



猪繁殖与呼吸综合征病毒 GS15 株 NSP2 蛋白多位点缺失病毒的拯救与体外生长特性分析

张兴民^{1,2,3}, 张婧^{2,3}, 孙普^{1,2,3}, 李娇阳^{2,3}, 崔占鼎^{2,3}, 李国秀^{2,3}, 王健^{2,3},
李平花^{2,3}, 袁红^{2,3}, 李坤^{2,3}, 曹轶梅^{2,3}, 付元芳^{2,3}, 李冬^{2,3}, 赵志荀^{2,3},
曾巧英^{1*}, 卢曾军^{2,3*}

1 甘肃农业大学动物医学院, 甘肃 兰州 730070

2 中国农业科学院兰州兽医研究所/兰州大学动物医学与生物安全学院 动物疫病防控全国重点实验室,
甘肃 兰州 730000

3 甘肃省病原生物学基础学科研究中心, 甘肃 兰州 730046

张兴民, 张婧, 孙普, 李娇阳, 崔占鼎, 李国秀, 王健, 李平花, 袁红, 李坤, 曹轶梅, 付元芳, 李冬, 赵志荀, 曾巧英, 卢曾军. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 GS15 株 NSP2 蛋白多位点缺失病毒的拯救与体外生长特性分析[J]. 微生物学报, 2024, 64(7): 2307-2322.

ZHANG Xingmin, ZHANG Jing, SUN Pu, LI Jiaoyang, CUI Zhanding, LI Guoxiu, WANG Jian, LI Pinghua, YUAN Hong, LI Kun, CAO Yimei, FU Yuanfang, LI Dong, ZHAO Zhixun, ZENG Qiaoying, LU Zengjun. Rescue and *in vitro* growth characterization of NSP2 multisite-deleted strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GS15[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(7): 2307-2322.

摘要:【目的】本实验室前期在高致病性毒株 PRRSV/GSWW/2015 的感染性克隆上, 拯救获得了非结构蛋白(non-structural protein 2, NSP2)第 519–565 位和第 628–747 位氨基酸双缺失的工程病毒(*rGS15-Δ2*)。本研究旨在在双缺失病毒的感染性克隆上, 构建拯救获得 NSP2 三个位点缺失的工程病毒。【方法】在前期双缺失病毒感染性克隆的基础上, 利用融合 PCR 方法分别构建缺失 NSP2 第 323–364 位和第 372–433 位优势抗原表位的两个 3 个位点缺失的重组质粒。经脂质体介导, 转染 Marc-145 细胞拯救病毒, 通过电子显微镜观察、免疫荧光实验、测定病毒滴度、绘制生长曲线等方法对缺失病毒的生长特性进行分析。【结果】成功获得拯救病毒 *rGS15-Δ3-1* 和 *rGS15-Δ3-2*。电子显微镜下可以观察到直径大小为 50–80 nm 的病毒粒子; 免疫荧光实验检测表明, 拯救病毒与亲本病毒 GS15 一致, 都能检测到 PRRSV N 蛋白表达; 缺失区域 RT-PCR 扩增鉴定, 拯救病毒

资助项目: 国家生猪技术创新中心先导科技项目(NCTIP-XD/C03); 甘肃省杰出青年基金(21JR7RA026)

This work was supported by the National Pig Technology Innovation Center Pilot Science and Technology Project (NCTIP-XD/C03) and the Distinguished Young Scholars Fund of Gansu Province (21JR7RA026).

*Corresponding authors. E-mail: ZENG Qiaoying, zengqy@gsau.edu.cn; LU Zengjun, luzengjun@caas.cn

Received: 2023-11-27; Accepted: 2024-02-27; Published online: 2024-02-29

传至 40 代缺失标记稳定存在; $rGS15-\Delta3-1$ 与 $rGS15-\Delta3-2$ 病毒滴度分别为 $2.00 \times 10^{6.0}$ TCID₅₀/mL 和 $2.25 \times 10^{5.8}$ TCID₅₀/mL, 与亲本病毒相比病毒滴度差异显著 ($P < 0.05$); 生长曲线分析表明拯救病毒复制水平低于亲本病毒达到最高滴度的培养时间比亲本病毒延迟 24 h。【结论】本研究通过对 PRRSV 基因 2 型非结构蛋白 NSP2 多位点缺失病毒的体外生长特性分析, 为研制新型 PRRSV 标记疫苗奠定了基础, 也为猪繁殖与呼吸综合症的防控提供新的策略。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合症病毒; 感染性克隆; 非结构蛋白 2 (NSP2); 缺失标记; 生长特性

Rescue and *in vitro* growth characterization of NSP2 multisite-deleted strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GS15

ZHANG Xingmin^{1,2,3}, ZHANG Jing^{2,3}, SUN Pu^{1,2,3}, LI Jiaoyang^{2,3}, CUI Zhanding^{2,3}, LI Guoxiu^{2,3}, WANG Jian^{2,3}, LI Pinghua^{2,3}, YUAN Hong^{2,3}, LI Kun^{2,3}, CAO Yimei^{2,3}, FU Yuanfang^{2,3}, LI Dong^{2,3}, ZHAO Zhixun^{2,3}, ZENG Qiaoying^{1*}, LU Zengjun^{2,3*}

1 College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu, China

2 State Key Laboratory of Animal Disease Prevention and Control, College of Animal Medicine and Biosafety, Lanzhou University, Lanzhou Veterinary Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730000, China

3 Gansu Provincial Research Center of Pathogen Biology, Lanzhou 730046, Gansu, China

Abstract: [Objective] A genetically engineered virus strain $rGS15-\Delta2$ with deletion of the residues at the positions 519–565 and 628–747 of the non-structural protein 2 (NSP2) had been rescued based on the PRRSV/GSWW/2015 infectious clone. This study aims to construct and rescue an engineered virus strain with the deletion of three sites in NSP2 based on $rGS15-\Delta2$. **[Methods]** Based on the infectious clones of $rGS15-\Delta2$, two recombinant plasmids with the deletion of three sites were constructed by fusion PCR. Specifically, the dominant epitope at the amino acid site 323–364 or 372–433 of NSP2 was further deleted on the basis of $rGS15-\Delta2$. The recombinant plasmids were linearized and mixed with liposome, which were transfected into Marc-145 cells for virus rescue. The growth characteristics of the engineered virus strains were analyzed by electron microscopy, immunofluorescence assay (IFA), virus titer determination, and growth curve establishment. **[Results]** The engineered virus strains $rGS15-\Delta3-1$ and $rGS15-\Delta3-2$ were rescued successfully. Virions with the diameter from 50 nm to 80 nm can be observed under an electron microscope. The results of IFA confirmed the expression of PRRSV N protein by the rescued virus strains and the parent strain GS15. Furthermore, the rescued viruses were cultured with Marc-145 cells for 40 passages, and the deletion regions were confirmed to be stable by RT-PCR and sequencing. The titers of $rGS15-\Delta3-1$ and $rGS15-\Delta3-2$ were $2.00 \times 10^{6.0}$ TCID₅₀/mL and $2.25 \times 10^{5.8}$ TCID₅₀/mL, respectively, which had differences from that of the parent strain ($P < 0.05$). The growth curves showed that the rescued viruses had lower replication levels than the parent strain, and they

reached the peak titers 24 h later than the parent strain. **[Conclusion]** We characterized the growth of the viruses with the deletion of multiple sites in NSP2 of PRRSV. The findings laid a foundation for the development of novel PRRSV-labeled vaccines and provided a new strategy for the prevention and control of porcine reproductive and respiratory syndrome.

Keywords: porcine reproductive and respiratory syndrome virus; infectious clone; non-structural protein 2 (NSP2); deletion marker; growth characteristics

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)引起的一种以母猪繁殖障碍和各年龄段猪呼吸道症状为主要特征的传染病, 给养猪业造成了巨大经济损失^[1]。PRRSV属于尼多病毒目(Nidovirales)、动脉病毒科(Arteriviridae)、动脉炎病毒属(Arteriviridae)成员, 单股正链 RNA 病毒。基因组约 15.4 kb, 基因组编码至少 16 个非结构蛋白 Nsp1 α -Nsp12b, 8 个结构蛋白 GP2、E、GP3、GP4、GP5 α 、GP5、M 和 N 蛋白^[2]。根据 2021 年 7 月, 国际病毒分类委员会(International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV)关于 PRRSV 的最新分类, 将其定义为两种不同的病原 [porcine reproductive and respiratory syndrome virus-1 (PRRSV-1, 欧洲型) 和 porcine reproductive and respiratory syndrome virus-2 (PRRSV-2, 美洲型)]^[3]。

反向遗传操作技术的建立有助于了解 PRRSV 复制和感染过程, 通过反向遗传操作技术能够对目的基因进行直接改造, 从而产生遗传修饰的突变病毒, 可进一步研究这些变化对表型和性状产生的影响, 有助于针对流行毒株的遗传特征合理设计新一代疫苗^[4]。研究报道, 尽管在 N 蛋白中构建了长片段氨基酸缺失的毒株, 但都未能成功拯救出病毒^[5]。因此, 结构蛋白的本质特性使得它不适合作为构建缺失标记毒株的目标区域。非结构蛋白(non-structural protein 2, NSP2)是 PRRSV 基因组中最大的非结构蛋白, NSP2 蛋白包含多个结

构域, 包括 N 端高变区(hyper variable region 1, HV1)和中间高变区(hyper variable region 2, HV2), 2 个 HVs 之间的木瓜样蛋白酶结构域, 以及 C 端疏水跨膜结构域^[6]。NSP2 的高变区(HV2)存在自然缺失和插入, 导致 PRRSV 株间基因组大小存在差异^[7]。NSP2 上的这种缺失和插入已成为构建缺失标记毒株的目标区域^[8]。研究报道, 在 VR2332 毒株 NSP2 上构建缺失第 323-726 位共 403 个氨基酸的缺失毒株, 其生长特性和致细胞病变的能力均低于亲本毒株^[9], 由此推断在 NSP2 的非必须区域缺失长片段的氨基酸能使缺失病毒的复制水平降低。NSP2 中包含多个功能区, 其中就包括一个高度免疫原性区域 21-840 aa, 该区域拥有多个 B 细胞线性表位^[10-11]。这些表位可以被感染 PRRSV 猪的抗体反应识别。研究报道, 在 NSP2 上的一些 B 细胞线性表位不在病毒复制所需的必需区域中, 在 PRRSV 全长感染性克隆中选择免疫优势表位以及缺失这些区域将是开发标记疫苗最为可行的方法^[12-13]。

王治家等^[14]根据近几年国内流行毒株序列比对结果, 为研究高致病性 PRRSV GS15 NSP2 不同缺失位置对病毒复制能力的影响, 构建了一系列 NSP2 不同位置的缺失毒株, 并成功拯救获得了缺失第 519-565 位的 *rGS15- Δ 1* 株和同时缺失第 519-565 位和第 628-747 位氨基酸的双缺失工程病毒 *rGS15- Δ 2*, 并比较缺失病毒与亲本病毒的复制能力、病毒滴度、对仔猪的致病性和免疫原性。*rGS15- Δ 1* 生长特性强于亲本毒株 GS15, 而 *rGS15- Δ 2* 复制能力略低于亲本毒株;

亲本毒株 GS15、rGS15-Δ1 和 rGS15-Δ2 病毒滴度分别为 $10^{7.5}$ 、 $10^{7.7}$ 和 $10^{7.2}$ TCID₅₀/mL, 病毒滴度无显著差异^[15]; 在对仔猪的致病性实验中亲本病毒 GS15 和 rGS15-Δ1 都导致实验组仔猪全部死亡, 而 rGS15-Δ2 引起仔猪出现严重临床症状, 但死亡率低于 GS15 和 rGS15-Δ1; 免疫保护性实验中 rGS15-Δ1 和 rGS15-Δ2 对同源毒株 GS15 达到完全保护, 但是对异源毒株保护力不强^[16]。以上研究为高致病性 PRRSV 标记病毒研制以及 NSP2 不同区域对病毒复制的重要性研究提供了有益的探索。本研究利用 IEDB 在线软件分析 PRRSV NSP2 中 B 细胞线性表位发现 E275-A610 位是一个较大的抗原表位, 其中第 P323-E364 位和第 L372-P433 位为优势抗原表位, 所以在已有双缺失毒株的基础上, 分别构建了缺失 NSP2 第 323-364 位、第 372-433 位优势抗原表位的 2 个 3 点缺失的感染性克隆, 转染 Marc-145 细胞拯救获得了 2 株缺失标记稳定存在的缺失毒株 rGS15-Δ3-1 和 rGS15-Δ3-2。为研制 HP-PRRSV NSP2 缺失标记疫苗奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 病毒株、载体与细胞

PRRSV 高致病性毒株 GS15 (GenBank 登录号为 KX767091.1), 缺失毒株 rGS15-Δ1 和 rGS15-Δ2 由本实验室分离、拯救、鉴定和保存。2 个 PRRSV GS15 基因组半长质粒 5'端 7 774 bp 与 3'端 7 774 bp (质粒分别命名为 pGS-A 和 pGS-B); 缺失 NSP2 第 519-565 位和第 628-747 位氨基酸编码区的 5'端 7 135 bp 半长质粒(命名为 pGS-A-Δ2), 由本实验室构建保存。2 个基因组半长质粒通过中间的 *Sph* I 和 *Nhe* I 酶切位点, 可以连接产生含有完整病毒基因组的重组质粒。Marc-145 细胞由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂

限制性内切酶 *Sph* I、*Nhe* I、*Spe* I、*Sac* I、*Acl* I 和 T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司; 大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109 感受态细胞、反转录酶 PrimeScriptTM II 1st Strand cDNA Synthesis Kit、无内毒素大提质粒试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司; 高保真 DNA 聚合酶 2×Phanta Max Master Mix 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; RNA 提取试剂盒 RNeasy Plus Mini Kit 购自 QIAGEN 公司; DMEM 培养基、胎牛血清、Lip3000 脂质体、0.25%胰酶购自 Gibco 公司; 磁珠法 DNA 纯化试剂盒购自广州康洋生物科技有限公司; SR30 株 N 蛋白单克隆抗体购自 RTILLC 公司; FITC-山羊抗小鼠 IgG 购自 BOSTER 公司。

1.2 Nsp2 缺失区域及引物的设计

利用 IEDB 在线软件分析 PRRSV NSP2 中 B 细胞线性表位发现, E275-A610 位是一个抗原表位, 其中第 P323-E364 位和第 L372-P433 位为优势抗原表位(图 1), 因此, 在已有双缺失毒株的基础上分别对这 2 个优势抗原表位进行缺失构建, 具体缺失位置如图 2 所示, 参照美洲型 PRRSV/GS15 株病毒基因组序列及 NSP2 缺失区域, 设计扩增 Δ3-1 片段的上下游引物对 Δ3-1F 和 Δ3-1R; 设计扩增 Δ3-2 片段的上下游引物对 Δ3-2F 和 Δ3-2R; D-F、D-R 为融合 PCR 引物, 含有 *Spe* I 和 *Sac* I 两个酶切位, 通过这 2 个酶切位点将 NSP2 缺失序列融合片段插入到 pGS-A 质粒中; 同时设计鉴定缺失标记的特异性引物 1648F 和 3720R; 检测 GS15 全基因组的 7 对特异性引物(表 1)。Δ3-1 缺失上游片段扩增引物对为 D-F 和 Δ3-1R, 长度为 1 870 bp, 下游片段扩增引物对为 Δ3-1F 和 D-R, 长度为 1 709 bp; Δ3-2 缺失上游片段扩增引物对为 D-F 和 Δ3-2R, 长度为 2 014 bp, 下游片段扩增引物对为 Δ3-2F 和 D-R, 长度为 1 523 bp。

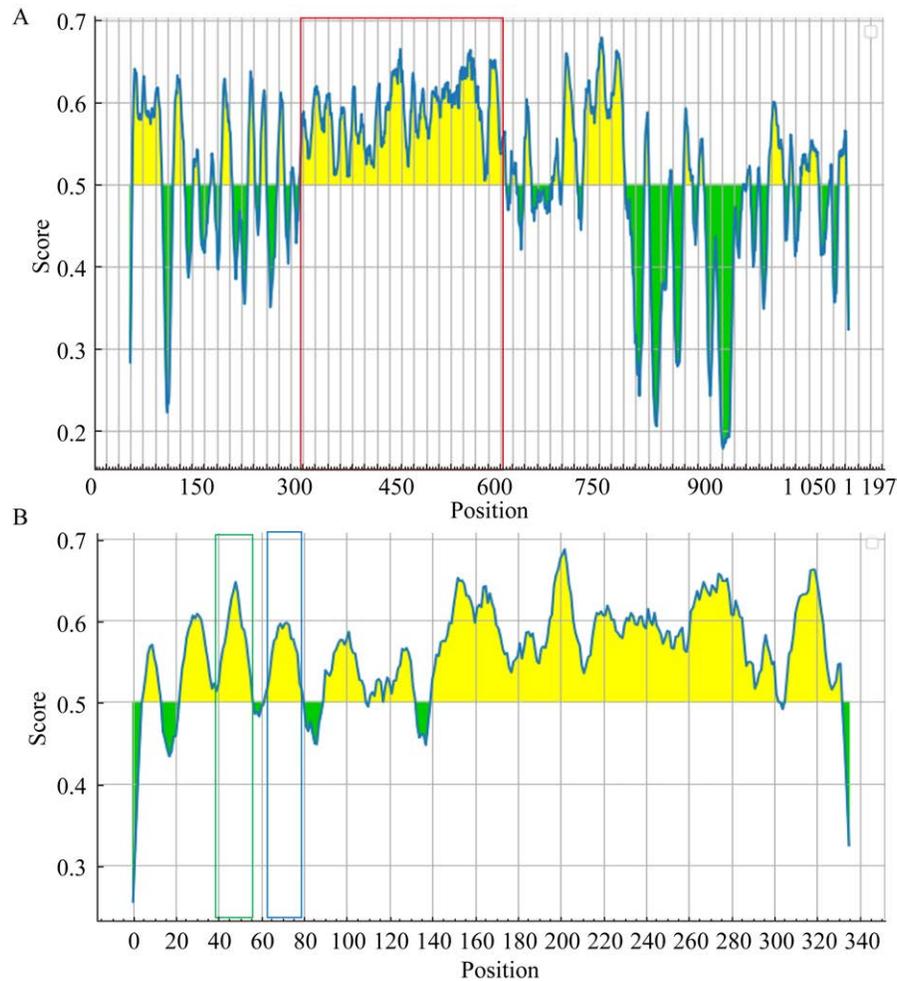


图1 NSP2基因组B细胞线性表位分析 A: IEDB在线软件分析NSP2基因组B细胞线性表位. B: IEDB在线软件分析NSP2第275–610位氨基酸B细胞线性表位. 红色框表示B细胞表位: E275–A610; 绿色框表示B细胞表位: P323–E364; 蓝色框表示B细胞表位: L372–P433

Figure 1 B-cell linear epitope analysis of NSP2 genome. A: IEDB online software analysis of NSP2 genome B cell linear epitopes. B: IEDB online software analysis of NSP2 amino acid positions 275–610 B cell linear epitopes. Red box represent B cell epitopes: E275–A610; Green box represent B cell epitopes: P323–E364; Blue box represent B cell epitopes: L372–P433.

1.3 NSP2 缺失区域分子克隆的构建

以 pGS-A-Δ2 质粒 DNA 为模板, 分别扩增 Δ3-1 缺失序列上下游片段, 上游片段扩增引物对为 D-F (5'-CTTCCGATTGCACGAATGACTA GTGGAAACCTGAA-3')和Δ3-1R (5'-GTGGGCA TGAGTCCGTATTCTTCCAGCAAAGGCTCTTG AGTCACGGGAGGGAC-3'). PCR 反应体系 (25 μL): 2×Phanta Max Mix (p515) 12.5 μL, 上、

下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, cDNA (20 ng/μL) 2.5 μL, ddH₂O 8 μL。PCR 扩增程序: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 58 °C 15 s, 72 °C 1 kb/30 s, 共 35 个循环; 72 °C 5 min。扩增获得Δ3-1 缺失序列上游片段长度为 1 870 bp, Δ3-1 下游片段扩增引物为 Δ3-1F (5'-GTCCCTCCCGTGACTCAAGCCTTT GCTGGAAGAATACGGACTCATGCCAC-3')和 D-R (5'-TTCACACCGACGGGAAAGAAAGGAG

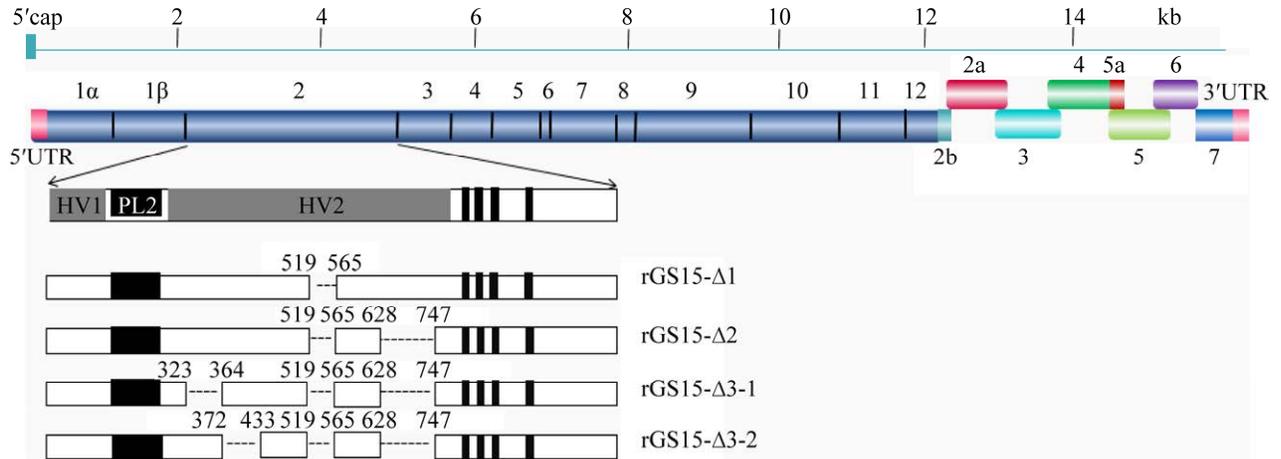


图 2 NSP2 缺失位置示意图

Figure 2 Schematic diagram of NSP2 missing location.

表 1 本研究所用引物序列

Table 1 Primers sequence used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')
D-F	CTTCCGATTGCACGAATGACTAGTGAAACCTGAA
D-R	TTCACACCGACGGGAAAGAAAGGAGCTCGAAATG
Δ3-1F	GTCCCTCCCGTGACTCAAGCCTTTGCTGGAAGAATACGGACTCATGCCCCAC
Δ3-1R	GTGGGCATGAGTCCGTATTCTTCCAGCAAAGGCTCTTGAGTCACGGGAGGGAC
Δ3-2F	CTCTCTAAGTTGGAAGAGGTTGTCCCGAGAGTTCAACCCCGCAGAACAAG
Δ3-2R	CTTGTCTGCGGGTTGAACTCTCGGGACAACCTCTTCCAACCTTAGAGAGTAC
1648F	TTGGACAGGAACGGCGCTTG
3720R	GAATAAGCCAACACCACCTG
F112-F	CGGCAAATGATAACCACGC
F112-R	TTCTGCCACCCAACACGAG
F1-F	ATGACGTATAGGTGTTGGCTC
F1-R	CAATGATGGCTTGAGCTGAG
F2-F	CTGAGTGAAATCTCGGACGTAC
F2-R	CAATAGCGCGACCAGTCCAC
F3-F	GGACTTCGCCATAGCYGATTGCC
F3-R	ATCCCAAAGCGTGCCATCAATCCC
F4-F	GGCGGCTTRGTTGTTACTGAGAC
F4-R	GGACAATGCTGGTGRAAGTG
F5-F	CCATGTGGGAAAACTCAGGTC
F5-R	AGTCCAACACADTTTCCAGCAC
F6-F	CTTCCGCGCTTCCTTCCAAG
F6-R	CGCGGTCAAGCAYTTCCCAACATA
F7-F	GTGTCAGGCATTGTGGCTGTGTG
F7-R	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATDCGGCCGCATGGTTCTCG

CTCGAAATG-3')。PCR 反应体系同上, 扩增获得 $\Delta 3-1$ 缺失序列下游片段长度为 1 709 bp, 上下游片段回收纯化。以回收纯化产物为模板, 通过融合 PCR 方法对上下游片段进行融合扩增, 融合引物对为 D-F (5'-CTTTCCGATTGCACGAATGACTAGTGGAAACCTGAA-3')和 D-R (5'-TTCACACCGACGGGAAAGAAAGGAGCTCGAAATG-3')。PCR 反应体系(25 μL): 2 \times Phanta Max Mix (p515) 12.5 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μL , cDNA (50 ng/ μL) 1 μL , ddH₂O 9.5 μL 。PCR 扩增程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 63 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 kb/30 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。融合基因片段 $\Delta 3-1$ 长度为 3 579 bp。以相同的方法扩增获得 $\Delta 3-2$ 基因片段长度为 3 537 bp。通过内切酶 *Spe* I 和 *Sac* I 对 pGS-A 质粒与 $\Delta 3-1/\Delta 3-2$ 基因片段进行双酶切, 酶切产物回收纯化, 将纯化后的片段 $\Delta 3-1/\Delta 3-2$ 连入 pGS-A 中获得 pGS-A- $\Delta 3-1/\Delta 3-2$ 半长质粒; 再通过内切酶 *Sph* I 和 *Nhe* I 对质粒 pGS-B 与 pGS-A- $\Delta 3-1/\Delta 3-2$ 进行双酶切, 酶切产物回收纯化。将纯化后的 GS-A- $\Delta 3-1/\Delta 3-2$ 片段连接到 pGS-B 中, 得到全长质粒 pGS-AB- $\Delta 3-1/\Delta 3-2$, 转化 JM109 感受态细胞, 挑阳性克隆, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜, 大提质粒定量后于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.4 pGS-AB- $\Delta 3-1/\Delta 3-2$ 全长质粒酶切鉴定

pGS-AB- $\Delta 3-1$ 和 pGS-AB- $\Delta 3-2$ 全长质粒长约 18 kb, 利用限制性内切酶 *Sac* I 进行酶切鉴定, 酶切鉴定体系: *Sac* I 2 μL , 10 \times buffer 2 μL , pGS-AB- $\Delta 3-1/\Delta 3-2$ 5 μL , ddH₂O 11 μL 。

1.5 全长质粒线性化及转染

通过限制性内切酶 *Acl* I 将全长质粒 pGS-AB- $\Delta 3-1/\Delta 3-2$ 线性化处理, 利用磁珠法 DNA 纯化试剂盒, 按照纯化说明方法纯化线性化的 DNA, 纯化产物加 10 μL 无核酸酶水溶解, 定量后于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。将 Marc-145 细胞均

匀铺至 6 孔板中, 培养至 70%–90% 时按照 Lip3000 试剂说明书将纯化后的线性化 DNA 转染于 Marc-145 细胞。将细胞置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 72 h 后, 反复冻融 3 次收集细胞液。

1.6 病毒拯救与传代

将转染后的初代细胞液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 500 r/min 离心 10 min, 并过滤后收集上清液。将上清液按照体积分数 1% 接种于 Marc-145 细胞连续传代, 加入 5% FBS DMEM 培养基, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO₂ 培养箱中培养, 观察细胞病变情况。

1.7 电镜观察

取第 5 代病毒液接种于 Marc-145 细胞中, 培养 72 h 后收集病毒培养物, 将病毒培养物反复冻融 3 次, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 60 min。取出上清, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、38 000 r/min (Thermo Scientific 公司) 超离 120 min。以适量 PBS 重悬沉淀, 与等量 10 倍稀释的 PRRSV 阳性血清于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。之后 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 60 min, 加适量 PBS 重悬沉淀。最后, 将此悬液滴在 0.5% Formvar 包被的 200 目铜网上自然干燥, 按体积比 1:1 滴加病毒负染液(pH 7.2 的 1% 磷钨酸 PTA 水溶液)到铜网上, 负染 1 min, 用滤纸条将多余的负染液吸去, 待自然风干后, 利用透射电镜观察。

1.8 拯救病毒 PCR 扩增测序鉴定

分别取拯救病毒第 5、10、20、30 和 40 代病毒液, 反复冻融 3 次后提取病毒 RNA, 反转录后以 cDNA 为模板, 以 1648F (5'-TTGGACAGGAACGGCGCTTG-3') 与 3720R (5'-GAATAAGC CAACACCACCTG-3') 为鉴定引物, 通过 PCR 分别扩增 5 个不同代次毒株 NSP2 中缺失区域, 检测缺失区域是否稳定存在; 同时通过 7 对引物(表 1)分别扩增第 5、10、20、30、40 代次拯救病毒和亲本病毒的全长序列, 检测拯救病毒核苷酸和氨基酸序列的稳定性。

1.9 间接免疫荧光试验(immunofluorescence assay, IFA)

取第 5 代细胞液上清按体积分数 1%接种于长满单层 Marc-145 细胞的 6 孔板中, 同时设置阴性对照, 接毒 48 h 后使用 4%甲醛室温固定 30 min, 0.1% Triton X-100 室温穿透 15 min, 再使用抗 PRRSV-SR30 单克隆抗体(1:200) 37 °C 孵育 1 h, PBS 洗 5 次, 最后加入 FITC 标记山羊抗鼠 IgG (1:500) 37 °C 反应 30 min, PBS 洗 5 次, 加入 300 μ L 的 PBS 于倒置荧光显微镜下观察结果。

1.10 测定毒价 TCID₅₀

第 5、10、20、30、40 代 rGS15- Δ 3-1 和 rGS15- Δ 3-2 的细胞液离心取上清、10 倍倍比稀释, 将 10^{-1} – 10^{-8} 稀释的病毒分别接种于长满单层 Marc-145 细胞的 96 孔板中, 每孔 100 μ L。每个代次做 3 次重复, 每个稀释度做 8 个孔, 同时设置不加病毒的正常细胞作为对照。37 °C 培养、观察 5–7 d, 每天记录各稀释度出现细胞病变的孔数, 按 Reed-Muench 方法计算半数组织感染量(50% tissue culture infective dose, TCID₅₀)。

1.11 rGS15- Δ 3-1 和 rGS15- Δ 3-2 生长动力曲线测定

分别将 GS15、rGS15- Δ 1、rGS15- Δ 2 以及第 20 代拯救病毒 rGS15- Δ 3-1 和 rGS15- Δ 3-2 以感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 0.1 接种到铺满 Marc-145 细胞的 6 孔板中, 在接种后 6–96 h 不同的时间点分别吸取培养上清液 100 μ L, 进行后续 TCID₅₀ 测定, 每个时间点样品做 3 次重复孔。将取得的每个上清样品使用 DMEM 进行 10 倍浓度梯度稀释, 将 10^{-1} – 10^{-8} 稀释的病毒接种长满单层 Marc-145 细胞的 96 孔细胞培养板中, 每个稀释梯度做 8 个孔, 每孔 100 μ L。37 °C 培养箱连续培养 5–7 d, 每天对病变情况进行观察计数。待细胞病变数稳定后, 计算 TCID₅₀, 计算方法采用 Reed-Muench 法。最

后绘制生长动力曲线。

1.12 数据分析

拯救病毒的病毒滴度及生长曲线分析, 使用 *t* 检验(双样本等方差假设)分析法进行统计学分析(数据为 3 次独立试验的平均值), 差异显著性用 *P* 表示($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 NSP2 缺失融合 PCR 扩增及半长质粒的构建

以质粒 pGS-A- Δ 2 为模板, 分别扩增 Δ 3-1 和 Δ 3-2 缺失区域的上下游片段, 再通过融合引物 D-F 和 D-R 扩增获得融合片段 Δ 3-1 和 Δ 3-2。融合片段大小分别为 3 579 bp 和 3 537 bp (图 3)。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳观察, 结果显示条带大小与预期一致。经限制性内切酶 *Spe* I 和 *Sac* I 将 pGS-A 质粒与 Δ 3-1 和 Δ 3-2 基因片段进行双酶切, 酶切产物回收纯化, 将纯化后的片段 Δ 3-1 和 Δ 3-2 连接到 pGS-A 中获得半长质粒 pGS-A- Δ 3-1/ Δ 3-2。

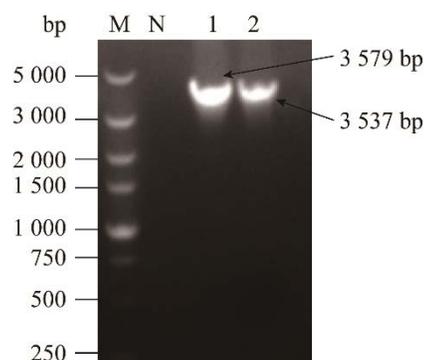


图 3 Δ 3-1 和 Δ 3-2 融合 PCR 扩增 M: DL5000 DNA 分子标记; Lane 1: Δ 3-1 融合扩增条带; Lane 2: Δ 3-2 融合扩增条带; N: 阴性对照

Figure 3 Fusion PCR amplification of Δ 3-1 and Δ 3-2. M: DL5000 DNA Marker; Lane 1: Fusion fragment of Δ 3-1; Lane 2: Fusion fragment of Δ 3-2; N: Negative control.

2.2 全长重组质粒构建及鉴定

通过限制性内切酶 *Sph* I、*Nhe* I 双酶切半长质粒 pGS-B 与 pGS-A- Δ 3-1/ Δ 3-2, 将切下的 GS-A- Δ 3-1/ Δ 3-2 片段连入 pGS-B 中, 获得全长质粒 pGS-AB- Δ 3-1/ Δ 3-2, 全长质粒长约 18 kb (图 4A)。pGS-AB- Δ 3-1、pGS-AB- Δ 3-2 全长质粒通过限制性内切酶 *Sac* I 酶切鉴定结果(图 4B), *Sac* I 酶切可得 13 000、4 768、1 300 bp 三条条带。全长质粒的酶切条带与预期大小一致, 表明 pGS-AB- Δ 3-1 与 pGS-AB- Δ 3-2 全长 cDNA 质粒构建成功。

2.3 缺失病毒的拯救

将纯化后的线性化 DNA 转染 Marc-145 细胞, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养观察。在 Marc-145 细胞连续传代至第 5 代后培养 84 h 出现典型的细胞病变(图 5): 细胞开始聚集、变圆、皱缩、崩解、大部分细胞脱落。收集 Marc-145 细胞上连续稳定传至第 15 代的细胞毒液, 超速

离心后, 用 PRRSV 抗血清进行免疫电镜负染观察。拯救病毒粒子呈 PRRSV 的典型形态特征, 即有囊膜的球形病毒粒子, 直径大小为 50–80 nm, 以上结果说明成功拯救到 2 株在 NSP2 中缺失 3 个位点的缺失毒株分别命名为 rGS15- Δ 3-1 和 rGS15- Δ 3-2。

2.4 缺失病毒的鉴定

2.4.1 PCR 扩增鉴定缺失病毒的缺失区域与传代稳定性

分别取拯救病毒第 5、10、20、30、40 代病毒液和亲本病毒, 提取病毒 RNA, 反转录以 cDNA 为模板, 利用鉴定引物 1648F 和 3720R, 通过 PCR 扩增 NSP2 缺失区域, 可得明显的扩增条带, 拯救病毒的条带均小于亲本病毒, 同代次缺失病毒的扩增条带大小相同, 分别为 1 445 bp 和 1 385 bp, 与预期结果一致(图 6)。将扩增片段进行测序鉴定, 结果表明, 缺失病毒 rGS15- Δ 3-1、rGS15- Δ 3-2 的缺失标记均稳定存在。不同代次缺失病毒

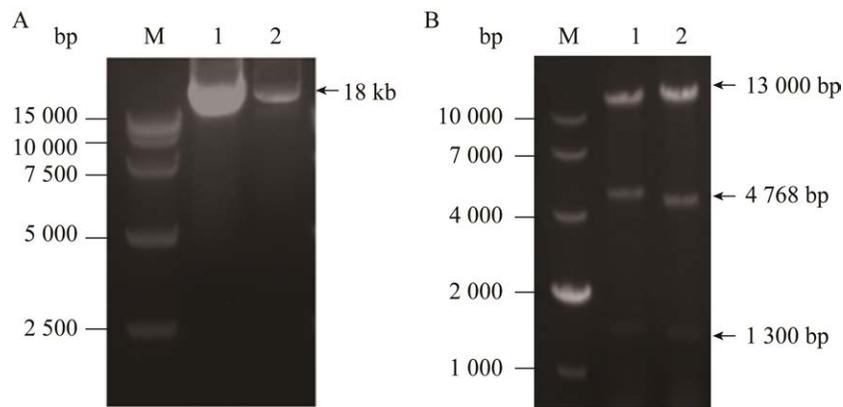


图 4 全长质粒 pGS-AB- Δ 3-1 和 pGS-AB- Δ 3-2 1%凝胶电泳鉴定 A: pGS-AB- Δ 3-1 和 pGS-AB- Δ 3-2 株全长质粒. M: DL15000 DNA 分子标记; Lane 1: pGS-AB- Δ 3-1 全长质粒; Lane 2: pGS-AB- Δ 3-2 全长质粒. B: pGS-AB- Δ 3-1 和 pGS-AB- Δ 3-2 株全长质粒酶切鉴定. M: DL10000 DNA 分子标记; Lane 1: pGS-AB- Δ 3-1 *Sac* I 酶切产物; Lane 2: pGS-AB- Δ 3-2 *Sac* I 酶切产物

Figure 4 Identification of full-length plasmids pGS-AB- Δ 3-1 and pGS-AB- Δ 3-2 by 1% gel electrophoresis. A: Full-length plasmid pGS-AB- Δ 3-1 and pGS-AB- Δ 3-2. M: DL15000 DNA Marker; Lane 1: Full-length plasmid pGS-AB- Δ 3-1; Lane 2: Full-length plasmid pGS-AB- Δ 3-2. B: Identification of full-length plasmid pGS-AB- Δ 3-1 and pGS-AB- Δ 3-2 by enzyme digestion. M: DL10000 DNA Marker; 1: pGS-AB- Δ 3-1 digested with *Sac* I; 2: pGS-AB- Δ 3-2 digested with *Sac* I.

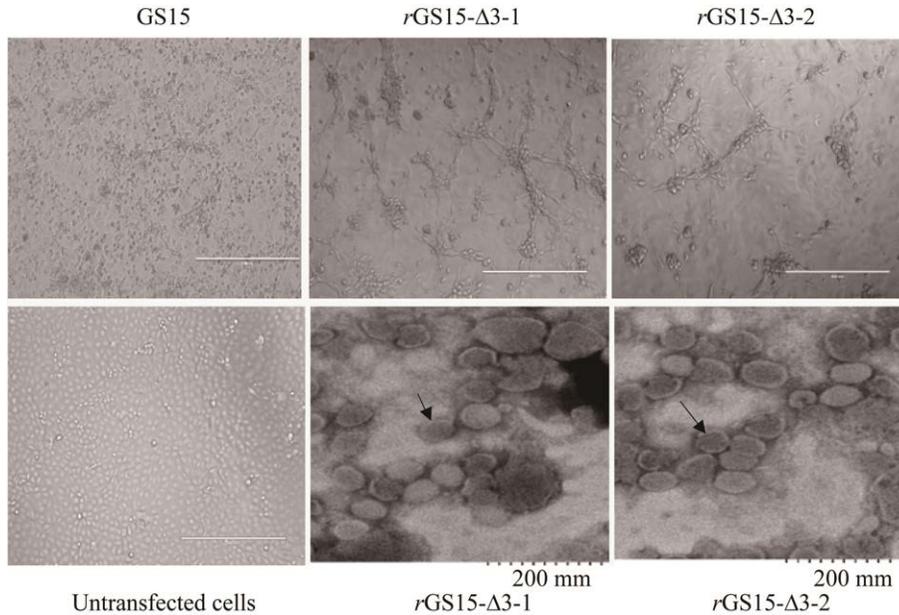


图 5 亲本病毒 GS15 和拯救病毒 *rGS15-Δ3-1*、*rGS15-Δ3-2* 在 Marc-145 细胞上的细胞病变效应及拯救病毒 *rGS15-Δ3-1*、*rGS15-Δ3-2* 的电镜观察

Figure 5 Cytopathic effect of the parent virus GS15 and rescued viruses *rGS15-Δ3-1*, *rGS15-Δ3-2* on Marc-145, and electron micrographs of the rescued viruses *rGS15-Δ3-1* and *rGS15-Δ3-2*.

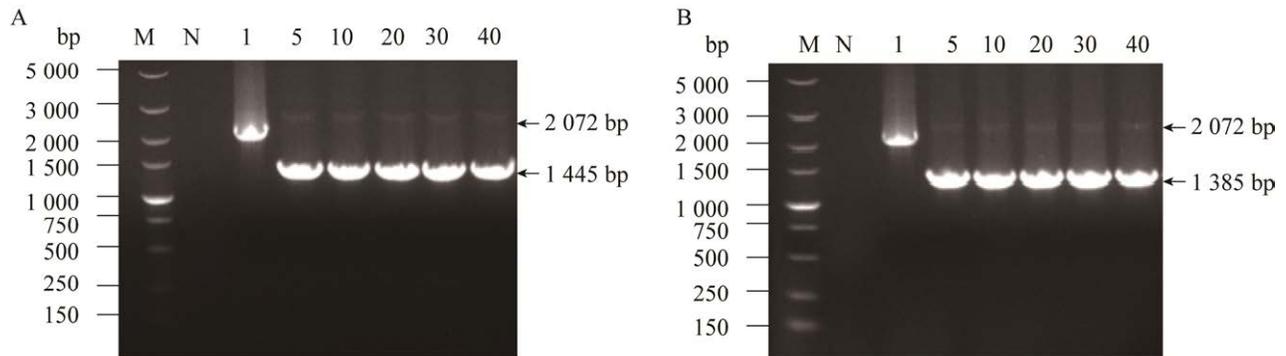


图 6 不同代次缺失病毒 *rGS15-Δ3-1* (A)和 *rGS15-Δ3-2* (B) NSP2 缺失区域 PCR 扩增鉴定 M:DL5000 DNA 分子标记; N: 阴性对照。A, Lane 1: GS15; Lane 5–40: *rGS15-Δ3-1* 毒株第 5 到第 40 代 RT-PCR 扩增条带。B, Lane 1: GS15; Lane 5–40: *rGS15-Δ3-2* 毒株第 5 到第 40 代 RT-PCR 扩增条带

Figure 6 The deletion region of NSP2 was identified by PCR amplification of different passages of deletion virus *rGS15-Δ3-1* (A) and *rGS15-Δ3-2* (B). M: DL10000 DNA Marker; N: Negative control. A, Lane 1: RT-PCR product of GS15; Lane 5–40: F5–F40 RT-PCR products of *rGS15-Δ3-1*. B, Lane 1: RT-PCR product of GS15; Lane 5–40: F5–F40 RT-PCR products of *rGS15-Δ3-2*.

rGS15-Δ3-1、*rGS15-Δ3-2* 的全长序列与亲本病毒 GS15 全长序列比对结果表明(表 2), *rGS15-Δ3-1* 传至第 40 代共有 8 个氨基酸发生突变, 其中主要集中在第 5 代至第 10 代共有 7 个氨基酸发生突变, 而第 20 代至第 40 代仅有 1 个

氨基酸发生突变; *rGS15-Δ3-2* 传至第 40 代共有 5 个氨基酸发生突变, 主要也集中在第 5 代至第 10 代共有 4 个氨基酸发生突变, 而第 20 代至第 40 代也仅有 1 个氨基酸发生突变。拯救病毒的突变氨基酸主要分布于 NSP1 β 、NSP2、GP5 和 N。

表 2 rGS15-Δ3-1 和 rGS15-Δ3-2 不同代次病毒核苷酸和氨基酸突变的位置及氨基酸变化统计

Table 2 Nucleotide and amino acid mutations of rGS15-Δ3-1 and rGS15-Δ3-2 viruses at different passages and amino acid change statistics

Protein	Nucleotide position	Nucleotide change	Amino acid position	Parent virus GS15	Amino acid change in rGS15-Δ3-1		Amino acid change in rGS15-Δ3-2	
					F5	F20	F5	F20
NSP1β	821	G→T	201	W	N	Silent	Silent	N
NSP2	3 799	C→A/T	1 194	L	I	Silent	F	Silent
	3 821	A→G/C	1 201	Q	R	Silent	P	Silent
	3 946	A→T	1 243	S	C	Silent	Silent	Silent
	3 970	C→G	1 251	P	Silent	A	A	Silent
GP4	13 431	A→C	84	N	T	Silent	Silent	Silent
GP5	13 414	G→A	13	R	K	Silent	Silent	Silent
N	14 904	C→T	26	L	Silent	Silent	P	Silent
	14 946	G→C	40	G	A	Silent	Silent	Silent

2.4.2 间接免疫荧光检测(immunofluorescence assay, IFA)

将亲本毒株 GS15 和缺失病毒 rGS15-Δ3-1、rGS15-Δ3-2 病毒液按体积分数 1% 接种 Marc-145 细胞, 72 h 后进行 IFA 检测。结果显示, 接种亲本病毒 GS15 和拯救病毒 rGS15-Δ3-1、rGS15-Δ3-2 的细胞在荧光显微镜下可观察到特异的绿色荧光(图 7), 而对照细胞无荧光。

2.5 缺失病毒的 TCID₅₀

对 rGS15-Δ3-1 和 rGS15-Δ3-2 第 5、10、20、30、40 代培养物进行了 TCID₅₀ 测定。结果表明(表 3), 拯救病毒与亲本病毒相比病毒滴度差异显著($P < 0.05$), 两个拯救病毒不同代次之间的滴度无显著差异($P > 0.05$)。表明 rGS15-Δ3-1 和 rGS15-Δ3-2 在 Marc-145 细胞上连续传代 20 代后滴度增殖稳定。

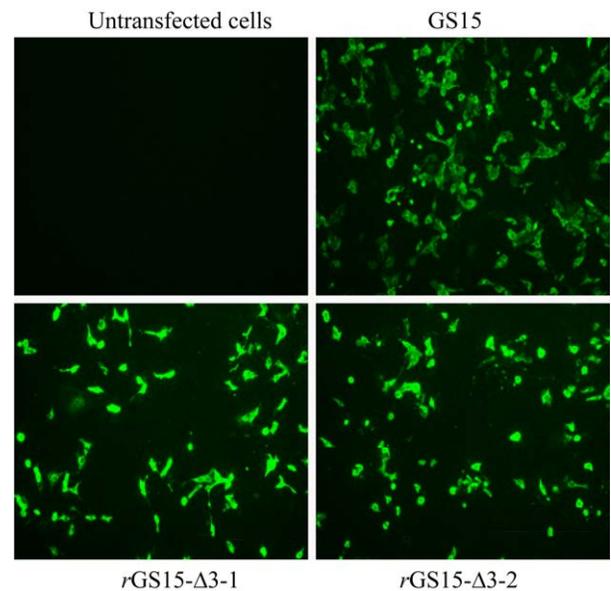


图 7 亲本病毒 GS15 与拯救病毒 rGS15-Δ3-1、rGS15-Δ3-2 IFA 鉴定(72 h, 200×)

Figure 7 Identification of the parental virus GS15 and rescued viruses rGS15-Δ3-1, rGS15-Δ3-2 using IFA (72 h, 200×).

表 3 拯救病毒不同代次病毒滴度测定

Table 3 Detection of virus titers of different generations of rescue viruses

Deletion virus	F5	F10	F20	F30	F40
rGS15-Δ3-1	5.35 (0.20)	5.31 (0.22)	5.80 (0.21)	6.01 (0.20)	5.98 (0.30)
rGS15-Δ3-2	4.90 (0.30)	5.15 (0.22)	5.70 (0.30)	5.90 (0.24)	5.85 (0.40)

Standard error of mean titers shown in parenthesis.

2.6 拯救病毒的生长曲线

对亲本毒株 GS15、单点缺失毒株 $rGS15-\Delta 1$ 、双缺失毒株 $rGS15-\Delta 2$ 和第 20 代的拯救病毒 $rGS15-\Delta 3-1$ 和 $rGS15-\Delta 3-2$ 在 Marc-145 细胞上进行病毒生长曲线测定, 每个采样时间点重复 3 次, 各时间点的病毒滴度如图 8 所示。结果表明, 拯救病毒的滴度在每个时间点都低于亲本毒株 GS15、 $rGS15-\Delta 1$ 、 $rGS15-\Delta 2$, 其中在 48 h $rGS15-\Delta 3-1$ 和 $rGS15-\Delta 3-2$ 显著低于亲本毒株 GS15、 $rGS15-\Delta 1$ 、 $rGS15-\Delta 2$ 。拯救病毒的生长特性明显低于亲本病毒 GS15、 $rGS15-\Delta 1$ 、 $rGS15-\Delta 2$, 而 $rGS15-\Delta 3-1$ 和 $rGS15-\Delta 3-2$ 的生长特性没有明显的差异($P>0.05$)。拯救病毒 $rGS15-\Delta 3-1$ 和 $rGS15-\Delta 3-2$ 在 Marc-145 细胞上已适应良好, 72 h 能达到较高的滴度, 达到最高滴度的培养时间比亲本病毒延迟 24 h。

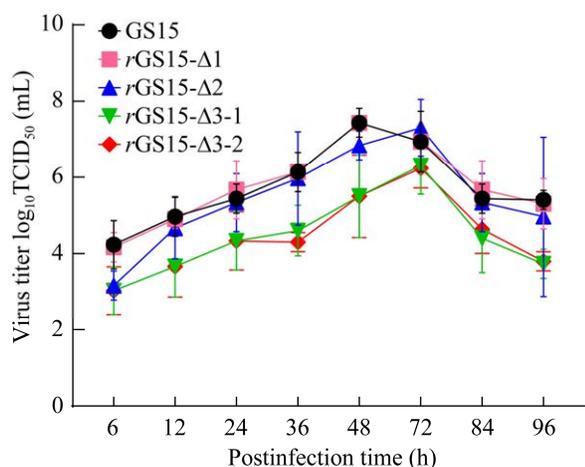


图 8 亲本病毒 GS15、 $rGS15-\Delta 1$ 、 $rGS15-\Delta 2$ 以及拯救病毒 $rGS15-\Delta 3-1$ 、 $rGS15-\Delta 3-2$ 的生长曲线

Figure 8 The growth curves of the parental viruses GS15, $rGS15-\Delta 1$, $rGS15-\Delta 2$ and the rescued viruses $rGS15-\Delta 3-1$, $rGS15-\Delta 3-2$.

3 讨论与结论

自从 PRRS 在全球暴发以来, 疫苗接种是预防和控制该疾病最可行和有效的措施之一^[17], 灭活疫苗和改良活疫苗已广泛应用于临床。然而, 这些目前使用的商业化的疫苗在安全性和免疫保护力上存在一些局限性^[18]。van Oirschot 于 1999 年提出了标记疫苗的概念(marker vaccine), 也叫区分感染者和接种疫苗者疫苗(differentiating infected from vaccinated individuals, DIVA), 其主要特点是在相应的弱毒疫苗中删除一个或多个具有抗原性, 并且是病毒复制非必需的区域作为阴性标记, 用以区分疫苗接种动物和野毒感染动物^[19-20]。目前, 这些商业化的 PRRSV 疫苗的共同缺点是缺乏 DIVA, 这意味着对感染和接种的动物无法区分, 进而无法净化根除疾病^[21]。因此, 研发一种 DIVA 弱毒疫苗对 PRRS 的控制和最终根除具有重要价值。

应用反向遗传学技术构建 RNA 病毒感感染性克隆, 已被广泛应用于研究病毒遗传变异、致病机制以及新一代标记疫苗研发等领域^[22]。相关研究表明 NSP2 具有较高的抗原性, 在该蛋白中鉴定出许多表位^[23], 包括免疫原性 B 细胞表位和一些潜在的 T 细胞表位^[24]。张民泽等^[25]以高致病性 XH-GD 株的感染性克隆为骨架, 构建了包含 3 处抗原表位缺失 105 aa 的感染性重组质粒并拯救到活病毒, NSP2 上一些抗原表位并不是病毒复制的必需区域, 缺失并不影响病毒的复制。本研究利用 IEDB 在线软件分析 PRRSV NSP2 中 B 细胞线性表位, 其中第 323-364 位和第 372-433 位为优势抗原表位, 在 NSP2 上缺失第 323-364 位和 372-433 位氨基酸并成功拯救到活病毒, 也表明这 2 个抗原表位不是病毒复制的必需区域。通过研究缺失优势抗原表位对病毒生长特性的影响, 可以为研制 PRRSV DIVA 疫苗奠定一定理论基础。

NSP2 中缺失区域的长短及位置对病毒复制具有一定的影响。研究发现缺失短片段的氨基酸,并不影响病毒在 Marc-145 细胞上的复制,而缺失长片段的氨基酸可能会降低病毒的复制能力^[26]。本课题组王治家等^[14]前期拯救获得了在 NSP2 缺失 47 aa 的 *rGS15-Δ1*,但其复制能力强于亲本病毒,而拯救获得缺失 167 aa 的 *rGS15-Δ2*,其复制能力略低于亲本病毒。研究报道在 VR2332 的 NSP2 上拯救获得了缺失第 323–433 位(110 aa)的病毒^[9]。本研究在缺失 167 aa 的重组质粒的基础上尝试缺失第 323–433 位(110 aa)但未能拯救到活病毒,这可能是由于缺失片段过长或是存在毒株特异性,因为高致病病毒株 GS15 与 VR2332 基因组一致性为 93.5%,NSP2 氨基酸一致性仅为 73.0%。因此,本研究将该缺失区域根据优势表位截断为 2 个部分,在双缺失毒株 *rGS15-Δ2* 的基础上分别缺失第 323–364 位(共 208 aa)和第 372–433 位(共 228 aa),拯救获得 2 株 3 个位点缺失毒株 *rGS15-Δ3-1* 和 *rGS15-Δ3-2*。亲本毒株 GS15 产生典型细胞病变的时间一直在感染后 48 h 左右,而 *rGS15-Δ3-1* 和 *rGS15-Δ3-2* 产生典型细胞病变的时间是感染后 72 h 左右,比亲本病毒晚 24 h。这表明成功拯救的缺失长片段氨基酸病毒,致细胞病变的时间延长。*rGS15-Δ3-1*、*rGS15-Δ3-2* 在体外连续传代,病毒滴度增殖稳定分别为 $10^{6.0}$ TCID₅₀/mL, $10^{5.8}$ TCID₅₀/mL,与亲本毒株 GS15、*rGS15-Δ3-1*、*rGS15-Δ3-2* 相比在 Marc-145 细胞上的增殖速度有所减慢,病毒滴度差异显著($P < 0.05$)。另外,*rGS15-Δ3-1*、*rGS15-Δ3-2* 生长曲线表明,这 2 株 3 个位点缺失毒株的复制能力明显低于亲本毒株,以上结果表明长片段氨基酸的缺失不仅影响病毒致细胞病变的能力,而且对病毒在体外的复制水平也有一定的影响。

拯救毒株 *rGS15-Δ3-1*、*rGS15-Δ3-2* 在 Marc-145 细胞上可以稳定连续传代,传至第 5 代出现典型的细胞病变。自第 20 代以后各代次间的病毒滴度也无明显差异。另外,拯救病毒 *rGS15-Δ3-1*、*rGS15-Δ3-2* 的缺失标记在不同代次中均稳定存在。PRRSV 非结构蛋白的功能主要表现在病毒 RNA 复制合成及宿主对病毒的免疫反应调控过程;而结构蛋白为成熟病毒粒子的构成成分,在病毒刺激宿主免疫反应过程中发挥重要作用^[27]。分析拯救病毒的全基因组氨基酸的突变情况,发现 *rGS15-Δ3-1* 传至第 40 代共有 8 个氨基酸发生突变,其中主要集中在第 5 代和第 10 代,共有 7 个氨基酸发生突变,而第 20 代和第 40 代仅有 1 个氨基酸发生突变;*rGS15-Δ3-2* 传至第 40 代共有 5 个氨基酸发生突变,主要也集中在第 5 代和第 10 代,共有 4 个氨基酸发生突变,而第 20 代和第 40 代也仅有 1 个氨基酸发生突变。拯救病毒的突变氨基酸主要分布于 NSP1 β 、NSP2、GP5 和 N,其他区结构蛋白和非结构蛋白中未发现突变的核苷酸和氨基酸。由于结构蛋白的基因序列相对比较保守,所以氨基酸的突变主要发生在非结构蛋白^[28]。*rGS15-Δ3-1* 和 *rGS15-Δ3-2* 在非结构蛋白 NSP1 突变氨基酸中 W201N 该位置氨基酸的突变影响半胱氨酸酶 β 的活性从而影响了 PRRSV 的基因组复制和转录;*rGS15-Δ3-1* 和 *rGS15-Δ3-2* 在 NSP2 突变的氨基酸分别为 L1194I、Q1201R、S1243C、P1251A、L1194F、Q1201P 和 P1251A,主要分布于中间高变区域中,以上氨基酸的突变可能对胰凝乳蛋白酶样半胱氨酸蛋白酶的切割效率造成影响,从而影响病毒的增殖或装配;GP4 为次要结构蛋白,能够经二硫键与 GP2 和 GP3 形成异源三聚体,GP4 为糖基化蛋白,有 4 个糖基化位点分别为第 37 位、第 84 位、第 120 位和第

130位^[29]。rGS15-Δ3-1在GP4第84位氨基酸发生突变,由N突变为T,该位点氨基酸的突变影响PRRSV毒力,同时也影响了病毒的复制。GP5、N蛋白是PRRSV的主要结构蛋白,在病毒对细胞的吸附和感染中发挥重要的作用^[30]。GP5是膜基质蛋白,变异程度大,rGS15-Δ3-1在GP5第13位氨基酸发生突变,均由R突变为K,研究表明GP5蛋白中第13位和第152位氨基酸与病毒毒力有关^[31],R13和R152是强毒株的特征,但PRRSV的毒力是由多基因决定的,该位点氨基酸的突变也可能影响拯救病毒的致病力。N蛋白相对保守,在结构蛋白中占比最高,免疫原性最强,美洲型毒株N蛋白至少有5个抗原表位,4个是线性表位(30–52 aa、37–52 aa、69–112 aa和112–123 aa),另一个是以52–69 aa和112–123 aa为中心的构象决定簇,其中4个线性表位在美洲毒株间是相对保守的^[32]。rGS15-Δ3-2在N蛋白第26位氨基酸发生突变,由L突变为P,突变的氨基酸不在线性表位和构象决定簇上,该位置氨基酸的突变不影响病毒的免疫原性。rGS15-Δ3-1在N蛋白第40位氨基酸发生突变,由G突变为A,这第40位突变的氨基酸位于线性表位β转角与无规则蜷曲的区域,该氨基酸的突变可能影响rGS15-Δ3-1的免疫原性。以上非结构蛋白和结构蛋白氨基酸的突变影响了病毒在细胞上的复制和致病力,降低了病毒的复制效率和致病性,同时也影响了病毒的免疫原性。

理想的PRRSV疫苗应是具有DIVA功能的弱毒疫苗,本研究结果证明通过缺失多个抗原表位来开发新一代PRRSV DIVA疫苗的方法是可行的。同时制备配套的血清鉴别诊断试剂盒,用于疫苗免疫动物和野毒感染动物的鉴别诊断,从而有望净化根除猪场PRRS。

参考文献

- [1] LI JX, LI SB, QIU M, LI XS, LI C, FENG BH, LIN H, ZHENG WL, ZHU JZ, CHEN NH. Minor and major envelope proteins of PRRSV play synergistic roles in inducing heterologous neutralizing antibodies and conferring cross protection[J]. *Virus Research*, 2022, 315: 198789.
- [2] RAWAL G, ALMEIDA MN, GAUGER PC, ZIMMERMAN JJ, YE FS, RADEMACHER CJ, ARMENTA LEYVA B, MUNGUIA-RAMIREZ B, TARASIUK G, SCHUMACHER LL, ALJETS EK, THOMAS JT, ZHU JH, TREXEL JB, ZHANG JQ. *In vivo* and *in vitro* characterization of the recently emergent PRRSV 1-4-4 L1C variant (L1C.5) in comparison with other PRRSV-2 lineage 1 isolates[J]. *Viruses*, 2023, 15(11): 2233.
- [3] DEE S, SHAH A, JONES C, SINGREY A, HANSON D, EDLER R, SPRONK G, NIEDERWERDER M, NELSON E. Evidence of viral survival in representative volumes of feed and feed ingredients during long-distance commercial transport across the continental United States[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2022, 69(1): 149-156.
- [4] NAN Y, WU C, GU G, SUN WY, ZHANG YJ, ZHOU EM. Improved vaccine against PRRSV: current progress and future perspective[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1635-1652.
- [5] KICK AR, GRETE AF, CRISCI E, ALMOND GW, KÄSER T. Testable candidate immune correlates of protection for porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccination[J]. *Vaccines*, 2023, 11(3): 594.
- [6] WANG QM, YI HY, GUO YC, SUN YK, YU ZQ, LU LC, YE RR, XIE EM, WU QW, QIU YW, QUAN WP, ZHANG GH, WANG H. PCNA promotes PRRSV replication by increasing the synthesis of viral genome[J]. *Veterinary Microbiology*, 2023, 281: 109741.
- [7] CHAUDHARI J, VU HLX. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus reverse genetics and the major applications[J]. *Viruses*, 2020, 12(11): 1245.
- [8] LIU X, BAI J, WANG HY, FAN BC, LI YF, JIANG P. Effect of amino acids residues 323–433 and 628–747 in Nsp2 of representative porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains on inflammatory response *in vitro*[J]. *Virus Research*, 2015, 208: 13-21.

- [9] HAN J, LIU GP, WANG Y, FAABERG KS. Identification of nonessential regions of the Nsp2 replicase protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain VR-2332 for replication in cell culture[J]. *Journal of Virology*, 2007, 81(18): 9878-9890.
- [10] SHI XB, FAN XM, NIE SY, KOU LY, ZHANG XZ, LIU HL, JI SD, DENG RG, WANG AP, ZHANG GP. Identification of a linear B-cell epitope on glycoprotein (GP) 2a of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 139: 1288-1294.
- [11] 刘飞, 王开功, 周碧君, 罗险峰, 文明, 安同庆, 刘春国, 程振涛, 路宪礼, 陈俊. 贵州省 PRRSV 分离株 Nsp2 基因的克隆及序列分析[J]. *中国预防兽医学报*, 2010, 32(12): 924-928.
- LIU F, WANG KG, ZHOU BJ, LUO XF, WEN M, AN TQ, LIU CG, CHENG ZT, LU XL, CHEN J. Cloning and sequence analysis of the *Nsp2* gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolated in Guizhou area[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2010, 32(12): 924-928 (in Chinese).
- [12] KIM DY, KAISER TJ, HORLEN K, KEITH ML, TAYLOR LP, JOLIE R, CALVERT JG, ROWLAND RRR. Insertion and deletion in a non-essential region of the nonstructural protein 2 (Nsp2) of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: effects on virulence and immunogenicity[J]. *Virus Genes*, 2009, 38(1): 118-128.
- [13] CHOI HW, NAM E, LEE YJ, NOH YH, LEE SC, YOON IJ, KIM HS, KANG SY, CHOI YK, LEE C. Genomic analysis and pathogenic characteristics of type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus *nsp2* deletion strains isolated in Korea[J]. *Veterinary Microbiology*, 2014, 170(3/4): 232-245.
- [14] 王治家, 张婧, 白伟杰, 孙普, 曹轶梅, 李冬, 刘在新, 卢曾军. 通过基因组合成构建美洲型猪繁殖与呼吸综合征病毒感染性克隆[J]. *中国兽医科学*, 2017, 47(7): 838-842.
- WANG ZJ, ZHANG J, BAI WJ, SUN P, CAO YM, LI D, LIU ZX, LU ZJ. Construction of infectious clones of porcine reproductive and respiratory syndrome virus *via* biosynthesis[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2017, 47(7): 838-842.
- [15] 谯雨, 王治家, 张婧, 孙普, 白兴文, 李坤, 包慧芳, 曹轶梅, 李平花, 李冬, 刘在新, 卢曾军. 两株 PRRSV NSP2 不同位置缺失基因工程病毒的生物学特性分析[J]. *中国兽医科学*, 2019, 49(9): 1073-1081.
- QIAO Y, WANG ZJ, ZHANG J, SUN P, BAI XW, LI K, BAO HF, CAO YM, LI PH, LI D, LIU ZX, LU ZJ. Biological features of two genetically engineered porcine reproductive and respiratory syndrome viruses with deletions at different locations in non-structural protein 2[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2019, 49(9): 1073-1081.
- [16] BAI WJ, WANG ZJ, SUN P, ZHANG J, BAO HF, CAO YM, CHANG YY, LIU ZX, LI D, LU ZJ. The molecular characteristic analysis of PRRSV GSWW/2015 strain and its pathogenicity to pigs[J]. *BMC Veterinary Research*, 2018, 14(1): 240.
- [17] WANG SY, LIU YL, YU LY, LIANG TR, ZHANG PF, DONG JG, ZHANG LY, LIANG PS, WANG L, XU Z, SONG CX. A strain of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus: genomic characterization, pathogenicity, and construction of an infectious full-length cDNA clone[J]. *Archives of Virology*, 2021, 166(11): 3127-3141.
- [18] LITTLE E, DUNKELBERGER J, HANSON D, EGGERT J, GONDA M, MacNEIL M, KNOL E, DEE S. Evaluation of PRRSV vaccine efficacy following infection with PRRSV 1-7-4[J]. *Journal of Swine Health and Production*, 2021, 29(4): 204-207.
- [19] van Oirschot JT. Diva vaccines that reduce virus transmission[J]. *Journal of Biotechnology*, 1999, 73(2/3): 195-205.
- [20] PASICK J. Application of DIVA vaccines and their companion diagnostic tests to foreign animal disease eradication[J]. *Animal Health Research Reviews*, 2004, 5(2): 257-262.
- [21] GAO F, JIANG YF, LI GX, LI LW, ZHANG YJ, YU LX, ZHENG H, TONG W, ZHOU YJ, LIU CL, SHAN TL, YU H, KONG N, CHEN PF, TONG GZ. Evaluation of immune efficacy of recombinant PRRSV vectored vaccine rPRRSV-E2 in piglets with maternal derived antibodies[J]. *Veterinary Microbiology*, 2020, 248: 108833.
- [22] PANDEY MK, RAJUKUMAR K, SENTHILKUMAR D, KOMBIAH S, SINGH F, VENKATESH G, KUMAR M, SHRIVAS S, SHRIVASTAVA D, SINGH VP, SANYAL A. Evaluation of dynamics of immune responses and protective efficacy in piglets immunized with an inactivated porcine reproductive and respiratory syndrome vaccine candidate[J]. *Vaccine*, 2023, 41(42): 6327-6338.

- [23] MA J, MA LL, YANG MT, WU W, FENG WH, CHEN ZZ. The function of the PRRSV-host interactions and their effects on viral replication and propagation in antiviral strategies[J]. *Vaccines*, 2021, 9(4): 364.
- [24] LEE MN, JAYARAMAIAH U, YOU SH, SHIN EG, SONG SM, JU L, KANG SJ, HYUN BH, LEE HS. Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Korea from 2018 to 2022[J]. *Pathogens*, 2023, 12(6): 757.
- [25] 张民泽, 谢杰雄, 郭泗虎, 王衡, 闫明菲, 赵孟孟, 黄震, 粟硕, 孙龙, 张桂红. PRRSV XH-GD 株 Nsp2 部分缺失感染性克隆的构建[J]. *中国预防兽医学报*, 2013, 35(1): 10-14.
ZHANG MZ, XIE JX, GUO SH, WANG H, YAN MF, ZHAO MM, HUANG Z, SU S, SUN L, ZHANG GH. Construction and identification of infectious clone of partial deletion in Nsp2 for porcine reproductive and respiratory syndrome virus XH-GD strain[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2013, 35(1): 10-14 (in Chinese).
- [26] XU YZ, ZHOU YJ, ZHANG SR, TONG W, LI L, JIANG YF, TONG GZ. Identification of nonessential regions of the Nsp2 protein of an attenuated vaccine strain (HuN4-F112) of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus for replication in Marc-145 cell[J]. *Virology Journal*, 2012, 9: 141.
- [27] DENG H, XIN N, ZENG FC, WEN F, YI HY, MA CQ, HUANG SJ, ZHANG GH, CHEN Y. A novel amino acid site of N protein could affect the PRRSV-2 replication by regulating the viral RNA transcription[J]. *BMC Veterinary Research*, 2022, 18(1): 171-183.
- [28] SHA HY, ZHANG H, CHEN Y, HUANG LZ, ZHAO MM, WANG NN. Research progress on the NSP9 protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2022, 9: 872205.
- [29] GUO H, GAOWA WD, ZHAO HZ, LIU CY, HOU LN, WEN YJ, WANG FX. Glycosylated protein 4-deficient PRRSV in complementing cell line shows low virus titer[J]. *Research in Veterinary Science*, 2023, 158: 84-95.
- [30] WANG HL, XU YY, FENG WH. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: immune escape and application of reverse genetics in attenuated live vaccine development[J]. *Vaccines*, 2021, 9(5): 480.
- [31] ZHANG MZ, HAN XL, OSTERRIEDER K, VEIT M. Palmitoylation of the envelope membrane proteins GP5 and M of porcine reproductive and respiratory syndrome virus is essential for virus growth[J]. *PLoS Pathogens*, 2021, 17(4): e1009554.
- [32] ZHANG LX, LI R, GENG R, WANG L, CHEN XX, QIAO SL, ZHANG GP. Tumor susceptibility gene 101 (*TSG101*) contributes to virion formation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus *via* interaction with the nucleocapsid (N) protein along with the early secretory pathway[J]. *Journal of Virology*, 2022, 96(6): e0000522.