

张健, 吴珍芳, 杨化强. CD163 基因敲除大白猪的抗蓝耳病性能和主要生产性能研究 [J]. 华南农业大学学报, 2023, 44(3): 333-339.
ZHANG Jian, WU Zhenfang, YANG Huaqiang. Resistance to blue ear disease and production performance assessment of CD163 gene-edited Large White pigs[J]. Journal of South China Agricultural University, 2023, 44(3): 333-339.

CD163 基因敲除大白猪的抗蓝耳病 性能和主要生产性能研究

张 健✉, 吴珍芳, 杨化强✉

(岭南现代农业科学与技术广东省实验室 云浮分中心/广东中芯种业科技有限公司, 广东 云浮 527400)

摘要:【目的】运用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术和体细胞核移植技术获得 CD163 基因全敲除 (CD163 gene knockout, CD163-KO) 的克隆猪, 验证该基因敲除大白猪的抗蓝耳病特性, 并研究其与野生型大白猪在生理、生产和繁殖性能等方面的差别, 评估 CD163-KO 大白猪的主要生产性能。【方法】用猪繁殖与呼吸综合征病毒 (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 流行毒株 NADC30-like 对本研究所获得的 11 头 CD163-KO 大白猪和 5 头年龄、体质量相当的野生型大白猪进行攻毒试验。连续 14 d 观察猪的临床症状, 记录直肠温度变化, 检测血清中 PRRSV 病毒含量和抗体水平。14 d 后取肺部组织进行切片, 通过 PRRSV 免疫荧光试验观察肺脏感染情况。采集 CD163-KO 和野生型大白猪肺泡巨噬细胞进行免疫染色, 观察肺泡巨噬细胞表面 CD163 蛋白的表达情况; 采集猪外周血单核细胞进行诱导分化, 观察 CD163-KO 与野生型大白猪诱导分化的巨噬细胞对血红蛋白-结合珠蛋白复合物的摄取情况。最后, 统计分析 CD163-KO 与野生型大白猪的生产性能及公猪的繁殖性能。【结果】本研究获得的 CD163-KO 大白猪对蓝耳病 NADC30-like 毒株具有完全抗性, 敲除 CD163 基因不影响巨噬细胞的生理功能, CD163-KO 与野生型大白猪的生长性能和繁殖性能无明显差异。【结论】本研究是对 CD163-KO 猪抵抗蓝耳病的又一佐证和补充, 证明 CD163 基因敲除操作对生产性能没有潜在的负面影响, 为抗蓝耳病猪的生物安全提供了支撑。

关键词: CD163; 基因敲除; 大白猪; PRRSV; 类 NADC30 毒株; 抗病育种; 生物安全评价

中图分类号: S813.3

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2023)03-0333-07

Resistance to blue ear disease and production performance assessment of CD163 gene-edited Large White pigs

ZHANG Jian✉, WU Zhenfang, YANG Huaqiang✉

(Yunfu Subcenter, Guangdong Laboratory for Lingnan Modern Agriculture/Guangdong
ZonXin Seedstock Core Technology Co., Ltd., Yunfu 527400, China)

Abstract: 【Objective】The purpose of this study was to generate CD163 gene knockout (CD163-KO) Large White pigs by CRISPR/Cas9 gene editing and somatic cell nuclear transfer technologies, investigate the resistance to blue ear disease and the biosafety effect including physiology, productive and reproductive performances of the gene knockout pigs, and assess the main production performances of CD163-KO Large White pigs. 【Method】In this study, the 11 CD163-KO pigs and five age- and body weight-matched wild type Large White pigs were challenged with NADC30-like strain of porcine reproductive and respiratory syndrome

收稿日期: 2022-03-18 网络首发时间: 2023-01-03 10:04:18

首发网址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20221230.1622.007.html>

作者简介: 张 健, 助理研究员, 硕士, 主要从事生物技术抗病育种研究, E-mail: zhangjian-336@163.com; 通信作者: 杨化强, 副研究员, 博士, 主要从事大动物基因修饰育种、动物克隆和干细胞相关领域的研究, E-mail: yangh@scau.edu.cn

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金 (2019B1515210030)

virus (PRRSV). The rectal temperature, PRRSV antibody and virus variation were monitored continuously for 14 days. The lung tissues were examined by immunofluorescence of PRRSV antigen. Expression of CD163 protein on the surface of pulmonary alveolar macrophages in wild type and CD163-KO Large White pigs were examined through immunofluorescence staining. We compared the differentiation potential of monocytes into macrophages between CD163-KO and wild type pigs, and observed their uptake capacities to hemoglobin-haptoglobin complex. In addition, we analyzed the growth and reproductive production of the boars between CD163-KO pigs and wild type control to assess their biosafety and breeding value. 【Result】 CD163-KO pigs were completely resistant to NADC30-like strain without impairing the biological function associated with the modified gene, as well as productive and reproductive performances. 【Conclusion】 This study is an evidence and supplement of CD163-KO pigs resistance to blue ear disease, and demonstrates that CD163 gene knockout has no potentially negative effects on production performance, which provides evidences for the biosecurity of CD163-KO pigs.

Key words: CD163; Gene knockout; Large White pig; PRRSV; NADC30-like toxic strain; Antiviral breeding; Biosafety assessment

猪繁殖与呼吸综合征 (Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS), 俗称“猪蓝耳病”, 是导致养猪业重大损失的主要疾病之一; 其防控较为困难与该病原猪繁殖与呼吸综合征病毒 (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 的遗传多样性有关。PRRSV 是约 15 kb 的单链 RNA 病毒, 有 2 种特征明确的基因型: I 型, 又称为欧洲型 (EU 型); II 型, 也称为北美型 (NA 型)。我国流行的 PRRSV 毒株绝大部分为 NA 型。2006 年中国第 1 次爆发高致病性猪蓝耳病疫情, 对养猪业造成了巨大损失^[1-2]。2013 年, 中国首次发现新的重组 PRRSV 毒株, 称为类 NADC30 (NADC30-like), 该毒株引起的呼吸道症状不明显, 死亡率低, 但却会对母猪繁殖性能造成严重影响, 母猪流产率高达 30%^[3-4]。近几年流行病学调查表明 NADC30-like 毒株已成为优势流行毒株, 特别是在华南地区呈扩散态势, 对养猪业构成了重大挑战^[5]。过去, 疫苗接种一直是预防 PRRSV 感染的主要策略。针对 PRRSV 的多种改良活疫苗和灭活疫苗已经开发出来, 然而由于 PRRSV 的高度重组和变异, 这些疫苗未能提供可持续的保护^[6-8], 猪场蓝耳病仍时有出现, 因此急需一种行之有效的方法来抵抗 PRRSV 在猪场的传播。

利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除 PRRSV 关键宿主因子是一个很有前景的方法。想要通过基因编辑技术制备出能够抵抗某一种病毒的猪, 重要的前提条件是, 需要知道该病毒与宿主互作的关键受体基因。目前只有为数不多的几种病毒受体得到了鉴定^[9-11], CD163 基因是目前最广为认知的病毒受体, Whitworth 等^[12]在 2015 年证实

CD163 基因敲除 (CD163 gene knockout, CD163-KO) 大白猪表现出显著的 PRRSV 耐药性, 并且 CD163 基因修饰猪没有出现病毒血症和临床症状。2018 年, 华南农业大学吴珍芳教授课题组利用类似试验验证了 CD163-KO 杜洛克猪可以完全抵抗高致病性 PRRSV 的感染^[13]。近年来国内外大量研究也证明 CD163 是 PRRSV 感染宿主细胞必不可少的蛋白分子, 敲除 CD163 基因可使猪抵抗 PRRSV 的感染^[14-20]。

本研究是在团队前期研究的基础上, 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术和体细胞核移植的方法, 成功获得 CD163-KO 大白猪。接种国内目前流行的 NADC30-like 毒株进行攻毒试验, 通过临床观察、免疫荧光试验、检测血清中抗体滴度和病毒 RNA 水平等方法, 证明了所获得的 CD163-KO 大白猪能够完全抵抗 NADC30-like 毒株的感染; 同时, 为了评估基因修饰对种猪生产和繁殖性能的影响, 我们对 CD163-KO 大白猪的生长速度、繁殖性能、肉料比等生产性能进行了分析, 评估其生产性能和育种价值, 为其可能的产业化应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

大白猪胎儿成纤维细胞由华南农业大学吴珍芳教授课题组分离培养并保存, 代孕母猪由广东中芯种业科技有限公司提供。猪蓝耳病 NADC30-like 毒株为温氏食品集团股份有限公司研究院猪病研究室惠赠。

1.2 试验方法

1.2.1 猪 CD163 基因 gRNA 设计及靶向质粒

pX330-CD163 的构建 针对猪 CD163 基因外显子 7 (Exon 7) 设计 gRNA: 选择 GGTCGTGTTGAAGTACAACA 为打靶位点, TGG 为引导识别位点 (图 1)。表达 gRNA 的 DNA 序列在两端带上的酶切位点为 *Bbs*I, 生物合成 gRNA 互补双链——正义链: 5'-CACCGGTCGTGTTGAAGTACAACA-3', 反义链: 5'-AAACTGTTGTACTTCAACACGACC-3', 退火后连接到载体 pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (简称 PX330, Addgene, 货号 42230), 构成靶向质粒 pX330-CD163。

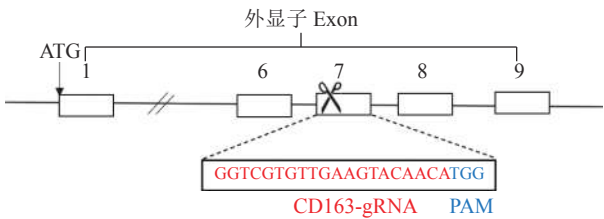


图 1 猪 CD163 基因示意图和 CD163-gRNA 序列
Fig. 1 Genetic map of pig CD163 gene and sequence of CD163-gRNA

1.2.2 阳性单克隆细胞的筛选与体细胞核移植 复苏大白猪胎儿成纤维细胞, 用含 15% (φ) 胎牛血清的 DMEM 完全培养基, 于 38 °C、5% (φ) CO₂ 的培养箱中培养, 当细胞长至 80% 汇合度时消化备用, 按照 Lonza 原代成纤维细胞转染试剂盒说明书将 10 μ g 靶向质粒 pX330-CD163 转染至 1 $\times$ 10⁶ 个猪胎儿成纤维细胞中, 使用 A-033 程序进行瞬时转染后, 将细胞按照每 cm² 10 个细胞的密度接种到直径 10 cm 的培养皿中连续培养 10 d, 中途换液 1 次。10 d 后挑取单克隆至 48 孔板中继续培养, 48 孔长满后取少许细胞直接裂解并进行 PCR 检测, 筛选 CD163 阳性细胞, 剩余细胞转移至 24 孔板继续培养。PCR 引物为 CD163-F: GAATTGTCTCCAGGAAGGA, CD163-R: AGCCAGATCTGTCCACTTC; 产物长度: 380 bp。阳性细胞长满后即可作为供体细胞进行体细胞核移植操作, 每头受体母猪移植 200~250 个操作胚胎。

1.2.3 CD163-KO 大白猪鉴定 新生克隆猪采耳组织再进行 PCR 测序鉴定。死亡仔猪采肺脏、脾脏、淋巴结、骨髓组织, 提取总蛋白, 进行 CD163 蛋白的 Western blot 检测, 一抗选用 anti-CD163 抗体 (兔多克隆抗体, ab87099), 100 倍稀释, 二抗选用 HRP 羊抗兔 IgG (博士德, BA1054), 内参一抗选用 GAPDH 小鼠单抗 (上海康成, KC-5G4), 二抗用 HRP 羊抗小鼠 IgG (博士德, BA1050)。另取一头瘦弱仔猪, 在实验室取肺冲出肺泡巨噬细胞, 用鼠抗

猪 CD163 RPE (伯乐, MCA2311PE) 免疫荧光染色, 荧光显微镜观察到 CD163-KO 大白猪无 CD163 蛋白表达。

1.2.4 CD163-KO 大白猪攻毒试验 取 30 日龄的 11 头 CD163-KO 大白猪和 5 头野生型大白猪 (对照), 用 NADC30-like 毒株进行攻毒, 毒价为 1 $\times$ 10⁷ TCID₅₀/mL, 采用滴鼻 1 mL 和肌注 1 mL 的攻毒方式, 攻毒当天测量温度, 采集血清, 连续 14 d 记录体温, 攻毒后第 3、7、10 和 14 天采集血清, 检测血清中 PRRSV 含量和抗体水平。14 d 后杀猪取肺脏组织进行免疫荧光检测。

1.2.5 CD163-KO 大白猪单核细胞诱导分化的巨噬细胞对血红蛋白-结合珠蛋白复合物的摄取试验 分别取 CD163-KO 大白猪与野生型大白猪抗凝外周血 10 mL, 根据 TBD 动物外周血单核细胞分离液试剂盒方法分离外周血单核细胞 (Peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 将分离到的细胞沉淀用含 20% (φ) 胎牛血清的 1640 培养液重悬, 调整细胞密度为 5 $\times$ 10⁶~10 $\times$ 10⁶/mL, 以每孔 2 mL 加入 6 孔板培养 2 h, 待 PBMC 贴壁, 用 37 °C 培养基轻轻洗涤 3 遍, 去除悬浮细胞。换上含 10% (φ) 胎牛血清和 hM-CSF (巨噬细胞集落刺激因子, 20 ng/mL) 的 1640 诱导分化培养基, 培养 7 d, 中间换液 1 次, 诱导成巨噬细胞。

按照 FITC 蛋白偶联试剂盒 (生工, 货号: D601049) 标记血红蛋白, 再将血红蛋白-FITC 与结合珠蛋白按照 1:1 的质量比混合, 形成 FITC 荧光标记的血红蛋白-结合珠蛋白复合物, 将复合物按照终质量浓度 10 μ g/mL 加入到诱导分化的巨噬细胞培养液中, 37 °C 条件下避光孵育 30 min, PBS 溶液洗 2 遍后拍照, 观察细胞荧光情况。

1.2.6 CD163-KO 大白猪生产性能和公猪的繁殖性能测定 统计 CD163-KO 大白猪和野生型大白猪的出生质量、终测数据及公猪的精液质量等指标, 分析 CD163 基因敲除是否影响大白猪的生产性能和公猪的繁殖性能。

2 结果与分析

2.1 CD163-KO 大白猪的克隆与鉴定

筛选得到 3 个阳性单克隆细胞, 移植 5 头受体母猪, 共分娩 18 头克隆仔猪, 采集耳组织提取基因组 DNA, 经 PCR 和测序鉴定, 18 头克隆仔猪的 CD163 基因都是插入 1 个 A 碱基 (表 1)。采集 CD163-KO 克隆猪肺脏、脾脏、淋巴结和骨髓, Western blot 检测结果表明成功获得 CD163-KO 大白猪 (图 2),

表 1 阳性单克隆细胞及 CD163-KO 大白猪测序结果

Table 1 Sequencing results of positive monoclonal cells and CD163-KO Large White pigs

类型 Type	靶位点序列(5'→3') Sequence of target site	插入/缺失 Insertion/ Deletion	数量 Number
野生型大白猪 Wild type Large White pig	GGTCGTGTTGAAGTACAACATGG		
阳性单克隆细胞 Positive monoclonal cell	GGTCGTGTTGAAGTACAAACATGG	+A	3
CD163-KO大白猪 CD163-KO Large White pig	GGTCGTGTTGAAGTACAAACATGG	+A	18

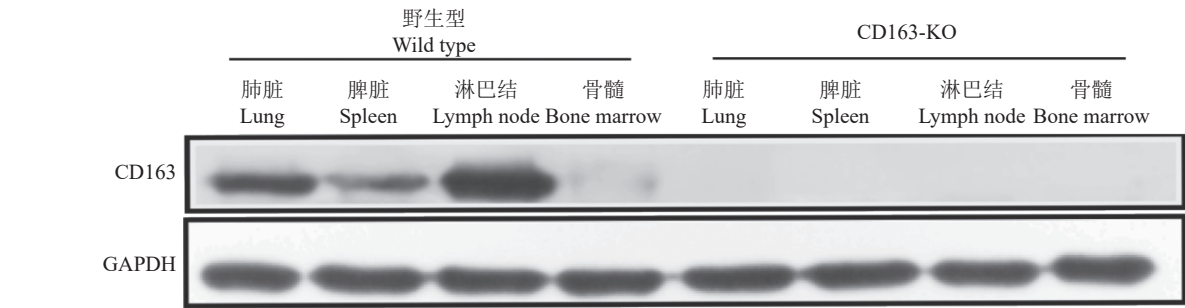


图 2 野生型和 CD163-KO 大白猪取样组织中 CD163 蛋白表达

Fig. 2 CD163 protein expression in sampling tissues of wild type and CD163-KO Large White pigs

CD163-KO 大白猪的肺泡巨噬细胞 CD163 免疫荧光结果也证实 CD163 蛋白完全缺失 (图 3)。

2.2 CD163-KO 大白猪攻毒试验

野生型大白猪于攻毒后第 3 天开始发热，直到

第 14 天体温维持在 40 ℃ 左右，没有出现明显的呼吸道症状，没有死亡；CD163-KO 大白猪没有任何临床症状，体温正常 (图 4A)。检测攻毒 CD163-KO 猪第 0、3、7、10 和 14 天血清中 PRRSV 病毒和抗体含量，发现 5 头野生型大白猪病毒核酸水平快速增长，第 3 天病毒核酸含量达到 81g RNA 拷贝数/mL，而 11 头 CD163-KO 大白猪在此期间血清中病毒含量一直为 0 (图 4B)。野生型大白猪的抗体水平在第 10 和 14 天时，滴度明显提高，而 11 头 CD163-KO 大白猪抗体一直是阴性 (图 4C)。猪肺脏组织免疫荧光结果显示，野生型大白猪肺脏巨噬细胞表面存在大量的 PRRSV，而 CD163-KO 大白猪完全没有该病毒存在 (图 5)。

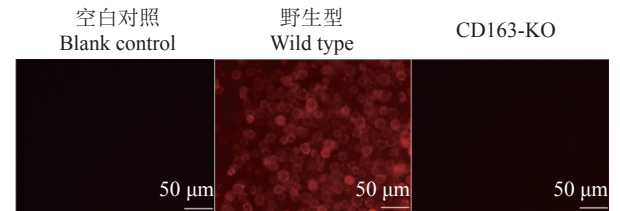


图 3 野生型和 CD163-KO 大白猪肺泡巨噬细胞表面 CD163 免疫荧光检测

Fig. 3 Immunofluorescence detection of CD163 on the surface of pulmonary alveolar macrophages in wild type and CD163-KO Large White pigs

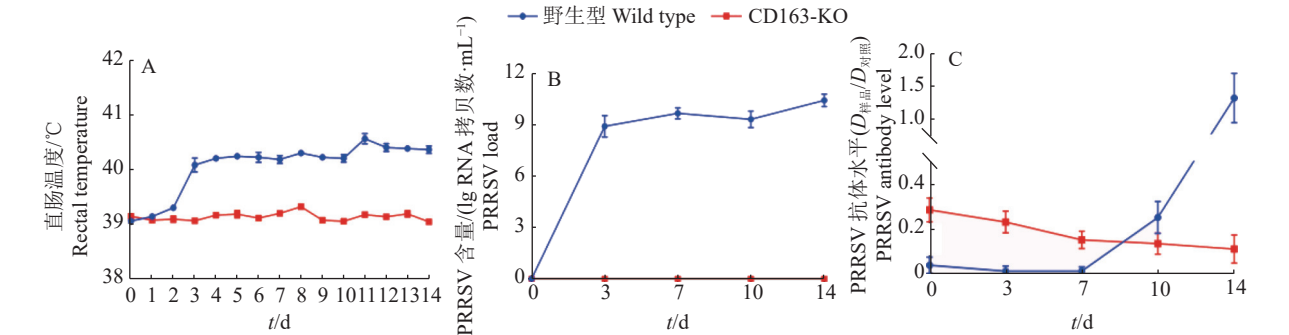


图 4 野生型和 CD163-KO 大白猪攻毒后直肠温度、血清中 PRRSV 含量和抗体水平

Fig. 4 Rectal temperature, PRRSV load and antibody level in serum of wild type and CD163-KO Large White pigs post infection

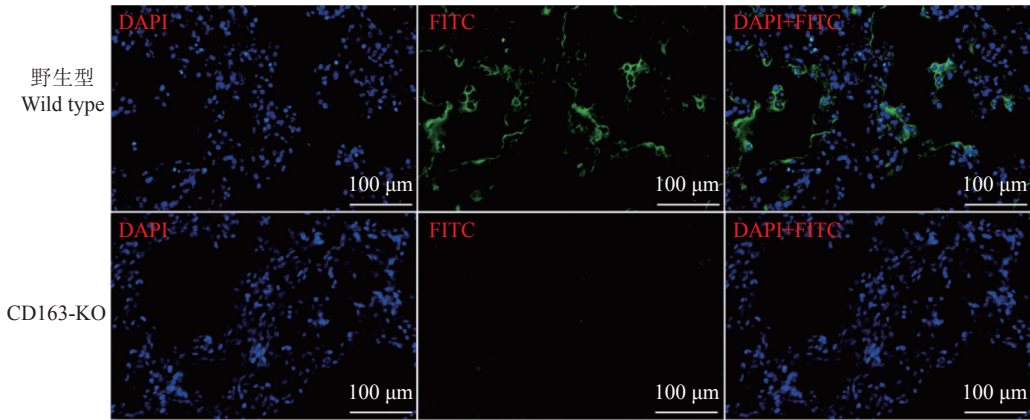


图5 野生型和CD163-KO大白猪攻毒后第14天肺脏PRRSV免疫荧光结果

Fig. 5 Immunofluorescence result of PRRSV in lung of wild type and CD163-KO Large White pigs at 14 d post infection

2.3 CD163-KO 大白猪巨噬细胞功能分析

野生型和CD163-KO大白猪得到相同结果,体外分离得到的单核细胞利用hM-CSF体外诱导得到的巨噬细胞能够正常摄取血红蛋白-结合珠蛋白复合物(图6),并不影响其正常的生理功能。

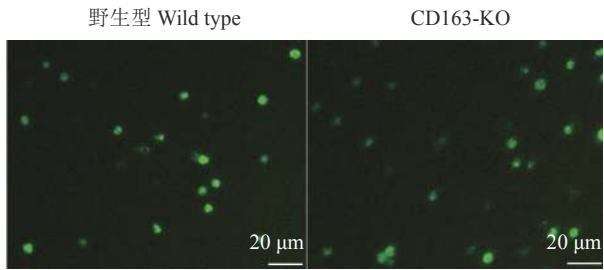


图6 野生型和CD163-KO大白猪巨噬细胞对血红蛋白-结合珠蛋白复合物的摄取能力

Fig. 6 Uptake capacity of macrophages from wild type and CD163-KO Large White pigs to hemoglobin-haptoglobin complex

2.4 CD163-KO 大白猪生产和繁殖性能测定

取10头品系相同、年龄和体质量相近的野生型大白猪为阴性对照,对5头F0代CD163-KO公猪的出生体质量、体长、体高、115 kg背膘厚和115 kg眼肌面积、30~115 kg测定期平均日增体质量和饲料转化率进行测定,结果如表2所示。F0代基因敲除猪的出生体质量、体高、体长、115 kg肌内脂肪、115 kg背膘厚、115 kg眼肌面积、平均日增体质量和饲料转化效率等指标与野生型对照没有明显差异。

取10份F0代CD163-KO大白猪的精液样本、20份一级野生型大白猪的精液,进行精液质量分析,统计结果如表3显示。CD163-KO大白猪采精量,精液1:1稀释后精子活力、密度与野生型大白猪无明显差异,其中畸形率略低于野生型大白猪。

表2 野生型(n=10)和CD16-KO(n=5)大白猪生产性能比较¹⁾
Table 2 Comparison of the productive performance of wild type and CD163-KO Large White pigs

项目 Item	野生型 Wild type	CD163-KO	P
出生体质量/kg Birth body weight	2.04±0.13	1.80±0.15	0.277
115 kg体长/cm Body length of 115 kg	119.8±1.2	119.2±1.0	0.746
115 kg体高/cm Body height of 115 kg	68.6±0.6	68.4±0.8	0.841
115 kg背膘厚/mm	12.069±0.401	11.702±0.495	0.592
Backfat thickness of 115 kg			
115 kg眼肌面积/cm ²	35.670±1.202	36.320±1.090	0.736
Eye muscle area of 115 kg			
30~115 kg平均日增体质量/kg	1.075±0.047	1.008±0.068	0.428
Average daily gain of body weight during 30~115 kg			
30~115 kg饲料转化率	2.326±0.085	2.548±0.154	0.191
Feed/gain ratio during 30~115 kg			

1)表中数据为平均值±标准误,P>0.05表示两组间差异不显著(t检验)
1) Data are expressed as the mean ± standard error, P > 0.05 means there is no significant difference between two sets (t test)

表 3 野生型 (n=20) 与 CD163-KO (n=10) 大白猪精液质量比较¹⁾

Table 3 Comparison of the quality of the semen from wild type and CD163-KO Large White pigs

项目 Item	野生型 Wild type	CD163-KO	P
精子总数/亿 Number of sperms	680.643 ± 84.535	685.726 ± 99.930	0.971
1 : 1 稀释后精子活力 Sperm motility after 1 : 1 dilution	0.675 ± 0.013	0.700 ± 0.000	0.219
1 : 1 稀释后精子密度/(亿·mL ⁻¹) Sperm density after 1 : 1 dilution	1.685 ± 0.195	1.578 ± 0.239	0.747
精子畸形率/% Abnormal rate of sperm	11.092 ± 1.358	10.000 ± 0.964	0.606

1)表中数据为平均值±标准误, P>0.05表示两组间没有显著差异(t检验)
1) Data are expressed as the mean ± standard error, P > 0.05 means there is no significant difference between two sets (t test)

3 讨论与结论

大量研究表明, PRRSV 进入细胞是由多种细胞受体介导的, 如唾液粘附素 (Sn/CD169)、CD151、硫酸肝素、CD163^[21-23]。其中, 目前已经证明 CD163 是 PRRSV 感染过程中的关键受体。CD163 被称为清道夫受体, 是一种 I 型跨膜糖蛋白, 在单核细胞/巨噬细胞系 (如肺泡巨噬细胞) 和非洲绿猴胚胎肾细胞 (MAC145) 表面表达。CD163 由富含半胱氨酸的 9 个清道夫受体结构域 (SRCR1~9) 组成, 其中 SRCR2 被证明支持红细胞的黏附, 促进红细胞成熟, SRCR3 可以清除血浆中的游离血红蛋白, SRCR5 对 PRRSV 进入靶细胞至关重要^[24-25]。本研究通过设计靶向 CD163 基因的 SRCR5 区域 (对应外显子 7) 的 gRNA, 通过单克隆筛选只有 1 个 A 碱基插入的突变型作为供体细胞移植, 获得 18 头 CD163-KO 克隆猪, 克隆效率处于较高水平, 在方法学上也为制备 CD163-KO 大白猪提供了一定的参考。

本研究证实了利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术获得的 CD163-KO 大白猪对当前本地区流行的蓝耳病 NADC30-like 毒株具有完全抗性, 并且不损伤猪的主要生产性能。CD163 基因缺失并没有影响猪正常生理功能, 体外单核细胞诱导分化的巨噬细胞能够保持吞噬细胞外血红蛋白的功能^[24, 26], 但是 CD163 基因敲除是否会影响 CD163 的其他一些功能还需要更多研究进行验证。下一步工作需要尽可能详尽地追踪 CD163-KO 大白猪的生长性能和繁殖性能, 扩大群体规模, 为后期应用提供更多数据支撑。

本研究敲除 CD163 基因没有改变猪的生产性能等指标。CD163-KO 大白猪与自然分娩的野生型大白猪在出生体质量和料肉比等性状上无明显差异, 这一结果和多数研究结果相似。研究报道, 克隆猪的出生、3 周龄和断奶体质量以及 30~110 kg 平均日增体质量、料肉比、背膘厚等性状与对照猪均无明显差异^[27-29]。

对于猪常见的其他传染性疾病, 目前还没发现很有效的受体基因。一方面是因为病毒侵袭宿主基因组很可能是多个基因协同作用的结果, 这导致仅修饰单个基因很难达到抵抗病毒入侵的目的; 其次, 目前的分子试验技术很难一次性精准找到与病毒相互作用的关键基因, 而会识别出大量的候选基因, 导致后期验证工作量异常艰巨, 进展缓慢。2020 年, 华中农业大学赵书红教授团队首次利用猪全基因组 CRISPR 敲除文库, 对抗乙型脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV) 基因进行了筛选, 筛选到几个显著影响 JEV 病毒在细胞内复制的关键基因^[29], 然而这些基因并不是 JEV 病毒进入细胞的膜受体, 所以并不能阻止病毒进入细胞。此外, 即使找到了病毒的关键受体基因, 也不能简单地将其敲除。基因组的每个编码基因不仅执行特定功能, 而且参与多个基因通路, 起着不同的作用, 如果简单地敲除, 必然会影响宿主某一方面的功能; 或者有些基因至关重要, 敲除后会导致胚胎致死等情况。这些都决定了病毒受体的寻找和利用难度非常大, 还有更多的工作要做。

参考文献:

[1] HAN J, ZHOU L, GE X, et al. Pathogenesis and control of the Chinese highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 209: 30-47.
[2] TIAN K, YU X, ZHAO T, 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.
[3] ZHAO K, YE C, CHANG X, et al. Importation and recombination are responsible for the latest emergence of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in China[J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(20): 10712-10716.
[4] WANG H M, LIU Y G, TANG Y D, et al. A natural recombinant PRRSV between HP-PRRSV JXA1-like and NADC30-like strains[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2018, 65(4): 1078-1086.
[5] YU Y, ZHANG Q, CAO Z, et al. Recent advances in por-

- cine reproductive and respiratory syndrome virus NADC30-like research in China: Molecular characterization, pathogenicity, and control[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 12: 791313. doi: 10.3389/fmicb.2021.791313.
- [6] ZHOU L, YANG B, 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]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 207: 108-116.
- [7] CHAI W, LIU Z, SUN Z, et al. Efficacy of two porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) modified-live virus (MLV) vaccines against heterologous NADC30-like PRRS virus challenge[J]. *Veterinary Microbiology*, 2020, 248: 108805. doi: 10.1016/j.vetmic.2020.108805.
- [8] RENUKARADHYA G J, MENG X J, CALVERT J G, et al. Inactivated and subunit vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome: Current status and future direction[J]. *Vaccine*, 2015, 33(27): 3065-3072.
- [9] 熊胜利, 龙清孟, 陈大方, 等. 抗病育种技术在引进美国 SPF 种猪后代选育中应用探究[J]. *养猪*, 2014(3): 73-74.
- [10] YUAN H, YANG L, ZHANG Y, et al. Current status of genetically modified pigs that are resistant to virus infection[J]. *Viruses*, 2022, 14(2): 417. doi: 10.3390/v14020417.
- [11] PROUDFOOT C, LILLICO S, TAIT-BURKARD C. Genome editing for disease resistance in pigs and chickens[J]. *Animal Frontiers*, 2019, 9(3): 6-12.
- [12] WHITWORTH K M, ROWLAND R R R, EWEN C L, et al. Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Nature Biotechnology*, 2016, 34(1): 20-22.
- [13] YANG H, ZHANG J, ZHANG X, et al. CD163 knock-out pigs are fully resistant to highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Antiviral Research*, 2018, 151: 63-70.
- [14] BURKARD C, LILLICO S G, REID E, et al. Precision engineering for PRRSV resistance in pigs: Macrophages from genome edited pigs lacking CD163 SRCR5 domain are fully resistant to both PRRSV genotypes while maintaining biological function[J]. *PLOS Pathogens*, 2017, 13(2): e1006206.
- [15] WELCH S K W, CALVERT J G. A brief review of CD163 and its role in PRRSV infection[J]. *Virus Research*, 2010, 154(1/2): 98-103.
- [16] XU Y, WU S, LI Y, et al. A porcine alveolar macrophage cell line stably expressing CD163 demonstrates virus replication and cytokine secretion characteristics similar to primary alveolar macrophages following PRRSV infection[J]. *Veterinary Microbiology*, 2020, 244: 108690. doi: 10.1016/j.vetmic.2020.108690.
- [17] XU K, ZHOU Y, MU Y, et al. CD163 and pAPN double-knockout pigs are resistant to PRRSV and TGEV and exhibit decreased susceptibility to PDCoV while maintaining normal production performance[J]. *eLife*, 2020, 9: e57132.
- [18] 韩晓松, 高杨, 刘海龙, 等. 利用 CRISPR/Cas9 技术制备 CD163 基因 SRCR5 序列敲除猪[J]. *农业生物技术学报*, 2020, 28(9): 1535-1542.
- [19] GUO C, WANG M, ZHU Z, et al. Highly efficient generation of pigs harboring a partial deletion of the CD163 SRCR5 domain, which are fully resistant to porcine reproductive and respiratory syndrome virus 2 infection[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 1846. doi: 10.3389/fimmu.2019.01846.
- [20] CHEN J, WANG H, BAI J, et al. Generation of pigs resistant to highly pathogenic-porcine reproductive and respiratory syndrome virus through gene editing of CD163[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2019, 15(2): 481-492.
- [21] VAN GORP H, VAN BREEDAM W, DELPUTTE P L, et al. Sialoadhesin and CD163 join forces during entry of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Journal of General Virology*, 2008, 89: 2943-2953.
- [22] ZHANG Q, YOO D. PRRS virus receptors and their role for pathogenesis[J]. *Veterinary Microbiology*, 2015, 177(3/4): 229-241.
- [23] VAN BREEDAM W, VERBEECK M, CHRISTIAENS I, et al. Porcine, murine and human sialoadhesin (Sn/Siglec-1/CD169): Portals for porcine reproductive and respiratory syndrome virus entry into target cells[J]. *Journal of General Virology*, 2013, 94: 1955-1960.
- [24] GRAVERSEN J H, MADSEN M, MOESTRUP S K. CD163: A signal receptor scavenging haptoglobin-hemoglobin complexes from plasma[J]. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2002, 34(4): 309-314.
- [25] KRISTIANSEN M, GRAVERSEN J H, JACOBSEN C, et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor[J]. *Nature*, 2001, 409(6817): 198-201.
- [26] SCHAEER C A, VALLELIAN F, IMHOF A, et al. CD163-expressing monocytes constitute an endotoxin-sensitive Hb clearance compartment within the vascular system[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2007, 82(1): 106-110.
- [27] 石俊松, 周荣, 曾海玉, 等. 体细胞克隆猪繁殖性能及后代生长性能评估[J]. *华南农业大学学报*, 2019, 40(S1): 100-103.
- [28] ADACHI N, YAMAGUCHI D, WATANABE A, et al. Growth, reproductive performance, carcass characteristics and meat quality in F1 and F2 progenies of somatic cell-cloned pigs[J]. *Journal of Reproduction and Development*, 2014, 60(2): 100-105.
- [29] KAWARASAKI T, ENYA S, OTAKE M, et al. Reproductive performance and expression of imprinted genes in somatic cell cloned boars[J]. *Animal Science Journal*, 2017, 88(11): 1801-1810.