

分类号:

密级:



华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

硕士学位论文

MASTER'S DEGREE DISSERTATION

欧洲型猪繁殖与呼吸综合征病毒的分离鉴定、致病性
研究及 N 蛋白单克隆抗体的制备
ISOLATION, IDENTIFICATION AND PATHOGENICITY
OF PRRSV-1 AND PREPARATION OF MONOCLONAL
ANTIBODY AGAINST N PROTEIN

研究生: 任天泽

CANDIDATE: REN TIANZE

学号: 2021302110147

STUDENT NO.:

专业: 预防兽医学

MAJOR: PREVENTIVE
VETERINARY MEDICINE

导师: 方六荣 教授

SUPERVISOR: PROFESSOR FANG LIURONG

中国 武汉
WUHAN, CHINA

二〇二四年六月

JUNE, 2024

华中农业大学硕士学位论文

欧洲型猪繁殖与呼吸综合征病毒的分离鉴定、致病性研究及 N 蛋白单克隆抗体的制备

**Isolation, Identification and Pathogenicity of PRRSV-1 and
Preparation of Monoclonal Antibody Against N Protein**

研 究 生：任天泽

学 号：2021302110147

指 导 教 师：方六荣 教授

指 导 小 组：方六荣 教授

肖少波 教授

专业：预防兽医学

研究方向：动物病毒学

获得学位名称：农学硕士

获得学位时间：2024 年 6 月

华中农业大学动物科学技术学院、动物医学院

二〇二四年六月

目 录

摘要	i
Abstract.....	iii
缩略语表 (Abbreviation)	vi
第 1 章 文献综述	1
1.1 猪繁殖与呼吸综合征概述	1
1.2 猪繁殖与呼吸综合征病毒研究进展	1
1.2.1 PRRSV 病原学	1
1.2.2 PRRSV 的形态结构	1
1.2.3 PRRSV 的基因组结构	2
1.2.4 PRRSV 的分离与培养	3
1.2.5 PRRSV-1 的起源与流行	3
1.2.6 PRRSV-1 的遗传进化	5
1.2.7 PRRSV-1 的致病性	7
1.3 PRRSV 单克隆抗体的研究概述	8
第 2 章 研究目的与意义	10
第 3 章 材料与方法	11
3.1 实验材料	11
3.1.1 临床病料、细胞、毒株、菌株、抗体与实验动物	11
3.1.2 主要载体	12
3.1.3 主要工具酶及试剂盒	12
3.1.4 细胞培养所需材料和试剂	13
3.1.5 蛋白原核表达、真核表达及纯化所需的材料和试剂	13
3.1.6 SDS-PAGE 及 Western Blot 所需的材料和试剂	15
3.1.7 间接免疫荧光试验所需材料和试剂	15
3.1.8 透射电镜观察所需材料和试剂	16
3.1.9 小鼠免疫及 ELISA 所需材料和试剂	16
3.1.10 单克隆抗体亚型鉴定所需材料和试剂	16
3.1.11 单抗腹水纯化所需材料和试剂	16
3.1.12 主要实验仪器及设备	17
3.1.13 分子生物学软件	17
3.2 实验方法	18
3.2.1 临床样品的 RT-PCR 检测	18
3.2.2 病毒的分离与鉴定	20

3.2.3 PRRSV-1 分离株的遗传进化分析	22
3.2.4 PRRSV-1 分离株的致病性试验	26
3.2.5 PRRSV-1 N 蛋白的原核表达和真核表达.....	30
3.2.6 SDS-PAGE 和 Western Blot 验证 PRRSV-1 N 蛋白	35
3.2.7 PRRSV-1 N 蛋白单克隆抗体的制备.....	36
3.2.8 单克隆抗体的大量制备及纯化.....	41
3.2.9 统计学方法	42
第 4 章 结果与分析	43
4.1 临床样品的检测	43
4.2 PRRSV-1 的分离鉴定	43
4.2.1 PRRSV-1 的分离	43
4.2.2 PRRSV-1 分离株的透射电镜观察	44
4.2.3 PRRSV-1 分离株的间接免疫荧光鉴定	45
4.3 PRRSV-1 N 蛋白单克隆抗体的制备.....	46
4.3.1 PRRSV-1 N 蛋白原核表达质粒的构建.....	46
4.3.2 PRRSV-1 N 蛋白原核表达形式的确定.....	46
4.3.3 PRRSV-1 N 原核表达蛋白的纯化及验证.....	47
4.3.4 PRRSV-1 N 蛋白的真核表达及验证.....	48
4.3.5 小鼠的免疫与抗体效价测定	49
4.3.6 PRRSV N 蛋白阳性杂交瘤细胞株的筛选.....	50
4.3.7 单克隆抗体与真核表达的 PRRSV-1 N 蛋白反应的验证.....	50
4.3.8 单克隆抗体与 PRRSV-1 全病毒反应的验证.....	51
4.3.9 PRRSV-1 N 蛋白单克隆抗体的亚型鉴定.....	53
4.3.10 PRRSV-1 N 蛋白单克隆抗体的大量制备与纯化.....	53
4.3.11 单克隆抗体的效价测定	54
4.3.12 纯化单克隆抗体的验证	54
4.3.13 纯化单克隆抗体的特异性验证	56
4.4 PRRSV-1 分离株的遗传进化分析	56
4.4.1 PRRSV-1 分离株的全基因组扩增与克隆	56
4.4.2 PRRSV-1 分离株的全基因组核苷酸同源性分析	57
4.4.3 PRRSV-1 分离株的遗传进化分析	57
4.4.4 PRRSV-1 分离株的氨基酸序列分析	60
4.5 PRRSV-1 RGZ02 株对仔猪的致病性	61
4.5.1 攻毒后仔猪的临床症状.....	62

4.5.2 攻毒仔猪的病理变化	62
4.5.3 攻毒后仔猪肺脏的免疫组化分析	63
4.5.4 攻毒仔猪的病毒血症与组织病毒载量测定	64
第 5 章 讨论与结论	65
5.1 讨论	65
5.1.1 PRRSV-1 的检测与分离	65
5.1.2 PRRSV-1 的遗传进化分析	66
5.1.3 PRRSV-1 的致病性	67
5.1.4 PRRSV-1 N 蛋白单克隆抗体的制备	68
5.2 结论	70
参考文献	71
致谢	84

摘要

猪繁殖与呼吸综合征病毒 (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 可感染各年龄段的猪, 是一种在世界范围内对养猪业的发展造成巨大阻碍的病原。依据基因组和遗传进化的差异将 PRRSV 分为欧洲型毒株 (PRRSV-1) 和美洲型毒株 (PRRSV-2)。PRRSV-2 是我国流行的主要基因型, 但近年来不断有猪场检测到 PRRSV-1。了解 PRRSV-1 在我国猪场中的流行情况, 对有效防控 PRRSV 的感染与流行具有重要意义。鉴于此, 本研究对来自全国各猪场送检的疑似 PRRSV 感染的临床样品进行了检测和病毒分离, 对分离的病毒进行了遗传进化分析和致病性研究, 同时还制备了 PRRSV-1 N 蛋白的单克隆抗体, 研究结果为我国 PRRSV-1 感染的防控奠定了基础。具体研究内容如下:

1. 临床样品的检测

对全国各猪场送检的疑似 PRRSV 感染的临床样品进行 RT-PCR 检测, 结果显示检测的 836 份样品中有 30 份 PRRSV-1 阳性样品, 阳性率为 3.59% (30/836), 说明 PRRSV-1 在我国猪场中的感染率并不高。进一步对 30 份 PRRSV-1 阳性样品进行了 PRRSV-2 的检测, 结果有 11 份为 PRRSV-2 阳性, 说明临床上存在 PRRSV-1 与 PRRSV-2 混合感染的现象。

2. PRRSV-1 的分离与鉴定

将检测为 PRRSV-1 单独感染的样品处理后接种 PAMs 进行病毒分离, 结果有 3 份样品在盲传至第 3 代时出现了典型的细胞病变。对第 3 代 PAMs 培养物进行 RT-PCR 扩增均可检测到 PRRSV-1 N 基因, 在透射电镜下可观察到直径约 50-70nm 的球形病毒粒子, 由此证实成功分离到了 3 株 PRRSV-1, 分别命名为 RGZ01、RGZ02 和 RYN01。将获得的病毒分别在 MARC-145 细胞上进行传代培养, 结果发现所获得的 3 株病毒均不能适应 MARC-145 细胞培养。

3. PRRSV-1 N 蛋白单克隆抗体的制备

构建了原核表达质粒 pET-25b-N 和 pMAL-c5x-N 表达 PRRSV-1 N 蛋白。以 pMAL-c5x-N 表达的 N 蛋白免疫 BALB/c 小鼠并进行细胞融合, 以 pET-25b-N 表达的 N 蛋白建立间接 ELISA 方法对融合的细胞进行筛选, 获得了 8 株阳性细胞, 分别命名为 N1A7、N1A8、N1H4、N3F11、N4G12、N7H10、N8G10、N9G1。IFA

结果显示 8 株单抗均与真核表达的 PRRSV-1 N 蛋白及 PRRSV-1 全病毒有特异性反应；Western Blot 检测显示 8 株单抗均与真核表达的 PRRSV-1 N 蛋白有特异性反应，但只有 N1A7 和 N1A8 株单抗与 PRRSV-1 全病毒有特异性反应。于是制备了 N1A7 和 N1A8 株的腹水型抗体并进行了纯化，IFA 和 Western Blot 检测证实纯化的单克隆抗体 N1A7 和 N1A8 特异性良好，且与 PRRSV-2 也有反应。

4. PRRSV-1 分离株遗传进化分析

扩增 PRRSV-1 分离株的全基因组序列并进行了序列测定与分析。全基因组序列比对分析发现，3 株 PRRSV-1 分离株与 PRRSV-1 代表毒株 Lelystad 的核苷酸同源性最高，与 PRRSV-2 代表毒株 VR2332 株的核苷酸同源性最低。全基因组及 ORF5 序列遗传进化分析显示，3 株 PRRSV-1 均属于 Subtype I 且与四川分离株 SC-2020-1 形成了 1 个新的亚群。氨基酸序列分析结果显示，nsp2 第 313-353 位和第 420 位氨基酸、GP3 第 243-246 位及 GP4 第 64-67 位氨基酸缺失，与 181187-2 株和 SC-2020-1 株的缺失特征相似；此外，在 nsp2 第 460-461 位氨基酸和 GP3 C 末端存在不同程度的氨基酸插入，这些变异特征在其他已报道的 PRRSV-1 中暂未发现。

5. PRRSV-1 RGZ02 株的致病性分析

将 PRRSV-1 RGZ01 株、RGZ02 株与 RYN01 株分别在 PAMs 上传至第 6 代，病毒滴度测定显示其 TCID₅₀ 分别为 $1 \times 10^{5.2}/\text{mL}$ 、 $1 \times 10^{5.6}/\text{mL}$ 和 $1 \times 10^{4.9}/\text{mL}$ 。由于 3 株 PRRSV-1 分离株的同源性较高，因此选择增殖滴度最高的 RGZ02 株开展了动物致病性试验。将 RGZ02 株经颈部肌肉注射（ 2×10^5 TCID₅₀/头）和滴鼻（ 2×10^5 TCID₅₀/头）两种方式接种断奶仔猪。结果在 14 d 的观察期内仅有 3/5 的感染仔猪发病，并且症状较轻，没有仔猪死亡，病猪体温呈一过性升高，平均日增重略低于对照仔猪；剖检可见肺脏局部肉变，HE 染色可见肺脏局部实变，肺泡间质增宽，部分肺泡结构消失，间质内有炎性细胞浸润；免疫组化可从感染仔猪的肺脏中检测病毒抗原；荧光定量 RT-PCR 从感染仔猪的扁桃体、肺脏和腹股沟淋巴结中可检测到病毒 N 基因，在感染后第 7-14 d 的血清中检测到病毒 N 基因，但病毒含量都不高。以上结果表明 PRRSV-1 RGZ02 株对仔猪的致病性较弱。

关键词：欧洲型猪繁殖与呼吸综合征病毒；分离鉴定；遗传变异；致病性；N 蛋白；单克隆抗体

Abstract

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) can infect pigs of all ages, and it is a pathogen that greatly hinders the development of pig industry worldwide. According to the difference of genome, PRRSV is divided into European strain (PRRSV-1) and American strain (PRRSV-2). PRRSV-2 is prevalent in China, but the reports about PRRSV-1 being detected in China have gradually increased in recent years. Investigating the epidemiology of PRRSV-1 in China is crucial for effectively prevent and control the infection and epidemic of PRRSV. In view of this, the clinical samples suspected of PRRSV infection from pig farms all over the country were detected and the virus was isolated, and the genetic evolution and pathogenicity of the isolated virus were studied. At the same time, monoclonal antibody (mAb) against PRRSV-1 N protein was prepared. The research results laid a foundation for the prevention and control of PRRSV-1 infection in China. The specific research contents are as follows:

1. Detection of clinical samples

The clinical samples suspected of PRRSV infection sent by pig farms all over the country were detected by RT-PCR. The results showed that 30 samples were PRRSV-1 positive, and the positive rate was 3.59% (30/836), indicating that the infection rate of PRRSV-1 in pig farms in China was not high. Further, 30 PRRSV-1 positive samples were tested for PRRSV-2, and 11 samples were positive for PRRSV-2, which indicated that PRRSV-1 and PRRSV-2 were mixed in clinic.

2. Isolation and identification of PRRSV-1

Positive samples detected as PRRSV-1 mono-infection were treated and inoculated with PAMs for virus isolation, and three samples showed typical CPE when they cultured to passage 3. The PRRSV-1 N gene in passage 3 PAMs culture was detected by RT-PCR. Spherical virions with a size of about 50 - 70 nm could also be observed under electron microscope, which confirmed that three strains of PRRSV-1 were isolated, which were named RGZ01, RGZ02, and RYN01 respectively. The obtained viruses were subcultured on MARC-145 cells. The results showed three viruses could not adapt to MARC-145 cell.

3. Preparation of mAb against PRRSV-1 N protein

PRRSV-1 N protein were expressed by Prokaryotic expression plasmids pET-25b-N and pMAL-c5x-N, and the N protein expressed by pMAL-c5x-N was mainly soluble, while the N protein expressed by pET-25b-N mainly existed in the form of inclusion bodies. BALB/c mice were immunized with N protein expressed by pMAL-c5x-N and fused. The fused cells were screened by indirect ELISA using N protein expressed by pET-25b-N. We got 8 positive cells, which named N1A7, N1A8, N1H4, N3F11, N4G12, N7H10, N8G10 and N9G1. IFA showed that all 8 mAbs reacted specifically with PRRSV-1 whole virus and PRRSV-1 N protein expressed by eukaryotic expression plasmid; Western Blot showed that all 8 mAbs reacted specifically with PRRSV-1 N protein expressed by eukaryotic expression plasmid, but only N1A7 and N1A8 mAbs reacted specifically with PRRSV-1 whole virus. The purified ascites antibodies of N1A7 and N1A8 strains were prepared and purified, and the purified ascites mAbs were obtained with high purity. IFA and Western Blot assays confirmed that both purified N1A7 and N1A8 mAbs had good specificity and also reacted with PRRSV-2.

4. Genetic evolution analysis of PRRSV-1 isolates

The complete genome sequences of PRRSV-1 isolates were amplified and the sequence was determined and analyzed. Whole genome sequence alignment analysis revealed that the three PRRSV-1 isolates had the highest nucleotide homology with, Lelystad and the lowest nucleotide homology with VR2332, the representative strain of PRRSV-2. Genome-wide and ORF5 sequence genetic evolution analysis showed that all three PRRSV-1 isolates belonged to Subtype I and formed a new subgroup with SC-2020-1 isolated from Sichuan. The results of amino acid sequence analysis showed that amino acid deletions at aa 313-353 and aa 420 of nsp2, aa 243-246 of GP3 and aa 64-67 of GP4, which were similar to those of 181187-2 and SC-2020-1. In addition, there were different degrees of amino acid insertions at aa 460-461 of nsp2 and the C-terminus of GP3, which were not yet found in other reported PRRSV-1 strains. The above results indicate that PRRSV-1 in China is constantly mutating.

5. Animal pathogenicity analysis of PRRSV-1 RGZ02

PRRSV-1 RGZ01, RGZ02 and RYN01 were uploaded to passage 6 in PAMs. Virus titer assays showed the TCID₅₀ of RGZ01, RGZ02, and RYN01 at passage 6 were $1 \times 10^{5.2}/\text{mL}$, $1 \times 10^{5.6}/\text{mL}$, and $1 \times 10^{4.9}/\text{mL}$ respectively. Because of the high homology of three PRRSV-1 isolates, the RGZ02 strain with the highest proliferative titer was selected for animal experiment. The weaned piglets were inoculated with RGZ02 strain by intramuscular injection (2×10^5 TCID₅₀/piglet) and intranasal drip (2×10^5 TCID₅₀/piglet). The results showed that only 3/5 of RGZ02 infected piglets developed the disease during the observation period of 14d, the symptoms were mild and no piglets died. The body temperature of sick piglets showed a transient increase, and the average daily gain was slightly lower than that of control piglets. Necropsy showed local degeneration of the lungs, HE staining showed local consolidation of the lungs, widening of the alveolar interstitium, disappearance of some alveolar structures, and inflammatory cell invasion in the interstitium and bronchioles; immunohistochemistry could detect viral antigens from the lungs of infected piglets. RT-qPCR could detect the viral N gene from the tonsils, lungs, and inguinal lymph nodes of infected piglets, and the viral N gene was detected in the serum of infected piglets from the 7 - 14d after infection, but the viral content was not high. The above results showed that PRRSV-1 RGZ02 had weak pathogenicity to piglets.

Keywords: PRRSV-1; isolation and identification; genetic variation; pathogenicity; N protein; monoclonal antibody

缩略语表 (Abbreviation)

英文缩写 Abbreviations	英文全称 English Name	中文全称 Chinese Name
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
ADE	Antibody dependent enhancement	抗体依赖性增强
bp, kb	Base pair, Kilobase pair	碱基对, 千碱基对
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
cDNA	Complementary DNA	互补 DNA
CPE	Cytopathic effect	细胞病变效应
ddH ₂ O	Double distilled H ₂ O	双蒸水
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-二脒基-2-苯基吲哚
DEPC	Diethyl pyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium	杜氏细胞培养基
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
DTT	Dithiothreitol	二硫苏糖醇
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	乙二胺四乙酸
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay	酶联免疫吸附试验
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
h, min, sec	Hour, minute, second	小时, 分钟, 秒钟
HAT	Hypoxanthine aminopterin thymidine (medium)	次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸苷
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid	4-羟乙基哌嗪乙磺酸
HEK-293T	Human embryonic kidney 293T cell	人胚肾细胞
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
HT	Hypoxanthine thymidine (medium)	次黄嘌呤-胸苷
IFA	Indirect immunofluorescence	间接免疫荧光
IgG	Immunoglobulin G	免疫球蛋白 G
kDa	Kilodalton	千道尔顿
LB	Luria-Bertani medium	LB 培养基
MARC-145	MARC-145	非洲绿猴肾传代细胞
McAb	Monoclonal antibody	单克隆抗体
MLV	Modified-Live Virus Vaccines	减毒活疫苗
MOI	multiplicity of infection	病毒感染复数
nsp	Nonstructural protein	非结构蛋白
OD	Optical Density	光密度
ORF	Open reading frame	开放阅读框
PAMs	Porcine alveolar macrophages	猪肺泡巨噬细胞
PBS	Phosphate buffer solution	磷酸盐缓冲液
PBST	Phosphate buffer solution tween	磷酸盐吐温缓冲液
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PEG 1450	Polyethylene glycol 1450	聚乙二醇 1450

PRRS	Porcine reproductive and respiratory syndrome	猪繁殖与呼吸综合征
PRRSV	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	猪繁殖与呼吸综合征病毒
PRRRV N	PRRSV nuclear capsid protein	PRRSV 核衣壳蛋白
PVDF	Polyvinylidene Fluoride	聚偏二氟乙烯
r/min	Rotation per minute	每分钟转数
SDS	Sodium dodecyl sulphate	十二烷基磺酸钠
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
TBST	Tris-HCl buffer solution tween	氨丁三醇盐酸缓冲液
TEMED	Tetramethyl ethylenediamine	四甲基乙二胺
TCID ₅₀	50% Tissue culture infective dose	半数组织培养感染剂量
μg, mg, g	Microgram, milligram, gram	微克, 毫克, 克
μL, mL, L	Microliter, milliliter, liter	微升, 毫升, 升

第 1 章 文献综述

1.1 猪繁殖与呼吸综合征概述

PRRS 是由 PRRSV 感染引起的一种病毒性传染病。PRRSV 的天然宿主为家猪和野猪 (Murtaugh et al 2010), 猪体感染后常见的临床症状以发热、食欲不振、母猪繁殖障碍及各年龄段猪呼吸系统疾病为主 (Rossow et al 1994), 剖检可见肺脏弥漫性间质性肺炎, 充血, 出血 (Garner et al 2001, Neumann et al 2005)。PRRS 首次被报道于二十世纪末的美国(Keffaber 1989), 随后迅速传播至世界各国, 在全球范围内长期阻碍养猪业的发展 (Meng 2000, Wills et al 1997)。

1.2 猪繁殖与呼吸综合征病毒研究进展

1.2.1 PRRSV 病原学

根据病毒核苷酸序列差异、抗原差异及地理分布差异等可将 PRRSV 分为欧洲型 PRRSV (又称 PRRSV-1) 和美洲型 PRRSV (又称为 PRRSV-2)。2 种 PRRSV 基因组差异巨大, 全基因组序列同源性只有 60%左右 (Murtaugh et al 1995), 其中分别以早期在欧洲流行的 Lelystad 株 (Wensvoort et al 1991)为 PRRSV-1 的代表毒株, 以在美洲流行的 VR-2332 株 (Collins et al 1992)为 PRRSV-2 的代表毒株。无论是 PRRSV-1 还是 PRRSV-2 都存在广泛的遗传变异, 不同毒株的致病性也不尽相同 (Forsberg et al 2002, Frossard et al 2013, Murtaugh et al 1998)。由于 PRRSV 低免疫原性, 高突变率和高重组率的特点, 导致至今缺乏有效的疫苗和抗病毒药物, 对全球猪养殖业造成巨大经济损失 (Tian et al 2007, Wang et al 2015)。

1.2.2 PRRSV 的形态结构

PRRSV 经负染电镜可观察到直径约为 50-70 nm, 有囊膜的球形病毒粒子 (Veit et al 2014)。囊膜以基质蛋白 (M 蛋白) 为骨架, 与囊膜蛋白 (E 蛋白)、GP2a、GP3、GP4、GP5 和 GP5a 构成脂质双层膜 (Bautista et al 1996, Meulenberg et al 1997)。核衣壳由核衣壳蛋白 (N 蛋白) 构成, 直径在 25-35nm 之间, 呈二十面体对称, 核衣壳内含 PRRSV 基因组 RNA (图 1-1)。

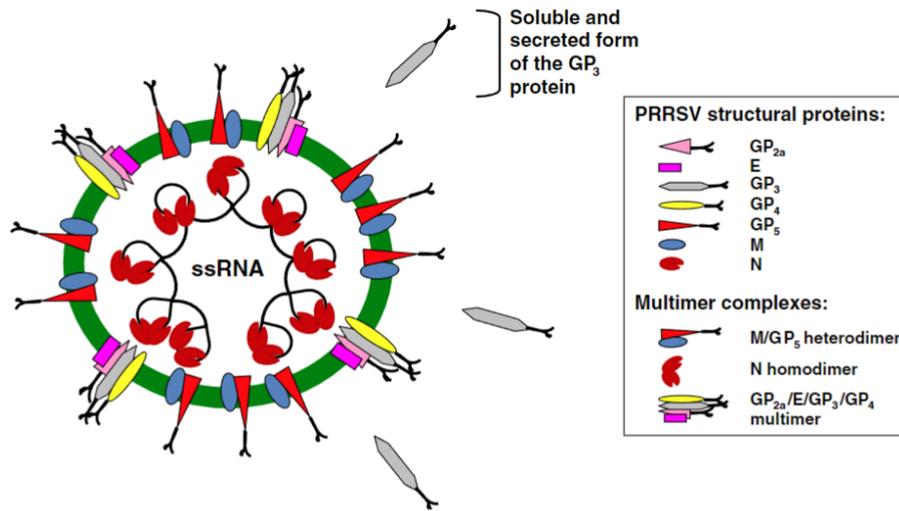


图 1-1 PRRSV 病毒粒子结构 (Music and Gagnon 2010)

Fig. 1-1 PRRSV virus particle

1.2.3 PRRSV 的基因组结构

PRRSV 基因组是为不分节段的单股正链 RNA，全长约 15 kb，在 5'端和 3'端分别具有帽子结构和 Poly (A) 尾巴结构 (Dokland 2010, Xie et al 2013)。最新研究表明，PRRSV 基因组包含至少 11 个开放阅读框 (ORF)：ORF1a、ORF1b、ORF2a、ORF2b、ORF3-7、ORF5a 和 ORF2TF (图 1-2) (Conzelmann et al 1993, Cui et al 2022, Fang et al 2012, Lunney et al 2016, Snijder and Meulenberg 1998)。约占整个基因组 75%的靠近 5'端的 2 个 ORF 为 ORF1a 和 ORF1b，翻译出多聚蛋白 pp1a 和 pp1ab，在病毒蛋白酶的作用下裂解产生至少 16 种非结构蛋白 (nsps)：nsp1-nsp12，其中 nsp1 和 nsp7 又可裂解为 nsp1 α 和 nsp1 β 及 nsp7 α 和 nsp7 β (Fang and Snijder 2010, Snijder et al 1998)；ORF2TF 是近年来在 nsp2 发现的 1 个新 ORF，编码产生额外的 2 个 nsps：nsp2N 和 nsp2TF (Fang et al 2012, Li et al 2014)。其余约占整个基因组 25%近 3'端的 8 个 ORF 分别表达成熟病毒粒子不可或缺 8 种结构蛋白 (Dokland 2010)，从 5'端到 3'端依次为：GP2、E 蛋白、GP3、GP4、GP5、ORF5a 蛋白、M 蛋白以及核 N 蛋白 (Johnson et al 2011, Meulenberg et al 1993, Snijder et al 1998)。其中以 GP5 蛋白、M 蛋白和 N 蛋白是主要的结构蛋白。

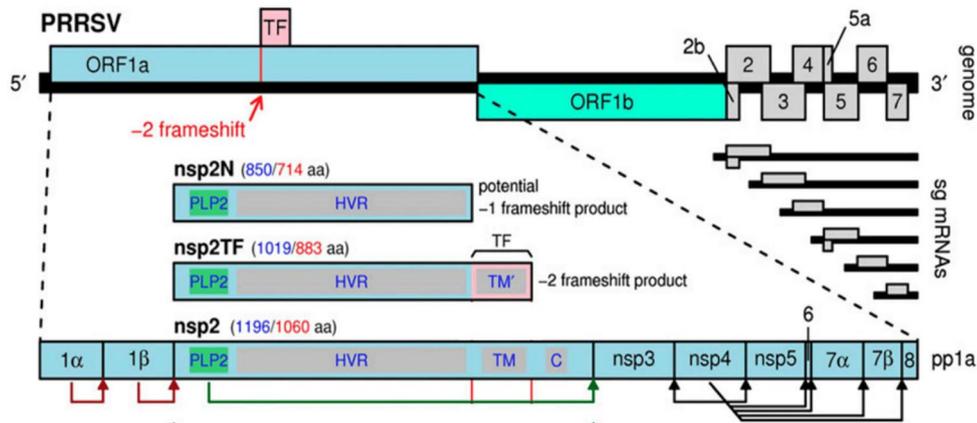


图 1-2 PRRSV基因组结构 (Fang et al 2012)

Fig. 1-2 PRRSV genome structure

1.2.4 PRRSV 的分离与培养

PRRSV 的天然宿主为猪，包括家猪和野猪 (Murtaugh et al 2010)。单核细胞和巨噬细胞是 PRRSV 侵入猪体内的宿主细胞，其中以 PAMs（猪肺泡巨噬细胞）为主 (Pol et al 1997)，世界上第 1 株 PRRSV 就是使用 PAMs 分离得到的 (Wensvoort et al 1991)。但由于 PAMs 为原代细胞，存在成本高、分离步骤繁琐、易污染等问题，研究人员筛选了一系列可用于病毒分离与体外培养的永生化细胞系，MARC-145 目前体外培养 PRRSV 最常用的永生化细胞系 (Collins et al 1992, Kim et al 1993)。在体外培养中，大部分 PRRSV-2 在 PAMs 或 MARC-145 中均能增殖 (Bautista et al 1996)，但 PRRSV-1 几乎只在 PAMs 中正常增殖，只有很少一部分 PRRSV-1 可在 MARC-145 中增殖，如 2012 年 Li 等人于我国辽宁省分离得到的 PRRSV-1 LNEU12 株在 MARC-145 连续传代至第 7 代才出现明显的细胞病变效应 (CPE) (Li et al 2014)。

1.2.5 PRRSV-1 的起源与流行

1987 年在美国发现了一种病原不明的新型传染病，在妊娠母猪中表现为流产、死胎、木乃伊胎等，在断奶仔猪中表现为呼吸系统症状 (Keffaber 1989, Loula 1991)，由于病原的不确定，该病最初被称为“神秘猪病”或“SMEDI 样综合征”，后根据其临床症状将其命名为猪繁殖与呼吸综合征 (PRRS)。该病于 1990 年

底便扩散美国至少 11 个州并在短短几年迅速蔓延至加拿大、荷兰和西班牙等欧美国家 (Elazhary et al 1991, Morin et al 1991, Plana et al 1992, Rossow et al 1994, Wensvoort et al 1991)。1991 年荷兰学者 Wensvoort 等人首次从临床病料中分离得到一种有囊膜的 RNA 病毒并将其命名为 Lelystad virus, 通过攻毒试验成功复制出与 PRRS 相似的临床症状, Wensvoort 等人认为该 RNA 病毒即为 PRRS 的病原 PRRSV (Wensvoort et al 1991), 随后美国学者 Collins 等人于 1992 年也从临床病料中分离得到类似的毒株并命名为 VR-2332 (Collins et al 1992)。根据病毒核苷酸序列差异、抗原差异及地理分布差异等可将 PRRSV 分为欧洲型 PRRSV (PRRSV-1) 和美洲型 PRRSV (PRRSV-2), 且分别以 Lelystad virus 株和 VR-2332 株作为 PRRSV-1 和 PRRSV-2 的代表毒株 (Murtaugh et al 1995)。我国最早于 1995 年发现 PRRS 并逐渐蔓延至全国各省份。2011 年, Chen 等人从 2006 年至 2009 年在我国各猪场收集的临床病料中分离得到 2 株 PRRSV-1 并命名为 BJEU06-1, NMEU09-1 (Chen et al 2011), 是我国猪场野生 PRRSV-1 分离株的首次报道。但有关报道显示, 早在 1997 年中国海关就有截获感染了 PRRSV-1 B13 株的猪 (Yun and Zhixiong 1998), 说明 PRRSV-1 侵入我国的时间可能发生于更早。同在 2011 年, PRRSV-1 GZ11-G1 株被分离自贵州某从未接种过 PRRSV 减毒活疫苗 (MLV) 的猪场, 该分离株与 PRRSV-1 疫苗株 Amervac 株的核苷酸序列高度同源 (Wang et al 2016), 然而截至目前, 我国暂未有接种 PRRSV-1 MLV 的相关记录, 推测该类毒株进入我国可能通过引进接种 PRRSV-1 MLV 的种猪或违规使用 PRRSV-1 MLV (Nilubol et al 2013)。此外, PRRSV-1 在韩国、泰国、日本等亚洲国家也相继被检测到 (Iseki et al 2016, Jantafong et al 2015, Kim et al 2015, Lyoo et al 2015)。

PRRSV-1 与 PRRSV-2 在我国均有流行, 其中 PRRSV-2 是我国主要流行的基因型, 对我国猪养殖业的发展造成巨大的阻碍, 因此我国对 PRRSV 的研究也主要集中在 PRRSV-2 上 (Gao et al 2004, Tian et al 2007, Zhou et al 2014, Zhou et al 2008)。由于 PRRSV-1 在中国的检出率较低且致病性较轻, PRRSV-1 一直没有引起国内学者的重视, 自 Chen 等人分离得到第 1 株 PRRSV-1 BJEU06-1 后 (Chen et al 2011), 中国有关检测到 PRRSV-1 的报道逐渐增多。2016 年, Zhai 等人检测了从广东省 15 个地区 50 个养殖场收集到的 750 份临床病料, 结果显示 PRRSV-1 阳性率高达 24.8% (Zhai et al 2018)。此外, 随着非洲猪瘟的爆发, 近几年国内对动物疫情的监

管得到了进一步加强，可能间接导致 PRRSV-1 检出率的提高。迄今为止，PRRSV-1 在我国超过 23 地区被检出，在我国中部、北部、南部、东部、东北和西南部均有广泛分布（如图 1-3）（Chen et al 2011, Chen et al 2017, Chen et al 2020, Gao et al 2017, Hsueh et al 2023, Li et al 2022, Liu et al 2017, Sun et al 2023, Wang et al 2016, Xu et al 2023, Yu et al 2022, Zhai et al 2018, Zhao et al 2021, Zhou et al 2015）。



图 1-3 PRRSV-1 在中国地区的分布 (Sun et al 2023)

Fig. 1-3 Distribution of PRRSV-1 in China

1.2.6 PRRSV-1 的遗传进化

PRRSV 在基因及抗原方面具有多样性，是一种具有广泛遗传变异特点的病毒 (Meng 2000, Nelsen et al 1999)。PRRSV 基因组中的 nsp2、ORF5 区域以及 ORF3 和 ORF4 的重叠区域均表现出高度变异性 (An et al 2007, Andreyev et al 1997, Brar et al 2014, Chen et al 2006, Fang et al 2004, Murtaugh et al 1995, Wang et al 2017)，因此常用于遗传进化分析、亚型分析及分子流行病学等研究。

GP5 蛋白是 PRRSV 中变异性最高的蛋白，存在 1 个超变区 (aa 32-40)、2 个高变区 (aa 57-70、aa 121-130) (Plagemann 2004)。基于 ORF5 核苷酸序列，PRRSV-1 可分为 3 个亚型 (subtype I、II、III) (Shi et al 2010)。3 种亚型以波兰、斯洛伐克和罗马尼亚为分界线，subtype I 主要分布在分界线以西，因此也被称为泛欧 1 型；subtype II 和 subtype III 在分界线以东更为常见，因此也分别被称为东欧 2

型和东欧 3 型 (Stadejek et al 2013)。先前的研究表明, 中国分离的 PRRSV-1 均属于 subtype I, 且可进一步分为 4 个亚群, 分别以 BJEU06-1、Amervac、HKEU16 和 NMEU09-1 作为各亚群的代表毒株(Chen et al 2017)。Xu 等人对 2016-2022 年间我国分离到的 20 株 PRRSV-1 的 ORF5 序列进行分析, 发现 20 株 PRRSV-1 分离株中有 16 株属于 BJEU06-1-like, 说明近年来 BJEU06-1-like 已成为我国部分地区 PRRSV-1 的主要亚群。此外, Sun 等人分析了截止至 2023 年在 NCBI 上记录的所有中国 PRRSV-1 的 ORF5 序列, 发现除上述 4 个亚群外, 国内 PRRSV-1 形成了 3 个新的独立亚群, 且 3 个亚群内的毒株均在 2018 年后被检测到, 表明我国 PRRSV-1 在近几年中发生了较大的变异 (Sun et al 2023)。

PRRSV-1 ORF3 和 ORF4 的重叠区域同样是 1 个高变区 (Lee et al 2017, Ropp et al 2004, Zhang et al 2020)。Zhang 等人发现在第 241-248 位氨基酸连续 8 个氨基酸缺失是该区域最常见的一种缺失模式 (Zhang et al 2020), 而在 ORF3 第 244-247 位氨基酸和 ORF4 第 64-67 位氨基酸连续 4 个氨基酸缺失首次发现于 SC-2020-1 株 (Zhang et al 2020)。此外, 在 PRRSV-1 高致病株 lena 和 Westsib13 的 GP3 C 末端发现有氨基酸提前终止的现象 (Karniyuchuk et al 2010, Yuzhakov et al 2017)。近年来在国内 PRRSV-1 分离株 ZD-1 和 EUGDHD2018 的 GP3 C 末端也分别发现了 26 个氨基酸和 23 个氨基酸提前终止的现象, 且通过致病性试验发现 ZD-1 具有中度致病性 (Xu et al 2023)。但 GP3 C 末端的提前终止是否会影响 PRRSV-1 的致病性仍未可知。

nsp2 是 PRRSV 中最大的非结构蛋白, 是 PRRSV 中最易变的非结构蛋白, 其高变区常发生氨基酸的突变、插入或缺失, 在 PRRSV-1 与 PRRSV-2 间的同源性只有 32%左右 (Allende et al 1999), 因此也可作为鉴别 PRRSV-1 与 PRRSV-2 病毒基因的区域。2020 年, Zhang 等人分析了中国 PRRSV-1 nsp2 区域的缺失特征, 发现国内的 PRRSV-1 共有 12 种缺失模式 (Zhang et al 2020)。2023 年, Sun 等人比较了国内外 PRRSV-1 nsp2 区域发现在第 357-360 位氨基酸和第 411 位氨基酸发生的 4+1 个氨基酸不连续缺失是在国内 PRRSV-1 nsp2 区域中最常见的一种缺失模式且主要发生在 BJEU06-1 like 亚群 (Sun et al 2023)。而在近年新形成的亚群中, 在 SC-2020-1 株 nsp2 区域的第 330 位和第 427 位氨基酸表现为独特的 2 个氨基酸 (1+1) 不连续缺失模式 (Zhao et al 2021); 在 181187-2 株 nsp2 区域的第 306-359 位氨基酸

存在连续 54 个氨基酸的缺失 (Wang et al 2023), 这些缺失模式在其他已报道的的 PRRSV-1 序列中是未曾发现的。

重组事件的发生也是导致 PRRSV 多样性的重要因素之一。Liu 等人发现当 2 株不同的 PRRSV 感染同一细胞或猪时会发生重组 (Liu et al 2011)。在 PRRSV-1 内或 PRRSV-2 内的重组是较为常见的, 但至今还没有 PRRSV-1 与 PRRSV-2 之间发生重组事件的报道 (Renson et al 2017)。此外, 疫苗接种是控制和预防 PRRSV-1 的重要手段, PRRSV-1 MLV 自 1990 年后就已广泛应用于欧洲 (Chae 2021)。但研究表明猪体接种 PRRSV MLV 后仍存在排毒, 进而增加了重组事件发生的可能 (Eclercy et al 2019)。Yu 等人对国内外 91 株 PRRSV-1 的全基因组序列进行分析, 发现在重组事件主要集中在 nsp2 及 GP2-GP4 区域 (Yu et al 2022)。Sun 等人分析国内 PRRSV-1 全基因序列发现我国有 5 株 PRRSV-1 分离株参与了重组事件, 包括野生株与疫苗株之间的重组和野生株之间的重组, 重组位点主要位于 nsp2、nsp3、nsp9、nsp10 和 GP3-N 区域 (Sun et al 2023)。近年来国内外已相继发现来源于 2 种 MLV 毒株的重组病毒 (Kvisgaard et al 2020, Renson et al 2017, Sun et al 2022), 且相比于亲本毒株, 重组毒株表现出更强的传播能力及致病性 (Eclercy et al 2019, Kvisgaard et al 2020)。由于国内暂未有接种 PRRSV-1 MLV 的相关记录, 国内报道的与 PRRSV-1 疫苗株相关的重组毒株很有可能来源于国外。

1.2.7 PRRSV-1 的致病性

不同年龄段的猪均可感染 PRRSV, 其中以妊娠期母猪和断奶仔猪最易感。愈后母猪和病猪是 PRRSV 最主要的传染源, 在愈后 8 周仍可持续排毒 (Faaberg et al 1998)。PRRSV 主要传播途径是接触性传播和气溶胶污染 (Le Potier et al 1997, Otake et al 2010), 2-3 个月即可传至全群 (Bilodeau et al 1994)。PRRSV 主要在 PAMs 内进行增殖, 导致 PAMs 发生皱缩、破碎和数量减少, 直接损害 PAMs 细胞的吞噬作用 (Gomez-Laguna et al 2010), 随着 PAMs 的裂解, 大量病毒被释放出来并进入血液循环, 因此 PRRSV 感染后常伴有病毒血症的出现 (Van Breedam et al 2010)。宿主免疫功能受损后易发生继发感染并最终导致死亡 (Mengeling et al 1998)。猪体感染 PRRSV 后常见的临床症状以发热、食欲不振、妊娠母猪繁殖障碍及其他年龄段猪呼吸系统疾病为主 (Rossow et al 1994), 剖检可见肺脏弥漫性间质性肺炎、充血、

出血，实质器官点状出血 (Garner et al 2001, Neumann et al 2005)。PRRSV-1 和 PRRSV-2 的临床症状相似 (Jeong et al 2022)。但相比于 PRRSV-2，PRRSV-1 的致病性有限，感染后不致死，表现为短暂的体温升高和低病毒血症 (Stadejek et al 2017, Wang et al 2016)，只有少部分毒株具有较强的致病性且主要是分布在东欧的 subtype II 和 subtype III，仔猪感染后死亡率较高 (Karniychuk et al 2010, Yuzhakov et al 2017)。我国有关 PRRSV-1 分离株致病性研究的报道有限且表现出的致病性普遍较低 (Hsueh et al 2023, Ming et al 2017, Wang et al 2016)。但在 2023 年报道的属于 BJEU06-1-like 的 ZD-1 株 (Xu et al 2023) 和形成 1 个新亚群的 181187-2 株 (Wang et al 2023) 表现出中等致病性，表明我国 PRRSV-1 的致病性有可能有上升趋势。此外，在国外已有高致病性 PRRSV-1 subtype I 的相关报道 (Canelli et al 2017, Frydas et al 2015, Martín-Valls et al 2022)。因此，加强对 PRRSV-1 的监测是有必要的。

1.3 PRRSV 单克隆抗体的研究概述

在日常实验及临床应用中，往往需要大量可与某些抗原发生特异性结合的抗体用于实验或检测等项目，但由于浆细胞增殖能力有限，难以满足大量获得能单一识别特定抗原的抗体需求。1975 年 Kohler 和 Milstein 首次将免疫小鼠的 B 细胞和骨髓瘤细胞进行融合得到杂交瘤细胞株 (Kohler and Milstein 1975)。杂交瘤细胞继承了骨髓瘤细胞无限增殖的特性，又可分泌针对某一特定抗原的抗体，获得的高纯度抗体即为单克隆抗体。目前已广泛应用于病毒分离与鉴定、疾病诊断、研究抗原表位等领域，对病原诊断、疾病预防及探究免疫机制等方面有着重要意义 (Chahar et al 2020)。

目前，国内外已研制出多种针对 PRRSV 不同抗原的单克隆抗体，包括但不限于针对 PRRSV M 蛋白、N 蛋白、GP5 蛋白、E 蛋白及多种非结构蛋白的单克隆抗体。N 蛋白具有丰富的抗原表位。Meulenberg 等人的研究表明 PRRSV-1 N 蛋白具有 3 个线性表位：第 2-12 位氨基酸，第 25-30 位氨基酸以及第 40-46 位氨基酸；1 个构象表位：由第 51-67 位氨基酸和第 80-90 位氨基酸构成 (Meulenberg et al 1998)，Dea 等人发现 PRRSV-1 N 蛋白具有的 4 个抗原表位中第 2-12 位氨基酸和 a 第 40-46 位氨基酸仅在 PRRSV-1 间高度保守，而第 25-30 位氨基酸在 PRRSV-1 和 PRRSV-2 之间是高度保守的 (Dea et al 2000)。相比于 M 蛋白和 GP5 蛋白，抗 N 蛋白的抗体是猪体

感染PRRSV后最先产生的抗体且在猪体内的持续时间更长，因此在开发检测PRRSV特异性抗体试剂盒及临床诊断等方面常选择N蛋白作为靶蛋白 (Music et al 2010)。根据国内外报道，目前既有特异性识别PRRSV-1 或PRRSV-2 的PRRSV N蛋白单抗，也有可识别PRRSV-1 和PRRSV-2 共有表位的PRRSV N蛋白单抗 (Meulenberg et al 1998, Wootton et al 2001, Wootton et al 1998, Zhou et al 2006)。

第 2 章 研究目的与意义

PRRS 是由 PRRSV 感染引起猪的一种病毒性传染病，在我国属于一类传染病。PRRSV 感染后可导致妊娠母猪繁殖障碍，如流产、死胎和木乃伊胎等，还会引起各年龄段猪呼吸系统症状，严重阻碍我国养猪业的发展。依据基因组和遗传进化的差异将 PRRSV 分为 PRRSV-1 和 PRRSV-2，其中 PRRSV-2 是我国流行的主要基因型。近年来国内猪群不断检测到 PRRSV-1，部分研究也表明我国 PRRSV-1 的致病性在未来可能呈逐渐上升趋势，但目前国内对 PRRSV-1 的研究远少于 PRRSV-2，不能完全反映出国内 PRRSV-1 的流行情况及未来的发展趋势。此外，国内建立的检测方法主要针对的是 PRRSV-2，由于 PRRSV-1 与 PRRSV-2 的同源性较低，在检测过程中可能会出现漏检，导致目前国内缺乏针对 PRRSV-1 的有效检测手段。由 ORF7 编码的 N 蛋白是 PRRSV 病毒粒子中含量最高的蛋白，具有丰富的抗原表位和较强的免疫原性，相比于 M 蛋白和 GP5 蛋白，抗 N 蛋白的抗体是猪体感染 PRRSV 后最先产生的抗体且在猪体内的持续时间更长，因此在开发检测 PRRSV 特异性抗体试剂盒及临床诊断等方面常选择 N 蛋白作为靶蛋白。

本研究设计特异性扩增 PRRSV-1 N 基因的引物，通过 RT-PCR 的方法对全国各猪场送检的疑似 PRRSV 感染的临床样品进行检测，使用 PAMs 对检测阳性的临床样品进行病毒分离及鉴定，通过序列测定揭示了分离株的遗传进化规律，并进一步对其致病性进行研究，以期丰富我国 PRRSV-1 的相关研究数据，为我国对 PRRSV-1 的全面监控与预防提供科学支撑；同时，本研究表达并纯化 PRRSV-1 的 N 蛋白，以此为抗原制备针对 PRRSV-1 N 蛋白的单克隆抗体，为我国 PRRSV-1 的综合防控及诊断试剂的研发奠定基础。

第 3 章 材料与amp;方法

3.1 实验材料

3.1.1 临床病料、细胞、毒株、菌株、抗体与实验动物

临床病料：836 份疑似 PRRSV 感染的临床病料收集自全国各地规模化猪场送至华中农业大学动物疫病诊断中心检测实验室的样品。

细胞：非洲绿猴胚胎肾细胞（MARC-145）、人胚肾细胞（HEK-293T）由本实验室保存；小鼠骨髓瘤细胞（SP2/0）、猪肺泡巨噬细胞（PAMs）由本实验室分离并保存。

毒株：PRRSV-1：RGZ01 株、RGZ02 株、RYN01 株由本研究分离并保存，疫苗毒株 Amervac 株由中国农业大学杨汉春教授惠赠；PRRSV-2：高致病性毒株 WUH-3 株、NADC30-like 毒株 HB04 株、NADC34-like 毒株 HN08 株由本实验室分离并保存，经典毒株 CH-1a 株由本实验室保存；TGEV WH-1 株、PEDV AJ1102 株、PDCoV DHeB1 株、PoRV RheN2 株由本实验室分离并保存，PRV Ea 株由本实验室保存。

菌株：*E.coli* DH5 α 由本实验室制备并保存、*E.coli* BL21（DE3）购自于北京全式金生物科技有限公司。

抗体：抗 PRRSV-2 N、M、GP5、nsp4、nsp7 蛋白单克隆抗体由本实验室制备并保存；抗 His、MBP、Flag 标签蛋白单克隆抗体购自武汉爱博泰克生物科技有限公司。

实验动物：4 周龄断奶仔猪购自湖北省咸宁市某猪场，经 RT-PCR 检测 PRRSV 核酸阴性，病毒中和试验检测仔猪 PRRSV 抗体阴性，实验动物许可证号为 SYXK（鄂）2023-0070，实验动物伦理编号为 HZAUSW-2024-0003；6-8 周龄 BALB/c 雌性小鼠购自华中农业大学实验动物中心，实验动物许可证号为 SYXK（鄂）2020-0084，实验动物伦理编号为 HZAUMO-2023-0200。动物实验期间严格遵守实验动物福利和科学伦理原则。

3.1.2 主要载体

原核表达载体 pET-25b (图 3-1)、pMAL-c5x (图 3-2) 由本实验室保存。

真核表达载体 pCAGGS (图 3-3) 由本实验室在 N 端插入 Flag 标签并保存。

平末端 PCR 产物快速克隆载体 pESI-Blunt Simple (图 3-4) 购自翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司。

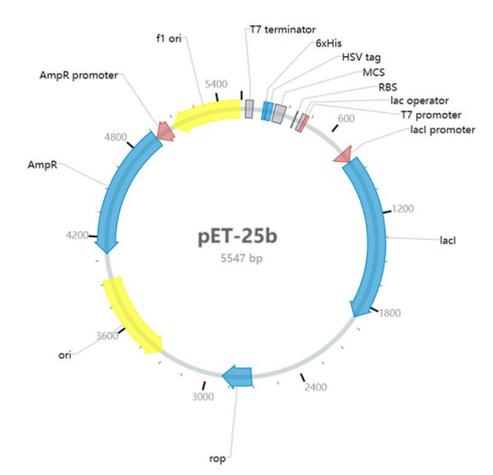


图 3-1 pET-25b 限制性图谱

Fig. 3-1 Restriction map of the pET-25b

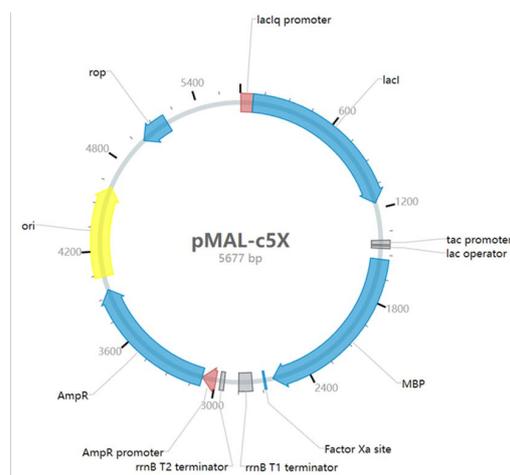


图 3-2 pMAL-c5x 限制性图谱

Fig. 3-2 Restriction map of the pMAL-c5x

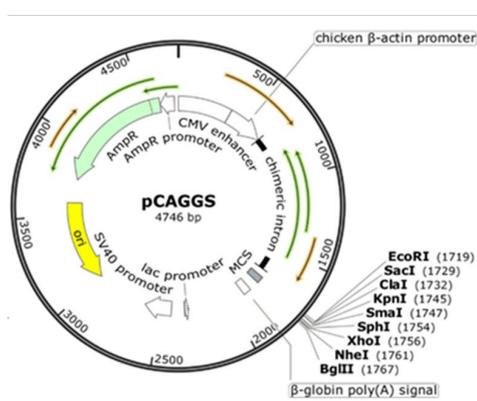


图 3-3 pCAGGS 限制性图谱

Fig. 3-3 Restriction map of the pCAGGS

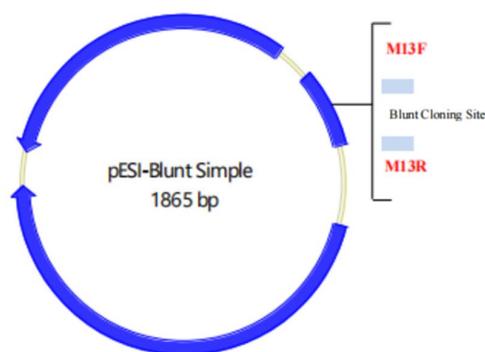


图 3-4 pESI-Blunt Simple 限制性图谱

Fig. 3-4 Restriction map of the pESI-Blunt

3.1.3 主要工具酶及试剂盒

各类限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶等均购自大连宝生物公司；总 RNA 提取试剂 Trizol 以及质粒提取试剂盒购自 Omega 公司；同源重组酶、反转录试剂盒、高保真 DNA 聚合酶和 DNA 回收试剂盒均购自南京诺唯赞公司。

3.1.4 细胞培养所需材料和试剂

DMEM 粉末和胰酶粉剂购自 Gibco 公司；RPMI-1640 基础培养基购自 Hyclone 公司；胎牛血清（FBS）购自内蒙古奥普赛生物科技有限公司；细胞用青/链霉素（100×）购自 Hyclone 公司；HEPES、HAT 冻干粉、HT 冻干粉、淋巴细胞分离液、PEG 1450 融合剂、二甲基亚砷（DMSO）购自 Sigma 公司。

DMEM 基础培养基：将 DMEM 粉剂 13.5 g 溶于 950 mL 双蒸水（ddH₂O）中，轻轻搅拌至完全溶解后加入 3.7 g NaHCO₃，用 1 mol/L HCl 调 pH 至 6.8，定容到 1000 mL，0.22 μm 滤器过滤除菌，保存至 4°C 冰箱备用。

细胞消化液：分别称取葡萄糖 1 g、NaHCO₃ 0.35 g、NaCl 7.94 g、KCl 0.4 g、EDTA 2Na 0.6 g 溶解于 900 mL ddH₂O 中，调 pH 值至 7.2 后定容到 1 L，然后加入 2.5 g 胰蛋白酶，0.22 μm 滤器过滤除菌，分装后 -20°C 保存备用。

细胞生长液（MARC-145/PAMs）：在 445 mL DMEM/RPMI-1640 基础培养基中各加 50 mL FBS 和 5 mL 青/链霉素溶液，4°C 保存备用。

细胞维持液（MARC-145/PAMs）：在 485 mL DMEM/RPMI-1640 基础培养基中各加 10 mL FBS 和 5 mL 青/链霉素溶液，4°C 保存备用。

细胞冻存液：在 9 mL FBS 中加 1 mL DMSO。

RPMI-1640 完全培养基：在 395 mL RPMI-1640 基础培养基中各加 100 mL FBS 和 5 mL 青/链霉素溶液，4°C 保存备用。

HAT（HT）培养基：每瓶 HAT（HT）（50×）粉剂用 10 mL RPMI-1640 基础培养基溶解，每 100 mL HAT（HT）培养基中含 RPMI-1640 基础培养基 77 mL，FBS 20 mL，HAT（HT）溶液 2 mL 和青/链霉素溶液 1 mL。

3.1.5 蛋白原核表达、真核表达及纯化所需的材料和试剂

细菌用培养基中胰蛋白胨（Tryptone）、酵母浸出物（Yeast Extract）均购自 OXOID 公司；卡那霉素和氨苄青霉素购自 Biosharp 公司；IPTG（异丙基硫代-β-D-半乳糖苷）购自 Sigma 公司；jetPRIME 转染试剂购自 PolyPlus-transfection 公司；原核蛋白纯化填料 Dextrin Beads 6、FFNi Focurose 6FF 购自常州天地人和生物科技有限公司；蛋白去内毒素试剂盒购自翌圣生物科技（上海）股份有限公司；NaCl、蔗糖、咪唑、精氨酸、盐酸胍等化学试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

氨苄青霉素：用灭菌 ddH₂O 配成贮存浓度 100 mg/mL，0.22 μm 滤器过滤后，分装-20℃保存备用。

IPTG：用 ddH₂O 配制成储存浓度 0.8 mol/mL，0.22 μm 滤器过滤，分装后-20℃保存备用。

LB 液体培养基：取酵母浸出物 5 g，胰蛋白胨 10 g，NaCl 10 g 于 900 mL ddH₂O 中，搅拌至完全溶解，定容至 1 L，121℃灭菌 20 min，室温保存备用。

LB 固体培养基：在 LB 液体培养基中加入 1.5%的琼脂粉，121℃灭菌 20 min，待温度降至 50℃左右，按照比例加入相应的抗生素，倾倒平皿，冷却凝固后，4℃保存备用。

PBS Buffer：称取 NaCl 8 g、KCl 0.2 g、Na₂HPO₄ 1.42 g、KH₂PO₄ 0.27 g 溶于 800 mL ddH₂O 中，调节 pH 值至 7.4，定容至 1 L，室温保存。

包涵体洗涤液 1：称取脲素 120 g，EDTA 1.46 g，Tris-HCl 2.42 g，NaCl 5.84 g，溶于 800 mL ddH₂O 中，调节 pH 至 8.0，定容至 1 L，室温保存。

包涵体洗涤液 2：称取 Tris-HCl 2.42 g，EDTA 1.46 g，NaCl 58.4 g，曲拉通 5 mL，甘油 50 mL，溶于 800 mL ddH₂O 中，调节 pH 至 8.0，定容至 1 L，室温保存。

包涵体洗涤液 3：称取 MES 9.75 g，曲拉通 10 mL，溶于 800 mL ddH₂O 中，调节 pH 至 8.0，定容至 1 L，室温保存。

包涵体溶解液：称取盐酸胍 573 g，Tris-HCl 6.05 g，NaCl 17.52 g，溶于 800 mL ddH₂O 中，调节 pH 至 8.0，定容至 1 L，室温保存。

包涵体洗杂液：称取脲素 480 g，NaCl 29.2 g，咪唑 1.36 g，Tris-HCl 6.05 g，溶于 800 mL ddH₂O 中，调节 pH 至 8.0，定容至 1 L，室温保存。

包涵体洗脱液：称取脲素 480 g，NaCl 5.84 g，咪唑 17 g，Tris-HCl 2.42 g，溶于 800 mL ddH₂O 中，调节 pH 至 7.5，定容至 1 L，室温保存。

20%无水乙醇：取 100 mL 无水乙醇，加入 300 mL ddH₂O 中，定容至 500 mL，0.22 μm 滤器过滤，室温保存。

蛋白透析复性液：称取 NaCl 14 g，KCl 0.745 g，精氨酸 87.1 g，盐酸胍 71.6 g，还原型谷胱甘肽 0.614 g，氧化型谷胱甘肽 1.0 g，Tris 2.42 g，溶于 800 mL ddH₂O 中，调节 pH 至 8.0，定容至 1 L，室温保存。

3.1.6 SDS-PAGE 及 Western Blot 所需的材料和试剂

PVDF 膜 (0.2 μm) 购自 Millipore 公司。甘氨酸 (Glycine)、十二烷基硫酸钠 (SDS)、三羟甲基氨基甲烷 (Tris base) 等购于 BIOSHARP 公司; 冰醋酸、过硫酸铵、吐温-20 等常用化学试剂购自国药集团化学试剂有限公司; Western Blot 细胞裂解液、5 \times SDS-PAGE Loading Buffer、HRP (辣根过氧化物酶) 标记的羊抗鼠/兔 IgG 购自上海碧云天生物技术有限公司; 增强型 Western Blot 化学发光检测试剂 (显色液) 购自 Pierce 公司; 三色预染蛋白 Marker、PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (12.5%)、促凝剂购自雅酶生物医药有限公司。

SDS-PAGE 电泳缓冲液 (5 \times Tris-Glycine Buffer): 取 Tris base 15.1 g, 甘氨酸 94 g, SDS 5 g 溶于 800 mL ddH₂O 中, 搅拌至完全溶解后, 定容至 1 L。

考马斯亮蓝染色液: 取 1 g 考马斯亮蓝 R-250 溶于 500 mL ddH₂O, 加入 250 mL 异丙醇、100 mL 冰醋酸, 搅拌均匀, 定容至 1 L, 用滤纸除去颗粒物后, 室温保存备用。

SDS-PAGE 胶脱色液: 40 mL 冰醋酸、180 mL 甲醇、180 mL ddH₂O, 于烧杯中混匀即为脱色液, 室温保存备用。

膜转移缓冲液: 取甘氨酸 14.43 g, Tris base 3.03 g, 加入 600 mL ddH₂O, 再加入 200 mL 甲醇, 搅拌均匀, 定容至 1 L。

膜清洗液 (TBST): 取 NaCl 8.8 g, 1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 10 mL 于 800 mL ddH₂O 中, 搅拌至溶解后, 加入 0.5 mL Tween-20, 搅拌均匀, 定容至 1 L。

封闭液: 含 10% (W/V) 脱脂奶粉的 TBST。

3.1.7 间接免疫荧光试验所需材料和试剂

间接免疫荧光所用的二抗, 绿色荧光 (Alexa Fluor 488) 标记的羊抗鼠 IgG 购自 Abbkine 公司; 细胞核染料 DAPI 购自上海碧云天生物技术有限公司; 4%多聚甲醛、甲醇等试剂购自国药集团化学试剂有限公司; BSA 牛血清白蛋白: 购自武汉科瑞生物技术有限公司。

封闭液: 含 5% (W/V) BSA 的 PBS。

3.1.8 透射电镜观察所需材料和试剂

透射电镜铜网购自上海化科实验器材有限公司。

1 mol/L Tris-HCl (pH 6.8): 取 121.1 g Tris base 于 800 mL ddH₂O 中完全溶解后用盐酸调 pH 值至 6.8, 定容至 1 L, 用 0.22 μm 滤器过滤, 室温保存。

1 mol/L NaOH: 取 40 g NaOH 粉末溶于 1 L ddH₂O, 用 0.22 μm 滤器过滤, 室温保存。

负染色液: 取 20 g 磷钨酸溶于 1 L ddH₂O, 室温保存。

3.1.9 小鼠免疫及 ELISA 所需材料和试剂

Quick Antibody Mouse 快速免疫佐剂购自北京博奥龙免疫技术有限公司; 酶联免疫吸附板购自深圳金灿华实业有限公司; 底物显色液 A、B 和显色终止液购自武汉科前生物股份有限公司; 羊抗鼠 IgG-HRP: 购自上海碧云天生物技术有限公司。

包被液 (0.05 mol/L pH 9.6 碳酸盐缓冲液): 取 NaHCO₃ 2.93 g, Na₂CO₃ 1.59 g 于 900 mL ddH₂O 中, 搅拌至完全溶解, 调 pH 值至 9.6, 定容至 1 L。

洗涤液 (PBST 缓冲液): 称取 NaCl 8 g、KCl 0.2 g、Na₂HPO₄ 1.42 g、KH₂PO₄ 0.27 g 溶于 800 mL ddH₂O 中, 加 500 μL 的 Tween-20, 搅拌均匀, 定容至 1 L。

封闭液: 含 5% (W/V) 脱脂奶粉的 PBST 溶液。

3.1.10 单克隆抗体亚型鉴定所需材料和试剂

小鼠单抗 Ig 类亚类鉴定酶标试剂盒: 购自北京博奥龙免疫技术有限公司。

3.1.11 单抗腹水纯化所需材料和试剂

Protein A+G 购自上海碧云天生物技术有限公司。

单抗结合液/洗杂液: 称取 8.77 g NaCl, 2.84 g Na₂HPO₄, 溶解于 800 mL 去离子水中, 使用 HCl 调 pH 至 7.0, 再定容至 1 L, 0.22 μm 滤器过滤。

单抗洗脱液: 称取 7.507 g 甘氨酸溶解于 800 mL 去离子水中, 使用 HCl 调 pH 至 2.7, 再定容至 1 L, 0.22 μm 滤器过滤。

中和缓冲液: 称取 121.1 g Tris base 溶于 800 mL 去离子水中, 使用 NaOH 调 pH 至 8.0, 再定容至 1 L, 0.22 μm 滤器过滤。

3.1.12 主要实验仪器及设备

可调式多温水浴锅 (Pharmacia LKB Multi Temp II); 室温水平摇床 (其林贝尔, TS-1000); PCR 仪 (Bio-Rad, S1000); 涡旋振荡仪 (Thermo Fisher); 冷冻高速水平离心机 (Thermo Fisher); 化学发光成像系统、电泳仪及电泳槽、全自动多功能凝胶成像系统 (Bio-Rad); 倒置显微镜 (Olympus); 超低温冰箱 (Haier); 细胞恒温 CO₂ 培养箱 (SANYO); 生化培养箱 (上海); 制冰机 (SANYO); pH 计 (METTLER TOLEDO 320 pH Meter); NanoDrop2000 微量分光光度计 (Thermo Fisher); 超净工作台 (哈东联); 荧光定量 PCR 仪 (ABI QuantStudio 6); 倒置荧光显微镜 (Olympus IX70); Western Blot 显色仪 (Bio-Rad), 高压细胞破碎仪 (LIFE TECHNOLOGIES AH-1500); 100kV 透射电子显微镜 (日立 H-7000FA) 蛋白纯化分析系统 (AKTA Pure)。

3.1.13 分子生物学软件

本研究涉及到的生物学分析软件包括: Image Lab 5.1、Quant Studio Real-Time PCR Software、Primer 5、DNA STAR、SnapGene、MEGA 11 及 Graph Pad Prism 6 等软件。

3.2 实验方法

3.2.1 临床样品的 RT-PCR 检测

3.2.1.1 样品处理

收集全国各地规模化猪场送检的疑似 PRRS 病例的临床病料共 863 份，将收集的病料按照地点、时间等相关背景分类并于 -80°C 保存。把病料剪碎混匀，分装在 2.0 mL EP 管中，每份 100 mg，并将灭菌的钢珠放入其中，每管加入 1.5 mL 灭菌 PBS。使用组织研磨仪 20 Hz 研磨样品 15 min，冻融 2 次后，12000 r/min 离心 3 min，吸取上清 300 μ L，用于病毒 RNA 的提取，其余的保存于 -80°C 备用。

3.2.1.2 引物设计与合成

以 PRRSV-1 代表毒株 Lelystad 株和 PRRSV-2 WUH-3 株为参考病毒株，通过 Oligo6.0 软件设计了 2 对针对 PRRSV-1 ORF7 和 PRRSV-2 nsp 的检测引物（表 3-1），由生工生物工程（上海）有限公司合成引物序列。

表 3-1 RT-PCR 引物序列

Table. 3-1 Sequence of the primers used for RT-PCR assay

引物名称	引物序列 (5'-3')	长度 (bp)	退火温度 (°C)
EU-F	AGCTGCTACCTCTCCGATTC	580	59
EU-R	ACATTGGCACCAGTACGAGA		
NA-F	CTCCTTTGATTGGAATGTTGTG	1000	54
NA-R	GATGGCTTGAGCTGAGTATTTTG		

3.2.1.3 细胞总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

RNA 的提取按 Trizol 试剂说明书进行，步骤如下（此实验中所有耗材都无 RNAase/DNAase）：

（1）取 300 μ L 样品于 1.5 mL EP 管中，加入 700 μ L Trizol 裂解细胞（一般根据实验所需 RNA 的用量决定需要提取的管数），轻柔涡旋，反复数次直至均匀，室温放置 10 min。

（2）加入 200 μ L 氯仿，盖紧盖子涡旋 10 sec，混匀后冰浴 10 min，使混合液分层。

(3) 4°C 12000 r/min 离心 15 min, 小心转移上层清亮液体 (切勿吸到中间层) 到 1 个新的 EP 管中, 加入等体积的异丙醇, 颠倒混匀后 4°C 静置 10 min。

(4) 4°C 12000 r/min 离心 10 min; 弃上清, 加入 1 mL 75%乙醇进行洗涤 (尽量重悬白色沉淀), 4°C 7500 r/min 离心 5 min 后小心将上清弃去, 倒扣 EP 管于洁净滤纸上室温晾干 (约 10 min), 用 DEPC 水溶解管中沉淀即获得 RNA, 测定 RNA 浓度 (RNA 很容易降解, 可小量分装于 -80°C 低温保存)。

(5) 按照诺唯赞公司反转录试剂盒说明书 (货号: R223), 分 2 步将 RNA 反转成 cDNA。

第一步: 反应条件为 42°C, 2 min, RT-PCR 体系如下 (表 3-2):

表 3-2 RT-PCR 反应体系

Table. 3-2 Reaction system of RT-PCR

成分	含量
4×gDNA Wiper Mix	4 μL
RNA 样品	≤1 μg
RNase Free H ₂ O	至 16 μL

第二步: 上述反应体系中加入 4 μL 5×qRT SuperMix II, 经 50°C, 15 min; 85°C, 5 sec 反应后即可获得 cDNA, 获取的 cDNA 可用于基因 CDS 的克隆, 也可用于荧光定量 PCR。

3.2.1.4 PCR 扩增及凝胶电泳检测

(1) 以上述反转录得到的 cDNA 为模板, 按照诺唯赞公司高保真快速 PCR 试剂盒说明书 (货号: P510) 进行 PCR 扩增反应, 反应条件为: 98°C 30 sec 进行预变性; 98°C 10 sec, 55°C (根据各引物退火温度设定) 5 sec, 72°C 10 sec, 进行 35 个循环后 72°C 延伸 1 min, PCR 反应体系如下 (表 3-3):

表 3-3 PCR 反应体系

Table. 3-3 Reaction system of PCR

成分	含量
2 × Phanta Flash Master Mix	25 μL
上/下游特异性引物 (F/R)	各 2 μL
cDNA	2 μL
ddH ₂ O	至 50 μL

(2) 用 1×TBE 电泳缓冲液配制 1% (w/v) 琼脂糖凝胶溶液, 加热至琼脂糖完全溶解后, 加 EB (10 mg/mL) 至终浓度 0.5 μg/mL, 混匀倒入选定的胶模中, 插入相应的梳子, 凝胶厚度在 3-5 mm 之间。待凝胶完全凝固, 小心拔出梳子, 将凝胶放入装有 1×TBE 电泳缓冲液的电泳槽中, 使电泳液刚没过胶面 (约 1 mm)。用移液器取将上述 PCR 产物加到梳孔中, 同时加入 DNA Marker 作对照, 以 5 v/cm 的电压电泳, 当溴酚蓝电泳至适当位置, 在全自动多功能凝胶成像系统 (Bio-Rad) 中观察是否出现 PRRSV-1 阳性条带。

3.2.2 病毒的分离与鉴定

3.2.2.1 PRRSV-1 的分离与增殖

将上述 RT-PCR 检测结果为阳性的组织研磨上清用 0.22 μm 的滤器过滤后接种至长成单层 PAMs 的 24 孔板, 同时设置正常细胞对照, 37°C 吸附 2 h 后, 吸弃培养液, 加入细胞维持液, 每孔 500 μL, 在 37°C 5% CO₂ 培养箱中培养 3-5 d。若没有病变, 反复冻融 3 次后在 PAMs 上传代 3 次, 若无病变则将其废弃; 若有病变则待细胞出现 80% 以上病变时, 收获病毒悬液, 反复冻融 3 次, 12000 r/min 离心 10 min, 收集上清即为病毒液, 分装后于 PAMs 上传代培养或于 -80°C 保存备用。

3.2.2.2 PRRSV-1 分离株的 RT-PCR 鉴定

按上述 3.2.1 的方法提取分离株基因组 RNA 并合成 cDNA, 进行 RT-PCR 检测。

3.2.2.3 PRRSV-1 分离株的增殖滴度测定

(1) 于 96 孔细胞培养板接种 PAMs, 待铺满单层后使用多道移液器吸弃生长液, 并用细胞维持液洗板 2 次。

(2) 取出 -80°C 冻存的病毒冰上融化, 将待测病毒用细胞维持液在 1.5 mL EP 管中进行 10 倍倍比稀释, 即 10⁻¹-10⁻¹⁰, 稀释过程注意及时更换枪头以确保病毒稀释过程的准确性。

(3) 将 96 孔板中细胞维持液吸弃后, 将每个稀释度的病毒液接种到 96 孔细胞培养板第 1-10 列中, 每列 8 孔, 每孔接种 100 μL。第 11、12 列加入等体积的维持培养基做对照。

(4) 将 96 孔细胞板置 37°C, 5% CO₂ 培养箱中培养, 24 h 后开始观察, 记录细胞产生 CPE 孔数, 直到约 4-5 d 后不再出现 CPE 孔停止记录。

(5) 以上实验重复 3 次, 按 Reed-Muench 两氏法计算待测病毒 TCID₅₀ 值。

3.2.2.4 PRRSV-1 分离株的间接免疫荧光鉴定

(1) 将 PRRSV-1 分离株与 PRRSV-2 WUH-3 株按 0.1 MOI 分别接种至长成单层 PAMs 的 24 孔板, 同时设置正常细胞对照, 37°C 吸附 2 h 后, 吸弃培养液, 每孔加入 500 μL 细胞维持液, 在 37°C 5% CO₂ 培养箱中培养。

(2) 接毒 36 h 之后, 弃去细胞上清, 将细胞板用 PBS 洗 3 遍;

(3) 每孔加入 500 μL 多聚甲醛室温固定 15 min;

(4) 将细胞板用 PBS 洗 3 遍, 每孔加入 500 μL 预冷的甲醇室温作用 10 min;

(5) 将细胞板用 PBS 洗 3 遍, 每孔加入 500 μL 5% 的 BSA 封闭 1 h;

(6) 将细胞板用 PBS 洗 3 遍, 每孔加入 250 μL 一抗 (1:500 倍稀释), 37°C 孵育 1 h;

(7) PBS 洗细胞板 3 遍, 每孔加入 250 μL 绿色荧光 (Alexa Fluor 488) 标记的羊抗鼠 IgG (1:2000 倍稀释), 37°C 孵育 1 h;

(8) 弃去荧光二抗, 每孔加入 500 μL 0.01% 的 DAPI 染料, 室温避光孵育 15 min;

(9) 弃去 DAPI 染料, 将细胞板用 PBS 洗 3 遍, 用倒置荧光显微镜观察。

3.2.2.5 PRRSV-1 分离株的透射电镜观察

(1) 将 30 mL 病毒液 12000 r/min 离心 10 min 后吸取上清, 并用 0.22 μm 滤器过滤去除细胞碎片。少量多次加入超滤管中, 4°C 4000 r/min 离心 10 min, 直至浓缩至 1-2 mL。

(2) 在蛋白纯化分析系统中使用混合模式色谱法通过 Capto Core 700 对病毒液进行纯化。

(3) 将纯化的病毒悬液样品分别滴到铜网上吸附 10 min, 用滤纸轻轻吸取病毒悬液, 待干燥后滴加 20 g/L 的磷钨酸进行负染 10 min, 负染后用滤纸将磷钨酸吸去, 待干燥后在透射电镜下拍照观察。

3.2.3 PRRSV-1 分离株的遗传进化分析

3.2.3.1 引物设计

以 PRRSV-1 代表毒株 Lelystad virus 株为参考病毒株，通过 Oligo6.0 软件设计了 1 对扩增 PRRSV-1 检测株 ORF5 序列和 15 对扩增 PRRSV-1 分离株全基因组的引物（表 3-4），由生工生物工程（上海）有限公司合成引物序列。

表 3-4 PRRSV-1 全基因组扩增引物序列

Table. 3-4 Sequence of the primers for full gene amplification of PRRSV-1

引物名称	引物序列 (5'-3')	长度 (bp)	退火温度 (°C)
EU-ORF5-F	TGAGGTGGGCYACAACCAT	680	55
EU-ORF5-R	CGCCCTAATTGAATAGGTGACTCAG		
EU-5'UTR-F1	ATGATGTGTAGGGTATTCCCCCT	592	58
EU-5'UTR-R1	CGCTCGTAAACTTGGAGTTCAC		
EU-5'UTR-F2	TAGCCCAACAGGTATCCTTCTC	1233	58
EU-ORF1a-R2	AGCCCAATCATCCTCTGGTCTGT		
EU-ORF1a-F3	ACGGGTCTTGTGGTTGGCA	1297	61
EU-ORF1a-R3	CCAGGGTCAGACGCGGTG		
EU-ORF1a-F4	GAAGACGAACCACTGGATTTGT	1130	58
EU-ORF1a-R4	CAATCACCTGGAGCCATAGAGC		
EU-ORF1a-F5	CCCAGCTTTTATGCTCACACTT	1243	58
EU-ORF1a-R5	CACGGCTGAGAACAATGGCA		
EU-ORF1a-F6	CCKCTGACCCATGGTGTTC	1333	58
EU-ORF1a-R6	GCTCGGACCAAACTGCTG		
EU-ORF1a-F7	ATTGAGTCCAGCCATTATCC	1217	58
EU-ORF1a-R7	ATGGAGCCCAAGGTGAAG		
EU-ORF1a-F8	CATCCCACTCCAGACACCAACC	1195	59
EU-ORF1a-R8	GGCGTGAATCAAGGTACTCCAT		
EU-ORF1b-F9	GCGTCCTGACACTCCCTT	1314	59
EU-ORF1b-R9	GGCGATGCCGCAGATAAG		
EU-ORF1b-F10	CGCAGAACGCCTCAGAGTATTA	1274	59
EU-ORF1b-R10	GGCTACAAGTGCTCGGGATT		
EU-ORF1b-F11	CACTGCGATAACCATTGATTC	1334	57
EU-ORF1b-R11	CTGTAACCCTAAGATTTTCCACT		
EU-ORF1b-F12	AGCCACCGCCTATTTCCAGTT	1371	61
EU-ORF3-R12	AACTCATCATGGTCACGCTCCT		
EU-ORF2-F13	ACGAGGCCCAAGTTGACCGA	1206	61
EU-ORF5-R13	CCAGGACAAGCCGGTACACA		
EU-ORF4-F14	CTTGTTTGTTCGCCATTCTCTT	1247	58
EU-ORF7-R14	ACCGCTGGGACTTTATCATTG		
EU-ORF6-F15	AGAAAGCCCGGACTAACAT	613	58
EU-3'UTR-R15	TTTAATTTTCGGTCACATGGTTCCTG		

3.2.3.2 PRRSV-1 分离株的全基因组扩增

以 3.2.1.3 获得的 PRRSV-1 检测株 cDNA 和 3.2.2.2 PRRSV-1 分离株 cDNA 为模板，用诺唯赞公司高保真快速 PCR 试剂盒（货号：P505）扩增 PRRSV-1 检测株的 ORF5 基因及分离株的全基因组，反应完成后对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测，具体步骤参考 3.2.1.4。

3.2.3.3 PCR 产物的凝胶回收

PCR 产物经过电泳检测为阳性后，用南京诺唯赞公司的凝胶回收试剂盒（货号：DC301）进行胶回收纯化，具体步骤如下：

（1）将单一的目的 DNA 条带在琼脂糖凝胶上切下，放入准备好的 EP 管内，加入溶胶液 PN，以没过 DNA 凝胶为准。

（2）60°C 水浴，在此期间不断柔和地上下颠倒溶胶液，以便使凝胶彻底溶解。待凝胶完全溶解后放置于冰上降温 30 sec

（3）将降温后的液体转移到一个吸附柱 CA2 内，室温静置 1 min，在 12000 r/min 的条件下离心 5 sec，弃废液，之后将吸附柱 CA2 重新放回收集管中。

（4）向吸附柱中加入 600 μ L 的漂洗液 PW，然后 12000 r/min 离心 1 min，弃废液。

（5）重复操作步骤（4）。

（6）将吸附柱 CA2 重新放回收集管中，12000 r/min 离心 2 min，60°C 烘箱内静置 5-10 min，以便吸附柱烘干，去除残留的乙醇。并且同时将洗脱液放置于 60°C 烘箱内预热。室温静置几分钟，以便吸附柱充分晾干。

（7）把吸附柱 CA2 放进另 1 个干净的 EP 管中，对准吸附膜中间位置加入 30 μ L 的洗脱液 EB（悬空滴加，不可触及吸附膜；如果回收片段大于 10 kb，则洗脱液应置 65°C 水浴加热），室温静置 2 min，然后 12000 r/min 离心 2 min。EP 管中的液体含有回收的目的 DNA，保存于 -20°C。

3.2.3.4 PCR 回收产物与克隆载体的连接

使用 Hieff Clone[®] Zero TOPO-Blunt Simple Cloning Kit 试剂盒将上述回收的目的 DNA 片段连接至平末端 PCR 产物快速克隆载体 pESI-Blunt Simple，于 25°C 反应 5 min 即可，连接反应体系如下（表 3-5）：

表 3-5 PCR 回收产物与克隆载体的连接反应体系

Table. 3-5 Reaction system of connection between PCR recovered product and cloning vector

成分	含量
10×Enhancer	1 μL
pESI-Blunt simple vector (30 ng/mL)	1 μL
目的 DNA 片段	4 μL
ddH ₂ O	至 10 μL

3.2.3.5 连接产物的转化

(1) 无菌操作将上述 10 μL 连接产物加入 100 μL 的 *E.coli* DH5α 感受态细胞中，冰浴 30 min，然后 42°C 水浴热击 90 sec，再冰浴 3-5 min。

(2) 添加 400 μL 液体 LB，37°C 摇床培养振荡培养 30-45 min。

(3) 4000 r/min 离心 3 min，弃去约 300 μL 上清，将剩余沉淀轻轻吹匀并用灭菌玻璃棒涂抹至含 Amp 抗性的平皿，正放于 37°C 温箱，1 h 后倒置培养 12-16 h，待其长出单个菌落后，在超净工作台中挑取单菌落加至含 Amp 抗性的液体 LB 培养基中扩大培养。

3.2.3.6 菌液 PCR 鉴定与测序

以上述菌液为模板，使用通用引物 M13 F/R 进行 PCR 扩增鉴定，具体试验步骤参考 3.2.1.4。将阳性菌液送至武汉擎科生物科技有限公司进行测序，并使用 Snapgene 分子生物学软件分析测序结果。

3.2.3.7 全基因组序列拼接及分析

利用 SeqMam 软件 (DNASTAR) 对以上述测序结果进行全基因组序列拼接，组成完整的 PRRSV-1 分离株全基因组序列。以 NCBI 上记录的国内外 PRRSV-1 为参考毒株 (表 3-6)。使用 MegAlign 软件对 PRRSV-1 分离株全基因组序列进行同源性分析，使用 MEGA 11 软件对 PRRSV-1 分离株全基因组及 ORF5 序列进行遗传进化分析。

表 3-6 参考毒株信息

Table. 3-6 Reference strain information

编号	名称	国家	分离时间	登录号
1	AUT13-883	Austria	2013	KT326148
2	AUT14-440	Austria	2014	KT334375
3	lena	Belarus	2007	JF802085

表 3-6 参考毒株信息 (续)

Table. 3-6 Reference strain information

编号	名称	国家	分离时间	登录号
4	SU1-Be	Belarus	2010	KP889243
5	07V063	Belgium	2007	GU737264
6	13V117	Belgium	2013	KT159249
7	13V091	Belgium	2013	KT159248
8	DK-1992-PRRS-111_92	Denmark	1992	KC862566
9	DK-2003-6-5	Denmark	2003	KC862571
10	DK-2008-10-5-2	Denmark	2008	KC862573
11	DK-2010-10-10-3	Denmark	2010	KC862568
12	DK-2011-05-23-9	Denmark	2011	KC862569
13	DK-2011-05-11-14	Denmark	2011	KC862567
14	DK-2012-01-05-2	Denmark	2012	KC862574
15	PRRS-FR-2005-29-24-1	France	2005	KY366411
16	PRRS-FR-2014-56-11-1	France	2014	KY767026
17	GER09-613	Germany	2009	KT344816
18	14432/2011	Hungary	2011	KR296711
19	9625/2012	Hungary	2012	KJ415276
20	PR40/2014	Italy	2014	MF346695
21	Lelystad	Netherlands	1993	M96262
22	DV	Netherlands	1996	KF991509
23	LV4.2.1	Netherlands	2004	AY588319
24	Cresa3267	Portugal	2006	JF276435
25	WestSib13	Russia	2013	KX668221
26	Tyu16	Russia	2016	MT008024
27	Olot/91	Spain	1991	KF203132
28	Cresa3262	Spain	1992	JF276431
29	MLV-DV	Spain	1999	KJ127878
30	Cresa3249	Spain	2005	JF276433
31	CReSA38	Spain	2014	KX249750
32	CReSA17	Spain	2014	KX249749
33	CReSA100	Spain	2014	KX249753
34	Amervac	Spain	Vaccine	GU067771
35	01CB1	Thailand	2009	DQ864705
36	SD01-08	USA	2001	DQ489311
37	96V198	USA	1996	MK876228
38	EuroPRRSV	USA	2003	AY366525
39	SD03-15_P83	USA	2003	KU131560
40	94881	USA	2006	KT988004
41	KNU-07	South Korea	2007	FJ349261
42	B13	China	1999	AY633973
43	HK3	China	2003	KF287129
44	HK5	China	2004	KF287130

表 3-6 参考毒株信息 (续)

Table. 3-6 Reference strain information

编号	名称	国家	分离时间	登录号
45	HK8	China	2004	KF287128
46	HK10	China	2004	KF287131
47	BJEU06-1	China	2006	GU047344
48	FJ0603	China	2006	HM114313
49	HKEU16	China	2007	EU076704
50	NMEU09-1	China	2009	GU047345
51	SHE	China	2009	GQ461593
52	NVDC-NM1-2011	China	2011	JX187609
53	GZ11-G1	China	2011	KF001144
54	NVDC-FJ	China	2011	KC492506
55	NVDC-NM2	China	2011	KC492504
56	NVDC-NM3	China	2011	KC492505
57	LNEU12	China	2012	KM196101
58	FJEU13	China	2013	KP860912
59	FJQEU14	China	2014	KP860913
60	HLJB1	China	2014	KT224385
61	15HEN1	China	2015	KX967492
62	GDFS16	China	2016	MF153486
63	GDGZ16	China	2016	MF153487
64	ZD-1	China	2016	OP355712
65	HENZMD-10	China	2017	KY363382
66	KZ2018	China	2018	MN550991
67	NPUST-2789-3W-2	China	2018	MN242825
68	NPUST-2789-3W-5	China	2018	MN265857
69	NPUST-2860-S-6	China	2018	MN265858
70	181187-2	China	2018	OQ856755
71	HN1804-1	China	2018	MK689121
72	EUGDHD2018	China	2018	MK639926
73	180900-5	China	2018	MK303390
74	TZJ637	China	2020	OP566683
75	SC-2020-1	China	2020	MW115431
76	VR2332	USA	1971	EF536003

3.2.4 PRRSV-1 分离株的致病性试验

3.2.4.1 PRRSV-1 分离株对 4 周龄仔猪致病性试验

选取 PEDV、TGEV、PRV、PDCoV 等常见病原阴性且 PRRSV 抗体和抗原均为阴性的仔猪；将 PRRSV-1 分离株在 PAMs 上扩增至第 6 代后以 4×10^5 TCID₅₀/头的剂量接种断奶仔猪，每头仔猪均采用颈部肌肉注射和滴鼻两种方法进行接种（颈

部肌肉注射 2×10^5 TCID₅₀/头，滴鼻 2×10^5 TCID₅₀/头)，具体分组如下（表 3-7）：

表 3-7 实验动物分组

Table. 3-7 Group of experimental animals

日龄	分组	数量	攻毒方案	攻毒方式
30 日龄	攻毒	5 头	PRRSV-1 F6 代： 4×10^5 TCID ₅₀ /头	滴鼻+颈部肌肉注射
	对照	5 头	等体积细胞维持液	滴鼻+颈部肌肉注射

3.2.4.2 临床症状观察

体温：于每天上午 9 点进行体温的测量，以直肠温度 $\geq 40^\circ\text{C}$ 作为发热临界温度，绘制体温变化曲线。

体重：分别于攻毒的 0 d、7 d、14 d 对所有猪进行称重，计算各组的猪平均日增重并进行统计学分析。

死亡率：记录各组的猪的死亡数量和死亡时间，绘制各试验组猪的生存曲线并进行统计学分析。

3.2.4.2 病毒血症检测

分别在攻毒的 0 d、3 d、7 d、10 d 和 14 d 采集猪的非抗凝血，分离血清，通过实时荧光定量 RT-PCR（RT-qPCR）检测血清样品中病毒 N 基因拷贝数，具体步骤如下：

（1）按照 3.2.1.3 提取样品 RNA 并合成 cDNA，依照诺唯赞公司 RT-qPCR 试剂盒说明（货号：Q712）配制 RT-qPCR 体系（SYBR Green 法），RT-qPCR 反应体系如下（表 3-8）：

表 3-8 RT-qPCR 反应体系

Table. 3-8 Reaction system of RT-qPCR

成分	含量
SYBR qPCR Master Mix (2×)	5 μL
上游引物 F (10.0 $\mu\text{mol/L}$)	0.25 μL
下游引物 R (10.0 $\mu\text{mol/L}$)	0.25 μL
cDNA 模版	1 μL
RNase Free H ₂ O	至 10 μL

(2) 将 PRRSV-1 完整的 N 基因扩增后连接至克隆载体 pESI-Blunt Simple 中获得 PRRSV-1 标准品, 标准品拷贝数为: 1×10^{10} 、 1×10^9 、 1×10^8 、 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、 1×10^1 copies/ μ L

上述体系置于 ABI QuantStudio 6 Flex 型荧光定量 PCR 仪中进行扩增反应, 条件为: 94°C , 10 min 进行预变性; 94°C , 15 sec, 58°C , 30 sec, 72°C , 30 sec 进行 40 个循环的扩增并收集荧光信号。本研究涉及到的 RT-qPCR 引物见表 3-9。

表 3-9 实时荧光定量 PCR 引物序列

Table. 3-9 Sequence of the primers used for quantitative real-time PCR assay

引物名称	引物序列 (5'-3')
pPRRSV-N-F	GGAGTGGTTAACCTCGTCAAGT
pPRRSV-N-R	CGGACGTCATCCTCAGCAG

3.2.4.3 攻毒后病理变化及各组织病毒载量检测

于攻毒 14d 后对所有仔猪进行安乐死, 剖检后观察大体病变照片, 采集病猪组织器官包括: 脑、扁桃体、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、腹股沟淋巴结检测样品中病毒 N 基因拷贝数, 试验方法参照 3.2.4.2。

3.2.4.4 病理切片与免疫组化切片制备

使用 4% 的多聚甲醛溶液固定实验组与对照组的组织器官, 用于后续制备组织病理切片及组化切片。

(1) 脱水, 浸泡的组织在 24 h 后从 10% 的福尔马林溶液中取出, 用洁净的去离子水漂洗两遍, 然后放入浓度为 70% 的乙醇中, 之后每过 2 h 依次取出放入 80%、90% 及 100% 各浓度的乙醇中, 完成脱水过程;

(2) 透明, 将组织转入无水乙醇和二甲苯 (1:1) 的混合液中浸渍 1.5 h, 然后转入二甲苯中浸渍至组织呈透明状态;

(3) 浸蜡与包埋, 取出透明的组织放入融化的石蜡内浸蜡, 后将浸蜡后的组织放入融化的固体石蜡中, 待其凝固成含组织的蜡块, 即为包埋;

(4) 切片和拷片, 将蜡块稍稍修整后放入切片机上切成若干 4-6 μm 的蜡带, 待其在温水上展平后, 放于载玻片上在 60°C 温箱内烤片 30 min;

(5) 染色, 干燥的切片经二甲苯脱蜡, 不同浓度酒精逐级脱苯, 蒸馏水复水后进行 HE 染色, 将染色后的切片经酒精梯度脱水, 二甲苯透明;

(6) 封片，在切片的中央加 1 滴中性树胶，缓缓将盖玻片放下。然后将制作好的切片置于普通倒置显微镜下观察。

3.2.4.5 免疫组化切片染色

(1) 60°C温箱烤片 5 min。

(2) 各级酒精脱蜡：二甲苯 10 min、二甲苯 10 min、100%乙醇 5 min、100%乙醇 5 min、95%乙醇 5 min、90%乙醇 5 min、80%乙醇 5 min、70%乙醇 5 min、蒸馏水 5 min。

(3) 30% H₂O₂ 1 份+甲醇溶液 9 份混合，室温 30 min 避光浸泡以灭活内源性酶。蒸馏水洗 3 次，每次 5 min。

(4) 将切片浸入 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液 (pH 6.0)，电炉或微波炉高火加热至沸腾后断电，间隔 3 min 后，低火 20 min。冷却后 PBS (pH 7.2-7.4) 洗涤 3 次，每次 5 min。

(5) 滴加 5% BSA 封闭液，室温 20 min。甩去多余液体，不洗。

(6) 滴加适当稀释的一抗，4°C过夜。PBS 洗 3 次，每次 2 min。

(7) 滴加生物素化山羊抗小鼠 IgG，37°C 20 min。PBS 洗 3 次，每次 2 min。

(8) 滴加试剂 SABC，37°C 30 min。PBS 洗 4 次，每次 5 min。

(9) DAB 显色：使用 DAB 显色试剂盒。取 1 mL 蒸馏水，加试剂盒中 A，B，C 试剂各 1 滴，混匀后加至切片。室温显色，镜下控制反应时间，一般在 10 min 以内。

(10) 苏木素轻度复染。脱水，透明：70%乙醇 5 min、80%乙醇 5 min、90%乙醇 5 min、95%乙醇 5 min、95%乙醇 5 min、100%乙醇 5 min、100%乙醇 5 min、100%乙醇 5 min、二甲苯 10min、二甲苯 10 min。

(11) 中性树胶封片。

(12) 37°C烤片，过夜。

(13) 显微镜观察。

3.2.5 PRRSV-1 N 蛋白的原核表达和真核表达

3.2.5.1 引物设计

根据本研究获得的 PRRSV-1 分离株全基因组序列，设计 3 对扩增 PRRSV-1 N 基因的引物（表 3-10），由生工生物工程（上海）有限公司合成引物序列。

表 3-10 PRRSV-1 N 基因扩增引物序列

Table. 3-10 Sequence of the primers used for PRRSV-1 N gene amplification

引物名称	引物序列 (5'-3')	长度 (bp)	退火温度 (°C)
pET-N-F	AAGAAGGAGATATACATATGGCCGGTAAGAACCAGAG	442	55
pET-N-R	TCGAGTGC GGCCGCAAGCTTTTAGTGGTGGTGGTGGTGTGGTCTGCACCCTGACCAGC		
pMAL-N-F	CTTTCGTTTTATTTGAAGCTTTTAGTCTGCACCCTGACCAGC	426	55
pMAL-N-R	GAGGGAAGGATTTTCACATATGGCCGGTAAGAACCAGAGC		
pCAGGS-N-F	CCGGAATTCATGGCCGGTAAGAACCAG	406	55
pCAGGS-N-R	CCGCTCGAGTTAGTCTGCACCCTGACC		

3.2.5.2 PRRSV-1 分离株的 N 基因扩增

以 3.2.2.2 获得的 PRRSV-1 分离株 cDNA 为模板，扩增 PRRSV-1 分离株的 N 基因并进行胶回收。具体步骤参考 3.2.3.3。

3.2.5.3 PRRSV-1 N 蛋白原核表达质粒和真核表达质粒的构建

分别吸取一定量的 PCR 回收产物及空载体质粒（用于同源重组法构建质粒的 PCR 回收产物不需要酶切），加入相应的限制性内切酶（pMAL-c5x 和 pET-25b 均选用 *Nde* I 和 *Hind* III 进行双酶切，含 Flag 标签的 pCAGGS 空载体选择 *Eco*R I 和 *Xho* I 进行双酶切）及 10×限制性内切酶反应缓冲液，置 37°C 温箱，酶切 3 h，之后进行产物回收，具体步骤参考 3.2.3.3，双酶切反应体系如下（表 3-11）：

表 3-11 双酶切反应体系

Table. 3-11 Reaction system of double enzyme digestion

成分	含量
限制性内切酶 1	1 μL
限制性内切酶 2	1 μL
质粒/PCR 回收产物	3 μg
10×k Buffer	5.0 μL
ddH ₂ O	至 10 μL

(1) PRRSV-1 N 蛋白原核表达质粒的构建：使用诺唯赞公司的同源重组酶（货号：C115）将回收的 PCR 产物与空载体质粒酶切产物按摩尔比 2:1 的比例进行连接，50°C 连接 30 min，构建 PRRSV-1 N 蛋白原核表达质粒并分别命名为 pMAL-c5x-N 和 pET-25b-N，同源重组反应体系如下（表 3-12）：

表 3-12 同源重组反应体系

Table. 3-12 Reaction system of homologous recombination

成分	含量
2 × ClonExpress Mix	10 μL
载体	0.03 pmol
目的片段	0.06 pmol
ddH ₂ O	至 20 μL

(2) PRRSV-1 N 蛋白真核表达质粒的构建：使用宝生生物公司的 T4 连接酶（货号：2011A）将回收的 PCR 酶切产物与空载体质粒酶切产物按摩尔比 3:1 的比例进行连接，4°C 过夜连接，构建 PRRSV-1 N 蛋白真核表达质粒并命名为 pCAGGS-N，酶连反应体系如下（表 3-13）。

表 3-13 酶连反应体系

Table. 3-13 Reaction system of enzymatic connection

成分	含量
T4 DNA Ligase	1 μL
10×T4 DNA Ligase Buffer	2 μL
载体	0.02 pmol
目的片段	0.06 pmol
ddH ₂ O	至 20 μL

3.2.5.4 连接产物的转化

按照 3.2.3.4 的方法将连接好的原核和真核表达质粒转化至 DH5α 感受态细胞中，并通过菌液 PCR 及测序选择阳性菌液。

3.2.5.5 阳性质粒提取（去内毒素小提）

取阳性菌液 100 μL 接种到 10-15 mL 含相应抗生素的 LB 培养液中，37°C 300 r/min 摇床振荡过夜扩大培养。利用 Omega 公司的去内毒素质粒小量提取试剂盒（货号：D6945）提取质粒。具体步骤如下：

（1）将菌液转入 50 mL 离心管中，5000 r/min 离心 10 min，弃上清，倒置于干净吸水纸，吸干液体。

（2）加入 500 μL Solution I（含 RNase A），涡旋或使用移液枪吹打完全混匀，将重悬的液体转移至 1.5 mL EP 管中。

（3）加入 500 μL Solution II，上下颠倒混匀数次直至液体澄清，静置孵育 2-3 min（不要剧烈混合，防止 DNA 断裂降低质粒纯度，裂解时间不超过 5 min），Solution II 不使用时要盖紧防止空气中的 CO_2 酸化试剂。

（4）加入 250 μL 预冷的 N3 Buffer，迅速颠倒混匀，出现白色絮状沉淀，13000 r/min 常温离心 10 min 以上，可以见到管底有白色沉淀（如离心后上清中仍有白色絮状沉淀，再次离心），立即进行下一步实验。

（5）吸取上清，转移至新的 1.5 mL EP 管中，估算其体积，加入 0.1 倍的 ETR Buffer，上下颠倒 1 次混匀。

（6）冰上孵育 10 min，期间颠倒数次（冰浴结束后，液体变澄清），42°C 水浴 5 min，液体再次变浑浊。

（7）12000 r/min 常温离心 3 min，ETR 在底部呈现蓝色，将上清转移到新的 2 mL EP 管中，加入 0.5 倍体积的无水乙醇，颠倒混匀，常温静置 1-2 min。

（8）将 MINI II 柱子放进 2 mL 收集管中，加入 GPS 过柱子，12000 r/min 离心 30-60 sec，弃掉液体。加入第七步骤中的液体，12000 r/min 离心 30-60 sec，弃掉液体。

（9）加入 500 μL HBC Buffer，离心，弃掉液体。

（10）加入 700 μL DNA Wash Buffer，离心，弃掉液体，重复洗 1 次。

（11）空甩 2 min，转移至干净的 1.5 mL EP 管中，烘干加入 80-100 μL 的 Elution Buffer，常温静置 2 min，12000 r/min 离心 1 min，得到质粒，于 -20°C 保存。

3.2.5.6 PRRSV-1 N 蛋白原核表达形式的确定

(1) 将 3.2.5.5 获得的原核表达质粒 pMAL-c5x-N 和 pET-25b-N 分别转化至 *E.coli* BL21 (DE3) 中, 涂至含 Amp 抗性的平板, 37°C 倒置培养 12-18 h, 挑单菌落扩大培养, 菌液中加入 20% (V/V) 的甘油于 -20°C 保存。

(2) 将保存的菌液:氨苄青霉素:LB 液体培养基按照 1:1:1000 的比例进行菌液复苏, 37°C 振荡培养过夜。

(3) 将复苏的菌液:氨苄青霉素:LB 液体培养基按照 10:1:1000 的比例进行振荡培养, 当菌液 OD₆₀₀ 达到 0.4-0.6 时, 加入终浓度为 1 mmol/L 的异丙基硫代-β-D-半乳糖苷 (IPTG) 进行诱导表达, 分别于 18°C 和 37°C 下过夜培养。收集诱导前后的菌液 12000 r/min 离心 10 min, 用 PBS 重悬, 将重悬的菌液经高压细胞破碎仪破碎, 12000 r/min 离心 10 min, 分别取上清和沉淀制备样品, 进行 SDS-PAGE 检测, 确定蛋白最佳表达温度和表达形式。

3.2.5.7 pMAL-c5x-N 的大量表达及纯化

(1) 确定 37°C 时 pMAL-c5x-N 在 *E.coli* BL21 (DE3) 中诱导以可溶性形式表达后, 诱导 1 L 菌液, 8000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 用 PBS 重悬沉淀并进行超声破碎后 8000 r/min 离心 10 min, 收集上清液即为可溶性蛋白。

(2) 通过与目的蛋白融合表达的 MBP 标签进行亲和纯化, 可获得较纯的目的蛋白, 操作步骤如下: 将 Dextrin Beads 6FF 填入重力柱, 再使用 10 倍柱体积的 PBS 平衡重力柱。将收集的上清使用 0.45 μm 滤器过滤后加入平衡好的 Dextrin Beads 6FF 重力柱中, 收集流穿液, 重复上样 1 次。使用 10 倍柱体积的 PBS 进行清洗, 去除非特异性吸附的杂质。使用 5 倍柱体积的含 10 mmol/L 麦芽糖的 PBS 进行洗脱, 收集洗脱液。最后使用 5 倍柱体积的 PBS 平衡填料, 10 倍柱体积去离子水清洗填料, 封存于 20% 乙醇中, 置于 4°C 保存。

(3) 收集各管洗脱产物, 测定各管蛋白浓度, 同时制备样品进行 SDS-PAGE 检测。调整蛋白浓度为 1 mg/mL 后, 以 4°C 12000 r/min 离心 30 min, 收集上清即为 pMAL-c5x-N 表达的 N 蛋白, 将蛋白分装并保存于 -80°C 备用。

3.2.5.8 pET-25b-N 的大量表达及纯化

(1) 确定 37°C 时 pET-25b-N 在 *E.coli* BL21 (DE3) 中以包涵体形式表达后, 诱导 1 L 菌液, 8000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 用 PBS 重悬沉淀并进行超声破碎

后 8000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 重复洗涤菌体 2 次。然后用 200 mL PBS 将沉淀重悬, 用高压细胞破碎仪破碎。破碎后的菌液 4°C 12000 r/min 离心 20 min, 弃上清, 获得的沉淀即为包涵体。

(2) 使用 3 种包涵体洗涤液依次对包涵体沉淀进行洗涤, 每次 5 min, 洗涤后 4°C 12000 r/min 离心 20 min, 弃上清。

(3) 加入 50 mL 包涵体溶解液对包涵体进行溶解, 重悬包涵体沉淀后剧烈振荡使其溶解。

(4) 通过与目的蛋白融合表达的 His 标签进行亲和纯化, 可获得较纯的目的蛋白, 操作步骤如下: 先将包涵体溶液 4°C 12000 r/min 离心 30 min, 收集上清后使用 0.45 μm 滤器过滤。将 Ni Focurose 6FF 填入重力柱, 再使用 10 倍柱体积的包涵体溶解液平衡重力柱。将处理好的样品加入平衡好的 Ni Focurose 6FF 重力柱中, 收集流穿液, 重复上样 1 次。使用 10 倍柱体积的包涵体洗杂液进行清洗, 去除非特异性吸附的杂质。使用 5 倍柱体积的包涵体洗脱液进行洗脱, 收集洗脱液。最后使用 5 倍柱体积包涵体溶解液平衡填料, 10 倍柱体积去离子水清洗填料, 封存于 20%乙醇中, 置于 4°C 保存。

(5) 收集各管洗脱产物, 测定各管蛋白浓度, 同时制备样品进行 SDS-PAGE 检测。调整蛋白浓度为 1 mg/mL 后, 置于 4°C 透析复性液中缓慢复性, 每 8h 更换 1 次透析液, 共透析复性 24 h。复性结束后使用 PBS 溶液对蛋白再次进行透析, 每 8h 更换 1 次透析液, 共透析脱盐 24 h。2 次透析结束后, 以 4°C 12000 r/min 离心 30 min, 收集上清即为 pET-25b-N 表达的 N 蛋白, 将蛋白分装并保存于 -80°C 备用。

3.2.5.9 PRRSV-1 N 蛋白的真核表达

使用脂质体转染试剂盒 jetPRIME 进行转染, 转染流程参考其说明书, 具体操作步骤如下:

(1) 转染前 1 d 将形态良好、生长旺盛的 HEK-293T 细胞接入 24 孔细胞培养板, 待细胞长至 80% 单层准备转染。

(2) 取 1 个 1.5 mL 无菌 EP 管, 分别加入 50 μL jetPRIME buffer 和 0.5 μg 目的质粒 (3.2.5.5 获得的 pCAGGS -N), 同时转染 pCAGGS 空载体作为阴性对照, 涡旋混匀, 随后向该管加入 1 μL jetPRIME reagent, 混匀后于室温静置 10 min。

(3) 静置期间, 弃去待转染细胞孔的培养基, 用细胞维持液洗 2 遍, 每孔加入 450 mL 细胞维持液, 将 EP 管中的 50 μ L 混合液轻轻滴加到细胞培养板中, 轻轻摇匀, 然后将细胞板置于 37°C 含 5% CO₂ 培养箱中培养, 进行蛋白表达。

3.2.6 SDS-PAGE 和 Western Blot 验证 PRRSV-1 N 蛋白

(1) 样品制备: 取 80 μ L 样品与 20 μ L 5×Loading Buffer 混匀后于沸水中煮样 10 min, 冰浴后 12000 r/min 离心 5 min, 暂存 -20°C 备用。

(2) SDS-PAGE 电泳检测: 将根据实验室常规方法制备 12.5% PAGE 凝胶; 架好制胶玻璃板, 将充分混合的下层胶迅速灌入 2 块玻璃板之间缝隙中 (尽可能避免产生气泡), 37°C 静置 15 min, 待下层胶凝固后弃灌注配制好的上层胶并迅速插入梳子, 37°C 静置 10 min; 待胶完全凝固后将胶板转移到电泳槽中, 随后向电泳槽内槽中加满 1×SDS-PAGE 电泳缓冲液, 小心移除梳子并用注射器清洗胶孔中的残存胶; 取出处理好的 PAGE 样品进行上样, 20 μ L/孔, 并补足电泳槽中所需的 1×SDS-PAGE 电泳缓冲液, 固定电泳装置, 接通电源, 电泳条件为 80 V 电泳 20 min, 120 V 电泳将近 2 h。当看到溴酚蓝指示剂跑至距离胶底部 0.5 cm 处结束电泳, 拆卸胶板, 蛋白胶用于考马斯亮兰染色或转膜。

(3) 蛋白转印: 按照胶的大小裁剪相同尺寸的 PVDF 膜和滤纸。将电泳完成的 SDS-PAGE 胶小心取出, 与滤纸共同放入转膜液中浸泡备用, 将 PVDF 膜放入甲醇中活化 5 min。进行电转的各层物质顺序从负极到正极依次为: 滤纸→SDS-PAGE 胶→PVDF 膜→滤纸, 放置过程要避免各层之间出现气泡, 电压设置 50 V, 转印 2 h, 电转过程中要在电转槽外侧放置冰袋, 保持低温。

(4) PVDF 膜封闭: 电转结束后, 将 PVDF 膜取出, 置于 TBST 中洗涤, 再放于含有 10% (W/V) 脱脂奶粉的 TBST 中, 在摇床上缓慢晃动, 室温封闭 4 h。

(5) 孵育一抗: 将封闭后的 PVDF 膜在 TBST 中洗涤 3 次, 每次 5 min, 加入相应蛋白单克隆抗体, 室温孵育 4 h。

(6) 孵育二抗: 回收抗体, 用 TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min, 加入 1:5000 倍稀释羊抗鼠/兔 IgG-HRP, 放置摇床上低速室温反应 45 min。

(7) 显色: 回收二抗, 洗膜 3 次, 每次 5 min, 将 TBST 液体全部吸出, 加入化学发光底物显色液, 在化学发光成像系统中观察并拍照保存结果。

3.2.7 PRRSV-1 N 蛋白单克隆抗体的制备

3.2.7.1 BALB/c 小鼠的免疫

使用翌圣生物科技（上海）股份有限公司蛋白样品内毒素去除试剂盒（货号：E3224930）去除 pMAL-c5x-N 表达的 N 蛋白中的内毒素，具体操作方法详见说明书。选取 5 只 6-8 周龄、体型适中的健康雌性 BALB/c 小鼠，使用去内毒素后的 N 蛋白进行免疫，通过后腿小腿肌肉注射免疫，具体免疫程序如下：

（1）首次免疫：按 100 μg /只的剂量取适量 pMAL-c5x-N 表达的 N 蛋白与等体积快速免疫佐剂迅速混匀，抽入 1 mL 无菌注射器后尽快对动物进行注射。

（2）二次免疫：首免 14 d 后按照同样的方式稀释蛋白，混匀佐剂进行加强免疫 1 针，每次使用的佐剂和抗原都遵循现配现用原则。第 3 次免疫后，通过断尾采血法，采集微量尾血进行 ELISA 测定，血清抗体效价应该在 1:12800 及以上，当免疫小鼠血清抗体效价未达到细胞融合条件时，进行第 4 次免疫。

（3）加强免疫：当小鼠血清效价抗体达到细胞融合条件时，于融合前 3-5，腹腔注射 pMAL-c5x-N 表达的 N 蛋白（不含佐剂）200 μg /只。

3.2.7.2 抗原的最佳包被浓度与小鼠血清抗体效价测定

通过断尾采血法对免疫小鼠进行血清的收集，采用交叉交叉法进行间接 ELISA 测定抗原的最佳包被浓度，通过间接 ELISA 对免疫小鼠的血清抗体效价进行评估，血清按照 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800, 1:25600, 1:51200 比例稀释；根据血清抗体在 1:12800 稀释度时 OD_{630} 值大于 1 时，判定小鼠达到融合要求；对血清抗体效价达到细胞融合条件的小鼠进行加强免疫，腹腔注射抗原 100 μg /只。

采用交叉交叉法进行间接 ELISA 测定抗原的最佳包被浓度，具体步骤如下：

（1）包被抗原：用包被液将 pET-25b-N 表达的 N 蛋白以 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 稀释，100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ，横向加入酶标板中，4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜；次日，用 PBST 洗涤 3 次，5 min/次。

（2）封闭：加入含 5%（W/V）脱脂奶粉的 PBST 进行封闭，200 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ，37 $^{\circ}\text{C}$ 2 h，PBST 洗涤 3 次，5 min/次。

（3）孵育一抗：免疫小鼠血清作为一抗，按照 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800, 1:25600, 1:51200 稀释，100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ，纵向加入

酶标板，37°C 2 h，PBST 洗涤 3 次，5 min/次。

(4) 孵育二抗：用 PBS 缓冲液将羊抗鼠 IgG-HRP 进行 1:5000 稀释，100 μ L/孔，37°C 2 h，PBST 洗涤 3 次，5 min/次。

(5) 显色：依次加入 TMB 底物显色液 A 和 B (50 μ L/孔)，避光显色 10 min，加入终止液 50 μ L/孔。使用 BioTek 酶标仪 Gen5 软件在 630nm 波长下读取其吸光值。

将测定的数值转换成折线图，分析 OD₆₃₀ 的变化趋势，以血清稀释度对应的 OD₆₃₀ 最大的抗原饱和稀释浓度作为抗原的最佳包被浓度。以确定的抗原最佳包被浓度包被酶标板，按照以上步骤 (2) - (5) 测定 5 只小鼠血清抗体效价。

3.2.7.3 SP2/0 骨髓瘤细胞的复苏及制备

SP2/0 骨髓瘤细胞的复苏：将-80°C冰箱中冻存的 SP2/0 骨髓瘤细胞取出，迅速置于 42°C水浴环境中，快速晃动至完全融化，将融化的细胞悬液吸取至无菌 EP 管中 1000 r/min 离心 10 min，弃掉上清，细胞用完全 RPMI-1640 培养基重悬接入细胞培养瓶，5% CO₂，37°C培养箱中培养，隔日观察细胞状态。若部分细胞有漂浮或形态异常，可轻轻吸弃上层培养基，更换新鲜培养基，使已经贴壁的细胞逐渐分裂生长；若细胞圆形透亮，并且轻微贴壁生长，则状态良好，根据细胞生长状况进行传代扩大。

细胞融合对 SP2/0 骨髓瘤细胞活性要求很高，而体内环境分裂增殖的 SP2/0 骨髓瘤细胞活性要优于其在体外培养状态，因此一般将其注射到小鼠皮下，使细胞在小鼠体内增殖，然后分离获得瘤细胞；将细胞瓶中培养的细胞轻轻吹起，1000 r/min 离心 10 min，弃去上清，300 μ L 基础 RPMI-1640 培养基重悬 0.5-1 \times 10⁶ 个细胞，颈背部皮下注射 6 周龄的 BALB/c 雌性小鼠。通常注射后 10 d 左右可以观察到肿瘤生长，待长至大小适中且形态完整的瘤子时分离 SP2/0 骨髓瘤细胞，SP2/0 骨髓瘤细胞的分离步骤为：

(1) 保定并麻醉小鼠，眼眶放血后进行脱颈椎处死，浸泡于 75%酒精中进行体表消毒，10 min 后取出。

(2) 在超净工作台中，将小鼠背面朝上固定在解剖板上，利用灭菌眼科剪和眼科镊子剥开皮毛，取下的肿瘤块放入灭菌匀浆器中。

(3) 先加 5 mL 基础 RPMI-1640 培养基, 用研磨棒轻轻研磨, 研磨充分后补加 10 mL 基础 RPMI-1640 培养基混匀, 静置 3 min, 轻轻吸取上层细胞悬液 5 mL 到 50 mL 无菌离心管中, 然后再补加 10 mL 基础 RPMI-1640 培养基 2 次, 每次补加后混匀静置 3 min, 第 1 次吸出 10 mL, 第 2 次全部吸出, 最后 1 次吸取时可适当弃掉底部 3 mL 左右液体, 避免吸取到大的组织块。

(4) 1000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 用 30 mL 基础 1640 培养基重悬细胞。

(5) 向另 1 个 50 mL 无菌离心管中加入 15 mL 淋巴细胞分离液, 将上步中的细胞悬液贴壁缓慢加入淋巴细胞分离液上层 (细胞悬液与淋巴细胞分离液体积比例为 2:1-1:1)。

(6) 1200 r/min 离心 15 min 后, 吸取液面分界线处白色致密的细胞层转移至 50 mL 无菌离心管中, 用基础 RPMI-1640 培养基重悬洗涤 2 次, 最终用 10 mL 基础 RPMI-1640 培养基重悬细胞, 计数后置于 5% CO₂ 37°C 培养箱内备用。

3.2.7.4 饲养细胞的制备

本研究选择 BALB/c 小鼠正常脾细胞作为饲养细胞, 制备过程与免疫脾细胞的制备过程 (3.2.7.5) 相同, 使用的是空白对照小鼠, 收集的血清为阴性对照血清。细胞洗涤离心后用 HAT 培养基重悬, 接种于 96 孔细胞板中备用, 细胞融合前 1 d 制备好饲养细胞, 确认饲养细胞无污染后进行免疫脾细胞的制备。

3.2.7.5 免疫脾细胞的制备

(1) 保定 BALB/c 雌鼠进行麻醉, 捏紧颈背部皮肤, 小鼠眼球突出后使用镊子夹取眼球, 通过眼眶放血后脱颈椎处死, 收集阳性血清, 放置 -20°C 冰箱保存。

(2) 将小鼠浸泡于 75% 酒精中进行体表消毒, 10 min 后取出, 然后在超净工作台中将小鼠左侧卧固定在经杀菌处理的解剖板上, 取 1 套灭菌的剪刀和镊子将皮毛层从腹底部中间位置剪开, 由腹底部往胸腔方向将皮毛层剥开, 仅暴露腹膜层。

(3) 更换 1 套灭菌剪刀和镊子, 为避免剪到腹腔脏器, 左手用镊子向上提取腹膜, 右手用剪刀从小鼠的左下腹部向上再向右剪开腹膜, 将剪开的腹膜翻转固定在解剖板上, 暴露腹腔。

(4) 再次更换 1 套无菌剪刀和镊子, 小心分离脾脏与周围的连接组织, 将脾脏夹出放入灭菌匀浆器中, 研磨操作同 3.2.2.3 中步骤 (3)。

(5) 将细胞悬液 1000 r/min 离心 10 min, 弃去上清, 用 20 mL 基础 RPMI-1640 培养基重悬后进行细胞计数。

3.2.7.6 细胞融合

(1) 取 0.8 mL PEG 1450 融合剂和基础 1640 培养基提前置于 37°C 培养箱预热。

(2) 将 $1-2 \times 10^7$ 个骨髓瘤细胞和 10^8 个免疫脾细胞 (两者比例 1:5-1:10) 充分混匀, 1000 r/min 离心 10 min, 弃掉上清。用无菌滤纸吸净离心管壁上残余的溶液, 以免融合剂的作用浓度受到影响, 轻弹离心管底部使细胞团块松动。

(3) 融合过程在 37°C 水浴中进行, 用 1 mL 无菌吸管吸取已预热的 0.8 mL PEG 1450, 在 1 min 内缓慢加入离心管底部, 一边加一边轻轻搅拌细胞团块, 加完后继续搅拌 30 sec, 静置 30 sec。

(4) 静置过程中融合剂充分作用, 然后缓慢加入已预热的基础 1640 培养基终止融合反应。前 2 min 加入 2 mL, 在第 3-4 min 内加入 3 mL, 在第 5 min 内加入 5 mL, 更换 10 mL 无菌吸管, 最后加入剩余 30 mL。基础 1640 培养基一定要缓慢加入, 不断轻轻的搅拌细胞悬液, 整个操作尽量在 10 min 之内完成。

(5) 1000 r/min 离心 5 min, 弃去上清, 将细胞沉淀于 37°C 温箱放置 5-8 min。

(6) 用提前加入饲养细胞的 HAT 培养基轻轻重悬细胞沉淀, 铺于 96 孔细胞板中培养, 每孔 250 μ L, 置于 5% CO₂ 37°C 培养箱内培养。

(7) 融合后第 3 d 开始观察细胞集落, 第 4 d 吸弃 100 μ L 培养基补加 HT 培养基 100 μ L。第 1 轮筛选前需要连续换液 3-4 次; 如观察发现细胞集落的生长状态差, 应及时采取补救措施, 如: 补加饲养细胞和更换商品化 HT 培养基等。

3.2.7.7 间接酶联免疫吸附试验 (ELISA) 筛选阳性细胞孔

待融合细胞集落长至培养孔底面积的 1/4-1/3、培养基轻微变黄时, 收集各孔培养上清。用包被液将 pET-25b-N 表达的 N 蛋白以测得的最佳包被浓度包被于酶标板, 以杂交瘤细胞培养上清作为一抗进行间接 ELISA 检测, 筛选阳性细胞孔, 具体操作方法参考 3.2.7.2。

3.2.7.8 阳性细胞的亚克隆

亚克隆前按照方法 3.2.7.4 制备饲养细胞，用适量 HT 培养基重悬饲养细胞后，置于 5% CO₂ 37°C 培养箱中备用。采用有限稀释法对筛选到的阳性细胞进行亚克隆，具体步骤如下：

(1) 提前 1 d 取阴性 BALB/c 小鼠脾脏作为饲养细胞，接种于 96 孔板，置于 5% CO₂ 37°C 培养箱中培养。

(2) 在间接 ELISA 检测阳性的细胞孔中，根据细胞集落生长状态和大小等因素挑选需要亚克隆的细胞孔。用移液器轻轻重悬阳性细胞孔中的细胞，取 10 μL 细胞悬液进行 50 倍稀释再计数，按照每 3 mL HT 培养基包含约 100 个细胞的浓度进行稀释，最终每株细胞取 2.4 mL 铺入 96 孔细胞板的 3 列中 (3×8)，100 μL/孔。

(3) 克隆后第 4 d 观察杂交瘤细胞的生长状况，检查是否有污染，并补加 1 滴 HT 培养基。

(4) 克隆后第 7-9 d 细胞集落长到细胞孔 1/3 时，再次进行 ELISA 检测，剔除生长状态不佳和不分泌抗体的细胞株；连续进行 3 次有限稀释法亚克隆，每次挑选状态良好、持续分泌抗体且呈单细胞集落的细胞孔进行后续的亚克隆，最终获得能够稳定分泌针对单一抗原表位抗体的细胞株，及时扩大至 24 孔板培养，进行相关验证后，冻存于液氮罐中。

3.2.7.9 真核表达的 PRRSV-1 N 蛋白验证 PRRSV-1 N 蛋白单克隆抗体

按照 3.2.5.7 所述的方法将 PRRSV-1 N 蛋白真核表达质粒 pCAGGS-N 和空载体 pCAGGS 分别转染至 HEK-293T 细胞中进行表达，转染 24 h 后参考 3.2.2.4 和 3.2.6 所述的方法制备 IFA 样品和 Western Blot 样品，以 3.2.7.8 获得的阳性细胞培养上清作为一抗进行 IFA 和 Western Blot 验证。

3.2.7.10 PRRSV-1 全病毒验证 PRRSV-1 N 蛋白单克隆抗体

将 PRRSV-1 分离株按 0.1 MOI 分别接种至长成单层 PAMs 的 24 孔板，并设置正常细胞孔作为阴性对照，接毒 36h 后参考 3.2.2.4 和 3.2.6 所述的方法制备 IFA 样品和 Western Blot 样品后，以 3.2.7.8 获得的阳性细胞培养上清作为一抗进行 IFA 和 Western Blot 验证。

3.2.7.11 单克隆抗体的亚型鉴定

鼠源抗体的 IgG 亚型分为 IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3，其轻链分为 kappa (κ) 型和 lambda (λ) 型。使用北京博奥龙单抗亚型快速鉴定试剂盒进行单克隆抗体亚型鉴定，具体操作过程参照产品说明书。

3.2.7.12 单克隆抗体的冻存

将鉴定后的阳性单克隆杂交瘤细胞株扩大培养，通过细胞传代、添加生长因子等方法调整细胞状态和生长速度，冻存前，细胞应处于对数生长期。使用基础培养基重悬细胞后通过台盼蓝染色，进行活细胞计数。4°C 1500 r/min 离心 10 min，使用无血清细胞冻存液重悬细胞沉淀，调整浓度为 5×10^5 个/mL，分装后减少在外存放时间，尽快转移至 -80°C 冰箱放置 24 h 后再转移至液氮保存。

3.2.8 单克隆抗体的大量制备及纯化

3.2.8.1 单克隆抗体的大量制备

采用动物体内诱生腹水的方法制备抗体，选择 6-8 周龄的 SPF 级 BALB/c 雌性小鼠，首先按 500 μ L/只腹腔注射弗氏不完全佐剂进行预刺激，7 d 后将扩大培养的杂交瘤细胞用 500 μ L 基础 1640 培养基重悬，按照 5×10^5 个细胞/只，接种于小鼠腹腔。大约 9 d 后可观察到腹部开始膨胀，第 10-14 d 视腹部情况及时采集腹水，对小鼠进行麻醉采集腹水后脱颈椎处死。将收集到的腹水 4000 r/min 离心 10 min，取中间层淡黄色清亮液体分装后于 -80°C 冻存。

3.2.8.2 单克隆抗体的纯化

使用 Protein A+G 对腹水进行纯化，操作步骤如下：

(1) 将 Protein A+G 填料转入重力柱，使用 5 倍柱体积的去离子水冲洗填料，再使用 10 倍柱体积的单抗结合液平衡。

(2) 用单抗结合液将腹水稀释 5-10 倍，控制总体积为 10 mL，12000 r/min 离心 10 min，收集上清，再使用 0.45 μ m 滤器过滤后加入重力柱中，室温摇转孵育 2 h，以提高目的蛋白回收率，收集流出液。用 10-15 倍柱体积的单抗洗杂液进行清洗，去除非特异性吸附的杂蛋白，用 5-10 倍柱体积的单抗洗脱液洗脱，收集洗脱液至含中和缓冲液的 EP 管中，使终 pH 为 7.0。使用 5 倍柱体积的单抗洗脱液和 10 倍柱体积的去离子水依次清洗填料，最后使用 20% 的乙醇封存。

(3) 将洗脱液置于 PBS 中透析，每 8h 更换 1 次透析液，共透析脱盐 24 h，即可得到纯化后的单克隆抗体。

(4) 按照 3.2.6 进行 SDS-PAGE 检测，同时测定单克隆抗体纯化后的浓度并分装保存于-80°C。

3.2.8.3 单克隆抗体效价的测定

首先使用包被液将 pET-25b-N 表达的 N 蛋白按最佳包被浓度包被于酶标板，将纯化前、后的腹水先做 100 倍稀释，再进行连续 2 倍倍比稀释，稀释至 2^{12} ，经间接 ELISA 检测腹水效价，具体操作方法参考 3.2.7.2。纯化后的单克隆抗体按 1:500 稀释后作为 1 抗进行 IFA 和 Western Blot 验证。

3.2.8.4 纯化后单克隆抗体的验证

将 PRRSV-1 分离株、PRRSV-2 NADC30-like HB04 株和 NADC34-like HN08 株按 0.1 MOI 分别接种至长成单层 PAMs 的 24 孔板，并设置正常细胞孔作为阴性对照；PRRSV-1 疫苗株 Amervac、PRRSV-2 经典毒株 CH-1a 株和高致病性毒株 WUH-3 株按 0.1 MOI 分别接种至长成单层 MARC-145 细胞的 24 孔板，并设置正常细胞孔作为阴性对照。接毒 36h 后参考 3.2.2.4 和 3.2.6 所述的方法制备 IFA 样品和 Western Blot 样品并进行验证。

3.2.8.5 纯化后单克隆抗体的特异性验证

对实验室保存的 TGEV WH-1 株、PEDV AJ1102 株、PDCoV DHeB1 株、PoRV RheN2 株、PRV Ea 株按 3.2.6 所述的方法制备 Western Blot 样品并进行验证。

3.2.9 统计学方法

本研究试验数据分析方法采用双样本等方差 t 检验进行， $p < 0.05$ 表明实验结果有显著性；“*”代表 $p < 0.05$ ，“**”代表 $p < 0.01$ ，“***”代表 $p < 0.001$ 。

第 4 章 结果与分析

4.1 临床样品的检测

本研究利用特异性扩增 PRRSV-1 N 基因的引物对 836 份采集自我国华东、华南、华中、西南、西北和东北地区各省猪场送检的疑似 PRRSV 感染临床病料进行 RT-PCR 检测，检测结果显示有 30 份样品为 PRRSV-1 阳性，阳性率为 3.59%。对 30 份 PRRSV-1 阳性样品进一步进行了 PRRSV-2 的 RT-PCR 检测，结果有 11 份为 PRRSV-2 阳性，说明临床上存在 PRRSV-1 与 PRRSV-2 混合感染的现象，且比较普遍。部分临床样品的检测结果如图 4-1 所示。

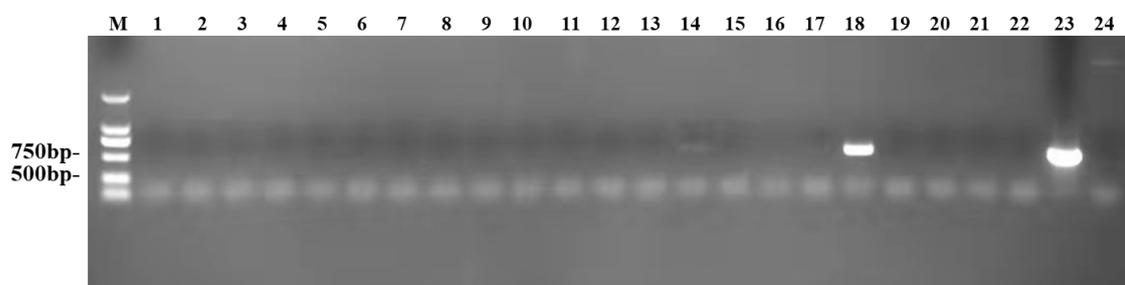


图4-1 部分临床样品PRRSV-1 N基因扩增结果

Fig. 4-1 Amplification results of PRRSV-1 N gene in clinical samples

M: DL2000 DNA Marker; 1-21: 部分临床样品检测结果;

22: 阴性对照; 23: PRRSV-1 阳性对照; 24: PRRSV-2 对照

4.2 PRRSV-1 的分离鉴定

4.2.1 PRRSV-1 的分离

将 30 份 PRRSV-1 阳性样品中 PRRSV-1 单独感染的样品处理后接种 PAMs 进行病毒分离，结果有 2 份来自广州和 1 份来自云南的样品在 PAMs 上传至第 3 代即出现了明显的细胞病变（CPE），主要表现为细胞皱缩、破碎、脱落等，而对照细胞正常（图 4-2）。取在 PAMs 上的第 3 代培养物分别接种至 MARC-145 细胞并连续培养 3 代，结果均未出现明显 CPE。通过 RT-PCR 对 PAMs 上的第 3 代细胞培养物和 MARC-145 细胞上的第 1-3 代细胞培养物进行检测。结果显示，3 株 PRRSV-1 分离株在 PAMs 上的第 3 代细胞培养物和 MARC-145 细胞上的第 1 代细胞培养物均

获得大小为 580bp 的 PRRSV-1 N 基因片段，在 MARC-145 细胞上的第 2-3 代细胞培养物及阴性对照均未见特异性扩增条带（图 4-3），说明分离的 3 株病毒为 PRRSV-1 且可在 PAMs 上稳定增殖，但不能适应 MARC-145 细胞培养。于是将 3 株病毒分别命名为 PRRSV-1 RGZ01、RGZ02 和 RYN01。

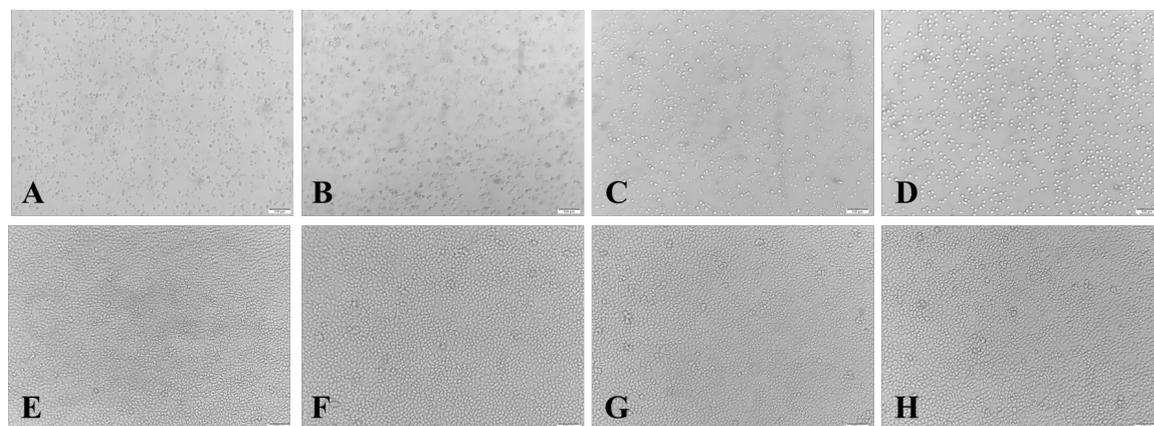


图4-2 PRRSV-1分离毒株感染的PAMs和MARC-145细胞

Fig. 4-2 PAMs and MARC-145 infected with PRRSV-1 isolates

A-C: 第3代RGZ01、RGZ02、RYN01感染的PAMs；D: PAMs对照；

E-F: 第3代RGZ01、RGZ02、RYN01感染的MARC-145；H: MARC-145对照

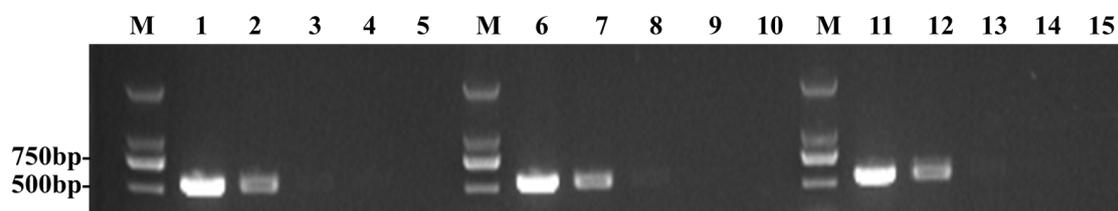


图4-3 RT-PCR检测PRRSV-1分离株N基因

Fig. 4-3 Detection of PRRSV-1 N gene of isolates via RT-PCR

M: DL2000 DNA Marker；1、6、11: PAMs 培养的第 3 代 RGZ01、RGZ02、RYN01；

2-4: MARC-145细胞培养的第1-3代RGZ01；7-9: MARC-145细胞培养的第1-3代RGZ02；

12-14: MARC-145细胞培养的第1-3代RYN01；5、10、15: MARC-145对照

4.2.2 PRRSV-1 分离株的透射电镜观察

电镜观察是确定病毒颗粒的金标准，为进一步对分离的病毒进行鉴定，对 3 株 PRRSV-1 分离株进行超滤浓缩、纯化及负染后使用透射电镜进行观察。结果显示，在透射电镜下可观察到直径在 50-70nm 之间的球形病毒粒子，与 PRRSV 病毒粒子的特征一致（图 4-4），进一步证实分离的病毒为 PRRSV-1。

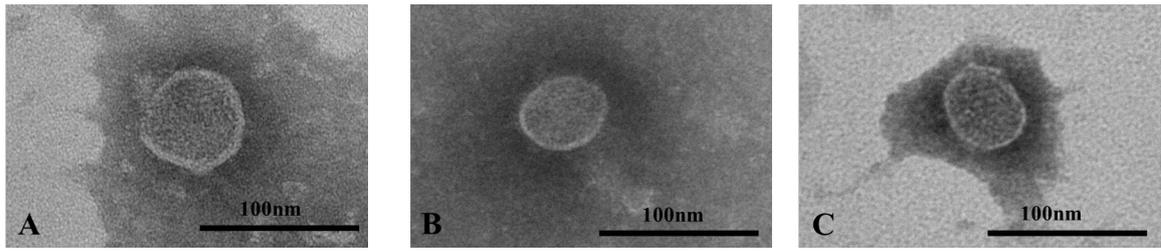


图4-4 PRRSV-1分离株电镜观察结果

Fig. 4-4 Election micrograph of PRRSV-1 isolates

A: RGZ01; B: RGZ02; C: RYN01

4.2.3 PRRSV-1 分离株的间接免疫荧光鉴定

研究证实 PRRSV-1 和 PRRSV-2 存在共有表位(Wootton et al 2001)。将 PRRSV-1 RGZ01 株与 PRRSV-2 WUH-3 株按 0.1 MOI 分别接种 PAMs，以本实验室制备的针对 PRRSV-2 各蛋白的单克隆抗体为一抗进行 IFA 检测，结果显示，PRRSV-2 WUH-3 株感染的 PAMs 有特异性绿色荧光出现，而 RGZ01 感染的 PAMs 无荧光反应（图 4-5）。说明本实验室制备的 PRRSV-2 单克隆抗体不能识别 PRRSV-1。因此，有必要针对 PRRSV-1 开展单克隆抗体的制备。

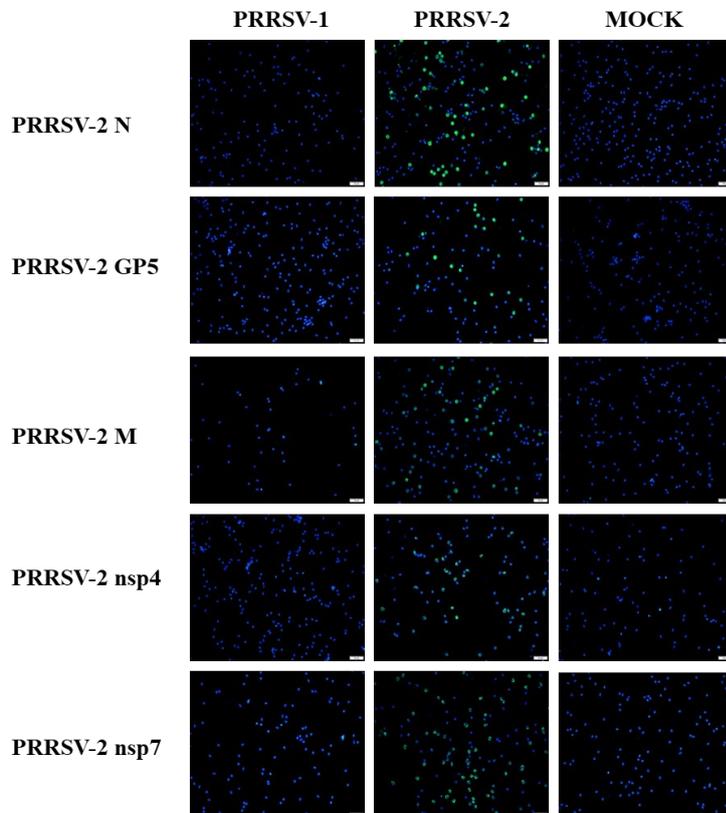


图4-5 PRRSV-2单克隆抗体不能与PRRSV-1发生特异性反应

Fig. 4-5 The monoclonal antibody against PRRSV-2 cannot react specifically with PRRSV-1

4.3 PRRSV-1 N 蛋白单克隆抗体的制备

4.3.1 RRSV-1 N 蛋白原核表达质粒的构建

以 PRRSV-1 RGZ01 株 cDNA 为模板，扩增获得带有 pMAL-c5x 或 pET-25b 同源臂的 PRRSV-1 N 基因，琼脂糖凝胶电泳结果显示：获得了大小与预期相符特异性片段（440 bp）（图 4-6）。通过同源重组法构建原核表达质粒 pMAL-c5x-N 和 pET-25b-N，转化 *E.coli* DH5 α 后挑单菌落进行扩大培养。提取质粒并进行测序鉴定，获得了序列正确的原核表达质粒。

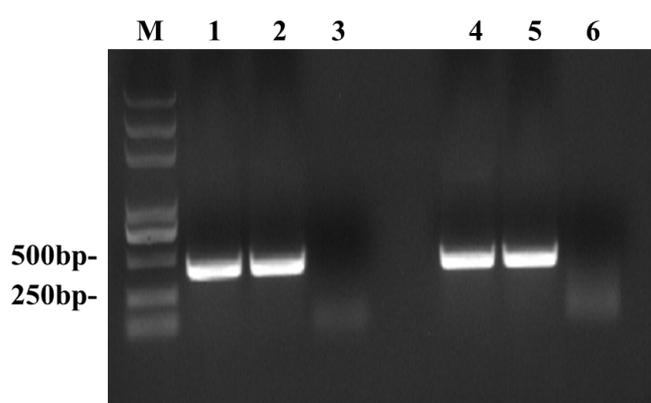


图 4-6 PRRSV-1 N 基因的扩增

Fig. 4-6 Amplification of PRRSV-1 N gene

M: DL5000 DNA Marker; 1-2: 带 pMAL-c5x 同源臂的 N 基因;

4-5: 带 pET-25b 同源臂的 N 基因; 3、6: 阴性对照

4.3.2 PRRSV-1 N 蛋白原核表达形式的确定

将 pMAL-c5x-N 和 pET-25b-N 分别转化 *E.coli* BL21 (DE3)，挑单菌落扩大培养后加入 IPTG，于 18°C 和 37°C 下过夜诱导表达，收集菌体制样后进行 SDS-PAGE 检测。结果显示，pMAL-c5x-N 在 2 种温度下均以可溶性形式表达 N 蛋白（约 57 kDa），但在 37°C 下的表达量更高（图 4-7 A）；pET-25b-N 在 18°C 下以可溶性形式表达 N 蛋白（约 16 kDa），在 37°C 下以包涵体形式表达 N 蛋白且表达量更高（图 4-7 B）。

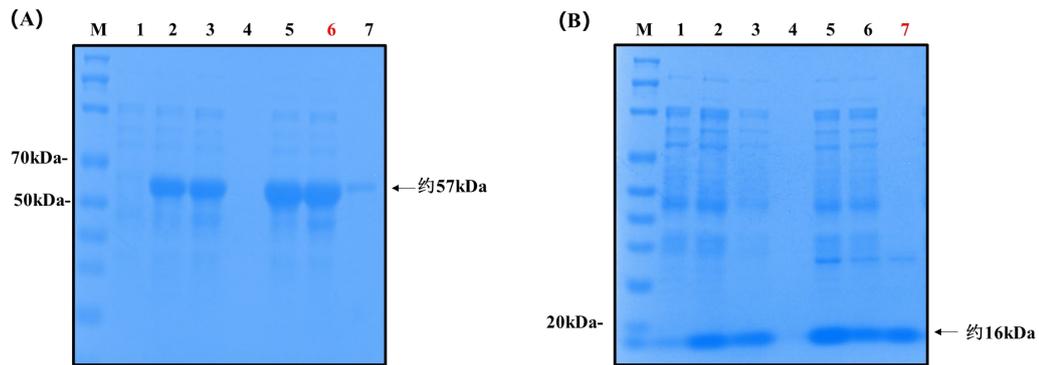


图 4-7 SDS-PAGE 检测 PRRSV-1 N 蛋白的表达形式

Fig. 4-7 Identification of PRRSV-1 N proteins expression forms via SDS-PAGE

(A): pMAL-c5x-N 表达的 N 蛋白; (B): pET-25b-N 表达的 N 蛋白

M: Protein Marker; 1: 未诱导的全菌;

2: 18°C 过夜诱导的全菌; 3: 18°C 诱导全菌破碎后的上清; 4: 18°C 诱导全菌破碎后的沉淀;

5: 37°C 过夜诱导的全菌; 6: 37°C 诱导全菌破碎后的上清; 7: 37°C 诱导全菌破碎后的沉淀

4.3.3 PRRSV-1 N 原核表达蛋白的纯化及验证

根据确定的表达条件大量诱导表达 PRRSV-1 N 蛋白，并对表达的蛋白进行纯化，SDS-PAGE 检测结果表明获得了纯度较高的 2 种 PRRSV-1 N 原核表达蛋白（图 4-8）。以抗 His 标签蛋白和 MBP 标签蛋白的单克隆抗体分别作为一抗对纯化后的蛋白进行 Western Blot 验证，结果可观察到与预期大小一致的特异性反应条带（图 4-9），进一步说明 2 种质粒均能正确表达 PRRSV-1 N 蛋白。

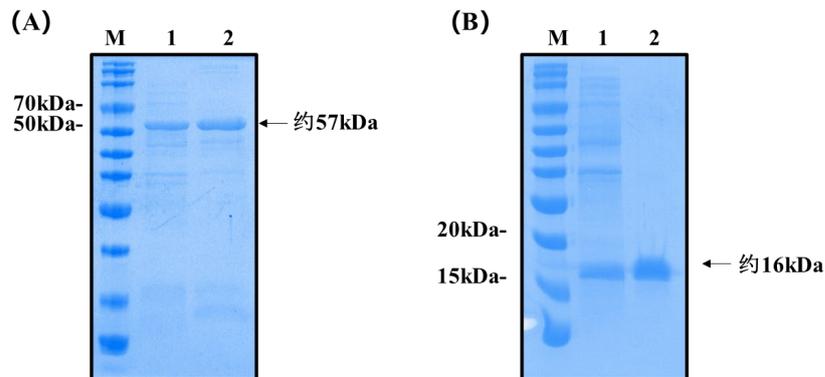


图 4-8 SDS-PAGE 检测 PRRSV-1 N 蛋白的纯化的结果

Fig. 4-8 Detection of PRRSV-1 N proteins purification via SDS-PAGE

(A): pMAL-c5x-N 表达的 N 蛋白; (B): pET-25b-N 表达的 N 蛋白

M: Protein Marker; 1: 纯化前的 PRRSV-1 N 蛋白; 2: 纯化后的 PRRSV-1 N 蛋白

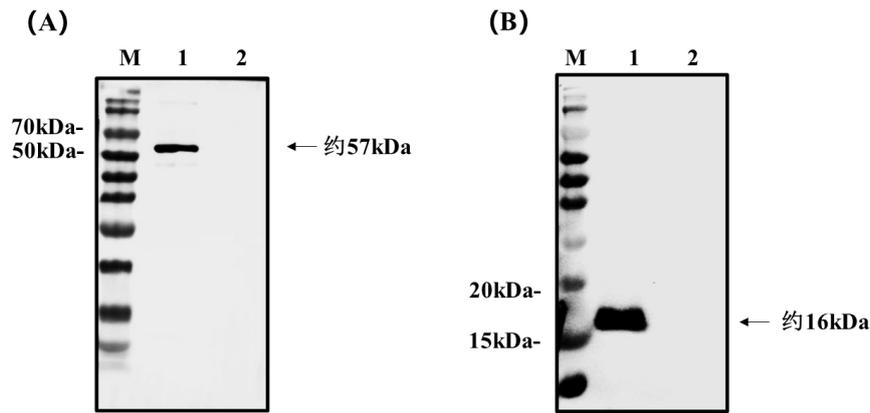


图 4-9 Western Blot 验证 PRRSV-1 N 蛋白

Fig. 4-9 Verification of PRRSV-1 N protein via Western Blot

(A): pMAL-c5x-N 表达的 N 蛋白; (B): pET-25b-N 表达的 N 蛋白

M: Protein Marker; 1: 纯化后的 PRRSV-1 N 蛋白; 2: 空载体

4.3.4 PRRSV-1 N 蛋白的真核表达及验证

以 PRRSV-1 RGZ01 株 cDNA 为模板扩增 PRRSV-1 N 基因 (图 4-10), 使用 *EcoR* I 和 *Xho* I 限制性内切酶将 PCR 产物与含 Flag 标签的 pCAGGS 空载体连接, 转化 *E.coli* DH5 α 后挑单菌落扩大培养, 提取质粒并测序进行鉴定, 获得序列正确的真核表达质粒 pCAGGS-N 并将其转染 HEK-293T 细胞, 同时转染 pCAGGS 空载体作为阴性对照, 转染 24 h 后收集细胞样品, 以抗 Flag 标签蛋白的单克隆抗体作为一抗进行 Western Blot 检测, 结果出现了与预期大小一致的特异性反应条带 (约 16kDa) (图 4-11), 说明 PRRSV-1 N 基因在 HEK293T 细胞中正确表达。

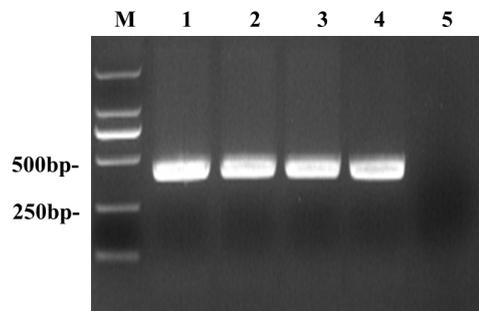


图 4-10 PRRSV-1 N 基因的扩增

Fig. 4-10 Amplification of PRRSV-1 N gene

M: DL2000 DNA Marker; 1-4: PRRSV-1 N 基因; 5: 阴性对照

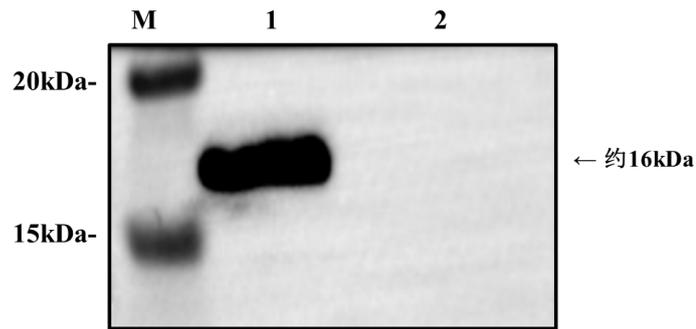


图 4-11 Western Blot 验证真核表达的 PRRSV-1 N 蛋白

Fig. 4-11 Verification of eukaryotic expression of PRRSV-1 N protein via Western Blot

M: Protein Marker; 1: pCAGGS-N 表达的 PRRSV-1 N 蛋白; 2: pCAGGS 空载体

4.3.5 小鼠的免疫与抗体效价测定

以 pET-25b-N 表达的 N 蛋白作为抗原进行包被建立间接 ELISA 检测方法，方阵滴定法确定抗原的最佳包被浓度为 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ (图 4-12)。用 pMAL-c5x-N 表达的 N 蛋白免疫小鼠，经 3 次免疫后采集血液并分离血清，通过间接 ELISA 测定免疫小鼠血清中的抗体效价。结果显示 5 只小鼠的抗体效价均达到 1:12800，符合细胞融合的要求 (图 4-13)。

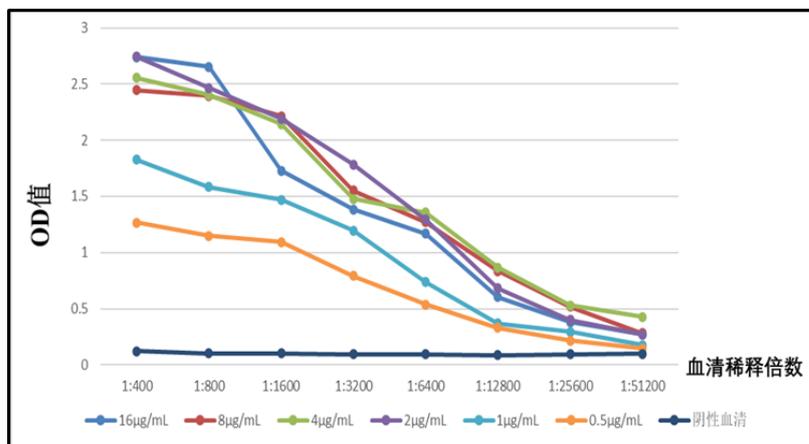


图 4-12 最佳包被浓度测定

Fig. 4-12 Determination of optimum coating concentration

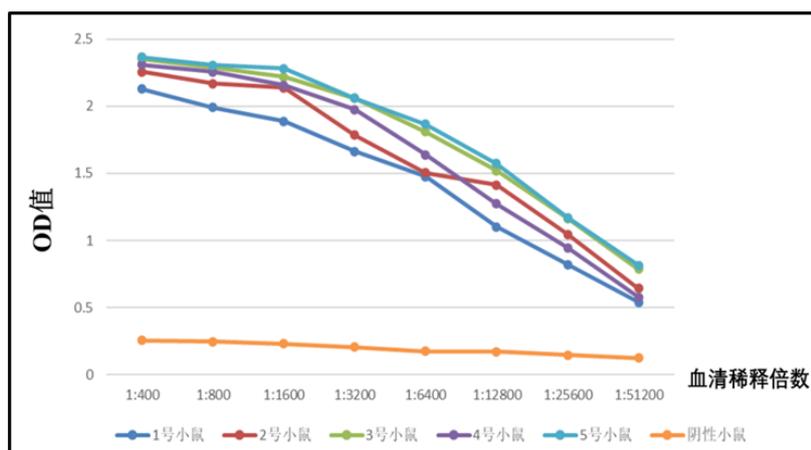


图 4-13 PRRSV N 蛋白免疫小鼠血清抗体效价的检测

Fig. 4-13 Detection of antibody titers in mice immunized with PRRSV-1 N protein

4.3.6 PRRSV N 蛋白阳性杂交瘤细胞株的筛选

选择符合细胞融合要求的小鼠进行加强免疫并加强免疫后 3-5 d 内进行免细胞融合试验，待培养 10-14 d 后，收集细胞上清作为一抗，通过间接 ELISA 筛选阳性细胞，连续进行 3 次亚克隆后共获得 8 株可分泌 PRRSV-1 N 蛋白单克隆抗体的阳性细胞株，将其命名为：N1A7、N1A8、N1H4、N3F11、N4G12、N7H10、N8G10 和 N9G1。

4.3.7 单克隆抗体与真核表达的 PRRSV-1 N 蛋白反应的验证

以 8 株阳性细胞上清作为一抗，通过 IFA 和 Western Blot 验证单克隆抗体与真核表达的 PRRSV-1 N 蛋白的反应。IFA 结果显示，8 株阳性杂交瘤细胞培养上清均可与转染了 pCAGGS-N 的细胞产生特异性荧光反应，与阴性对照无反应（图 4-14）；Western Blot 结果显示，8 株阳性杂交瘤细胞培养上清均可与真核表达的 PRRSV-1 N 蛋白产生特异性条带，与阴性对照无反应（图 4-15）。表明 8 株阳性杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体均能特异性识别真核表达的 PRRSV-1 N 蛋白。

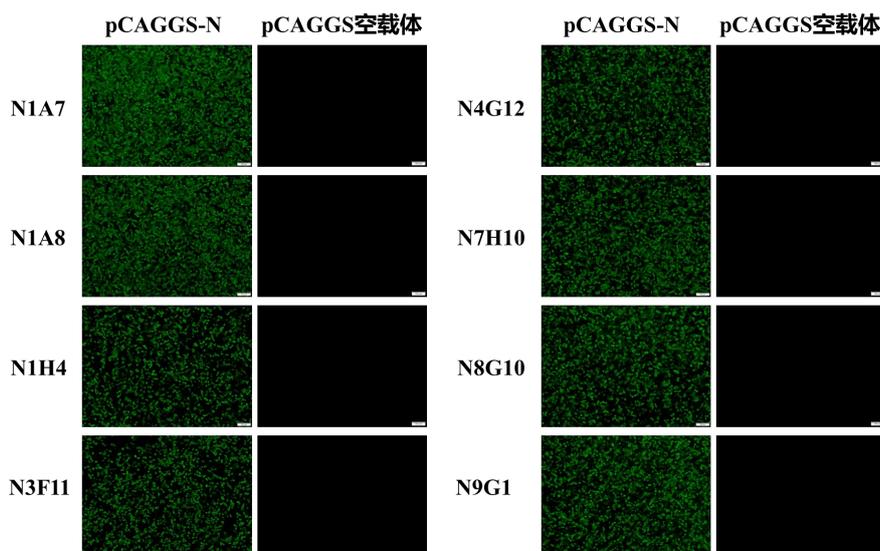


图 4-14 IFA 验证单克隆抗体识别真核表达的 PRRSV-1 N 蛋白

Fig. 4-14 Verification of mAbs against PRRSV-1 N eukaryotic protein via IFA

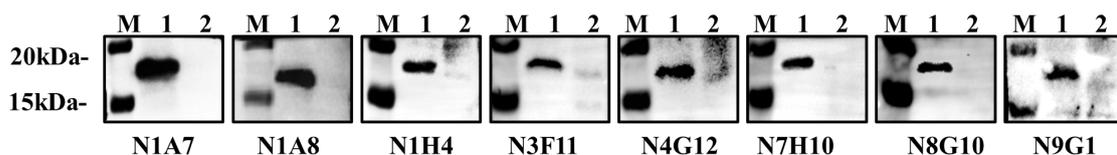


图 4-15 Western Blot 验证单克隆抗体识别真核表达的 PRRSV-1 N 蛋白

Fig. 4-15 Verification of mAbs against PRRSV-1 N eukaryotic protein via Western Blot

M: Protein Marker; 1: pCAGGS-N 表达的 PRRSV-1 N 蛋白; 2: pCAGGS 空载体

4.3.8 单克隆抗体与 PRRSV-1 全病毒反应的验证

将 PRRSV-1 分离株 RGZ01、RGZ02、RYN01 株按 0.1 MOI 分别接种 24 孔板中的 PAMs，并设置正常细胞孔作为阴性对照，接毒 36 h 后收集样品，以 8 株阳性细胞上清作为一抗，通过 IFA 和 Western Blot 验证单克隆抗体与真核表达的 PRRSV-1 N 全病毒的反应。结果显示，8 株阳性细胞分泌的单克隆抗体均可通过 IFA 特异性识别感染了 PRRSV-1 的 PAMs（图 4-16），但只有 N1A7 株和 N1A8 株单克隆抗体可通过 Western Blot 特异性识别 PRRSV-1 全病毒（图 4-17）。8 株单克隆抗体与阴性对照均无反应。

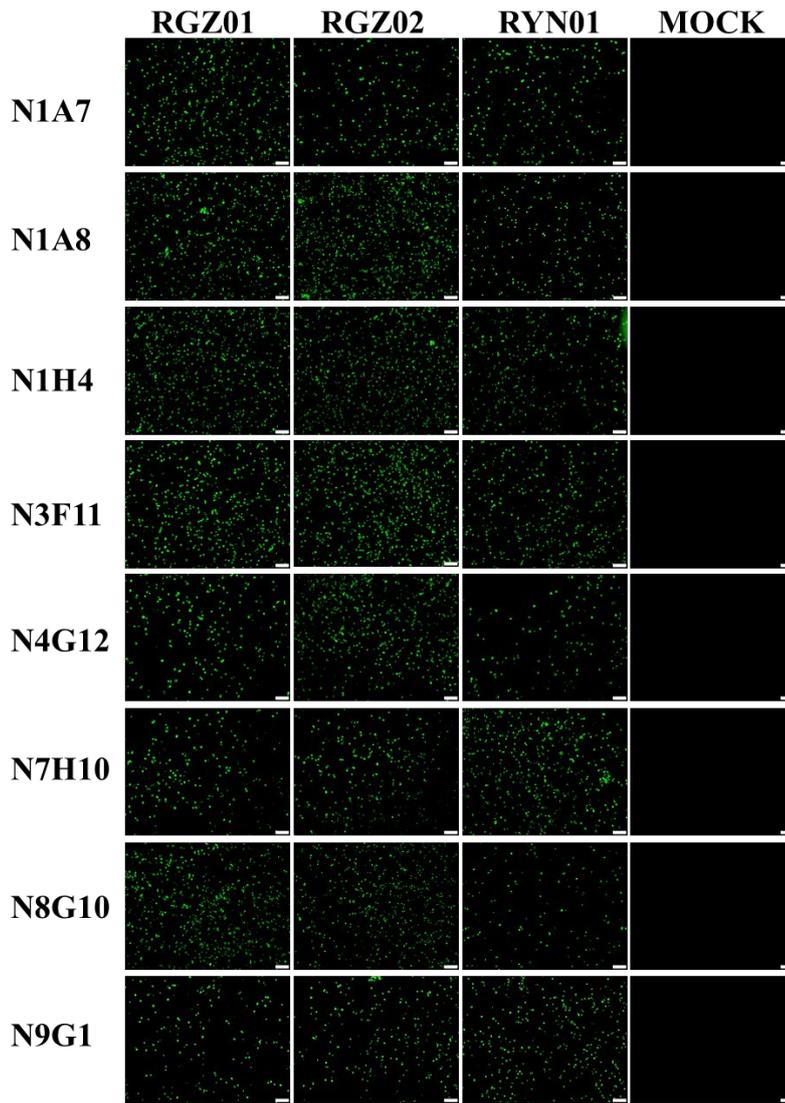


图 4-16 IFA 验证单克隆抗体识别 PRRSV-1 全病毒

Fig. 4-16 Verification of mAbs against PRRSV-1 via IFA

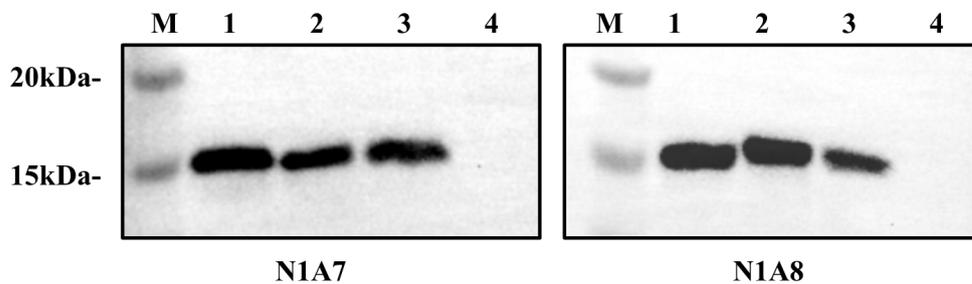


图 4-17 Western Blot 验证单克隆抗体识别 PRRSV-1 全病毒

Fig. 4-17 Verification of mAbs against PRRSV-1 via Western Blot

M: Protein Marker; 1: RGZ01; 2: RGZ02; 3: RYN01; 4: PAMs 对照

4.3.9 PRRSV-1 N 蛋白单克隆抗体的亚型鉴定

单克隆抗体的亚型鉴定结果显示 8 株单抗的重链均为 IgG1 亚型，轻链均为 κ 亚型（表 4-1）。

表 4-1 单克隆抗体的亚型鉴定

Table. 4-1 Identification subtypes of mAbs

杂交瘤细胞株名称	重链亚型	轻链亚型
N1A7	IgG1	κ
N1A8	IgG1	κ
N1H4	IgG1	κ
N3F11	IgG1	κ
N4G2	IgG1	κ
N7H10	IgG1	κ
N8G10	IgG1	κ
N9G1	IgG1	κ

4.3.10 PRRSV-1 N 蛋白单克隆抗体的大量制备与纯化

由于只有 N1A7 和 N1A8 株杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体可分别通过 IFA 和 Western Blot 检测 PRRSV-1 全病毒，因此制备这 2 株单克隆抗体的腹水型抗体。利用 Protein A+G 亲和纯化法对腹水进行纯化后通过 SDS-PAGE 验证纯化效果。结果表明获得了纯度较高的腹水型单克隆抗体 N1A7 和 N1A8（图 4-18）。

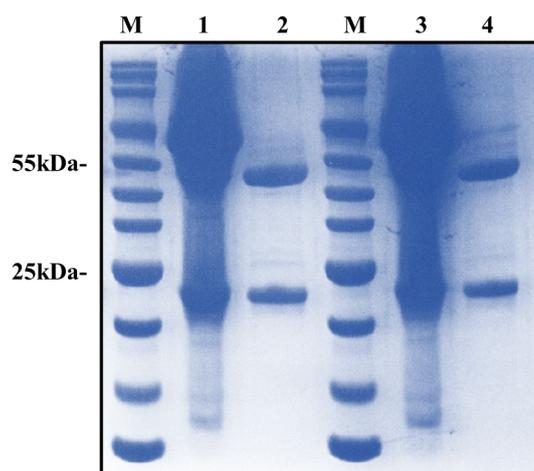


图 4-18 SDS-PAGE 验证单克隆抗体的纯化

Fig. 4-18 Verification of purified mAbs via SDS-PAG

M: Protein marker; 1: N1A7 腹水原液; 2: N1A7 纯化洗脱液; 3: N1A8 腹水原液; 4: N1A8 纯化洗脱液

4.3.11 单克隆抗体的效价测定

将纯化前、后的腹水浓度调整至 1 mg/mL 后作 100 倍稀释，再进行连续 2 倍倍比稀释，稀释至 2^{12} ，用 pET-25b-N 表达的 N 蛋白按最佳包被浓度（2 $\mu\text{g/mL}$ ）包被酶标板对纯化前后的腹水进行间接 ELISA 检测。结果显示，2 株单克隆抗体纯化后的效价均达到 100×2^{11} （表 4-2）。纯化后的单克隆抗体按 1:500 稀释后作为一抗进行后续 IFA 和 Western Blot 验证。

表 4-2 腹水效价测定

Table. 4-2 Detection of ascites titer

PRRSV-1 N 单克隆抗体		抗体效价
N1A7	纯化前	100×2^{12}
	纯化后	100×2^{11}
N1A8	纯化前	100×2^{12}
	纯化后	100×2^{11}

4.3.12 纯化单克隆抗体的验证

将 PRRSV-1 分离株、PRRSV-2 NADC30-like 毒株 HB04 株和 NADC34-like 毒株 HN08 株按 0.1 MOI 分别接种 PAMs，PRRSV-1 疫苗株 Amervac 株、PRRSV-2 经典毒株 CH-1a 株和高致病性毒株 WUH-3 株按 0.1 MOI 分别接种 MARC-145 细胞，同时以未接毒的 PAMs 和 MARC-145 细胞作为阴性对照。接毒 36 h 后收集样品，以 2 株纯化的单克隆抗体分别作为一抗进行 IFA 和 Western Blot 验证。结果显示，单克隆抗体 N1A7 和 N1A8 与感染了 PRRSV-1 和 PRRSV-2 的细胞均有特异性反应，与阴性对照无反应（图 4-19，图 4-20）。表明这 2 株 PRRSV-1 N 蛋白单克隆抗体可识别 PRRSV-1 和 PRRSV-2 的共有表位。

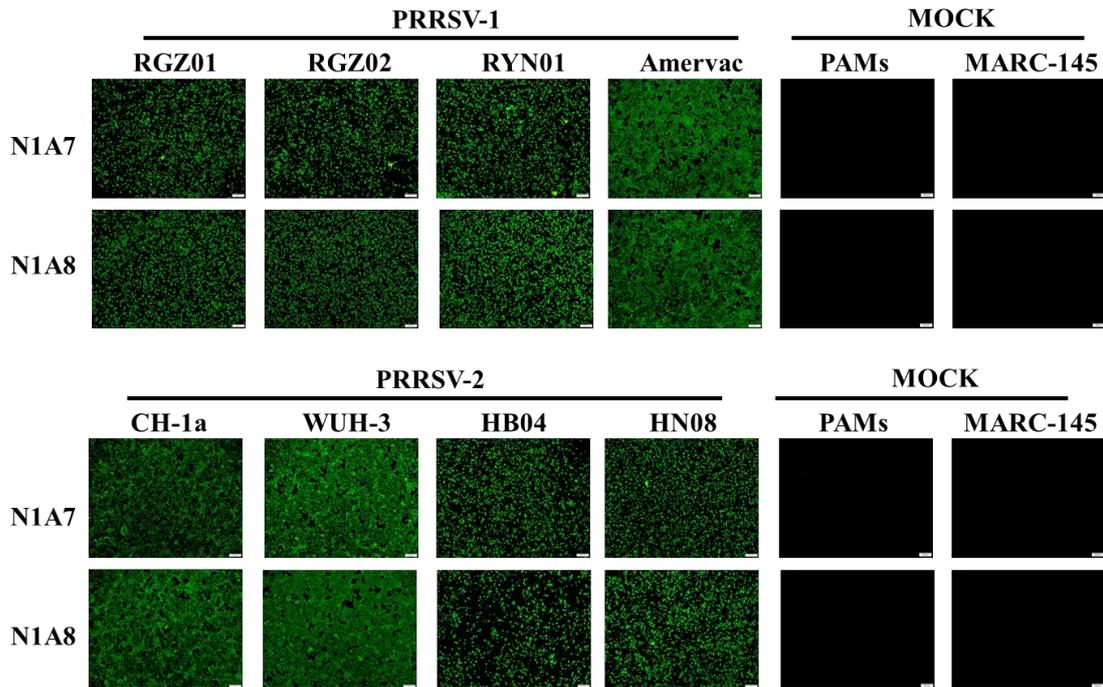


图 4-19 IFA 验证纯化的单克隆抗体

Fig. 4-19 Verification of purified mAbs via IFA

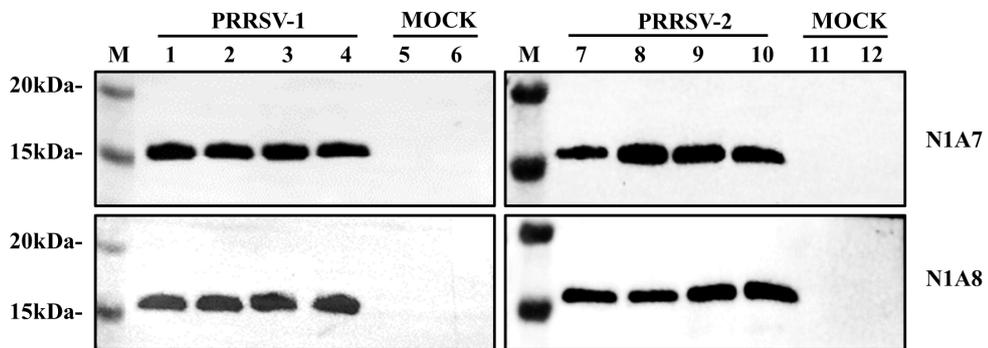


图 4-20 Western Blot 验证纯化的单克隆抗体

Fig. 4-20 Verification of purified mAbs via Western Blot

M: Protein marker; 1: RGZ01; 2: RGZ02; 3: RYN01; 4: Amervac; 7: CH-1a; 8: WUH-3;
9: HB04; 10: HN08; 5、11: PAMs 对照; 6、12: MARC-145 对照

4.3.13 纯化单克隆抗体的特异性验证

将实验室保存的 TGEV WH-1 株、PEDV AJ1102 株、PDCoV DHeB1 株、PoRV RHeN2 株和 PRV Ea 株按 3.2.6 所述的方法制备 Western Blot 样品后，以纯化的 2 株单克隆抗体分别作为一抗进行 Western Blot 验证。结果显示，单克隆抗体 N1A7 和 N1A8 与 TGEV、PEDV、PDCoV、PoRV、PRV 均不能产生反应（图 4-21），表明这 2 株 PRRSV-1 N 蛋白单克隆抗体具有良好的特异性。

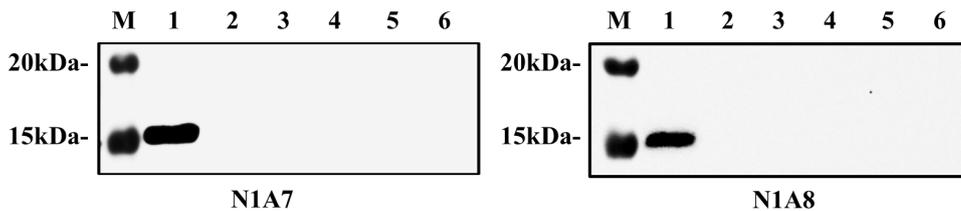


图 4-21 Western Blot 验证单克隆抗体的特异性

Fig. 4-21 Verification of specificity of purified mAbs via Western Blot

M: Protein marker; 1: PRRSV-1; 2: PDCoV; 3: PEDV; 4: TGEV; 5: PoRV; 6: PRV

4.4 PRRSV-1 分离株的遗传进化分析

4.4.1 PRRSV-1 分离株的全基因组扩增与克隆

设计 15 对引物对 3 株 PRRSV-1 分离株的全基因组进行分段扩增，以 RGZ01 株全基因组扩增结果为例，成功得到 15 个与目的片段大小相符的 PCR 产物（图 4-22）。将扩增产物回收后连接至克隆载体 pESI-Blunt Simple，经转化、挑菌鉴定后测序，成功获得 3 株病毒的 15 段基因序列。

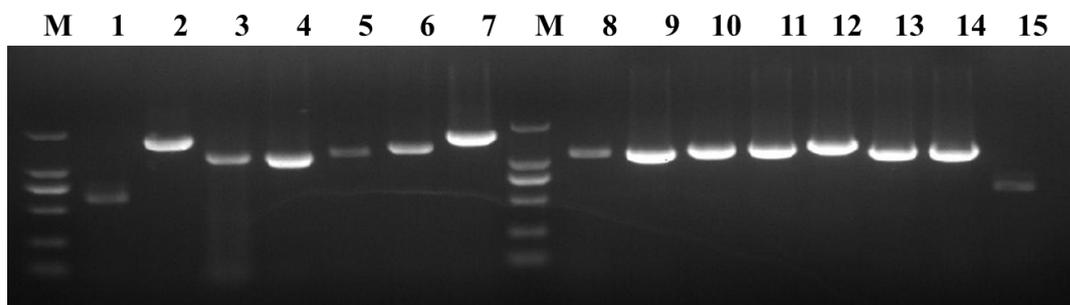


图4-22 PRRSV-1 RGZ01株全基因组扩增结果

Fig. 4-22 Amplification of PRRSV-1 RGZ01 whole genome

M: DL2000 DNA Marker; 1-15: RGZ01 全基因组片段

4.4.2 PRRSV-1 分离株的全基因组核苷酸同源性分析

使用 SeqMan 软件拼接得到分离株的全基因组序列（不含 Poly (A) 尾）：RGZ01 全长 14983bp、RGZ02 全长 14958bp、RYN01 全长 15083bp。用 MegAlign 软件（DNASTAR）对 3 株 PRRSV-1 分离株全基因组序列进行核苷酸同源性分析，结果显示，RGZ01 与 RGZ02 株的核苷酸同源性为 95.9%，RGZ01 和 RGZ02 株与 RYN01 株的核苷酸同源性均为 86.8%；与国外 PRRSV 代表毒株相比，3 株 PRRSV-1 分离株均与 PRRSV-1 代表株 Lelystad 株的核苷酸同源性最高，为 86.4%-86.9%，与 PRRSV-2 代表株 VR2332 株的核苷酸同源性最低，为 55.5%-56.5%；与国内各亚群代表毒株相比，RGZ01、RGZ02、RYN01 株均与 SC-2020-1 株的同源性最高，分别为 84.4%、84.5%、84.9%（图 4-23）。以上结果证实本研究分离得到的 3 株病毒均为 PRRSV-1。

		Percent Identity																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
Divergence	1	█	95.9	86.8	86.4	83.9	85.4	84.0	82.4	82.0	82.3	84.4	82.3	78.9	78.6	55.5	1	RGZ01
	2	4.4	█	86.8	86.5	84.1	85.3	84.1	82.4	81.9	82.1	84.5	82.1	78.9	78.6	55.8	2	RGZ02
	3	14.8	15.1	█	86.9	84.6	86.0	85.0	83.4	82.3	81.9	84.9	81.9	79.4	78.9	56.5	3	RYN01
	4	15.2	15.2	15.7	█	92.0	95.3	91.7	87.7	87.3	85.0	88.1	84.9	80.9	80.6	56.9	4	Lelystad
	5	18.7	18.6	18.9	8.9	█	89.8	88.3	85.6	84.6	83.2	85.3	83.1	79.9	79.4	56.9	5	BJEU06-1
	6	16.7	17.0	17.0	5.2	11.7	█	89.7	87.6	87.2	84.5	86.8	84.4	80.9	80.5	57.1	6	Amervac
	7	18.7	18.6	18.3	9.3	13.9	11.8	█	85.7	84.6	83.2	85.5	83.2	79.7	79.7	57.0	7	HKEU16
	8	21.1	21.3	20.7	14.5	17.5	14.7	17.4	█	83.3	82.6	84.0	82.5	80.2	79.6	56.6	8	NMEU09-1
	9	21.2	21.6	21.9	14.8	18.3	15.0	18.4	20.3	█	81.6	82.7	81.5	79.1	78.8	56.4	9	EUGDHD2018
	10	22.0	22.4	21.6	17.3	19.7	17.9	19.6	20.7	21.8	█	81.9	99.8	79.1	79.1	56.3	10	180900-5
	11	18.1	18.0	18.4	14.0	17.7	15.6	17.5	19.6	21.1	21.5	█	81.9	79.2	78.8	56.6	11	SC-2020-1
	12	22.1	22.5	21.7	17.3	19.8	18.0	19.7	20.8	21.9	0.2	21.5	█	79.0	79.0	56.3	12	181187-2
	13	25.9	26.0	25.8	23.7	25.0	23.7	25.3	24.4	25.9	25.5	25.9	25.6	█	82.4	56.1	13	lena
	14	26.6	26.8	26.9	24.4	26.0	24.6	25.5	25.7	26.6	25.8	27.0	26.0	21.6	█	56.4	14	WestSib13
	15	54.8	54.4	53.7	52.6	52.6	52.3	52.7	53.5	53.7	52.6	53.6	52.6	53.8	53.4	█	15	VR2332
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		

图4-23 PRRSV-1全基因组核苷酸同源性分析

Fig. 4-23 Analysis of nucleotide homology of PRRSV-1 whole genome

4.4.3 PRRSV-1 分离株的遗传进化分析

为了进一步了解 3 株 PRRSV-1 分离株的遗传进化规律，利用 MEGA 11 软件中的 NJ 法（Bootstrap=1000）将 3 株 PRRSV-1 与国内外各亚群参考毒株的全基因组序列及 ORF5 序列分别进行遗传进化分析并构建遗传进化树。结果显示，本研究分离的 3 株 PRRSV-1 和在四川、山东某猪场送检样品中检测到的 SCYB230922、

SDDY230412 均属于以 SC-2020-1 株为代表株的新亚群；陕西某猪场送检样品中检测到的 SXHZ230510 属 Amervac-like 亚群；山东、河南、甘肃某猪场送检样品中检测到的 SDLW230928、HN231011、GS230329 均属于 BJEU06-1 like 亚群（图 4-24）。



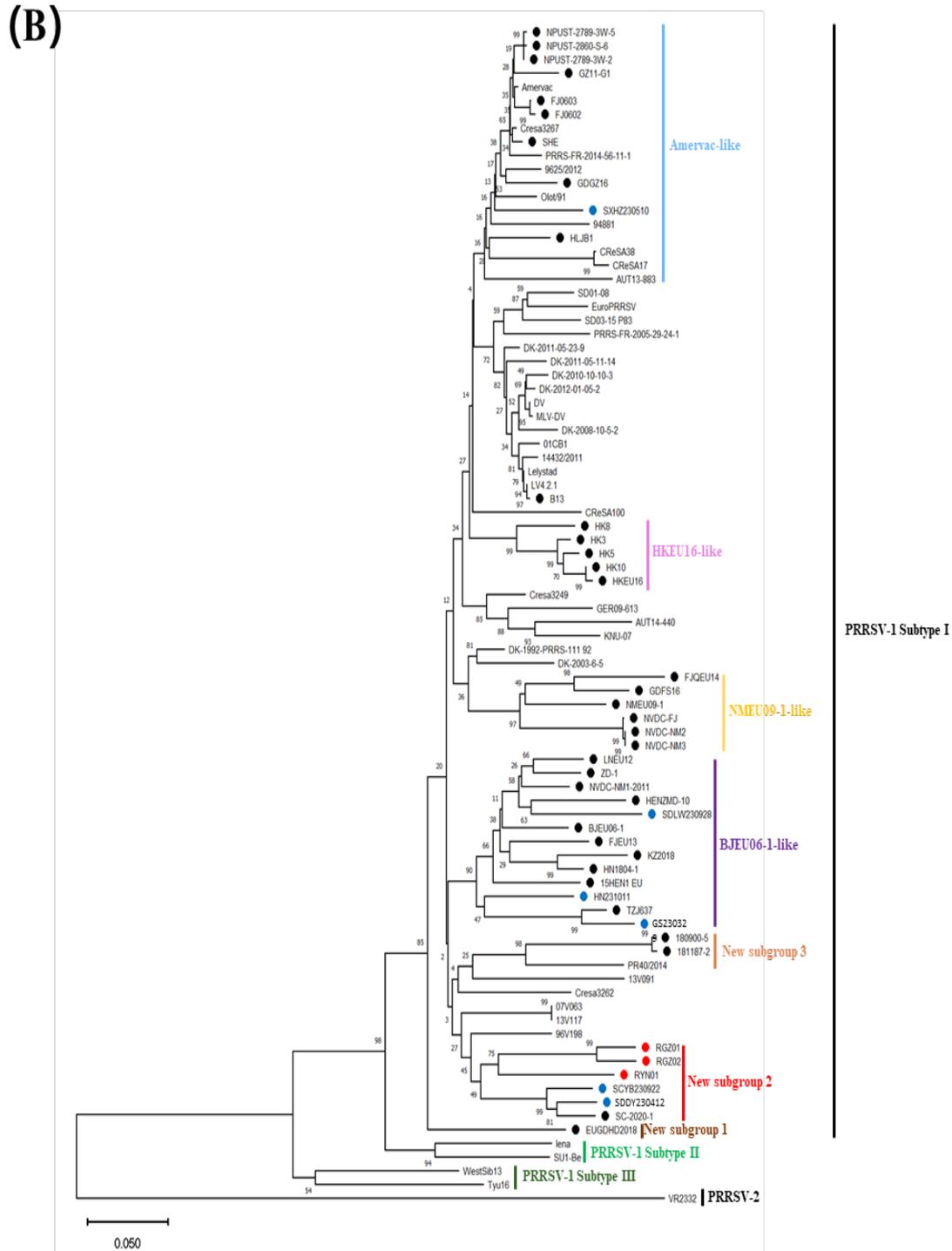


图4-24 PRRSV-1全基因组和ORF5遗传进化分析

Fig. 4-24 Genetic evolution analysis of PRRSV-1 whole genome and ORF5

(A): PRRSV-1全基因组遗传进化树; (B): PRRSV-1ORF5 遗传进化树

●: 国内分离的 PRRSV-1; ●: 本研究分离的 PRRSV-1; ●: 本研究检测的 PRRSV-1

4.4.4.2 GP3 和 GP4 蛋白的氨基酸变异分析

结果显示：与 Lelystad 株相比，RGZ01、RGZ02 和 RYN01 株 GP3 的第 243-246 位氨基酸缺失、GP4 的第 64-67 位氨基酸缺失，与 SC-2020-1 株缺失特征相同；RGZ01 和 RGZ02 株 GP3 C 末端存在连续 4 个氨基酸的插入（图 4-26），在已报道的其他 PRRSV-1 序列中暂未发现。

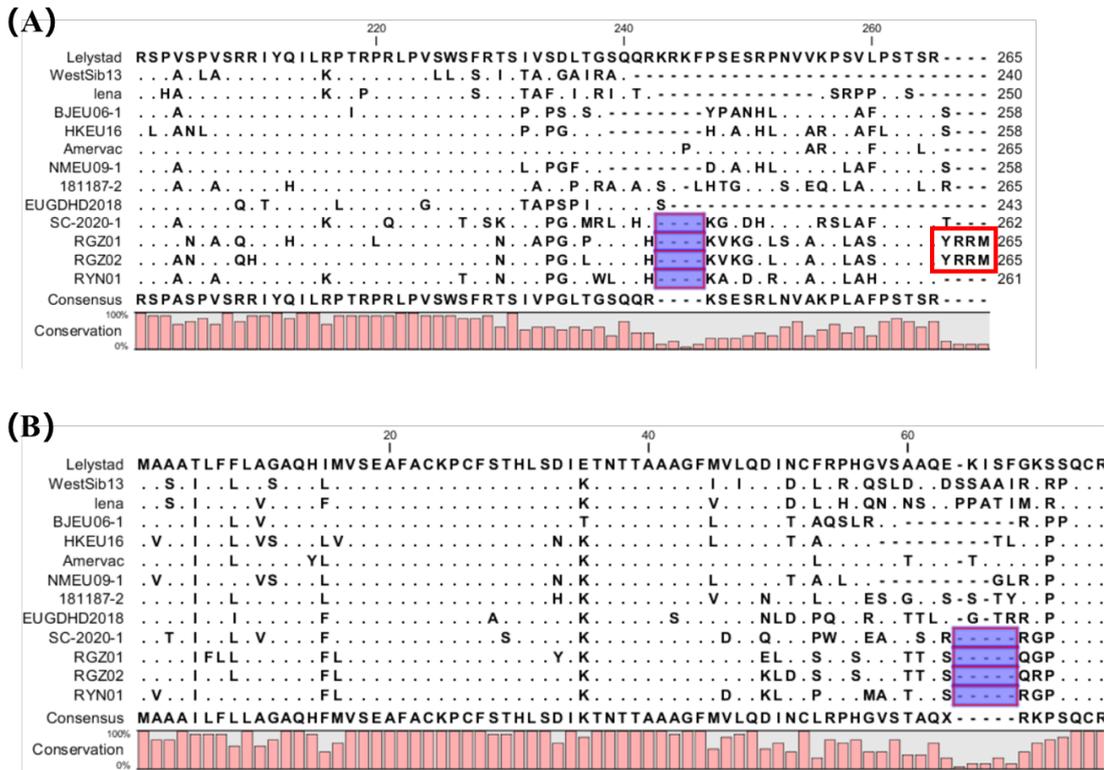


图4-26 PRRSV-1 GP3和GP4蛋白的氨基酸序列比对分析

Fig. 4-26 Comparative analysis of amino acid sequences of PRRSV-1 GP3 and GP4

(A): PRRSV-1 GP3 蛋白; (B): PRRSV-1 GP4 蛋白

4.5 PRRSV-1 RGZ02 株对仔猪的致病性

将 3 株 PRRSV-1 分离株在 PAMs 连续培养至第 6 代后测定病毒增殖滴度，通过 Reed-Muench 两氏法测得 RGZ01、RGZ02 与 RYN01 的 TCID₅₀ 分别为 1×10^{5.2}/mL、1×10^{5.6}/mL 和 1×10^{4.9}/mL。由于分离的 3 株 PRRSV-1 病毒同源性较高，因此选择增殖滴度最高的 RGZ02 株病毒开展了动物实验。将 RGZ02 株病毒经颈部肌肉注射（2×10⁵ TCID₅₀/头）和滴鼻（2×10⁵ TCID₅₀/头）2 种方式接种断奶仔猪，接种后观察仔猪临床症状、测定体温和平均日增重、检测病理变化、病毒血症和组织病毒载量，评价病毒对仔猪的致病性。

4.5.1 攻毒后仔猪的临床症状

PRRSV-1 RGZ02 株感染的 5 头仔猪中有 3 头表现出明显的临床症状，主要表现为咳嗽、采食及精神沉郁，对照仔猪未见明显的临床症状；PRRSV-1 RGZ02 株感染的 5 头仔猪中有 3 头在攻毒后 3-10 d 内出现发热，体温在 40.0°C 及以上，最高为 40.7°C，但体温升高持续的时间均较短，呈一过性升高，对照组仔猪未见体温升高（图 4-27 A）。平均日增重分析结果显示，PRRSV-1 RGZ02 株感染的 5 头仔猪中有 3 头的体重在攻毒后第 1 周下降，但在第 2 周有所恢复，整体平均日增重显著低于对照组（图 4-27 B）。在整个观察期内（14 d）PRRSV-1 RGZ02 株感染仔猪的发病率为 60%（3/5），没有仔猪死亡。

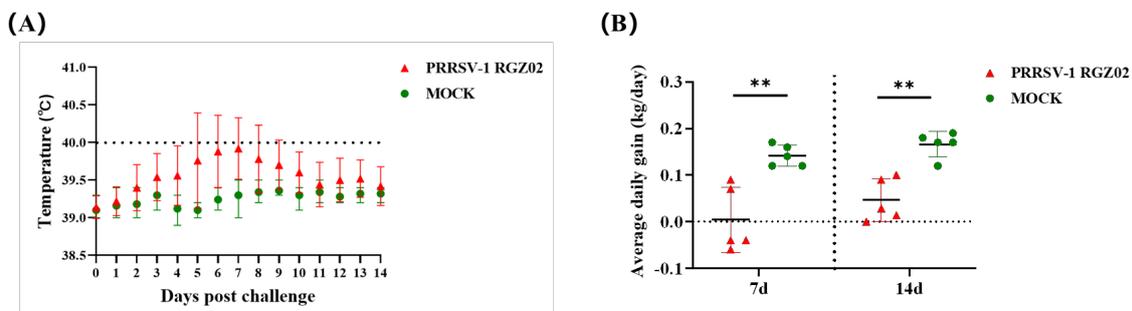


图4-27 攻毒后仔猪的临床症状

Fig. 4-27 Clinical symptoms of piglets after challenge

(A): 攻毒后仔猪的体温变化；(B): 攻毒后仔猪的平均日增重

4.5.2 攻毒仔猪的病理变化

于攻毒后 14 d 后对所有仔猪进行安乐死，每组随机选取 1 头仔猪进行剖检并观察大体病变，结果显示，PRRSV-1 RGZ02 株感染仔猪肺脏尖叶、心叶出现局部肉变，其他脏器未见明显病变，对照仔猪未见异常（图 4-28 A）。于是取肺脏组织制作病理切片，经 HE 染色后观察微观病理变化，结果显示，PRRSV-1 RGZ02 株感染仔猪的肺脏存在实变，肺泡间质增宽，部分肺泡结构消失，间质及细支气管内有炎性细胞浸润，而对照仔猪的肺脏未观察到明显病理变化（图 4-28 B）。

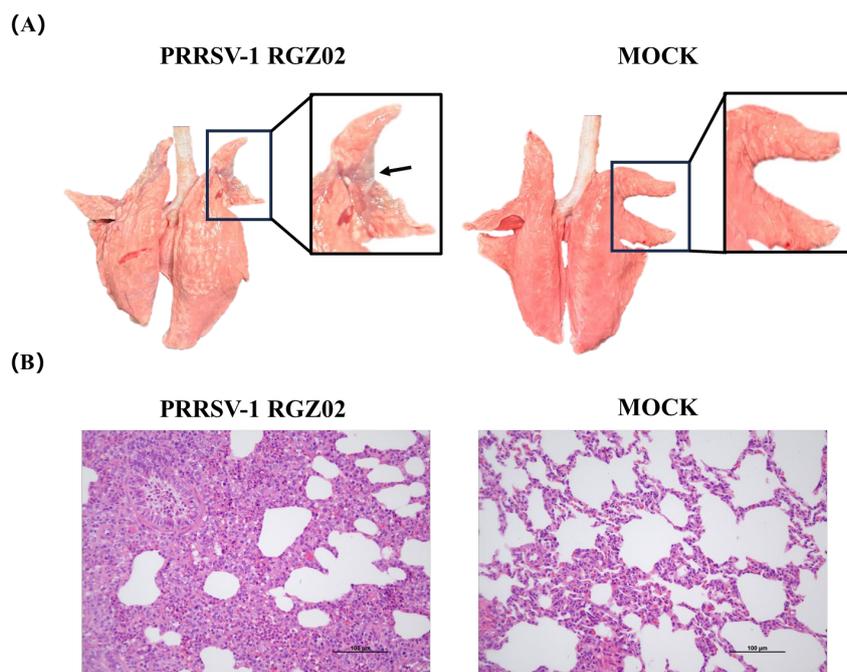


图4-28 攻毒后仔猪肺脏的病理变化

Fig. 4-28 Pathological changes of piglets' lungs after challenge

(A): 攻毒后仔猪肺脏的大体病变; (B): 攻毒后仔猪肺脏的微观病理变化

4.5.3 攻毒后仔猪肺脏的免疫组化分析

以本研究制备的 PRRSV-1 N 蛋白单抗为一抗, 通过免疫组化检测攻毒后 14 d PRRSV-1 抗原在仔猪肺脏中的分布, 结果显示, PRRSV-1 RGZ02 株感染仔猪的肺脏中存在病毒抗原, 而对照组仔猪肺脏中未检测到病毒抗原 (图 4-29)。

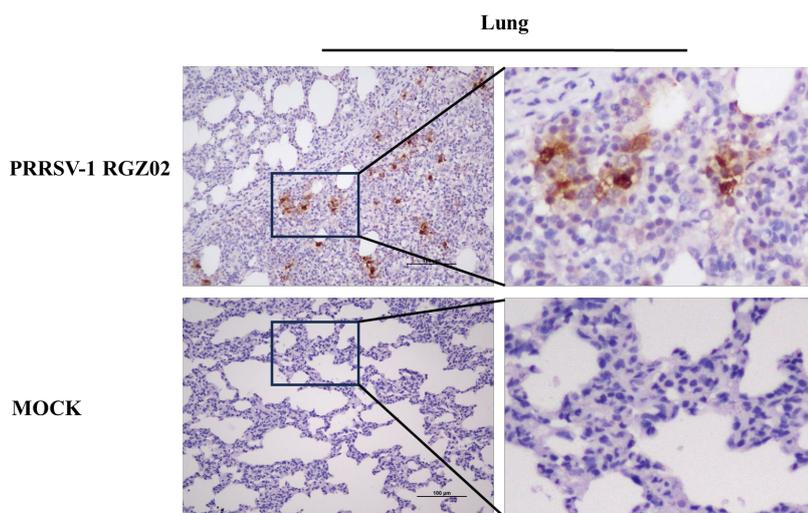


图4-29 攻毒后仔猪肺脏的免疫组化分析

Fig. 4-29 Immunohistochemical analysis of piglets' lungs after challenge

4.5.4 攻毒仔猪的病毒血症与组织病毒载量测定

于攻毒后 0、3、7、10、14 d 采集仔猪的非抗凝血，分离血清并提取 RNA，通过荧光定量 RT-PCR 检测 PRRSV-1 N 基因 (ORF7) 的含量。结果显示，PRRSV-1 RGZ02 株感染的 5 头仔猪中有 3 头在攻毒后第 7 d、第 10 d 和第 14 d 检测到 PRRSV-1 ORF7，于第 10 d 达到峰值，拷贝数为 $10^{3.8}$ copies/mL，对照仔猪的血清中未检测到 PRRSV-1 ORF7 (图 4-30 A)。

不同 PRRSV 毒株存在组织嗜性的差异，为探究 PRRSV-1 RGZ02 株的组织嗜性，于攻毒后第 14 d 采集剖杀仔猪的脑、扁桃体、肺、肝脏、脾脏、肾脏、腹股沟淋巴结样品，经匀浆破碎后提取组织 RNA，通过荧光定量 RT-PCR 检测各组织中 PRRSV-1 N 基因的含量。结果显示，从 PRRSV-1 RGZ02 株感染仔猪的扁桃体、肺脏和腹股沟淋巴结中检测到 PRRSV-1 ORF7，其中肺脏中的拷贝数最高，为 $10^{5.2}$ copies/g，而对照仔猪各组织中均未检测到 PRRSV-1 ORF7 (图 4-30 B)。综上，结合临床症状及肺脏病理变化可知 PRRSV-1 RGZ02 株对仔猪的致病性较低。

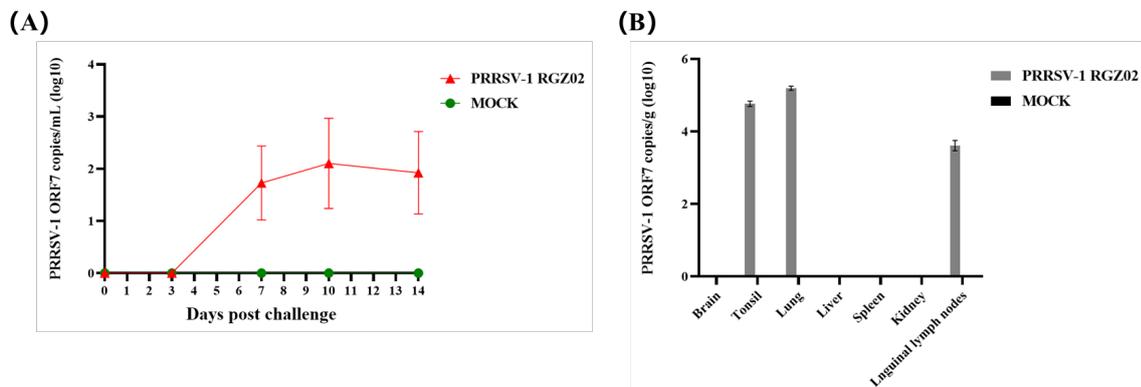


图4-30 攻毒后仔猪血清及各组织中的病毒载量

Fig. 4-30 Viral load in serum and tissues of piglets after challenge

(A): 攻毒后仔猪血清中的病毒载量; (B): 攻毒后仔猪各组织中的病毒载量

第 5 章 讨论与结论

5.1 讨论

5.1.1 PRRSV-1 的检测与分离

自 1996 年我国首次发现 PRRSV 以来, PRRSV-2 一直是国内流行的主要基因型。我国陆续经历了经典 PRRSV-2、高致病性 PRRSV-2、NADC30-like PRRSV-2 以及近几年新出现的 NADC34-like PRRSV-2, 目前在国内呈多种亚型并存的局面, 同时随着 PRRSV 变异株、重组株的不断出现, 尽管采取诸多手段进行防控, 但至今未得到很有效的控制, 对我国猪养殖业造成严重损失。此外, 在国内部分猪场也检测到 PRRSV-1, 相比于 PRRSV-2, PRRSV-1 在国内的检出率较低且致病性较轻, 一直没有引起足够的重视。但随着 PRRSV-1 在广东、福建、江西、台湾等地区相继被报道, PRRSV-1 目前已在我国超过 23 地区被检出, 说明未来可能会呈流行趋势。本研究从来自全国各地规模化猪场送检的 836 份疑似病料中, 利用 RT-PCR 的方法测得 PRRSV-1 阳性病料 30 份, 阳性率约为 3.6%, 分别来自于我国广东、广西、甘肃、山东、陕西、云南、四川及河南的 9 个猪场。而甘肃、云南、陕西此前并未有检出 PRRSV-1 的报道, 且 30 份 PRRSV-1 阳性病料中有 11 份 PRRSV-2 阳性病料。说明 PRRSV-1 已分布于我国部分地区, 虽未呈爆发性流行但持续存在, 并且存在 PRRSV-1 与 PRRSV-2 混合感染的现象。

研究表明, PAMs 是 PRRSV 感染的主要靶细胞 (Halbur et al 1996, Pol et al 1997), 此外, MACR-145、MA-104 及 CL2621 等细胞也可用于 PRRSV 的体外分离培养 (Kim et al 1993, Zhang and Yoo 2015)。本研究利用 PAMs 从 30 份阳性样品中分离得到 3 株 PRRSV-1, 但接种 MARC-145 细胞后未见明显 CPE, 说明 PAMs 仍是 PRRSV-1 体外分离培养的首选靶细胞。PAMs 为原代细胞, 存在成本高、分离步骤繁琐、易污染等问题, 而最近的研究表明部分 PRRSV-1 可在永生化的 PAMs 上进行增殖 (Wang et al 2018), 永生化的 PAMs 是否可代替 PAMs 用作 PRRSV-1 的体外分离培养仍需进一步探究。此外, 相比于传统的二维细胞系, 类器官在理想状态下与体内分化的组织具有相似的生理特性, 目前猪肠类器官已被报道可用作猪肠道冠状病毒体外感染的新模型 (Li et al 2019), Yamamoto 等人报道了一种可长期扩增肺

泡干细胞的肺类器官 (Yamamoto et al 2017), 是否可以利用肺类器官建立一种 PRRSV 的体外感染模型, 对 PRRSV 的体外培养及深入探究病毒感染猪体后的致病机制具有重要意义。

5.1.2 PRRSV-1 的遗传进化分析

基于 ORF5 核苷酸序列, PRRSV-1 可分为 3 个亚型: subtype I、II、III。我国目前报道的 PRRSV-1 均为 subtype I, 并可进一步分为 4 个亚群: BJEU06-1-like、Amervac-like、HKEU16-like 和 NMEU09-1-like (Chen et al 2017)。2018 年后, 我国 PRRSV-1 又出现了新的亚群 (Sun et al 2023), 说明国内 PRRSV-1 正不断发生新的变异。为进一步了解 PRRSV-1 分离株的遗传进化规律及分子特征, 本研究对分离株进行全基因组测序, 并以国内外报道的 PRRSV-1 作为参考毒株进行比对分析。全基因组序列同源性比对结果显示, 3 株 PRRSV-1 与 PRRSV-2 代表株 VR2332 同源性只有 55.5%-56.5%, 与 PRRSV-1 代表株 Lelystad 株的同源性最高, 分别为: 86.4%、86.5%、86.9%。全基因组及 ORF5 序列遗传进化分析结果显示, 3 株 PRRSV-1 分离株均为 Subtype I, 但不属于国内常见的 4 个亚群, 而是与 2020 年四川分离的 SC-2020-1 株形成 1 个新的亚群。推测本研究在广州和云南某猪场送检的病料中分离得到的 PRRSV-1 可能是由四川地区传播过去并发生变异, 其中 RGZ01 与 RGZ02 来自广州同一地区, 同源性为 95.9%, 可能由同 1 株 PRRSV-1 毒株遗传演化而来。

nsp2 是 PRRSV 中最大、最易变的非结构蛋白, 其高变区常发生氨基酸的突变、缺失和插入。国内 PRRSV-1 目前已知有 12 种缺失模式 (Zhang et al 2020), 其中以 nsp2 第 357-360 和第 411 位氨基酸表现出的 5 个氨基酸 (4+1) 不连续缺失模式最为常见, 主要发生于 BJEU06-1 like 与部分 NMEU09-1 like 中。nsp2 氨基酸序列分析结果显示, 3 株 PRRSV-1 在 nsp2 第 420 位氨基酸均存在 1 个氨基酸的缺失, 与 SC-2020-1 株缺失特征相同 (Zhao et al 2021); RGZ01 与 RGZ02 在 nsp2 第 313-353 位氨基酸均存在连续 40 个氨基酸的缺失, 与 181187-2 株 nsp2 区域的第 306-359 存在 54 个氨基酸的缺失特征相似 (Wang et al 2023)。SC-2020-1 株和 181187-2 株均是 2018 年后属于新亚群的 PRRSV-1。此外, RGZ01 在 nsp2 第 461-467 位氨基酸存在连续 7 个氨基酸的插入。PRRSV-1 ORF3 与 OPRF4 重叠部分含有

1 个高变区 (aa 237-252), 相比于其他结构蛋白更易发生变异, 在第 241-248 位氨基酸存在连续 8 个氨基酸缺失是该区域最常见的 1 种缺失模式 (Zhang et al 2020)。GP3 和 GP4 氨基酸序列分析结果显示, RGZ01、RGZ02 和 RYN0 在 ORF3 第 243-246 位氨基酸和 ORF4 第 64-67 存在连续 4 个氨基酸的缺失, 与 SC-2020-1 株缺失特征相同(Zhao et al 2021)。此外, RGZ01 和 RGZ02 在 GP3 C 末端存在连续 4 个氨基酸的插入。上述这些缺失模式是以前未曾报道过的, 说明 nsp2、ORF3 与 ORF4 重叠部分都是 PRRSV-1 主要的遗传变异区域且正不断发生变异, 这些变异对毒株的致病性等生物学特性有何影响还需进一步研究。

不同毒株之间的重组也是 PRRSV 不断发生变异进化的原因之一。我国很少有 PRRSV-1 重组毒株的报道, 对本研究中分离的 3 株 PRRSV-1 进行重组分析, 结果显示 3 株 PRRSV-1 均不为重组毒株, 可能与我们目前 PRRSV-1 流行仍较少有关。虽然 PRRSV-1 尚未对我国猪养殖业造成严重损失, 但上述结果表明 PRRSV-1 正不断发生变异, 因此有必要加强对 PRRSV-1 的监控与检测, 预防 PRRSV-1 在国内发生大的流行。

5.1.3 PRRSV-1 的致病性

在国内已报道的 PRRSV-1 致病性研究中, 临床症状与 PRRSV-2 相似, 但大多表现为低致病性 (Hsueh et al 2023, Ming et al 2017, Wang et al 2016)。本研究以 PRRSV-1 分离株 RGZ02 进行仔猪致病性试验, 临床结果显示仔猪感染 RGZ02 不致死, 体温呈一过性升高, 剖检可见肺脏局部肉变; 荧光定量 PCR 结果显示, PRRSV-1 RGZ02 株感染仔猪后在扁桃体、肺脏和腹股沟淋巴结中可检测到病毒 N 基因, 在感染后第 7-14 d 可血清中检测到病毒 N 基因, 整体呈低病毒血症。上述结果表明 PRRSV-1 RGZ02 株对仔猪具有低致病性。虽然 PRRSV-1 暂未对我国养猪业造成严重损失, 但在 2023 已有中等致病性 PRRSV-1 的报道 (Wang et al 2023), 表明我国 PRRSV-1 在近几年可能发生较大变异且致病性可能有上升趋势。并且国外已有高致病性 PRRSV-1 的相关报道 (Canelli et al 2017, Martín-Valls et al 2022, Yuzhakov et al 2017), 可能通过种猪引进传入我国。此外, 国内于 2023 年分离到 1 株 PRRSV-1 ZD-1 株, 在其 GP3 C 末端发现了 26 个氨基酸提前终止的现象, 通过致病性试验发现 ZD-1 具有中度致病性 (Xu et al 2023)。在 PRRSV-1 高致病株 lena

和 Westsib13 的 GP3 C 末端也同样发现有氨基酸提前终止的现象 (Karniychuk et al 2010, Yuzhakov et al 2017), GP3 C 末端的提前终止是否对 PRRSV-1 的致病性有影响还有待进一步探究, 但近年连续发现具中度致病性的 PRRSV-1 (Wang et al 2023, Xu et al 2023), 提示国内 PRRSV-1 的致病性在未来可能会有逐渐上升的趋势。因此, 加强对 PRRSV-1 的监测, 丰富 PRRSV-1 相关实验数据对防止 PRRSV-1 在国内流行是有必要的。

5.1.4 PRRSV-1 N 蛋白单克隆抗体的制备

随着 PRRSV 在国内的流行和爆发, 对 PRRSV 的检测也愈发受到重视。目前针对 PRRSV 常用的检测方法主要包括病毒的核酸检测、抗原检测及抗体检测。但国内建立的检测方法主要针对的是 PRRSV-2, 由于 PRRSV-1 与 PRRSV-2 的同源性较低, 在检测过程中可能会出现漏检。单克隆抗体具有纯度高、特异性强、可无限量获得等特点, 广泛应用于病毒的抗原检测。在本研究早期使用实验室制备的针对 PRRSV-2 各蛋白的单克隆抗体对 PRRSV-1 进行 IFA 检测但均未有特异性荧光, 说明本实验室现有的 PRRSV 单克隆抗体不能有效检测出 PRRSV-1, 因此制备针对 PRRSV-1 的单克隆抗体, 对进一步完善实验室今后对 PRRSV 的综合诊断是有必要的。N 蛋白是 PRRSV 病毒粒子中含量最高的蛋白, 具有较强的免疫原性, PRRSV 感染后猪体首先产生针对 N 蛋白的抗体, 因此 N 蛋白常作为检测 PRRSV 特异性抗体和疾病诊断的理想靶蛋白 (Music et al 2010)。

PRRSV-1 N 蛋白分子量约为 15 kDa, 由于分子量较小, 若直接免疫小鼠产生的免疫效果可能较差, 最终导致免疫失败。因此, 本研究选择利用 pMAL-c5x 原核表达载体进行蛋白表达, 因该载体携带 MBP 标签 (40 kDa), 可增加蛋白分子量, 提高免疫原性。此外, 相比于包涵体形式表达的蛋白, pMAL-c5x-N 重组蛋白以可溶性蛋白的形式进行表达, 杂蛋白更少, 与抗原的天然构象与功能差异更小。但 MBP 标签蛋白在免疫小鼠时同样可作为抗原, 刺激小鼠产生针对 MBP 标签的效应 B 细胞, 为避免间接 ELISA 筛选阳性细胞时出现假阳性结果, 本研究表达带 His 标签的 pET-25b-N 重组蛋白用于间接 ELISA 的抗原包被, 筛选抗 PRRSV-1 N 蛋白的单克隆抗体。

目前动物免疫常用的免疫方法是使用弗氏佐剂对抗原进行乳化后通过四肢肌肉

注射和背部皮下多点注射的方式进行免疫。本研究中动物免疫所使用的 pMAL-c5x-N 重组蛋白以可溶性蛋白的形式进行表达，并选择博奥龙公司的 Quick Antibody 佐剂来处理抗原。相比于弗氏佐剂，Quick Antibody 佐剂具备以下优点：1) 该佐剂为水溶性佐剂，与蛋白混合均匀后即可使用，避免了乳化与注射过程中的浪费；2) 该佐剂不需乳化，不会影响蛋白结构，可维持蛋白本身的天然构象。

经间接 ELISA 筛选及亚克隆共得到 8 株阳性杂交瘤细胞，收集培养上清作为一抗与真核表达的 PRRSV N 蛋白或 PRRSV-1 全病毒进行验证。IFA 验证时，8 株阳性杂交瘤细胞培养上清均可与真核表达的 PRRSV N 蛋白和 PRRSV-1 全病毒反应并检测到特异性荧光；Western Blot 验证时，8 株阳性杂交瘤细胞培养上清均可与真核表达的 PRRSV N 蛋白反应并检测到特异性条带，但只有 N1A7 株和 N1A8 株可与 PRRSV-1 全病毒反应并检测到特异性条带。Western Blot 实验中制备样品时会破坏蛋白的空间结构，由此推断 N1A7 株和 N1A8 株单克隆抗体均识别 PRRSV-1 的线性表位，而不是构象表位，且 N1A7 株和 N1A8 株效果较好，经扩大后可用于 IFA 和 Western Blot 检测。

研究表明 PRRSV-1 N 蛋白至少具有 4 个抗原表位，包括 3 个线性表位 (aa 2-12, aa 25-30, aa 40-46) 和 1 个构象表位 (由 aa 51-67 和 aa 80-90 构成)，其中线性表位 aa 25-30 在 PRRSV-1 和 PRRSV-2 之间是高度保守的 (Dea et al 2000, Meulenberg et al 1998)。此外，Zhou 等人还发现虽然由 aa 51-67 和 aa 80-90 构成的构象表位在 PRRSV-1 或 PRRSV-2 之间均不保守，但在构象表位中具有 1 个相对独立的线性表位 (aa 51-58) 在 PRRSV-1 和 PRRSV-2 之间高度保守 (Zhou et al 2006)。为确定本研究制备的单克隆抗体是否可同时识别 PRRSV-1 和 PRRSV-2，本研究将 N1A7 株和 N1A8 株扩大并纯化后，与本研究分离得到的 3 株 PRRSV-1 全病毒 (RGZ01、RGZ02、RYN01) 以及实验室保存的 PRRSV-1 疫苗株 (Amervac) 和 PRRSV-2 全病毒 (经典毒株 CH-1a、高致病性毒株 WUH-3、NADC30-like 毒株 HB04、NADC34-like 毒株 HN08) 进行验证。IFA 和 Western Blot 结果表明 2 株单克隆抗体均能同时识别 PRRSV-1 和 PRRSV-2，初步推断 2 株抗体识别的抗原位点可能位于 aa 25-30 或 aa 51-58，2 株抗体是否识别相同的抗原位点仍需进一步探究。

5.2 结论

(1) 从临床疑似 PRRSV 感染的样品中检测到低感染率的 PRRSV-1, 且存在 PRRSV-1 与 PRRSV-2 混合感染的现象。利用 PAMs 分离到 3 株 PRRSV-1, 分别命名为 RGZ01、RGZ02、RYN01, 并证实 3 株病毒均只能在 PAMs 细胞上稳定传代和增殖, 但不能在 MARC-145 细胞上增殖。

(2) 利用原核表达的 PRRSV-1 N 重组蛋白免疫小鼠, 制备了 8 株针对 PRRSV-1 N 蛋白的单克隆抗体, 分别命名为 N1A7、N1A8、N1H4、N3F11、N4G12、N7H10、N8G10、N9G1, 并证实 N1A7、N1A8 株单抗与 PRRSV-2 毒株也有特异性反应。

(3) 对 3 株 PRRSV-1 分离株进行了全基因组测序与分析, 发现 3 株 PRRSV-1 分离株均属于 Subtype I, 且与四川分离株 SC-2020-1 形成了 1 个新的亚群。动物致病性试验证实 PRRSV-1 RGZ02 株可引起感染仔猪发病, 但致病性不强。

参考文献

1. Allende R, Lewis TL, Lu Z, Rock DL, Kutish GF, Ali A, Doster AR, Osorio FA. North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions. *J Gen Virol*, 1999, 80 (Pt 2): 307-315.
2. An TQ, Zhou YJ, Liu GQ, Tian ZJ, Li J, Qiu HJ, Tong GZ. 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: 43-52.
3. Andreyev VG, Wesley RD, Mengeling WL, Vorwald AC, Lager KM. Genetic variation and phylogenetic relationships of 22 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) field strains based on sequence analysis of open reading frame 5. *Arch Virol*, 1997, 142: 993-1001.
4. Bautista EM, Meulenber JJ, Choi CS, Molitor TW. Structural polypeptides of the American (VR-2332) strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch Virol*, 1996, 141: 1357-1365.
5. Bilodeau R, Archambault D, Vezina SA, Sauvageau R, Fournier M, Dea S. Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in a swine operation. *Can J Vet Res*, 1994, 58: 291-298.
6. Brar MS, Shi M, Hui RK, Leung FC. Genomic evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates revealed by deep sequencing. *PLoS One*, 2014, 9: e88807.
7. Canelli E, Catella A, Borghetti P, Ferrari L, Ogno G, De Angelis E, Corradi A, Passeri B, Bertani V, Sandri G, Bonilauri P, Leung FC, Guazzetti S, Martelli P. Phenotypic characterization of a highly pathogenic Italian porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) type 1 subtype 1 isolate in experimentally infected pigs. *Vet Microbiol*, 2017, 210: 124-133.

8. Chae C. Commercial PRRS Modified-Live Virus Vaccines. *Vaccines (Basel)*, 2021, 9: 185.
9. Chahar DS, Ravindran S, Pisal SS. Monoclonal antibody purification and its progression to commercial scale. *Biologicals*, 2020, 63: 1-13.
10. Chen J, Liu T, Zhu CG, Jin YF, Zhang YZ. Genetic variation of Chinese PRRSV strains based on ORF5 sequence. *Biochem Genet*, 2006, 44: 425-435.
11. Chen NH, Cao Z, Yu XL, Deng XY, Zhao TZ, Wang LL, Liu Q, Li XX, Tian KG. Emergence of novel European genotype porcine reproductive and respiratory syndrome virus in mainland China. *J Gen Virol*, 2011, 92: 880-892.
12. Chen NH, Liu QR, Qiao MM, Deng XY, Chen XZ, Sun M. Whole genome characterization of a novel porcine reproductive and respiratory syndrome virus 1 isolate: Genetic evidence for recombination between Amervac vaccine and circulating strains in mainland China. *Infect Genet Evol*, 2017, 54: 308-313.
13. Chen NH, Xiao YZ, Ye MX, Li XS, Li SB, Xie NJ, Wei Y, Wang JL, Zhu JZ. High genetic diversity of Chinese porcine reproductive and respiratory syndrome viruses from 2016 to 2019. *Res Vet Sci*, 2020, 131: 38-42.
14. Collins JE, Benfield DA, Christianson WT, Harris L, Hennings JC, Shaw DP, Goyal SM, McCullough S, Morrison RB, Joo HS, 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: 117-126.
15. Conzelmann KK, Visser N, Van Woensel P, Thiel HJ. Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the arterivirus group. *Virology*, 1993, 193: 329-339.
16. Cui XY, Xia DS, Huang XY, Sun Y, Shi M, Zhang JQ, Li GW, Yang YB, Wang HW, Cai XH, An TQ. Analysis of Recombinant Characteristics Based on 949 PRRSV-2 Genomic Sequences Obtained from 1991 to 2021 Shows That Viral Multiplication Ability Contributes to Dominant Recombination. *Microbiol Spectr*, 2022, 10: e0293422.

17. Dea S, Gagnon CA, Mardassi H, Pirzadeh B, Rogan D. Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. *Arch Virol*, 2000, 145: 659-688.
18. Dokland T. The structural biology of PRRSV. *Virus Res*, 2010, 154: 86-97.
19. Eclercy J, Renson P, Lebret A, Hirchaud E, Normand V, Andraud M, Paboeuf F, Blanchard Y, Rose N, Bourry O. A Field Recombinant Strain Derived from Two Type 1 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV-1) Modified Live Vaccines Shows Increased Viremia and Transmission in SPF Pigs. *Viruses*, 2019, 11: 296.
20. Elazhary Y, Weber J, Bikour H, Morin M, Girard C. Mystery Swine Disease in Canada. *Vet Rec*, 1991, 129: 495-496.
21. Faaberg KS, Elam MR, Nelsen CJ, Murtaugh MP. Subgenomic RNA7 is transcribed with different leader-body junction sites in PRRSV (strain VR2332) infection of CL2621 cells. *Adv Exp Med Biol*, 1998, 440: 275-279.
22. Fang Y, Kim DY, Ropp S, Steen P, Christopher-Hennings J, Nelson EA, Rowland RR. Heterogeneity in Nsp2 of European-like porcine reproductive and respiratory syndrome viruses isolated in the United States. *Virus Res*, 2004, 100: 229-235.
23. Fang Y, Snijder EJ. The PRRSV replicase: exploring the multifunctionality of an intriguing set of nonstructural proteins. *Virus Res*, 2010, 154: 61-76.
24. Fang Y, Treffers EE, Li Y, Tas A, Sun Z, van der Meer Y, de Ru AH, van Veelen PA, Atkins JF, Snijder EJ, Firth AE. Efficient -2 frameshifting by mammalian ribosomes to synthesize an additional arterivirus protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109: E2920-2928.
25. Forsberg R, Storgaard T, Nielsen HS, Oleksiewicz MB, Cordioli P, Sala G, Hein J, Bøtner A. The genetic diversity of European type PRRSV is similar to that of the North American type but is geographically skewed within Europe. *Virology*, 2002, 299: 38-47.

26. Frossard JP, Hughes GJ, Westcott DG, Naidu B, Williamson S, Woodger NGA, Steinbach F, Drew TW. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: genetic diversity of recent British isolates. *Vet Microbiol*, 2013, 162: 507-518.
27. Frydas IS, Trus I, Kvisgaard LK, Bonckaert C, Reddy VR, Li Y, Larsen LE, Nauwynck HJ. Different clinical, virological, serological and tissue tropism outcomes of two new and one old Belgian type 1 subtype 1 porcine reproductive and respiratory virus (PRRSV) isolates. *Vet Res*, 2015, 46: 37.
28. Gao JC, Xiong JY, Ye C, Chang XB, Guo JC, Jiang CG, Zhang GH, Tian ZJ, Cai XH, Tong GZ, An TQ. Genotypic and geographical distribution of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses in mainland China in 1996-2016. *Vet Microbiol*, 2017, 208: 164-172.
29. Gao ZQ, Guo X, Yang HC. Genomic characterization of two Chinese isolates of porcine respiratory and reproductive syndrome virus. *Arch Virol*, 2004, 149: 1341-1351.
30. Garner MG, Whan IF, Gard GP, Phillips D. The expected economic impact of selected exotic diseases on the pig industry of Australia. *Rev Sci Tech Oie*, 2001, 20: 671-685.
31. Gomez-Laguna J, Salguero FJ, Barranco I, Pallares FJ, Rodriguez-Gomez IM, Bernabe A, Carrasco L. Cytokine expression by macrophages in the lung of pigs infected with the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Comp Pathol*, 2010, 142: 51-60.
32. Halbur PG, Paul PS, Meng XJ, Lum MA, Andrews JJ, Rathje JA. Comparative pathogenicity of nine US porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates in a five-week-old cesarean-derived, colostrum-deprived pig model. *J Vet Diagn Invest*, 1996, 8: 11-20.
33. Hsueh FC, Kuo KL, Hsu FY, Wang SY, Chiu HJ, Wu MT, Lin CF, Huang YH, Chiou MT, Lin CN. Molecular Characteristics and Pathogenicity of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) 1 in Taiwan during 2019-2020. *Life (Basel)*, 2023, 13: 843.

34. Iseki H, Takagi M, Kawashima K, Shibahara T, Kuroda Y, Tsunemitsu H, Yamakawa M. Pathogenicity of emerging Japanese type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus in experimentally infected pigs. *J Vet Med Sci*, 2016, 77: 1663-1666.
35. Jantafong T, Sangtong P, Saenglub W, Mungkundar C, Romlamduan N, Lekchareonsuk C, Lekcharoensuk P. Genetic diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Thailand and Southeast Asia from 2008 to 2013. *Vet Microbiol*, 2015, 176: 229-238.
36. Jeong CG, Nazki S, Kim SC, Khatun A, Noh YH, Lee DU, Kang SC, Seo BJ, Yang MS, Lee SI, Yoon IJ, Kim B, Kim WI. Comparison of the pathogenicity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-1 and PRRSV-2 in pregnant sows. *Arch Virol*, 2022, 167: 425-439.
37. Johnson CR, Griggs TF, Gnanandarajah J, Murtaugh MP. Novel structural protein in porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by an alternative ORF5 present in all arteriviruses. *J Gen Virol*, 2011, 92: 1107-1116.
38. Karniyuchuk UU, Geldhof M, Vanhee M, Van Doorselaere J, Saveleva TA, Nauwynck HJ. Pathogenesis and antigenic characterization of a new East European subtype 3 porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate. *BMC Vet Res*, 2010, 6: 30.
39. Keffaber KK. Reproductive failure of unknown etiology. *am. assoc. swine pract. news*, 1989.
40. Kim HS, Kwang J, Yoon IJ, Joo HS, Frey ML. Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. *Arch Virol*, 1993, 133: 477-483.
41. Kim JM, Kwon YW, Choi EJ, Ouh IO, Choe SE, Lee J, Song JY, Cha SH. Complete Genome Sequence of Type 1 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Strain E38, Isolated from South Korea with a Novel Deletion. *Genome Announc*, 2015, 3: e01180-15.

42. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 1975, 256: 495-497.
43. Kvisgaard LK, Kristensen CS, Ryt-Hansen P, Pedersen K, Stadejek T, Trebbien R, Andresen LO, Larsen LE. A recombination between two Type 1 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV-1) vaccine strains has caused severe outbreaks in Danish pigs. *Transbound Emerg Dis*, 2020, 67: 1786-1796.
44. Le Potier MF, Blanquefort P, Morvan E, Albina E. Results of a control programme for the porcine reproductive and respiratory syndrome in the French 'Pays de la Loire' region. *Vet Microbiol*, 1997, 55: 355-360.
45. Lee DU, Yoo SJ, Kwon T, Je SH, Shin JY, Byun JJ, Kim MH, Lyoo YS. Genetic diversity of ORF 4-6 of type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus in naturally infected pigs. *Vet Microbiol*, 2017, 199: 54-61.
46. Li B, Gao S, Zhou T, Liu X, Lu H, Feng F. Complete Genome Sequence of European Genotype Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Strain LNEU12 in Northern China. *Genome Announc*, 2014, 2: e00957-14.
47. Li C, Xu H, Zhao J, Gong B, Sun Q, Xiang L, Li W, Guo Z, Li J, Tang YD, Leng C, Peng J, Wang Q, An T, Cai X, Tian ZJ, Zhou G, Zhang H. Epidemiological investigation and genetic evolutionary analysis of PRRSV-1 on a pig farm in China. *Front Microbiol*, 2022, 13: 1067173.
48. Li L, Fu F, Guo SS, Wang HF, He XJ, Xue M, Yin LD, Feng L, Liu PH. Porcine Intestinal Enteroids: a New Model for Studying Enteric Coronavirus Porcine Epidemic Diarrhea Virus Infection and the Host Innate Response. *J Virol*, 2019, 93: e01682-18.
49. Li Y, Treffers EE, Naphine S, Tas A, Zhu L, Sun Z, Bell S, Mark BL, van Veelen PA, van Hemert MJ, Firth AE, Brierley I, Snijder EJ, Fang Y. Transactivation of programmed ribosomal frameshifting by a viral protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111: E2172-2181.

50. Liu D, Zhou R, Zhang J, Zhou L, Jiang Q, Guo X, Ge X, Yang H. Recombination analyses between two strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in vivo. *Virus Res*, 2011, 155: 473-486.
51. Liu JK, Wei CH, Dai AL, Fan KW, Yang BH, Huang CF, Li XH, Yang XY, Luo ML. Complete genomic characterization of two European-genotype porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in Fujian province of China. *Archives of Virology*, 2017, 162: 823-833.
52. Loula T. Mystery Pig-Disease. *Agri-Practice*, 1991, 12: 23.
53. Lunney JK, Fang Y, Ladinig A, Chen N, Li Y, Rowland B, Renukaradhya GJ. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): Pathogenesis and Interaction with the Immune System. *Annu Rev Anim Biosci*, 2016, 4: 129-154.
54. Lyoo KS, Yeom M, Choi JY, Park JH, Yoon SW, Song D. Unusual severe cases of type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in conventionally reared pigs in South Korea. *BMC Vet Res*, 2015, 11: 272.
55. Martín-Valls GE, Cortey M, Allepuz A, Illas F, Tello M, Mateu E. Description of a New Clade within Subtype 1 of Betaarterivirus suid 1 Causing Severe Outbreaks in Spain. *MRA*, 2022, 11: e0030422.
56. Meng XJ. Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. *Vet Microbiol*, 2000, 74: 309-329.
57. Mengeling WL, Lager KM, Vorwald AC. Clinical consequences of exposing pregnant gilts to strains of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus isolated from field cases of "atypical" PRRS. *Am J Vet Res*, 1998, 59: 1540-1544.
58. Meulenber JJ, de Meijer EJ, Moormann RJ. Subgenomic RNAs of Lelystad virus contain a conserved leader-body junction sequence. *J Gen Virol*, 1993, 74 (Pt 8): 1697-1701.
59. Meulenber JJ, Petersen den Besten A, de Kluyver E, van Nieuwstadt A, Wensvoort G, Moormann RJ. Molecular characterization of Lelystad virus. *Vet*

- Microbiol*, 1997, 55: 197-202.
60. Meulenbergh JJ, van Nieuwstadt AP, van Essen-Zandbergen A, Bos-de Ruijter JN, Langeveld JP, Meeuwissen RH. Localization and fine mapping of antigenic sites on the nucleocapsid protein N of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with monoclonal antibodies. *Virology*, 1998, 252: 106-114.
 61. Ming S, Yongying M, Bohua L, Huiying L, Xiaoyu D, Qiaorong L, Mingming Q, Xi C, Xinyan Y, Xizhao C. Pathogenic Characterization of European Genotype Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Recently Isolated in Mainland China. *Open Virol J*, 2017, 11: 83-89.
 62. Morin M, Elazhary Y, Girard C. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome in Quebec. *Vet Rec*, 1991, 129: 252-252.
 63. 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.
 64. Murtaugh MP, Faaberg KS, Laber J, Elam M, Kapur V. Genetic variation in the PRRS virus. *Adv Exp Med Biol*, 1998, 440: 787-794.
 65. Murtaugh MP, Stadejek T, Abrahante JE, Lam TT, Leung FC. The ever-expanding diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res*, 2010, 154: 18-30.
 66. Music N, Gagnon CA. The role of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus structural and non-structural proteins in virus pathogenesis. *Anim Health Res Rev*, 2010, 11: 135-163.
 67. Nelsen CJ, Murtaugh MP, Faaberg KS. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. *J Virol*, 1999, 73: 270-280.
 68. Neumann EJ, Kliebenstein JB, Johnson CD, Mabry JW, Bush EJ, Seitzinger AH, Green AL, Zimmerman JJ. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *Javma-J Am Vet Med A*, 2005, 227: 385-392.

69. Nilubol D, Tripipat T, Hoonsuwan T, Tipsombatboon P, Piriyaongsa J. Genetic diversity of the ORF5 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) genotypes I and II in Thailand. *Arch Virol*, 2013, 158: 943-953.
70. Otake S, Dee S, Corzo C, Oliveira S, Deen J. Long-distance airborne transport of infectious PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* from a swine population infected with multiple viral variants. *Vet Microbiol*, 2010, 145: 198-208.
71. Plagemann PG. GP5 ectodomain epitope of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, strain Lelystad virus. *Virus Res*, 2004, 102: 225-230.
72. Plana J, Vayreda M, Vilarrasa J, Bastons M, Rosell R, Martinez M, San Gabriel A, Pujols J, Badiola JL, Ramos JA, et al. Porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease). Isolation in Spain of the causative agent and experimental reproduction of the disease. *Vet Microbiol*, 1992, 33: 203-211.
73. Pol JM, Wagenaar F, Reus JE. Comparative morphogenesis of three PRRS virus strains. *Vet Microbiol*, 1997, 55: 203-208.
74. Renson P, Touzain F, Leuret A, Le Dimna M, Quenault H, Normand V, Claude JB, Pez F, Rose N, Blanchard Y, Bourry O. Complete Genome Sequence of a Recombinant Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Strain from Two Genotype 1 Modified Live Virus Vaccine Strains. *Genome Announc*, 2017, 5: e00454-17.
75. Ropp SL, Wees CE, Fang Y, Nelson EA, Rossow KD, Bien M, Arndt B, Preszler S, Steen P, Christopher-Hennings J, Collins JE, Benfield DA, Faaberg KS. Characterization of emerging European-like porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the United States. *J Virol*, 2004, 78: 3684-3703.
76. Rossow KD, Bautista EM, Goyal SM, Molitor TW, Murtaugh MP, Morrison RB, Benfield DA, Collins JE. Experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in one-, four-, and 10-week-old pigs. *J Vet Diagn Invest*, 1994, 6: 3-12.

77. Shi M, Lam TT, Hon CC, Hui RK, Faaberg KS, Wennblom T, Murtaugh MP, Stadejek T, Leung FC. Molecular epidemiology of PRRSV: a phylogenetic perspective. *Virus Res*, 2010, 154: 7-17.
78. Snijder EJ, Meulenberg JJM. The molecular biology of arteriviruses. *J Gen Virol*, 1998, 79: 961-979.
79. Stadejek T, Larsen LE, Podgorska K, Botner A, Botti S, Dolka I, Fabisiak M, Heegaard PMH, Hjulsager CK, Huc T, Kvisgaard LK, Sapierzynski R, Nielsen J. Pathogenicity of three genetically diverse strains of PRRSV Type 1 in specific pathogen free pigs. *Vet Microbiol*, 2017, 209: 13-19.
80. Stadejek T, Stankevicius A, Murtaugh MP, Oleksiewicz MB. Molecular evolution of PRRSV in Europe: current state of play. *Vet Microbiol*, 2013, 165: 21-28.
81. Sun Q, Xu H, An TQ, Cai XH, Tian ZJ, Zhang HL. Recent Progress in Studies of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus 1 in China. *Viruses-Basel*, 2023, 15: 1528.
82. Sun Q, Xu H, Li C, Gong B, Li Z, Tian ZJ, Zhang H. Emergence of a novel PRRSV-1 strain in mainland China: A recombinant strain derived from the two commercial modified live viruses Amervac and DV. *Front Vet Sci*, 2022, 9: 974743.
83. Tian K, Yu X, Zhao T, Feng Y, Cao Z, Wang C, Hu Y, Chen X, Hu D, Tian X, Liu D, Zhang S, Deng X, Ding Y, Yang L, Zhang Y, Xiao H, Qiao M, Wang B, Hou L *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: e526.
84. Van Breedam W, Van Gorp H, Zhang JQ, Crocker PR, Delputte PL, Nauwynck HJ. The M/GP(5) glycoprotein complex of porcine reproductive and respiratory syndrome virus binds the sialoadhesin receptor in a sialic acid-dependent manner. *PLoS Pathog*, 2010, 6: e1000730.

85. Veit M, Matczuk AK, Sinhadri BC, Krause E, Thaa B. Membrane proteins of arterivirus particles: structure, topology, processing and function. *Virus Res*, 2014, 194: 16-36.
86. Wang PP, Dong JG, Zhang LY, Liang PS, Liu YL, Wang L, Fan FH, Song CX. Sequence and Phylogenetic Analyses of the Nsp2 and ORF5 Genes of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Boars from South China in 2015. *Transbound Emerg Dis*, 2017, 64: 1953-1964.
87. Wang TY, Liu YG, Li L, Wang G, Wang HM, Zhang HL, Zhao SF, Gao JC, An TQ, Tian ZJ, Tang YD, Cai XH. Porcine alveolar macrophage CD163 abundance is a pivotal switch for porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Oncotarget*, 2018, 9: 12174-12185.
88. Wang X, Bai X, Wang Y, Wang L, Wei L, Tan F, Zhou Z, Tian K. Pathogenicity characterization of PRRSV-1 181187-2 isolated in China. *Microb Pathog*, 2023, 180: 106158.
89. Wang X, Marthaler D, Rovira A, Rossow S, Murtaugh MP. Emergence of a virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus in vaccinated herds in the United States. *Virus Res*, 2015, 210: 34-41.
90. Wang XC, Yang XR, Zhou R, Zhou L, Ge XN, Guo X, Yang HC. Genomic characterization and pathogenicity of a strain of type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res*, 2016, 225: 40-49.
91. Wensvoort G, Terpstra C, Pol JMA, Terlaak EA, Bloemraad M, Dekluyver EP, Kragten C, Vanbuiten L, Denbesten A, Wagenaar F, Broekhuijsen JM, Moonen PLJM, Zetstra T, Deboer EA, Tibben HJ, Dejong MF, Vantveld P, Groenland GJR, Vangennep JA, Voets MT *et al.* Mystery Swine Disease in the Netherlands - the Isolation of Lelystad Virus. *Vet Quart*, 1991, 13: 121-130.
92. Wills RW, Zimmerman JJ, Yoon KJ, Swenson SL, Hoffman LJ, McGinley MJ, Hill HT, Platt KB. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: routes of excretion. *Vet Microbiol*, 1997, 57: 69-81.

93. Wootton S, Koljesar G, Yang LZ, Yoon KJ, Yoo D. Antigenic importance of the carboxy-terminal beta-strand of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2001, 8: 598-603.
94. Wootton SK, Nelson EA, Yoo D. Antigenic structure of the nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1998, 5: 773-779.
95. Xie J, Zhu W, Chen Y, Wei C, Zhou P, Zhang M, Huang Z, Sun L, Su S, Zhang G. Molecular epidemiology of PRRSV in South China from 2007 to 2011 based on the genetic analysis of ORF5. *Microb Pathog*, 2013, 63: 30-36.
96. Xu H, Gong BJ, Sun Q, Li C, Zhao J, Xiang LR, Li WS, Guo ZY, Tang YD, Leng CL, Li Z, Wang Q, Zhou GH, An TQ, Cai XH, Tian ZJ, Peng JM, Zhang HL. Genomic Characterization and Pathogenicity of BJEU06-1-Like PRRSV-1 ZD-1 Isolated in China. *Transbound Emerg Dis*, 2023, 2023: 6793604.
97. Yamamoto Y, Gotoh S, Korogi Y, Seki M, Konishi S, Ikeo S, Sone N, Nagasaki T, Matsumoto H, Muro S, Ito I, Hirai T, Kohno T, Suzuki Y, Mishima M. Long-term expansion of alveolar stem cells derived from human iPS cells in organoids. *Nat Methods*, 2017, 14: 1097.
98. Yu F, Liu LQ, Tian XX, Chen LG, Huang XY, Sun Y, Yan Y, Tian ZJ, Cai XH, Liu D, An TQ. Genomic Analysis of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus 1 Revealed Extensive Recombination and Potential Introduction Events in China. *Vet Sci*, 2022, 9: 450.
99. Yun Z, Zhixiong L. Molecular Cloning and Identification of the ORF 7 gene of Chinese Isolates B 13 of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *CHINESE JOURNAL OF VETERINARY MEDICINE*, 1998, 24: 3-5.
100. Yuzhakov AG, Raev SA, Skrylev AN, Mishin AM, Grebennikova TV, Verkhovsky OA, Zaberezhny AD, Trus I, Nauwynck HJ, Aliper TI. Genetic and pathogenic characterization of a Russian subtype 2 PRRSV-1 isolate. *Vet Microbiol*, 2017, 211: 22-28.

101. Zhai SL, Lin T, Zhou X, Pei ZF, Wei ZZ, Zhang H, Wen XH, Chen QL, Lv DH, Wei WK. Phylogeographic analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus 1 in Guangdong province, Southern China. *Arch Virol*, 2018, 163: 2443-2449.
102. Zhang QY, Song ZB, Yu Y, Huang J, Jiang P, Shan H. Genetic analysis of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus 1 strain in China with new patterns of amino acid deletions in nsp2, GP3 and GP4. *Microb Pathogenesis*, 2020, 149: 104531.
103. Zhang QZ, Yoo DW. PRRS virus receptors and their role for pathogenesis. *Veterinary Microbiology*, 2015, 177: 229-241.
104. Zhao J, Zhu L, Deng H, Li F, Xu L, Sun X, Yin W, Kuang S, Li S, Zhou Y, Xu Z. Genetic characterization of a novel porcine reproductive and respiratory syndrome virus type I strain from southwest China. *Arch Virol*, 2021, 166: 1769-1773.
105. Zhou L, Yang X, Tian Y, Yin S, Geng G, Ge X, Guo X, Yang H. Genetic diversity analysis of genotype 2 porcine reproductive and respiratory syndrome viruses emerging in recent years in China. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 748068.
106. Zhou YJ, An TQ, Liu JX, Qiu HJ, Wang YF, Tong GZ. Identification of a conserved epitope cluster in the N protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Viral Immunol*, 2006, 19: 383-390.
107. Zhou YJ, Hao XF, Tian ZJ, Tong GZ, Yoo D, An TQ, Zhou T, Li GX, Qiu HJ, Wei TC, Yuan XF. Highly virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus emerged in China. *Transbound Emerg Dis*, 2008, 55: 152-164.
108. Zhou Z, Liu Q, Hu DM, Zhang Q, Han T, Ma Y, Gu XX, Zhai XY, Tian KG. Complete genomic characterization and genetic diversity of four European genotype porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates from China in 2011. *Virus Genes*, 2015, 51: 375-384