

高致病性猪蓝耳病病毒 GST-Nsp2 融合

蛋白的原核表达

刘金玲¹, 魏 澍², 潘树德¹

(1.沈阳农业大学 畜牧兽医学院, 辽宁 沈阳 110866; 2.辽宁省动物疫病预防控制中心, 辽宁 沈阳 110164)

摘要: 通过对高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒(HPPRRSV) *Nsp2* 基因进行克隆表达以获得蛋白, 为该病的诊断预防奠定基础。采用自行设计的引物对高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒进行 RT-PCR 扩增, 将产物基因回收纯化测序后构建 PGEX-6P-1-Nsp2 原核表达载体, 用 BL21(DE3)细胞进行转化, 挑选阳性菌, 用 IPTG 诱导表达, 采用 SDS-PAGE 电泳和 Western-Blot 对表达产物进行鉴定。获得了 HPPRRSV *Nsp2* 基因序列, 成功构建了 PGEX-6P-1-Nsp2 原核表达载体, 经 37 °C, 4 h 获得表达产物, 将表达产物进行 SDS-PAGE 和 Western-Blot 分析, 获得了一条约 42 ku 浓缩蛋白带。本实验的克隆表达产物为高致病性蓝耳病病毒 *Nsp2* 目的蛋白。

关键词: 高致病性; 猪繁殖与呼吸综合征病毒; *Nsp2* 基因; 原核表达
中图分类号: S852.65⁺1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2286(2012)03-0546-04

Prokaryotic Expression of GST-Nsp2 Fusion Protein of Highly Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus

LIU Jin-ling¹, WEI Shu², PAN Shu-de¹

(1.College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China; 2.The Preventive Center of Animal Disease of Liaoning Province, Shenyang 110164, China)

Abstract: The study was to lay the foundation for the disease prevention and diagnosis by cloning and expressing the *Nsp2* gene of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus (HPPRRSV). The primer designed by the authors was used to amplify the *Nsp2* gene of Highly Pathogenic Porcine repro respiratory syndrome virus by reverse transcriptase polymerase chain reaction, and the gene was cloned into PGEX-6P-1 vector after the *Nsp2* gene of HPPRRSV was purified and sequenced, after that, the recombinant plasmid PGEX-6P-1-Nsp2 was obtained. The full plasmid was transferred into *E. coli* BL21 (DE3) bacteria and the bacteria containing the positive plasmid were selected, the total expressed protein was harvested and extracted and then identified by SDS-PAGE and Western-Blot. *Nsp2* gene of HPPRRSV and the recombinant plasmid PGEX-6P-1-Nsp2 were obtained, and then, the expressed proteins induced with IPTG for 4 hours later at 37 °C were harvested. The analysis showed that the molecular weight of the fusion protein was approximately 42 ku in agreement with the expect. The cloning and expression product in this study was the *Nsp2* protein of HP PRRSV.

Key words: highly pathogenic; PRRSV; *Nsp2* gene; prokaryotic expression

高致病性猪蓝耳病是由猪繁殖与呼吸综合征(俗称蓝耳病)病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)变异株引起的一种急性高度致死性疾病^[1-2], 该病自 2006 年在全国范围内流行出现, 给我国的养猪业造成了巨大的经济损失^[3]。从目前国内多个实验室分离的病毒的序列分析来看, 高致病性猪蓝耳病病毒与猪蓝耳病病毒出现了较大的变异, 国内分离株均在 *Nsp2* 蛋白处有约 30 个氨

收稿日期: 2012-02-07 修回日期: 2012-04-09

基金项目: 国家科技攻关项目(413010209)和沈阳农业大学校青年基金项目(200705)

作者简介: 刘金玲(1977—), 女, 讲师, 博士, 主要从事微生物与免疫学研究, E-mail: LjLfree@sina.com。

氨基酸残基的缺失^[4]。高致病性蓝耳病病毒基因组为 dsRNA, 大小约 15 kb, 含有 8 个 ORF, 其中 ORF1 编码聚合蛋白, 其裂解产生可以产生 12 个非结构蛋白(Nsp1-12), 而 ORF2~7 编码 6 种结构蛋白。目前国内外学者对高致病性蓝耳病病毒的主要结构蛋白的生物学特性已做了大量的相关性研究, 而对非结构蛋白的生物学功能研究的相对较少。在高致病性蓝耳病病毒的 12 个非结构蛋白中, 只有 Nsp9 和 Nsp10 被证实有复制酶和解旋酶活性外^[5], 其他 10 个非结构蛋白的确切功能还没有被证实。目前, 还没有关于高致病性 PRRSV 的 Nsp2 蛋白的确切结构和功能特征报道以及 Nsp2 蛋白的生物学和临床意义还未被完全阐明, 对于 Nsp2 蛋白的了解都是依靠生物信息学手段较而获得的, 因此开展对该 Nsp2 蛋白的研究具有重要意义。大肠杆菌表达系统具有遗传背景清楚、使用安全、操作简便、周期短, 可以大规模发酵培养的优点, 是现阶段蛋白质结构生物学研究中基因表达的首选系统。本研究拟利用自己构建的原核高效表达系统 PGEX-6P-1 体外表达高致病性 PRRSV LN 分离株的 Nsp2, 以期为该蛋白的结构和功能、制备单克隆抗体、建立检测抗非结构蛋白抗体的血清学诊断方法等方面奠定物质基础。这对于辽宁地区高致病性 PRRS 的流行病学调查、病原学研究、强弱毒感染的诊断均具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

高致病性猪蓝耳病病毒由沈阳农业大学预防兽医实验室提供, PGEX-6p-1 质粒载体由中国医科大学惠赠, IgG-HRP 羊抗鼠、GST 单抗、DAB 显色试剂盒、感受态细胞 *E.coli* BL21(DE3) 购自天根生物技术有限公司。蛋白(低)Maker、DL1500 DNA Marker、限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I、AMV 反转录试剂盒购自大连宝生物工程有限公司; Trizol 购自凯基生物科技发展有限公司; *Taq* DNA Polymerase 购自上海生工生物工程技术服务有限公司; DNA 胶回收试剂盒和小量质粒 DNA 提取试剂盒购自北京赛百盛生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 扩增与检测 根据 NCBI GeneBank 发表的 HPPRRSV Nsp2 基因的核苷酸序列设计引物, 上游 5'ACTCGAGAGCCGATGACAC-CTATGAGTGAGCC3', 下游 5'ATTCCAAACCTGCCATTAAAGATGCGAAA 3'。参照 Trizol 裂解法提取 HPPRRS 病毒 RNA, 按照 AMV 反转录试剂盒操作说明将提取的病毒 RNA 反转录成 cDNA 后按如下步骤进行作为 PCR 反应。取 cDNA 2.0 μ L, Mg^{2+} 1.5 μ L, dNTP 0.5 μ L, 上下游引物各 0.5 μ L, 10 \times PCR Buffer 2.0 μ L, *Taq* DNA 酶 0.5 μ L, DEPC 水 12.5 μ L 共 20 μ L 反应体系, 充分混匀。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 59 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s 延伸共 40 个循环, 循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 最后用 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测。

1.2.2 PCR 产物的胶回收与测序 扩增反应体系按上述方法获得 100 μ L Nsp2 基因的 PCR 产物, 经 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测后, 切下含有 Nsp2 基因的 DNA 片段的凝胶(约 100 mg)放入灭菌的 1.5 mL 离心管。按照北京赛百盛胶回收试剂盒说明书回收 PCR 产物, 将纯化后的 PCR 产物送沈阳联星生物有限公司测序。

1.2.3 PEGX-6p-1-Nsp2 重组载体的构建及鉴定 将从菌液中提取的质粒 PGEX-6p-1 和纯化后的 PCR 产物在 37 $^{\circ}$ C 分别用限制性内切酶 *Xho* I、*EcoR* I 进行双酶切并过夜。纯化酶切后的目的基因片段和质粒载体, 并用 T4DNA 连接酶在 16 $^{\circ}$ C 连接并过夜。然后, 将连接产物转入宿主细胞 *E.coli* BL21 (DE3) 中, 在含 Amp LB 固体培养基 37 $^{\circ}$ C 培养 12 h 后, 挑取单个光滑均匀的菌落在含 Amp LB 液体培养基培养并过夜。用质粒提取试剂盒从菌液中提取重组质粒, 并以其为模板进行 PCR 扩增和酶切, 鉴定结果为阳性重组体后送沈阳联星生物公司测序。

1.2.4 GST-Nsp2 融合蛋白的 IPTG 的诱导表达及 SDS-PAGE 检测 将含有 PEGX-6p-1-Nsp2 重组质粒的菌液 37 $^{\circ}$ C 培养后, 取 20 μ L 放入新配置的含 Amp 的 LB 液体培养基 37 $^{\circ}$ C 摇床震荡培养, 测量菌液 OD₆₀₀ 达到 0.5~1.0 后, 加入 40 μ L 100 mmol/L 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranoside, IPTG) 诱导表达 4 h, 收获菌体。用 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)对表达的蛋白产物进行电泳检测。

1.2.5 Western-Blot 鉴定 将含有目的蛋白的 SDS-PAGE 凝胶, 在 100 V 电压, 室温的条件下进行硝酸纤维素(nitrocellulose, NC)转膜, 1.5 h 后, 在将 NC 膜放入 15 g/L 脱脂乳中 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h, 用 PBST 漂洗 NC 膜 3 次, 每次 5 min, 加入一抗(GST 单抗 1:500 稀释)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 再用 PBST 漂洗 NC 膜 3 次/5 min, 最后用二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显示试剂盒进行染色约 1 min 终止反应。

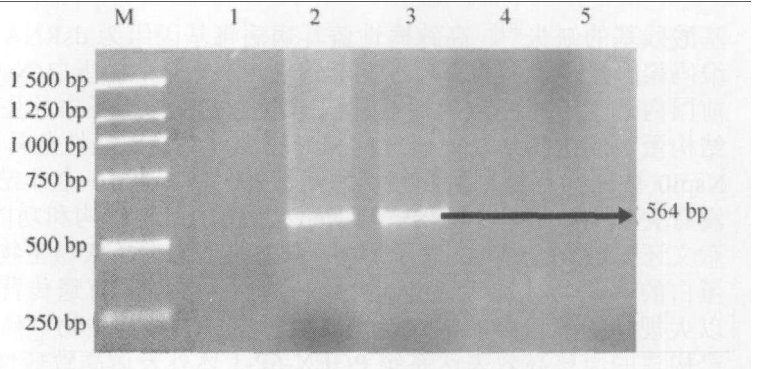
2 结果

2.1 RT-PCR 检测与测序结果

RT-PCR 产物为 564 bp 与预测结果相符 (图 1), PCR 产物测序结果与 GenBank 上公布的高致病性蓝耳病 *Nsp2* 序列进行同源性比较, 同源性为 91% 以上 (图 2)。

2.2 重组质粒 PGEX-6p-1-Nsp2 酶切鉴定与测序结果

重组质粒 PGEX-6p-1-Nsp2 双酶切后分别在 564 bp 和 4 900 bp 有带(图 3), 重组质粒测序结果与 PCR 产物的测序结果进行对比结果完全一致, 这表明成功的构建了 PEGX-6p-1-Nsp2 原核表达载体。



1:蓝耳病毒对照;2,3:高致病性猪蓝耳病毒 PCR 产物;4:空白对照;5:猪瘟疫病毒 PCR 对照;M:DL1500 Marker 对照

Lane1: PRRSV PCR product; Lane2-3:HPPRRSV PCR product; Lane 4: Blank control; Lane5 HC virus control for PCR;M:DNA Marker DL1500 control

图 1 高致病性猪蓝耳病毒 *Nsp2* 基因的 RT-PCR 扩增
Fig.1 The Amplification for *Nsp2* gene of HPPRRS by RT-PCR

		Percent identity					
		1	2	3	4	5	6
Divergence	1	■	91.6	91.6	99.6	90.7	92.0
	2	9.0	■	100	92.0	92.0	97.5
	3	9.0	0.0	■	9.2	92.0	97.5
	4	0.4	8.6	8.6	■	91.1	92.4
	5	10.1	8.6	8.6	9.6	■	92.4
	6	8.6	2.6	2.6	8.1	8.1	■
		1	2	3	4	5	6

1:江西株;2:河北株;3:河南株;4:广东株;5:辽宁株;6:山西株。

1:JX strain;2:HB strain;3:HN strain;4:GD strain;5:LN strain; 6: SX strain.

图 2 高致病性猪蓝耳病毒基因同源性比较
Fig.2 Comparing of gene homology analysis for HPPRRSV

2.3 GST-Nsp2 融合蛋白 SDS-PAGE 凝胶分析及纯化

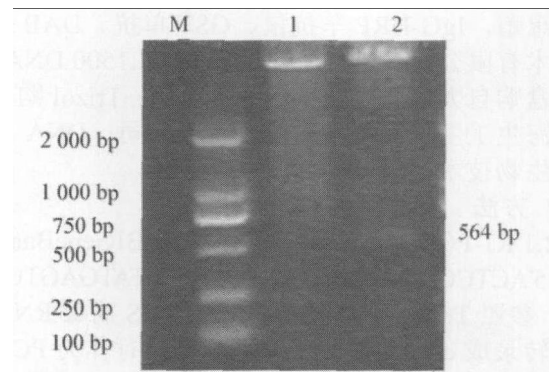
将阳性菌液诱导表达 4 h 后,收获菌体并相应处理,然后进行 12%SDS-PAGE 不连续凝胶电泳分析,对阳性菌表达产物在 42 ku 有带,而对空质粒 (PGEX-6p-1) 的表达在 26 ku 有带(图 4)。

2.4 Western-Blot 鉴定

含有目的蛋白的 SDS-PAGE 凝胶转移到 NC 膜上,并对 NC 膜进行封闭、一抗、二抗孵育,然后对其 DAB 显色,结果发现在约 42 ku 有一条棕色带(图 5),这表明 GST-Nsp2 融合蛋白在大肠杆菌中成功的获得了表达。

3 讨论与结论

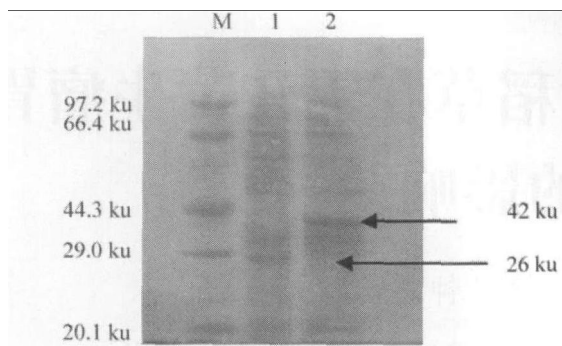
近年来,国内外学者对高致病性 PRRSV 的 *Nsp2* 尤为关注。首先, *Nsp2* 是一个复合功能蛋白,具有 3C 样半胱氨酸蛋白酶活性;其次 *Nsp2* 基因是高致病性 PRRSV 基因组中变异最大的区域,基因的突变、缺失和插入呈多态性;再者, *Nsp2* 上有丰富的抗原表位,具有较强的免疫原性^[6]。 *Nsp2* 是高致病性 PRRSV 基因组中变异最大的一个的基因,其变异主要表现在中部区域, N 端和 C 端被认为比较保守。本研究选取 LN 高致病性 PRRSV 分离株,针对 *Nsp2* 的相对保守区设计表达引物扩增 *Nsp2* 基因并与国内不同毒株进行同源性比较,测序结果分析与 GenBank 公布的早期毒株序列的同源性比较均为 91% 以上,而与近两年 GenBank 公布的毒株 JX2006、HN2007 和 HB2008 等同源性比较分别为 90.7%、



M:DL 2 000;1:PGEX-6p-1 酶切产物阴性对照;2:PGEX-6p-1-Nsp2 酶切产物。

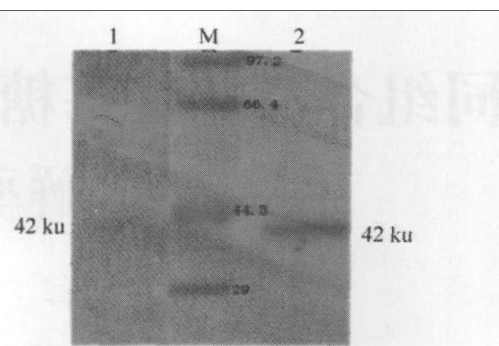
M:DNA maker DL2000; Lane1:PGEX-6p-1 control; Lane2: PGEX-6p-1-Nsp2 product.

图 3 重组质粒 PGEX-6p-1-Nsp2 酶切鉴定
Fig.3 Identification of recombinant plasmid PGEX-6p-1-Nsp2 by restriction enzyme



M:蛋白 Maker;1:PGEX-6p-1 表达产物;2:PGEX-6p-1-Nsp2 表达产物。
M:Protein maker; Lane1:PGEX-6p-1 expression product; Lane2:PGEX-6p-1-Nsp2 product

图4 12%SDS-PAGE 凝胶电泳检测
Fig.4 12%SDS-PAGE



M:蛋白 Maker;1:GST-Nsp2 融合蛋白 NC 膜印记;2:GST-Nsp2 融合蛋白 SDS-PAGE。

M:Protein maker; Lane1:Footprint of NC membrane for PGEX-6p-1-Nsp2 fusion expression protein;Lane2: SDS-PAGE of PGEX-6p-1-Nsp2 product fusion expression protein.

图5 Western-Blot 鉴定结果
Fig.5 Western-Blot Identify Result

92%和 92%，说明高致病性 PRRSV LN 分离株与国内其他地区分离株核苷酸同源性较高。同时利用生物学软件 GOLDKEY 分析其抗原性、亲水性、疏水性等，利用表效率较高的 pGEX-6P-1 系统表达毒株的 Nsp2 蛋白，结果目的蛋白在该系统得到成功表达，为建立区分传统毒株和变异毒株感染的特异性 ELISA 方法的建立提供了可能，也为进一步研究 Nsp2 蛋白的变异性与毒力的关系及 Nsp2 蛋白的生物学和免疫学活性奠定了基础^[7-9]。pGEX-6P-1 原核表达载体系统与其他表达系统相比具有使用安全、操作简便、周期短，可以大规模发酵培养的优点。本研究采用该表达系统成功表达 Nsp2 蛋白，SDS-PAGE 和 WesternBlot 结果提示该蛋白为本实验的目的产物。另外，Nsp2 蛋白为病毒非结构蛋白，只在病毒增殖复制时产生，这在诊断和血清学调查上的价值很大^[10-12]。所以 Nsp2 蛋白在生产实践中作为一项重要指标，对检测猪群的感染率及强弱毒感染的研究具有重要意义。作为本研究的后续，可以通过建立 ELISA 试剂盒的方式用于临床检测抗体(此工作尚在进行中)，还可以达到区分 PRRSV 是疫苗毒还是野毒感染的目的，同时用表达的蛋白替代 PRRSV 全基因产物作为诊断抗原，可以提高诊断的特异性。本试验研究成功的构建了表达载体 PGEX-6p-1-Nsp2，并利用宿主细胞进行外源性原核表达，成功的获得了 GST-Nsp2 融合蛋白，为高致病性 PRRSV 诊断和 Nsp2 功能研究奠定了重要的基础。

参考文献:

- [1] 郑芹,郭万正,胡立学.猪“高热病”:高致病性猪蓝耳病的防治[J].养殖与饲料,2007(6): 21-22.
- [2] 刘书亮,王红宁.PRRS 的病原学和免疫学研究进展[J].四川畜牧兽医,2000,2(113):78-81.
- [3] Leman A D, Straw B E, Mengeling W L, et al. Diseases of Swine (7th edited) [M]/Taylor. The porcine reproductive and respiratory virus. Lodon:Lowa State University Press,1997:756-762.
- [4] 王守山,李玉保,孟喜龙,等.猪繁殖与呼吸综合征病毒 SYBR Green I 荧光定量 RT-PCR 方法的建立[J].江西农业大学学报,2009,31(6):1074-1078.
- [5] Bautista E M, Faaberg K S, Mickelson D, et al. Functional properties of the predicted helicase of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. Virology, 2002, 298(2):258-270.
- [6] Oleksiewicz M B, Botner A, Toft P, et al. Epitope mapping porcine reproductive and respiratory virus by phage display the NSP2 fragmentation of the replicase polyprotein contains a cluster of B cell epitopes[J]. J Virol, 2001, 75(7):3277-3290.
- [7] 孙颖杰,孙延峰,潘凤城,等.猪繁殖和呼吸综合征的检疫和诊断[J].中国兽医杂志,1997,23(2):89-91.
- [8] 杨汉春,管山红,尹晓敏,等.猪繁殖与呼吸综合征病毒的分离与初步鉴定[J].中国兽医杂志,1997,23(10):89-91.
- [9] 姜平,简中友,马志永,等.我国猪繁殖和呼吸综合征病毒分离与鉴定[C].中国畜牧兽医学学会家畜传染病学分会论文集,1997:242-244.
- [10] Allende R, Lewis T, Lu Z, et al. North American and European Porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in nonstructural protein coding regions[J]. Gen Virol, 1999, 80:307-315.
- [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, 145:871-883.
- [12] Johnson C, Wanqin Y, Murtaugh M. Cross-reactive antibody responses to Nsp1 and Nsp2 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. J Gen Virol, 2007, 88:1184-1195.