

## 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

# Expression of GP5-M Fusion Protein of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus(PRRSV) and Establishment of ELISA Diagnose Based on the Recombinant Fusion Protein

江云波, 方六荣, 肖少波, 谢甜甜, 陈焕春\*

JIANG Yun-Bo, FANG Liu-Rong, XIAO Shao-Bo, XIE Tian-Tian and CHEN Huan-Chun\*

华中农业大学动物医学院动物病毒室, 430070

Laboratory of Animal Virology, College of Animal Science and Veterinary Medicine, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China

**摘 要** 利用谷胱甘肽-S-转移酶(GST)表达系统将猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)的 ORF5 和 ORF6 基因依序串联于 GST 下游,并在大肠杆菌中成功表达,获得了大小约为 60kD 的融合蛋白 GST-GP5-M,Western blot 检测证实表达的融合蛋白具有良好的生物学活性。以纯化的融合蛋白为抗原建立了猪繁殖与呼吸综合征 P56-ELISA 检测方法,与国外试剂盒 IDEXX-ELISA 总符合率为 94.1%,表明建立的 P56-ELISA 检测方法具有很好的特异性和敏感性。进一步分析了 P56-ELISA 检测结果与血清中和试验的相关性,经回归函数分析,发现在临床送检猪血清中的抗融合蛋白 GP5-M 抗体水平( $OD_{630nm}$ )与中和抗体水平之间的相关性并不高。

**关键词** 猪繁殖与呼吸综合征病毒, GP5-M 融合蛋白, ELISA, 中和抗体, 相关性

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)02-0259-06

**Abstract** The cDNA fragment encoding the truncated GP5 and the full-length M protein of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) were orderly fused to the downstream of glutathione S-transferase (GST) of pGEX-KG expression vector, resulting in the fusion expression plasmid pKG-56. After transformed into *E. coli* BL21(DE3) and induced by IPTG, the results of SDS-PAGE showed that the GST-GP5-M fusion protein was expressed in high level. Western-blot was performed to confirm that the expressed fusion protein could specifically react with antiserum against PRRSV. The fusion protein was further purified and used as an antigen to establish a novel PRRSV ELISA diagnose assay (P56-ELISA). Comparison between P56-ELISA and the abroad kit IDEXX-ELISA showed the two methods had 94.1 percent agreement by detecting 205 serum samples, indicating that the indirect P56-ELISA was specific and sensitive. The correlation between virus neutralization antibody of the infected pigs (not convalescent pigs) and antibody response to the fusion protein GP5-M was further studied. The regression

Received: September 14, 2004; Accepted: December 1, 2004.

This work was supported by Grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 30300257) and the Youth Scientist Project of Wuhan City (No. 20025001041).

\* Corresponding author. Tel: 86-27-87282608; E-mail: hzavet@public.wh.hb.cn

国家自然科学基金(No. 30300257)和武汉市青年科技晨光计划(No. 20025001041)资助项目。

function analysis suggested that there was no significant correlation between ELISA antibody response ( $OD_{630nm}$ ) to the fusion protein GP5-M in clinical serum and their specific neutralizing titers.

**Key words** porcine reproductive and respiratory syndrome virus, the fusion protein GST-GP5-M, ELISA, neutralization antibody, correlation

猪繁殖与呼吸综合征是由猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 引起的一种严重危害养猪业的新传染病<sup>[1]</sup>。临床上以妊娠母猪流产、死胎、木乃伊胎、弱仔等繁殖障碍以及仔猪的呼吸道症状和高死亡率为特征。最初由于不知其病原被称为“神秘病”。该病自 1987 年首次在美国发现以来, 随后的 2、3 年间, 加拿大和欧洲一些国家也相继报道了该病的发生, 几年之内便席卷了北美洲和欧洲大陆, 现已蔓延至许多亚太国家和地区<sup>[2]</sup>。尽管我国 1995 年才首次暴发此病, 但根据临床和血清学调查, 该病在我国普遍存在, 而且近年来还呈流行态势<sup>[3]</sup>。

PRRSV 属动脉炎病毒科, 系单股正链 RNA 病毒, 基因组大小为 15kb, 包括 8 个开放阅读框架, 可编码 6 种结构蛋白和 2 种非结构蛋白, 其中 ORF5 编码病毒的糖基化囊膜蛋白 (又称 E 蛋白和 GP5), 是主要的结构蛋白, 也是一种多功能蛋白, 参与细胞免疫与体液免疫<sup>[4,5]</sup>, 是发展新型疫苗和诊断试剂的良好目标基因。最近, 又有研究表明由 ORF6 编码的非糖基化的基质蛋白 (M 蛋白) 也存在中和表位, 而且在不同 PRRSV 分离株中高度保守<sup>[6,7]</sup>。此外, 在 PRRSV 感染的培养物中 GP5 和 M 蛋白通过分子间的二硫键连接形成异源二聚体, 并包装入病毒粒子中<sup>[8]</sup>, 提示这两种蛋白在 PRRSV 的免疫应答中可能具有重要作用。

目前, 在我国对于 PRRS 的诊断主要通过表达 PRRSV 保守蛋白 N 蛋白所建立的 ELISA 血清学方法来检测<sup>[9]</sup>。虽然该血清学诊断方法已成功地应用于 PRRSV 抗体的检测, 但是该方法并不能反映临床猪群的免疫保护水平。尽管 PRRSV 的 GP5 和 M 蛋白已以不同的形式获得了表达<sup>[10,11]</sup>, 但在这两种蛋白表达基础上还尚未建立有效的 PRRS 血清学诊断方法。基于 GP5 和 M 蛋白的作用与功能, 本研究在大肠杆菌中表达了 GP5-M 融合蛋白, 以纯化的融合蛋白作为诊断抗原, 建立了一种检测 PRRS 抗体的 ELISA 方法, 并与国外试剂盒 IDEXX-ELISA 进行了比较, 同时还探讨了感染猪血清中抗融合蛋白 GP5-M 抗体水平 ( $OD_{630nm}$ ) 与中和抗体水平之间的相关

性。

## 1 材料与方法

### 1.1 毒株、质粒与细胞

PRRSV YA 株系本实验室从发病猪中分离的高致病力野毒株, 由本实验室保存。含 PRRSV YA 株 ORF5 基因和 ORF6 基因完整编码区的质粒 pMT-ORF5 和 pMT-ORF6 由本实验室方六荣博士构建并提供<sup>[12]</sup>。Marc-145 细胞由德国巴伐利亚州动物疾病诊断中心 Czerny 博士赠送。GST 融合表达载体 pGEX-KG, 由华中农业大学生命科学院张忠明教授惠赠。T-载体 pMD-18T 购自大连宝生物。大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、BL21 (DE3) 均由本实验室保存。

### 1.2 工具酶与试剂

各种限制酶、T4 DNA 连接酶均为大连宝生物工程公司产品。DNA 快速回收试剂盒购自上海生工生物工程股份有限公司。HRP 标记的羊抗猪 IgG 为 SBA 公司产品。

### 1.3 引物设计与 PCR 扩增

根据 PRRSV YA 株的 ORF5、ORF6 基因的序列设计 2 对引物 P53、P54 和 P64、P65。P53 和 P54 可扩增截去信号肽的 ORF5 基因, 并且在其下游没有终止密码子; P64 和 P65 可扩增完整的 ORF6 基因。为了便于连接并保证 ORF5-ORF6 两基因的读码框吻合, 引物 P53、P54 两端分别设计了 *Eco*R I 和 *Xho* I, 引物 P64、P65 两端分别设计了 *Xho* I 和 *Hind* III。上述引物均由上海生工生物工程股份有限公司合成, 引物序列为:

P53: 5'-GAAGAATTCCTGTGCTCGTCAACGCC-3'

P54: 5'-TTTCTCGAGACGACCCCATTTGTTCCGC-3'

P64: 5'-TTTCTCGAGATGGGGTCGTCTCTAG-3'

P65: 5'-GCCAAGCTTTTATTTGGCATATTTG-3'

ORF5 基因的扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 5min 变性后进入循环, 循环参数为 95 $^{\circ}$ C 1min, 56 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min, 35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

ORF6 基因的扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 5min 变性后进入循环, 循环参数为 95 $^{\circ}$ C 1min, 58 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min, 35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

#### 1.4 原核表达质粒的构建

ORF5 和 ORF6 基因的扩增产物纯化后分别克隆到 pMD-18T 中,获得重组质粒 pMD-ORF5 和 pMD-ORF6。pMD-ORF5 经 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切,回收 0.54kb 的目的片段;pMD-ORF6 经 *Xho* I 和 *Hind* III 酶切,回收 0.5kb 的目的片段;两个目的片段同时与经 *EcoR* I 和 *Hind* III 消化后的 pGEX-KG 连接,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,碱裂解法少量制备质粒,重组质粒经酶切及 PCR 扩增鉴定,筛选到的阳性克隆命名为 pKG-56,并对其中插入的外源 DNA 进行测序,以证实其读码框是否正确。

#### 1.5 融合蛋白在大肠杆菌中的表达

将重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,在转化的平皿中挑取单菌落于 37℃ 振荡培养约 10~12h,至  $OD_{600nm}$  达到 1.0 时,放入 4℃ 冰箱过夜。次日,将培养物 5000r/min 离心 5min,然后用新鲜 LB 培养基洗涤 1 次,沉淀用 3mL LB 悬浮,以 1:100 的稀释度接种于含相应抗生素的新鲜 LB 液体培养基中,于 37℃ 振荡培养约 3h,至  $OD_{600nm}$  达到 0.6 时,加入不同终浓度的 IPTG,继续培养 3h,其间每隔 1h(在第 0、1、2、3h)取 1mL 菌液至 EP 管中。将收集于 EP 管中的细菌沉淀用 12% 的 SDS-PAGE 检测重组蛋白的表达,并通过凝胶薄层扫描分析所表达外源蛋白含量。原始空白载体经诱导表达后作为阴性对照。

#### 1.6 融合蛋白的纯化及免疫学活性检测

取诱导表达的细菌培养物超声波破碎(冰上操作)后的上清和沉淀,进行 SDS-PAGE 分析。包涵体用含 0.6% N-月桂酰胺肌钠盐(SKL)缓冲液进行缓慢溶解后,静置 1~2h,加入 0.2% PEG 4000、1.0mmol/L 氧化型谷胱甘肽及还原型谷胱甘肽,复性获得正确折叠的目的蛋白。对空白载体、重组菌体诱导后的裂解物,以及复性后获得的融合蛋白进行 Western-blot 分析,检测融合蛋白免疫学活性。

#### 1.7 融合蛋白 P56-ELISA 方法的建立

将按上述方法纯化的目的蛋白作为抗原按 10 倍倍比稀释包被酶标板,同时与 10 倍倍比稀释的标准阳性血清(PRRSV 高免血清)和阴性血清(进口 PRRSV 检测试剂盒(IDEXX-ELISA)检测为阴性)进行方阵滴定,于 37℃ 作用 30min 后,加入辣根过氧化物酶标记的抗猪二抗,反应 30min,利用四甲基联苯二胺(TMB)进行显色后,于波长 630nm 测定 OD 值,确定最佳抗原包被浓度和血清最佳稀释倍数。利用来自 PRRSV 阴性猪场的并进口 PRRSV 检测试剂盒(IDEXX-ELISA)检测为阴性的 57 份阴性血清确定

阴阳性判定的临界值。同时,对 205 份临床血清样品采用建立的 ELISA 方法与 IDEXX-ELISA 检测试剂盒进行比较。

#### 1.8 微量中和试验

将被检血清样品于 56℃ 灭活 30min 后,在 96 孔细胞培养板中将血清作连续 2 倍的倍比稀释,从 1:2 至 1:256,每孔 50.0 $\mu$ L;病毒液为 100TCID<sub>50</sub> PRRSV,于 37℃,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中作用 1h,再于每孔中滴加 2  $\times$  10<sup>5</sup> 个/mL 的 Marc-145 细胞悬液 100.0 $\mu$ L,继续培养 5d,观察细胞病变情况并记录中和效价,中和效价为能够完全保护细胞不发生病变的最高稀释倍数。利用直线回归相关性分析检验所检测血清样品中和抗体效价与 P56-ELISA 抗体滴度( $OD_{630nm}$ )之间的相关性。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组质粒 pKG-56 的构建及鉴定

以 P53、P54 和 P64、P65 为引物分别扩增截去信号肽序列 ORF5 基因和全长 ORF6 基因,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳与预期大小相当(图略)。进一步将 PCR 扩增产物克隆到 pMD-18T 中,序列分析证实无碱基误配。利用引入的酶切位点将截短的 ORF5 与 ORF6 基因同时插入 pGEX-KG 中,获得 GST-GP5-M 融合表达质粒 pKG-56,重组质粒 pKG-56 经酶切和 PCR 鉴定证实构建正确(图 1)。

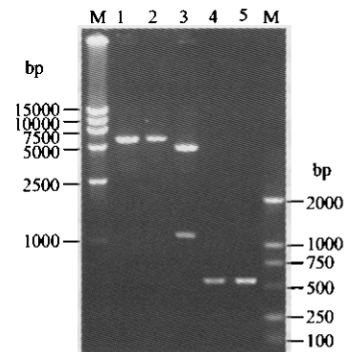


图 1 重组质粒 pKG-56 的鉴定

Fig.1 Identification of the recombinant plasmid

pKG-56 by restriction analysis and PCR

M: DNA marker; 1: pKG-56/*EcoR* I; 2: pKG-56/*Hind* III; 3: pKG-56/*EcoR* I + *Hind* III; 4: PCR product of the plasmid pKG-56 ORF6 gene; 5: PCR product of the plasmid pKG-56 ORF5 gene.

### 2.2 GST-GP5-M 融合蛋白在大肠杆菌中的表达

将鉴定正确的重组表达质粒 pKG-56 和空白载体质粒 pGEX-KG 分别转化大肠杆菌 BL21(DE3),在 IPTG 诱导下,菌体裂解物经 SDS-PAGE,考马斯亮兰

染色后, pKG-56 在分子量约 60kD 处有特异性蛋白条带, 与融合蛋白 (GST-GP5-M) 预期大小基本一致 (图 2), 空白载体的菌体裂解物中在此处无特异性表达带, 而是在 28kD 处出现特异性条带, 正好与 GST 的分子量相当。经凝胶薄层扫描分析显示融合蛋白用不同浓度 IPTG (0.4、0.6、0.8、1.0mmol/L) 诱导及诱导不同时间, 表达量没有明显差异, 占细菌总蛋白量的 14.35%, 但是通过包涵体的提取与纯化后, 目的蛋白所占百分比可以提升到 91.6%, 说明该目的蛋白纯度较高, 可以满足作为 ELISA 抗原包被的条件。

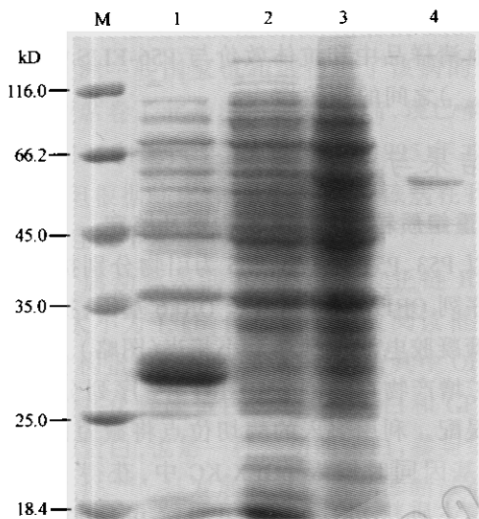


图 2 重组质粒 pKG-56 在大肠杆菌中的表达

Fig.2 Expression of the recombinant plasmid pKG-56 in BL21 (DE3)

M: protein marker; 1: control empty vector pGEX-KG; 2: uninduced product of pKG-56; 3: induced product of pKG-56; 4: the purified fusion protein of pKG-56.

将 pKG-56 诱导 3h 后的菌体、提取的包涵体及空白载体菌体经 SDS-PAGE 后, 转印到硝酸纤维素膜上, 进行 Western-blot 分析。一抗为经多次免疫后提纯的猪抗 PRRSV 高免血清。结果 pKG-56 诱导 3h 后的菌体与提取的包涵体均在约 60kD 处出现特异性带 (图 3), 而空白载体未出现特异性条带, 证实表达的融合蛋白具有较好的反应原性。

### 2.3 融合蛋白 P56-ELISA 方法的建立

纯化的融合蛋白倍比稀释包被酶标板, 经方滴定确定最佳包被浓度为 0.75 $\mu$ g/mL, 血清最佳稀释度为 1:40, 此时阴阳血清的 OD 值相差最大。通过对 57 份 PRRSV 阴性血清进行检测, 求得  $OD_{630nm}$  平均值 (Average)  $X = 0.151$ ; 标准差 (Standard Difference)  $SD = 0.066$ ; 确定阴阳性临界值为  $X + 3SD =$

0.35。即待测样品的  $OD_{630nm}$  值大于 0.35 则为阳性, 小于或等于 0.35 则为阴性。

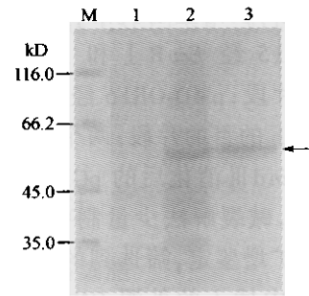


图 3 重组菌体裂解物的 Western-blot 分析

Fig.3 The Western-blot analysis of the expression product of pKG-56

M: protein marker; 1: control empty vector pGEX-KG; 2: induced product of pKG-56; 3: the purified fusion protein of pKG-56.

利用所建立的 P56-ELISA 与进口的 PRRS 检测试剂盒 IDEXX-ELISA 对 205 份临床送检血清进行平行检测, 结果见表 1。从表中可以看出, 阳性符合率为 92.9%, 阴性符合率为 96.1%, 总符合率达到 94.1%, 表明所建立的 P56-ELISA 具有较高的特异性和敏感性。

表 1 P56-ELISA 与 IDEXX-ELISA 检测试剂盒检测结果统计

Table 1 The statistical results of the detection kit P56-ELISA and IDEXX-ELISA

|          | P56-ELISA   | IDEXX-ELISA | Coincident ratio |
|----------|-------------|-------------|------------------|
| Positive | 125 (119 *) | 128         | 92.9% (119/128)  |
| Negative | 80 (74 *)   | 77          | 96.1% (74/77)    |
| Total    | 205 (193 *) | 205         | 94.1% (193/205)  |

\*: The identical number of the detection results between P56-ELISA and IDEXX-ELISA kit.

### 2.4 中和抗体水平与抗 GP5-M 融合蛋白抗体滴度之间的相关性

因为 GP5 和 M 蛋白均存在 PRRSV 的中和表位, 为了探讨针对 GP5-M 融合蛋白的 ELISA 抗体是否与中和抗体存在相关性, 进一步检测了 205 份临床送检血清的中和抗体, 并与 ELISA 抗体进行了比较, 发现 205 份血清的中和抗体水平表现不一, 从阴性到最高中和效价 1:64 均有随机分布。利用回归函数分析中和抗体效价与抗 GST-GP5-M 融合蛋白抗体水平 ( $OD_{630nm}$ ) 之间并不存在相关性。两种检测方法所表现出的敏感性和特异性都不相同, 但中和抗体检测为阳性的 ( $\geq 1:4$ ), P56-ELISA 检测一定也为阳性 (AB 区域), 中和抗体检测为阴性的, P56-

ELISA 检测不一定为阴性(BCD 区域)。但是, P56-ELISA 检测为阴性的, 其中和抗体全部为阴性(ABC 区域)。

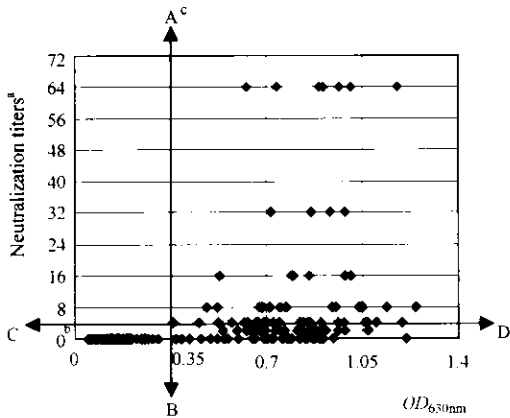


图4 P56-ELISA 检测结果与中和试验结果的比较

Fig.4 The data compared the results of P56-ELISA with seroneutralization test

a: seroneutralization titers, the antibody highest dilution providing complete protection of Marc-145 cell monolayers against 200 TCIDSO PRRSV tissue culture infective. 0<sup>0</sup>: neutralization titers less than 1:2 or negative; c: A, B is the cutoff point calculated with the following formula: [average OD<sub>630nm</sub>] + 3 × [standard difference]; C, D is the cutoff point of seroneutralization test positive/negative.

### 3 讨论

ORF5 基因编码的 GP5 蛋白是 PRRSV 最重要的免疫原性蛋白, 参与中和抗体的产生, 并且在 PRRSV 感染后康复猪血清中的中和抗体主要针对 GP5<sup>[13]</sup>, 因此 GP5 是作为新型基因工程疫苗和诊断试剂的良好的靶蛋白。Govin 等(1999)曾利用大肠杆菌表达的 GST-GP5 融合蛋白建立了 PRRSV 的 GP5-ELISA 检测方法, 并证实具有较好的特异性和敏感性<sup>[14]</sup>。但大量的研究数据表明不同分离株的 ORF5 基因变异较大, 并可能存在抗原漂移<sup>[15]</sup>, 提示用单独的 GP5 作为诊断抗原会出现假阴性的可能。ORF6 基因编码的 M 蛋白为非糖基化的基质蛋白, 是在美洲株中以及美洲株与欧洲型间最为保守的一种蛋白<sup>[16]</sup>, 而且最近的研究还发现 M 蛋白中也存在中和表位<sup>[7]</sup>。考虑到 GP5 和 M 蛋白都具有作为诊断的潜在价值, 本研究在大肠杆菌中高效表达了 GP5-M 融合蛋白, 并利用纯化的蛋白作为抗原, 建立了 P56-ELISA 诊断方法, 通过对 205 份临床送检血清检测证实具有很好的特异性和敏感性, 与国外进口试剂盒 IDEXX-ELISA 的符合率为 94.1%, 表明利用 GP5/M 融合蛋白作为诊断抗原是可行的。同时,

本研究建立的 P56-ELISA 所采用的抗原是体外表达的重组蛋白, 不仅较采用纯化的病毒粒子建立的国外进口试剂盒 IDEXX-ELISA 具有更好的安全性, 而且能降低生产成本, 因此, 对其进一步的完善将有望应用于生产实践。

尽管目前对 PRRSV 感染后免疫反应的研究还不够深入, 但大量的研究表明中和抗体在免疫保护中具有十分重要的作用, 因此, 对免疫后所产生的中和抗体水平检测是评价机体免疫状况的重要指标。因为 GP5 和 M 蛋白都参与中和抗体的产生, 本研究进一步探讨了 P56-ELISA 抗体水平与中和抗体的相关性。通过对 205 份临床送检血清的中和抗体与 P56-ELISA 抗体的检测, 利用直线回归函数分析发现中和抗体水平与其抗 GP5-M 融合蛋白抗体水平 (OD<sub>630nm</sub>) 之间的相关性较低, 但同时也发现中和抗体检测为阳性的 (≥ 1:4), P56-ELISA 检测一定也为阳性。分析其原因之一可能是 PRRSV 诱发机体产生中和抗体缓慢<sup>[17]</sup>。猪群虽然已经感染 PRRSV (P56-ELISA 检测为阳性), 由于中和抗体产生较晚和中和实验 (SNT) 检测不敏感的原因, 导致部分中和抗体表现阴性或较低。另外, 最近 Oleksiewicz 等<sup>[18]</sup> 通过研究发现在 GP5 的胞外区同时存在两个抗原表位, 一个是非中和表位, 另一个是中和表位, 病毒感染或免疫后非中和表位首先被识别, 并且由于非中和表位的反应原性很强, 所产生的针对非中和表位的抗体对中和表位的识别产生一种覆盖效应, 使中和抗体的产生很慢并且抗体水平很低。类似的现象在 HIV 感染中也存在<sup>[19]</sup>, HIV 的 gp120 中也同时存在非中和表位和中和表位, 非中和表位也进化成对中和表位具有覆盖效应的覆盖表位, 导致在 HIV 感染数月后才能检测到中和抗体, 而在此之前就可检测到针对 gp120 的 ELISA 抗体。本研究所建立的 P56-ELISA 与中和抗体间的相关性不高也可能与 GP5 蛋白中非中和表位的覆盖效应有关。利用消除 GP5 中覆盖性的非中和表位的重组蛋白而建立的 ELISA 是否确与中和抗体水平存在较高的相关性是值得探讨的课题, 但这种修饰后又是是否会降低 ELISA 的敏感性呢? 目前本实验室正在开展这方面的研究。此外, 本研究所建立的 P56-ELISA 是利用表达 ORF5-ORF6 串联基因的融合蛋白作为抗原, 这两个基因的串联表达是否会影响折叠, 从而影响分析 ELISA 和中和抗体之间的关系呢? 这也是值得探讨的问题。

总之, 本研究首次利用 PRRSV 的两种主要结构

蛋白进行串联表达,建立了 PRRS P56-ELISA 血清学诊断方法,同时也发现在临床感染猪群中的中和抗体水平与其抗 GP5-M 融合蛋白抗体水平之间并不存在相关性,为今后研制更特异、敏感的诊断方法提供了新的思路和研究基础。

## REFERENCES(参考文献)

- [1] Menlenberg JJM, Hulst M, De Meifer EJ *et al.* Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEDRS), is related to LDV and EAV. *Virology*, 1993, **192**: 62 - 72
- [2] Goyal SM. Porcine reproductive and respiratory syndrome. *J Vet Diagn Invest*, 1993, **5**: 656 - 664
- [3] Albina E. Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an overview. *Vet Microbiol*, 1997, **55**: 309 - 316
- [4] Cavanagh O. Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch Virol*, 1997, **142**: 629 - 633
- [5] Lopez F, Domenech LN, Alvarez B. Analysis of cellular immune response in pigs recovered from porcine reproductive and respiratory syndrome infection. *Virus Res*, 1999, **64**: 33 - 42
- [6] Murtaugh MP, Elan MR, Kakach LT. Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and lelystad virus strains of the PRRS virus. *Arch Virol*, 1995, **140**: 1451 - 1460
- [7] Yang L, Frey ML, Yoon KJ *et al.* Categorization of north American porcine reproductive and respiratory syndrome virus: Epitopic profiles of the N, M, GP5, and GP3 proteins and susceptibility to neutralization. *Arch Virol*, 2000, **145**: 1599 - 1619
- [8] Mardassi H, Massie B, Dea S. Intracellular synthesis, processing and transport of proteins encoded by ORFs5 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology*, 1996, **221**: 98 - 112
- [9] Liu PH (刘平黄), Yang HC (杨汉春), Gao Y (高云) *et al.* An indirect ELISA based on recombinant nucleoprotein for detection of antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Chinese Journal of Veterinary Medicine (中国兽医杂志)*, 2003, **39**: 10 - 13
- [10] Gu H (谷红), Yang HC (杨汉春), Guo X (郭鑫) *et al.* Prokaryotic expression of ORF5 gene of PRRS virus BJ-24 and purification of recombinant protein. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica (畜牧兽医学报)*, 2004, **35**: 64 - 69
- [11] Chen S (陈声), Yang HC (杨汉春), Huang FF (黄芳芳) *et al.* The expression of the M protein of PRRS virus in *E. coli*. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology (中国兽医科技)*, 2001, **31**: 6 - 8
- [12] Fang LR (方六荣). Study on suicidal DNA vaccine and virus vector vaccine of porcine reproductive and respiratory syndrome. [Doctoral thesis], Huazhong Agriculture University (华中农业大学), 2003
- [13] Weiland EM, Wiezorek-krohmer M, Kohl D. Monoclonal antibodies to the GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus are more effective in virus neutralization than monoclonal antibodies to the GP4. *Vet Microbiol*, 1999, **66**: 171 - 185
- [14] Govin P, Pirzadeh B, Gagnon CA *et al.* Seroneutralization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus correlates with antibody response to the GP5 major envelope glycoprotein. *J Vet Diagn Invest*, 1999, **11**: 20 - 26
- [15] Takuya I, Masumi T, Takashi N *et al.* Analysis of open reading frame 5 in Japanese porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates by restriction fragment length polymorphism. *Virology*, 2001, **11**: 1203 - 1207
- [16] Kreuz LC, Mengeling WL. Baculovirus expression and immunological detection of the major structural protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol*, 1997, **59**: 1 - 13
- [17] Albina E, Pirion L, Hutet E. Immune responses in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet Immuno and Immunopathology*, 1998, **61**: 49 - 66
- [18] Oleksiewicz MB, Botner A, Toft P. Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain. *J Virol*, 2002, **76**: 4241 - 4250
- [19] Garrity RR, Rimmelzwaan G, Minassian A *et al.* Refocusing neutralizing antibody response by targeted dampening of an immunodominant epitope. *J Immunol*, 1997, **159**: 279 - 289