

# 猪繁殖与呼吸综合征病毒核衣壳蛋白 翻译起始位点的研究

谭菲菲, 张 荣, 韦祖樟, 袁世山\*

(中国农业科学院上海兽医研究所 猪传染病防治研究室, 上海 200241)

**摘 要:** 猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, PRRSV)核衣壳蛋白(Nucleocapsid protein, N 蛋白)的表达是通过非连续性转录合成的亚基因组(Subgenomic, sg)mRNA 翻译而来。但位于亚基因组前导序列中的 2 个 AUG 均不能作为 N 蛋白翻译的起始位点, 其翻译使用的是 N 开放阅读框(ORF)中的首个 AUG, 因此, 本研究旨在感染性克隆的基础上研究 N 蛋白的翻译起始位点。作者实验室已有在 ORF6 和 ORF7 之间插入酶切位点的感染性克隆 pORF673, 该突变克隆中含有 3 个潜在的 AUG, 分别构建了 pORF673 中 N 蛋白的其中 2 个潜在的起始密码子 AUG 突变的全长克隆, 转染 Marc-145 细胞。这些突变体都能够拯救出子代病毒, 其中 2 个突变病毒的 N 蛋白的前 11 个氨基酸完全改变, 这些突变病毒都能够在 Marc-145 细胞上稳定传代。经 RT-PCR 分析子代病毒的 N 基因序列及其亚基因组序列, 结果表明 N 蛋白的翻译偏向于使用其 ORF 的第 1 个潜在的 AUG。如果后者移码, 则病毒可以自身修复, 这是首次发现病毒有矫正 ORF 的功能。本研究为 N 蛋白 N 端插入标签作为标记疫苗以及进一步研究 N 蛋白结构与功能奠定了基础。

**关键词:** PRRSV; 反向遗传操作; 核衣壳蛋白; 翻译调控

中图分类号: S852.659.6

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)07-0847-07

## Translational Control of Nucleocapsid Protein of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus

TAN Fei-fei, ZHANG Rong, WEI Zu-zhang, YUAN Shi-shan\*

(Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of  
Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China)

**Abstract:** The structural genes of PRRSV are expressed from a nested set of subgenomic mRNAs (sgmRNA). Nucleocapsid (N) protein is expressed from sgmRNA7, but the initiation site of translation is the first AUG in N coding region, not the AUG in leader sequence of sgmRNA. This experiment is designed to study the translational initiation site of N protein. pORF673 is a former constructed full-length infectious cDNA clone that separated ORF6 & ORF7 and inserted three restriction sites, the conjunction sequence contains three potential AUGs. Three full-length cDNA clones encompassing ATG mutation were conducted to estimate their effects on virus replication. Viable viruses could be recovered and stably passaged on Marc-145 cells. The first 11 residues of two recovered viruses were fully changed. The result indicates that the expression of N protein prones to choose the first AUG. This study lays a foundation for the genetically tagged vaccine and further molecular dissection of the roles of N protein in PRRSV replication cycle.

**Key words:** porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV); reverse genetic manipulation; nucleocapsid protein; translational control

收稿日期: 2010-03-02

基金项目: “十一五”支撑项目课题(2007BAD86B06-3)

作者简介: 谭菲菲(1983-), 女, 河南三门峡人, 博士生, 主要从事动物分子病毒学研究, E-mail: tf0801@126.com, Tel: 021-34293156

\* 通讯作者: 袁世山, E-mail: shishanyuan@shvri.ac.cn

猪繁殖与呼吸综合征自 1987 年在美国发现以来<sup>[1]</sup>,已经蔓延至世界各地,给全世界的养猪业造成了巨大的经济损失。该病的病原为猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, PRRSV),属于套式病毒目动脉炎病毒科的成员,同属于该科的还包括马动脉炎病毒、鼠乳酸脱氢酶病毒和猴出血热病毒<sup>[2]</sup>。PRRSV 包括 2 个基因型,欧洲型(I 型)<sup>[3]</sup>和北美型(II 型)<sup>[4]</sup>,代表株分别为 LV 株和 VR2332 株。PRRSV 基因组包含至少 9 个开放阅读框(Open Reading Frame, ORF),ORF1 通过-1 核糖体移码机制合成 pp1a 和 pp1ab 两个病毒的多聚蛋白,ORF2~7 编码病毒的结构蛋白,其中 ORF2a、ORF3、ORF4、ORF5 分别编码囊膜糖蛋白 GP2a (Glycoprotein 2a)、GP3、GP4、GP5。ORF6 编码非糖基化的膜蛋白(Membrane protein, M 蛋白),ORF7 编码核衣壳蛋白(Nucleocapsid protein, N 蛋白),还有新确立的由 ORF2b 编码的膜蛋白(Envelope protein, E 蛋白)<sup>[5]</sup>。

N 蛋白是病毒粒子中含量最高的结构蛋白,在病毒粒子的包装中起重要作用。一般地, I 型和 II 型的 N 蛋白分别含有 128 和 123 个氨基酸。但是 Stadejek 等研究表明 I 型 N 蛋白具有广泛的长度多态性,其氨基酸残基数目为 124~130 个<sup>[6]</sup>。尽管 N 蛋白的序列在基因型内相对保守,但在两基因型间,如 LV 和 VR2332,在氨基酸水平上只有 64% 的一致性<sup>[7]</sup>。

套式病毒目是由其非连续性转录的特性而得名,结构蛋白的合成是通过一系列共 5' 和 3' 的亚基因组(Subgenomic mRNA, sgmRNA)翻译而来<sup>[2]</sup>,它们共有的 5' 前导序列中含有 2 个可能的起始密码子 AUG,但它们在各个结构蛋白的翻译中并没有起作用。动脉炎病毒基因组的另一个重要特点是其各个 ORF 之间存在着不同程度的重叠,这些重叠在一定程度上影响了对单个 ORF 编码蛋白的研究。为了进一步研究各个结构蛋白的功能,作者实验室曾构建了一系列将各个 ORF 拉开并插入酶切位点的感染性克隆,这些全长质粒的生长特性与亲本病毒基本没有差异,因此可以用来研究各个结构蛋白的特性<sup>[8]</sup>。同样, II 型 PRRSV 的 ORF6 和 ORF7 之间也存在着 11 个核苷酸的重叠, pORF673 即是将这重叠的 11 个核苷酸拉开并插入 3 个酶切位点的全长感染性克隆,其拥有和野生型感染克隆 pAP-

RRS<sup>[9]</sup> 相同的生长特性<sup>[8]</sup>。

前人的研究已表明 PRRSV 的 ORF7 具有 2 条亚基因组,分别为 sgmRNA7.1 和 sgmRNA7.2<sup>[10]</sup>, pORF673 同样也不例外<sup>[8]</sup>。pORF673 在拉开 ORF6 和 ORF7 时在 ORF6 的终止密码子后插入了包含 3 个酶切位点的 25 个碱基,紧跟其后的是重叠的 11 个核苷酸,这样在 N 蛋白的编码区前引入了 3 个潜在的起始密码子 AUG, 2 个位于重叠的 11 个核苷酸中,另一个位于插入的酶切位点(图 1)。为了更好地研究 N 蛋白的翻译起始位点,作者在感染性克隆 pORF673 的基础上分别构建了各个 ATG 突变的突变体,转染 Marc-145 细胞后研究它们对于病毒复制的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞、质粒

Marc-145 细胞由本实验室保存,生长液为含 10% 胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)的 MEM (Minimum essential media),维持液为含 2% FBS 的 MEM,培养于含 5% CO<sub>2</sub> 的 37 °C 培养箱中。

pORF673 为基于亲本全长感染性克隆 pAP-RRS<sup>[9]</sup> 构建的将 ORF6 和 ORF7 之间重叠的 11 个核苷酸拉开并插入 3 个酶切位点(*Pac* I、*Swa* I 和 *Asc* I)的全长质粒,且已证明其具有感染性<sup>[8]</sup>。重叠区及插入的序列见图 1。

### 1.2 分子生物学试剂

限制性内切酶及 T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司,感受态细胞 Top10 购自 TIANGEN 公司,质粒提取试剂盒购自华舜公司、QIAGEN 公司,胶回收试剂盒购自华舜公司。提取病毒上清 RNA 的 QIAamp Viral RNA Mini Kit 购自 QIAGEN 公司。LA *Taq* 聚合酶、反转录酶 AMV 购自 TAKARA 公司。转染试剂 FuGene HD 购自 Roche 公司,TR-Izol<sup>®</sup> Reagent 购自 Invitrogen 公司,二抗 Alexa Fluor 568 羊抗鼠 IgG (H+L)购于 Invitrogen 公司。

### 1.3 全长突变体的构建

构建突变体 p7PM1m 时,上游引物为 SPEF(基因组 nt13117 处,表 1),含 *Spe* I 酶切位点,下游引物为 PSR14998m1,含 *Pac* I 酶切位点;p7AM2 构建时,在上游引物 ASF14998m 中引入突变位点,且含 *Pac* I 酶切位点,下游引物 Qst,位于病毒基因组 3' 末端 Poly (A) 的后面,含有 *Xho* I 酶切位点。利

用 LA *Taq* 聚合酶通过 PCR 扩增获得含有目的突变的片段后,通过测序鉴定突变位点。将 PCR 片段和载体 pORF673 分别用上、下游引物所含的酶切位点进行双酶切,回收相应的片段,由 T4 DNA 连接酶连接获得相应的全长突变体。利用 *Pac* I 和 *Xho* I 分别酶切 p7PM1m 和 p7AM2,将 p7AM2 的 *Pac* I-*Xho* I 之间片段连入载体 p7PM1m 即得到全长突变体 p7APM。所有构建的质粒经克隆、筛选,最后通过 *Sma* I 酶切鉴定和测序鉴定。

#### 1.4 转染及病毒拯救

经酶切和测序鉴定的全长质粒用 QIAGEN 试剂盒提取,在 Marc-145 细胞长到 80% 时进行转染。转染试剂为 FuGENE HD,转染的质粒为 1  $\mu$ g,参考其说明书操作。吸附 6 h 后弃上清,加入含 2% FBS 的 MEM,每天观察 1 次。转染后有细胞病变 (Cytopathic effect, CPE) 出现的,收取细胞上清命名为 P0 代病毒。P0 代病毒经 100 倍稀释后感染 Marc-145 细胞,待出现 CPE 后收取细胞上清命名为 P1 代病毒,以同样的方法相应获得 P2、P3、P4、P5 代病毒。

#### 1.5 免疫荧光试验

突变体转染 Marc-145 细胞后,分别在转染后的 48、72 h 用免疫荧光法检测细胞内非结构蛋白 nsp2 和结构蛋白 N 蛋白的表达。首先弃去转染的上清,用冰甲醇固定 10 min,磷酸盐缓冲液 (Phosphate Buffered Saline, PBS) 洗 2 次后,用 1% 牛血清白蛋

白 (Bovine serum Albumin, BSA) 封闭 30 min, PBS 洗 2 次,再分别加 nsp2 和 N 蛋白特异的单克隆抗体在 37  $^{\circ}$ C 孵育 2 h, PBS 洗 5 次后加入羊抗鼠的 IgG 二抗, 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后在显微镜下进行观察。

#### 1.6 RT-PCR 法检测突变病毒 N 基因的序列

收取的病毒上清 RNA 用 QIAamp Viral RNA 试剂盒提取,参考其说明书操作。用 AMV 反转录获得 cDNA。PCR 扩增引物为 SF14413/SR15497,引物序列见表 1。扩增出的 PCR 产物经胶回收后直接送桑尼公司测序。P1~P5 每代的病毒上清都进行检测,以观察突变病毒的稳定性。

#### 1.7 突变病毒亚基因组的检测

转染后的 Marc-145 细胞,每孔加入 1 mL TR-Izol,按照其说明书提取细胞总 RNA。同样用 AMV 反转录获得 cDNA。扩增 sgmRNA7 的引物为 SF12/SR15284,其中上游引物 SF12 位于病毒的 5'UTR 中,下游引物 SR15284 位于 ORF7 中,具体序列见表 1。

#### 1.8 突变病毒的一步生长曲线

拯救出的病毒在体外传至第 5 代后先经 TCID<sub>50</sub> 测定病毒的滴度,然后以 1 MOI (Multiplicity of infection) 的量感染 Marc-145 细胞,分别在感染后不同的时间点 (4、8、12、16、20、24 和 28 h) 收集细胞上清,每次收取 200  $\mu$ L,同时补充 200  $\mu$ L 新的维持液。收取上清进行 TCID<sub>50</sub> 试验,计算出病毒滴度,并用 GraphPad 软件绘制病毒的生长曲线。

表 1 突变体构建及 RT-PCR 所用引物

Table 1 Primers used for mutants construction and RT-PCR

引物 Primer	序列 (5'-3') Sequence	用途 Usage
SPEF	GAAGGCCACTTG <u>ACTAGT</u> GTTTACG	构建 p7PM1m 的上游引物
PSR14998m1	GC <u>TTAATTAAGTTATTTGCGT</u> ATTTAACAAGGT	构建 p7PM1m 的下游引物
ASF14998m2	<u>TT GGCGCGCCTACGCCAAATAACAACGGC</u>	构建 p7AM2 的上游引物
Qst	GAGTGACGAGGA <u>CTCGAGCGCATGCTTTTTTTTTTTTTTTT</u>	构建 p7AM2 的下游引物
SF14413	CTGATCGA <u>CCTCAAAAAGAGTTGTGCTTG</u>	RT-PCR 检测 ORF7
SR15497	CAAT TAAATCTTACCCCCACACGGTCG	RT-PCR 检测 ORF7
SF12	GTGTTGGCTCTATGCCTTGAC	RT-PCR 检测 sgmRNA7
SR15284	CTCCACAGTGTA <u>ACTTATCCTCC</u>	RT-PCR 检测 sgmRNA7

序列中下划线所示为酶切位点所在位置

Sites of enzyme digestion are highlighted by underline

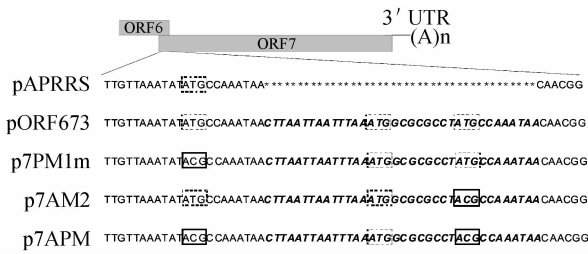
## 2 结果

### 2.1 全长突变体的构建及鉴定

本文在 pORF673 的基础上,分别构建了 3 个 ATG 突变的全长质粒,如图 1 所示,分别命名为 p7PM1m、p7AM2 和 p7APM。p7PM1m 为将酶切

位点前的 ATG 突变为 ACG, p7AM2 将酶切位点后的 ATG 突变为 ACG。p7APM 将这 2 个 ATG 同时突变,仅保留酶切位点中的 ATG。

所有全长突变体用 *Sma* I 进行酶切鉴定,见图 2, 3 个全长突变体 p7PM1m、p7AM2、p7APM 切出的带型与野生型 pAPRRS 和亲本 pORF673 完全一



斜体代表 ORF6 和 ORF7 之间插入的 36 个碱基;实线框中的为突变的位置,均为将 ATG 突变为 ACG;虚线框中为可能的 ORF7 的起始密码子

The italic nucleotide indicates the insertion sequence compared to wild-type APRRS. The ATG in solid box indicates the mutated position; the ATG in dash box indicates the possible translation start codon

图 1 野生型及 ATG 突变的全长克隆的构建

Fig. 1 Schematic diagram of wild-type PRRSV or mutants with ATG mutation

致。5 条带的大小分别为 10 454、4 143、2 787、954 和 187 bp。

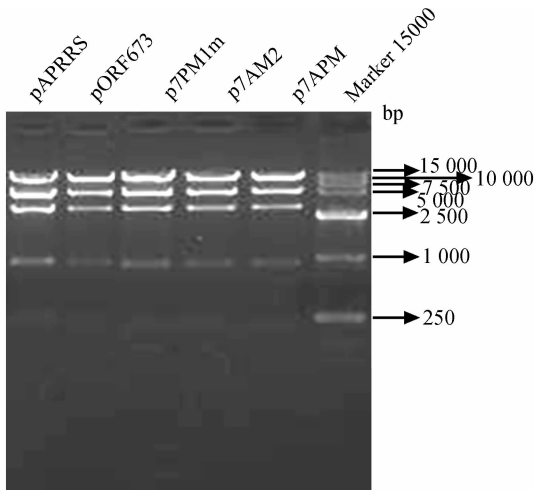


图 2 所有构建的全长质粒的 *Sma* I 酶切鉴定图谱

Fig. 2 Restriction enzyme *Sma* I digestion of all full length clones

## 2.2 突变体对病毒复制的影响

所有突变体转染后,分别在第 2 天和第 3 天进行免疫荧光检测细胞内 nsp2 和 N 蛋白的表达,分别能够反映突变体的复制和转录特性。如图 3 所示,所有的突变体都能够检测到 nsp2 和 N 蛋白的表达。荧光结果表明所有的突变体都没有影响病毒的复制和转录。

## 2.3 子代病毒的拯救及 N 基因序列的鉴定

为了验证这些突变体对病毒感染性的影响,转

染后的细胞置于培养箱中进行观察,阳性对照 pORF673 在转染后第 3 天即出现了明显的 CPE, p7AM2 在第 4 天出现 CPE,而 p7PM1m 出现 CPE 的时间则延迟到了第 5 天。出现细胞病变的突变体,收取其细胞上清,分别命名为 vORF673、v7PM1m 和 v7AM2。利用 RT-PCR 方法检测病毒的 N 基因序列。如图 4 所示,vORF673 和 v7AM2 的突变位点在 P1-P5 中都能够保持稳定存在。其中第 3 处的 T 插入为拯救出的病毒 v7PM1m 所特有。

v7PM1m 病毒序列在保留其突变位点外,在 ORF7 中又插入了 1 个碱基 T,经分析若 ORF7 的翻译从酶切位点之后的 AUG(图 1)开始,则 N 蛋白的序列从第 11 个氨基酸开始就会完全移码,对于在病毒包装中起重要作用的 N 蛋白,移码的 N 蛋白是不能够完成包装的。因此作者推断在 v7PM1m 中,ORF7 的翻译利用的是插入的酶切位点序列中的 AUG,这样使得 N 蛋白的前 11 个氨基酸完全改变,且其 N 端多了 4 个氨基酸,但可以保证第 11 个氨基酸之后的序列保持不变,从而维持其功能。

为了更直接地证明 N 蛋白的翻译利用的是酶切位点中的 AUG,又构建了其前后 2 个 AUG 都突变的突变体,即 p7APM(图 1)。转染后 p7APM 也能拯救出活的病毒,子代病毒 v7APM 的 N 基因序列经检测后又在与 v7PM1m 同样的位置插入了 1 个碱基 A(图 4),这样就直接证明 N 蛋白的翻译利用的是酶切位点中的 AUG。

## 2.4 突变病毒的稳定性

为了验证突变病毒在 Marc-145 细胞上的稳定性,所有的拯救病毒在细胞上连续传 5 代,每代都提取上清 RNA,通过 RT-PCR 进行 ORF7 序列的测定。测序结果表明所有突变病毒都能够在 Marc-145 细胞上至少稳定传 5 代。

## 2.5 突变病毒亚基因组的检测

鉴于套式病毒独特的转录机制,其结构蛋白的合成都是通过一系列共 5' 和 3' 的亚基因组翻译而来,为了更直接地鉴定 N 蛋白的亚基因组序列,作者收取细胞总 RNA 利用 RT-PCR 方法进行 sgmRNA7 的检测,检测结果见图 5。扩增出的 2 条亚基因组分别命名为 sgmRNA7. 1 和 sgmRNA7. 2<sup>[8]</sup>。通过切胶回收测序,各个病毒 sgmRNA7. 1 的序列如图 6 所示,其亚基因组的序列与拯救出的病毒基因组序列完全相同,vORF673 和 v7AM2 序列与质粒序列相同。说明在 v7PM1m 和 v7APM 中,N 蛋

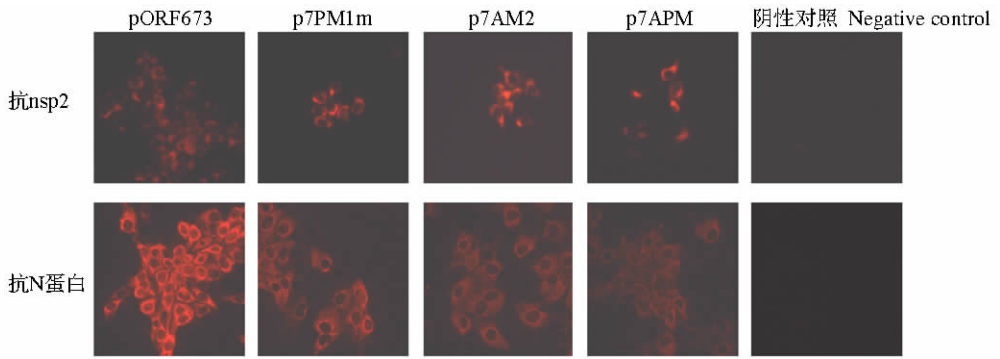
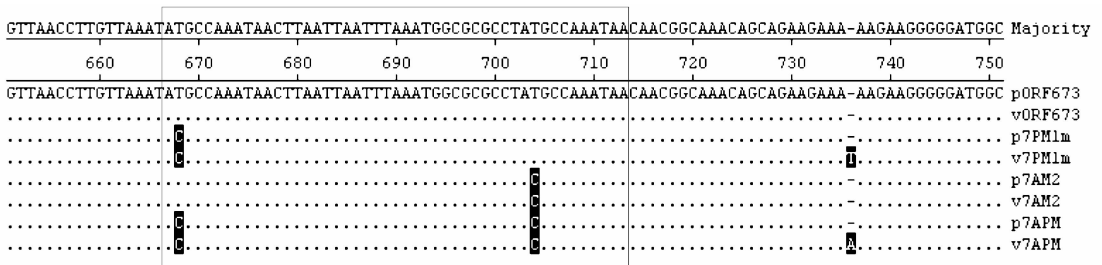


图 3 突变体对病毒复制和转录的影响

Fig. 3 Infectious properties of mutants



点表示与亲本 pORF673 一致;阴影部分为与 pORF673 不同,其中黑线框中的为构建时所做突变,而第 3 处的 T 插入为拯救出的病毒 v7PM1m 所特有的,A 插入为拯救病毒 v7PM 所特有

Dots indicate identical bases with the parent strain pORF673; Shadows show the mutant bases, and these in the Box are designed mutations, T and A insertion are specific to rescued v7PM1m and v7APM, respectively

图 4 p7PM1m、p7AM2、p7APM 转染细胞后拯救出的病毒序列与亲本毒序列比对

Fig. 4 Sequence alignment of recovered v7PM1m, v7AM2 and v7APM with parental virus

白的翻译确是始于酶切位点中的 AUG,即为核糖体扫描时遇到的第 1 个 AUG。

分别为感染后 24、28、20 h,野生型病毒 vORF673 达到高峰的时间为感染后 24 h。突变病毒的滴度与野生型基本没有差别,从图 7 中可以看出野生型病毒 vORF673 的滴度峰值略高于其它的突变病毒,为  $10^{6.82} \text{TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

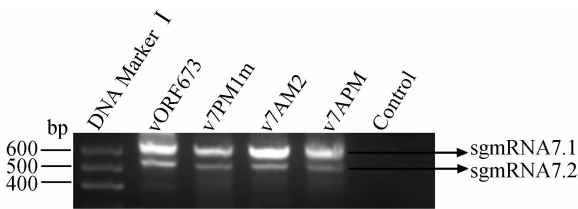


图 5 RT-PCR 方法检测 ORF7 的亚基因组 sgmRNA7. 1 和 sgmRNA7. 2

Fig. 5 Detection of sgmRNA7. 1 and sgmRNA7. 2 of ORF7 by RT-PCR

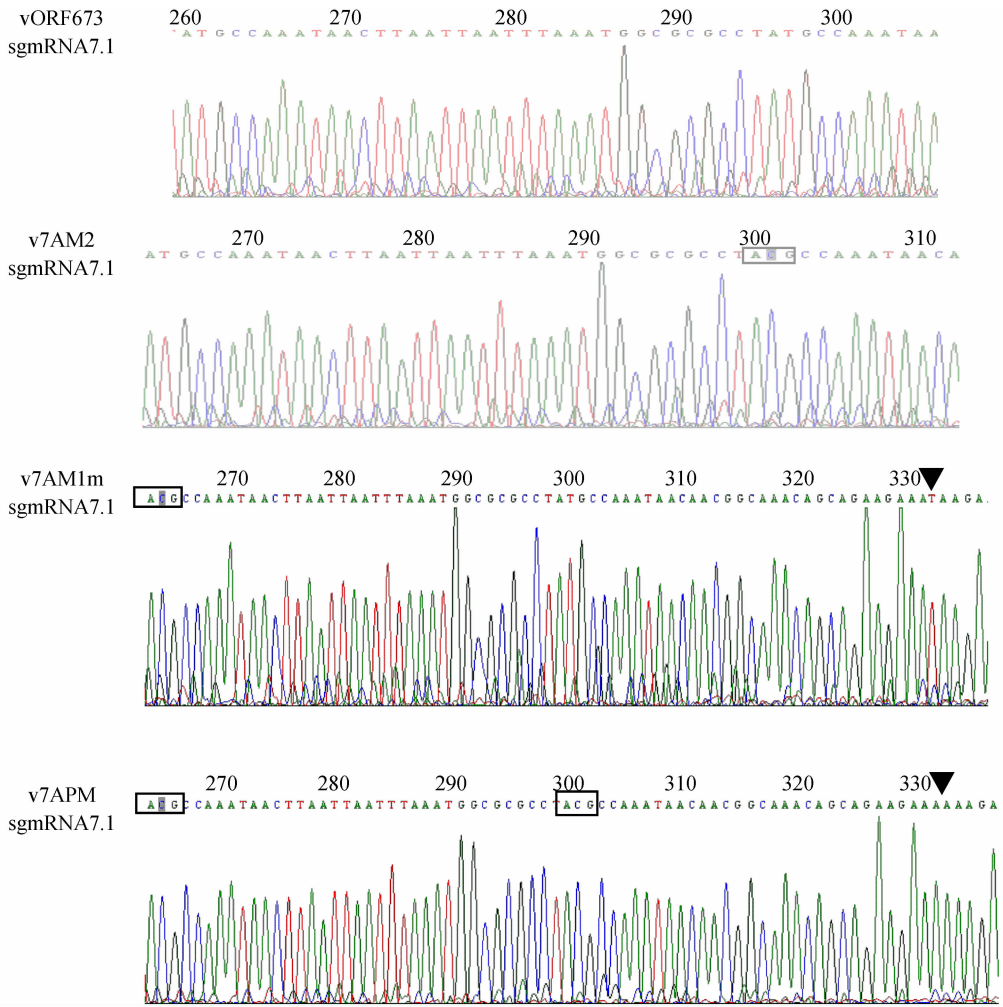
### 2.6 突变病毒的一步生长曲线

为了更好地研究所拯救病毒的体外生长特性,传代至 P5 的病毒经滴度测定后,用相同的 MOI 感染 Marc-145 后,分别在不同的时间点收集细胞上清进行病毒滴度测定,绘制一步生长曲线(图 7)。突变病毒 v7PM1m、v7AM2、v7APM 达到高峰的时间

### 3 讨论

套式病毒目因其独特的转录机制而得名,在其每个亚基因组中,都含有相同的 5' 前导序列和 3' UTR 的序列,但是 5' UTR 的序列却并不翻译产生蛋白,尽管其中也存在 AUG。因此结构蛋白的翻译调控机制需要进一步研究。

利用感染性克隆的平台,本实验室前期的工作首先构建了将 ORF6 和 ORF7 拉开并插入酶切位点的全长感染性克隆 pORF673,其在引入酶切位点的同时无意引入了 1 个 ATG,这为我们研究 N 蛋白的翻译起始提供了条件。在分别突变酶切位点前



黑框中为突变的 AUG,黑三角所指为拯救病毒 v7PM1m 和 v7APM 中所插入的碱基  
The bases within the box are mutant AUG; the black triangles indicate inserted base in rescued v7PM1m and v7APM

图 6 各个亚基因组序列测定的峰图

Fig. 6 Trice file of sgRNA 7.1 sequences of all rescued viruses

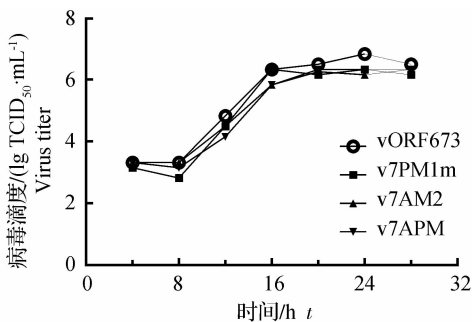


图 7 拯救病毒的一步生长曲线

Fig. 7 One-step growth curve of recovered viruses

后的 2 个 ATG 后,都拯救出了活的病毒,意外的是在病毒 v7PM1m 中,其 N 蛋白的基因组和亚基因组序列在 ORF7 中的第 33 个碱基的位置都插入了 1

个碱基 T。经分析,v7PM1m 的 N 蛋白的翻译没有使用酶切位点后的 AUG,而选择使用酶切位点中的 AUG,即核糖体扫描时遇到的第 1 个 AUG,这一方面与 AUG 周围的碱基序列有关,另一方面也说明了 N 蛋白的翻译是有严格调控的。

为了更直接地说明 N 蛋白能够在拯救病毒的同时额外插入碱基,作者又构建了将酶切位点前后的 2 个 ATG 都突变只保留酶切位点中 ATG 的全长克隆 p7APM,经转染证明 p7APM 也能够拯救出活的病毒,且在其基因组的相应位置也插入了 1 个碱基 A,虽然插入的碱基不同,但同样说明了病毒能够通过自身修复来调控 N 蛋白的翻译。

在病毒 v7PM1m 和 v7APM 中,病毒通过自身修复在其基因组中插入了不同的碱基,这个碱基的

插入完全改变了正常 N 蛋白的前 11 个氨基酸序列,同时在其 N 端插入了 4 个氨基酸,说明 PRRSV 的 N 蛋白的前 11 个氨基酸的特异性对于病毒的感染性不是必需的,同时表明 N 蛋白的 N 端是非常灵活的<sup>[11]</sup>。在此试验结果的基础上,可以进一步在 N 蛋白的 N 端插入外源序列融合表达,为标记疫苗的研究奠定了基础。

#### 参考文献:

- [ 1 ] KEFFABER K K. Reproductive failure of unknown etiology[J]. *Association Swine Practice News*, 1989, 1:1-19.
- [ 2 ] SNIJDER E J, MEULENBERG J J. The molecular biology of arteriviruses[J]. *Journal of General Virology*, 1998, 79:961-979.
- [ 3 ] WENSVOORT G, DE KLUYVER E P, POL J M, et al. Lelystad virus, the cause of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome: a review of mystery swine disease research at Lelystad [J]. *Veterinary Microbiology*, 1992, 33:185-193.
- [ 4 ] BENFIELD D A, NELSON E, COLLINS J E, et al. Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332) [J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1992, 4:127-133.
- [ 5 ] WU W H, FANG Y, ROWLAND R R, et al. The 2b protein as a minor structural component of PRRSV [J]. *Virus Research*, 2005, 114:177-181.
- [ 6 ] STADEJEK T, OLEKSIEWICZ M. B, SCHERBAKOV A V, et al. Definition of subtypes in the European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: nucleocapsid characteristics and geographical distribution in Europe [J]. *Archives of Virology*, 2008, 153:1479-1488.
- [ 7 ] MENG X J, PAUL P S, HALBUR P G, et al. Phylogenetic analyses of the putative M (ORF 6) and N (ORF 7) genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): implication for the existence of two genotypes of PRRSV in the U. S. A. and Europe [J]. *Archives of Virology*, 1995, 140: 745-755.
- [ 8 ] YU D, LV J, SUN Z, et al. Reverse genetic manipulation of the overlapping coding regions for structural proteins of the type II porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Virology*, 2009, 383: 22-31.
- [ 9 ] 袁世山, 韦祖樟. PRRSV 全长感染性 cDNA 克隆的构建: 非结构蛋白和结构蛋白之间编码区的分离 [J]. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2008, 38: 66-73.
- [10] MENG X J, PAUL P S, MOROZOV I, et al. A nested set of six or seven subgenomic mRNAs is formed in cells infected with different isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Journal of General Virology*, 1996, 77:1265-1270.
- [11] DOAN D N, DOKLAND T. Structure of the nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Structure*, 2003, 11: 1445-1451.

(编辑 白永平)