

猪繁殖与呼吸综合征病毒 *ORF5* 基因不同编码区的表达和反应原性鉴定

周宏专^{1,2}, 徐福洲², 王金洛², 杨新建³, 史爱华², 杨 兵²

(1. 首都师范大学 生命科学学院, 北京 100037; 2. 北京市农林科学院畜牧兽医研究所, 北京 100097;
3. 北京农业职业学院, 北京 102442)

摘要: 为鉴定猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)囊膜糖蛋白 GP5 编码基因 *ORF5* 不同编码区的原核表达能力, 利用 PCR 方法分别扩增 *ORF5* 基因缺失信号肽的 D 片段、缺失信号肽和跨膜区的 L 片段、缺失信号肽的 5' 端 N 片段和缺失跨膜区的 3' 端 C 片段, 经克隆测序后分别插入原核表达载体 pET-32a 中进行原核表达, 结果显示未缺失跨膜区的 D 片段未见表达产物, 而 L 片段、N 片段和 C 片段分别表达大小约为 33, 25, 29 kDa 的融合蛋白。Western blotting 检测结果显示 L 片段表达蛋白可与 PRRS 阳性血清发生阳性反应, C 片段反应性稍弱, 而 N 片段未出现阳性反应, 证实 *ORF5* 基因编码产物的 C 端在与抗体结合的反应原性方面具有重要作用。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合征病毒; *ORF5* 基因; 原核表达; 反应原性; 跨膜区

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)03-0012-04

Prokaryotic Expression and Immunoreactivity Identification of Different Encoding Regions of the *ORF5* Gene of PRRSV

ZHOU Hong-zhuan^{1,2}, XU Fu-zhou², WANG Jin-luo², YANG Xin-jian³, SHI Ai-hua², YANG Bing²

(1. College of Life Sciences, Capital Normal University, Beijing 100037, China; 2. Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China; 3. Beijing Vocational College of Agriculture, Beijing 102442, China)

Abstract: To identify prokaryotic expression of the *ORF5* gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in different encoding regions, fragments D, L, N and C obtained by deleting the N-terminal signal peptide sequence and/or the transmembrane domain sequence of *ORF5* gene were amplified by PCR. Based on cloning and sequence. These fragments were inserted into the prokaryotic expression vector pET-32a respectively. The recombinant expression plasmids contained fragments L, N or C yielded recombinant fusion proteins of the expected sizes (33, 25 and 29 kDa respectively), but fragment D yielded no recombinant fusion protein. The recombinant fusion protein of fragment L showed strong positive reaction with PRRSV-infected swine serum by Western blotting, fragment C showed weak positive, whereas fragment N showed no positive. It indicated that the C-terminus of *ORF5* encoding protein played an important role in immunoreactivity.

Key words: PRRSV; *ORF5* gene; Prokaryotic expression; Immunoreactivity; Transmembrane domain

猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine Respiratory and Reproduction Syndrome Virus, PRRSV)为感染猪的一种危害极其严重的传染性病原,临床上以妊娠母猪繁殖障碍和仔猪呼吸道疾病为特征。PRRSV 基因组全长 15 kb, 含有 8 个开放阅读框(ORF), 编码 6

种结构蛋白和 2 种非结构蛋白, 其中 *ORF5* 基因编码病毒的糖基化包膜蛋白 GP5, 是病毒的主要结构蛋白, 参与细胞免疫与体液免疫, PRRSV 感染康复猪的血清中 GP5 的抗体滴度与中和病毒的能力呈显著相关性, 因此 GP5 蛋白在 PRRSV 免疫保护方面具有重

收稿日期: 2006-10-30

基金项目: 北京市科技新星计划资助(2004B23)

作者简介: 周宏专(1982-), 男, 江苏盐城人, 在读硕士, 主要从事基础分子免疫学研究

通讯作者: 徐福洲(1973-), 男, 山东单县人, 副研究员, 博士, 主要从事动物分子细菌学和免疫学研究。

要意义^[1-3]。研究发现 GP5 蛋白为含有信号肽的 3 次跨膜蛋白, 应用多种表达系统难以获得高效的表达^[3]。本试验通过对 ORF5 基因不同编码区分别进行原核表达, 探讨了跨膜区对该基因原核表达的影响, 为研究表达产物的生物学活性奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

PRRSV BJ-4 株 ORF5 基因重组质粒 pGEM-ORF5, 由中国农业大学农业部预防兽医学重点开放实验室构建并保存^[2]。pGEM-T Easy Vector Kit 购自 Promega 公司; pET-32a 载体购自 Invitrogen 公司; PCR 反应试剂、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; Western-blot 用 Immobilon-P PVDF 膜购自 Millipore 公司; 质粒提取试剂盒和 DNA 片段回收

试剂盒购自天根生物公司。

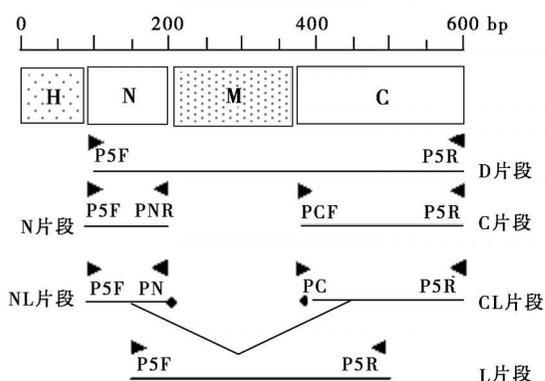
1.2 基因片段的 PCR 扩增

参照 PRRSV BJ-4 株 ORF5 基因序列 (AF331831)^[1], 采用 Primer 5.0 软件设计引物, 分别扩增 N 片段 (111 bp)、C 片段 (237 bp)、D 片段 (516 bp) 和 L 片段 (348 bp)。其中 L 片段扩增参照黄金海博士设计的方法进行^[3]。扩增不同基因片段所用引物对见图 1, 各引物的编号、序列、长度以及在 ORF5 基因中的位置见表 1。反应组分为: 引物各 0.4 μmol/L, dNTP 各 0.2 mmol/L, 模板 50 ng, Taq 酶 2 U、10 倍反应缓冲液 2.5 μL、灭菌去离子水补足至 25 μL。反应程序为: 95 °C, 5 min; 94 °C, 30 s, 56 °C, 30 s, 72 °C, 1 min, 循环 30 次; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测后用 DNA 回收试剂盒回收。

表 1 用于扩增 ORF5 基因不同区段的引物

Tab 1 Primers used for amplifying the segments of ORF5 gene

编号 Code	序列 Sequence	位置 Position	长度/nt Length	画线注解 Remarks
P5F	5'-ACGAATTCAACGCCAGCAACGACAGG-3'	88~105	26	EcoRI 酶切位点
P5R	5'-AACTCGAGCTAAGGACGACCCATTG-3'	586~603	26	XhoI 酶切位点
PCF	5'-AGGAATTCGGAGGCATTAGGTTTGG-3'	367~383	25	EcoRI 酶切位点
PNR	5'-ATCTCGAGTGGTCCCACTGCCCAAT-3'	182~198	25	XhoI 酶切位点
PN	5'-GCCTCTGGTCCACTGCCCAAT-3'	182~192	23	所加 linker
PC	5'-GGACCAGGAGGCATTAGGTTTGG-3'	373~383	23	所加 linker



H, M 分别表示 ORF5 基因的信号肽和跨膜区编码序列
H and M denote the signal peptide and the putative transmembrane domain encoding sequences of ORF5 gene respectively

图 1 ORF5 基因不同编码区基因片段的 PCR 扩增

Fig 1 Amplification of the fragments of ORF5 gene by PCR

1.3 扩增片段的克隆和测序

PCR 扩增的 N, C, D, L 基因片段回收后分别与 pGEM-T Easy vector 连接, 连接产物转化大肠杆菌 Top10, 涂布于含氨苄青霉素 (100 μg/mL)、X-gal、IPTG 的 LB 培养板, 经 37 °C 培养过夜挑取白色菌落增殖后抽提质粒, 经 PCR 和酶切鉴定为阳性的重组质粒进行序列测定。

1.4 重组表达质粒的构建

将上述重组质粒和原核表达载体 pET-32a 分别

用 EcoRI 和 XhoI 双酶切, 2% 琼脂糖凝胶电泳回收目的片段后进行连接, 将连接产物转化大肠杆菌 Top10 并筛选阳性菌落, 经 PCR 和酶切鉴定后获得重组表达质粒, 进而将重组表达质粒转化 BL21 (DE3), 进行目的片段的表达。

1.5 目的片段的表达

挑取含有重组表达质粒的 BL21 (DE3) 单菌落, 接种于 5 mL LB 中, 37 °C 振荡培养过夜。取 50 μL 过夜培养物转入 5 mL LB 中, 37 °C 振荡培养至 OD₆₀₀ 值达 0.6, 于 25 °C 加入 1 mmol/L IPTG 进行诱导表达, 分别于诱导后的 3, 4, 5, 6 h 各取 1 mL 菌液, 经 12 000 r/min, 离心 1 min 后弃掉上清液, 用 PBS 缓冲液漂洗菌沉淀后重悬于 100 μL PBS 中, 加入 2 倍蛋白电泳上样缓冲液 100 μL 和 5 μL DTT, 100 °C 煮沸 5 min, 经 12 000 r/min, 离心 5 min 后取上清液 15 μL 进行 SDS-PAGE 蛋白电泳。

1.6 Western blotting 分析

将 N, C 和 L 基因片段的重组表达质粒分别进行诱导表达, 表达产物经 SDS-PAGE 电泳后转移至 PVDF 膜上进行 Western blotting 分析。一抗为 PRRSV 感染猪阳性血清 (1: 250 稀释), 二抗为 HRP 标记的兔抗猪 IgG (1: 250 稀释), 最后用 DAB 作为底

物进行显色反应。

2 结果与分析

2.1 基因片段的 PCR 扩增

经 2% 琼脂糖凝胶电泳显示扩增的 N 片段(111 bp)、C 片段(237 bp)、D 片段(516 bp) 和 L 片段(348 bp) 如图 2-A 所示, 与预计大小一致。

2.2 重组质粒酶切鉴定

酶切鉴定结果显示, 用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切后均可分别切出大小为 3.0 kb 的质粒载体和相应的插入片段 2 条带(图 2-B)。表明目的基因片段均已克隆至 T 载体中。序列测定结果显示各基因片段与参照序列(AF331831) 同源性在 99% 以上。

2.3 重组表达质粒酶切鉴定

酶切鉴定结果显示, 用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切后均出现 5.9 kb 的表达载体和相应的插入片段 E 条带(图 2-C)。表明目的片段以正确方向插入原核表达载体 pET-32a 中。

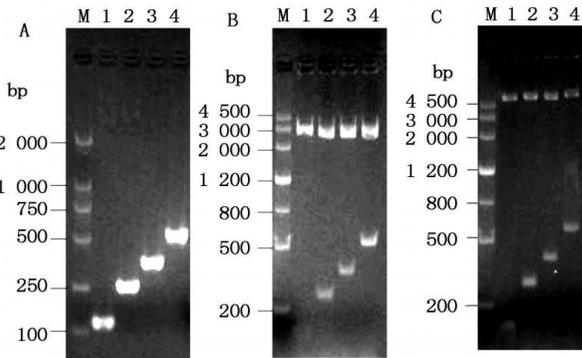


图 2 基因片段的 PCR 扩增(A)、重组质粒酶切鉴定(B)及重组表达质粒酶切鉴定(C)结果

M. DNA Marker; 1~ 4. 分别表示 N, C, L 和 D 片段的 PCR 扩增和酶切鉴定结果

图 2 基因片段的 PCR 扩增(A)、重组质粒酶切鉴定(B)及重组表达质粒酶切鉴定(C)结果

Fig. 2 N, C, L and D fragments of the *ORF5* gene with amplifying by PCR (A), digested identification of recombinant plasmids (B), digested identification of recombinant expression plasmids (C)

2.4 目的片段的表达

电泳结果显示 D 片段插入 pET-32a 构建的重组表达质粒在 BL21(DE3) 中未见表达产物, 而 N, C, L 片段重组表达质粒均出现表达产物且表达的融合蛋白大小分别约为 25, 29, 33 kDa, 与预测大小相符, 不同诱导时间显示诱导后 5~ 6 h 蛋白表达量最高(图 3)。

2.5 Western blotting 分析

结果显示, N 片段表达产物与 PRRS 阳性血清未出现阳性条带, C 片段表达产物与 PRRS 阳性血清反应出现较弱的阳性条带, 而 L 片段表达产物与

PRRS 阳性血清反应出现的阳性条带最强(图 4), 表明 L 片段表达产物具有较强的反应原性, C 片段表达产物反应原性稍弱, 而 N 片段表达产物无反应原性。

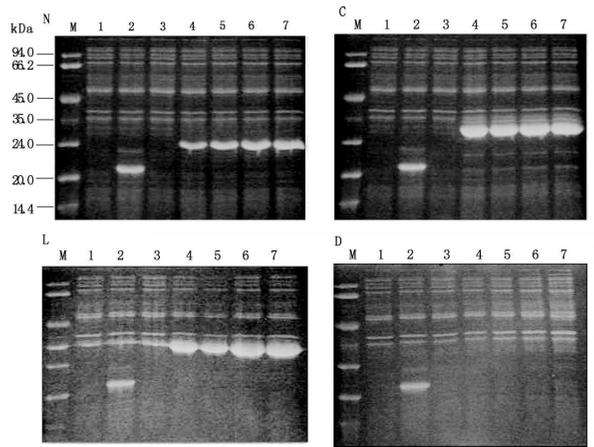


图 3 重组表达质粒在 BL21(DE3) 中诱导表达的 SDS-PAGE 电泳结果

Fig. 3 SDS-PAGE electrophoresis of recombinant expression plasmids in BL21(DE3)

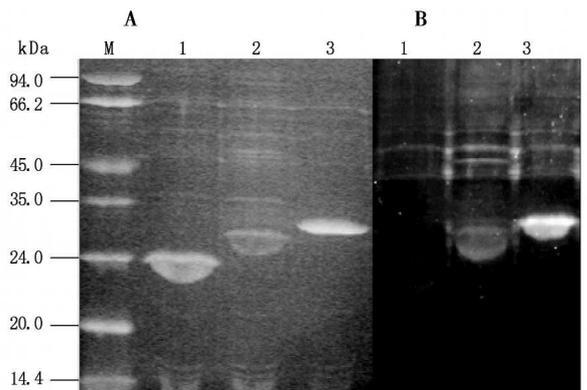


图 4 N, C, L 基因片段表达产物的蛋白电泳(A)和 Western blotting 检测(B)结果

图 4 N, C, L 基因片段表达产物的蛋白电泳(A)和 Western blotting 检测(B)结果

Fig. 4 SDS-PAGE electrophoresis (A) and Western blotting analysis (B) of N, C and L expressed protein

3 讨论

鉴于 *ORF5* 基因编码的囊膜糖蛋白 GP5 在 PRRSV 病毒变异、感染和免疫等方面的重要作用, 特别是其刺激机体产生的抗体与病毒中和活性的显著相关性, 因而目前已报道利用多种表达系统对该

基因进行表达以研究其免疫原性等生物学活性^[2-5]。

研究发现, GP5 为 3 次跨膜的囊膜糖蛋白, 跨膜区含有较多的疏水性氨基酸, 使利用大肠杆菌等进行原核表达的难度大大增加, 黄金海^[3]、Rodriguez 等^[6]的研究均表明缺失跨膜区的 ORF5 基因在大肠杆菌中获得良好的表达, 且表达产物可与 PRRS 阳性血清发生阳性反应。本试验结果也显示, 未缺失跨膜区的 ORF5 基因片段在原核表达载体 pET-32a 中未获得表达, 而其 N 端、C 端编码区以及两者串联后的基因片段均获得良好表达, 且缺失跨膜区后的表达产物依然具有 GP5 的免疫反应性。

本试验结果还显示, ORF5 基因编码区的 C 端在保持 GP5 反应原性方面具有极其重要的作用, 缺失 C 端的单纯 N 端表达产物不能与 PRRSV 阳性血清发生免疫反应; Rodriguez 等^[6]通过 GP5 的 C 端表达产物与自然感染猪血清免疫反应显示, 存在于 170~ 201 aa 的抗原表位与 PRRS 阳性血清具有极好的反应性, 而 130~ 170 aa 处的抗原表位则与自然感染猪阳性血清反应性差, 这些结果均表明 C 端有较强的抗原性或其维持 GP5 结构上有重要作用。

参考文献:

- [1] 杨汉春, 黄芳芳, 郭 鑫, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV) BJ-4 株全基因组序列测定与分析[J]. 农业生物技术学报, 2001, 9(3): 212- 218.
- [2] 谷 红, 杨汉春, 郭 鑫, 等. PRRSV BJ-4 株 ORF5 基因的原核表达与重组蛋白的纯化[J]. 畜牧兽医学报, 2004, 35(1): 64- 69.
- [3] 黄金海. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 N, GP5 蛋白的表达、纯化及结构分析 [D]. 北京: 中国农业大学, 2004
- [4] Pizadeh B, Dea S. Immune response in pigs vaccinated with plasmid DNA encoding ORF5 of porcine and respiratory syndrome virus [J]. J Gen Virol, 1998, 79: 989- 999.
- [5] Gagnon C A, Lachapelle G, Langelier Y, *et al.* Adenoviral-expressed GP5 of porcine respiratory and reproductive syndrome virus differs in its cellular maturation from the authentic viral protein but maintains known biological functions [J]. Arch Virol, 2003, 148(5): 951- 972.
- [6] Rodriguez M J, Saraseca J, Fominaya J, *et al.* Identification of an immunodominant epitope in the C terminus of glycoprotein 5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. J Gen Virol, 2001, 82: 995- 999.