

猪生殖和呼吸综合征中国分离株 ORF₅ 基因的克隆及序列分析

赵耘 刘尚高 陈博文 林志雄

(中国农业大学动物医学院) (广州动植物检疫局)

摘要 本研究利用对应于 PRRSV ATCC VR-2332 株及 LV 株 ORF₅ 基因保守序列的 1 对均为 25 个碱基的引物 1005PS、1006PR 对 PRRSV 中国分离株 B₁₃ 进行 RT-PCR, 扩增出了包括完整 ORF₅ 基因的 DNA 片段, 片段长约 730 bp。将此片段定向克隆入 pUC18 载体的 EcoR I 和 Pst I 位点之间, 获得了 B₁₃ ORF₅ 基因与 pUC18 载体的重组质粒。通过 EcoR I /Pst I、EcoR I /Hind III 及 PCR 方法证明此重组质粒为 B₁₃ ORF₅ 基因与 pUC18 载体的重组质粒。同时, 对此 ORF₅ 基因进行全序列测定, 并与 ATCC VR-2332 及 LV 序列做了比较。结果 B₁₃ ORF₅ 序列与 LV 的十分相似, 其核苷酸同源性达到 99.7%, 氨基酸序列完全相同, 而与 ATCC VR-2332 株则相差甚远, 其核苷酸和氨基酸同源性分别为 59.2% 和 56.0%。故而 B₁₃ 在基因结构上与 LV 较为接近。

关键词 猪生殖和呼吸综合症病毒; 中国分离株 B₁₃; ORF₅ 基因; 克隆; 序列测定
分类号 Q74

Molecular Cloning and Nucleotide Sequencing of the ORF₅ Gene of Chinese Isolates B₁₃ of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus

Zhao Yun Liu Shanggao Chen Bowen Lin Zhixiong
(College of Veterinary Medicine, CAU) (Guangzhou Animal and Plant Quarantine Bureau)

Abstract The viral genome RNA of Chinese isolate B₁₃ of PRRSV was amplified by RT-PCR using the primer pair 1005PS and 1006PR which are both 25bp in length, designed according to the conserved sequence of ORF₅ gene of ATCC VR-2332 and LV. A DNA fragment was amplified which contains completely ORF₅ gene and the size is about 730 bp and then the DNA fragment was cloned site-specifically into pUC18 vector between the EcoR I and Pst I cleavage sites, getting a recombinant plasmid of B₁₃ ORF₅ gene and pUC18 vector. Using the methods of digestion with EcoR I /Pst I, EcoR I /Hind III and PCR, the recombinant plasmid was identified as being recombined with B₁₃ ORF₅ gene and pUC18 vector. Meanwhile, the B₁₃ ORF₅ gene were sequenced, and its nucleotide and deduced amino acid sequence were compared with those of ATCC VR-2332 and LV. The result shows that B₁₃ is very similar to LV, and different widely from ATCC VR-2332 in ORF₅ nucleotide and amino acid sequence. The isogenesis of ORF₅ nucleotide are 99.7% and amino acid sequence are all

收稿日期: 1998-05-15

①赵耘, 北京圆明园西路 2 号中国农业大学(西校区), 100094

the same between B₁₃ and LV, and were 59.2%, 56.0% respectively between B₁₃ and ATVV VR-2332. Therefore, it is concluded that the Chinese isolates B₁₃ of PRRSV and LV may belong to the same genotypes.

Key words PRRSV; Chinese isolates B₁₃; ORF₅ gene; cloning; sequencing

猪生殖和呼吸综合征 (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 是危害世界养猪业的一种病毒性疾病, 其病原是猪生殖和呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)^[1]。PRRSV 是单股 RNA 病毒, 其基因组长 15 kb, 含有 8 个开放性阅读框, 其中 ORF₅ 编码糖基化的膜蛋白 (E)^[2]。现已发现, 在中和抗体出现后, 多克隆血清识别的主要蛋白为 E 蛋白^[3]。此外, 在 PRRSV 的 ORF₅ 内还存有数个与抗原性有关的高变区^[3]。故研究其序列有利于从分子水平上揭示 PRRSV 的变异基础和规律, 并对开发相应的基因工程疫苗有重要意义。

目前, 我国已发现存在 PRRS, 且已分离到 PRRSV, 并对其生物学特性及血清学特点作了一定的研究^[4~6], 但对其分子生物学方面的研究还未见报道。本研究旨在对 PRRSV 中国分离株 B₁₃ 株的 ORF₅ 基因进行克隆及序列测定, 以为国内 PRRSV 分子流行病学研究提供依据, 并为进一步表达 PRRSV B₁₃ 株 ORF₅ 基因奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

PRRS 病毒中国分离株 B₁₃ 株由大连动植物检疫局馈赠; HS₂H 细胞由美国明尼苏达大学 Dr. Han. Soo. Joo 馈赠; 用于做感受态细胞的 DH_{5α} 菌种及 pUC18 质粒载体由广东省农科院兽医研究所宋长绪博士馈赠。

1.2 方法

1.2.1 病毒的增殖 将 B₁₃ 株接种 HS₂H 细胞上, 营养液为含 10% 犊牛血清、1% 谷氨酰胺和 0.15% NaHCO₃ 的 MEM, 37℃ 培养 48~72 h, 细胞出现 70%~80% CPE 时, 收毒。-20℃ 保存。

1.2.2 病毒的纯化 参照 Madassi^[7] 的方法进行。取 -20℃ 保存的病毒液, 反复冻融 3 次, 5 000×g 4℃ 30 min, 收集上清, 铺加于 30% 蔗糖垫上 100 000×g 4℃ 2 h, 弃上清, 沉淀用无 RNA 酶水悬浮, 100 000×g 4℃ 2 h, 弃上清, 沉淀用无 RNA 酶水悬浮, -20℃ 保存。

1.2.3 病毒 RNA 的提取 用 Promega 公司的总 RNA 提取试剂盒, 反应按其说明书进行。

1.2.4 引物的设计与合成 参照已发表的 ATCC VR-2332 和 LV 的 ORF₅ 基因上下游保守区段序列设计出了一对 25 bp 的引物。引物的代号及序列如下:

1005PS: 5' GCGAATTCGCGATTCTGTTGGCAAT 3';

1006PR: 5' TTCTGCAGCCTTTAGGGCATATATC 3'。

引物的位置及所扩增的片段的长度见表 1, 1005PS 和 1006PR 两引物间包括完整的 ORF₅ 基因。两引物 5' 端分别引入 EcoR I (5'GAATTC3') 和 Pst I (5'CTGCAG3') 酶切位点, 且在酶切位点外侧加有保护碱基。引物的合成由上海 Sagon 生物工程公司合成。

1.2.5 RT-PCR 反应 用宝灵曼公司的单管 RT-PCR 试剂盒, 反应按其说明书进行。

表 1 1005PS,1006PR 位置及所扩增片段的长度

引物	毒株 LV		毒株 ATCCVR-2332	
	位置	扩增片段长度(bp)*	位置	扩增片段长度(bp)*
1005PS	13 467~13 493	728	1 769~1 795	739
1006PR	14 163~14 179		2 476~2 492	

* 扩增片段长度包括酶切位点及保护碱基。

1.2.6 PCR 产物的克隆 将 PCR 产物纯化后用 EcoR I、Pst I 酶部分消化,与用 EcoR I、Pst I 酶完全消化且用碱性磷酸酶处理的 pUC18 质粒连接,转化大肠杆菌 DH_{5α},在含有 Amp、x-gal 及 IPTG 的 LB 固体培养基上培养,挑取白色菌落,利用质粒快速提取法^[8],进行重组质粒的初筛。

1.2.7 重组质粒的酶切鉴定 将初筛确定为阳性的重组质粒的 DNA 用 EcoR I-Hind III, EcoR I-Pst I 双酶切,电泳,并设定载体 DNA(未重组质粒 DNA)和 PCR 产物对照。

1.2.8 重组质粒的 PCR 鉴定 将初筛及酶切鉴定为阳性的重组质粒的 DNA 作为模板,进行 PCR 扩增。反应体系为:10×buffer 5 μL, MgCl₂ 25 mmol·L⁻¹ 5 μL, dNTP 2.5 mmol·L⁻¹ Mix 4 μL, 50 μmol·L⁻¹ 的上下游引物各 1 μL,模板 DNA 2 μL, 2 U·μL⁻¹ Taq 酶 2 μL,用无离子水将终体积调至 50 μL,混匀,于 PE 公司的 2400 PCR 仪扩增。扩增条件为:94 C 5 min; 94 C 1 min, 50 C 45 s, 72 C 1 min,共进行 30 个循环,最后 72 C 延伸 10 min,用 1.5% 琼脂糖凝胶分析 PCR 产物,同时设置空载体 DNA(未重组 pUC18 质粒 DNA),无模板阴性对照各 1 管,RT-PCR 产物阳性对照 1 管。

1.2.9 测序及其序列分析 在加拿大真达公司的帮助下,从 2 个方向读取 PRRSV B₁₃ 株 ORF₅ 基因的全序列,分析并推导出氨基酸序列,与已发表的 ATCC VR-2332 和 LV 株 ORF₅ 基因及其氨基酸序列作比较。

2 结果

2.1 引物设计与目的基因的获取

经过分析,引物 1005PS 和 1006PR 内均无连续 4 个以上碱基构成反向互补配对序列,二者 3' 端也无同源性,不会形成引物二聚体。利用这对引物对 PRRSV B₁₃ 株进行 RT-PCR 反应得到标准分子量的 DNA 片段电泳结果(图 1),绘制标准曲线,求出扩增片段约为 730 bp,与预期的吻合。

2.2 重组子酶切鉴定及 PCR 鉴定

在克隆之前,用引物引入的限制性内切酶对 PCR 产物进行预酶切,结果发现在该片段存在 2 个 Pst I 的酶切位点,因而克隆时用 EcoR I、Pst I 双切 PCR 产物采用部分酶切,使克隆仍能在不更换限制内切酶情况下完成。筛选出的重组质粒命名为 pUC18B₁₃ORF₅108。因 PCR 产物中含有 Pst I 位点,故而 EcoR I-Pst I 双切重组质粒,产生 1 条约 2.7 kb 的大片段

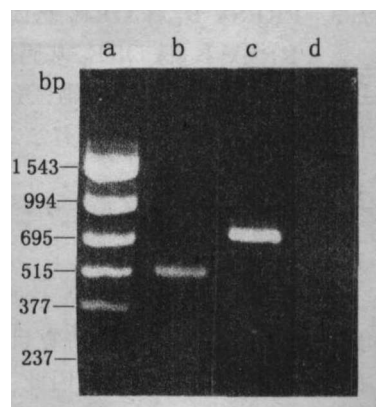


图 1 PRRSV B₁₃ 的 RT-PCR 结果

a: 标准分子量 b: ORF₇
c: ORF₅ d: 空白对照

和数条 200~300 bp 的小片段。同时,又选用质粒载体多克隆酶切位点 Pst I 外侧的 Hind III 与 EcoR I 双切重组质粒 DNA,结果产生 1 条约 730 bp 的小片段和 1 条 2.7 kb 的大片段,他们分别与目的基因以及载体质粒大小一致(图 2)。用引物 1005PS、1006PR 对重组质粒进行 PCR,得到唯一 1 条约为 730 bp 的片段(图 3)。以上结果表明 PRRSV B₁₃ 株 ORF₅ 基因已正确插入载体质粒 pUC18 用 EcoR I 和 Pst I 切开的窗口中。

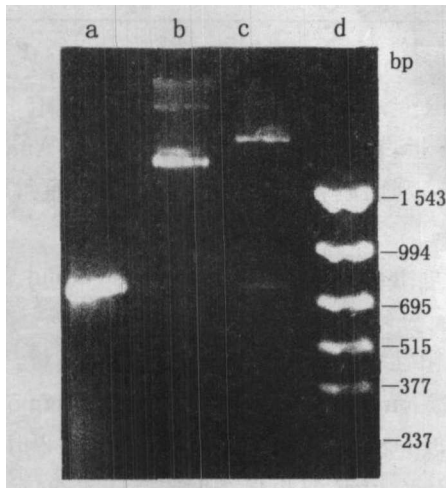


图 2 pUC18 B₁₃ORF₅108 的
EcoR I /Hind III 酶切结果

a: RT-PCR 产物阳性对照; b: 未重组 pUC18 质粒 DNA (未切开); c: pUC18 B₁₃ ORF₅108/ EcoR I /Hind III
d: 标准分子量

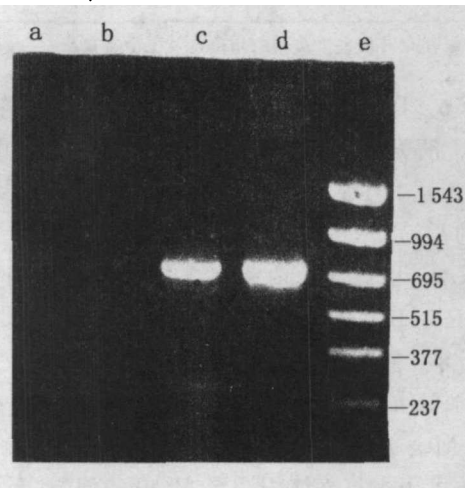


图 3 pUC18 B₁₃
ORF₅108 的 PCR 结果

a: 空白对照; b: pUC18 对照; c: RT-PCR
产物阳性对照; d: pUC18 B₁₃ ORF₅108;
e: 标准分子量

2.3 PRRSV B₁₃ 株 ORF₅ 基因序列测定及与 ATCC VR-2332, LV 序列的比较

PRRSV B₁₃ 株 ORF₅ 基因序列及氨基酸序列见图 4。结果表明获得了 PRRSV 中国分离株 B₁₃ ORF₅ 基因的完整编码区,与已报道的 LV 序列比较,在 603 个碱基组成的 ORF₅ 基因中,仅在第 58 位和第 407 位有 2 个同义突变的碱基变异(G→T, G→A),而氨基酸序列完全相同。

3 讨论

3.1 引物设计

PRRSV 是单股 RNA 病毒,易发生变异,尤其 ORF₅ 内具有数个高频突变的位点^[9],所以设计引物时要根据不同的研究目的有所侧重。本研究目的在于调取完整的 ORF₅ 基因,另外还要便于以后该基因的表达。因此上游引物开始于起始密码子之前,下游引物则终止于终止密码子之后。另外,引物上附加的限制性内切酶酶切序列的选择要慎重,最好是在克隆前做预酶切。

3.2 测序及分析

据文献报道,PRRSV 的 2 个基因型(欧洲型 LV 和美洲型 VR-2332)在临床上引起的症状极为相似,但其核苷酸序列及氨基酸序列却有着相当大的差异。本研究首次报道了 PRRSV 中国分离株 ORF₅ 基因的全序列,并与标准毒株 ATCC VR-2332 和 LV 的 ORF₅ 序列作了比较。测序结果表明 PRRSV B₁₃ 株 ORF₅ 基因共包括 603 个碱基。A, T, G 和 C 四个碱基的分布:

(1) 1	ATGAGATGTT	CTCACAAATT	GGGGCGTTTC	TTGACTCCGC	ACTCTTGCTT	(L)
	-----GA	AATG-TTGAC	C-C-G-C-GT	-GCT-G-GAR	TGCT--CT--	(B)
						(V)
51	CTGGTGGCTT	TTTTTGCTGT	GTACCGGCTT	GTCCTGGTCC	TTTGCCGATG	(L)
	-----T--					(B)
	G-----TA-C	G-GCC-T-C-	--TTT-CTG-	-000000CT-	GCCAA--CCA	(V)
101	GCAACGGCGA	CAGCTCGACA	TACCAATACA	TATATAACTT	GACGATATGC	(L)
	-----A-AG	-----CAT	CTA--GCTG-	-T--C-----	---C----T	(B)
						(V)
151	GAGCTGAATG	GGACCGACTG	GTTGTCCAGC	CATTTTGGTT	GGGCAGTCGA	(L)
	-----	-.C-.A-.T-	-.C-AG-T-A-	A-A-----A-	-----G-	(B)
						(V)
201	GACCTTTGTG	CTTTACCCGG	TGCCACTCA	TATCCTCTCA	CTGGGTTTTT	(L)
	---GT-----C	A-C-TT-C-	--TTG-----	C--TG---C	TAT--GCC-	(B)
						(V)
251	TCACAACAAG	CCATTTTTTT	GACGCGCTCG	GTCTCGGCGC	TGTATCCACT	(L)
	---T-C--	-----CC--	---A-AG-G-	C-T-A-T-A-	---G--T--C	(B)
						(V)
301	TCACAACAAG	CCATTTTTTT	GACGCGCTCG	GTCTCGGCGC	TGTATCCACT	(L)
	---T-C--	-----CC--	---A-AG-G-	C-T-A-T-A-	---G--T--C	(B)
						(V)
351	TGCTTTCGCA	GCGTTCGTAT	GTTTTGTCAT	CCGTGCTGCT	AAAAATTGCA	(L)
	GTGCC-G--T	----GACT-	-C--C-----	TA--TT-----	--G-----	(B)
						(V)
401	TGGCCTGCCG	CTATGCCCGT	ACCCGGTTTA	CCAACTTCAT	TGTGGACGAC	(L)
	---T-----G--	---C-GT--	---A-A-A--	-----TC-	-C-----ACT	(B)
						(V)
451	CGGGGGAGAG	TTCATCGATG	GAAGTCTCCA	ATAGTGGTAG	AAAAATTGGG	(L)
	AA---C---C	-CT---T--	-CG---G--T	G-CA-CA---	-G---AG---	(B)
						(V)
501	CAAAGCCGAA	GTCGATGGCA	ACCTCGTCAC	CATCAAACAT	GTCGTCCTCG	(L)
	----TT--G	----A--TC	-T--GA--TA	-C-----AGA	--T--G--T-	(B)
						(V)
551	AAGGGGTAA	AGCTCAACCC	TTGACGAGGA	CTTCGGCTGA	GCAATGGGAG	(L)
	-T-TTTCCGT	G--AACC--T	A-A-TC--AG	T--A--G--	A-----T	(B)
						(V)
601	GCCOOO					(L)
	---OOO					(B)
	CTTCCT					(V)
(2) 1	MRCSHKLGRF	LTPHSCFWWL	FLLCTGLSWS	FADGNDSST		(L)
	-----LEKCLTAGC	CSRLLSL-CI	VPF-FAVOOL	ANAS-DS--H		(B)
						(V)
41	YQYIYNLTIC	ELNGTDWLSS	HFGWAVETFV	LVPVATHILS		(L)
	LPL-----L-	-----AN	K-D----S--	IF--L---V-		(B)
						(V)
81	LGFLTTSHFF	DALGLGAVST	AGFVGGRYVL	CSVYGACAFA		(L)
	Y-A-----L	-TVA-VT---	-----H---	S-I-AV--L-		(B)
						(V)
121	AFVCFVIRAA	KNCMACRYAR	TRFTNFIVDD	RGRVHRWKSP		(L)
	-LT-----F	---SW---C	-----LL-T	K--LY--R--		(B)
						(V)
161	IVIEKRKQVE	VDGNLVTIKH	VVLEGVKAQP	LTRTSAEQWE		(L)
	VI-----	-E-H-I---R	---DSV-T-	1--V-----S		(B)
						(V)
201	AO					
	AO					
	RP					

图 4 PRRSV B₁₃株 ORF₅ 基因的核苷酸序列(1)和氨基酸序列(2)及其与 LV 株(L)、VR-2332 株(V)的同源性比较

B: B₁₃; L: LV; V: VR-2332; --, 同源; 0, 缺失

A 为 20.1%(121/603)、T 为 28.2%(170/603)、G 为 26.5%(160/603)、C 为 25.2%(152/603)。对该基因进行限制性内切酶位点分析,结果发现除第 299~304 位、第 330~335 位有 2 个 Pst I 位点外,无 EcoR I、BamH I、Hind III、Sac I 等常用酶的识别序列。因此克隆 ORF₅ 基因时,可以从这些酶中选择克隆用酶。根据基因核苷酸序列推断,B₁₃ ORF₅ 氨基酸序列由 201 个氨基酸组成,其编码蛋白的分子量约为 22.4 kD,在 Met 之后带有一段信号肽序列,其切割位点位于第 32~33 位氨基酸。另外在其第 47 位及 54 位各有 2 个糖基化位点。这与特点均与所报道的 LV 序列一致^[10]。

与 ATCC VR-2332、LV 序列同源性比较结果表明,PRRSV B₁₃ 株 ORF₅ 基因核苷酸序列与 LV 的序列非常相似,仅有 2 个核苷酸不一样,且属于同义突变,核苷酸同源性达 99.7%,氨基酸序列则完全相同。而与 ATCC VR-2332 ORF₅ 序列相比则差异较大,核苷酸同源性为 59.2%,氨基酸同源性为 56.0%。

通过以上的分析,此序列即为 PRRSV B₁₃ ORF₅ 基因序列,且其在基因结构上与 LV 较为接近。这说明在我国 PRRS 的流行中可能存在着欧洲亚型的 PRRSV。

参 考 文 献

- 1 Sagar S M. Porcine reproductive and respiratory syndrome. *J Vet Diag Invest*, 1993, 5: 656~664
- 2 Conzelmann K K, Visser N, Thiel H J, et al. Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the arterivirus group. *Virology*, 1993, 193: 329~339
- 3 Yoon K H, Zimmerman J J, Swenson S L, et al. Characterization of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection. *J Vet Diag Invest*, 1995, 7: 305~312
- 4 郭宝清,陈章水,刘文兴等. 从疑似 PRRS 流产胎儿分离猪生殖和呼吸综合征病毒(PRRSV)的研究. *中国畜禽传染病*, 1996, (2): 1~5
- 5 姜平,简中友,马志永等. 猪生殖和呼吸综合征病毒分离与鉴定. *南京农业大学学报*, 1997, 20(3): 82~86
- 6 孙颖杰,孙延峰,潘凤城等. 猪生殖和呼吸综合征的检测和诊断. *中国兽医杂志*, 1997, 23(2): 8~9
- 7 Madassi H, Mounir S, Dea S. Identification of major difference in the nucleocapsid protein genes of a Quebec strain and European strains of Journal of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol*, 1994, 75: 681~685
- 8 彭秀玲,袁汉英. 分子生物学试验技术. 长沙:湖南科技出版社,1987
- 9 Meng X J, Paul P S, Halbur P G, et al. Sequence comparison of open reading frames 3 to 5 of low and high virulence United States isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol*, 1995, 76: 3181~3188
- 10 Meulenberg J J M, Den Besten A, De Kluyver E P, et al. Characterization of protein encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus. *Virology*, 1995, 206: 155~163