

李子镛, 任金瑞, 吴香菊, 等. PRRSV 非结构蛋白 NSP4 及其 3 个主要结构域过表达慢病毒载体的构建及鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (12): 74-80.

LI Z Y, REN J R, WU X J, et al. Construction and identification of lentiviral vectors overexpressing PRRSV NSP4 and its three major domains [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (12): 74-80.

# PRRSV 非结构蛋白 NSP4 及其 3 个主要结构域过表达慢病毒载体的构建及鉴定

李子镛<sup>1,2,3</sup>, 任金瑞<sup>2,3</sup>, 吴香菊<sup>2,3</sup>, 丛晓燕<sup>2,3</sup>, 李均同<sup>2,3</sup>, 齐静<sup>2,3</sup>,  
王晓晔<sup>1\*</sup>, 胡悦<sup>2,3\*</sup>, 杜以军<sup>2,3\*</sup>

- 广西大学动物科学技术学院/广西畜禽繁育与疾病防控重点实验室/广西兽用生物制品工程研究中心/动物疾病预防与控制重点实验室, 广西南宁 530004;
- 山东省农业科学院畜牧兽医研究所 山东省畜禽疫病防治与繁育重点实验室, 山东 济南 250100;
- 农业农村部畜禽生物学重点实验室, 山东 济南 250100)

**摘要:** 旨在构建猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) NSP4 蛋白及其 3 个主要结构域的过表达慢病毒载体, 包装慢病毒并检测 4 种慢病毒在单核细胞白血病细胞 THP-1 和猪肺泡巨噬细胞 PAM 中的表达。试验以质粒 pXJ41-HA-NSP4 为模板, 分别扩增 NSP4 全长及其 3 个结构域 NSP4-D I、NSP4-D II、NSP4-D III 片段, 连接到 pCD513B 慢病毒表达载体中, 构建重组质粒 pCD513B-NSP4、pCD513B-NSP4-D I、pCD513B-NSP4-D II、pCD513B-NSP4-D III; 将慢病毒重组质粒与包装质粒 pLP1、pLP2、pLP/VSVG 共转染 HEK-293T 细胞, 包装获得 4 种重组慢病毒 rLV-NSP4、rLV-NSP4-D I、rLV-NSP4-D II、rLV-NSP4-D III, 并感染 HEK-293T 细胞测定病毒滴度; 分别将 4 种重组慢病毒感染 THP-1 细胞、PAM 细胞, 荧光显微镜观察目的蛋白表达, 荧光定量 PCR (qPCR) 检测目的基因转录水平, Western blot 检测不同感染时间目的蛋白表达水平。结果: 4 种慢病毒 rLV-NSP4、rLV-NSP4-D I、rLV-NSP4-D II、rLV-NSP4-D III 感染 HEK-293T 细胞的病毒滴度分别为  $2.2 \times 10^6$ 、 $2.8 \times 10^6$ 、 $2.5 \times 10^6$  和  $2.5 \times 10^6$  TU/mL; 荧光显微镜观察显示 4 种慢病毒感染 THP-1 细胞和 PAM 细胞后阳性细胞数均随着时间的增加而增多; qPCR 结果表明目的基因转录水平在慢病毒感染后 60 h 内随着感染时间增加而升高; Western blot 表明 4 种慢病毒能够成功感染 THP-1 细胞和 PAM 细胞并稳定表达相应的目的蛋白, 且蛋白表达水平随着感染时间增加而升高。综上, 本研究成功包装 PRRSV NSP4 及其 3 个主要结构域重组过表达慢病毒, 为进一步研究 PRRSV NSP4 及其 3 个结构域的功能奠定了基础。

**关键词:** 猪繁殖与呼吸综合征病毒; NSP4; 慢病毒载体; 鉴定

中图分类号: S852 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)12-0074-07

## Construction and identification of lentiviral vectors overexpressing PRRSV NSP4 and its three major domains

LI Ziyong<sup>1,2,3</sup>, REN Jinrui<sup>2,3</sup>, WU Xiangju<sup>2,3</sup>, CONG Xiaoyan<sup>2,3</sup>, LI Juntong<sup>2,3</sup>, QI Jing<sup>2,3</sup>,  
WANG Xiaoye<sup>1\*</sup>, HU Yue<sup>2,3\*</sup>, DU Yijun<sup>2,3\*</sup>

- College of Animal Science and Technology Guangxi University/Guangxi Key Laboratory of Animal Reproduction, Breeding and Disease Control/Guangxi Zhuang Autonomous Region Engineering Research Center of Veterinary Biologics/Guangxi Colleges and Universities Key Laboratory of Prevention and Control for Animal Disease, Nanning 530004, China;
- Shandong Province Key Laboratory of Animal Disease Control and Breeding, Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China;
- Key Laboratory of Livestock and Poultry Multi-omics of MARA, Jinan 250100, China)

**Abstract:** The aims of this study were to construct lentiviral vectors for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)

收稿日期: 2023-12-13; 修回日期: 2024-09-30

基金项目: 山东省自然科学基金项目 (ZR2023MC076, ZR2021ZD08, ZR2021MC139); 国家自然科学基金项目 (32373094, 32102710); 国家兽用生物制品工程技术研究中心开放课题 [GTKF (23) 009]

第一作者: 李子镛, 女, 硕士

\* 通信作者: 王晓晔, 副教授, 研究方向: 猪传染性疾病诊断与防控, E-mail: xywang@gxu.edu.cn; 胡悦, 助理研究员, 研究方向: 动物抗病毒感染及免疫学, E-mail: huyue0203@126.com; 杜以军, 研究员, 研究方向: 动物抗病毒感染及免疫学, E-mail: duyijun0916@163.com。

NSP4 and its three domains, and to package the lentiviruses and detect the expression of the four lentiviruses in THP-1 and PAM. The plasmid pXJ41-HA-NSP4 was used as a template to amplify the NSP4, NSP4-D I, NSP4-D II, and NSP4-D III genes. The amplified gene fragments were ligated into the pCD513B lentiviral vector, and the recombinant plasmids obtained were named pCD513B-NSP4, pCD513B-NSP4-D I, pCD513B-NSP4-D II and pCD513B-NSP4-D III, respectively. HEK-293T cells were then transfected with the lentiviral recombinant plasmids together with packaging plasmids pLP1, pLP2, pLP/VSVG, and the lentiviruses obtained by packaging were named rLV-NSP4, rLV-NSP4-D I, rLV-NSP4-D II and rLV-NSP4-D III, respectively. The four recombinant lentiviruses were infected into HEK-293T cells, and the lentiviral titers were determined. Finally, THP-1 cells and PAM cells were infected respectively, the expression of target proteins was observed by fluorescence microscopy, the transcription level of target genes was detected by qPCR, and the expression level of target proteins was detected by Western blot at different infection times. The results showed that the viral titers of the packaged rLV-NSP4, rLV-NSP4-D I, rLV-NSP4-D II, and rLV-NSP4-D III were  $2.2 \times 10^6$  TU/mL,  $2.8 \times 10^6$  TU/mL,  $2.5 \times 10^6$  TU/mL and  $2.5 \times 10^6$  TU/mL. The results of fluorescence microscopy showed that the number of positive cells increased with the increase in time after the four lentiviruses infected the THP-1 cells and PAM cells. qPCR results showed that the transcript levels of the target genes increased with the increase in infection time within 60 h after lentivirus infection. The Western blot results showed that the four lentiviruses were able to successfully infect THP-1 and PAM cells and express the corresponding target proteins, and that the protein expression levels increased with the increase in infection time. In conclusion, the recombinantly overexpressed lentivirus of PRRSV NSP4 and its three main domains were successfully packaged and expressed here, which laid the foundation for further research on the function of PRRSV NSP4 and its three domains.

**Keywords:** PRRSV; NSP4; lentiviral vector; identification

猪繁殖与呼吸综合征 (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 是由 PRRS 病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 引起的一种高度接触性传染病, 俗称猪蓝耳病。PRRSV 感染猪体后可导致母猪返情、流产、产死胎或弱仔、仔猪死亡及各种年龄的猪不同程度的呼吸道症状, 并且破坏猪的免疫系统, 引起混合感染或继发感染。目前尚无特异性针对 PRRSV 的抗病毒药物, PRRSV 的不断重组与变异也使疫苗效果十分有限。

PRRSV 基因组为单股正链、不分节段的 RNA, 能够编码 8 个结构蛋白和 14 个非结构蛋白 (non-structural protein, NSP)<sup>[1-2]</sup>。其中非结构蛋白 NSP4 是一种具有 3C 样丝氨酸蛋白酶活性 (3C-like serine protease, 3CLSP) 的主要蛋白酶, 不仅在病毒的复制和致病过程中起核心作用, 还能抑制宿主免疫应答, 影响细胞正常功能的发挥<sup>[3-4]</sup>。3CLSP 的晶体结构揭示了 NSP4 蛋白主要由 3 个结构域组成, 两个反向平行  $\beta$  折叠桶结构域 I (Domain I, D I), 结构域 II (Domain II, D II) 和 C 末端的结构域 III (Domain III, D III), 不同结构域行使不同的功能<sup>[5]</sup>。NSP4 活性位点位于 N 端两个  $\beta$  桶状结构域之间, 并且含有一个典型的催化三联体, 由第 39 位组氨酸 (His)、第 64 位天冬氨酸 (Asp) 和第 118 位丝氨酸 (Ser) 构成<sup>[6-7]</sup>。Qi 等<sup>[8]</sup>发现 NSP4 D III 通过结合  $\beta 2$  微球蛋白 ( $\beta 2M$ ) 基因的启动子区降低基因的转录和翻译, 下调细胞表面猪主要组织相容性重复复合体 I 类 (SLA-I) 的表达; 于莹等<sup>[9]</sup>的研究显示猪的 RNase L 与 NSP4 DI 相互作用, 发挥抗 PRRSV 活性。因此,

得到 NSP4 不同结构域的表达蛋白对研究 NSP4 蛋白的功能具有重要的意义。

常见的转染技术包括病毒感染、脂质体转染等方式。脂质体转染方便快捷, 但细胞毒性大, 且有些细胞无法成功转染。与腺病毒载体相比, 慢病毒载体具有明显的优势, 对分裂细胞和非分裂细胞均具有感染力, 转染效率较腺病毒高, 且能将目的基因整合至宿主细胞的染色体中, 实现目的基因稳定表达<sup>[10]</sup>。

本研究分别构建了过表达 NSP4 全长基因以及 3 个主要结构域 NSP4-D I、NSP4-D II、NSP4-D III 的 4 种重组慢病毒载体, 包装慢病毒并感染 THP-1 细胞及 PAM 细胞进行表达鉴定, 为进一步研究 PRRSV NSP4 及其 3 个结构域的功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

人胚胎肾上皮细胞 (HEK-293T)、猪肺泡巨噬细胞 (PAM) 由本实验室保存; 人单核细胞白血病细胞 (THP-1) 由山东大学基础医学院高成江教授惠赠; pXJ41-HA-NSP4 为本实验室构建保存; 慢病毒空载体 pCD513B, 包装质粒 pLP1、pLP2、pLP/VSVG 由扬州大学兽医学院商邵彬教授惠赠。

### 1.2 主要试剂

*EcoR* I、*Not* I 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、高糖型 DMEM 细胞培养基、RPMI-1640 细胞培养基、胎牛血清 FBS 均购自 Thermo 公司; 化学感受态 DH5 $\alpha$ 、RNA-easy™ Isolation Reagent 均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 质粒小提试剂盒、DNA 回收试剂盒均购自天根生化科技有限公司; 聚凝胺

polybrene 购自北京索莱宝科技有限公司;  $\beta$ -actin 抗体购自 Abways 公司; 鼠源 FLAG M2 单克隆抗体购自 Sigma 公司; 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记羊抗鼠 IgG 购自武汉博士德生物工程有限公司。

### 1.3 引物设计与合成

根据 PRRSV NSP4 的晶体结构<sup>[5]</sup>和 NSP4 截短突变体结构域示意图<sup>[8]</sup>确定主要结构域并绘制 NSP4 及

其 3 个结构域蛋白结构图, 结合 NSP4 基因序列 (GenBank 登录号: HQ315836.1) 设计目的基因 NSP4、NSP4-D I (1~80 aa)、NSP4-D II (60~156 aa) 和 NSP4-D III (157~204 aa) 的扩增引物。上游引物添加 Flag 标签序列和 *EcoR* I 酶切位点, 下游引物添加 *Not* I 酶切位点, 由北京擎科生物科技有限公司合成 (表 1)。

表 1 目的基因引物信息

引物名称	引物序列 (5'→3')
NSP4-F	CGCGAATTCACCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGGGCGCTTTCAGAACTCAAAG
NSP4-R	TATGCGGCCGCTCATTATTCAGTTTCGGTTTGGCAG
NSP4-D I -F	CGCGAATTCACCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGGGCGCTTTCAGAACTCAAAG
NSP4-D I -R	TATGCGGCCGCTCATTAGGTTTTGGGACGAGCCCTT
NSP4-D II -F	CGCGAATTCACCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGGTAAAGGAGACTTTGCCATA
NSP4-D II -R	TATGCGGCCGCTCATTAGGGCGTAACTACAAAAT
NSP4-D III -F	CGCGAATTCACCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGATCAAGCTGAGCGAGTTGAGT
NSP4-D III -R	TATGCGGCCGCTCATTATTCAGTTTCGGTTTGGCAG

注: 下划线部分为酶切位点序列, 上游引物 *EcoR* I 酶切, 下游引物 *Not* I 酶切; 加粗部分为 Flag 标签序列, 斜体部分为 NSP4 基因的部分序列。

### 1.4 慢病毒表达质粒构建和鉴定

以前期构建质粒 pXJ41-HA-NSP4 为模板, 选用对应的引物, PCR 分别扩增 NSP4、NSP4-D I、NSP4-D II、NSP4-D III 基因序列, 反应条件为 98 °C 预变性 3 min; 98 °C 10 s、58 °C 5 s、72 °C 45 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 并参照天根普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒说明书切胶回收目的基因片段。用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Not* I 将胶回收产物和 pCD513B 载体进行双酶切并纯化, T4 DNA 连接酶 4 °C 过夜连接。重组质粒转化至 DH5 $\alpha$  中, 并涂布在氨苄抗性的 LB 平板 37 °C 过夜培养。挑取单克隆菌落扩大培养, 用质粒提取试剂盒提取质粒, 选择经 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切鉴定正确的质粒, 送至北京擎科生物科技有限公司测序。

### 1.5 慢病毒包装和收集

HEK-293T 细胞接种于 10 cm 细胞培养皿, 含 10% FBS 的高糖型 DMEM, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 过夜培养。培养至细胞密度为 80% 左右按照 pLP1 : pLP2 : pLP/VSVG : 重组质粒 = 1 : 1 : 1 : 3 比例转染。48 h 后收集上清液, 4 °C、4 000 r/min 离心、过滤、分装后冻存于 -80 °C。

### 1.6 慢病毒滴度测定

HEK-293T 细胞接种于 96 孔细胞板过夜培养, 用含 2% FBS、8  $\mu$ g/mL 聚凝胺的 DMEM 培养基 10

倍梯度稀释得到 10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup> 共 3 个浓度梯度的病毒液。待细胞密度为 80% 左右, 弃去细胞培养液, 用不同浓度的病毒液各 100  $\mu$ L 分别感染 HEK-293T 细胞, 未接毒细胞设为阴性对照, 每个浓度设置 3 个重复。感染慢病毒 48 h 后用荧光显微镜观察荧光, 计算病毒滴度。病毒滴度 (TU/mL) = 绿色荧光细胞数量  $\times$  病毒的稀释倍数 / 病毒液体积。

### 1.7 慢病毒感染细胞及目的基因的转录水平检测

THP-1 细胞、PAM 细胞接种 12 孔细胞板, 过夜培养。待细胞密度为 80% 左右更换含 2% FBS、8  $\mu$ g/mL 聚凝胺的 RPMI-1640 细胞培养基, 设置感染复数 (MOI) 为 5, 用慢病毒 rLV-NSP4、rLV-NSP4-D I、rLV-NSP4-D II、rLV-NSP4-D III 分别感染两种细胞。感染 36、48、60 h 后观察荧光表达情况, 并按 RNA-easy<sup>TM</sup> Isolation Reagent 说明书提取 RNA, 反转录为 cDNA 后用荧光定量 PCR (qPCR) 检测细胞中目的基因的转录水平。根据 PRRSV-NSP4 基因序列设计 qPCR 引物, 由北京擎科生物科技有限公司合成 (表 2)。

### 1.8 Western blot 检测目的基因的蛋白表达

4 种慢病毒感染 THP-1、PAM 细胞后, 分别于 36、48、60 h 提取细胞总蛋白样品, 进行 SDS-PAGE 电泳。采用湿法转印将蛋白转印至 NC 膜, 用 5% 脱脂奶粉室温封闭。一抗使用 1 : 2 000 稀释的鼠源 Flag 和  $\beta$ -actin 抗体, 二抗使用 1 : 8 000 稀释的 HRP

标记的羊抗鼠 IgG 抗体。用化学发光试剂盒进行显色，BIO-RAD 凝胶成像仪进行曝光检测。

表 2 qPCR 引物信息

引物名称	引物序列 (5'→3')	引物长度/bp
NSP4-F	GATTGCCCGAATTGGCAAGG	20
NSP4-R	TGAAACAGAAGGCGAACCCA	20
NSP4-D I -F	CCCTCACTGAACACCGTCAA	20
NSP4-D I -R	AAACCCTAGCTGAGTTGCC	20
NSP4-D II -F	GATTGCCCGAATTGGCAAGG	20
NSP4-D II -R	TGAAACAGAAGGCGAACCCA	20
NSP4-D III -F	AGCTGAGCGAGTTGAGTGAA	20
NSP4-D III -R	AGCAGGGCACAAAGATCTGA	20

### 1.9 数据统计与分析

采用 SPSS 26.0 对数据进行分析，Graph Pad Prism 8 绘制数据图表；组间比较采用单因素方差分

析， $P < 0.05$  表示差异显著， $P < 0.01$  表示差异极显著。

## 2 结果

### 2.1 慢病毒表达质粒的构建与鉴定

以 pXJ41-HA-NSP4 为模板，分别扩增 Flag-NSP4、Flag-NSP4-D I、Flag-NSP4-D II 和 Flag-NSP4-D III，琼脂糖凝胶电泳结果如图 1A，扩增条带清晰，无杂带，片段长度分别为 297、348、201、669 bp 左右，符合预期；回收酶切产物连接至 pCD513B 表达载体构建重组质粒 pCD513B-Flag-NSP4、pCD513B-Flag-NSP4-D I、pCD513B-Flag-NSP4-D II、pCD513B-Flag-NSP4-D III；重组质粒双酶切鉴定结果如图 1B，4 个重组质粒酶切后分别得到了符合载体长度和目的基因长度的片段；重组质粒测序结果与目的基因序列进行比对，序列一致，说明表达质粒构建成功。

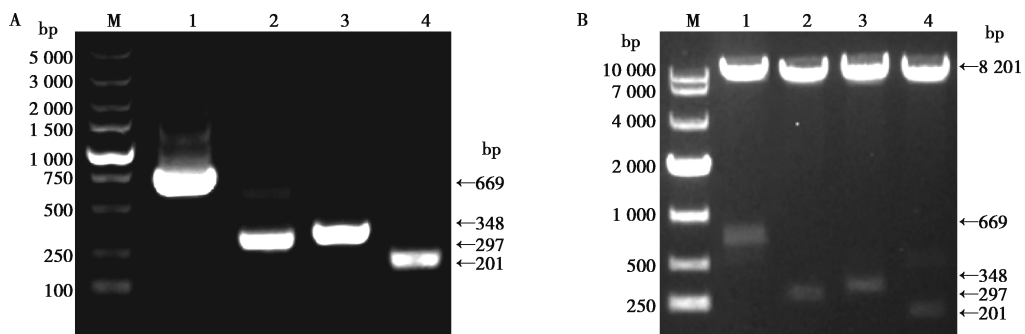


图 1 重组质粒的构建及鉴定

### 2.2 慢病毒滴度测定

将病毒液按照  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$  稀释后感染 HEK-293T 细胞，48 h 后荧光显微镜观察不同浓度病毒液的荧光表达 (图 2)。经计算，rLV-NSP4 病毒滴度为  $2.2 \times 10^6$  TU/mL；rLV-NSP4-D I 病毒滴度为  $2.8 \times 10^6$  TU/mL；rLV-NSP4-D II 病毒滴度为  $2.5 \times 10^6$  TU/mL；rLV-NSP4-D III 病毒滴度为  $2.5 \times 10^6$  TU/mL。

### 2.3 重组慢病毒在 THP-1 细胞、PAM 细胞中的表达情况

重组慢病毒 rLV-NSP4、rLV-NSP4-D I、rLV-NSP4-D II、rLV-NSP4-D III 以 MOI = 5 感染 THP-1 细胞、PAM 细胞，感染 36、48、60 h 后的荧光表达

情况如图 3。与 36 h 相比，4 种慢病毒感染 THP-1 细胞和 PAM 细胞 48 及 60 h，阳性细胞数均有显著增加。

### 2.4 qPCR 检测目的基因转录水平

根据统计结果可见，与 36 h 相比，THP-1 细胞感染 4 种慢病毒 48 和 60 h 的目的基因 mRNA 转录水平均有显著升高 ( $P < 0.01$ )。在 PAM 细胞上，感染 rLV-NSP4 和 rLV-NSP4-D III 48 h 后目的基因 mRNA 转录水平升高明显 ( $P < 0.05$ )，感染 rLV-NSP4-D I、rLV-NSP4-D II 转录水平显著升高 ( $P < 0.01$ )；感染 60 h 后，4 种目的基因 mRNA 转录水平均显著上调 ( $P < 0.01$ ) (图 4)。

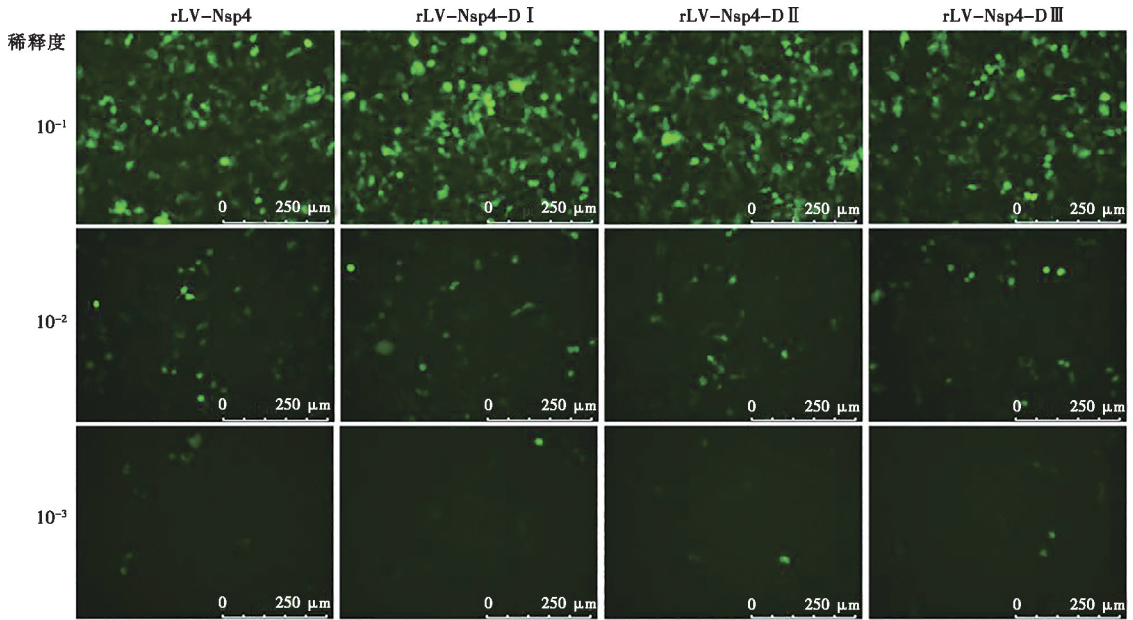


图 2 慢病毒滴度测定

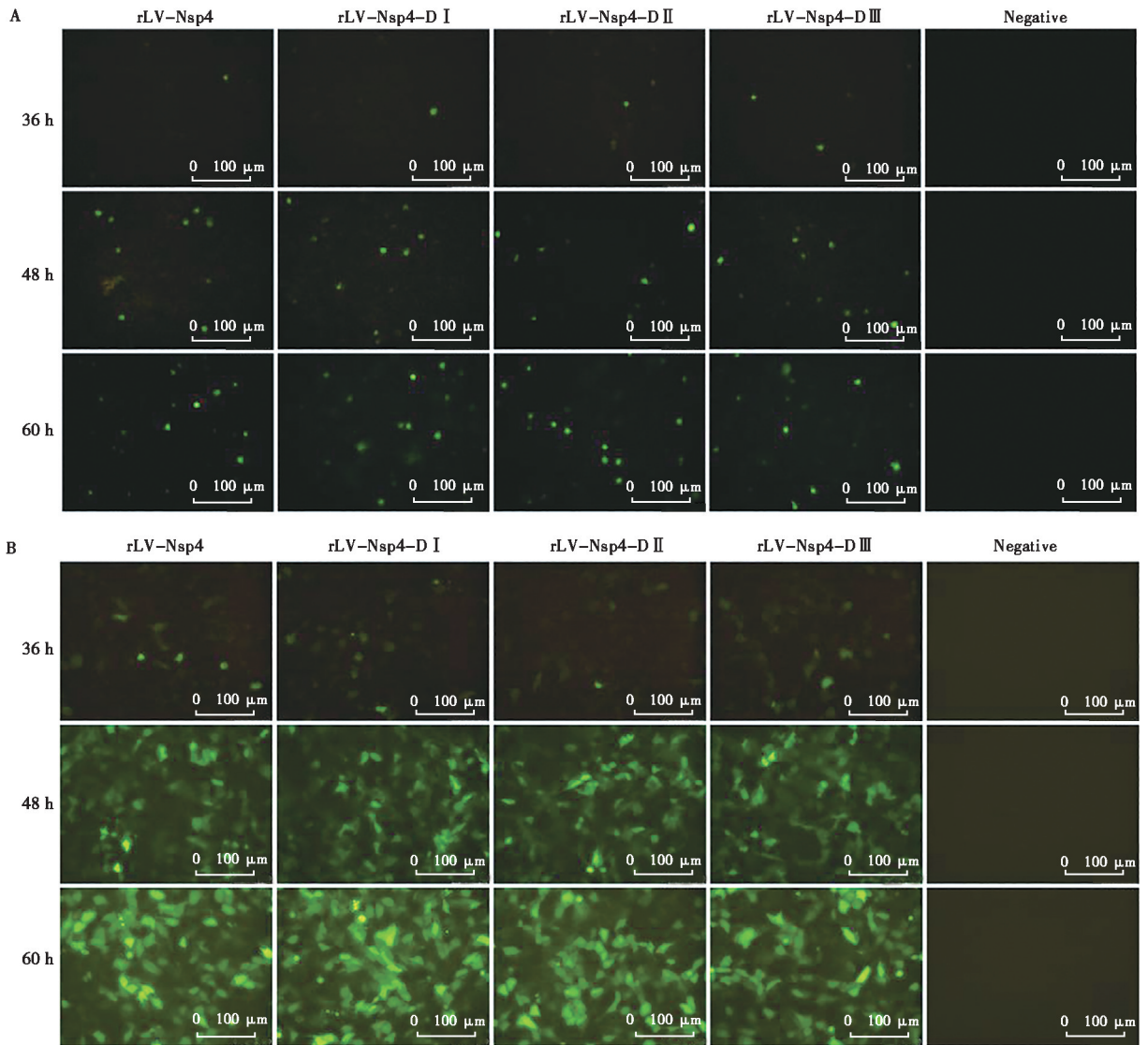


图 3 慢病毒感染 THP-1 细胞 (A) 和 PAM 细胞 (B) 不同时间荧光表达

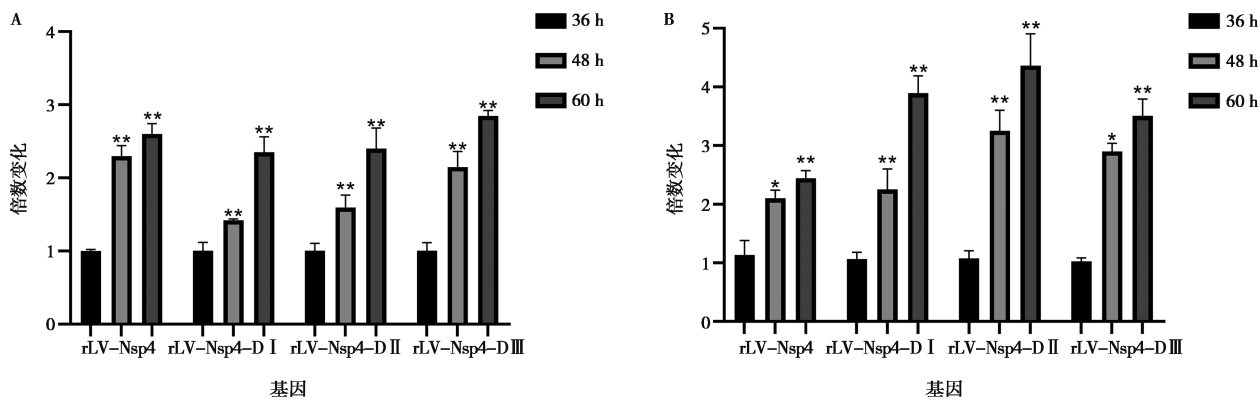


图4 qPCR检测不同感染时间 THP-1 细胞 (A) 和 PAM 细胞 (B) 中目的基因转录水平差异

### 2.5 Western blot 检测目的基因的蛋白表达

Western blot 结果表明慢病毒 rLV-NSP4、rLV-NSP4-D I、rLV-NSP4-D II、rLV-NSP4-D III 均能够

成功感染 THP-1 细胞和 PAM 细胞并过表达相应的目的蛋白，感染时间为 60 h 时目的蛋白表达最明显 (图 5)。

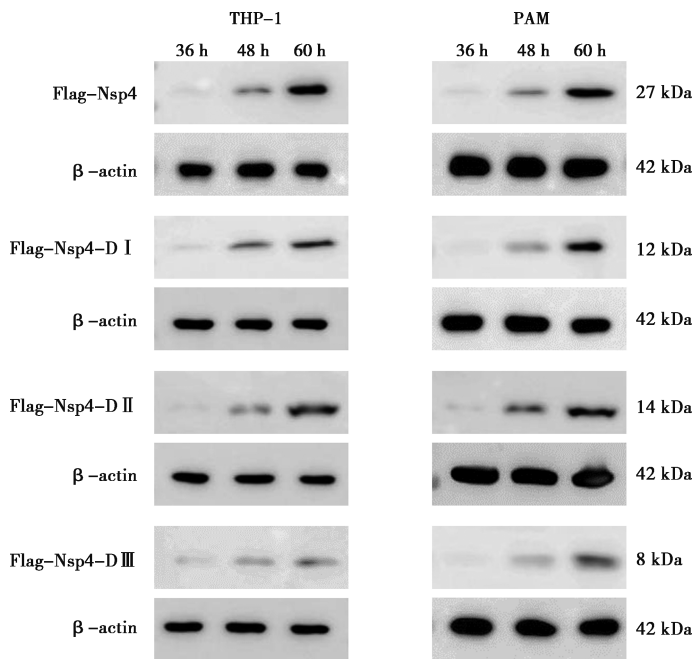


图5 Western blot 检测不同感染时间 THP-1 细胞和 PAM 细胞中目的蛋白表达水平

### 3 讨论

PRRSV 的 NSP4 基因序列高度保守，NSP4 蛋白不仅是病毒增殖过程中起重要作用的蛋白酶，更是 PRRSV 抑制宿主免疫反应、诱导宿主凋亡的重要蛋白。Wei 等<sup>[11]</sup>发现 NSP4 Asp<sup>185</sup>突变后会削弱 NSP4 的催化活性，证明了 Asp<sup>185</sup>是高致病性 PRRSV (HP-PRRSV) 发挥拮抗 IFN-I 表达功能的关键位点；Zhao 等<sup>[12]</sup>通过将 NSP4 转染 Marc-145 细胞发现 NSP4 通过切割外源性锌指抗病毒蛋白 (ZAP) 下调 ZAP 的表达，且 Ser<sup>180</sup>突变 NSP4 切割 ZAP 的能力下降；Jiao 等<sup>[13]</sup>将 NSP4 转染 HEK-293T 细胞，证明

NSP4 在 E378 位点切割 IKKβ，以抑制 NF-κB 信号通路的激活。如今，有效防控 PRRS 仍是农畜行业世界性难题，深入研究 PRRSV NSP4 引起免疫逃逸、免疫抑制的机制，可为弱化 PRRSV 和开发安全有效的疫苗提供理论基础。

PRRSV 作为一种免疫抑制性病毒，主要感染肺泡巨噬细胞，研究 NSP4 调节宿主免疫反应机制常需要转染巨噬细胞。Liu 等<sup>[14]</sup>的研究表明 PRRSV NSP4 和 NSP1α 在肺泡巨噬细胞中会减弱 MHC-I 分子 β2M 的表达从而干扰病毒抗原肽的呈递，最终影响 MHC-I 类分子上呈现的肽的数量和质量；黄琛<sup>[15]</sup>在 PAM 细胞中验证 HP-PRRSV NSP4 可抑制 VISA 蛋白表达

水平,且HP-PRRSV NSP4比经典毒株CH-1a NSP4更能抑制IFN- $\beta$ 的产生。免疫细胞转染效率低一直是其基因改造的一个难题,慢病毒载体可以将病毒DNA高效整合到非分裂细胞基因组中,因此可以转导脂质体难转染的血液前体细胞、神经细胞、淋巴细胞和巨噬细胞<sup>[16]</sup>。颜文杰等<sup>[17]</sup>用腺病毒、慢病毒、脂质体2000这3种方法转染THP-1细胞,发现脂质体2000对THP-1细胞毒性较大,细胞死亡率高,转染效率极低,而用慢病毒转染当MOI=60时,转染率可以达到92%左右。Liu等<sup>[18]</sup>利用慢病毒载体将特异性纳米抗体(Nb41、Nb42、Nb43)基因导入Marc-145细胞,发现了Nb41和Nb43可以通过识别NSP4功能表位抑制PRRSV复制。NSP4蛋白不仅是病毒增殖过程中起核心作用的3CLSP活性蛋白酶,更是PRRSV抑制宿主免疫反应、诱导宿主凋亡的重要蛋白质,本研究包装的4种慢病毒rLV-NSP4、rLV-NSP4-D I、rLV-NSP4-D II、rLV-NSP4-D III能够成功感染THP-1和PAM细胞,可以用于后续研究PRRSV免疫抑制机制时筛选NSP4发挥作用的关键结构域,也可以作为开发基于NSP4靶点的抗病毒药物时基因改造的高效工具。

慢病毒对不同细胞的感染能力有区别,造血细胞和一些上皮细胞系的慢病毒感染效率较低,需要使用高MOI<sup>[19-20]</sup>。本试验4种慢病毒同样MOI感染THP-1细胞的效率比感染PAM细胞效率低,这与其不同的细胞特性有关,后续考虑通过超滤离心管或PEG 8000浓缩慢病毒,增加感染MOI提高慢病毒对THP-1等悬浮细胞的感染效率。

综上所述,本研究分别构建了NSP4及其3个主要结构域NSP4-D I、NSP4-D II、NSP4-D III的过表达慢病毒载体,并获得能在THP-1及PAM细胞中稳定表达的4种慢病毒,为进一步研究NSP4及其结构域在PRRSV感染和免疫调控中机制奠定了基础,为PRRSV相关疫苗研发提供了技术支持。

## 参考文献:

[1] TERJE D. The structural biology of PRRSV [J]. *Virus Res*, 2010, 154 (1): 86-97.

[2] 周洛译,孙跃峰,侯石桐,等.猪繁殖与呼吸综合征疫苗的发展现状及mRNA疫苗前景[J].*动物医学进展*, 2023, 44 (12): 93-98.

[3] YANHUA L, ALI T, ZHI S, et al. Proteolytic processing of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus replicase [J]. *Virus Res*, 2015, 202: 48-59.

[4] 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 (9):

76-81.

[5] XINSHENG T, GUANGWEN L, FENG G, et al. Structure and cleavage specificity of the chymotrypsin-Like serine protease (3CLSP/nsp4) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) [J]. *J Mol Biol*, 2009, 392 (4): 977-993.

[6] MA Z, WANG Y, ZHAO H, et al. Correction: porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 4 induces apoptosis dependent on its 3C-Like serine protease activity [J]. *PLoS One*, 2020, 15 (2): e0230086.

[7] 沙惠阳,张航,黄良宗,等.猪繁殖与呼吸综合征病毒NSP4研究进展[J].*动物医学进展*, 2022, 43 (10): 80-85.

[8] QI P, LIU K, WEI J, et al. Nonstructural protein 4 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus modulates cell surface swine leukocyte antigen class I expression by downregulating  $\beta$ 2-microglobulin transcription [J]. *J Virol*, 2017, 91 (5): e01755-16.

[9] 于莹,李均同,丛晓燕,等.猪RNase L与PRRSV nsp4缺失突变体的构建及其互作研究[J].*畜牧与兽医*, 2021, 53 (11): 85-92.

[10] 何倩,沈逵,秦爱建,等.禽白血病毒衣壳蛋白P27慢病毒载体的构建及其在鸡肝癌细胞中的表达[J].*中国家禽*, 2021, 43 (3): 16-21.

[11] WEI Z, LIU F, LI Y, et al. Aspartic acid at residue 185 modulates the capacity of HP-PRRSV nsp4 to antagonize IFN-1 expression [J]. *Virology*, 2020, 546: 79-87.

[12] ZHAO Y, SONG Z, BAI J, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus NSP4 cleaves ZAP to antagonize its antiviral activity [J]. *Vet Microbiol*, 2020, 250: 108863.

[13] JIAO S, LI C, LIU H, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection inhibits NF- $\kappa$ B signaling pathway through cleavage of IKK $\beta$  by NSP4 [J]. *Vet Microbiol*, 2023, 282: 109767.

[14] LIU Q, YU Y, WANG H, et al. The IFN- $\gamma$ -induced immunoproteasome is suppressed in highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected alveolar macrophages [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2020, 226: 110069.

[15] 黄琛.猪繁殖与呼吸综合征病毒逃逸I型干扰素反应机制的研究[D].北京:中国农业大学,2016.

[16] 王丙萍,段金凯,高凤英,等.PSMA-CAR慢病毒颗粒包装浓缩及感染CIK细胞的研究[J].*肿瘤预防与治疗*, 2022, 35 (3): 203-210.

[17] 颜文杰,孙文逵,李培,等.三种不同方法转染THP-1巨噬细胞效果比较[J].*中华肺部疾病杂志(电子版)*, 2015, 8 (1): 7-12.

[18] LIU H, LIANG C, DUAN H, et al. Intracellularly expressed nanobodies against non-structural protein 4 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus inhibit virus replication [J]. *Biotechnol Lett*, 2016, 38 (7): 1081-1088.

[19] QUINN S, LENART N, DRONZEK V, et al. Genetic modification of T cells for the immunotherapy of cancer [J]. *Vaccines*, 2022, 10 (3): 457.

[20] LAMB L S Jr, BOWERSOCK J, DASGUPTA A, et al. Engineered drug resistant  $\gamma\delta$  T cells kill glioblastoma cell lines during a chemotherapy challenge: a strategy for combining chemo-and immunotherapy [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (1): e51805.