

PRRSV 全长感染性 cDNA 克隆的构建: 非结构蛋白和结构蛋白之间编码区的分离

袁世山*, 韦祖樟

中国农业科学院上海兽医研究所 中国动物卫生与流行病学中心上海分中心 动物传染病防治研究室农业部动物寄生虫病重点实验室, 上海 200232

* 联系人, E-mail: shishanyuan@hotmail.com

收稿日期: 2007-09-04; 接受日期: 2007-10-16

国家自然科学基金重点项目(批准号: 30530580)和国家重点基础研究发展计划(批准号: 2005CB523200)资助

摘要 猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)是近两年来流行于我国大部分省份的“猪高热综合征”的主要病原体. 该病毒在繁殖过程中具有遗传多变性和高频率的抗原突变. 如何设计有效的疫苗来防治持续多变的流行变异株是研究者所关注的焦点. 本研究中我们构建了 II 型 PRRSV 弱毒株的感染性 cDNA 克隆, 并对编码结构蛋白的 ORF1 和编码结构蛋白的 ORF2 之间插入几个酶切位点. 通过 RT-PCR 和 DNA 测序以及分子克隆方法, 获得了细胞致弱株(APRRS)的全长 cDNA 克隆. APRRSV 基因组 RNA 为 15521 个核苷酸(不包括 poly(A)尾). 与 PRRSV Nsp 株和疫苗株的相似性均为 99.7%. 根据测序结果, 利用基因组上的酶切位点将全长 PRRSV cDNA 克隆到 pBlueScript 载体中, 在病毒 5' 末端引入 T7 启动子序列. 为了区分重组病毒和亲本病毒, 在 ORF5 编码区引入 *Mlu* I 酶切位点. 将最初构建的全长 cDNA 和带有 *Mlu* I 酶切位点的 cDNA 分别体外转录成 RNA 后转染 MA-104, 均能够观察到典型的细胞病变(cytopathic effect, CPE). 拯救的重组病毒与亲本病毒有着相同的病毒学特性. 通过突变 PCR 的方法将编码非结构蛋白基因 ORF1 和编码结构蛋白基因 ORF2-7 之间的编码区分离, 从而构建了克隆 pCSA. pCSA 体外转录产物具有感染性, 而且拯救的病毒与亲本病毒具有相同的病毒学特性. 本研究为构建嵌合病毒作为疫苗候选株以此对遗传多变的 PRRSV 毒株提供有效的交叉保护提供了宝贵的工具, 同时也为建立 PRRSV 为基因表达载体来构建针对其他重要的猪源疾病重组疫苗搭建了一个很好的平台.

关键词

猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)
反向遗传系统
编码区
非结构蛋白

猪繁殖与呼吸综合征(porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)于二十世纪 80 年代后期

在美国首先被发现^[1]. Wensvoort 等人^[2]在 1991 年首先在荷兰分离到了 PRRSV, 并命名为 LV 株(Lelystad

virus). 随后 Collins 等人 [1] 在美国分离到 PRRSV 北美株 (VR-2332). 根据血清型和遗传特性的差异, 可将 PRRSV 划分为 2 个基因型 (Genotype), 即欧洲 (I) 型 (代表株 Lelystad virus, LV) 和美洲 (II) 型 (代表株 VR 2332) [4]. 目前该病已在全世界范围内流行, 造成了重大的经济损失. 1996 年我国 Guo 等人 [5] 首次从国内 PRRS 血清阳性猪群中分离到 PRRSV, 证实了我国也有该病的流行. 如今在我国猪群中的 PRRSV 感染率高达 90%. 该病主要临床的特征为感染母猪流产和不孕, 感染的小猪可由于继发感染其他病原而导致死亡率上升. 在过去的 20 年中, 由 PRRSV 造成的损害也日益严重. 不久前在 PRRSV 高发猪群中分离到嗜神经型的 PRRSV, 提示着 PRRSV 可能扩大它的靶组织嗜性 [6]; 最近, 出现了一种 PRRSV, 以导致怀孕母猪更严重的流产和高死亡率为特征, 使养猪业遭受了巨大的经济损失 [7]; 更让人惊讶的是在免疫了活疫苗的猪群中也爆发了所谓的非典型性 PRRSV (atypical PRRSV) [7]. 2006 年春季开始, 席卷我国大部分地区的所谓“猪无名高热” (porcine high fever syndrome, PHFS) 导致了约 3000 万头生猪死亡, 实验证明从中分离到的高致病 PRRSV 变异株为 PHFS 主要的致病病原 [8,9] (Yuan 等人, 未发表资料). 尽管尝试了不同的传统疫苗, 都不能有效地对高致病性 PRRSV 变异株起到免疫保护作用 (Tian 等人, 个人交流). 另外, PRRSV 的靶细胞为猪肺泡巨噬细胞, 感染猪后可导致宿主免疫抑制从而引发二次感染. 该病常与其他病原一起形成混合感染, 造成了更加难以防治的断奶仔猪多系统衰竭综合征 (post-weaning multi-system syndrome, PMWS) 和猪呼吸道疾病综合征 (porcine respiratory disease complex, PRDC). 很明显, PRRS 已成为世界养猪业的头号威胁, 对 PRRSV 制定有效预防和控制策略迫在眉睫.

PRRSV 与马动脉炎病毒 (equine arteritis virus, EAV)、小鼠乳酸脱氢酶升高症病毒 (lactate dehydrogenase-elevating virus, LDV) 以及猴出血热病毒 (simian hemorrhagic fever virus, SHFV) 同属于动脉炎病毒属 (*Arterivirus*), 动脉炎病毒科 (*Arteriviridae*), 套式 (又称“巢状”) 病毒目 (*Nidovirales*). PRRSV 基因组为不分节段的单股正链 RNA, 全长约 15 kb, 具有 5' 端帽状

结构和 3' poly(A) 尾. 5' 非翻译区 (untranslated region, 5' UTR) 长为 189~222 个核苷酸 (nucleotide, nt), 3' UTR 长约 110~150 nt. 蛋白编码区包含至少 8 个部分首尾重叠的可读框 (open reading frame, ORF), 近 5' 端约占基因组总长 3/4 的 ORF1 编码复制酶 (replicase) 蛋白. ORF1 可进一步划分为 ORF1a 和 ORF1b, 位于下游的 ORF1b 采用 -1 核糖体移码 (-1 ribosomal frameshifting) 机制来表达. 病毒通过非连续性转录机制 (discontinuous transcription mechanism) 产生至少 6 个亚基因组 mRNA (subgenomic mRNA, sgmRNA) 来翻译结构蛋白. sgmRNA 与 mRNA1 (亦即病毒基因组 RNA, vRNA) 共享 5' UTR, 3' UTR 以及 poly(A). ORF2-6 编码病毒的膜相关结构蛋白. 具有多功能的 N 蛋白由 ORF7 编码.

作为 RNA 病毒, PRRSV 具有多变的遗传学特性和免疫学特性. 2 种基因型间的核苷酸水平只有 60% 相似性, 两型之间很少有血清交叉反应 [11], 即使是同一基因型间, 也有高达 20% 遗传变异 [12,13]. PRRSV 的高度的异质性 (high heterogeneity) 对研发预防相似的遗传特性和不断变化的流行株疫苗是一种严峻的挑战, 而目前临床使用的疫苗对异源性 (heterologous) 毒力株不能提供交叉保护作用 [10]. 因此, PRRSV 的遗传多样性是 PRRS 控制的主要障碍.

RNA 病毒的全长感染性克隆是研究病毒生物学功能的重要工具, 反向遗传操作系统 (reverse genetics system) 已经应用于解析一些 RNA 病毒复制过程, 通过 RGS 反向遗传操作, 还可以构建出具有某种遗传特性和免疫学特性的标记疫苗. 虽然目前欧洲型 [14,15] 和几株北美型 PRRSV [16-19] 分离株的感染性 cDNA 克隆已经建立, 但有必要建立细胞适应的 PRRSV 非毒力株的反向遗传操作系统, 从而更好地研究病毒的毒力因子和解析控制病毒复制过程的顺式作用元件 (*cis-acting elements*) 和反式作用因子 (*trans-acting factors*). 而且, 为了研制修饰活疫苗, RGS 方法比传统的细胞弱化方法研制疫苗有着巨大的优势, 因为 RGS 可以很容易地根据流行毒株的不同而改变相对应的保护性抗原. 本研究构建了弱毒 PRRSV 毒株的感染性克隆; 在此基础上, 在复制酶复合物和结构蛋白之间的编码区之间插入多克隆位点, 获得了一个

突变感染性克隆. 拯救重组病毒与亲本病毒具有相同的病毒学特性, 从而为构建带有流行 PRRSV 株的保护性抗原的弱毒疫苗建立操作平台.

1 材料和方法

1.1 病毒和细胞

从产生典型 PRRS 临床症状的感染猪中分离到了 PRRSV, 接着在 MA-104 细胞上连续传 90 代, 命名为 APRRSV 株. MA-104 在含有 2% FBS(Gibco BRL)的 EMEM(Gibco BRL)培养基中培养. 在病毒感染细胞 4~5 天, CPE 达到 80%后收集上清; 将收集的病毒悬液分装并作为种毒保存在-70℃.

1.2 RT-PCR 扩增病毒 cDNA

按 QIAGEN Viral RNA Mini Kit(QIAGEN Inc., Valencia, CA)说明提取病毒 RNA, RNA 以 Nuclease-Free Water 溶解, 保存于-70℃. 根据 GenBank 上登录号为 AF184212^[20]和 U87932 全基因组序列^[11], 用 Oligo 6.0 软件设计了 PCR 引物(表 1), 其中引物 STL 含有 T7 启动子核心序列和 2 个非病毒核苷酸 G, 之后紧接着就是病毒基因组的第一个核苷酸及其后面的序列. 下游引物 Qvt 中还加入病毒原始序列中不存在的单酶切位点 *Vsp* I 和 *Xho* I 以用于 cDNA 模板的线性化. 参照 SuperScript™ II Reverse Transcriptase 产品说明书, 以 Qvt 为 RT 引物, 合成 cDNA 第一链. PCR 扩增参照 Platinum High Fidelity DNA polymerase (Gibco/BRL) 产品说明书进行. 2 μL 的 RT 产物作为 PCR 模板, 引物见表 1. PCR 条扩增条件一般为: 95℃ 2 min; 接着 95

℃ 30 s, 64℃ 30 s, 68℃ 1 min/kb, 运行 30 个循环; 最后 68℃ 孵育 10 min. 用 1% 的琼脂糖胶鉴定 PCR 产物. DNA 条带纯化按照 QIAEX II gel-purification kit 产品说明书进行.

1.3 病毒 cDNA 的克隆和测序

纯化的 RT-PCR 产物克隆到 pCR-ZeroBlunt-TOPO vector (Invitrogen, USA) 载体中, 用 QIAprep Miniprep Spin Kit (QIAGEN Inc., USA) 按照产品说明书抽提质粒, 电泳鉴定阳性克隆, 接着进行酶切鉴定和测序. 限制性内切酶和其他修饰酶购自 Promega 和 New England Biolabs 两个公司. 克隆和 PCR 片段的序列测定由上海 Auke Inc 公司进行. 用 Lasergene Software Package (DNASTAR Inc., USA) 软件包对测序结果进行分析.

1.4 全长 cDNA 克隆的构建

如图 1 所示, 利用设计的 5 对特异性引物, RT-PCR 扩增了 TB1(STL/SR2573), TB2(SF797/SR6589), TB3(SF4344/SR9573), TB4(SF7682/SR13334) 和 TB5(SF11210/Qvt) 5 个片段. 将各个 PCR 片段克隆到 pZero-Blunt 或 pCR-XL 载体中 (Invitrogen), 转化 TOP 10 感受态细胞, 提取重组质粒, 接着进行酶切和序列测定. 根据测序结果拼接而获得全长基因组序列的限制性酶切图谱和克隆载体的限制性酶切图谱, 以此设计各片段连接顺序及连接方法. 通过基因组 5388 位点的 *Kpn* I 酶切位点将 TB2 和 TB3 连接起来获得亚克隆 TB23, 通过基因组 2177 位 *Mlu* I 位点将 TB1

表 1 用于 RT-PCR 和 PCR 突变的引物^{a)}

Name	Sequence (5'→3')	position	application
Qyt	GAGTGACGAGGACTCGAGCGCATTAAATTTTTTTTTTTT ACATGCATGCTAATACGACTCACTATAGGTATGACGTA	15412	RT-PCR
STL	TAGGTGTTGGC	1	PCR
R2573*	CTGCCAGGCCATCATGTCCGAAGTC	2573	PCR
F1973*	CGCCACAACGGAGGGAATCAC	1973	PCR
R5609	CGCGGGGCCACTGGTGTAATGAT	5501	PCR
F5124	GCGGCACCGGCACTAACGAT	5016	PCR
R9753	GTACCCGCACACTCTCGACTTCTCCCCTCAT	9645	PCR
F7682	CTTCCGTTGAGCAGGCCCTTGATGA	7574	PCR
PSA2F	TTAATTAATTTAAATGGCGCGCCAATGAAATGGGGTCCATGC	12072	Mutagenesis
PSA1R	GGCGCGCCATTTAAATTAATTAATCAATTCAGGCCTAAAGTTGG	12072	Mutagenesis
MLU5F	TGTCCTGGCGCTACGCGTGCACCAGATACA	14194	Mutagenesis
MLU5R	TGTATCTGGTGCACGCGTAGCGCCAGGACA	14194	Mutagenesis

a) *: F 代表正向引物, R 代表反向引物

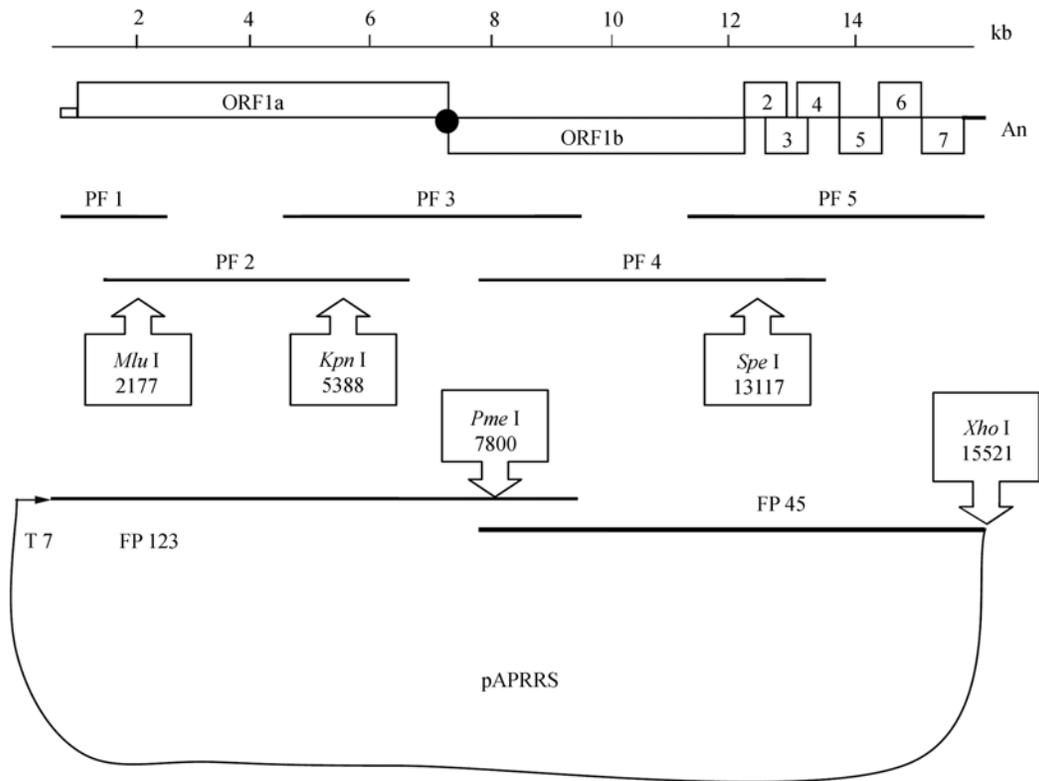


图 1 PRRSV 的基因组结构和全长 cDNA 克隆的构建策略

和 TB23 连接获得覆盖基因组 5'半分子的亚克隆 TB123. 使用基因组 13117 位点的 *Spe* I 酶切位点将 TB4 和 TB5 连接得到了覆盖基因组 3'半分子的亚克隆 TB45. 最后利用 7800 位点的 *Pme* I 酶切位点将 2 个中间克隆连接, 最后克隆到 pBluescript SK(+)载体 (Stratagene) 中, 从而得到了全长的 cDNA 克隆 APRRSV. 全长克隆 5'末端引入了 T7 启动子, 紧接其后是普遍认为能够增强 RNA 体外转录水平的非病毒序列 2 个核苷酸 G. 3'末端的引入酶切位点 *Vsp* I 或 *Xho* I 能够线性化 cDNA 模板. 最后通过酶切和测序鉴定方法全长 cDNA 序列.

1.5 突变全长 cDNA 克隆的构建

用质粒 pBT45 模板, 用含有 *Pac* I, *Swa* I 和 *Asc* I 酶切位点的引物 PSA1F 和 PSA1R, 参照 Quickchange Site-directed Mutagenesis kit 说明书进行突变 PCR, 将 *Pac* I, *Swa* I 和 *Asc* I 酶切位点插到 ORF1 和 ORF2 之间. PCR 反应条件为 95°C 5 min; 95°C 30 s, 55°C 30 s, 68°C 20 min, 运行 18 个循环;

最后 68°C 10 min. 为了去除质粒模板, 在 PCR 产物中加入 *Dpn* I (Invitrogen, MA), 37°C 孵育 4 h. 接着将 2 μL *Dpn* I 消化的 PCR 产物转化 TOP10 细胞, 抽提质粒, 通过酶切和测序的方法鉴定阳性克隆. 将突变后亚克隆通过合适的酶切位点转到全长克隆中, 最后用酶切和测序的方法鉴定插入全长克隆中突变位点.

1.6 体外转录和转染

用 QIAGEN 公司的 QIAprep Spin Miniprep kit (QIAGEN Inc.)试剂盒提取全长 cDNA 克隆, *Xho* I 进行单酶切线性化全长克隆, 使用 QIAGEN 公司 QIAquick PCR Purification 试剂盒(QIAGEN Inc.)纯化回收. 以纯化后的线性化质粒为模板按照 Ambion 公司的 T7 mMessage Machine Kit 试剂盒的实验步骤体外合成 RNA. 反应结束后用 DNase 消化模板, 并保存于 -70°C. 将体外转录的 RNA 按 DMRIE-C 转染试剂 (Invitrogen)的说明书转染 Marc-145 细胞, 置 37°C, 5% CO₂ 培养箱中培养观察. 转染细胞后每天观察细胞病变, 待细胞病变达 90%时候收取细胞上清, 保存

于-70℃. 抽提细胞上清 RNA, RT-PCR 扩增含有突变位点区域的基因组片段, 测序分析突变位点的存在.

1.7 间接免疫荧光

将纯化后的稀释病毒以 0.1 MOI 感染单层 MA-104 细胞, 感染后 36 h 弃去培养基. 用冰甲醇固定 10 min, 1% BSA 室温封闭 30 min, 用 PRRSV N 蛋白的特异性单抗室温孵育 2 h, 再加入 FITC 标记羊抗鼠的二抗室温孵育 1 h, PBS 洗 3 遍后, 在荧光显微镜下观察结果.

1.8 Northern blot 分析病毒亚基因组

将拯救后重组病毒以低感染剂量(0.1 MOI)感染单层 MARC-145 细胞, 48 h 后弃去培养基并加入 7.5 mL RNAWiz (Ambion), 参照说明书提取细胞总 RNA, 溶解到 200 μ L 无核酸酶的水中, -70℃ 冻存备用. 参照 BrightStar Psoralen-Biotin 试剂盒(Ambion)的说明书标记探针 PSA1R, 标记探针置-70℃ 保存备用. 参照 NorthernMax Kit (Ambion)的说明书进行 RNA 变性琼脂糖(1%)电泳, 并杂交. 15 μ g 细胞总 RNA 加入 45 μ L Formaldehyde Load Dye, 混匀后 65℃ 变性 15 min. 40 V 电泳过夜后即可将 RNA 转印到 BrightStar-Plus (Ambion)膜上. 将转印后的膜移入预热的 ULTRAhyb 杂交液(Ambion)中, 42℃ 预杂交 30 min, 以 1 mL 已预热的 ULTRAhyb 杂交液稀释 20 pmol/L 探针, 加入杂交管, 杂交仪(HYBAID)42℃ 杂交过夜. 洗涤后将膜密封在杂交袋内, 置膜于暗盒中 X-光胶片上成像. 曝光后的第 2 天开始洗底片, 并拍照保存.

2 结果

2.1 致弱 PRRSV 全基因组序列

从临床感染猪中分离到具有毒力的 PRRSV, 在 MA-145 细胞传了 90 代后致弱, 命名为 APRRSV, 并证明是一个有效的疫苗候选株(Yuan 等人, 未发表资料). 将 RT-PCR 产物克隆测序后, 用 SeqMan program 将各 PCR 片段的核苷酸序列组装成全长的基因组, 结果显示 APRRSV 基因组长为 15521 个核苷酸. 与 Nsp 株和商用的疫苗株 PrimePac (AF184212)相似性为 99.7%. 与 PRRSV II 型原型毒株 VR2332 和其疫苗株 RespPRRS ORF5 的相似性为 96%. 与 Nsp 株一样, APPSV 在 Nsp2 编码区独特的插入了 108 个核苷酸.

2.2 全长 cDNA 克隆的构建

根据各个亚克隆的核苷酸序列和限制性酶切位点, 如在“材料和方法”中的图 1 所示, 构建了 APRRSV 全长的 cDNA 克隆. 为了区分 APRRSV 和亲本病毒, 用突变 PCR 的方法将 APRRSV ORF5 编码区的 14035 位点 T 突变为 G 和 14037 位点 A 突变为 G, 构建带有 *Mlu* I 酶切位点的质粒 pORF5M. 为了将非结构蛋白和结构蛋白之间的编码区分开, 在 ORF1 的末端和 ORF2 的最上游插入 *Pac* I, *Swa* I 和 *Asc* I 等 3 个酶切位点, 构建了质粒 pCSA. 最后对这 2 个质粒的突变位点进行酶切鉴定和测序.

2.3 PRRSV 全长 cDNA 克隆的体外转录和病毒的拯救

为了鉴定全长 cDNA 克隆的感染性, 将质粒 DNA 模板 pAPRRS, pORF5M 和 pCSA 用 *Xho* I 线性化后进行体外转录成 RNA. 用 *Spe* I/*Xho* I 酶切质粒 pAPRRSV, 除去 pAPRRSV ORF4-7 编码区和 3'UTR 后的基因组片段 BTSA 的体外转录本作为阴性对照. 将合成的 RNA 用 DMRIE 试剂转染 80%的 MA-104 细胞, 转染 2 或 3 天后, pAPRRS, pORF5M 和 pCSA 的体外转录本均产生了典型的 CPE, 当细胞病变达到 80%收集细胞上清. 而阴性对照 BTSX, 即使转染 14 天后也没有 CPE 出现. 为了将病毒传代, 用出现 CPE 的 200 μ L 细胞上清感染新鲜的 MA-104 细胞, 感染后 2~3 天出现 CPE. 用 FITC 标记的抗 N 单克隆抗体 SR-30F 对拯救的病毒进行免疫荧光实验分析(图 2), 结果显示所有的拯救病毒 vAPRRSV, vORF5ME 和 vCSA 都能特异地与 PRRSV N 蛋白反应. 这些结果表明全长 cDNA 克隆 APRRSV 及其衍生的突变克隆与其亲本病毒有着相似病毒感染周期.

2.4 拯救的病毒包含人工突变以及非结构蛋白和结构蛋白编码区的分离

为了证明重组的病毒含有人为导入的突变, 对拯救的病毒 RNA 进行 RT-PCR, 将 PCR 产物进行酶切鉴定和测序, 最后将亲本病毒序列与突变的质粒 DNA 进行比对. 如图 3 所示, vORF5ME 和 vCSA 的 RT-PCR 产物的核苷酸序列与父代质粒序列一致, 说明突变克隆产生了重组病毒.

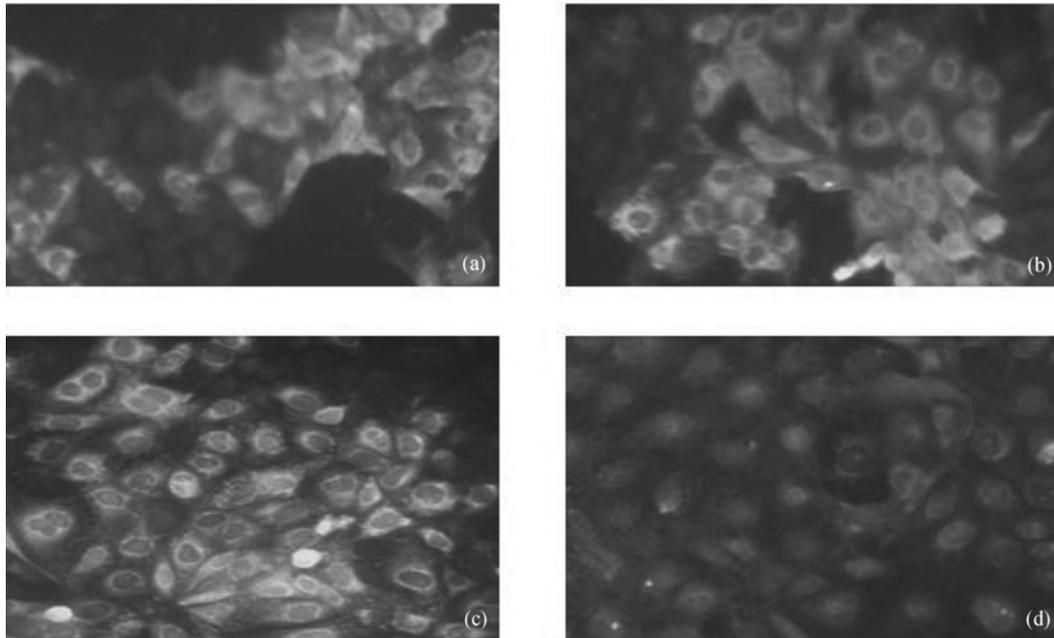


图 2 拯救病毒的免疫荧光分析
(a) vAPRRSV; (b) vORF5ME; (c) vCSA; (d) BTSX

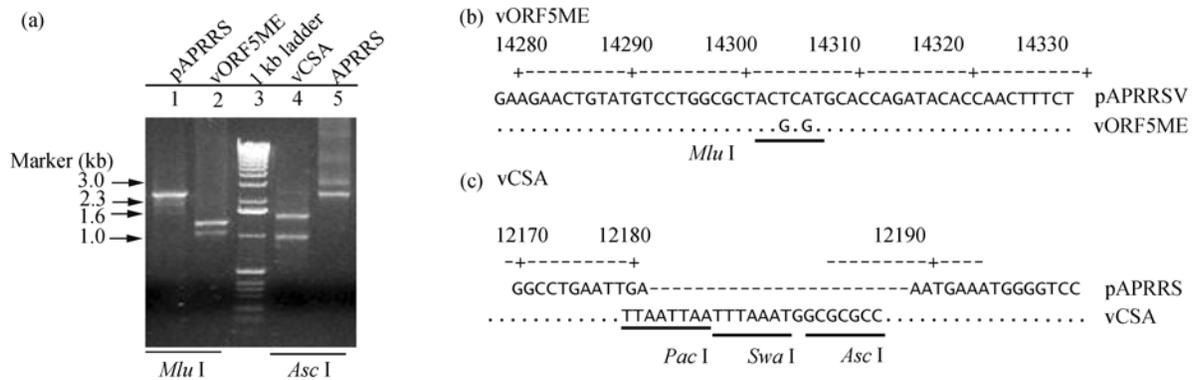


图 3 拯救病毒中导入的突变在基因组中稳定存在

(a) *Mlu*I 或 *Asc*I 酶切鉴定重组病毒 RNA 的 RT-PCR 产物。1, vAPRRS, 2, vORF5ME, 3, Marker, 4, vCSA, 5 APRRS; (b) vORF5ME 与 pAPRRSV 序列比对结果, 下划线为导入的酶切位点; (c) vCSA 与 pAPRRSV 序列比对结果, 下划线为导入的酶切位点

2.5 拯救病毒的亚基因组 mRNA 组分

为了研究插入的序列是否能以亚基因组 RNA 形式表达, 特别是插入 ORF1 和 ORF2 之间的 PSA 接头是否能以一个亚基因组的方式转录, 我们对拯救的病毒进行 Northern blot 分析, 将 vAPRRS, vCSA 和空白感染的细胞总 RNA 与 DIG-11-ddUTP 标记的寡核苷酸探针 PSA1R 杂交。结果显示探针 PSA1R 与 vCSA

有着较强的杂交信号, 表明 vCSA 的 mRNA 2 含有 PSA 接头(图 4)。探针 PSA1R 与 vAPRRSV 有着微弱的杂交信号, 这是因为 PSA1R 探针含有 14 个亲本病毒的核苷酸序列。

3 讨论

反向遗传系统的建立有助于我们了解 PRRSV 复制和感染过程, 以及针对不断改变遗传特性的流行

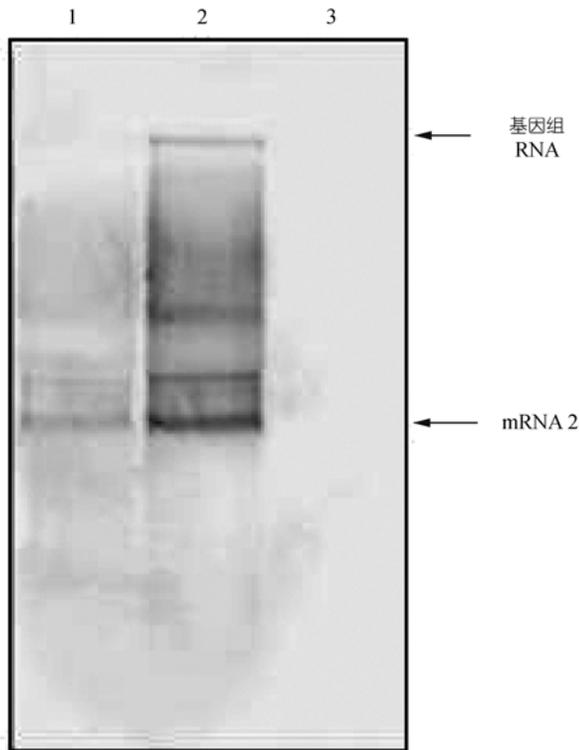


图4 Northern blot 分析拯救病毒感染细胞后的总 RNA
1, vAPRRS; 2, vCSA; 3, 未感染

毒株合理设计新一代疫苗. 本研究中, 我们获得了疫苗株 APRRSV 的全长感染性克隆(未发表资料). 据我们所知, 这是构建的第一个 PRRSV 疫苗株的反向遗传系统, 这为进一步研发目前商用疫苗无法预防的高致病 PRRSV 疫苗提供了非常有用的工具. 为此我们还构建了在非结构蛋白和结构蛋白之间编码区插入多克隆位点的突变感染性克隆. 如果在确定病毒的毒力因子的基础上, 我们可以将弱毒的 APPRS 感染性克隆的结构蛋白编码区替换为高致病相对应的区域, 从而研发具有高交叉保护性的嵌合疫苗来预防 HP PRRSV. 而且, 感染性 cDNA 克隆也可应用于解析目前流行的 HP PRRSV 毒力上升机制.

病毒毒力与 Nsp2 遗传多变性的关系: APRRSV 和其亲本病毒与 PrimePac Nsp 毒株 [20] 一样, 在 Nsp2 中间都含有 108 个核苷酸的插入. 令人惊讶的是, 在猪无名高热中分离的 HP PRRSV 株的 Nsp2 不连续地缺失了 90 个核苷酸之多, 形成此次流行的 HP PRRSV 独特的遗传标志. Tian 等人 [8] 推测 Nsp2 的核苷酸缺失与 HP PRRSV 的毒力上升有关. 有趣的是, 此前分离的高致病性的 PRRSV MN184 Nsp2 也有很大的一段缺失. 另外, 一些 II 型 PRRSV 和在北美地区分离的中等毒力 I 型 PRRSV 分离株 Nsp2 也存在系列缺失现象. 因此, 是 Nsp2 还是病毒其他组分与 HP PRRSV 的致病性有关? 还需进一步的实验证明.

PRRSV 异质性与病毒活疫苗的交叉保护: 作为 RNA 病毒, PRRSV 复制常具有错误倾向并导致遗传变异和高频率的抗原漂移, 这加剧了对流行 PRRS 株的免疫预防难度 [10]. 事实上, 目前商用的传统 PRRSV 毒株疫苗对国内正在流行的 HP PRRSV 起不到免疫保护作用 (Tian 等, 个人交流). 经过农业部批准研发的灭活疫苗目前正在处于临床试验阶段, 但是该疫苗是否能对正在流行的 HP PRRSV 起到免疫保护作用, 还需进一步评估. 况且, 已有一些实验证明 PRRSV 灭活疫苗的免疫效率远远低于 MLV. 而目前的 MLV 是用传统的毒株研制的, 其核苷酸同源性与 HP PRRSV 相比仅有 89%, 因此我们很容易理解为什么商用 MLV 对 HP PRRSV 的交叉保护力低. PRRSV 的保护性免疫主要由非结构蛋白引发细胞免疫和结构蛋白刺激体液免疫组成. 非结构蛋白主要编码相对保守病毒的复制酶复合物, 是刺激细胞免疫和宿主先天性免疫的主要病毒组分. 体液免疫主要由 ORF2-7 编码的结构蛋白刺激产生. 因此, 一种合理的 PRRSV 疫苗应要求有细胞免疫的抗原和和体液免疫的保护性抗原组成. 为此, 我们构建了 PRRSV 弱毒株反向遗传操作系统, 以此为研发新一代 MLV 疫苗来预防 HP PRRSV 奠定基础.

参考文献

- 1 Keffaber K K. Reproductive failure of unknown etiology. Am Assoc Swine Prac Newsl, 1989, 1(2): 1—9
- 2 Wensvoot G, Terpstra C, Pol J, et al. Mystery swine disease in the Neitherlnds: the isolation of Lelystad virus. Vet Quarterly, 1991, 13: 121—130

- 3 Collins J, Benfield D A, Nelson E, et al. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J Vet Diagn Invest*, 1992, 4: 117—127
- 4 Snijder E J, Brinton M A, Faaberg K S, et al. Family Arteriviridae. In: Fauquet C M, Mayo M A, Maniloff J, ed. *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London: Elsevier/Academic Press, 2004
- 5 Guo B Q, Chen Z S, Liu W X, et al. Isolation of PRRSV from aborted fetus with typical clinical PRRS manifestations. *Chinese J Preventive Vet Med*, 1996, 2: 1—5
- 6 Rossow K D, Shivers J L, Yeske P E, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in neonatal pigs characterised by marked neurovirulence. *Vet Rec*, 1999, 144 (16): 444—448
- 7 Mengeling W L, Lager K M, Vorwald A C. The effect of porcine parvovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine reproductive performance. *Anim Reprod Sci*, 2000, 60-61: 199—210 [\[DOI\]](#)
- 8 Tian K, Yu Y, Zhao T, et al. Emergence of fatal PRRSV variants: Unparalleled outbreaks of atypical PRRS in china and molecular dissection of the unique hallmark. *PLoS ONE* 2007. 6: e526 [\[DOI\]](#)
- 9 Tong G Z, Zhou Y J, Hao X F, et al. Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome, China letter. *Emerg Infect Dis Letter*, 2007, 9(13): 1434—1436
- 10 Meng X J. Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. *Vet Microbiol*, 2000, 74(4): 309—329 [\[DOI\]](#)
- 11 Nelsen C J, Murtaugh M P, Faaberg K S. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. *J Virol*, 1999, 73(1): 270—280
- 12 Mateu E, Martin M, Vidal D. Genetic diversity and phylogenetic analysis of glycoprotein 5 of European-type porcine reproductive and respiratory virus strains in Spain. *J Gen Virol*, 2003, 84(Pt 3): 529—534 [\[DOI\]](#)
- 13 An T Q, Zhou Y, Tong G. Genetic diversity and phylogenetic analysis of glycoprotein 5 of PRRSV isolates in mainland China from 1996 to 2006: coexistence of two NA-subgenotypes with great diversity. *Vet Microbiol*, 2007, 123(1-3): 43—45 [\[DOI\]](#)
- 14 Meulenberg J J, Bos-de Ruijter J N, van de Graaf R, et al. Infectious transcripts from cloned genome-length cDNA of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Virol*, 1998, 72(1): 380—387
- 15 Fang Y, Rowland R R, Roof M, et al. A full-length cDNA infectious clone of North American type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus: expression of green fluorescent protein in the Nsp2 region. *J Virol*, 2006, 80(23): 11447—11455 [\[DOI\]](#)
- 16 Yoo D, Welch S K, Lee C, et al. Infectious cDNA clones of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and their potential as vaccine vectors. *Vet Immunol Immunopathol*, 2004, 102(3): 143—154 [\[DOI\]](#)
- 17 Lee C, Calvert J G, Welch S K, et al. A DNA-launched reverse genetics system for porcine reproductive and respiratory syndrome virus reveals that homodimerization of the nucleocapsid protein is essential for virus infectivity. *Virology*, 2005, 331(1): 47—62 [\[DOI\]](#)
- 18 Nielsen H S, Liu G, Nielsen J, et al. Generation of an infectious clone of VR-2332, a highly virulent North American-type isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Virol*, 2003, 77(6): 3702—11 [\[DOI\]](#)
- 19 Ran Z G, Chen X Y, Yang H C, et al. Recovery of an infectious virus from the full-length cDNA of PRRSV BJ-4. *Acta Microbiol*, 2007, 47(3): 423—429
- 20 Shen S, Kwang J, Liu W, et al. Determination of the complete nucleotide sequence of a vaccine strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and identification of the Nsp2 gene with a unique insertion. *Arch Virol*, 2000, 145: 871—883 [\[DOI\]](#)