

猪 CD151 转基因 PK-15 细胞系构建及其对猪繁殖与呼吸综合征病毒的易感性

黄燕燕, 郭睿, 张钰, 张鑫宇, 夏晓莉, 孙怀昌*

扬州大学兽医学院, 扬州 225009

摘要: 【目的】建立猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 易感的猪 CD151 转基因 PK-15 细胞系, 研究 CD151 分子在 PRRSV 感染猪源细胞中的作用。【方法】用 RT-PCR 从猪肺泡巨噬细胞中扩增 CD151 全长 cDNA, 测序正确后克隆入真核表达载体 pcDNA3; 用重组载体 pcDNA-CD151 转染 PK-15 细胞, 经 G418 抗性筛选获得转基因细胞系 PK15-CD151, 用 RT-PCR 和免疫荧光试验检测 CD151 表达; 用 VR-2332 株 PRRSV 分别感染 PK-15 细胞、PK15-CD151 细胞、MARC-145 细胞和 3D4-CD163 细胞, 定期观察细胞病变, 用 RT-PCR 和免疫荧光试验检测病毒 RNA 基因组和病毒抗原, 用半数组织细胞感染剂量测定病毒滴度。【结果】从猪巨噬细胞中克隆得序列正确的猪 CD151 cDNA; 从重组载体转染的 PK-15 细胞培养中筛选得 G418 抗性细胞克隆, 并能正确表达猪 CD151 分子; 在 PRRSV 感染后, PK15-CD151 细胞虽然不表现明显的细胞病变, 但能检测到病毒 RNA 基因组和病毒抗原, 并能产生较高滴度的感染性病毒; 该细胞系已在体外传 30 代以上, 第 10、20、30 代细胞的 PRRSV 滴度无明显变化。【结论】猪 CD151 基因转染能使非易感 PK-15 细胞获得对 PRRSV 的易感性, 提示猪 CD151 参与 PRRSV 感染猪源细胞。

关键词: 猪 CD151, 转基因细胞系, 猪呼吸与繁殖障碍综合征病毒

中图分类号: S852 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2013)05-0507-08

猪繁殖与呼吸综合征 (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 是猪的一种高度接触性传染病, 以成年母猪生殖障碍、早产、流产、死产和产木乃伊胎及仔猪呼吸异常为主要特征。自 20 世纪 80 年代在美国发现以来, 该病一直在世界范围内流行, 给养猪业造成巨大的经济损失^[1-3]。猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 是动脉炎病毒属的单股、正链 RNA 病毒, 具有复杂的感染与免疫逃避机制^[4-5]。目前, PRRS 主要靠免疫接种进行控制, 但

灭活苗的免疫保护效果不确实, 弱毒疫苗具有毒力返强或散毒风险^[6], 因此迫切需要研究控制该病的新策略。

PRRSV 主要感染猪的单核-巨噬细胞系统, 参与的细胞受体至少有 3 个。其中, 硫酸乙酰肝素 (heparan sulphate) 参与细胞非特异性吸附, 唾液酸粘附素 (sialoadhesin) 负责病毒的吸附与进入细胞, CD163 则与病毒脱衣壳有关^[7]。由于巨噬细胞培养及基因转染难度较大等原因, 现有的猪巨噬细胞

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项 (2009ZX08010-019B); 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD); 禽类预防医学教育部重点实验室“教育部创新团队”项目 (IRT0978)

* 通信作者。Tel: +86-514-87979335; E-mail: sunh@yzu.edu.cn

作者简介: 黄燕燕 (1987-), 女, 安徽蚌埠人, 硕士, 主要从事兽医微生物学与免疫学研究。

收稿日期: 2012-07-20; **修回日期:** 2013-02-27

系极为有限,而且因不表达 CD163 分子失去对 PRRSV 的易感性^[8]。因此,PRRSV 分离培养、疫苗研制以及感染机制研究多用 MARC-145 细胞系进行,但其感染机制明显不同于巨噬细胞感染^[7]。另外,猴源与猪源细胞的糖基化模式有差异,MARC-145 细胞源疫苗的免疫效果不及猪巨噬细胞源疫苗^[9]。

CD151 是四跨膜蛋白超家族成员,分布于血小板、巨核细胞、激活 T 淋巴细胞、树突状细胞、血旺细胞、上皮细胞、内皮细胞和肌肉细胞等细胞表面^[10]。有研究资料显示,CD151 在 PRRSV 感染 MARC-145 细胞中发挥重要作用,可能的机制是通过与病毒 RNA 基因组的 3'非翻译区结合,从而影响病毒的基因转录、翻译和 RNA 运输^[11]。例如,猴 CD151 基因转染可增加 MARC-145 细胞的 PRRSV 滴度,CD151 抗体处理或 RNA 干扰其基因表达可阻断 PRRSV 感染,而 CD151 基因转染可使非易感 BHK-21 细胞获得对 PRRSV 的易感性^[11]。本研究用从猪肺巨噬细胞中克隆的 CD151 cDNA 转染猪肾 PK-15 细胞系,经 RT-PCR、免疫荧光试验和感染性病毒滴定证明,猪 CD151 转基因 PK-15 细胞不仅能支持 PRRSV 感染与复制,而且能产生较高的病毒滴度,为 PRRSV 分离培养以及疫苗研制增添了新的实验工具,也为进一步研究猪 CD151 在 PRRSV 感染中的作用打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与病毒株:VR-2332 株 PRRSV 由扬州威克生物有限公司提供;猪肺巨噬细胞系 (porcine alveolar macrophage, PAM) 3D4/21 购自美国 ATCC (CRL-2843), 将从猪肺巨噬细胞中克隆的猪 CD163 cDNA 插入真核表达载体 pVITRO2-mcs (美国 InvivoGen 公司),用重组载体转染 PAM 3D4/21 细胞,经潮霉素筛选得猪 CD163 转基因猪巨噬细胞系 3D4-CD163 (另文发表);猪肾 PK-15 细胞系从美国 ATCC 引进 (ATCC CCL-33);MARC-145 细胞由扬州友邦科技有限公司提供。

1.1.2 主要试剂:限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、

LA Taq DNA 聚合酶、pMD18-T 为大连宝生物公司 (TaKaRa) 产品;大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 α 感受态细胞按常规方法制备;质粒 DNA 提取及快速回收试剂盒为杭州爱思进生物技术有限公司产品;Genopure Plasmid Midi Kit 为罗氏公司产品;RNAgent Total RNA Isolation System 为美国 Promega 产品;M-MuLV Reverse Transcriptase Kit 和 G418 购自 Fermentas 公司;DMEM 培养基、胎牛血清 (FBS) 和 LipofectamineTM 2000 Reagent 为 Invitrogen 公司产品;PRRSV 阳性血清来自美国 INDEXX 公司 PRRSV ELISA 抗体检测试剂盒;小鼠抗猪 CD151 免疫血清用大肠杆菌表达的猪重组 CD51 抗原制备 (另文发表);FITC 标记羊抗抗猪 IgG 和羊抗鼠 IgG 购自 Rockland 公司;其他试剂为分析纯级。

1.2 猪 CD151 cDNA 扩增

根据猪 CD151 mRNA 序列 (GenBank Accession No, AK240006) 设计 PCR 引物,正向引物序列为 5'-ACGATATCATGGGCGAATTCGGCGAG-3' (引入 *EcoRV* 位点),反向引物为 5'-ATGCGGCCGCTCAGTAGTGCTCCAGCTTC-3' (引入 *NotI* 位点),引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。按照文献报道的方法^[12] 制备猪肺巨噬细胞,根据 RNAgent Total RNA Isolation System 说明书提取细胞总 RNA,按照 M-MuLV Reverse Transcriptase Kit 说明书进行反转录,RNA 用量为 4 μ g,反应条件为 37 $^{\circ}$ C 60 min。50 μ L PCR 反应体系为:10 \times buffer 5 μ L, dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 4 μ L, 正、反向引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, RT product 2 μ L, LA Taq DNA polymerase 2.5 U。PCR 程序为:94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 次循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.3 PCR 产物克隆与序列分析

PCR 产物克隆按照 pMD18-T 说明书进行。将重组质粒转化菌接种含 100 U/mL 氨苄青霉素 (Amp) LB 平板,37 $^{\circ}$ C 培养过夜后挑取 3 个单菌落,接种含 100 U/mL Amp 的 LB 培养液,37 $^{\circ}$ C 培养过夜,按照试剂盒说明书提取质粒,用于限制性酶切鉴定和序列测定。

1.4 真核表达载体构建与鉴定

用限制酶 *EcoRV* 和 *NotI* 将猪 CD151 cDNA 从

pMD18-T 载体上切下, 与同酶线性化表达载体 pcDNA3 连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 获得的重组质粒 pcDNA-CD151 用相同限制酶进行酶切鉴定。

1.5 PK-15 细胞转染及抗性克隆筛选

先用含 10% FBS 和不同浓度 (200、300、400、500、600、700、800 $\mu\text{g}/\text{mL}$) G418 的 DMEM 培养基培养 PK-15 细胞, 培养 2 周后计算得最小细胞致死浓度。然后在 24 孔板培养 PK-15 细胞, 在细胞密度达 80% 时, 按照 LipofectamineTM 2000 Reagent 说明书进行基因转染, 重组质粒 pcDNA-CD151 用量为 2 $\mu\text{g}/\text{孔}$ 。转染后用含 10% FBS 的 DMEM 培养 24 h, 然后改换含最小致死剂量 G418 和 2% FBS 的 DMEM 继续培养, 每隔 3 天换液 1 次。培养两周后用消毒接种环钩取单细胞克隆, 在 24 孔板上扩大培养后连续传 30 代。

1.6 CD151 表达检测

1.6.1 RT-PCR: 在 T25 细胞瓶培养 PK-15 及其 CD151 转基因细胞 PK15-CD151, 当细胞密度为 90% 时, 按照 RNAGENT Total RNA Isolation System 说明书提取细胞总 RNA, 用克隆猪 CD151 cDNA 的引物和程序进行 RT-PCR 扩增, 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.6.2 间接免疫荧光试验: 在 24 孔板培养上述细胞, 当细胞密度达 80% 时, 用预冷丙酮/乙醇 (3:2) 混合液固定 10 min, 用含 5% 脱脂粉 PBS 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 60 min, 然后按照常规方法进行间接免疫荧光试验, 第一抗体为小鼠抗猪 CD151 免疫血清, 第二抗体为 FITC 标记羊抗鼠 IgG。

1.7 PRRSV 感染与检测

1.7.1 RT-PCR: 在 24 孔板上培养 MARC-145 细胞、PK-15 细胞和 PK15-CD151 细胞, 当细胞密度达 80% 时, 按照文献报道方法^[13] 用 VR2332 株 PRRSV 感染, 在感染后 24、48、72 h 进行细胞病变 (CPE) 观察。当 MARC-145 出现明显 CPE 时, 用 RNAGENT Total RNA Isolation System 提取 3 种感染细胞的总 RNA, 用 M-MuLV Reverse Transcriptase Kit 进行反转录, 以 PRRSV GP5 特异引物进行 PCR 扩增, 正、反向引物序列分别为 5'-TTGAATGTTCAA GTATG-3' 和 5'-ATCATTGCAGAAGTCGT-3'。25 μL PCR 反应

体系由 4 μL 反转录产物、1 U *rTaq* DNA 聚合酶、2.5 mmol/L dNTP mix 和 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 引物组成。30 次循环 PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.7.2 间接免疫荧光试验: 用上述方法 (1.7.1) 进行 PK-15 和 PK-CD151 细胞培养和病毒感染, 在感染后 48 h, 用上述方法 (1.6.2) 进行间接免疫荧光试验, 第一抗体为 1:100 稀释 PRRSV 阳性血清, 第二抗体为 1:1000 稀释 FITC 标记羊抗猪 IgG。

1.8 病毒滴度检测

在 24 孔板上培养 PK-15 细胞、PK15-CD151 细胞、3D4-CD163 细胞和 MARC-145 细胞, 培养 24 h 后进行 PRRSV 感染, 每试验组设 8 孔重复。在感染后 24、48、72 和 96 h, 将细胞反复冻融 3 次, 高速离心后取上清, 按照文献报道的方法^[13] 在 MARC-145 细胞上进行半数组织细胞感染剂量 (50% tissue culture infectious dose, TCID₅₀) 测定。用 PRRSV 感染第 10、20、30 代 PK15-CD151 细胞, 在感染 48 h 收获病毒, 按照上述方法在 MARC-145 细胞上进行病毒滴度测定。

2 结果和分析

2.1 猪 CD151 cDNA 克隆与序列分析

2.1.1 RT-PCR 扩增: 以从猪肺巨噬细胞提取的 RNA 为模板, 以猪 CD151 基因特异引物进行 RT-PCR 扩增。琼脂糖凝胶电泳结果显示, 扩增产物为预期的 762 bp (图 1-A)。

2.1.2 序列分析: 将猪 CD151 基因 RT-PCR 扩增产物克隆入 pMD18-T 载体, 随机挑取 3 个克隆进行序列测定, 所获序列完全一致, 提示无测序错误。序列比对分析结果显示: 本研究克隆的猪 CD151 cDNA 与发表序列的同源性为 99.7%, 无插入、缺失或移码突变, 仅 458 和 563 位核苷酸各有 1 个 T \rightarrow C 碱基转换, 导致 F153S 和 V188A 替换, 此碱基突变可能是猪品种差异所致。

2.2 真核表达载体构建与鉴定

将测序正确的猪 CD151 cDNA 定向插入 pcDNA3 表达载体, 用限制酶 *EcoRV* 和 *NotI* 双酶切

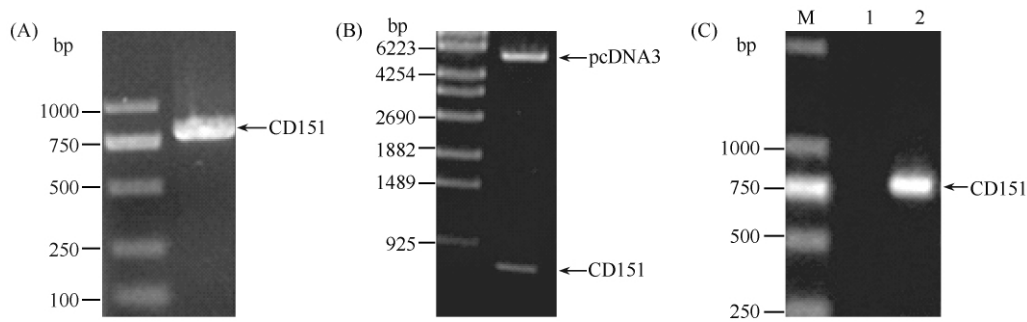


图 1. 猪 CD151 cDNA 表达载体构建与鉴定

Figure 1. Construction and identification of porcine CD151 expression vector. The porcine CD151 cDNA was amplified from pig alveolar macrophages by RT-PCR (A), and the recombinant vector pcDNA-CD151 was identified by restriction digestion (B). The porcine CD151 transcription in untransfected (lane 1) or pcDNA-CD151 transfected PK-15 cells (lane 2) was detected by RT-PCR (C).

鉴定,结果显示能释放出预期大小的插入片段(图 2-B)。

2.3 猪 CD151cDNA 表达检测

2.3.1 RT-PCR 检测:分别以未转染 PK-15 细胞和猪 CD151 cDNA 转染 PK15-CD151 细胞总 RNA 为模板,用扩增猪 CD151 cDNA 引物和程序进行 RT-PCR 检测。琼脂糖凝胶电泳结果显示:在 PK15-CD151 细胞中能扩增出预期大小的目的条带,而在 PK-15 细胞不能扩增出相应的目的条带(图 1-C)。

2.3.2 免疫荧光检测:在细胞密度达 80% 时,用猪 CD151 免疫血清进行间接免疫荧光试验,结果显示:PK15-CD151 细胞为猪 CD151 抗体反应阳性,而 PK-15 细胞为反应阴性(图 2)。

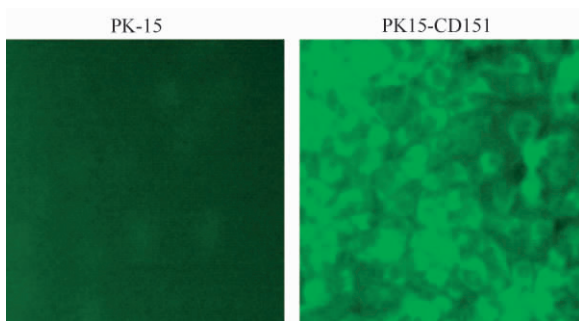


图 2. PK15-CD151 细胞中猪 CD151 表达的免疫荧光检测

Figure 2. Detection of porcine CD151 expression in the recombinant vector-transfected PK-15 cells by immunofluorescence. The mock-transfected PK-15 cells and pcDNA-CD151-transfected PK15-CD151 cells were stained with mouse antiserum against porcine CD151 as the first antibody and FITC-labeled goat anti-mouse IgG as the secondary antibody.

2.4 PK15-CD151 细胞对 PRRSV 的易感性检测

2.4.1 细胞病变观察与免疫荧光试验:分别用 VR2332 株 PRRSV 感染 PK-15、PK15-CD151 和 MARC-145 细胞,在感染后 24、48、72 h 进行 CPE 观察。结果显示:MARC-145 细胞在感染后 24 h 即出现明显的 CPE,而 PK-15 和 PK15-CD151 细胞在观察期间无明显 CPE(图 3)。但免疫荧光试验结果显示:PK15-CD151 和 MARC-145 细胞均为 PRRSV 阳性血清反应阳性,而 PK-15 细胞为反应阴性(图 3)。

2.4.2 RT-PCR 检测:在 PRRSV 感染后 48 h,分别从 PK-15、PK15-CD151 和 MARC-145 细胞提取 RNA,以 PRRSV GP5 特异引物进行 RT-PCR 检测。结果显示:在病毒感染的 MARC-145 和 PK15-CD151 细胞中均能扩增到预期大小的 GP5 转录子,而 PK-15 细胞不能扩增出相应的目的条带(图 4)。

2.4.3 病毒滴度检测:分别用 PRRSV 感染 PK-15、PK15-CD151、MARC-145 和 3D4-CD163 细胞,感染后 24、48、72 和 96 h 收获病毒,在 MARC-145 细胞上滴定病毒的 TCID₅₀。结果显示:感染后 24 h 的 PK15-CD151、MARC-145 和 3D4-CD163 细胞中的 PRRSV TCID₅₀ 平均为 3.6、3.5 和 2.9 log₁₀,随着培养时间延长病毒滴度呈逐渐升高趋势,感染后 96 h 的 TCID₅₀ 平均为 5.5、5.7 和 4.7 log₁₀(图 5)。在此期间,PRRSV 感染的 PK-15 细胞中检测不到感染性病毒。

用 PRRSV 感染第 10、20、30 代 PK15-CD151 细胞,在感染后 48 h 收获病毒,在 MARC-145 细胞上进行 TCID₅₀ 测定。结果显示:在 PRRSV 感染后

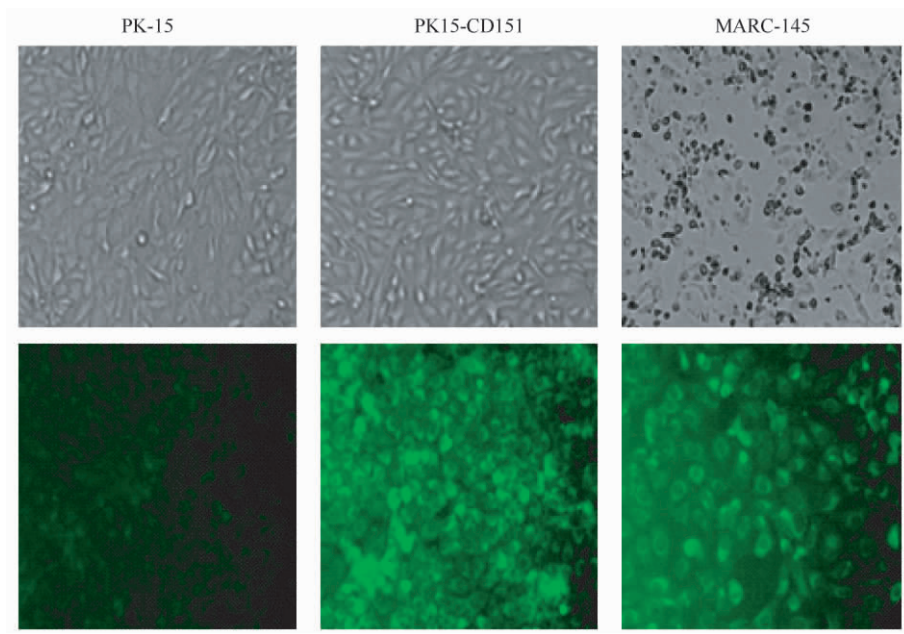


图 3. PRRSV 感染 PK15-CD151 细胞的光学和免疫荧光显微镜观察

Figure 3. Light (top panel) and immunofluorescent (bottom panel) microscopy of PK15-CD151 cells after PRRSV infection using PK-15 cells as the negative control and MARC-145 cells as the positive control, respectively.

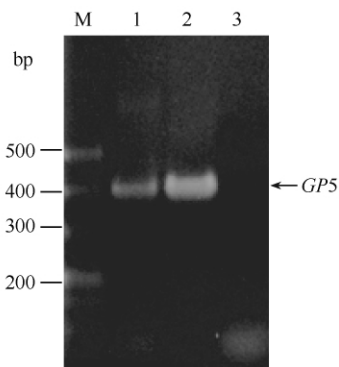


图 4. PRRSV 感染细胞中 GP5 转录子的 RT-PCR 检测

Figure 4. Detection of the GP5 transcript in PRRSV-infected cells. Total RNA was extracted from PRRSV-infected PK15-CD151 cells (lane 1), MARC-145 cells (lane 2) or PK-15 cells (lane 3) 48 h post-infection and amplified by RT-PCR using the GP5 primer pair.

48 h, 第 10、20、30 代 PK15-CD151 细胞的病毒滴度分别平均为 3.78、3.74 和 3.56 log₁₀ (图 6)。

3 讨论

现有的研究资料显示,CD151 在 PRRSV 感染中扮演重要角色。例如,所有 PRRSV 易感猴肾细胞系

均表达 CD151 分子,包括 MA-104、MARC-145、COS-7 和 Vero 细胞。再如,CD151 基因转染可增强 MARC-145 细胞对 PRRSV 的易感性,而 RNA 干扰 CD151 基因表达或 CD151 抗体处理可阻断 PRRSV 感染。另外,CD151 基因转染还能使 PRRSV 非易感 BHK-21 细胞成为易感细胞^[1]。本研究用猪 CD151 表达载体转染猪肾 PK-15 细胞,建立了 PRRSV 易感细胞系 PK15-CD151。病毒感染及检测试验结果显示,尽管 PK15-CD151 细胞在 PRRSV 感染后不表现明显的 CPE (图 3),但能检测到病毒 RNA 基因组和病毒抗原的存在 (图 3 和图 4)。更为重要的是,用 PRRSV 感染的 PK-CD151 细胞裂解物接种 MARC-145 细胞,不仅能观察到明显的细胞病变,而且能检测到感染性病毒 (图 5)。在病毒感染平行对比试验中,三种细胞培养中的 PRRSV 滴度均随感染时间延长而呈上升趋势 (图 5)。该细胞系已在体外传 30 代以上,而且不同代次的 PRRSV 滴度无明显变化 (图 6),表明该细胞系的遗传和 PRRSV 易感性能保持稳定。这些研究结果提示,PK15-CD151 细胞不仅可以用于 PRRSV 的分离培养,而且可以用于病毒扩增及疫苗制备。就疫苗制备而言,PK15-CD151 细胞与其他两种细胞相比具有一定的优势。其中,3D4-

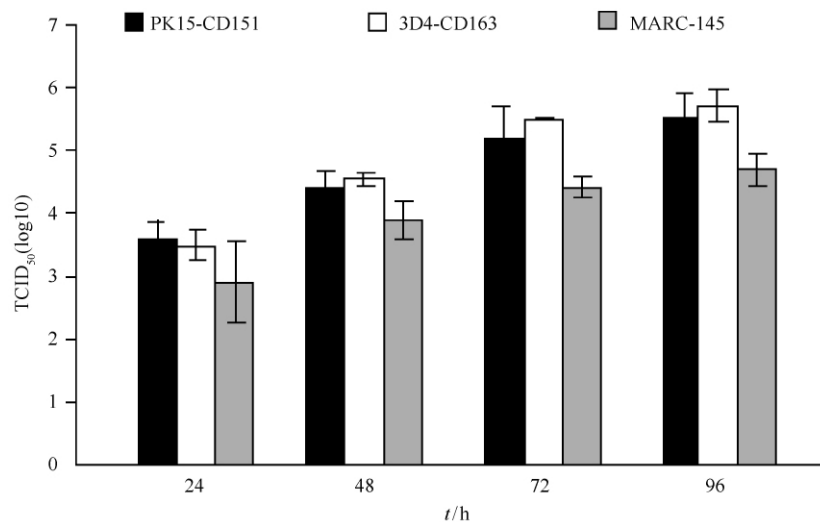


图 5. PRRSV 感染细胞中的病毒滴度测定

Figure 5. Viral titration in different cells at different time points after PRRSV infection.

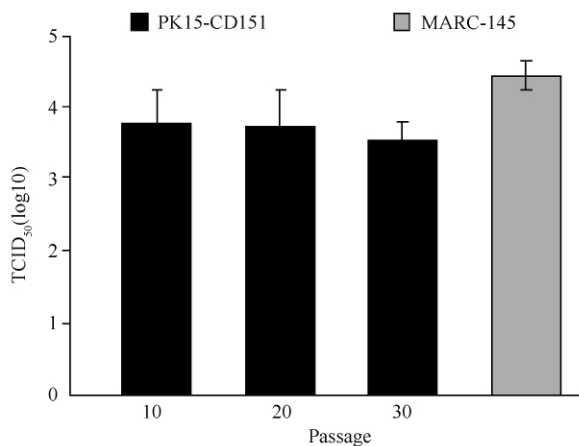


图 6. PRRSV 感染不同代 PK15-CD151 细胞的病毒滴度测定

Figure 6. Viral titration in different passages of PK15-CD151 cells after PRRSV infection.

CD163 细胞源于猪肺巨噬细胞系 3D4/21, 此细胞系由 SV40 T 抗原基因转化而得, 因不表达 CD163 分子而对 PRRSV 不易感, 尽管导入猪 CD163 基因后对 PRRSV 高度易感^[8], 但因含有其他病毒序列和抗性选择标记, 用于疫苗生产可能存在生物安全隐患, 其细胞培养条件要求也较高。MARC-145 细胞是目前使用较多的 PRRS 疫苗生产细胞系, 主要缺点是猴源细胞糖基化模式有别于猪源细胞, 用其制备疫苗的免疫保护效果不及猪源细胞^[9]。

CD151 主要分布于血小板、巨核细胞、激活 T 淋巴细胞、树突状细胞、血旺细胞、上皮细胞、内皮细

胞和肌肉细胞表面^[10], 在猪肾 PK-15 细胞中不表达。在本研究中, 猪 CD151 cDNA 转染能使非易感 PK-15 细胞获得对 PRRSV 的易感性, 提示猪 CD151 在 PRRSV 自然感染中也可能发挥重要作用。首先, 尽管 Sn 和 CD163 是猪巨噬细胞上两个重要的病毒受体, 两者表达足以支持 PRRSV 感染与复制^[7], 但猪巨噬细胞也表达 CD151 分子(本实验室待发表资料), 其协助 PRRSV 感染巨噬细胞的可能性不能排除。其次, PRRSV 感染靶细胞不仅仅局限于猪单核-巨噬细胞, 肺泡上皮细胞以及扁桃腺、淋巴结血管内皮细胞等也可检测到病毒^[14-15], 其感染机制无法用 Sn/CD163 介导的胞吞机制来解释, 因为这些细胞并不表达巨噬细胞特异 Sn 和 CD163 分子。综合现有的研究资料和本研究结果, 我们有理由推测猪 CD151 在 PRRSV 感染中, 特别是在感染非巨噬细胞中具有重要作用, 值得进一步研究。

参考文献

- Pejsak Z, Stadejek T, Markowska-Daniel I. Clinical signs and economic losses caused by porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a large breeding farm. *Veterinary Microbiology*, 1997, 55 (1-4) : 317-322.
- Neumann EJ, Kliebenstein JB, Johnson CD, Mabry JW, Bush EJ, Seitzinger AH, Green AL, Zimmerman JJ. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the

- United States. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 2005, 227: 385-392.
- [3] Zhou L, Yang HC. Porcine reproductive and respiratory syndrome in China. *Virus Research*, 2010, 154: 31-37.
- [4] Snijder EJ, Meulenberg JJ. The molecular biology of arteriviruses. *Journal of General Virology*, 1998, 79: 961-979.
- [5] Done SH, Paton DJ. Porcine reproductive and respiratory syndrome: clinical disease, pathology and immunosuppression. *Veterinary Record*, 1995, 136: 32-35.
- [6] Kimman TG, Cornelissen LA, Moormann RJ, Rebel JM, Stockhofe-Zurwieden N. Challenges for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccinology. *Vaccine*, 2009, 27 (28) : 3704-3718.
- [7] Van Breedam W, Delputte PL, Van Gorp H, Misinzo G, Vanderheijden N, Duan X, Nauwynck HJ. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus entry into the porcine macrophage. *Journal of General Virology*, 2010, 91 (Pt 7) :1659-1667.
- [8] Lee YJ, Park CK, Nam E, Kim SH, Lee OS, Lee du S, Lee C. Generation of a porcine alveolar macrophage cell line for the growth of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Virological Methods*, 2010, 163 (2) :410-415.
- [9] Calzada-Nova G, Husmann RJ, Schnitzlein WM, Zuckermann FA. Effect of the host cell line on the vaccine efficacy of an attenuated porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2012, 148 (1-2) : 116-125.
- [10] Sincock PM, Fitter S, Parton RG, Berndt MC, Gamble JR, Ashman LK. PETA-3/CD151, a member of the transmembrane 4 superfamily, is localised to the plasma membrane and endocytic system of endothelial cells, associates with multiple integrins and modulates cell function. *Journal of Cellular Science*, 1999, 112 (Pt 6) : 833-844.
- [11] Shanmukhappa K, Kim JK, Kapil S. Role of CD151, A tetraspanin, in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Virology Journal*, 2007, 4:62.
- [12] Hood JW, McMartin DA, Harris JW. Growth of chlamydia in pig lung alveolar macrophages; preparation of macrophages and demonstration of growth. *Veterinary Research Communication*, 1984, 8 (1) :15-23.
- [13] Jacobs AC, Hermann JR, Munoz-Zanzi C, Prickett JR, Roof MB, Yoon KJ. Stability of porcine reproductive and respiratory syndrome virus at ambient temperatures. *Journal of Veterinary Diagnosis and Investigation*, 2010, 22: 257-260.
- [14] Hu SP, Zhang Z, Liu YG, Tian ZJ, Wu DL, Cai XH, He XJ. Pathogenicity and distribution of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs. *Transbound and Emerging Diseases*, 2012, 10: 1865-1682.
- [15] Han K, Seo HW, Oh Y, Kang I, Park C, Chae C. Pathogenesis of Korean type 1 (European genotype) porcine reproductive and respiratory syndrome virus in experimentally infected pigs. *Journal of Comparative Pathology*, 2012, 6: 1-10.

Establishment of a porcine CD151 transgenic PK-15 cell line susceptible to porcine reproductive and respiratory syndrome virus

Yanyan Huang, Rui Guo, Yu Zhang, Xinyu Zhang, Xiaoli Xia, Huaichang Sun*

College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

Abstract: [Objective] In order to study the role of porcine CD151 in infection of porcine cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), we established a porcine CD151 transgenic PK-15 cell line. [Methods] The full-length complementary DNA (cDNA) for porcine CD151 was amplified from porcine alveolar macrophages by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and subcloned into eukaryotic expression vector pcDNA3. The recombinant vector pcDNA-CD151 was transfected into PK-15 cells and the transgenic cell line was generated after G418 selection. Transcription of the CD151 cDNA in transgenic cell line was detected by RT-PCR and immunofluorescence. The cell line, together with control cell lines PK-15, 3D4-CD163 and MARC-145, was infected with PRRSV, and the viral RNA genome or antigens in the infected cells was detected by RT-PCR or immunofluorescence. At different time points post-infection, the virus was harvested and titrated on MARC-145 cells. [Results] The expected size of porcine CD151 cDNA was amplified with a sequence identity of 99.7% to the published sequence. From the pcDNA-CD151-transfected cell culture, a transgenic cell line PK15-CD151 was generated and correct expression of porcine CD151 was confirmed. After PRRSV infection, the viral RNA genome and antigens were detected in the cell line. Although apparent cytopathic effect was not observed in the virally infected cell line, the infectious virus with a high viral title was detected. The cell line had been passed for more than 30 generations and no significant difference in viral title was observed among generations 10, 20 and 30 after PRRSV infection. [Conclusion] Transfection of non-permissive PK-15 cells with porcine CD151 cDNA conferred the susceptibility to PRRSV infection, indicating an important role of the porcine CD151 in PRRSV infection of porcine cells.

Keywords: porcine CD151, transgenic cell line, porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRSV)

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Priority Academic Program Development (PAPD) of Jiangsu Higher Education Institutions, by the Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (IRT0978) and by the Grant from the Ministry of Science and Technology and the Ministry of Agriculture, China

* Corresponding author. Tel: +86-514-87979335; Fax: +86-514-87972218; E-mail: sunh@yzu.edu.cn

Received: 20 July 2012 / Revised: 27 February 2013