

分类号: S855.3

学校代码: 10757

密 级: 公开

学 号: 10757222125

# 塔里木大学

TARIM UNIVERSITY

## 硕士学位论文

(专业学位)

猪繁殖与呼吸综合征病毒 RT-RAA 检测方法的建立及 N 蛋白杂交瘤细胞的筛选

**Establishment of RT-RAA detection method for porcine reproductive and respiratory syndrome virus and preparation of N protein hybridism cells**

研 究 生 姓 名: 于 娜  
指 导 教 师: 赵爱云 副教授  
合 作 指 导 教 师: 曹宗喜 研究员  
申 请 学 位 类 别: 兽医硕士  
专 业 名 称: 兽医  
研 究 方 向: 动物疫病防控与检疫  
所 在 学 院: 动物科学与技术学院

新疆·阿拉尔  
二〇二四年六月

# 猪繁殖与呼吸综合征病毒 RT-RAA 检测方法的建立及 N 蛋白杂交瘤细胞的筛选

## 摘要

猪繁殖与呼吸综合征 (Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 是一种急性、高度传染的病毒性传染病, 该病的发生给养猪业带来很严重的经济损失。为了防止疾病的发生及传播导致的经济损失, 需要针对本病建立快速、便捷、高效的检测方法。由于 PRRSV NSP2 基因存在自然的插入和缺失, 根据不同毒株的插入和缺失位点可以鉴别不同的毒株, 所以本研究建立了针对 PRRSV (PRRS virus) NSP2 基因经典株、高致病病毒株 RT-RAA 荧光法和 RT-RAA 试纸条检测方法。因为 PRRSV N 蛋白有核定位功能且是动物产生 PRRS 抗体的主要抗原, 所以本研究针对 PRRSV ORF7 基因保守序列设计引物并进行 PRRSV N 蛋白的表达纯化及杂交瘤细胞的筛选, 目的为后续成功制备出 PRRSV N 单克隆抗体提供条件, 进而为 PRRSV 检测方法的建立提供基础。

RT-RAA 检测方法针对两个毒株设计一对引物及两对探针, 并且构建成功了两个重组质粒 pMD18T-NSP2-TJ、pMD18T-NSP2-VR2332, 将质粒按照十倍倍比稀释进行敏感性、特异性试验。pMD18T-NSP2-TJ (高致病病毒株) 的 RT-RAA 试纸法最低检测限为  $1.71 \times 10^3$  copies/ $\mu\text{L}$ , pMD18T-NSP2-VR233 (经典株) 为  $2.19 \times 10^4$  copies/ $\mu\text{L}$ ; RT-RAA 荧光法对高致病性毒株最低检测限为  $1.71 \times 10^1$  copies/ $\mu\text{L}$ , 经典株为  $2.19 \times 10^3$  copies/ $\mu\text{L}$ 。将 RT-RAA 方法与国标 PCR 法进行临床样本检测, 检测结果比较得出 RT-RAA 试纸法敏感性为 100%, 高致病病毒株试纸法特异性为 97.7%, 假阳性率为 2.25%, 经典株特异性为 98.4%, 假阳性率为 1.56%; RT-RAA 高致病病毒株荧光法敏感性为 95.5%, 特异性为 100%; 经典株敏感性为 93.0%, 特异性为 100%。

本试验选择 pET-28a 作为载体与 PRRSV ORF7 基因进行连接、转化, 成功构建重组质粒 pET-28a-ORF7, 经鉴定重组蛋白 pET-28a-N 表达形式为上清表达。将表达蛋白纯化作为抗原与佐剂混合进行小鼠免疫, 将效价达到要求的小鼠取脾细胞与 SP2/0 细胞进行融合后用间接 ELISA 进行阳性杂交瘤细胞筛选。

**关键词:** 猪繁殖与呼吸综合征病毒; RT-RAA; 高致病病毒株; 经典株; N 蛋白; 细胞融合

# Establishment of RT-RAA detection method for porcine reproductive and respiratory syndrome virus and preparation of N protein hybridism cells

## Abstract

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is an acute and highly contagious viral infectious disease, which brings serious economic losses to the pig industry. In order to prevent the occurrence of the disease and the economic loss caused by the spread of the disease, it is necessary to establish a rapid, convenient and efficient detection method for the disease. Because of natural insertions and deletions in the PRRSV NSP2 gene, Different strains can be identified according to the insertion and deletion sites of different strains. Therefore, in this study, we established RT-RAA fluorescent assay and RT-RAA dipstick-based assay for the detection of NSP2 gene of PRRSV (PRRS virus) classical strain and highly pathogenic strain. Because PRRSV N protein has nuclear localization function and is the main antigen for producing PRRS antibodies in animals, we also designed primers targeting the conserved sequence of PRRSV ORF7 gene, purified PRRSV N protein and screened hybridism cells. The aim of this study is to provide conditions for the successful production of PRRSV N monoclonal antibody, and to provide a basis for the establishment of PRRSV N detection method.

A pair of primers and two pairs of probes were designed and two recombination plai ds pMD18T-NSP2-TJ and pMD18T-NSP2-VR2332 were successfully constructed for RT-RAA detection. The sensitivity and specificity of the plai ds were tested by tenfold dilution. The detection limits of pMD18T-NSP2-TJ (highly pathogenic strain) and pMD18T-NSP2-VR233 (classical strain) were  $1.71 \times 10^3$  copies/ $\mu$ L and  $2.19 \times 10^4$  copies/ $\mu$ L, respectively. The detection limit of RT-RAA fluorescence assay for highly pathogenic strains was  $1.71 \times 10^1$  copies/ $\mu$ L, and that for classical strains was  $2.19 \times 10^3$  copies/ $\mu$ L. The results showed that the sensitivity of RT-RAA test strip method was 100%, the specificity of RT-RAA test strip method was 97.7%, the false positive rate was 2.25%, and the specificity of classic strain was 98.4%, the false positive rate was 1.56%. The sensitivity and specificity of RT-RAA assay for highly pathogenic strains were 95.5% and 100%, respectively. The sensitivity of the classical strain was 93.0%, and the specificity was 100%.

In this study, pET-28a was selected as a vector to connect and transform the PRRSV ORF7 gene, and the recombination plasma pET-28a-ORF7 was successfully constructed. The recombination protein pET-28a-N was identified as the superannuate expression. The expressed protein was purified and used as antigen mixed with adjustment to immunize mice. The spleen cells of the mice with the required niter were fused with SP2/0 cells, and the positive hybridism cells were screened by indirect ELISA.

**Key words:** Porcine reproductive and respiratory syndrome virus; RT-RAA; Highly pathogenic strains; Classical strain; N protein; Cell fusion

本文是国家自然科学基金项目  
“GP4 和 GP2a 蛋白的 N-糖基化修饰影响 PRRSV 感染入侵  
的机制研究”的部分研究成果

(项目编号: 32060796)

课题主持人: 曹宗喜 研究员

(海南省农业科学院)

# 缩略词表

缩写	英文名称	中文名称
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
WB	Western blot	免疫印迹
TMB	Tetra methyl Benzedrine	四甲基联苯胺
FCA	Freund's Adjuvant Complete	弗式完全佐剂
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate	十二烷基硫酸钠
bp	Base pair	碱基对
FIA	Freund incomplete adjuvant	弗式不完全佐剂
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside	异丙基-β-D-硫代半乳糖苷
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
OD	Optical density	光密度

## 目 录

第 1 章 引言.....	1
1.1 PRRSV 的流行病学.....	1
1.2 病原学研究进展.....	2
1.3 诊断方法研究进展.....	4
1.4 选题目的及意义.....	9
第 2 章 PRRSV NSP2 基因 RT-RAA 试纸法的建立 .....	10
2.1 材料.....	10
2.2 试验方法.....	11
2.3 试验结果.....	16
2.4 讨论.....	20
第 3 章 PRRSV NSP2 基因 RT-RAA 荧光法的建立 .....	22
3.1 材料.....	22
3.2 试验方法.....	22
3.3 结果.....	24
3.4 讨论.....	27
第 4 章 PRRSV N 蛋白的克隆及表达.....	28
4.1 材料.....	28
4.2 试验方法.....	29
4.3 试验结果.....	33
4.4 讨论.....	36
第 5 章 动物免疫及 N 蛋白杂交瘤细胞的筛选 .....	37
5.1 材料.....	37
5.2 试验方法.....	38
5.3 结果.....	41
5.4 讨论.....	44
结论.....	46
参考文献.....	47

## 第 1 章 引言

猪繁殖与呼吸综合征是由猪繁殖与呼吸综合征病毒（PRRS virus, PRRSV）感染猪而引起的疾病。感染 PRRSV 的母猪会出现繁殖障碍、耳尖发绀、呼吸不畅等临床特征。PRRS 是危害生猪养殖业健康发展的重要疫病之一<sup>[1,2]</sup>。

### 1.1 PRRSV 的流行病学

PRRSV 可以感染所有年龄段的猪只，妊娠母猪和幼猪的临床症状最明显<sup>[3]</sup>。妊娠母猪感染 PRRSV 会出现死胎、木乃伊胎等；仔猪感染则会产生呼吸系统疾病导致呼吸困难<sup>[4]</sup>。本病原主要经呼吸道入侵，直接或间接感染等<sup>[5]</sup>。

#### 1.1.1 传染源

发病猪以及携带 PRRSV 的无症状感染的猪都是本病的传染源。PRRSV 可在猪肺泡巨噬细胞上增殖并产生病变，发病猪的脾细胞中以及呼吸道上皮都有病毒抗原的存在<sup>[6,7]</sup>。

#### 1.1.2 传播途径

本病可以通过粪便以及分泌物向外排毒而导致周围环境的污染，间接接触或交配导致健康动物感染 PRRSV<sup>[8]</sup>，以及通过垂直传播导致胎儿感染<sup>[9]</sup>。

#### 1.1.3 易感动物

PRRSV 对于不同性别、年龄以及生长阶段的猪均易感。野猪在与家猪一起饲养时，非常容易感染发病<sup>[10]</sup>。

#### 1.1.4 疫病史

在 1987 年美国首次报道了 PRRS 的存在，但由于不清楚其病原所以将其称为“猪神秘病”。在 1990~1992 年欧洲和亚洲也对 PRRS 进行了报道，1991 年在荷兰分离得到

PRRSV Leslystad virus (LV) 株, 1992 年在美国分离得到 PRRSV VR-2332 株, 同年本病原被 OIE 正式命名为猪繁殖与呼吸综合征病毒。Leslystad virus(欧洲毒株)与 VR-2332 (北美毒株) 被认为是每个地区的参考毒株。郭宝清团队于 1995 年首次从流产胎儿中分离出 CH-1a 毒株<sup>[11]</sup>, 从 1995 年到 2005 年我国主要呈地方性流行状态, 从 2006 年开始中国出现了高致病性 PRRSV 毒株而导致 PRRS 的大流行<sup>[12-14]</sup>。自 2013 年以后中国又出现了新的毒株 NADC30 样变异株<sup>[15-18]</sup>。PRRS 一直在中国流行至今, 造成了巨大的经济损失<sup>[19,20]</sup>。

## 1.2 病原学研究进展

### 1.1.3 基因组结构

PRRSV 为动脉病毒科动脉炎病毒属单股正链 RNA 病毒且具有囊膜, 病毒粒子呈球形, 表面有纤突, 直径约为 45~65 nm, PRRSV 基因组全长约 15 kb, 包含已知的 11 开放阅读框, ORF1a 和 ORF1b 位于 5'端, 编码病毒 RNA 聚合酶复制。在 5'端和 3'端都各有一编码结构, 5'非编码区前含一帽子结构, 3'端非编码区后存在一 PloyA 尾巴<sup>[21,22]</sup>。

### 1.1.4 主要编码蛋白

ORF1 基因编码非结构蛋白, 可以参与病毒的复制<sup>[23]</sup>。ORF1a 和 ORF1b 构成了 ORF1, ORF1a 编码 10 个非结构蛋白, 分别为: NSP1 $\alpha$ 、NSP1 $\beta$ 、NSP2~NSP6、NSP7 $\alpha$ 、NSP7 $\beta$ 、NSP8<sup>[24,25]</sup>。ORF1b 则编码 4 个非结构蛋白, 分别为: NSP9~NSP12。

NSP1 $\alpha$ : 一共有三个结构域: N 端的锌指结构、番瓜酶样半胱氨酸蛋白区和 C 端延伸区<sup>[26]</sup>。锌指结构域对动脉炎病毒基因组的 RNA 转录有重要作用。NSP1 $\alpha$ 被多聚蛋白复合体释放出来 PCP $\beta$ 产生 NSP1 $\beta$ , 其结构包括 4 个部分其中的核酶区对单链 RNA 和双链 DNA 都具有核酶活性、PCP $\beta$ 区的活性位点位于 Cys90 和 His159。NSP1 $\beta$ 会抑制干扰素的产生以及对抗宿主的天然抗病毒功能<sup>[27,28]</sup>。

**NSP2:** 在不同的 PRRSV 毒株中, 其大小从 1168 到 1196 个残基不等<sup>[29]</sup>。它是最易变的非结构蛋白, 亚型之间只有 32% 的相似性。NSP2 在其 N 端附近包含一个木瓜蛋白酶样结构域 (PL2), 随后是一个富含脯氨酸的高变区和四个疏水区域, 以及一个保守的 C 端结构域。PL2 具有去泛素化活性<sup>[30,31]</sup>。NSP2 可以直接影响 PRRSV 的病毒复制, 在调节宿主免疫反应性当中也同样具有重要作用, 最重要的是 NSP2 的缺失位点不同而不同毒株之间 PRRSV 的毒力存在差异。

**NSP3 蛋白:** 有四个推定的跨膜区, 和其他非结构蛋白一起形成复制/转录复合体。

**NSP4:** 它在被 NSP2 蛋白酶水解后激活。NSP4 具有 3C 样蛋白酶活性, 一共包括三个结构域, 其中 C 末端的功能区域 III 能影响酶切割效率, NSP4 可以进行顺式切割, 在 NSP4/5 连接区进行顺式切割, 在 NSP3/4 以 NSP11/12 的连接区进行反式切割<sup>[32]</sup>。

**NSP7:** 含有一个内部切割位点, 并被证明被切割成两个蛋白质 NSP7 $\alpha$ 和 NSP7 $\beta$ <sup>[33,34]</sup>。

**NSP8:** NSP8 是 NSP9 的 N 端延伸, 其功能可能与 NSP9 有很大关联<sup>[35]</sup>。

**NSP9:** 是病毒 RNA 依赖性聚合酶, NSP10 是一种含有锌指区域的解旋酶<sup>[36]</sup>, 而 NSP11 是一种特异性尿苷酸内切酶<sup>[37]</sup>。

**GP2a:** 由 ORF2 编码的 GP2a 包含 N 端信号序列、外结构域、内结构域。GP2a 有两个保守的糖基化位点。GP2a 能抑制细胞凋亡、T 淋巴细胞增殖的功能, 并且可以与 CD163 受体结合介导病毒进入宿主细胞<sup>[38]</sup>。ORF2b 完全嵌入编码 GP2a 的 ORF2 中, 编码的 E 蛋白是一种非糖基化次要包膜蛋白。GP2a 有可能参与病毒融合及内化过程, 与在许多其他病毒中发现的其他蛋白类似。

**GP3:** GP3 是病毒包膜的一个次要成分, 是 PRRSV 糖化程度最高的包膜蛋白。美国和欧洲亚型之间的总体序列相似性为 58%, 但最高的差异是在 C 端 30~50 个残基, 其中欧洲亚型有额外的 11 个氨基酸延伸。预测的外域在两种亚型之间约有 70% 一致性

[39]。

**GP4:** GP4 蛋白的氨基酸序列进行比较, 40~79 aa 的中和结构域是 GP4 变化最大的区域。GP4 的中和结构域可鉴定 LV。GP4 中含有高度可变的中和表位, 能够诱导保护性免疫<sup>[40, 41]</sup>。

**GP5 蛋白:** ORF5 编码, N 端的信号肽和外功能区、跨膜区、C 末端构成 GP5 蛋白, 至少有 3 个 B 细胞表位以及两个 T 细胞表位。有 5 个糖基化位点, 其高变区有潜在的 N-糖基化位点, 且 GP5 的胞外结构域及糖基化的缺失会增强病毒中和效果及中和表位 B 细胞的免疫原性<sup>[42, 43]</sup>。在 PRRSV 的结构蛋白编码区的 5 个氨基酸位点和非结构蛋白编码区的 4 个氨基酸位点的替换可能导致其毒力减弱。

**M 蛋白:** M 蛋白是 PRRSV 中的保守蛋白且有很强的抗原性并可与肝素受体互作, GP5 蛋白参与病毒与受体结合的过程同时也促进病毒进入宿主细胞<sup>[43, 44]</sup>。PRRSV 缺失 M 蛋白与 GP5 蛋白任意一个都会导致无法产生病毒粒子<sup>[45]</sup>。

**N 蛋白:** PRRSV N 蛋白是 PRRSV 病毒粒子中含量最多的蛋白, 由 ORF7 基因编码, 分子量为 15 kDa, ORF7 由最小的亚基因组表达, 是感染细胞中表达量最高蛋白免疫原性最强, 在猪感染 PRRSV 最先产生的抗体就是针对 N 蛋白。PRRSV 不同毒株之间序列存在的最明显的差异就是在该结构域当中。

### 1.1.5 致病性

PRRSV 会导致母猪繁殖障碍以及仔猪呼吸系统疾病等, 妊娠母猪出现流产、发情推迟等症状; 仔猪会出现阶段性腹泻、轻微的神经症状以及关节炎等。PRRSV 主要感染猪的单核细胞和巨噬细胞, 会出现气喘、咳嗽、呼吸急促的现象<sup>[46]</sup>。PRRSV 常与猪瘟病毒、猪圆环病毒、猪伪狂犬病毒等混合感染<sup>[47]</sup>, 容易继发沙门氏菌、副猪嗜血杆菌病等, 严重导致猪的死亡。

## 1.3 诊断方法研究进展

根据临床症状、流行病学等可以做出初步判断，为了能准确地对疾病做出判断还需要进行实验室诊断才能得出最后的结论<sup>[48]</sup>。实验室诊断分为病原学诊断、分子生物学诊断、血清学诊断、病理组织学诊断等。每一种诊断方法都有其各自的优点和缺点。病毒分离检测<sup>[49]</sup>耗时长且操作较复杂，需要专业的人员进行实验操作，不适用于比较大规模的检测；分子生物学当中的 PCR、qPCR 应用较多，PCR 需要退火延伸变性等，耗时也长还需要搭配琼脂糖凝胶电泳才能得出最终的检测结果具有一定的局限性<sup>[50]</sup>；qPCR 检测结果取决于定量循环和标准曲线的关系<sup>[51]</sup>；LAMP 等容易污染出现假阳性<sup>[52]</sup>。而血清学检测方法当中的 ELISA 检测方法不适用于抗体水平的定量分析<sup>[53]</sup>，间接免疫荧光试验这种方法存在较强的主观性需要专业的人员进行分析，不适用于推广于临床实践当中去<sup>[54]</sup>。

### 1.3.1 病原学诊断

病原学诊断通过分离 PRRSV 进行病毒鉴定确诊，根据不同的临床症状采取不同的样本诊断<sup>[55]</sup>。

#### 1.3.1.1 病原分离与鉴定

将病料组织加入适量的 PBS 研磨处理后离心，用过滤器进行过滤，反复冻融三次接种于 Marc-145 细胞培养，盲传三代后经鉴定在 Marc-145 细胞上进行分离，观察细胞病变。细胞病变典型特征是细胞发生圆缩、聚集、破裂，最后形成空洞<sup>[56]</sup>，通过电子显微镜观察可以看到完整的病毒粒子。由于电子显微镜的价格比较高并且不能准确地区分这一类病毒，不适合临床应用，不能作为常规的检测方法。

### 1.3.2 血清学诊断

#### 1.3.2.1 酶联免疫吸附试验（Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）

ELISA 操作简便实验时间短易于标准化，可应用于大范围的流行病学调查。杨锐<sup>[57]</sup>对 N 蛋白进行表达纯化免疫小鼠建立 PRRSV 间接 ELISA 方法，对小鼠抗体效价进行检

测，并用 ELISA 筛选能稳定分泌 PRRSV N 蛋白的单克隆抗体。经试验证明此试验建立的检测方法重复性好、特异性强、灵敏度高，为有效的 PRRSV 检测方法。Zhao 应用 ELISA 针对不同基因型的 PRRSV 抗体，包括 PRRSV-1、经典毒株、HP-PRRSV 以及 NADC30 类毒株，检测 PRRSV 抗体评估 NADC30 样灭活疫苗有重要价值<sup>[58]</sup>。

### 1.3.2.2 间接免疫荧光实验 (Indirect immunofluorescence assay, IFA)

IFA 是可以用于检测 PRRSV 抗体或抗原。此方法灵敏度较高，一种荧光二抗可以检测多种抗原抗体。荆扬<sup>[59]</sup>利用 IFA 评估 MARC-145<sup>ORF6</sup> 细胞系传代的稳定性及亚细胞定位，实验结果表明细胞系在传代过程中保持稳定。Dike Jiang<sup>[60]</sup> 为了确认从猪样本中分离的 PRRSV，使用 IFA 来鉴定已培养 48 h 的感染 Marc-145 细胞。细胞进行染色，分离的 PRRSV 毒株可以在 Marc-145 细胞上增殖，观察到的病毒感染的形态学变化。

### 1.3.2.3 免疫过氧化物酶单层实验 (Immunoperoxidase monolayer assay, IPMA)

IPMA 可用于检测 PRRSV 抗体，需要对敏感的单层细胞（如 Marc-145 细胞）进行实验<sup>[61]</sup>。杨艳艳<sup>[61]</sup>应用 IPMA 筛选出 PRRSV 单克隆抗体能够使 PRRSV 中高致病性毒株 HN07-1 和经典株 BJ-4 感染的 Marc-145 细胞被特异性染色，精准地筛选出单克隆抗体，可用单克隆抗体的初筛及鉴定和单克隆抗体的特异性鉴定。

### 1.3.2.4 免疫胶体金诊断试纸条 (Immune colloidal gold technique, GICT)

GICT 将胶体金标记技术、免疫检测技术和层析分析技术等多种技术有机结合在一起的标记免疫检测技术。与斑点法区别在于液体移动方向不一致，斑点法是径向穿流而 GICT 是横向流动<sup>[63]</sup>。胡冉冉<sup>[64]</sup>将 PRRSV M 蛋白进行表达纯化后进行小鼠的免疫，制备鼠抗 PRRSV dM 的多克隆抗体，应用制备的多克隆抗体和重组蛋白建立了胶体金免疫层析试纸条的方法，实现了疾病的可视化检测。

## 1.3.3 分子生物学诊断

### 1.3.3.1 聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

PCR 是体外酶促进合成特异 DNA 片段的一种检测方法, 由低温退火、高温变性、延伸等步骤反应组成的一个循环周期, 能使目的基因片段进行扩增, 特异性强, 灵敏度高<sup>[65]</sup>。2001 年孙明<sup>[65]</sup>应用 PCR 建立了几种病毒的检测方法, 其中包括 PRRSV 的检测, 通过 PCR 技术的建立为进一步多联 PCR 技术打下了基础。2023 年陈旭<sup>[67]</sup>根据 HP-PRRSV Nsp2 蛋白氨基酸的缺失设计了 2 对特异性引物建立二重 PCR 方法, 可以鉴别 PRRSV 和 HP-PRRSV 且对 PRRSV 检测灵敏度高。

### 1.3.3.2 荧光定量 PCR (Real-time PCR, RT-PCR)

实时荧光定量 PCR Taq-Man 探针法相较于常规 PCR 特异性高、定量准确, 多重 Taq-Man 荧光定量 PCR 在一个体系当中可以检测多种病原, 可以节约时间以及成本<sup>[68]</sup>。周茜<sup>[69]</sup>建立了检 PRRSV 同时鉴别类 NADC30 毒株的双重荧光定量 PCR, 此检测方法可用于 PRRSV 和类 NADC30 样毒株的流行病学调查, 分别针对保守的 N 蛋白基因和 NSP2 基因设计特异性引物以及探针, 并且优化反应体系以及条件, 对临床样本检测结果显示此检测方法与临床诊断结果一致, 可以应用于流行病学调查。查帆<sup>[70]</sup>建立检测美洲型 PRRSV 荧光定量 PCR, 并且将此方法与国标法进行比较, 符合率相当且高于常规 PCR 的阳性检出率。建立的检测方法可避免因引物结合位点突变引起的检测准确率有差异的现象, 并且为猪繁殖与呼吸综合征病毒的快检和定量分析提供了思路及策略。

### 1.3.3.3 环介导等温扩增技术 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)

此技术基本原理是在目的双链 DNA 解链后, 内外引物识别相应位点, 在聚合酶作用下延伸<sup>[71]</sup>。当外引物延伸至内引物处时可将内链置换形成 DNA 结构。此结构再被反复识别、延伸、扩增, 最终形成一系列大小不一的结构。环介导等温扩增技术不需要模板热变性, 仅需要普通的水浴就能完成。罗斐斐<sup>[72]</sup>建立 LAMP 检测方法不需要借助昂贵的仪器, 只要加入 1  $\mu\text{L}$  的橙红色核酸染料就可以对结果进行判读。罗永忠<sup>[73]</sup>基于 PRRSV M 蛋白基因保守区域设计引物建立 LAMP 检测方法, 并对其灵敏性、特异性、稳定性进行了评价。该方法在 60 min 内就能实现对目标核酸片段的大量扩增, 实现了

真正意义上的快检。

#### 1.3.3.4 重组酶介导扩增技术 (Recombinase Aided Amplification, RAA)

重组酶环介导扩增技术是一种新型的分子生物学检测技术, 应用的范围较广泛, RAA 技术在恒温 37°C 时可以使核酸快速扩增, 方便应用于实践<sup>[74]</sup>。陈素贞<sup>[75]</sup>建立 RT-RAA 试纸法, 通过反转录酶与重组酶扩增结合检测 PRRSV 的侧流层析试纸条的可视化 RT-RAA 方法。能够很直观地观察到检测结果并且在 20 min 内即可完成检测, 2 min 就能对结果进行可视化判定。陈耀<sup>[76]</sup>针对 PRRSV ORF6 基因的保守区域建立了 RT-RAA 检测方法, 该方法能在 40 °C 时 25 min 即可完成扩增, 经试验证明此方法灵敏度是常规 RT-PCR 的 10 倍, 检测结果与荧光 RT-PCR 测方法一致。

#### 1.3.3.5 DNA 芯片 (DNA microarray)

DNA 芯片是一种载体上面排列着数千个 cDNA 或寡核苷酸代表已知基因覆盖基因整个序列及所有可能的突变。从组织中提取的荧光标记的 DNA 或 RNA 进行列阵杂交, 可以应用于定量和定性实验当中<sup>[77]</sup>。2018 年刘胜利<sup>[78]</sup>针对五种猪病病毒的保守区域设计特异性引物和探针, 制备出核苷酸芯片建立了检测方法, 能够同时对种猪的疾病进行检测, 经临床试验结果与多重 PCR 符合率为 100%。陈茹<sup>[79]</sup>等人通过双重一步法 RT-PCR 不对称扩增和双重微球杂交反应建立了双重液相基因芯片方法。对 12 株 PRRSV 以及其他 12 种猪病原体的检测显示, 该法能特异性良好并准确鉴别其中 7 株 HP-PRRSV。罗宁<sup>[80]</sup>等人建立的基因检测方法可以一步同时检测 10 种猪的常见病, 与普通 PCR 和 RT-PCR 方法符合率为 96.79% 以上。实现了同步检测多种病毒, 方便应用于临床病料的初步诊断。

### 1.3.4 临床诊断

在母猪发病初期, 表现为采食量减少、精神萎靡、伴有体温升高、腹泻; 呼吸系统症状主要表现为间质性肺炎; 部分猪只会出现四肢末端呈现蓝紫色; 怀孕母猪流产; 其他猪只则表现为体重逐渐降低、眼睑水肿等症状<sup>[81]</sup>。对死猪进行解剖会观察到肺部、心

脏出现实质性病变<sup>[82]</sup>，对感染仔猪的肾组织进行观察有部分严重的淤血，表面散在红色针尖大小的红点。

### 1.3.5 病理学诊断

病理组织学诊断是将病料进行固定染色后借助显微镜观察组织的结构和特征性病变来诊断 PRRSV。猪感染 PRRSV 肾组织与正常组织相比出现局灶性出血以及大面积的淤血，间质与血管内出现大量巨噬细胞和淋巴性细胞浸润<sup>[82]</sup>；可见肺部出现水肿、淤血、出血，心叶、尖叶出现灶性暗红色实变；脑部出现胶冻样物质渗出等。

## 1.4 选题目的及意义

全世界范围内，动物传染病发生的风险及频率非常高，要保证动物健康防止PRRS发生就要对PRRSV的检测进行深入的研究。

由于猪繁殖与呼吸综合征的发生与传播对经济造成的损失很严重且PRRSV等RNA病毒具有高突变率、进化速度快和遗传变异性，这使得可靠诊断方法的开发变得复杂<sup>[84]</sup>。随着新毒株的出现，PRRSV的遗传多样性不断增加，快速准确地检测PRRSV是预防和控制PRRS的关键因素之一，因此对PRRSV检测方法的研究对防控猪繁殖与呼吸综合征具有重要意义。本研究致力于建立PRRSV的快速检测方法以及为其提供基础，应用不同的检测方法实现对PRRSV的快检。

## 第2章 PRRSV NSP2 基因 RT-RAA 试纸法的建立

RT-RAA 试纸条检测方法可以应用于缺少实验仪器的场景下，可以直观、简单、清晰地诊断出感染 PRRSV 的何种毒株，检测结果能够直接用肉眼进行判读，不需要精密的仪器，此方法受环境的局限性。

### 2.1 材料

#### 2.1.1 毒株

PRRSV TJM-F92株（高致病病毒株）、PRRSV VR2332株（经典株）、CSFV E1株、PRV ZJ01株、PEDV LJX株、TGEV Purdue株保存于海南省农业科学院畜牧兽医研究所海南省热带动物繁育与疫病研究重点实验室。

#### 2.1.2 主要试剂

引物由擎科生物科技有限公司或Takara公司合成；dNTP Mixture（4030Q）、pMD18-T、Recombinant RNase Inhibitor（2313Q）、*E.coli* DH5 $\alpha$  Competent Cells（9057）、Reverse Transcriptase M-MLV（2641Q）、DL2,000 DNA Marker（3427A），PrimeSTAR Max Premix（2X）（R045Q）购自Takara公司；Gel Extraction Kit D2500（DC2500-01）购自Omega公司；FastPure Viral DNA/RNA Mini Kit(RC311)、FastPure Plasmid Mini Kit（DC201-01）购自Vazyme公司；核酸测试纸条购自Milenia-biotec公司；RT-RAA-nfo核酸扩增试剂（S006ZC）购自杭州众测生物科技有限公司。

#### 2.1.3 主要仪器设备

EPS-200 数显式稳压稳流电泳仪（EPS-200）、数显恒温水浴锅（HH-2）购自江苏科析仪器有限公司；荧光定量 PCR 仪（CFX-96 TOUCH）、Thermal Cycler（T100）梯度 PCR 仪均购自美国 Bio-Rad 公司；生化培养箱（LRH-250）购自上海一恒科学有限公司；泛用高速冷冻型离心机（Z326K）购自德国 HERMLE 公司；空气浴摇床（ES-20）

购自英国 Grant Instruments 公司；全自动雪花制冰机（IMS-40）购自海南青鸟科技有限公司；超微量核酸蛋白测定仪（P-330-31—1C）购自德国 IMPLLEN 公司。

## 2.1.4 相关溶液配置

### 2.1.4.1 琼脂糖凝胶电泳所用试剂

#### (1) 1×TAE

将10 mL 50×TAE 加490 mL纯水配制成1×TAE。

#### (2) 1.0%琼脂糖凝胶

称0.4 g琼脂糖，加入40 mL 1×TAE，置于微波炉中加热溶解。

### 2.1.4.2 细菌培养所用溶液

#### (1) LB 液体培养基

称胰蛋白胨5 g、酵母提取物2.5 g、氯化钠5 g，加入500 mL去离子水溶解，放置于高压锅中于121 °C下高压灭菌20 min。

#### (2) 氨苄霉素

分别称0.5 g固体氨苄霉素溶于5 mL纯水中，用0.22 μm滤网过滤，分装后至-80 °C保存。

## 2.2 试验方法

### 2.2.1 pMD18T-NSP2-VR2332、pMD18T-NSP2-TJ 重组质粒的构建

#### 2.2.1.1 引物设计

下载PRRSV NSP2不同谱系毒株序列，利用软件Oligo7.0设计NSP2上游引物和下游引物（表2-1），送擎科生物科技有限公司合成。

表 2-1引物序列

Tab. 2-1 Primers sequences

名称	引物序列 (5'-3')	片段大小
NSP2-F	AGCCTGTCCCCGCCCGCGCAGGAA	387 bp (VR2332)/
NSP2-R	CAGTCTGTGAGGAAGCAGACAAATC	292 bp (TJM-F92)

### 2.2.1.2 RNA 的提取及反转录

PRRSV (VR2332株、TJM-F92株) 接种于Marc-145细胞, 于25 cm<sup>2</sup>细胞培养瓶培养72 h后收集细胞, 冻融3次离心取上清, 将待检测样本基因组用通用RNA提取试剂盒提取; 将细胞连同培养液一起转移至1.5 mL离心管中, 1,000 ×g离心5 min, 弃去上清液, 反复收集得到所需要的细胞数量。向RNase-free离心管中加入200 μL样本, 加入 Buffer VL500 μL涡旋混匀15~30 s, 将混合液离心收集至管底。FastPure RNA Columns置于Collection Tubes 2 mL中, 上述混合液转移至FastPureRNAColumns中于12,000 ×g离心1 min, 弃滤液。向FastPure RNA Columns中加入Buffer RW600 μL, 12,000 ×g离心30 s, 弃液重复操作将空柱于12,000 ×g离心2 min。转移至新的RNase-free Collection Tubes 1.5 mL中, 向膜中央加入30~50 μL的RNase-free ddH<sub>2</sub>O, 室温下放置1 min, 12,000 ×g离心1 min。弃去FastPure RNA Columns, 得到RNA进行反转录 (表2-2)。

表 2-2 反转录体系

Tab. 2-2 Reverse transcription system

组分	体积 (μL)
Component	Volume(μL)
M-MLV 5×Reaction buffer	4
dNTP	4
RNase	0.5
M-MLV	1
反转录引物	1
模板RNA	10

### 2.2.1.3 PCR 扩增及产物回收

PCR 扩增体系 (表 2-3), 反应条件为: 94 °C 15 s, 退火 57 °C 5 s, 72 °C 1 min, 30 个循环, 72 °C延伸 5 min。

表 2-3 PCR 反应体系

Tab. 2-3 PCR reaction system

组分 Component	体积 (μL) Volume(μL)
PrimeSTAR Max Premix 2×	50
NSP2-F	0.5
NSP2-R	0.5
ddH <sub>2</sub> O	47
cDNA	2

将 PRRSV TJF92 cDNA 和 PRRSV VR2332 cDNA 用 (表 2-1) 引物进行扩增, PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶进行扩增, 扩增条件为 100 V 电压电泳 1 h。目的片段用 OMEGA 凝胶纯化试剂盒进行回收纯化, 将目的片段按 1 g/mL 的密度计算, 按照 1:1000 的比例加相应体积的 XP2 Binding Buffer 并在 50~60 °C 下放置 7 min 到凝胶完全融化。将融化的液体转移至过滤柱于 12,000 ×g 离心 1 min。加 300 μL XP2 Buffer 12,000 ×g 离心 1 min。随后加 700 μL SPW Buffer 于 12,000 ×g 离心 1 min。最后以 12,000 ×g 空甩 2 min。将过滤柱放置至新的 1.5 mL 离心管中, 加入 30 μL 提前预热的洗脱液并于室温放置 2 min, 12,000 ×g 离心 1 min, 用超微量核酸蛋白测定仪检测回收产物浓度。

#### 2.2.1.4 质粒构建

将 pMD18-T 载体与胶回收产物于 16 °C 条件下连接过夜, 10 μL 体系: 1 μL pMD18-T (0.03 pmol/50ng), DNA 与载体摩尔比 1: 2~10, 灭菌水加至 5 μL, 5 μL Solution I。DH5α 与连接产物与比例为 1: 10, 冰上放置 30 min 后放置于水浴锅中 42 °C 水浴 45 s, 水浴结束冰上孵育 2~3 min, 加无抗培养液放置 37 °C 恒温摇床中以 160 ×g 转速摇菌液 60 min。在氨苄琼脂平板培养基倒置培养 16 h, 挑单个菌落至 700 μL 氨苄液体培养基, 37 °C 摇床培养 6 h。根据 (表 2-3) 的 PCR 扩增体系扩增目标条带, 验证是否成功将目的片段连接到载体, 扩增出目的片段送生工生物工程 (上海) 有限公司测序正确, 重组质粒命名 pMD18T-NSP2-VR2332、pMD18T-NSP2-TJ。

#### 2.2.1.5 质粒提取

用无菌枪头挑起单个菌落，将枪头打入含有氨苄青霉素的 LB 液体培养基内，放入摇床 37 °C 200 ×g 6 h，再以 1: 1000 的比例将菌液加入液体培养基中二次培养 16 h，菌液即可提取质粒，提取步骤如下：

(1) 将菌液分别加入 4 个 1.5 mL 无菌离心管内 12,000 ×g 离心 1 min，弃上清液，重复此步骤直至菌液全部离心完毕，最后一次离心完毕将离心管倒置于吸水纸上吸干。

(2) 将已经加入 RNase A 的 Buffer P1 250 μL 加至离心管中，沉淀吹打混匀，使菌液裂解充分。

(3) 上述液体中加 250 μL Buffer P2，上下颠倒 8~10 次。

(4) 再加 Buffer P3 350 μL，再次上下颠倒 8~10 次，加入时肉眼可见白色絮状沉淀，12,000 ×g 离心 10 min。

(5) 收集管中放入吸附柱，将(4)步骤上清转移到吸附柱中，只吸取上清液于 12,000 ×g 离心 1 min，弃去液体。

(6) 加 Buffer PW2 600 μL 于吸附柱，12,000 ×g 离心 1 min，弃液。此步骤重复两次后 12,000 ×g 离心 1 min。

(8) 在新的无菌 1.5 mL 离心管中放入吸附柱，在膜中央加入 40 μL 提前预热的 Elution Buffer，室温下静置 2 min，12,000 ×g 离心 1 min 后弃吸附柱，检测 DNA 产物浓度并保存于-20 °C。

### 2.2.2 RT-RAA 试纸法引物设计

按照设计 RAA 扩增引物主要原则，要考虑的因素是引物的长度应该保持在 30~35 nt 之间，退火温度没有非常严格的要求，最合适的引物对需要经过验证才能筛选出来，在引物的 5'端用生物素标记；探针长度要在 46~52 nt 间，探针的 5'端用 FITC 标记；内部含有四氢呋喃残基；3'端有聚合酶延伸阻断基团。设计 PRRSV NSP2 RT-RAA 试纸法引物用软件 Oligo 7，在擎科生物科技有限公司合成，引物序列见（表 2-4）。

表 2-4 引物序列

Tab. 2-4 Primers sequences

名称	引物序列 (5' -3' )	片段大小
NSP2-F	AGCCTGTCCCCGCCCCGCGCAGGAA	387/297bp
NSP2-R	Biotin-CAGTCTGTGAGGAAGCAGACAAATC	
RAA-NSP2-Taql	FITC-GTGCCCGCGTCGCGACGTGTCTCCAAGCTG (THE) TGACACCTTTGAGTG-C3 Spacer	
RAA-NSP2-Taq2	FITC-GCCGATCCCTGTGCCCCGCACCGCGGCGTAA (THE) TTTCAGCAGGTGAA-C3 Spacer	

### 2.2.3 RT-RAA 试纸法敏感性试验

#### 2.2.3.1 样品的制备

将重组质粒 pMD18T-NSP2-TJ (561 ng/ $\mu$ L)、pMD18T-NSP2-VR2332 (742 ng/ $\mu$ L) 用 10 倍梯度稀释 ( $10^{10}$ - $10^1$  copies/ $\mu$ L), 检测 RT-RAA 试纸法的敏感性。

#### 2.2.3.2 RT-RAA 试纸法敏感性试验

RT-RAA 试纸法反应体系如下表 2-5:

表 2-5 RT-RAA 试纸法反应体系

Tab.2-5 RT-RAA Test strip method reaction system

组分	体积 ( $\mu$ L)
Component	Volume( $\mu$ L)
A Buffer	40.9
NSP2-F	2.0
NSP2-R	2.0
探针	0.6
逆转录酶	1

按照 (表 2-5) 中反应体系将其加入含有反应干粉的检测单元管中, 在反应单元管加入模板 2  $\mu$ L, 在检测单元管盖加 B Buffer 2.5  $\mu$ L 盖好盖子上下颠倒混匀并且充分振荡混匀 5~6 次, 低速离心 10 s。将检测单元反应管放入 39  $^{\circ}$ C 恒温下反应 10 min 扩增产物用 ddH<sub>2</sub>O 5 倍稀释, 将试纸条直接插入检测管检测, 同时出现控制线和对照线为阳性样本; 只出现一条对照线则为阴性样本; 如果检测样本无条带则结果无效。

## 2.2.4 RT-RAA 试纸法特异性试验

### 2.2.4.1 样品制备

以 PRRSV TJM-F92 株和 PRRSV VR2332 株及提取的 TGEV RNA、CSFV RNA、PEDV RNA、PRV DNA 作为检测样本。

(1) DNA 提取：600  $\mu\text{L}$  的溶液 A 加入 200  $\mu\text{L}$  的样品中，振荡时间为 30 s，放置 10 min，12,000  $\times g$  离心 1 min 后将溶液转移至吸附柱，于室温下静置 2 min，离心 12,000  $\times g$ ，1 min 弃液，加入 700  $\mu\text{L}$  洗柱液，离心并弃液后 12,000  $\times g$  1 min，空甩吸附柱后转移至 1.5 mL 离心管，加入 30  $\mu\text{L}$  DNA 洗脱液，同样于室温条件下静置 2 min，离心后即得到 DNA 溶液，将 DNA 溶液保存于 -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱。

(2) CSFV RNA、PEDV RNA、TGEV RNA 提取：操作同 2.2.1.2，将 RNA 反转录成 cDNA 保存于 -80  $^{\circ}\text{C}$ 。

### 2.2.4.2 RT-RAA 试纸法特异性试验

应用（表 2-4）中的引物序列进行荧光定量 PCR 扩增，参照 2.2.3.2 当中的方法，用本试验建立的 RT-RAA 试纸法对 CSFV、PRV、PEDV、TGEV 进行检测，检测其特异性。

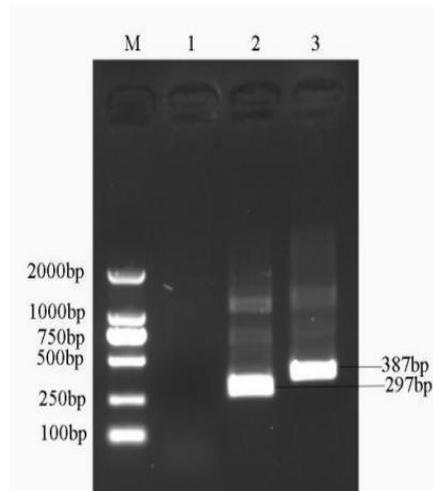
## 2.2.5 RT-RAA 试纸法检测临床样本

采集猪场血清样本 200 份，分别来自海南省海口市、临高县、琼中县等地，提取样本 RNA 反转录成 cDNA，用 PCR 检测阳性和阴性样本得出结果，相同的样品用 RT-RAA 试纸法检测，将两种方法的结果相比较得出本试验方法对 PRRSV 的检出率。

## 2.3 试验结果

### 2.3.1 RNA 提取及质粒构建

选择 PRRSV TJ-MF92、PRRSV VR2332 构建重组质粒。根据 NSP2 序列设计上下游引物的扩增，扩增目的片段大小为 PRRSV TJ-MF92 387 bp、PRRSV VR2332 297 bp。将 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体进行测序，测序结果正确（图 2-2）：命名为 pMD18 T-NSP2-VR2332、pMD18T-NSP2-TJ。



泳道 M: DL 2,000 DNA Maker; 泳道 1: 阴性对照; 泳道 2: PRRSV TJM-F92 NSP2; 泳道 3: PRRSV VR2332 NSP2

图 2-1 NSP2 基因琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 2-1 NSP2 gene agarose gel electrophoresis results

### 2.3.2 RT-RAA 敏感性试验结果

选择质粒 pMD18T-NSP2-TJ、pMD18T-NSP2-VR2332 根据拷贝数计算公式计算两个重组质粒的拷贝数：pMD18T-NSP2-TJ 拷贝数  $1.71 \times 10^{11}$ 、pMD18T-NSP2-VR2332 拷贝数为  $2.19 \times 10^{11}$ 。将质粒按照 10 倍 ( $10^{10}$ - $10^1$ ) 稀释制备样品，pMD18T-NSP2-TJ 的 RT-RAA 试纸法最低检测限（图 2-3a）为  $1.71 \times 10^3$  copies/ $\mu$ L；pMD18T-NSP2-VR2332（图 2-3b）为  $2.19 \times 10^4$  copies/ $\mu$ L。

### 2.3.3 RT-RAA 特异性试验结果

以 pMD18T-NSP2-TJ 和 pMD18T-NSP2-VR2332 质粒及提取的 PRV DNA、PEDV RNA、CSFV RNA、TGEV RNA 作为检测样本，按照步骤 2.2.3.1 和 2.2.3.2 进行检测，分别用（表 2-4）中的探针进行检测，由于每轮试验添加相应的探针不一致，其结果显示检测每种探针仅对相对应的 PRRSV 毒株类型具有特异性。即 RAA-NSP2-Taq1 探针可

鉴别高致病毒株（图 2-4a），RAA-NSP2-Taq2 在鉴别经典株时具有良好的特异性（图 2-4b）。

### 2.3.4 临床样本检测

在 200 份血清样本中，PCR 检测经典株 72 份，阴性 128 份；高致病毒株阳性 67 份，阴性 133 份。RT-RAA 试纸法检测高致病毒株 70 份阳性样品，130 份阴性样品；经典株 74 份阳性样品，126 份阴性样品。RT-RAA 试纸法敏感性为 100%，检测高致病毒株特异性为 97.7%，假阳性率为 2.25%（表 2-6）；经典株特异性为 98.4%，假阳性率为 1.56%（表 2-7）。

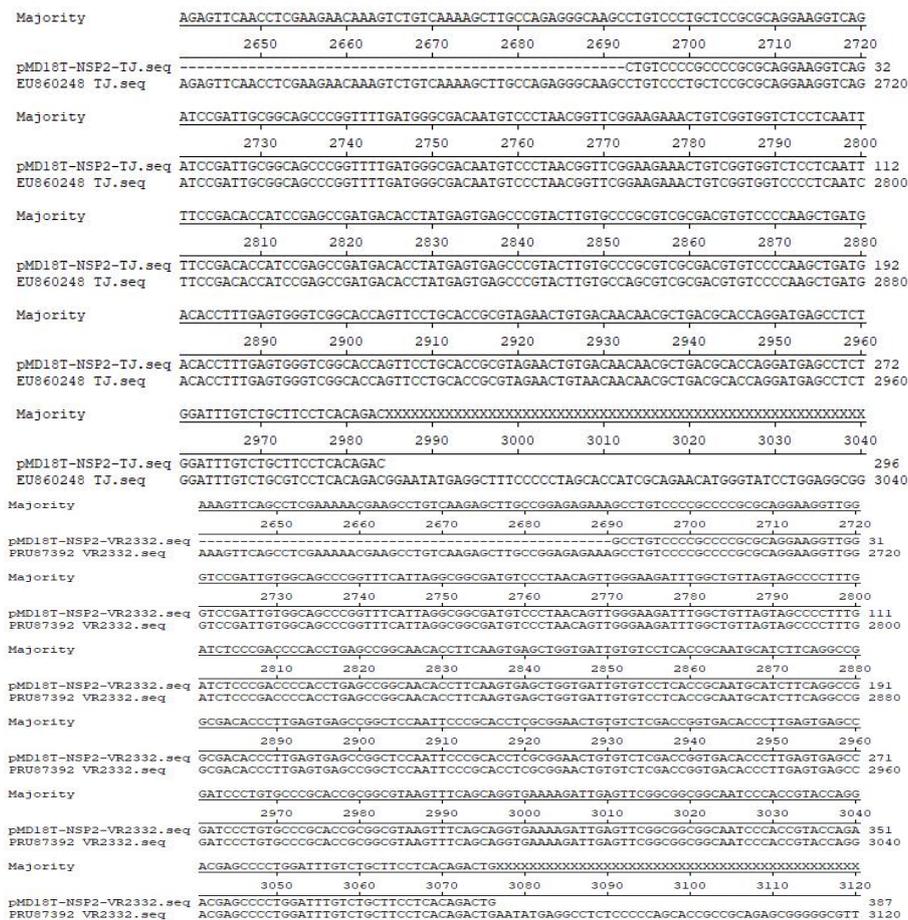
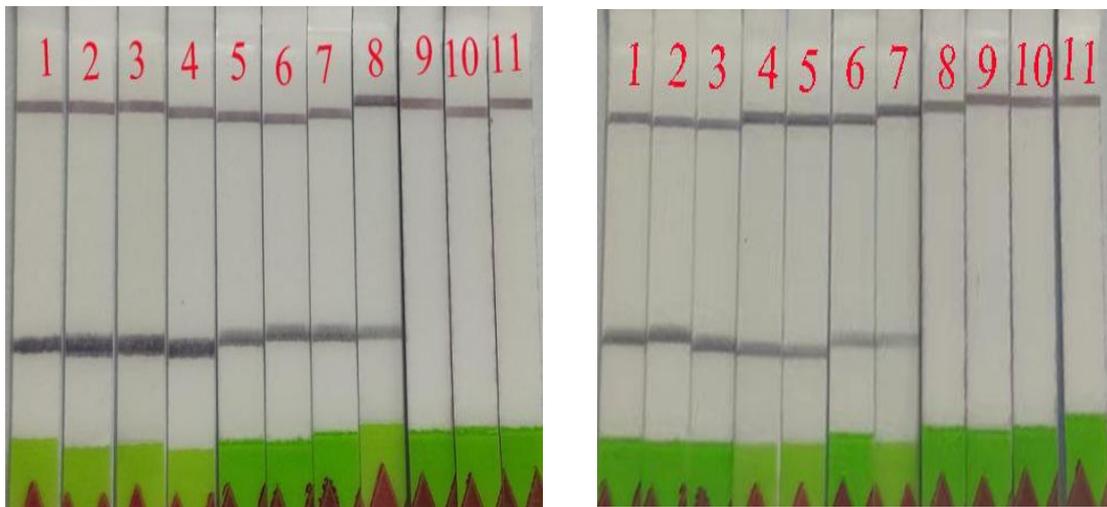


图 2-2 NSP2 基因测序结果

Fig. 2-2 NSP2 gene agarose gel sequencing results



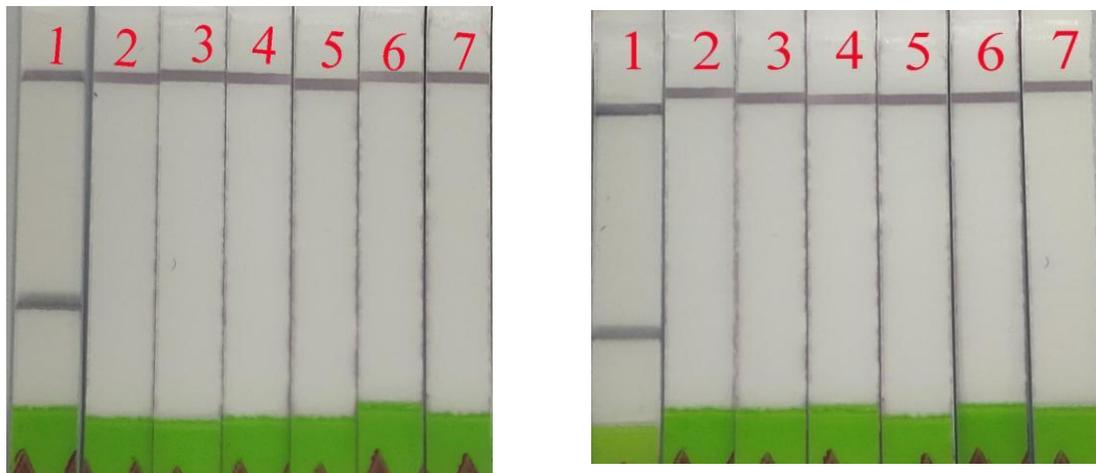
a

b

(a) 1~10 依次为: pMD18T-NSP2-TJ  $1.71 \times 10^{10} \sim 10^1$  copies/ $\mu$ L; 11: 阴性对照 (b) 1~10 依次为: pMD18T-NSP2-VR2332  $2.19 \times 10^{10} \sim 10^1$  copies/ $\mu$ L; 11: 阴性对照

**图 2-3 RT-RAA 试纸法敏感性试验检测结果**

Fig. 2-3 Sensitivity test results of RT-RAA test paper method



a

b

(a) 1~6: 依次为 pMD18T-NSP2-TJ、pMD18T-NSP2-VR2332、CSFV、PRV、PEDV、TGEV; 7: 阴性对照; (b) 1~6: 依次为 pMD18T-NSP2-TJ、pMD18T-NSP2-VR2332、CSFV、PRV、PEDV、TGEV; 7: 阴性对照。

**图 2-4 RT-RAA 试纸法特异性试验结果**

Fig. 2-4 Specificity test results of RT-RAA test paper method

**表 2-6 高致病病毒株 RT-RAA 试纸法与 PCR 方法检测临床标本的比较表**

Tab. 2-6 Comparison of RT-RAA-LF method and PCR method for the identification of highly pathogenic strains

		PCR (高致病病毒株)		总量
		阳性	阴性	
RT-RAA 试纸法 (高致病病毒株)	阳性	67	3	70
	阴性	0	130	130
		67	133	200

**表 2-7 经典株 RT-RAA 试纸法与 PCR 方法检测临床标本的比较表**

Tab. 2-7 Comparison of clinical specimens detected by RT-RAA-LF method and PCR method for the identification of classical strains

		PCR (经典株)		总量
		阳性	阴性	
RT-RAA 试纸法 (经典株)	阳性	72	2	74
	阴性	0	126	126
		72	128	200

## 2.4 讨论

PRRS 主要通过呼吸道进行传播, 传播迅速可造成大范围的感染。根据报道, 每年全球因 PRRS 传播而导致很严重的经济损失, 为了降低由于 PRRS 感染而造成的损失我们就需要在疾病诊断方面找到更准确迅速的方法对疾病做出判断, 在疾病发生之初做出应对的措施使 PRRS 带来的损失降到最低。PRRSV 于 1995 年在我国首次报道<sup>[84]</sup>, 迄今为止对 PRRSV 的研究也越来越多针对此类疾病的检测方法也不断在更新, 建立了不同的检测方法<sup>[85-87]</sup>, 每一种方法都有其独特的优势比如准确性高、检测时间快、不受场地的限制、稳定性好等优点, 但是将这些优点汇聚于一处的方法还比较少。经过不同的检测方法的比对最后选择基于 PRRSV NSP2 基因建立 RT-RAA 的检测方法是因为它具备了上述优点, RT-RAA 试纸法可以直接应用于临床当中而不受场景的限制在 30 min 之内即可出现检测结果, 可以在任何场景下应用, 不需要专业的人员对结果进行判定。

RT-RAA 技术可以于恒温条件下短时间扩增出目的片段, 不需要精密仪器, 根据 RT-RAA 反应体系设计的探针和引物, 使用试纸条对检测结果进行可视化分析<sup>[88]</sup>, 根据

检测线和质控线出现的结果作出判断，能在短时间内确定是否感染 PRRSV 以及确定感染的是何种类型的毒株。有利于针对不同的毒株采取不同的措施，可以做到真正的“对症下药”。RT-RAA 技术比 RT-PCR<sup>[89]</sup>具有一定的优势，但还存在一些局限性，RT-RAA 试纸法在操作过程中对操作环境的要求比较严苛，需要在绝对干净的环境下操作避免污染，污染会导致出现假阳性导致结果不准确。

现在的养殖场对于各种猪病的预防非常重视，无论是猪瘟、非洲猪瘟、猪繁殖与呼吸综合征、猪流行性腹泻还是猪传染性胃肠炎这些疾病的发生与发展对于养殖场来说无异于一场巨大的战役<sup>[90]</sup>，在养殖场当中对消毒的要求非常高，防止病毒的携带。不论是从养殖场的管理还是设备的配备上都做出了很大的改变，现在各种养殖场基本配备了实验所需的仪器 RT-PCR 仪、核酸提取仪等，这样更方便对 PRRSV 的检测以及本实验建立的检测方法应用于临床检测。

由于现在疫苗的使用导致了許多重组毒株<sup>[93]</sup>的出现给疾病防控带来了不小的挑战，此类疾病发病急且传播速度快就需要迅速准确地判断，减少病毒大范围传播的风险。因此，开发一种灵敏度高、操作简便、出结果迅速的检测方法就显得尤为重要。本研究建立的方法应用于临床当中还需要更多的临床样本对其灵敏度进行测试，根据所需在本研究建立的检测方法的基础上进一步优化试验条件。

## 第3章 PRRSV NSP2 基因 RT-RAA 荧光法的建立

RT-RAA 荧光法需要借助荧光定量 PCR 仪进行结果的判读,相较于试纸条检测方法能够避免由于污染导致的假阳性问题,检测结果在短时间内就能得出,适用于检测环境较好的实验室检测。

### 3.1 材料

#### 3.1.1 毒株

毒株同2.1.1

#### 3.1.2 主要试剂

主要试剂同2.1.2, RT-荧光型核酸扩增试剂(S004ZC)购自杭州众测生物有限公司。

#### 3.1.3 主要仪器设备

主要仪器设备同2.1.3。

#### 3.1.4 相关溶液配置

相关溶液同2.1.4。

### 3.2 试验方法

#### 3.2.1 质粒提取

应用2.2.1.4当中构建的重组质粒pMD18T-NSP2-TJ、pMD18T-NSP2-VR2332按照2.2.1.5的步骤进行质粒的提取。

#### 3.2.2 RT-RAA 荧光法引物设计

根据引物及探针设计原则设计引物及探针,序列见(表3-1)

表 3-1 引物序列

Tab. 3-1 Primers sequences

名称	引物序列 (5'-3')	片段大小
NSP2-F	AGCCTGTCCCCGCCCCGCGCAGGAA	387/297bp
NSP2-R	CAGTCTGTGAGGAAGCAGACAAATC	
RAA-HTaq1	GTGCCCCGCGTCGCGACGTGTCTCCAAGC (6FAM) G (THE) (TAM) GACACCTTTGAGTG	
RAA-CTaq2	GCCGATCCCTGTGCCCCGACCGCGGCG (Cy5) AA (THE) (BHQ2) TTCAGCAGGTGAA	

### 3.2.3 RT-RAA 荧光法敏感性试验

#### 3.2.3.1 样品的制备

将重组质粒 pMD18T-NSP2-TJ (561 ng/ $\mu$ L)、pMD18T-NSP2-VR2332 (742 ng/ $\mu$ L) 10 倍稀释 ( $10^{10}$ - $10^1$  copies/ $\mu$ L), 检测 RT-RAA 荧光法的敏感性。

#### 3.2.3.2 RT-RAA 荧光法敏感性试验

RT-RAA 荧光法反应体系如下表 3-2:

表 3-2 RT-RAA 荧光法反应体系

Tab.3-2 RT-RAA Test strip method reaction system

组分	体积 ( $\mu$ L)
Component	Volume( $\mu$ L)
A Buffer	42.5
Nsp2-F	2.0
Nsp2-R	2.0
去离子水	12.9
RNA	5
B buffer	2.5

样本体积总量为 50  $\mu$ L。加入 12.9  $\mu$ L 纯水、42.5  $\mu$ L 含有 25  $\mu$ L A Buffer 溶液、下游引物 (10  $\mu$ M)、上游引物 (10  $\mu$ M) 各 2  $\mu$ L 的混合物于单元管中, 将反应干粉溶解, RNA 样本加入 5  $\mu$ l 于试管中再加入 B Buffer 溶液 2.5  $\mu$ L。将反应管放置于荧光定量 PCR 仪中, 采集荧光信号。有典型的扩增曲线出现且出峰时间 $\leq$ 18 min 时为阳性, 出峰时间 $>$ 18min 时则为阴性。

### 3.2.4 RT-RAA 荧光法特异性试验

选择4种病毒与PRRSV同时用RT-RAA荧光法进行检测,用通用提取RNA和DNA提取试剂盒提取CSFV、PRV、PEDV、TGEV等RNA或DNA。进行特异性试验,检测操作同3.2.3.2。

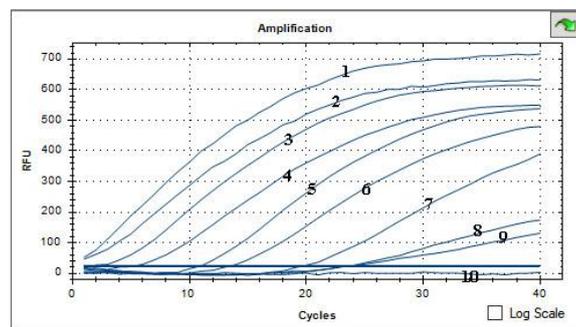
### 3.2.5 临床样本检测

根据2.3.4中的PCR检测结果与RT-RAA荧光法检测结果对比:RT-RAA荧光法检测64份高致病病毒株阳性样品,阴性样品136份;经典株阳性样品67份,阴性样品133份。高致病病毒株RT-RAA荧光法特异性为100%,敏感性为95.5%;经典株敏感性为93.0%,特异性100%。

## 3.3 结果

### 3.3.1 敏感性试验结果

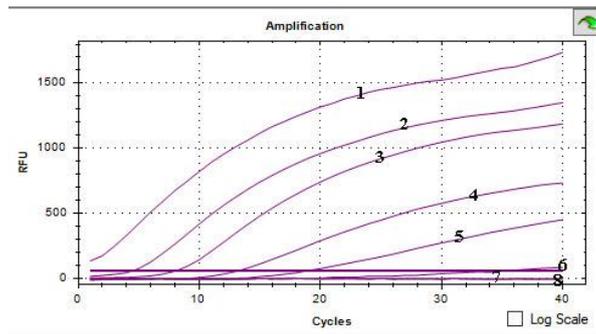
将质粒pMD18T-NSP2-TJ、pMD18T-NSP2-VR2332按照2.2.3.1当中计算的拷贝数进行10倍稀释。应用(表3-1)的引物序列进行扩增,按照3.2.3.2的方法对两种毒株进行敏感性试验检测,对高致病性毒株最低检测限(图3-1)为 $1.71 \times 10^3$  copies/ $\mu$ L;经典株的最低检测限(图3-2)为 $2.19 \times 10^4$  copies/ $\mu$ L。



1~9: 依次为 pMD18T-NSP2-TJ  $1.71 \times 10^9 \sim 10^1$  copies/ $\mu$ L 的反应结果; 10: 阴性对照

图 3-1 RT-RAA-HTaq1 荧光法敏感性实验结果

Figure. 3-1 RT-RAA-HTaq1 Sensitivity results



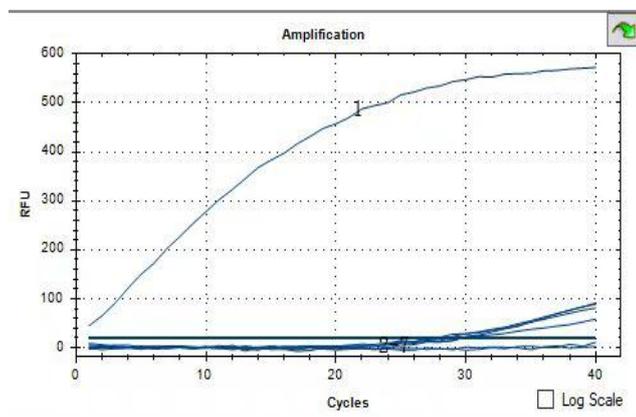
1~7: 依次为 pMD18T-NSP2-VR2332  $2.19 \times 10^7 \sim 10^1$  copies/ $\mu$ L 的反应结果；8: 阴性对照

**图 3-2 RT-RAA-CTaq2 荧光法敏感性实验结果**

Figure. 3-2 RT RAA-CTaq2 Sensitivity results

### 3.3.2 特异性试验结果

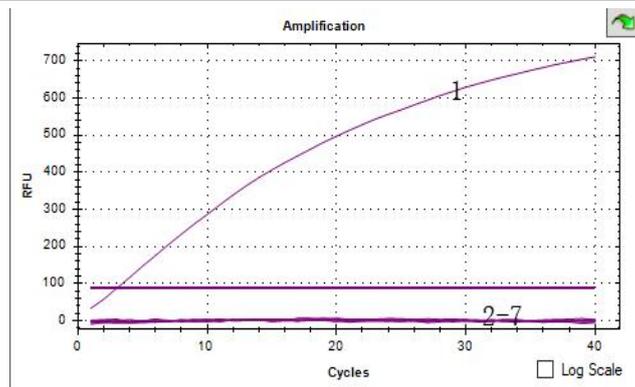
选取 pMD18T-NSP2-TJ、pMD18T-NSP2-VR2332、CSFV E1、PRV ZJ01、PEDV Purdue、TGEV LJX, 分别用 RAA-HTaq1、RAA-CTaq2 探针验证 RT-RAA 荧光法特异性。RAA-HTaq1 探针对 pMD18T-NSP2-TJ 有特异性扩增（图 3-3），RAA-CTaq2 探针对 pMD18T-NSP2-VR2332 有扩增曲线（图 3-4）说明本试验方法特异性良好。



1~6: 依次为 PRRSV TJ-F92、pMD18T-NSP2-VR2332、CSFV E1、PRV ZJ01、PEDV Purdue、TGEV LJX 的反应结果；7: 阴性对照

**图 3-3 RT-RAA-HTaq1 特异性实验结果**

Figure.3-3 RT-RAA-HTaq1 Specificity test results



1~6: PRRSV VR2332、pMD18T-NSP2-TJ、CSFV E1、PRV ZJ01、PEDV Purdue、TGEV LJX 的反应结果；7: 阴性对照

图 3-4 RT-RAA-CTaq2 特异性实验结果

Figure.3-4 RT-RAA-CTaq2 Specificity test results

### 3.3.3 临床样本检测

使用 2.3.4 当中的 200 份血清样本，RT-RAA 荧光法与 PCR 方法对比结果（表 3-3）（表 3-4）。PCR 结果同 2.3.4，RT-RAA 荧光法检测高致病病毒株阳性样品 64 份，阴性 136 份；经典株阳性样品 67 份，阴性样品 133 份。RT-RAA 高致病病毒株荧光法敏感性为 95.5%，特异性为 100%；经典株敏感性 93.0%，特异性为 100%。

表 3-3 RT-RAA 荧光法高致病病毒株与 PCR 方法检测临床标本的比较表

Tab. 3-3 Comparison of RT-RAA method and PCR method for the identification of highly pathogenic strains

		PCR（高致病病毒株）		
		阳性	阴性	总量
RT-RAA 荧光法 （高致病病毒株）	阳性	64	0	64
	阴性	3	133	136
		67	133	200

表 3-4 RT-RAA 荧光法经典株与 PCR 方法检测临床标本的比较表

Tab. 3-4 Comparison of RT-RAA method and PCR method for the identification of Classic strains

		PCR（高致病病毒株）		
		阳性	阴性	总量
RT-RAA 荧光法 （经典株）	阳性	67	0	67
	阴性	5	128	133
		72	128	200

### 3.4 讨论

RT-RAA 反应依赖于三种必需蛋白质: 重组酶、单链 DNA 结合蛋白和 DNA 聚合酶。在 RT-RAA 中重组酶将特异性引物与 DNA 模板中的同源序列配对发生链交换反应, 单链 DNA 结合蛋白有助于打开 DNA 的双链结构<sup>[94]</sup>。随后, DNA 聚合酶启动靶区扩增。RT-RAA 可以一步法扩增 RNA 模板, 节省时间和成本。在反应混合物中加入特殊探针, 则可以通过实时荧光分析 RT-RAA 结果。探针包含一个四氢呋喃 (THF) 位点, 两侧标记有荧光团和淬灭基团, 并在探针的 3' 端添加阻断剂。荧光基团在单链探针中是稳定的, 当核酸外切酶未被激活时, 其荧光被淬灭基团吸收。一旦探针与靶序列结合, 核酸外切酶就会被激活, 识别并切割 THF 位点。释放荧光团检测到荧光信号<sup>[95]</sup>。

本试验在试验最初对于引物设计的要求比较严格, 引物需要与目的片段序列严格互补, 这样特异性和扩增效率才会高。在试验操作过程中在质粒稀释时要将质粒充分颠倒混匀后再进行下一次稀释, 否则会导致试验结果失败。RT-RAA 检测方法与 RT-RAA 试纸法是两种不同的表现形式, 可以根据不同的场景选择更为合适的检测方法, Wu<sup>[96]</sup>针对 PRRSV 建立了 RF-RT-RAA 检测方法, 此方法的结果可以使用实时荧光读数进行监测, 也可以使用便携式蓝光透射仪用肉眼观察, 为 PRRSV 检测提供了新的思路与方法。目前 RT-RAA 技术的使用越来越广泛, 不只是在检测 PRRSV 方面, 在 CSFV<sup>[97]</sup>、PEDV<sup>[98]</sup>、TGEV<sup>[99]</sup>等疾病的检测应用都很普遍。为动物的疾病防控与畜牧业的稳定发展提供了保障。

RT-RAA 检测方法实现了快检, 适用于广泛应用于临床当中, 能够在疾病发生之初发现, 并采取有效的治疗及防控措施。一切先进的技术都是服务于临床的, 随着近年来新的不同的重组 PRRSV 毒株的出现给 PRRS 的防控带来了极大的挑战, 所以我们要将疾病的防控放在首位。将疾病检测和预防紧密相连所以 RT-RAA 检测方法的研究就显得至关重要。

## 第4章 PRRSV N蛋白的克隆及表达

N蛋白是由 PRRSV ORF7 编码的蛋白，在基因组当中是最为保守的而且在 PRRS 感染之初我们最先能检测到 N 蛋白的抗体，这就是很多有关 PRRSV 的研究都选择 ORF7 编码的 N 蛋白进行的原因。本研究对 PRRSV N 进行了表达及纯化为后续试验提供了基础。

### 4.1 材料

#### 4.1.1 菌株、质粒

原核表达载体 pET-28a 由海南省农业科学院畜牧兽医研究所海南省热带动物繁育与疫病研究重点实验室保存；DH 5 $\alpha$ 感受态细胞(CB101)、BL21(DE3)感受态细胞(CB105)购自天根生化科技(北京)公司。

#### 4.1.2 主要试剂材料

*Bam*H I(1010S)和 *Hind* III(1060S)限制性内切酶、T4 连接酶(2011A)购自 Takara；TAE 缓冲液(50 $\times$ )(B548101)购自生工生物工程(上海)股份有限公司；IPTG(II0130)、考马斯亮蓝 R250(C8430)、PBS 缓冲液片剂(P1000)购自索莱宝生物科技有限公司；HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG(A0216)购自碧云天生物技术有限公司；蛋白纯化树脂(17531806)购自 GE 公司；脱脂奶粉(BS102)购自 Biosharp 公司；Tris-Glycine SDS 电泳缓冲液(WB52001)、Western Blot 转膜液(WB52002)购自苏州新赛美生物科技有限公司。

#### 4.1.3 主要仪器设备

主要仪器设备同 2.2.3。

#### 4.1.4 相关溶液配置

#### 4.1.4.1 SDS-PAGE 所用试剂

(1) 1×电泳液 (1 L)

将一包 Tris-Glycine SDS 电泳缓冲液 (粉剂) 溶于 1 L 双蒸水中即为 1×电泳液

(2) 考马斯亮蓝染液 R250

称考马斯亮蓝 R250 1 g, 加入乙酸 40 mL、甲醇 180 mL、蒸馏水 180 mL, 均匀混合为考马斯亮蓝染色液。

(3) 考马斯亮蓝脱色液

分别称取乙酸 80 mL、蒸馏水 140 mL、无水乙醇 180 mL 混合均匀为考马斯亮蓝脱色液。

#### 4.1.4.2 Western blotting 所用溶液

(1) 磷酸盐缓冲液 (PBS)

将 5 片 PBS 片剂溶 500 mL 蒸馏水中混合均匀即为 1×PBS 缓冲液。

(2) Western Blot 转膜液

(3) 将一包 Western Blot (粉剂) 溶 1 L 蒸馏水中即为 1×Western Blot 转膜液。

(4) 洗涤缓冲液 (PBST)

在 250 mL PBS 中加入吐温-20 125  $\mu$ L, 混匀即为 PBST。

## 4.2 试验方法

### 4.2.1 PRRSV ORF7 目的基因扩增

从 NCBI 基因数据库提供的 PRRSV ORF7 基因, 根据 PRRSV ORF7 基因保守序列进行特异性引物设计, 设计好的引物由擎科生物科技有限公司合成 (表 4-1)。

表 4-1 ORF7引物序列

Tab. 4-1 ORF7 Primers sequences

名称	引物序列 (5'-3')	片段大小
28a-ORF7-F	CATAG GGATCC ATGCCAAATAACAAC	392 bp
28a-ORF7-R	CATAG AAGCTTg TGCTGAGGGTGA	

注: 下划线序列 *Hind* III(AAGCTT)、*Bam*HI (GGATCC) 酶切位点

表 4-2 PCR反应体系

Tab. 4-2 PCR Test strip method reaction system

组分	体积 ( $\mu\text{L}$ )
Component	Volume( $\mu\text{L}$ )
PrimeSTAR Max Premix 2 $\times$	50
28a-ORF7-F	0.5
28a-ORF7-R	0.5
cDNA	2
ddH <sub>2</sub> O	47

按照 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 15 s; 57 °C 退火 5 s, 72 °C 延伸 60 s, 最后 72 °C 终延伸 5 min, 重复 30 个循环的反应条件以及 (表 4-2) 反应体系进行 PCR 扩增。用 1% 浓度琼脂糖凝胶核酸电泳对 PCR 扩增产物进行鉴定后纯化, 纯化步骤参照 OMEGA 凝胶纯化试剂盒进行。

## 4.2.2 重组质粒 pET-28a-ORF7 的构建

### 4.2.2.1 限制性内切酶酶切试验

分别用 *Bam*H I、*Hind* III 将 PCR 扩增的产物与 pET-28a 载体进行双酶切, PCR 产物体系如下: FastDigest *Hind* III 2.5  $\mu\text{L}$ 、10 $\times$ FastDigest Buffer 5  $\mu\text{L}$ 、PCR 产物 40  $\mu\text{L}$ 、FastDigest *Bam*H I 2.5  $\mu\text{L}$  进行酶切反应; pET-28a 载体酶切按 FastDigest *Bam*H I 2.5  $\mu\text{L}$ 、ddH<sub>2</sub>O 36  $\mu\text{L}$ 、10 $\times$ FastDigest Buffer 5  $\mu\text{L}$ 、PCR 产物 4  $\mu\text{L}$ 、FastDigest *Hind* III 2.5  $\mu\text{L}$ 。于 37 °C 反应 1 h。双酶切产物纯化后测定 DNA 浓度。

### 4.2.2.2 重组质粒的连接

将回收纯化的 PCR 产物与 pET-28a 载体按照 pET-28a 3.3  $\mu\text{L}$ 、PCR 产物 1  $\mu\text{L}$ 、10 $\times$ T4

ligase Buffer 1  $\mu\text{L}$ 、T4 DNA 连接酶 1  $\mu\text{L}$ 、ddH<sub>2</sub>O 3.7  $\mu\text{L}$  反应体系进行, 16  $^{\circ}\text{C}$ 连接 16 h。

#### 4.2.2.3 连接产物的转化

(1) 将 100  $\mu\text{L}$  DH 5 $\alpha$ 感受态细胞加入 10  $\mu\text{L}$  连接产物, 用枪头混匀, 冰上孵育 30 min, 预热水浴锅至 42  $^{\circ}\text{C}$ 。

(2) 孵育结束, 42  $^{\circ}\text{C}$ 水浴 90 s, 结束放入冰上 2~3 min, 于超净台当中加入 500  $\mu\text{L}$  无抗生素培养基于 37  $^{\circ}\text{C}$ , 150  $\times\text{g}$  摇菌 45 min。

(3) 5,000  $\times\text{g}$  离心 1 min, 弃 400  $\mu\text{L}$  上清后沉淀重悬, 取 100  $\mu\text{L}$  于卡纳固体培养基上划线, 倒置放入 37  $^{\circ}\text{C}$ 培养箱过夜培养。

#### 4.2.2.4 重组质粒的提取

操作同 2.2.1.4。

### 4.2.3 质粒 pET-28a-ORF7 阳性克隆的鉴定

将 4.2.2.4 当中提取的质粒按照 (表 4-3) 当中的反应体系双酶切鉴定, 于 37  $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h, 酶切产物用琼脂糖凝胶电泳。用 (表 4-2) PCR 体系扩增目标条带, 验证是否将目的片段连接到目的载体上, 扩增出目的片段的菌液送生工生物工程 (上海) 有限公司测序。测序结果正确并且双酶切鉴定成功将重组质粒命名 pET-28a-ORF7。

**表 4-3 重组质粒的双酶切体系**

Tab. 4-3 Double enzyme reaction system for recombinant plasmid

组分 Component	体积 ( $\mu\text{L}$ ) Volume( $\mu\text{L}$ )
pET-28a-ORF7	40
10 $\times$ FastDigest Buffer	5
FastDigest <i>Bam</i> H I	2.5
FastDigest <i>Hind</i> III	2.5
总体积	50

### 4.2.4 pET-28a-ORF7 原核表达、鉴定及纯化

#### 4.2.4.1 N 蛋白的原核表达

将原核表达的重组质粒 (pET-28a-ORF7) 转化入 BL21(DE3)大肠杆菌感受态细胞, 划线于含有卡纳霉素抗性的固体培养基, 于 37 °C温箱中倒置培养 16 h, 挑单个菌落接种于液体培养基, 160 ×g 在 37 °C摇床摇菌培养, 菌液 OD<sub>600 nm</sub> 值达到 0.6~0.8 加入不同终浓度的 (0.2 mmol/L、0.4 mmol/L、0.6 mmol/L、0.8 mmol/L、1.0 mmol/L) IPTG 在 16 °C 160 ×g 摇菌 16 h 和 37 °C 160 ×g 摇菌 5 h 诱导诱导蛋白表达, 表达产物用 SDS-PAGE 对上清和沉淀进行分析验证, 确定表达形式。

#### 4.2.4.2 N 蛋白的纯化

将可溶性蛋白加入 3 mL 的树脂至重力柱, 首先用 5 倍柱体积的裂解液平衡树脂。摘掉重力柱下方保护帽, 纯化柱中液体因重力作用自然流出。结合蛋白的树脂用 10 倍柱体积的 Washing Buffer 洗涤, 让洗涤液自然流出。在洗涤缓冲液之后加入蛋白洗脱液体积为 5 倍柱, 收集洗脱液后 4 °C下透析过夜。将纯化后的目的蛋白进行 Western blotting 和 SDS-PAGE 鉴定。

#### 4.2.4.3 N 蛋白的 SDS-PAGE 分析鉴定

(1) 将 40 μL 表达产物加入 10 μL 5×Loading Buffer, 将样品于沸水中煮 10 min, 4 °C 10,000 ×g 离心 5 min。

(2) 用 12.5%浓度的分离胶, 向电泳槽中加入 1×电泳液, 向凝胶孔中加入待检蛋白样品, 将电压调至 150 V 进行 65 min 电泳。

(3) 电泳结束将 SDS-PAGE 胶平整切下, 室温用考马斯亮蓝染色液染色 20 min, 用脱色液过夜脱色。

#### 4.2.4.4 N 蛋白的 WB 分析鉴定

第一步第二步同 4.2.4.3 (1)、(2)

(3) 将 SDS-PAGE 胶进行测量后裁剪与其大小一致的 PVDF 膜, 甲醇活化 90 s, 将 SDS-PAGE 胶、NC 膜、PVDF 膜、滤纸按顺序放好, 用刮板赶出气泡, 转入预先加

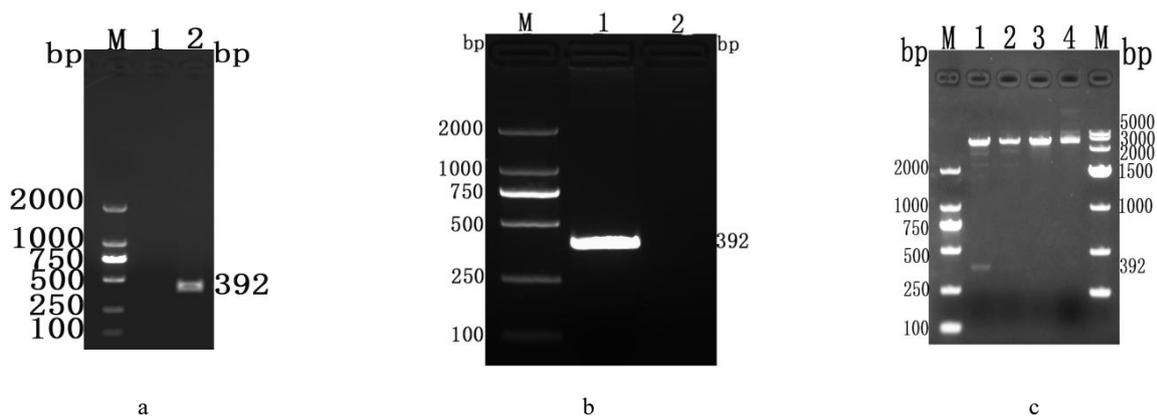
好转膜液的转膜槽，将转膜槽中放冰袋，80 V 转膜 20 min。

- (4) 20 min 后小心取出 PVDF 膜将其放入 5%脱脂乳中，室温封闭 2 h。
- (5) 2 h 后用 PBST 洗膜三次用 His 标签抗体于 4 °C 孵育过夜。
- (6) 一抗孵育结束洗膜三次，加 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG，室温孵育 1 h。
- (7) 二抗孵育结束在避光条件下将 ECL 超敏发光液均匀地滴到 PVDF 膜，读取结果。

### 4.3 试验结果

#### 4.3.1 重组 N 蛋白原核表达的构建及鉴定

以全长质粒为模板以（表 4-1）为引物进行 PCR，扩增 ORF7 目的基因片段，PCR 产物进行电泳。如（图 4-1）结果所示，成功获得大小在 392 bp 的 ORF7 目的基因，符合预期大小。经鉴定重组质粒构建正确。



a: PCR 扩增 b: PCR 鉴定 c: 酶切鉴定

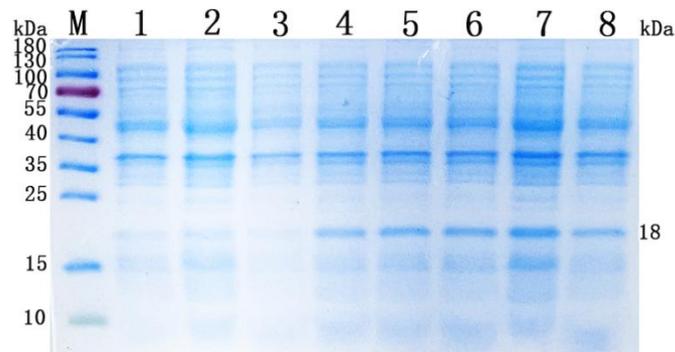
(a) M: DL 2,000 DNA Maker; 1: 阴性对照; 2: ORF7 基因 PCR 产物 (b) M: DL 2,000 DNA Maker; 1: pET-28a-ORF7 PCR 扩增产物; 2: 阴性对照 (c) M: DL 2,000 DNA Maker、DL 5,000 DNA Maker、1: pET-28a-ORF7 重组质粒的双酶切 (*Hind* III、*Bam*H I) 鉴定; 2: pET-28a-ORF7 重组质粒的单酶切 (*Hind* III) 鉴定; 3: pET-28a-ORF7 重组质粒的单酶切 (*Bam*H I) 鉴定; 4: pET-28a-ORF7 空载体对照

图 4-1 重组质粒 pET-28a-ORF7 的构建

Fig. 4-1 Construction of recombinant plasmid pET-28a-ORF7

### 4.3.2 N蛋白的原核表达

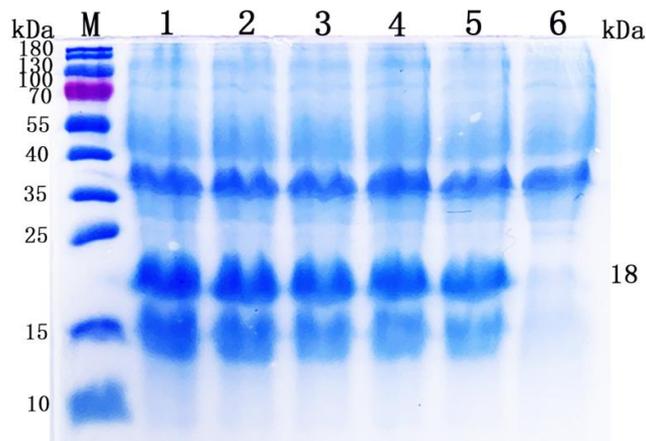
经过条件摸索在诱导表达时加入终浓度 0.4 mmol/L IPTG 于 16 °C 下过夜诱导 16 h 进行蛋白表达（图 4-2），经 SDS-PAGE 鉴定分析蛋白表达形式，结果（图 4-4a）显示蛋白在上清沉淀中均有表达，大小为 18 kDa，与预测蛋白分子量一致。



M: Thermo Scientific PageRuler Maker(10-180 kDa); 1: pET-28a 未诱导; 2: pET-28a 诱导 5 h; 3: pET-28a-ORF7 未诱导; 4-8: 终浓度为 0.2 mmol/L、终浓度为 0.4 mmol/L、终浓度为 0.6 mmol/L、终浓度为 0.8 mmol/L、终浓度为 1.0 mmol/L IPTG 诱导 16 h

图 4-2 不同浓度 IPTG 诱导蛋白表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4-2 SDS-PAGE analysis of IPTG-induced protein expression at different concentrations



M: Thermo Scientific PageRuler Maker(10-180 kDa); 1: pET-28-N 诱导 1 h (37 °C) ; 2: pET-28-N 诱导 2 h (37 °C) ; 3: pET-28-N 诱导 3 h (37 °C) ; 4: pET-28-N 诱导 4 h (37 °C) ; 5: pET-28-N 诱导 5 h (37 °C) 6: PET-28a 空载体对照

图 4-3 不同时间诱导蛋白表达的 SDS-PAGE 分析

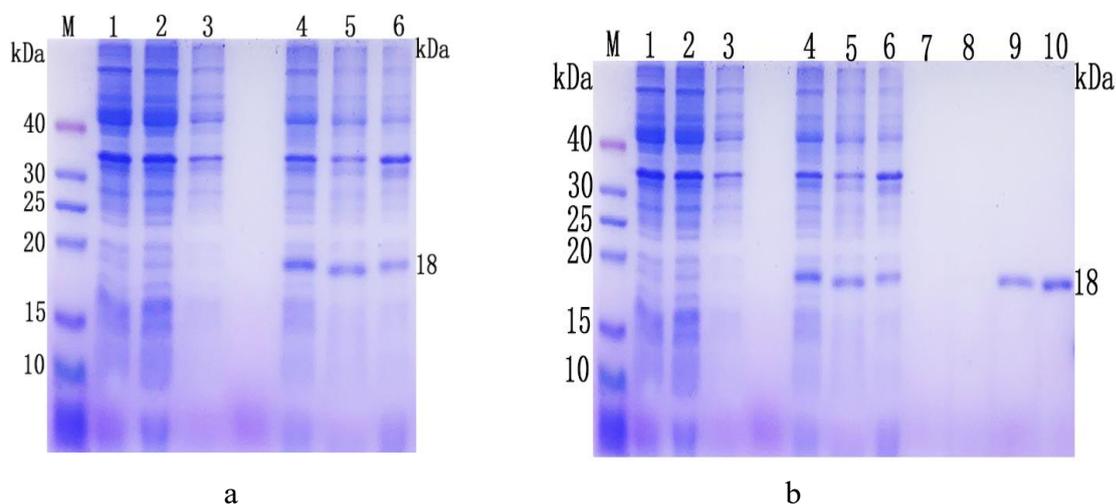
Fig.4-3 SDS-PAGE analysis of protein expression induced at different times

### 4.3.3 N蛋白的纯化

对表达的目的蛋白进行纯化后 SDS-PAGE 以及 Western blotting 鉴定, 结果显示(图 4-4) 成功纯化出带 His 标签的纯净目的蛋白。

### 4.3.4 N蛋白的 Western blotting 鉴定

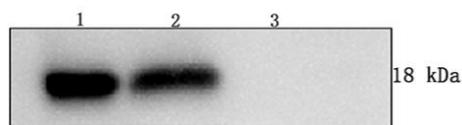
将纯化好的蛋白和透析蛋白进行 Western blotting 鉴定同时设置 pET-28a 为空载体对照结果(图 4-4b)在 18 kDa 处只有一条单一条带, 表明成功纯化出重组 N 蛋白(图 4-5)。



(a) M: Prestained Color Protein Maker(3-40 kDa); 1: pET-28a 未诱导; 2: pET-28a (诱导 5 h); 3: pET-28a-ORF7 未诱导; 4: pET-28a-ORF7 (诱导 16h 全菌); 5: pET-28a-ORF7 (诱导 16 h 上清); 6: pET-28a-ORF7 (诱导 16 h 沉淀) (b) M: Prestained Color Protein Maker(3-40 kDa); 1: pET-28a 未诱导; 2: pET-28a (诱导 5 h); 3: pET-28a-ORF7 未诱导; 4: pET-28a-ORF7 (诱导 16h 全菌); 5: pET-28a-ORF7 (诱导 16 h 上清); 6: pET-28a-ORF7 (诱导 16 h 沉淀); 7: 裂解液冲洗镍柱样品; 8: 洗杂样品; 9: 洗脱样品; 10: 透析蛋白

图 4-4 N 蛋白的表达和纯化

Fig.4-4 Expression of ORF7 and purification of N proteins



1: 透析蛋白; 2: 纯化蛋白; 3: pET-28a 空载体对照

图 4-5 重组蛋白 pET-28a-N 的 Western blotting 鉴定

Fig. 4-5 Western blotting identification of the recombinant protein pET-28a-N

## 4.4 讨论

在免疫原选择前为了避免免疫抗原中的杂蛋白干扰后续试验，所以选择了纯化蛋白作为免疫原<sup>[99]</sup>。对比 PRRSV 的多个序列中，ORF7 编码的 N 蛋白是高度保守的蛋白，所以选择 N 蛋白作为免疫原，可以避免各种因素对试验产生的影响<sup>[101]</sup>。直接将纯化好的蛋白免疫小鼠，高纯度的蛋白可以提高细胞的融合的阳性率<sup>[102]</sup>。

原核表达相对于真核表达实验操作较为简便<sup>[103]</sup>，成本低且表达量高，真核表达需要在细胞上进行蛋白表达，如果操作过程中造成污染会影响试验的进度。原核表达需要对表达条件进行摸索，摸索到最适的表达条件能减少蛋白的错误折叠，本研究通过试验条件的摸索成功表达可溶性蛋白，最后成功纯化出干净的蛋白。

在本试验过程中要注意 OD<sub>600 nm</sub> 值的测定，如果摇菌时间过长会导致 OD<sub>600 nm</sub> 的值过高，存放时间长的菌液影响蛋白表达。摇菌后添加 IPTG 进行诱导表达时需要进行一个预实验，选择最适的 IPTG 终浓度添加到菌液中，在蛋白表达足够量时所用的 IPTG 终浓度，IPTG 本身具有一定的毒性，添加量过多会影响蛋白的表达量。在诱导温度直接选择了 16 °C 低温诱导，在低温下可以减少蛋白的错误折叠从而使其产生较多的可溶性蛋白<sup>[104]</sup>。经 SDS-PAGE 鉴定结果表明，在 OD<sub>600 nm</sub> 至 0.6~0.8 时加入终浓度为 0.4 mmol/L 16 °C 诱导 16 h 可以获得表达量较多的可溶性重组蛋白 pET-28a-N。

本研究用 GE 填料可纯化 His 标签蛋白，纯化结果良好，只有一条带的蛋白并且可发生特异性反应，将纯化的蛋白进行透析除去化学试剂，将透析过后的重组蛋白经 Western blotting 验证，可用于下一步试验。

## 第5章 动物免疫及N蛋白杂交瘤细胞的筛选

动物免疫纯化的N蛋白作为抗原后进行杂交瘤细胞的融合是制备单克隆抗体必不可少的一步，本研究为单克隆抗体的制备做准备，选择纯化蛋白做抗原可以提高小鼠的免疫效价以及杂交瘤细胞融合的效果。

### 5.1 材料

#### 5.1.1 细胞、实验动物

本实验所用的SP2/0细胞由中国农业科学院兰州兽医研究所刘光亮研究员提供；脾细胞由免疫后的BALB/c雌性小鼠脾脏分离所得；6~8周龄BALB/c雌性小鼠购买广东省实验的动物中心，有关实验动物的试验均经审查按照有关规定进行操作。

#### 5.1.2 主要试剂材料

胎牛血清（A5669701）购自GIBCO公司；40 μm细胞网筛（15-1040）购自巴罗克生物科技股份有限公司；DMEM培养基（D0822）、HAT培养基添加剂（50×）（H0262）、HT培养基添加剂（50×）（CB 85111505）、融合剂PEG 3350（PHR2362）购自默克公司；96孔细胞培养板（11510）购自甄选；TMB显色液（P0211）购自碧云天生物技术有限公司；ELISA包被液（10×）（C1055）、浓缩洗涤液（SEKE102）、ELISA终止液（C1058）均购自索莱宝科技有限公司。

#### 5.1.3 主要仪器设备

佐剂乳化器（BDYQ1001）购自博奥龙生物科技有限公司；多功能酶标仪购自（SpectraMax iD5）美谷分子仪器（上海）有限公司。

#### 5.1.4 相关溶液配制

##### （1）HT选择培养液

DMED 培养液 78 mL、胎牛血清 10 mL、双抗 1 mL、HT 1 mL

(2) HAT 选择培养液

DMED 培养液 78 mL、胎牛血清 10 mL、双抗 1 mL、HAT 1 mL

(3) DMEM 完全培养液

DMED 培养液 79 mL、胎牛血清 20 mL、双抗 1 mL

## 5.2 试验方法

### 5.2.1 小鼠免疫

取 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠，将 N 蛋白与弗氏佐剂 1: 1 等体积混合，用佐剂乳化器充分乳化，对小鼠进行背部及皮下多点注射，每只小鼠注射纯化的 N 蛋白含量为 100  $\mu\text{g}$ ，在初次免疫后用弗式不完全佐剂与蛋白 1: 1 乳化后进行第二次到第四次免疫（表 5-1）。在三免后断尾采血收集血清，用 N 蛋白包被的酶标板进行间接 ELISA 分析免疫应答水平。

表 5-1 小鼠免疫N蛋白程序

Tab. 5-1 Mice were immunized with the N protein program

免疫次数	免疫时间	免疫抗原	免疫剂量	免疫方法
初次免疫	1天	等量抗原+FCA	100 $\mu\text{g}$ /只	背部皮下多点注射
第二次免疫	15天	等量抗原+FICA	100 $\mu\text{g}$ /只	背部皮下多点注射
第三次免疫	29天	等量抗原+FICA	100 $\mu\text{g}$ /只	背部皮下多点注射
第四次免疫	43天	等量抗原+FICA	100 $\mu\text{g}$ /只	背部皮下多点注射
加强免疫	融合前三天	纯化蛋白	200 $\mu\text{g}$ /只	腹腔注射

### 5.2.2 间接 ELISA 反应条件确定

按照间接 ELISA 步骤用方阵法确定抗原最佳包被量及阴性血清、阳性血清（鼠抗

重组蛋白多抗)最佳稀释度。

(1) 抗原包被 将纯化的N蛋白用包被液分别做1:50、1:100、1:200、1:400、1:800稀释后包被酶标板,每孔加100 $\mu$ L于4 $^{\circ}$ C包被过夜。用PBST洗涤5min洗三次。

(2) 封闭 酶标板用10%脱脂乳于37 $^{\circ}$ C封闭1h,用PBST洗涤5min洗三次。

(3) 一抗 阳性血清和阴性血清分别1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600倍比稀释,每孔加100 $\mu$ L,并同时设空白对照,于37 $^{\circ}$ C孵育1h。用PBST洗涤5min洗三次。

(4) 二抗(HRP-羊抗鼠IgG) 将HRP-羊抗鼠IgG二抗用PBS1:5000稀释,每孔加100 $\mu$ L于37 $^{\circ}$ C孵育1h。

(5) 显色 每孔加入100 $\mu$ LTMB显色液,37 $^{\circ}$ C孵育15min。

(6) 终止 终止液每孔各加50 $\mu$ L终止反应。

(7) 酶标仪读数 读取OD<sub>450nm</sub>值以阳性孔的OD值接近1.0,P/N>2.1的抗原和血清的最大稀释度作为抗原和血清的最佳工作浓度。

## 5.2.3 细胞融合

### 5.2.3.1 骨髓瘤细胞准备

小鼠骨髓瘤细胞SP2/0是半贴壁细胞,融合率高,容易培养与小鼠的脾细胞为同一品系,但是在HAT和HT选择培养基中不能生长从而被筛选掉。

将冻存的SP2/0细胞从液氮罐当中取出,并于37 $^{\circ}$ C水浴锅中水浴迅速溶解,将细胞悬液加入细胞培养瓶中,并加入5mL20%胎牛血清的DMEM培养基,置于含5%CO<sub>2</sub>37 $^{\circ}$ C培养箱中培养6h后进行换液。在传代过程中加入8-氮鸟嘌呤培养,融合当天将细胞圆润、透亮大小均一的细胞收集至离心管中1,000 $\times$ g离心10min收集细胞,用37 $^{\circ}$ C

预热的 DMEM 培养液洗涤后计数。

### 5.2.3.2 饲养层细胞准备

在细胞融合过程中需要加入饲养层细胞才能使融合细胞生长繁殖，本试验当中使用的饲养层细胞是小鼠腹腔巨噬细胞，饲养层巨噬细胞制备如下：

(1) 取一只阴性对照鼠（未免疫），断尾采血分离阴性血清，脱颈处死并置于75%酒精中消毒5 min。

(2) 将小鼠放置于超净台当中的泡沫板上，用高压灭菌的手术剪剪开皮肤不可伤及腹膜使腹膜充分暴露。用10 mL 无菌注射器注射10 mL 的 DMEM 不完全培养液至腹膜并用左手拿镊子夹酒精棉球轻揉腹膜后将腹腔当中培养液抽出，注入15 mL 离心管当中， $1,000 \times g$  离心10 min，再用含20%胎牛血清的 HAT 培养液重悬待用。

(3) 将饲养层细胞加入96孔板当中每孔100  $\mu\text{L}$ ，置于培养箱中培养。

### 5.2.3.3 脾细胞准备

(1) 取加强免疫3 d 的小鼠断尾采血，并且分离阳性血清做对照。

(2) 按5.2.3.2 当中的方法无菌取出脾脏放入 DMEM 不完全培养基中，清洗结缔组织病脾，放入加入20 mL 不完全培养基的研磨钵中进行研磨，将细胞悬液用200目的细胞网筛进行筛选。

(3) 将细胞悬液转移至20 mL 无菌离心管中， $1,000 \times g$  离心5 min 细胞沉淀重悬后计数备用。

### 5.2.3.4 细胞融合过程

(1) 取含20% FBS 的 HAT 培养基、DMEM 不完全培养基和50% PEG3350 预热。

(2) 将骨髓瘤细胞与脾细胞1:10融合后 $1,000 \times g$ 离心5 min 弃上清，倒置离心管于吸水纸上吸干残余液体，轻弹管底。

(3) 将 1 mL 预热的融合剂缓慢加入离心管，边转动边滴加充分融合后静置 1 min。

(4) 缓缓滴入预热的 1 mL 不完全培养基，操作同(3)，以相同的方法滴加不完全培养液 2 mL，随后滴加 4 mL 不完全培养液，最后将 DMEM 培养液不加至 30 mL，轻搅离心管使融合剂稀释静置 10 min。

(5) 800 ×g 离心 5 min 后弃上清，将细胞沉淀悬于 80 mL 含 20% FBS 的 HAT 培养液中，均匀混合。

(6) 在融合第七天半量更换 HAT 培养液，14 天半量更换 HT 培养液，19 天全量更换为 HT 选择培养液。

#### 5.2.3.5 阳性杂交瘤细胞筛选

杂交瘤细胞长满至 96 孔板的 60% 时于细胞换液后三天对培养液变黄的细胞培养孔进行阳性杂交瘤细胞筛选，用纯化的 N 蛋白作为抗原包被，最佳工作浓度的小鼠阳性及阴性血清对照于 5.2.2 中确定并且设置 SP2/0 细胞上清和空白对照。阳性孔 OD 值大于 0.2，P/N > 2.1 为阳性杂交瘤细胞孔。

#### 5.2.3.6 有限稀释阳性杂交瘤细胞

筛选的阳性杂交瘤细胞进行有限稀释，细胞吹落制成细胞悬液，吸取 20 μL 细胞悬液与等体积的台盼蓝染液混合进行细胞计数，用含有 20% 胎牛血清的 HT 培养基稀释细胞，将细胞按每孔 0.5 个细胞接种于前一天准备好饲养层细胞中，置于 37 °C，5% CO<sub>2</sub> 中培养。

### 5.3 结果

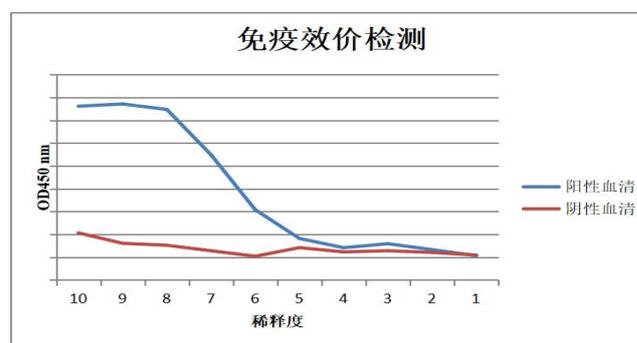
#### 5.3.1 动物免疫

将纯化好的蛋白以免疫小鼠，最后一次加强免疫选择腹腔内注射，加强免疫三天后

进行断尾采血测定小鼠抗体效价

### 5.3.2 间接 ELISA 检测动物免疫抗体效价

在第四次免疫后验证小鼠抗体效价用间接 ELISA 对小鼠血清进行检测，以纯化的病毒作为抗原 1: 100 包被于酶标板上，将小鼠血清进行 10 倍倍比稀释，HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 作为二抗进行检测。小鼠的抗体效价可达  $10^7$  (图 5-1)，可进行后续试验。



横坐标10-1分别为： $10^1$ 、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 、 $10^{10}$  稀释度

图 5-1 pET-28a-N蛋白免疫小鼠效价检测

Fig. 5-1 pET-28a-N protein immune titer test in mice

### 5.3.3 间接 ELISA 筛选单抗条件的确定

采用方阵法确定筛选阳性杂交瘤细胞的间接 ELISA 条件，将免疫小鼠血清作为阳性血清未免疫小鼠血清为阴性血清同时设置空白对照，最后确定最佳的抗原包被浓度和阴性阳性血清的最佳稀释度。根据 OD 值接近 1.0，P/N>2.1 的抗原和血清的最大稀释度作为抗原和血清的最佳工作浓度，抗原 1: 400 稀释阴性阳性血清 1: 200 稀释为最佳工作浓度 (表 5-2)。

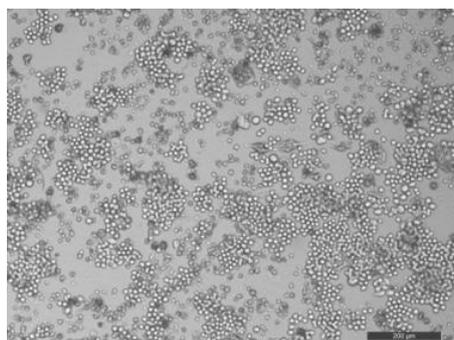
表 5-2 抗原最佳包被浓度与阴、阳性血清最佳稀释度的ELISA检测结果

Tab. 5-2 ELISA analysis of optimal concentration of PRRSV coating antigen and mouse serum against N protein

包被抗原 (PRRSV) 浓度 mg/mL	血清稀释度									
	1: 100 (+)	1: 100 (-)	1: 200 (+)	1: 200 (-)	1: 400 (+)	1: 400 (-)	1: 800 (+)	1: 800 (-)	1:1600 (+)	1:1600 (-)
8	3.9816	0.7789	3.8994	0.7958	3.9159	1.004	3.9506	0.6368	3.9706	0.6423
4	3.9078	1.1272	3.8417	0.7702	3.8379	0.6999	3.9428	0.7724	3.9676	0.4426
2	3.9433	1.4775	3.8368	1.0162	3.8639	0.9643	3.9356	0.6257	3.9401	0.6123
1	3.7379	1.0313	1.0826	0.468	1.1133	0.963	3.9939	0.6466	4	0.5085
0.5	3.9619	0.3417	3.7512	0.2173	3.6298	0.2239	3.729	0.162	3.236	0.0833

### 5.3.4 阳性杂交瘤细胞株的筛选

细胞融合 (图 5-2) 后用间接 ELISA 进行杂交瘤阳性细胞的筛选, 阳性杂交瘤细胞 (表 5-3) 进行有限稀释。



融合杂交瘤细胞

图 5-2 细胞融合

Fig. 5-2 Cell fusion

表 5-3 阳性杂交瘤细胞筛选结果

Tab.5-3 Results of screening of positive hybridoma cells

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0.0526	0.0565	0.0556	0.0595	0.0454	0.0531	0.0524	0.1076	0.0754	0.361	0.6454	0.4359
0.0518	0.0699	0.058	0.0572	0.0483	0.0449	0.0484	0.1074	0.083	0.3949	0.4247	0.2802
0.0483	0.056	0.0559	0.0456	0.0461	0.0488	0.0615	0.2691	0.0766	0.3176	0.2304	0.4006
0.0626	0.0605	0.0462	0.0489	0.0493	0.0541	0.2392	0.152	0.3171	0.2999	0.2869	0.5139
0.0564	0.0798	0.0475	0.0491	0.0506	0.1813	0.1236	0.2054	0.2899	0.1256	0.5547	0.3641
0.0886	0.0509	0.0541	0.0515	0.0641	0.0499	0.173	0.4183	0.2477	0.4881	0.4776	0.1607
0.0602	0.0888	0.0696	0.0725	0.0548	0.0474	0.3	0.2151	0.0665	0.0763	0.1674	0.2962
0.052	0.0646	0.0849	0.0543	0.2267	0.0617	0.3708	0.4197	0.5159	0.1038	0.5081	0.2425
0.3116	0.2172	0.1871	0.0828	0.0793	0.0429	0.0449	0.0385	0.0415	0.0457	0.047	0.0461
0.443	0.1608	0.3582	0.0459	0.2966	0.1231	0.0433	0.0386	0.0387	0.0416	0.0466	0.044
0.2776	0.2666	0.0887	0.1229	0.0576	0.0456	0.0434	0.0369	0.0363	0.0416	0.0408	0.0588
0.3519	0.1037	0.0745	0.0502	0.264	0.0415	0.0435	0.0376	0.0373	0.0456	0.0455	0.0477
0.33	0.1439	0.1131	0.155	0.0875	0.1087	0.0418	0.0395	0.04	0.0419	0.0423	0.0462
0.2662	0.2596	0.3983	0.0492	0.0562	0.0438	0.0428	0.0372	0.0375	0.0522	0.0445	0.0452
0.3192	0.0513	0.052	0.0495	0.0683	0.0461	0.0419	0.0401	0.0377	0.0425	0.045	0.0468
0.5463	0.193	0.0654	0.094	0.0694	0.0451	0.0488	0.0343	0.036	0.0477	0.0437	0.0517
(+)	(-)										
0.992	0.0937										

注：阴性孔值 < 0.2 P/N > 2.1 为阳性杂交瘤细胞孔

## 5.4 讨论

在进行动物免疫时需要注意的是要将抗原与佐剂进行充分乳化达到才能有更好的免疫效果，将乳化好的抗原免疫小鼠需多点注射这样能便于小鼠好的吸收。注射蛋白前要将小鼠固定好抓住小鼠的两只耳朵同时将尾巴缠绕于左手的小指将小鼠固定好注射，注射操作时间不宜过长，时间过长会导致小鼠应激或者保定鼠的力度过重导致小鼠窒息从而死亡<sup>[105]</sup>。注射完毕要用 75% 的酒精给注射部位进行消毒避免感染保证实验动物健康。

在进行间接 ELISA 检测抗体效价时要将酶标板充分洗涤干净，否则会影响检测结果<sup>[106]</sup>，要及时地对抗体效价进行监测距离免疫时间过长检测效价可能会降低，可以在

包被蛋白时同时多包被几个酶标板保存于-20℃，这样防止由于试验过程中的意外情况影响检测效价时间。在确定间接ELISA<sup>[107]</sup>最佳工作条件时由于用的是方阵法进行试验所以我们在试验过程中要标记好不同的稀释倍数的血清及抗原避免由于样品数过多没有标记正确而出现的实验结果紊乱，在试验过程中要注意二抗的使用一定要使用与一抗同源的抗体作为酶标二抗，否则会因为抗体使用错误而导致抗原抗体没有结合最后没有阳性样本。

细胞融合首先就是要准备足够的SP2/0细胞，将细胞复苏后进行传代观察细胞状态在细胞圆润透亮时即可进行细胞融合<sup>[108]</sup>。融合前三天进行加强免疫时需要另外多免疫一只备用，细胞融合最重要的就是无菌操作避免细胞污染导致试验失败，在融合前一天要准备好饲养层细胞，融合需要饲养层细胞。融合后要注意观察细胞状态当融合细胞成团存在时进行阳性杂交瘤细胞的筛选。

## 结论

- 1) 本研究构建了 pMD18T-NSP2-TJ、pMD18T-NSP2-VR2332 重组质粒，建立了 RT-RAA 荧光法及 RT-RAA 试纸法，建立的方法能够区分高致病病毒株与经典株，具有良好的敏感性及特异性。
- 2) 本研究构建了重组质粒 pET-28a-ORF7，表达并且纯化了 pET-28a-N 蛋白。
- 3) 纯化蛋白经鉴定可作为抗原免疫小鼠，产生相应抗体效价进行杂交瘤细胞融合，成功筛选出阳性杂交瘤细胞。

## 参考文献

- [1] 郭宝清. 猪繁殖与呼吸综合征[J]. 养猪, 1999, (04): 34-35.
- [2] 杨汉春,管山红,尹晓敏,等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒的分离与初步鉴定 [J]. 中国兽医杂志, 1997, (10): 9-10.
- [3] 何晨鹏,李柏珍,刘杰,等. 母猪繁殖障碍综合征的主要发病原因及机制研究进展 [J]. 畜牧兽医学报, 2023, 54 (08): 3139-3151.
- [4] I. R ,I.M. R ,J.M. S , et al. The jigsaw of PRRSV virulence [J]. Veterinary Microbiology, 2021, 260.
- [5] 谭政,朱敏,黄金海.猪繁殖与呼吸综合征病毒的致病机制及疫苗研究进展[J].中国预防兽医学报,2023,45(02):212-219.
- [6] Rodríguez-Gómez M I ,Sánchez-Carvajal M J ,Pallarés J F , et al.Virulent Lena strain induced an earlier and stronger downregulation of CD163 in bronchoalveolar lavage cells[J].Veterinary Microbiology,2019,235101-109.
- [7] Thacker L E ,Thacker J B ,Young F T , et al.Effect of vaccination on the potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-induced pneumonia by Mycoplasma hyopneumoniae[J].Vaccine,2000,18(13):1244-1252.
- [8] Štukeč M ,Plut J,Toplak I.Serum inoculation as a possibility for elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) from a farrow-to-finish pig farm[J].Acta Veterinaria Hungarica,2015,63(3):389-399.
- [9] Mesa L V ,Munoz Q A ,Sobhy M N , et al.Survival of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) in the Environment[J].Veterinary Sciences,2024,11(1):22.
- [10] 姜丹丹,王凯月,杜以军,等.2021—2022年山东省猪繁殖与呼吸综合征病毒分子流行病学调查[J].畜牧与兽医,2023,55(06):87-92.
- [11] 刘光清,薛强,仇华吉,等.猪繁殖与呼吸综合征病毒 CH-1a 株非结构基因的分子克隆及其基因特征的研究[J].中国预防兽医学报,2002,(02):2-8.

- [12] 姚睿玉,陈芳洲,何启盖,等. 两株分离自疫苗免疫猪场的 PRRSV 毒株的遗传演化分析 [J]. 中国兽医科学, 2019, 49 (07): 847-854.
- [13] 欧阳艳,周艳荣,方六荣,等.我国生猪集中养殖区 PRRSV 流行及遗传特征分析[J].动物医学进展,2022,43(03):33-37.
- [14] 谭菲菲,周智,田克恭.PRRSV-1 在我国的流行现状及其感染防控的研究进展[J].中国预防兽医学报,2022,44(10):1125-1130.
- [15] 王彪,谷尚品,侯晓璇,等.我国近 5 年类 NADC30 PRRSV 毒株序列的重组及限制性片段长度多态性分析[J].中国兽医学报,2023,43(08):1594-1603.
- [16] Li Y, Xu L, Jiao D, et al. Genomic similarity and antibody-dependent enhancement of immune serum potentially affect the protective efficacy of commercial MLV vaccines against NADC30-like PRRSV. *Virology*. 2023;38(5):813-826.
- [17] Yu Y, Zhang Q, Cao Z, et al. Recent Advances in Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus NADC30-Like Research in China: Molecular Characterization, Pathogenicity, and Control. *Front Microbiol.* 2022;12:791313.
- [18] 赵杨.猪繁殖与呼吸综合征病毒 JS2014 株的生物学特性及其防控研究[D].华南农业大学,2018.
- [19] 王钰.山东省 PRRS 流行病学调查及特征性分离毒株的致病性分析[D].山东农业大学,2022.
- [20] Weesendorp E, Stockhofe-Zurwieden N, Nauwynck HJ, Popma-De Graaf DJ, Rebel JM. Characterization of immune responses following homologous reinfection of pigs with European subtype 1 and 3 porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains that differ in virulence. *Vet Microbiol.* 2016;182:64-74.
- [21] [Yumei S ,Chang L ,Zhongzhu L , et al.Chinese herbal extracts with antiviral activity: evaluation, mechanisms, and potential for preventing PRV, PEDV and PRRSV infections[J].*Animal Diseases*,2023,3(1):35.
- [22] 曹宗喜,师志海,林哲敏,等.PRRSV 的病毒蛋白研究进展 [J]. 广东农业科学,2013,40(16):134-137.

- [23] Fang Y, Treffers EE, Li Y, et al. Efficient -2 frameshifting by mammalian ribosomes to synthesize an additional arterivirus protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(43):E2920-E2928.
- [24] 陈旭,汤德元,曾智勇,等.猪繁殖与呼吸综合征病毒结构蛋白和非结构蛋白研究进展[J].*动物医学进展*,2023,44(09):76-81.
- [25] Josefina M C ,Gladis F ,Alvaro R S , et al.Immunogenic and antigenic analysis of recombinant NSP1 and NSP11 of PRRS virus.[J].*Veterinary medicine and science*,2022,8(2):610-618.
- [26] Yi H, Wang Q, Lu L, et al. PSMB4 Degrades the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Nsp1 $\alpha$  Protein via the Autolysosome Pathway and Induces the Production of Type I Interferon. *J Virol*. 2023;97(4):e0026423.
- [27] Riccio S ,Childs K ,Jackson B , et al.The Identification of Host Proteins That Interact with Non-Structural Proteins-1 $\alpha$  and -1 $\beta$  of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus-1[J].*Viruses*,2023,15(12):2445.
- [28] [Yuanyuan L ,Peng G ,Lei Z , et al.Mapping the Key Residues within the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus nsp1 $\alpha$  Replicase Protein Required for Degradation of Swine Leukocyte Antigen Class I Molecules[J].*Viruses*,2022,14(4):690-690.
- [29] Liu B ,Luo L ,Shi Z , et al.Research Progress of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus NSP2 Protein[J].*Viruses*,2023,15(12):2310.
- [30] Kong C, Li D, Hu Y, et al. The Genetic Variation of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Replicase Protein nsp2 Modulates Viral Virulence and Persistence. *J Virol*. 2023;97(3):e0168922.
- [31] Hang Z ,Qin L ,Yajie Z , et al.Genetic Variability and Recombination of the NSP2 Gene of PRRSV-2 Strains in China from 1996 to 2021.[J].*Veterinary sciences*,2023,10(5):325.
- [32] Ruiqi S ,Yanyu G ,Xiaoyang L , et al.PRRSV Non-Structural Proteins Orchestrate Porcine E3 Ubiquitin Ligase RNF122 to Promote PRRSV Proliferation[J].*Viruses*,2022,14(2):424-424.
- [33] Huawei L ,Qin L ,Huiyuan J , et al.Research Progress on Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus NSP7 Protein.[J].*Animals : an open access journal from*

MDPI,2023,13(14):2269.

[34] C M R ,T M C D ,Abby P , et al.The PRRSV-Specific Memory B Cell Response Is Long-Lived in Blood and Is Boosted During Live Virus Re-exposure.[J].Frontiers in immunology,2020,11247.

[35] Yuanyuan L ,Yunhao H ,Yue C , et al.Identification of Nonstructural Protein 8 as the N-Terminus of the RNA-Dependent RNA Polymerase of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus.[J].Virologica Sinica,2018,33(5):429-439.

[36] Song J ,Liu Y ,Gao P , et al.Mapping the Nonstructural Protein Interaction Network of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus[J].Journal of Virology,2018,92(24):e01112-18.

[37] Sha H, Zhang H, Chen Y, Huang L, Zhao M, Wang N. Research Progress on the NSP9 Protein of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Front Vet Sci.* 2022;9:872205.

[38] 扣莉云,张改平,史西保,等.PRRSV GP2a 胞外区的原核表达及免疫原性分析[J].中国兽医学报,2020,40(02):231-236.

[39] Yijun D ,Jing Q ,Yu L , et al.Evaluation of a DNA vaccine candidate co-expressing GP3 and GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) with interferon  $\alpha/\gamma$  in immediate and long-lasting protection against HP-PRRSV challenge.[J].Virus genes,2012,45(3):474-87.

[40] Meulenber g JJ, van Nieuwstadt AP, van Essen-Zandbergen A, Langeveld JP. Posttranslational processing and identification of a neutralization domain of the GP4 protein encoded by ORF4 of Lelystad virus. *J Virol.* 1997;71(8):6061-6067.

[41] Zhiying C ,Likun Z ,Shijie Z , et al.The Host E3-Ubiquitin Ligase TRIM28 Impedes Viral Protein GP4 Ubiquitination and Promotes PRRSV Replication.[J].International journal of molecular sciences,2023,24(13):10965.

[42] Qin L ,Yajie Z ,Yingxin H , et al.Genetic variation and recombination analysis of the GP5 (GP5a) gene of PRRSV-2 strains in China from 1996 to 2022#13;[J].Frontiers in Microbiology,2023,141238766-1238766.

[43] Qin L ,Yajie Z ,Hang Z , et al.Research Progress on Glycoprotein 5 of Porcine Reproductive

and Respiratory Syndrome Virus[J].Animals,2023,13(5):813-813.

[44] Choi JC, Kim MS, Choi HY, et al. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Engineered by Serine Substitution on the 44th Amino Acid of GP5 Resulted in a Potential Vaccine Candidate with the Ability to Produce High Levels of Neutralizing Antibody. Vet Sci. 2023;10(3):191.

[45] Michael V ,Rasheed M G ,Minze Z .Using Alphafold2 to Predict the Structure of the Gp5/M Dimer of Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome Virus[J].International Journal of Molecular Sciences,2022,23(21):13209-13209.

[46] 李易儒,陈立思,胡守萍,等.高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒感染对仔猪单核巨噬细胞系统影响的研究[J].中国预防兽医学报,2016,38(11):865-868.

[47] 牛绪东,任禾,冯学俊,等.猪瘟、蓝耳病和圆环病毒病混合感染的诊断与防控[J].黑龙江畜牧兽医,2018,(12):5.

[48] 韩相敏,马晶晶,吴汉字,等.一例猪繁殖与呼吸综合征高致病性毒株与链球菌混合感染的实验室诊断[J].中国兽药杂志,2023,57(04):11-17.

[49] 田笑笑,黄昕怡,夏大松,等.猪繁殖与呼吸综合征病毒 RFLP 1-4-4 L1C 株的分离鉴定及其遗传演化分析[J].中国预防兽医学报,2022,44(06):044.

[50] 于新友,李天芝,李书光,等.猪繁殖与呼吸综合征病毒和猪肺炎支原体双重荧光 PCR 检测方法的建立[J].中国兽医杂志,2023,59(06):60-64.

[51] 张帅,赵云环,刘莹,等.基于 PRRSV ORF5 基因 TaqMan qPCR 检测方法的建立及遗传变异分析[J].中国兽医学报,2022,42(06):1122-1130.

[52] Ji C, Zhou L, Chen Y, et al. Microfluidic-LAMP chip for the point-of-care detection of gene-deleted and wild-type African swine fever viruses and other four swine pathogens. Front Vet Sci. 2023;10:1116352.

[53] Cheng Y, Wu M, Xiao L, et al. Identification of a novel linear epitope on the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein, as recognized by a specific monoclonal antibody. Front Immunol. 2023;14:1165396.

[54] 刘梦莹,李敏华,王倩,等.美洲型猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP4 蛋白中和活性单克隆抗体

备及其抗原表位鉴定[J].中国预防兽医学报,2019,41(06):641-644.

[55] 边东生,王东.2017—2021年南阳市猪主要病毒病的病原学检测与分析[J].黑龙江畜牧兽医,2023,(04):85-89.

[56] 王金萍,付嘉佳,李富祥,等.高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒云南株的分离鉴定及遗传变异分析[J].中国动物检疫,2023,40(10):27-33.

[57] 杨锐,杭洁,王凡,等.猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白的表达及其单克隆抗体的制备[J].中国兽医科学,2023,53(03):346-351.

[58] Zhao J, Zhang R, Zhu L, et al. Establishment of a peptide-based enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies against PRRSV M protein. BMC Vet Res. 2021;17(1):355.

[59] 荆扬,王玉淼,李洋,等.稳定表达 PRRSV M 蛋白的 MARC-145~(ORF6)细胞系的构建及其对 PRRSV 增殖的影响[J].畜牧兽医学报,2024,55(03):1159-1169.

[60] Jiang D, Tu T, Zhou Y, et al. Epidemiological investigation and pathogenicity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Sichuan, China. Front Microbiol. 2023;14:1241354.

[61] 温平.猪繁殖与呼吸综合征病毒 IgM 抗体 ELISA 检测方法的建立与应用[D].华中农业大学,2023.

[62] 杨艳艳,乔松林,李睿,等.IPMA 筛选猪繁殖与呼吸综合征病毒单克隆抗体方法研究[J].华北农学报,2019,34(03):217-223.

[63] 周盛华.快速检测猪繁殖与呼吸综合征病毒免疫胶体金诊断试纸条的研制[D].东北农业大学,2008.

[64] 胡冉冉.猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体胶体金试纸条的研制[D].河北农业大学,2021.

[65] 王梦杰,张文立,王欣荣,等.猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪圆环病毒三型、猪流感病毒三重 RT-PCR 检测方法建立及初步应用[J].微生物学通报,2022,49(12):5092-5099.

[66] 孙明,李红卫,高显明,等.应用多联 PCR 对引发猪繁殖障碍有关病毒的检测 II.JEV、PPV、PRRSV、PRV 单项 PCR 检测方法的建立[J].中国兽医学报,2001,(01):10-13.

- [67] 陈旭,汤德元,曾智勇,等.检测 PRRSV 及鉴别 HP-PRRSV 毒株的二重 PCR 与二重 TaqMan 荧光定量 PCR 方法[J].中国兽医科学,2024,54(03):316-324.
- [68] 蒋春燕,王泰健,王琴,等.实时荧光定量 PCR 技术[J].动物医学进展,2005,(12):97-101.
- [69] 周茜,于孔森,林青青,等.检测猪繁殖与呼吸综合征病毒及鉴别类 NADC30 毒株的双重荧光定量 PCR 方法[J].中国兽医科学,2023,53(04):462-467.
- [70] 查帆,李倩文,孙广禄,等.美洲型猪繁殖与呼吸综合征病毒荧光定量 PCR 检测方法的建立[J].中国预防兽医学报,2022,44(07):044.
- [71] 匡燕云,李思光,罗玉萍.环介导等温扩增核酸技术及其应用[J].微生物学通报,2007,(03):557-560.
- [72] 尹斐斐,吴家强,刘少宁,等.猪繁殖与呼吸综合征病毒 LAMP 检测方法的建立[J].家畜生态学报,2011,32(02):50-54.
- [73] 罗忠永,王印,杨泽晓.猪繁殖与呼吸综合征病毒 LAMP 检测方法的建立[J].动物医学进展,2016,37(03):1-5.
- [74] 唐卓,陈刚毅,董娟.基于重组酶的环介导扩增方法[P].四川省:CN201911129747.6,2022-05-17.
- [75] 陈素贞,马佳镁,黄春媛,等.基于猪繁殖与呼吸综合征病毒 ORF2a 基因的 RT-RAA-LF 检测方法的建立[J].中国兽医科学,2023,53(10):1249-1253.
- [76] 陈耀,仲欣雨,吴陈雨,等.反转录-重组酶介导等温扩增(RT-RAA)快速检测基因 2 型猪繁殖与呼吸综合征病毒[J].中国动物检疫,2023,40(01):121-127.
- [77] 李凌,马文丽.DNA 芯片技术研究进展[J].中国生物化学与分子生物学报,2000,(02):151-155.
- [78] 刘胜利.猪五种繁殖障碍性病毒病多重 PCR 诊断及联合检测基因芯片诊断方法的建立[D].河南农业大学,2018.
- [79] 陈茹,于晓璐,高小博,等.高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒双重液相基因芯片检测方法的建立[J].动物医学进展,2016,37(06):1-6.
- [80] 罗宁.猪十种常见疫病病毒多重 PCR 和基因芯片检测方法的研究[D].青岛农业大学,2017.

- [81] Rajic A , Dewey C E , Deckert A E , et al. Production of PRRSV-negative pigs commingled from multiple, vaccinated, serologically stable, PRRSV-positive breeding herds[J]. *Journal of Swine Health & Production*, 2001, 9(4):179-184.
- [82] 孙明潭,袁万哲,孙继国.猪繁殖与呼吸综合征诊断方法的研究进展[J]. *中国兽医杂志*, 2015, 51(08):61-63.
- [83] 罗传真.PRRSV 感染通城仔猪肾损伤的病理观察及转录组分析[D]. 华中农业大学, 2021.
- [84] [1]季程远,覃一峰,黄培超,等.一起猪蓝耳病继发感染传染性胸膜肺炎的诊断与分析[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2018, (12):131-133.
- [85] 贾佩,连星,张琪,等.规模化猪场猪繁殖与呼吸综合征的诊断与防控[J]. *动物医学进展*, 2022, 43(09):119-125.
- [86] Tan S , Dvorak C , Murtaugh M .Rapid, Unbiased PRRSV Strain Detection Using MinION Direct RNA Sequencing and Bioinformatics Tools.[J]. *Viruses*, 11(12):1132.
- [87] A. L ,P. B ,V. N , et al.PRRSV detection by qPCR in processing fluids and serum samples collected in a positive stable breeding herd following mass vaccination of sows with a modified live vaccine[J]. *Porcine Health Management*, 2021, 7(1):6-6.
- [88] Xia W, Chen Y, Ding X, et al. Rapid and Visual Detection of Type 2 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus by Real-Time Fluorescence-Based Reverse Transcription Recombinase-Aided Amplification. *Viruses*. 2022;14(11):2526.
- [89] Sozzi E ,Leo G ,Bertasio C , et al.Presence and Characterisation of Porcine Respirovirus 1 (PRV1) in Northern Italy[J]. *Pathogens*, 2024, 13(1):85.
- [90] Lin Y , Cao C , Shi W , et al. Development of a triplex real-time PCR assay for detection and differentiation of gene-deleted and wild-type African swine fever virus[J]. *Journal of Virological Methods*, 2020, 280:113875.
- [91] Hao Z ,Chuangchao Z ,Ouyang P , et al. Global dynamics of porcine enteric coronavirus PEDV epidemiology, evolution and transmission.[J]. *Molecular biology and evolution*, 2023, 40(3):msad052.
- [92] Yiwu C ,Yuanzhu Z ,Xi W , et al. Transmissible Gastroenteritis Virus: An Update Review and

Perspective[J].Viruses,2023,15(2):359-359.

[93] 王新港,王傲杰,周峰,等.两株田间重组猪繁殖与呼吸综合征病毒的分离鉴定、进化分析及其致病性研究[J].病毒学报,2018,34(03):362-371.

[94] 毛迎雪,刘蒙达,张皓博,等.重组酶介导等温扩增技术(RAA)在病原微生物检测中的应用进展[J].中国动物检疫,2024,41(01):60-66.

[95] Fan X, Li L, Zhao Y, et al. Clinical Validation of Two Recombinase-Based Isothermal Amplification Assays (RPA/RAA) for the Rapid Detection of African Swine Fever Virus. Front Microbiol. 2020;11:1696.

[96] Xia W, Chen Y, Ding X, et al. Rapid and Visual Detection of Type 2 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus by Real-Time Fluorescence-Based Reverse Transcription Recombinase-Aided Amplification. Viruses. 2022;14(11):2526.

[97] Z. Y ,G. J ,L. Q , et al.Nucleic acid-unextracted, isothermal and discriminative detection of classical swine fever virus virulent and vaccine vtrain by CRISPR/Cas13a[C]//国际免疫学联合会,中国免疫学会 .Abstracts of IUIS 2019 Beijing——17th International Congress of Immunology (V) .Henan Agricultural University;Henan Academy of Agricultural Sciences;;2019:1.

[98] Wu X, Liu Y, Gao L, et al. Development and Application of a Reverse-Transcription Recombinase-Aided Amplification Assay for Porcine Epidemic Diarrhea Virus. Viruses. 2022;14(3):591.

[99] 吕莽,赵钟毅,尹德玮,等.猪传染性胃肠炎病毒荧光 RT-RAA 方法的建立及初步应用[J].畜牧兽医学报,2023,54(05):2208-2214.

[100] 王猛.猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白重组原及单克隆抗体的制备与鉴定[D].中国农业科学院,2011.

[101] Duan H, Chen X, Zhang Z, et al. A nanobody inhibiting porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication via blocking self-interaction of viral nucleocapsid protein. J Virol. 2024;98(1):e0131923.

[102] 邹抒洁.猪流行性腹泻病毒特异性 SIgA ELISA 检测方法的建立[D].新疆农业大学,2022

- [103] 王鑫,张洪亮,秦志华,等.猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP5 蛋白特异性纳米抗体的原核表达及鉴定[J].中国动物检疫,2023,40(10):106-111.
- [104] 沙娜瓦尔·塔希,王传锋,买买提艾力·斯迪克,等.PRRSV 新疆株 N 基因原核表达条件的优化及蛋白纯化[J].新疆农业科学,2011,48(06):1110-1114.
- [105] 吴胜昔,邵烈刚,曾政,等.猪繁殖与呼吸综合征病毒核衣壳蛋白的原核表达及单克隆抗体制备[J].免疫学杂志,2013,29(10):894-897.
- [106] 吴延功,许立华,陈溥言,等.重组 N 蛋白抗原检测 PRRSV 抗体 ELISA 的研究I.ELISA 方法的初步建立及其标化[C]//全国现代免疫诊断技术学术研讨会.2005.
- [107] Yuko K ,Taizo S ,Eiji T , et al.A serological survey of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in wild boar in Gifu Prefecture, Japan.[J].The Journal of veterinary medical science,2022,84(10):1406-1409.
- [108] 胡晓静,张路捷,张杰,等.猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白单克隆抗体制备及其抗原表位鉴定[J].畜牧与兽医,2023,55(05):103-109.