

猪繁殖与呼吸综合征病毒 nsp7 蛋白的表达与纯化

刘永晖¹, 张改平², 乔松林², 刘明阳¹, 蒋志政¹, 王蕊¹,
万博², 鲍登克², 王爱萍^{1*}

(1. 郑州大学 生物工程系, 河南 郑州 450001; 2. 河南省农业科学院 农业部动物免疫学
重点开放实验室/河南省动物免疫学重点实验室, 河南 郑州 450002)

摘要: 为了解 nsp7 重组蛋白的免疫学活性, 采用 RT-PCR 的方法从猪繁殖与呼吸道综合症病毒 (PRRSV) BJ-4 毒株中扩增得到 *nsp7* 基因, 将基因连接到 pET-28a 载体并转化至大肠杆菌 BL21 中进行诱导表达, 利用 Ni-NTA 进行亲和纯化, 通过 SDS-PAGE 和 Western-blot 对重组蛋白进行分析和鉴定, 通过间接 ELISA 方法研究了重组蛋白的免疫学活性。结果表明, 成功制备了 nsp7 重组蛋白, 间接 ELISA 结果表明, 重组蛋白具有良好的免疫活性, 为建立 nsp7 特异性抗体的间接 ELISA 检测方法以及 PRRS 诊断试剂盒的研制奠定了基础。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合症病毒; nsp7 蛋白; BJ-4 病毒; 原核表达

中图分类号: S828 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2012)05-0141-04

Prokaryotic Expression and Purification of Nonstructural Protein 7 of PRRSV

LIU Yong-hui¹, ZHANG Gai-ping², QIAO Song-lin², LIU Ming-yang¹, JIANG Zhi-zheng¹,
WANG Rui¹, WAN Bo², BAO Deng-ke², WANG Ai-ping^{1*}

(1. Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China;
2. Key Laboratory of Animal Immunology of the Ministry of Agriculture/Henan Provincial Key Laboratory
of Animal Immunology, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: To investigate the immunological activity of nsp7 recombinant protein, the PRRSV BJ-4 *nsp7* gene amplified by RT-PCR was sub-cloned into the Escherichia coli expression vector pET-28a. The recombinant protein was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) and purified by Ni-chelation. After purification, the recombinant protein was analyzed by SDS-PAGE and western blot. The immunogenicity of nsp7 protein was evaluated by ELISA. The results showed that the nsp7 protein was expressed successfully and the recombinant protein had immunological activity which could be recognized by the porcine positive serum. This assay provided theoretical support for constructing indirect-ELISA of nsp7 recombinant protein.

Key words: PRRSV; nsp7 protein; BJ-4 strains; prokaryotic expression

猪繁殖与呼吸综合征 (PRRS) 也称蓝耳病, 由猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 引起, 其主要特征为母猪流产和仔猪呼吸障碍, 给世界养猪业带来了巨大的经济损失^[1]。国际上将 PRRSV 分为以

ATCC VR-2332 为代表的美洲型和以 LV 为代表的欧洲型^[2]。我国学者郭宝清等于 1996 年首次报道了从流产胎儿中分离到 PRRSV^[3]。目前我国所分离的毒株多为美洲型 PRRSV, 但也有少量欧洲

收稿日期: 2011-12-30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30730068)

作者简介: 刘永晖 (1983-), 男, 北京怀柔人, 在读硕士研究生, 研究方向: 动物免疫学。E-mail: bjliuyonghui@163.com

* 通讯作者: 王爱萍 (1970-), 女, 青海西宁人, 教授, 主要从事动物免疫学研究。E-mail: pingaw@126.com

型 PRRSV^[4]。

猪繁殖与呼吸道综合征病毒为有囊膜的不分节单股正链 RNA 病毒,基因全长约 15 kb,包括 8 个开放阅读框,其相邻的开放阅读框均有部分重叠^[5-6]。占基因组较大部分的(约 80%)是 ORF1,包括 ORF1a 和 ORF1b。ORF1a 和 ORF1b 分别编码 pp1a 和 pp1ab 蛋白,pp1a 最终裂解成 9 个非结构蛋白,分别为: nsp1 α 、nsp1 β 和 nsp2—nsp8^[7], pp1ab 蛋白最终裂解为 nsp9—nsp12。由 pp1a 蛋白裂解产生的蛋白主要功能是参与其他 nsp 蛋白的加工,而 nsp9—nsp12 参与病毒的转录和复制^[8]。研究表明, nsp7 蛋白有很强的免疫原性,当猪体内感染 PRRSV 后,14 d 就可以检测到 nsp7 抗体的存在,并且这种抗体水平一直持续到 202 d 以后^[9]。为了解 nsp7 重组蛋白的免疫学活性,本试验表达和纯化了 nsp7 蛋白,并分析重组 nsp7 蛋白的抗原性,为研制检测 PRRSV 血清抗体的试剂盒奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

BJ-4 病毒、原核表达质粒 pET-28a 由河南省动物免疫学重点实验室保存,大肠杆菌克隆菌株 DH5 α 、表达菌株 BL21、核酸胶回收纯化试剂盒、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Bam*H I、限制性内切酶 *Xho* I、*Ex Taq* 酶均购自宝生物工程(大连)有限公司,质粒 DNA 小量回收试剂盒购自爱思进生物技术(杭州)有限公司,AEC 酶底物试剂盒购自北京中衫金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 *nsp7* 基因扩增引物的合成 根据 GenBank 中 *nsp7* 基因的核苷酸序列(AF331831.1),利用 Primer5.0 软件设计 *nsp7* 基因引物。上游引物为 nsp7F: 5'-CGCGGATCCTCTCTGACTGGTGC-CCTCGCTATG-3',下游引物为 nsp7R: 5'-CCGCTCGAGTTCCATTGAAGTCTTCCAT-3' (下划线分别为 *Xho* I 和 *Bam*H I 的酶切位点),引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.2.2 *nsp7* 基因的扩增和重组质粒的构建 取冷冻保存的 PRRSV BJ-4 细胞株培养液按照 RNA 提取试剂盒 Trizol 说明书进行 RNA 提取。按照反转录酶说明书进行反转录,PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 58 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定并回收。将 *nsp7* 基因的 PCR 产物进行 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切,同时将 pET-28a 载体进行同样

条件的双酶切,将酶切产物进行连接得到 pET28a-nsp7 重组质粒,将重组质粒转化至 BL-21 感受态细胞中得到 pET28a-nsp7/BL-21 重组菌,提取质粒进行双酶切鉴定和 PCR 鉴定,重组质粒送往宝生物工程(大连)有限公司进行测序。

1.2.3 *nsp7* 蛋白的表达、可溶性分析和 Western-blot 检测 对重组菌 pET28a-nsp7/BL-21 经 1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达,每隔 2 h 取 1 mL 菌液,诱导表达 8 h 后,收集诱导菌液并超声破碎,离心后收集上清和沉淀,通过 SDS-PAGE 进行诱导表达鉴定和可溶性分析。电泳分离 nsp7 表达蛋白,通过电转印记于 NC 膜上,以 PRRSV 阳性血清为一抗,HRP 标记的抗猪的 IgG 为二抗进行 Western-blot 分析。

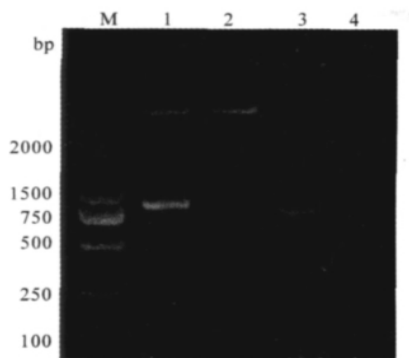
1.2.4 *nsp7* 蛋白的纯化 培养 400 mL pET28a-nsp7/BL-21 表达菌,待 OD₆₀₀ 为 0.8 时,加入 IPTG,使其终浓度为 1 mmol/L,37 $^{\circ}$ C 下诱导表达 8 h,离心收集诱导表达菌体,经超声破碎后离心收集上清,按 Ni-NTA 标签纯化树脂使用说明书亲和纯化表达蛋白,以 ND-1000 微量分光光度计测定蛋白浓度。

1.2.5 间接 ELISA 法分析重组蛋白的抗原性 为了研究所表达的重组 nsp7 蛋白作为诊断抗原的可能性,采用棋盘滴定法,确定重组 nsp7 蛋白作为包被抗原的最佳浓度,通过与阳性血清和阴性血清的反应(血清经 IDEXX 试剂盒检测),验证重组 nsp7 蛋白的抗原性。具体步骤如下:以 pH 值为 9.6 的碳酸盐缓冲液将重组蛋白稀释成不同浓度包被酶标板,每孔加入 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 下反应 2 h,PBST 洗 3 次;加入 5% 的脱脂奶 4 $^{\circ}$ C 条件下封闭过夜,PBST 洗 3 次;加入 100 μ L 5% 脱脂奶 1:40 稀释的阳性血清和阴性血清。37 $^{\circ}$ C 下反应 30 min,PBST 洗 3 次;加入 HRP 标记的羊抗猪的酶标二抗,7 $^{\circ}$ C 下反应 30 min,PBST 洗 3 次后加入 TMB 显色,并由 2 mmol/L 的硫酸进行终止,P/N \geq 2.1 结果判为阳性。

2 结果与分析

2.1 *nsp7* 基因的扩增与重组质粒的构建结果

以提取的 PRRSV BJ-4 株总 RNA 为模板,经过 RT-PCR 扩增后得到大约 770 bp 的片段,与预期的大小相符。重组质粒 pET28a-nsp7 进行 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切得到分别大小约为 5 400 bp 与 770 bp 的 2 个片段,与预期的结果相符(图 1)。测序的结果与预期的结构相符。

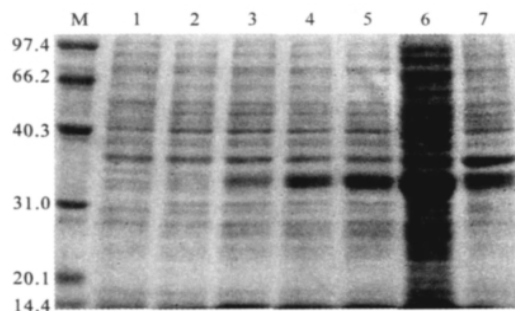


M. DNA Marker(DL2000); 1. pET28a-nsp7 双酶切条带; 2. pET28 a 双酶切带; 3. pET28a-nsp7 PCR 鉴定; 4. pET28a PCR 鉴定

图 1 重组质粒 pET28a-nsp7 PCR 和双酶切鉴定图谱

2.2 nsp7 蛋白的表达、纯化和 Western-blot 检测结果

重组质粒 pET28a-nsp7 转化至 BL21(DE3),经 IPTG 诱导表达后,产物经 SDS-PAGE 进行鉴定(图 2)。结果表明,在约 30 kD 处重组质粒 pET28a-nsp7 比空白载体 pET-28a 明显多了一条较浓的蛋白带,



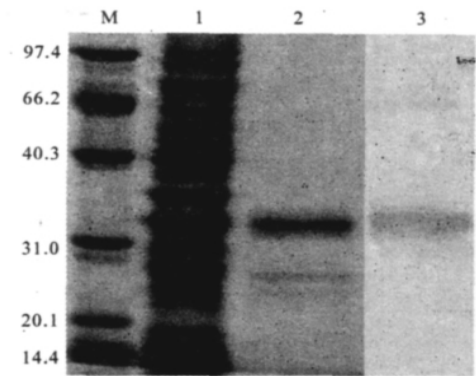
M. 标准蛋白质 Marker; 1. pET-28a; 2. 诱导 2 h; 3. 诱导 4 h; 4. 诱导 6 h; 5. 诱导 8 h; 6. 上清; 7. 沉淀

图 2 不同诱导时间下 nsp7 重组蛋白的表达结果

说明 nsp7 在大肠杆菌 BL21 中获得了高效表达,此外诱导表达蛋白 8 h 含量达到最高,并且表达蛋白存在于上清中,为可溶性蛋白。离心收集诱导表达菌体,菌液经超声破碎后离心收集上清,依据 Ni-NTA 标签纯化树脂使用说明亲和纯化表达蛋白,并经过 SDS-PAGE 进行鉴定后得到大小约为 30 kD 的目的蛋白,与预期的结果一致。对纯化得到的蛋白进行 Western-blot 检测,结果仅有 1 条明显的带(图 3),说明表达的重组蛋白与 PRRSV 阳性血清发生特异性反应。

2.3 间接 ELISA 法分析重组蛋白的抗原性

为了解表达的重组 nsp7 蛋白的免疫学活性,探讨其作为诊断抗原的可能性,将纯化蛋白包被酶标板,检测猪阳性血清。结果如表 1 所示,结果表明:



M. 标准蛋白质 Marker; 1. 超声破碎上清液; 2. 蛋白纯化洗脱液; 3. Western-blot

图 3 pET28a-nsp7 蛋白的纯化和 Western-blot 结果

当蛋白包被浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,阳性血清的 OD_{450} 值(1.327)与阴性血清的 OD_{450} 值(0.131)有很大的差异,能够很好的区分阳性血清和阴性血清,表达的重组 nsp7 蛋白具有很好的免疫学活性。

表 1 间接 ELISA 分析重组蛋白的抗原性的结果

参考血清	抗原稀释度/ $(\mu\text{g}/\text{mL})$			
	7.5	3.75	1.875	0.94
阳性血清(OD_{450})	1.209	1.327	1.327	1.288
阴性血清(OD_{450})	0.150	0.140	0.131	0.129
空白对照(OD_{450})	0.058	0.092	0.071	0.062
P/N	14.23	17.95	20.95	21.47

3 讨论

猪繁殖与呼吸综合症给养猪业造成巨大的经济损失,早期诊断对于该病预防与控制具有非常重要的意义^[10-12]。血清学检测方法是该病重要的诊断方法。大量的研究表明,N 蛋白具有很强的免疫原性,能够用于检测 PRRSV 感染^[1],美国的 IDEXX HerdChek PRRS 2XR ELISA 试剂盒就是选用此蛋白作为抗体检测蛋白。然而,研究表明此种检测方法存在大量的假阳性,因此有必要寻找一个其他的蛋白代替 N 蛋白用于血清抗体的检测。

到目前为止,我国所分离的 PRRSV 毒株多为美洲型,也有少量的欧洲型,PRRSV BJ-4 毒株属于美洲型。研究结果表明,nsp7 基因在同一基因型中是高度保守的序列,其氨基酸序列在同一基因型的同源性达到 90% 以上^[13]。当猪体内感染 PRRSV 后,14 d 就可以检测到 nsp7 抗体的存在,这种抗体水平一直持续到 202 d 以后。因此,以 nsp7 作为抗原,用于检测血清抗体,对于检测猪 PRRSV 感染具有十分重要的意义。

nsp7 蛋白为非结构蛋白,其主要功能是参与其他 nsp 蛋白的加工,因此,该蛋白在猪体内存在的水平可以反映 PRRS 病毒在猪体内感染状况。本试验成功构建了 pET28a-nsp7 表达载体,表达和纯化了 nsp7 重组蛋白,并用间接 ELISA 法初步分析了重组蛋白 nsp7 的抗原性,为进一步研究基于 nsp7 蛋白的快速诊断技术提供了必要的条件。

参考文献:

- [1] 钱如文.猪繁殖与呼吸综合征的发生与防制[J].现代农业科技,2009(4):302.
- [2] 冯淑平,何丹,易春华,等.广西部分地区高致病性猪繁殖与呼吸综合征的流行病学研究[J].现代农业科技,2009(1):229,238.
- [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,1996,18(2):1-4.
- [4] Chen J, Liu T, Zhu C G, *et al.* Genetic variation of Chinese PRRSV strains based on ORF5 sequence[J]. Biochem Genet, 2006, 44: 421-431.
- [5] 李彬,何孔旺,温立斌,等.我国长江流域 PRRSV ORF3 基因的遗传变异[J].华北农学报,2011,26(3):204-209.
- [6] 范博华,蒋继志,刘红梅,等.PRRS 病毒 E 基因的克隆及表达载体的构建[J].华北农学报,2006,21(1):27-30.
- [7] den Boon J A, Faaberg K S, Meulenberg J J, *et al.* Processing and evolution of the N-terminal region of the arterivirus replicase ORF1a protein: identification of two papain-like cysteine proteases[J]. J Virol, 1995, 69: 4500-4505.
- [8] Van Dinten L C, Wassenaar A L, Gorbalenya A E, *et al.* Processing of the equine arteritis virus replicase ORF1b protein: identification of cleavage products containing the putative viral polymerase and helicase domains[J]. J Virol, 1996, 70: 6625-6633.
- [9] Elizabeth Brown, Steven Lawson, Craig Welbon, *et al.* Antibody response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) nonstructural proteins and implications for diagnostic detection and differentiation of PRRSV types I and II [J]. Clinical and Vaccine Immunology, 2009, 16(5): 628-635.
- [10] 万博,鲍登克,乔松林,等.猪 α 干扰素的表达及在 PAM 细胞系中抗 PRRSV 活性检测[J].河南农业科学,2010(3):93-95.
- [11] 张凤华,卢晓燕,徐红云,等.感染 PRRSV Nsp2 基因部分缺失变异株的仔猪抗体变化规律[J].华北农学报,2011,26(3):68-71.
- [12] 詹丽娥,乔国锋,乔忠,等.猪生殖与呼吸系统综合症研究进展[J].山西农业科学,1999,27(1):73-75.
- [13] Fang Y, Kim D Y, Ropp S, *et al.* Heterogeneity in Nsp2 of Europeanlike porcine reproductive and respiratory syndrome viruses isolated in the United States [J]. Virus Res, 2004, 100(2): 229-235.
- (上接第 140 页)
- [4] Biron C A, Pien G C, Cousens L P, *et al.* Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines[J]. Annu Rev Immunol, 1999, 17: 189-220.
- [5] Argyrios N Theofilopoulos, Roberto Baccala, Bruce Beutler, *et al.* The function of type I interferons in antimicrobial immunity[J]. Curr Opin Immunol, 2000, 12: 419-424.
- [6] Mitsuharu Sato, Tadatsugu Taniguchi, Nobuyuki Tanaka. The interferon system and interferon regulatory factor transcription factors studies from gene knockout mice [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2001, 12: 133-142.
- [7] Mitsuharu Sato, Nobuyuki Tanaka, Tadatsugu Taniguchi, *et al.* Involvement of the IRF family transcription factor IRF-3 in virus-induced activation of the IFN- β gene[J]. FEBS Letters, 1998, 425: 112-116.
- [8] 曹永浩,周元聪,张仕坚,等.干扰素调节因子家族和免疫调控[J].生命的化学,2006,26(5):387-389.
- [9] Patrick Stordeur, Lionel F Poulin, Ligia Craciun, *et al.* Cytokine mRNA quantification by real-time PCR[J]. J Immunol Methods, 2002, 259: 55-64.
- [10] 冯丽丽,张丽萍,张改平,等.脂多糖对猪肺泡巨噬细胞分泌 IL-1 β 及 TNF- α 的影响[J].河南农业科学,2009(3):107-109.
- [11] Tahar Ait-Ali, Alison D Wilson, David G Westcott, *et al.* Innate immune responses to replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in isolated swine alveolar macrophages[J]. Viral Immunology, 2007, 20: 105-118.
- [12] Ramos-Payán R, Aguilar-Medina M, Estrada-Parra S, *et al.* Quantification of cytokine gene expression using an economical real-time polymerase chain reaction method based on SYBR Green I [J]. Scand J Immunol, 2003, 57: 439-445.
- [13] Marka A Valasek, Joyce J Repa. The power of real-time PCR [J]. Advances in physiology education, 2005, 29(3): 151-159.