

# 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒 NSP2 主要抗原区域的原核表达及间接 ELISA 检测方法的建立

林 华,郭万柱\*,张 博,陈弟诗,陈 扬,  
王小玉,徐志文,王 印,朱 玲

(四川农业大学 动物生物技术中心,雅安 625014)

**摘 要:** 本研究以高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒(HPPRRSV)重组 NSP2 蛋白为包被抗原,建立了检测 PRRSV 抗体的间接 ELISA 方法。通过 RT-PCR 技术,从 PRRSV SCMS08 株中,成功扩增出 NSP2 的主要抗原区域。将其克隆到 pET-32a(+),成功构建原核表达载体,并转化宿主菌(*E. coli*)Rosetta 2(DE3)。以镍柱纯化表达蛋白,SDS-PAGE 检测证实重组蛋白获得了高效表达,Western blot 检测表明所表达蛋白能够被抗组氨酸标签单克隆抗体和 PRRSV 阳性血清识别。以此蛋白包被酶标板,初步建立了 PRRSV NSP2-ELISA 诊断方法。优化的 NSP2-ELISA 的最佳抗原包被浓度为  $1.7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,血清的最佳稀释度为 1:40。用该方法检测 185 份血清样品,与 IDEXX 公司 ELISA 试剂盒检测结果符合率为 90.8%。建立的间接 ELISA 方法敏感性高、特异性强,可用于猪繁殖与呼吸综合征的常规诊断及流行病学调查。

**关键词:** 猪繁殖与呼吸综合征;NSP2;间接 ELISA

中图分类号:S852.659.6

文献标识码:A

文章编号:0366-6964(2010)06-0711-06

## Prokaryotic Expression of NSP2 Major Antigen Region of Highly Pathogenic PRRSV and Development of an Indirect ELISA Based on the Expressed Protein

LIN Hua, GUO Wan-zhu\*, ZHANG Bo, CHEN Di-shi, CHEN Yang, WANG Xiao-yu,  
XU Zhi-wen, WANG Yin, ZHU Ling

(Animal Biotechnology Center, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

**Abstract:** The present experiment was performed with the objective of establishing an indirect ELISA for detection of PRRSV with the purified NSP2 fusion protein as coating antigen. The major antigen region of NSP2 was successfully amplified by RT-PCR from a highly pathogenic PRRSV (SCMS08 strain), and inserted into pET-32a(+) vector. The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* Rosetta 2 (DE3) and induced with IPTG. The fusion protein was treated with Ni-chelated chromatography under denaturing conditions. With the purified fusion protein as coating antigen, an ELISA for detection of PRRSV was established. SDS-PAGE showed that the fusion protein was expressed at high level in Rosetta 2. Western blot analyses showed that the expressed protein was recognized specifically by anti-His monoclonal antibody as well as PRRSV positive serum. In the optimized NSP2-ELISA, the fusion protein was coated at  $1.7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  and swine serum samples were diluted at 1:40. About 185 serum samples were detected by the method and IDEXX-ELISA kit, respectively. The agreement ratio between the two methods reached at 90.8%. The results indicated that NSP2-ELISA was specific, sensitive and suitable

收稿日期:2010-01-13

基金项目:教育部长江学者和创新团队发展计划(IRTO555)

作者简介:林 华(1982-),男,四川丹棱人,博士生,主要从事动物传染病病原分子生物学及分子免疫学研究,E-mail:sicaueric@yahoo.com.cn, Tel:0835-2885846

\* 通讯作者:郭万柱, E-mail:wzguo@126.com

for routine diagnosis of PRRS and also for epidemiological surveys.

**Key words:** porcine reproductive and respiratory syndrome virus; NSP2; indirect ELISA

猪繁殖与呼吸综合征(porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)是由猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)引起的病毒性传染病,以成年母猪繁殖障碍和仔猪呼吸道疾病为主要特征<sup>[1]</sup>。自20世纪80年代末在美国暴发以来,迅速在全球蔓延,成为世界养猪业最重要的疾病之一<sup>[2]</sup>。郭宝清等于1996年首次证实了PRRSV在中国的存在和流行<sup>[3]</sup>。2006年以来,高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒给我国养猪业造成了极为惨重的经济损失<sup>[4-5]</sup>。

PRRSV属动脉炎病毒科,为单股正链RNA病毒,基因组大小约为15 kb<sup>[6]</sup>,包括8个开放阅读框架(ORF),ORF2~7编码6种结构蛋白,ORF1(包括ORF1a和ORF1b)编码的聚合蛋白裂解产生12个非结构蛋白(NSP1~12)<sup>[7]</sup>。NSP2是变异最大的非结构蛋白,并具有多个B细胞表位,在病毒的感染过程中能够刺激机体产生特异性抗体。

ELISA是检测PRRS抗体最常用的方法之一。目前所建立的ELISA检测方法大多采用PRRSV全病毒或表达的核衣壳(N)蛋白作为抗原<sup>[8-9]</sup>。NSP2是否能作为ELISA诊断抗原目前尚未见有相关报道。本研究将NSP2基因主要抗原表位进行原核表达,获得重组NSP2融合蛋白,并将融合蛋白纯化后,初步建立了检测PRRSV抗体的间接ELISA方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞和菌株

Marc-145细胞、高致病性PRRSV SCMS08株、大肠杆菌DH5 $\alpha$ 均由作者实验室保存。

### 1.2 主要试剂

DMEM培养基购自GIBCO公司;RNAiso Reagent、Prime Script<sup>TM</sup> RT reagent kit反转录试剂盒、pMD19-T simple载体、DNA聚合酶购自TaKaRa公司;E. z. N. A. Gel Extraction Kit和Plasmid Mini Kit购自OMEGA公司;DNA和蛋白质分子量标准购自北京天根生化科技有限公司;5,5-四甲基联苯胺(TMB)显色溶液为Promega公司产品;异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)购自上海生工生

物工程技术服务有限公司;His标签纯化树脂购自北京索来宝科技有限公司;抗His单克隆抗体和HRP标记羊抗猪IgG购自北京中山金桥生物技术有限公司;其余试剂均为国产分析纯。

### 1.3 血清检测样品的采集与处理

阴性血清采自健康猪,经IDEXX公司抗体检测试剂盒及RT-PCR检测均为阴性;PRRSV检测血清样品采自四川发病猪场。猪圆环病毒(PCV2)、猪瘟病毒(CSFV)、猪伪狂犬病毒(PRV)、细小病毒(PPV)阳性血清均由笔者所在实验室制备并保存。

### 1.4 引物设计和合成

根据PRRSV经典株Nsp2基因已鉴定的主要抗原表位,并参照PRRSV JXA1株基因序列(GenBank登陆号为EF112445),用Oligo 6.0设计Nsp2(P1、P2)主要抗原表位区域的引物。P1: 5'-GGAATTCACCCAGGCGACTTCAGATATG3'; P2: 5'-CGTCGACCAGTTGGTCTAAGAGCCT-3';下划线依次为引入EcoRI、SalI内切酶位点),预期扩增片段为1260 bp。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

### 1.5 Nsp2基因原核表达质粒载体的构建

参照TaKaRa RNAiso Reagent试剂使用说明书提取病毒细胞培养物总RNA。用Prime Script<sup>TM</sup> RT reagent kit反转录试剂盒反转录合成cDNA。PCR扩增采用25  $\mu$ L体系,PCR产物经胶回收后,进行TA克隆,鉴定为阳性的转化菌,送上海英骏生物技术有限公司测序。经测序正确后命名为pMD-Nsp2-1。pMD-Nsp2-1经限制性内切酶EcoRI、SalI双酶切,与酶切消化的pET32a(+)载体连接,并转化至DH5 $\alpha$ 宿主菌,经PCR和酶切鉴定。

### 1.6 Nsp2基因的诱导表达与表达产物的纯化

将鉴定的阳性质粒转化Rosetta 2(DE3)菌株,挑取单个白色菌落在10 mL LB/Amp肉汤培养基中37  $^{\circ}$ C振荡培养过夜。然后按1:10比例扩大振荡培养,待OD值达到0.6左右时,加入IPTG(终浓度为0.5 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>),37  $^{\circ}$ C诱导表达4 h,4  $^{\circ}$ C 3 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup>离心30 min,收集菌体沉淀,以12% SDS-PAGE电泳分析蛋白表达。超声波裂解诱导

表达菌体,分离裂解液上清和沉淀,SDS-PAGE 电泳分析重组蛋白的表达形式。采用咪唑竞争结合法在变性条件下以 Ni-NTA 亲和纯化重组蛋白,操作方法参照产品手册,从表达产物中纯化重组蛋白。将含有目的蛋白质的洗脱液用蛋白质透析液逐步透析复性。经 SDS-PAGE 检测纯化重组蛋白,并用核酸蛋白仪测定纯化的重组蛋白的浓度。

### 1.7 原核表达产物的 Western blot 分析

将上述诱导菌液进行 SDS-PAGE 后转至硝酸纤维素膜(NC)上,以 3% 牛血清白蛋白(BSA)封闭, TBST 洗涤后,加入 1:1 000 鼠源组氨酸单克隆抗体或 PRRSV 阳性血清孵育过夜,洗涤,再加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 孵育 1 h,洗涤后以 DAB 为显色底物进行 Western blot 分析。

### 1.8 ELISA 抗原包被浓度与血清稀释倍数的确定

以方阵试验检测抗原的最适工作浓度和血清最佳稀释度。用  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液(pH 9.6)对 NSP2 重组蛋白( $0.54 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )进行 1:20、1:40、1:80……倍比稀释,每孔 100  $\mu\text{L}$ , 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜包被酶标反应板,  $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  脱脂乳 37  $^{\circ}\text{C}$  封闭 2 h; 分别加入 1:20、1:40、1:80……倍比稀释的 PRRSV 阳性血清和阴性血清, 37  $^{\circ}\text{C}$  反应 1 h; 以 HRP 标记的羊抗猪 IgG(1:2 000)为二抗, 37  $^{\circ}\text{C}$  作用 1 h, 以 TMB 为显色底物进行常规 ELISA 检测, 计算阳性血清孔的平均  $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$  值(P) 和阴性血清孔的平均  $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$  值(N) 之比(P/N)。

### 1.9 临界值的确定

随机挑取 PRRSV 抗体阴性的血清 20 份, 以优化的抗原包被量和血清工作浓度进行 ELISA 检测, 确定 ELISA 结果判定的临界值。临界值 = 阴性血清平均  $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$  值 +  $3 \times$  标准差(s)。

### 1.10 NSP2 ELISA 的交叉反应试验

分别将 PRRSV 阳性血清以及 PCV2、CSFV、PRV、PPV 阳性血清和阴性血清 1:40 稀释, 利用建立的 NSP2 ELISA 方法进行检测, 测定 NSP2 ELISA 方法对其他相关猪病血清的交叉反应性。

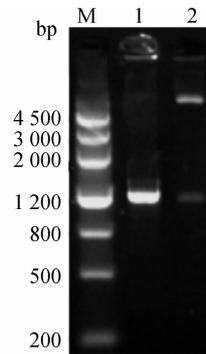
### 1.11 NSP2 ELISA 与 IDEXX 公司检测试剂盒的比较

NSP2 ELISA 方法分别检测 143 份和 42 份经 IDEXX 公司 ELISA 检测试剂盒检测为阳性和阴性的猪临床血清样品, 测定 NSP2 ELISA 与 IDEXX 检测试剂盒的符合率。

## 2 结果

### 2.1 Nsp2 原核表达载体的构建

以反转录 cDNA 为模板, PCR 扩增, 获得 1 条约 1 200 bp 的 PRRSV *Nsp2* 基因片段, 序列测定结果表明, 片段大小为 1 260 bp, 与 PRRSV JXA1 的基因同源性为 99.0%。将 *Nsp2* 基因片段亚克隆到表达载体 pET-32a(+), 经 PCR 和 *EcoR* I、*Sal* I 双酶切鉴定(图 1), 成功构建了重组质粒, 命名为 pET-Nsp2-1。



M. DNA 相对分子质量标准 III; 1. PCR 产物; 2. *EcoR* I / *Sal* I 双酶切

M. Marker III; 1. PCR product; 2. Digested with *EcoR* I and *Sal* I

图 1 pET-Nsp2-1 的 PCR 和酶切鉴定

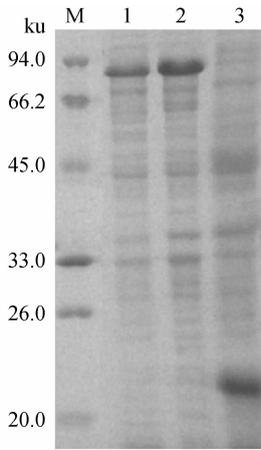
Fig. 1 Identification of pET-Nsp2-1 by PCR and restriction endonucleases

### 2.2 融合蛋白的诱导表达及纯化

用  $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 IPTG 诱导阳性重组大肠杆菌及空质粒对照, 在加入诱导剂 4 h 后, 经 SDS-PAGE 电泳, 表达的融合蛋白质约为 70 ku(图 2), 经 BandScan 软件分析, 蛋白质的最高表达量占细菌总蛋白的 38.2%; 表达产物经  $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  尿素变性后, 经 Ni-NTA 柱纯化, 洗脱, SDS-PAGE 分析表明获得了纯度较高的重组蛋白(图 3)。Western blot 分析表明, 表达产物能与抗 His 单克隆抗体和 PRRSV 阳性血清特异识别(图 4), 表明其为 His-Nsp2 融合蛋白, 具有良好的抗原反应性。

### 2.3 NSP2-ELISA 检测方法的建立

经核酸蛋白仪测定, 纯化蛋白浓度为  $0.54 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。方阵试验表明, 抗原稀释度在 1:320、抗体稀释度在 1:40 时, P/N 值最大, 所以选择抗原 1:320、血清 1:40 稀释为最佳工作浓度, 此时抗原的包被浓度约为  $1.7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

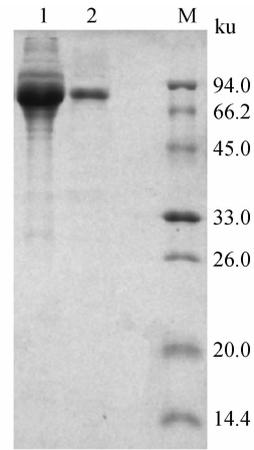


M. 蛋白质分子质量标准;1,2. 诱导的 pET-Nsp2-1;3. 诱导的 pET-32a(+ )空载体

M. Protein molecular weight marker; 1, 2. Induced pET-Nsp2-1; 3. Induced pET-32 a(+)

图 2 pET-Nsp2-1 的诱导表达结果

Fig. 2 The induced expression of pET-Nsp2-1

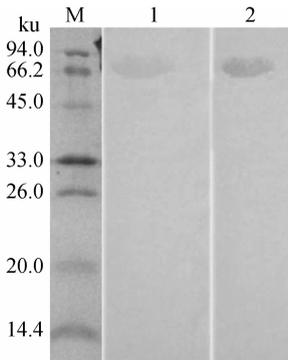


M. 蛋白质分子质量标准;1. 纯化前包涵体;2. 包涵体经镍柱纯化后产物

M. Protein molecular weight marker; 1. The unpurified inclusion body; 2. The purified product of inclusion body by Ni-chelated chromatography

图 3 NSP2 蛋白的纯化

Fig. 3 Purification of the expressed NSP2 protein



M. 蛋白质分子质量标准;1. PRRSV 阳性血清;2. 抗组氨酸单克隆抗体

M. Protein molecular weight marker; 1. PRRSV positive serum; 2. Anti-His monoclonal antibody

图 4 Nsp2 表达蛋白的 Western blot 分析

Fig. 4 Western blot analysis of the expressed Nsp2 protein of PRRSV

### 2.4 间接 ELISA 方法临界值的确定

对 20 份 PRRSV 阴性血清进行间接 ELISA,按照已经确立的 ELISA 程序进行测定,20 份血清 OD<sub>450 nm</sub>的平均值为 0.228, s 为 0.086 5,ELISA 阴阳性临界值等于 0.49。因此确定:样本 OD<sub>450 nm</sub> ≥ 0.49,判为阳性;样本 OD<sub>450 nm</sub> < 0.49,判为阴性。

### 2.5 NSP2-ELISA 的特异性试验

用建立的 NSP2-ELISA 方法检测 PRRSV 阴性血清、PCV2、CSFV、PRV、PPV 阳性血清,结果均为阴性。同时对照试剂盒与上述血清均不发生反应,表明该方法具有良好的特异性。

### 2.6 与试剂盒的符合率试验

用建立的 ELISA 方法与 IDEXX PRRSV 抗体检测试剂盒平行检测 185 份送检血清,与 IDEXX 试剂盒检测的阳性符合率为 90.2%(129/143),阴性符合率为 92.9%(39/42),总符合率为 90.8%[(129+39)/185],见表 1。

表 1 ELISA 检测方法与对照试剂盒检测结果的比较

Table 1 Comparison of the results between the established ELISA and commercial kit

检测结果 The results	IDEXX ELISA 试剂盒		NSP2-ELISA 检测结果	
	Commercial kit		The results of established NSP2-ELISA	
	血清数 Serum counts		阳性数 Positive counts	阴性数 Negative counts
阳性 Positive	143		129	3
阴性 Negative	42		14	39
合计 Total	185		143	42

### 3 讨 论

自 1987 年首次发现 PRRSV 至今,国内外已建立了多种检测技术,主要包括抗体检测和抗原检测两方面。抗体检测的方法主要有间接免疫荧光(IFA)、免疫过氧化物酶单层试验(IPMA)、酶联免疫吸附试验(ELISA)等,其中以 ELISA 应用最为广泛。目前应用的 ELISA 试剂盒,主要分为包被全病毒和表达蛋白 2 类。N 蛋白具有 4 个明确的抗原表位,免疫原性好、血清抗体维持时间长<sup>[10]</sup>,因此目前 PRRSV ELISA 检测试剂盒大多选择 N 蛋白作为包被抗原。另外 M、E 蛋白亦可作为诊断抗原用于 ELISA 的检测<sup>[11]</sup>。利用非结构蛋白进行 ELISA 检测,目前尚处于研究起步阶段,而 NSP2 是目前研究的重点之一。

*Nsp2* 位于 ORF1a 基因编码区内,长度约 2.9 kb,是 PRRSV 感染细胞后最早复制的蛋白之一<sup>[12]</sup>,最早可于 1 周内从被感染猪血清中检出针对 NSP2 的抗体。NSP2 是非结构蛋白中变异最大的蛋白。PRRSV 美洲型和欧洲型毒株间 *Nsp2* 基因所推导的氨基酸序列同源性仅 32.0%,美洲分离株之间 NSP2 同源性最低,约为 70%,有学者将其作为划分美洲型 PRRSV 不同亚型的依据及监测 PRRSV 变异的理想标志<sup>[13-14]</sup>。*Nsp2* 基因的变异包括碱基长度的不同、缺失、置换、插入等,因而已成为开发 PRRSV 标志性疫苗的重要候选区域<sup>[15-16]</sup>。国内外多位学者研究发现,体外表达的 PRRSV NSP2 融合蛋白具有良好的免疫原性<sup>[14-18]</sup>。Oleksiewicz 等通过噬菌体展示技术显示,NSP2 有 6 个抗原表位能诱导产生较高水平的抗体<sup>[12]</sup>;De 等通过肽扫描技术发现 NSP2 上存在 18 个抗原表位,其中有 10 个表位具有较强免疫原性,而 18 个抗原表位中有 13 个位于 *Nsp2* 基因 400—850 位氨基酸区域,其中 7 个是免疫原性较强的表位<sup>[18]</sup>。

笔者综合前人的研究结果,并参照 PRRSV JXA1 株基因序列,设计了 1 对引物,对高致病性 PRRSV 变异株的主要抗原区域进行了扩增,并进行了序列测定。通过序列比对发现所扩增序列与经典株 ATCC VR-2332 和 CH-1a 氨基酸同源性分别为 72% 和 87.5%。通过抗原表位分析发现大多数抗原表位发生抗原漂移,与经典株差异较大。但同时也发现其中 6 个抗原表位变异较小,其中 3 个是抗原性较强的抗原表位:<sup>441</sup> PPPPPRVQPRKTKSV<sup>445</sup>、

<sup>441</sup> KTKSVKSLPGNKVPV<sup>445</sup>、<sup>606</sup> VLSEISDTLNDIN-PA<sup>620</sup>。<sup>431</sup> PPPPPRVQPRKTKSV<sup>445</sup> 仅有 1 个氨基酸的突变,由 441 位赖氨酸(K)突变为精氨酸(R)。因此笔者推测变异株 NSP2 融合蛋白对 PRRSV 经典株阳性血清仍然具有较高的识别率。为此将所扩增的主要抗原区域克隆到 pET-32a(+) 载体,成功构建了原核表达载体,并转化宿主菌(*E. coli*) Rosetta 2(DE3),获得了高效表达。融合蛋白采用镍柱纯化后,作为包被抗原建立了 NSP2-ELISA 抗体检测方法,并与 IDEXX 公司的 PRRSV 检测试剂盒进行了对比,符合率达到 90%,与笔者的预测相符。试验结果表明将 NSP2 蛋白作为诊断抗原是可行的,并且具有较高的准确性和敏感性。但所建立的 NSP2-ELISA 方法与商用试剂盒一样,均不能有效区分经典株与变异株产生的抗体。但如果将变异株 NSP2 主要抗原区域与经典株抗原表位相近的抗原表位去除后,则有望开发出能特异检测高致病性 PRRSV 变异株抗体的 ELISA 方法,从而实现疫苗与野毒感染的区分。

### 4 结 论

本研究成功克隆了高致病性 PRRSV SCMS08 株 *Nsp2* 基因的主要抗原表位的区域,并在大肠杆菌中高效表达,融合蛋白能够被 PRRS 阳性血清所识别。以纯化蛋白为包被抗原初步建立的 NSP2-ELISA 抗体检测方法敏感性高、特异性强,可用于 PRRS 的常规诊断及流行病学调查,为最终开发出能鉴别诊断 PRRSV 不同亚型的 ELISA 检测方法奠定了基础。

### 参 考 文 献:

- [1] GOYAL S M. Porcine reproductive and respiratory syndrome[J]. *Vet Diagn Invest*, 1993, 5(4): 656-664.
- [2] WENSVOORT G, TERPSTRA C, POL J M, et al. Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad[J]. *Virus Vet Q*, 1991, 13(3): 121-130.
- [3] 郭宝清,陈章水,刘文兴,等. 从疑似 PRRS 流产胎儿分离 PRRSV 的研究[J]. *中国畜禽传染病*, 1996, (2): 1-5.
- [4] 宁宜宝,郑 杰,张纯萍,等. 我国南方猪高热病的研究(II)——猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒的分离、鉴定和致病性测定[J]. *中国兽药杂志*, 2007, 41(1):

- 14-18.
- [5] 童光志,周艳君,郝晓芳,等.高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒的分离鉴定及其分子流行病学分析[J].中国预防兽医学报,2007,29(5):323-327.
- [6] MEULENBERG J J, HULST M M, DE MEIFER E J, et al. Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV[J]. *Virology*, 1993, 192(1): 62-72.
- [7] FANG Y, KIM D Y, ROPP S, et al. Heterogeneity in Nsp2 of European-like porcine reproductive and respiratory syndrome viruses isolated in the United States[J]. *Virus Res*, 2004, 100(2): 229-235.
- [8] 夏平安,尹彦涛,李素平,等.猪繁殖与呼吸综合征病毒重组 N 蛋白的高效表达及间接 ELISA 方法的建立[J].中国兽医学报,2009,29(05):537-541.
- [9] 吴延功,王志亮,王君玮. PRRS ELISA 试剂盒检测猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体的应用[J].中国动物检疫,2004,21(6):23-25.
- [10] OPRIESSNIGT, BAKER R B, HALBUR P G. Use of an experimental model to test the efficacy of planned exposure to live porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2007, 14(12):1572-1577.
- [11] 江云波,方六荣,肖少波,等.猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)GP5-M 在大肠杆菌中的融合表达及其 ELISA 诊断方法的建立[J].生物工程学报,2005, 21(2):259-264.
- [12] OLEKSIEWICZ M B, BOTNER A, TOFT P, et al. Epitope mapping porcine reproductive and respiratory syndrome virus by phage display: the nsp2 fragment of the replicase polyprotein contains a cluster of B-cell epitopes[J]. *Virology*, 2001, 75(7): 3277-3290.
- [13] 马静云,李浩波,王玲玲,等.高致病性 PRRSV 的分离及其 Nsp2 和 ORF5 基因的序列分析[J].中国兽医学报,2008,38(8):650-657.
- [14] YOSHII M, OKINAGA T, MIYAZAKI A, et al. Genetic polymorphism of the nsp2 gene in North American type-porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Arch Virol*, 2008, 153(7): 1323-1334.
- [15] KIM D Y, KAISER T J, HORLEN K, et al. Insertion and deletion in a non-essential region of the non-structural protein 2 (nsp2) of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: effects on virulence and immunogenicity [J]. *Virus Genes*, 2009, 38(1): 118-128.
- [16] DE LIMA M, KWON B, ANSARI I H, et al. Development of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus differentiable (DIVA) strain through deletion of specific immunodominant epitopes [J]. *Vaccine*, 2008, 26(29-30): 3594-3600.
- [17] 王海燕,姜平,杜以军,等.猪繁殖与呼吸综合征病毒非结构蛋白 nsp2 的原核表达及其单克隆抗体的制备[J].中国生物工程杂志,2008,28(2):42-46.
- [18] DE LIMA M, PATTNAIK A K, FLORES E F, et al. Serologic marker candidates identified among B-cell linear epitopes of Nsp2 and structural proteins of a North American strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Virology*, 2006, 353(2): 410-421.

(编辑 白永平)