



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117925707 A

(43) 申请公布日 2024. 04. 26

(21) 申请号 202311493297.5

A61P 31/14 (2006.01)

(22) 申请日 2023.11.10

C12R 1/93 (2006.01)

(71) 申请人 扬州大学

地址 225009 江苏省扬州市大学南路88号

(72) 发明人 陈南华 邱明 李鑫帅 林鸿

朱建中

(74) 专利代理机构 南京苏高专利商标事务所

(普通合伙) 32204

专利代理师 王艳

(51) Int. Cl.

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 15/40 (2006.01)

C12N 15/66 (2006.01)

C12N 7/01 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

权利要求书1页 说明书14页

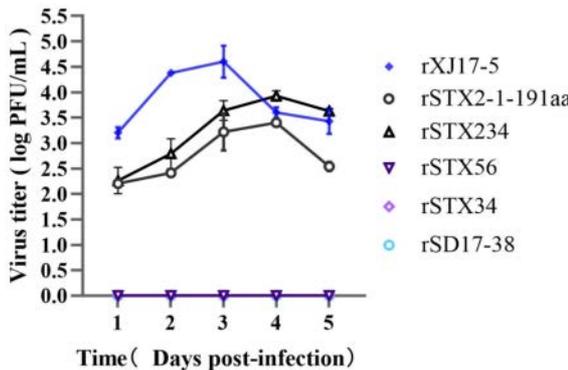
序列表(电子公布) 附图5页

(54) 发明名称

一株NADC30-like猪繁殖与呼吸综合征病毒强毒株感染性克隆病毒及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种感染性克隆质粒pACYC177-rSD17-38及其构建方法,本发明还公开了一种感染性克隆病毒及其构建方法,本发明还公开了可适应Marc-145细胞体外培养的NADC30-like PRRSV改造毒株。本发明还公开了感染性克隆质粒pACYC177-rSD17-38、所述的感染性克隆病毒、所述的改造毒株在制备猪繁殖与呼吸综合征病毒的疫苗中的应用。本发明所构建的改造病毒接种Marc-145传代细胞可引起细胞病变。本发明所构建的反向遗传操作平台及Marc-145适应的改造病毒可用于研制我国首个NADC30-like PRRSV基因工程疫苗,有利于我国PRRS疫情的防控。



1. 一种感染性克隆质粒pACYC177-rSD17-38, 其特征在于, 所述感染性克隆质粒是将中间载体与基因片段F4连接得到, 所述中间载体是将基因片段F1、F2和F3通过同源重组的方式与质粒pACYC177连接得到, 所述基因片段F1、F2、F3和F4依次位于NADC30-like PRRSV SD17-38病毒的全基因组的第1~1525位核苷酸、第1481-7891位核苷酸、第7844-12371位核苷酸和第12321-15177位核苷酸。

2. 权利要求1所述的感染性克隆质粒pACYC177-rSD17-38的构建方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

1) 分别设计基因片段F1、F2、F3的引物对, 然后分别进行扩增得到SD17-38-F1、SD17-38-F2和SD17-38-F3片段;

2) 设计基因片段F4的引物对, 首先使用SD17-38-Bsp1407IF4和SD17-38-4R1引物对, 扩增得到F4-1, 然后, 以F4-1作为模板, 使用引物SD17-38-Bsp1407IF4和3'端加入丁型肝炎病毒的基因序列的引物SD17-38-AscI-4R2组合, 扩增得到F4;

3) 将pACYC177质粒通过PacI和Bsp1407I双酶切线性化, 再将F1、F2和F3片段与该线性化载体同源重组得到连接上F1、F2和F3片段的质粒pACYC177-rSD17-38-F1+F2+F3, 然后将pACYC177-rSD17-38-F1+F2+F3质粒和F4片段通过Bsp1407I和AscI双酶切, 再将F4片段与该载体通过酶切连接法得到完整的pACYC177-rSD17-38质粒。

3. 根据权利要求2所述的构建方法, 其特征在于, 所述同源重组的体系为F1片段20~40ng、F2片段为100~200ng、F3片段为50~150ng和pACYC177线性化载体100~300ng, 再添加1 μ L Exanse MultiS和5 \times CE MultiS Buffuer 2 μ L, 条件为37 $^{\circ}$ C30min。

4. 一种感染性克隆病毒, 其特征在于, 所述感染性克隆是将权利要求1所述的质粒转染细胞后, 再通过感染易感细胞得到。

5. 权利要求4所述的感染性克隆病毒的拯救方法, 其特征在于, 包括以下步骤: 将权利要求1所述的pACYC177-rSD17-38质粒转染到BHK-21细胞中, 得到的转染液再接种原代PAM细胞, 培养数天后, 得到拯救的感染性克隆病毒。

6. 可适应Marc-145细胞体外培养的NADC30-like PRRSV改造毒株, 其特征在于, 所述改造毒株是将权利要求4所述的感染性克隆病毒的小囊膜蛋白的部分编码基因替换为HP-PRRSV XJ17-5分离株的小囊膜蛋白的部分编码基因。

7. 根据权利要求6所述的可适应Marc-145细胞体外培养的NADC30-like PRRSV改造毒株, 其特征在于, 替换后的所述小囊膜蛋白的部分编码基因包括XJ17-5株ORF2-ORF3-ORF4或XJ17-5株ORF2的第1-191位氨基酸的编码基因, 所述XJ17-5株ORF2-ORF3-ORF4的基因序列如SEQ ID NO.2 的第1-1705位核苷酸, 所述XJ17-5株ORF2的基因序列如SEQ ID NO.2 的第1-573bp位核苷酸。

8. 权利要求1所述的感染性克隆质粒pACYC177-rSD17-38、权利要求4所述的感染性克隆病毒、权利要求6~7任一项所述的改造毒株在制备猪繁殖与呼吸综合征病毒的疫苗中的应用。

9. 一种猪繁殖与呼吸综合征病毒的疫苗, 其特征在于, 所述疫苗包括权利要求4所述的感染性克隆病毒或权利要求6~7任一项所述的改造毒株。

一株NADC30-like猪繁殖与呼吸综合征病毒强毒株感染性克隆病毒及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物工程技术领域,具体涉及一株NADC30-like猪繁殖与呼吸综合征病毒强毒株感染性克隆病毒及其应用,尤其涉及拯救以及改造获得的适应Marc-145细胞的嵌合病毒。

背景技术

[0002] 猪繁殖与呼吸综合征 (PRRS) 是引起母猪流产和仔猪呼吸道综合征的重要传染病之一,该病给全世界养猪业造成巨大的经济损失。PRRS的病原是猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV)。PRRSV可分为两个种 (species): PRRSV1和PRRSV2。近年来,我国流行的是PRRSV2。以HP-PRRSV、NADC30-like PRRSV和NADC34-like PRRSV为主。其中,NADC30-like PRRSV的毒力强,传染性强,在我国多个省市流行,是我国目前流行率最高的毒株,给我国生猪健康养殖造成了严重危害。

[0003] PRRSV2属于动脉炎病毒科,是一种单股正链的RNA病毒,其基因组大小约为15kb。包含至少10个开放阅读框 (ORF)。ORF1a和ORF1b基因编码至少16个非结构蛋白,ORF2-7基因编码8个结构蛋白。其中,ORF2-4基因编码的三种小囊膜蛋白 (GP2a、GP3和GP4) 在决定PRRSV毒株细胞嗜性中发挥关键作用。

[0004] 疫苗免疫是防控PRRS疫情的有效手段。但目前我国的商品化PRRSV弱毒疫苗 (JXA1-R、R98和HuN-F112等)对NADC30-like PRRSV的交叉保护效果差。此外,Marc-145细胞系是用于PRRSV疫苗生产的传代细胞系,而NADC30-like PRRSV野毒株不能适应Marc-145细胞,这是阻碍NADC30-like疫苗研制的主要障碍之一。因此,我们急需培育一株可适应Marc-145细胞系体外传代培养的NADC30-like PRRSV疫苗株。

发明内容

[0005] 发明目的:本发明所要解决的技术问题是提供了一种感染性克隆质粒pACYC177-rSD17-38及其构建方法。

[0006] 本发明所要解决的技术问题是提供了一种感染性克隆病毒及其构建方法。

[0007] 本发明还要解决的技术问题是提供了一种可适应Marc-145细胞体外培养的NADC30-like PRRSV改造毒株。

[0008] 本发明还要解决的技术问题是提供了所述的感染性克隆质粒pACYC177-rSD17-38、所述的感染性克隆病毒或所述的改造毒株在制备猪繁殖与呼吸综合征病毒的疫苗中的应用。

[0009] 本发明最后要解决的技术问题是提供了一种猪繁殖与呼吸综合征病毒的疫苗。

[0010] 技术方案:为了解决上述技术问题,本发明提供了所述感染性克隆质粒是将中间载体与基因片段F4连接得到,所述中间载体是将基因片段F1、F2和F3通过同源重组的方式与质粒pACYC177连接得,所述基因片段F1、F2、F3和F4依次位于NADC30-like PRRSV SD17-

38病毒的全基因组的第1~1525位核苷酸、第1481-7891位核苷酸、第7844-12371位核苷酸和第12321-15177位核苷酸。

[0011] 本发明内容还包括所述的感染性克隆质粒pACYC177-rSD17-38的构建方法,包括以下步骤:

[0012] 1) 分别设计基因片段F1、F2、F3的引物对,然后分别进行扩增得到SD17-38-F1、SD17-38-F2和SD17-38-F3片段;

[0013] 2) 设计基因片段F4的引物对,首先使用SD17-38-Bsp1407IF4和SD17-38-4R1引物对,扩增得到F4-1,然后,以F4-1作为模板,使用引物SD17-38-Bsp1407IF4和3'端加入丁型肝炎病毒的基因序列(SEQ ID NO.1)的引物SD17-38-AscI-4R2组合,扩增得到F4;

[0014] 3) 将pACYC177质粒通过PacI和Bsp1407I双酶切线性化,再将F1、F2和F3片段与该线性化载体同源重组得到连接上F1、F2和F3片段的质粒pACYC177-rSD17-38-F1+F2+F3,然后将pACYC177-rSD17-38-F1+F2+F3质粒和F4片段通过Bsp1407I和AscI双酶切,再将F4片段与该载体通过酶切连接法得到完整的pACYC177-rSD17-38质粒。

[0015] 其中,所述同源重组的体系为F1片段20~40ng、F2片段为100~200ng、F3片段为50~150ng和pACYC177线性化载体100~300ng,再添加1 μ L Exanse MultiS和5 \times CE MultiS Buffuer 2 μ L,条件为37 $^{\circ}$ C30min。

[0016] 本发明内容还包括一种感染性克隆病毒,所述感染性克隆是将所述的质粒转染细胞后,再通过感染易感细胞得到。

[0017] 本发明内容还包括所述的感染性克隆病毒的拯救方法,包括以下步骤:将所述的pACYC177-rSD17-38质粒转染到BHK-21细胞中,得到的转染液再接种原代PAM细胞,培养数天后,得到拯救的感染性克隆病毒。

[0018] 本发明内容还包括可适应Marc-145细胞体外培养的NADC30-like PRRSV改造毒株,其特征在于,所述改造毒株是将所述的感染性克隆病毒的小囊膜蛋白的部分编码基因替换为HP-PRRSV XJ17-5分离株的小囊膜蛋白的部分编码基因。

[0019] 其中,替换后的所述小囊膜蛋白的部分编码基因包括XJ17-5株ORF2-ORF3-ORF4或XJ17-5株ORF2的第1-191位氨基酸的编码基因,所述XJ17-5株ORF2-ORF3-ORF4的基因序列如SEQ ID NO.2的第1-1705位核苷酸,所述XJ17-5株ORF2的基因序列如SEQ ID NO.2的第1-573bp位核苷酸。

[0020] 本发明内容还包括所述的感染性克隆质粒pACYC177-rSD17-38、所述的感染性克隆病毒或所述的改造毒株在制备猪繁殖与呼吸综合征病毒的疫苗中的应用。

[0021] 本发明内容还包括一种猪繁殖与呼吸综合征病毒的疫苗,所述疫苗包括所述的感染性克隆病毒或所述的改造毒株。

[0022] 综上,本发明一方面提供了NADC30-like PRRSV的反向遗传操作平台及其构建方法。具体包括以pACY177质粒为载体,利用PCR扩增、酶切连接及同源重组等方法将NADC30-like PRRSV SD17-38强毒株的全基因组分段连接到载体上,获得SD17-38全长感染性克隆,构建并拯救了感染性克隆病毒rSD17-38,成功搭建了首个NADC30-like PRRSV强毒株感染性克隆平台。

[0023] 本发明的另一个方面,提供了改造获得可适应Marc-145细胞传代培养NADC30-like PRRSV毒株的方法。具体包括以本发明中NADC30-like PRRSV反向遗传操作平台为基

础,利用同源重组等方法将Marc-145细胞适应株XJ17-5的小囊膜蛋白合成基因ORF2-ORF3-ORF4序列及GP2a-1-191aa替换到NADC30-like PRRSV感染性克隆中的对应片段,构建拯救两株可适应Marc-145细胞的NADC30-like PRRSV改造毒株。

[0024] 有益效果:与现有技术相比,本发明具备以下优点:

[0025] 1、本发明以NADC30-like PRRSV强毒株SD17-38为亲本病毒,构建了反向遗传操作平台—感染性克隆质粒pACYC177-rSD17-38;

[0026] 2、本发明进一步得到的感染性克隆病毒在原代肺泡巨噬细胞(PAM)上有良好的增殖效力;

[0027] 3、基于NADC30-like PRRSV反向遗传操作平台改造得到两株能够适应Marc-145的NADC30-like PRRSV改造病毒;

[0028] 4、本发明所构建的改造病毒接种Marc-145传代细胞可引起细胞病变(CPE)。

[0029] 5、本发明所构建的反向遗传操作平台及Marc-145适应的改造病毒可用于研制我国首个NADC30-like PRRSV基因工程疫苗,有利于我国PRRS疫情的防控。

附图说明

[0030] 图1是实施例1中SD17-36和SD17-38的序列比对图;

[0031] 图2是实施例1中SD17-36和SD17-38感染性克隆的构建策略示意图;

[0032] 图3是实施例1中SD17-36和SD17-38基因组4个片段的PCR扩增结果图;

[0033] 图4是实施例1中利用针对PRRSV-N蛋白的单抗6A1的间接免疫荧光法检测拯救的SD17-36和rSD17-38的间接免疫荧光鉴定图;

[0034] 图5是实施例1中利用荧光定量PCR方法检测SD17-38及其感染性克隆病毒rSD17-38在原代PAM细胞上拯救的动态增殖结果;

[0035] 图6是实施例2中rSTX56、rSTX234、rSTX34和rSTX2-1-191aa嵌合病毒的构建策略示意图;

[0036] 图7是实施例2中rSTX56、rSTX234、rSTX34和rSTX2-1-191aa嵌合病毒在Marc-145细胞上拯救后6dpi利用针对PRRSV-N蛋白的单抗6A1对Marc-145细胞上复制的rSTX234和rSTX2-1-191aa嵌合病毒进行间接免疫荧光检测的结果;

[0037] 图8是实施例2中rSTX56、rSTX234、rSTX34和rSTX2-1-191aa嵌合病毒在Marc-145细胞上的动态增殖结果;

[0038] 图9是实施例2中rSTX56、rSTX234、rSTX34和rSTX2-1-191aa嵌合病毒在Marc-145细胞上的噬斑图。

具体实施方式

[0039] 下列实施例中的常规实验方法,参见Sambrook等编写的《分子克隆实验指南》第三版(北京:科学出版社,2002),仪器的使用参照仪器操作说明书。

[0040] 在本发明的实施例中,病毒有本实验室已分离的NADC30-like PRRSV SD17-36毒株(简称SD17-36,分离病料为山东省肺组织病料,GenBank登录号:MH121061)、本实验室已分离的NADC30-like PRRSV SD17-38强毒分离株(简称SD17-38,分离病料为山东省肺组织病料,GenBank登录号:MH068878)、本实验室已分离的HP-PRRSV XJ17-5分离株(分离病料为

新疆维吾尔自治区肺组织病料, GenBank登录号: MK759853) 及其本实验室已构建的感染性克隆毒rXJ17-5及其感染性克隆质粒pACYC177-rXJ17-5。细胞包括本实验室传代培养的BHK-21和Marc-145细胞系, 及原代肺泡巨噬细胞PAM。PRRSV抗N蛋白单克隆抗体15A1和PRRSV抗N蛋白单克隆抗体6A1均为与扬州大学李向东教授馈赠。(上述材料均已公开发表)。

[0041] 在本发明实施例中, 质粒和菌株:pACYC177质粒购广州自优宝生物科技有限公司, Trans1-T1感受态细胞(CD501-02) 购自北京全式金生物有限公司。

[0042] 在本发明实施例中, 使用的其他试剂: RNase Free H₂O (R1600) 购自Solarbio公司、胰酶细胞消化液(S310JV) (酚红) 购自Solarbio公司; TRIpure Reagent总RNA提取试剂购自艾德莱生物公司; PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit (6110A)、2×PrimeSTAR MAX DNA Polymearse (R045) 购自TAKARA公司; FastPure Plasmid Mini Kit (DC201-01) 购自诺维赞生物科技有限公司; 同源重组试剂(C115-01) 购自诺维赞生物科技有限公司; DMEM培养基(SH30243.01) 购自HyClone生物化学制品有限公司; 胎牛血清(FBSKM0503) 购自澳范公司; DyLight 594, Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody购自Invitrogen; DNA Marker购自浙江博而金科技股份有限公司; Gel Extraction Kit (CW2302M) 购自北京康为世纪生物科技有限公司; DNA限制性内切酶购自Thermo Fisher公司; LipofectamineTM3000 Transfection Reagent 1 (L3000015) 购自Invitrogen公司; Opti-MEM (31985070) 购自Gibco公司。

[0043] 实施例1 NADC30-like PRRSV SD17-36和SD17-38反向遗传操作平台的构建

[0044] 利用网站(<https://benchling.com/>) 进行NADC30-like PRRSV SD17-36和SD17-38毒株全长序列比对。如图1所示, 比对发现, 两株NADC30-like PRRSV毒株的同源性仅为93.13%。故针对两株毒设计不同的构建策略, 构建方法如下。

[0045] 1、反向遗传操作系统构建的引物设计

[0046] 按照图2所示两株毒的构建策略, 选择病毒基因组上限制性内切酶位点的位置, 使用Primer 5.0设计扩增NADC30-like PRRSV SD17-36株和SD17-38株各片段的引物。好处如下: 第一, 可以通过同源重组和酶切连接两种方法进行感染性克隆质粒构建, 当同源重组法效率低下时, 还可通过传统的酶切连接法继续完成感染性克隆构建; 第二, 也可方便后期感染性克隆质粒应用时各片段的改造。在NADC30-like PRRSV毒株基因组的5' 端引入PacI单酶切位点, 3' 端加入丁型肝炎病毒(HDV Ribozyme) 序列(SEQ ID NO.1)。引物具体信息如表1和表2所示。

[0047] 表1SD17-36感染性克隆构建引物

[0048]

引物名称	引物序列
SD 17- 36- Pac I- F1	AGCTCGTTAATTAATACATGACGTATAGGTGTTGGCTCT
SD 17- 36- Xh oI- R1	ATTCCGGCGAAGACCCCTCGAGCCACGGCAGTGACT
SD 17- 36- Xh oI- F2	AGTCACTGCCGTGGCTCGAGGGTCTTCGCCGGAAT
SD 17- 36- AflI I- R2	ACAATCAGGGGCTGGACCTTAAGCATGTCCTCAAACCTT
SD 17- 36- AflI I- F3	TGATTTATGCGCAGCATATGGTGCTCAGTTA
SD 17- 36- Bsp 140 7I-	AATAGCACCTTTTGTACAGCCGTGCTATCATTACA

	R3	
	SD 17- 36- Bsp 140 7I- F4	TGTAATGATAGCACGGCTGTACAAAAGGTGCTATT
[0049]	SD 17- 36- 4R1	AGCGAGGAGGCTGGGACCATGCCGGCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATTC GGCCGCATGGTTCT
	SD 17- 36- Asc I- 4R2	ACAGGGCGCGCCGTCCCATTCCGATTACCGAGGGGACGGTCCCCTCGGAAT GTTGCCAGCCGGCGCCAGCGAGGAGGCTGGGACCAT

[0050] 表2SD17-38感染性克隆的构建引物

编号	引物名称	序列 (5'-3')	长度 (bp)
1	SD17-38-PacI-F1	TATATAAGCAGAGCTCGTTAATTAATACAT GACGTATAGGTGTTGGCTCCA	51
2	SD17-38-ScaI-R1	TTGCCATCGGCGGGTGGGGAGTAGTACTT AAGGGGTTTCATCCTT	44
3	SD17-38-ScaI-F2	AAGGATGAACCCCTTAAGTACTACTCCCCA CCCGCCGATGGCAA	44
4	SD17-38-NotI-R2	TGGCATTAGGCGTAAGGAGGCGGCCGCAT GTATTGGGCTCCCAGTAT	48
5	SD17-38-NotI-F3	ATACTGGGAGCCCAATACATGCGGCCGCC TCCTTACGCCTAATGCCA	48
6	SD17-38-Bsp1407I-R3	AACAGAGGAAAATATGGAGGAATGTACA GCTATTAACCATTCG TGAAAGT	50
7	SD17-38-Bsp1407I-F4	ACTTTCAGCAATGGTTAATAGCTGTACATT CCTCCATAITTTCTCTGTT	50
8	SD17-38-4R1	AATGTTGCCAGCCGGCGCCAGCGAGG AGGCTGGGACCATGCCGGCCTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTAAATTCGGCCGCATGGTTCT	88
9	SD17-38-AscI-4R2	TCGCTGGCGCCGGCTGGGCAACATTCCG AGGGGACCGTCCCCTCGGTAATGGCGAAT GGGACGGCGCGCCCTGTGCCTTCTAGTT GCCA	89

[0052] 2、SD17-36和SD17-38感染性克隆的构建

[0053] 1)、SD17-36和SD17-38全基因片段分段扩增

[0054] 首先,取200μl SD17-36和SD17-38病毒原液使用TRIpure Reagent (艾德莱) 进行总RNA提取,将提取到的总RNA保存于-20℃或长期保存于-80℃。使用反转录试剂盒

(PrimeScript™1st strand cDNA Synthesis Kit, TAKARA) 将病毒RNA反转录为cDNA,并将获得的cDNA保存于-20℃备用。反应体系与程序详见表3和表4。

[0055] 表3、SD17-36和SD17-38总RNA预处理体系和程序

名称	OligodT Primer(50μM)	Random 6 mers(50μM)	dNTP Mixture (10mM each)	Template RNA
[0056] 剂量	1μL	0.4μL	1μL	7.6μL
程序	65℃, 5min			

[0057] 表4、SD17-36和SD17-38总RNA反转录体系和程序

名称	预处理产物	5xPrimeScript Buffer	RNase Inhibitor (40 U/μL)	PrimeScript RTase (200 U/μL)	RNase free d H2O
[0058] 剂量	10μL	0.4μL	1μL	7.6μL	补至 20μL
程序	30℃, 10min; 42℃, 60min; 70℃, 15min				

[0059] 如图2所示,SD17-36全基因组被分为四个片段F1(基因组1-2329bp)、F2(基因组2294-8740bp)、F3(基因组8709-14052bp)和F4(基因组14017-15147bp)。首先,以上述反转录得到的SD17-36 cDNA作为模板。将表1中的上下游引物对SD17-36-PacI-F1和SD17-36-XhoI-R1组合,扩增F1片段;SD17-36-XhoI-F2和SD17-36-Af1II-R2组合,扩增F2片段;SD17-36-Af1II-F3和SD17-36-Bsp1407I-R3组合,扩增F3;其次,为添加Poly-A尾添加到病毒全基因组中,将Poly-A尾序列合成至引物SD17-36-4R1中,再以SD17-38 cDNA为模板,以该引物和SD17-36-Bsp1407I-F3引物组合进行第一次扩增,得到F4-1(14017-15078bp)。然后为了在病毒基因组的3'端加入丁型肝炎病毒(HDV Ribozyme)序列(SEQ ID NO.1),将该序列合成至引物SD17-36-AscI-4R2中,再以F4-1片段为模板,以该引物和SD17-36-Bsp1407IF3引物组合进行第二次扩增,得到F4。

[0060] SD17-38全基因组被分为四个片段F1(基因组1-1525bp)、F2(基因组1481-7891bp)、F3(基因组7844-12371bp)和F4(基因组12321-15177bp)。首先,以上述反转录得到的SD17-38 cDNA作为模板。将表2中的上下游引物对SD17-38-PacI-F1和SD17-38-ScaI-R1;SD17-38-ScaI-F2和SD17-38-NotI-R2;SD17-38-NotI-F3和SD17-38-Bsp1407I-R3组合,分别扩增得到F1、F2和F3片段。同样,扩增F4分为两步进行,SD17-38-Bsp1407I-F3和引物SD17-36-4R1组合进行第一次扩增,得到F4-1(12321-15113bp)。然后以引物SD17-38-Bsp1407I-F3和引物SD17-38-AscI-4R2组合,再以F4-1片段为模板,进行第二次扩增,得到F4(12321-15177bp)。具体反应体系及反应程序见表5和表6。

[0061] 表5、反应体系

[0062]	名称	cDNA	上下游引物对 (10 μ M)	2 \times PrimeSTAR MAX DNA Polymearse	RNase Free H ₂ O
	剂量	2 μ L	各 1 μ L	20 μ L	补至 40 μ L

[0063] 表6、反应程序

[0064]	步骤	变性	退火	延伸	循环数
	温度	98 $^{\circ}$ C	55 $^{\circ}$ C	72 $^{\circ}$ C	35cycles
	时间	10s	30s	5min	

[0065] PCR反应完成后,将全部F1、F2和F3及2 μ L F4 PCR产物使用浓度为0.9%的琼脂糖凝胶进行电泳。电泳结果如图3所示,获得SD17-36基因片段F1大小为2329bp,F2大小为6446bp,F3大小为5343,F4大小为1130bp;获得SD17-38基因片段F1大小为1525bp,F2大小为6410bp,F3大小为4527bp,F4大小为2856bp。

[0066] 2)、SD17-36和SD17-38各片段连接

[0067] 使用产物胶回收试剂盒回收上述扩增产物。再将pACYC177质粒双酶切,依次将胶回收产物同源重组(或连接)到pACYC177载体,构建策略如图1所示。具体操作步骤如下:

[0068] 首先使用PacI和NotI双酶切pACYC177质粒,pACYC177酶切体系为:pACYC177质粒(200ng/ μ L) 15 μ L,PacI 3 μ L,Bsp1407I 3 μ L,10 \times CutSmart Buffer 4 μ L,RNase Free H₂O补至40 μ L。反应条件:37 $^{\circ}$ C水浴30分钟。具体信息如表8所示。

[0069] 表8、pACYC177质粒双酶切体系

[0070]	名称	pACYC177质粒	PacI	Bsp1407I	10 \times CutSmart Buffer	RNase Free H ₂ O
	剂量	3000ng	3 μ L	3 μ L	4 μ L	补至40 μ L

[0071] 利用琼脂糖凝胶电泳分离酶切条带,切下目的条带进行凝胶回收。将胶回收的线性载体pACYC177再与F1、F2和F3胶回收产物进行同源重组,具体的体系如表9和表10所示,反应程序为37 $^{\circ}$ C 30min。得到的产物命名为pACYC177-rSD17-36-F1+F2+F3和pACYC177-rSD17-38-F1+F2+F3。

[0072] 表9、SD17-36同源重组体系

[0073]	名称	F1 片段	F2 片段	F3 片段	pACYC177	5 \times CE MultiS Buffer	Exanse MultiS
	剂量	47ng	129ng	107ng	200ng	2 μ L	1 μ L

[0074] 表10、SD17-38同源重组体系

[0075]	名称	F1 片段	F2 片段	F3 片段	pACYC177	5 \times CE MultiS Buffer	Exanse MultiS
	剂量	31ng	128ng	91ng	200ng	2 μ L	1 μ L

[0076] 将同源重组产物转化Trans1-T1感受态细胞。挑取6个菌落过夜增菌培养,提取质粒DNA,使用PacI和Bsp1407I进行双酶切鉴定,1%琼脂糖凝胶电泳,挑取酶切大小正确的质粒进行测序验证,然后继续进行F4片段连接。

[0077] 首先将F4片段进行PCR产物纯化,操作方法按照Fast Pure Plasmid Mini Kit说明书进行。pACYC177-rSD17-36-F1+F2+F3和pACYC177-rSD17-38-F1+F2+F3质粒及纯化后的

SD17-36和SD17-38的F4片段进行Bsp1407I和AscI双酶切,双酶切体系如表11和表12所示。得到的产物为pACYC177-rSD17-36-F1+F2+F3和pACYC177-rSD17-38-F1+F2+F3线性化载体及带有粘性末端的SD17-36和SD17-38的F4片段。再按照图2所示构建策略图进行T4连接酶连接,连接体系如表13所示。再用上述方法进行转化及菌落双酶切筛选,并通过表1中的引物SD17-36-PacI-F1、SD17-36-XhoI-F2、SD17-36-AflIII-F3和SD17-38-Bsp1407I-F4对pACYC177-rSD17-36进行测序;通过表2中的引物SD17-38-PacI-F1、SD17-38-ScaI-F2、SD17-38-NotI-F3和SD17-38-Bsp1407I-F3对pACYC177-rSD17-38进行测序。最终获得含全基因组序列的感染性克隆质粒pACYC177-rSD17-36和pACYC177-rSD17-38。

[0078] 表11、pACYC177-rSD17-36-F1+F2+F3和pACYC177-rSD17-38-F1+F2+F3质粒双酶切体系

[0079]	名称	质粒	Bsp1407I	AscI	10×CutSmart Buffer	RNase Free H2O
	剂量	3000ng	3μL	3μL	4μL	补至40μL

[0080] 表12、SD17-36和SD17-38的F4片段双酶切体系

[0081]	名称	F4片段	Bsp1407I	AscI	10×CutSmart Buffer	RNase Free H2O
	剂量	2000ng	2μL	2μL	4μL	补至40μL

[0082] 表13、T4连接体系

[0083]	名称	线性化载体	F4 片段	T4 ligase	2×Buffer	RNase Free H2O
	剂量	2μL	2.5μL	0.2μL	5μL	补至 10μL
反应条件: 25°C 2 小时						

[0084] 1.3、rSD17-36和rSD17-38感染性克隆的拯救

[0085] 预先使用含10%FBS的DMEM培养基将BHK-21细胞按 1×10^6 cells/孔的密度接种于12孔细胞培养板,置于37°C,5%CO₂的培养箱培养至细胞密度达到90%左右。按照Lipofectamine™3000 Transfection Reagent说明书,该试剂盒中包括P3000和Lip3000两种试剂,另需自备Opti-MEM进行细胞转染,具体操作如下:

[0086] 首先在一个EP管中配置质粒预混液:感染性克隆质粒pACYC177-rSD17-36或pACYC177-rSD17-38 2000ng、P3000 4μL、Opti-MEM 50μL;在另一个EP管中配置Lip3000预混液:Lip3000 3μL、Opti-MEM 50μL;最后将上述两步获得的预混液混合,室温静置15min后,加入上述的BHK-21细胞中。细胞转染后48h,将12孔板用密封袋密封后于-80°C冻融2次备用。具体转染体系如表14所示。

[0087] 表14、转染体系

[0088]	种类\名称	质粒	Lip3000	P3000	Opti-MEM
	质粒预混液	2000ng	-	3μL	50μL
	Lip3000预混液	-	4μL	-	50μL

[0089] 由于BHK-21细胞只能用于转染,并不易感PRRSV。而原代PAM细胞为SD17-36和SD17-38的易感细胞,故使用该细胞进行BHK-21冻融液接种,以完成病毒拯救。2mL含有2%FBS的RPMI (1640) 培养基将原代PAM细胞按 2×10^5 cells/孔的密度接种到12孔细胞培养板,置于37°C,5%CO₂的培养。取500μL的BHK-21细胞转染上清液,覆盖到原代PAM细胞上,孵育

2h后,弃去上清,添加含2% FBS的RPMI (1640) 培养基继续培养。此外,将 1×10^3 TCID₅₀ SD17-36及SD17-38原毒感染原代PAM细胞作为阳性对照。培养3天,将细胞上清液收集后,留下细胞进行IFA鉴定。如图4所示,PRRSV抗N蛋白单克隆抗体6A1检测,拯救病毒rSD17-36并未出现特异性红色荧光,而其亲本毒SD17-36、拯救病毒(rSD17-38)和亲本病毒(SD17-38)可见特异性红色荧光,阴性对照组无特异性荧光产生,证实rSD17-36拯救失败,rSD17-38感染性克隆病毒在原代PAM细胞上拯救成功。

[0090] 实验数据证明,NADC30-like PRRSV毒株感染性克隆病毒拯救具有相当的难度,仅SD17-38株的感染性克隆病毒拯救成功。故后续感染性克隆病毒改造均在pACYC177-rSD17-38质粒上进行。

[0091] 1.4、rSD17-38和SD17-38增殖活性测定

[0092] 使用含有2mL 2%FBS的RPMI (1640) 培养基将原代PAM细胞按 2×10^5 cells/孔的密度接种到12孔细胞培养板,置于37°C,5% CO₂的培养箱培养,待完全贴壁后,以1:2000的比例添加病毒液(1 μ L),分别于2hpi(hours post infection),24hpi,48hpi,72hpi,96hpi收集上清,使用TRIpure Reagent提取上清病毒RNA。所得cDNA取1 μ L用于real-time PCR检测PRRSV1 ORF7基因。具体反应体系和扩增程序如表15和表16所示。

[0093] 表15、反应体系

[0094]	名称	cDNA	2 \times EX Taq	引物对(10 μ M)	探针(10 μ M)	RNase Free H ₂ O
	剂量	1 μ L	20 μ L	各0.5 μ L	0.4 μ L	补至20 μ L

[0095] 表16、real-time PCR引物及探针序列

[0096]	编号	引物名称	序列(5' -3')
	1	PRRSV2-UF1	TTGTGCTTGCTAGGCCGC
	2	PRRSV2-UR1	ACGACAAATGCGTGGTTATCA
	3	探针	FAM-TCTGGCCCCTGCCCA-MGB

[0097] 表17、反应程序

[0098]	循环数	温度(°C)	时间
	1	95	30 s
	40	95	5 s
		60(采集荧光信号)	1 min

[0099] rSD17-38感染性克隆病毒在原代PAM细胞上的动态增殖情况如图5所示,rSD17-38在体外有良好的增殖效力。

[0100] 实施例2可适应Marc-145细胞体外培养的NADC30-like PRRSV的改造、构建与拯救

[0101] 将NADC30-like PRRSV2 rSD17-38的小囊膜蛋白(GP2a-GP3-GP4)编码基因ORF2-ORF3-ORF4和主要囊膜蛋白(GP5-M)编码基因ORF5-ORF6分别替换为可适应Marc-145细胞体外培养毒株HP-PRRSV XJ17-5株的ORF2-ORF3-ORF4(SEQ ID NO.2)和ORF5-ORF6(SEQ ID NO.3),构建两个感染性克隆rSD17-38-T-XJ17-5-ORF5-ORF6(rSTX56)和rSD17-38-T-XJ17-5-ORF2-ORF3-ORF4(rSTX234)。实验发现,GP2a-GP3-GP4替换可使rSD17-38改造病毒适应Marc-145细胞,而GP5-M替换不能使rSD17-38改造病毒适应Marc-145细胞。再通过将rSD17-38的GP2a的第1-191aa和GP3-GP4分别替换为XJ17-5的对应蛋白,构建两个感染性克隆

rSD17-38-T-XJ17-5-ORF34 (rSTX34) 和 rSD17-38-T-XJ17-5-ORF2a-1-191aa (rSTX2-1-191aa)。结果 rSTX2-1-191aa 获得 Marc-145 细胞嗜性, 而 rSTX34 不能适应 Marc-145 细胞。最终, 我们获得两株改造毒株 rSTX234 和 rSTX2-1-191aa 可以适应 Marc-145 细胞。具体的构建过程如下:

[0102] 1、引物设计

[0103] 按照如图6所示的构建策略, 使用 Primer 5.0 设计扩增 XJ17-5 株 ORF2-ORF3-ORF4 (SEQ ID NO.2)、XJ17-5 株 ORF3-ORF4 (SEQ ID NO.2) 的 624-1705bp)、XJ17-5 株 ORF2-1-191aa (SEQ ID NO.2) 的 1-573bp) 和 XJ17-5 株 ORF5-ORF6 (SEQ ID NO:3) 的引物, 引物之间包含至少 20bp 的同源臂。引物具体信息如表18所示。

[0104] 表18、嵌合病毒的构建引物

编号	引物名称	序列 (5'-3')	长度 (bp)
1	SD17-38-NotIF3	ATACTGGGAGCCCAATACATGCGGCCGCCTCCTTACGCCTAATGCC A	47
2	rSTX56-ORF5-F	ccatcctgttgcaattgaatgttcaagtattgttggg	38
3	rSTX56-ORF5-R	cccaacatactgaacattcaaattgccaacaggatgg	38
4	rSTX56-ORF6-F	ccttgtaaafatgccaataacaacggcagacagc	36
5	rSTX56-ORF6-R	gctgtctgccgtgttatttggcatatttaacaagg	36
6	rSTX234-ORF2-R	gcatagacccatttcatttcagtcaagcc	31
[0105] 7	rSTX234-ORF2-F	ggcttgaactgaaatgaaatggggtctatgc	31
8	rSTX234-ORF4-R	CCAACATATCTAAACATtcaaattgccagtaggatggc	38
9	rSTX234-ORF4-F	gccatcctactggcaattgaATGTTTAGATATGTTGG	38
10	JXA1-R-NOTI-2fu-1	CAAACAACAGATGGCTGGCAACTAGAAGGCACAG	34
11	rSTX34-ORF3-F	cttcatgatttcagcaatggctaataagctgtacattcc	39
12	rSTX34-ORF3-R	ggaatgtacagctattagccattgctgaaaatcatgaag	39
13	rSTX2-1-191aa-F	gcttcatgatttcagcaatggctaataagctgtacattcctc	42
14	rSTX2-1-191aa-R	gaggatgtacagctattagccattgctgaaaatcatgaagc	42

[0106] 2、改造病毒的构建及拯救

[0107] 将 XJ17-5 的 ORF2-ORF3-ORF4、ORF5-ORF6、ORF3-ORF4 和 ORF2-1-191aa 分别替换到 rSD17-38 的对应位置, 构建图6中所示的嵌合病毒 rSTX56、rSTX234、rSTX34 和 rSTX2-1-

191aa。

[0108] 2.1、XJ17-5-ORF5-ORF6、XJ17-5-ORF2-ORF3-ORF4、rSD17-38前段和rSD17-38后段扩增

[0109] 将表18中的引物SD17-38-NotIF3和rSTX56-ORF5-R；rSTX56-ORF5-F和rSTX56-ORF6-R；rSTX56-ORF6-F和JXA1-RNOTI-2fu-1；SD17-38-NotIF3和rSTX234-ORF2-R；rSTX234-ORF2-F和rSTX234-ORF4-R；rSTX234-ORF4-F和JXA1-RNOTI-2fu-1分别组合成引物对，分别用于XJ17-5-ORF5-ORF6、rSTX56前段、rSTX56后段XJ17-5-ORF2-ORF3-ORF4、rSTX234前段和rSTX234后段的扩增，反应的模板分别为pACYC177-rXJ17-5质粒和pACYC177-rSD17-38质粒。反应的具体程序如表19和表20所示。

[0110] 表19、反应体系

[0111]	名称	pACYC177-rXJ17-5 或 pACYC177-rSD17-38 质粒	上下游引物 对 (10 μ M)	2 \times PrimeSTAR MAX DNA Polymearse	RNase Free H ₂ O
	剂量	2 μ L	各 1 μ L	25 μ L	补至 50 μ L

[0112] 表20、反应程序

[0113]	步骤	变性	退火	延伸	循环数
	温度	98 $^{\circ}$ C	55 $^{\circ}$ C	72 $^{\circ}$ C	35cycles
	时间	10s	30s	3min	

[0114] PCR反应完成后，取反应产物2 μ L，使用浓度为1%的琼脂糖凝胶进行电泳。获得的片段XJ17-5株ORF5-ORF6大小为1122bp (SEQ ID NO.3)、rSTX56前段大小为5587bp (SEQ ID NO.4)、rSTX56后段大小为679bp (SEQ ID NO.5)、XJ17-5株ORF2-ORF3-ORF4大小为1705bp (SEQ ID NO.2)、rSTX234前段大小为3882bp (SEQ ID NO.6)、rSTX234后段大小为1800bp (SEQ ID NO.7)。

[0115] 2.2、rSTX234各片段同源重组

[0116] 用NotI和AscI对pACYC177-rSD17-38进行双酶切，获得pACYC177-rSD17-38-F1+F2线性化载体。具体操作方法与实施例1中相似。具体信息详见表21。

[0117] 表21、pACYC177-rSD17-38质粒双酶切体系

[0118]	名称	pACYC177-rSD17-38 质粒	NotI	AscI	10 \times CutSmart Buffer	RNase Free H ₂ O
	剂量	20 μ L	2 μ L	2 μ L	4 μ L	补至 40 μ L
反应条件：37 $^{\circ}$ C30min						

[0119] 利用琼脂糖凝胶电泳分离酶切条带，切下目的条带进行凝胶回收。胶回收后，使用Nanodrop测定浓度后备用。使用同源重组的方法将XJ17-5-ORF2-ORF3-ORF4、rSTX234前段和rSTX234后段利用同源重组法连接到pACYC177-rSD17-38-F1+F2线性化载体上。rSTX56的构建具体方法与rSTX234的构建方法相同，即使用同源重组的方法将XJ17-5-ORF5-ORF6、rSTX56前段和rSTX56后段利用同源重组法连接到pACYC177-rSD17-38-F1+F2线性化载体上。同源重组具体操作如下：

[0120] 同源重组体系为：77ng XJ17-5-ORF2-ORF3-ORF4、34ng rSD17-38前段和33ng rSD17-38后段、200ng pACYC177-rSD17-38-F1+F2线性化中间载体、4 μ l 5 \times CE MultiS Buffer和2 μ l Exanse MultiS。反应条件为37 $^{\circ}$ C反应30min。详见表22。

[0121] 表22、同源重组体系

[0122]	名称	XJ17-5-ORF2-ORF3-ORF4	rSTX234前段	rSTX234后段	pACYC177-BJ1805-2-F1+F2	5×CE Buffer	MultiS	Exanse MultiS
	剂量	34ng	77ng	33ng	200ng	2μL		1μL

[0123] 将同源重组产物转化到Trans1-T1感受态细胞,挑取独立的菌落进行纯培养。挑取6个菌落过夜增菌培养,提取质粒DNA,使用NotI和AscI进行双酶切鉴定,0.9%琼脂糖凝胶电泳,挑取酶切鉴定正确的质粒保留,将其命名为pACYC177-rSTX234。按照上述同样的方法可得到阳性质粒pACYC177-rSTX56。

[0124] 质粒pACYC177-rSTX34的构建方法如下:

[0125] 待完成2.2中rSTX234阳性质粒的构建后,挑选双酶切鉴定正确的质粒作为PCR模板,利用表8中引物,表9和表10中体系及程序进行嵌合毒rSTX34及rSTX2-1-191aa的片段扩增及质粒构建。具体信息如下:取实施例1中拯救成功的阳性质粒pACYC177-rSD17-38 1ng作为模板,用引物SD17-38-NotIF3和rSTX34-ORF3-R扩增rSTX34前段;以实施例2.2中得到的pACYC177-rSTX234阳性质粒1ng为模板,rSTX34-ORF3-F和引物JXA1-R-NOTI-2fu-1扩增rSTX34的后段。

[0126] 质粒pACYC177-rSTX2-1-191aa的构建方法如下:

[0127] 取pACYC177-rSTX234阳性质粒1ng作为模板,用引物SD17-38-NotIF3和rSTX2-1-191aa-R扩增rSTX2-1-191aa前段;以实施例1中拯救成功的阳性质粒pACYC177-rSD17-38质粒为模板,rSTX2-77-191aa-F和引物JXA1-R-NOTI-2fu-1扩增rSTX2-1-191aa的后段。

[0128] 将上述扩增片段连接上pACYC177-rSD17-38-F1+F2线性化载体的方法及阳性质粒筛选过的方法与pACYC177-rSTX234的构建相同。根据上述方法,得到构建完成的阳性质粒pACYC177-rSTX34和pACYC177-rSTX2-1-191aa。至此,得到了pACYC177-rSTX234、pACYC177-rSTX56、pACYC177-rSTX34和pACYC177-rSTX2-1-191aa,共四个改造质粒。

[0129] 2.3、改造病毒的拯救

[0130] 预先使用含10% FBS的DMEM培养基将BHK-21细胞按 1×10^6 cells/孔的密度接种于12孔细胞培养板,置于37℃,5% CO₂的培养箱培养至细胞密度达到80%左右。按照Lipofectamine™3000 Transfection Reagent说明进行细胞转染。细胞转染后48h,将12孔板密封好后冻于-80℃,反复冻融两次后取全部细胞悬液,10000×g离心4min,收集上清液。转染方法与实施例1相似。详细信息见表14。

[0131] 得到BHK-21细胞冻融上清液后,需将上清液接种至PAM细胞完成病毒拯救。具体方法如下:预先使用含2% FBS的1640培养基将原代PAM细胞按 1×10^6 cells/孔的密度接种于12孔细胞培养板,置于37℃,5% CO₂的培养箱培养。待细胞贴壁后,加入转染BHK-21细胞的冻融上清液,孵育2h后,弃液。换为2% FBS的1640培养基。4天后获得拯救完成的病毒上清液。

[0132] 预先使用含10% FBS的DMEM培养基将Marc-145细胞按 2×10^5 cells/孔的密度接种于12孔细胞培养板,置于37℃,5% CO₂的培养箱培养,至细胞密度达到80%左右,换用含2% FBS的DMEM培养基。

[0133] 取500 μ L拯救成功的rSTX234、rSTX56、rSTX34和rSTX2-1-191aa病毒上清,加入Marc-145细胞,继续培养。同时将rXJ17-5和实施例1中拯救成功的含rSD17-38及SD17-38病毒的上清液 1×10^3 TCID₅₀接种Marc-145细胞作为对照组,每天观察细胞情况。待感染6天后,收集上清保存,留下单层细胞进行间接免疫荧光法(IFA)检测病毒蛋白情况。rXJ17-5使用抗N蛋白单克隆抗体15A1检测,改造病毒使用PRRSV抗N蛋白单克隆抗体6A1检测。如图7所示,改造病毒rSTX56、rSTX34在PAM细胞上成功检测到N蛋白特异性红色荧光,但不能在Marc-145细胞上检测到特异性红色荧光,证明这两个改造病毒不能适应Marc-145细胞培养。rSTX234和rSTX2-1-191aa接种Marc-145细胞后,可见改造病毒的N蛋白出现特异性红色荧光,而阴性对照组无荧光产生,证明仅有rSTX234和rSTX2-1-191aa改造病毒获得Marc-145细胞嗜性。

[0134] 2.4、rSTX234及rSTX2-1-191aa在Marc-145细胞上的增殖特性测定

[0135] 预先使用含10% FBS的DMEM培养基将Marc-145细胞按 1×10^5 cells/孔的密度接种于24孔细胞培养板,置于37 $^{\circ}$ C,5% CO₂的培养箱培养,至细胞密度达到80%左右,换用含2% FBS的DMEM培养基。

[0136] 取 1×10^3 TCID₅₀rXJ17-5、rSD17-38、rSTX56、rSTX34、rSTX234及rSTX2-1-191aa接种到6孔板的Marc-145细胞上。感染后1、2、3、4和5天,每天取上清100 μ L冻存于-80 $^{\circ}$ C冰箱,待收集完成后利用空斑法进行多步生长曲线测定。空斑法具体方法如下:预先使用含10% FBS的DMEM培养基将Marc-145细胞按 8×10^4 cells/孔的密度接种于24孔细胞培养板,置于37 $^{\circ}$ C,5% CO₂的培养箱培养,至细胞密度达到80%左右,换用含2% FBS的DMEM培养基。第二天观察细胞密度,直至细胞达到致密状态时进行下一步。

[0137] 5个时间点的100 μ L病毒液用900 μ L的无血清DMEM进行10倍稀释,依次稀释至-5。然后取每个稀释梯度500 μ L稀释液感染Marc-145细胞1.5h。1.5h后弃去病毒液,用无血清DMEM轻柔清洗1到2次,配置1%甲基纤维素培养液(30mL培养基配方:15mL DMEM+600 μ L胎牛血清+300 μ L青链霉素+最后倒入15mL 2%甲基纤维素),摇匀后直接覆盖单层细胞。6天后观察。细胞病变形成后,弃掉1%甲基纤维素培养液,使用4%多聚甲醛覆盖培养基,固定过夜后进行结晶紫染色3h。染色完成后用水冲洗,观察,计数即可得到每个时间点的病毒颗粒数。

[0138] 多步生长曲线测定结果如图8所示,仅有rXJ17-5、rSTX234及rSTX2-1-191aa成功在Marc-145细胞上复制。

[0139] 2.5、rSTX234及rSTX2-1-191aa噬斑试验

[0140] 空斑的实验方法具体如2.4所述。噬斑实验结果如图所示9所示,rXJ17-5、rSTX234和rSTX2-1-191aa能在Marc-145细胞上形成空斑,而rSTX56、rSTX34、rSD17-38不能产生空斑。



图1

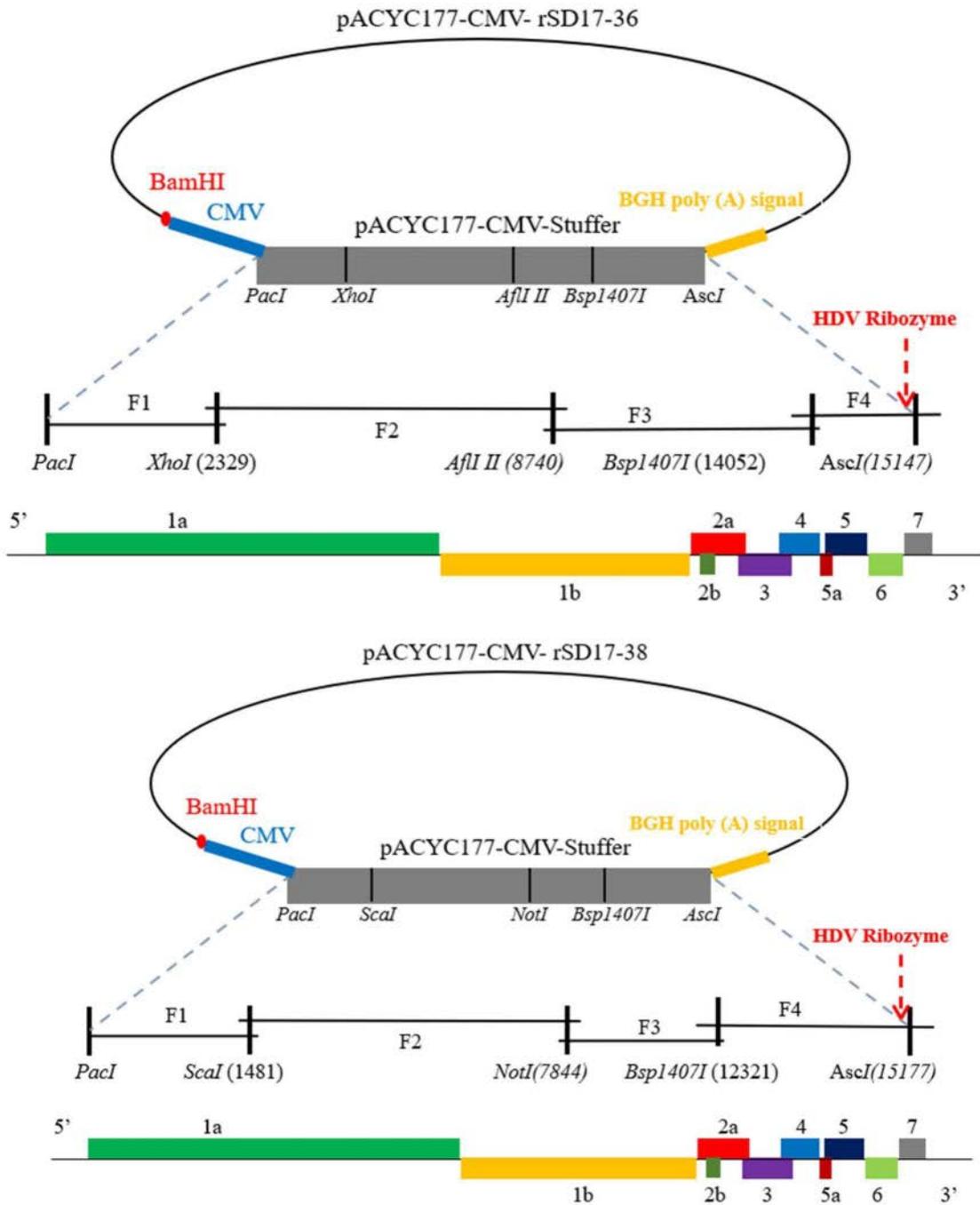


图2

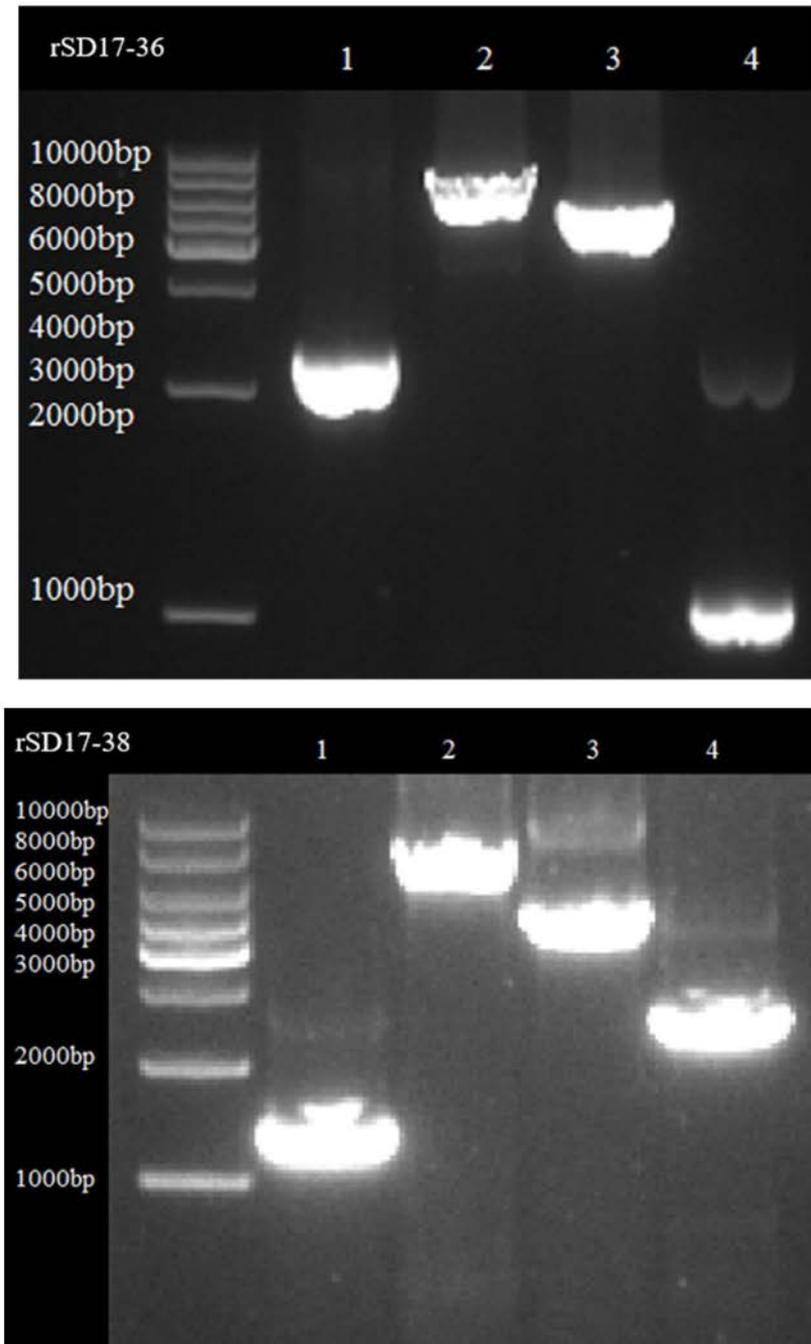


图3

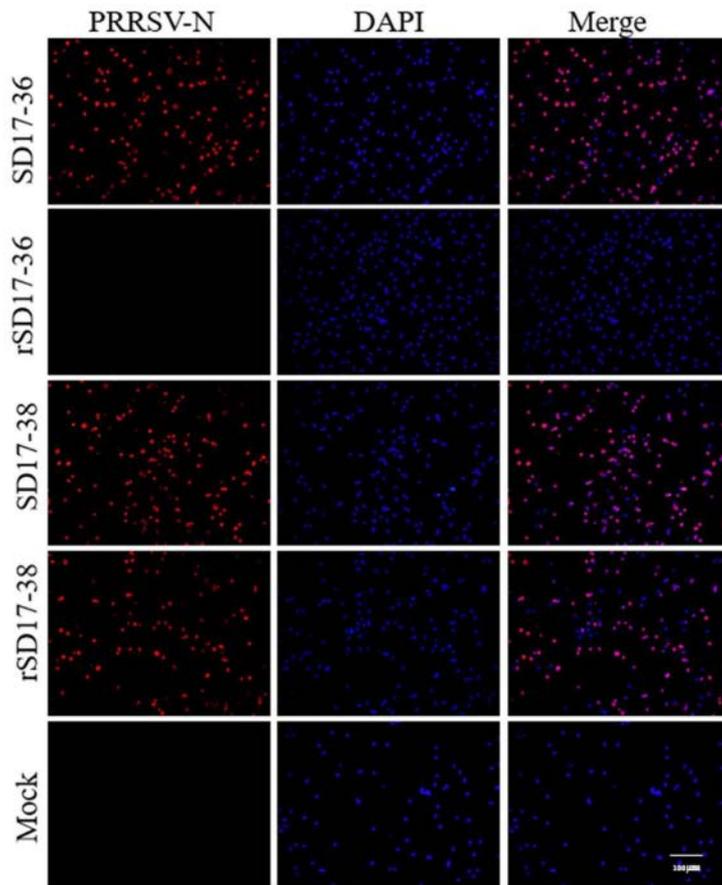


图4

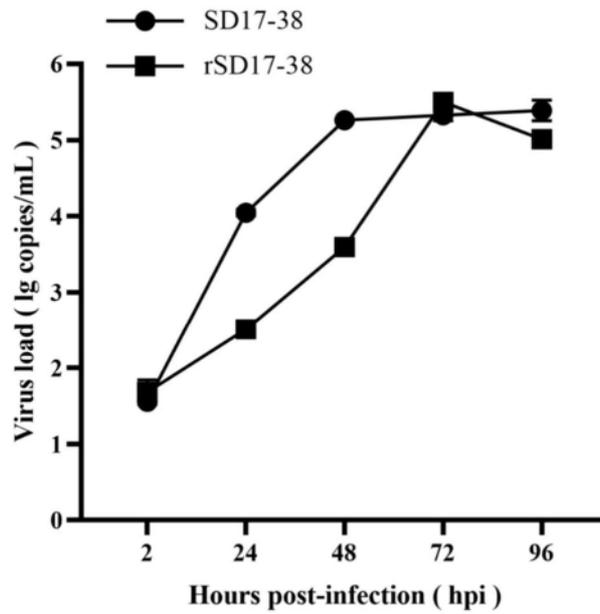


图5

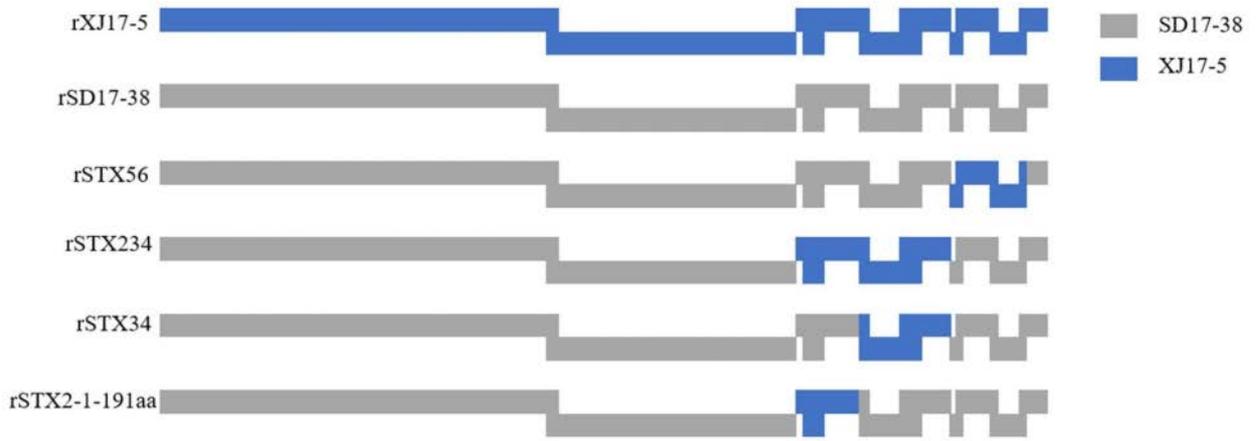


图6

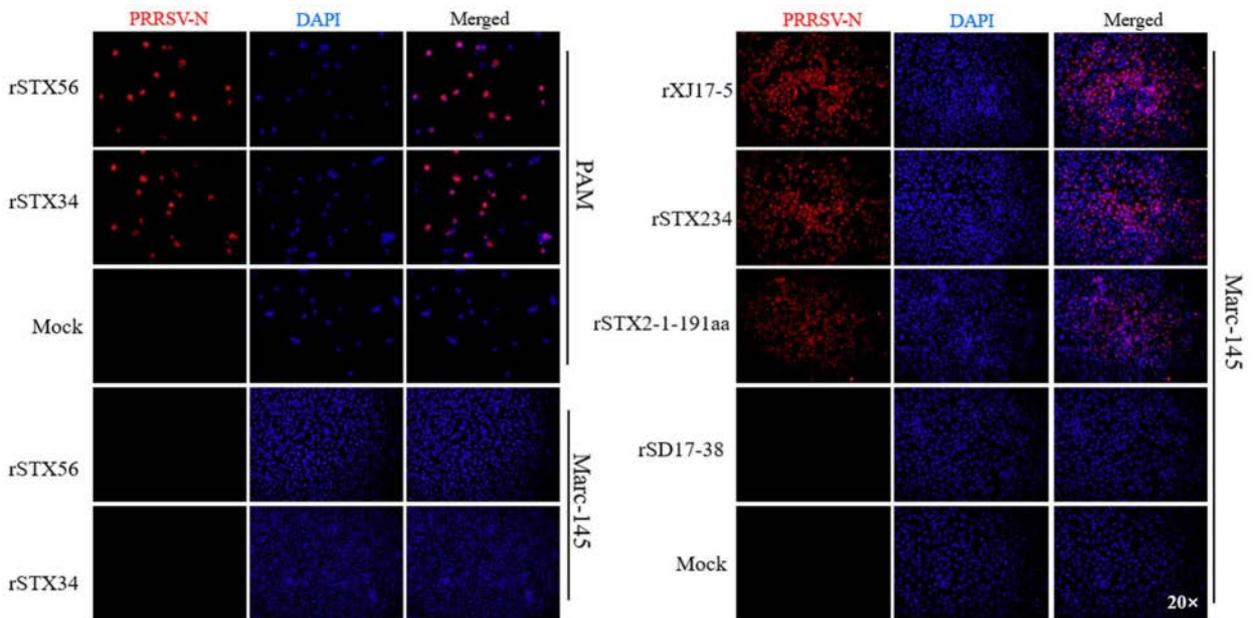


图7

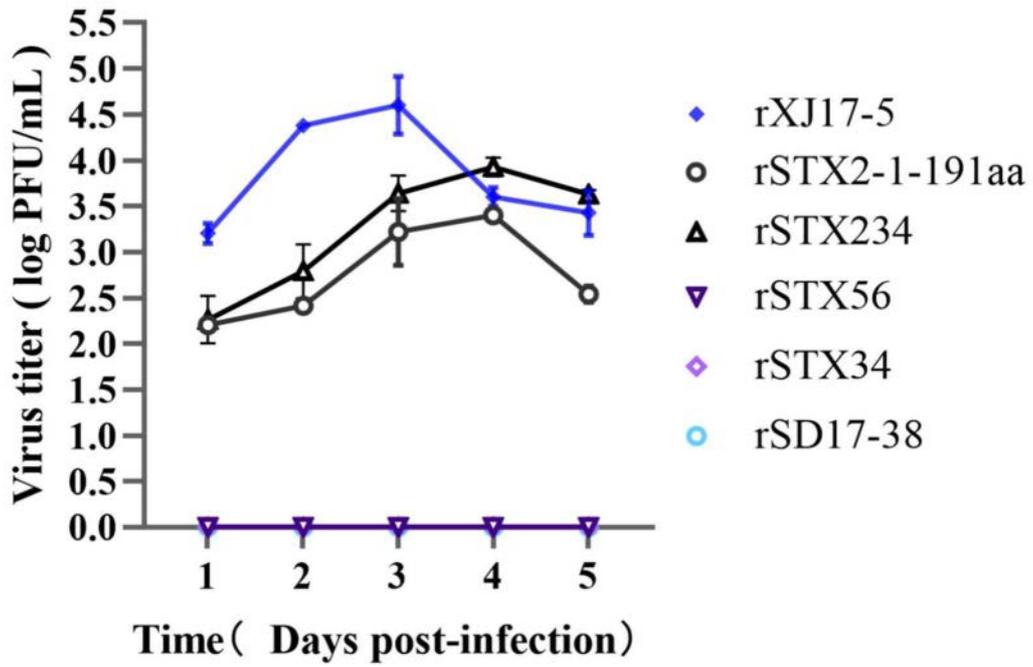


图8

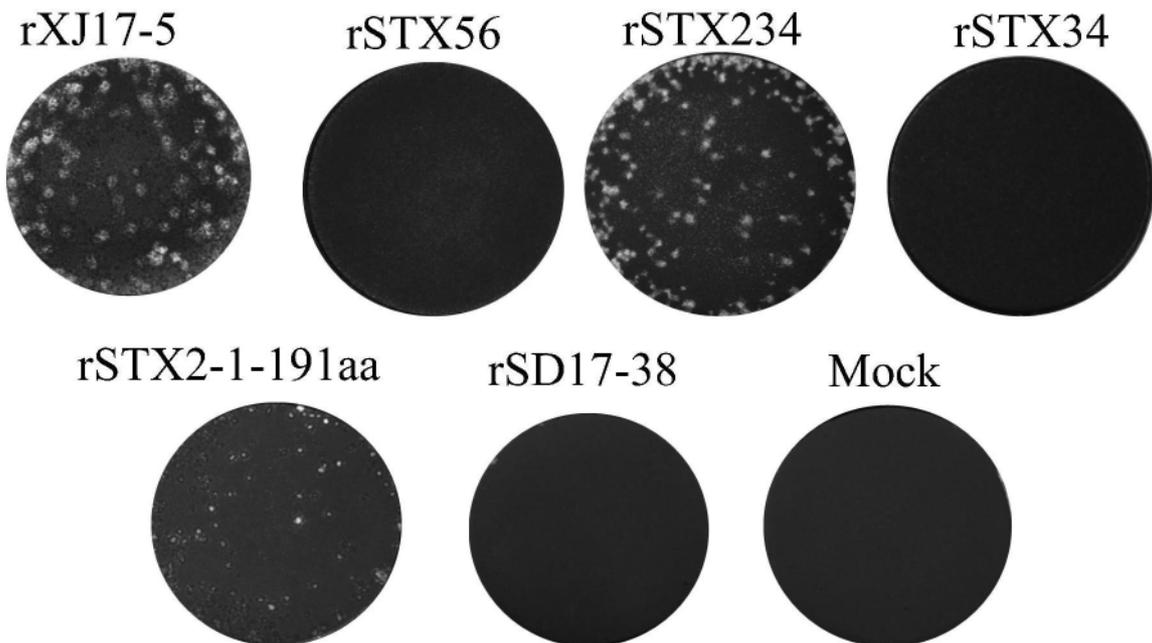


图9