

高致病性 PRRSV TJ 株 Nsp2 蛋白的缺失及其二级结构预测

王凤雪, 冷雪, 李真光, 温永俊, 刘准, 武华*

(中国农业科学院特产研究所 人兽共患病研究室, 吉林 吉林市 132109)

摘要: 根据 GenBank 上发表的猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV) TJ 株 F₃ 代全基因序列(GenBank 登录号为 EU860248), 结合多个 PRRSV 亚洲株 *Nsp2* 基因比对结果, 设计合成引物, 选择高致病性 PRRSV TJ 株噬斑克隆纯化前后 14 个不同代次, 利用合成的引物扩增各代次 *Nsp2* 基因的高变区片段及 F₃ 代和 F₉₂ 代 *Nsp2* 全基因, 并进行产物克隆和氨基酸序列分析及结构预测。测序结果表明: PRRSV TJ 株在克隆传代过程中出现了序列整段缺失, 共缺失 120 个氨基酸, 并且从 F₁₈ 代噬斑克隆开始一直稳定存在。缺失高变区及 *Nsp2* 蛋白二级结构预测结果表明: 缺失的氨基酸使 *Nsp2* 蛋白在空间结构上发生了较大的变化, 推测这可能与 PRRSV TJM-F92 的毒力和致病力减弱有关。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合征病毒; 非结构蛋白 2; 蛋白缺失; 蛋白二级结构

中图分类号: S852.65 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)04-0429-07

Deletion of Nsp2 protein in highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus TJ strain and its secondary structure prediction

WANG Feng-xue, LENG Xue, LI Zhen-guang, WEN Yong-jun, LIU Zhun, WU Hua*

(Institute of Special Wild Economic Animal and Plant Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Jilin, Jilin 132109, China)

Abstract: Two pairs of primers were designed according to the *Nsp2* gene sequences of PRRSV TJ strain (EU860248). The hypervariable fragment of 1 004 bp of *Nsp2* was amplified by RT-PCR with primer pair ns-U and ns-L from TJ strain passaged on Marc-145. PCR products were cloned to pMD18-T, and sequenced. Comparison among the hypervariable region showed that a 360 bp (encoding 120 amino acids) deletion in *Nsp2* of PRRSV TJ strain was appeared in passage 18 and the deletion existed through passage 122. Full length *Nsp2* gene was amplified with primer pair Nsp2-U and Nsp2-L from the 3rd generation (F₃) virus and the 92nd generation (TJM-F92) virus which is virulence attenuated to analyze the second structure of *Nsp2* protein, the results showed the deletion of 120 amino acids caused space structure changes and it was speculated the deletion was related to the attenuated virulence and pathogenicity of PRRSV TJM-F92.

Key words: porcine reproductive and respiratory syndrome virus(PRRSV); Nsp2; deletion of protein; second structure of protein

猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)作为致病因子, 被划分为套式病毒目动脉炎病毒科动脉炎病毒属, 其基因组全长约 15.5 kb, 存在高度的变异性^[1-3]。

5'端 ORF1 占基因组的 75%, 包括 ORF1a 和 ORF1b; 3'端 6 个 ORF 编码 6 种结构蛋白。PRRSV ORF1 编码非结构蛋白 Nsp1~Nsp12^[4-5], 其中 *Nsp2* 被认为是 PRRSV 的高变区之一。据报道^[6-7], 中国大陆

收稿日期: 2011-03-27

基金项目: 国家“十一·五”科技支撑计划项目(2009BADB4B02)

作者简介: 王凤雪(1978—), 女, 山东潍坊人, 博士研究生, 助理研究员, 主要从事动物病毒分子生物学研究, wangfx_vet@163.com;

*通信作者, wuhua@bvbio.com

PRRS 首次爆发时,国内猪群感染率达 90%。PRRSV 感染商品活疫苗免疫猪的死亡率增高,特别是怀孕母猪的流产发生率和死亡率增高的原因可能是组织嗜性的改变。2006 年爆发的猪高热病综合征 (PHFS)短时间内遍及全国,造成约 300 万头猪的损失,后来被证明这是由 PRRSV 高致病性病原引起,并且这些新发生的高致病性 PRRSV 具有 *Nsp2* 基因 30 aa 不连续缺失的特点^[8-9]。

将中国农业科学院特产研究所人兽共患病研究室(下称“本研究室”)在发病猪体内分离的 PRRSV 高致病性强毒 TJ 株通过噬斑筛选后,在 Marc-145 细胞上传代至 92 代,获得了致弱的疫苗毒 TJM-F92。鉴于 *Nsp2* 多变性的特点,笔者对 PRRSV TJ 株多个代次毒的 *Nsp2* 高变区段进行序列测定,分析其序列变化特点,并对其结构进行预测,旨在为 PRRSV 致病机制的研究提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 毒株和细胞

猪繁殖与呼吸综合征病毒 PRRSV 强毒 TJ 株由本研究室分离、鉴定、保存;致弱毒 TJM-F92 为 TJ 株在 Marc-145 细胞上克隆纯化并传代 92 代获得。Marc-145 细胞由本研究室保存。

1.2 载体、菌株及试剂

pMD18-T 载体、AMV 反转录酶、RNA 酶抑制剂、dNTP、Oligod(T)、*ExTaq* 酶、限制性内切酶和质粒抽提试剂盒购于宝生物工程(大连)有限公司。总 RNA 抽提试剂 Trizol 为美国 Invitrogen 公司产品。大肠杆菌感受态 DH5 α 菌株为本研究室保存。其他化学试剂均为国产,分析纯。

1.3 引物的设计与合成

根据 GenBank 上发表的 TJ 株全基因序列 (GenBank 登录号为 EU860248),利用 Primer Premier5.0 软件,设计 *Nsp2* 高变区(ns)扩增引物 (ns-U : 5'-GCGTCCTCACAGACGGAATA-3' ; ns-L : 5'-CGCCGAGAAGACCCAGA-3' ;产物长度为 1 004 bp)和 *Nsp2* 全基因扩增引物(*Nsp2*-U : 5'-CAGGGT TGAGCCCAATACG-3' ; *Nsp2*-L : 5'-GCAAGGC AGCAATGAGGTG-3', 产物理论长度为 2 850 bp)共 2 对特异性引物。引物由上海英骏生

物技术有限公司合成。

1.4 病毒 RNA 制备

在 Marc-145 细胞单层上培养 PRRSV TJ 株,选取有代表性的多个代次病毒,收毒冻融 3 次后,按照美国 Invitrogen 公司的 Trizol 试剂说明书提取病毒总 RNA,分装,于 -70 °C 保存备用。

1.5 RT-PCR 反应

1.5.1 反转录 (RT)

反转录体系 20 μ L,引物 Oligo dT 1 μ L, RNA 5 μ L, 70 °C 加热 10 min,冰浴 10 min;再加入 5 倍 AMV Buffer 4 μ L, 10 mmol/L dNTP 2 μ L, RNasin 0.5 μ L, AMV 反转录酶 1 μ L, DEPC H₂O 6.5 μ L,充分混合后离心,42 °C 温浴 60 min,95 °C 灭活 AMV 反转录酶,立即于冰上冷却,进行 PCR。

1.5.2 PCR 反应

反转录产物 5 μ L,10 倍 PCR Buffer 5 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 4 μ L,上、下游引物各 1 μ L, *ExTaq* DNA Polymerase 0.5 μ L,加水补至 50 μ L。优化 PCR 循环参数,确定 PCR 最佳反应程序为:95 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,55.9 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,35 个循环,72 °C 延伸 10 min。取 5 μ L PCR 产物,进行 1%琼脂糖凝胶电泳检测,观察产物扩增效果和片段大小。

1.6 RT-PCR 产物的克隆

RT-PCR 产物经琼脂糖凝胶回收、纯化后,按照 pMD18-T 载体操作手册进行连接,转化 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞,挑取白色菌落进行增菌培养,小剂量提取质粒。

1.7 酶切鉴定

取重组质粒,用限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Hind*III 进行单酶切和双酶切,于 1%琼脂糖凝胶中电泳,进行阳性克隆的筛选。

1.8 序列测定及分析

将连接 T 载体的阳性质粒送交上海英骏生物技术有限公司测序,将测得的序列用 Lasergene 生物软件对其序列进行编辑、拼接,并将不同代次的 PRRSV TJ 株 *Nsp2* 高变区氨基酸序列进行比较分

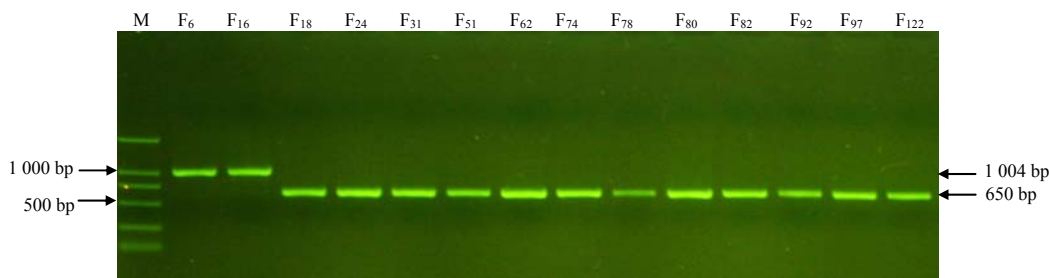
析。用 Predictprotein, DNASTar 和 Sopma 分析软件对 PRRSV TJ 株 F₃ 代和 TJM-F92 的 Nsp2 蛋白二级结构进行分析。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 扩增结果

以 PRRSV TJ 株 RNA 反转录产物为模板, 以

ns-U/ ns-L 为引物, RT-PCR 扩增 PRRSV TJ 株克隆传代前、后共 14 个代次的病毒液, 均获得了清晰、单一的条带(图 1)。图 1 中, PRRSV TJ 株 F₆ 和 F₁₆ 的 ns 大小为 1 004 bp; F₁₈~F₁₂₂ 的 ns 大小约为 650 bp, 即条带的理论大小约为 1 004 bp, 但从 F₁₈ 代开始扩增到条带的大小为 650 bp 左右。



M DL2 000 DNA 相对分子质量标准; 电泳条带为各代次病毒扩增得到的 ns 片段。

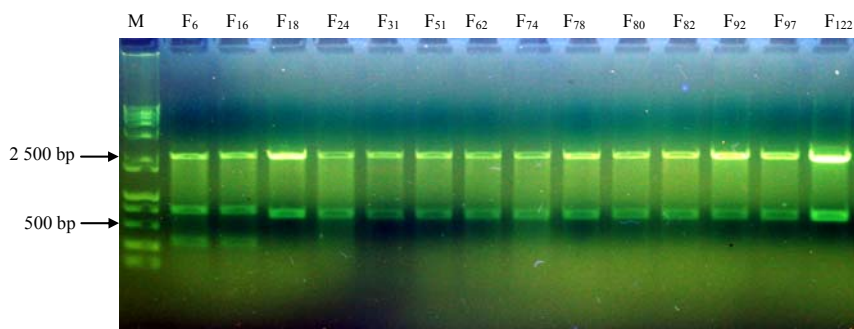
图 1 不同代次 PRRSV TJ 株 *Nsp2* 高变区 RT-PCR 扩增产物的电泳图谱

Fig.1 Amplified products of variable region of *Nsp2* from PRRSV TJ strain

2.2 RT-PCR 产物的克隆及鉴定

将 RT-PCR 产物回收、纯化后克隆到 pMD18-T 载体中。理论上, ns 片段的 T 克隆质粒经 *Bam*HI 和 *Hind* 双酶切后应得到 2700、700、300 bp 3 个片段。实际上, 用 *Bam*HI 和 *Hind*III 处理质粒后,

F₆ 和 F₁₆ 的 ns 克隆得到了 2 700、700、300 bp 3 个片段, 但 F₁₈ 以后的 ns 克隆均被切为 2 个片段, 只得到约 2 700 bp 和 650 bp 的条带, 其酶切鉴定结果见图 2。



M DL15 000+2 000 DNA 相对分子质量标准; 电泳条带为各代次 ns 片段的 T 克隆质粒被限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Hind* 处理的结果。

图 2 克隆质粒酶切片段的电泳图谱

Fig.2 Verification of plasmid of cloned PRRSV *Nsp2* by RFLP

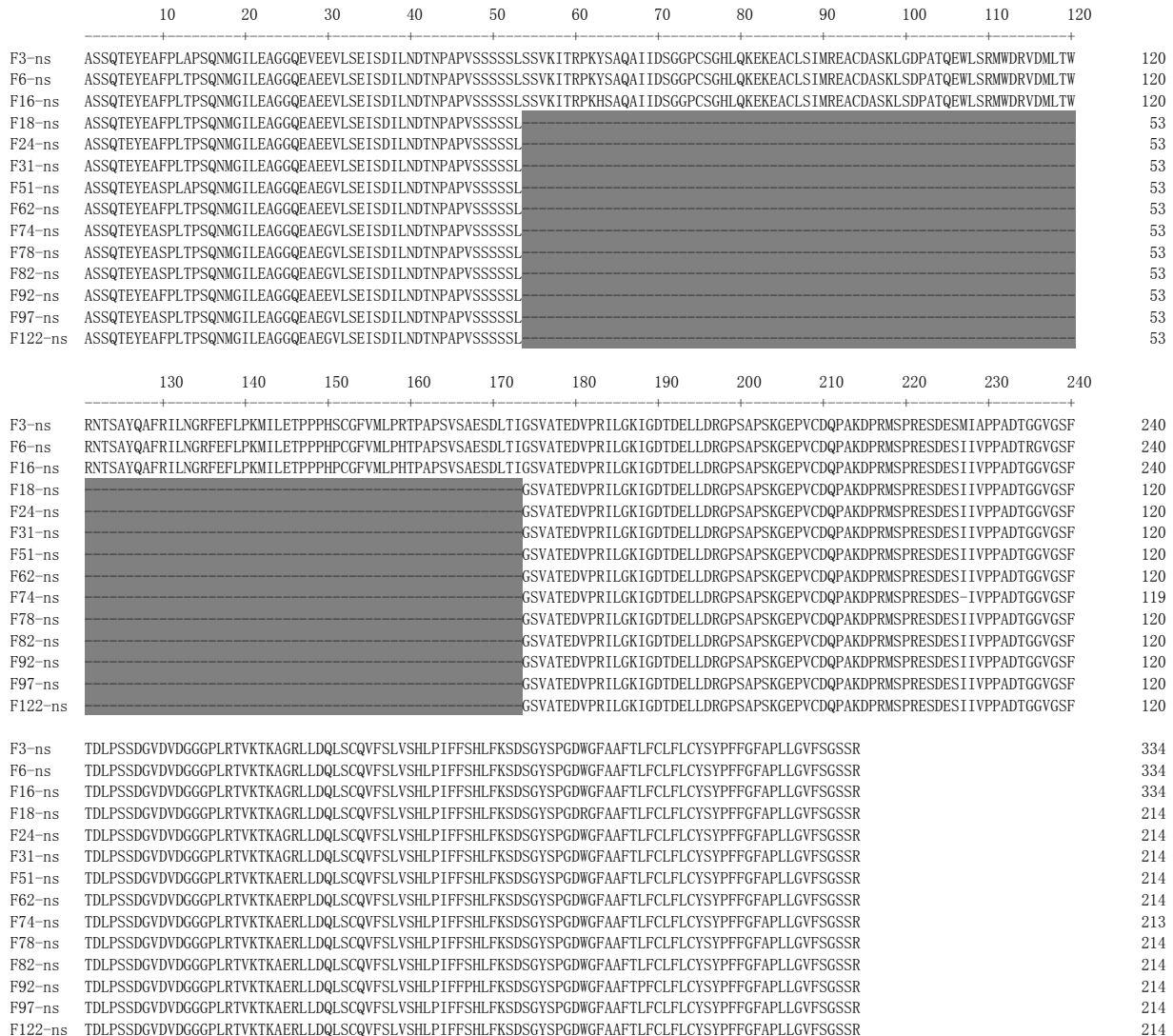
2.3 重组质粒的测序及氨基酸比对

挑取被鉴定为阳性的重组质粒进行测序。应用 Lasergene 生物软件的 MegAlign, 对 ns 的测序结果与亲本毒 ns 序列进行比对, 结果表明, F₆ 和 F₁₆ 代 ns 片段长为 1 004 bp, 与亲本毒 TJ F₃ 代的相同, F₁₈ 代以后的病毒 ns 片段长 644 bp, 比理论值小 360

bp, 并且稳定存在; 在缺失的片段上有 1 个 *Hind* 酶切位点, 这与 T 克隆质粒酶切结果相对应。这说明 PRRSV TJ 株在 F₁₇ 代噬斑克隆后, *Nsp2* 编码区发生了缺失, 缺失段为位于 PRRSV TJ 株全基因组 3 130~3 489 nt 位的 360 个核苷酸, 对应 120 个氨基酸(图 3)。成功扩增到 PRRSV TJ 株 F₃ 代和 F₉₂ 代

毒的全长 *Nsp2* 基因, 测序准确, 与高变区引物测得序列缺失一样, 存在 120 aa 的缺失, 其他区域只

存在个别碱基的变化, 无移码突变等情况。



阴影部分为 PRRSV TJ 株 *Nsp2* 从 F₁₈ 代开始的 120 个氨基酸缺失区段。

图 3 PRRSV TJ 株不同代次 *Nsp2* 高变区 (ns) 氨基酸推导序列的比对结果

Fig.3 Amino acids comparison of *Nsp2* hypervariable region from different generation of TJ strain

2.4 缺失 120 aa 蛋白质的结构分析

蛋白质二级结构主要有 alpha 螺旋、beta 折叠、beta 片层和无规则卷曲。本研究结果表明: PRRSV TJM-F92 *Nsp2* 缺失的 120 aa 内无信号肽序列和潜在糖基化位点(蛋白序列分析结果); TJM-F92 *Nsp2* 缺失的 120 个氨基酸的结构中主要为 alpha 螺旋(53.33%)和无规则卷曲(41.67%), 还有一部分延伸带(在线软件 Predictprotein 的预测结果), 缺失氨基酸序列中亲水区或者抗原系数区较多(图 4), 并且结构中以 alpha 螺旋、无规则卷曲和部分 beta 折叠为主

(DNASar Protean 分析结果), 这与 Predictprotein 预测结果略有不同。

2.5 PRRSV TJ 株 F₃ 代和 TJM-F92 的 *Nsp2* 蛋白二级结构预测

在线软件 Sopma 预测 PRRSV TJ 株 F₃ 代和 TJM-F92 的 *Nsp2* 蛋白二级结构, 发现后者缺失了 3 个较大的 alpha 螺旋结构(图 5-a、b), 使 *Nsp2* 蛋白二级结构发生了较大变化(图 5-c、d)。

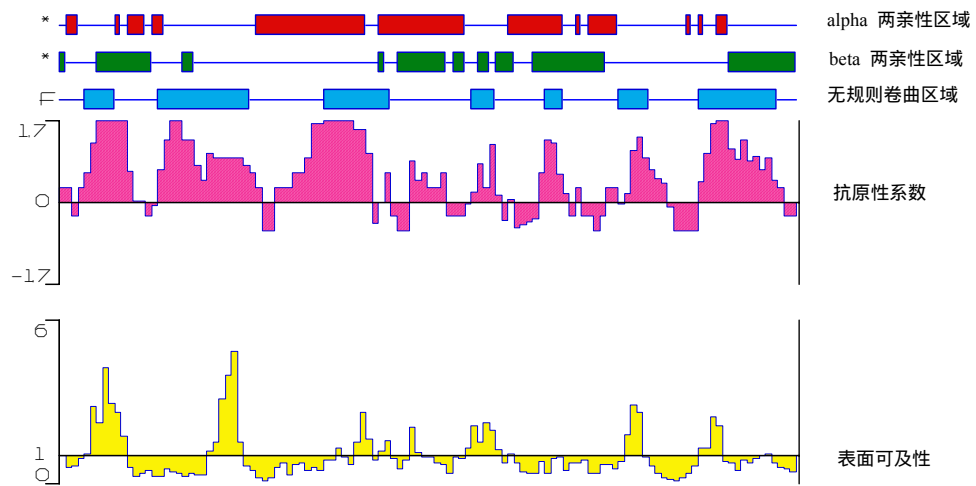


图 4 PRRSV TJ 株 *Nsp2* 蛋白缺失区 (120 aa) 序列结构的 Protean 预测
Fig.4 Structure prediction of the 120 aa deleted *Nsp2* protein of TJ strain by protean

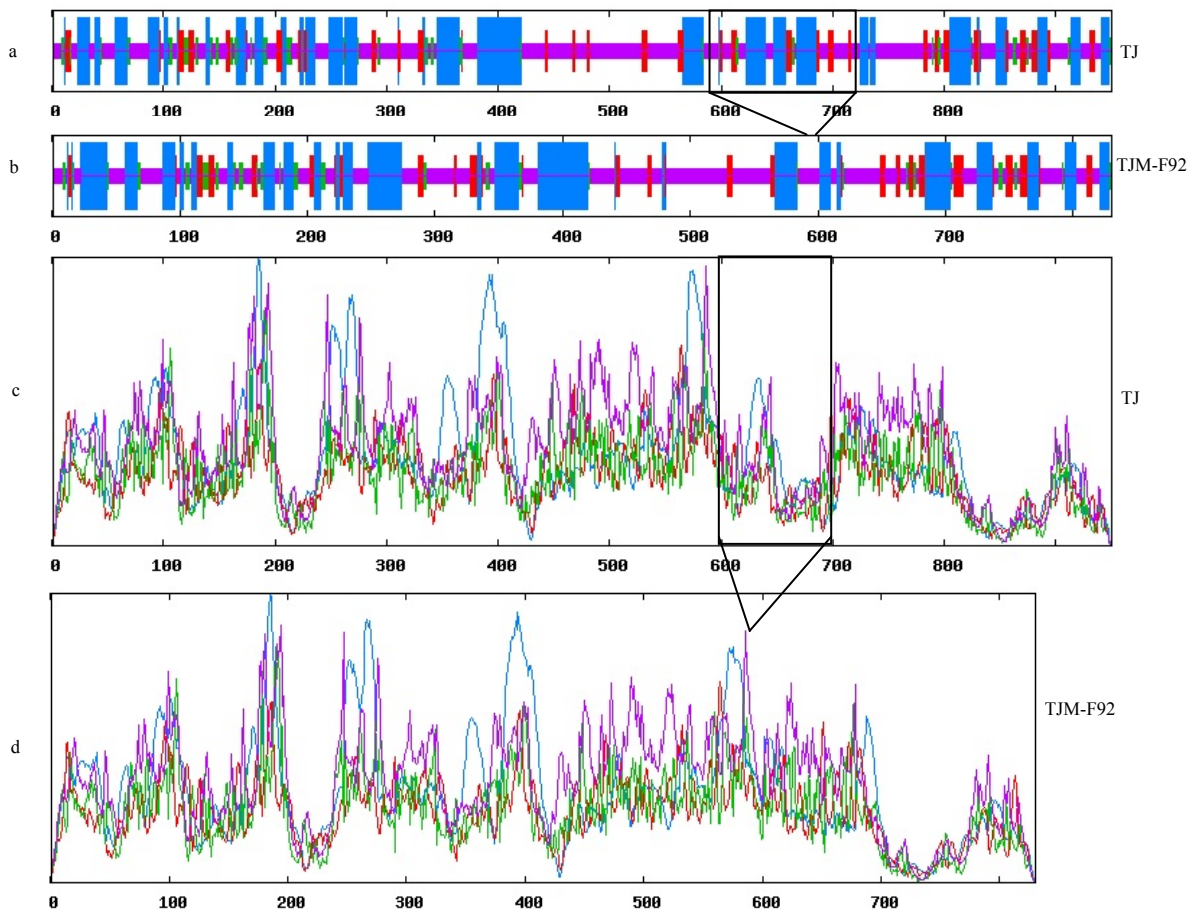


图 5 Sopma 软件对 PRRSV TJ 株和 TJM-F92 株 *Nsp2* 蛋白结构的预测
Fig.5 Structure prediction of *Nsp2* protein of TJ strain F₃ and F₉₂ with SOPMA

3 结论与讨论

对 PRRSV TJ 株系列代次的 *Nsp2* 高变区进行测序和分析, 得到如下结论:

1) 在 Marc-145 细胞上的克隆、纯化过程中, PRRSV TJ 株在 F_{18} 代发生缺失, 并稳定存在。该缺失为完整的 120 aa 片段, 具有 alpha 螺旋、无规则卷曲和部分 beta 折叠结构, 且序列中亲水区或者抗原系数区较多。

2) 软件 Sopma 预测 PRRSV TJ 株和 TJM-F92 的 *Nsp2* 蛋白结构, 发现后者缺失了 3 个较大的 alpha 螺旋结构, 导致二级结构发生变化。

Nsp2 基因中可见点突变、核苷酸插入或突变等多种基因变化, 这种情况存在于北美与欧洲基因型之间, 在同基因型之间也是如此。与欧洲株 LV 相比, 第 1 株测序的北美洲型 PRRSV 16244B 株, *Nsp2* 基因变异明显, 只有 32% 的氨基酸同源, 中间有 120 个氨基酸插入^[10]。PRRSV 疫苗株 SP *Nsp2* 的 C 端插入了 36 aa 和 155 aa, 这些序列与动脉炎病毒中同类蛋白均无同源性。APRRSV、PrimePac Nsp^[11]、EDRD-1 同样有 108 个碱基的插入, EDRD-1 还存在另外 117 个碱基的缺失^[12]。与标准毒株 VR-2332 比较, HB-2(sh)/2002 株 *Nsp2* 的 12 aa 缺失^[13]、MN184 株 *Nsp2* 的 111 aa、1 aa 和 19 aa 的不连续缺失^[14]都是同一基因型间的基因变化。与 LV 相比, 欧洲型 SD01-08 株和 EuroPRRSV 的 *Nsp2* 存在 17 aa 缺失, 并且认为 *Nsp2* 缺失区及高变区是免疫重要区^[15-16]。

2006 年以来爆发的高致病 PRRSV 的共同特点是 *Nsp2* 蛋白存在 30 aa 的不连续缺失^[8-9,17]。这些流行株属于相同演化方向的不同变种。推测 *Nsp2* 的缺失可能与高致病性 PRRSV 的毒力增强有关, 但在高毒力 PRRSV MN184 株^[15]和普通毒力 II 型^[18]及北美分离的 I 型^[19]毒株中也发现了一系列的 *Nsp2* 缺失。

本研究室分离的高致病性 PRRSV TJ 株经噬斑纯化得到毒力弱、免疫原性强的 TJM-F92 疫苗株。对噬斑克隆前后及纯化后传代的不同代次共 14 个代次细胞毒进行了 *Nsp2* 高变区(ns)测序, 从 F_{17} 代噬斑克隆后出现 120 aa 整段缺失, 并稳定存在。为

核实该段缺失是否在易感动物体内修复, 测定缺失毒 TJM-F92 接种易感动物的 F_1 代至 F_5 代分离毒 *Nsp2* 高变区的序列, 缺失依然存在。这 120 aa 结构中以 alpha 螺旋和无规则卷曲结构为主, 虽然 Predictprotein 与 DNASTar 预测结果有不同, 但 alpha 螺旋和无规则卷曲结构的特点相似。

Nsp2 基因多样性是功能改变的原因。*Nsp2* 拥有一个半胱氨酸蛋白酶域^[10,20]、一个 B 细胞表位^[21]和一个潜在的 T 细胞表位^[15]。*Nsp2* 区缺失 63 个核苷酸的重组病毒 rV63 表现出生长能力的增强, 说明 rV63 更适应 Marc-145 细胞, 推测 *Nsp2* 可能对病毒过量复制和 RNA 的过量表达有调控功能。与瘟病毒等其他病毒的非结构蛋白一样^[22], 缺失可能导致这种限制减弱。alpha 螺旋结构使蛋白质形成二聚体或者稳定结构的形状, 无规则卷曲受侧链相互作用的影响很大, 经常构成酶活性部位和其他蛋白质特异的功能部位, 如钙结合蛋白质中结合钙离子的 EF 手结构(E-F hand structure)的中央环。TJM-F92 的 *Nsp2* 蛋白缺失的 3 个 alpha 螺旋结构使之结构稳定性和功能性部位减少, 这或许会影响 *Nsp2* 蛋白与其他分子的结合, 从而引起毒力和致病力的变化。

在临床动物试验中发现克隆传代后的病毒出现了明显的毒力、致病力减弱现象。有专家认为高致病性 PRRSV 的 30 个氨基酸缺失与 PRRSV 的毒力增强可能有关^[23], 而有研究^[24]证明其与病毒毒力变化无关。PRRSV TJM-F92 株 *Nsp2* 蛋白缺失导致结构上的改变是否与 PRRSV 毒力减弱相关, 还需要进一步通过反向遗传技术研究来证明。

参考文献:

- [1] Wensvoort G, de Kluiver 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]. *Vet Microbiol*, 1992, 33(1/4): 185-193.
- [2] Collins J E, Benfield D A, Christianson W T, et al. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs[J]. *J Vet Diagn Invest*, 1992, 4(2): 117-126.
- [3] Jusa E R, Inaba Y, Kouno M, et al. Slow-reacting and

- complement-requiring neutralizing antibody in swine infected with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus[J]. *J Vet Med Sci*, 1996, 58(8): 749-753.
- [4] Meulenberg J J, Petersen-den Besten A, de Kluiver E P, et al. Characterization of structural proteins of Ielystad virus[J]. *Adv Exp Med Biol*, 1995, 380: 271-276.
- [5] Mardassi H, Mounir S, Dea S. Structural gene analysis of a Quebec reference strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) [J]. *Adv Exp Med Biol*, 1995, 380: 277-281.
- [6] Rossow K D, Shivers J L, Yeske P E, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in neonatal pigs characterised by marked neurovirulence [J]. *Vet Rec*, 1999, 144(16): 444-448.
- [7] Mengeling W L, Lager K M, Vorwald A C. The effect of porcine parvovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine reproductive performance[J]. *Anim Reprod Sci*, 2000, 60/61: 199-210.
- [8] Tian K, Yu X, Zhao T, et al. Emergence of fatal PRRSV variants: Unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark[J]. *PLoS One*, 2007, 2(6): 526.
- [9] Zhou Y J, Hao X F, Tian Z J, et al. Highly virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus emerged in China[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2008, 55(3/4): 152-164.
- [10] Allende R, Lewis T L, Lu Z, et al. North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions [J]. *J Gen Virol*, 1999, 80(2): 307-315.
- [11] Shen S, Kwang J, Liu W, et al. Determination of the complete nucleotide sequence of a vaccine strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and identification of the *Nsp2* gene with a unique insertion [J]. *Arch Virol*, 2000, 145(5): 871-883.
- [12] 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.
- [13] Gao Z Q, Guo X, Yang H C. Genomic characterization of two Chinese isolates of porcine respiratory and reproductive syndrome virus[J]. *Arch Virol*, 2004, 149(7): 1341-1351.
- [14] Han J, Wang Y, Faaberg K S. Complete genome analysis of RFLP 184 isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Virus Res*, 2006, 122(1/2): 175-182.
- [15] 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.
- [16] Ropp S L, Wees C E, Fang Y, et al. Characterization of emerging European-like porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the United States [J]. *J Virol*, 2004, 78(7): 3684-3703.
- [17] Li Y, Wang X, Bo K, et al. Emergence of a highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the Mid-Eastern region of China [J]. *Vet J*, 2007, 174(3): 577-584.
- [18] Han J, Liu G, Wang Y, et al. Identification of nonessential regions of the *nsp2* replicase protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain VR-2332 for replication in cell culture[J]. *J Virol*, 2007, 81(18): 9878-9890.
- [19] Fang Y, Schneider P, Zhang W P, et al. Diversity and evolution of a newly emerged North American Type 1 porcine arterivirus: Analysis of isolates collected between 1999 and 2004[J]. *Arch Virol*, 2007, 152(5): 1009-1017.
- [20] Nelsen C J, Murtaugh M P, Faaberg K S. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: Divergent evolution on two continents[J]. *J Virol*, 1999, 73(1): 270-280.
- [21] 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]. *J Virol*, 2001, 75(7): 3277-3290.
- [22] Moser C, Stettler P, Tratschin J D, et al. Cytopathogenic and noncytopathogenic RNA replicons of classical swine fever virus[J]. *J Virol*, 1999, 73(9): 7787-7794.
- [23] Tong G Z, Zhou Y J, Hao X F, et al. Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome, China [J]. *Emerg Infect Dis*, 2007, 13(9): 1434-1436.
- [24] Zhou L, Zhang J, Zeng J, et al. The 30-amino-acid deletion in the *Nsp2* of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus emerging in China is not related to its virulence[J]. *J Virol*, 2009, 83(10): 5156-5167.

责任编辑: 王赛群