

NADC30-like 猪繁殖与呼吸综合征病毒样颗粒的制备与鉴定

陶一墨^{1,2}, 解长占², 王鹏², 金宁一^{*1,2}, 鲁会军^{*2}

1 广西大学动物科学技术学院, 广西 南宁 530004

2 中国农业科学院长春兽医研究所, 吉林 长春 130122

陶一墨, 解长占, 王鹏, 金宁一, 鲁会军. NADC30-like 猪繁殖与呼吸综合征病毒样颗粒的制备与鉴定[J]. 微生物学通报, 2022, 49(12): 5287-5297

Tao Yimo, Xie Changzhan, Wang Peng, Jin Ningyi, Lu Huijun. Preparation and verification of NADC30-like porcine reproductive and respiratory syndrome virus-like particles[J]. Microbiology China, 2022, 49(12): 5287-5297

摘要: 【背景】猪繁殖和呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)可以造成怀孕母猪的繁殖障碍及仔猪的呼吸系统疾病, 近年来, NADC30-like 谱系 PRRSV 已成为国内的优势流行毒株。【目的】研制针对 NADC30-like 谱系 PRRSV 的病毒样颗粒(virus-like particle, VLP)疫苗。【方法】将 PRRSV NADC30-like 毒株编码 GP5 蛋白开放阅读框 5 (open reading frame 5, ORF5)、ORF6 (编码 M 蛋白)分别连接至 pFastBacTMDual 载体 P₁₀ 和 P_H 启动子下游多克隆位点, 获得穿梭质粒 pFB-30-ORF5 及 pFB-30-ORF6, 酶切鉴定后, 将 ORF6 基因插入到穿梭质粒 pFB-30-ORF5 P_H 启动子下游, 构建穿梭质粒 pFB-30-ORF5-OPF6。将上述 3 种穿梭质粒分别转化大肠杆菌 DH10Bac 感受态细胞, 通过蓝白斑筛选及 PCR 鉴定重组杆粒。再将获得的重组杆粒转染至 SF9 昆虫细胞, 发现细胞病变后收获病毒液, 继续盲传 3 代, 在透射电镜下观察是否有病毒样颗粒。用第 3 代病毒液感染 SF9 细胞后, 分别用 GP5 蛋白、His-tag、Flag-tag 单克隆抗体作为一抗, 通过免疫电镜、间接免疫荧光(indirect immunofluorescence assay, IFA)、Western blotting 鉴定重组蛋白。【结果】成功构建了 3 种穿梭质粒 pFB-30-ORF5、pFB-30-ORF6 和 pFB-30-ORF5-OPF6, 酶切鉴定正确。通过蓝白斑筛选及 PCR 验证后获得重组杆粒, 分别命名为 Bacmind-30-ORF5、Bacmind-30-ORF6 和 Bacmind-30-ORF5-ORF6。重组杆粒感染 SF9 细胞 120 h 时出现明显的细胞病变, 收获病毒液后, 在透射电子显微镜可观察到大小为 50 nm 左右呈现球形结构的 VLPs。免疫电镜可以观察到胶体金颗粒结合在 VLPs 周围; IFA 结果显示实验组均出现了明显绿色的特异性荧光灶; Western blotting 结果表明, 3 种 VLPs 均出现特异性条带, 并与预期大

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0500104, 2018YFD0500803)

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2018YFD0500104, 2018YFD0500803)

*Corresponding authors: E-mail: JIN Ningyi: ningyik@126.com; LU Huijun: huijun_lu@126.com

Received: 2022-07-27; Accepted: 2022-10-05; Published online: 2022-11-09

小一致。【结论】制备了3种NADC30-like谱系PRRSV的病毒样颗粒,为针对PRRSV新谱系流行株疫苗的研发奠定了基础。

关键词: NADC30-like猪繁殖和呼吸综合征病毒(PRRSV); 病毒样颗粒; 重组杆状病毒

Preparation and verification of NADC30-like porcine reproductive and respiratory syndrome virus-like particles

TAO Yimo^{1,2}, XIE Changzhan², WANG Peng², JIN Ningyi^{*1,2}, LU Huijun^{*2}

1 College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi, China
2 Changchun Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130122, Jilin, China

Abstract: [Background] Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) can cause reproductive disorders in pregnant sows and respiratory diseases in piglets. In recent years, NADC30-like strains of PRRSV have become dominant in China. [Objective] To develop a virus-like particle (VLP) vaccine against NADC30-like strains of PRRSV. [Methods] We linked the encoding GP5 protein open reading frame 5 (ORF5) and ORF6 (encoding M protein) genes of NADC30-like strain to the downstream polyclonal sites of P₁₀ and P_H promoters in pFastBacTM dual vector to obtain the shuttle plasmids pFB-30-ORF5 and pFB-30-ORF6, respectively. After identification by restriction endonuclease digestion, the ORF6 gene was inserted into the downstream region of P_H promoter in the shuttle plasmid pFB-30-ORF5 to construct the shuttle plasmid pFB-30-ORF5-OPF6. The above three shuttle plasmids were respectively transformed into DH10Bac competent *Escherichia coli* cells, and the recombinant plasmids were identified by blue-white screening and PCR. The recombinant plasmids were then transfected into SF9 insect cells. After the appearance of cytopathic changes, the virus was harvested and passed on blindly for three generations. Whether there were virus-like particles was observed under a transmission electron microscope. After the SF9 cells were infected with the third-generation virus, the GP5, His-tag, and Flag-tag antibodies were used as the primary antibodies for the recombinant protein identification by indirect immunofluorescence assay (IFA) and Western blotting. [Results] Three shuttle plasmids pFB-30-ORF5, pFB-30-ORF6, and pFB-30-ORF5-OPF6 were successfully constructed and identified by restriction endonuclease digestion. After blue-white screening and PCR verification, the recombinant rod particles were obtained and named Bacmind-30-ORF5, Bacmind-30-ORF6, and Bacmind-30-ORF5-ORF6, respectively. Obvious cytopathic effect was observed in SF9 cells 120 h post infection with recombinant rod particles. After harvesting of the virus suspension, the spherical VLPs with the diameter of about 50 nm were observed under a transmission electron microscope. The binding of colloidal gold particles around VLPs was observed via immunoelectron microscopy, and the results of immunofluorescence assay showed obvious green specific fluorescent foci in the experimental group. Western blotting showed that all the three kinds of VLPs generated specific bands with the expected size. [Conclusion] Three kinds of virus-like particles of NADC30-like PRRSV were prepared, which laid a foundation for the research and development of

vaccines against the new prevalent strains of PRRSV.

Keywords: NADC30-like porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV); virus-like particle; recombinant baculovirus

猪繁殖与呼吸综合征(porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)是一种会造成母猪生殖障碍及仔猪呼吸系统疾病的免疫抑制类疾病,感染后可导致宿主免疫机能降低,继发其他病原感染^[1]。其病原体 PRRSV 是动脉炎病毒科有囊膜的单股正链 RNA 病毒,具有多种传播途径,变异速度快,不同亚型毒株的疫苗间交叉保护效果差^[2]。

2008 年,美国报道了一株 Nsp2 基因存在 131 个不连续氨基酸缺失的 PRRSV 并命名为 NADC30^[3-4]。自 2013 年以来,PRRS 在中国流行,这是由新的 PRRSV 变异株 NADC30-like 引起的,可能是从北美进口并在中国进化流行^[5]。目前我国大部分省份均有 NADC30-like PRRSV 检出,而且阳性率逐年上升,NADC30-like 现已成为多地的优势流行毒株。

GP5 是病毒主要的糖基化结构膜蛋白^[6],其与 M 蛋白共同构成病毒蛋白的至少一半,并在病毒中形成二硫键连接的异源二聚体。GP5 蛋白是 PRRSV 变异最大的蛋白,在欧洲型和美洲型之间只有 51%–55% 的序列同源性。GP5 的高度变异性可能是病毒之间缺乏免疫交叉反应的原因^[7]。GP5 在病毒的感染、组装和诱导机体产生中和抗体方面起到关键作用^[8]。

病毒样颗粒(virus-like particles, VLPs)是纳米级生物结构,以模仿天然病毒结构蛋白的空心颗粒,但不包含病毒遗传物质^[9]。杆状病毒表达系统是真核细胞中产生 VLP 的最常用系统之一^[10]。杆状病毒表达系统可以高水平表达目的蛋白^[11],并且其在形态结构上与相应的天然病毒具有高度一致性,具有较强的免疫原性、

特异性及生物活性^[11]。杆状病毒表达系统还具有安全性好、抗原纯度高等特点,所以具有良好的应用前景^[10]。

目前,商品化的疫苗主要针对经典 PRRSV 和 HP-PRRSV。目前,灭活和亚单位候选 PRRSV 疫苗的研究热点包括各种病毒灭活策略、佐剂、基于纳米颗粒的疫苗递送系统、DNA 疫苗,以及使用杆状病毒、植物和复制缺陷病毒作为载体疫苗生产的重组亚单位疫苗^[12]。因此,本试验利用昆虫细胞-杆状病毒表达系统表达了 NADC30 PRRSV 的 GP5 蛋白、M 蛋白和 GP5-M 融合表达蛋白,以期今后 NADC30-like PRRSV 的诊断及 VLPs 疫苗研发奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

大肠杆菌 DH10Bac 感受态细胞,北京百奥莱博科技有限公司; Trans1-T1 感受态大肠杆菌, TaKaRa 公司; Sf9 昆虫细胞、pFastBacTM Dual 载体由本实验室保存; T4 连接酶、Xho I、Kpn I、BamH I 和 Hind III 限制性内切酶, NEB 公司; 电泳缓冲液(50×TAE Buffer), 生工生物工程(上海)股份有限公司; 胶回收试剂盒, BioFluX 公司; 质粒小提试剂盒, Invitrogen 公司; Cellfectin[®] II、Grace 培养基、Sf-900 II 培养基试剂和 PRRSV GP5 蛋白单克隆抗体, Thermo Fisher 公司; IP 裂解液、His 抗体 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG、FITC 标记山羊抗小鼠 IgG 和核酸电泳凝胶回收试剂盒, BioFlux 公司。恒温水浴锅, 上海一恒科技有限公司; PCR 扩增仪, Life 公司; 冷冻离心机, Eppendorf 公司。

1.2 引物设计、克隆质粒的构建与鉴定

根据 GenBank 收录的 PRRSV NADC30 毒株基因序列(登录号为 MF375260.1)及杆粒的细菌转座附着位点 Tn7 (mini-attTn7)设计引物(表 1), 由吉林省库美生物科技有限公司合成。

在 ORF5、ORF6 的 N 端分别添加 6×His 标签和 Flag 标签,并在上、下游分别添加 *Xho* I、*Kpn* I 和 *Bam*H I、*Hind* III 酶切位点,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成重组质粒,分别命名为 pUC57-30-ORF5 和 pUC57-30-ORF6。

1.3 pFastBac™ Dual 穿梭质粒的构建与鉴定

将 pFastBac™ Dual 载体与克隆质粒 pUC57-30-ORF5 同时用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Kpn* I 进行双酶切,将 pFastBac™ Dual 载体与克隆质粒 pUC57-30-ORF6 同时用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行双酶切。胶回收目基因片段,使用 T4 连接酶将 ORF5、OPF6 分别连接至 pFastBac™ 双载体 P_H、P_{I0} 启动子下游多克隆位点,将连接产物转化至 Trans1-T1 感受态大肠杆菌,涂布于 100 μg/mL 的氨苄抗性 LB 琼脂平板,37 °C 培养 10 h。挑取单个菌落接入 100 μg/mL 氨苄抗性液体 LB 培养基,37 °C、220 r/min 培养 10 h 后小提质粒,将穿梭质粒用对应的限制性内切酶进行酶切,并将质粒测序鉴定。鉴定正确后分别命名为 pFB-30-ORF5 和 pFB-30-ORF6。

将 ORF6 基因连接至鉴定正确的穿梭质粒 pFB-30-ORF5 P_{I0} 启动子下游多克隆位点,方法同上,鉴定正确后命名为 pFB-30-ORF5-ORF6。

1.4 重组杆粒的获取

将穿梭质粒 pFB-30-ORF5、pFB-30-ORF6、pFB-30-ORF5-ORF6 分别转化至大肠杆菌 DH10Bac 感受态细胞,涂布于含有 50 μg/mL 卡那霉素、7 μg/mL 庆大霉素、10 μg/mL 四环素(以下简称“三抗”),以及 100 μg/mL β-半乳糖酶苷酶底物(X-gal)和 40 μg/mL IPTG 的 LB 平板上,37 °C 培养 48 h。挑取数个白色菌落于 5 mL 三抗液体 LB 培养基中,37 °C、220 r/min 培养 4 h 后划线于三抗 LB 琼脂平板,37 °C 培养 24 h 挑取单个白色菌落接入培养三抗液体 LB 培养基,37 °C、220 r/min 培养 12 h,碱裂解法提取重组杆粒,利用 M13 正向和反向引物对重组杆粒进行 PCR 验证。PCR 产物的大小=Mini-attTn7 长度(2 560 bp)+插入片段的大小。验证成功后分别命名为 Bacmid-30-ORF5、Bacmid-30-ORF6 和 Bacmid-30-ORF5-ORF6。

1.5 转染 Sf9 昆虫细胞及重组杆状病毒的收获与扩增

在六孔板中每孔接种 1×10⁶ 个细胞,细胞完全贴壁后换为 Grace 培养基。取 8 μL Cellfectin® II 和 5 μL 重组杆粒分别稀释于 100 μL Grace 培养基中(室温下至多 30 min)。将稀释后的 DNA 与

表 1 本实验所用引物

Table 1 Sequences of primers used in present study

引物名称 Gene name	序列 Sequence (5'→3')	基因 Gene	长度 Length (bp)
GP5-F	GGCTCGAGATGCTGGGTTAAATGCCTGA	ORF5	606
GP5-R	CCGGTACCCTAGTGGTGTATGGTGGTGG		
M-F	CCGGATCCATGGGTTCTTCTATCGACG	ORF6	517
M-R	CCAAGCTTTTATTTATCGTCGTCATCT		
M13F	TGTAAAACGACGGCCAGT	Mini-attTn7	2 560
M13R	CAGGAAACAGCTATGACC		

稀释的 Cellfectin® II 混合并在室温下孵育 20 min (以上为每孔用量)。每孔滴加 200 μ L DNA-转染混合物, 27 $^{\circ}$ C 孵育细胞 5 h 后换为 2 mL SF-900 II 完全培养基。27 $^{\circ}$ C 孵育细胞 6 d 左右, 直至观察到明显的细胞病变, 收取 P1 代重组杆状病毒, 在六孔板中每孔接种 2×10^6 个细胞, 细胞完全贴壁后, 每空加入 40 μ L 重组杆状病毒, 27 $^{\circ}$ C 孵育细胞 72 h, 收取 P2 代重组杆状病毒, 同理将重组杆状病毒培养至 P3 代。利用合成质粒 pUC57-30-ORF5、pUC57-30-ORF6 为标准品, 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, RT-qPCR) 测定第 3 代重组杆状病毒滴度。

1.6 电镜观察病毒样颗粒

将 P3 代培养物 27 $^{\circ}$ C 培养 72 h 后, 用移液器将细胞与培养基吹打混匀, 并转移至离心管, 3 000 r/min 离心 5 min, 上清即 P3 代重组杆状病毒, 转移至新的离心管, -80° C 保存。沉淀中加入 200 μ L 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)吹打混匀, 在功率 500 W 条件下工作 10 s、间歇 10 s, 共超声破碎 10 min 后, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清于无菌 EP 管中, 1% 磷钨酸负染后进行电镜观察。

1.7 免疫电镜观察病毒样颗粒

利用 GP5 蛋白、Flag-tag 单克隆抗体为一抗, 胶体金标记山羊抗兔 IgG (5 nm) 为二抗对第三代重组蛋白进行免疫电镜观察。

1.8 Western blotting 验证目的蛋白表达

将 P3 代沉淀用裂解液裂解并超声破碎(功率 500 W, 工作 10 s, 间歇 10 s, 共 10 min), 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清于无菌 EP 管, 加入 5 \times 蛋白上样缓冲液, 沸水浴 10 min, 进行 SDS-PAGE 电泳后转膜。将 1:1 000 稀释的 GP5 蛋白、Flag-tag 单克隆抗体分别作为一抗, 室温孵育 2 h, 1:1 000 稀释的山羊抗兔 IgG 为二抗,

室温孵育 30 min, 显影鉴定。

1.9 间接免疫荧光实验(indirect immunofluorescence assay)鉴定目的蛋白表达

将 SF9 细胞以 1×10^6 个细胞/孔的密度加入 12 孔板, 细胞贴壁后每孔接入 10 μ L P3 代重组杆状病毒, 27 $^{\circ}$ C 孵育细胞 60 h 后进行间接免疫荧光实验(indirect immunofluorescence assay, IFA)。

2 结果与分析

2.1 穿梭质粒构建及酶切鉴定结果

将 pFastBac™ Dual 载体与克隆质粒 pUC57-30-ORF5、pUC57-30-ORF6 用对应的限制性内切酶进行酶切, 可见约 5 000、606 及 516 bp 的条带。

对穿梭质粒 pFB-30-ORF5、pFB-30-ORF6 分别用对应的限制性内切酶酶切鉴定, 酶切鉴定结果如图 1 和图 2 所示, 可见约 606、516 bp 处条带, 对质粒测序验证, 发现与原序列一致, 表明 pFB-30-ORF5、pFB-30-ORF6 穿梭质粒构建成功。

将鉴定穿梭质粒 pFB-30-ORF5 与克隆质粒 pUC57-30-ORF6 同时用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行双酶切, 可见约 5 800、516 bp 的条带(图 1)。

对穿梭质粒 pFB-30-ORF5-ORF6 用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Kpn* I、*Bam*H I 和 *Hind* III 分别酶切鉴定, 可见约 606、516 bp 处条带(图 2B), 对质粒测序验证, 发现与原序列一致, 表明 pFB-30-ORF5-ORF6 穿梭质粒构建成功。

2.2 重组杆粒 PCR 鉴定结果

将重组杆粒转化至 DH10Bac, 提取重组杆粒利用 M13 正向和反向引物进行 PCR 鉴定, 结

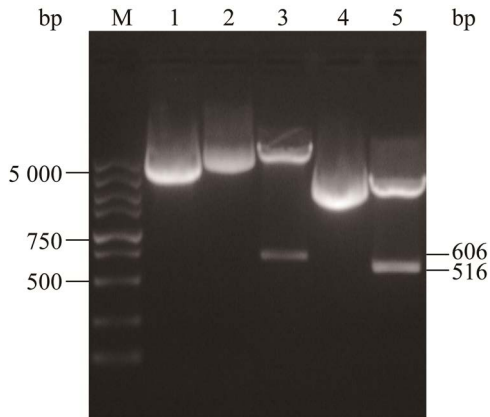


图1 穿梭质粒 pFB-30-ORF5、pFB-30-ORF6 的酶切鉴定 M: DL5000 DNA Marker; 1: pFastBac™ Dual; 2: pFB-30-ORF5; 3: pFB-30-ORF5 酶切鉴定; 4: pFB-30-ORF6; 5: pFB-30-ORF6 酶切鉴定

Figure 1 Identification of the pFB-30-ORF5 and pFB-30-ORF6. M: DL5000 DNA Marker; 1: pFastBac™ Dual; 2: pFB-30-ORF5; 3: Digestion reaction of pFB-30-ORF5; 4: pFB-30-ORF6; 5: Digestion reaction of pFB-30-ORF6.

果如图3所示, Bacmid-30-ORF5 约为 3 166 bp、Bacmid-30-ORF6 约为 3 076 bp、Bacmid-30-ORF5-ORF6 约为 3 682 bp, 与预期大小一致(图3)。表明重组杆粒 Bacmid-30-ORF5、Bacmid-30-ORF6 和 Bacmid-30-ORF5-ORF6 构建成功。

2.3 重组杆状病毒 30-GP5 的包装

重组杆粒转染到 Sf9 昆虫细胞后继续培养, 每天记录细胞病变。如图4所示, 与正常细胞相比(图4A), 培养 72 h 时细胞体积开始变大, 部分细胞悬浮(图4B); 培养 120 h 时, 绝大部分细胞破裂(图4C), 出现明显的细胞病变 (cytopathic effect, CPE)。说明重组杆状病毒 rBV-GP5、rBV-M、rBV-GP5-M 包装成功。P3 代重组杆状病毒接入 Sf9 细胞后, 如图4D所示, 培养 72 h 时出现了明显的 CPE。重组杆状病毒 rBV-GP5、rBV-M、rBV-GP5-M 滴度分别为 3.14×10^8 、 2.9×10^8 、 4.05×10^8 TCID₅₀/mL。

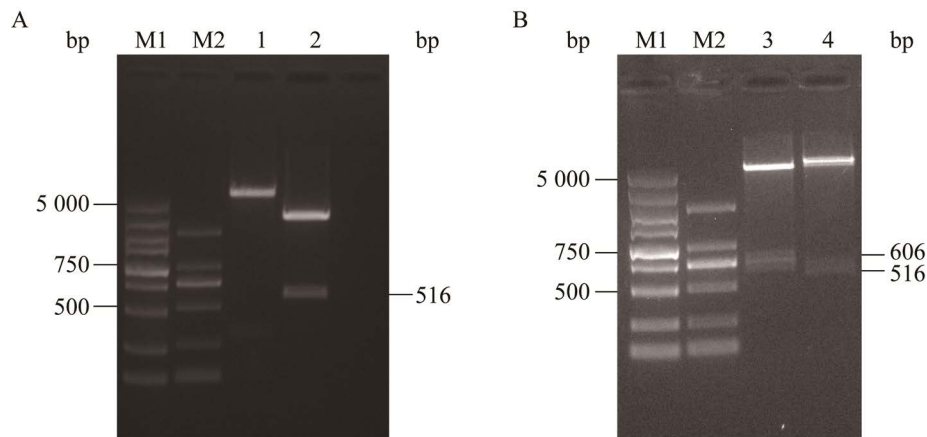


图2 pFB-30-ORF5-ORF6 的构建与鉴定 A: pFB-30-ORF5-ORF6 的构建; B: pFB-30-ORF5-ORF6 的鉴定; M1: DL5000 DNA Marker; M2: DL2000 DNA Marker; 1: pFB-30-ORF5; 2: pUC57-30-ORF6; 3: pFB-30-ORF5-ORF6 BamH I和 Hind III酶切产物; 4: pFB-30-ORF5-ORF6 Xho I和 Kpn I酶切产物

Figure 2 Construction and digestion reaction of pFB-30-ORF5-ORF6. A: Construction of pFB-30-ORF5-ORF6; B: Digestion reaction of pFB-30-ORF5-ORF6; M1: DL 5000 DNA Marker; M2: DL 2000 DNA Marker; 1: pFB-30-ORF5; 2: pUC57-30-ORF6; 3: Digestion reaction of pFB-30-ORF5-ORF6 by BamH I and Hind III; 4: Digestion reaction of pFB-30-ORF5-ORF6 by Xho I and Kpn I.

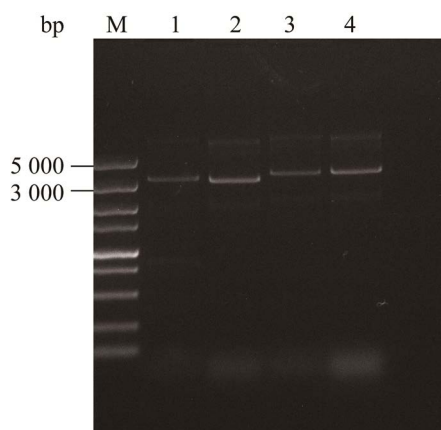


图3 重组杆粒 PCR 鉴定结果

Figure 3 Identification of the recombinant bacmaids by PCR. M: DL5000 DNA Marker; 1: Bacmid-30-ORF5; 2: Bacmid-30-ORF6; 3: Bacmid-30-ORF5-ORF6.

2.4 VLPs 电镜观察结果

通过透射电子显微镜观察可见,大量大小为 50 nm 左右的 VLPs 呈现球形结构,表面光滑、无凸起,符合 PRRSV 的基本形态特征(图 5)。

2.5 VLPs 免疫电镜观察结果

如图 6 所示,免疫电镜可观察到胶体金颗粒结合在 VLPs 周围。

2.6 间接免疫荧光对 P3 代重组杆状病毒 GP5 和 M 蛋白表达的鉴定结果

利用 GP5 蛋白单克隆抗体对重组杆状病毒 rBV-GP5 (图 7A)和 rBV-GP5-M (图 7B)表达 GP5 蛋白,Flag-tag 抗体对重组杆状病毒 rBV-M (图 7C)和 rBV-GP5-M (图 7D)表达 M 蛋白进行 IFA 检测,与未接入 P3 代重组杆状病毒的阴性对照组

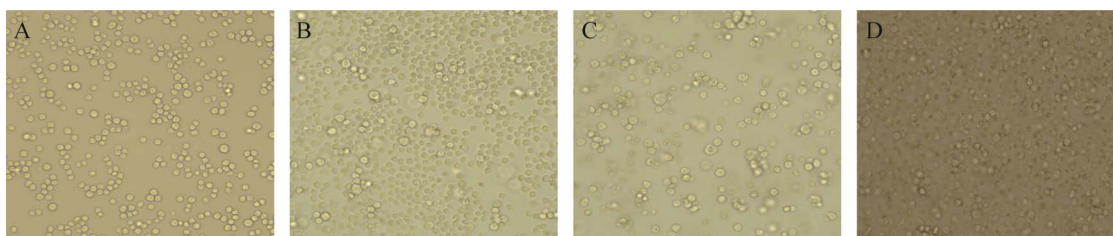


图4 昆虫细胞病变(200×)

Figure 4 Cytopathic effect of virally-infected SF9 insect cell (200×).

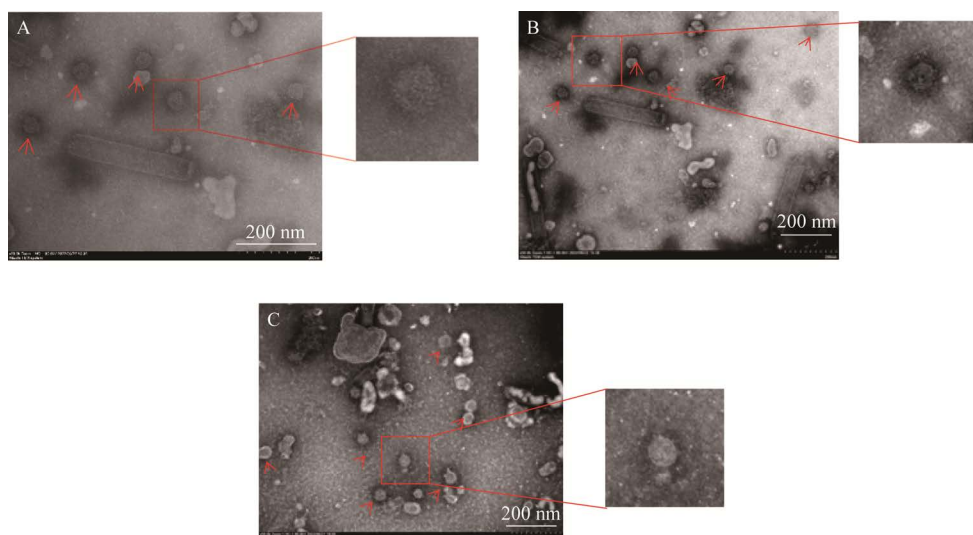


图5 VLP 电镜图

Figure 5 Electron microscopy of VLPs. A: 30-GP5 VLPs; B: 30-GP5-M VLPs; C: 30-M VLPs.

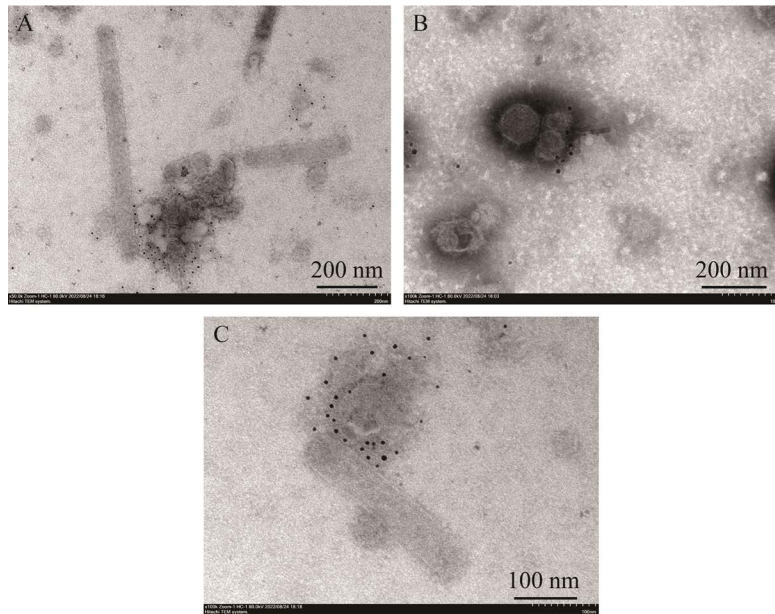


图 6 VLP 免疫电镜图

Figure 6 Immunoelectron microscopy of VLPs. A: 30-GP5 VLPs; B: 30-GP5-M VLPs; C: 30-M VLPs.

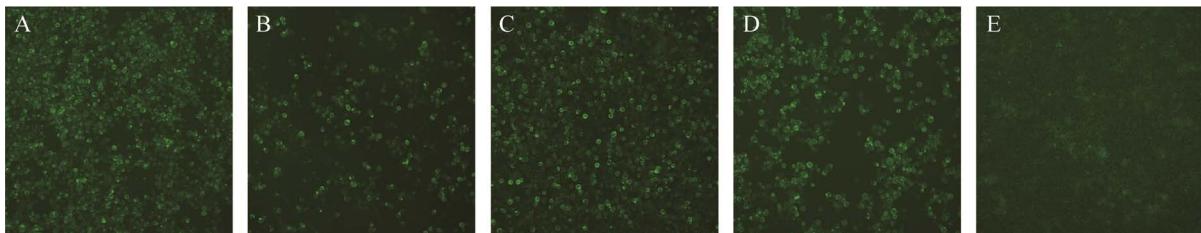


图 7 IFA 鉴定 GP5、M 蛋白的表达(200×) A: rBV-GP5; B: rBV-GP5-M; C: rBV-M; D: rBV-GP5-M; E: 阴性对照 SF9 细胞

Figure 7 Identification of the GP5-linker-M protein expression by IFA (200×). A: rBV-GP5; B: rBV-GP5-M; C: rBV-M; D: rBV-GP5-M; E: Normal SF9 cells.

(图7E)相比,实验组均出现了明显绿色特异性荧光灶,说明 GP5 蛋白、M 蛋白和 GP5-M 共表达蛋白已经在 SF9 细胞内表达。

2.7 重组蛋白 Western blotting 结果分析

对 P3 代蛋白样品 30-GP5、30-M、30-GP5-M 进行 Western blotting 实验后,如图 8 所示,在 23、20、53 kDa 左右出现了明显条带,而阴性对照泳道未出现条带,说明通过昆虫细胞—杆状病毒系统已经表达出目的蛋白。

3 讨论与结论

猪繁殖与呼吸综合征(PRRS)于 1987 年在美国首次发现,1990 年在欧洲首次报道^[13],PRRS 是引起妊娠母猪严重繁殖障碍和各年龄段猪的呼吸紊乱为主要特征的重要猪传染病之一^[14]。PRRS 是由猪繁殖和呼吸综合征病毒(PRRSV)引起的,其属于套式病毒目(Nidovirales)动脉病毒科(Arteriviridae),有囊膜,单股正链 RNA 病毒,基因组长度约为

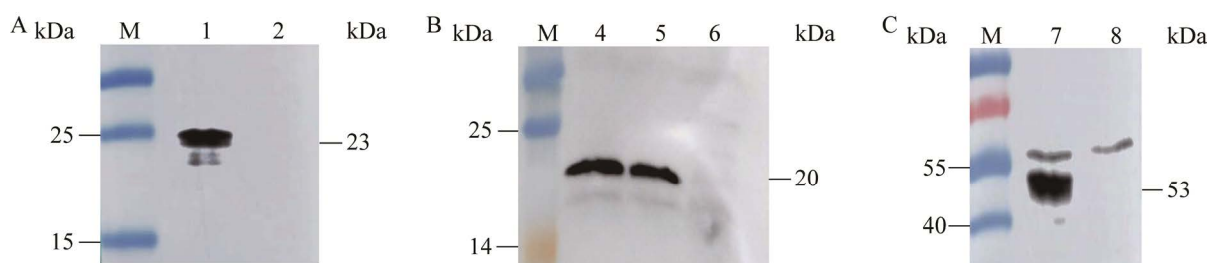


图 8 重组蛋白 Western blotting 鉴定 M: 蛋白 Marker; 1: GP5 蛋白; 4 和 5: M 蛋白; 7: GP5-M 重组蛋白; 2、6 和 8: 空白对照组

Figure 8 Identification of the GP5-linker-M protein expression by Western blotting. M: Protein Marker; 1: GP5 protein; 4, 5: M protein; 7: GP5-M recombinant protein; 2, 6, 8: Blank control group.

15 kb^[15]。2014 年以来, 有研究报道了中国南方地区 PRRSV 的野外分离株与 NADC30 的核苷酸具有很高相似性^[16]。在过去的两年里, NADC30-like 已经成为很多省份已接种疫苗猪的优势毒株^[16]。与 2006 年以来成为中国主要流行的高致病性 PRRSV (HP-PRRSV) 相比, NADC30-like 的毒力相对较弱, 主要导致临床呼吸道症状, 对猪的死亡率为 30%–50%^[17]。目前的商业疫苗对 NADC30-like 毒株无效^[18]。

预防猪繁殖和呼吸综合征 (PRRS) 的主要策略是接种疫苗。然而, 目前的商业化猪繁殖和呼吸综合征病毒 (PRRSV) 疫苗效果有限, 甚至可能导致猪感染^[19]。由于免疫逃避策略和病毒抗原的异质性, 目前商业化的 PRRSV 疫苗 (灭活疫苗和改良活疫苗) 效果不佳, 尤其是对于不同亚型毒株的感染^[20]。目前, 实验开发中的疫苗包括 PRRSV 减毒活疫苗、表达 PRRSV 病毒蛋白的重组载体疫苗、DNA 疫苗和植物亚基疫苗等^[21]。因为各亚型之间的遗传与抗原特异性, 又有 PRRSV 的各种免疫逃避策略^[22], 传统的控制策略和常规疫苗无法提供可持续保护, 限制了几乎所有实验中的 PRRSV 疫苗的价值。开发一种能对流行的 PRRSV 毒株提供广泛保护的通用疫苗已成为当前疫苗开发的主要挑战。

PRRSV GP5 蛋白是最丰富的包膜糖蛋白, 也是中和抗体的关键靶位^[23]。M 蛋白高度保守, 与 GP5 形成异源二聚体, 在病毒的组装与出芽过程中起到关键作用^[24]。昆虫细胞-杆状病毒表达系统可以稳定表达外源基因, 并可以对蛋白进行修饰, 而且杆状病毒具有高度的种属特异性, 不感染猪等脊椎动物, 具有生物安全性^[25]。

目前, 针对 PRRSV 的 VLP 疫苗的研究还很少, Xu 等^[26]通过 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统表达 PRRSV-1 的 GP5 和 M 蛋白的重组杆状病毒, 并且 PRRSV VLP+A5 佐剂可以通过鼻内免疫有效地触发特异性体液免疫反应。Murthy 等^[27]通过 PRRSV 保守抗原表位在大肠杆菌中表达了 HBcAg VLP, 并证明其可以阻断病毒对 MARC145 细胞的感染。本研究分别将 PRRSV NADC30 ORF5、ORF6 基因插入到 pFastBacTM 双载体上, 获得重组穿梭质粒, 将重组质粒转化至 DHbac 感受态大肠杆菌并获得重组杆粒, 通过脂质体转染法将重组杆粒转染至 SF9 贴壁昆虫细胞, 成功拯救出包装 VLPs 所需的各种重组杆状病毒, 这与许汪^[28]、王俊等^[29]利用该表达策略成功表达 PRRSV VLPs 的结果一致。通过 Western blotting、透射电镜观察证明, 利用 Bac-to-Bac 表达系统制备了 NADC30-like

VLPs, 可为后续 NADC30-like 猪繁殖与呼吸综合征病毒样颗粒研究奠定基础。

REFERENCES

- [1] Rossow KD. Porcine reproductive and respiratory syndrome[J]. *Veterinary Pathology*, 1998, 35(1): 1-20
- [2] Kappes MA, Faaberg KS. PRRSV structure, replication and recombination: origin of phenotype and genotype diversity[J]. *Virology*, 2015, 479/480: 475-486
- [3] Lunney JK, Fang Y, Ladinig A, Chen NH, Li YH, Rowland B, Renukaradhya GJ. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): pathogenesis and interaction with the immune system[J]. *Annual Review of Animal Biosciences*, 2016, 4(5): 129-154
- [4] Dokland T. The structural biology of PRRSV[J]. *Virus Research*, 2010, 154(1/2): 86-97
- [5] Popescu LN, Tribble BR, Chen NH, Rowland RRR. GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) as a target for homologous and broadly neutralizing antibodies[J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 209: 90-96
- [6] Brockmeier SL, Loving CL, Vorwald AC, Kehrl Jr ME, Baker RB, Nicholson TL, Lager KM, Miller LC, Faaberg KS. Genomic sequence and virulence comparison of four type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains[J]. *Virus Research*, 2012, 169(1): 212-221
- [7] Yu Y, Zhang QY, Cao Z, Tang YD, Xia DS, Wang G, Shan H. Recent advances in porcine reproductive and respiratory syndrome virus NADC30-like research in China: molecular characterization, pathogenicity, and control[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 12: 791313
- [8] Guo ZH, Chen XX, Li R, Qiao SL, Zhang GP. The prevalent status and genetic diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in China: a molecular epidemiological perspective[J]. *Virology Journal*, 2018, 15(1): 2
- [9] Hill BD, Zak A, Khera E, Wen F. Engineering virus-like particles for antigen and drug delivery[J]. *Current Protein & Peptide Science*, 2018, 19(1): 112-127
- [10] Fuenmayor J, Gòdia F, Cervera L. Production of virus-like particles for vaccines[J]. *New Biotechnology*, 2017, 39(Pt B): 174-180
- [11] Gopal R, Schneemann A. Production and application of insect virus-based VLPs[J]. *Methods in Molecular Biology*: Clifton, N J, 2018, 1776: 125-141
- [12] Renukaradhya GJ, Meng XJ, Calvert JG, Roof M, Lager KM. Inactivated and subunit vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome: current status and future direction[J]. *Vaccine*, 2015, 33(27): 3065-3072
- [13] Albina E. Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an overview[J]. *Veterinary Microbiology*, 1997, 55(1/2/3/4): 309-316
- [14] Lunney JK, Benfield DA, Rowland RRR. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: an update on an emerging and re-emerging viral disease of swine[J]. *Virus Research*, 2010, 154(1/2): 1-6
- [15] Ma ZX, Yang LP, Zhang YJ. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: propagation and quantification[J]. *Current Protocols in Microbiology*, 2018, 48: 15M.1.1-15M.15M.1.14
- [16] Li C, Zhuang J, Wang J, Han L, Sun Z, Xiao Y, Ji G, Li Y, Tan F, Li X, et al. Outbreak investigation of NADC30-like PRRSV in south-east China[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2016, 63(5): 474-479
- [17] Zhou L, Wang ZC, Ding YP, Ge XN, Guo X, Yang HC. NADC30-like strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, China[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2015, 21(12): 2256-2257
- [18] Jiang P, Chen PY, Dong YY, Cai JL, Cai BX, Jiang ZH. Isolation and genome characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in P.R. China[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 2000, 12(2): 156-158
- [19] Li LM, Zhao Q, Ge XN, Teng KD, Kuang Y, Chen YH, Guo X, Yang HC. Chinese highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus exhibits more extensive tissue tropism for pigs[J]. *Virology Journal*, 2012, 9: 203
- [20] Zhang FX, Chen SQ, Yang T, Ao H, Zhai LW, Li QJ, Xing K, Liu YB, Liu HT, Yu Y, et al. Novel DNA methylation markers of PRRSV-specific antibodies and their intergenerational transmission from pregnant sows to piglets[J]. *Gene*, 2021, 801: 145831
- [21] Hu J, Zhang C. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines: current status and strategies to a universal vaccine[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2014, 61(2): 109-120
- [22] Huang YW, Meng XJ. Novel strategies and approaches to develop the next generation of vaccines against

- porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)[J]. *Virus Research*, 2010, 154(1/2): 141-149
- [23] Thanawongnuwech R, Suradhat S. Taming PRRSV: revisiting the control strategies and vaccine design[J]. *Virus Research*, 2010, 154(1/2): 133-140
- [24] Wu F, Peng KF, Tian J, Xu XD, Zhou EM, Chen HY. Immune response to Fc tagged GP5 glycoproteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Viral Immunology*, 2014, 27(7): 343-349
- [25] Delputte PL, Vanderheijden N, Nauwynck HJ, Pensaert MB. Involvement of the matrix protein in attachment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to a heparinlike receptor on porcine alveolar macrophages[J]. *Journal of Virology*, 2002, 76(9): 4312-4320
- [26] Xu W, Du SW, Li TY, Wu SP, Jin NY, Ren LZ, Li C. Generation and evaluation of recombinant baculovirus coexpressing GP5 and M proteins of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus type 1[J]. *Viral Immunology*, 2021, 34(10): 697-707
- [27] Murthy AMV, Ni YY, Meng XJ, Zhang CM. Production and evaluation of virus-like particles displaying immunogenic epitopes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(4): 8382-8396
- [28] 许汪. PRRSV-1 VLPs 的构建及免疫原性研究[D]. 长春: 吉林农业大学硕士学位论文, 2018
Xu W. Construction and immunogenicity of PRRSV-1 VLPs[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin Agricultural University, 2018 (in Chinese)
- [29] 王俊, 代军飞, 马炳, 丁耀忠, 李茜, 侯谦, 乌云达来, 李克斌, 杨儒爱, 刘永生, 等. PRRSV 标记病毒样颗粒的制备及其鉴定[J]. *中国兽医科学*, 2018, 48(11): 1341-1351
Wang J, Dai JF, Ma B, Ding YZ, Li Q, Hou Q, Wu YDL, Li KB, Yang RA, Liu YS, et al. Preparation and identification of PRRSV virus-like particles with Myc and His tags[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2018, 48(11): 1341-1351 (in Chinese)