

从 PRRSV BJ-4 株基因组全长 cDNA 获得感染性病毒

冉智光* * 陈小云* * 杨汉春* 郭 鑫 盖新娜

(中国农业大学 农业部预防兽医学重点开放实验室 北京 10094)

摘 要 对已构建的覆盖猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)BJ-4 全长 cDNA 的 6 个重组质粒进行测序,并对部分点突变进行定点回复突变,将突变片段顺次连接,获得了全长 cDNA 克隆 pWSK-DCBA。通过体外转录获得病毒基因组 RNA,将 RNA 与脂质体混合后直接转染 MARC-145 细胞,获得拯救病毒(rV68)。rV68 能在 MARC-145 细胞上稳定传代,并可引起 PRRSV 特征性的细胞病变(CPE)。增殖动态分析表明, rV68 在 MARC-145 细胞上的生长有所迟滞,达到最高滴度的培养时间比亲本病毒延迟 12h,但滴毒无显著差异($P > 0.05$)。结果表明,构建的 BJ-4 全长 cDNA pWSK-DCBA 具有感染性,为研究中国 PRRSV 的分子致病与免疫机制、新型疫苗等奠定了基础。

关键词 :猪繁殖与呼吸综合征病毒 ;感染性 cDNA 克隆 ;拯救病毒

中图分类号 :Q78 S852.65 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2007)03-0423-07

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(PRRSV)引起的一种高度传染性疾病,其主要特征是引起繁殖障碍、呼吸道疾病、哺乳仔猪的高死亡率、免疫抑制和持续性感染^[1~3],给养猪业造成了巨大的经济损失^[4]。PRRSV 为单股正链 RNA 病毒。其基因组长约 15kb,5'端有帽子结构,3'端有 poly(A)尾,编码区有 9 个开放阅读框(ORF)。其中, ORF1a/b 编码病毒的复制酶, ORF2a ~ 7 编码 7 种结构蛋白^[5~8],但也有人认为 ORF3 编码非结构蛋白^[9]。根据抗原性和基因型的不同, PRRSV 可分为欧洲型和美洲型^[10,11]。各个毒株在致病性、细胞培养特性等方面也存在差异^[12,13]。由于研究手段的限制,多年来,关于 PRRSV 的基础研究一直没有取得重要的突破。近年来兴起的反向遗传技术给 PRRSV 的研究提供了一个崭新的技术平台。目前已有 LV、VR-2332、NVSL # 97-7895、P129 和 PL97-1 共 5 株 PRRSV 的感染性克隆获得成功^[14~18],而国内还未见报道。本研究以我国 PRRSV BJ-4 为材料,在已构建出全长 cDNA^[19]的基础上,对全长 cDNA 中的部分点突变进行回复突变、体外转录,将 RNA 直接转染 MARC-145 细胞,获得了感染性病毒。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和细胞 重组质粒 pGEM-A1、pGEM-A2、pGEM-B1、pSK-B2、pGEM-C、pGEM-D,分别携带 BJ-4 毒株的 cDNA 重叠片段,由本室构建^[19]。大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 由本室保存。低拷贝载体 pWSK29 由军事医学科学院范宝昌博士惠赠。PPRSVBJ-4 株和 MARC-145 细胞由本室保存。

1.1.2 试剂和仪器 胎牛血清(FBS)购自 Hyclone 公司; Fluorescein(FITC)-conjugated AffiniPure rabbit anti-mouse IgG (H + L) 购自 Jackson ImmunoResearch Laboratories 公司。QuikChange[®] multi site-directed mutagenesis kit 购自 Stratagene 公司; EndoFree[®] plasmid maxikit 购自 Qiagen 公司。mMessage mMachine[®] High Yield Capped RNA Transcription kit 和 MEGA[®] clear kit 购自 Ambion 公司。DMEM 培养基、DMRIE-C、TRIzol[®] LS 和 Opti-MEM[®] I Reduced Serum Medium 购自 Invitrogen 公司。AMV 反转录酶、蛋白酶 K、Vsp I 购自 Promega 公司。BamH I、Nhe I、Fse I、Not I、Sph I 等购自 NEB 公司。RNase A 购自 Amresco 公司。DTT、RNA 酶抑制剂、Taq DNA 聚

基金项目 :国家重点基础研究发展计划(973 项目)(2005CB523204)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-10-62731296 E-mail : yanghanchun1@cau.edu.cn

* * 并列第一作者

作者简介 :冉智光(1971 -)男,重庆人,博士研究生;陈小云(1977 -)男,江西人,博士研究生,研究方向为动物分子病毒学与免疫学。

其他作者 :王 芳

收稿日期 :2006-09-25 ;接受日期 :2006-12-11 ;修回日期 :2007-03-09

合酶、dNTPs 购自天为时代公司。PRRSV 阳性血清由本室制备。N 蛋白 McAb SDOW17 ,由美国 North Carolina State University 提供。BJ-4 GP5 蛋白 McAb F12F10 由本室制备。

1.2 引物设计

根据 BJ-4 序列(GenBank 收录号 :AF331831) ,采用 Stratagene 公司的网络多点突变引物设计软件

(<http://labtools.stratagene.com/QC>) ,设计了 23 条 5' 磷酸化定点突变引物(表 1)。用软件 Oligo 6.0 设计两条遗传标记检测引物 DetcM1 (5'-GAACAAGTTTAAGGAGCTACAGAC-3') 和 DetcM2(5'-ATTGGACCTGAGTTTTTCCCACAT-3')。所有引物由上海生工生物工程公司合成。

表 1 定点突变引物
Table 1 Primers used for site-directed mutagenesis

Primer	Mutagenesis point	Mutagenesis nucleotide	Sequence(5'→3')
P4U-M1201	1 ,172	T→C	GGACCTATCGTCGTACAGTACTTCTTCGTAAAGG
P4L-M829	1 ,989	G→A	CACAGCGGAGGGAATCACCCTGACCAACT
P4L-M947	2 ,107	A→T	GGTCGCAGCAAAGATTGACCTGTACCTCCGT
P4L-M2113	3 ,273	T→C	GCCATCATCGACTCGGGCGGGCCCT
P4L-M2435	3 ,592	A→T	TTGGCTCAGTTGCTACTGAAGATGTTCCACGCATC
P4L-M2829	3 ,986	C→T	TTGCAGCTTTTACTCTATITGTGCCTCTTTTATGTTACAGTTACC
P4L-M3086	4 ,243	C→T	GGCCCCGTCGGTCTCGGTCCTTGC
P3U-M322	4 ,720	T→C	GTCCCAAAAGTGGTCAAGGTTTCCGCTGTTC
P3U-M792	5 ,190	A→T	CTTGGTCGTTTTGATTTTGTTTCCATCGGAGGCATGG
P3U-M907	5 ,305	C→T	GTTGCTTTGTGTGTTTCCTTGCTGCTTGCCTGGTTGCGTGTTT
P3U-M1230	5 ,628	T→C	GGTGCTTTCAGAACTCGAAAGCCCTCACTGA
P3U-M1492	5 ,891	A→T	CTGGCCGTGCCTATTGGCTAACATCCTCTG
MP3L-M485	8 ,092	C→G	GCGCGGCGACGCTCCTGAAATTGGTCT
P2-M395	9 ,648	A→G	GGGTACTGCGGGGCCCGGCCCC
P2-M1364	10 ,617	C→T	CATCACTATTGACTCCAGTCAAGGCGCCACATTCC
P2-M1859	11 ,094	T→C	CGGCTGCTTGCCACGCTTCGCCC
P2-M2446	11 ,699	C→G	CCCCTGCATGGGCCCCGCCCTTT
P2-M3007	12 ,260	T→C	TCCGTACGCGCCCTGCCATTCACTCTG
P2-M3375	12 ,628	C→T	GTAACCATAGTGATAATAGCACTTTGAATCAGGTGTTGCTATTTTTC
P184A-M80	12 ,697	C→T	GCTTCATGATTTTCAGCAATGGTTAATAGCTGTACATTCCTC
P184A-M594	13 ,211	C→T	TATTACCAACATCAAGTCGACGGCGGCAATTGGT
P184A-M1650	14 ,267	C→T	GGTCGCCCTGTCATCATAGAGA AAAGGGGCAAAGT
P184A-M2680	15 ,297	A→G	CATCTCAGTGTTGAATTGGAAGA ATGTGTGGTGAATGGC

Mutagenesis nucleotide in each primer is shown in boldfaces. Each primer was 5'-phosphorylated for maximum mutagenesis efficiency.

1.3 重组质粒的定点突变

将覆盖 BJ-4 全长 cDNA 的 6 个重组质粒 pGEM-A1、pGEM-A2、pGEM-B1、pSK-B2、pGEM-C、pGEM-D 进行测序发现 ,在 6 个片段中共有 46 个点突变(含引入遗传标记的 1 个沉默突变)。为尽可能减少或消除这些突变的潜在影响 ,用 Quikchange® Multi Site-Directed Mutagenesis kit 和突变引物 ,根据说明方法对位于 PRRSV 保守序列中的 23 个点突变进行回复突变。

1.4 全长 cDNA 的连接与序列测定

按文献 [19] 的方法将 6 个片段依次插入低拷贝载体 pWSK29 中 ,构建定点突变后的全长 cDNA 克隆(pWSK-DCBA)。将 pWSK-DCBA 转化 DH5α 感受态细胞 ,挑单个菌落接种 LB 液体培养基(含氨苄青霉素 60μg/mL) ,28℃、150r/min 振荡培养过夜 ,取适量

菌液涂布 LB 平板(含氨苄青霉素 60μg/mL) ,挑单个克隆接种 LB 液体培养基振荡培养 ,如此循环 10 次。根据 EndoFree® plasmid maxikit 说明书大量提取质粒 DNA ,进行酶切分析。最后挑选 68 号克隆进行全序测定。

1.5 RNA 体外转录与纯化

取适量质粒 DNA 以 Sph I 彻底消化 ,热灭活 Sph I ,加终浓度为 0.5% 的 SDS 和 200μg/mL 的蛋白酶 K ,50℃ 消化 30min ,用无核酸酶的酚/氯仿抽提两次 ,加 1/10 体积的 NaAc(3mol/L) 和 0.7 倍体积的异丙醇 ,于 - 20℃ 沉淀 1h。之后 ,12000r/min 离心 15min ,沉淀用 70% 乙醇洗涤 1 次 ,干燥后加适量无 RNA 酶的水溶解沉淀 ,使浓度达 0.5μg/μL 以上。基因组 RNA 的体外转录和纯化分别按照 mMessage mMachine® High Yield Capped RNA Transcription kit 和

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

MEGA[®] clear kit 说明书进行。

1.6 RNA 转染

MARC-145 细胞以含 10% FBS (HyClone Laboratories Inc) 的 DMEM 按常规方法培养。选择形态正常、生长旺盛的 MARC-145 细胞,经胰酶消化后,以约 10⁶ 个/mL 的细胞密度转入 6 孔板培养。待形成 80% 以上细胞单层时,按照 DMRIE-C 说明书进行转染。同时设 DMRIE-C 和 Opti-MEM[®] I Reduced Serum Medium 对照。5d 后,取转染上清接种 MARC-145 细胞单层或 PAM,进行传代。

1.7 间接免疫荧光试验

用第 6 代拯救病毒接种 MARC-145,72h 后,用冷乙醇室温固定 10min,PBS(pH7.2)洗涤 3 次。用 1% BSA 于室温中封闭 30min,PBS 洗涤 3 次。加 1:250 稀释的 McAb SDOW17 或 1:10 稀释的 F12F10 于 37℃ 反应 45min,PBS 洗涤 3 次。最后,加荧光标记二抗(含 0.01% Evans blue)于 37℃ 反应 45min,PBS 洗涤 3 次后封片、镜检。

1.8 遗传标记检测

取 250μL 病毒培养上清,按 TRIzol LS 试剂说明书制备 RNA。取适量 RNA 与 1μL 引物 DetcM2 (25pmol/μL)混匀,75℃ 5~10min,自然冷却至室温后,加入 5× 反转录缓冲液 4μL,dNTPs (10mmol/L) 1μL,DTT (0.1mol/L) 2μL,RNase 抑制剂(30U/μL) 0.5μL,AMV 反转录酶(10U/μL) 1μL,于 42℃ 反转录 1.5~2h。取适量 cDNA 以引物 DetcM1/ DetcM2 进行 PCR 扩增。反应条件:94℃ 3min;94℃ 30s,55℃ 30s,72℃ 45s,共 35 个循环;72℃ 10min。取适量 PCR 扩增产物进行 *Vsp* I 酶切鉴定。将 PCR 产物纯化后进行直接测序鉴定。

1.9 免疫电镜

将病毒培养物反复冻融 3 次,4℃ 10000r/min 离心 1h。取出上清,4℃ 45000r/min(Beckman OptimaTM LE-80K,rotor 70Ti)超离 2h。以适量 PBS 重悬沉淀,与等量 10 倍稀释的 PRRSV 阳性血清于 37℃ 孵育 1h,随后 4℃ 过夜。4℃ 12000r/min 离心 1h,加适量 PBS 重悬沉淀。最后,将此悬液滴在 Formvar 包被的 200 目铜网上,醋酸铀负染,透射电镜观察。

1.10 TCID₅₀ 测定

在 96 孔细胞培养板上进行。取不同代次的克隆病毒,用维持培养基进行 10 倍递增稀释,将 10⁻³~10⁻⁸ 稀释的病毒接种 MARC-145 细胞单层,每个稀释梯度 4 孔,每孔 100μL,培养 7d,观察 CPE,根据 Reed-Muench 方法计算 TCID₅₀。取亲本病毒和拯救

病毒 0.01m.o.i 的剂量感染 MARC-145 细胞(25cm² 培养瓶),37℃ 吸附 1h,弃去接种病毒液,以 PBS (0.01mol/L,pH7.2)洗涤 3 次,补加 5mL 维持培养基 (2% FBS 的 DMEM)继续培养。于不同时间取出适量上清,测定其 TCID₅₀ 值。

2 结果和分析

2.1 重组质粒的定点突变与全长 cDNA 的构建

对 6 个质粒定点突变后,对 23 个突变点及其附近进行部分测序,结果表明 23 个点突变成功回复。将 6 个片段依次插入低拷贝载体 pWSK29 中,构建定点突变后的全长 cDNA 克隆(pWSK-DCBA)。对 pWSK-DCBA 第 10 代质粒进行酶切,其图谱与预计完全相符。取 68 号克隆进行全序列测定,结果显示插入 pWSK29 载体中的 BJ-4 基因组 cDNA 长度与 GenBank 中的序列一致[不含 poly(A)]。有 23 个点突变分布于各个片段。其中 11 个为沉默突变(含引入 *Vsp* I 位点的突变),其余 12 个导致氨基酸的置换,分布于 Nsp2、Nsp3、Nsp7、Nsp9、GP4 和 GP5(表 2)。基因组上游存在 SP6 启动子核心序列,在核心序列和基因组第一个碱基之间多一个外源 G,3' 端有 43 个 poly(A),比 pGEM-D 少 40 个。

表 2 全长 cDNA 与 BJ-4 基因组序列比较

Table 2 Genomic comparison of full-length cDNA and parental BJ-4					
Nucleotide location ^a	Triplet code	Nucleotide change	Type of mutation	Amino acid change	Predicted domain
532	TCG	G→A	replacement	silent	Nsp1a
2413	AAT	T→G	replacement	N→K	Nsp2
2823	CTG	T→C	replacement	L→P	Nsp2
3482	TTG	T→A	replacement	L→F	Nsp2
3621	ACA	C→T	replacement	T→I	Nsp2
3919	TCG	G→A	replacement	silent	Nsp2
4804	CCC	C→T	replacement	silent	Nsp3
4838	CCC	C→T	replacement	P→S	Nsp3
4880	AGC	C→T	replacement	silent	Nsp3
5011	TCC	C→T	replacement	silent	Nsp3
5288	CTG	C→T	replacement	silent	Nsp3
7224	GCT	C→T	replacement	A→V	Nsp7
7277	GAG	G→A	replacement	E→K	Nsp7
7479	AGG	G→A	replacement	R→K	Nsp7
8220 ^b	CCG	G→A	replacement	silent	Nsp9
8372	CTT	T→C	replacement	L→P	Nsp9
8936	GGA	G→A	replacement	G→E	Nsp9
9357	ATA	A→T	replacement	silent	Nsp9
11079	CCG	G→A	replacement	silent	Nsp11
13472	TAT	T→C	replacement	silent	GP4
13623	ATC	A→G	replacement	I→V	GP4
14055	ACG	G→A	replacement	silent	GP5
14110	TGT	T→A	replacement	C→S	GP5

^a Nucleotide locations are numbered according to BJ-4 sequence (GenBank accession number: AF331831). ^b *Vsp* I marker was introduced by

中国科学微生物学杂志 2007 年第 3 期 联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

2.2 全长 cDNA 的感染性与拯救病毒的鉴定

体外转录的基因组 RNA 转染 MARC-145 细胞后 5d,取转染上清接种 MARC-145 细胞单层,连续传至第 5 代时,细胞产生了明显的 CPE,最初是局灶性细胞聚集、变圆、皱缩,逐渐脱离细胞单层、崩解、脱落。在感染后 5~6d,整个细胞单层完全破坏,大部分细胞脱落。表明构建的 pWSK-DCBA 具有感染性,可拯救出病毒,将该克隆病毒命名为 rV68。取第 5 代(出现 CPE 的第 1 代)细胞培养上清,接种 MARC-145 细胞,3d 后固定,分别以单抗 SDOW17、F12F10 进行间接免疫荧光检测。结果显示在 rV68 和 BJ-4 感染的细胞的胞浆内都呈现很强的特异性荧光,而对照细胞无特异性荧光(图 1)。

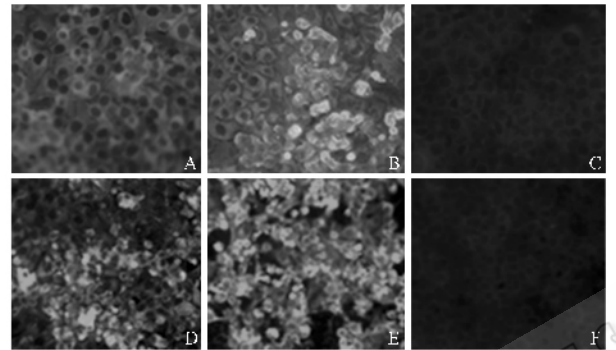


图 1 拯救病毒的间接免疫荧光检测

Fig.1 Detection of the rescued virus by indirect immunofluorescence assay. A :rV68 stained with McAb SDOW17 ;B :BJ-4 stained with McAb SDOW17 ;C :Normal cell stained with McAb ;D :rV68 stained with McAb F12F10 ;E :BJ-4 stained with McAb F12F10 ;F :Normal cell stained with McAb F12F10.

在构建全长 cDNA 时,引入了特异性的 *Vsp* I 位点作为遗传标记,而在亲本毒株 BJ-4 的相应序列中无该标记。从第 5 代细胞培养上清中提取 RNA,用引物 DetcM1/DetcM2 进行 RT-PCR 及特异性遗传标

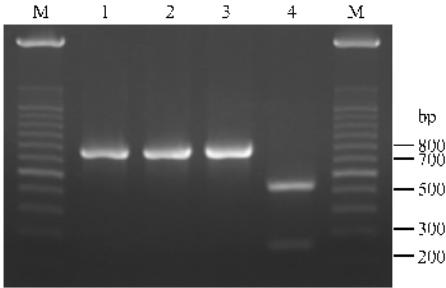


图 2 拯救病毒的遗传标记检测

Fig.2 Detection of genetic marker for the rescued virus. M : 100bp ladder;1. The fragment amplified from BJ-4 (undigested);2. The fragment amplified from rV68 (undigested);3. The fragment amplified from BJ-4 (digested) 4. The fragment amplified from rV68 (digested).

记的酶切鉴定。结果从拯救病毒和亲本病毒中都扩增到 793bp 大小的片段,而从 rV68 获得的产物可被 *Vsp* I 切成 540bp 和 253bp 两条带,但 BJ-4 的扩增产物不能被 *Vsp* I 消化(图 2)。将 PCR 产物纯化后进行直接测序表明, rV68 的遗传标记存在。

对 rV68 体外连续稳定传 5 代(即第 10 代)的病毒,超速离心后,用 PRRSV 抗血清进行免疫电镜负染观察。表明拯救病毒粒子呈 PRRSV 的典型形态特征,即有囊膜的球形病毒粒子,大小为 60~80nm (图 3)。

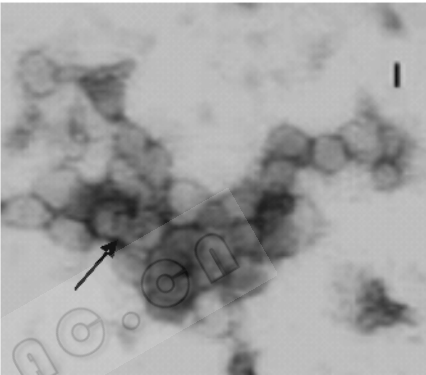


图 3 拯救病毒的电镜观察

Fig.3 Electron micrograph of the rescued virus. Scale bar : 50nm.

2.3 拯救病毒的体外培养特征

在 MARC-145 细胞上的传代结果表明, rV68 在 MARC-145 细胞上连续传 20 代,细胞病变稳定。自第 6 代以后, rV68 产生典型 CPE 的时间一直在感染后 84h 左右,比亲本病毒晚 24h 左右。对 rV68 第 5、9、13、19 代培养物进行了 TCID₅₀ 测定,平均毒价分别为 (6.00 ± 0.21) logTCID₅₀/mL、(7.50 ± 0.20) logTCID₅₀/mL、(7.00 ± 0.23) logTCID₅₀/mL、(7.23 ± 0.4) logTCID₅₀/mL。除第 5 代以外,不同代次之间的毒价没有显著差异 (P > 0.05)。表明 rV68 在 MARC-145 细胞上连续传代增殖滴度稳定。对 rV68 第 20 代病毒进行 RT-PCR 及其产物的酶切和序列分析表明,其遗传标记依然存在,表明人为引入的突变能随病毒体外传代而稳定遗传。

对 rV68 第 13 代培养物在 MARC-145 细胞上的增殖动态进行了测定,并与亲本病毒进行了比较,结果(图 4)表明, rV68 在感染后 72h 以前收集的培养上清,其病毒滴度均明显低于亲本病毒 PRRSV BJ-4 (P < 0.05),达到滴度峰值的时间也比亲本病毒 PRRSV BJ-4 延迟约 12h,说明拯救病毒 rV68 在 MARC-145 细胞上的增殖速度有所迟滞。BJ-4 和 rV68 的平均最高滴度分别为 10^{8.92} TCID₅₀/mL、10^{8.52} TCID₅₀/mL。

TCID₅₀/mL, 没有统计学差异 ($P > 0.05$)

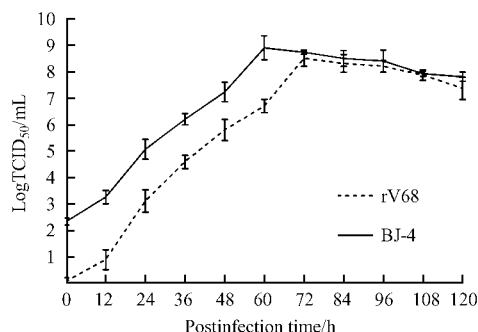


图4 拯救病毒在 MARC-145 细胞上的增殖动态

Fig.4 Growth curves of the rescued virus in MARC-145 cells.

3 讨论

本研究以我国 PRRSV 分离株 BJ-4 为材料,通过 SP6 原核启动子控制全长 cDNA 的体外转录和脂质体介导的直接转染 MARC-145 细胞,获得一株能稳定传代的拯救病毒(rV68)。这是国内第 1 株建立感染性克隆的 PRRSV,这为研究我国 PRRSV 毒株的遗传与变异、复制、转录及其调控、致病与免疫机理、蛋白结构与功能、病毒与宿主细胞相互作用及新型疫苗奠定了必要的技术基础。

获得的拯救病毒(rV68)在 MARC-145 细胞上可稳定连续传代,并出现典型的 CPE。除第 5 代外,各代之间的病毒滴度也无明显差异,人为引入的遗传标记在体外能随病毒稳定地遗传。但与亲本毒株相比,rV68 在 MARC-145 细胞上的增殖速度有所减慢,虽滴度偏低,但是并无统计学差异($P > 0.05$)。这可能由于全长 cDNA 克隆中的 23 个尚未回复的点突变对拯救病毒的增殖有影响。首先,第 8372 和 8936 位核苷酸突变改变了病毒聚合酶的两个氨基酸,可能降低病毒的复制效率^[20];其次,GP5 的一个氨基酸改变($C_{109} \rightarrow S_{109}$)也可能降低病毒的感染效率,因为推测 GP5 可能介入病毒对靶细胞的吸附和穿膜过程^[21];再次,Nsp2 内 4 个氨基酸发生改变($T_{358} \rightarrow G_{358}$ 、 $L_{494} \rightarrow P_{494}$ 、 $L_{715} \rightarrow F_{715}$ 、 $T_{761} \rightarrow I_{761}$),可能会影响其作为胰凝乳蛋白酶样半胱氨酸蛋白酶的切割效率,从而影响病毒的增殖或装配;第四,在 Nsp3、Nsp7 和 GP4 内分别有 1 个、3 个和 1 个氨基酸发生改变,它们也可能影响病毒的复制。其中 Nsp3 可能性比较大,因为 Nsp3 参与病毒复制酶复合体(replicase complex)在细胞内膜(intracellular membrane)上的锚定^[22~24]。最后,其余的点突变虽然不改变氨基酸,但是它们可能改变病毒基因组的

二级、三级结构,也可能会影响病毒的复制。

PRRSV 5'和 3'末端 UTR 对病毒基因组的复制、转录具有重要作用,因此会直接影响转染的成功与否。Meulenberg 等^[14]发现帽子对体外转录本的感染性是必须的,而且加帽对转录本的稳定性没有影响。因此,我们在对 BJ-4 全长 cDNA 进行体外转录时,在转录体系中加入 $m^7G(5')ppp(5')G$ 帽子类似物。由于 PRRSV 基因组 5'最末端很难准确测定,第一个碱基是否为 T,还有不同看法。Meulenberg 等对 26 个克隆进行测序,最终才确定 LV 株的 5'最末端为 A^[14]。在已知的 PRRSV 全序中,大部分毒株 5'最末端都是“ A”,只有 BJ-4 等少数毒株还多出一个“ T”^[25]。VR-2332 株在 GenBank 中的序列的 5'端并没有“ T”,但是在构建感染性 cDNA 克隆中却有^[15]。在已经建立感染性 cDNA 克隆的 5 个毒株中,既有第一个碱基是“ A”的,也有是“ T”的。提示有无这个“ T”对感染性克隆没有致命影响。目前尚不清楚 PRRSV 基因组的 3'末端究竟有多少个 Poly(A),因此也不能准确预测保证感染性克隆成功的 Poly(A)长度。但是通常认为,感染性 cDNA 克隆中的 poly(A)数量存在一个最低阈值,高于这个值才足以保证获得感染性病毒。第一个获得成功的 PRRSV 感染性克隆中含有 109 个 Poly(A)^[14];第二个和第三个分别含有 40 个和 41 个 Poly(A)^[15,16];最近构建的一个感染性 cDNA 中只有 21nt Poly(A)获得转染成功^[17]。我们构建的 BJ-4 全长 cDNA 中携带 43nt 长的 Poly(A),最终也获得感染性病毒。但是这比全长 cDNA 连接前短了 40nt。Meulenberg 等曾报道在 PRRSV 感染性克隆的构建中,常常出现 Poly(A)的缺失现象^[14]。我们推测太长的 Poly(A)可能降低了 cDNA 本身的稳定性,从而导致 Poly(A)在全长 cDNA 的连接过程中出现缺失,也可能是因为长链 Poly(A)对宿主菌产生不利影响而被宿主菌剪切。这提示在构建感染性 cDNA 过程中不必一味追求 Poly(A)的长度。对 PRRSV 而言,40nt 左右的 Poly(A)便足够保证感染性克隆的成功。

由于 RNA 在体外极不稳定,很容易降解,RNase 又无处不在,加之 PRRSV 基因组长达 15kb,所以在体外转录、纯化和转染过程中,防止 RNA 的酶解和机械损伤非常重要。这给操作带来很多不便。将基因组全长 cDNA 置于真核启动子的控制下直接转染细胞,在细胞内完成转录过程可克服这一问题,而且还可节省试验成本,这在 P129 株已经获得成功^[17]。我们用 RNA 转染法在 MARC-145 细胞上连续传

至第 5 代时才出现明显的 CPE 类似现象在 VR-2332 的感染性克隆中也遇到^[15]。这可能与 RNA 转染效率低或者前 4 代拯救病毒在 MARC-145 细胞内处于低水平复制状态有关。

参 考 文 献

- [1] Rossow KD. Porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet Pathol*, 1998, **35** :1 – 20.
- [2] Li H, Yang H. Infection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus suppresses the antibody response to classical swine fever virus vaccination. *Vet Microbiol*, 2003, **95** (4) :295 – 301.
- [3] Bilodeau R, Archambault D, Vezina SA, et al. Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in a swine operation. *Can J Vet Res*, 1994, **58** (4) :291 – 198.
- [4] Neumann EJ, Kliebenstein JB, Johnson CD, et al. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *J Am Vet Med Assoc*, 2005, **227** (3) :385 – 392.
- [5] Conzelmann KK, Visser N, van Woensel P, et al. Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the Arterivirus group. *Virology*, 1993, **193** :329 – 339.
- [6] Murtaugh MP, Elam MR, Kakach LT. Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus. *Arch Virol*, 1995, **140** :1451 – 1460.
- [7] Wu WH, Fang Y, Rowland RR, et al. The 2b protein as a minor structural component of PRRSV. *Virus Res*, 2005, **114** (1-2) :177 – 181.
- [8] Van Nieuwstadt AP, Meulenber JJM, van Essen-Zandbergen A, et al. Proteins encoded by open reading frames 3 and 4 of the genome of Lelystad virus (Arteriviridae) are structural proteins of the virion. *J Virol*, 1996, **70** (7) :4767 – 4772.
- [9] Mardassi H, Gonin P, Gagnon CA, et al. A subset of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP3 glycoprotein is released into the culture medium of cells as a non-virion-associated and membrane-free (soluble) form. *J Virol*, 1998, **72** (8) :6298 – 6306.
- [10] Nelsen CJ, Murtaugh MP, Faaborg KS. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. *J Virol*, 1999, **73** (1) :270 – 280.
- [11] Nelson EA, Christopher-Hennings J, Drew T, et al. Differentiation of U. S. and European isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol*, 1993, **31** (12) :3184 – 3189.
- [12] Bautista EM, Goyal SM, Yoon IJ, et al. Comparison of porcine alveolar macrophages and CL 2621 for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and anti-PRRS antibody. *J Vet Diagn Invest*, 1993, **5** (2) :163 – 165.
- [13] Meng XJ, Paul PS, Halbur PG, et al. Sequence comparison of open reading frames 2 to 5 of low and high virulence United States isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol*, 1995, **76** :3181 – 3188.
- [14] Meulenber JJM, Bos-de Ruijter JNA, van de Graaf R, et al. Infectious transcripts from cloned genome-length cDNA of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Virol*, 1998, **72** :380 – 387.
- [15] Nielsen HS, 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** :3702 – 3711.
- [16] Truong Ha M, Lu Z, Kutish GF, et al. A highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus generated from an infectious cDNA clone retains the *in vivo* virulence and transmissibility properties of the parental virus. *Virology*, 2004, **325** :308 – 319.
- [17] Lee C, Calvert JG, Welch Siao-Kun W, 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** :47 – 62.
- [18] Choi YJ, Yun SI, Kang SY, et al. Identification of 5' and 3' cis-acting elements of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus: Acquisition of novel 5' AU-rich sequences restored replication of a 5'-proximal 7-nucleotide deletion mutant. *J Virol*, 2006, **80** (2) :723 – 736.
- [19] 陈小云, 杨汉春, 郭 鑫. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 BJ-4 株全长 cDNA 的构建. *农业生物技术学报*, 2005, **13** (1) :61 – 65.
- [20] Yuan S, Mickelson D, Murtaugh MP, et al. Erratum to "Complete genome comparison of porcine reproductive and respiratory syndrome virus parental and attenuated strains". *Virus Res*, 2001, **79** :189 – 200.
- [21] Dea S, Gagnon CA, Mardassi H, et al. Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American European isolates. *Arch Virol*, 2000, **145** :659 – 688.
- [22] Swoon S, Yoo D, Rogan D. Full-length sequence of a Canadian porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolate. *Arch Virol*, 2000, **145** :2297 – 2323.
- [23] van der Meer Y, van Tol H, Locker JK, et al. ORF1a-encoded replicase subunits are involved in the membrane association of the Arterivirus replication complex. *J Virol*, 1998, **72** :6689 – 6698.
- [24] Pedersen KW, van der Meer Y, Roos N, et al. Open reading frame 1a-encoded subunits of the arterivirus replicase induce endoplasmic reticulum-derived double-membrane vesicles which carry the viral replication complex. *J Virol*, 1999, **73** :2016 – 2026.
- [25] 杨汉春, 黄芳芳, 郭 鑫, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒病毒 (PRRSV) BJ-4 株全基因组序列测定与分析. *农业生物技术学报*, 2001, **9** (3) :212 – 218.

Recovery of an infectious virus from the full-length cDNA of PRRSV BJ-4

RAN Zhi-guang , CHEN Xiao-yun , YANG Han-chun* , GUO Xin , GAI Xin-na

(Key Laboratory of Preventive Veterinary Medicine of Ministry of Agriculture , College of Veterinary Medicine ,
China Agricultural University , Beijing 10094 , China)

Abstract Six recombinant plasmids covering cDNA of porcine reproductive and respiratory syndrome virus BJ-4 were sequenced , respectively , and 23 point mutations were reverted with site-directed mutagenesis kit . The full-length cDNA clone pWSK-DCBA was assembled and re-sequenced . The capped viral genomic RNA was transcribed *in vitro* , mixed with liposome and transfected into MARC-145 cells , and an infectious virus (designated rV68) was rescued . The rescued virus was able to induce CPE typical of PRRSV on MARC-145 and stably propagated *in vitro* . Growth kinetics curve of the rV68 exhibited a delayed replication in MARC-145 cell , namely its peak titer time was 12h later than that of parental virus . However , there was no significant difference between the peak titers of the rescued and parental virus ($P > 0.05$). These results suggest that the full-length cDNA clone pWSK-DCBA of PRRSV BJ-4 is infectious , which provide a basis for further study on molecular pathogenicity and immunity , as well as developing novel vaccine of PRRSV .

Keywords : Porcine reproductive and respiratory syndrome virus ; infectious cDNA clone ; the rescued virus

Foundation item : Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2005CB523204)

* Corresponding author . Tel/Fax : 86-10-62731296 ; E-mail : yanghanchun1@cau.edu.cn

Other author : WANG Fang

Received 25 September 2006 / Accepted 11 December 2006 / Revised 9 March 2007