

猪繁殖与呼吸综合征病毒嵌合感染性克隆的构建和应用

李祥健^{1,2}, 张建武¹, 吕健¹, 余丹丹¹, 姚火春², 袁世山¹

1 中国农业科学院上海兽医研究所 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 200241

2 南京农业大学动物医学院 农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 南京 210095

摘要: 高致病性猪蓝耳病近年来在我国广泛流行, 目前尚无高效疫苗用于该病的防制。本研究以 PRRSV 弱毒感染性克隆-pAPRRS 作为主要骨架, 将高致病性猪蓝耳病病毒江西分离株(JX143)的主要结构蛋白基因(ORF4-7)以及 3'UTR 区域替换入 pAPRRS 相应编码区域, 构建了 pSX12(ORF4-7-3'UTR)、p5NX12(ORF5-7-3'UTR)以及 p56N12(ORF5-6)三个 PRRSV 全长嵌合克隆。经 DNA 转染 Marc-145 细胞后拯救出嵌合病毒, 并对拯救病毒进行了病毒生物学特性的分析; 选取拯救病毒 v56N12(ORF5-6)和 vSX12(ORF4-7-3'UTR)免疫 29 日龄猪进行免疫原性试验, 结果表明, 以 v56N12 免疫后抗体水平相对较低, 故免疫原性相对较差; 而 vSX12 病毒免疫后 14 d 血清 ELISA 抗体达到阳性值(IDEXX ELISA 值 $s/p \geq 0.4$), 免疫后 28 d 中和抗体效价从原来的 1:5 以下上升到 1:15 以上, 说明 vSX12 具有良好的免疫原性并可进行免疫监测; 免疫后 28 d 以强毒 JX143 株攻毒, 结果 vSX12 免疫组未见发病, 而未免疫攻毒对照组全部发病并有 1 头死亡, vSX12 免疫猪攻毒后病毒血症持续 6 d 后消失, 而对照组攻毒后至少持续 13 d, 说明 vSX12 可对高致病性猪蓝耳病提供有效的免疫保护。本研究构建的三个嵌合病毒为开发同时抗经典和变异株 PRRSV 感染的二价疫苗, 以及探寻高致病性猪蓝耳病病毒的毒力因子奠定了基础。

关键词: 猪繁殖与呼吸障碍综合征, 高致病性猪蓝耳病, 感染性克隆, 嵌合病毒, 候选疫苗

Construction and Application of Chimeric Infectious Clones of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus

Xiangjian Li^{1,2}, Jianwu Zhang¹, Jian Lü¹, Dandan Yu¹, Huochun Yao², and Shishan Yuan¹

1 Department of Animal Infectious Diseases, Shanghai Veterinary Research Institute, China Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China

2 Key Laboratory of Animal Diseases Diagnostic and Immunology, College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Ministry of Agriculture, Nanjing 210095, China

Abstract: In recent years, mass outbreaks of highly pathogenic (HP) porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) have spread all over the Chinese swine industry. Based on the first infectious cDNA clone of HP PRRSV strain pJX143 and that of an attenuated PRRSV, pAPRRS, constructed in our group, we constructed several chimeric clones with various substitutions of structural protein genes (ORF4-7) and 3' UTR between attenuated pAPRRS and virulent pJX143. Upon transfection of MA-104

Received: January 18, 2008; **Accepted:** March 26, 2008

Supported by: the National TCM Project Application in the 11th Five-Year Period(No. 2007BAD86B06-3), Shanghai Municipal Kejixingnong Program (No. 2006-10-4), Shanghai Pujiang Program (No. 06PJ14118), the Major State Basic Research Development Program of China (973 program) (No. 2005CB523202).

Corresponding author: Shishan Yuan. Tel: +86-21-3429-3137; E-mail: shishanyuan@shvri.ac.cn
Huochun Yao. Tel: +86-25-8439-5328; E-mail: yaohch@njau.edu.cn

国家“十一五”科技支撑计划(No. 2007BAD86B06-3), 上海市科技兴农计划(No. 2006-10-4), 上海浦江人才计划(No. 06PJ14118)及“973”项目(No. 2005CB523202)资助。

cultured cells, all chimeric constructs pSX12, p5NX12, and p56N12 were rescued. The rescued viruses maintained the similar virological properties, based on the results of the growth curve of the rescued viruses. To test if the chimeric viruses can be used as a vaccine candidate, vSX12 and v56N12 vaccinated pigs were challenged with the HP PRRSV JX143 strain. As a result, the vSX12 vaccinated pigs were all seroconverted by 14-day-post vaccination, while v56N12 vaccinated pigs showed poor antibody response. Upon challenge, the vSX12-vaccinated group showed no signs of clinical PRRS syndrome, and viremia period was shortened to 6 days post-challenge. Our results demonstrated that 1) vSX12 chimeric virus is a good vaccine candidate; 2) the virulence determinants of HP PRRSV probably located in coding regions other than ORF3-7 and 3' UTR, as our chimeric viruses were proved to be attenuated.

Keywords: PRRSV, high pathogenicity, infectious cDNA clone, chimeric viruses, vaccine candidates

猪繁殖与呼吸综合征(Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS), 俗称猪“蓝耳病”, 于上世纪 80 年代末首次在美国发现^[1], 其致病病原为猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRS virus, PRRSV), 上世纪 90 年代初相继分离于欧洲和美国^[2,3]。1995 年, 我国首次在暴发具有严重繁殖与呼吸障碍症状的猪场分离到 PRRSV。PRRSV 与乳酸脱氢酶升高症病毒(Lactate dehydrogenase-elevating virus, LDV)、马动脉炎病毒(Equine arteritis virus, EAV)、猴出血热病毒(Simian hemorrhagic fever virus, SHFV)同属于套式病毒目(Nidovirales), 动脉炎病毒科(Arteriviridae)^[4]。PRRSV 基因组长约 15.5 kb, 为不分节段的单股正义 RNA, 具有 5'端帽状结构和 3' poly(A)尾^[5]。PRRSV 基因组编码至少 9 个开放阅读框, 其中 ORF 1a 和 1b 占整个病毒基因组的 3/4, 编码病毒的非结构蛋白, 主要包括病毒复制酶和聚合酶, 其余的 ORF(2a, 2b 和 3~7)编码病毒的结构蛋白^[6]。ORF5、ORF6 和 ORF7 所编码的蛋白为病毒所必需的蛋白, GP5 被认为是病毒受体的结合蛋白, 同时也是刺激机体产生中和抗体的主要蛋白; 核衣壳蛋白 N 是免疫原性最强的蛋白, PRRSV 结构蛋白在激发机体体液免疫中具有重要作用。而其他糖蛋白 GP2、GP3、GP4 等在病毒颗粒组装及激发机体免疫过程中的作用还存在争议, 需要进一步的研究。

PRRS 在世界范围内迅速蔓延而成为养猪业的头号威胁。2006 年以来, “猪高热综合征”肆虐我国养猪业, 高致病性猪蓝耳病病毒是其主要致病病原^[7-10]。由于病毒基因组 RNA 突变及重组^[11]等原因导致 PRRSV 的生物型、抗原型、遗传型变异极快^[12], 给猪蓝耳病防控带来了严峻挑战。现有疫苗在免疫原性以及交叉保护性方面的作用均值得商榷, 突出表现为: 一方面灭活疫苗免疫原性低下, 很难检测到免疫抗体, 这为疫苗效检及免疫监测等工作带来了

困难; 另一方面, 基于 PRRSV 经典毒株(特指我国“猪高热综合征”暴发以前的病毒分离株)的弱毒活苗对我国高致病性猪蓝耳病的交叉保护性还有待提高。因此如何提高疫苗的保护性和针对性成为了猪蓝耳病防控的关键问题, PRRSV 嵌合病毒疫苗的研制有望成为解决这一问题的有效手段。近年来, 反向遗传操作技术的应用给嵌合病毒的研究带来极大的便利^[13], 嵌合病毒疫苗的研究相继在许多人类和动物病毒上取得成功^[14,15]。

本研究以 PRRSV 经典弱毒株感染性克隆(pAPRRS)^[16]和我室吕健等^[10]构建的高致病性 PRRSV 感染性克隆(pJX143)为基础, 利用反向遗传操作系统, 将高致病性猪蓝耳病病毒株 JX143 的主要结构蛋白替换入弱毒感染性克隆中的相应区域, 得到 3 个嵌合 PRRSV 克隆, 经转染细胞后获得 3 株嵌合病毒。优选其中 2 株进行动物实验以探讨作为疫苗候选株的可行性, 结果表明其中 1 株嵌合病毒(vSX12)可以激发针对高致病性猪蓝耳病病毒的高效免疫保护, 是具有良好开发前景的疫苗候选株, 同时, 本研究为高致病性猪蓝耳病病毒的毒力因子的探寻奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 载体、病毒与细胞

PRRSV 弱毒疫苗株全长感染性克隆 pAPRRS^[16]: (GenBank Accession No. AF184212), p5NDE(在 pAPRRS 的 ORF4 和 ORF5 之间插入了 *Nde* I 酶切位点, 余丹丹 等, 未发表资料), 高致病性猪蓝耳病 JX143 株感染性克隆 pJX143^[10], 以上感染性克隆均在病毒基因组 5'端上游插入了 CMV 启动子, 均由本实验室构建、保存。高致病性猪蓝耳病 JX143 株病毒(GenBank Accession No. EF488048), Marc-145 细胞由本实验室保存。

1.2 其他试剂与实验动物

细胞培养液为含 10%胎牛血清(FBS,Gibco-BRL)的 MEM(Gibco-BRL), 维持液为含 2% FBS 的 MEM。QIAamp Viral RNA Mini Kit 购于 QIAGEN 公司, PfuUltra Hotstart High-Fidelity DNA polymerase 购于 STRATAGENE 公司。pBS-T 载体、TOP10 感受态菌购自 TIANGEN 公司。AMV 和 rTaq 购于 TAKARA 公司。29 日龄 PRRSV 抗体及抗原阴性仔猪, 购于上海某猪场。HerdCheck IDEXX ELISA Kit 购自北京世纪元亨动物防疫技术有限公司。

1.3 引物设计

根据 GenBank 中 PRRSV 北美株的序列设计引物, 引物序列如表 1。

1.4 系列主要结构蛋白嵌合克隆的构建

以 pJX143 感染性克隆为模板, 通过 PCR 扩增、酶切、连接的方法将 PRRSV JX143 株主要结构蛋白置换入 PRRSV 弱毒的全长感染性克隆 pAPRRS 中,

得到一系列 PRRSV 结构蛋白基因嵌合克隆, 如图 1 所示。

1.4.1 嵌合克隆 pSX12、p5NX12 的构建和鉴定

以 pJX143 为模板, SPEF、Qst 为引物, 扩增 pJX143 结构蛋白 GP4-GP5-M-N 以及 3'UTR 2.4 kb 的目的片段, 经 *Spe* I、*Xho* I 双酶切, 回收后与质粒 pAPRRS 经 *Spe* I、*Xho* I 双酶切回收的大片段连接, 筛选阳性克隆, 命名为 pSX12; 以 Nde5F、Qst 为引物, 扩增 pJX143 结构蛋白 GP5-M-N 以及 3'UTR 1.6 kb 的目的片段, 经与 *Nde* I、*Xho* I 双酶切后, 与质粒 p5NDE 经 *Nde* I、*Xho* I 双酶切后的大片段连接, 筛选阳性克隆, 命名为 p5NX12, 送上海英骏生物技术公司进行测序鉴定。

1.4.2 嵌合克隆 p56N12 的构建和鉴定

以 p5NX12 为基础, 通过重叠延伸 PCR(Gene splicing overlap extension PCR, SOE PCR)方法^[17], 把 p5NX12 的 N 蛋白以及 3'UTR 基因置换入弱毒疫

表 1 克隆以及测序所用的引物
Table 1 Primers used for the cloning and sequencing

Name	Sequence (5'-3')	Use
SPEF	GCCACTTG <u>ACTAGT</u> GTTTACG#	PCR to construct pSX12, p56N12
NDE5F	CTGTTGGCAGTTTGACATATGTTAAGTATG#	PCR to construct p5NX12
Qst	GAGTGACGAGGACTCGAGCGCATGCTTTTTTTTTTTT#	Reverse transcript primer; PCR to construct pSX12, p5NX12, p56N12
SRSOE6	TGTTATTGGCATAATTTAACAAGGTTTACCACTCCCTGCT	SOE PCR primer, PCR to construct p56N12
SFSOE7	TTGTAAATATGCCAAATAACAACGGCAAACAGCAG	SOE PCR primer, PCR to construct p56N12
SF12670	CTCTCGGCTACCCATGCTACAC	Analytical RT-PCR for vSX12, v5NX12, v56N12
SR14365	ACCGCAACGATAGAGTCTGCCCTTAGTGTCC	Analytical RT-PCR for vSX12, v5NX12, v56N12
SF14413	CTGATCGACCTCAAAAGAGTTGTGCTTG	Analytical RT-PCR for v56N12
SR15497	CAATTAATCTTACCCCCACACGGTCC	Analytical RT-PCR for v56N12

Restriction sites introduced by PCR are underlined

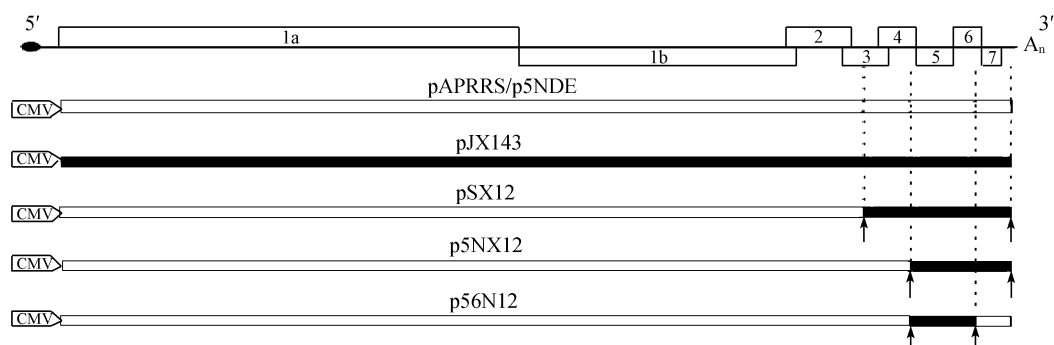


图 1 PRRSV 嵌合感染性克隆构建示意图

Fig. 1 Parent and chimeric PRRSV infectious cDNA clone constructs created in this study

苗株全长感染性克隆 pAPRRS 的相应部分, 得到 GP5-M 的嵌合克隆 p56N12。在 M 蛋白和 N 蛋白基因重叠区域设计 SOE PCR 内、外引物 SRSOE6 和 SFISOE7, 进行 PCR 操作, 具体步骤如下:

以 p5NX12 为模板, SPEF 和 SRISOE6 为上下游引物, 进行第一轮 PCR 扩增, 目的片段为 1.9 kb; 同时以 pAPRRS 为模板, 以 SFISOE7 和 Qst 为上下游引物进行 PCR 扩增, 目的片段为 0.5 kb。最后, 以回收的两个 PCR 产物为模板, SPEF 和 Qst 为上下游引物, 进行第二轮 PCR, 目的片段为 2.5 kb, 获得的 PCR 产物与 pAPRRS 经 *Spe* I、*Xho* I 双酶切后回收的大片段进行连接, 筛选阳性克隆, 命名为 p56N12, 送上海英骏生物技术公司进行测序鉴定。

1.4.3 嵌合感染性克隆质粒的鉴定与序列分析

pSX12、p5NX12、p56N12 以 *Sma* I 酶切鉴定是否存在缺失及突变; 并测定嵌合处核苷酸序列, 再经 DNASTAR 软件分析构建质粒正确与否。

1.5 嵌合感染性克隆的拯救和拯救病毒的特性研究

1.5.1 嵌合克隆转染细胞

将 Marc-145 细胞传至六孔板中, 使每孔细胞数达到 2×10^5 个左右, 细胞生长密度至 60%~80% 时进行转染。质粒 pSX12, p5NX12, p56N12 按 Roche 公司 FuGENE HD 转染试剂的转染方法转染 Marc-145 细胞, 置 37°C、5% CO₂ 培养箱中继续培养, 每天观察细胞病变, 待细胞病变达到 80% 时收集细胞培养病毒上清。

1.5.2 转染病毒上清的传代与鉴定

将收集的病变细胞上清用维持液(含 2% FBS 的 MEM)做 1:10 稀释后取 200 μ L 接种细胞, 置 37°C 继续培养, 待细胞病变达到 80% 时收集细胞培养病毒上清作为第二代病毒。当传代 5 次后, 收集产生 80% CPE 的病毒上清, 按照 QIAgen Viral RNA mini Kit 说明书的方法提取病毒 RNA, 最终将病毒 RNA 溶于无核酸酶的水中, 利用 AMV 反转录酶和 rTaq 进行 RT-PCR 操作, PCR 扩增片段大小正确后进行序列测定。

1.5.3 病毒生长曲线的绘制

用低剂量(0.1 MOI)病毒感染 Marc-145 细胞, 分别在感染后不同的时间(8 h、16 h、24 h、32 h、40 h、

48 h、56 h、64 h、72 h、84 h、96 h、104 h)收集 200 μ L 细胞上清进行病毒滴度的测定, 每个病毒的每个时间点进行 3 次重复测定, 根据测定结果绘制病毒生长曲线。

1.5.4 病毒感染性滴度的检测

在 96 孔培养板上进行拯救病毒感染性滴度的测定, 将待检样品用维持液作 10 倍系列稀释, 将 10^{-3} ~ 10^{-9} 连续稀释的病毒接种 96 孔细胞培养板上的 Marc-145 单层细胞, 每个稀释度接种 4 孔, 设 2 孔对照(用维持液代替病毒液), 200 μ L/孔, 37°C 培养, 每天观察细胞病变情况, 直到停止出现细胞病变为止, 记录出现细胞病变的孔数。根据结果按 Spearman/Kaber 法^[18]计算拯救病毒的 TCID₅₀。

1.6 嵌合病毒疫苗候选株的免疫保护性实验

1.6.1 免疫接种与攻毒

选取 29 日龄 PRRSV 抗体及抗原阴性的健康仔猪 15 头, 称重后随机将其分为 3 组, 5 头/组, 隔离饲养 5 d 后进行免疫接种。两组实验组分别每头颈部肌肉接种 2 mL $10^{4.0}$ TCID₅₀/mL Marc-145 第 5 代嵌合病毒 vSX12 和 v56N12(v56N12 组在首次免疫后 14 d 进行第二次免疫); 对照组 5 头猪颈部肌肉接种灭菌 PBS 液, 2 mL/头, 每天测量体温并进行临床症状的观察。

vSX12 接种后第 28 d 与 v56N12 第二次接种后 28 d(总第 42 d), 3 组试验猪以 JX143 株病毒攻毒, 攻毒剂量为 3 mL $10^{4.7}$ TCID₅₀/mL, 颈部肌肉注射, 攻毒后每天测量体温并进行临床症状的观察。

根据试验猪的呼吸、咳嗽及整体行为状态, 分为正常、轻微、严重和死亡 4 个级别, 分别记为 1、2、3、4 分进行打分, 然后计算每头试验猪特定时间的总分值。

1.6.2 免疫后 ELISA 抗体测定以及 vSX12 组中和抗体检测

在嵌合病毒接种后第 0 d、3 d、5 d、7 d、10 d、14 d、21 d、28 d 采集血清, 并利用 IDEXX PRRSV 抗体检测试剂盒进行抗体检测, 同时对未免疫组定期采集的血清进行抗体检测作为对照。

同时, 按照殷震《动物病毒学》(第二版)的方法, 对 vSX12 组免疫后第 0、28 d 的采集的血清进行中和抗体的操作, 并在倒置显微镜下逐孔观察细胞病变(CPE), 每天观察一次, 连续观察 5 d, 结果按

Reed-Muench 法进行计算。

1.6.3 vSX12 组免疫及攻毒后病毒血症检测

在 vSX12 接种后第 0、3、5、7、10、14、21、28 d 以及攻毒后各特定时间点采集血清, 提取各时间点血清中病毒的 RNA, 采用针对 M 和 N 蛋白保守区域设计的上下游引物 SF14413 和 SR15497, 以 RT-PCR 方法检测血清中的病毒血症情况。

1.6.4 组织器官的病理学观察以及肺部组织病变评价

剖杀各实验组死亡猪和 JX143 株病毒攻毒后 21 d 的存活猪, 观察各组织器官病变情况, 根据 Halbur 等^[19]的方法, 对肺部的肺炎病变进行评估打分。

2 结果

2.1 高致病性 PRRSV 结构蛋白编码区的扩增及鉴定

利用 SPEF/Qst、NDE5F/Qst 分别扩增 pJX143 的 ORF4-7-3'UTR 和 ORF5-7-3'UTR, 片段大小分别为 2.4 kb 和 1.6 kb。通过 SOE PCR 扩增的片段分别为 1.9 kb 和 0.5 kb。结果如图 2 所示。获得扩增片段经 QIAgen Gel-purification kit 纯化后进行序列测定, 测序结果证明扩增片段为目的基因。

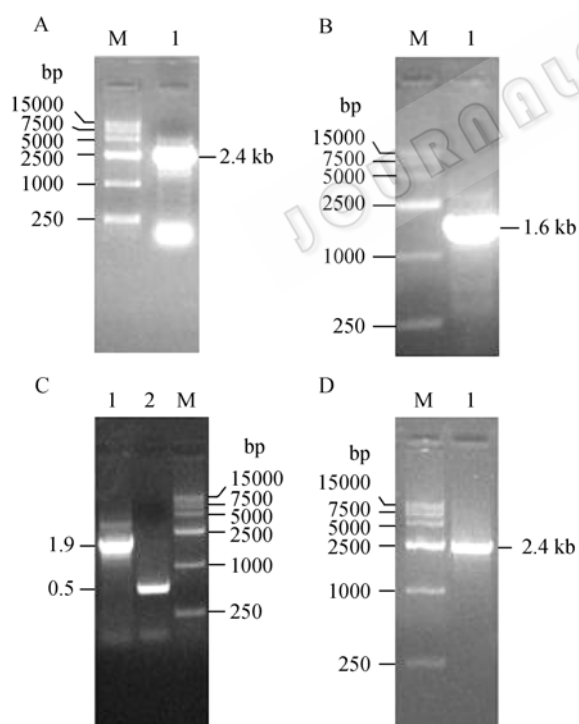


图 2 结构蛋白编码区的扩增

Fig. 2 Amplification of pJX143 structure protein coding regions

A: PCR amplification of JX143 ORF4-7-3'UTR; B: PCR amplification of JX143 ORF5-7-3'UTR; C, D: S.O.E PCR amplification

2.2 嵌合克隆质粒的鉴定

通过反向遗传操作, 以 PRRSV 北美型弱毒株感染性克隆 pAPRRS^[16]质粒为基础, 把高致病性 PRRSV JX143 株^[11]GP4-GP5-M-N 全部或部分编码区置换入 pAPRRS 中得到 3 个 PRRSV 嵌合感染性克隆的 pSX12、p5NX12 和 p56N12。经 *Sma* I 酶切鉴定为阳性重组质粒, 经测序分析后均与最初设计一致, 证明获得了一系列高致病性 PRRSV 变异株结构蛋白嵌合的感染性克隆。

2.3 嵌合病毒的拯救和鉴定

将全长嵌合质粒 pSX12、p5NX12 和 p56N12 同时转染 Marc-145 细胞, 以 pAPRRS 为阳性对照, 分别于转染后第 7 d、第 6 d、第 6 d、第 7 d 出现细胞病变, 表现为细胞圆缩, 聚集, 而空白对照未观察到任何细胞病变, 所得到的拯救病毒分别命名为 vSX12、v5NX12、v56N12 和 vAPRRS。

将拯救病毒分别在 Marc-145 细胞上连续传 5 代, 收集细胞上清提取病毒 RNA, 并进行 RT-PCR 检测。将与预期大小相同的 PCR 扩增产物与 pBS-T 载体连接, 筛选阳性重组子送上海英骏公司进行测序, 采用 DNASTAR 软件与亲本感染性克隆 pAPRRS (GenBank Accession No. AF184212) 以及 PRRSV pJX143 序列 (GenBank Accession No. EF488048) 进行比对, 结果表明: 所有嵌合病毒的嵌合基因序列均能稳定地存在于至少 5 代的子代嵌合病毒中, 并未发现其他突变。

2.4 拯救病毒的特性

病毒的生长曲线显示: 5 株病毒均在感染 8 h 后形成第 1 个复制高峰, 随后在感染 24 h 出现第 2 个复制高峰期; 感染 48 h 后亲本病毒 vAPRRS 的滴度均略高于 3 个嵌合病毒, 而亲本病毒 vJX143 于感染 48 h 前与其他病毒相比滴度较低, 3 个嵌合病毒中 vSX12 的滴度与 vJX143 较相似, 均低于其他两个嵌合病毒, 生长曲线显示的总体趋势是一致的, 如图 3 所示。

2.5 嵌合病毒疫苗候选株的免疫原性及保护性实验

2.5.1 临床变化

试验猪在免疫接种后及高致病性 PRRSV JX143 株病毒攻毒后每天进行症状观察, 其中试验组在接种 vSX12 和 v56N12 病毒后未出现可观察到的症状反应; 在 JX143 株病毒攻毒后 vSX12 免疫组 5 头中有两头出现轻微的呼吸困难和咳嗽症状, 未出现典

型的腹式呼吸; v56N12组5头猪也无明显临床症状。而5头对照组猪在攻毒后第2 d开始出现喜卧, 食欲减退甚至废绝, 咳嗽、喘气等呼吸道症状, 出现红疹; 并有一头猪于攻毒后14 d死亡。其余4头对照组猪攻毒后20 d除红疹外, 其他症状消失。对症状进行评分表明: 未免疫组至少有10 d以上平均积分都在6分以上, 而vSX12和v56N12病毒接种组几乎未出现严重的临床症状, 平均积分都在6以下。

根据体温测定结果, 试验组在接种vSX12和两次接种v56N12病毒后未出现可观察到的体温反应; PRRSV JX143株病毒攻毒后vSX12病毒和v56N12病毒接种组出现一过性体温升高, 而对照组则出现明显的体温升高, 并且高体温水平持续更长的时间, 如图4所示。

2.5.2 抗体变化

对特定时间采集的vSX12组、v56N12组和对照组猪的血清, 用IDEXX试剂盒进行PRRSV抗体

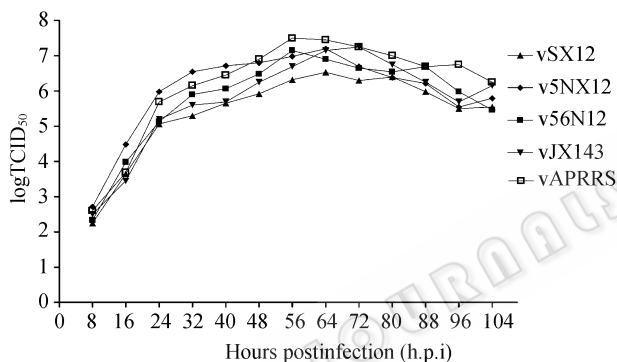


图3 亲本病毒以及嵌合病毒生长特性比较

Fig. 3 Comparison of the chimeric and parents PRRSV Growth kinetics in Marc-145 cells of viruses were harvested at the indicated hours postinfection (h.p.i), and their titers were determined by TCID₅₀

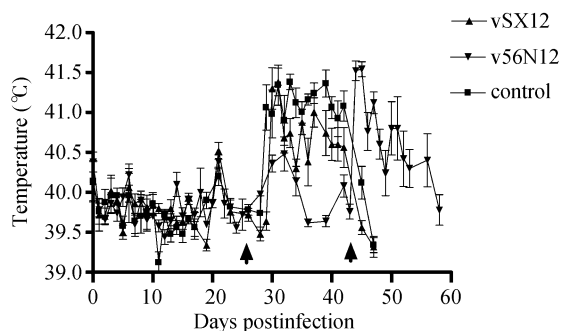


图4 嵌合病毒接种以及攻毒后的体温变化

Fig. 4 Temperatures were recorded daily Average temperatures from five different animals in each group are shown. Challenge virus inoculation on day 28 (SX12 group and control) and day 43 (56N12 group) are indicated by the arrow

检测, 计算同一时间每组试验猪抗体的平均值, 结果如图5所示。其中vSX12组在接种后第10 d抗体开始产生, 14 d达到阳性值(ELISA S/P ≥ 0.4), 而后抗体一直处于上升趋势。而v56N12在首次免疫接种后抗体水平较低, 故在首次免疫接种后第14 d用v56N12进行第二次免疫, 接种剂量为2 mL 10^{5.0} TCID₅₀/mL, 第二次免疫后v56N12组抗体水平有所上升, 但整体水平仍低vSX12组。(攻毒后的抗体变化数据未显示)

利用病毒中和试验对vSX12组免疫后第0 d和第28 d采集的血清进行中和抗体的检测, 计算特定时间采集血清的中和抗体效价, 同时计算不同时间血清中和抗体效价的平均值, 结果如图6所示。结果表明vSX12组免疫后28 d中和抗体效价从免疫前的1:5以下上升到1:15以上, 说明, vSX12免疫后可有效刺激机体产生中和抗体。

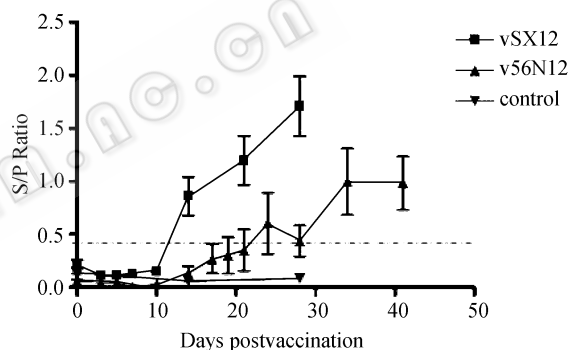


图5 嵌合病毒接种后抗体变化

Fig. 5 Serum antibody titers were determined with the IDEXX ELISA kit

Dashed line at 0.4 S/P ratio designates threshold value above which titers are considered positive for anti-PRRSV antibodies

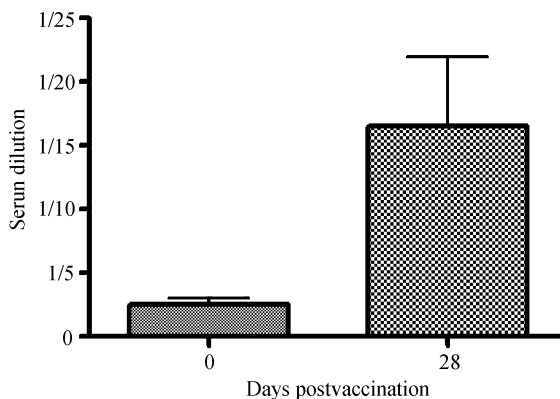


图6 vSX12组免疫前后中和抗体变化

Fig. 6 Serum neutralization antibody titers of vSX12 group at points 0 day and 28 day postvaccination are shown

表 2 免疫以及攻毒后血清中病毒血症情况
Table 2 Virus viremia at all time points

Group	Viremia positive percentage (%)												
	Day0	Day3	Day5	Day7	Day14	Day21	Day28	Day30	Day32	Day34	Day36	Day38	Day41
vSX12	0	60	80	80	60	40	0	0	20	80	100	40	0
Control	0	0	0	0	0	0	0	20	40	60	100	80	80

2.5.3 病毒血症情况

以针对 M 和 N 蛋白保守区域设计的引物 (SF14413、SR15497), 利用 RT-PCR 对各时间点采集的 vSX12 病毒接种组和未免疫攻毒组试验猪的血清进行 PRRSV 的检测。统计阳性结果并计算阳性率, 结果如表 2 所示, 在 vSX12 免疫后, 第 3 d 开始产生病毒血症, 并持续至 21 d, 至第 28 d 完全消失。攻毒后, vSX12 株病毒免疫组的病毒血症持续 6 d 后消失, 而对照组至少持续 13 d, 且保持较高的阳性率。

2.5.4 肺部病变的评价

观察剖杀的 vSX12 免疫组及未免疫对照组攻毒后死亡及攻毒后 21 d 存活猪的肺部病变情况, 根据相关文献计算因肺炎引起病变体积所占整个肺脏总体积的百分比, 然后计算出两组试验猪肺部病变百分比的平均数和标准差(见表 3)。评价结果表明: vSX12 株免疫组肺部病变百分比为 12.00 ± 8.37 , 远低于未免疫对照组的肺部病变百分比(55.00 ± 12.91), 说明 vSX12 对免疫猪有较好保护作用, 肺部病变轻微, 说明该毒株对强毒的攻击有良好的保护作用。

表 3 肺脏的病理学评价
Table 3 Lung pathological evaluation

Group	Days post challenge	
	14	21
vSX12	ND	12.00 ± 8.37
control	80.00	55.00 ± 12.91

3 讨论

2006 年以来, 我国各地相继暴发了“猪高热综合征”, 该病以高发病率和高死亡率为特点, 病猪临床主要表现为体温升高、精神沉郁、食欲不振或废绝, 呼吸困难、喘气, 部分猪伴有皮肤发红变紫等症状, 少数猪毛孔有出血点。一般猪群发病率在 50% 以上, 而死亡率高达 50%~70%, 个别猪群死亡率可达到 80%~100%, 因此本次疫病的流行对我国养猪

业造成巨大的经济损失, 并直接造成了目前猪肉价格的暴涨。初步研究表明, 高致病性猪蓝耳病是其主要病因之一^[7-10]。作为一种 RNA 病毒, PRRSV 极易发生变异, 根据病毒基因组序列测定和分析, 高致病性 PRRSV JX143 株与经典株 PRRSV 间的 ORF5 的核苷酸同源性仅为 89%^[10], 这给猪蓝耳病的防治带来了极大困难。

随着各种 RNA 病毒反向遗传操作系统的建立和应用, 许多 RNA 病毒分子生物学的研究取得了重大进展, Borisevich 等^[20]在 2006 年采用该技术将西尼罗河病毒(West Nile virus)强毒株 NY99 的结构蛋白区域置换入疫苗株 W956 的相应区域, 获得嵌合病毒, 动物实验表明, 该嵌合病毒具有良好的免疫原性和保护性。利用这一技术, 不仅可以探索 PRRSV 基因组调控机制和病毒致病机制, 而且还可以构建并拯救嵌合病毒和突变病毒; 更重要的是可通过反向遗传操作系统来设计新型疫苗, 利用弱毒疫苗株的复制酶系统和高毒力毒株的结构蛋白区域之间的嵌合来研制嵌合病毒疫苗是一个可行的策略, 此外基于反向遗传操作系统的嵌合疫苗还可以快速有效的应对各种 PRRSV 变异株。

本研究通过反向遗传操作构建的 PRRSV 嵌合感染性克隆, 是将高致病性猪蓝耳病 JX143 株的主要结构蛋白置换入经典 PRRSV 疫苗株, 试验证明本研究构建的嵌合病毒 vSX12 在猪体内具有良好的免疫原性, 中和抗体检测结果表明, vSX12 能够有效地激发机体产生高效而持久的中和抗体, 在攻毒后未出现明显的临床症状, 对高致病性猪蓝耳病具有良好的保护力, 而未免疫组的猪在攻毒后表现出了严重的临床症状, 且有 1 头猪死亡。在清除病毒血症上, 免疫组实验猪可在攻毒后较短时间内清除猪血清中的病毒, 说明 vSX12 是一株具有良好免疫原性和保护性, 是防治高致病性猪蓝耳病的疫苗候选株。同时构建的 v56N12 嵌合病毒虽然在免疫后也能刺激机体产生免疫反应, 而其抗体维持在较低的水

平,再次加强免疫后抗体水平仍然低于 vSX12 组,但 v56N12 组在第 2 次免疫后 28 d 攻毒,攻毒后无论在体温、症状上都无明显变化。疫苗免疫后抗体水平的高低是评价疫苗免疫原性优劣以及免疫检测的重要指标, v56N12 与 vSX12 相比,少替换了高致病性猪蓝耳病 JX143 株的 ORF7 和 3'UTR,其免疫原性却出现了较大的差异,分析原因如下:(1) PRRSV 的 ORF7 编码的是病毒核衣壳蛋白,此蛋白的差异有可能引起病毒在对靶细胞的侵入和感染过程中蛋白识别位点或中和表位发生变化;(2) PRRSV 的 3'UTR 在病毒复制和转录过程中的具体作用虽然未知,但是我们推测该蛋白的差异有可能在病毒复制的早期会导致不同的病毒动力学,从而导致各结构蛋白表达量和效率的差异;(3) 病毒作为一个整体, N 蛋白, M 蛋白和 GP5 蛋白之间都具有相互协调的作用,单纯的改变其中一个蛋白,有可能会引起其他蛋白抗原表位的变化,尤其是在高级结构上的改变。

关于 PRRSV 尤其是高致病性 PRRSV 毒力因子的界定众说纷纭,在早期研究中通过对病毒全基因组序列的比对来探寻病毒毒力和致弱区域^[21, 22],但一些毒株特异性的核苷酸突变是否对病毒的毒力有改变还不得而知。我们可以借助于反向遗传操作平台,以强、弱毒间嵌合感染性克隆的方式,替换 PRRSV 基因组的的不同部分,拯救这些嵌合病毒进行动物实验,从而可缩小甚至定位毒力因子区域。为了验证 PRRSV 的结构蛋白基因,尤其是 ORF5 区域,是否能对毒力产生决定性的影响,本研究通过替换高致病性 PRRSV 结构蛋白区域获得的嵌合病毒,通过动物试验表明,替换结构蛋白区域的嵌合病毒并未出现引起病毒毒力明显升高的迹象: vSX12 免疫后,猪在体温、症状上与对照组相比没有明显的差别,这说明高致病性 PRRSV 的 ORF4-7-3'UTR 区域可能与高致病性 PRRS 的毒力升高之间的联系较小,至少该区域不能单独引起病毒毒力的大幅度提升。同时我们通过序列比对分析发现,这次大面积暴发的高致病性 PRRSV 与以前流行株间最大的差异就是在 ORF1a 所编码的各种非结构蛋白(Nsp)区域,这其中又以 Nsp2 的变异最为明显,高致病性 PRRSV Nsp2 区域存在非连续缺失 30 个氨基酸。研究表明, Nsp2 含有 B 细胞识别的抗原决定簇^[23],而且也有试

证实 Nsp2 蛋白具有有效的抗原决定簇,而且还可以促进免疫系统对抗原决定簇的有效识别。有学者推测 Nsp2 区域的突变可能是引起 PRRSV 高致病性的毒力升高的因子^[12],本实验室也正在利用相同的策略来研究高致病性 PRRSV Nsp2 的非连续缺失与毒力之间的潜在相关性。

在本研究的动物实验中,对照组进行 JX143 毒株攻毒后虽然体温升高并且出现了严重的食欲减退甚至废绝、咳嗽、喘气等呼吸症状,除一头死亡外,其余四头在攻毒后 20 d 左右恢复正常。表面看来 JX143 毒株致病力相对偏低,这可能与以下方面有关:(1) 目前国内通行的实验动物数目偏少,因此农业部规定的 3/5 死亡率的高致病性标准易于产生统计学差异及重复性问题;(2) 本试验攻毒时猪的日龄(62)稍偏大,且为近来发现对 PRRSV 最不敏感的杜洛克品系(田克恭等,个人通讯)。事实上,我们前期进行的五周龄猪致病力试验结果表明: JX143 株病毒导致高达 67%的死亡率(12/18,未发表资料);随后进行的经反向遗传拯救的克隆病毒 vJX143 及 JX143 株对同日龄猪致病力高达 100%(各 3/3)^[10];另外,正在进行中的动物试验结果表明 JX143 株对 62 龄猪致病率达 100%,感染后 10 d 死亡率已达 3/5(临床观察表明另外两头也将死亡),符合农业部关于高致病性蓝耳病的评判标准。鉴于本试验采用的 JX143 株病毒基因组核苷酸同源性与参考株(JXA1)同源性高达 99.8%,尽管本次试验阴性对照组攻毒后死亡率偏低,对临床、病理学、病毒学及免疫学等指标的综合分析表明, vSX12 株应该是抗高致病性猪蓝耳病的理想的候选疫苗株。

本研究建立的 PRRSV 嵌合病毒体系,有助于在短期内根据 PRRS 疫情变化来研制有针对性的多价基因工程疫苗,同时为进一步研制 PRRSV-PCV 等多联基因工程疫苗奠定技术及物质基础。此外,嵌合病毒具有两种病毒不同的基因序列,本质上有利于临床疫病监测过程中利用特定靶序列区分疫苗免疫株和自然感染的野毒株,同时还可以成为大规模使用的疫苗候选株。

REFERENCES

- [1] Keffaber KK. Reproductive failure of unknown etiology. *Am Assoc Swine Prac Newslett*, 1989, 1(2): 1-9.

- [2] Wensvoort G, Terpstra C, Pol JM, *et al.* Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet Quarterly*, 1991, **13**(3): 121–130.
- [3] Collins JE, Benfield DA, Christianson WT, *et al.* Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J Vet Diagn Invest*, 1992, **4**(2): 117–126.
- [4] Snijder EJ, Meulenberg JJ. The molecular biology of arteriviruses. *J Gen Virol*, 1998, **79**, 961–979.
- [5] Lee C, Hodgins D, Calvert JG, *et al.* Mutations within the nuclear localization signal of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein attenuate virus replication. *Virology*, 2006, **346**(1), 238–250.
- [6] Meulenberg J. PRRSV, the virus. *Vet Res*, 2000, **31**(1), 11–21.
- [7] 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. *PLoS one*, 2007, **2**(6): e526.
- [8] Tong GZ, Zhou YJ, Hao XF, *et al.* Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome, China. *Emerg Infect Dis*, 2007, **13**(9): 1434–1436.
- [9] Li Y, Wang X, Bo K, *et al.* Emergence of a highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the Mid-Eastern region of China. *Vet J*, 2007, **174**(3): 577–584.
- [10] Lv J, Sun Z, Zhang JW, *et al.* Construction of full-length infectious clone of PRRSV isolate from “Swine High Fever syndrome”. *Microbiol Infect*, 2007, **2**(4): 219–227.
吕健, 孙志, 张建武, 刘维全, 袁世山. 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒 JX143 株感染性克隆的构建. *微生物与感染*, 2007, **2**(4): 219–227.
- [11] Yuan S, Nelsen CJ, Murtaugh MP, *et al.* Recombination between North American strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res*, 1999, **61**: 87–98.
- [12] Han J, Wang Y, Faaberg KS. Complete genome analysis of RFLP 184 isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res*, 2006, **122**: 175–182.
- [13] Yoo D, Welch SK, 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**: 143–154.
- [14] Whitehead SS, Hill MG, Firestone CY, *et al.* Replacement of the F and G proteins of respiratory syncytial virus (RSV) subgroup A with those of subgroup B generates chimeric live attenuated RSV subgroup B vaccine candidates. *J Virol*, 1999, **73**: 9773–9780.
- [15] Pham QN, Biacchesi S, Skiadopoulos MH, *et al.* Chimeric recombinant human metapneumoviruses with thenucleoprotein or phosphoprotein open reading frame replaced by that of avian metapneumovirus exhibit improved growth *in vitro* and attenuation *in vivo*. *J Virol*, 2005, **79**: 15114–15122.
- [16] Yuan S, Wei ZZ. Construction of infectious cDNA clones of PRRSV: Separation of coding regions for nonstructural and structural proteins. *Sci China C Life Sci*, 2008, **38** (1): 66–73.
袁世山, 韦祖樟. 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. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2008, **38**(1): 66–73.
- [17] Heckman KL, Pease LR. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nat Protoc*, 2007, **2**(4): 924–932.
- [18] Dulbecco R, Vogt M. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J Exp Med*, 1954, **99**(2): 167–182.
- [19] Halbur PG, Paul PS, Frey ML, *et al.* Comparison of the pathogenicity of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Vet Pathol*, 1995, **32**: 648–660.
- [20] Borisevich V, Seregin A, Nistler R, *et al.* Biological properties of chimeric West Nile viruses. *Virology*, 2006, **349**: 371–381.
- [21] Oleksiewicz MB, Bötner A, Nielsen J, *et al.* Determination of 5'-leader sequences from radically disparate strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus reveals the presence of highly conserved sequence motifs. *Arch Virol*, 1999, **144**: 981–987.
- [22] Allende R, Kutish GF, Laegreid W, *et al.* Mutations in the genome of porcine reproductive and respiratory syndrome virus responsible for the attenuation phenotype. *Arch Virol*, 2000, **145**: 1149–1161.
- [23] Butler JE, Lemke CD, Weber P, *et al.* Antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets: XIX. Undiversified B cells with hydrophobic HCDR3s preferentially proliferate in the porcine reproductive and respiratory syndrome. *J Immunol*, 2007, **178**(10): 6320–6331.