

韩晓亮, 冯松林, 孙彦阔, 等. 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒株 JXA1 反向遗传平台的构建 [J]. 华南农业大学学报, 2020, 41(1): 34-41.
HAN Xiaoliang, FENG Songlin, SUN Yankuo, et al. Construction of reverse genetic platform of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain JXA1[J]. Journal of South China Agricultural University, 2020, 41(1): 34-41.

高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒株 JXA1 反向遗传平台的构建

韩晓亮^{1,2}, 冯松林^{1,2}, 孙彦阔^{1,2}, 王 衡^{1,3}, 张桂红^{1,2}

(1 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642; 2 广东省动物源性人兽共患病预防与控制重点实验室, 广东 广州 510642; 3 广东省兽医临床重大疾病综合防控重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】为高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒 (Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus, HP-PRRSV) 的结构功能和致病机理的研究奠定基础。【方法】运用反向遗传技术将 HP-PRRSV JXA1 株的全基因组分段克隆至改造过的低拷贝载体 pOKq 上, 并在病毒基因组两端分别添加 CMV 启动子和 BGH 终止信号肽以及在病毒全基因组第 510 位核苷酸突变引入 *FseI* 酶切位点, 作为遗传标记位点。采取基于 DNA-launched 途径进行病毒拯救, 并对拯救的病毒进行生物学特性分析。【结果】构建的 PRRSV JXA1 毒株的全长 cDNA 克隆具有感染性; 成功拯救了病毒, 命名为 rJXA1; 成功引入了拯救病毒的遗传标记; 拯救病毒与亲本病毒的生长曲线相似, 二者达到最高滴度的时间均为感染后 72 h。【结论】成功构建了 JXA1 株反向遗传平台, 为进一步研究 HP-PRRSV 的致病机理、基因功能以及新型疫苗研发奠定了基础。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合征病毒; JXA1; 反向遗传技术; 感染性克隆; 病毒拯救
中图分类号: S852.651 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2020)01-0034-08

Construction of reverse genetic platform of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain JXA1

HAN Xiaoliang^{1,2}, FENG Songlin^{1,2}, SUN Yankuo^{1,2}, WANG Heng^{1,3}, ZHANG Guihong^{1,2}

(1 College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2 Key Laboratory of Zoonosis Prevention and Control of Guangdong Province, Guangzhou 510642, China; 3 Guangdong Provincial Key Laboratory of Prevention and Control for Severe Clinical Animal Diseases, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】To provide a basis for studying the structural function and pathogenic mechanism of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus (HP-PRRSV). 【Method】Fragments of the whole genome of HP-PRRSV JXA1 strain were cloned into the modified low copy vector pOKq with reverse genetics technique. The CMV promoter and BGH termination signal peptide were added into the terminals of the viral genome. The *FseI* restriction site, as a genetic marker locus, was introduced at the 510th nucleotide of the whole genome of the virus by mutation. DNA-launched approach was used for viral rescue and the biological properties of rescued viruses were analyzed. 【Result】The full-length cDNA clone of the constructed PRRSV JXA1 strain was infectious. The virus was successfully rescued and named rJXA1. The genetic marker was successfully introduced into the rescued virus. The rescued virus and parental virus had similar growth curves with

reaching the maximum titer at 72 h after infection. 【Conclusion】 The reverse genetic platform of the JXA1 strain has been successfully constructed, which will lay a foundation for further research on the pathogenesis, gene function and vaccine development of PRRSV.

Key words: porcine reproductive and respiratory syndrome virus; JXA1; reverse genetics technique; infectious clone; viral rescue

猪繁殖与呼吸综合征 (Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 是一种以母猪繁殖障碍和各种生长阶段猪的呼吸系统疾病为特征的病毒性传染病, 俗称“猪蓝耳病”, 其病原为猪繁殖与呼吸综合征病毒 (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)^[1-2]。PRRS 于 20 世纪 80 年代末首先在美国被发现, 临床上主要表现为母猪晚期繁殖障碍和新生仔猪的呼吸道疾病^[3]。随后该病相继在北美、欧洲、亚洲的养猪国家广泛流行, 并引发了空前的“流产风暴”^[4], 给世界养猪业造成了巨大的经济损失。

2006 年, 在我国南方部分省份出现的“猪无名高热”病, 经鉴定其病原为以 JXA1 株为代表的高致病性 PRRSV, 引发了严重的 PRRS 疫情^[5-6]。在 PRRSV 的遗传进化树中, HP-PRRSV 和之前流行的经典毒株同属于 Lineage 8, 其重要特征是 Nsp2 编码区存在 30 个不连续氨基酸的缺失^[7-8], 这种新出现的毒株具有毒力强、致死率高、传播速度快等特点, 至今依然是国内流行的优势毒株^[9], 给我国养猪业造成非常严重的损失。

反向遗传学技术是研究 RNA 病毒的有力工具, 该技术通过对相关病毒基因进行直接改造后构建出病毒的感染性克隆, 并经 RNA-launched 和 DNA-launched 2 种途径对病毒进行拯救^[10-11]。RNA-launched 途径是 RNA 病毒基因组先反转录成 cDNA, 接着克隆到合适的转录载体上, 通过克隆到 T7 或者 SP6 启动子的下游, 先在体外转录出病毒全长的基因组 RNA, 随后将这些体外的转录本转染宿主细胞, 在宿主细胞内包装出活的病毒粒子^[12-13]。DNA-launched 途径则是将经反转录的病毒 cDNA 克隆到真核启动子如 CMV 启动子的下游, 并将构建好的质粒不经体外转录, 直接转染宿主细胞, 利用宿主细胞的核功能转录出病毒基因组, 进而完成病毒粒子的包装^[14]。相比 RNA-launched 途径, DNA-launched 途径避开了体外转录步骤, 不仅操作简便, 还降低了转染过程中 RNA 降解的风险, 使转染的效率大大提高。目前, 反向遗传技术在研究 PRRSV 的结构与功能、致病机制以及

研发新型疫苗等方面有着广泛应用^[15-17]。本研究运用反向遗传操作技术将 HP-PRRSV JXA1 株的全基因组分段克隆至改造过的低拷贝载体 pOKq 上, 成功构建了 JXA1 株的全长感染性克隆。并采取基于 DNA-launched 途径成功获得拯救的病毒, 并对拯救病毒进行生物学特性的分析。HP-PRRSV 代表株 JXA1 株反向遗传平台的构建, 为 HP-PRRSV 后续的结构功能探索、致病机理研究以及新型疫苗研发奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 载体、毒株、细胞、抗体 克隆载体 pJET1.2 购买自 Thermo Fisher Scientific。由 pOK12 改造具有多克隆位点的低拷贝载体 pOKq、XH-GD 全长感染性克隆质粒、PRRSV 易感细胞 Marc-145 细胞、转染用 BHK-21 细胞均由华南农业大学兽医学院传染病教研室保存。HP-PRRSV JXA1 毒株由河南农业大学田克恭教授惠赠。PRRSV N 蛋白单克隆抗体购买自韩国金诺公司。FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗购买自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.1.2 主要试剂 RNA 抽提试剂盒购自上海飞捷生物技术有限公司, 反转录试剂盒、Taq 酶、高保真 DNA 聚合酶购自宝日医生物技术 (北京) 有限公司。限制性核酸内切酶购自 NEB 公司。T4 DNA 连接酶购自 Thermo Fisher Scientific。DL2000 DNA marker、250 bp DNA ladder (Dye plus)、克隆菌感受态细胞 *Escherichia coli* DH5α、克隆载体 pMD18-T vector 购自宝日医生物技术 (北京) 有限公司; DNA 凝胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒购自 OMEGA 公司。DMEM 高糖培养基、胰蛋白酶购自 Biological Industries。胎牛血清购自 Gibco 公司。二甲亚砜 (DMSO) 购自 Amresco 公司。

1.2 方法

1.2.1 全长 cDNA 构建方案与引物设计 构建方案: JXA1 毒株全长 cDNA 的构建见图 1。先将 CMV、A1、A2 片段融合, 融合产物再与 A3 片段连

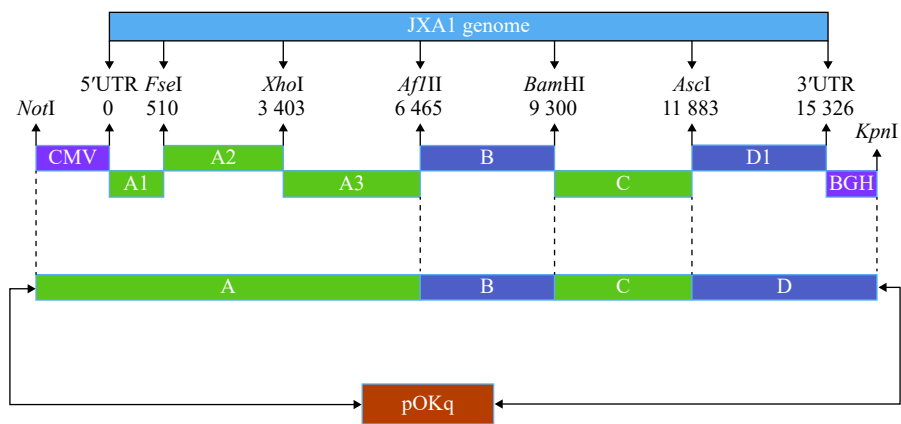


图 1 JXA1 毒株全长 cDNA 克隆的构建策略

Fig. 1 The strategy for construction of the full-length cDNA clone of JXA1 strain

接, 构成 A 片段。将 D1 片段和终止信号肽序列 BGH 片段融合构成 D 片段, 然后将 D、C、B、A 共 4 个片段依次亚克隆到低拷贝载体 pOKq 上。

根据 GenBank 中收录的 PRRSV JXA1 毒株全基因组序列, 利用 Oligo7.0 软件设计 6 对引物对病毒的全长基因进行分段克隆, 获得 A1、A2、A3、B、C 和 D1 段。同时以 PRRSV XH-GD 全长感染性克隆质粒为模板, 设计引物扩增 CMV 和 BGH 片段。同时在扩增 A1 片段时引入 1 个沉默突变, 将全基

因组第 510 位碱基由 A 突变为 G, 引入遗传标记 *FseI*, 以便与亲代病毒相区别。引物序列由上海英潍捷基生物技术有限公司合成。各段引物的序列、扩增片段大小及引物名称见表 1。

1.2.2 JXA1 毒株全基因组各片段的扩增 以 XH-GD 全长感染性克隆质粒为模板, 分别用引物 (CMV-F、CMV-R) 和 (BGH-F、BGH-R) 扩增 CMV 启动子序列和 BGH 终止信号肽序列; 按上海英潍捷生物技术有限公司的 RNA 抽提试剂盒操作说

表 1 构建 JXA1 株全长感染性克隆设计的引物序列

Table 1 Primer sequences used for construction of the full-length infectious clone of JXA1 strain

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') ¹⁾ Primer sequence	产物长度/bp Product length
CMV-F	AGTC <u>CGGCCG</u> CCGATGTACGGCCAGATATAC	757
CMV-R	ATAGAGCCAACACCTATACGTCA	
A1-F	TGACGTATAGGTGTTGGCTCTAT	528
A1-R	TAGGGGTGAGTTGGCCGGCCCTGTA	
A2-F	ATCTACAGGGCCGGCCAACTCAC	2 193
A2-R	CGGCGGTGTCTCGAGAATCATCT	
A3-F	CAAAGATGATTCTCGAGACACC	3 096
A3-R	AAGGCATAGGTGCTTAAGT	
B-F	CATCCGTTACAGGTGGTAATG	2 951
B-R	AGCACAGCTGTCCATGAGTATTGC	
C-F	GAAGACAACCATCACAGACTCAC	2 713
C-R	AAACCTCATGCTGGTGGCATT	
D1-F	AGGACTGGGAGGATTACAATGAT	3 341
D1-R	GTGCCAAAGAATGCCAGCCCATCATG	
BGH-F	CATGATGGGCTGGCATTCTTTGGCAC	533
BGH-R	GGGATCGAGGT <u>ACCC</u> CAGAAGC	

1) 下划线部分为酶切位点

1) The underlined portion is the restricted enzyme digestion site

明书提取 JXA1 细胞病毒的总 RNA, 用适量 RNase free 水溶解, 获得总 RNA, 用 SuperScript™ III 逆转录酶和 OligodT(20)(Invitrogen, USA), 按照操作说明书进行 cDNA 合成, 然后将获得的 cDNA 作为模板, 用表 1 中扩增引物进行各片段的扩增, 经过 RT-PCR, 获得 A1、A2、A3、B、C 和 D1 片段, 参照 DNA purification kit 说明书纯化扩增的片段, 利用融合 PCR 技术, 用引物 (A1-F、A2-R) 融合 A1 和 A2 片段, 构建点突变以引入全长感染性克隆的遗传标记 *FseI* 酶切位点, 以回收的 CMV 片段和 A1、A2 融合片段为模板, 用引物 (CMV-F、A2-R) 融合 CMV、A1、A2 片段并回收; 以回收的 BGH 片段和 D1 片段为模板, 用引物 (D1-F、BGH-R) 融合 D1 和 BGH 片段构成 D 片段并回收, PCR 按常规方法进行, 并设立空白对照。PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶 (含 0.5 μg/mL EB) 电泳检测并回收纯化。另外, 为了提高目的片段的保真性, 构建感染性克隆过程中的所有 PCR 反应均使用宝日医生物技术 (北京) 有限公司的 PrimeSTAR® Max 高保真 DNA 聚合酶。

1.2.3 质粒 pOK-A、pJET-B、pJET-C 和 pJET-D 的构建 将 CMV、A1、A2 的融合回收产物连接到 pOKq 空载体上形成载体 pOK-CMV-A1-A2, 再将扩增的 A3 片段连接到 pOK-CMV-A1-A2 载体上, 构建出 pOK-A 中间载体。将 D、C 和 B 这 3 个片段的纯化产物分别与 pJET1.2 载体连接。取 5 μL 的连接产物转化克隆菌感受态细胞 *E. coli* DH5α 后, 用灭菌枪头挑取可疑菌落于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 于 37 °C 条件下振荡培养 4~6 h, 取适量菌液进行 PCR 鉴定。将 PCR 鉴定为阳性的菌液送上海英潍捷基生物技术有限公司进行测序验证。测序正确的重组质粒分别命名为 pJET-B、pJET-C 和 pJET-D, 并按照 OMEGA 公司的质粒提取试剂盒说明书进行质粒抽提。

1.2.4 JXA1 毒株全长 cDNA 的构建 将 pJET-D、pJET-C、pJET-B 和 pOK-A 按照图 1 所示的顺序依次亚克隆到 pOKq 载体, 构建的质粒经 PCR 鉴定为阳性的重组菌液送上海英潍捷基生物技术有限公司进行测序, 将测序正确的克隆质粒命名为 pOK-JXA1, 并参照 OMEGA 公司去内毒素质粒提取试剂盒说明书进行去内毒素质粒抽提。

1.2.5 JXA1 株病毒的拯救 将 JXA1 株病毒全长 cDNA 的重组质粒 pOK-JXA1 转染 BHK-21 细胞, 转染使用 Lipofectamine 3000(后文简称 Lipo 3000) 脂质体, 具体操作步骤参照说明书。转染 72 h

后, 将 6 孔板反复冻融 3 次, 收集细胞液, 4 °C、7 000 r/min 离心 7 min, 取上清接种于单层 Marc-145 细胞, 吸附 1 h 后补加含 2%(φ)FBS 的 DMEM, 置于 37 °C、CO₂ 体积分数为 5% 的培养箱培养, 观察细胞病变情况 (Cytopathic effect, CPE), 出现病变后冻融收毒, 连续传 12 代。将拯救的病毒命名为 rJXA1。

1.2.6 拯救病毒的鉴定 为验证所看到的细胞病变是拯救病毒所致, 排除亲本病毒污染的可能, 利用引入的沉默突变 *FseI* 酶切位点进行鉴定。取第 3 代的病毒细胞培养悬液进行总 RNA 的提取, 再取 2 μg RNA 进行反转录。以得到的 cDNA 为模板, 以 A1-F 和 A2-R 为引物进行 PCR 扩增。PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测并回收纯化, 将纯化后的 PCR 产物送上海英潍捷基生物技术有限公司进行测序鉴定。

同时将拯救病毒的第 3 代 rJXA1-P3 和亲本病毒的第 3 代 JXA1-P3 接种至长满单层的 Marc-145 细胞 6 孔板中并设 1 孔阴性对照, 置于 37 °C、CO₂ 体积分数为 5% 培养箱中培养 72 h 后对拯救的病毒进行间接免疫荧光 (Indirect immunofluorescence assay, IFA) 试验鉴定。

1.2.7 拯救病毒的稳定性 将拯救病毒 rJXA1 在 Marc-145 细胞上连续传至 12 代, 观察每一代的 CPE 情况。同时从拯救获得的病毒中, 选择第 1、3、6、9 和 12 代病毒进行 TCID₅₀ 测定。将 Marc-145 细胞接种到 96 孔细胞培养板上, 待细胞汇合度达到 90% 以上时, 将获得的相应代次的拯救病毒进行 10 倍梯度倍比稀释, 即用 DMEM 进行 10⁻¹~10⁻⁸ 倍比稀释, 分别接种于 Marc-145 细胞中, 每个稀释度接种 8 孔, 每孔 100 μL。同时设未接毒的空白对照, 将细胞板放置 37 °C、CO₂ 体积分数为 5% 细胞培养箱作用 90 min。弃去病毒液, 加入含 2%(φ)FBS 的 DMEM, 放置于 37 °C、CO₂ 体积分数为 5% 细胞培养箱。连续观察 2~7 d, 记录每个稀释度细胞病变的孔数, 本试验重复 3 次求其平均值, 并按照 Reed-Muench 法计算各个样品的 TCID₅₀。

1.2.8 拯救病毒的生长曲线 测定 rJXA1 第 3 代病毒和亲本病毒 JXA1 第 3 代病毒在 Marc-145 细胞中的生长曲线。将 rJXA1 第 3 代病毒和亲本病毒 JXA1 第 3 代病毒用 DMEM 培养基稀释至感染复数 (Multiplicity of infection, MOI) 为 0.1, 接种于长成单层的 Marc-145 细胞, 置于 37 °C、CO₂ 体积分数为 5% 培养箱中孵育 1 h, 每个病毒各做 3 次重复。孵育结束后弃去上清, 用 PBS 缓冲液洗涤细胞 2 次, 加入 5 mL 含 2%(φ)FBS 的 DMEM 细胞维持

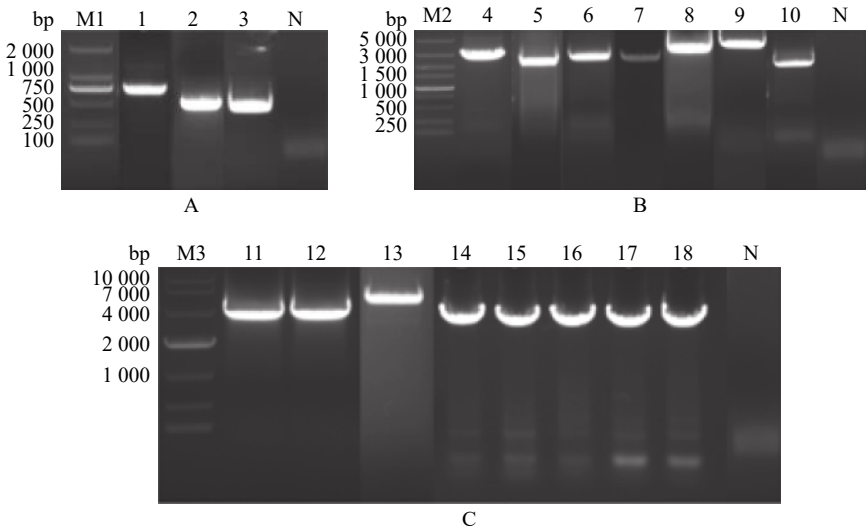
液, 置于 37 ℃、CO₂ 体积分数为 5% 的培养箱中培养。分别于接种病毒 12、24、36、48、60、72、84 和 96 h 后, 从每瓶细胞中吸取 200 μL 上清, 然后测定各时相上清中病毒的 TCID₅₀, 绘制病毒的生长曲线。

2 结果与分析

2.1 JXA1 毒株全基因组各片段的扩增

以 XH-GD 全长感染性克隆质粒为模板扩增

CMV 启动子序列和 BGH 终止信号肽序列, 以 JXA1 反转录后的 cDNA 为模板扩增 JAX1 的 A1、A2、A3、B、C 和 D1 段。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后, 可见相应的目的条带, 其中 CMV、BGH 和 A1 片段的扩增产物大小分别约为 750、500 和 500 bp, 与预期大小相符 (图 2A)。A2、A3、B、C 和 D1 片段的扩增产物大小分别约为 2 200、3 000、3 000、2 700 和 3 300 bp, 与预期大小相符 (图 2B)。



M1: DL2000 DNA marker; M2: DL5000 DNA marker; M3: DL10000 DNA marker; 1: CMV 片段; 2: BGH 片段; 3: A1 片段; 4: B 片段; 5: C 片段; 6: A3 片段; 7: A3 片段酶切产物; 8: D1 片段; 9: D1 和 BGH 融合片段; 10: A2 片段; 11~12: CMV、A1 和 A2 融合片段; 13: pOK-CMV-A1-A2 的酶切产物; 14~18: 菌液 PCR 鉴定; N: 阴性对照

M1: DL2000 DNA marker; M2: DL5000 DNA marker; M3: DL10000 DNA marker; 1: CMV fragment; 2: BGH fragment; 3 A1 fragment; 4: B fragment; 5: C fragment; 6: A3 fragment; 7: Enzyme digestion of A3 fragment; 8: D1 fragment; 9: D1 and BGH fusion fragment; 10: A2 fragment; 11~12: CMV, A1 and A2 fusion fragment; 13: Enzyme digestion of pOK-CMV-A1-A2; 14~18: PCR identification of the bacterial liquid; N: Negative control

图 2 JXA1 株各基因片段的 PCR 扩增与构建

Fig. 2 PCR amplification and construction of each gene fragment of JXA1 strain

利用融合 PCR 技术融合 A1 和 A2 片段, 构建点突变来引入全长感染性克隆的遗传标记 *FseI* 酶切位点, 以回收的 CMV 片段和 A1、A2 融合片段为模板, 对 CMV、A1、A2 片段进行融合 PCR 扩增并回收, PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后, 可见约为 3 800 bp 扩增片段, 与预期大小相符 (图 2C)。将 CMV、A1、A2 的融合回收产物连接到 pOKq 空载体上形成载体 pOK-CMV-A1-A2, 再将扩增的 A3 片段连接到 pOK-CMV-A1-A2 载体上, 并进行菌液 PCR 鉴定 (图 2C), 构建出 pOK-A 中间载体; 以回收的 BGH 和 D1 段为模板, 对 D1 和 BGH 片段进行融合 PCR 扩增并回收, PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后, 可见约为 3 800 bp 扩增片段, 与预期大小相符 (图 2B), 然后将 D、C、B 片段依次克隆到 pJET1.2 载体上。

2.2 JXA1 毒株全长 cDNA 的构建与鉴定

将 pJET-D、pJET-C、pJET-B 和 pOK-A 按照图 1

所示的顺序依次连接到 pOKq 载体, 构建全长 cDNA 的重组质粒 pOK-JXA1, 用引物 CMV-F、A1-R 对重组质粒 pOK-JXA1 进行 PCR 鉴定, PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后, 可见约为 1 300 bp 的扩增条带, 与预期大小相符 (图 3), 鉴定阳性的重组菌液送往上海英潍捷基生物技术有限公司进行测序验证, 测序正确的重组质粒命名为 pOK-JXA1。

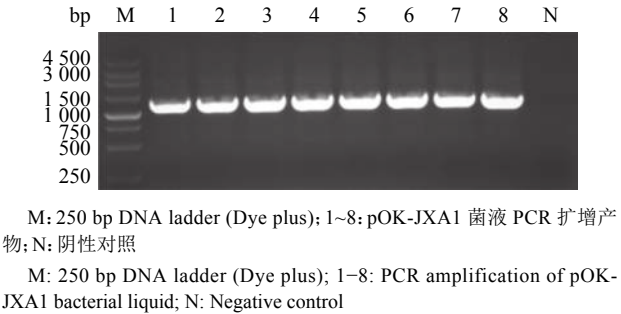
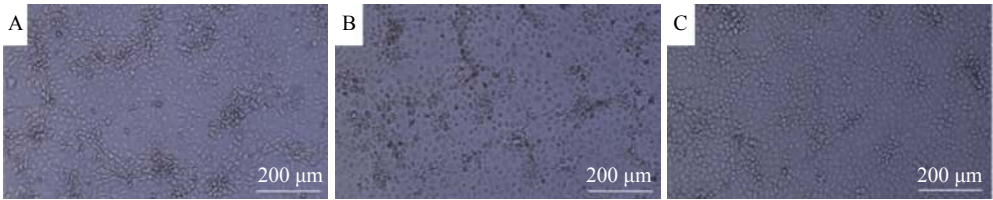


图 3 pOK-JXA1 菌液 PCR 鉴定
Fig. 3 PCR identification of pOK-JXA1 bacterial liquid

2.3 JXA1 株病毒的拯救

将质粒 pOK-JXA1 转染 BHK-21 细胞 72 h 后, 冻融收获病毒, 离心取上清后接种至 Marc-145 细

胞, 置于 37 ℃、CO₂ 体积分数为 5% 的培养箱中培养 72 h, 显微镜下可见与亲本病毒 JXA1 类似的 CPE (图 4), 将拯救病毒命名为 rJXA1。



A: 拯救病毒 rJXA1 产生的 CPE; B: 亲本病毒 JXA1 产生的 CPE; C: 对照细胞
A: CPE produced in the rescued virus rJXA1; B: CPE produced in the parental virus JXA1; C: Control cell

图 4 拯救病毒产生的细胞病变

Fig. 4 Cytopathic effect (CPE) produced in the rescued viruses

2.4 拯救病毒的鉴定

将拯救获得的 rJXA1 在 Marc-145 细胞中连续传代。取第 3 代病毒 (rJXA1-P3) 的培养液抽提 RNA 进行 RT-PCR 鉴定, PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后可检测到强阳性条带, 大小与预期相符 (图 5)。将纯化的 PCR 产物送测序, 测序结果显示拯救病毒 rJXA1 全基因组的第 510 位核苷酸由 A 突变为

G, 对应的阅读框由 AGA 变为 AGG, 推导的氨基酸均为精氨酸, 产生了新的酶切位点 *Fse*I(GGCCG GCC), 与预期结果一致, 表明拯救病毒的遗传标记被成功引入。

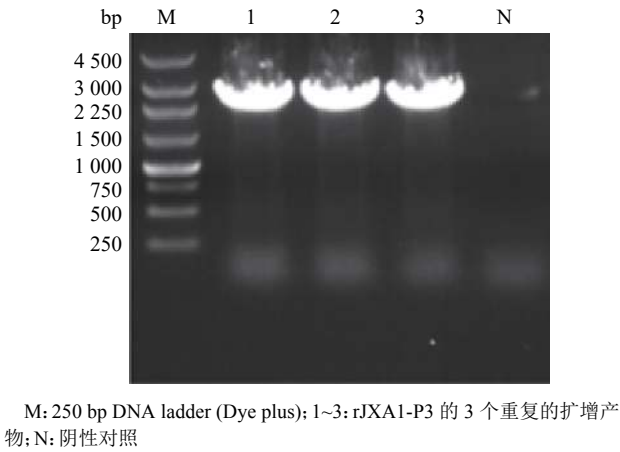
用 PRRSV N 蛋白单克隆抗体对亲本病毒以及拯救病毒进行间接免疫荧光鉴定, 结果显示: 接种亲本病毒和拯救病毒的细胞在荧光显微镜下可观察到特异性的绿色荧光, 而阴性对照细胞没有荧光产生 (图 6), 证明病毒拯救成功。

2.5 拯救病毒的稳定性

将拯救病毒 rJXA1 在 Marc-145 细胞上连续传至 12 代, 每一代均可以产生明显 CPE。图 7 为第 1、3、6、9 和 12 代的细胞病变情况。同时对第 1、3、6、9 和 12 代病毒进行 TCID₅₀ 的测定, 结果表明, 拯救病毒可在 Marc-145 细胞上稳定传代, 病毒滴度介于 10^{6.0}~10^{7.3} TCID₅₀/mL。

2.6 拯救病毒的生长曲线

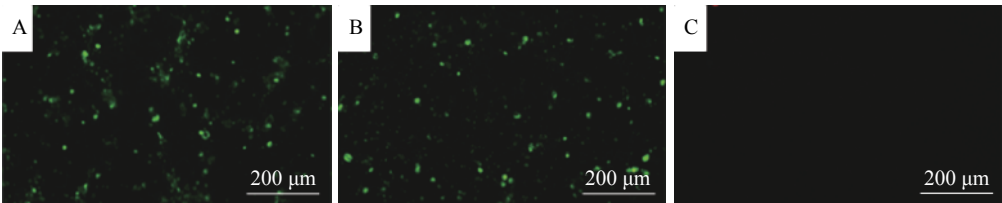
对拯救病毒 rJXA1 的第 3 代病毒和亲本病毒 JXA1 的第 3 代病毒进行生长曲线的测定, 结果表明拯救病毒 rJXA1 第 3 代和亲本病毒 JXA1 第 3 代的生长曲线相似, 二者达到最高滴度的时间相同, 均为 72 h(图 8)。



M: 250 bp DNA ladder (Dye plus); 1~3: rJXA1-P3 的 3 个重复的扩增产物; N: 阴性对照
M: 250 bp DNA ladder (Dye plus); 1~3: Amplification products of three replicates of rJXA1-P3; N: Negative control

图 5 拯救病毒的遗传标记位点 RT-PCR 鉴定

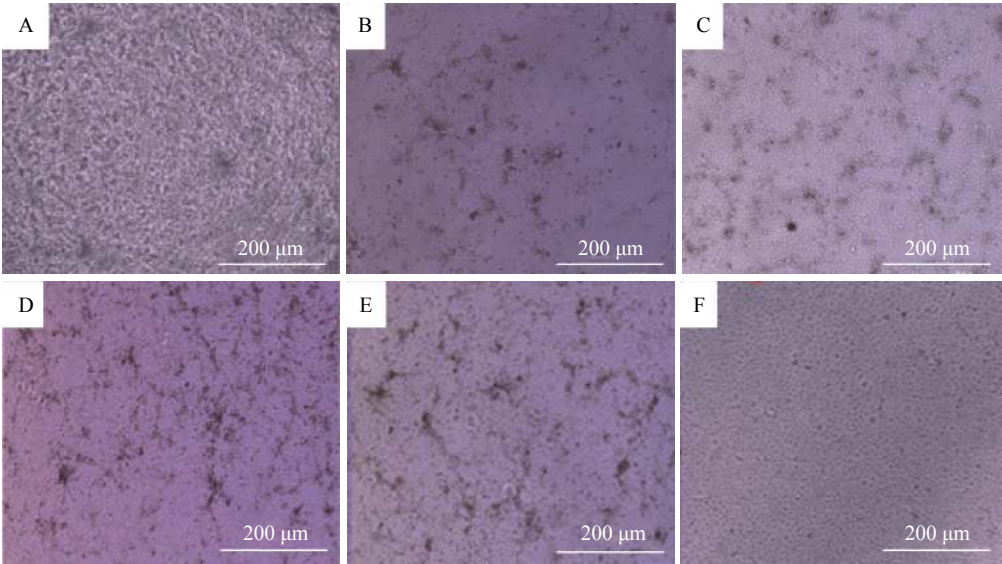
Fig. 5 Identification of genetic marker of the rescued virus by RT-PCR



A: 亲本病毒; B: 拯救病毒; C: 空白对照
A: Parental virus; B: Rescued virus; C: Blank control

图 6 拯救病毒的间接免疫荧光鉴定

Fig. 6 Identification of the rescued virus through indirect immunofluorescence assay



A: 第 1 代; B: 第 3 代; C: 第 6 代; D: 第 9 代; E: 第 12 代; F: 空白对照
A: The first generation; B: The third generation; C: The sixth generation; D: The ninth generation; E: The 12th generation; F: Blank control

图 7 rJXA1 在 Marc-145 细胞中引起的细胞病变

Fig. 7 Cytopathic effect (CPE) induced by rJXA1 in Marc-145 cells

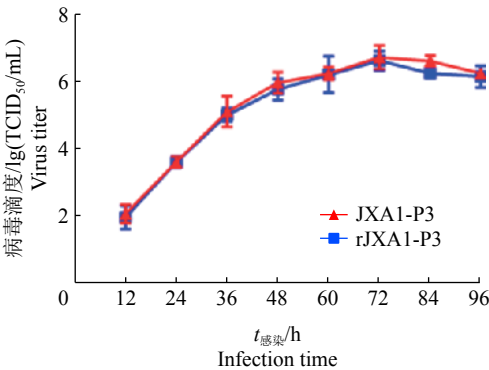


图 8 拯救病毒和亲本病毒的生长曲线

Fig. 8 The growth curves of the rescued virus and parental virus.

3 讨论与结论

2006 年以来,以感染猪高热、高发病率和高死亡率为特征的高致病性猪繁殖与呼吸综合征在我国爆发,并在全国范围流行。截至目前,该病依然在国内广泛流行,给我国养猪业带来巨大的经济损失^[18]。

PRRSV 基因组为不分节段的单股正链 RNA,全长 15 kb 左右。构建其全长感染性克隆时需要避免基因突变、缺失等破坏保真性的情况出现。为克服这一难点,本研究在构建过程中全程使用 PrimeSTAR® Max 高保真聚合酶进行基因的扩增或融合 PCR 扩增。此外,为了避免长片段扩增导致的保真性降低,本研究还将整个病毒的基因组分为 4 个节段分段克隆,逐步连接到严谨性较高的低拷贝载体 pOKq 上,成功构建了 JXA1 株的全长感染

性克隆。并采取基于 DNA-launched 途径进行病毒拯救,成功构建了 HP-PRRSV JXA1 株的反向遗传平台,获得了感染性拯救病毒 rJXA1。该拯救病毒与亲本毒株 JXA1 具有相同的体外增殖能力。

为了区分亲本病毒和拯救病毒,需要在拯救病毒的基因中加入遗传标记。本研究选择了 20 株有代表性的基因 II 型 PRRSV 毒株,使用 MegAlign 软件对其进行全基因组序列比对。最终选择第 510 位碱基作为遗传标记位点。20 株基因 II 型代表株在该位点的碱基均为 A,对应的氨基酸密码子为 AGA,编码精氨酸,将其突变为 G 后不影响编码的氨基酸,同时可以形成一个新的单酶切位点 *FseI* (GGCCGGCC),便于对拯救病毒和亲本病毒的鉴定。

准确且完整的全长感染性克隆的构建是病毒拯救的关键^[19]。本研究采取基于 DNA-launched 途径进行病毒拯救,避开了 RNA 体外转录的步骤,不仅减少了试验操作的影响,也简化了整个试验流程。另外,本研究还在 JXA1 病毒的基因组两端添加了核酶序列,全长质粒转染至 BHK-21 细胞后在细胞内转录出 RNA,在核酶的作用下直接剪切,形成不含外源基因的病毒基因组。PRRSV 基因组 3'端存在 1 个 ploy A 尾,ploy A 的个数对病毒转录的稳定性有重要作用,如果 ploy A 尾上 A 的个数过少,有可能导致转录失败,无法产生具有感染性的病毒粒子。基于广东省动物源性人兽共患病预防与控制重点实验室以前建立 RNA-launched 反向遗传平台时的经验,本研究选择了 42 个 A 构建病毒基因组的 ploy A 尾。

虽然国内已使用高致病性 PRRSV 弱毒活疫苗来控制 HP-PRRSV 的流行, 但 HP-PRRSV 毒株依然在国内广泛流行, 未呈现明显的减弱趋势^[20], 其他亚群 (如 NADC30-like 亚群和 GM2-like 亚群) 呈现上升趋势^[21-22], 所以很有必要对其原因进行研究。本研究成功构建的 HP-PRRSV JXA1 株的反向遗传平台将为进一步研究 HP-PRRSV 的致病机理、基因功能以及新型疫苗研发奠定了基础, 同时可为 PRRSV 的防控提供技术参考。

致谢: 感谢河南农业大学田克恭教授惠赠 HP-PRRSV JXA1 毒株, 感谢华南农业大学兽医学院陈耀博士在本研究的选题上给予的指导与建议!

参考文献:

[1] NEUMANN E J, KLIEBENSTEIN J B, JOHNSON C D, et al. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States[J]. *J Am Vet Med Assoc*, 2005, 227(3): 385-392.

[2] LI B, LIU R F, LIU S Y, et al. The genomic diversity of Chinese porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates from 1996 to 2009[J]. *Vet Microbiol*, 2010, 146(3/4): 226-237.

[3] 童光志, 周艳君, 郝晓芳, 等. 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒的分离鉴定及其分子流行病学分析 [J]. *中国预防兽医学报*, 2007, 25(5): 323-327.

[4] ALBINA E. Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): An overview[J]. *Vet Microbiol*, 1997, 55(1/2/3/4): 309-316.

[5] TIAN K G, YU X L, ZHAO T Z, et al. Emergence of fatal PRRSV variants: Unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark[J]. *PLoS One*, 2007, 2(6): e526.

[6] ZHAO K, YE C, CHANG X B, et al. Importation and recombination are responsible for the latest emergence of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in China[J]. *J Virol*, 2015, 89(20): 10712-10716.

[7] Li Y F, WANG X L, BO K T, et al. Emergence of a highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the mid-eastern region of China[J]. *Vet J*, 2007, 174(3): 577-584.

[8] ZHOU Z, LI X D, LIU Q, et al. Complete genome sequence of two novel Chinese virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus variants[J]. *J Virol*, 2012, 86(11): 6373-6374.

[9] ZHAO K, GAO J C, XIONG J Y, et al. Two residues in NSP9 contribute to the enhanced replication and pathogenicity of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *J Virol*, 2018, 92(7): e02209-17.

[10] TRUONG H M, LU Z, KUTISH G F, et al. A highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syn-

drome virus generated from an infectious cDNA clone retains the in vivo virulence and transmissibility properties of the parental virus[J]. *Virology*, 2004, 325(2): 308-319.

[11] 吴欣伟, 熊永忠, 秦宏阳, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 XH 株感染性克隆的构建 [J]. *中国预防兽医学报*, 2011, 33(2): 97-100.

[12] HUANG Y W, FANG Y, MENG X J. Identification and characterization of a porcine monocytic cell line supporting porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) replication and progeny virion production by using an improved DNA-launched PRRSV reverse genetics system[J]. *Virus Res*, 2009, 145(1): 1-8.

[13] 常亚飞, 刘永刚, 李爱东, 等. 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒 HuN4 传代致弱株 HuN4-F30 感染性克隆的构建及拯救病毒致病性分析 [J]. *中国预防兽医学报*, 2016, 38(7): 532-536.

[14] 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[J]. *Virology*, 2005, 331(1): 47-62.

[15] RENUKARADHYA G J, MENG X J, CALVERT J G, et al. Live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines: Current status and future direction[J]. *Vaccine*, 2015, 33(33): 4069-4080.

[16] SUHARDIMAN M, KRAMYU J, NARKPUK J, et al. Generation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by in vitro assembly of viral genomic cDNA fragments[J]. *Virus Res*, 2015, 195: 1-8.

[17] 翟新验, 韩焘, 周智. 反向遗传学在猪繁殖与呼吸综合征病毒研究中的应用 [J]. *中国兽医杂志*, 2014, 50(4): 52-53.

[18] ZHOU L, KANG R M, JI G S, et al. Molecular characterization and recombination analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus emerged in south-western China during 2012-2016[J]. *Virus Genes*, 2018, 54(1): 98-110.

[19] LV J, ZHANG J W, SUN Z, et al. An infectious cDNA clone of a highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus variant associated with porcine high fever syndrome[J]. *J Gen Virol*, 2008, 89(Pt 9): 2075-2079.

[20] 韩焘, 张硕, 吴佳俊, 等. 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒疫苗株 JXA1-R 感染性克隆的构建与鉴定 [J]. *中国兽医学报*, 2016, 36(11): 1818-1822.

[21] WANG L J, XIE W T, CHEN X X, et al. Molecular epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in central China since 2014: The prevalence of NADC30-like PRRSVs[J]. *Microb Pathog*, 2017, 109: 20-28.

[22] ZHOU L, YANG B N, XU L, et al. Efficacy evaluation of three modified-live virus vaccines against a strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus NADC30-like[J]. *Vet Microbiol*, 2017, 207: 108-116.