.7 | 99.7 | 99.7  | 99.7 | 99.7  | 99.7 | 99.8  | 87.1  | 94.9 | 55.2 | 12     | HUN4     |       |
| 1.0        | 0.3              | 0.2  | 0.3  | 0.7  | 0.2  | 0.5  | 0.7  | 0.3  | 0.0   | 0.2   | 99.7 | 99.7 | 99.8 | 99.2 | 99.7  | 99.7 | 99.7  | 99.7 | 99.7  | 87.1  | 94.9 | 55.2 | 13     | JXA1     |       |
| 1.0        | 0.3              | 0.5  | 0.3  | 0.7  | 0.2  | 0.5  | 1.0  | 0.3  | 0.3   | 0.2   | 0.3  | 99.7 | 99.8 | 99.2 | 99.7  | 99.7 | 99.7  | 99.8 | 99.8  | 87.1  | 94.9 | 55.4 | 14     | JXM80    |       |
| 1.0        | 0.3              | 0.5  | 0.3  | 0.7  | 0.2  | 0.5  | 1.0  | 0.3  | 0.3   | 0.2   | 0.3  | 0.3  | 99.8 | 99.2 | 100.0 | 99.7 | 100.0 | 99.6 | 87.2  | 95.0  | 55.6 | 15   | JXwn06 |          |       |
| 0.8        | 0.2              | 0.3  | 0.2  | 0.5  | 0.0  | 0.3  | 0.8  | 0.2  | 0.2   | 0.0   | 0.2  | 0.2  | 0.2  | 99.3 | 99.8  | 99.8 | 99.8  | 99.8 | 100.0 | 87.2  | 95.0 | 55.8 | 16     | NX06     |       |
| 1.5        | 0.8              | 1.0  | 0.8  | 1.2  | 0.7  | 0.3  | 1.5  | 0.8  | 0.8   | 0.7   | 0.8  | 0.8  | 0.7  | 99.2 | 99.2  | 99.2 | 99.2  | 99.3 | 86.7  | 94.4  | 55.2 | 17   | SD-09  |          |       |
| 1.0        | 0.3              | 0.5  | 0.3  | 0.7  | 0.2  | 0.5  | 1.0  | 0.3  | 0.3   | 0.2   | 0.3  | 0.3  | 0.0  | 0.2  | 0.8   | 98.7 | 100.0 | 99.8 | 87.2  | 95.0  | 55.6 | 18   | SHH    |          |       |
| 2.0        | 1.3              | 1.5  | 1.3  | 1.7  | 1.2  | 1.5  | 2.0  | 1.3  | 1.3   | 1.2   | 1.3  | 1.3  | 1.2  | 1.9  | 1.3   | 1.2  | 1.9   | 1.3  | 98.7  | 98.6  | 87.2 | 94.5 | 55.1   | 19       | SX-09 |
| 1.0        | 0.3              | 0.5  | 0.3  | 0.7  | 0.2  | 0.5  | 1.0  | 0.3  | 0.3   | 0.2   | 0.3  | 0.3  | 0.0  | 0.2  | 0.8   | 0.0  | 1.3   | 99.6 | 87.2  | 95.0  | 55.6 | 20   | TJ     |          |       |
| 0.8        | 0.2              | 0.3  | 0.2  | 0.5  | 0.0  | 0.3  | 0.8  | 0.2  | 0.2   | 0.0   | 0.2  | 0.2  | 0.2  | 0.0  | 0.7   | 0.2  | 1.2   | 0.2  | 87.2  | 95.0  | 55.8 | 21   | TP     |          |       |
| 12.0       | 12.0             | 11.8 | 11.8 | 12.4 | 11.8 | 11.8 | 12.8 | 12.0 | 12.0  | 11.8  | 12.0 | 12.0 | 11.8 | 11.8 | 12.2  | 11.8 | 12.0  | 11.8 | 11.8  | 90.7  | 56.6 | 22   | VR2332 |          |       |
| 5.2        | 4.8              | 5.0  | 4.8  | 5.2  | 4.6  | 5.0  | 5.5  | 4.8  | 4.8   | 4.6   | 4.8  | 4.8  | 4.6  | 4.6  | 5.4   | 4.6  | 5.2   | 4.6  | 4.6   | 8.7   | 56.2 | 23   | CH-1a  |          |       |
| 48.2       | 45.6             | 46.2 | 45.9 | 46.3 | 45.9 | 45.6 | 46.8 | 45.8 | 46.2  | 45.9  | 46.2 | 46.3 | 45.9 | 45.9 | 46.3  | 45.9 | 47.3  | 45.9 | 45.9  | 45.7  | 46.0 | 24   | LV     |          |       |
| 2          | 3                | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11    | 12    | 13   | 14   | 15   | 16   | 17    | 18   | 19    | 20   | 21    | 22    | 23   | 24   |        |          |       |

图 2 PRRSV-FJ09A 毒株 ORF5 基因核苷酸序列与其他毒株之间的同源性

Fig. 2 The homology of nucleotide sequence of ORF5 gene between PRRSV-FJ09A and other strains

| Divergence | Percent Identity |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |    |
|------------|------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|----|
|            | 2                | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   | 13   | 14   | 15   | 16   | 17   | 18   | 19   | 20   | 21   | 22   | 23   | 24   | 25   |      |     |    |
| 98.5       | 99.5             | 98.5 | 99.5 | 99.0 | 99.5 | 99.0 | 97.5 | 99.5 | 99.0 | 99.5 | 99.5 | 99.5 | 99.5 | 99.5 | 99.5 | 99.5 | 97.5 | 99.5 | 99.5 | 99.5 | 98.1 | 93.0 | 56.2 | 1    |      |     |    |
| 98.5       | 99.5             | 97.5 | 98.5 | 98.0 | 98.5 | 98.0 | 96.5 | 98.5 | 98.0 | 98.5 | 98.5 | 98.5 | 98.5 | 98.5 | 98.5 | 98.5 | 98.5 | 98.5 | 98.5 | 98.5 | 98.5 | 98.1 | 92.0 | 55.2 | 2    |     |    |
| 1.0        | 1.0              | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 3   |    |
| 2.0        | 1.0              | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 4   |    |
| 1.0        | 0.0              | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 5   |    |
| 1.5        | 0.5              | 1.5  | 0.5  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 6   |    |
| 1.0        | 0.0              | 1.0  | 0.0  | 0.5  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 7   |    |
| 1.5        | 0.5              | 1.5  | 0.5  | 1.0  | 0.5  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 8   |    |
| 3.1        | 2.0              | 2.0  | 2.0  | 2.5  | 2.0  | 2.5  | 2.0  | 2.5  | 2.0  | 2.5  | 2.0  | 2.5  | 2.0  | 2.5  | 2.0  | 2.5  | 2.0  | 2.5  | 2.0  | 2.5  | 2.0  | 2.5  | 2.0  | 2.5  | 2.0  | 9   |    |
| 1.0        | 0.0              | 1.0  | 0.0  | 0.5  | 0.0  | 0.5  | 2.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0 | 10 |
| 1.5        | 0.5              | 1.5  | 0.5  | 1.0  | 0.5  | 1.0  | 1.5  | 0.5  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0 | 11 |
| 1.0        | 0.0              | 1.0  | 0.0  | 0.5  | 0.0  | 0.5  | 2.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0 | 12 |
| 1.5        | 0.5              | 1.5  | 0.5  | 1.0  | 0.5  | 1.0  | 1.5  | 0.5  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0 | 13 |
| 1.0        | 0.0              | 1.0  | 0.0  | 0.5  | 0.0  | 0.5  | 2.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0 | 14 |
| 1.0        | 0.0              | 1.0  | 0.0  | 0.5  | 0.0  | 0.5  | 2.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0 | 15 |
| 1.0        | 0.0              | 1.0  | 0.0  | 0.5  | 0.0  | 0.5  | 2.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0 | 16 |
| 1.5        | 0.5              | 1.5  | 0.5  | 1.0  | 0.5  | 0.0  | 2.5  | 0.5  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0 | 17 |
| 1.0        | 0.0              | 1.0  | 0.0  | 0.5  | 0.0  | 0.5  | 2.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0 | 18 |
| 3.1        | 2.0              | 3.1  | 2.0  | 2.5  | 2.0  | 2.5  | 4.1  | 2.0  | 2.5  | 2.0  | 2.5  | 2.0  | 2.5  | 2.0  | 2.5  | 2.0  | 2.5  | 2.0  | 2.5  | 2.0  | 2.5  | 2.0  | 2.5  | 2.0  | 2.5  | 2.0 | 19 |
| 1.0        | 0.0              | 1.0  | 0.0  | 0.5  | 0.0  | 0.5  | 2.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0 | 20 |
| 1.0        | 0.0              | 1.0  | 0.0  | 0.5  | 0.0  | 0.5  | 2.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0 | 21 |
| 1.0        | 0.0              | 1.0  | 0.0  | 0.5  | 0.0  | 0.5  | 2.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0 | 22 |
| 13.7       | 12.5             | 12.5 | 12.5 | 13.1 | 12.5 | 11.9 | 14.9 | 12.5 | 13.1 | 12.5 | 13.1 | 12.5 | 12.5 | 12.5 | 12.5 | 12.5 | 12.5 | 12.5 | 12.5 | 12.5 | 12.5 | 12.5 | 12.5 | 12.5 | 12.5 | 23  |    |
| 7.9        | 6.8              | 7.9  | 6.8  | 7.4  | 6.8  | 7.4  | 9.0  | 6.8  | 7.4  | 6.8  | 7.4  | 6.8  | 6.8  | 6.8  | 6.8  | 6.8  | 6.8  | 6.8  | 6.8  | 6.8  | 6.8  | 6.8  | 6.8  | 6.8  | 6.8  | 6.8 | 24 |
| 59.3       | 57.2             | 58.2 | 57.2 | 57.2 | 57.2 | 57.2 | 59.3 | 57.2 | 58.2 | 57.2 | 58.2 | 57.2 | 57.2 | 57.2 | 57.2 | 57.2 | 57.2 | 57.2 | 57.2 | 57.2 | 57.2 | 57.2 | 57.2 | 57.2 | 57.2 | 25  |    |
| 2          | 3                | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   | 13   | 14   | 15   | 16   | 17   | 18   | 19   | 20   | 21   | 22   | 23   | 24   | 25   |      |      |     |    |

图 3 PRRSV-FJ09A 毒株 ORF5 基因推导的氨基酸序列与其他毒株之间的同源性

Fig. 3 The homology of putative amino acid sequence of ORF5 gene between PRRSV-FJ09A and other strains

| Divergence | Percent Identity |      |      |      |      |      |      |      |      |      |         |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |    |
|------------|------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|---------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|----|
|            | 2                | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12      | 13   | 14   | 15   | 16   | 17   | 18   | 19   | 20   | 21   | 22   | 23   | 24   | 25   |      |     |    |
| 98.3       | 98.8             | 99.0 | 98.5 | 98.9 | 98.9 | 98.4 | 98.7 | 99.1 | 99.0 | 99.1 | 99.0    | 98.7 | 99.2 | 98.4 | 98.8 | 98.9 | 98.7 | 99.0 | 98.8 | 98.0 | 90.7 | 25.8 | 1    |      |      |     |    |
| 98.9       | 99.9             | 99.1 | 98.7 | 99.0 | 99.1 | 98.5 | 98.8 | 99.2 | 99.3 | 99.2 | 99.7    | 99.3 | 98.5 | 99.0 | 99.0 | 98.8 | 99.1 | 98.9 | 98.0 | 90.7 | 25.7 | 2    |      |      |      |     |    |
| 0.9        | 99.2             | 98.7 | 99.2 | 99.1 | 98.6 | 98.9 | 99.3 | 99.2 | 99.4 | 99.2 | 98.8    | 99.3 | 98.6 | 99.1 | 99.0 | 98.9 | 99.1 | 99.0 | 98.8 | 90.0 | 26.3 | 3    |      |      |      |     |    |
| 0.7        | 0.8              | 0.9  | 0.9  | 9.4  | 9.4  | 9.8  | 9.9  | 9.5  | 9.5  | 9.8  | 9.6     | 9.6  | 9.8  | 9.9  | 9.0  | 9.9  | 9.3  | 9.2  | 9.2  | 9.2  | 9.0  | 9.1  | 26.1 | 4    |      |     |    |
| 1.1        | 1.3              | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0     | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0 | 5  |
| 0.8        | 0.6              | 0.6  | 1.1  | 1.1  | 9.3  | 98.8 | 99.1 | 99.5 | 99.4 | 99.6 | 99.4    | 99.0 | 99.5 | 99.8 | 99.2 | 99.3 | 99.1 | 99.3 | 99.2 | 99.0 | 99.5 | 99.4 | 99.0 | 99.2 | 26.2 | 6   |    |
| 0.7        | 0.9              | 0.6  | 1.1  | 0.7  | 0.7  | 98.8 | 99.1 | 99.5 | 99.4 | 99.5 | 99.4    | 99.0 | 99.5 | 99.8 | 99.3 | 99.3 | 99.1 | 99.3 | 99.2 | 99.0 | 99.5 | 99.4 | 99.0 | 99.2 | 26.2 | 7   |    |
| 1.3        | 1.4              | 1.1  | 1.0  | 1.2  | 1.2  | 1.0  | 1.4  | 1.0  | 1.1  | 1.0  | 1.1     | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 1.0  | 0.9  | 0.9  | 0.9  | 0.9  | 0.9  | 0.9  | 0.9  | 0.9  | 0.9  | 0.9  | 0.9 | 8  |
| 1.0        | 1.1              | 0.5  | 0.9  | 0.9  | 0.9  | 0.7  | 0.3  | 0.4  | 0.3  | 0.4  | 0.7     | 0.7  | 0.7  | 0.7  | 0.7  | 0.7  | 0.7  | 0.7  | 0.7  | 0.7  | 0.7  | 0.7  | 0.7  | 0.7  | 0.7  | 0.7 | 9  |
| 0.6        | 0.5              | 0.5  | 0.9  | 0.5  | 0.5  | 1.0  | 0.7  | 0.7  | 99.6 | 99.8 | 99.6    | 99.9 | 99.7 | 99.0 | 99.4 | 99.4 | 99.3 | 99.5 | 99.4 | 99.4 | 99.0 | 99.2 | 26.0 | 10   |      |     |    |
| 0.7        | 0.8              | 0.2  | 1.0  | 0.6  | 1.1  | 0.3  | 0.4  | 0.4  | 0.4  | 0.4  | 0.4     | 0.4  | 0.4  | 0.4  | 0.4  | 0.4  | 0.4  | 0.4  | 0.4  | 0.4  | 0.4  | 0.4  | 0.4  | 0.4  | 0.4  | 0.4 | 11 |
| 0.6        | 0.4              | 0.9  | 0.4  | 0.5  | 1.0  | 0.7  | 0.2  | 0.4  | 0.4  | 0.4  | 0.4     | 0.4  | 0.4  | 0.4  | 0.4  | 0.4  | 0.4  | 0.4  | 0.4  | 0.4  | 0.4  | 0.4  | 0.4  | 0.4  | 0.4  | 0.4 | 12 |
| 0.7        | 0.8              | 0.2  | 1.0  | 0.6  | 1.1  | 0.3  | 0.4  | 0.0  | 0.4  | 0.4  | 0.4     | 0.4  | 0.4  | 0.4  | 0.4  | 0.4  | 0.4  | 0.4  | 0.4  | 0.4  | 0.4  | 0.4  | 0.4  | 0.4  | 0.4  | 0.4 | 13 |
| 1.1        | 1.2              | 1.0  | 0.6  | 1.0  | 1.0  | 1.2  | 0.9  | 0.9  | 0.8  | 0.8  | 0.9     | 0.8  | 0.9  | 0.9  | 0.9  | 0.9  | 0.9  | 0.9  | 0.9  | 0.9  | 0.9  | 0.9  | 0.9  | 0.9  | 0.9  | 0.9 | 14 |
| 0.6        | 0.7              | 0.4  | 0.7  | 0.5  | 0.9  | 0.7  | 0.3  | 0.4  | 0.3  | 0.4  | 0.7     | 0.7  | 0.7  | 0.7  | 0.7  | 0.7  | 0.7  | 0.7  | 0.7  | 0.7  | 0.7  | 0.7  | 0.7  | 0.7  | 0.7  | 0.7 | 15 |
| 1.3        | 1.4              | 1.1  | 1.0  | 1.1  | 1.2  | 1.0  | 1.4  | 1.0  | 1.1  | 1.0  | 1.1</td |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |    |

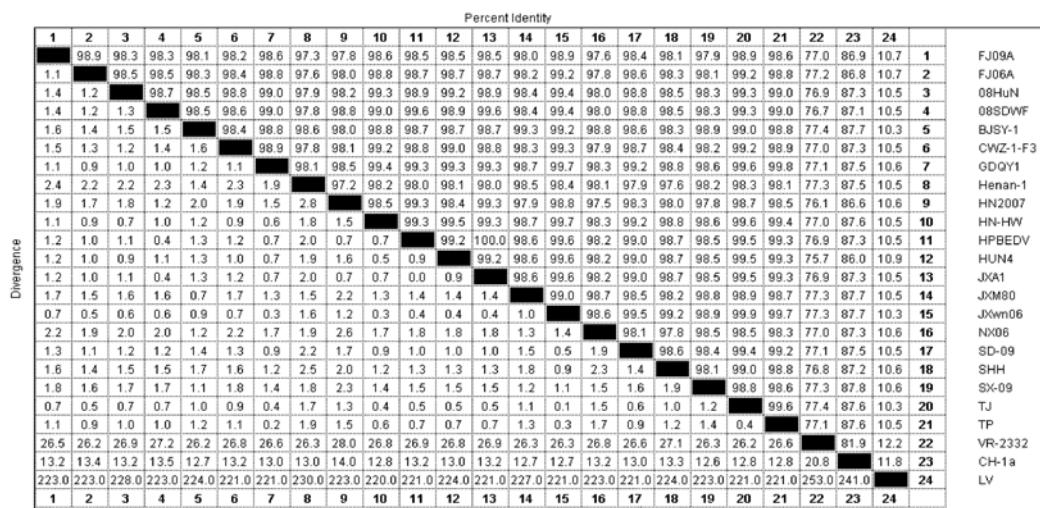


图 5 PRRSV-FJ09A 毒株 NSP2 基因推导的氨基酸序列与其他毒株之间的同源性

Fig. 5 The homology of putative amino acid sequence of NSP2 gene between PRRSV-FJ09A and other strains

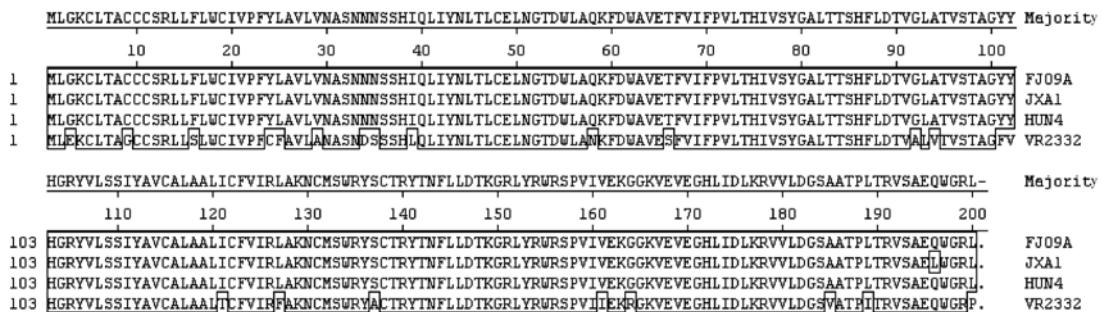


图 6 PRRSV-FJ09A 毒株 GP5 氨基酸序列比较

Fig. 6 Comparison of amino acid sequence of GP5 of PRRSV-FJ09A isolate

PRRSV-FJ09A 毒株的 NSP2 基因特征与分离的 PRRSV-FJ06A 毒株一样，在 3 处共自然缺失 31 个氨基酸，缺失位置分别在 483 位、491 位和 535~563 位，比国内其他分离的高致病性毒株多 1 处（491 位）缺失 1 个氨基酸（图 7），与国内外各美洲型 PRRSV 毒株的氨基酸同源性为 77.0%~98.9%，由此表明，PRRSV-FJ09A 毒株的 NSP2 基因变异程度比较大。

#### 2.4 ORF5 基因核苷酸系统发育进化树分析

根据测得 PRRSV-FJ09A 毒株的 ORF5 基因序列，绘制遗传进化树。分析结果（图 8）表明，PRRSV-FJ09A 毒株属于美洲型，与 PRRSV-FJ06A 毒株处于同一分支，与 PRRSV-VR2332 毒株处于另外一小分支，与国内高致病性 SX-09 和 08HuN 等毒株的亲缘关系比较近，源于同一祖先。

#### 2.5 动物回归试验

##### 2.5.1 临床症状 试验组仔猪（1 号、2 号、3 号

和 4 号）接毒 3 d 后均出现体温升高至 40.0~41.6℃，呈稽留热，精神沉郁，食欲不振或废绝，皮肤偏红，尿黄，咳嗽和喘气症状；1 号、2 号和 4 号猪只病程 9 d 后，病重猪耳朵发绀，腹部发绀，眼结膜发炎，呼吸困难；2 号和 4 号猪只濒死前站立不稳，出现震颤和四肢划水样等神经症状；病程稍长的 1 号病猪全身苍白，被毛粗乱，呼吸急促以致困难。猪群发病率为 100%，死亡率为 75.0%。阴性对照组正常。

2.5.2 病理变化 病重的猪群主要表现为：肺部有出血点、间质增宽和肉变；肺门、腹股沟和肠系膜等处淋巴结出现淤血、肿大或出血；扁桃体出血；部分病死猪心冠状沟脂肪及心内外膜有出血点，肾脏出血，质地较脆；部分病死猪胃底黏膜出血、溃疡，小肠黏膜出血，脑有充血，脾脏较黑及易脆等病理变化。

|   | 400 | 490 | 500 | 510 | 520 | 530 | 540 | 550 | 560 | 570 |                       |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----------------------|
| NGSEE-TVGGPLNFFPTPSEPMTPMSEPVLPASRRVPKLMTPLSGSAPVPAPRRTVT-----  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | TTLTHQDEPLDL Majority |
| NGSEE-TVGGPLNFFPTPSEPMTPMSEPVLPASRRVPKLMTPLSGSAPVPAPRRTVT-----  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | TTLTHQDEPLDL FJ09A    |
| NGSEE-TVGGPLNFFPTPSEPMTPMSEPVLPASRRVPKLMTPLSGSAPVPAPRRTVT-----  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | TTLTHQDEPLDL FJ06A    |
| NGSEE-TVGGPLNFFPTPSEPMTPMSEPVLPASRRVPKLMTPLSGSAPVPAPRRTVT-----  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | TTLTHQDEPLDL 08HuN    |
| NGSEE-TVGGPLNFFPTPSEPMTPMSEPVLPASRRVPKLMTPLSGSAPVPAPRRTVT-----  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | TTLTHQDEPLDL 08SDW    |
| NGSEE-TVGGPLNFFPTPSEPMTPMSEPVLPASRRVPKLMTPLSGSAPVPAPRRTVT-----  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | TTLTHQDEPLDL BJSY-1   |
| NGSEE-TVGGPLNFFPTPSEPMTPMSEPVLPASRRVPKLMTPLRSAPVPAPRRTVT-----   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | TTLTHQDEPLDL CWZ-1-F3 |
| NGSEE-TVGGPLNFFPTPSEPMTPMSEPVLPASRRVPKLMTPLSGSAPVPAPRRTVT-----  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | TTLTHQDEPLDL GDQY1    |
| NGSEE-TVDGPLNFFPTPSEPMTPMSEPVLPASRRVPKLMTPLSGSAPVPAPRRTVT-----  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | TTLTHQDEPLDL Henan-1  |
| NGSEE-TVGGPLNFFPTPSEPMTPMSEPVLPASRRVPKLMTPLSGSAPVPAPRRTVT-----  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | TTLTHQDEPLDL HN2007   |
| NGSEE-TVGGPLNFFPTPSEPMTPMSEPVLPASRRVPKLMTPLSGSAPVPAPRRTVT-----  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | TTLTHQDEPLDL HN-HW    |
| NGSEE-TVGGPLNFFPTPSEPMTPMSEPVLPASRRVPKLMTPLSGSAPVPAPRRTVT-----  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | TTLTHQDEPLDL HPBEDV   |
| NGSEE-TVGGPLNFFPTPSEPMTPMSEPVLPASRRVPKLMTPLSGSAPVPAPRRTVT-----  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | TTLTHQDEPLDL HUN4     |
| NGSEE-TVGGPLNFFPTPSEPMTPMSEPVLPASRRVPKLMTPLSGSAPVPAPRRTVT-----  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | TTLTHQDEPLDL JXA1     |
| NGSEE-TVGGPLNFFPTPSEPMTPMSEPVLPASRRVPKLMTPLSGSAPVPAPRRTVT-----  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | TTLTHQDEPLDL JXM80    |
| NGSEE-TVGGPLNFFPTPSEPMTPMSEPVLPASRRVPKLMTPLSGSAPVPAPRRTVT-----  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | TTLTHQDEPLDL JXwn06   |
| NGSEE-TVGGPLNFFPTPSEPMTPMSEPVLPASRRVPKLMTPLSGSAPVPAPRRTVT-----  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | TTLTHQDEPLDL NX06     |
| NGSEE-TVGGPLNFFPTPSEPMTPMSEPVLPASRRVPKLMTPLSGSAPVPAPRRTVT-----  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | TTLTHQDEPLDL SD-09    |
| NGSEE-TVGGPLNFFPTPSEPMTPMSEPVLPASRRVPKLMTPLSGSAPVPAPRRTVT-----  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | TTLTHQDEPLDL SHH      |
| NGSEE-TVGGPLDFPTPSEPMTPMSEPVLPASRRVPKLMTPLSGSAPVPAPRRTVT-----   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | TTLTHQDEPLDL SX-09    |
| NGSEE-TVGGPLNLPTPSEPMTPMSEPVLPASRRVPKLMTPLSGSAPVPAPRRTVT-----   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | TTLTHQDEPLDL TJ       |
| NGSEE-TVGGPLNFFPTPSEPMTPMSEPVLPASRRVPKLMTPLSGSAPVPAPRRTVT-----  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | TTLTHQDEPLDL TP       |
| NSWEDLAWSPPFDLPTTPEPATPSSELVIVSSPQCIFRPATPLSEFAPIPAPRGTVSRPVTPLESEPIPVPAPRRKFQKVRLSSAAAIPPYQDPEPLDL VR-2332 | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | VR-2332               |
| NGWEDFAVGGPLDFPTPSEPMTPLSEPVLMPASQH1PRPVTPLSGAPVPAPRRTVSAPRHKFQQVEEANPAATTLYQDPEPLDL CH-1e                  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | CH-1e                 |

图 7 PRRSV-FJ09A 毒株 NSP2 区推导氨基酸序列缺失的 31 个氨基酸

Fig. 7 The consequent 31 amino acids deletion in NSP2 gene of PRRSV-FJ09A

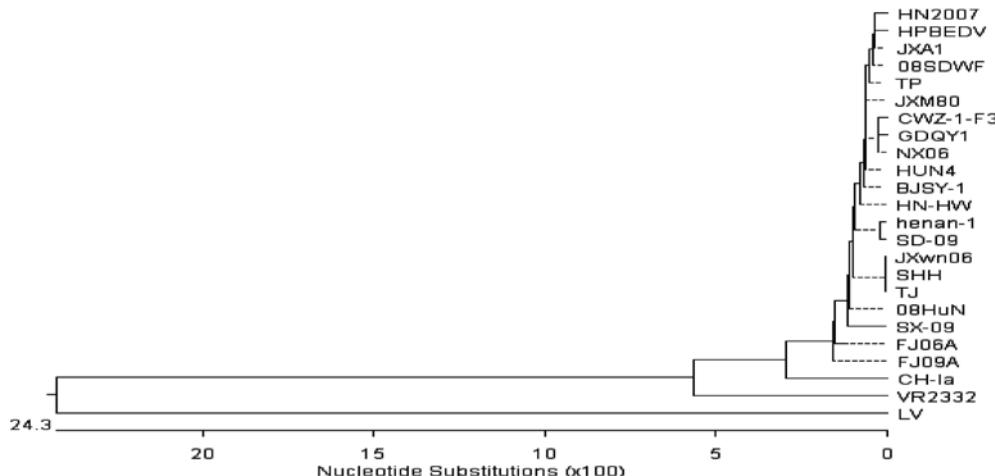


图 8 PRRSV-FJ09A 毒株遗传进化树 (ORF5 基因)

Fig. 8 Phylogenetic tree analysis of PRRSV-FJ09A isolates based on ORF5 gene

**2.5.3 病料检测** 采集病死猪的肺脏、淋巴结、脾脏及关节液体, 参照参考文献 [5] 的方法进行 SCFV、PRV、PCV、PRRSV 检测和细菌分离, 结果仅 PRRSV 检测为阳性, 其他病毒检测为阴性, 细菌分离为阴性, 说明分离 PRRSV-FJ09A 毒株能单独感染 30 日龄仔猪发病死亡, 致病性较强。

### 3 讨 论

ORF5 作为 PRRSV 基因组中的高变区之一, 大约由 200 个氨基酸组成, 分子量约为 25 kD, 含 4 个糖基化位点, 其编码蛋白 GP5 是 PRRSV 主要的宿主保护性抗原, 参与细胞免疫和体液免疫, 导致 ORF5 的变异将直接降低 PRRS 疫苗株的交叉

保护率<sup>[7-8]</sup>。目前, 美洲型毒株的 GP5 蛋白已被确定有 3 个抗原表位, 1 个是中和表位 (37~45) 位氨基酸, 2 个是非中和表位 (27~30) 位氨基酸和 (180~197) 位氨基酸<sup>[9]</sup>。通过序列分析发现, PRRSV-FJ09A 毒株的 ORF5 基因片段发生了 23 个氨基酸变化, 其中在中和表位 39 位点处, 由 L 变成为 I, 而在非中和表位 29 位、185 位和 189 位点处, 分别由 A 变为 V、V 变为 A 和 I 变为 L, 在区分标准疫苗株的 137 位氨基酸处由 A 变为 S, 结合病毒分离背景, 说明 PRRSV-FJ09A 毒株为野毒株, 且 GP5 蛋白的抗原表位已经出现病毒受体结合位点或抗原位点的变化, 使病毒获得免疫逃逸, 特别是非中和表位 29 位点与 185 位点 2 处的

突变，这种现象是否会造成 PRRSV 的抗原漂移或毒力的改变，尚需进一步研究。

有关研究表明，NSP2 蛋白是 PRRSV 非结构蛋白区域变异程度最大的部分，很容易发生基因缺失或突变<sup>[10]</sup>，并且该缺失特征成为高致病性 PRRSV 的重要标志，是判断 PRRSV 是否为高致病性病毒株的重要指标<sup>[11]</sup>。通过对 PRRSV-FJ09A 毒株 NSP2 基因推导的氨基酸分析比较表明，该毒株的 NSP2 基因片段分 3 处缺失了 31 个氨基酸，缺失位置分别位于 NSP2 基因片段的 483 位、491 位和 535~563 位，比国内其他分离高致病性毒株<sup>[4~12]</sup>多 1 处（491 位）缺失 1 个苯丙氨酸（F），为一种新型 PRRSV NSP2 缺失型毒株。同时，该毒株与国内其他地区的各分离株的同源性存在差异，进一步说明 PRRSV 的变异与时间或地域跨度有一定的相关性。

通过动物实验表明，分离病毒接种 4 头 30 日龄的仔猪 3 d 后出现“高热”症状，发病率 100.0%，死亡率为 75.0%，具有高致病性 PRRSV 典型的“三高一低”的特征，说明毒株能致猪群发病死亡，具有高致病性，但对于该毒株在 NSP2 基因片段的基因变异及多缺失 1 个氨基酸是否对病毒的其他特性具有影响，有待进一步研究。

#### 参考文献：

- [1] STADEJEK T, STANKEVICIUS A, STORGAARD T, et al. Identification of radically different variants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Eastern Europe: towards a common ancestor for European and American viruses [J]. J Gen Virol, 2002, 83 (8): 1861~1873.
- [2] CONZELMANN K K, VISSER N, VAN WOENSEL P, et al. Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. Virology, 1993, 193 (1): 329~339.
- [3] ALLENDE R, KUTISH G F, LAEGREID W, et al. Mutations in the genome of porcine reproductive and respiratory syndrome virus responsible for the attenuation phenotype [J]. Arch Virol, 2000, 145: 1149~1161.
- [4] 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.
- [5] 周伦江, 王隆柏, 王伟, 等. 变异型猪繁殖与呼吸综合征病毒 FJ06A 毒株的分离鉴定和致病性 [J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2011, 40 (6): 618~623.
- [6] 王隆柏, 吴学敏, 车勇良, 等. 猪流行性腹泻病毒 ORF3 和 M 基因的克隆与序列分析 [J]. 中国动物传染病学报, 2012, 20 (3): 67~72.
- [7] WEN SVOORT G, TERPST R A C, POL J M A, et al. Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus [J]. Vet Quart, 1991, 13 (3): 121~130.
- [8] 王剑非, 孙建全, 张金强, 等. PRRSV 分离株 Nsp2 基因和 ORF5 基因的遗传变异分析 [J]. 家畜生态学报, 2011, 32 (1): 48~53.
- [9] FAABERG K S, HOCKER J D, ERDMAN M M, et al. Neutralizing antibody responses of pigs infected with natural GP5 N-glycan mutants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. Viral Immunol, 2006, 19: 294~304.
- [10] 万根, 许兰娇, 邓舜洲, 等. 高致病性 PRRSV NSP2 基因的扩增与分析 [J]. 江西农业大学学报, 2009, 31(4): 734~737.
- [11] ZHOU L, ZHONG J L, ZENG J W, et al. The 30-Amino-Acid deletion in the Nsp2 of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus emerging in China is not related to its virulence [J]. J Virol, 2009, 83 (10): 5156~5167.
- [12] 高志强, 郭鑫, 杨汉春, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒缺失变异株的基因组特征 [J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36 (6): 578~584.

（责任编辑：张梅）