

猪繁殖与呼吸综合征病毒宁夏地区地方株的分离与鉴定

赵娜, 赵晓瑞* (宁夏农业学校, 宁夏银川 750021)

摘要 [目的]弄清宁夏地区部分猪场出现“无名高热”病因及更加有效预防、控制此类疾病的发生。[方法]通过从宁夏某发病猪场采集产生典型病变的猪肺部组织,将病料处理后分别用 Marc-145、PK-15、BHK-21 等传代细胞系进行病毒的分离与鉴定。[结果]只有 Marc-145 细胞上有典型病变,连续传代 3 次后病变稳定,接毒 48~72 h 后病变率达 70% 左右。RT-PCR 及双酶切的结果表明分离培养物为猪繁殖与呼吸综合征病毒毒株。通过 RNA 提取、RT-PCR 及酶切反应,实现了对分离培养物快速、确切鉴定。[结论]用 MARC-145 细胞成功分离到 1 株 PRRSV,命名为 ZH-w 株。

关键词 猪繁殖与呼吸综合征病毒;宁夏;分离;鉴定

中图分类号 S852.65⁺1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)24-09994-03

Isolation and Identification of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Strain from Ningxia Area

ZHAO Na et al (Ningxia Agricultural School, Yinchuan, Ningxia 750021)

Abstract [Objective] The research aimed to understand the causes of unknown fever in some pig farms of Ningxia area and effectively prevent and control the occurrence of this disease. [Method] The typical lung tissues of diseased pigs were collected from some pig farm of Ningxia. And the collected samples were treated with Marc-145, PK-15 and BHK-21 and other continuous cell lines to make the virus isolation and identification. [Result] Only Marc-145 cell lines showed clear CPE. And it was stable after 3 passages of virus and the disease rate reached 70% after 48-72 h. The results of RT-PCR and double enzyme digestion showed the isolated strain was a strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. The isolated strains were rapidly and accurately identified by RNA extraction, RT-PCR and double enzyme digestion. [Conclusion] A strain of PRRSV was successfully separated and named as ZH-w.

Key words Porcine reproductive and respiratory syndrome virus; Ningxia; Isolation; Identification

猪繁殖与呼吸综合征(Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)由猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)引起,也称为蓝耳病,主要表现为妊娠母猪早期流产、死胎、木乃伊胎及产弱仔等繁殖障碍以及各年龄猪发生呼吸道症状和仔猪死亡率、感染猪出现免疫抑制等现象^[1-2]。该病最早于 1987 年在美国南部报道,随后 1990 年欧洲等国也证实该病的发生^[1,3],我国于 1996 年由郭宝清等分离到 PRRS 的病毒^[4]。以后全国大部分省市均有该病的报道,进一步证实该病已在我国流行和蔓延,成为我国猪病中的重要疾病之一。

猪繁殖与呼吸综合征临床症状为食欲减退、发热、呼吸困难。怀孕母猪有流产、早产现象,仔猪出生后几小时内迅速死亡,母猪伴发肺水肿、膀胱炎、肾炎等现象^[5]。

PRRSV 属于动脉炎病毒科,为 1 种有囊膜的单股正链 RNA 病毒,基因组全长约 15 kb,含有 9 个开放阅读框^[6],可编码 6 种结构蛋白和 2 种非结构蛋白,其中由 ORF3 编码的 GP3 蛋白是 PRRSV 的次要结构蛋白,在各毒株间保守性最差^[7],由 ORF5 基因编码病毒的糖基化包膜蛋白(E 蛋白)是主要的结构蛋白,参与细胞免疫与体液免疫,刺激机体产生中和抗体^[8]。

近年来宁夏地区部分猪场出现与南方“无名高热”病相同的临床特征,为弄清其病因及更加有效地预防、控制此类疾病的发生,根据农业部制定的蓝耳病的诊断方法,通过临床症状观察和病理剖检分析,同时采用细胞分离培养和 RT-PCR 等

方法鉴定,成功地分离了 1 株 PRRSV,命名为 ZH-w 株。

1 材料与方法

1.1 仪器 PCR 仪,购自 DNAEngine Peltier Thermal Cycler BIO-RAD 公司;电热恒温培养箱,DNP-9272 型,购自上海精宏实验设备有限公司;超净工作台,购自苏净集团安泰公司;紫外凝胶成像仪(SYNGENE),购自 A DIVISION OF SYNOPTICS LTD;高速低温离心机,购自 Centrifuge 5417R Eppendorf 公司;室温离心机,购自 Centrifuge 5415D Eppendorf 公司;电泳仪,购自北京六一仪器厂。

1.2 试剂 胰酶、氨苄青霉素、链霉素,均购自鼎国(北京)生物技术公司;MEM 培养基、RPMI-1640 培养基,购自广州英伟创津公司;两性霉素液体,250 U/ml 为 Gibco 产品。

DNA 胶回收纯化试剂盒和小量质粒提取试剂盒,均购自大连宝生物工程有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.3 细胞和菌株 Marc-145 细胞由宁夏农林科学院草畜研究中心惠赠;PK15、BHK-21 细胞由宁夏医科大学实验动物中心惠赠。JM109 菌种及 PMD18-T 载体,均购自大连宝生物工程有限公司。

1.4 病料采集与剖检 病料采自宁夏地区且具有典型猪无名高热病症的猪场。无菌采集发病猪血液、脾脏、肺脏、淋巴结,及时处理。具体方法如下:血液离心后收集血清,无菌分装成至少 3 等份,每份不少于 0.5 ml,编号后于 -70℃ 保存备用;实质脏器剪碎研磨后,用 PBS 稀释,取 1 ml,研磨液用 5 ml 无血清培养基稀释成 1:5 的悬液,加入 0.5% 双抗及 0.4% 两性霉素,3 000 r/min 离心 10 min,取上清用 0.45 μm 微孔滤器除菌,同上分装,编号后于 -70℃ 下保存备用。

1.5 组织病料的细胞传代 ①取生长良好的处于亚融合状态的单层 Marc-145、PK15、BHK-21 细胞;②弃去细胞培养液,将 1 ml“1.4”中所制备的液体接种于 Marc-145、

基金项目 2012 年宁夏农校校级科研项目(NX12005)。

作者简介 赵娜(1982-),女,河北石家庄人,助教,硕士,从事分子病毒学方面的教学研究,E-mail:zhaona19822002@163.com。
*通讯作者,教授,硕士,从事畜禽生产与疾病防治工作,E-mail:rein505507@163.com

收稿日期 2013-07-15

PK15、BHK-21 细胞;③37 °C 吸附 1 h,然后补足维持液(含 5% 的 DMEM 培养基)于 37 °C 50 ml/L CO₂ 培养箱中培养;④培养箱中培养观察 5~7 d。若没有病变,则收集培养物进行盲传;⑤当传至第 3 代时观察到明显的细胞病变,待细胞病变达到 70% 左右的时候收集病毒并保存于 -70 °C 冰箱;没有细胞病变的细胞进行摇晃,收集细胞液体,同样方法保存。

1.6 引物设计 参考 GenBank 中登录的 PRRSV 全序列(CH-1a, AY032626)设计包含完整 ORF3、ORF5 序列的引物,为了便于基因的克隆及构建表达载体等后续工作,在上、下游引物的 5' 端分别添加 *Bam*HI、*Hind*III 和 *Eco*RI 酶切位点(引物中划线部分)。其中, P3F、P3R 为 ORF3 引物, P5F、P5R 为 ORF5 引物。通用引物 M13F/M13R 参照 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统设计,引物均由大连宝生物工程有限公司合成。引物序列为: P3F: 5'-CGGGATCCATGCCTAATAGCGGTACA-3' (*Bam*HI 酶切位点); P3R: 5'-CCAAGCTTC-TATCGCCGTGCGGCACT-3' (*Hind* III 酶切位点)。P5F: 5'-CGGGATCCGTGTTGGCAAATGCCTGACC-3' (*Bam*HI 酶切位点); P5R: 5'-CGGAATTCCTAGACACGACGCCATTGT-3' (*Eco*RI 酶切位点)。通用引物序列为 M13F: 5'-GTTTTC-CCAGTCAACGAC-3'; M13R: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'。

1.7 PRRSV 基因组 RNA 的提取 将病毒培养物反复冻融 3 次,取病毒液 250 μl 加入 750 μl Trizol 试剂,混合后静置几分钟,然后加入氯仿 200 μl 充分混匀,12 000 r/min 离心 5 min。取上清加入 500 μl 异丙醇,室温静置 15~30 min,经 12 000 r/min 离心 15 min,然后将沉淀用 75% 乙醇洗涤,风干,再加入 DEPC 水 35 μl,于 -70 °C 下保存。

1.8 ORF5 基因的 RT-PCR 扩增、克隆及测序 将提取的 RNA 作为模板,用特异性的下游引物 P3R、P5R 进行反转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板,扩增 ORF5 基因。ORF3 基因扩增条件为:94 °C 5 min;94 °C 50 s,60 °C 40 s,72 °C 1 min,共 30 个循环;72 °C 延伸 10 min。ORF5 基因扩增条件:94 °C 5 min;94 °C 50 s,55 °C 40 s,72 °C 延伸 10 min,共 30 个循环;

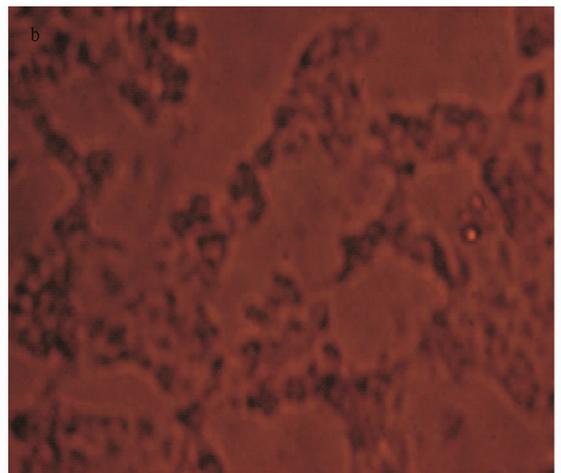
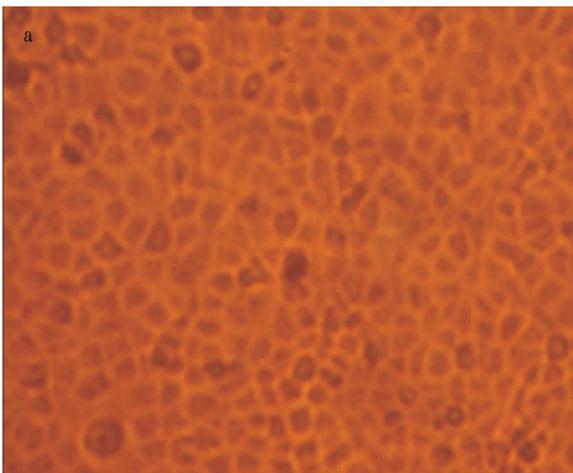
72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳,按照胶回收试剂盒说明回收 ORF3 和 ORF5 目的基因片段,分别与 pMD18-T 载体连接后,转化工程菌 JM109 感受态细胞,通过蓝白斑筛选挑取单菌落,接种到含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37 °C 振荡培养过夜直至液体混浊,用质粒(小量)提取试剂盒提取质粒,并分别进行酶切鉴定。取 1 ml 经酶切鉴定为阳性的重组质粒菌液送交大连宝生物工程有限公司测序。

2 结果与分析

2.1 临床症状 发病猪群表现为:发热、体温 41 °C 以上,厌食或不食;耳部、口鼻部、后躯及股内侧皮肤发红、淤血、出血斑、丘疹;咳嗽、喘气等呼吸道症状;后躯无力、不能站立或摇摆、圆圈运动、抽搐等神经症状;部分发病猪呈顽固性腹泻。发病猪不分年龄段均出现急性死亡;仔猪出现高发病率和高死亡率,发病率可达 100%,死亡率可达 50% 以上,母猪流产率可达 30% 以上。

2.2 病理剖检 肉眼主要见肺出血、淤血以及以心叶、尖叶为主的灶性暗红色实变;扁桃体出血、化脓;脑出血、淤血、软化灶及胶冻样物质渗出;心衰、心肌出血、坏死;脾、淋巴结新鲜或陈旧性出血、梗死;肾表面和切面部分可见出血点、出血斑等;部分猪肝可见黄白色坏死灶或出血灶;肾表面凹凸不平;肠出血等。由于该病毒可以引起免疫抑制临床上容易出现其他病原体的继发感染或混合感染,使病理变化更加严重。

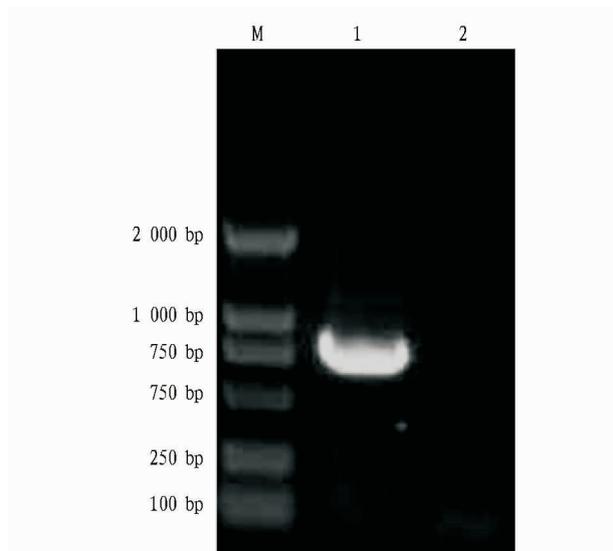
2.5 病料组织细胞传代分离结果 对所处理的病料分别接种 Marc-145、PK15、BHK-21 单层细胞,进行病毒分离培养,结果表明该病料在 PK15、BHK-21 单层细胞上盲传 5 代均未出现病变。病毒接种于 Marc-145 细胞第 1、2 代已出现少量细胞堆积,折光性增强。当传代至第 3 代时,培养至 72~96 h 时细胞明显膨大、细胞出现折光性增强、继而堆积变圆脱落。传代至第 7 代时,CPE(细胞病变效应)表现趋于稳定,接毒后 36~48 h 开始出现病变,72~96 h CPE 达到 70% (图 1)。



注:a. 正常 Marc-145 细胞;b. 病变 Marc-145 细胞。

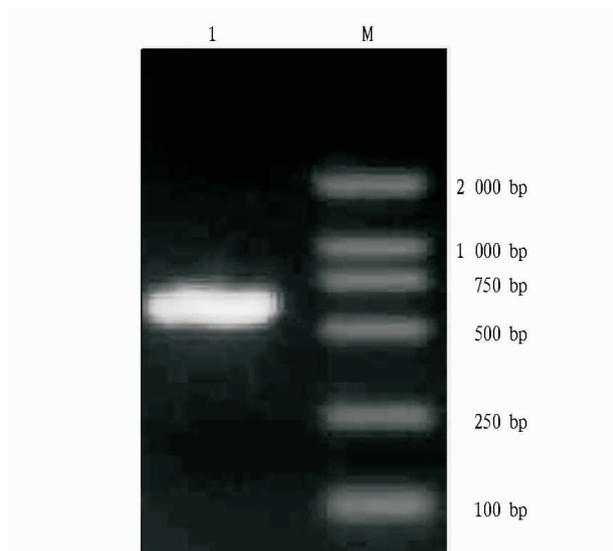
图 1 病料组织细胞的传代分离结果

2.6 细胞毒 RT-PCR 结果 提取细胞毒液 RNA 后,反转录得到 cDNA,PCR 扩增 ORF3 基因得到约 765 bp,扩增 ORF5 基因得到约 603 bp 的目的条带(图 2~3)



注:M. DL-2000 Marker;1. ORF3 的扩增结果;2. 阴性对照。

图 2 ORF3 基因 RT-PCR 产物的扩增结果



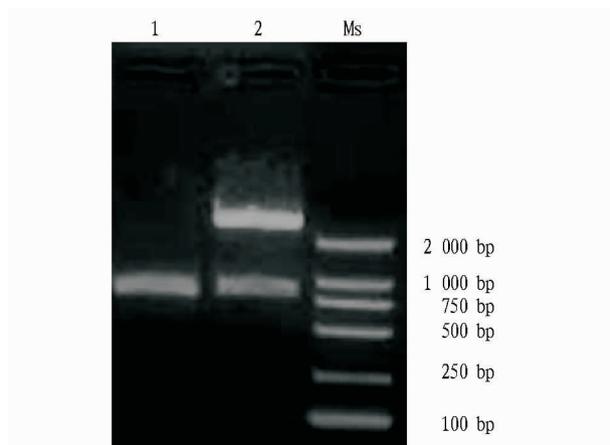
注:M. DL-2000 Marker;1. ORF5 的扩增结果。

图 3 ORF5 基因 RT-PCR 产物扩增结果

2.7 ORF3 和 ORF5 基因克隆 将凝胶纯化的 ORF3、ORF5 DNA 片段分别与 PMD18-T 载体 16 ℃ 连接 12 h 后,转化 JM109,挑取白色单个菌落制备质粒,用 *Bam*HI、*Hind*III 双酶切 T-ORF3,1 条与 ORF3 扩增带大小一致,另 1 条约 2.7 kb 大小,为 pMD18-T 载体带;用 *Bam*HI、*Eco*RI 双酶切 T-ORF5,1 条与 ORF5 扩增带大小一致,另 1 条约 2.7 kb 大小,为 pMD18-T 载体带(图 4~5)。

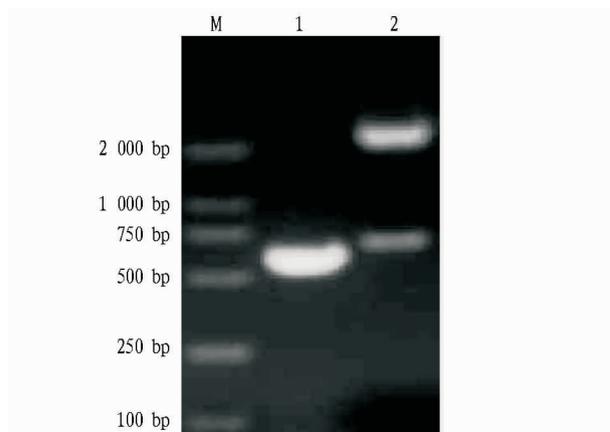
3 讨论

PRRSV 的广泛流行给我国各地区的养猪业及食品卫生产业带来严重的危害。虽然目前还未见 PRRSV 感染人的报道,但作为一种变异性较强的病毒,PRRSV 经过重组变异后传染给人类的可能性尚不能完全排除。PRRSV 引起了国内



注:M. DL-2000 Marker;1. T-ORF3 的扩增结果;2. T-ORF3 被 *Bam*H + *Hind*III 酶切的结果。

图 4 重组克隆载体 T-ORF3 的 PCR 和酶切鉴定



注:M. DL-2000 Marker;1. T-ORF5 的扩增结果;2. T-ORF5 被 *Bam*H + *Eco*RI 酶切的结果。

图 5 重组克隆载体 T-ORF5 的 PCR 和酶切鉴定

外动物医学及卫生学界的专家学者的广泛重视,所以加强对该病毒的基础研究十分重要。

病毒的分离与鉴定是诊断 PRRS 最确切的方法,也是进行病毒分子特性、致病机理研究、疫苗的设计研发和疾病预防控制的关键和基础。自 20 世纪 80 年代发生以来,各国都获得了大量 PRRSV 毒株,虽然其基因序列都有所差异,但仍以欧洲型和美洲型为主。我国除 B13 株属于欧洲型以外,其他大多数分离株在遗传学上与美洲型相距较近^[9]。笔者从宁夏某发病猪场分离的 ZH-w 毒株也属于美洲型。该研究丰富了宁夏地区流行病学数据库,也为 PRRSV 在宁夏的流行变异规律提供参考依据。

PRRSV 在肺脏的滴度较高,所以该试验以病猪的肺脏为材料。PRRSV 对宿主要求严格,常用于培养病毒的原代和传代细胞中均不能生长。只有在 PAMs(猪原代肺泡巨噬细胞)、CL2621、MA104 及其克隆株 Marc-145 等细胞上可以正常生长^[10-11]。由于 PAMs 培养操作较困难,并且极易污染,所以采用 Marc-145、PK-15、BHK-21 等传代细胞系对 PRRSV 病毒进行分离,结果只在 Marc-145 细胞上有典型病

(下转第 10006 页)

的发病率为 82%,本地犬则为 18%。品种与发病率有很大的关系。一般而言,纯种犬发病率高于本地犬。

表 2 犬免疫状况与发病的关系

年免疫次数//次	病犬数//只	发病率//%
0	72	82.0
1	12	13.3
2	4	4.7

表 3 犬品种与发病率的关系

品种	病犬数//只	发病率//%
纯种犬	72	82
本地犬	16	18

2.4 犬的年龄与发病的关系 从表 4 可以看出,1~2 月龄犬发病率最高,达 67.25%;2 岁以上犬发病率最低,仅 3.51%。犬年龄越大,其对犬细小病毒病的抵抗力越强;年龄越小,发病率越高。

表 4 各年龄段犬的发病情况

发病时间	病犬数	发病率//%
1~2 月龄	59	67.25
4~12 月龄	18	20.70
1~2 岁	8	8.54
2 岁以上	5	3.51

3 讨论

3.1 犬细小病毒病的感染情况 此次调查结果表明该地区犬细小病毒总体感染率为 45% 以上,这与国内其他省市的调查结果存在一定差异。在广州、成都、上海等地区犬细小病毒的感染率都在 48% 以上。这可能是菏泽地区大部分养犬户在农村,而且大多以土种家犬为主。农户普遍缺乏防病治

(上接第 9996 页)

变。Marc-145 细胞培养操作简单同时对 PRRSV 有较高的敏感性。经过试验总结适宜病毒分离的条件。①细胞浓度应低,待细胞 72 h 后生长至亚融合状态时接种病毒;②病毒对 pH 敏感,pH(5.5~7.0)是病毒较适合的生长环境;③病毒在 Marc-145 细胞上产生 CPE 相对缓慢,一般需要 4~5 d;④PRRSV 是有囊膜病毒,因此相对比较脆弱,在保存和传代时应避免反复冻融。

在进行病毒分离的同时,对细胞培养分离的病毒也可用 PCR 法作遗传基因鉴定,从而使结果更为可靠^[12]。在该试验中在细胞出现典型的 CPE 后,便取其感染物从中提取病毒 RNA 进行 RT-PCR,实现了对所获得分离培养物进行快速、准确鉴定。经 RT-PCR 扩增及双酶切的结果表明分离培养物为猪繁殖与呼吸综合征病毒。

笔者成功从宁夏某发病猪场采集临床症状,病理剖检具有典型特征的病猪的肺部组织,用 MARC-145 细胞成功分离到 1 株毒株,经 RT-PCR 进一步证实所分离到的为猪繁殖与呼吸综合征毒株,命名为 ZH-w。

参考文献

[1] WENSVOORT G,TEPSTRA C,POL J M A,et al. Mystery swine disease in

病意识,仅有少数畜主将病犬带至兽医门诊就诊,这是此次调查结果偏低的主要原因。另外,农村地域广阔,养犬相对分散,大部分是每家养 1~2 只犬用于看家护院,规模化的养犬基地较少,这些因素抑制了该病的传播和流行。

3.2 犬细小病毒病的发病原因

3.2.1 犬细小病毒病发病与免疫状态的关系。犬细小病毒病发病与免疫状态有直接关系,未免疫犬的发病率占总发病犬的 81.6%。此外,免疫次数也影响发病率,每年免疫 2 次与免疫 1 次的发病率分别为 12.7% 和 5.7%,发病率明显降低。

3.2.2 犬的年龄、品种与发病的关系。犬发生细小病毒病主要集中在 1~3 月龄幼犬。此阶段的幼犬刚刚断奶,处在免疫空白期,疫苗免疫尚未产生足够多的抗体,所以发病率最高。2 岁以上的成年犬发病率低,主要是成年犬有一定的抵抗力。犬细小病毒的发病与品种有一定关系,纯种犬的感染率最高,占 62.85%;而土种犬感染最少,占 11.99%,主要是与纯种犬的易感性高有关。

3.2.3 季节性与发病的关系。温差变化大的季节,犬细小病毒病的发生率显著升高。秋末春初季节发病率最高,夏季光照充足,温度较高。犬细小病毒病的发病率降低。

参考文献

- [1] HIRAYAMA J,ABE H,IKEBUEHI K,et al. Virus intivation in superoxide dismutase preparations by ultraviolet light irradiation[J]. Biol Pharm Bull, 1998,21(6):621-623.
- [2] 侯加法. 小动物疾病学[M]. 北京:中国农业出版社,2002.
- [3] 陈溥言. 兽医传染病学[M]. 北京:中国农业出版社,2006.
- [4] 马国红. 犬细小病毒病的诊治[J]. 河北畜牧兽医,2002,18(4):38.
- [5] 张成图,杨桂梅. 藏獒犬细小病毒的流行病学调查及防治[J]. 防检技术,2010,27(11):50-51.
- [6] the Netherlands;the isolation of Lelystad virus[J]. Vet Q,1991,13(3):121-130.
- [7] SNIJDER E J,MEULENBERG J M. The molecular biology of arteriviruses[J]. J Gen Virol,1998,27(1):4684-4691.
- [8] MENGELING W L,LAGER K M,VORWALD A C. Clinical effects of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on pigs during the early postnatal interval[J]. Am J Vet Res,1998,59(1):52-55.
- [9] 郭宝清,陈章水,刘文兴. 从疑似 PRRSV 流产胎儿分离猪生殖与呼吸综合征病毒的研究[J]. 中国畜禽传染病,1996,87(2):1-5.
- [10] LOULA T. Mystery pig disease[J]. Agriculture - practice,1991,12:23-34.
- [11] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京:科学出版社,1997:998-1009.
- [12] 蒋文明,姜平,李玉峰. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 S1 株 GP3 蛋白的原核表达与纯化[J]. 中国病毒学,2005,20(5):519-521.
- [13] CAVANAGH D. Nidovirales:a new order composing coronaviridae and arteriviridae[J]. Arch Virol,1997,142(3):629-633.
- [14] MENG X J. Heterogeneity of porcine and respiratory syndrome virus; implications for current vaccine efficacy and future vaccine development[J]. Vet Microbiol,2000,74(4):309-329.
- [15] MENGELING, MICHAEL R, ERIC V, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome isolates and methods of use[J]. J Virol,1998,67(8):4514-4528.
- [16] 高云,杨汉春,任慧英. 猪繁殖与呼吸综合征病毒分离毒株基因型的鉴定[J]. 农业生物学报,1998,6(4):327-330.
- [17] 蒯高明,杜伟贤,李雪梅,等. 猪繁殖呼吸系统综合征细胞分离培养[J]. 中国兽医学报,2001,20(1):40-41.